

**Aus dem Institut für Rechtsmedizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Sektion DNA-Labor
(Direktor: Prof. Dr.med. M. Kleiber)**



**Etablierung einer Short tandem repeat Multiplexreaktion für forensische
und klinische Zwecke**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)**

**vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**von Thomas Johannes Betz
geboren am 20.05.1979 in Kösching**

Verteidigung am 08.06.2007

**Betreuer: PD Dr.med. M. Klintschar
Gutachter: PD Dr.med. M. Klintschar
Prof. Dr. F Neuhuber**

urn:nbn:de:gbv:3-000012138

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012138>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Die Verwendung von Short tandem repeats (STRs) zur Durchführung von Vaterschaftsgutachten gilt mittlerweile als Standard in der forensischen Medizin. Diese DNA-Polymorphismen (Synonym: Mikrosatelliten) lassen sich jedoch nicht nur zur Bearbeitung von Abstammungsgutachten oder Spurenfällen nutzen, sondern finden auch Verwendung in der Populationsgenetik und der Tumorforschung. Kommerziell erhältliche Multiplexkits sind häufig teuer, ihre Aussagekraft bei speziellen Fragestellungen eingeschränkt. Ziel der Arbeit war es, eine eigene Multiplexreaktion zu erstellen und ihre Anwendungsmöglichkeiten im klinischen und forensischen Bereich aufzuzeigen. Wir erstellten eine Multiplexreaktion (Dekaplexreaktion) unter Verwendung von neun Mikrosatelliten-Loci und Amelogenin als Marker zur Geschlechtsbestimmung. Bei der Auswahl der Genorte legten wir auf eine sinnvolle Ergänzung kommerziell erhältlicher Multiplexkits Wert wie z.B. dem Powerplex 16 Kit (© Promega Cooperation). Zunächst wurden die STRs paarweise kombiniert. Bei Amplifikationserfolg fügten wir Schritt um Schritt einen weiteren Genort hinzu. Für das System D17S976 konstruierten wir einen neuen Primer. Im Anschluß daran optimierten wir die erstellte Dekaplexreaktion durch Veränderung von PCR- und Elektrophoreseparametern. Wir untersuchten jeden Genort an 110 Personen aus dem Raum Halle/Saale. Für jeden Genort berechneten wir Allelfrequenz, DP (discriminating power), PE (power of exclusion) und die Heterozygotenfrequenz. Im Vergleich mit den statistischen Parametern des Powerplex 16-Kits zeigte sich, dass die erstellte Dekaplexreaktion vergleichbar aussagekräftig ist. Wir zeigten die unterschiedlichen Anwendungsmöglichkeiten der Reaktion insbesondere für die Abstammungsbegutachtung auf: Mit Hilfe der Dekaplexreaktion untersuchten wir mehrere Fälle, die mit dem aussagekräftigsten kommerziell erhältlichen Kit (Powerplex 16 Kit) alleine nicht gelöst werden konnten. Drei dieser Fälle, ein Defizienzfall, ein Fall mit zwei Mutationen und ein Fall bei dem 5 Brüder als Vater in Frage kamen wurden exemplarisch dargestellt. Erst durch Einsatz der Dekaplexreaktion konnten diese komplizierten Vaterschaftsfälle gelöst werden. Weiterhin zeigten wir, dass sich die Multiplexreaktion auch für die Analyse von Mikrosatelliteninstabilität bei Tumoren anwenden lässt. Insgesamt lässt sich sagen, dass die erstellte Dekaplexreaktion durch ihre vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten den Einsatz im forensischen Laborbetrieb auf alle Fälle rechtfertigt.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Aufbau der DNA	1
1.2	Mikrosatelliten	3
1.3	Eigenschaften in der Forensik genutzter Short tandem repeats	5
1.4	Internetdatenbanken über STRs	7
1.5	Anwendungsmöglichkeiten	7
1.5.1	Abstammungsgutachten	7
1.5.2	Defizienzfall	9
1.5.3	Mikrosatelliteninstabilität	9
2.	DNA-Fingerprinting	11
2.1	Extraktion von DNA aus Blut oder Mundschleimhautabstrichen	11
2.1.1	Chelexextraktion	11
2.1.2	Quiagenextraktion	12
2.2	Prinzip der Polymerasekettenreaktion	13
2.3	Fragmentlängendetektion	15
3.	Methoden	17
3.1	Chemikalien und Geräte	17
3.2	Auswahl der Genorte	18
3.3	DNA-Extraktion	20
3.4	PCR-Amplifikation	21
3.5	Gelelektrophorese	26
3.6	Kapillarelektrophorese	26
3.7	Optimierung der Dekaplexreaktion	27
3.7.1	Virtuelle Optimierung der Dekaplexreaktion mittels AutoDimersoftware	27
3.7.2	PCR-Parameter	29
3.7.3	Fragmentlängendetektion	30
4.	Ergebnisse	32
5.	Praktische Anwendung	43
5.1	Anwendung der Dekaplexreaktion bei Mutationen	43
5.1.1	Ein Vaterschaftsfall mit zwei isolierten Ausschlüssen: Mutation oder Ausschluss der Vaterschaft?	43
5.1.2	Ein Vaterschaftsfall mit 5 Brüdern als Putativväter	46
5.2	Beispielhafte Anwendung der Dekaplexreaktion bei Defizienzfällen	48

6.	Diskussion und Schlusswort	51
7.	Literaturverzeichnis	53
8.	Thesen der Dissertation	58

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Adenin
AgNO ₃	Silbernitrat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CCD	Charged coupled device
cm	Zentimeter
DMA	Dimethylpolyacrylamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DP	Power of Discrimination
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM	Essen-Möller-Wert
Exp.h	Erwartete Heterozygotität
FL	Fluorescein
G	Guanin
HNO ₃	Salpetersäure
HNPCC	Hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom Syndrom
HPLC	Aqua bidest
ILS	Internal Lane Standard
JOE	6-Carboxy-2', 7'-dimethoxy-4', 5'dichlorofluorescein
kV	Kilovolt
LOH	Loss of Heterozygosity
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
mA	Milliamper
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MI	Mikrosatelliteninstabilität
min.	Minuten
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mM	Millimolar
mW	Milliwatt
NA ₂ CO ₃	Natriumbicarbonat
nm	Nanometer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Power of Exclusion
PI	Paternity Index
pmol	Pikomol
POP-4	Performance optimiced polymer
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
sec.	Sekunden
STR	Short tandem repeat (Synonym: Mikrosatellit)
T	Thymin
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TAPS	N-Tris-(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropan-Schwefelsäure
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VNTR	Variable number of tandem repeats
W	Watt
W-Wert	Vaterschaftswahrscheinlichkeit in %

1. Einleitung

Die Entwicklung von PCR-basierten Techniken zur Identifizierung von forensischem Spurenmaterial hat in den letzten Jahren gewaltige Fortschritte gemacht. War man noch vor zehn Jahren auf große Mengen von DNA-Material angewiesen, so ist es heute möglich, selbst mit kleinsten Mengen einen aussagekräftigen Nachweis durchzuführen (12). Als DNA-Quelle kann jedes biologische Präparat mit kernhaltigen Zellen dienen: Blut, Sperma, Haar, Knochen, Speichel (Zellen der Mundschleimhaut), Fingerabdrücke (Hautzellen) und Urin, in dem Zellen aus Niere, Harnapparat und Blase enthalten sind (29). Nach Extraktion und Vervielfältigung der DNA-Moleküle mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion werden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Kapillarelektrophorese analysiert.

1.1 Aufbau der DNA

Die Erbinformationen des Menschen befinden sich im Zellkern auf den Chromosomen. Ein Chromosom besteht aus zwei Chromatiden, welche an einer Stelle, dem Zentromer, miteinander verbunden sind. Der Mensch besitzt 22 Paare von Chromosomen (Autosomen), sowie 1 Paar, welches das Geschlecht determiniert (Gonosomen; Frau: XX, Mann: XY). Die Chromatiden setzen sich aus Strängen von aneinandergereihter DNA zusammen, die der eigentliche Träger der genetischen Information ist. Grundverpackungseinheit der DNA ist das Nukleosom, ein Proteinkern aufgebaut aus Histonen, um den die DNA zweimal herumgewickelt ist. Mehrere Nukleosomen reihen sich zu einer Faser aneinander, die durch Spiralisierung gebündelt und so eine 30 nm dicke Chromatinfaser bildet. Jeder Spiralabschnitt enthält sechs Nukleosomen. Die Chromatinfaser wiederum bildet ebenfalls Schleifen, die der aufgelockerten Form der Chromosomen entsprechen.

Die Nukleinsäuren steuern die Zellvermehrung; sie sind Träger und Übermittler der genetischen Information von einer Generation auf die nächste. Die DNA ist aus je zwei Purin- und Pyrimidinbasen (Adenin, Guanin, Thymin, Cytosin) aufgebaut, die über Wasserstoffbrückenbindungen aneinander gebunden sind. Die verbundenen Basenpaare sind stets Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin. An jede Base sind ein Zucker (Pentose mit fünf Kohlenstoffatomen) und ein Phosphorsäurerest in Esterbindung angeknüpft. Zusammen bilden Base, Zucker und Phosphorsäure ein Nukleotid. Mehrere Nukleotide lagern

sich über Phosphorsäurediester-Zuckerbindungen aneinander. Der DNA-Doppelstrang ist so in Form einer rechtshändigen, langgestreckten Spirale verdrillt (Abb.1).

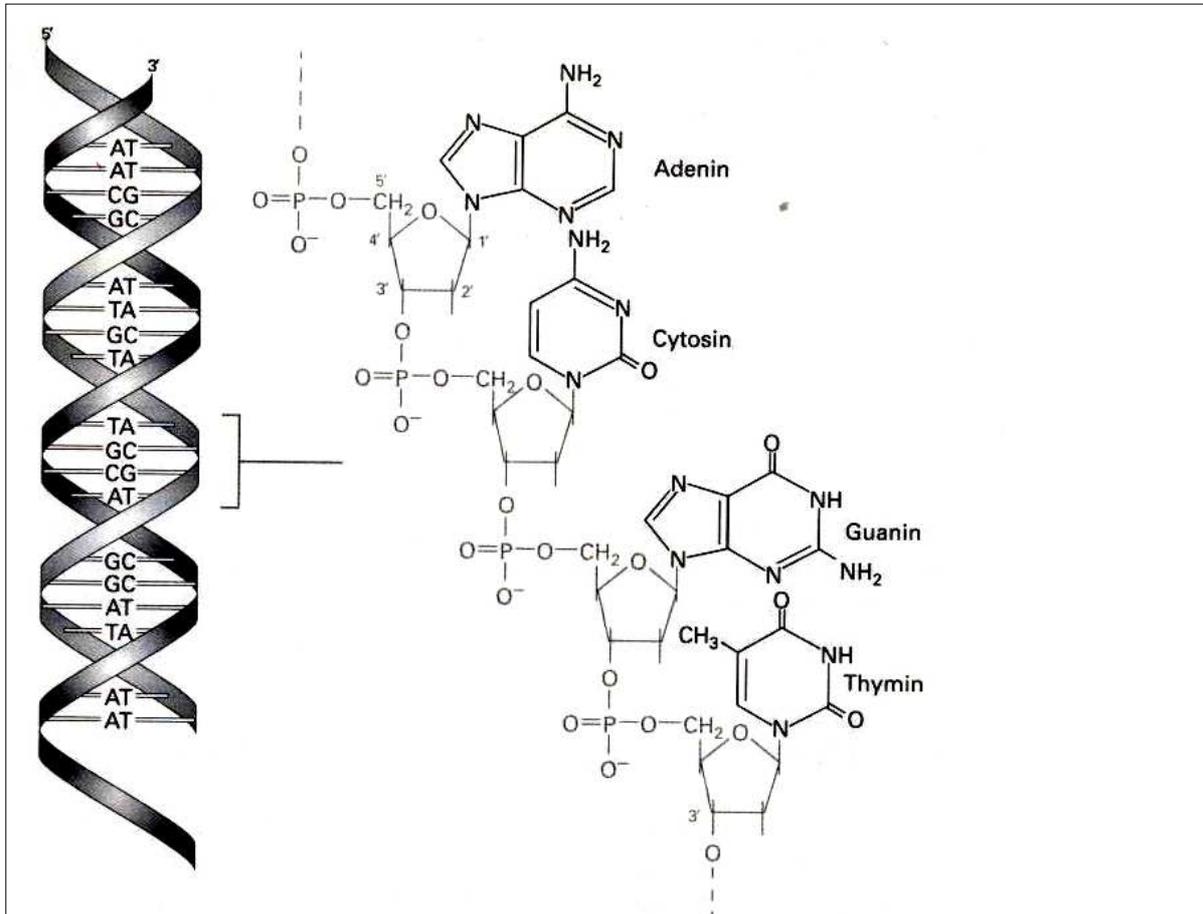


Abb.1: DNA-Struktur. Der linke Teil der Abbildung zeigt schematisch ein doppelsträngiges DNA-Molekül. Das Zucker-Phosphat-Rückgrat jedes Stranges ist als Band dargestellt. Die über Basenpaarung miteinander verbundenen Stränge bilden die Doppelhelix (nach Gelehrter und Collins, 1990)

Das DNA-Material in Chromosomen setzt sich aus DNA-Abschnitten (Genen) zusammen, die Proteine kodieren, sog. Exons, und funktionslos erscheinenden, nicht-kodierenden Regionen (Introns und Pseudogenen). Genetische Marker, die zur Identifizierung von menschlichen Individuen genutzt werden, befinden sich zumeist in diesen nicht-kodierenden Regionen.

Die Position, die ein solcher Marker auf dem Chromosom einnimmt, wird auch Locus (Plural: Loci) genannt. Als Allele bezeichnet man eines von zwei oder mehreren verschiedenen Formen eines Gens an einem bestimmten Gen-Locus (38). Sie können in homozygoter oder heterozygoter Form vorliegen. Bei der homozygoten Form besitzen die homologen Chromosomen der Zelle an einem bestimmten Locus dasselbe Allel, bei der heterozygoten

Form zwei unterschiedliche Allele. Als Genotyp werden alle Allele eines menschlichen Individuums bezeichnet. Heterozygote Allele homologer Chromosomen unterscheiden sich auf DNA-Ebene hinsichtlich ihrer Sequenz oder ihrer Länge, man spricht auch von DNA-Sequenzpolymorphismus oder DNA-Längenpolymorphismus (Abb.2). Homozygote Allele sind identisch.

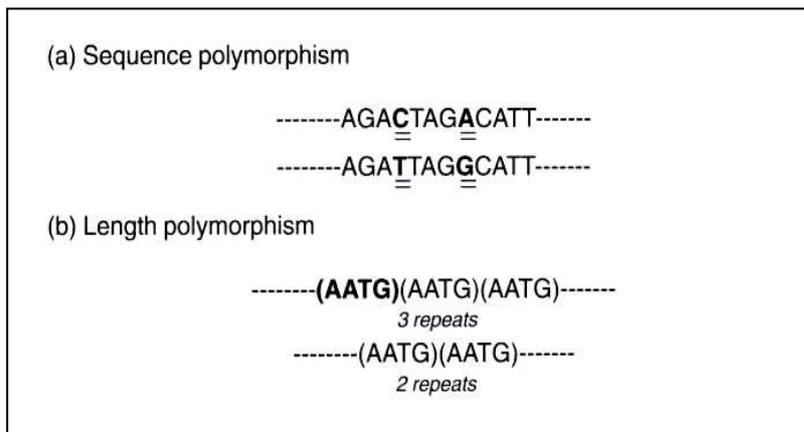


Abb.2:
 Sequenzpolymorphismus (a)
 und Längenpolymorphismus (b)
 (nach John Butler, 2001)

1.2 Mikrosatelliten

DNA-Sequenzen, die sich aufgrund ihrer Länge unterscheiden, sind aus sich wiederholenden Basenpaareinheiten (repetitive Sequenzen) zusammengesetzt. DNA-Regionen mit repetitiven Sequenzen von 2-6 Basenpaaren werden als Mikrosatelliten oder STRs bezeichnet. Sie werden nach der Anzahl ihrer Wiederholungseinheiten eingeteilt. Dementsprechend unterscheidet man im Falle von Mikrosatelliten-DNA Di-, Tri-, Tetra-, Penta- und Hexanucleotide. Mittlerweile wurden tausende STRs im gesamten Genom identifiziert und kartiert (8). Dadurch, dass sie sich von Individuum zu Individuum erheblich unterscheiden, eignen sie sich hervorragend als DNA-Marker in der forensischen Medizin, insbesondere im Rahmen von Vaterschaftstestung und Spurenkunde:

Sind die den STR-Locus flankierenden Regionen bekannt, so können komplementär zu diesen Oligonucleotidprimer hergestellt werden. Mit Hilfe dieser Primer können die DNA-Abschnitte durch PCR in vitro vervielfältigt werden. Anschließend werden diese durch Gelelektrophorese aufgetrennt. Dadurch, dass sie anhand der Anzahl an Wiederholungseinheiten, also anhand ihrer Größe, differieren, wandern die DNA-Fragmente

im elektrischen Feld mehr oder weniger weit und können so voneinander unterschieden werden (13).

Kombiniert man mehrere solcher Systeme miteinander in einer PCR, so spricht man von einer Multiplex-Reaktion. Markiert man die Primer mit Farbstoffen, lassen sie sich auf Sequenzierautomaten halbautomatisiert detektieren. Geringer Einsatz von DNA, geringe Fehlerquoten und hohe statistische Aussagekraft (14) zeichnen solche Multiplexreaktionen aus. Deshalb sind sie mittlerweile Standard bei der Bearbeitung von Spurenfällen oder Abstammungsgutachten in gerichtsmedizinischen Labors. Sie lassen sich aber nicht nur im forensischen Bereich nutzen, sondern spielen u.a. auch eine wichtige Rolle in Tumorforschung und der Populationsgenetik. Es gibt bereits zahlreiche kommerziell erhältliche Kits, trotzdem reichen sie nicht für alle Anwendungen aus, da sie teuer sind und manchmal eine höhere Aussagekraft erwünscht ist. Diese Arbeit befasst sich mit der Erstellung einer eigenen Multiplexreaktion und ihren Anwendungsmöglichkeiten im klinischen und forensischen Bereich, insbesondere bei der Vaterschaftsbegutachtung.

