

Abstammungsgutachten

Wie der Sohn so der Vater?

CHRISTIAN SCHUBERT

Bei ungeklärter Vaterschaft kann ein Abstammungsgutachten absolute Klarheit schaffen. Da nur ein einziger Fehler im Prozess von Probenbeschriftung bis zur Auswertung gravierende Folgen nach sich zieht, muss die DNA-Analytik zur Abstammungsbegutachtung hohe Qualitätsstandards erfüllen.

Als untenstehendes Foto entstand, war die Plausibilitätskontrolle anhand sichtbarer Merkmale als Instrument zur Begutachtung der Abstammung noch weit verbreitet. Menschen sagten damals, dass der Junge seinem Vater (oder auch dem Briefträger) wie aus dem Gesicht geschnitten sei. Der Vergleich anthropologischer Merkmale liefert jedoch ähnlich wie der Vergleich der Blutgruppen keine sicheren Ergebnisse. Man kann damit in



© Christian Schubert

Wer tatsächlich der Vater des Jungen ist, ließe sich nur in einem Abstammungsgutachten mit Sicherheit klären.

wenigen Fällen eine Vaterschaft ausschließen, einen validen Einschluss erreicht man nicht. Als in den folgenden Jahrzehnten weitere biochemische Marker (z.B. HLA-Antigene) einbezogen wurden, wurden die Ergebnisse genauer. Der Durchbruch gelang erst mit der DNA-Analytik Ende der 1980er-Jahre, für die Watson und Crick 1953 mit der Entdeckung der Doppelhelix den Grundstein gelegt hatten. Nach der Sequenzierung des menschlichen Genoms wurden Industriestandards entwickelt und durchgesetzt.

Das menschliche Genom

Das menschliche Genom (Gesamtheit der DNA) besteht bezogen auf den haploiden Chromosomensatz aus circa drei Milliarden Basenpaaren. Im gestreckten Zustand hat der Einzelstrang eine Länge von 1,80 Metern und enthält etwa 30.000 Gene. Die Genome verschiedener Individuen sind weitgehend identisch. Man schätzt jedoch, dass eines von 300 bis 1.000 Basenpaaren nicht identisch ist. Für das ganze Genom ergibt das circa drei Millionen „individuelle Basenpaare“. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Unterschiede nicht gleichmäßig über das ganze Genom verteilt sind. Besonders große Unterschiede findet man in nicht codierenden Regionen der DNA. Diese enthalten häufig mehrfache Wiederholungen einer kurzen Sequenz von drei bis fünf Basenpaaren (Short-Tandem-Repeats, STRs).

In manchen Regionen des Genoms kann der Unterschied zwischen einer und circa 30 Wiederholungen der STRs liegen. Diese DNA-Abschnitte werden als

Marker bezeichnet. Die in der Länge unterschiedlichen STRs werden nach einer Kartierungsnummernklatur benannt und in einer Datenbank (STRbase, www.cstl.nist.gov/strbase) gesammelt. So bedeutet die Bezeichnung D3S1358, dass sich der betreffende STR auf Chromosom 3 an der Stelle S 1358 befindet.

Der genetische Fingerabdruck

Der genetische Fingerabdruck beruht auf einer Messung individuell unterschiedlicher Wiederholungen dieser STRs. Selbst wenn zwei Menschen zufällig Ähnlichkeiten in einigen der untersuchten STRs haben, gibt es immer noch andere Bereiche, in denen sie eindeutig voneinander verschieden sind. Eine hinreichend große Kombination mehrerer Marker ist für jeden Menschen einmalig (Ausnahme: eineiige Zwillinge).

DNA-Vaterschaftstest

STRs sind heute die wirkungsvollsten eingesetzten Werkzeuge des DNA-Vaterschaftstests. Man erwartet pro STR-Locus und untersuchter Person zwei Banden, also zwei Allele des STRs, die von den beiden homologen Chromosomen (eines vom Vater, eines von der Mutter) stammen. Es müssen sich demnach beim Kind Anteile der mütterlichen und väterlichen DNA-Merkmale wieder finden. Passen die festgestellten Größenmerkmale von mutmaßlichem Vater und Kind nicht zueinander, so ist er als biologischer Vater auszuschließen. Im umgekehrten Fall kann eine Vaterschaft mit einer sehr hohen statistischen Wahrscheinlichkeit belegt werden.

