Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Ulm
amtierender Leiter: Herr Prof. Dr. E. Miltner

SNP-Typisierung in der forensischen Genetik unter Berücksichtigung der Analyse von degradierter DNA

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Rachel Klein
geboren in Köln

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Peter Wiegand
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Walther Vogel

Tag der Promotion: 16.11.2007

Meinen Eltern

„Wahre Worte sind nicht schön,

schöne Worte sind nicht wahr.“ (Lao Tse, Tao te King, Buch 2, Kapitel 81)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung ..... 1 – 15
1.1 DNA-Polymorphismen ..... 1 – 3
1.2 Forensische Genetik ..... 3 – 5
1.3. AB0-Blutgruppen Gen ..... 5 – 6
1.4 Mitochondriale DNA (MtDNA) ..... 6 – 8
1.5 Das Y-Chromosom ..... 8 – 10
1.6 Methoden der SNP-Analytik ..... 10 – 15
1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit 15
2. Material und Methoden ..... 17 – 26
2.1 DNA-Proben 17
2.2 Chemikalien 17
2.3 Größenmarker zur Bestimmung der Größe von PCR-Produkten 17
2.4 *Primer* ..... 17 – 18
2.5 Labormaterialien 18
2.6 Geräte 18
2.7 DNA-Extraktion 19
2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ..... 19 – 21
2.9 Reinigung der PCR-Produkte ..... 21 – 22
2.10 Elektrophorese / PAGE ..... 22 – 23
2.11 Silberfärbung ..... 23 – 24
2.12 Nachweis der SNPs ..... 24 – 25
2.13 Kapillarelektrophorese 26
3. Ergebnisse ..... 27 - 69
3.1 AB0-Blutgruppen-Gen ..... 27 – 44
3.2 mtDNA ..... 45 – 56
3.3 Y-Chromosom ..... 57 – 69
4. Diskussion ..... 70 – 89
4.1 Methodik der SNP-Detektion bei dem AB0-Blutgruppen-Gen, der mtDNA und dem Y-Chromosom ..... 70 – 81
4.2 AB0-Blutgruppen-Gen ..... 81 – 84

4.3 mtDNA ..... 84 – 87
4.4 Y-Chromosom ..... 87 – 90
4.5 Schlussbetrachtung 90
5. Zusammenfassung 91
6. Literatur ..... 92 -108
7. Anhang ..... 109 – 115
Danksagung 116
Lebenslauf ..... 117 – 118

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A. dest	Aqua dest
$AgNO_3$	Silbernitrat
APS	Ammoniumpersulfat
AU	Anson Unit Ein AU ist definiert als die Menge an Enzym, die pro Minute 1 µmol (181 µg) Tyrosin aus Casein freisetzt bei pH 7,5 und 37°C.
bp	Basenpaar, Größenangabe für Nukleinsäuren
BSA	*bovine serum albumin* (Rinderserum Albumin)
C	Cytosin
CHES	2 – (N-Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid
CIAP	*calf intestine alkaline phosphatase*
D-Loop	Region der mtDNA, Kontrollregion
DNA	*desoxyribonucleic acid* (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleotid
EDNAP	*European DNA Profiling group*
EMPOP	*EDNAP mitochondrial DNA population database*
ExoI	Exonuclease I aus *E. coli*
FRET	*Fluorescence resonance energy transfer*
HNO_3	Salpetersäure
HPLC	*High Performace Liquid Chromatography*
HV	hypervariable Region innerhalb der Kontrollregion der mtDNA
G	Guanin
kb	Kilobasenpaar
KpnI	Endonuclease aus *Klebsiella pneumoniae*
M	Molar
mA	Milliampere
MALDI-TOF	*matrix-assosiated laser desorption time-of-flight mass spectrometry*

$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
min	Minute
mM	Millimolar
ml	Milliliter
m-RNA	*messenger ribonucleic acid*
MSY	*male specific region of the Y chromosome*
mtDNA	mitochondriale DNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Na_2C0_3	Natriumcarbonat
$Na_2S_20_3$	Natriumthiosulfat
NRY	*non-recombining Y*
OLA	*oligonucleotide ligation assay*
PAA	Acrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	*polymerase chain reaction* (Polymerase Kettenreaktion)
PDA	Piperazindiacrylamid
pmol	Picomolar
RFLP	*restriction fragment length polymorphism*
RFU	*relative fluorescent unit*
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	*shrimp alkaline phosphatase*
SNP	*single nucleotid polymorphism*
SRY	*sex-determining region of the Y chromosome*
SSCP	*single-strand conformation polymorphism*
STR	*short tandem repeat*
T	Thymin
Taq	DNA-Polymerase des *Thermophilus aquaticus*
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminoethan
U	*unit*, Aktivitätseinheit eines Enzyms
Upm	Umdrehungen pro minute
VNTR	*variable number tandem repeats*

w/v	Masse pro Volumen

1. Einleitung

1.1 DNA-Polymorphismen

Vergleicht man menschliche Genome zweier nicht verwandter Individuen miteinander, so stimmen sie zu 99,99% überein (Venter et al 2001). Die restlichen 0,01% sind individuelle Unterschiede innerhalb der DNA-Sequenz, die als Polymorphismen bezeichnet werden. Neben Unterschieden an einzelnen Positionen in der DNA-Sequenz, die als SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) oder Punktmutationen bezeichnet werden, zählen dazu auch repetitive DNA-Sequenzen, bei denen Längenunterschiede zwischen nicht verwandten Individuen zu beobachten sind. Die DNA-Polymorphismen werden zu etwa 90% durch SNPs hervorgerufen (Collins et al. 1998).

1.1.1 Satelliten-DNA

Unter repetititven DNA-Sequenzen versteht man DNA-Bereiche, in denen sich Basenmotive von 1 bp (Basenpaar) bis hin zu mehreren 1000 bp wiederholen (Butler 2005). Je nach Länge der sich wiederholenden repetitiven DNA-Sequenzen und der Basenzusammensetzung werden verschiedene Typen unterschieden. Der Begriff Satelliten-DNA bezeichnet dabei hoch repetitive DNA-Sequenzen, die in heterochromatischen Bereichen des Genoms liegen und Motive 1 bp bis mehrere 1000 bp beinhalten (Britten and Kohne 1968, Strachan and Read 1996). Innerhalb des Oberbegriffs Satelliten-DNA differenziert man zwischen Mini- bzw. Mikrosatelliten, wobei Minisatelliten 10 bis 100 bp und Mikrosatelliten 2 bis 7 bp umfassen (Tautz 1993, Butler 2005).
Die hier auftretenden Variationen zwischen zwei Individuen bilden die Grundlage zur Identifikation und Abstammungsbegutachtung (Jeffreys and Pena 1993). Während bei Einführung der PCR-Technologie in die forensische Genetik mit den längeren VNTRs (*variable number tandem repeats*) gearbeitet wurde, die zu den Minisatelliten zählen, werden heute üblicherweise die kürzeren STRs (*short tandem repeats*) (Urquart et al. 1994) untersucht, die zu den Mikrosatelliten gehören.

Allele der Satelliten-DNA unterscheiden sich jeweils durch die Anzahl an Wiederholung und lassen sich anhand ihrer Länge charakterisieren. Da zwei und mehr Allele auftreten, bezeichnet man diese Loci als polymorph (Jeffrey and Pena 1993).

1.1.2 SNPs

Im Unterschied zu den Längenpolymorphismen der Satelliten-DNA sind SNPs Sequenzpolymorphismen. Eine SNP ist dadurch charakterisiert, dass an einer Position der DNA mindestens zwei verschiedene Nukleotide in einer Population auftreten. Die seltenere Variante ist dabei in mindestens 1 % der Population vertreten (Brookes 1999). Es handelt sich also um einen biallelischen Marker. Im Einzelfall können allerdings bis zu vier Allele auftreten (Philipps et al. 2004). Punktmutationen, die durch Insertion bzw. Deletion eines Nukleotids verursacht werden, werden rein formal als *indels* und nicht als SNPs bezeichnet (Brookes 1999).

Die Entstehung der Punktmutationen wird durch unterschiedliche Mechanismen beeinflusst, die einen Austausch des Nukleotids an dieser Position zur Folge hat. Dabei treten im Schnitt mehr Transitionen (Austausch von Purin gegen Purin bzw. Pyrimidin gegen Pyrimidin) auf als Transversionen (Austausch von Purin gegen Pyrimidin und umgekehrt) (Zhao and Boerwinkle 2002).

Werden SNPs zur Unterscheidung zweier Individuen genutzt, müssen rein rechnerisch mindestens 50 SNPs untersucht werden, um eine vergleichbare Aussagekraft zu erreichen werden wie mit einer Anzahl von bis zu 15 STRs (Gill 2001, Butler 2005). Voraussetzung dafür ist, dass die Frequenz der Allele des SNPs innerhalb der Population je 50% beträgt (Gill 2001). Da die Verteilung der Allelfrequenzen häufig nicht einer 50 zu 50 Verteilung folgt, liegt die Anzahl der untersuchten SNPs meist bei 100 – 150.

Schätzungen zufolge sollen etwa 11 Millionen SNPs, die die definierte Häufigkeit von ≥ 1% in der Population besitzen, zu finden sein (Kruglyak and Nickerson 2001). Eine 2001 erstellte SNP Karte des menschlichen Genoms verzeichnet allerdings nur etwa ein Zehntel der geschätzten SNPs, insgesamt 1,42 Millionen (Sachidanandam et al. 2001), so dass im Durchschnitt alle 2 kb je ein SNP zu finden ist. Diese Zahl hat sich auf 4 – 5 Millionen heute bekannte und validierte SNPs gesteigert (Sobrino et al. 2005). Damit stehen genügend SNPs zur Auswahl,

anhand derer Identifikationen durchgeführt werden können. Eine populationsgenetische Studie sollte allerdings vor Gebrauch eines kartierten SNPs erfolgen, da Schätzungen zufolge 20 – 50% der veröffentlichten SNPs falsch positiv sind (Marth et al. 2001). Diese Fehlerrate wird durch Sequenzierfehler bzw. die verwendeten Algorithmen begründet.

Bei der Verwendung von SNPs ist ebenfalls das als *linkage disequilibrium* bekannte Phänomen zu berücksichtigen. Es beschreibt die gemeinsame Vererbung von nahe benachbarten SNPs (Reich et al. 2001, Kaessmann et al. 2002). Die SNPs lassen sich in Kopplungsgruppen und diese wiederum zu einzelnen Haplotypen zusammenfassen. Einen Überblick über die einzelnen Kopplungsgruppen und Haplotypen gibt die zur Zeit erstellte HapMap. Anhand der einzelnen Haplotypen können komplexe Erkrankungen wie Herz-Kreislauf- oder Tumorerkrankungen besser analysiert werden (Gibbs et al. 2003).

Eine weitere Eigenschaft der SNPs ist ihre relativ geringe Mutationsrate im Vergleich zu den bisher verwendeten STRs (Brinkmann et al. 1998, Nachmann and Crowell 2000, Amorim and Pereira 2005). SNPs sind aufgrund ihrer langsamen Mutationsrate prädestiniert für populationsgenetische und populationsgeographische Untersuchungen sowie für Untersuchungen über den Ursprung und die Evolution des Menschen (Bandelt et al. 1995, Macaulay et al. 1999, Richards et al. 2000, Underhill et al. 2000, Oota et al. 2001, Jobling and Tyler-Smith 2003, Shiver and Kittles 2004). Durch ihre Stabilität sind sie auch für die Abstammungsbegutachtung, für die die SNPs derzeit evaluiert werden (Amorim and Pereira 2005), sowie für die Identifikation in der forensischen Genetik geeignet.

1.2 Forensische Genetik

In der forensischen Genetik wird heute zur Identifikation eines Menschen der genetische Fingerabdruck verwendet (Jeffreys and Pena 1993, Jobling and Gill 2004), welcher auf Unterschieden in den Längenpolymorphismen repetitiver DNA-Bereiche beruht. Üblicherweise werden zur Erstellung des genetischen Fingerabdrucks tetramere STRs eingesetzt, hochrepetitive Sequenzen, die ein sich mehrmals wiederholendes Muster aus vier Nukleotiden umfassen (Urquart et

al. 1994). Es reichen acht STRs aus, um zwei Individuen eindeutig voneinander unterscheiden zu können.

Die STRs lösten eine Reihe von klassischen genetischen Markern ab, die bis zu diesem Zeitpunkt die einzige Möglichkeit boten, Blutspuren und andere menschliche Sekrete aus einem Kriminalfall Individuen zuzuordnen oder diese Individuen als Spurenverursacher auszuschließen. Dazu zählt u. a. die von Karl Landsteiner 1901 entdeckte AB0-Blutgruppe (Landsteiner 1901, Geserick et al. 2001, Jobling and Gill 2004).

Analog zur klassischen Serologie stößt nun heutzutage die STR-Analytik bei der Untersuchung folgender biologischer Spuren an ihre Grenzen:

1. bei biologischen Spuren, die wenig kernhaltige Zellen enthalten.
2. bei biologischen Spuren, deren DNA degradiert oder chemisch modifiziert ist.

Ursache für DNA-Degradation und DNA-Modifikation sind chemische Reaktionen, die sowohl im wässrigen Milieu jeder lebenden und abgestorbenen Zelle auftreten (Lindahl 1993) als auch durch verschiedene Umweltfaktoren ausgelöst werden. Während in der lebenden Zelle entsprechende Reparaturmechanismen die Schäden beseitigen, bleiben in der abgestorbenen Zelle die DNA-Schäden erhalten. Als Umweltfaktoren spielen bei der DNA-Degradation u. a. der Mikrobenbefall der entsprechenden Zellen und Gewebe (Poinar 2002), die natürliche UV-Strahlung in der Umwelt, die Temperatur und die Feuchtigkeit der Umgebung eine Rolle. Eine Konservierung von DNA abgestorbener Zellen ist am besten durch tiefe Temperaturen möglich, wie sie in Permafrostböden vorliegen (Höss et al. 1996). Für die forensische Genetik spielen neben den inneren und äußeren Degradationsprozessen die Lagerungsbedingungen nach der Asservierung der biologischen Spur eine Rolle. Hierbei sind tiefe Temperaturen bzw. eine trockene Lagerung entscheidend, um eine DNA-Degradation zu verhindern.

Unterschreitet die zu untersuchende degradierte DNA eine bestimmte Länge intakter Doppelstränge, so lassen sich die herkömmlichen STRs nicht mehr detektieren (Chung et al. 2004). Zur Lösung dieses Problems werden zwei Wege eingeschlagen: Einerseits wird versucht die bestehenden STR-Systeme mit möglichst kurzen PCR-Produkten zu generieren (Wiegand and Kleiber 2001, Butler et al. 2003, Grubwieser et al. 2006, Wiegand et al. 2006). Andererseits werden SNPs untersucht, für deren Analyse sehr kurze DNA-Bereiche ausreichen

und unterschiedlich sensitive Methoden zur Verfügung stehen (Syvänen 2001, Sobrion et al 2005).

1.3 AB0-Blutgruppen-Gen

Wie zuvor beschrieben ist die AB0-Blutgruppe ein lange verwendeter forensisch relevanter Marker. Erste Untersuchungen zur AB0-Blutgruppe von Karl Landsteiner (1901) beruhten auf der Agglutinationsreaktion verschiedener menschlicher Blutseren. Anhand dessen wurden insgesamt vier verschiedene AB0-Blutgruppen definiert: A, B, AB und 0. Diese vier Blutgruppen werden durch die drei verschiedenen Allele A, B und 0 erzeugt. Dabei sind A und B zueinander kodominant, d.h. beide werden parallel exprimiert, so dass die Blutgruppe AB entsteht, wenn beide Allele im Genom vorliegen. Gegenüber dem Allel 0 sind beide Allele dominant, so dass die Blutgruppen A bzw. B durch die Allelkombination A/0 bzw. B/0 erzeugt werden. Die Blutgruppe 0 zeigt sich nur, wenn beide Allele 0 sind.

Das AB0-Blutgruppen-Gen liegt auf dem Chromosom 9 (9q34) und damit mit zwei Kopien im Genom vor. Es kodiert für eine Glycosyltransferase, die je nach Allel einen entsprechenden Zuckerrest an das sogenannte Antigen H anhängt, also an Proteine der Zellmembran. Das Allel A kodiert dabei für die Transferase A, die das Antigen H mit einem N-acetyl-galactoserest verknüpft und es in das Antigen A umwandelt. Ähnlich verhält es sich mit dem Allel B, das die Transferase B kodiert, die einen Galactoserest auf das Antigen H überträgt und somit in das Antigen B überführt. Die Blutgruppe AB entsteht durch die Aktivität beider Glycosyl-transferasen, während bei der Blutgruppe 0 die Glycosyltransferase durch eine Mutation defekt ist und das Antigen H nicht verändert wird.

Die unterschiedlichen Allele des AB0-Blutgruppen-Gens und die damit verbundenen Glycosyltransferaseaktivitäten werden durch verschiedene SNPs charakterisiert, die seit Anfang der Neuziger Jahre des letzten Jahrhunderts bekannt sind (Yamamoto et al. 1990).

Um die molekulargenetische Basis zu entschlüsseln wurden m-RNA-Moleküle (*messenger ribonucleic acid*) analysiert. Dabei zeigte sich, dass sich die Allele A und B lediglich in sieben Nukleotiden unterscheiden, die letztlich zu vier Aminosäureunterschieden zwischen beiden Glycosyltransferasen führen

(Aminosäurepositionen 176, 235, 266, 268). Verantwortlich für die unterschiedliche Substratspezifität der nahezu identischen Glycosyltransferasen ist nach neueren Untersuchungen nur der Aminosäurerest an der Position 266 (Leucin /Methionin) (Patenaude et al. 2002).
Insgesamt wurden bisher 26 Allelvarianten entdeckt (Hallensleben et al. 1999), die als Varianten der Allele A, B oder 0 klassifiziert werden können (Müller et al. 2001, Seltsam et al. 2003a, Seltsam et al. 2003b, Blumenfeld OO 2003).
Die in der Kriminalistik zunächst verwendeten serologischen Verfahren wurden, sobald die molekularen Grundlagen des AB0-Systems bekannt waren, zunehmend durch PCR-basierte Methoden ersetzt (Lee and Chang 1992). Somit konnte die AB0-Typisierung auch anhand von Geweben und schwierigen forensischen Spuren zuverlässig durchgeführt werden (Yamada et al. 1994, Schacker et al. 1995, Ladd et al. 1996, Watanabe et al. 1997).

1.4 Mitochondriale DNA (mtDNA)

Zusätzlich zur Kern-DNA findet sich beim Menschen in den Mitochondrien, den Zellorganellen zur Energiegewinnung, mitochondriale DNA (mtDNA). Die mtDNA ist ein ringförmiges Molekül von 16 569 bp (Chondriom), deren Sequenz komplett bekannt und inzwischen berichtigt ist (Anderson et al. 1981, Andrews et al. 1999). Pro Zelle liegen bis zu mehrere tausend Kopien der mtDNA vor bzw. je Mitochondrium im Schnitt 2 bis 10 mtDNA-Moleküle (Bogenhagen and Clayton 1974). Je nach Gewebe kann daher die Menge der mtDNA bis zu 0,5% des Kerngenoms ausmachen. Die Vererbung der mtDNA erfolgt nach bisherigem Wissenstand überwiegend durch die Mutter. In einem Einzelfall konnte eine Vererbung der mtDNA durch den Vater beobachtet werden (Schwartz und Vissing 2002), die allerdings mit einer schweren Muskelerkrankungen einherging.
Bei Betrachtung aller mtDNA-Moleküle innerhalb einer Zelle können entweder durchweg nur gleiche Moleküle gefunden werden (Homoplasmie) oder zwei verschiedene Varianten von mtDNA-Molekülen (Heteroplasmie). Oftmals bleiben beide verschiedenen Varianten in Verwandten oder der Vererbungslinie erhalten (Gill et al. 1994, Ivanov et al. 1996). Es können sich allerdings prozentuale Verschiebungen im Anteil beider Varianten ergeben, da bei der Teilung der Mitochondrien und der gesamten Zelle eine ungleichmäßige Verteilung auftritt. Als

extrem ungleichmäßige Verteilung innerhalb der Keimbahn wird die Homoplasmie in der nächsten Generation angesehen. Rekombination als Ursache wird allerdings ausgeschlossen, auch wenn sie in geringem Ausmaß bei menschlicher mtDNA beobachtet wurde (Kraytsberg et al. 2004, Sato et al. 2005).

Anhand auftretender Mutationen, zu denen zum Großteil SNPs zählen, lassen sich ähnlich wie im Kerngenom Haplotypen bzw. Haplogruppen erstellen. Haplotypen werden anhand der SNPs in der D-Loop-Region (*displacement loop region*) definiert. Diese Region zählt zum nicht kodierenden Bereich der mtDNA und mutiert schneller als das restliche Molekül. Aufgrund dieser Eigenschaft lassen sich in der D-Loop-Region drei verschiedene DNA-Bereiche abgrenzen, die eine Vielzahl an Mutationen zeigen. Es sind die hypervariablen Regionen 1, 2 und 3 (HV1, HV2 und HV3). Menschen, die in mütterlicher Linie miteinander verwandt sind, beispielsweise Tochter, Mutter und Großmutter, teilen aufgrund der rein mütterlichen Vererbung der mtDNA alle Mutationen innerhalb der HV-Regionen und damit den gleichen Haplotyp. Anhand der Haplotypen lässt sich eine mütterliche Linie in die Vergangenheit verfolgen. Dies wird vor allem für evolutionsgeschichtliche Untersuchungen des Menschen genutzt, beispielsweise um seine Herkunft und seine Wanderwege zu untersuchen (Cann et al. 1987, Richards et al. 1998, Torroni et al. 1998, Alves-Silva et al. 2000, Helgason et al. 2000).

Mehrere mütterliche Linien, die sich nur geringfügig in ihren Haplotypen unterscheiden, werden in sogenannte Haplogruppen zusammengefasst. Dabei werden die Haplogruppen durch SNPs bzw. Mutationen im kodierenden Bereich der mtDNA definiert, die im Vergleich zu SNPs in der D-Loop-Region relativ langsam mutieren (Macaulay et al. 1999). Die mütterlichen Linien einer Haplogruppe lassen sich somit auf einen gemeinsamen Urahnen zurückführen. Entsprechend können auch alle bisher bekannten Haplogruppen auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgeführt werden, der in der Literatur unter dem Begriff *mitochondrial eve* bekannt ist. Sie repräsentiert somit den Urtyp aller heute bekannten mtDNA Haplotypen, aber nicht den einzigen mtDNA Haplotyp ihrer Zeit (Cann et al. 1987, Hagelberg 2003).

Für die forensische Genetik ist die mtDNA insofern interessant, als sie in hoher Kopienanzahl pro Zelle vorkommt und durch ihren ringförmigen Aufbau besser vor Degradation geschützt ist als das Kerngenom (Sullivan et al. 1992, Butler and Levin 1998). Bei der Analyse der mtDNA steht zur Identifizierung ein Vergleich mit

mütterlichen Verwandten im Vordergrund (Gill et al. 1994). Eine Übereinstimmung des Haplotyps deutet dabei auf die Identität des untersuchten Individuums hin. Sicher ist sie allerdings nicht, da die einzelnen Haplotypen in mehr als einer mütterlichen Linie auftauchen und außerdem alle Individuen einer mütterlichen Linie den gleichen Haplotyp besitzen. Eindeutig sind nur Ausschluss-konstellationen, die ein Individuum einem anderen Haplotyp als der zu vergleichenden mütterlichen Linie zuordnen.

MtDNA wird in der forensischen Genetik nur dann untersucht, wenn die Analyse der biologischen Spuren mit den herkömmlich verwendeten STRs nicht mehr möglich ist, z.B. bei hoch degradierter DNA. Als Beispiel sind telogene Haare und Haarschäfte zu nennen, bei denen die Kern-DNA weitgehend degradiert bzw. nicht mehr vorhanden ist (Butler and Levin 1998).

Zur Abschätzung der Häufigkeit eines mtDNA-Haplotyps ist es wichtig, für die forensischen Untersuchungen auf entsprechende Datenbanken zurückgreifen zu können. Seit Oktober 2006 steht mit der EMPOP-Datenbank (*EDNAP (European DNA Profiling group) mitochondrial DNA population database*) eine sehr gut validierte und mit großen Datenmengen gefütterte Datenbank zur Verfügung (Parson et al. 2004a, Parson et al. 2004b, Brandstätter et al. 2007).

1.5 Das Y-Chromosom

Das Y-Chromosom stellt ebenso wie die mtDNA eine Besonderheit dar: Es findet sich nur bei Männern und wird vom Vater an seine Söhne, also patrilinear, weiter vererbt (Groß 2003). Im Unterschied zu anderen Chromosomen liegt es haploid vor. Das homologe Chromosom ist das X-Chromosom, mit dem das Y-Chromosom zwei subtelomere DNA-Regionen teilt, die sogenannten pseudoautosomalen Regionen (PAR1 und PAR2). In diesem Bereich finden Anlagerung und Rekombination in der Mitose und Meiose statt. Der restliche Bereich von ca. 95% ist davon nicht betroffen und wird daher auch als *non-recombining Y* (NRY)-Region bezeichnet. Durch neuere Untersuchungen in diesem Bereich des Y-Chromosoms, der eine starke intrachromosomale Rekombination des Y-Chromosoms enthüllte, ist der Begriff der *male specific region of the Y chromosome* (MSY) eingeführt worden. MSY soll den Begriff der NRY ersetzen, da es sich um einen DNA-Bereich handelt, der der Rekombination

unterworfen ist, auch wenn sie nur innerhalb des Chromosoms stattfindet (intrachromosomal) und nicht zwischen zwei homologen Chromosomen (interchromosomal) wie bei den restlichen Chromosomen (Skaletsky et al. 2003). In diesem Bereich liegt auch die *sex-determining region* des Y-Chromosoms (SRY), die für die Ausbildung des männlichen Geschlechts sowie für die Sperminogenese verantwortlich ist. Neben dem Chromosom 21 zählt das Y-Chromosom zu den kleinsten Chromosomen des menschlichen Kerngenoms. Es umfasst etwa 1 % des diploiden menschlichen Genoms mit einer Länge von etwa 60 Mb. Charakteristisch für das Y-Chromomsom sind neben den Genen für die Geschlechtsausbildung, Sperminogenese und Fertilität große Bereiche mit repetitiven Sequenzen (Groß 2003, Jobling and Tyler-Smith 2003). Sie stellen sicher, dass die für die Fertilität des Mannes wichtigen Gene erhalten bleiben, da diese Sequenzen der Ausgangspunkt der intrachromosomalen Rekombination sind.

Ähnlich wie in anderen DNA-Bereichen finden sich auf dem Y-Chromosom auch SNPs und STRs. Beide Y-chromosomalen Marker werden in der forensischen Genetik und für populationsgeographische Untersuchungen verwendet (Hammer 1995, Raitio et al. 2001, Jobling and Tyler-Smith 2003, Kayser et al. 2005). Die Y-chromosomalen STRs werden ähnlich wie die SNPs aus dem D-Loop-Bereich der mtDNA zur Erstellung von Haplotypen herangezogen, denn beide zählen zu den schnell mutierenden DNA-Markern. Im Gegensatz dazu werden die Y-chromosomalen SNPs zur Einteilung in Haplogruppen verwendet, da sie zu den langsam mutierenden DNA-Markern zählen. Eine Nomenklatur für die Y-chromosomalen Haplotypen und Haplogruppen wurde von dem *Y Chromosome Consortium* (YCC) entworfen ebenso wie ein Abstammungsbaum, der alle bisher untersuchten und bekannten Haplotypen und Haplogruppen nach ihrer möglichen Abstammung anordnet (The Y Chromosome Consortium 2002).

Ähnlich wie bei der mtDNA lassen sich anhand der Y-chromosomalen Marker und dem resultierenden Haplotyp bzw. der Haplogruppe väterliche Verwandte identifizieren und zuordnen. Des Weiteren können väterliche Linien erstellt werden, die eine Rückverfolgung bis zu einem gemeinsamen Urahn ermöglichen und für evolutionsgeschichtliche und populationsgeographische Untersuchungen erforderlich sind (Jobling and Tyler-Smith 1995, Zerjal et al. 1997, Su et al. 1999, Helgason et al. 2003, Nasidze et al. 2004). Das Y-Chromosom und die verwendeten Marker sind in diesem Zusammenhang als Gegenstück zur mtDNA

anzusehen und zeichnen die menschliche Geschichte vom männlichen Standpunkt aus nach.

Darüber hinaus kommt den Y-chromosomalen Markern noch eine besondere Bedeutung innerhalb der forensischen Genetik zu. Bei vielen Kriminalfällen findet sich eine Konstellation von weiblichem Opfer und männlichem Täter. Da zur Untersuchung zunächst nur das weibliche Opfer zur Verfügung steht, erhält man biologische Spuren, die einen Überschuss an weiblicher DNA enthalten und nur einen ganz geringen Anteil an männlicher DNA. Je nach Spurenart lässt sich zwar der Anteil an männlicher DNA für die Analyse erhöhen (z.B. bei Sperma-Vaginalepithelzell-Spuren mit Hilfe der differentiellen Lyse, Gill et al. 1985), aber bei einem Großteil der Spuren ist dies jedoch nicht möglich. Als Alternative können hier Y-chromosomale STRs oder SNPs untersucht werden. Sie können einerseits einen Hinweis auf die ethnische Zugehörigkeit des Täters geben, andererseits verlässliche Daten liefern, die einen Abgleich mit tatverdächtigen Personen einwandfrei ermöglichen. Zur statistischen Auswertung steht außerdem für die Y-STRs eine Datenbank zur Verfügung, die nach den drei großen ethnischen Gruppen (Europäer, Schwarzafrikaner und Asiaten) aufgeteilt ist, die *Y-STR Haplotype Reference Database* (http://ystr.org/) (Roewer et al. 2001, Lessig et al. 2003).

1.6 Methoden der SNP-Analytik

SNPs wurden und werden sehr intensiv untersucht. Die Methoden sind vielfältig, lassen sich aber auf folgende fünf biochemische Grundprinzipien zurückführen (Syvänen 2001):

1. Restriktionsendonuklease/Flap Endonuklease Verfahren
2. Ligation allelspezifischer Oligonukleotide
3. Hybridisierung mit allelspezifische Oligonukleotidsonden
4. PCR mit allelspezifischen *Primern*
5. Minisequenzierung (*Minisequencing*)/*Primerextention*-Reaktion

1.6.1 Restriktionsendonuklease/Flap Endonuklease Verfahren

Eine schon seit Mitte der achtziger Jahre verwendete Methode zur Untersuchung von SNPs ist die Verwendung von Restriktionsendonukleasen. Diese bakteriellen Enzyme spalten dabei an speziellen Sequenzenabfolgen, die 4 – 8 Nukleotiden umfassen. Liegt ein SNP an einer solchen Schnittstelle, können die einzelnen Varianten durch Schneiden bzw. nicht Schneiden der DNA erkannt werden. Es ergibt sich je nach Variante ein spezielles DNA-Fragmentlängen-Muster, dass durch die Elektrophorese untersucht wird. Diese Methode wurde früher zur Untersuchung von Erbkrankheiten oder den AB0-Blutgruppen verwendet und ist in der Literatur als *restriction fragment length polymorphism* (RFLP) bekannt (Lee and Chang 1992, Villa et al. 1996, Hummel et al. 2002). Ein klarer Nachteil dieser Methode ist die Festlegung auf eine bestimmte Sequenzabfolge und die hauptsächliche Verwendung von Singleplexreaktionen, bei denen in einem Ansatz nur eine Enzymreaktion durchgeführt wird und damit je Reaktion nur ein SNP detektiert werden kann. Von den insgesamt vier Varianten kann nur eine Variante klar durch Schneiden der DNA erkannt werden. Die anderen drei Varianten lassen sich dadurch nicht voneinander unterscheiden.

Ein spezielles Verfahren innerhalb der Verwendung der Restriktions-endonukleasen ist das Flap Endonukleaseverfahren (*invader probe assay*) (Lyamichev et al. 1999), bei welchem ebenfalls ein bakterielles Enzym verwendet wird. Im Unterschied zu den Restriktionsendonukleasen schneidet die Flap Endonuklease allerdings nicht bei bestimmten Sequenzabfolgen sondern an speziellen DNA-Strukturen. Diese DNA-Strukuren entstehen, wenn bei einem bestehenden DNA-Doppelstrang durch Hybridisieren eines weiteren Einzel-stranges der Gegenstrang verdrängt und damit überhängende einzelstränge DNA entsteht. Für die SNP-Analyse macht man sich dies zunutze, indem eine *invader probe* nahe bei dem SNP und allelspezifische Sonden hergestellt werden. *Invader probe* und allelspezifische Sonde überlappen also in der Sequenz am 5'-Ende. Hybridisieren beide Sonden an die genomische DNA, so entsteht am 5'-Ende der allelspezifischen Sonde ein einzelsträngiger DNA-Bereich. Dieser wird von der Flap Endonuklease erkannt und abgespalten. Der SNP-Nachweis erfolgt wie bei den restlichen Restriktionsendonukleasen über den Nachweis des Spaltproduktes. Diese Reaktion ist bei dem *Invader® assay* von Third wave™ Technology umgesetzt worden (Syvänen A-C 2001, Sobrino et al. 2005).

1.6.2 Ligation allelspezifischer Oligonukleotide

Bei der Ligation allelspezifischer Oligonukleotide (*oligonucleotide ligation assay*, OLA) werden insgesamt zwei verschieden Oligonukleotide verwendet (Landegren et al. 1988). Dabei enthält das erste Oligonukleotid die SNP-Position, so dass hier entsprechend der SNP-Varianten mehrere Oligonukleotide zur Verfügung stehen müssen. Das zweite Oligonukleotid endet genau vor der SNP-Position, so dass die beiden Oligonukleotide mit den jeweiligen Sequenzen am SNP enden. Hybridisieren beide Oligonukleotide komplett, so kann die beigefügte Ligase beide Oligonukleotide miteinander verbinden, so dass ein intakter DNA-Einzelstrang entsteht, der den Bereich des SNP überspannt. Ist die Hybridisierung am SNP durch nicht komplementäre Nukleotide unterbrochen, so erfolgt keine Ligation.
Ein Nachweis der Ligationsprodukte kann über verschiedene Methoden erfolgen, beispielsweise kolorimetrisch (Landegren et al. 1988) oder im Rahmen einer Realtime-PCR in Kombination mit FRET-Sonden (*Fluorescence resonance energy transfer*) (Chen et al. 1998). Moderne Verfahren wie der SNPlex™ (Applied Biosystems) oder *Illumina genotyping reaction* (Invitrogen) nutzen als biochemisches Verfahren den OLA. Durch eine anschließende PCR wird dabei das Signal verstärkt und durch Kapillarelektrophorese (SNPlex) oder Hybridisierung auf einem Array (Illumina) detektiert. Trotz der Möglichkeit genomische DNA zum SNP-Nachweis direkt zu verwenden, ist ein klarer Nachteil dieser Methode, dass eine hohe DNA-Konzentration vorliegen muss. Derartige DNA-Konzentrationen sind bei forensischen Proben meistens nicht vorhanden (Sobrino et al. 2005).

1.6.3 Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotidsonden

Bei der Hybridisierung mit allelspezifischen Oligonukleotidsonden werden Oligonukleotide hergestellt, die komplementär zu dem zu untersuchenden SNP und seiner Umgebung auf der DNA sind. Dabei wird für jede Variante des SNPs eine Sonde hergestellt, maximal also vier Sonden. Bei der Hybridisierungsreaktion bilden sich zwischen den zu untersuchenden DNA-Strängen und den Sonden die typische Doppelhelixstruktur aus. Stabil sind diese Hybridmoleküle unter den gewählten Bedingungen nur, wenn sie in allen Nukleotiden komplementär sind, einschließlich der SNP-Position. Der Nachweis kann dann über unterschiedliche

Plattformen erfolgen. Bekannt sind hierbei vor allem die *Microarrays*, auf denen die Hybridisierung stattfindet und die Signale der markierten und hybridisierten Oligonukleotide ausgewertet werden, oder das *Realtime*-PCR-Verfahren in unterschiedlicher Ausführung [*TaqMan™ assay* (Holland et al. 1991), LightCycler® (Lareu et al. 2001), *Molecular Beacon assay* (Tyagi and Kramer 1996)]. Die Verbindung von *Realtime*-PCR und allelspezifischer Hybridisierung ist für die Forensik von Vorteil, da sie nur einen Reaktionsschritt umfasst und damit ein geringes Kontaminationsrisiko darstellt.
Ein Nachteil bei dieser Methode ist allerdings, dass nur in begrenztem Maße Multiplexe, bei denen in einem Ansatz mehrere Hybridisierungsreaktionen gleichzeitig ablaufen, erstellt werden können; es steht nämlich nur eine begrenzte Anzahl an Farbstoffen und Farbkanälen an den Auswertungsplattformen zur Verfügung. Damit sollten diese Methoden der SNP-Analytik wohl eher zur Etablierung, Validierung und Aufbau entsprechender Datenbanken genutzt werden (Sobrino et al. 2005).

1.6.4 Allelspezifische PCR

Ähnlich wie bei der Hybridisierung mit allelspezifischen Sonden werden bei der PCR mit allelspezifischen *Primern* Oligonukleotide verwendet, die komplementär zu dem jeweiligen SNP sind. Allerdings liegt die SNP-Position am 3'-Ende des Oligonukleotids bzw. *Primers.* Neben den *Primern* an der SNP-Position wird noch ein abwärts liegender *Primer* benötigt, dessen Position vom SNP nicht direkt festgelegt wird. Kann der SNP-positionierte *Primer* komplett binden, so ist die PCR erfolgreich und ein PCR-Produkt entsteht. Bindet der SNP-positionierte *Primer* am 3'-Ende nicht, so entsteht auch kein PCR-Produkt. Über den Nachweis eines PCR-Produktes bei einer entsprechenden Kombination von *Primern* wird dann der SNP detektiert (Newton et al. 1989, Watanabe et al. 1997, Watanabe et al. 2001).
Es bieten sich ebenfalls unterschiedliche Nachweisverfahren an u.a. die *Realtime*-PCR und verschiedene Elektrophoreseverfahren, beispielsweise auch die in der forensischen Genetik verbreitete Kapillarelektrophorese. Eine Fertigung von Multiplexen ist durchaus möglich (Hussain et al. 2001, Dixon et al. 2005). Allerdings lassen sich falsch positive Ergebnisse nicht ausschließen, da die allelspezifischen *Primer* je nach Nukleotid am 3'-Ende an beide SNP-Varianten binden können und damit PCR-Produkte unspezifisch amplifiziert werden können

(Kwok et al. 1990, Nollau and Wagener 1997). Eine Lösung scheinen *Primer* zu bieten, die zusätzliche *Mismatch*-Positionen enthalten, bzw. optimierte PCR-Programme und spezielle Oligonukleotide (Latorra et al. 2003, Strerath et al. 2004).