1.3 Eigenschaften von in der Forensik genutzten Short tandem repeats

Um sinnvolle DNA-Diagnostik betreiben zu können, ist es notwendig, auf STR-Marker zurückzugreifen, die jeder für sich oder in Kombination eine hohe Aussagekraft besitzen (18). Gegenüber Genorten mit längeren Repeats (sog. Minisatelliten) besitzen sie den Vorteil, nur eine eingeschränkte Anzahl von diskreten, gut definierten Allelen aufzuweisen. Dadurch wird auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Artefakten, wie z.B. einem Allelausfall („Allelic Dropout“), minimiert. Darunter versteht man, dass während der PCR einzelne Allele nicht gleich stark amplifiziert werden, was zu einer falschen Homozygotie führen kann.

In der Regel werden heute STR-Systeme verwendet, die Tetra-oder Pentanukleotidrepeats enthalten, weil diese gegenüber STR-Systemen mit Di-oder Trinukleotidrepeats den Vorteil geringerer Anfälligkeit für Artefaktbildung bei der PCR („Stotterbanden“) aufweisen (siehe Abb.3).

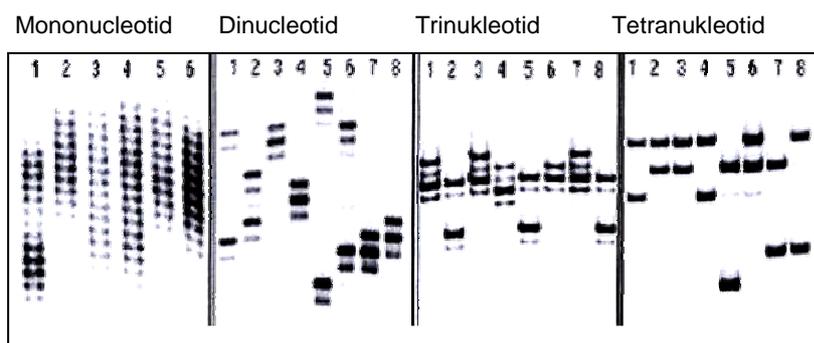


Abb.3: Stotterbanden (nach John Butler, 2004)

Stotterbanden („Slippage“-Banden) treten – je nach System und Primerdesign – mit unterschiedlicher Häufigkeit auf, besonders häufig sind sie bei 1- und 2 Bp-Repeat-Sequenzen festzustellen (36). Sie zeigen sich als um ein Repeat verkürzte „Stotterpeaks“, die dadurch entstehen, dass bei Elongation des neusynthetisierten Stranges durch die Polymerase (Abb.4) in den ersten PCR-Zyklen ein Repeat ausgelassen wird (56). Dadurch wird die Interpretation von DNA-Profilen, vor allem in Fällen mit Mischungen von DNA mehrerer Individuen, beeinflusst. Oft steht die auswertende Person vor dem Problem, ob es sich bei den Peaks um ein wirkliches Allel der untersuchten Person handelt oder um einen Stotterpeak des folgenden Allels.

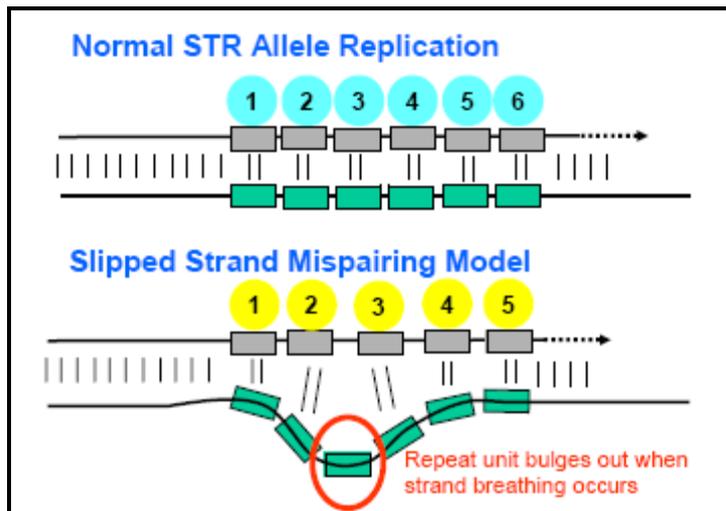


Abb.4: Entstehungsmechanismus von Stotterbanden (nach Walsh et al, 1996)

Es ist auch möglich, dass sogenannte „Primer-Dimer“ auftreten. Bei ungünstiger Auswahl der Primersequenzen treten diese in der Gelelektrophorese als intensive zusätzliche Bande auf; sie entsprechen in ihrer Länge nahezu der kombinierten Länge beider PCR-Primer. Das Auftreten von Primer-Dimer-Artefakten wird durch Sequenzkomplementarität im Bereich der 3`-Enden hervorgerufen (16). Dadurch binden die Primer eher aneinander als jeweils einzeln im Bereich der Zielsequenz, wodurch diese mit geringerer Effektivität amplifiziert wird. Um diesem Problem begegnen zu können wurden Softwareprogramme entwickelt, mit denen sich feststellen lässt, inwieweit die Wahrscheinlichkeit besteht, dass dieses Phänomen in einer Multiplexreaktion auftritt. Schließlich wurden Kriterien definiert, welche STR-Loci, die im Rahmen der Forensik verwendet werden, erfüllen müssen (15). Die verwendeten STR-Loci sollten eine große Diskriminationskraft besitzen, möglichst heterozygot sein, eine geringe Mutationsrate und eine geringe Anfälligkeit für Artefakte besitzen. Sie sollten sich auf verschiedenen Chromosomen befinden, um ein Kopplungsungleichgewicht unwahrscheinlich zu machen. Die Ergebnisse sollten stabil bleiben, auch wenn die STR-Loci mit anderen Primern repliziert werden.

Um eine Multiplexreaktion auswerten zu können, bedarf es einer sog. Allelleiter. Es handelt sich hierbei um eine Kombination der Allele, die in einer Bevölkerungspopulation vorkommen (47). Die Leiter wird in der gleichen Multiplexreaktion mit den gleichen Primern mitrepliziert und dient als Referenzgröße für jeden STR-Locus.

1.4 Internetdatenbanken über STRs

Die für die Erstellung einer eigenen Multiplexreaktion benötigten Informationen können größtenteils dem World Wide Web entnommen werden. Informationen über publizierte STR-Loci findet man in Datenbanken wie der STRbase (<http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/>). Es handelt sich dabei um eine vom *National Institute of Standards and Technology (NIST)* unterhaltene Datenbank, in der Informationen über DNA-Fingerprinting enthalten sind.

Neben Literatur über STR-Loci und entsprechenden Querverweisen auf andere Internetseiten, sind auch Daten zu den einzelnen STRs abrufbar. Es werden die chromosomale Lokalisation, die Basensequenz des STR-Repeats, die Genbankregistrierungsnummer und die Anzahl an Repeat-Einheiten in der Referenzsequenz beschrieben. Ferner findet man Informationen über STR-Kits, die in privaten Laboren erstellt wurden (45). Die benötigten Informationen sind als PDF- oder HTML-Datei abrufbar.

1.5 Anwendungsmöglichkeiten

1.5.1 Abstammungsgutachten

Für Abstammungsgutachten werden heute in erster Linie STRs verwendet. Bei der Durchführung der Erbmerkmalsuntersuchungen zur Feststellung der Vaterschaft ist der Gutachter an Vorgaben gebunden, welche in den Richtlinien zur Erstattung von Abstammungsgutachten niedergelegt sind, die von der Bundesärztekammer festgelegt werden (11). Gutachten können demnach von Gerichten, Behörden und Privatpersonen in Auftrag gegeben werden. Als Untersuchungsgut dient eine Blutprobe oder ein Mundschleimhautabstrich. Das Untersuchungsspektrum muss mindestens 12 voneinander unabhängige Genorte mit bekannten Mutationsraten umfassen. Es müssen Polymorphismen verwendet werden, deren paternale Mutationsraten zuverlässig geschätzt und hinreichend klein sind. Bei unklarer Gutachtenlage müssen im Bedarfsfall weitere Systeme, gegebenenfalls auch andere Systemkategorien (z.B. Blutgruppensysteme) untersucht werden. Drei und mehr Ausschlusskonstellationen auf verschiedenen Chromosomen erlauben die Aussage, dass die Abstammung vom Putativvater ausgeschlossen ist. Bei weniger als drei Ausschlusskonstellationen muss eine biostatistische Würdigung unter Einbeziehung von möglichen Mutationen beziehungsweise stummen Allelen erfolgen. Voraussetzung für

Einschluss oder Ausschluss ist die Kenntnis der verlässlich abgeschätzten Parameter wie Genfrequenzen, Haplotypfrequenzen und Mutationsraten. Die Basis der Berechnung ist eine exakte Hypothesenformulierung (Terzetenfall und Defizienzfall) im Hinblick auf postulierte Verwandtschaftsbeziehungen und die ethnische Zugehörigkeit. Aus der Häufigkeit des obligat paternal vererbten Allels können statistische Aussagen über die Wahrscheinlichkeit der Vaterschaft getätigt werden. Als statistische Maßzahlen werden der W-Wert, der PI oder EM-Wert und die individuelle Ausschlusschance A verwendet. Ein W-Wert größer gleich 99.9% oder analoge statistische Maßzahlen entsprechen dem Prädikat „Vaterschaft praktisch erwiesen“.

Zur Abstammungsbegutachtung werden meist Genorte aus nationalen DNA-Datenbanken verwendet. Diese sind in der Regel in kommerziell erhältlichen Multiplexkits enthalten (z.B. *Powerplex Plus Kit*, Promega Cooperation, Madison, Wisconsin; *Identifiler Kit*, ABI, Foster City, Ca.). Bei beiden Kits werden in einer PCR 15 Genorte amplifiziert.

Im Institut für Rechtsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg werden in erster Linie zwei Multiplexkits, der SGM-plus-Kit (©Applied Biosystems) und der Powerplex 16 Kit (©Promega) zur Durchführung von Abstammungsgutachten verwendet. In diesen werden an Zahl und Lokalisation unterschiedliche Genorte verwendet. Im SGM-Kit sind 10 STR-Loci enthalten: D3S1358, vWA, D16S539, D2S1338, D8S1179, D21S11, D18S51, D19S433, TH01, FGA. Beim Powerplex 16 Kit wird auf 15 Genorte zurückgegriffen: Penta E, D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, vWA, Penta D, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818. Beide Kits enthalten zusätzlich Amelogenin (Marker zur Geschlechtsbestimmung).

15 Genorte reichen im allgemeinen aus, einen großen Teil der untersuchten Vaterschaftsfälle zu lösen.

Oft können jedoch auch "einfache" Abstammungsgutachten "schwierig" werden, wenn z.B. Mutationen auftreten, wenn es sich um einen Defizienzfall (s.u.) handelt oder wenn die Verwandtschaftsbeziehungen der getesteten Personen recht eng sind. In Vaterschaftsfällen, bei denen der Putativvater fehlt, z.B. weil er verstorben oder verschollen ist, oder in Inzestfällen, bei denen sich die genetischen Profile von Putativvater und Kindesmutter nur wenig voneinander unterscheiden, erreichen kommerzielle Multiplexreaktionen häufig nicht die erwünschte Aussagekraft (26, 35, 59). Zudem eignen sich kommerziell erhältliche Multiplexkits in der Regel eher zur Analyse forensischer Spuren als zur Durchführung von Abstammungsgutachten.

In diesen Fällen ist es von Vorteil, weitere Genorte zu untersuchen, um die Wahrscheinlichkeit eines Einschlusses oder Ausschlusses zu erhöhen. Daraus entspringt die Notwendigkeit, neben der Verwendung kommerziell erhältlicher Multiplexkits auch eigene Multiplexreaktionen zu verwenden, um die Aussagekraft zu erhöhen.

1.5.2 Defizienzfall

Multiplexreaktionen auf Basis von Mikrosatelliten haben mittlerweile Blutgruppensysteme und die HLA-Systeme in der Abstammungsdiagnostik weitgehend verdrängt. Umstrittene Vaterschaftsfälle werden heutzutage durch Analyse von DNA-Profilen bei Mutter, Kind und Putativvater geklärt. Steht ein Elternteil nicht zur Verfügung (Proband verstorben, nicht auffindbar, etc.) so spricht man von sog. Defizienzfällen (52). Sehr kompliziert sind Fälle, bei denen möglicherweise enge Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den in Frage kommenden Tatverdächtigen vorliegen. Da sich die DNA-Profile der betreffenden Personen in solchen Fällen recht ähnlich sind, ist es schwierig, auch bei Verwendung von Multiplexreaktionen, eine klare Aussage – also Ausschluss oder Einschluss – treffen zu können. Dennoch lassen sich solche Vaterschaftsfälle bei Analyse einer ausreichenden Zahl hinreichend aussagekräftiger STRs lösen.

1.5.3 Mikrosatelliteninstabilität

Mikrosatelliten lassen sich nicht nur zur Abstammungsbegutachtung nutzen, sondern werden auch im Rahmen der Tumorforschung verwendet (4). Das Interesse dabei gilt insbesondere der Aufdeckung von molekulargenetischen Grundlagen, um so die Entstehung, Biologie und das Verhalten von Tumoren besser zu verstehen und therapeutisch eingreifen zu können.

Es ist bekannt, dass im Tumorgewebe das Phänomen der genetischen Instabilität auftreten kann (32). Neben Veränderungen auf chromosomaler Ebene finden auch Veränderungen auf DNA-Ebene statt (53). Veränderungen von Mikrosatelliten-DNA, insbesondere die Entstehung neuer Allele, wird als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet. Sie ist mit Defekten von DNA-Reparaturgenen (Mismatch-Repair-Gene) assoziiert, die für die Korrektur von DNA-Replikationsfehlern zuständig sind. Werden sie ausgeschaltet, wird die Tumorgenese gefördert (27), da eine Ineffizienz der Mismatch-Repair-Gene sekundäre Mutationen begünstigt und unter Umständen weitere maligne Transformationen ermöglicht (1, 2, 24, 51).

Bei Tumoren des Kolons, besonders bei familiär vererbten Syndromen wie dem hereditären, nichtpolypösem Kolonkarzinom Syndrom (HNPCC) lassen sich Mikrosatelliteninstabilitäten recht häufig beobachten (17, 46).

Durch Analyse von Tumorzell-DNA mit Hilfe einer Multiplexreaktion lässt sich nicht nur eine Aussage über MI treffen, es können damit auch Alleldeletionen bei heterozygoten Genorten nachgewiesen werden. Deletionen eines Chromosomenabschnittes sind bei Tumoren häufig und können (im Falle der Deletion eines Tumorsuppressorgens) ebenfalls zur

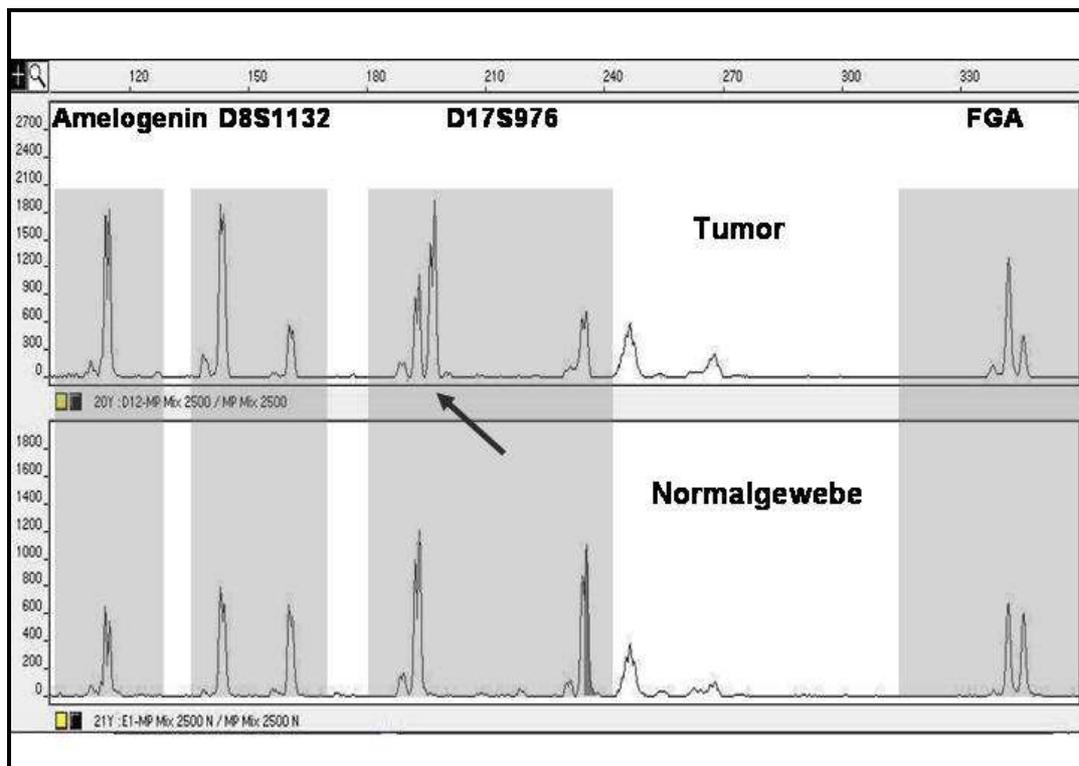


Abb.5: Mikrosatelliteninstabilität beim Schilddrüsenkarzinom (Genort:D17S976)

Entartung einer Zelle führen. Wird ein Mikrosatellit im deletierten Bereich analysiert, beobachtet man den Verlust eines Allels (Loss of Heterozygosity; LOH). Die Untersuchung von Mikrosatelliten ist daher eine Möglichkeit Deletionen bei Tumorzellen nachzuweisen. Da dafür sehr viele Genorte untersucht werden müssen, ist eine effiziente Analyse nur mit Multiplexreaktionen, wie der in der gegenständlichen Arbeit konstruierten möglich. Mittlerweile hat sich das Spektrum molekulargenetisch untersuchter Neoplasien enorm erweitert. Neben bösartigen Neubildungen des Gastrointestinaltrakts sind auch Tumoren der Schilddrüse (39, 43, 49) und anderer Organsysteme (19, 22, 33, 42) Gegenstand intensiver Forschung.

Obwohl die Untersuchung von Mikrosatelliteninstabilität und LOH nicht Ziel der vorliegenden Arbeit war, kann es im Rahmen der Vaterschaftsbegutachtung dazu kommen, dass von einem verstorbenen Putativvater lediglich formalinfixiertes Tumormaterial zur Verfügung steht. Abb.5 zeigt die Typisierung der im gegenständlichen Projekt erstellten Multiplexreaktion bei einem Karzinom (oben) und Normalgewebe ein und derselben Person. Es sind nur die mit dem gelben Farbstoff Tamra markierten Loci dargestellt (Amelogenin, D8S1132, D17S976 und FGA). Das Tumorgewebe weist ein zusätzliches (drittes) Allel bei D17S976 auf (mit Pfeil markiert). Außerdem zeigen sich bei D8S1132 und FGA allelische Imbalancen (ein Allel jeweils deutlich kleiner als das zweite) als Hinweis auf LOH im Bereich dieser Genorte. Die flachen Peaks zwischen 240 und 280 bp sind Artefakte. Diese Genorte können sich also auch für eine Untersuchung auf Mikrosatelliteninstabilität oder LOH eignen.

