

**Molekularbiologische Geschlechts- und
Verwandtschafts-Bestimmung in historischen Skelettresten**

*Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen*

**vorgelegt
von Monika Zeller
aus Trencín / Slowakei
2000**

Danksagung

Diese Doktorarbeit entstand am Institut für Gerichtliche Medizin der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen. Ich möchte Herrn Prof.Dr.med.Dipl.-Phys. H.-D. Wehner für die interessante Themenstellung und für die Übernahme des Zweitgutachtens herzlich danken. Vor allem danke ich ihm für das hervorragende Management meiner Forschung und meiner persönlichen beruflichen Entwicklung.

Mein ganz besonderer Dank gehört meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr.rer.nat. N. Blin vom Institut für Anthropologie und Humangenetik. Ich möchte mich bei ihm für seine ständige Hilfsbereitschaft, bemerkenswerte Betreuung und volle Unterstützung ganz herzlich bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. A. Czarnetzki vom Institut für Anthropologie und Humangenetik für seine Bereitwilligkeit bei der Bereitstellung des historischen Knochenmaterials und für seine Hilfsbereitschaft.

Herrn Dr. F. Mirghomizadeh vom Institut für Anthropologie und Humangenetik danke ich für seine Betreuung beim Sequenzierautomaten und für seine Unterstützung.

Herrn T. Kayademir vom Institut für Anthropologie und Humangenetik danke ich für seine Hilfe am Anfang meiner Forschung, für die deutschsprachigen Korrekturen und für seine Hilfsbereitschaft.

Frau B. Bardtke vom Institut für Anthropologie und Humangenetik danke ich für die Betreuung beim Sequenzierautomaten an Wochenenden.

Herrn Dr. J. Wahl vom Landesdenkmalamt Baden-Württemberg in Konstanz danke ich für die Bereitstellung des historischen Knochenmaterials aus Kirchheim am Ries.

Frau Dr. C. Luckenbach vom Institut für Anthropologie und Humangenetik,
Priv.-Doz.Dr. P. Gött vom Institut für Anthropologie und Humangenetik,
Herrn Dr. C. Pusch von der Augenklinik an der UNI-Tübingen danke ich für ihre Gesprächsbereitschaft.

Herrn H. Esmer vom Institut für Anthropologie und Humangenetik danke ich für eine gute Zusammenarbeit im Sequenzierungs-Labor.

Meiner Schwiegermutter Gerda Zeller und P. Azarschad danke ich für die deutschsprachigen Korrekturen.
Meinem Mann Peter danke ich für sein Verständnis, seine Hilfe und Unterstützung.

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Juni 2000

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Prof.Dr. Wolfgang Wohlleben

Prof.Dr. Nikolaus Blin

Prof.Dr.med.Dipl.-Phys. Heinz-Dieter Wehner

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. <i>Die Humangenetik in der Forensik</i>	1
1.1.1. Historisches Überblick	2
1.1.2. DNA-Polymorphismus	3
1.1.3. Die repetitiven Sequenzen der Kern-DNA	4
1.1.3.1. DNA-Fingerprinting (MLS-Analyse)	5
1.1.3.2. Die SLS-Analyse	6
1.1.3.3. Die STR-Typisierung	7
1.1.4. DNA-Datenbanken	11
1.1.5. Die mitochondrielle DNA	12
1.1.5.1. Die Menge der mtDNA in menschlichen Zellen	12
1.1.5.2. Das mitochondrielle Genom	13
1.1.5.3. D-Loop-Region und Polymorphismus der mtDNA	14
1.1.5.4. Mutationen der mtDNA	15
1.1.5.5. Die mtDNA in der Forensik	17
1.2. <i>Die DNA-Analyse an altem Skelettmaterial</i>	19
1.2.1. Historisches Skelettmaterial	19
1.2.2. Die bodengelagerten Knochen	20
1.2.2.1. Die Knochen	20
1.2.2.1.1. Makroskopischer Aufbau des Knochens	21
1.2.2.1.2. Mikroskopischer Aufbau des Knochens	21
1.2.2.1.3. Chemische Bestandteile des Knochens	22
1.2.2.2. Die Erhaltung der DNA in Knochen	23
1.2.2.3. Der Boden - Liegemilieu des alten Skelettmaterials	25
1.2.2.3.1. Huminstoffe	25
1.2.2.3.2. Die Zersetzung einer Leiche im Erdgrab	25
1.2.2.3.3. Chemie des Bodens	26
1.2.2.3.4. Der Erhaltungszustand der Knochen im Boden	27
1.2.2.3.5. Die Knochendeckomposition	27
1.2.2.3.6. Die Degradation der organischen Phase des Knochens	28
1.2.3. Alte DNA (aDNA)	30
1.3. <i>Zielsetzung</i>	33
2. Material	34
2.1. <i>Weiche Gewebe</i>	34
2.2. <i>Frische (rezente) Knochen</i>	34
2.3. <i>Ältere Knochen</i>	34
2.4. <i>Altes Material aus Schönau und Ellwangen</i>	35
2.5. <i>Alte Knochen von 800 – 5 000 Jahre alt</i>	35
2.6. <i>Forensisches Material</i>	36
2.7. <i>Knochen mit Meningeom (Hochmittelalter)</i>	36
2.8. <i>Reihengräberfriedhöfe von Kirchheim am Ries</i>	37
2.8.1. Kirchheim am Ries	37
2.8.2. Gräber	37

2.9.	<i>Alamannische Adelsgräber von Niederstotzingen</i>	38
2.9.1.	Niederstotzingen	38
2.9.2.	Gräber	38
3.	Methoden	40
3.1.	<i>Probenentnahme</i>	40
3.2.	<i>Vorbereitung der Knochen für die Analyse</i>	40
3.3.	<i>Extraktion der DNA aus Knochenmaterial</i>	41
3.3.1.	Prinzip der DNA-Extraktion aus dem Knochenmaterial	41
3.3.2.	Extraktionsmethode von Hochmeister et al. (1991)	43
3.3.3.	Extraktionsmethode von Lee et al. (1991)	43
3.3.4.	Extraktionsmethode von Scholz und Pusch (1997)	44
3.3.5.	Modifikation der Methode von Scholz und Pusch (1997)	44
3.4.	<i>Bestimmung der Qualität und der Quantität der DNA</i>	45
3.4.1.	Spektrophotometrische Messungen	46
3.4.2.	Restriktionsspaltung der DNA und Agarose-Gel-Elektrophorese	47
3.4.2.1.	Restriktionsenzyme	47
3.4.2.2.	Restriktionsspaltung der DNA	48
3.4.2.3.	Agarose-Gel-Elektrophorese	50
3.5.	<i>PCR-Amplifikation der DNA</i>	53
3.5.1.	Prinzip der PCR	53
3.5.2.	Wichtige Bestandteile der PCR	54
3.5.3.	PCR der alten DNA als Matrize	57
3.5.3.1.	Jumping-PCR	57
3.5.3.2.	Aminosäurerazemisierung	58
3.5.3.3.	Inhibition der PCR	58
3.5.3.4.	Test für Inhibition und Test für Amplifizierbarkeit	59
3.5.3.5.	Kontaminationsvermeidung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	60
3.5.4.	aDNA-PCR-Strategien	61
3.5.4.1.	Biphasische PCR	61
3.5.4.2.	Booster-PCR	61
3.5.4.3.	Nested-PCR	61
3.5.4.4.	Hot-Start PCR	62
3.5.4.5.	PEP (primer-extension-preamplification)	62
3.6.	<i>Identifikation und Verwandtschaftsanalyse mittels der STR-PCR-Typisierung</i>	62
3.6.1.	Kurze Beschreibung von verwendeten STR-Loci	63
3.6.2.	STR-PCR-Amplifikationen	64
3.6.2.1.	PCR-Kits	64
3.6.2.2.	PCR-Cycler	65
3.6.2.3.	Amplifizierbarkeit der DNA aus weichem Gewebe	65
3.6.2.4.	Amplifizierbarkeit der DNA aus rezentem Knochenmaterial	65
3.6.2.5.	Amplifizierbarkeit der DNA aus älterem Knochenmaterial	65
3.6.2.6.	Biphasische Amplifikation der DNA aus 150-300 jährigen Knochen	65
3.6.2.7.	STR-PCR-Amplifikation der 800-5 000 jährigen DNA aus Knochen	66
3.6.2.8.	STR-PCR-Typisierung des Knochenmaterials aus Kirchheim am Ries	68
3.6.2.9.	STR-PCR-Typisierung an Skelettindividuen aus Niederstotzingen	71
3.6.3.	Die Geschlechtsbestimmung am Skelettmaterial	73
3.6.4.	Untersuchung des forensischen Materials	74
3.6.5.	Untersuchung von Knochen und Zähnen aus Schönau und Ellwangen	74

3.7.	<i>Untersuchung des entarteten Meningeoms des Schädels</i>	75
3.7.1.	„Comparative Genomic Hybridization“	75
3.7.2.	DOP-PCR (Degenerate oligonucleotide-primed PCR)	77
3.8.	<i>Polyacrylamidgelelektrophorese und Silberfärbung</i>	78
3.8.1.	Elektrophorese	78
3.8.2.	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	79
3.8.3.	Silberfärbung	81
3.9.	<i>Humane-Herkunft-Test der untersuchten DNA</i>	82
3.10.	<i>Identifikation und Verwandtschaftsanalyse mittels der D-Loop-mtDNA-Sequenzierung</i>	83
3.10.1.	PCR-Amplifikation des D-Loops der mtDNA	83
3.10.1.1.	Auswahl der Miniprimer	83
3.10.1.2.	Symmetrische PCR	83
3.10.1.3.	Spezifischer PCR-Ansatz	84
3.10.1.4.	PCR-Programm	84
3.10.2.	Reinigung der PCR-Produkte	85
3.10.3.	Sequenzierung	86
3.10.3.1.	Sanger-Sequenzierungsmethode	86
3.10.3.2.	Cycle-Sequenzierung	88
3.10.3.3.	Ethanol-fällung	91
3.10.3.4.	ABI Prism 377 DNA Sequenzer	92
3.10.3.5.	Sequenzdatenbanken	93
4.	<u>Ergebnisse und Diskussion</u>	95
4.1.	<i>Vergleich der drei getesteten Extraktionsmethoden und Leistung des eigenen Extraktionsverfahren</i>	95
4.1.1.	Extraktion der DNA aus weichen Geweben	95
4.1.2.	Extraktion der DNA aus rezenten Knochen	96
4.1.3.	Extraktion der DNA aus älteren Knochen	97
4.1.4.	Ergebnisse der Restriktionsanalyse	97
4.1.5.	Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA	99
4.1.6.	Leistung der eigenen Extraktionsmethode	102
4.2.	<i>DNA-Typisierung an Knochen aus Schönau und Ellwangen</i>	104
4.3.	<i>DNA-Analyse des forensischen Materials</i>	105
4.4.	<i>Untersuchung des entarteten Meningeoms des Schädels</i>	106
4.5.	<i>Kern-DNA-Typisierung an 800-5 000 Jahre alten Knochen</i>	107
4.6.	<i>Humane Herkunft der extrahierten DNA</i>	110
4.7.	<i>Molekularbiologische Geschlechtstypisierung an altem Skelettmaterial</i>	112
4.8.	<i>Verwandtschaftsbestimmung an Skeletten aus multiplen Bestattungen in Kirchheim am Ries und in Niederstotzingen</i>	116
5.	<u>Zusammenfassung</u>	133
	<u>Literaturverzeichnis</u>	136

1. EINLEITUNG

Für forensische Spezialisten kann es eine besondere wissenschaftliche Herausforderung sein, bei bestimmten Ermittlungen menschliche sterbliche Überreste (Knochen) in Massengräbern zu identifizieren.

Normalerweise besteht die Identifikation aus dem Vergleich der zahnärztlichen und medizinischen Unterlagen mit den entsprechenden Beobachtungen am Skelett.

In vielen Ländern sind solche Unterlagen spärlich oder existieren gar nicht. Dies gilt besonders in den Fällen, in denen eine lange Zeit (mehrere/viele Jahre) zwischen dem Tod des Opfers und der Entdeckung des Skelettes liegt.

Oft sind es dann einerseits nur Informationen von der Familie des Opfers, die lediglich aus den allgemeinen anthropologischen Variablen wie Alter, Geschlecht, Rasse, Statur bestehen. Andererseits sind es Informationen über Knochen-Anomalien, die krankheits-verursacht sich auch an Knochen manifestieren. In einigen Fällen helfen auch Angaben über die persönlichen Sachen, die ein Opfer im Besitz hatte. Derartige Informationen sind ausreichend, um die Identität eines Opfers festzustellen, wenn die Grab-Population klein ist und vom Alter, Geschlecht, Statur hinreichend differenziert ist.

Wenn es sich aber in einem Grab um eine recht homogene Skelettgruppe (z. B. junge Männer im wehrfähigen Alter) handelt, reichen derartige Informationen zur Identifikation nicht. Die genetische Typisierung an Skelettmaterial kann solche Probleme lösen. Mit einer leistungsfähigen DNA-Extraktionsmethode und mit der Analyse der Kern-DNA-Marker und der mitochondrialen DNA kann man zuverlässig menschliche sterbliche Überreste identifizieren.

Die molekularbiologische Geschlechts- und Verwandtschaftsbestimmung ist nicht nur in der Forensik von Bedeutung. Die genetisch-forensische Wissenschaft kann ihre „Identifikations-Werkzeuge“ auch anderen Wissenschaften zur Verfügung stellen. Die Analyse von Mikrosatelliten-DNA und von mtDNA ist auch zur Feststellung von Verwandtschaft zwischen historischen Skelettindividuen geeignet. Die Bestimmung von Allelfrequenzen kann die Trennung einzelner Gruppen einer historischen Population ermöglichen, im Idealfall sogar die Rekonstruktion von Stammbäumen im Sinne von Genealogien. Durch solche genetische Analysen können auch z.B. Anthropologie, Archäologie und die umweltgeschichtlich orientierten Wissenschaften Zugang zu ererbten Eigenschaften historischer Individuen und Populationen erhalten. Sie können indirekt auch Informationen über soziales Verhalten, damalige gesellschaftliche Gewohnheiten der historischen Populationen gewinnen.

1.1. Humangenetik in der Forensik

Der DNA-Analyse kommt auf den Gebieten Identifikation, Geschlechtsbestimmung sowie Zuordnung biologischer Spuren entscheidende Bedeutung zu. Verantwortlich dafür ist die Hypervariabilität humaner DNA-Sequenzen und die relative Beständigkeit des DNA-Moleküls gegenüber postmortalen Abbauprozessen. Als dritter Vorzug der DNA-Analytik gegenüber klassischen hämogenetischen Verfahren ist eine um Größenordnungen gesteigerte

Sensitivität der Nachweisteknik zu nennen, die insbesondere der Einführung der PCR (polymerase chain reaction) zu verdanken ist.

Die menschliche DNA befindet sich im Zellkern jeder Körperzelle (außer Erythrozyten) in Form von Chromosomen. Neben der im Zellkern lokalisierten nukleären oder genomischen DNA existiert in den Mitochondrien eine mtDNA-Fraktion. Jede Zelle enthält nur ein nukleäres, aber 1 000 bis 10 000 mitochondriale DNA-Moleküle. Dies impliziert, daß die mtDNA-Analyse erheblich sensitiver ist als die übliche Kern-DNA-Analyse. In der Praxis werden je nach Fragestellung beide DNA-Fraktionen zur Typisierung von biologischen Spurenmaterialien herangezogen.

Bestimmung erblicher Merkmale auf der Ebene der DNA hat vor Gericht meistens zwei Anwendungsbereiche:

1. In der Abstammungsbegutachtung (im Zivilprozeß) werden Fälle strittiger Vaterschaften untersucht.
2. Die Spurenanalyse (im Strafprozeß) befaßt sich mit der Frage, ob ein in einer Strafsache relevantes Spurenmaterial von einer bestimmten Person stammt.

1.1.1. Historischer Überblick

Die ersten verwendeten biologischen Methoden in der Kriminalistik waren die Phänotyp bestimmenden Methoden wie die Analysen des Polymorphismus der erythrozytären (ABO, Rhesus,...) und der enzymatischen Gruppen (PGM, EAP,...), wie auch der Seroproteinen (Gc, Haptoglobin,...).

Diese Analysen dominierten in der Forensik bis Ende der 80-er Jahre.

Diese ältere Techniken waren sensibel aber ihr Diskriminierungspotential war schwach.

Im Jahr 1985 schlägt Jeffreys (Jeffreys, 1985) eine neue Identifikationsmethode des genetischen Fingerabdrucks vor. Das Genom jedes Menschen, mit Ausnahme monozygoter Zwillinge, ist singulär und individualspezifisch. Besonders hohe interindividuelle Variabilität weist die DNA-Struktur außerhalb der Gene auf, wo keine phänotypisch relevanten Informationen gespeichert sind. Neben dem einfachen Basenaustausch (geschätzte Häufigkeit 2×10^7 im humanen Genom) gibt es eine Reihe anderer Mutationsmechanismen, die noch stärkere Auswirkungen auf die Veränderlichkeit des Genoms haben. Von besonderer Bedeutung sind hier die tandem-repetitiven Strukturelemente. Lange Ketten wiederholter Sequenzmotive neigen zu extremer Schwankung in der Zahl hintereinandergeschalteter Repeat-Bausteine. Solche hypervariablen Loci vom VNTR-Typ (variable number of tandem repeats) weisen im Unterschied zu dimorphen, biallelischen Systemen multiple Allelie in teilweise extremem Ausmaß auf. Schon kurze Zeit nach ihrer Entdeckung (Jeffreys et al., 1985) wurde die Eignung solcher hypervariabler, repetitiver DNA-Sequenzen für die forensische Individualisierung erkannt. Die Nachweisteknik fand unter dem Namen „DNA-Fingerprinting“ Eingang in die forensisch-hämogenetisch tätigen Labors.

Aufgrund der überlegenen Sensitivität und relativ einfachen Technik haben später PCR-gestützte Verfahren die Hybridisierungstechniken mit Single-Locus- und Multi-Locus-Sonden weitgehend verdrängt. PCR verspricht Erfolg dort, wo die ersten Systemgenerationen versagen. Man erreicht mit dem genetischen Fingerabdruck niemals die Empfindlichkeit

der PCR, wobei theoretisch z.B. eine einzige Zelle der Mundschleimhaut an einem Zigarettenfilter reicht, um den Spurenleger zu identifizieren. In der Praxis führen heute gegen hundert Zellen bereits zu verwertbaren Ergebnissen. Eine Haarwurzel oder ein Speicheltropfen enthalten genügend DNA (Germann, 1997). Jedoch ist man beim Fingerprinting auch nicht den Artefakten (Kontaminationsgefahr) ausgeliefert, die ein derart sensibles Verfahren wie die PCR mit sich bringt.

Unter den heute verwendeten DNA-Loci haben sich zwei Klassen polymorpher Systeme durchgesetzt: erstens längenpolymorphe DNA-Sequenzen, sog. STR oder Mikrosatelliten und zweitens Sequenzpolymorphismen hochvariabler Regionen (z. B. HLA-Genorte).

Ein interessanter Aspekt ist die Untersuchung uniparental vererbter DNA-Sequenzen (maternal vererbte mtDNA oder paternal vererbte Y-chromosomale DNA). Hier kann eine Zuordnung unbekannter Individuen auch durch Vergleich mit entfernten Verwandten einer Erblinie vorgenommen werden (Fälle Mengele, Romanow, Hauser).

Mit den DNA-Analysen wurde die diskriminatorische Kraft der Untersuchungen von biologischen Spuren deutlich erhöht.

	<i>Notwendige Materialmenge</i>	<i>Möglichkeit die degradierte DNA zu analysieren</i>	<i>Die Identitäts- Wahrscheinlichkeit</i>
ABO-Typisierung	> 0,1 µl Blut	-	40%
PGM-Typisierung	> 0,1 µl Blut	-	25%
MLS-Analyse	> 500 ng DNA	-	< 10 ⁻⁷
SLS-Analyse	> 20 ng DNA	-	< 1%
STRs-Analyse	< 1 ng DNA	+++	2-10 %
MtDNA-Analyse	<<< 1 ng DNA	+++	10 ⁻⁴

(Coquoz, 1994)

1.1.2. DNA – Polymorphismus

Das Genom jedes Menschen, mit Ausnahme monozygoter Zwillinge, ist singulär und individualspezifisch. Besonders hohe interindividuelle Variabilität weist die DNA-Struktur außerhalb der Gene auf, wo keine phänotypisch relevanten Informationen gespeichert sind. Existieren in einem Merkmalssystem unterschiedliche Zustandsformen eines DNA-Abschnitts („Allele“), nennt man diese Tatsache Polymorphismus. Dies ist bereits gegeben, wenn zwei Allele „A“ und „B“ existieren. (mögliche Genotypen: AA; AB; BB). Wenn viele Allele nachgewiesen werden können, spricht man von einem hochpolymorphen System. Für forensische Zwecke interessieren hauptsächlich hochpolymorphe Systeme, da diese wesentlich aussagekräftiger sind als beispielsweise Zwei-Allele-Systeme.

Ein weiteres entscheidendes Kriterium für die Aussagekraft eines Systems ist die Allelverteilung, d.h. die Häufigkeiten, mit denen die einzelnen Allele in der Bevölkerung vorgefunden werden.

Die Variabilität aller Sequenzen wird traditionell als DNA-Polymorphismus bezeichnet, wenn es in einer menschlichen Population für einen Locus mehr als eine Variante (ein Allel) gibt, die (das) mit einer Häufigkeit von über 0,01 auftritt. Bei dieser Häufigkeit ist die Wahrscheinlichkeit gering, daß die Variante nur zufällig mehrmals auftritt. Es ist bekannt, daß jedes zweihundertste Basenpaar der menschlichen DNA variiert, somit ist sie polymorph. Die durchschnittliche Heterozygotie beträgt beim menschlichen Genom etwa 0,0037 (das heißt, bei allen Sequenzen weichen 1/250 bis 1/300 der Basen voneinander ab).

Formal lassen sich DNA-Polymorphismen in Sequenzpolymorphismen (z. B. D-Loop der mtDNA) und Längenpolymorphismen (STR) trennen.

Die Variationen aller Sequenzen sind selten das Ergebnis neuer Mutationen. Die meisten Unterschiede zwischen allen Sequenzen, die man bei einem bestimmten Organismus findet, gehen auf eine Vererbung und nicht auf eine de novo-Mutation zurück.

Basensubstitutionen gehören zu den häufigsten Mutationen. Transitionen sind häufig insbesondere in mitochondrieller DNA (Strachan et al., 1996).

Insertions- und Deletionsmutationen sind im kodierenden Bereich selten, denn der Selektionsdruck richtet sich gegen Mutationen, die das Leseraster bei der Genexpression verschieben (Lewin, 1988).

Im nicht-kodierenden Bereich können Insertionen oder Deletionen eines oder mehrerer gleichartiger Sequenzmotive zu sog. VNTR-Polymorphismen führen. Dieser Mutationstyp kommt relativ häufig in nicht-translatierten Sequenzen vor, weil diese im allgemeinen weniger konserviert sind als jene in den kodierenden DNA-Sequenzen.

In den Introns (innerhalb der Gene) und der repetitiven DNA (zwischen den einzelnen Genen) können außerordentlich viele hochpolymorphe Varianten eines DNA-Abschnitts vorkommen, wodurch sich Individuen vorzüglich unterscheiden und Körperflüssigkeiten oder Gewebeteile mit großen Wahrscheinlichkeiten einer bestimmten Person zuordnen lassen. Im Bereich der Gene sind die Introns häufig von Insertions- / Deletionsmutationen betroffen, allerdings nicht mit so hoher Frequenz wie extragenische tandem-repetitive Bereiche, in denen die Mutationshäufigkeit 1% übersteigen kann (Jeffreys et al., 1985).