1.6.5 Minisequenzierung

Im Unterschied zu den vorherigen Verfahren wird bei der Minisequenzierung, auch bekannt als *Minisequencing* oder *Primerextention*-Reaktion, ein Oligonukleotid verwendet, das ein Nukleotid vor der SNP-Position endet. Das freie 3'-Ende kann nun mit Hilfe einer DNA-Polymerase und zugefügten Didesoxynukleotiden um ein Nukleotid verlängert werden. Eine weitere Verlängerung ist durch die Verwendung von Didesoxynukleotiden nicht möglich. Damit ist das eingebaute Nukleotid komplementär zum SNP. Zum späteren Nachweis sind die Didesoxynukleotide entsprechend markiert. Ein Nachweis kann über sämtliche Elektrophorese-verfahren (Pastinen et al. 1996, Levo et al. 2003) sowie über Massenspektrometrie (MALDI-TOF) (Li et al. 1999, Lessig et al. 2005, Oberacher et al 2007), aber auch über die Arraytechnologie erfolgen.
Z.Z. wird in der forensischen Genetik die Analyse über die Kapillarelektrophorese in Kombination mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden bevorzugt (Sobrino et al. 2005). Ihre Vorzüge liegen einerseits in der im Labor etablierten Auftrennungs- und Detektionstechnik, andererseits in der hohen Multiplexfähigkeit (Sanchez et al. 2003, Vallone et al. 2005, Onofri et al. 2006). Die Fehlerquoten sind ähnlich wie bei der PCR und der PCR-basierten Sequenzierung.

Anhand der aufgeführten Verfahren und den zum Nachweis verwendeten Plattformen wird deutlich, dass zur SNP-Analytik eine Vielzahl von Kombinationen zwischen den einzelnen biochemischen Verfahren mit einzelnen Detektionsverfahren und Auswerteplattformen besteht. Jede einzelne Methode bietet Vor- und Nachteile, die bei der Einführung einer einzelnen Methode in die forensische Genetik als Standard abzuwägen sind. In den meisten forensischen Laboren steht zur Analyse der STR-Systeme eine Kapillarelektrophorese als Detektionsplattform zur Verfügung, so dass SNP-Analyseverfahren ausgewählt werden, die eine Kombination mit dieser Plattform ermöglichen. Der Vorzug wird

dabei der Minisequenzierung in Verbindung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden gegeben.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein Multiplexsystem zur Untersuchung von SNPs auf der Basis der Minisequenzierung in Kombination mit der Kapillar-elektrophorese zu etablieren, da es möglich ist,

1. Multiplexe für die PCR und Minisequenzierung herzustellen,
2. viele einzelne SNPs in einem Ansatz zu analysieren, da ein entsprechender Auftrennungsbereich zur Verfügung steht,
3. eine gute Vergleichsmöglichkeit besteht, da die Minisequenzierung in Kombination mit der Kapillarelektrophorese weit verbreitet ist in forensischen Laboren.

Die Minisequenzierung ist im Vergleich zu anderen Methoden kostengünstig und aufgrund der Verwendung der Kapillarelektrophrese mit geringem Arbeitsaufwand durchzuführen.

Als DNA-Bereiche werden das AB0-Blutgruppensystem, die mtDNA und das Y-Chromosom ausgewählt, die alle drei eine große forensische Bedeutung besitzen.

Bei allen drei DNA-Bereichen wird ein PCR-Multiplex und anschließend ein Multiplex für die Minisequenzierung erstellt.

Zielsetzung ist dabei, für jeden DNA-Bereich alle zu untersuchenden SNPs in einem PCR-Ansatz vervielfältigen zu können, welcher bei der anschließenden Minisequenzierung eingesetzt werden soll. Die Minisequenzierung wird ebenso wie die PCR optimiert, so dass alle SNPs in einer Reaktion detektiert werden können. Alle ausgewählten SNPs sind somit mit nur zwei Reaktionsschritten nachzuweisen.

Zusätzlich wird mit unterschiedlich langen PCR-Produkten je DNA-Marker gearbeitet, um den Einfluss verkürzter PCR-Produkte auf die Nachweisbarkeit einzelner SNPs in der Minisequenzierungsreaktion zu testen.

Neben der Anwendung für Blut- und Speichelproben soll die Analyse von biologischen Spuren wie Zigarettenkippen, Haare, Knochenmaterial getestet und entsprechend optimiert werden. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf Spuren mit degradierter DNA, bei denen ein Großteil der üblichen STR-Systeme nur partielle Ergebnisse liefert.

2. Material und Methoden

2.1 DNA-Proben

DNA wurde aus unterschiedlichem biologischen Material gewonnen. Dazu zählten einerseits Blutproben und Speichelproben, die zu Vergleichszwecken entnommen wurden, und andererseits Speichelspuren von Briefmarken und Zigarettenkippen sowie Haaren und Knochen.
Als standardisierte DNA wurden DNA-Lösungen der Zelllinien 9947A und 9948 (Promega, Madison/USA) verwendet in einer Konzentration von 1ng/µl.

2.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt von Merck KGaa (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.3 Größenmarker zur Bestimmung der Größe von PCR-Produkten

123 bp Ladder, Invitrogen life technologies, Karlsruhe
HyperLadder V, Bioline GmbH, Luckenwalde

2.4 *Primer*

Die verwendeten *Primer* (Oligonukleotide) wurden in lyophilisierter Form von den Firmen MWG (Ebersberg) und biomers.net (Ulm) bezogen. Alle Oligonukleotide der Firma biomers.net wurden über HPLC (= High Performace Liquid Chromatography) aufgereinigt, um Artefakte des Polymerisierungsprozesses abzutrennen. Die Sequenzen wurden der Literatur entnommen oder anhand der

entsprechenden Sequenz aus GenBank ausgewählt. Alle ausgewählten *Primer* wurden mit Hilfe der Lasergene® sequence analysis software (DNA✱, DNASTAR Inc., Madison, USA) auf Dimerbildung und Sekundärstrukturen getestet. *Primer*, die bei diesem Test kaum Sekundärstrukturen bzw. Dimerbildung zeigten, wurden für die PCR [2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)] eingesetzt. Die einzelnen *Primer*-Sequenzen sind im Anhang (7.1 Tabellen der PCR-*Primer* und Minisequenzierungs-*Primer*) aufgeführt.

Des Weiteren wurden alle *Primer*-Paare, die in einem Multiplex-PCR-Ansatz kombiniert werden sollten, mit dem Programm AutoDimerv1 (Vallone and Butler 2004a) auf alle möglichen Kombinationen von *Primer*-Dimeren und Hairpins getestet.

2.5 Labormaterialien

Reaktionsgefäß für PCR	0,2 ml, peqLab,
Probengefäß für ABI310	0,5 ml; Applied Biosystems
Reaktionsgefäß	1,5 ml, Eppendorf,
Serva Gel-Fix® Folien	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

2.6 Geräte

ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Darmstadt
Biofuge pico Heraeus, Kendro Laboratory Products, Hanau
Electrophoresis Power Supply, Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg
Multiphor II Electrophoresis System, Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg
MultiTemp III, Amersham Biosciences GE Healthcare, Freiburg
T1 Thermocycler, Whatman Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort, Eppendorf AG, Hamburg,
Wasserbad GFL
Waage Sartorius Basic, Sartorius AG, Göttingen,

2.7 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte mittels dreier etablierter Methoden.

1. Blutspuren sowie Speichelproben wurden über die Chelex-Extraktionsmethode aufgearbeitet. Dabei wurden die entsprechenden biologischen Spuren mit 190 µl 5% Chelexlösung und 8 µl Proteinase K (>600 mAU/ml, Qiagen, Hilden) versetzt und bei 56°C inkubiert. Nach einer ausreichenden Inkubationszeit von 30 min. wurde das Ganze bei 93°C aufgekocht, um die Proteinase K zu inaktivieren. Danach wurden die Proben bei 13000 Upm für 3 min. zentrifugiert. 1 – 5 µl des Überstandes wurden dann in die PCR eingesetzt.
2. Bei der zweiten Methode wird die genomische DNA über alkalische Lyse und Isopropanolfällung aufgereinigt. Dazu wurde der "First-DNA all-tissue DNA Kit" (GEN-IAL® GmbH, Troisdorf) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode wurde für Material wie Zigaretten, Haare und Knochen verwendet.
3. Als dritte Methode wurde der „Charge Switch® Forensic DNA Purification Kit“(Invitrogen life technologies, Karlsruhe) angewendet. Bei diesem Verfahren wird die genomische DNA an positiv geladene Magnetkügelchen gebunden und aus dem Zellextrakt präzipitiert. Die Ladung der Magnetkügelchen ist dabei abhängig vom pH-Wert der umgebenden Lösung. Durch Waschen mit entsprechenden Puffern wird die DNA an den Magnetkügelchen gereinigt und von den Zellfragmenten getrennt. Über pH-Wertänderung des Puffers wird die DNA wieder in Lösung gebracht und von den Magnetkügelchen abgetrennt. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Das Kit wurde für Materialien verwendet, bei denen die DNA erfahrungsgemäß schwierig zu extrahieren ist. Dazu zählen Knochen und Haare.

2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR (Polymerase chain reaction) werden Abschnitte auf jedem beliebigen DNA-Molekül, die von Interesse sind, gezielt vervielfältigt. Daher wird die PCR besonders bei biologischem Spurenmaterial verwendet, da hier die DNA

in geringen Mengen und z.T. in hoch degradiertem Zustand, vorliegt. Standardmäßig wird in forensischen Laboren bei dieser in-vitro-Technik eine sogenannte Hotstart-*Taq*-Polymerase eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine hitzestabile DNA-Polymerase, die durch Antikörper blockiert wird, so dass sie bei Raumtemperatur keine Reaktionen katalysieren kann. Durch eine entsprechende Hitzebehandlung wird der Antikörper denaturiert und die *Taq*-Polymerase kann ihre Aktivität aufnehmen.
Die PCR-Ansätze wurden wie folgt zusammengesetzt:

Bestandteile und Menge	Endkonzentration
1 – 5 µl DNA-Extrakt	
$MgCl_2$-Lösung, 25 mM, ABI	1,75 mM
BSA, 10mg/ml	0,3 µg/µl
1 µl GeneAmp 10x PCR Buffer II - $MgCl_2$, ABI	1x
0,5 – 1 µl dNTP-Mix, 2,5 mM	0,125 - 0,25 mM
je 0,1 µl *Primer* 1 + 2 (100 pmol/µl)	je *Primer* 1 pmol/µl
0,3 µl Ampli*Taq* Gold, 5U/µl, ABI	1,5 U
ad 10 µl mit A. dest	

Für jedes der untersuchten Systeme wurde ein eigenes PCR-Programm benutzt. Die unterschiedlichen PCR-Programme sind nach dem jeweiligen System geordnet.

AB0-Blutgruppen-Gen SNPs:
AB01

11 min bei 95°C

30x 
1 min bei 95°C
1 min bei 63,5°C
1 min bei 72°C

15 min bei 72°C
∞ bei 15°C

mtDNA SNPs:

mt-DNA

11 min bei 96°C

30x  1 min bei 93°C
1 min bei 62°C
30 s bei 72°C

45 min bei 72°C
∞ bei 15°C

Y-chromosomale SNPs:

SANCH30x

11 min bei 94°C

30x  45 s bei 95°C
45 s bei 60°C
45 s bei 65°C

7 min bei 65°C
∞ bei 15°C

Nach Durchführung des PCR-Programms auf einem Thermocycler wurden die Amplifikate bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei 4°C oder im Gefrierschrank bei –20°C gelagert.

2.9 Reinigung der PCR-Produkte

Eine Reinigung der PCR-Produkte fand über die folgenden vier Methoden statt. Dabei sollen Nukleotide sowie die PCR-*Primer* von den PCR-Produkten abgetrennt werden.

1. Reinigung mit ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland/USA)
2. Reinigung mit *SAP* (shrimp alkaline phosphatase) (Roche, Mannheim) und *ExoI* (Exonuclease I aus *E. coli*) (New England Biolabs, Beverly/USA)

3. Reinigung mit Microcon YM-100 (Millipore Corporation, Bedford/USA)
4. Reinigung mit QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden)

Die Reinigung erfolgte nach dem Protokoll des jeweiligen Herstellers. Nur für die zweite Auftreinigungsmethode wurden die einzeln gekauften Enzyme *SAP* und *ExoI* nach den Angaben zum SNaPShot-Kit von Applied Biosystems gemischt. Dabei dephosphoryliert die *SAP* die Nukleotide aus dem PCR-Ansatz, so dass diese nicht für eine weitere Verlängerung von Oligonukleotiden verwendet werden können. Das Enzym *ExoI* zerstört als Exonuklease alle einzelsträngigen Oligonukleotide, so dass die PCR-*Primer* abgebaut werden. Diese enzymatische Aufreinigung erfolgte für eine Stunde bei 37°C, die Hitzeinaktivierung bei 85°C für 20 min.

2.10 Elektrophorese / PAGE

Eine Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über ein 11,2%iges Polyacrylamidgel mittels Elektrophorese. Analog zu Agarosegelen werden auch hier DNA-Moleküle mit Hilfe einer angelegten Spannung der Größe nach getrennt. Die kleineren Moleküle legen dabei eine größere Laufstrecke zurück als die Größeren. Im Vergleich zu Agarosegelen bieten Polyacryamidgele allerdings folgende Vorteile:

1. Die Auftrennung von DNA-Molekülen ist bis zu 0,1 % ihres Molekulargewichtes möglich, d.h. bei 1000 bp bis zu 1 bp. Dadurch ist der Bereich von 20 – 1000 bp bei sehr gutem Auflösungsvermögen darzustellen.
2. Bis zu 10 µg DNA können aufgetrennt werden – eine wesentlich größere Menge als bei Agarosegelen.
3. Die aus Polyacrylamidgelen extrahierten DNA-Moleküle sind extrem sauber.

Eine anschließende Silberfärbung des Gels steigert die Nachweissensitivität auf bis zu 1 pg DNA.

Für die hier durchgeführte horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese verändert nach Budowle et al. (1991) wurden Polyacrylamidgele nach folgender Rezeptur hergestellt:

11,6 ml 28,9 % (w/v) Acrylamid (PAA), 1,1 % (w/v) Piperazindiacrylamid (PDA)
11,5 ml A. dest
5 ml 0,5 M Tris/Formiat, pH 9,0
3 ml 0,28 M Tris/CHES (2-(Cyclohexylamino)ethansulfonsäure), pH 9,0
120 µl 10 % (w/v) APS (Ammoniumpersulfat)
6 µl TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylendiamin)

Die Lösung wurde zwischen zwei Glasplatten in 2 - 3 mm Dicke auf Serva Gel-Fix® Folien gegossen und zum Polymerisieren mindestens 30 min bei RT inkubiert.
Anschließend wurden auf das Gel 1 – 4 µl PCR-Produkt über zurechtgeschnittene Papierstreifen (*Serva Sample Application Pieces*, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) aufgetragen. Von den Längenstandards (2.3 Größenmarker zur Bestimmung der Größe von PCR-Produkten) wurden je 1,5 µl Menge aufgetragen.
Die Elektrophorese wurde in dem *Multiphor II Electrophoresis* System durchgeführt. Die Spannung wurde über Agarose-*Plugs* (2 % (w/v) Agarose, 0,28 M Tris/Borat, pH 9,0; blau angefärbt mit Bromphenolblau) an das Gel angelegt. Dabei wurde ein konstanter Stromfluß I von 18 mA bzw. 28 mA angelegt.
Nach 2 bis 3 Stunden wurde die Auftrennung gestoppt und anschließend das Gel mit Silber gefärbt.

2.11 Silberfärbung

Die Silberfärbung erfolgte modifiziert nach Budowle et al. (1991). Bei diesem Verfahren werden Silberionen (Ag^+) spezifisch an das Phosphat-Rückgrad des DNA-Moleküls gebunden und in alkalischer Lösung zu Silber (Ag) reduziert. Zur Reduktion des Hintergrundes wurde für die Polyacrylamidgele Piperazindiamin als Vernetzer verwendet und mit Aqua bidest gespült.

Verwendete Lösungen:

Fixierer:	2% HNO_3 (Salpetersäure)
Färbelösung:	5,9 mM $AgNO_3$ (Silbernitrat), 0,0 6 % Formaldehyd

Entwickler: 0,28 M Na_2C0_3 (Natriumcarbonat),
0,09 % Formaldehyd,
0,025 M $Na_2S_20_3$ (Natriumthiosulfat)

Stopplösung. 7,5 % Essigsäure

Durchführung der Silberfärbung

1. 3 min in 2 % HNO_3
2. 3 min in A. bidest
3. 20 min in 5,9 mM $AgNO_3$, 0,06 % Formaldehyd
4. 10 s mit A. bidest spülen
5. mit 0,28 M Na_2C0_3, 0,09 % Formaldehyd, 0,025 M $Na_2S_20_3$, entwickeln
6. 3 min in 7,5 % Essigsäure
7. 10 s mit A. bidest spülen
8. 3 min in 5 % Glycerollösung
9. gefärbtes Gel an der Luft trocknen

Zur weiteren Aufbewahrung wurden die getrockneten Polyacryamidgele in Frischhaltefolie eingeschlagen und bei RT gelagert.

2.12 Nachweis der SNPs

2.12.1 SNaPShot

Die einzelnen Punktmutationen wurden mit Hilfe der Minisequenzierung nachgewiesen. Dabei wird ein *Primer*, dessen 3'-Ende ein Nukleotid vor dem SNP endet, um ein Nukleotid verlängert. Die benötigte Polymerase sowie die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotide und das optimale Puffermedium wurden in Form des SNaPShot-Kits (Applied Biosystems, Darmstadt) bezogen. Die Durchführung der Minisequenzierung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Ausnahme des Reaktionsansatzes:

3 µl Reaktionsmix/SNaPShot Ready Reaction Mix
1 µl *Primer* (1 pmol/µl) – 3 µl *Primer*-Mix
1 –2 µl gereinigtes PCR-Produkt
ad 10 µl mit A. dest

Je nach Anzahl der untersuchten SNPs wurde die Menge der einzelnen *Primer* variiert. Die *Primer*-Mischungen für die einzelnen Multiplexe sind geordnet nach den untersuchten DNA-Systemen im Ergebnisteil aufgeführt.
Für die Minisequenzierung wurde das *Cyclesequencing*-Programm des Herstellers wie folgt abgeändert:

1 min bei 96°C

30x 10 s bei 96°C
15 s bei 50°C
1 min bei 60°C

2 min bei 60°C

Zur Bearbeitung von Spuren wurde je nach Ergebnis mit den herkömmlichen STRs die Zyklenzahl auf 33 hochgesetzt. Die anschließende Reinigung der fluroreszenzmarkierten Produkte der Minisequenzierung erfolgte über eine Dephosphorylierung mit *CIAP* (calf intestine alkaline phosphatase). Die gereinigten Minisequenzierungsansätze wurden anschließend über den ABI Prism 310 Genetic Analyzer ausgewertet.

2.12.2 Restriktionsanalyse

Der Restriktionsverdau wird klassisch bei der Analyse der AB0-Blutgruppen-Polymorphismen verwendet. Dazu wird für Position 261 das Enzym *KpnI* (MBI, St.Leon-Roth) verwendet. Der Ansatz wurde wie folgt erstellt:

2 µl Puffer
1 U Enzym (*KpnI*)
2 µl PCR-Produkt
ad 20 µl mit A. dest.

2.13 Kapillarelektrophorese

Für die Kapillarelektrophorese wurde der ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) verwendet. Die Proben wurden mit Hilfe der 5-Farben-Technologie von ABI analysiert. Zuvor wurden sie entsprechend den Anweisungen des Herstellers in Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems, Darmstadt) aufgenommen.

Je 2 µl der gereinigten Minisequenzierungsansätze wurde dabei mit je 10 µl Formamid und 0,5 µl Längenstandard GeneScan™-120 LIZ™ Size Standard (Applied Biosystems, Darmstadt) versetzt. Die Ansätze wurden für 2 min bei 92°C erhitzt, kurz bei 4°C abgekühlt und anschließend über die Kapillarelektrophorese aufgetrennt.

3. Ergebnisse

Entsprechend der Reihenfolge in der Einleitung werden als erstes die Ergebnisse für das AB0-Blutgruppen-System aufgeführt. Anhand dieser Ergebnisse sollen exemplarisch der Aufbau und die Optimierungsstrategien sowohl für den PCR-Multiplex als auch für die Multiplex der Minisequenzierung vorgestellt werden. Für die beiden weiteren DNA-Systeme, die mtDNA und das Y-Chromosom, werden nur die optimierten Multiplexansätze vorgestellt.

3.1 AB0-Blutgruppen-Gen

3.1.1 AB0-Blutgruppen-Gen - PCR-Produkte und PCR-Multiplexe

Um die einzelnen Allele A, B und 0 des AB0-Blutgruppen-Gens voneinander unterscheiden zu können, werden in den beiden größten Exons 6 und 7 des Locus einzelne SNPs untersucht. Diese SNPs beeinflussen die Substratspezifität der Glycosyltransferase. Ausgehend von Allel A_1 werden folgende SNPs zur Unterscheidung der einzelnen Allele herangezogen, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt sind.



Allelvariante	Nukleotide	
	261	297
A1	G	A
A2	G	A
B	G	G
0	-	A
02	G	G

Allelvariante	Nukleotide				
	703	796	802	803	1060
A1	G	C	G	G	C
A2	G	C	G	G	-
B	A	A	G	C	C
0	G	C	G	G	C
02	G	C	A	G	C

Abb.1: Darstellung der beiden Exons 6 und 7 des AB0-Blutgruppengens. Unter den beiden als Balken schematisch dargestellten Exons sind in tabellarischer Form die SNPs aufgeführt, mit deren Hilfe sich die AB0-Blutgruppen Allele A_1, A_2, B, 0 und 0_2 unterscheiden lassen. Die jeweiligen Mutationen sind rot markiert; liegt eine Deletion vor, so steht dort ein rotes Minus. Definitionsgemäß werden alle Mutationen auf das Allel A_1 bezogen.

1. SNP261 ermöglicht die Erkennung von Allel 0. Das Allel 0 zeigt hier die Deletion des bei den restlichen Allelen vorhandenen Nukleotids G, was zu einer funktionslosen Glycosyltransferase führt.
2. SNP802 dient der Erkennung der Allelvariante 0_2.
3. SNP703, SNP796 und SNP803 lassen eine eindeutige Zuordnung von Allel A und Allel B zu.
4. SNP1060 dient der Unterscheidung von Varianten A_1 und A_2.

Der ebenfalls aufgeführte SNP297 zeigt sich bei den Allelen 0_{v1} (in Abbildung 1 nicht aufgeführt), 0_2 und B, so dass dieser SNP eine eindeutige Zuordnung eines Allels nicht erlaubt, in Kombination mit den restlichen SNPs aber eine Unterscheidung der Allele 0 und 0v1 ermöglicht.

Bei der Auswahl der oben aufgeführten SNPs spielte vor allem die Unterscheidung der drei Allelklassen A, B und 0 sowie bisher bekannte und serologisch analysierbare Allelvarianten eine Rolle.

Um die ausgewählten sieben SNPs mittels Minisequenzierung analysieren zu können, sollte zunächst eine Multiplex-PCR entwickelt werden, mit deren Hilfe die relevanten Bereiche des Exons 6 und 7 in einem Ansatz vervielfältigt werden. Zur Amplifikation wurden mehrere *Primer*-Paare ausgetestet. Es wurde mit den folgenden vier *Primer*-Paaren weitergearbeitet:

1. AB0Exon6forward2 + AB0Exon6reverse2 (AB0Exon6f2 + r2), PCR-Produktlänge = 130 bp
2. AB0Exon7forward4 + AB0Exon7reverse4 (AB0Exon7f4 + r4), PCR-Produktlänge = 353 bp
3. AB0Exon7forward5 + AB0Exon7reverse3 (AB0Exon7f5 + r3), PCR-Produktlänge = 163 bp
4. AB0Exon7forward6 + AB0Exon7reverse6 (AB0Exon7f6 + r6), PCR-Produktlänge = 178 bp

Die unter 2. und 4. aufgeführten *Primer*-Paare wurden zur Amplifikation des Bereiches von Exon 7 verwendet, der die SNPs SNP703, SNP796, SNP802 und SNP803 umfasst. Sie können gegeneinander ausgetauscht werden.

Es wurden insgesamt für die Multiplex-PCR zwei *Primer*-Sets erstellt, die jeweils drei *Primer*-Paare enthalten:

1. AB0Exon6f2 + r2, AB0Exon7f4 + r4 und AB0Exon7f5 + r3 (TriplexAB0-1).
2. AB0Exon6f2 +r2, AB0Exon7f5 + r3 und AB0Exon7f6 + r6 (TriplexAB0-2).

Das erste aufgeführte *Primer*-Paar vervielfältigt dabei den Bereich von Exon 6, der die beiden SNPs SNP261 und SNP297 enthält, während das dritte *Primer*-Paar den SNP1060 amplifiziert.

Die verwendeten *Primer* wurden in den entsprechenden Kombinationen mit dem Programm AutoDimerv1 geprüft. Dabei konnten unter den von den Autoren vorgegebenen Bedingungen keine Dimere und *Hairpins* der untersuchten *Primer* festgestellt werden.

Das Ergebnis der Singleplex-PCR-Ansätze sowie des Multiplex-PCR-Ansatzes mit TriplexAB0-1 ist in der Abbildung 2 zu sehen.

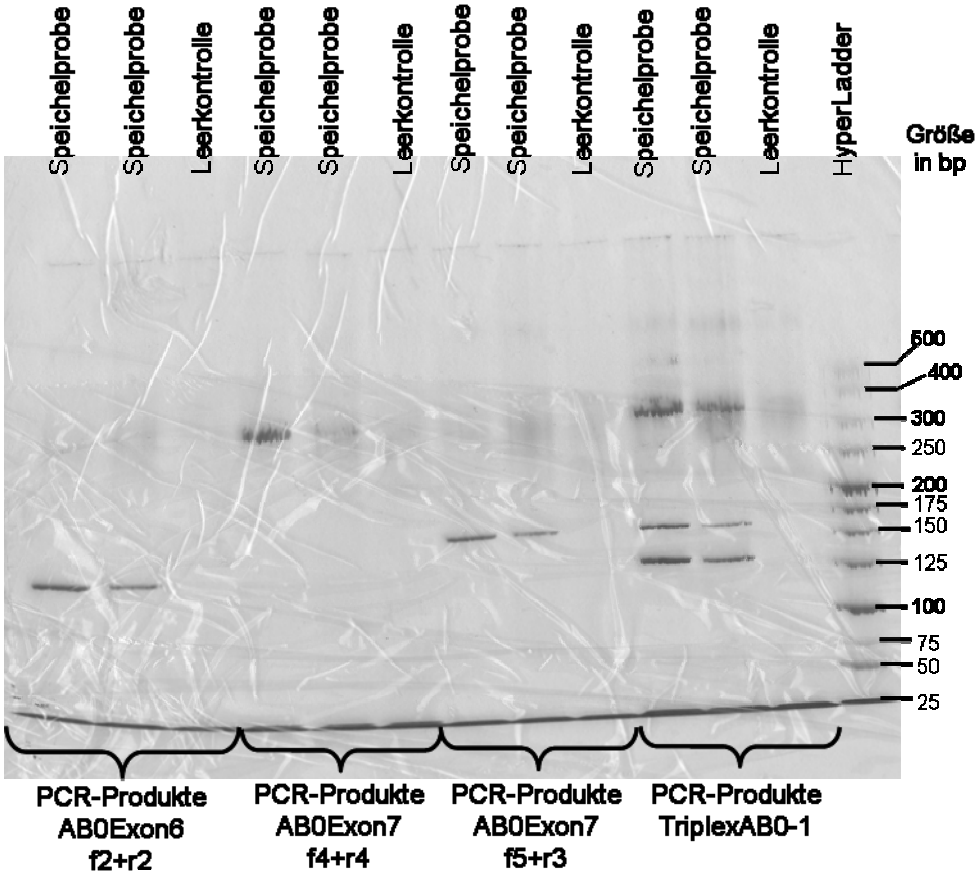

Abb.2: Darstellung eines Polyacrylamidgels mit drei Singleplex-PCR-Ansätzen (AB0Exon6f2 +r2, AB0Exon7f4 +r4 und AB0Exon7f5 +r3) und dem Triplex-PCR-Ansatz TriplexAB0-1. Als DNA-Proben wurden zwei verschiedene Speichelproben mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen eingesetzt. Die PCR-Produkte für Single- und Triplex sind vorhanden und in der entsprechenden Größe im Gel zu sehen. bp = Basen

Anhand der Abbildung 2 wird deutlich, dass für alle verschiedenen PCR-Ansätze eine erfolgreiche und im Falle des TriplexAB0-1 eine relativ gleichmäßige Amplifikation der gewünschten DNA-Abschnitte möglich ist.

Die Optimierung der PCR-Multiplex erfolgte über das Austesten unterschiedlicher Annealingtemperaturen (T_a) für das verwendete PCR-Programm. Die optimale

Annealingtemperatur wurde mit T_a = 63,5°C ermittelt und für die in Abbildung 2 dargestellten PCR-Ansätze verwendet. Die optimale *Primer*-Konzentration für TriplexAB0-1 ist für alle drei enthaltenen *Primer*-Paare 1,6 pmol/µl.

In Abbildung 3 sind analog die Singleplex- und Multiplex-PCR-Ansätze für TriplexAB0-2 zu sehen. Da die *Primer*-Paare AB0Exon6f2 + r2 und AB0Exon7f5 + r3 in beiden *Primer*-Sets Verwendung finden, wurde auf eine nochmalige Darstellung der jeweiligen Singleplex-PCR-Ansätze verzichtet.

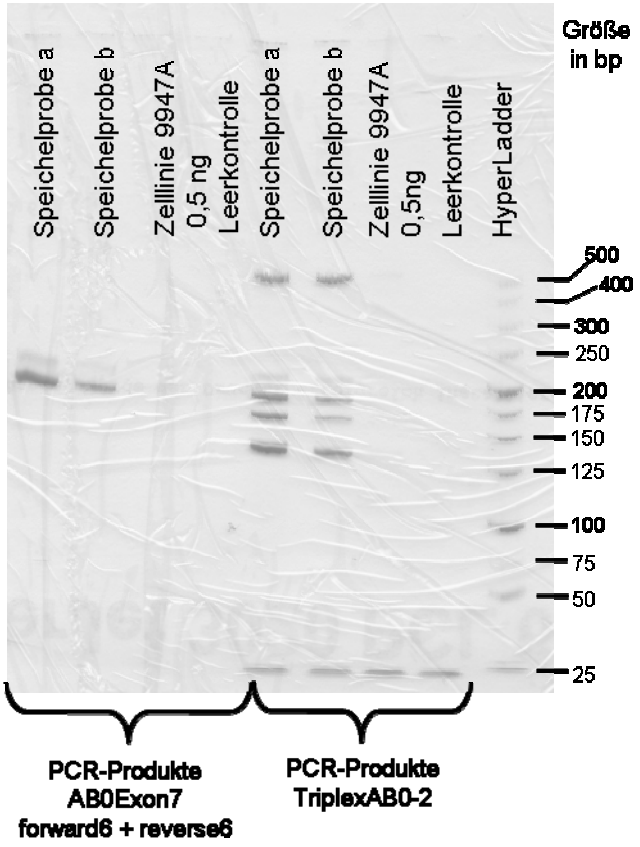

Abb. 3: Darstellung eines Polyacrylamidgels mit einem Singleplex-PCR-Ansatz (AB0Exon7f6 + r6) und dem Triplex-PCR-Ansatz TriplexAB0-2. Als DNA-Proben wurden zwei verschiedene Speichelproben mit unterschiedlichen DNA-Konzentrationen sowie 0,5 ng DNA der Zelllinie 9947A eingesetzt. Die PCR-Produkte für Single- und Triplex sind vorhanden und in der entsprechenden Größe (bp) im Gel zu sehen. Zusätzliche Banden sind bei ca. 500 bp sichtbar. bp = Basenpaar

Die Bedingungen für den TriplexAB0-2-Ansatz wurden im Hinblick auf Konzentrationen der PCR-*Primer* und das PCR-Programm genauso gewählt wie für die PCR-Ansätze für TriplexAB0-1. Abbildung 3 zeigt die erfolgreiche Amplifikation des ausgewählten Bereiches von Exon 7 des AB0-Blutgruppen-Gens mit Hilfe des *Primer*-Paares AB0Exon7f6 +r6. Allerdings sind unspezifische Amplifikationsprodukte im Singleplex bei etwa 220 bp zuerkennen (siehe Abb. 3 Speichelprobe a). Im TriplexAB0-2 ist bei ca. 510 bp ebenfalls eine Bande zu

erkennen, die auf eine erfolgreiche Amplifikation der Primer AB0Exon7f6 und AB0Exon7r3 zurückzuführen ist. Dieses PCR-Produkt umfasst alle zu untersuchenden SNPs des Exons 7 und sollte daher keine unspezifischen Signale in der anschließenden Minisequenzierung erzeugen.

Analog zu den Vergleichsproben wurde DNA aus biologischen Tatortspuren mit Hilfe der beiden Triplex-PCR-Ansätze vervielfältigt. Hauptsächlich handelte es sich dabei um Knochenproben. Es wurde aber auch DNA aus Speichelspuren von Zigarettenkippen sowie DNA aus Haaren eingesetzt. Exemplarisch sind in Abbildung 4 die PCR-Produkte zweier Knochenproben (a und b) sowie dreier Haarproben (a - c) zu sehen, deren DNA mit Hilfe des Primersets TriplexAB0-1 amplifiziert wurde.

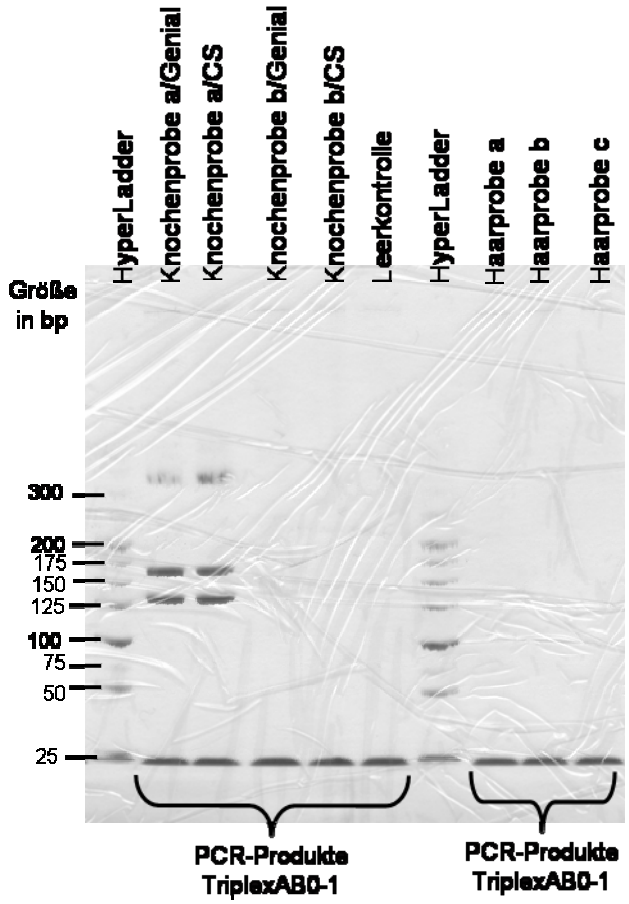

Abb. 4: Darstellung der PCR-Produkte des TriplexAB0-1 für die Knochenproben a und b sowie die Haarproben a - c auf einem Polyacrylamidgel. Analog zu Abb. 2 sind für die Knochenprobe a alle drei PCR-Produkte deutlich erkennbar. Für die Knochenprobe b sowie die drei Haarproben sind keinerlei PCR-Produkte auf dem silbergefärbten Polyacrylamidgel zu detektieren. bp = Basenpaar, CS = Charge Switch

In Abbildung 4 sind für die Knochenprobe a alle drei PCR-Produkte des TriplexAB0-1 eindeutig erkennbar. Bei den weiteren DNA-Proben (Knochenprobe

b sowie die Haarproben a - c) sind keine PCR-Produkte sichtbar. Ein ähnliches Bild ergab sich für das zweite *Primer*-Set TriplexAB0-2, daher wird auf eine Darstellung an dieser Stelle verzichtet.

3.1.2 AB0-Blutgruppen-Gen – Minisequenzierung im Singleplex- und Multiplexansatz

Analog zu den PCR-Ansätzen wurden für die Minisequenzierung Single- und Multiplexansätze ausgetestet, d.h. je Reaktion wurden nur ein spezifisches Oligonukleotid oder mehrere Oligonukleotide verwendet. Die Konzentration der in den Singleplexansätzen verwendeten Oligonukleotide betrug 1 pmol/µl (Endkonzentration 0,1 pmol/µl). Für die Multiplexansätze wurde die Konzentration der einzelnen Oligonukleotide je nach Ergebnis im Singleplex und der verwendeten Charge variiert. Die bei Auftrennung der verschiedenen Reaktionsprodukte über die Kapillarelektorphorese erhaltenen Chromatogramme sind für die Singleplexansätze in den folgenden Abbildungen 5A – 5G zu sehen. Die in den Chromatogrammen sichtbaren farbigen Ausschläge bzw. Banden, auch *peak* genannt, sind Signale, die von den Reaktionsprodukten der Minisequenzierung erzeugt werden. Sie entstehen durch die Addition eines fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotids an die eingesetzten Oligonukleotide, so genannte Minisequenzierungs-*Primer*. Bei der Kapillarelektrophorese werden diese Reaktionsprodukte durch den eingebauten Laser angeregt und das zurückgestrahlte Licht über eine Kamera detektiert. Die Darstellung erfolgt in den oben beschriebenen Ausschlägen bzw. Banden. Die farbigen Ausschläge geben anhand der Farbe Aufschluss über das eingebaute Nukleotid, anhand der Länge, bei der der Ausschlag beobachtet wird, um welchen der analysierten SNPs es sich handelt. Die Farben der einzelnen Didesoxy-nukleotide sind wie folgt: Blau = Didesoxynukleotid Guanin (G), grün = Didesoxy-nukleotid Adenin (A), schwarz = Didesoxynukleotid Cytosin (C), rot = Didesoxy-nukleotid Thymin (T).
In den ersten beiden Abbildungen 5A und 5B sind die Ergebnisse für die beiden SNPs SNP261 und SNP297, die auf dem Exon 6 liegen, dargestellt.

