

Forensische DNA-Analytik:
Methodische, spurenkundliche und populationsgenetische
Betrachtungen unter besonderer Berücksichtigung
mitochondrialer DNA-Polymorphismen

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von
Sven Jung
aus
Hermeskeil

Würzburg 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. R. Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. D. Patzelt

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 31.7.2002

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Veröffentlichungen:

Jung S., Patzelt D.; Population data for the STR systems D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11 and the Y-chromosomal DYS385 in a population from Lower Franconia (South Germany). *Journal of Forensic Sciences* (im Druck; September 2002)

Jung S., Patzelt D.; Comparison of five methods for extraction of DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Science International* (eingereicht)

Jung S., Patzelt D.; Paternity testing and establishment of an identity using formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. *Forensic Science International* (eingereicht)

Wittig H., Augustin C., Baasner A., Bulnheim U., Dimo-Simonin N., Edelmann J., Hering S., Jung S., Lutz S., Michael M., Parson W., Poetsch M., Schneider P.M., Weichold G., Krause D.; Mitochondrial DNA in the central european population: Human identification with the help of the forensic mt-DNA D-Loop-Base Database. *Forensic Science International* 113:113-118; 2000.

Lutz S., Weisser H.J., Heizmann J., Junge A., Dimo-Simonin N., Parson W., Edelmann J., Anslinger K., Jung S., Augustin C.; Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Science International* 113:97-101; 2000.

Poster:

Jung S., Laudенbacher C., Patzelt D.; Populationsgenetische Untersuchung der STR-Systeme D3S1358, VWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317 und D7S820 mittels Multiplex-PCR (AmpFISTR Profiler / Perkin Elmer). (Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin DGRM 1998)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung.....	3
1.1 ALLGEMEINER ÜBERBLICK.....	3
1.2 ENTWICKLUNG DER FORENSISCHEN SEROLOGIE.....	3
1.2.1 <i>Proteinpolymorphismen</i>	3
1.2.2 <i>Nukleäre DNA-Polymorphismen</i>	4
1.2.2.1 Minisatelliten	5
1.2.2.2 Mikrosatelliten	7
1.2.2.3 Y-chromosomale STR-Systeme	12
1.2.2.4 Homologe DNA-Polymorphismen zwischen X- und Y- Chromosom.....	13
1.2.2.5 RAPD-PCR.....	14
1.2.3 <i>Mitochondriale DNA - Polymorphismen</i>	14
1.2.3.1 Struktureller Aufbau der mitochondrialen DNA	14
1.2.3.2 Replikation und Transkription der mitochondrialen DNA	16
1.2.3.3 Besondere Eigenschaften der mitochondrialen DNA	16
1.2.3.4 Mitochondriale DNA in der Spurenkunde	17
1.2.3.5 Mitochondriale DNA und die Evolution des Menschen	21
1.3 AUFGABENSTELLUNG.....	24
1.3.1 <i>Mitochondriale DNA</i>	24
1.3.2 <i>Short tandem repeats</i>	25
1.3.3 <i>DNA-Isolationsmethoden</i>	26
2 Abkürzungen	28
3 Material und Methoden	30
3.1 MATERIAL.....	30
3.1.1 <i>Geräte</i>	30
3.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	31
3.1.3 <i>Chemikalien</i>	32
3.1.4 <i>Benötigte Puffer</i>	33
3.1.5 <i>Oligonukleotide</i>	34
3.1.6 <i>Biologisches Material</i>	35
3.2 METHODEN.....	35
3.2.1 <i>DNA-Extraktion</i>	35
3.2.1.1 Chelexextraktion (Walsh et al. 1991)	35
3.2.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion (Hoff-Olsen et al. 1999)	36
3.2.1.3 DNA-Extraktion mit peqGold TriFast™ (Peqlab/Erlangen).....	38
3.2.1.4 DNA-Extraktion aus Vollblut (Miller et al. 1988)	39
3.2.1.5 DNA-Extraktionsprotokolle aus Paraffin	39
3.2.1.6 DNA-Extraktion aus Knochenmaterial.....	42
3.2.1.7 DNA-Extraktion aus Urin.....	44
3.2.2 <i>DNA-Aufreinigung</i>	45
3.2.2.1 DNA-Aufreinigung mittels Diatomeenerde (Günther et al. 1995).....	45
3.2.2.2 Aufreinigung von PCR-Produkten	46
3.2.2.3 Aufreinigung von Sequenzierungsprodukten	46
3.2.3 <i>DNA – Konzentrationsbestimmung</i>	47
3.2.4 <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	48
3.2.5 <i>Sequenzierung</i>	51
3.2.6 <i>Restriktionsverdau</i>	52
3.2.7 <i>DNA-Auftrennung</i>	53
3.2.7.1 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)	53
3.2.7.2 Hochauflösende Kapillarelektrophorese.....	55
3.2.8 <i>Haplogruppenzuordnung mitochondrialer Sequenzen</i>	58
3.2.9 <i>Statistische Erfassung mitochondrialer Sequenzen</i>	59
3.2.10 <i>Heterozyotenrate und Diskriminationsstärke bei nukleären DNA-Polymorphismen</i>	60
4 Ergebnisse.....	61
4.1 MITOCHONDRIALE DNA	61
4.1.1 <i>Interpretation problematischer Sequenzen</i>	61
4.1.2 <i>Sequenzpolymorphismen in einer deutschen Bevölkerungsstichprobe</i>	65

4.1.3 Sequenzpolymorphismen in anderen Populationsstichproben.....	70
4.1.4 Anwendungsbeispiel für mitochondriale DNA in der Spurenkunde.....	72
4.1.5 Untersuchung weiterer nicht kodierender mitochondrialer Bereiche.....	74
4.1.6 Mutationshäufigkeiten bei der mitochondrialen DNA.....	75
4.1.7 Speziesbestimmung mittels des mitochondrialen Cytochrom b Genes.....	75
4.2 ETABLIERUNG VON STR-SYSTEMEN	78
4.2.1 Der Geschlechtsmarker Amelogenin.....	78
4.2.2 Autosomale STR-Systeme.....	79
4.2.2.1 D3S1358	80
4.2.2.2 D8S1179	81
4.2.2.3 D18S51	82
4.2.2.4 D21S11	83
4.2.2.5 Statistische Auswertung.....	85
4.2.3 Das gonosomale STR-System DYS 385.....	85
4.2.4 Der AmpFISTR® Profiler™ Multiplex (ABI) und die Mutationsrate von STR-Systemen	87
4.3 DNA-EXTRAKTIONSMETHODEN.....	88
4.3.1 DNA-Extraktion aus in Paraffin eingebettetem Gewebe.....	88
4.3.2 DNA-Extraktion aus Urin.....	90
4.3.3 DNA-Extraktion aus Geweben.....	92
4.3.4 DNA-Extraktion aus Knochengewebe.....	94
5 Diskussion.....	96
5.1 MITOCHONDRIALE DNA	96
5.1.1 Interpretation problematischer Sequenzen.....	96
5.1.2 Sequenzpolymorphismen in einer deutschen Bevölkerungsstichprobe.....	98
5.1.3 Sequenzpolymorphismen anderer Populationen	100
5.1.4 Haplogruppenpolymorphismen	104
5.1.5 Anwendungsbeispiel für mitochondriale DNA in der Spurenkunde.....	114
5.1.6 Ausweitung der mitochondrialen DNA-Analyse auf HVIII und NC 1-4	115
5.1.7 Mutationshäufigkeiten bei der mitochondrialen DNA.....	116
5.1.8 Speziesbestimmung anhand der mitochondrialen DNA	116
5.2 ETABLIERUNG VON STR-SYSTEMEN	118
5.2.1 Der Geschlechtsmarker Amelogenin.....	118
5.2.2 Die STR-Systeme D3S1358, D8S1179, D18S51 und D21S11.....	118
5.2.3 Das gonosomale STR-System DYS385.....	119
5.2.4 AmpFISTR® Profiler™ (ABI) und die Mutationsrate von STR-Systemen	120
5.3 DNA – EXTRAKTIONSMETHODEN	122
5.3.1 DNA-Extraktion aus in Paraffin eingebettetem Gewebe.....	122
5.3.2 DNA-Extraktion aus Urin.....	124
5.3.3 DNA-Extraktion aus Geweben.....	125
5.3.4 DNA-Extraktion aus Knochenmaterial	125
6 Zusammenfassung.....	127
7 Summary.....	129
8 Literaturverzeichnis	131
9 Anhang.....	A-1
ANHANG I (DEUTSCHE).....	A-2
ANHANG II (DEUTSCHE / HV1).....	A-11
ANHANG III (TÜRKEN / HV1).....	A-12
ANHANG IV (ÄTHIOPIER / HV1).....	A-13
ANHANG V (CHINESEN / HV1).....	A-14

1 Einleitung

1.1 Allgemeiner Überblick

Die Rechtsmedizin unterteilt sich in drei Hauptgebiete. Dies sind die forensische Pathologie, die forensische Toxikologie und die forensische Serologie. Die forensische Pathologie als das Kerngebiet der Rechtsmedizin umfasst Fragestellungen wie z. B. die Erfassung von Todesursachen und Liegezeit eines Toten, wobei vor allem makroskopische und histologische Befunde von Bedeutung sind (Mueller 1975). Die forensische Toxikologie befasst sich mit Giften, Giftwirkungen und Giftnachweisen. Die forensische Serologie schließlich, mit der sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, behandelt molekularbiologische Themen (Mueller 1975). Hierzu zählen vor allem die Abstammungsbegutachtung, also die Zuordnung bzw. der Ausschluss eines Putativvaters zu einem Kind, die Identifizierung und die Spurenkunde: Ausgehend von einer, in der Regel von der Polizei, an einem Tatort gesicherten Spur werden bestimmte Merkmale festgestellt und bei Vorhandensein eines Tatverdächtigen mit dessen Vergleichsprobe (Speichel oder Blut) auf Übereinstimmungen untersucht. Zudem befasst sich die Serologie mit Fragen der Identifizierung im Sinne einer Zuordnung einer Leiche oder von Teilen einer solchen zu einer realen Person. Hierbei wird ein aus Leichenmaterial gewonnenes Merkmalsmuster z. B. mit dem von in Frage kommenden Verwandten verglichen (Schleyer et al. 1995).

1.2 Entwicklung der forensischen Serologie

1.2.1 Proteinpolymorphismen

Mit der Entdeckung des ABO-Systems durch Karl Landsteiner wurde die Grundlage für die forensische Serologie gelegt. Bis zu diesem Zeitpunkt war es z. B. in der Abstammungsbegutachtung üblich, aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten

zwischen einem Kind und einem als Vater in Frage kommenden Mann die Vaterschaft auszuschließen oder zu bestätigen. Diese sehr subjektive Form der Begutachtung konnte mit Hilfe von Landsteiners Entdeckung und anderen proteinanalytischen Methoden unter Anwendung der Mendelschen Regeln jetzt auf eine objektive Basis gestellt werden. Durch die Analyse des ABO-Systems und weiterer in den folgenden Jahren aufgedeckter Proteinpolymorphismen wurde es nun möglich, objektive Vaterschaftswahrscheinlichkeiten bzw. Ausschlusswahrscheinlichkeiten anzugeben. Des Weiteren fand die Serologie Eingang in die Spurenkunde. Es wurde möglich, Tatverdächtige aufgrund von am Tatort gesicherten Spuren, vor allem von Blutspuren, Spurenlegern zuzuordnen (Schwerd 1962).

1.2.2 Nukleäre DNA-Polymorphismen

Die in der forensischen Serologie zum Einsatz kommenden und im Folgenden beschriebenen DNA-Systeme bestehen hauptsächlich aus Satelliten-DNA. Diese setzt sich aus mittel- und hochrepetitiven Sequenzen zusammen. Von Interesse für die Spurenkunde sind dabei insbesondere die sogenannten „Short Tandem Repeats“ oder STRs. Ihren Namen verdanken die STRs ihrer strukturellen Eigenschaft. Sie bestehen aus kurzen Wiederholungen ein und desselben immer wiederkehrenden Sequenzmotivs. Die Bezeichnung Satelliten-DNA hat ihren Ursprung darin, dass sich bei einer Cäsiumchlorid-Dichtegradienten-Zentrifugation neben einer den nicht-repetitiven Bereich umfassenden Hauptbande eine kleine, weniger dichte Nebenbande bildet. Diese Nebenbande wurde demzufolge als Satellit zur Hauptbande angesehen. Die STRs weisen Längenpolymorphismen mit hoher Variabilität auf. Diese hohe Variabilität liegt darin begründet, dass kein so hoher Selektionsdruck auf den Satelliten lastet, wie dies zum Beispiel bei den Genen der Fall ist. Da aus Satelliten-DNA kein Genprodukt resultiert, kann die Selektion hier nicht im gleichen Maß ansetzen und wirkt sich allenfalls auf strukturelle Eigenschaften des Genoms aus (Jeffreys et al. 1985). Je nach Länge der repetitiven Sequenzen unterscheidet man zwischen den Minisatelliten und den Mikrosatelliten.

1.2.2.1 Minisatelliten

Mit den 80er Jahren erreichte die Serologie eine qualitativ und quantitativ neue Stufe. Durch die Etablierung von Methoden zur DNA-Analytik ergaben sich ganz neue Möglichkeiten. Zunächst sorgte die Einführung der Analyse von DNA-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs) für die Ablösung der bis dahin dominierenden Genprodukt-Analytik in der Spurenkunde. Voraussetzung für die RFLP-Darstellung ist die Eigenschaft von bakteriellen Restriktionsendonukleasen, DNA sequenzspezifisch zu schneiden. Bestehende Polymorphismen resultieren aus unterschiedlichen Längen der restringierten DNA-Abschnitte.

Bis zu diesem Zeitpunkt war die Zuordnung einer an einem Tatort asservierten Spur zu einem Tatverdächtigen nur auf umfassende Spurenantragungen beschränkt. Wegen der im Vergleich zur DNA geringeren Robustheit der Proteinsysteme unterliegen diese einer ungleich höheren Degradationsgefahr und eine erfolgreiche Untersuchung hing stark von Dauer und Form der Lagerungsbedingungen der Spur ab (Feuerbach 1993).

Als weiterer Grund für die Einführung der DNA-Analytik in die forensische Serologie war nicht zuletzt die weitaus höhere Variabilität der untersuchten Systeme ausschlaggebend.

Zwar besitzen die Protein-Polymorphismen, wie z. B. das AB0-System, durchaus eine gewisse Individualzuordnungspotenz (IZP). Im Vergleich zu den durch RFLPs dargestellten Minisatelliten-Polymorphismen sind sie aber nicht konkurrenzfähig. So werden je Sonde in der Regel bei einem Stichprobenumfang von 100 Individuen mehr als 70 unterschiedliche Allele gezählt. Bei der Kombination von vier nicht gekoppelten dieser Systeme, also z. B. bei Einsatz der Sonden MS1 (D1S7), MS8 (D5S43), MS31 (D7S21) und MS43 (D12S11) beträgt der Diskriminationsindex zum Beispiel $1 - 4 \times 10^{-11}$ (Brinkmann et al. 1991).

Die ersten in der DNA-Analytik eingesetzten Systeme wurden über die sogenannten Multilocussonden (MLS) erschlossen. Diese Sonden erkennen zahlreiche repetitive Sequenzen mit Größen zwischen 10.000 und 20.000 bp. Die einzelnen repetitiven Bereiche setzen sich aus 10 – ca. 1000fachen Wiederholungen immer derselben Sequenzmotive zusammen. Die Sequenzmotive selbst besitzen im Regelfall Längen zwischen 10 und 100 bp. Die erkannten Bereiche sind über das gesamte

chromosomale Genom verteilt. Durch Einsatz von geeigneten Restriktionsendonukleasen, die in den flankierenden Sequenzbereichen schneiden, lassen sich die Minisatelliten ihrer spezifischen Größe nach elektrophoretisch auftrennen und durch einen sogenannten Southern-Blot auf eine Nylon-Membran transferieren. Die Sonden hybridisieren mit ihren repetitiven Zielsequenzen und die Banden sind durch Einsatz von an die Sonden gekoppelten Enzymen, die eine Reaktionskette auslösen, an deren Ende ein gefärbtes Reaktionsprodukt steht, nachweisbar (Feuerbach 1993). Die typischen Bandenmuster mit bis zu 50 einzelnen voneinander unterscheidbaren Banden erhielten von ihren Entdeckern Jeffreys et al. (1985) den bezeichnenden und nach wie vor für die gesamte forensische DNA-Analytik gebräuchlichen Namen „Genetischer Fingerabdruck“, da sie wie sein eigentlicher Fingerabdruck ein Individuum kennzeichnen.

Durch die komplizierten Bandenmuster waren die MLS-Systeme jedoch formalgenetisch nur schwer interpretierbar. Aus diesem Grund setzten sich im weiteren Verlauf die Singlelocussonden (SLS) durch. Die hierbei eingesetzten komplexeren Sonden hybridisieren mit repetitiven Sequenzen, die einen ähnlichen Aufbau und ähnliche Größe aufweisen, wie dies bei den MLS der Fall ist. Der Vorteil der SLS-Systeme ist jedoch, dass im gesamten Genom nur jeweils ein repetitiver Bereich erkannt wird. Hierdurch ergeben sich leicht interpretierbare Bandenmuster, nämlich zwei Banden im Fall einer Heterozygotie der beiden in Frage kommenden homologen Chromosomen, bzw. eine Bande im Fall der seltenen Homozygotie.

Die Minisatelliten-DNA von RFLP-Charakter erhielt aufgrund ihres Aufbaus und ihrer Eigenschaften auch den Namen „Variable Number of Tandem Repeats“ (Brinkmann et al. 1991). Ein Einfluss auf den jeweiligen individuellen Phänotyp des untersuchten Probanden ist nicht feststellbar. Jeffreys et al. (1985) vermuten jedoch strukturelle Funktionen, wie eine Signalfunktion im Rekombinationsvorgang zwischen homologen Chromosomen.

Die Situation innerhalb der Spurenkunde hatte sich somit deutlich gebessert. Es waren nicht mehr so große Mengen an Spurenmaterial notwendig, um eine Spur zu typisieren. Die Wahrscheinlichkeit, eine Spur einem Täter zuzuordnen, ist durch den Einsatz dieser neuen Techniken enorm gestiegen. Zudem konnten die jeweiligen Merkmale unter geeigneten Umweltbedingungen nun auch aus älteren Spuren typisiert werden.

1.2.2.2 Mikrosatelliten

Die für Polymerasekettenreaktions-Analysen (PCR) geeigneten Mikrosatelliten (< 1.000 bp), haben in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung gewonnen (Kimpton et al. 1993). Das Interesse für die Mikrosatelliten in der Spurenkunde lag zunächst vor allem in ihrer geringen Größe. Hochmolekulare DNA, die für die Minisatelliten benötigt wird, lässt sich in den entsprechenden Mengen (> 1 µg) praktisch nur aus sehr frischen und großen Spuren oder aus Blutproben isolieren. Spuren, die durch schlechte Umweltbedingungen vergleichsweise degradiert sind oder nur geringe Mengen an Material aufweisen, lassen sich mittels RFLP-Analyse kaum typisieren.

Die Variabilität der Mikrosatelliten, die im folgenden kurz als STRs bezeichnet werden sollen, ist aufgrund der geringeren Fragmentlängen gegenüber der Variabilität der Minisatelliten stark vermindert, da es hier nur eine begrenzte Anzahl von Allelen gibt. Der Grund hierfür liegt darin, dass die STRs zu großen Teilen innerhalb der Introns von codierenden Genen liegen. Damit besteht für die STRs nur ein vergleichsweise kleiner Spielraum, innerhalb dessen sich ihre jeweilige Größe bewegen kann. Zu lange oder kurze STRs würden beispielsweise zu fehlerhaftem RNA-Splicing führen, was aller Wahrscheinlichkeit nach Mutationen hervorrufen würde, die sich dann in der Regel unvorteilhaft auf den betroffenen Organismus auswirken.

Solche im menschlichen Genom häufigen und über alle Chromosomen verteilten Mikrosatelliten, lassen sich aufgrund ihrer geringen Größe mittels PCR amplifizieren. Die DNA wird also nicht wie bei den RFLPs in den flankierenden Sequenzen des Tandemrepeats mit einer Restriktionsendonuklease geschnitten. Vielmehr lagern sich Oligonukleotide, sogenannte Primer, beidseitig dieser den repetitiven Bereich flankierenden Regionen an. In einer die Replikation im Zellzyklus simulierenden Kettenreaktion wird dann der repetitive Bereich je simuliertem Zyklus verdoppelt (Saiki et al. 1985). Mit hochauflösenden Elektrophoresemethoden, z. B. Polyacrylamidgel- oder Kapillarelektrophorese, lassen sich die polymorphen Allele dann erschließen (Abb. 1.1). Die verschiedenen Allele dieser DNA-Loci

unterscheiden sich in der Zahl repetitiver Elemente, die sich in der mittels PCR vermehrten DNA-Region befinden. Die Allele sind also jeweils durch die Anzahl ihrer repetitiven Elemente eindeutig definiert (Geserick und Roewer 1998).

Um erhobene Befunde zwischen unterschiedlichen Laboratorien vergleichbar zu machen, wurde eine einheitliche Nomenklatur entwickelt (Schneider et al. 1998). Die einzelnen Allele definieren sich demzufolge durch den jeweiligen Systemnamen und die jeweilige Anzahl der Elemente des Repeats.

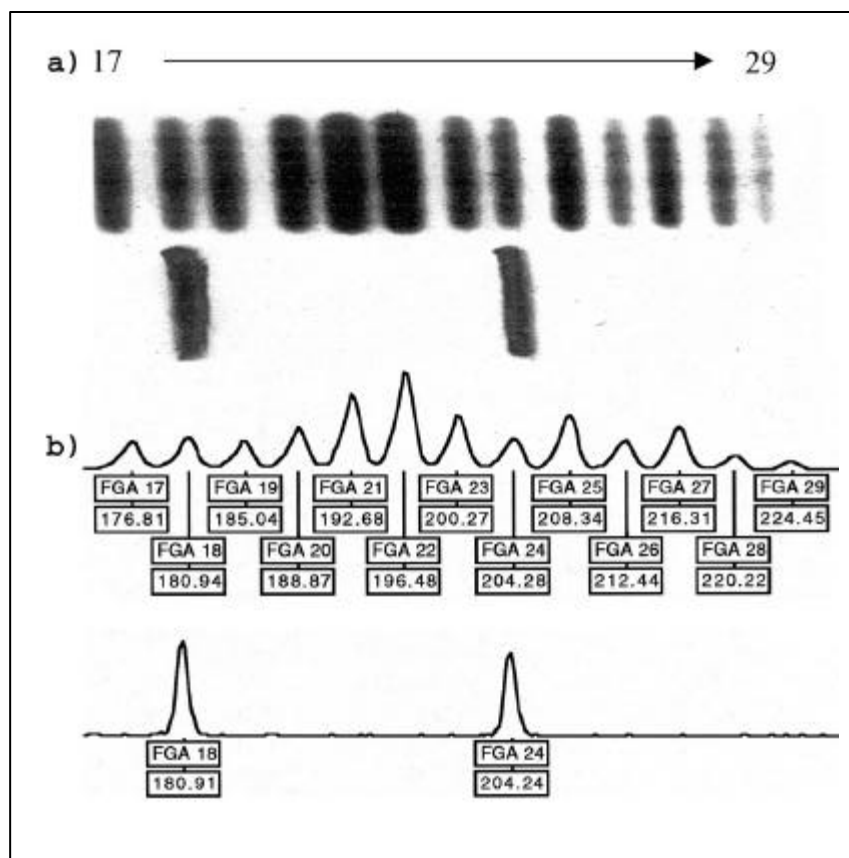


Abb. 1.1: STR-Darstellung am Beispiel des Systems FGA(FIBRA) a) im hochauflösenden Polyacrylamidgel, b) mittels Kapillarelektrophorese (im ABI 310, Applied Biosystems). Dargestellt sind jeweils die Allelkombination 18/24 zusammen mit der zugehörigen allelischen Leiter.

Die anfänglich in der Rechtsmedizin eingesetzten STRs waren vergleichsweise große Mikrosatelliten, wie beispielsweise die Systeme YNZ 22 (D17S5) oder MCT 118 (D1S80). So setzt sich das System MCT 118 aus jeweils 15 bp langen repetitiven Elementen zusammen und erreicht Allelgrößen zwischen 350 bp und 800 bp. STRs dieser Größe werden auch als AmpFLPs (amplifiable fragment length

polymorphisms) bezeichnet (Huber 1999). Dieser Größenbereich erwies sich als besonders vorteilhaft für die Auftrennung in hochauflösenden Polyacrylamidgelen. STRs mit Größen unter 500 bp und bedingt dadurch mit repetitiven Elementen, die in der Regel kleiner als 5 bp sind, waren jedoch nicht immer analysierbar. Insbesondere das regelmäßige Auftreten von Zwischenallelen, also Allelen mit einzelnen, verkürzten Elementen, komplizierte die Allelzuordnung zu den allelischen Leitern erheblich.

Mit der Einführung der Kapillarelektrophorese im automatischen Sequenz-Analysator wurden diese aufwendigen Analysemethoden jedoch schnell verdrängt. Mit der Kapillarelektrophorese verkürzt sich die Analysezeit pro eingesetzter Probe deutlich. Zudem sind die Ergebnisse bedingt durch die Automatisierung weitaus stärker reproduzierbar. Die Unterschiede von Analyselauf zu Analyselauf sind so gering, dass Ergebnisse verschiedener Läufe ohne weiteres direkt miteinander verglichen werden können. Durch die Detektion fluoreszenzmarkierter PCR-Fragmente mittels Lasertechnik, sowie die Auftrennung dieser Fragmente in einer mit Polymer gefüllten Glaskapillare, wurde die Trennschärfe der Fragmentanalyse enorm gesteigert. Die repetitiven Elemente der heute routinemäßig eingesetzten Mikrosatelliten besitzen nun Längen zwischen 3 und 5 bp. In der Regel ist unterhalb von 300 bp eine Detektion von Zwischenallelen mit Unterschieden zu den Hauptallelen von nur einem Basenpaar möglich. Diese Trennschärfe kann durch Einsatz härterer Polymere auch auf Größen über 500 bp ausgedehnt werden, was jedoch auf Kosten der Laufgeschwindigkeit geht.

Die zu Arbeitsbeginn für spurenkundliche Fragestellungen üblicherweise eingesetzten und im folgenden kurz vorgestellten Mikrosatelliten-STR-Systeme waren die Systeme FES/FPS, FGA(FIBRA), TH01, VWA und SE33(ACTBP2).

Das System FES/FPS besitzt die chromosomale Lokalisation **15q25** und liegt im Bereich des humanen *c-fes/fps* Proto-Onkogens. Sein repetitiver Bereich besteht aus Tetranukleotiden der Form (ATTT)_n. Seine Gesamtgröße liegt zwischen 210 bp (Allel 8) und 230 bp (Allel 13) (Günther und Patzelt 1996).

Das System FGA (FIBRA) besitzt die chromosomale Lokalisation **4q28** und liegt im dritten Intron des humanen α -Fibrinogen-Gens. Sein repetitiver Bereich besteht aus

Tetranukleotiden der Form (CTTT)_n. Seine Gesamtgröße liegt zwischen 180 bp (Allel 18) und 220 bp (Allel 28) (Bäßler et al. 1999).

Das System TH01 (TC11) besitzt die chromosomale Lokalisation **11p15-15.5** und liegt im ersten Intron des humanen Tyrosinhydroxylase Gens. Sein repetitiver Bereich besteht aus Tetranukleotiden der Form (TCAT)_n. Seine Gesamtgröße liegt zwischen 183 bp (Allel 6) und 199 bp (Allel 10) (Günther und Patzelt 1996).

Das System VWA (vWF) besitzt die chromosomale Lokalisation **12p12** und liegt nahe dem Gen für den von-Willebrand-Faktor. Sein repetitiver Bereich besteht aus Tetranukleotiden der Form (TCTA)_n. Seine Gesamtgröße liegt zwischen 138 bp (Allel 14) und 166 bp (Allel 21) (Günther und Patzelt 1996).

Das System SE33 (ACTBP2) besitzt die chromosomale Lokalisation **5pter-5qter** und liegt im Bereich des β -Aktin Pseudogen 2. Sein repetitiver Bereich besteht aus Tetranukleotiden der Form (AAAG)_n. Seine Gesamtgröße liegt zwischen 231 bp (Allel 13) und 315 bp (Allel 34) (Bäßler et al. 1999).

Mit Einführung der DNA-Datenbank durch das Bundeskriminalamt (BKA) im Jahre 1999 wurde es jedoch notwendig, diese anfängliche Konstellation zu ändern. Die von den Ermittlungsdienststellen der Polizei angeforderten Datensätze sollten nun statt des Systems FES/FPS das System D21S11 beinhalten. Weiterhin wird die DNA-Datenbank in Kürze um die drei Mikrosatelliten-Systeme D3S1358, D8S1179 und D18S51 erweitert werden. Im folgenden seien die zu diesen Systemen gehörenden Daten kurz aufgeführt.

Das System D3S1358 besitzt die Lokalisation 3p und basiert auf dem repetitiven Tetranukleotid (TCTA)_n. Die Gesamtgröße des Systems liegt zwischen 111 bp (Allel 13) und 135 bp (Allel 19) (STRBase/Ruitberg et al. 2001).

Das System D8S1179 befindet sich auf Chromosom 8. Es basiert auf dem repetitiven Tetranukleotid (TATC)_n und sein Gesamtgröße liegt zwischen 161 bp (Allel 8) und 201 bp (Allel 18) (STRBase/Ruitberg et al. 2001).

Das System D18S51 besitzt die Lokalisation 18q21.3 und basiert auf dem repetitiven Tetranukleotid (GAAA)_n. Die Gesamtgröße des Systems liegt zwischen 274 bp (Allel 10) und 326 bp (Allel 23) (STRBase/Ruitberg et al. 2001).

Das System D21S11 befindet sich auf Chromosom 21. Es basiert auf den repetitiven Tetranukleotiden (TCTA)_n und (TCTG)_n, wobei sich die Zwischenallele (30,2 bis 34,2) jeweils durch einen zusätzlichen TA-Einschub vom ganzzahligen Allel unterscheiden. Die Gesamtgröße des Systems liegt zwischen 214 bp (Allel 27) und 244 bp (Allel 34,2) (STRBase/Ruitberg et al. 2001).

Der Vorteil dieser kürzeren Mikrosatelliten liegt aber nicht nur in ihrer geringen Größe und der möglichen Auftrennung von Zwischenallelen. Die bei der Kapillarelektrophorese benötigte geringere Materialmenge erlaubt es, mehrere Systeme während eines Analyselaufes gleichzeitig aufzutrennen. Problematisch ist dabei jedoch, dass keine Systeme mit sich überlappenden Größenbereichen verwendet werden können, soweit derselbe Fluoreszenzfarbstoff verwendet wird. Dies könnte beispielsweise bei den Systemen TH01 und FGA der Fall sein, deren Allele sich unter Umständen im Bereich 180 bp bis 199 bp überlagern, was zu Interpretationsproblemen führen würde. Diese Problematik wird jedoch mit dem Einsatz dreier unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe, nämlich FAM (blau), HEX (grün) und TAMRA (gelb), umgangen.

Noch einen Arbeitsschritt früher setzen die sogenannten Multiplex-PCR-Systeme an (Abb. 1.2). Hier findet die Vereinigung unterschiedlicher STR-Systeme nicht erst bei der Fragment-Analyse statt. Vielmehr wird bereits die PCR der verschiedenen im Multiplex enthaltenen STR-Systeme in einer Reaktion durchgeführt. Problematisch hierbei ist jedoch, dass für viele der verwendeten Systeme die Hybridisierungstemperaturen der eingesetzten Primer unterschiedlich ausfallen. Die für den Multiplex genutzte Temperatur ist folglich immer ein Kompromiss. Dieser bedingt, dass je nach Qualität und Quantität der zu untersuchenden DNA für verschiedene Systeme unterschiedlich gute Resultate erzielt werden können. In diesen Fällen wird es unumgänglich, die Systeme mit den nicht verwertbaren Resultaten in einer Einzelsystem-PCR zu wiederholen. In Multiplexsystemen werden bis zu 16

verschiedene PCR-Einzelsysteme vereinigt. Diese sind jedoch nur in aufwendigen Versuchsreihen realisierbar, so dass lediglich wenige Hersteller zu deren Produktion in der Lage sind. Bei den derzeit auf dem Markt befindlichen und auch vor Ort eingesetzten 16-plex STR-Systemen handelt es sich um das Powerplex-16 System von Promega (Mannheim) und den AmpFISTR-Identifiler von Applied Biosystems (Weiterstadt).

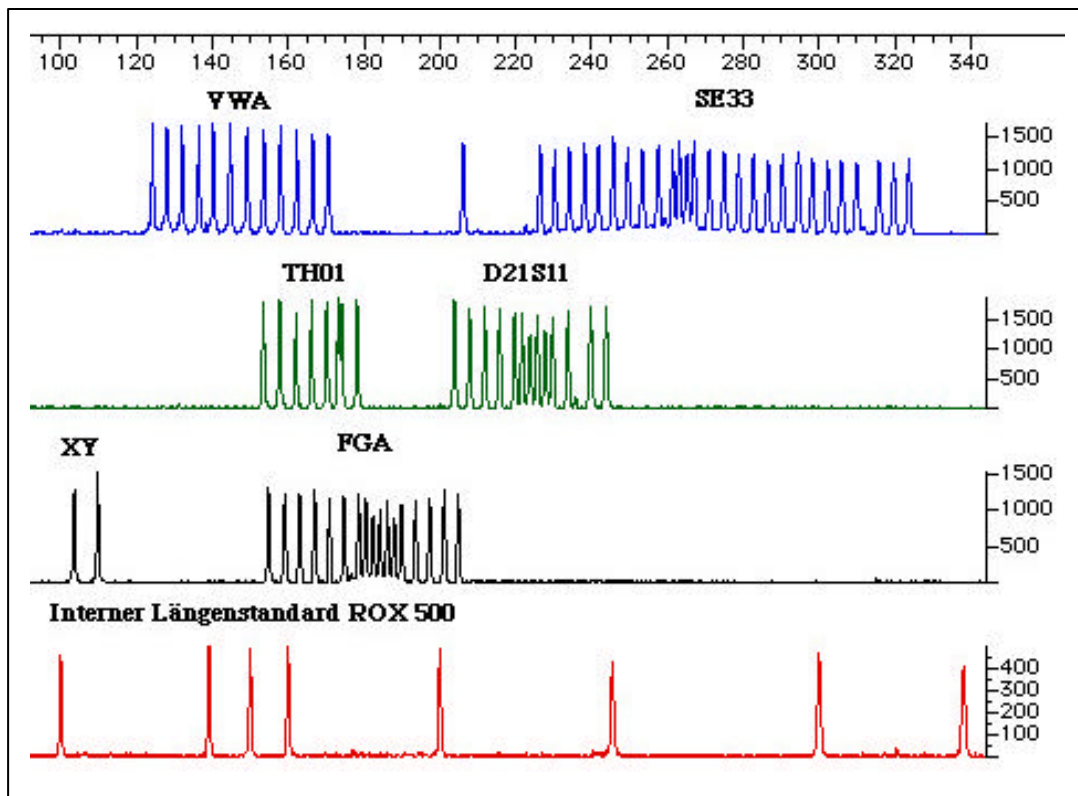


Abb. 1.2: Beispiel eines Multikomponenten-Fragmentlängen-Analyse-Laufes im ABI 310 (Applied Biosystems). Zum Einsatz kam die alleliche Leiter des Multiplex-System GenRes MPX (Serac, Bad Homburg), das die STR-Systeme VWA (6-FAM), SE33 (6-FAM), TH01 (HEX), D21S11 (HEX), FGA (NED) und den Geschlechtsmarker Amelogenin (XY / NED) beinhaltet (In Klammern jeweils die Art der Farbmarkierung). Der Interne Längenstandard GS ROX 500 (Applied Biosystems) wird jedem Analyselauf beigemischt und dient der Größenbestimmung der einzelnen Allele.

1.2.2.3 Y-chromosomale STR-Systeme

Neben den oben beschriebenen autosomalen STR-Systemen, die im Regelfall bei spurenkundlichen Untersuchungen zum Einsatz kommen, spielen auch die geschlechtsspezifischen Mikrosatelliten eine wichtige Rolle. Vor allem die Y-

chromosomalen STRs haben bei der Aufklärung von Sexualdelikten ihren festen Platz in der Spurenkunde. Dadurch, dass diese Systeme ausschließlich auf das männliche Geschlecht beschränkt sind, wird es möglich, selbst aus Spuren deren männlicher Anteil nur 1 : 100 beträgt (typischerweise Scheidenabstriche nach Sexualdelikten) ein vollständiges Y-chromosomales Merkmalsmuster des Täters zu erstellen. Häufig verwendete und auch vor Ort in Gebrauch befindliche STRs sind zum Beispiel die Systeme DYS19, DYS388, DYS390 und DYS393 (Günther, 1997).

1.2.2.4 Homologe DNA-Polymorphismen zwischen X- und Y- Chromosom

Ein verwendetes System zur Geschlechtsbestimmung einer Spur oder Blut- bzw. Speichelprobe beruhte auf einer Koamplifikation von Satelliten-Sequenzen auf dem X- bzw. auf dem Y-Chromosom. Eingesetzt werden hierfür die Marker DYZ1 und DXS424. Problematisch ist diese Methode aus mehreren Gründen: Es handelt sich um eine Koamplifikation zweier Primerpaare, so dass z. B. der Befund „XX“ nicht nur durch das alleinige Vorhandensein von DNA weiblicher Herkunft erklärbar ist, sondern dass unter Umständen die Y-spezifische Reaktion nicht funktioniert hat bzw. die Y-Komponente nur in sehr geringer Menge auftritt. Zudem ist das System DXS424 polymorph (181/199bp), was eine automatische Analyse erschwert. Es handelt sich darüber hinaus bei den eingesetzten Systemen um α -Satelliten-Systeme, d. h. sie liegen in mehreren Kopien (X-Chromosom ca. 5000 / Y-Chromosom ca. 100) auf den jeweiligen Chromosomen vor. Dies bedingt, dass eine quantitative Abschätzung des männlichen Anteils an einer gemischtgeschlechtlichen Spur praktisch nicht möglich ist (Pfitzinger et al. 1993).

Ein anderer Geschlechtmarker ist auf dem Amelogenin-Genort lokalisiert. Dieses auf X und Y Chromosom in nicht rekombinierenden Kopien homolog vorliegende Gen besitzt im ersten Intron einen geschlechtsspezifischen Längenpolymorphismus, der auf dem X-Chromosom 106 bp und auf dem Y-Chromosom 112 bp beträgt. Zum Nachweis dieses Polymorphismus ist nur ein Primerpaar nötig und die vergleichsweise geringe Größe erlaubt seinen Einsatz auch in einem Multiplex-Ansatz bzw. ermöglicht die ungestörte Auftrennung in der Kapillarelektrophorese zusammen mit anderen Systemen (Mannucci et al. 1994).

1.2.2.5 RAPD-PCR

Die Spezieszuordnung mittels zufällig amplifizierter polymorpher DNA oder RAPD (Random amplified polymorphic DNA) beruht auf dem Prinzip der PCR (James et al. 1994). Hierbei kommen jedoch nicht wie üblich zwei sequenzspezifische Primer zum Einsatz, sondern es wird nur ein einzelner kurzer (9 – 12 bp) Primer eingesetzt, der zu keiner bestimmten Sequenz zuzuordnen ist. Die resultierenden PCR-Produkte entstehen vielmehr dadurch dass sich der Primer über das ganze Genom verstreut an die DNA anlagert und nur jeweils zufällig zwei Primer in der richtigen Orientierung nah genug beieinander binden, um eine PCR zu ermöglichen. Die hierbei entstehenden Bandenmuster sind weitgehend artspezifisch und können so zur Spezieszuordnung eingesetzt werden.

1.2.3 Mitochondriale DNA - Polymorphismen

Neben der DNA-Analyse an Hand der kerngenomischen STRs hat sich in manchen Fällen, wie im folgenden beschrieben, auch die DNA-Analyse unter Nutzung mitochondrialer DNA (mtDNA) als hilfreich erwiesen.

1.2.3.1 Struktureller Aufbau der mitochondrialen DNA

Neben der chromosomalen, im Zellkern lokalisierten DNA gibt es bei den meisten Tieren auch die sogenannte mitochondriale DNA (mtDNA). Eine Ausnahme von dieser Regel bilden die Spinnen. Die menschliche mtDNA wurde vollständig sequenziert. Sie ist zirkulär, doppelsträngig und mit ca. 16,5 kb vergleichsweise klein (Anderson et al. 1981). Sie codiert nur für eine geringe Zahl unterschiedlicher Genprodukte.

