

## Genetik – Vaterschaftsdiagnostik



### Vaterschaftsdiagnostik

Die Methoden für Abstammungsgutachten wurden durch den Fortschritt der Wissenschaft weiterentwickelt. Es gibt u.a. die folgenden Methoden:

- Bei *Blutgruppentests* werden die Blutgruppen der Mutter, des Kindes und des vermutlichen Vaters ermittelt. Die bekannten Vererbungsregeln schließen eine Reihe von Ergebniskombinationen zwingend aus.
- Bei *serologischen Gutachten* werden weitere Blutbestandteile (HLA-Antigene andere Proteine) in die Untersuchung eingezogen.
- Bei *anthropologischen-erbbiologischen Gutachten* wurde mit Hilfe von vererbaren äußeren Merkmalen (z.B. Haut-, Augen-, Haarfarbe, Kopfform, Irisstruktur) die Wahrscheinlichkeit der Vaterschaft geprüft.
- Die *DNA-Analyse* stellt die modernste Methode des Abstammungstests dar. Sie bietet einen fast hundertprozentig sicheren, positiven wie auch negativen Abstammungsnachweis.

Abstammungsgutachten anhand von DNA-Analysen [Bearbeiten]

\* Durch den Genetischen Fingerabdruck (Fingerprinting) wurde von 1985 bis 1998 die so genannte Minisatelliten-DNA (auch "VNTRs" = variable number of tandem repeats)

untersucht die bei jedem Individuum in einer unverwechselbaren Länge und Kombination auftreten. Mit PCR-Technik (Polymerase-Kettenreaktion) werden DNA-Abschnitte, die Minisatelliten enthalten, vervielfältigt und können mit Gelelektrophorese aufgetrennt und sichtbar gemacht werden. Da die VNTRs bei jedem Menschen unterschiedlich lang sind, ergibt sich für jeden Menschen ein spezifisches Bandenmuster.

\* Etwa ab 1998 wurden die Minisatellitentechnik fast vollständig durch die STR-Technik (Short Tandem Repeat) verdrängt.

Generell ist das Ergebnis umso sicherer, je mehr der Regionen auf Übereinstimmung geprüft werden. Jedoch ist die Sicherheit des Ergebnisses nicht nur von der Zahl der getesteten Regionen abhängig. Seit 2003 hat sich ein Testverfahren mit 15+1 DNA-Markern (DNA-Regionen) in vielen Laboratorien durchgesetzt. Es handelt sich um 15+1 Marker, da von diesen 16 Markern nur 15 für die Begutachtung der Abstammung benutzt werden können – der 16. Marker erfasst lediglich das Geschlecht der getesteten Person. Dieser Test erreicht eine Wahrscheinlichkeit von 99,9% für die Vater-Kind Abstammung, ein Test mit 25 DNA-Regionen erreicht eine Wahrscheinlichkeit von 99,99999%.

Jeweils die Hälfte der im DNA-Labor gemessenen Erbmerkmale (Allele) des Kindes müssen mit denen jedes Elternteils übereinstimmen. Da die Natur allerdings neben den Zuständen 0 und 1, im Sinne Vaterschaft ja und nein, eine Reihe von Zwischenzuständen kennt, ist der Ausschluss einer biologischen Vaterschaft nur möglich, wenn mindestens auf drei Genorten (Markern) zwischen dem möglichen Vater (Putativvater) und dem Kind keine gemeinsamen Allele vorhanden sind. Wird z. B. in einem Set von 15 untersuchten genetischen Regionen, nur eine Nichtübereinstimmung zwischen Vater und Kind gefunden, kann es sich um eine Mutation handeln. Nach der genannten Daumenregel von mindestens drei Ausschlüssen, ist der Ausschluss auf nur einem Genort nicht ausreichend, um die Vaterschaft in Frage zu stellen. In einem solchen Fall muss der Gutachter entscheiden, ob vielleicht weitere Genorte zur Untersuchung herangezogen werden müssen, um die Sicherheit des Ergebnisses zu erhöhen. Die Sicherheit des Ergebnisses ist bei der Annahme des Vorliegens einer Mutation insbesondere dann reduziert, wenn die Berechnung der Vaterschaftswahrscheinlichkeit ohne das DNA-Profil der Mutter vorgenommen wurde. In den meisten Fällen kann dann ein sicheres Ergebnis erzielt werden, wenn auch das DNA-Profil der Mutter bekannt ist. In nur wenigen Ausnahmefällen müssen tatsächlich weitere Genorte untersucht werden.

Allerdings sind Mutationen nicht der einzig mögliche Grund für ein oder zwei Nichtübereinstimmungen zwischen Vater und Kind. Gerade dann, wenn ein Verwandter des getesteten Mannes als Alternativvater in Frage kommen kann, stellt der Abstammungstest große Anforderungen an das ausführende Labor. Eineiige Zwillinge besitzen sogar ein ununterscheidbares DNA-Profil, sodass der normale DNA-Test nicht in der Lage ist, bei Zwillingen als Alternativvätern, den wahren Vater zu identifizieren. Da die DNA-Analyse nur nicht codierende DNA-Bereiche erfasst, zeigen dabei entdeckte Mutationen keinen Bezug zu genetischen Krankheiten.