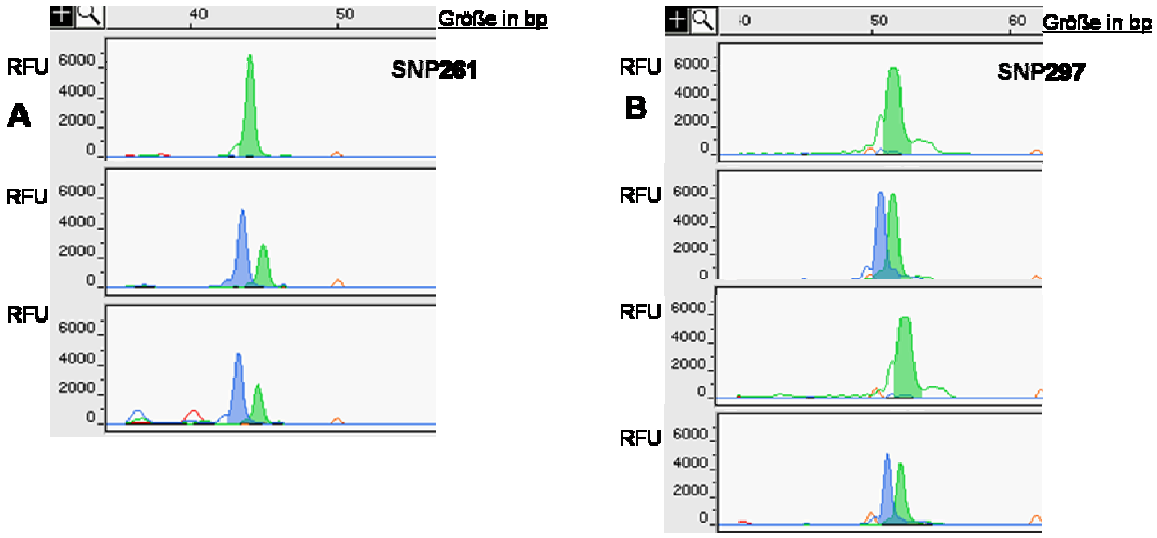

Abb.5A und 5B: Darstellung der Chromatogramme für die SNP-Positionen SNP261 (A) und SNP297 (B). Von oben nach unten sind in den einzelnen Zeilen der Abbildungen A und B die folgenden Genotypen zu sehen: bei A: 1. 0/0, 2. A_1/0, 3. B/0; bei B: 1. 0/0, 2. 0/0_{v1}, 3. A_1/0, 4. B/0. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Die Abbildung 5A zeigt für SNP261 untereinander aufgeführt folgende Genotypen: 0/0, A_1/0 und B/0. Die im Chromatogramm auftauchende grüne Bande bei einer Länge von 44 bp ist dabei charakteristisch für das Allel 0 bzw. 0_{v1}. Der für die Genotypen A/0 und B/0 zusätzlich feststellbare blaue Ausschlag bei einer Länge von 43 bp kennzeichnet alle anderen AB0-Blutgruppen Allele. Eine Unterscheidung der anderen Allele ist an dieser Position nicht möglich. Analog sieht man in Abbildung 5B für SNP297 die Genotypen 0/0, 0/0_{v1}, A_1/0 und B/0 von oben nach unten. Charakteristisch ist hierbei für die Allele 0 und A ein grüner Ausschlag bei einer Länge von 52 bp, während bei dem Allel B eine blaue Bande bei einer Länge von 51 bp zu sehen ist. Letztere kennzeichnet auch das Allel 0_{v1}, welches im zweiten Chromatogramm der Abbildung 5B zu sehen ist. Diese Variante ist mit ca. 40 % in der europäischen Population vertreten und zeigt serologisch dieselben Eigenschaften wie das Allel 0.

In den weiteren Abbildungen 5C – 5G sind die SNPs des Exons 7 zu sehen, d.h. die SNPs SNP703, SNP796, SNP802, SNP803 und SNP1060.

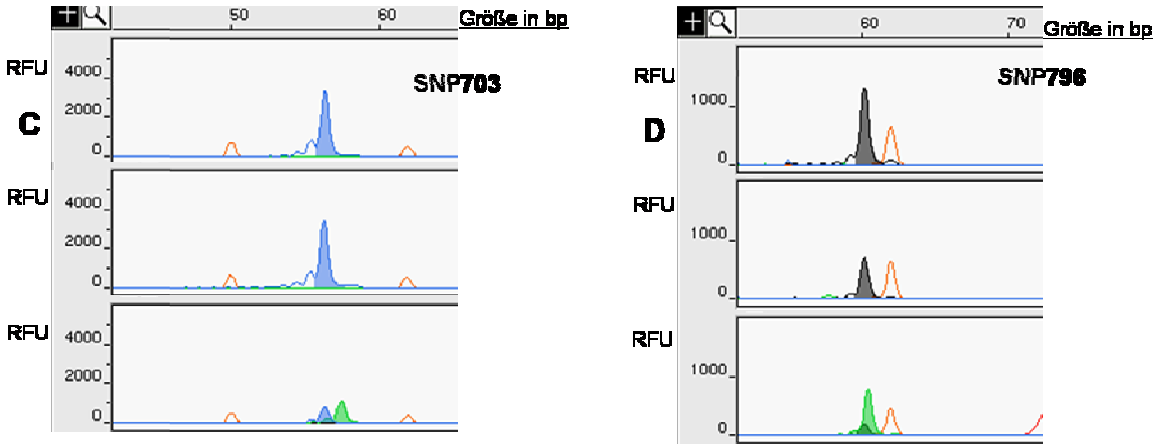

Abb. 5C und 5D: Darstellung der Chromatogramme für die SNP-Positionen SNP703 (C) und SNP796 (D). Von oben nach unten sind in den einzelnen Zeilen der Abbildungen C und D die folgenden Genotypen zu sehen: 1. 0/0, 2. A_1/0, 3. B/0. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande= eingebautes Nukleotid C, *RFU = relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

In Abbildung 5C sind für SNP703 untereinander die Genotypen 0/0, A/0 und B/0 dargestellt. Kennzeichnend für die Allele 0 und A ist an dieser Position ein blauer Ausschlag bei einer Länge von 56 bp. Dagegen ist Allel B durch einen grüne Bande bei einer Länge von 57 bp charakterisiert (siehe drittes Chromatogramm der Abb. 5C). Analog zeigt Abbildung 5D die Ergebnisse für den SNP 796 bei den gleichen Genotypen wie in Abbildung 5C. Entsprechend lässt sich hier für die Allele 0 und A eine schwarze Bande bei einer Länge von 60 bp nachweisen. Für Allel B findet sich hier ein grüner Ausschlag derselben Länge, so dass, wie in der dritten Zeile der Abbildung 5D zu sehen, für den Genotyp B/0 eine grüne und eine schwarze Bande übereinander liegend vorhanden sind.

Die Abbildung 5E stellt für den SNP802 von oben nach unten die Genotypen 0_2/B, A_1/0 und B/0 dar. Hierbei fällt in der obersten Zeile eine grüne Bande bei einer Länge von 63 bp auf, die für das Allel 0_2 kennzeichnend ist.

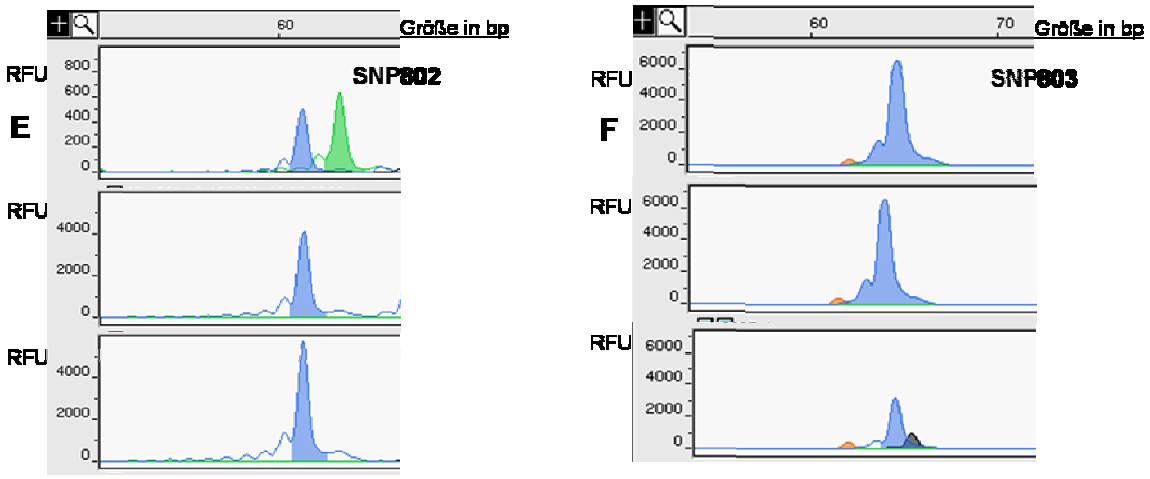

Abb. 5E und 5F: Darstellung der Chromatogramme für die SNP-Positionen SNP802 (E) und SNP803 (F). Von oben nach unten sind in den einzelnen Zeilen der Abbildungen E und F die folgenden Genotypen zu sehen: bei E 1. 0_2/B, 2. A_1/0, 3. B/0; bei F 1. 0/0, 2. A_1/0, 3. B/0. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Die anderen Allele zeichnen sich durch einen blauen Ausschlag bei einer Länge von 61 bp aus wie in der zweiten und dritten Zeile der Abb. 5E zu sehen. An dieser Stelle ist eine eindeutige Unterscheidung der Allele A, B und 0_2 möglich. 0_2 ist eine Nullallelvariante, die in 4 % - 10 % der europäischen Bevölkerung auftaucht.

In der Abbildung 5F sind die Chromatogramme für SNP803 zu sehen. Von oben nach unten sind die Genotypen 0/0, A_1/0 und B/0 aufgeführt. Die beiden Allele 0 und A zeigen hierbei jeweils einen blauen Ausschlag bei einer Länge von 64 bp. Das Allel B hingegen zeigt einen schwarzen Ausschlag bei einer Länge von 65 bp. Ähnlich wie die SNPs SNP703 und SNP796 (siehe Abb. 5C und 5D) kann auch über SNP803 das Allel B eindeutig von den Allelen 0 und A unterschieden werden und bei Ausfall der beiden anderen SNPs zur Genotypisierung herangezogen werden. Diese Redundanz ermöglicht bei suboptimalen Reaktionsbedingungen eine Zuordnung der AB0-Blutgruppe.

In der Abbildung 5G sind die Chromatogramme für den letzten der sieben untersuchten SNPs im AB0-Blutgruppen-Gen zu sehen: SNP1060.

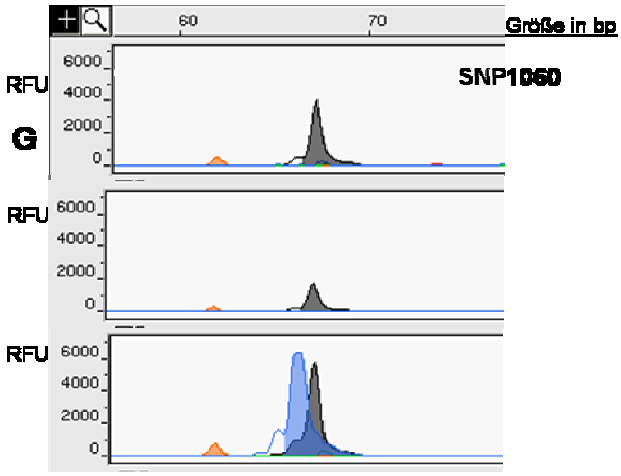

Abb. 5G: Darstellung der Ergebnisse für die SNP-Position SNP1060 (G). Von oben nach unten sind in den einzelnen Zeilen der Abbildung G die folgenden Genotypen zu sehen: Bei 1. 0/0, 2. A_1/0, 3. A_2/B. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Dabei sind von oben nach unten folgende Genotypen zu sehen: 0/0, A_1/0 und A_2/B. Während sich die Allele 0, A_1 und B durch eine schwarze Bande bei einer Länge von 67 bp auszeichnen, ist das Allel A_2 durch eine blaue Bande bei einer Länge von 66 bp charakterisiert. Mit Hilfe dieses SNPs lassen sich die Allelvarianten A_1 und A_2 eindeutig unterscheiden.

Alle ausgewählten SNPs sind, wie die Abbildungen zeigen, unter den gewählten Bedingungen mit Hilfe der Minisequenzierung im Singleplexansatz eindeutig nachzuweisen. Bei Betrachtung der einzelnen Abbildungen 5A – 5G wird allerdings deutlich, dass je nach Position und eingebautem fluoreszenzmarkiertem Didesoxynukleotid deutliche Unterschiede in den Signalhöhen der detektierten Ausschläge bestehen. Die Unterschiede sind besonders auffällig bei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen: zwischen blauen und schwarzen (siehe Abb. 5F und Abb. 5G) bzw. grünen und schwarzen Ausschlägen (siehe Abb. 5D). Unterschiede in der Signalhöhe sind zwischen blauen und grünen Banden kaum feststellbar (siehe Abb. 5A und Abb. 5B).

Für den Multiplexansatz wurden, so weit möglich, nahezu gleiche Signalintensitäten der Banden aller nachzuweisenden SNPs angestrebt. Daher wurden die Signalhöhen im Singleplexansatz für die Mischungsverhältnisse der sieben Oligonukleotide im Multiplex einbezogen. Mit folgenden Konzentrationen wurde gearbeitet, wobei sich die Endkonzentrationen auf ein Gesamtvolumen von 10 µl des SNaPShot-Ansatzes beziehen:

AB0261	0,011 pmol/µl
AB0297	0,011 pmol/µl
AB0703	0,044 pmol/µl
AB0796	0,11 pmol/µl
AB0802	0,055 pmol/µl
AB0803	0,055 pmol/µl
AB01060	0,11 pmol/µl

Ein Test der sieben *Primer* für die Minisequenzierungsreaktion mit dem Programm AutoDimerv1 zeigte, dass unter Standardbedingungen keinerlei Primerdimere und *hairpin*-Strukturen untereinander auftreten. Eine klare Unterscheidung der Ausschläge für die einzelnen SNPs bei der Auftrennung über die Kapillarelektrophorese sollte gewährleistet sein, zumal sich die Größe benachbarter *Primer* für die Minisequenzierung im Schnitt um 4 bp unterscheiden. Eine Ausnahme bilden hierbei die Oligonukleotide AB0297 und AB0703, deren Länge sich lediglich um 1 bp unterscheidet. Wie allerdings aus den Abbildungen 5B und 5C ersichtlich wird, sind die beiden detektierten Bande anhand der jeweiligen Farbe und Länge eindeutig voneinander zu unterscheiden und die Allele der beiden SNPs eindeutig zuzuordnen.

Die folgende Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Minisequenzierung der einzelnen SNPs im Überblick angeordnet nach den fünf Allele A_1, A_2, 0, 0_2 und B. Je Allel sind für die einzelnen SNP-Positionen die Farbe, das eingebaute Nukleotid und die Länge, bei der der Ausschlag in der Kapillarelektrophorese beobachtet wird, aufgeführt.

Tab.1: Darstellung der Ergebnisse für die Kapillarelektrophorese der Minisequenzierung für die einzelnen AB0-Blutgruppen Allele. Die in Farbe wiedergegebenen Buchstaben bezeichnen das eingebaute Nukleotid, wobei die Farbe identisch ist mit der Farbe der im Chromatogramm erscheinenden Bande. Die darunter aufgeführte Zahl gibt die Länge in bp an, bei der die Bande erscheint. bp = Basenpaar

AB0-Blutgruppen-Allel	**SNP 261/ Länge in bp**	**SNP 297/ Länge in bp**	**SNP 703/ Länge in bp**	**SNP 796/ Länge in bp**	**SNP 802/ Länge in bp**	**SNP 803/ Länge in bp**	**SNP 1060/ Länge in bp**
A_1	**G 43**	**A 52**	**G 56**	**C 60**	**G 61**	**G 64**	**C 67**
A_2	**G 43**	**A 52**	**G 56**	**C 60**	**G 61**	**G 64**	**G 66**
0	**A 44**	**A 52**	**G 56**	**C 60**	**G 61**	**G 64**	**C 67**

AB0-Blutgruppen-Allel	SNP 261/ Länge in bp	SNP 297/ Länge in bp	SNP 703/ Länge in bp	SNP 796/ Länge in bp	SNP 802/ Länge in bp	SNP 803/ Länge in bp	SNP 1060/ Länge in bp
0_2	G 43	G 51	G 56	C 60	A 63	G 64	C 67
B	G 43	G 51	A 57	A 60	G 61	C 65	C 67

In der folgenden Abbildung 5H sind exemplarisch die Ergebnisse der Minisequenzierung aller sieben SNPs für die Genotypen 0/0, 0_{v1}/0, 0_2/B, A_1/0, A_2B und B/0 dargestellt.

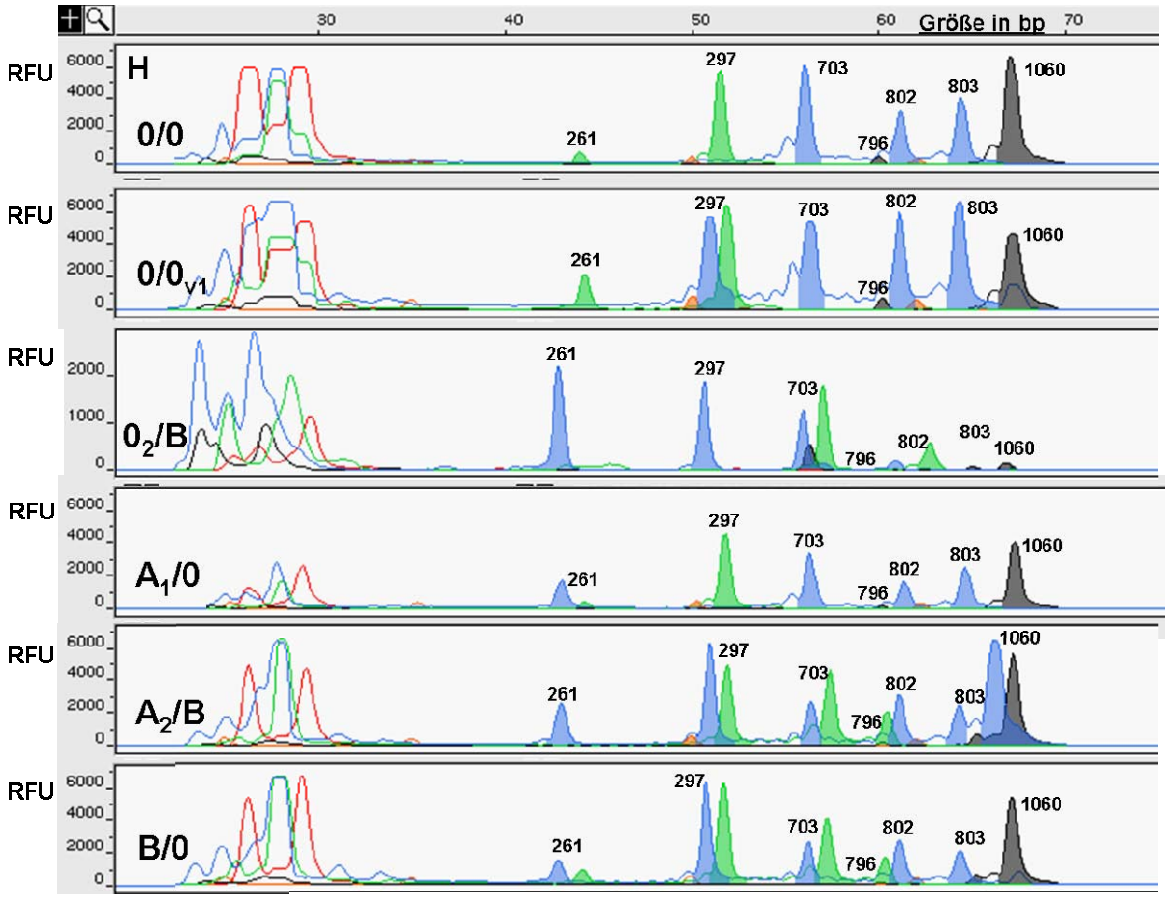

Abb. 5H: Darstellung der Chromatogramme des Multiplexansatzes mit den sieben SNPs SNP261, SNP297, SNP703, SNP796, SNP802, SNP803 und SNP1060 für die sechs verschiedenen Genotypen 1. 0/0, 2. 0/0 $_{v1}$, 3. 0_2/B, 4. A_1/0 5. A_2/B und 6. B/0. Die relevanten Banden sind mit der Ziffer des entsprechenden SNP markiert. Die Genotypen sind links innerhalb jedes Chromatogramms aufgeführt. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Für die Darstellung wurde jeweils DNA aus Speichel- bzw. Blutproben verwendet. Die Banden in den einzelnen Chromatogramme lassen sich, wie erwartet, eindeutig den einzelnen SNPs zuordnen entsprechend der Abbildungen 5A – 5G.

Insgesamt lassen sich sechs Allele bestimmen sowie die zugehörigen Genotypen und AB0-Blutgruppen ableiten.

Bei Betrachtung der einzelnen Chromatogramme fällt allerdings auf, dass der zuvor für die Singleplexansätze beschriebene Effekt der unterschiedlichen Signalhöhen auch im Multiplexansatz zu finden ist. Hierbei fallen besonders die unterschiedlichen Signalhöhen für die schwarzen bzw. grünen Banden an der Position SNP796 sowie für die blauen und schwarzen Banden für SNP803 auf. In beiden Fällen ist die Signalhöhe der jeweils schwarzen Bande sehr gering. Trotz Austesten unterschiedlicher Konzentrationen für die beiden *Primer* AB0796 und AB0803 konnte die Signalintensität der schwarzen Banden für SNP796 und SNP803 nicht erhöht werden. Eine Verwendung der rückwärtig vom SNP gelegenen Sequenz als *Primer*-Sequenz wurde ausgetestet, führte aber schon auf der Ebene der Singleplexansätze zu keinem Ergebnis.

Des Weiteren fallen im Bereich von 25 – 35 bp starke Bandenmuster als Artefakte auf. Sie beeinflussen die Auswertung der relevanten Banden allerdings nicht. Diese Artefakte wurden in allen Multiplexansätzen beobachtet.

Die Minisequenzierung mit PCR-Produkten der *Primer*-Sets TriplexAB0-1 und TriplexAB0-2 wurde wiederholt erfolgreich durchgeführt. Unterschiede in der Nachweissensitivität der sieben SNPs zwischen den beiden *Primer*-Sets ließen sich bei Vergleichsproben bzw. DNA-Proben und DNA aus biologischen Tatortspuren, die genügend intakte DNA enthielten, nicht feststellen.

Exemplarisch ist in der folgenden Abbildung 6 das Ergebnis der Minisequenzierung für die Knochenprobe a zu sehen, deren PCR-Produkte (TriplexAB0-1) in Abbildung 4 dargestellt sind. Parallel dazu ist das SNP-Profil für den AB0-Genotyp der Zelllinie 9948 zu sehen, das mit 1 ng DNA der Zelllinie erstellt wurde. Aus der Abbildung 6 geht hervor, dass alle ausgewählten sieben SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens für die Knochenprobe a eindeutig und mit vergleichbar hoher Signalintensität wie Speichelproben darzustellen sind. Der AB0-Genotyp der Knochenprobe a lässt sich mit $0/0_{v1}$ bestimmen; die serologisch feststellbare AB0-Blutgruppe ist daher 0. Für die Zelllinie 9948 lautet der Genotyp 0/0, und somit ist die AB0-Blutgruppe ebenfalls 0.

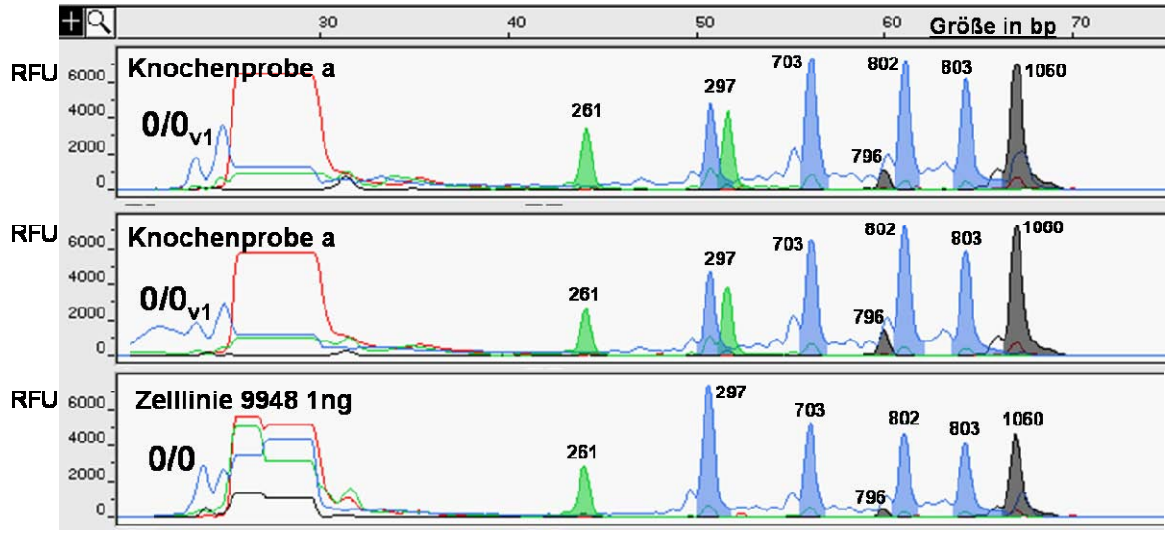

Abb. 6: Darstellung von drei Chromatogrammen, welche Ergebnis der Minisequenzierung für die Knochenprobe a (Chromatogramm eins und zwei) sowie für die Zelllinie 9948 (Chromatogramm drei) für das AB0-Blutgruppen-Gen darstellen. Der ermittelte AB0-Genotyp ist jeweils auf der linken Seite im Chromatogramm aufgeführt. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Weitere analysierte biologische Tatortspuren zeigten, abweichend zu der dargestellten Knochenprobe a, Unterschiede in der Nachweisbarkeit und der Signalhöhe der beobachten Banden einzelner SNPs. In den folgenden Abbildungen 7 - 9 sind die Ergebnisse der Minisequenzierung einer weiteren Knochenprobe und zweier Haarproben zu sehen.

Die Abbildung 7 zeigt das Ergebnis für die Knochenprobe c, bei der die DNA über die zwei verschiedenen Extraktionsverfahren *all-tissue DNA-Kit* + Glasmilch, im Weiteren als Genial+Glasmilch bezeichnet, und *Charge Switch® Forensic DNA Purification Kit*, im Weiteren als ChargeSwitch bezeichnet, gewonnen wurde (siehe 2.7 DNA-Extraktion). Die verwendeten PCR-Produkte wurden mittels *Primer*-Set TriplexAB0-2 amplifiziert, da eine zuvor durchgeführte Mini-sequenzierung mit PCR-Produkten des TriplexAB0-1 kein Ergebnis lieferte.

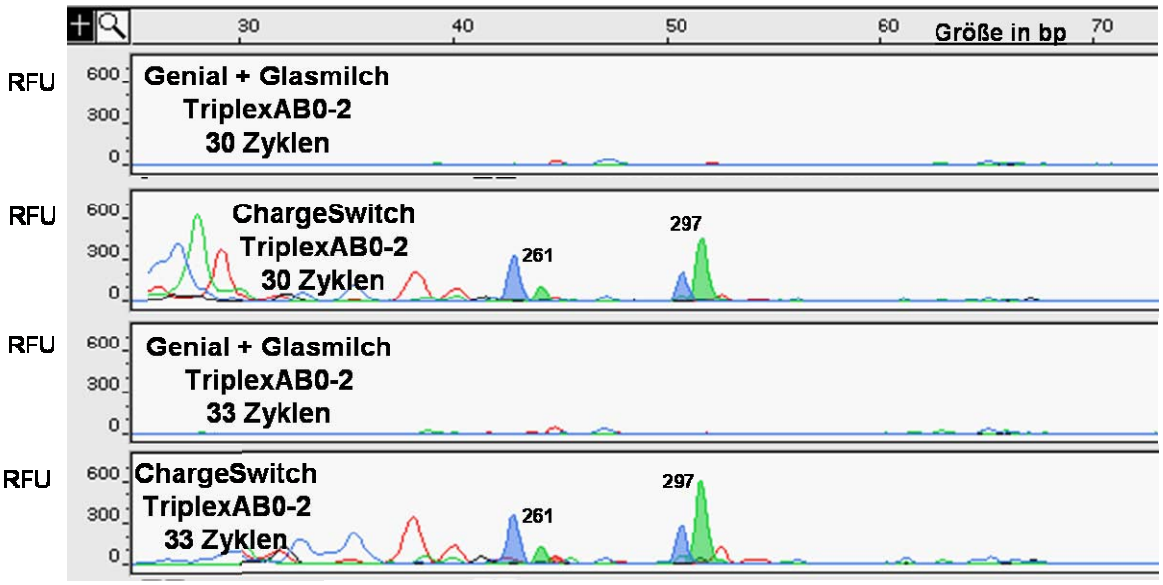

Abb. 7: Darstellung der Ergebnisse der Minisequenzierung der sieben SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens für die Knochenprobe c. Die für die Gewinnung der DNA verwendete Extraktionsmethode sowie die Anzahl der Zyklen bei der „Minisequencing"-Reaktion sind links im Chromatogramm vermerkt. Aufgrund der Teilbefunde kommen zwei AB0-Genotypen für die Knochenprobe c in Betracht: B/0 und A/0_{v1}. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze BAnde = eingebautes Nukleotid C, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Von den insgesamt vier Chromatogrammen zeigen lediglich zwei, das zweite und das vierte Chromatogramm, ein Ergebnis. In beiden sind je eine blaue und eine grüne Bande für die SNPs SNP261 und SNP297 erkennbar.

Der Unterschied zwischen den Chromatogrammen eins bzw. drei auf der einen und den Chromatogrammen zwei und vier auf der anderen Seite besteht darin, dass die ersteren mit DNA aus einer Genial+Glasmilch – Extraktion erstellt wurden, während die letzteren mittels DNA aus einer Extraktion mit ChargeSwitch erzeugt wurden. Trotz unterschiedlicher Zyklenzahl (30 bzw. 33 Zyklen) zeigen die Chromatogramme zwei und vier im Wesentlichen identische Ergebnisse, so dass davon auszugehen ist, dass eine Erhöhung der Zyklenzahl für das Ergebnis der Minisequenzierung nicht ausschlaggebend ist. Aufgrund der Ergebnisse kann der AB0-Genotyp für Knochenprobe c entweder B/0 oder A/0_{v1} lauten.

In den folgenden beiden Abbildungen sind die Typisierungsergebnisse für die zwei telogenen Haarproben a (Abb. 8) und b (Abb. 9) dargestellt, deren PCR-Ergebnis in Abbildung 4 zu sehen ist.

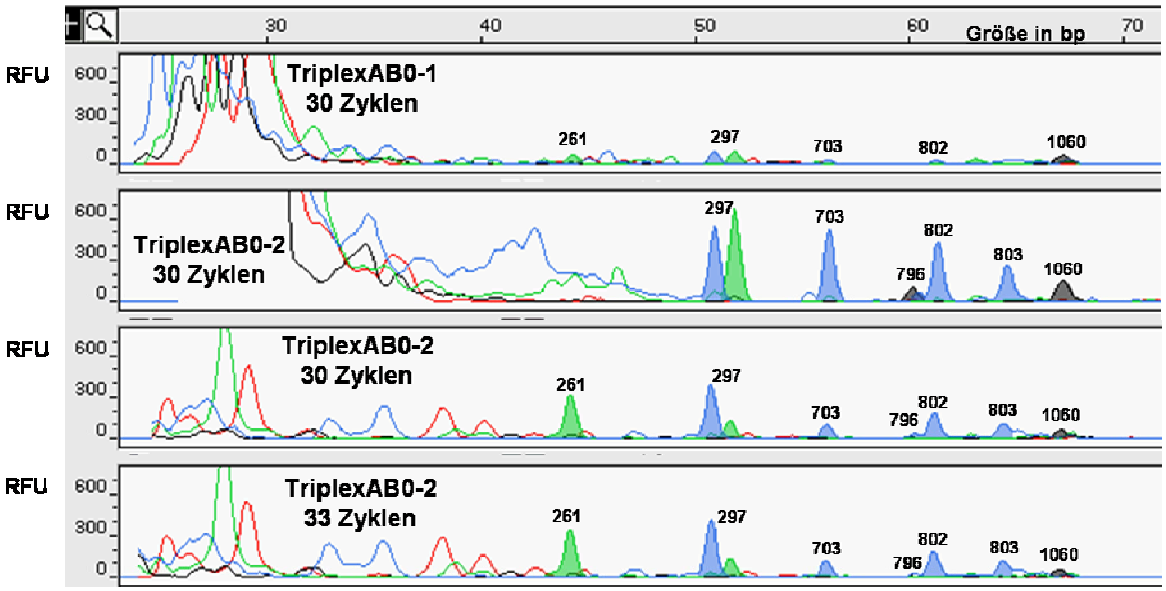

Abb. 8: Darstellung von vier Chromatogrammen, die die Ergebnisse der Minisequenzierung der sieben SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens für die Haarprobe a zeigen. Das verwendete PCR-Primerset sowie die Anzahl der Zyklen bei der „Minisequencing"-Reaktion sind links im Chromatogramm vermerkt. Der AB0-Genotyp lässt sich bei allen Reaktionen mit $0/0_{v1}$ bestimmen. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

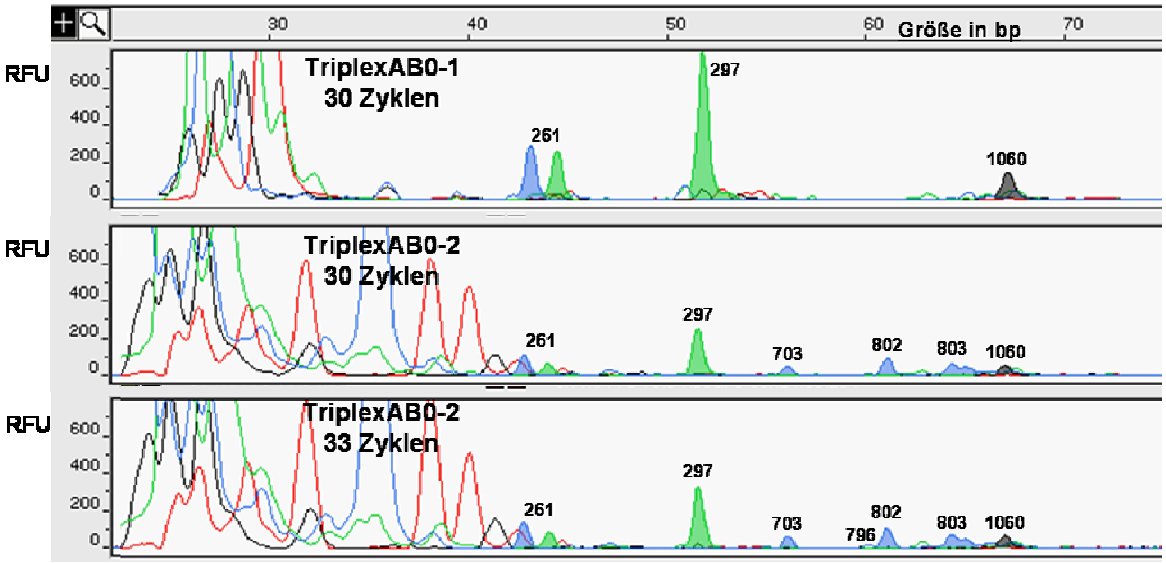

Abb. 9: Darstellung von drei Chromatogrammen mit den Ergebnissen der Minisequenzierung der sieben SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens für die Haarprobe b. Das verwendete PCR-*Primer*-Set sowie die Anzahl der Zyklen bei der Minisequenzierung sind links im Chromatogramm vermerkt. Der AB0-Genotyp ist $A_1/0$. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Anhand beider Abbildungen sind eindeutig die AB0-Genotypen der Haarproben a und b abzulesen, wobei der AB0-Genotyp der Haarproben identisch mit der

jeweiligen Vergleichsprobe ist. Für die Haarprobe a ergibt sich der AB0-Genotyp $0/0_{v1}$, für die Haarprobe b $A_1/0$.

In Abhängigkeit von den verwendeten PCR-Produkten lassen sich in Abbildung 8 für die Haarprobe a unterschiedliche Signalintensitäten für die Minisequenzierung feststellen. Die schwächste Reaktion wurde bei der Kombination von PCR-Produkten des TriplexAB0-1 mit Standardbedingungen für die Minisequenzierung erzeugt (erstes Chromatogramm in Abb. 8). Die restlichen Chromatogramme zeigen die Minisequenzierung, die mit PCR-Produkten des TriplexAB0-2 erstellt wurde. Unabhängig von der verwendeten Zyklenzahl für die Minisequenzierung wurde dabei eine höhere Signalintensität der einzelnen Banden erzielt als bei Verwendung von PCR-Produkten des TriplexAB0-1.

Für die Haarprobe b in Abbildung 9 ist festzustellen, dass bei den Ergebnissen, die mit PCR-Produkten des *Primer*-Sets TriplexAB0-1 erstellt wurden, die SNPs des längsten PCR-Produktes (AB0Exon7f4 + r4) SNP703, SNP796, SNP802 und SNP803 nicht detektiert werden können. Das erhaltene Teilergebnis reichte daher nicht für eine eindeutige Genotypisierung aus. Die weiteren Ergebnisse auf Basis des TriplexAB0-2 zeigten für die entsprechenden vier SNPs ein schwaches Resultat, dass eine eindeutige AB0-Genotypisierung zuließ.

Die parallel eingesetzten PCR-Produkte des *Primer*-Sets TriplexAB0-2 zeigen an dieser Stelle insofern Vorteile gegenüber den PCR-Produkten des *Primer*-Sets TriplexAB0-1, da sich die SNPs SNP703, SNP796, SNP802 und SNP803, durchaus unter Standardbedingungen wie auch mit erhöhter Zyklenzahl, mit schwachen Signalintensitäten aber eindeutig typisieren lassen.

3.1.3 AB0-Blutgruppen-Gen – Analyse mittels Restriktionsendonuklease

Zusätzlich zur Minisequenzierung wurde exemplarisch für eine weitere Knochenprobe eine Analyse mittels RFLP durchgeführt. Bei dem analysierten SNP handelt es sich um SNP261. In der folgenden Abbildung 10 sind im Vergleich die Ergebnisse für die Minisequenzierung (rechts) und für die Analyse mit der Restriktionsendonuklease *KpnI* (links) zu sehen.