1.1.3. Die repetitiven Sequenzen der Kern - DNA

Die repetitiven DNA-Sequenzen machen etwa 40% der Gesamt-DNA in einem Säuger genom aus. Repetitive DNA-Bereiche können unterschiedliche Längen aufweisen.

Man unterscheidet im allgemeinen :

- hochrepetitive DNA (mit mehr als 100 000 Kopien)
- mittelrepetitive DNA (mit 100-100 000 Kopien)
- wenigrepetitive DNA (mit < 100 Kopien).

Je nach Art ihrer Anordnung unterscheidet man :

- Tandem - Repeats (direkt hintereinandergeschaltete Wiederholungseinheiten, z.B. AATAATAAT)
- Interspersed Repeats (verstreute Wiederholungseinheiten).

Zu den im Genom verstreuten Repeats gehören z. B. LINE-Elemente (long interspersed elements), welche ca. 5-7 kb lang sind. Der Hauptvertreter ist eine im Genom von Primaten vorkommende L1 Sequenzfamilie. Diese Repeat-Motive stellen etwa 1-2 % des menschlichen Genoms.

Die SINE-Elemente (short interspersed elements) sind gewöhnlich kürzer als 500 bp. Hierzu zählt die sog. Alu-Familie, die spezifisch in menschlicher DNA gefunden wird. Diese Repeat-Motive machen etwa 5% des menschlichen Genoms aus (Ferak, 1990).

Für die Forensik sind die Tandem-Repeats von Bedeutung:

Tandem-repetitive-DNA ist oft als Satelliten-DNA bezeichnet. Sie stellt den größten Teil des Heterochromatins (Chromosomenabschnitte, an denen keine oder nahezu keine Genexpression stattfindet). Die DNA in den Centromeren der Chromosomen besteht zu einem großen Teil auch aus Satelliten-DNA. Ihre biologische Funktion ist nach wie vor wenig verstanden.

Man unterscheidet zwei Familien:

1. Satelliten-DNA und α -Satelliten-DNA
2. Minisatelliten-DNA (VNTR) und Mikrosatelliten-DNA (STR)

Die Satelliten-DNA-Wiederholungseinheit hat 20-30 bp, die der α -Satelliten-DNA 170 bp. Es handelt sich um hochrepetitive Sequenzen. Ihre Allele sind nicht nur zu groß für die Spurenanalyse, sie sind sogar ungeeignet, weil ihre einzelnen Repeats nicht identisch, sondern nur bis 95% homolog sind.

Für die Forensik sind VNTR und STR von Bedeutung:

VNTR (variable number of tandem repeats) zeigen eine extrem hohe allelische Variabilität, die auf interindividuellen Unterschieden der Zahl repetierter Sequenzmotive beruht.

1.1.3.1. DNA – Fingerprinting (MLS-Analyse)

VNTR sind längere DNA-Abschnitte als STR. Sie sind durch eine Repeatlänge von 7 bis etwa 100 Basenpaare gekennzeichnet. Pro Locus können mehrere tausend hintereinandergeschaltet sein. Ihr Fragmentlängenbereich erstreckt sich von 170 Bp bis etwa 1,2 Kb. Einige tausend solcher Loci finden sich auf dem Genom.

VNTR weisen Restriktionspolymorphismus (RFLP) auf.

Die Analyse von VNTR-Polymorphismen unter Verwendung von Restriktionsenzymen war die Grundlage der ersten Phase der forensischen DNA-Analytik, die Grundlage des sog. genetischen Fingerabdrucks. Das von Jeffreys et al. (1985) entwickelte Verfahren des genetischen Fingerabdrucks dokumentierte die enorme interindividuelle Variabilität in extragenischen VNTR-Bereichen. Als Restriktionsenzyme wurden bei dieser Untersuchung Hinf I und Hae III verwendet, wobei die wesentliche Voraussetzung für die Auswahl des Restriktionsenzym ist, daß dieses nicht im tandem-repetitiven, sondern nur im flankierenden Bereich schneidet.

Multilocus-Sonden (MLS) waren die ersten Werkzeuge der forensischen DNA-Analytik.

Die genetische Fingerprinting-Analyse erfolgte mit Multilocus-Sonden. Bei der Spaltung genomischer DNA mit einem Restriktionsenzym entstehen sehr viele Fragmente. MLS (z. B. 33.15, 33.6,...) weisen Varianten repetitiver Sequenzen an vielen verschiedenen DNA-Loci gleichzeitig nach, es entsteht ein komplexes, multiallelisches Bandenmuster („DNA-Fingerprint“). Nachgewiesen werden die individuellen Satelliten-Muster mit Hilfe der Southern-Blot-Technik.

Die erhaltenen DNA-Fragmente werden gelelektrophoretisch voneinander getrennt, dann werden sie auf eine Nylonmembran übertragen. Nach Sondenhybridisierung erfolgt die Darstellung der DNA-Bandenmuster (des DNA-Fingerabdrucks) auf einem Röntgenfilm.

Die Darstellung der „genetischen Fingerabdrücke“ mittels simpler repetitiven Oligo-Sonden erlaubt die Unterscheidung aller Menschen, mit der Ausnahme von eineiigen Zwillingen. Das Individualisierungspotential ist ungleich größer, verglichen mit den bisherigen Merkmalsystemen (Blutgruppenserologie, Enzym polymorphismen, HLA-Typisierung).

Nachteile des genetischen Fingerabdrucks:

1. Die Empfindlichkeit ist gering. Man benötigt ca. 500 ng DNA (entspricht 500 000 bis 1 Million Spermien).
2. Ausgewertet werden üblicherweise nur die Banden > 4000 Bp, weil Banden < 4000 Bp sehr dicht zusammenliegen und damit kaum differenzierbar sind. Man benötigt also hochmolekulare DNA, welche in biologischen Spuren nicht vorliegt, da diese degradiert, kontaminiert, unkontrolliert zerschnitten von Bakterien-Enzymen (Ergebnis kann fehlerhaft oder negativ sein) ist.
3. Es besteht ein Nebeneinander von Banden (Fragmenten) sehr unterschiedlicher Intensität (Je mehr Sonden an ein Fragment hybridisieren, desto intensiver ist das Markierungssignal.). Besonders in Spuren können die weniger intensiven verloren gehen. Es besteht ein schwer interpretierbares Defektmuster.
4. Im Fall von Mischspuren ist die Interpretation trotz spezieller Extraktionsmethoden fast immer unmöglich.
5. Wie die polygen gesteuerten morphologischen Merkmale ist der „genetische Fingerabdruck“ statistisch nicht analysierbar. Es ist nicht bekannt, welche Banden zu einem Locus gehören (Ritter H., 1991).
6. Die Restriktion mit Hinf I, Hae III erzeugt auch bei verschiedenen Tier- und Pflanzenarten polymorphe Muster.

1.1.3.2. Die SLS - Analyse

Die zweite Phase der DNA-Analytik begann mit der Untersuchung von Single-Locus-Systemen (SLS) mit der RFLP-Methodik, bei denen 1-2 Fragmente pro Individuum nachzuweisen sind.

Es wurden Sonden eingesetzt (z. B. MS1, MS8, MS31, MS43, g3, TBQ7,...), deren komplementäre Sequenzen nur einmal im Genom auftreten und damit die Detektion von Einzelloci ermöglichen. SLS sind genortspezifisch, weisen demzufolge zwei Allele je Person auf und folgen einem einfachen codominanten Erbgang.

Für die Hinf I-Polymorphismen der Loci D1S7, D2S44, D7S21, D7S22, D12S11 und D16S309 gibt es umfangreiche populationsgenetische Daten (Smith et al., 1990; Baird et al., 1986; Balazs et al., 1989).

Nachteile der SLS - Methode:

1. Geringe Empfindlichkeit, man benötigt etwa 20 ng DNA.
2. Die hochmolekulare DNA ist oft erforderlich. Die meisten Systeme liegen zwischen 2 – 20 kb, in vielen Spuren ist die DNA degradiert.
3. Die Ergebnisse eines einzigen Merkmalsystems erreichen nicht die Aussagekraft einer MLS-Analyse.

Eine einzelne SL-Sonde kann im Vergleich mit einer ML-Sonde nur eine um 10-er Prozenten geringere Individualisierungseffizienz liefern, aber die Kombination von 4 SL-Sonden gewährleistet eine extrem hohe Diskriminationskraft von etwa $4 \cdot 10^{-11}$ (Berlot- Picard, 1993).

Vorteile der SLS- gegenüber MLS-Analytik:

1. Erkennbarkeit von Mischspuren, die sich als Mehrbandenmuster darstellen.
2. Im Gegensatz zu ML-Sonden stimmt bei SL-Sonden nicht nur die Kern-Sequenz eines Repeats mit dem zu markierenden repetitiven Bereich überein, sondern auch im wesentlichen die flankierende Sequenz des Einzelrepeats. Folglich können SL-Sonden mit deutlich höherer Stringenz eingesetzt werden.
3. SLS ermöglichen je nach Allelbereich auch bei teilweise degradiertem DNA erfolgreiche Typisierungen (Wiegand et al., 1992). SLS waren etwa 10-mal sensitiver als MLS.

Forensisch relevante und heute mittels PCR typisierbare VNTR sind z.B. D1S80 (MCT118), D17S5 (YNZ22), EKMOZA.

Sehr beliebt ist heute noch z.B. Locus D1S80. Seine Diskriminationskraft ist nämlich sehr hoch (0,94) und die Empfindlichkeit dieses Lokuses ist extrem (0,1 ng genomischer DNA ergaben ein korrektes Typisierungsergebnis) (Kloosterman et al., 1993).

Aufgrund der überlegenen Sensitivität, der geringen Degradationsanfälligkeit, einfachen Methodik und Datenbankfähigkeit der Ergebnisse hat die PCR-Technik auch im Bereich der forensischen Identifikation die VNTR-Analyse weitestgehend abgelöst.

Für die forensische DNA-Analyse werden solche Sequenzen ausgewählt, die entweder - analog den VNTR-Systemen – interindividuelle Unterschiede in der Länge (STRs) aufweisen oder in der Sequenzstruktur (HLA-Region, mtDNA) variieren.

Da nur relativ kurze DNA-Abschnitte von wenigen hundert Basenpaaren Länge und damit begrenzter Sequenzvielfalt amplifiziert werden können, ist der Informationsgehalt je PCR-System geringer als für MLS- oder SLS-Systeme, die sehr ausgedehnte Zielregionen mit großem Variantenreichtum aufweisen.

1.1.3.3. Die STR - Typisierung

Diese tandemrepetitive DNA hat den größten Fortschritt für die Individualisierung von biologischen Spuren gebracht.

Vor allem die Etablierung der STRs hat die sehr aufwendige Methode über Digoxigenin-markierte Sonden überflüssig gemacht (Pflug et al., 1997). Da die Fragmentgröße meist kleiner als 500 Bp ist, ist die Ziel-DNA einfach mittels PCR zu amplifizieren.

Vorteile der PCR gegenüber bisherigen Methoden:

Schnelligkeit,
Empfindlichkeit,
Degradiertes Material ist analysierbar,
Detektion ohne Radioaktivität,
Richtige Typisierung von Einzelbanden der VNTR (bei dem Southern Blotting kann man einen falschen Homozygot typisieren).

VNTR sind zwar polymorpher als STR, aber sie sind ziemlich groß für die PCR.

Das heißt, man brauchte mehr Material für eine Analyse mittels VNTRs als mittels STRs. Bei Anwendung der STR kann man die Template-DNA-Menge auf weniger als 1 ng reduzieren. Die geringen Längenunterschiede der Allele bei STR sind auch vorteilhaft gegenüber VNTR. Sie verringern die Gefahr, da bei zwei weit größenunterschiedlichen Allelen selektiv das kleinere Allel amplifiziert wird. Der Effekt heißt „Allelic dropout“; ein heterozygoter Phänotyp kann fälschlich als homozygot typisiert werden.

Die STR-Typisierung spielt heute eine dominierende Rolle in der forensischen Praxis. Die STR-Systeme haben nicht nur für spurenkundlichrechtsmedizinische Fragestellungen größte Bedeutung, sondern sind wertvoll auch in der Paternitätsdiagnostik.

Die Repeat-Einheit eines STR-s besitzt 2-6 Nukleotiden. Die STR haben sehr kurze Fragmentlänge, ca. 120-350 Basenpaaren. Daher sind sie sehr degradationsunempfindlich. Sie haben extrem hohe Nachweisempfindlichkeit. Es genügen 50-100 pg DNA für eine erfolgreiche Analyse. Geringe Mengen stark degradiertes DNA können typisiert werden (Sanchez-Hanke et al., 1996). Der Grund für die begrenzte Wiederholungsrate ist unbekannt.

STRs sind sehr polymorph, ihre Allele sind definiert, d.h. numerisch speicherbar, mehrere Systeme lassen sich in sog. Multiplex-Reaktionen koppeln, die Nachweisttechnik ist automatisierbar bzw. mittels Silberfärbung relativ unaufwendig.

Merkmale der STR-Systeme werden bei relativ geringen Mutationsraten (ca. 0,2%) kodominant vererbt.

Kriterien der Wahl der STRs für forensische Anwendung:

- Grad des Polymorphismus ist wichtig, gemessen nach der Heterozygotität oder nach der Diskriminationskraft. (Wenn viele Allele nachgewiesen werden können, spricht man von einem hochpolymorphen System. Ein weiteres entscheidendes Kriterium für die Aussagekraft eines Systems ist die Allelverteilung, d.h. die Häufigkeiten, mit denen die einzelnen Allele in der Bevölkerung vorgefunden werden.)
- Die Größe der Allele sollte kleiner als 250 Bp sein.
- Optimale Annealing-Temperatur (Sie hängt von der MgCl₂-Konzentration ab, wenn sie niedrig ist, senkt die Spezifität der PCR, wenn sie zu hoch ist, sinkt die Produktivität der PCR.),
- Die Fähigkeit, sich mit anderen Loci coamplifizieren zu lassen (Urquhart, 1995).
- Keine Mikroheterogenität
Die Mutationsraten der verwendeten DNA-Systeme müssen bekannt sein und dürfen eine Häufigkeit von 1% pro Meiose nicht überschreiten. Bei einer isolierten Ausschlußkonstellation muß eine mögliche Mutation in Betracht gezogen werden.
- Die chromosomale Lokalisation und eventuell vorhandene Kopplungsbeziehungen zu anderen Polymorphismen sollten bekannt sein. Bei eng gekoppelten Systemen (Rekombinationsfrequenz <5cM) können die Einzelergebnisse nur unter Berücksichtigung des Kopplungsungleichgewichtes angewendet werden. Am besten sollen die Loci nicht genetisch verbunden sein (Gill, 1995).
- Wenig Stutter Bands

- Komplementäre Banden (zwei Stränge der selben Allele) sollen zusammen in nicht-denaturierendem Gel migrieren.

Routinemäßig verwendete STR-s :

LOCUS	Heterozyg. max. (%)	Lokalisation	Repeat-Einheit	Allele-Größe (Bp)	Allele-Anzahl
TH01	80%	11p15.5	AATG	179-203	7
CSF1PO	66%	5q33.5,5-34	AGAT	299-323	9
F13B	66%	1q31-q32.1	AAAT	169-185	6
VWA	83%	12p12-pter	TCTA/TCTG	126-166	9
TPOX	60%	2p13	AATG	232-248	7
FES/FPS	70%	15q25-qter	AAAT	222-250	7
HPRTB	70%	Xq26	AGAT	259-299	11
LPL	80%	8p22	AAAT	125-175	7
ACTBP2	93%	5/6	AAAG	230-330	21
D21S11	83%	21	TCTR	172-264	17
FIBRA/FGA	86%	4q28	CTTT	176-224	13
D18S51	86%	18	AAAG	275-323	14
F13A1	70%	6p24-p25	AAAG	281-331	14
D8S1132	83%	8	TCTA	134-170	10
CD4	68%	12p12-pter	CTTTT	125-175	8

Die Abkürzungen gehen meist auf die Namen der den STRs benachbarten Gene zurück (bei VWA/VWF zum Beispiel der Von-Willebrand-Faktor). Andere Namen ergeben sich aus einer alten Genetikermethode, bei der eine festgelegte Kartierungssprache oder –formel angewendet wird. Der STR mit der Bezeichnung D8S306 liegt auf Chromosom 8 am „Kilometerstein“ 306. „D“ steht für DNA, „S“ steht für „single copy sequence“.

Wegen ihres ausgeprägten Längenpolymorphismus eignen sich STR-Systeme für die Typisierung und Individualisierung in der Paternitätsanalyse, für die forensische Analytik, wie auch für die Vorbereitung von Knochenmarkstransplantationen und zur Typisierung von Zelllinien.

Von besonderem Interesse in der Forensik sind STR-Loci mittels derer ein Geschlechtsnachweis möglich ist (z. B. Amelogenin).

Das Amelogenin-Gen wurde bei einigen Spezien studiert. Der große Teil der beiden Regionen (kodierenden und nicht-kodierenden) ist offensichtlich die ganze Zeit durch die Evolution konserviert (Bailey et al., 1992; Watson et al., 1992; Buel et al., 1995; Lyngstadaas et al., 1990) worden.

Das Amelogenin-Gen kodiert ein Protein für die Entwicklung des Zahnschmelzes bei den Säugern (Nakahori et al., 1991).

Amelogenin wurde schon oft verwendet für die Geschlechtsbestimmung an forensischem Material (Akane et al., 1992; Akane et al., 1991; Casarino et al., 1995; Mannucci et al., 1994).

Auf dem X-Chromosom finden sich nach Schätzungen 3 bzw. 4 Bp STR-Polymorphismen etwa alle 300 bis 500 Kb (Edwards et al., 1992).

Für Fälle, in denen das umstrittene Kind weiblich ist, bietet jedoch gerade die Untersuchung X-chromosomalen Marker besonders aussagekräftige Ergebnisse. Erfahrungen mit der

Verwendung von vier X-chromosomalen Markern AR, HPRTB, DXS7423, DXS8377 (alternativ zu DXS7423) zeigten, daß einige Defizienz-Paternitätsgutachten nur durch Untersuchung von X-chromosomalen Markern lösbar waren. Auch HUMAM (HUMARA) und HPRT sind sehr polymorph.

Bei Frauen sind bei der Heterozygotie zwei Banden detektierbar, bei Männern generell nur eine Bande. Insofern ist der Informationsgewinn bei der Typisierung von DNA männlicher Zugehörigkeit deutlich geringer gegenüber autosomalen Polymorphismen.

Größere forensische Relevanz besitzen allerdings schon hier beschriebene Y-chromosomale Typisierungssysteme.

Die Y-DNA ist immer männlicher Herkunft. Mit Y-STRs ist es möglich, die Anwesenheit der männlichen DNA im forensischen Material nachzuweisen. Im Gegensatz zu den autosomalen STR-Systemen, selbst die große Menge an weiblicher DNA inhibiert nicht die Amplifikation des Y-chromosomalen Alleles (Prinz et al., 1997).

Das Y-Chromosom umfaßt zwei verschiedene Teile: eine pseudoautosomale Region, die mit dem X-Chromosom verkuppelt und der Rest, der männlich spezifisch ist und nicht an der Rekombination beteiligt (Mitchell et al., 1995) ist.

Bis 60% des Y-Chromosoms formieren repetitive Sequenzen, die ausschließlich auf dem Yq lokalisiert sind. Diese Sequenzen gehören zu der HaeIII-satelliten III Subfamilie (3,4 kB) (Kunkel et al., 1979), jetzt definiert als DYZ1 (Miller et al., 1984), zu der MspI-satelliten I Subfamilie (Cooke, 1982), jetzt definiert als DYZ2 (Miller et al., 1984). Andere tandem, wenig repetitiven Sequenzen wurden auch auf dem Yp gefunden, wie z.B. DYZ4 (Vergnaud et al., 1986), DYZ5 (Müller et al., 1986). In dem zentromerischen Bereich des Y-Chromosoms gibt es alphanoiden Satelliten-DNA DYZ3 (Wolfe et al., 1985; Tyler-Smith et al., 1988).

Es besteht Hemizygotie dadurch, daß nur (im Normalfall) ein Y-Chromosom vorhanden ist, im Gel ist daher nur eine Bande zu finden; Homo- oder Heterozygotie gibt es nicht.

Im Stammbaum geben immer die Väter ihr Y-Chromosom an ihre Söhne weiter, daher haben im Regelfall Brüder, Väter, Söhne und weitere Verwandte (z.B. Großvater väterlicherseits, Enkelsohn), sofern sie über männliche Linie verwandt sind, dieselben STR-s in allen Y-Systemen (mit Ausnahme einer Mutation).

Y-Marker sind insbesondere bei Sexualdelikten sehr hilfreich (Prinz et al., 1993). Es besteht nämlich ein Vorteil in der Unabhängigkeit des Nachweises vom eventuellen Mischungsverhältnis der Sekrete in der Spur. Es wird nur männliche DNA amplifiziert.

Die Geschlechtstypisierung forensischer Proben bei sexueller Gewalt ist sehr relevant und das besonders, wenn die mikroskopische Identifikation von Spermien durch die X-Y-PCR der extrahierten DNA bestätigt ist. Die DNA-Geschlechtstypisierung ist oft erfolgreich, auch wenn mikroskopisch keine Spermien beobachtet werden konnten. Im Gegenteil, die mikroskopische Identifikation von wenigen Spermien führt nicht immer zu der erfolgreichen DNA-Typisierung (Pfitzinger, Ludes et al., 1993).

Es lassen sich in Mischspuren Zellenteile, die in wesentlich geringerer Menge (unter 5-10% des Hauptanteils) enthalten sind, häufig nicht zweifelsfrei typisieren. Mit der Entdeckung der Y-chromosomalen STR-Systeme, d.h. polymorphen männlich spezifischen Systemen, gelang zumindest eine Teillösung des Problems. Es konnte gezeigt werden, daß sich mit diesen PCR-Systemen männliche DNA in Mischungen aus weiblicher und männlicher DNA nachweisen läßt (Prinz et al., 1997).

Y-chromosomale Systeme können zum Screening von Spuren auf mögliche männliche Zellanhaftungen dienen und bei positivem Ergebnis kann ergänzend zur Erhöhung der Aussagekraft mit autosomalen STR-Systemen weitertypisiert werden.

Zum kombinierten Geschlechts- und Identitätsnachweis bieten sich hochpolymorphe Y-chromosomal lokalisierte STR-Systeme an, z.B. DYS19, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385, DYS389I/II, YCAII (Roewer L. et al., 1992; Kayser M. et al., 1997). Für Spurenuntersuchungen wurden z.B. DYS19, DYS385, DYS389 I/II, DYS390 eingesetzt. Sie sind sehr sensitiv und selbst relativ lange Fragmente des DYS385 und DYS389 I/II lassen sich in Spuren gut nachweisen. Es gibt auch weitere interessante Y-Marker wie z.B. DYS391, DYS393, DYS392, DYS391. In vielen Fällen ist allein mit der Untersuchung mehrerer Y-Systeme eine Identitätswahrscheinlichkeit von ca. 99% zu erreichen.

Auf dem Y-Chromosom wurden auch wenig polymorphe Loci gefunden wie z. B. DYS288, DYS388, YCAI, DXYS156Y, die für die forensischen Anwendungen nicht empfehlenswert sind.

STR-Systeme werden in der Forensik seit Jahren eingesetzt, so daß sie molekular-, populations- und familien-genetisch hervorragend charakterisiert sind und ständigen nationalen und internationalen Qualitätskontrollen (Ringversuche EDNAP, GEDNAP) unterliegen.

