

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

**Analyse von Mutationen der nicht-kodierenden
Hypervariablen Region I (HVI) und kodierender Einzelnukleotid-
Polymorphismen (SNPs) des mitochondrialen Genoms**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Pfältzer, Adrian Bernhard Wolfgang
aus Frankfurt am Main

2014

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Heidi Pfeiffer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Dworniczak

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2014

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Institut für Rechtsmedizin
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Heidi Pfeiffer -
Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Heidi Pfeiffer
Koreferent: Prof. Dr. Bernd Dworniczak

ZUSAMMENFASSUNG

Analyse von Mutationen der nicht-kodierenden Hypervariablen Region I (HVI) und kodierender Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) des mitochondrialen Genoms

Pfältzer, Adrian Bernhard Wolfgang

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die statistische Aussagekraft der etablierten Sanger-Sequenzierung der Hypervariablen Region I (HVI) der mitochondrialen DNA (mtDNA) mit dem am Institut für Rechtsmedizin (IfR) der Universität Münster entwickelten 32 mtDNA SNaPshot verglichen. Als statistisches Maß diente dafür die Power of Discrimination (PD).

Das Ziel dieser Arbeit war zu belegen, dass die Haplogruppen-Bestimmung mittels 32 mtDNA SNaPshot vor der Sanger-Sequenzierung der HVI erfolgen sollte. Dazu wurde die DNA der HVI-Region in endlich viele virtuelle Abschnitte unterteilt, die nach Bestimmung der Haplogruppe (Hg) untersucht werden können und eine maximale PD erwarten lassen.

Insgesamt wurden 861 Speichelproben auf ihre Hgn und HVI-Sequenzen untersucht und gemäß ihrer Hgn aufgeteilt. Die HVI-Sequenzierungsdaten wurden danach in jeweils 217 fortlaufende, 120 Basenpaare (bp) lange, virtuelle DNA-Abschnitte unterteilt. Die Länge dieser Abschnitte wurde mit 120 bp bewusst sehr kurz gewählt, damit sie insbesondere für die Untersuchung degradierten Spurenmaterials geeignet sind.

Alle 861 Proben konnten erfolgreich untersucht werden. Die Ergebnisse der HVI-Sequenzierung und des SNaPshots zeigen die typischen Merkmale und Hgn-Verteilung einer westeuropäischen Population. Mittels des SNaPshots konnten die 861 Individuen 29 Hgn zugeordnet und eine PD von 0,911 erzielt werden. Den größten Anteil daran hat die Hg ‚H‘ mit 174 Individuen. Unter Berücksichtigung der im 32 mtDNA SNaPshot enthaltenen individualisierenden SNPs wurden 166 Haplotypen (Htn) und eine PD von 0,957 bestimmt. Mittels der HVI-Sequenzierung konnten 343 Htn differenziert werden, die größte Gruppe umfasst dabei 102 Individuen. Die PD lag bei 0,974.

Nach statistischer Auswertung konnte für 18 Hgn ein spezifischer Abschnitt der HVI-Sequenz ermittelt werden, der gemäß den vorliegenden Untersuchungsergebnissen die höchste PD bietet.

Der mtDNA SNaPshot, der zeit- und materialsparender eingesetzt werden kann, als die HVI-Sequenzierung, kann somit gut als leistungsfähige Screening Methode eingesetzt werden. Die Ergebnisse der Hgn-Bestimmung mittels SNaPshot-Verfahren erlauben dabei eine klare Eingrenzung der zu sequenzierenden HVI-Abschnitte, um eine maximale PD zu erzielen.

Beide Techniken können so ergänzend verwendet werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.04.2014

Eidesstattliche Erklärung

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Analyse von Mutationen der nicht-kodierenden Hypervariablen Region I (HVI) und kodierender Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) des mitochondrialen Genoms

im:

Institut für Rechtsmedizin

unter der Anleitung von:

Univ.-Prof. Dr. med. Heidi Pfeiffer

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Dresden, den 11.04.2014

Adrian Pfälzter

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Der genetische Fingerabdruck.....	7
1.2. Die Forensik vor der Entwicklung der DNA-Analytik.....	8
1.3. Die Entwicklung der forensischen Genetik.....	8
1.4. Die Zelle	10
1.4.1. Eukaryoten	10
1.4.2. Prokaryoten	11
1.5. Das Mitochondrium.....	12
1.5.1. Die Endosymbiontentheorie	12
1.5.2. Mitochondrien als Ursprung von Krankheiten.....	16
1.6. Das menschliche Genom	16
1.6.1. Nukleäre DNA.....	17
1.6.2. Mitochondriale DNA	17
1.7. Mitochondriale DNA in der Forensik.....	20
1.7.1. Hypervariable Regionen der mitochondrialen DNA	21
1.7.2. SNaPshots der mitochondrialen DNA	22
1.7.3. Mitochondriale DNA - Mini-Amplikons, Mitominis und Mini Variable Regions ..	23
1.7.4. Haplogruppen der mitochondrialen DNA.....	24
1.8. Ziel der Untersuchung	28
2. Material und Methoden	29
2.1. Material	29
2.1.1. Geräte	29
2.1.2. Software.....	29
2.1.3. Verbrauchsmaterialien	29
2.1.4. Chemikalien.....	30
2.1.5. Lösungen	31
2.1.6. Ready-Reaction-Mixes (Kits)	32
2.1.7. Enzyme	32
2.1.8. Oligonukleotide.....	32
2.1.9. PCR-Primer-Sequenzen	33
2.1.10. PCR- und SNaPshot-Primer Konzentrationen	34
2.1.11. Probenmaterial	36
2.2. Methoden.....	36
2.2.1. Gewinnung von Speichelproben.....	36

2.2.2.	Die Polymerase Kettenreaktion	37
2.2.3.	HVI-Sequenzierung	38
2.2.4.	Minisequenzierung - der SNaPshot.....	40
2.2.5.	Auswahl der SNPs	41
2.2.6.	PCR und SNaPshot Primer Gestaltung	42
2.2.7.	Multiplex PCR Protokoll	42
2.2.8.	Multiplex Extension Primer Protokoll:	43
2.2.9.	Amplikon Analyse mittels Kapillarelektrophese	44
2.2.10.	Haplogruppen-Zuordnung	47
2.2.11.	Haplotypen-Zuweisung	50
2.2.12.	Datenanalyse in zwei Schritten	50
2.2.13.	Die Power of Discrimination	50
2.2.14.	Einsatz von virtuellen Mini-Amplikons zur Analyse von mtDNA	51
3.	Ergebnisse	53
3.1.	Die Datenanalyse	54
3.2.	Haplogruppen-Verteilung.....	55
3.3.	Haplotypen-Verteilung	57
3.4.	Haplogruppen und Mini-Amplikons	58
3.4.1.	Mitomini I.....	58
3.4.2.	Mitomini II.....	59
3.4.3.	Mitomini III.....	60
3.4.4.	Überblick: Power of Discrimination der Mitominis nach Eichmann und Parson.	61
3.5.	Mini-Amplikon X	63
3.6.	Vergleich Mitominis nach Eichmann u. Parson mit Mini-Amplikons X.....	64
4.	Diskussion	66
5.	Literaturverzeichnis	74
6.	Tabellenverzeichnis.....	78
7.	Abbildungsverzeichnis	79
	Lebenslauf	80
	Danksagung	81
	Anhang	I

1. Einleitung

1.1. Der genetische Fingerabdruck

Die Entdeckung und Weiterentwicklung des ‚genetischen Fingerabdrucks‘ stellt ohne Frage einen entscheidenden Impuls für die Forensik, womöglich den Bedeutendsten im Verlauf des 20. Jahrhunderts dar.

Insbesondere die hohe Sensitivität und Spezifität der Analyse von DNA übertreffen alle bis dahin bekannten forensischen Verfahren.

In den letzten Jahren konnte sich dabei die Analyse von mitochondrialer DNA (mtDNA) als letzte Möglichkeit des genetischen Fingerabdrucks etablieren. Dabei nimmt das am Institut für Rechtsmedizin (IfR) entwickelte und seit 2009 angewandte Verfahren zur Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen, Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs), eine entscheidende Rolle ein [39; 40; 41].

Viele bis zur Entdeckung des ‚genetischen Fingerabdrucks‘ als ungelöst geltende Kriminalfälle, z.B. des „Green River Killers“ aus Seattle [74], konnten erst dadurch aufgeklärt werden, indem der Nachweis genetischen Materials am Opfer, dem Täter, dem Tatort oder an Beweismitteln gelang und daraus stichhaltige Beweise zur Überführung der Täter gewonnen wurden. Gary Ridgeway, der sog. „Green River Killer“, wurde im Jahr 2000 durch eine DNA Probe überführt, die er 1987 als Verdächtiger gegeben hatte.

Doch der genetische Fingerabdruck dient nicht nur als belastendes Beweismittel.

Er hat auch zur Entlastung von zahlreichen Unschuldigen geführt, die durch bis dahin zur Verfügung stehende Beweismittel und Indizien als Täter überführt galten und rechtskräftig zu Haft- oder Todesstrafen verurteilt waren. In den USA hat sich das Innocence Project der Aufgabe verschrieben, diesen Menschen zu ihrem Recht zu verhelfen [15, S. 8]. Bis zum 26. Mai 2013 konnten 307 Menschen entlastet werden. Die durchschnittliche Inhaftierungsdauer der Freigelassenen betrug dabei 13,6 Jahre [33].

Der ‚genetische Fingerabdruck‘ hat dadurch nicht nur das Fach der Forensik revolutioniert, sondern das Verständnis der Gesellschaft von Schuld und Unschuld verändert [15, S. 8].

Was umgangssprachlich als ‚genetischer Fingerabdruck‘ bezeichnet wird, impliziert letztlich diverse Möglichkeiten den Nachweis und die Zuordnung menschlicher DNA zu erbringen.

(Auch in der deutschen Fachliteratur ist der englische Begriff DNA (Desoxyribonucleic Acid) wesentlich gebräuchlicher als der deutsche Begriff DNS (Desoxyribonuklein Säure), deshalb wurde er auch für diese Arbeit gewählt.) DNA kann in vielen verschiedenen Formen vorliegen und es haben sich vielfältige Techniken entwickelt sie zu nutzen.

1.2. Die Forensik vor der Entwicklung der DNA-Analytik

Im Zeitalter vor der Analyse der DNA wurde versucht durch allgemeine (Geschlecht, Größe, Gewicht, Körperbau, Alter, Haar- und Irisfarbe, etc.) und besondere Merkmale (Naevi, Amputationen, Prothesen und Implantate, Narben) Menschen zu identifizieren [46, S. 90]. Das bekannteste Mittel dürfte dabei der klassische Fingerabdruck (Daktyloskopie) sein, der bereits seit Jahrhunderten genutzt und weiter entwickelt wurde [74]. Diesem sind jedoch erkennbar Grenzen gesetzt sind, da er gezielt vermieden oder aufgrund postmortaler Veränderungen nicht genutzt werden kann. Eine weitere Methode ist die odontologische Identifikation, die auch bei starken Veränderungen der Leiche noch präzise Ergebnisse liefert, vorausgesetzt es gibt zahnärztliche Befunde, die zum Vergleich heran gezogen werden können [46, S. 90].

Lange bevor die direkte Analyse genotypischer Merkmale der DNA möglich wurde, nutzte die Forensik indirekt mit der Blutgruppentestung [74] genetische bedingte, phänotypische, Merkmale zur Identifikation und Abstammungsbegutachtung. Die Möglichkeiten dabei sind allerdings eingeschränkt, da nur die vier Blutgruppen A, B, AB und 0 unterschieden werden können und 40 % der Bevölkerung Träger der Blutgruppe 0 sind.

1.3. Die Entwicklung der forensischen Genetik

Als Wegbereiter der forensischen Genetik gilt Dr. Alec Jeffreys, der während seiner Arbeit mit RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) entdeckte, dass die interindividuellen Unterschiede der VNTRS (Variable Number of Tandem Repeats) [35] die eindeutige Identifikation eines Menschen ermöglichen [34]. Jeffreys war es auch, der den Begriff des ‚genetische Fingerabdrucks‘ (Genetic Fingerprinting) etablierte. Im Jahr 1987 konnte mit seinem Verfahren der Täter zweier Morde, die sich 1983 und 1986 in der Nähe von Leicestershire ereigneten hatten, erfolgreich überführt werden [24]. Zuvor war ein dringend Tatverdächtiger durch den DNA-Beweis entlastet worden [15, S. 3].

Am Anfang des ‚genetischen Fingerabdrucks‘ stand die Analyse von DNA aus dem Nukleus der menschlichen Zelle. Dieser Anteil des menschlichen Genoms wird auch als nukleäre DNA (nDNA) oder Zellkern-DNA bezeichnet. Die von Jeffreys genutzten RFLPs werden in zweierlei Verfahren einmal als MLP (Multi Locus Probe) und SLP (Single Locus Probe) eingesetzt [15, SS. 3-5]. Insbesondere die MLP-RFLPs gelten dabei als besonders zeitaufwändig und nur eingeschränkt geeignet für Mischspuren, weshalb sie in vielen Laboren zuerst von SLP-RFLPs, später vom heute weitaus gebräuchlichsten Verfahren der STR (Short Tandem Repeat) abgelöst wurden [15, S. 5]. STR-Verfahren bieten einen guten Kompromiss aus maximaler PD und Bearbeitungszeit. Da sie Multiplex-fähig sind, können in kurzer Zeit große Mengen untersucht werden [15, S. 5].

Der ursprüngliche Set aus 13 Kern STR Loci wurde von einer Reihe von Gen-Datenbanken u. a. dem CODIS (Combined DNA Index System) des FBI (Federal Bureau of Investigation) der USA [13; 74] 1997 etabliert und bietet eine PD von mehr als 1 : 1 Billion zwischen nicht verwandten Individuen [17]. Ist eine klare Zuordnung mit diesem Konsensus Set nicht möglich, kann er durch weitere Loci ergänzt werden. Ausgehend von den ursprünglichen 13 Standard-Loci ist die Zahl der ergänzenden CODIS Loci in den vergangenen Jahren deutlich erweitert worden. Im Mai 2010 wurde daher vom FBI eine Arbeitsgruppe ins Leben gerufen (CODIS Core Loci Working Group) mit der Aufgabe, den aus 13 Loci bestehenden Standard-Set zu überprüfen und an den aktuellen Stand der Erkenntnisse anzupassen. Voraussichtlich wird die Zahl der Standard-Loci auf 20 bis 24 erweitert werden [23; 27; 37].

Seit den Anfängen der forensischen Genetik in den frühen 80iger Jahren wurde die Technik rapide weiter entwickelt und nutzt heute dem jeweiligen Untersuchungsziel entsprechende DNA-Bestandteile. Liegen ausreichende Mengen an DNA Material vor, werden STRs der nDNA untersucht. Bei einer geringen DNA-Ausbeute kann es notwendig werden auf die Untersuchung von SNPs zurück zu greifen. SNPs können in der nDNA aber auch in der mtDNA gefunden werden und haben sich in den letzten Jahren als nützlich erwiesen.

Insbesondere in Fällen mit stark degeneriertem genetischen Material nimmt die Untersuchung der mtDNA mittlerweile eine bedeutende Rolle in der forensischen Arbeit ein [18], da sie eine Reihe von Vorteilen bietet, die eine Identifikation auch in kritischen Fällen z.B. der Opfer und Täter der Anschläge vom 11. September noch möglich machen [15, SS. 5, 251-255; 20].

Die Identifikation der Opfer der Anschläge auf das World Trade Center in New York war bis heute eine der größten und schwierigsten Aufgabe, der sich die forensische Genetik

angenommen hat [15, S. 552]. Die dabei erzielten Erfolge verdeutlichen den ungeheuren Fortschritt, den das Fachgebiet in den letzten Jahrzehnten erfahren hat.

Erforderte die Bearbeitung der von Jeffreys entdeckten RFLPs noch wenigstens eine Woche mit chemiluminiszenten Proben und bis zu sechs bis acht Wochen mit radioaktiven Proben bei einem DNA Bedarf von 50 bis 500 ng, so kann mit modernen PCR Verfahren die Bearbeitung in ein bis zwei Tagen und mit einem DNA-Einsatz von 0,1 bis 1 ng [15, S. 29] erfolgen. Der geringe DNA-Bedarf ermöglicht die Analyse von DNA-armen Spuren/Beweismitteln z.B. Haaren, Knochen oder Urin [15, S. 49]. Mit dem von Köhnemann et al. [39] beschriebenen 32 mtDNA SNaPshot ließen sich sogar Proben mit einem DNA Gehalt von lediglich über 0,02 ng erfolgreich analysieren.

Die Bedeutung der forensischen Genetik wurde gerade auch durch das große mediale Interesse an eben diesem Fall einer breiten Öffentlichkeit bekannt.

1.4. Die Zelle

Zum besseren Verständnis der genetischen Methoden in der Forensik ist eine Auseinandersetzung mit der Biologie der DNA unerlässlich.

Die kleinste Einheit des Lebens ist die Zelle.

In der langen Evolution der Zelle haben sich zwei verschiedene Formen der Zelle entwickelt:

Eukaryoten und Prokaryoten.

Beide Zellfamilien lassen sich anhand ihrer Struktur von einander unterscheiden, aber diese strukturellen Unterschiede sind nur ein Aspekt zweier auch im Detail sehr verschieden aufgebauter und arbeitender Organismen.

1.4.1. Eukaryoten

Eukaryoten sind höchst strukturierte Organismen, die von einer festen Zellwand (z.B. Pflanzen, Pilze) oder -membran umgeben sind. In ihrem Inneren enthalten sie ein Zytoskelett und Organellen, die in der Lage sind eigene Kompartimente, getrennt vom Zytoplasma der Zelle deren Komponente sie sind, zu schaffen [30]. Die Entstehung von eukaryoten Organismen mit hochspezialisierten Organellen aus Prokaryoten ähnlichen Zellen ist bis heute nicht gänzlich

aufgeklärt und Gegenstand reger wissenschaftlicher Diskussion und Forschung [28] (siehe 1.5.1. Die Endosymbiontentheorie).

Der Zellkern, Nukleus, ist das genetische Reservoir jedes eukaryoten Organismus und enthält mit Ausnahme der mtDNA das gesamte zelluläre Genom. Bei Eukaryoten findet sich die DNA, abgesehen für den Zweck der Mitose und Meiose, immer in ihrem Nukleus. Wird genetische Information in anderen Teilen der Zelle benötigt, muss diese immer im Nukleus transkribiert werden.

Typisches Merkmal jeder eukaryoten Zelle ist das Vorhandensein von Nukleus, Mitochondrien [65] und anderen Zellorganellen wie dem Golgi-Apparat. Eukaryoten sind ein- oder mehrzellige Lebewesen. Alle Tiere, Pflanzen, Pilze und Protisten werden zu den Eukaryoten gezählt.

1.4.2. Prokaryoten

Im Gegensatz zu Eukaryoten besitzen Prokaryoten keinen Nukleus und auch keine durch Membranen abgetrennten Organellen wie Mitochondrien und sind immer einzellige Lebewesen, die sich jedoch zu Kolonien zusammen schließen können. Ihr Genom liegt frei in ihrem Zytosol als Nukleoid, einer ringförmigen DNA, vor. Zusätzlich besitzen viele Prokaryoten eine zweite DNA Struktur, die als Plasmid bezeichnet wird und sich selbstständig replizieren kann.

Über Jahrzehnte erschien die von Édouard Chatton 1938 erdachte dichotome Gliederung in Eukaryoten und Prokaryoten unumstößlich, bis sie in den 70iger Jahren des vergangenen Jahrhunderts durch neue Erkenntnisse aus der Untersuchung von rRNA ins Wanken geriet und heute als nicht mehr haltbar erscheint. Die große Gruppe der Prokaryoten teilt sich nunmehr in Eubakterien (z.B. Bakterien) und Archaeobakterien (z.B. Algen) auf, wodurch sich zusammen mit dem Eukaryoten eine Dreigliederung ergibt. [63; 75; 76].

Die Ähnlichkeit von Prokaryoten mit Organellen eukaryoter Zellen wurde mit der Weiterentwicklung der Lichtmikroskopie entdeckt und mit der Endosymbiontentheorie von Konstantin Sergejewitsch Mereschkowski ein erster Versuch der Erklärung gewagt [48]. In den 1920iger Jahren übertrug Ivan Wallin [72] diese Idee auf die auch in menschlichen Zellen vorkommenden Mitochondrien.

1.5. Das Mitochondrium

Die Funktion der in den Zellen enthaltenen Mitochondrien ist für den menschlichen Organismus essentiell. Gern als die Kraftwerke der Zellen beschrieben, liefern Sie 90 % der benötigten Energie und verbrauchen den gleichen Anteil an Sauerstoff [65]. Ihr Beitrag zum Bestand der Zelle geht weit über das Liefern von Energie hinaus [3; 25]. Dabei unterscheiden sich Mitochondrien in ihren Eigenschaften deutlich von denen der menschlichen Zellen. Sie ähneln in ihrem Aufbau viel mehr den Strukturen wie sie von Bakterien bekannt ist (siehe Kapitel 1.5.1. Die Endosymbiontentheorie). Aufgrund dieser Eigenheiten wird angenommen, dass es in der Frühgeschichte der Evolution aus einem symbiotischen Verhältnis der Ur-Eukaryote und des Ur-Mitochondrien heraus zu einem Einschluss des Ur-Mitochondriums in die Ur-Eukaryote kam [3].

1.5.1. Die Endosymbiontentheorie

Konstantin Sergejewitsch Mereschkowski postulierte zu Beginn des 20. Jahrhundert als erster eine Endosymbionten-Hypothese, allerdings im Bezug auf Chloroplasten und ihren eigenständigen Ursprung in Cyanobakterien [48].

Tatsächlich scheinen Mitochondrien ihren Ursprung in einem α -Proteobakterium zu haben [3]. Noch heute lebt der überwiegende Teil dieser Gruppe in einem symbiotischen oder parasitären Verhältnis zu eukaryoten Organismen [3; 43].

Als entscheidender Aspekt in der Entstehung des Lebens und der eukaryoter Organismen wird heute die Oxygenierung der Atmosphäre durch Photosynthese betreibende Organismen erachtet [70]. Die Endosymbiose muss zu einem frühen Zeitpunkt der Evolution der Eukaryoten erfolgt sein, bevor sich diese diversifizieren konnten, da Mitochondrien monophylitischen Ursprungs sind, somit einen gemeinsamen Ahnen besitzen [3; 25]. Nach heutigem Wissensstand wurde die Entstehung der späteren Eukaryoten selbst bereits durch eine Ur-Endosymbiose zweier Organismen in Gang gesetzt [28; 30].

Es existieren drei Modelle, die versuchen den Ursprung der mitochondrialen Endosymbiose zu erklären:

Die Wasserstoff-Hypothese

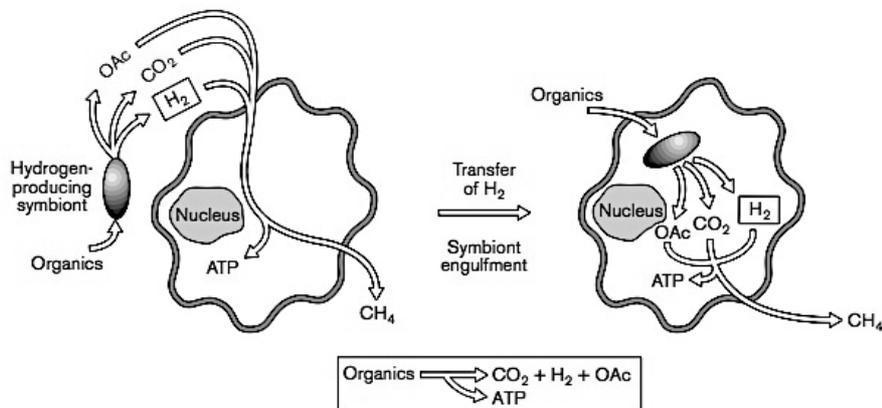


Abb. 1.1 - Die Wasserstoff-Hypothese, verändert nach: [3]

Dieser Hypothese folgend bestand initial eine Symbiose zwischen einem Wasserstoff (H_2) produzierendem Bakterium und einem fakultativ anaeroben wasserstoffabhängigen Wirt (Abb. 1.1). Die Abhängigkeit wurde irgendwann so bestimmend, dass der Wirt den Symbiont vereinnahmte.

