

Verwendung des C3(β_{1c} -Globulin)- Polymorphismus bei der Vaterschaftsbegutachtung

Darjusch D. Farhud* und Hubert Walter

Anthropologisches Institut der Universität Mainz (BRD)

Eingegangen am 4. Januar 1973

Use of C3 (β_{1c} -Globulin)-Polymorphism in Cases of Disputed Paternity

Summary. We have confirmed the autosomal, co-dominant mode of inheritance for the three common phenotypes for the C3 system proposed by other authors. This was done through the study of 31 twin pairs (15 monozygotic and 16 dizygotic), 24 families with 43 children and finally 34 mother-child pairs. The formal genetic model is a two allele (C3^S and C3^F) three phenotypes (S, SF, F) one, which is also in accord with the findings of other authors. There were no differences in the distribution of C3 phenotypes between the sexes basing on a study of 96 women and 114 men from the German population. These observations indicated the usefulness of applying this system in cases of disputed paternity. The theoretical probability of exclusion of a man falsely accused, based on this system is 13.14%. This probability is based on the gene frequencies of C3^S = 0.8071 and C3^F = 0.1928. Examination of 27 cases of disputed paternity enabled us to exclude one of the accused men in 2 cases based only on this system. Thus the empirical rate of exclusion is 7.40%. Possible reasons for the discrepancy are discussed.

Zusammenfassung. Zur Feststellung der Vererblichkeit und des Vererbungsmodus des C3-Proteins haben wir Phänotypenbestimmungen bei insgesamt 31 Zwillingspaaren (16 zweieiigen und 15 eineiigen), 24 Familien mit 43 Kindern und schließlich 34 Mutter-Kind-Paaren vorgenommen. Dabei haben wir eine autosomale, kodominante Vererbung dieser Serumprotein-Phänotypen feststellen können, was auch mit den Ergebnissen anderer Autoren übereinstimmt. Damit kann das vorliegende formalgenetische Modell als zutreffend gelten: drei Phänotypen (C3 S, SF, F) gesteuert von zwei autosomal kodominanten allelen Genen (C3^S und C3^F). Dies stimmt vollkommen überein mit den von anderen Autoren vorgenommenen Untersuchungen. Geschlechtsunterschiede in der C3-Phänotypenverteilung liegen nicht vor, da unsere Untersuchung an einer deutschen Stichprobe (96 Frauen und 114 Männer) keine signifikanten Unterschiede zeigte. Auch dies stimmte mit den bisherigen Ergebnissen anderer Autoren überein. Darüber hinaus haben wir die Anwendbarkeit und Aussagekraft dieses Systems bei Vaterschaftsnachweisen auf Grund der Auswertung der von uns errechneten Genfrequenzen in Rheinland-Pfalz (C3^S = 0,8071, C3^F = 0,1928) überprüft, wobei wir ein relativ gutes Ergebnis erzielten, indem die theoretische Ausschlußwahrscheinlichkeit für das C3-System 13,14% beträgt. Durch Untersuchung von 27 Vaterschaftsgutachtenfällen konnte in 2 Fällen jeweils ein Mann allein auf Grund dieses Systems durch einen klassischen Ausschluß als Vater ausgeschlossen werden. Dies ergibt eine empirische Ausschlußquote von 7,40%. Der Grund dieser Diskrepanz zwischen theoretischer und empirischer Ausschlußchance wird nachstehend erörtert.

Key words: C3-Polymorphismus — Vaterschaftsgutachten.

Der Immunmechanismus eines Säugers oder des Menschen kann allgemein in einen spezifischen und nichtspezifischen Abwehrmechanismus klassifiziert werden. Der sog. 3. Ergänzungsfaktor (Complement Component = C3) gehört zu dem nicht-

* Diese Publikation ist ein Teil der Dissertationsarbeit, die im Juni 1972 an die Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Mainz eingereicht worden ist.

spezifischen Abwehrmechanismus. Mayer (1967) unterteilte den Komponentfaktor in 9 Kategorien: C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 und C9.