Dies sind 13 Polypeptidkomponenten, die alle Bestandteil der Enzymkomplexe der Atmungskette sind und sich an der inneren mitochondrialen Membran befinden. Alle 13 mtDNA-codierten Peptide sind essentiell, da sie für die oxidative Phosphorylierung und damit zur ATP-Produktion nötig sind (Wallace 1997). Alle

übrigen benötigten Proteine werden im Zellkern codiert und durch spezifische Signale in die Mitochondrien importiert (Schatz 1996). Des weiteren codiert die mtDNA für 2 ribosomale RNAs (rRNA) und einen vollständigen Satz von 22 Transfer-RNAs (tRNA). Die zwei rRNAs und 14 tRNAs sowie 12 von 13 proteincodierende Gene codieren auf dem schwereren Purin-reichen Strang oder heavy (H-) strand. Acht tRNA-Gene und ein Protein-codierendes Gen codieren auf dem leichteren Pyrimidin-reichen Strang oder light (L-) strand (Anderson et al. 1981).

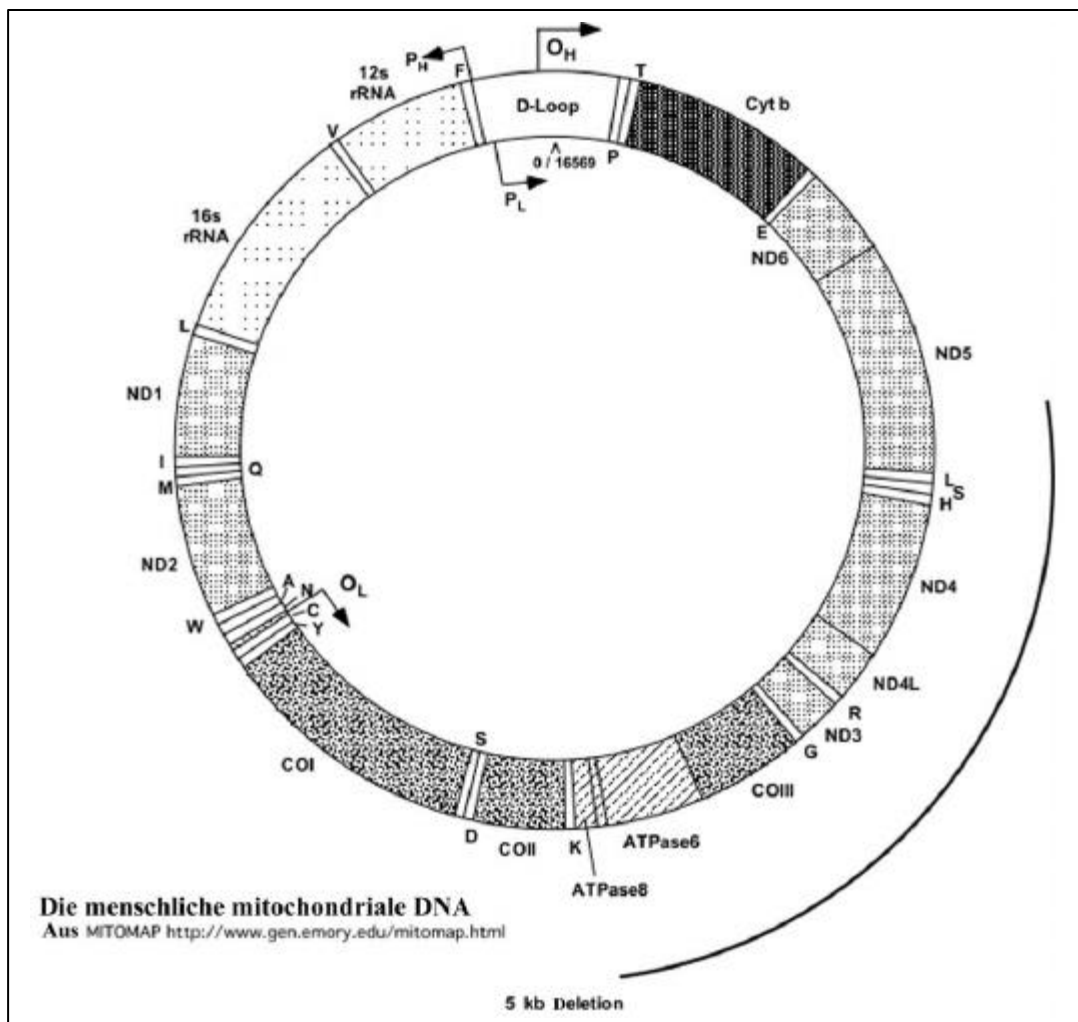


Abb. 1.3: Die menschliche mtDNA; Großbuchstaben sind gleichbedeutend mit den tRNAs aus der Protein-Nomenklatur; Cyt b – Cytochrom b; ND 1-5 – NADH-Dehydrogenase Untereinheiten; CO I-III – Cytochrom-Oxidase Untereinheiten; O_H, O_L – Replikationsursprung auf H- bzw. L-Strang; P_H, P_L – Promotor des H- bzw. L-Stranges.

1.2.3.2 Replikation und Transkription der mitochondrialen DNA

Die Transkription startet, je nachdem auf welchem Strang synthetisiert wird, von dem in der Kontrollregion lokalisierten light-strand promoter (LSP) oder vom heavy-strand promoter (HSP). Von beiden Strängen werden große polycistronische Vorläufer-RNAs synthetisiert, die anschließend zu den fertigen tRNAs, rRNAs und mRNAs prozessiert werden (Clayton 1984). Bei der Prozessierung des RNA-Transkriptionsproduktes vom L-Strang bleibt im Bereich des L-Strang-Promoters ein kurzes RNA-Stück stehen. Dieses dient als Primer für die H-Strang-Replikation (Clayton 1991). Bei einem Teil dieser Replikationen kommt es an einer sequenzspezifischen Stelle zum Replikationsabbruch. Das entstandene H-Strang-Replikationsprodukt bleibt jedoch am L-Strang gebunden und verdrängt in dieser Region den parentalen H-Strang. Auf diese Weise entsteht ein Displacement-Loop oder D-Loop der möglicherweise einen Teil der mtDNA in ständiger Replikationsbereitschaft hält (King und Low 1987). Wird die Replikation fortgesetzt, erreicht die Replikationsgabel nach ungefähr 2/3 eines Durchlaufes des gesamten DNA-Ringes den L-Strang-Replikationsursprung. Die Replikationsgabel lässt den parentalen H-Strang einzelsträngig zurück, so dass sich hier nun eine stabile Haarnadelschleifen-Struktur ausbilden kann. Dies dient als Signal für eine DNA-Primase, die einen kurzen RNA-Primer synthetisiert, woraufhin die L-Strang-Replikation einsetzen kann (Hixson et al. 1986).

Der H-Strang-Replikationsursprung legt gleichzeitig den Anfang der numerischen Nomenklatur aller mitochondrialen Basenpaare fest. Diese endet nach Durchlauf der gesamten Sequenz mit dem Basenpaar 16569 wiederum am selben Punkt.

1.2.3.3 Besondere Eigenschaften der mitochondrialen DNA

Kennzeichnend für mitochondriale DNA ist ihre monoklonale Natur. Diese erleichtert die Sequenzierung erheblich, denn man muss hier im Gegensatz zur Sequenzierung chromosomaler DNA zuvor keine unterschiedlichen Allele voneinander trennen. Begründet ist dies durch die rein maternale Weitergabe der mitochondrialen DNA mit der Eizelle (Giles et al. 1980). Dieser Zustand wird nicht nur durch den enormen

Mengenunterschied an Mitochondrien hervorgerufen (Ei: ca. 10.000; Spermium: ca. 50), sondern es kommt viel mehr zu einer aktiven Beseitigung paternaler Mitochondrien während und kurz nach der Befruchtung (Manfredi et al. 1997). Die rein maternale Vererbung macht die mitochondriale DNA für Anthropologen interessant, da auf diese Weise Verwandtschaftsverhältnisse über viele Generationen hinweg nachvollziehbar werden. Anhand der mtDNA sind nun auch auf genetischer Basis Rückschlüsse über die Ursprünge des Menschen möglich geworden (Darlu et al. 1987). Aber auch für die Spurenkunde hat die maternale Vererbung seine Bedeutung. So kann nun die Identität menschlicher Überreste, soweit Nachkommen der mütterlichen Linie vorhanden sind, über Generationen hinweg festgestellt werden wie im Fall der Romanovs, der russischen Zarenfamilie (Gill et al. 1994). Auf die gleiche Weise konnte auch Kaspar Hauser als Nachkomme der Badischen Regentenfamilie ausgeschlossen werden (Weichold et al. 1998).

Polyklonale Ausnahmen, wie zum Beispiel gewebsspezifische Deletionen von einigen Kilobasen wurden bei Krankheiten wie Mitochondriale Myopathie, Leighs Syndrom, Kearns-Sayre Syndrom und anderen berichtet (Wallace 1992). Ähnliche Deletionen treten möglicherweise auch altersbedingt auf (Meißner et al. 1997).

Andere im Regelfall durch Punktmutationen hervorgerufene polyklonale Ausnahmen lassen sich nur durch Sequenzierung nachweisen und werden allgemein als Heteroplasmien bezeichnet (Wilson et al. 1997). Diese können sowohl zwischen unterschiedlichen Mitochondrien auftreten als auch, bedingt durch das Vorhandensein mehrerer DNA-Moleküle in einem Mitochondrium, innerhalb derselben Organelle. Eine Heteroplasmie äußert sich in der Sequenzanalyse durch eine Überlagerung zweier unterschiedlicher Peaks und ist damit kaum von einer Kontamination durch eine ähnliche Sequenz unterscheidbar (Lutz et al. 1999).

1.2.3.4 Mitochondriale DNA in der Spurenkunde

Die für forensische Fragestellungen interessantesten Sequenzpolymorphismen wurden im nicht kodierenden Bereich der Kontrollregion festgestellt und zwar insbesondere in zwei hypervariablen Regionen beiderseits des Replikationsursprungs: die Hypervariable Region 1 (HV1) zwischen den Positionen 16.024 – 16.365 (Anderson

et al. 1981) und die Hypervariable Region 2 (HV2) zwischen den Positionen 73 – 340 (Greenberg et al. 1983).

Eine dritte Region mit etwas geringerer Variabilität wurde im Bereich 438 – 574 entdeckt (HV3; Lutz et al. 1997).

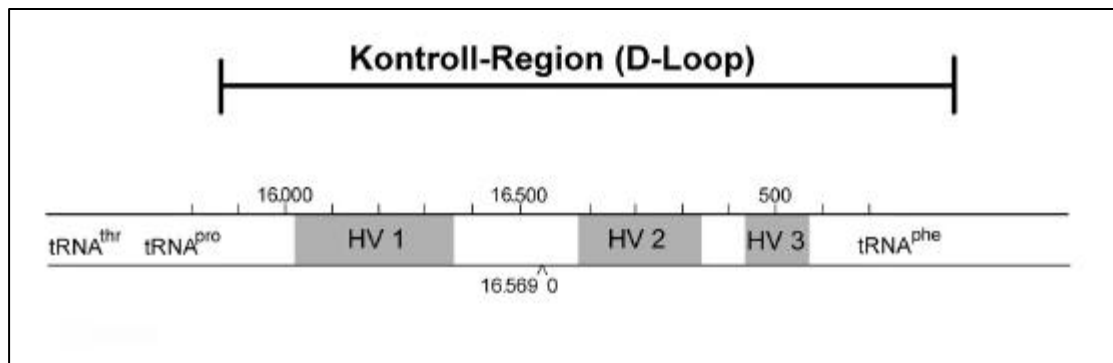


Abb. 1.4: Die Kontroll-Region der menschlichen mitochondrialen DNA mit den hypervariable Regionen HV 1 – 3. Die Skalierung bezeichnet die Nomenklatur der Basenpaare nach Anderson et al. 1981.

Weiterhin existieren über die gesamte mitochondriale DNA verstreut einzelne kurze (1-30 bp lange) nicht kodierende Bereiche. Über die Möglichkeit einer Variabilität dieser sogenannten „noncoding nucleotides (NCs)“ ist bisher aber nichts bekannt (MITOMAP).

Das hohe Maß an Variabilität begründet sich durch die eher geringe Zuverlässigkeit der mitochondrialen DNA-Polymerase und ein unzureichendes DNA-Reparatur-System, das nur zur Behebung einfacher Schäden fähig ist (Driggers et al. 1993). Mutationen können sich jedoch praktisch nur in diesem nicht kodierenden Bereich durchsetzen, da eine außerhalb des nichtcodierenden Bereiches liegende Mutation fast zwangsläufig zu einem Funktionsverlust des Mitochondriums führen muss.

Der Hauptvorteil des Einsatzes mitochondrialer DNA für forensische Untersuchungen ist ihre hohe Kopienzahl. Während die nukleäre DNA nur in zwei unterschiedlichen Kopien auftritt, gibt es pro Zelle einige hundert oder sogar einige tausend Kopien mitochondrialer DNA (Wilson et al. 1993). Somit ist es eher möglich, bei sehr geringem oder stark degradiertem Spurenmaterial, wie alten Knochen, alten Zähnen oder einzelnen Haaren, eine erfolgreiche mitochondriale DNA-Analyse

durchzuführen, als dies bei nukleären Systemen wie den STRs der Fall wäre (Fisher et al. 1993, Allen et al. 1998).

Andererseits bleibt die Beweiskraft mitochondrialer Systeme weit hinter denen der STRs zurück. Zum einen ist der Informationsgehalt der kleinen mitochondrialen DNA natürlich deutlich geringer als der des umfassenden nukleären Genoms. Zum anderen wird die mitochondriale DNA im Komplex vererbt und es lassen sich hier keine Kopplungsgruppen unterscheiden. Auftretenswahrscheinlichkeiten einzelner mitochondrialer Polymorphismen, wie Punktmutationen, können also nicht getrennt voneinander betrachtet werden. Das heißt gewonnene Informationen, z. B. durch Sequenzierung der Kontrollregion, können nur anhand einer Datenbank zu einer Häufigkeitsbestimmung führen, deren Genauigkeit direkt von der Datenbankgröße abhängig ist.

Den momentan besten Nachweis mitochondrialer DNA-Heterogenität bietet die DNA-Sequenzierung, wobei die Sequenz Base für Base analysiert wird. Im Regelfall wird hierbei nur die Sequenz der hypervariablen Regionen untersucht, da andere Bereiche der Kontrollregion keine genügende Anzahl an Polymorphismen aufweisen. Eine schnelle und einfache Methode zur Sequenzierung bietet eine Abwandlung der „nested PCR“. Hier wird die gesamte Kontrollregion mittels PCR amplifiziert. Die Sequenzierungsreaktion selbst findet aber auf dem gewonnenen Amplifikat nur über die hypervariablen Regionen hinweg statt.

Zur Beschreibung eines durch Sequenzierung gewonnenen Haplotyps hat es sich als vernünftig erwiesen und demzufolge auch durchgesetzt, nicht die gesamte gewonnene Sequenz anzugeben. Vielmehr werden nur die Abweichungen zu einer bestimmten Referenzsequenz benannt. Diese ist im Regelfall die von Anderson et al. (1981) veröffentlichte Sequenz. Ein typisches mitochondriales Merkmalsmuster, wie es auch in einem Gutachten Eingang finden könnte, ist zur Verdeutlichung in Tabelle 1.1 angegeben.

HV1	
Position	Abweichung
16051	A → G
16129	G → C
16183	A → C
16189	T → C
16362	T → C

HV2	
Position	Abweichung
73	A → G
152	T → C
217	T → C
263	A → G
309.1	C – Insertion
309.2	C – Insertion
315.1	C – Insertion
340	C → T

Tab. 1.1: Beispiel für ein mitochondriales Merkmalsmuster. Angegeben werden die Position des Polymorphismus gegenüber der Referenzsequenz (Anderson et al. 1981) und die Art der Abweichung. HV : Hypervariable Region.

Häufigste Polymorphismen beruhen auf Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen. Punktmutationen unterteilen sich zudem in Transitionen, also den Austausch einer Pyrimidinbase durch eine andere (bzw. Purin ↔ Purin), so dass ein G * C Basenpaar durch ein A * T Basenpaar ersetzt wird und umgekehrt. Die seltenere Punktmutation ist die Transversion, bei der ein Purin mit einem Pyrimidin vertauscht wird oder umgekehrt (Lutz et al. 1998).

Andere Methoden zur Feststellung von mtDNA-Polymorphismen sind weniger aussagekräftig. Dies sind unter anderem RFLPs der gesamten mtDNA oder nur der amplifizierten Kontrollregion. Hierbei wird die DNA mit sequenzspezifischen Restriktionsendonukleasen gespalten. Die Restriktionsenzyme werden dabei so gewählt, dass sie an möglichst variablen Punkten die DNA restringieren. Damit schneiden die Enzyme nur in einem Teil der Fälle, so dass sich bei Auftrennung auf einem Agarosegel unterschiedliche Bandenmuster zeigen (Brega et al. 1986).

Zum Einsatz kommen auch Einzelstrang-Konformations-DNA-Polymorphismen (SSCP). Die amplifizierten hypervariablen Regionen werden hierbei zu einzelsträngiger DNA denaturiert und falten sich je nach Sequenz zu spezifischen

Sekundärstrukturen, die sich auf einem nativen Polyacrylamidgel auftrennen und unterscheiden lassen (Alonso et al. 1996).

Aber auch wenn letztere Methoden in Schnelligkeit und aus Kostengründen gegenüber der Sequenzierung überlegen sind, so ist die Sequenzierung doch die sensitivere Methode. Dies macht ihren Einsatz sinnvoll, zumal die Informationsausbeute mitochondrialer DNA insgesamt eher begrenzt erscheint.

Eine weitere Möglichkeit bietet die mitochondriale DNA möglicherweise in Hinblick auf die Spezieszuordnung von Spurenlegern. Das Cytochrom b Gen bietet als hochkonservierter Bestandteil der mtDNA die Möglichkeit mit einem einheitlichen PCR-Ansatz durch Einsatz unterschiedlicher Restriktionsenzyme speziesspezifische RFLP-Bandenmuster darzustellen (Zehner et al. 1998).

1.2.3.5 Mitochondriale DNA und die Evolution des Menschen

Zwei Eigenschaften machen die mitochondriale DNA für Evolutionsforscher interessant. Einerseits ist dies die Vererbung mitochondrialer DNA ausschließlich entlang der mütterlichen Linien. Das macht es theoretisch möglich, alle gefundenen Linien auf eine gemeinsame Urmutter zurückzuverfolgen. Andererseits ist dies, gemessen an der geringen Größe im Vergleich zur chromosomalen DNA, die hohe Variabilität der mitochondrialen DNA.

Die normale Vorgehensweise in der mitochondrialen Evolutionsforschung ist zunächst die Erhebung von Populationsdaten der zu untersuchenden Bevölkerungsgruppen. Dies geschieht in der Regel durch Sequenzierung der hypervariablen Regionen 1 und 2 oder durch Einsatz mehrerer paralleler PCRs, deren resultierende Produkte verschiedenen Restriktionsendonukleasen ausgesetzt werden und als RFLPs darstellbar sind. Die auf diese Art gewonnenen Haplotypen werden dann gemäß einem festen Schema (Abb. 1.5) in Haplogruppen eingeteilt (Macaulay et al. 1999). Zu beachten ist hierbei, dass es sich nicht um einen phylogenetischen Baum handelt, sondern um eine Einteilungshilfe für Haplogruppen. Um hieraus einen phylogenetischen Baum zu entwickeln, müsste ein rezenter Verwandter von *homo sapiens* miteinbezogen werden. Zudem wären Sequenzdaten bzw. RFLP-Daten weit

in der Vergangenheit lebender Vorfahren, wie z. B. *homo erectus* o. ä., als Wurzel des Baumes zu verwenden (Darlu et al. 1987).

Die Einteilung nach dem Schema aus Abbildung 1.5 aufgrund von Sequenzdaten der hypervariablen Regionen kann jedoch für Verwirrung sorgen, da die Einteilung ursprünglich auf Basis der RFLP-Bandenmuster vorgenommen wurde. So ist es nicht möglich, die Haplogruppen X und L3b auseinander zu halten, wie dies im dargestellten Baum deutlich wird. Als alternative Vorgehensweise wird in der Regel eine Gruppe nicht definierbarer Haplotypen gebildet (Simoni et al. 2000). Die andere häufig angewandte Vorgehensweise besteht darin, anhand bereits erhobener Populationsdaten ähnlicher Bevölkerungsgruppen eine prozentuale Einteilung in die jeweilige Haplogruppe vorzunehmen bzw. eine der in Frage kommenden Alternativen auszuschließen (Helgason et al. 2001).

Neben den verwendeten Bäumen zur Darstellung von Beziehungen zwischen einzelnen Haplogruppen wird teilweise auch eine Konstruktion von Netzwerken einander ähnelnder Sequenzen der hypervariablen Regionen vorgeschlagen. Anhand dieser Netzwerke werden dann potentielle Verwandtschaftsbeziehungen deutlicher und eine nachträgliche Einteilung zu den einzelnen Haplogruppen wird erleichtert (Bandelt et al. 2000).

Mit den so gewonnenen Häufigkeiten von Haplogruppen oder sogar manchmal auch von einzelnen Haplotypen werden die Diversitäten innerhalb der betrachteten Populationen (dw – diversity within) und zwischen jeweils zwei verschiedenen Populationen (db – diversity between) berechnet.

Die Relation dieser beiden Diversitäten ergibt ein Maß für den effektiven Abstand zweier Populationen voneinander. Anhand der so gewonnenen Abstände hoffen viele Evolutionsforscher, die Herkunft des Menschen aus Afrika weiter belegen zu können (Vigilant et al. 1991), und vielleicht sogar vergleichsweise kleine Wanderungsbewegungen, wie zum Beispiel die Besiedlung Islands nachvollziehbar zu machen (Helgason et al. 2001).

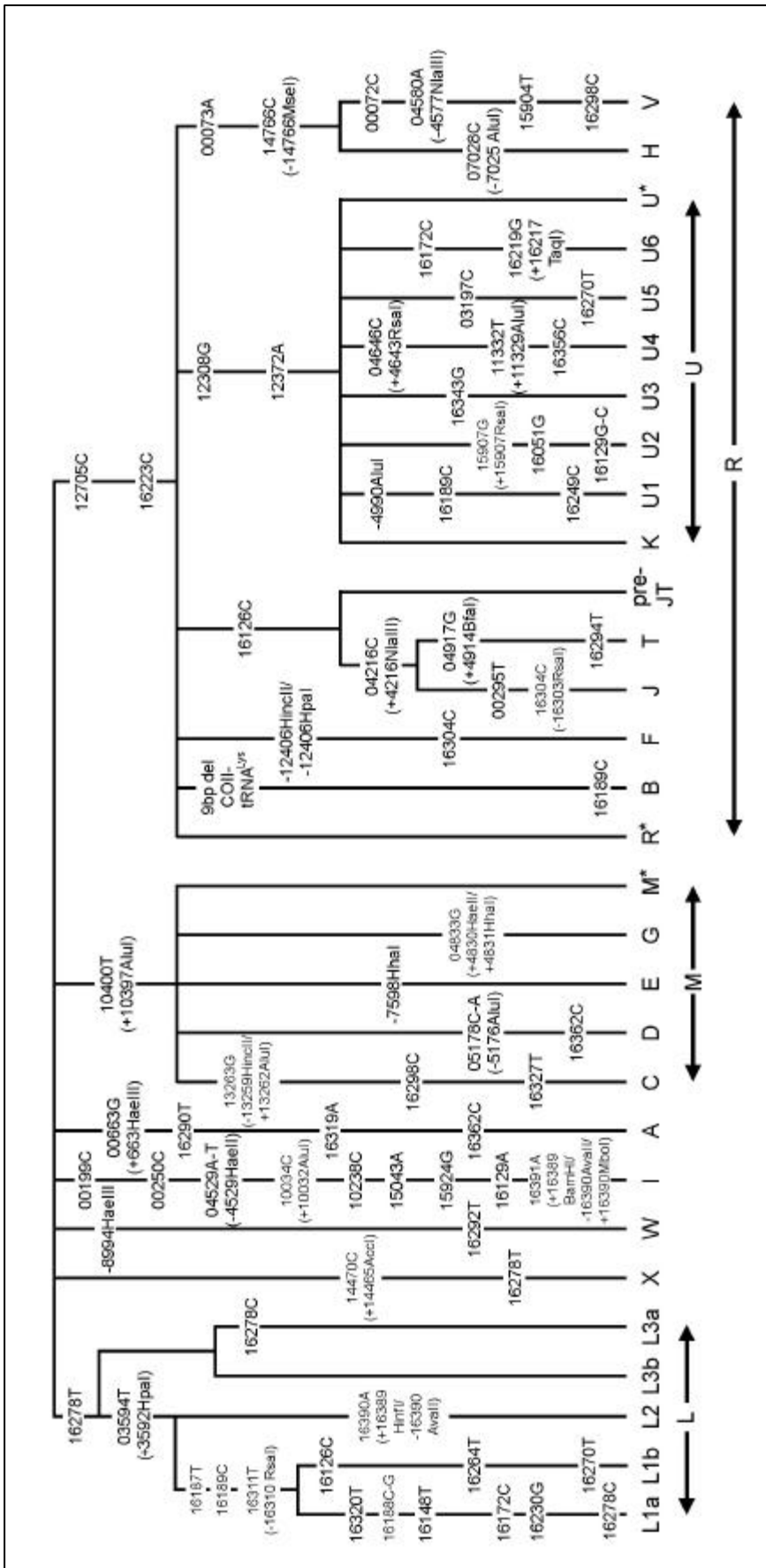


Abb. 1.5: Schema zur Einteilung gefundener Sequenzdaten bzw. RFLP-Daten in die zugehörigen Haplogruppen. Die Großbuchstaben stellen Haplogruppen dar. Zahlen gefolgt von Buchstaben sind gleichbedeutend mit den notwendigen Eigenschaften zur Einteilung in die Haplogruppen. Die Bezeichnungen in Klammern zeigen den resultierenden Gewinn (+) oder Verlust (-) der jeweiligen Restriktionsschnittstelle (Macaulay et al. 1999).

1.3 Aufgabenstellung

1.3.1 Mitochondriale DNA

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die mitochondriale DNA spurenkundlich nutzbar zu machen. Dies bedeutet, aus den bisher bekannten Analyse-Methoden die geeignetsten auszusortieren und zu etablieren. Insbesondere sollten regional relevante Populationsdaten, also Unterfränkische/Süddeutsche Sequenzdaten erhoben werden. Anhand dieser sollte eine unterfränkische Datenbank aufgebaut werden, die dann auch für Routinefälle einsetzbar ist. Die erhobenen Daten sollten auch an die überregionale Datenbank „D-loop-BASE“ in Magdeburg weitergeleitet werden, um gemeinsam mit anderen mitteleuropäischen Instituten eine angemessene Datenbankgröße zu erreichen. Die gefundenen Daten sollten des Weiteren mit Populationsdaten anderer im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchenden europäischen und außereuropäischen Bevölkerungsstichproben verglichen werden. Ein Vergleich mit weiteren in der Literatur veröffentlichten Daten sollte zudem das Spektrum der zu vergleichenden Populationen verbreitern.

Neben der Sequenzierung der hypervariablen Regionen I und II sollten auch andere Bereiche der mitochondrialen DNA auf rechtsmedizinische Relevanz untersucht werden und gegebenenfalls in das Sortiment der etablierten Methoden aufgenommen werden.

So war die kürzere und weniger aussagekräftige hypervariable Region III zum Beispiel daraufhin zu untersuchen, ob sich Haplotypen, die sich durch Analyse der Regionen I und II nicht unterscheiden lassen, möglicherweise durch eine Ausdehnung der Analyse auf die Region III oder auch durch Analyse der über das mitochondriale Genom verteilten NCs weiter differenzieren lassen.

Weiterhin sollte die Möglichkeit einer Spezieszuordnung durch RFLP-Analyse des Cytochrom b Genes anhand einer Auswahl von Haustieren und Wildtieren mit anderen Methoden der Spezieszuordnung anhand von DNA-Material, wie z. B. mit der RAPD-PCR (Günther 1997) verglichen werden.

1.3.2 Short tandem repeats

Eine weitere Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, aktuelle Entwicklungen innerhalb der forensischen DNA-Analytik zu verfolgen und das Institut durch Etablierung neuer Methoden bzw. Systeme auf dem aktuellsten Stand zu halten.

Hierunter fiel vor allem die Etablierung neuer STR-Systeme, insbesondere da mit Einführung der Datenbank des Bundeskriminalamtes (BKA) das institutseigene STR-Spektrum regelmäßig erweitert werden musste. Für die Einstellung in diese Datenbank müssen Spuren bzw. Vergleichsmaterial von überführten Tätern in fünf STR-Systemen untersucht werden. Hierzu zählen die bisher am Institut etablierten und angewandten Systeme TH01, VWA, FGA(FIBRA) und SE33(ACTBP2) (Günther und Patzelt, 1996; Bäßler et al., 1999). Das fünfte zu Beginn der Arbeit am Institut nicht eingesetzte System D21S11 (Möller et al., 1994) sollte hierfür methodisch etabliert werden. Außerdem sollten anhand einer Unterfränkischen Populationsstichprobe für eigene Untersuchungen relevante Daten erhoben werden. Dasselbe gilt für die Systeme D3S1358, D8S1179 und D18S51 (Gené et al., 1998), da die Datenbank in naher Zukunft um diese STR-Systeme erweitert werden soll.

Zusätzlich zu den bereits für Unterfranken etablierten Y-chromosomalen STR-Systemen DYS19, DYS388, DYS390 und DYS393 (Günther, 1997) sollte ein weiteres aussagekräftiges System, das DYS385 eingeführt werden. Dieses System verfügt über die Besonderheit, dass zwei Kopien auf dem Y-Chromosom angelegt sind, so dass sich meist zwei unterschiedliche Allele unterscheiden lassen, was dessen Aussagekraft erheblich verstärkt (Schneider et al. 1998).

Das Amelogenin sollte als Geschlechtmarker eingeführt werden. Dieses auf X und Y Chromosom homolog vorliegende Gen besitzt im ersten Intron einen geschlechtsspezifischen Polymorphismus. Probleme wie beim oben beschriebenen System sollten hier nicht auftreten, da nur ein Primerpaar zum Einsatz kommt und die Zielsequenz nur in einer ausschließlich geschlechtspolymorphen Kopie auftritt (Mannucci et al. 1994).

Mit der Bereitstellung von kommerziellen STR-Multiplex-Kits ergibt sich die Möglichkeit, schnell und effizient Probanden zu untersuchen. Problematisch in der Abstammungsbegutachtung ist allerdings, dass Mutationsraten der STR-Systeme weitgehend unbekannt sind. Durch Mutter-Kind-Vergleiche sollte mit dem Multiplex-

System AmpFlSTR® Profiler™ von Applied Biosystems versucht werden zu dieser Problematik Antworten zu finden. Im Zuge dieser Untersuchung gewonnene Populationsdaten der betrachteten unterfränkischen Bevölkerungstichprobe sollten mit den von Applied Biosystems angegebenen Frequenzen verglichen werden.

1.3.3 DNA-Isolationsmethoden

Aufgrund aktueller Fragestellungen der forensischen Praxis war es regelmäßig erforderlich, neue Untersuchungsmethoden für problematische Spuren zu entwickeln bzw. die geeignetsten Methoden aus der Literatur herauszufiltern.

Hierzu gehörten eine geeignete Methode zur Extraktion von DNA aus Paraffin-Schnitten bzw. aus in Paraffin eingebetteten Gewebeteilen. In der Regel wird eine derartige Methode innerhalb der Rechtsmedizin benötigt, wenn es um Vergleichsmaterial verstorbener Personen geht. Dies kann z. B. eine Identifizierung sein, bei der die DNA-Merkmale einer unbekanntes Leiche mit den Merkmalen einer zuordenbaren Probe z. B. aus einer Biopsie verglichen werden. Ein anderes mögliches Anwendungsgebiet ist die Abstammungsbegutachtung. In Fällen, in denen ein in Frage kommender Elternteil verstorben ist, kann sich die Feststellung der Blutsverwandtschaft als schwierig erweisen. Liegen jedoch in Paraffin eingebettete Gewebeprobe vor, z. B. aufgrund einer erfolgten Sektion oder zu Lebzeiten durchgeführten Biopsie, so ist es möglich, auch ohne Exhumierung ein Abstammungsgutachten zu erstellen. Problematisch gestaltet sich diese Extraktion insbesondere in Fällen, in denen die Gewebeteile vor der Einbettung zu lange im Fixierungsmittel Formalin aufbewahrt wurden. Die in der wässrigen Lösung von Formaldehyd entstehende Ameisensäure hydrolysiert in diesen Fällen nach und nach die DNA und erschwert DNA-Typisierungen erheblich.

Eine geeignete Methode sollte auch zur DNA-Extraktion aus Urin gefunden werden. Dies ist in Fällen von Bedeutung, in denen die Herkunft einer Urinprobe in Frage gestellt wird und mit dem Merkmalsmuster eines in Frage kommenden Probanden verglichen werden soll.

Ein weiteres regelmäßig auftretendes Problem innerhalb der forensischen Serologie ist die DNA-Isolation aus Geweben, insbesondere aus Knochenmaterial, das erst einige Zeit nach dem Todeszeitpunkt z. B. einer unbekanntes Person entnommen

wurden. Gewebeproben dieser Art befinden sich in der Regel in fortgeschrittenem Verwesungszustand. Dies kann bedeuten, dass durch bakteriellen Abbau die DNA weitgehend degradiert ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte auch eine Methode gefunden und etabliert werden, die geeignet ist, aus derartigen Gewebeproben typisierungsfähige DNA zu gewinnen.

2 Abkürzungen

A	Ampere oder Adenin
A. dest.	destilliertes Wasser
Abb	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserum
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz- Dihydrat
EtOH	Äthanol
g	Einheit der Gravitation oder Gramm
G	Guanin
h	Stunde
M	Mol
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ng	Nanogramm
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
pmol	Picomol

rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylen Diamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TSR	Template suppression reagent
V	Volt
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Geräteart	Markenname	Hersteller (Vertreiber)
Ableitgerät	E122	Consort (Peqlab, Erlangen)
Autoklav	Typ 23	MELAG (Hartenstein)
Brutschrank	B 30	Memmert (Hartenstein)
PAG-Elektrophoresegeräte	Multiphor II	
	Electrophoresis Unit	LKB/Pharmacia, Freiburg
	Macrodrive 5	
	Constant Power Supply	LKB/Pharmacia, Freiburg
	Multitemp II	
	Thermostatic Circulator	LKB/Pharmacia, Freiburg
Exsikator		Hartenstein, Würzburg
Flachbettscanner	StudioStar	Agfa
Homogenisator (Glas)		Hartenstein, Würzburg
Mühle	KM 75	Krups
pH-Meter	pH526	WTW (Hartenstein)
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
+ Thermaldrucker	DPU-414	Eppendorf, Hamburg
Rührer	M21	GLW (Hartenstein)
Schüttler	Vortex Genie 2	Bender+Hobein, Zürich
Sequenzierer	310 Genetic Analyser	ABI, Weiterstadt
Sofortbildkamera	CRT / TA 40	ORMAF (Padua, Italien)
	mit Polaroidaufsatz	
	und Electrophoresis hood GH10	

Taumelrotator, horizontal	Polymax 2040	Heidolph (Hartenstein)
Taumelrotator, vertikal	RT 20	CAT (Klein, Würzburg)
Thermocycler	2400	ABI, Weiterstadt
ABI, Weiterstadt		
personal cycler	Biometra, Göttingen	
Tischwaage	basic	Sartorius (Hartenstein)
Wasserbad, klein	B	LAUDA (Hartenstein)
Wasserbad, groß	1083	GFL (Hartenstein)
Wasserstrahlpumpe		Hartenstein, Würzburg
Zentrifuge, gekühlt	Biofuge 17RS	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Tisch	Mikroliter	Hettich, Tuttlingen

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Artikel	Bezeichnung	Hersteller
Filterpipettenspitzen	Safeguard-Filtertips 10,30,100,200 u.1.000 µl	Peqlab (Erlangen)
Fritten	Wizard Minicolumns	Promega (Mannheim)
Glaswaren (Bechergläser usw.)		Hartenstein (Würzburg) od. Noras (Würzburg)
Pipetten		Roth (Karlsruhe)
Pipettenspitzen	Standardtips gelb und blau	Eppendorf (Hamburg)
	Gilson-Precision-Tips grau	üb. Noras (Würzburg)
Reaktionsgefäße	Standard und Safelock (1,5 und 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
	Mikroschraubröhrchen (1,5 ml)	Sarstedt (Nürnbrecht)

Sofortbildfilme	667	Polaroid
Spritzen	2 ml Einmalspritzen	Primo (üb. Hartenstein)
	50 ml Einmalspritzen	Becton-Dickinson (üb. Noras)
Zentrifugenröhrchen	15 ml und 50 ml	Greiner (üb. Noras)

3.1.3 Chemikalien

Verbrauchskemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, standardmäßig über Sigma (München), Roth (Karlsruhe) und Merck eurolab (Darmstadt) bezogen.

Als Standardpolymerase wurde die Taq DNA Polymerase von Eppendorf (Hamburg) eingesetzt; alternativ kam die AmpliTaq Gold™ von Applied Biosystems (Weiterstadt) zur Anwendung.

Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) und Restriktionsendonukleasen wurden von MBI Fermentas (Wilna, Litauen) erworben.

Als Längenstandards in der PAGE kamen die Leitern GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus und GeneRuler™ 50bp DNA Ladder von MBI Fermentas (Wilna, Litauen) zum Einsatz.

3.1.4 Benötigte Puffer

Agarosegel-Probenpuffer	0,25% Bromphenol Blau 0,25% Xylen Cyanol 25% Ficoll 400
Erythrozyten-Lysepuffer	150 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA
PBS	2,7 mM Kaliumchlorid (KCl) 137 mM Natriumchlorid (NaCl) 1,5 mM Kalium-di-hydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) 7,75 mM Di-Natrium-hydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄), pH 7,4
10 x TBE-Puffer	890 mM Tris-Borat 25 mM EDTA, pH 8,0
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA, pH 8,0
TEN-Puffer	10 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 150 mM NaCl, pH 8,0
TENS-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM EDTA 100 mM NaCl 1% SDS

3.1.5 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden durch die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert:

Bezeichnung	Sequenz	Aus (Literatur):
L 15926	5'- TCA AAG CTT ACA CCA GTC TTG TCT TGT AAA CC	Sullivan et al. 1992
L 15997	5'- CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT	"
L 16196	5'- CCC CCC CCC CAT	Szibor und Michael 1999
H16251	5'- GGA GTT GCA GTT GAT GT	Pfeiffer et al. 2001
H 16395	5'- CAC GGA GGA TGG TGG CAA G	Sullivan et al. 1992
L 00048	5'- GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C	"
L 00262	5'- AAT TGA ATG TCT GCA CAG CC	Lutz et al. 1997
H 00537	5'- TGG TTG GTT CGG GGT ATG	"
H 00408	5'- CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A	Sullivan et al. 1992
H 00580	5'- TTG AGG AGG TAA GCT ACA TA	"
Cyt B 1	5'- CAT CGA CCT TCC AGC CCC ATC	Zehner et al. 1998
Cyt B 2	5'- TGT TCT ACT GGT TGG CCT CCA AT	"
F 5318	5'- CAC CAT CAC CCT CCT TAA CC	"
R 5882	5'- GCT GAG TGA AGC ATT GCA CTG	"
F 5700	5'- TAA GCA CCC TAA TCA ACT GGC	"
R 6262	5'- GCC TCC ACT ATA GCA GAT GCG	"
F 8164	5'- CGG TCA ATG CTC TGA AAT CTG TG	"
R 8669	5'- CAT TGT GTG GTG ATT AGT CG	"
RAPD – 2	5'- ACG ACC CAC G	James et. al. 1994
Amelogenin 1	5'- CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG	Mannucci et al. 1994
Amelogenin 2	5'- ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG	"
D3S1358 – 1	5'- ACT GCA GTC CAA TCT GGG T	Gené et al. 1998
D3S1358 – 2	5'- ATG AAA TCA ACA GAG GCT TG	"
D8S1179 – 1	5'- TTT TTG TAT TTC ATG TGT ACA TTC G	"
D8S1179 – 2	5'- CGT AGC TAT AAT TAG TTC ATT TTC	"
D18S51 – 1	5'- CAA ACC CGA CTA CCA GCA AC	"
D18S51 – 2	5'- GAG CCA TGT TCA TGC CAC TG	"
D21S11 – 1	5'- GTG AGT CAA TTC CCC AAG	Möller et al. 1994
D21S11 – 2	5'- GTT GTA TTA GTC AAT GTT CTC	"
DYS 385 – 1	5'- AGC ATG GGT GAC AGA GCT A	Schneider et al. 1998

DYS 385 – 2	5'- CCA ATT ACA TAG TCC TCC TTT	"
SE33 P1	5'- AAT CTG GGC GAC AAG AGT GA	Bäßler et al. 1999
SE33 P2	5'- ACA TCT CCC CTA CCG CTA TA	"
X 3	5'- TAT TTG GAC TCT CTC TGA GGA	Pfitzinger et al. 1993
X 4	5'- TTC TAC TAC AAG GGT GTT GCA	"
Y 3	5'- GTG TAT TCA CCT CCG GGA G	"
Y 4	5'- ACA AAA GGT TCA ATT CTG TGA G	"

3.1.6 Biologisches Material

Blut- und Speichelproben wurden entweder aus dem routinemäßig anfallenden Material entnommen oder freundlicherweise von Stefan Günther zur Verfügung gestellt.

