

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Rechtsmedizin  
-Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Heidi Pfeiffer-

**Analyse binärer Y-chromosomaler Polymorphismen in  
unterschiedlichen Populationen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Petra Anna Lünemann

aus Spelle

2009

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen  
Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. W. Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. B. Brinkmann
2. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. H. Pfeiffer

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2009

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Institut für Rechtsmedizin  
-Direktorin: Prof. Dr. med. Heidi Pfeiffer-

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. B. Brinkmann

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. H. Pfeiffer

### **Zusammenfassung**

Analyse binärer Y-chromosomaler Polymorphismen  
in unterschiedlichen Populationen

Petra Anna Lünemann

Für die drei binären Polymorphismen YAP, SRY-1532 und 92R7 wurden Nachweisverfahren etabliert, um Y-Chromosomen aus den folgenden Populationen zu analysieren: Buschmänner (Tsumkwe, Namibia), Han Chinesen (Shenyang, China), Deutsche (Nordrhein-Westfalen), Japaner (Shiga), Khalk-Mongolen (Mongolei), Ovambo (Oshakati, Angola), West-Pygmäen (Biaka, Zentralafrika), Ost-Pygmäen (Efe, D.R. Kongo) und Türken (Adana).

Die Allelverteilung der DNA-Marker wurde in den einzelnen Populationen festgestellt. Weiterhin wurden Haplogruppen konstruiert und grafisch dargestellt, um Aussagen über verwandtschaftliche Verhältnisse zu treffen. Nach dem Prinzip des phylogenetischen Baumes nach Y Chromosom Consortium wurde anhand der untersuchten Polymorphismen ein Baum konstruiert, in dem die Haplogruppen die Hauptzweige darstellen.

Tag der mündlichen Prüfung: 05.10.2009

## I. INHALTSVERZEICHNIS

## II. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

## III. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### I. INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
1.1. Charakterisierung der humanen Chromosomen .....	10
1.2. Das humane Y-Chromosom .....	11
1.3. Polymorphismen des Y-Chromosoms .....	13
1.3.1. Charakterisierung von YAP (Alu-Insertion).....	15
1.3.2. Charakterisierung von SRY-1532 (A→G Transition).....	16
1.3.3. Charakterisierung von 92R7 (C→T Transition).....	18
1.3.4. STRs (Short tandem repeats).....	19
1.4. Populationsgenetik.....	21
1.5. Phylogenetischer Baum .....	24
1.6. Zielsetzung.....	27
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>28</b>
2.1. Proben.....	28
2.2. Extraktion von DNA aus Blutproben .....	28
2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
2.3.1. YAP (nach Hammer and Horai 1995) .....	29
2.3.2. SRY-1532 (nach Whitfield et al. 1995).....	30
2.3.3. 92R7 (nach Kwock et al. 1996) .....	30
2.4. Restriktionsverdau .....	31
2.4.1. SRY-1532 .....	32
2.4.2. 92R7 .....	32
2.5. Elektrophorese .....	33
2.6. Silberfärbung .....	34
2.7. Sequenzierung .....	35
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
3.1. Etablierung und Optimierung der drei biallelischen Marker .....	37
3.1.1. YAP .....	37
3.1.2. SRY-1532 .....	39
3.1.3. 92R7 .....	42
3.2. Haplogruppenzuordnung .....	44
3.2.1. Grafische Darstellung der Haplogruppen .....	46
3.2.2. Haplogruppendiversität innerhalb der Populationen .....	49
3.2.3. Netzwerke .....	53
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>56</b>
4.1. Y-chromosomale Polymorphismen .....	56
4.2. Binäre Polymorphismen im Y-STR-Stammbaum .....	57
4.3. Haplogruppenzuordnung .....	60
<b>5. Literatur .....</b>	<b>64</b>

## IV. ANHANG

## V. LEBENSLAUF

## VI. DANKSAGUNG

### ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Karyogramm .....	10
Abb. 2: Das humane Y-Chromosom .....	11
Abb. 3: Schematische Darstellung des Y-Chromosoms.....	15
Abb. 4: Kladogramm .....	24
Abb. 5: Phylogenetischer Baum nach YCC 2002.....	26
Abb. 6: YAP-Polymorphismus im nativen PAA-Gel (8 %).....	38
Abb. 7: Längenvarianten bei YAP-positiven Probanden (8 % PAA).....	38
Abb. 8: PAA-Gel (8 %) nach Amplifikation von SRY-1532.....	40
Abb. 9: SRY-1532 nach Restriktionsverdau mit Dra III (8 % PAA-Gel) .....	41
Abb. 10: Kontrollgel (12 %) nach Amplifikation von 92R7 .....	42
Abb. 11: 92R7 Polymorphismus nach Hind III-Reaktion (14 % PAA-Gel) .....	43
Abb. 12: Haplogruppe II.....	46
Abb. 13: Haplogruppe IV .....	47
Abb. 14: Haplogruppe V .....	47
Abb. 15: Haplogruppe VI.....	48
Abb. 16: Haplogruppe VII.....	48
Abb. 17: Japaner .....	49
Abb. 18: Han Chinesen.....	49
Abb. 19: Mongolen.....	50
Abb. 20: Türken.....	50
Abb. 21: Deutsche .....	51
Abb. 22: Ovambo .....	51
Abb. 23: Populationen innerhalb einzelner Haplogruppen.....	52
Abb. 24: Netzwerkdarstellung der Haplogruppen über alle Populationen .....	53
Abb. 25: Japaner.....	53
Abb. 26: Han Chinesen.....	53
Abb. 27: Mongolen.....	54
Abb. 28: Türken.....	54
Abb. 29: Deutsche.....	54
Abb. 30: Ovambo.....	54
Abb. 31: Einordnung in den Phylogenetischen Baum nach YCC (2002).....	55
Abb. 32: Stammbaum nach Jobling et al. 1997.....	59

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 1: Amplifikationsbedingungen im Überblick.....	31
Tab. 2: YAP-Polymorphismen in verschiedenen Populationen .....	39
Tab. 3: SRY-1532 Polymorphismen in verschiedenen Populationen .....	41
Tab. 4: 92R7 Polymorphismen in verschiedenen Populationen.....	44
Tab. 5: Haplogruppen unter Berücksichtigung der drei binären Marker.....	45
Tab. 6: Haplogruppenzugehörigkeit der einzelnen Populationen.....	45

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AgNO <sub>3</sub>	Silbernitrat
bp	<u>B</u> asenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin (Rinderserumalbumin)
DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (Desoxyribonukleinsäure)
Dra III	Restriktionsendonuklease aus <i>Deinococcus radiophilus</i>
dATP	<u>D</u> esoxy <u>a</u> denosin <u>t</u> riphosphat
dCTP	<u>D</u> esoxycytidin <u>t</u> riphosphat
dGTP	<u>D</u> esoxyguanosin <u>t</u> riphosphat
dTTP	<u>D</u> esoxythymidin <u>t</u> riphosphat
dNTP	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleosid <u>t</u> riphosphat
EDTA	<u>E</u> thylendi <u>a</u> min <u>t</u> etra <u>a</u> ccetat
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde
Hind III	Restriktionsendonuklease aus <i>Haemophilus influenzae</i> Rd com-10
HG	<u>H</u> aplogruppe
HNO <sub>3</sub>	Salpetersäure
HPLC	<u>h</u> igh <u>p</u> erformance <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography (Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie)
HT	<u>H</u> aplotyp
kb	<u>K</u> ilobasen
LINES	<u>l</u> ong <u>i</u> nterspersed repetitive <u>e</u> lements (lang verteilte Wiederholungssequenzen)
M	Molar (mol/l)

min.	Minuten
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MSY	<u>m</u> ale-specific region on <u>Y</u> (Mann-spezifische Region des Y-Chromosoms)
n	Individuenzahl
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ammoniumsulfat
NRPY	<u>n</u> on <u>r</u> ecombining part of the <u>Y</u> -chromosome (nicht rekombinierender Anteil des Y-Chromosoms)
PAA	<u>P</u> oly <u>a</u> cryl <u>a</u> mid
PAR	<u>p</u> seudo <u>a</u> utosomale <u>R</u> egion
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline (Phosphatpuffer)
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction (Polymerasekettenreaktion)
RFLP	<u>R</u> estriktions <u>f</u> ragment <u>l</u> ängen- <u>P</u> olymorphismus
s	Sekunde
SINES	<u>s</u> hort <u>i</u> nterspersed repetitive <u>e</u> lements (kurz verteilte Wiederholungssequenzen)
STR	<u>s</u> hort <u>t</u> andem <u>r</u> epeat (Mikrosatelliten)
SNP	<u>s</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphisms (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
TEMED	N,N,N',N'- <u>T</u> etramethyl <u>e</u> ndi <u>a</u> min
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
% (w/v)	Volumengewichtsprozent
% (v/v)	Volumenprozent
YAP	<u>Y</u> - <u>A</u> lu Insertions <u>P</u> olymorphismus

YCC

Y Chromosome Consortium

Yp

kurzer Arm des Y-Chromosoms

Yq

langer Arm des Y-Chromosoms

μl

Mikroliter

## 1. Einleitung

### 1.1. Charakterisierung der humanen Chromosomen

Die Zellkerne des menschlichen Körpers enthalten das Genom, welches auf die Chromosomen verteilt ist. In somatischen Zellen liegen die Chromosomen in zweifacher Kopie vor, daher wird der somatische Chromosomensatz als diploid bezeichnet. Die 46 Chromosomen sind hier zu 23 Paaren gruppiert. Der Chromosomensatz der Gameten dagegen wird als haploid bezeichnet, da nur eine Kopie vorhanden ist. Dabei sind 22 Chromosomenpaare identisch (homolog), ein Chromosom wird mütterlicherseits vererbt und das andere stammt vom Vater. Solche Chromosomenpaare sind als Autosomen bekannt. Beim 23. Paar unterscheiden sich die Chromosomen. Während Frauen zwei X-Chromosomen besitzen, haben Männer ein X- und ein Y-Chromosom. Diese Chromosomen werden auch als Geschlechtschromosomen (Gonosomen) bezeichnet. Der Karyotyp der Frauen ist dementsprechend 46XX und jener der Männer 46XY. Der haploide Chromosomensatz der Gameten ist auf eine Meiose (Reduktionsteilung) während der Oogenese bzw. Spermatogenese zurückzuführen. Zu Beginn der Meiose ordnen sich homologe Chromosomen parallel an und können sich dabei umschlingen. Durch dieses „crossing-over“ kommt es zum Austausch von DNA-Fragmenten, was auch als homologe Rekombination bezeichnet wird. Die Rekombination führt zur Vermischung zwischen paternalem und maternalem Erbgut, so dass nach meiotischer Teilung in den Gameten Chromosomen entstehen, die eine unterschiedliche Verteilung väterlicher bzw. mütterlicher Gene aufweisen. Somit ist die Vielfalt in der Nachkommenschaft eines Elternpaares erklärbar (Löffler G. und Petrides P.E., 1997).

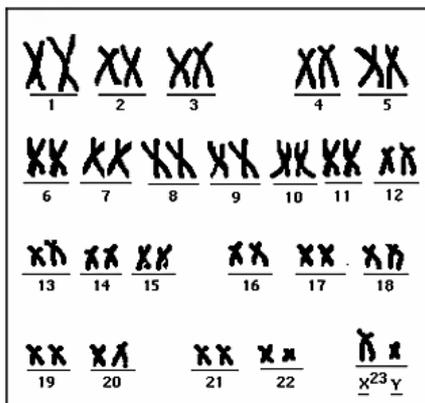
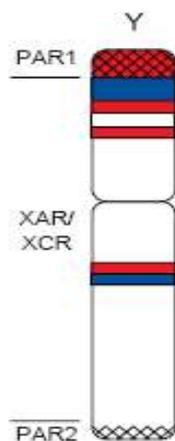


Abb. 1: Karyogramm

## 1.2. Das humane Y-Chromosom

Mit seinen ca. 60 Megabasen (MB) ist das akrozentrische Y-Chromosom (Abb. 2) das zweitkleinste menschliche Chromosom. Die Telomer-Regionen des langen Arms (Yq) und des kurzen Arms (Yp) stellen die distale Grenze der pseudoautosomalen Regionen PAR1 und PAR2 dar, die identisch sind mit den beiden telomer lokalisierten pseudoautosomalen Regionen des X-Chromosoms (Delbridge and Graves 1999). Da nur in diesen Bereichen eine homologe Rekombination stattfindet, wurde die Region als pseudoautosomal bezeichnet (Jobling et al. 1997).



**Abb. 2: Das humane Y-Chromosom**

Schematische Struktur des Y-Chromosoms modifiziert nach Delbridge and Graves 1999. Dargestellt die beiden pseudoautosomalen Regionen und zwei X-Y Homologien.

Im Jahre 1990 wurde vom U.S. Department of Energy (DOE) und dem National Institute of Health (NIH) in Kooperation mit einigen internationalen Arbeitsgruppen das Humangenomprojekt (HGP) initiiert. Das Ziel war die Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms. Eine nahezu vollständige DNA-Referenz wurde schließlich im Juni 2000 veröffentlicht. Diese Sequenz enthielt ca. 90% der euchromatischen Bereiche des menschlichen Genoms. Weitere Lücken in der Sequenz sollten im Verlauf der Zeit geschlossen werden. Nach ersten Erkenntnissen schien der größte Teil des Y-Chromosoms aus endlosen Wiederholungen und inaktiven Pseudogenen zu bestehen. Dies machte seine Sequenzierung schwieriger als die des restlichen menschlichen Genoms, so dass Wissenschaftler aus Amsterdam, St. Louis und Cambridge unter

Leitung von David Page neue Methoden entwickelten, um den beim Humangenomprojekt ausgesparten Teil des Y-Chromosoms zu sequenzieren. Neben der Entdeckung von 78 Genen gelang es dadurch, die Evolution des Y-Chromosoms zu rekonstruieren (Skaletsky et al. 2003).

Heute wird davon ausgegangen, dass anfangs das Y-Chromosom sowie das X-Chromosom wie Autosomen homolog zueinander waren, das heißt, sie besaßen dieselbe Struktur und dieselben Genorte. Vor ca. 350 Millionen Jahren entstand auf dem längeren Arm des einen X-Chromosoms aus dem Gen SOX3 die sex determining region of Y (SRY-Gen). Dieses führte über spezielle Codierungen und Aktivierung anderer Gene zur Entwicklung der Hoden im Embryo. Im weiteren Verlauf kam es im längeren Arm des Y-Chromosoms zu einer Inversion, was eine weitere Rekombination zwischen X- und Y-Chromosom verhindert. Die X-Chromosomen konnten weiter untereinander rekombinieren und haben sich daher im Verlauf der Evolution nur wenig verändert, was durch eine ähnliche Reihenfolge der Gene bei verschiedenen Säugetieren gezeigt werden kann (Lahn et al. 2001). Die fehlende Rekombination beim Y-Chromosom und somit der Ausfall von Reparaturmechanismen der DNA durch homologe Rekombination führte zu Ansammlung von Mutationen und Entstehung von defekten Genen, die im Verlauf verloren gingen (Deletion). Die heutige Struktur des Y-Chromosoms zeigt letztendlich, was passiert, wenn kein Crossing-over stattfindet. Lediglich zwei kurze Abschnitte an den Enden können sich bei der Bildung von Spermien noch mit entsprechenden Abschnitten des X-Chromosoms austauschen und somit für die Intaktheit ihrer Gene sorgen. Der o.g. Bereich wird, wie bereits erwähnt als pseudo-autosomale Region (PAR) bezeichnet und macht ca. 5% des Chromosoms aus. Der Rest des Chromosoms besteht aus dem Bereich, der lange, als non-recombining region (NRY) bekannt war. Dieser umfasst 95% und wurde nach Page et al. 2003 umbenannt in die male specific region (MSY). Die Sequenzdaten zeigten, dass auf dem Y-Chromosom offensichtlich zahlreiche Rekombinationen innerhalb des eigenen DNA-Stranges stattfanden (Skaletsky et al. 2003). Die Bereiche der MSY lassen sich in drei unterschiedliche Gruppen unterteilen. Die erste Gruppe sind es die „X-transponierten“ Regionen, die nur zwei der insgesamt 78 Gene der MSY enthalten. Als zweite Gruppe gibt es die Gruppe der „X-degenerierten“ Gene, die 16 funktionierende Gene, darunter

das SRY-Gen, und 13 Pseudogene enthält. Alle 29 Gene zeigen Homologien auf dem X-Chromosom, was die These stützt, dass die Gonosomen ursprünglich autosomale Chromosomen waren. In der zweiten Gruppe wird deutlich, dass durch fehlendes Crossing-over die Funktionsfähigkeit der Gene verloren geht, da keine genetische Konstanz mehr gewährleistet ist. Durch die ungeschlechtliche Fortpflanzung von Vater zu Sohn muss befürchtet werden, dass sich unter anderem verderbliche Mutationen anreichern können. Der neu entdeckte Kompensationsmechanismus wurde schließlich in der dritten Gruppe gefunden, die die amplikonischen DNA-Abschnitte enthält (Skaletsky et al. 2003). Unter einem Amplikon versteht man einen vervielfältigten DNA-Abschnitt. Diese große Anzahl an Kopien der MSY enthält neun aktive Gene, die hauptsächlich im Hoden exprimiert werden und in Sequenzbereichen liegen, die sich zueinander wie Bild und Spiegelbild verhalten. Das heißt, sie treten als sog. Palindrome auf und dienen als Sicherheitskopie und Austauschpartner bei fehlendem Crossing-over. Mittels Rekombination auf dem eigenem DNA-Strang wird der Erhalt des Y-Chromosoms gesichert. In weiteren Studien wurde beschrieben, dass sechs der acht großen Palindrome auch beim Schimpansen vorliegen und somit also mehr als fünf Millionen Jahre alt sind (Rozen et al. 2003).

### **1.3. Polymorphismen des Y-Chromosoms**

Obwohl die MSY zahlreiche Polymorphismen enthält, ist die Anzahl insgesamt im Vergleich mit anderen Chromosomen sehr gering (Mathias et al. 1994). Es gibt verschiedene Erklärungsansätze, die auf die Seltenheit der Polymorphie eingehen, zum einen ist die Variabilität eines Chromosoms stark abhängig von seiner Häufigkeit in der Bevölkerung, denn auf 100 Autosomen in der Population kommen nur 75 X-Chromosomen und 25 Y-Chromosomen. Des Weiteren muss die fehlende Rekombination des überwiegenden Teils des Y-Chromosoms berücksichtigt werden. Schließlich gibt es einen evolutionären Erklärungsansatz: Aufgrund bestimmter Fortpflanzungsverhalten kann die Populationsgröße des Y-Chromosoms reduziert sein (Jobling & Tyler-Smith 1995). Beispielsweise haben nicht alle Männer Söhne, oder in männlich polygamen Kulturen können wenige Männer viele Söhne haben. Verschiedene

Wissenschaftler beschreiben eine reduzierte Y-chromosomale Diversität in Gesellschaften, in denen eine männliche Polygamie bestand bzw. heute noch vorherrscht (Roewer et al. 1993, Lucotte et al. 1994, Salem et al. 1996). Es handelt sich dabei um Populationen aus Südamerika, Zentralafrika und Arabien (Sinai). Ferner können politische Ereignisse wie z.B. Kriege oder religiös bedingte Verhaltensweisen wie z.B. die Heirat zwischen einer Witwe und dem Bruder des verstorbenen Ehemannes Einfluss auf die Diversität haben (Mitchell & Hammer 1996).

Für die evolutionären Fragestellungen sind vier verschiedene Typen von DNA-Markern hervorzuheben. In den 70er Jahren wurden erstmals die Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLPs) beschrieben, es folgten Mitte der 80er Jahre die Minisatelliten, auch variable number of tandem repeats (VNTRs) genannt und im Anschluss die Mikrosatelliten, bekannt als short tandem repeats (STRs). Seit Ende der 90er-Jahre werden Punktmutationen, so genannte single nucleotide polymorphisms (SNPs) untersucht, die eine enorme Variabilität im menschlichen Genom zeigen.

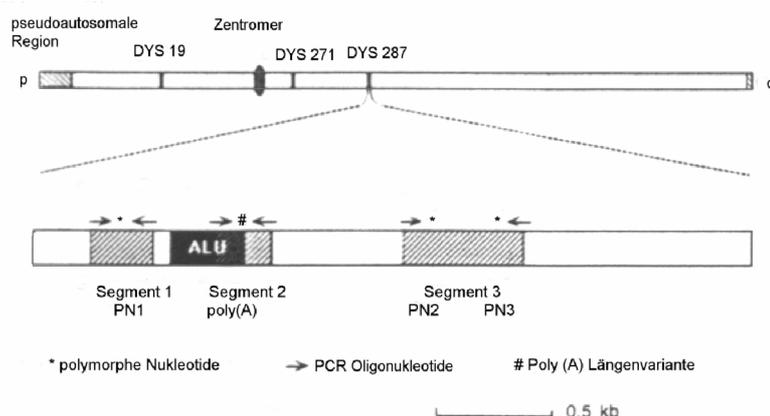
Die o.g. Polymorphismen lassen sich anhand ihrer unterschiedlichen Eigenschaften in zwei Gruppen unterteilen: Die Minisatelliten und Mikrosatelliten liegen in der Regel in nichtkodierenden Abschnitten und werden als repetitive Sequenzen bezeichnet, ihre Kennzeichen sind Wiederholungssequenzen. RFLPs und SNPs liegen sowohl in kodierenden als auch in nichtkodierenden Abschnitten. In der Praxis ist die Verwendung Y-chromosomaler DNA-Polymorphismen abhängig von der Mutationsrate des entsprechenden Systems und von der Typisierungsmethode. Für Evolutionsstudien werden bevorzugt binäre Polymorphismen (SNPs) eingesetzt, da diese aufgrund einer geringen Mutationsrate von ca.  $5 \times 10^{-7}$  pro Base per Generation (Hammer 1995) ein einmaliges Ereignis darstellen (Jobling et al. 1997).