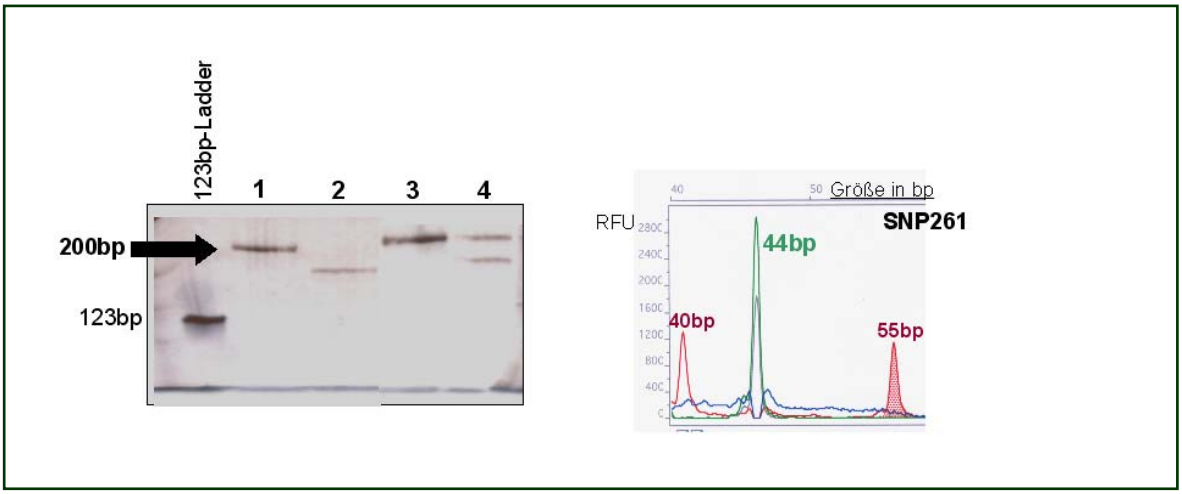

Abb.10: Gegenüberstellung der Ergebnisse einer Knochenprobe für SNP261 erstellt durch die Analyse mit einer speziellen Restriktionsendonuklease und der Minisequenzierung. Links ist ein Polyacryamidgel dargestellt, auf dem insgesamt zwei Proben vor (Spuren 1 und 3) und nach (Spuren 2 und 4) Behandlung mit *KpnI* aufgetragen sind. Für die Knochenprobe (Spur 1,2) ist das PCR-Produkt komplett gespalten worden, so dass daraus der AB0-Genotyp 0/0 folgt. Die Vergleichsprobe dagegen zeigt entsprechend ihrem Genotyp A/0 nach *KpnI*-Behandlung eine geschnittene und eine ungeschnittene Bande. Rechts ist das Ergebnis für die Minisequenzierung von SNP261 der Knochenprobe zu sehen, wobei nur eine grüne Bande bei einer Länge von 44 bp sichtbar ist, was auf einen Genotyp von 0/0 hinweist. Grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Während in der rechten Hälfte der Abbildung die für das Allel 0 charakteristische grüne Bande bei einer Länge von 44 b nach Auftrennung der Reaktionsprodukte der Minisequenzierung auf der Kapillarelektrophorese zu sehen ist, ist links das Spaltungsmuster der Restriktionsendonuklease *KpnI* eines PCR-Produktes, das den SNP261 umfasst, dargestellt. Wird das PCR-Produkt durch die *KpnI* gespalten, handelt es sich um das Allel 0; wird das PCR-Produkt durch die *KpnI* nicht gespalten liegt entweder das Allel A oder B vor. In den links auf dem Polyacrylamidgel sichtbaren Spuren 1 und 2, die das ungeschnittene (1) und das gespaltene (2) PCR-Produkt der Knochenprobe zeigen, ist das für Allel 0 charakteristische Schnittmuster zu sehen. Die Spuren 3 (ungeschnitten) und 4 (geschnitten) zeigen das Muster einer Vergleichsprobe mit dem Genotyp A/0.
Somit wurde für die Knochenprobe mit zwei verschiedenen Methoden das gleiche Ergebnis für die AB0-Typisierung des SNP261 erzielt, so dass davon auszugehen ist, dass die Minisequenzierung als gleichwertige Methode zur Analyse von SNPs bzw. zur AB0-Genotypisierung verwendet werden kann.

3.2 mtDNA

3.2.1 mtDNA - PCR-Produkte und PCR-Multiplex

Für die Unterscheidung einzelner mtDNA-Haplotypen stehen Mutationen innerhalb der hypervariablen Regionen HV1 und HV2 der Kontrollregion zur Verfügung. Eine Zuordnung zu den mtDNA-Haplogruppen, die über SNPs außerhalb der Kontrollregion definiert sind, kann entsprechend der analysierten Haplotypen erfolgen, ist aber nicht eindeutig. Für die Untersuchung von mtDNA aus biologischen Tatortspuren wurden exemplarisch sechs SNPs und ein Längenpolymorphismus aus der Kontrollregion der mtDNA ausgewählt (Morley et al. 1999). In der HV1 sind dies die SNPs an den Positionen 16069, 16224 und 16312, in der HV2 die SNPs der Positionen 73, 152, 247 sowie der Längenpolymorphismus an Position 309 (*C stretch*), der über ein Oligonukleotid mit Lage der 3'-Position bei 303 analysiert wird. Die relevanten Bereiche der mtDNA wurden mittels drei verschiedener *Primer*-Paare vervielfältigt (siehe Anhang 7.1 Tabellen der PCR- und Minisequenzierungs-*Primer*). Mit Hilfe der *Primer*-Kombination L16048 und H16332 wird die Region HV1 vervielfältigt, im Weiteren *Primer*-Paar HV1 genannt. Für die Vervielfältigung der Region HV2 wird die Kombination L00066 und H00326 verwendet, die als *Primer*-Paar HV2 bezeichnet wird. Die dritte Kombination L15997 und H00580 amplifiziert die gesamte Kontrollregion, d.h. die drei hypervariablen Regionen HV1, HV2 und HV3 und wird im Folgenden *Primer*-Paar HV komplett genannt. Für die einzelnen Kombinationen ergeben sich PCR-Produkte folgender Längen:

Primerpaar HV1	343 bp
Primerpaar HV2	331 bp
Primerpaar HV komplett	1193 bp

Zunächst wurden alle drei Kombinationen einzeln in PCR-Ansätzen ausgetestet. Nach erfolgreicher Amplifikation, wie in Abbildung 11 zu sehen, wurden die Primerpaare HV1 und HV2 miteinander in einem PCR-Ansatz kombiniert, so dass alle sieben zu analysierenden Polymorphismen in einem PCR-Ansatz vervielfältigt werden konnten. Im Weiteren wird dieser PCR-Ansatz mit Duplex bezeichnet. Die Ergebnisse der Duplex-Ansätze sind ebenfalls in Abbildung 11 zu sehen. Für die Singleplex-PCR-Ansätze aller drei *Primer*-Kombinationen wurde eine

Konzentration von 2 pmol/µl je Oligonukleotid verwendet. Für die Duplex wurde je Oligonukleotid 1 pmol/µl für den PCR-Ansatz eingesetzt.

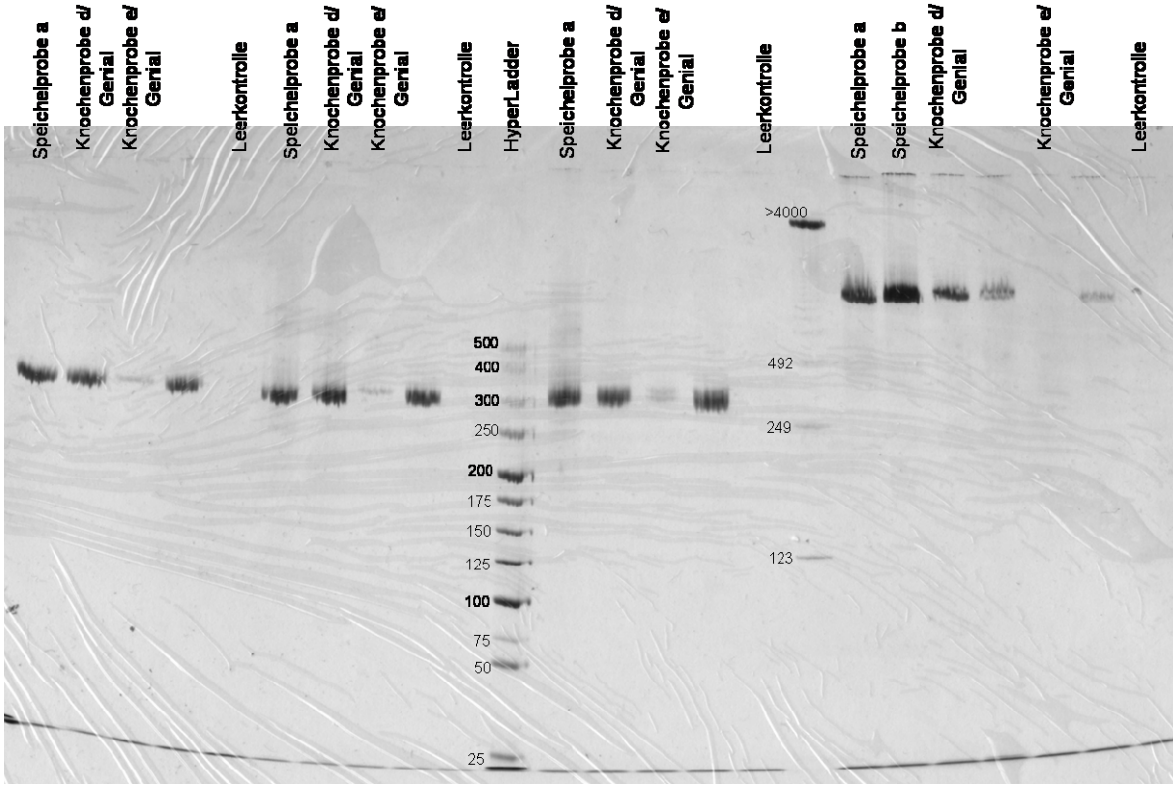

Abb. 11: Darstellung der Singleplex-PCR-Ansätze für die *Primer*-Paare HV1, HV2 und HV komplett sowie die Duplex (HV1 und HV2) auf einem Polyacrylamidgel. Als DNA-Proben wurden eine Speichelprobe sowie die beiden Knochenproben d und e eingesetzt. Falls unterschiedliche DNA-Extraktionsmethoden verwendeten wurden, sind die Proben mit Genial bzw. ChargeSwitch (CS) bezeichnet. Entsprechend der oben aufgeführten PCR-Produktlängen sind für alle Singleplexansätze und den Duplexansatz PCR-Produkte in der angegeben Länge im Gel nachweisbar. Zur Bestimmung der Länge der PCR-Produkte wurden zwei verschiedene Längenmarker aufgetragen: die HyperLadder und die 123 bp Ladder. Die Größe für die einzelnen Banden der beiden Längenmarker ist in der Abbildung in bp angegeben. bp = Basenpaar

Für die in Abbildung 11 dargestellten PCR-Ansätze wurde DNA der Speichelprobe a und der Knochenproben d und e verwendet, wobei die DNA der Knochenprobe e mit zwei verschiedenen Verfahren („all-tissue DNA-Kit „(Genial) + Glasmilch und „Charge Switch® Forensic DNA Purification Kit“) extrahiert wurde. Zusätzlich wurde mit dem *Primer*-Paar HV komplett DNA einer weiteren Speichelprobe b und einer Mischspur aus Hautzellen und Blut amplifiziert. Für alle vier DNA-Proben sind die PCR-Produkte für HV1, HV2 und die Duplex eindeutig, z.T. recht schwach (z.B. Knochenprobe e/Genial), zu erkennen. Für das *Primer*-Paar HV komplett ist für alle fünf DNA-Proben ebenfalls das erwartete PCR-Produkt zu finden, mit Ausnahme der Knochenprobe e/Genial. Ähnliche Beobachtungen

konnten bei weiteren Knochenproben gemacht werden, die über die beiden Extraktionsmethoden aufgereinigt wurde. Hierbei zeigten sich ebenfalls wie bei der Knochenprobe e Unterschiede in Menge und Länge der erfolgreich amplifizierten PCR-Produkte.

Analog zu den Speichel- und Knochenproben wurden Haarproben untersucht, deren PCR-Ergebnisse in Abbildung 12 dargestellt sind. Auf eine Darstellung der Singleplex-PCR von HV1 und HV2 wurde hierbei verzichtet und nur die Duplex durchgeführt.

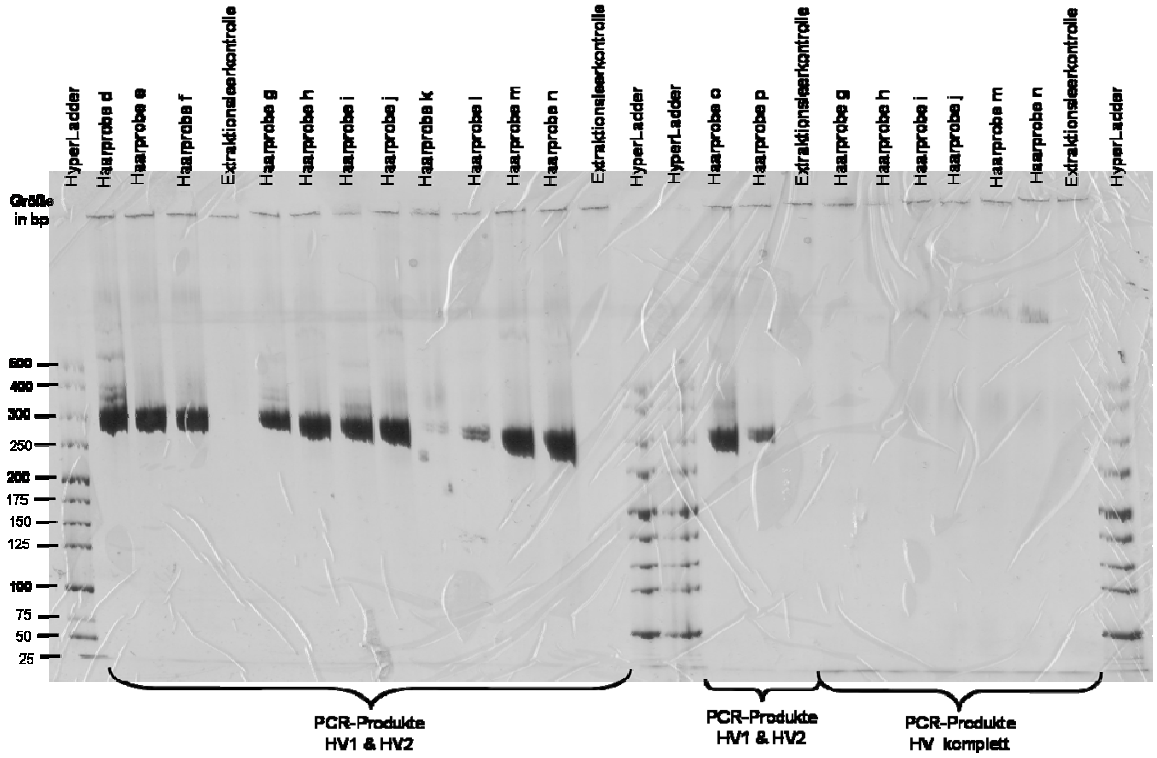

Abb.12: Darstellung der PCR-Ansätze für den Duplex-Ansatz von HV1 und HV2 sowie dem Primerpaar HV komplett auf einem silbergefärbten Polyacrylamidgel. Als DNA-Proben wurden unterschiedliche Haarproben, benannt mit d – o, verwendet. Als Längenstandard wurde die HyperLadder verwendet. bp = Basenpaar

Bei den untersuchten Proben handelte es sich um Haare, die von insgesamt vier verschiedenen Personen stammten. Da sich jedes einzelne Haar in Länge, Pigmentierung bzw. künstlicher Färbung und Qualität der mtDNA unterscheidet, wurde jedes einzelne bearbeitete Haar mit einem neuen Buchstaben benannt.

Während die Proben d bis f pro Person und DNA-Extraktion zwei komplette Haare umfassen, wurden für die Proben g, i, k und m von den vier Personen je zwei telogene Haare, für die Proben h, j, l und n je zwei Haarschäfte bearbeitet. Die Proben k und l unterschieden sich von den restlichen Haarproben zusätzlich durch durchschnittlich längere Haare bzw. Haarschäfte. Bei den beiden letzten Proben o

und p handelte es sich um Mischproben, bei denen je zwei telogene Haare bzw. Haarschäfte von zwei verschiedenen Personen in einer Probe enthalten waren.
Bei Betrachtung der PCR-Ergebnisse in Abbildung 12 werden vor allem Unterschiede zwischen den relativ kurzen PCR-Produkten der Duplex und dem langen PCR-Produkt des *Primer*-Paares HV komplett deutlich: Während mit dem Duplexansatz alle verwendeten Haarproben erfolgreich amplifiziert werden konnten, war dies für das *Primer*-Paar HV komplett nur für die Haarproben i, j, m und n möglich. Zudem ist analog zu den zuvor dargestellten Knochenproben ein Unterschied in der Konzentration der einzelnen PCR-Produkte sichtbar: Mit Ausnahme der Haarproben k und l werden für den Duplex hohe Konzentrationen an PCR-Produkten nachgewiesen, sichtbar an den stark geschwärzten und dicken Banden im silbergefärbten Polyacrylamidgel. Die Proben k und l zeigen eine schwach gefärbte aber deutliche Bande, die im Vergleich zu den restlichen Proben auf eine geringere Menge an PCR-Produkten schließen lässt. Für das *Primer*-Paar HV komplett sind, im Gegensatz zur Duplex, für lediglich vier Proben (i, j, m und n) schwach gefärbte Banden sichtbar, die ebenfalls auf eine geringere Konzentration an PCR-Produkt schließen lassen. Die restlichen beiden Proben (g und h) zeigen keinerlei PCR-Produkt.
Insgesamt konnten mit Hilfe der Duplex DNA-Extrakte verschiedener biologischer Spuren erfolgreich amplifiziert werden. Ähnliches gilt für HV komplett, wobei für einen Teil der Knochenproben und der Haarproben ein Ausfall des PCR-Produktes bei dem Nachweis im Polyacrylamidgel zu beobachten war. Für die Analyse biologischer Tatortspuren wird daher die Duplex bevorzugt eingesetzt.

3.2.2 mtDNA – Minisequenzierung

Analog zur Minisequenzierung der SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens wurden die sieben Polymorphismen der Kontrollregion der mtDNA zunächst im Singleplex-, dann im Multiplexansatz analysiert. Im Folgenden werden die Multiplexansätze von drei bis sieben SNPs dargestellt.
Bei den dargestellten Multiplexen der Minisequenzierung wurde mit den aufgeführten Konzentrationen der Minisequenzierungs-*Primer* gearbeitet:

H00074	0,0434 pmol/µl
H00153	0,0193 pmol/µl

H00248	0,0217 pmol/µl
H00303	0,0434 pmol/µl
H16070	0,0145 pmol/µl
H16224	0,029 pmol/µl
H16312	0,029 pmol/µl

Ebenfalls wurden die sieben ausgewählten Oligonukleotide mit AutoDimerv1 getestet. Hierbei ergaben sich unter Standardbedingungen keinerlei Sekundärstrukturen (Dimere und *hairpins*), so dass auf dieser Ebene Artefakte durch die *Primer* in der Minisequenzierung ausgeschlossen werden können. Um die im Chromatogramm des Multiplexansatzes sichtbaren Banden zuordnen zu können, wurde Tabelle 2 erstellt, die neben dem untersuchten SNP und der entsprechenden Bezeichnung des Oligonukleotids Informationen zum ursprünglichen bzw. mutierten Nukleotid an der SNP-Position enthält sowie die Länge und Farbe des im Chromatogramm sichtbaren Ausschlages.

Tab.2: Auflistung der sieben mtDNA SNPs mit zugehörigem *Primer* und beiden Nukleotidvarianten. Letztere sind getrennt nach dem in der Referenzsequenz (Andersonsequenz) gefundenen Nukleotid (ursprüngliches Nukleotid) und der Mutation (mutiertes Nukleotid). In der gleichen Spalte darunter ist das in der Reaktion eingebaute Nukleotid, die und die Länge in bp aufgeführt, unter der der *peak* auftaucht. bp = Basenpaar

SNP	**Minisequenzierungs-*Primer***	**ursprüngliches Nukleotid/Nachweis**	**mutiertes Nukleotid/Nachweis**
73	H00074	A **T 41 bp**	G **C 39 bp**
152	H00153	T **A 52 bp**	C **G 51 bp**
247	H00248	G **C 57 bp**	A **T 58 bp**
C-Stretch 309	H00303	- **T 41 bp**	C (Insertion) **G 40 bp**
16069	H16070	C **G 47 bp**	T **A 48 bp**
16224	H16224	T **A 61 bp**	C **G 60 bp**
16311	H16312	T **A 44 bp**	C **G 43 bp**

In der folgenden Abbildung 13 ist exemplarisch das Ergebnis der Minisequenzierung der PCR-Produkte der drei einzelnen PCR-*Primer*-Kombinationen sowie der Duplex ein und derselben Speichelprobe zu sehen. Anhand der einzelnen Chromatogramme können die SNPs getrennt nach HV1 und HV2 betrachtet werden sowie die Ergebnisse von HV komplett und der Duplex auf ihre Ergebnisse hin überprüft werden. Eine Zuordnung erfolgt anhand der Angaben in der Tabelle 2.

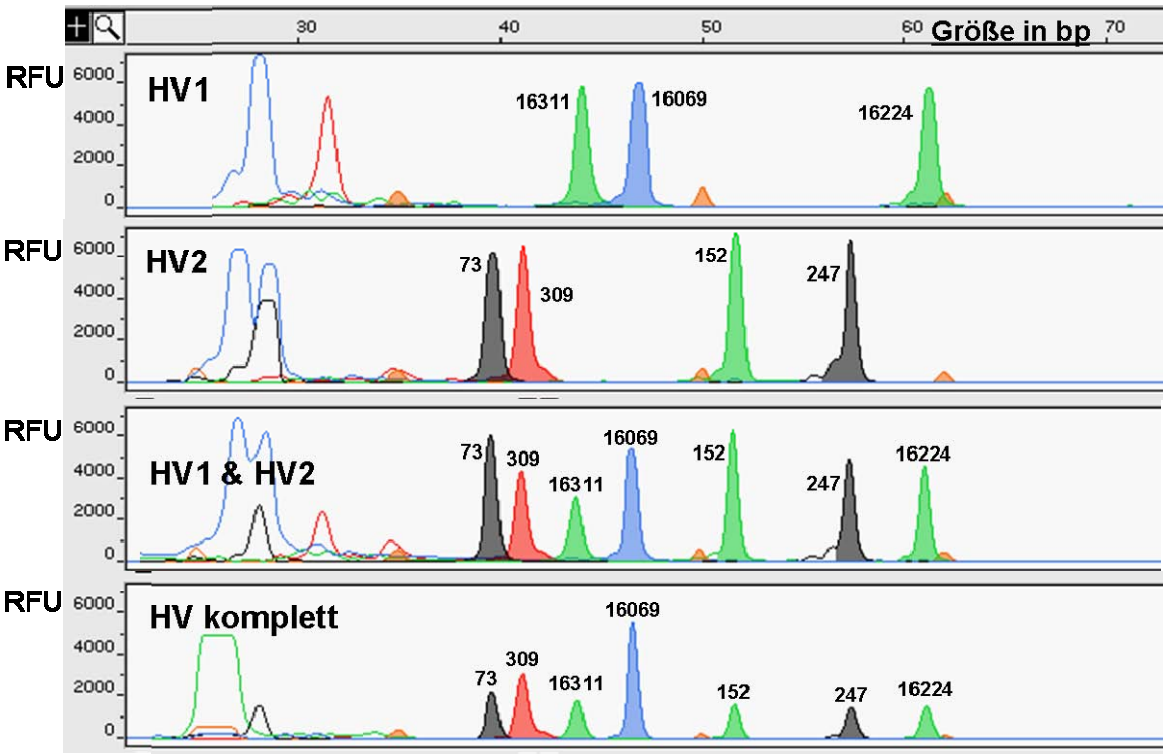

Abb. 13: Darstellung von vier Multiplexansätzen der sieben untersuchten SNPs von HV1 und HV2 der mtDNA aufgeteilt nach den einzelnen PCR-Produkten der Kombination HV1, HV2 und HV komplett sowie der Duplex. Die Amplifikation der PCR-Produkte erfolgte mit dem DNA-Extrakt derselben Speichelprobe. Die in den Chromatogrammen sichtbaren Ausschläge sind mit der Ziffer der entsprechenden SNPs gekennzeichnet. Die jeweiligen PCR-*Primer*-Kombinationen sind links aufgeführt. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, rote Bande = eingebautes Nukleotid T, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Die ersten beiden Chromatogramme zeigen drei bzw. vier der analysierten SNPs der HV1 bzw. HV2. Alle Banden sind eindeutig zu erkennen und mit hoher Signalintensität nachweisbar. Werden die sieben SNPs in einem Ansatz untersucht, wie bei PCR-Produkten von HV komplett und der Duplex der Fall, so sind ebenfalls alle Banden eindeutig von einander getrennt nachweisbar und dem jeweilige SNP eindeutig zuzuordnen. Die Ergebnisse der verschiedenen PCR-Produkte sind für die jeweils untersuchten SNPs übereinstimmend. Bei

Betrachtung der beiden letzteren Chromatogramme fällt auf, dass die Signalintensität der einzelnen Banden für HV komplett im Durchschnitt geringer ist als für die PCR-Produkte der Duplex. Dagegen sind die Signale einzelner Banden der Minisequenzierung der PCR-Produkte HV1, HV2 und der Duplex vergleichbar hoch. Des Weiteren fällt auf, dass die blaue Bande für SNP 16069 eine im Vergleich zu den restlichen Banden hohe Signalintensität bei allen vier analysierten PCR-Produkten zeigt. Zusätzlich sind in allen vier Chromatogrammen in einem Größenbereich von 25 – 35 bp weitere Banden zu sehen, die allerdings keinen Einfluss auf die Auswertung der Minisequenzierung haben. Diese Artefakte treten in allen weiteren Minisequenzierungen auf unabhängig von den verwendeten PCR-Produkten.

Inwiefern die Verwendung verschiedener *Prime*r-Paare und deren Produkte Einfluss auf die Nachweisbarkeit der mtDNA-SNPs bei biologischen Tatortspuren hat, sollte im Folgenden überprüft werden.

Bei den biologischen Tatortspuren handelte es sich hauptsächlich um Knochen- und Haarproben, deren PCR-Ergebnisse in den Abbildungen 11 und 12 dargestellt sind. Die in den fünf Abbildungen (Abb. 14 – 18) dargestellten Profile der analysierten mtDNA-SNPs wurden unter Standardbedingungen analog zu der in Abbildung 13 dargestellten Vergleichsprobe erstellt.

In den folgenden beiden Abbildungen 14 und 15 sind exemplarisch die Ergebnisse der Knochenproben d und e zu sehen. Für die Knochenprobe e wurden die PCR-Produkte HV komplett und der Duplex verwendet, die durch zwei verschiedene DNA-Extrakte gewonnen wurden, die sich ihrerseits durch das verwendete Extraktionsverfahren unterschieden (s.o.).

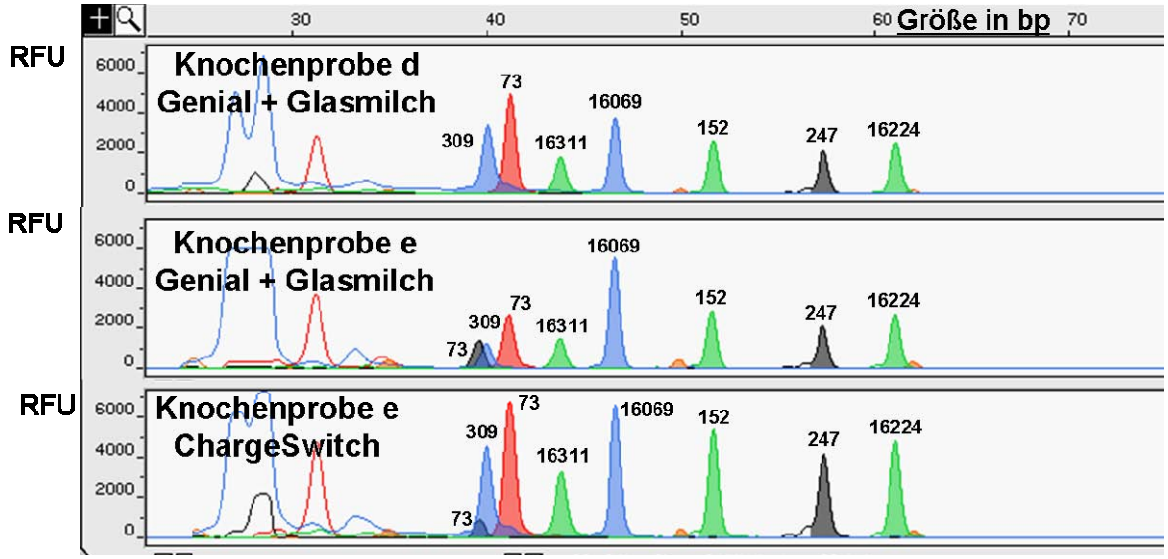

Abb.14: Darstellung der Minisequenzierung der sieben SNPs der mtDNA für die beiden Knochenproben d und e mit PCR-Produkten der Duplex. Für die Knochenprobe e wurden beide vorliegenden DNA-Extrakte in die Reaktion eingesetzt. Die Bezeichnung der Knochenprobe sowie die für die DNA-Extraktion benutzte Methode sind links aufgeführt. Die SNP-Profile für die Knochenprobe e sind identisch. blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, rote Bande = eingebautes Nukleotid T, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

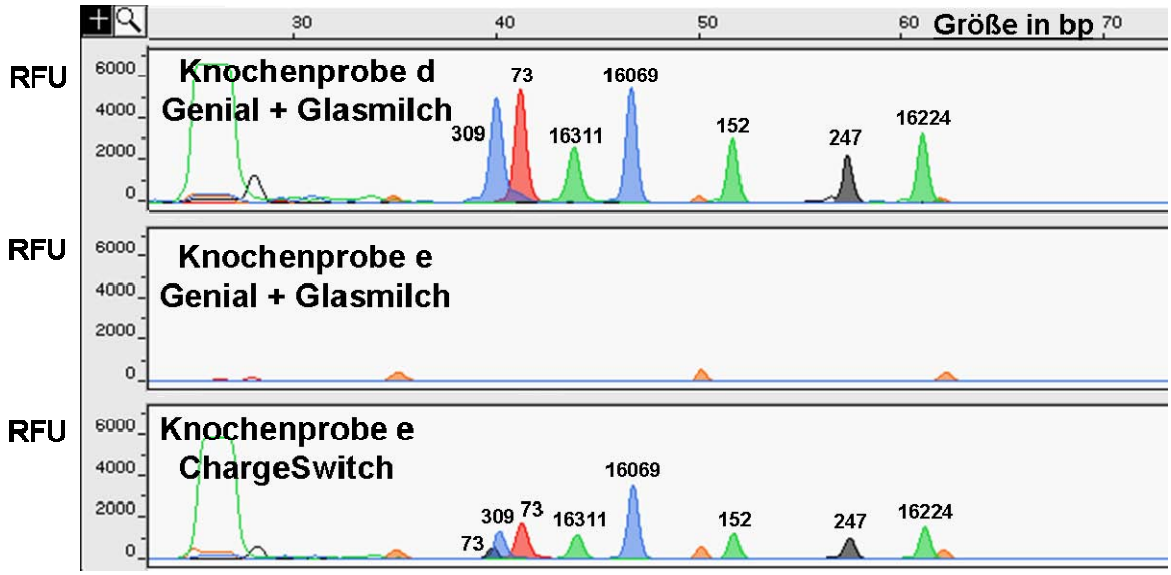

Abb. 15: Darstellung der Multiplexansätze für die sieben SNPs der mtDNA für die Knochenproben d und e analog zu Abbildung 14. Für die Darstellung wurden die PCR-Produkte von HV komplett verwendet. Für zwei der drei Knochenproben kann ein eindeutiges SNP-Profil erstellt werden. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, rote Bande = eingebautes Nukleotid T, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Während in der Abbildung 14 die Minisequenzierung zu sehen ist, die bei der Verwendung der PCR-Produkte der Duplex erzielt wurden, sind in Abbildung 15 die Ergebnisse unter Verwendung des PCR-Produktes HV komplett dargestellt.

Im Hinblick auf die Typisierung der einzelnen SNPs sind die Ergebnisse für beide Knochenproben jeweils identisch unabhängig von den verwendeten PCR-Produkten. Eine Ausnahme bildet hierbei der DNA-Extrakt der Knochenprobe e, der mit Hilfe des Genial+Glasmilch-Extraktionsverfahren gewonnen wurde. Hierbei lassen sich zwar übereinstimmende Ergebnisse für das PCR-Produkte der Duplex beider DNA-Extrakte erzielen, aber für das PCR-Produkt HV komplett konnte kein Ergebnis festgestellt werden. Ebenso lassen sich bei den Reaktionen der Minisequenzierung abhängig von dem verwendeten PCR-Produkt Unterschiede in der Signalintensität feststellen, die bei den DNA-Extrakten der Knochenprobe e im Vergleich ausgeprägter sind als beim DNA-Extrakt der Knochenprobe d. Insgesamt zeigte die Knochenprobe e/ ChargeSwitch bei Verwendung des PCR-Produktes HV komplett eine geringere Signalintensität aller sieben Banden im Vergleich zu den Ergebnissen mit den PCR-Produkten der Duplex. Gleiches gilt für die PCR-Produkte der Knochenprobe e/Genial+Glasmilch, wobei es bei zweiterer Reaktion zu einem kompletten Ausfall des Ergebnisses kommt. Die Knochenprobe d zeigt dagegen in beiden Reaktionen Banden mit hoher Signalintensität. Hervorstechend ist bei der Minisequenzierung aller verwendeten Knochenproben wieder die relativ hohe Signalintensität für den SNP 16069, der in der vorherigen Abbildung 13 ebenfalls eine hohe Signalintensität im Vergleich zu den restlichen Banden zeigte.

Die nächsten drei Abbildungen (16 - 18) zeigen die Typisierungsergebnisse für die SNPs der mtDNA von insgesamt 6 verschiedene Haarproben (i, j, k, l, m und n). Bei den Haarproben i, k und m handelt es sich um Haarschäfte von drei Personen; entsprechend bei den Haarproben j, l und n um telogene Haare dieser Personen. Die Ergebnisse der PCR-Ansätze der sechs verschiedenen Haarproben sind in Abbildung 12 zu sehen. Für die Minisequenzierung wurden analog zu den Knochenproben d und e sowohl PCR-Produkte der Duplex als auch von HV komplett eingesetzt. Die Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der eingesetzten PCR-Produkte der Haarproben m, n und der zugehörigen Vergleichsprobe.

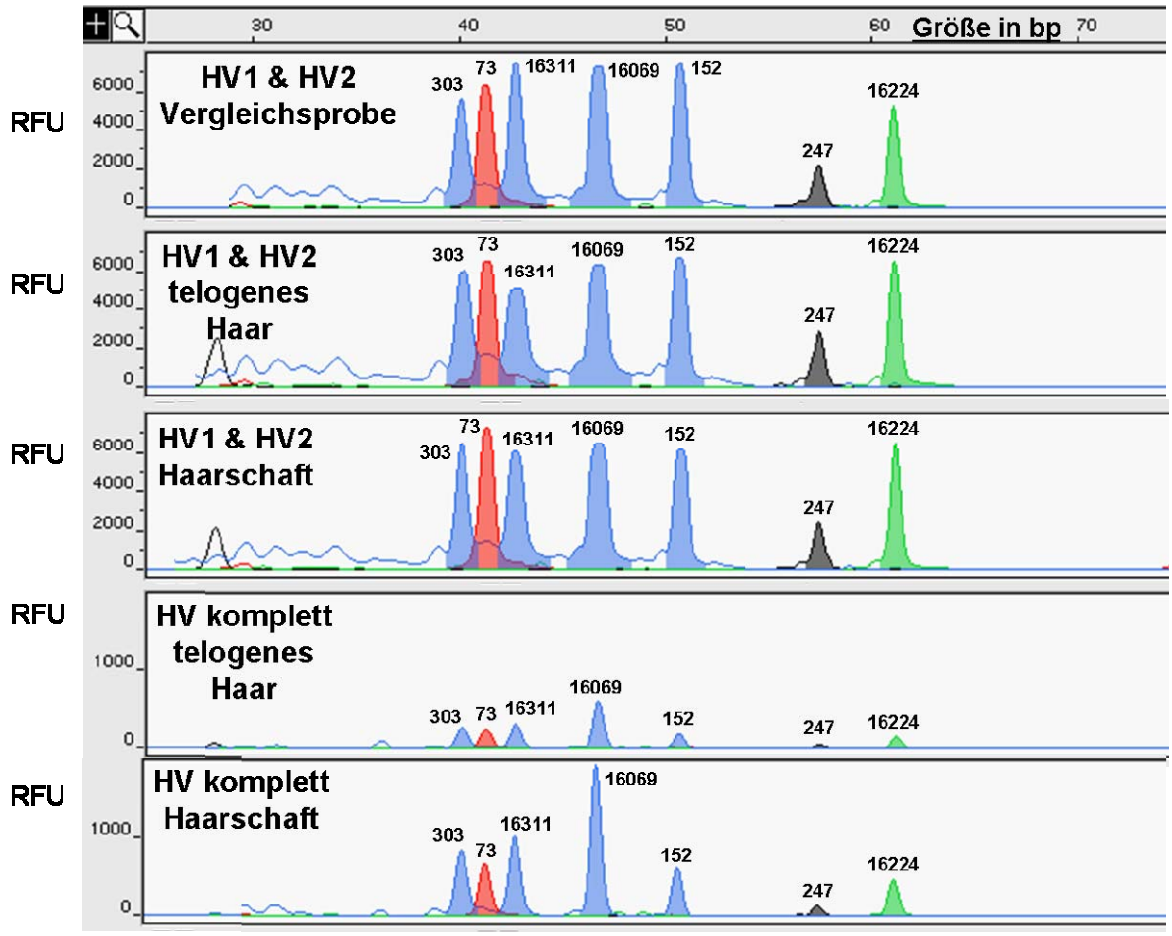

Abb. 16: Darstellung der Multiplexansätze für die sieben SNPs aus der D-Loop-Region der mtDNA der zwei Haarproben m und n sowie der entsprechenden Vergleichsprobe. Die jeweiligen verwenden PCR-Produkte sowie die Art der Haarprobe ist links in den Chromatogrammen aufgeführt. Ein eindeutiger Nachweis aller SNPs ist möglich und führt für alle verwendeten PCR-Produkte zu übereinstimmenden Ergebnissen. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, rote Bande = eingebautes Nukleotid T, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

In Abbildung 16 sind neben der Vergleichsprobe oben im ersten Chromatogramm vier weitere Chromatogramme abgebildet, die die Ergebnisse für Haarprobe n (telogenes Haar) und m (Haarschaft) unter Verwendung von PCR-Produkten der Duplex bzw. des PCR-Produktes HV komplett entstanden sind. Alle vier Chromatogramme zeigen SNP-Profile, die identisch sind mit dem Profil der Vergleichsprobe. Allerdings wird deutlich, dass sich die Ergebnisse der Minisequenzierung einzelner PCR-Produkte im Hinblick auf ihre Signalintensität unterscheiden. Während mit den PCR-Produkte der Duplex beider Haarproben nahezu gleiche Signalintensitäten erzielt werden wie mit der Vergleichsprobe (ca. 6000 rfu), lassen sich für die PCR-Produkte HV komplett beider Haarproben zwar komplette und identische SNP-Profile erzeugen, die eine sechsfach geringerer Signalintensität (≤ 2000 rfu) zeigen. Eine eindeutige Zuordnung der einzelnen

SNPs ist allerdings mit beiden verwendeten Haarproben und jeweils beiden verwendeten PCR-Produkten möglich. Daneben werden Unterschiede in der Signalintensität einzelner SNPs eines Profils deutlich, wie vorher schon beobachtet. Auffallend ist auch hier wieder die hohe Signalintensität für die blaue Bande des SNPs 16069. Daneben zeigt die schwarze Bande für den SNP 247 in allen Chromatogrammen insgesamt die geringste Signalintensität, ca. 2000 rfu bei durchschnittlich hoher Signalintensität bzw. ca. 100 rfu bei insgesamt niedriger Signalintensität aller dargestellten sieben mtDNA-SNPs. Eine Angleichung der Signalintensitäten aller dargestellten SNPs war analog zur Minisequenzierung für das AB0-Blutgruppen-Gen nicht möglich.

