

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Variabilität der mitochondrialen Genloci nt00073 und nt16519
im populationsgenetischen Vergleich - eine Untersuchung anhand von RFLP- und
LightCycler-Daten

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von..... Ursula Szibor-Kriesen
aus.....Haldensleben
Magdeburg.....2002

Dokumentationsblatt

bibliographische Beschreibung

Szibor-Kriesen, Ursula:

Variabilität der mitochondrialen Genloci nt00073 und nt16519 im populationsgenetischen Vergleich - eine Untersuchung anhand von RFLP- und LightCycler-Daten. - 2002. - 73 Bl.: 14 Abb., 19 Tab.

Kurzreferat

Ein Ziel dieser Arbeit sollte es sein, Populationen anhand ihres mitochondrialen (mt) Erbgutes miteinander zu vergleichen. Ein weiteres Ziel war die Vorstellung der LightCycler-Technik in der forensischen MtDNA-Analyse.

Die beiden mtLoci nt00073 und nt16519 wurden untersucht. Sie sind in der zentraleuropäischen Population hochvariabel. Die Transition A→G am Locus nt00073 kreiert einen Schnittort für *Apa*L1, die Transition T→C am Genort nt16519 einen *Hae*III-Schnittort. Die Polymorphismen können anhand der RFLP-Technik leicht nachgewiesen werden. Außerdem kam die innovative LightCycler-Technik zur Anwendung, um diese SNPs zu identifizieren, die auf der Analyse von Schmelzkurven basiert.

Es wurden Proben von 150 deutschen, je 100 syrischen, japanischen, vietnamesischen und peruanischen sowie 60 afrikanischen Individuen auf die Genorte nt00073 und nt16519 hin miteinander verglichen. In der deutschen und syrischen Population wurde eine hohe Frequenz des Allels A am nt00073-Locus gefunden. Dieses Allel ist selten oder fehlt sogar völlig in den Proben aus Asien, Afrika und Südamerika. Die Transition T→C am Locus nt16519 ist in allen Populationen häufig. Die Haplotypisierung der Loci nt00073 und nt16519 liefert ein hohes Differenzierungspotenzial in der deutschen und syrischen Population, da hier beide Genorte sehr polymorph sind. Die LightCycler-Methode ermöglicht eine schnelle und präzise Arbeitsweise.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	5
1. Einleitung.....	6
1.1. Besonderheiten der mitochondrialen DNA (mtDNA), ihre forensische Bedeutung und Entwicklungsstand der forensischen mtDNA-Analysetechniken.....	6
Charakter der Mitochondrien und ihrer DNA	6
Zur Genetik der mtDNA und deren forensischer Bedeutung.....	8
1.2. Populationsgenetische Untersuchungen und deren Bezug zu forensischen Zielen	11
1.3. Zur Auswahl der variablen mt- Loci nt00073 und nt16519 zum Untersuchungsgegenstand in dieser Arbeit	13
1.4. Methodische Grundlagen der Untersuchung: RFLP- und LightCycler-Technik.....	14
Restriktionstest	14
LightCycler-Untersuchungen	14
1.5. Alternative Labormethoden zur Analyse mitochondrialer SNPs	17
Minisequencing.....	17
Pyrosequencing.....	18
1.6. Zielstellung der Arbeit.....	19
2. Material und Methoden.....	21
2.1. Untersuchte Populationen.....	21
2.2. Präparations- und Analysetechniken	21
DNA-Präparation.....	21
Amplifikation mitochondrialer DNA.....	22
RFLP-Analyse der PCR-Produkte	23
Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	23
Elektrophoresebedingungen zur Kontrolle von PCR- beziehungsweise Spaltprodukten.....	24
Silberfärbung von DNA-Fragmenten in PAA-Gelen.....	24
Anwendung der LightCycler Technik.....	24
LightCycler-Analyse des Locus nt00073.....	25
Protokoll der Amplifikation	27
LightCycler-Analyse des Locus nt16519.....	27
Protokoll der Amplifikation	29
Feinchemikalien, Enzyme und Kits	29
Geräte / Verbrauchsmaterialien	30
2.3. Statistische Berechnungen zu den Populationsstudien.....	32

3.	Ergebnisse	33
3.1.	Ergebnisse des Vergleiches von zwei Methoden zur Analyse mitochondrialer SNPs	33
	Ergebnisse der RFLP-Analyse	33
	Ergebnisse der Etablierung LightCycler-Analyse für die SNPs nt00073 und nt16519.....	34
	Vergleichende Untersuchungen an DNA-Proben mit verschiedenen mtHaplotypen	38
3.2	Ergebnisse der Populationsstudien	38
	Analysenergebnisse zu den mitochondrialen SNPs nt00073 und nt16519 mit Hilfe der Restriktionsenzyme <i>Apa</i> L1 und <i>Hae</i> III	38
	Ergebnisse der Untersuchung der deutschen Bevölkerung	38
	Ergebnisse der Untersuchung der syrischen Bevölkerung	39
	Ergebnisse der Untersuchung der japanischen Bevölkerung	39
	Ergebnisse der Untersuchung der vietnamesischen Bevölkerung	40
	Ergebnisse der Untersuchung der peruanischen Bevölkerung	40
	Ergebnisse der Untersuchung der afrikanischen Bevölkerung	40
3.3.	Vergleich verschiedener ethnischer Gruppen	41
	Statistische Grundlagen	41
	Haplotypenverteilung und X^2 -Verteilung	41
	Unterschiede zwischen den Populationen	43
	Power of Discrimination	44
4.	Diskussion	46
4.1.	Zur forensischen Bedeutung von mitochondrialen Polymorphismen	46
	Die Restriktionsanalyse	49
	Verwendbarkeit der Befunde für den Genlocus nt00073 im Kontext der forensischen Medizin	49
	Verwendbarkeit der Befunde für den Genlocus nt16519 im Kontext der forensischen Medizin	51
	Analyse des Haplotyp nt00073/ nt16519 in der RFLP-Technik	52
	Zur Sensitivität und Spezifität der RFLP- und LightCycler-Untersuchung	52
	Evaluation der Ergebnisse aus der LightCycler-Untersuchung	53
4.2.	Populationsgenetische Hintergründe	53
5.	Zusammenfassung und Ausblick	58
6.	Literaturverzeichnis	60
7.	Anhang	71
	Danksagung	71
	Erklärung	72
	Bildungsweg	73

Abkürzungsverzeichnis

A, C, G, T	Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin
APS	Adenosin-5-Phosphosulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
(CA) _n -Repeat	3'-D-Loop-(CA) _n -Repeat (nt514-nt523)
D-Loop	mitochondriale Kontrollregion (displacement loop)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNDP	Desoxynucleotiddiphosphat
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Na ₂ -Salz
Fa.	Firma
HV	hypervariable Region
mt	mitochondrial
nt	nucleotide
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	1,4-di(1-oxo-2-propenyl)-piperazin (Diacrylyl-piperazin)
PPi	Pyrophosphat
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	single nucleotide polymorphism
STR	short tandem repeat
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TEMED	1,2-Bis-(dimethylamino)-ethan (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin)
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer RNA
v/v	Volumen per Volumen (volume per volume)

1. Einleitung

1.1. Besonderheiten der mitochondrialen DNA (mtDNA), ihre forensische Bedeutung und Entwicklungsstand der forensischen mtDNA-Analysetechniken

• Charakter der Mitochondrien und ihrer DNA

Humane Zellen enthalten neben der nukleären DNA zusätzliche Erbinformationen in den Mitochondrien. Zahlreiche Erkrankungen werden in Zusammenhang gebracht mit Mutationen der mtDNA (Mitochondriopathien) und geben einen Anhalt für die komplexen Funktionen dieser Zellelemente [Huizing et al. (1996), Kirches et al. (1998), Poulton et al. (1992, 1998), Taanman et al. (1997), Wallace (1999), Walter (1983), Yang et al. (1995)]. Die Mitochondrien sind als Zellorganellen für die oxidative Phosphorylierung verantwortlich und sorgen so für die Energieversorgung der Zelle [Saraste (1999)]. Sie werden auch als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet. Außerdem spielen Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei der Alterung und der Apoptose von Zellen [Krysko et al. (2001), Zimmermann et al. (2001)]. Neben den erwähnten pathogenen Varianten der mitochondrialen Erbinformation, weisen die Mitochondrien auch eine natürliche, nicht pathogene Variabilität auf. Die Untersuchung der Variabilität der mtDNA gehört zu den Inhalten der hier vorgelegten Arbeit. Mitochondrien, so wird vermutet, sind in die eukaryoten Zellen eingewanderte farblose, aerobe Bakterien. Andersson et al. (1998) konnten zeigen, dass ein enges verwandtschaftliches Verhältnis zu den heutigen Rickettsien (*R. prowazekii*) besteht. Gray et al. (1999) argumentierten, dass es eine Ursprungszelle gab, die die Grundlage für alle in heutigen Eukaryoten existierenden Mitochondrien bildet, und dass diese Zellorganelle zum gleichen Zeitpunkt in die Zelle einwanderte zu dem der Zellkern entstanden ist. Ein großer Teil der Mitochondrien-Gene ist im Laufe der Evolution in den Zellkern umgelagert worden [Sorenson und Fleischer (1996)]. Der Rest der DNA dieser Bakterien ist aber im Laufe dieser Symbiose als eigenständiger Bestandteil in den Mitochondrien verblieben. Ein Teil dieser DNA kann als forensisch wertvoller Informationsträger genutzt werden. Die mtDNA ist ein doppelsträngiges, geschlossen-circuläres Molekül. Hinsichtlich der Zusammensetzung der beiden mtDNA-Stränge gibt es wichtige Unterschiede. Man unterscheidet zwischen einem Pyrimidin-reichen L-Strang (L= light, engl. leicht) und einem Purin-reichen H-Strang (H=heavy, engl. schwer). Seine Länge beträgt nach der so genannten Cambridge Reference Sequence (CRS) 16569

Basenpaare (bp). Anderson et al. (1981) bestimmten die komplette mtDNA-Nucleotidsequenz. Sie wird seitdem als Bezugssequenz für alle Angaben, die sich auf die mtDNA beziehen, benutzt. Für die Charakterisierung einer mtDNA-Sequenz wird gewöhnlich die Abweichung von der CRS, auch Anderson-Sequenz genannt, angegeben. An der CRS orientieren sich alle topographischen Angaben auf der mtDNA, zum Beispiel die Lokalisierung von Einzelbasen, Genen, Mutationen, Primern usw.

Die mtDNA enthält die kodierenden Bereiche, die den Hauptanteil des Moleküls ausmachen, und die nicht-kodierenden Abschnitte. Erstgenannte sind sehr kompakt organisiert und kodieren für 37 Gene. Unter den nicht-kodierenden Abschnitten gibt es neben mehreren kleinen Sequenzen nur einen größeren Bereich, den sogenannten D-Loop (displacement loop) oder auch mitochondriale Kontrollregion. Sie wird von den Genen der tRNA für Prolin und Phenylalanin flankiert und ist 1122 bp lang. Die nicht kodierenden Sequenzen in der mtDNA sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Die Kontrollregion ist der Abschnitt der mtDNA, der die höchste Variabilität aufweist [Uphold & Dawid (1977)]. Die sogenannten hypervariablen Regionen (HV1-HV3) zeigen zahlreiche Unterschiede zwischen verschiedenen Individuen [Aquadro & Greenberg (1983), Cann und Wilson (1983)]. Die HV1, HV2 [Vigilant et al. (1989)] und HV3 [Lutz et al. (1997, 2000)] sind Regionen gesteigerten Interesses in der forensischen Medizin und Populationsgenetik [Salas (2000), Budowle et al. (1999)]. Sie liefern grundlegende Erkenntnisse hinsichtlich der Verwandtschaft der Hominiden, der Evolution des Menschen [Cann et al. (1982, 1984, 1987)] und der Tiere [Brown et al. (1979, 1980, 1982), Brown et al. (1980)] sowie auch der Besiedelung der Erde durch die Menschen. [Renfrew et al. (1992), Brown et al. (1980), Ingman et al. (2000), Pesole et al. (1992), Gray et al. (1999), Forster (1996, 2001)]. Im HV3-Bereich liegt auch der schon länger bekannte polymorphe CA-Repeat [Bodenteich et al. (1992)]. Seine Variabilität lässt sich für die forensische Individualisierung effektiv nutzen [Szibor et al. (1997)]. Die in dieser Arbeit untersuchten Loci liegen in der Region HV2 (nt00073) und außerhalb der HV (nt16519).

Tabelle 1: Lage nichtkodierender Regionen im mitochondrialen Genom. Stop-Codons des mitochondrialen Codes sind kursiv gedruckt und unterstrichen. Die als forensisch bedeutsam angesehenen Regionen im D-Loop sind in den Zeilen 13.0 - 13.4 ausgewiesen.

Die Informationen sind in der Datenbank <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html> <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html> zugänglich.

	Länge [bp]	Position in der CRS	Basenfolge	Anmerkungen
1	2	03305 – 03306	AC	
2	2	04261 – 04262	TA	
3	1	04401	T	
4	1	05511	A	
5	7	05580 – 05586	<u>TAA</u> CAG C	
6	12	05591 – 05902	TCA CCC CCA CTG	
7	3	07442 - 07444	TAG	
8	28	08267 - 08294	TAG <u>CACCCCCTCT</u> <u>ACCCCCTCT</u> AGA GCC	intergenische Region <i>COH/tRNA^{LYS}</i> <u>mit 9bp Repeat</u>
9	1	08365	A	
10	1	09990	T	
11	1	10404	T	
12	4	14743 - 14746	ACCA	
13.0	1122	16024 - 00576		D-Loop
13.1	380	00029 - 00408		HV2
13.2	475	16024 - 16498		HV1
13.3	168	00409 - 00576		HV3
13.4	10	00514 - 00523	(CA) _n	CA-Repeat

- **Zur Genetik der mtDNA und deren forensischer Bedeutung**

Die Amplifikation chromosomaler DNA-Polymorphismen, die eine Längenvariabilität auf Basis von Short Tandem Repeats (STR) aufweisen, stellt zurzeit die bevorzugte Methode

der forensischen Identifizierung dar. Zur Lösung einer Identifizierungsaufgabe in der forensischen Medizin genügt es im Allgemeinen, PCR-Untersuchungen an etwa acht bis zwölf unterschiedlichen chromosomalen Loci durchzuführen, um eine Person oder eine Spur eindeutig zu individualisieren. Diese Methode macht sich die Variabilität der chromosomalen DNA zunutze. Sie reicht zur Aufklärung der überwiegenden Anzahl der forensischen Fälle aus. Trotzdem werden immer wieder Beispiele bekannt, bei denen die herkömmliche Methodik der DNA-Analyse nicht genügt, um eine Spur zu identifizieren. Mitochondriale DNA kann eine ergänzende oder alternative Informationsquelle sein. Die Untersuchung der mtDNA besitzt gegenüber der STR-Typisierung in verschiedener Hinsicht Vorteile: Während pro Zelle nur ein bis zwei Moleküle mit einem chromosomalen Merkmal vorliegen, gibt es einige tausend mtDNA-Kopien. [Bogenhagen und Clayton (1974), Wilson et al. (1993)]. Aufgrund der zirkular-geschlossenen Form der mtDNA-Moleküle kann man davon ausgehen, dass sie vor dem postmortalen Abbau durch Exonukleasen besser geschützt ist als die chromosomale DNA. MtDNA kann so insbesondere in Knochen [Boles et al.(1995), Corach et al. (1997), Gill et al. (1994), Holland et al. (1993), Lutz et al. (1996), Yamamoto et al. 1998)] oder Zähnen [Ginther et al. (1998), Merriwether et al. (1994), Pfeiffer et al. (1998), Yamada et al. (1997)] noch nach sehr langen Liegezeiten [Monsalve et al. (1996), Weichhold et al. (1998)], sogar an prähistorischen Knochenfunden [Hagelberg et al. (1989, 1993), Handt et al. (1998), Krings et al.(1997), Boles et al. (1995), Oota (1995), Stone et al. (2001), Stoneking et al. (1991, 1992)] erfolgreich analysiert werden. Doch auch aus Überresten von Weichteilen, wie zum Beispiel dem Gehirn, kann bei geeigneter Lagerung mtDNA gewonnen werden [Paabo et al. (1988)]. Dabei können interessante und oft rätselhafte Geschichten und Anekdoten der Vergangenheit aufgeklärt werden [Sullivan (1994), Weichhold et al. (1998), Stone et al. (2001)]. Die maternale Vererbung und das Fehlen von Rekombination gehören zu den Besonderheiten der mtDNA [Giles et al. (1980), Yaffe (1999), Ohno (1997)]. Auch diese Tatsache kann Grundlage dafür sein, dass die mitochondrialen Polymorphismen in bestimmten Situationen als Identifizierungsmarker den nukleären Markern überlegen sind. Für Spuren ohne unmittelbare Vergleichsmaterialien von mutmaßlichen Spurenverursachern können (eventuell sogar entfernte) Verwandte aus mütterlicher Vererbungslinie das Vergleichsmaterial liefern [Yamamoto et al. (1998), Allen et al. (1998)]. (In der Kriminalistik kommt diese Besonderheit aus rechtlichen Gründen allerdings kaum für Täterspuren sondern eher für Opferspuren in betracht.) Verwandtschaftsnachweise beziehungsweise -ausschlüsse können sicher geführt werden. Im Gegensatz zu Untersuchungen an Kern-DNA-Systemen führen bei der

mitochondrialen Analytik illegitime Vaterschaften nicht zu einem Fehlerpotenzial, weil väterliche Vererbung nicht stattfindet und somit auch nicht als Untersuchungskriterium in Frage kommt.

Die mütterliche Vererbung von Mitochondrien [Giles et al. (1980)] und die forensische Anwendbarkeit von mt-Markern ist seit langem bekannt. Untersuchungen zur Konstanz der mtDNA-Vererbung unter forensischen Gesichtspunkten sind durchgeführt worden und haben gezeigt, dass trotz erhöhter Mutabilität des mt-Genoms forensische Aussagen getroffen werden können. Voraussetzung dafür ist eine stets kritische Wertung der Befunde. Mutationen treten in mtDNA fünf bis zehn Mal häufiger auf als in chromosomaler DNA [Cann et al. (1987), Lundstrom et al. (1992)]. Der Grund dafür ist vorwiegend durch das Fehlen eines mitochondrialen Reparatursystems erklärbar. Mutationen in einzelnen Mitochondrien manifestieren sich zunächst in Form einer Heteroplasmie, d.h. es existieren unterschiedliche Mitochondrienpopulationen nebeneinander [Bendall et al. (1995), Comas et al. (1995)]. Die Mitochondrien eines Embryos lassen sich auf eine ganz geringe Ausgangszahl zurückführen. Die damit einhergehende, sogenannte "bottleneck selection" bei der mtDNA-Vererbung kann so im Verlauf von nur wenigen Generationen eine Umkehr der Populationsanteile bewirken [Howell et al. (1992, 1996)]. Als Konsequenz aus diesen Zusammenhängen für die forensische Praxis ist festzuhalten, dass mitochondrial geführte Verwandtschaftsausschlüsse sich auf Differenzen in mindestens drei mt-Loci gründen müssen.

Eines der Ziele dieser Arbeit soll es sein, Populationen anhand ihrer mitochondrialen Erbinformation zu vergleichen. Die Fragestellung ist, ob und mit welcher Sicherheit Rückschlüsse auf die Zugehörigkeit eines Spurenverursachers zu einer Population möglich ist.

Die natürliche Variabilität der mtDNA hält ein beträchtliches Informationspotenzial bereit. Die forensisch nutzbaren Informationen, die aus der mtDNA gewonnen werden können, verlangten von der Wissenschaft die Einführung zuverlässiger, schneller und gut handhabbarer Methoden zur Identifizierung von Spuren beziehungsweise anderer Proben. Bis heute wird dies häufig über den Weg der Sequenzierung bewerkstelligt. Auch die RFLP-Technik ist eine zuverlässige Methode, die zur Analyse von mtDNA genutzt wird [Brown et al. (1980, 1981)]. Andere mtDNA-Analysetechniken sind weitgehend unentwickelt. Dabei sind in anderen Wissenschaftszweigen wie der molekularen Humangenetik oder der Virologie bereits eine

Vielzahl von Methoden etabliert, die ohne Weiteres auch für die forensische mtDNA-Analyse einsetzbar wären, aber gegenwärtig, bis auf ganz wenige Ausnahmen im Bereich der Rechtsmedizin, nicht angewandt werden. Es ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit zu zeigen, dass neue Techniken auch im Bereich der forensischen Medizin ihren Platz haben. Ein Beispiel dafür ist die LightCycler-Technique™, die in Form eines Methodenvergleiches in dieser Arbeit Untersuchungsgegenstand ist. Der LightCycler findet Anwendung zum Nachweis von Einzelbasensubstitutionen (single-base-substitutions) zum Beispiel auf dem Gebiet der Diagnostik von viralen Erkrankungen [Read et al. (2001), Koenig et al. (2001)], in der Präimplantations- und Tumordiagnostik [Pals et al. (2001), Max et al. (2001)], in der forensischen Medizin zum Analysieren von Y-Chromosomen in Spuren [Lareu et al. (2001)] und zum Auffinden von molekularen Karzinommarkern [Schneider-Stock et al. (2001)]. In der medizinischen Genetik können mit Krankheiten assoziierte Gene gefunden werden [Toyota et al. (2000)]. Auch die Quantifizierung von Proben mit unbekannten Mengen DNA kann zuverlässig im LightCycler vorgenommen werden [Rasmussen et al. (1998), Sagner und Goldstein (2001)]. Ein weiterer Vorteil des LightCyclers ist die Möglichkeit, sehr kleine Proben nachweisen zu können [Wittwer et al. (1997)].