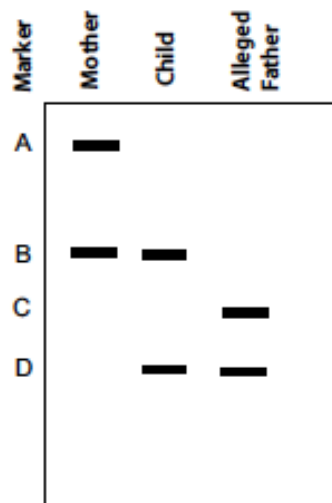
Die DNA-Analyse selbst ist nicht mit der Gendiagnostik zu verwechseln, da nur die Bereiche zwischen den Genen analysiert werden. Informationen über defekte Gene und/oder Erbkrankheiten erhält man dabei nicht.

Die für den Test benötigte DNA kann z. B. mit Hilfe einer Speichelprobe (Mundschleimhautzellen), Haaren, Hautzellen, benutzten Taschentüchern, Schnullern, Zahnbürsten, Kaugummis oder anderen zellhaltigen Materialien gewonnen werden. Haare führen nur in Ausnahmefällen zu in einem Verwandtschaftstest verwertbaren DNA-Profilen, da nur die Haarwurzeln Zellen mit analytisch verwertbarem Material enthalten.

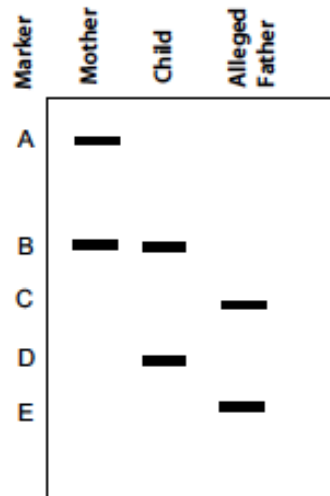
Quelle: Wiki

### Szenario

Hier siehst du ein klassisches Bandenmuster, welches die Vaterschaft des getesteten Vaters belegt (Du siehst, dass das Kind bezüglich eines Bestimmten Markes exakt das gleiche Bandenmuster zeigt wie sein leiblicher Vater):



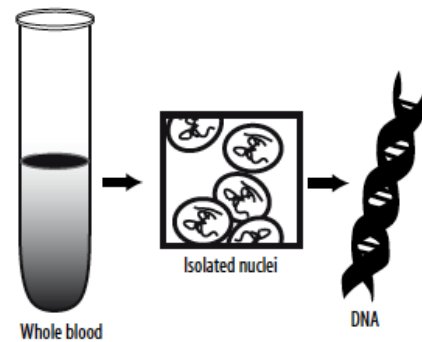
Und so schaut es aus, wenn der Vater nicht der biologische Vater des entsprechenden Kindes ist (man sieht keine Übereinstimmung des DNS-Bandenmusters im Bereich des getesteten Marker):



### Wie wird das DNS-Fingerprinting durchgeführt?

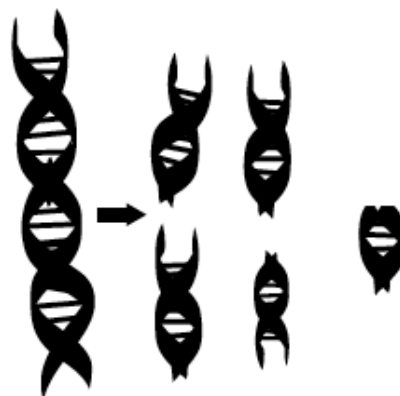
#### Schritt 1:

Zunächst wird die DNS aus Körperflüssigkeit oder Körpergewebe isoliert und mittels Polymerasekettenreaktion vervielfältigt um genügend Material für die Untersuchung zur Verfügung zu haben.



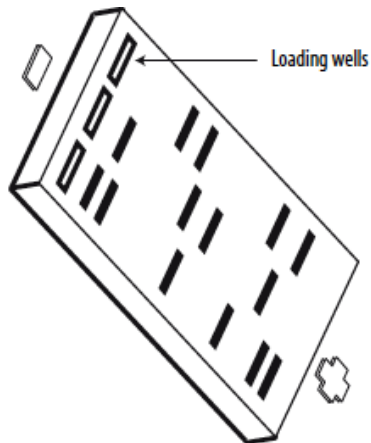
#### Schritt 2:

Die DNS wird mit Restriktionsenzymen (die an einer bestimmten Stelle in der DNS selbige Schneiden) verdaut – dadurch erhält man unterschiedlich große Fragmente (Banden)



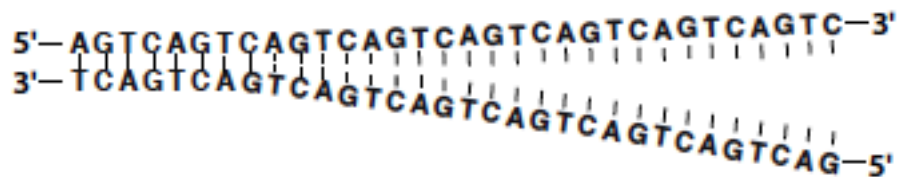
*Schritt 3:*

Die DNS wird im Agarose-Gel aufgetrennt.