Wieme u. Demeulenaere (1967) beschrieben den C3-Polymorphismus, der als dritter Komplementfaktor und als β_{1c} -Globulin bekannt ist. Alper u. Propp (1968) berichteten über den genetischen Polymorphismus des C3 mit Hilfe der horizontalen Hochspannungselektrophorese mit Agarosegel. Gleichzeitig ermittelten Azen u. Smithies (1968) an Hand von Stärkegel-Hochspannungselektrophorese dieses Serumprotein, und zwar im β_{1c} - und β_{1a} -Bereich. Teisberg (1971 b) bewies, daß keinerlei Anzeichen für eine Beziehung zwischen den C3-Phänotypen und denen der ABO-, Rh-, MN-, Hp-, Gc- und PGM₁-Systeme bestehen.

Zu Nomenklatur und Phänotypen

Von verschiedenen Autoren, u. a. Wieme u. Demeulenaere (1967), Alper u. Propp (1968), Azen u. Smithies (1968), Teisberg (1970), sind bestimmte C3-Phänotypen als besonders häufig beschrieben worden. Darüber hinaus sind aber auch einige seltene Varianten bekannt.

Auf Grund unserer eigenen Erfahrungen und der bisher vorliegenden Publikationen kann man von zwei häufigen Allelen ($C3^S = C3^2$, $C3^F = C3^1$) sowie 10 seltenen Allelen sprechen. Als Produkte dieser Allelen sind bis jetzt insgesamt 20 Phänotypen beschrieben worden. Bei den seltenen Allelen wurde keine Homozygotie beobachtet. Alper u. Propp (1968) bezeichnen die 2 häufigen Allelen in S- und F-Nomenklatur. Azen u. Smithies (1968) verwendeten 2- und 1-Nomenklatur. Prokop (1971) vermutet, daß die Posttransferrin-Gruppen (Geserick und Rose) mit C3 identisch sein können und bezeichnet $Pt^B = C3^S = C3^2$, $Pt^A = C3^F = C3^1$. Zur Bestätigung dieser Identität zwischen dem C3- und Pt-System liegt jedoch bisher keine vergleichende Arbeit vor.

Wir übernahmen bewußt wegen besserer Einteilungsmöglichkeit hinsichtlich der selteneren Varianten die S- und F-Nomenklatur von Alper u. Propp. Es sei hierzu auch auf Rittner (1973) verwiesen.

Material

Es wurden Phänotypenbestimmungen an insgesamt 31 Zwillingspaaren (15 EZ, 16 ZZ) sowie 24 Familien mit 43 Kindern und 34 Mutter-Kind-Paaren vorgenommen. Darüber hinaus wurden C3-Typisierungen an 27 Gutachtenfällen, die an unserem Institut sowohl zu serologischen als auch anthropologischen Untersuchungen gelangt sind, durchgeführt.

Methodik

Nach Versuchen mit anderen Elektrophoresemethoden sind wir wegen besserer Differenzierung auf die von Teisberg (1970) beschriebene horizontale Agarose-Dünnschicht-Hochspannungselektrophorese mit gewissen Modifikationen übergegangen. Teisberg hatte diese Methode wiederum von Alper u. Propp übernommen und mit Abänderungen in seiner Publikation (1970) ausführlich beschrieben.

Gelpuffer: Barbital 0,0037 M, Barbital-Natrium 0,0230 M und Calciumlactat 0,0009 M, pH 8,6 (Barbital 1,704 g + Barbital-Na 11,855 g + Calcium lactat 0,693 g ad 2500 ml Aqua dest.).

Brückenpuffer: Barbital 0,0106 M, Barbital-Natrium 0,0610 M und Calciumlactat 0,0018 M, pH 8,6 (Barbital 4,881 g + Barbital-Na 31,443 g + Calciumlactat 1,837 g ad 2500 ml Aqua dest.).

Gelplatte: Die $20 \times 20 \times 0,2$ cm große Glasplatte wird mit 1%igem, 1—2 mm starkem Agarosegel belegt. Die Gelplatte ist bei günstiger Aufbewahrung bis zu 4 Wochen verwendbar.

Serum: Dieses sollte möglichst frisch (optimal 2—5 Tage kühl gelagert) als auch lipid- und hämolysefrei sein. Die Seren sind bei -20°C noch ca. 2 Monate und bei -80°C nach noch längerem Zeitraum typisierbar. Die Serumproben werden in die Spalten, die durch leichtes Pressen des dicken Filterpapiers (z. B. Whatman No. 3) ca. 2 cm von der Anode entfernt gebildet worden sind, eingimpft. Es können bis zu 25 Seren in einer Platte angesetzt werden (optimal 14—17 Seren). Die Spaltlänge beträgt dementsprechend 5—10 mm, und der jeweilige Abstand beträgt 2—5 mm.

