

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 18, 1980, pp. 13–16

Schnelle Phänotypisierung des α_1 -Antitrypsins zur Bestimmung der Subtypen des Phänotyps MM

Von K. Bencze und L. Sabatke

Institut und Poliklinik für Arbeitsmedizin (Direktor: Prof. Dr. G. Fruhmann) der Universität München

(Eingegangen am 2. Januar/10. August 1979)

Zusammenfassung: Die Polyacrylamid-Gel-Platten zur isoelektrischen Fokussierung wurden durch Zugabe einer bestimmten Menge Harnstoff und durch einen Vorlauf ohne Proben für eine Serummenge von 20 μ l eingestellt. Dadurch kann eine gute Auftrennung der einzelnen Proteinfractionen erreicht und insbesondere der Abstand zwischen der M₂- und der M₈-Bande bei einer Gesamtlaufstrecke von 120 mm auf über 20 mm erhöht werden. Zur Differenzierung der PiMM-Subtypen wird außerdem ein M₁M₃-Standardserum eingeführt und die M₈-Bande in die Auswertung einbezogen. Anhand einer bereits an anderer Stelle (Bencze, K. et al. (1979) Chest 76, im Druck) veröffentlichten klinischen Studie wird die klinische Relevanz der Methode demonstriert.

Fast α_1 -antitrypsin phenotyping for the differentiation of PiMM-sub-types

Summary: The polyacrylamide gel slabs for isoelectric focussing were adapted for 20 μ l samples by adding a certain quantity of urea, and by letting it run idle before adding the sample. A better separation of protein fractions was obtained, and the distance of the M₂- and M₈-bands was increased to more than 20 mm in a total migration length of 120 mm. A M₁M₃ standard serum was introduced and the M₈ band was included to differentiate PiMM sub-types. The clinical use of the method is demonstrated with the results of a recently published clinical study by Bencze, K. et al. ((1979), Chest 76, in press).

Einführung

Die Heterogenität des Phänotyps MM des α_1 -Antitrypsins wurde von mehreren Autoren beschrieben (1–5). Genz, Martin & Cleve (6) postulierten drei unterschiedliche Allele M₁, M₂ und M₃, die in Kombination insgesamt sechs Subtypen ergaben, wie es auch durch Frants & Eriksson (7) bestätigt wird. Da bestimmte Proteine dieser Allele einen geringfügig anderen isoelektrischen Punkt im pH-Bereich von 4,3 bis 4,6 besitzen, können die Subtypen optimal nur mittels der isoelektrischen Fokussierung auf Polyacrylamidgelplatten unterschieden werden (8).

Die Differenzierung der Subtypen erfolgte bisher nur aufgrund der abweichenden Lokalisation der M₄- und M₆-Banden. Bei herkömmlicher Trenntechnik ist jedoch die Verwechslungsmöglichkeit der Subtypen M₁M₁ mit M₁M₂ und M₁M₂ mit M₂M₂ einerseits und M₂M₃ mit M₃M₃ andererseits, sehr groß. Bestimmte Veränderungen der Methodik erschienen uns daher zum Ausschluß von Fehlauswertungen notwendig. Die verbesserte Methodik wurde zur Untersuchung chronisch lungenkranker Patienten angewandt (9, 10, 11).

Methodik

Geräte

Für die isoelektrische Fokussierung wurden eine Doppeltrennkammer, Polymerisationsküvetten, Platin-Breitbandelektroden und ein Netzanschlußgerät (DESAGA, Heidelberg) verwendet. Ferner fanden ein Thermostat (COLORA Ultrathermostat WK 3) und Spezialelektroden zur pH-Gradienteneinstellung (INGOLD LOT 403-M3 und LOT 405-M8) Verwendung.