1.2. Populationsgenetische Untersuchungen und deren Bezug zu forensischen Zielen

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Populationen aus verschiedenen Regionen der Erde untersucht werden. Es wurden afrikanische, peruanische, japanische, deutsche, vietnamesische und syrische Populationen untersucht. Auf die Besonderheit, dass mtDNA ohne Rekombination von der Mutter auf den Nachwuchs vererbt wird, wurde bereits hingewiesen. Auf diese Weise sind die mtDNA-Moleküle in den Deszendenz-Reihen vom Grunde her identisch, Unterschiede stellen sich durch die auftretenden Mutationen ein. Die Anzahl der Differenzen zwischen mtDNA-Molekülen ist somit eine Funktion der Anzahl der Generationen. Analoges gilt übrigens auch für das Y-Chromosom.

In diesem Zusammenhang soll noch einmal darauf hingewiesen werden, dass der Nutzen der mtDNA für forensische Zwecke durch die relativ hohe Spontanmutationsrate eingeschränkt ist. Eine solche Untersuchung ist also nur dann sinnvoll, wenn mehrere Loci gleichzeitig untersucht werden [Paabo (1996)]. Viele wissenschaftliche und populärwissenschaftliche Publikationen wiesen in den letzten Jahren auf die neuen

Möglichkeiten der Evolutionsforschung mit nukleären, Y-chromosomalen und mitochondrialen DNA-Molekülen hin [Sykes (2000), Graff (2001)]. Diese Veröffentlichungen favorisieren die sogenannte out-of-africa-Theorie, nach der der homo sapiens von Afrika aus nach Asien expandierte [Renfrew et al. (2000)]. Von Sibirien wanderten Stämme vor ungefähr 20.000 Jahren nach Nordamerika. [Forster et al. (1996)] und von dort vor ca. 13.000 Jahren [nach Berechnungen von Dillehay et al. (1988) aus Forster et al. (1996)] weiter in Richtung Süden. Verbunden mit diesem Sachverhalt ist die Frage nach dem Ausmaß der Diversität der mtDNA in verschiedenen Populationen.

Die Aussicht, dass eine umfangreiche molekulare Analyse einer biologischen Spur nicht nur den Vergleich zu einem möglichen Verursacher zulässt, sondern im Falle der Defizienz von Vergleichsmaterialien Personenkreise bestimmter regionaler oder ethnischer Herkunft als Verursacher ausschließt oder einschließt, ist ein Ziel, das in der forensischen Medizin legitimerweise verfolgt wird. Die Feststellung signifikanter Unterschiede in der Frequenz bestimmter mitochondrialer Marker können demnach forensisch von Bedeutung sein, sofern die notwendigen Populationsdaten dazu erarbeitet worden sind. Die Möglichkeit, die gesamte D-Loop-Sequenz aufzeichnen zu können, ist aber gerade bei gealterten Spuren und Knochen mit degradierter DNA stark eingeschränkt. Es ist deshalb sinnvoll zu versuchen, charakteristische populationstypische mitochondriale Merkmale zu erkennen und für diese einfache Nachweistechiken zu etablieren, die ohne Vollsequenzierung des D-Loop auskommen. Angesichts der Schwierigkeit, aus degradierter DNA längere Abschnitte zu sequenzieren, ist auch das variable RFLP-Muster des mitochondrialen D-Loops von Interesse. Es eröffnet die Möglichkeit, auch bei schwierigster Spurenlage, durch Kombination von PCR und Restriktion genetische Marker von forensischer Bedeutung zu bestimmen. Es war deshalb Anliegen dieser Untersuchung, zwei hochgradig variable Restriktionsorte des D-Loops im Kontext mit einer Populationsstudie zu betrachten. Wittig et al. (2000) etablierten und unterhalten in Magdeburg eine zentraleuropäische Datenbank. Ähnlich der Y-chromosomalen [Roewer et al. (1996, 2001), Gill et al. (2001), Kayser et al. (1997)] könnte auf lange Sicht auch eine weltweite mt-Datensammlung daraus entstehen, die solche Befunde integriert.

1.3. Zur Auswahl der variablen mt-Loci nt00073 und nt16519 zum Untersuchungsgegenstand in dieser Arbeit

Für die forensische Medizin ist prinzipiell die Anwendung von DNA-Markern mit hohem PIC (Polymorphic Informative Content) von Interesse. Forensisch genutzte Marker der Chromosomen sind in ihrer großen Mehrzahl durch multiple Allelie gekennzeichnet. Sie können PIC-Werte bis zu 0.8 aufweisen. Im Zusammenhang damit steht ihre hohe Diskriminationskraft [engl. Power of Discrimination (PD)]. Im Gegensatz dazu haben bis auf ganz wenige Ausnahmen mt-Marker pro Locus nur zwei Allele. Das hohe Diskriminationspotenzial der mtDNA-Analyse basiert auf der Nutzung des gesamten mitochondrialen Haplotypes. Hier gehen im Normalfall die Sequenziererergebnisse der Bereiche der HV1 und HV2 ein. Vereinfachte Analysemethoden, wie sie auch mit dieser Arbeit gefördert werden sollen, beschränken sich jedoch auf die punktuelle Analyse einer Auswahl von einigen Loci. Bei einem solchen Vorgehen erfolgt die Auswahl der Loci nach deren Informationswert.

In der mitteleuropäischen Bevölkerung besitzt der in der HV2 gelegene Locus nt00073 die höchste Informativität [PD=ca. 0,5] (Auf die Angabe des PIC wird im Zusammenhang mit mtMarkern verzichtet, weil die PIC-Formel für dioploide Marker entwickelt wurde). Das konnte bereits aufgrund von Publikationen [Rousselet et al. (1998), Parson et al. (1998), Lutz et al. (1998)] und der Datenbank „D-loop-Base“ abgeschätzt werden. Des weiteren war zu Beginn dieser Arbeit bereits bekannt, dass der genannte Locus unter Japanern nicht beziehungsweise kaum polymorph ist [Seo et al. (1998)]. Die Auswahl des nt00073-Locus zur näheren Untersuchung ist somit begründet durch seine hohe PD in der deutschen Population und sein Potenzial zur ethnischen Differenzierung. Der Locus nt16519 ist bisher kaum untersucht. Er befindet sich im mtD-loop außerhalb der oft sequenzierten HV1 - HV3. Von den 1716 Sequenzen, die in Datenbank „D-loop-Base“ eingegeben wurden, ist der Bereich um nt16519 nur 252 mal untersucht worden. Die Angaben beziehen sich auf kaukasoide Populationen. Hierbei wird erkennbar, dass nt16519 in der mitteleuropäischen Population sehr polymorph ist. Literaturangaben zu anderen Populationen fehlen aber offenbar völlig. Die gemeinsame Untersuchung der genannten Loci in verschiedenen Populationen ist die Voraussetzung, um den Wert der Loci für forensische Individualisierungsaufgaben als auch zur

ethnischen Einordnung von zum Beispiel Spuren einschätzen zu können. Des weiteren ist die Untersuchung hochgradig polymorpher Loci für einen Methodenvergleich besonders geeignet.

1.4. Methodische Grundlagen der Untersuchung: RFLP- und LightCycler-Technik

- **Restriktionstest**

Zur Identifizierung der Loci nt00073 und nt16519 kamen zwei labortechnische Methoden zur Anwendung, die Restriktionsanalyse und die LightCycler-Technik. Über die Analyse mitochondrialer RFLPs in der forensischen Medizin gibt es bis jetzt noch wenige Veröffentlichungen [Michael (2000)]. Trotzdem stellen sie eine sichere und zuverlässige Möglichkeit dar, Mutationen nachzuweisen. In der molekularen Humangenetik ist diese Technik seit langem etabliert.

Durch die bereits vor dieser Arbeit vorliegenden Untersuchungsergebnisse war bekannt, dass die untersuchten Loci jeweils mit zwei Allelen in Erscheinung treten. Für den Locus nt00073 bedeutet dies im L-Strang A beziehungsweise G. Daraus folgt, dass das von der CRS abweichende Allel G in der Position nt00073 - nt00078 den *Apa*L1-Schnittort GTGCAC kreiert. Eine Transition im Locus nt00073 kann somit leicht durch Spaltung eines zuvor erzeugten PCR-Produkts gezeigt werden.

Eine Transition im Locus nt16519 von T zu C bildet den *Hae*III-Spaltort GGCC. Wiederum kann der Nachweis durch den Verdau eines PCR-Fragmentes geführt werden. Da die beiden untersuchten Loci dicht beieinander liegen, können beide Tests an einem 189bp langen Produkt untersucht werden.

- **LightCycler-Untersuchungen**

Der LightCycler der Firma Roche kombiniert eine schnelle PCR-Amplifikation und die anschließende Analyse des Ansatzes in einem Arbeitsschritt. Dem Auffinden von SNPs dient die Auswertung der Schmelzkurve (melting curve analysis) der untersuchten DNA. Die Proben werden in 20µl Glaskapillaren gefüllt. Zusätzlich zum PCR-Ansatz und der DNA werden zwei sequenzspezifische Oligonucleotide zugefügt. Beide fungieren als Sonden. Eines der

Oligonucleotide enthält am 5'-Ende ein Fluorophor. Das andere, in der Nachbarschaft bindende Oligonucleotid enthält am 3'-Ende Fluorescein. Nur wenn beide Sonden am PCR-Produkt binden, sind sie einander angenähert. In diesem Fall kann das vom Gerät abgegebene Licht das Fluorescein am 3'-Ende anregen und es kommt zu einem Energietransfer zwischen den beiden Fluorophoren. Die abgegebene Energie wird vom Fluorophor am 5'-Ende als Lichtsignal abgegeben und kann als fluorescence resonance energy transfer (FRET) registriert werden [Sagner et al. (1999)]. Die emittierte Energie ist proportional zur Konzentration der DNA in den Kapillaren und zur Temperatur. Während der Analyse der Schmelzkurve wird die Temperatur langsam erhöht. Entscheidend für die Analyse von SNPs ist die melting curve analysis. Diese findet parallel zur Amplifikation der Proben im Gerät statt.

Das Programm läuft wie folgt ab: Die Proben in den Glaskapillaren werden schnell auf eine hohe Temperatur erhitzt (in diesem Versuch 94°C für 3 Sekunden). Ziel dieser Temperaturerhöhung ist die Denaturierung der DNA. Im Anschluss daran erfolgt die Abkühlung ungefähr 5°C unterhalb der annealing Temperatur. Für die Ermittlung der Schmelzkurve erfolgt dann die langsame Erwärmung der Probe bei zum Beispiel 0,2°C pro Sekunde. Die hinzugefügten Sensoren schmelzen bei bestimmten charakteristischen Temperaturen vom DNA-Strang ab. Der Schmelzpunkt hängt von der Anzahl an G-C-Bindungen im DNA-Strang sowie von der Anzahl der Fehlpaarungen (mismatches) zwischen der DNA und den Sensoren ab. Die Schmelztemperatur ist im Voraus berechenbar, nicht selten kommt es jedoch zu Differenzen zwischen dem theoretischen und dem tatsächlichen Wert. Das Fluorimeter registriert einen rapiden Abfall der Fluoreszenz, wenn der spezifische Schmelzpunkt des Sensor-DNA-Strang-Hybrids erreicht wird. Der Energietransfer bricht ab. Mit Hilfe dieses Arbeitsschrittes können Mutationen beziehungsweise die Allele von SNPs aufgedeckt werden. Die Graphik der Abbildung 1 zeigt die Darstellung der Temperatur in der Abszisse und der Fluoreszenz in der Ordinate. Gemäß der oben beschriebenen Funktionsweise nimmt bei dieser Darstellung die Fluoreszenz mit steigender Temperatur ab. Für die Analyse der melting curve wird aber besser die Darstellung der ersten negativen Ableitung über der Zeit in der Y-Achse und der Temperatur in der X-Achse benutzt (Abbildung 2). Hier sieht man deutlicher die eigentlichen Schmelzpunkte. Sie werden durch Spitzen bei einer bestimmten Temperatur angezeigt.

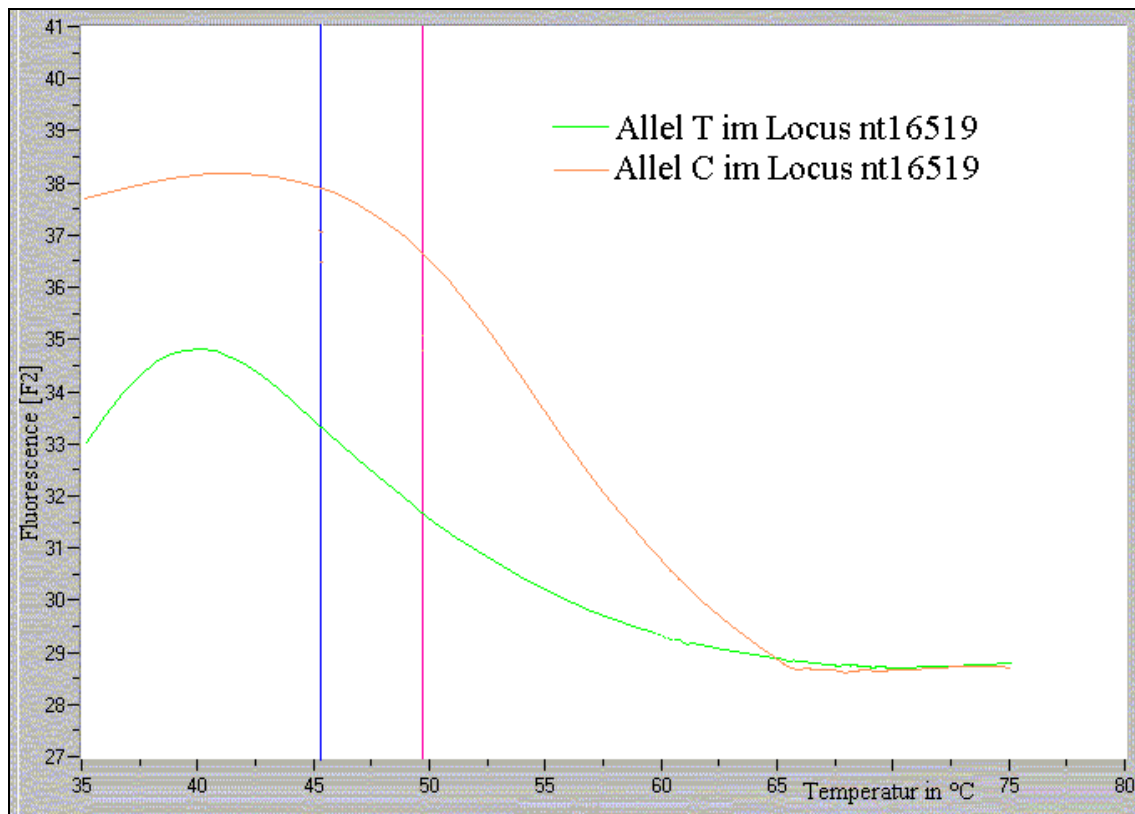


Abbildung 1: Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse am LightCycler anhand von ausgewählten Proben.

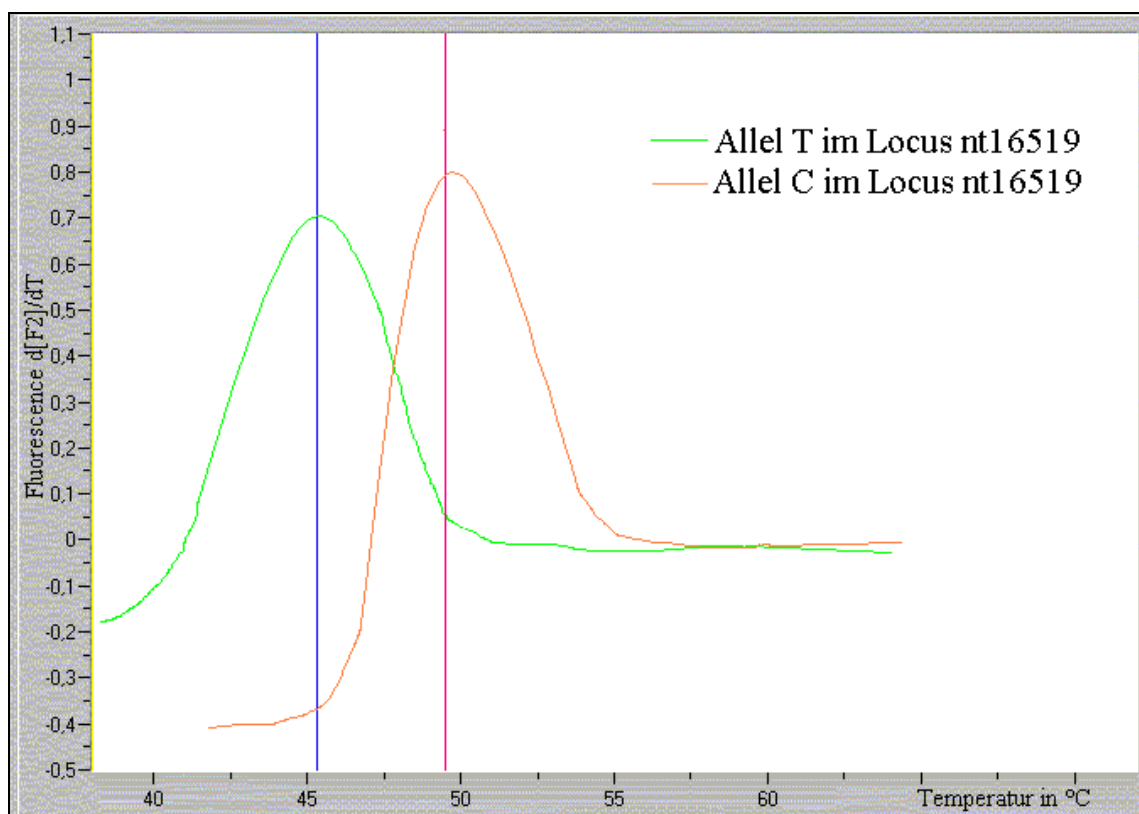


Abbildung 2: Erste negative Ableitung von Schmelzkurven im LightCycler. Diese Darstellung leitet sich aus den Schmelzkurven der Abbildung 1 ab.

1.5. Alternative Labormethoden zur Analyse mitochondrialer SNPs

Bei den in dieser Arbeit angewandten Techniken der RFLP- und der LightCycler-Analyse handelt es sich nur um zwei von mehreren Möglichkeiten. Es soll an dieser Stelle auf zwei interessante und richtungsweisende Alternativen zur vorgestellten Technik hingewiesen werden - auf das Mini- und das Pyrosequencing.

- **Minisequencing**

Die Methode des Minisequencings wird hier vorgestellt, weil sie eine Alternative zu den in der vorliegenden Arbeit verwandten Techniken darstellt. Sie ist selbst nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die „minisequencing primer extension-Technik“ wird zum Auffinden von Sequenzvarianten genutzt [Syvänen et al. (1999)]. Die PCR wird gefolgt von einer Immobilisation der PCR-Produkte. Im nächsten Schritt werden dem Reaktionsgemisch Primer hinzugefügt. Die Primer sind so entworfen, dass sie direkt vor dem 3'-Ende der zu untersuchenden Position enden. An diese Primer erfolgt jeweils die Extension mit einem einzigen markierten dNTP, der zum Kettenabbruch führt. Im Gegensatz zum herkömmlichen Sequenzieren werden in einer Arbeit von Tully et al. (1996) bis zu zwölf Polymorphismen untersucht, die bei verschiedenen Individuen eine hohe Diskriminationskraft haben. Das waren zehn Substitutionen und zwei Längenpolymorphismen, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.054 in britischen Kaukasiern vorkommen. Der Vorteil dieses Systems ist, dass die Reaktion an jeder Stelle, unabhängig von den den SNP umgebenden Sequenzen stattfinden kann. Sie ist unabhängig von Fehlpaarungen und dadurch besonders robust und genau.