Apparatur: Von uns wurde Desaga Dünnschicht-Elektrophoresekammer (121200C Desaga GmbH, Heidelberg) verwendet. Bei optimaler Stromstärke von 20—22 V/cm mit 60—80 mA ist eine Elektrophoresedauer von 2—2½ Std notwendig.

Nach einer Fixierung mit 4%iger Essigsäurelösung von 30—40 min erfolgt während ca. 30 min Eintauchen in Aqua dest.-Schale. Dann wird die Glasplatte mit dem Gel bei optimal 100—120°C in den Trockenschrank gebracht.

Nach 1—2 Std ist das Gel trocken und wird anschließend mit Aminoschwarz-Lösung ca. 5 min gefärbt und mit 1%iger Essigsäure entfärbt.

(Barbital, Barbital-Natrium, Calciumlactat = Fa. Merck, Darmstadt. Agarose, Aminoschwarz 10B = Fa. Serva, Heidelberg.)

Tabelle 1. Zweieiige Zwillinge (16 Paare)

Konstellation	Konkordant			Diskordant		
	S	SF	F	S—SF	S—F	SF—F
Phänotypen	S	SF	F	S—SF	S—F	SF—F
Zahlen	10	4	0	2	0	0
Summe		14			2	
Prozent		87,50			12,50	

Tabelle 2. Eineiige Zwillinge (15 Paare)

Konstellation	Konkordant			Diskordant		
	S	SF	F	S—SF	S—F	SF—F
Phänotypen	S	SF	F	S—SF	S—F	SF—F
Zahlen	13	2	0	0	0	0
Summe		15			0	
Prozent		100,00			0,00	

Tabelle 3. Eltern-Kind-Kombination (eigenes Material)

Eltern	Kinder				χ^2	FG	P					
	S	SF	F	Summe								
Konstel.	beo.	erw.	beo.	erw.	beo.	erw.	beo.	erw.	Summe			
S × S	7	7,59	18	18	—	—	—	—	18			
S × SF	11	10,12	5	9	13	9	—	—	18	3,555	1	0,10 > P > 0,05
SF × SF	3	3,37	2	0,75	0	1,5	1	0,75	3	3,666	2	0,20 > P > 0,10
SF × F	1	1,12	—	—	0	0,5	1	0,5	1	1,000	1	0,50 > P > 0,30
S × F	2	1,68	—	—	3	3	—	—	3			
F × F	0	0,09	—	—	—	—	0	0	0			
Summe	24	23,97	25	25,32	16	15,34	2	2,32	43	0,0764	2	0,98 > P > 0,95

Ergebnisse und Diskussion

Auf Grund unserer Zwillingsuntersuchung konnten wir die grundsätzliche Frage der Erbllichkeit des C3-Systems prüfen. Es ergab sich bei ZZ eine Konkordanz von 87,50% (Tabelle 1) und bei EZ eine Konkordanz von 100% (Tabelle 2). Jedes der Zwillingspaare wurde von uns zuerst auf die Eiigkeit mit Hilfe von Serum-, Blutgruppenmerkmalen und Enzymen diagnostiziert.

Zur Überprüfung des Vererbungsmodus untersuchten wir 24 Familien mit insgesamt 43 Kindern (Tabelle 3). Die Ehelichkeit wurde durch Untersuchung zahlreicher Blut-, Serumprotein- und Enzymgruppen (wie bei unserem Zwillingmaterial) soweit wie möglich gesichert. Seltene Varianten wurden bei unserer Familienuntersuchung nicht angetroffen. Um eine bessere Aussagekraft zu erreichen, wurden die Familienuntersuchungen anderer Autoren aus Deutschland (Goedde *et al.*, 1970, 70 Eltern, 126 Kinder), Amerika (Azen u. Smithies, 1968, 24 Eltern, 81 Kinder; Azen *et al.*, 1969, 29 Eltern, 89 Kinder) und Norwegen (Teisberg, 1971 b, 53 Eltern, 161 Kinder) mit unserem Familienmaterial kombiniert (Tabelle 4). Bei Übernahme der Untersuchungsergebnisse der obengenannten Autoren haben wir auf die Eltern-Kind-Kombinationen mit seltenen Varianten wegen zu geringer Anzahl (8 Eltern, 13 Kinder) verzichtet.

