

EIN VERGLEICH VON 25 BLUTGRUPPENSYSTEMEN MIT POLYMORPHEN
DNA-MARKERN IN DER VATERSCHAFTSBEGUTACHTUNG

W. Weber und K. Olek

Institut für Blutgruppenforschung Köln, Olpener Str. 110, D-5000 Köln 91
Institut für Strahlenbiologie der Universität Bonn

Seit etwa 1975 erfolgt in der Humangenetik eine geradezu revolutionäre Entwicklung, indem sie sich die Erkenntnisse und Methoden der Molekularbiologie zueigen macht. Anfang der 80er Jahre wurde bei der Erforschung der Struktur des menschlichen Genoms eine für die Identitätsbegutachtung wesentliche Erkenntnis gewonnen; auf DNA-Ebene ist eine fast unbegrenzte Vielfalt von Polymorphismen zu erwarten. Nachdem etwa seit 1980 das Arbeiten mit der rekombinanten DNA-Technologie große Verbreitung in humanbiologisch orientierten Laboratorien gefunden hatte, sind tatsächlich bis zur sogenannten Human Gene Mapping Conference in Helsinki 1985 rd. 500 dieser DNA-Polymorphismen beschrieben worden. Ziel dieser weltweiten Bemühungen war es, das menschliche Genom möglichst dicht und möglichst gleichmäßig mit einem Netz solcher Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) zu überziehen. Man wollte sich damit in die Lage versetzen, auch genetische Erkrankungen, deren eigentlicher Gendefekt nicht bekannt ist, im Genom zu lokalisieren und zu diagnostizieren. Das Konzept hat sich hervorragend bewährt; zahlreiche bedeutende Probleme der humangenetischen Diagnostik (vor- und nachgeburtliche Diagnostik) sind in den vergangenen drei Jahren gelöst worden. Die Anwendung von DNA-Polymorphismen in der Identitätsbegutachtung, der Spurenkunde und der Abstammungsbegutachtung ist naheliegend. Im Rahmen unserer Studie haben wir 724 DNA-Isolierungen aus EDTA-Bluten und 1435 DNA-Analysen durchgeführt. Die Untersuchungen an 195 Blutspendern, 39 deutschen Familien (Raum Köln/Düsseldorf) und 85 Gutachtenfällen hatten das Ziel, die Brauchbarkeit von DNA-Sonden zu prüfen und Allel-Frequenzen für die formale Genetik zu ermitteln.

METHODEN

Der Eco RI-Polymorphismus an D14S1 läßt sich durch die von Wyman et al. 1980 beschriebene DNA-Sonde pAW101 nachweisen. Der Taq I-Polymorphismus des HRAS-Onkogens wird durch ein 879 bp langes SphI-CIal-Fragment aufgedeckt (Capon et al. 1983). Die Sonden wurden uns freundlicherweise von den Drs. White und Capon zur Verfügung gestellt. Die Darstellung der Allele erfolgte mit der üblichen Southern-Blot-Prozedur. Wir verwendeten extrem langlaufende 0,6%ige Agarosegele für den D14S1-Polymorphismus und 1,2%ige Gele für das HRAS-Onkogen. Die aus dem Plasmid herausgeschnittenen Sonden wurden per Nick-Translation bis auf rd. 2×10^8 cpm/ μ g radioaktiv markiert. Die Expositionsdauer betrug zwischen 10 und 16 Stunden. Zur Messung der Allelgrößen wurde jeweils neben der DNA der Probanden käufliche und/oder zusätzlich restriktionsverdaute Längenstandard-DNA auf das Agarosegel gebracht. Zusammen mit der radioaktiv markierten Sonde wurde jeweils eine kleine Menge ebenfalls markierte λ -DNA für die Hybridisierungslösung verwendet.

Die Auswertung erfolgte von Hand. Zur Ermittlung der Meßgenauigkeit fertigten wir aus den unterschiedlichen Größenbereichen der Allele mehrere Gele an; die Standardabweichung bei 20kbp war 1,1%, bei einem 14,5 kbp Allel 1,3%. Das optische Auflösungsvermögen in unserem Trennsystem war im Bereich der kleineren Allele (14-15 kbp) ca. 150 bp und bei den größeren (>23 kbp) ca. 1 kbp.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Im Fall des D14S1-Locus haben wir in 39 Familien mit insgesamt 205 Personen und bei HRAS in 24 Familien mit 129 Personen in keinem Fall eine Ausnahme von Mendelscher Vererbung gefunden. Daraus leiten wir die Annahme ab, daß es sich um genetisch stabile Systeme handelt (Abb. 1 und 2).