Tully et al. (1996) betonten, dass das Minisequencing schon seit geraumer Zeit in forensischen Arbeiten unterschiedlichen Charakters verwendet werden kann. Eine parallele Untersuchung mehrerer Loci ist mit der Vier-Farbentechnik moderner Genanalyser und durch die Variation der Primer möglich. Von besonderem Vorteil ist, dass mit dieser Methode mehrere Hundert SNPs in einer Untersuchung nachgewiesen werden können [Watson (2000)]. Minisequencing mitochondrialer DNA ist eine zuverlässige und genaue Methode für die forensische Medizin [Morley et al. (1999)]. Laan et al (1995) nutzten das Minisequencing, um die Anzahl von Kopien eines Gens in einer Probenmischung zu ermitteln. Auch in der klinischen Genetik lässt sich das Minisequencing anwenden. Harju et al. (1993) stellten eine

Methode vor, mit Hilfe des Minisequencings einen genetisch determinierten α_1 -Antitrypsinmangel darzustellen.

- **Pyrosequencing**

Das Funktionsprinzip des Pyrosequencings beruht auf einer Abfolge von vier Schritten, die während der gesamten Zeit der Analyse nacheinander ablaufen. Im ersten Schritt wird ein Primer mit einsträngigem PCR-Produkt inkubiert. Dazu kommen die Enzyme DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase sowie Adenosin-5-Phosphorsulfat und Luciferin. Im Folgenden werden nacheinander die vier dNTPs einzeln hinzugefügt. An dieser Stelle wird das passende dNTP in die DNA eingefügt, wenn die gegenüberliegende Base komplementär ist. In diesem Fall kommt es zur Abspaltung von Pyrophosphat und zum Abbau durch die Luciferase unter Verbrauch von Luciferin (dritter Schritt). Zum Zeitpunkt der Zugabe des passenden dNTP entsteht ein Lichtsignal, das zur Menge des vorhandenen Pyrophosphats proportional ist. Das bedeutet, dass sowohl das entsprechende Nucleotid als auch die Dosis (heterozygot oder homozygot) durch das Lichtsignal erkannt werden kann. Die ebenfalls in der Lösung enthaltene Apyrase setzt nicht eingebaute dNTP und ATP schnell zu dNDP und AMP um und bereitet die Lösung auf das folgende dNTP vor (vierter Schritt) [Ronaghi (2000, 2001)].

Die Abbildung 3 verdeutlicht den Arbeitsvorgang im Pyrosequencing.

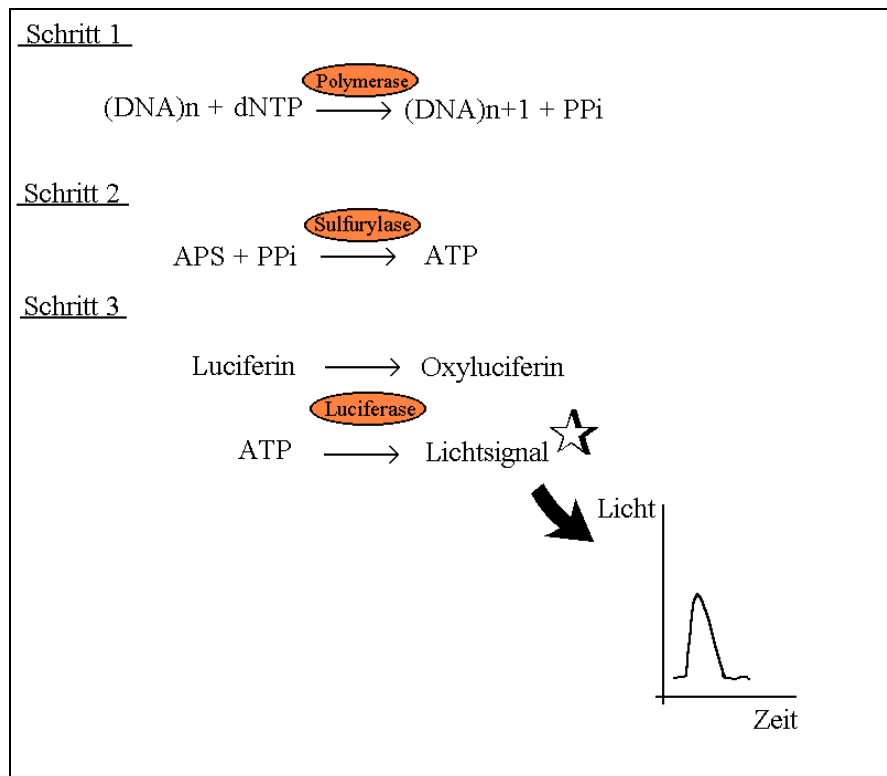


Abbildung 3: Die Graphik zeigt schematisch die Schritte 1 bis 3 des Pyrosequencing. In diesem Fall wird das Nukleotid in die DNA inkorporiert. Das so entstehende Pyrophosphat wird durch die Sulfurylase in ATP umgebaut, das dann die Reaktion von Luciferin in Oxyluciferin, durch die Luciferase vermittelt, in Gang setzt. Bei dieser Reaktion wird Energie in Form von Licht frei. Diese Energie kann durch einen Sensor registriert werden (dNTP = Desoxynukleotidtriphosphat, PPi = Pyrophosphat, APS = Adenosin-5-Phosphosulfat).

Andreasson et al. (2001) konnten zeigen, dass Pyrosequencing im Rahmen der Analyse von HV1, HV2 und der gesamten D-loop-Analyse eine sehr sensitive, schnelle und zuverlässige Untersuchung ermöglicht. Pyrosequencing ist somit ebenfalls zur SNP- und Mutationsanalyse geeignet [Nyrén et al. (1997)].

1.6. Zielstellung der Arbeit

In der forensischen Medizin besitzt die mtDNA-Analyse einen hohen Stellenwert. Neben den Aufgaben der Individualisierung von Proben und der Identifizierung von Skeletten via Verwandtschaftstest werden zunehmend auch Informationen zur ethnischen Zugehörigkeit

von menschlichen Spuren beziehungsweise Überresten wie zum Beispiel Skeletten erbeten. Hier gilt es, das Potenzial der mtDNA-Analyse weiter zu entwickeln.

In der deutschen Bevölkerung sind die Frequenzen der Transitionen nt00073 A→G und nt16519 T→C sehr hoch. Somit sind diese Loci in Bezug auf ihre Diskriminationskraft (PD) sehr wertvoll. In Anbetracht zunehmender Migration der Erdbevölkerung ist aus rechtsmedizinischer Sicht zu klären, welchen Informationswert die Untersuchung der genannten Loci besitzt, wenn Personen aus dem nichteuropäischen Raum involviert sind. Außerdem sollen die Loci hinsichtlich ihres Potenzials zur Erkennung der ethnischen Zugehörigkeit von Skeletten beziehungsweise anderen menschlichen Überresten geprüft werden. Eine Aufgabe dieser Arbeit war es somit, die Allelverteilung an den genannten Loci in verschiedenen Populationen aus verschiedenen Regionen der Erde zu untersuchen. Es wurden afrikanische, peruanische, japanische, deutsche, vietnamesische und syrische Populationen untersucht.

Außerdem war ein Methodenvergleich ein Ziel dieser Arbeit. Für den Fall, dass die Analyse der Loci nt00073 und nt16519 zu einem forensisch interessanten Ergebnis führt, sollte geprüft werden, ob die innovative LightCycler-Methode für die Analyse dieser Polymorphismen geeignet ist. Das Ergebnis wäre allerdings nicht nur für diese enge Fragestellung von Belang, sondern es könnte als Modell für die Einführung der LightCycler-SNP-Diagnostik in der forensischen Medizin, speziell der forensischen mt-Untersuchung, dienen. Dazu sollte eine begrenzte Anzahl von Proben mit der Restriktionsanalyse und der LightCycler-Technik parallel untersucht werden. Gegebenenfalls auftretende Differenzen sollten molekular aufgeklärt werden. Aus Kostengründen war vorgesehen, die Anzahl der LightCycler-Analysen gering zu halten.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchte Populationen

Als Untersuchungsmaterial für diese populationsgenetische Studie waren Blutproben bzw. Buccal Swabs je einer Population aus Kamerun, Deutschland, Peru, Japan, Vietnam, Syrien verfügbar. Insgesamt wurden Proben von 150 unverwandten deutschen Kaukasiern aus dem mitteldeutschen Raum, je 100 Proben von Syrern, Japanern, Peruanern und Vietnamesen untersucht. Außerdem standen 60 Proben von Bantu-Afrikanern aus Kamerun (Yaounde) zur Verfügung. Die angegebenen Gesamtzahlen beziehen sich dabei auf Untersuchungen der RFLP-Technik. Die LightCycler-Methode konnte aus Kostengründen nur anhand von kleinen Stichproben gezeigt werden. Die Abnahme der Blut- bzw. Speichelproben erfolgte im Institut für Rechtsmedizin Magdeburg, der José de Bantu-Klinik Kamerun, im Institute of Community Medicine, University of Tsukuba, Japan, Institute of Medicine, University of Hanoi, Vietnam, im Institute of Forensic Medicine, Damaskus, Syrien und im Instituto Peruano de Energia Nuclear, Lima, Peru. Alle Proben wurden von Personen gewonnen, die der Untersuchung ihrer DNA zu wissenschaftlichen Zwecken ausdrücklich zugestimmt hatten. Die Proben der deutschen Population lagen als EDTA-Blute vor. Proben der ausländischen Populationen wurden als Trockenblutproben beziehungsweise Buccal Swabs verschickt. Von allen untersuchten Personen wurde zunächst die DNA präpariert.

2.2. Präparations- und Analysetechniken

- **DNA-Präparation**

Die DNA-Präparation aus Trockenblutproben erfolgte nach dem modifizierten Protokoll von Old (1993). Es wurde ein ca. 1 x 1 cm großes Filterpapierstück, das die Blutauftragungen enthielt, zerkleinert und in 2 ml 154 mM Kochsalzlösung aufgenommen. Im Falle der Buccal swabs kamen die Watteträger in analoger Weise zum Einsatz. Nach 30-minütigem Lösen (unter Schütteln) wurde die Suspension mit einer Pipette abgezogen und in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt. Zur Sedimentierung erfolgte eine Zentrifugation für 10 min bei 15000 x g. Der Überstand wurde verworfen und dem Pellet 460 µl 1 x Lysis-Puffer (150 mM NaCl, 25 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris/HCL (pH 8,5), 1% SDS) und 40 µl Proteinase

K (100 mg/ml) zugegeben. Nach anschließendem Resuspendieren des Pellets wurde der Ansatz über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die Extraktion der DNA aus dem Lysat erfolgte durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform. Das gewonnene Lysat wurde zusammen mit 1 Volumen (v/v) Phenol in ein Vacutainer-Gelröhrchen (Becton & Dickinson) gegeben. Die Extraktion der DNA erfolgte durch vorsichtiges Schwenken des Röhrchens für 2 min. Durch 15 min Zentrifugation bei 3000 x g sammelte sich die phenolische Phase unter dem Gel-Pfropf. Erneut wurde 1 Volumen (v/v) Phenol zugegeben und das Röhrchen für 2 min geschwenkt. Nach erneuter Sedimentation wurden die Extraktionsschritte analog insgesamt 2 mal mit 1 Volumen (v/v) Chloroform wiederholt. Anschließend wurde der Überstand in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,04 Volumen 7,5 M Ammoniumacetat (500 mM Finalkonzentration) und 2 Volumen absoluten Ethanol erfolgte die Präzipitation der DNA. Es schloss sich eine Zentrifugation für 20 min bei 15000 x g an. Die DNA wurde 2 mal mit 1 ml 70%igen Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 30-50 µl Reinstwasser (LiChrsolv, Merck) aufgenommen.

- **Amplifikation mitochondrialer DNA**

Die zu untersuchenden Regionen wurden amplifiziert unter Benutzung der Primer L16517 (CGACATCTGGTTCCTACTTCAGG) und H00097 (GGTGCTCCGGCTCCAGC). Die Amplifikation ergab PCR-Fragmente mit einer Länge von 189 bp. Die Fragmente enthielten die beiden zu untersuchenden Loci. Für die PCR wurden der Reaktionspuffer E des Masteramp™ PCR Optimization Kit (Biozym) durch Vorversuche aus den Premixen A bis L ausgewählt. Optimierungsversuche ergaben die beste Amplifikationseffektivität für diesen Puffer. Die Lösungen des Kits enthalten die üblichen Ingredienzien eines PCR-Ansatzes wie z.B. KCl, MgCl₂, DMSO, Nukleotide und so weiter in variierten Konzentrationen. Die Nutzung des Kits erlaubt eine sehr schnelle Optimierung und ist ökonomisch sinnvoll. Die Mischung erfolgte zu gleichen Anteilen aus 2 mal Premix E und dem Gemisch aus DNA, Primer und DNA-Polymerase. Der 25 µl Ansatz bestehend aus 2 µl DNA, (entsprechend 5-20 ng DNA) 2,5 µl jeden Primers in einer 4 pM Gebrauchslösung (0,4 µM jeden Primers Endkonzentration), 0,5 U Goldstar DNA-Polymerase von Eurogentech) und 5,5 µl Reinstwasser wurde unter folgenden PCR-Zyklusparametern angesetzt: 94°C (3 min); [94°C (1 min); 56°C (1 min); 72°C (2 min)] x 35; 72°C (5 min).

- **RFLP-Analyse der PCR-Produkte**

Die PCR-Produkte wurden separat voneinander mit *Hae*III und *Apa*L1 verdaut. Die Mutation des Locus L16519 T→C kann durch *Hae* III-Spaltung gefunden werden. Die Restriktionssequenz lautet GG/CC. Die Transition des Locus L00073 A→G lässt einen *Apa*L1-Ort entstehen. Hier lautet die Restriktionssequenz G/TGCTC. Diese Enzyme detektieren die Mutationen durch Aufspalten des 189 Basenpaare enthaltenden PCR-Produktes in 165 und 24 bp beziehungsweise in 153 und 36 bp.

Für die Restriktionsansätze galten folgende Zusammensetzungen: Der *Hae*III-Restriktionsansatz setzte sich zusammen aus 8 µl des unbehandelten PCR-Produktes, 1 µl des passenden Verdauungspuffers des Herstellers, 0,18 µl BSA, 0,5 µl Enzym und 6 µl Reinstwasser. Für *Apa*L1-Restriktionsansatz wurden 8µl des unbehandelten PCR-Produktes, 11 µl Reinstwasser, 1,5 µl Restriktionspuffer und 1µl Enzym gemischt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Morgen der elektrophoretischen Auswertung zugeführt.

- **Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Die PCR-Produkte wurden hinsichtlich ihrer Ausbeute (halbquantitativ), ihrer Fragmentgröße und Spezifität (Erkennung unerwünschter Nebenbanden) mittels horizontaler PAGE geprüft. Die PCR-Produkte liefen in einem kontinuierlichen Puffersystem auf dünnen, nativen Polyacrylamid-Gelen mit Piperazin-Diacrylamid (PDA) als Crosslinker. Durch Verwendung dieses Bisacryl-Analogons kam es zur Reduktion der Hintergrundfärbung, die bei konventionellen Gelen viel stärker auftritt. Außerdem konnte eine höhere Festigkeit und eine bessere Auflösung erreicht werden.

Folgende Mischungsverhältnisse gelten für den gewählten Geltyp: 7,3 ml Acryl-PDA Lösung 1, 6,4 ml Tris-Formiat Lösung 1, 27,5 ml Aqua bidest, 280 µl APS und 14 µl TEMED. Die Gele wurden mit Hilfe von Glasplatten und Spacern in Abmessungen von 265 x 193 x 0,4 mm auf Gel-Fix-Folien der Firma Serva gegossen.

- **Elektrophoresebedingungen zur Kontrolle von PCR- beziehungsweise Spaltprodukten**

Die PCR-Produktauftrennung erfolgte in den beschriebenen Gelen bei 15°C. Die Temperaturkonstanz wurde durch einen Umlaufthermostaten realisiert. Als Elektrophorese-Einheit kamen die Multiphor II gemeinsam mit dem Spannungsversorger EPS3500 (Pharmacia) zum Einsatz. Die Probenapplikation fand in 4-7 µl Dosierungen auf „Application-Pieces“ aus Glasfleece (Pharmacia) statt. Der Einlauf der Proben wurde bei 5 W (Anstieg 5W/5min), die Trennung bei 20 W durchgeführt. TBE-Puffer (2x) [180 mM Tris-Borat, 4 mM EDTA, Bromphenolblau (pH 9,0)] diente als Brücken-Puffer zwischen den Elektroden und dem Gel. Die Banden wurden durch Silberfärbung sichtbar gemacht.

- **Silberfärbung von DNA-Fragmenten in PAA-Gelen**

Die Silberfärbung stellt eine vereinfachte Variante des Protokolls von Westermeier (1993) dar. Dieses Verfahren wurde von Budowle et al. (1991) modifiziert. Die Gele wurden in einer Photoschale ca. 3 min (bis zum Farbumschlag der blauen Bromphenolblaubande ins Gelbe) in 2 %iger Salpetersäure geschwenkt und anschließend 2 mal für 3 min mit Aqua bidest. gewaschen. Danach wurden die PAA-Gele für 20 min in einer 5 mM Silbernitrat-Lösung bei RT auf einem Wipptisch geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen (je 1 min) mit Aqua bidest. erfolgte die Anfärbung der Banden durch mehrfaches Inkubieren der Gele mit Natriumcarbonat/Formaldehyd-Lösung [0,2 % (v/v) Formaldehyd und 250 mM Natriumcarbonat] bis zum Erscheinen der Banden (Die Lösungen wurden beim Braunwerden gewechselt). Die Reaktion wurde mit 10 %iger Essigsäure abgestoppt (1 min Inkubationszeit), die Gele erneut 2 mal für 1 min mit Aqua bidest. gewaschen und für mindestens 15 min in einer 5%igen Glycerol-Lösung eingetaucht. Zur Lagerung wurden die PAA-Gele anschließend luftgetrocknet und mit Kopierfolien abdeckt.

- **Anwendung der LightCycler Technik**

Für die Versuche am LightCycler wurden 40 DNA-Proben der deutschen Population aus dem oben genannten Versuch so ausgewählt, dass jeweils 10 Proben jeden Haplotyps

untersucht werden konnten. Die DNA-Proben waren identisch mit denen aus den vorhergehenden Untersuchungen der RFLP-Technik. Die Loci nt00073 und nt16519 mussten getrennt analysiert werden.

Mit Hilfe des von der Firma Roche Biotechnics bezogenen LightCycler Kits (LC-DNA Master Hybridization probes, Katalognummer 2015102) konnten beide Loci untersucht werden. Die Schmelztemperaturen wurden registriert und aufgezeichnet von einem micro-volume Fluorimeter (Optik von Rodenstock) und von einem Pentium PC gespeichert und ausgewertet.

- **LightCycler-Analyse des Locus nt00073**

Die Ansätze enthielten Substanzen wie sie in der Zusammensetzung und Konzentration in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt sind. Die Materialien für die Analyse des nt00073 (Sequenzen für die Primer, den Sensor und Anchor sowie deren theoretische Schmelzpunkte) sind der Tabelle 2 zu entnehmen. Für die initiale Denaturierung wurden die Ansätze für 3 Sekunden auf 95°C erhitzt. Die nachfolgende Amplifikation fand für die Analyse beider Loci bei 40 x 95°C (8 min); 60°C (8 min); 72°C (15 min) statt. Es galten die Zyklusparameter 40 x 95°C (5 min); 60°C (8 min) und 72°C (15 min). Die Schmelzanalyse für beide Ansätze wurde durchgeführt mit 95°C (20 min); 38°C (20 min) und 85°C (0 min). Die kontinuierliche Temperatursteigerung erfolgte mit 0,2°C pro Sekunde. Eingestellt wurden die Fluorescence settings: F1=1, F2=15, F3=35. Die Abbildung 4 gibt die relevante mtSequenz und die dazu konstruierten Oligonucleotidkonstrukte, wie sie in der Tabelle 2 aufgeführt sind, wieder.