### 1.3.1. Charakterisierung von YAP (Alu-Insertion)

YAP (DYS287) gilt als wichtiger Marker in evolutionären Studien, da es ein einmaliges, stabiles Mutationsereignis darstellt (Hammer 1994, Hammer & Horai 1995). Dieser Polymorphismus der Alu-Familie ist auf dem langen Arm des Y-Chromosoms lokalisiert. Es handelt sich um eine 305 bp lange Insertion, die ausnahmslos zwischen definierten Basenpaaren liegt. Neben der Insertion sind drei weitere Polymorphismen (PN1, C-T; PN2, C-T; PN3, G-A) der 2,6 kb langen YAP-Region beschrieben worden [siehe Abb. 3] (Hammer et al. 1997).

Im Rahmen der direkten Sequenzierung der Alu-Insertion wurde am 3' Ende der Insertion ein variabler Poly-A-Schwanz entdeckt. Beschrieben wird eine kurze Variante mit 26 Adeninbasen, eine lange Variante mit 46 bp, eine sehr kurze Variante mit 19 bp und die mittlere Variante mit 36 bp (Hammer et al. 1997).

Untersuchungen an Primaten zeigten, dass es ursprünglich keine Alu-Insertion an diesem Locus gab (Hammer 1994, Hammer & Horai 1995). Der Entstehungszeitraum der Alu-Insertion wird während der letzten 29.000-334.000 Jahre angenommen (Hammer 1995). Am häufigsten wurde die YAP-Insertion in afrikanischen Populationen beobachtet, was auf einen afrikanischen Ursprung deuten könnte (Hammer et al. 1994). Erkenntnisse weisen jedoch auch auf einen asiatischen Ursprung mit späterer Rückwanderung nach Afrika hin (Hammer et al. 1997, Altheide & Hammer 1997).



**Abb. 3: Schematische Darstellung des Y-Chromosoms**

Detaillierte Beschreibung von *DYS287*, nach Hammer et al. 1997. p (kurzer Arm), q (langer Arm), an den Enden die PAR. Das Segment 2 enthält den poly-A Bereich.

### 1.3.2. Charakterisierung von SRY-1532 (A→G Transition)

Das Gen SRY (sex determining region on the y chromosom) wurde 1990 erstmals aus der geschlechtsdeterminierenden Region des Y-Chromosoms isoliert. Versuche zeigten, dass die Expression des humanen SRY-Gens in weiblichen Maus-Embryonen zur Ausbildung von Testikeln führt (Koopman et al. 1991). Noch 1923 bestand die These, dass die Anzahl der X-Chromosomen Einfluss auf die Geschlechtsdeterminierung hat (Painter 1923). Diese Annahme wurde 1959 von Jacobs und Strong widerlegt.

Mary Lyon stellte 1961 die These auf, dass in normalen weiblichen Somazellen eines der beiden X-Chromosomen inaktiviert ist. Während der Embryogenese (12.-16. Tag nach Befruchtung) erfolgt die irreversible Inaktivierung entweder des mütterlichen oder des väterlichen X-Chromosoms in allen somatischen Zellen. Das X-Chromatin (Sex-Chromatin, Barr-Körper) dient als morphologisches Zeichen der X-chromosomalen Inaktivierung (Mittal et al. 2008). Es handelt sich dabei um ein in 40% der weiblichen Somazellen in Erscheinung tretendes Kernkörperchen, das als dichte randständige Kernsubstanz erkennbar ist. Dieses wird nur bei Zellen gefunden, die zwei X-Chromosomen enthalten, also bei Frauen oder Personen mit numerischer chromosomaler Aberration, nicht aber bei Männern. Laut Lyon-Hypothese entspricht die Anzahl der Barr-Körperchen der Anzahl der in einer Zelle vorhandenen X-Chromosomen minus eins. Die Lyon-Hypothese wird durch folgende Beobachtungen gestützt:

- 1) Konduktorinnen mit X-chromosomal bedingtem Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel haben entsprechend dem Enzymdefekt zwei verschiedene Erythrozytenpopulationen.
- 2) Im Falle des heterozygoten Auftretens der Muskeldystrophie vom Typ Duchenne können bei den betroffenen Patienten bei einer Untersuchung des Muskelgewebes herdförmige pathologische Areale neben gesunden Bezirken nachgewiesen werden.
- 3) Die Bildung des Gerinnungsfaktors F VIII wird von Genen im X-Chromosom gesteuert. Die Frau müsste theoretisch die doppelte Aktivität an F VIII haben, es finden sich aber wie beim gesunden Mann nur ca. 100 %.

Allerdings gibt es Beobachtungen, die gegen die Lyon-Hypothese sprechen:

- 1) Das Ullrich-Turner Syndrom (X0): Es besteht phänotypisch ein Unterschied zwischen normalen weiblichen Personen und X0-Individuen. Erklärt wird dies durch die Aktivität beider X-Chromosomen bis zur Inaktivierung eines der beiden Chromosomen am Ende der zweiten Woche nach Befruchtung.
- 2) Das Klinefelter-Syndrom (XXY): Auch hier besteht ein phänotypischer Unterschied zwischen XXY- und XY-Mann.
- 3) Trotz der Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen ist die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Aktivität bei weiblichen Neugeborenen höher als bei männlichen (Scholz A., 1995).

Heute sind verschiedene spezifische Gene des Y-Chromosoms bekannt, die die Geschlechtsdeterminierung während der Embryogenese durch die Entwicklung von interstitiellen Hodenzellen steuern. Genaue Erklärungen zum Wirkmechanismus von SRY sind derzeit allerdings noch unbekannt (Graves et al. 1995). Die Mutationen des SRY-Gens spielen eine wichtige Rolle im klinischen Alltag. Beim Swyer-Syndrom (XY-Frau) beispielsweise ist bei 20-30% der Patientinnen eine Deletion oder Punktmutation des SRY-Gens nachzuweisen (Meschede et al. 1999). Das Krankheitsbild des Swyer-Syndroms ist definiert durch die Kombination aus weiblichem Habitus, männlichem Karyotyp (46 XY) und beidseitigen Stranggonaden. Oftmals handelt es sich um eine familiäre Genläsion, wobei Mutationsträgerinnen innerhalb der Familie auch eine normale Geschlechtsentwicklung haben können. Auch ohne nachweisbare Veränderungen des SRY-Gens treten gelegentlich familiäre Häufungen des Swyer-Syndroms auf. Hier wie auch bei den sporadischen Fällen mit normalem SRY-Gen ist die Ursache der Erkrankung unklar (Meschede et al. 1999). Nennenswert ist an dieser Stelle ebenfalls das Krankheitsbild des XX-Mannes. Unter den XX-Männern sind z.B. 75% Träger einer Translokation, durch die das SRY-Gen vom Y- auf ein X-Chromosom geraten ist (Wieacker et al. 1996). Diese sog. „SRY-positiven“ Patienten werden klinisch meist erst im Erwachsenenalter durch eine endokrine Hodeninsuffizienz und / oder Infertilität auffällig. Die Genitalstrukturen sind in der Regel eindeutig männlich ausgeprägt, wobei die Hoden hypoplastisch sind. Viele

SRY-negative XX-Männer weisen dagegen nur partiell virilisierte Genitalmerkmale auf. Die Mechanismen, die bei SRY-negativen XX-Männern die Geschlechtsdifferenzierung stören, sind bislang ungeklärt (Meschede et al. 1999).

Bei dem in dieser Arbeit typisierten SRY-1532 Locus handelt es sich um eine Basensubstitution (Adenin zu Guanin) an der Position 1532 des SRY-Gens. Die Typisierung erfolgte mit der PCR und einem anschließenden Restriktionsverdau mit Dra III (bakterielles Restriktionsenzym). Das SRY-Gen ist derzeit nicht nur wegen seiner geschlechtsdeterminierenden Funktion populär, der SRY-Polymorphismus hat zudem eine entscheidende Bedeutung in evolutionären Studien eingenommen. SRY-1532 als binärer Polymorphismus hat eine niedrige Mutationsrate und stellte lange ein einmaliges Ereignis dar, bis Rückmutationen von Guanin zu Adenin in phylogenetischen Netzwerken entdeckt wurden. Das genaue Mutationsverhalten im Locus SRY-1532 ist derzeit noch nicht aufgeklärt. Insgesamt stellt der Polymorphismus aber eine der frühesten Entdeckungen auf dem Y-Chromosom dar (Jobling 1997, Jobling et al. 2003).

### **1.3.3. Charakterisierung von 92R7 (C→T Transition)**

Im Rahmen einer Studie, die sich mit der Struktur des Y-Chromosoms befasste, wurde ein weiterer RFLP entdeckt (Mathias et al. 1994). RFLPs entstehen durch DNA-Veränderungen wie z.B. Deletionen, Insertionen oder Basenaustausche. Hierdurch werden die Schnittstellen der DNA so verändert, dass durch Schneiden mit einer Restriktionsendonuklease unterschiedlich lange DNA-Fragmente erzeugt werden. Beim 92R7-Polymorphismus handelt es sich um eine Sequenz, welche durch einem Restriktionsverdau von männlicher DNA mit dem Enzym Hind III 7 fragmentiert wird. Die Fragmente unterscheiden sich in der Länge, sie sind entweder 4,6kb oder 6,7kb lang. Da beim Einsatz anderer Restriktionsenzyme keine Varianten gefunden wurden, ist es wahrscheinlich, dass der Polymorphismus infolge einer Punktmutation an der Zielsequenz des Hind III entstanden ist (Mathias et al. 1994). Heute liegt eine genaue Beschreibung der Basensubstitution am 92R7-Locus auf Yp vor, die mit Hilfe der PCR und anschließendem Restriktionsverdau nachgewiesen werden kann. Wie auch beim

SRY-1532 Locus geht man von einer früh stattgefundenen Punktmutation in der männlichen Evolution aus.

#### **1.3.4. STRs (Short tandem repeats)**

Nur maximal 3% der menschlichen DNA enthält Informationen für Genprodukte, der Rest besteht unter anderem aus short tandem repeats (STRs), auch Mikrosatelliten genannt. Sie stellen die häufigste Form repetitiver DNA dar. Es handelt sich um eine Form von Satelliten, die durch Wiederholungslängen klassifiziert ist. Die Mikrosatelliten weisen Wiederholungseinheiten von 1-7 bp auf, die in vielen Kopien hintereinander angeordnet vorliegen (Brinkmann 2004). Die Funktion dieser Tandemwiederholungen, von denen das humane Genom zwischen 50.000 und 100.000 enthält, ist noch unbekannt (Löffler G. und Petrides P.E., 1997). Durch die variable Anzahl der repetitiven Einheiten wird der Polymorphismus bestimmt. Der Entstehung von Mikrosatelliten liegt unter anderem der Mechanismus des „polymerase-slippage“ zugrunde (Brinkmann et al. 1998). Hierbei handelt es sich um ein Verrutschen der DNA-Einzelstränge während der Replikation. Die STRs werden abhängig von der Länge des wiederholten Motivs in Di-, Tri-, Tetra- und Pentanukleotide unterschieden. Die Struktur und die Mutationsrate eines Mikrosatelliten stehen miteinander in Verbindung, denn Dinukleotid-STRs mutieren signifikant häufiger als Pentanukleotide. Zudem hat die Anzahl der Repeats Einfluss auf die Mutationsrate. Wie in der Studie von Brinkmann et al. 1998 beschrieben, erhöht sich die Wahrscheinlichkeit auf ein erneutes Mutationsereignis mit der Anzahl der vorhandenen Repeats. Nach Weber & Wong (1993) liegt die mittlere Mutationsrate für autosomale STRs bei  $1,2 \times 10^{-3}$ . Es ist hilfreich, die Mutationsraten sowohl für die forensische Applikation der Systeme (Interpretation von Nichtidentität) als auch für die molekulare Evolution (Interpretation phylogenetischer Zusammenhänge) zu kennen.

Zu Beginn der 90-er Jahre wurde der erste Mikrosatelliten-Locus des Y-Chromosoms entdeckt, DYS19 (Roewer et al. 1992). Mittlerweile sind nach internationalen Multicenterstudien (Kayser et al. 1997, Kayser et al. 2000, Lim et al. 2007) zahlreiche Mikrosatelliten des Y-Chromosoms in multiplen Populationen typisiert worden. Die

Mutationsrate für Y-chromosomale STRs wurde von Kayser et al. mit  $2,8 \times 10^{-3}$  berechnet (Kayser et al. 2000).

Autosomale wie auch Y-chromosomale STRs finden ihre Anwendung in der forensischen, populationsgenetischen und klinischen Praxis. Nachdem zu Beginn der neunziger Jahre erstmals variable Mikrosatelliten auf dem Y-Chromosom innerhalb der MSY-Region (zuvor als NRY-Region bekannt) beschrieben wurden, gewannen sie in der Forensik an Gewicht. Durch die Kombination mit autosomalen STRs werden ein eindeutiger Geschlechtsnachweis und gleichzeitig ein männlicher Identitätsnachweis möglich. Besonders im Rahmen der Aufklärung von Gewaltverbrechen spielen die Y-chromosomalen STRs eine große Rolle, da 93% der Gewaltverbrechen gegen andere Personen oder 99% der Sexualverbrechen zum Beispiel in England und Wales von männlichen Personen begangen werden (Jobling et al. 1997). In Vergewaltigungsfällen wird die Analyse von Mischspuren, die aus weiblicher und männlicher DNA bestehen, durch die Y-chromosomalen Marker erleichtert, da die männlichen Merkmale separat dargestellt werden können.

Neben der Forensik finden autosomale STRs breite Anwendung in der Vaterschaftsdiagnostik. Klassische Systeme wie z.B. die Blutgruppensysteme ABO sind dadurch in den Hintergrund getreten. Werden STRs kombiniert, können Ausschlusswahrscheinlichkeiten von  $\geq 99,99\%$  erreicht werden, d.h. nur einer von 10000 Nicht-Vätern kann letztlich nicht als wahrer Vater ausgeschlossen werden. Die Untersuchung Y-chromosomaler STRs liefern insbesondere bei Defizienzfällen zusätzliche, wertvolle Informationen in der Abstammungsbegutachtung hinsichtlich männlicher Abstammungslinien.

Mikrosatelliten unterscheiden sich in ihrer Sequenzstruktur. Sie können in einfacher und komplexer Form vorliegen (Hohoff et al. 1999). Aufgrund ihrer Variabilität stellen sie einen wichtigen Marker in der Auflösung der menschlichen Evolution dar. In Anbetracht der von Weber & Wong 1993 und Heyer et al. 1997 ermittelten hohen Mutationsrate von ca.  $10^{-3}$  für autosomale und für Y-chromosomale Loci ist es möglich, dass Allele mit gleicher Anzahl von Wiederholungssequenzen mehrmals und unabhängig voneinander im Rahmen von Rückmutationen entstehen. Eine ergänzende Arbeit von Hohoff et al. 2007 beschäftigt sich mit dem Mutationsverhalten und den

Mutationsraten der Y-STRs basierend auf westfälischen Vater-Sohn-Paaren. Es wurde gezeigt, dass die Di- und Pentanukleotide geringere Mutationsraten aufweisen als die Tetranukleotide. Des Weiteren ändert sich das Mutationsverhalten bei zunehmendem Alter der Väter, indem die Mutationsrate zunimmt. Bereits Jobling & Tyler-Smith haben 1995 darauf hingewiesen, dass STRs aufgrund der höheren Mutationsrate für Analysen von weniger weit zurückliegenden Ereignissen in der humanen Evolution geeignet sind. Erwartungsgemäß finden Y-STRs somit ergänzend Verwendung in populationsgenetischen Studien, einschließlich der Konstruktion phylogenetischer Stammbäume, welche die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen verschiedenen Populationen demonstrieren können (Brinkmann et al. 1996a).

Da Y-STRs keiner Rekombination unterliegen und dadurch Loci gekoppelt vererbt werden, können Einzelloci als so genannte Haplotypen zusammengefasst werden. Durch die Haplotypenanalyse lassen sich z.B. männliche Populationen differenzierter charakterisieren.

#### **1.4. Populationsgenetik**

Die Populationsgenetik beschäftigt sich mit der Häufigkeit verschiedener Genotypen in einer Population. Dabei ist die Population als eine Fortpflanzungsgemeinschaft von Individuen einer Art mit einem gemeinsamen Genpool definiert. Der Genpool ist die Summe aller Gene und Allele, die in der Population vorkommen. Der Genpool unterliegt unterschiedlichen Evolutionsfaktoren, wie z.B. der Gendrift. Als Gendrift wird eine zufällige Veränderung der Genfrequenz innerhalb des Genpools einer Population bezeichnet. Da die genetische Drift in kleineren Populationen stärker ins Gewicht fällt, hat sie einen großen Einfluss auf die Evolution von Gründerpopulationen. Aus Sicht der Populationsgenetik ist Gendrift ein Wahrscheinlichkeitseffekt. Die Gene, die an die nachfolgende Generation weitergegeben werden, sind keine identischen Kopien, sondern eine Stichprobe mit zufälligen Schwankungen, auch individuelle Variabilität genannt. Im Gegensatz zur natürlichen Selektion ist der Gendrift eine Veränderung in der Häufigkeit der Allele, unabhängig davon, ob sie vorteilhaft oder nachteilig für die Phänotypen sind. Die natürliche Selektion dagegen bevorzugt die

Allele, die sich positiv auf die Phänotypen auswirken. In großen Populationen hat die natürliche Selektion den größeren Einfluss auf die Veränderung der Genfrequenzen. In kleineren Populationen dagegen werden die größeren statistischen Schwankungen durch Gendrift die Veränderungen durch die natürliche Selektion überlagern.

Kommt es innerhalb des Genpools zum Beispiel zufällig durch ein Naturereignis zu einer Verringerung der Allelfrequenz und somit auch zu einer Verminderung der Variabilität in der Population, spricht man vom Flaschenhalseffekt. Hierbei wird die Art den neuen Umweltbedingungen angepasst und bildet eine neue Vielfalt von Genen.

Die Populationsgenetik findet in verschiedenen Bereichen Anwendung. Zum einen stellt sie die Grundlage zur Untersuchung der evolutionären Vorgänge in der Entwicklungsgeschichte des Menschen dar. Ferner bildet die genetische Beschreibung einer Population die Basis für das Verstehen von epidemiologischen Zusammenhängen genetischer Erkrankungen. Schließlich spielt sie eine entscheidende Rolle in der Aufklärung von Kriminaldelikten sowie in der Begutachtung von Vaterschaften. Im Rahmen von Straftaten geht es häufig um die Identifikation von biologischen Spuren, die ein Täter am Tatort hinterlassen hat. Mit Hilfe von polymorphen Markern können für den Spurenverursacher möglicherweise Hinweise auf eine ethnische Gruppe gewonnen werden. Die vielfältige Anwendung von populationsgenetischen Methoden ist auf die Entwicklung einfacher moderner molekularbiologischer Verfahren wie z.B. die PCR zurückzuführen.

Im Rahmen anthropologischer Studien werden die Polymorphismen in der jeweiligen Population analysiert. Der Polymorphismus ist die allele Form eines Gens. Während Polymorphismen der mitochondrialen DNA (mtDNA) aufgrund ihrer maternalen Vererbung weibliche Linien beschreiben, charakterisieren solche der NRY durch paternale Vererbung männliche Linien. Aufgrund der fehlenden Rekombination ist es möglich, polymorphe Allele mehrerer Y-Loci in Form von Haplotypen zusammenzufassen. Derartige Haplotypen können ein gesamtes Y-Chromosom genauer charakterisieren. Y-chromosomale Polymorphismen bieten gegenüber mitochondrialen den Vorteil, dass sie eine mindestens zehnfach geringere Mutationsrate für Basensubstitution aufweisen. Somit ist auch die Wahrscheinlichkeit für Rückmutationen geringer. Durch die höhere Komplexität des Y-Chromosoms gibt es weiterhin ein

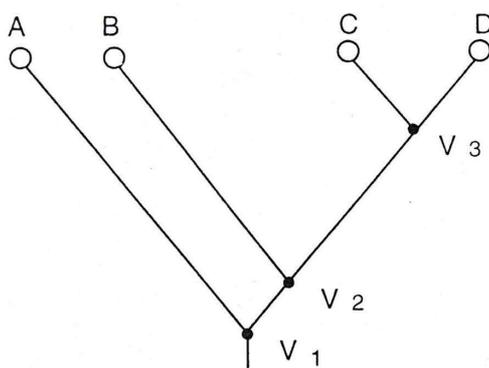
größeres Sortiment von Mutationstypen mit unterschiedlichen Mutationsraten, die ein Studium verschiedener zeitlicher Ebenen humaner Evolution erlauben sollten. So wie alle heutigen mtDNA Moleküle über Polymorphismen auf ein gemeinsames ursprüngliches mtDNA Molekül zurückzuführen sind (mitochondriale EVA), wären auch alle heutigen Y-Chromosomen auf ein gemeinsames ursprüngliches Y-Chromosom (Y-chromosomaler ADAM) zurückzuführen.

Die Verwendungen Y-chromosomaler DNA-Polymorphismen sind, wie von DNA-Polymorphismen allgemein, abhängig von ihrer Mutationsrate und einer effizienten Form ihrer Analyse. Für evolutionsbiologische bzw. populationshistorische Fragestellungen eignen sich besonders binäre Polymorphismen, die bei einer geringen Mutationsrate einmalige Ereignisse darstellen. Die Mutationsrate von nukleären und somit auch von Y-chromosomalen Basensubstitutionen ist mit ca.  $5 \times 10^{-7}$  pro Base pro Generation so gering, dass man von singulären Ereignissen ausgehen kann (Hammer 1995). Über PCR detektierbare Y-chromosomale Basensubstitutionen sind somit die Marker der Wahl für die Erforschung weiter zurückliegender Ereignisse in der männlichen humanen Evolution. Bisher gibt es keine hinreichenden Daten über den Ort des Y-chromosomalen Ursprungs des Menschen.

Einige Populations-Dendrogramme, basierend auf Y-chromosomalen Polymorphismen, zeigen eine primäre Trennung zwischen afrikanischen, Sub-Sahara und nicht-afrikanischen Populationen, z.B. bei der Verwendung von YAP (Hammer 1994), YAP/PN1-3/PolyA/ DYS271/DYS19 (Hammer et al. 1997).

