

Der Polymorphismus des menschlichen Chromosomensatzes — eine Möglichkeit für den Vaterschaftsnachweis*

W. Schnedl

Histologisch-Embryologisches Institut der Universität Wien (Österreich)

Eingegangen am 13. Juni 1973

Polymorphisms in Human Chromosomes — a New Aid for Affiliation Cases

Summary. The recent quinacrine fluorescence analysis and the Giemsa banding methods allow identification of all human chromosomes. When human chromosomes were studied by using these methods, at least 10 of the 23 chromosome pairs showed polymorphism occurring at a relatively high frequency. Since these features are carried by the chromosomes they are necessarily inherited. The frequency of these variabilities is high enough to allow exclusion of paternity in affiliation cases at a likelihood of at least 70%.

Zusammenfassung. In den letzten Jahren ist durch die Quinacrine-Fluoreszenzmethode und die Giemsa-Bänderverfahren eine Identifizierung sämtlicher Chromosomen des Menschen möglich geworden. Dabei hat sich auch gezeigt, daß mindestens 10 von den 23 Chromosomenpaaren zum Teil sehr häufige Variabilitäten aufweisen, die, da sie in die Erbräger integriert sind, notwendigerweise vererbt werden. Die Frequenzen dieser Polymorphismen würden, auch bei Verwendung nur der am leichtesten zu erkennenden Strukturverschiedenheiten, beim Vaterschaftsnachweis eine Ausschlußwahrscheinlichkeit von ca. 70% ergeben.

Key words: Vaterschaftsnachweis, Polymorphismus des menschlichen Chromosomensatzes Quinacrin Fluoreszenz.

Einleitung

Zum Vaterschaftsnachweis wurden bisher vor allem zwei Methoden angewandt: die Bestimmung der erblichen Blutgruppen- und Serumfaktoren und der Vergleich erblicher morphologischer Merkmale. In beiden Fällen wird der Phänotyp von chromosomal verankerten Eigenschaften bestimmt. Eine direkte Untersuchung am Erbräger selbst, dem Chromosom, war bisher unmöglich. Obwohl das Vorliegen von morphologischen Variabilitäten in den Chromosomen schon seit längerer Zeit bekannt war (z. B. Ferguson-Smith *et al.*, 1962; Turpin u. Lejeune, 1965; Lubs u. Ruddle, 1970; Passarge, 1970), konnten diese Polymorphismen doch nicht als genetische Marker verwendet werden, weil die Zuordnung zu bestimmten Chromosomen nicht verlässlich war.

Heute ermöglichen bereits mehrere Methoden die Unterscheidung der 23 Chromosomenpaare des Menschen. Das erste dieser Verfahren ist die Quinacrine-Fluoreszenzmethode (z. B. Caspersson *et al.*, 1970a). Nach Färbung mit gewissen Quinacrine-Derivaten werden im Fluoreszenzmikroskop charakteristische Querbänder in den Chromosomen sichtbar, die eine Identifizierung aller Elemente des menschlichen Chromosomensatzes ermöglichen (Abb. 1). Das Y-Chromosom zeigt eine besonders starke Fluoreszenz. Ähnliche Bändermuster werden mit der so-

* Für wertvolle Hilfe bei der Berechnung der Ausschlußwahrscheinlichkeiten bin ich Herrn Doz. Dr. J. Herbig und Herrn Dr. K. Meinhart sehr zu Dank verpflichtet.