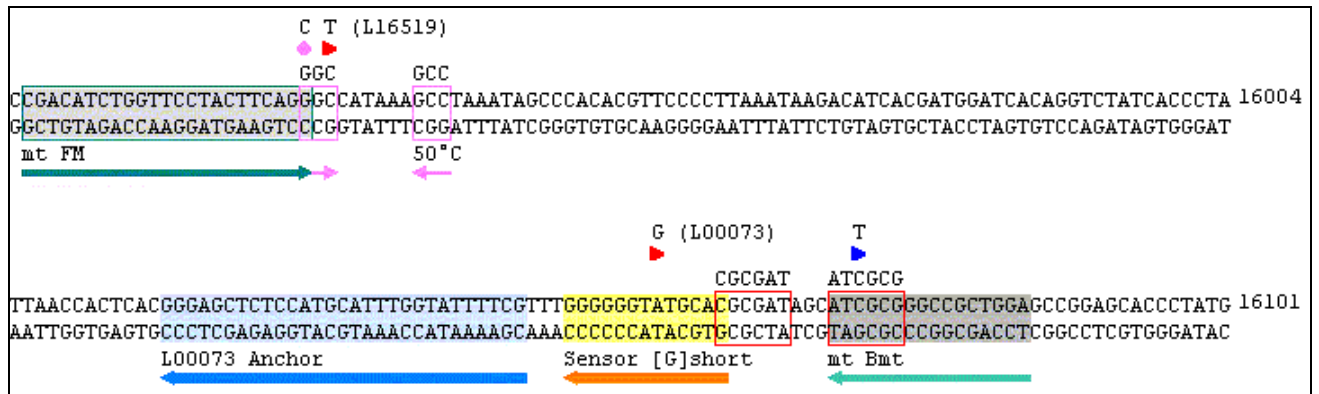


Abbildung 4: LightCycler-Analyse des Locus nt00073: Darstellung des mtDNA Sequenzabschnitts nt16494 bis nt00118 als CRS. Die grau unterlegten Abschnitte mtFM (nt16495-nt16518) und mtBmt (nt00087-nt00102) sind die Primer-Bindungs-Areale. Der mtFM Primer trägt ein mismatch in Position nt16518. Der Primer mtBmt ist mit einem nt00089-mismatch versehen. Die mismatches sollen Sekundärstrukturen verhindern. Rot eingrahmte Sequenzabschnitte tragen ein Potenzial zur Bildung zu Sekundärstrukturen.

Tabelle 2: Primer, Sensor und Anchor-Sequenzen zur Analyse des Locus nt00073.

In den Sequenzen der Primer dunkelblau unterlegte Basen stellen künstlich eingebaute mismatches dar, die der Bildung von Sekundärstrukturen entgegenwirken sollen (siehe auch Abbildung 4). Die im Sensor [G] short grün unterlegte Base bindet am Locus nt00073. Bei CRS in der Sequenz kommt es somit zum mismatch und zum früheren Abschmelzen des Sensors (* bezogen auf CRS, ¹ errechneter Wert)

	L00073		Tm ¹
MtFM	CgACATCTggTTCCTACTTCa g	*nt ¹⁶⁴⁹⁵ -nt ¹⁶⁵¹⁸	58,4°C
mtBmt	TCCAgCggCCCg CA AT	*nt ⁰⁰⁰⁸⁷ -nt ⁰⁰¹⁰²	63,2°C
Sensor [G]short	gTgCA G ACCCCCC X	*nt ⁰⁰⁰⁶⁶ -nt ⁰⁰⁰⁷⁹	50,4°C
L00073 Anc	LC Red640- CgAAAATACCAAATgCATggAgAgCTCCC p	*nt ⁰⁰⁰³⁴ -nt ⁰⁰⁰⁶²	68,8°C

Tabelle 3: LightCycler-Konditionen: Konzentrationen der Ingredienzien für die Analyse des SNP nt00073

Substanzen	Stammlösung (Konzentration).	Endkonzentration im Test.
H ₂ O		
Puffer, (NH ₂) ₄ SO ₄ (Genecraft)	166 mM	16.6 mM
MgCl ₂ (Genecraft)	25 mM	3.125 mM
dNTP (Genecraft)	10 mM	0.5 mM
Sense primer (TIB MOLBIOL)	10 µM	0.5 µM
Antisense primer (TIB MOLBIOL)	10 µM	0.5 µM
3'FL probe (TIB MOLBIOL)	3 µM	0.15 µM
5'LC probe (TIB MOLBIOL)	3 µM	0.15 µM
BSA (SIGMA)	600 ng/µl	12 ng
TaqPolymerase (Genecraft)	5 U/µl	2.5 U

- **Protokoll der Amplifikation**

initiale Denaturierung 95°C/3 sec

zyklische Amplifikation 40 x 95°C/8 min; 60°C/8 min; 72°C/15 min

Schmelzanalyse 95°C/20 min; 38°C/20 min; 85°C/0 min mit 0.2°C/sec (kont.)

- **LightCycler-Analyse des Locus nt16519**

Die Materialien für die Analyse des nt16519 (Sequenzen für die Primer, den Sensor und Anchor sowie deren theoretische Schmelzpunkte) sind der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Konzentrationen der Ingredienzien sind in Tabelle 5 aufgeführt. Die Abbildung 5 gibt die relevante mtSequenz und die dazu konstruierten Oligonucleotidkonstrukte für die Analyse des

nt16519 wie sie in der Tabelle 5 aufgeführt sind wieder. Für die initiale Denaturierung wurden die Ansätze für 3 Sekunden auf 95°C erhitzt. Die nachfolgende Amplifikation fand für die Analyse des Locus 16519 bei 40 x 95°C (8 min); 60°C (8 min); 72°C (15 min) statt. Es galten die Zyklusparameter 40 x 95°C (5 min); 60°C (8 min) und 72°C (15 min). Wie bereits oben erwähnt, galten für beide Loci die Schmelzanalyse wie folgt: 95°C (20 min); 38°C (20 min) und 85°C (0 min) bei 0,2°C pro Sekunde Temperatursteigerung. Es wurden die Fluorescence settings: F1=1, F2=15, F3=35 eingestellt.

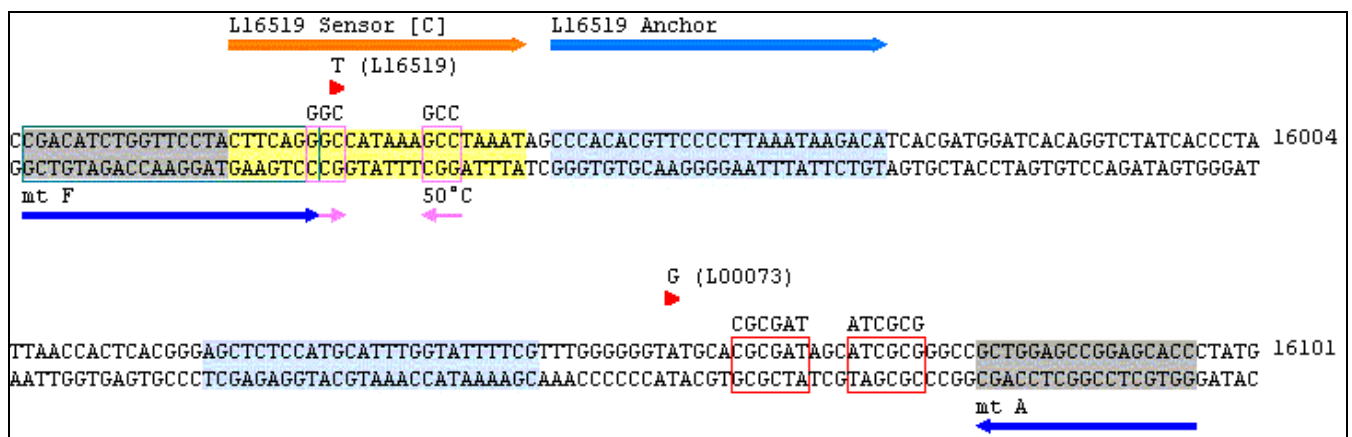


Abbildung 5: LightCycler-Analyse des Locus nt16519: Darstellung des mtDNA Sequenzabschnitts nt16494 bis nt00118. Die grau unterlegten Abschnitte mtF (nt16495-nt16517) und mtA (nt00097-nt00113) sind die Primer-Bindungs-Areale. Der Sensor ist gelb unterlegt (nt16511-nt16534).

Tabelle 4: Sequenztabelle zur Analyse des nt16519: (Primer, Sensor und Anchor-Sequenzen)
Die dunkelblau unterlegte Base im Sensor [C] ist ein eingebautes mismatch, die verhindern soll, dass sich Sekundärstrukturen ausbilden. Grün unterlegt im Sensor [C] bindet an den zu untersuchenden Locus nt16519 (* bezogen auf CRS, ¹ errechneter Wert).

	L16519		Tm ¹
mtF	CgACATCTggTTCCTACTTCAgg	*nt ¹⁶⁴⁹⁵ -nt ¹⁶⁵¹⁷	58,3°C
mtA	GgTgCTCCggCTCCAgC	*nt ⁰⁰⁰⁹⁷ -nt ⁰⁰¹¹³	62,2°C
Sensor [C]	CTTCagCgCATAAAgCCTAAAT X	*nt ¹⁶⁵¹¹ -nt ¹⁶⁵³⁴	59,8°C
L16519 Anc	LC Red640- CCCACACgTTCCCCTTAAATAAgACA p	*nt ¹⁶⁵³⁶ -nt ¹⁶⁵⁶¹	63,1°C

Tabelle 5: LightCycler-Konditionen: Konzentrationen der Ingredienzien zur Analyse des SNP nt16519

Substanzen	Stammlösung (Konzentration).	Endkonzentration im Test.
H ₂ O		
Puffer, (NH ₂) ₄ SO ₄ (Genecraft)	166 mM	16.6 mM
MgCl ₂ (Genecraft)	25 mM	3.125 mM
dNTP (Genecraft)	10 mM	0.5 mM
Sense primer (TIB MOLBIOL)	10 µM	0.5 µM
Antisense primer (TIB MOLBIOL)	10 µM	0.5 µM
3'FL probe (TIB MOLBIOL)	3 µM	0.15 µM
5'LC probe (TIB MOLBIOL)	3 µM	0.15 µM
BSA (SIGMA)	600 ng/µl	12 ng
TaqPolymerase (Genecraft)	5 U/µl	2.5 U

- Protokoll der Amplifikation**

initiale Denaturierung 95°C/3 sec
 zyklische Amplifikation 40 x 95°C/8 min; 60°C/8 min; 72°C/15 min
 Schmelzanalyse 95°C/20 min; 38°C/20 min; 85°C/0 min mit 0.2°C/sec (kont.)

- Feinchemikalien, Enzyme und Kits**

Amplitaq Gold DNA-Polymerase	Fa. PE BIOSYSTEMS
4x Acrylamid	Fa. SERVA
Ammoniumperoxodisulfat	Fa. SERVA

Borsäure	Fa. MERCK
Chloroform	Fa. MERCK
dATP, dCTP, dGTP, TTP	(Bestandteil des Optikits)
EDTA	Fa. SIGMA
Ethanol	Fa. MERCK
Formaldehyd	Fa. MERCK
Goldstar DNA-Polymerase	Fa. EUROGENTEC
Natriumcarbonat purum p. a.	Fa. FLUKA
Natriumchlorid	Fa. MERCK
PCR-Optimierungskit	Fa Biozym
PCR-Primer (PCR-Ansatz für RFLP-Analyse)	Fa. EUROGENTEC
PDA	Fa. Biorad
Phenol	Fa. Roth
Proteinase K	Fa. Merck
Reinstwasser (LiChrsolv)	Fa. MERCK
Restriktionsendonucleasen	Fa. NE Biolabs
TEMED	Fa. SIGMA
Tris	Fa. SERVA
LightCycler Kit (LC-DNA Master Hybridization probes)	Fa. Roche Diagnostics

• **Geräte / Verbrauchsmaterialien**

Geräte

Mikroliterpipetten verschiedener Größen	Fa. Eppendorf
Electrophoresis Power Supply: EPS3500	Fa. Pharmacia
Elektrophoresekammer: LKB Multiphor II	Fa. Pharmacia
PCR-Geräte: PTC-100 Thermal Controller	Fa. MJ Research Inc.
Schüttler:	

TH 25 Swip	Fa. Edmund Bühler
Thermomixer:	
5437	Fa. Eppendorf
Thermostat:	
F 10 C	Fa. Biometra
Zentrifugen:	
centrifuge 5417	Fa. Eppendorf
LightCycler Instrument	
Probenkarussell im LightCycler	
LightCycler Software Package	
32 Adapter mit Kühlblock	
Pentium PC mit Windows NT	

Glaskapillare mit Außendurchmesser 1,5 mm und 3 cm Länge mit Plastikaufsatz
 Plastikstopper
 43 cm Monitor
 Farbdrucker
 Operators Manual
 Centrifuge

Verbrauchsmaterialien

Filterpapier:	Fa. Schleicher und Schuell
Gelfolien:	
GelFix®Folien	Fa. Serva
Gelröhrchen:	
2ml	Fa. Becton & Dickinson
5ml	
Eppendorfreaktionsgefäße:	
0,5ml	Fa. Eppendorf
1,5ml	
2,0ml	

Pipettenspitzen:

0,5-10µl

Fa. Eppendorf

10-200µl

200-1000µl

2.3. Statistische Berechnungen zu den Populationsstudien

Die Varianz der Haplotypen zwischen verschiedenen Populationen wurde mit dem χ^2 -Test auf Unabhängigkeit die Ergebnisse aus den Versuchen statistisch ausgewertet [Heinecke et al. (1992)]. Die Angaben des Signifikanzniveaus werden unterteilt in nicht signifikant und signifikant mit den vorgegebenen Signifikanzniveaus von $\alpha \leq 0,05$, $\alpha \leq 0,01$ und $\alpha \leq 0,001$.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse des Vergleiches von zwei Methoden zur Analyse mitochondrialer SNPs

- Ergebnisse der RFLP-Analyse

*Apa*L1-Spaltung zur Analyse des Locus nt00073

Die folgenden Abbildungen zeigen Darstellungen von Gelen, auf denen *Apa*L1 behandelte PCR-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt worden sind. In der Abbildung 6 stammen die Proben von einer deutschen Population, die Abbildung 7 zeigt Proben einer japanischen Population.

Es ist erkennbar, dass die Allele L00073A und G mit den Banden 189bp (ungeschnitten) bzw. 153bp (geschnitten) einhergehen. Im Falle der Restriktion erscheint unterhalb der 153bp-Bande eine zusätzliche „Geisterbande“. Es ist zu vermuten, dass es sich dabei um eine Struktur handelt, die sich aufgrund der „sticky ends“ aus den abgeschnittenen 26bp Fragmenten bilden. Das Auftreten der Zusatzbanden tangiert die Aussagesicherheit nicht.

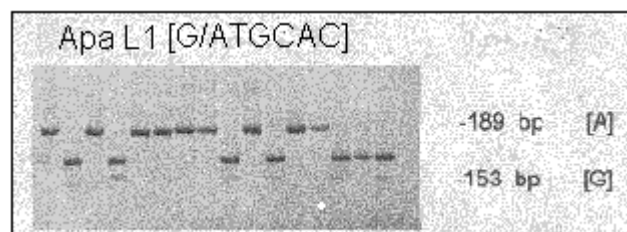


Abbildung 6: Gelbild der Analyse des *Apa*L1 Schnittortes nt00073 - nt00078, der den SNP nt00073 entdeckt. Die Stichprobe entstammt einer deutschen Population.

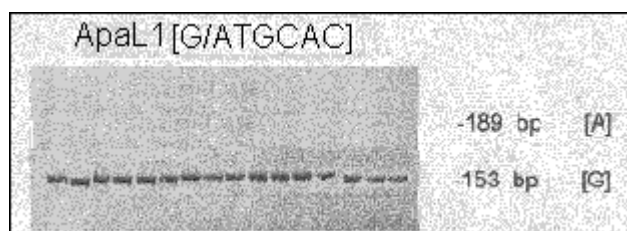


Abbildung 7: Gelbild der Analyse des *Apa*L1 Schnittortes nt00073 - nt00078, der den SNP nt00073 entdeckt. Die Stichprobe entstammt einer japanischen Population.

***Hae*III-Spaltung zur Analyse des Locus nt16519**

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen Darstellungen von Gelen, auf denen *Hae*III behandelte PCR-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt worden sind. In der Abbildung 8 stammen die Proben von einer deutschen Population, die Abbildung 9 zeigt Proben einer japanischen Population. Das Allel L16519 T geht mit der Bande 189bp (ungeschnitten) einher. Das Allel L16519C bedingt den *Hae*III-Schnittort und ermöglicht eine Restriktion in die Fragmente 165bp und 24 bp. Das Gelbild ist eindeutig und leicht abzulesen. Es zeigte sich ein hoher Grad der Polymorphie in beiden abgebildeten Stichproben.

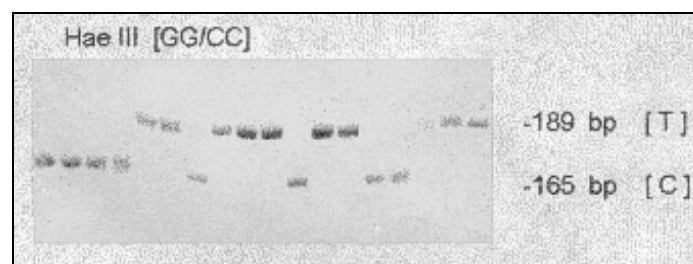


Abbildung 8: Gelbild der Analyse des *Hae*III-Schnittortes nt16517 - nt16520, der den SNP nt16519 entdeckt. Die Stichprobe entstammt einer deutschen Population.

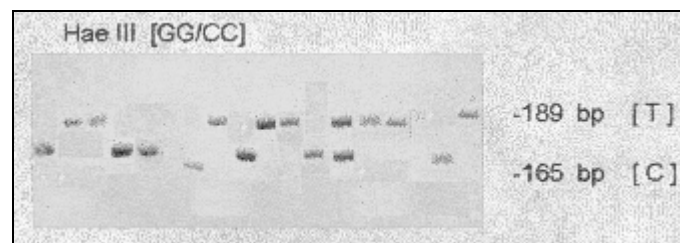


Abbildung 9: Gelbild der Analyse des *Hae*III-Schnittortes nt16517 - nt16520, der den SNP nt16519 entdeckt. Die Stichprobe entstammt einer japanischen Population.

- **Ergebnisse der Etablierung LightCycler-Analyse für die SNPs nt00073 und nt16519**

SNP nt00073

Die Abbildung 10 zeigt, dass die Analyse des SNP nt00073 bei Einsatz der im Abschnitt Material und Methoden dargestellten Oligonucleotiden gelingt. Gemäß der vorn beschriebenen Funktionsweise nimmt bei dieser Darstellung die Fluoreszenz mit steigender

Temperatur ab. Das Ablösen der fluoreszierenden Oligonucleotide verursacht diese Abnahme, insbesondere durch Aufhebung des Energietransfers zwischen Anker- und Sensorsonde. Schon in dieser Abbildung lassen sich die Schmelzpunkte der Proben vermuten. Für die Analyse der Schmelzkurve ist aber die Darstellung der ersten negativen Ableitung über der Zeit in der Y-Achse und der Temperatur in der X-Achse besser geeignet. (Abbildung 11) Hier sieht man die eigentlichen Schmelzpunkte deutlicher. Sie werden durch Spitzen bei einer bestimmten Temperatur dargestellt. Es wird erkennbar, dass man jedem der beiden nt00073-Allele einen charakteristischen Schmelzpunkt zuweisen kann: L00073G entspricht 55,6 °C; L00073A entspricht 41,8 °C. Diese tatsächlich gemessenen Temperaturen weichen allerdings stark von den berechneten Temperaturen ab (siehe Tabellen 2 und 4). Die Berechnung erfolgte durch die Herstellerfirma. Abweichungen zwischen berechneten und gemessenen Temperaturen seien nach deren Angaben nicht ungewöhnlich.

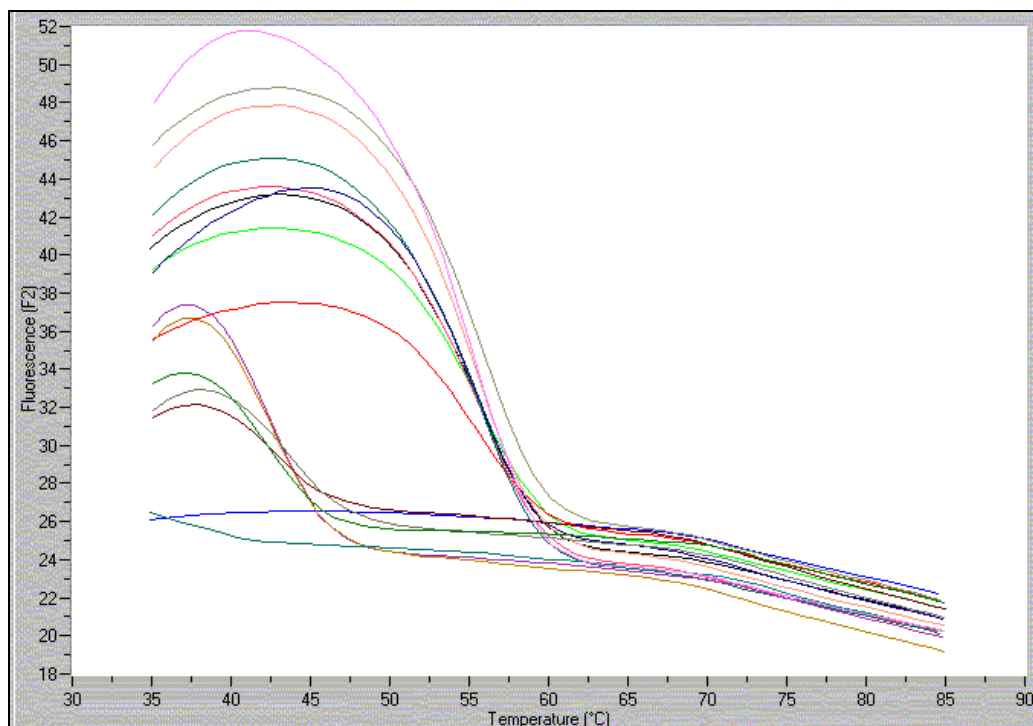


Abbildung 10: Darstellung der Fluoreszenzkurven von ausgewählten Proben am LightCycler bei Analyse des mitochondrialen SNPs nt00073.