Diese Theorie unterscheidet sich in zwei Merkmalen von den übrigen. Sie geht davon aus, dass der spätere Wirt fakultativ anaerob und Ziel der Symbiose Wasserstoff nicht Adenosinriphosphat (ATP) war [3; 47].

Die Synthrophie-Hypothese

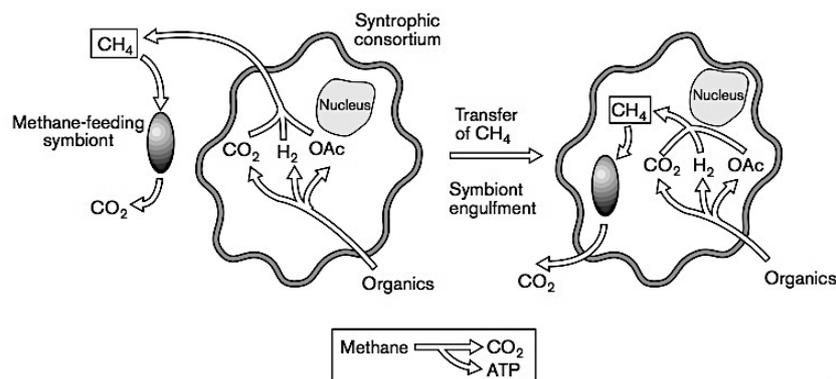


Abb. 1.2 - Die Synthrophie-Hypothese, verändert nach [3]

Diese Theorie stellt ebenfalls Wasserstoff in das Zentrum und geht nicht von einem einmaligen endosymbiotischen Ereignis, sondern einer Endosymbiose in zwei Schritten aus (Abb. 1.2). Zuerst sollen demnach Sulfat-reduzierende Myxobakterien eine Symbiose mit Methanbildern

eingegangen sein. Das spätere Mitochondrium soll dann aus einem methanotrophem α -Proteobakterium hervor gegangen sein, welches sich von dem aus der ersten Symbiose hervorgehenden Methan ernährte [3; 45; 49].

Die Ox-Tox-Hypothese

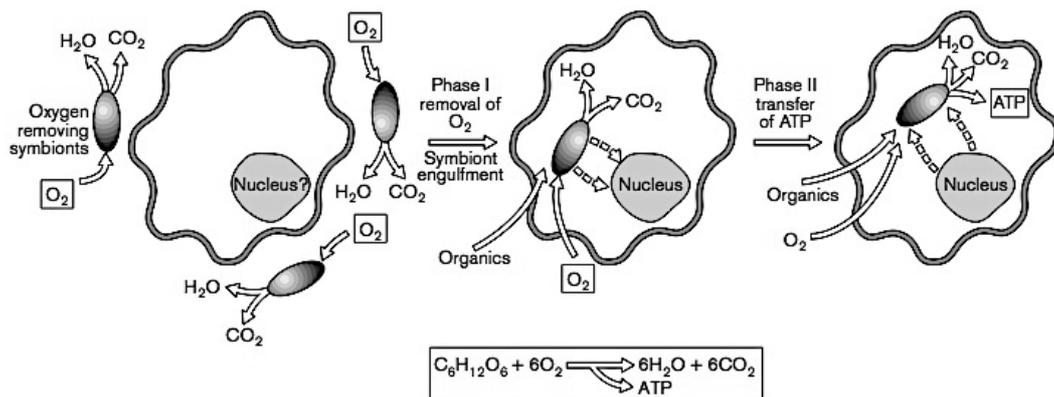


Abb. 1.3 - Die Ox-Tox-Hypothese, verändert nach: [3]

Die Ox-Tox-Hypothese geht ebenfalls von einer Endosymbiose in zwei Etappen aus. Als erster Schritt steht dabei die Entgiftung des Zytoplasmas und der unmittelbaren Lebensumgebung des späteren Wirtes durch ein Bakterium, welches den für den Wirt toxischen Sauerstoff aufspaltete (Abb. 1.3). Als zweiter Schritt wird der Einschluss des Symbionten in die Zelle sowie die Ausweitung der Symbiose auf die Lieferung von ATP erachtet. Gleichzeitig muss es einen horizontalen DNA-Transfer von der Zelle zu ihrem Symbionten und umgekehrt gegeben haben [43]. Es kam zu einer Verknüpfung des Metabolismus beider Akteure, dazu begann der Symbiont auch Proteine der Zelle wie die ATP/ADP Translokase zu nutzen [3; 25]. Derzeit erscheint die Ox-Tox-Hypothese als die plausibelste Erklärung auf der Suche nach den Ursprüngen der mitochondrialen Endosymbiose zu sein [3].

Ein anderes Erklärungsmodell geht weniger von einer Symbiose, sondern von einer initialen Infektion der Zelle durch ein parasitäres Bakterium aus, durch welche die Zelle jedoch nicht zu Grunde ging und sich letztlich daraus eine Symbiose etablierte [65].

Die Endosymbiose hatte einen tiefgreifenden Effekt auf den weiteren Verlauf der Evolution beider Organismen. Mitochondrien durchliefen offenbar eine reduktive Evolution und verloren oder transferierten einen großen Teil ihrer DNA, gleichzeitig übernahmen sie Teile der nDNA.

Heute besitzen Mitochondrien nur noch die Anlage für 10 % ihrer Proteine, Mitochondrien sind damit abhängig von der sie inkorporierenden „Wirtszelle“. Wie komplex die Symbiose zwischen Mitochondrium und der eukaryoten Zelle ist, wird am Beispiel von ATP deutlich. ATP ist der zentrale Baustein, der in den Mitochondrien stattfindenden Atmungskette (Abb. 1.4). ATP selbst wird vom Mitochondrium synthetisiert, die für den Austausch von ATP/ADP zuständige Translokase wird hingegen von der nDNA kodiert [3].

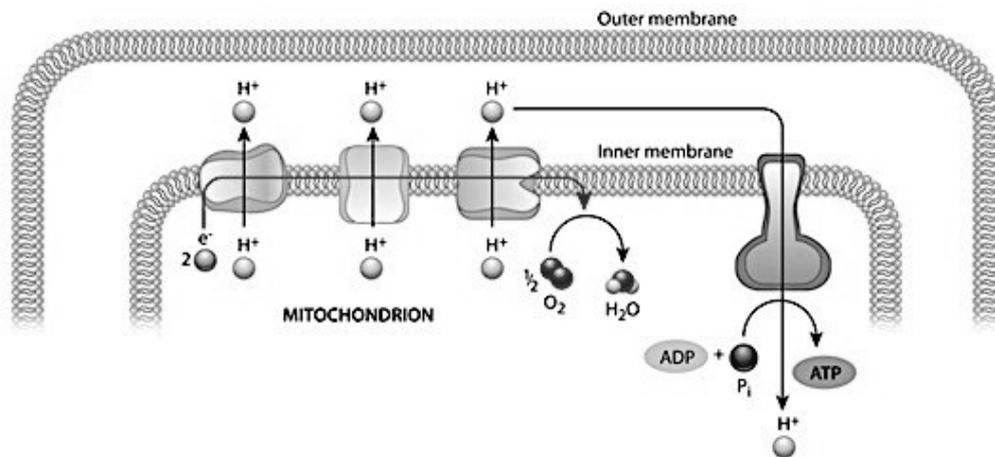


Abb. 1.4 - Die Atmungskette, verändert nach: Nature Education [52]

Die heutige Form der Endosymbiose ist über viele Millionen Jahre entstanden und die Vereinnahmung des mitochondrialen Urahnen stellte dabei nur den Auftakt einer gemeinsamen Evolution dar, die ein weitreichendes Geben und Nehmen der Symbionten nach sich zog.

Mitochondrien, wie sie heute vorzufinden sind, wurden nicht als fertige Endosymbionten in die Zelle aufgenommen, entstanden aber auch nicht allein in der Zelle, somit sind sie sowohl xenogenem als auch autogenem Ursprungs [3; 25]. Trotz ihrer weitgehenden Anpassung haben sie sich Teile ihres bakteriellen, prokaryoten, Erbes erhalten. Mitochondrien entstehen allein durch Zellteilung und können nicht durch ihre Wirtszelle hergestellt werden. Sterben die Mitochondrien einer Zelle aus, stirbt in der Folge auch die Zelle selbst. Mitochondrien bleiben unabhängig von allen übrigen Bestandteilen im Zytoplasma und fusionieren nicht mit anderen Organellen oder der Zellmembran. Mitochondrien besitzen einen eigenen Apparat zur Proteinsynthese und die für Bakterien typische DNA-Struktur [65].

1.5.2. Mitochondrien als Ursprung von Krankheiten

In den vergangenen Jahren ist die Rolle der Mitochondrien bei der Entstehung von Krankheiten zunehmend in den Fokus der Wissenschaft geraten [65]. Dabei gereicht die Endosymbiose der Zelle zwar grundsätzlich zu einem metabolischen Vorteil, ist aber dennoch nicht unproblematisch, da durch die Arbeit der Mitochondrien kontinuierlich Sauerstoffradikale entstehen, die das Mitochondrium selbst, aber auch die beherbergende Zelle schädigen [73] und letztlich zu deren Alterung [31] und Tod führen [65]. Darüber hinaus entstehen durch diesen oxidativen Stress Mutationen, die zu Krebs und anderen Krankheiten führen können [29]. Mitochondriale DNA mutiert 10mal häufiger als nDNA [12; 65], im Laufe eines Menschenlebens führt diese konstante Schädigung der mtDNA zu einer Reduktion der funktionstüchtigen Mitochondrien in den Zellen [65]. Damit einhergehend kommt es zu einer Reduktion des respiratorischen Potenzials, dadurch zu einer unzureichenden Energieversorgung und final zum Untergang insbesondere energiebedürftiger Zellen z.B. des Nervensystems [36; 65]. Mitochondrien stehen daher unter Verdacht zur Entwicklung von Alzheimer, Parkinson und Diabetes mellitus Typ II beizutragen [65]. Neben der Alterungskomponente wird auch der Einfluss von vererbten mtDNA Mutationen auf die Entwicklung verschiedener Erkrankungen, so z.B. bei Alzheimer [22] und der Leberschen hereditären Optikus-Neuropathie [36; 71] diskutiert.

Mitochondrien besitzen mehr als eine Kopie ihres Genoms [59], wodurch in einem Mitochondrium oder einer Zelle durch Mutationen verschiedene mitochondriale Genotypen existieren können. Mutationen sind der Ursprung von Heteroplasmien, d.h. die einzelnen Kopien des Genoms können verschiedene Polymorphismen, SNPs, aufweisen, da das Vorhandensein einer Mutation zugleich nicht automatisch zum Untergang des Mitochondriums führt und auch keinen negativen Einfluss auf die Reproduktionsfähigkeit des Mitochondriums haben muss. Die erst dadurch mögliche Persistenz tiefgreifender Mutationen kann zu schwerwiegenden Erkrankungen führen [36].

1.6. Das menschliche Genom

Das menschliche Genom besteht letztlich aus zwei Genomen, dem nukleären (nDNA) und dem mitochondrialen (mtDNA) Genom [15, S. 22; 36].

1.6.1. Nukleäre DNA

Der Zellkern enthält 23 Chromosomenpaare.

Jedes Paar setzt sich dabei aus einem Strang maternalen und einem Strang paternalen Ursprungs zusammen, die jeweils als einsträngige Kopie vorliegen. Jede Zelle beinhaltet so auf 46 Chromosomen einen doppelten Satz des Genoms, der wiederum 23 Chromosomenpaare bildet. Diese Konfiguration der DNA nennt sich diploid und wird in nahezu allen Körperzellen vorgefunden. Eine Ausnahme bilden dabei die Gameten, Spermien und Eizellen, die einen aus 23 Chromosomen bestehenden, einfachen, haploiden DNA Satz enthalten. Das 23. Paar der DNA, die Gonosomen, definiert das Geschlecht jedes Individuums. Zwei X-Chromosomen definieren ein Individuum dabei als weiblich, die Kombination aus einem X- und einem Y-Chromosom als männlich.

Alle Chromosomen sind ihrer Größe entsprechend, mit dem größten beginnend, nummeriert, ausgenommen der Gonosomen.

Insgesamt summiert sich die menschliche nDNA zu 3,2 Milliarden bp. Sie besteht aus kodierenden und nicht-kodierenden Abschnitten und beinhaltet 30000 proteindefinierende Gene.

Das Genom von Eukaryoten befindet sich immer im Kern ihrer Zelle/Zellen. Die nDNA erfüllt dabei zwei wesentliche Funktionen. Sie dient als geschützter Speicher der genetischen Information und zugleich als Vorlage für die Transkription von RNA, deren Information in der übrigen Zelle für die Synthese von Proteinen und Enzymen benötigt wird.

1.6.2. Mitochondriale DNA

Der überwiegende Teil der DNA befindet sich im Nukleus der Körperzellen.

Die mtDNA ist um das 200.000-fache kleiner als die nDNA und besteht lediglich aus 16569 bp und liegt als mindestens eine Kopie in jedem Mitochondrium des Körpers vor [59; 64]. Während der Ursprung der nDNA die Rekombination von haploiden Bestandteilen der mütterlichen und väterlichen DNA ist, wird die mtDNA vollständig in mütterlicher Linie vererbt, da sie mit den in jeder Eizelle der Mutter vorliegenden Mitochondrien unverändert weiter gegeben wird. Die Oozyte besitzt etwa 100000 Mitochondrien, während ein Spermium nur etwa 100 besitzt [71]. Die vom Vater stammenden Mitochondrien, die in den Spermien enthalten sind, werden in einer frühen Phase der Embryogenese gezielt zerstört [67; 71]. Die

mütterlichen Mitochondrien bleiben erhalten. Jedes Mitochondrium enthält so ausschließlich einen, den mütterlichen Mitochondrien entsprechenden, Satz an DNA. Aufgrund der rein maternalen Vererbung eignet sich mtDNA besonders für phylogenetische Untersuchungen [65; 71]. Die mtDNA ist nicht wie im Nukleus in Form von Chromosomen organisiert, sondern als Plasmid, einer ringförmigen DNA-Variante. Wie die nukleäre DNA beinhaltet sie kodierende und nicht-kodierende Abschnitte [19; 69].

Jede Zelle des menschlichen Körpers besitzt nur einen einzigen Zellkern, der mit 46 Chromosomen einen diploiden Satz DNA enthält und den überwiegenden Teil des menschlichen Genoms ausmacht. Im Gegensatz dazu besitzt jede Zelle bis zu viele hundert oder sogar tausende von Mitochondrien [59]. Dies ist stark abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Jedes Mitochondrium besitzt darüber hinaus bis zu 15 Sätze an mtDNA [59; 64], von Satoh et al [64] untersuchte Zellen enthielten durchschnittlich ca. 500 mtDNA Genome. Selbst in stark degenerierten forensischen Spuren, die lediglich Bruchteile einer menschlichen Zelle, womöglich ohne ihren Nukleus, enthalten, findet sich daher mit hoher Wahrscheinlichkeit noch mtDNA [15, S. 241]. Zudem enthält unabhängig vom Grad der Degeneration nicht jedes Spurenmaterial genügend nDNA für eine erfolgreiche Untersuchung [11; 15, S. 49].

Auch wenn der Anteil der mtDNA am menschlichen Genom im Vergleich zur nDNA gering erscheint und eine zweifelsfreie Identifikation eines Menschen aufgrund ihrer non-rekombinanten Vererbung nicht möglich ist, kann sie der entscheidende Baustein zur Überführung bzw. Entlastung eines Tatverdächtigen sein [15, S. 5].

Die erste vollständige Analyse des mitochondrialen Genoms wurde 1981 von Anderson et al. vorgelegt [2]. Die sog. Anderson Sequence (AS) wird auch als Cambridge Reference Sequence (CRS) bezeichnet. Im Jahr 1999 wurde eine erneute Analyse der ursprünglichen Proben durchgeführt, um dem Fortschritt der Genetik seit der Erstveröffentlichung und einigen Ungenauigkeiten der Erstanalyse Rechnung zu tragen, diese wird auch als rCRS (revised Cambridge Reference Sequence) bezeichnet [4]. Im Rahmen des Human Genome Project wurde eine weitere Standard-Sequenz erstellt, die afrikanischen Ursprungs war [32]. International hat sich die rCRS als Standard durchgesetzt. Die Länge des Genoms wurde mit 16569 bp definiert, kann aber auch etwas länger oder kürzer ausfallen: 16569 bp [2], 16568 bp [4], 16571 bp [32].

Im vergangenen Jahr wurde das bis dato akzeptierte System der rCRS durch eine Publikation von Behar et al. [7] in Frage gestellt. Darin wird eine Reconstructed Sapiens Reference

Sequence (RSRS) vorgestellt, mit dem Ziel die rCRS abzulösen. Anders als in der Genetik üblich folgt das System der rCRS nicht der Idee des Most Common Recent Ancestor (MRCA), sondern repräsentiert, als das erste vollständig publizierte mitochondriale Genom, selbst eine Hg, H2a2a1 [7]. Das bekannte System der rCRS verursacht eine Reihe von Missverständnissen, da die rCRS nicht die phylogenetische Wurzel der menschlichen mtDNA, sondern ein peripheren Zweig davon darstellt. Die Arbeitsgruppe um Behar et al. schlägt vor, möglichst bald eine Umstellung auf die von ihnen entwickelte RSRS vorzunehmen, da sie davon ausgeht, dass die Zahl der zukünftig sequenzierten mitochondrialen Genome die bislang sequenzierten schnell überschreiten wird [7]. Inwieweit sich die neue RSRS durchsetzen wird, ist noch nicht abzusehen. Vor dem Hintergrund der bereits existierenden, auf der rCRS aufbauenden Datenbanken wie z.B. der European DNA Profile Group mtDNA Population Database (EMPOP) [55], erscheint ein kurzfristige Umstellung der Systematik unwahrscheinlich [60].

Alle Angaben in dieser Arbeit beziehen sich auf die rCRS.

Das mitochondriale Genom ist etwa 16569 bp lang und kodiert für 37 Gene, darunter 13 Proteine, 2 ribosomale RNA und 22 tRNAs [15, SS. 242-244]. Innerhalb dieses Genoms gibt es eine 1122 bp lange Kontroll-Region, die auch als D-Loop (displacement-loop) bezeichnet wird. Sie reicht von 16024 bp bis 16569 bp und von 1 bp bis 576 bp. Dieser Anteil kodiert keines der mtDNA Gene, weshalb er auch als non-coding Region bezeichnet wird. Er ist jedoch zuständig für die Replikation des mtDNA Genoms [15, SS. 242-243].

Die kodierende Region misst 15447 bp, darunter lediglich 55 [15, S. 245] bis 91 [18] non-coding Nukleotide, was im Vergleich zur nDNA einen sehr kompakten Aufbau darstellt, da die mtDNA keine Introns besitzt [11; 18]. Diese non-coding Abschnitte in der coding Region fungieren als „intergenetische Spacer“ und stellen mit 7 % den variabelsten Bereich der kodierenden Region dar [18]. Eine weitere Besonderheit der mtDNA ist das Vorhandensein eines leichten (light Strand), inneren, und eines schweren (heavy Strand), äußeren, Stranges.

Von besonderem Interesse für die forensische Genetik war/ist der sog. D-loop, der die HVI, HVII und HVIII Region enthält, da dieser non-coding Anteil der mtDNA eine höhere interindividuelle Variabilität aufweist (Abb. 1.5).

Die coding Region weist eine durchschnittliche Variabilität von 2,5 % auf, Anteile der non-coding Region außerhalb der HVI und HVII weisen mit durchschnittlich 4,1 % jedoch weniger auf als besonders variable Bereiche der coding Region [18]. Dies wird mit der Kontrollfunktion

Dies ist häufig der Fall, wenn lediglich sehr altes oder stark Umwelteinflüssen ausgeliefertes Probenmaterial zur Verfügung steht und teilweise gar keine nDNA mehr vorhanden ist [15, S. 241; 18; 41]. Die Wahrscheinlichkeit in Probenmaterial mtDNA vorzufinden ist durch die biologischen Eigenschaften gegenüber nDNA deutlich erhöht (siehe Kapitel 1.6.2). Zudem ist die Analyse von mtDNA aufgrund ihrer maternalen Vererbung insbesondere dann geeignet, wenn die Referenzproben maternalen Ursprungs sind [18].

1.7.1. Hypervariable Regionen der mitochondrialen DNA

Wie bereits erwähnt, besitzt das mitochondriale Genom zwei unterschiedliche Abschnitte. HVI und HVII gehören zur non-coding (nicht-kodierenden) Region der mtDNA und sind somit nicht Gegenstand der natürlichen Selektion, sie gelten daher als weniger stabil als kodierende Regionen [5; 12]. Die HVI Region reicht von 16024 bp bis 16365 bp auf dem mitochondrialen Genom und ist damit 342 bp lang, die HVII Region reicht von 73 bp bis 340 bp und ist damit 268 bp lang. Eine weitere Region ist die HVIII, die von 438 bp bis 574 bp reicht, sie ist 137 bp lang und befindet sich ebenfalls in der non-coding Region, wird in der forensischen Arbeit aber nur selten genutzt [15, S. 255; 20; 69], siehe Abb. 1.6.

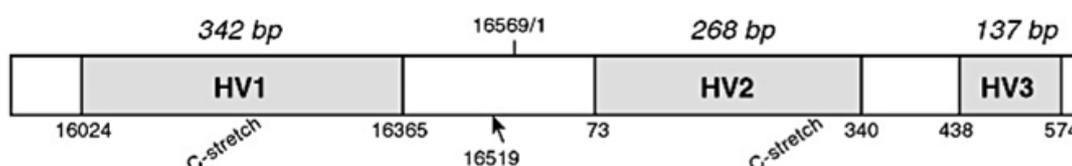


Abb. 1.6 - HVI, HVII und HVIII Region [15, S. 255]

Bei der Untersuchung von mtDNA sind die Sequenzierung und der Abgleich der HVI und der HVII mit der sog. Anderson Sequence [2] bzw. rCRS [4] gut etabliert, insbesondere die Sequenzierung der HVI wird von vielen Laboren auf der ganzen Welt eingesetzt [20]. Die Anderson Sequence wird dabei als Standard verwendet und jeder Unterschied in der Basenfolge als Mutation angesehen. Diese Mutationen werden auch als Polymorphismen bezeichnet. MtDNA-Analyse ist besonders geeignet zur Identifikation von Individuen aus kleinen Populationen/Gruppen, da bei größeren Gruppen Übereinstimmungen der HVI und HVII keine Seltenheit darstellen [20; 38].

Die Sequenzierung der HVI bietet dabei Vorteile gegenüber der Sequenzierung der HVII Region, da sie mehr Varianten als die HVII und damit ein größeres Diskriminationspotenzial besitzt [20].

Da die menschliche DNA nach dem Tod des Organismus einer raschen Degeneration unterworfen ist, stellt fragmentierte DNA in der Forensik eine alltägliche Herausforderung dar [6]. Die Degeneration der DNA wird dabei von Endo- und Exonukleasen voran getrieben, welche die DNA letztlich in ihre Nukleotid-Bestandteile zerlegen [6], wodurch sie ihre typischen Struktur einbüßt. DNA Partikel, die kürzer als 400 bp sind, können mit der gebräuchlichen HVI/HVII Technik nicht erfolgreich analysiert werden. Schwerwiegende Degeneration von Proben- bzw. Spurenmaterial und der damit einhergehende Zerfall der HVI Region führen damit zwangsläufig zu Fehlern oder gänzlichem Misslingen beim Einsatz dieses Verfahrens und zeigen damit die spezifischen Grenzen auf [21].

Zudem ist der Vergleich beider Sequenzabschnitte, HVI und HVII, sehr zeit- und arbeitsaufwändig [38].

1.7.2. SNaPshots der mitochondrialen DNA

Neben der HVI/HVII-Sequenzierung, hat sich in den letzten Jahren eine weitere Technik entwickelt, der sog. SNaPshot auch als Minisequencing bezeichnet. Sein Ansatz unterscheidet sich erheblich von dem der HVI/HVII-Sequenzierung.

Ziel ist es nicht zusammenhängende Passagen der mtDNA zu sequenzieren, sondern SNPs, die überall auf dem Plasmid lokalisiert sein können, zu bestimmen. Dafür eignen sich insbesondere Nukleotide, die eine hohe Mutationsrate aufweisen, da nur sie das Potenzial der Individualisierung/Differenzierung einer Probe bieten können. So kann eine adäquate PD erzielt werden, welche das Potenzial der etablierten Sequenzierungstechniken bei der Bearbeitung von degradiertem Probenmaterial erreicht oder sogar übertrifft [10].