2. DNA-Fingerprinting

2.1 Extraktion von DNA aus Blut oder Mundschleimhautabstrichen

Um aus einer Blut- oder Mundschleimhautprobe PCR-fähiges Material zu erhalten, muss die darin enthaltene DNA isoliert werden. Die DNA-Moleküle müssen vom restlichen zellulären Material getrennt werden, bevor weiter mit ihnen gearbeitet werden kann. Während des Trennungsvorganges, der sog. Extraktion, wird die Kern-DNA in mehreren Schritten von den übrigen Zellbestandteilen wie Zellwandbestandteilen oder Zellorganellen befreit. Häufig verwendete Extraktionsverfahren sind die Chelexextraktion und die Extraktion mit Hilfe von Quiagen spin columns.

2.1.1 Chelexextraktion

Bei der Chelexextraktion (55) macht man sich die chemischen Eigenschaften der Chelexsuspension zu Nutze. Sie hat die Eigenschaft als Chelatbildner zu fungieren, der mit polyvalenten Metallionen wie Magnesium Bindungen eingeht. Damit wird DNA-zerstörenden Enzymen ihr Kofaktor entzogen, die Kern-DNA bleibt unversehrt erhalten.

Zunächst wird die Probe (z.B. ein auf Baumwolle getrockneter Blutfleck) in ein 1.5 ml grosses Eppendorf-Röhrchen gegeben und unter Zugabe von Aqua bidest gewaschen. Nach Zugabe von Chelex 5% und Proteinase K wird das Eppendorf-Röhrchen für 30 min. in ein auf 56°C aufgeheiztes Wasserbad gestellt. In dieser Zeit beginnt die zugegebene Proteinase die enthaltenen Zellen aufzuschließen. In einem weiteren Schritt wird die Probe über einen Zeitraum von 8 min. auf 100°C erhitzt und so eine Inaktivierung des Enzyms erreicht. Nach einem Zentrifugationschritt bei 13000 upm trennt sich die Kern-DNA von den übrigen Bestandteilen und kann nun als Überstand abgenommen und mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion vervielfältigt werden.

2.1.2 Quiagenextraktion

Ein weiteres Verfahren zur Extraktion von DNA aus Spurenmaterial bietet sich durch die Verwendung von Quiagen spin columns an (20). Hierbei befindet sich der getrocknete Blutfleck ebenfalls in einem 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen und die Kern-DNA wird zuerst durch Zugabe von unterschiedlichen Pufferlösungen mit Proteinase K lysiert. Nach Zugabe von Ethanol wird die freigewordene DNA während eines Zentrifugationsschrittes an eine Silikagelmembran gebunden (Festphasenextraktion). Die gebundene DNA wird in der Folge in zwei Schritten von kontaminierenden Stoffen gereinigt und mit einem kleinen Volumen Extraktionspuffer eluiert.

Das so gewonnene Ultrafiltrat enthält dann PCR-fähiges Material. Wird die extrahierte DNA gleich weiter „verarbeitet“, also in Form einer Polymerasekettenreaktion, unterscheiden sich beide Methoden in der Qualität der Ergebnisse nicht voneinander. Es hat sich jedoch gezeigt, dass es bei längerer Lagerung von Chelex-extrahierter DNA zur Degradation und damit in der STR-Analyse zu einem Allelausfall kommen kann, während das bei Verwendung von Quiagen-Extrakten nicht der Fall ist (20). Deswegen hat es sich bewährt, bei Proben, die geringe DNA-Konzentrationen enthalten oder stark kontaminiert sind auf diese Extraktionsmethode zurückzugreifen. Welche Methode angewandt wird, hängt von den Umständen und Zielen der Untersuchung ab. Im Institut für Rechtsmedizin in Halle werden die Untersuchungen zur Gewährleistung der Qualität doppelt durchgeführt, zunächst mit einem Quiagen-Extrakt, danach mit einem Chelex-Extrakt.

2.2 Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Nach der Extraktion von DNA aus forensischem Spurenmaterial liegt diese in nur sehr geringer Konzentration vor. Die Menge an DNA muss mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion zunächst vergrößert werden. Die PCR ist eine in vitro-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte vervielfältigen kann (21). Hierbei wird DNA durch Hitzedenaturierung in Einzelstränge aufgetrennt und anschließend mit Hilfe eines Enzyms, der DNA-Polymerase, das an diese Einzelstränge bindet, wieder zu Doppelsträngen synthetisiert. Dieser Vorgang wird in einer PCR-Reaktion typischerweise 30 mal durchlaufen. Dementsprechend hat sich das genetische Material am Ende der Reaktion vervielfältigt.

Voraussetzung für die Durchführung einer PCR ist, dass man die Sequenz der zu vervielfältigenden Zielsequenz kennt, und zwar insbesondere die Bereiche, welche den polymorphen Genort flankieren. Komplementär zu diesen Randbereichen setzt man in die Reaktion kurze Oligonucleotide als sog. Primer ein. Diese binden an die Einzelstränge und ermöglichen es der DNA-Polymerase, von diesem kurzen Doppelstrangbereich aus Desoxynucleotidtriphosphate - als Bausteine für die Replikation - anzufügen. Damit werden DNA-Stränge synthetisiert, deren Sequenz komplementär zum Template ist (38). Die wesentlichen Komponenten der PCR bestehen also aus der zu vervielfältigenden DNA-Sequenz, dNTPs, der DNA-Polymerase und Oligonucleotidprimern, sowie einer Pufferlösung. Die eigentliche Reaktion findet in einem Thermocycler statt, in dem hintereinander verschiedene Erhitzungs- und Abkühlungsschritte durchlaufen werden. Jeder Reaktionszyklus besteht aus drei Teilschritten: *Denaturierung* – *Annealing* – *Extension*. Denaturierung bezeichnet das Aufschmelzen der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge durch Erhitzen. Bei einer Temperatur von ca. 95°C über ca. 60 Sekunden werden die nicht kovalenten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen Adenin und Thymin sowie Guanin und Cytosin gelöst und es liegen nun zwei DNA-Einzelstränge vor. Ein Absinken der Temperatur auf 55-72°C über einen weiteren Zeitraum von 60 Sekunden ermöglicht es den Oligonucleotidprimern an die jeweils komplementäre Startsequenz der Einzelstränge zu hybridisieren (Annealing). Somit ist die Zielsequenz am Schluss des zweiten Reaktionsschrittes eindeutig festgelegt, flankiert durch die gebundenen Primer. Unter Extension versteht man die Neusynthese von DNA durch die DNA-Polymerase bei 72°C, wobei als Startpunkt die gebundenen Primer fungieren. Meist reichen 60-120 Sekunden für diesen Schritt, bei längeren Amplikons kann die Reaktion auch mehr Zeit beanspruchen. Als

Anlaufzeit (ramp time) bezeichnet man die Zeit (ca.120 Sekunden), die der Thermocycler zum Aufheizen und Abkühlen benötigt. Ein Reaktionszyklus dauert also etwa 5 Minuten, danach liegen die Original-DNA und deren Kopien vor (Abb.6).

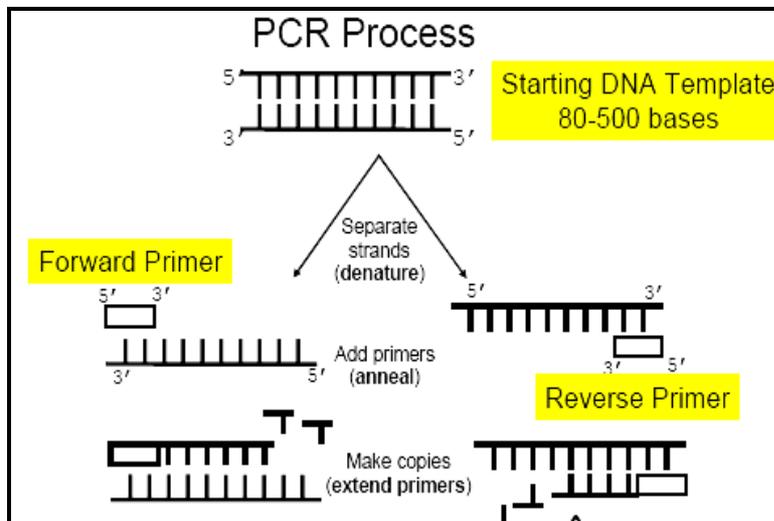


Abb.6: Prinzip der PCR (nach Butler, 2001)

Bei einem weiteren Zyklus, der wiederum mit der Denaturierung der doppelsträngigen DNA beginnt, dienen sowohl die ursprüngliche als auch die neusynthetisierte DNA als Matrize für die polymerasevermittelte DNA-Synthese. Mit jedem weiteren Zyklus wird somit die aus dem vorangegangenen Zyklus resultierende Menge des zu vervielfältigenden Bereichs der DNA verdoppelt. Zunächst haben die neu synthetisierten Stränge keine definierte Länge, da die Polymerase so lange synthetisiert bis ein neuer Zyklus beginnt oder von alleine anhält. Erst ab dem dritten Zyklus erhält man Syntheseprodukte, deren Länge genau durch die Position der Primer festgelegt ist, sog. Amplifikate. Eine Polymerasekettenreaktion besteht aus zumeist 30 solcher Zyklen, dementsprechend steigt die Konzentration der Amplifikate exponentiell nach der Gleichung: $(2^n - 2n) \cdot x$, wobei n für die Anzahl der Vermehrungszyklen, 2n für Produkte des ersten und zweiten Vermehrungszyklus, deren Länge nicht definiert ist und x für die Anzahl der ursprünglichen DNA-Matrize stehen. Theoretisch lässt sich mit dieser Technik genetisches Material unendlich amplifizieren, praktisch wird aber nie eine hundertprozentige Ausbeute erreicht (38). Das liegt unter anderem daran, dass ab einem bestimmten Überschuss an Ziel-DNA die Enzymmenge einen begrenzenden Faktor darstellt und mit zunehmender Zeit das Enzym durch die Hitze im Laufe der Reaktion mit denaturiert wird. Andererseits lassen sich mit Hilfe der PCR selbst kleine Mengen an DNA-Material vervielfältigen, das

darüber hinaus noch stark degradiert sein kann (38). Um eine erfolgreiche Vervielfältigung nachzuweisen, werden kleine Mengen des PCR-Produkts auf ein Gel aus Polyacrylamid oder Agarose aufgebracht. Anschließend wird an diesem Gel eine elektrische Spannung angelegt. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern hierbei zur Anode; je nach Größe der Fragmente unterschiedlich weit. Durch Färbung des Gels mit Silberlösung (3) können die „Banden“ unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.3 Fragmentlängendetektion

Wie bereits erwähnt, ist die Multiplex-PCR zur Identifizierung von Individuen heutzutage Standard in forensischen DNA-Labors. Um die einzelnen STR-Systeme voneinander zu unterscheiden, müssen sie sich in der Länge der Fragmente eindeutig unterscheiden. Da die Amplifikation beliebig langer Fragmente problematisch ist (im Allgemeinen werden nur Fragmente unter 500 bp mit für diesen Zweck ausreichender Effizienz amplifiziert), im Gegensatz zur VNTR-Analyse (9, 37), bedient man sich zusätzlich mit unterschiedlichen Farben markierter Primer. Diese sind am 5'-OH-Ende mit einem fluoreszierenden Farbstoff angefärbt. Zur STR-Analyse werden unterschiedlich fluoreszierende Farbstoffe verwendet, z.B. FL (blau), JOE (grün), TMR (gelb), CXR oder ROX (rot) (30). Mit der im Institut für Rechtsmedizin in Halle etablierten Technologie (ABI 310 Genetic Analyzer) ist die Markierung von PCR Fragmenten in 3 Farben (blau, grün, gelb) möglich, während die 4. Farbe (rot) als interner Längenstandard dient. Während der PCR lagern sich diese Primer entsprechend ihrem komplementären template, also dem zu detektierenden STR-Locus, an und ermöglichen es so, der DNA-Polymerase den Einzelstrang zum Doppelstrang zu vervollständigen. Nach Abschluss der PCR hat man je nach Anzahl der eingesetzten Primerpaare eine entsprechende Menge an fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten. Das weitere Vorgehen besteht prinzipiell aus drei aufeinanderfolgenden Schritten, nämlich der Vorbereitung der Probe für das Elektrophoresegerät, der eigentlichen Elektrophorese und der Auswertung der erhaltenen Werte mit der entsprechenden Software (12).

Zunächst muss das PCR-Produkt nach Zugabe von Formamid und einem Längenstandard (in unserem Fall Genescan 500, markiert mit dem „roten“ Farbstoff ROX) bei einer Temperatur von 95°C im Thermocycler denaturiert werden, um Einzelstrang-DNA zu erhalten. Das Formamid hilft bei diesem Prozess, indem es eine Wiederherstellung der

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen verhindert. Beim dazugegebenen Längenstandard handelt es sich um DNA-Fragmente von bekannter Größe, die ebenfalls fluoreszenzmarkiert sind. Sie durchlaufen, wie die Probe, die sich anschließende Elektrophorese, um als Vergleichswert zu dienen.

Der ABI 310 Genetic Analyzer ist aus mehreren Komponenten aufgebaut. Über eine Kapillare wird das Probenmaterial aufgenommen. Von Probe zu Probe gelangt in die Kapillare aus einer Spritze Elektrophoresepolymer. Es handelt sich hierbei um 4%-Dimethylpolyacrylamid, POP-4. Der zur Elektrophorese verwendete Puffer enthält 100mM TAPS und 1mM EDTA bei einem pH-Wert von 8.0 (44). Eine Elektrode sorgt für die zur Elektrophorese benötigte Spannung (etwa 15 kV), eine Heizplatte hält die Temperatur während der Elektrophorese konstant bei 60°C. Das Gerät ist an einen PC gekoppelt, auf dem sich die entsprechende Steuerungs- und Auswertungssoftware befindet. Am PC werden die zur Analyse notwendigen Parameter eingestellt: Verwendetes Gelpolymer (POP4 oder POP6), Injektionszeit der Kapillare (in sec.), Temperatur der Heizplatte (60°C), Längenstandard (ILS600 oder ROX500, Laufzeit eines Analysevorgangs (in min.) und Filterset (abhängig von den verwendeten Primerfarbstoffen).

Die DNA-Fragmente werden elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und passieren einen Laser, der Lichtwellen bestimmter Wellenlänge (488, 514.5 nm) emittiert. Treffen die Lichtwellen auf die in die DNA-Fragmente eingebauten Farbstoffe (Fluophore), werden diese zur Fluoreszenz angeregt und beginnen Licht anderer Wellenlänge zu emittieren. Eine CCD-Kamera erfasst die Wellenlängenveränderungen und wandelt sie in elektronische Signale um (14).

Mit der entsprechenden Computer-Software (GeneScan, ©Applied Biosystems) können sie graphisch dargestellt und ausgewertet werden. Jeder Peak repräsentiert ein Allel der analysierten Genorte. Homozygote Allele werden als einzelne Peaks dargestellt, heterozygote als doppelte. Durch Vergleich der Peaks miteinander können Unterschiede oder Übereinstimmungen im „genetischen Profil“ der analysierten Proben gefunden werden. Der Vorteil der automatisierten Analyse von DNA liegt darin, dass die Arbeitsschritte automatisiert ablaufen. Es ist nicht mehr nötig, Probenmaterial auf Elektrophoresegele zu setzen. Dementsprechend ist die Fehlerquote durch Kontamination oder schlechte Beschaffenheit der Elektrophoresegele gering (10). Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass nur wenig Probenmaterial verwendet werden muss, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten (12).

3. Methoden

Aufgabenstellung: Ziel der Arbeit war es eine eigene Multiplexreaktion zu erstellen, die im Rechtsmedizinischen Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zur Durchführung von Abstammungsgutachten, insbesondere der Bearbeitung von Defizienzvaterschaften sowie zur Untersuchung von Mikrosatelliteninstabilitäten verwendet werden kann. Das untersuchte Material stammte aus DNA-Proben von im Institut durchgeführten Abstammungsgutachten. Bei der erstellten Reaktion handelt es sich um eine Multiplexreaktion mit neun Primersystemen und dem Geschlechtsmarker Amelogenin (Dekaplexreaktion): D10S2325, D12S391, Penta E, D7S1517, SE33, Penta D, Amelogenin, D8S1132, D17S976, FGA.

3.1 Chemikalien und Geräte

- Die Taq-Polymerase (Ampli-Taq-Goldpolymerase) sowie alle Reagenzien zur Durchführung der Kapillarelektrophorese stammten von Applied Biosystems, Foster City, CA.
- Sämtliche Primersysteme wurden von der MWG-Biotech AG, Ebenberg, Deutschland, bezogen.
- Proteinase K stammte von Roche Diagnostics, Basel, Schweiz.
- PCR Reaktionsgefäße, Pipetten und Zentrifugen stammten von Eppendorf, Hamburg, Deutschland.
- Die Thermocycler stammten von Biometra, Göttingen, Deutschland.
- Zur Sequenzierung wurde der Sequenzer ABI 310 Genetic Analyzer von Applied Biosystems, Foster City, CA verwendet
- Die zur Gelelektrophorese verwendeten Chemikalien stammten von Serra, Heidelberg, und Roth, Karlsruhe, Deutschland.

3.2 Auswahl der Genorte

Die Auswahl der einzelnen STR-Systeme folgte der Überlegung, die eigene Multiplexreaktion so zu konstruieren, dass kommerziell erhältliche Reaktionen hinsichtlich der statistischen Aussagekraft (PE, DP) sinnvoll ergänzt werden.

