
Standardisierung der DNA-Typisierung zur Identifikation von Dopingkontrollproben

Ch. Lach, C. Schmitt, M. Staak (Projektleiter)

Universität zu Köln
Institut für Rechtsmedizin

1 Problem

Im Rahmen von Dopingkontrollen kann bei Verdacht auf Probenverwechslung oder Probenmanipulation die Identifikation von Urin oder Haarproben notwendig werden. Die Probe fraglicher Herkunft muss dann nachträglich dem wirklichen Spender zugeordnet werden können. Eine sichere Zuordnung wird hier durch die Analyse polymorpher DNA-Abschnitte erreicht. Es handelt sich hierbei um nichtkodierende Abschnitte im Genom, deren Polymorphismus auf der unterschiedlichen Anzahl tandemförmig hintereinandergestellter Sequenzwiederholungen basiert. Die sich daraus ergebenden Fragmente sind bei der zur Zeit weltweit in der Forensik eingesetzten Generation an polymorphen Markern, den „Short Tandem Repeats“ (STR), zwischen 100 und 400 Basenpaare lang und werden als Allele mit der Polymerasekettenreaktion (PCR, MULLIS et al. 1987) dargestellt. Die Typisierung der meist geringen Mengen DNA aus gelagertem Urin wurde bereits von der Arbeitsgruppe in einem vorangegangenen Projekt (BENECKE, SCHMITT und STAAK 1996) mittels Triplex-PCR-Reaktion erfolgreich durchgeführt. Hierbei wurden die drei STR-Loci CD4, DHFRP2 und D8S306 in einem PCR-Ansatz simultan dargestellt. Im vorliegenden Projekt sollte nun diese Triplex-PCR internationalen Normen angepasst werden, um eine standardisierte Typisierung von Urin oder Haaren aus Dopingkontrollproben zu ermöglichen. Hierzu gehörte die Strukturanalyse der genannten drei STR-Loci auf Nukleotidebene sowie die Validierung der Loci an Haarschaftproben.

2 Methode

2.1 Sequenzierung

Die PCR-Reaktion wird in einem 25µl Ansatz mit 10 ng DNA aus Blut durchgeführt. Mastermix: 2U Taq Polymerase (Promega) in 1x Promega PCR Puffer, 150 µM dNTPs; 1,5 mM MgCl₂; CD4: 0,6 µM pro Primer, DHFRP2: 0,36 µM pro Primer, D8S306: 0,48 µM pro Primer (BENECKE et al., 1996).

Amplifikationsbedingungen CD4: 94°, 1 min; 62°, 1 min; 72°, 2 min; 30 Zyklen

Amplifikationsbedingungen DHFRP2: 94°, 20 sec; 58°, 20 sec; 72°, 1 min; 29 Zyklen

Amplifikationsbedingungen D8S306: 94°, 1 min; 60°, 1 min; 72°, 2 min; 30 Zyklen

2.1.1 Isolierung und Aufreinigung des zu sequenzierenden Allels aus Heterozygoten

Zunächst wird jedes der drei Systeme in einer Singleplex-Reaktion amplifiziert (s. oben).

Primer 1: 5'-fluoresceinmarkiert; Primer 2: unmarkiert

Die Isolierung des DNA-Fragments aus Heterozygoten erfolgt mittels horizontaler nativer Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die anschließende Silberfärbung des Gels erfolgt ohne Essigsäurefixierung. Die DNA-haltigen Gelstücke werden mit einem sterilen Skalpell exakt aus dem Gel geschnitten, in Eppendorfhütchen in 50µl A. bidest. suspendiert und über Nacht bei 37°C eluiert. Die wässrigen Eluate (50µl) werden in Microcon-100-Säulen (Fa. Amicon) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und eingeengt. Auf diesem Weg erhält man etwa 5µl konzentriertes DNA-Eluat, welches in eine zweite PCR (Reamplifikation) eingesetzt wird.