1.1.4. DNA - Datenbanken

Um die Tausende DNAs von Menschen und Tatorte zu vergleichen, benötigt man umfangreiche DNA-Datensammlungen („Datenbanken“).

Sie entstehen seit 1995 in immer mehr Ländern der Welt, wobei die USA und England Pionierarbeit geleistet haben. In den englischsprachigen Ländern ist die Kriminalistik traditionell ein besonders bekanntes Fach, und die Bürger hatten wesentlich weniger Bedenken gegen forensische DNA-Datensammlungen als die meisten Mitteleuropäer. Die weltweit erste nationale DNA-Datenbank wurde in der Geschäftsstelle des *Forensic Science Service (FSS)* im englischen Birmingham (Midlands) eingerichtet (Newnham, 1996).

Auch Irland, Dänemark, Schweden, Norwegen, Österreich, Italien, Finnland und die Niederlande haben den neuen kriminalistischen Weg bereits seit etwa 1996 beschritten. In den meisten dieser Länder gilt der Grundsatz, daß DNA-Typisierungsergebnisse nur über solche Personen erstellt und gespeichert werden dürfen, denen im Falle einer Verurteilung eine Haftstrafe von mindestens ein bis zwei Jahren droht.

Das Datenbanksystem des FBI heißt „*Combined DNA Index System (CODIS)*“ und ist zahlreichen kleinen Datenbanken übergeordnet. So hat z.B. die Stadt New York eine Datenbank mit den DNA-Typen örtlicher Straftäter, es gibt aber auch eine weitere Datensammlung für den Staat New York. In der Regel werden die Daten eines Verbrechers erst dann in die CODIS – Datenbank übertragen, wenn er in mehreren Staaten auffällig geworden ist bzw. eine besonders schwere Straftat begangen hat.

Im Rahmen von CODIS werden in USA 13 STR-Systeme untersucht:

D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, FGA, TPOX, D8S1179, VWA, CSF1PO, D16S539, D7S820, D13S317, D5S818.

In Belgien war es noch 1994 unmöglich, eine Datensammlung einzurichten. Der Skandal um den Kindermörder Dutroux und seine Hintermänner sorgte im August 1996 für eine abrupte Kehrtwende.

Deutschland und Frankreich wehrten sich bis etwa 1997 gegen die Einführung von Datensammlungen. Erst als auch hierzulande mehrere Fälle grausamer Sexualmorde an Kindern nicht mit herkömmlichen Mitteln geklärt werden konnten, wurden die Gesetze und Regelungen zur Datenspeicherung von individuellen DNA-Mustern geändert.

Am 17. April 1998 wurde die zentrale DNA-Analyse-Datei als Verbunddatei beim Bundeskriminalamt eingerichtet. Der Zweck der Datei besteht in der Aufdeckung von Tatzusammenhängen, sowie im Erkennen von Mehrfachtätern.

Deutschland untersucht fünf STR-Systeme: TH01, VWA, FGA, SE33, D21S11 (Kube et al., 1998).

Österreich und Großbritannien benutzen zusätzlich noch zwei STRs: D8S1179 und D18S51. Trotz der stark steigenden Effizienz der Datengewinnung werden zweierlei Arten von Ergebnissen der DNA-Analysen grundsätzlich nie in Datenbanken eingetragen und gespeichert: DNA-Ergebnisse aus Verwandtschaftstests und aus kleinen Reihenuntersuchungen wie derjenigen von 1 500 der insgesamt 5 000 Männern des Dorfes Vechelde, in dem 1996 die verstümmelte Leiche einer Schülerin aus Uelzen gefunden wurde. DNA-Typisierungsdaten aus Verwandtschaftsfällen und örtlich begrenzten Reihenuntersuchungen werden ausschließlich dann gesammelt, wenn die Häufigkeit von Allelen in einer großen Bevölkerungsgruppe ermittelt werden soll. Es ist dabei nicht möglich, die DNA-Muster jemals ihren Trägern zuzuordnen, weil nur die reinen Allelbezeichnungen ohne persönliche Informationen erfaßt werden. Umgekehrtes gilt für DNA-Typisierungen von Straftätern. Hier zeichnet sich weltweit die Tendenz ab, auch DNA-Typen von Menschen abzuspeichern, die sich wegen schwerer Straftaten bereits in Haft befinden, also ohne daß ein Gerichtsverfahren gegen sie läuft. Dadurch sollte es z. B. nach der Freilassung dieser Menschen schnell möglich sein, Rückfälle anhand biologischer Tatortspuren zu erkennen.

1.1.5. Die mitochondrielle DNA

Der weitaus größte Teil der genetischen Information einer Eukaryonten-Zelle ist in der DNA des Zellkerns gespeichert, doch ein kleiner, aber für das Leben der Zelle wesentlicher Teil befindet sich auf der DNA in Mitochondrien.

Die mtDNA-Analyse ist mit Abstand das sensitivste Verfahren in der forensischen DNA-Analytik und kommt in schwierigsten Identifikationsfällen zum Einsatz, z.B. für die Analyse von exhumierten Leichenmaterial, mumifizierten oder skelettierten Körpern.

Von besonderer Bedeutung ist der uniparentale Erbgang von mtDNA, die ausschließlich in maternalen Linie vererbt wird. Es lassen sich damit auch entfernte Verwandte in mütterlicher Linie zur Feststellung der Identität eines unbekanntes Toten heranziehen.

1.1.5.1. Die Menge der mtDNA in menschlichen Zellen

Im Gegensatz zur Kern-DNA, die in der Regel nur einmal pro Zelle vorkommt, findet sich pro Zelle – je nach Zelltyp – eine unterschiedliche Anzahl an Mitochondrien.

Anzahl der Mitochondrien pro Zelle:

Mitochondrien entstehen unabhängig von der Kernteilung. Sie vermehren sich während der Zellproliferation. Jedes Organell teilt sich einmal pro Zellzyklus, so daß die Zahl der Mitochondrien pro Zelle im wesentlichen gleich bleibt.

Eine Zelle kann nur einige von Mitochondrien haben oder auch ein paar hundert, sogar einige tausend, je nachdem, wieviel Energie sie braucht.

Die geringste Anzahl an Mitochondrien weisen Spermien auf (etwa 50), die höchste Anzahl besitzen Eizellen mit etwa 10 000-1 000 000 Mitochondrien. Zellen mit besonders intensivem Stoffwechsel, wie Leberzellen, enthalten bis zu 1000 Mitochondrien.

Der Energiestoffwechsel in Herzmuskelzellen ist erheblich intensiver als in den Zellen des Pankreas. Da in den Herzmuskelzellen als Ort des aeroben Glukoseabbaus besonders viel ATP bereitgestellt werden muß, sind hier besonders viele Mitochondrien zu finden.

Die im forensischen Zusammenhang sehr häufig zu untersuchenden Epithelzellen haben etwa 1000 Mitochondrien pro Zelle (Stoneking et al. 1991).

Die kurze durchschnittliche Lebensdauer von Mitochondrien (in der Leberzelle der Ratte etwa eine Woche) bedingt ihre ständige Erneuerung (Geneser, 1990).

Zudem ist zu berücksichtigen, daß ein Mitochondrium mehrere DNA-Moleküle enthalten kann. Die Mitochondrien der meisten Zellarten enthalten in ihrem Matrixraum 5 bis 10 DNA-Moleküle. Höhere Werte (bis zu 50 Moleküle / Mitochondrium) sind die Ausnahme. Normalerweise befinden sich also in den menschlichen Zellen mehrere tausend Kopien des mtDNA – Moleküls. Die höhere Kopienzahl von mtDNA pro Zelle begünstigt eine Amplifikation der mtDNA auch bei sehr geringer Materialmenge (bei nur weniger pg) (Holland et al., 1994 (b)).

1.1.5.2. Das mitochondrielle Genom

Das mitochondrielle Genom des Menschen besteht aus nur einem einzigen zirkulären DNA-Doppelstrang, dessen gesamte Nukleotidsequenz bekannt ist. Mt-DNA war komplett sequenziert im Jahr 1981 (Anderson et al., 1981).

Die linearen Formen entstehen durch Strangbrüche bei der Untersuchung.

Mt-DNA ist nicht verbunden mit Proteinen vom Histontyp, im Gegenteil zur Kern-DNA (Kapeller, 1990).

Man unterscheidet zwei Stränge der mtDNA:

-ein schwerer (heavy) H-Strang

-ein leichter (light) L-Strang.

Die beiden DNA-Einzelstränge unterscheiden sich deutlich in ihrer Basenzusammensetzung:

- der schwere (H) Strang enthält viel Guanin

- der leichte (L) Strang enthält viel Cytosin.

Das mitochondrielle Genom besitzt eine äußerst kompakte Struktur:

- etwa 93 % der mtDNA-Sequenzen sind kodierend

- es gibt keine Introns, keine Rekombination

- auffälliges Fehlen repetitiver DNA.

In den meisten Fällen stoßen die kodierenden Sequenzen benachbarter Gene aneinander oder werden nur durch ein oder zwei nichtcodierende Basen getrennt.

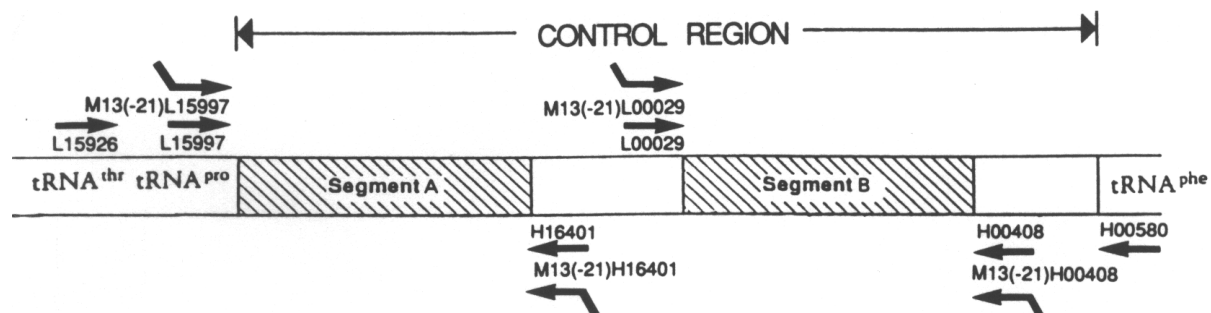
Das mitochondrielle Genom ist 16 569 bp (Basenpaaren) lang. Es ist deutlich kürzer als viele bakterielle Genome (z.B. das von E. Coli mit 4,6 Mb). Es gibt 37 mitochondrielle Gene mit 44 % GC-Gehalt. 28 Gene liegen auf dem schweren, 9 auf dem leichten Strang. H-Strang ist also dicht vollgestopft mit Genen, während auf dem L-Strang nur die Gene für ein Protein (ND6) und für 8 tRNAs liegen (Knippers et al., 1990).

13 der 37 Gene kodieren Polypeptide, die auf mitochondriellen Ribosomen synthetisiert werden. Sie liefern einige Untereinheiten für vier der fünf respiratorischen Komplexe, der vielkettigen Enzyme der oxidativen Phosphorylierung, die an der ATP-Produktion beteiligt sind. Die Proteine, die von mitochondriellen Ribosomen synthetisiert werden, müssen ihre Aufgabe innerhalb der Mitochondrien erfüllen.

Die übrigen 24 mitochondriellen Gene codieren 2 rRNA-Moleküle, 22 Arten von tRNA sowie wenige (etwa zehn) Arten von mRNA, die zum mitochondriellen Proteinsyntheseapparat gehören.

1.1.5.3. D-Loop - Region und Polymorphismus der mtDNA

Obwohl im Prinzip doppelsträngig, hat die mitochondrielle DNA doch in einem kleinen Teil eine Dreifachstrangstruktur. An dieser Stelle befindet sich ein zusätzlich synthetisierter Abschnitt, ein kurzes Stück vom H-Strang der mitochondriellen DNA, die 7S-DNA (D-Loop-Displacement).



Der einzige nichtkodierende mtDNA-Bereich ist der D-Loop (Displacement). D-Loop-Region mit bedeutender Größe 1122 Bp ist zwischen tRNA-Genen für Prolin und Phenylalanin lokalisiert. Hier bildet sich dadurch, daß zusätzlich ein kurzes Stück vom H-Strang der DNA, die 7S-DNA, synthetisiert wird, eine dreisträngige Struktur aus.

D-Loop nimmt einen besonderen Platz bei der Replikation der mtDNA:

Die Replikation startet an bestimmten Stellen: beim H-Strang im D-Loop, wobei der L-Strang als Matrize dient. Die H- und L-Stränge werden jeweils in einer Richtung repliziert. Erst wenn zwei Drittel des H-Tochterstrangs synthetisiert sind, wird der Startpunkt für die L-Strang-Synthese zugänglich. Dann wird der L-Strang mit dem H-Strang als Matrize in Gegenrichtung repliziert.

Der Kontroll-Bereich der mtDNA, der nicht-kodierende D-Loop, kann benutzt werden, um die unverwandten Individuen zu unterscheiden (Holland, 1994 (a)). D-Loop ist nämlich der polymorphste Teil der mtDNA. Die D-Loop-Region menschlicher mt-DNA hat bekannterweise eine ziemlich hohe evolutionäre Rate (Kurosaki et al., 1993).

Die größte Sequenzvariabilität ist in zwei je ca. 400 Bp langen hypervariablen Segmenten HV1 und HV2 des D-Loops vorhanden (Stoneking et al., 1991). Die Mehrheit der polymorphen Information ist zwischen den Positionen 16024 und 16365 des HV1 Segments (26 %) und zwischen den Positionen 73 und 340 des HV2 Segments (24 %) (Holland et al., 1994 (b)). HV1 ist am variablesten im D-Loop aller tierischen mt-DNA-s (Savolainen et al., 1997).

Lutz et al. (1998) liefern den Beweis der Existenz des dritten hypervariablen Segments (ein bißchen kleinerer Variabilität (18 %)), dessen Position zwischen 438 – 574 Bp ist. Im Gegensatz dazu, die zwischen den hypervariablen Segmenten lokalisierten Sequenzen zeigen nur 3 – 7%-ige Nukleotidsubstitution (Lutz et al., 1998).

Die Mutationsrate der D-Loop-Region ist vermutlich 1 Polymorphismus jede 200 – 400 Generationen. Unpublizierte Daten suggerieren höhere Mutationsraten. Der Polymorphismus wurde zwischen Individuen beobachtet, welche nur mit 18 Generationen getrennt waren (Holland et al., 1994 (b)).

Die Rate der Sequenzdifferenz der HV1-Region bei Menschen wird auf höchstens 33 % per ein Million Jahren geschätzt. HV1 und HV2 zeigen ein ungewöhnliches Muster der Evolution, welches eine extensive Bildung von Insertionen, Deletionen und Erzeugung

der kurzen Repeats (Wiederholungen) enthält (Savolainen et al., 1997). Für die Mehrheit der polymorphen Stellen trifft nur Mutationstyp zu. Nur in 14 von 202 Positionen (7%) wurden zwei oder mehr unterschiedliche Mutationstypen beobachtet. Unter den Transitionen, sind die Pyrimidin-Substitutionen überwiegend, C–T Transitionen kommen ebenfalls oft vor. Unter den Transversionen wurde keine eindeutige Präferenz beobachtet. Die Längevariationen (Deletionen, Insertionen) kommen nur selten und gewöhnlich nur in sehr begrenzter Größe im D-Loop der mtDNA vor.

MtDNA stellt einen einfachen Locus dar. Man kann voraussehen, daß unterschiedliche Mutationen voneinander abhängig sind, z.B. die Nukleotid-Substitutionen auf den Positionen 16294 und 16296 sind oft miteinander verbunden (Lutz et al., 1998).

Insgesamt finden sich über 120 polymorphe Substitutionsstellen im D-Loop-Bereich (Anderson et al., 1981; Stoneking et al., 1991).

Der größte Informationsgewinn läßt sich durch eine Sequenzierung der D-Loop-Region erzielen. Obwohl die Sequenzanalyse des HV1 und HV2 Segments bevorzugt wird, hat man weitere Techniken für den schnellen Vergleich der mtDNA-Sequenztypen entwickelt, so daß man eine Selektion durchführt, bevor man mit der Sequenzierung beginnt. Doch Techniken müssen noch weiter entwickelt und so raffinierter werden (Holland et al., 1994 (b)).

Eine Variante, die sich durch Fragmentlängendetektion nachweisen läßt, ist eine 9 Bp-Deletion, die sich nicht im D-Loop-Bereich, sondern in der Region V befindet. Mittels PCR-Amplifikation können entweder ein 120 Bp-Fragment oder die 111 Bp-Deletionsvariante nachgewiesen werden (Higuchi et al., 1988). Die 9 Bp-Deletionsvariante kommt vor allem im ostasiatischen Raum sehr häufig vor (Brinkmann et al., 1997).

In der D-Loop-Region befinden sich nicht nur Sequenzpolymorphismen, sondern auch ein 2-bp-Repeat-Polymorphismus. Dieser tandem-repetitive Bereich zeigt bei Kaukasiern 4 Allele (Bodenteich et al., 1992). Wenngleich die Diskriminationskraft dieses Locus relativ gering ist, so muß doch der enorme Sensitivitätsvorteil der mtDNA-Typisierung gegenüber Kern-DNA, insbesondere in den Fällen mit sehr geringen Template-DNA-Mengen, (<1 ng) bedacht werden.

Die forensische Validierung der mitochondrialen Kontrollregion erfordert einerseits die Frequenzbestimmung der Haplotypen und andererseits die Abschätzung der Mutationsrate. Holtz und Schmidt (1996) haben in einer 5-Generationen-Familien keine Mutation der maternalen Sequenz beobachtet. Sie haben auch keine Heteroplasmie beobachtet. Ihre Ergebnisse weisen auf die vertikale und horizontale Stabilität dieses Genortes hin.

1.1.5.4. Mutationen der mtDNA

Mutationen in der mitochondrialen DNA beim Menschen (und bei anderen Säugetieren) zeigen zwei Besonderheiten, die sich bis jetzt nur schwer erklären lassen.

Die mütterliche Oocyte enthält ungewöhnlich viele mtDNA-Moleküle (~ 100 000). Im Normalfall sind bei einem Individuum ~ 99,9 % der mtDNAs identisch (Homoplasmie). Wenn jedoch eine neue Mutation auftritt und sich in der mtDNA-Population ausbreitet, gibt es schließlich zwei mtDNA-Genotypen mit signifikanter Häufigkeit (Heteroplasmie).

Die neue Mutation betrifft nur ein einziges Molekül, das sich stark vermehren muß, um schließlich alle anderen mtDNA-Moleküle innerhalb der Population zu ersetzen. Auf diese Weise wird der homoplasmische Zustand wieder hergestellt. Da es in Säugetierzellen anscheinend nicht zu einer Rekombination zwischen den mtDNA-Molekülen kommt, muß die Fixierung auf andere Weise erfolgen (dennoch ist eine Rekombination denkbar, auch wenn der Beweis dafür bis jetzt fehlt).

Mutationen werden zehnmal schneller in der mtDNA fixiert als bei den entsprechenden Sequenzen im Kerngenom (Brown et al., 1979).

Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, daß es während der Oogenese einen Engpaß gibt, der die effektive Zahl der mtDNA-Moleküle drastisch verringert. Später setzt eine Überreplikation der mtDNA-Moleküle ein. Bei neutralen Polymorphismen würde sich nach dem Engpaß sehr schnell eine erneute Homoplasmie herausbilden. Dies könnte bedeuten, daß während der Aufteilung des Cytoplasmas in der frühen Embryonalphase eine Segregation mitochondrieller Genotypen möglich ist.

Ein vollständiger Wechsel des mtDNA-Typs nach wenigen Generationen (manchmal sogar nach einer Generation) ist möglich. Dies weist darauf hin, daß der Engpaß sogar nur aus einem einzigen mtDNA-Molekül bestehen könnte (Koehler et al., 1991).

Andere Mutationen zeigen jedoch keinen so schnellen Wechsel:

Der Unterschied zwischen schnell und langsam segregierenden mtDNA-Genotypen läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß während der Engpaßphase nur ein einziges Mitochondrium existiert, das entweder homoplasmisch oder heteroplasmisch ist. Das setzt jedoch voraus, daß in menschlichen Zellen tatsächlich einzelne Mitochondrien existieren. Neuere Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, daß Mitochondrien Teil eines einzigen dynamischen zellulären Komplex sind (Hayashi et al., 1994). Einige Polymorphismen können vielleicht sogar den Engpaß überstehen (Poulton, 1995).

Zur Zeit ist noch nicht völlig klar, warum es so häufig zu Mutationen in der mtDNA kommt. Es wurden verschiedene Erklärungen vorgeschlagen:

- Der hohe Fluß von Sauerstoffradikalen in der Atmungskette könnte zu erheblichen oxidativen Schäden in der mtDNA führen, die ist nicht durch Histone geschützt.
- Die mtDNA durchläuft wesentlich mehr Replikationszyklen als die chromosomale DNA, die meisten Mutationen entstehen während der DNA-Replikation.
- Die Replikation der mtDNA verläuft relativ langsam und hochgradig asymmetrisch. Die Replikationsursprünge für den H- und den L-Strang liegen in verschiedenen DNA-Abschnitten. Während der Replikation der mtDNA verdrängt der neu synthetisierte H-Strang den ursprünglichen H-Strang, der danach solange einzelsträngig bleibt, bis der neue Tochter-L-Strang synthetisiert worden ist. Einzelsträngige DNA ist jedoch besonders anfällig für spontan auftretende Mutationen. So kommt es 200mal häufiger zu einer spontanen Desaminierung von Cytosin zu Uracil als bei doppelsträngiger DNA. Zum Beispiel treten G→A Transitionen im L-Strang neunmal häufiger auf als im H-Strang, vermutlich aufgrund der großen Häufigkeit von spontanen Desaminierungen von C zu U auf dem H-Strang (Tanaka und Ozawa, 1994).
- Die Mitochondrien in tierischen Zellen verfügen zwar über die sehr genau arbeitende DNA-Polymerase γ , die in 3'→5'-Richtung eine hoch aktive exonucleolytische Korrekturlesefunktion besitzt, andererseits gibt es in Mitochondrien (im Gegensatz zum Zellkern) kein Reparatursystem, das einzelne Nukleotide herauschneiden und ersetzen kann.

Bei älteren Menschen ist eine tendentielle Zunahme der Variationen zu beobachten, und die Ansammlung von Mitochondrien mit einem Defekt in der Energieerzeugung ist möglicherweise *ein Alterungsfaktor*.

Es gibt die Hypothese, daß die Alterung ein Nachlassen der oxydativen Phosphorylierung ist, aufgrund des Zuwachses an den somatischen Mutationen in der mt-DNA (Fouret et al., 1993). Die Deletionen sind verbunden mit dem natürlichen Alterungsprozeß. Im mitochondrialen Genom existieren bis zu 20 verschiedene Deletionen.

Die *4977 Bp-Deletion* kommt am häufigsten vor und weist gleichzeitig eine Korrelation zum Lebensalter auf. Je fortgeschrittener das Alter eines Individuums, desto höher ist der Anteil der deletierten mitochondrialen DNA.

In der Altersgruppe von 0-20 Lebensjahren war trotz des Einsatzes von 500 ng Gesamt-DNA als template keine deletierte mt-DNA nachweisbar (Meißner et al., 1996). Bei den Menschen

zwischen 20-30 Lebensjahren hat Fouret et al. (1993) diese Deletion in 13 von 15 Fällen gefunden. Es reichte 1 ng Gesamt-DNA bei den Menschen ab dem 70. Lebensjahr um die 4977 bp-Deletion in allen Fällen zu finden (Meißner et al., 1996; Fouret et al., 1993).