Alleleitern für STR-Analysen wurden entweder selbst aus bekannten und günstig verteilten DNA-Proben zusammengestellt oder im Zusammenhang mit einem Multiplex käuflich erworben (Applied Biosystems, Promega o.ä.)

Gewebeproben, Paraffinschnitte, Haare, Urin, Stuhlproben usw. wurden aus Institutsbeständen, aus der laufenden Routinearbeit oder auch zum Teil von Institutsmitarbeitern gewonnen.

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Extraktion

3.2.1.1 Chelexextraktion (Walsh et al. 1991)

(Für Vollblut, Blut-, Speichel- und Spermaspuren)

Die innerhalb der Rechtsmedizin am weitesten verbreitete DNA-Isolationsmethode ist die Chelexextraktion. Chelex besteht aus Kunstharzpartikeln, die als Matrix für einen

an die Oberfläche gebundenen Chelator dienen. Chelex bindet also bivalente Ionen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} und sorgt auf diese Weise einerseits für die Deaktivierung unerwünschter Enzyme wie z. B. der DNasen, andererseits werden Ca^{2+} -abhängige Strukturkomponenten wie Cytoskelett und extrazelluläre Strukturproteine inaktiviert, was zur Destabilisierung der gesamten Zelle führt. Zugabe von Proteinase K, einem Ca^{2+} -unabhängigen Enzym, führt schließlich zum Abbau dieser Enzyme und Strukturproteine und letztlich zur Auflösung der Zelle und zur Freisetzung der DNA. Die Proteinase, die die darauffolgenden erwünschten Enzymreaktionen wie Restriktionsverdau oder PCR behindern würde, wird im Anschluss durch Abkochen deaktiviert.

Zur 3 mm² großen Blut-, Speichel- oder Spermaspur bzw. 3 µl Vollblut im Eppendorfgefäß wird 1 ml steriles A. dest. zugegeben und gut gemischt. Es folgt eine 15-30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur – bei alten Spuren auch länger - mit wiederholtem Mischen. Der Ansatz wird für 2-3 Minuten bei 10.000 – 15.000 g zentrifugiert und der Überstand wird anschließend bis auf 20-30 µl abpipettiert und verworfen. Der Spureträger wird hierbei im Sediment belassen. Nun werden 150 µl Chelex (5 % in A. dest.) und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben – bei Spermaspuren kommen zusätzlich 7 µl 1 M DTT hinzu. Der Reaktionsansatz wird 15 – 30 min bei 56 °C inkubiert; alte Spuren werden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Proben werden nun gut geschüttelt und 8 min im Wasserbad gekocht. Es wird wiederum gut gemischt und anschließend für 2 – 3 Minuten bei 10.000 – 15.000 g zentrifugiert. Der DNA-Extrakt kann nun entweder direkt für die Amplifikation eingesetzt (5 µl) oder weiter aufgereinigt werden (s.u.).

3.2.1.2 Phenol-Chloroform-Extraktion (Hoff-Olsen et al. 1999)

(Blutspuren, Gewebe, Knochen)

Die Phenolisierung der DNA ist eine weitere Möglichkeit der DNA-Isolation. Sie beruht auf dem Prinzip, ein verunreinigtes Gemisch durch Zugabe von Phenol und Chloroform in zwei Phasen zu unterteilen. Hierbei werden die Proteine denaturiert und reichern sich auf Grund ihrer Zusammensetzung aus hydrophilen und lipophilen

Aminosäureteilmereichen an der Phasengrenze oder Interphase an, während lipophile Stoffe, die später stören würden, sich in der organischen Phenolphase sammeln. Die hydrophile DNA hingegen wird in der aquatischen Phase gehalten. Im Vergleich zur Chelexextraktion ist die Phenolisierung erheblich zeitaufwendiger. Der Einsatz von Phenol und Chloroform bedingt zudem im Vergleich zur Chelexextraktion eine gewisse Gesundheitsgefährdung. Dennoch hat die Phenolisierung Vorteile. Sie ist effektiver was Quantität und Qualität der gewonnenen DNA angeht und die resultierende DNA ist länger lagerungsfähig. Für kritische Spurenfälle kann sie also trotz der genannten Nachteile zur Methode der Wahl werden.

Zur ca. 1 cm² großen Blutspur (bzw. 100 mg Gewebe) werden in ein dicht schließendes Reaktionsgefäß 500 µl Extraktionspuffer (0,01 M Tris/HCl pH 7,6; 0,01 M EDTA; 0,1 M NaCl), 50 µl Proteinase K (10 mg/ml), 50 µl DTT (60 mg/ml) und 50 µl 20 % SDS gegeben. Der Ansatz wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wird das gleiche Volumen Phenol/Chloroform (z. B. Roth/Karlsruhe) zugegeben und 5 min gut geschüttelt. Die Probe wird zentrifugiert (7 min; 12.000 g) und die obere wässrige Phase wird in ein frisches Röhrchen überführt. Es wird erneut das entsprechende Volumen Phenol/Chloroform zugegeben und nach 5 minütigem Mischen wird für 7 min zentrifugiert (12.000 g). Die obere Phase wird sorgfältig, ohne Phenol mitzunehmen, in ein neues Röhrchen überführt. Nun wird 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (4 °C), 1 µl Glycogen (20 mg/ml) und 2 Volumen 100% EtOH (4 °C) zugegeben und der Ansatz wird vorsichtig manuell gemischt. Die Fällung der DNA erfolgt über Nacht bei -20 °C. Nun wird für 30 min abzentrifugiert (4 °C; 12.000 g). Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und verworfen. Zum Sediment wird 70% EtOH (4 °C) zugegeben und die Probe wird 5 min bei 4 °C belassen. Anschließend wird 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird wiederum vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wird im Vakuum getrocknet. Zur getrockneten DNA werden 50 µl TE-Puffer zugegeben und die Probe wird zur Lösung über Nacht im Kühlschrank gelagert.

3.2.1.3 DNA-Extraktion mit peqGold TriFast™ (Peqlab/Erlangen)

(Gewebe und Knochen)

Diese Methode beruht auf einem kommerziell zu erwerbenden Reagens, dessen Zusammensetzung nach Angabe der Firma Peqlab bekannt sei. Sie ähnelt vom Ablauf her der Phenol-Chloroform-Fällung, ist aber auch zur Abtrennung von RNA und/oder Proteinen einsetzbar.

50 – 100 mg Gewebe werden mit je 1 ml peqGOLD TriFast™ im Homogenisator zermahlen. Dabei sollte das Probevolumen nicht mehr als 10 % des verwendeten TriFast™-Volumens betragen.

Die Proben werden für 5 min bei RT belassen, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Je eingesetztem Milliliter TriFast™ werden 0,2 ml Chloroform zugegeben, und die Proben werden 15 s lang kräftig geschüttelt. Danach werden sie wiederum 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine anschließende Zentrifugation für 5 min bei 12.000 g und RT führt zur Trennung der Probe in drei Phasen: eine untere gelbe Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende Interphase. Die RNA ist ausschließlich in der wässrigen Phase angereichert, während sich die DNA und die Proteine in der Interphase und der Phenolphase befinden. Die wässrige Phase nimmt dabei ca. 60 % des Probenvolumens ein. Das verwendete Chloroform sollte von Zusätzen wie z. B. Isoamylalkohol frei sein.

Nach dem vollständigen Entfernen der wässrigen Phase wird die DNA durch die Zugabe von 0,3 ml 100% EtOH präzipitiert. Durch mehrmaliges Invertieren wird vorsichtig gemischt und die Proben werden für 3 min bei RT gelagert. Die DNA wird mit einer anschließenden Zentrifugation bei 2.000 g und 4 °C für 5 min sedimentiert. Das sorgfältige Entfernen der wässrigen Phase beeinflusst die Qualität der DNA in hohem Maße. Der Überstand (Ethanol/Phenolphase) wird verworfen. Das DNA-Sediment wird zweimal mit 1 ml 0,1 M Natriumcitrat in 10 % EtOH gewaschen. Bei jedem Waschvorgang wird die DNA für 30 Minuten bei RT in der Waschlösung inkubiert und danach für 5 min bei 2.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Abschluss der Waschzyklen wird die DNA in 2 ml 75% EtOH aufgenommen und 15 min bei RT inkubiert. Die Lösung sollte wiederholt geschüttelt und anschließend für 5 min bei

2.000 g und 4 °C zentrifugiert werden. Das DNA-Sediment wird durch Anlegen eines Vakuums für 10 min getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.2.1.4 DNA-Extraktion aus Vollblut (Miller et al. 1988)

5 ml Vollblut werden mit 50 ml Erythrozyten-Lysepuffer gemischt und für 5 min auf Eis gebracht. Es wird zentrifugiert (10 min, 4 °C, 1.000 g) und der Überstand wird verworfen. Dieser Schritt wird wiederholt, bis das Sediment weiß erscheint, und somit alle Erythrozyten lysiert sind. Die Zellen werden in 20 ml eiskalter PBS resuspendiert und es wird erneut zentrifugiert (10 min, 4° C, 1.000 g). Das Sediment wird in 3 ml eiskaltem TEN-Puffer resuspendiert. Zur DNA-Extraktion wird die Suspension für eine Minute im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Es werden 30 µl 20 % SDS und 60 µl Proteinase K (5 mg/ml) hinzugefügt, und die Mischung wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der klaren viskosen Mischung werden am nächsten Tag 1,2 ml gesättigte NaCl zugeführt und es wird 15 s kräftig geschüttelt. Der Inhalt des Röhrchens wird zentrifugiert (15 min, RT, 5.000 g). Der Überstand, der jetzt die deproteinisierte DNA enthält, wird abgenommen und 2 Volumina 100 % EtOH werden hinzugegeben. Der Röhrcheninhalt wird vorsichtig durchmischt, bis die DNA fädig ausfällt (nach ca. 1 min). Die DNA wird mit Hilfe eines Glashakens entnommen und in 1 ml 70 % EtOH getaucht. Die DNA wird luftgetrocknet und anschließend in TE-Puffer gelöst (37 °C, 2 h oder alternativ 4 °C über Nacht).

Durch eine kleine Modifikation lässt sich diese Methode auch zur Isolation aus Geweben einsetzen. Hierfür werden zunächst 50-100 mg Gewebe mit einem Skalpell kleingeschnitten und in ein Reaktionsgefäß, das 3 ml TENS-Puffer enthält, überführt. Zu diesem werden 125 µl Proteinase K (10 mg / ml) gegeben, und der Ansatz wird über Nacht bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zu der resultierenden viskosen Lösung werden 1,2 ml NaCl zugegeben und wie oben beschrieben weiterverfahren.

3.2.1.5 DNA-Extraktionsprotokolle aus Paraffin

Für die Extraktion aus in Formalin fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe wurden folgende Methoden der Literatur entnommen:

Protokoll I (Yamada et al. 1994):

Diese Methode verwendet das lipophile Reagens Xylol, um das zu untersuchende Gewebe aus dem Paraffin zu lösen. Die DNA wird mittels Phenolisierung aufgereinigt.

5 µm starke Schnitte werden aus einem Block geschnitten und mit einem Skalpell zerteilt. Die Proben werden mit Xylol gewaschen und in 200 µl TEN (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 40 mM EDTA; 10 mM NaCl), der 1 % SDS und 0,5 mg/ml Proteinase K enthält, aufgenommen. Der Ansatz wird 16 h bei 50 °C inkubiert. SDS und Proteinase K werden zu Endkonzentrationen von jeweils 2 % und 1 mg/ml aufgefüllt und für weitere 24 h inkubiert. Es folgt eine Phenol-Chloroform-Fällung. Die DNA wird in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; pH 8,0; 1 mM EDTA) aufgenommen und mit 20 µg/ml Ribonuklease A versetzt.

Protokoll II (Burns et al. 1997):

Hierbei kommt es zu keiner DNA-Aufreinigung, sondern mit einem initialen Denaturierungsschritt unter Verwendung des schwachen Detergens Triton soll die DNA direkt in dem PCR-Mix gelöst werden.

5 µm-Schnitte werden direkt in ein PCR-Röhrchen gegeben. 1% Triton X-100 wird zugegeben (abhängig von der Größe des PCR-Ansatzes) und für 20 min bei 95 °C inkubiert. Anschließend wird der PCR-Reaktionsansatz zugegeben und die PCR wie gewöhnlich durchgeführt.

Protokoll III (Banerjee et al. 1995):

Zur Lösung des Gewebes aus dem Paraffin schlagen die Autoren kein lipophiles Reagens vor, sondern sie empfehlen ein Herausschmelzen aus dem Paraffinschnitt durch Hitzeinwirkung.

5 µm-Schnitte werden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß (EG) überführt und vorsichtig mit einer Pipettenspitze zermahlen. 200 µl Verdauungspuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,5; 1mM EDTA und 0,5 % Tween 20) werden zugegeben.

Die Proben werden 30 – 60 s in einen Mikrowellenherd (500 W) erhitzt. Um ein Zerplatzen der Röhrchen zu vermeiden, sollte die Bestrahlung in 15 s-Schritte

aufgeteilt werden. Die Proben werden zentrifugiert (12.000 g, 10 min, RT). Die feste Paraffinphase wird mit einer Pipettenspitze entfernt, der Überstand wird abgenommen und verworfen. Das Gewebesediment wird in Verdauungspuffer aufgenommen, und es wird 2,4 µl Proteinase K (16,5 mg/ml) zugegeben. Die Ansätze werden über Nacht bei 42 °C inkubiert. Die Proben werden zentrifugiert (6.000 g, 5 min, RT) und der Überstand wird in neue Röhrchen überführt. Diese werden für 10 min gekocht.

Protokoll IV (Turbett et al. 1996):

Auch diese Methode beruht auf einem Herauslösen des Gewebes mit Xylol. Im Unterschied zum Protokoll nach Yamada et al. schließen Turbett et al. eine teilweise Rehydrierung des Gewebes an.

5 µm-Schnitte werden in ein 1,5 ml EG gegeben und mit Xylol gewaschen. Es folgen drei Rehydrierungs-Schritte in 100 %, 95 % und 70 % EtOH und anschließendes Lufttrocknen. Das Gewebe wird in 200µl Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 % Tween 20; 2 mg/ml Proteinase K) verdaut. Die Proben werden 16 - 24 h bei 55 °C inkubiert und anschließend 20 min gekocht. Die Röhrchen werden kurz zentrifugiert, und der Überstand wird in ein frisches Röhrchen überführt.

Protokoll V (Burton et al. 1998):

Auch hier wird ein lipophiles Reagens zur Trennung von Gewebe und Paraffin verwendet. Im Unterschied zu Yamada et al. bzw. Turbett et al. kommt hier nicht Xylol, sondern Oktan zum Einsatz.

5 µm-Schnitte werden in 1 ml Oktan aufgenommen. Es wird einmal mit 100 % Ethanol gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Die Proben werden in 50 µl-Ansätzen über Nacht bei 52°C verdaut (1mg/ml Proteinase K; 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA; 0,45 % Tween 20). Es werden 950 µl A. dest. zugegeben und 5 µl in die PCR eingesetzt.

3.2.1.6 DNA-Extraktion aus Knochenmaterial

Knochenextraktion nach Holland et al. (1993):

Diese Methode löst die Knochenzellen durch zweitägige Inkubation mit dem Chelator EDTA. Das für die Knochenkristallisation entscheidende Kalzium wird hierdurch entfernt und die einzelnen Zellen werden für die gewöhnlich zur Extraktion eingesetzten Reagenzien zugänglich.

Extraktions-Puffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0

100 mM NaCl

2% SDS

10 mM EDTA

Je Extraktion werden ca. 2 g Knochenmaterial eingesetzt. Zunächst wird der Knochen mit einem Skalpell von eventuellen Geweberesten und anderen Verunreinigungen befreit und anschließend mit A. dest. und EtOH gewaschen. Der saubere Knochen wird in einer Mühle zermahlen und das Mahlgut in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Um den Knochen zu dekalzifizieren wird er dreimal für jeweils 8 bis 12 h auf dem Taumelrotator in 8 ml 0,5 M EDTA gewaschen und anschließend bei 4.000 g für 10 min und bei RT zentrifugiert. Um überschüssiges EDTA zu entfernen, wird der Knochen dreimal mit sterilem, deionisiertem H₂O gewaschen und wiederum bei 4.000 g und RT zentrifugiert. Die Probe wird in 3 ml auf 56 °C vorgewärmtem Extraktions-Puffer, welcher 0,5 mg/ml Proteinase K enthält, aufgenommen. Zur DNA-Extraktion wird der Ansatz 18 h bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird durch Zugabe von Proteinase K auf eine Endkonzentration von 1 mg/ml und eine weitere Inkubation für 5 h bei 56 °C der Proteinabbau und die resultierende Zell-Lyse forciert. Zur Entfernung von Verunreinigungen wird eine

Phenolextraktion (3.2.1.2) durchgeführt. Soweit möglich wird die DNA mit einem Photometer vermessen.

DNA – Extraktion aus Knochen nach Prado et al. (1997)

Diese Methode beruht auf einer kürzeren Inkubation mit EDTA. Dies macht eine intensivere Nachbehandlung mit mehreren Waschschritten nötig. Zur Verwendung kommt hierbei Guanidinthiocyanat, welches für eine Denaturierung störender Proteine sorgt.

Waschpuffer:

5,0 M Guanidinthiocyanat

0,1 M Tris-HCl, pH 6,4

Eine ca. 1 mm dicke Schicht wird zunächst von der Knochenoberfläche entfernt. Der Knochen wird zu feinem Pulver zermahlen. Dies geschieht entweder durch Eintauchen der Probe in flüssigem Stickstoff und Zertrümmern im Mörser oder durch Pulverisieren in einer Schlagmühle. 1-2 g des Knochenpulvers werden in 3 ml einer Lösung aus 1,5 mg Proteinase K, 0,5% Tween 20 und 0,5 M EDTA über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Mischung wird nun zweimal mit Phenol, zweimal mit Phenol/Chloroform und einmal mit Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wird in ein Centricon 30 micro concentrator (Amicon) überführt und eine Stunde zentrifugiert. Das Konzentrat wird einige Male mit Waschpuffer gewaschen. Dies geschieht so lange bis das gewöhnlich bräunliche bis gelbe Konzentrat klar wird.

Abweichend vom Originalprotokoll wurde das so erhaltene Konzentrat mit Diatomeenerde (3.2.2.1) statt mit Silikatpartikeln weiter aufgereinigt.

Knochenextraktion nach Höss und Pääbo (1993)

Diese Methode verzichtet auf eine Dekalzifizierung. Zur Extraktion gelangen also nur die durch Pulverisierung des Knochens freigelegten Zellen. Auch hier werden mit Guanidinthiocyanat die unerwünschten Proteine ausgefällt.

Ca. 0,5 g Knochen werden in der Schlagmühle zu feinem Pulver zermalen. Dieses wird dann in 1 ml Extraktionspuffer (10 M Guanidinthiocyanat; 0,1 M Tris-HCl pH 6,4; 0,02 M EDTA; 1,3 % Triton X-100) aufgenommen und eine bis mehrere Stunden unter gelegentlichem Schütteln bei 60 °C inkubiert.

Nun wird 5 min bei 5.000 g und RT zentrifugiert. Es werden ca. 500 µl des Überstandes abgenommen, und durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion wird die DNA isoliert.

3.2.1.7 DNA-Extraktion aus Urin

3.2.1.7.1 Extraktion durch Zentrifugation

Für diese auf einem einzigen Zentrifugationsschritt beruhende Isolationsmethode werden 8 ml Urin eingesetzt. Dieser wird in einem 15 ml – Röhrchen zentrifugiert (4.000 g, RT, 30 min). Der Überstand wird bis auf ca. 100 µl verworfen. Durch kräftiges Schütteln resuspendiert man das Sediment. Es werden 500 µl TENS-Puffer und 20 µl Proteinase K (10 mg/ml) zugegeben, gemischt und es erfolgt eine Inkubation bei 56 °C für 1 h. Der Reaktionsansatz wird 8 min im Wasserbad abgekocht und zur Abtrennung inhibierender Stoffe einer Diatomeenreinigung unterzogen (3.2.2.1).

3.2.1.7.2 Extraktion mit QIAamp® Spinsäulen (Qiagen, Hilden)

Da Urin nur eine geringe Menge an Zellen enthält, muss die Probe zunächst konzentriert werden. Hierfür werden 3,5 ml Urin in einen Centricon™-100 Mikrokonzentrator (Amicon/Millipore) gegeben und 30 min bei RT und 1.000 g zentrifugiert, so dass die Probe auf ca. 140 µl eingeengt vorliegt. Ist das Volumen nach einer halben Stunde noch zu groß, so kann die Zentrifugationszeit auf 60 min ausgedehnt werden.

Die Probe wird nun in ein 1,5 ml EG überführt. Es werden 560 µl Puffer AVL (Qiagen, Hilden) zugegeben und es wird gründlich geschüttelt. Die Probe wird 10 min

bei RT belassen. Anschließend werden 560 μ l 100 % EtOH zugegeben, und es wird erneut kräftig geschüttelt.

Eine QIAamp[®] Spinsäule wird einem 2 ml Sammelröhrchen aufgesetzt und 630 μ l der Probe werden auf die Säule gegeben. Es wird 1 min bei 6.000 g zentrifugiert, und die Säule wird in ein neues, sauberes Sammelröhrchen gesteckt. Der Rest des Ansatzes wird nun auf die Säule gegeben, und nach erneutem Zentrifugieren wird die Säule in ein frisches Sammelröhrchen transferiert.

Es wird zweimal mit 500 μ l Puffer AW gewaschen (Zentrifugation bei 6.000 g, für 1 min) und die Probe wird in ein neues Sammelröhrchen überführt. Anschließend wird noch einmal bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Die Säule wird in ein neues 1,5 ml-EG überführt, es werden 50 μ l auf 80 °C vorgeheizter Puffer TE zugegeben und für 1 min bei 6.000 g zentrifugiert. Die Säule kann verworfen werden, und die Probe ist PCR-fertig aufgereinigt.

3.2.2 DNA-Aufreinigung

3.2.2.1 DNA-Aufreinigung mittels Diatomeenerde (Günther et al. 1995)

50 – 100 μ l des DNA-Extraktes werden mit 900 μ l L6-Puffer (100 ml 0,1M Tris-HCl, pH 6,4; 8,8 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0; 2,6 ml Triton-X 100; 120 g Guanidinthiocyanat ad 250ml H₂O) und 50 μ l Diatomeen (200 g/l Diatomeenerde, Sigma); 10 ml/l konz. HCl) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Mit einer Einwegspritze wird der Ansatz durch eine Fritte (Promega) gedrückt. Auf die gleiche Weise wird mit 2 ml 80 % Isopropanol gewaschen. Die Fritte wird nun in ein leeres Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und es wird kurz abzentrifugiert (20 s bei 10.000 g). Das Zentrifugat wird verworfen. Die Elution der DNA geschieht durch Zugabe von 50 μ l sterilem A. dest. bei 10 – 12 minütiger Inkubation. Die DNA Lösung wird nun kurz abzentrifugiert (20 s; 10.000g), und die Fritte kann verworfen werden.

3.2.2.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um Primer und Nukleotide z. B. für eine anschließende Sequenzierung abzutrennen, kann eine Ethanol-Fällung der DNA durchgeführt werden. Hierfür wird der PCR-Reaktionsansatz unter dem Mineralöl herauspipettiert. Der Ansatz wird in ein neues 0,5 ml PCR-Röhrchen überführt, mit 1 Volumen 4 M NH_4Cl und 6 Volumina 100 % EtOH versetzt und bei 12.000 g und RT für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Es werden 250 μl 70 % EtOH zugegeben und erneut zentrifugiert (12.000 g, RT, 5 min). Der Überstand wird wiederum verworfen, und das resultierende DNA-Sediment wird im Vakuum getrocknet.

3.2.2.3 Aufreinigung von Sequenzierungsprodukten

Zur Abtrennung von modifizierten Nukleotiden, welche später bei der Auftrennung stören würden, müssen die Sequenzierungsprodukte aufgereinigt werden. Hierfür werden Centrisep-Säulchen (Princeton Separations/Applied Biosystems, Weiterstadt) eingesetzt. Um die Säulen zu hydrieren, werden zunächst 0,8 ml A. dest. zugegeben. Die Quellung nimmt zwei Stunden in Anspruch. Anschließend werden die Säulen invertiert und luftblasenfrei geklopft. Sie werden bei 750 g für 2 min zentrifugiert und das Sequenzierungsprodukt wird zügig auf das Säulenmaterial gegeben, wobei eine direkte Berührung mit dem Säulenmaterial vermieden werden muss. Die Säulen werden in ein 1,5 ml EG gegeben und erneut zentrifugiert (750 g, 2 min, RT). Die Säulen können nun verworfen werden.

Alternativ kann das Sequenzierprodukt auch mit Isopropanol aufgereinigt werden. Zu 20 μl Sequenzierprodukt (bei Bedarf mit A. dest. auffüllen) werden 80 μl 75 % Isopropanol zugegeben. Zum Fällern der DNA wird der Ansatz kurz geschüttelt und mindestens 15 min stehen gelassen. Kürzere Fällungszeiten bedingen eine unvollständige Fällung kleiner DNA-Fragmente; bei Zeiten über 24 h besteht die Gefahr, dass farbmarkierte Nukleotide mit ausfallen. Die Proben werden nun 20 min bei 12.000 g und RT zentrifugiert und der Überstand wird vorsichtig und möglichst vollständig entfernt. Es werden 250 μl 75 % Isopropanol zugegeben, kurz geschüttelt

und 5 min bei 12.000 g und RT zentrifugiert. Der Überstand wird erneut entfernt, und das Sediment wird im Vakuum getrocknet.

Eine Alternative zur Säulenaufreinigung stellt die Ethanolfällung dar. Hierbei werden 10 µl Sequenzierprodukt mit 1 µl Natriumacetat und 55 µl EtOH (100 %) versetzt. Der Ansatz wird 15 min zentrifugiert (12.000 g, RT), der Überstand wird entfernt und es werden zum Waschen 250 µl 70 % EtOH zugegeben. Nach erneuter 5 minütiger Zentrifugation (12.000 g, RT) wird wiederum der Überstand entfernt und das Sediment wird im Vakuum getrocknet.

Der Einsatz der beiden alternativen Alkoholfällungen ist aber nur bedingt empfehlenswert. Einerseits ist die Ausbeute nicht sonderlich effektiv, andererseits werden häufig die farbmarkierten Nukleotide nicht vollständig ausgewaschen. Dies führt unter Umständen dazu, dass die ersten Basen einer Sequenz von nicht inkorporiertem Farbstoff überlagert werden und in der Folge nicht mehr analysierbar sind. Spielen diese Faktoren jedoch keine Rolle, da genug Probenmaterial vorhanden oder der Anfangsbereich der Sequenz nicht von Interesse ist, so bieten sich dennoch diese weitaus kostengünstigeren Methoden an.

3.2.3 DNA – Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Menge wird im Regelfall grob abgeschätzt, indem sie mit den Bandenstärken des Längenstandards auf dem PAG verglichen wird. Exaktere Messungen hingegen werden photometrisch mit dem Biophotometer (Eppendorf) durchgeführt. Eine DNA-Lösung wird im Lichtschacht des Gerätes mit UV-Strahlung von vier definierten Wellenlängen (230 nm, 260 nm, 280 nm, 320 nm) bestrahlt. Die DNA absorbiert nun entsprechend ihrer Konzentration Licht der Wellenlänge 230 nm, 260 nm und 280 nm, wobei das Absorptionsmaximum bei 260 nm liegt. Verunreinigungen der DNA zeigen sich einerseits durch zusätzliche Absorption bei 320 nm, welche als Hintergrund herausgerechnet werden kann. Zudem zeigt das Verhältnis (Ratio) der Absorptionen bei 260 und 280 nm die Anwesenheit von Salzen und/oder Proteinen. Die Ratio sollte im Idealfall zwischen 1,7 und 1,9 liegen. Diese

Werte sowie die aus der Absorption bei 260 nm berechnete DNA-Konzentration wird vom Photometer berechnet und an einem angeschlossenen Thermaldrucker ausgegeben.

Die Probe muss hierzu bei voraussichtlichen DNA-Mengen von über 3 µg mit A. dest. oder TE-Puffer verdünnt werden. Andernfalls ist die lichtabsorbierende Fozelle überlastet. Außerdem darf das Probenvolumen nicht kleiner als 50 µl sein, da ansonsten das Licht nicht vollständig durch die DNA-Lösung geleitet wird.

Das Photometer muss vor jeder Messreihe mit einer Leerprobe kalibriert werden. Die Vermessung von aus Vollblut isolierter DNA sollte in einer Verdünnung von 1:20 durchgeführt werden. Anderenfalls fällt unter Umständen die DNA-Konzentration für eine erfolgreiche photometrische Messung zu hoch aus. Vermessungen von aufgereinigtem PCR-Produkt werden in der Regel in einer Verdünnung von 1:2 durchgeführt, da sonst das Mindestvolumen von 50 µl unterschritten wird.

3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR macht es möglich, aus einigen wenigen DNA-Molekülen bestimmte spezifische DNA-Fragmente anzureichern (Saiki et al. 1985). Hierzu werden zunächst Oligonukleotide benötigt, die das gewünschte Fragment von beiden Seiten eingrenzen. Diese Primer genannten Oligonukleotide binden jeweils am 5'-Ende der gewünschten Sequenz und dienen einer hitzestabilen DNA-Polymerase als Synthese-Ansatzpunkt. Diese Polymerase stammt ursprünglich aus dem hitzeresistenten Bakterium *Thermus aquaticus* und heißt Taq-Polymerase.

Die Neusynthese der DNA-Fragmente geschieht zyklisch. Ein Denaturierungsschritt (bei 94 °C) zerlegt die doppelsträngige DNA in ihre einzelsträngigen Komponenten. Im darauffolgenden Hybridisierungsschritt dessen Temperatur von der Schmelztemperatur (T_m) des eingesetzten Primers abhängig ist, lagert sich der Primer spezifisch an seine komplementäre Sequenz innerhalb der DNA an. Von hier aus hängt im Syntheseschritt bei 72 °C die Taq-Polymerase in 3'-Richtung neue Nukleotide gemäß der Vorgabe im Matrizenstrang an bis die Reaktion stoppt. Dies geschieht in den ersten Syntheseschritten durch Beginn des nächsten Zyklus, oder in

nachfolgenden Zyklen durch Erreichen des Endes des Gegenprimers und damit des Endes des in einem vorhergehenden Zyklus synthetisierten PCR-Produktes. Durch mehrfache Wiederholung dieses Zyklus (in der Regel zwischen 25 und 40 mal) kommt es jeweils zur Verdopplung des gewünschten DNA-Fragmentes, so dass letztlich theoretisch die $(2^n - 2n)$ -fache Menge, gemessen an der ursprünglich eingesetzten DNA, erreicht wird.

Die PCR wurde für alle Systeme mit demselben Reaktionsansatz (50 μ l) durchgeführt:

67 mM Tris/HCl, pH 8,8

2 mM $MgCl_2$

1 mM DTT

160 μ g/ml BSA

250 μ M von jedem dNTP

2 U Taq-Polymerase

und jeweils 20 pmol der Primer in beiden Richtungen.

Die Amplifikationsbedingungen setzen sich wie folgt zusammen. Die Reaktion beginnt jeweils mit einem initialen Denaturierungsschritt für 1 min bei 94 °C. Es folgen 35 Zyklen mit 1 min bei 94 °C zur Denaturierung, Primeranlagerungsschritt mit systemspezifischer Temperatur (Tab 3.1) von jeweils 1 min und einem Extensionsschritt bei 72 °C für 1 min. Zuletzt wird ein abschließender Extensionsschritt (72 °C, 45 min) durchgeführt. Dieser Schritt dient dem Auffüllen von PCR-Produkten der Länge $n-1$ auf die vollständige und zu erwartende Länge des amplifizierten Fragments. Somit wird eine Artefaktbildung, wie zum Beispiel das Auftreten von Stotterbanden, unterbunden.

PCR-System	Anlagerungstemperatur
RAPD	30 °C
Cytochrom b	55 °C
D21S11	55 °C
mtNC3 (F 5318 / R 5882)	55 °C
mtNC5 (F 5700 / R 6262)	55 °C
mtNC7 (F 8164 / R 8669)	55 °C
D-Loop (L15926 / H00580)	55 °C
HV 1a (L15997 / H16251)	55 °C
HV 1b (L16196 / H16395)	55 °C
HV 3 (L00262 / H00537)	55 °C
D3S1358	56 °C
D8S1179	56 °C
D18S51	56 °C
DYS385	56 °C
SE33 (ACTBP2)	60 °C
HV 2 (L00048 / H00408)	60 °C
Amelogenin	60 °C
XY	60 °C
HV1 (L15997 / H16395)	65 °C

Tab. 3.1: Die eingesetzten PCR-Systeme und ihre jeweiligen Primer-Anlagerungstemperaturen. Soweit sie nicht eindeutig aus dem Namen hervorgehen, sind die zugehörigen Primer in Klammern angegeben.

Neben den oben beschriebenen PCR-Einzelsystemen sind auch zahlreiche Systemkombinationen, sogenannte Multiplex-Systeme im Handel erhältlich. Der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Multiplex ist der Second Generation Multiplex (AmpFISTR[®] SGM plus[™]) von Applied Biosystems. Zu 1-5 ng DNA werden hier jeweils 5 µl Primermix, 10 µl Reaktionsmix und 0,5 µl AmpliTaq Gold (alles Applied Biosystems) gegeben. Der Reaktionsansatz wird mit A. dest. auf 25 µl aufgefüllt und in einen Thermocycler gegeben (GeneAmp 2400, Applied Biosystems). Die PCR

wird wie gewohnt durchgeführt, wobei aber der initiale Denaturierungsschritt bei 95 °C auf 10 Minuten ausgedehnt werden muss. Der Grund hierfür ist, dass die AmpliTaq Gold eine Hotstart-Taq-Polymerase ist, also einer Hitzeaktivierung bedarf. Die Anlagerungstemperatur für den Primermix beträgt 59 °C, und es werden 29 Zyklen durchgeführt.

3.2.5 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode (modifiziert nach Sanger, 1975) durchgeführt. Diese Methode funktioniert nach einem der PCR verwandten Prinzip, bei der jedoch nur ein Primer zum Einsatz kommt. An diesem wird mittels Taq-Polymerase und Nukleotiden die Kettenverlängerung durchgeführt. Dies geschieht so lange, bis zufällig ein in bestimmter Konzentration im Ansatz vorhandenes fluoreszenzmarkiertes Didesoxyribonukleotid eingebaut wird, so dass es nach erfolgtem Einbau zum DNA-Syntheseabbruch kommt. Für die vier Nukleotide G, A, T und C wird jeweils ein unterschiedlicher Farbstoff eingesetzt, so dass sich, je nach Nukleotid an dem der Abbruch stattfindet, ein Fragment mit entsprechender Farbmarkierung unterscheiden lässt. Eine Sequenzierungsreaktion geschieht analog zur PCR zyklisch, und zwar mit je einem Denaturierungs-, Primeranlagerungs- und Elongationsschritt. Der Sequenzprodukt-Zuwachs findet demzufolge aufgrund des Einsatzes nur eines einzelnen Primers im Gegensatz zum Zuwachs bei der eigentlichen PCR linear statt.

Zur Sequenzierung wurde für diese Arbeit der Bigdye-Kit von Applied Biosystems eingesetzt.

Der Reaktionsansatz besteht, soweit nicht anders erwähnt, aus den folgenden Komponenten:

2 µl TRR (Terminator-Ready-Reaction Mix)

0,7 µl Primer

20 ng DNA

ad 10 µl H₂O

Die Ansätze werden in einen Thermocycler gegeben. Ein Zyklus der Reaktion besteht aus einem Denaturierungsschritt für 1 min bei 96 °C, einem Annealingschritt für 1 min mit System-abhängiger Temperatur (Tab 3.1) und einem abschließenden Elongationsschritt für 4 min bei 60 °C. Die Sequenzierungsreaktion setzt sich aus jeweils 30 Zyklen zusammen.

3.2.6 Restriktionsverdau

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich ein AluI-Verdau durchgeführt. Zum Einsatz kam der 10x Reaktionspuffer Y+(MBI-Fermentas, Litauen):

33 mM Tris-Acetat, pH 7,9

10 mM Mg-Acetat

66 mM K-Acetat

0,1 mg/ml BSA

Für den Verdau wurden ca. 50 ng PCR-Produkt auf ein Volumen von 10 µl mit H₂O verdünnt. Zur DNA wurden nun 3 U AluI (= 1µl) und 1,2 µl Y+ 10x Reaktionspuffer zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Amplifikate des Cytochrom b Genes (s. 3.2.4) einem AluI-Verdau unterzogen. Die Darstellung der resultierenden unterschiedlich großen Fragmente geschah durch Auftrennung in einem 5 %igen Polyacrylamidgel (s. 3.2.7.1). Die Spezieszuordnung wurde gemäß den Vorgaben von Zehner et al. durchgeführt (Tab. 3.2)

Rind	Schwein	Schaf	Hund	Katze	Hase	Kaninchen	Mensch
453	580	517	463	655	450	834	987
322	243	450	387	206	374	157	3
206	131	14	101	120	157		
	27		30				

Tab. 3.2: Fragmentlängen (in bp) von Cytochrom b Amplifikaten nach AluI-Verdau bei verschiedenen Spezies (Zehner et al. 1998).

3.2.7 DNA-Auftrennung

3.2.7.1 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE)

Für Anwendungen, bei denen eine niedrigauflösende Darstellung der DNA genügt, wie zum Beispiel bei der Überprüfung des PCR-Erfolges, wird eine horizontale PAGE durchgeführt. Gibt man Acrylamid und Bisacrylamid zusammen und fügt einen Katalysator bei, so polymerisiert das Gemisch zu einem molekülsiebenden Gel, dessen Dichte sich nach der Acrylamidkonzentration und dessen Vernetzungsgrad sich nach dem Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid richtet. Trägt man auf ein derartiges Gel DNA auf und legt eine Spannung an, so wandert die DNA im elektrischen Feld vom negativ zum positiv geladenen Pol. Ursache ist, dass die DNA aufgrund der Phosphatbrücken zwischen den einzelnen Nukleotiden eine negative Nettoladung trägt. Während der Elektrophorese trennt sich die DNA aufgrund der Vernetzung des Polyacrylamidgels der Fragmentgröße nach auf. Kleinere Fragmente wandern schneller und liegen nach Abschluss der Elektrophorese näher am positiv geladenen Pol, größere wandern hingegen langsamer und liegen dementsprechend näher am negativen Pol.

Gelvorbereitung:

Auf eine mit einem Tropfen Wasser benetzte Glasplatte der Größe 124 x 258 mm wird ein Gelfilm (GelBond PAG-film, Amersham/Pharmacia, Freiburg) gegeben, wobei die hydrophobe Seite auf der Glasplatte zu liegen kommt, die hydrophile Seite jedoch nach oben zeigt. Eine zweite, längsseits jeweils mit zwei Lagen Isolierband als Abstandhalter beklebte Glasplatte wird aufgelegt (Abb. 3.1). Mit einer 50 ml Spritze wird der frisch angesetzte Gel-Ansatz zwischen die Glasplatten gegeben.

Dieser setzt sich für ein 5%-iges Acrylamidgel wie folgt zusammen:

16 ml H₂O

2,1 ml 10 x TBE

2,7 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung

(Acrylamide-Bis, 19:1 / Serva, Heidelberg)

200 µl APS (Serva, Heidelberg)

1,5 µl TEMED (Serva, Heidelberg)

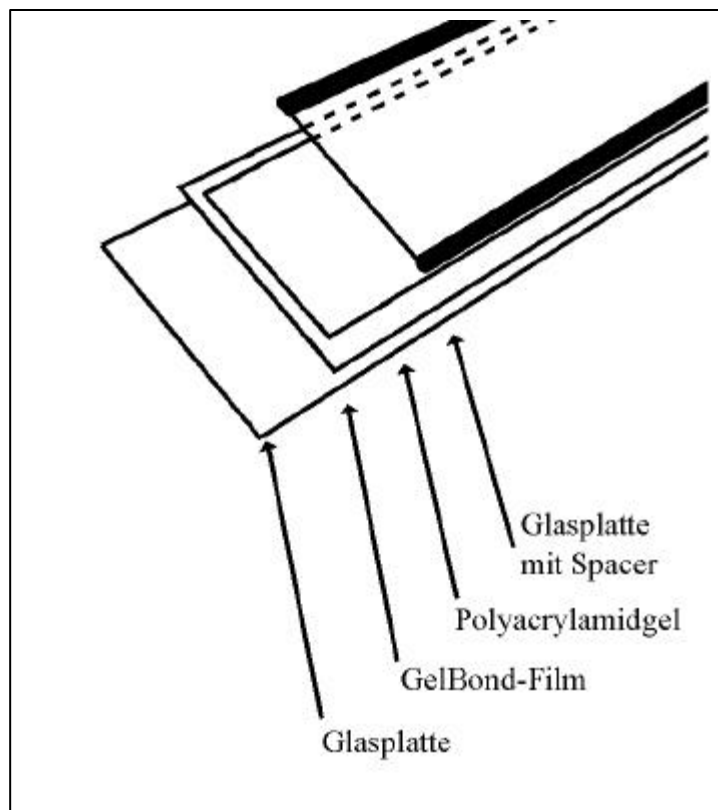


Abb. 3.1: Schematischer Aufbau eines Polyacrylamidgels.