Locus Designation	Chromosome Location	Common Sequence Motif	Size Range (bp) ^a	Dye Label
D3S1358	3p	TCTA (TCTG) ₁₋₃ (TCTA) _n	114–142	5-FAM
vWA	12p12-pter	TCTA(TCTG) ₃₋₄ (TCTA) _n	157–209	5-FAM
D16S539	16q24-qter	(AGAT) _n	234–274	5-FAM
D2S1338	2q35–37.1	(TGCC) _n (TTCC) _n	289–341	5-FAM
Amelogenin	X: p22.1–22.3 Y: p11.2	—	107 113	JOE
D8S1179 ^b	8	(TCTR) _n ^c	128–172	JOE
D21S11	21q11.2–q21	(TCTA) _n (TCTG) _n [(TCTA) ₃ TA(TCTA) ₃ TCA (TCTA) ₂ TCCA TA] (TCTA) _n	187–243	JOE
D18S51	18q21.3	(AGAA) _n	26–345	JOE
D19S433	19q12–13.1	(AAGG)(AAAG)(AAGG)(TAGG) (AAGG) _n	106–140	NED
TH01	11p15.5	(AATG) _n	165–204	NED
FGA	4q28	(TTTC) ₃ TTTT TTCT (CTTT) _n CTCC (TTCC) ₂	215–353	NED

Abb.7: AmpFISTR SGM Plus Kit Loci (Applied Biosystems, 2005)

STR Locus	Label	Chromosomal Location	GenBank® Locus and Locus Definition	Repeat Sequence ¹ 5'→3'
Penta E	FL	15q	NA	AAAGA
D18S51	FL	18q21.3	HUMUT574	AGAA (21)
D21S11	FL	21q11–21q21	HUMD21LOC	TCTA Complex (21)
TH01	FL	11p15.5	HUMTH01, Human tyrosine hydroxylase gene	AATG (21)
D3S1358	FL	3p	NA	TCTA Complex
FGA	TMR	4q28	HUMFIBRA, Human fibrinogen alpha chain gene	TTTC Complex (21)
TPOX	TMR	2p23–2pter	HUMTPOX, Human thyroid peroxidase gene	AATG
D8S1179	TMR	8q	NA	TCTA Complex (21)
vWA	TMR	12p12–pter	HUMVWFA31, Human von Willebrand factor gene	TCTA Complex (21)
Amelogenin	TMR	Xp22.1–22.3 and Y	HUMAMEL, Human Y chromosomal gene for Amelogenin-like protein	NA
Penta D	JOE	21q	NA	AAAGA
CSF1PO	JOE	5q33.3–34	HUMCSF1PO, Human c-fms proto-oncogene for CSF-1 receptor gene	AGAT
D16S539	JOE	16q24–qter	NA	GATA
D7S820	JOE	7q11.21–22	NA	GATA
D13S317	JOE	13q22–q31	NA	TATC
D5S818	JOE	5q23.3–32	NA	AGAT

¹The August 1997 report (22,23) of the DNA Commission of the International Society for Forensic Haemogenetics (ISFH) states, "1) for STR loci within coding genes, the coding strand shall be used and the repeat sequence motif defined using the first possible 5' nucleotide of a repeat motif; and 2) for STR loci not associated with a coding gene, the first database entry or original literature description shall be used."

TMR = carboxy-tetramethylrhodamine

FL = fluorescein

JOE = 6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein

NA = not applicable

Abb.8: Powerplex© 16 System Loci (Promega, 2002)

Als Vergleichssystem wurde der Genort TH01 ausgewählt. Es handelt sich hierbei um eines der bekanntesten STR-Systeme, mit dem auch im Institut für Rechtsmedizin in Halle häufig gearbeitet wird. Die verwendeten Systeme sollten eine dem TH01 ähnliche oder bessere PE und DP aufweisen. Weiterhin gingen wir von dem Gedanken aus, Systeme mit kurzen, mittleren und langen Fragmentlängen zu kombinieren - ähnlich der Powerplex 16 oder SGM-Plus Reaktion - wobei zunächst STR-Systeme mit kurzen Fragmentlängen kombiniert wurden. Um zu erfahren, ob die Primer harmonisieren, also ob sich Artefakte (Primerdimer) bilden, wurden alle verwendeten Primer mit dem Computerprogramm Autodimer getestet ((©P.Vallone,<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>)).

Zuerst wurden die Systeme D7S1517, D8S1132, D1S1656 und D10S2325 jeweils in Duplex PCRs (2 STRs in einer PCR) miteinander amplifiziert (also z.B. D7S1517 und D8S1132 und D1S1656 und D10S2325). Dabei wurden publizierte Primer verwendet (28, 31, 34, 40, 41, 50, 57, 58). Bei der Wahl der Konzentration der verwendeten Reagenzien haben wir auf die Standards zurückgegriffen, die im Institut bei Einzelsystemen verwendet werden. Es wurde also immer die gleiche Menge an Puffer und Taq-Polymerase in das Reaktionsgemisch eingesetzt. Nach Ablauf der PCR wurde das Amplifikat zunächst auf ein Silbergel aufgetragen und eine Elektrophorese durchgeführt, um einen Amplifikationserfolg nachzuweisen. Dabei stellte sich heraus, dass das System D1S1656 nicht kompatibel zu den restlichen Loci war, wohingegen sich bei den Duplexreaktionen D7S1517 und D8S1132, D7S1517 und D10S2325 sowie D8S1132 und D10S2325 jeweils beide Genorte mit hoher Sensitivität amplifizieren ließen.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen erstellten wir eine Triplex Reaktion (3 STRs in einer PCR) aus den Loci D7S1517, D10S2325 und D8S1132, wobei wir jeden der 3 Loci mit einem unterschiedlichen Farbstoff markierten (D7S1517: JOE, D10S2325: Fluorescein und D8S1132:TAMRA) und die Produkte auf dem 310 Genetic Analyzer analysierten.

Dabei zeigte sich, dass hohe Primerkonzentrationen die Stärke von Artefakten erhöhen, weshalb die Konzentrationen schrittweise deutlich reduziert wurden. Nachdem dadurch ein stabiles, hochempfindliches PCR Assay konstruiert werden konnte, wurde zur anfänglichen aus oben genannten Primern bestehenden Triplexreaktion ein weiterer Primer eingesetzt. Da die Primer für D7S1517, D8S1132 und D10S2325 jeweils Produkte von ca. 120-180 bp Länge liefern und keine vierte Farbe zur Verfügung stand, wurden Systeme mit mittleren

Fragmentlängen eingesetzt, also ca. 200-300 bp Länge. Zunächst wurde daher das System SE33 (markiert mit JOE), dann das System D12S391 (markiert mit FL) und D17S976 (markiert mit TMR) eingesetzt. Während für die Systeme SE33 und D12S391 wiederum die publizierten Primer ohne Verlust der Sensitivität in die Multiplexreaktion integriert werden konnten, zeigte sich beim System D17S976 das Problem, dass die publizierten Primer eine zu geringe Sensitivität aufwiesen. Es war daher notwendig, einen neuen Primer zu konstruieren. Dies wurde dann auch mit Hilfe des Web-Primer-Programms durchgeführt. Im Anschluss daran verlief die nun erhaltene Hexaplexreaktion stabil.

Schließlich wurden noch STR-Systeme mit langen Fragmentlängen der Reaktion hinzugefügt. Dabei griffen wir auf die schon im Powerplex 16 Kit enthaltenen Systeme Penta E, Penta D und FGA zurück. Zuletzt wurden Primer für den Geschlechtsmarker Amelogenin hinzugefügt. Das Ergebnis war eine Multiplexreaktion, die über neun STR-Systeme verfügte, alle mit hoher PE und DP, die miteinander harmonisierten und gute Ergebnisse auf dem 310 Genetic Analyzer zeigten. Um zwischen X und Y-Chromosom unterscheiden zu können, haben wir als Geschlechtsmarker noch das STR-System Amelogenin in die Reaktion aufgenommen.

3.3 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte nach der Chelexmethode nach Walsh et al. Von den Blutproben werden auf 3 cm x 3 cm großen Baumwollstoffstücken Blutflecken angelegt. Diese wurden getrocknet (sog. Trockenblutspuren), um eine stabile langfristige Lagerung zu ermöglichen. Anschließend wurde ein 4 mm x 4 mm großes Stück herausgeschnitten und in ein 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Nach jeder Probe wurde die Schere und die Pinzette mit verdünntem Alkohol gereinigt, um eine Kontamination zu vermeiden. Die Baumwollstückchen verbleiben während der gesamten Extraktion im Eppendorf-Röhrchen. In jedes Eppendorf-Röhrchen wurden 700 µl steriles Aqua bidest. pipettiert. Die Ansätze wurden 30 min. bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 13000 upm für 2 min. zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde vorsichtig entnommen, so dass nur noch 20 µl im Eppendorf-Röhrchen verblieben. In jedes 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen wurden 190 µl 5%ige Chelexsuspension und 10 µl Proteinase K gegeben. Die Proben wurden für eine Extraktionsdauer von 30 min. unter leichtem Schütteln bei 56°C in einem Wasserbad inkubiert. Nach 30 min. wurden die Proben aus dem Wasserbad genommen und für 8 min. in

20

ein kochendes Wasserbad gestellt. Im Anschluss daran wurden die Proben entnommen und für 10 min. gekühlt (Kühlschrank). Dann wurden sie bei 13000 upm für 5 min. zentrifugiert. Der sich im Eppendorf-Röhrchen befindende Überstand enthielt dann die extrahierte DNA und konnte zur weiteren Analyse abgenommen werden.

3.4 PCR-Amplifikation

Für die Dekaplexreaktion wurden 9 Genorte (Abb.9) und der Geschlechtsmarker Amelogenin verwendet: D10S2325, D12S391, Penta E, D7S1517, SE33, Penta D, Amelogenin, D8S1132, D17S976, FGA (Abb.9). Es folgt eine Beschreibung der STR-Systeme (chromosomale Lokalisation, Primersequenz, STR-Sequenzen aus *Human BLAT Search*: <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>):

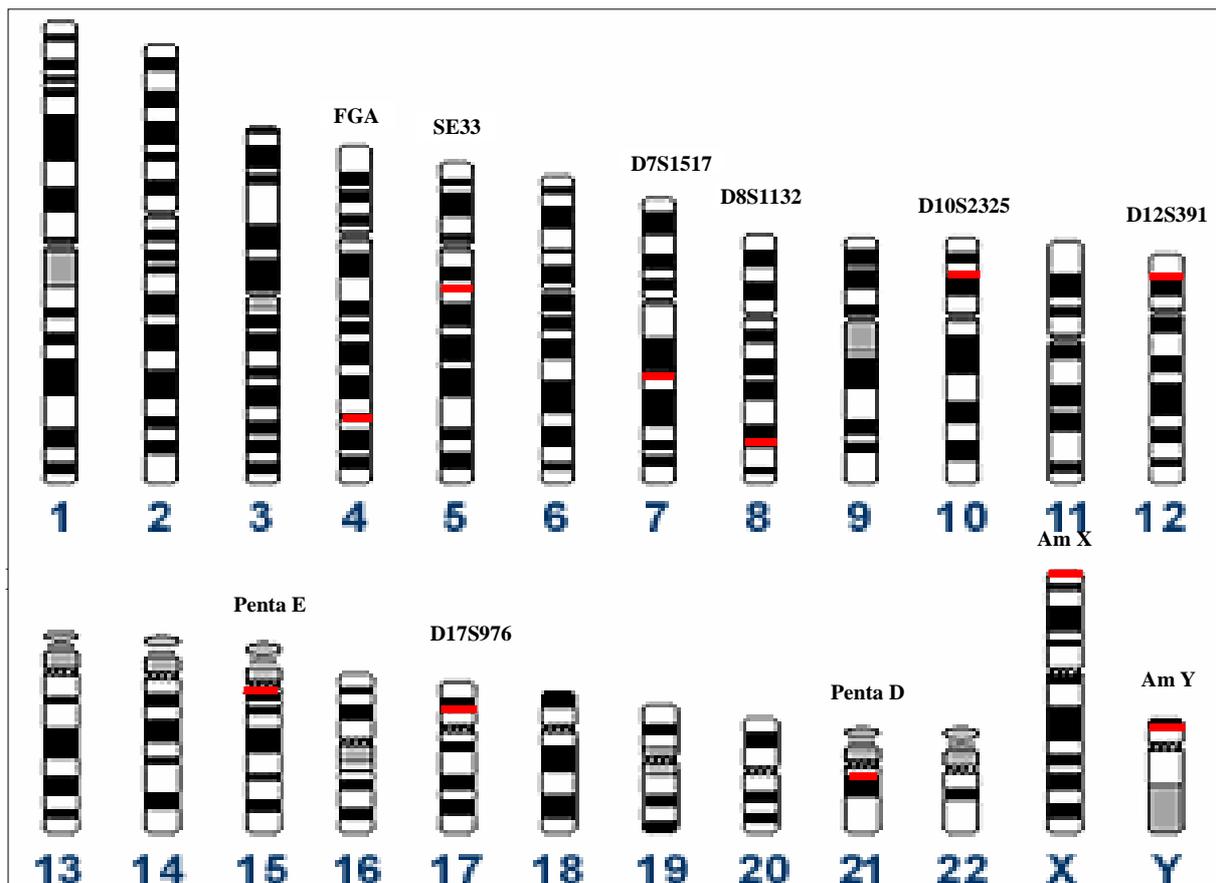


Abb.9: Schematische Darstellung der chromosomalen Lokalisation der verwendeten Mikrosatelliten

D10S2325

Chromosomale Lokalisation: 10p12

Primer 1: CTC ACG AAA GAA GCC TTC TG

Primer 2: GAG CTG AGA GAT CAC GCA CT

STR-Sequenz:

CTCACGAAAG AAGCCTTCTG AAGCCTTCTT ATCTTATCTT ATCTTATCTT
ATCTTATCTT ATCTTATCTT ATCTTATCTT ATCTTATCTT ATCTTATCTT
ATTGGGGGAG ACGGGCTCCG TCACCCAGGC TGAATGCAG TGGCGTGATC TCTCAGCTCA

D12S391

Chromosomale Lokalisation: 12p12

Primer 1: 5'-AAC AGG ATC AAT GGA TGC AT-3'

Primer 2: 5'-TGG CTT TTA GAC CTG GAC TG-3'

STR-Sequenz:

AACAGGATCA ATGGATGCAT AGGTAGATAG ATAGATAGAT AGATAGATAG
ATAGATAGAT AGATAGATAG ACAGACAGAC AGACAGACAG ACAGACAGAT
GAGAGGGGAT TTATTAGAGG AATTAGCTCA AGTGATATGG AGGCTGAAAA
ATCTCATGAC AGTCCATCTG CAAGCTGGAG ACCCAGGGAC ACTAGGAGCA
TGGCTCAGTC CAGGTCTAAA GCCA

Penta E

Chromosomale Lokalisation: 15q

Primer 1: ATT ACC AAC ATG AAA GGG TAC CAA TA

Primer 2: TGG GTT ATT AAT TGA GAA AAC TCC TTA CAA TTT

STR-Sequenz:

ATTACCAACAT GAAAGGGTAC CAATAACAAG AAAATTGTGG ACAGGTGCGG
TGATTCACGC CTGCAATCCT AGCACTTTGG GAGGCCGATG CAGGTGTATT
ACCTGAGCTC AGGAGATCAA GACCAGCCTG GGCAACATGG TGAAACCCCG
TCTCTACTAA AATACAAAAA ATTAGCTGGG TGTGGTGGTA GGCACCTGTA
ATCCCAGCTA CTCTGGAGGC TGAAACAGGA GAATCACTTG AACCCAGGAG
GTGGAGATTG AAGTGAGCCG AGATCACGCC ATTGCACTCC AGCCTGGGCG
ACTGAGCAAG ACTCAGTCTC AAAGAAAAGA AAAGAAAAGA AAAGAAAAATT
GTAAGGAGTT TTCTCAATTA ATAACCCA

Penta D

Chromosomale Lokalisation: 21q

Primer 1: GAA GGT CGA AGC TGA AGT G

Primer 2: ATT AGA ATT CTT TAA TCT GGA CAC AAG

STR-Sequenz:

ATTAGAATTC TTTAATCTGG ACACAAGTCC TTTTTTAGAT ATGTGATTAGAAG
TACTTTCTCT TAGCCTGTGG CGTGTCTTTT TACTTTCTTT ATAAGGTATC
TTTTGAAGAG TAGAACTTTT AAGTTTTGAT GAACTTACT TTATTATTAT
TTTTTAATAG GTCATGATTT TGTGATATCT AAGAAATATT TGCCTAACCT
ATGGTCATAA CGATTTTTTT GAGAAATTTT ACATTTATGT TTATGATTCT
CTTTTTTCC CCTTCGTTTT TTCTTTTCTT TTCTTTTCTT TTCTTTTCTT
TTCTTTTCTT TTCTTTTCTT TTCTTTTCTT TTCTTTTCTT TTTTCTTTC
TTGAGATGGT GTCTTGCTCT GTCACCTAGG CTGGAGTGTA GTGGTGTGAT
CATGGCTCAC TTCAGCTTCG ACCTTC

D7S1517

Chromosomale Lokalisation: 7q31

Primer 1: GTG ACC AAC TGA ATT ATG TTT TG

Primer 2: CAT CTT GCC AGC TGC CT

STR-Sequenz:

GTGACCAACT GAATTATGTT TTGTTTCTAT TGAAAGAAAG AAAGAAAGAA
AGAAAAGAAAG AAAGAAAGAA AGAAAAGAAAG AAAGAAAGAA AGAAACAAAC
AAAGAAAGAA ACAAAGAAAG **GCAGCTGGCA AGATGG**

D8S1132

Chromosomale Lokalisation: 8q23

Primer 1: GGC TAG GAA AGG TTA GTG GC

Primer 2: CCC CTC TTT CGA GCA AT

STR-Sequenz:

GGCTAGGAAA GGTTAGTGGC TTAATGTATT TGTTTTTCTC TCTTTTTTTC
TATCTATCTA TCTATCTATC TATCATCTAT CTATCTATCT ATCTATCTAT
CTATCTATCT ATCTATCTAT CTATCTATCT **ATTGCTCGAA AGAGAGAGGG**

SE33

Chromosomale Lokalisation: 5q14

Primer 1: AAT CTG GGC GAC AAG AGT GA

Primer 2: ACA TCT CCC CTA CCG CTA TA

STR-Sequenz:

AATCTGGGCG ACAAGAGTGA AACTCCGTCA AAAGAAAGAA
AGAAAGAGAC AAAGAGAGTT AGAAAAGAAAG AAAGAGAGAG
AGAGAGAAAG GAAGGAAGGA AGAAAAAGAA AGAAAAAGAA
AGAAAGAGAA AGAAAGAAAG AGAAAGAAAG AAAGAAAGAA
AGAAAGAAAG AAAGAAAGAA AGAAAGAAAA AGAAAGAAAG
AAAGAAAGAA AGAAAGAAAG AAAGAAAGAA AGAAAGAAAG
AAAGAAAGGA AGAAAGAAA GAGCAAGTTA CT**ATAGCGGT**
AGGGGAGATG T

D17S976

Chromosomale Lokalisation: .17p11

Primer 1: ATA TGC CAC CAC ACC TGG TT

Primer 2: TGG TAG CAT GCA TCT GTA GTC C

STR-Sequenz:

CAATCCTCCT GCCTCAGGCT CGCGAGTAGC TCGGACTATA GGT**ATATGCC ACCACACCTG**
GTTTTTTAAA TCAATCATCT ATCTATCTAT CTATCTATCT ATCTATCTAT CTATCTATCT
ATCTTATCTA TCCTATCTAT CTATCTATCT ATCTATCTAT CTATCTATCT ATCTATCTAA
GATGGAGTCT CACCCTGTAG CCCAAGCTGG AGTGCAGTGG TGCAATCTTG GCTCACTGCA
ACCTCTGCCT CCCATGCTCA AGCGATTCTC CCAAGTAGCT **GGGACTACAG ATGCATGCTA**
CCA

FGA

Chromosomale Lokalisation: 4q28

Primer 1: GGC TGC AGG GCA TAA CAT TA

Primer 2: ATT CTA TGA CTT TGC GCT TCA GGA

STR-Sequenz:

GGCTGCAGGG CATAACATTA TCCAAAAGTC AAATGCCCCA TAGGTTTTGA
ACTCACAGAT TAAACTGTAA CCAAAATAAA ATTAGGCATA TTTACAAGCT
AGTTTCTTTC TTTCTTTTTT CTCTTCTTTT CTTTCTTTCT TTCTTTCTTT
CTTTCTTTCT TTCTTTCTTT CTTTCTTTCT CCTTCCTTCC TTTCTTCCTT
TCTTTTTTGC TGGCAATTAC AGACAAATCA CTCAGCAGCT ACTTCAATAA
CCATATTTTC GATTTTCAGAC CGTGATAATA CCTACAACCG AGTGTCAGAG
GATCTGAGAA GCAGAATTGA AG**TCCTGAAG CGCAAAGTCA TAGAAT**

Amelogenin

Chromosomale Lokalisation: X, Y

Primer 1: ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG

Primer 2: CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG

Sequenz (X-Chromosom):

CCCT GGGCTCTGTA AAGAATAGTG TGTTGATTCT TTATCCCAGA TGTTTCTCAA GTGGTCCTGA
TTTTACAGTT CCTACCACCA **GCTTCCCAGT TTAAGCTCTGAT**

Sequenz (Y-Chromosom):

CCCT GGGCTCTGTA AAGAATAGTG GGTGGATTCT TCATCCCCAAA **TAAAGTGGTT** TCTCAAGTGG
TCCCAATTTT ACAGTTCCTA CCAT**CAGCTT CCCAGTTTAA GCTCTGAT**

(6bp Insertion gegenüber der Sequenz auf dem Y-Chromosom ist grau unterlegt)

Zur Durchführung der PCR wurde ein Mastermix erstellt. Forward- und Reverseprimer der einzelnen STR-Systeme wurden in hochreinem Wasser gelöst (Lösungsvolumen: 100 pmol/µl) und im Verhältnis 1:1 in einem Eppendorf-Röhrchen gemischt. Anschließend wurden pro Probe 1.25 µl Goldstar-Pufferlösung, Primer (Primer 1 + Primer 2, Konzentrationen siehe Tab.1) und 0.2 µl DNA-Polymerase (Ampli Taq Gold Polymerase) in ein 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben und bei 8000 upm für 1min. zentrifugiert. Pro Probe wurden 3.085 µl Mastermix in ein 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen gegeben. Nach Zugabe von 1 µl DNA wurde der Reaktionsansatz mit 8.415 µl Aqua bidest auf 12.5 µl Ansatzvolumen aufgefüllt.

Tab.1: Primerkonzentrationen

STR-Loci	Primerkonzentration in μM
D10S2325	1.2
D12S391	0.2
Penta E	1.6
D7S1517	1.2
Penta D	0.8
Amelogenin	0.24
D8S1132	0.64
D17S976	0.6
FGA	6.4
SE33	0.2

Um eine Kontamination mit Fremd-DNA erkennen zu können, wurde eine Leerkontrolle mitgeführt. Diese enthält anstelle der DNA 1 μl hochreines Wasser. Als Positivkontrolle dienen 2 μl DNA der Zelllinie K562. Die Proben wurden anschließend in einem Thermocycler (Biometra®) nach folgendem Protokoll amplifiziert (33 Zyklen, Programm 11, PP16 Multiplex):

<u>Denaturierung: 95°C für 11 min.</u>	
<u>10 Zyklen</u>	
Denaturierung	96°C für 1 min.
Annealing	60°C für 1 min.
Polymerisation	70°C für 1 min. 40sec.
<u>20 Zyklen</u>	
Denaturierung	90°C für 1 min.
Annealing	60°C für 1 min.
Polymerisation	70°C für 1 min. 40sec + 60°C für 30 min.
Abkühlen: 4°C	

3.5 Gelelektrophorese

Im Anschluss an die PCR wurden die Proben auf ein Polyacrylamidgel gesetzt und eine Elektrophorese mit folgenden Parametern durchgeführt: Laufzeit 30 min., angelegte Spannung 1000 V, Stromstärke 20 mA und Leistung 10 W. Danach wurde das Gel in eine Färbewanne gelegt und unter Schwenken des Laborschüttlers wie folgt behandelt (die Lösungen wurden nach jedem Schritt gewechselt):

1. Fixierung: 200 ml 2% HNO₃ für 3 min.
2. Spülung: 200 ml Aqua bidest für 3 min.
3. Färbung: 200 ml AgNO₃ (1 l Aqua bidest + 1.5 ml Formalin + 1 g AgNO₃) für 20 min.
4. Spülung: 200 ml Aqua bidest für 10 sec.
5. Entwicklung: 200 ml NA₂CO₃ (4°C) bis Banden sichtbar
6. Stoppen: 200 ml 7.5% Essigsäure (4°C) für 3 min.
- 7 Spülung: 200 ml Aqua bidest für 10 sec.
8. Imprägnieren: 200 ml 5% Glycerol für 3 min.
9. Lufttrocknung

Sichtbare Banden gelten als erfolgreicher Nachweis von amplifizierter DNA. Die Proben werden dann der kapillären Elektrophorese unterzogen.

3.6 Kapillarelektrophorese

Vor Durchführung der DNA-Fragmentanalyse, wurden die einzelnen Proben denaturiert. Hierzu wurde pro zu analysierender Probe in ein 0.5 ml Eppendorf-Röhrchen 12 µl Formamid, 0,8 µl Standard (ROX 500) und 2 µl Amplifikat pipettiert. Die Eppendorf-Röhrchen wurden bei 13000 upm für 1 min. zentrifugiert und anschließend im Thermocycler bei 94°C für 2 min. denaturiert. Danach wurden sie für 5 min. gekühlt (Kühlschrank 4°C). Im Anschluss daran wurden die Eppendorf-Röhrchen in das Elektrophoresegerät gestellt (ABI Prism 310 Genetic Analyzer). Die Parameter der Elektrophorese wurden über die Software kontrolliert: Jede Probe wurde bei einer Heizplattentemperatur von 60°C und einer

Laserstärke von 10mW analysiert. Es wurde eine Injektionszeit von 5 sec. und eine Laufzeit von 25 min. eingestellt. „GS STR POP 4“ wurde als Modul verwendet. Im Anschluss an die kapilläre Elektrophorese wurden die gelaufenen Proben mit dem Softwareprogramm Genescan (©Applied Biosystems) ausgewertet und graphisch dargestellt.

3.7 Optimierung der Dekaplexreaktion

3.7.1 Virtuelle Optimierung der Dekaplexreaktion mittels AutoDimer Software.

Die AutoDimer Software (©P.Vallone, <http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/AutoDimerHomepage/AutoDimerProgramHomepage.htm>) ist ein Public Domain Program, das entwickelt wurde, um eine große Zahl von Oligonucleotidprimerpaaren zur Optimierung von Multiplex PCR Ansätzen auf Interferenzen wie z.B. Primerdimer Bildung oder Selbstannealing („hairpins“) zu testen. Dadurch wird die Konstruktion von Multiplexreaktionen vereinfacht. Aus diesem Grund wurden die Primer der ausgesuchten Loci zuerst mit dieser Software auf Kompatibilität überprüft (Abb.10). AutoDimer vergleicht sämtliche Primer miteinander und sucht nach kompatiblen, also möglicherweise Dimere bildenden Sequenzen. Das Programm bestimmt die Sequenzhomologien. Für jede homologe Paarung wird ein Score von 1 vergeben. Wird die homologe Region von einem nicht homologen Basenpaar unterbrochen, wird ein Punkt vom Score abgezogen. Das Programm ist so voreingestellt, dass Primerpaare mit einem Score von 7 oder mehr identifiziert werden. Das Set von Primern, das von uns verwendet wurde, ergab kein einziges Mal einen Score von 7 oder mehr. Zwei Primerpaare ergaben einen Score von 6 (Der SE33-I Primer bindet an sich selbst und der FGA-I Primer an den D7S1517-I Primer (Abb. 10). Diese Dimere mit dem Score unter 7 werden jedoch als nicht schädlich eingestuft, insbesondere da der letztere Primerdimer bereits bei 41,3°C schmilzt. Hairpins wurden (wie erwartet) nicht gefunden. Die von uns gewählten Genorte und die publizierten Primer wurden daher aufgrund der virtuellen PCR Effizienztestung mit der AutoDimer Software als geeignet für die Etablierung einer Multiplexreaktion eingestuft.

Für D17S976 wurden neue Primer konstruiert. Dazu wurde die Sequenz des Polymorphismus und je 100 bp der flankierenden Regionen (GenBank: AADC01129041) in das Programm Web Primer (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>) eingegeben. Das Programm schlägt bis 250 neue Primerpaaren vor und reiht diese nach zu erwartender Effizienz. Letztlich wurde das Primerpaar gewählt, das laut Web Primer die beste Effizienz erwarten ließ, da es (siehe. Abb.10, „Neue Primer“) im AutoDimer Program eine geringe Interferenz mit den anderen Primerpaaren im Multiplex erwarten ließ. Als zusätzlicher positiver Effekt ist die Verkürzung der amplifizierten Fragmente um 59 bp zu erwähnen, wodurch höhere Sensitivität bei fragmentierter DNA zu erwarten ist.

3.7.2 PCR-Parameter

Anfangs wurde auf ein PCR-Schema zurückgegriffen, das im hiesigen Institut zur Amplifikation von Singleplex-PCRs für STRs wie TH01 oder FGA Verwendung findet. Für jede Reaktion wurde eine entsprechende Menge an $MgCl_2$, BSA (bovines Serumalbumin), Puffer, dNTPs, Primer und Taq-Polymerase eingesetzt.

Die erhaltenen Ergebnisse erwiesen sich jedoch als nicht verwertbar, da sich während der Analyse auf dem 310 Sequencer eine hohe Rate an Artefakten zeigte; oftmals war zuvor kein Amplifikationserfolg nachweisbar. Um Fehlerquellen zu reduzieren gingen wir dazu über, ein PCR-Schema zu verwenden, das auch bei kommerziellen Reaktionen benutzt wird. Es wurden nur noch GoldStar-Puffer, AmpliTaq Gold DNA Polymerase und die entsprechenden Primer in die Reaktionen eingesetzt.

$MgCl_2$, BSA und dNTPs (in der GoldStar-Pufferlösung sind sämtliche für eine suffiziente PCR notwendigen Reagenzien schon enthalten) wurden weggelassen.

Bei der Wahl der Polymerase (s.o.) orientierte wir uns an bei der Erstellung und Optimierung von Multiplexreaktionen aufgetretenen Erfahrungswerten. (48). Die von uns verwendete AmpliTaq Gold Polymerase weist eine höhere Hitzestabilität auf und lässt somit höhere Denaturierungstemperaturen zu. Dadurch lassen sich z.B. Matrizen mit G-C-reichen Regionen oder komplexen Sekundärstrukturen effektiv amplifizieren. Als besonders hilfreich erweist sich das Enzym – wie in unserem Fall – in kombinierten Reaktionsansätzen, in der in einer Reaktion zwei oder mehr DNA-Matrizen gleichzeitig amplifiziert werden (38). Sämtliche nach diesem Optimierungsschritt durchgeführten PCRs zeigten deutlich bessere Ergebnisse,

sowohl in Bezug auf die Gelelektrophorese als auch nach Analyse auf dem 310 Genetic Analyzer. Auch bei Durchführung der PCR wurde festgestellt, dass sich die Wahl der Denaturierungstemperatur sowie Variation von Aufheiz- und Abkühlungsschritten durchaus auf Ergebnis und Qualität der Multiplexreaktion auswirken.

Bei einer Denaturierungstemperatur zwischen 94°C und 96°C - das Optimum der Temperatur liegt für die verwendete Polymerase bei 95°C (54) - wurden Annealing- und Polymerisationstemperaturen sowie die entsprechenden Zeiten verändert. Die Annealingtemperatur wurde in einer Temperaturspanne von 55°C bis 64°C variiert. Hierbei stellte sich heraus, dass eine Temperatur von 60°C am geeignetsten war. Die Polymerisationszeit wurde bei fester Temperatur von 70°C von 1 min. auf 1 min.30 sec. und schließlich 1 min.40 sec. erhöht, was ebenfalls zur Verbesserung der PCR beitrug. Ziel war auch hier ein positiver Nachweis von amplifizierter DNA aller Loci in der Elektrophorese sowie stabile und artefaktfreie Ergebnisse auf dem 310 Genetic Analyzer.

3.7.3 Fragmentlängendetektion

Es wurden nicht nur an der PCR Optimierungen vorgenommen, sondern auch am 310 Genetic Analyzer. Dieses Gerät lässt es in begrenztem Maße zu, über die Steuerungssoftware die Parameter eines Analyselaufes zu verändern und somit bessere Ergebnisse zu erzielen.

Nach Amplifikation der extrahierten DNA und positivem Amplifikationsnachweis in der Gelelektrophorese, wurden die Amplifikate zur Sequenzierung auf den 310 Genetic Analyzer geladen. Anfangs verwendeten wir wie bei der PCR Standardeinstellungen, wie sie auch im Institut bei kommerziell erhältlichen Multiplexkits benutzt werden. Dabei zeigte sich, dass in der graphischen Auswertung manchmal zusätzliche Signale auftraten, die um ein oder zwei Wiederholungseinheiten vom Hauptallel abweichen. Es wurde beobachtet, dass diese als „Stotterpeaks“ oder „Stotterbanden“ bezeichneten Artefakte sehr stark ausgeprägt waren, wenn auch die Hauptallele zu starke Signale aufwiesen. Bei Auftragen von großen Mengen Amplifikationsprodukt traten unruhige Basislinien und Hintergrundrauschen in der graphischen Auswertung auf.

Es zeigte sich, dass sich diese Artefaktbildung durch schrittweise Reduzierung der Menge an eingesetzter Template -DNA von 2 µl auf 1 µl minimieren (Abb.11), jedoch nicht ganz vermeiden lässt.

Ebenso wirkte sich eine Reduzierung der Injektionszeit pro Probe von 10 sec. auf 5 sec. positiv auf das graphische Endergebnis aus. Es konnte die Zahl an Stotterpeaks und das Auftreten von Hintergrundrauschen deutlich reduziert werden.

Bei der Wahl des Längenstandards zeigte sich, dass die beiden zur kommerziellen STR-Multiplex-Analyse benutzten Längenstandards ILS 600 und ROX 500 beide zur Sequenzierung ohne Qualitätsunterschiede verwendet werden können.

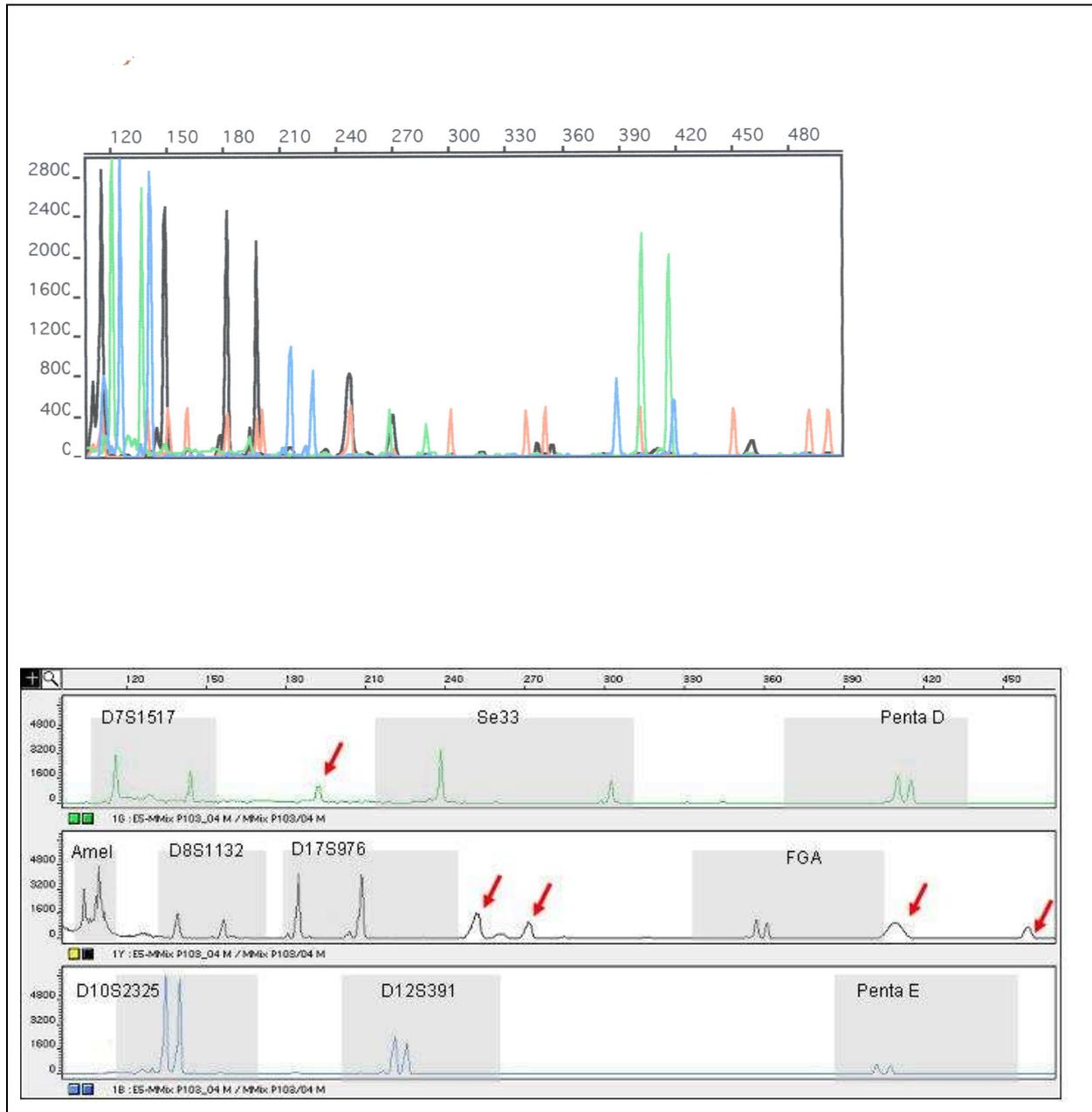


Abb.11.: Dekomplexreaktion nach Optimierung der Laufparameter und Artefaktbildung in Detailansicht; bei den mit roten Pfeilen markierten Peaks im unteren Teil von Abb.11 handelt es sich um Artefakte, die jedoch in keiner Weise mit der Sequenzierung interferieren.