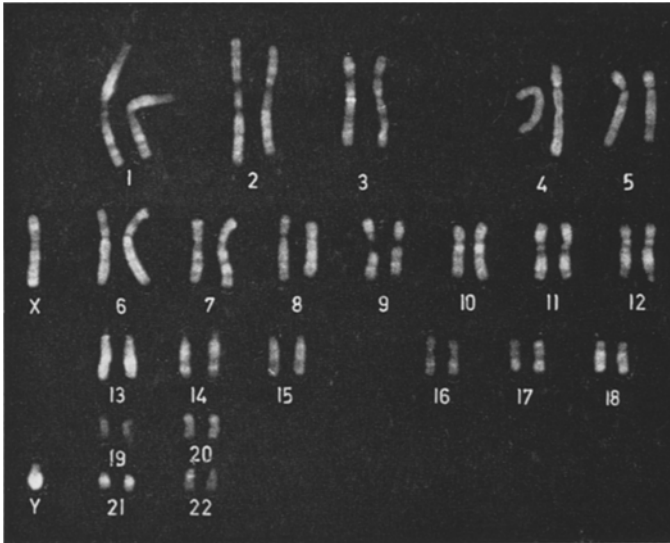


Abb. 1. Menschlicher Chromosomensatz, männlich, Quinacrine mustard-Fluorescenz. Die Bänderungsmuster in den Chromosomen ermöglichen eine Identifizierung aller Elemente des Karyotyps. Das Y-Chromosom zeigt im distalen Teil des langen Arms eine besonders auffällige Fluorescenz

genannten Giemsa-Bändermethode dargestellt (z. B. Schnedl, 1971 a, b; Sumner *et al.*, 1971). Für diese Methode wird kein Fluorescenzmikroskop benötigt. Die meisten der variablen Stellen der Chromosomen, auf die es uns hier besonders ankommt, werden aber mit der Quinacrine-Fluorescenz besser dargestellt. Mindestens 10 von den 23 Chromosomenpaaren des Menschen zeigen Variabilitäten (Schnedl, 1973). Ihre Häufigkeit ist so groß (bis 50%), daß sie sich für die Bestimmung von Verwandtschaftsverhältnissen direkt anbieten.

Material und Methoden

Das gebräuchlichste Verfahren zur Gewinnung von Chromosomenpräparaten besteht in der Kultivierung von Zellen *in vitro*. Üblicherweise wird die Blutkulturmethode angewandt (Moorhead *et al.*, 1960). Die Mikro-Blutkulturen (z. B. Araraki u. Sparkes, 1963; Hunderford, 1965) ermöglichen, Chromosomenpräparate aus wenigen Tropfen Blut zu gewinnen; dies ist bei der Untersuchung von kleinen Kindern von größtem Wert.

Auch aus Fibroblastenkulturen (z. B. aus Hautbiopsien) können Chromosomenpräparate gewonnen werden; während für Blutkulturen nur 3 Tage benötigt werden, dauert die Gewinnung von Chromosomenpräparaten aus Fibroblastenkulturen wesentlich länger (ca. 14 Tage).

Zur Darstellung der Quinacrine-Fluorescenz können mehrere Farbstoffe verwendet werden:

- Quinacrine mustard (50 µg/ml in destilliertem Wasser),
- Quinacrine dihydrochloride (2% in destilliertem Wasser),
- Quinacrine hydrochloride (1% in destilliertem Wasser).

Quinacrine mustard verblaßt unter der UV-Bestrahlung etwas langsamer als die anderen Farbstoffe. Quinacrine dihydrochloride gibt aber völlig gleichwertige Resultate. Die Farblösungen lassen sich jahrelang verwenden, wenn durch Zusatz von Thymol Bakterienentwicklung verhindert wird.

Bei der Fluoreszenzmikroskopie wird eine Blaulichtanregung angewandt (Lampe z. B. HBO 200; Erregerfilter BG 12 (Schott), verschiedene Dicken dieses Filterglases sollten versucht werden). Als Sperrfilter verwenden wir OG-515 und GG-9 (Schott), wobei letzteres dem Objekt zugewandt sein muß.

Die besten Ergebnisse werden mit Durchlicht-Dunkelfeldanregung erzielt; in der Praxis ist es aber bequemer, Auflichtanregung zu verwenden.

Die Darstellung der Giemsa-Bänder in den Chromosomen kann mit mehreren Verfahren erreicht werden (z. B. Schnedl, 1971 a, b; Sumner *et al.*, 1971; Dutrillaux *et al.*, 1971). Die variablen sekundären Constrictionen der Chromosomen 1, 9 und 16 werden aber auch mit der Methode nach Arrighi u. Hsu (1971) gut dargestellt. Eine spezifische Anfärbung der sekundären Constrictionen im Chromosom Nr. 9 gelingt mit den Methoden von Bobrow *et al.* (1972) und Gagné u. Laberge (1972).