Nach einer Lagerung von ca. einer Stunde bei RT ist das Gel auspolymerisiert und für die Elektrophorese einsetzbar.

Elektrophorese:

Die Glasplatten werden entfernt, und 4 µl der Proben werden auf Probenauftragsplättchen (Sample application pieces, Amersham/Pharmacia, Freiburg) gegeben, die zuvor in ca. 2 cm Entfernung vom kathodenseitigen Gelrand aufgereiht

wurden. Das Gel wird nun auf die an die Wasserkühlung angeschlossene Kühlplatte gelegt. Jeweils entlang der Längsseiten werden zwei zuvor in 2x TBE getauchte Elektrodenstreifen auf das Gel gelegt. Beiderseits und auf gleicher Höhe der Proben wird jeweils ein Tropfen Agarosegel-Probenpuffer aufgetragen, um die Lauffront erkennbar zu machen. Die Elektrodenplatte wird nun aufgelegt, so dass die Platinelektroden auf den Elektrodenstreifen zu liegen kommen. Das Netzgerät wird auf 40 mA eingestellt (bei kleineren Gelen proportional weniger) und die Elektrophorese wird für 30 min bis 1 h durchgeführt.

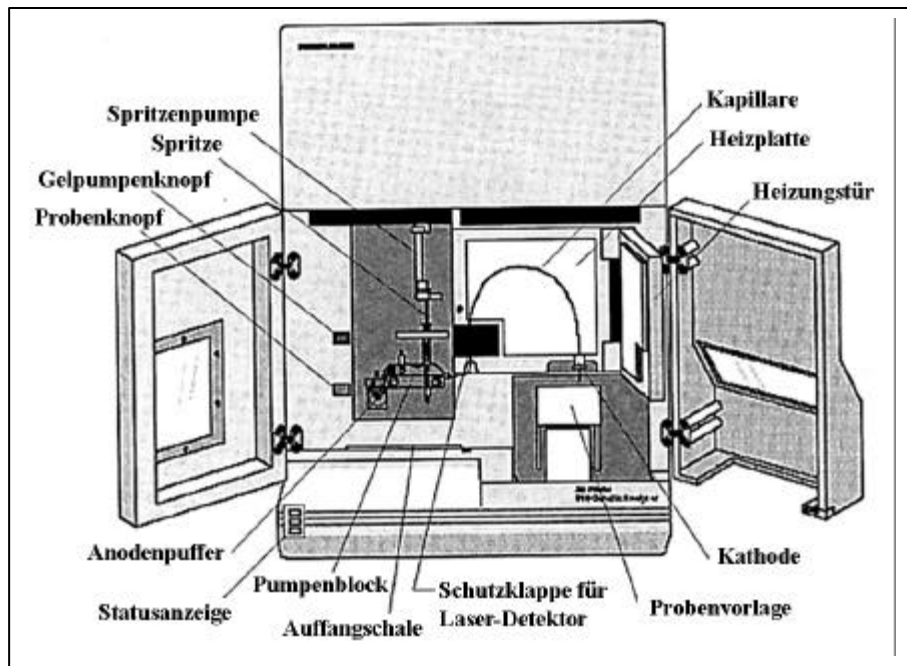
Silberfärbung (Allen et al. 1989):

Nach Abschluss der Elektrophorese wird das Polyacrylamidgel in eine Glas- oder Kunststoffschale gegeben. Zur Äquilibrierung wird das Gel 5 min in 1% Salpetersäure (HNO_3) auf einen Taumelschüttler gestellt. Anschließend wird ca. 10 s mit A. dest. gespült und die frisch angesetzte AgNO_3 -Lösung (12 mM in A. dest.) zugegeben. Das Gel verbleibt nun 12 min auf dem Schüttler. Die Reduktion der Lösung geschieht unter mehrmaligem Wechseln der Lösung durch 0,28 M NaH_2CO_3 (wasserfrei) mit 0,019 % Formalin. Nachdem die PCR-Banden auf diese Weise sichtbar gemacht wurden, wird der Reduktionsprozess mit 10 % Essigsäure abgestoppt (2 min). Zur Aufbewahrung des vollständig entwickelten Gels wird dieses zunächst gut mit A. dest. gespült, für 5 min in 5 % Glycerol gegeben und über Nacht bei 80 °C in den Wärmeschrank gelegt.

Zur Dokumentation des Trennbefundes kann das Gel anschließend entweder mit einem Flachbettscanner eingescannt oder mit einer Sofortbildkamera fotografiert werden.

3.2.7.2 Hochauflösende Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese wird im automatischen Sequenzierer Genetic Analyzer ABI 310 (Applied Biosystems) durchgeführt.



**Abb. 3.2: Kapillar-Elektrophorese-Sequenzierer:
Genetic Analyser ABI310 (Applied Biosystems)**

Die Elektrophorese erfolgt hierbei in einer mit Polymer als Geläquivalent gefüllten Kapillare. Das eingesetzte Polymer beruht auf Cellulosebasis und ist je nach Anwendung unterschiedlich dicht. Zur Analyse wird die Kapillare jeweils neu mit Polymer befüllt. Die Kapillare wird kurz unter Anlegen einer Spannung in das jeweilige Probengefäß eingeführt, gewaschen und in den Kathodenpuffer getaucht. Nach Anlegen der Betriebsspannung erfolgt die Auftrennung der DNA ihrer Größe nach in der Kapillare. Die Detektion der Fragmentlängen geschieht durch einen Laser. Durch ein durchsichtiges Teilstück am Ende der Kapillare regt der Laser die vorbeiwandernden DNA-Fragmente optisch an und die daran gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe strahlen Licht zurück, das von Fotozellen aufgenommen und als Signal an den angeschlossenen Computer weitergegeben wird.

Grundlage hierfür ist, dass für die Fragmentanalyse farbmarkierte Primer eingesetzt werden, so dass auch die resultierenden STR-Fragmente eine entsprechende Markierung tragen. Zur Sequenzierung werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide eingesetzt. Bei der Fragmentanalyse muss zusätzlich zu jeder Probe ein in der Regel rot markierter Längenstandard zugegeben werden, so dass für jede Fragmentbande eine Größenordnung möglich ist. Dies ist für die Sequenzierung nicht nötig, da hier nicht die Fragmentgröße, sondern die Abfolge der markierten Banden als Ausdruck

der Basensequenz von Bedeutung ist. Die Auswertung der vom Sequenzierer gelieferten Rohdaten geschieht im angeschlossenen Rechner bei der Fragmentlängenanalyse mit den Programmen GeneScan und Genotyper, bei der Sequenzierung mit den Programmen Sequencing Analysis und Sequence Navigator (alle Programme von Applied Biosystems). Das Programm GeneScan berechnet aus den eingehenden Rohdaten die Größe und Farbe der detektierten Banden. Das Programm Genotyper wird zur übersichtlichen Darstellung der erhaltenen Daten benötigt; so kann man beispielsweise die im GeneScan errechneten Fragmentlängen eines Allels der allelischen Leiter des entsprechenden STR-Systems zuordnen. Das Programm Sequencing Analysis erfasst ebenfalls aus eingegangenen Rohdaten die Farbe der detektierten Banden, reiht sie in einer Sequenz ihrer Größe entsprechend aneinander und ordnet den Banden die Buchstaben der entsprechenden Nukleotide zu. Das Programm Sequence Navigator kann dann zum Beispiel zum Vergleich mit einer bereits bekannten Referenzsequenz verwendet werden.

Vorbereitung der Proben:

Die Bandenstärken der Proben werden für die Fragmentanalyse zunächst in einem niedrigauflösenden Polyacrylamidgel abgeschätzt. Entsprechend der Bandenstärke werden 0,3 – 5 µl PCR-Produkt in ein Genetic Analyser Probenröhrchen gegeben. Des weiteren gibt man 0,5 µl internen Längenstandard (GS ROX-500, Applied Biosystems oder ILS-600, Promega) dazu. Es werden 12 µl deionisiertes Formamid (Sigma) hinzupipettiert, und das Röhrchen wird mit einem Gummi-Septum (Genetic Analyser Septa, Applied Biosystems) verschlossen. Die Proben werden 2,5 min bei 95 °C in einem Heizblock inkubiert, um die doppelsträngige DNA zu denaturieren und damit die korrekte Größenordnung zu gewährleisten. Die Röhrchen werden in den Probenträger des Sequencers eingesetzt, und die automatische Analyse wird gestartet.

Die Vorbereitung der Proben für die Sequenzierung unterscheidet sich nur dadurch, dass jeweils 4 µl des mit Centrisep aufgereinigten Sequenzproduktes und 12 µl TSR (Template suppression reagent, Applied Biosystems) in die Probenröhrchen gegeben werden.

3.2.8 Haplogruppenzuordnung mitochondrialer Sequenzen

Zur Vereinfachung populationsgenetischer Untersuchungen werden die erfassten Datensätze häufig in sogenannte Haplogruppen unterteilt (Abb. 1.5).

Eine Einteilung in verschiedene Haplogruppen geschieht in der Regel so, dass bestimmte Bereiche der mitochondrialen DNA mit Hilfe der PCR amplifiziert werden. Die so gewonnenen DNA-Fragmente werden unter Einsatz von Restriktionsendonukleasen geschnitten. Die entstehenden Bandenmuster geben Aufschluss über polymorphe Stellen innerhalb der mtDNA (Krings et al. 1997).

Eine derartige Zuordnung ist auch mit Hilfe der hypervariablen Regionen 1 und 2 möglich (Simoni et al. 2000). Tabelle 3.3 gibt Aufschluss über die in dieser Arbeit eingesetzten Zuordnungskriterien .

Haplogruppe	Variable Position	Haplogruppe	Variable Position
H	73A	T	16126C, 16294T
I	16223T, 16129A	U2	16051G, 16129C
J	16126C, 16069T	U3	16343G
K	16224C	U4	16356C
L2	16223T, 16278C, 16390A	U5	16270T
L3	16223T, 16278C	V	72C, 73A, 16298C
M	16223T	W	16223T, 16292T
pre JT	16126C	X	16223T, 16278C

Tab. 3.3: Zuordnungsvorschrift für die Umwandlung von Sequenzdaten in Haplogruppen anhand Variabler Positionen der hypervariablen Regionen 1 und 2.

3.2.9 Statistische Erfassung mitochondrialer Sequenzen

Die einfache Haplotypdiversität, also die Wahrscheinlichkeit dw_{\min} verschiedene Haplotypen zu erhalten, wenn zwei Individuen einer Population untersucht werden lautet:

$$dw_{\min} = 1 - \sum_{i=1}^h \left(\frac{x_i}{N_x} \right)^2$$

wobei x_i die absolute Frequenz des i -ten Haplotyps, h die Zahl der unterschiedlichen Haplotypen, und N_x die Zahl der untersuchten Probanden ist.

Wenn zwischen verschiedenen Populationen verglichen werden soll, ist db_{\max} die Wahrscheinlichkeit, unterschiedliche Haplotypen zu erhalten, wenn unterschiedliche Populationen untersucht wurden.

$$db_{\max} = 1 - \sum_{i=1}^m \frac{x_i y_i}{N_x N_y}$$

wobei ausschließlich die m übereinstimmenden Sequenzen zwischen den Populationen X und Y betrachtet werden müssen. Beide Formeln gehen davon aus, dass die absolute Frequenz jedes Haplotyps innerhalb einer Studie mit der relativen Frequenz innerhalb der Population übereinstimmt. Also ist das Verhältnis $(1 - dw_{\min} / (1 - db_{\max}))$ oder der äquivalente Ausdruck mw_{\max} / mb_{\min} eine zu hohe Schätzung des Verhältnisses zwischen den Wahrscheinlichkeiten für eine Übereinstimmung innerhalb einer Population bzw. zwischen zwei Populationen. Um eine untere Grenze für diesen Vergleich zu erhalten, kann man annehmen, dass alle in der Stichprobe einmaligen Haplotypen eine relative Frequenz nahe Null besitzen. Die Wahrscheinlichkeit einer Übereinstimmung innerhalb einer Population mw_{\min} beträgt dann:

$$\sum_{i=1}^h \frac{\binom{x_i}{2}}{\binom{N_x}{2}}$$

Das Verhältnis $m_{w_{\min}} / m_{b_{\min}}$ stellt dann eine zu niedrige Schätzung dar, wie viel wahrscheinlicher es ist, eine Übereinstimmung innerhalb einer Population zu erhalten, als zwischen zwei verschiedenen Populationen (Brinkmann et al. 1999).

3.2.10 Heterozygotenrate und Diskriminationsstärke bei nukleären DNA-Polymorphismen

Die Heterozygotenrate und deren Standardabweichung berechnen sich nach den beiden folgenden Formeln.

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum p_i^2\right)$$

$$\text{Var}(\hat{H}) = \frac{2}{n(n-1)} \left[(3-2n) \left(\sum p_i^2\right)^2 + 2(n-2) \sum p_i^3 + \sum p_i^4 \right]$$

Hierbei ist n jeweils die Stichprobengröße und p_i die relative Häufigkeit des i -ten Allels in der Stichprobe (nach Nei und Roychoudhury, 1973).

Die Diskriminationsstärke autosomaler Systeme berechnet sich, wie von Jones (1972) beschrieben, nach der Formel

$$1 - 2 \left(\sum p_i^2\right)^2 + \sum p_i^4 .$$

4 Ergebnisse

4.1 Mitochondriale DNA

Zur Evaluierung der Möglichkeiten der DNA-Analyse mit Hilfe mitochondrialer DNA wurde eine unterfränkische Populationsstichprobe (n=198) in den hypervariablen Bereichen HV1 und HV2 untersucht.

Hierfür wurde aus Vollblut isolierte DNA (s. 3.2.1.4) eingesetzt. 5 ng der DNA wurden jeweils in eine PCR (s. 3.2.4) eingesetzt. Zum Einsatz kamen für die HV1 die Primer L15997 und H16395. Für die HV2 wurden die Primer L048 und H408 verwendet (s. 3.1.5). Der PCR-Erfolg wurde mit einem 5 %igen Polyacrylamidgel überprüft (s. 3.2.7.1) und die PCR-Produkte wurden durch Ethanol-Fällung aufgereinigt (s. 3.2.2.2). Die DNA-Konzentration wurde im Biophotometer vermessen (s. 3.2.3) und 20 ng PCR-Produkt wurden in die anschließende Sequenzierungsreaktion eingesetzt (s. 3.2.5). Die Sequenzierungsprodukte wurden mit Centrisep-Säulen aufgereinigt (s. 3.2.2.3). Die Auftrennung der Sequenzierungsprodukte wurde im automatischen Kapillar-Sequenzier-Automat ABI 310 durchgeführt (s. 3.2.7.2).

Die so gewonnenen Sequenzen wurden mit der von Anderson et al. (1981) veröffentlichten Referenzsequenz verglichen und die auftretenden Unterschiede wie Transitionen, Transversionen, Deletionen oder Insertionen wurden in tabellarischer Form festgehalten (Anhang I und II).

4.1.1 Interpretation problematischer Sequenzen

Obwohl sich die untersuchten mitochondrialen Haplotypen in der Regel nur an einigen wenigen Positionen unterschieden (Anhang I bis V) gab es einige Sequenzen, die eine Sequenzierung erheblich erschwert haben. Besonders erwähnenswert ist hierbei das Phänomen der Heteroplasmien. In einem Fall (Anhang I, Unterfranke D 154) waren zwei in Position 152 unterschiedliche Sequenzen überlagert (Abb. 4.1).

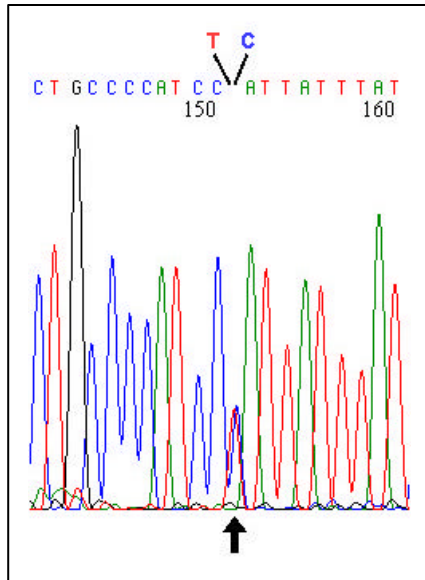


Abb. 4.1: Heteroplasmie an Position 152 (Pfeil).

Eine andere Form der Heteroplasmie bilden die Längenpolymorphismen in den Poly-C-Bereichen beider hypervariabler Regionen. In der hypervariablen Region 1 liegt dieser Bereich zwischen den Basenpaaren 16.184 und 19.193. Im Regelfall stellt die Sequenzierung hier kein besonderes Problem dar (Abb. 4.2). Liegt aber an Position 19.189 eine Transition (T => C) vor, so bricht die Sequenzierung ab (Abb. 4.3).

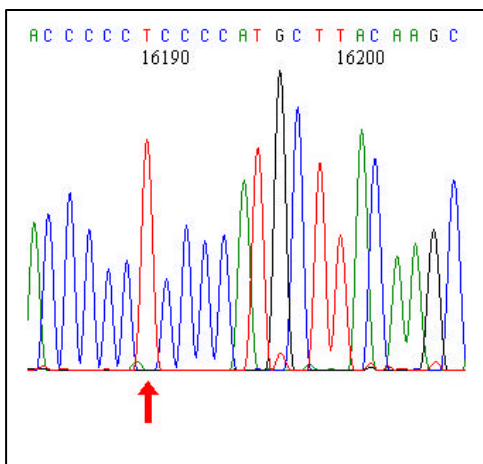


Abb. 4.2: C-Trakt zwischen Positionen 16.184 und 16.193. Der rote Pfeil markiert die kritische Position 16.189

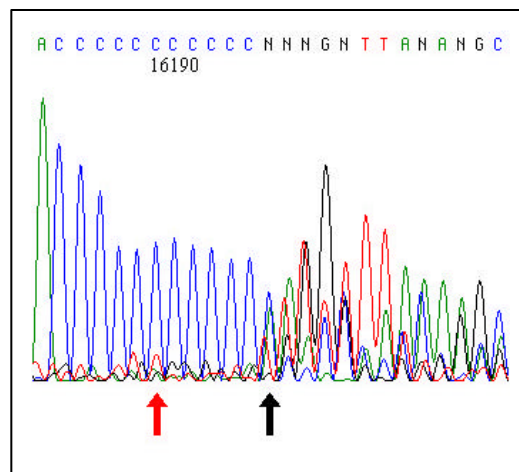


Abb. 4.3: C-Trakt zwischen Positionen 16.184 und 16.193 mit Transition an Position 16.189 (roter Pfeil). Der schwarze Pfeil markiert das Ende der interpretierbaren Sequenz

Um die nachfolgenden Bereiche dennoch untersuchen zu können, muss also entweder die Gegenrichtung sequenziert und/oder ein zusätzlicher Primer eingesetzt werden, der an der Abbruchstelle anlagert, wie dies für den Primer L16196 der Fall ist (Abb. 4.4).

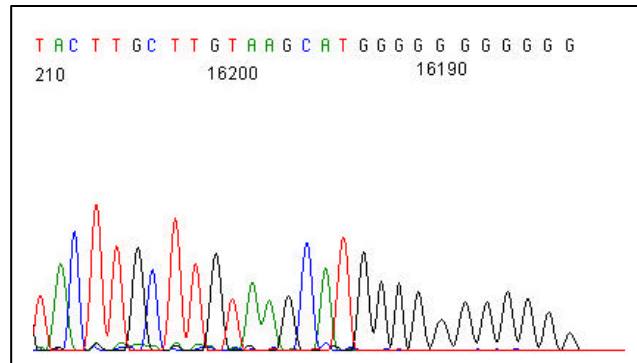


Abb. 4.4: C-Trakt zwischen Positionen 16.184 und 16.193. Ein am C-Trakt anlagernder Primer erleichtert die Lesbarkeit der Sequenz in beide Richtungen, auch an nachfolgenden Positionen.

Die Bewertung der Längenpolymorphismen in der HV2 gestaltet sich normalerweise etwas unproblematischer. Die im Regelfall gut lesbare Sequenz im dortigen C-reichen Bereich (Abb. 4.5) kann durch zusätzliche Insertionen von Cytosinen zur Überlagerung mehrerer Sequenzen führen. Dies führt zwar nicht wie in der hypervariablen Region 1 zum Zusammenbruch der Sequenzierungsreaktion, aber die Lesbarkeit der betroffenen Sequenz ist erheblich gemindert (Abb. 4.6).

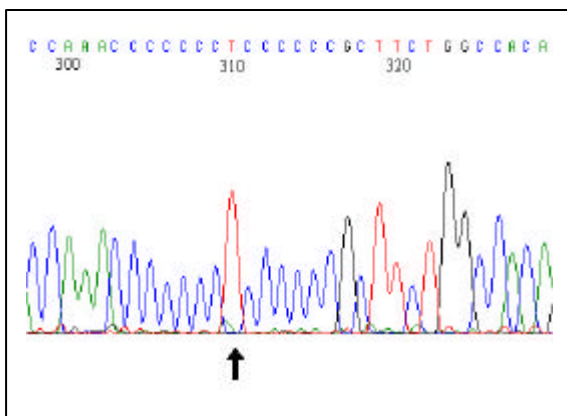


Abb. 4.5: C-Trakt zwischen Positionen 303 und 315 ohne besonderen Befund.

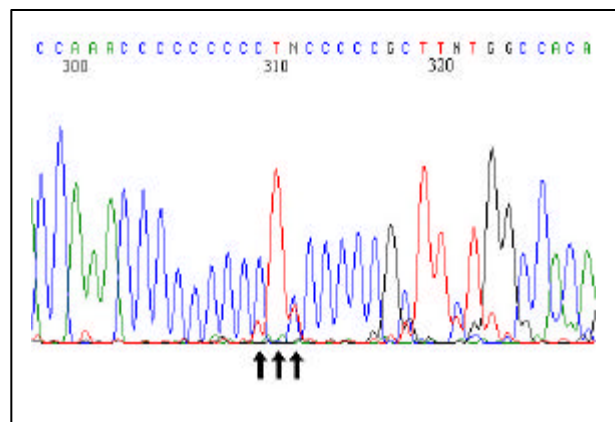


Abb. 4.6: C-Trakt zwischen Positionen 303 und 315. Die Pfeile markieren die drei Positionen, an welchen bedingt durch den Längenpolymorphismus das Thymin zu liegen kommt.

Ein weiterer Problemfall ist zwischen den Positionen 16.143 und 16.161 anzutreffen. Die Basenpaare 16.143 bis 16.152 sind identisch mit den Basenpaaren 16.395 bis 16.404. Dies führt beim standardmäßig eingesetzten Primer H16395 in einigen Fällen zu Komplikationen, da dieser auch die Positionen 16.395 bis 16.414 abdeckt. Hieraus kann eine Überlagerung der zwei betroffenen Sequenzen resultieren, wodurch die Interpretation erheblich erschwert wird (Abb. 4.7). Durch Einsatz eines anderen H-Strang-Primers, wie z.B. dem Primer H16430, lässt sich diese Problematik aber umgehen (Abb. 4.8).

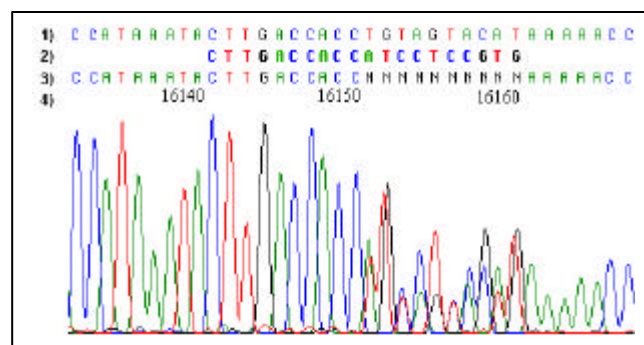


Abb. 4.7: Sequenzüberlagerung zwischen Positionen 16.152-16.161. 1: Referenzsequenz (Anderson et al. 1981) 2: Primersequenz H16395 3: resultierende Sequenz bei Einsatz von Primer H16395. 4: Position innerhalb der mitochondrialen DNA.

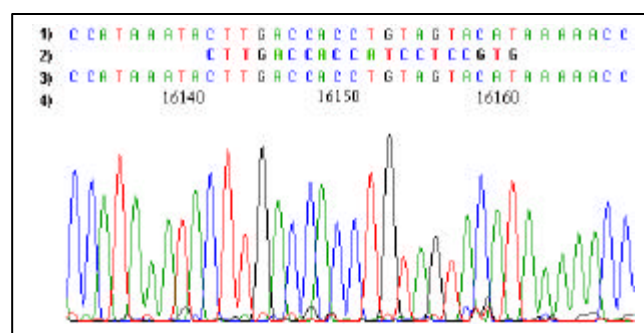


Abb. 4.8: Sequenz nach Einsatz des Primers H16430 (ohne Sequenzhomologie). 1: Referenzsequenz 2: Primersequenz H16395 3: resultierende Sequenz bei Einsatz von Primer H16430. 4: Position innerhalb der mitochondrialen DNA.

4.1.2 Sequenzpolymorphismen in einer deutschen Bevölkerungsstichprobe

Die 198 in der hypervariablen Region 1 untersuchten Sequenzen ließen sich in 130 voneinander unterscheidbare Haplotypen aufteilen. Diese definieren sich durch 99 verschiedene Abweichungen von der Referenzsequenz. Insgesamt waren 477 einzelne Divergenzen zur Referenzsequenz feststellbar. Diese unterteilen sich in 441 Transitionen, also Punktmutationen der Form $A \leftrightarrow G$ oder $T \leftrightarrow C$. Transversionen, also Austausch von Purinen durch Pyrimidine und umgekehrt waren in 26 Fällen feststellbar. Des weiteren traten zwei Deletionen und acht Insertionen auf. Sequenzpolymorphismen waren zwischen Position 16.017 und 16.391 feststellbar (Abb. 4.9).

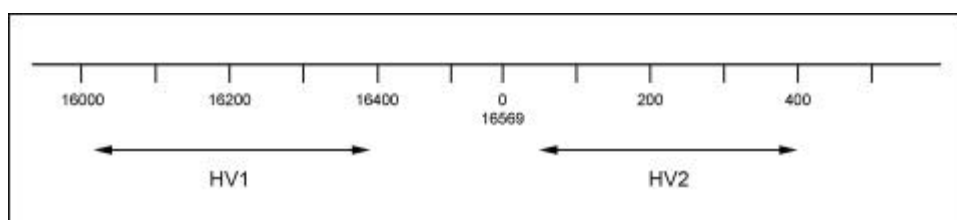


Abb. 4.9: Schematische Darstellung der beobachteten polymorphen Bereiche der beiden hypervariablen Regionen 1 und 2.

Die Verteilung der Differenzen zur Referenzsequenz in der HV1 zeigte sich sowohl quantitativ, also in der Anzahl der an einer Position abweichenden Haplotypen, als auch qualitativ uneinheitlich im Sinne einer Streuung über den untersuchten Bereich. So war der am häufigsten zu beobachtende Unterschied zur Referenzsequenz, eine Transitionen von T nach C an Position 16.189, in 39 Fällen feststellbar. Diese Transition ging häufig mit dem Auftreten eines Längenpolymorphismus einher, also der Überlagerung mehrerer unterschiedlich langer Sequenzen, die die Auswertung erheblich erschwert (siehe auch 4.1.1). In diesen Fällen ist auch oft eine Deletion eines (in 13 Fällen) oder mehrerer (in 3 Fällen) der vorangehenden Adenosine (Positionen 16.182 und 16.183) zu vermerken. Eine weitere häufig anzutreffende Differenz war eine in 35 Fällen beobachtete Transition von T nach C an Position 16.126. Andere Abweichungen von der Referenzsequenz, wie z. B. die Transition von C nach T an Position 16.169, traten dagegen zum Teil nur einmalig auf. Die Sequenzabweichungen waren nicht gleichmäßig über die gesamte HV1 verteilt. Vielmehr waren Bereiche feststellbar, in denen im Verlauf der Untersuchung an jeder

Position ein oder mehrere Unterschiede zur Referenzsequenz gefunden wurden. Dies war z. B. zwischen den Positionen 16.290 und 16.298 der Fall. In anderen Bereichen hingegen, wie beispielsweise zwischen den Positionen 16.148 und 16.161, konnte zum Teil keine einzige Abweichung zur Referenzsequenz gefunden werden (Abb. 4.10).

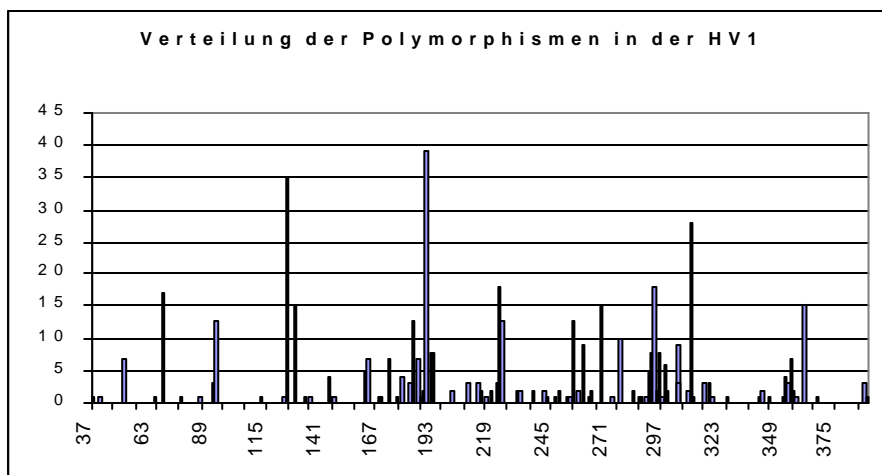


Abb. 4.10: Verteilung der Differenzen zur Referenzsequenz. Y-Achse: Häufigkeit der Differenz; X-Achse Position innerhalb der mitochondrialen DNA (=X + 16.000).

Einige der bei der Untersuchung gefundenen Haplotypen wiesen eine hohe Häufigkeit auf. Der bei 30 Probanden und damit am häufigsten beobachtete Haplotyp wies dabei keine Abweichungen zur Referenzsequenz auf (Tab. 4.1). Weiterhin wurden fünf unterschiedliche Haplotypen bei jeweils drei Individuen und 11 Haplotypen bei jeweils zwei Individuen festgestellt. 109 Sequenzen traten nur einmalig auf.

Anzahl der Individuen	Unterschiede zur Referenzsequenz (Anderson et al. 1981)
5	16.298C
5	16.069T, 16.126C
6	16.224C, 16.311C
6	16.126C, 16.163G, 16.186T, 16.189C, 16.294T
30	keine Unterschiede feststellbar

Tab. 4.1: Häufigste Haplotypen der unterfränkischen Stichprobe in der HV1.

Unter den 180 in der hypervariablen Region 2 untersuchten Sequenzen traten insgesamt 93 Haplotypen auf. Der beobachtete variable Bereich der HV2 lag zwischen den Positionen 53 und 399 (Abb. 4.9). Diese lassen sich durch Sequenzunterschiede an 55 unterschiedlichen Positionen festhalten. Insgesamt traten 816 einzelne Unterschiede zur Referenzsequenz auf. Hiervon sind 516 Sequenzunterschiede durch Transition, 296 durch Insertion, drei durch Transversion und einer durch Deletion aus der Referenzsequenz herleitbar. Auch in der HV2 ist die Verteilungen der Unterschiede zur Referenzsequenz uneinheitlich. An Position 315 unterscheiden sich alle 180 untersuchten Sequenzen von der Referenzsequenz durch ein zusätzliches C. Eine Transition von A nach G ist in 179 aller beobachteten Fälle aufgetreten. Weniger häufig waren die Insertion eines C an Position 309 in 94 der 180 untersuchten Fälle und die Transition von A nach G an Position 73 in 88 aller Fälle zu verzeichnen. Die übrigen Divergenzen zur Referenzsequenz wiesen Häufigkeiten von weniger als 35 auf. Auch die Positionen mit Divergenzen zur Referenzsequenz waren sehr unterschiedlich verteilt. Zwischen Position 154 und Position 181 fanden sich beispielsweise keinerlei Unterschiede zur Referenzsequenz, während an den vier vorhergehenden Positionen 150 bis 153 insgesamt 62 untersuchte Personen Abweichungen von der Referenzsequenz aufwiesen (Abb. 4.11).

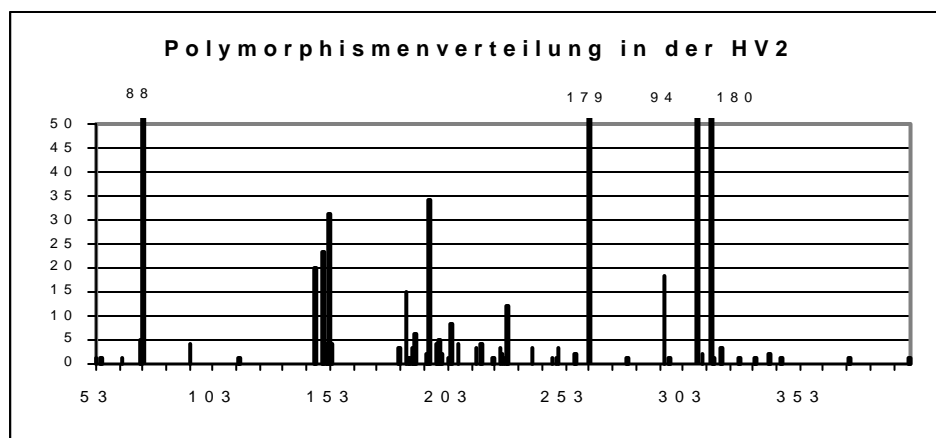


Abb. 4.11: Verteilung der Differenzen zur Referenzsequenz bei einer unterfränkischen Populationsstichprobe. Y-Achse: Häufigkeit der Differenz; X-Achse Position innerhalb der mitochondrialen DNA.

Der am häufigsten aufgetretene Haplotyp innerhalb der HV2 wurde von 25 Individuen geteilt und unterschied sich von der Referenzsequenz mit einer Transition von A nach G in Position 263 und einer Insertion eines C in Position 315. Auch die

übrigen häufiger aufgetretenen Haplotypen wiesen dieses Sequenzmotiv mit auf (Tab. 4.2).

Anzahl der Individuen	Unterschiede zur Referenzsequenz (Anderson et al. 1981)
4	73G, 152C, 195C, 263G, 309.1C, 315.1C
4	73G, 185A, 228A, 263G, 295T, 315.1C
6	73G, 150T, 263G, 315.1C
6	263G, 309.1C, 309.2C, 315.1C
9	73G, 263G, 315.1C
11	73G, 263G, 309.1C, 315.1C
16	263G, 309.1C, 315.1C
25	263G, 315.1C

Tab. 4.2: Häufigste Haplotypen der unterfränkischen Stichprobe in der HV2.

Des Weiteren wurden drei unterschiedliche Haplotypen bei jeweils drei Individuen festgestellt und acht Haplotypen bei jeweils zwei Individuen. 74 Haplotypen traten jeweils nur ein Mal in Erscheinung.

Ein Vergleich der 180 gewonnenen Sequenzen von HV1 und HV2 zusammengenommen ergab 156 unterschiedliche mitochondriale Linien, die durch 156 variable Positionen definiert sind. Die beiden am häufigsten angetroffenen Haplotypen unterschieden sich von der Referenzsequenz ausschließlich in der HV2 (Tab. 4.3).

Anzahl der Individuen	Unterschiede zur Referenzsequenz (Anderson et al. 1981)
3	16.298C, 72C, 263G, 309.1C, 309.2C, 315.1C
3	263G, 309.1C, 309.2C, 315.1C
4	16.126C, 16.163G, 16.186T, 16.189C, 16.294T, 73G, 152T, 195C, 263G, 309.1C, 315.1C
5	263G, 315.1C
8	263G, 309.1C, 315.1C

Tab. 4.3: Häufigste Polymorphismen der HV1 und HV2 in einer unterfränkischen Bevölkerungsstichprobe.

In insgesamt acht Fällen lag eine Übereinstimmung zwischen zwei Individuen vor. 141 Sequenzen traten innerhalb der unterfränkischen Bevölkerung nur ein einziges mal auf.

Keine Sequenz zeigte vollständige Übereinstimmung mit der Referenzsequenz; bei jeder untersuchten Sequenz waren mindestens zwei Sequenzunterschiede feststellbar. Sechs Sequenzunterschiede zur Referenzsequenz waren bei 26 Individuen und damit am häufigsten zu beobachten (Abb. 4.12).

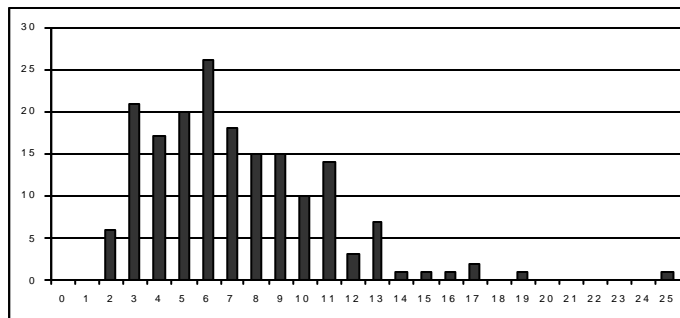


Abb. 4.12: Anzahl der Polymorphismen pro Sequenz. X-Achse Anzahl der Unterschiede Zur Referenzsequenz; Y-Achse Häufigkeit innerhalb der unterfränkischen Population.

Aus den Häufigkeiten der einzelnen Haplotypen wurden die Haplotypdiversitäten $d_{w_{min}}$ und $d_{w_{max}}$ entsprechend der Formeln aus 3.2.9 errechnet (Tab. 4.4).

Betrachteter Bereich	$d_{w_{min}}$	$d_{w_{max}}$
HV1	0,9694	0,9743
HV2	0,9593	0,9646
HV1 + HV2	0,9948	0,9960

Tab. 4.4: Haplotypdiversität der hypervariablen Regionen innerhalb der unterfränkischen Bevölkerung.

Die Übereinstimmungswahrscheinlichkeit zweier zufällig ausgewählter unterfränkischer Sequenzen ($1 - d_w$) für den routinemäßig untersuchten Bereich bestehend aus HV1 und HV2 liegt also zwischen 0,40 % und 0,52 %.

4.1.3 Sequenzpolymorphismen in anderen Populationsstichproben

Die untersuchte deutsche (unterfränkische) Bevölkerungsstichprobe sollte nun mit anderen europäischen und nichteuropäischen Stichproben verglichen werden, um einen globalen Überblick über die Verteilung der mitochondrialen DNA-Polymorphismen zu erhalten. Hierzu wurden drei Bevölkerungsgruppen untersucht. Dies waren Äthiopier (n=65), Chinesen (n=60) und Türken (n=37). Die Haplotypen der Stichproben wurden durch Sequenzierung der hypervariablen Region 1 bestimmt. Die eingesetzte Methodik entsprach hierbei der für die deutsche Stichprobe eingesetzten. Die gewonnenen Sequenzen finden sich in Anhang III bis Anhang V.

Die Verteilung der bezüglich der Referenzsequenz polymorphen Stellen ergab bei allen drei untersuchten Populationen ein ähnlich uneinheitliches Bild wie für die deutsche (unterfränkische) Stichprobe.

Die in der chinesischen Population in 38 von 60 Fällen und in der äthiopischen Population mit 33 von 65 Fällen am häufigsten anzutreffende Abweichung zur Referenzsequenz war eine Transition von C nach T an Position 16.223. Andere Sequenzunterschiede, wie die in 19 Fällen anzutreffende Transition von G nach A an Position 16.129 bei den Chinesen, waren bei den Äthiopiern nur mit geringerer Frequenz (in 8 Fällen; eine Transversion nach C war in 4 weiteren Fällen zu beobachten) anzutreffen. Umgekehrt verhielt es sich mit der Transition von T nach C an Position 16.311. Diese trat in der äthiopischen Stichprobe 21 mal auf, während die chinesische Stichprobe nur 10 dieser Fälle aufwies (Abb. 4.13 und 4.14).

Der häufigste Sequenzpolymorphismus in der türkischen Population (11 von 37 Fälle) war die Transition an Position 16.189, mit dem damit einhergehenden Längenpolymorphismus und der häufig anzutreffenden Deletion eines vorangehenden A (Abb. 4.15).

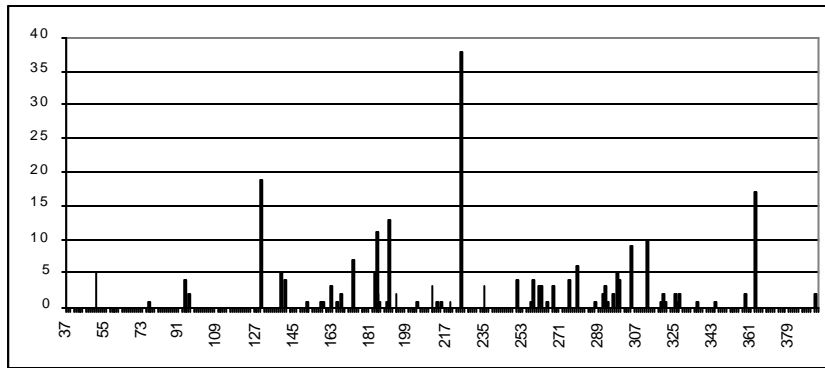


Abb. 4.13: Verteilung der polymorphen Stellen bei Chinesen bezüglich der Referenzsequenz. X-Achse: Position innerhalb der HV1 (+16.000); Y-Achse: Häufigkeit des Polymorphismus.

