

Vaterschaftstest

1. Methode

Ausgangspunkt

Ausgangspunkt der Untersuchung ist die Erstellung des genetischen Profils ("Fingerprints"), der bei jedem Mensch einzigartig ist. Hierfür werden sogenannte STR ("short tandem repeats") analysiert. STR sind DNA-Sequenzen mit fester Abfolge des genetischen Codes, die sich unterschiedlich häufig wiederholen.

DNA

Die DNA besteht aus Nucleinsäuren bzw. Nucleotiden, die sich aus einem Zuckermolekül, einem Phosphatrest und einer organischen Base - Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin (kurz A, C, G und T) - zusammensetzen:

GACATCTACACCGATAAATAGCTAGACACACAGATACATACATC

STR

Es handelt sich um DNA-Abschnitte, in denen ein 2 bis 8 Nukleotide langes Basenmuster mehrmals wiederholt wird (z.B. GATTA):

Allel 1: GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA

Allel 2: GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA

Diese Abschnitte kodieren keine genetischen Eigenschaften: man erkennt lediglich das Geschlecht einer Person, das mit XX (weiblich) und XY (männlich) gekennzeichnet wird. Es wurden 23 unabhängige PCR-Systeme verwendet.

D3S1358	D16S539	D2S441
TH01	CSF1PO	D10S1248
D21S11	Penta D	D2S1338
D18S51	vWA	D12S391
Penta E	D8S1179	D19S433
D5S818	TPOX	D22S1045
D13S317	FGA	DYS391
D7S820	D1S1656	Amelogenin

Merkmal "Amelogenin" ist geschlechtsspezifisch, für eine zusätzliche Kontrolle des Ergebnisses.

Genetischer Profil

Bei jedem Menschen ist die Anzahl der Wiederholungen unterschiedlich und jeder Mensch verfügt über viele verschiedene STR-Sequenzen. Ein genetisches Profil ist nichts anderes

als eine Auflistung der Wiederholungen mehrerer STR einer bestimmten Person. Das genetische Profil ist das DNA-Profil, das sich aus der Analyse von 16 oder mehr unterschiedlichen Abschnitten der DNA ergibt.

STR als Marker

Die Anzahl der Sequenzwiederholungen wird vererbt und variiert von Mensch zu Mensch. Die Wahrscheinlichkeit, dass ein anderer Mensch das gleiche genetische Profil hat, wird auf 1:30 Milliarden geschätzt. Je mehr STR als Marker man testet, desto größer ist dieses Verhältnis.

Allel

Untersucht man z.B. bei einer Person den Gen-Ort mit Marker "D7S820", so finden:

Allel 1: GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA

Allel 2: GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA

Bei Allel 1 ist also die Abfolge "GATA" 10-mal wiederholt, bei Allel 2 dagegen 11-mal.

Dies wird dann beim genetischen Profil, wie folgt, notiert: D7S820 mit 10 und 11. Da jede Person von jedem Chromosom stets zwei Kopien trägt: eine stammt von der Mutter, die andere vom Vater. Auf einem Genort sind immer zwei Allele, entweder zwei verschiedene Allele (als heterozygot bezeichnet) oder zwei gleiche Allele (als homozygot bezeichnet).

Marker

Ein genetischer Marker wird als Folge von Buchstaben und Zahlen dargestellt, das heißt – aus dem Namen des Locus (zum Beispiel TPOX, THO1, D16S53) und der Anzahl der Wiederholungen beim jeweiligen Allel.

Vererbung von Marker: Mutter, Kind, möglichem/ unmöglichem Vater.

Für den Vaterschaftstest nutzt man die genetischen Profile, da die Wiederholungsanzahlen der STR vererbt werden, so dass hierüber Aussagen über Verwandtschaftsverhältnisse möglich werden. Welches Allel dabei von der Mutter und welches vom genetischen Vater stammen, kann nur durch Vergleich der DNA-Profile des Vaters und des Kindes erfolgen, eben durch einen DNA Vaterschaftstest.