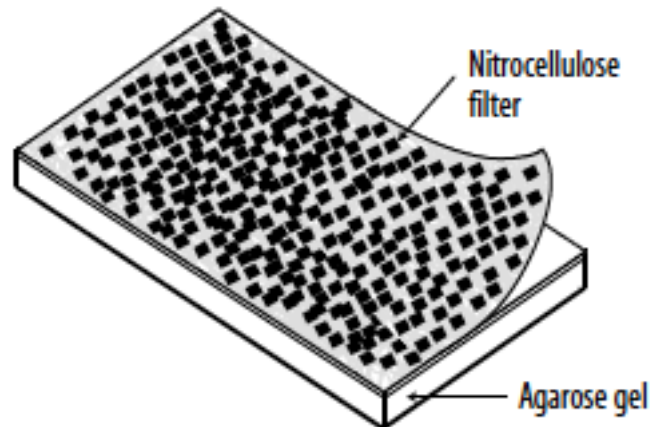
*Schritt 4:*

Die doppelsträngige DNS kann im Gel wahlweise durch Erhitzen oder Chemikalien (SDS) denaturiert und dadurch in 2 Stränge aufgespalten werden.



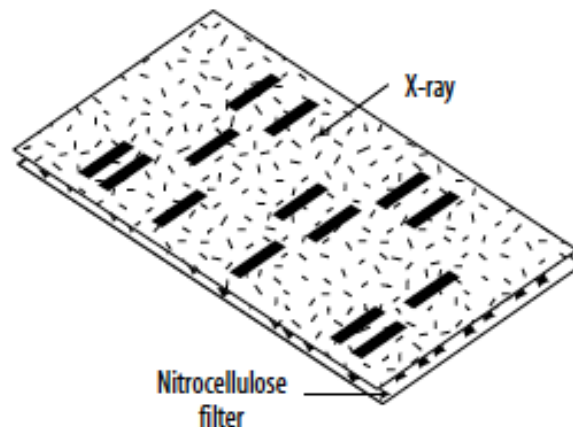
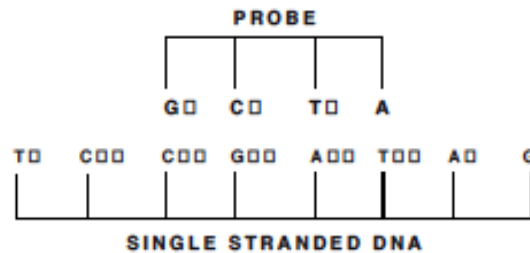
*Schritt 5:*

Die Wasserstoffbrückenbindungen der Doppelhelix brechen bei diesem Prozess auf und es entsteht Einzelstrang-DNS. Das Gel mit den Einzelsträngen wird nun auf Nitrozellulosepapier geblotet. Diese Technik nennt man Southern Blot – sie bedeutet im übertragenen Sinne nicht anderes, als dass man die im Gel aufgetrennten und nun zu Einzelsträngen denaturierten DNS-Stücke auf eine Membran überträgt um auf diesem Medium weiterarbeiten zu können (Agarose-gele wären viel zu unpraktisch und instabil für weiteres Arbeiten)



*Schritt 6:*

Das Übertragen der DNS vom Agarosegel auf die Membran nennt man Hybridisierung. Dazu wird die Einzelstrang-DNS mit einer radioaktiv-markierten Sequenz behandelt, um komplementäre Sequenzen in den Fragmenten zu finden. Anschließend wird ein Röntgenfilm auf die Nitrozellulosemembran gelegt, der an eben den Stellen ein Signal detektiert, an dem eine radioaktive Sequenz an eine passende Einzelstrang-Sequenz auf der Membran gebunden hat. Dieses Muster, das man auf dem Röntgenfilm in Form von geschwärzten Banden erkennen kann, nennt man den DNS-Fingerprint.



## Versuchsdurchführung

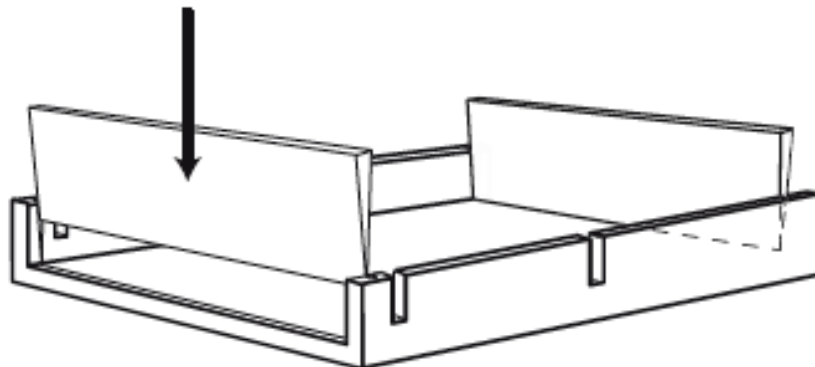
Du solltest während des gesamten Versuches einen Laborkittel, Handschuhe und eine Schutzbrille tragen!