Ergebnisse

Mit Hilfe der durch die Quinacrine-Fluoreszenzmethode dargestellten Bandmuster können alle Chromosomen des Menschen unterschieden werden (Abb. 1). In folgenden Chromosomen sind variable Regionen enthalten: in Nr. 1, 3, 4, 9, 13—15, 16, 20, 21 und im Y.

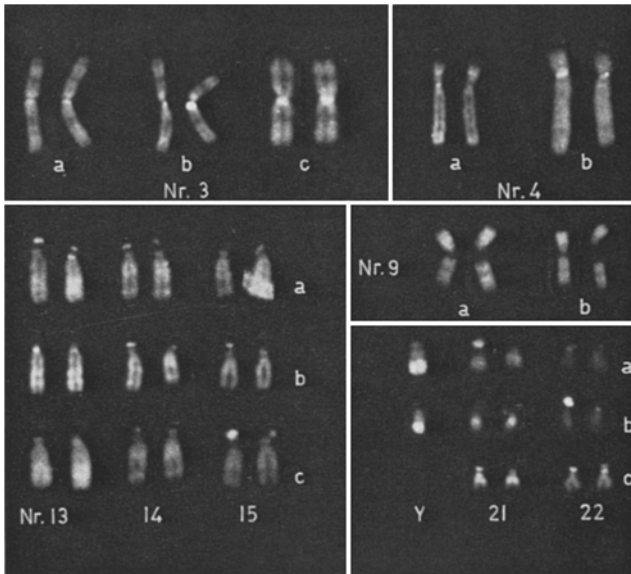


Abb. 2. Einige Beispiele vom Polymorphismus der menschlichen Chromosomen, Quinacrine-mustard-Fluoreszenz. *Chromosom Nr. 3:* a Homologenpaar mit nur schwach fluoreszierender zentromerischer Region; b in einem Homologen ein schwacher, im anderen ein stark fluoreszierender Fleck in der zentromerischen Region; c beide Homologe zeigen einen stark fluoreszierenden Fleck (homozygotes Auftreten). *Chromosom Nr. 4:* a in einem Homologen ein fluoreszierender Punkt am Zentromer; b ein ungewöhnlich stark fluoreszierender Fleck in einem Homologen, im anderen ein durchschnittlich starker Fluoreszenzfleck. *Chromosom Nr. 9:* a eine durchschnittliche in einem und eine etwas vergrößerte sekundäre Constriction im anderen Homologen; b eine sehr schmale und eine übermäßig lange sekundäre Constriction im Homologenpaar Nr. 9. *Chromosomen Nr. 13—15:* a—c verschieden ausgeprägte Satelliten und kurze Arme bei 3 Fällen. *Chromosomen Nr. 21—22:* a starker Satellit an einem Chromosom Nr. 21; b starker Satellit an einem Chromosom Nr. 22; c weibliche Zelle, verschieden stark ausgeprägte Satelliten, in einem Nr. 22 ein verstärkter kurzer Arm

Am einfachsten zu erfassen sind die Längenvariabilitäten. So ist z. B. die sekundäre Constriction des Chromosoms Nr. 1 von variabler Größe. Mit den neuen Methoden (z. B. Arrighi u. Hsu, 1971) wird diese Region stark angefärbt. Im Quinacrine-Fluoreszenzbild ist diese Stelle jedoch nur sehr schwach gefärbt. Eine ähnliche Situation findet sich bei den entsprechenden Regionen der Chromosomen 9 und 16. Auch diese Regionen sind von wechselnder Länge (Abb. 2).

Auch das menschliche Y-Chromosom zeigt, wie schon aus Untersuchungen mit konventionellen Färbemethoden bekannt (z. B. Cohen *et al.*, 1966), eine weite Variabilität seiner Länge. Mit Hilfe der Quinacrine-Fluoreszenzmethode konnte gezeigt werden, daß diese Variabilität größtenteils durch die wechselnde Länge des stark fluoreszierenden distalen Anteiles bedingt ist (Schnedl, 1971 c; Bobrow *et al.*, 1971).