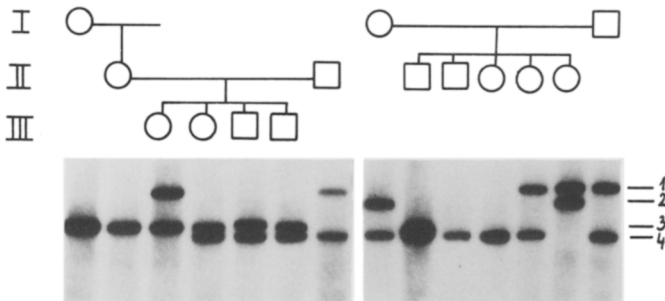


Abb. 1 D14S1, Eco RI-Polymorphismus in 2 Familien

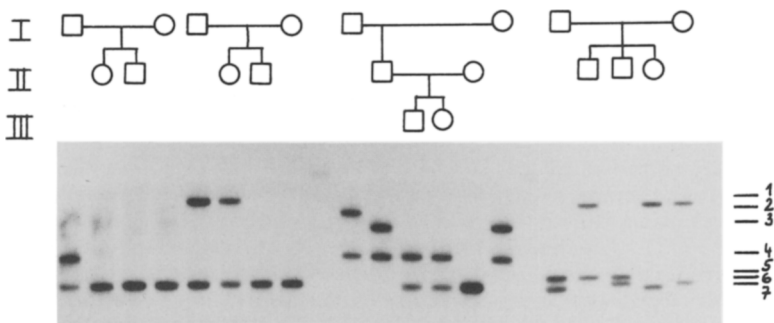


Abb. 2 HRAS, Taq I-Polymorphismus in 4 Familien

Die Untersuchung der Allelenfrequenzen bei HRAS ergab die in der Abb. 3 dargestellte Verteilung. Es sind 171 nicht verwandte Personen untersucht worden. Wir fanden 11 problemlos zu differenzierende Allele, 7 weniger als in der 1986 von Baird et al. publizierten Studie. Aufgrund der Genfrequenzen errechnete sich eine AVACH von 27,88 %.

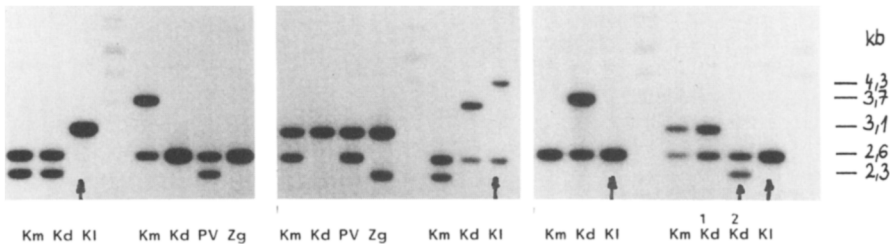


Abb. 6 HRAS, Vaterschaftsausschlüsse (Pfeil) in 6 Gutachten

Bei nur geringfügig verbesserter Trenntechnik kann man mit weit höherer Aufklärungsrate rechnen.

Für die praktische Anwendung hat man die Wahl zwischen folgenden Systemen: 1. mehrere Zweiallelen-Loci (Smouse and Chakraborty 1986), 2. hochpolymorphe Marker mit 10-20 Allelen und 3. Marker, die dem 1985 von Jeffreys beschriebenen Minisatellitensystem entsprechen.

Abgesehen davon, daß der Identitätsbestimmung eine theoretisch unbegrenzte Zahl von Markern zur Verfügung steht, hat die DNA-Analyse gegenüber der bisherigen Verfahrensweise folgende Vorteile: 1. das zu untersuchende Probenmaterial (DNA) ist wesentlich stabiler als das für alle bisher verfügbaren Analysen angewandte, 2. das Problem der "stummen" Gene existiert nicht und 3. selbst bei Anwendung einer großen Zahl von verschiedenen Markern ist die im Labor verwendete Technik immer die gleiche, mit der Folge einer methodisch erhöhten Sicherheit und Vergleichbarkeit.

Wir leiten aus unseren Ergebnissen den Schluß ab: Für Marker des hier beschriebenen Typs kann man mit vertretbarem Aufwand die formalgenetischen Grundlagen für eine Anwendung in der Abstammungsbegutachtung schaffen; sie können eine wirksame Ergänzung des zur Zeit verwendeten Instrumentariums insbesondere bei der Klärung von Problemfällen sein.

LITERATUR

1. Baird M, Balazs I, Giusti A, Miyazaki L, Nicholas L, Wechsler K, Kanter E, Glassberg J, Allen F, Rubinstein P, Sussman L. *Am J Hum Genet* 39: 489-501, 1986
2. Capon DJ, Chen EY, Levinson AD, Seeburg PH, Goeddel DV. *Nature* 302: 33-37, 1983
3. Wyman A, White R. *Proc Natl acad Sci USA* 77: 6754-6758, 1980
4. Smouse PE, Chakraborty R. *Am J Hum Genet* 38: 918-939, 1986
5. Jeffreys AJ, Wilson V. *Nature* 314: 67-73, 1985

Danksagung

Wir danken Herrn Dr. med. A. Koch, Haan/Rhld. für die Beschaffung zahlreicher Familien-Blutproben.