Zwischen den Erwartungs- und Beobachtungswerten bestand nach Berechnung des χ^2 -Tests bei den Kindern kein signifikanter Unterschied, abgesehen von den

Tabelle 4. Eltern-Kind-Kombination (Gesamtmaterial)

Eltern	Kinder								χ^2	FG	P
	S		SF		F		Summe				
Konstel.	beo.	erw.	beo.	erw.	beo.	erw.		beo.	erw.		
S × S	64	69,40	158	158	—	—	—	—	158		
S × SF	94	84,08	130	131	132	131	—	—	262	2,00	1 0,20 > P > 0,10
SF × SF	26	25,52	17	11	15	22	12	11	44	6,499	2 0,05 > P > 0,02
SF × F	8	7,76	—	—	8	9,5	11	9,5	19	0,473	1 0,50 > P > 0,30
S × F	8	12,76	—	—	17	17	—	—	17		
F × F	0	0,58	—	—	—	—	0	0	0		
Summe	200	200,10	305	300	172	179,5	23	20,5	500	0,701	2 0,80 > P > 0,70

Tabelle 5. Mutter-Kind-Kombination (eigenes Material)

Mutter	Kind			
	S	SF	F	
S	19	13	6	—
SF	13	6	5	2
F	2	—	1	1
Summe	34	19	12	3

Kindern der Elternkonstellation SF \times SF (Tabelle 4), was wahrscheinlich auf die relativ geringe Probandenzahl zurückzuführen ist.

Bezüglich der C3-Phänotypenuntersuchung an Mutter-Kind-Kombinationen verfügen wir über 34 Mutter-Kind-Paare (Tabelle 5). Bei der Zusammenstellung des Untersuchungsmaterials anderer Autoren aus Deutschland (Goedde *et al.*, 1970, 115 M.-K.-Paare), Dänemark (Dissing u. Sørensen, 1971, 117 M.-K.-Paare) und Norwegen (Teisberg, 1971 b, 1206 M.-K.-Paare) mit unserem Material ergaben sich 1462 Mutter-Kind-Paare (Tabelle 6). Auch hier haben wir auf die von den Autoren angegebenen beobachteten seltenen Varianten wegen geringer Anzahl (15 M.-K.-Paare) verzichtet.

An dem Gesamtmaterial, d. h. Eltern-Kind- sowie Mutter-Kind-Kombinationen mit relativ großen Stichproben, ist also kein einziger Fall von entgegengesetzter Homozygotie zu beobachten gewesen. Auf Grund dieser Untersuchungen kann man von zwei häufigen Allelen C3^S und C3^F mit ihren Produkten C3 S, SF und F sprechen, die autosomal kodominant vererbt werden.

An Hand unseres Untersuchungsgutes von 96 Frauen und 114 Männern aus Rheinland-Pfalz haben wir keine statistisch gesicherten Unterschiede zwischen der C3-Phänotypenverteilung bei Männern und Frauen feststellen können (Tabelle 7).

Tabelle 6. Mutter-Kind-Kombination (Gesamtmaterial)

Mutter		Kind		
		S	SF	F
S	924	741	183	—
SF	461	198	207	56
F	77	—	60	17
Summe	1462	939	450	73

Tabelle 7. Phänotypenverteilung bei Frauen und Männern (eigenes Material)

Geschlecht	Summe	S	SF	F
Weiblich	96	64	30	2
Männlich	114	71	39	4
Summe	210	135	69	6

$$\chi^2 = 2,9627; \text{FG} = 2; 0,58 > P > 0,30.$$

Tabelle 8. Phänotypenverteilung bei Frauen und Männern (Gesamtmaterial)

Geschlecht	Summe	S	SF	F
Weiblich	1321	828	429	64
Männlich	1722	1105	544	73
Summe	3043	1933	973	137

$$\chi^2 = 1,0521; \text{FG} = 2; 0,70 > P > 0,50.$$

Auch die bisherigen Untersuchungen an Stichproben aus Norwegen (Teisberg, 1971a, 1034 Frauen, 1394 Männer) und Dänemark (Dissing u. Sørensen, 1971, 191 Frauen, 214 Männer) ergaben das gleiche Resultat (Tabelle 8). Hier haben wir ebenso die seltenen Varianten (9 Frauen, 18 Männer) nicht berücksichtigt.