Während durch das HVI/HVII Verfahren lediglich DNA Abschnitte untersucht werden, die in der nicht-kodierenden Kontrollregion des mitochondrialen Genoms liegen, werden SNPs ebenso aus den kodierenden Regionen des Genoms bestimmt [10; 18; 38].

Nachdem das SNaPshot Verfahren am Anfang seiner Entwicklung ein Nischen-Verfahren [38] mit besonderen Eignung für höchst degradiertes Spurenmaterial oder Spurenmaterial mit geringem DNA Anteil, wie ausgefallene Haare oder starken Umwelteinflüssen ausgelieferte

Knochen [9; 38] darstellte, verspricht das mit der Weiterentwicklung stetig zunehmende Potenzial für die Zukunft ein deutlich breitere Anwendung.

Insbesondere der Einsatz als zeit- und arbeitssparende Screening-Methode, die bereits an sich eine hohe PD besitzt, ist sinnvoll [9; 38]. Eine Beschränkung auf qualitativ minderwertige Proben ist nicht länger gerechtfertigt und sogar eine Positionierung als weitreichende Alternative zu dem angestammten Verfahren der HVI/HVII erscheint möglich [9; 39].

Diese Arbeit baut auf dem am Institut für Rechtsmedizin der Universität Münster unter der Leitung von Frau Univ.-Prof. Dr. med. Heidi Pfeiffer zwischen September 2007 und Oktober 2009 von Herrn Dr. rer. med. Stephan Köhnemann entwickelten 32 mtDNA SNaPshot auf [39]. Dieser SNaPshot wurde entwickelt, um die Analyse von Spurenmaterial, bei der Routineuntersuchungen fehlschlagen, zu ermöglichen.

1.7.3. Mitochondriale DNA - Mini-Amplikons, Mitominis und Mini Variable Regions

Einen weiteren Ansatz zur Analyse des mitochondrialen Genoms stellt die Unterteilung der mtDNA in Mini-Amplikons (MAs) [8; 21], auch als Mitominis (Mms) [21] oder Mini Variable Regions (mVRs) [20] bezeichnet, dar. Das Armed Forces DNA Identification Laboratory (AFDIL) hat dafür einen Satz von zwei mVRs formuliert, die beide auf die Kontroll-Region beschränkt sind. Die mVRI reicht von 16471 bp bis 16561 bp (91 bp), die mVRII von 424 bp bis 548 bp (125 bp) [20]. Während die vom AFDIL beschriebene mVRI sich zwischen HVI und HVII befindet, ist die mVRII nahezu deckungsgleich mit der HVIII, die von 438 bp bis 574 bp reicht. Obwohl beide Abschnitte sehr kompakt gewählt sind und wie die mVRII mit bekannten Größen nahezu übereinstimmen, ergeben sich aus dieser Konstellation zusätzliche Informationen, die oftmals eine höhere PD liefern und so für die Bearbeitung eines Falls entscheidend sein können [20].

An der Universität Innsbruck wurde die gesamte Kontroll-Region in zehn überlappende MAs, Mms genannt [21], von 144 bp bis 237 bp Länge unterteilt (siehe Abb. 1.7).

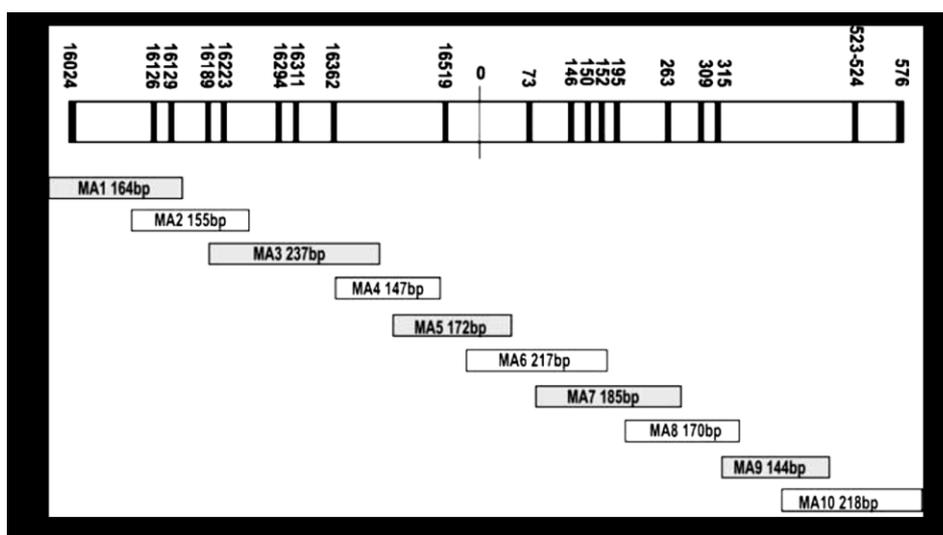


Abb. 1.7 - Mini Amplikons (MA), Mitominis genannt, wie von Eichmann und Parson beschrieben [21]

Zuvor gab es auch durch andere Forschungsgruppen den Ansatz, lediglich die HVI in sechs überlappende Amplikons von 100 bp bis 130 bp Länge zu unterteilen [1].

Erfolgt die Sequenzierung der kurzen Amplikons jedoch einzeln, erfordert sie eine erhebliche DNA Menge, was die Anwendbarkeit deutlich reduziert. Die sinnvolle Nutzung bei degradierten Proben ist damit nur in Form einer Multiplex möglich [8; 21].

Die Amplifizierung von Abschnitten der Kontroll-Region der mtDNA erhöht dabei insbesondere bei stark degradierten Proben im Vergleich zu den herkömmlichen Verfahren, der vollständigen Amplifikation, die Erfolgsaussichten [21].

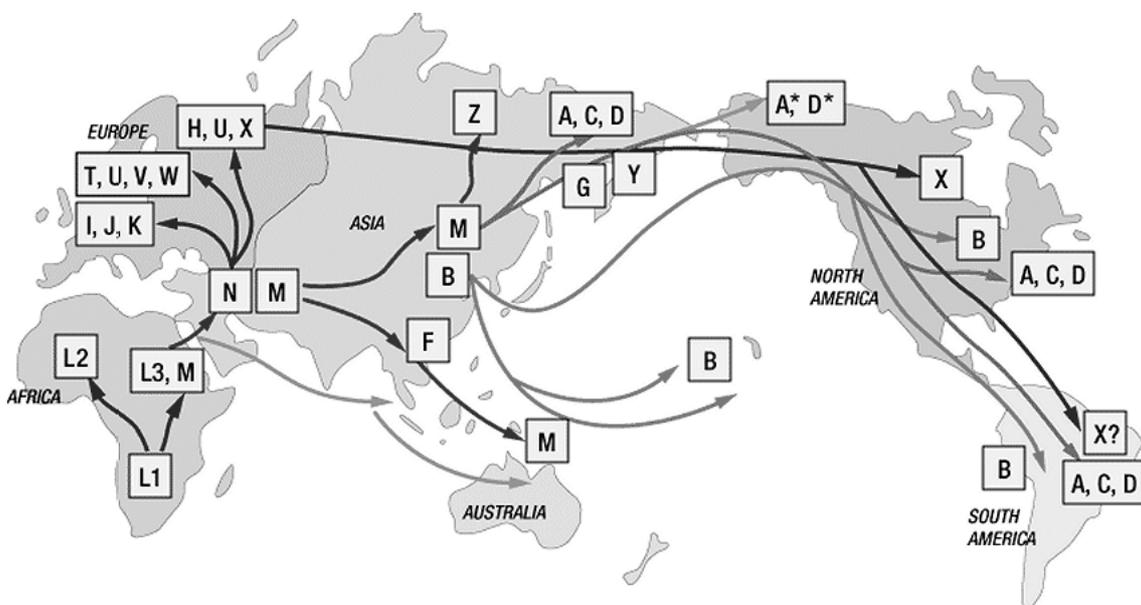
Diese Beispiele belegen, dass sich für die forensische Genetik die Suche nach Alternativen jenseits der Analyse der HV-Regionen, selbst bei einer Beschränkung auf die Kontroll-Region auszahlen kann [1; 8; 20; 21].

1.7.4. Haplogruppen der mitochondrialen DNA

Zu Beginn der Untersuchung von mtDNA in 1980 und 1990er Jahren wurden Proben, die identische Haplotypen (Ht), Muster, besaßen zu Gruppen geordnet. Aus Gemeinsamkeiten, Übereinstimmungen, der vielen verschiedenen Htn ergaben sich populationspezifische Übergruppen, die sog. Haplogruppen (Hgn) [15, SS. 286-288]. Hgn werden dabei über SNPs definiert, die sich für bestimmte Populationen z.B. Europa als spezifisch erwiesen haben [9]. Anfänglich auf SNPs aus der Kontroll-Region beschränkt [9], wurden die Hgn-bestimmenden

SNPs auf das gesamte mitochondriale Genom ausgeweitet. Die SNPs des kodierenden Abschnitts ermöglichen in vielen Fällen erst die Zuordnung einer Hg [15, SS. 286-288].

Die Untersuchung der Hgn ermöglicht es, dank der rein maternalen Vererbung der mtDNA, die Verbreitung des Menschen über die Erde zu untersuchen und die Menschheitsentwicklung besser zu verstehen [16]. So kann heute dank der Analyse des mitochondrialen Genoms nicht nur der Ursprung des Menschen in Afrika bestätigt, sondern rechnerisch auch der Beginn seiner Ausbreitung über die Erde ermittelt werden [71]. Demnach liegt der Ursprung der Menschheit 150 000 Jahre zurück, die Auswanderung nach Asien und Europa begann vor rund 70 000 Jahren [71] (siehe Abb. 1.8).



EXPANSION TIMES (years ago)	
Africa	120,000 - 150,000
Out of Africa	55,000 - 75,000
Asia	40,000 - 70,000
Australia/PNG	40,000 - 60,000
Europe	35,000 - 50,000
Americas	15,000 - 35,000
Na-Dene/Esk/Aleuts	8,000 - 10,000

Abb. 1.8 - „Out of Africa“ und die Verbreitung der mtDNA Hgn (Darstellung entnommen aus: Genealogy by Genetics, Ltd., Family Tree DNA)

Darüber hinaus können die Erkenntnisse aus der Hgn-Forschung auch für die forensische Genetik genutzt werden.

Bei der Identifikation der Opfer der Anschlagsorte des 11. Septembers konnten alle Getöteten, abgesehen von vier Individuen in Shanksville, Pennsylvania zweifelsfrei identifiziert werden. Die fehlenden Identitäten wurden den Terroristen zugeordnet. Bei der Untersuchung der vier fehlenden Profile von Shanksville konnten Hgn nachgewiesen werden, die eine Herkunft der Individuen aus dem Nahen Osten und damit eine Identifizierung als Spuren der Terroristen wahrscheinlich macht [20].

Trotz dieses augenscheinlichen Erfolgs zeigt dieses Beispiel zugleich die Schwächen der Hgn-Bestimmung auf. Die Hgn erlauben keine Aussage über die tatsächliche Herkunft eines Individuums oder seine phänotypischen Eigenschaften wie Haar- oder Hautfarbe, sondern vor allem über seine Abstammung in maternaler Linie [20]. Zudem erfordert die Unterteilung in aussagekräftige Hgn mtDNA Datenbanken mit einer sehr hohen Zahl an Individuen, da alle Analysen sonst zwangsläufig vage bleiben [20]. Datenbanken wie EMPOP werden daher für die mtDNA Diagnostik zukünftig große Bedeutung haben [55]. Zudem müssen die vorhandenen Hgn auf mögliche Sub-Hgn untersucht werden, um letztlich eine möglichst hohe Differenzierung allein durch die Zuordnung der Hgn zu erreichen. In vielen Teilen der Welt besteht dabei noch eine recht grobmaschige Hgn-Aufteilung [20]. Erschwerend kommt hinzu, dass in bestimmten Populationen eine recht uniforme Hgn-Verteilung mit Konzentration auf eine Super-Hgn vorliegt. In Europa entfallen etwas 40-50 % der Bevölkerung auf die Hg H, wobei diese hohen Werte vor allem einer noch immer unzureichenden Unter-Differenzierung geschuldet sein dürfte [10; 26; 44].

Die Zuordnung von Probenergebnissen zu Hgn kann als erster Schritt bei der Bearbeitung einer Probe dienen und so die Differenzierung erleichtern [10].

Zur schnelleren Bearbeitung von Proben und exakteren Zuweisung von Hgn wurden in den vergangenen Jahren eine Reihe von Multiplex-SNaPshots entwickelt [9; 38; 39; 41; 42; 54], welche die Differenzierungen von bis zu 42 Hgn bei geringem DNA-Einsatz ermöglichen [39]. Dabei müssen diese Multiplexes populationsabhängig abgestimmt werden, um adäquate Ergebnisse zu erzielen [54].

Die Auswahl der zu differenzierenden Hgn wird in Populationen mit einem hohen oder zunehmenden Anteil der Bevölkerung mit Migrationshintergrund erschwert (siehe Tabelle 1.1).

Dabei führt eine Ausweitung der Hgn-Untersuchung zwangsläufig zu einer verstärkten Anwendung des SNaPshot-Verfahrens, da differenzierende SNPs oft weit verteilt auf der mtDNA angeordnet sind und zudem eine Sequenzierung der HVI/HVII nicht ausreicht.

Tabelle 1.1 - Populationen und typische Haplogruppen

Haplogruppe	Population	Haplogruppe	Population
A	ASIATISCH	K	KAUKASISCH
B	ASIATISCH	T	KAUKASISCH
F	ASIATISCH	U	KAUKASISCH
M	ASIATISCH-AMERIKANISCH	V	KAUKASISCH
H	KAUKASISCH	W	KAUKASISCH
I	KAUKASISCH	X	KAUKASISCH
J	KAUKASISCH	L	AFRIKANISCH

1.8. Ziel der Untersuchung

Ziel dieser Arbeit ist es kurze Abschnitte (120 bp), MAs, der HVI Region zu bestimmen, die es ermöglichen Proben, die eine identische Hg aufweisen, dennoch zu differenzieren. Dabei werden die von Eichmann und Parson [21] publizierten Mms als Referenz gewählt. Durch diese Arbeit soll der am Institut für Rechtsmedizin entwickelte 32 mtDNA SNaPshot als Screening-Methode etabliert werden, um ihn zur Vorselektion der Proben einsetzen zu können. So könnte in Fällen mit einem hohen Spurenaufkommen die Zahl der gänzlich mittels HVI zu sequenzierenden Proben verringert und dadurch die Bearbeitungszeit reduziert werden.

Zudem könnten diese Erkenntnisse für die Arbeit mit stark degenerierten Proben genutzt werden, bei denen eine vollständige HVI-Sequenzierung nicht möglich ist, wodurch der SNaPshot zur entscheidenden Untersuchung würde. Durch die mit 120 bp Länge sehr kurzen MAs könnte, falls notwendig, im Anschluss an den 32 mtDNA SNaPshot eine weitere Differenzierung erreicht werden.

Vor diesem Hintergrund sollen zu einer bereits vorhandenen Datenbank mit HVI-sequenzierten Proben 32 mtDNA SNaPshots erstellt werden, um die Ergebnisse beider Untersuchungen vergleichen zu können. Die Ergebnisse der HVI-Sequenzierung wurden dabei bereits zuvor publiziert [42].

Aufgrund der hohen Probenanzahl muss eine schnelle und präzise Lösung für die Zuordnung der Hgn, basierend auf den Daten des SNaPshots gefunden werden, da eine manuelle Zuordnung sich als sehr zeitintensiv darstellt. Zu diesem Zweck soll ein Programm entwickelt werden, um die Hgn-Zuordnung zu automatisieren. Für die Suche nach geeigneten Abschnitten der HVI wird es notwendig sein, ein weiteres Programm zur Überprüfung der PD der ausgewählten Abschnitte zu erstellen, da dies manuell bei der hohen Anzahl an Proben und der zu untersuchenden Abschnitten manuell nicht möglich wäre.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

ABI PRISM®3100-Avant Genetic Analyser	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
Magnetrührer, Ikamag RCT	IKA, Staufen
Thermocycler ABI GeneAmp® PCR System 2700	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
Thermocycler ABI GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
Vortex Mixer I	IKA, Staufen
Vortex Mixer II	Heidolph, Schwabach
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Heraeus, Hanau

2.1.2. Software

3100-Avant Data Collection Software (v.1.0)	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
Excel (v. 5.1/v. 12.2.7/v. 14.2.5)	Microsoft Corporation, Redmond
GeneScan® (v. 3.7)	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
Genotyper® 2.0 (v. 2.5)	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt

2.1.3. Verbrauchsmaterialien

Adhäsives Klebeband	Serva, Heidelberg
Gel Blotting Papier GB002 (580mm x 600mm/0,4mm)	Amersham Biosciences, Freiburg
Gel Fix (265*125mm)	Serva, Heidelberg
PCR Thermo Tube (0,2 ml)	Kisker, Steinfurt
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Diagonal, Münster
Sample Application Pieces, 1/4 plate	General Electrics (GE), Frankfurt
Screw Cap Micro Tubes (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Septa Meadow	Serva, Heidelberg
THERMO-FAST® 96 PCR DETECTION PLATE	Greiner, Frickenhausen

2.1.4. Chemikalien

10X Genetic Analyser Buffer	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
10X PCR Buffer	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
123 bp DNA Ladder	Invitrogen, Darmstadt
3100 POP-4 Buffer Solution	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
9947 A Cell Line DNA	Promega, Mannheim
9948 Cell Line DNA	Promega, Mannheim
Acrylamid	Bio-Rad, München
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxydisulphat	Merck, Darmstadt
AmpliTaq Gold PCR buffer	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumin, 20mg/ml	MoBiTec, Göttingen
BT Chelex® 100 Resin, Sodium Form	Bio-Rad, München
Bromphenolblau pH 3,0 - 4,6	Merck, Darmstadt
Di-Natrium Hydrogen Phosphat	Merck, Darmstadt
dNTP 250µM	GE Healthcare, Solingen
Essigsäure, rein	Merck, Darmstadt
GeneScan 120 LIZ®	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
Glyzerin, pflanzlich, 99 % (w/v)	Serva, Heidelberg
Formaldehyd, 37 % (w/v)	Merck, Darmstadt
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
HPLC-Wasser	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ , 50mM	Applied Biosystems (ABI), Darmstadt
Natrium Azetat Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumkarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	VWR, Darmstadt
Natriumhypochlorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumlaurylsulphat	Serva , Heidelberg
Natriumthiosulphat	Merck, Darmstadt
Proteinase K	Roche, Grenzach-Wyhlen

Proteinase K buffer	Macherey Nagel, Düren
Proteinase K, lyophilisiert	Macherey Nagel, Düren
Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Salpetersäure, 65 % (w/v)	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Carl Roth, Karlsruhe
Stickstoff	WWU
Sulfonsäure, konz.	Merck, Darmstadt
Tetramethylethylenediamin	Serva, Heidelberg
Titriplex III (EDTA-Na), 1 mM	Merck, Darmstadt
Tris, 10 mM	Merck, Darmstadt

2.1.5. Lösungen

APD Lsg., 10 % (w/v)	APD, 5g A. dest., ad 50 ml
Chelex Lsg., 5 % (w/v)	Chelex® 100, 5 g HPLC-Wasser, ad 100 ml
Essigsäure Lsg., 7,5 % (w/v)	Essigsäure, rein, 375 ml A. dest., 4625 ml
Glycerin Lsg., 5 % (w/v)	Glycerin, 99 % (w/v), 25 ml A. dest. ad. 500 ml
Natriumacetat Lsg., 10 mM	Natriumacetat Trihydrat, 0,136 g HPLC Wasser, ad 100 ml Essigsäure, konz., bis zu pH 5,2
Natriumkarbonat Lsg., 3,5 % (w/v)	Natriumkarbonat, 150 g Formaldehyd, 37 % (w/v), 12 ml Natriumthiosulphat Lsg., 2 ml
Natriumthiosulfat Lsg.	Natriumthiosulphat, 200 mg A. dest., ad 50 ml

Proteinase K Lsg.; 20 mg/ml

Proteinase K, 100 mg

TE-Buffer-Sol., 1,2 % (w/v), 50 ml

Salpetersäure Lsg., 2% (w/v)

A. dest., 4850 ml

Salpetersäure, 65 % (w/v), 150 ml

Silbernitrat Lsg., 0,1 % (w/v)

Silbernitrat, 1 g

Formaldehyd, 37 % (w/v), 1,5 ml

A. dest., ad 1 l

TE-Puffer Lsg., 1,2 % (w/v)

Tris, 10 mM, 1,21 g

Titriplex III, 1 mM, 0,379 g

A. dest., ad 1 l

Salzsäure, bis pH 7,5

Tri-Sulphat-Puffer Lsg.,

A. dest., 850 ml

40mM

Sulfonsäure, konz., 2,15 ml

Tris, bis zu pH 9, etwa 9 g

A. dest., ad 1 l

2.1.6. Ready-Reaction-Mixes (Kits)

ABI Prism SNaPshot™ Multiplex Kit

Applied Biosystems (ABI), Darmstadt

2.1.7. Enzyme

Ampli Taq Gold DNA Polymerase mit GeneAmp®

Applied Biosystems (ABI), Darmstadt

Exonuklease

New England BioLabs, Ipswich

Shrimp Alkaline Phosphatase

Roche, Grenzach-Wyhlen

2.1.8. Oligonukleotide

Extension (SNP)-Primer

Biomers, Ulm

PCR-Primer

Biomers, Ulm

2.1.9. PCR-Primer-Sequenzen

Tabelle 2.1 - PCR Primer-Sequenzen, entnommen aus Köhnemann et al. [39]

Nr.	SNP	FWD-Primer-Sequenz	bp	REV-Primer-Sequenz	bp
1.	R-G709A	AAGATTACACATGCAAGCATCC	22	CTAGGCTAAGCGTTTTGAGCTG	22
2.	G1719A	CTTGACCGCTCTGAGCTAAA	20	GCAGAAGGTATAGGGGTTAGTCC	23
3.	A1811G				
4.	R-A2706G	ACTTTTAACCAAGTAAATTGACCT	24	GCCCCAACCGAAATTTTTTA	19
5.	R-C2772T				
6.	R-G3010A	CGACCTCGATGTTGGATCAGGACA	24	CGAACCTTTAATAGCGGCTGCACCAT	26
7.	R-G3915A	TAGCAGAGACCAACCGAACCC	20	GGCGTATTTCGATGTTGAAGC	20
8.	G4580A	TCTTTGACAGGCACACTCATC	20	GCAGCTTCTGTGGAACGAG	19
9.	T5004C	TCCATCATAGCAGGCAGTTG	20	TGGTTATGTTAGGGTTGTACGG	22
10.	T6365C	TGGAGCCTCCGTAGACTTAA	20	TGGCAGGGGGTTTTATATTG	20
11.	T6392C				
12.	T6776C	TGGCTTCTAGGGTTTATCG	20	CGGAGGTGAAATATGCTCGT	20
13.	C7028T	AGCAAACCTCATCACTAGACATCG	23	GATGGCAAATACAGCTCCTATTGA	24
14.	R-G8251A	CATGCCCATCGTCTAGAAT	20	AAGTTAGCTTTACAGTGGGCTCT	23
15.	T8404C	CAGTGAATGCCCAACTAAA	21	TTTGGTGAGGGAGGTAGGTG	20
16.	R-G8697A	CCAACAATGACTAATCAAATAACC	25	GTATAAGAGATCAGGTTCTGCTTTT	25
17.	G9055A	CGCCTAACCGCTAACATTACT	21	TGATAAGTGTAGAGGGAAGGTTAATG	26
18.	R-A9066G				
19.	C10400T	GCCCTAAGTCTGGCCTATGA	20	TGAGTCGAAATCATTGTTTTG	22
20.	T10873C	AATCAACACAACCAACCCACA	20	GGGGAACAGCTAAATAGGTTG	21
21.	A11251G	CGCAGGCACATACTTCTATTTC	22	AGTGAGCCTAGGGTGTGTGAG	22
22.	A112812G	TCCTCTCTCAAGGACTTCAAACCT	23	GGCTTCTAGAAAGTCATCAAAAA	23
23.	G12372A	AAAAATTTTGGTGAACCTCCA	21	GGTTAACGAGGGTGGTAAGGA	21
24.	R-C12705T	CCCAAACATTAATCAGTTCTTCAA	24	GAACAGTTGGAATAGGTTGTTAGC	24
25.	C12858T	ATGATACGCCCGAGCAGA	18	TGTGGGTCTCATGAGTTGGA	20
26.	G13708A	CGTTCCCCACCTTACTA	19	GCGGGGAAATGTTGTTAG	19
27.	R-T14470	CCCATGCCTCAGGATACTC	20	TTTAGGGGGAATGATGGTTG	20
28.	C14766T	CAACTACAAGAACCAATG	20	GGGAGGTCGATGAATGAGTG	20
29.	T14798C	AATGACCCCAATACGCAAAA	20	ATCATGCGGAGATGTTGGAT	20
30.	A15607G	TCTCCGATCCGTCCTAAC	19	GATGGATAGTAATAGGCAAGGAC	24
31.	R-C15904T	TACTCAAATGGGCCTGTCT	20	TGATTTGTCCTTGAAAAAGGT	22
32.	R-T16519C	CCATAACACTTGGGGGTAGC	20	TTATTTAAGGGGAACGTGTGG	21

2.1.10. PCR- und SNaPshot-Primer Konzentrationen

Tabelle 2.2 - Konzentration für PCR- und SNaPshot Multiplex in μM , entnommen aus Köhnmann et al. [39]. Ein R zeigt an, dass der SNaPshot Primer am rückwärts gewandten Strang der mtDNA anknüpft. Der erste Buchstabe vor der SNP Position stellt den jeweiligen SNP der rCRS entsprechend dar, der zweite Buchstabe eine mögliche Mutation.