Lösungen

1. 30,0 g Acrylamid (SERVA 10675) in 100 ml H₂O.
2. 0,9 g N,N'-Methylen-bisacrylamid (SERVA 29195) in 100 ml H₂O.
3. 15,015 g Harnstoff (MERCK 8488) in 500 ml H₂O.
4. 4,0 g Saccharose (MERCK 7654) in 10 ml Lösung 3) + 10 ml H₂O.
5. Trägerampholyt: 0,9 ml Ampholine (LKB) pH 3,5–5 + 0,6 ml Ampholine (LKB) pH 4,0–6
6. 0,020 g Ammoniumperoxodisulfat (SERVA 15375) in 1 ml H₂O.
7. Kathodenlösung: 10,0 g NaOH (MERCK 6498) in 250 ml H₂O.
8. Anodenlösung: 16,9 ml o-Phosphorsäure (MERCK 573) in 250 ml H₂O.
9. 450,0 g Trichloressigsäure (MERCK 807) in 2500 ml H₂O.

10. Färbelösung:

a) 0,375 g Coomassie-Brillantblau R 250 in 500 ml Methanol (MERCK 6009)

b) 125,0 g Trichloressigsäure (MERCK 807) + 125,0 g 5-Sulfosalicylsäure (MERCK 609) in 1500 ml H₂O

Nachdem beide Ansätze vollständig gelöst sind, wird Lösung a) zu Lösung b) gegeben, einen Tag stehengelassen, zwischendurch mehrmals durchgeschüttelt und dann filtriert.

11. Entfärbelösung: 650 ml H₂O + 50 ml Essigsäure + 150 ml Methanol

Zum Ansetzen der Lösungen soll nur destilliertes und entionisiertes Wasser verwendet werden. Die Lösungen 4), 5) und 6) sollen immer frisch angesetzt werden, die Lösungen 1) und 2) können im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Isoelektrische Fokussierung

Herstellung der Polyacrylamidgelplatten

Je 5,0 ml der Lösungen 1) und 2) sowie dann 4) und 5) werden mit einem Magnetrührer gut durchgemischt. Aus der erhaltenen Lösung müssen im Vakuum (Wasserstrahlpumpe) die gelösten Gase entfernt werden. Zuletzt wird Lösung 6) zugegeben und vorsichtig umgerührt. Wichtig ist eine gleichmäßige Verteilung von Persulfat in der Lösung, da sonst die Platten inhomogen werden können. Bei zu intensivem Rühren der Reagentien (zu intensiver Luftkontakt), können bei der Polymerisation störende Luftblasen in der Gelschicht entstehen.

Die so erhaltene Lösung wird blasenfrei mit einer Kunststoffspritze in die 1 mm breiten Polymerisationsküvetten gefüllt. Das Gemisch wird mit einer etwa 5 mm hohen Wasserschicht geschützt und zur Verhinderung der Verdunstung mit Parafilm abgedeckt. Die Polymerisation ist von der Lichtintensität und von der Raumtemperatur abhängig und normalerweise in 30 bis 60 min beendet.

Probenauftrag

Zur Fokussierung werden frische Seren oder bei -20 °C eingefrorene Seren verwendet. Letztere werden kurz vor dem Probenauftrag aufgetaut und gut geschüttelt.

Der Probenauftrag erfolgt in 10 mm Entfernung zum Anodenstreifen auf ein Filterpapier (5 × 8 mm, Schleicher u. Schüll, No. 2668). Die Serummenge von 20 μ l ist auch für eingefrorene alte Seren optimal.

Aufbringen der Elektroden

10 mm breite Filterkartonstreifen (Machery u. Nagel, No. 866), getränkt mit der entsprechenden Elektrodenlösung 7) oder 8), werden dicht und unter Vermeidung von Blasenbildung an die Gelschicht herangeschoben. Auf die Streifen werden Platin-Breitbandelektroden gelegt und an das Netzgerät angeschlossen.

Fokussierung

Vor dem Probenauftrag wird eine Spannung von 50 V/cm für etwa 30 min angelegt, bis die Stromstärke < 10 mA beträgt. Der Leerlauf sichert die Entionisierung der Platten, da die Bildung von Metallproteinen verhindert wird. Zugleich wird eine wesentlich bessere Spreizung der Trägerampholyte erreicht.

Nach dem Probenauftrag behält man etwa 30 min lang konstante Bedingungen bei, die Stromstärke muß dabei unter 5 mA absinken. Dann wird der Spannungsgradient um den Faktor 2 erhöht.