Je Schülergruppe wird Folgendes benötigt:

- 10 µl DNS-Probe der Mutter
- 10 µl DNS-Probe des vermuteten Vaters
- 10 µl DNS-Probe des Kindes
- 1 Mikropipette mit 4 passenden Spitzen
- 1 Gelelektrophoresekammer mit Netzgerät
- 350 ml 1x TBE-Puffer
- 100 ml Neo/Blue DNS-Färbelösung
- 1 Plastikbeutel

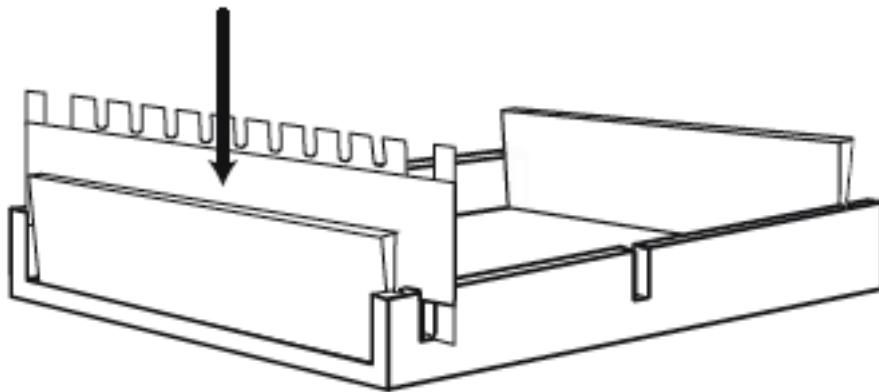
Zum Betrachten des gefärbten Geles sollte ein Lichtpult (Overhead-Projektor) vorhanden sein, außerdem eine Heizplatte oder eine Mikrowelle um die Agarose für das Gel zu schmelzen.

### Wie gieße ich ein Gel?



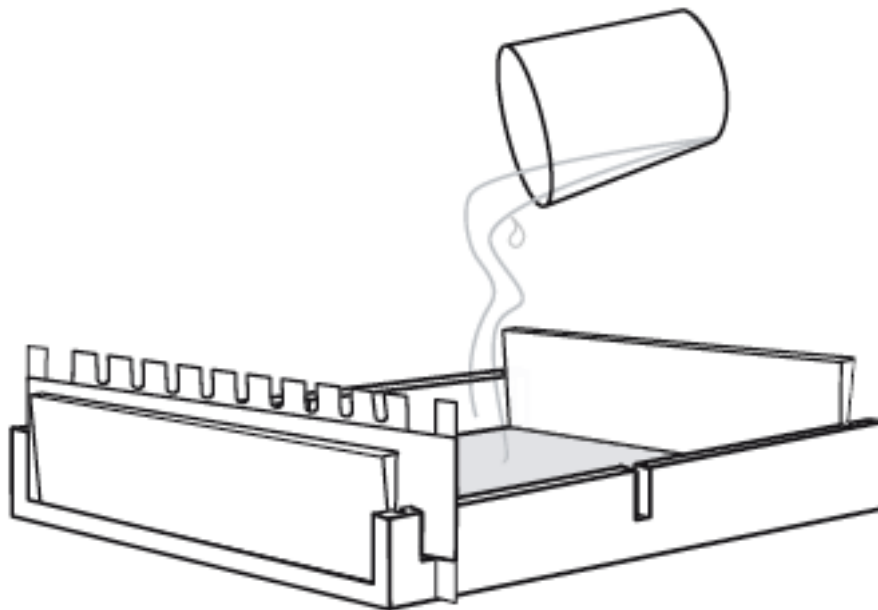
#### *Schritt 2:*

Gel-Kamm in die obere Einkerbung des Gelschlittens einsetzen.



*Schritt 3:*

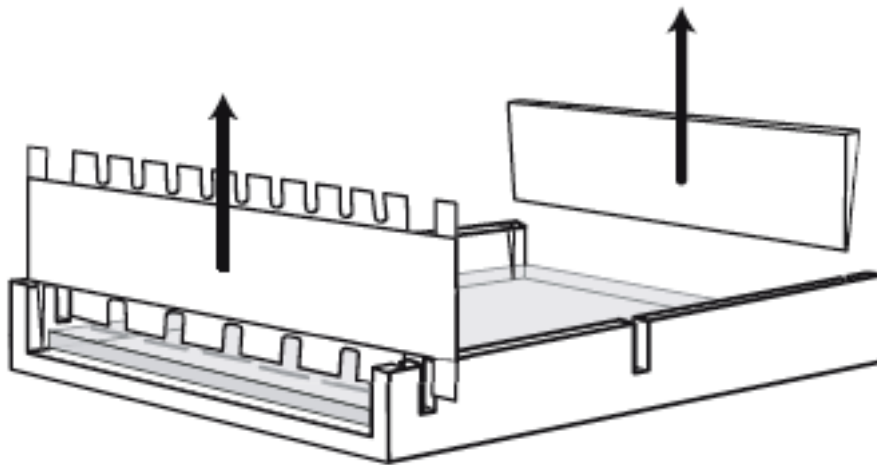
Die geschmolzene Agaroselösung auf 55°C abkühlen lassen, in die Form gießen (ca. 1 cm dick) und auskühlen lassen (das Gel wird milchig wenn es vollständig erkaltet ist)



*Schritt 4:*

Vorsichtig den Kamm und Gummibrücken (bzw. das Tesa-Band) entfernen.