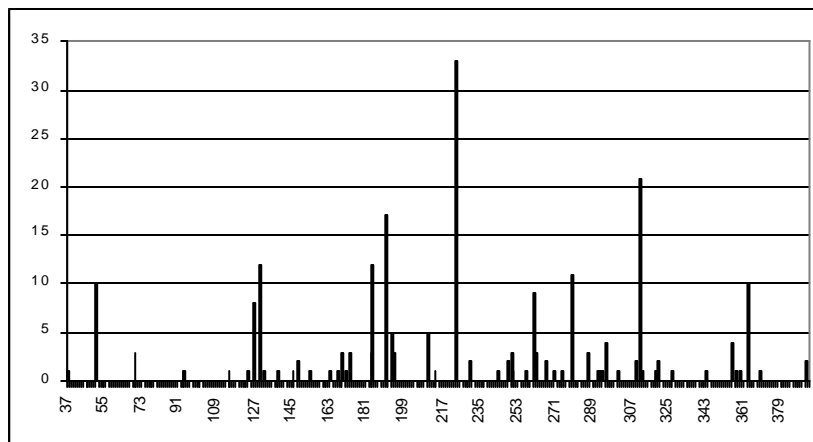


Abb. 4.14: Verteilung der Polymorphismen bezüglich der Referenzsequenz bei Äthiopiern. X-Achse: Position innerhalb der HV1 (+16.000); Y-Achse: Häufigkeit des Polymorphismus.

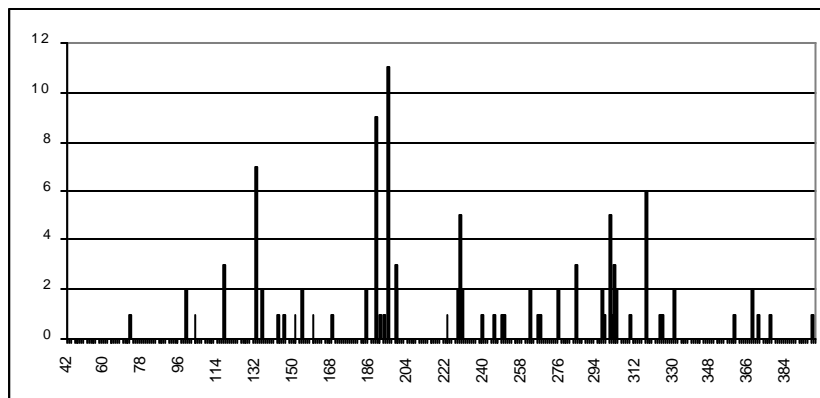


Abb. 4.15: Verteilung der Polymorphismen bezüglich der Referenzsequenz bei Türken. X-Achse: Position innerhalb der HV1 (+16.000); Y-Achse: Häufigkeit des Polymorphismus.

4.1.4 Anwendungsbeispiel für mitochondriale DNA in der Spurenkunde

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit kam die Sequenzierung mitochondrialer DNA auch zur praktischen Anwendung bei der spurenkundlichen Aufklärung von Straftaten.

Zur Untersuchung gelangten in neun Fällen Haarschäfte und telogene Haare, also Haarmaterial an dem in der Regel nur wenige bzw. keine vollständigen Zellen mit erhaltenem Zellkern vorhanden sind. In einigen wenigen Fällen wurde eine mitochondriale DNA-Analyse auch an anderen Spuren durchgeführt, in denen die chromosomale DNA stark degradiert vorlag.

In keinem Fall war es möglich, aus dem vorliegenden Spurenmaterial genügend DNA zu isolieren, die zur Typisierung eines vollständigen chromosomalen Merkmalsmusters gereicht hätte. Die Untersuchung mitochondrialer DNA hingegen ergab in sechs der neun betreffenden Fälle eine vollständige Sequenz zumindest der hypervariablen Region 1.

Beispielhaft soll hier der Fall eines Einbruchdiebstahls erwähnt werden:

In diesem Fall wurden auf einer am Tatort gesicherten Mütze Haare gefunden. Bei diesen handelte es sich ausschließlich um Haarschäfte; d.h. die Haare lagen ohne ihre jeweiligen Haarwurzeln vor. Die zwei längsten und damit aussichtsreichsten Haarteile wurden in eine Chelexextraktion eingesetzt (3.2.1.1). Zunächst wurde versucht, an Hand der üblicherweise eingesetzten chromosomalen STR-Systeme ein genügend aussagekräftiges Merkmalsmuster zu erstellen. Die hierfür eingesetzten STR-Systeme waren SE33(ACTBP2) und FGA(FIBRA), D21S11, VWA und. Diese erbrachten jedoch nicht das gewünschte Ergebnis. Lediglich im System D21S11 war bei einem der untersuchten Haare der Genotyp 29/30 feststellbar.

Die Amplifikation der hypervariablen Regionen (HV) 1 und 2 der mitochondrialen DNA hingegen erbrachte positive Ergebnisse (3.2.4, 3.2.7.1). Beide Haare konnten in beiden Bereichen sequenziert werden (3.2.5). Die sicheren Bereiche, also die Bereiche, deren Sequenz für L-Strang und H-Strang erhoben werden konnten (3.2.7.2), lagen für die HV 1 zwischen den Nukleotidpositionen 16.035 und 16.352 bzw. 16.008 und 16.391. Für die HV 2 lag der sichere Bereich zwischen den

Nukleotidpositionen 75 und 369 bzw. 37 und 422. Die beiden Sequenzen ergaben einen in allen Positionen übereinstimmenden in Haplotyp (Tab. 4.5).

HV 1 Position	Ereignis	HV 2 Position	Ereignis
16.168	C > T (Transition)	73	A > G (Transition)
16.192	C > T (Transition)	263	A > G (Transition)
16.256	C > T (Transition)	315.1	C (Insertion)
16.270	C > T (Transition)		

Tab. 4.5: Abweichungen der untersuchten Probe zur Referenzsequenz (Anderson et al. 1981); HV = hypervariable Region.

Mit den Nukleotiden 16.270T und 73G ließ sich der gewonnene Haplotyp nun eindeutig der Haplogruppe U5 zuordnen. Diese ist in der unterfränkischen Bevölkerung in 16 von 198 Fällen aufgetreten.

Unter den 179 am Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg zum betreffenden Zeitpunkt in diesem Bereich untersuchten Sequenzen, kam der angegebene Haplotyp nicht vor. Eine Anfrage bei der Datenbank D-Loop BASE in Magdeburg (Wittig et al. 2000) ergab ebenfalls keine einzige Übereinstimmung. Die damalige Datenbankgröße betrug 1.207 Datensätze. Die gewonnenen Daten wurden mit den aus einem Mundschleimhautabstrich eines Tatverdächtigen gewonnenen Daten verglichen und ergaben eine Übereinstimmung in allen Positionen.

4.1.5 Untersuchung weiterer nicht kodierender mitochondrialer Bereiche

Um eine mögliche Unterdifferenzierung der gelegentlich auftretenden übereinstimmenden mitochondrialen Genotypen zu untersuchen, wurde der Analysebereich ausgeweitet.

Der am häufigsten in der unterfränkischen Population auftretende Genotyp (acht Individuen) wurde in vier zusätzlichen mitochondrialen Systemen untersucht (Tab 4.6).

	Position	Zitat
HV III	438 – 574	Lutz et al. 1997
MTNC 3	5.577 – 5.586	Mitomap
MTNC 5	5.892 – 5.903	"
MTNC 7	8.263 – 8.294	"

Tab. 4.6: Position der untersuchten nicht kodierenden Bereiche in der mitochondrialen DNA. HV: hypervariable Region; MTNC: mitochondriale nichtcodierende Nukleotide.

Jeweils 5 ng aus Vollblut isolierte DNA (s. 3.2.1.4) wurde in die verschiedenen PCRs eingesetzt (s. 3.2.4). Die PCR-Produkte wurden mit Ethanol aufgereinigt (s. 3.2.2.2) und sequenziert (s. 3.2.5). Die Produkte der Sequenzierung wurden wiederum aufgereinigt (s. 3.2.2.3) und im Sequenzierer ABI310 aufgetrennt (s. 3.2.7.2).

Wie sich zeigte, wies keine der untersuchten Proben in den untersuchten NCs Unterschiede zur von Anderson et al. veröffentlichten Sequenz auf.

Nur die HV III ermöglichte es, in einem Fall eine Unterscheidung zu treffen. Die Sequenz wies hier eine zusätzliche CA-Insertion an Position 523.1/523.2 und eine Transversion von C nach A an Position 552 auf.

4.1.6 Mutationshäufigkeiten bei der mitochondrialen DNA

Es wurden 50 Paare von unterfränkischen Müttern und deren Kindern in der HV1 untersucht. Bei den untersuchten Müttern handelt es sich um die in Anhang I und II mit X markierten Sequenzen. Die jeweiligen Kinder wurden nicht extra aufgeführt. In nur einem Fall (Anhang I, Unterfränkin D 139) war ein Sequenzunterschied zwischen Mutter und Kind feststellbar. Hierbei handelte es sich um eine Transition von T (bei der Mutter) nach C (beim Kind) an Position 16.354. Alle übrigen untersuchten Paare wiesen vollständige Übereinstimmung an allen betrachteten Positionen zwischen Mutter und Kind auf.

4.1.7 Speziesbestimmung mittels des mitochondrialen Cytochrom b Genes

Die beiden für die Speziesbestimmung verwendbaren Methoden RFLP-Darstellung des amplifizierten Cytochrom b Genes und RAPD-PCR des gesamten Genoms wurden für eine Auswahl von Haustieren, Wildtieren und Primaten durchgeführt.

DNA wurde aus Blutspuren auf Leinenläppchen mit der Chelexextraktion und anschließender Diatomeenaufreinigung gewonnen (s. 3.2.1.1 und 3.2.2.1). 1 µl der so isolierten DNA wurde jeweils in die PCR (s. 3.2.4) eingesetzt. Das Amplifikat des Cytochrom b Genes wurde einem AluI-Restriktionsverdau unterzogen (s. 3.2.6), die Proben auf einem 5%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. 3.2.7.1).

Die Auftrennung der RAPD-PCR-Produkte brachte für jede der untersuchten Tierarten unterschiedliche Bandenmuster hervor. Eine exakte Größenordnung der einzelnen aufgetretenen Banden war aufgrund ihrer zum Teil sehr dichten Staffelung im niedrigauflösenden Polyacrylamidgel nicht möglich (Abb. 4.16).

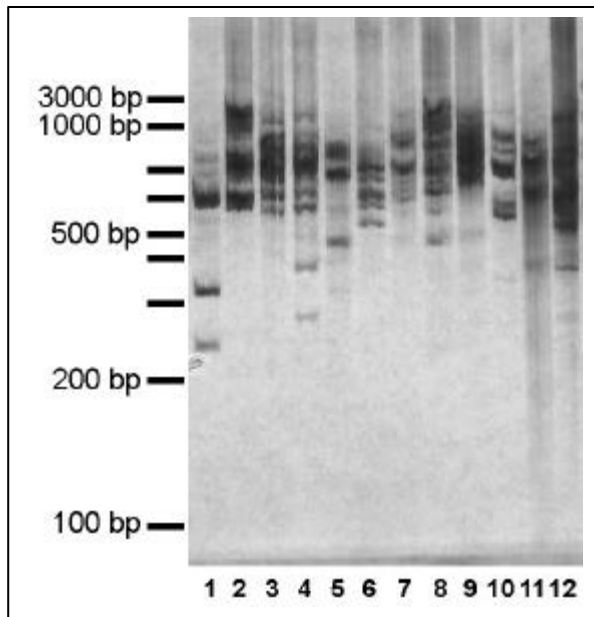


Abb. 4.16: 5 %iges PAG einer RAPD-PCR für unterschiedliche Tierarten. 1. Hund, 2. Katze, 3. Schwein, 4. Wildschwein, 5. Rind, 6. Reh, 7. Pferd, 8. Pony, 9. Esel, 10. Kapuzineraffe, 11. Orang-Utan, 12. Mensch.

Durch Modifikation des RAPD-Primers mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM wurde die Auftrennung der PCR-Produkte durch Kapillarelektrophorese ermöglicht (3.2.7.2). Die Auswertung mit dem Programm GeneScan lieferte zu jeder in Abb. 4.16 aufgetretenen Bande die Länge in bp und Intensität des Fluoreszenzsignals (Abb. 4.17).

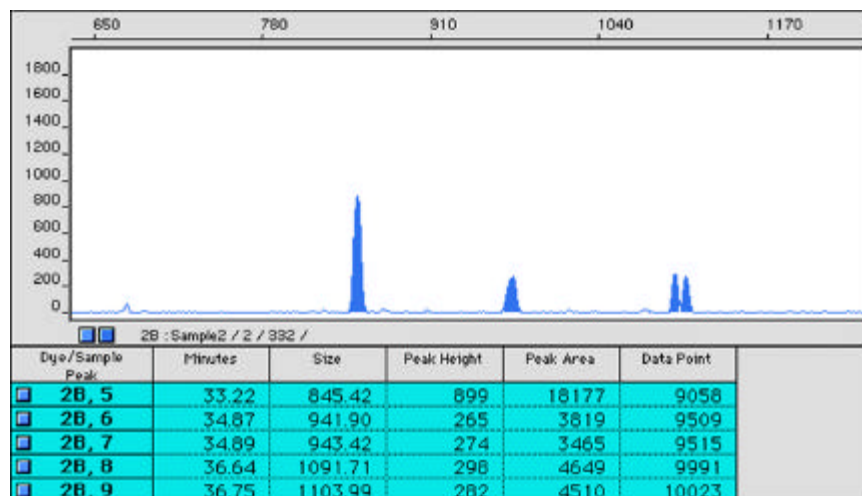


Abb. 4.17: GeneScan Darstellung des RAPD-PCR-Produktes für ein Schwein nach Kapillarelektrophorese im Genetic Analyser ABI310 (Applied Biosystems).

Die Größenordnung der bei RFLP-Darstellung des Cytochrom b Genes vorgefundenen Banden fiel durch die geringere Bandenzahl dagegen leichter (Abb. 4.18). Die Zuordnung der gefundenen Banden ergab für alle Tierarten die jeweils in Tab. 3.2 geforderten Größen.

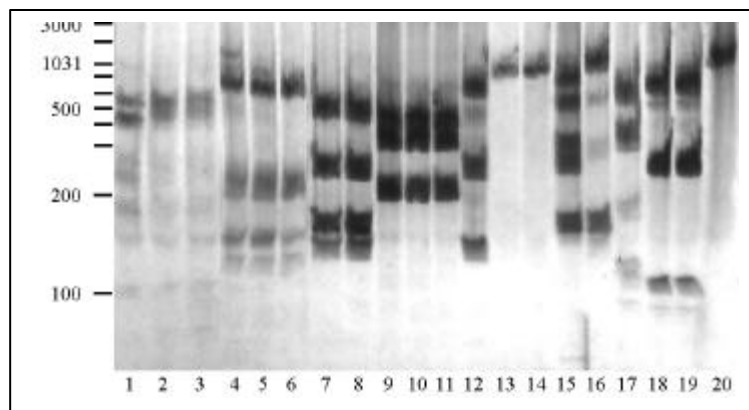


Abb. 4.18: RFLP-Bandenmuster des Cytochrom b Genes bei verschiedenen Tierarten. 1-3 Hund, 4-6 Katze, 7/8 Schwein, 9-11 Rind, 12 Wildschwein, 13/14 Reh, 15 Pferd, 16 Kaninchen, 17 Kapuzineraffe, 18/19 Schimpansen, 20 Mensch)

4.2 Etablierung von STR-Systemen

4.2.1 Der Geschlechtsmarker Amelogenin

Bei mehreren Personen wurden parallel das auf Koamplifikation beruhende X/Y - System (α -Satelliten bei DYZ1 und DXS424) und das durch eine einzige Amplifikation realisierbare X/Y-System im 1. Intron des Amelogenin-Gens – im folgenden kurz Amelogenin genannt – untersucht.

5 ng, aus Vollblut isolierte DNA (s. 3.2.1.4) wurde in eine PCR (s. 3.2.4) eingesetzt. Zum Einsatz kamen für die Koamplifikation die Primer X3, X4, Y3 und Y4. Für die Einzelamplifikation wurden die Primer Amelogenin 1 und 2 verwendet (s. 3.1.5). Der Amelogeninprimer Nr. 1 war am 5'-Ende für eine spätere automatische Analyse mit dem blauen Fluoreszenz-Farbstoff 5-FAM markiert.

Die PCR-Produkte beider Amplifikationen wurden in einem niedrigauflösendes PAG aufgetrennt (s. 3.2.7.1). Das Amelogenin wurde außerdem einer hochauflösenden Kapillarelektrophorese unterzogen (s. 3.2.7.2).

Mit beiden Amplifikationen war im PAG eine deutliche Unterscheidung zwischen Proben männlicher und weiblicher Herkunft möglich. Die um 6 bp größere Y-chromosomale Bande (Abb. 4.19/1) im Amelogenin lässt sich noch deutlich von der X-chromosomalen Bande (Abb. 4.19/2) unterscheiden. Noch deutlicher fällt dieser Dimorphismus bei den α -Satellitensystemen aus (Abb. 4.19/3 und 4). Die Amplifikation des Y-chromosomalen Satelliten DYZ1 erbrachte eine zusätzliche unerwartete Bande bei ca. 300 bp. Die Auftrennung des Amelogenins in der Kapillarelektrophorese ergab außer einer 1 bp kleineren Nebenbande keine weiteren Artefakte (Abb. 4.20).

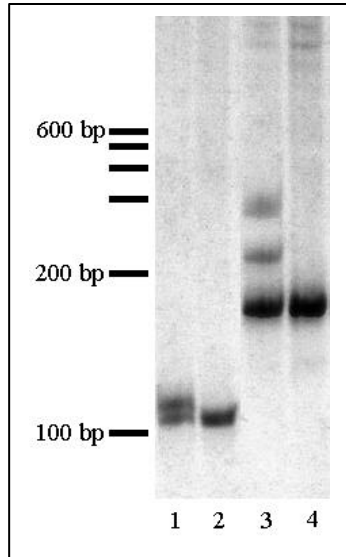


Abb. 4.19: Niedrigauflösendes 5%-iges PAA-Gel der eingesetzten Geschlechtsmarker; 1 u. 2: Amelogenin-PCR-Produkt einer männlichen / weiblichen Testperson; 3 u. 4: PCR-Produkt der α -Satelliten-Systeme einer männlichen/weiblichen Testperson.

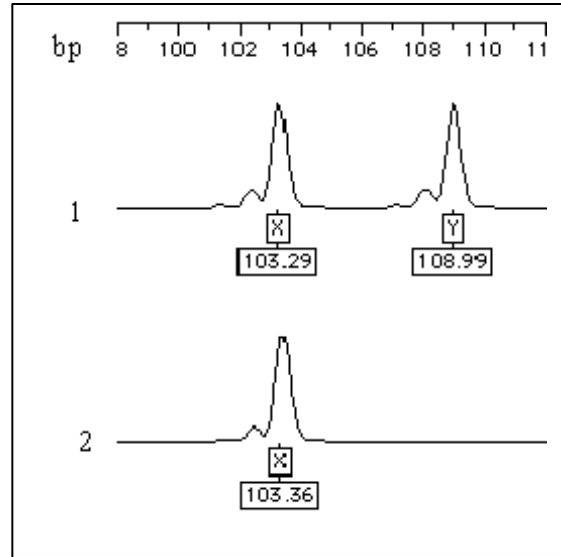


Abb. 4.20: Hochauflösendes Elektropherogramm des Amelogenin-Systems. 1: männliche Testperson; 2: weibliche Testperson

4.2.2 Autosomale STR-Systeme

Die autosomalen Mikrosatellitensysteme D3S1358, D8S1179, D18S51 und D21S11 wurden gleichfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht (Jung und Patzelt 2002). Hierfür wurden Proben unverwandter Bewohner Unterfrankens typisiert.

Die DNA der untersuchten Testpersonen wurde durch Aussalzen aus Vollblut isoliert (s. 3.2.1.4). 5 ng DNA wurden in die jeweiligen PCRs eingesetzt (s. 3.2.4). 4 μ l der PCR-Produkte wurden zur Erfolgskontrolle und zur Abschätzung der Bandenstärke mit einem 5 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. 3.2.7.1). Je nach Bandenstärke wurden 0,3 μ l bis 5 μ l in den sich anschließenden Fragmentanalyselauf eingesetzt (s. 3.2.7.2). Die Bestimmung der Größen der auftretenden Allele wurde mit dem Programm Genescan durchgeführt. Die Zuordnung der Allele zur jeweiligen Allelleiter geschah unter Verwendung des Programms Genotyper. Die gemäß internationaler Übereinkünfte (Bär et al. 1997) gültigen Allelbezeichnungen wurden durch Vergleich mit Befunden im SGM plus™ Kit (ABI) bestimmt.

Die gefundenen unterfränkischen Populationsdaten wurden jeweils mit einer US-amerikanischen Kaukasierstichprobe (Handbuch – AmpFlSTR® SGM plus™-Kit, Applied Biosystems) verglichen.

4.2.2.1 D3S1358

Zur Erhebung relevanter Populationsdaten wurden 195 unverwandte Unterfranken mit dem STR-System D3S1358 typisiert.

Es waren sieben verschiedene Allele feststellbar. Dies waren die Allele 13 (119 bp) bis 19 (147 bp). Zwischenallele wurden nicht gefunden.

Unter den aus Unterfranken typisierten Proben wurden für eine allelische Leiter, die beim routinemäßigen Einsatz des STR-Systems die Allelzuordnung erleichtern soll, geeignete PCR-Produkte ausgewählt. Das heißt drei Probanden, deren Merkmalskombinationen im System D3S1358 keine Identität oder Teilidentität aufwiesen wurden in einem Ansatz vereinigt. Die Leiter wurde im Sequenz-Analysator aufgetrennt (Abb. 4.21).

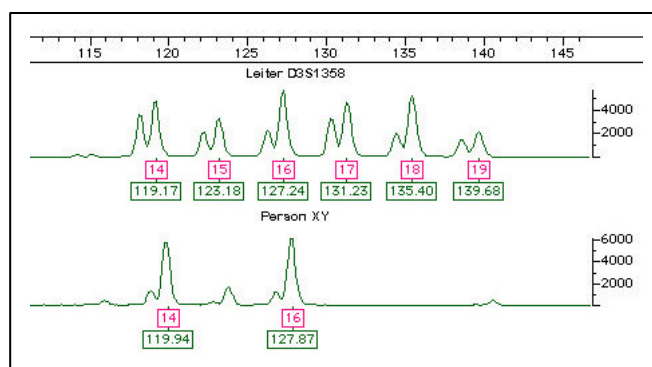


Abb. 4.21: Allelleiter des STR-Systems D3S1358 mit Befundbeispiel. Die magentafarbenen Zahlen geben die Allelbezeichnung; die grünfarbigen Zahlen die jeweilige Größe in bp an.

In der unterfränkischen Bevölkerungsstichprobe wie auch bei der US-amerikanischen Kaukasierbevölkerung waren die Allele 14 bis 18 am häufigsten vertreten. Kleine Unterschiede waren in der Verteilung der Häufigkeiten feststellbar. So war in Unterfranken das Allel 16 am häufigsten, während Applied Biosystems beim größten Teil der US-Kaukasier das Allel 15 feststellte (Tab. 4.7/Abb. 4.21).

D3S1358	Unterfranken (n=195)		US-Kaukasier (n=200)	
Allel-Nr.	abs.	rel.	abs.	rel.
13	1	0,003	2	0,005
14	45	0,115	45	0,113
15	94	0,241	113	0,283
16	109	0,279	89	0,223
17	73	0,187	89	0,223
18	65	0,167	58	0,145
19	4	0,01	2	0,005

Tab. 4.7: Allelfrequenzen des STR-Systems D3S1358; abs = absolute Häufigkeit; rel = relative Häufigkeit; n = Stichprobengröße.

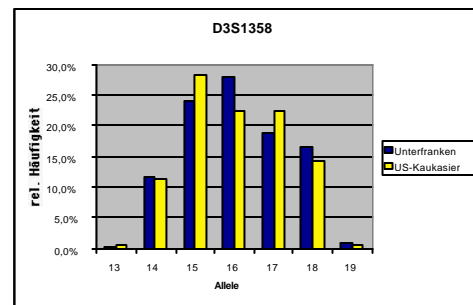


Abb. 4.22: Graphische Darstellung der Allelverteilung des STR-Systems D3S1358.

4.2.2.2 D8S1179

Das STR-System D8S1179 wurde anhand einer Bevölkerungsstichprobe von 165 unverwandten Unterfranken untersucht.

11 verschiedene Allele wurden gefunden. Dies waren alle ganzzahligen Allele zwischen Allel 8 (162 bp) und Allel 18 (202 bp). Zwischenallele wurden nicht gefunden. PCR-Produkte geeigneter Probanden wurden, analog zum Vorgehen im System D3S1358, zu einer allelischen Leiter zusammengestellt und im Sequenzierer mit aufgetrennt (Abb. 4.22).

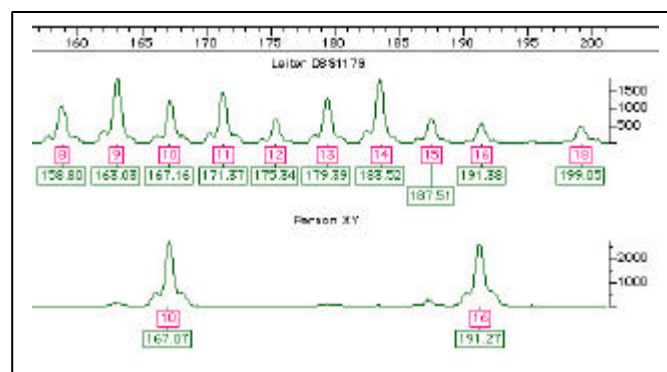
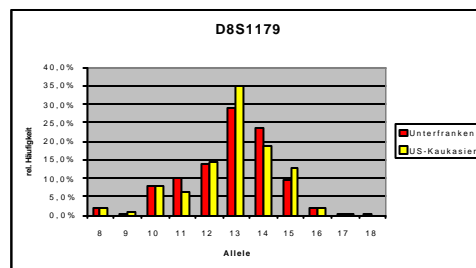


Abb. 4.23: Allelleiter des STR-Systems D8S1179 mit einer Beispielsprobe. Magentafarbige Zahlen geben die Allelbezeichnung an; grüne Zahlen die jeweiligen Allelgrößen.

Die sechs Allele 10 bis 15 waren mit relativen Häufigkeiten von jeweils über 5 % vertreten. Allel 13 ist bei Unterfranken und US-Kaukasieren das am häufigsten

auftretende Allel. Die Häufigkeit in Unterfranken liegt jedoch um 0,05 unter der in den USA gefundenen. Infolgedessen ist die Allelverteilung in Unterfranken insgesamt etwas homogener. Die dominierende Rolle des Allel 13 in der US-kaucasischen Bevölkerung teilen sich in Unterfranken die Allele 13 und 14 (Tab. 4.8 / Abb. 4.23).

D8S1179	Unterfranken (n=165)		US-Kaukasier (n=200)	
	abs.	rel.	abs.	rel.
8	6	0,018	7	0,018
9	2	0,006	4	0,01
10	27	0,082	32	0,08
11	34	0,103	25	0,063
12	46	0,139	57	0,143
13	96	0,291	139	0,348
14	78	0,236	75	0,188
15	32	0,097	52	0,13
16	6	0,018	8	0,02
17	2	0,006	1	0,003
18	1	0,003	0	0



Tab. 4.8: Allelfrequenzen des STR-Systems D8S1179; abs = absolute Häufigkeit; rel = relative Häufigkeit; n = Stichprobengröße.

Abb. 4.24: Graphische Darstellung der Allelverteilung des STR-Systems D8S1179.

4.2.2.3 D18S51

Anhand einer Populationsstichprobe von 173 unverwandten Unterfranken wurde das System D18S51 untersucht.

Es traten 14 unterschiedliche Allele auf. Dies waren die Allele 10 mit 275 bp bis 23 mit 327 bp. Wie beim STR-System D3S1358 wurde auch hier zur einfacheren Allelzuordnung eine Allelleiter hergestellt (Abb. 4.24).

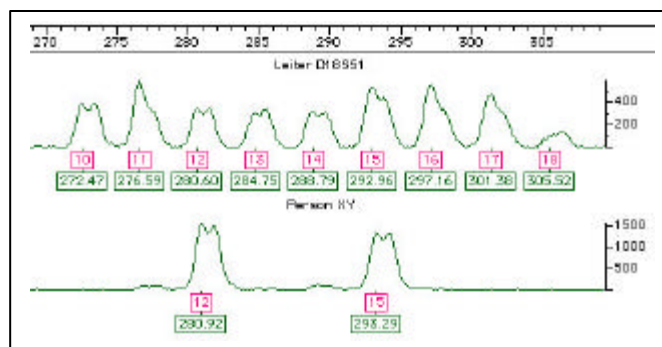


Abb. 4.25: Allelleiter des STR-Systems D18S51 zusammen mit einer Beispielprobe. Magentafarbene Zahlen bezeichnen die Allelnamen; grüne Zahlen bezeichnen die jeweiligen Allelgrößen in bp.

Sieben der 14 gefundenen Allele wiesen Häufigkeiten über 5% auf. Relative Häufigkeitswerte zwischen 9 % und 20 % bei den sechs Allelen 12 bis 17 sorgen für eine sehr gleichmäßige Verteilung. Allel 15 ist in Unterfranken im Vergleich zu den USA etwas unterrepräsentiert, wohingegen Allel 14 in Unterfranken häufiger auftritt (Tab. 4.9 / Abb. 4.24).

D18S51	Unterfranken (n=173)		US-Kaukasier (n=200)	
	abs.	rel.	abs.	rel.
10	3	0,009	2	0,005
11	3	0,009	8	0,02
12	52	0,15	57	0,143
13	46	0,133	60	0,15
14	68	0,197	67	0,168
15	31	0,09	57	0,143
16	48	0,139	56	0,14
17	41	0,118	42	0,105
18	31	0,09	24	0,06
19	13	0,038	15	0,038
20	6	0,017	6	0,015
21	1	0,003	4	0,01
22	1	0,003	1	0,003
23	2	0,006	1	0,003

Tab. 4.9: Allelfrequenzen des STR-Systems D18S51; abs = absolute Häufigkeit; rel = relative Häufigkeit; n = Stichprobengröße.

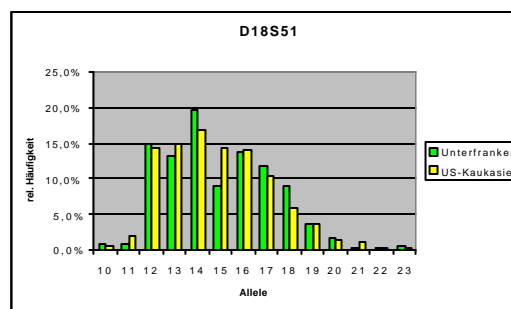


Abb. 4.26: Graphische Darstellung der Allelverteilung des STR-Systems D18S51.

4.2.2.4 D21S11

Zur Analyse einer unterfränkischen Bevölkerungsstichprobe im System D21S11 wurden 164 Probanden einbezogen.

Es wurden acht ganzzahlige Allele gefunden. Es handelt sich um die Allele 27 (213 bp) bis 34 (241 bp). Ab Allel 30 war zudem jeweils ein zwei Basenpaare größeres Zwischenallel feststellbar (Allele 30,2 bis 34,2). Analog zum Vorgehen beim System D3S1358 wurde auch für das System D21S11 eine allelische Leiter erstellt (Abb. 4.26).

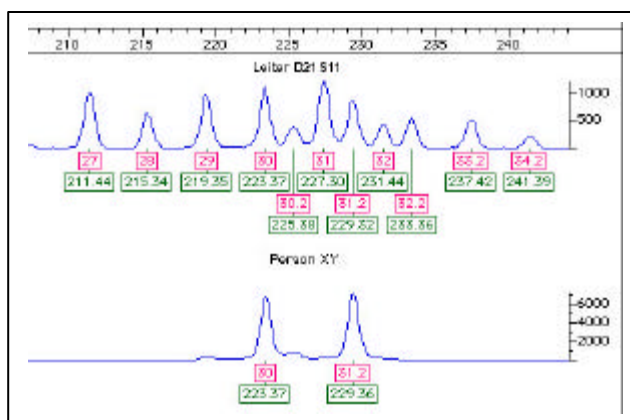


Abb. 4.27: Allelleiter für das STR-System D21S11 mit Beispielprobe. Magentafarbene Zahlen bezeichnen die jeweiligen Allele; grüne Zahlen die Zugehörigen Größen in bp.

Die Allele 28, 29 und 30 stellen mit relativen Häufigkeiten von jeweils über 15 % den Hauptanteil in beiden betrachteten Bevölkerungen. Bei größeren Allelen als Allel 30,2 liegen die relativen Häufigkeiten der um zwei Basenpaare größeren Zwischenallele jeweils höher als die der Hauptallele. Zwischen unterfränkischer und US-kaukasischer Bevölkerung waren nur geringe Unterschiede in den Häufigkeitsverteilungen feststellbar (Tab. 4.10 / Abb. 4.27).

D21S11	Unterfranken (n=164)		US-Kaukasier (n=200)	
Allel	abs.	rel.	abs.	rel.
27	9	0,027	15	0,038
28	61	0,186	65	0,163
29	70	0,213	83	0,208
30	78	0,238	105	0,263
30,2	14	0,043	10	0,025
31	19	0,058	22	0,055
31,2	28	0,085	42	0,105
32	4	0,012	5	0,013
32,2	27	0,082	29	0,073
33	1	0,003	1	0,003
33,2	11	0,034	16	0,04
34	1	0,003	0	0
34,2	5	0,015	3	0,008

Tab. 4.10: Allelfrequenzen des STR-Systems D21S11; abs = absolute Häufigkeit; rel = relative Häufigkeit; n = Stichprobengröße.

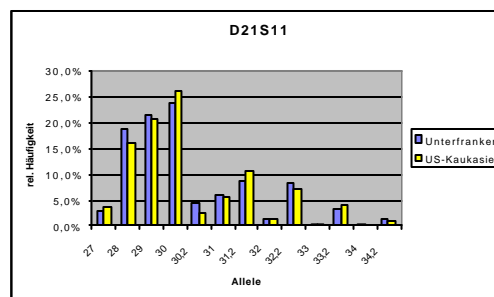


Abb. 4.28: Graphische Darstellung der Allelverteilung des STR-Systems D18S51.

4.2.2.5 Statistische Auswertung

Um die Aussagekraft der untersuchten STR-Systeme vergleichen zu können wurden statistische Berechnungen durchgeführt.

Die in den STR-Systemen D3S1358, D8S1179, D18S51 und D21S11 aufgetretenen Heterozygoten wurden gezählt und deren Anteil an der Bevölkerungsstichprobe errechnet. Diskriminationsstärke und theoretische Heterozygotenrate der Systeme wurden wie in 3.2.10 beschrieben errechnet.

Die kleineren und allelärmeren STR-Systeme D3S1358 und D8S1179 wiesen auch entsprechend die jeweils geringeren Raten auf. D18S51 besitzt den größten Diskriminationsindex und die höchsten Heterozygotenraten (Tab. 4.11).

System	Errechnete Heterozygotenrate	Beobachtete Heterozygotenrate	Diskriminationsindex
D3S1358	$0,7905 \pm 0,0062$	0,7934	0,9221
D8S1179	$0,8151 \pm 0,0100$	0,8314	0,9407
D18S51	$0,8724 \pm 0,0053$	0,9037	0,9691
D21S11	$0,8444 \pm 0,0087$	0,8938	0,9565

Tab. 4.11: Statistische Daten der vier untersuchten autosomalen STR-Systeme.

4.2.3 Das gonosomale STR-System DYS 385

Das Y-chromosomale Mikrosatellitensystem DYS385 wurde als Ergänzung zu den bereits vorhandenen Y-chromosomalen STRs eingeführt. Hierfür wurde eine unterfränkische Populationsstichprobe der Größe $n = 145$ typisiert.

Die DNA wurde aus Vollblut durch Aussalzen isoliert (s. 3.2.1.4). Nach Durchführung einer PCR (s. 3.2.4) wurde die Zuordnung der Allele durch Analyse im ABI 310 (s. 3.2.7.2) vorgenommen. Die Auswertung der gewonnenen Daten wurde mit den Programmen Genescan und Genotyper durchgeführt.

Wie bei den autosomalen STR-Systemen wurde auch für das gonosomale System DYS385 zur Erleichterung der Allelzuordnung eine allelische Leiter zusammengestellt (Abb. 4.28).

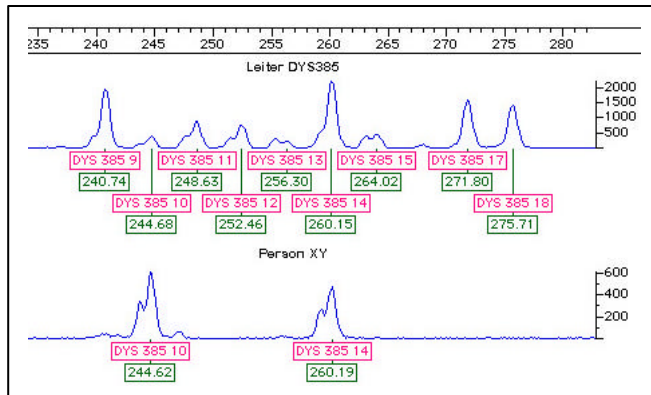


Abb. 4.29: Allelleiter für das gonosomale STR-System DYS385 mit Beispielprobe. Die Bezeichnung der Allele ist Magenta, grün die jeweilige Allelgröße.

Der Haplotyp 11-14 wurde in der unterfränkischen Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 33% am meisten beobachtet. Außer diesem erreichten nur die Haplotypen 11-15 und 13-14 Häufigkeiten von über 5 %. Haplotypen, an denen Allel 14 einen Anteil hat, machten insgesamt 61,4 % der untersuchten Stichprobe aus (Tab. 4.12).

DYS385	Unterfranken (n=145)				
Allel-Nr.	abs.	rel.	Allel-Nr.	abs.	rel.
9-9	1	0,7%	12-18	1	0,7%
9-14	1	0,7%	13-13	1	0,7%
10-10	1	0,7%	13-14	13	9,0%
10-14	7	4,8%	13-15	5	3,4%
10-15	1	0,7%	13-16	2	1,4%
11-11	2	1,4%	13-17	2	1,4%
11-12	2	1,4%	13-19	1	0,7%
11-13	6	4,1%	14-14	5	3,4%
11-14	48	33,1%	14-15	6	4,1%
11-15	11	7,6%	14-16	3	2,1%
11-16	3	2,1%	14-17	2	1,4%
11-18	1	0,7%	15-15	2	1,4%
12-13	4	2,8%	15-16	1	0,7%
12-14	4	2,8%	16-18	4	2,8%
12-15	1	0,7%	16-19	1	0,7%
12-16	1	0,7%	17-18	2	1,4%

Tab. 4.12: Allelfrequenzen einer unterfränkischen Bevölkerungsstichprobe im STR-System DYS385.

Die Diskriminationsindex des Systems DYS 385 wurde berechnet (s. 3.2.10). Er beträgt 0,8735.

4.2.4 Der AmpFISTR® Profiler™ Multiplex (ABI) und die Mutationsrate von STR-Systemen

Um einen Überblick über die Mutationshäufigkeiten innerhalb von STR-Systemen zu erhalten, wurden 50 Paare von Müttern und deren Kindern untersucht. Dies geschah mit dem AmpFISTR® Profiler™ Amplifikationskit von Applied Biosystems (Jung et al. 1998). Dieses Multiplexsystem setzt sich aus neun einzelnen STR-Systeme zusammen. Hierdurch wird bei der gewünschten Untersuchung sowohl ein breites STR-Spektrum abgedeckt als auch der Arbeitsaufwand erheblich verringert.

5 ng aus Vollblut isolierte DNA (s. 3.2.1.4) wurden jeweils in die PCR, (s. 3.2.4) eingesetzt. Die PCR-Bedingungen waren die selben wie für den AmpFISTR® SGM plus™-Kit nur, dass statt dem SGM plus™-Primermix der Profiler™-Primermix verwendet wurde. Die Fragmentlängenanalyse wurde mit dem Sequenzierer ABI 310 (Applied Biosystems) durchgeführt (s. 3.2.7.2).

Der einzige unter den 50 untersuchten Fälle, in dem kein übereinstimmendes Allel der Mutter mit einem Allel des zugehörigen Kindes gefunden werden konnte, ereignete sich im System D3S1358 .

Die Mutter besaß hier die Allele 14 / 17, das Kind hatte die Allele 16 / 16, war also homozygot im genannten System.