Das mtDNA-Deletionsniveau ist erhöht bei den Individuen mit Degenerationkrankheiten, wie Parkinsonsche Krankheit, Kardiomyopathies, Cyrrhosis. Jedoch ist es noch nicht bekannt, ob die mtDNA-Deletion die Folge der Krankheit ist, oder ihre Ursache.

Man kennt noch nicht alle Faktoren, welche die mtDNA-Deletionen verursachen. Es ist mit Sicherheit das Sonnenlicht, was die Deletionshäufigkeit in der mtDNA drastisch erhöhen kann (Fouret et al., 1993).

Nicht alle mitochondriellen Anomalien gehen auf Mutationen im mitochondriellen Genom zurück. Viele molekulare Komponenten der Mitochondrien werden durch Gene im Zellkern kodiert, und verschiedene Gene des Zellkerns steuern mitochondrielle Prozesse.

1.1.5.5. Die mtDNA in der Forensik

Die Untersuchung der extrachromosomalen DNA hat im Laufe der letzten Jahre zunehmende forensische Relevanz erlangt (Budowle et al., 1990; Sullivan et al., 1992; Gill et al., 1994).

MtDNA ist forensisch wertvoll aus folgenden Gründen:

1. hohe Kopienanzahl pro Zelle
2. mütterliche Vererbung (wahrscheinlich keine Rekombinationen in Meiose)
3. äußerst polymorpher Charakter
4. 1981 vollständig sequenziert
5. ein Individuum hat gewöhnlich (es gibt Ausnahmen) einheitliche mt-DNA-Population (Infolge dessen ist die mtDNA zwischen Mutter und Kind und zwischen Geschwister identisch.)

Wenn man nur noch geringe Mengen von Kern-DNA hat oder die Kern-DNA so weit degradiert ist, daß die Kern-DNA-Typisierung „nichts“ bringt, kann noch die mtDNA-Analyse erfolgreich durchgeführt werden (Lutz et al., 1996 (a)). Die Analyse der mtDNA ist meist effektiv, wenn die extrahierte DNA sehr degradiert oder in Menge der unter 1 ng ist (Brinkmann et al., 1997).

Die Sequenzanalyse der mtDNA wird in zunehmendem Maße eine populäre Methode bei der Identifikation der sterblichen Überreste von Menschen. Aufgrund dessen, daß ein Individuum gewöhnlich homoplasmisch in Bezug auf sein mtDNA-Genom ist, sind die gewonnenen Sequenzen aus verschiedenen Körperteilen identisch, vorausgesetzt, daß die Körperteile ein und der selben Person gehören (Wilson et al., 1995).

Die größte Besorgnis bei der Benutzung der mtDNA für forensische Zwecke ist die potentielle Heterogenität innerhalb eines Individuums (*Heteroplasmie*). Jedoch war ein hoher Grad der Sequenzhomogenität in somatischen Zellen bewiesen und die Heteroplasmie (die Mischung der Mutante und des ursprünglichen Typs der mtDNA in derselben Zelle) war bei den Menschen vorzufinden, die bestimmten neuromuskularen Krankheiten haben und man konnte sie nicht in der nicht-kodierenden Region beobachten (Piercy et al., 1993).

Matrilineares Vererbungsmuster des mitochondrialen Genoms:

Die Vererbung ist matrilinear, weil die Mitochondrien des Vaters nicht auf die Kinder übergehen, was nicht den Mendelschen Regeln folgt.

Begründung: In den männlichen Samenfäden befindet sich die mtDNA im Mittel- und im Schwanzstück, nicht im Kopfteil. Bei der Befruchtung der reifen Eizelle kommt aber nur die Kern-DNA aus dem Kopf in das Zellinnere. Hals und Schwanz des Samenfadens bleiben draußen. Deshalb besitzt die sich entwickelnde menschliche Zygote nur mütterliche mtDNA (Krause et al., 1998). Männer wie Frauen erben gleichermaßen ihre Mitochondrien von der Mutter. Deswegen dient die mtDNA zum Teil zur Identifikation und vor allem zur Feststellung der mütterlichen Verwandtschaft.

Die Art des mtDNA-Erbganges hat auch ihre Nachteile für die Forensik:

Des mütterliches Erbganges wegen kann man mit der mtDNA-Analyse die Geschwister und die Mutter voneinander nicht unterscheiden. Und deswegen kann sie nicht für die Vaterschaftsbestimmung benutzt werden.

Die mtDNA-Analyse ist nützlich für Identifikation und für Verwandtschaftsbestimmung mütterlicherseits. Wenn nahe Verwandte für den Vergleichszweck nicht erhältlich sind (Vater, Mutter, Geschwister, Kinder), kann die mtDNA-Sequenz von fernen Cousins und Cousinen (mütterlicherseits) direkt verglichen werden mit der Sequenz von den sterblichen Überresten, um die Identifizierung durchzuführen. Entfernte mütterliche Verwandtschaft kann also das Referenzmaterial für den direkten Vergleich liefern.

Dies kann verschiedene praktische Anwendungen im forensischen Bereich haben.

Ein sehr großes Problem ist der schwarze Markt mit den Kindern, deren Verwandte (aus mütterlicher Seite) könnten durch die mtDNA-Analyse gefunden werden.

Die mtDNA-Probe von der Spur ist identisch mit der mtDNA von allen Geschwistern und Halbgeschwistern des Spurenverursachers, wenn diese von der gleichen Mutter abstammen. Weiterhin liegen auch identische Befunde vor bei der Schwester der Mutter (Tante) und deren Kindern, dem Bruder der Mutter (Onkel), der Großmutter des Spurenverursachers.

Sollte die mt-DNA einmal zur Altersbestimmung (Zunahme der 4977 bp-Deletion der mitochondrialen DNA mit steigendem Lebensalter) von forensischen Proben eingesetzt werden, so ist es entscheidend, daß Verunreinigungen der Probe mit Fremd-DNA, die von Insekten, Pilzen, oder aber aus Körperflüssigkeiten von Tieren mitextrahiert wird, keinen Einfluß auf die quantitative Abschätzung hat.

Der Kontroll-Bereich der mtDNA enthält sehr polymorphe Sequenz, welche man benutzen kann, um die unverwandten Individuen zu unterscheiden (Holland, 1994 (a)).

Am Tatort lassen sich oft Haare finden. Und nicht nur menschliche Haare, sondern auch tierische Haare können von forensischem Interesse sein (besonders Hundehaare sind häufig). Forensisch sichere Ergebnisse der mtDNA-Analytik aus abgeschnittenen oder ausgefallenen Haaren sind noch schwierig, aber möglich.

Mitochondriale DNA ist ein besonders empfindlicher Nachweis, weil von der Kern-DNA nur 1-2 Kopien vorliegen, bei der mtDNA aber sind es meist viele Tausend pro Zelle. Es genügen also Bruchteile einer Zelle z. B. abgeschilferte Hornhautschüppchen an einem Drosselwerkzeug, das der Täter mit bloßen Händen kräftig zugezogen hat.

Stoneking et al. (1991) versuchten mit 23 Oligosonden (15 bis 20 Bp lang) die Variationen im D-Loop zu detektieren. Sie konnten 274 Variationstypen in einer Stichprobe von 525 Individuen aus fünf verschiedenen ethnischen Gruppen differenzieren.

Die Wahrscheinlichkeit der Zufallsübereinstimmung zweier Muster nicht verwandter Personen lag bei 2,6 %.

Sullivan et al. (1992) gelang es mit einer aus Haaren extrahierten DNA-Menge von < 200 pg eine verwandtschaftliche Zuordnung in einem Identifikationsfall zu erzielen.

Sie bestimmten bei ihrer Untersuchung die durchschnittliche Wahrscheinlichkeit der Sequenzübereinstimmung zweier nicht verwandter Individuen mit 1,9 %.

Die Eignung der Mitochondrien-DNA-Analytik, insbesondere auch im Zusammenhang mit der Klärung von Verwandtschaftsverhältnissen an sehr altem biologischen Material, konnten Gill et al. (1994) bei der Untersuchung der Romanov-Zarenfamilie zeigen. Insgesamt ließen sich im Rahmen dieser Studie 19 hypervariable Positionen in der D-Loop-Region differenzieren.

Weitere für die forensische Praxis relevante Validierungsstudien führten Wilson et al. (1995) durch, um den Einfluß verschiedener Gewebearten, (insbesondere Haare bzw. Haarschäfte) sowie chemischer Kontaminationen und Kontaminationen mit Körperflüssigkeiten anderer Personen zu testen. Sequenziert wurden die gleichen D-Loop-Bereiche wie bei Sullivan et al. (1992). Neben der Amplifikation und Sequenzierung problematischer Spuren, wie Blut auf Blue Jeans oder Leder, gelang auch die Typisierung von Haarschaft-DNA.

Horai et al. (1990) haben beobachtet, daß viele polymorphe mtDNA-Stellen spezifisch für mongoloide, negroide und kaukasoide Rasse existieren. Es ist natürlich auch für die Forensik von Bedeutung.

Alle Autoren weisen ausdrücklich daraufhin, daß generell bei dieser extrem sensitiven Methodik erhöhte Kontaminationsrisiken mit Fremd-DNA bestehen. Forensisch relevant ist diese Untersuchungsmethodik insbesondere in Fällen mit sehr wenig DNA und auch in Identifizierungsfällen. Bei Problemspuren wie telogenen Haaren, Haarschäften oder auch extrem alten Materialien (Skelettfunde, mumifiziertes Gewebe) bestehen gute Typisierungschancen (Ginther et al., 1992).

Die mtDNA-Analyse ist sehr hilfreich, auch bei der Identifizierung von unbekanntem Leichen und Skeletten sowie bei Spuren von historischer Bedeutung. MtDNA ermöglicht die Identifizierung von Mikrospuren und degradiertem biologischen Material, wenn die Kern-DNA-Analyse versagt.

1.2. DNA-Analyse an altem Skelettmaterial

1.2.1. Historisches Skelettmaterial

Ein bedeutendes Quellenmaterial, das unmittelbar Aufschluß über den Menschen vergangener Zeiträume zu geben vermag, sind seine körperlichen Überreste (Knochen), welche die Zeiten überdauern haben. Im wesentlichen sind dies Skelettfunde, Leichenbrände, Mumien und Moorleichen, von denen die beiden ersten zahlen- und verbreitungsmäßig die größte Bedeutung besitzen.

Aus ihnen erschließt der Anthropologe primär die individuellen biologischen Daten wie Alter, Geschlecht, Körperhöhe und besondere Merkmale. Werden die Individualdaten miteinander verbunden, z. B. bei Skelettfunden eines Friedhofes, ergeben sich Aussagen über die Biologie der ehemaligen Bevölkerung. So sind historische Skelettfunde von zugleich biologischem und historischem Erkenntniswert.

Die überwiegende Zahl der Körpergrabskelette wird als Einzelbestattung aufgefunden,

d.h. es wurde je ein Individuum in einer eigenen Grabgrube beigesetzt. Doppel- oder Dreifachbestattungen sind vergleichsweise selten. Neben diesen gibt es aber auch Kollektivbestattungen, welche für bestimmte Zeitabschnitte sogar typisch sein können (z. B. neolithische Totenhütten).

Sehr häufig befinden sich die Skelette in einem Kollektivgrab nicht mehr in einem anatomischen Verband, so daß die Identifikation einzelner Individuen stark erschwert oder sogar unmöglich wird.

Eine der interessantesten Aufgaben der Anthropologen ist, die Verwandtschaftsverhältnisse der Bestatteten zu erkennen, Familienverbände zu rekonstruieren und Genealogien zu erstellen.

Es besteht nach wie vor die dringende Forderung, die Aussagekraft der morphologischen Merkmale an Skelettkollektiven mit bekanntem Verwandtschaftsgrad zu prüfen.

Von vielen Gräberfeldern ist bekannt, daß Familienangehörige auch in räumlicher Nähe zueinander bestattet werden, so daß die Feststellung der Distanzen zwischen einander ähnlichen Individuen stets in eine Verwandtschaftsdiagnose einbezogen werden sollte.

Da bei der morphologischen Vorgehensweise die Erbllichkeit der untersuchten Merkmale nur vermutet wird, ist die Analyse der DNA aus bodengelagerten Knochen von großem Interesse.

Mit der Geschlechtsdiagnose erhält man, neben dem Individualalter, die zweite grundlegende biologische Information über ein Individuum. Bei gestörtem und fragmentiertem Skelett ist es kaum morphologisch möglich. Da bietet sich auch die DNA-Analyse an. Mit der Entdeckung, daß man aus den alten Knochen DNA gewinnen kann, ergab sich die Möglichkeit vergangene Populationen zu studieren. DNA „überlebt“ besser in alten Knochen als in weichen Geweben. Möglich sind dabei sowohl Untersuchungen, die sich biologische Gruppenbildungen innerhalb einer Population zum Ziel nehmen, als auch Familienrekonstruktionen durch die Erstellung von Genealogien sowie Identifikationen durch einfache Vaterschafts- bzw. Elternschaftsanalysen und zwar durch die Verwandtschaftsbestimmung sowohl väterlicherseits wie auch mütterlicherseits.

Es ist eine große Herausforderung, verwandschaftliche Beziehungen von Individuen und Bevölkerungen historischer Epochen aufzuhellen. Die Anlage von Genbanken für historische Individuen könnte langfristig neben Geschlechts- und Verwandtschaftsdiagnosen von Einzelindividuen auch Interpopulationsvergleiche gestatten, wie dies an Rezentpopulationen möglich ist.

1.2.2. Die bodengelagerten Knochen

1.2.2.1. Die Knochen

Rund 200 Knochen hat der erwachsene Mensch, wenn man das Becken als einen Knochen betrachtet. Das ungeborene Baby hat mehr als 300 Knochen, von denen einige im Säuglingsalter und während der Kindheit zusammenwachsen. In seinem Grundaufbau ist das menschliche Skelett vergleichbar mit den Knochengerüsten aller 40 000 Wirbeltierarten, die es auf der Welt gibt (Parker, 1988).

Bei der Untersuchung von „Knochen“ müssen zwei Bedeutungen des Begriffs Knochen unterschieden werden. Zum einen ist Knochen das Organ, das aus Knochengewebe, Knochenmark, Knochenhaut, Knorpel und Blut besteht (engl. bones). Zum anderen wird mit diesem Begriff das „tote“ Knochengewebe, d.h. das Baumaterial, bezeichnet (engl. bone) (Eastoe, 1971).

Das Knochengewebe bildet den Hauptanteil des Skelettes und die Knochensubstanz wird beim Menschen alle 5-10 Jahren vollständig erneuert (Price, 1989).
Schon im 19. Jahrhundert erfolgten Analysen fossiler Knochen (Price et al., 1985).

Knochenmaterial hat gegenüber Weichgewebe den Vorteil, daß es in sehr vielen archäologischen Fundstätten vorhanden ist. Funde von Weichgeweben sind auf Regionen beschränkt, in denen Mumifizierung entweder aus kulturellen Gründen erfolgt oder eine natürliche Mumifizierung aufgrund der klimatischen Bedingungen (heiß, trocken) möglich ist. Lange Zeit wurde Knochenmaterial für Extraktionen alter DNA nicht in Betracht gezogen. Gemäß einer Hypothese sollte DNA in Knochenmaterial, das aufgrund seiner Lage im Körper relativ spät austrocknet, nur sehr schlecht erhalten sein. Doch alle Beobachtungen sprechen dafür, daß DNA in Knochenmaterial sehr gut präserviert wird (Hagelberg et al., 1989; Hagelberg et al., 1991; Hänni et al., 1990; Horai et al., 1989).

1.2.2.1.1. Makroskopischer Aufbau des Knochens

Nach der Form werden platte (z. B. Pelvis), kurze (z. B. Wirbel) und lange Knochen, sog. Röhrenknochen (z. B. Femur), unterschieden (Benninghoff et al., 1975).

Man unterscheidet zwei Schichten:

- die innere Substantia spongiosa
- die äußere Substantia compacta (dichte Masse ohne Zwischenräume)

Spongiosa unterscheidet sich makroskopisch deutlich von der Kompakta. Die Strukturen auf der mikroskopischen Ebene sind identisch in spongiösem und in kompaktem Gewebe (Vaughan, 1981).

Im Hinblick auf postmortale Kontamination sollten auch bei der Untersuchung von Hartgeweben eher kompakte Bereiche wie die Kompakta großer Langknochen zur Probenentnahme gewählt werden.

Bei den Röhrenknochen, etwa dem Humerus, Femur, der Tibia, Fibula besteht die Diaphyse aus Kompaktaknochen, der die Markhöhle als dickwandige Röhre umgibt. Die Enden der Röhrenknochen, die Epiphysen, werden vorwiegend von Spongiosaknochen gebildet. Platte Knochen wie die des Schädels bestehen aus zwei dicken Lagen von Kompaktaknochen, der Tabula externa und der Tabula interna, zwischen denen sich eine Spongiosaknochen-schicht erstreckt.

Die Kurzknöchen bestehen vorwiegend aus Spongiosa.

1.2.2.1.2. Mikroskopischer Aufbau des Knochens

Man unterscheidet vier Arten von Knochenzellen:

- Knochenstammzellen
- Osteoblasten
- Osteozyten
- Osteoklasten

Knochenstammzellen sind wenig differenzierte Zellen. Aus verschiedenen Stammzellen entwickeln sich die Osteoblasten und Osteoklasten.

Osteoblasten sind knochenbildende Zellen und synthetisieren die Interzellulärsubstanz des Knochens. Während der Knochenbildung haben sie im Zytoplasma beträchtliche Mengen alkalischer Phosphatase.

Osteozyten sind der dominierende Zelltyp des reifen Knochens. Sie sind die eigentlichen Knochenzellen. Sie entwickeln sich aus Osteoblasten. Die Osteozyten behalten eine gewisse Stoffwechselaktivität bei, da sie in ihrer unmittelbaren Umgebung durch Osteozyten-Osteolyse die Interzellulärsubstanz auflösen und Knochenminerale resorbieren können. Osteozyten spielen daher eine wichtige Rolle für die Homöostase des Kalziums. Osteoklasten sind knochenzerstörende Zellen. Viele der Osteoklasten liegen in flachen Mulden der Knochenoberfläche. Die Osteoklasten resorbieren Knochensubstanz und erschaffen so die Lakunen. Die Zelloberfläche zeigt tiefe Einfaltungen und Ausstülpungen. Zwischen den Falten und Vorsprüngen können Kristalle von Knochenmineralien liegen.

Die histologische Erhaltung des Knochens ist sehr variabel und das Skelettmaterial kann durch den Diagenese-Prozess tiefst verändert sein (Hackett, 1981; Bell, 1990). Die histologische Untersuchung an Knochen könnte dem anschließenden DNA-Prozessgewinn helfen.

1.2.2.1.3. Chemische Bestandteile des Knochens

Der Knochen kombiniert in einzigartiger Weise Härte und Stärke bei geringem Materialeinsatz und mit dem geringstmöglichen Gewicht.

Das Knochengewebe ist eine Kombination aus anorganischem und organischem Material und enthält ca. 20 % Wasser. Organischer und anorganischer Knochenbestandteil besitzen unterschiedliche mechanische Eigenschaften. Die Härte und damit die Stabilität des Knochens wird von seinem Gehalt an anorganischen Salzen bestimmt, seine Elastizität dagegen vom Kollagenanteil. Durch den speziellen Aufbau des Knochengewebes addieren sich die unterschiedlichen Eigenschaften beider Bestandteile nicht einfach, sondern es entsteht ein sog. Zwei-Phasen-Material mit einer neuen, besseren Qualität als die der Einzelkomponenten. Die Elastizität dieses zusammengesetzten Materials liegt in der Mitte zwischen den Werten für Kollagen und Hydroxylapatit. Seine Festigkeit ist jedoch größer als die der beiden Bestandteile (McGregor, 1983). Bei den bodengelagerten Knochen ist dies Gleichgewicht nicht mehr intakt.

Organische Bestandteile des Knochens

Ca. 30 % des getrockneten Knochengewebes adulter Individuen ist organisch und aus Kohlenstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Schwefel und Phosphor zusammengesetzt. Die organische Phase besteht zu ca. 90 % aus Kollagen. 10 % des organischen Anteils bilden Kohlenhydrate, Proteine, Peptide, Lipide u. a. m. Die kohlenhydrathaltige Komponente besteht aus Sialoproteinen und Proteoglykanen, die vorwiegend Chondroitinsulfat und kleine Mengen von Hyaluronsäure enthalten.

Das Kollagen ist vermutlich das häufigste im Tierreich vorkommende Protein. Im menschlichen Körper sind etwa ein Drittel aller Proteine Kollagene. Aus verschiedenen Geweben stammende Kollagene können unterschiedliche Eigenschaften besitzen (Geneser, 1990).

Das Knochenkollagen wird aus drei Polypeptidketten verschiedener Zusammensetzung gebildet. Aufgrund der besonderen Struktur und der chemischen Eigenschaften seiner Fasern wird es als Kernbereich für die Kristallisation des Hydroxylapatits, d. h. für den Beginn der Ossifikation, angesehen. Seiner komplexen und bindungsreichen Tertiärstruktur, seiner überwiegenden Wasserunlöslichkeit und der engen strukturellen Bindung an die anorganischen Knochenkomponente verdankt das Kollagen seine hohe chemische Stabilität, sowie einen hohen Grad an Zugfestigkeit und Elastizität (Grupe, 1986).

Anorganische Bestandteile des Knochens

Die anorganischen Bestandteile entsprechen beim Erwachsenen etwa 75 % des Trockengewichts der Knochen. Diese liegen zum überwiegenden Teil als Apatit vor. Es handelt sich dabei um Ablagerung kristallinen Kalziumphosphats. Das ideale Kristall, das Hydroxylapatit, ist ein Einkristall mit hexagonaler Gitterstruktur mit der Summenformel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Es zeichnet sich durch sehr kleine Kristalle aus, wodurch eine sehr große Oberfläche (ca. $180 \text{ m}^2/\text{g}$) existiert, die dem Stoffaustausch zwischen dem Mineral und dem restlichen Knochengewebe dient (Eastoe, 1971). Die Kristalle erscheinen als schlanke Stäbchen von etwa 3-6 nm Dicke und bis zu 60 nm Länge.

Neben der kristallinen Phase existiert ein geringerer Anteil von amorphen Calciumphosphat (Grube, 1986). Eine streng definierte chemische Zusammensetzung dieser Substanz ist nicht bekannt.

In Knochen junger Individuen ist der Anteil der amorphen Substanz höher als in denen ausgewachsener Individuen, d. h. mit zunehmendem Alter vergrößert sich der Anteil des Hydroxylapatits zuungunsten des Anteils des amorphen Calciumphosphats, während sich der Wassergehalt verringert.

Verkalkung (Kalzifizierung)

Die Ablagerung von Mineralien in der organischen Matrix von Knochen nennt man Verkalkung (Kalzifizierung).

Die Kalzifizierung hängt von der Kalzium- und Phosphatkonzentration in der extrazellulären Flüssigkeit ab. Die Interzellulärschicht des Knochens besteht aus einer organischen Matrix und anorganischen Salzen. Die organische Matrix umfaßt eine Grundsubstanz und darin eingebettete Kollagenfasern sind azidophil, da das Kollagen 90 % ihrer Masse ausmacht.

Die Anwesenheit von Kollagen ist für die Kalzifizierung erforderlich.

Die Natur des Verkalkungsvorgangs konnte bisher noch nicht umfassend aufgeklärt werden (Geneser, 1990).