*Schritt 5:*

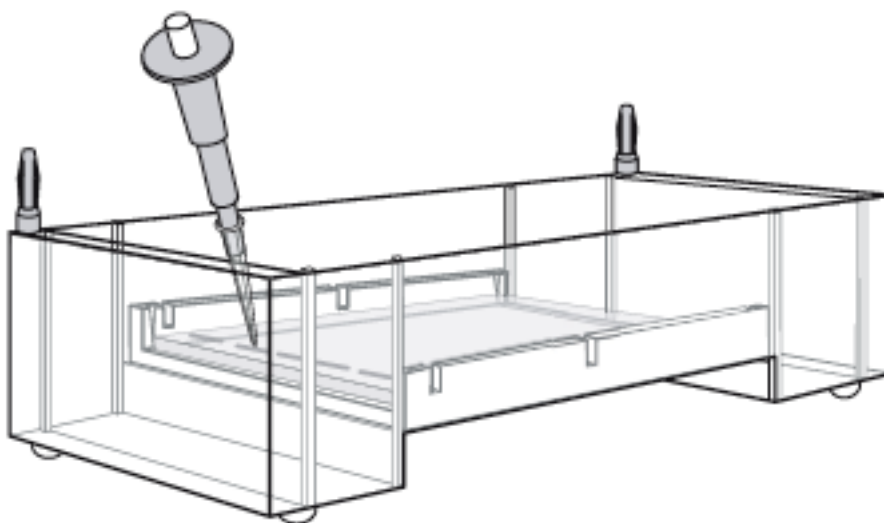
Das Gel in die Gelelektrophoresekammer legen und die Kammer mit 1x Laufpuffer auffüllen bis das Gel ca. 0,5 cm damit bedeckt ist.

*Schritt 6:*

Belade das Gel wie folgt (in jede Tasche werden 10 µl Probe aufgetragen):

Kontrolle – leer – Mary – Fran – Samantha

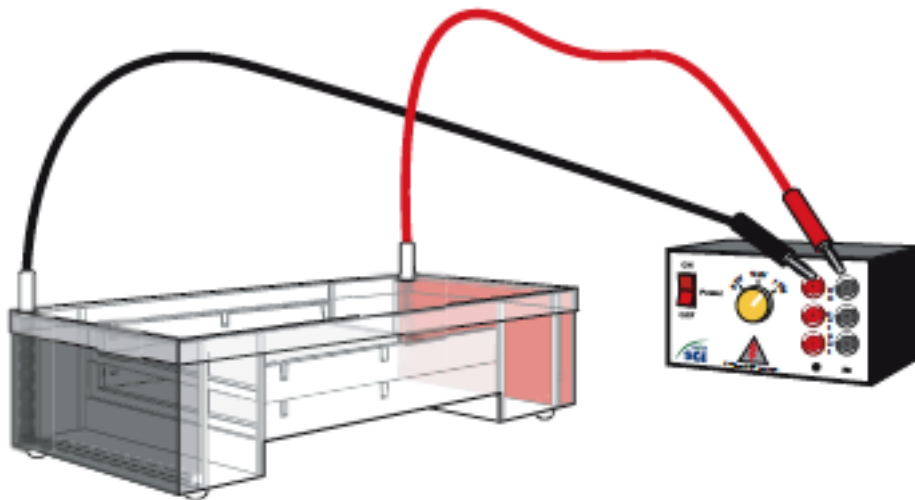
Beachte beim Beladen dass Du nicht die Geltasche zerstörst.



**Schritt 7:**

Verschließe die Gelkammer mit dem Deckel und schließe sie an das Netzgerät an. Beachte dabei den roten Bananenstecker in die rote Buchse, und den schwarzen in die schwarze Buchse zu stecken. Lass das Gel bei ca. 80-100 V für ca. 30-40min laufen.

Ist alles richtig angeschlossen, solltest Du Blasen an Anode (Sauerstoff) und Kathode (Wasserstoff) aufsteigen sehen.

**Schritt 8:**

Nach Beendigung der Elektrophorese zieh erst den Stecker aus dem Netzgerät, dann stöpsle die Bananenstecker aus und öffne die Gelkammer. Du kannst das Gel jetzt entnehmen und in die Färbewanne überführen (auf keinen Fall das Gel ohne Flüssigkeit lagern, es trocknet schnell aus).

**Schritt 9:**

Gib die Färbelösung für 10-15min zu dem Gel. Anschließend wird das Gel mit lauwarmem Wasser „gewaschen“: Dazu gießt Du die Färbelösung ab, gibst lauwarmes Wasser auf das Gel (bis es vollständig bedeckt ist) und gießt diese sofort wieder ab. Dann gibst Du erneut lauwarmes Wasser auf das Gel (vollständig bedecken) und wartest 15-20 min (ab und an mal kontrollieren, denn ist das Gel erst einmal zu stark entfärbt, dann muss man erneut färben!)