DNA-Fingerprinting

Beim heute als Goldstandard verwendeten DNA-Fingerprinting werden 15 STRs untersucht, die von verschiedenen internationalen Organisationen (Interpol, FBI, European Network of Forensic Science Institutes) für Identitätsnachweise anerkannt und genutzt werden. Hinzu kommt die Geschlechtsbestimmung, sodass insgesamt 16 Marker getestet werden. Die zugeordnete Wahrscheinlichkeit, dass sich bei zwei Personen exakt dieselbe DNA-Kombination bei den ausgewählten Marken findet, beträgt theoretisch $1:10^{18}$, also eine Trillion.

Nach Isolierung der DNA im Labor wird die DNA von 15 ausgewählten STRs mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Durch eine Elektrophorese im Sequencer werden die bei der PCR amplifizierte DNA-Fragmente der Länge nach getrennt und durch Anfärbung dargestellt. Durch die DNA-Amplifikation kann der Test mit winzigen Mengen an DNA durchgeführt werden. Bei der Untersuchung dieser DNA-Marker bei Vater, Mutter und Kind erreicht man im positiven Fall eine Wahrscheinlichkeit von mindestens 99,999 % für eine Vaterschaft. Werden nur der fragliche Vater und das Kind untersucht („Defizienzfall“), lassen sich diese hohen Aussagewerte oftmals nicht erreichen. Im negativen Fall kann aber auch hier eine Vaterschaft zu 100 % ausgeschlossen werden.

Grundsätzlich schließt sich der molekularbiologischen Untersuchung eine statistische Bewertung (Hypothesenvergleich) an. Diese Multiplex-Testsysteme werden heute als Industriestandard welt-

Tabelle 1

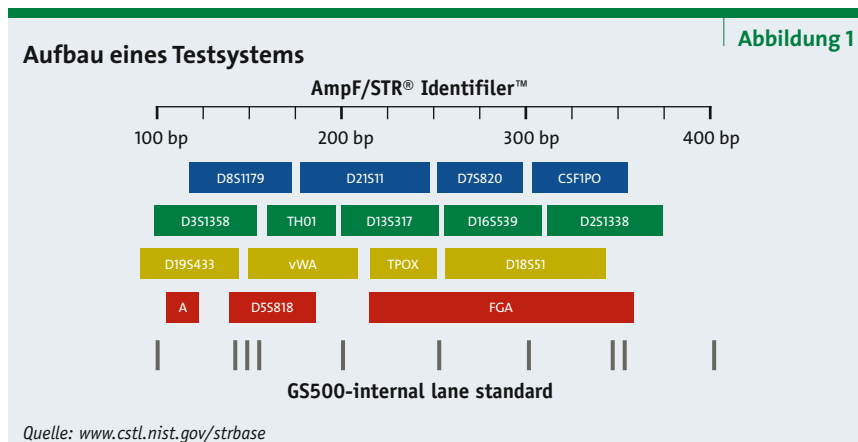
Vergleich der DNA-Marker zweier mutmaßlicher Väter								
Marker	Mutter		Kind	Vater 1		Vater 2		
D3S1358	15	16	16	17	14	17	14	14
TH01	9	9	9	9,3	9,3	9,3	9	10
D21S11	29	30,2	30,2	31	29	31	30	32

weit von zwei Unternehmen angeboten. Im Folgenden soll der Aufbau des Testsystems „Identifiler“ anhand eines einfachen Schemas erläutert werden (Abb. 1). Die Genloci werden dabei nach internationaler Nomenklatur benannt, die Allelnamen eines jeden Locus sind Zahlen, welche die Anzahl der Wiederholungen der Vierbasen-STRs bezeichnen. Die Farben entsprechen den Farben der Fluoreszenzfarbstoffe, mit denen die Primer chemisch markiert worden sind. Die horizontalen Balken bezeichnen durch ihre Breite die möglichen Molmassen in Basenpaaren (bp), die durch unterschiedliche Wiederholungsanzahlen der entsprechenden STRs verursacht sind. Die STRs der in einer Zeile stehenden Genorte sind eigentlich gleich schwer. Indem für die PCR verschieden großer Primer verwendet werden, wird eine Spreizung der Molmassen erreicht, die es zusammen mit der Verwendung von vier unterschiedlichen Farbstoffen ermöglicht, 16 Merkmale auf einmal in der Kapillarelektrophorese im Sequencer zu charakterisieren. Eine Allelleiter dient dabei als Standard, die Abweichung dieser Systeme liegt bei weniger als 0,15 bp, Daten unterschiedlicher Labore sind dadurch direkt vergleichbar.

Statistische Bewertung

Sowohl der statistische Nachweis für eine Vaterschaft als auch der Ausschluss derselben kann durch eine Bayes-Wahrscheinlichkeit charakterisiert werden.