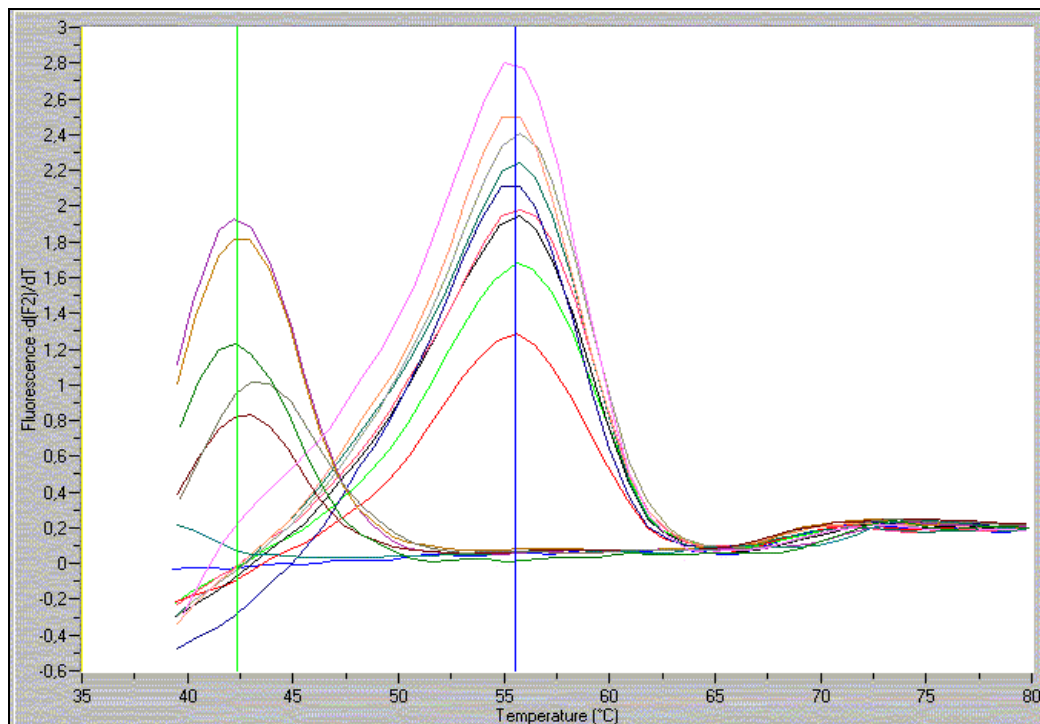


Abbildung 11: Die negative Ableitung der Fluoreszenzkurve bei Analyse des mitochondrialen SNPs nt00073 der gleichen Proben wie in Abbildung 10 zeigt die Schmelzpunkte des Sensor-Template-Hybrids für die Allele L00073G bei 55,6°C (errechneter Wert: 50,4°C) und L00073A bei 41,8°C.

SNP nt16519

Die Graphiken der Abbildungen 12 und 13 zeigen die Ergebnisse der LightCycler-Analyse des SNP nt16519. Auch für diesen SNP ist eine klare Unterscheidung der Allele möglich. Die negative Ableitung der Fluoreszenzkurve bei Analyse des mitochondrialen SNPs nt16519 zeigt einen Schmelzpunkt des Sensor-Template-Hybrids für das Allel L16519C von 49,5 °C und L16519T von 45,3°C. Die Auswahl der Proben erfolgte aufgrund der Ergebnisse der Restriktionsanalysen.

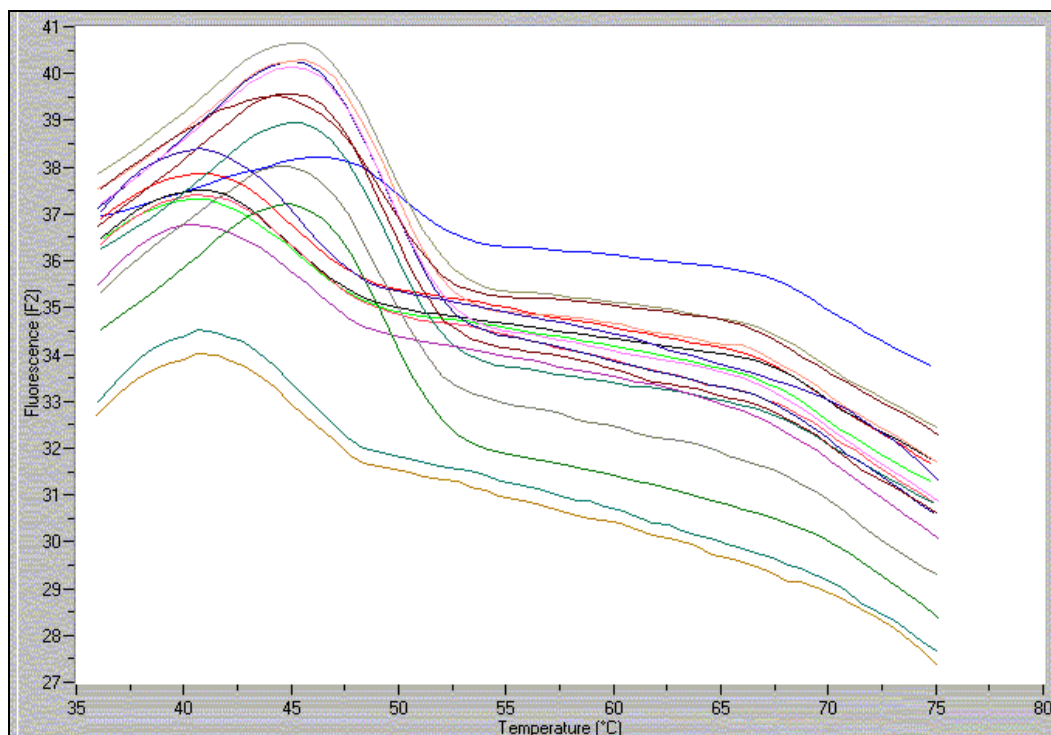


Abbildung 12: Darstellung der Fluoreszenzkurve von ausgewählten Proben am LightCycler bei Analyse des mitochondrialen SNPs nt16519

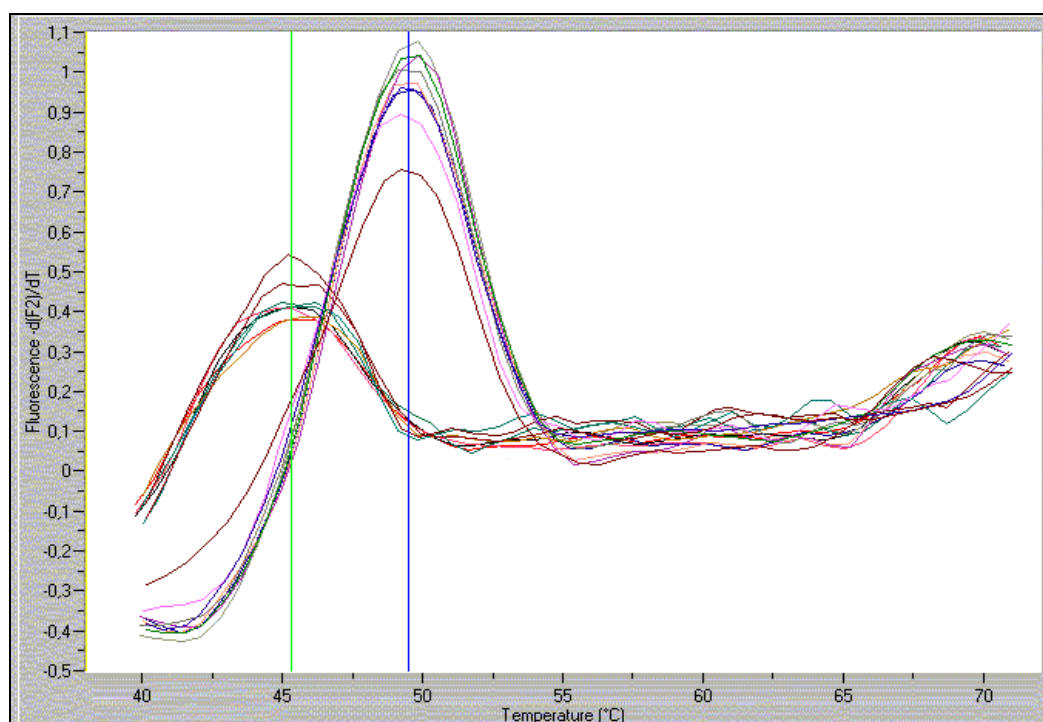


Abbildung 13: Die negativen Ableitung der Fluoreszenzkurve bei Analyse des mitochondrialen SNPs nt16519 der gleichen Proben wie in Abbildung 12 zeigt die Schmelzpunkte des Sensor-Template-Hybrids für die Allele L16519C bei 49,5°C (errechneter Wert: 59,8°C) und L16519T bei 45,3°C.

- **Vergleichende Untersuchungen an DNA-Proben mit verschiedenen mtHaplotypen**

Nachdem die Populationsstudien mit Hilfe der RFLP-Technik durchgeführt worden waren, wurden von jedem der vier möglichen Haplotypen ($A^{nt00073}-T^{nt16519}$, $G^{nt00073}-T^{nt16519}$, $A^{nt00073}-C^{nt16519}$, $G^{nt00073}-C^{nt16519}$) Stichproben von zehn DNA-Präparationen der LightCycler-Analyse unterworfen.

Es zeigte sich, dass die Ergebnisse der RFLP-Analyse und der LightCyclertechnik kompatibel sind.

Tabelle 6: Ergebnisse des LightCyclers im Vergleich mit den Ergebnissen aus der Restriktionsanalyse

Proben	Haplotyp	ApaL1		HaeIII		Nt00073-Sensor		Nt16519-Sensor	
(n)		Verdau	n	Verdau	n	Tm max	n	Tm max	n
10	$A^{nt00073}-T^{nt16519}$	negativ	10	negativ	10	41,8°C	10	45,3°C	10
10	$G^{nt00073}-T^{nt16519}$	positiv	10	negativ	10	55,6°C	10	45,3°C	10
10	$A^{nt00073}-C^{nt16519}$	negativ	10	positiv	10	41,8°C	10	49,5°C	10
10	$G^{nt00073}-C^{nt16519}$	positiv	10	positiv	10	55,6°C	10	49,5°C	10

3.2 Ergebnisse der Populationsstudien

- **Analysenergebnisse zu den mitochondrialen SNPs nt00073 und nt16519 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *ApaL1* und *HaeIII***

Es wurden die zwei mitochondrialen Loci nt00073 und nt16519 von 150 nicht verwandten Deutschen, je 100 Syrern, Japanern, Peruanern, Vietnamesen und 60 Kamerunern bezüglich ihrer Genloci nt00073 und nt16519 untersucht. Dabei sollten die Allelfrequenzen für die beiden Orte ermittelt werden. Außerdem waren für jede Population die Haplotypenhäufigkeit, das heißt die Kombinationen auf den Orten nt00073 und nt16519, festzustellen. Alle ethnischen Gruppen wurden hinsichtlich der einzelnen Allelfrequenzen und bezüglich der Haplotypenfrequenzen miteinander verglichen.

- **Ergebnisse der Untersuchung der deutschen Bevölkerung**

Für die deutschen Kaukasier wurden im Genlocus nt00073 insgesamt 74 Individuen mit dem Allel L00073A beobachtet. Das entspricht der Anderson-Sequenz. Die anderen 76 Individuen zeigten das Allel nt00073G. Am Locus nt16519 zeigten 96 Personen das Allel C, 54 Personen entsprachen mit dem Allel T der CRS. Die Haplotypen sind in der Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Haplotypenverteilung in der untersuchten deutschen Population

Haplotyp (00073-16519)	A ^{nt00073} T ^{nt16519}	A ^{nt00073} C ^{nt16519}	G ^{nt00073} T ^{nt16519}	G ^{nt00073} C ^{nt16519}
Anzahl (Frequenz)	30 (0.20)	44 (0.29)	24 (0.16)	52 (0.35)

- Ergebnisse der Untersuchung der syrischen Bevölkerung**

Am Locus nt00073 zeigten 59 Personen der 100 Untersuchten das Allel G (Abweichung von der CRS). Am Locus nt16519 wurde die entsprechende Transition bei 55 Personen gefunden. Die Haplotypen sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Haplotypenverteilung der untersuchten syrischen Population

Haplotyp(00073-16519)	A ^{nt00073} T ^{nt16519}	A ^{nt00073} C ^{nt16519}	G ^{nt00073} T ^{nt16519}	G ^{nt00073} C ^{nt16519}
Anzahl (Frequenz)	25 (0.25)	16 (0.16)	20 (0.20)	39 (0.39)

- Ergebnisse der Untersuchung der japanischen Bevölkerung**

Von den 100 Japanern zeigten im Locus nt00073 alle die Abweichung von der Anderson-Sequenz (A), also die Base G. Am Locus nt16519 zeigte sich bei 49 Individuen die Transition T → C. Die Haplotypen sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Haplotypenverteilung der untersuchten japanischen Population

Haplotyp (00073-16519)	A ^{nt00073} T ^{nt16519}	A ^{nt00073} C ^{nt16519}	G ^{nt00073} T ^{nt16519}	G ^{nt00073} C ^{nt16519}
Anzahl (Frequenz)	0	0	51(0.51)	49(0.49)

- **Ergebnisse der Untersuchung der vietnamesischen Bevölkerung**

Die Allel- beziehungsweise Haplotypenverteilung in der vietnamesischen Bevölkerung war erwartungsgemäß der japanischen sehr ähnlich. Nur ein Individuum zeigte am Locus nt00073 das Allel A (der CRS entsprechend). 66 Individuen zeigten die T→C-Transition am Locus nt16519. Die dazugehörenden Haplotypen sind in der Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Haplotypenverteilung der untersuchten vietnamesischen Population

Haplotyp (00073-16519)	A ^{nt00073} T ^{nt16519}	A ^{nt00073} C ^{nt16519}	G ^{nt00073} T ^{nt16519}	G ^{nt00073} C ^{nt16519}
Anzahl (Frequenz)	0	1 (0.01)	34 (0.34)	65 (0.65)

- **Ergebnisse der Untersuchung der peruanischen Bevölkerung**

Auch die Population aus Peru zeigt in Position nt00073 zu einem hohen Prozentsatz, nämlich 90% (94), das Allel G. Am Locus nt16519 unterscheidet sich die peruanische Population mit 66% T→C-Transitionen kaum von anderen Populationen. Tabelle 11 zeigt die Haplotypenverteilung für die Population der Peruaner.

Tabelle 11: Haplotypenverteilung der untersuchten peruanischen Population

Haplotyp (00073-16519)	A ^{nt00073} T ^{nt16519}	A ^{nt00073} C ^{nt16519}	G ^{nt00073} T ^{nt16519}	G ^{nt00073} C ^{nt16519}
Anzahl (Frequenz)	2 (0.02)	4 (0.04)	32 (0.32)	62 (0.62)

- **Ergebnisse der Untersuchung der afrikanischen Bevölkerung**

Von 60 untersuchten Bantu aus Kamerun zeigten am nt00073 nur acht Probanden das Allel A wie in der Anderson-Sequenz. Wiederum trugen etwa die Hälfte der untersuchten Personen das Allel C in der Position nt16519. Tabelle 12 zeigt die Haplotypen.

Tabelle 12: Haplotypenverteilung der untersuchten afrikanischen Population

Haplotyp (00073-16519)	A ^{nt00073} T ^{nt16519}	A ^{nt00073} C ^{nt16519}	G ^{nt00073} T ^{nt16519}	G ^{nt00073} C ^{nt16519}
Anzahl (Frequenz)	2 (0.03)	6 (0.10)	24 (0.40)	28 (0.47)

3.3. Vergleich verschiedener ethnischer Gruppen

- **Statistische Grundlagen**

Wie oben benannt, verfolgte die populationsgenetische Studie das Ziel, zu ermitteln, wie sich die Haplotypenfrequenzen und somit die PD in den untersuchten Populationen unterscheiden. Außerdem sollte die Möglichkeit erkundet werden, für Einzelpersonen eine Zuordnung zu einer ethnischen Gruppe anhand der erhobenen Daten vorzunehmen. Der Vergleich der untersuchten Populationen erfolgte durch den χ^2 -Test auf Unabhängigkeit [Heinecke et al. (1992)]. Die festgelegten Signifikanzniveaus definieren Quantile der χ^2 -Verteilung für die Freiheitsgrade $f = 1$ beim Vergleich der einzelnen Haplotypen beziehungsweise $f = 3$ für den Haplotypenvergleich. Die Quantile für die entsprechenden Freiheitsgrade und Signifikanzniveaus sind der Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Quantile $\chi^2_{f;1-\alpha}$ der χ^2 -Verteilung mit f Freiheitsgraden

[aus Heinecke et al. (1992)]

F	1- α	0.950	0.990	0.999
1		3.84	6.63	10.83
3		7.81	11.34	16.27

Diese Signifikanzniveaus legen im Weiteren den Verwerfungsbereich bei Werten unterhalb des Quantils für $\alpha = 0.05$ fest. Die Werte oberhalb der Quantile bedeuten, dass die postulierte Nullhypothese verworfen werden muss. Das jeweilige Genauigkeitsintervall ist in den Tabellen mit ns für nicht signifikant. Für signifikante Unterschiede stehen * für $\alpha \leq 0.05$, ** für $\alpha \leq 0.01$ und *** für $\alpha \leq 0.001$ angegeben.

- **Haplotypenverteilung und χ^2 -Verteilung**

Zunächst sollen die einzelnen Loci getrennt voneinander betrachtet werden. Dazu werden die Häufigkeiten von G am Locus nt00073, dann die Auftretenshäufigkeit von C am Locus nt16519 in tabellarischer Form dargestellt.

Die Nullhypothese und die Alternativhypothese lauten für die erste Darstellung:

H0: Populationszugehörigkeit und Haplotyp am Locus nt00073 sind unabhängig voneinander.

H1: Populationszugehörigkeit und Haplotyp am Locus nt00073 sind abhängig voneinander.

Tabelle 14: Vergleich der Allelfrequenzen am SNP nt00073 mit dem χ^2 -Test auf Unabhängigkeit für die sechs untersuchten Populationen. Es wurden jeweils der Wert des χ^2 aufgeführt. (ns = nicht signifikant, * für $\alpha \leq 0.05$, ** für $\alpha \leq 0.01$ und *** für $\alpha \leq 0.001$)

Population		nt00073	Vergleich der Populationen					
		G [n (f)]	D	Syr	Jap	Viet	Per	Cam
	Σ							
D	150	76 (0.51)	-	1,67 ^{ns}	>70***	>66***	>51***	>23***
Syr	100	59 (0.59)	-	-	>51***	>48***	>34***	<13***
Jap	100	100 (1.00)	-	-	-	1.0 ^{ns}	6.2*	>14***
Viet	100	99 (0.99)	-	-	-	-	3.7 ^{ns}	>10**
Per	100	94 (0.94)	-	-	-	-	-	2.5 ^{ns}
Cam	60	52 (0.87)	-	-	-	-	-	-

Die Nullhypothese muss für die vergleichende Darstellung im Falle der deutschen und syrischen Proben beibehalten werden. Das Gleiche gilt für die vietnamesischen und japanischen, sowie vietnamesischen und peruanischen und die peruanischen und afrikanischen Proben. Für die anderen Proben muss auf dem jeweiligen Signifikanzniveau die Nullhypothese verworfen werden. Für die folgende Tabelle gelten die Nullhypothese beziehungsweise Alternativhypothese entsprechend den obigen Angaben für den Locus nt16519.