Die Knochen enthalten über 99 % des Körperkalziums. 0,5 – 1 % davon liegen als austauschbares Kalzium vor, das rasch Kalziumionen an das Blutplasma abgeben oder aus ihm aufnehmen kann. Es handelt sich also hier um einen in enger Beziehung zum Kalziumgehalt des Blutes stehenden Puffermechanismus. Die Kalziumionen des Puffers lagern sich vermutlich in Form von CaHPO_4 an die Oberfläche der Apatitkristalle (Geneser, 1990) an.

Chemisch gesehen besteht der anorganische Knochenanteil überwiegend aus Kalzium, Phosphat und Carbonat. In geringeren Konzentrationen sind die Nebenbestandteile K, Na, Mg, Zitrone, u. a. m. enthalten und nur in Spuren finden sich Al, Ba, Fe, Mn, Sr, Zn u.a.m. (Eastoe, 1971; Vaughan, 1981).

1.2.2.2. Die Erhaltung der DNA in Knochen

Postmortem Stabilität der DNA

Der Zerfall des menschlichen Körpers nach dem Tod ist ein extrem komplexer Prozeß, der noch nicht völlig verstanden ist. Er beginnt mit der Autolyse und Zersetzung.

Die Autolyse ist die nicht-bakterielle Digestion mittels der aus den Lysosomen freigelassenen Enzyme (Strassmann, 1924; Müller, 1955). Die Zersetzung ist eine anaerobe bakterielle Dekomposition der Proteine oft begleitet von einer Gas-Produktion. Diese zwei Prozesse

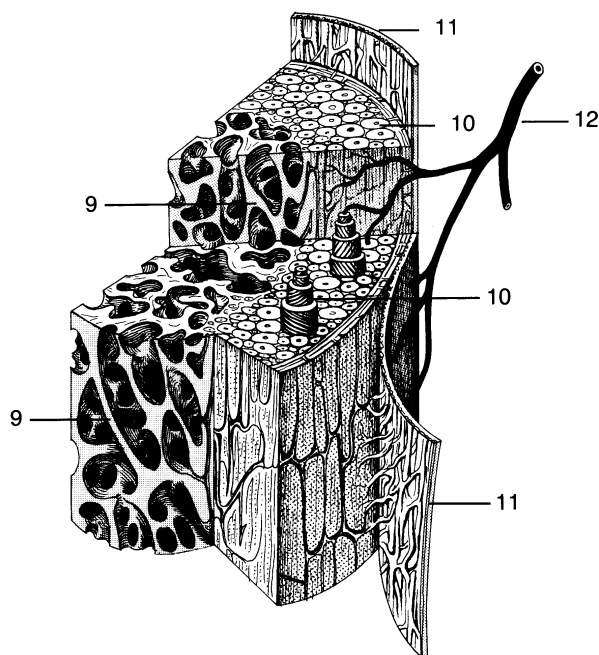
können nicht klar separiert werden und ihre maximale Aktivität liegt bei einer Temperatur zwischen 34 - 40°C. Die Luftfeuchtigkeit hat Einfluß auf die Autolyse. Der Verlust der enzymatischen Regulation und der Milch-Acidose während der Autolyse erhöht die Aktivität einiger Enzyme, z.B. der Hydrolasen (Bradley, 1938). Die meisten Enzyme sind sehr resistent gegenüber Autolyse, sie selbst können aber schnell durch die Bakterien zerstört werden. Die DNA in abgestorbenen Zellen ist degradiert durch Nukleasen, die zu den Hydrolasen gehören. Sie existieren in Form von Exo- und Endonukleasen. Die Endonukleasen schneiden die DNA in kurze Fragmente und die Exonukleasen entfernen ein Nukleotid nach dem anderen von den Enden der Stränge, was die DNA-Fragmente immer kürzer macht. Die alte DNA ist also stark fragmentiert.

Niedrige Temperaturen während der Lagerung des Knochenmaterials scheinen einer der wichtigsten Faktoren für die DNA-Erhaltung zu sein. Eine Erklärung für den konservierenden Effekt tiefer Temperaturen ist die generelle Verlangsamung aller chemischen Reaktionen (pro 10°C Halbierung bis Drittelung der Reaktionsgeschwindigkeit), die sicher auch auf schadensinduzierende Prozesse zutrifft.

Trockene und warme Bedingungen sind vorteilhaft, was die DNA-Erhaltung angeht, da sie eine schnelle Austrocknung von Geweben gewährleisten.

Vergleicht man das Weichgewebe und die Knochen eines Individuums in einem Grab, so ist die DNA im Knochen besser erhalten. Dies basiert auf der Tatsache, daß man mit der Knochen-DNA längere Fragmente amplifizieren kann, als mit der aus dem Weichgewebe extrahierten DNA (Cooper et al., 1992).

Die Gründe für die gute Erhaltung der DNA in Knochen sind nicht vollständig geklärt, es existiert nur eine begründete Hypothese. Um diese zu verstehen, muß man sich den Knochenaufbau ansehen.



- 9 substantia spongiosa
- 10 substantia compacta mit Osteonen
- 11 periost
- 12 Blutgefäße und Nerven des Knochens

Die Einheit des Knochens ist das Osteon oder Havers-System. Hier sind um einen zentralen Gefäßkanal in konzentrischen Ringen Lamellen aus mineralischer Knochensubstanz angeordnet. Dann sitzen in Lakunen die knochenbildenden Zellen die Osteozyten. Osteone, Gefäßkanäle und Lakunen sind miteinander durch weitere Kanäle und Kanälchen in einem Netzwerk verbunden. Durch die Gefäßkanäle ziehen Blutgefäße und Nerven. Zu Lebzeiten eines Individuums sind im Knochenmaterial also durchaus Zellen und damit DNA vorhanden. Die Knochenmatrix besteht aus einem organischen und einem anorganischen Anteil, der wiederum hauptsächlich aus Hydroxylapatit besteht. Nun hat die DNA die Eigenschaft, an Hydroxylapatit binden zu können.

Man nutzt das in der Molekularbiologie unter anderem dazu aus, um einzelsträngige von doppelsträngiger DNA zu trennen. Die Vermutung ist nun, daß die nach dem Tod eines Individuums durch Abbau der Zellen freigesetzte DNA an das Hydroxylapatit der Knochenmatrix bindet. Dadurch, so nimmt man an, ist DNA in Knochenmaterial vor Abbau und Beschädigung besser geschützt als in getrocknetem Weichgewebe.

1.2.2.3. Der Boden – Liegemilieu des alten Skelettmaterials

Limitierend für eine molekularbiologische Untersuchung am Knochen ist die Degradation der (Osteozyten) DNA. Die ist von den Lagerungsbedingungen abhängig.

Der Boden ist ein offenes System. Er unterliegt jederzeit den verschiedensten Umwelteinflüssen von außen. Pedogenese findet permanent statt und läßt das Medium Boden aus dem anorganischen Ausgangsmaterial Mineral und Gestein, sowie organischen Anteilen unter Mitwirkung der biologischen Phase entstehen.

1.2.2.3.1. Huminstoffe

Als Huminstoffe bezeichnet man schwach bis stark braun (schwarz) gefärbte, in der Regel in Böden gebildete, postmortale organische Substanzen, ohne reproduzierbare chemische Struktur. Ihr Anteil ist ein wichtiges Indiz für die Zuordnung und Beschreibung eines Bodens.

Es sind z. B.:

- Fulvo- und Hymatomelansäuren
- Kren- und Apokrensäuren
- Grau- und Braunhuminsäuren

Unter den organischen Bodeninhaltsstoffen spielen Huminstoffe nicht nur infolge ihrer Menge, sondern auch wegen ihrer besonderen Reaktivität eine herausragende Rolle. Sie bestimmen die physikalischen und kolloidchemischen Eigenschaften eines Bodens mit, sowie dessen chemisches Potential.

Ihre Bildung erfolgt im Humifizierungsprozeß, der damit zu einem der wesentlichen Vorgänge im Boden wird. In diesem Vorgang werden sämtliche terrestrischen Organica mit unterschiedlichen Umsetzungsgeschwindigkeiten einbezogen. Trotz der unübersehbaren Zahl von Möglichkeiten ist der Humifizierungsprozeß nicht ganz geklärt.

1.2.2.3.2. Die Zersetzung einer Leiche im Erdgrab

Während die Zersetzung der Leichen im Erdgrab primär unabhängig vom Boden erfolgt, wird sie sekundär von der Bodenbeschaffenheit, der Bodenzusammensetzung und

der Bodenreaktion gesteuert.

Berg und Specht (1958) fanden die Erfahrung bestätigt, daß die letzten Weichteilreste nach etwa 5 Jahren Lagerung an der Luft und rund 10 Jahren in der Erde verschwinden. Dabei fördern porös-humöse Böden und oberflächliche Lagerung den Zerfall, während er durch lehmig-feuchtes Erdreich verzögert wird.

Die Knochen zeigten sich bei ihnen (aus Münchener Friedhofsböden) schon nach 8-9 Jahren völlig skelettiert, ohne oder mit nur geringen Markresten in Form von Fettwachs.

Das Material mit Liegezeiten von 10-100 Jahren unterschied sich makroskopisch hinsichtlich Schwere, Festigkeit bzw. Härte, fehlender Oberflächenusuren usw. vielfach überhaupt nicht; ja sogar einige der 200-500 Jahre alten Knochen waren mit den Mitteln der grobsinnlichen Überprüfung von den 10 bis 20 jährigen praktisch nicht zu unterscheiden.

Durch die Leichenzersetzungsprodukte werden andererseits charakteristische chemische und strukturelle Veränderungen in dem angrenzenden Boden des Erdgrabes (besonders bei Vergrabungen ohne Sarg) hervorgerufen. Diese sind z. B. die Bildung von grünem bis grünschwartzem Eisensulfid, von blauen bis blaugrünen Vivianitablagerungen $(\text{PO}_4)_2\text{Fe}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, sowie Bleichung des Bodens und Abführung seiner Feinstbestandteile.

1.2.2.3.3. Chemie des Bodens

Bodenwasser:

Der Hauptanteil der chemischen Reaktionen im Boden spielt sich in Lösung ab, zumindest aber an der Grenzfläche von Lösung zu Festkörper. Transportvorgänge sind in aller Regel ebenfalls auf die gelöste Phase angewiesen.

Dem Wasser, das einzige im Boden natürlich vorkommende Lösungsmittel, kommt dabei eine herausragende Rolle zu. Wasser besteht aus Dipolmolekülen und tritt daher mit allen geladenen Teilchen in Wechselwirkung (auch mit DNA in Knochen).

Absorption von organischen Verbindungen:

Organische Stoffe im Boden stellen keine prinzipiell neue Kategorie dar, da sie als Kationen bzw. Anionen reagieren und damit ein ähnliches Verhalten wie die anorganischen Ionen zeigen. Abweichend von den anorganischen Ionen ist hier lediglich die größere Ausdehnung zu beachten, die bei der Adsorption zu Phänomenen wie der sterischen Behinderung der Moleküle untereinander führen kann.

Die Interaktion mit dem Boden stellt sich recht vielfältig dar.

Für die organische Substanz sind zunächst nur zwei Mechanismen zu diskutieren:

- die Wasserstoffbrückenbindung
- die Elektronen-Donator-Akzeptor-Komplexe.

Die DNA und eine ganze Reihe von Verbindungen zeigen sauren Charakter. Sie dissoziieren in wäßriger Lösung in Protonen und Anionen. Daneben treten die polarisierten organischen Moleküle mit Wasser in Wechselwirkung. Dieser Prozeß tritt in befeuchteten Böden besonders häufig auf (Ziechmann, 1990).

Die feuchten Böden sind also nicht ideal für die Lagerung der Knochen, aus welchen man die DNA isolieren möchte.

DNA und andere organische Phosphorverbindungen in Boden:

Je höher die P-Konzentration ist, desto mehr organische Substanz ist im Sediment vorhanden. Der P-Gehalt der archäologischen Knochen ist mit einem von ca. 17 % geringer als die P-Anteile in rezentem Knochenmaterial (Stephan, 1992).

Die geringe Löslichkeit von Phosphorverbindungen in alkalischen Boden resultiert aus der Fixierung von P an Ca und Mg.

P wird in kalkhaltigem Milieu nach und nach in eine Apatitform umgebaut, die resistent gegen Auswaschung ist (Letensorer, 1981). DNA überlebt in alkalischen Boden mit größerer Wahrscheinlichkeit als in einem sauren Boden.

Im sauren, Ca-armen Milieu ist die P-Fixierung gering. In solchem Milieu wird DNA aus bodengelagerten Knochen ausgewaschen. Das organische Phosphat wird schnell zu anorganischem umgebaut. So wird eine Reihe leicht löslicher organischer Phosphate nach kurzer Zeit unextrahierbar.

Organische Phosphorverbindungen selbst können auch gebunden werden, etwa über die ortho-Phosphatgruppe an Fe^{3+} - und Al^{3+} -oxide. Dies kann dann zu einer deutlichen Erhöhung der Stabilität der organischen Phosphorverbindungen im Boden führen. Eine weitere Möglichkeit der Bindung ist die Adsorption durch die organische Substanz des Bodens, z. B. durch die Huminstoffe.

1.2.2.3.4. Der Erhaltungszustand der Knochen im Boden

Während der Bodenlagerung wirken komplexe physikalische, chemische und biologische Vorgänge auf die anorganische und organische Phase des Knochens ein.

Das Ausmaß der Veränderungen während der Bodenlagerung wird sowohl von den Eigenschaften des Knochengewebes als auch des umgebenden Sediments bestimmt (Parker, Toots, 1980). Beim Knochen spielen neben dem Knochenteil (Spongiosa oder Compacta) das Individualalter und der Gesundheitszustand des Individuums eine Rolle.

Im Liegemilieu sind der pH-Wert, die Temperatur, die Feuchtigkeit und der Stofftransport abhängig vom Porenvolumen und den Löslichkeitsverhältnissen bestimmend. Zusätzlich üben mechanischer Druck, der Anteil der organischen Substanz und die Tätigkeit von Mikroorganismen im Hüllsediment Einfluß auf die Knochen aus (Pate, Hutton, 1988).

Da das Ausmaß der Veränderungen in und an Knochen sicher mit den äußeren Bedingungen variiert, denen die Knochen nach dem Tode ausgesetzt waren, kann man den Grad von Umbildungsvorgängen nicht schematisch als ein Maß der Zeit betrachten, die seit dem Ableben des Individuums verstrichen ist.

Für die Differenzen in der Knochenerhaltung zwischen den Fundorten können neben den erfaßten Sedimenteigenschaften klimatische Differenzen, unterschiedliche mechanische Belastungen während der Liegezeit und unterschiedliche Dauer der Bodenlagerung von Bedeutung sein.

Generell ist zu sagen, daß eher durchlässige Sedimente wie etwa Sandböden die fortschreitende Dekomposition des Knochens begünstigen, da hier gelöste Bestandteile ungehindert in die Umgebung diffundieren können, während schwere, undurchlässige Sedimente wie Lößböden zur Erhaltung der Hartgewebe beitragen.

1.2.2.3.5. Die Knochendekomposition

Am Ende des Prozesses der Leichenzerstörung steht schließlich die Knochendekomposition. Chemische Faktoren der Knochendekomposition werden aus der Leiche und ihrer Umgebung unmittelbar vom Individualtod an bis zum Zeitpunkt der Ausgrabung und Bearbeitung wirksam.

In Abhängigkeit von der Bodenart kann man im histologischen Bild verschiedene Zerfallsformen der Knochen unterscheiden (Werner, 1977).

Organischer und mineralischer Anteil werden in Abhängigkeit vom Sediment, vom Klima etc. unterschiedlich schnell abgebaut. Daraus resultieren veränderte mechanische Eigenschaften. Bei einem schnelleren Kollagenabbau wird der Knochen spröder, bei Abbau des Kristalls zäher (Blumenauer, 1984; Schatt, 1987).

1.2.2.3.6. Die Degradation der organischen Phase des Knochens

Sie beginnt durch den mikrobiellen Abbau des Kollagens. Dies führt zu einer Freisetzung von CO_2 , HCO_3^- und H^+ -Ionen, die Ca im Hydroxylapatit ersetzen und so Ca^{2+} -Ionen freisetzen. Die Ionen können ausgewaschen werden oder verbleiben in einer anderen Mineralform im Knochen.

Diese Reaktion ist zunächst abhängig von einer kleinräumigen Ansäuerung des Milieus durch körpereigene Abbauprodukte und durch Mitwirkung von Mikroorganismen.

D.h. die Vorgänge funktionieren auch in kalkhaltigen Sedimenten, da die notwendigen Säuren im Inneren des Knochengewebes gebildet werden.

Erst bei fortschreitendem Abbau spielt der pH-Wert des Liegemilieus eine Rolle. Den stärksten Einfluß auf die Knochenerhaltung besitzt der pH-Wert. Je mehr Ca im Sediment enthalten ist, um so mehr steigt der pH-Wert (Stephan, 1992). Der pH-Wert wird nicht nur von Ca-, oder Mg-Konzentrationen bestimmt. Er resultiert auch aus dem Kohlendioxid-Partialdruck und der Pufferung der Sedimente durch Carbonate (Schachtschabel et al., 1989).

In alkalischem Milieu substituieren Ca^{2+} -Ionen die Protonen des mit H^+ angereicherten Hydroxylapatit und stabilisieren damit den Kristall. Die Ca-Konzentration kann so trotz Umbau des Hydroxylapatits im Knochen gleich bleiben. Das kalkreiche, dolomitische Milieu kann die Herauslösung des Calciumphosphats und damit die Zerstörung der Knochen verhindern.

Im alkalischen Milieu schreitet der Abbau des Kollagens langsamer fort und der Hydroxylapatit ist schwerer löslich als in einem sauren Liegemilieu.

In saurem Milieu kommt es beispielsweise infolge Einwirkung von Humus und Gerbsäuren durch Unterbindung der bakteriellen Zersetzung zu gewissen Konservierungen der Haut und oft auch der inneren Organe, im Gegensatz zu der Zerstörung des Knochens durch Herauslösen des Kalziumphosphats (Apatit).

Bethel et al. (1989) zeigten, daß sehr saure Böden (bei sauren pH-Werten) aufgrund der höheren Löslichkeit des Apatits eine generelle Entkalkung der Knochen hervorrufen.

Je stärker die Dekomposition der organischen Phase, d. h. hauptsächlich des Kollagens, fortgeschritten ist, desto schlechter ist die Beschaffenheit der Knochenoberfläche und desto weniger dicht und hart ist das Knochengewebe.

Je dichter, zäher und härter die Knochen sind, desto mehr organische Substanz enthalten sie. Das muß aber nicht für die DNA der Fall sein.

Die Erhaltung der Knochen ist umso besser, ebenso die Dichte und Härte des Knochens um so größer, je höher der pH-Wert sowie die Ca- und P-Konzentrationen des Hülsediments sind. Mg wird im Zusammenhang mit der Dekomposition der organischen Phase und der Abnahme der Härte und Zähigkeit der Knochen in Abhängigkeit vom pH-Wert des Hülsediments aus dem Gewebe ausgewaschen.

Je höher der pH-Wert desto mehr Mg ist im Knochengewebe vorhanden, d.h. desto weniger Mg ist ausgewaschen. Unter günstigen Umständen verändert sich der Mg-Gehalt des Knochens während der Liegezeit nicht (Lambert et al., 1989).

Innerhalb des Kristallgitters können Ionen ersetzt werden (mögliche spätere Kontaminationen):

Das Ausmaß der Kontamination ist außer vom Sediment auch von der Beschaffenheit des Knochengewebes abhängig. Eine große Rolle spielt das Vorhandensein von Spongiosa und die Porosität der Knochen (Badone et al., 1982 ; Lambert et al., 1985).

Die OH-Ionen des Kristalls können isomorph, d.h. ohne Strukturveränderungen, durch F^- , mit geringen Änderungen durch Cl^- und möglicherweise durch Carbonate ersetzt werden (Grupe, 1986). Isomorphe Substitutionen der Calciumionen sind durch Na, Pb und Sr möglich. Weitere Substitutionen können u.a. durch Al, Ba, Fe, Mg und eventuell Zn erfolgen (Runia, 1987 (a), 1987 (b)). An die Stelle des PO_4^{2-} kann CO_3^{2-} treten. Neben den Substitutionen kann eine große Anzahl von Substanzen wie z. B. Citrat, Ca, K, Mn und Na, gefördert durch die große Kristalloberfläche, an die Oberfläche des Kristalls adsorbiert werden (Vaughan, 1981; Engström, 1972). Aufgrund dieser zahlreichen chemischen Substitutions- und Adsorptionsvorgänge wird in der Regel ein Hydroxylapatit mit geringerem Ca-Gehalt angetroffen.

Weitere Hinweise auf den Erhaltungszustand der Knochen geben die Al- und Fe-Anreicherungen im Knochengewebe. Die Kontamination des Knochengewebes mit Al nimmt mit zunehmender Zerstörung der Knochenoberfläche und einer Verringerung der Dichte und Härte zu. Das Ausmaß der Fe-Einwanderung in das Gewebe vergrößert sich mit steigender Fe-Konzentration im Hüllsediment, schlechter Erhaltung der Oberfläche und Verschlechterung der physikalischen Eigenschaften der Knochen. Zwischen Fe und der organischen Substanz bestehen positive Zusammenhänge. Zu erklären ist dies mit einer Bindung des Fe an das Kollagen (Klepinger et al., 1986).

Da Fe rote und braune und Mn schwarze Verbindungen im Sediment bilden, wird die Einwanderung dieser Elemente in den Knochen an der Verfärbung des Knochengewebes sichtbar. Da das gesamte Knochengewebe verfärbt ist, scheinen diese Elemente bis in das Compactinnere eingewandert zu sein (Gruppe, 1986). Für die gelb- und graubraune Farbe des Knochengewebes sind die Al- und Fe-Konzentrationen verantwortlich.

Die archäologischen Knochen besitzen signifikant mehr Al, Fe und Mn als das rezente Material (Stephan, 1992). Al, Fe und Mn sind im Sediment in wesentlich höheren Konzentrationen anzutreffen als in Knochen. Sie können in Form von Tonmineralen, Oxiden und Sulfiden in bodengelagerte Knochen einwandern (Williams et al., 1988).

Da Sr und Ba durch die strukturelle Bindung an Hydroxylapatit zu einem Austausch mit Ionen der Umgebungslösung unfähig sind verhalten sie sich deshalb prinzipiell auch nach langer Bodenlagerung im Knochen stabil (Grupe, 1986).

Die Kontamination des Knochengewebes mit den Elementen Sr, Ba ist umso stärker, je schlechter die Knochen erhalten sind. Das Strontium wurde sowohl an der Oberfläche (die dort gelagerte Strontiummenge kann bis zu 10 % der Kalziummenge erreichen) als auch innerhalb des Kristallgitters gefunden. Der Gehalt von Ba und Sr in den Knochen ist von den Ausgangskonzentrationen des Bodens und der Pflanzen einer geographischen Region abhängig.

Auch andere, dem Knochengewebe eigentlich fremde Ionen können sich anlagern oder in die Kristallgitter aufgenommen werden, z.B. die Ionen von Gold, Silber und anderen Schwermetallen, aber auch eine Anzahl der besonders radioaktiven Produkte einer Wasserstoffbombenexplosion (Geneser, 1990).

Im Boden können hauptsächlich folgende Faktoren den Erhaltungszustand der DNA beeinflussen:

- pH-Wert,
- Temperatur,
- Feuchtigkeit (Wasser besteht aus Dipolmolekülen und tritt daher mit allen geladenen Teilchen in Wechselwirkung (auch mit DNA in Knochen)),
- Stofftransport,
- mechanischer Druck,
- Anteil der organischen Substanz und die Tätigkeit von Mikroorganismen im Hülsediment (Pate, Hutton, 1988).