Anwendung in der Vaterschaftsuntersuchung

Auf Grund der vorher besprochenen Familienuntersuchung sowie Mutter-Kind-Kombinationen mit relativ großen Stichproben ist der Vererbungsmodus des C3 klar bewiesen, so daß diese Hauptbedingung zur Verwendung dieses Systems für die Vaterschaftsbegutachtung gegeben ist.

Eine weitere Voraussetzung für die Anwendbarkeit eines Systems ist eine gute Relation zwischen den einzelnen Genfrequenzen, d. h., das System soll kein zu häufiges Allel oder ein bzw. mehrere Allele mit zu niedrigen Genfrequenzen (weniger als 0,01) enthalten. Das C3-System kann infolge relativ günstiger Allelenverteilung als brauchbares System in diesem Sinne angegeben werden.

Als dritt wichtigste Voraussetzung ist die einwandfreie technische Bestimmungsmethode zu nennen, die mit keiner Fehldiagnostik verbunden ist. Auch dies ist bei der C3-Bestimmung mittels Agarosegel-Elektrophorese ausreichend gegeben.

Wir untersuchten 27 vollständige Gutachtenfälle auf die C3-Phänotypen. Es handelte sich hierbei um 27 Mütter, 27 Kinder und 32 Männer.

Unser Material mit 2 klassischen Ausschlüssen ergibt (Abb. 1) eine empirische isolierte Ausschlusswahrscheinlichkeit von 7,40%. Wir errechneten jedoch auf Grund der C3-Genfrequenzen in Deutschland (Rheinland-Pfalz) $C3^S = 0,8071$, $C3^F = 0,1928$ (Farhud u. Walter, 1972) nach dem Essen-Möller-Verfahren (Hummel, 1961, 1963,

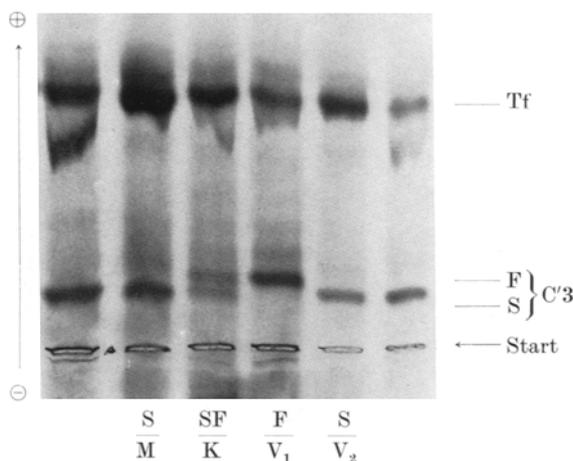


Abb. 1. Modellfall einer der beiden obengenannten Fälle. Weder V_1 noch V_2 war mittels eines der von uns nur serologischen Vaterschaftsbegutachtung routinemäßig verwendeten Blut-, Serum- und Enzymsysteme (ABO, MNSS, Rh, P, K, Fy (a), Hp, Gc, Gm, InV, SEPh, AK, PGM, ADA, Tf) auszuschließen

Tabelle 9
Kind-Mutter-fragliche Vaterkombination und die jeweilige Ausschlußwahrscheinlichkeit

Kind	Mutter	Vater	log. Y/X	(+ 10)
S	S	S	log. A	9,9069
	SF	SF	log. 2A	10,2078
SF	S	F	log. a	9,2851
		SF	log. 2a	9,5881
		S	log. 1	10,0000
	SF	SF	log. 1	10,0000
		FF	log. 1	10,0000
		F	S	log. A
F	F	SF	log. 2A	10,2078
		FF	log. a	9,2851
	SF	FF	log. 2a	9,5861
		SF	SF	log. 2a

Genfrequenzen: $C3^S = 0,8071 (= A)$; $C3^F = 0,1928 (= a)$. Isolierte Ausschlußwahrscheinlichkeit = 13,14%.