2.1.2 Reamplifikation des zu sequenzierenden Allels

Primer 1: 5'-biotinmarkiert; Primer 2: 5'-M13-(CGA-CGT-TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT)-markiert, gegensätzliche Markierung bei Gegenstrangsequenzierung

Die Reamplifikation wird mit 2µl des erhaltenen DNA-Eluates durchgeführt und unterscheidet sich von der Amplifikation wie folgt: Reaktionsvolumen 50µl; je 10 pmol Biotin- und M13-Primer

Zur Sequenzierung wird das AutoLoad solid phase sequencing Kit (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt.

2.2 Validierung der drei STR-Loci an Haarschaften

Die Typisierungschance von Haarschaften sollte bei einer größeren Stichprobe (ca. 50 Haarschaftproben mit dazugehöriger Referenz) ermittelt werden. Hier sollten verschiedene Reinigungs- und Extraktionsmethoden getestet werden.

3 Ergebnis

3.1 Sequenzierung

Die endgültigen Allellängen der drei Systeme sind unter Einbeziehung der die Repeatregion flankierenden Sequenzen sowie der Primersequenzen ermittelt worden.

Tab. 1: Eigenschaften des STR-Systems CD4

Locus	CD4
Repeatstruktur	zusammengesetzter Repeat, Pentanukleotid
Repeatsequenz	(AAAAG) ₄₋₁₀ (AAAGG) ₀₋₁ (AAAAG) ₀₋₂
Länge in bp	86-131
Allelbezeichnung	10 Allele; Allel 4-Allel 13

Tab. 2: Eigenschaften des STR-Systems DHFRP2

Locus	DHFRP2
Repeatstruktur	einfacher Repeat, Tetranukleotid
Repeatsequenz	(TTTG) ₄₋₈
Länge in bp	155-171
Allelbezeichnung	5 Allele; Allel 4-Allel 8

Tab. 3: Eigenschaften des STR-Systems D8S306

Locus	D8S306
Repeatstruktur	zusammengesetzter Repeat, Tetranukleotid
Repeatsequenz	(AAAG) ₁₁₋₂₀ , konstante Region von 17 Basen, (AAAG) ₄₋₇
Länge in bp	252-292
Allelbezeichnung	11 Allele; Allel 17-Allel 27

3.2 Typisierung von nuklearer Haarschaft-DNA

Beim Einsetzen von Haarschaften in die PCR traten häufig Zusatzbanden, Allelausfälle oder Fremdallele auf. Ein zahlenmäßiger Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Artefakte und eingesetzter Haarmenge, Haarfarbe, chemischer Behandlung (Dauerwelle, Coloration, Gel), Reinigung und Extraktionsmethode konnte nicht festgestellt werden. Offenbar spielte es auch keine Rolle, ob ein Kopf- oder Schamhaarschaft untersucht oder welcher Teil eines Kopfharschaftes (kopfhautnah oder Haarende) eingesetzt wurde. Die

besten Typisierungsergebnisse ergaben sich nach Phenol-Chloroform- oder Forensic-Kit-Extraktion (Lyse des Ausgangsmaterials unter einem chaotropen Puffersystem, nachfolgender Bindung der DNA an ein mineralisches Trägermaterial, Elution mit einem Niedrigsalzpuffer vom Trägermaterial). Durch unterschiedliche Reinigungsmethoden der Haarschafte konnte Kontamination als Ursache für das Auftreten der oben beschriebenen Artefakte ausgeschlossen werden.

4 Diskussion

Durch die vollständige Strukturaufklärung der drei STR-Loci konnte eine neue Nomenklatur, beruhend auf den Empfehlungen der „DNA Commission of the International Society of Forensic Haemogenetics“ (1997), festgelegt werden. Durch die nun angepasste Nomenklatur und die Bereitstellung einer sequenzierten Allelleiter sollte eine von labor-internen Bedingungen (z.B. Wahl des Elektrophoresesystems) unabhängige und damit interlaboriell vergleichbare Typisierungsmethode gewährleistet sein.