Fossilisation und Mineralisation:

Die Fossilisation wird mit dem Verschwinden des Proteinmaterials eingeleitet, das durch gelöste Substanzen aus dem Grundwasser der umgebenden Bodenschicht ersetzt wird. Diesem Vorgang folgt ein Austausch von Molekülen im Kristallgitter des Apatits, wodurch der Knochen in eine steinerne Kopie seiner selbst verwandelt wird. Da sich die Substitutionen im molekularen Bereich abspielen, bleibt die Form des Knochens bei seiner Verwandlung zu Stein vollkommen erhalten.

Erst im Laufe von Jahrmillionen werden Knochen zu Gestein. Da hat man aber mit der DNA keine Chance mehr.

In nassen, sauren Böden findet keine Fossilisation statt, Knochenreste zerfallen.

In nassen, sauren Böden mit Luftabschluß, wie z.B. in Torf, wird das gesamte Lebewesen mit Knochen und Weichteilen vor dem Zerfall bewahrt.

Nasse alkalische Böden lösen die mineralischen Bestandteile des Knochens nicht auf, Fossilisation ist möglich.

In trockenem, alkalischem Boden wird der Knochen zu einem leichten Subfossil (Day, 1997).

1.2.3. Alte DNA (aDNA)

Ancient DNA (aDNA) ist die DNA, die einem toten Organismus oder Teilen von ihm entstammt. Dazu gehört jede DNA, die einen autolytischen oder diagenetischen Prozeß durchlaufen hat, der zu ihrer Degradierung führte. Somit ist extrakorporale DNA aus noch lebenden Organismen (z. B. Blutspuren) ebenfalls inbegriffen.

1984 berichteten Wilson et al. erstmals von der sog. alten DNA. Sie klonierten DNA aus der Haut des ausgestorbenen Quagga.

Pääbo hat im Jahr 1985 mtDNA aus Resten einer 2400 Jahre alten menschlichen Mumie sequenziert. Es wurde eine neue Disziplin ins Leben gerufen: molekulare Archäologie.

Eines der größten Probleme stellt die Kontamination mit moderner DNA dar, was die Beurteilung, ob eine untersuchte Quelle alter DNA tatsächlich alte DNA enthält, erschwert. Die alte DNA besitzt Eigenschaften, die den Umgang mit ihr wesentlich schwieriger machen als mit moderner DNA. So untersuchte Pääbo (1989) mit Hilfe verschiedener Methoden wie HPLC, Elektronenmikroskopie und enzymatische Untersuchungen alte DNA auf Schädigungen der DNA-Basen. Demnach war alte DNA stark fragmentiert, den Hauptanteil des Basenschadens machten oxidierte Pyrimidine und basenlose Stellen aus.

Die PCR stellte den Schlüssel für die Weiterentwicklung der molekularen Archäologie dar. Mit Projekten mit alter DNA verbinden sich so exotische Arten wie :

Quagga (Higuchi et al., 1984),
 Tasmanischer Wolf (Thomas et al., 1989),
 Säbelzahn tiger (Jancziewski et al., 1992),
 Moa (Cooper et al., 1992),
 Riesenfaultier oder Mammut.

mtDNA-Analyse hat gezeigt, daß das Mammut ein Verwandter des Elephanten ist, jedoch keine Identität zu einer Elefantenspezies zeigt.

Pääbo et al. (1988) haben die mtDNA des 7000 Jahre alten Gehirns aus Florida analysiert (exzellente Preservationsbedingungen: anaerob, trocken, neutral).

Poinar et al.(1982) haben repetitive DNA-Sequenzen von einer alten ägyptischen Mumie kloniert.

Handt et al. (1994) haben eine im alpinischen Gletscher gefundene ungefähr 5000 Jahre alte Mumie (Tyrolischer Eis-Mann) typisiert.

Grundsätzlich sind für die Extraktion alter DNA Weichgewebe, Knochen und Zähne geeignet. DNA „überlebt“ besser in Knochen als in weichen Geweberesten. Wegen der hohen Dichte der Strukturen sind Zähne und kompakte Knochen zu bevorzugen, da hier seltener Verunreinigungen des Probenmaterials mit DNA von Mikroorganismen zu erwarten sind. Bei fortgeschrittenen fäulnisveränderten Leichen (-teilen) werden Knochen und Haare herangezogen.

Der Erfolg einer DNA-Analyse wird neben der Quantität auch von der Qualität der extrahierten DNA bestimmt. Diese nimmt im allgemeinen proportional zur Lagerungszeit der Gewebe ab, d. h. die molekulare Integrität der DNA wird durch exogene und endogene hydrolytische Abbauprozesse zunehmend beeinträchtigt. Generell verläuft die Hydrolyse des DNA-Moleküls langsamer als die Proteolyse (Gill et al., 1985; Bär et al. 1988).

Die Problematik bei der Bearbeitung von aDNA umfaßt drei wesentliche Punkte:

1. Die aDNA liegt degradiert vor, meist sind Fragmente nur einige hundert Basenpaare groß. Sie kann auch verschiedene Mutationen erfahren haben (Pääbo, 1989). Es gibt nur wenige Moleküle, die als Matrize für die PCR dienen können.
2. Es existieren inhibitorische Substanzen, die meist parallel zur Extraktion angereichert werden. Sie machen eine Amplifikation unmöglich und verursachen somit falsch negative Ergebnisse.
3. Häufig treten DNA-Kontaminationen auf, die aufgrund der Sensitivität der PCR zu falsch positiven Resultaten führen.

Ein größeres Problem als die Fragmentierung des Moleküls stellen häufig Inhibitoren dar, die sich bei DNA-Gewinnung aus gealtertem oder fixiertem biologischem Material in den Extrakten befinden. Selten sind Inhibitoren der DNA-Analyse bekannte Verbindungen wie Hämoglobin oder Melanin. Zumeist sind Hemmstoffe nicht bekannt bzw. ihr Wirkmechanismus ist ungeklärt.

Die Arbeit mit alter DNA unterliegt vielen Einschränkungen. Im Vordergrund steht dabei die im Normalfall sehr geringe Kopienzahl der endogenen DNA in einem DNA-Extrakt, wobei einerseits Amplifikationen erschwert werden, und andererseits die Kontamination selbst mit winzigen Mengen an Fremd-DNA zu einem Problem wird (Stoneking, 1995). Die Reduzierung der DNA-Menge vom Tod eines Organismus bis zur Probennahme wird DNA-Abbauprozessen zugeschrieben. So wird die nach den initialen Abbauvorgängen durch Mikroorganismen noch vorhandene DNA vermutlich vor allem durch hydrolytische und oxidative Schädigungen, die letztendlich zu Strangbruch führen, immer weiter zerstört.

Hydrolytische Schäden werden dabei durch Anwesenheit von Wassermolekülen, oxidative Schäden durch ionisierende Erdstrahlung in Zusammenarbeit mit Wassermolekülen induziert (Friedberg, 1985). Durch hydrolytische Spaltung kommt es in hydratisierter DNA am häufigsten zu Depurinierung und, in abnehmender Häufigkeit, auch zu Depyrimidierung und zu Desamidierung. Von oxidativem Schaden sind die vier DNA-Basen, aber auch der Zucker-Rest in der DNA betroffen. Dafür ist nicht unbedingt die Anwesenheit von Sauerstoff nötig, da auch über Hydroxylradikale, die durch ionisierende Strahlung aus Wassermolekülen gebildet werden, oxidative Schäden induziert werden können. Die DNA lebender Zellen ist ständig unterschiedlichen Beschädigungsprozessen ausgesetzt. Es ist verschiedenen, effizienten Reparatursystemen zu verdanken, daß ein Organismus trotzdem überlebensfähig ist. In fossiler DNA kommt es zu einer Anhäufung von Schäden, da diese Reparatursysteme nach dem Tod nicht mehr aktiv sind.

Die mtDNA verspricht eine große Zukunft bei der Analyse von alter DNA und von extrem problematischen Spuren, wie einzelnen ausgefallenen Haaren, alten Knochen sowie einzelnen Zellen. Dieser Bereich befindet sich in der Entwicklung (Sullivan et al., 1992).

Vor wenigen Jahren gelangen die ersten PCR-gestützten Analysen von aDNA aus bodengelagertem Skelettmaterial. Amplifiziert werden konnten Sequenzen der mtDNA (Hagelberg, 1989) und chromosomaler DNA (Hummel, 1995).

Als Anfang der 90-er Jahre DNA-Sequenzen einiger extrem alter Fundstücke veröffentlicht wurden (Golenberg et al., 1990; DeSalle et al., 1992; Cano et al., 1992), entstand eine Diskussion über die Authentizität dieser Sequenzen und Ergebnisse der Forschung über alte DNA generell. Die Kritiken stammten dabei sowohl aus dem Feld selbst (z. B. Sidow et al., 1991) als auch aus den Reihen der Biochemiker, die das Überleben von DNA-Molekülen über ein gewisses Alter hinaus anzweifeln. Sehr früh war Kontamination mit moderner DNA als ein dominierendes Problem erkannt worden.

Die Forderung gewisser Kriterien ist berechtigt, wenn das Gebiet der alten DNA aus der Gruppe der respektierten Wissenschaften nicht ausgeschlossen werden soll. Deshalb wurde in dieser Arbeit der bedeutende Arbeitsaufwand den unterschiedlichsten Kontrollen gewidmet. Unsere Kontrollen sollten eine Kontamination verhindern oder zumindest entdecken. Zusätzlich wurde in dieser Arbeit ein enormer Wert auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gelegt.

1.3. ZIELSETZUNG

Die Zielsetzung dieser Arbeit stellte die Suche nach einer leistungsfähigen DNA-Extraktionsmethode an morphologisch indifferenten und kleinsten Skelettfragmenten mit anschließender Geschlechts- und Verwandtschaftsbestimmung auf molekularbiologischer Ebene.

Zur Feststellung möglicher Verwandtschaftsverhältnisse zwischen historischen Skelettindividuen aus multiplen Bestattungen sollten Analysen von Kern-DNA und mitochondrieller DNA eingesetzt werden.

Diese Forschung ist vor allem für die Identifikationsfragestellungen in der Forensik (Gerichtsmedizin, Kriminalistik) von eminenter Bedeutung. Viele forensische Spezialisten sind oft mit den Ansprüchen konfrontiert, die menschlichen sterblichen Reste (Knochen) in einzelnen Gräbern oder in Massengräbern zu identifizieren.

Von solchen molekularbiologischen Analyseverfahren können dann auch die Wissenschaftler der Anthropologie, Archäologie sowie umweltgeschichtlich orientierte Wissenschaften profitieren.

2. MATERIAL

2.1. Weiche Gewebe

Die in unserem Labor noch nie verwendete Extraktionsmethode von Scholz und Pusch (1997) wurde zuerst an einfachem Material wie *Muskel, Plazenta, Hirn* angewendet, um mich in das Extraktionsverfahren richtig einzuarbeiten.

2.2. Frische (rezente) Knochen

Bei diesem Probenmaterial handelte es sich um eingefrorene Teile des menschlichen Skelettes mit Ausnahme von zwei Rindknochen-Proben. Die menschlichen Knochen stammen aus unterschiedlichen Knochenasservaten im Institut für Gerichtliche Medizin, wo sie nach den Obduktionen in gefrorenem Zustand gelagert wurden.

An diesem Material habe ich drei Extraktionsmethoden (siehe Kapitel 3. *Methoden*) getestet und verglichen. Die problemlos extrahierte DNA aus diesen Knochen war später immer wieder sehr nützlich, um die meisten methodischen Schritte auszuprobieren, zu testen und, um eine Art positive Kontrolle zu haben.

Es handelte sich um folgende Proben:

Probe Nr. 1	frischer Rindknochen I
Probe Nr. 2	frischer Rindknochen II
Probe Nr. 3	Femur, 2 Tage alt
Probe Nr. 4	Femur, 5 Tage alt
Probe Nr. 5	Humerus, 10 Tage alt
Probe Nr. 6	Femur, 10 Tage alt
Probe Nr. 7	Femur, 30 Tage alt
Probe Nr. 8	Humerus, 1 Tag alt
Probe Nr. 9	Femur, 2 Jahre alt

2.3. Ältere Knochen

Die fünf Knochen von 18 bis 49 Jahre alt hatte ich im Insitut für Gerichtliche Medizin zur Disposition. Durch die Zusammenarbeit mit dem Landesdenkmalamt Baden-Württemberg in Konstanz standen auch ältere Knochen (300 Jahre alt) zur Verfügung. An diesem Skelettmaterial wurden noch einmal alle drei Extraktionsmethoden getestet und verglichen.

Zur Verfügung standen folgende Proben:

1. Os Petrum 18 Jahre
2. Kalotte 19 Jahre
3. Kalotte 35 Jahre
4. Kalotte 35 Jahre
5. Os Petrum 49 Jahre
6. Rippe 100-150 Jahre
7. Vertebrae 300 Jahre
8. Kalotte 300 Jahre
9. Kalotte 300 Jahre
10. Femur 300 Jahre
11. Humerus 300 Jahre

2.4. Altes Material aus Schönau und Ellwangen

Aus dem Landesdenkmalamt Baden-Württemberg in Konstanz bekam ich drei Knochenfragmente und drei Zähne aus Gräbern in Schönau (Rathausstrasse) und einen Knochenfragment aus Ellwangen.

- | | | | |
|----|------------------------|------------------|-----------------|
| 1. | Grab Nr. 4 in Schönau | Knochen und Zahn | (430 Jahre alt) |
| 2. | Grab Nr. 10 in Schönau | Knochen und Zahn | (410 Jahre alt) |
| 3. | Grab Nr. 9 in Schönau | Knochen und Zahn | (410 Jahre alt) |
| 4. | Ellwangen | Knochen | (300 Jahre alt) |

2.5. Alte Knochen von 800 – 5 000 Jahre alt

Folgendes Knochenmaterial stammt aus unterschiedlichen Ländern und Zeiten aber aus einer und einmaliger Knochensammlung von Herrn Dr. Czarnetzki im Institut für Anthropologie und Humangenetik an der Universität in Tübingen.

- | | | |
|------------|---------|----------------|
| Probe Nr.1 | Femur | 800 Jahre alt |
| Probe Nr.2 | Femur | 800 Jahre alt |
| Probe Nr.3 | Femur | 800 Jahre alt |
| Probe Nr.4 | Femur | 1400 Jahre alt |
| Probe Nr.5 | Humerus | 4500 Jahre alt |
| Probe Nr.6 | Femur | 4500 Jahre alt |
| Probe Nr.7 | Femur | 4500 Jahre alt |
| Probe Nr.8 | Femur | 4500 Jahre alt |
| Probe Nr.9 | Femur | 5000 Jahre alt |

2.6. Forensisches Material

Im Auftrag von der Gerichtsmedizin im Saarland konnte ich Material aus der forensischen Praxis untersuchen.

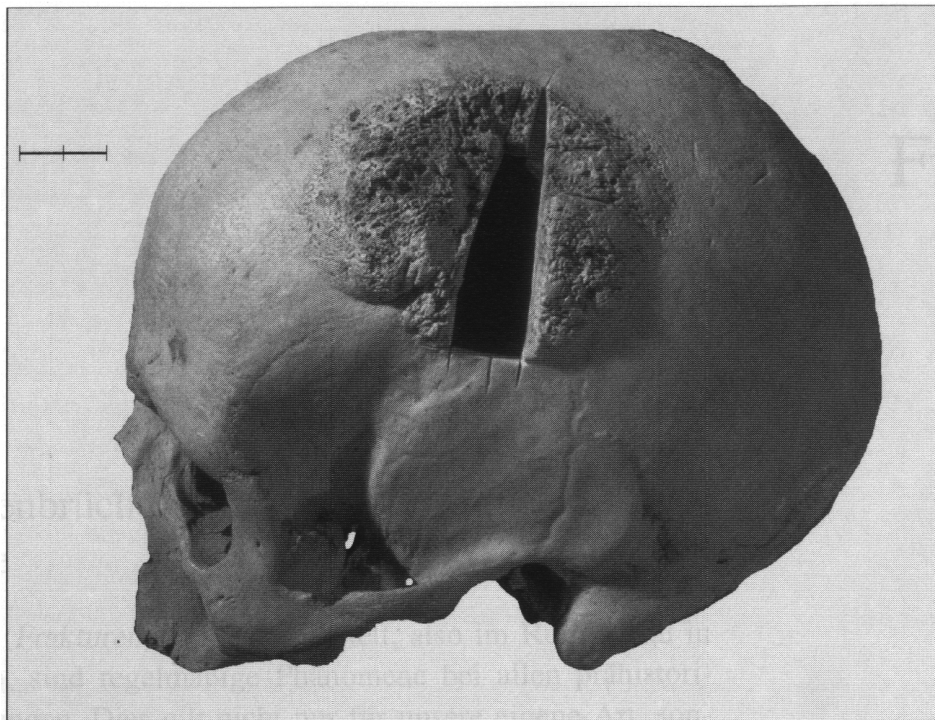
Es handelte sich um drei Proben:

1. SpK 40/99 Ass.1 Knochenteilchen
2. SpK 105/98 + SpK 20/97 Knochenfragment
3. Wi 03/98 Ass. 2 mumifizierte Muskulatur „Gustav“

2.7. Knochen mit Meningeom (Hochmittelalter)

Dr. Alfred Czarnetzki, der wissenschaftliche Verwalter der Osteologischen Sammlung der Universität Tübingen, eines der großen Knochenarchive in Deutschland, stellt zusammen mit Mitarbeitern im Katalog „Stumme Zeugen ihrer Leiden“ einige interessante paläopathologische Befunde vor (Czarnetzki, 1996).

Ich konnte Proben aus entartetem Meningeom des Schädels (1 200 Jahre alt) eines erwachsenen Individuums aus Vaihingen entnehmen.



Geschlecht: Mann
 Alter: Erwachsen
 Herkunft: Vaihingen (Enz)
 Zeit: Hochmittelalter

Auf der linken Schädelseite hat sich ein 8,5 cm langer und 6,5 cm breiter Tumor gebildet, dessen Oberfläche in der für diesen Tumor typischen Weise zerklüftet ist. Da der eigentliche Knochen zerstört wurde, handelt es sich um einen bösartigen Tumor. Dieser ging wohl von der Hirnhaut aus, durchbrach den Knochen und führte danach zu einer Knochenneubildung an der Schädelaußenfläche.

2.8. Reihengräberfriedhöfe von Kirchheim am Ries

2.8.1. Kirchheim am Ries

Kirchheim am Ries, Ostalbkreis, liegt am Westrand des Rieses unterhalb des westöstlich sich langhinziehenden Blasiensberges. Der jetzige Ort ist im 13. Jahrhundert aus zwei verschiedenen Niederlassungen, Ober- und Unterkirchheim, zusammengewachsen. Das alamannische Gräberfeld lag genau 300 Meter östlich der Jakobskirche, die durch eine leichte Senke von diesem getrennt ist.

Grundlage des Reichtums der in Kirchheim Bestatteten wird in den fruchtbaren Böden des Rieses, die bis heute nicht erschöpft sind, und in einem wohl zwangsläufig damit verbundenem großen Grundbesitz der führenden Geschlechter zu suchen sein. Dies erklärt sich aus der geologischen Beschaffenheit des Rieses, einer fast kreisförmigen Mulde mit einem mittleren Durchmesser von 20 km, die 80 bis 100 Meter tief in das umgebende Juragestein eingesenkt ist und eine geschlossene Lößschicht mit darauf liegendem Humus von 1 bis 1,5 Meter Stärke trägt.

2.8.2. Gräber

Das alamannische Gräberfeld von Kirchheim lag in der Flur "Gözlen" am südlichen Hang einer allseitig abfallenden Kuppe aus Weißjura nordöstlich des Ortes. Die planmäßige Ausgrabung durch die Abteilung Bodendenkmalpflege des Landesdenkmalamtes in Stuttgart begann im Sommer 1962 und wurde in mehreren, sich über drei Jahre hinziehenden Kampagnen durchgeführt. Im Laufe der Ausgrabung stellte es sich erst heraus, daß der Hauptteil des Friedhofes sich südlich und östlich des Schulhausneubaues ausbreitete, und zwar reichte die Belegung bis an die Fundamentgräben der östlichen Schulhauswand heran. Einige Gräber sind sogar durch diese abgeschnitten worden, was bedeutet, daß beim Ausschachten der Baugrube nicht nur im Westen, sondern auch im östlichen Teil Gräber zerstört worden sind. Es ist nicht auszuschließen, daß im gesamten Bereich des Schulneubaues Gräber unbeobachtet zerstört worden sind.

Die Zahl der Gräber, die durch das Landesdenkmalamt in Stuttgart untersucht wurden, beträgt 480. Die Reihengräberfriedhöfe von Kirchheim sind um die Mitte des 6. Jahrhunderts angelegt worden. Das Friedhofsareal umfaßte drei verschiedene, wenn auch dicht benachbarte Bestattungsplätze. Auf dem großen Friedhof, der im 6. Jahrhundert beginnt, liegen außer zahlreichen Kriegergräbern drei reiche Bestattungen (Gräber 363, 370, 208/209), die

dem späten 6., der zweiten Hälfte des 7. und dem frühen 8. Jahrhundert angehören. Sie dürfen als Adelsgräber bezeichnet werden. Diese habe ich in meine Untersuchungen nicht angeschlossen.

Ich habe im Rahmen meiner Arbeit zwei multiple Bestattungen untersucht:

In einem Grab lagen drei Personen: Nr. 81, Nr. 87, Nr. 88.

In zweitem Grab wurden vier Individuen bestattet: Nr. 279, Nr. 282, Nr. 286, Nr. 289.

Unser Ziel war die molekulargenetische Geschlechts- und Verwandtschaftsbestimmung dieser Individuen.

Die Proben wurden aus folgenden Knochen entnommen:

<i>Person</i>	<i>Knochen</i>
81	Humerus
87	Humerus
88	Femur
279	Femur
282	Femur
286	Tibia
289	Humerus

2.9. Alamannische Adelsgräber von Niederstotzingen

2.9.1. Niederstotzingen

Im Kreise Heidenheim liegt Niederstotzingen. An betont höchster Stelle des Ortes erheben sich heute die Kirche St. Peter und Paul und das gräfliche Schloß. Eine Nebenstrasse führt an den östlich vom Städtchen gelegenen Friedhof mit der einstigen Andreaskapelle und der Familiengruft der Grafen von Maldeghem. 120 m südöstlich der Südostecke des Friedhofs liegt der alamannische Bestattungsplatz mit zehn Gräbern und mit zwei Pferdegruben.

2.9.2. Gräber

Die Gräber machten sich oberflächlich nicht bemerkbar. Erst nach Abschälung der Humusschicht hoben sich die dunkelgefärbten Rechtecke der Grabschächte in verschiedener Größe von dem helleren, unberührten Lehm Boden ab. Eine Umgrenzung des Bestattungsplatzes oder der Einzelgräber, zeigte sich nicht. Alle Gräber waren west-ost-orientiert.

In dieser Arbeit habe ich drei Skelletindividuen aus dem **Grab Nr. 3** genetisch untersucht. Der Schacht des Grabes 3 hatte eine Länge von 2,60 bis 2,70 m, eine Breite von 2,30 bis

2,50 m und eine Tiefe von 1,70 m. Es ist ein Kammergrab, der Einbau einer Holzkammer wurde beobachtet.

In dem Grab 3 lagen auf dem gedielten Boden angeblich drei schwer bewaffnete Krieger: der größere der dreien an der Südseite, etwas für sich und reicher ausgestattet, daneben zwei kleinere, Arm in Arm, miteinander zugewandten Köpfen.

Auch die anthropologische Untersuchung stellt wesentliche Unterschiede fest:

Der **Krieger 3a**, etwa 20 bis 30 Jahre alt und etwa 176 bis 179 cm groß, ist ein kräftiger Mann von überdurchschnittlicher Größe gewesen. An dem breiten und langen Schädel springt das rechteckig-breite Kinn stark hervor.