4. Ergebnisse

In der erstellten Dekaplexreaktion wurden 9 STR-Loci verwendet. Es handelte sich hierbei um die Loci D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D17S976, Penta E, Penta D, FGA, SE33 (ACTP2) und Amelogenin (Marker zur Geschlechtsbestimmung). Die verwendeten STR-Loci entsprachen den allgemeinen Vaterschaftsrichtlinien. Jeder STR-Locus wurde an 110 Personen aus dem Raum Halle/Saale untersucht. Die Berechnung von forensischen Effizienzparametern erfolgte mit der PowerStatsV1.2 Software (©Promega Cooperation). Dabei wurden erwartete Heterozygotität (exp.h), Power of Discrimination (DP) und Power of exclusion (PE) nach folgenden Formeln berechnet (5, 6, 25):

H = Homozygote

h = Heterozygote

G_i = Häufigkeit von Proben für Allel „i“

$P_{i,i}$ = Häufigkeit von Proben homozygot für Allel „i“

$$\text{Power of Discrimination (PD)} = 1 - \sum G_i^2 \quad (53)$$

$$\text{Power of exclusion (PE)} = h^2(1 - 2 \cdot h \cdot H^2) \quad (53)$$

$$\text{Erwartete Heterozygotität (exp.h)} = \sum P_{i,i}^2$$

Weiterhin wurde für jedes Allel der untersuchten Genorte die Allelfrequenz berechnet. Beim System D7S1517 wurden erfolgreich 110 Personen analysiert. Es wurden 11 Allele (Allel 18 – Allel 28) beobachtet. Hierbei waren das Allel 21 mit 14% Häufigkeit, das Allel 24 mit 14,5% und das Allel 25 mit 23,6% die häufigsten (Tab.2). Es wurde eine PE von 0.67, eine DP von 0.96 und eine exp.h von 0.86 berechnet.

Ebenso verhält es sich beim System D8S1132. Es wurden 110 Personen getestet, wobei 9 Allele (Allel 17-25) beobachtet wurden. Die Allele 18, 19 und 22 kamen am häufigsten vor (Allel 18: 24%, Allel 19: 13,6%, Allel 22: 15%) (Tab.9). Es wurde eine PE von 0.69, eine DP von 0.96 und eine exp.h von 0.86 berechnet.

Beim System D10S2325 wurden erfolgreich 110 Personen analysiert. Es wurden 10 Allele (Allele 7 - 16) beobachtet. Hierbei waren das Allel 13 mit 19,5% Häufigkeit und die Allele 10

und 12 mit 15,9% die häufigsten (Tab.3). Es wurde eine PE von 0.76, eine DP von 0.95 und eine exp.h von 0.86 berechnet.

Beim System D12S391 wurden erfolgreich 110 Personen analysiert. Es wurden 13 Allele (Allele 15, 16, 16.3, 17, 18, 19, 19.3, 20, 21, 22, 23, 24, 25) beobachtet. Hierbei waren das Allel 18 mit 18,6% Häufigkeit, das Allel 19 mit 14% und das Allel 20 mit 13,1% die häufigsten (Tab.4). Es wurde eine PE von 0.71, eine DP von 0.97 und eine exp.h von 0.87 berechnet.

Beim System Penta D wurden erfolgreich 110 Personen analysiert. Es wurden 9 Allele (Allele 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16) beobachtet. Hierbei waren das Allel 13 mit 25,9% Häufigkeit, das Allel 9 mit 22,7% und das Allel 12 mit 19,5% die häufigsten (Tab.5). Es wurde eine PE von 0.71, eine DP von 0.92 und eine exp.h von 0.81 berechnet.

Beim System Penta E wurden erfolgreich 110 Personen analysiert. Es wurden 14 Allele (Allele 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19, 20) beobachtet. Hierbei waren das Allel 12 mit 18,2% Häufigkeit, das Allel 7 mit 15,5% und das Allel 5 mit 12,2% die häufigsten (Tab.6). Es wurde eine PE von 0.78, eine DP von 0.96 und eine exp.h von 0.86 berechnet.

Beim System FGA wurden erfolgreich 110 Personen analysiert. Es wurden 12 Allele (Allele 18, 19, 20, 21, 22, 23, 23.2, 24, 25, 26, 27, 28) beobachtet. Hierbei waren das Allel 20 mit 20,9% Häufigkeit, das Allel 21 mit 19,5% und das Allel 22 mit 16,8% die häufigsten (Tab.7). Es wurde eine PE von 0.68, eine DP von 0.94 und eine exp.h von 0.87 berechnet.

Beim System SE33 wurden erfolgreich 110 Personen analysiert. Es wurden 30 Allele (Allele 13, 14, 14.2, 15, 15.2, 16, 17, 18, 19, 19.2, 20, 20.2, 21, 21.2, 22, 22.2, 23, 23.2, 24.2, 25.2, 26.2, 27, 27.2, 28.2, 29.2, 30.2, 31.2, 32.2, 33.2, 34.2) beobachtet. Hierbei waren die Allele 17 und 18 mit 7,7% Häufigkeit und die Allele 19 und 20 mit 6,8% die häufigsten (Tab.8). Es wurde eine PE von 0.89, eine DP von 0.99 und eine exp.h von 0.95 berechnet.

Beim System D17S976 wurden erfolgreich 110 Personen analysiert. Es wurden 27 Allele (Allele 19.3, 20, 20.3, 21, 21.3, 22, 22.3, 23, 23.3, 24, 25, 25.3, 26, 26.3, 27, 27.3, 28.3, 29.3, 30, 30.3, 31.3, 32.3, 33, 33.3, 34, 35, 36) beobachtet. Hierbei waren die Allele 19.3 mit 14,5% Häufigkeit und die Allele 22, 24 und 27.3 mit 7,7% die häufigsten (Tab.10). Es wurde eine PE von 0.80, eine DP von 0.99 und eine exp.h von 0.93 berechnet.

Gesamt-PE und Gesamt-DP der erstellten Dekaplexreaktion wurden nach folgender Formel berechnet: $1/1+(1-x_1)*(1-x_2)*(1-x_3)$ etc., wobei für x die jeweilige DP bzw. PE des entsprechenden Genortes eingesetzt wurde. Als DP wurde 0.9999999, als PE 0.9999968 berechnet. Anhand statistischer Vergleiche (Lins et al, 1996) mit dem kommerziell

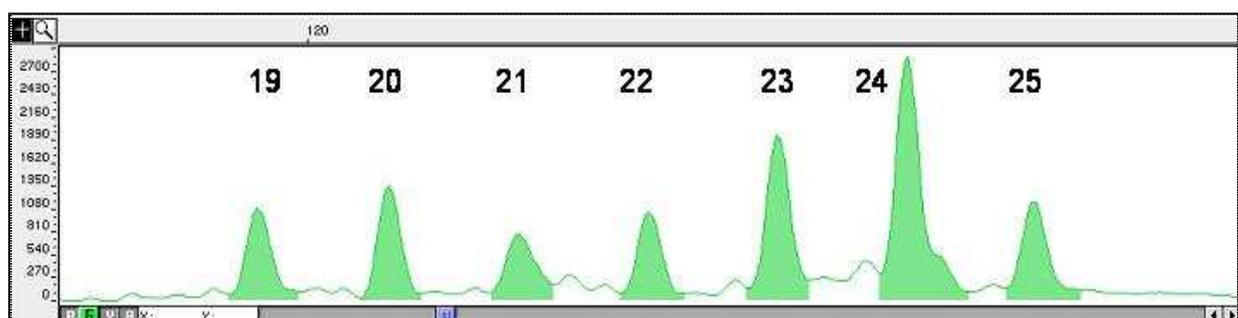
erhältlichen Poweplex 16 Kit lässt sich aufzeigen, dass die erstellte Dekaplexreaktion zumindest im gleichen Maße aussagekräftig ist wie die PP16-Reaktion.

Es folgen die berechneten Allelfrequenzen der einzelnen Genorte sowie die für jeden Genort erstellte Allelleiter:

Tab.2: STR-Allelfrequenzen Genorts D7S1517

STR	D7S1517 n = 110
Allel	Allelfrequenzen
18	0.031
19	0.104
20	0.100
21	0.140
22	0.109
23	0.072
24	0.145
25	0.236
26	0.036
27	0.018
28	0.004
PE	0.67
DP	0.96
Exp. Heterozygotität	0.86

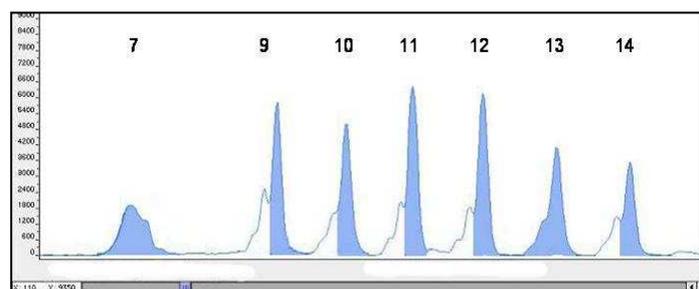
Allelleiter Genort D7S1517



Tab.3: STR-Allelfrequenzen des Genorts D10S2325

STR	D10S2325 n = 110
Allel	Allelfrequenzen
6	
7	0.127
8	0.050
9	0.086
10	0.159
11	0.140
12	0.159
13	0.195
14	0.059
15	0.018
15.3	
16	0.004
16.3	
17	
17.3	
18	
18.3	
19	
19.3	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
PE	0.76
DP	0.95
Exp. Heterozygotität	0.86

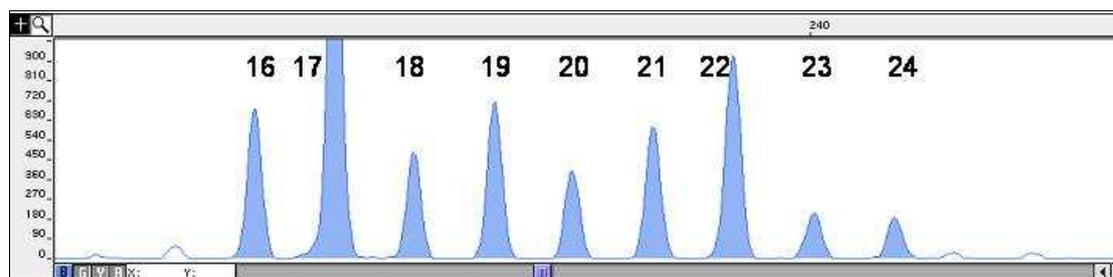
Allelleiter des Genorts D10S2325



Tab.4: STR-Allelfrequenzen des Genorts D12S391

STR	D12S391 n = 110
14	
15	0.027
15.3	
16	0.032
16.3	0.004
17	0.095
17.3	
18	0.186
18.3	
19	0.140
19.3	0.004
20	0.131
21	0.100
22	0.113
23	0.082
24	0.054
25	0.027
26	
PE	0.71
DP	0.97
Exp. Heterozygotität	0.87

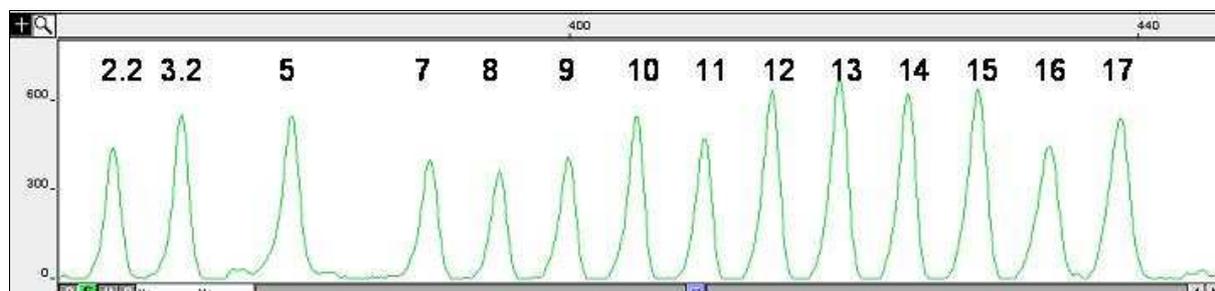
Allelleiter Genort D12S391



Tab.5: STR-Allelfrequenzen des Genorts Penta D

STR	Penta D n = 110
Allel	Allelfrequenzen
7	
8	0.018
9	0.227
10	0.113
11	0.136
12	0.195
13	0.259
14	0.031
15	0.009
16	0.009
PE	0.71
DP	0.92
Exp.Hetero	0.81

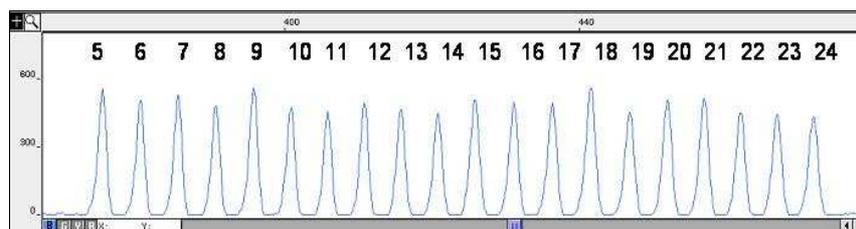
Allelleiter Genort Penta D



Tab.6: STR-Allelfrequenzen des Genorts Penta E

STR	Penta E n=110
Allel	
5	0.122
6	
7	0.155
8	0.023
9	0.014
10	0.104
11	0.090
12	0.182
13	0.100
14	0.055
15	0.055
16	0.041
17	0.045
18	
19	0.004
20	0.009
PE	0.78
DP	0.96
Exp. Heterozygotität	0.86

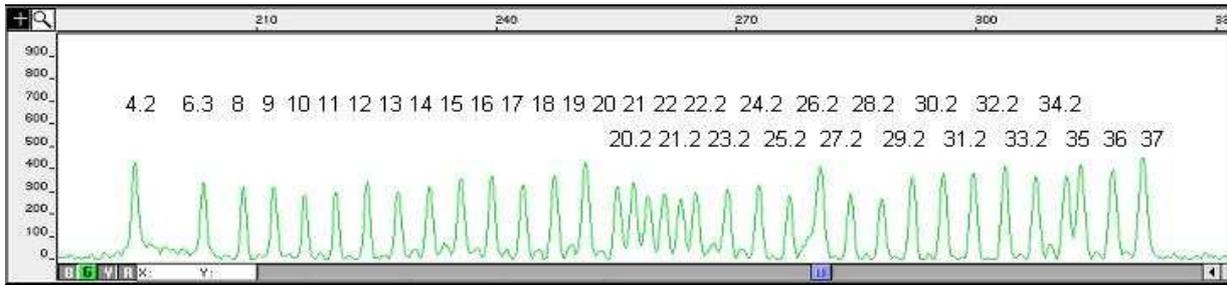
Allelleiter des Genorts Penta E



Tab.8: STR-Allelfrequenzen des Genortes SE33

STR	SE33 n = 110
Allel	
13	0.004
14	0.036
14,2	0.004
15	0.050
15,2	0.004
16	0.040
17	0.077
18	0.077
19	0.068
19,2	0.004
20	0.068
20,2	0.009
21	0.030
21,2	0.018
22	0.014
22,2	0.027
23	0.009
23,2	0.045
24,2	0.027
25	
25,2	0.036
26	
26,2	0.045
27	0.004
27,2	0.077
28	
28,2	0.068
29,2	0.063
30,2	0.040
31,2	0.009
32,2	0.014
33,2	0.027
34,2	0.004
PE	0.89
DP	0.99
Exp. Heterozygotität	0.95

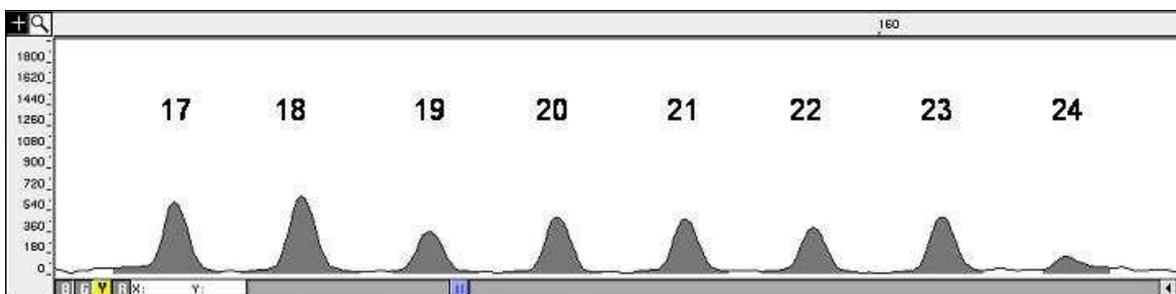
Allelleiter des Genorts SE33



Tab.9: STR-Allelfrequenzen des Genorts D8S1132

STR	D8S1132 n = 110
Allel	Allelfrequenzen
17	0.077
18	0.240
19	0.136
20	0.104
21	0.122
22	0.150
23	0.100
24	0.050
25	0.018
PE	0.69
DP	0.96
Exp. Heterozygotität	0.86

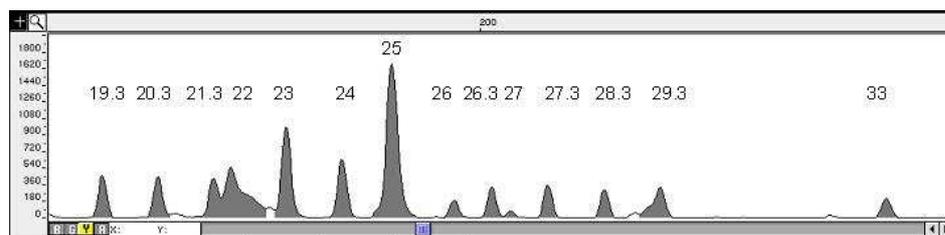
Allelleiter Genort D8S1132



Tab.10: STR-Allelfrequenzen und Allelleiter des Genorts D17S976

STR	D17S976 n = 110
Allel	Allelfrequenz
19,3	0.145
20	0.023
20,3	0.027
21	0.014
21,3	0.059
22	0.077
22,3	0.018
23	0.122
23,3	0.004
24	0.077
25	0.041
25,3	0.014
26	0.027
26,3	0.054
27	0.014
27,3	0.077
28,3	0.054
29,3	0.032
30	0.004
30,3	0.036
31,3	0.009
32,3	0.023
33	0.014
33,3	0.009
34	0.009
35	0.004
36	0.004
PE	0.80
DP	0.99
Exp. Heterozygotität	0.93

Allelleiter des Genorts D17S976



5. Praktische Anwendung

Die hier vorgestellte Dekaplexreaktion wurde konzipiert um ein Instrument zur Verfügung zu haben, mit dem komplizierte Vaterschaftsfälle gelöst werden können, bei denen kommerziell erhältliche Multiplexreaktionen alleine ungenügende Ergebnisse liefern. Es handelt sich dabei in erster Linie darum, dass anstatt des verstorbenen Putativvaters dessen Verwandte in die Testung einbezogen werden müssen (Defizienzfälle) oder um Fälle mit Mutationen. Am Institut für Rechtsmedizin in Halle tritt eine solche Konstellation etwa 5 mal im Jahr auf. In all diesen Fällen hat sich erwiesen, dass die erstellte Dekaplexreaktion einen wesentlichen Beitrag zur Lösung leistet.