Überstimmung und nicht Überstimmung zwischen Vater und Kind

Sind an allen getesteten STR Gen-Orten Übereinstimmungen zwischen Kind und möglichem Vater vorhanden, kann durch eine statistische Berechnung die Vaterschaftswahrscheinlichkeit ermittelt werden. Ist diese hoch genug, gilt die Vaterschaft als praktisch erwiesen. Andernfalls müssen weitere STR Gen-Orte untersucht werden, um die Aussagekraft der Untersuchung zu erhöhen. Findet man zwischen Kind und möglichem Vater Nicht-Übereinstimmungen, deutet dies darauf hin, dass es sich bei der Person nicht um den biologischen Vater des Kindes handelt. Als 100% erwiesen gilt

dies jedoch erst, wenn mindestens vier Nicht-Übereinstimmungen an STR auf unterschiedlichen Chromosomen vorliegen. Denn Nicht-Übereinstimmungen können auch durch Mutationen entstehen. Wenn die DNA von den Eltern an das Kind vererbt wird, können sich gelegentlich auch Merkmale leicht verändern. Und davon sind STR Gen-Orte genauso betroffen wie der Rest der DNA-Information. Aus fünf Wiederholungen des Vaters können so beim Kind schon einmal vier oder sechs werden.

Solche Mutationen sind aber eher selten, daher auch des 100% Ausschluss der Vaterschaft ab vier gefundenen Nicht-Übereinstimmungen. Liegen weniger als vier vor, könnte es sich aber um Mutationen handeln. Dann ist die Vaterschaftsfrage noch unklar und es müssen wiederum mehr STR Gen-Orte getestet werden, bis man entweder weitere Nicht-Übereinstimmungen nachweisen kann oder so viele Übereinstimmungen bestehen, dass man mit statistischer Sicherheit sagen kann, dass es sich bei den Nicht-Übereinstimmungen um Mutationen handelt.

2. Analyse im Labor

Analyse Isolierung der DNA aus der Proben

DNA wird aus den Proben extrahiert, d. h. von anderen Zellbestandteilen wie Proteinen befreit. Die so gereinigte DNA ist Ausgangsmaterial für die Polymerasekettenreaktion, kurz PCR.

PCR in Form Multiplex-PCR

Hierbei werden kurze Abschnitte der DNA, auf denen die STR-Polymorphismen, liegen, vermehrt und anschließend wird die Länge der PCR-Produkte bestimmt. Hier die aus den Proben isolierte DNA dient als Ausgangsmaterial für die Polymerasekettenreaktion. Die Vermehrung erfolgt durch Multiplex-PCR mit anschließender Fragmentlängenbestimmung. Multiplex-PCR bedeutet, dass in einem Ansatz mehrere Primer Paare für unterschiedliche Loci gleichzeitig eingesetzt werden.

Bestimmung der Marker mit der Kapillarelektrophorese

Durch die Markierung der einzelnen Marker mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen und bei der unterschiedlichen Längen der Marker kann man durch die gleichzeitige Detektion mehrerer Fluoreszenz-Farbstoffe eine Fragmentlängenbestimmung der PCR-Produkte mit der Kapillarelektrophorese im Labor durchführen. Hier ist, ein höheres Maß an Automatisierung in Laboren, ein bestehendes Standard.

3. Auswertungstabellen

Auswertungstabelle: Vaterschaftstest: Vater + Kind, Bewiesen

STR	Breite	Putativvater	Kind	Mutter		Index
D3S1358	(9 - 20)	15	15 16	---	---	OK 1.832
TH01	(3 - 13.3)	9.3	8 9.3	---	---	OK 1.450
D21S11	(24 - 38)	30 31.2	29 31.2	---	---	OK 2.542
D18S51	(7 - 27)	15 19	19	---	---	OK 12.448
Penta E	(5 - 24)	7	7	---	---	OK 5.918
D5S818	(6 - 18)	9 10	9 12	---	---	OK 6.017
D13S317	(5 - 17)	11 12	8 11	---	---	OK 0.768
D7S820	(5 - 16)	9 10	10	---	---	OK 1.951
D16S539	(4 - 16)	12 13	11 13	---	---	OK 1.530
CSF1PO	(5 - 16)	10	10 15	---	---	OK 2.270
Penta D	(2.2 - 17)	8 14	13 14	---	---	OK 4.102
Amelogenin	(X - XY)	Male (XY)	Male (XY)	---	---	N/A N/A
vWA	(10 - 24)	14 15	14 17	---	---	OK 2.694
D8S1179	(7 - 19)	13 14	14	---	---	OK 3.008
TPOX	(4 - 16)	8 9	8 11	---	---	OK 0.476
FGA	(14 - 50.2)	18 21	21 22	---	---	OK 1.399
D1S1656	(9 - 20.3)	15 16.3	15 17	---	---	OK 1.671
D2S441	(8 - 17)	11 11.3	11 11.3	---	---	OK 4.830
D10S1248	(8 - 19)	14 16	15 16	---	---	OK 1.880
D2S1338	(10 - 28)	18 25	19 25	---	---	OK 2.439
D12S391	(14 - 27)	18 22	18 22	---	---	LD 4.072
D19S433	(5.2 - 18.2)	14 14.2	14 16	---	---	OK 0.692
D22S1045	(7 - 20)	15	11 15	---	---	OK 1.556
DYS391	(5 - 16)	10	10	---	---	OK 1.969