Fällt die Stromstärke nach weiteren 120 min unter 10 mA, ist die Fokussierung beendet. Die Gesamtdauer der Fokussierung beträgt damit etwa 3 Stunden.

Bei der Fokussierung ist eine intensive Kühlung der Trägerplatte erforderlich. Nur bei einer Geltemperatur von 4–10 °C kann eine scharfe Auftrennung erreicht werden.

Färbung der Polyacrylamidgelplatten

Nach beendeter Fokussierung wird die Gelplatte mit Lösung 9) abgespült und anschließend etwa 60 bis 90 min lang mit Lösung 10) behandelt. Maßgebend für die Färbedauer ist die Farbinintensität der M8-Banden. Sollte der Untergrund zu stark gefärbt

sein, so kann mit Lösung 11) wieder aufgehellt werden. Zur Dokumentation kann die Platte auf 2,5 mm dicken, weißen Zeichenkarton aufgezo-gen und getrocknet werden. Die Auswertung kann jedoch bereits am frischen Gel erfolgen.

Effekt von Harnstoff

Bei der Auswertung der Platte sind nicht nur die Position von M4 und M6 zu berücksichtigen, sondern auch die Lage der M8-Bande (Abb. 1 u. 2). Um die Intensität der M8-Bande zu erhöhen, ist eine größere Serummenge aufzutragen. Der Serummenge entsprechend muß die Trennkapazität der Gelplatte durch Zugabe von Trägerampholyt und Harnstoff erhöht werden (12), da sonst nur eine unzulängliche Auftrennung erreicht wird. Der Harnstoffgehalt der Polyacrylamidgelplatte kann jedoch nicht beliebig variiert werden, da mit zu starker Harnstoffkonzentration das Auflösungsvermögen für die einzelnen Proteinfractionen wieder verringert wird. Dieser Effekt ist beim M₁M₃ Subtyp besonders gut zu beobachten: die Doppelbanden in M4 und M6 sind bei zu hohem Harnstoffgehalt nur noch als eine breite Linie sichtbar. Die Trägerkapazität der Gelplatten liegt in der von uns angegebenen Zusammensetzung bei über 20 μ l Serum.

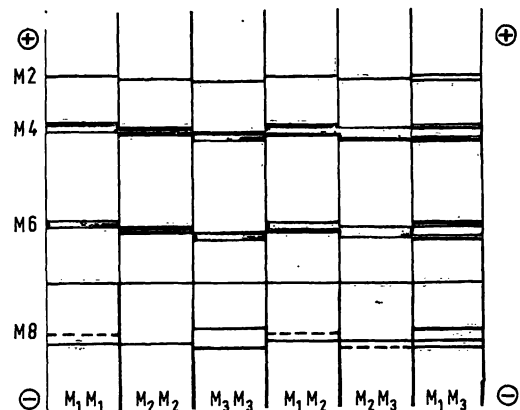


Abb. 1. Schema der PiMM Subtypen des α_1 -Antitrypsins.



Abb. 2. Die homozygoten Subtypen M₁M₁, M₂M₂ und M₃M₃ auf der Originalplatte.

Standardserum

Bei der Klassifizierung der PiMM-Subtypen muß die Position und Breite der Banden exakt auswertbar sein. Das Trennvermögen der Gelplatten ist strenggenommen inkonstant. Eine gute Vergleichsmöglichkeit bietet sich an, wenn man nach je zwei unbekanntem Proben ein bekanntes M₁M₃-Serum als Standardserum aufträgt (Abb. 3). Durch den Einbau eines derartigen Standards fällt es leichter, Position und Breite der M4- und M6-Banden über die ganze Breite der Platte genau zu bestimmen. In Zweifelsfällen ist eine Wiederholung der Fokussierung angezeigt.