Die vereinfachte Tabelle 1 zeigt einen Ausschnitt eines möglichen Analyseergebnisses mit zwei vermuteten Vätern. Dargestellt sind drei Marker (D3S1358, TH01 und D21S11). Die Zahlen in der Tabelle, zum Beispiel 9/9.3 bei dem STR „TH01“ geben die Länge dieses DNA-Abschnitts bei den jeweils untersuchten Personen an. Jedes Tabellenfeld enthält zwei Zahlenangaben, weil die Erbinformation in jeder Körperzelle doppelt vorliegt: ein Allel vom Vater, ein Allel von der Mutter. Die verschiedenen Varianten kommen in der menschlichen Population mit unterschiedlicher Häufigkeit vor; die Variante TH01=10 findet man beispielsweise nur bei circa 2 % aller Mitteleuropäer. Die Interpretation ist denkbar einfach: Zunächst werden mütterliche und kindliche Merkmale miteinander verglichen. Das verbleibende Merkmal (grün markiert) ist das väterliche. Hat der vermutliche Vater das Merkmal nicht, ist er als Vater ausgeschlossen (Vater 2). Besitzt er es, ist er der mögliche Vater. Daran schließt sich eine statistische Berechnung an. Durch die Untersuchung von 15 Markern kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Vaterschaft ausschließen oder beweisen. Bei Wahrscheinlichkeitswerten oberhalb von 99,9 % gilt die Vaterschaft als praktisch erwiesen. Findet man aber mehr als zwei Marker, die weder der mütterlichen, noch der väterlichen DNA (Beispiel: Vater 2) zugeordnet werden können, so ist die Vaterschaft praktisch ausgeschlossen.



schiedlichen Labors werden unterschiedliche Varianten der DNA-Analyse verwendet. Einige Labors nutzen veraltete Methoden und prüfen nur wenige (drei oder vier) Marker. Rein statistisch gesehen kann man aus dieser geringen Anzahl von Markern kein verlässliches Ergebnis erwarten. Wenige Labors nutzen sogar noch ältere und ungenauere Methoden wie Blutgruppentypisierung oder Übereinstimmung serologischer Merkmale wie HLA, um eine Vaterschaft zu bestimmen.

Die verlässlichsten Ergebnisse kann man von Labors erwarten, die 13 oder mehr Markersysteme testen. Diese Labors nutzen dieselbe Technologie wie sie auch von rechtsmedizinischen Instituten zur Beweisführung mittels DNA-Analyse verwendet werden. Einige Labors, die sich auf genetische Vaterschaftstests spezialisiert haben, gehen noch einen Schritt weiter und prüfen 15 Markersysteme plus eines zur Geschlechtszuordnung, also insgesamt 16. Bei der Vaterschaftsfeststellung wird die Identifikation von DNA-Markern mit statistischen Berechnungen bezüglich der Wahrscheinlichkeit, mit der diese Marker vererbt werden, kombiniert. Deshalb gilt: Je mehr Marker getestet werden, desto sicherer ist das Ergebnis.

Im Folgenden wird anhand von zwei Beispielen erörtert, wie sich eine zu geringe Anzahl von Markern sowie die Nichtverfügbarkeit der Mutter negativ auf das Analyseergebnis auswirken können.

Zu wenige Marker: Eine besonders große Rolle spielt die Anzahl der Marker, wenn die Mutter für den Test nicht zur Verfügung steht, also nur vermeintlicher Vater und Kind getestet werden können. Die Vereinigung der Amerikanischen Blutbanken und das College der Amerikanischen Pathologen schreiben vor, dass mindestens zwei DNA-Markersysteme nicht übereinstimmen dürfen, um die Vaterschaft sicher ausschließen zu können. Dies ist internationaler Standard.

Angenommen, ein Labor führt einen Vaterschaftstest mit zehn Markern durch und findet bei allen zehn Übereinstimmung. Dieses Labor würde einen „Nichtausschluss“ der Vaterschaft mit einer Wahrscheinlichkeit von über 99 % angeben, also den Spender der DNA-Probe als biologischen Vater des Kindes ausweisen. Bei dieser Untersuchung ist das Ergebnis zweifellos wahr, es kann aber dennoch falsch sein: Hätte jenes Labor 16 Marker getestet, könnten sie Nichtübereinstimmung bei zwei oder mehr von den Markern gefunden haben, die sie nicht getestet haben. Damit wiederum hätte die Vaterschaft zu 100 % ausgeschlossen werden können. Die Genauigkeit des Tests steht somit in direkter Beziehung zur getesteten Anzahl der Marker. Der Test ist am genauesten, wenn ein Trio getestet wird (Mutter, Kind, vermeintlicher Vater). Es gibt seltene Fälle, bei denen die Testung von zu wenigen Markern zu zweideutigen Ergebnissen führt, zum Beispiel wenn zwei

infrage kommende Väter miteinander verwandt sind. In Fällen, in denen zwei eineiige Zwillingbrüder als Väter infrage kommen, ist man an den Grenzen der DNA-Analytik angelangt. Hier kann man ebenso eine Münze werfen.