**Schritt 10:**

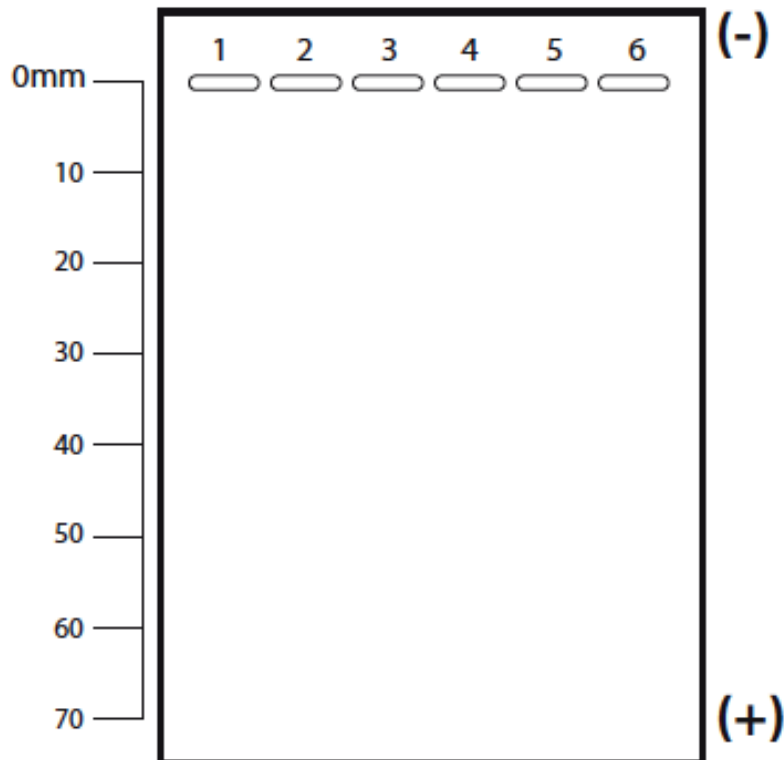
Miss für jeden Probe die Laufstrecke von der Tasche bis zur entstandenen Bande (Migrationsstrecke) und notiere diese:

**Data Table 1**

<b>Mother's DNA Sample</b>			<b>Alleged Father's DNA Sample</b>			<b>Child's DNA Sample</b>		
DNA Fragment No.	Migration Distance (mm)	DNA Fragment Size (bp)	DNA Fragment No.	Migration Distance (mm)	DNA Fragment Size (bp)	DNA Fragment No.	Migration Distance (mm)	DNA Fragment Size (bp)
1			1			1		
2			2			2		
3			3			3		
4			4			4		
5			5			5		
6						6		
7						7		
8								
9								
10								

*Schritt 11:*

Fertige eine Zeichnung Deines Geles an:

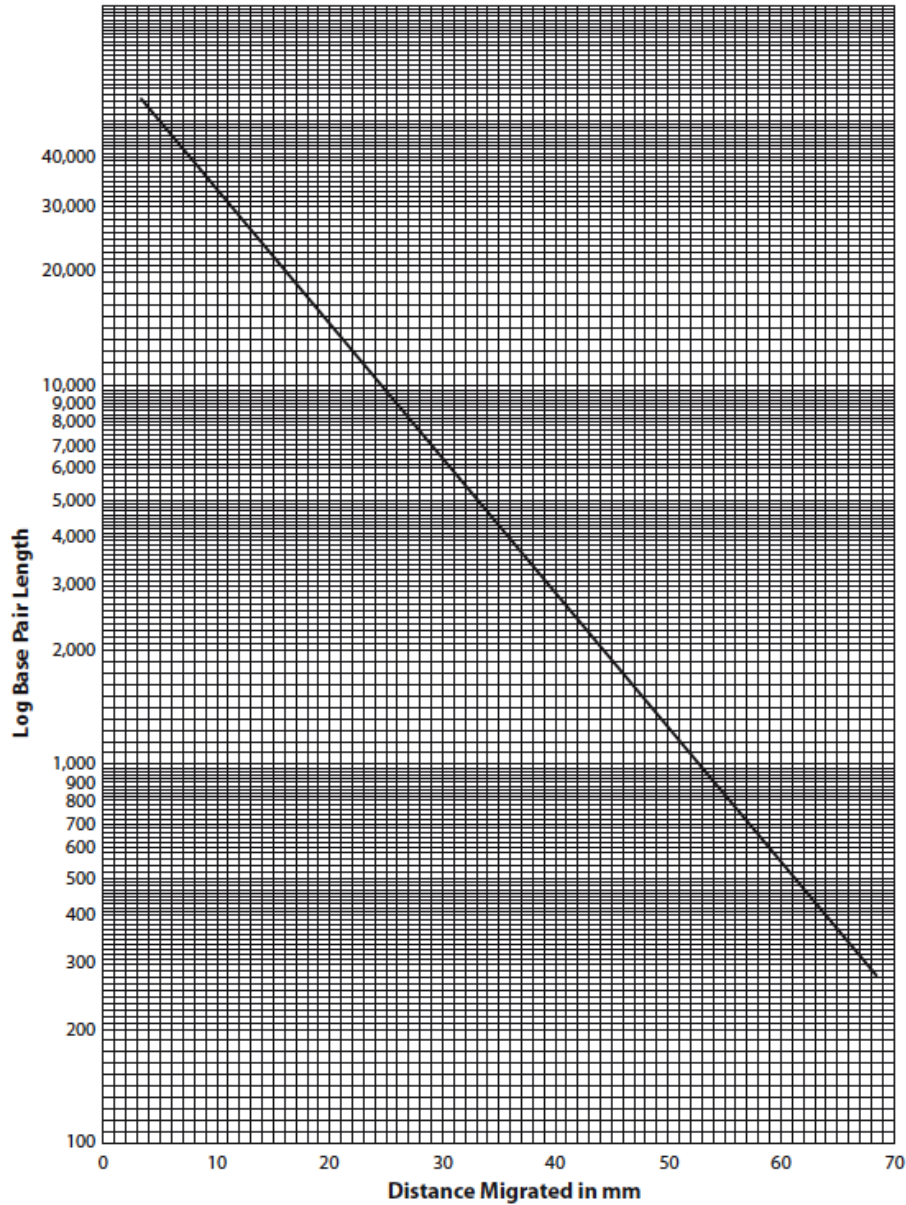


Die molekulare Größe eines unbekanntes Moleküls kann durch Vergleich der elektrophoretischen Beweglichkeit mit einem Standard-Fragment (bekannter Größe) im Agarosegel ermittelt werden.

*Schritt 12:*

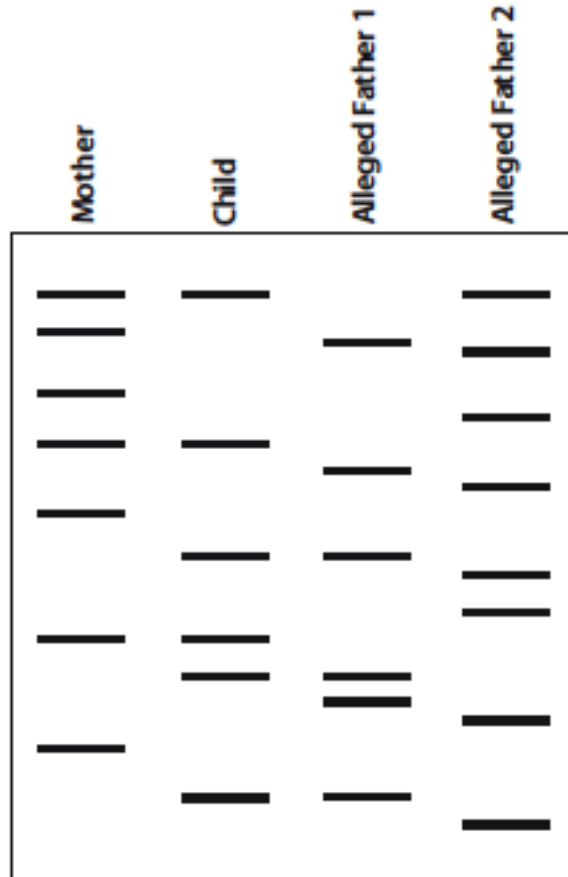
Erstelle eine Standardkurve. Trage dazu die Migrationsstrecken der einzelnen Fragmente in den Grafen ein. Dann gehst Du von diesem Punkt senkrecht nach oben, bis Du die Gerade schneidest. Vom Geradenschnittpunkt gehst Du nach links und kannst dort das zum Deinem Fragment gehörende Molekulargewicht ablesen.

**Molecular Weight Standard Curve**

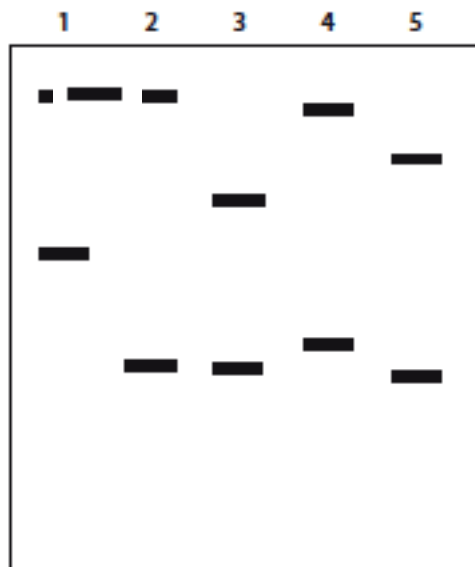


**Fragen:**

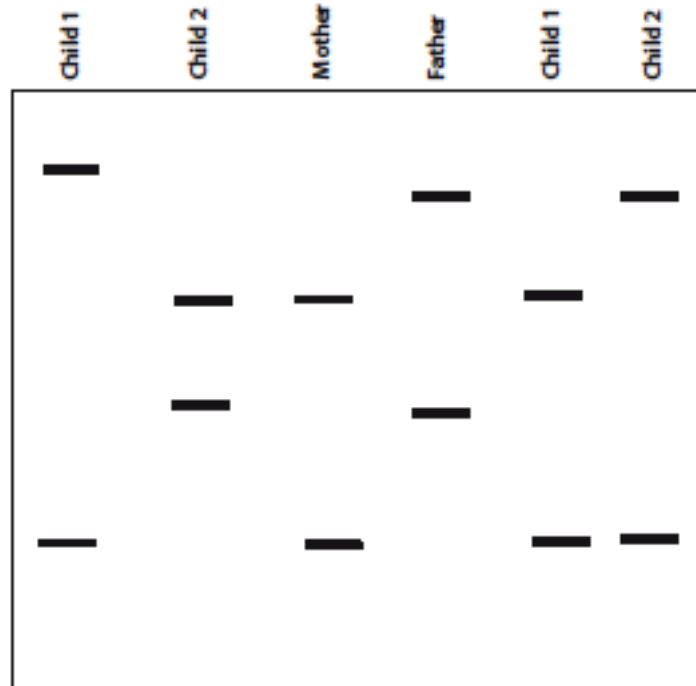
1. Gehe davon aus, das Bandenmuster Deines Agarose-Geles sei ein Radiogramm. Kann der vermutete Vater der biologische Vater des Kindes sein? Begründe!
2. Das unten gezeigte Radiogramm zeigt die Mutter und zwei mögliche Väter eines Kindes. Welcher Vater ist der biologische Vater?