Die auffälligste und häufigste Variabilität betrifft die zentromerische Region des langen Armes im Chromosom Nr. 3 (Schnedl, 1971 d). An dieser Stelle findet sich oft ein stark fluoreszierender Fleck (Abb. 1 u. 2). Wenn auch verschiedene Grade von Fluoreszenzintensität in dieser Region gefunden werden, so ist es doch möglich, zwischen Chromosomen zu unterscheiden, denen eine solche fluoreszierende Region fehlt, und denen, die dort einen fluoreszierenden Punkt haben. Dieses variable Merkmal des Chromosoms Nr. 3 kann sowohl homozygot wie heterozygot vorliegen; die Eigenschaft kann auch in beiden Chromosomen Nr. 3 fehlen (Abb. 2). In unserer gegenwärtig 100 normale Personen umfassenden Serie liegt die Häufigkeit dieses fluoreszierenden Punktes bei 50% (Tabelle 1). Die Häufigkeit des homozygoten Auftretens und des Fehlens dieser Eigenschaft in beiden Homologen wird in Tabelle 2 angeführt. Im χ^2 -Test zeigt sich eine gute Übereinstimmung zwischen den erwarteten und beobachteten Zahlen (Hardy-Weinberg-Gesetz).

Im Chromosom Nr. 4 findet sich eine ähnliche Situation. Die zentromerische Region enthält auch hier häufig einen fluoreszierenden Fleck; nur selten erreicht dieser die Fluoreszenzintensität der entsprechenden Stelle im Chromosom Nr. 3 (Abb. 2). Meistens liegt dieser Fleck auf der dem langen Arm zugewandten Seite des Zentromers; er kann aber auch am kurzen Arm liegen (Schnedl, 1973). Es ist

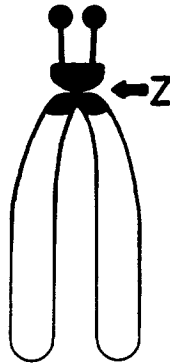


Abb. 3. Schematische Darstellung eines akrozentrischen Chromosoms vom Menschen (Nr. 13 bis 15, 21—22); Z Zentromer. Vier Regionen (schwarz) sind von variabler Ausbildung: 1. die zentromerische Region des langen Arms; 2. im kurzen Arm: a der proximale Teil des kurzen Arms, b der Satellitenstiel, c die Satelliten

Tabelle 1. Frequenzen der häufigsten Fluoreszenz-Variabilitäten des menschlichen Chromosomensatzes in 50 Fällen (bei Chromosom Nr. 3 in 100 Fällen)

Chromosom Nr.		Häufigkeit (%)	Ausschluß- wahrscheinlichkeit (%)
3	zentromerische Region	50	18,7
13	Satelliten	14	10,5
	zentromerische Region	54	18,0
14	Satelliten	22	14,3
	kurzer Arm	1	1,0
15	Satelliten	12	9,4
	kurzer Arm	1	1,0
21	Satelliten	28	14,3
	kurzer Arm	1	1,0
22	Satelliten	21	13,8
	kurzer Arm	11	8,0

schwierig, Häufigkeiten dieser Varianten anzugeben, da ihre Sichtbarkeit weitgehend von der Qualität der Präparate abhängt.

Ein komplexes Bild von Variabilitäten findet sich in den großen und kleinen akrozentrischen Chromosomen (Nr. 13—15 bzw. Nr. 21 u. 22). Sehr häufig zeigen diese Chromosomen verstärkte Fluoreszenz am Zentromer und besonders im Bereich des kurzen Armes (Caspersson *et al.*, 1970 b). Diese Chromosomen tragen in ihrem kurzen Arm die Nucleolus-Organisator-Region (Hendersen *et al.*, 1972). Der Aufbau des kurzen Armes wird in Abb. 3 verdeutlicht. Insgesamt sind vier Regionen der akrozentrischen Chromosomen von variabler Ausbildung: 1. die zentromerische Region, 2. der proximale Teil des kurzen Armes, 3. der Satellitenstiel und 4. die Satelliten selbst. Alle diese Bestandteile können unabhängig voneinander variieren. In Abb. 2 werden einige Beispiele dieser Varianten gezeigt. In Tabelle 1 sind die Häufigkeiten einiger dieser Varianten in einer Gruppe von 50 Fällen zusammengestellt. Wie man Tabelle 1 entnehmen kann, sind Polymorphismen in den akrozentrischen Chromosomen (Gruppe D und G) recht häufig.