### 1.5. Phylogenetischer Baum

Verwandtschaftliche Beziehungen werden durch Stammbaumrekonstruktion grafisch dargestellt. Um phylogenetische Beziehungen und Stammbaumrekonstruktionen zu analysieren, gibt es drei unterschiedliche Methoden: Die evolutionäre Taxonomie, die phylogenetische Systematik oder Kladistik und die numerische Taxonomie oder Phänetik. Die phylogenetische Systematik untersucht die Verteilung bestimmter Merkmale in einer Gruppe verwandter Individuen. Im Rahmen der Kladistik entstehen dichotome Verzweigungen, die die Aufspaltung einer Elternart in zwei Tochterarten mit gleichem taxonomischem Rang darstellen. Wird ein phylogenetischer Baum grafisch in Form eines Kladogramms dargestellt, zeigt sich in der Darstellung der Abfolge der Artaufspaltung, welche Arten am nächsten miteinander verwandt sind. Eine Klade ist eine geschlossene Abstammungsgemeinschaft, d.h. es gibt einen gemeinsamen Vorfahren. Kladogramme weisen keine Zeitachse auf. Die Knoten eines phylogenetischen Baumes werden als taxonomische Einheit bezeichnet und stellen die Verbindung zwischen dem Vorfahren und dem nächsten gemeinsamen Verwandten dieses Vorfahren dar. Um die Ergebnisse analysierter Gene in einem phylogenetischen Baum darzustellen, werden Heuristiken verwendet. Dazu gehören Maximum-Likelihood-, Neighbor-Joining- und Maximum Parsimony-Methode sowie die Bayes'sche Analyse. Die Abbildung 4 zeigt ein Beispiel für ein Kladogramm.



**Abb. 4: Kladogramm**

(Henke, W. und Rothe, H. Stammesgeschichte des Menschen Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1999)

Um verwandtschaftliche Beziehungen in Stammbäumen übersichtlicher darzustellen und um sie besser zu verstehen, werden heute Kombinationen von Y-STRs als Haplotypen und Kombinationen binärer Polymorphismen als Haplogruppen (HG) definiert. Binäre Marker wurden in den letzten Jahren verstärkt eingesetzt, da sie einfach zu analysieren sind und etablierte Haplogruppen definieren. Die Zugehörigkeit zu einer definierten HG ist in der Anthropologie und in der Forensik von großem Interesse, da HG eine geografische Spezifität aufweisen. Forensisch kann somit möglicherweise eine Herkunftshypothese eines unbekanntes männlichen Spurenlegers ermittelt werden kann. Im Jahr 2002 veröffentlichte das YCC eine Nomenklatur für einen phylogenetischen Baum auf der Grundlage binärer Y-chromosomaler Polymorphismen. Dieser Stammbaum (siehe Abb. 5) zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen 153 Haplogruppen auf der Basis von 243 binären Markern und bietet somit eine standardisierte Nomenklatur. Die Y-chromosomalen Abstammungslinien sind in Form von Kladen dargestellt, welche mit Großbuchstaben gekennzeichnet sind. Die Unterkladen sind ergänzend mit Nummern versehen. Somit ist jederzeit eine Ergänzung des Baumes über die Typisierung neuerer Y-SNPs möglich. Paragruppen, die zu einer Hauptklade aber nicht einer Unterklade zuzuordnen sind, erhalten zusätzlich einen Stern.



## 1.6. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten PCR-Bedingungen etabliert werden, die zur Darstellung der drei binären Polymorphismen YAP, SRY-1532 und 92R7 führen. Diese Marker wurden gewählt, da sie die ältesten bekannten Mutationsereignisse im menschlichen Y-Stammbaum darstellen. Die zu typisierenden Proben stammen aus verschiedenen Populationen: Buschmänner aus der Region Tsumkwe/ Namibia, Han Chinesen aus der Region Shenyang, Deutsche aus Nordrhein-Westfalen, Japaner aus der Region Shiga, Khalk-Mongolen aus der Mongolei, Ovambo aus der Region Oshakati/Angola, West-Pygmäen aus der Region Biaka in Zentralafrika, Ost-Pygmäen aus der Region Elfe/ D.R. Kongo und Türken aus der Region Adana. Aus den Ergebnissen galt es, die Allelfrequenzen zu ermitteln und die Zuordnung in Haplogruppen darzustellen. Nach Erstellung der möglichen Haplogruppen sollte geprüft werden, ob diese nach aktueller Nomenklatur (nach YCC 2002) dem phylogenetischen Baum zuzuordnen sind. Schließlich sollte die Frage geklärt werden, ob ethnische Gruppen klassifizierbar sind. Zusätzlich wurden die Y-STRs einbezogen unter der Fragestellung, ob die Y-STR-Haplotypen durch die Ergänzung binärer Marker weiter differenziert und individualisiert werden können.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Proben

Die analysierten Blutproben stammen aus folgenden Regionen:

Buschmänner:	Tsumkwe, Namibia
Han Chinesen:	Shenyang, China
Deutsche:	Nordrhein-Westfalen
Japaner:	Shiga
Khalk-Mongolen:	Mongolei
Ovambo:	Oshakati, Angola
West-Pygmäen:	Biaka, Zentralafrika
Ost-Pygmäen:	Efe, D.R. Kongo
Türken:	Adana

### 2.2. Extraktion von DNA aus Blutproben

Bei der angewendeten modifizierten Chelex-Extraktion (Wiegand et al. 1993) wurde mittels Kochen unter Zugabe des Styrolharzes Chelex 100 die DNA aus den Zellen freigesetzt. Chelex 100 ist in der Lage, mit seinen gepaarten Iminodiacetat-Gruppen mehrwertige Metallionen zu chelatisieren, die ansonsten unter hohen Temperaturen die DNA katalytisch fragmentieren könnten (Singer-Sam et al. 1989). Zusätzlich wurde den Ansätzen Proteinase K zugefügt, um die Effizienz der Lyse zu erhöhen (Wiegand et al. 1993).

Die Proben lagen in Form von getrockneten Blutflecken auf Baumwollstoffträgern vor. Für die DNA-Isolierung wurde zunächst ein ca. 3 x 3 mm großes Stück des Baumwollträgers mit einer Schere ausgeschnitten und in ein mit 1 ml Aqua bidest. gefülltes 1,5 ml - Reaktionsgefäß überführt. Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Proben wiederholt auf dem Vortexer durchmischt. Im Anschluss daran wurde 5 min. bei 14000 x g zentrifugiert und 950 µl vom Überstand abgenommen und verworfen. Zu den verbliebenen 50 µl wurden

150 µl Chelex 100 und 50 µl Proteinase K-Lösung (2 mg/ml) zugegeben. Der Ansatz wurde auf dem Vortexer durchgemischt und dann bei 56 °C im Wasserbad für 30 min. inkubiert. Anschließend erfolgte nach 10 s Durchmischung eine Inkubationszeit von 8 min. bei 100 °C im Wasserbad. Nach abschließender Zentrifugation bei 14000 x g für eine Minute konnte der Überstand direkt für die PCR eingesetzt werden.

### 2.3. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der PCR basiert auf der in-vitro-Synthese von spezifischen DNA-Sequenzen durch eine thermostabile DNA-Polymerase. Es handelt sich um ein zyklisches Verfahren, bei dem es zu einer exponentiellen Zunahme der amplifizierten Moleküle kommt. Als Startpunkt fungieren bei der PCR zwei aus ca. 15-25 Basen bestehende Oligonukleotide, so genannte Primer. Aus den entsprechenden Reagenzien wurde für die verschiedenen Systeme ein Mastermix hergestellt und in die einzelnen Reaktionsgefäße vorgelegt. Anschließend wurde eine definierte Menge der extrahierten DNA dazugegeben.

#### PCR-Ansätze:

##### 2.3.1. YAP (nach Hammer and Horai 1995)

Primer 1: 5' CAG GGG AAG ATA AAG AAA TA 3'

Primer 2: 5' ACT GCT AAA AGG GGA TGG AT 3'

Ansatz:

2,0 µl	25 mM	MgCl <sub>2</sub> (Applied Biosystems, Darmstadt)
0,5 µl	2 mg/ml	BSA (Sigma, Deisenhofen)
2,0 µl	10 x	Reaktionspuffer Eurogentec (750 mM, Tris-HCl, pH 9,0, 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 % (w/v) Tween 20)
2,0 µl	2,5 mM	dNTPs; je 2,5 mM dGTP, dATP, dCTP, dTTP
0,1 µl	100 µM	Primer 1 (Eurogentec)
0,1 µl	100 µM	Primer 2 (Eurogentec)
0,4 µl	0,1 U	Goldstar-DNA-Polymerase (Eurogentec)
2 µl		DNA-Extrakt
ad 25 µl Aqua bidest.		

**2.3.2. SRY-1532 (nach Whitfield et al. 1995)**

Primer 1: 5' TCC TTA GCA ACC ATT AAT CTG G 3'

Primer 2: 5' AAA TAG CAA AAA ATG ACA CAA GGC 3'

Ansatz:

1,5 µl	25 mM	MgCl <sub>2</sub> (Applied Biosystems, Darmstadt)
0,5 µl	2 mg/ml	BSA (Sigma, Deisenhofen)
2,0 µl	10 x	Reaktionspuffer Eurogentec (750 mM, Tris-HCl, pH 9,0, 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 % (w/v) Tween 20)
2,0 µl	2,5 mM	dNTPs; je 2,5 mM
		dGTP, dATP, dCTP, dTTP
0,1 µl	100 µM	Primer 1 (Eurogentec)
0,1 µl	100 µM	Primer 2 (Eurogentec)
0,4 µl	0,1 U	Goldstar-DNA-Polymerase (Eurogentec)
2 µl		DNA-Extrakt
ad 25µl Aqua bidest.		

**2.3.3. 92R7 (nach Kwock et al. 1996)**

Primer 1: 5' TGC ATG AAC ACA AAA GAC GTA 3'

Primer 2: 5' GCA TTG TTA AAT ATG ACC AGC 3'

Ansatz:

2,5 µl	25 mM	MgCl <sub>2</sub> (Applied Biosystems, Darmstadt)
0,5 µl	2 mg/ml	BSA (Sigma, Deisenhofen)
2,0 µl	10 x	Reaktionspuffer Eurogentec (750 mM Tris-HCl, pH 9,0, 200 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,1 % (w/v) Tween 20)
2,0 µl	2,5 mM	dNTPs; je 2,5 mM
		dGTP, dATP, dCTP, dTTP
0,1 µl	100 µM	Primer 1 (Eurogentec)
0,1 µl	100 µM	Primer 2 (Eurogentec)
0,4 µl	0,1 U	Goldstar-DNA-Polymerase (Eurogentec)
2 µl		DNA-Extrakt
ad 25µl Aqua bidest.		

Die Amplifikationen wurden in automatischen Thermocyclern (Trio-Thermoblock, Biometra, Göttingen) durchgeführt. Hierbei wurden zunächst die Stränge der Ziel-DNA durch eine Erhöhung der Temperatur auf 94 °C getrennt (Denaturierung). Danach wurde der Ansatz auf 53 °C bzw. 57 °C abgekühlt, wodurch sich die Primer an die spezifische Zielregion anlagern konnten (Annealing). Im Anschluss daran erfolgte bei 72 °C die DNA-Neusynthese durch die DNA-Polymerase (Extension). Die drei Amplifikationszyklen wurden insgesamt 30 mal durchgeführt.

**Tab. 1: Amplifikationsbedingungen im Überblick**

	Temp. (°C)	YAP	SRY-1532	92R7
Denaturierung	94	30 s	30 s	30 s
Annealing		30 s	60 s	60 s
SRY-1532	57			
92 R7	57			
YAP	53			
Extension	72	30 s	30 s	30 s
Anzahl der Zyklen		30	30	30

#### 2.4. Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA zerlegen können. Sie erkennen eine spezifische Sequenz aus 4 bis 8 Basenpaaren und schneiden die DNA innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz. Es entstehen Fragmente unterschiedlicher Länge. Durch genetische DNA-Veränderungen, z.B. kleinere Deletionen, Insertionen oder Basenaustausche, können die Erkennungssequenzen der DNA verändert sein, sodass die DNA nicht fragmentiert wird. In Bakterien sorgen Restriktionsendonukleasen für den Abbau eingedrungener artfremder DNA. Arteigene DNA wird an den Erkennungssequenzen durch Methylierung modifiziert und somit vor Restriktion geschützt.

### 2.4.1. SRY-1532

Mit Hilfe des Restriktionsenzym Dra III aus *Deinococcus radiophilus* (Erkennungssequenz: CAC NNN/GTG) wurde bei vorhandener A→G Transition das PCR-Produkt gespalten. Die Länge des ungeschnittenen Produktes betrug 167 bp und nach dem Restriktionsverdau 55 und 112 bp.

#### SRY-1532-Sequenz:

5'- TCC TTA GCA ACC ATT AAT CTG GTT TTA GTC TCT ATT CAT TTG CCT  
TTC CTG GAT ATT TCA TAT ACA TGG GAT CAT TCA GTA TCT GGC CTC  
TTG TAT CTG ACT TTT T **CA CAC AGT (A/G)** TA ACA TTT TCA AGG TTC ACC  
TAT GTG GTG CCT TGT GTC AGT TTT TGC TAT TT - 3'

#### Ansatz:

5,0 µl		PCR-Produkt
0,4 µl	1 U/µl	Dra III (ROCHE Mannheim)
2,0 µl	10 x	Inkubationspuffer (ROCHE Mannheim)
ad 20 µl Aqua bidest.		

Die Inkubationszeit betrug 1,5 h bei 37 ° C im Wasserbad.

### 2.4.2. 92R7

Mittels Restriktionsendonuklease Hind III aus *Haemophilus influenzae* (Erkennungssequenz: A/AGCTT) wurden die Amplikone (55 bp) bei Vorliegen einer Mutation (Cytidinbase) nicht gespalten. War der Wildtyp (Thymidinbase) vorhanden, wurde das PCR-Produkt gespalten (25 und 30 bp).

#### 92R7-Sequenz:

5' - TGC ATG AAC ACA AAA GAC GTA G **AA G(C/T) T** TGT CTT TGC TGG TCA  
TAT TTA ACA ATG C - 3'

Ansatz:

10 µl		PCR-Produkt
1 µl	1 U/µl	Hind III (ROCHE Mannheim)
2 µl	10 x	Inkubationspuffer (ROCHE Mannheim)
7 µl		Aqua bidest

Der Ansatz wurde 4 h bei 37° C im Wasserbad inkubiert.

## 2.5. Elektrophorese

Nach einem Verfahren von Allen et al. (1989) wurde unter nativen Bedingungen die horizontale Polyacrylamidelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine Isotachoelektrophorese mit Borat-Ionen als Leitonen. Die Trenneigenschaften eines Gels sind abhängig von den Acrylamidkonzentrationen und dem Vernetzungsgrad. Für die Systeme YAP, SRY-1532 und 92R7 wurden 0,45 mm dicke 8 %ige Acrylamidgele verwendet. Die Abmessungen betragen 12 cm x 26 cm. Somit ergab sich eine Trennstrecke von 10 cm.

Folgende Reagenzien wurden für die Herstellung der 8 %igen Gele verwendet:

4 ml	30 %	Acrylamid/Bisacrylamidlösung: (29,1 % (w/v) Acrylamid, 0,9 % (w/v) Bisacrylamid)
3 ml	0,4 M	Tris/Sulfat, pH 9,0
8 ml		Aqua bidest.

Durch Zugabe von

105 µl	10 % (w/v)	Ammoniumperoxodisulfat (APD)
5,3 µl		N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)

wurde die radikalische Polymerisation katalysiert. 15 ml dieses Lösungsgemisches wurden zwischen zwei Glasplatten auf PAG-Folie (Serva, Heidelberg) gegossen. Nachdem das Gel nach ca. 2 Stunden vollständig polymerisiert war, wurde jeweils 3,5 µl des Amplifikates kathodisch auf Glasfasergewebeplättchen (Pharmacia, Freiburg), aufgetragen. Für die Elektrophorese wurden zwei mit Elektrodenpuffer

getränkte Agarose-Streifen entsprechend der Trennstrecke in einem Abstand von ca. 10 cm angebracht.

Elektrodenpuffer (Budowle et al. 1991):

1,28 M	Tris/Borat, pH 9,0
0,05 % (w/v)	Bromphenolblau

Die Elektrophorese wurde auf Multiphor II Gelelektrophoresekammern (Pharmacia, Freiburg) mit Multidrive XL Transformatoren (Pharmacia) bei einer Kammertemperatur von 15° C durchgeführt. Die Elektrophoreseparameter waren 1000 V, 20 mA, und 10 W. Beendet wurde die Elektrophorese nach etwa 30 Minuten, sobald der Farbstoff (Bromphenolblau) die Anode erreicht hatte.

Für den Locus 92R7 wurde nach dem Restriktionsverdau ein 14 %iges Gel verwendet, da die kurzen Amplikone 25 und 30 bp aufwiesen und im 8 %igem Gel nicht darstellt werden konnten.

## 2.6. Silberfärbung

Um die DNA-Amplikone als Banden auf dem Gel sichtbar zu machen, erfolgte die modifizierte Silberfärbung nach Budowle et al. (1991).

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

Fixierer:	2,0 % (v/v)	HNO <sub>3</sub>
Silbernitratlösung	0,1 % (w/v)	AgNO <sub>3</sub>
Entwickler:	0,28 M	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	0,05 % (v/v)	Natriumthiosulfat
	0,24 % (v/v)	Formaldehyd
Stopplösung:	10,0 % (v/v)	Essigsäure
Konservierungslösung:	5,0 % (v/v)	Glycerin

Dem Färbvorgang wurde unter ständigem Schütteln jeweils etwa 100 ml Flüssigkeit durchgeführt. Zunächst wurden die Gele 5 min. in HNO<sub>3</sub> fixiert und anschließend zweimal kurz in Aqua bidest. gespült. Die anschließende Inkubationszeit in

Silbernitratlösung betrug 20 min. Danach wurden die Gele wiederum kurz in Aqua bidest. gespült, bevor sie entwickelt wurden. Die Gele wurden solange im Entwickler inkubiert, bis sich die Banden deutlich auf den Gelen darstellten. Durch 3 min. Spülen in Essigsäure wurde die Entwicklung beendet. Nach 3 min. Spülvorgang in Aqua bidest. wurden die Gele für mindestens 5 min. in Glycerin inkubiert, um schließlich über Nacht im Wärmeschrank bei 80 °C getrocknet zu werden.

## 2.7. Sequenzierung

Die Sequenzierung der doppelsträngigen DNA erfolgt nach dem Prinzip des Kettenabbruchs durch farbstoffmarkierte Didesoxynukleotide (Sanger et al. 1977). Beginnend mit einem spezifischen Primer wird durch die DNA-Polymerase ein DNA-Strang verlängert. Die vier Basen sind zum Teil als fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide enthalten. Werden sie in den neuen Strang eingebaut, ist eine weitere Verlängerung durch die Polymerase nicht möglich, da sie keine 3'Hydroxygruppe besitzen. In einer zyklischen Wiederholung, ähnlich der PCR erfolgt die lineare Amplifikation dieser Abbruchsequenzen (Kettenabbruch). Die unterschiedlich markierten Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt, wobei die Fluoreszenzfarbstoffe spezifisch erkannt werden. Es resultiert ein Chromatogramm, das die Basensequenz des sequenzierten DNA-Stranges zeigt. Vor der Sequenzierreaktion erfolgte eine Aufreinigung (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen GmbH Hilden) des PCR-Produkts. Hierbei wurden ca. 20 µl Amplifikat mit der 5 fachen Menge PB Puffer (Binding-Buffer) in einem PCR-Eppendorfgefäß vermischt. Anschließend wurde die Gesamtmenge in die speziellen Filter-Reaktionsgefäße überführt und 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und auf den Filter wurden 600 µl PE Puffer (Ethanol-Waschpuffer) gegeben. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 10000 x g für 1 min. Im Anschluss wurde das Filtrat verworfen und durch Wiederholung der Zentrifugation wurde der restliche Puffer entfernt. Schließlich wurde der Filter in ein neues Eppendorfgefäß gesetzt und mit 30 µl Elutionspuffer gefüllt. Nach einminütiger Inkubation, wurde wiederum für 1 min. bei 10000 x g zentrifugiert. Anschließend befanden sich ca. 35 µl

gereinigtes Amplifikat im Reaktionsgefäß, von dem dann die entsprechende Menge (s.u.) für die eigentliche Sequenzierreaktion eingesetzt wurde.

Für die Sequenzierreaktion wurde folgender Ansatz hergestellt:

2 µl		aufgereinigte DNA
4 µl		Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) enthält: Pufferlösung, dNTP-Mix, ddNTP-Mix (markiert), Taq-Polymerase
1 µl	10 µM	Primer 1 bzw. Primer 2
ad 20µl Aqua bidest.		

Die Sequenzierreaktion erfolgte im Thermocycler 9600 (Perkin Elmer) unter den standardisierten Bedingungen:

1. Thermische Denaturierung der DNA (96 °C; 15 s).
2. Anlagerung der Primer an die Matrize (Annealing) (58 °C; 30 s).
3. Verlängerung der Primer mittels Taq-DNA-Polymerase (Extension) (60 °C; 4 min.).

Um nach der Sequenzierung überschüssige ddNTPs zu entfernen, erfolgte eine Aufreinigung mit Centriflex™ Gel Filtration Cartridge (MoBiTec). Die chromatografische Säule, welche die noch frei vorliegenden Terminatoren in einer Gel-Matrix bindet, wurde 1 min bei 750 x g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit dem Sequenzierprodukt überschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (2 min, 750 x g) enthielt das Eluat das aufgereinigte Sequenzierprodukt.