Angesichts der vergleichsweise geringen Stichprobenzahl wurde auf statistische Auswertungen wie Mittelwertbildung der Mutationshäufigkeit und deren Varianz verzichtet.

4.3 DNA-Extraktionsmethoden

4.3.1 DNA-Extraktion aus in Paraffin eingebettetem Gewebe

In Fällen, in denen das DNA-Merkmalmuster eines Verstorbenen bestimmt werden muss, wie z. B. im Zusammenhang mit Abstammungsbegutachtungen, ist unter Umständen noch für medizinische Untersuchungen archiviertes Material vorhanden. Hierbei handelt es sich zumeist um in Formalin fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine für rechtsmedizinische Belange geeignete Methode gefunden und etabliert werden. Insbesondere war hierbei von Interesse, dass auch DNA-Extraktionen aus längere Zeit in Formalin gelagerten Geweben ermöglicht werden sollten (Jung und Patzelt; im Druck).

In Paraffin eingebettete Proben mit unterschiedlichen Fixierungszeiten in Formalin (Tab. 4.13) wurden mit fünf unterschiedlichen DNA-Isolationsmethoden (s. 3.2.1.5) behandelt.

Proben- Nr.	Fixierungszeit
1	6 Monate
2	2 Tage
3	9 Monate
4	3 Jahre
5	1 Tag

Tab. 4.13: Formalin-Fixierungszeiten der eingesetzten Gewebe

Der Erfolg der Isolation wurde anhand einer PCR bestimmt (s. 3.2.4). Zum Einsatz für die Ergebnisüberprüfung kam das STR-System SE33. Es wurden jeweils 2 µl DNA-Lösung in die PCR eingesetzt.

Die Arbeitsvorschrift von Burton et al. 1998, die Octan zur Lösung des Paraffins vorschlägt (Protokoll V), erbrachte in keinem Fall ein positives Amplifikationsergebnis.

Der Einsatz des Gewebeschnittes direkt in die PCR, wie von Burns et al. 1997 vorgeschlagen (Protokoll II), brachte nur bei der für zwei Tage fixierten Probe ein positives Resultat (Abb. 4.30 b).

Die Methode nach Yamada et al. 1994 unter Verwendung von Xylol (Protokoll I / Abb. 4.30 a) und die Methode nach Banerjee et al. 1995, bei der die Probe im Mikrowellenherd bestrahlt wird (Protokoll III / Abb. 4.30 c) erbrachten bei den nur wenige Tage fixierten Proben übereinstimmend einen positiven Befund. Gewebe mit Fixierungszeiten länger als einen Monat erwiesen sich mit diesen Methoden hingegen als nicht typisierbar.

Nur die von Turbett et al. 1996 vorgeschlagene Behandlung mit Xylol unter anschließender Rehydrierung des Gewebes (Protokoll IV) ergab in allen fünf untersuchten Fällen ein positives, wenn auch zum Teil nur schwaches Amplifikationsergebnis (Abb. 4.30 d).

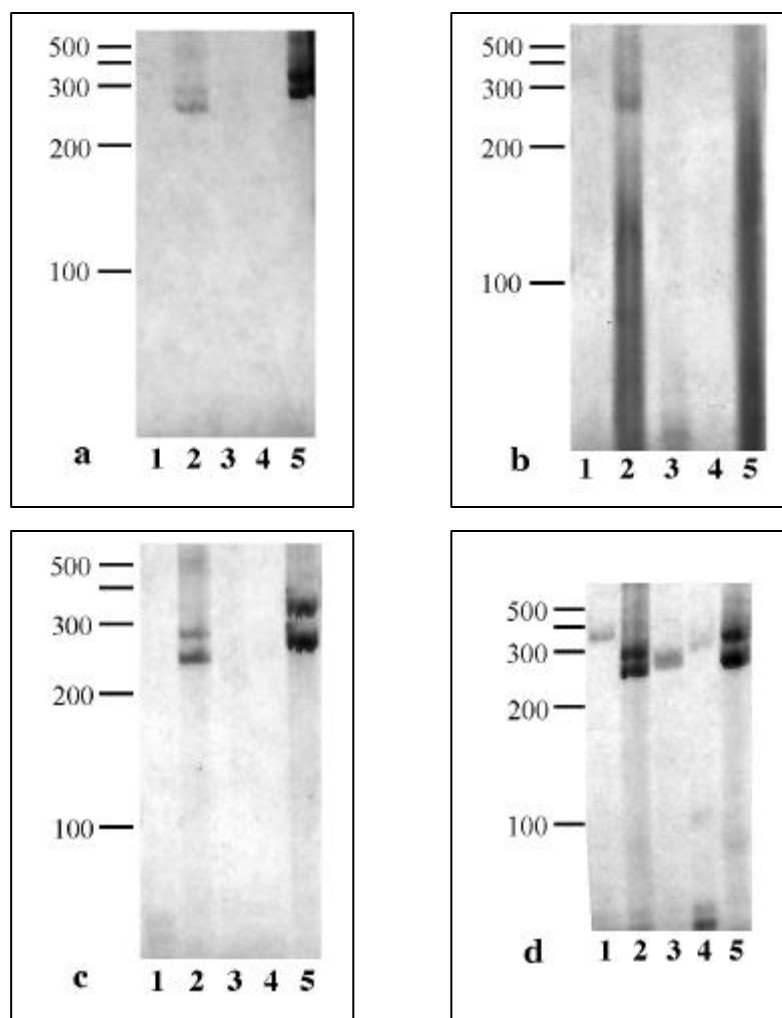


Abb. 4.30 a-d: 5%-ige PAA-Gele der Amplifikate des STR-Systems SE33 der aus Paraffinschnitten extrahierten DNA. 1 – 5: Proben 1 – 5; a: Extraktion nach Protokoll I; b: Extraktion nach Protokoll II; c: Extraktion nach Protokoll III; d: Extraktion nach Protokoll IV.

Die hochauflösende Kapillarelektrophorese im automatischen Sequenzierer (s. 3.2.5), ergab für die Proben 2 und 5 im STR-System SE33, soweit nachweisbar, übereinstimmende Befunde. Für Probe 1 ergab sich eine Differenz zwischen den Ergebnissen der Isolationen nach Protokoll III und IV. Die durch Isolation nach Protokoll IV gewonnenen Merkmale der Proben 3 und 4 blieben mangels alternativer Isolationserfolge unbestätigt (Tab. 4.14).

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
Protokoll I	./.	12 / 21	./.	./.	16 / 31,2
Protokoll II	./.	12 / 21	./.	./.	./.
Protokoll III	18	12 / 21	./.	./.	16 / 31,2
Protokoll IV	29,2 / 30,2	12 / 21	14,2 / 18	21,2 / 22	16 / 31,2
Protokoll V	./.	./.	./.	./.	./.

Tab. 4.14: Merkmale im STR-System SE33 der Proben 1 – 5 nach Durchführung der Protokolle I – V.

4.3.2 DNA-Extraktion aus Urin

Zur DNA-Analyse von Urin-Proben wurden zwei Isolationsmethoden getestet. Einerseits wurde die von der Firma Qiagen (Hilden) vorgeschlagene Methode zur DNA-Isolation mit QIAamp[®] – Säulen angewandt. Außerdem wurde eine in der eigenen Arbeitsgruppe entwickelte Methode eingesetzt. Diese beruht auf einem Zentrifugationsschritt, gefolgt von einer Zell-Lyse und einer Diatomeenaufreinigung (s. 3.2.1.7).

Um die Anwendbarkeit der beiden Methoden für rechtsmedizinische Belange zu prüfen wurden eine frische (U1), eine einen Monat bei 4 °C gelagerte (U2) und eine drei Monate bei 4 °C gelagerte Urin-Probe (U3) beiden Isolationsmethoden unterzogen.

Der Erfolg der Isolation wurde durch eine anschließende PCR mit dem AmpFISTR[®] SGM plus[™]-Kit (Applied Biosystems) überprüft (3.2.4). Für die PCR wurden 5 µl

DNA-Lösung eingesetzt. Ein niedrigauflösenden Polyacrylamidgel (3.2.7.1) wurde zur Darstellung des Ergebnisses verwendet.

Die Isolation mit dem Kit der Firma Qiagen zeigte keine positiven Amplifikationsergebnisse, wohingegen die Isolation durch einfaches Zentrifugieren in allen drei Fällen typisierbare Befunde erbrachte.

Das Amplifikationsergebnis wird von der frisch entnommenen Urinprobe hin zur drei Monate alten Probe deutlich schwächer. Dieses Nachlassen der Signalstärke betrifft, soweit dies im PAG erkennbar ist, alle Systeme. Systeme mit vergleichsweise kleinen Fragmentlängen (< ca. 150 bp) und mit großen Längen (> ca. 300 bp) sind hierbei besonders stark in Mitleidenschaft gezogen (Abb. 4.31).

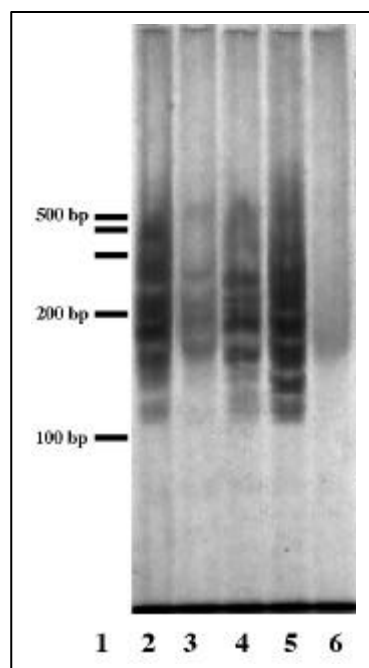


Abb. 4.31: 5 %iges PAA Gel der Urin-Proben nach DNA-Extraktion durch Zentrifugation und Diatomeenaufreinigung. 1: Längenstandard; 2: + Kontrolle; 3: U3; 4: U2; 5: U1; 6: - Kontrolle

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss im ABI-310 Sequenzierer aufgetrennt (3.2.7.2). In allen STR-Systemen war ein deutlicher Rückgang der Signalstärken sichtbar. Nur in den gelb markierten STR-Systemen D19S433, TH01 und FGA konnten auch nach drei Monaten noch alle Merkmale festgestellt werden. In anderen STR-Systemen waren schon zum Teil nach einmonatiger Lagerung Ausfälle einzelner Allele (z. B. D21S11) bzw. zusätzliche falsche Allele (z. B. D3S1358) feststellbar. Das System D2S1338 ließ sich sogar schon aus dem frisch entnommenen Urin nicht

mehr zweifelsfrei typisieren. Ein Zusammenhang zwischen Größe des jeweiligen Systems und Verlust der Typisierbarkeit war nicht feststellbar. So ergab das vergleichsweise große System FGA auch nach drei Monaten noch verwertbare Befunde, während die kleinen Systeme D3S1358 und D8S1179 hier schon keine eindeutige Allelzuordnung mehr zuließen (Tab. 4.15).

System	D3S1358	VWA	D16S539	D2S1338	D8S1179
Größe	114-142 bp	157-209 bp	234-274 bp	289-341 bp	128-172 bp
Vergleich	17 / 18	16 / 18	9 / 10	20 / 23	11 / 13
U1	17 / 18	16 / 18	9 / 10	20 / (23)	11 / 13
U2	17 / 18	16 / 18	9 / 10	- / -	11 / 13
U3	(15) / 17 / 18	16 / (17)	(9) / (10)	- / -	11 / 13 / (14)

System	D21S11	D18S51	D19S433	TH01	FGA
Größe	187-243	265-345	106-140	165-204	215-353
Vergleich	28 / 32	12 / 15	15	7 / 9,3	19 / 20
U1	28 / 32	12 / 15	15	7 / 9,3	19 / 20
U2	(28)	12 / 15	15	7 / 9,3	19 / (20)
U3	- / -	12 / ?	15	7 / 9,3	19 / 20

Tab. 4.15: Allelübersicht der unterschiedlich alten Urin-Proben im SGM-Kit. U1: Frisch entnommener Urin, U2: 1 Monat alter Urin, U3 drei Monate alter Urin. Die Angaben in bp beziehen sich jeweils auf den Größenbereich des jeweils betrachteten STR-Systems.

4.3.3 DNA-Extraktion aus Geweben

Bei der Identifizierung von Leichen oder bei der Abstammungsbegutachtung in Fällen, in denen ein Elternteil verstorben ist, kann die Entnahme und Untersuchung von Gewebeproben weiterhelfen. Die Etablierung einer schnellen und effizienten Methode zur DNA-Isolation aus Geweben war auch Teil der vorliegenden Arbeit. Zum Einsatz für die DNA-Isolation kam an Weichgewebe wegen der relativen Fäulnisresistenz vor allem Skelettmuskulatur. Die DNA wurde auf zwei unterschiedliche Arten isoliert. Eine Möglichkeit ist die Behandlung mit dem kommerziell erhältlichen TriFast™ (Peqlab, Erlangen; s. 3.2.1.3). Eine andere eingesetzte Isolationsmethode beruht auf einer Modifikation der Isolation aus Vollblut (s. 3.2.1.4).

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden in mehreren Fällen DNA-Isolationen aus Gewebe durchgeführt. Beispielhaft sollen hier nur vier Fälle behandelt werden. Es handelt sich um Gewebe von Leichen mit geschätzten Liegezeiten von drei Tagen,

4 – 5 Tagen (nach Entnahme in Ethanol gelagert), einem Monat im Winter und einem Monat im Sommer.

Zur Erfolgsüberprüfung der beiden Isolationsmethoden wurde die DNA photometrisch vermessen (s. 3.2.3) und jeweils 1 µl des Extraktes in eine PCR eingesetzt (s. 3.2.4). Das PCR-Produkt des hierfür verwendeten SGM plus™-Kits wurde in einem 5 %igen Polyacrylamidgel (s. 3.2.7.1) aufgetrennt.

Zwischen den beiden zur Untersuchung verwendeten Isolationsmethoden waren keine qualitativen Unterschiede feststellbar. Insgesamt wird aber deutlich, dass eine erfolgreiche PCR nur in einem relativ kurzen Zeitraum möglich ist. Eine Liegezeit von einem Monat bringt auch im Winter schon einen deutlichen Rückgang der Bandenstärken mit sich. Die gleiche Liegezeit im Sommer macht hingegen eine Erhebung des Merkmalsmusters unmöglich (Abb. 4.32).

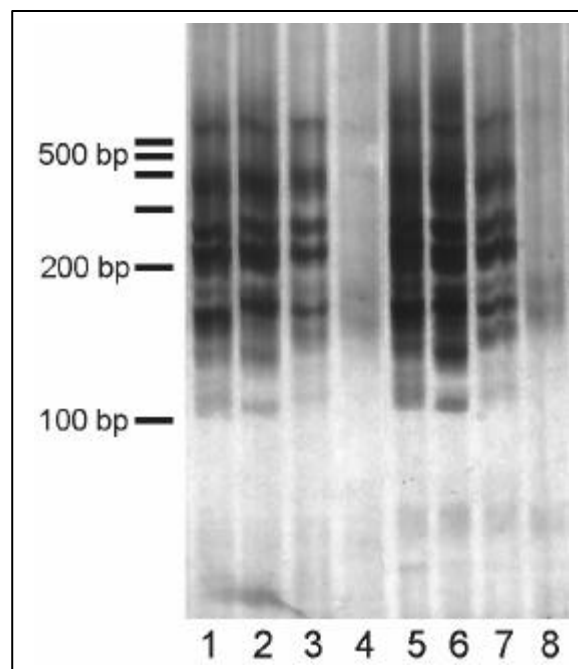


Abb. 4.32: 5 %iges PAA-Gel der SGM-Amplifikate von Gewebeproben. 1 – 4: Proben 1 – 4 nach Extraktion mit Trifast; 5 – 8: Proben 1 – 4 nach Extraktion durch Aussalzen.

4.3.4 DNA-Extraktion aus Knochengewebe

Zur Merkmalsbestimmung in Fällen längerer Leichenliegezeit ist es in der Regel nicht mehr möglich, aus Weichgewebematerial typisierungsfähige DNA zu isolieren (s. 4.3.3). Hier war es notwendig, eine geeignete Methode für die DNA-Isolation aus Knochenmaterial zu finden und zu etablieren.

Als Probenmaterial wurden aus der Routinepraxis beispielhaft vier Knochenproben ausgewählt. Tabelle 4.16 gibt einen kurzen Überblick über die jeweiligen Lagerungsbedingungen der Proben.

	Liegezeit	Ort	Jahreszeit
Probe 1	ca. 2 Monate	Wasser	Winter
Probe 2	ca. 4 Monate	Wasser	Winter
Probe 3	ca. 3 Monate	Wohnung	Sommer
Probe 4	> 6 Monate	Wald	unbestimmt

Tab. 4.16: Lagerungsbedingungen der untersuchten Knochenproben

Die drei Isolationsmethoden für Knochenmaterial aus 3.2.1.6 wurden auf ihre Brauchbarkeit für rechtsmedizinische Belange untersucht. Zudem kam die Isolation aus Geweben mit TriFast™ zum Einsatz (s. 3.2.1.3). Für diese Methode wurde jedoch ausschließlich auf Knochenmark zurückgegriffen. Der Erfolg der DNA-Isolation wurde wiederum mittels Multiplex-PCR unter Verwendung des AmpFISTR® SGM plus™-Kits bestimmt (s. 3.2.4.). In die PCR eingesetzt wurden 5 ng DNA, soweit eine photometrische Messung (s. 3.2.6) möglich war. Andernfalls wurden 5 µl des gewonnenen DNA-Extraktes in die PCR gegeben.

Die Isolation aus Knochenmark mit TriFast™ war nur bei Probe 1 erfolgreich. Bei Proben mit längerer Liegezeit waren allenfalls einzelne Merkmale bestimmbar.

Bei der Extraktion aus Knochen führte die Methode nach Höss und Pääbo (1993) in keinem Fall zu einem messbaren Ergebnis. Die Methoden nach Holland et al. (1993) und Prado et al. (1997) führten zu positiven Amplifikationsergebnissen bei Probe 1.

Nur die Methode nach Holland erbrachte volle DNA – Profile im SGM™-Kit für die Proben 2 und 3. Bei Probe 4 war es auch mit der Holland-Methode nur möglich, ein fragmentarisches Profil zu erstellen (Tab 4.17). Soweit die jeweiligen Extraktionen erfolgreich verliefen, waren keine unterschiedlichen Befunde zwischen den einzelnen Isolationsmethoden feststellbar.

System	D3S1358	VWA	D16S539	D2S1338	D8S1179
Größe	114-142 bp	157-209 bp	234-274 bp	289-341 bp	128-172 bp
Probe 1	15 / 18	17 / 18	12 / 13	17 / 19	10 / 12
Probe 2	14 / 17	16 / 16	11 / 13	18 / 19	12 / 13
Probe 3	17 / 19	16 / 18	11 / 13	16 / 18	13 / 15
Probe 4	15 / 16 / 17	- / -	9 / 11 / 12 / 14	- / -	12 / 13 / 14 / 15

System	D21S11	D18S51	D19S433	TH01	FGA
Größe	187-243	265-345	106-140	165-204	215-353
Probe 1	30 / 31	10 / 17	12 / 15	7 / 9,3	20 / 27
Probe 2	28 / 31	13 / 14	13 / 14	7 / 9,3	20 / 23
Probe 3	30 / 31	12 / 13	13 / 16	6 / 9	19 / 21
Probe 4	29 / 32,2	12 / 14	12 / 16	6 / 7 / 8 / 9 / 9,3	20 / 21 / 22

Tab. 4.17: Analyse-Ergebnisse der untersuchten Knochenproben nach PCR im SGM-Multiplex (Applied Biosystems).

5 Diskussion

5.1 Mitochondriale DNA

Die Haplotypen von 198 Unterfranken wurden anhand der hypervariablen Region 1 erschlossen. Bei 180 Unterfranken wurde zusätzlich die hypervariable Region 2 untersucht. Ziel dieser Untersuchung war es, einen Überblick über die Haplotypenverteilung innerhalb dieser Population zu erhalten und damit die Aussagekraft der mitochondrialen DNA insbesondere für rechtsmedizinische Belange zu evaluieren. Da innerhalb der mitochondrialen DNA keine Rekombinationsvorgänge zu beobachten sind und nur die mütterliche DNA an die Nachkommen weitergegeben wird, fließt in die Häufigkeitsbestimmung eines Merkmals nur jeweils der gesamte Haplotyp ein. Um eine größtmögliche Aussagekraft der erhobenen Daten zu erzielen, wurden diese in anonymisierter Form an die mitochondriale DNA Datenbank D-Loop BASE in Magdeburg weitergegeben (Wittig et al. 2000). Diese ist eine Gemeinschaftseinrichtung von 12 mitteleuropäischen rechtsmedizinischen Instituten. Mit den eigenen Daten zusammen umfasst die dortige Datenbank derzeit ca. 1.500 Datensätze. Da laut Information des dortigen Datenbankadministrators nach wie vor immer neue Haplotypen eingehen, ist bisher nicht abzusehen, ab wie vielen Datensätzen adäquate Merkmalshäufigkeiten für einzelne Haplotypen angegeben werden können.

5.1.1 Interpretation problematischer Sequenzen

Heteroplasmien erschweren die Interpretation von Merkmalsmustern erheblich. Durch Punktmutation hervorgerufene Heteroplasmien, wie in Abb. 4.1, könnten auch durch Überlagerung zweier Spuren von Personen mit ähnlichem Merkmalsmuster vorgetäuscht sein. Abgeschwächte Befunde dieser Art können auch durch fehlerhafte Matrizen erzielt werden. Die erhobenen Rohdaten werden in diesem Fall vom an den Sequenzierer angeschlossenen Rechner nicht richtig berechnet. Obwohl nur die einzelnen Farben nicht in das richtige Verhältnis gesetzt wurden, wird bei bestimmten

Nukleotiden immer ein gewisser Anteil eines anderen Nukelotids festgestellt. Um eine derartige Heteroplasmie zu verifizieren, ist es daher nötig, zumindest die Sequenz in der Gegenrichtung zu überprüfen. Insgesamt ist sogar eine neue DNA-Isolation wünschenswert, um mögliche Kontaminationen mit fremder DNA auszuschließen.

Problematisch in anderer Hinsicht sind die Längenpolymorphismen, insbesondere in der HV1. Hier kann man durch ein Sequenzieren der Gegenrichtung die Basenabfolge rekonstruieren. Es wird also von beiden Seiten an die Abbruchstelle (Abb. 4.3) heransequenziert. Eventuell auftretende Problemfälle, wie Heteroplasmien, sind aber nicht verifizierbar. Immer wieder auftretende systematisch-technische Fehler, wie zum Beispiel Luftblasen in der Kapillare oder ein „Springen“ der Kapillare produzieren über einige Basenpaare hinweg nicht zu interpretierende Sequenzen. Im schlimmsten Fall hat dies zur Folge, dass die Probe mehrfach einem Analyselauf unterzogen werden muss, bis eine eindeutig interpretierbare Sequenz zur Verfügung steht. Auch verliert man zum Teil wertvolle Informationen. Nur bei hochreiner, hochmolekularer DNA ist es möglich, von der Primeransatzstelle an die gesamte Sequenz zu bestimmen. Ist die zu untersuchende DNA verunreinigt bzw. teilweise degradiert, wie es bei Spurenfällen auch nach intensiver Aufreinigung regelmäßig der Fall ist, so ist die Sequenz innerhalb der ersten 100 Basenpaare meist aufgrund von Sequenzüberlagerungen nicht mehr interpretierbar. Der Einsatz des Gegenprimers ermöglicht häufig dennoch eine Interpretation der betreffenden Daten. Ein Sequenzabbruch wie in Abb. 4.3 oder 4.6 unterbindet diesen Versuch jedoch effektiv. So resultiert also eine Verkürzung der interpretierbaren Sequenz zum Teil um über 200 bp, was bei einer Gesamtlänge des untersuchten Bereichs von 418 bp durchaus erheblich ist.

Der Einsatz von Primern, die am C-Trakt zwischen den Positionen 16.184 und 16.193 anlagern (Abb. 4.4), ermöglicht es in derartigen Fällen dennoch, die gesamte Sequenz zu rekonstruieren.

Für die Interpretation der Längenpolymorphismen in der HV2 (Abb. 4.6) genügt die Sequenzierung in der Gegenrichtung. Die Sequenz jenseits des C-Traktes ist zwar nicht leicht interpretierbar, aber die Sequenzierung bricht zum einen nicht ab und ist zum anderen durch Abgleich mit der Gegensequenz eindeutig zuzuordnen.

Die Sequenzüberlagerung zwischen den Positionen 16.143 und 16.152 (Abb. 4.7) und deren Auflösung durch Einsatz eines geeigneten Primers (H16251 oder H16430), wie in Abbildung 4.22 gezeigt, lässt den Fehlschluss zu, dass es günstiger wäre, direkt auf einen der beiden Primer zurückzugreifen. Nachteilig ist jedoch, dass der Primer H16251 zu einer Sequenzverkürzung um 150 bp führt und eine zusätzliche Sequenzierungsreaktion für die übrige HV1 nötig macht. Der Primer H16430, der gegenüber Primer H16395 die Sequenzierung eines größeren Bereiches ermöglicht, da er weiter außerhalb dieses Bereiches liegt, weist einen anderen Nachteil auf. Er bindet schwächer an seine Zielsequenz und führt im Regelfall nur bei aus Vollblut isolierter DNA zu geeigneten Ergebnissen. Da derartige Sequenzüberlagerungen aber nur in Ausnahmefällen auftreten, bleibt der standardmäßig eingesetzte Primer H16395 dennoch das Mittel der Wahl.

5.1.2 Sequenzpolymorphismen in einer deutschen Bevölkerungsstichprobe

Sequenzabweichungen zur Referenzsequenz, wie die in allen Haplogruppen regelmäßig auftretende Transition an Position 16.189 (Häufigkeit ca. 1 von 5), können durchaus ein Hinweis auf Hotspots, also mutationsanfälliger Sequenzabschnitte sein. Die Häufigkeiten der vorkommenden Abweichungen zur Referenzsequenz (Abb. 4.10) sind jedoch nicht in jedem Fall als Hotspots zu deuten. Die Transition an Position 16.126 mit einer absoluten Häufigkeit von immerhin 35 aus 198 ist zum Beispiel vielmehr ein Marker für zwei ganze Haplogruppen, nämlich J und T (3.2.8). Neben der Möglichkeit, dass an solchen Häufungspunkten besonders leicht eine Punktmutation auftreten kann, kommt eine derartige Häufigkeit also auch durchaus als Hinweis auf eine phylogenetische Trennung von Haplogruppen in Frage.

Die willkürliche Wahl der als Referenz verwendeten Sequenz wird insbesondere durch die Befunde in der HV2 deutlich. An Position 315.1 trägt jede untersuchte Sequenz ein zusätzliches Cytosin, was auch im Vergleich zu anderen europäischen Daten (Cali et al. 2001 bei Sizilianern und Franzosen, Crespillo et al. 2000 bei Spaniern, Helgason et al. 2001 bei Schotten und Isländern) nicht auf eine häufig in Europa vorkommende Mutation schließen lässt, sondern auf eine seltene Deletion des betreffenden Nukleotids, mit der die Referenzsequenz behaftet ist. Ebenso verhält es

sich mit der Transition von A nach G an Position 263. Mit 179 an dieser Position beobachteten Transitionen erscheint eher die Referenzsequenz und die Sequenz D 179 (Anhang I) die Ausnahme zu sein, als umgekehrt. Auch die Transition an Position 73 mit einer Häufigkeit von 88 aus 180 ist kein Hinweis auf eine besonders variable Position. Vielmehr deutet das Fehlen dieser Transition auf die Haplogruppen H oder V hin. Dieser Befund macht nochmals die Problematik der Wahl der Referenzsequenz deutlich. Betrachtet man nämlich Populationen, die nur wenige Mitglieder der Haplogruppen H oder V aufweisen, so wird hier die relative Häufigkeit einer Transition von A nach G bei fast 100 % liegen. Insgesamt stellt sich die Verteilung in der HV2 schlechter dar. Mit 55 variablen Positionen bei einer Länge von 400 bp ist es schwer möglich, die Aussagekraft der HV1 zu erreichen. Dies ist auch statistisch an den Haplotypendiversitäten festzustellen. Für die HV2 liegen dw_{\min} und dw_{\max} jeweils bei ungefähr 0,01 unter den in der HV1 erreichten Werten (Tab. 4.4). Die erhebliche Steigerung der Diversität unter Einbeziehung beider Regionen macht deutlich, wie wichtig es gerade bei der Untersuchung rechtsmedizinischer Fragestellungen ist, möglichst beide Regionen zu sequenzieren.

Bei Betrachtung der Abbildung 4.12 erkennt man, dass zumindest für die Untersuchung einer deutschen Populationsstichprobe die Wahl einer anderen Referenzsequenz von Vorteil sein könnte. Es wurde keine Sequenz gefunden, die nicht wenigstens zwei Abweichungen von der zugrundeliegenden Referenzsequenz zeigte. Durch Abänderung der Referenzsequenz in der HV2 an den genannten Positionen 263 und 315 könnte eine Verteilung erzielt werden, mit der sogar fünf der untersuchten Sequenzen vollständige Übereinstimmung mit der nun neuen Referenzsequenz zeigen würden.

Dies wäre aber ein ähnlich willkürlicher Akt, wenn man bedenkt, dass diese den Idealtyp der Haplogruppe H verkörpernde Sequenz (3.2.8) weltweit betrachtet selbst eher eine Ausnahme darstellt. Um Verwirrungen durch unterschiedliche Nomenklaturen zu verhindern und nicht zuletzt, um die Leistung des Erstsequenzierers zu honorieren, wird es also aller Voraussicht nach bei der konventionellen Nomenklatur bleiben und nicht zu einer Abänderung der Bezeichnungen, wie von Lutz et al. (1999) vorgeschlagen, kommen.

5.1.3 Sequenzpolymorphismen anderer Populationen

Die Verteilungen der einzelnen Sequenzabweichungen der betrachteten chinesischen, äthiopischen und türkischen Stichproben zur Referenzsequenz (Abb. 4.13 bis 4.15) ergibt insofern keine offensichtlichen Abweichungen von der untersuchten deutschen, als eine ähnliche Streuung über die HV1 hinweg zu erkennen ist. Zu beobachten war jedoch, dass die chinesische und äthiopische Stichprobe eine erheblich höhere Häufigkeit der Transition an Position 16.223 von C nach T aufwies. Dies liegt in engem Zusammenhang damit, dass die kaukasische Stichproben, wozu die deutsche und auch die türkische zu zählen sind, sich hauptsächlich aus der Superhaplogruppe R rekrutieren. Diese umfasst die Haplogruppen H, J, K, T, U und V und stellt somit den überwältigenden Anteil der europäischen Population dar (Simoni et al. 2000). Die afrikanischen Populationen hingegen rekrutieren sich vornehmlich aus der Superhaplogruppe L (Chen et al. 2000), während asiatische Haplotypen wie auch die indianischen (Starikovskaya et al. 1998) in erster Linie der Superhaplogruppe M zuzuordnen sind. Aus diesen beiden Haplogruppen geht die Superhaplogruppe R jedoch durch Transition von T nach C an Position 16.223 hervor.

Die Haplotypdiversitäten der hypervariablen Region 1 in den betrachteten Populationen wurden nach 3.2.9 berechnet. Zum Vergleich mit anderen Europäern wurden zusätzlich bereits veröffentlichte Populationsdaten von Basken (Bertranpetit et al. 1995), Sizilianern (Cali et al. 2001) und Spaniern (Crespillo et al. 2000) hinzugezogen (Tab 5.1).

Population	dw_{\min}	dw_{\max}	n
Deutsche	0,9694	0,9743	198
Chinesen	0,9811	0,9977	60
Äthiopier	0,9613	0,9880	65
Türken	0,9679	0,9758	37
Basken	0,9246	0,9461	42
Sizilianer	0,9092	0,9193	91
Spanier	0,9604	0,9694	118

Tab. 5.1: Haplotypdiversitäten der HV1 innerhalb der betrachteten Populationen.

Die einzelnen in Tabelle 5.1 betrachteten Diversitäten der Haplotypen zeigen deutliche Unterschiede. Dies ist zum Teil sicherlich auf die geringen Stichprobenzahlen mancher untersuchter Populationen zurückzuführen. Aber auch andere Effekte beeinflussen diese Daten. So zeigt die sizilianische Stichprobe in 30 von den untersuchten 106 Fällen keine Abweichungen von der Referenzsequenz. Zum Vergleich sind dies innerhalb der unterfränkischen Population 30 von 180 Probanden. Diese auch bei anderen Autoren beobachtete, im Vergleich zu anderen Populationen hohe Häufigkeit senkt in der Folge die resultierende Diversität. Die enorm hohe Diversität bei der chinesischen Population rührt möglicherweise daher, dass die Proben aus Taiwan stammen. Die Bevölkerung dieser Insel setzt sich aus geschichtlichen Gründen vornehmlich aus Flüchtlingen von Gesamtchina zusammen und ist damit untypisch für eine regional begrenzte Stichprobe.

Um die Diversität der Haplotypen *zwischen* den untersuchten Populationen zu ermitteln, wurden zunächst mit Hilfe des Programms Excel (Microsoft, USA) die Anzahl und Häufigkeit von Sequenzübereinstimmungen zwischen den Populationen bestimmt. Nach 3.2.9 wurde der Wert db_{max} , also die Abschätzung der Haplotypendiversität nach oben, errechnet (Tab. 5.2). Die höchsten Diversitäten mit Werten von jeweils über 0,99 waren hierbei jeweils zwischen den Populationen verschiedener Erdteile und Kontinente zu beobachten, also z. B. beim Vergleich Chinesen / Äthiopier oder Äthiopier / Türken. Die Werte beim Vergleich europäischer Populationen miteinander lagen dagegen zwischen 0,93 (Basken / Sizilianer) und 0,98 (Spanier / Türken).

db_{max}	Deutsche	Türken	Chinesen	Äthiopier	Basken	Sizilianer	Spanier
Deutsche	X	0,9854	0,9992	0,997	0,9657	0,9561	0,9709
Türken	0,9854	X	0,9996	0,9963	0,9822	0,9766	0,9858
Chinesen	0,9992	0,9996	X	0,999	0,9981	0,9994	0,9991
Äthiopier	0,997	0,9963	0,999	X	0,9969	0,9953	0,9974
Basken	0,9657	0,9822	0,9981	0,9969	X	0,9345	0,9572
Sizilianer	0,9561	0,9766	0,9994	0,9953	0,9345	X	0,9433
Spanier	0,9709	0,9858	0,9991	0,9974	0,9572	0,9433	X

Tab. 5.2: Haplotypendiversität zwischen unterschiedlichen Populationen.

Die Diversitäten zwischen unterschiedlichen Populationen müssen jedoch immer im Zusammenhang zu den Diversitäten innerhalb der Populationen selbst gesehen werden. Eine hohe Diversität zwischen zwei verschiedenen Bevölkerungen ist wenig aufschlussreich, wenn die Diversität innerhalb der Bevölkerung selbst noch höher liegt, wie dies beim Vergleich zwischen Spaniern und Sizilianern der Fall ist. Diesem Problem wird Rechnung getragen, indem die Werte innerhalb einer Bevölkerung mit denen zwischen zwei Bevölkerungen in Relation gesetzt werden (Tab 5.3). Die hierfür eingesetzten Werte mw_{max} bzw. mb_{min} errechnen sich nach den Formeln aus 3.2.9.

Die größten Werte ergaben sich beim Vergleich zwischen Chinesen und allen übrigen Populationen mit Werten von über 38. Explizit bedeuten diese Werte, dass es bei zufälliger Wahl z. B. eines Chinesen 151,3 mal wahrscheinlicher ist, diesen der chinesischen Population zuzuordnen als der sizilianischen. Die Werte innerhalb Europas lagen dagegen durchgehend unterhalb 4,2 und erreichten zum Teil sogar Größen >1 . Bei zufälliger Wahl eines Sizilianers ist es also sogar wahrscheinlicher, diesen fälschlicherweise der deutschen Population zuzuordnen als der sizilianischen ($mw_{max} / mb_{min} = 0,7$). Die Werte der äthiopischen Population ($8,7 < X < 24,3$) bewegten sich zwischen diesen beiden Extremen.

mw_{max} / mb_{min}	Deutsche	Türken	Chinesen	Äthiopier	Baske	Sizilianer	Spanier
Deutsche	X	2,1	38,3	10,2	0,89	0,7	1,1
Türken	2,2	X	80,3	8,7	1,8	1,4	2,3
Chinesen	23,6	47,3	X	18,9	9,9	31,5	21
Äthiopier	12,9	10,5	38,7	X	12,5	2,6	14,9
Baske	2,2	4,2	39,7	24,3	X	0,82	1,8
Sizilianer	2,1	3,9	151,3	19,3	1,4	X	1,6
Spanier	1,4	2,8	44	15,2	0,93	0,7	X

Tab. 5.3:Verhältnis der Haplotypdiversitäten innerhalb einer Population (mw_{max} / in den Reihen) zu dem zwischen zu vergleichenden Populationen (mb_{min} / in den Spalten) bei einer Abschätzung nach oben.

Wie bei der Haplotypdiversität innerhalb einer Bevölkerung gibt es auch bei den Wahrscheinlichkeitsrelationen eine Abschätzung nach unten die sich aus dem Verhältnis mw_{min} / mb_{min} errechnet (Tab. 5.4).

mw_{\min}/mb_{\min}	Deutsche	Türken	Chinesen	Äthiopier	Basken	Sizilianer	Spanier
Deutsche	X	1,8	32,1	8,6	0,75	0,59	0,88
Türken	1,7	X	60,5	6,5	1,8	1	1,7
Chinesen	2,9	5,8	X	2,3	1,2	6,7	2,6
Äthiopier	4	3,4	12	X	3,9	2,6	4,6
Basken	1,6	3	28,4	17,4	X	0,82	1,3
Sizilianer	1,8	3,4	134,5	17,2	1,2	X	1,4
Spanier	1,1	2,2	34	11,8	0,71	0,54	X

Tab. 5.4: Verhältnis der Haplotypdiversitäten innerhalb einer Population (mw_{\max} / in den Reihen) zu dem zwischen zu vergleichenden Populationen (mb_{\min} / in den Spalten) bei einer Abschätzung nach unten.

Auffallend in den Tabellen 5.3 und 5.4 ist die enorme Spannweite mancher Befunde. Wählt man beispielsweise aus der sizilianischen Stichprobe einen beliebigen Datensatz und versucht diesen der chinesischen oder sizilianischen Population zuzuordnen, so ist es höchstens 31,5 mal (mindestens 6,7 mal) wahrscheinlicher diese auch der sizilianischen Stichprobe zuzuordnen als der chinesischen. Im umgekehrten Fall hingegen ist es maximal 151,3 mal (minimal 134,5 mal) so wahrscheinlich, einen chinesischen Haplotyp auch der chinesischen Stichprobe zuzuordnen als der sizilianischen. Derartige Wertschwankungen sind in sehr geringerem Umfang auch innerhalb der betrachteten europäischen Populationen feststellbar. So ist es nur höchstens 0,7 mal (mindestens 0,59 mal) so wahrscheinlich, einen sizilianischen Haplotyp auch der sizilianischen Bevölkerungsstichprobe zuzuordnen statt der deutschen; umgekehrt hingegen ist es höchstens 2,1 mal (mindestens 1,8 mal) wahrscheinlicher, einen deutschen Haplotyp auch der deutschen Stichprobe zuzuordnen. Die Unterschiede zwischen den meisten hier betrachteten Populationen schwanken erheblich, je nach dem von welcher Population aus der Vergleich stattfindet. Festzuhalten ist aber, dass sich die europäischen einschließlich der türkischen Bevölkerungsstichproben soweit ähneln, dass es nicht auffallen würde, sollte zum Beispiel ein Sizilianer fälschlicherweise als Deutscher eingeordnet werden. Andererseits weist die chinesische Stichprobe eine so hohe Diversität auf, dass die resultierenden Vergleichswerte mit anderen Populationen erheblich schwanken. Im Vergleich mit den Sizilianern wird wie bereits erwähnt ein Wahrscheinlichkeits-

verhältnis von bis zu 151,3 erreicht, während dieses im Vergleich zur deutschen Stichprobe maximal 38,3 beträgt und damit einen ähnlichen Wert wie im Vergleich mit der äthiopischen Stichprobe aufweist (38,7).

Die hohen Diversitäten innerhalb und zwischen den verschiedenen Populationen machen es in der Folge auch schwer, zumindest bei den vorliegenden Stichprobengrößen, Verwandtschaftsbeziehungen zwischen einzelnen Populationen bestimmen zu können. Die Sequenzierung der hypervariablen Regionen erweist sich damit als ein Mittel, anhand dessen man bei genügend großen Populationsstichproben zwar zu einzelnen Haplotypen Häufigkeiten angeben kann, die rechtsmedizinischen Bedürfnissen entsprechen. Zur Erstellung phylogenetischer Stammbäume hingegen, die möglicherweise Rückschlüsse auf Herkunft und Wanderungsbewegungen einzelner Populationen ziehen lassen, erscheint diese Methode als zu stark differenzierend.