1971) bzw. nach Krüger (1968) eine theoretische isolierte Ausschlußwahrscheinlichkeit von 13,14% (Tabelle 9). Diese Diskrepanz zwischen theoretischer und empirischer isolierter Ausschlußwahrscheinlichkeit beruht höchstwahrscheinlich auf der geringen Zahl der von uns untersuchten Gutachtenfälle und dürfte daher zufallsbedingt sein.

Bei gleichzeitiger Berücksichtigung der anderen in der Vaterschaftsbestimmung üblicherweise verwendeten serologischen Systeme erhöht sich die kombinierte Ausschlußwahrscheinlichkeit für Nicht-Väter durch Hinzufügen des C3-Systems um ca. 1,3%.

Die Autoren bedanken sich für die freundliche Hilfe und Ausarbeitung bei Fr. U. Wilhelm, Wiesbaden, und Fr. H. Steegmüller an unserem Institut. Für wertvolle Hinweise und Unterstützung danken wir auch unserem Kollegen Herrn Dr. R. Ananthakrishnan.

Literatur

- Alper, C. A., Propp, R. P.: Genetic polymorphism of the third component of human complement (C3). *J. clin. Invest.* **47**, 2181—2191 (1968).
- Azen, E. A., Smithies, O.: Genetic polymorphism of C3 (β_{1c} -globulin) in human serum. *Science* **162**, 905—907 (1968).
- Azen, E. A., Smithies, O., Hiller, O.: High-voltage starch-gel-electrophoresis in the study of post-albumin proteins and C3 (β_{1c} -globulin) polymorphism. *Biochem. Genet.* **3**, 215—228 (1969).
- Dissing, J., Sørensen, H.: Studies on C3 polymorphism in Denmark. *Hum. Hered.* **21**, 272—277 (1971).
- Farhud, D. D., Walter, H.: Polymorphism of C3 in German, Bulgarian, Iranian and Angola population. *Humangenetik* **16**, 161—164 (1972).
- Goedde, H. W., Benkmann, H. G., Hirth, L.: Genetic polymorphism of C3 (β_{1c} -globulin) component of complement in a German and Spanish population. *Humangenetik* **10**, 231—234 (1970).
- Hummel, K.: Die medizinische Vaterschaftsbegutachtung mit biostatistischem Beweis. Stuttgart: Fischer 1961.

- Hummel, K.: Ergänzende Ig Y/X-Tabellen zur Berechnung der Vaterschaftswahrscheinlichkeit im serologischen Gutachten. *Z. Immun.-Allergieforsch.* **125**, 277—284 (1963).
- Hummel, K.: Biostatistische Abstammungsbegutachtung mit Blutgruppenbefunden. Stuttgart: Fischer 1971.
- Krüger, J., Fuhrmann, W., Lichte, K.-H., Steffens, Chr.: Zur Verwendung des Polymorphismus der sauren Erythrozytenphosphatase bei der Vaterschaftsbegutachtung. *Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med.* **64**, 126—146 (1968).
- Mayer, M. M.: Nomenclature and reaction mechanism of the complement system. Amsterdam: Elsevier Publishing Company 1967.
- Prokop, O.: Die menschlichen Blut- und Serumgruppen. Stuttgart: Fischer 1971.
- Rittner, Ch. (Ed.): First International Symposium and Workshop on the Polymorphism of the Third Component of the Human Complement System. *Vox Sang.* **34** (1973, in the press).
- Teisberg, P.: High voltage agarose gel electrophoresis in the study of C3-polymorphism. *Vox Sang.* (Basel) **19**, 47—56 (1970).
- Teisberg, P.: The distribution of C3-types in Norway. *Hum. Hered.* **21**, 154—161 (1971a).
- Teisberg, P.: Genetics of the C3-system. *Hum. Hered.* **21**, 458—466 (1971b).
- Wieme, R. J., Demeulenaere, L.: Genetically determined electrophoretic variant of the human complement component C3. *Nature* (Lond.) **214**, 1042 (1967).

Dr. Dr. D. D. Farhud
Prof. Dr. H. Walter
Anthropologisches Institut der Universität
D-6500 Mainz, Saarstraße 21
Bundesrepublik Deutschland