Auswertungstabelle: Vaterschaftstest: Vater + Kind, Ausgeschlossen

STR	Breite	Putativvater	Kind	Mutter		Index
D3S1358	(9 - 20)	14 15	15 18	---	---	OK 0.916
TH01	(3 - 13.3)	6 8	7 9	---	---	M1 Zero
D21S11	(24 - 38)	30	26.3 28	---	---	M1 Zero
D18S51	(7 - 27)	13	16 17	---	---	M1 Zero
Penta E	(5 - 24)	10	7 15	---	---	M1 Zero
D5S818	(6 - 18)	11	12 13	---	---	M1 Zero
D13S317	(5 - 17)	9 13	13 14	---	---	OK 2.149
D7S820	(5 - 16)	10 11	9 10	---	---	OK 0.976
D16S539	(4 - 16)	9 12	9 11	---	---	OK 2.344
CSF1PO	(5 - 16)	11 12	11	---	---	OK 1.619
Penta D	(2.2 - 17)	9 13	11	---	---	M1 Zero
Amelogenin	(X - XY)	Male (XY)	Female (X)	---	---	N/A N/A
vWA	(10 - 24)	16 18	15 16	---	---	OK 1.245
D8S1179	(7 - 19)	13 14	14	---	---	OK 3.008
TPOX	(4 - 16)	11	8 11	---	---	OK 1.984
FGA	(14 - 50.2)	22	19 20	---	---	M1 Zero
D1S1656	(9 - 20.3)	10 12	14 14.3	---	---	M1 Zero
D2S441	(8 - 17)	14	11 14	---	---	OK 2.075
D10S1248	(8 - 19)	14 17	13 14	---	---	OK 0.840
D2S1338	(10 - 28)	19 20	21 25	---	---	M1 Zero
D12S391	(14 - 27)	16 20	18	---	---	M1 Zero
D19S433	(5.2 - 18.2)	14	15 15.2	---	---	M1 Zero
D22S1045	(7 - 20)	11 15	14 16	---	---	M1 Zero
DYS391	(5 - 16)	10		---	---	OK N/A

Begrifserklärung:

STR: Namen der STR Marker; Breite: Breite der STR Marker; Spalten Vater, Kind, Mutter: 2 Allele der Personen. Marker "Amelogenin" ist geschlechtsspezifisch: für eine zusätzliche Kontrolle des Ergebnisses. Übereinstimmung: **OK**; Nicht Übereinstimmung: **M1**.

4. Auswertung

Ausschluss

Bei einem Umfang der genetischen Analysen von 16 STR-Systemen erlaubt das Vorliegen von vier und mehr Ausschluss-Konstellationen auf verschiedenen Chromosomen die Aussage, dass die Abstammung vom Putativvater ausgeschlossen ist. Bei weniger als vier Ausschluss-Konstellationen muss eine biostatistische Würdigung unter Einbeziehung von möglichen Mutationen oder stummen Allelen erfolgen.

Nichtausschluss

Der Nichtausschluss erfordert die Quantifizierung der Ergebnisse im Hinblick auf ihren Beweiswert durch geeignete statistische Maßzahlen.