Im Folgenden sollen drei Beispiele angeführt werden.

5.1 Anwendung der Dekaplexreaktion bei Mutationen

5.1.1 Ein Vaterschaftsfall mit zwei isolierten Ausschlüssen: Mutation oder Ausschluss der Vaterschaft?

In einem regulären Vaterschaftsfall (Mutter, Kind und Putativvater) wurden die 15 STRs des Powerplex 16 Kits getestet (Tab.11).

In 13 dieser Systeme war der Putativvater eingeschlossen, in zwei Systemen (FGA und VWA) wies er jedoch das obligatorisch väterlich vererbte Allel nicht auf, jedoch jeweils Allele, die sich nur um eine Wiederholungseinheit unterschieden (Abb.12). Die Kriterien für einen eindeutigen Vaterschaftsausschluss (Ausschlüsse an 3 voneinander unabhängigen Genorten) sind demnach nicht erfüllt.

Zur Erklärung bietet sich folgende Alternative an:

Entweder der Putativvater ist Erzeuger des Kindes, dies würde allerdings das extrem seltene Auftreten von 2 Mutationen voraussetzen.

Oder nicht der Putativvater, sondern ein naher Verwandter desselben, in erster Linie ein Bruder, käme als Erzeuger in Frage.

Nach Essen-Möller (23) lässt sich eine Vaterschaftswahrscheinlichkeit W von 99,9988% aus den 13 Genorten mit Einschlüssen errechnen. Bei Einschluss der mutierten Loci und der

konservativen Annahme einer Mutationshäufigkeit von 0,1% (7) sinkt die Vaterschaftswahrscheinlichkeit hingegen auf lediglich 7,60%.

Eine Klärung ist nur durch Einbeziehen weiterer Genorte möglich. Nach Typisierung der Genorte im vorgestellten Multiplex (Tab.12, Abb.13) wird für alle 6 neu bestimmten Loci ein Vaterschaftseinschluss festgestellt (Penta D, Penta E und FGA wurden bereits mit dem Powerplex 16 Kit bestimmt). Da diese 6 Genorte ausgesprochen hochpolymorph sind, erhöht sich die Vaterschaftswahrscheinlichkeit nunmehr auf über 99,9% und genügt somit den in den Richtlinien der Bundesärztekammer festgelegten Anforderung (11) für die Feststellung, dass „die Vaterschaft praktisch erwiesen“ ist.

Tab.11: Ergebnisse für den Vaterschaftsfall mit zwei Mutationen mit dem Powerplex 16 Kit

Genort	Allele Kind	Allele Mutter	Allele Beklagter
D3S1358	16/18	16/18	15/16
TH01	7/9	7/9	6/9
D21S11	29/29	29/30	29/29
D18S51	16/19	13/19	13/16
Penta E	7/14	13/14	7/9
D5S818	10/12	10/12	10/11
D13S317	8/13	8/13	8/11
D7S820	11/11	11/11	8/11
D16S539	9/13	11/13	9/11
CSF1PO	10/11	10/13	11/11
Penta D	9/10	10/12	9/10
VWA	17/18	17/17	16/17
D8S1179	14/14	14/14	13/14
TPOX	8/8	8/12	8/8
FGA	21/21	21/23	22/23

Tab.12: Ergebnisse für den Vaterschaftsfall mit zwei Mutationen mit der Dekaplexreaktion

Genort	Allele Kind	Allele Mutter	Allele Beklagter
SE33	17/24.2	17/22.2	23.2/24.2
Penta D	9/10	10/12	9/10
Penta E	7/14	13/14	7/9
FGA	21/21	21/23	22/23
D7S1517	19/19	19/24	19/24
D10S2325	7/10	10/12	7/12
D8S1132	20/22	20/22	22/24
D12S391	20/23	15/20	16/23
D17S976	26.3/26.3	26.3/33	24.3/26.3

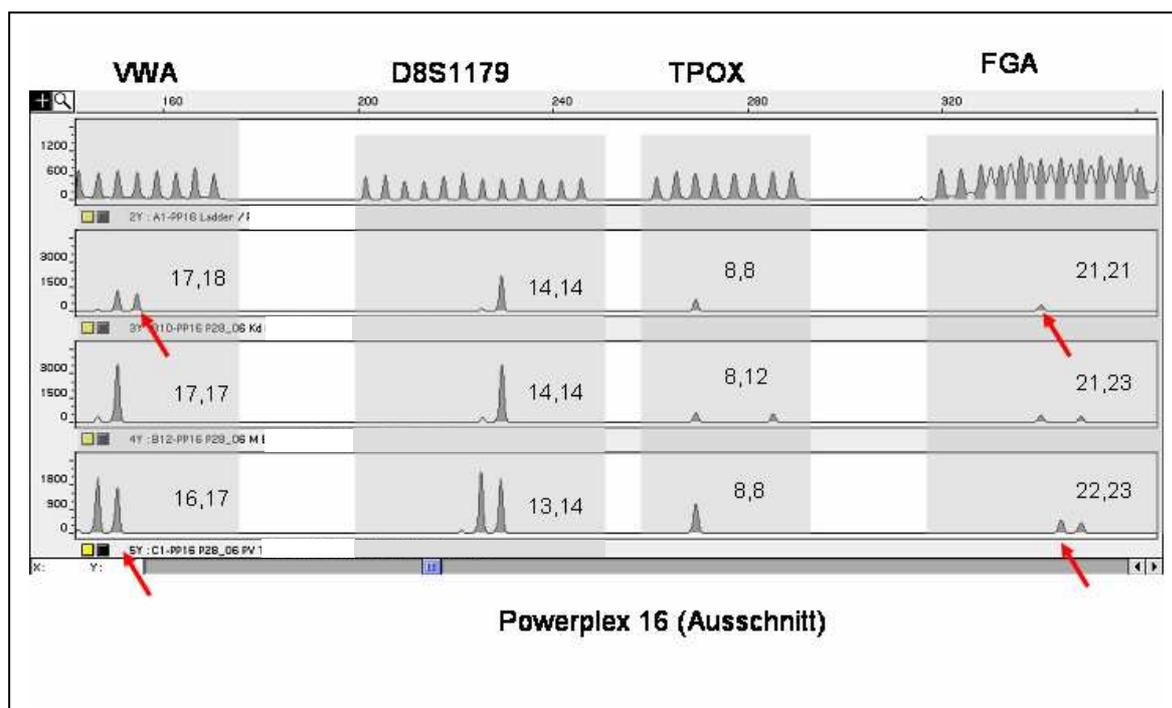


Abb.12: Analyse der Genorte VWA, D8S1179, TPOX und FGA mit dem Powerplex 16 Kit (von oben nach unten: Allelleiter, Kind, Mutter, Putativvater)

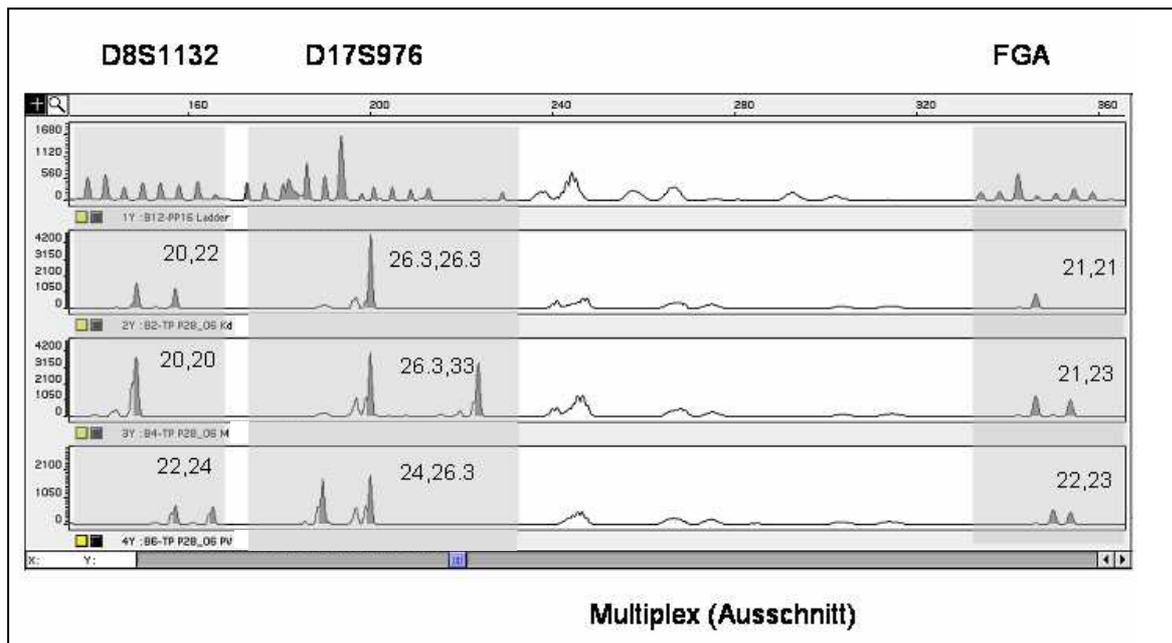


Abb.13: Analyse der Genorte D8S1132, D17S976 und FGA mit der Dekaplexreaktion (von oben nach unten: Allelleiter, Kind, Mutter, Putativvater)

Im Genort vWA (Abb.12) weisen das Kind die Allele 17/18, die Mutter die Allele 17/17 und der Putativvater die Allele 16/17 auf. Das Allel 17 kann von Putativvater oder Kindesmutter an das Kind weitervererbt worden sein. Das Allel 18 muss aus einer Mutation entstanden sein. Ebenso verhält es sich beim Genort FGA (Abb.12).

5.1.2 Ein Vaterschaftsfall mit 5 Brüdern als Putativväter

Die Kindesmutter gab W.N. als vermutlichen Vater an, räumte jedoch ein, dass auch alle 4 Brüder des Putativvaters als Erzeuger in Frage kämen.

W.N. wies in allen 15 Genorten des Powerplex 16 Kits das obligat väterlich vererbte Allel auf (Tab.13). Er kam daher als Erzeuger des Kindes in Frage. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte eine Vaterschaftswahrscheinlichkeit von weit über den geforderten 99,9% errechnet werden (99,9999994%). allerdings fiel auf, dass einer der Brüder (P.N.) lediglich im System D3S1358 als Erzeuger auszuschliessen war, wohingegen er in allen anderen 14 Systemen eingeschlossen war. Bei Annahme einer Mutationshäufigkeit von ca. 0,1% errechnete sich daher eine Vaterschaftswahrscheinlichkeit von 99,998% für P.N..

Da nach den derzeit gültigen Richtlinien für die Erstattung von Abstammungsgutachten (11) ein sicherer Ausschluss der Vaterschaft nur dann möglich ist, wenn Ausschlüsse an mindestens 3 Genorten gefunden werden, erlaubte die Analyse mit dem Powerplex 16 Kit lediglich die Aussage, dass die Vaterschaft des W.N. wahrscheinlicher ist als die des P.N.. Eine eindeutige Aussage war jedoch nicht möglich.

Erst nach Typisierung der Dekaplexreaktion konnte die Vaterschaft des W.N. zweifelsfrei bewiesen werden: Nunmehr war W.N. in allen 21 STRs eingeschlossen, wohingegen für P.N. 4 weitere Ausschlüsse gefunden wurden (Tab.14).

Tab.13: Ergebnisse für den Vaterschaftsfall mit 5 Putativvätern für den Powerplex 16 Kit

Genorte	Allele J.N. Kind	Allele M.N. Mutter	Allele W.N. Putativ- vater 1	Allele S.N. Putativ- vater 2	Allele P.N. Putativ- vater 3	Allele E.N. Putativ- vater 4	Allele E.S. Putativ- vater 5
D3S1358	18/18	16/18	17/18	14/15	14/15	15/17	17/18
TH01	9/9,3	8/9	9,3/9,3	9,3/9,3	9,3/9,3	9,3/9,3	9,3/10
D21S11	27/28	27/30	28/30	28/30	28/30	28/30	30/30
D18S51	15/17	16/17	14/15	12/15	12/15	14/15	12/15
D5S818	12/13	12/13	12/12	9/10	12/12	12/12	9/10
D13S317	8/11	9/11	8/11	10/12	8/11	10/11	10/12
D7S820	8/10	8/8	10/10	9/10	10/10	10/10	10/10
D16S539	8/13	9/13	8/14	11/14	8/14	11/14	11/14
CSFIPO	11/11	11/12	11/13	10/12	11/13	11/13	12/13
VWA	16/18	16/17	15/18	15/18	15/18	18/19	15/18
D8S1179	13/15	13/13	14/15	11/12	12/15	14/15	12/15
TPOX	8/9	8/9	8/11	8/11	8/8	8/8	8/11
FGA	20/24	20/21	24/24	23/24	24/24	24/25	24/24
Penta E	15/16	13/15	7/16	7/12	7/16	7/12	7/16
Penta D	9/11	9/10	11/12	12/12	11/12	11/12	11/12

Tab.14: Ergebnisse für den Vaterschaftsfall mit 5 Putativvätern für die Dekaplexreaktion

Genorte	Allele J.N. Kind	Allele M.N. Mutter	Allele W.N. Putativ- vater 1	Allele S.N. Putativ- vater 2	Allele P.N. Putativ- vater 3	Allele E.N. Putativ- vater 4	Allele E.S. Putativ- vater 5
D7S1517	19/24	24/25	19/20	25/26	25/26	19/20	20/25
D12S391	17/18	15/18	17/17	17/18	17/18	16/18	17/18
D8S1132	18/18	18/22	18/21	18/21	20/21	18/21	18/18
D10S2325	7/12	7/7	12/12	11/12	12/12	12/12	12/12
SE33	17/27,2	17/17	17/27,2	17/29,2	17/29,2	27,2/27,2	27,2/29,2

5.2 Beispielhafte Anwendung der Dekaplexreaktion bei Defizienzfällen

Eine in der DDR geborene Frau hatte berechtigten Grund für die Annahme, dass ein vor über 10 Jahren verstorbener Westdeutscher ihr Vater wäre, auch wenn dieser die Vaterschaft offiziell nie anerkannt hatte. Sie strengte daher einen Prozess an, bei dem DNA des Putativvaters nicht zur Verfügung stand („Defizienzfall“). Es wurden möglichst viele Verwandte des Verstorbenen in die Testung einbezogen. Zur Verfügung standen die Klägerin, ihre Mutter, Nichte und Neffe des Verstorbenen (die Kinder seiner ebenfalls verstorbenen Schwester) sowie deren Vater (Abb.14).

Die Testung erstreckte sich zuerst auf die Systeme des Powerplex 16 Kits (Tab.15). Unter Verwendung dieser Werte konnte durch einen Biostatistiker nach Essen-Möller eine Vaterschaftswahrscheinlichkeit von lediglich 68,44% errechnet werden.

Dies erlaubt aber keine verlässliche Aussage über die Vaterschaft (Indifferenzbereich).

Nach Typisieren der hier vorgestellten Dekaplexreaktion (Tab.16) ergab sich, dass die Ergebnisse für die Systeme D8S1132, D7S1517, D10S2325 und insbesondere D17S976, in denen das sehr seltene obligatorisch väterlich ererbte Allel des Kindes im rekonstruierten Genotyp der Schwester des Verstorbenen erschien, auf eine Vaterschaft hindeuteten.

Durch Einbeziehung der Ergebnisse der Dekaplexreaktion erhöhte sich die biostatistische Vaterschaftswahrscheinlichkeit auf über 99,87%.

Durch weiteres Einbeziehen von 3 X-chromosomalen Systemen (DXS6800, DXS101 und DXS8377) konnte die Vaterschaftswahrscheinlichkeit schliesslich auf 99,95% erhöht werden. Die Putativvaterschaft galt damit als „praktisch erwiesen“.