Die Identifikation von Haarschaften durch Darstellung der STR-Systeme CD4, DHFRP2 und D8S306 ist zwar generell möglich, aber durch das häufige Auftreten von Artefakten bislang keine sichere Methode, um abgeschnittene Haarschafte eindeutig einem Spender zuzuordnen. Da die Artefakte falsche Typisierungsergebnisse (z.B. Vortäuschung von Homozygotie bei Allelausfällen) hervorrufen, ist die STR-Typisierung an Haarschaften derzeit nicht sicher einsetzbar. Als möglicher Erklärungsansatz für das Auftreten von Artefakten bei der Amplifikation von Haarschaft-DNA wird folgendes diskutiert: Die Individualidentifikation anhand eines ausgerissenen Haares mit Wurzel ist problemlos möglich, da die Wurzel unverhornt ist und ihr auch Gewebereste aus dem Haarfollikel anhaften. Es sind genügend hochmolekulare DNA-Stränge vorhanden, die sich erfolgreich typisieren lassen. Da der verhornte Haarschaft hingegen nur Überbleibsel zerfallener Zellkerne enthält, scheinen zwei Faktoren für den Schwund der nuklearen DNA verantwortlich zu sein. Einerseits werden die hochmolekularen DNA-Stränge vor dem Eingehen in den wachsenden Haarschaft kontrolliert abgebaut (Apoptose). Andererseits durchläuft das Haar vor dem Ausfallen eine bis zu zweijährige Ruhephase, in welcher zahlreiche, die nukleare DNA zerstörende Faktoren auf den Haarschaft einwirken (UV-Strahlung, Waschmittel, chemische Behandlung). Die dabei entstehenden DNA-Bruchstücke lagern sich möglicherweise zu „neuen“ Templates zusammen und sind Ursache für die nach der PCR auftretenden Artefakte (falsche Genotypen, Fremdallele).

Eine sichere Aussage darüber, ob eine Verwechslung oder Vertauschung von Haarproben stattgefunden hat, ist derzeit nur an ausgerissenen oder ausgefallenen Haaren mit Wurzel oder Wurzelresten möglich. Einen Verbesserungsansatz stellt die weitere Verkürzung der

darzustellenden polymorphen Bereiche dar. Dies kann durch den Einsatz modifizierter Primer (Primeranlagerungsstelle näher an die Repeatregion) erzielt werden. Theoretisch steigt damit die Chance, noch kürzere DNA-Bruchstücke, wie sie vermutlich in Haarschaften vorkommen, zu amplifizieren. Erste Versuche an den STR-Systemen DHFRP2 und D8S306 zeigen, dass mit modifizierten Primern die Chance auf eine korrekte Typisierung von Haarschaften stark ansteigt.

5 Literatur

- BÄR, W.; BRINKMANN, B.; BUDOWLE, B.; CARRACEDO, A.; GILL, P.; LINCOLN, P.; MAYR, W.; OLAISEN, B.: DNA recommendations, Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Forensic Science International* 110 (1997), 175-176
- BENECKE, M.; SCHMITT, C.; STAAK, M.: Development of a fast new STR triplex system for identification of urine samples. Proceedings of the First European Symposium on Human Identification. Toulouse 1996
- JEHAES, E.; GILISSEN, A.; CASSIMAN, J.J.; DECORTE, R.: Evaluation of a decontamination protocol for hair shafts before mtDNA sequencing. *Forensic Science International* 94 (1998), 65-71
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155 (1987), 335-350
- LACH, C.; SCHMITT, C.; STAAK, M.: Sequence structure of the three autosomal STR loci CD4, DHFRP2 and D8S306: A new triplex for forensic casework. *Progress in Forensic Genetics* 8 (1999), 52-54