Der **Krieger 3b** hat ein Alter von 50 bis 60 Jahren und eine unter dem Durchschnitt liegende Größe von 170 bis 171 cm. Eine Narbe im Gesicht läßt möglicherweise auf die Blindheit des rechten Auges und auf eine Verwundung durch einen Saxstich schließen.

Der dritte **Krieger 3c** ist etwa 20 bis 30 Jahre alt und 165 bis 166 cm groß. Er ist ein nicht eben kräftiger junger Mann (nach der morphologischen Geschlechtstypisierung) von unterdurchschnittlicher Größe (Paulsen, 1967).

Die Skelette waren sehr unterschiedlich in ihrem Erhaltungszustand.

Die Proben wurden aus Femur entnommen.

Mein Ziel war das selbe wie im Fall von multiplen Bestattungen in Kirchheim am Ries. Diese Untersuchung sollte aber zusätzlich die Leistung unserer Methodik beweisen, daß mein Analyseverfahren nicht nur an einem Gräberfeld funktioniert, sondern auch anderswo, insofern sehr leistungsfähig und zuverlässig ist.

3. METHODEN

3.1. Probenentnahme

Der erste Schritt bei meiner Arbeit war die Probenentnahme. Wegen der hohen Dichte der Strukturen sind für die Arbeit mit alter DNA Knochen mit möglichst dickem Compactaanteil zu bevorzugen. Nach der Auswahl eines geeigneten Bereichs (möglichst frei von Rissen oder sonstigen Beschädigungen, möglichst dicker Compacta-Anteil) einer Probe wurde diese mit einer Säge ausgeschnitten.

3.2. Vorbereitung der Knochen und Zähne für die Analyse

Von dem abgesägten Knochenstück wurde mit einem Schleifpapier 1-2 mm dicke Schicht entfernt. So habe ich das Risiko einer Kontamination durch fremde DNA, durch aus dem Boden transportierte Stoffe, minimiert. Die Zähne wurden auch mehrfach mit einem Schleifpapier abgetragen. So kann ich die größere Verunreinigung ausschließen.

Anschließend wurden die Proben von allen Seiten aus kurzem Abstand (5-10 cm) für jeweils 15 Minuten mit kurzwelligem ultraviolettem Licht (254 nm) bestrahlt. Durch die Bestrahlung wird die Struktur der anhaftenden DNA chemisch so verändert, daß sie in der PCR nicht mehr amplifiziert werden kann.

Der vorbehandelte Knochen (Zahn) mußte dann mit dem Hammer zerkleinert werden, um in die Mahlgefäße der Mühlen zu passen.

Die Materialsplitter wurden in einer Kugelschwingmühle Typ MM 2000 (von Firma Retsch) bis zu einer pulvrigen (mehligen) Konsistenz gemahlen. So ist die Knochenoberfläche vergrößert und Zellen leichter aufzuschließen. Die Probe sollte sich dabei nicht zu stark erwärmen, der Mahlvorgang mußte zwischenzeitlich unterbrochen werden und die Mahlgefäße in den flüssigen Stickstoff reingelegt.

Das Knochenpulver (das Zahnpulver) wurde dann im Gefrierschrank bei -20°C gelagert.

Mit der Schwingmühle Typ MM 2000 können je zwei Proben von ca. 0,2-10 ml aufbereitet werden. Die Hauptvorteile der MM 2000 sind die hohe Mahl- und Mischleistung in kürzester Zeit, die einfache, sichere Handhabung und die Vielseitigkeit. Das Einsatzgebiet der MM 2000 reicht von der Zerkleinerung von Aschen, Bettfedern, Gestein, Getreide, Haaren, Knochen, Kunststoffen, Legierungen, Mineralien, Ölsaaten, Tabletten, Gewebeprobe, Pflanzenteilen, Textilfasern bis hin zum Zellaufschluß und der Kaltvermahlung von temperaturempfindlichen Stoffen.

Das rezente Knochenmaterial habe ich von Weichteilresten mit einem Skalpell befreit. Die Knochen wurden auf 2-3 größere Stücke mit einem Hammer zerkleinert und dann

mit jeweils neuem Schleifpapier abgetragen. Anschließend wurden die Knochen mit abs. Ethanol und bidestilliertem Wasser abgewischt. Weitere Schritte waren wie bei alten Knochen (Schwingmühle, Lagerung).

Eine gründliche Reinigung mit reinem Ethanol oder Aceton sämtlicher Arbeitsgeräte und Sterilisation von Mahlgefäßen zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen ist erforderlich. Das Endprodukt der Probenaufbereitung war ein feines Knochenpulver (Zahnpulver), das als Ausgangsmaterial für die Extraktionsmethode diente.

3.3. Extraktion der DNA aus Knochenmaterial

Die effiziente Extraktion der DNA ist der entscheidende Faktor für eine erfolgreiche DNA-Typisierung.

Die Kern-DNA höherer Organismen ist zusammen mit Proteinen zu „Chromatin“ verdichtet – dem Material, aus dem die Chromosomen bestehen. Man extrahiert die DNA aus Chromatin, indem man alles übrige entfernt. In erster Linie erreicht man dies durch die Wirkung von Enzymen, durch proteindenaturierende Agentien, Salze und organische Lösungsmittel wie Phenol und Chloroform.

Ich habe drei Extraktionsmethoden getestet; die von Hochmeister et al. (1991), von Lee et al. (1991) und von Scholz und Pusch (1997). Diese drei Extraktionsmethoden wurden im Rahmen dieser Arbeit angewendet an rezemtem Knochenmaterial und an elf unterschiedlichen bodengelagerten Knochen aus unterschiedlichen Gräbern mit der Liegezeit von 18 bis 300 Jahre.

3.3.1. Prinzip der DNA-Extraktion aus dem Knochenmaterial

DNA-Extraktionsverfahren bestehen aus drei Hauptschritten:

1. Zellen werden in schwach alkalischer Pufferlösung homogenisiert.
2. Zellyse.
3. Aufreinigung.

Ein typischer Extraktion-Puffer enthält Tris-HCl und EDTA. Um die Zellen aus der anorganischen Matrix zu lösen, ist eine Dekalzifizierung mit EDTA erforderlich. Es geschieht durch die Chelation mit Kalzium-Ionen des Apatits. Das Natrium- oder Kalium-Salz formiert ein isotonisches Milieu und stabilisiert damit freie Nukleinsäure. Dieser Prozeß ist durch das Vermahlen der Probe (Vergrößerung der Oberfläche) stark beschleunigt. EDTA entfernt die für die Aufrechterhaltung der Gesamtstruktur der Zellhülle unentbehrlichen Magnesiumionen; außerdem hemmt es DNA-abbauende Enzyme.

Metall-Ionen katalysieren unter bestimmten Bedingungen (hohe Temperatur, Lösungen geringer Ionenstärke) die Degradation der DNA, was durch die Komplexbildung z. B. mit Chelex (in meinem Fall mit Sephadex) verhindert wird.

Detergenzien zur Lyse der Membranen und Denaturierung der Proteine sind z. B. SDS, Triton X-100, Tween 20. Sie unterstützen den Auflösungsvorgang, weil sie Lipidmoleküle entfernen und so dafür sorgen, daß die Zellmembran zerreißt. Nachteil ist, daß z. B. SDS die PCR beeinträchtigt. Ein nicht-ionischer Detergent stabilisiert Puffer und DNA.

Tris puffert den Extraktionsansatz.

Dithiothreitol (DTT) reduziert in Proteinen quantitativ Disulfid-Brücken oder schützt freie Sulfhydryl-Gruppen. Aufgrund seiner proteinstabilisierenden Wirkung ist DTT Bestandteil vieler Puffer, in denen z. B. Proteinase K aufbewahrt wird.

Proteinase K ist unspezifische Serin-Protease, die aus dem Pilz *Tritirachium album limber* gewonnen wird. Sie inaktiviert native Proteine (z. B. Desoxyribonukleasen), Ribosomen, Histone, usw., daher wird sie bei der DNA-Isolierung eingesetzt.

Das meist verwendete Verfahren für DNA-Extraktion nutzt die unterschiedliche Anfälligkeit der DNA und Proteine für die Denaturierung mit organischen Lösungen wie Phenol und Chloroform. Ein klassisches Verfahren der Aufreinigung ist die Verwendung von Phenol, Chloroform, Isoamylalkohol (25:24:1). Die Mischung Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol ist das effektivere proteindenaturierende Mittel als pures Phenol.

Phenol ist ein aminophiles Reagenz, das Proteinspaltprodukte aufnimmt und sich aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften von der wässrigen Phase abtrennt. Die Phenol-Phase enthält nach der Zentrifugation Proteine und Lipide, die wässrige Phase die DNA. Die denaturierten Proteine formieren eine unlösliche Interphase. Eine dicke Interphase zwischen der Phenol- und Aqua-Phase deutet auf eine unkomplette Extraktion der DNA. Eine zusätzliche wiederholte Extraktion der Aqua- und der Interphase kann gewünscht werden. Chloroform denaturiert Proteine und führt ebenfalls zur Trennung der organischen von der wässrigen Phase. Die Mischung Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) oder Chloroform allein entfernt die letzten Spuren des Phenols. Die Phenolreste sammeln sich in der Interphase an. Zu dem Zeitpunkt sollten auch die in der Probe vorhandenen Huminsäuren, die ebenfalls Phenolgruppen aufweisen, entfernt worden sein.

Isoamylalkohol verhindert das Schäumen während der Extraktion.

Die allgemeine Methode, um die Phenol- und Chloroform-Reste zu entfernen, ist die Präzipitation der DNA mit kaltem Ethanol und Anwesenheit von Salz. Nach Zugabe von Salz (mindestens z. B. 100 mM NaCl) und Alkohol (Ethanol, Isopropanol) wird die DNA dehydratisiert und präzipitiert aus der wässrigen Lösung. NaCl fällt Proteine aus, weil die Aminosäuren zu ihren Salzen werden.

Hochmolare Salzlösungen erhöhen den Präzipitationsprozeß. Wenn man mit hochmolaren Puffern arbeitet (EDTA-Salze), braucht man nicht noch zusätzliche hochmolare Salze. Das kann dann eventuell den Präzipitationsprozeß sogar hindern. Hochmolare EDTA-Salze haben immer einen ausreichenden Präzipitationseffekt.

Eine gute Alternative zu Ethanol bei der ersten Präzipitation ist Isopropanol. Der gesamte Volumen ist dann kleiner, weil nur ein Volumen von Isopropanol zu der DNA-Lösung zugegeben wird.

Auch die Extraktion mit Ether entfernt die organischen Lösungsmittel aus einem Extrakt mit alter DNA.

Bei der Zugabe von 70%-100%-igem Ethanol aggregieren die DNA-Moleküle und präzipitieren durch den Entzug von Wassermolekülen. Niedermolekulare Oligonukleotide, Nukleotide und Salze bleiben gelöst. DNA kann dann nach Auswaschen der Salzurückstände mit 70%-100%-igem wässrigem (z. B. Ethanol) Alkohol getrocknet und zur Weiterverarbeitung (Lagerung) in einer schwach alkalischen niedermolaren Pufferlösung vorsichtig gelöst werden.

Als Puffer verwendet man in der Regel den Standard-Puffer TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0), oder steriles Wasser. In TE-Puffer können DNA-Proben mehr als 4 Jahre bei 6°C im Kühlschrank ohne Degradationserscheinungen aufbewahrt werden (Driesel, 1985).

3.3.2. Extraktionsmethode von Hochmeister et al. (1991)

1. 1g Knochenpulver wird mit 8 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5) bei Raumtemperatur unter ständigem Schütteln drei bis fünf Tage inkubiert. Täglich zentrifugiert man bei 4 500 rpm 15 Minuten ab, verwirft den Überstand und füllt mit frischem EDTA auf. *Dieser Schritt der Dekalzifizierung ist typisch für diese Methode.*
2. Um die akkumulierten Ionen und das EDTA zu entfernen, wird das Pellet mehrmals mit deionisiertem, sterilem Wasser gewaschen.
3. Dem gewaschenen Pellet setzt man 0,5 ml vorgewärmten (56°C) Extraktionspuffer [0,01M Tris(hydroxymethyl)aminomethane, 0,01M Disodium (Na₂)EDTA·2H₂O, 0,1M NaCl, 0,039M Dithiothreitol (DTT), 20 µl Proteinase K (20 mg/ml)] zu und inkubiert bei 56°C über Nacht. Während der ersten zwei Stunden Inkubationszeit wird das Gemisch gelegentlich aufgeschüttelt.
4. Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) inkubiert man erneut bei 56°C für drei Stunden.
5. Den Extraktionsansatz schüttelt man anschließend mit 1 Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) für 10 Minuten. Zur Phasentrennung zentrifugiert man 10 Minuten bei 4 000 rpm und entfernt die organische Phase und die Interphase. Mit der wässrigen Phase wiederholt man diesen Schritt noch zweimal.
6. Um verbliebene Phenolreste zu entfernen, schüttelt man mit Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) aus. Nach dem Zentrifugationsschritt 10 Minuten bei 4 000 rpm wird die organische Phase verworfen.
7. Anschließend folgt eine n-Butanol-Extraktion und die wässrige Phase ist dann mit Centricon-30 Konzentratoren konzentriert.
8. Das Retentat ist dreimal mit 400 µl TE-Puffer (0,01M Tris, 0,001M (Na₂)EDTA·2H₂O, pH 7,5) gewaschen und bei -20°C gelagert.

3.3.3. Extraktionsmethode von Lee et al. (1991)

1. 100 mg Knochenpulver werden mit 400 µl Extraktionspuffer (0,01M Tris, 0,01M EDTA, 0,1M NaCl, 2% SDS, 0,5 mg/ml Proteinase K) versetzt und bei 37°C über Nacht inkubiert.
2. Den Extraktionsansatz schüttelt man anschließend mit 1 Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25:24:1) für 10 Minuten. Zur Phasentrennung zentrifugiert man 10 Minuten bei 4 000 rpm und entfernt die organische Phase und die Interphase. Mit der wässrigen Phase wiederholt man diesen Schritt noch einmal.
3. Das restliche Phenol in der wässrigen Phase wird mit 1 Volumen Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) 10 Minuten ausgeschüttelt. Zur Phasentrennung wird 10 Minuten bei 4 000 rpm zentrifugiert.
4. Der wässrigen DNA-haltigen Phase wird mit 2 Volumen eisgekühlten absoluten Ethanol das Wasser entzogen.
5. Um die DNA zu fällen, gibt man 1/10 Volumenanteil 3M Natriumacetat-Lösung zu. Die gefällte DNA wird durch den Zentrifugationsschritt bei 12 000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert.
6. Das über Nacht bei -20°C präzipitierte DNA wird mit 70%-igem Ethanol gewaschen, dann erneut bei 12 000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet getrocknet.

7. Das trockene Pellet löst man in TE-Puffer (0,01M Tris, 0,001M (Na₂)EDTA·2H₂O, pH 7,5) über Nacht bei 50°C und lagert bei -20°C.

3.3.4. Extraktionsmethode von Scholz und Pusch (1997)

1. 0,2 g Knochenmehl ist mit 500 µl vorgewärmtem (60°C) Puffer I (8,0% Saccharose, 5,0% Triton X-100, 0,01M EDTA, 0,005M Tris-HCl (pH 8,0), 0,005M Ammoniumacetat, 0,002M Magnesiumacetat, 100 µl Sephadex G-50) gemischt.
2. 1 Volumen von Phenol ist zugegeben. Die Suspension wird 5 Stunden lang bei der Temperatur unter 45°C geschüttelt.
3. Die Phasentrennung folgt durch Zentrifugation bei 14 000 rpm für 5 Minuten.
4. Die wässrige (obere) Phase wird in neue 1,5 ml - Tube übertragen. 1 Volumen von Chloroform (ungefähr 500-600 µl) ist zu der wässrigen Phase zugegeben. Jede Tube wird 2 Minuten lang vortexiert und dann bei 14 000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.
5. Der Überstand wird in neue Tube übertragen und mit 0,7 Volumen von Propan-2-ol und 20 µg Glycogen gemischt. Vorsichtig vortexen.
6. Die DNA wird dann bei -20°C während 30 Minuten präzipitiert.
7. Zentrifugieren bei 12 500 rpm für 15 Minuten bei 4°C.
8. Das DNA-Pellet wird luftgetrocknet und anschließend in 200 µl von Puffer II (8,0% Saccharose, 0,1% Triton X-100, 0,005M EDTA, 1,2M NaCl) gelöst.
9. Die Schritte 5-8 sind ein- bis zweimal wiederholt, aber ohne Zugabe von Glycogen.
10. Das DNA-Pellet ist mit 70%-igem Ethanol 15 Minuten lang gewaschen. Anschließend folgen das Vortexen und das Zentrifugieren bei 12 500 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
11. Das Pellet wird langsam getrocknet bei Raumtemperatur und die DNA in 10-15 µl TE-Puffer (0,01M Tris-HCl pH 7,2-8,0; 0,001M EDTA) gelöst und bei -20°C gelagert.

3.3.5. Modifikation der Methode von Scholz und Pusch (1997)

Die Methode von Scholz und Pusch (1997) wurde etwas modifiziert und in dieser modifizierten Form für die Untersuchung bis zu 5 000 Jahre alter Knochen angewendet.

1. 1 g Knochenmehl ist mit 2 500 µl vorgewärmtem (60°C) Puffer I (8,0% Saccharose, 5,0% Triton X-100, 0,01M EDTA, 0,005M Tris-HCl (pH 8,0), 0,005M Ammoniumacetat, 0,002M Magnesiumacetat, 500 µl Sephadex G-50) gemischt.
2. Volumen von Phenol ist zugegeben. Die Suspension wird 5 Stunden lang bei der Raumtemperatur geschüttelt.
3. Die Phasentrennung folgt durch Zentrifugation bei 14 000 rpm für 5 Minuten.
4. Die wässrige (obere) Phase wird in neue 10 ml-Tube übertragen. 1 Volumen von Chloroform (individuelle Menge je nach Probe) ist zu der wässrigen Phase zugegeben. Jede Tube wird 2 Minuten lang vortexiert und dann bei 14 000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert.
5. Der Überstand wird in neue 10 ml-Tube übertragen und mit 0,7 Volumen von Propan-2-ol und 100 µg Glycogen gemischt. Vorsichtig vortexen.
6. Die DNA wird dann bei -20°C über Nacht präzipitiert.
7. Zentrifugieren bei 12 500 rpm für 15 Minuten bei 4°C.
8. Das DNA-Pellet wird direkt in 1 000 µl von Puffer II (8,0% Saccharose,

0,1% Triton X-100, 0,005M EDTA, 1,2M NaCl) gelöst und 700 µl von Propan-2-ol zugegeben.

9. Die DNA läßt man dann 2 Stunden lang bei -20°C präzipitieren.
10. Zentrifugieren bei 12 500 rpm für 15 Minuten bei 4°C .
11. Das DNA-Pellet ist mit 70%-igem Ethanol 15-45 Minuten lang gewaschen. Anschließend folgen das Vortexen und das Zentrifugieren bei 12 500 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
12. Das Pellet wird bei $37-40^{\circ}\text{C}$ getrocknet und die DNA in 300 µl TE-Puffer (0,01M Tris-HCl pH 7,6–8,0; 0,001M EDTA pH 8,0) über Nacht bei 37°C gelöst und dann bei -20°C gelagert.

Je nach Beschaffenheit des Knochenmaterials kann die DNA-Konzentration nach der Extraktion zu klein sein. Darum ist es nötig, den Extrakt um einen bestimmten Faktor zu konzentrieren.

DNA aus forensischen oder archäologischen Spuren sind auch oft kontaminiert und/oder degradiert, was die PCR stören kann. In solchen Fällen muß man auch die Reinigung neben der Konzentrierung der extrahierten DNA durchführen.

13. Zu den 300 µl DNA-Lösung gibt man 30 µl 3M Natriumacetat (pH 4,6-5,0) und 750 µl vom absoluten gekühlten Ethanol zu. Gut vortexen.
14. 2 Stunden lang bei -20°C präzipitieren lassen.
15. Zentrifugieren bei 12 000 rpm für 25 Minuten bei 2°C und Überstand abpipettieren.
16. Das Pellet wird mit 250 µl von 70%-igem Ethanol 15-45 Minuten lang gewaschen. Der 70%-ige Ethanol entfernt die Salz-Reste, die die DNA schwer lösbar machen könnten und die PCR inhibieren könnten.
17. Zentrifugieren bei 12 000 rpm für 10 Minuten bei 2°C und Ethanol abheben.
18. Das Pellet bei $37-40^{\circ}\text{C}$ trocknen lassen und anschließend in 10 µl TE-Puffer (0,01M Tris-HCl pH 7,6–8,0; 0,001M EDTA pH 8,0) über Nacht bei 37°C lösen und dann bei -20°C lagern.

Ich habe auch einen anderen Konzentrierungsschritt ausprobiert.

Centricon-100-Ultrafiltration:

Die Centricon-100-Säule wurde zuerst mit 2 ml steriles Wasser gewaschen. In die Centricon-100-Tube wurden dann 1 700 µl TE-Puffer gegeben und dazu 300 µl von DNA-Extrakt. Dann folgte die Zentrifugation bei 5 000 rpm für 20 Minuten. Anschließend wurden 2 ml TE-Puffer dazu pipettiert, und die Zentrifugation wiederholt.

3.4. Bestimmung der Qualität und der Quantität der DNA

Der Erfolg einer DNA-Analyse wird neben der Quantität von der Qualität der extrahierten DNA bestimmt. Diese nimmt im allgemeinen proportional zur Lagerungszeit der Gewebe ab, d.h. die molekulare Integrität der DNA wird durch exogene und endogene hydrolytische Abbauprozesse zunehmend beeinträchtigt. Die DNA in alten Knochen ist in der Regel degradiert und nur geringe Mengen stehen zur Verfügung. Nach der Extraktion der DNA, vor weiteren Analyseschritten habe ich die Qualität und die Quantität der DNA im Extrakt bestimmt.

Ich habe dazu zwei Methoden benutzt:

1. *Spektrophotometrische Messung*
 2. *Restriktionsspaltung der DNA und Agarose-Gel-Elektrophorese.*
- Mit diesen zwei Methoden kennt man die Konzentration der DNA im Extrakt, gesamte Menge der DNA, ihre Reinheit (Qualität) und ihren Degradationsgrad.

3.4.1. Spektrophotometrische Messungen

Zur schnellen Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA wurden Absorptionsmessungen benutzt (Spektrophotometrie). Das Absorptionsspektrum von Makromolekülen wird bestimmt durch ihre chemische Struktur und das Lösungsmittel. Seine pH-Wert und die Polarität können sowohl die Wellenlängen der Absorptionsmaxima als auch die molaren Extinktionskoeffizienten beeinflussen. Nukleinsäuren absorbieren aufgrund der Eigenschaften der in ihnen enthaltenen Basen ultraviolettes Licht zwischen 250–270 nm Wellenlänge. Das Absorptionsmaximum liegt bei 260 nm (Gassen et al., 1991).