Nr.	SNP	PCR Konzentration [μM]	SNaPshot Konzentration [μM]
1.	R-G709A	0,1	0,035
2.	G1719A	0,36	0,08
3.	A1811G	0,1	0,1
4.	R-A2706G	0,144	0,075
5.	R-C2772T		0,075
6.	G3010A	0,03	0,012
7.	R-G3915	0,15	0,06
8.	G4580A	0,14	0,025
9.	T 5004C	0,12	0,035
10.	T 6365C	0,04	0,09
11.	T 6392C		0,1
12.	R-T 6776C	0,036	0,012
13.	C7028T	0,06	0,025
14.	R-G8251A	0,16	0,08
15.	T 8404C	0,12	0,05
16.	R-G8697A	0,04	0,0275
17.	G9055A	0,05	0,012
18.	R-A9066G		0,125
19.	C10400T	0,2	0,075
20.	T 10873C	0,2	0,07
21.	A11251G	0,036	0,0065
22.	A11812G	0,08	0,006
23.	G12372A	0,1	0,05
24.	R-C12705T	0,12	0,05
25.	C12858T	0,05	0,0225
26.	G13708A	0,22	0,16
27.	R-T 14470A/C	0,3	0,15
28.	C14766T	0,14	0,04
29.	T 14798C		0,08
30.	A15607	0,022	0,0175
31.	R-C15904T	0,1	0,007
32.	R-T 16519C	0,1	0,015

Tabelle 2.3 - SNaPshot Primer Konfiguration, entnommen aus Köhnemann et al. [39].

Nr.	Primer	Sequenz	ddNTP	bp
1.	R-G709A	5'-TTTAGAGGTGAACACTCACTGGAA-3'	C-T	23
2.	G1719A	5'-(AACTGACTAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGCTGACAAACGTGTAAGTCTGACAA)-CCACCTTACTACCAGACAAACCTTA-3'	C-T	86
3.	A1811G	5'-(AACTGACTAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGCTGACAA)-GCAAGGAAAGATGAAAAATTATA-3'	T-C	64
4.	R-A2706G	5'-(CGTGAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-CTCGATGTTGGATCAGGACATCCC-3'	T-C	44
5.	R-C2772T	5'-GTATTGCGATGTTGAAAGCCTGAGACTAGTTCGGACTC-3'	G-A	31
6.	R-G3010A	5'-GTATTGCGATGTTGAAAGCCTGAGACTAGTTCGGACTC-3'	C-T	80
7.	R-G3915A	5'-(ACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-TTACCTGAGTAGGCTAGAAAATAAACAT-3'	C-T	36
8.	G4580A	5'-(TCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-TCAGAAAGTGAAGGGGGGC-3'	C-T	72
9.	T5004C	5'-(GCCAGTGTGAAAGTCTGACAA)-CCAGACCAGCTACGCAAAATC-3'	A-G	38
10.	T6365C	5'-(GTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-CATCTTCTTACACCTAGCAGG-3'	A-G	42
11.	T6392C	5'-CGTGTGCTACGTCTACTCTACTGTAATAT-3'	A-G	47
12.	T6776C	5'-ACTACGACACGACTACGTTGTAGC-3'	A-G	51
13.	C7028T	5'-(TCTGACAA)-GGGTGCTATAGGGTAAATACGGG-3'	G-A	27
14.	R-G8251A	5'-(GTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-CGTCTTTAGTGTGTGATGGTTAT-3'	C-T	31
15.	T8404C	5'-(TAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-ACTCATGCACCTAATGGAAAGC-3'	A-G	61
16.	R-G8697A	5'-(AACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-CTTCCCCTACTATCGCACT-3'	C-T	51
17.	G9055A	5'-CACACTACTAACCACCTAACCT-35'-CACACTACTATAACCACCTAACCT-3'	C-T	50
18.	R-A9066G	5'-(AACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-GCAGCCATCAAGCAATCTTATA-3'	T-C	70
19.	C10400T	5'-(GACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-TAAACCCATTAAAAGCCTG-3'	G-A	65
20.	T10873C	5'-(AAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-AATTTATTTAGGGGGAATGATGTTGCTTTGG-3'	A-G	69
21.	A11251G	5'-(AACTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-CAATGACCCCAATACGCCAAA-3'	T-C	60
22.	A112812G	5'-(CGTGAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-CCCCTAATAAAAATTAATTAACCACTCA-3'	T-C	37
23.	G12372A	5'-(ACGTCGTGAAAGTCTGACAA)-CCGGTTTACAAGACTGGTGTATTA-3'	C-T	82
24.	R-C12705T	5'-(CGTGAAGTCTGACAA)-TGTGGGCTATTTAGGCTTTATG-3'	G-C	73
25.	C12858T	5'-AAAACCTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAAGCCGCAATCAAGCAATCCTATA-3'	G-A	55
26.	G13708A	5'GACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAATAAACCCCATTAAGCCCTG-3'	C-T	56
27.	R-T14470	5'-TCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAATAATTTAGGGGGAATGATGTTGCTTTGG-3'	A	81
28.	C14766T	5'-GAAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAACCAATGACCCCAATACGCAAAA-3'	T-A	76
29.	T14798C	5'-CGTGAAGTCTGACAAAACCTGACTAAACTAGGTGCCACGTCGTGAAAGTCTGACAAACCCCTAATAAAAATTAATTAACCACTCA-3'	A-G	83
30.	A15607G	5'-AGTCTGACAACTCCGATCCGTCCTAACAA-3'	T-C	30
31.	R-C15904T	5'-ACGTCGTGAAAGTCTGACAAACCCGTTTACAAGACTGGTGTATTA-3'	G-A	44
32.	R-T16519C	5'-CGTGAAGTCTGACAAATGTTGGCTATTTAGGCTTTATG-3'	A-G	38

2.1.11. Probenmaterial

Insgesamt wurden 861 Speichelproben untersucht. Diese wurden in den Jahren 1997 und 1998 von freiwilligen, männlichen Spendern im Landkreis Peine in Niedersachsen, Deutschland, gesammelt. Die Proben wurden bei einer konstanten Temperatur von 8 °C gelagert.

In einer ersten Untersuchung wurden von allen Proben die HVI der mtDNA sequenziert [57]. In einer zweiten Untersuchung wurden alle Proben mit einem 32 mtDNA SNaPshot untersucht. Insgesamt konnten 861 Proben erfolgreich mit beiden Verfahren untersucht und verglichen werden.

2.2. Methoden

2.2.1. Gewinnung von Speichelproben

Die Speichelproben wurden mittels Chelex-Extraktion aufbereitet und konserviert [66], dazu wurden durch Abreiben der Mundschleimhaut der Spender mit einem Wattetupfer Epithelzellen gewonnen. Die Tupferspitzen wurden getrocknet und danach ein Teil der Spitze in 5-prozentige Chelex-Lösung gegeben. Zur Lyse des Zellmaterials wurden dem Probenmaterial anschließend 50 µl Proteinase K hinzugefügt, danach wurden die Proben 30 min bei 56 °C zur Inkubation ins Wasserbad gegeben. Im Anschluss wurde der Ansatz für 8 min im Wasserbad gekocht. Nach Zentrifugierung bei 14000 g für 5 min wurde der aus den Proben gewonnene Überstand direkt für die PCR eingesetzt, andernfalls wurden die Proben bei 4 °C eingelagert.

Chelex[®] 100 ist ein Ionenaustauscherharz bestehend aus Styrol-Divinylbenzol-Copolymeren mit gepaarten Iminodiazetat-Ionen, die als chelatisierende Gruppen mehrwertige Metallionen binden. Durch die Entfernung von Magnesium aus dem Probenmaterial werden Nukleasen und DNA-Enzyme inaktiviert und so die DNA-Moleküle vor der Degeneration bei hohen Temperaturen bewahrt.

2.2.2. Die Polymerase Kettenreaktion

Die 1986 von Mullis erstmals publizierte Polymerase Kettenreaktion (**Polymerase Chain Reaction, PCR**) revolutionierte die Arbeit mit DNA, da es damit möglich wurde geringe Mengen DNA fast beliebig oft zu vervielfältigen und so Untersuchungen durchzuführen, für die bis dahin die DNA Menge nicht ausreichte [51].

Bei der PCR wird ein bekannter DNA-Abschnitt mittels sequenzspezifischer Primer (Oligonukleotide, die als Startpunkt für die DNA-Replikation fungieren) repliziert. Die Primer werden spezifisch auf die Bindung an einem bestimmten DNA-Abschnitt gestaltet. Nachdem sie dort angeknüpft haben, erstellt eine hitzebeständige DNA-Polymerase Kopien der Abschnitte, die wiederum in einem nächsten Zyklus der PCR als Vorlage für weitere Kopien dienen. Die zu kopierenden DNA Sequenzen werden logarithmisch vervielfältigt (siehe Abb 2.1).

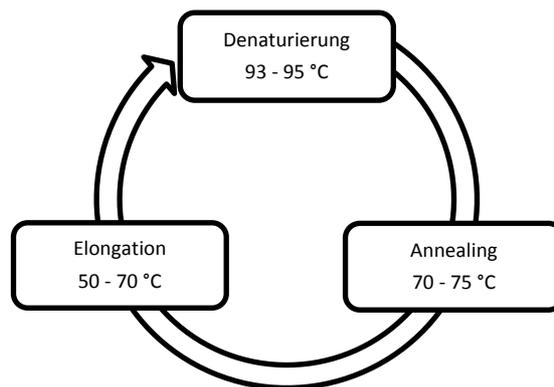


Abb. 2.1 - Der PCR-Zyklus

Bei der Denaturierung zerfällt die DNA in zwei Einzelstränge, dies geschieht bei humaner DNA bei Temperaturen zwischen 93 °C und 95 °C. Nach der Auftrennung wird die Temperatur in den Bereich von 70 °C bis 75 °C gesenkt, um ein Anlagern der spezifischen Primer an die komplementären DNA-Stränge zu ermöglichen. Dabei gibt es immer einen forward- (vorwärts-) und einen reverse- (rückwärts-) Primer, um an beiden Strängen der zu replizierenden/amplifizierenden DNA-Sequenz zu binden. Anschließend erfolgt bei Temperaturen zwischen 50 °C und 70 °C die Amplifikation der sich an die Primer anschließenden ‚freien‘ DNA-Abschnitte durch die DNA-Polymerase. Die Amplifikation erfolgt immer vom 5' zum 3'-Ende. Mit jedem PCR-Zyklus wird die von Primern begrenzte DNA-Sequenz ein weiteres Mal repliziert. Ein Zyklus der PCR dauert ca. 1 bis 2 Minuten.

Üblicherweise werden 30 bis 35 PCR-Zyklen durchlaufen. Theoretisch kommt es dabei mit jedem vollendeten Zyklus zu einer Verdopplung der DNA-Menge. Nach 30 Zyklen sollte damit etwa das 1073741824-fache der Ursprungs-DNA vorliegen. Praktisch liegt der Multiplikationsfaktor mit jedem Zyklus jedoch bei ca. 1,7 [50, S. 88].

2.2.3. HVI-Sequenzierung

Die Sequenzierung der HVI-Region (Hypervariable Region) der mtDNA ist besonders für die Analyse von mtDNA geeignet, da die HVI als Teil des sog. D-Loops (displacement loop) nicht zum kodierenden Anteil der mtDNA, sondern zur Kontrollregion zählt und besonders variantenreich ist.

Bei der Untersuchung des D-Loops werden am häufigsten die HVI und HVII Region genutzt, die HVIII Region ist hingegen nur selten von Interesse [15, S. 254].

Üblicherweise folgt einer PCR eine Sequenzanalyse, bei der die DNA-Sequenz jeder Probe innerhalb der Grenzen der HVI (16024 bis 16365) bestimmt und anschließend mit der sog. Anderson Sequence bzw. der rCRS verglichen wird. Die Unterschiede werden dann mit der entsprechenden Nukleotidposition und der an dieser Stelle veränderten Base festgehalten.

Die Sequenzierung der HVI-Region folgt der Methode nach Sanger [62], auch Didesoxymethode oder Kettenabbruch-Synthese genannt. Als erster Schritt wird die DNA mittels PCR-Amplifikation vervielfältigt. Im Anschluss daran muss das PCR Produkt von ungebundenen dNTPs und Primern getrennt werden. Dies geschieht entweder mittels Zentrifugations-Filtrierung oder mittels eines enzymatischen Verdaus dieser Bestandteile durch Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) und Exonuclease I (Exo). Danach muss die durch die PCR-Reaktion erzeugte DNA-Menge ermittelt werden.

Entscheidend ist jedoch der darauf folgende Schritt. Die zu sequenzierende DNA wird denaturiert und anschließend, ähnlich dem Verfahren der PCR, mit einem Primer versetzt, der in diesem Fall jedoch nur einen Strang der DNA markiert. Die übrige DNA-Sequenz wird durch die DNA-Polymerase vervollständigt. Für diesen Prozess stehen der Polymerase zwei unterschiedliche Grundbausteine zur Verfügung: **Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dNTPs)** und **Didesoxyribonukleosid-Triphosphate (ddNTP)**.

Diese sind jeweils für alle der möglichen Nukleotide (A, C, G, T) vorhanden. ddNTPs sind künstlich veränderte dNTPs, die an Position 2' und 3' der Ribose desoxidiert sind, wodurch am 3' Kohlenstoffatom keine Hydroxylgruppe entstehen und so kein weiteres Nukleotid eingebaut

werden kann. Wird ein ddNTP von der DNA-Polymerase im Lauf der Replikation an Stelle eines dNTP eingefügt, bricht die Polymerisation dort ab. Die dNTP Moleküle sind nicht markiert, die ddNTP Moleküle tragen zusätzlich einen für jedes Nukleotid spezifischen farbigen Marker (Dye), der zur Fluoreszenz angeregt werden kann.

Adenin	grün
Cytosin	blau
Guanin	gelb - wird in Elektropherogrammen schwarz dargestellt
Thymin	rot

Letztlich entstehen so Sequenzierungsstücke in jeder möglichen Länge, die an ihrem Ende jeweils mit einem fluoreszierendem Marker (Dye) versehen sind.

Die Schritte der HVI-Sequenzierung werden in Abb. 2.2 dargestellt:

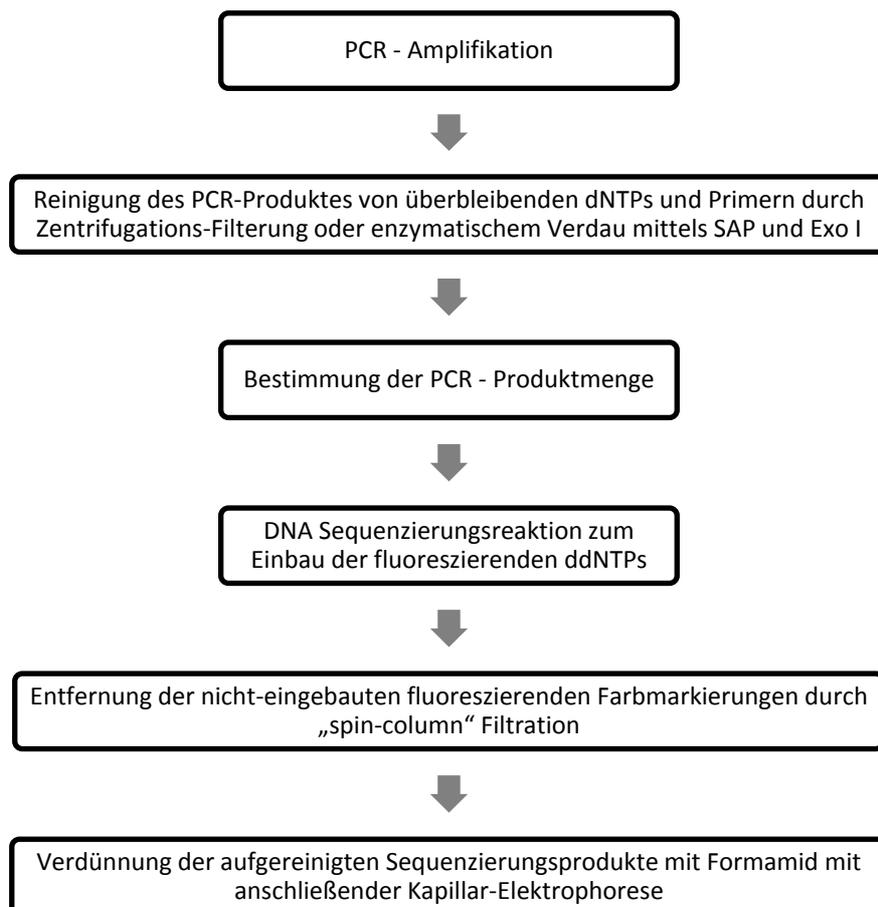


Abb. 2.2 - Die HVI-Sequenzierung im Überblick

2.2.4. Minisequenzierung - der SNaPshot

Bei der Minisequenzierung, die auch als SNaPshot bezeichnet wird, werden sequenz-spezifische Extension-Primer, ddNTPs, mit fluoreszierenden Markern eingesetzt.

Ziel ist es die DNA auf Punktmutationen zu untersuchen.

Als erster Schritt werden die späteren SNaPshot Loki mittels PCR amplifiziert. Dies kann durch eine Single- oder Multiplex Reaktion erfolgen. Die verbleibenden Primer und dNTPs werden im Anschluss an die PCR mittels Exo (Exonuklease) und SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) enzymatisch entfernt. Dabei verdaut die Exonuklease die einsträngigen Primer, die Shrimp Alkaline Phosphatase zerstört die dNTPs. Dieser Schritt ist notwendig, um zu verhindern, dass übrige Primer und dNTPs die SNaPshot Reaktion verunreinigen.

Der eigentliche SNaPshot erfolgt nun durch die Hinzugabe von Extension-Primern, den vier möglichen ddNTPs mit Fluoreszenzmarkern sowie dem zuvor mit ExoSAP gereinigtem PCR-Produkt. Als Basis für die SNaPshot Reaktion wurde der SNaPshot Kit der Firma Applied Biosystems verwendet. Dieser enthält die bereits markierten ddNTPs, Puffer und DNA-Polymerase.

Die Primer für das SNaPshot Verfahren sind so gestaltet, dass sie unmittelbar vor dem zu untersuchenden SNP-Lokus an die DNA binden, so dass durch den Einbau eines einzigen entsprechenden ddNTPs die Position bestimmt werden kann. Anschließend durchläuft das Reaktionsgemisch auf einem Thermocycler, ähnlich dem Vorgehen bei der PCR, mehrere direkt aufeinander folgende Heiz- und Kühlzyklen. Verbleiben dNTPs in der Reaktionslösung, können die Primer um mehr als eine Base verlängert werden; es kommt so zu einer späteren ddNTP Bindung und damit zu verfälschten Ergebnissen [15, SS. 186-187].

Im Anschluss an die SNaPshot Reaktion wird das entstandene Produkt mit SAP gereinigt, um verbliebenes ddNTP zu zerstören, da es sonst bei der Kapillarelektrophorese zu Fehlern kommen kann.

Vor der Kapillarelektrophorese wird dem fertigen und gereinigten SNaPshot Produkt noch Gene Scan 120 LIZ hinzugefügt. Dabei handelt es sich um einen Längenstandard, der neun einsträngige DNA Fragmente enthält (15, 20, 25, 35, 50, 62, 80, 110 und 120), die mit einer fünften "Farbe" markiert sind. Dieser Standard wird vom Genetic Analyser als Referenz für die Wanderungsgeschwindigkeit der SNaPshot Produkte verwendet.

Ein SNaPshot-Zyklus ist in Abb. 2.3 exemplarisch dargestellt.

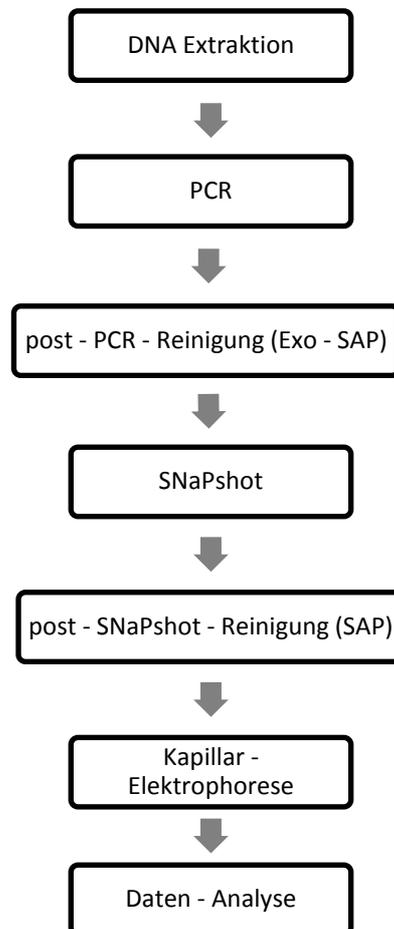


Abb. 2.3 - SNaPshot Arbeitsablauf

2.2.5. Auswahl der SNPs

Die Auswahl der 32 mtDNA SNPs erlaubt eine Differenzierung zwischen den international auftretenden Super-Hgn N, M und L (SNPs 10400 und 10873) sowie eine Differenzierung der häufigsten europäischen (kaukasischen) Hgn und deren häufigsten Untergruppen, siehe dazu auch Abb. 2.5, (SNPs 709, 1719, 1811, 2706, 3010, 4580, 5004, 6365, 6776, 7028, 8251, 8697, 9055, 9066, 10400, 10873, 11251, 11812, 12372, 12705, 12858, 13708, 14766, 15607, 15904, 16519) und erlaubt unabhängig davon in einzelnen Fällen die weitere Individualisierung von Proben (SNP 2772) [39; 42]. Zugleich konnten mit diesem 32 mtDNA SNaPshot die asiatischen Sub-Hgn D4 (SNP 3010), G (SNP 709), M3 (SNP 4580) sowie M42 (SNP 8251) bestimmt werden. Zur Auswahl der SNP-Positionen wurden folgende Publikationen heran gezogen: [9; 10; 18; 53; 58; 69].

2.2.6. PCR und SNaPshot Primer Gestaltung

Die Primer entsprachen der 2009 von Köhnemann et al. [39] publizierten Gestaltung. Die genaue Primer Gestaltung sind in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.3 zu sehen.

Die Extension-Primer für die SNaPshot Reaktion wurden abgesehen von den Taqs für die Elektrophorese entsprechend [9; 10; 18; 39; 58; 69] gewählt. Die Taq wurde entsprechend [61] ausgeführt.