Abstammungsgutachten ohne Mutter:

Am Beispiel in Tabelle 2 ist ersichtlich, dass in Fällen, in denen die Mutter nicht verfügbar ist, ein falsches Ergebnis erzielt werden kann. Es sollte deshalb immer ein Trio getestet werden.

Test A (Duo): Der vermeintliche Vater hat Marker mit dem Kind gemein und besitzt alle im Test eingeschlossenen Marker. Deshalb kann er in diesem Test nicht ausgeschlossen werden.

Test B (Trio): Bezieht man die Information über die mütterliche DNA in die Auswertung ein, kommen die Marker des vermeintlichen Vaters nicht mehr in allen getesteten Markersystemen vor. Einige der Marker, die im Test ohne Mutter dem vermeintlichen Vater zugeordnet worden waren, können nur von der Mutter stammen. Die der Mutter zuzuordnenden Merkmale müssen stimmen, die demnach vom Vater stammenden Merkmale sind unter „obligatorische Marker“ aufgelistet. Sechs der erforderlichen Merkmale (mit + in der rechten Spalte gekennzeichnet) stimmen nicht mit denen des vermeintlichen Vaters überein. Der getestete Mann ist also nicht der Vater des Kindes. Wäre er der Vater, so müsste er jene sechs Merkmale besitzen.

Tests mit Duo oder Trio										Tabelle 2
Marker	Vater		Kind		Marker, die einen Rückschluss zulassen	Mutter		Obligatorische Marker	Ausschluss	
	1	2	1	2		1	2			
Marker 1	8	12	8	12	8 oder 12	7	8	12	-	
Marker 2	12	14	12	13	12	12	19	13	+	
Marker 3	26	27	25	27	27	23	27	25	+	
Marker 4	14	18	9	18	18	11	18	9	+	
Marker 5	9	14	6	14	14	6	12	14	-	
Marker 6	16	17	17	18	17	17	19	18	+	
Marker 7	22	23	21	22	22	16	21	22	-	
Marker 8	9	11	9	10	9	9	13	10	+	
Marker 9	10	11	10	12	10	10	11	12	+	
Marker 10	14	15	15	16	15	14	16	15	-	

* Der Übersichtlichkeit halber sind im Beispiel nur 10 Marker aufgeführt – getestet werden sollten immer 16 Marker!

In der Realität kommt es in einigen hundert bis einigen tausend Fällen bei zufällig ausgewählten, nicht miteinander verwandten Männern gleicher Rasse zu einem falsch positiven Ergebnis, wenn die Mutter für einen Test nicht zur Verfügung steht. Wenn auch die Mutter getestet wird, ändert sich die Irrtumswahrscheinlichkeit auf eins in einigen zehntausend bis zu eins in einigen Millionen bei zufällig ausgewählten, nicht verwandten Männern gleicher Rasse. Das bedeutet, dass bei Test A ein Mann aus der Nachbarschaft oder in einer Kleinstadt nicht sicher als potenzieller Vater ausgeschlossen werden kann. Bei Test B kommt kein anderer Mann aus einer sehr großen Stadt als Vater infrage.

Zwar kommen Tests ohne Mutter auch zum richtigen Ergebnis, wenn der vermeintliche Vater durch das Fehlen mindestens zweier gemeinsamer Merkmale ausgeschlossen werden kann. Der Test ist jedoch nicht so verlässlich, wenn das Ergebnis den vermeintlichen Vater nicht ausschließt. Deshalb sollte der Test ohne Mutter nur den Fällen vorbehalten sein, in denen die Mutter wirklich nicht verfügbar ist.

Qualitätssicherung entscheidend

Die Herkunft der Proben muss eindeutig und dokumentiert sein, am besten mit einer „Eidesstattlichen Versicherung“, die jeder unbescholtene erwachsene deutsche Staatsbürger abgeben darf. Zusätzlich ist empfehlenswert, die Personaldokumente der Probanden zu fotografieren oder zu kopieren. Forensische Proben wie Zigarettenkippen, Trinkgläser oder Schnuller sollten nicht in Betracht gezogen werden. Sie sind nach geltendem Recht in Deutschland für diesen Zweck nicht zulässig.