Abschließend bleibt also festzustellen, dass es, zumindest bei der hier untersuchten Stichprobengröße nicht möglich ist, anhand einer einzelnen europäischen Sequenz der HV1 die genetische Herkunft des Probanden zu bestimmen. Dies wäre insbesondere deswegen ein zweifelhaftes Unterfangen, da immer die Möglichkeit besteht, dass zum Beispiel eine Ahnin vor mehreren Generationen aus einer asiatischen oder afrikanischen Population nach Europa migriert ist – es seien hier nur beispielhaft größere Bevölkerungsbewegungen wie der Einfall der Hunnen nach Europa oder die Völkerwanderungen der Germanen bis nach Afrika erwähnt.

Die stark ausgeprägte Homogenität zwischen verschiedenen europäischen Populationen wurde auch schon von anderen Autoren beobachtet (Helgason et al. 2001, Richards et al. 2000) und auf das wiederholte Zusammendrängen und einer daraus folgenden Durchmischung der europäischen Populationen während der vergangenen Eiszeiten auf kleine Rückzugsgebiete zurückgeführt.

5.1.4 Haplogruppenpolymorphismen

Die Sequenzierung der hypervariablen Regionen ist wie oben erwähnt scheinbar nur bedingt geeignet, um anhand kleiner Stichproben Verwandtschaftsbeziehungen zwischen verschiedenen Populationen zu ermitteln. Dies liegt sicherlich auch daran,

dass die gewonnenen Daten zu aussagekräftig sind; Populationsdaten, die schon innerhalb einer Bevölkerungsgruppe enorme Diversitäten aufweisen, sind schwer vergleichbar, wenn die Diversitäten zu anderen Populationen in ähnlichen Größenordnungen angesiedelt sind. Die Sequenzierung ist für derartige Fragestellungen zudem eher die Ausnahme.

Zur Bestimmung der verschiedenen Diversitäten wird nicht einheitlich vorgegangen. Häufig wird statt der hier eingesetzten Sequenzierung der hypervariablen Regionen die Diversität auch unter Einsatz von Polymerasekettenreaktion und anschließendem Restriktionsverdau der gewonnenen PCR-Produkte bestimmt. Diese weniger sensitive Methode dient dann zur Einteilung in Klassen von sogenannten Haplogruppen.

Die im Laufe dieser Arbeit erhobenen Sequenzdaten wurden entsprechend der Vorgaben von Simoni et al. 2000 (3.2.8) ihren Haplogruppen zugeordnet (siehe Anhang I bis V). Die Haplogruppenzugehörigkeiten einer indischen Populationsstichprobe wurde direkt der Literatur entnommen (Kivisild et al. 1999). Aus den beobachteten absoluten Häufigkeiten der Haplogruppen wurden die relativen Häufigkeiten für die jeweiligen Populationen errechnet (Tab. 5.5).

	Deutsche	Türken	Äthiopier	Chinesen	Inder
n	198	37	65	60	489
HV	0,444	0,553	0,2	0,1	0,014
JT	0,187	0,21	0,139	0	0,033
K	0,091	0,053	0	0	0,002
L	0,04	0,079	0,431	0	0,002
M	0,01	0	0,062	0,533	0,595
R*	0,015	0	0	0,217	0,184
U	0,171	0,053	0,154	0,033	0,139
IWX	0,035	0,053	0,015	0,117	0,01

Tab. 5.5: Relative Häufigkeiten der Haplogruppen innerhalb der angegebenen Populationen. Die eng verwandten Haplogruppen H / V, J / T und I / W / X sind der besseren Übersicht wegen jeweils zusammengefasst.

Wie insbesondere bei der grafischen Darstellung der Haplogruppenverteilung deutlich wird, bildet die Haplogruppe H bei Türken und Unterfranken den größten Anteil an der Bevölkerung. Bis auf wenige Ausnahmen konnte der übrige Bevölkerungsanteil bei beiden Populationen der Superhaplogruppe R (Haplogruppen H, J, K, T, U und V) zugeordnet werden (Abb. 5.1 und 5.2). Bei den anderen betrachteten außereuropäischen Populationen spielt die Haplogruppe H hingegen nur eine untergeordnete Rolle. Zwar konnte bei Äthiopiern, Chinesen und Indern durchaus ein beträchtlicher Anteil der Superhaplogruppe R zugeordnet werden. Die größte Haplogruppe bildete bei der äthiopischen Stichprobe jedoch die Gruppe L3 (Abb. 5.3) und bei der chinesischen und indischen Stichprobe die Superhaplogruppe M (Abb. 5.4 und 5.5).

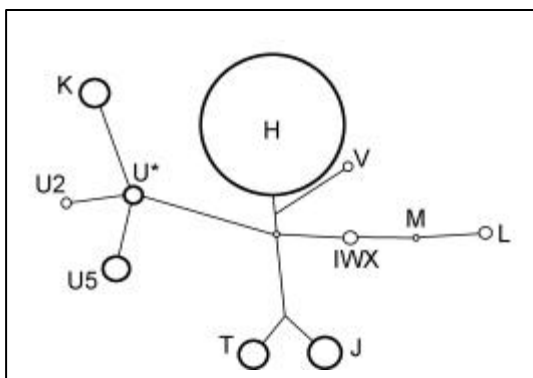


Abb. 5.1: Haplogruppenverteilung der deutschen Populationsstichprobe.

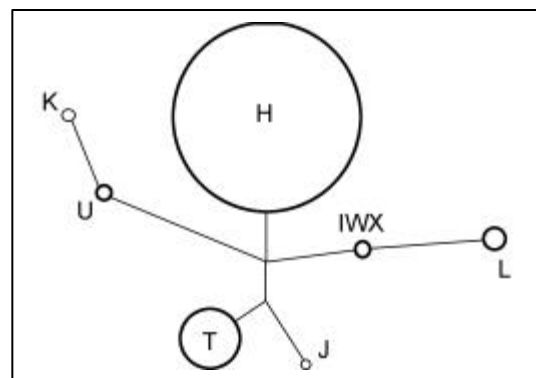


Abb. 5.2: Haplogruppenverteilung der türkischen Populationsstichprobe.

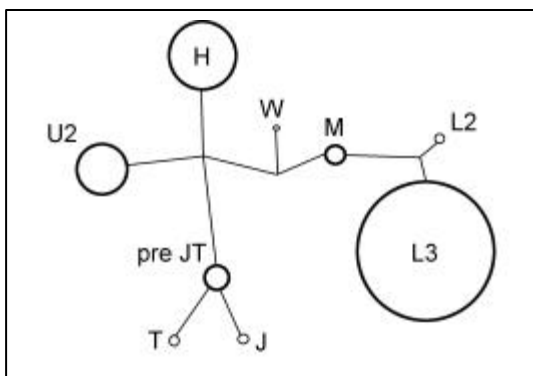


Abb. 5.3: Haplogruppenverteilung der äthiopischen Populationsstichprobe

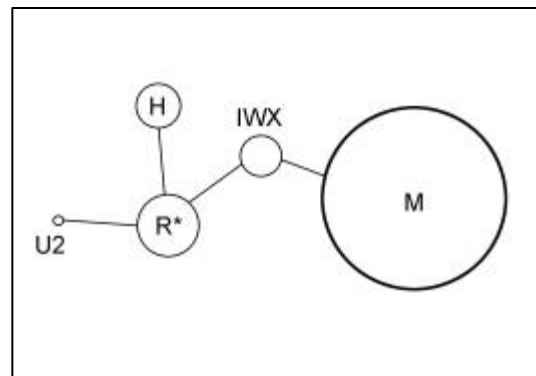


Abb. 5.4: Haplogruppenverteilung der chinesischen Populationsstichprobe

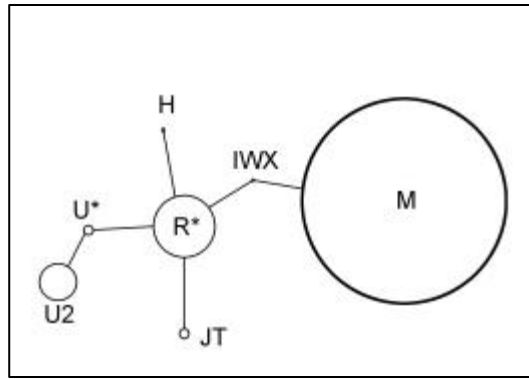


Abb. 5.5: Haplogruppenverteilung der indischen Populationsstichprobe (Kivisild et al.).

Bei Betrachtung der Abbildungen 5.1 bis 5.5 erkennt man die deutlichen Ähnlichkeiten der deutschen und türkischen Haplogruppenverteilung. Insbesondere die stark vertretene Haplogruppe H und die Verteilung der meisten übrigen Probanden auf die Haplogruppen JT und UK scheinen diese beiden Gruppen zu charakterisieren. All diese Haplogruppen sind zwar bei der äthiopischen Bevölkerungsstichprobe auch vorhanden, es dominiert hier aber die Unterhaplogruppe L3, während bei Chinesen und Indern die Haplogruppe M dominant ist.

Die Haplotypendiversitäten in ihren Abschätzungen nach unten (dw_{\min}) bzw. nach oben (dw_{\max}) wurde anhand der jeweiligen relativen Häufigkeiten berechnet (s. 3.2.9 / Tab. 5.6).

	Deutsche	Türken	Äthiopier	Chinesen	Inder
dw_{\min}	0,7272	0,6354	0,7271	0,644	0,5914
dw_{\max}	0,7285	0,6529	0,7389	0,661	0,5924

Tab. 5.6: Haplotypendiversitäten bezüglich der Haplogruppen.

Die Zusammenfassung der Sequenzen in Haplogruppen macht sich natürlich sofort in der Senkung der einzelnen Diversitäten innerhalb der Bevölkerungen

Der Vergleich zwischen den betrachteten Populationen ergab wiederum die Haplotypendiversität db_{\max} (siehe 3.2.9) zwischen zwei unterschiedlichen Populationen. Die Diversitäten zwischen den asiatischen Populationen und den übrigen Bevölkerungsgruppen fielen mit Werten von jeweils über 0,93 am größten

aus. Deutlich geringer lagen die Diversitäten zwischen Äthiopiern und Deutschen (0,84) bzw. Türken (0,79). Die Diversität zwischen Deutschen und Türken zeigte mit 0,7 einen noch niedrigeren Wert und lag damit sogar im Bereich der Diversitäten innerhalb dieser beiden Populationen (Tab. 5.7).

db_{\max}	Deutsche	Türken	Chinesen	Äthiopier	Inder
Deutsche	X	0,6959	0,9373	0,84	0,9454
Türken	0,6959	X	0,9368	0,7883	0,9772
Chinesen	0,9373	0,9368	X	0,9401	0,6358
Äthiopier	0,84	0,7883	0,9401	X	0,9333
Inder	0,9545	0,9772	0,6358	0,9333	X

Tab. 5.7: Haplotypendiversitäten zwischen den einzelnen betrachteten Populationen.

Hieraus wurde wiederum das Verhältnis zwischen einer Abschätzung der Haplotypendiversität nach oben innerhalb einer Population und der Haplotypendiversität zwischen zwei verschiedenen Populationen mw_{\max}/mb_{\min} bestimmt (s. 3.2.9). Die sich hierbei ergebenden Werte lagen beim Vergleich der asiatischen Populationen mit den Bevölkerungen anderer Erdteile jeweils über 4. Der höchste Wert ergab sich zwischen Indern und Türken. Demnach ist es 16 Mal wahrscheinlicher bei zufälliger Wahl eines Inders diesen anhand der Haplogruppen auch der indischen Bevölkerung zuzuordnen, als der türkischen. Die Vergleichswerte zwischen Türken und Deutschen lagen dagegen nahe bei 1,0 und die zwischen Äthiopiern und Europäern zwischen 1,3 und 1,7 (Tab. 5.8).

mw_{\max}/mb_{\min}	Deutsche	Türken	Chinesen	Äthiopier	Inder
Deutsche	X	0,89	4,35	1,71	6
Türken	1,2	X	5,77	1,72	16
Chinesen	5,68	5,63	X	5,94	0,98
Äthiopier	1,71	1,29	4,56	X	4,09
Inder	8,98	17,92	1,12	6,13	X

Tab. 5.8: Abschätzung nach oben des Verhältnisses der Wahrscheinlichkeiten einer Übereinstimmung innerhalb einer Population und zwischen zwei Populationen bei Haplogruppen.

Die entsprechende Abschätzung nach unten ergab sich analog zur Abschätzung nach oben unter Verwendung von mw_{\min} (siehe 3.2.9).

mw_{\min}/mb_{\min}	Deutsche	Türken	Chinesen	Äthiopier	Inder
Deutsche	X	0,89	4,33	1,7	4,97
Türken	1,14	X	5,49	1,64	15,22
Chinesen	5,41	5,36	X	5,66	0,93
Äthiopier	1,63	1,23	4,35	X	3,9
Inder	8,96	17,88	1,12	6,11	X

Tab. 5.9: Abschätzung nach unten bezüglich des Verhältnisses der Wahrscheinlichkeiten einer Übereinstimmung innerhalb einer Population und zwischen zwei Populationen bei Haplogruppen.

Beim Vergleich der Übereinstimmungswahrscheinlichkeiten innerhalb einer und zwischen zwei verschiedenen Populationen in den Tabellen 5.8 und 5.9 ist eine deutliche Milderung der bei der Sequenzierung beobachteten Wertschwankungen festzustellen. Die Verhältnisse stimmen nun von beiden Seiten betrachtet annähernd überein. Auch bestätigt sich der bei Betrachtung der Graphiken 5.1 bis 5.5 gewonnene Eindruck der Haplogruppenverteilungen zwischen den verschiedenen Populationen. Türken und Deutsche sind mit Verhältnissen von annähernd 1 auf Basis der Haplogruppen praktisch nicht voneinander zu unterscheiden. Überraschend ist die vergleichsweise Nähe der äthiopischen Haplogruppenverteilung zu den beiden kaukasoiden mit Werten zwischen 1,3 und 1,7. Im Gegensatz dazu scheint die chinesische Population von den europäischen und der äthiopischen Population mit Verhältniswerten zwischen 5,6 und 5,9 jeweils ungefähr den gleichen Abstand zu haben. Ähnliches ergibt sich auch für die Inder, wobei der Wert 16 beim Vergleich mit den Türken möglicherweise auf die geringe türkische Stichprobengröße und damit einhergehende statistische Ausnahmerecheinungen zurückzuführen ist. Die verhältnismäßig große Nähe zwischen indischer und chinesischer Population ist unter Umständen nur scheinbar. Die Haplogruppe M unterteilt sich im Gegensatz zur Haplogruppe H, in mehrere, klar voneinander abgrenzbare Untergruppen, die jedoch allein durch Sequenzierung der hypervariablen Regionen nicht differenzierbar sind. Dennoch sind all diese Untergruppen desselben phylogenetischen Ursprungs (Chen et

al. 2000), und die Nähe der beiden Populationen im Verhältnis zu den anderen betrachteten Bevölkerungsstichproben ist unverkennbar.

Basierend auf der „out of Africa“-Hypothese lässt sich also davon ausgehen, dass der asiatische Kontinent von Afrika aus entweder erheblich früher besiedelt wurde als Europa, oder dass nur eine verhältnismäßig kleine Gruppe nach Asien zog. Europa hingegen wurde scheinbar erst später oder eben von einer größeren und damit heterogeneren Gruppe besiedelt.

Die „out of Africa“-Hypothese lässt sich allerdings durch derartige Daten *nicht* beweisen. Es ist allein anhand der vorliegenden Zahlen jeder andere Ort genauso als Ursprung der Menschheit vorstellbar.

Untersuchungen, nach denen auf *mitochondrialer* Basis die Herkunft der Menschheit aus Afrika als bewiesen dargestellt werden (Vigilant et al. 1991), sind nicht unumstritten. So sind die zugrundeliegenden Stichprobengrößen der herangezogenen Populationen mit Werten von jeweils ungefähr $n = 20$ bisher bei weitem zu klein, um derartige Aussagen treffen zu können. Noch problematischer ist, dass kein phylogenetischer Baum den Berechnungen zugrundegelegt wurde, sondern ein Baum, der ausschließlich die statistische Nähe einzelner gefundener rezenter Haplotypen zueinander darlegt, ähnlich dem in Abbildung 1.5 dargestellten. Ein phylogenetischer Baum hingegen zeichnet sich dadurch aus, dass er zum einen evolutive Wurzeln, beispielsweise aus Knochenfunden o. ä., mit einschließt, zum anderen sollte immer ein außerhalb des Baumes liegender Bezugspunkt, in diesem Fall z. B. eine Schimpansenpopulation miteingeschlossen werden, um einen hypothetischen evolutiven Vorgänger rekonstruieren zu können (Darlu et al. 1987). Beides ist aber nur schwer möglich, da einerseits die DNA-Isolation aus viele 10.000 Jahre alten Knochenfunden, wie auch diese Arbeit zeigt, kaum praktikabel ist. Die mtDNA der Schimpansen weist andererseits so starke Abweichungen zur humanen mtDNA auf, dass eine hypothetische Vorgänger-mtDNA nicht rekonstruierbar ist.

Ohne Bezug zu geschichtlichen Wanderungsbewegungen sind derartige Daten also kaum verwertbar. Dies gestaltet sich aber bei der viele 10.000 Jahre währenden Geschichte der Menschheit schwer, wenn nicht sogar unmöglich. Die Hauptbeweislast für derartig gelagerte Hypothesen wird also immer bei paläontologischen Funden liegen, anhand derer ja zumindest die „out of Africa“-Hypothese hinreichend belegt ist.

Zur Überprüfung ob eine Einteilung in Haplogruppen auch innerhalb europäischer Populationen aussagekräftige Ergebnisse zeitigt, wurden die Sequenzen der bereits betrachteten Basken (Bertranpetit et al. 1995) und Sizilianern (Cali et al. 2001) ihren entsprechenden Haplogruppen zugeordnet (3.2.8). Außerdem wurde eine weitere deutsche Populationsstichprobe (Südwestdeutschland / Lutz et al. 1998) in Haplogruppen eingeteilt um auch einen innerdeutschen Vergleich zu gewährleisten (Tab. 5.10).

	Deutsche	Deutsche (Lutz et al.)	Sizilianer	Basken	Türken
n	198	188	91	42	37
H	0,414	0,541	0,582	0,548	0,568
I	0,02	0,033	0,022	0	0
J	0,101	0,077	0,077	0,048	0,027
K	0,091	0,093	0,022	0,024	0,054
L	0,04	0	0,011	0	0,081
M	0,01	0,005	0,033	0	0
R*	0,015	0,005	0	0,071	0
T	0,086	0,087	0,11	0,048	0,189
U	0,171	0,131	0,066	0,095	0,054
V	0,03	0,027	0,055	0,119	0
W	0,01	0,011	0	0	0,035
X	0,005	0,011	0,022	0,048	0

Tab. 5.10: relative Häufigkeiten der Haplogruppen innerhalb verschiedener europäischer Populationen.

Wie bei Türken und Unterfranken (Abb. 5.1 und 5.2) ist auch in den übrigen betrachteten europäischen Bevölkerungsgruppen die Haplogruppe H am stärksten vertreten. Die nicht der Haplogruppe H angehörenden Europäer verteilen sich wie bei Türken und Deutschen bereits beobachtet weitgehend auf die anderen Untergruppen der Superhaplogruppe R. Die bei Indern, Chinesen und Äthiopiern aufgetretenen Haplogruppen L und M weisen allenfalls eine geringe Häufigkeit auf (Abb. 5.6 bis 5.8).

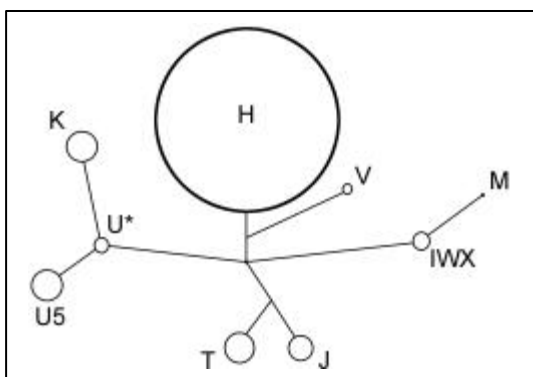


Abb. 4.34: Haplogruppenverteilung der deutschen Populationsstichprobe nach Lutz et al.

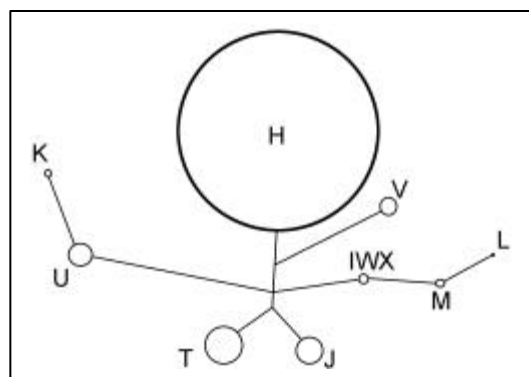


Abb. 4.35: Haplogruppenverteilung der sizilianischen Populationsstichprobe nach Cali et al.

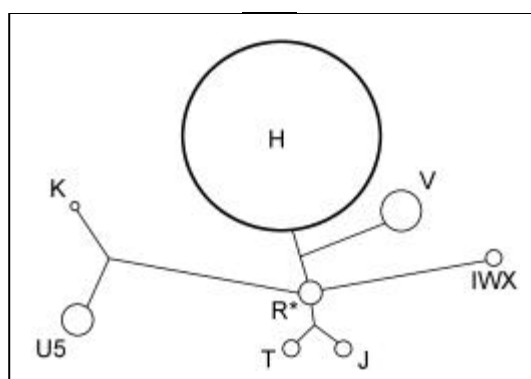


Abb. 4.36: Haplogruppenverteilung der baskischen Populationsstichprobe nach Bertranpetit et al.

Hieraus ergaben sich nach 3.2.9 die Haplotypendiversitäten innerhalb der einzelnen Populationen (Tab 5.11) und beim Vergleich untereinander die Haplotypendiversitäten zwischen den verschiedenen Populationen (Tab 5.12).

	Deutsche	Deutsche (Lutz et al.)	Sizilianer	Basken	Türken
dw_{\min}	0,7701	0,6659	0,6332	0,664	0,6273
dw_{\max}	0,7719	0,6861	0,6398	0,6806	0,6456

Tab. 5.11: Haplotypendiversitäten der Haplogruppen innerhalb europäischer Populationen.

db_{\max}	Deutsche	Deutsche (Lutz et al.)	Sizilianer	Basken	Türken
Deutsche	X	0,7281	0,7256	0,7408	0,7281
Deutsche (Lutz et al.)	0,7281	X	0,6563	0,6769	0,6617
Sizilianer	0,7256	0,6563	X	0,6577	0,6409
Basken	0,7408	0,6769	0,6577	X	0,6719
Türken	0,7281	0,6617	0,6409	0,6719	X

Tab. 5.12: Haplotypendiversitäten zwischen unterschiedlichen europäischen Bevölkerungen.

Die Wahrscheinlichkeitsverhältnisse einer Übereinstimmung innerhalb einer Population und zwischen zwei verschiedenen europäischen Populationen wurden in einer Abschätzung nach oben (mw_{\max}/mb_{\min}) und einer Abschätzung nach unten (mw_{\min}/mb_{\min}) gemäß 3.2.9 errechnet. Die sich hierbei ergebenden Werte lagen alle nahe 1. Eine Ausnahme hiervon bildeten die Werte der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten deutschen (unterfränkischen) Bevölkerungsgruppen. Abweichend von den anderen Populationen ergaben sich hier Werte zwischen 1,23 und 1,37, bei Vergleich mit der von Lutz et al. bzw. der für diese Arbeit untersuchten türkischen Bevölkerungsstichprobe.

mw_{\max}/mb_{\min}	Deutsche	Deutsche (Lutz et al.)	Sizilianer	Basken	Türken
Deutsche	X	0,85	0,84	0,87	0,85
Deutsche (Lutz et al.)	1,23	X	0,97	1,03	0,99
Sizilianer	1,34	1,07	X	1,07	1,02
Basken	1,3	1,04	0,98	X	1,02
Türken	1,37	1,1	1,04	1,14	X

Tab. 5.13: Abschätzung nach oben des Verhältnisses der Wahrscheinlichkeiten einer Übereinstimmung innerhalb einer Population und zwischen zwei europäischen Populationen bei Haplogruppen.

$m_{w_{\min}}/m_{b_{\min}}$	Deutsche	Deutsche (Lutz et al.)	Sizilianer	Basken	Türken
Deutsche	X	0,84	0,83	0,88	0,84
Deutsche (Lutz et al.)	1,15	X	0,91	0,97	0,93
Sizilianer	1,31	1,05	X	1,05	1,06
Basken	1,23	0,99	0,93	X	0,97
Türken	1,3	1,05	0,99	1,08	X

Tab. 5.14: Abschätzung nach unten des Verhältnisses der Wahrscheinlichkeiten einer Übereinstimmung innerhalb einer Population und zwischen zwei Populationen bei Haplogruppen (Europäer).

Der Vergleich der Haplogruppenverteilungen innerhalb kaukasischer Populationsstichproben bestätigt nochmals den Befund bei Vergleich der deutschen mit der türkischen Stichprobe. Bis auf kleine Abweichungen, die unter Umständen mit den jeweiligen geringen Stichprobenzahlen zusammenhängen, haben alle betrachteten europäischen Populationen eine annähernd gleiche Haplogruppenverteilung. Die Werte der Wahrscheinlichkeitsverhältnisse liegen alle annähernd bei 1, was gleichbedeutend damit ist, dass bei blinder Auswahl irgendeines Probanden aus dem europäischen Haplogruppenpool eine Zuordnung zur Ursprungspopulation nicht mehr möglich ist. Kleine Abweichungen der Werte beim Vergleich unterschiedlicher Populationen miteinander sind praktisch ohne Aussagekraft. Dies wird eindrücklich dadurch belegt, dass die größten Abweichungen zwischen den zwei betrachteten deutschen Bevölkerungsstichproben gefunden wurden. Hierbei weisen die in dieser Arbeit untersuchten Unterfranken von den von Lutz et al. (1999) untersuchten Südwestdeutschen nicht einmal für innerdeutsche Verhältnisse eine besonders große geographische Distanz auf.

5.1.5 Anwendungsbeispiel für mitochondriale DNA in der Spurenkunde

Die chromosomalen STR-Systeme und die mitochondrialen hypervariablen Regionen bieten jeweils Vor- und Nachteile, die anhand eines Fallbeispiels verdeutlicht wurden.

Die spurekundliche Untersuchung mitochondrialer DNA ist unter Umständen mit erheblichen Schwierigkeiten verbunden. Dies sind zum einen die geschilderten Interpretationsprobleme insbesondere bei Heteroplasmien. Zum anderen sind die erzielten Merkmalshäufigkeiten bei weitem nicht so aussagekräftig, wie dies durch Aufmultiplizierung der Diversitäten bei den normalerweise eingesetzten STRs (Tab. 4.11) der Fall ist. Die Sequenzierung der beiden interessierenden Regionen bringt auch einen erheblichen Mehraufwand an Arbeitszeit und Materialkosten mit sich.

Da die routinemäßig angewandten Methoden jedoch versagen, soweit nur Spuren wie die oben geschilderten vorliegen, hat sich die Etablierung der Analyse mitochondrialer DNA mehrfach bewährt. Je nach Sachlage des entsprechenden Falles kann die Überführung eines Straftäters den zusätzlichen Mehraufwand rechtfertigen.

Abzuwarten bleibt jedoch, ob sich neueste Ergebnisse zur DNA-Typisierung durch Einsatz von STR-Systemen mit verkürzten Sequenzen bestätigen (Hellmann et al. 2001), und inwieweit die Erfolgsquote dieser Methodik an die bei Analyse mitochondrialer DNA heranreicht.

5.1.6 Ausweitung der mitochondrialen DNA-Analyse auf HVIII und NC 1-4

Zusätzliche variable Positionen der mitochondrialen DNA könnten helfen, die Diversität untersuchter Haplotypen weiter zu erhöhen, was je nach Häufigkeit einzelner Haplotypen durchaus von Interesse wäre. Aus diesem Grund wurden weitere nicht kodierende, also potentiell variable Bereiche der mtDNA auf Divergenzen zur Referenzsequenz untersucht.

Der Sachverhalt, dass keinerlei Differenzen zwischen den hier untersuchten nicht kodierenden Nukleotiden feststellbar waren, besagt selbstverständlich nicht, dass es derartige Differenzen nicht gibt. Die hohe Variabilität, welche die hypervariablen Regionen 1 und 2 auszeichnet, dürfte aber selbst bei Untersuchung einer erheblich größeren Stichprobenzahl, nicht zuletzt aufgrund der geringen Größe der betreffenden Regionen, nicht erreichbar sein.

Die in dieser Arbeit durch Analyse der HV3 gezeigte Möglichkeit der weiteren Unterdifferenzierung von einem aus acht in HV1 und HV2 übereinstimmenden Haplotypen deckt sich mit einer Studie, die mit mehreren anderen Arbeitsgruppen

gemeinsam durchgeführt wurde (Lutz et al. 2000). Wie diese Studie zeigte, war es möglich, aus 24 in HV1 und HV2 übereinstimmenden Sequenzen durch Einsatz der HV3 fünf zusätzliche Haplotypen zu erfassen.

Der zusätzliche Arbeitsaufwand steht jedoch in keinem Verhältnis zur gewonnenen Informationsmenge. Lutz et al. (1997) geben die relative Häufigkeit der variablen Stellen in dieser Region mit 18 % an, also geringer als die von HV1 mit 26 % und HV2 mit 24 %. Demzufolge wird die Sequenzierung der HV3 wohl nicht die Bedeutung erhalten, wie sie den Regionen HV1 und HV2 zukam.

5.1.7 Mutationshäufigkeiten bei der mitochondrialen DNA

Die geringe Stichprobenzahl der Mutter-Kind-Paare lässt selbstverständlich nur geringe Rückschlüsse auf die tatsächliche Mutationsrate innerhalb der hypervariablen Regionen zu. Aber zumindest scheint die Mutationsrate nicht so hoch zu sein, dass die Herstellung von Verwandtschaftsbeziehungen mehrerer Personen über mehrere Generationen hinweg unmöglich würde. Anwendungsbeispiele wie der Fall der Romanovs (Gill et al. 1994) und der Fall Kaspar Hauser (Weichold et al. 1998) belegen diese Vermutung.

Hier lagen die Verhältnisse trotz einzelner Sequenzabweichungen so klar, dass keine Zweifel an der Zuordnung bzw. am Ausschluss der jeweiligen Beteiligten aufkamen.

5.1.8 Speziesbestimmung anhand der mitochondrialen DNA

Die beiden eingesetzten Methoden der RFLP-Analyse des Cytochrom b Genes und der RAPD-PCR des gesamten Genoms zeigen jeweils Bandenmuster, die eine eindeutige Zuordnung der untersuchten Tierarten zulassen. Beide Methoden haben jedoch Vor- und Nachteile. Die RFLP-Darstellung des Cytochrom b Genes ergibt ein klar definiertes Bild von nicht mehr als drei oder vier Banden, was eine optische Zuordnung erheblich erleichtert. In Zweifelsfällen ist ein fragliches Ergebnis zudem durch Sequenzierung des Genes und Recherche in einer Gen-Datei verifizierbar. Identische Bandenmuster müssen aber nicht immer auch gleiche Tierart bedeuten. So bleibt bei Verdau mit AluI nicht nur das menschliche Cytochrom b Gen unversehrt;

Puten und Hühner weisen hier dasselbe Muster auf. Innerhalb einer Spezies ist zudem durchaus ein gewisser Sequenzpolymorphismus feststellbar (Parson et al. 2000). Dies bedeutet, dass unter Umständen zusätzliche Schnittstellen auftreten bzw. verloren gehen könnten. Erst der Einsatz zusätzlicher Restriktionsenzyme oder die Sequenzierung des Bereiches gibt demzufolge vollständige Sicherheit.

Die RAPD - PCR hingegen ist nicht durch Sequenzierung der einzelnen Fragmente verifizierbar. Auch ergeben sich hier teilweise nur schwer interpretierbare Bandenmuster. Der Vorteil der Methode ist hingegen, dass es sehr unwahrscheinlich ist, dass durch reinen Zufall die Bandenmuster unterschiedlicher Tierarten identische Befunde ergeben. Durch zusätzliche hochauflösende Auftrennung z. B. in der Kapillarelektrophorese lassen sich überdies den einzelnen Banden klar die jeweiligen Größen zuordnen, was nach RFLP-Analyse nur unter erheblichem Mehraufwand durch nachträgliche Farbmarkierung der entstehenden Fragmente möglich wäre.

5.2 Etablierung von STR-Systemen

5.2.1 Der Geschlechtsmarker Amelogenin

Zur Geschlechtererkennung auf der Ebene der DNA eignen sich besonders zwischen X- und Y-Chromosom homologe Loci.

Soweit es darum geht, aus einer einfachen Speichel- oder Blutspur das Geschlecht des Spurenlegers zu erschließen, spielt es keine Rolle, welchen der beiden in dieser Arbeit angewandten Geschlechtsmarker man einsetzt. Die PCR-Produkte sind, wie in Abb.4.19 zu sehen, gut sichtbar und in beiden Fällen ist eine Unterscheidung zwischen männlicher und weiblicher Herkunft der Probe eindeutig möglich. Die geringe Größendifferenz zwischen dem X- und dem Y-chromosomalen Marker im Amelogeninsystem bewirkt aber, dass eine Auftrennung in der Kapillarelektrophorese mit diesem System sinnvoller wäre. Man hat im Elektropherogramm (Abb. 4.20) die beiden in Frage kommenden Signale in unmittelbarer Nähe zueinander und kann durch die geringe Größe der Fragmente die meisten verwendeten STR-Systeme im selben Fragmentanalyse-Lauf auftrennen. Und gerade die Auftrennung im hochsensitiven automatischen Sequenzanalysator ermöglicht eine Detektion auch geringer Y-chromosomaler Anteile, wie sie beispielsweise bei Abstrichen nach Sexualdelikten zu erwarten sind. Dem Nachweis Y-chromosomaler Anteile durch X-Y-homologe Systeme sind jedoch Grenzen gesetzt. Der Nachweis Y-chromosomaler Komponenten wird bei vergleichsweise geringem männlichen Anteil an einer Mischspur (5 %) durch präferentielle Amplifikation der im Überschuss vorhandenen X-chromosomalen Komponenten gestört (Zehner und Bohrer 1998).

5.2.2 Die STR-Systeme D3S1358, D8S1179, D18S51 und D21S11

Die autosomalen STR-Systeme D3S1358, D8S1179, D18S51 und D21S11 wurden mit dieser Arbeit vor Ort in die forensische Spurenanalytik eingeführt. Es wurden Populationsdaten einer unterfränkischen Bevölkerungsstichprobe erhoben und mit denen einer US-amerikanischen Kaukasier-Population verglichen.

Die beobachteten Abweichungen waren im einzelnen eher gering und sind z. T. wahrscheinlich auf die geringen Stichprobenzahlen der Unterfränkischen und US-amerikanischen Bevölkerungen zurückzuführen.

Zwar weisen die Systeme D3S1358 und D8S1179 keine besonders gute Verteilung der einzelnen Allele auf (Abb. 4.21 und 4.23); so haben im System D3S1358 die beiden Allele 15 und 16 zusammengenommen eine relative Häufigkeit von 52 %. Zusammen mit den anderen untersuchten Systemen ergibt sich aber dennoch eine beachtliche Diskriminationsstärke von 0,999994 (Tab. 4.11). Dies entspricht der Aussage, dass die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit einer zufälligen Übereinstimmung zweier unverwandter Personen bei 1 : 166.667 liegt. Zudem ist zu bedenken, dass die betrachteten Systeme vor allem als Ergänzung der bereits vor Ort eingesetzten STR-Systeme dienen. Die Kombination mit den üblicherweise hier verwendeten Systemen SE33, TH01, FGA und VWA (Möller et al. 1994, Bäßler et al. 1999) ergibt eine weitaus höhere Diskriminationsstärke, nämlich 0,99999999995. Eine zufällige Übereinstimmung zweier unverwandter Personen hat damit eine Wahrscheinlichkeit von über 1 : 200.000.000.000.

Die untersuchten STR-Systeme bilden also eine aussagekräftige Erweiterung des bisher eingesetzten STR-Spektrums. Insbesondere die Tatsache, dass die Systeme TH01, FGA, VWA, D21S11, D3S1358, D8S1179 und D18S51 in Zukunft für eine europaweite DNA-Datenbank, ähnlich der vom Bundeskriminalamt verwendeten, zum Einsatz kommen sollen, unterstreicht die Wichtigkeit der Etablierung dieser Systeme.

5.2.3 Das gonosomale STR-System DYS385

Das Y-chromosomale STR-System DYS385 wurde anhand einer unterfränkischen Bevölkerungsstichprobe untersucht.

Die Tatsache, dass das System DYS385 sich aus zwei Motiven auf dem Y-Chromosom zusammensetzt, gibt dem System ein untypisches Aussehen; die gewöhnlich auftretenden zwei Signale vermitteln den falschen Eindruck einer Heterozygotie. Gerade dies macht das System aber so wertvoll. Da auf dem Y-Chromosom nur Haplotypen zu beobachten sind, können die einzelnen STRs nicht

aufmultipliziert werden. Um Aussagen über Häufigkeiten einer bestimmten Merkmalskombination zu treffen, muss man demnach den gesamten Y-chromosomalen Haplotyp betrachten. Durch die weite Streuung der möglichen Allelkombinationen im System DYS385 erhöht sich die Aussagekraft einer Merkmalskombination dann erheblich, soweit nicht ausgerechnet der Typ 11-14 vorliegt, der eine relative Häufigkeit von immerhin 33,1 % aufweist. Die Frequenz des Haplotyps 11-14 gemeinsam mit dem haploiden Auftreten des Systems bewirkt also letztlich, dass trotz der breiten Streuung des Systems dessen Diskriminationsstärke mit 0,8735 weit schwächer ausfällt, als dies beim uninformativsten der hier untersuchten autosomalen Systeme D3S1358 mit 0,9221 der Fall ist.

5.2.4 AmpFISTR® Profiler™ (ABI) und die Mutationsrate von STR-Systemen

Anhand des Multiplex-Systems AmpFISTR® Profiler™ (Applied Biosystems) wurden 50 Paare von Müttern mit ihren Kinder untersucht. Eine einzige Mutation im System D3S1358 war nachweisbar. Bedingt durch die Allelverteilung bei Mutter (14/17) und Kind (16/16) ist es wahrscheinlich, dass das Mutationsereignis vom mütterlichen Allel 17 ausging. Dies begründet sich darin, dass es sich erfahrungsgemäß bei ca. 90 % aller Mutationsereignisse um Verkürzungen und Verlängerungen um jeweils ein Repeat handelt (Brinkmann et al. 1998). Weiterhin berichteten diese Autoren, dass die Häufigkeit von Mutationen in direktem Zusammenhang zur durchschnittlichen Länge des STRs steht. Demzufolge widerspricht der hier gefundene Befund nicht anderen Untersuchungen, da die durchschnittliche Anzahl der Repeats im System D3S1358 im Bereich des Systems VWA liegt, dessen Mutationshäufigkeit nur knapp hinter dem als am mutationsanfälligsten beobachteten System FGA liegt.

Über die tatsächliche Häufigkeit derartiger Ereignisse lässt sich anhand der hier untersuchten, vergleichsweise kleinen Stichprobe nicht viel aussagen. Festzuhalten bleibt aber, dass bei immerhin 450 einzelnen untersuchten Systemen – der Profiler™ besteht aus neun Einzelsystemen – nur eine einzige Abweichung bei einer Mutter und ihrem Kind auftrat. Allerdings handelt es sich hierbei um eine Abschätzung nach unten. Da die zugehörigen Väter nicht mituntersucht wurden, ist es nicht

auszuschließen, dass das scheinbar mütterliche Allel beim Kind eigentlich vom Vater stammt und das zweite Allel durch Mutation aus dem mütterlichen Allel hervorgegangen ist. Da dieser Fall aber eher die Ausnahme sein dürfte, wurde auf die zusätzliche Untersuchung der väterlichen Merkmale verzichtet. Andere Untersuchungen kamen zu ähnlichen Ergebnissen. So berichten Brinkmann et al. (1998) von einer beobachteten Mutationshäufigkeit von 24 Fällen bei 10.844 untersuchten Vater-Mutter-Kind Konstellationen. Zudem beobachtete diese Arbeitsgruppe ein Verhältnis zwischen mütterlichen und väterlichen Meiosen von 3:17.

Problematisch ist der Fall einer eingetretenen Mutation vor allem bei Abstammungsbegutachtungen. Mit Daten über die Wahrscheinlichkeit von Mutationen innerhalb jedes einzelnen Systems lässt sich dieses Problem jedoch rechnerisch erfassen und mit einbeziehen. Für rein spurenkundliche Betrachtungen spielt die Problematik von meiotisch auftretenden Mutationen hingegen praktisch keine Rolle.

5.3 DNA – Extraktionsmethoden

5.3.1 DNA-Extraktion aus in Paraffin eingebettetem Gewebe

Die DNA-Isolation aus in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Probenmaterial gestaltet sich insbesondere dann problematisch, wenn die Proben nach erfolgter Fixierung nicht umgehend eingebettet wurden. Mit der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem eine Methode gefunden werden, mit der es möglich ist auch aus länger fixierten Paraffin-Proben noch ausreichend typisierbares DNA-Material zu isolieren.