Der Gestaltung der Primer kommt eine Schlüsselrolle für den Erfolg der PCR zu [21]. In den vergangenen Jahren haben sich dafür eine Reihe von allgemeingültigen Normen etabliert. So sollten Primer neben einer für die zu sequenzierende Region möglichst spezifische Basenfolgen (Vermeiden von repetitive Sequenzeinheiten) nicht länger als 18 bis 25 Nukleotide sein und zugleich der Guanin/Cytosin-Gehalt zwischen 40 und 60 % betragen, wobei eine möglichst gleichmäßige Verteilung aller vier Basen (A, C, G, T) anzustreben ist. Des Weiteren sind beim Design der Primer die spezifischen Schmelztemperaturen (Temperatur bei der sich die komplementären DNA-Stränge trennen) zu beachten [14]. Für die korrespondierenden Primer sollte die Schmelztemperatur nicht mehr als 5 °C, zwischen Primern und Amplifikationsprodukt nicht mehr als 10 °C von einander abweichen. Adenosin-Tyrosin Paare haben eine gegenüber Guanin-Cytosin Paaren niedrigere Schmelztemperatur, da sie statt von drei nur von zwei Wasserstoffbrücken zusammen gehalten werden und sich so bereits bei niedrigeren Temperaturen trennen. Die 3'-Basenfolge sollte für jeden Primer möglichst spezifisch sein, insbesondere sollten Übereinstimmungen mit dem Gegenprimer vermieden werden, selbst Entsprechungen im gleichen Primerstrang sollten nicht mehr als drei bp betragen, um eine möglichst zuverlässige Bindung zu gewährleisten.

2.2.7. Multiplex PCR Protokoll

Bei der sog. Multiplex-PCR wird im Unterschied zur normalen PCR mehr als ein Primerpaar zur Amplifikation eingesetzt. Eine Multiplex-Reaktion stellt damit besondere Anforderungen an das Design der Primer, da die Annealing-Temperaturen aufeinander abgestimmt und komplementäre Primersequenzen vermieden werden müssen, um die Bildung von Primer-Dimeren zu verhindern. Mit jedem weiteren Primer steigt das Potenzial möglicher Interaktion exponentiell. Die Optimierung bzw. Balancierung einer Multiplex PCR kann daher einen sehr aufwändigen Prozess darstellen [15].

Die Amplifikation mittels Multiplex PCR wurde mit einem Gesamtvolumen von 12,5 µl und den in Tabelle 2.2 dargestellten PCR-Primer-Konzentrationen durchgeführt.

Die übrigen Reagenzien wurden in den folgenden Konzentrationen eingesetzt:

- 1,25 µl MgCl₂ (5 mM),
- 1,25 µl Ampli Taq Gold PCR Buffer (x10),
- 0,2 µl Ampli Taq Gold DNA Polymerase (5 U/µl),
- 1,25 µl Deoxynukleotid Triphosphat (dNTPs; 250 µM) und
- 0,2 µl Bovine Serum Albumin (20 mg/ml).

Das Thermocycling wurde mittels Reverse Touchdown mit einem nach Vallone et al. [69] modifizierten Verfahren wie unten beschrieben durchgeführt.

Multiplex PCR Thermocycling:

Vorinkubation für 10 min bei 95 °C gefolgt von 3 Zyklen à 30 s bei 95 °C, 45 s bei 50 °C, 30 s bei 72 °C dann 19 Zyklen à 30 s bei 95 °C und 45 s bei 50 °C mit ein ‚ramping‘-Temperatur von 0,2 °C pro Zyklus; 30 s bei 72 °C, 11 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 45 s bei 60 °C, 30 s bei 72 °C, zum Schluss 7 min bei 72 °C. Danach wurden die Proben zur Lagerung auf 4 °C herab gekühlt.

Post PCR-Reinigung:

Im Anschluss an die PCR wurden dem PCR-Produkt 0,5 µl Shrimp Alkaline Phosphatase/Exonuklease I Mischung hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte dann bei 37 °C für 95 min mit anschließender Denaturierung für 15 min bei 78 °C. Die Proben wurden zur Lagerung auf 4 °C herunter gekühlt.

2.2.8. Multiplex Extension Primer Protokoll:

Die Multiplex Primer Extension wurde mit einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Die Extension (SNaPshot) Primer Konzentration entspricht der Darstellung in Tabelle 2.2.

Die übrigen Reagenzien wurden in den folgenden Konzentrationen eingesetzt:

- 2,5 µl ABI Prism SNaPshot Multiplex Kit Mix,
- 0,5 µl von x10 Ampli Taq Gold PCR Buffer,
- 1,0 µl aufgereinigtes Multiplex PCR-Produkt
- 6 µl Extension Primer Lösung

Das Thermocycling wurde wie folgt durchgeführt:

Primer Extension Reaktion Bedingungen

25 Zyklen à 10 s bei 96 °C, 5 s bei 55 °C, 30 s bei 60 °C, anschließende Lagerung bei 4 °C.

Post SNaPshot Reinigung:

Im Anschluss an die SNaPshot Reaktion wurden dem Zwischenprodukt 0,5 µl Shrimp Alkaline Phosphatase hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 95 min mit anschließender Denaturierung für 15 min bei 78 °C. Die Proben wurden erneut bei 4 °C gelagert.

2.2.9. Amplikon Analyse mittels Kapillarelektrophese

Vom gereinigten SNaPshot-Produkt wurden nun jeweils 1 µl mit 10 µl eines Mastermixes, bestehend aus 9,6 µl HiDi Formamid und 0,4 µl GeneScan 120 LIZ, in der Kammer einer 96-wells Platte gemischt. Die Kapillarelektrophese wurde mit einem 3100-Avant Genetic Analyser von ABI durchgeführt. Die Rohdatenverarbeitung wurde mit der GeneScan Software desselben Herstellers ausgeführt. Die daraus hervorgehenden Daten wurden in Microsoft Excel übertragen und dort weiter verarbeitet.

Ziel der Elektrophorese ist es die zuvor mittels PCR vervielfältigten DNA-Moleküle ihrer Größe entsprechend zu ordnen, um die Basenfolge des untersuchten Abschnitts ermitteln zu können. Diese Technik macht sich zu Nutze, dass DNA-Moleküle in den meisten Lösungen bzw. Puffern negativ geladen sind, da ihre Phosphatgruppen H^+ -Ionen abgeben, wodurch sie innerhalb eines elektrischen Feldes zur Anode wandern.

Die Sortierung geschieht durch die Applikation von Strom an ein Medium, Gel, das DNA enthält.

Es werden zwei Formen der Elektrophorese durchgeführt:

1. Agarosegel-Elektrophorese und
2. Automatisierte Gel-Elektrophorese mittels Sequencer.

Während die Agarosegelelektrophorese darauf basiert, dass die DNA sich entsprechend ihrer Größe in Banden innerhalb eines Gels anlagert, lesen die heute gebräuchlichen Sequencer die DNA Abschnitte quasi beim Vorbeiwandern an Sensoren. Da die DNA Fragmente bei konstanter Feldstärke dabei umgekehrt proportional schnell zu ihrer Größe wandern,

passieren sie ihrer Länge entsprechend (klein-groß) einen Laser, der die während der Sequenzierungsreaktion eingebauten ddNTPs zur Fluoreszenz anregt. Die emittierten Lichtspektren (A-grün, C-blau, G-gelb, T-rot) werden in einem Elektropherogramm (Abb. 2.4) und in die entsprechenden Basen übersetzt als Datensatz ausgegeben. Die dabei gewonnenen Basenfolgen sind komplementär zu der tatsächlichen Basenfolge.

Die automatisierte DNA Sequenzierung ist ein Ergebnis des Human Genome Projects, zuvor war Sequenzierung ein in weiten Teilen manueller Prozess, der sehr viel Zeit in Anspruch nahm und die Analyse größerer Mengen DNA nahezu unmöglich machte [15, SS. 318-319, 358].

Während für die klassische Gel-Elektrophorese in der Vorbereitung ein flächiges Gel gegossen werden muss, dass dann mit der zu untersuchenden DNA beimpft wird, enthält jeder automatisierte Sequencer einen kleinen Vorrat flüssigen Gels. Die zu untersuchenden Proben werden in Platten von bis zu 96 Ansätzen in das Gerät gegeben. Der Sequencer zieht dann über einzelne Kapillaren die DNA-Ansätze in das Gerät und legt zugleich eine elektrische Spannung an jede Kapillare an. So ordnen sich innerhalb des in den Kapillaren befindlichen Gels die DNA-Moleküle nach ihrer Größe, um am Ende der Kapillaren von einem Laser zur Fluoreszenz angeregt zu werden.

Die Kapillarelektrophorese mittels Sequencer weist eine Reihe von Vorteilen gegenüber der herkömmlichen Platten-Gelelektrophorese auf. Vorteile sind zum einen der geringere Einsatz an DNA-Material und zum anderen dass die Probenansätze theoretisch mehrfach verwendet werden können. Die Elektrophorese innerhalb der Kapillaren des Sequencers erfolgt zudem wesentlich schneller, als in einem flächigen Gel, da aufgrund einer besseren Hitzeableitung der Kapillaren höhere Spannungen angelegt werden können. Die gewonnenen Ergebnisse liegen direkt in einem elektronischen Format, geeignet zur Weiterverarbeitung vor, wodurch das Scannen oder Fotografieren des Gels entfällt. Durch den geschlossenen Versuchsaufbau besteht zudem eine geringe Gefahr der Kontamination.

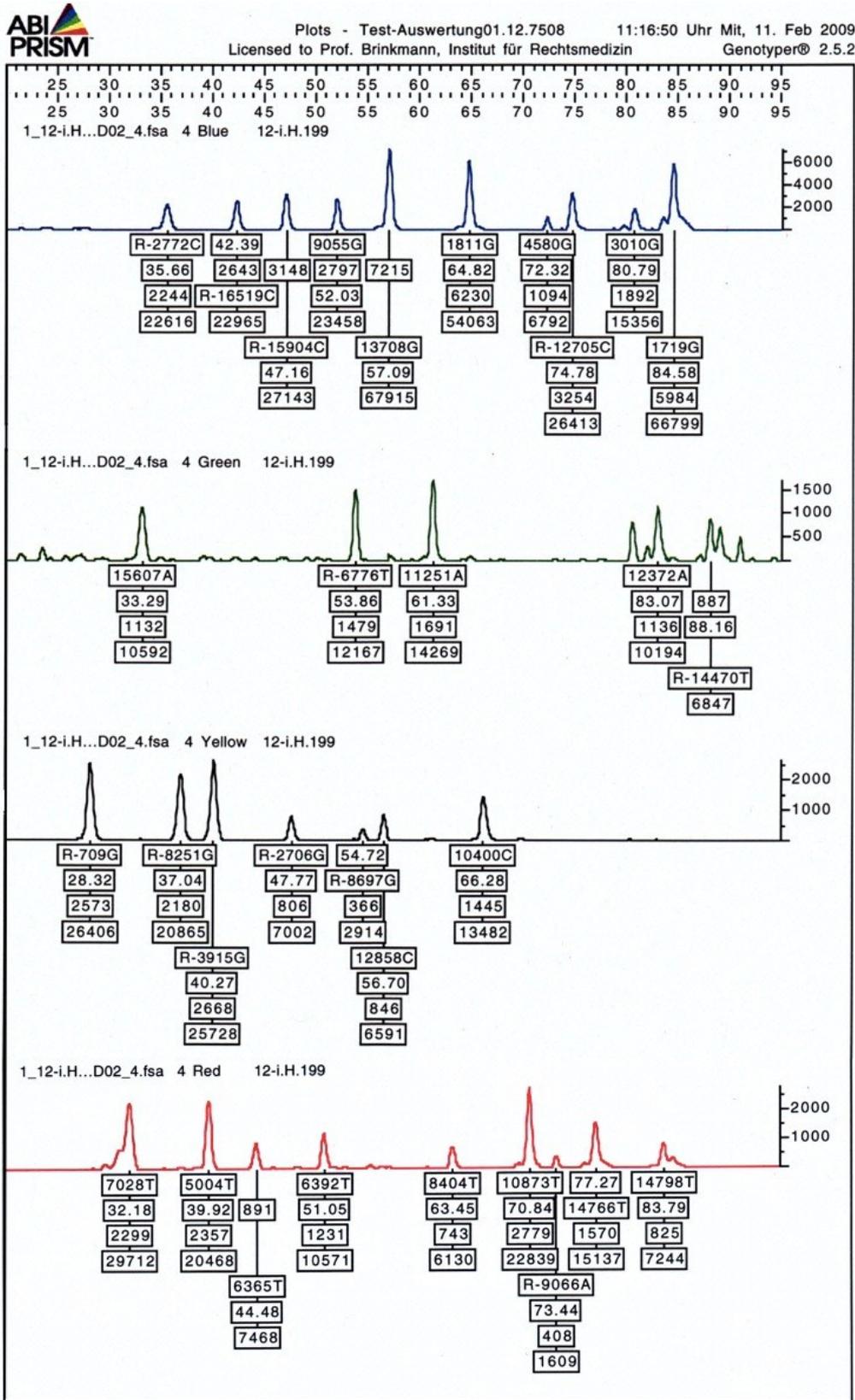


Abb. 2.4 - Elektropherogramm, Haplogruppe Un

2.2.10. Haplogruppen-Zuordnung

Die Hgn-Zuordnung wurde mit Hilfe eines Excel-Spreadsheets durchgeführt und folgte dem in Abb. 2.5 zu sehenden Entscheidungsbaum. Abweichend von bereits durch [39; 42] publizierten Entscheidungsbäumen, die keine weitere Differenzierung der außer-europäischen Hgn vorsahen, konnten ausgehend von der asiatischen Hg M die Sub-Hgn D4 (SNP 3010), G (SNP 709), M3 (SNP 4580) und M42 (SNP 8251) sowie die von Hg R ausgehende eurasischen Sub-Hgn P (SNP 15607) und R11 (SNP 709) zugeordnet werden.

Anhand der im Entscheidungsbaum dargestellten Merkmale konnte jeder der 861 Proben eine definitive Hg zugeordnet werden.

Ein Ausschnitt aus der Excel-Arbeitsmappe, der den Prozess der Hgn-Zuordnung und den Aufbau der Tabelle zeigt, ist ebenfalls zu sehen (siehe Abb. 2.6). Im Laufe der Arbeit konnte der Prozess der Hgn-Zuweisung soweit optimiert werden, dass die Tabelle mit der darin eingebetteten Funktion diese Aufgabe vollkommen automatisch durchführte, sobald ein neuer Datensatz hinzugefügt wurde. Die für die Zuweisung entscheidenden Funktionen finden weiterhin Anwendung am Institut für Rechtsmedizin.

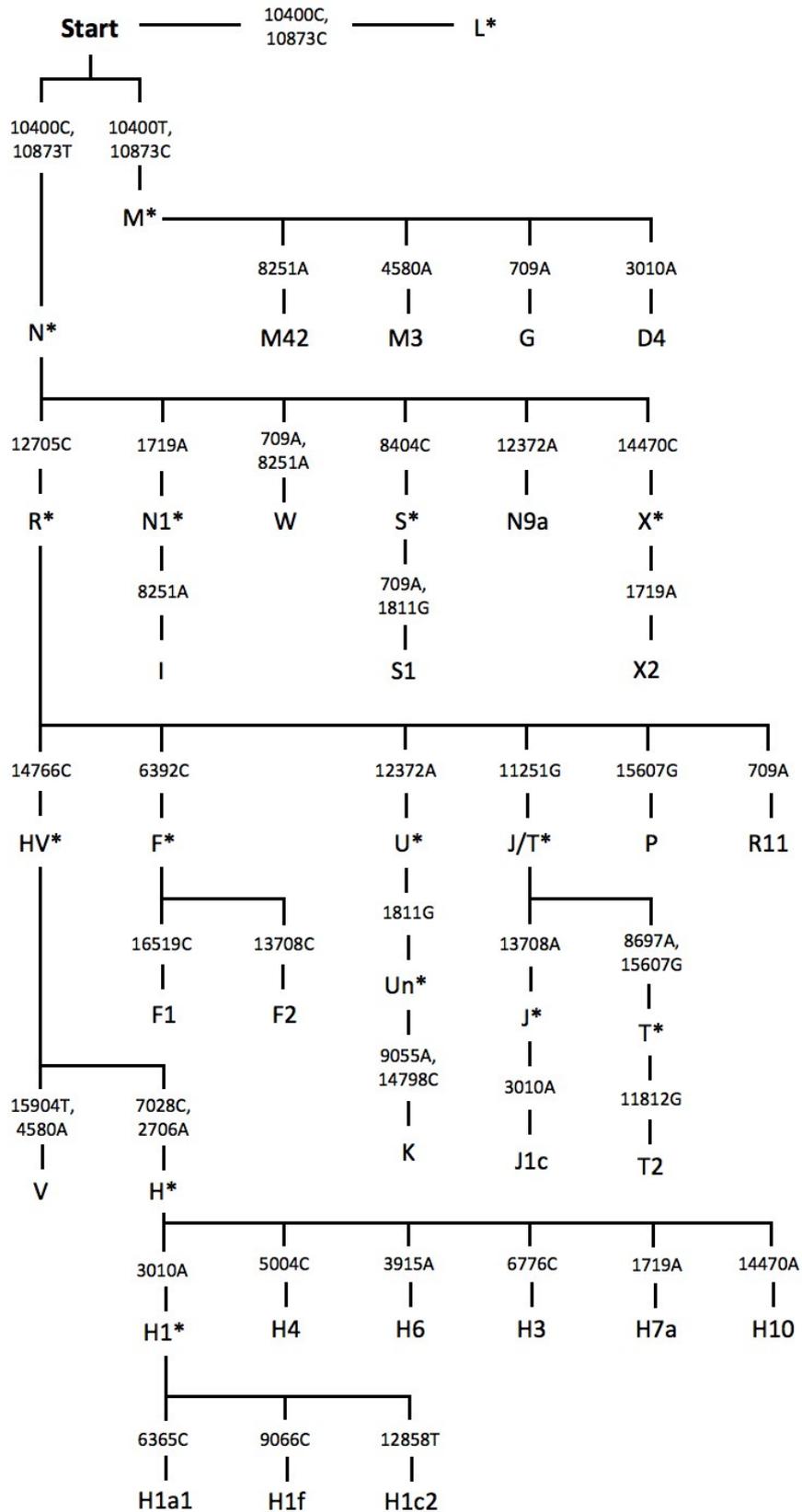


Abb. 2.5 - Haplogruppen Entscheidungsbaum: Positionsnummern der Mutation dem rCRS folgend; Haplogruppen mit * können in weitere Subgruppen unterteilt werden.

2.2.11. Haplotypen-Zuweisung

Die Htn-Zuweisung wurde anhand der Sanger-Sequenz [62] der HVI mit Microsoft Excel durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden alle Basen der HVI-Sequenz Datenbank zu Ketten verknüpft und entsprechend ihres Hts (Basenfolge) alphabetisch sortiert. Anschließend wurden den Htn in der Folge ihres Auftretens Nummern von 1 bis 343 zugewiesen. Der vorherrschende Ht war in seiner Sequenz identisch mit der Anderson Sequence.

2.2.12. Datenanalyse in zwei Schritten

Die Proben wurden in zwei Schritten analysiert. Zuerst erfolgte die Analyse der Ergebnisse des 32 mtDNA SNaPshots. In einem zweiten Schritt die Analyse der Ergebnisse der HVI-Sequenzierung.

861 Proben wurden einem 32 mtDNA SNaPshot unterzogen und konnten danach erfolgreich einer Hg zugeordnet werden. Von 861 Proben wurde eine HVI-Sequenzierung durchgeführt und ein Ht zugewiesen.

Die Forschungsgruppe von Brandstätter et al. schlägt vor, zuerst einen SNaPshot als Screening-Methode durchzuführen, um anhand der Ergebnisse Proben für die Sequenzierung auszuwählen [9].

2.2.13. Die Power of Discrimination

Die PD, auch als Random Matching Probability [10] bezeichnet, wurde berechnet wie in [9; 10; 42; 68] beschrieben (siehe Abb. 2.7):

'n' = Anzahl der in der Datenbank enthaltenden Individuen, 'm' = Anzahl der in der Datenbank gefundenen Htn, 'x_i' = Häufigkeit des Htn und 'i' in der Datenbank

$$PD = 1 - \left[n^{-2} \sum_{i=1}^m x_i^2 \right]$$

Abb. 2.7 - Die PD [42]

2.2.14. Einsatz von virtuellen Mini-Amplikons zur Analyse von mtDNA

Die Ergebnisse der HVI-Sequenzierung wurden angelehnt an die von Eichmann und Parson [21] publizierte wissenschaftliche Arbeit (Näheres siehe Einleitung) mittels MAs untersucht. Dabei wurden zuerst Abschnitte untersucht, die bereits 2008 von Eichmann und Parson in ähnlicher Form analysiert worden waren. Da sich die von Eichmann und Parson untersuchten Abschnitte nicht auf die HVI Region beschränkten, sondern auch die HVII und HVIII beinhalteten, konnten, wie in Abb. 2.8 zu sehen, letztlich mit den vorliegenden Daten nur drei der vorbeschriebenen Abschnitte mit virtuellen MAs, Mms, untersucht werden. Die übrigen Abschnitte sind in Abb. 2.8 daher grau verdeckt dargestellt.

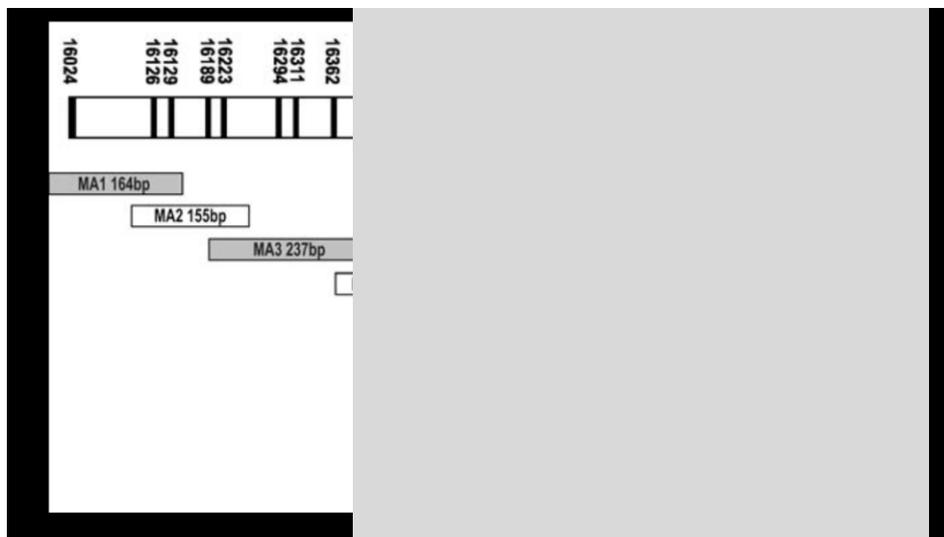


Abb. 2.8 - Mms nach Eichmann und Parson [21], die 19 variabelsten Bereiche sind hervorgehoben

Die in Abb. 2.8. zu sehenden MA 1, 2 und 3 wurden gegenüber der Gestaltung von Eichmann und Parson [21] um bis zu 51,6 % verkürzt, gleichzeitig aber auf die variabelsten Bereiche, der HVI-Region konzentriert. Von ihrer Länge entsprechen sie damit am ehesten der mVRI (91 bp) des AFDIL [20].

Die angepassten MAs werden in Anlehnung an den Titel der Publikation von Eichmann und Parson [21] als Mms bezeichnet. Die Mms I-III, sind in Tabelle 2.4 zu sehen.

Tabelle 2.4 - PD der 'Mitominis' nach Eichmann und Parson [21]

Mitomini	Länge (bp)
MITOMINI I: 16029 - 16112	89
MITOMINI II: 16134 - 16208	75
MITOMINI III: 16223 - 16365	133

Nach dem 32 mtDNA SNaPshot mit der anschließenden Zuordnung der Hgn wurden die 18 Hgn mit mehr als 10 Individuen, insgesamt 806 Proben, in eine eigene Datenbank überführt und eine Untersuchung der gesamten HVI-Sequenz mit virtuellen MAs durchgeführt.

Dabei kamen zum einen drei MAs in Anlehnung an die von Eichmann und Parson [21] konzipierten „Mitominis“ zum Einsatz, zum anderen wurde die HVI Region jedes unabhängigen Hgn Datensatzes in 217 virtuelle MAs von je 120 bp Länge unterteilt und die PD für jeden dieser Abschnitte untersucht. Die Vorgehensweise wird durch die Abb. 2.9. illustriert.