Standardmäßig sollten Zellen aus der Mundschleimhaut verwendet werden. Sie sind durch einen einfachen Abstrich schmerzlos zu gewinnen und liefern ebenso gute Ergebnisse wie Blutproben. Von der Probenentnahme bis zum Analyseergebnis muss durch geeignete Maßnahmen (z.B. automatische Strichcodeerteilung) sichergestellt sein, dass Proben niemals verwechselt werden können. Proben auf FTA-Karten (haltbar mehr als 15 Jahre) sollten für den Fall später auftretender Unstimmigkeiten zeitlich begrenzt archiviert werden.

Man sollte immer bedenken: Es geht hier in jedem Einzelfall um eine große Verantwortung und viel Geld. Jede Probenverwechslung hat das Resultat „nicht der Vater“ zur Folge!

Aktuelle Gesetzeslage

Die ehemalige Bundesministerin der Justiz Brigitte Zypries hat das „Gesetz zur Klärung der Vaterschaft unabhängig vom Anfechtungsverfahren“ auf den Weg gebracht, das seit dem 1. April 2008 gilt. Die gute (?) Nachricht: Jeder Mensch hat nach § 1598A BGB das Recht auf Kenntnis seiner genetischen Abstammung. Stimmt die Mutter nicht zu, macht das Gericht eine „Ersatzvornahme“. Die Elternschaft ist danach klar, die Beziehung garantiert hin.

Seit dem 1. Februar 2010 gilt in Deutschland ein „Gendiagnostikgesetz“, das auch den Umgang mit Abstammungsgutachten regelt. Nun haben Abstammungsgutachten zwar nichts mit Gendiagnostik zu tun, aber wer will unseren Politikern schon Ahnungslosigkeit verdenken. Kurz und nicht gut: Heimliche Tests sind bei Strafe verboten. Labore müssen sich ab 2011 für viel Geld akkreditieren lassen – Marktberingung nennt man das – zugunsten der Großen.

Dr. rer. nat Christian Schubert

Diplom-Chemiker
Fachchemiker der Medizin
Am Wäldchen 1
04579 Pötzschau
www.papagenom.de

Weiteres Einsatzgebiet des DNA-Fingerprintings: der „Untreuetest“

Bei Verdacht auf sexuelle Untreue des Partners werden meist Privatdetektive eingeschaltet. In der Allgemeinheit weniger bekannt sind forensisch anerkannte und routinemäßig verwendete chemische Schnelltests auf Ejakulat. Dazu werden Flecken in Kleidungsstücken oder auf Gegenständen (z.B. Autositze, Matratzen) auf das Vorhandensein der prostataspezifischen sauren Phosphatase (PAP) untersucht. Dieses Enzym stammt aus der Prostata und kommt beim Menschen extrakorporal nur in der Samenflüssigkeit vor. PAP ist – solange das Kleidungsstück oder der Gegenstand nicht gewaschen werden – sehr robust und über Jahre aktiv. Deshalb wird dieser Test als sehr zuverlässig eingestuft. Auf demselben Prinzip basiert ein Schnelltest zur häuslichen Anwendung (CheckMate®). Die Probengewinnung erfolgt mit einem Wischtest. Die geprüften Gegenstände bleiben unverehrt, der Test wird auf Filterpapier entwickelt (Abb.). Bei positiven Proben wird das künstliche Substrat Alpha-Naphthyl-

phosphat vom Enzym zu Alpha-Naphthol und Phosphat hydrolysiert. Das Naphthol reagiert anschließend spontan mit der Farbstoffvorstufe Fast Red TR zu einem violetten Diazofarbstoff. Im Beispiel enthält die Negativkontrolle links kein Enzym, die Positivkontrolle in der Mitte enthält PAP, die Probe (rechts) ist in diesem Fall negativ. Bei einem positiven Testergebnis lassen sich weitere Untersuchungen anschließen:

— Mikroskopie: Bei Flecken, die nicht älter als vier Tage sind, lassen sich die Spermien unter dem Mikroskop betrachten. Fehlen die Spermien, ist der Mann vasktomiert oder der Fleck ist älter als gedacht.

— DNA-Fingerprinting: Man kann DNA aus den Flecken extrahieren, falls vorhanden weibliche und männliche DNA voneinander trennen und diese wie in einem Vaterschaftstest mit der DNA eines Schleimhautabstrichs aus der Mundhöhle des vermuteten Nebenbuhlers vergleichen.



Kontrolle (-) Kontrolle (+) Probe

Abbildung 2: Filter-Test auf die prostataspezifische saure Phosphatase