Die Basis für die Quantifizierung ist Likelihood-Berechnung: eine exakte Hypothesenformulierung (Terzettenfall und Defizienzfall) im Hinblick auf postulierte Verwandtschaftsbeziehungen und die ethnische Zugehörigkeit. Als statistische Maßzahlen werden angegeben und bewertet: Wahrscheinlichkeitswert (unter Angabe der a-priori-Wahrscheinlichkeit), X/Y (Paternity Index PI) und individuelle Ausschlusschance.

Vaterschaft ist praktisch erwiesen

Ein Wahrscheinlichkeitswert $\geq 99,9\%$ oder analoge statistische Maßzahlen entsprechen dem verbalen Prädikat "Verwandtschaftshypothese praktisch erwiesen".

Index

Ein Wert >1 bedeutet, dass die Vaterschaft des untersuchten Mannes wahrscheinlicher ist als die Nichtvaterschaft. Dieser Index-Wert wird nun für jeden einzelnen Marker berechnet. Werte für einzelne Marker liegen im Bereich von 0-100, meist zwischen 0,7 und 3.

Combined Index

Bei 15 Markern gibt es also auch 15 solchen einzelne Indexe. Unter bestimmten Voraussetzungen dürfen diese einzelnen Werte kumuliert werden, indem sie miteinander multipliziert werden. Je größer ist das Resultat, je genauer das Testergebnis. Ein Index von 1000 korrespondiert dann zu einer Wahrscheinlichkeit von 99,9 %. Ein kombinierter Paternitätsindex von 500 gibt beispielsweise an, dass es 500-mal wahrscheinlicher ist, dass der getestete Mann der biologische Vater ist, als ein zufällig ausgewählter unverwandter Mann.

Wahrscheinlichkeitswert

Ein Wert >50% bedeutet, dass die Vaterschaft des untersuchten Mannes wahrscheinlicher ist als die Nichtvaterschaft. Nach den Richtlinien für die Erstattung von Abstammungsgutachten der Bundesärztekammer wird ab einem Wahrscheinlichkeitswert von 99,9% das verbale Prädikat „Vaterschaft praktisch erwiesen“ vergeben. Hier ist die Annahme einer so genannten A-priori-Wahrscheinlichkeit von 50%. Das bedeutet, dass für die zu beurteilende fragliche Vaterschaft angenommen wird, dass der vorgestellte Mann vor der Untersuchung eine Wahrscheinlichkeit von 50% hatte, der Vater zu sein.

Ausschlusschance

Ausschlusschance ist weitere statistische Maßzahl. Der individuelle Wert von z. B. 99% bedeutet, dass von 100 untersuchten Männern, die mit dem Kind nicht verwandt sind, 99 von der Vaterschaft ausgeschlossen werden.

Wenn Verwandte in Frage kommt

Sollte ein Verwandter, z. B. ein Bruder des untersuchten Mannes, als Erzeuger in Frage kommen, sind ein anderes Rechenverfahren und in der Regel ein erhöhter Untersuchungsumfang nötig. Dennoch lassen sich auch solche Fälle statistisch eindeutig klären. Wichtig ist aber, dass die Verwandtschaft zwischen den in Frage kommenden Männern bekannt ist und bei der Formulierung der Hypothesen berücksichtigt werden kann.

Mutationen

In seltenen Fällen kommt es vor, dass Putativvater und Kind an nur einem der untersuchten Loci eine isolierte Ausschlusskonstellation aufweisen. Ursache für dieses Phänomen kann ein Mutationsereignis in der Keimbahn des Elternteils sein. Alternativ muss auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass der Putativvater nicht der Erzeuger des Kindes ist und dass die restlichen untersuchten Loci nur zufällig passen. Diese beiden Alternativen werden bei der Berechnung der Vaterschaftswahrscheinlichkeit miteinander verglichen.

Das Verfahren zur Abschätzung der Vaterschaftswahrscheinlichkeit in diesen Fällen beruht auf Likelihood-Quotienten unter Verwendung für Locus spezifischen Mutationsraten. Hierbei wird die Mutation als negativer Hinweis in die Berechnung der Verwandtschaftswahrscheinlichkeit einbezogen. Da die Mutationsraten in der Regel sehr klein sind $< 1 \times 10^{-3}$, treten Mutationen nur bei etwa 1 von 100 untersuchten Familien auf. Wichtig ist, dass man in diesen Fällen enge Blutsverwandte des untersuchten Mannes als mögliche Erzeuger des Kindes ausschließen kann.