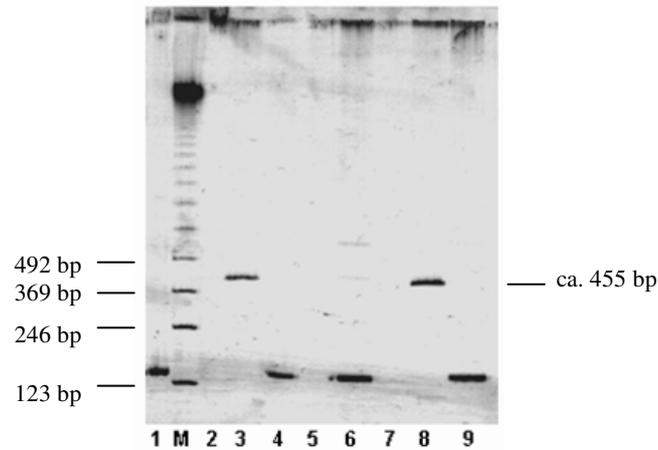
Abschließend erfolgte die Detektion der Sequenzierprodukte auf einem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt). Mittels Kapillargelelektrophorese werden die fluoreszenzmarkierten DNA-Amplikone ihrer Länge nach aufgetrennt. Durch Laserlicht werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, Licht spezifischer Wellenlängen zu emittieren. Dieses wird von einer CCD-Kamera registriert und mittels entsprechender Software grafisch dargestellt (Elektropherogramm).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Etablierung und Optimierung der drei biallelischen Marker

##### 3.1.1. YAP

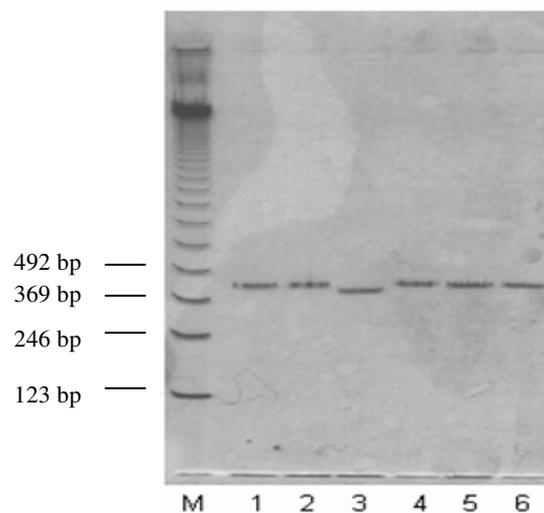
Bei dem YAP-System handelt es sich um einen Polymorphismus einer Alu-Insertion auf dem Y-Chromosom (vgl. 1.3.1.). Zur Typisierung wurden die von Hammer und Horai (1995) beschriebenen Primer verwendet. Zunächst wurde die Menge an Primer und  $\text{MgCl}_2$  sowie die Annealingtemperatur optimiert. Bei 53 °C Annealing mit 2,0 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0,1  $\mu\text{M}$  je Primer ergab sich ein deutliches Amplifikationsprodukt ohne Nebenbanden (Abb. 6). Daher wurden alle weiteren Bestimmungen mit diesen Bedingungen durchgeführt. Um Kontaminationen zu erkennen, wurde bei jedem Amplifikationsansatz eine Leerkontrolle mitgeführt. Diese enthielt alle PCR-Reagenzien mit Ausnahme der Matrize (DNA). Als YAP-positive bzw. YAP-negative Kontrolle dienten Populationsproben, die zuvor von Tatiana Zerjal (Dept. of Biochemistry, University of Oxford, England) analysiert wurden. Als YAP-negativ gelten die Proben, die keine Alu-Insertion aufweisen. Nach der Amplifikation stellte sich auf dem 8 %igen Gel ein Amplikon bei ca. 155 bp dar. Die YAP-positiven Proben mit Alu-Insertion dagegen wiesen ein Amplikon bei ca. 455 bp auf dem silbergefärbten PAA-Gel auf (Abb. 6). Zur Abschätzung der Amplikonlänge diente eine 123 bp DNA-Leiter (Gibco/BRL, Eggenstein). Die Leiter besteht aus DNA-Amplikonen im Abstand von 123 Basen mit einer Länge von 123 bp bis 4182 bp.



**Abb. 6: YAP-Polymorphismus im nativen PAA-Gel (8 %)**

M: 123 bp-DNA-Leiter; Spur 2: Leerkontrolle, Spur 3, 8: YAP-pos. (ca. 455 bp); Spur 1, 4, 6 9: YAP-neg. (ca. 155 bp); Spur 5, 7: Kein Amplifikationsprodukt.

Die Typisierung im YAP-System zeigte, wie erstmals von Hammer 1994 beschrieben, eine Längenvariation bei YAP-positiven Probanden (siehe Abb. 7). Die Sequenzierung der Längenvarianten bestätigte das Vorliegen eines unterschiedlich langen Poly-A-Schwanzes. Die kurze Variante hat am Ende 28 zusätzliche Adeninbasen, die lange Variante dagegen 45 Adeninbasen (Hammer 1995).



**Abb. 7: Längenvarianten bei YAP-positiven Probanden (8 % PAA)**

M: 123 bp-DNA-Leiter; Spur 1, 2, 4, 5, 6: YAP-pos. (lange Variante); Spur 3: YAP-pos. (kurze Variante).

**Tab. 2: YAP-Polymorphismen in verschiedenen Populationen**

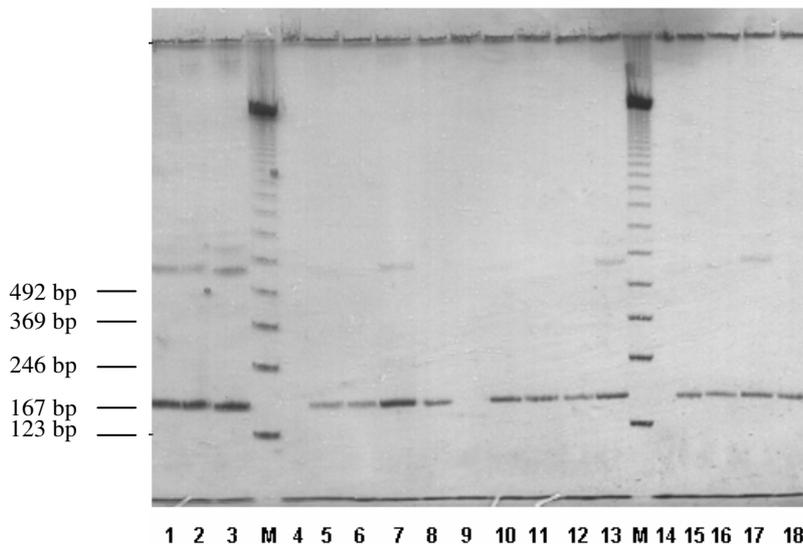
Population	n	YAP-positiv		YAP-negativ	
		n	Frequenz	n	Frequenz
Japaner	54	24	0,44	30	0,56
Han Chinesen	74	0	0,00	74	1,00
Khalk-Mongolen	18	0	0,00	18	1,00
Türken	86	13	0,15	73	0,85
Deutsche	87	6	0,07	81	0,93
Buschmänner	2	0	0,00	2	1,00
Ovambo	51	47	0,92	4	0,08
West-Pygmäen	5	2	0,40	3	0,60
Ost-Pygmäen	3	0	0,00	3	1,00
Gesamt	380	92	0,24	288	0,76

Die Tabelle 2 zeigt die Verteilung des YAP-Systems in den neun untersuchten Populationen. YAP-positive Probanden finden sich vor allem in der afrikanischen Bevölkerung (Ovambo, West-Pygmäen), unter den Japanern und in geringerer Frequenz auch in Europa (Türken, Deutsche). Die übrigen Asiaten (Han Chinesen, Khalk-Mongolen) sind ausnahmslos YAP-negativ.

### 3.1.2. SRY-1532

Der SRY-1532 Locus wurde mit den Primern nach Kwok und Whitfield (Whitfield et al. 1995) amplifiziert. Der Polymorphismus besteht in einer Transition A→G an der Position 1532 des SRY-Gens. Liegt dort eine Guaninbase vor, entsteht eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Dra III. Das Amplikon wird nicht geschnitten, wenn an der entsprechenden Position eine Adeninbase vorliegt. Zur Optimierung der Amplifikationsbedingungen wurde ebenfalls die Konzentration an MgCl<sub>2</sub>, die Primerkonzentration und die Annealing-Temperatur variiert. Die besten

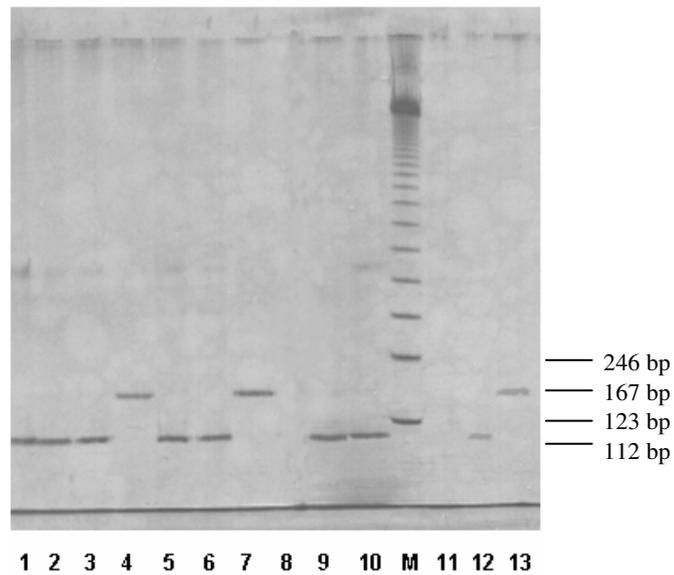
Amplifikationsergebnisse wurden erzielt durch Einsatz von 1,5  $\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$  und je 1  $\mu\text{M}$  Primer bei einer Annealingtemperatur von 57  $^\circ\text{C}$ . Zur Überprüfung des Amplifikationserfolges wurden die Amplifikate auf 8 %ige PAA-Gele aufgetragen und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. Als Standard wurde auch hier die 123 bp DNA-Leiter eingesetzt. Die Bande des Amplikons lag bei ca. 167 bp (siehe Abb. 8).



**Abb. 8: PAA-Gel (8 %) nach Amplifikation von SRY-1532**

M: 123 bp-DNA-Leiter; Spur 4 und 14: Leerkontrollen; Spur 1-3, 5-8, 10-13, 15-18: Amplikon bei ca. 167 bp. Spur 9: negativ.

Der Polymorphismus konnte anschließend nach einem Verdau mit dem Restriktionsenzym Dra III dargestellt werden. Liegt im Gen eine Adeninbase vor, kann Dra III an vorgesehener Position nicht schneiden. Die Bande des Amplikons lag entsprechend bei ca. 167 bp. Kommt es allerdings aufgrund einer Punktmutation zum Austausch von Adenin zu Guanin, entsteht eine Schnittstelle. Nach dem Restriktionsverdau entstehen zwei DNA-Amplikone, ca. 112 bp und 55 bp lang (siehe Abb. 9). Das Amplikon mit der Länge von 55 bp war in den 8 %igen Gelen nicht sichtbar, da diese nur einen Darstellungsbereich ab 60 bp zuließen.



**Abb. 9: SRY-1532 nach Restriktionsverdau mit Dra III (8 % PAA-Gel)**

M: 123 bp- DNA-Leiter; Spur 11: Leerkontrolle; Spur 12: pos. Kontrolle (SRY-1532 G); Spur 13: neg. Kontrolle (SRY-1532 A); Spur 4, 7: nicht mutierte Probanden; Spur 1-3, 5, 6, 9, 10: mutierte Probanden; Spur 8: kein Amplifikationsprodukt.

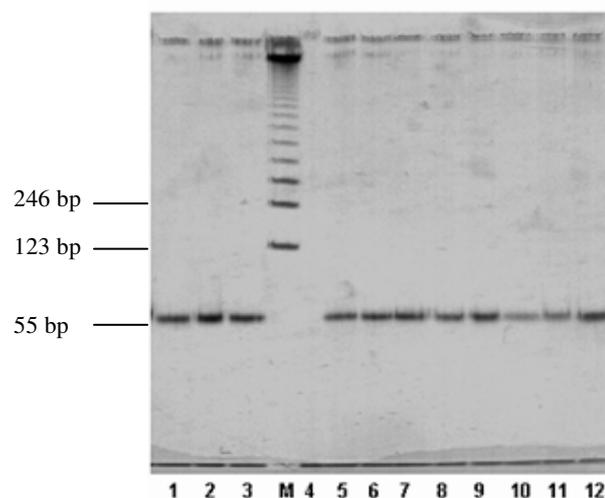
**Tab. 3: SRY-1532 Polymorphismen in verschiedenen Populationen**

Population	n	SRY-1532 G		SRY-1532 A	
		n	Frequenz	n	Frequenz
Japaner	54	54	1,00	0	0,00
Han Chinesen	74	74	1,00	0	0,00
Khalk-Mongolen	18	18	1,00	0	0,00
Türken	86	71	0,83	15	0,17
Deutsche	87	72	0,83	15	0,17
Buschmänner	2	1	0,5	1	0,5
Ovambo	51	51	1,00	0	0,00
West-Pygmäen	5	5	1,00	0	0,00
Ost-Pygmäen	3	3	1,00	0	0,00
Gesamt	380	349	0,92	31	0,08

Die Tabelle 3 zeigt die Allelverteilung des SRY-1532 Locus innerhalb der neun untersuchten Populationen. Die asiatische Bevölkerung (Japaner, Han Chinesen und Khalk-Mongolen), sowie die afrikanischen Populationen (Ovambo, West-Pygmäen, Ost-Pygmäen) zeigen fast ausnahmslos die SRY-1532 Mutation. In Europa (Deutsche, Türken) zeigt sich eine geringere Frequenz der Männer mit Mutation.

### 3.1.3. 92R7

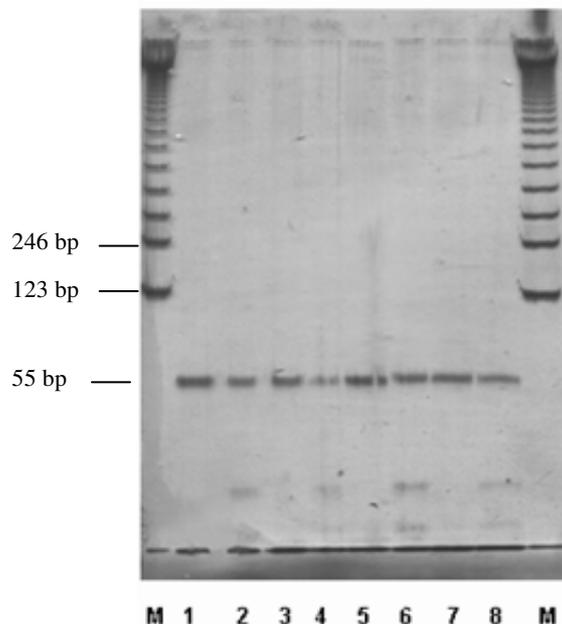
Um den Polymorphismus 92R7, der auf einer Basensubstitution (C→T) beruht (Mathias et al. 1994) nachzuweisen, wurden die oben genannten Primer verwendet. Zur Optimierung der Amplifikationsbedingungen wurden alle Parameter der PCR variiert. Die optimalen Amplifikationsbedingungen (2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 μM je Primer und eine Annealingtemperatur von 57 °C) wurden mit Hilfe eines 12 %igen PAA-Gel bestätigt. Durch die Erhöhung der Acrylamidkonzentration auf 12 % bzw. 14 % wurde die Quervernetzung im Gel erhöht, wodurch die kurzen Amplikone (55 bp) gut darzustellen waren (siehe Abb.10).



**Abb. 10: Kontrollgel (12 %) nach Amplifikation von 92R7**

M: 123 bp-DNA-Leiter; Spur 4: Leerkontrolle; Spur 1-3, 5-12: Amplikone bei ca. 55 bp.

Im Anschluss wurde das Amplifikat mit dem Restriktionsenzym Hind III bei 37 °C inkubiert. Bei Vorliegen einer Cytosinbase hat keine Mutation stattgefunden und es kam zur Spaltung (als negativ gewertet), beim Vorliegen einer Thyminbase erfolgte keine Spaltung. Aufgrund von Genduplikationen besteht eine Homologie zum X-Chromosom. Da nur der Y-Anteil polymorph ist, bleiben 50 % ungeschnitten. Dieses Phänomen zeigt sich deutlich in der Abbildung 11. Die geschnittenen Produkte stellen sich bei einer Länge von ca. 25 und 30 bp dar, wobei die Banden nur sehr schwach erschienen. Ferner sieht man bei den geschnittenen Produkten zusätzlich eine Bande bei ca. 55 bp. Als Referenz diente auch hier die 123 bp DNA-Leiter.



**Abb. 11: 92R7 Polymorphismus nach Hind III-Reaktion (14 % PAA-Gel)**

M: 123 bp-DNA-Leiter; Spur 1, 3, 5, 7: Probanden mit Mutation (92R7 T); Spur 2, 4, 6, 8: Probanden ohne Mutation (92R7 C).

**Tab. 4: 92R7 Polymorphismen in verschiedenen Populationen.**

Population	n	92R7 C		92R7 T	
		n	Frequenz	n	Frequenz
Japaner	54	54	1,00	0	0,00
Han Chinesen	74	72	0,97	2	0,03
Khalk-Mongolen	18	16	0,89	2	0,10
Türken	86	57	0,66	29	0,34
Deutsche	87	32	0,37	55	0,63
Buschmänner	2	2	1,00	0	0,00
Ovambo	51	51	1,00	0	0,00
West-Pygmäen	5	5	1,00	0	0,00
Ost-Pygmäen	3	3	1,00	0	0,00
Gesamt	380	292	0,77	88	0,23

Die Tabelle 4 zeigt die Verteilung der 92R7-Allele innerhalb der typisierten Populationen. Den mutierten Typ findet man vor allem in den türkischen und deutschen Stichproben. Die anderen Populationen weisen bis auf wenige Ausnahmen (Chinesen, Mongolen) ausschließlich den Wildtyp auf.

### 3.2. Haplogruppenzuordnung

Aus drei binären Marker lassen sich acht Haplogruppen konstruieren. Von 380 Y-Chromosomen aus verschiedenen Populationen ließen sich bei den untersuchten Polymorphismen fünf HG nachweisen.

**Tab. 5: Haplogruppen unter Berücksichtigung der drei binären Marker**

HG	YAP	SRY-1532	92R7
I *	Insertion	A→G	C→T
II	Insertion	A→G	WT
III *	Insertion	WT	WT
IV	WT	WT	WT
V	WT	WT	C→T
VI	WT	A→G	C→T
VII	WT	A→G	WT
VIII *	Insertion	WT	C→T

\*: Laut Phylogenetischem Baum nach YCC können die Haplogruppe I, III und VIII nicht vorkommen

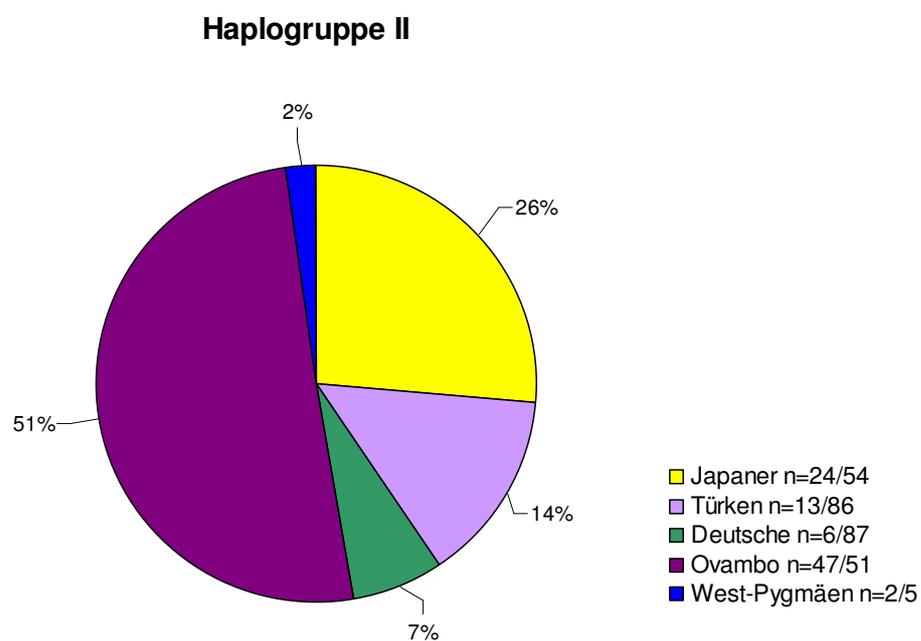
Wildtyp (WT): keine Mutation

**Tab. 6: Haplogruppenzugehörigkeit der einzelnen Populationen**

Haplogruppe	II	IV	V	VI	VII
Japaner n=54	24				30
Han Chinesen n=74				2	72
Mongolen n=18			1	1	16
Türken n=86	13		15	15	43
Deutsche n=87	6		15	40	26
Buschmänner n=2		1			1
Ovambo n=51	47				4
West-Pygmäen n=5	2				3
Ost-Pygmäen n=3					3
Summe n=380	92	1	31	58	198

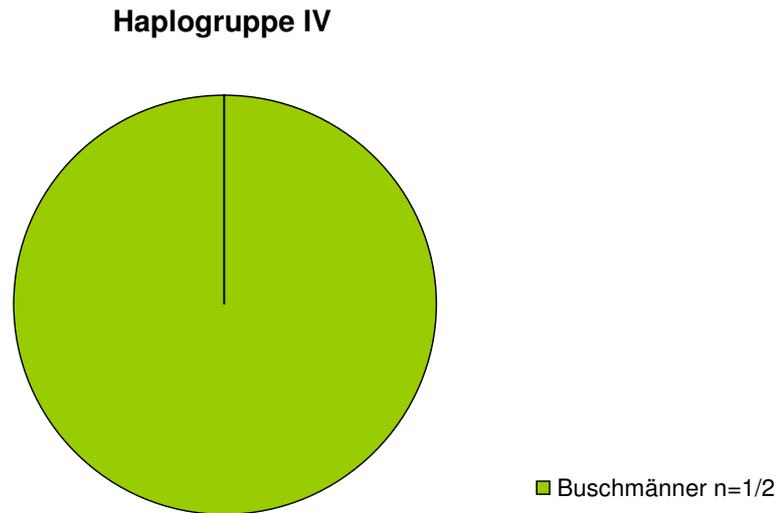
Die Tabelle 6 zeigt die Haplogruppenzugehörigkeit der einzelnen Populationen auf Grundlage von drei binären Polymorphismen. Die HG I, III und VIII sind nicht aufgeführt, da sie nach aktueller YCC-Nomenklatur nicht möglich sind. Die HG VII wurde in allen Populationen beobachtet.