Die weiteren Haarproben werden in den beiden weiteren Abbildungen analog dargestellt mit dem Unterschied, dass auf eine Darstellung der Vergleichsprobe verzichtet wird, da in beiden Fällen Vergleichsproben und Haarproben identisch im Profil der analysierten mtDNA-SNPs waren. Auf eine Darstellung der Reaktionen ohne Ergebnis wurde in diesem Zusammenhang verzichtet. Die Abbildung 17 zeigt dabei die Haarproben i und j, die Abbildung 18 die Haarproben m und n.

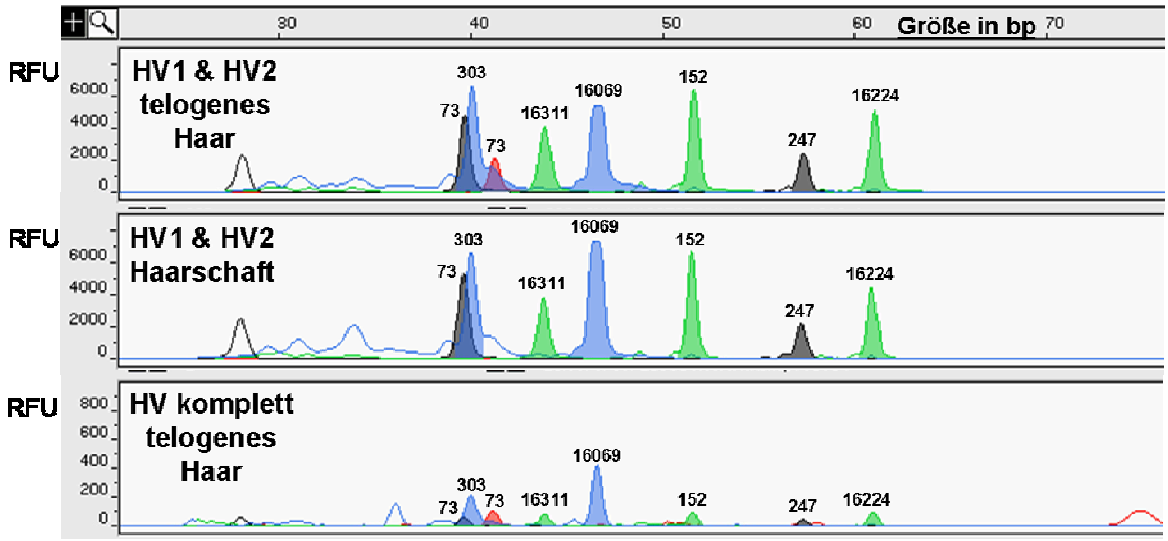

Abb. 17: Darstellung des Multiplexansätze für die sieben SNPs aus der D-Loop-Region der mtDNA der zwei Haarproben i und j. Neben identischen SNP-Profilen, abgesehen von SNP73 lassen, sich für die einzelnen Chromatogramme Unterschiede in der Signalintensität in Abhängigkeit von dem verwendeten PCR-Produkt feststellen. Für die Haarprobe i (Haarschaft) ließ sich mit Hilfe des PCR-Produktes HV komplett keinerlei Ergebnis erzielen. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, rote Bande = eingebautes Nukleotid T, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

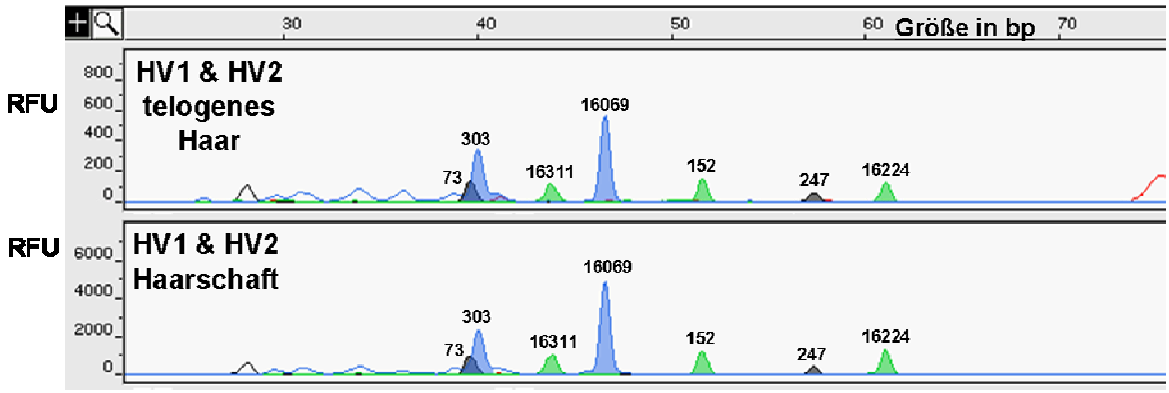

Abb. 18: Darstellung der Multiplexansätze für die sieben SNPs aus der D-Loop-Region der mtDNA der zwei Haarproben k und l. Ergebnisse für die Minisequenzierung konnten nur für die PCR-Produkte der Duplex erzielt werden für k (telogenes Haar) und l (Haarschaft) erzielt werden. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Bei Betrachtung beider Abbildungen 17 und 18 fällt auf, dass Ergebnisse für die Minisequenzierung unter Verwendung von PCR-Produkten HV komplett nur für Haarprobe j (telogenes Haar, Abb. 17) möglich war. Die restlichen Haarproben i, k und l waren unabhängig davon, ob es sich um telogene Haare oder Haarschäfte handelt, in Kombination mit dem PCR-Produkt HV komplett über die Reaktion der Minisequenzierung nicht zu analysieren. Dagegen konnten alle vier Haarproben ohne Weiteres durch Verwendung der PCR-Produkte der Duplex durch die Minisequenzierung erfolgreich typisiert werden.

Insgesamt konnten für die Ergebnisse der Minisequenzierung unter Verwendung der PCR-Produkte der Duplex bei allen Haarproben außer der Probe k Signalintensitäten wie bei Vergleichsproben (z.B. Abb. 13) festgestellt werden. Die Haarprobe k zeigt dagegen Signalintensitäten ≤ 1000 rfu, ähnlich wie die Haarprobe i in Kombination mit dem PCR-Produkt HV komplett. Des Weiteren ist in der Abbildung 17 für die Haarprobe j (telogenes Haar) bei beiden Reaktionen der Minisequenzierung eine rote Bande für SNP 73 feststellbar, der in dieser Form nicht in der Speichelprobe auftritt. Dieses als Heteroplasmie bezeichnete Phänomen ist für SNPs der mtDNA in der Literatur sowohl für verschiedene Haare derselben Person als auch für unterschiedliche Gewebe schon beschrieben worden.

3.3 Y-Chromosom

3.2.1 Y-Chromosom – PCR-Produkte und PCR-Multiplexe

Ähnlich wie bei der mtDNA so werden auch auf dem Y-Chromosom verschiedene SNPs zur Bestimmung der einzelnen Y-Haplogruppen herangezogen. Für die vorliegende Arbeit wurden die SNPs M2, M9, M45, M46, M89, M167 und SRY10831 analysiert. Die relevanten Bereiche, die die sieben verschiedenen SNPs umfassen, wurden über sieben verschiedene PCR-Produkte amplifiziert.
Für die SNPs M9 und M45 wurden je zwei voneinander unabhängige Paare an *PCR*-Primern eingesetzt, deren PCR-Produkte sich in ihrer Länge um ca. 50 % unterschieden. Die Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die unterschiedlichen PCR-Produktlängen aller PCR-Produkte. Insgesamt konnten mit allen zur Verfügung stehenden *Primern* die beiden Multiplexe Hl und Hs erstellt werden, die sich lediglich in den *Primern* für die SNPs M9 und M45 unterscheiden.

Tab.3: In der Tabelle sind für die sieben untersuchten SNPs die PCR-Produktlängen aufgeführt, die in dem Multiplex Hl und Hs auftreten.

SNP	**PCR-Produktlänge in Hl**	**PCR-Produktlänge in Hs**
M2	209 bp	209 bp
M9	340 bp	186 bp
M45	352 bp	138 bp
M46	112 bp	112 bp
M89	527 bp	527 bp
M167	376 bp	376 bp
SRY10831	165 bp	165 bp

Wie zuvor bei allen *Primern* wurden auch alle PCR-*Primer* zur Amplifikation der Y-chromosomalen SNPs mit dem Programm AutoDimerv1 unter Standard-bedingungen getestet. Dabei wurden *Primer*-Dimere für den *Primer* M9reverse2 für den SNP M9 sowie den *Primer* M89-P2 für den SNP M89 festgestellt (siehe Anhang 7.1 Tabellen der PCR- und Minisequenzierungs-*Primer*). Dies wurde bei der Zusammenstellung beider PCR-Multiplexe insofern berücksichtigt als die

Konzentrationen für die beiden betroffenen PCR-Primer entsprechend erhöht wurden.

Vorab wurden alle verwendeten PCR-Primer im Singleplexansatz getestet. Aus diesen Ergebnissen wurden die für die beiden PCR-Multiplexe Hl und Hs eingesetzten Konzentrationen der *Primer* abgeschätzt und durch wiederholtes Austesten auf folgende Konzentrationen eingestellt (Tab 4):

Tab.4: Darstellung der eingesetzten Primerkonzentrationen für die PCR-Multiplexe Hl und Hs.

SNP	**Hl Konzentration je Primer [pmol/µl]**	**Hs Konzentration je Primer [pmol/µl]**
M2	0,42	0,5
M9	0,83	0,5
M45	0,83	0,5
M46	0,42	0,5
M89	1,25	1,5
M167	0,83	1
SRY10831	0,42	0,5

Bei Betrachtung der Tabelle wird deutlich, dass vor allem für beide PCR-*Primer* des SNPs M89 im Schnitt sehr viel höhere Konzentrationen in beide PCR-Multiplexe eingesetzt wird als für die restlichen *Primer*. Ein vergleichbarer Effekt konnte für die *Primer* von SNP M9 im Multiplex Hs nicht beobachtet werden, obwohl über das Programm AutoDimerv1 Sekundärstrukturen für eines der Oligonukleotide (M9reverse2) festgestellt wurde ähnlich wie für M89-P2 für den SNP 89.

Einen Überblick über die Ergebnisse der PCR-Multiplexe Hl und Hs geben die beiden Abbildungen 19 und 20, die neben ungereinigten PCR-Produkten beider Multiplexe auch gereinigte PCR-Produkte zeigen.

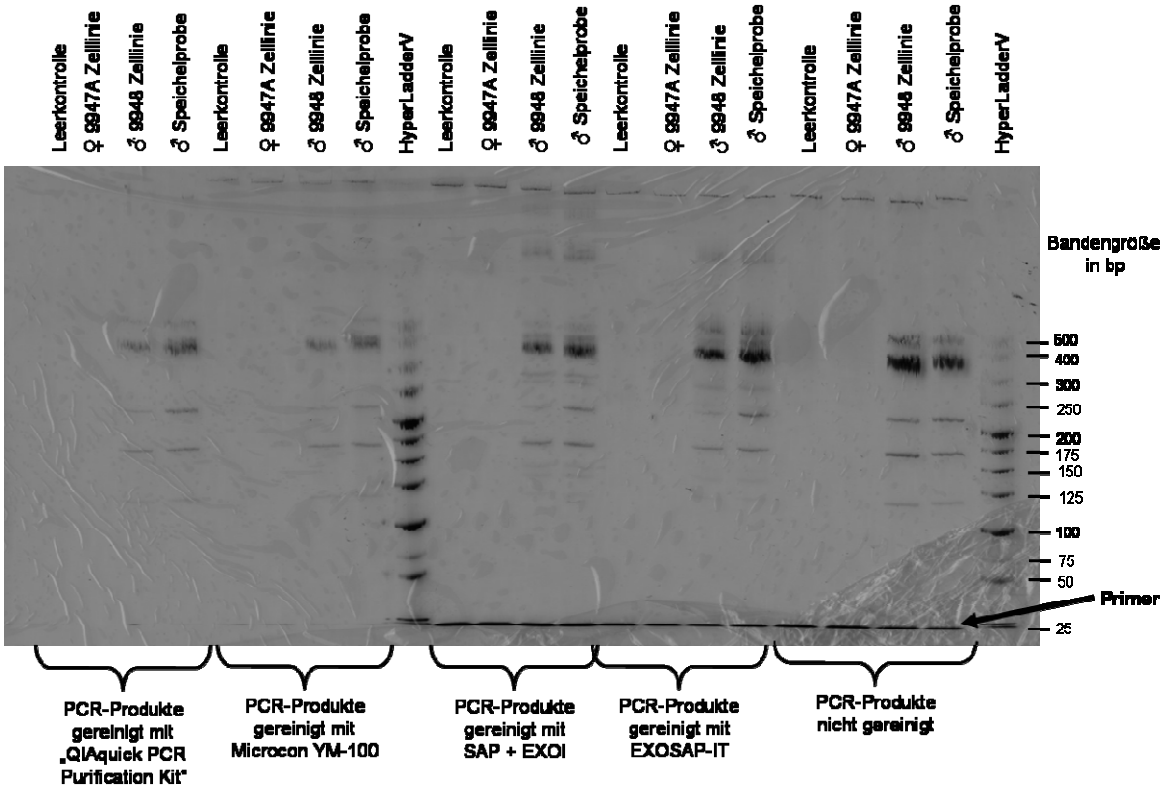

Abb.19: Darstellung der PCR-Produkte des PCR-Multiplex HI im Polyacrylamidgel ungereinigt und mit vier verschiedenen Methoden gereinigt. Als DNA-Extrakte wurden die Speichelprobe eines Mannes sowie die Zelllinien 9948 (♂) und 9947A (♀) eingesetzt. Als Größenmarker ist die HyperLadder V aufgetragen. Mit einem Pfeil rechts ist eine Bande auf Höhe von 25 bp markiert, die überschüssige PCR-Primer enthält. Diese Bande taucht in den Spuren mit den ungereinigten PCR-Produkten sowie den mit EXOSAP-IT bzw. SAP und EXOI gereinigten PCR-Produkten auf. bp = Basenpaar

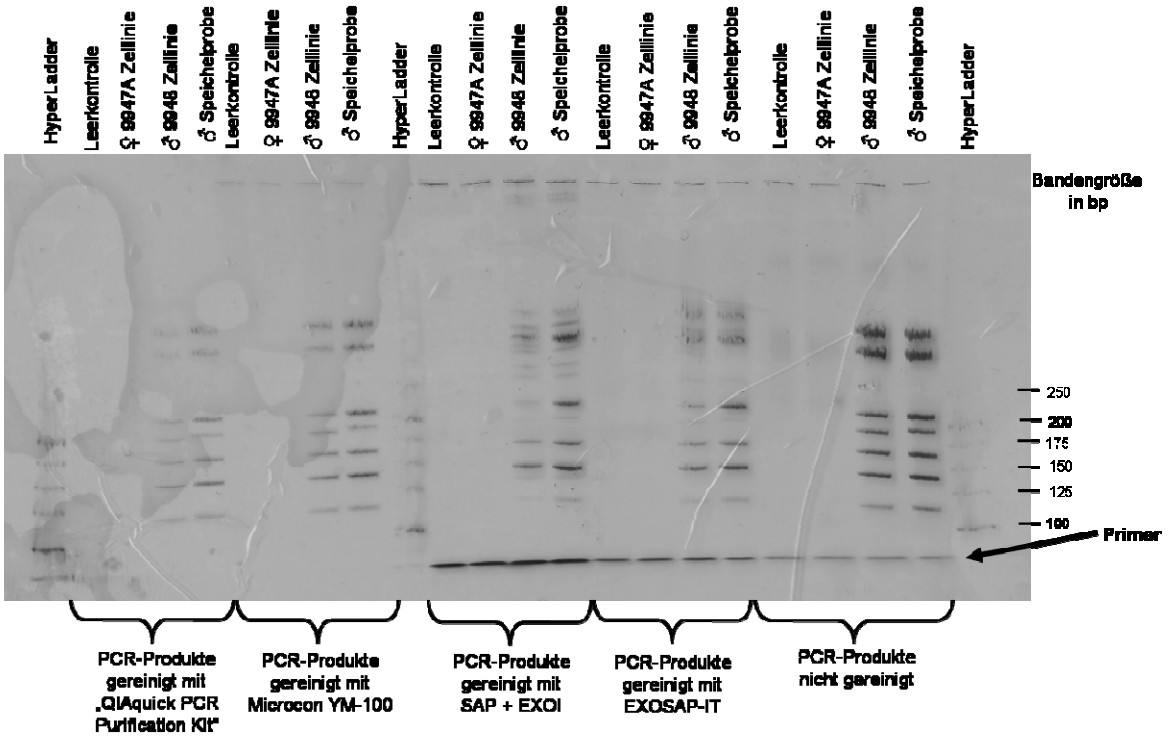

Abb. 20: Darstellung der PCR-Produkte des PCR-Multiplex Hs im Polyacrylamidgel ungereinigt und mit vier verschiedenen Methoden gereinigt. Als DNA-Extrakte wurden die Speichelprobe eines Mannes sowie die Zelllinien 9948 (♂) und 9947A (♀) eingesetzt. Mit einem Pfeil rechts ist eine Bande auf der Höhe von 25 bp markiert, die überschüssige PCR-Primer enthält. Diese Bande findet sich wieder in den Spuren mit den nicht gereinigten PCR-Produkten sowie den mit EXOSAP-IT bzw. SAP und EXOI gereinigten PCR-Produkte. bp = Basenpaar

Insgesamt wurden die PCR-Produkte mit vier verschiedenen Methoden gereinigt. Dadurch sollte ausgetestet werden, inwiefern sich die zuvor in den Chromatogrammen der Reaktionen der Minisequenzierung für das AB0-Blutgruppen-Gen bzw. die hypervariablen Regionen der mtDNA beobachteten Artefakte im Bereich von 25 bp bis 35 bp durch andere Reinigungsmethoden für die PCR-Produkte als die bisher verwendete enzymatische Reinigung minimieren lassen. Für die Abbildungen 19 und 20 wurden dieselben drei DNA-Extrakte, eine männliche Speichelprobe, die DNA-Extrakte der Zelllinien 9947A (weiblich) und 9948 (männlich), und dieselben vier verschiedenen Reinigungsmethoden verwendet. Bei Betrachtung der Abbildung 19 sind für den Multiplex Hl im Bereich von 100 – 500 bp fünf Banden sichtbar, wobei eine der Banden bei etwa 350 bp intensiver angefärbt ist als die restlichen Banden. Innerhalb einer Spur auf dem Polyacrylamidgel sind von unten nach oben die PCR-Produkte der Y-chromosomalen SNPs wie folgt sichtbar: 1. M46 (112 bp), 2. SRY10831 (165 bp), 3. M2 (209 bp), 4. M9 (340 bp), M45 (352 bp) und M167 (376 bp), 5. M89 (527 bp)

(siehe Tab. 3). Der intensiven Bande bei ca. 350 bp, die der 4. Bande in der Aufzählung entspricht, werden dabei die drei PCR-Produkte von M9, M45 und M167 zugeordnet. Somit sind alle PCR-Produkte erfolgreich amplifiziert worden. Beim Vergleich der aufgetragenen PCR-Produkte der Proben können für die beiden enzymatischen Reinigungsmethoden vergleichbare Intensitäten festgestellt werden wie für die ungereinigten PCR-Produkte. Allerdings lassen sich zusätzliche DNA-Banden in den enzymatisch gereinigten PCR-Produkten feststellen bei einer Größe von 200 bp bis 350 bp sowie im Bereich über 500 bp und im hochmolekularen Bereich. Es scheint sich hierbei um DNA-Moleküle zu handeln, die durch die enzymatische Behandlung der PCR-Produkte entstehen. Die beiden weiteren Reinigungsmethoden über Microcon- bzw. Qiagen-Säulen zeigen bei gleichem aufgetragenen Volumen der PCR-Produkte für die Polyacrylamidgel-Elektrophorese zwar die gleiche Anzahl, aber weniger intensive Banden. Zusätzliche DNA-Banden wie bei den zuvor beschriebenen enzymatisch gereinigten PCR-Proben lassen sich in den angegebenen Größenbereichen nicht feststellen.
Darüber hinaus lässt sich bei den ungereinigten sowie enzymatisch gereinigten PCR-Produkten eine deutliche Bande bei ca. 25 bp erkennen, die der Länge der verwendeten PCR-*Primern* entspricht und vermutlich überschüssige *Primer* enthält. Diese Bande fehlt bei den mittels Säulen gereinigten PCR-Produkten.

Die Abbildung 20 ist analog zu Abbildung 19 aufgebaut mit dem Unterschied, dass alle PCR-Produkte mit dem Multiplex Hs erzeugt wurden. Anders als im Multiplex Hl sind alle PCR-Produkte als einzelne getrennte Bande sichtbar, so dass insgesamt sieben verschieden große Banden erkennbar sind. Von unten nach oben sind in einer Spur folgende PCR-Produkte der Y-chromosomalen SNPs zu sehen: 1. M46 (112 bp), 2. M45 (138 bp), 3. SRY10831 (165 bp), 4. M9 (186 bp), 5. M2 (209 bp), 6. M167 (376 bp), 7. M89 (527 bp) (siehe Tab. 3). Die in Abbildung 19 beobachteten unterschiedlichen Intensitäten einzelner PCR-Produkte in Abhängigkeit von der Art der Reinigung lassen sich in Abbildung 20 in gleicher Weise für den PCR-Multiplex Hs feststellen. Ebenso ist deutlich eine Bande bei 25 bp in den ungereinigten bzw. enzymatisch gereinigten PCR-Multiplex-Ansätzen zu detektieren sowie zusätzliche Banden bei den enzymatisch gereinigten PCR-Produkten im Bereich von 200 – 350 bp bzw. oberhalb von 500 bp und im

hochmolekularen Bereich. Diese Artefakte sind in den mittels Säulen gereinigten PCR-Produkten, wie im Multiplex Hl, nicht feststellbar.
Inwieweit die bei den enzymatischen Reinigungsmethoden beobachteten Artefakte einen Einfluss auf die Ergebnisse der SNP-Typisierung haben, wird sich im Folgenden bei der Minisequenzierung zeigen.

3.3.2 Y-Chromosom – Minisequenzierung

Für die Minisequenzierung wurde für die sieben ausgewählten Y-chromosomalen SNPs zunächst ein Singleplexansatz, dann ein Multiplexansatz durchgeführt. Auf eine Darstellung der Singleplexansätze wird verzichtet. Bei den dargestellten Multiplexen wurde mit den unten aufgeführten Konzentrationen der unten aufgeführten Oligonukleotide gearbeitet:

M2	0,0033 pmol/µl
M9	0,0053 pmol/µl
M45	0,0396 pmol/µl
M46	0,0198 pmol/µl
M89	0,066 pmol/µl
M167	0,0132 pmol/µl
SRY10831	0,0528 pmol/µl

Eine Zuordnung der Ergebnisse der Minisequenzierung ist über die Tabelle 5 möglich, in welcher für die sieben Y-SNPs die zugehörigen Oligonukleotide und die beiden bekannten Nukleotidvarianten aufgeführt sind. Die Angaben umfassen einen farbig markierten Buchstaben, der für das eingebaute Nukleotid steht, sowie die Länge, unter der die jeweilige Bande auftaucht, in der gleichen Farbe.

Tab.5: Darstellung der sieben Y-chromosomalen SNPs mit Bezeichung, zugehörigem Oligonukleotid und beiden Nukleotidvarianten. Dabei wird nach entwicklungsgeschichtlich älterer (ursprüngliches Nukleotid) und jüngerer Variante (mutiertes Nukleotid) unterschieden. Darunter ist jeweils das in der Minisequenzierung eingebaute Nukleotid, die Farbe der nachgewiesen Bande und die Länge, bei der die Bande auftaucht, aufgeführt. bp = Basenpaar

SNP	**„Minisequencing“-Primer**	**ursprüngliches Nukleotid/Nachweis**	**Mutiertes Nukleotid/Nachweis**
M2	sY1-2	A **T 44 bp**	G **C 43 bp**
M9	M9-4	C **C 60 bp**	G **G 59 bp**
M45	M45-1	G **C 62 bp**	A **T 63 bp**
M46	Tat1	T **A 45 bp**	C **G 44 bp**
M89	M89-1	C **G 57 bp**	T **A 58 bp**
M167	SRY2627-2	C **G 49 bp**	T **A 48 bp**
SRY10831	SRY1532-5	A **A 26 bp**	G **G 25 bp**

In der folgenden Abbildung 21 ist exemplarisch der Multiplexansatz für die Minisequenzierung der in Tabelle 5 aufgeführten Y-SNPs nach Auftrennung über die Kapillarelektrophorese zu sehen.

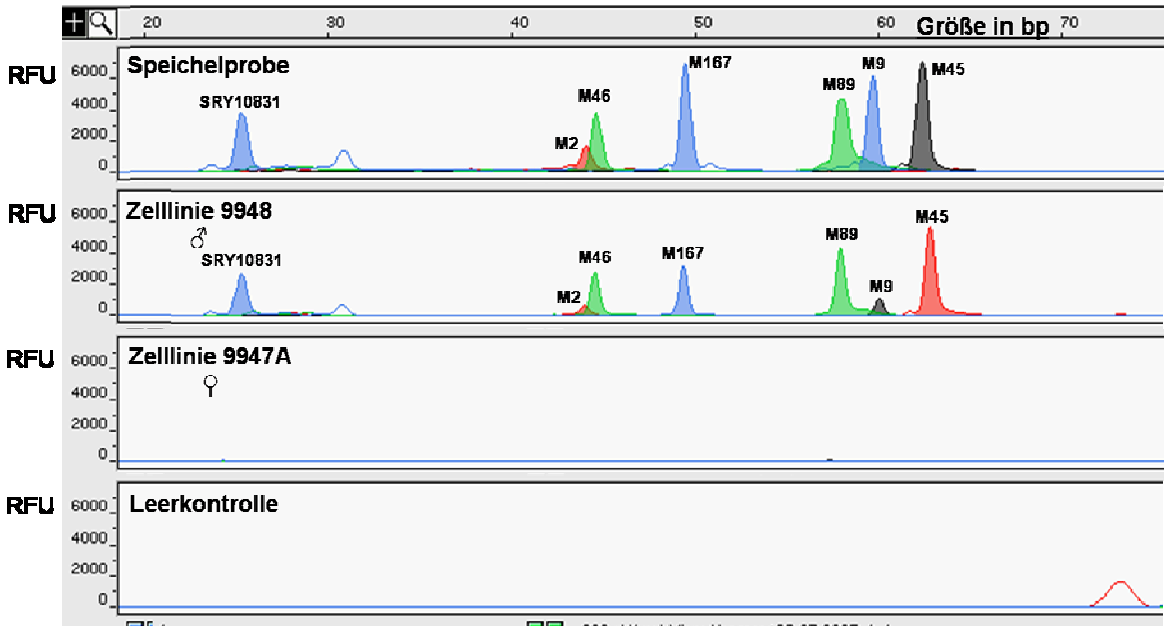

Abb. 21: Darstellung der sieben Y-chromosomalen SNPs über Minisequenzierung unter Verwendung der DNA-Proben einer männlichen Vergleichsperson und den Zelllinien 9948 (♂) und 9947A (♀). In die Reaktion wurden die PCR-Produkte des Multiplex HI nach Reinigung über Microconsäulen eingesetzt. Links ist die Bezeichnung der jeweiligen Probe aufgeführt. Die sichtbaren Banden sind mit der Bezeichnung der untersuchten SNPs markiert. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, rote Bande = eingebautes Nukleotid T, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Für die Minisequenzierung wurden PCR-Produkte des PCR-Multiplex HI verwendet, die über Microconsäulen gereinigt wurden. Als DNA-Extrakte wurden in den PCR-Multiplexansatz die Speichelprobe eines Mannes und der DNA-Extrakt der Zelllinie 9948 eingesetzt. Als Kontrollen wurden neben der üblichen Negativkontrolle DNA-Extrakt der weiblichen Zellinie 9947A verwendet. Diese dient als Kontrolle der untersuchten Y-SNPs auf Y-chromosomale Spezifität und dem Ausschluss falschpositiver Ergebnisse, die über X-chromosomale homologe Sequenzen auf dem Y-Chromosom verursacht werden können.

Die Ergebnisse finden sich in der Reihenfolge:

1. Speichelprobe des Mannes, 2. Zelllinie 9948 und 3. Zelllinie 9947A und 4. Leerkontrolle von oben nach unten in der Abbildung 21 wieder. In den beiden oberen Chromatogrammen sind insgesamt sieben deutliche und eindeutige Banden für die sieben Y-chromosomalen SNPs zu sehen, die entsprechend beschriftet sind. Insgesamt sind die SNP-Profile beider männlichen Proben in Signalintensität einzelner Banden und Muster vergleichbar. Unterschiede innerhalb des Profils in bezug auf die Signalintensität zeigen sich für die beiden

SNPs M2 und M46, die eine geringe Signalhöhe für die entsprechenden Banden zeigen. Eine eindeutige Zuordnung ist aber möglich, da sich beide Banden eindeutig vom Hintergrund abheben. Unterschiede in der Signalhöhe lassen sich aber auch zwischen beiden SNP-Profilen für den SNP M9 feststellen. Dieser zeigt für die Speichelprobe eine blaue Bande mit einer Signalintensität von ca. 6000 rfu zeigt, während für die Zellinie 9948 für den SNP M9 eine schwarze Bande mit einer Signalintensität von etwa 1000 rfu beobachtet wird. Des Weiteren sind beide Allelevarianten für die SNPs M9 und M45 in beiden Proben zu beobachten. Bei der Untersuchung weiterer DNA-Proben konnten nur die bei den in Abbildung 21 dargestellten Allelvarianten registriert werden.Für die DNA-Probe der weiblichen Zellinie 9947A zeigen sich keinerlei Bandenmuster an den für die männlichen DNA-Proben spezifischen Positionen, so dass die ausgewählten sieben Y-chromosomalen SNPs spezifisch für das Y-Chromosom sind.
Die folgende Abbildung 22 zeigt untereinander die Ergebnisse der Mini-sequenzierung für die Zellinie 9948 unter Verwendung von PCR-Produkten der Multiplex Hl und Hs.

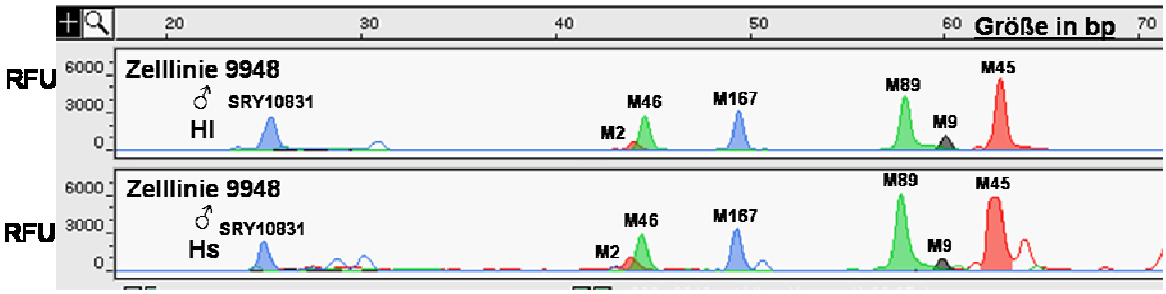

Abb. 22: Darstellung der Ergebnisse der Minisequenzierung des DNA-Extraktes der Zelllinie 9948. Im oberen Chromatogramm sind die Ergebnisse unter Verwendung der PCR-Produkte des Multiplex Hl zu sehen, im unteren der PCR-Produkte des Multiplex Hs. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, rote Bande = eingebautes Nukleotid T, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Zur Reinigung der PCR-Produkte wurden Microconsäulen eingesetzt; die Minisequenzierung wurde unter den Standardbedingungen ausgeführt. Bei gleicher Behandlung zeigt sich im Chromatogramm für die PCR-Produkte des Multiplex Hs für den SNP M45 eine höhere Signalintensität der zugehörigen roten Bande als bei den PCR-Produkten aus dem Multiplex Hl; die höhere Signalintensität wird hierbei durch die entsprechende Breite der Bande für M45 sichtbar. Unterschiede der Banden der restlichen SNPs im Hinblick auf die Signalintensität sind nicht zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigen einerseits,

dass mit den Produkten beider PCR-Multiplexen gleiche SNP-Profile erzielt werden und somit qualitativ gegeneinander austauschbar sind, andererseits dass PCR-Produkte des Multiplex Hs aufgrund der höheren Signalintensität für M45 im Zweifelsfall der Vorzug zu geben ist.

In der nächsten Abbildung sind im Vergleich die Ergebnisse der Zellinie 9948 zu sehen unter Verwendung der PCR-Produkte des Multiplex Hl, die mit den vier vorgestellten Reinigungsmethoden behandelt wurden.

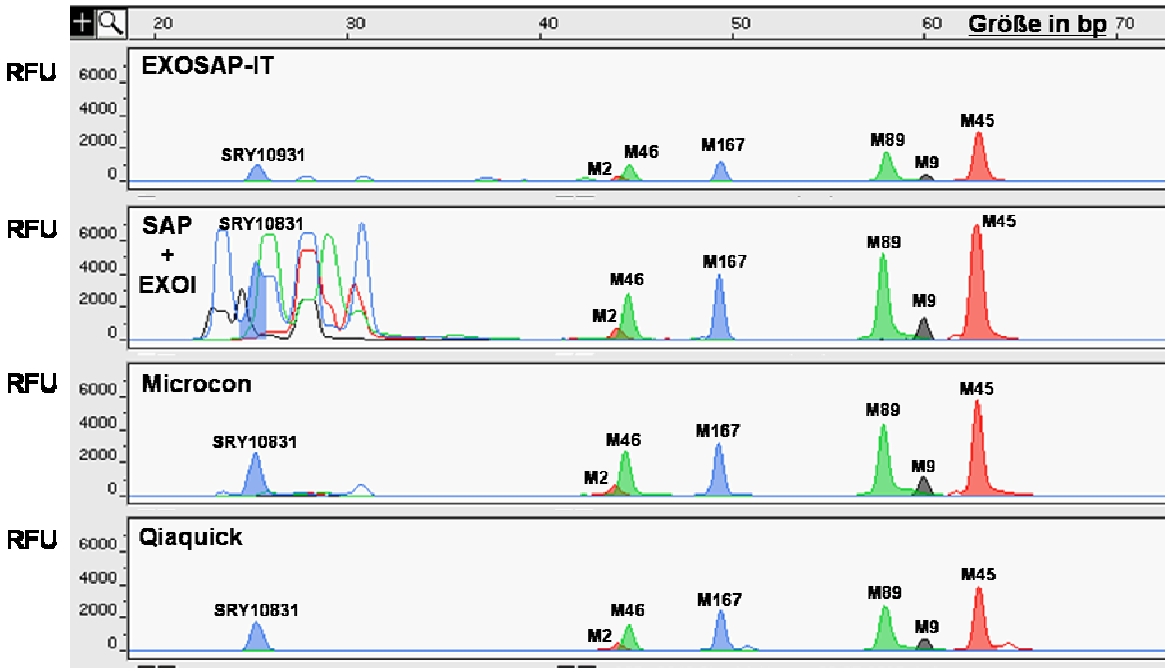

Abb. 23: Darstellung der sieben Y-chromosomalen SNP nach Minisequenzierung und Auftrennung über die Kapillarelektrophorese. Verwendung für die vier Chromatogramme fanden PCR-Produkte des Multiplex Hl, die über die vier Reinigungsmethoden vorbereitet wurden. Die Reinigungsmethode ist links in jedem Chromatogramm vermerkt. Der Übersichtlichkeit halber wurden dieselbe DNA-Probe und derselbe PCR-Ansatz verwendet. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, rote Bande = eingebautes Nukleotid T, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

In den insgesamt vier Chromatogrammen ist von oben nach unten das SNP-Profil der Zelllinie 9948 zu sehen, deren PCR-Produkte aus dem PCR-Multiplex Hl mit 1. EXOSAP-IT, 2. SAP + EXOI, 3. Microconsäulen, 4. Qiaquick gereinigt wurden. Alle SNP-Profile sind identisch und stimmen mit den in Abbildung 21 und 22 dargestellten SNP-Profilen überein. Unterschiede ergeben sich bei den vier Chromatogrammen im Hinblick auf die Artefakte. Auffallend sind diese im zweiten Chromatogramm im Größenbereich von 20 bp bis 35 bp mit Signalintensitäten von bis zu 6000 rfu. Die hier sichtbaren Banden verdecken die im Bereich von 25 bp

liegenden Bande des SNP SRY10831. Eine eindeutige Zuordnung ist somit nicht möglich. Die restlichen Banden im Chromatogramm zwei sind nicht durch Artefakte überlagert und zeigen ähnliche Signalintensitäten wie in den Chromatogrammen drei und vier.

Die mit EXOSAP-IT gereinigten PCR-Produkte in Chromatogramm eins zeigen kaum Artefakte, aber eine insgesamt geringe Signalintensität aller Banden von bis zu 2000 rfu im Vergleich zu den restlichen PCR-Produkten. Eine Zuordnung aller SNPs ist also möglich, obwohl die Art der Reinigung der PCR-Produkte bei der Minisequenzierung zu einer verringerten Nachweissensitivität führt.