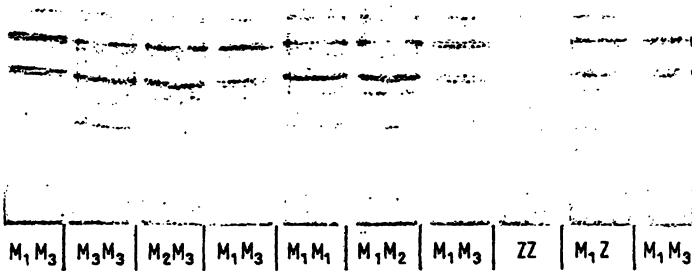


Abb. 3. Das PiM₁M₃-Standardserum nach jedem zweiten unbekanntem Serum erleichtert die Differenzierung der Subtypen.

Da die in der klinischen Chemie gebräuchlichen Standardseren häufig aus gepoolten Seren bestehen oder chemische Zusätze enthalten, können sie für die Fokussierung nicht eingesetzt werden. Da jedoch nach unserer Erfahrung über 20% der Bevölkerung Träger des M₁M₃-Phänotyps sind, dürfte es nicht schwer sein, ein geeignetes Standardserum zu finden.

Ergebnisse

Nach der beschriebenen Methode wird eine größere Serummenge aufgetragen und dadurch sind die Liniengruppen M8 und Z6 – auch in alten Seren – besser erkennbar. Die Trennkapazität der Platte muß man dementsprechend durch Ampholyt- und Harnstoffzugabe erhöhen.

Die Einbeziehung der M8-Bande erleichtert die Differenzierung der PiMM-Subtypen. Abbildung 4 zeigt, daß auch bei der M8-Bande charakteristische Unterschiede bei den einzelnen Subtypen zu erkennen sind. Durch die Optimierung der einzelnen Phasen des analytischen Vorgangs, wie Leerlauf und Vorlauf und bei guter Geldichte und gutem Vernetzungsgrad – T = 4,75; C = 2,9 – kann man auch ohne spezielle Chemikalien oder besondere Behandlung der Platte oder der Seren eine sehr gute Auftrennung erreichen. Die Entfernung der Proteinbanden M2 und M8 beträgt bei einer Laufstrecke von 120 mm mehr als

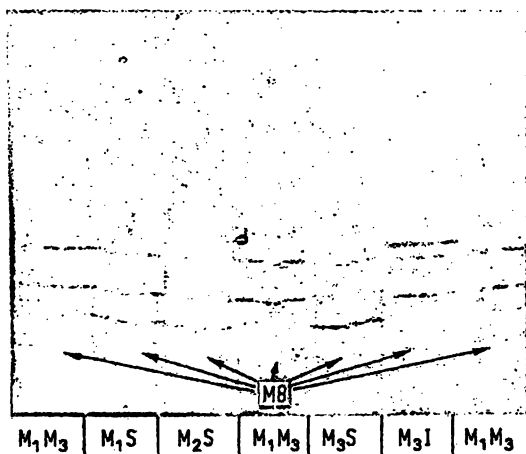


Abb. 4. Die M8-Banden erlauben die Klassifizierung des PiM-Allels auch bei den MS- und MI-Varianten.

20 mm. Diese Trennstrecke kann auch als Indikator für die Qualität der Auftrennung und der verwendeten Ampholyte gewertet werden. Die gute Auftrennung ist die Hauptvoraussetzung für die richtige Klassifizierung der PiMM-Subtypen.

Mit dem Auftragen eines Standardserums PiM₁M₃ nach jeder zweiten zu untersuchenden Probe wird die ganze Plattenbreite besser auswertbar. Die Position und Breite der entsprechenden Banden kann exakt abgelesen werden.

Die beschriebene Methodik wurde bei der Bestimmung von Seren zweier Kollektive angewendet (11). Die erste Gruppe bestand aus 280 gesunden Probanden (Industriearbeitern). Die relative Häufigkeit der Subtypen ist mit dem von Genz (6) untersuchten Kollektiv in Tabelle 1 gegenübergestellt. Unterschiedliche Ergebnisse zeigen sich nur bei den mit der herkömmlichen Methodik leicht verwechselbaren Subtypen.

Bei der zweiten Gruppe handelt es sich um Patienten einer pulmonologischen Ambulanz, die in einem umschriebenen Zeitraum untersucht und behandelt wurden (Tab. 2). Aus diesem Kollektiv wurden nur die Patienten in die Betrachtung einbezogen, die bodyplethysmographisch einen Atemwegswiderstand > kPa × l⁻¹ × s bei mindestens zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungen aufwiesen (n = 76).