### 3.2.1. Grafische Darstellung der Haplogruppen



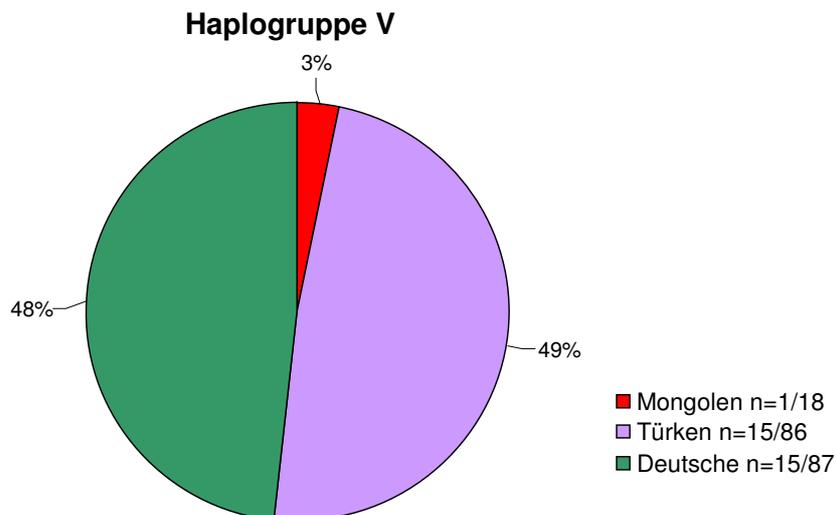
**Abb. 12: Haplogruppe II**

Die HG II entsteht durch die Mutationen von SRY-1532 und YAP. Sie beinhaltet Stichproben aus Japan, der Türkei, aus Deutschland und Afrika (Ovambo und Westpygmäen).



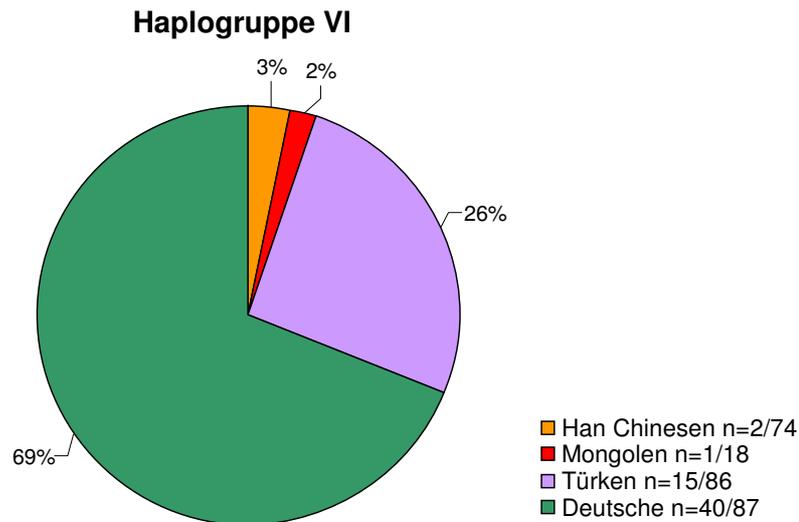
**Abb. 13: Haplogruppe IV**

Die HG IV ist charakterisiert durch das Vorliegen des Wildtyps in allen drei Polymorphismen. Von 380 Y-Chromosomen wurde sie ein einziges Mal in der Population der Buschmänner gefunden.



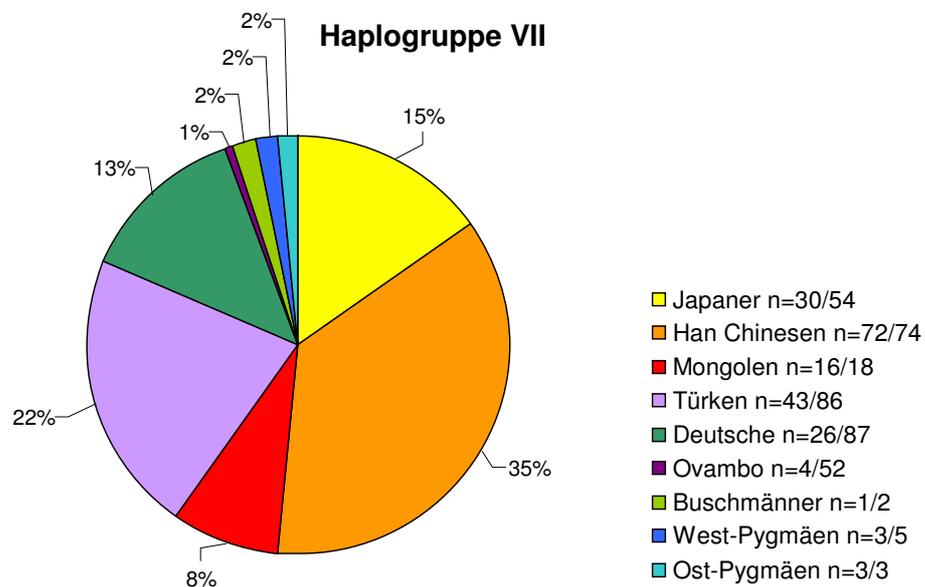
**Abb. 14: Haplogruppe V**

Die HG V entsteht durch die Mutation von 92R7 und die Rückmutation von SRY-1532 (siehe Diskussion). Von 380 Männern wurden 31 (8%) der Haplogruppe V zugeordnet. Diese Mutationen zeigten sich hauptsächlich bei den türkischen und deutschen Proben. Ein einziger Mongole wies diese Haplogruppe auf.



**Abb. 15: Haplogruppe VI**

Die HG VI entsteht durch die Mutationen von SRY-1532 und 92R7. Von insgesamt 380 typisierten Männern wurden 58 (15 %) der HG VI zugeordnet. Der größte prozentuale Anteil wird mit 69 % von der deutschen Population eingenommen. Die türkischen Proben weisen einen Anteil von 26 % auf. Die Mongolen und Han Chinesen sind jeweils nur zu einem geringen Anteil zu finden.

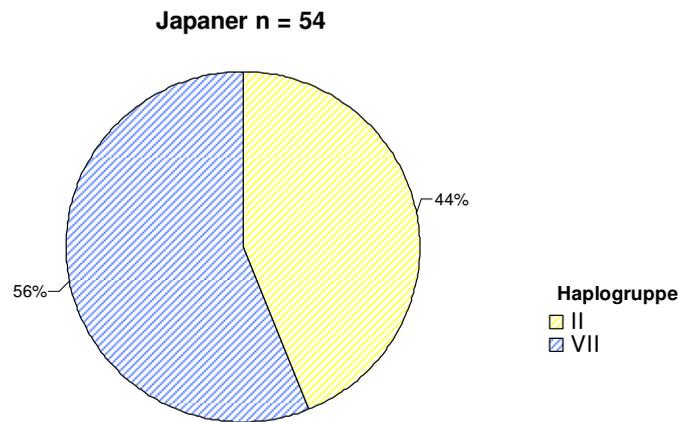


**Abb. 16: Haplogruppe VII**

Die HG VII entsteht durch eine Mutation im SRY-1532-Locus. Eine große Zugehörigkeit findet sich bei den Han Chinesen, den Japanern, den Mongolen, den Türken und den Deutschen. Ferner bei den Pygmäen unter Berücksichtigung einer kleinen Stichprobe. Auffällig ist, dass die Ovambo nur einen geringen Anteil ausmachen.

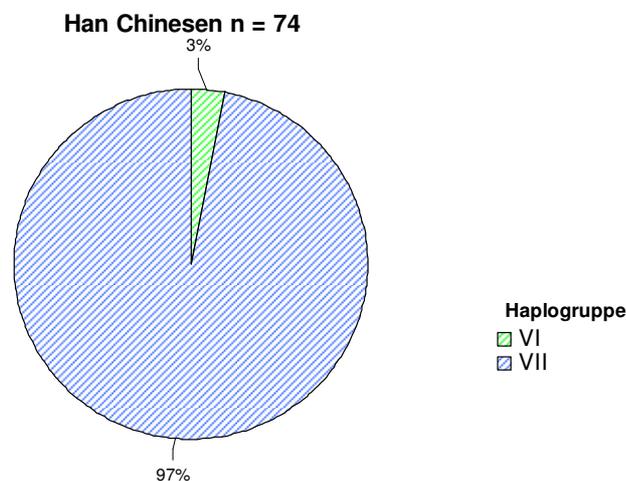
### 3.2.2. Haplogruppendiversität innerhalb der Populationen

Die folgenden Kreisdiagramme zeigen in der jeweiligen Population die Diversität der vorhandenen Haplogruppen.



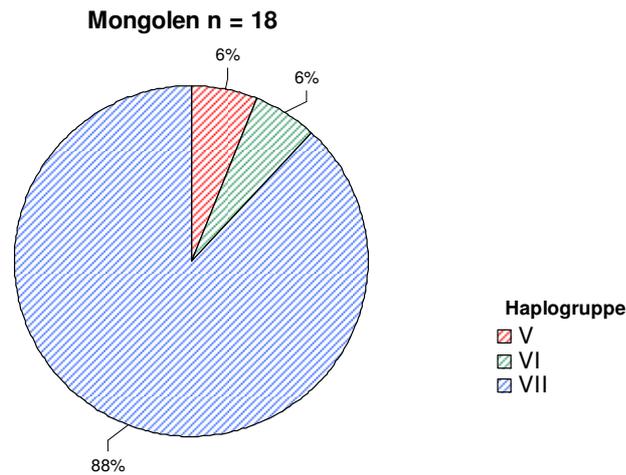
**Abb. 17: Japaner**

Die japanischen Männer sind zu 44 % der HG II (YAP-Insertion und Mutation im Locus SRY-1532) und zu 56 % der HG VII (Mutation im Locus SRY-1532) zuzuordnen. Mutationsereignisse im Locus 92R7 wurden nicht gefunden.



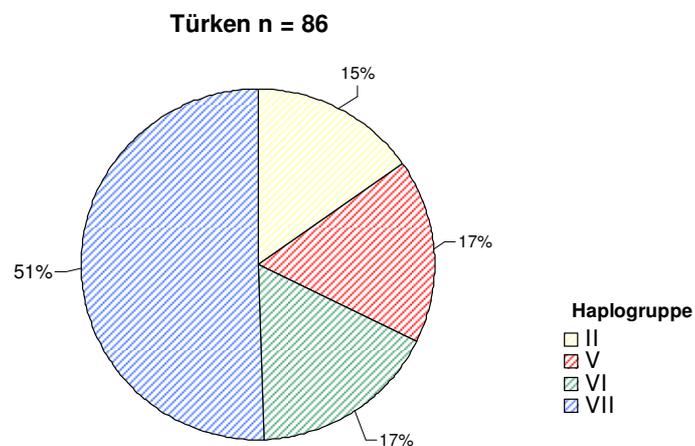
**Abb. 18: Han Chinesen**

Der größte Anteil dieser Population ist der Haplogruppe VII zuzuordnen. Es liegt eine SRY-1532-Mutation vor. Wenige Männer zeigen eine 92R7-Mutation und gehören somit der HG VI an. Es zeigen sich keine YAP-Insertionen.



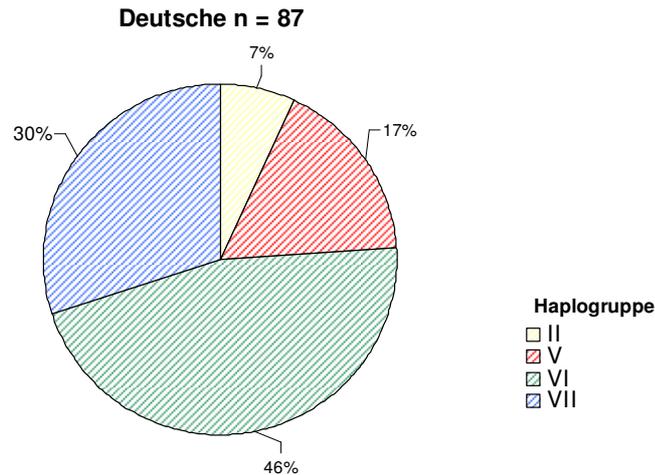
**Abb. 19: Mongolen**

Der größte Anteil der Männer ist, wie auch bei den Han Chinesen, der HG VII zuzuordnen. Ein kleinerer Anteil sind der HG VI (Mutationen im SRY-1532 und 92R7-Locus) zuzuordnen und einige Probanden zeigen die SRY-1532-Rückmutation (HG V).



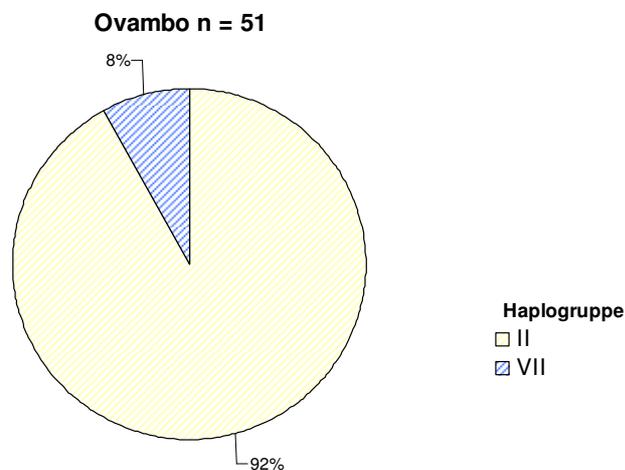
**Abb. 20: Türken**

Der größte Anteil der Männer findet sich in der HG VII mit SRY-1532-Mutation. Daneben finden sich Proben die sich den HG VI, HG V und HG II zuordnen lassen. Insgesamt zeigt sich eine hohe Haplogruppendiversität.



**Abb. 21: Deutsche**

Von 87 Männern sind 46 % der HG VI zuzuordnen, d.h. sie tragen die SRY-1532 und 92R7-Mutationen. Des Weiteren sind Probanden der HG VII, der HG V und auch der HG II zuzuordnen. Insgesamt besteht eine hohe Haplogruppendiversität.



**Abb. 22: Ovambo**

Der größte Anteil der 52 Männer ist in der HG II mit YAP-Insertion und SRY-1532-Mutation zu finden. Einige Proben weisen lediglich die SRY-1532-Mutation (HG VII) auf.

### Buschmänner und Pygmäen

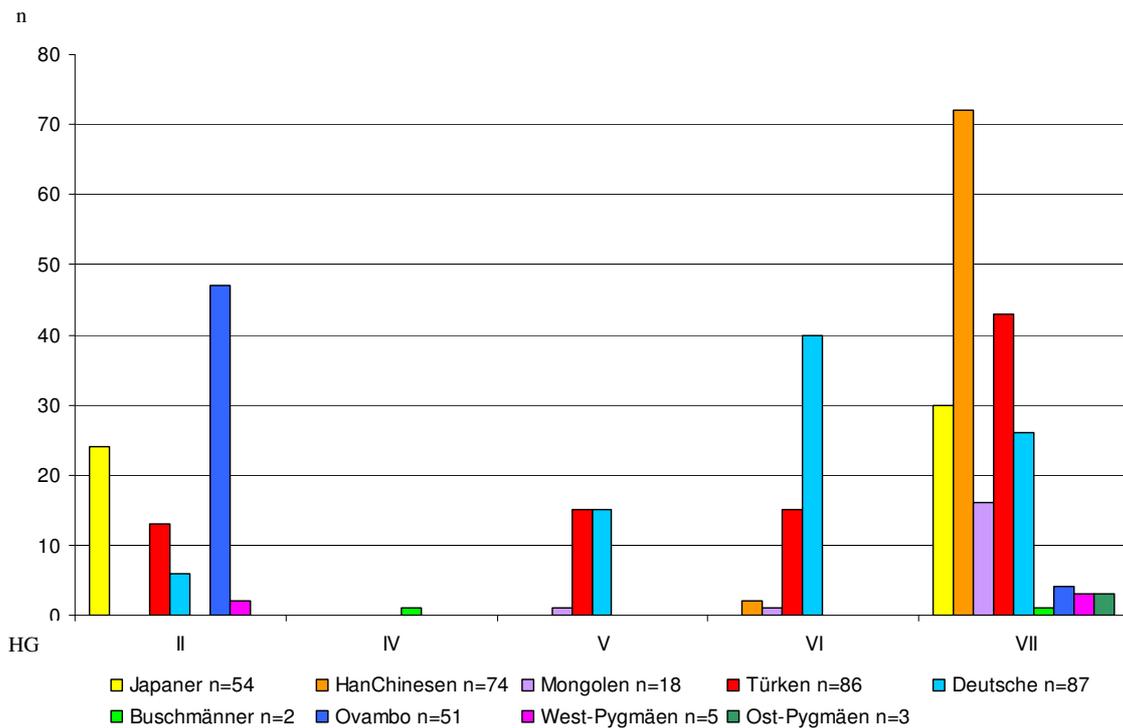
Aufgrund einer nur sehr kleinen Stichprobe von Buschmännern ( $n = 2$ ) und Pygmäen ( $n = 8$ ) wurde hier auf eine grafische Darstellung verzichtet.

Die Buschmänner sind der HG VII (SRY-1532-Mutation) und HG IV (kein Mutation- bzw. Insertionsereignis) zuzuordnen.

Bei dem nur kleinen Kollektiv der West-Pygmäen von fünf Proben zeigte sich, dass drei Proben der HG VII angehören und die restlichen zwei der HG II.

Die Stichprobe der Ostpygmäen umfasst drei Männer, die aufgrund der SRY-1532 Punktmutation der HG VII zuzuordnen sind.

Die nachfolgende Abbildung zeigt zusammengefasst die Verteilung der Populationen in den einzelnen Haplogruppen.



**Abb. 23: Populationen innerhalb einzelner Haplogruppen**

### 3.2.3. Netzwerke

Nachfolgende Netzwerke zeigen die Haplogruppenverteilung in der gesamten und innerhalb der verschiedenen Populationen. Diese Art der Darstellung visualisiert den Zusammenhang zwischen HG und den entsprechenden Mutationsereignissen, welche durch die Verbindung einzelner Knoten veranschaulicht wird. HG VII und HG V beispielsweise unterscheiden sich durch zwei Mutationsereignisse in den Polymorphismen 92R7 und SRY-1532.

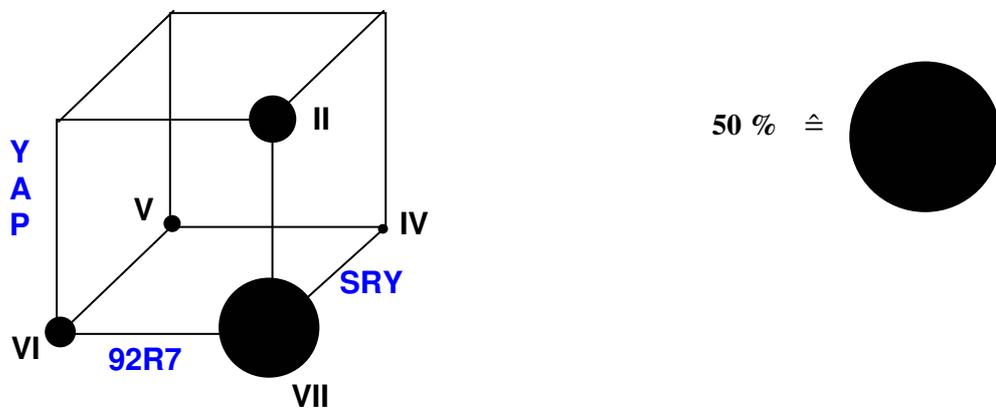


Abb. 24: Netzwerkdarstellung der Haplogruppen über alle Populationen

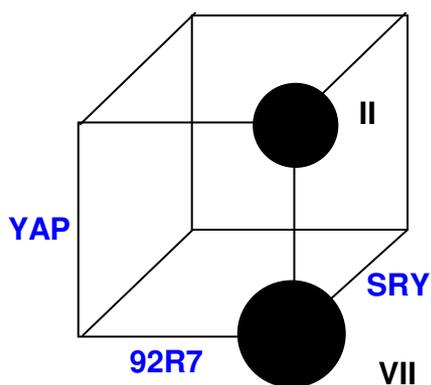


Abb. 25: Japaner

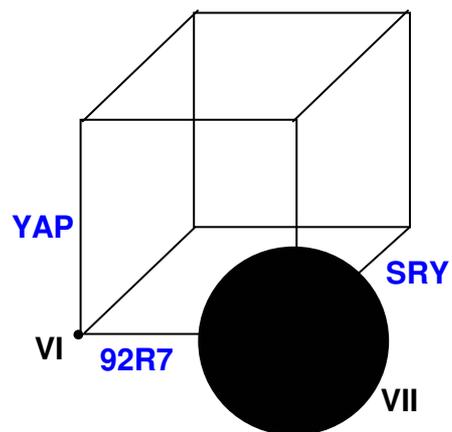


Abb. 26: Han Chinesen

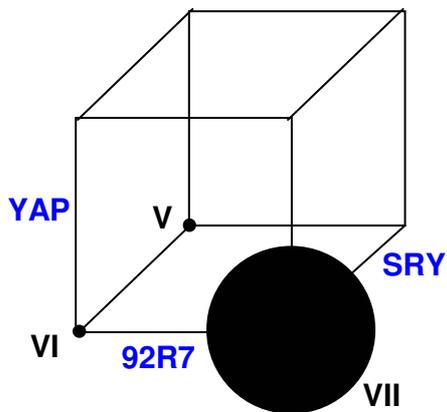


Abb. 27: Mongolen

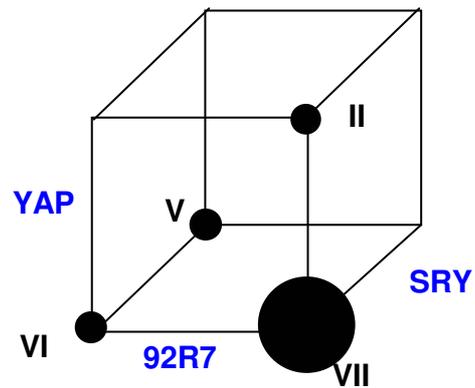


Abb. 28: Türken

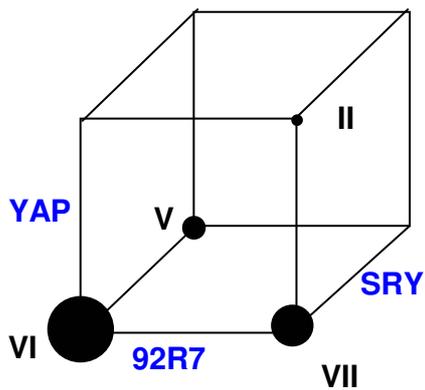


Abb. 29: Deutsche

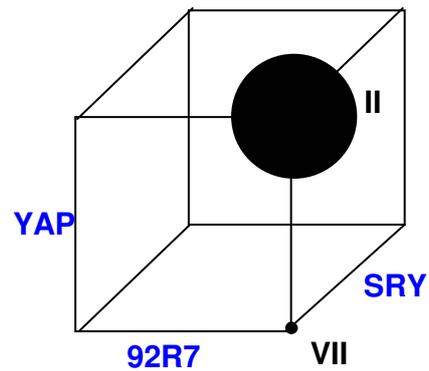
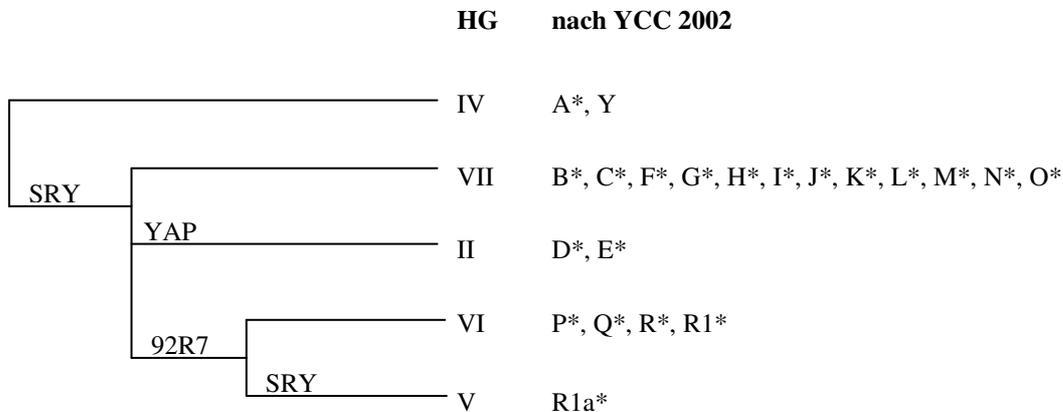


Abb. 30: Ovambo

Im Gegensatz zu der oben gezeigten Haplogruppenverteilung in Form von Kreisdiagrammen lassen sich mit Hilfe der Netzwerkmethod e einzelne Mutationsereignisse ableiten. Die Populationen werden in ihrer Diversität übersichtlich dargestellt. Die Türken und Deutschen sind durch mehr Mutationsereignisse als die Japaner, Han Chinesen und Ovambo gekennzeichnet.