Die PCR-Produkte, die über Microcon- oder Qiaquicksäulen gereinigt wurden, zeigen in der Minisequenzierung ebenfalls kaum Artefakte. Lediglich für die mit Microconsäulen gereinigten PCR-Produkte zeigen sich im Chromatogramm bei etwa 35 bp unspezifische Banden mit geringer Signalintensität. Insgesamt reichen die Signalintensitäten der Banden der sieben SNPs von 1000 rfu bis zu 4000 - 6000 rfu je nach SNP.

Da im Vergleich die über Säulen gereinigten PCR-Produkte in der Minisequenzierung weniger Artefakte und eine höhere Nachweissensitivität zeigen, wurden zur Analyse von biologischen Tatortspuren PCR-Produkte des Multiplex Hs eingesetzt, die über Micronsäulen gereinigt wurden.

Die Ergebnisse der Minisequenzierung von biologischen Tatortspuren, die nach dem beschriebenen Prozedere analysiert wurden, sind in der Abbildung 24 ist exemplarisch dargestellt.

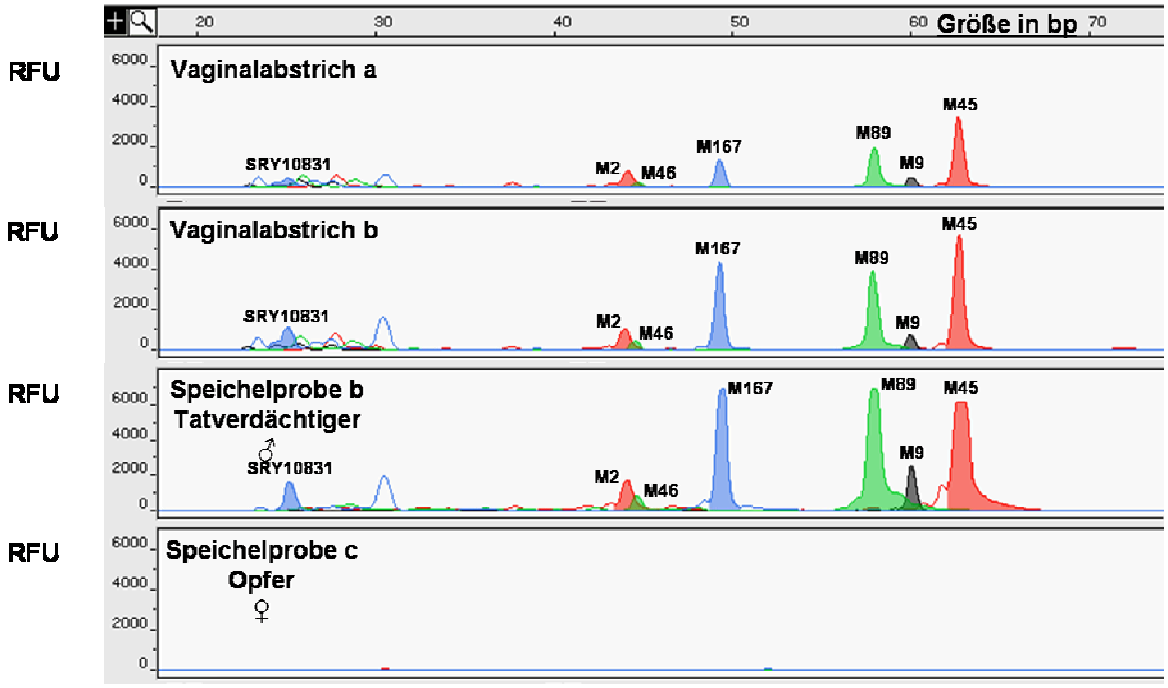

Abb. 24: Darstellung von der Y-chromosomalen SNPs mit Minisequenzierung und Kapillarelektrophorese unter Verwendung von vier DNA-Proben, die in Zusammenhang mit einer Straftat erhoben wurden. Es handelt sich dabei um zwei Vaginalabstriche (a und b) sowie die Vergleichsproben von Tatverdächtigem und Opfer. Die Bezeichnung der einzelnen DNA-Proben ist im linken Bereich des Chromatogramms vermerkt. Blaue Bande = eingebautes Nukleotid G, grüne Bande = eingebautes Nukleotid A, schwarze Bande = eingebautes Nukleotid C, rote Bande = eingebautes Nukleotid T, RFU = *relative fluorescent unit*, bp = Basenpaar

Als biologische Tatortspuren lagen zur Analyse zwei Vaginalabstriche sowie die Speichelprobe des Tatverdächtigen und die Speichelprobe des Opfers vor, die sowohl mit den üblichen STR-Systemen als auch mit den Y-SNPs untersucht wurden. Insgesamt ließen sich von beiden Vaginalabstrichen für sechs der sieben Y-SNPs identische Ergebnisse erzielen. Nur für den Vaginalabstrich b ließ sich auch der SNP SRY10831 eindeutig zuordnen (siehe Chromatogramm zwei). Für den Vaginalabstrich a konnte das Ergebnis für den SNP SRY10831 nicht eindeutig ermittelt werden, da hier Artefakte in einem Größenbereich von 20 bis 30 bp auftraten und die zu dem SNP zugehörige Bande verdeckten.

Das komplette Y-SNP-Profil des Vaginalabstriches b sowie der Teilbefund des Vaginalabstriches a sind identisch zu dem vom Tatverdächtigen erhobenen Y-SNP-Profil, das im dritten Chromatogramm zu sehen ist. Wie das zusätzlich dargestellte Ergebnis der Opferprobe zeigt, kann das in den Abstrichen sichtbare Y-SNP-Profil nur vom Täter stammen, da sich, wie zu erwarten, keinerlei spezifische Banden der Y-SNPs in der Speichelprobe des Opfers detektiert werden können. Eine klare Zuordnung zum Tatverdächtigen kann dabei nur

insofern erfolgen, als der Tatverdächtige durch ein identisches SNP-Profil als Täter nicht ausgeschlossen werden kann.

Mit den üblichen STR-Systemen konnte für die beiden Vaginalabstriche nur das DNA-Profil des Opfers dargestellt werden. Allele, die dem Täter zuzuordnen sind, wurden nicht detektiert. Insofern zeigen die hier verwendeten sieben Y-chromosomalen SNPs bei Tatvorgängen mit einem weiblichem Opfer und einem männlichem Täter einen Vorteil gegenüber der etablierten Analyse mittels STR-Systemen.

4. Diskussion

4.1 Methodik der SNP-Detektion bei dem AB0-Blutgruppen-Gen, der mtDNA und dem Y-Chromosom

4.1.1 Erwartungen

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die SNP-Analytik für biologische Tatortspuren sowohl auf Ebene der PCR als auch der Minisequenzierung zu optimieren, um bei Spuren mit degradierter DNA oder geringen Konzentrationen an DNA Alternativen zur Analyse mit STR-Systemen zur Verfügung zu haben. Im Vordergrund stehen dabei die Etablierung geeigneter Marker sowie die Optimierung für die Spurenarbeit. Dazu wurden drei verschiedene DNA-Bereiche analysiert:

1. das AB0-Blutgruppen-Gen, welches auf den Autosomen liegt und ein sogenanntes *single copy gene* ist, das mit nur einer Kopie im Genom vorliegt.
2. die beiden hypervariablen Regionen HV1 und HV2 der mtDNA, die in bis zu 1000 Kopien je Zelle vorliegen kann.
3. das Y-Chromosom, das sowohl Bereiche mit *single copy genes* als auch repetitive Sequenzen umfasst.

Aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der DNA-Marker im Hinblick auf die Kopienzahl lassen sich für geringe DNA-Konzentrationen vor allem für die mtDNA-SNPs gute Ergebnisse erwarten aufgrund der hohen Kopienanzahl der mtDNA pro Zelle. Die beiden anderen untersuchten DNA-Bereiche werden hierbei eher partielle Ergebnisse bzw. einen Ausfall der Ergebnisse zeigen.

Für degradierte DNA ist dagegen die Größe der verwendeten PCR-Produkte ausschlaggebend. Dabei gilt, je kürzer ein PCR-Produkt ist, desto wahrscheinlicher ist die Vervielfältigung und der Nachweis des PCR-Produktes in Proben mit degradierter DNA. Bei den untersuchten DNA-Bereichen liegen die kürzesten PCR-Produkte bei 130 bp für das AB0Exon6f2+r2-PCR-Produkt und bei 112 bp für SNP M46 des Y-Chromosoms. Es ist also zu erwarten, dass bei Proben mit degradierter DNA die SNPs, die auf den genannten PCR-Produkten liegen, nachweisbar sind, während die restlichen SNPs nicht detektierbar sind.

Demgegenüber fallen die PCR-Produkte der hypervariablen Region der mtDNA aus dem Rahmen, als die Längen der PCR-Produkte [331 bp (HV2), 343 bp (HV1) und 1193 bp (HV komplett)] im Durchschnitt größer sind als bei den beiden anderen Systemen. Bisherige Untersuchungen an mtDNA zeigten allerdings, dass sich mtDNA aus biologischen Spuren, deren DNA degradiert ist und mit den üblichen STR-Systemen nicht analysiert werden konnte, durchaus erfolgreich untersuchen lässt (Butler and Levin 1998). Dabei scheint es nicht nur von Vorteil zu sein, dass die mtDNA in einem proportional höheren Anteil je Zelle vorkommt, sondern außerdem durch ihren ringförmigen Aufbau besser vor Degradation geschützt ist. Ein Beleg dafür ist die Analyse der mtDNA über Sequenzierung der D-Loop-Region, die eine gewisse Menge an intakter DNA und eine minimale Länge der DNA erfordert (Gill et al. 1994, Ivanov et al. 1996, Gabriel et al. 2001, Gabriel et al. 2003). Es ist daher davon auszugehen, dass sich biologische Spuren, die degradierte DNA enthalten, bei mtDNA mit im Schnitt längeren PCR-Produkten erfolgreich analysieren lassen.
Bei den Y-chromosomalen SNPs wurde mit zwei PCR-Multiplexen (Hl und Hs) gearbeitet, die sich in der Länge der beiden PCR-Produkte für den SNP M9 und M45 um ca. 50 % unterschieden. Dabei enthielt der Multiplex Hl die beiden langen PCR-Produkte und der Multiplex Hs die um etwa die Hälfte kürzeren PCR-Produkte. Es ist zu erwarten, dass mit Hilfe der kürzeren PCR-Produkte für SNP M9 und M45 erfolgreicher Minisequenzierungen an biologischen Tatortspuren durchgeführt werden können als mit den längeren PCR-Produkten.

4.1.2 PCR-Ergebnisse aller drei DNA-Marker

Bei Betrachtung der vorliegenden PCR-Ergebnisse fällt auf, dass für das AB0-Blutgruppen-Gen bei degradierten Haar- und Knochenproben keinerlei PCR-Produkt mehr nachgewiesen werden konnte, auch nicht das kürzeste PCR-Produkt AB0Exon6f2+r2 (siehe 3.1.1). Neben der DNA-Degradation wird hierbei die eingesetzte DNA-Konzentration und die daraus resultierende Menge an PCR-Produkt eine Rolle spielen. Es ist also davon auszugehen, dass das PCR-Produkt AB0Exon6f2+r2 vorhanden ist, die Konzentration aber so gering ist, dass es trotz einer Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Färbung mit Silbernitrat nicht detektiert werden kann. Die anschließende Minisequenzierung für die entsprechenden Haar- und Knochenproben zeigt durchweg Ergebnisse für das

PCR-Produkt AB0Exon6f2+r2 (siehe 3.1.2), teilweise auch für die größeren PCR-Produkte. Daran sieht man, dass unabhängig von der PCR-Multiplex für die z. T. degradierten Haar- und Knochenproben das kürzeste PCR-Produkt vorhanden ist und analysiert werden kann, wenn gleich ein Nachweis über das Polyacryamidgel aufgrund der geringeren Nachweissensitivität gegenüber der Kapillar-elektrophorese nicht möglich ist. Im Vergleich dazu sind für die mtDNA für die untersuchten Knochen- und Haarproben die PCR-Produkte HV1 und HV2 in allen untersuchten DNA-Proben im Polyacrylamidgel nachzuweisen. Ein Ausfall von PCR-Produkten wurde dagegen für das längere PCR-Produkt HV komplett für einige Knochenproben sowie einen Großteil der Haarproben beobachtet (siehe Abbildung 11 und 12, 3.2.1 mtDNA - PCR-Produkte und PCR-Multiplexe). Dies bestätigt einerseits die Ergebnisse aus der Literatur; dabei konnten Knochenproben, die längere Zeit im Boden lagerten, schließlich über Analyse der mtDNA identifiziert werden (Gill et al. 1994, Ivanov et al. 1996, Gabriel et al. 2001, Gabriel et al. 2003). Andererseits stimmen diese Ergebnisse auch mit den Beobachtungen aus der forensischen Genetik und der Molekularen Archäologie (*Ancient DNA*) überein (Poinar et al 1998, Butler and Levin 1998). Auf beiden Gebieten wurde immer wieder beobachtet, dass kurze PCR-Produkte auch bei Probenmaterial, dass über längere Zeit den Umweltbedingungen ausgesetzt war, durchaus zu vervielfältigen waren, während die längeren PCR-Produkte ausfielen (Poinar et al. 1998, Butler et al. 2003, Chung et al. 2004, Wiegand et al. 2006). Eine Analyse der mtDNA auf Ebene der Minisequenzierung war anhand der kürzeren PCR-Produkte sowohl für Knochen als auch für die Haarproben reproduzierbar und eindeutig möglich (siehe 3.2.2). Allerdings ließen sich je nach Zustand des biologischen Materials und der Nachweisbarkeit des langen PCR-Produktes HV komplett schwächere Signalintensitäten bzw. keine Ergebnisse bei Verwendung für die Minisequenzierung erzielen.

Mit den Y-chromosomalen SNPs wurden hauptsächlich künstliche und vom Tatort erhobene Mischspuren aus weiblichen und männlichen Zellen untersucht, deren PCR-Produkte im Polyacrylamidgel nachgewiesen werden konnten (nicht dargestellt) und dabei ähnliche Muster zeigten wie die in Abbildung 19 und 20 sichtbaren Speichelproben (siehe 3.2.1). Es handelte sich dabei um biologisches Material, dass im Gegensatz zu den Haar- und Knochenproben nicht lange den Umweltbedingungen aussetzt war und optimal gelagert wurde. Vorteile im Nachweis der kürzeren PCR-Produkte, wie sie bei den beiden anderen DNA-

Markern und in der Literatur beobachtet wurden, lassen sich anhand dieser Proben nicht machen. Für die anschließende Minisequenzierung ließ sich lediglich für den SNP M45 eine Erhöhung der Signalintensität der resultierenden Bande bei Verwendung des verkürzten PCR-Produktes für M45 feststellen (siehe 3.3.2). Diese Beobachtung lässt sich damit erklären, im Schnitt die kürzeren PCR-Produkte eines PCR-Multiplex stärker vervielfältigt werden als die längeren PCR-Produkte (Newton and Graham 1994). Die höhere Konzentration des in die Minisequenzierung eingesetzten PCR-Produktes führt nun seinerseits zu mehr Reaktionsprodukt, das wiederum eine höhere Signalintensität der spezifischen Bande bei der Kapillarelektrophorese erzeugt. Ein vergleichbarer Effekt konnte für den SNP M9, für welchen ebenfalls ein verkürztes PCR-Produkt im Multiplex Hs eingesetzt wurde, nicht beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung sind die durch das Programm AutoDimerv1 vorhergesagte Sekundärstrukturen, die unter den PCR-Bedindungen zu einer geringeren und weniger erfolgreichen Amplifikation des für M9 ausgewählten DNA-Bereiches führt und damit für die Minisequenzierung weniger PCR-Produkt zur Verfügung stellt.

Erfolg oder Misserfolg der Minisequenzierung lassen sich im Vorfeld bei allen drei DNA-Markern nicht sicher anhand einer mit den PCR-Produkten durchgeführten Polyacrylamidgelelektrophorese nicht abschätzen.
Für jeden untersuchten DNA-Bereich ließen sich auf Ebene der PCR erfolgreich und reproduzierbar ein bis zwei Multiplexe erstellen. Optimierungen wurden in allen Fällen durch die eingesetzten Primerkonzentrationen sowie ein entsprechend angepasstes PCR-Programm durchgeführt. Durch entsprechende Absenkung der Elongationstemperatur auf 65°C ließ sich eine gleichmäßige Amplifikation aller PCR-Produkte erreichen. Ähnliche Modifikationen wurden erfolgreich bei der Etablierung von PCR-Multiplexen von Sanchez et al. (2003) eingeführt.

4.1.3 Minisequenzierung – Einfluss verschiedener Faktoren auf die Signalintensität der nachweisbaren Banden

In gleicher Weise erfolgreich und reproduzierbar waren die Reaktionen der Minisequenzierung. Eine Optimierung wurde hier anhand der Konzentrationen der eingesetzten Oligonukleotide durchgeführt. Als Orientierungshilfe zur Bestimmung der einzusetzenden Konzentrationen wurden die in den Singleplexansätze der

einzelnen SNPs erzielten Signalintensitäten der spezifischen Banden benutzt. Ziel war es, möglichst gleiche Signalintensitäten für alle spezifischen Banden einer Minisequenzierung zu erzielen. Eine Ausgewogenheit konnte allerdings nicht erreicht werden. Dieser Effekt wurde in der Literatur bei Verwendung des hier eingesetzten SNaPshot-Kits schon beobachtet; die Typisierung wurde dadurch wie auch in der vorliegenden Arbeit nicht beeinträchtigt (Quintáns et al. 2004).

Ein Grund für die unterschiedlichen Signalintensitäten sind die Emissionseigenschaften der an die verwendeten Didesoxynukleotide gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe. Die insgesamt vier Farbstoffe dR110 (blau), dR6G (grün), dTamra (schwarz) und dRox (rot) emittieren bei Anregung mit dem Laserstrahl des Kapillarelektrophoresegerätes die in Klammer stehenden Farben mit hoher Intensität für dR110 und dR6G und mit niedriger Intensität für dTamara und dRox. Die unterschiedlichen Signalintensitäten der einzelnen Banden lassen sich bei allen drei DNA-Markern nicht durch höhere Konzentrationen der jeweiligen Oligonukleotide mit niedrigen Signalintensitäten ausgleichen, da das Ungleichgewicht häufig beide Allele eines SNPs betrifft. Besonders auffällig ist daher dieser Effekt bei diploiden DNA-Markern, also beim AB0-Blutgruppen-Gen. Dies zeigt sich bei der Analyse des AB0-Blutgruppen-Gens z.B. für die Allele A bzw. B an den SNPs SNP796 und SNP803. Der jeweilige grüne Bande bzw. blaue Bande ist um einiges höher ist als die zugehörige schwarze Bande. Bei den analysierten mtDNA-SNPs konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden. Dabei ließ sich mit sehr hoher Signalintensität der SNP 16069 in allen Proben nachweisen, während der SNP 247 mit im Durchschnitt dreifach niedrigerer Signalintensität zu detektieren war. Auch für die Y-SNPs M9 und M45 konnten vergleichbare Beobachtungen gemacht werden.

Dieses Problem könnte umgangen werden, wenn nur A/G- bzw. G/A-Polymorphismen untersucht werden, d.h. es werden im Chromatogramm nur blaue und grüne Banden sichtbar. Das hängt allerdings von den zu untersuchenden SNPs ab und lässt sich bei definierten SNPs wie bei den drei untersuchten DNA-Markern nicht durch den Untersucher beeinflussen.

Ein weiterer Faktor, der die Signalintensität der einzelnen spezifischen Banden im Chromatogramm beeinflusst, ist die Sequenz der eingesetzten Oligonukleotide. Sie wird durch den SNP vorgegeben; allerdings kann zwischen zwei Varianten, der Sequenz vor bzw. nach dem SNP, gewählt werden. Je nach Sequenz bindet das Oligonukleotid besser oder schlechter während der Minisequenzierung an das

zu analysierende PCR-Produkt, so dass mehr oder weniger Produkte während der Minisequenzierung gebildet werden. Um das beste Ergebnis für die Minisequenzierung zu erzielen, müssen daher beide Sequenzvarianten als *Primer* ausgetestet werden. Eine Verwendung der komplementären Sequenzen ist ebenfalls möglich. Für die untersuchten DNA-Marker wurden für die SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens an den Positionen SNP796 und SNP803 verschiedene Varianten als *Primer* ausgetestet. Alle Oligonukleotide, die die rückwärtig von SNP liegende Sequenz umfassten, führten zu keinem Ergebnis. Auf diese *Primer* wurde daher im Weiteren verzichtet. Welchen Einfluss unterschiedliche Sequenzen der Oligonukleotide auf die Signalintensität innerhalb der Minisequenzierung als Singleplex und Multiplex haben wurde bisher nicht systematisch ausgetestet (Vallone et al. 2004).

Für eine optimale Bindung der Oligonukleotide spielen des Weiteren auch die Bedingungen der Minisequenzierung sowie die Qualität der gelieferten Oligonukleotide eine Rolle. Aufgrund der Multiplexreaktion können allerdings die Bedingungen für jedes einzelne Oligonukleotid nicht optimal eingestellt werden, so dass immer ein Kompromiss zwischen optimalen Bedingungen für die einzelne Minisequenzierung bzw. die Multiplexreaktion eingegangen werden muss. Die Qualität der *Primer* für die Minisequenzierung ist bei jeder neuen Charge zu prüfen und kann unter Umständen zu neuen Mischungsverhältnissen führen.

Als weiterer Faktor in der Minisequenzierung, der die Signalintensität der einzelnen Banden beeinflusst, ist auch die DNA-Polymerase zu nennen. Die einzelnen DNA-Polymerasen bauen die vier verschiedenen Nukleotide unterschiedlich schnell ein und bevorzugen aufgrund ihres aktiven Zentrums dabei einzelne Nukleotide (Strauss 1991, Shibutani et al. 1997, Strauss 2002). Beispielsweise hängt die Taq-DNA-Polymerase an die 3'-Enden von PCR-Produkten bevorzugt das Nukleotid Adenosintriphosphat an. Die strukturellen Unterschiede der vier Nukleotide werden durch die unterschiedlichen angehängten Fluoreszenzfarbstoffe noch verstärkt, so dass es hierdurch zu Unterschieden in den Einbauraten der vier Nukleotide und daraus resultierend unterschiedliche Signalintensitäten der spezifischen Banden zu beobachten sind. Da für die Minisequenzierung ein kommerzielles Produkt verwendet wird, ist allerdings davon auszugehen, dass das enthaltene DNA-Polymerase-Gemisch optimale Einbauraten für alle vier Nukleotide besitzt.

4.1.4 Minisequenzierung – Artefakte der Kapillarelektrophorese

Bei Betrachtung der Reaktionen der Minisequenzierung nach Auftrennung durch die Kapillarelektrophorese lässt sich bei allen drei untersuchten DNA-Bereichen feststellen, dass in den Chromatogrammen Artefakte im Bereich zwischen 20 bp und 35 bp auftreten (Abb. 23, 3.3.2). Inwiefern sich diese Artefakte durch die Reinigung der PCR-Produkte, die für die Minisequenzierung eingesetzt wurden, beseitigen lassen, wurde anhand der beiden PCR-Multiplexe Hl und Hs für die Y-SNPs austestet. Als vier verschiedene Reinigungsverfahren wurden neben der Reinigung über die beiden Enzyme SAP und ExoI, welche bei allen PCR-Produkten standardmäßig durchgeführt wurde, EXOSAP-IT, ebenfalls ein enzymatisches Verfahren, sowie Microcon- und Qiaquicksäulen verwendet. Wie anhand der beiden Abbildungen 19 und 20 (siehe 3.3.1) zu sehen, zeigen die beiden enzymatischen Reinigungsmethoden zusätzliche DNA-Moleküle bei ca. 25 bp sowie im Bereich von 200 – 350 bp, 500 bp und im hochmolekularen Bereich, die bei den beiden Reinigungsverfahren über Säulen nicht zu beobachten sind. Die auftretenden unspezifischen Banden bei den enzymatischen Reinigungsverfahren, lassen sich im Bereich von 25 bp mit überschüssigen und während der PCR nicht verbrauchten *Primern* erklären. Bei den *Primern* handelt es sich um einzelsträngige DNA-Moleküle, die über das Enzym ExoI abgebaut und aus dem PCR-Ansatz entfernt werden sollen. Augenscheinlich reicht die Menge an ExoI sowohl in dem selbst zusammen gemischten Ansatz mit SAP als auch in dem kommerziell verfügbaren EXOSAP-IT nicht aus, um alle *Primer* entfernen. In der Literatur wird anders als bei den Angaben des Herstellers für den SNaPshot-Kit eine wesentlich höhere Menge an ExoI verwendet (Vallone et al. 2005). Sowohl eine Erhöhung der Menge an Enzym als auch der Einsatz von weniger PCR-*Primer* sollte daher diese Artefakte zum Verschwinden bringen.

Die ebenfalls feststellbaren zusätzlichen DNA-Moleküle müssen anders als die *Primer* durch die Aktivität der Enzyme entstanden sein, vermutlich durch Aktivität der ExoI an einzelsträngigen PCR-Produkten. Sie sollten im Gegensatz zu den PCR-*Primern* keinen Einfluss auf die Reaktionsprodukte der Minisequenzierung haben. Ähnliche Beobachtungen sind aus der Literatur nicht bekannt.

Wie zu erwarten, finden sich in den Chromatogrammen der PCR-Produkte, die enyzmatisch aufgereinigt wurden, Artefakte im Bereich von 20 bp bis 35 bp (siehe Abb. 23, 3.3.2). Diese Artefakte werden dadurch verursacht, dass die

überschüssigen PCR-*Primer* ebenso wie die spezifischen Oligonukleotide der Minisequenzierung innerhalb der Reaktion durch ein markiertes Didesoxynukleotid verlängert werden. Die Reaktionsprodukte werden dann bei der Auftrennung über die Kapillarelektrophorese genauso wie die spezifischen Banden dargestellt. Die Länge der PCR-*Primer* für die Y-SNPs liegt im Bereich von 20 – 26 bp, was den Bereich der Artefakte erklärt, zumal Reaktionsprodukte der Minisequenzierung in diesem Längenbereich sich nicht proportional zu ihrer Länge in den Chromatogrammen wieder finden (Quintáns et al. 2004). Die Artefakte für die selbst hergestellte Mischung der Enzyme SNP und ExoI wesentlich höher als für die kommerzielle Mischung EXOSAP-IT, was darauf schließen lässt, dass die selbst hergestellte Mischung noch nicht optimal eingestellt ist.

Im Hinblick auf biologische Tatortspuren sollten allerdings die säulenbasierten Reinigungsmethoden vorgezogen werden, da hier nicht nur die Artefakte gering bzw. gar nicht auftauchen, sondern auch hohe Signalintensitäten für die sieben Banden erreicht werden, die die Nachweissensitivität der Minisequenzierung für geringe DNA-Mengen und degradierte DNA erhöhen. Zudem ist es über die Reinigung mit Microsonsäulen möglich, die Konzentration an PCR-Produkt zu erhöhen, so dass mehr PCR-Produkt in die Minisequenzierung eingesetzt werden kann. Für die SNP-Analyse bei dem AB0-Blutgruppen-Gen und in der D-Loop-Region der mtDNA sind die Artefakte nicht störend, da die relevanten Banden erst bei einer Länge ≥ 43 bp bzw. ≥ 39 bp sind. Im Zuge einer Erweiterung beider Multiplexe kann durch eine entsprechende Reinigung der Bereich ≤ 39 bp zusätzlich genutzt werden.

Ein weiterer Faktor, der die beobachteten Artefakte beeinflusst, können in der Kapillarelektrophorese vorhandene Verunreinigungen durch die ebenfalls an diesem Gerät durchgeführten Fragmentlängenanalysen sein. Die dabei analysierten PCR-Proben enthalten neben den fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten einen Überschuss an fluoreszenzmarkierten PCR-*Primern* im Bereich von 25 bp, die in eines der für die Elektrophorese verwendeten Puffergefäße gelangen oder auf der Kapillare verbleiben. Eine Reinigung kann durch Auftrennen von Formamid über die Kapillarelektrophorese erfolgen oder vor dem Lauf durch Austausch des Puffers in den beiden Gefäßen. Die Artefakte werden dadurch abgeschwächt, verschwinden aber nicht komplett.

4.1.5 Minisequenzierung – Nachweissensitivität der einzelnen DNA-Bereiche

Ein Vergleich der drei analysierten DNA-Bereiche untereinander zeigt, dass alle drei Systeme unterschiedliche Nachweissensitivität in Abhängigkeit von Menge und Degradation der DNA sowie der im Genom vorhandenen Kopienanzahl des untersuchten DNA-Markers besitzen. Es ist daher zu erwarten, dass die Nachweissensitivität für die SNPs der mtDNA aufgrund der höheren Kopienzahl größer ist als für die SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens und der Y-SNPs.
Bei Betrachtung der Ergebnisse für Knochenproben für die SNPs des AB0-Blutgruppen-Gen einerseits und für die SNPs der mtDNA andererseits lässt sich feststellen, dass ein Nachweis der SNPs der mtDNA bei allen untersuchten Knochenproben möglich war. Mit Hilfe der SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens ließen sich dagegen nur für ausreichende Mengen an DNA komplette Profile erzielen. Häufiger waren nur Teilergebnisse zu erzielen, die eine eindeutige Zuordnung der AB0-Blutgruppe nicht ermöglichten (siehe Abb. 7, 3.1.2). Dies bestätigt die Ergebnisse aus der Literatur, bei denen festgestellt wurde, dass bei Probenmaterial, dass degradierte und geringe Mengen an DNA enthält, die Analyse von mtDNA erfolgreicher ist als die Analyse über die üblichen STR-Systeme (Butler and Levin 1998, Morley et al. 1999). In diesem Zusammenhang sind die STR-Systeme, die nur mit einer Kopie im menschlichen Genom vorkommen, dem hier untersuchten AB0-Blutgruppen-Gen gleichzusetzen. Momentan wird versucht die Nachweissensitivität für die herkömmlichen STR-Systeme zu steigern, indem mit verkürzten PCR-Produkten gearbeitet wird (Wiegand and Kleiber 2001, Butler et al. 2003, Chung et al. 2004, Grubwieser et al 2006, Wiegand et al. 2006). Diese Steigerung der Nachweissensitivität durch die Verwendung der kürzeren PCR-Produkte lässt sich bei den SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens durchaus auch beobachten: Die partiellen Ergebnisse, die für Knochen- und Haarproben erzielt werden konnten, wurden hauptsächlich mit PCR-Produkten des Multiplex AB0Tri-2 erzielt. Dieser Multiplex erzeugt im Schnitt kürzere PCR-Produkte als der Multiplex AB0Tri-1. Im Allgemeinen läuft während der PCR bevorzugt die Vervielfältigung von kürzeren PCR-Produkten ab, was zu höheren Konzentrationen an kürzeren PCR-Produkten sowohl für ausreichende DNA-Mengen als auch für wenig DNA oder degradierte DNA führt. Dies wird besonders an PCR-basierten Verfahren zur Analyse von repetitiven Sequenzen wie STRs deutlich, bei denen in Untersuchungen die kürzeren Allele stärker

vervielfältigt wurden gegenüber den längeren Allelen (Walsh et al. 1992, Schmitt et al. 1994). Diese Beobachtung macht man sich bei der Analyse gerade schwierigen Probenmaterials wie Knochen zu nutze, indem möglichst kurze PCR-Produkte untersucht werden. Ein Beispiel ist die AB0-Typisierung von älterem Knochenmaterial von Hummel et al. (2002), für die PCR-Produkte mit einer Länge von 60 bis 110 bp eingesetzt wurden.

Trotz der Vergleichbarkeit in der Kopienanzahl von SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens und den STR-Systemen ließ sich für die SNPs insgesamt eine höhere Nachweissensitivität feststellen. Alle mit den SNPs analysierten Knochen- und Haarproben wurden zuvor mit STRs untersucht, was zu stark eingeschränkten oder keinem Ergebnis führte. Mit Hilfe der SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens wurde dann entweder ein komplettes Profil erzielt oder ein partielles Ergebnis; insgesamt war also die Analyse mit SNPs erfolgreicher als mit STR-Systemen, was auch auf eine höhere Nachweissensitivität der SNPs hinweist (Sanchez et al. 2006).

Neben der Verkürzung der PCR-Produkte wirkte sich bei der Untersuchung von Knochenproben mittels AB0-Blutgruppen-Gen und mtDNA für die Nachweissensitivität der SNPs die Methode der DNA-Extraktion aus. Dabei zeigt DNA, die über ChargeSwitch extrahiert wurde, insofern Vorteile gegenüber der DNA, die mit der sonst verwendeten Genial+Glasmilch Methode extrahiert wurde, als mehr SNPs detektiert, höhere Signalintensitäten erzielt und längere PCR-Produkte verwendet werden konnten (siehe Abb. 7 – 9, 3.1.2 und Abb. 14 und 15, 3.2.2). Die Unterschiede lassen vermuten, dass durch die beiden verschiedenen DNA-Extraktionsverfahren unterschiedlich lange DNA-Stränge gewonnen wurden; dabei werden mit Hilfe der Magnetkugeln (ChargeSwitch) im Schnitt längere DNA-Stränge extrahiert als mit der üblichen Extraktionsmethode. Das die Art der DNA-Extraktion einen erheblichen Einfluss auf die Qualität der DNA-Moleküle und die Länge der DNA-Stränge haben kann, ist aus der Literatur hinreichend bekannt, u.a. auch für die ebenfalls problematischen Haarproben (Gilbert et al. 2007, Müller et al. 2007, Ribeiro and Lovato 2007)

Die Y-chromsomalen SNPs lassen sich in diesem Zusammenhang nur auf ihre Nachweissensitivität bei einem erheblichen Überschuss an weiblicher DNA beurteilen. Wie in der Literatur zeigt auch die vorliegende Arbeit eine hohe Nachweissensitivität der ausgewählten sieben Y-chromosomalen SNPs bei einem Überschuss an weiblicher DNA (Abb. 24, 3.3.2). Im Gegensatz zu den zuvor

eingesetzten STR-Systemen zur Analyse, die lediglich das Muster des weiblichen Opfers zeigten, lassen sich für einen der beiden Vaginalabstriche alle sieben ausgewählten Y-SNPs nachweisen; der zweite Vaginalabstrich liefert ein Teilergebnis von insgesamt sechs Y-SNPs. Aus der Literatur ist eine vergleichbar hohe Nachweissensitivität einzelner Y-SNPs bei Mischspuren aus männlicher und weiblicher DNA bekannt. In Abhängigkeit von der Anzahl, der gewählten Nachweismethode und dem untersuchten Y-SNP lassen sich die Y-SNPs in einem Mischungsverhältnis von 1:300 (männlich zu weiblich) (Lareu et al. 2001) bzw. 1:1000 (männlich zu weiblich) (Schell et al. 2006, Onofri et al. 2006) detektieren. Es zeigte sich, dass ein Nachweis bei einer Anzahl von bis zu acht Y-SNPs mit Hilfe der Minisequenzierung bei einem 1000fachen Überschuss an weiblicher DNA möglich ist (Onofri et al. 2006). Damit sind die vorliegenden Ergebnisse in Übereinstimmung mit Ergebnissen aus der Literatur und bekräftigen die weitere Verwendung der Y-SNPs für die Analyse von Mischspuren mit einem Überschuss an DNA des weiblichen Opfers, wie sie in der forensischen Praxis auftreten. In diesem Zusammenhang ist vor allem die Arbeit von Onofri et al. (2006) zu beachten, die insgesamt 35 Y-SNPs untersuchen und die häufigen europäischen Y-Haplogruppen bestimmen konnten, bei gleich bleibend hoher Nachweis-sensitivität in einem Überschuss von weiblicher DNA.

4.1.6 Allgemeine Schlussfolgerungen

Insgesamt lässt sich bei allen drei DNA-Bereichen eine hohe Nachweissensitivität der ausgewählten SNPs bei geringen DNA-Mengen bzw. degradierte DNA feststellen, ein Effekt der auch durch europäische und nordamerikanische Untersuchungen bestätigt wird (Gill et al. 2004, Sanchez et al. 2006). Die erhöhte Nachweissensitivität scheint durch die Signalerzeugung in zwei Schritten zu entstehen: 1. die Amplifikation des genomischen Bereiches über PCR mit relativ kurzen Amplicons und 2. die anschließende Minisequenzierung.
Trotz der höheren Nachweissensitivität der SNPs gerade bei biologischen Spuren mit degradierter DNA ist zu bedenken, dass SNPs im Vergleich zu den bisher verwendeten STRs eine wesentlich geringere Aussagekraft zur Identifikation eines Individuums besitzen, so dass 50 – 150 SNPs im Vergleich zu 8 – 15 STRs untersucht werden müssten (Gill 2001). Dies bedeutet, dass eine größere DNA-

Menge zur Analyse der großen Anzahl an SNPs benötigt wird als für die STR-Systeme (Vallone et al. 2005, Dixon et al. 2005), etwa 1 – 2 ng, die gerade bei biologischen Tatortspuren limitiert ist. Um dieses Problem zu umgehen, wird von Dixon et al. (2005) vorgeschlagen, mit Hilfe einer speziellen allelspezifischen PCR in einem ersten Schritt die SNPs über spezifische PCR-*Primer* zu vervielfältigen. Um das entstandene Signal zu erhöhen, wird in einem zweiten Schritt das spezifische PCR-Produkt durch universelle PCR-*Primer* stark vervielfältigt. Im Unterschied zur Minisequenzierung und anderen SNP-Analyse-Verfahren, kommt diese Form der allelspezifischen PCR mit ≥ 100 pg aus und lässt sich in einem Ansatz durchführen. Allerdings lassen sich mit dieser Methode nur 2 Allele erfassen im Unterschied zu der Minisequenzierung.

Trotz der hohen Nachweissensitivität werden daher die SNPs die STR-Systeme bei der Analyse biologischer Tatortspuren nicht ersetzen können. Eine ergänzende Analyse von biologischen Tatortspuren, die geringe Mengen und/oder degradierte DNA enthalten, mit SNPs ist allerdings aufgrund der vorliegenden Ergebnisse zu empfehlen. Dabei sollte der Minisequenzierung der Vorzug gegeben werden, da alle möglichen Allele nachgewiesen werden können, eine hohe Nachweissensitivität erreicht wird und eine gute Datengrundlage aufgrund der verbreiteten Verwendung der Minisequenzierung in anderen forensischen Laboren vorliegt (Sobrino et al. 2005, Onofri et al. 2006, Sanchez et al. 2006)

4.2 AB0-Blutgruppen-Gen

Insgesamt ließ sich das AB0-Blutgruppen-Gen mit Hilfe der Minisequenzierung eindeutig und reproduzierbar typisieren. Die zunächst durchgeführte Validierung ergab für die Vergleichsproben, deren AB0-Blutgruppe serologisch bestimmt worden war, identische Ergebnisse bei der AB0-Genotypisierung mittels Minisequenzierung. Abweichungen ergaben sich nur für serologisch nicht erfasste Allele wie z.B. 0_{v1} (Olsson and Chester 1996), das sich lediglich durch zwei Nukleotidpositionen von dem bekannten Allel 0 unterscheidet, oder das Allel 0_2, welchem die charakteristische Deletion an Position SNP261 fehlt und in verschiedenen Studien nicht eindeutig von den Allelen 0 und 0_{v1} unterschieden werden kann (Gassner et al. 1996, Ringel et al. 2000).