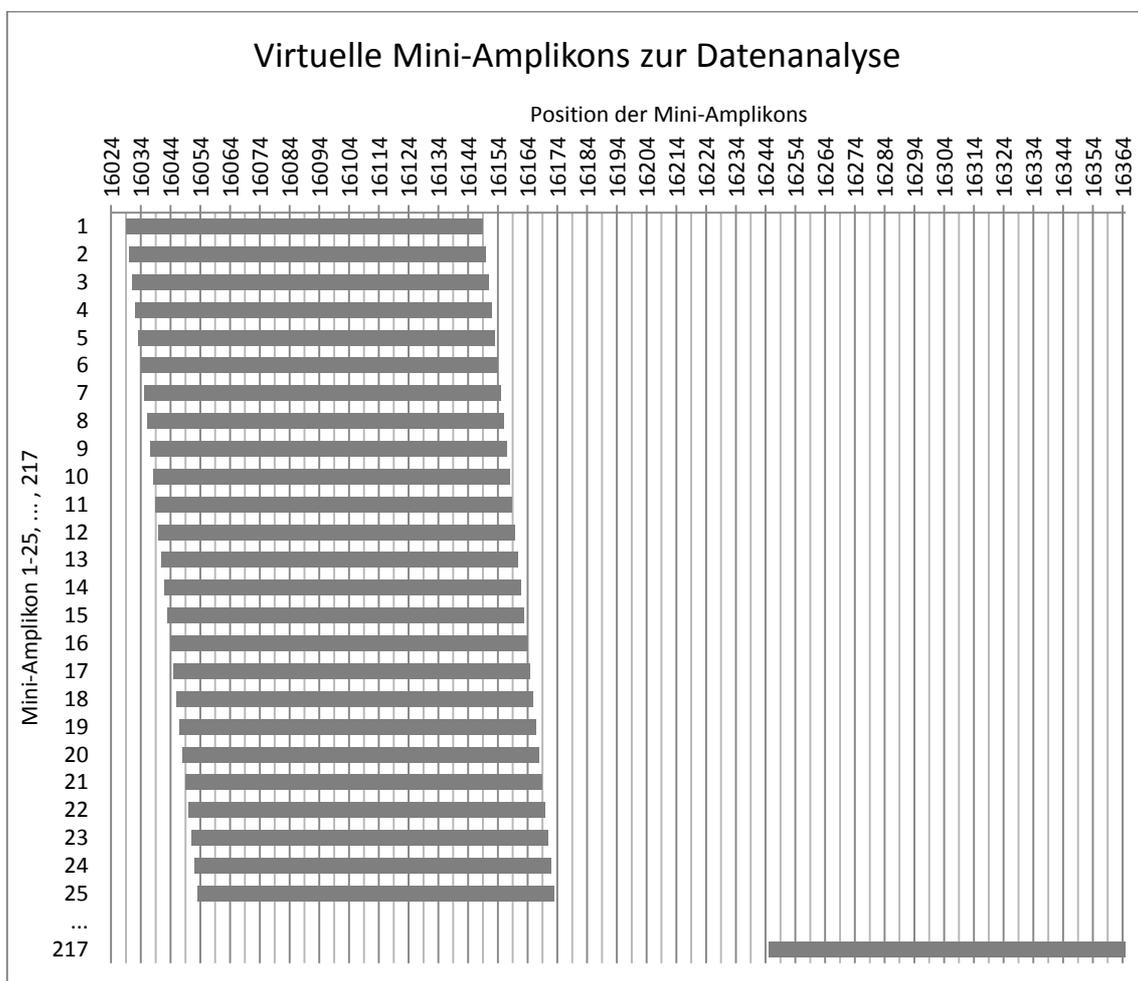


Abb. 2.9 - Virtuelle Mini-Amplikons zur Datenanalyse

3. Ergebnisse

Insgesamt wurde von 861 Proben ein 32 mtDNA SNaPshot erstellt, von diesen Proben wurde außerdem eine HVI-Sequenzierung durchgeführt. Jeder Probe konnte erfolgreich einer Hg zugeordnet werden und so mit den korrespondierenden Ergebnissen aus der HVI-Sequenzierung verglichen werden.

Bei der Analyse der Proben wurde vorausgesetzt, dass als erster Untersuchungsschritt der 32 mtDNA SNaPshot erfolgte. Können zwei Individuen danach nicht diskriminiert werden, da sie der gleichen Hg zugeordnet wurden, müssen sie anhand ihrer HVI Region differenziert werden. Dazu wurde die HVI Region in 217 Abschnitte mit einer Länge von je 120 bp unterteilt. Der erste Abschnitt reicht dabei von 16024 bp - 16144 bp, der zweite von 16025 bp - 16145 bp, ... , der letzte Abschnitt von 16245bp - 16365 bp (siehe Abb. 2.9).

Diese virtuellen MAs, wurden nun auf ihre PD untersucht, um für jede Hg Bereiche der HVI zu identifizieren, die eine Unterscheidung ermöglichen. Dazu wurden aus den vollständigen HVI-Basenreihen (16024 bp - 16365 bp) die entsprechenden Abschnitte ausgewählt (z.B. 16024 bp - 16144 bp), diese nach alphabetischer Reihenfolge ihrer Htn sortiert und anschließend gezählt. Anhand der Gesamtzahl der Proben innerhalb der Hg und der Frequenz der einzelnen Htn innerhalb des gewählten Abschnitts konnte anschließend die PD für eben diesen Bereich der HVI berechnet werden.

Die PD wurde zuerst mit drei Mms nach Eichmann und Parson [21] berechnet. Die Ergebnisse aus diesen Untersuchungen werden im Folgenden mit selbst erstellten MAs verglichen. Es wurden in beiden Fällen lediglich Hgn, die in dieser Datenbank mit mehr als zehn Individuen vertreten sind, auf die PD der Mms bzw. MAs hin untersucht. Die Berechnung mit einer niedrigeren Probenzahl hätte eine zu geringe Aussagekraft gehabt.

Mit den im Verlauf dieser Arbeit gewonnenen Daten des 32 mtDNA SNaPshots und der HVI-Sequenzierung wurde zur Erweiterung der EMPOP mtDNA Datenbank, <http://www.empop.org>, [55] beigetragen. Das Datenmaterial wurde dazu einer phylogenetischen Plausibilitätsprüfung durch entsprechende Software der EMPOP Datenbank unterzogen [56].

3.1. Die Datenanalyse

Werden die Ergebnisse des 32 mtDNA SNaPshots und der HVI-Sequenzierung gegenüber gestellt, zeigt sich, dass mit ersterem Verfahren allein durch die Zuordnung der Hgn eine (PD 0,911) mit der HVI-Sequenzierung (PD 0,974) durchaus vergleichbare PD erreicht werden kann. Bei der Berücksichtigung individualisierender SNPs konnte eine PD von 0,957 erzielt werden.

Durch den SNaPshot konnten 29 von 41 möglichen Hgn vergeben werden. Dabei zeigte das Probenmaterial bis auf wenige Ausnahmen (M & L und deren Subgruppen) die für eine norddeutsche bzw. westeuropäische Population typische Hgn-Verteilung [9; 10; 39]. Darüber hinaus konnten allein durch den SNaPshot 166 Htn ermittelt werden. Der häufigste Ht konnte dabei 95-mal (11,03 %) gefunden werden, 109-mal (12,66 %) trat ein Ht nur einmal auf.

Bei der Untersuchung der HVI wurden insgesamt 343 Htn ermittelt, der häufigste Ht konnte 102-mal (11,84 %) zugewiesen werden und entsprach der Anderson Sequence.

240-mal (27,87 %) konnte ein Ht nur einmal gefunden werden.

Eine Übersicht der Ergebnisse wird in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1 - Ergebnisse der SNaPshot und HVI Analyse

Proben	SNaPshot				HVI	
	Haplogruppen Anzahl (n)	PD	Haplotypen Anzahl (n)	PD	Haplotypen Anzahl (n)	PD
861	29	0,911	166	0,957	343	0,974

3.2. Haplogruppen-Verteilung

Insgesamt wurden 29 der 41 möglichen Hgn (siehe Entscheidungsbaum, Abb. 2.5) zugeordnet. Die Hgn H und ihre Subgruppen H1, H1a1, H10, H3, H4, H6 und H7A belaufen sich dabei auf insgesamt 356 Individuen bzw. 41,35 % aller Probenergebnisse. Durch Bestimmung der Subgruppen konnte die Anzahl der als H bestimmten Proben auf 174 bzw. 20,21 % reduziert und damit mehr als halbiert werden. Zugleich war H mit 174 Individuen die häufigste Hg, die seltenste Hg war D4 mit nur einem Individuum.

Die Subgruppen von H belaufen sich auf insgesamt 182 Proben bzw. 21,14 % mit H1 108 (12,54 %), H1a1 7 (0,81 %), H10 8 (0,93 %), H3 18 (2,09 %), H4 8 (0,93 %), H6 28 (3,25 %) und H7A 5 (0,58 %) wie z.B. von Brandstätter publiziert [10].

Eine Übersicht der Ergebnisse wird in Tabelle 3.2 dargestellt.

Tabelle 3.2 - Ergebnisse der Haplogruppe Zuordnung, die Kumulation entsteht aus den einzelnen Anteilen der Haplogruppen.

Haplogruppe	Anzahl (n)	Anteil (%)	Kumulation (%)
D4	1	0,12	0,12
G	3	0,35	0,46
H	174	20,21	20,67
H1	108	12,54	33,22
H1A1	7	0,81	34,03
H10	8	0,93	34,96
H3	18	2,09	37,05
H4	8	0,93	37,98
H6	28	3,25	41,23
H7A	5	0,58	41,81
HV	40	4,65	46,46
I	16	1,86	48,32
J	17	1,97	50,29
J/T	14	1,63	51,92
J1C	59	6,85	58,77
K	60	6,97	65,74
L	16	1,86	67,60
M	2	0,23	67,83
N	10	1,16	68,99
N1	4	0,46	69,45
R	12	1,39	70,85
T	41	4,76	75,61
T2	49	5,69	81,30
U	77	8,94	90,24
UN	42	4,88	95,12
V	25	2,90	98,03
W	8	0,93	98,95
X	2	0,23	99,19
X2	7	0,81	100,00
29	861	100	

Das Diagramm (Abb. 3.1) verdeutlicht die dominante Rolle der Hg H und ihrer Sub-Hgn in der Verteilung der Hgn. Die Hgn werden dabei von D4 bis X2 alphabetisch im Uhrzeigersinn gezeigt.

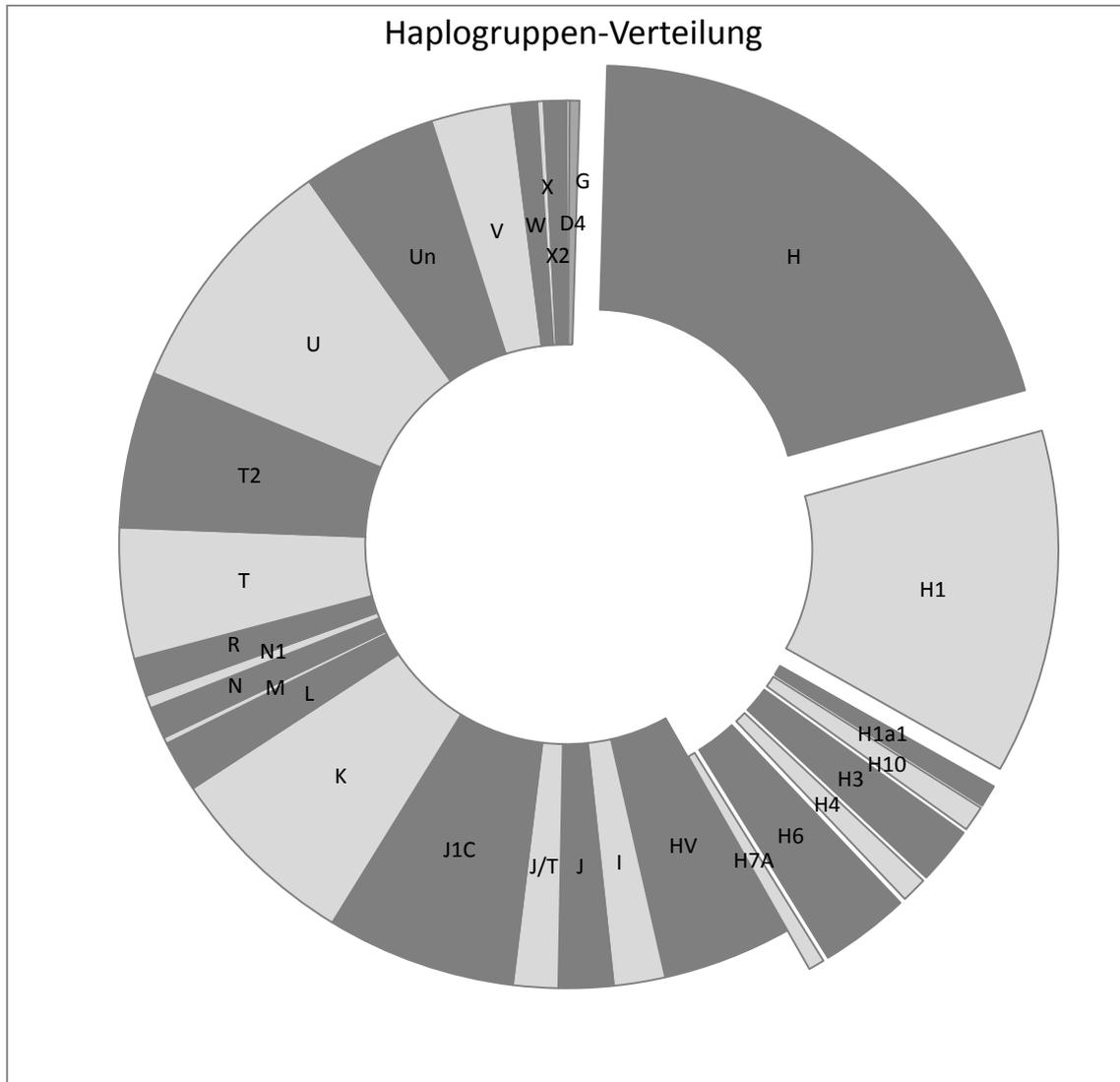


Abb. 3.1 - Haplogruppen-Verteilung

3.3. Haplotypen-Verteilung

Die Untersuchung der HVI-Sequenzierung ergab 343 Htn, der häufigste Ht konnte 102-mal (11,84 %) nachgewiesen werden und entsprach der AS. 240-mal (27,87 %) konnte ein einzigartiger Ht gefunden werden. Die Summe der Htn, die zweimal oder häufiger auftraten, belief sich auf insgesamt 519 Proben (60,28 %) (siehe Abb. 3.2).

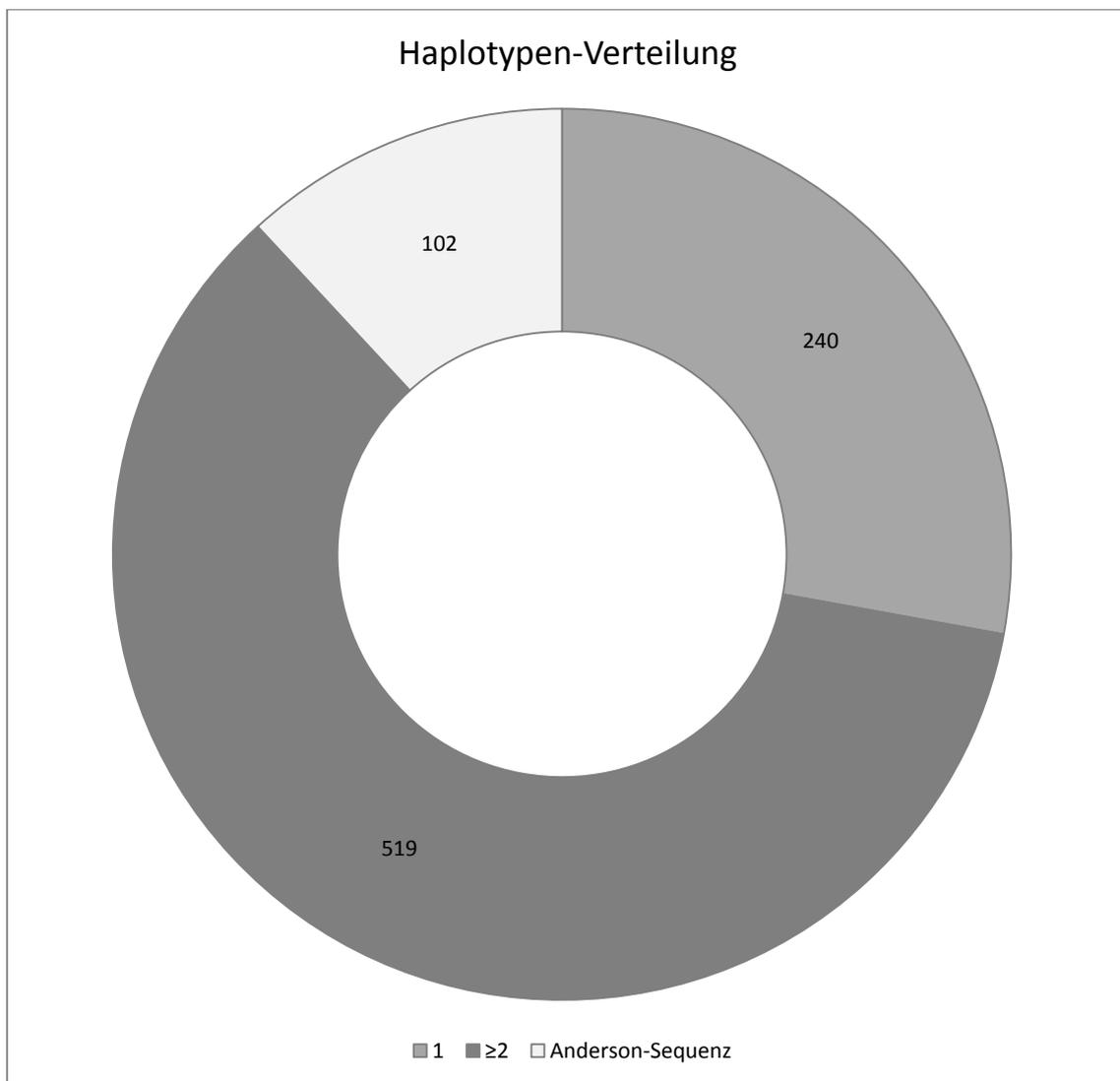


Abb. 3.2 - Haplotypen-Verteilung der einmaligen oder häufiger/gleich 2-mal vorhandenen sowie der AS entsprechenden Proben

3.4. Haplogruppen und Mini-Amplikons

3.4.1. Mitomini I

Der Mm I hat eine Länge von 84 bp und war damit das zweitkürzeste Mm. Es bietet insgesamt die wenigsten Htn (20) und die niedrigste PD (0,350) von allen getesteten Mms (siehe Tabelle 3.3). Bezogen auf die Mms bei J, T, T2 und V (0,0) die niedrigste und für R (0,583) die höchste PD. J, T, T2 und V sind in diesem Bereich identisch und bieten daher kein Diskriminationspotenzial (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.3 - Überblick: Mitomini I

Mitomini I	
16029 - 16112	
Haplotypen Anzahl (n)	PD
20	0,350

Tabelle 3.4 - Haplogruppen in Mitomini I

Haplogruppe	Proben Anzahl (n)	Haplotypen Anzahl (n)	PD
H	174	6	0,201
H1	108	7	0,349
H3	18	2	0,105
H6	28	3	0,135
HV	40	6	0,311
I	16	2	0,219
J	17	1	0,000
J/T	14	4	0,367
J1C	59	4	0,159
K	60	2	0,231
L	16	3	0,398
N	10	2	0,180
R	12	4	0,583
T	41	1	0,000
T2	49	1	0,000
U	77	5	0,192
UN	42	4	0,354
V	25	1	0,000
TOTAL	806		

3.4.2. Mitomini II

Der Mitomini II hat eine Länge von 75 bp und ist damit das kürzeste getestete Amplikon. Bezogen auf Htn (52) und PD (0,581) liegt es zwischen Mitomini I und III (siehe Tabelle 3.5). Es bietet für Hg H6 die niedrigste PD (0,191) und für Hg J/T die höchste PD (0,827) (siehe Tabelle 3.6).

Tabelle 3.5 - Überblick Mitomini II

Mitomini II	
16134 - 16208	
Haplotypen Anzahl (n)	PD
52	0,581

Tabelle 3.6 - Haplogruppen in Mitomini II

Haplogruppe	Proben Anzahl (n)	Haplotypen Anzahl (n)	PD
H	174	16	0,226
H1	108	14	0,699
H3	18	5	0,383
H6	28	2	0,191
HV	40	12	0,565
I	16	3	0,227
J	17	4	0,471
J/T	14	8	0,827
J1C	59	9	0,498
K	60	3	0,096
L	16	5	0,563
N	10	4	0,480
R	12	4	0,597
T	41	3	0,380
T2	49	4	0,374
U	77	16	0,788
UN	42	13	0,782
V	25	4	0,221
TOTAL	806		

3.4.3. Mitomini III

Der Mitomini III hat eine Länge von 133 bp und ist damit das längste getestete Amplikon. Gleichzeitig bietet es die meisten Htn (176) und die höchste PD (0,911) (siehe Tabelle 3.7). Die niedrigste PD bietet es für Hg V (0,15), die höchste für L (0,93) (siehe Tabelle 3.8).

Tabelle 3.7 - Überblick Mitomini III

Mitomini III	
16233 - 16365	
Haplotypen Anzahl (n)	PD
176	0,911

Tabelle 3.8 - Haplogruppen in Mitomini III

Haplogruppe	Proben Anzahl (n)	Haplotypen Anzahl (n)	PD
H	174	34	0,788
H1	108	28	0,582
H3	18	5	0,457
H6	28	6	0,372
HV	40	20	0,868
I	16	6	0,508
J	17	7	0,561
J/T	14	12	0,908
J1C	59	13	0,544
K	60	12	0,431
L	16	15	0,930
N	10	8	0,840
R	12	11	0,903
T	41	11	0,490
T2	49	12	0,623
U	77	28	0,855
UN	42	26	0,902
V	25	3	0,150
TOTAL	806		

3.4.4. Überblick: Power of Discrimination der Mitomins nach Eichmann und Parson

Von 18 getesteten Hgn wies Mm I keinmal die höchste PD auf, zudem bot es für J, T, T2 und V jeweils kein Diskriminationspotenzial, anders die Mms II und III, die in jedem Fall zumindest niedrige Diskriminationspotenziale boten. Mm III bietet in 16 von 18 Fällen (H, H3, H6, HV, I, J, J/T, J1c, K, L, N, R, T, T2, U, Un) die höchste PD, Mm II in zwei Fällen (H1, V) (siehe Tabelle 3.9).

Tabelle 3.9 - PD der Mitomins I-III für die Haplogruppen

Haplogruppe	PD		
	Mitomini I	Mitomini II	Mitomini III
H	0,201	0,226	0,788
H1	0,349	0,699	0,582
H3	0,105	0,383	0,457
H6	0,135	0,191	0,372
HV	0,311	0,565	0,868
I	0,219	0,227	0,508
J	0,000	0,471	0,561
J/T	0,367	0,827	0,908
J1C	0,159	0,498	0,544
K	0,231	0,096	0,431
L	0,398	0,563	0,930
N	0,180	0,480	0,840
R	0,583	0,597	0,903
T	0,000	0,380	0,490
T2	0,000	0,374	0,623
U	0,192	0,788	0,855
UN	0,354	0,782	0,902
V	0,000	0,221	0,150

Das Säulendiagramm (Abb. 3.3) verdeutlicht diese Konstellation.