Für die o.g. HG wurde der phylogenetische Baum auf der Basis des YCC konstruiert.



**Abb. 31: Einordnung in den Phylogenetischen Baum nach YCC (2002)**

Die Abbildung 31 zeigt einen phylogenetischen Stammbaum, modifiziert nach YCC. Die fünf dargestellten Haplogruppen liegen den drei binären Polymorphismen YAP, SRY-1532 und 92R7 zu Grunde, die bei 380 Männern aus unterschiedlichen Populationen typisiert wurden.

Von allen 380 typisierten Probanden sind 198 (52 %) der HG VII zuzuordnen. Es liegt lediglich eine Mutation im Locus SRY-1532 vor. Bei drei analysierten binären Markern entspricht das nach YCC den Haplogruppen B\*/C\*/F\*/G\*/H\*/I\*/J\*/K\*/L\*/M\*/N\*/O\*. Es handelt sich dabei um Paragruppen, da sie einer Hauptklade, aber keine Subklade zuzuordnen sind. Somit zeigt sich in dieser häufig vorkommenden HG eine hohe Diversität. Die zweithäufigste vorkommende HG unter 380 typisierten Y-Chromosomen stellt mit 92 Proben (24 %) die Haplogruppe II dar. Hier liegt eine YAP-Insertion und eine Mutation im Locus SRY-1532 vor. Nach aktueller Nomenklatur entspricht das den HG D\* oder E\*. Die HG IV entspricht der Paragruppe Y\*, die HG VI der Paragruppe P\*. Bei der HG V handelt es sich um eine Rückmutation im SRY-1532-Locus. Nach YCC ist sie als R1a\* definiert.

## 4. Diskussion

### 4.1. Y-chromosomale Polymorphismen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Methodik zur Typisierung der drei binären Polymorphismen YAP, SRY-1532 und 92R7 etabliert. Binäre Polymorphismen sind in Evolutionsstudien vorteilhaft, da sie langsam mutieren, meist einmalige Ereignisse darstellen und daher zuverlässige Stammbäume konstruierbar sind. Ergänzend liegt eine eindeutige Wurzelung eines Stammbaumes vor, da der ancestrale Wildtyp bekannt ist (z.B. keine YAP-Insertion), oder durch Außengruppenvergleiche, z.B. mit Primaten, bestimmt wird. Ausgewählt wurden die o.g. SNPs, weil sie die derzeit ältesten bekannten Mutationsereignisse im menschlichen Y-Stammbaum darstellen (Jobling et al. 1997). Um Aussagen über spezifische Verwandtschaftsverhältnisse aufzudecken, wurden Populationen verschiedener Kontinente ausgewählt. Zum einen stammten afrikanische Proben aus den Regionen Tsumkwe/ Namibia, Oshakati/ Angola, Biaha/ Zentralafrika und Efe / D.R. Kongo. Zum anderen stammten asiatische Probanden aus den Regionen Shenyang, Shiga und der Mongolei. Ergänzend wurden zwei europäische Gruppen (Türken aus der Region Adana und Deutsche aus der Region Nordrhein-Westfalen) in die Untersuchungen mit einbezogen.

Die polymorphe Alu-Insertion des Y-Chromosoms (YAP) umfasst 305 bp. Diese Insertion kann auf ein unikales Ereignis während der letzten 29.000 – 334.000 Jahre zurückgeführt werden (Hammer 1995). Untersuchungen an Primaten ergaben, dass es ursprünglich keine Alu-Insertion an diesem Locus gab (Hammer 1994, Hammer & Horai 1995). Anfänglich wurde die Alu-Insertion mit größter Frequenz in Afrika beobachtet, was auf einen afrikanischen Ursprung hindeuten könnte (Hammer et al. 1994). Spätere Untersuchungen (Altheide & Hammer 1997, Hammer et al. 1997, 1998, 2001) führten zur Hypothese eines erstmaligen Auftretens in Asien mit Rückwanderung nach Afrika. Die in der hier vorliegenden Arbeit analysierten männlichen Individuen aus Japan zeigen eine Alu-Insertion mit einer Frequenz von 0,44 und die männlichen Individuen aus Afrika (Ovambo) zeigen eine Alu-Insertion mit einer Frequenz von 0,92. Beide Populationen fanden sich in der Haplogruppe II (YAP-Insertion, SRY-1532 WT und 92R7 WT) wieder. Wie bereits erwähnt entspricht das nach YCC der Haplogruppe

DE, die durch den YAP-Polymorphismus definiert wird. Dabei wird davon ausgegangen, dass die Unterhaplogruppe D einen asiatischen Ursprung hat (Karafet et al. 2008) und die Unterhaplogruppe E wahrscheinlich afrikanischer Abstammung ist (Underhill 2001). Trotz der rasanten Entwicklung im Bereich der SNP-Typisierung bleibt die Frage nach der ursprünglichen Entwicklung der YAP-Insertion offen (siehe 4.3.).

#### **4.2. Binäre Polymorphismen im Y-STR-Stammbaum**

Mit der Frage, ob Y-chromosomale STRs zuverlässige Stammbäume liefern, beschäftigen sich Forster et al. (2000). Zu Grunde gelegt wurden männliche Individuen aus verschiedenen Populationen, unter anderem die auch in dieser Arbeit analysierten Populationen. Neben der Analyse von Y-chromosomalen binären Markern (YAP, SRY-1532 und 92R7) erfolgte die Typisierung der STR-Loci DYS19, DXYS156-Y, DYS389, DYS390, DYS392 sowie DYS393. Die Amplifikation erfolgte nach Kayser et al. (1997) und Rolf et al. (1999). Die Amplifikate wurden auf silbergefärbten Polyacrylamidgelen dargestellt. Die Loci DYS389 und DYS390 wurden direkt sequenziert.

Da die oben genannten Y-STRs von der Rekombination ausgeschlossen sind, können Haplotypen definiert werden, die zur Rekonstruktion phylogenetischer Stammbäume beitragen. Im Gegensatz zu den autosomalen STRs kann somit eine männliche Abstammungslinie von Generation zu Generation verfolgt werden, was dazu führt, dass Mutationseffekte unmittelbar zu beobachten sind, ohne dass Allelveränderungen aufgrund von Rekombinationen eine Rolle spielen. Um nun verwandtschaftliche Beziehungen zwischen einzelnen Individuen durch Vergleiche der Haplogruppen darzustellen, werden phylogenetische Netzwerkmethoden angewandt, die über verschiedene Rechenalgorithmen ähnliche Haplotypen z.B. in einem Ast gruppieren. Zeigt sich idealerweise mittels einzelner Haplotypen eine populationsspezifische Verteilung, so können z.B. Thesen über die vermutliche Größe einer Gründerpopulation erstellt werden. Die Netzwerkmethoden lassen sich in verschiedene Netzwerkalgorithmen unterteilen: Zur Darstellung phylogenetischer Stammbäume auf

der Grundlage Y-chromosomaler Haplotypen kommt neben der „reduced-median“-Methode (Bandelt et al. 1995) die Methode des medianen Netzwerkes („median-joining phylogenetic network method“, Bandelt et al. 1999) zur Anwendung.

Da die Mutationsrate für verschiedene Y-STR-Loci stark variiert, ist es für die Berechnung mittels o.g. Netzwerkmethoden unerlässlich, den Einfluss schnell mutierender und damit instabiler Systeme gering zu halten. Um Verzerrungen wie z.B. parallele Mutationsereignisse durch instabile Y-STR-Marker zu vermeiden, wurden diese in diversen Berechnungen nicht berücksichtigt (Forster et al. 2000). Um stabilere STR-Marker stärker hervorzuheben und um plausiblere Diagramme zu erhalten, wurden diese Marker bei der Berechnung mit einer höheren Gewichtung belegt. In verschiedenen Arbeiten (Rolf et al. 1998, Forster et al. 1998) war zuvor gezeigt worden, dass die einzelnen Y-STRs sehr komplex und variabel sind.

Führt nun die Einbeziehung stabilerer Systeme (biallelische Marker) zur plausibleren Darstellung auch weiter zurückliegender Ereignisse? Oder lassen sich STR-Stammbäume durch binäre Marker verifizieren?

Um frühe phylogenetische Ereignisse darzustellen, wurde die reduced median (RM) Netzwerkmethod (Bandelt et al. 1995) angewandt. Schließlich wurde mit Hilfe ancestraler Y-chromosomaler biallelischer Marker aus der vorliegenden Arbeit der auf Y-STRs basierende Stammbaum überprüft. Bei den binären Markern wurden fünf Mutationsereignisse berücksichtigt, denn bei der YAP-Insertion wurde zusätzlich zwischen einer langen und einer kurzen Insertion unterschieden. Des Weiteren beschrieben Jobling et al. 1997, dass es zwei frühe unabhängige SRY-1532 Mutationen gibt. Der Y-STR-Stammbaum basiert auf 187 Y-Chromosomen. Nach Kombination mit den binären Loci zeigt sich ein plausibler Stammbaum. Im Falle der YAP-Insertion demarkiert sich im STR-Netzwerk keine Unterteilung in YAP-Mutation oder YAP-Wildtyp. Es ist jedoch eine Differenzierung bzgl. der Längenvarianten erkennbar, denn es zeigt sich eine Gruppierung der kurzen YAP-Variante, sodass bei der längeren Variante von einem ancestralen Ursprung ausgegangen werden kann (Forster et al. 2000). Des Weiteren teilt das Netzwerk die zwei unabhängigen SRY-1532-Mutationen in Afrikaner und Nicht-Afrikaner in Übereinstimmung mit dem biallelischen Baum, entwickelt von Jobling et al. 1997. Die Wurzel des Y-STR-Stammbaumes wurde

erwartungsgemäß demarkiert durch den SRY-1532-Polymorphismus (Jobling et al. 1997) und wurde in der Population der Buschmänner gefunden. Ferner beschrieb bereits Scozzari et al. 1997 dieses Phänomen in seiner Arbeit, in der er sich schwerpunktmäßig mit den Y-Chromosomen der afrikanischen Bevölkerung beschäftigte. Die Marker SRY-1532 und 92R7 wurden der „Weißen Population“ zugeordnet. Allerdings kam es mittels Y-STR in dieser Gruppe zu keiner weiteren internen Auflösung. Wird jedoch der von Jobling et al. konstruierte Stammbaum (siehe Abb. 32) zu Grunde gelegt, erhält man mittels Y-STRs eine Auflösung der tiefsten Knoten der biallelischen Marker (Gruppe 2, Jobling et al. 1997) aufgrund von DXYS156-Y. Die Tatsache bleibt bestehen, dass sich STRs aufgrund ihrer höheren Mutationsrate eher eignen für Analysen weniger weit zurückliegender Ereignisse in der humanen Evolution (Jobling & Tyler-Smith 1995). Für weiter zurückreichende populationsgenetische Untersuchungen sind Marker mit niedriger Mutationsrate besser geeignet.

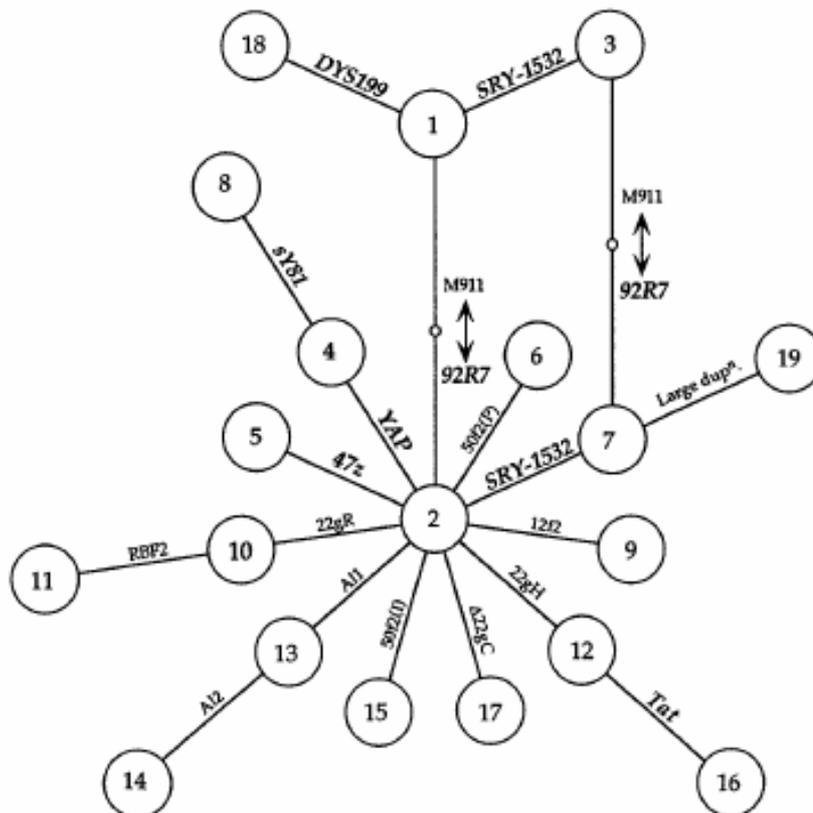


Abb. 32: Stammbaum nach Jobling et al. 1997

### 4.3. Haplogruppenzuordnung

Um verwandtschaftliche Beziehungen übersichtlicher darzustellen, wurden in dieser Arbeit die 380 typisierten Individuen auf der Basis der etablierten binären Markern (YAP, SRY-1532 und 92R7) Haplogruppen zugeordnet. Aufgrund der typisierten Y-Polymorphismen, können theoretisch acht verschiedene Haplogruppen definiert werden. Modifiziert nach dem phylogenetischen Stammbaum nach YCC (2002) kann es die HG I, III und VIII nicht geben, da erstens eine YAP-Insertion und eine Mutation im Locus 92R7 nicht gleichzeitig vorliegen kann und zweitens eine alleinige YAP-Insertion nicht möglich ist (siehe Abb. 24). Die HG II, IV, V, VI, und VII lassen sich wie in Abbildung 31 gezeigt, zuordnen. Aufgrund der wenigen SNPs und der verschiedenen Populationen innerhalb einer HG (siehe Tabelle 6), ist über die verwandtschaftlichen Verhältnisse keine eindeutige Aussage zu treffen. Jede einzelne HG enthält in der Regel eine Anzahl verschiedener Y-Chromosomen, die die gleichen binären Polymorphismen aufweisen, jedoch in den Y-STRs-Haplotypen variieren. Die Haplotypen werden bevorzugt in Netzwerken dargestellt, da sie Hin- und Rückmutationen, sowie parallelen Mutationen unterliegen (Y Chromosome Consortium 2002). Die *European DNA Profiling Group* (EDNAP) beschäftigt sich im Rahmen von Forschungsprojekten mit der Anwendbarkeit von binären Y-chromosomalen Polymorphismen. Brion et al. veröffentlichten hierzu 2004 eine Arbeit, in der 95 westfälische Männer basierend auf 11 binären Polymorphismen typisiert wurden. Die 13 definierten HG wurden nach YCC in einem phylogenetischen Baum und als Tortendiagramm dargestellt, welches die HG-Diversität anzeigt. Mit diesen Ergebnissen können somit Vergleiche zu anderen europäischen Populationen getroffen werden. Jobling und Tyler-Smith beschäftigten sich 2000 mit Haplogruppenfrequenzen. In der Arbeit wurden Populationen von fünf verschiedenen Kontinenten typisiert. Die Haplogruppenfrequenz wurde für die einzelnen Populationen in phylogenetischen Bäumen dargestellt und zeigt die unterschiedlichen Verteilungen. Im Jahr 2008 wurde der YCC-Stammbaum (2002) von Karafet et al. modifiziert. Auf der Grundlage von ca. 600 binären Markern, werden 311 verschiedene Haplogruppen und zwei neue Haupthaplogruppen (S und T) dargestellt. Das Ziel war es, aufgrund der mittlerweile mehr als 400 neu entdeckten binären Polymorphismen die Abstammungslinien der Y-Chromosomen weiter aufzulösen, um

die evolutionären Verwandtschaftsverhältnisse aufzuzeigen. Durch neu entdeckte Mutationen konnten einzelne Kladen weiter aufgespalten, geteilt oder zusammengeführt werden. Die HG I und J wurden z.B. zur „IJ-clade“, sechs neue SNPs vereinigten die N- und O-Abstammungslinien zur „NO-clade“ und durch den SNP P143 veränderte sich die Topografie. Durch die Vereinigung der Haupthaplogruppen C und FT, wurde der Baum polychotom (vielzweigig). Bzgl. der Nomenklatur wurde die mutationsbasierte Methode verfolgt, wodurch die HG durch die letzte Mutation benannt werden, z.B. E-M81.

Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit gezeigten HG und dem Vergleich mit YCC 2002 (siehe Abbildung 5) gibt es geringe Veränderungen. Die HG VII wird ergänzend den Haupthaplogruppen S und T zugeordnet. Des Weiteren findet sich die HG VI zusätzlich in der clade R1b\* und Untergruppen, sowie R2 wieder. Die HG II findet sich in der DE-clade und in der Untergruppe DE\*, die durch die Entdeckung des SNP M174 die YAP-clade neu definiert (Weale et al. 2003). Bisher blieb trotz zusätzlicher Aufzweigung innerhalb der HG DE die Frage nach der ursprünglichen YAP-Abstammung offen.

#### **4.4. Y-STRs**

Eine Vielzahl von STRs stehen heute für Populationsstudien sowie für moderne forensische Untersuchungen zur Verfügung. Die Typisierung dieser Loci hat den Vorteil, dass kurze Amplikonlängen untersucht werden können. Die PCR stellt eine äußerst einfache und sichere Analysemethode dar. Der hohe Individualisierungsgrad bei der simultanen Analyse mehrerer Marker (Multiplex) und die Vorteile, dass DNA aus jeder kernhaltigen Zelle extrahiert werden kann und für die PCR nur wenig Material benötigt wird, erklärt die breite Anwendung dieser Polymorphismen in der Forensik. Ausgehend von der Tatsache, dass viele Gewaltverbrechen von Männern verübt werden, bieten sich Y-chromosomale DNA Typisierungen für die Identifizierung von Spuren an, besonders in den Fällen, wo männliche und weibliche kernhaltige Zellen gemischt vorliegen und für die Analyse mit autosomalen STRs durch differenzielle Zellyse getrennt werden müssen (Jobling et al. 1997).

Aufgrund der paternalen Vererbung Y-spezifischer Loci ist es wie bereits erwähnt möglich, Y-STRs in HT und Y-SNPs in HG zusammen zu fassen. Unter rechtsmedizinischen Gesichtspunkten ist die Zusammenfassung hilfreich um eine männliche Person effizienter charakterisieren zu können, als das über Einzel-Locus-Allelfrequenzen möglich ist. Wenn es sich bei der Analyse von Y-STRs bei Täter und Spur um ein zufällig gleich bestehender Haplotyp handelt, kann bei unterschiedlich vorliegender HG weiter diskriminiert werden, wie im folgendem beschrieben wird. Desweiteren können Populationsstrukturen genauer beschrieben werden.

Die Charakterisierung der in dieser Arbeit analysierten neun Populationen zeigt unter Einbezug der im Institut für Rechtsmedizin Münster analysierten 8 Y-STRs (DYS19, DXYS156-Y, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393) folgende Resultate:

Nach Y-STR-Typisierung von 323 Proben finden sich 254 Haplotypen. Von diesen 254 Haplotypen gibt es 45 Haplotypen, die mehrfach vorkommen. D.h., dass 209 HT (82 %) nur in jeweils einem der 323 Individuen zu beobachten war. Dadurch wird der Grad an Variabilität der Y-chromosomalen HT verdeutlicht. Von den o.g. 45 Haplotypen können durch SNP-Typisierung (YAP, SRY-1532 und 92R7) fünf Haplotypen weiter diskriminiert werden, sodass 323 Individuen 259 Haplotypen enthalten.