In der Literatur konnten ähnliche Übereinstimmungen zwischen serologischen Daten und über molekularbiologische Methoden erhobene AB0-Genotypen festgestellt werden ebenso wie in der vorliegenden Arbeit (Ugozolli and Wallace 1992, Grunnet et al. 1994, Villa et al. 1996, Watanabe et al. 1997, Ringel et al. 2000). Zur AB0-Genotypisierung wurden im Laufe der Zeit seit Entdeckung der molekularen Grundlage der AB0-Blutgruppe (Yamamoto et al. 1990) verschiedene molekularbiologische Methoden eingesetzt, u.a die RFLP-Analyse mit Restriktionsendonukleasen (Lee and Chang 1992, Schacker et al. 1995, Herrin 1996, Villa et al. 1996, Hummel et al. 2002), die allelspezifische PCR in verschiedenen Ausführungen (Ugozzoli and Wallace 1992, Gassner et al. 1996, Lee et al. 1996, Watanabe et al. 1997), die SSCP-Analyse (=single-strand conformation polymorphism) von PCR-Produkten (Yip 2000) und die Minisequenzierung (Ferri et al. 2004, Ferri et al. 2006). Für die in einigen Arbeiten beobachteten Abweichungen zwischen serologischer und molekularbiologischer AB0-Typisierung sind nicht nur die oben erwähnten serologisch nicht erfassbaren Allele verantwortlich, sondern auch die zum Nachweis der SNPs verwendete Methode (Ringel et al. 2000) und die Anzahl bzw. die Stabilität der untersuchten SNPs.

Da Mutationen an jedem der untersuchten SNPs (Grunnet et al. 1994, Gassner et al. 1996, Watanabe et al. 1997, Yip 2000) auftreten können, sollten zur Unterscheidung der drei Allelgruppen A, B und 0 mehrere charakteristische SNPs parallel untersucht werden, soweit möglich. Im Hinblick darauf wurden für die vorliegende Arbeit insgesamt vier verschiedene SNPs (SNP297, SNP703, SNP796 und SNP803) ausgewählt zur eindeutigen Unterscheidung der Allele A und B. Bei der Untersuchung der Haarproben erwies sich diese Strategie als sinnvoll, da sich nicht alle SNPs zur Unterscheidung des AB0-Genotyps darstellen ließen (siehe Abb. 7, 8 und 9, 3.1.2).

Im Zusammenhang mit biologischen Tatortspuren ist die molekularbiologische AB0-Genotypisierung bei unterschiedlichem biologischen Material bis hin zu Knochen möglich, bei denen die serologische Analyse schwer durchführbar bzw. nur unter Zuhilfenahme immunhistologischer und damit aufwendiger Färbemethoden möglich ist (Pfeiffer et al. 2002).

Da die RFLP-Analyse die historisch erste molekularbiologische Methode zur AB0-Genotypisierung ist, wurde bei der vorliegenden Arbeit exemplarisch der SNP261 zusätzlich zur Minisequenzierung mit der Restriktionsendonuklease KpnI

untersucht. Es handelte sich dabei um eine Knochenprobe einer teilskelettierten Leiche, in deren Kleidung u.a. ein Blutgruppenpaß gefunden wurde. Beide Methoden führten zu identischen AB0-Genotypen für den SNP261 (siehe Abb. 10, 3.1.3), was wiederum mit der im Blutgruppenpaß vermerkten, serologischen ermittelten AB0-Blutgruppe übereinstimmte. Es ist also davon auszugehen, dass die Minisequenzierung dieselben Ergebnisse liefert wie die gut validierte und etablierte RFLP-Analytik. Im Vergleich zur RFLP-Analyse hat die Minisequenzierung allerdings den Vorteil, dass mehrere SNPs in einem einzigen Ansatz untersucht werden können und alle vier möglichen Allele (Philipps et al. 2004), die an jeder SNP-Position auftreten können, detektiert werden (Syvänen 2001, Sobrino et al. 2005). Dies gilt auch gegenüber den schon vor längerer Zeit entwickelten Methoden auf Basis der allelspezifischen PCR (Ugozolli and Wallace 1992, Watanabe et al. 1997), die zwar einen Multiplex ermöglicht, aber nicht alle möglichen Allele nachweisen kann.

Die AB0-Genotypisierung unter Verwendung der Minisequenzierung wurde bisher nur von Ferri et al. (2004, 2006) durchgeführt. Insgesamt wurden fünf SNPs untersucht, die zu einer Unterscheidung der Allele A_1, A_2, B, 0_1, 0_{1v} und 0_2 führt. Künstlich hergestellte biologische Spuren wurden dabei bis zu einer DNA-Konzentration von 200 pg erfolgreich analysiert; Untersuchungen biologischer Tatortspuren wie in der vorliegenden Arbeit wurden nicht vorgenommen. Untersuchungen an geringen Mengen von DNA sowie degradierter DNA wurden dagegen von Hummel et al. (2002) durchgeführt. Die aus Knochen gewonnene DNA wurde dabei mit Hilfe der RFLP-Analytik erfolgreich untersucht. Wichtig war dabei der Einsatz stark verkürzter PCR-Produkte (103/104 bp und 64 bp), die mit vier verschiedenen Restriktionsendonukleasen behandelt wurden, so das die folgenden fünf AB0-Blutgruppen Allele zu differenzieren waren A, B, 0, 0_{v1} und 0_2. Eine Unterscheidung von A_1 und A_2 ist mit diesem Ansatz nicht möglich. Insgesamt konnten 15 Knochenproben, die zuvor schon mittels STR-Systeme untersucht worden waren, erfolgreich AB0 typisiert werden. Dies zeigt, dass es durchaus möglich ist, AB0-Genotypisierung an relativ altem Knochenmaterial, das vermutlich degradierte und geringe Mengen an DNA enthält, erfolgreich durchzuführen. Ähnliche Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit erzielt werden, wobei sich hierbei die Verwendung des verkürzten PCR-Multiplex TriplexAB0-2 als hilfreich erwies. Dieser enthält für die vier SNPs SNP703, SNP796, SNP802 und SNP803 des Exons 7 des AB0-Blutgruppen-Gens ein um

ca. 50% verkürztes PCR-Produkt (AB0Exon7f6+r6, PCR-Produktlänge 178 bp). Eine Analyse von DNA-Proben mit degradierter DNA wie beispielsweise die zwei telogenen Haarproben (siehe Abb. 8 und 9; 3.2.1) war damit für diese vier SNPs eindeutig möglich. Wie allerdings die in Abbildung 7 zu sehende AB0-Typisierung der Knochenprobe c zeigt, muss für stark degradierte DNA ein PCR-Multiplex entwickelt werden, der noch kürzere PCR-Produkte für die zu untersuchenden SNPs enthält, etwa in einem Bereich von 90 – 130 bp ähnlich wie bei Hummel et al. (2002).

Neben der erfolgreichen AB0-Genotypisierung der hier vorgestellten Minisequenzierung, die sich mit Ergebnissen aus der Literatur deckt, ist hier noch auf einen Nachteil dieser Methode hinzuweisen, der bei der Erstellung des Multiplex aufgetreten ist. Zur Unterscheidung der Allele A und B sollte zunächst der SNP 526 (Ugozolli and Wallace 1992) verwendet werden, der mit Hilfe der zuvor getesteten allelspezifischen PCR (Schacker et al. 1995) erfolgreich analysiert werden konnte. Die für den SNP ausgewählten *Primer* produzierten eine falschpositiven Bande, der durch eine entsprechende Bildung von Dimeren des *Primers* erzeugt wurde. Zur Analyse dieses SNPs sollte daher eine andere Detektionsmethode ausgewählt werden z.B. die RFLP-Analytik oder die allelspezifische PCR. Die Auswahl der SNP-Analyse-Methode ist, wie der SNP 526 zeigt, vor allem abhängig von der DNA-Sequenz, die den zu untersuchenden SNP umgibt (Sobrino et al. 2005).

4.3 mtDNA

Ähnlich wie die AB0-Genotypisierung so ist auch die Bestimmung der sieben SNPs aus der Kontrollregion der mtDNA erfolgreich durchgeführt worden. Eine Überprüfung der Typisierungsergebnisse der Minisequenzierung fand exemplarisch anhand von Vergleichsproben statt, die im Rahmen einer Populationsstudie sequenziert wurden (Brandstätter et al. 2006b). Beide Methoden führten an den sieben ausgewählten SNPs zu identischen Ergebnissen. Dabei konnten für sechs der mtDNA-SNPs beide Allele eines SNPs beobachtet werden.

Eine Ausnahme bildet hierbei der SNP 247 der HV2-Region, der sich nur in der ursprünglichen Variante (Nukleotid G) nachweisen ließ. Aus der Literatur ist

allerdings bekannt, dass dieser SNP innerhalb der verschiedenen europäischen Haplogruppen bzw. Haplotypen kaum variiert (Piercy et al. 1993, Alves-Silva et al. 2000), was sich mit den Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deckt.

Neben der häufig genutzten Sequenzierung (Sullivan et al. 1992, Gill et al. 1994, Parson et al. 1998, Lutz et al. 1998, Salas et al. 2002, Friedlaender et al. 2005, Brandstätter et al. 2006b) werden die Polymorphismen in den beiden hypervariablen Regionen der mtDNA mit Hilfe der Analyse über Restriktionsendonukleasen (Torroni et al. 1996, Richards et al. 1998, Macaulay et al. 1999, Izagirre and de la Rúa 1999, Alves-Silva et al. 2000, Santos et al. 2004) und der Minisequenzierung bestimmt (Tully et al. 1996, Morley et al. 1999). Vergleiche zwischen den aufgeführten Methoden zur Analyse der SNPs der mtDNA zeigen, dass die Minisequenzierung zu den gleichen Ergebnissen führt wie die RFLP-Analytik und das Sequenzieren (Tully et al. 1996, Morley et al. 1999), wie auch die vorliegende Arbeit zeigt. Hierbei bietet die Minisequenzierung gegenüber der RFLP-Analytik den Vorteil, dass mehr als ein Allel mit einem Ansatz nachgewiesen werden kann und die Erstellung eines Multiplex ohne weiteres möglich ist. Obwohl die Sequenzierung mehr Informationen in einem Ansatz erhebt, hat die Minisequenzierung Vorteile, wenn gezielt einzelne SNP-Positionen untersucht werden sollen, deren Varianten durch eingehende Populationsstudien zuvor erhoben wurden. Gerade bei der Sequenzierung der gesamten mtDNA zeigt die Minisequenzierung im Hinblick auf den zeitlichen Aufwand und die Verarbeitung der relevanten Informationen einzelner SNP-Positionen Vorteile gegenüber der klassischen Sequenzierung.

Relativ selten wird die Massenspektrometrie zur SNP-Bestimmung eingesetzt (Oberacher et al. 2007). Da hierbei die Zusammensetzung und nicht die Reihenfolge der einzelnen Nukleotide bestimmt werden kann, werden meist Längenpolymorphismen, wie die *C-Stretches* aus HV1 und HV2, analysiert, die aufgrund der auftretenden homopolymeren Abschnitte zu Schwierigkeiten bei der Vervielfältigung führen.

Die Auswahl der für die vorliegende Arbeit verwendeten sieben SNPs aus den hypervariablen Regionen HV1 und HV2 richtete sich nach den Diskriminations-möglichkeiten von individuellen Haplotypen. Damit schieden zunächst die für die Haplogruppen und Haplotypen charakteristischen SNPs, die sich sowohl in der Kontrollregion wie im kodierenden Bereich der mtDNA befinden, aus. In Anlehnung an die Arbeiten von Piercy et al. (1993), Tully et al. (1996) und Morley

et al. (1999), die eine zufällige Übereinstimmung zweier nicht verwandter Individuen mit 5,4% bzw 2,3% bei Verwendung ihrer SNPs erhielten, wurden sieben SNPs (73, 152, 247, *C-Stretch* 309 in der HV2, 16069, 16224 und 16311) daraus ausgewählt. Zwar ist damit eine geringe Unterscheidungsmöglichkeit einzelner mtDNA-Haplotypen gegeben als in der Literatur, andererseits bietet sich eine bessere Vergleichbarkeit zu den SNPs-Sets der genomischen DNA, also des AB0-Blutgruppen-Gen und des Y-Chromosoms. Ein Ausbau des SNPs-Sets der mtDNA sollte aufgrund der in der Literatur vorliegenden Ergebnisse ohne Probleme möglich sein. Ähnlich wie in den drei Arbeiten konnten in der vorliegenden Arbeit gute Ergebnisse bei den unterschiedlichen Spuren auf Ebene der PCR und der Minisequenzierung erzielt werden, vor allem für Knochenmaterial und Haarschäfte, bei denen Typisierungen mit STR-Systemen und den SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens partielle oder gar keine Ergebnisse lieferten. Somit stimmen die vorliegenden Ergebnisse in Hinblick auf die bessere Typisierbarkeit der mtDNA-Polymorphismen im Vergleich zu Markern der genomischen DNA mit den Ergebnissen aus der Literatur überein (Sullivan et al. 1992, Butler and Levin 1998, Morley et al. 1999). Daher sollte bei Teilergebnissen für Knochen- und Haarproben unter Verwendung von STRs und SNPs der genomischen DNA auf eine Typisierung der mtDNA-SNPs über die Minisequenzierung zurückgegriffen werden.

In letzter Zeit wird die Minisequenzierung verstärkt genutzt zur Typisierung von SNPs in der kodierenden Region der mtDNA (Brandstätter et al. 2003, Quintáns et al. 2004, Vallone et al. 2004, Brandstätter et al. 2006a, Grignani et al. 2006) als relativ schnelle und kostengünstige Alternative zur Sequenzierung. Anhand der SNPs aus der kodierenden Region der mtDNA werden einerseits die Haplogruppen und somit eine geographische Zugehörigkeit bestimmt (Brandstätter et al. 2003), andererseits ist es möglich, die in Europa häufig vertretene Haplogruppe H über charakteristische SNPs der kodierenden Region in Subgruppen zu unterteilen (Quintáns et al. 2004, Vallone et al. 2004, Brandstätter et al. 2006b, Grignani et al. 2006). Somit stellt die Minisequenzierung bei Bestimmung einzelner Haplogruppen eine zusätzliche Technik dar, die neben dem Sequenzieren der hypervariablen Regionen der D-Loop-Region durchgeführt wird. Eine Anwendung für forensisch relevante biologische Tatortspuren ist aufgrund der durchgeführten Sensitivitätstests möglich, wurde bisher aber nur von Vallone et al. (2004) anhand von 8 Knochenproben mit degradierter DNA bestätigt.

Neben der Bestimmung von Haplogruppen und Haplotypen spielt die Bestimmung von Heteroplasmien bei der Analyse der mtDNA eine Rolle (Ivanov et al. 1996, Parsons et al. 1997, Hühne et al. 1998, Budowle et al. 2000, Brandstätter and Parson 2003). Heteroplasmien der mtDNA konnten durch Untersuchung von Speichel- bzw. Blutproben und anderen Geweben derselben Person als stabile Polymorphismen der mtDNA bestimmt werden (Juvonen et al. 1994, Lagerström-Fermér et al. 2001, Bini and Pappalardo 2005). Bei diesen Analysen zeigte sich, dass die Minisequenzierung hierbei der Sequenzierung überlegen ist, da Heteroplasmien der mtDNA mit einem Anteil von ≥ 1 – 2 % quantitativ bestimmt werden können (Juvonen et al. 1994, Lagerström-Fermér et al. 2001). Heteroplasmien der mtDNA konnten in der vorliegenden Arbeit bei der Untersuchung telogener Haare und Haarschäfte beobachtet werden. Es handelte sich dabei um die Haarproben zweier Personen, die für den SNP 73 der HV2 den Heteroplasmiestatus A/G zeigten, der in Speichelproben sowie weiteren Haarproben nicht zu beobachten war (Abb.17, 3.2.2). Heteroplasmien der mtDNA in Haarproben, die in anderen Geweben bzw. in der Speichelprobe dergleichen Person nicht feststellbar sind, sind in der Literatur bekannt (Sullivan et al. 1996, Wilson et al. 1997, Grzybowski 2000, Brandstätter and Parson 2003, Paneto et al. 2007) und konnten in unterschiedlichem Ausmaß bestimmt werden. Besonders schnell mutierende Positionen, sogenannte *hot spots*, sind von Heteroplasmien betroffen (Paneto et al. 2007). Eine eindeutige Erklärung für das Auftreten von Heteroplasmien der mtDNA in HV1 und HV2 in Haarproben gibt es bisher noch nicht.

4.4 Y-Chromsom

Die Typisierungsergebnisse der Minisequenzierung für das Y-Chromosom waren wie für das AB0-Blutgruppen-Gen und die hypervariablen Regionen HV1 und HV2 der mtDNA eindeutig auszuwerten und zuzuordnen. Probleme bereitete anfangs die Darstellung des Y-SNPs SRY10831, dessen Bande im Chromatogramm nach Kapillarelektrophorese bei 25 bp auftaucht. In diesem Bereich konnten sowohl für die Minisequenzierung der Y-chromosomalen SNPs als auch die anderen untersuchten SNPs Artefakte beobachtet werden, die in diesem Bereich liegende

spezifische Bande verdecken. Aus der Literatur ist dieses Phänomen ebenfalls bekannt (Onofri et al. 2006). Die Darstellung des Y-SNP SYR10831 gelang nach der Optimierung der Methode zur Reinigung des PCR-Produktes eindeutig. Entscheidend war hierfür eine bessere Entfernung der überschüssigen PCR-*Primer* aus dem PCR-Ansatz, die ansonsten in der anschließenden Minisequenzierung Produkte in einem Bereich von 20 bis 35 bp erzeugen. Dabei konnte mit den säulenbasierten Reinigungsmethoden relativ schnell eine gute Abtrennung der PCR-*Primer* und kaum Artefakte bei der Minisequenzierung erzielt werden.

Ähnlich wie für die mtDNA so wurde auch für zwei der hier verwendeten SNPs, M9 und M45, eine Populationsstudie durchgeführt (Schell et al. 2006). Die Befunde zeigen für die Allele beider SNPs eine Verteilung von je 50 %, was mit Populationsstudien aus der Literatur übereinstimmt (Sanchez et al. 2003). Die restlichen SNPs zeigen in europäischen Populationen häufig nur eines der beiden Allele, wie aus der Literatur bekannt (Y Chromosome Consortium 2002, Butler 2003, Vallone and Butler 2004b).

Des Weiteren bleibt festzustellen, dass ein Großteil der Y-chromosomalen SNPs über die in der vorliegenden Arbeit verwendete Minisequenzierung untersucht wird (Sanchez et al. 2003, Vallone and Butler 2004b, Brión et al. 2004, Brión et al. 2005, Alessandrini et al. 2005, Onofri et al. 2006). Häufig wird dabei in Kombination mit der Kapillarelektrophorese gearbeitet, die aufgrund der in den forensischen Laboren durchgeführten Fragmentlängenanalyse der STR-Systeme überall vorhanden ist. Relativ selten wird statt der Kapillarelektrophorese die Massenspektrometrie zur Auftrennung der Reaktionsprodukte aus der Minisequenzierung verwendet (Lessig et al. 2005). Als weitere Methoden zum Nachweis der Y-SNPs werden Restriktionsendonukleasen genutzt (Zerjal et al. 1997, Dupuy et al. 2001) sowie die Hybridisierung mit allelspezifischen Sonden durchgeführt (LightCycler®-Verfahren) (Lareu et al. 2001), die sich allerdings in der forensischen Praxis bisher noch nicht durchgesetzt haben.

Sämtliche Methoden wie RFLP, Sequenzierung, Minisequenzierung, Massenspektometrie und Hybridisierung über Microarrays (NanoChip) wurden durch Sanchez et al. (2004) im Vergleich getestet und führten für die beiden untersuchten Loci, P25 und 92R7, zu identischen Ergebnissen. Lediglich die RFLP-Analytik zeigte einige Schwächen. Die Minisequenzierung erscheint daher

als verlässliche und häufig verwendete Methode zur Bestimmung der Y-chromosomalen SNPs.

Die Auswahl der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Y-SNPs dient analog zu den mtDNA-SNPs lediglich der Etablierung der Analyse der Y-SNPs bei biologischen Tatortspuren. Deshalb ist eine Spezifizierung der DNA-Proben im Hinblick auf die Haplogruppe bzw. eine Zuordnung zu einer regionalen Population nicht möglich wie sie in der Literatur angestrebt wird (Sanchez et al. 2003, Vallone and Butler 2004b, Brión et al. 2004, Brión et al. 2005, Alessandrini et al. 2005, Lessig et al. 2005, Onofri et al. 2006). Die folgende Tabelle 6 zeigt die für die sieben ausgewählten Y-SNPs zuordbaren Haplogruppen bzw. Haplogruppenkreise.

Tab.6: Darstellung der sieben untersuchten Y-SNPs und ihre Spezifität innerhalb des phylogenetischen Baums der Y-chromosomalen SNPs nach dem *Y chromsome consortium* (2002) und Modifikationen von Jobling and Tyler-Smith (2003) sowie der *International Society of Genetic Genealogy* (http://isogg.org/tree/index.html). Neben den spezifizierten Haplogruppen, die z.T. auch ganze Paragruppen (z.B. K oder P) umfassen, ist zusätzlich die Region, in der diese Haplogruppe zu finden ist, aufgelistet.

SNP	**Haplogruppe**	**Spezifisch für Population aus**
M2	E3a	Afrika
M9	K (K-R)	-
M45	P (P-R)	-
M46	N3	nördliches Eurasien
M89	F (F-R)	-
M167	R1b1c6	Südeuropa
SRY10831	B-R	-

Wie anhand der Tabelle deutlich wird, lassen sich eindeutige Zuordnungen zu Haplogruppen bzw. zu regionalen Populationen nur über Variationen der Y-SNPs M2, M46 und M167 durchführen, da lediglich diese drei SNPs charakteristisch für eine spezielle Haplogruppe bzw. eine regionale Population sind. Die restlichen SNPs definieren Cluster bzw. Paragruppen (Y chromsome consortium 2002), die nicht spezifisch für eine Population sind.

Um vergleichbare Ergebnisse wie in der einschlägigen Literatur (Brión et al. 2004, Brión et al. 2005, Onofri et al. 2006) zu erhalten, kann der hier vorgestellte Multiplex aus sieben Y-SNPs durch bis zu 30 bzw. 40 Y-SNPs entsprechend der

modernen populationsgeographischen Forschung (Homepage der „International Society of Genetic Genealogy“ (http://isogg.org/tree/index.html)) ergänzt werden.

4.5 Schlussbetrachtung

Bei abschließender Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse lassen sich folgende Punkte festhalten:

- Eine Typisierung von SNPs konnte mit Hilfe des Minisequenzierung erfolgreich für das AB0-Blutgruppen-Gen, die mtDNA und das Y-Chromosom durchgeführt werden. Dabei waren die erhaltenen Resultate für alle drei untersuchten DNA-Bereiche mit Ergebnissen in der Literatur vergleichbar. Die Minisequenzierung ist somit eine erfolgreich für die forensische Genetik einsetzbare Technik.
- Typisierungen von SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens und der mtDNA ließen sich ebenfalls erfolgreich für Proben mit degradierter DNA erzielen. Reaktionen der Minisequenzierung mit verkürzten PCR-Produkten hatten im Schnitt eine höhere Erfolgsrate als Reaktionen mit längeren PCR-Produkten, die den gleichen DNA-Bereich vervielfältigten. Hierbei spielte auch die Extraktionsmethode eine Rolle, mit der die untersuchte DNA gewonnen wurde.
- Typisierungen der Y-SNPs waren an biologischen Tatortspuren, die eine Mischung mit einem Überschuss an weiblicher DNA und einen geringeren Anteil an männlicher DNA enthielten, erfolgreich durchzuführen. Dies deckt sich mit Beobachtungen aus der Literatur.
- Eine Analyse von insgesamt sieben SNPs war für alle drei DNA-Bereiche mit einem Multiplexansatz für PCR und die Minisequenzierung erfolgreich durchzuführen. Eine Optimierung der PCR-Multiplexe und der Multiplexansätze der Minisequenzierung konnte in der vorliegenden Arbeit erzielt werden. Die Darstellung mit der Kapillarelektrophorese ließ sich durch verschiedene Reinigungsmethoden für die eingesetzten PCR-Produkte verbessern.

5. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Analyse von forensisch relevanten biologischen Tatortspuren mit Hilfe von SNPs (single nucleotide polymorphisms). Der Untersuchungsschwerpunkt lag dabei auf DNA-Proben, die wenige kernhaltige Zellen bzw. hoch degradierte DNA enthalten. Insgesamt wurden drei verschiedene, forensisch bedeutsame DNA-Bereich untersucht:
das AB0-Blutgruppen-Gen, die mtDNA (mitochrondriale DNA) und das Y-Chromosom. Für jeden DNA-Bereich wurden sieben SNPs zur Analyse ausgewählt:

1. AB0-Blutgruppen-Gen: SNP261, SNP297, SNP703, SNP796, SNP802, SNP803 und SNP1060.
2. hypervariablen Region 1 und 2 (HV1 & HV2) der mtDNA: 16069, 16223, 16311 und 73, 152, 247 und den C-Stretch bei Position 309.
3. Y-Chromosom: M2, M9, M45, M46, M89, M167 und SRY10831.

Alle drei DNA-Bereiche ließen sich erfolgreich mit Hilfe der Minisequenzierung in Kombination mit der Kapillarelektrophorese untersuchen. Dabei konnten für alle analysierten SNPs Multiplexreaktionen für die PCR und hergestellt werden. Eine Analyse von hoch degradierter DNA aus Knochen- und Haarproben war dabei mit Hilfe der SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens und der mtDNA möglich. Bei Verwendung der SNPs des AB0-Blutgruppen-Gens konnten je nach Qualität der DNA allerdings nur Teilergebnisse erzielt werden.
Des Weiteren ließ sich in biologische Tatortspuren, die einen Überschuss an DNA einer weiblichen Person und einen geringeren Anteil an DNA einer männlichen Person enthielten, das Y-chromosomale SNP-Profil der männlichen Person detektieren.
Neben der Länge der PCR-Produkte waren für eine valide Minisequenzierung unabhängig vom ausgewählten DNA-Bereich die Methode der DNA-Extraktion und das Reinigungsverfahren für die einzusetzenden PCR-Produkte entscheidend. Am besten geeignet erschienen dabei DNA-Extrakte, die über beschichtete Magnetkugeln gewonnen wurden, bzw. PCR-Produkte, die vor der Minisequenzierung über Säulen gereinigt wurden.
SNPs lassen sich daher vor allem für die Analyse von biologischen Tatortspuren mit hoch degradierter DNA in der forensischen Genetik erfolgreich einsetzen.

6. Literatur

Alessandrini F, Turchi C, Onofri V, Buscemi L, Pesaresi M and Tagliabracci A (2005): Multiplex PCR Development of Y-chromosomal Biallelic Polymorphisms for Forensic Application. J Forensic Sci, 50 (3), 519 - 525

Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PEM, Ferreira ACS, Bandelt H-J, Pena SDJ, and Prado VF (2000): The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. Am J Hum Genet, 67, 444 - 461

Amorim A and Pereira L (2005): Pros and Cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs. Forensic Sci Int, 150, 17 - 21

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Snith AJH, Staden R and Young IG (1981): Sequence and organization of the huamn mitochondrial genome. Nature, 290 (5806), 457 - 465

Andrews RM, Kubacka I, Chinnery PF, Lightowlers RN, Turnbull DM and Howell N (1999): Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. Nat Genet, 23, 147

Bandelt H-J, Forster P, Sykes BC and Richards MB (1995): Mitochondrial Portraits of Human Populations Using Median Networks. Genetics, 141 (2), 743 - 753

Berger B, Hölzl G, Oberacher H, Niederstätter H, Huber CG, Parson W (2002): Single nucleotide polymorphism genotyping by on-line liquid chromatography-mass spectrometry in forensic science of the Y-chromosomal locus M9. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 782 (1 - 2), 89 - 97

Bini C and Pappalardo G (2005): mtDNA HVI length heteroplasmic profile in different tissues of maternally related members. Forensic Sci Int, 152, 35 – 38

Blumenfeld OO (2003): Blood group antigene mutation database. Available at: http://www.bioc.aecom.yu.edu/bgmut/index.php

Bogenhagen D and Clayton DA (1974): The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. J Biol Chem, 249, 7991 - 7995

Brandstätter A and Parson W (2003): Mitochondrial DNA heteroplasmy or artefacts – a matter of the amplification strategy? Int J Legal Med, 117, 180 - 184

Brandstätter A, Parsons TJ, Parson W (2003): Rapid screening of mtDNA coding region SNPs for the identification of west European Caucasian haplogroups. Int J Legal Med, 117, 291 - 298

Brandstätter A, Salas A, Niederstätter H, Gassner C, Carracedo A, Parson W (2006)a: Dissection of mitochondrial superhaplogroup H using coding region SNPs. Electrophoresis, 27 (13), 2541 -2550

Brandstätter A, Klein R, Duftner N, Wiegand P, Parson W (2006)b: Application of a quasi-median network analysis fort he visualization of character conflicts to a population sample of mitochondrial DNA control region sequences from southern Germany (Ulm). Int J Legal Med, 120 (5), 310 - 314

Brandstätter A, Niederstätter H, Pavlic M, Grubwieser P, Parson W (2007): Generating high-quality population data fort he EMPOP database – an overview of mtDNA sequencing, evaluation and validation processes considering 273 Austrian control region sequences as example. Forensic Sci Int, 166 (2 - 3), 164 - 175

Brinkmann B, Klintschar M, Neuhuber F, Hühne J and Rolf B (1998): Mutation Rate in Human Microsatellites: Influence of the Structure and Length of the Tandem Repeat. Am J Hum Genet, 62, 1408 - 1415

Brión M, Sobrino B, Blanco-Verea A, Lareu MV, Carracedo A (2004): Hierachical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations. Int J Legal Med, 119, 10 - 15

Brión M, Sanchez JJ, Balogh K, Thacker C, Blanco-Verea A, Børsting C, Stradmann-Bellinghausen B, Bogus M, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N (2005):Introduction of an single nucleodite polymorphism-based “Major Y-chromosome haplogroup typing kit” suitable for predicting the geographical origin of male lineages. Electrophoresis, 26, 4411 - 4420

Britten and Kohne (1968): Repeated Sequences in DNA. Science, 161 (3841), 529 - 540

Brookes AJ (1999): The essence of SNPs. Gene, 234, 177 - 186

Budowle B, Chakraborty R, Ciusti AM, Eisenberg AJ, Allen RC (1991): Analysis of the variable number of tandem reat locus D1S80 by the polymerase chain reaction followed by high resolution polyacrylamide gel electrophoresis. Am. J. Hum Genet, 48, 137 – 144

Budowle B, Allard MW, Wilson MR (2002): Critique of interpretation of high levels of heteroplasmy in the human mitochondrial DNA hypervariable region I from hair. Forensic Sci Int, 130 (1), 30 - 33

Butler JM and Levin BC (1998): Forensic applications of mitochondrial DNA. Trends Biotech, 16, 158 – 162

Butler JM (2003): Recent Developments in Y-Short Tandem Repeat and Y-Single Nucleotide Polymorphism Analysis. Forensic Science Review, 15 (2), 92 – 111

Butler JM, Shen Y and McCord BR (2003): The Development of Reduced Size STR Amplicons as Tools for Analysis of Degraded DNA. J Forensic Sci, 48 (5), 1054 - 1064

Butler JM (2005): Forensic DNA Typing. Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. 2th edition, Elsevier Academic Press, Burlington/ USA, 85 – 121

Cann RL, Stoneking M and Wilson AC (1987): Mitochondrial DNA and human evolution. Nature, 325, 31 - 36

Chen X, Livak KJ and Kwok P-Y (1998): A Homogeneous, Ligase-Mediated DNA Diagnostic Test. Genome Res, 9, 549 - 556

Chung DT, Drábek J, Opel KL, Butler JM and McCord BR (2004): A Study on the Effects of Degradation and Template Concentration on the Amplification Efficiency of the STR Miniplex Primer Sets. J Forensic Sci, 49 (4), 733 - 740

Collins FS, Brooks LD and Chakravarti A (1998): A DNA Polymorphism Dicovery Resource for Research on Human Genetic Variation. Genome Res, 8, 1229 - 1231

Dixon LA, Murray CM, Archer EJ, Dobbins AE, Koumi P, Gill P (2005): Validation of a 21-locus autosomal SNP multiplex for forensic identification purpose. Forensic Sci Int, 154 (1), 62 - 77

Dupuy BM, Andreassen R, Flønes AG, Tomassen K, Egeland T, Brion M, Carracedo A, Olaisen B (2001): Y-chromosome variation in a Norwegian population sample. Forensic Sci Int, 117, 163 – 173

Ferri G, Bini C, Ceccardi S, Pelotti S (2004): AB0 blood group genotyping of multiple single nucleotide polymorphisms using SNaPshot. In: Doutremépuich C and Morling N (eds), Prog Forensic Genet 10, Elsevier, Amsterdam, 556 - 558

Ferri G, Bini C, Ceccardi S, Ingravallo F, Lugaresi F, Pelotti S (2006): Minisequening-Based Genotyping of Duffy and AB0 Blood Groups for Forensisc Puposes. J Forensic Sci, 51 (2), 357 – 360

Friedlaender J, Schurr T, Gentz F, Koki G, Friedlaender F, Horvat G, Babb P, Cerchio S, Kaestle F, Schanfield M, Deka R, Yanagihara R and Meriwether DA (2005): Expanding Southwest Pacific Mitochondrial Haplogroups P and Q. Mol Biol Evol, 22 (6), 1506 - 1517

Geserick G, Wirth I, Strauch H (2001): 100 Jahre Forensische Serologie. Rechtsmedizin 11, 198 - 204

Gabriel MN, Calloway DC, Reynolds RL, Andelinović Š, Primorac D (2001): Population Variation of Human Mitochondrial DNA Hypervariale Regions I and II in 105 Croatian Individuals Demonstrated by Immobilized Sequence-specific Oligonucleotide Probe Analysis. Croat Med J, 42 (3), 328 - 335

Gabriel MN, Calloway DC, Reynolds RL, Primorac D (2003): Identification of Human Remains by Immobilized Sequence-specific Oligonucleotide Probe Analysis of mtDNA Hypervariable Regions I and II. Croat Med J, 44 (3), 293 – 298

Gassner C, Schmarda A, Nussbaumer W, and Schönitzer D (1996): AB0 Glycosyltransferase Genotyping by Polymerase Chain Reaction Using Sequence-Specific Primers. Blood, 88 (5), 1852 - 1856

Gibbs RA et al./ The International HapMap Consortium (2003): The International HpaMap Project. Nature 426, 789 - 796

Gilbert MTP, Haselkorn T, Bunce M, Sanchez JJ, Lucas SB, Jewell LD, Van Marck E, Worobey M (2007): The Isolation of Nucleic Acids from Fixed, Paraffin-Embedded Tissues – Which Mehtods Are Useful When? Public Library of Science One, 6, e537, 1 – 12

Gill P, Jeffreys AJ and Werret DJ (1985): Forensic application of DNA ‘fingerprints’. Nature, 318, 577 - 579

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

Gill P (2001): An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. Int J Legal Med 114 (4-5), 204 - 210

Gill P, Werrett DJ, Budowle B, Guerrieri R (2004): An assessment of wether SNPs will replace STRs in national DNA databases – joint considerations of the DNA working group of the European Natwork of Forensic Science Institutes (ENFSI) and the scientific working group on DNA analysis methods (SWGDAM). Sci Justice, 44, 51 – 53

Grignani P, Peloso G, Achilli A, Turchi C, Tagliabracci A, Alù M, Beduschi G, Ricci U, Giunti L, Robino C, Gino S, Previderè (2006): Subtyping mtDNA haplogroup H by SNaPshot minisequencing and its application in forensic individual identification. Int J Legal Med, 120, 151 – 156

Groß M (2003): Das Y-Chromosom: Scheidung auf genetisch. Nachrichten aus der Chemie (51), 1063 – 1064

Grubwieser P, Mühlmann R, Berger B, Niederstätter H, Pavlic M, Parson W (2006): A new „miniSTR-multiplex“ displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. Int J leg Med, 120 (2), 115 - 120

Grunnet N, Steffensen R, Bennett EP, Clausen H (1994): Evalutation of histo-blood group AB0 genotyping in a Danish population: frequency of a novel 0 allele defined as 02. Vox Sang, 67 (2), 210 - 215

Grzybowski T (2000): Extremely high levels of human mitochondrial DNA heteroplasmy in single hair roots. Electrophoresis, 21, 548 - 553

Hagelberg E (2003): Recombination or mutation rate heterogeneity? Implications for Mitochrondrial Eve. Trends Genet, 19 (2), 84 - 90

Hallensleben M, Heuft HG, Blasczyk R (1999): Molecular screening of the AB0-glycosyltransferase gene by primer walking. Infusionstherapie und Transfusionsmedizin, 26 (1), 29

Hammer MF (1995): A recent common ancestry for human Y chromosomes. Nature, 378, 376 - 378

Helgason A, Sigurdardóttir S, Gulcher JR, Ward R, and Stefánsson K (2000): mtDNA and the Origin of the Icelanders: Deciphering Signals of Recent Population History. Am J Hum Genet, 66, 999 - 1016

Helgason A, Hrafnkelsson B, Gulcher JR, Ward R, and Stefánsson K (2003): A Populationwide Coalescent Analysis of Icelandic Matrilineal and Patrilineal Genealogies: Evidence for a Faster Evolutionary Rate of mtDNA Lineages than Y Chromosomes. Am J Hum Genet, 72, 1370 - 1388

Herrin G (1996): A simplified amplification procedure for two regions of the glycosyt transferase (AB0 blood group) gene. J Forensic Sci, 41 (1), 138 – 141

Höss M, Jaruga P, Zastawny TH, Dizdaroglu M and Pääbo S (1996): DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. Nucleic Acids Res, 24 (7), 1304 - 1307

Holland PM, Abramson RD, Watson R, and Gelfand D (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5’ → 3’ exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA, 88, 7276 - 7280

Hühne J, Pfeiffer H, Brinkmann B (1998): Heteroplasmic substitutions in the mitochondrial DNA control region in mother and child samples. Int J Legal Med, 112, 27 - 30