Tab.15: Ergebnisse für den Defizienzfall mit dem Powerplex 16 Kit

Genorte	P.M. Allele Klägerin	I.M. Allele Mutter der Klägerin	K.S. AlleleTochter der Schwester des verstorbenen Putativvaters	J.B. AlleleSohn der Schwester des verstorbenen Putativvaters	J.G.B. AlleleVater von K.S. und J.B.
D3S1358	16/17	16/17	14/15	14/14	14/15
TH01	9.3/9.3	6/9.3	6/9.3	9/9.3	9.3/9.3
D21S11	30.2/32.2	29/30.2	31.2/32.2	30/32.2	29/32.2
D18S51	14/19	14/16	12/17	14/17	17/17
Penta E	7/14	12/14	5/7	5/16	5/10
D5S818	12/13	13/13	11/13	11/13	12/13
D13S317	8/11	10/11	12/13	8/12	12/12
D7S820	8/12	11/12	8/11	8/12	8/12
D16S539	12/13	12/13	12/12	12/12	12/13
CSF1PO	11/12	12/12	10/12	10/12	10/12
Penta D	11/11	11/12	9/9	11/12	9/12
VWA	17/17	17/18	17/17	17/17	17/18
D8S1179	15/16	14/16	12/15	12/15	12/12
TPOX	9/11	8/11	11/11	11/12	11/12
FGA	21/21	20/21	20/20	20/20	20/21

Tab.16: Ergebnisse für den Defizienzfall mit der Dekaplexreaktion

	P.M. Klägerin	I.M. Mutter der Klägerin	K.S. Tochter der Schwester des verstorbenen Putativvaters	J.B. Sohn der Schwester des verstorbenen Putativvaters	J.G.B. Vater von K.S. und J.B.
D12S391	16/18	18/21	17/18	17/18	17/19
D7S1517	20/23	23/24	20/20	24/25	20/24
D8S1132	18/23	18/19	23/23	19/23	19/23
D10S2325	10/11	11/11	10/15	10/12	12/15
Se33	20/26.2	26.2/28.2	29.2/30.2	29.2/30.2	26.2/29.2
D17S976	20.3/31.3	20.3/22	28.3/31.3	27.3/28.3	24/28.3
FGA	21/21	20/21	20/20	20/20	20/21
Penta D	11/11	11/12	9/9	11/12	9/12
Penta E	7/14	12/14	5/7	5/16	5/10

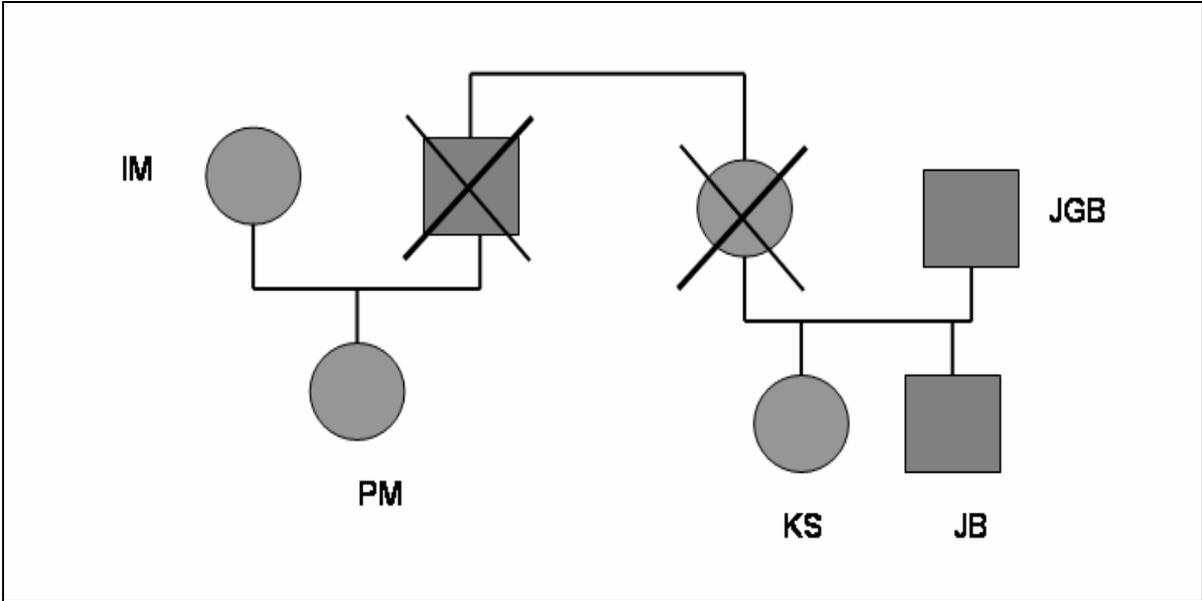


Abb.14: Stammbaum des Defizienzfalls

6. Diskussion und Schlusswort

Es wurde eine Multiplexreaktion erstellt, die mit geringem Einsatz von DNA reproduzierbare Ergebnisse lieferte. Eine Population von 110 Personen (Halle/Saale) wurde analysiert. Anhand statistischer Vergleiche mit dem kommerziell erhältlichen Powerplex16 Kit ließ sich nachweisen, dass die erstellte Reaktion fast im gleichen Maße aussagekräftig ist wie der kommerziell erhältliche Powerplex16 Kit (Tab.17).

Tab.17: Statistische Daten Dekaplexreaktion und Powerplex16 (aus Lins et al: Powerplex 16, Populationsstatistische Daten, Promega Cooperation)

Dekaplexreaktion				Powerplex16			
	PE	DP	Exp.h	Genort	PE	DP	Exp.h
Genort				Genort			
D7S1517	0.67	0.96	0.86	D3S1358	0.58	0.92	0.78
D8S1132	0.69	0.96	0.86	D5S818	0.45	0.85	0.71
D10S2325	0.76	0.95	0.86	D7S820	0.59	0.94	0.79
D12S391	0.71	0.97	0.87	D8S1179	0.69	0.93	0.85
D17S976	0.80	0.99	0.93	D13S317	0.44	0.92	0.71
Penta D	0.71	0.92	0.81	D16S539	0.47	0.92	0.73
Penta E	0.78	0.96	0.86	D18S51	0.74	0.97	0.83
SE33	0.89	0.99	0.95	D21S11	0.68	0.95	0.84
FGA	0.68	0.94	0.87	TH01	0.54	0.91	0.76
				Penta D	0.72	0.94	0.86
				Penta E	0.76	0.97	0.88
				FGA	0.74	0.96	0.87
				TPOX	0.35	0.79	0.65
				vWA	0.64	0.94	0.82
				CSF1PO	0.56	0.87	0.78
PE _{gesamt}	0.9999968			PE _{gesamt}	0.9999994		
DP _{gesamt}	0.9999999			DP _{gesamt}	0.9999999		

Der forensische Nutzen der untersuchten STR-Marker wurde durch die Berechnung der kombinierten DP und die Berechnung der kombinierten PE nachgewiesen:

Die kombinierte DP aller Genorte der Dekaplexreaktion stimmte mit der kombinierten DP der Powerplex16-Reaktion überein (DP Dekaplex: 0.9999999, DP PP16: 0.9999999) während die

kombinierten PE der beiden Reaktionen nur geringfügig voneinander abwichen (PE Dekaplex: 0.9999918, PE PP16: 0.9999994).

Es wurden die unterschiedlichen Einsatzmöglichkeiten der Reaktion aufgezeigt. Im Rahmen von Vaterschaftsgutachten lässt sie sich aufgrund hoher PE und DP als Alternative zu kommerziell erhältlichen Kits sehen. Aufgrund der Nutzung hochpolymorpher Genorte hat sich gezeigt, dass die erstellte Reaktion bei bestimmten Konstellationen (Mutation, Defizienzfall) unter Verwendung geeigneter biostatistischer Parameter kommerziell erhältlichen Multiplexreaktionen, wie dem Powerplex 16-Kit überlegen ist. Ist in schwierigen Fällen die Analyse weiterer Genorte notwendig, um ein verwertbares Ergebnis zu erhalten, kann sie die Powerplex16-Reaktion sinnvoll ergänzen. Neben dem Einsatz bei Vaterschaftsgutachten hat sich gezeigt, dass sich die Reaktion auch zum Nachweis von Mikrosatelliteninstabilität einsetzen lässt.

Es ist vorgesehen, die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene Multiplexreaktion in den Routinebetrieb des DNA-Labors des Instituts für Rechtsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg zu übernehmen.

Die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten (Routineabstammungsuntersuchung, Defizienzfälle, Nachweis von MSI) rechtfertigen die Anwendung im forensischen Laborbetrieb auf jeden Fall.

7. Literaturverzeichnis

- 1) Aaltonen et al: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260 (1993) 812-816
- 2) Aaltonen et al: Replikation errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Research* 54 (1994) 1645-1648
- 3) Bassam PJ, Caetano-Anolles G, Gesshof PM: Fast and sensitive silver staining of dna in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196 (1991) 80-83
- 4) Berg et al: Detection of microsatellite instability by fluorescence multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Molecular Diagnostics* 2 (2000) 20-28
- 5) Botstein D, White RL, Skolnick M: Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics* 32 (1980) 314-331
- 6) Brenner C, Morris J: Paternity index calculations in single locus hypervariable dna probes: validation and other studies. In *Proceedings for the International Symposium of Human Identification 1989*. Promega Cooperation, Madison, WI (1990) 21-53
- 7) Brinkmann et al: Mutation rate in human microsatellites: Influence of the structure and length of the short tandem repeat. *American Journal of Human Genetics* 62 (1998) 1408-1415
- 8) Bromann et al: Comprehensive human genetic maps: Individual and sex-Specific variation in recombination, *The American Journal of Human Genetics* 63 (1998) 861-869
- 9) Budowle et al: Analysis of the VNTR locus D1S820 by the pcr followed by high-resolution page. *American Journal of Human Genetics* 48 (1991) 137-144
- 10) Buel E, Schwartz MB, LaFountain MJ: Capillary electrophoresis STR analysis: comparison to gel-based systems. *Journal of Forensic Sciences* 43 (1998) 164-170
- 11) Bundesärztekammer: Richtlinien für die Erstattung von Abstammungsgutachten. *Deutsches Ärzteblatt* 10 (2002) 665-667
- 12) Butler et al: Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* 25 (2004) 1397-1412
- 13) Butler JM: *Forensic DNA Typing, Biology & Technology behind STR Markers*. 2.Auflage, Academic Press, London, 2003, S.135-145

- 14) Butler JM: Forensic DNA Typing, Biology & Technology behind STR Markers. 2.Auflage, Academic Press, London, 2003, S.148-160
- 15) Carracedo et al: Proceedings of the ninth international symposium on human identification. Promega Cooperation (1998) 89-107
- 16) Chou et al: Prevention of pre-pcr mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. Nucleic Acids Research 20 (1992) 1717-1723
- 17) Fujiwara et al: Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. American Journal of Pathology 153 (1998) 1063-1078
- 18) Gill P et al: A new method of STR interpretation using inferential logic-development of a criminal intelligence database. International Journal of Legal Medicine 109 (1996) 14-22
- 19) Mao et al: Molecular detection of primary bladder cancer by microsatellite analysis. Science 271 (1996) 659-662
- 20) Greenspoon et al: QIAamp spin columns as a method of dna isolation for forensic casework. Journal of Forensic Sciences 43 (1998) 1024-1030
- 21) Herrmann et al: DNA-Technik und medizinische Diagnostik, MTA 15 (1996) 59-62
- 22) Huddart et al: Microsatellite instability in human testicular germ cell tumours. British Journal of Cancer 72 (1995) 642-645
- 23) Hummel K.: Die medizinische Vaterschaftsbegutachtung mit biostatistischem Beweis. Stuttgart: Gustav Fischer 1961.
- 24) Ionov et al: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. Nature 363 (1993) 558-561
- 25) Jones DA: Blood samples. Probability of discrimination. Journal of Forensic Sciences 12 (1972) 355-359
- 26) Junge et al: Mutations or exclusion: an unusual case in paternity testing. International Journal of Legal Medicine 19 (2005) 1-4
- 27) Karran P: Microsatellites instability and dna mismatch repair in human cancer. Cancer Biology 7 (1996) 15-24
- 28) Klintschar et al: Genetic variation and sequence studies of a highly variable short tandem repeat at the D17S976 locus. International Journal of Legal Medicine 112 (1998) 50-54

- 29) Krawczak M, Schmidtke J: DNA-Fingerprinting. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, 1994, S.33-34
- 30) Krenke et al: Validation of a 16-Locus Fluorescent Multiplex System. *Journal of Forensic Sciences* 47 (2002) 773-785
- 31) Lareau et al: A highly variable STR at the D12S391 locus. *International Journal of Legal Medicine* 109 (1996) 134-138
- 32) Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Genetic instabilities in human cancers, *Nature* 396 (1998) 643-649
- 33) Merlo et al: Frequent microsatellite instability in primary small cell lung cancer. *Cancer Research* 54 (1994) 2098-2101
- 34) Mills KA, Even D, Murray JC: Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). *Human Molecular Genetics* 109 (1992) 779
- 35) Mixich F, Ionna M, Mixich VA: Paternity analysis in special fatherless cases without direct testing of alleged father. *Forensic Science International* 146 (2004) 159-161
- 36) Murray, Monchawin C, England PR: The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide pcr. *Nucleic Acids Research* 21 (1993) 2395-2398
- 37) Nakamura et al: Variable number of tandem repeats (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235 (1987) 1616-1622
- 38) Newton CR, Graham A: PCR. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford 1994
- 39) Onda et al: Microsatellite instability in thyroid cancer: Hot spots, clinicopathological implications and prognostic significance. *Clinical Cancer Research* 7 (2001) 3444-3449
- 40) Wiegand P, Klintschar M: Population genetic data, comparison of the repeat structure and mutation events of two short STRs. *International Journal of Legal Medicine* 116 (2002) 258-261
- 41) Polymeropoulos et al: Tetranucleotide repeat polymorphism at the human betaactin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2). *Nucleic Acids Research* 20 (1992) 1432
- 42) Risinger et al: Genetic instability of microsatellites in endometrial carcinoma. *Cancer research* 53 (1993) 5100-5103
- 43) Rodrigues-Serpa A, Catarino A, Soares J: Loss of heterozygosity in follicular and papillary thyroid carcinomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 141 (2003) 26-31

- 44) Rosenblum et al: Improved single-strand DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 25 (1997) 3925-3929
- 45) Ruitberg CM, Reeder DJ, Butler JM: STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Research* 29 (2001) 320-322
- 46) Rüschoff et al: Molekulare Krebsdispositionsdiagnostik am Beispiel des kolorektalen Karzinoms. Welchen Beitrag kann die Pathologie leisten? *Der Pathologe* 19 (1998) 269-278
- 47) Sajantila et al: Amplification of reproducible allele markers for amplified fragment length polymorphism analysis. *Biotechniques* 12 (1992) 20-22
- 48) Sparkes et al: The validation of a 7-locus multiplex STR-test for use in forensic casework. (II) Artefacts, casework studies and successrates. *International Journal of Legal Medicine* 109 (1996) 195-204
- 49) Stoler et al: Genomic instability measurement in the diagnosis of thyroid neoplasms. *Head & Neck* March (2002) 290-295
- 50) Sullivan et al: A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques* 15 (1993) 637-641
- 51) Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260 (1993) 751-752
- 52) Thomson et al: Validation of short tandem repeat analysis of the investigation of cases of disputed paternity. *Forensic Science International* 100 (1999) 1-16
- 53) Vogelstein et al: Genetic alterations during colorectal tumor development, *New England Journal of Medicine* 319 (1988) 525-532
- 54) Wallin et al: Constructing universal multiplex PCR-systems for comparative genotyping. *Journal of Forensic Sciences* 47 (2002) 52-65
- 55) Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for per-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10 (1991) 506-513
- 56) Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R: Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus VWA. *Nucleic Acids Research* 24 (1996) 2807-2812
- 57) Wiegand et al: D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics. *International Journal of Legal Medicine* 112 (1999) 360-363

- 58) Wiegand et al: Tetranucleotide STR system D8S1132: sequencing data and population genetic comparisons. *International Journal of Legal Medicine* 111 (1998) 180-182
- 59) Wurmb-Schwark et al: Possible pitfalls in motherless paternity analysis with relative putative fathers. *Forensic Science International* 159 (2006) 2-3

8. Thesen zur Dissertation "Etablierung einer Short tandem repeat Multiplexreaktion für klinische und forensische Zwecke"

Short tandem repeats (STRs) bzw. Mikrosatelliten sind nicht-codierende DNA Elemente, die in der Forensik für Abstammungsbegutachtungen und spurenkundliche Analysen eingesetzt werden.

STRs können effizient mittels PCR mit fluoreszenzmarkierten Primern amplifiziert werden. Die Typisierung erfolgt zumeist auf Kapillarelektrophoresegeräten ("Sequencer").

STR-Multiplexreaktionen erlauben die gleichzeitige Amplifikation von mehreren STRs. Sie sind mittlerweile Standard bei der Abstammungsbegutachtung und lassen sich auch im Rahmen der Tumorforschung zum Nachweis von Mikrosatelliteninstabilität im Tumorgewebe nutzen.

Kommerziell erhältliche Multiplex Kits sind teuer und bei komplexen Vaterschaftsfällen (Mutationen, Defizienzfälle) oftmals nicht aussagekräftig genug, um ein statistisch valides Ergebnis zu erzielen.

Es besteht daher Bedarf an weiteren STR Systemen, mit denen auch diese komplexen Fälle gelöst werden.

Ziel der Arbeit war es, eine zur Bearbeitung von komplexen Vaterschaftsfällen geeignete Multiplexreaktion zu erstellen und deren Einsatzmöglichkeiten im forensischen Bereich in Kombination mit kommerziell erhältlichen Kits (z.B. dem Powerplex 16 Kit) aufzuzeigen.

Es wurde eine Multiplexreaktion erstellt, hierbei wurde auf neun hochpolymorphe Genorte zurückgegriffen: D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D17S976, Penta E, Penta D, FGA, SE33 (ACTP2). Als Geschlechtsmarker wurde noch Amelogenin zur Reaktion hinzugefügt.

Mit der erstellten Multiplexreaktion wurden 110 Personen aus dem Raum Halle/Saale untersucht.

Anhand statistischer Vergleiche mit dem Powerplex 16-Kit zeigt sich, dass die erstellte Dekaplex Reaktion diesem in etwa gleichwertig ist und eine Kombination aus beiden Kits sich, wie gefordert, zur Lösung komplexer Abstammungsgutachten eignet.

Ferner lässt sich mit der Dekaplex Reaktion Mikrosatelliteninstabilität bei Tumoren nachweisen.

Aufgrund der vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten und ihrer überraschend hohen Aussagekraft rechtfertigt sie den routinemäßigen Einsatz im forensischen Laborbetrieb.

Lebenslauf

Daten zur Person:

Name: Betz Thomas Johannes
Geburtsdatum: 20.05.1979
Geburtsort: Kösching
Anschrift: Rebenstr.31, 92339 Beilngries
Familienstand: Ledig
Konfession: Römisch-Katholisch
Vater: Reinhold Betz, Schulrektor
Mutter: Karin Betz, MTA
Geschwister: Susanne Betz, Gymnasiallehrerin
Michael Betz, Hauptschullehrer

Schulbildung:

1985 – 1989 Grundschule Beilngries
1989 - 1998 Willibald-Gymnasium Eichstätt, humanistischer Zweig
1998 Abitur
1998-1999 Zivildienst am Klinikum Ingolstadt, Oberbayern

Studium:

2000 – 2006 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität
Halle Wittenberg

D a n k s a g u n g

Bei Herrn Prof. Dr. med. habil. M. Kleiber, Institut für Rechtsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, möchte ich mich sehr herzlich für die Überlassung des Themas bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. M. Klitschar, Leiter des DNA-Labors am Institut für Rechtsmedizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die erwiesene Hilfe bei der Erstellung dieser Dissertation sowohl im fachlichen als auch im menschlichen Bereich.

Ich danke meinen Eltern und meiner Bergit für die allzeit erfahrene Unterstützung.

E r k l ä r u n g

Hiermit erkläre ich, dass ich vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur erstellt habe.

Halle/Saale, November 2006

Betz Thomas