3. Die Skizze zeigt das Radiogramm eines einzelnen DNS-Markes eines Vaters und seiner vier Kinder. Welche Spur zeigt das Bandenmuster des Vaters?



4. Die Skizze zeigt das Radiogramm-Bandenmuster von Mutter, Vater und vier Kindern. Welches der Kinder stammt biologisch von beiden Eltern?

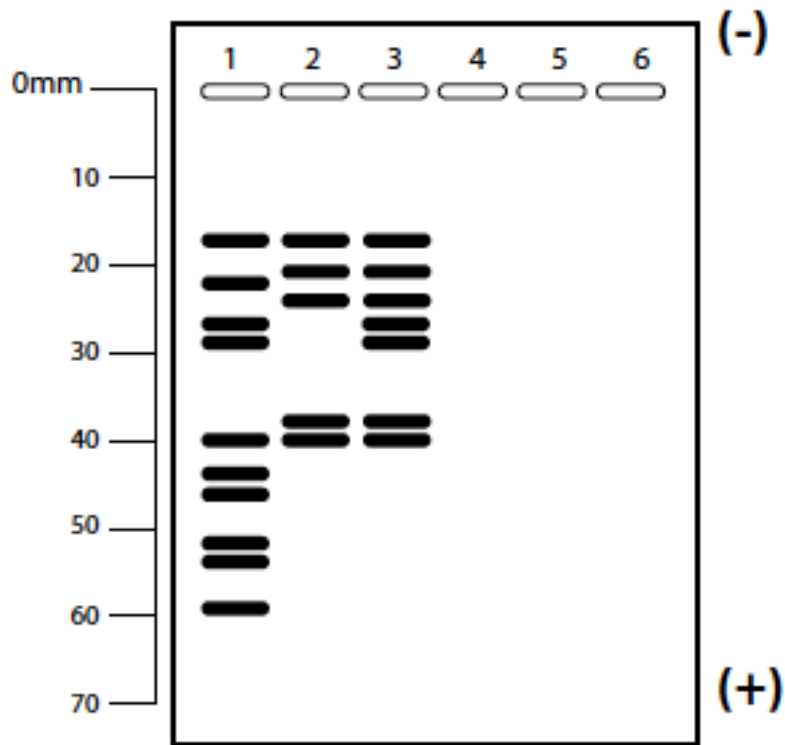


### Lehrerinformationen und Vorbereitungen

Laufpuffer: Bereiten Sie den 1x TBE-Laufpuffer vor indem sie 20 ml des 20x TBE-Puffer-Konzentrats mit 380 ml destilliertem Wasser auffüllen.

**Lösungen:**

So sollte das gefärbte Gel in etwa aussehen:



**Note:** *The smaller-sized fragments may not be visible on your gel.*



Die Migrationsstrecken der einzelnen Banden (können variieren):

**Data Table 1**

Mother's DNA Sample			Alleged Father's DNA Sample			Child's DNA Sample		
DNA Fragment No.	Migration Distance (mm)	DNA Fragment Size (bp)	DNA Fragment No.	Migration Distance (mm)	DNA Fragment Size (bp)	DNA Fragment No.	Migration Distance (mm)	DNA Fragment Size (bp)
1	17	19,000	1	17	19,000	1	17	19,000
2	22	13,000	2	21	14,000	2	21	14,000
3	27	8,000	3	24	10,500	3	24	10,500
4	29	7,000	4	38	3,300	4	27	8,000
5	40	2,900	5	40	2,900	5	29	7,000
6	44	2,000				6	38	3,300
7	46	1,800				7	40	2,900
8	52	1,100						
9	54	900						
10	59	600						

Antworten zu den Fragen:

1. Ja, es handelt sich um den biologischen Vater (99,9%) da sowohl charakteristische Banden der Mutter, als auch des Vaters vorhanden sind
2. Beim ersten Vater handelt es sich um den biologischen Vater, da hier eine Übereinstimmung in den charakteristischen Banden zu finden ist.
3. Zur Erinnerung: Jedes Elternteil vererbt ein Allel an jedes Kind, d.h. sind alle vier Kinder vom gleichen Vater, so müsste jedes Kind zumindest in einem Fragment eine Übereinstimmung mit dem Vater zeigen. Die 2.Spur repräsentiert also in unserem Fall den Vater, da eine Übereinstimmung zwischen Spur 1+2+4 im ersten Fragment vorliegt und eine Übereinstimmung zwischen Spur 2+3+5 im zweiten Fragment.