Als die ungeeigneteste Lösung erwies sich die auf Oktan basierende Methode nach Burton et al. (1998). Oktan ist ein langkettiges Kohlenwasserstoffmolekül, das zwar sehr energiereich ist, aber keine reaktive Gruppen enthält. Die lipophilen Eigenschaften von Oktan ermöglichen es, ohne weiteres das Paraffin aus den zu behandelnden Gewebeschnitten zu entfernen. Gleichzeitig sind es wohl gerade diese lipophilen Eigenschaften, welche diese Methode ungeeignet machen. Proteine mit hydrophoben bzw. lipophilen Teilbereichen, wie also auch die Taq-Polymerase, laufen bei Kontakt mit anderen lipophilen Molekülen Gefahr, mit diesen zu interagieren. Dabei verändern die Proteine in der Regel ihre Konformation, was meist zu einem Verlust der Aktivität führt. Soweit also Oktan nicht vollständig ausgewaschen wird, besteht immer das Risiko einer Inhibition nachfolgender enzymatischer Prozesse.

Als etwas günstiger erwies sich der direkte Einsatz der Schnitte in die PCR nach Burns et al. (1997). Zumindest bei Proben, die direkt weiterverarbeitet wurden, scheint das beigefügte Triton X-100 das Paraffin und die Zellen soweit auflösen zu können, dass für eine PCR genügend DNA freigesetzt wird, wie dies bei Probe 2 (3 Tage Fixierung / Abb. 4.30b) deutlich wird. Der Verbrauch an Probenmaterial ist zwar etwas höher als bei den anderen eingesetzten Methoden, da zur Merkmalerhebung im Regelfall mehrere PCRs nötig sind. Dies fällt aber kaum ins Gewicht, soweit gleich für mehrere Reaktionen Material bereitgestellt wird und der Paraffinblock nicht jedes Mal von Neuem zurechtgeschnitten werden muss. Nachteilig ist allerdings, dass die PCR-Produkte nur schwach und mit starkem

Hintergrund nachweisbar sind. Dies lässt auf einen hohen Grad an Verunreinigung schließen und führt in der Folge zu einer Verringerung der Ausbeute an PCR-Produkt. Bei Betrachtung von Probe 5 (1 Tag Fixierung) zeigt sich, dass es mit dieser Methode selbst bei schnell verarbeiteten Proben keine Erfolgsgarantie gibt. Aus länger fixierten Proben war mit dieser Methode überhaupt kein PCR-Produkt nachweisbar.

Der Einsatz von Xylol ohne Rehydrierung der Probe nach Yamada et al. (1994) ermöglichte zumindest in den nur kurz fixierten Proben 2 und 5 eine erfolgreiche PCR (s. Abb. 4.30a). Die weniger lipophilen Eigenschaften von Xylol, einem aromatischen Ring mit zwei Methylgruppen, scheinen im Gegensatz zu Oktan zumindest eine gewisse Funktionsfähigkeit der Taq-Polymerase zu gewährleisten. Länger fixierte Proben (1, 3 und 5) hingegen sind ebenfalls nicht typisierbar.

Ein diesbezüglich etwas besseres Ergebnis zeitigt die Paraffinentfernung durch Hitzebehandlung in der Mikrowelle nach Banerjee et al. 1995. Der Verzicht auf lipophile Reagenzien sorgt für eine möglichst geringe Störung der PCR, wodurch zumindest die kurz fixierten Proben 2 und 5 leicht und eindeutig typisierbar werden (Abb. 4.30c).

Die vom Ergebnis her geeigneteste Methode aber ist der Einsatz von Xylol zum Entfernen des Paraffins verbunden mit einer anschließenden Rehydrierung der Probe nach Turbett et al. (1996). In allen Fällen war ein PCR-Produkt nachweisbar, wenn auch zum Teil (wie bei Probe 4) nur in geringen Mengen (Abb. 4.30d). Die Proben waren hier in allen Fällen typisierbar. Das Entfernen von Xylolresten durch einige wenige Waschschrte und der schonendere Umgang mit der Probe im Gegensatz zur Vakuumtrocknung bei DNA-Extraktion durch Xylol ohne Rehydrierung erhält scheinbar einerseits die Integrität der DNA soweit, dass genügend Material selbst zur Typisierung älterer Proben vorhanden ist. Andererseits wird natürlich die PCR umso weniger inhibiert, je weniger Xylol in die Reaktion gelangt. Eine mögliche Erklärung für die Überlegenheit dieser Methode gegenüber der Hitzebehandlung in der Mikrowelle ist, dass natürlich die rein mechanische Belastung der DNA bei einem solchen Verfahren enorm ist. Dies kann zu einer zusätzlichen Schädigung der letzten typisierbaren DNA-Reste führen. Auch bleiben immer Paraffinreste nach der Hitzebehandlung im Reaktionsmix zurück, die bei Entfernung durch Zentrifugieren einen gewissen Materialverlust unvermeidlich machen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass zur DNA-Isolation aus Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe eine Xylolbehandlung mit anschließender Rehydrierung am geeignetsten ist. Selbst überlang fixierte Proben, deren DNA-Gehalt durch Einwirkung der mit Formalin auftretenden Ameisensäure stark vermindert ist, lassen sich so noch untersuchen. Da Xylol aber ein gesundheitsschädliches Reagens ist, ist es für Probenmaterial, das innerhalb weniger Tage verarbeitet wurde, durchaus eine Alternative, auf die Hitzebehandlung in der Mikrowelle zurückzugreifen.

5.3.2 DNA-Extraktion aus Urin

Zur Extraktion von DNA aus unterschiedlich lange gelagerten Urin-Proben wurden zwei Methoden getestet. Die eine Methode beruht auf Zentrifugation mit anschließendem Verdau des Sediments und Diatomeenaufreinigung des resultierenden Extraktes. Die andere Methode basiert auf einer Einengung des Probenvolumens und anschließender Reinigung mit QIAamp[®] Zentrifugations-sälchen (Qiagen).

Dass nur die erstgenannte Methode zur erfolgreichen DNA-Extraktion führte, liegt wahrscheinlich daran, dass die Methode nach Qiagen zur Isolation viraler DNA entwickelt wurde, während die Gewinnung chromosomaler DNA allenfalls als positiver Nebeneffekt zu werten ist. Inwieweit hier noch Optimierungsmöglichkeiten bestehen, lässt sich nicht sagen, da das Rezept für den im entscheidenden Schritt eingesetzten Puffer AVL im Handel nicht erhältlich ist.

Betrachtet man die durch die PCR gewonnenen Daten (Abb. 4.31, Tab 4.15), so zeigt sich, dass die DNA unter diesen Lagerungsbedingungen fortwährenden Degradationsprozessen ausgesetzt ist. Dies zeigt sich vor allem bei STR-Systemen mit großen Fragmentlängen wie D2S1338 (289 – 341 bp). Hier ist innerhalb eines Monats ein deutlicher Rückgang der Signalstärke feststellbar. Innerhalb der nächsten zwei Monate setzt sich dieser Degradationsprozess fort, und auch kleine Systeme zeigen Ausfallserscheinungen wie beispielsweise das System D8S1179 (128 – 172 bp).

Besteht also Grund zur Annahme, dass eine Urinprobe zu einem späteren Zeitpunkt einem Probanden zugeordnet werden muss, ist es sinnvoll, frühzeitig genügend Material durch Einfrieren zu asservieren bzw. gleich aus der betreffenden Probe DNA zu isolieren.

5.3.3 DNA-Extraktion aus Geweben

Zwei Extraktionsmethoden wurden zur DNA-Isolierung aus Gewebestücken angewandt. Die eine basiert auf einer Aussalzung, die andere auf einer Phenolisierung des Ansatzes. Beide führten wie Abbildung 4.32 zeigt bei Geweben, die nur kurze Liegezeiten aufwiesen (Proben 1 und 2) oder unter für rechtsmedizinische Fragestellungen günstigen Bedingungen gelagert waren (Probe 3), zu positiven Amplifikationsergebnissen. Dass Gewebe mit längeren Liegezeiten unter ungünstigen Bedingungen wie z. B. hohe Temperatur und Luftfeuchtigkeit keine positiven Amplifikationsergebnisse zeigten, dürfte auf die fortgeschrittene bakterielle DNA-Degradation zurückzuführen sein.

Obwohl beide Isolationsmethoden zum gleichen Ergebnis führen, hat die Isolation durch Aussalzen nach Miller et al. (1988) gewisse Vorteile gegenüber der TriFast™ Methode der Firma Peqlab (Erlangen). Zum Aussalzen benötigt man keine toxischen Substanzen, während der TriFast™-Methode eine Phenolisierung zugrunde liegt. Zudem ist das Aussalzen die sanftere Isolationsmethode, da die DNA nach dem Ausfällen nicht abzentrifugiert, sondern lediglich vorsichtig auf einen Glashaken genommen und mit dessen Hilfe auch gewaschen wird. Hierdurch erhält man sehr große Mengen an reiner und hochmolekularer DNA, die auch für jene Methoden geeignet ist, welche nicht auf einer PCR basieren, wie zum Beispiel die Darstellung von RFLPs.

5.3.4 DNA-Extraktion aus Knochenmaterial

Mehrere Methoden wurden auf ihre Tauglichkeit für die Isolation von DNA aus unterschiedlich gelagertem Knochenmaterial getestet.

Die Isolation aus Knochenmark mit der TriFast™-Methode von Peqlab (Erlangen) ergibt, soweit das Knochenmark noch nicht bakteriell angegriffen ist, durchaus respektable Ergebnisse. Fällen, in denen man auf Knochenmaterial zurückgreift, gehen jedoch in der Regel schon erfolglose Isolationsversuche aus anderem Gewebematerial voraus. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Knochenmark in solchen Fällen noch keiner bakteriellen Degradation unterlag, ist hier dann ebenfalls gering, und es wäre sinnvoller, direkt einen Isolationsversuch aus der *Substantia Compacta*, dem stark kalzifizierten Material, des Knochens zu starten.

Einzig eine gründliche Dekalzifizierung, wie sie bei der Methode nach Holland et al. (1993) angewandt wird, führte auch bei älteren Knochenfunden zum Erfolg. Die dreitägige EDTA-Behandlung des gewonnenen, eher groben Knochenmehls ermöglicht dabei die Aufweichung auch kompakter Knochenreste, so dass hierin eingeschlossene Zellen freigesetzt werden können. Derartig geschützte Zellen können durch alleinigen Verdau mit Proteinase K nicht herausgelöst werden, sind dadurch aber wiederum gegen bakterielle Degradation besser geschützt. Hierdurch kann der Zeitraum, in dem noch DNA aus dem Knochenmaterial gewonnen werden kann, weiter verlängert werden.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Möglichkeiten, die die mitochondriale DNA-Analytik für die Spurenkunde und die Populationsgenetik eröffnet, ausgelotet.

Polymorphismen der beiden nichtcodierenden hypervariablen Regionen HV1 und HV2 wurden durch Sequenzierung erschlossen und ergaben zusammen für eine deutsche Populationsstichprobe (Unterfranken, n = 180) einen Diskriminationsindex (DI) von 0,99. Der DI betrug bei alleiniger Betrachtung der HV1 für eine deutsche (n = 198), türkische (n = 37), äthiopische (n = 65) und chinesische (n = 60) Populationsstichprobe jeweils 0,97, 0,97, 0,96 und 0,98.

Lösungen für spezifische Sequenzierungsprobleme der mitochondrialen DNA wurden gefunden, so dass ein reibungsloser Einsatz in der Laborroutine gewährleistet ist.

Die Mutationshäufigkeit in der HV1 und HV2 wurde mit einem Wert von ca. einem Basenaustausch bei 50 Generationswechseln festgestellt.

Die Nützlichkeit der mitochondrialen DNA für rechtsmedizinische Belange hat sich bereits mehrfach bestätigt. Insbesondere bei der Untersuchung von Haarschäften und telogenen Haaren zeigte sich, dass mit Hilfe mitochondrialer DNA noch erfolgreiche Amplifikationen durchgeführt werden können, wenn die klassischen STR-Systeme bereits versagen.

Die für spurenkundliche Analysen sinnvolle Sequenz-Analyse der HVs wurde für populationsgenetische Untersuchungen als ungeeignet erkannt. Untersuchungen auf Grund einer Einteilung in Haplogruppen erbrachten hingegen verwertbare Ergebnisse. Beim Vergleich der verschiedenen Populationen unter Zuhilfenahme weiterer, andernorts untersuchter Bevölkerungsgruppen zeigte sich, dass es durchaus möglich ist, an Hand der mitochondrialen DNA Populationen verschiedener Kontinente voneinander abzugrenzen. Innerhalb Europas (Kaukasier) ist eine derartige Abgrenzung hingegen nicht möglich, geschweige denn, dass Wanderungsbewegungen o.ä. nachweisbar wären. Dies gilt sowohl für Untersuchungen auf Grund der Sequenzen der hypervariablen Regionen, als auch basierend auf Untersuchungen der Haplogruppen.

Andere variable Regionen der mitochondrialen DNA erwiesen sich als zu wenig aussagekräftig, als dass sie in der rechtsmedizinischen Praxis von besonderer Relevanz wären.

Die Analyse des hochkonservierten Cytochrom b Genes kann dagegen als geeignetes Mittel zur Speziesidentifikation betrachtet werden. Unsicherheiten bei der RFLP-Darstellung machen jedoch unter Umständen eine Sequenzierung des Genes nötig.

Ein im ersten Intron des X-Y homologen Amelogenin-Gens liegendes, geschlechtsspezifisch polymorphes STR-System wurde eingeführt, welches auch für die automatisierte Auftrennung im Sequenz-Analysator geeignet ist.

Die vier autosomalen STR-Systeme D3S1358, D8S1179, D18S51 und D21S11 wurden für die forensische Praxis als Einzelsysteme etabliert. Zu diesen Systemen wurden jeweils unterfränkische Populationsstichproben typisiert, um für diese Region relevantes Datenmaterial zu erhalten.

Zur Erweiterung der bereits vorhandenen Y-chromosomalen STR-Spektrums wurde das aussagekräftige Mikrosatellitensystem DYS385 eingeführt. Auch mit diesem System wurde eine unterfränkische Populationsstichprobe typisiert.

Die Mutationshäufigkeit verschiedener STR-Systeme wurde untersucht und die gefundenen Ergebnisse lagen im Vergleich mit anderen Arbeiten im erwarteten Rahmen.

Für die DNA-Extraktion aus in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem Gewebe wurde eine geeignete Methode gefunden, auch aus Geweben, die sehr lange in Formalin fixiert wurden, noch typisierbare DNA zu extrahieren.

Die untersuchten Extraktionsprotokolle für unbehandelte Gewebeproben zeigten untereinander keine gravierenden Unterschiede. Der begrenzende Faktor für eine erfolgreiche DNA-Extraktion ist hier vielmehr der Zersetzungsgrad des behandelten Gewebes und die damit einhergehende Degradation der DNA.

Insofern ist es sinnvoll in Fällen, in denen unbehandeltes Gewebematerial längere Zeit unwirtlichen Bedingungen ausgesetzt war, gleich auf eine DNA-Extraktionsmethode aus Knochenmaterial, wie die in dieser Arbeit beschriebene, zurückzugreifen.

7 Summary

In this study various possibilities of mitochondrial DNA (mtDNA)-analysis in forensic casework and population genetics have been examined.

Polymorphisms of the two noncoding hypervariable regions HV1 and HV2 were analyzed by sequencing and for a German population sample (Lower Franconia, n = 180) the Power of Discrimination (PD) was calculated to 0.99. PD of the HV1 only for a German (n = 198), Turkish (n = 37), Ethiopian (n = 65) and Chinese (n = 60) population sample was 0.97, 0.97, 0.96 and 0.98 respectively.

Various problems with DNA-sequencing of the mtDNA resulting out of structural features have been solved.

The mutation rate for HV1 and HV2 was found to be about 1 base-exchange in 50 generations.

Analysis of mtDNA has already shown its usefulness in forensic casework, especially when hair shafts or telogen hairs had to be examined. While the regularly used STR-systems failed to provide valid data, amplification of mtDNA often was successful.

For population studies by means of mtDNA sequencing data had to be assigned to haplogroups. Comparison of the examined population data and data from other groups showed the possibility to differentiate between populations on a global scale. Differentiation or tracing of population movements for European (Caucasian) populations however could be shown to be of little use.

Other variable regions of the mtDNA displayed only little forensic relevance.

Analysis of the highly conservative cytochrome b gene seems promising for species identification purposes. However fast accomplished methods like RFLP-analysis cause uncertainties that have to be dealt with by sequencing the gene.

A new DNA-based sex-test consisting of a sex-specific STR-system within the first intron of the X-Y homologues amelogenin gene was established, that is applicable for separation in a capillary sequencer.

The four autosomal STR-systems D3S1358, D8S1179, D18S51 and D21S11 have been set up for forensic applications. A population sample from Lower Franconia was evaluated in order to receive regionally relevant data.

The Y-chromosomal STR-system DYS385 was evaluated in the same way. Mutation rates for several STR-systems were determined. The observed rates were in good accordance with the results found by other researchers.

A method for extraction of DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded material was established. This method allows DNA-extraction from tissues, even after prolonged fixation times.

The examined extraction-protocols for untreated tissues did not result in significant differences. The limiting factor for a successful DNA-analysis seems to be rather the state of decay and the resulting DNA-degradation. Therefore, when working with decayed material, it revealed to be more efficient to directly extract DNA from compact bone using an extraction method, like the one presented in this study.

8 Literaturverzeichnis

Allen M., Engström A.S., Meyers S., Handt O., Saldeen T., von Haeseler A., Pääbo S., Gyllenstein U.; Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *J. Forensic Sci.* 43:453-464; 1998.

Allen R.C., Graves G., Budowle B.; Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Biotechniques* 7:736-744; 1989.

Alonso A., Martin P., Albarran C., Garcia O., Sancho M.; Rapid detection of sequence polymorphisms in the human mitochondrial DNA control region by polymerase chain reaction and single-strand conformation analysis in mutation detection enhancement gels. *Electrophoresis* 17:1299-1301; 1996.

Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., de Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R., Young I.G.; Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457-465; 1981.

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. *Int. J. Legal Med.* 110:175-176; 1997.

Bäßler G., Förster R., Eberspächer B., Karl C., Kugler M., Pflug W.; Frequency data for the STR loci HumFibra (FGA) and Hum ACTBP2 (SE33) in a population of Germans and Turks from South-West Germany. *Int. J. Legal Med.* 112:136-138; 1999.

Bandelt H.-J., Macaulay V., Richards M.; Median networks: Speedy construction and greedy reduction, one simulation, and two case studies from human mtDNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16:8-28; 2000.

Banerjee S.K., Makdisi W.F., Weston A.P., Mitchell S.M., Campbell D.R.; Microwave-based DNA extraction from paraffin-embedded tissue for PCR amplification. *Biotechniques* 18:768-773; 1995.

Betranpetit J., Sala J., Calafell F., Underhill P.A., Moral P., Comas D.; Human mitochondrial DNA variation and the origin of Basques. *Ann. Hum. Genet.* 59:63-81; 1995.

Brega, A. et al.; Genetic studies on the Tharu population of Nepal: restriction endonuclease polymorphisms of mtDNA. *Am. J. Hum. Genet.* 39:502-512; 1986.

Brinkmann B., Rand S., Wiegand P.; Population and family data of RFLP's using selected single- and multi-locus systems. *Int. J. Legal Med.* 104:81-86; 1991.

Brinkmann B., Klintschar M., Neuhuber F., Hühne J., Rolf B.; Mutation rate in human microsatellites: Influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1408-1415; 1998.

Brinkmann C., Forster P., Schürenkamp M., Horst J., Rolf B., Brinkmann B.; Human Y-chromosomal STR haplotypes in a Kurdish population sample. *Int. J. Legal Med.* 112:181-183; 1999.

Burns W.C., Liu Y.S., Dow C., Thomas R.J.S., Phillips W.A.; Direct PCR from paraffin-embedded tissue. *Biotechniques* 22:638-640; 1997.

Burton M.P., Schneider B.G., Brown R., Escamilla-Ponce N., Gulley M.L.; Comparison of histologic stains for use in PCR analysis of microdissected, paraffin-embedded tissues. *Biotechniques* 24:86-92; 1998.

Cali F., LeRoux M.G., D'Anna R.D., Flugy A., De Leo G., Chiavetta V., Ayala G.F., Romano V.; MtDNA control region and RFLP data for Sicily and France. *Int. J. Legal Med.* 114:229-231; 2001.

Chen Y.-S., Olckers A., Schurr T.G., Kogelnik A.M., Huoponen K., Wallace D.C.; MtDNA variation in the south African Kung and Khwe – and their genetic relationships to other African populations. *Am. J. Hum. Genet.* 66:1362-1383; 2000.

Clayton D.A.; Transcription of the mammalian mitochondrial genome. *Annu. Rev. Biochem.* 53:573-594; 1984.

Clayton D.A.; Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7:453-478; 1991.

Crespillo M., Luque J.A., Paredes M., Fernández R., Valverde J.L.; Mitochondrial DNA sequences for 118 individuals from northeast Spain. *Int. J. Legal Med.* 114:130-132; 2000.

Darlu P., Tassy P., Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C.; Disputed African origin of human populations. *Nature* 329:111-112; 1987.

Driggers W.J., LeDoux S.P., Wilson G.L.; Repair of oxidative damage within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells. *J. Biol. Chem.* 268:22042-22045; 1993.

Feuerbach M.; Zur DNA-Analytik in der Rechtsmedizin unter besonderer Berücksichtigung der Spurenkunde. Dissertation, Würzburg, 1993.

Fisher D.L., Holland M.M., Mitchell L., Sledzik P.S., Wilcox A.W., Wadhams M., Weedn V.W.; Extraction, evaluation and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone. *J. Forensic Sci.* 38:60-68; 1993.

Gené M., Piqué E., Borrego N., Carracedo A., Huguet E., Moreno P.; Catalonian population study of the tetranucleotide repeat loci D3S1358, D8S1179, D18S51, D19S253. *Int. J. Legal Med.* 112:75-77; 1998.

Geserick, Roewer: Beiträge der modernen Hämogenetik zur Identifikation. In Leopold D. (Hrsg.): Identifikation unbekannter Toter. Schmidt-Römhild Verlag, 1998.

Giles R.E., Blanc. H., Cann H.M., Wallace D.C.; Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6715-6719; 1980.

Gill P., Ivanov P.L., Kimpton C., Piercy R., Benson N., Tully G., Evett I., Hagelberg E., Sullivan K.; Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat. Genet.* 6:130-135; 1994.

Greenberg B.D., Newbold J.E., Sugino A.; Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene* 21:33-49; 1983.

Günther S., Herold J., Patzelt D.; Extraction of high quality DNA from bloodstains using diatoms. *Int. J. Legal Med.* 108:154; 1995.

Günther S., Patzelt D.; Population data for the STR systems HumTH01, HumVWA and FES/FPS in a population sample from Lower Franconia. *Int. J. Legal Med.* 109:102-103; 1996.

Günther S.; DNA-Polymorphismen – methodische, spurenkundliche und evolutionsgeschichtliche Betrachtungen unter besonderer Berücksichtigung Y-chromosomaler STR-Systeme. Dissertation, Würzburg, 1997.

Helgason A., Hickey E., Goodacre S., Bosnes V., Stefánsson K., Ward R., Sykes B.; mtDNA and the islands of the north Atlantic: Estimating the proportions of Norse and Gaelic ancestry. *Am. J. Hum. Genet.* 68:723-737; 2001.

Hellmann A., Rohleder U., Schmitter H., Wittig M.; STR typing of human telogen hairs – a new approach. *Int. J. Legal Med.* 114:269-273; 2001.

Hixson J.E., Wong T.W., Clayton D.A.; Both the conserved stem-loop and divergent 5'-flanking sequences are required for initiation at the human mitochondrial origin of light-strand DNA replication. *J. Biol. Chem.* 261:2384-2390; 1986.

Holland M.M., Fisher D.L., Mitchell L.G., Rodriguez W.C., Canik J.J., Merrill C.R., Weedn V.W.; Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam war. *J. Forensic. Sci.* 38:542-553; 1993.

Hoff-Olsen P., Mevag B., Staalstrom E., Hovde B., Egeland T., Olaisen B.; Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing. *Forensic Sci. Int.* 105:171-183; 1999.

Höss M., Pääbo S.; DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21:3913-3914; 1993.

Huber M.K.; Der genetische Polymorphismus D1S80 (MCT 118). Studie zur Formal- und Populationsgenetik. Dissertation, Würzburg, 1999.

James C-I.L., Jan-Gowth C.; Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Sci. Int.* 67:103-107; 1994.

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L.; Individual specific „fingerprints“ of human DNA. *Nature* 316:76-79; 1985.

Jones D.A.; Blood samples: probability of discrimination. *J. Forens. Sci. Soc.* 12:355-359; 1972.

Jung S., Laudembacher C., Patzelt D.; Populationsgenetische Untersuchung der STR-Systeme D3S1358, VWA, FGA, TH01, TPOX, CSF1PO, D5S818, D13S317 und D7S820 mittels Multiplex-PCR (AmpFISTR® Profiler™ / Perkin Elmer). Poster auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin (DGRM) 1998.

Jung S., Patzelt D.; Population data for the STR systems D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11 and the Y-chromosomal DYS385 in a population sample from Lower Franconia (South Germany). *J. Forensic Sci.* (im Druck; vorraussichtlicher Erscheinungstermin: September 2002)

Jung S., Patzelt D.; Comparison of five methods for extraction of DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. (Eingereicht bei Forensic Sci. Int.)

Kimpton C.P., Gill P., Walton A., Urquhart A., Millican E.S., Adams M.; Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl.* 3:13-22; 1993.

King T.C., Low R.C.; Mitochondrial DNA displacement loop structure depends on growth state in bovine cells. *J. Biol. Chem.* 262:6214-6220; 1987.

Kivisild T., Bamshad M.J., Kaldma K., Metspalu M., Metspalu E., Reidla M., Laos S., Parik J., Watkins W.S., Dixon M.E., Papiha S.S., Mastana S.S., Mir M.R., Ferak V., Villems R.; Deep common ancestry of Indian and western-Eurasian mitochondrial DNA-lineages. *Curr. Biol.* 9:1331-1334; 1999.

Krings M., Stone A., Schmitz R.W., Krainitzki H., Stoneking M., Pääbo S.; Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell* 90:19-30; 1997.

Lutz S., Weisser H.-J., Heizmann J., Pollak S.; A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. *Hum. Genet.* 101:384; 1997.

Lutz S., Weisser H.-J., Heizmann J., Pollak S.; Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *Int J. Legal Med.* 111:67-77; 1998.

Lutz S., Weisser H.-J., Heizmann J., Pollak S.; Mitochondrial heteroplasmy among maternally related individuals. *Int. J. Legal Med.* 113:155-161; 1999.

Lutz S., Wittig H., Weisser H.-J., Heizmann J., Junge A., Dimo-Simonin N., Parson W., Edelmann J., Anslinger K., Jung S., Augustin C.; Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Sci. Int.* 113:97-101; 2000.

Macaulay V., Richards M., Hickey E., Vega E., Cruciani F., Guida V., Scozzari R., Bonn -Tamir B., Sykes B., Torroni A.; The emerging tree of west Eurasian mtDNAs: A synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* 64:232-249; 1999.

Manfredi G., Thyagarajan D., Papadopoulou L.C., Pallotti F., Schon E.A.; The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *Am. J. Hum. Genet.* 61:953-960; 1997.

Mannucci A., Sullivan K.M., Ivanov P.L., Gill P.; Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int. J. Legal Med.* 106:190-193; 1994.

Mei ner C., von Wurmb N., Oehmichen M.; Detection of the age-dependent 4977bp deletion of mitochondrial DNA. *Int.J. Legal Med.* 110:288-291; 1997.

Miller S.A., Dykes D.D., Polesky H.F.; A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acids Res.* 10:1215; 1988.

MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database.

Center for Molecular Medicine, Emory University, Atlanta, GA, USA.
<http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>, 2000.

Möller A., Meyer E., Brinkmann B.; Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int. J. Legal Med.* 106:319-323; 1994.

Mueller; Gerichtliche Medizin, Band 1 und 2, Springer Verlag, 1975.

Nei M., Roychoudhury A.K.; Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics* 76:379-390; 1974.

Parson W., Pegoraro K., Niederstätter H., Föger M., Steinlechner M.; Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int. J. Legal Med.* 114:23-28; 2000.

Pfeiffer H., Forster P., Ortmann C., Brinkmann B.; The results of an mtDNA study of 1200 inhabitants of a German village in comparison to other Caucasian databases and its relevance for forensic casework. *Int. J. Legal Med.* 114:169-172; 2001.

Pfizinger H., Ludes B., Mangin P.; Sex determination of forensic samples: Co-amplification and simultaneous detection of a Y-specific and an X-specific DNA sequence. *Int. J. Legal Med.* 105:213-216; 1993.

Prado V.F., Castro A.K.F., Oliveira C.L., Souza K.T., Pena S.D.J.; Extraction of DNA from human skeletal remains: practical applications in forensic sciences. *Genetic Analysis* 14:41-44; 1997.

Richards M., Macaulay V., Hickey E., Vega E., Sykes B., Guida V., Rengo C., Sellitto D., Cruciani F., Kivisild T., Villems R., Thomas M., Rychkov S., Rychkov O., Rychkov Y., Gölge M., Dimitrov D., Hill E., Bradley D., Romano V., Calì F., Vona G., Demaine A., Papiha S., Triantaphyllidis C., Stefanescu G., Hatina J., Belledi M., Di Rienzo A., Novelletto A., Oppenheim A., Nørby S., Al-Zaheri N., Santachiara-Benerecetti S., Scozzari R., Torroni A., Bandelt H.J.; Tracing European founder lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *Am. J. Hum. Genet.* 67:1251-1276; 2000.

Ruitberg C.M., Reeder D.J., Butler J.M.; STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res.* 29:320-322; 2001.

Saiki R.K., Scharf S., Faloona F., Mullis K.B., Horn G.T., Erlich H.A., Arnheim N.; Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354; 1985.

Sanger F., Coulson A.R.; A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94:441-448; 1975.

Schatz G.; The protein import system of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271:31763-31766; 1996.

Schleyer, Oepen, Henkel (Hrsg.); Humanbiologische Spuren, Kriminalistik Verlag (Heidelberg), 1995.

Schneider P.M., Meuser S., Waiyawuth W., Seo Y., Rittner C.; Tandem repeat structure of the duplicated Y-chromosomal STR locus DYS 385 and frequency studies in the German and three Asian populations. *Forensic Sci. Int.* 97:61-70; 1998.

Schneider H.R., Rand S., Schmitter H., Weichhold G.; ACTBP-2-nomenclature recommendations of GEDNAP. *Int. J. Legal Med.* 111:97-100; 1998.

Schwerd W.; Der rote Blutfarbstoff und seine wichtigsten Derivate. Verlag Max Schmidt-Römhild, Lübeck; 1962.

Simoni L., Calafell F., Pettener D., Bertranpetit J., Barbujani G.; Geographic patterns of mtDNA diversity in Europe. *Am. J. Hum. Genet.* 66:262-278; 2000.

Starikovskaya Y.B., Sukernik R.I., Schurr T.G., Kogelnik A.M., Wallace D.C.; mtDNA diversity in Chukchi and Siberian Eskimos: Implication for the genetic

history of ancient Beringia and the peopling of the New World. *Am. J. Hum. Genet.* 63:1473-1491; 1998.

Sullivan K.M., Hopgood R., Gill P.; Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. *Int. J. Legal Med.* 105:83-86; 1992.

Szibor R., Michael M.; Correct mitochondrial L-strand sequencing after C-stretches. *Int. J. Legal Med.* 112:348-349; 1999.

Turbett G.R., Barnett T.C., Dillon E.K., Sellner L.N.; Single-tube protocol for the extraction of DNA or RNA from paraffin-embedded tissues using a starch-based adhesive. *Biotechniques* 20:846-853; 1996.

Vigilant L., Stoneking M., Harpending H., Hawkes K., Wilson A.C.; African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253:1503-1507; 1991.

Wallace D.C.; Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 61:1175-1212; 1992.

Wallace D.C.; Mitochondrial DNA in aging and disease. *Sci. Am.* 277:40-47; 1997.

Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R.; Chelex[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10:506-513; 1991.

Weichold G.M., Bark J.E., Korte W., Eisenmenger W., Sullivan K.M.; DNA analysis in the case of Kaspar Hauser. *Int. J. Legal Med.* 111:287-291; 1998.

Wilson M.R., Stoneking M., Holland M.M., DiZinno J.A., Budowle B.; Guidelines for the use of mitochondrial DNA sequencing in forensic science. *Crime Lab. Digest* 20:68-77; 1993.

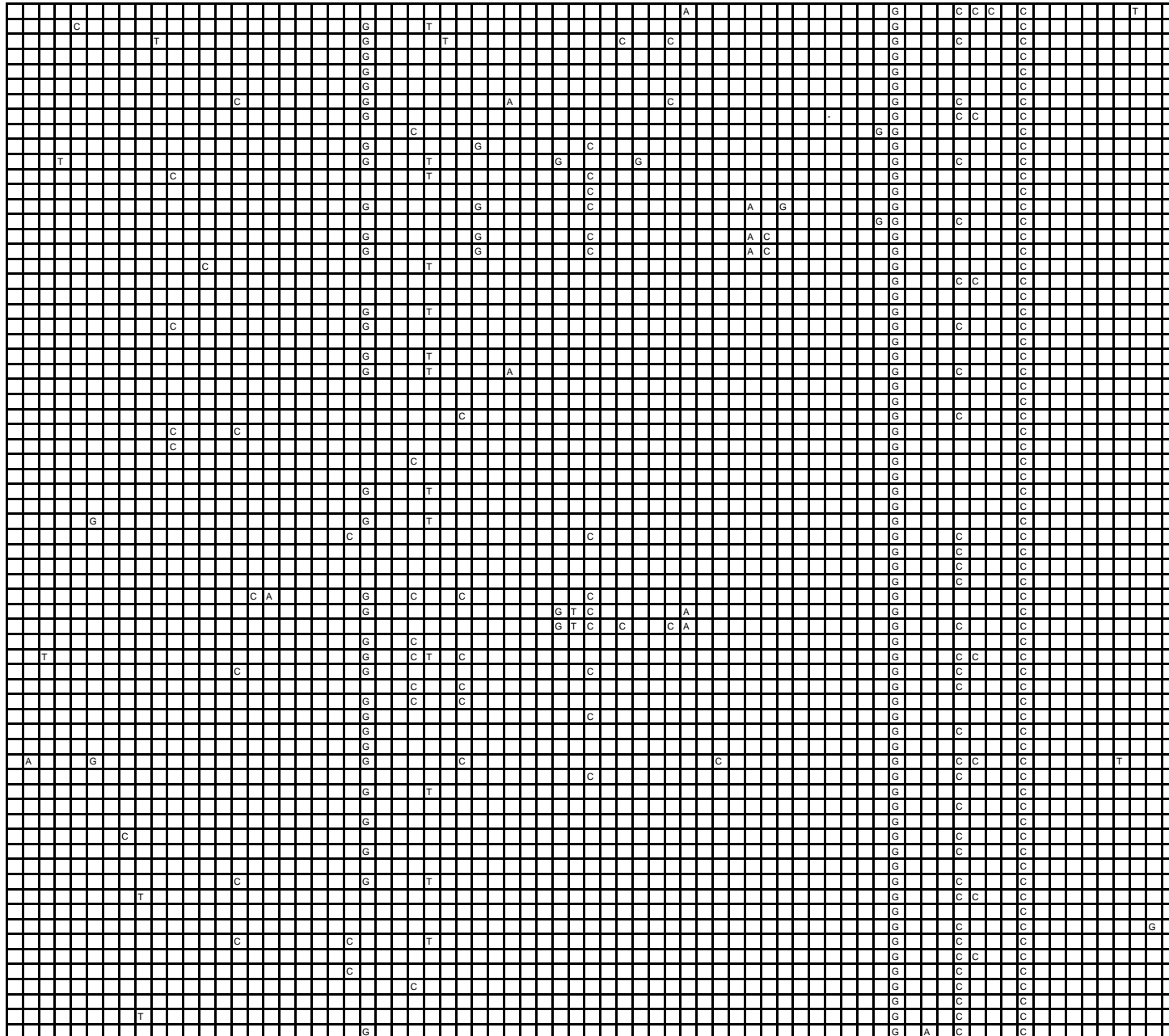
Wilson M.R., Polansky D., Ropple J., DiZinno J.A., Budowle B.; A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes. *Hum. Genet.* 100:167-171; 1997.

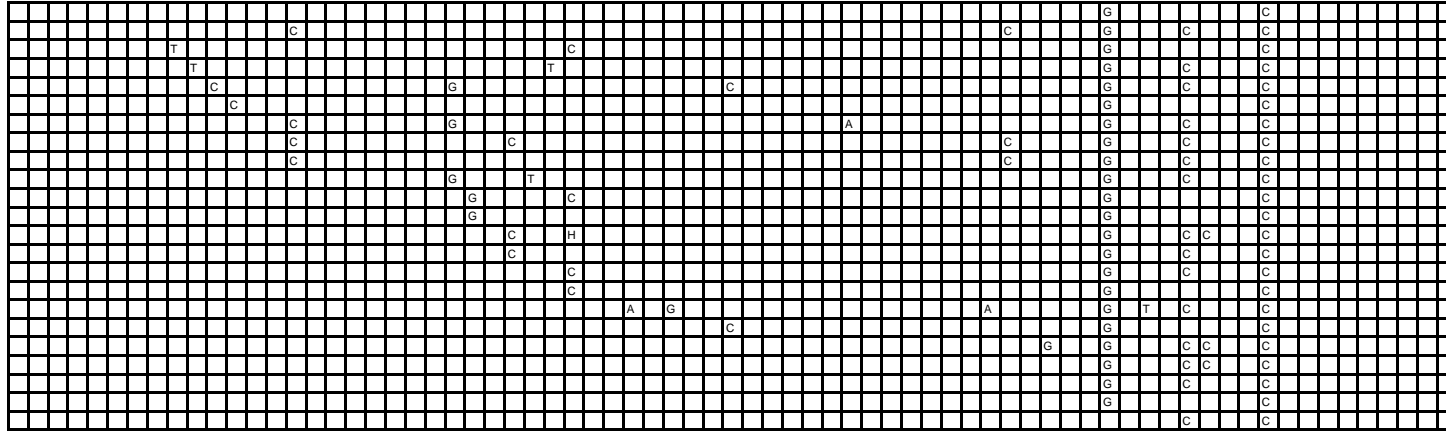
Wittig H., Augustin C., Baasner A., Bulnheim U., Dimo-Simonin N., Edelmann J., Hering S., Jung S., Lutz S., Michael M., Parson W., Poetsch M., Schneider P.M., Weichhold G., Krause D.; Mitochondrial DNA in the central european population: Human identification with the help of the forensic mt-DNA D-Loop-Base Database. *Forensic Sci. Int.* 113:113-118; 2000.

Yamada M., Yamamoto Y., Tanegashima A., Kane M., Ikehara Y., Fukunaga T., Nishi K.; Determination of ABO genotypes with DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Int. J. Leg. Med.* 106:285-287; 1994.

Zehner R., Bohrer U.; DYS19 and amelogenin in artificial blood stains with defined amounts of male and female cells. *Int. J. Legal Med.* 111:340-342; 1998.

Zehner R., Zimmermann S., Mebs D.; RFLP and sequence analysis of the cytochrome B gene of selected animals and man: methodology and forensic application. *Int. J. Legal Med.* 111:323-327; 1998.





Lebenslauf von Sven Jung

*18.2.1971 in Hermeskeil als Sohn von Wolfgang Jung und Helga Jung, geb. Faller

August 1977 – Juli 1981 Besuch der Grundschule an der Grund- und Hauptschule
Hinterzarten

August 1981 – Mai 1990 Besuch des Gymnasiums an der Schule Birklehof in
Hinterzarten

Mai 1990 Allgemeine Hochschulreife

Juli 1990 – Juni 1991 Wehrdienst

September 1991 – August 1992 Studium der Informatik an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität Würzburg

September 1992 – Oktober 1997 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-
Maximilians-Universität Würzburg

Oktober 1996 – Oktober 1997 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Zoologie I (Abteilung
Elektronenmikroskopie, Betreuer: Prof. Dr. G. Krohne) der Universität Würzburg
Thema: „Versuche zur in vitro Rekonstitution von Zellkernen“

Seit Februar 1998 Promotion am Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg

Erklärung

Ich gebe hiermit mein Ehrenwort, dass ich die Dissertation mit dem Titel „Forensische DNA-Analytik: Methodische, spurenkundliche und populationsgenetische Betrachtungen unter besonderer Berücksichtigung mitochondrialer DNA-Polymorphismen“ selbstständig angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Würzburg, den 5.8.2002

(Sven Jung)

Erklärung

Vorliegende Dissertation mit dem Titel „Forensische DNA-Analytik: Methodische, spurenkundliche und populationsgenetische Betrachtungen unter besonderer Berücksichtigung mitochondrialer DNA-Polymorphismen“ hat nicht in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Neben dem Grad eines Diplom-Biologen (Univ.) habe ich keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 5.8.2002

(Sven Jung)