Tabelle 15: Vergleich der Allelfrequenzen am SNP nt16519 mit dem χ^2 Test auf Unabhängigkeit für die sechs untersuchten Populationen. Es wurde jeweils der Wert des χ^2 aufgeführt. (ns = nicht signifikant, * für $\alpha \leq 0.05$)

Population		nt16519	Vergleich der Populationen					
		C [n (f)]	D	Syr	Jap	Viet	Per	Cam
	Σ							
D	150	96 (0.64)	-	2.0 ^{ns}	5.5*	0.1 ^{ns}	0.1 ^{ns}	0.9 ^{ns}
Syr	100	55 (0.55)	-	-	0.7 ^{ns}	2.5 ^{ns}	2.5 ^{ns}	0.04 ^{ns}
Jap	100	49 (0,49)	-	-	-	5.9*	5.9*	0.9 ^{ns}
Viet	100	66 (0.66)	-	-	-	-	0.0 ^{ns}	1.4 ^{ns}
Per	100	66 (0.66)	-	-	-	-	-	1.4 ^{ns}
Cam	60	34 (0.57)	-	-	-	-	-	-

Für die Ergebnisse der Tabelle 15 gilt, dass für alle mit ns gekennzeichneten Proben die Nullhypothese erhalten bleibt. Auf dem niedrigsten Signifikanzniveau gilt nur für drei Beispiele die Alternativhypothese, nämlich dass Haplotyp und Nationalität voneinander abhängig sind.

- **Unterschiede zwischen den Populationen**

Die unterschiedlichen Häufigkeiten des gleichzeitigen Auftretens der untersuchten Haplotypen in den verschiedenen Populationen waren zu prüfen. Die zugrunde liegenden Hypothesen lauteten hier:

H0: Der Haplotyp nt00073/nt16519 ist unabhängig von der ethnischen Herkunft.

H1: Das Vorkommen des Haplotypen nt00073/nt16519 hängt mit der ethnischen Herkunft der Probe zusammen.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle 16 aufgelistet.

Tabelle 16: χ^2 -Verteilung der Haplotypen nt00073/nt16519 in den untersuchten Populationen.

Aufgeführt sind jeweils die Ergebnisse aus dem χ^2 -Test auf Unabhängigkeit (ns =nicht signifikant, * für $\alpha \leq 0.05$, ** für $\alpha \leq 0.01$ und *** für $\alpha \leq 0.001$).

	X²-Verteilung der Haplotypen nt00073/nt16519					
Population	D	Syr	Jap	Viet	Per	Cam
D	-	>15**	>91***	>81***	>65***	>49***
Syr	-		>55***	>48***	>34***	>21***
Jap	-		-	6.6 ^{ns}	11.9**	11.9**
Viet	-		-	-	3.9 ^{ns}	10.8*
Per	-		-	-	-	3.9 ^{ns}

Auffällig sind die großen Unterschiede zwischen den Kaukasiern und den Asiaten und Südamerikanern. Hier ist die Alternativhypothese zutreffend. Für die nicht signifikanten Ergebnisse muss die Nullhypothese beibehalten werden, das heißt, dass man von den Haplotypen nicht auf die Zugehörigkeit zu einer Populationen schließen kann.

- **Power of Discrimination**

Die Power of Discrimination (PD) gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der zwei Proben, die von nicht verwandten Personen stammen, unterschieden werden können. Je höher PD, desto größer ist die Unterscheidungskraft zwischen einzelnen Individuen. Für die forensische Praxis bedeutet das, dass Loci, die eine hohe PD ermöglichen, zur Identifizierung von Spuren herangezogen werden. Eine Person kann dann mit dieser Wahrscheinlichkeit als Spurenleger identifiziert werden. Die PD errechnet sich aus der Formel $1 - X^2/Y^2$ (X und Y stehen für die jeweiligen Frequenzen der Haplotypenkombinationen in der Population.).

Tabelle 17: Darstellung der Power of Discrimination innerhalb der einzelnen Populationen. Die PD bezieht sich auf die Untersuchung beider Loci zusammen.

Population	PD
D	0.73
Syr	0.72
Jap	0.50
Viet	0.46
Per	0.51
Cam	0.61

4. Diskussion

4.1. Zur forensischen Bedeutung von mitochondrialen Polymorphismen

Forensische Identifizierungen erfolgen gegenwärtig hauptsächlich durch Amplifikation chromosomaler DNA-Polymorphismen, die eine Längenvariabilität als short tandem repeats (STR) aufweisen. Die Untersuchung dieser Systeme ermöglicht die Identifizierung von Personen über den Weg des Abstammungsgutachtens und die Individualisierung von Spuren. Mitochondriale Systeme sind von Bedeutung bei der Identifizierung, wenn DNA-Proben von nahen Verwandten zum Abstammungsnachweis nicht verfügbar sind [Yamamoto et al. (1998), Allen et al. (1998)].

Die Ausschöpfung des individualisierenden Potenzials der mitochondrialen Analyse wird in der Rechtsmedizin bisher noch nicht im vollen Umfang genutzt. Dafür gibt es mehrere Gründe: Die Analyse chromosomaler Polymorphismen hat gegenüber der mtAnalyse eine Reihe von Vorteilen, die sich aus dem höheren Individualisierungspotenzial dieser Marker ergeben. Die Frequenz eines bestimmten Genotyps kann hier einfach durch die Multiplikation der Genotypenfrequenzen für die Einzelmarker erhalten werden. Lediglich bei der Verwendung gekoppelter Marker sind Einschränkungen zu beachten, jedoch erwachsen daraus keine prinzipiellen Probleme. Auf diese Weise kann man bei Verwendung einer überschaubaren Anzahl von STRs einen Individualisierungsgrad von eins zu mehreren Millionen erreichen. Da sich die Methode etabliert und bewährt hat, kann es nicht das Ziel der forensischen mtDNA-Forschung sein, die Untersuchungen der Kern-DNA-Polymorphismen zurückzudrängen oder zu ersetzen. Die mtDNA-Analyse soll aber als eine sinnvolle Ergänzung zur Untersuchung der chromosomalen STRs entwickelt werden.

Alle mitochondrialen Polymorphismen sind letztlich gekoppelte Marker, so dass die Frequenz eines Einzelmerkmals nicht unabhängig von der Frequenz eines anderen Merkmals ist. Daraus folgt, dass zur Errechnung einer mtDNA-Frequenz die Produktregel, wonach sich die Frequenz einer Merkmalskombination aus den Einzelfrequenzen der involvierten Merkmale berechnen lässt, nicht angewendet werden kann. Die Angabe der Frequenz einer gefundenen mtDNA-Sequenz kann deshalb nur durch den Vergleich der Sequenz mit mtDNA-Datenbanken erfolgen. Diese enthalten derzeit jedoch nur, je nach Datenbank, ein bis mehrere

tausend Datensätze jeder untersuchten Population. Das bedeutet, dass Häufigkeitsangaben von mtDNA den Promillebereich nicht unterschreiten können. Auch ist wegen der maternalen Vererbung und des Fehlens von Rekombination mit territorialen Unterschieden zu rechnen. In Gebieten mit einer wenig mobilen Population kann es theoretisch zu hohen Häufigkeiten von wenigen mtHaplotypen kommen, die sich von der übrigen Bevölkerung des Landes stark unterscheidet.

Wesentlich ist in der jetzigen Phase der Entwicklung, zunächst die Erstellung von mtDatenbanken voranzutreiben. Die Magdeburger mtDNA Datenbank <http://www.D-Loop-Base.de> [Wittig et al. (2000)] ist als ein Schritt in diese Richtung zu sehen. Neben den Nachteilen der forensischen mtAnalyse gibt es im Vergleich zur Analyse chromosomaler Marker eine Reihe von Vorteilen. Diese leiten sich einerseits von der hohen Sensitivität der Analyse andererseits von dem einzigartigen Vererbungsmodus ab. Eine Chance, telogene Haare typisieren zu können, ergibt sich bei guter Aussicht auf Erfolg nur für die Anwendung der mitochondrialen DNA-Analyse [Higuchi et al. (1988), Wilson et al. (1995), Linch et al. (1998)]. Auch ist die Erfolgsaussicht, aus bodengelagerten Skeletten oder mumifiziertem Gewebe amplifizierbare DNA extrahieren zu können, mittels mtDNA-Analyse aussichtsreicher [Oota et al. (1995)] als bei nukleärer DNA.

In bestimmten Situationen, zum Beispiel bei Skelettidentifikationen, ergeben sich aus dem Vererbungsmodus der mtDNA besondere Möglichkeiten für den Abstammungsnachweis. Wenn als Vergleichsmaterial nur die DNA eines Geschwisters herangezogen werden kann, ist die Identifizierung eines Skelettes mit ausreichender Zuverlässigkeit fast immer nur über mtDNA-Analyse möglich. Es ist zu bedenken, dass die normalerweise anzunehmende gleiche Vaterschaft für Geschwister keinesfalls sicher ist. Die Dunkelziffer bei der Rate der illegitim gezeugten Kinder wird in Deutschland auf der Basis von Untersuchungsergebnissen [Göhler (1981)] auf etwa sechs Prozent geschätzt.

Es ist zu beachten, dass Fehlbestimmungen im Identifizierungsfall (oder auch nur die diesbezügliche gezielte Befragung eines betroffenen Verwandten zur Vermeidung einer Fehlbestimmung) schwerwiegende ethische Probleme aufwerfen. Zum Beispiel dann, wenn die Befragten über die Abstammungsverhältnisse keine Auskunft geben möchten. Die Identifizierung über den Weg der mitochondrialen Analyse setzt dagegen nur die Abstammung

von der gleichen Mutter voraus - eine Annahme, die fast immer als sicher angesehen werden kann. Dabei bleibt zu beachten, dass die Mutabilität mitochondrialer DNA höher ist als die nukleärer DNA. Mitochondriale Mutationen führen zunächst zu Heteroplasmien. Die Bottleneck-Selektion kann dann in einer Position zu Differenzen zwischen Mutter und Kind führen. Umsichtige Befundinterpretationen können jedoch Fehlbestimmungen vorbeugen [Michael (2000)].

Für forensische Belange ist es auch wichtig, dass mitochondriale Polymorphismen ein Potenzial zur ethnischen Differenzierung von Spuren aufweisen. Das ergibt sich daraus, dass mtDNA keine Möglichkeit der Rekombination besitzt, und dass mtHaplotypen demzufolge (von Mutationen abgesehen) immer unverändert weitervererbt werden. Ebenso sind aber die Chancen, Informationen aus einer Spur zu gewinnen, die weit über das Individualisierungsproblem im engeren Sinne hinaus reichen, hervorzuheben. Besonders dann, wenn Leichen und Skelettteile zur Identifizierung anstehen und a priori weder Vergleichsmaterial von fraglichen Verwandten zum Abstammungstest zur Verfügung steht, noch sonstige nützliche Informationen vorliegen, können Marker mit Informationswert zur ethnischen Zugehörigkeit von hoher Bedeutung sein. Probleme, die Informationssysteme dieser Art benötigen, sind nach Flugzeug- und anderen Verkehrskatastrophen oder auch im Zusammenhang mit der Kriegsopferbergung (zum Beispiel in Vietnam) von Belang.

Die bisher allgemein zu beobachtende geringe Verbreitung der Nutzung mitochondrialer Polymorphismen für forensische Belange ist nicht ausschließlich durch die Natur der mtDNA und den damit zusammenhängenden Einschränkungen der Aussagefähigkeit verbunden. Der im Vergleich zur STR-Analyse hohe Aufwand des Sequenzierens und die Ungewissheit, ob bei schlechter Spurenlage eine Sequenzierung überhaupt gelingt, können als die hauptsächlichen Hemmnisse der Anwendung der forensischen mtDNA-Analyse angesehen werden.

Das Anliegen, das Potenzial der Analyse der mitochondrialen DNA auch dann auszuschöpfen, wenn die Untersuchungsumstände ungünstig sind (verschmutzte Spuren, Mischspuren, Spuren mit degradiertem DNA u.s.w.) erfordert die Entwicklung beziehungsweise Adaptation geeigneter Techniken, welche die Sequenzierung ergänzen.

- **Die Restriktionsanalyse**

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass es in mancher Hinsicht ausreichend ist, zur Verbesserung der Aussagefähigkeit der mitochondrialen Analyse neben der Sequenzierung andere bereits etablierte einfache Methoden einzusetzen. Einen besonderen Stellenwert nimmt hierbei die Untersuchung mitochondrialer RFLPs ein. Diese Untersuchungsmethode war schon vor der Einführung des Sequenzierens in der allgemeinen Routine etabliert. So gab es auf der Basis dieser Methode bereits frühzeitig Basisstudien zur Mitochondriengenetik [Brown et al. (1980), Giles et al. (1980)], populationsgenetische Studien [Torroni et al. (1994)] und medizinisch-genetische Untersuchungen [Taanman et al. (1997), Kuwahara et al. (1992)]. Die Anwendungsmöglichkeiten von Restriktionsenzymen zur forensischen mtDNA-Analyse sind mannigfaltig:

Wenn geprüft werden soll, ob die Komponente einer Vergleichs-DNA (z.B. Tatverdächtiger) in einer Mischspur vorhanden ist, kann dies, obwohl eigentlich die Sequenzierung die Methode der Wahl ist, gegebenenfalls auch durch einen Restriktionstest nachgewiesen werden. Außerdem, wenn unter einem hohen Probenaufkommen auf ein bestimmtes mtDNA-Muster gescreent werden soll, bietet sich der Restriktionstest an, weil eine Sequenzierung hunderter Proben nicht realisierbar wäre. Die vereinfachten Methoden sind aber besonders auch dazu geeignet, für ausgewählte Loci einen größeren Bestand an Populationsdaten zu erarbeiten als dies mittels Sequenzierung möglich wäre. Wie anhand der hier vorgelegten Befunde gezeigt wurde, ist die Restriktionstechnik geeignet, die für Populationsstudien notwendigen Stichprobenumfänge zu bewältigen.

- **Verwendbarkeit der Befunde für den Genlocus nt00073 im Kontext der forensischen Medizin**

Der Locus nt00073 liegt in der HVII-Region und ist somit ein gut untersuchter Genort der mitochondrialen Genetik. Wie aus früheren Veröffentlichungen bekannt war [Lutz et al. (1998), Piercy et al. (1993), Rousselet und Mangin (1998), Parson et al. (1998), Macaulay et

al. (2000)], ist nt00073 ein variabler Ort in kaukasischen Populationen mit einer Häufigkeit der CRS-konformen Allels A von 50 bis 60 Prozent. Ganz anders sieht die Situation in asiatischen, südamerikanischen und afrikanischen Populationen aus. Hier hat der größte Teil der Bevölkerung, bei den Japanern sogar alle untersuchten Proben, das Allel G wie in der CRS. Die Kenntnis der ermittelten Populationsfrequenzen der Loci erlaubt Rückschlüsse auf die Wahrscheinlichkeit der Zugehörigkeit zu ethnischen Gruppen. Beispielsweise würde auf einem Kriegsgräberfeld in Vietnam ein Skelett, dessen mtDNA das Allel L00073A aufweist, mit hoher Wahrscheinlichkeit als nicht aus der vietnamesischen Population stammend erkannt werden.

Vergleichbare Fragestellungen treten bei der Verbrechensaufklärung auch im europäischen Umfeld auf. Hierbei ist unter anderem an Tötungsverbrechen, die im Zusammenhang mit Menschenhandel zu verzeichnen sind, zu denken.

Tabelle 19: Auflistung ausgewählter Loci am Beispiel des D-Loops, die für Populationsstudien interessant erscheinen. Die Liste bezieht sich auf bekannte Daten aus Mitteleuropa [nach Wittig (2000)].

Position	Base	Häufigkeit (%) von (850)
315.1	C	98,0
263	G	97,5
73	G	51,8
309.1	C	51,3
16126	C	19,6
152	C	19,3
195	C	16,7
16311	C	14,2
16294	T	11,3
309.2	C	9,8
16304	C	9,7
16189	C	9,4
146	C	9,1

150	T	8,8
16069	T	8,7

Allerdings dürfte die Situation nicht in allen Lagen so eindeutig ausfallen. Ziel muss es sein, weitere aussagekräftige mtLoci zu identifizieren und angemessene Analyseverfahren zu etablieren. Der Weg dahin führt über Populationsstudien wie die hier vorliegende. Loci, die nach dem Stand der Literatur dafür von Interesse sind, sind in der Tabelle 19 aufgeführt.

Mit den Befunden der ethnischen Unterscheidbarkeit in den SNPs verbunden ist die Feststellung einer populationsspezifischen PD. Für den Locus nt00073 ist entsprechend der Allelverteilung die PD in kaukasischen Populationen hoch. In der Fallarbeit kann der Locus somit einen hohen Beitrag zu Individualisierung leisten. Dagegen ist der Beitrag des Locus in asiatischen offenbar nahe Null. In südamerikanischen Ländern mit ihrer europäisch-indianischen Mischpopulation ist das Problem differenziert zu betrachten.

Eine mögliche Ausnutzung des nt00073 Polymorphismus ist für forensische Fallarbeiten vorstellbar, wenn eine Mischspur von zwei beteiligten (z.B. Opfer und mutmaßlicher Täter) vorliegt. Die Sequenzierung von Mischspuren funktioniert normalerweise nicht zufriedenstellend. Man kann dann unter günstigen Umständen den Anteil des Opfers mit Hilfe der RFLP-Technik aus der Probe eliminieren, wenn beide sich in einem Schnittort unterscheiden. Die Aufzeichnung der unbekannten Sequenz des mutmaßlichen Täters kann dann mit hoher Zuverlässigkeit erfolgen [Michael et al. (2000)]. Da am Locus nt00073 eine hohe Variabilität, zumindest unter Europäern, zu verzeichnen ist, bietet sich dieser Locus für diese Art der Untersuchung an. Diese Strategie ist bezogen auf den Locus nt00073 in ca. 25% der Mischspuren aus zwei Komponenten erfolgreich.

- **Verwendbarkeit der Befunde für den Genlocus nt16519 im Kontext der forensischen Medizin**

Der Locus nt16519 liegt weder in der HVI- noch in der HVII-Region. Er ist daher wenig untersucht worden. Es zeigt sich in allen Populationen eine hohe Variabilität. Daraus folgt, dass sein Beitrag zur Identifizierung von Spuren in allen Populationen gut ist, dass aber eine Differenzierung zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen gering ist. Auch hier gilt

analog zum Locus nt00073, dass unter günstigen Umständen die Möglichkeit der Trennung von Spuren nach dem Sequenzieren einen Beitrag zur Identifizierung leisten kann.

- **Analyse des Haplotyp nt00073/ nt16519 in der RFLP-Technik**

Es zeigt sich, dass bei der Unterscheidung zwischen verschiedenen ethnischen Gruppen die Kombination aus den Allelen nt00073 und nt16519 einen nur geringfügig höheren Beitrag leistet als der Ort nt00073 allein. Die Power of Discrimination ist aber durch die Kombination in der syrischen (möglicherweise auch in anderen arabischen Populationen) und in der deutschen Population besonders hoch. Daraus folgt, dass bei der Konzeption von forensischen mtAnalyse-Konzepten die Analyse dieser beiden Loci immer Berücksichtigung finden sollten.

- **Zur Sensitivität und Spezifität der RFLP- und LightCycler-Untersuchung**

Die Sensitivität gibt die Fähigkeit eines Testes an, eine gesuchte Eigenschaft zu erkennen. Im klinischen Test bedeutet dies, tatsächlich „Kranke“ auch als krank zu erkennen. In unserem Versuch wäre die Sensitivität das Verhältnis der festgestellten Transitionen zu den tatsächlich vorhandenen. Die Spezifität ist das Verhältnis der richtig negativ erkannten zu allen negativen Proben. Das wären im Fall des Locus nt00073 alle Proben mit der Base A, die auch als solche erkannt werden.

Die RFLP-Methode ist eine gut etablierte und anerkannte Technik zum Nachweis von SNPs. Dabei kann von einer hohen Sensitivität und Spezifität ausgegangen werden. Mutationen im Bereich der Restriktionsequenz machen diese Methode störanfällig. So ist es zum Beispiel möglich, dass eine Substitution oder Deletion in direkter Nachbarschaft zum untersuchten Polymorphismus einen Verdau verhindert und so das Ergebnis verändert. Die Transition nt00073A→G würde nicht erkannt werden. Die Spezifität des Testes wäre somit herabgesetzt. Die Sensitivität ist weniger störanfällig. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Transition außerhalb der zu untersuchenden Sequenz einen Restriktionsort kreiert, ist gering. Sie wäre überdies durch die abweichende Fragmentgröße erkennbar.

Bei der LightCycler-Technik handelt es sich um eine Methode mit hoher Spezifität und Sensitivität [Koenig et al. 2001]). Das aufwändige Design der Oligonucleotide ist auf die zu untersuchende Sequenz abgestimmt. Punktmutationen, Deletionen und Substitutionen in diesem Bereich können aber zu mismatch-Bindungen führen. Dabei ändert sich die Schmelztemperatur und somit auch die Spezifität der Methode.