Diskussion

Varianten der menschlichen Chromosomen sind sowohl aus theoretischen wie praktischen Gründen interessant. Nur solche Chromosomenregionen können Polymorphismen zeigen, die genetisch inaktiv sind oder aus DNS-Sequenzen aufgebaut sind, in denen Überschuß oder Verlust von genetischem Material leicht kompensiert werden kann. Es ist naheliegend anzunehmen, daß Varianten besonders in aus repetitiver DNS aufgebauten Chromosomenregionen vorkommen werden. In solchen Regionen könnte, wenn auch sehr selten, ungleiches Crossover auftreten, wodurch es zur Chromosomenvariabilität kommt. Damit gibt die Variabilität eines bestimmten Chromosomenabschnittes einen indirekten Hinweis über das dort lokalisierte Material.

Tabelle 2. Vorkommen der stark fluoreszierenden Region am Zentromer des Chromosoms Nr. 3 in 100 Fällen

	Beobachtete Zahl	Erwarteter Wert
Fehlend	26	25,0
Heterozygot	48	50,0
Homozygot	26	25,0
	100	100,0

Da all die hier beschriebenen Polymorphismen in das Chromosom integriert sind, müssen sie notwendigerweise vererbt werden. Jede Zelle eines bestimmten Individuums zeigt das gleiche Muster an Variabilität. Die typische Verteilung des Auftretens des fluoreszierenden Fleckes im Chromosomenpaar Nr. 3 in einer Population spricht ebenfalls für eine Erbllichkeit dieser Eigenschaften. Die beobachteten Häufigkeiten des homozygoten und heterozygoten Vorkommens dieses Flecks und dessen Fehlen stimmen mit der für eine genetische Eigenschaft erwarteten Verteilung überein (Schnedl, 1971 d). Für die Erbllichkeit der Längenvariation des Y-Chromosoms (Schnedl, 1971 c; Bobrow *et al.*, 1971) liegen Familienuntersuchungen vor (McKenzie *et al.*, 1972).

Dementsprechend sind diese Merkmale der Chromosomen schon in einzelnen Fällen zur Klärung von genetischen Verhältnissen verwendet worden (Jonasson *et al.*, 1972). Es war auch möglich, die ursprüngliche Annahme, daß das überzählige Chromosom Nr. 21 beim Mongolismus von der Mutter stammt, mit Hilfe des Polymorphismus dieses Chromosoms zu bestätigen (Licznernski u. Lindsten, 1972; Robinson, 1973).

In Tabelle 1 sind auch die Ausschlußwahrscheinlichkeiten aus einigen der Chromosomenpolymorphismen in den Chromosomengruppen D und G angegeben. Die Ausschlußwahrscheinlichkeit aus dem Leuchtfleck im Chromosom Nr. 3 allein beträgt 18,7%. Zusammen ergibt sich eine Ausschlußwahrscheinlichkeit von etwa 70%. Dabei ist zu bedenken, daß hierbei die Längenvariabilität der Satellitenstiele in den 5 akrozentrischen Chromosomen und die Längenvariabilität der Chromosomen 1, 9, 16 und Y noch nicht einbezogen sind.

Die Untersuchung der Chromosomen kann unmittelbar nach Geburt des fraglichen Kindes durchgeführt werden; die Ergebnisse können bereits 3—4 Tage nach der Blutabnahme vorliegen. Ein weiterer Vorteil liegt darin, daß sämtliche in Frage kommenden Faktoren in einem einzigen Arbeitsgang ermittelt werden können.

Damit bietet sich dieses Verfahren in allen Fällen, wo aus serologischen Eigenschaften allein kein Ausschluß zu erzielen ist, zum Vaterschaftsnachweis an.