Die Y-chromosomalen SNPs definieren bereits lang bestehende Haplogruppen. Unter forensischen Gesichtspunkten weisen Haplogruppen eine geografische Spezifität auf und können somit Hinweise auf die geografisch/ethnische Abstammung eines z. B. unbekanntem Spurenverursachers geben. In dieser Arbeit wurden die analysierten Haplogruppen unter Punkt 3.2. grafisch dargestellt. Die Kreisdiagramme zeigen, dass die Haplogruppendiversität in den einzelnen Populationen sehr unterschiedlich ist, wobei die dargestellten Netzwerke die jeweiligen Populationen mit den entsprechenden Mutationsereignissen darstellen und somit die verwandtschaftlichen Zusammenhänge deutlicher werden.

Insgesamt wird deutlich, dass drei Y-SNPs nicht ausreichen, um spezifische Populationsaffinitäten darzustellen. Wie bereits oben erwähnt sind mittlerweile etwa 600 unterschiedliche Y-SNPs bekannt, wodurch Verwandtschaftsverhältnisse effizienter und standardisierter in phylogentischen Stammbäumen darzustellen sind (Karafet et al.

2008). Besonders in der forensischen Fallarbeit sind SNP-Haplogruppen zu berücksichtigen, da sie Haplotypen weiter zu diskriminieren vermögen (Gusmão et al. 2006).

Der aktuelle Trend geht dahin, dass mittlerweile autosomale SNPs in einer Multiplex-Reaktion typisiert werden. Basierend auf der Arbeitsgruppe „The SNPforID consortium“ (Børsting et al. 2008) entwickelte die Firma Applied Biosystems eine neue SNP Typisierungsmethode (GenPlex), in der 48 autosomale SNPs und Amelogenin nachgewiesen werden können (Tomas et al. 2008).

## 5. Literatur

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

Altheide T.K., Hammer M.F. (1997) Evidence for a possible Asian origin of YAP+ Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 61: 462-466

Bandelt H.-J., Forster P., Sykes B., Richards B. (1995) Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* 141: 743-753

Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A. (1998) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16: 37-48

Børsting C, Sanchez JJ, Hansen HE, Hansen AJ, Bruun HQ, Morling N (2008) Performance of the SNPforID 52 SNP-plex assay in paternity testing. *Forensic Sci Int Genet.*: 2(4):292-300.

Brinkmann B., Meyer E., Junge A. (1996a) Complex mutational events at the HumD21S11 locus. *Hum Genet* 98: 60-64

Brinkmann B. (2004) Forensische DNA-Analytik. *Dtsch Ärztebl*; 101: A 2329-2334

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

Brion M., Dupuy B. M., Heinrich M., Hohoff C., Hoste B., Ludes B., Mevag B., Morling N., Niederstätter H., Parson W., Sanchez J., Bender K., Siebert N., Thacker C., Vide C., Carracedo A. (2005) A collaborative study of the EDNAP group regarding Y-chromosome binary polymorphism analysis. *Forensic Sci Int*;153:103-8

Budowle B., Chakraborty R., Giusti A. M., Eisenberg A. J., Allen R. C. (1991) Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. *Am J Hum Genet* 48: 841-855

Delbridge M.L., Graves J.A. (1999). Mammalian Y chromosome evolution and the male-specific function of Y chromosome-borne genes. *Rev Reprod* 4; 101-109

Forster P., Röhl A., Lünemann P., Brinkmann C., Zerjal T., Tyler-Smith C., Brinkmann B. (2000) A short tandem repeat-based phylogeny for the human Y chromosome. *Am J Hum Genet* 67: 182-196

Graves J.A.M. (1995) The origin and function of the mammalian Y chromosome and Y-borne genes - an evolving understanding. *BioEssays* 17: 311-320

Gusmão L., Butler J.M., Carracedo A., Gill P., Kayser M., Mayr W.R., Morling N., Prinz M., Roewer L., Tyler-Smith C., Schneider P.M. (2006) DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Int J Legal Med* 120: 191–200

Hammer M.F., Karafet T., Redd A.J., Jarjanazi H., Santachiara-Benerecetti et al. (2001) Hierarchical patterns of global human Y-chromosome diversity. *Mol Bio Evol.* 18: 1189-1203

Hammer M.F., Karafet T., Rasanayagam A., Wood E.T., Altheide T.K., Jenkins T., Griffiths R.C., Templeton A.R., Zegura S.L. (1998) Out of Africa and back again: nested cladistic analysis of human Y chromosome variation. *Mol Biol Evol* 15: 427-441

Hammer M.F., Spurdle A.B., Karafet T., Bonner M.R., Wood E.T., Novelletto A., Malaspina P., Mitchell R.J., Horai S., Jenkins T., Zegura S.L. (1997) The geographic distribution of human Y chromosome variation. *Genetics* 145: 787-805

Hammer M.F. (1995) A recent common ancestry for human Y chromosomes. *Nature* 378: 376-378

Hammer M.F., Horai S. (1995) Y chromosomal DNA variation and the peopling of Japan. *Am J Hum Gen* 56: 951-962

Hammer M.F., Zegura S.L. (1996) The role of the Y chromosome in human evolutionary studies. *Evol Anthropol* 5: 116-134

Hammer M.F. (1994) A recent insertion of an Alu element on the Y chromosome is a useful marker for human population studies. *Mol Biol Evol* 11: 749-761

Henke W., Rothe H. (1999) *Stammesgeschichte des Menschen*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Heyer E., Puymirat J., Dieltjes P., Bakker E., de Knijff P. (1997) Estimating Y chromosome specific microsatellite mutation frequencies using deep rooting pedigrees. *Hum Mol Genet* 6: 799-803

Hohoff C., Brinkmann B. (1999) Human identity testing with PCR-based systems. *Mol Biotechnol.* 13(2):123-36

Hohoff C., Dewa K., Sibbing U., Hoppe K., Forster P., Brinkmann B. (2007) Y-chromosomal microsatellite mutation rates in a population sample from northwestern Germany. *Int J legal Med* 121: 359-363

Jacobs P.A., Strong J.A. (1959) A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determinating mechanism. *Nature* 183: 302-303

Jobling M.A., Tyler-Smith C. (2003) The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat Rev Genet* 4: 598-612

Jobling M.A., Tyler-Smith C. (2000) New uses for new haplotypes. *Trends Genet* 16: 356-362

Jobling M.A., Pandya A., Tyler-Smith C. (1997) The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med* 110: 118-124

Jobling M.A., Tyler-Smith C. (1995) Father and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet* 11: 449-456

Karafet M., Mendez F.L., Meilerman M.B., Underhill P.A., Zegura S.L., Hammer M.F. (2008) New binary polymorphisms reshape and increase resolution of the human Y chromosomal haplogroup tree. *Genome Res* 18: 830-838

Kayser M., Caglià A., Corach D., Fretwell N., Gehrig C., Graziosi G., Heidorn F., Herrmann S., Herzog B., Hidding M., Honda K., Jobling M., Krawczak M., Leim K., Meuser S., Meyer E., Oesterreich W., Pandya A., Parson W., Penacino G., Perez-Lezaun A., Piccinini A., Prinz M., Schmitt C., Schneider P.M., Szibor R., Teifel-Greding J., Weichhold G., de Knijff P., Roewer L. (1997) Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Leg Med* 110: 125-133, 141-149

Kayser M., Roewer L., Hedmann M., Henke L., Henke J., Brauer S., Kruger C., Krawczak M., Nagy M., Dobosz T., Szibor R., de Knijff P., Stoneking M., Sajantila A. (2000) Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome revealed by direct observation in father/son pairs. *Am J Hum Genet* 66: 1580-1588

Koopman P., Gubbay J., Vivian N., Goodfellow P., Lovell-Badge R. (1991) Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature* 351: 159-173

Kwock C., Tyler-Smith C., Mendonca B.B., Berkovitz G.D., Goodfellow P.N., Hawkins J.R. (1996) Mutation analysis of the 2kb 5' to SRY in XY females and XY intersex subjects. *J Med Genet* 33: 465-468

Lahn B.T., Page D.C. (1999) Four evolutionary strata on the human X chromosome. *Science* 286: 964-967

Lim S.K., Xue Y., Parkin E.J., Tyler-Smith C. (2007) Variation of 52 new Y-STR loci in the Y Chromosome Consortium worldwide panel of 76 diverse individuals. *Int J Legal Med* 121:124–127

Löffler G., Petrides P.E. (1997) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, Berlin

Lucotte G., Gerard N., Krishnamoorthy R., David F., Aouizerate A., Galzot P. (1994) Reduced variability in Y-chromosome –specific haplotypes for some Central African populations. *Hum Biol* 66: 519-526

Mathias N., Bayés M., Tyler-Smith C. (1994) Highly informative compound haplotypes for the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 3: 115-123

Meschede D., Horst J., Nieschlag E. (1999) Störungen der sexuellen Differenzierung. In Diedrich, K. (Hrsg.) „Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe“, Urban & Schwarzenberg

Mitchell R.J., Hammer M.F. (1996) Human evolution and the Y chromosome. *Curr Opin Genet Dev* 6: 737-742

Mittal T., Saralaya K.M., Kuruvilla A., Achary C. (2008) Sex determination from buccal mucosa scrapes. *Int J Legal Med* DOI 10.1007/s00414-008-0285-8

Page D., de-Martinville B., Barker D., Wyman A., White R., Francke U., Botstein D. (1982) Single-copy sequence hybridizes to polymorphic and homologous loci on human X and Y chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 79: 5352-5356

Painter T. (1923) Studies in mammalian spermatogenesis.II. The spermatogenesis of man. *J Exp Zool* 37: 291-335

Roewer L, Nagy M, Schmidt P, Epplen JT, Herzog-Schröder G (1993) Microsatellite and HLA class II oligonucleotide typing in a population of Yanomami Indians. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreyas AJ (eds) *DNA fingerprinting: the state of the science*. Birkhäuser, Basel Boston Berlin, pp 221-230

Roewer L., Epplen J.T. (1992) Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeat sequences in case work. *Forensic Science Int* 53: 163-171

Rozen S., Skaletsky H., Marszalek J.D., Minx P.J., Cordum H.S., Waterston R.H., Wilson R.K., Page D.C. (2003) Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature* 423: 873-876

Salem A.-H., Badr F.M., Gaballah M.F., Pääbo S. (1996) The genetics of traditional living: Y-chromosomal and mitochondrial lineages in the Sinai peninsula. *Am J Hum Genet* 59: 741-743

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 74: 5463

Scholz A. (1995), *Humangenetik*, 9. Auflage, Chapman&Hall

Singer-Sam J., Tanguay R.L., Riggs A.D. (1989) Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications* 3: 11

Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J., Cordum H.S., Hillier L., Brown L.G., Repping S., Pyntikova T., Ali J., Bieri T., Chinwalla A., Delehaunty A., Delehaunty K., Du H., Fewell G., Fulton L., Fulton R., Graves T., Hou S.F., Latrielle P.,

Leonard S., Mardis E., Maupin R., McPherson J., Miner T., Nash W., Nguyen C., Ozersky P., Pepin K., Rock S., Rohlfing t., Scott K., Schultz B., Strong C., Tin-Wollam A., Yang S.P., Waterston R.H., Wilson R.K., Rozen S., Page D.C. (2003) The Male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423: 825-837

Tomas C., Stangegaard M., Børsting C., Hansen A.J., Morling N. and The SNPforID Consortium (2008) Typing of 48 autosomal SNPs and amelogenin with GenPlex SNP genotyping system in forensic genetics. *Forensic Sci Int: Genetics* 3: 1-6

Underhill P.A., Roseman C.C. (2001) The case for an African rather than an Asian origin of the human Y-chromosome YAP insertion, pp. 43-56 in *Genetics, Linguistic and Archaeological Perspectives on Human Diversity in Southeast Asia: Recent Advances in Human Biology*, Vol. 8, edited by L. Jin, M. Seielstad and C. Xiao. World Scientific Publishing, Singapore

Weale M.E., Shah T., Jones A.L., Greenhalgh J., Wilson J.F., Nymadawa P., Zeitlin D., Connell B.A., Bradman N., Thomas M.G. (2003) Rare Deep-Rooting Y Chromosome Lineages in Humans: Lessons for Phylogeography. *Genetics* 165: 229-234

Weber J.L., Wong C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 2:1123-1128

Whitfield L.S., Sulston J.E., Goodfellow P.N. (1995) Sequence variation of the human Y chromosome. *Nature* 378:379-380

Wieacker P.F., Jakubiczka S., Borgmann S., Petersen C., Ocran K. (1996) Das XX-Mann-Syndrom als mögliche Ursache der männlichen Infertilität- Molekulargenetische Aspekte. *Fertilität* 12: 142-145

Wiegand P., Bajanowski T., Brinkmann B. (1993) DNA typing of debris from finger nails. *Int J Legal Med* 106:81-83

---

Y-Chromosome Consortium (2002) A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res.* 12: 339-348

Zerjal T., Dashnyam B., Pandya A., Kayser M., Roewer L., Santos F.R., Schiefenhövel W., Fretwell N., Jobling M.A., Harihara S., Shimizu K., Semjida D., Sajantila A., Salo P., Crawford M.H., Ginter E.K., Evgrafov O.V., Tyler-Smith C. (1997) Genetic relationships of asians and northern europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis. *Am J Hum Genet* 60:1174-1183

## Ergebnistabellen der Y-chromosomalen STR- und der SNP-Systeme

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Buschmann 7	12	12.1	14	29	21	10	13	11	WT	WT	WT
Buschmann 14	16	11.1	14	30	20	9	11	13	WT	G	WT
Han Chinese 1	14	12.1	13	29	23	9	15	13	WT	G	WT
Han Chinese 3	15	13.1	12	29	23	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 4	15	11.1	13	29	23	10	11	14	WT	G	WT
Han Chinese 5	17	13.1	13	28	22	10	14	12	WT	G	WT
Han Chinese 6	14	12.1	14	31	23	10	14	13	WT	G	WT
Han Chinese 7	13	12.1	14	31	24	9	14	14	WT	G	WT
Han Chinese 8	16	11.1	13	30	23	10	11	15	WT	G	WT
Han Chinese 9	16	11.1	13	29	23	10	11	14	WT	G	WT
Han Chinese 11	17	13.1	12	28	25	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 13	14	14.1	12	27	24	10	14	12	WT	G	WT
Han Chinese 14	16	11.1	13	29	24	10	11	15	WT	G	WT
Han Chinese 15	15	12.1	13	29	23	10	14	13	WT	G	WT
Han Chinese 16	16	13.1	13	29	24	10	12	12	WT	G	WT
Han Chinese 17	15	12.1	13	29	22	10	14	13	WT	G	WT
Han Chinese 18	16	11.1	13	29	24	10	11	15	WT	G	WT
Han Chinese 19	17	13.1	12	28	25	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 20	16	13.1	13	28	24	10	13	13	WT	G	WT
Han Chinese 22	17	11.1	13	30	23	11	11	14	WT	G	WT
Han Chinese 23	15	13.1	13	29	25	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 24	15	13.1	12	28	23	10	12	12	WT	G	WT
Han Chinese 25	16	13.1	12	30	24	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 26	15	13.1	12	29	24	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 27	16	12.1	14	30	23	10	14	13	WT	G	T
Han Chinese 28	16	11.1	13	30	23	10	11	14	WT	G	WT
Han Chinese 29	16	11.1	13	31	24	10	11	15	WT	G	WT
Han Chinese 31	16	13.1	12	29	25	10	14	12	WT	G	WT
Han Chinese 32	14	12.1	14	30	23	10	11	12	WT	G	WT
Han Chinese 33	15	13.1	14	30	24	10	12	12	WT	G	WT

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Han Chinese 35	15	12.1	13	29	25	10	13	13	WT	G	WT
Han Chinese 37	15	11.1	13	29	23	10	11	14	WT	G	WT
Han Chinese 38	16	13.1	12	30	24	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 39	16	13.1	12	28	23	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 40	16	11.1	13	29	24	10	11	13	WT	G	WT
Han Chinese 41	15	13.1	13	30	23	10	13	13	WT	G	WT
Han Chinese 42	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Han Chinese 43	14	11.1	13	29	24	10	11	13	WT	G	WT
Han Chinese 44	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Han Chinese 45	16	13.1	12	29	22	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 46	15	12.1	11	27	23	11	14	13	WT	G	WT
Han Chinese 47	15	11.1	13	29	25	10	11	13	WT	G	WT
Han Chinese 48	14	13.1	13	30	23	10	12	12	WT	G	WT
Han Chinese 49	14	13.1	12	28	23	10	12	12	WT	G	WT
Han Chinese 52	14	12.1	12	30	24	10	14	13	WT	G	WT
Han Chinese 53	16	13.1	12	29	24	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 54	15	13.1	13	30	23	10	12	12	WT	G	WT
Han Chinese 55	16	12.1	13	28	23	10	13	13	WT	G	WT
Han Chinese 57	17	13.1	12	28	23	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 58	15	13.1	12	28	23	10	13	13	WT	G	WT
Han Chinese 59	13	11.1	12	29	23	10	12	12	WT	G	WT
Han Chinese 60	15	13.1	12	29	23	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 63	14	12.1	13	29	23	10	15	13	WT	G	WT
Han Chinese 64	15	12.1	14	30	24	10	13	14	WT	G	WT
Han Chinese 66	15	12.1	12	29	23	10	14	13	WT	G	WT
Han Chinese 67	17	13.1	12	27	24	10	13	13	WT	G	WT
Han Chinese 68	13	13.1	12	30	25	10	13	13	WT	G	WT
Han Chinese 70	14	14.1	13	29	23	10	14	12	WT	G	WT
Han Chinese 71	15	11.1	13	29	24	10	11	13	WT	G	WT
Han Chinese 73	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Han Chinese 74	13	12.1	14	30	25	9	13	14	WT	G	T
Han Chinese 76	15	13.1	12	29	23	10	12	12	WT	G	WT

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Han Chinese 80	15	11.1	13	30	24	11	11	15	WT	G	WT
Han Chinese 82	15	13.1	13	29	23	10	12	12	WT	G	WT
Han Chinese 86	15	14.1	12	28	23	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 87	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Han Chinese 88	14	13.1	12	30	23	11	12	12	WT	G	WT
Han Chinese 89	15	12.1	12	27	23	10	14	13	WT	G	WT
Han Chinese 90	15	13.1	12	27	21	11	14	12	WT	G	WT
Han Chinese 92	14	14.1	13	29	23	10	14	12	WT	G	WT
Han Chinese 93	16	13.1	12	28	26	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 94	15	13.1	13	29	25	10	13	12	WT	G	WT
Han Chinese 97	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Han Chinese 98	14	12.1	14	30	23	11	15	14	WT	G	WT
Han Chinese 99	15	13.1	12	29	24	10	12	12	WT	G	WT
Han Chinese 100	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Japaner 2	15	12.1	13	29	22	10	13	13	WT	G	WT
Japaner 5	17	11.1	15	32	25	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 12	17	11.1	14	32	24	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 13	16	11.1	14	30	24	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 14	17	11.1	14	31	25	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 17	15	12.1	14	30	22	10	13	13	WT	G	WT
Japaner 19	17	11.1	14	31	25	11	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 20	15	12.1	14	30	22	10	13	13	WT	G	WT
Japaner 21	15	12.1	14	29	23	10	13	13	WT	G	WT
Japaner 27	14	14.1	11	27	23	10	13	12	WT	G	WT
Japaner 29	15	12.1	14	30	22	10	14	13	WT	G	WT
Japaner 30	16	11.1	13	30	25	10	13	13	Insertion	G	WT
Japaner 31	15	11.1	14	32	26	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 39	15	11.1	14	30	26	10	11	12	Insertion	G	WT
Japaner 42	16	13.1	12	29	25	10	13	12	WT	G	WT
Japaner 43	16	11.1	13	31	24	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 45	15	12.1	13	29	22	10	13	13	WT	G	WT
Japaner 53	16	12.1	14	30	23	10	13	13	WT	G	WT
Japaner 54	14	12.1	14	29	22	10	14	14	WT	G	WT

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Japaner 56	17	13.1	12	28	25	10	13	12	WT	G	WT
Japaner 60	17	11.1	13	30	24	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 63	16	13.1	12	29	24	10	13	12	WT	G	WT
Japaner 64	17	11.1	13	29	26	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 65	15	11.1	14	29	23	10	11	15	WT	G	WT
Japaner 66	16	11.1	12	28	23	10	11	14	WT	G	WT
Japaner 70	15	12.1	14	30	22	10	13	13	WT	G	WT
Japaner 75	17	11.1	13	29	23	11	11	14	Insertion	G	WT
Japaner 76	15	11.1	14	31	25	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 79	17	11.1	14	31	25	11	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 80	16	13.1	12	30	26	10	14	12	WT	G	WT
Japaner 83	13	12.1	15	31	22	10	14	13	WT	G	WT
Japaner 84	15	11.1	13	30	25	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 95	17	11.1	14	31	25	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 97	16	13.1	12	29	24	10	13	12	WT	G	WT
Japaner 98	17	11.1	13	30	25	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 102	16	13.1	12	29	24	10	13	12	WT	G	WT
Japaner 104	15	12.1	14	30	22	10	13	13	WT	G	WT
Japaner 107	17	13.1	12	30	23	10	13	12	WT	G	WT
Japaner 110	17	11.1	14	31	24	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 111	15	11.1	14	30	23	10	11	14	WT	G	WT
Japaner 114	16	11.1	13	29	23	12	11	15	WT	G	WT
Japaner 115	16	13.1	12	29	23	10	12	12	WT	G	WT
Japaner 118	15	12.1	14	31	23	10	13	13	WT	G	WT
Japaner 119	16	13.1	11	27	23	10	12	12	WT	G	WT
Japaner 120	16	12.1	14	29	22	10	13	13	WT	G	WT
Japaner 125	17	11.1	13	30	26	11	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 127	17	11.1	14	31	25	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 128	17	11.1	14	31	24	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 129	15	12.1	14	29	22	11	13	13	WT	G	WT
Japaner 130	17	13.1	13	30	24	11	13	13	WT	G	WT
Japaner 131	15	11.1	13	30	25	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 133	17	11.1	13	30	25	10	11	13	Insertion	G	WT