- **Evaluation der Ergebnisse aus der LightCycler-Untersuchung**

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die LightCycler-Technik eine zuverlässige und schnelle Methode der DNA-Analysen ist, die sich auch zur Untersuchung von mitochondrialer DNA eignet. Einige Vorteile sind offensichtlich: Der Zeitaufwand der Untersuchung ist im Vergleich zur herkömmlichen PCR und anschließenden RFLP-Technik wesentlich reduziert. Die PCR und die Auswertung erfolgen im gleichen Arbeitsgang. Schon nach etwa 30 Minuten liegen die Ergebnisse vor, während man für die RFLP-Technik mehrere Arbeitsgänge benötigt und die Ergebnisse normalerweise erst am zweiten Arbeitstag erhält. Die Möglichkeit einer Kontamination ist in den Untersuchungen am LightCycler deutlich verringert. Das resultiert aus der reduzierten Zahl von Arbeitsgängen und aus der Tatsache, dass die PCR-Produkte in geschlossenen Gefäßen ausgewertet und dann verworfen werden. Damit ist das Risiko der Carry-over-Kontamination vollständig behoben. Nachteilig ist das aufwendige Design der Oligonucleotide für die LightCycler-Technik.

Während die Primer für die RFLP Technik ohne Probleme (auch von wenig geübtem Personal) entworfen werden können, erfordert das Design der LightCycler-Oligonucleotide viel Erfahrung. Für die Untersuchungen am LightCycler wurden die zugehörigen Primer, Sensoren und Anchor im Tibmolbiol-Labor in Berlin für unseren Bedarf entworfen. Aufgrund von Schwierigkeiten bei der Ausführung der LC-Untersuchungen konnten die oben genannten Untersuchungen der Loci nicht, wie zunächst geplant, in einem, sondern mussten in zwei Versuchsschritten durchgeführt werden. Diese Arbeit konnte zeigen, dass die LightCycler-Methode eine innovative und sichere Ergänzung in der bisherigen forensischen Forschung darstellen kann.

4.2. Populationsgenetische Hintergründe

Der Ursprung des Homo sapiens wird auf Grund von mitochondrialen [Chen et al. (1995), Cann et al. (1987)], Y-chromosomalen [Paabo (1995, 1999)], archäologischen, anatomischen und linguistischen Funden in Afrika vermutet. Die mitochondriale DNA weist in Afrika die höchste Vielfalt auf, was darauf schließen lässt, dass die Menschheit dort ihren Ursprung nahm [Watson et al. (1996)]. Zahlreiche mathematische Algorithmen wurden entwickelt, um die Spur der Menschheit zu ihrem Ursprung zurück zu verfolgen [Forster et al. (2001), Vigilant et al. (1991)]. Der Homo erectus, der sich etwa zur gleichen Zeit in Südwestasien entwickelte, wurde durch Homo sapiens verdrängt, ohne dass eine Mischung stattgefunden hat [Cann et al. (1987)]. So besagt es die heute favorisierte „out of africa“-Theorie.

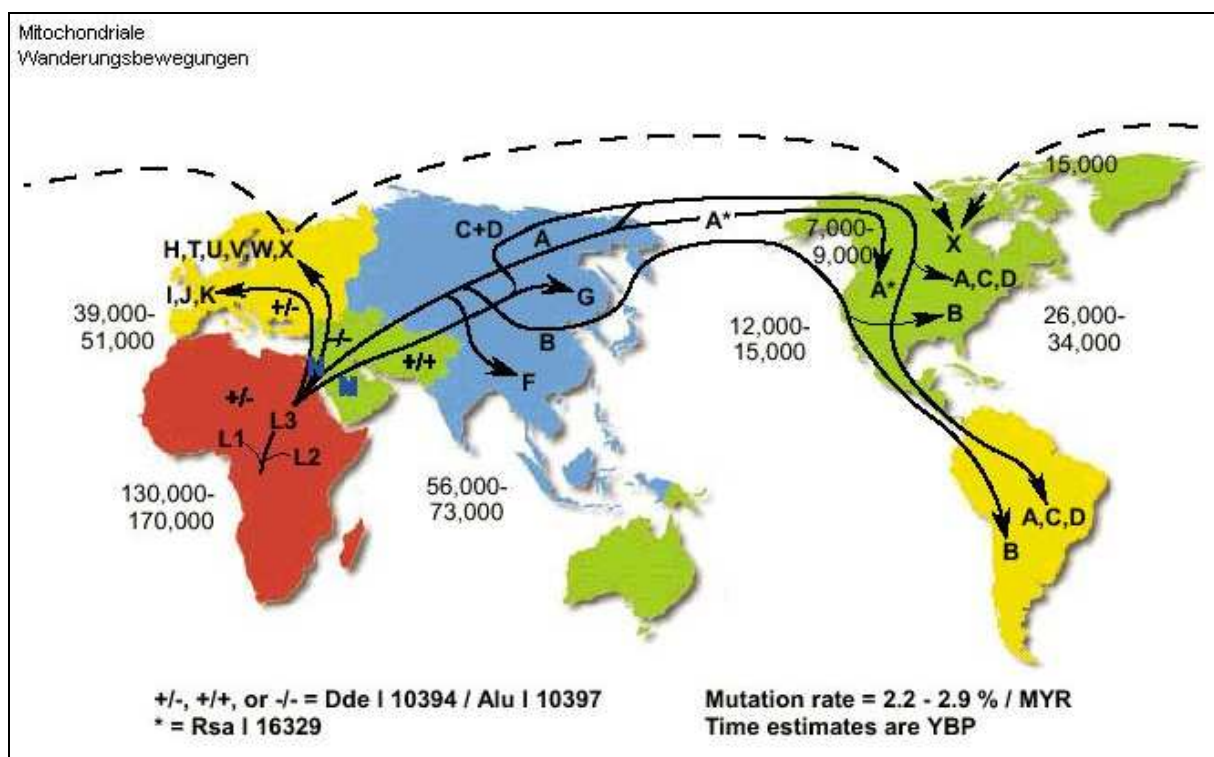


Abbildung 14: Migrationsverlauf der Menschen anhand von mitochondrialen Linien. Aus Afrika (Linien L1, L2, L3) stammend wanderten die Menschen nach Europa (Linien H, T, U, V, W, X, I, J, K) und nach Asien (Linien C+D, A, G, B, F). Über Sibirien kamen die Menschen dann in verschiedenen Wanderungswellen nach Amerika (Linien A, C, D, B, X). Die Abbildung stammt aus: <http://www.gen.emory.edu/MITOMAP/WorldMigrations.pdf>

Sykes (2001) berichtet über sieben Hauptlinien in Europa, die er die „Sieben Töchter Europas“ nennt. Die verschiedenen Gruppen sind in ganz Europa vertreten, ohne dass signifikante Häufungen auftreten. Von dieser Kohorte stammen ebenfalls die Syrer ab [Sykes (2000)].

Andere Studien teilen die Linien in neun Haplogruppen mit jeweiligen Untergruppen ein (siehe Abbildung 14) [Torroni et al. (2000), Macaulay et al. (1999)]. Ob sich diese Linien an den in dieser Arbeit untersuchten Genloci unterscheiden, ist nicht untersucht worden. Das muss eher angezweifelt werden, weil die vor 18.000 Jahren aufgetretene Eiszeit in Europa die Menschen gezwungen hat, in wärmere Gegenden zu ziehen. Vergleichende Arbeiten zwischen prähistorischen Knochenfunden und den heute in Europa vertretenen mitochondrialen Sequenzen deuten darauf hin, dass die Vorfahren der heutigen Europäer aus der Neolithenzeit vor circa 5200 bis 6400 Jahren stammen. Eine Kontinuität zwischen mesolithischen und heutigen Europäern konnte nicht gefunden werden [De Benedetto et al. (2000), Simoni et al. (2000)].

Tabelle 19: Charakteristische SNPs zur Identifizierung von mtHaplotypen und deren geographischer Herkunft [nach Alves Silva (2000)]. „+“ gibt das geographische Vorkommen der jeweiligen Haplotypen an.

Haplotyp	Charakteristische RFLP	Status		
		Afrika	Amerika	Europa
L1a	+3592HpaI, +11641HaeIII	+	-	-
L1b	+3592HpaI, -7055AluI, +2349MboI	+	-	-
L1c	+3592HpaI, +9070TaqI, +12810RsaI	+	-	-
L2	+3592HpaI, +16389 HinfI	+	-	-
L3b	+10084 TaqI	+	-	-
L3d	-3592HpaI, -8616MboI	+	-	-
L3e	-3592HpaI, +2349MboI	+	-	-
A	+663HaeIII	-	+	-
B	9bp-Deletion	-	+	-
C	-13259HincII	-	+	-
D	+5176AluI	-	+	-
H	-7025AluI	-	-	+
V	-4577NlaIII	-	-	+
HV	+14766MseI	-	-	+
U	+12308HinfI	-	-	+

K	+9052 <i>Hae</i> II	-	-	+
J	+13704 <i>Bst</i> NI	-	-	+
T	+13366 <i>Bam</i> HI, +15606 <i>Alu</i> I	-	-	+
I	-4529 <i>Hae</i> II, +8249 <i>Ava</i> II, +16389 <i>Bam</i> HI, +10032 <i>Alu</i> I	-	-	+
W	+8249 <i>Alu</i> I, -8994 <i>Hae</i> III	-	-	+
X	-1715 <i>Dde</i> I	-	+	+

Etwa zeitgleich drangen die Menschen auch auf den asiatischen Kontinent vor. Die verschiedenen aus dieser Wanderung entstandenen Haplogruppen gehen aus der Abbildung 14 hervor. Studien konnten zeigen, dass die Asiaten untereinander große Ähnlichkeiten aufweisen. Ivanova et al. (1999) untersuchten verschiedene Enzymmorphen und HLA-Marker und postulierten einen dualen Ursprung von Vietnamesen und Chinesen. Ungefähr zur gleichen Zeit, als die ersten Menschen über die Behringstraße von Sibirien nach Amerika übersetzten, begann die Besiedlung Japans. Zunächst kamen die Dschomon-Siedler, andere spätere Übersiedler kamen aus Korea und besiedelten die umliegenden Inseln. Neben archäologischen Funden konnten auch Untersuchungen an mtDNA Aufschluss über die unterschiedliche Herkunft verschiedener Einwohner Japans geben [Oota et al. (1995)]. In der vorliegenden Arbeit konnte nicht auf unterschiedliche Cluster japanischer Einwohner eingegangen werden.

Über die Herkunft der amerikanischen Ureinwohner wird viel spekuliert. Gut untersucht sind die vier Haplogruppen A, B, C, D. Die fünfte in Amerika vorkommende Haplogruppe X findet man nicht in Alaska und auch nicht in Sibirien. Theorien über die Herkunft der Menschen mit der Haplogruppe X gehen davon aus, dass sie an der Nordküste Asiens entlang bis zur Pazifik-Küste Amerikas gesegelt (?) sind.

Die Besiedlung Amerikas soll in drei Etappen stattgefunden und dabei vier verschiedene Mitochondrienpopulationen nach Amerika gebracht haben [Monsalve et al. (1994, 1996, 1997), Lorenz et al. (1996, 1994)]. Die erste Wanderwelle brachte die Amerindianer [Torroni et al. (1994)]. Diese Gruppe hat Nord-, Mittel- und Südamerika eingenommen. Die Na-Dene-Indianer kamen mit der zweiten Migration. Als letzte Gruppe erschienen die Aluet-Eskimos. Diese Gruppen besiedelten vorwiegend den Norden Amerikas.

Über peruanische Indianer ist wenig veröffentlicht. Die peruanischen, Quechua sprechenden Ureinwohner gehören zu den Amerindianern. Die meisten der untersuchten Proben konnten der mitochondrialen Haplogruppe B zugeordnet werden [Rodriguez-Delfin et al. (2001)]. Diese Haplogruppe unterscheidet sich stark von den anderen drei Haplogruppen A, C und D. Ihre Sequenz-Variation ist geringer, so dass von einer späteren Ankunft ausgegangen werden kann [Wallace et al. (1992)].

Auch die in dieser Arbeit gefundenen Sequenzen sind mit der gültigen These, dass die amerikanischen Indianer von asiatischen Vorfahren abstammen, vereinbar. Alle Frequenzen der beiden SNPs sind bei Japanern, Vietnamesen und peruanischen Indianern ähnlich.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Diese Arbeit verfolgte zwei Ziele. Zum einen sollte eine alternative Labortechnik mit einer gut untersuchten Methode verglichen werden. Zum anderen war eine populationsgenetische Studie Inhalt der Arbeit.

Für den Vergleich zwischen alten und alternativen Labormethoden wurde die RFLP-Technik mit der innovativen LightCycler-Technik verglichen. Die RFLP-Technik wird mittlerweile schon seit vielen Jahren für forensische [Forster et al. (1996)] und anthropologische [Brown (1980)] Zwecke auch in der Mitochondrienforschung angewendet. Die Methode hat sich bewährt und ist weithin akzeptiert.

Der LightCycler bringt durch weniger Arbeitsschritte und eine schnellere Arbeitsweise Zeitersparnis und präziseres Arbeiten mit sich. Die Gefahr der carry-over-Kontamination wird durch Reduktion der Arbeitsschritte vermindert. Der LightCycler ist eine genaue und sichere Methode zur Detektion von SNP.

Der LightCycler erfordert eine teure und gut erprobte Einarbeitung bevor er in die Routine eingehen kann. Die zur Zeit für den LightCycler auftretenden hohen Preise für Kits und Chemikalien-Design könnten in der Routinediagnostik bald abnehmen.

Die Populationsstudie brachte verschiedene Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass der Locus nt16519 zu den am meisten variablen Orten der mitochondrialen DNA in allen Populationen gehört. Dieser Locus war bisher wenig untersucht, weil er sich nicht in der HV-Region befindet. Zur ethnischen Differenzierung kann er keinen großen Beitrag leisten.

Die Haplotypisierung von Locus nt00073 und nt16519 zusammen liefert ein hohes Differenzierungspotenzial, besonders in den Proben, die auf beiden Loci sehr polymorph sind. Das sind besonders die syrischen und europäischen Populationen. Der Locus nt00073 ist lediglich in der deutschen und der syrischen Population hoch polymorph. In allen anderen untersuchten Populationen zeigt sich der Locus nahezu monomorph mit G abweichend von der CRS. Forensische Konsequenzen ergeben sich für Einschluss- beziehungsweise Ausschlusswahrscheinlichkeiten für Verdächtige aus den verschiedenen ethnischen Gruppen.

6. Literaturverzeichnis

1. Allen M, Engstrom AS, Meyers S, Handt O, Saldeen T, von Haeseler A, Paabo S, Gyllensten U. Mitochondrial DNA sequencing of shed hairs and saliva on robbery caps: sensitivity and matching probabilities. *J Forensic Sci.* 1998 May;43(3):453-64.
2. Alves-Silva J, daSilva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000 Sep;67(2):444-61.
3. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 1981 Apr 9;290(5806):457-65.
4. Andersson S, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, Naslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG. The Genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature.* 1998. 396 (6707):133-40.
5. Andreasson H, Asp A, Alderborn A, Gyllensten U, Allen M. Mitochondrial sequence analysis for forensic identification using pyrosequencing technology. *Biotechniques.* 2002 Jan;32(1):124-6, 128, 130-3.
6. Aquadro, CF; Greenberg, BD. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics.* 1983 Feb; 103(2): 287-312
7. Bendall KE, Sykes BC. Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet.* 1995 Aug;57(2):248-56.
8. Bodenteich A, Mitchell LG, Polymeropoulos MH, Merril CR. Dinucleotide repeat in the human mitochondrial D-loop. *Hum Mol Genet.* 1992 May;1(2):140. No abstract available.
9. Bogenhagen D, Clayton DA. The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem.* 1974 Dec 25;249(24):7991-5.
- 10.Boles TC, Snow CC, Stover E. Forensic DNA testing on skeletal remains from mass graves: a pilot project in Guatemala. *J Forensic Sci.* 1995 May;40(3):349-55.
- 11.Brown GG, Simpson MV. Intra- and interspecific variation of the mitochondrial genome in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*: restriction enzyme analysis of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationships. *Genetics.* 1981 Jan;97(1):125-43.
- 12.Brown WM, George M Jr, Wilson AC. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Apr;76(4):1967-71.

13. Brown WM, Prager EM, Wang A, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *J Mol Evol.* 1982;18(4):225-39.
14. Brown WM. Polymorphism in mitochondrial DNA of humans as revealed by restriction endonuclease analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980 Jun;77(6):3605-9
15. Budowle B, Wilson MR, DiZinno JA, Stauffer C, Fasano MA, Holland MM, Monson KL. Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. *Forensic Sci Int.* 1999 Jul 12;103(1):23-35.
16. Cann RL, Brown WM, Wilson AC. Evolution of human mitochondrial DNA: a preliminary report. *Prog Clin Biol Res.* 1982;103 Pt A:157-65.
17. Cann RL, Brown WM, Wilson AC. Polymorphic sites and the mechanism of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics.* 1984 Mar;106(3):479-99.
18. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature.* 1987 Jan 1-7;325(6099):31-6.
19. Cann RL, Wilson AC. Length mutations in human mitochondrial DNA. *Genetics.* 1983 Aug;104(4):699-711.
20. Chen YS, Torroni A, Excoffier L, Santachiara-Benerecetti AS, Wallace DC. Analysis of mtDNA variation in African populations reveals the most ancient of all human continent-specific haplogroups. *Am J Hum Genet.* 1995 Jul;57(1):133-49.
21. Comas D, Paabo S, Bertranpetit J. Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA. *Genome Res.* 1995 Aug;5(1):89-90.
22. Corach D, Sala A, Penacino G, Iannucci N, Bernardi P, Doretti M, Fondebrider L, Ginarte A, Inchaurregui A, Somigliana C, Turner S, Hagelberg E. Additional approaches to DNA typing of skeletal remains: the search for "missing" persons killed during the last dictatorship in Argentina. *Electrophoresis.* 1997 Aug;18(9):1608-12.
23. De Benedetto G, Nasidze IS, Stenico M, Nigro L, Krings M, Lanzinger M, Vigilant L, Stoneking M, Paabo S, Barbujani G. Mitochondrial DNA sequences in prehistoric human remains from the Alps. *Eur J Hum Genet.* 2000 Sep;8(9):669-77.
24. Forster P, Harding R, Torroni A, Bandelt HJ. Origin and evolution of Native American mtDNA variation: a reappraisal. *Am J Hum Genet.* 1996 Oct;59(4):935-45.
25. Forster P, Torroni A, Renfrew C, Rohl A. Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Mol Biol Evol.* 2001 Oct;18(10):1864-81.
26. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Nov;77(11):6715-9.

27. Gill P, Brenner C, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Jobling MA, de Knijff P, Kayser M, Krawczak M, Mayr WR, Morling N, Olaisen B, Pascali V, Prinz M, Roewer L, Schneider PM, Sajantila A, Tyler-Smith C. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Sci Int.* 2001 Dec 15;124(1):5-10.
28. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet.* 1994 Feb;6(2):130-5.
29. Ginther C, Issel-Tarver L, King MC. Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nat Genet.* 1992 Oct;2(2):135-8.
30. Göhler W. Die Bedeutung der Serogenetik im Teilgebiet der Humangenetik. *Z ges inn Med.* 1981, 36:342-6
31. Graff J. Living in the Past. *Time*, April 2000, Vol. 157, no. 17, 52-59
32. Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial evolution. *Science.* 1999 Mar 5;283(5407):1476-81.
33. Hagelberg E, Clegg JB. Genetic polymorphisms in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1993 May 22;252(1334):163-70.
34. Hagelberg E, Sykes B, Hedges R. Ancient bone DNA amplified. *Nature.* 1989 Nov 30;342(6249):485.
35. Handt O, Meyer S, von Haeseler A. Compilation of human mtDNA control region sequences. *Nucleic Acids Res.* 1998 Jan 1;26(1):126-9.
36. Harju L, Weber T, Alexandrova L, Lukin M, Ranki M, Jalanko A. Colorimetric solid-phase minisequencing assay illustrated by detection of alpha 1-antitrypsin Z mutation. *Clin Chem.* 1993 Nov;39(11 Pt 1):2282-7.
37. Heinecke A, Hultsch E, Repges R Medizinische Biometrie. Biomathematik und Statistik, Springer Verlag, Berlin 1992, 209-212
38. Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature.* 1988 Apr 7;332(6164):543-6.
39. Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriguez WC, Canik JJ, Merrill CR, Weedn VW. Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. *J Forensic Sci.* 1993 May;38(3):542-53.