Literatur

- Araraki, D. T., Sparkes, R. S.: Microtechnique for culturing leucocytes from whole blood. *Cytogenetics* **2**, 57—60 (1963)
- Arrighi, F. E., Hsu, T. C.: Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics* **10**, 81—86 (1971)
- Bobrow, M., Madan, K., Pearson, P. L.: Staining of some specific regions of human chromosomes, particularly the secondary constriction of No. 9. *Nature (Lond.) New Biol.* **238**, 122—124 (1972)

- Bobrow, M., Pearson, P. L., Pike, M. C., El-Alfi, O. S.: Length variation in the quinacrine-binding segment of human Y chromosomes of different sizes. *Cytogenetics* **10**, 190—198 (1971)
- Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C., Modest, E. J.: Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescent agents. *Chromosoma (Berl.)* **30**, 215—227 (1970 a)
- Caspersson, T., Zech, L., Johansson, C., Lindsten, J., Hultén, M.: Fluorescent staining of heteropycnotic chromosome region in human interphase nuclei. *Exp. Cell Res.* **61**, 472—474 (1970 b)
- Cohen, M. M., Shaw, M. W., MacCluer, J. W.: Racial differences in the length of the human Y chromosome. *Cytogenetics* **5**, 34—52 (1966)
- Dutrillaux, B., Grouchy, J. de, Finaz, C., Lejeune, J.: Mise en évidence de la structure fine des chromosomes humains par digestion enzymatique (pronase en particulier), Série D. C.R. Acad. Sci. (Paris) **273**, 587—588 (1971)
- Ferguson-Smith, M. A., Ferguson-Smith, M. E., Ellis, P. M., Dickson, M.: The sites and relative frequencies of secondary constrictions in human somatic chromosomes. *Cytogenetics* **1**, 325—343 (1962)
- Gagné, R., Laberge, C.: Specific cytological recognition of the heterochromatic segment of number 9 chromosome in man. *Exp. Cell Res.* **73**, 239—242 (1972)
- Hendersen, A. S., Warburton, D., Atwood, K. C.: Location of ribosomal DNA in the human chromosome complement. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **69**, 3394—3398 (1972)
- Hungerford, D. A.: Leucocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain Technol.* **40**, 333 (1965)
- Jonasson, J., Lindsten, J., Lundborg, R., Kissmeyer-Nielsen, F., Lamm, L. U., Petersen, G. B., Therkelsen, A. J.: HL-A antigens and heteromorphic fluorescence characters of chromosomes in prenatal paternity investigation. *Nature (Lond.)* **236**, 312—313 (1972)
- Licznerski, G., Lindsten, J.: Trisomy 21 in man due to maternal non-disjunction during the first meiotic division. *Hereditas (Lund)* **70**, 153—154 (1972)
- Lubs, H. A., Ruddle, F. H.: Applications of quantitative karyotypy to chromosome variation in 4400 consecutive newborns. Pfizer Foundation Series. Edinburgh: University Press 1970
- McKenzie, W. H., Hostetter, T. L., Lubs, H. A.: Y family study: heritable variation in the length of the human Y chromosome. *Amer. J. hum. Genet.* **24**, 686—693 (1972)
- Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Batipps, D. M., Hungerford, D. A.: Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* **20**, 613—616 (1960)
- Passarge, E.: Der Karyotyp des Menschen. In: Methoden in der medizinischen Cytogenetik, Schwarzscher, H. G., Wolf, U., Hrsg. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970
- Robinson, J.: Origin of extra chromosome in trisomy 21. *Lancet* **1973** I, 131—133
- Schnedl, W.: Banding pattern of human chromosomes. *Nature (Lond.) New Biol.* **233**, 93—94 (1971 a)
- Schnedl, W.: Analysis of the human karyotype using a reassociation technique. *Chromosoma (Berl.)* **34**, 448—454 (1971 b)
- Schnedl, W.: Fluorescenzuntersuchungen über die Längenvariabilität des Y-Chromosoms beim Menschen. *Humangenetik* **12**, 188—194 (1971 c)
- Schnedl, W.: Unterschiedliche Fluorescenz der beiden homologen Chromosomen Nr. 3 beim Menschen. *Humangenetik* **12**, 59—63 (1971 d)
- Schnedl, W.: Analysis of the human karyotype by the recent banding techniques. *Arch. Genet.* **46** (im Druck, 1973)
- Sumner, A. T., Evans, H. J., Buckland, R. A.: New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature (Lond.) New Biol.* **232**, 31—32 (1971)
- Turpin, R., Lejeune, J.: Les chromosomes humains. Caryotype normal et variations pathologiques. Paris: Gauthier-Villars 1965

Dr. W. Schnedl
Histologisch-Embryologisches Institut
der Universität
A-1090 Wien, Schwarzschanerstraße 17
Österreich