Beim Vergleich des gesunden und des kranken Kollektivs fällt die relative Abnahme der M₁M₁- und die Zunahme der mit einem M₂-Allel kombinierten Phänotypen auf. Das für den Unterschied errechnete Signifikanzniveau liegt bei p < 0,001.

Tab. 1. Relative Häufigkeit der Phänotypen des α_1 -Antitrypsins bei gesunden Probanden:

Phänotyp	Bencze et al. (11)		Genz et al. (6)	
	Zahl	rel. Häufigkeit	Zahl	rel. Häufigkeit
M ₁ M ₁	132	0,471	313	0,582
M ₂ M ₂	12	0,043	3	0,006
M ₃ M ₃	4	0,014	11	0,020
M ₁ M ₂	36	0,128	40	0,074
M ₂ M ₃	8	0,027	19	0,035
M ₁ M ₃	62	0,221	111	0,206
M ₁ S	14	0,050	14	0,026
M ₂ S	2	0,008	2	0,004
M ₃ S	1	0,004	4	0,007
M ₁ Z	4	0,014	11	0,020
M ₂ Z	2	0,008	0	
M ₃ Z	2	0,008	2	0,004
M ₁ *	1	0,004	5	0,009
M ₂ *	0		0	
M ₃ *	0		1	0,002
SS	0		2	0,004
ZZ	0		0	
SZ	0		0	
Zahl der Probanden	280		538	

*andere Phänotypen (Pi I, Pi L, Pi V, kombiniert)

Tab. 2. PiMM-Subtypen bei Gesunden und Patienten mit obstruktiven Lungenerkrankungen ($R > 0,35 \text{ kPa} \times \text{l}^{-1} \times \text{s}$) (11):

	Gesunde	Signifikanzniveau p	Kranke
Probenzahl	280 (1,00)		76 (1,00)
PiMM	254 (0,91)		70 (0,92)
Subtypen			
M ₁ M ₁	132 (0,52)	p < 0,001	15 (0,21)
M ₂ M ₂	12 (0,05)	p < 0,01	10 (0,14)
M ₃ M ₃	4 (0,02)	p > 0,1	2 (0,03)
M ₁ M ₂	36 (0,14)	p < 0,01	21 (0,30)
M ₂ M ₃	8 (0,03)	p > 0,1	4 (0,06)
M ₁ M ₃	68 (0,24)	p > 0,1	18 (0,26)

() in Klammern: rel. Häufigkeiten bezogen auf PiMM

Genfrequenzen-Gesunde: PiM₁: 0,678; PiM₂: 0,128; PiM₃: 0,148

PiS: 0,030; PiZ: 0,014; andere: 0,002
 -Kranke: PiM₁: 0,467; PiM₂: 0,309; PiM₃: 0,171
 PiS: 0,000; PiZ: 0,040; andere: 0,013

Diskussion

Die Frage einer guten Trennung der Proteinbanden steht bei der Technik der isoelektrischen Fokussierung im Vordergrund, da von ihr die sichere Identifizierung von PiMZ und der PiMM-Subtypen abhängt.

Johnson (2) hat für eine sichere Identifizierung von M₁ und M₃ mehrere Trennverfahren, wie Immunofixation und gekreuzte Immunelektrophorese, zusätzlich zur isoelektrischen Fokussierung auf Flachgelen verwendet. Für Serienuntersuchungen erscheint ein solcher Aufwand jedoch zu groß.

Pierce (13) verwendete Ampholyte in dem sehr engen pH-Bereich von 4,0 bis 4,5 und 4,5 bis 5,0 und behandelte

die Seren mit Reduktionsadditiven und erhielt damit eine große Auflösung. Auch Jeppsson (14) hat mit dieser Methode M₁M₃-Subtypen untersucht. Ampholyte in einem so engen pH-Bereich werden jedoch bisher nicht kommerziell hergestellt, so daß auch hier der Vorbereitungsaufwand sehr groß ist.