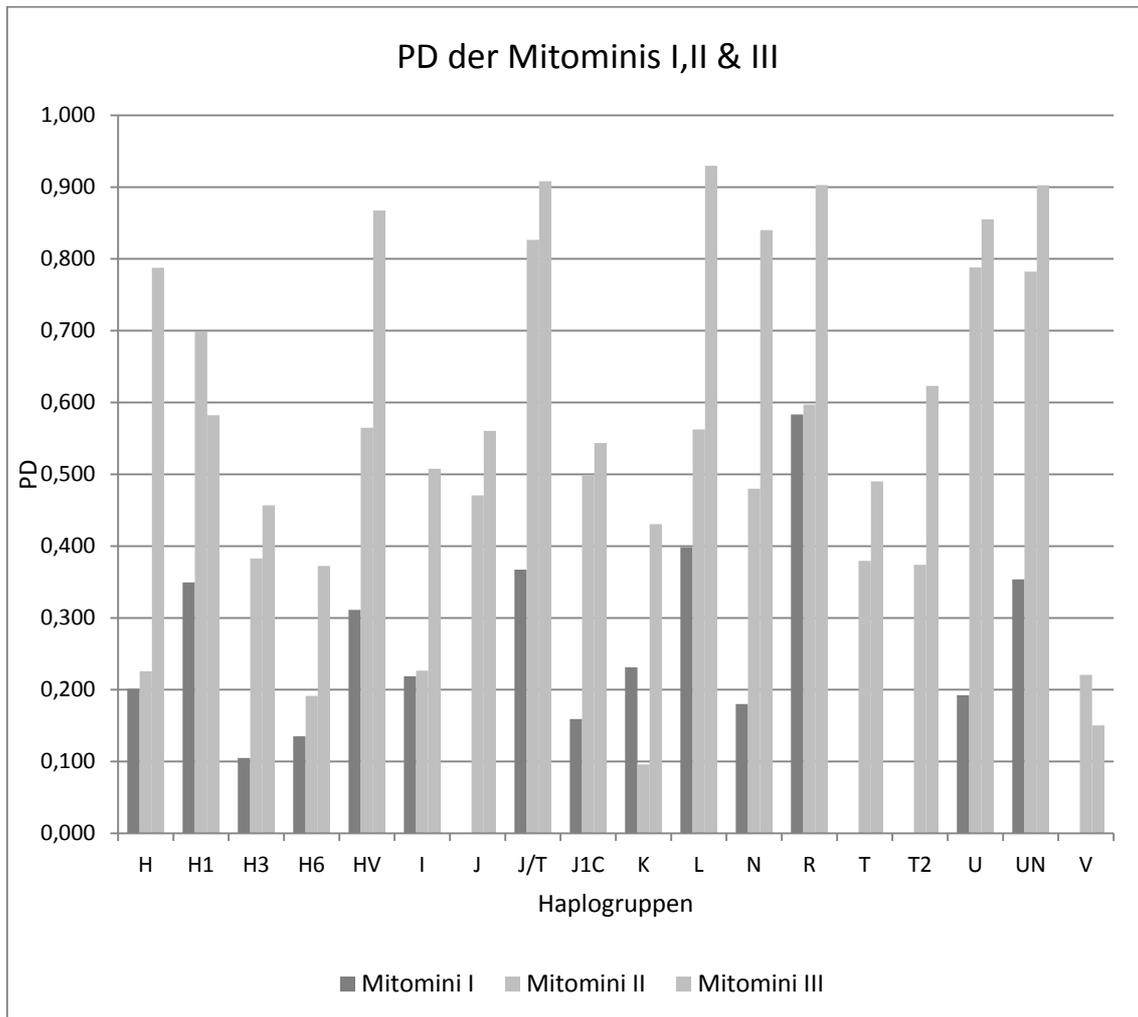


Abb. 3.3 - PD der Mitomins I,II und III nach Eichmann und Parson [21]

3.5. Mini-Amplikon X

Für alle 18 Hgn, die mehr als 10 Individuen enthielten, wurden weitere MAs mit einer Länge von minimal 120 bp in der HVI bestimmt. Hier aufgeführt sind lediglich die Abschnitte mit der höchsten PD. Dazu wurde die HVI Region von jeder Hg, wie in Abb. 2.9 zu sehen ist, beginnend bei Position 16029 in 217 Abschnitte von je 120 bp Länge unterteilt. Dabei ergab sich für jede Hg ein Bereich, bei Hg T2 zwei Bereiche, in der mehrere MAs eine identische PD bieten. Die sich überlappenden MAs von 120 bp werden deshalb als zusammenhängender Abschnitt betrachtet. Die in Tabelle 3.10 angegebenen Positionen und Längen der MAs in bp geben diese maximale Abschnittslänge an. Für Hg H finden sich zwischen 16199 und 16329 insgesamt 12 MAs von je 120 bp Länge. Die kürzeste Abschnittslänge ergab sich für die Hg K und Hg U, der längste Abschnitt für Hg H3 mit 171 bp Länge. Für die Hg T2 ergaben sich zwei unabhängige Abschnitte mit einer identischen PD (0,623). Die minimale PD ergab sich für Hg V (0,352), die maximale PD für Hg U (0,935) (siehe Tabelle 3.10).

Tabelle 3.10 - Mini-Amplikon X der einzelnen Haplogruppen im Vergleich

Haplogruppe	Mini-Amplikon X	bp	Haplotypen Anzahl (n)	PD
H	16199 - 16329	131	38	0,781
H1	16145 - 16268	124	21	0,776
H3	16122 - 16292	171	7	0,537
H6	16125 - 16249	125	6	0,469
HV	16191 - 16329	139	19	0,876
I	16052 - 16206	155	5	0,625
J	16205 - 16365	161	7	0,561
J/T	16178 - 16309	132	13	0,918
J1C	16143 - 16283	141	21	0,709
K	16093 - 16213	121	8	0,446
L	16236 - 16365	130	15	0,930
N	16191 - 16329	139	9	0,880
R	16242 - 16365	124	11	0,903
T	16184 - 16329	146	11	0,490
T2	16184 - 16309	126	11	0,623
	16242 - 16365	124	12	0,623
U	16174 - 16294	121	34	0,935
UN	16241 - 16365	125	25	0,890
V	16129 - 16260	132	6	0,352

3.6. Vergleich Mitomini nach Eichmann u. Parson mit Mini-Amplikon X

Im direkten Vergleich der Mms I-III nach Eichmann und Parson [21] mit den MAs zeigen sich große Übereinstimmungen in der PD insbesondere mit Mm III. In 11 von 18 Fällen konnten MAs gefunden werden, die eine höher PD als die Mms I bis III bieten, in zwei Fällen war die PD kleiner, in weiteren fünf Fällen gleich hoch. Die größte Differenz wurde bei Hg J1c (+0,165) erzielt (siehe Tabelle 3.11 und Abb. 3.4).

Tabelle 3.11 - Mini-Amplikon X der einzelnen Haplogruppen im Vergleich zu Mitomini I-III nach Eichmann und Parson [21]

Haplogruppe	Mini-Amplikon X	Mitomini I	Mitomini II	Mitomini III	Differenz
	PD				
H	0,781	0,201	0,226	0,788	-0,007
H1	0,776	0,349	0,699	0,582	0,077
H3	0,537	0,105	0,383	0,457	0,080
H6	0,469	0,135	0,191	0,372	0,097
HV	0,876	0,311	0,565	0,868	0,008
I	0,625	0,219	0,227	0,508	0,117
J	0,561	0,000	0,471	0,561	0,000
J/T	0,918	0,367	0,827	0,908	0,010
J1C	0,709	0,159	0,498	0,544	0,165
K	0,446	0,231	0,096	0,431	0,015
L	0,930	0,398	0,563	0,93	0,000
N	0,880	0,180	0,48	0,84	0,040
R	0,903	0,583	0,597	0,903	0,000
T	0,490	0,000	0,38	0,49	0,000
T2	0,623	0,000	0,374	0,623	0,000
U	0,935	0,192	0,788	0,855	0,080
UN	0,890	0,354	0,782	0,902	-0,012
V	0,352	0,000	0,221	0,15	0,131

Die nachfolgende Darstellung, Abb. 3.4, zeigt die Bereiche der MAs mit der höchsten PD in den Hgn und die Bereiche der drei Mms nach Eichmann und Parson [21] innerhalb der HVI.

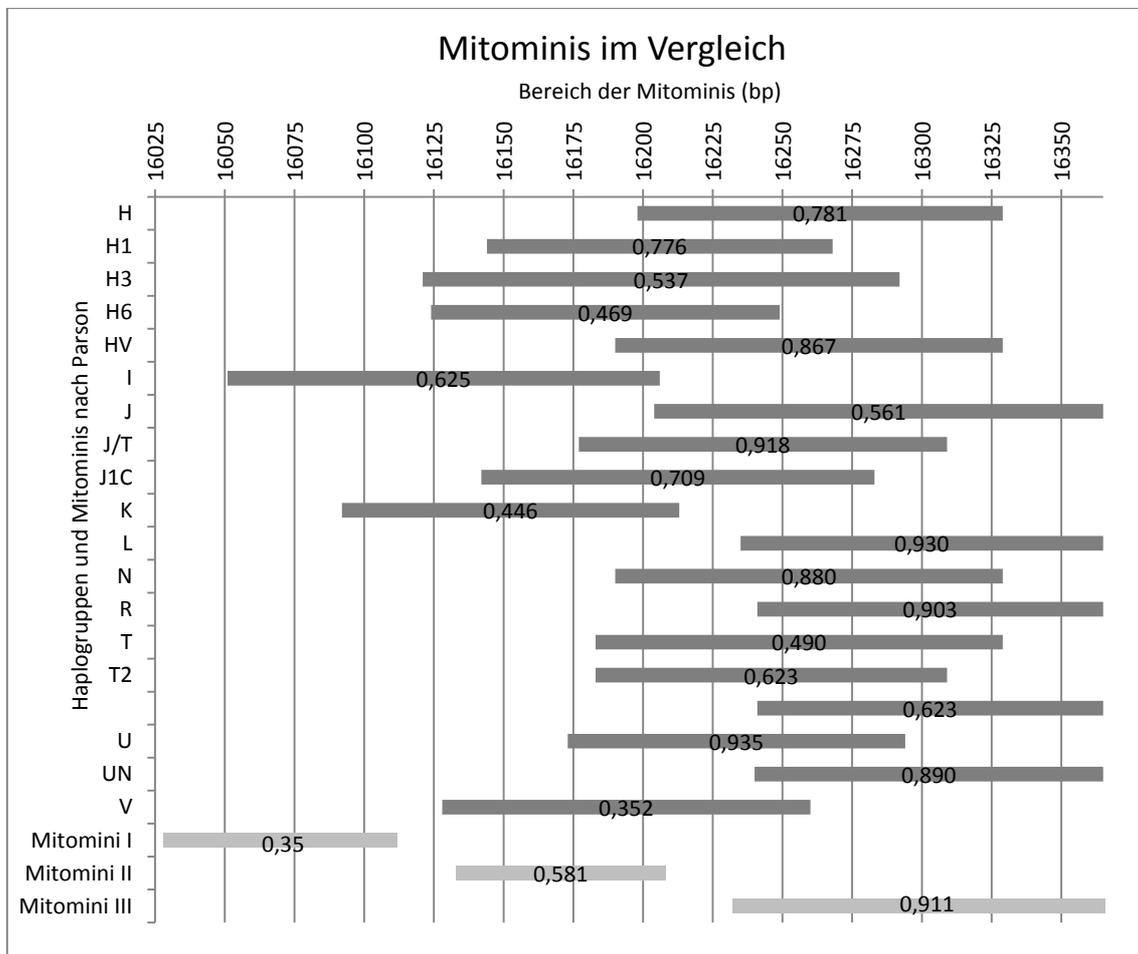


Abb. 3.4 - Mini-Amplikons und Mitominis im Vergleich

4. Diskussion

Im Laufe dieser Arbeit konnten insgesamt 861 Proben mit dem am Institut für Rechtsmedizin der Universität Münster entwickelten 32 mtDNA SNaPshot [39] untersucht und mit den Daten der HVI-Sequenzierung [42] derselben Proben verglichen werden.

Mit den Ergebnissen des SNaPshots wurden allen Proben Hgn entsprechend der Abb. 2.5 zugeordnet. Anschließend wurden die HVI-Sequenzen der Proben von 18 Hgn, die sich aus mehr als 10 Proben rekrutierten (H, H1, H3, H6, HV, I, J, J/T, J1C, K, L, N, R, T, T2, U, UN, V), insgesamt 806 Proben, mittels virtueller MAs von 120 bp Länge auf Abschnitte mit einer möglichst hohen PD untersucht. Hgn, die weniger als 10 Proben enthielten, wurden nicht berücksichtigt.

Für die überwiegende Zahl der Hgn konnten verwertbare Ergebnisse erzielt werden. Die alleinige Untersuchung der Proben mittels der Hgn-Zuordnung erbrachte eine PD von 0,911. Die Untersuchung derselben Proben mittels HVI-Sequenzierung ergab eine PD von 0,974. Die Ergebnisse der SNaPshot PD wurden dabei erzielt ohne individualisierende SNPs zu berücksichtigen.

Unter Einbeziehung individualisierender SNPs konnte mit den Ergebnissen des SNaPshots eine PD von 0,957 (siehe Tabelle 3.1) erreicht werden.

Die automatische Hgn-Zuordnung mittels Excel Spreadsheet erwies sich als verlässliche Methode, ohne die eine schnelle Auswertung der Probenergebnisse nicht möglich gewesen wäre.

Die Basis zur Entwicklung der Funktionen der Hgn-Zuordnung war der im IfR verwendete Hgn-Entscheidungsbaum (Abb. 2.5). Die Arbeitsweise der mittels Excel Spreadsheet durchgeführten Hgn-Zuordnung, wie sie in Abb. 2.6 zu sehen ist, folgt dabei einem Stufenschema, das in weiten Teilen durch die zum Zeitpunkt der Erarbeitung bestehenden Limitierungen von Excel bedingt ist. Mit der nun zur Verfügung stehenden Version ließe sich die Hgn-Zuordnung kompakter gestalten. Ein Vorzug der in Abb. 2.6 zu sehenden Vorgehensweise ist jedoch die dadurch vorhandene Kontrollierbarkeit der Ergebnisse, da die Hgn-Zuordnung für den Untersucher nachvollziehbar dargestellt wird. Zudem lieferte das für die Hgn-Zuordnung angelegte Excel Spreadsheet verlässliche Ergebnisse und findet im IfR auch weiterhin Anwendung zur Bestimmung der Hgn.

Durch die weitgehend automatisierte Untersuchung der ausgewählten virtuellen MAs der HVI wurde es möglich, eine sehr große Zahl von Abschnitten auf ihr Diskriminationspotenzial zu überprüfen. Insgesamt wurde die HVI-Sequenzen von 18 Hgn in jeweils 217 Abschnitte (16024-16144, 16025-16145, ... , 16245-16365) (siehe Abb. 2.9) unterteilt und auf ihre PD geprüft. Von 18 Hgn (H, H1, H3, H6, HV, I, J, J/T, J1C, K, L, N, R, T, T2, U, UN, V) wurden insgesamt 3906 MAs überprüft.

Eine besondere Herausforderung stellte die Entwicklung der für die Analyse der MAs benötigten Tabellenfunktionen dar. Dazu mussten die Einzel-Basen-Positionen der HVI-Proben-Daten in zusammenhängende Basenfolgen konvertiert werden. Da die ursprüngliche Notierung der HVI-Proben Daten lediglich die Basenpositionen enthielt, die innerhalb der vorliegenden Datenbank Veränderungen gegenüber der rCRS aufwiesen, mussten die übrigen Basen zuvor ergänzt werden. Daraus ergab sich für jeden der 861 Datensätze eine der HVI-Region entsprechende Basenfolge von 342 Zeichen. Mittels der in Excel zur Verfügung stehenden Funktionen konnten dann alle Proben, ausgehend von einer anzugebenden Startposition, gleichzeitig in Abschnitte von je 120 bp Länge unterteilt werden (siehe Abb. 2.9). Anschließend konnte eine Analyse der Htn dieses entsprechenden Abschnitts und aus diesen Daten die jeweilige PD berechnet werden. Diese Analyse erfordert eine manuelle Eingabe der Startposition, sowie eine Reihe manuell auszuwählender Befehle, wie die Sortierung der ausgewählten Basenfolgen. Dies macht die Arbeit trotz der weitgehenden Automatisierung sehr zeitaufwändig und kann zu Fehlern führen. Erst mit dem Erscheinen von Microsoft Excel 2010 wurde die Bearbeitung der Daten überhaupt in dieser Form möglich. Zu Beginn dieser Arbeit war eine Berechnung aufgrund des Datenumfangs mit der zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Version von Microsoft Excel mehrmals gescheitert.

Langfristig muss es das Ziel sein, die bei dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse in ein verlässliches Programm mit vollständig automatisierten Arbeitsschritten zu übertragen.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten des 32 mtDNA SNaPshots und die bereits vorliegenden Daten der HVI-Sequenzierung wurden zu einem Datensatz zusammengefasst und nach vorheriger phylogenetischer Prüfung in die EMPOP-Datenbank [55] aufgenommen.

Das SNaPshot Verfahren ist gerade aufgrund seiner großen Zuverlässigkeit von großem Interesse für die forensische Genetik, zudem liefert der 32 mtDNA SNaPshot selbst dann vollständige Ergebnisse, wenn STRs der nDNA und auch HVI-Sequenzierungen fehlschlagen [18; 41]. So konnten am Institut für Rechtsmedizin mit dem 32 mtDNA SNaPshot bereits Proben mit einem Alter von bis zu 1400 Jahren erfolgreich analysiert werden [41]. Der 32 mtDNA SNaPshot hat eine einwandfreie Einsetzbarkeit bei der Anwendung auf Speichel-, Blut-, Sperma-, Haar-, Zahn- und Knochenproben bewiesen [41]. Das SNaPshot Verfahren bietet, ohne Berücksichtigung individualisierender SNPs, eine geringere PD als eine HVI-Sequenzierung, zeigt aber gleichzeitig eine höhere Sensitivität.

SNaPshots machen sich eine Reihe von Besonderheit der mtDNA zu Nutze.

Abgesehen von einer Ausnahme, der sog. C-Stretch zwischen den Positionen 515 und 524, weist die mtDNA ausschließlich Punktmutationen, SNPs, auf [69]. Individuen, die sich in der HVI/HVII Region entsprechen, weisen durchschnittlich 6,2 Unterschiede verteilt über die verbleibende mtDNA auf [18]. Oft wird so durch den 32 mtDNA SNaPshot eine weitere Differenzierung von in der HVI-Region identischen Proben ermöglicht [39]. Mit den in der coding Region der mtDNA enthaltenen non-coding Nukleotiden, auch als „intergenetische Spacer“ bezeichnet [18], finden sich höchst variable Bereiche, die bei einer alleinigen Untersuchung der non-coding Region ungenutzt bleiben und weiteres Diskriminationspotenzial bieten [18; 19]. Diese „Spacer“ sind allerdings sehr ungleichmäßig über das Genom verteilt und weisen große Abstände auf [69]. Eine Sequenzierung großer Abschnitte gegenüber vieler differenzierter Nukleotide erscheint allein aus diesem Grund weniger effektiv. Ein weiterer Aspekt bei der Untersuchung der coding Region, der erst bei der Sequenzierung zusammenhängender Abschnitte zum Tragen kommt, sind sog. „synonymous-“ und „nonsynonymous sites“, das heißt Nukleotidvariationen in protein-kodierenden Abschnitten der mtDNA. Als „synonymous sites“ werden dabei Variationen ohne Einfluss auf das kodierte Protein bezeichnet, während „nonsynonymous sites“ eine Veränderung bewirken. Meist liegen „synonymous-“ und „nonsynonymous sites“ in direkter Nachbarschaft [19], weshalb bei der Untersuchung von unverdächtigen Abschnitten auch Informationen über protein-verändernde und damit auch potenziell pathogene Variationen gewonnen werden können [18; 19; 69]. Die Untersuchung dieser Regionen, insbesondere der „nonsynonymous sites“ wird daher ethisch vielfach kritisch bewertet und die Konzentration auf neutrale Bereiche empfohlen, da die Untersuchung von „nonsynonymous sites“ zugleich eine Verantwortung impliziert

Informationen über pathogene Veränderungen an die entsprechenden Spender zu kommunizieren [18; 19; 69]. Zudem hat sich die Sequenzierung ganzer Abschnitte der coding Region unabhängig von diesen Faktoren als wenig effektiv erwiesen, da durch die Analyse von SNPs ein deutlich höheres Diskriminationspotenzial erzielt werden kann [19; 69]. Es ist sinnvoll in einem ersten Schritt mittels eines SNaPshots die genetisch relativ stabile coding Region zu nutzen, da die genetisch-variablere non-coding Region im Anschluss noch ein zusätzliches Diskriminationspotenzial bereit hält, das umgekehrt nicht existiert [19].

Der mtDNA SNaPshot erscheint deshalb als das derzeit geeignetste Verfahren zur Analyse der coding Region zu sein [19; 69].

Entsprechen sich zwei oder mehr Proben im Anschluss an die SNaPshot-Untersuchung, muss bei einer für die Sequenzierung der gesamten HVI/HVII Region nicht ausreichenden Menge an DNA jedoch eine Alternative gefunden werden. Eine mögliche Lösung erscheint dabei die Analyse von kurzen Sequenzabschnitten, auch MAs [8; 21], Mms [21] oder mVRs [20] genannt. Für diese Arbeit wurde die HVI von 806 Proben aus 18 Hgn in jeweils 217 virtuelle MAs unterteilt und ihre PD berechnet. Die HVI Datenbank ist groß genug, um verlässliche Ergebnisse zu erzeugen, da eine deutliche größere Vielfalt an Htn für diese Population nicht zu erwarten ist [57].

Dieser Versuchsaufbau wurde auch im Hinblick darauf gewählt, den 32 mtDNA SNaPshot als Screening Methode mit einem möglichst niedrigen DNA Bedarf zu etablieren und MAs mit einer möglichst hohen PD bei identischer Hgn-Zuordnung zu ermitteln.

Die bei dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen, dass die Hgn-Zuordnung von forensischen Proben mittels 32 mtDNA SNaPshot eine probate Methode für die schnelle und aussagekräftige Untersuchung forensischer Proben darstellt.

Selbst ohne die Berücksichtigung individualisierender SNPs, abgesehen von Position 2772, konnte eine hohe PD (0,911) erzielt werden.

Die Untersuchung der HVI mittels MAs von 120 bp Länge zeigt, dass es möglich ist, selbst mit sehr kurzen Amplikons verwertbare Ergebnisse zu erzeugen. So konnte bei 18 untersuchten Hgn bei vier Hgn eine PD von über 0,9, insgesamt bei 14 aus 18 eine höheren PD als 0,5 (siehe Tabelle 3.11) erzielt werden. Dies bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit zweier nicht miteinander verwandter Individuen für diese Bereiche sich genetisch zu entsprechen unter 50 %

oder entsprechend weniger beträgt [10]. Das höchste Potenzial der HVI entfällt nach den vorliegenden Ergebnissen auf das letzte Drittel (siehe Abb. 3.4).

Damit erklären sich auch die Übereinstimmungen bei der Anwendung des nach Eichmann und Parson [21] ermittelten Mm III und der selbst ermittelten virtuellen MAs auf die Ergebnisse der Probandenbank (siehe Abb. 3.4).

Die Analyse der Mms nach Eichmann und Parson [21] bzw. mVR des AFDIL [20], sowie die Erstellung eigener virtueller MAs mit einer Länge von 120 bp ohne Primer im Anschluss an die Hgn-Zuordnung ergab für einzelne Hgn PDs, die noch über der PD der Hgn-Zuordnung lagen. Die hier lediglich virtuell erzeugten MAs von 120 bp Länge werden als Primer für die Amplifizierung der ermittelten Abschnitte ca. 160-180 bp Länge aufweisen. Die Verkürzung der virtuellen MAs auf 120 bp /160-180 bp Länge erhöht dabei die Einsetzbarkeit bei stark degeneriertem Probenmaterial und liefert für einzelne Hgn dennoch eine hohe PD. Die hier vorgelegte Arbeit reflektiert lediglich die Erkenntnisse aus der Analyse virtueller MAs. Nachteile bzw. Probleme, die mit der Amplifikation und bei der Optimierung der entsprechenden Primer einhergehen, können daher nicht benannt werden.

Trotz der augenscheinlichen Vorzüge des SNaPshots sprechen gegen den Einsatz des SNaPshot-Verfahrens die in vielen Gebieten bisweilen noch unzureichende Hgn Auflösungen. So belaufen sich allein auf H rund 20,21 % und auf H1 12,54 % der untersuchten Proben, eine weitere Differenzierung der Hgn ist hier dringend, auch im Hinblick auf die auf West-Europa zugeschnittene Nutzung, erforderlich [69].