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Japaner 136	15	11.1	13	30	25	10	11	13	Insertion	G	WT
Japaner 138	15	12.1	14	30	22	10	13	13	WT	G	WT
Ovambo 1	15	11.1	13	31	21	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 5	15	11.1	12	30	21	10	12	13	Insertion	G	WT
Ovambo 13	16	11.1	13	29	21	10	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 17	16	11.1	13	29	21	10	11	15	Insertion	G	WT
Ovambo 18	16	11.1	13	30	21	10	11	14	Insertion	G	WT
Ovambo 21	14	11.1	12	28	25	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 25	16	11.1	14	32	24	10	11	13	WT	G	WT
Ovambo 30	16	11.1	13	30	22	10	11	14	Insertion	G	WT
Ovambo 40	15	11.1	13	29	21	10	11	14	Insertion	G	WT
Ovambo 41	15	11.1	13	30	21	11	11	14	Insertion	G	WT
Ovambo 52	15	11.1	13	31	21	10	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 54	13	11.1	10	28	24	11	11	14	Insertion	G	WT
Ovambo 56	16	11.1	13	29	21	10	11	15	Insertion	G	WT
Ovambo 60	15	11.1	13	30	21	10	11	14	Insertion	G	WT
Ovambo 64	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Insertion	G	WT
Ovambo 65	15	11.1	12	30	21	10	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 68	15	11.1	12	29	21	10	11	14	Insertion	G	WT
Ovambo 69	16	11.1	13	30	21	10	11	14	Insertion	G	WT
Ovambo 71	15	11.1	13	30	21	10	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 72	15	11.1	13	30	21	10	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 73	15	11.1	12	30	21	10	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 74	17	11.1	13	30	21	10	11	15	Insertion	G	WT
Ovambo 78	15	11.1	13	32	24	10	11	14	WT	G	WT
Ovambo 80	15	11.1	13	31	21	10	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 84	15	11.1	14	32	21	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 87	16	12.1	12	29	22	10	11	12	WT	G	WT
Ovambo 107	15	11.1	13	30	21	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 108	15	11.1	13	31	21	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 113	16	11.1	13	30	21	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 116	15	11.1	12	31	21	10	11	12	Insertion	G	WT
Ovambo 117	15	11.1	13	30	21	10	11	14	Insertion	G	WT

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Ovambo 118	15	11.1	13	29	21	10	11	14	Insertion	G	WT
Ovambo 136	16	11.1	13	30	21	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 139	16	11.1	13	30	21	10	11	14	Insertion	G	WT
Ovambo 146	16	11.1	13	30	21	10	11	15	Insertion	G	WT
Ovambo 149	15	11.1	13	31	21	10	11	15	Insertion	G	WT
Ovambo 154	14	11.1	12	28	23	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 157	17	11.1	13	29	21	10	11	15	Insertion	G	WT
Ovambo 161	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Insertion	G	WT
Ovambo 169	14	11.1	13	30	21	10	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 171	15	11.1	14	32	21	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 172	15	11.1	14	32	21	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 174	15	11.1	13	31	21	10	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 176	16	11.1	14	32	24	10	11	13	WT	G	WT
Ovambo 177	15	11.1	12	30	21	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 181	14	11.1	12	28	24	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 185	15	11.1	13	30	21	10	11	12	Insertion	G	WT
Ovambo 186	15	11.1	13	32	21	10	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 188	15	11.1	13	30	21	10	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 189	15	11.1	13	32	21	11	11	13	Insertion	G	WT
Ovambo 191	16	11.1	13	30	21	10	11	15	Insertion	G	WT
Türke 4	14	12.1	12	29	23	10	11	13	WT	G	WT
Türke 5	15	12.1	12	29	21	10	11	14	WT	G	WT
Türke 9	14	13.1	13	30	24	9	13	14	WT	G	WT
Türke 12	15	12.1	14	34	24	11	11	13	WT	G	T
Türke 15	16	12.1	13	31	25	11	11	13	WT	WT	WT
Türke 22	13	11.1	12	29	23	10	12	13	Insertion	G	WT
Türke 26	14	12.1	12	28	23	10	11	12	WT	G	WT
Türke 29	13	11.1	12	31	24	10	11	12	Insertion	G	WT
Türke 32	17	12.1	13	31	24	11	11	12	WT	WT	T
Türke 33	14	12.1	13	28	23	10	14	13	WT	G	WT
Türke 34	14	11.1	14	31	24	10	11	13	Insertion	G	WT
Türke 38	14	12.1	13	29	24	11	13	12	WT	G	WT
Türke 39	15	12.1	12	28	23	10	11	12	WT	G	WT

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Türke 40	14	12.1	13	30	23	10	14	13	WT	G	WT
Türke 43	13	12.1	13	30	25	11	11	13	Insertion	G	WT
Türke 44	14	12.1	13	29	23	10	11	12	WT	G	WT
Türke 45	14	12.1	13	31	25	11	11	13	WT	WT	T
Türke 46	14	12.1	13	30	25	10	11	13	WT	WT	T
Türke 47	15	12.1	12	28	25	10	11	12	WT	G	WT
Türke 48	15	12.1	12	29	25	10	11	13	WT	WT	T
Türke 50	13	12.1	13	29	24	10	13	12	WT	G	T
Türke 51	15	12.1	13	30	23	11	13	13	WT	G	T
Türke 52	14	12.1	13	30	23	10	11	12	WT	G	WT
Türke 53	16	12.1	13	31	24	11	11	12	WT	WT	T
Türke 54	14	12.1	13	29	23	10	11	12	WT	G	WT
Türke 56	16	12.1	12	28	21	10	11	13	WT	G	WT
Türke 57	14	12.1	13	31	23	10	11	12	WT	G	WT
Türke 59	13	12.1	13	30	24	10	11	13	Insertion	G	WT
Türke 60	15	12.1	12	29	24	11	11	13	WT	WT	T
Türke 61	15	12.1	13	30	25	10	11	13	Insertion	G	WT
Türke 64	13	11.1	13	32	24	10	11	13	Insertion	G	WT
Türke 65	14	12.1	13	29	23	10	11	12	WT	G	T
Türke 68	14	12.1	12	29	22	11	12	12	Insertion	G	WT
Türke 72	13	11.1	13	32	24	10	11	13	WT	WT	T
Türke 83	17	12.1	13	31	24	11	11	13	WT	WT	T
Türke 91	15	12.1	12	29	24	10	11	12	WT	G	WT
Türke 94	14	13.1	13	29	23	11	13	12	WT	G	T
Türke 95	13	12.1	14	30	22	10	11	13	WT	G	WT
Türke 96	15	12.1	13	31	24	10	11	12	WT	G	WT
Türke 97	16	12.1	13	29	23	10	11	12	WT	G	WT
Türke 102	13	13.1	14	31	24	10	11	12	Insertion	G	WT
Türke 103	14	12.1	14	30	24	13	13	12	WT	G	T
Türke 107	16	12.1	14	31	25	11	11	12	WT	WT	T
Türke 108	15	12.1	14	30	25	11	11	13	WT	WT	T
Türke 109	15	12.1	13	29	23	11	11	12	WT	G	WT
Türke 110	14	12.1	14	29	24	10	14	12	WT	G	T

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Türke 111	15	12.1	14	31	23	10	15	14	WT	G	WT
Türke 112	15	12.1	12	28	22	10	12	14	WT	G	WT
Türke 113	14	12.1	14	30	24	11	13	13	WT	G	T
Türke 114	14	12.1	13	30	23	10	11	12	WT	G	WT
Türke 115	14	12.1	13	28	24	11	14	12	WT	G	T
Türke 116	15	12.1	12	28	22	10	11	14	WT	G	WT
Türke 117	14	12.1	12	28	24	11	13	13	WT	G	T
Türke 119	15	12.1	13	29	23	10	11	14	WT	G	WT
Türke 120	15	12.1	13	28	23	10	11	12	WT	G	WT
Türke 127	14	12.1	14	31	23	10	13	13	WT	G	WT
Türke 128	14	12.1	14	30	24	12	13	13	WT	G	T
Türke 136	17	12.1	12	28	21	10	11	15	WT	G	WT
Türke 139	14	12.1	14	30	24	10	11	12	WT	G	WT
Türke 143	15	12.1	13	29	23	9	11	15	WT	G	WT
Türke 149	15	12.1	12	29	25	10	13	12	WT	G	WT
Türke 150	16	11.1	14	30	23	9	11	14	WT	G	WT
Türke 151	15	12.1	13	28	23	11	11	12	WT	G	WT
Türke 162	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Türke 163	14	12.1	13	30	23	10	12	12	WT	G	WT
Türke 164	15	12.1	12	28	24	11	11	12	WT	G	WT
Türke 167	13	11.1	12	30	22	10	11	13	Insertion	G	WT
Türke 176	16	12.1	13	31	24	11	11	13	WT	G	WT
Türke 178	16	12.1	13	30	25	11	11	13	WT	WT	T
Türke 179	14	12.1	13	28	24	11	14	12	WT	G	T
Türke 180	15	12.1	13	30	23	9	11	15	WT	WT	T
Türke 181	13	11.1	12	30	22	10	11	13	Insertion	G	WT
Türke 182	14	12.1	12	27	23	10	11	12	WT	G	WT
Türke 183	14	12.1	13	29	22	10	11	12	WT	G	WT
Türke 184	14	12.1	14	30	24	11	13	12	WT	G	T
Türke 185	15	12.1	13	29	24	10	11	12	WT	G	WT
Türke 186	17	12.1	13	31	25	11	11	13	WT	WT	T
Türke 187	14	12.1	13	29	24	11	13	13	WT	G	T
Türke 189	13	11.1	13	30	24	10	11	13	Insertion	G	WT

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Türke 192	16	12.1	13	31	24	11	11	13	WT	WT	T
Türke 194	14	12.1	14	30	25	10	11	12	WT	G	WT
Türke 196	14	12.1	13	30	23	10	11	12	WT	G	WT
Türke 197	13	12.1	15	31	22	10	15	13	WT	G	T
Türke 198	14	12.1	14	31	23	10	11	12	WT	G	WT
Türke 3.45	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Türke 6.24	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Insertion	G	WT
Deutscher 1.06	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	WT	T
Deutscher 1.21	14	12.1	13	29	24	11	13	13	WT	G	T
Deutscher 1.36	14	12.1	13	29	24	12	13	13	WT	G	T
Deutscher 1.39	14	12.1	13	30	24	10	15	13	WT	G	T
Deutscher 1.45	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Deutscher 1.51	14	12.1	13	29	23	11	13	13	WT	G	T
Deutscher 1.54	14	12.1	13	29	23	10	13	13	WT	G	T
Deutscher 1.57	14	12.1	13	29	24	12	13	13	WT	G	T
Deutscher 1.6	14	13.1	12	28	22	10	11	13	WT	G	WT
Deutscher 1.69	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Insertion	G	WT
Deutscher 1.72	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	WT	T
Deutscher 1.78	14	12.1	13	31	24	10	13	13	WT	G	T
Deutscher 2.03	14	12.1	12	28	23	10	13	13	WT	G	T
Deutscher 2.06	14	12.1	13	29	24	12	13	13	WT	G	T
Deutscher 2.15	14	12.1	13	29	24	11	13	13	WT	G	T
Deutscher 2.18	14	12.1	13	29	23	12	13	13	WT	G	T
Deutscher 2.21	14	12.1	14	30	24	10	13	13	WT	G	T
Deutscher 2.27	14	12.1	13	29	24	11	13	14	WT	G	T
Deutscher 2.36	15	12.1	12	28	22	10	11	13	WT	G	T
Deutscher 2.39	14	12.1	13	29	25	10	14	13	WT	G	T
Deutscher 2.48	14	12.1	13	29	24	11	13	12	WT	G	T
Deutscher 2.6	16	12.1	13	30	25	10	11	13	WT	WT	T
Deutscher 2.63	15	12.1	13	30	26	11	11	13	WT	WT	T
Deutscher 2.69	16	12.1	13	31	24	11	11	13	WT	G	WT
Deutscher 2.72	14	12.1	13	29	24	11	14	14	WT	G	T
Deutscher 2.81	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Deutscher 3.03	16	12.1	12	28	21	10	11	14	WT	G	WT
Deutscher 3.06	15	12.1	13	29	25	11	14	13	WT	G	WT
Deutscher 3.18	14	12.1	14	30	24	11	13	13	WT	G	T
Deutscher 3.3	15	12.1	13	31	24	10	11	13	WT	WT	T
Deutscher 3.39	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	WT	T
Deutscher 3.45	14	12.1	12	28	23	10	11	12	WT	G	WT
Deutscher 3.51	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	WT	T
Deutscher 4.03	14	12.1	13	29	24	11	13	13	WT	G	T
Deutscher 4.06	15	12.1	13	31	25	10	11	13	WT	WT	T
Deutscher 4.09	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	WT	T
Deutscher 4.36	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Deutscher 4.48	14	12.1	13	29	24	11	13	13	WT	G	T
Deutscher 4.54	14	12.1	13	31	23	11	13	12	WT	G	T
Deutscher 4.57	16	12.1	13	31	23	11	11	13	WT	G	WT
Deutscher 4.78	15	12.1	12	29	22	10	11	12	WT	G	WT
Deutscher 4.81	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	T
Deutscher 5.03	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	T
Deutscher 5.06	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Deutscher 5.12	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Deutscher 5.15	14	12.1	12	30	22	10	11	13	WT	G	WT
Deutscher 5.21	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	T
Deutscher 5.33	14	12.1	12	29	22	10	11	13	WT	G	WT
Deutscher 5.36	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Deutscher 5.39	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Deutscher 5.42	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Insertion	G	WT
Deutscher 5.45	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	T
Deutscher 5.48	14	12.1	13	29	23	11	13	13	WT	G	T
Deutscher 5.51	14	11.1	13	29	23	10	13	13	WT	G	T
Deutscher 5.57	14	12.1	12	28	22	10	11	13	WT	G	WT
Deutscher 5.66	15	10.1	13	29	23	10	12	14	WT	G	WT
Deutscher 5.72	17	12.1	14	31	25	10	11	13	WT	G	T
Deutscher 5.78	14	12.1	13	29	23	11	11	13	WT	G	T
Deutscher 6.06	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	T

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Deutscher 6.15	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	T
Deutscher 6.18	16	11.1	13	30	21	10	11	14	Insertion	G	WT
Deutscher 6.21	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	WT	T
Deutscher 6.24	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Insertion	G	WT
Deutscher 6.45	14	12.1	13	29	24	10	13	13	WT	G	T
Deutscher 6.51	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	T
Deutscher 6.54	14	12.1	13	29	24	11	13	13	WT	G	T
Deutscher 6.57	14	12.1	13	29	22	10	13	13	WT	G	WT
Deutscher 6.66	16	12.1	13	29	25	10	11	13	WT	WT	T
Deutscher 6.69	14	12.1	13	29	24	11	13	13	WT	G	T
Deutscher 6.72	14	12.1	13	29	22	11	13	13	WT	G	T
Deutscher 6.78	16	12.1	13	31	25	11	11	13	WT	G	WT
Deutscher 7.09	14	12.1	13	29	24	11	13	12	WT	G	T
Deutscher 7.24	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	T
Deutscher 7.3	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Deutscher 7.42	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Deutscher 7.48	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	WT	T
Deutscher 7.57	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Deutscher 7.6	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	T
Deutscher 7.66	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	WT	T
Deutscher 7.69	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	WT	T
Deutscher 7.75	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Insertion	G	WT
Deutscher 8.09	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	WT	T
Deutscher 8.21	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Insertion	G	WT
Deutscher 8.36	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Deutscher 8.39	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Deutscher 8.45	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	T
Deutscher 8.48	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Mongole 236	17	12.1	12	27	22	10	12	12	WT	G	WT
Mongole 237	16	11.1	13	29	24	10	11	13	WT	G	WT
Mongole 239	14	12.1	14	30	24	10	11	12	WT	G	WT
Mongole 240	16	11.1	13	29	25	10	11	13	WT	G	WT
Mongole 241	14	14.1	12	28	25	11	14	12	WT	G	WT

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Petra Anna Lünemann  
Geburtsdatum: 23. Juli 1967  
Geburtsort: Spelle, Kreis Emsland  
Konfession: römisch-katholisch  
Familienstand: ledig  
Kinder: Pia Carolina, geb. 28.11.2003

### Schul- und Berufsausbildung:

Aug. 1974 – Juni 1978 St. Anna-Grundschule Dreierwalde  
Aug. 1978 – Juni 1984 Ketteler-Realschule Hopsten  
Aug. 1984 – Juni 1985 Kopernikus-Gymnasium Rheine  
Sep. 1985 – Sep. 1987 Lehranstalt der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster zur Ausbildung technischer Assistenten in der Medizin  
Abschluss: Staatlich geprüfte Medizinisch-Technische Laboratoriumsassistentin  
Feb. 1992 – Dez. 1994 Abendgymnasium der Stadt Münster, berufsbegleitend, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung:

April 1995 – Feb. 1997 Vorklinisches Studium der Humanmedizin, Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
April 1997 Physikum  
April 1997 – Sep. 2001 Klinisches Studium der Humanmedizin, Westfälische Wilhelms-Universität Münster  
Aug. 1998 1. Staatsexamen  
Aug. 2000 2. Staatsexamen  
Okt. 2000 – Sep. 2001 Praktisches Jahr an den Universitäten Münster (Innere Medizin, Gynäkologie) und Concepción, Chile (Chirurgie)  
Dez. 2001 3. Staatsexamen

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mir diese Dissertation ermöglicht haben.

Zunächst bedanke ich mich recht herzlich bei **Herrn Prof. Bernd Brinkmann**, der mir dieses interessante Thema zu Verfügung gestellt hat und mir als ehemaliger Chef beratend zur Seite stand.

Des Weiteren gilt mein Dank **Burkhard Rolf, Peter Forster** und **Carsten Hohoff**, die mich während dieser Arbeit so geduldig betreut haben und durch deren Diskussion ich viel gelernt habe.

**Ulla**, vielen Dank für die Hilfestellung bei den Korrekturen und danke für unterstützende Motivation zum Ende der Fertigstellung.

**Marianne**, was soll ich sagen? Danke für liebevolle und kompetente Unterstützung über all die Jahre. Schön mit dir gearbeitet zu haben.

Danken möchte ich allen **Mitarbeiterinnen** und **Mitarbeiter** des Instituts für Rechtsmedizin, die mich all die Jahre begleitet haben. Danke für Eure Hilfsbereitschaft und Eure Kollegialität.

Vielen Dank auch all den **Freunden** und **Bekanntem**, die mich so verständnisvoll in Computerfragen unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Tochter **Pia Carolina**, die so tapfer war, wenn ihre Mama mal wieder am Schreibtisch saß.

Zuletzt möchte ich meinen Freundinnen **Lucia Uhlenbrock, Anke Schubert, Babette Balzer** und **Margit Suter** danken, die mich immer wieder motiviert haben und ohne deren Hilfe ich hier nicht angekommen wäre.

**Berufliche Tätigkeiten als MTA:**

- Jan. 1988 – März 1990  
Institut für Transfusionsmedizin und Gerinnungswesen, Prof. Dr. med. Brüster, Heinrich Heine-Universität Düsseldorf
- April 1990 – Juni 1991  
Institut für Rechtsmedizin, Prof. Dr. med. B. Brinkmann, Westfälische Wilhelms-Universität Münster
- Juli 1991 – April 1995  
Labor für spezielle Hämatologie und Hämostase Medizinische Klinik A, Prof. Dr. med. van de Loo, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

**Tätigkeiten während des Medizinstudiums:**

- Sep. 1997 – Okt. 1997  
Famulatur im Bereich *Allgemeinmedizin* bei Herrn B. Zöfelt, Haltern
- Feb. 1998 – April 1998  
Famulatur im Bereich *Radiologie* bei Dr. Bosch Clinica Alemana, Santiago de Chile
- Sep. 1998 – Okt. 1998  
Famulatur im Bereich *Anästhesie* bei Dr. Lehnard Orthopädische Klinik, München-Harlaching
- Feb. 1999 – April 1999  
Famulatur im Bereich *Radiologie* und *Innere Medizin* bei Dr. Osler Good Health Wanganui, Neuseeland
- Juli 1999 – Feb. 2002  
Betreuerin im Langzeitbereich für Psychisch- und Geistigbehinderte Patienten, Alexianer-Krankenhaus Amelsbüren

**Berufliche Tätigkeiten als Ärztin:**

- März 2002 – Sept. 2003  
AIP in der Inneren Abteilung des Franz-Hospitals Dülmen
- Juli 2006 – Juni 2007  
Assistenzärztin in der psychosomatischen Abteilung Laer Marienhospital Steinfurt
- Seit April 2004  
Assistenzärztin in der Inneren Abteilung, Marienhospital Steinfurt

Proben-Nr.	DYS19	DXYS156-Y	DYS389 I	DYS389 II	DYS390	DYS391	DYS392	DYS393	YAP	SRY1532	92R7
Mongole 242	15	11.1	14	30	25	10	11	13	WT	G	WT
Mongole 243	14	12.1	13	28	23	10	14	13	WT	G	WT
Mongole 244	16	13.1	14	31	24	10	13	12	WT	G	WT
Mongole 245	14	12.1	13	30	23	11	16	13	WT	G	T
Mongole 246	18	12.1	13	31	25	11	11	13	WT	WT	T
Mongole 247	16	11.1	13	29	25	10	11	13	WT	G	WT
Mongole 248	15	13.1	12	28	24	10	13	12	WT	G	WT
Mongole 249	15	12.1	13	28	23	10	11	13	WT	G	WT
Mongole 250	15	11.1	13	28	23	10	11	14	WT	G	WT
Mongole 251	15	11.1	11	28	22	10	11	14	WT	G	WT
Mongole 252	15	11.1	13	29	24	10	11	13	WT	G	WT
Mongole 253	14	12.1	14	30	23	11	14	14	WT	G	WT
Mongole 254	16	11.1	13	29	25	10	11	13	WT	G	WT
West-Pygmäe 1	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
West-Pygmäe 2	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
West-Pygmäe 6	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Insertion	G	WT
West-Pygmäe 8	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
West-Pygmäe 9	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	Insertion	G	WT
Ost-Pygmäe 3	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Ost-Pygmäe 5	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT
Ost-Pygmäe 6	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	WT	G	WT

n.u. = nicht untersucht

WT = Wildtyp

YAP: Wildtyp: keine Insertion; Mutation: Alu-Insertion  
 SRY-1532: Wildtyp: Adeninbase; Mutation: Guaninbase  
 92R7 Wildtyp: Cytosinbase; Mutation: Thymidinbase