Die Verwendung der sog. Amphoter-Additiven oder -Separatoren stellt zwar eine weitere Möglichkeit dar, das Auflösungsvermögen der Flachgelen zu erhöhen (15), wie jedoch aus der Arbeit von Frants (16) hervorgeht, hat diese Art der Serumvorbereitung eine starke Veränderung des Auftrennungsmusters zur Folge.

Bei der von uns beschriebenen Methode wird zwar eine größere Serummenge als bei den bisher angegebenen Methodiken aufgetragen, dies hat jedoch den Vorteil, daß die M8- und Z6-Banden – auch bei alten Seren – besser erkennbar sind.

Die klinische Bedeutung einer besseren Differenzierung der PiMM-Subtypen ergibt sich daraus, daß wir aufgrund früherer Untersuchungen (9, 10, 11) annehmen, daß außer der genetisch determinierten Höhe des Inhibitorspiegels noch andere pathogenetische Faktoren wirksam sein müssen. Da es sich beim α_1 -Antitrypsin nach Lieberman (17) um ein "acute-phase reactant" handelt, die Konzentration im Serum also bei allen akut entzündlichen Vorgängen oder Cortisonmedikation ansteigt und die Aussagefähigkeit der quantitativen Bestimmungsmethoden insbesondere bei mäßigem α_1 -Antitrypsinmangel unzureichend ist, erscheint uns der Befund des vermehrten Vorkommens obstruktiver Lungenerkrankheiten bei Trägern von PiMM-Subtypen mit einem M₂-Allel sehr wichtig. Dies könnte für präventivmedizinische Fragestellungen, insbesondere an durch inhalative Noxen belasteten Arbeitsplätzen bedeutungsvoll werden.

Literatur

- Constans, J. & Vian, M. (1975), C. R. Acad. Sci. (Paris) 281, 1361–1364.
- Johnson, A. M. (1976), J. Lab. Clin. Med. 87, 152–163.
- Kueppers, F. (1976), Amer. J. Hum. Genet. 28, 370–377.
- Van den Broek, W. G. M., Hoffmann, J. J. M. L. & Dijkman, J. H. (1976), Hum. Genet. 34, 17–22.
- Frants, R. R. & Eriksson, A. W. (1976), Hum. Hered. 26, 435–440.
- Genz, Th., Martin, J.-P. & Cleve, H. (1977), Hum. Genet. 38, 325–332.
- Frants, R. R. & Eriksson, A. W. (1976), Hum. Hered. 28, 201–209.
- Allen, R. C., Harley, R. A. & Talamo, R. C. (1974), Amer. J. Clin. Pathol. 62, 732–739.
- Bencze, K. (1978), Elektrophorese Forum – Diskussionstagung an der TU München vom 25.–27. Oktober, (Radola, B. J. Hrsg.) Fotodruck Frank München, S. 7–13.
- Sabatke, L. & Bencze, K. (1979), Vortrag anl. der 85. Tagung der Deutschen Gesellschaft f. Innere Medizin, Wiesbaden vom 22.–26. April, im Druck.
- Bencze, K., Sabatke, L. & Fruhmann, G. (1979), Chest 76 im Druck.
- Radola, B. J. unveröffentlichte Ergebnisse.
- Pierce, J. A., Jeppsson, J.-O. & Laurell, C.-B. (1976), Anal. Biochem. 74, 227–241.
- Jeppsson, J.-O. (1977), Electrofocusing and Isotachophoresis (Radola, B. J. & Graesslin, D. Hrsg.) W. de Gruyter Berlin–New York, S. 273–279.
- Caspets, M. L., Posey, Y. & Brown, R. K. (1977), Anal. Biochem. 79, 166–172.
- Frants, R. R., Noordhoek, G. T. & Eriksson, A. W. (1978), Scand. J. Clin. Lab. Invest. 38, 457–462.
- Lieberman, J. & Mitman, C. (1973), Amer. J. Hum. Genet. 25, 610–617.

Dipl. Ing., Dr. K. Bencze
 Institut und Poliklinik für
 Arbeitsmedizin der Uni-
 versität München
 Ziemssenstraße 1
 D-8000 München 2