40. Howell N, Halvorson S, Kubacka I, McCullough DA, Bindoff LA, Turnbull DM (1992) Mitochondrial gene segregation in mammals. Is the bottleneck always narrow? *Hum Genet* 90: 117-120
41. Howell N, Kubacka I, Mackey DA (1996) How rapidly does the human genome evolve? *Am J Hum Genet* 59: 501-509
42. Huizing M, DePinto V, Ruitenbeek W, Trijbels FJ, van den Heuvel LP, Wendel U. Importance of mitochondrial transmembrane processes in human mitochondriopathies. *J Bioenerg Biomembr.* 1996 Apr;28(2):109-14.
43. Ingman M, Kaessmann H, Paabo S, Gyllensten U. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 2000 Dec 7;408(6813):708-13.
44. Ivanova R, Astrinidis A, Lepage V, Djoulah S, Wijnen E, Vu-Trieu AN, Hors J, Charron D. Mitochondrial DNA polymorphism in the Vietnamese population. *Eur J Immunogenet.* 1999 Dec;26(6):417-22.
45. Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, Honda K, Jobling M, Krawczak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Pandya A, Parson W, Penacino G, Perez-Lezaun A, Piccinini A, Prinz M, Schmitt C, Roewer L, et al. Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med.* 1997;110(3):125-33, 141-9.
46. Kirches EJ, Winkler K, Warich-Kirches M, Szibor R, Wien F, Kunz WS, von Bossanyi P, Bajaj PK, Dietzmann K. mtDNA depletion and impairment of mitochondrial function in a case of a multisystem disorder including severe myopathy. *J Inherit Metab Dis.* 1998 Jun;21(4):400-8.
47. Koenig M, Reynolds KS, Aldous W, Hickman M. Comparison of Light-Cycler PCR, enzyme immunoassay, and tissue culture for detection of herpes simplex virus. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2001 Jul;40(3):107-10.
48. Krings M, Stone A, Schmitz RW, Krainitzki H, Stoneking M, Paabo S. Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell.* 1997 Jul 11;90(1):19-30.
49. Krysko DV, Roels F, Leybaert L, D'Herde K. Mitochondrial transmembrane potential changes support the concept of mitochondrial heterogeneity during apoptosis. *J Histochem Cytochem.* 2001 Oct;49(10):1277-84.
50. Kuwahara T, Fukao T, Kano M, Yamaguchi S, Oritani T, Hashimoto T. Identification of TaqI polymorphism in the mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase gene and familial analysis of 3-ketothiolase deficiency. *Hum Genet.* 1992 Nov;90(3):208-10.

- 51.Laan M, Gron-Virta K, Salo A, Aula P, Peltonen L, Palotie A, Syvanen AC. Solid-phase minisequencing confirmed by FISH analysis in determination of gene copy number. *Hum Genet.* 1995 Sep;96(3):275-80.
- 52.Lareu M, Puente J, Sobrino B, Quintans B, Brion M, Carracedo A. The use of LightCycler for detection of Y chromosome SNPs. *Forensic Sci Int.* 2001 May 15;118(2-3):163-8
- 53.LightCycler homepage. http://biochem.roche.com/lightcycler/lc_principles/lc_prin-per-mon02.htm
- 54.Linch CA, Smith SL, Prahlow JA. Evaluation of the human hair root for DNA typing subsequent to microscopic comparison. *J Forensic Sci.* 1998 Mar;43(2):305-14.
- 55.Lorenz JG, Smith DG. Distribution of the 9-bp mitochondrial DNA region V deletion among North American Indians. *Hum Biol.* 1994 Oct;66(5):777-88.
- 56.Lorenz JG, Smith DG. Distribution of four founding mtDNA haplogroups among Native North Americans. *Am J Phys Anthropol.* 1996 Nov;101(3):307-23.
- 57.Lundstrom R, Tavaré S, Ward RH. Modeling the evolution of the human mitochondrial genome. *Math Biosci.* 1992 Dec;112(2):319-35.
- 58.Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. *Hum Genet.* 1997 Dec;101(3):384.
- 59.Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *Int J Legal Med.* 1998;111(2):67-77.
- 60.Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S. mtDNA as a tool for identification of human remains. Identification using mtDNA. *Int J Legal Med.* 1996;109(4):205-9.
- 61.Lutz S, Wittig H, Weisser HJ, Heizmann J, Junge A, Dimo-Simonin N, Parson W, Edelmann J, Anslinger K, Jung S, Augustin C. Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Sci Int.* 2000 Sep 11;113(1-3):97-101.
- 62.Macaulay V, Richards R, Hickey E, Vega E, Cruciani F, Guida V, Scozzari R, Bonn  -Tamir B, Sykes B, Torroni A. The emerging tree of West Eurasian mtDNA: A Synthesis of Control-Region Sequences and RFLPs. *Am J Hum Genet.* 1999 Jan 6;64(1):232-49.
- 63.Max N, Willhauck M, Wolf K, Thilo F, Reinhold U, Pawlita M, Thiel E, Keilholz U. Reliability of PCR-based detection of occult tumor cells: lessons from real-time RT-PCR. *Melanoma Res.* 2001 Aug;11(4):371-8.

64. Merriwether, DA, Rothhammer, F, Ferrell, RE. Genetic variation in the New World: ancient teeth, bone, and tissue as sources of DNA. *Experientia*. 1994 Jun 15; 50(6): 592-601
65. Michael M. Erfassung von forensisch nutzbaren mitochondrialen DNA-Polymorphismen und Versuchsergebnisse zur selektiven Analyse von Mischspurenkomponenten. *biochem. Diss. Otto-von Guericke-Universität Magdeburg* 2000
66. MITOMAP Human mtDNA "Cambridge" Sequence.
<http://www.gen.emory.edu/MITOMAP/mitoseq.html>
67. Monsalve MV, Cardenas F, Guhl F, Delaney AD, Devine DV. Phylogenetic analysis of mtDNA lineages in South American mummies. *Ann Hum Genet*. 1996 Jul;60 (Pt 4):293-303.
68. Monsalve MV, Groot de Restrepo H, Espinel A, Correal G, Devine DV. Evidence of mitochondrial DNA diversity in South American aborigines. *Ann Hum Genet*. 1994 Jul;58 (Pt 3):265-73.
69. Monsalve MV. Mitochondrial DNA in ancient Amerindians. *Am J Phys Anthropol*. 1997 Jul;103(3):423-5.
70. Morley JM, Bark JE, Evans CE, Perry JG, Hewitt CA, Tully G. Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *Int J Legal Med*. 1999;112(4):241-8.
71. Nyren P, Karamohamed S, Ronaghi M. Detection of single-base changes using a bioluminometric primer extension assay. *Anal Biochem*. 1997 Jan 15;244(2):367-73.
72. Ohno S. The one ancestor per generation rule and three other rules of mitochondrial inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jul 22;94(15):8033-5.
73. Oota H, Saitou N, Matsushita T, Ueda S. A genetic study of 2,000-year-old human remains from Japan using mitochondrial DNA sequences. *Am J Phys Anthropol*. 1995 Oct;98(2):133-45.
74. Paabo S. Mutational hot spot in the mitochondrial microcosm. *Am J Hum Genet* 1996 59: 493-496
75. Paabo S, Gifford JA, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year old brain. *Nucleic Acids Res*. 1988 Oct 25;16(20):9775-87.
76. Pals G, Young C, Mao HS, et al. Detection of a single base substitution in a single cell using the LightCycler. *J Biochem Biophys Methods (Netherlands)*, Jan 30 2001, 47(1-2) p121-9.

77. Parson W, Parsons TJ, Scheithauer R, Holland MM. Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *Int J Legal Med.* 1998;111(3):124-32.
78. Pesole G, Sbisa E, Preparata G, Saccone C. The evolution of the mitochondrial D-loop region and the origin of modern man. *Mol Biol Evol.* 1992 Jul;9(4):587-98.
79. Pfeiffer H; Steighner R; Fisher R; Mornstad H; Yoon CL; Holland MM. Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population. *Int J Legal Med.* 1998; 111(6): 309-13
80. Piercy R, Sullivan KM, Benson N, Gill P. The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int J Legal Med.* 1993;106(2):85-90.
81. Poulton J, Brown MS, Cooper A, Marchington DR, Phillips DI. A common mitochondrial DNA variant is associated with insulin resistance in adult life. *Diabetologia.* 1998 Jan;41(1):54-8.
82. Poulton J. Mitochondrial DNA and genetic disease. *Bioessays.* 1992 Nov;14(11):763-8.
83. Rasmussen R, Morrison T, Herrmann M, Wittwer C. Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye. Roche Molecular Biochemicals. BIOCHEMICA No. 2/1998
84. Read SJ. Recovery efficiencies on nucleic acid extraction kits as measured by quantitative LightCycler PCR. *Mol Pathol.* 2001 Apr;54(2):86-90.
85. Renfrew C, Forster P, Hurles M. The past within us. *Nat Genet.* 2000 Nov;26(3):253-4.
86. Rodriguez-Delfin LA, Rubin-de-Celis VE, Zago MA. Genetic diversity in an Andean population from Peru and regional migration patterns of Amerindians in South America: data from Y chromosome and mitochondrial DNA. *Hum Hered.* 2001;51(1-2):97-106.
87. Roewer L, deKnijff P, Kayser M. Y chromosome STR Analysis in Forensic Practice. 2001, <http://www.promega.com/geneticid/proc>
88. Roewer L, Krawczak M, Willuweit S, Nagy M, Alves C, Amorim A, Anslinger K, Augustin C, Betz A, Bosch E, Caglia A, Carracedo A, Corach D, Dekairelle AF, Dobosz T, Dupuy BM, Furedi S, Gehrig C, Gusmao L, Henke J, Henke L, Hidding M, Hohoff C, Hoste B, Jobling MA, Kargel HJ, de Knijff P, Lessig R, Liebeherr E, Lorente M, Martinez-Jarreta B, Nievas P, Nowak M, Parson W, Pascali VL, Penacino G, Ploski R, Rolf B, Sala A, Schmidt U, Schmitt C, Schneider PM, Szibor R, Teifel-Greding J, Kayser M. Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR)haplotypes. *Forensic Sci Int.* 2001 May 15;118(2-3):106-13.

89. Ronaghi M. Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Anal Biochem.* 2000 Nov 15;286(2):282-8.
90. Ronaghi M. Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res.* 2001 Jan;11(1):3-11. Review.
91. Rousselet F, Mangin P. Mitochondrial DNA polymorphisms: a study of 50 French Caucasian individuals and application to forensic casework. *Int J Legal Med.* 1998;111(6):292-8.
92. Salas A, Lareu V, Calafell F, Bertranpetit J, Carracedo A. mtDNA hypervariable region II (HVII) sequences in human evolution studies. *Eur J Hum Genet.* 2000 Dec;8(12):964-74.
93. Sagner G, Goldstein C. Principles, Workflow and Advantages of the New LightCycler Relative Quantification Software. *Biochemica 3.* 2001:15-7
94. Sagner G, Goldstein C, van Miltenburg R. Detection of multiple reporter dyes in Real-time, on-line PCR analysis with the LightCycler System. Roche Molecular Biochemicals. *BIOCHEMICA* No. 2/1999:7-11
95. Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science.* 1999 Mar 5; 283(5407):1488-93. Review.
96. Schneider-Stock R, Emrich T, Peters B, Jaeger V, Roessner A. Analysis of human telomerase reverse transcriptase mRNA (hTERT) expression in myxoid liposarcomas using LightCycler real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Electrophoresis.* 2001 Apr;22(6):1098-101.
97. Seo Y, Stradmann-Bellinghausen B, Rittner C, Takahama K, Schneider PM. Sequence polymorphism of mitochondrial DNA control region in Japanese. *Forensic Sci Int.* 1998 Nov 9;97(2-3):155-64.
98. Simoni L, Calafell F, Pettener D, Bertranpetit J, Barbujan G. Geographical patterns of mtDNA Diversity in Europe. *Am J Hum Genet* 2000 Dec 15;66(1):262-78.
99. Sorenson MD, Fleischer RC. Multiple independent transpositions of mitochondrial DNA control region sequences to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Dec 24;93(26):15239-43.
100. Stone AC, Starrs JE, Stoneking M. Mitochondrial DNA analysis of the presumptive remains of Jesse James. *J Forensic Sci.* 2001 Jan;46(1):173-6.
101. Stoneking M, Hedgecock D, Higuchi RG, Vigilant L, Erlich HA. Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet.* 1991 Feb;48(2):370-82.

- 102.Stoneking M, Sherry ST, Redd AJ, Vigilant L. New approaches to dating suggest a recent age for the human mtDNA ancestor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1992 Aug 29;337(1280):167-75.
- 103.Sullivan K. Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 1994 Feb;6(2):130-5
- 104.Sykes B. Die sieben Töchter Evas. Warum wir alle von sieben Frauen abstammen-revolutionäre Erkenntnisse der Gen-Forschung. 2001, Gusav Lübke Verlag, Bergisch Gladbach.
- 105.Syvänen AC. From Gels to Chips: „minisequencing“ Primer Extension for Analysis of Point Mutations and single Nucleotide Polymorphisms, *Hum Mutat.* 1999 (13):1-10,
- 106.Szibor R, Michael M, Spitsyn VA, Plate I, Ginter EK, Krause D. Mitochondrial D-loop 3' (CA)_n repeat polymorphism: optimization of analysis and population data. *Electrophoresis* 1997 Dec;18(15):2857-60
- 107.Taanman JW, Bodnar AG, Cooper JM, Morris AA, Clayton PT, Leonard JV, Schapira AH. Molecular mechanisms in mitochondrial DNA depletion syndrome. *Hum Mol Genet.* 1997 Jun;6(6):935-42.
- 108.Torroni A, Neel JV, Barrantes R, Schurr TG, Wallace DC. Mitochondrial DNA "clock" for the Amerinds and its implications for timing their entry into North America. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Feb 1;91(3):1158-62.
- 109.Torroni A, Richards M, Macaulay V, Forster P, Villems R, Norby S, Savontaus ML, Huoponen K, Scozzari R, Bandelt HJ. mtDNA haplogroups and frequency patterns in Europe. *Am J Hum Genet.* 2000 Mar;66(3):1173-7.
- 110.Toyota T, Watanabe A, Shibuya H, Nankai M, Hattori E, Yamada K, Kurumaji A, Karkera JD, Detera-Wadleigh SD, Yoshikawa T. Association study on the DUSP6 gene, an affective disorder candidate gene on 12q23, performed by using fluorescence resonance energy transfer-based melting curve analysis on the LightCycler. *Mol Psychiatry.* 2000 Sep;5(5):489-494.
- 111.Tully G, Morley JM, Bark JE. Forensic Analysis of Mitochondrial DNA: Application of Multiplex Solid-Phase-Fluorescent Minisequencing to high Throughput Analysis. 2001 <http://www.promega.com/geneticidproc/eusymp2proc/default.htm>
- 112.Tully G, Sullivan KM, Nixon P, Stones RE, Gill P. Rapid detection of mitochondrial sequence polymorphisms using multiplex solid-phase fluorescent minisequencing. *Genomics* 1996 May 15;34(1):107-13

- 113.Upholt,WB; Dawid,IB. Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the D loop region. *Cell*. 1977 Jul; 11(3): 571-83
- 114.Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC. Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec;86(23):9350-4.
- 115.Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*. 1991 Sep 27;253(5027):1503-7.
- 116.Wallace DC, Torroni A. American Indian prehistory as written in the mitochondrial DNA: a review. *Hum Biol*. 1992 Jun;64(3):403-16.
- 117.Wallace DC. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*. 1999 Mar 5;283(5407):1482-8.
- 118.Walter GF. Myoencephalopathies with abnormal mitochondria: a review. *Clin Neuropathol*. 1983;2(3):101-13. Review.
- 119.Watson A. New tools. A new breed of high-tech detectives. *Science*. 2000 Aug 11;289(5481):850-4.
- 120.Watson E, Bauer K, Aman R, Weiss G, von Haeseler A, Paabo S. mtDNA sequence diversity in Africa. *Am J Hum Genet*. 1996 Aug;59(2):437-44.
- 121.Weichhold GM, Bark JE, Korte W, Eisenmenger W, Sullivan KM. DNA analysis in the case of Kaspar Hauser. *Int J Legal Med*. 1998;111(6):287-91.
- 122.Wilson M, Stoneking M, Holland M, DiZinno J. Guidelines for the use of mitochondrial sequencing in forensic science. *Crime Lab Digest* 1993; 20:68-77
- 123.Wilson MR, Polanskey D, Butler J, DiZinno JA, Replogle J, Budowle B. Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts. *Bio Techniques* 1995, 18: 662-669
- 124.Wittig H, Augustin C, Baasner A, Bulnheim U, Dima-Simonin N, Edelmann J, Hering S, Jung S, Lutz S, Michael M, Parson W, Poetsch M, Schneider PM, Weichhold G, Krause D. Mitochondrial DNA in the Central European population. Human identification with the help of the forensic mt-DNA D-loop-base database. *Forensic Sci Int*. 2000 Sep 11;113(1-3):113-8.
- 125.Wittig H. D-Loop-Base. Forensische Datenbank nichtcodierender mitochondrialer DNA-Sequenzen. Eine Analyse von 850 mtDNA-Sequenzen zentraleuropäischer Kaukasoider. *Med. Diss. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg*. 2000

126. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, et al. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control *Biotechniques* (United States), Jan 1997, 22(1) p176-81
127. Yaffe MP. The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science*. 1999 Mar 5;283(5407):1493-7. Review.
128. Yamada Y, Ohira H, Iwase H, Takatori T, Nagao M, Ohtani S. Sequencing mitochondrial DNA from a tooth and application to forensic odontology. *J Forensic Odontostomatol*. 1997 Jun;15(1):13-6.
129. Yamamoto T, Uchihi R, Kojima T, Nozawa H, Huang XL, Tamaki K, Katsumata Y. Maternal identification from skeletal remains of an infant kept by the alleged mother for 16 years with DNA typing. *J Forensic Sci*. 1998 May;43(3):701-5.
130. Yang JH, Lee HC, Wei YH. Photoageing-associated mitochondrial DNA length mutations in human skin. *Arch Dermatol Res*. 1995;287(7):641-8.
131. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*. 2001 Oct;92(1):57-70.

7. Anhang

Danksagung

„Die kleinen Schritte sind es, mit denen ich, ohne mit meiner Kraft zu wüsten, den Berg doch schließlich besteige.“ (Erwin Strittmatter)

Viele kleine Schritte musste ich tun, um diese Arbeit fertigzustellen. Die meisten von ihnen hätte ich allein nicht gehen können. Oft war ich auf die Unterstützung, den Rat und die Hilfe anderer Menschen angewiesen. Ich möchte die Gelegenheit nutzen, mich bei allen, die mir den Weg ebneten und unzählige Steine aus dem Weg räumten, ganz herzlich zu bedanken.

Hiermit danke ich Herrn Prof. Dr. med. D. Krause für die Überlassung des Themas und Herrn Prof. Dr. rer. nat. R. Szibor für die umfassende und intensive Betreuung während meiner Arbeit im Labor und der Zeit am Computer beim Schreiben der hier vorliegenden Arbeit.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Frau Dr. med. habil. R. Schneider-Stock vom Institut für Pathologie für die Bereitstellung des LightCycler-Gerätes und die beratende Rolle beim Umgang mit diesem.

Ich möchte nicht vergessen, mich bei allen Mitarbeiterinnen im DNA-Labor der rechtsmedizinischen und der pathologischen Institute an der Otto-von-Guericke-Universität in Magdeburg für die tatkräftige Unterstützung zu bedanken. Bei den Mitarbeitern des Institutes für Rechtsmedizin der Universität Hamburg, des International Forensic Research & Consulting, Köln und bei der Firma Tib Molbiol für die freundliche Zuarbeit. Bei den Mitarbeitern im Institute of Community Medicine, University of Tsukuba (Japan) und im Institute of Medicine, University of Hanoi (Vietnam) sowie im Instituto Peruano de Energia Nuclear, Lima (Peru) bedanke ich mich für die Bereitstellung der Proben.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner lieben Familie und meinem Mann Stephan Kriesen für die Geduld, das Verständnis und die Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Variabilität der mitochondrialen Genloci nt00073 und nt16519 im populationsgenetischen Vergleich - eine Untersuchung anhand von RFLP- und LightCycler-Daten

im Institut für Rechtsmedizin

mit Unterstützung durch Prof. Dr. med. Dieter Krause und
Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Szibor

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Rostock, den 10. November 2002

Ursula Szibor-Kriesen

Bildungsweg

1980-1990	Polytechnische Oberschule Beendorf
1990-1991	Erweiterte Oberschule „Heinrich Heine“, Haldensleben
1991-1992	Piner High School, Santa Rosa, USA
1992-1995	Gymnasium Am Bötschenberg, Helmstedt Abitur: Note 1,3
1995-1997	Studium der Medizin an der Universität Rostock Physikum: Note 1,7
1997-1998	Sokrates - Austausch mit Aarhus, Dänemark
1998-1999	Fortsetzung des Studiums der Medizin in Rostock 1.Staatsexamen: Note 2
Sommer 2001	2. Staatsexamen: Note 1,7
2001-2002	Praktisches Jahr (teilweise an der Brown-University, Providence, USA)
Oktober 2002	3. Staatsexamen: Note 1

Unterschrift