Die Nutzung von MAs der HVI erscheint gerade vor diesem Hintergrund sinnvoll, auch wenn wie bei Eichmann und Parson beobachtet eine geringfügig erhöhte Kontaminationstendenz bei der Nutzung festgestellt wurde. Die große Sensitivität des SNaPshots kann dadurch leicht zum Nachteil des Verfahrens werden [21]. SNaPshot und HVI-Sequenzierung bieten unterschiedliche Vorteile, eine Verknüpfung beider Verfahren, so wie sie in dieser Arbeit dargestellt wird, kann die Arbeit der forensischen Genetik deutlich beschleunigen und verbessern.

Die Untersuchung forensischer Proben in einem zweistufigen Verfahren mittels SNaPshot und MA-Analyse der HVI stellt dabei ein schnelles und präzises Verfahren dar, das die Bearbeitung von Proben deutlich vereinfachen kann.

Die Durchführung des 32 mtDNA SNaPshots in einer einzigen Multiplex PCR und einem einzigen Multiplex SNaPshot ermöglicht zudem eine günstige Bearbeitung des Probenmaterials. Eine der HVI-Sequenzierung ähnliche PD zusammen mit einer stabilen Ergebnisqualität bei geringem DNA-Einsatz machen den SNaPshot gleichzeitig zu einem geeigneten Verfahren für die Bearbeitung von stark degeneriertem DNA-Material [41].

Der 32 mtDNA SNaPshot ist dabei auch für Labore gut geeignet, die nicht die gesamte Sequenzierung durchführen können und ihn als Screening-Methode nutzen wollen [38]. Die Anwendung des SNaPshots als Methode der ersten Wahl stellt eine sinnvolle Alternative zur sofortigen HVI-Sequenzierung dar. Damit ist der SNaPshot gut geeignet für pre-Screening bei „high-volume cases“, da er die Selektion der später zu sequenzierenden Proben und die Diskriminierung identischer H-Hgn ermöglicht [9; 10].

Das SNaPshot Verfahren ist in jeder Hinsicht ökonomischer, als die Sequenzierung der HVI und HVII Region, da diese den Vergleich von 510 Nukleotiden [38] erfordern. Die Untersuchung der mtDNA wurde aufgrund des hohen Aufwandes teilweise sogar vermieden, obwohl der Einsatz von mtDNA durch die Spurensituation geboten gewesen wäre und STR-Ansätze keine verwertbaren Ergebnisse lieferten [10]. Dabei erzeugt der 32 mtDNA SNaPshot, auch bei extrem geringen DNA-Vorkommen, ohne vorhandene nDNA, stabile Ergebnisse zur Bestimmung der Hgn [18].

Gleichzeitig bietet der in dieser Arbeit angewandte 32 mtDNA SNaPshot allein bei der Zuordnung von 29 Hgn (siehe Abb. 2.5) eine PD von 0,911. Die HVI-Sequenzierung erbrachte bei 343 Htn eine PD von 0,974.

Unabhängig der Vorteile der HVI-Sequenzierung im Bezug auf die maximal zu erreichenden PD, bleiben die genannten Vorzüge des 32 mtDNA SNaPshots bestehen.

Jenseits der Nischenanwendung bietet die Untersuchung von mtDNA gerade mit dem SNaPshot Verfahren handfeste Vorteile, die es für die Nutzung im täglichen Einsatz prädestinieren. Der Einsatz des mtDNA SNaPshots allein für degenerierte DNA Proben erscheint daher nicht länger gerechtfertigt.

MtDNA SNaPshots sind ein zukunftsweisendes Verfahren, da sie schnell, günstig und präzise sind.

Viele zuvor genutzte mtDNA SNaPshots Multiplexes bieten zwar eine gegenüber der Sequenzierung von HVI/HVII geringere PD [42], der hier genutzte 32 mtDNA SNaPshot liegt jedoch fast gleich auf (0,911 zu 0,974).

Wie bereits erfolgreich demonstriert wurde, können SNaPshots auch mit noch anspruchsvolleren SNaPshot Multiplexes, als die hier mit 32 mtDNA SNPs vorgestellten, durchgeführt werden [39; 41]. Multiplexes für bis zu 40 SNPs zeigen eine einwandfreie Funktion [54] und ermöglichen noch leistungsfähigere SNaPshots, die eine größere Hgn-Auflösung und somit PD bieten.

Das hier präsentierte Vorgehen in zwei Stufen (SNaPshot vor Sequenzierung) erlaubt die präzise und bedarfsgerechte Analyse von mtDNA bei einer größeren Zahl von Proben [9].

Den SNaPshot bei der forensischen Arbeit als Methode der ersten Wahl zu betrachten, könnte letztlich die HVI/HVII-Sequenzierung in den Hintergrund treten lassen. Durch das Hinzufügen von weiteren SNPs, insbesondere zur weiteren Differenzierung der großen Hgn, kann die Leistungsfähigkeit von SNaPshots noch weiter gesteigert werden und könnte die Sequenzierung in vielen Fällen vollkommen obsolet machen.

Gerade die großen Hgn müssen weiter untersucht werden, um sie kleinteiliger auflösen zu können. So können Hgn durch seltene Polymorphismen noch weiter individualisiert und dadurch eine höhere Diskrimination erreicht werden [41]. Die Zusammenstellung der SNPs für den SNaPshot wird sich dabei geographisch stark unterscheiden, da die Abstammung Vorkommen und Frequenz der Hgn einer Population bedingt.

Auch wenn die Analyse von mtDNA allein niemals für die positive Identifikation eines Individuums ausreicht, da abgesehen von Mutationen alle aus der gleichen maternalen Linie entspringenden Individuen aufgrund der rein maternalen Vererbung das gleiche mitochondriale Genom besitzen [20], ist die Untersuchung von mtDNA aus dem Repertoire der forensischen Genetik heute nicht mehr wegzudenken.

Insbesondere bei der Untersuchung stark degenerierten Spurenmaterials birgt die Analyse von mtDNA großes Potenzial, was unter anderem durch den Einsatz zur Identifikation der Opfer aber auch der Täter der Anschläge vom 11. September 2001 eindrucksvoll bewiesen werden konnte [20].

Mit der hier vorliegenden Arbeit konnte das Potenzial des 32 mtDNA SNaPshots erneut belegt und darüber hinaus die Relevanz von MAs der HVI für die forensische Arbeit gezeigt werden. Es erscheint möglich, dass durch eine Kombination des beschriebenen SNaPshots und durch eine weitere Evaluation der ermittelten MAs die Sequenzierung der HVI langfristig obsolet werden könnte.

Wie erfolgreich diese sich auf die Realität übertragen lassen, bleibt abzuwarten.

Trotz der immensen Fortschritte ist die forensische Genetik jedoch nicht die alleinige Kraft, sondern lediglich ein Bestandteil im Zusammenspiel vieler Komponenten, die letztlich zur Ergreifung eines Täters führen. Sie ist jedoch die Kraft, die einen Tatverdacht erhärten oder auflösen kann [74].

5. Literaturverzeichnis

- [1] Alonso A, Albarrána C, Martínez P, García P, García O (2003) Multiplex-PCR of short amplicons for mtDNA sequencing from ancient DNA. *International Congress Series* 1239: 585-588
- [2] Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, et al. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465
- [3] Andersson SG, Kurland CG (1999) Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Curr Opin Microbiol* 2: 535-541
- [4] Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM, Howell N (1999) Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet* 23: 147
- [5] Aquadro CF, Greenberg BD (1983) HUMAN MITOCHONDRIAL DNA VARIATION AND EVOLUTION: ANALYSIS OF NUCLEOTIDE SEQUENCES FROM SEVEN INDIVIDUALS. *Genetics* 103: 287-312
- [6] Bar W, Kratzer A, Machler M, Schmid W (1988) Postmortem stability of DNA. *Forensic Sci Int* 39: 59-70
- [7] Behar DM, van Oven M, Rosset S, Metspalu M, Loogvali EL, Silva NM, et al. (2012) A "Copernican" reassessment of the human mitochondrial DNA tree from its root. *Am J Hum Genet* 90: 675-684
- [8] Berger C, Parson W (2009) Mini-midi-mito: adapting the amplification and sequencing strategy of mtDNA to the degradation state of crime scene samples. *Forensic Sci Int Genet* 3: 149-153
- [9] Brandstatter A, Parsons TJ, Parson W (2003) Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. *Int J Legal Med* 117: 291-298
- [10] Brandstatter A, Salas A, Niederstatter H, Gassner C, Carracedo A, Parson W (2006) Dissection of mitochondrial superhaplogroup H using coding region SNPs. *Electrophoresis* 27: 2541-2550
- [11] Brinkmann B (2004) Forensische DNA-Analytik. *Deutsches Ärzteblatt* 101: 2329-2335
- [12] Brown WM, George M, Jr., Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 1967-1971
- [13] Budowle B (1998) CODIS and PCR-Based Short Tandem Repeat Loci: Law Enforcement Tools. 2nd European Symposium on Human Interaction
- [14] Buselmaier W, Tariverdian G (2006) Humangenetik für Biologen. Springer-Verlag, Heidelberg.
- [15] Butler JM (2005) Forensic DNA Typing - Biology, Technology, and Genetic of STR Markers. Elsevier Academic Press, Amsterdam Boston Heidelberg London New York Oxford Paris San Diego San Francisco Singapore Sydney Tokyo, 2. Aufl.
- [16] Cann RL, Stoneking M, Wilson AC (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31-36
- [17] Chakraborty R, Stivers DN, Su B, Zhong Y, Budowle B (1999) The utility of short tandem repeat loci beyond human identification: implications for development of new DNA typing systems. *Electrophoresis* 20: 1682-1696
- [18] Coble MD, Just RS, O'Callaghan JE, Letmanyi IH, Peterson CT, Irwin JA, et al. (2004) Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med* 118: 137-146
- [19] Coble MD, Vallone PM, Just RS, Diegoli TM, Smith BC, Parsons TJ (2006) Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region. *Int J Legal Med* 120: 27-32
- [20] Edson SM, Ross JP, Coble MD, Parson TJ, Barritt SM (2004) Naming the Dead — Confronting the Realities of Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains. *Forensic Science Review* 16:
- [21] Eichmann C, Parson W (2008) 'Mitominis': multiplex PCR analysis of reduced size amplicons for compound sequence analysis of the entire mtDNA control region in highly degraded samples. *Int J Legal Med* 122: 385-388
- [22] Elson JL, Herrnstadt C, Preston G, Thal L, Morris CM, Edwardson JA, et al. (2006) Does the mitochondrial genome play a role in the etiology of Alzheimer's disease? *Hum Genet* 119: 241-254

- [23] Ge J, Eisenberg A, Budowle B (2012) Developing criteria and data to determine best options for expanding the core CODIS loci. *Investigative genetics* 3: 1
- [24] Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ (1985) Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature* 318: 577-579
- [25] Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476-1481
- [26] Grignani P, Peloso G, Achilli A, Turchi C, Tagliabracci A, Alu M, et al. (2006) Subtyping mtDNA haplogroup H by SNaPshot minisequencing and its application in forensic individual identification. *Int J Legal Med* 120: 151-156
- [27] Hares DR (2012) Expanding the CODIS core loci in the United States. *Forensic Sci Int Genet* 6: e52-54
- [28] Hartman H, Fedorov A (2002) The origin of the eukaryotic cell: a genomic investigation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1420-1425
- [29] Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H, Vijg J (2003) Aging and genome maintenance: lessons from the mouse? *Science* 299: 1355-1359
- [30] Hedges SB, Chen H, Kumar S, Wang DY, Thompson AS, Watanabe H (2001) A genomic timescale for the origin of eukaryotes. *BMC Evol Biol* 1: 4
- [31] Hekimi S, Guarente L (2003) Genetics and the specificity of the aging process. *Science* 299: 1351-1354
- [32] Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U (2000) Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 408: 708-713
- [33] Innocence Project (2013): Innocence Project. [cited 2013 26.05.2013]. Erreichbar unter: <http://www.innocenceproject.org>
- [34] Jeffreys AJ, Brookfield JF, Semeonoff R (1985) Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. *Nature* 317: 818-819
- [35] Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73
- [36] Johns DR (1996) The other human genome: mitochondrial DNA and disease. *Nat Med* 2: 1065-1068
- [37] Katsanis SH, Wagner JK (2012) Characterization of the Standard and Recommended CODIS Markers*. *J Forensic Sci*: 169-172
- [38] Kline MC, Vallone PM, Redman JW, Duewer DL, Calloway CD, Butler JM (2005) Mitochondrial DNA typing screens with control region and coding region SNPs. *J Forensic Sci* 50: 377-385
- [39] Kohnemann S, Hohoff C, Pfeiffer H (2009) An economical mtDNA SNP assay detecting different mitochondrial haplogroups in identical HVR 1 samples of Caucasian ancestry. *Mitochondrion* 9: 370-375
- [40] Kohnemann S, Pennekamp P, Schmidt PF, Pfeiffer H (2010) qPCR and mtDNA SNP analysis of experimentally degraded hair samples and its application in forensic casework. *Int J Legal Med* 124: 337-342
- [41] Kohnemann S, Pfeiffer H (2011) Application of mtDNA SNP analysis in forensic casework. *Forensic Sci Int Genet* 5: 216-221
- [42] Kohnemann S, Sibbing U, Pfeiffer H, Hohoff C (2008) A rapid mtDNA assay of 22 SNPs in one multiplex reaction increases the power of forensic testing in European Caucasians. *Int J Legal Med* 122: 517-523
- [43] Kondo N, Nikoh N, Ijichi N, Shimada M, Fukatsu T (2002) Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14280-14285
- [44] Loogvali EL, Roostalu U, Malyarchuk BA, Derenko MV, Kivisild T, Metspalu E, et al. (2004) Disuniting uniformity: a pied cladistic canvas of mtDNA haplogroup H in Eurasia. *Mol Biol Evol* 21: 2012-2021
- [45] Lopez-Garcia P, Moreira D (1999) Metabolic symbiosis at the origin of eukaryotes. *Trends in biochemical sciences* 24: 88-93
- [46] Madea B, Dettmeyer R (2007) *Basiswissen Rechtsmedizin*. Springer, Heidelberg. S. 273
- [47] Martin W, Muller M (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392: 37-41

- [48] Martin W, v. Kowallik K (1999) Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'U6 ber Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche'. *Eur J Phycol*: 287–295
- [49] Moreira D, Lopez-Garcia P (1998) Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: the syntrophic hypothesis. *J Mol Evol* 47: 517-530
- [50] Mülhardt C (2009) *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg, 6. Aufl.
- [51] Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273
- [52] Nature Education (2010) Mitochondria. *Nature Education*. [cited 2012 2012.12.19]. Erreichbar unter: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/mitochondria-14053590>
- [53] Oberacher H, Niederstatter H, Pitterl F, Parson W (2006) Profiling 627 mitochondrial nucleotides via the analysis of a 23-plex polymerase chain reaction by liquid chromatography-electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry* 78: 7816-7827
- [54] Paneto GG, Kohnemann S, Martins JA, Cicarelli RM, Pfeiffer H (2011) A single multiplex PCR and SNaPshot minisequencing reaction of 42 SNPs to classify admixture populations into mitochondrial DNA haplogroups. *Mitochondrion* 11: 296-302
- [55] Parson W, Dur A (2007) EMPOP--a forensic mtDNA database. *Forensic Sci Int Genet* 1: 88-92
- [56] Parson W, Roewer L (2010) Publication of population data of linearly inherited DNA markers in the *International Journal of Legal Medicine*. *Int J Legal Med* 124: 505-509
- [57] Pfeiffer H, Forster P, Ortman C, Brinkmann B (2001) The results of an mtDNA study of 1,200 inhabitants of a German village in comparison to other Caucasian databases and its relevance for forensic casework. *Int J Legal Med* 114: 169-172
- [58] Quintans B, Alvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A (2004) Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Sci Int* 140: 251-257
- [59] Robin ED, Wong R (1988) Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J Cell Physiol* 136: 507-513
- [60] Salas A, Coble M, Desmyter S, Grzybowski T, Gusmao L, Hohoff C, et al. (2012) A cautionary note on switching mitochondrial DNA reference sequences in forensic genetics. *Forensic Sci Int Genet* 6: e182-184
- [61] Sanchez JJ, Borsting C, Morling N (2005) Typing of Y chromosome SNPs with multiplex PCR methods. *Methods Mol Biol* 297: 209-228
- [62] Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467
- [63] Sapp J (2005) The prokaryote-eukaryote dichotomy: meanings and mythology. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 69: 292-305
- [64] Satoh M, Kuroiwa T (1991) Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Experimental cell research* 196: 137-140
- [65] Searcy DG (2003) Metabolic integration during the evolutionary origin of mitochondria. *Cell Res* 13: 229-238
- [66] Singer-Sam J TR, Riggs AD (1989) Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications: A Forum for PCR Users* 3:
- [67] Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* 402: 371-372
- [68] Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595
- [69] Vallone PM, Just RS, Coble MD, Butler JM, Parsons TJ (2004) A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int J Legal Med* 118: 147-157

- [70] Vellai T, Takacs K, Vida G (1998) A new aspect to the origin and evolution of eukaryotes. *J Mol Evol* 46: 499-507
- [71] Wallace DC, Brown MD, Lott MT (1999) Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238: 211-230
- [72] Wallin IE (1927) *Symbiogenesis and the Origin of Species*. Bailliere, Tindall & Cox, London.
- [73] Wei YH, Lee HC (2002) Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. *Exp Biol Med (Maywood)* 227: 671-682
- [74] White JH, Lester D, Gentile M, Rosenbleeth J (2011) The utilization of forensic science and criminal profiling for capturing serial killers. *Forensic Sci Int* 209: 160-165
- [75] Woese CR, Fox GE (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5088-5090
- [76] Woese CR, Kandler O, Wheelis ML (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 4576-4579

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 - Populationen und typische Haplogruppen	27
Tabelle 2.1 - PCR Primer-Sequenzen, entnommen aus Köhnmann et al. [39]	33
Tabelle 2.2 - Konzentration für PCR- und SNaPshot Multiplex in μM , entnommen aus Köhnmann et al. [39]. Ein R zeigt an, dass der SNaPshot Primer am rückwärts gewandten Strang der mtDNA anknüpft. Der erste Buchstabe vor der SNP Position stellt den jeweiligen SNP der rCRS entsprechend dar, der zweite Buchstabe eine mögliche Mutation.....	34
Tabelle 2.3 - SNaPshot Primer Konfiguration, entnommen aus Köhnmann et al. [39].	35
Tabelle 2.4 - PD der 'Mitominis' nach Eichmann und Parson [21]	51
Tabelle 3.1 - Ergebnisse der SNaPshot und HVI Analyse	54
Tabelle 3.2 - Ergebnisse der Haplogruppe Zuordnung, die Kumulation entsteht aus den einzelnen Anteilen der Haplogruppen.....	55
Tabelle 3.3 - Überblick: Mitomini I	58
Tabelle 3.4 - Haplogruppen in Mitomini I.....	58
Tabelle 3.5 - Überblick Mitomini II	59
Tabelle 3.6 - Haplogruppen in Mitomini II.....	59
Tabelle 3.7 - Überblick Mitomini III	60
Tabelle 3.8 - Haplogruppen in Mitomini III.....	60
Tabelle 3.9 - PD der Mitominis I-III für die Haplogruppen.....	61
Tabelle 3.10 - Mini-Amplikon X der einzelnen Haplogruppen im Vergleich.....	63
Tabelle 3.11 - Mini-Amplikon X der einzelnen Haplogruppen im Vergleich zu Mitomini I-III nach Eichmann und Parson [21]	64

7. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 - Die Wasserstoff-Hypothese, verändert nach: [3]	13
Abb. 1.2 - Die Synthrophie-Hypothese, verändert nach [3]	13
Abb. 1.3 - Die Ox-Tox-Hypothese, verändert nach: [3]	14
Abb. 1.4 - Die Atmungskette, verändert nach: Nature Education [52]	15
Abb. 1.5 - Das mitochondriale Genom, die Abkürzungen stehen für die jeweils dort kodierte RNA und Proteine [15, S. 243]	20
Abb. 1.6 - HVI, HVII und HVIII Region [15, S. 255]	21
Abb. 1.7 - Mini Amplikons (MA), Mitominis genannt, wie von Eichmann und Parson beschrieben [21] ..	24
Abb. 1.8 - „Out of Africa“ und die Verbreitung der mtDNA Hgn (Darstellung entnommen aus: Genealogy by Genetics, Ltd. , Family Tree DNA)	25
Abb. 2.1 - Der PCR-Zyklus	37
Abb. 2.2 - Die HVI-Sequenzierung im Überblick	39
Abb. 2.3 - SNaPshot Arbeitsablauf	41
Abb. 2.4 - Elektropherogramm, Haplogruppe Un	46
Abb. 2.5 - Haplogruppen Entscheidungsbaum: Positionsnummern der Mutation dem rCRS folgend; Haplogruppen mit * können in weitere Subgruppen unterteilt werden.....	48
Abb. 2.6 - Automatische Zuweisung von Haplogruppen durch Excel.....	49
Abb. 2.7 - Die PD [42]	50
Abb. 2.8 - Mms nach Eichmann und Parson [21], die 19 variabelsten Bereiche sind hervorgehoben.....	51
Abb. 2.9 - Virtuelle Mini-Amplikons zur Datenanalyse.....	52
Abb. 3.1 - Haplogruppen-Verteilung	56
Abb. 3.2 - Haplotypen-Verteilung der einmaligen oder häufiger/gleich 2-mal vorhandenen sowie der AS entsprechenden Proben	57
Abb. 3.3 - PD der Mitominis I,II und III nach Eichmann und Parson [21]	62
Abb. 3.4 - Mini-Amplikons und Mitominis im Vergleich.....	65

Lebenslauf

Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere Frau Univ.-Prof. Dr. med. Heidi Pfeiffer, die mir die Möglichkeit dieser Arbeit an Ihrem Institut eröffnet und mir darüber hinaus geholfen hat, die Hürden auf dem Weg dorthin zu überwinden.

Herrn Dr. rer. med. Stephan Köhnemann danke ich für die umfangreiche wissenschaftliche Betreuung bei der Durchführung der Laborarbeiten, der späteren Auswertung und Interpretation der Ergebnisse.

Frau Dr. Osada danke ich herzlich für Ihre tatkräftige Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Mein herzlicher Dank gilt außerdem Frau Marianne Schürenkamp, die im Labor immer Zeit für meine Fragen gefunden hat.

Ein großer Dank gebührt darüber hinaus allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin, die mir die Arbeit dort stets angenehm gestaltet haben.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die mich bei dieser Arbeit immer unterstützt hat und meiner Freundin Gundula, die mich davon überzeugt hat diese Arbeit zu vollenden.

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillatum
ADP	Adenosindiphosphat
AFDIL	Armed Forces DNA Identification Laboratory
AS	Anderson Sequence
ATP	Adenosintriphosphat
bp	base pair (<i>Basenpaar</i>)
C	Cytosin
CE	Capillary Electrophoresis (<i>Kapillarelektrophorese</i>)
CODIS	Combined DNA Index System
CRS	Cambridge Reference Sequence
rCRS	revised Cambridge Reference Sequence
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
ddNTP	Dideoxynukleotidtriphosphat
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNS	Deoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMPOP	European DNA Profile Group mtDNA Population Database
Exo	Exonuklease
FBI	Federal Bureau of Investigation
FWD	forward (<i>vorwärts</i>)
G	Guanin
Hg	Haplogruppe
Ht	Haplotyp
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HVI	Hypervariable Region I
HVII	Hypervariable Region II

HVIII	Hypervariable Region III
H ₂	Wasserstoff
MLP	Multi Locus Probe
mtDNA	mitochondriale DNA
mtDNS	mitochondriale DNS
MA	Mini-Amplikon
Mm	Mitomini
mVR	Mini Variable Region
nDNA	nukleäre DNA
nDNS	nukleäre DNS
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PD	Power of Discrimination
rCRS	revised Cambridge Reference Sequence
REV	reverse (<i>rückwärts</i>)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonucleic Acid
RNS	Ribonukleinsäure
tRNA	transfer RNA
tRNS	transfer RNS
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SLP	Single Locus Probe
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
sol.	solutio (<i>Lösung</i>)
STR	Short Tandem Repeat
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
tris	tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan
VNTRS	Variable Number of Tandem Repeats
w/v	Weight per Volume