Hummel S, Schmidt D, Kahle M, Herrmann B (2002): AB0 blood group genotyping of ancient DNA by PCR-RFLP. Int J Legal Med, 116, 327 - 333

Hussain J, Gill P, Long A, Dixon L, Hinton K, Hughes J, Tully G (2003): Rapid preparation of SNP multiplexes utilising universal reporter primers and their detection by gel electrophoresis and microfabricated arrays. In: Brinkmann B and Carracedo A, Prog Forensic Genet 9, Elsevier, Amsterdam, 5 - 8

Ivanov PL, Wadhams MJ, Roby RK, Holland MM, Weedn VW and Parsons TJ (1996): Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke Russia Gerorgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II. Nat Genet, 12, 417 - 420

Izagirre N and de la Rúa C (1999): An mtDNA Analysis in Ancient Basque Populations: Implications for Haplogroup V as a Marker for a Major Paleolithic Expansion from Southwestern Europe. Am J Hum Genet, 65, 199 - 207

Jeffreys AJ and Pena SDJ (1993): Brief introduction to human DNA fingerprinting. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT and Jeffreys AJ (eds), DNA Fingerprinting: State of the Science, Birkhäuser Verlag: Basel, 1 – 20

Jobling MA and Tyler-Smith C (1995): Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. Trends Genet, 11 (11), 449 – 456

Jobling MA and Tyler-Smith C (2003): The human Y chromosome: An evolutionary marker comes of age. Nat Rev Genet, 4 (8), 598 - 612

Jobling MA and Gill P (2004): Encoded evidence: DNA in forensic analysis. Nat Rev Genet, 5, 739 - 751

Juvonen V, Huoponen K, Syvänen A-C, Nikoskelainen E, Savontaus M-L (1994): Quantification of point mutations associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy by solid-phase minisequencing. Hum Genet, 93, 16 - 20

Kaessmann H, Zöllner S, Gustafsson AC, Wiebe V, Laan M, Lundeberg J, Uhlén M and Pääbo S (2002): Extensive Linkage Disequilibrium in Small Human Populations in Eurasia. Am J Hum Genet, 70, 673 - 685

Kayser M, Lao O, Anslinger K, Augustin C, Bargel G, Edelmann J, Elias S, Heinrich M, Henke J, Henke L, Hohoff C, Illing A, Jonkisz A, Kuzniar P, Lebioda A, Lessig R, Lewicki S, Maciejewska A, Monies DM, Pawloski R, PoetschM, Schmid D, Schmidt U, Schneider PM, Stradmann-Bellinghausen B, Szibor R, Wegener R, Wozniak M, Zoledziewska M, Roewer L, Dobosz T and Ploski R (2005): Significant genetic differentiation between Poland and Germany follows present-day political bordders, as revealed by Y-chromosome analysis. Hum Gen, 117 (5), 428 - 443

Kraytsberg Y, Schwartz M, Brown TA, Ebralidse K, Kunz WS, Clayton DA, Vissing J, Khrapko K (2004): Recombination of Human Mitochondrial DNA. Science, 304, 981

Kruglyak L and Nickerson DA (2001): Variation is the spice of life. Nat Genet, 27, 234 - 236

Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C and Sninsky JJ (1990): Effects of primer – template mismatches on the polymerase chain reaction: Human immunodeficiency virus type 1 model studies. Nucleic Acids Res, 18 (4), 999 - 1005

Ladd C, Bourke MT, Scherczinger CA, Pagliaro EM, Gaensslen RE and Lee HC (1996): A PCR-Based Strategy for AB0 Genotype Determination.
J Forensic Sci, 41 (1), 134 - 137

Lagerström-Fermér M, Olsson C, Forsgren L, and Syvänen A-C (2001): Heteroplasmy of the Human mtDNA Control Region Remains Constant during Life. Am J Hum Genet, 68, 1299 - 1301

Landegren U, Kaiser R, Snders J, Hood L (1988): A Ligase-Mediated Gene Detection Technique. Science, 241, 1077 - 1080

Landsteiner K (1901): Ueber Agglutionationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. Wien Klin Wochenschr 14, 1132 - 1134

Lareu M, Puente J, Sobrino B, Quintáns, Brión, Carracedo A (2001): The use of the LightCycler for the detection of Y chormosome SNPs. Forensic Sci Int, 118, 163 - 168

Latorra D, Arar K, Hurley JM (2003): Design considerations and effects of LNA in PCR primers. Mol Cell Probes, 17, 253 - 259

Lee JC-I and Chang J-G (1992): AB0 Genotyping by Polymerase Chain Reaction. J Forensic Sci, 37 (5), 1269 – 1275

Lee JC-I, Tsai L-C, Chen C-H, Chang J-G (1996): AB0 genotyping by mutagenically separated polymerase chain reaction. Forensic Sci Int, 82 (3), 227 - 232

Lessig R, Willuweit S, Krawczak M, Wu FC, Pu CE, Kim W, Henke L, Henke J, Miranda J, Hidding M, Benecke M, Schmitt C, Magno M, Calacal G, Delfin FC, de Ungria MC, Elias S, Augustin C, Tun Z, Honda K, Kayser M, Gusmaõ L, Amorim A, Alves C, Hou Y, Keyser C, Ludes B, Klintschar M, Immel UD, Reichenpfader B, Zaharova B, Roewer L (2003): Asian online Y-STR Haplotype Reference Database. Leg Med (Tokyo), 5 Suppl 1, 160 - 163

Lessig R, Zoledziewska M, Fahr K, Edelmann J, Kostrzewa M, Dobosz T, Kleemann WJ (2005): Y-SNP-genotyping – a new approach in forensic analysis. Forensic Sci Int, 154, 128 - 136

Levo A, Koski A, Ojanperä I, Vuori E, Sajantila A (2003): Post-mortem SNP analysis of *CYP2D6* gene reveals correlation between genotype and opioid drug (tramadol) metabolite ratios in blood. Forensic Sci Int, 135 (1), 9 - 15

Li J, Butler JM, Tan Y, Lin H, Royer S, Ohler L, Shaler TA, Hunter JM, Pollart DJ, Monforte JA, Becker CH (1999): Single nucleotide polymorphisms determination using primer extension and time-of-flight mass spectrometry. Eletrophoresis, 20, 1258 - 1265

Lindahl T (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature, 362, 709 - 715

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

Lyamichev V, Mast AL, Hall JG, Prudent JR, Kaiser MW, Takova T, Kwiatkowski RW, Sander TJ, de Arruda M, Arco DA, Neri BP and Brow MAD (1999): Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. Nat Biotechnol, 17 (3), 292 – 296

Macaulay V, Richards M, Hickery E, Vega E, Cruciani F, Guida V, Scozzari R, Bonné-Tamir B, Sykes B and Torroni A (1999): The Emerging Tree of West Eurasian mtDNAs: A Synthesis of Control-Region Sequences and RFLPs. Am J Hum Genet, 64, 232 - 249

Marth G, Yeh R, Minton M, Donaldson R, Li Q, Duan S, Davenport R, Miller RD & Kwok P-Y (2001): Single-nucleotide polymorphisms in the public domain: how useful are they? Nat Genet 27, 371 - 372

Morley JM, Bark JE, Evans CE, Perry JG, Hewitt CA, Tully G (1999): Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. Int J Legal Med, 112, 241 - 248

Müller TH, Hallensleben M, Schunter F, Blasczyk R (2001): Molekulargenetische Blutgruppendiagnostik. Grundlagen und klinische Anwendungen. Dt. Ärzteblatt, 98 (6), 317-322

Müller K, Klein R, Miltner E, Wigand P (2007): Improved STR typing of telogen hair root and hair shaft DNA. Electrophoresis, in press

Nachmann MW and Corwell SL (2000): Estimate of the Mutation Rate per Nucleotide in Humans. Genetics, 156 (1), 297 - 304

Nasidze I, Ling EYS, Quinque D, Dupanloup I, Cordaux R, Rychkov S, Naumova O, Zhukova O, Sarraf-Zadegan N, Naderi GA, Asgary S, Sardas S, Farhud DD, Sarkisian T, Asadov C, Kerimov A and Stoneking M (2004): Mitochondrial DNA and Y-Chromosome Variantion in the Caucasus. Ann Hum Genet, 68, 205 - 221

Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF (1989): Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS), Nucleic Acids Res, 17, 1077 - 1082

Nollau P and Wagener C (1997): Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques, Clin Chem, 43 (7), 1114 - 1128

Olsson ML and Chester MA (1996): Frequent Occurence of a Variant 0^1 Gene at the Blood Group AB0 Locus. Vox Sang, 70, 26 – 30

Onofri V, Alessandrini F, Turchi C, Pesaresi M, Buscemi L, Tagliabracci A (2006): Development of multiplex PCRs for evolutionary and forensic applications of 37 human Y chromosome SNPs. Forensic Sci Int, 157, 23 - 35

Oberacher H, Niederstätter H, Parson W (2007): Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry for simultaneous detection of mtDNA length and nucleotide polymorphisms. Int J Legal Med, 121, 57 - 67

Oota H, Settheetham-Ishida W, Tiwawech D, Ishida T and Stoneking M (2001): Human mtDNA and Y-chomosome variation is correlated with matrilocal versus patrilocal residence. Nat Genet, 29, 20 - 21

Paneto GG, Martins JA, Longo LVG, Pereira GA, Freschi A, Alvarenga VLS, Chen B, Oliveira RN, Hirata MH, Cicarelli RMB (2007): Heteroplasmy in hair: Differences among hair and blood from the same individuals are still a matter of debate. Forensic Sci Int, in press

Parson W, Parsons TJ, Scheithauer R, Holland MM (1998): Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. Int J Legal Med, 111 (3), 124 - 132

Parson W, Brandstätter A, Alonso A, Brandt N, Brinkmann B, Carracedo A and others (2004)a: The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organisation, results and perspectives. Forensic Sci Int 139 (2-3), 215 – 226

Parson W, Brandstätter A, Pircher M, Steinlechner M, Scheithauer R (2004)b: EMPOP – The EDNAP mtDNA population database concept for a new generation, high-quality mtDNA database. In: Doutremépuich C and Morling N (eds), Prog Forensic Genet 10, Elsevier, Amsterdam, 106 - 108

Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson MR, Berry DL, Holland KA, Weedn VW, Gill P & Holland MM (1997): A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. Nat Genet, 15, 363 - 368

Pastinen T, Partanen J, Syvänen A-C (1996): Multiplex, fluorescent, solid-phase minisequencing for efficient screening of DNA sequence variation. Clin Chem, 42 (9); 1391 - 1397

Patenaude SI, Seto NOL, Borisova SN, Szpacenko A, Marcus SL, Palcic MM and Evans SV (2002): The structural basis for specificity in human AB0(H) blood group biosynthesis. Nat Struct Biol, 9 (9), 685 - 690

Pfeiffer H, Ortmann C and Brinkmann B (2002): Immunohistochemical detection of an AB0-incompatible blood transfusion in formalin-fixed tissue. Int J Legal Med, 116, 33 – 35

Philipps C, Lareu V, Salas A, Carracedo A (2004): Nonbinary single-nucleotide polymorphism markers. Doutremépuich C and Morling N (eds), Prog Forensic Genet 10, Elsevier, Amsterdam, 27 - 29

Piercy R, Sullivan KM, Benson N, and Gill P (1993): The application of mitochondrial DNA typing ot the study of white Caucasian genetic identification. Int J Legal Med, 106, 85 - 90

Poinar H (2002): The gentic secrets some fossils hold. Acc Chem Res, 35, 676 - 684

Quintáns B, Álvarez-Iglesias V, Salas A, Phillips C, Lareu MV, Carracedo A (2004): Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. Forensic Sci Int, 140, 251 - 257

Raitio M, Lindroos K, Laukkanen M, Pastinen T, Sistonen P, Sajantila A, Syvanen AC (2001): Y-chromosomal SNPs in Finno-Ugric-speaking populations analysed by minsequencing on microarrays. Genome Res 11: 471-482

Reich DE, Cargill M, Bolk S, Ireland J, Sabeti PC, Richter DJ, Lavery T, Kouyoumjian R, Farhadlan SF, Ward R and Lander ES (2001): Linkage disequilibrium in the human genome. Nature, 411(6834), 199 - 204

Ribeiro RA and Lovato MB (2007): Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. Genet Mol Res, 6 (1), 173 – 187

Richards M, Macaulay VA, Bandelt H-J, Sykes BC (1998): Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. Ann Hum Genet, 62, 241 - 260

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

Ringel PF, Weiler G, Bein G (2000): Errrors in AB0 typing of blood stains using PCR. Int J Legal Med, 113, 352 - 355

Roewer L, Krawczak M, Willuweit S, Nagy M, Alves C, Amorim A, Anslinger K, Augustin C, Betz A, Bosch E, Cagliá A, Carracedo A, Corach D, Dekairell A-F, Dobosz T, Dupuy BM, Füredi S, Gehrig C, Gusmaõ L, Henke J, Henke L, Hidding M, Hohoff C, Hoste B, Jobling MA, Kärgel HJ, de Knijff P, Lessig R, Liebeherr E, Lorente M, Martínez-Jarrreta B, Nievas P, Nowak M, Parson W, Pascali VL, Penacino G, Ploski P, Rolf B, Sala A, Schmidt U, Schmitt C, Schneider PM, Szibor R, Teifel-Greding J, Kayser M (2001): Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes. Forensic Sci Int, 118, 106 - 113

Sachidanandam R et al./ The international SNP Map Working Group (2001): A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature, 409, 928 - 933

Salas A, Richards M, De la Fe T, Lareu M-V, Sobrino B, Sánchez-Diz P, Macaulay V, Carracedo Á (2002): The Making of the African mtDNA Landscape. Am J Hum Genet, 71, 1082 - 1111

Sanchez JJ, Børsting C, Hallenberg C, Buchard A, Hernandez A, Morling N (2003): Multiplex PCR and minisequencing of SNPs—a model with 35 Y chromosome SNPs. Forensic Sci Int, 137: 74–84

Sanchez JJ, Brión M, Parson W, Blanco-Verea AJ, Børsting C, Lareu M, Niederstätter H, Oberacher H, Morling N, Carracedo A (2004): Duplications of the Y-chromosome specific loci P25 and 92R7 and forensic implications. Forensic Sci Int, 140, 241 - 250

Sanchez JJ, Phillips C, Børsting C, Balogh K, Bogus M, Fondevila M, Harrison CD, Musgrave-Brown E, Salas A, Syndercombe-Court D, Schneider PM, Carracedo A, Morling N (2006): A multiplex assay with 52 single nucleotide polymorphisms for human identification. Electrophoresis, 27, 1713 - 1724

Santos C, Montiel R, Anglés N, Lima M, Francalacci P, Malgosa A, Abade A, and Aluja MP (2004): Determination of Human Caucasian Mitochondrial DNA Haplogroups by Means of a Hierarchical Approach. Hum Biol, 76 (3), 431 - 453

Sato A, Nakada K, Akimoto M, Ishikawa K, Ono T, Shitara H, Yonekawa H and Hayashi J-I (2005): Rare creation of recombinant mtDNA haplotypes in mammalian tissues. Proc Natl Acad Sci USA, 102 (17), 6057 - 6062

Schacker U, Schneider PM and Zapata M (1995): AB0 Genotyping With PCR. In: Carracedo A, Brinkmann B and Bär W (eds), Advances in Forensic Haemogenetics 6, Springer Verlag, 416 - 417

Schell D, Klein R, Miltner E, Wiegand P (2006): Multiplex typing with 5 Y-chromosomal SNPs. In: Amorim A, Corte-Real F, Morling N (eds), Prog Forensic Genet 11, Elsevier, Amsterdam, 22 - 24

Schmitt C, Schmutzler A, Prinz M, Staak M (1994): High sensitive DNA typing approaches fort he analysis of forensic evidence: comparison of nested variable number of tandem repeats (VNTR) amplification and a short tandem reapeats (STR) polymorphism. Forensic Sci Int, 66, 129 – 141

Schwartz M and Vissing J (2002): Paternal inheritance of mitochondrial DNA. N Engl J Med, 347 (8), 576 - 580

Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A, Burkhart & Blasczyk R (2003)a: Systematic analysis of the AB0 gene diversity within exons 6 and 7 by PCR screening reveals new AB0 alleles. Transfusion 43 (4), 428

Seltsam A, Hallensleben M, Kollmann A and Blasczyk R (2003)b: The nature of diversity and diversification at the *AB0* locus. Transfusion Medicine, Blood, 102 (8), 3035 - 3042

Shibutani S, Takeshita M and Grollman AP (1997): Translesional Synthesis on DNA Templates Containing a Single Abasic Site. J Biol Chem, 272 (21), 13916 - 13922

Shriver MD and Kittles RA (2004): Genetic ancestry and the search for personalized genetic histories. Nat Genet Rev 5: 611-618.

Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier LD, Brown LG, Pepping S, Pyntikova T, All J, BieriT, Chinwalla A, Delehaunty A, Delehaunty K, Du H, Fewell G, Fulton L, Fulton R, Graves T, Hou S-F, Latrielle P, Leonard S, Mardis E, Maupin R, McPherson J, Miner T, Nash W, Nguyen C, Ozersky P, Pepin K, Rock S, Rohlfing T, Scott K, Schultz B, Strong C, Tin-Wollam A, Yang S-P, Waterston RH, Wilson RK, Rozen S and Page DC (2003): The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature 423, 825 -837

Sobrino B, Brión M, Carracedo A (2005): SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. Forensic Sci Int, 154, 181 – 194

Strachan T and Read AP (1996): Multigenfamilien und repetitive DNA beim Menschen. In: Molekulare Humangenetik, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 217 - 240

Strauss BS (1991): The ‘A rule’ of Mutagen Specificity: a Consequence of DNA Polymerase Bypass of Non-Intructional Lesions? Bioessays, 13 (2), 79 – 84

Strauss BS (2002): The “A” rule revisited: polymerases as determinants of mutational specificity. DNA Repair, 1 (2), 125 - 135

Strerath M, Gaster J, Summerer D, Marx A (2004): Increased Single-Nucleotide Discrimination of PCR by Primer Probes Bearing Hydrophobic 4’C Modifications. Chem Bio Chem, 5, 333 - 339

Su B, Xiao J, Underhill P, Deka R, Zhang W, Akey J, Huang W, Shen D, Lu D, Luo J, Chu J, Tan J, Shen P, Davis R, Cavalli-Sforza L, Chakraborty R, Xiong M, Du R, Oefner P, Chen Z, and Jin L (1999): Y-Chromosome Evidence for a Northward Migration of Modern Humans into Eastern Asia during the Last Ice Age. Am J Hum Genet, 65, 1618 - 1624

Sullivan KM, Hopgood R, Gill P (1992): Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. Int J Legal Med, 105 (2), 83 - 86

Sullivan KM, Alliston-Greiner R, Archampong FIA, Piercy R, Tully G, Gill P, and Lloyd-Davies C (1996): A Single Difference in MtDNA Control Region Sequence Observed Between Hair Shaft and Reference Samples from a Single Donor. 7th International Symposium on Human Identification – 1996, Genetic Identity Conference Proceedings, Promega, Madison/USA.

Syvänen A-C (2001): Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. Nat Rev Genet, 2, 930 - 942

Tautz D (1993): Notes on definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT and Jeffreys AJ (eds), DNA Fingerprinting: State of the Science, 21 – 28, Birkhäuser Verlag Basel

Torroni A, Huoponen K, Francalacci P, Petrozzi M, Morelli L, Scozzari R, Obinu D, Savontaus M-L and Wallace DC (1996): Classification of European mtDNAs From an Analysis of Three European Populations. Genetics, 144, 1835 – 1850

Torroni A, Bandelt H-J, D’Urbano L, Lahermo P, Moral P, Sellitto D, Rengo C, Forster P, Savontaus M-L, Bonné-Tamir B, and Scozzari R (1998): mtDNA Analysis Reveals a Major Late Paleolithic Population Expansion from Southwestern to Northeastern Europe. Am J Hum Genet, 62, 1137 - 1152

Tully G, Sullivan KM, Nixon P, Stones RE, Gill P (1996): Rapid detection of mitochondrial sequence polymorphisms using multiplex solid-phase fluorescent minisequencing. Genomics, 15, 107 - 113

Tyagi S and Kramer FR (1996): Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. Nat Biotechnol, 14 (3), 303 - 308

Underhill PA, Shen P, Lin AA, Jin L, Passarino G, Yang WH, Kauffman E, Bonne-Tamir B et al. (2000): Y chromosome sequence variation and the history of human populations. Nat Genet, 26, 358-361

Urquhart A, Kimpton CP, Downes FJ, Gill P (1994): Variation in short tandem repeat sequences – a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic idenification markers. Int J Legal Med, 107 (1), 13 – 20

Vallone PM and Butler JM (2004a): AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. BioTechniques 37: 226 – 231
Vallone PM and Butler JM (2004b): Y-SNP Typing of U.S. African American and Caucasian Samples Using Allele-Specific Hybridization and Primer Extension. J Forensic Sci, 49 (4), 723 – 732

Vallone PM, Just RS, Coble MD, Butler JM, Parsons TJ (2004a): A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. Int J Legal Med, 118, 147 - 157

Vallone PM, Decker AE, Butler JM (2005): Allele frequencies for 70 autosomal SNP loci with U.S. Caucasian, African-American, and Hispanic samples. Forensic Sci Int, 149, 279 – 286

Villa A, Drago F, Mistò R, Morelati F, Poli F, Sirchia G (1996): AB0 Genotyping in italian blood donors. Haematologica (81), 492 - 496

Venter JC et al (2001): The Human Genome. Science, 291, 1304 - 1351

Walsh PS, Erlich HA, and Higuchi R (1992): Preferential PCR Amplification of Alleles: Mechanisms and Solutions. PCR Methods Appl, 1 (4), 241 – 250

Watanabe, G, Umetsu, K, Yuasa, I and Suzuki, T (1997): Amplified product length polymorphism (APLP): a novel strategy for genotyping the AB0 blood group. Hum Gen, 99: 34 - 37

Watanabe G, Umetsu K, Sato M, Sakabe M, Naito E, Yamanouchi H, Suzuki T (2001): A novel technique for detecting single nucleotide polymorphisms by analyzing consumed allelespecific primers. Electrophoresis, 22, 418 - 420

Wiegand P and Kleiber M (2001): Less is more--length reduction of STR amplicons using redesigned primers. Int J Legal Med, 114 (4 – 5), 285 - 287

Wiegand P, Klein R, Braunschweiger G, Hohoff C, Brinkmann B (2006): Short amplicon STR multiplex for stain typing. Int J Legal Med, 120: 160 - 164
Wilson MR, Polanskey D, Replogle J, DiZinno JA, Budowle B (1997): A family exhibiting heteroplasmy in the human mitochrondrial DNA control region reveals both somatic mosaicism and pronounced segregation of mitotypes. Hum Genet, 100 (2), 167 - 171

The Y Chromosome Consortium (2002): A Nomenclature Systems for the Tree of Human Y-Chromosomal Binary Haplogroups. Genome Res, 12, 339 - 348

Yamada M, Yamamoto Y, Tanegashima A, Kane M, Ikehara Y, Fukunaga T, Nishi K (1994): Determination of AB0 genotypes with DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. Int J Legal Med, 106, 285 - 287

Yamamoto F-I, Clausen H, White T, Marken J & Hakamori S-I (1990): Molecular genetic basis of the histo-blood group AB0 system. Nature, 345, 229 – 233

Yip SP (2000): Single-tube multiplex PCR-SSCP analysis distinguishes 7 commom AB0 alleles and readily identifies new alleles. Blood, 95 (4), 1487-1492

Zerjal T, Dashnyam B, Pandya A, Kayser M, Roewer L, Santos FR, Schiefenhövel W, Fretwell N, Joblin MA, HariharaS, Shimizu K, Semjidmaa D, Sajantila A, Salo P, Crawford MH, Ginter EK, Evgrafov OV, Tyler-Smith C (1997): Genetic relationship of Asians and northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis. Am J Hum Genet, 60, 1174 – 1183

7. Anhang

7.1 Tabellen der PCR- und Minisequenzierungs-*Primer*

7.1.1 PCR-*Primer* für AB0-Blutgruppen-Gen SNPs:

Primer	Länge	Sequenz
AB0Exon6 forward	21 b	5‘-TAT GAC CGC ACG CCT CTC TCC-3‘
AB0Exon6 forward2	20 b	5’-GCA CGC CTC TCT CCA TGT GC-3’
AB0Exon6 reverse	22 b	5’-TCT ACC CTC GGC CAC CTC ACT G-3’
AB0Exon6 reverse2	20 b	5’-CAA TGG TGG GTT CTG GAG CC-3’
AB0Exon7 forward	21 b	5’-CGG CTC CCC CAG CCC CCG TCC-3’
AB0Exon7 forward2	20 b	5’-TCC CCC ATC GCT GGG AAG AG-3’
AB0Exon7 forward3	20 b	5’-CCC CAT CGC TGG GAA GAG GA-3’
AB0Exon7 forward4	20 b	5’-ACC TGG TGT GCG TGG ACG TG-3’
AB0Exon7 forward5	20 b	5’-CCG TCC TGA GGA AGC TGA GG-3’
AB0Exon7 reverse	21 b	5’-CAG AGC CCC TGG CAG CCG CTG-3’
AB0Exon7 reverse2	20 b	5’-CGG ACC GCC TGG TGG TTC TT-3’
AB0Exon7 reverse3	21 b	5’-GGA CGG ACA AAG GAA ACA GAG-3’
AB0Exon7 reverse4	21 b	5’-AGT ACT CGG GGG AGA GCA CC-3’
AB0Exon7 reverse5	23 b	5’-AGT TTA CCC GTT CTG CTA AAA CC-3’

7.1.2 Minisequenzierungs-*Primer* für AB0-Blutgruppen-Gen SNPs:

Primer	Länge	Sequenz
AB0261	39 b	5‘-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAG GAA GGA TGT CCT CGT GGT-3‘
AB0297	48 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GGC TCC CAT TGT CTG GGA GGG CAC-3’
AB0703	49 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAC TCC GCT GTT CGG CAC CCT GCA CCC C-3’
AB0796	54 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT CCC CAA GGA CGA GGG CGA TTT CTA-3’
AB0802	59 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA AGG ACG AGG GCG ATT TCT ACT ACC TGG GG-3’
AB0802-2	59 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT GAC GTG GAG AAC GTG GCT GGG GGG CTT CTT GG-3’
AB0803	59 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAA GGA

Primer	Länge	Sequenz
		CGA GGG CGA TTT CTA CTA CCT GGG GG-3’
AB0803-2	62 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TAA GGA CGA GGG CGA TTT CTA CTA CCT GGG GG -3’
AB0803-3	62 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGG CAC GTG GAG AAC GTG GCT GGG GGG CTT CTT GG-3’
AB01060	63 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGC CCA AGA ACG ACC AGG CGG TCC GGA ACC-3’
AB01060-2	66 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TGC CCA AGA ACC ACC AGG CGG TCC GGA ACC-3’
AB01060-3	66 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTG TCG GGA GGG TCT CGG GGA CCG TCG GCG AGT GCC-3’

7.1.3 PCR-*Primer* für mtDNA-SNPs:

Primer	Länge	Sequenz
L16048	19 b	5‘-TCA TGG GAA GCA GAT TTG G-3‘
H16332	23 b	5‘-GGA TTT GAC TGT AAT GTG CTA TG-3‘
L00066	21 b	5‘-TGC ATT TGG TAT TTT CGT CTG-3‘
H00326	22 b	5‘-CAG AGA TGT GTT TAA GTG CTG T-3‘
L15997	20 b	5‘-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3‘
H00580	20 b	5‘-TTG AGG AGG TAA GCT ACA TA-3‘

7.1.4 Minisequenzierungs-*Primer* für mtDNA-SNPs:

Primer	Länge	Sequenz
H00074	37 b	5‘-TTT TTT TTT CCA GCG TCT CGC AAT GCT ATC GCG TGC A-3‘
H00153	48 b	5‘-TTT TTT TTT TTT TTT TCT GTA ATA TTG AAC GTA GGT GCG ATA AAT AAT-3‘
H00248	54 b	5‘-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTC TGT GTG GAA AGT GGC TGT GCA GAC ATT-3‘
H00303	31 b	5‘-GTC GTG TGG CCA GAA GCG GGG GGA GGG GGG G-3‘
H16070	42 b	5‘-TTT TTT TTT TTT TTT TTA AAT ACA TAG CGG TTG TTG ATG GGT-3‘

H16224	56 b	5‘-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTG GAG TTG CAG TTG ATG TGT GAT AGT TG-3‘
H16312	38 b	5’-TTT TTT TTT TGT GCT ATG TAC GGT AAA TGG CTT TAT GT-3’

7.1.5 PCR-*Primer* für Y-chromosomale SNPs:

Primer	Länge	Sequenz
M2-P1= sY81-P1	20 b	5‘-AGG CAC TGG TCA GAA TGA AG-3‘
M2-P2 = sY81-P2	20 b	5’-AAT GGA AAA TAC AGC TCC CC-3’
M9-P1	21 b	5’-GCA GCA TAT AAA ACT TTC AGG-3’
M9-P2	21 b	5’-AAA ACC TAA CTT TGC TCA AGC-3’
M9forward2	22 b	5’-AGG ACC CTG AAA TAC AGA ACT G-3’
M9reverse2	26 b	5’-AAA TAT TTC AAC ATT TCA CAA AGG AA-3’
M17forward	22 b	5’-CCT GGT CAT AAC ACT GGA AAT C-3’
M17reverse	23 b	5’-AGC TGA CCA CAA ACT GAT GTA GA-3’
M45-P1	20 b	5’-GCT GGC AAG ACA CTT CTG AG-3’
M45-P2	21 b	5’-AAT AT TTC CTG ACA CCT TCC-3’
M45forward2	26 b	5’-GAG AGA GGA TAT CAA AAA TTG GCA GT-3’
M45reverse2	20 b	5’-TGA CAG TGG CAC CAA AGG TC-3’
M46-P1 = FF Tat1	22 b	5’-GAC TCT GAG TGT AGA CTT GTG A-3’
M46-P2 = Rev Tat3	22b	5’-GAA GGT GCC TA AAA GTG TGA A-3’
M89-P1	22 b	5’-AGA AGC AGA TTG ATG TCC CAC T-3’
M89-P2	21 b	5’-TCC AGT TAG GAG ATC CCC TCA-3’
M170forward	34 b	5’-CAG CTC TTA TTA AGT TAT GTT TTC ATA TTC TGT G-3’
M170reverse	26 b	5’-GTC CTC ATT TTA CAG TGA GAC ACA AC-3’
M173forward	26 b	5’-TTT TCT TAC AAT TCA AGG GCA TTT AG-3’
M173reverse	25 b	5’-CTG AAA ACA AAA CAC TGG CTT ATC A-3’
SRY-1532-P1	22 b	5’-TCC TTA GCA ACC ATT AAT CTG G-3’
SRY-1532-P2	23 b	5’-ATA GCA AAA AAT GAC ACA AGG CA-3’
SRY-2627-P1	22 b	5’-GAA CTC CTT TAC TGG GGT GAT G-3’
SRY-2627-P2	22 b	5’-ATA CGT GAT GGT GAC TGA ACA G-3’

7.1.6 Minisequenzierungs-*Primer* für Y-chromosomale SNPs:

Primer	Länge	Sequenz
M2, Oligo1	42b	5‘-AAT GGA AAA TAC AGC TCC CCC CTT ATA CCT CCA CAG ATC TCA-3‘
M2, Oligo2	42b	5‘-$(T)_{18}$TTC CTT TAT CCT CCA CAG ATC TCA-3‘
M9, Oligo1	65b	5'-TTA CAT AAC TAA GTA TGT AAG ACA TTG AAC GTT TGA ACA TGT CTA AAT TAA AGA AAA ATA AAG AG-3‘
M9-Oligo-Pigtail = M9, Oligo2	56b	5‘-GTT TCT TGT TTC TTG TTT CTT GTT TCT TCA TGT CTA AAT TAA AGA AAA ATA AAG AG-3‘
M9, Oligo3	58 b	5'-$(T)_{30}$GTA CAG ATT TAA TTT CTT TTT ATT TCT C-3‘
M9, Oligo4	59 b	5‘-AAC TAA GTA TGT AAG ACA TTG AAC GTT TGA ACA TGT CTA AAT TAA AGA AAA ATA AAG AG-3‘
M17f5 Oligo	48 b	5‘-TGA TTT GAT CTG GTG AAT TGT TTG GGG TTT TAA GTG AAT TTT TTT GGG-3‘
M17rev2 Oligo	48 b	5‘-TGC CAC GTC GTG AAA GTC TGA CAA CCC AAA ATT CAC TTA AAA AAA CCC-3‘
M17r3	48 b	5’-TGC CAC GTC GTG AAA GTC TGA CAA AAA CAC CAA CGA CCA ACA ATG CCC-3’
M17r4	48 b	5’-CCC CCC CCA GGA AAC AGC TAT GAC AAA CAC CAA CGA CCA ACA ATG CCC-3’
M45, Oligo1	60 b	5'-GTT TGT TTG TTT CTT AAA TCC TAC TAT CTC CTG GCC TGG ACC TCA GAA GGA GCT TTT TGC-3‘
M45, Oligo 2	39b	5'-$(T)_{18}$ACC TCA GAA GGA GCT TTT TGC-3‘
M46, Oligo1	42b	5‘-CCT TCT CTC TTG CTG TGC TCT GAA ATA TTA AAT TAA AAC AAC-3‘
M89, Oligo1	55b	5‘-CTT TGG GTC CAG GAT CAC CAG CAA AGG TAG CTG CAA CTC AGG CAA AGT GAG AGA T-3‘
M89, Oligo2	45 b	5‘-$(T)_{24}$AAC TCA GGC AAA GTG AGA GAT-3‘
M89/3	55 b	5’-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT AGG TAG CTG CAA CTC AGG CAA AGT GAG AGA T-3’
M170f9	52 b	5‘-CCC CCC CAA CTC ACT AAA CTA GGT GCC ACG TCC TAC TTA AAA ATC ATT GTT C-3‘
M170rev2	52 b	5‘-TTG TCA GAC TTT CAC GAC GTG GCA CCT AGT GTT GTT GGG TGT GAC TTT TTT T-3‘
M173f7	58 b	5‘-CCC CCC GAT CCA CGC AGC AGC AGC ACT TTC ATT TCT ACA ATT CAA GGG CAT TTA GAA C-3‘
M173f8	56 b	5‘-CCC CGA TCC ACG CAG CAG CAG CAC TTT CAT TTC TAC AAT TCA AGG GCA TTT AGA AC-3‘
M173rev3	58 b	5‘-TTG TCA GAC TTT CAC GAC GTG GCA CCT AGT TTA GTG ACT TAT AAT TGT CTA CTG TTT C-3‘
SRY1532, Oligo3	33 b	5‘-TCT GGC CTC TTG TAT CTG ACT TTT TCA CAC AGT-3‘

Primer	Länge	Sequenz
SRY1532, Oligo5	24 b	5‘-TTG TAT CTG ACT TTT TCA CAC AGT-3‘
SRY1532, Oligo6	42 b	5‘-TTG ACT GTG TTC CGT GGT GTA TCC ACT TGG AAC TTT TAC AAT-3‘
SRY2627, Oligo1	50 b	5‘-TAC CAG CTT CAG CCG CTT CAC CCT GTA GGG CAT GGG GCT TCA CCC TGT GG-3‘
SRY2627, Oligo2	50 b	5‘-$(T)_{27}$ TGG CAT GGG GCT TCA CCC TGT GG-3‘

Danksagung

An dieser Stelle danke ich herzlich Herrn PD Dr. Peter Wiegand und Herrn Prof. Dr. Miltner für die Überlassung des Dissertationsthemas, ihre Betreuung sowie meine Arbeitsstelle.
Herrn Prof. Dr. Flegel danke ich für die zur Verfügung gestellte DNA-Probe mit der AB0-Blutgruppen-Typisierung 0_2B.
Allen Leuten aus dem DNA-Labor Elke, Karin, Kathrin und vor allem Simone möchte ich für die angenehme und herzliche Arbeitsatmosphäre während meiner Arbeit danken. Zudem danke ich Simone für die gute Zusammenarbeit in meiner ersten Zeit in Ulm und die unvergesslichen Einblicke in den Ulmer Fasching.
Außerdem danke ich unseren medizinischen Doktorandinnen und Doktoranden Constantin, David, Felix, Katharina, Sonja und Thomas, die mir immer wieder klar gemacht haben, dass das Wissen, mit dem wir arbeiten Tag für Tag, sehr interessant und nicht selbstverständlich ist. Der Firma Jura danke ich für die Erfindung einer Kaffeemaschine, die so guten und schmackhaften Kaffee macht.
Des Weiteren danke ich für die gute Zusammenarbeit in den letzten Jahren allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern im Institut für Rechtsmedizin.
Frau Dr. Michaela Winkler danke ich mich für die vielen kollegialen wie privaten Gespräche, die mir das Leben in Ulm und im Ländle etwas leichter gemacht haben.
Frau Dr. Uta Immel und Herrn Dr. Dierk Wanke danke ich für das Korrekturlesen und viele gute Tipps.
Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für ihre Unterstützung in jeglicher Art, die mir das Studium und diese Dissertation ermöglicht haben.
Und ganz zum Schluss danke ich meinem Freund Heinz, dass er mir immer wieder Mut gemacht hat und einfach für mich da war, wenn ich Zuspruch und Aufmunterung brauchte.

Lebenslauf

Name:	Rachel Klein
geboren am	15.03.1974 in Köln
Familienstand:	ledig

Schulausbildung:

1980 – 1984	Grundschule in Köln
1984 – 1993	Gymnasium in Köln Abschluss Abitur

Studium:

1993 – 2000	Studium der Biologie an der Universität zu Köln
1999 – 2000	Diplomarbeit im Bereich der Botanik an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Arbeitsschwerpunkt: Molekularbiologie Abschluss: Diplom-Biologin mit der Note sehr gut

Beruf:

seit 2001	wissenschaftliche Angestellte des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Ulm mit Promotion auf dem Gebiet der SNP-Analytik in der forensischen Genetik

Tätigkeiten:

1996 – 2000	Studentische Hilfskraft in den Biologischen Instituten der Universität zu Köln sowie im Botanischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08 – 09/2000	Forschungstipendium
seit 2001	Arbeit als wissenschaftliche Angestellte und stellvertretende Laborleiterin im DNA-Labor des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Ulm

Preise und Publikationen:
Klein R, Miltner E, Wiegand P: AB0-Typisierung mit SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, 81. Jahrestagung DGRM, 24. – 28.08.2002. Rostock

Klein R, Braunschweiger G, Junge A, Wiegand P (2003): A very long ACTBP2 (SE33) allele. Int J Legal Med, 117, 235 – 236

Ulm, den 11.07.'07

Rachel Klein