Die optische Dichte der wässrigen DNA-Lösung wurde (mit Verdünnung um Faktor 100) bei 260 nm gemessen. In meinem konkreten Fall: (5 µl DNA-Extrakt + 495 µl steril. Wasser).

$$\text{Konzentration der DNA (} \mu\text{g / } \mu\text{l) = Absorbanz bei 260 nm} \times 100 \times 0,0475$$

(0,0475 ist molekularer Extinktionskoeffizient für doppelsträngige Säuger – DNA)
Die Absorbanz ist definiert als die durch eine Lösung absorbierte Lichtmenge, die mit Hilfe eines Spektrophotometers gemessen wird (Cattaneo et al., 1997).
Bei 260 nm Wellenlänge entspricht ein gemessener Absorptionswert von 1 bei 1 cm Schichtdicke ungefähr einer Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA, 37µg/ml bei RNA, oder einzelsträngiger DNA und 20 µg/ml bei kurzkettigen Oligonukleotiden. Man bezeichnet diese Mengen häufig als eine A₂₆₀-Einheit.

$$\text{Gesamtmenge der DNA (} \mu\text{g) = DNA-Konzentration (} \mu\text{g / } \mu\text{l) } \times \text{ Gesamtvolumen (} \mu\text{l)}$$

Man kann durch photometrische Messungen auch erfahren, wie die Qualität der DNA im Extrakt ist, im Hinblick auf eventuelle Proteinen- und Phenol-Kontaminationen. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm und beruht vor allen Dingen auf dem Gehalt an Tyrosin- und Tryptophan-Resten. Der Quotient A₂₆₀ / A₂₈₀ gibt Information über die Reinheit einer Nucleinsäure-Präparation.

A ₂₆₀ / A ₂₈₀	Information
< 1,8	Kontamination durch Proteinen, Phenol
1,8 – 1,95	Reine DNA - Lösung

(Ibelgaufts; 1990).

3.4.2. Restriktionsspaltung der DNA und Agarose-Gel-Elektrophorese

3.4.2.1. Restriktionsenzyme

Einer der Gründe für die rasante Entwicklung der Gentechnologie war die Entdeckung der Restriktionsendonukleasen oder kurz Restriktionsenzyme.

Restriktionsenzyme greifen hochmolekulare Nukleinsäuren an und werden deshalb zu den nukleinsäurespaltenden Enzymen, den Nukleasen gezählt. Die Spaltung des DNA-Doppelstrangs erfolgt durch Hydrolyse (Spaltung einer Bindung durch Addition von Wasser) jeweils einer Phosphodiester-Bindung auf jedem der beiden Stränge.

Es gibt zwei verschiedene Arten von Nukleasen:

-*Exonukleasen* entfernen ein Nukleotid nach dem anderen vom Ende eines DNA-Moleküls. Der Hauptunterschied zwischen den einzelnen Exonukleasen liegt in der Zahl der Stränge, die sie abbauen, wenn sie ein doppelsträngiges Molekül angreifen.

-*Endonukleasen* können Phosphodiesterbindungen im Innern eines DNA-Moleküls spalten.

Die Restriktionsenzyme spalten innerhalb eines Nukleinsäuremoleküls, weshalb sie zu den Endonukleasen zählen. Mit Hilfe dieser Enzyme kann man die DNA, die Struktur, in der die genetische Information kodiert ist, schneiden und dann fast beliebig neu kombinieren. Sie erwiesen sich als besonders wirkungsvolle Werkzeuge für die Analyse der Struktur des genetischen Materials. Mit gereinigten Restriktionsendonukleasen kann man DNA-Moleküle so präzise und reproduzierbar schneiden, wie es für die Klonierung erforderlich ist. Die Entdeckung dieser Enzyme, für die Arber, Smith und Nathans 1978 den Nobelpreis erhielten, war eine der wichtigsten Voraussetzungen für die Entwicklung der Gentechnik.

Die erste Beobachtung, die zur Entdeckung der Restriktionsendonukleasen führte, stammte aus den frühen fünfziger Jahren: Wie man schon damals zeigen konnte, sind manche Bakterienstämme gegen die Infektion mit einem Bakteriophagen immun, ein Phänomen, das man als wirtskontrollierte Restriktion bezeichnete.

Ursache der Restriktion ist ein von den Bakterien produziertes Enzym, das die Phagen-DNA abbaut, bevor sie sich replizieren und die Synthese neuer Phagenpartikel in Gang setzen kann. Die eigene DNA der Bakterien, deren Abbau natürlich tödlich wäre, ist gegen den Angriff geschützt, denn sie trägt zusätzliche Methylgruppen, welche die Wirkung des abbauenden Enzyms blockieren. Die Abbauenzyme bezeichnet man als Restriktionsendonukleasen; sie werden von vielen, vielleicht sogar von allen Bakterienarten produziert: Über 1200 solche Enzyme wurden bisher entdeckt und charakterisiert.

Man kennt drei Klassen von Restriktionsendonukleasen, die sich in ihrer Wirkungsweise geringfügig unterscheiden.

Die Klassen I und III sind ziemlich kompliziert und für die Gentechnik nur von sehr begrenzter Bedeutung. Dagegen handelt es sich bei den Restriktionsendonukleasen des Typs II um jene Schneideenzyme, die für die DNA-Klonierung wichtig sind.

Die erste Klasse von Enzymen erkennt eine spezifische Nukleotidsequenz und spaltet dann die DNA in einer unspezifischen Weise in einiger Entfernung von der Erkennungsstelle.

Alle Enzyme der II. Klasse stammen aus Prokaryonten; aus den wenigen untersuchten Eukaryonten wurde bislang kein Enzym mit ähnlichen Eigenschaften isoliert (Russel, 1983). Man hat hunderte der Klasse II – Restriktionsenzyme in den verschiedensten Bakterien

gefunden und isoliert. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Erkennungssequenzen und Schneidermuster stellen sie natürliche „molekulare Scheren“ dar, mit deren Hilfe DNA-Moleküle fragmentiert und somit bestimmte DNA-Sequenzen aus der gesamten Erbinformation eventuell isoliert werden können.

Alle sind sequenzspezifisch und daher ist die Zahl ihrer Schnittstellen von der Wiederholungshäufigkeit der spezifischen DNA-Sequenz abhängig (Russel, 1983). Ein einzelnes Enzym schneidet die DNA nur an seiner Erkennungssequenz und nirgendwo anders. Restriktionsenzyme schneiden doppelsträngige DNA an kurzen spezifischen Erkennungssequenzen von im Normalfall vier bis acht Nukleotiden. Der Abstand zwischen den Erkennungsstellen im Genom ist mehr oder weniger zufällig.

Hier wurde Enzym EcoRI benutzt:

Dieses Enzym gehört zu der Klasse II und es wurde aus Escherichia coli RY 13 isoliert. Bei Klasse II –Enzymen sind Erkennungs- und Schnittstelle in der Regel identisch. Aufgrund ihrer absoluten Sequenzspezifität werden sie deshalb bevorzugt für die DNA-Rekombinationstechnik verwendet.

Vergleicht man die Sequenzen der beiden Stränge an der Eco RI Schnittstelle (die Stränge werden ja in entgegengesetzter Richtung gelesen), stellt man fest, daß die beiden Sequenzen identisch sind. In der Semantik bezeichnet man einen Satz, der vorwärts oder rückwärts gelesen gleich lautet, als Palindrom, und so verwendet man diesen Begriff auch, um Sequenzen wie die Eco RI – Schnittstelle zu beschreiben.

So spaltet beispielsweise Eco RI die DNA nur an dem Hexanukleotid GAATTC (angegeben ist jeweils die Sequenz eines Stranges in 5´-3´-Richtung). Viele Restriktionsendonukleasen erkennen Sechsersequenzen, aber es gibt auch andere, die auf Gruppen von vier, fünf oder auch acht Nukleotiden ansprechen.

Die meisten Restriktionsenzyme erkennen spezifische palindromische Sequenzen.

Es gibt auch Restriktionsendonukleasen mit degenerierten Erkennungssequenzen, das heißt, sie schneiden die DNA an mehreren ähnlichen Sequenzen. Hinf I beispielsweise erkennt GANTC und schneidet dementsprechend an den Sequenzen GAATC, GATTC, GAGTC, GACTC.

Die Zahl der Restriktionserkennungsstellen in einem DNA-Molekül:

Wie viele Erkennungssequenzen für eine bestimmte Restriktionsendonuklease ein DNA-Molekül bekannter Länge enthält, kann man mathematisch berechnen. Eine Tetranukleotidsequenz sollte alle $4^4=256$ Nukleotide vorkommen. Solche Berechnungen gehen von der Annahme aus, daß die Nukleotide nach dem Zufallsprinzip angeordnet sind und daß der Anteil aller vier Nukleotide in der DNA gleich ist (das heißt, daß der GC-Gehalt 50% beträgt). In der Praxis treffen beide Annahmen nicht genau zu. So sollte beispielsweise die Lambda-DNA mit ihren 49 kB ungefähr zwölf Schnittstellen für eine Restriktionsendonuklease mit einer Sechser-Erkennungssequenz (wie in unserem Fall EcoRI) enthalten. Die Lambda-DNA enthält in Wirklichkeit nur fünf Schnittstellen für EcoRI. Der GC-Gehalt der Lambda-DNA liegt deutlich unter 50%.

3.4.2.2. Restriktionsspaltung der DNA

Das Hauptproblem bei der Digestion ist die Variation der lokalen DNA-Konzentrationen. Die Verklumpungen der DNA sind für die Restriktionsenzyme relativ unzugänglich. Dieses Problem existiert allerdings nur bei der hochmolekularen DNA.

Enzym

Die Restriktionsendonuklease Eco RI habe ich als reine Lösung mit bekannter Konzentration (10U/µl) vom Hersteller bezogen. Restriktionsenzyme sind stabil, wenn sie bei – 20 °C und in einem Puffer mit 50 % Glycerol gelagert sind.

Die Menge des Restriktionsenzym soll weniger als 0,1 des Finalvolumens sein, sonst ist die Enzym-Aktivität durch Glycerol inhibiert. Nach allgemeiner Übereinkunft ist eine Einheit des Enzyms als die Menge definiert, die 1 µg DNA in einer Stunde spaltet und das in empfohlenem Puffer, bei empfohlener Temperatur, in 20 µl-Reaktionsvolumen. Oft ist 1 µl des Restriktionsenzym ausreichend, um 10 µg der DNA in einer Stunde zu schneiden (Sambrook J. et al., 1989). Man kann allerdings die Enzym-Menge reduzieren, wenn man die Digestion-Zeit erhöht. Dies ist aber bei kleinen Mengen der alten DNA nicht zu empfehlen. Man muß bei der Manipulation das Enzym auf dem Eis haben und schnell arbeiten. Nachdem ich das Restriktionsenzym zugegeben habe, habe ich vorsichtig die Lösung bei 4 °C bewegt, 2–3 Minuten bevor ich inkubierte bei entsprechender Temperatur.

Puffer

Die meisten Restriktionsendonukleasen arbeiten gut bei pH 7,4, aber die einzelnen Enzyme benötigen unterschiedliche Ionenstärken (die gewöhnlich durch NaCl hergestellt werden) und Mg²⁺ Konzentrationen. Alle Restriktionsendonukleasen des Typs II benötigen Mg²⁺ für ihre Funktion. Ratsam ist außerdem, ein reduzierendes Agens wie Dithiothreitol zuzusetzen, welches das Enzym stabilisiert und seine Inaktivierung verhindert.

Die Puffer für verschiedene Restriktionsendonukleasen unterscheiden sich in NaCl-Konzentration. Es ist wichtig, daß man die richtigen Reaktionsbedingungen für das jeweilige Enzym herstellt: Eine falsche NaCl⁻ oder Mg²⁺- Konzentration kann nicht nur zu einem Aktivitätsrückgang der Restriktionsendonuklease führen, sondern auch zu Veränderungen in der Spezifität des Enzyms; dann wird die DNA auch an zusätzlichen, normalerweise nicht erkannten Sequenzen gespalten.

Ein einfaches Puffer ist Potassium Glutamat Puffer (KGB), in welchem praktisch alle Restriktionsenzyme arbeiten (Sambrook et al., 1989). Hier verwendetes Enzym EcoRI arbeitet sehr gut mit 0,5x –2x KGB-Puffern.

2 × KGB:

- 200 mM Potassium Glutamat
- 50 mM Tris-Acetat (pH 7,5)
- 20 mM Magnesium Acetat
- 100 µg/ml Bovine Serum Albumin
- 1 mM beta-mercaptoethanol

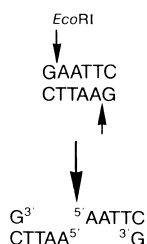
Nach dem Lösen der DNA im Puffer sollte die DNA bei 4 °C mehrere Stunden lang stehen. Dies gilt allerdings nur im Fall sehr dicker zäher DNA.

DNA-Proben:

Wieviel DNA wird verwendet, hängt von der Art des Experiments ab. Das Wasser wurde zugegeben, so daß sich ein Endvolumen von 20 µl ergibt.

In einem Reaktionsansatz befanden sich:

1. Ster. Wasser
2. 1x KGB Puffer (immer 10 % des Endvolumens)
3. DNA
4. Enzym (in meinem Fall Eco RI 15-20 Einheiten)



Inkubationstemperatur

Der letzte Faktor, den ich beachtet habe, war die Inkubationstemperatur. EcoRI wie die meisten Restriktionsenzyme wirkt bei 37°C am besten. Nach einer Stunde habe ich angenommen, daß die Spaltung vollständig abgelaufen ist.

Um das Enzym zu inaktivieren, habe ich meine Proben noch kurz (10 Minuten) bei 70°C inkubiert. Als Alternativen würden sich bei der Arbeit mit hochmolekularer DNA die EDTA-Zugabe (EDTA bindet Magnesiumionen und macht so das Enzym unwirksam) oder eine Phenolextraktion bieten (Brown, 1993).

Kontrolle

Zur Kontrolle einer vollständigen enzymatischen Spaltung genomischer DNA wurde stets ein Aliquot des Verdauungsansatzes in einem parallelen Ansatz mit Plasmid-DNA pUC18 unter gleichen Bedingungen inkubiert.

Der Ansatz der Kontrolle: 13-15 µl Wasser, 2 µl 1x Puffer KGB, 2-4 µl Plasmid-DNA (50-200 ng) pUC18, 1 µl Eco RI (10U/µl).

3.4.2.3. Agarose - Gel - Elektrophorese

Die DNA habe ich gelelektrophoretisch auf Molekulargewicht und Reinheit geprüft. Die Quantität und der Grad der Degradation der isolierten DNA können normalerweise mittels der Agarose-Gel-Elektrophorese untersucht werden.

Wie Proteine und viele andere Biomoleküle trägt auch die DNA eine elektrische Ladung, und zwar eine negative. Deshalb wandert sie in Richtung des positiven Pols. Durch einfache Elektrophorese kann man deshalb Fragmente unterschiedlicher Größe nicht voneinander trennen.

Agarose-Gel-Elektrophorese ist von Bedeutung nicht nur in klinischer Praxis, sondern auch bei Paternitätsuntersuchungen und in der forensischer Wissenschaft (Bär et al., 1983).

Agarose-Elektrophorese ist die Standardmethode für die Trennung, Identifizierung, RFLP-Analyse und Reinigung von DNA- und RNA-Fragmenten (Maniatis et al., 1982).

Die Agarosegel-Elektrophorese ist nicht nur zur Charakterisierung der PCR-Produkte geeignet, sondern auch zur Auftrennung von größeren DNA-Mengen. Agarose-Gelsysteme dienen sowohl zur Trennung und Analyse von linearen DNA-Fragmenten, superhelicalem Plasmid-DNA und RNA-Proben als auch zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten. Durch die Variation der Agarose-Konzentration können lineare DNA-Fragmenten der Größe 0,1 bis 60 kB separiert werden.

Agarose-Gele werden insbesondere dann verwendet, wenn man große Poren für Analysen von Molekülen über 10 nm Durchmesser benötigt. Agarosegele bilden ein relativ großporiges festes Gel, das vor allem bei Molekülen mit hohem Molekulargewicht (DNA, RNA, bestimmten Proteinen, Zellpartikeln) das geeignete Trägermaterial für Elektrophoresen darstellt.

Nichtdenaturierende Agarosegelelektrophoresen sind anwendbar bei doppelsträngigen DNA-Molekülen einer Länge von 500 – 20 000 Bp:

- Amplifikationsreaktionen (PCRs),
- *Restriktionsverdau*,
- Wissenschaftliches Anwendungsbeispiel: nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese beim Southern Blot (Martin, 1996).

Agarose

Agarose ist ein Polysaccharid und wird aus roten Meeresalgen hergestellt. Normale Agarose hat einen Schmelzpunkt von ca. 85-95°C. Besonders niedrig schmelzende Agarose mit einer Geliertemperatur von 30°C und einem Schmelzpunkt um 60°C, die bei 37°C mehrere Stunden flüssig bleibt, erhält man, wenn Agarose chemisch durch Einführung von Hydroxyethyl-Gruppen modifiziert wird. In der Gentechnologie wird niedrig schmelzende Agarose hauptsächlich bei der Gelelektrophorese von DNA und RNA eingesetzt, weil die Nukleinsäuren aus dem Agarose-Gel relativ problemlos zurückgewonnen werden können.

Agarose-Gel und Agarose-Gel-Elektrophorese

Ich habe meistens das 0,8%-ige Agarosegel verwendet:

0,8 g Agarose pure in 100 ml TBE-Puffer (pH = 8,3)

Der Auftrennungsbereich dieses Geles ist für lineare DNA-Moleküle 0,6-8 kb (Sambrook et al., 1989). Ich habe für meine Fälle der degradierten alten DNA auch höhere Agarosekonzentration (2% mit dem Auftrennungsbereich 0,1-2 kb) benutzt aber vergeblich. Die Anwesenheit von wenigen ungelösten Agarose-Partikeln wirkt sich nicht auf die Auflösung des Geles aus (Benzinger et al., 1998). Deswegen ist es nicht nötig die Agarose länger kochen (z. B. 20 Min.).

Zum Ausgießen wurde die Agaroselösung (0,8%) auf 60°C abgekühlt, die 2%-ige Agaroselösung wurde bei 70°C ausgegossen (Wink et al., 1994).

Die untersuchte DNA-Lösung wurde mit 1/10 Auftragspuffer versetzt. Der Auftragspuffer liefert nämlich mehrere Vorteile:

- Er erhöht die Dichte der DNA-Lösungen, so daß sie in die Geltaschen absinken.
- Durch die Anfärbung wird das Einfüllen der DNA-Lösungen erleichtert.
- Die Farbstoffe wandern im Gel mit und zeigen an, wie weit der Elektrophoreselauf fortgeschritten ist. Bromphenolblau entspricht mit seiner Wanderungsgeschwindigkeit etwa einem 300 Bp langem DNA-Fragment, Xylenzyanol einem 4 000 Bp langem Fragment, in einem 1%-igen Agarosegel.

Der Auftragspuffer wurde hergestellt nach dem folgenden Rezept (Sambrook et al., 1989):

0,25 % Bromphenol blue	Für 4 ml benutzte ich: 0,01 g Bromphenol blue
0,25 % Xylene Cyanol FF	0,01 g Xylene Cyanol
30 % Glycerol in Wasser	0,95 ml Glycerol
(lagern bei 4°C)	steriles Wasser

Ich habe TBE-Puffer (pH=8,3) benutzt. In TAE-Puffern wandern DNA-Fragmente zwar ca. 10% schneller aber TBE- und TPE-Puffer haben höhere Pufferkapazitäten als TAE-Puffer (Wink et al., 1994). In Agarose-Gelen erhöht TBE-Puffer in der Regel die molekulare Siebwirkung des Gels.

Für 500 ml TBE-Puffer (pH = 8,3) brauchte ich:

0,186 g EDTA (1 mM EDTA)
 0,605 g Tris (10 mM Tris)
 0,309 g Borsäure (10 mM Borsäure)
 bidist. Wasser
 pH 8,3 (Parson et al., 1998).

Elektrophoresegerät: HorizonTM 58, Model 200, BRL Life Technologies, Inc.
 Gelgröße: 5,7×8,3×0,5 (cm).

Elektrophorese verlief sehr langsam ($< 1 \text{ V / cm}$), daß die DNA-Fragmente sich nicht verschmieren. Meine Elektrophoreselaufbedingungen: 100 V, 30 - 45 Min.

Ethidiumbromid-Färbung

Man kann vor dem Ausgießen der Agaroselösung Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt werden. Hier wurde nicht Ethidiumbromid direkt zum Agarosegel zugegeben. Ethidiumbromid ist stark mutagene Substanz und verlangsamt die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA-Fragmenten um ca. 15% (Wink et al., 1994).

Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Ethidiumbromid-Lösung (10 mg / ml) 15–45 Minuten gefärbt.

Ethidiumbromid absorbiert UV-Licht der Wellenlänge 312 nm und fluoresziert im sichtbaren Bereich bei 590 nm rotorange. Die Agarosegele wurden im UV-Licht mit einer Videokamera und digitaler Bildverarbeitung dokumentiert und die Menge und Größe der Produkte errechnet.

Die Empfindlichkeit der EtBr-Färbung ist begrenzt. Wenn eine Bande weniger als 25 ng DNA enthält, ist sie nach der EtBr-Färbung meist nicht mehr erkennbar. Deshalb braucht man für kleine DNA-Mengen eine weitaus empfindlichere Nachweismethode (Brown, 1993).

Ergebnisse und Auswertung

Hat man es mit einer größeren Anzahl von Fragmenten mit vielen verschiedenen Größen zu tun, etwa einer Säuger-DNA, die mit EcoRI geschnitten wurde, liegt die Kapazität eines mittelgroßen Geles bei etwa 5-10 µg (Martin, 1996).

Trennt man geschnittene DNA durch Elektrophorese auf, tritt das Größenspektrum als eine durchgehende verwischte DNA-Spur in Erscheinung.

Hier wurde Videokamera eingesetzt, um Bilder von Ethidiumbromid-gefärbten Gelen aufzunehmen. Die elektronischen Bilder wurden dann mit Hilfe eines Computerprogrammes analysiert und ausgewertet.

Lambda-Marker

Hat man unbekannte Proben, kann man die DNA-Menge bestimmen und die Größe der DNA-Fragmente abschätzen, indem man sie mit einem Marker ähnlicher Intensität vergleicht. Ich ließ in jedem Elektrophoresegel einen Satz von Restriktionsfragmenten bekannter Größe mitlaufen. Als einen solchen Größenmarker benutzte ich schon gespaltete Lambda-DNA Eco 91I (Gibco BRL). Ich habe immer auf ein Gel 250 ng davon aufgetragen. Da ich die Größe der Fragmente in diesem Reaktionsansatz kenne, kann ich die Fragmentgrößen in meinem experimentellen Ansatz abschätzen, indem ich ihre Positionen in den beiden Spuren des Gels vergleiche. Diese Methode ist zwar nicht sehr genau, aber die Abweichungen liegen immerhin unter 5%, und das reicht für die meisten Zwecke aus (Brown, 1993).

Lambda ist ein Bakterienvirus, dessen Wirt „Escherichia coli“ ist. Der Phagenkopf enthält lineare, doppelsträngige DNA mit einer Länge von 48 502 Basenpaaren, deren Sequenz vollständig bekannt ist. Das Genom von Lambda enthält etwa 40 Gene. Lambda gehört

zu den molekularbiologisch am besten untersuchten Bakteriophagen.

3.5. PCR - Amplifikation der DNA

PCR, ist die Abkürzung für Polymerase-Ketten-Reaktion. Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation (gezielte Vermehrung) von DNA- und RNA-Sequenzen in vitro.

DNA-Abschnitte mit mindestens 10 000 Bp lassen sich noch sehr gut amplifizieren (Kapeller, 1990).

Die PCR wurde 1985 erstmals beschrieben. Ihr Erfinder ist Kary B. Mullis.

Das Originalprotokoll wurde bei der Firma Cetus entwickelt und 1985 von Saiki et al. in „Science“ veröffentlicht. In der Arbeit wurde die Vervielfältigung des β -Globingens beschrieben, das amplifizierte Produkt wurde zur pränatalen Diagnostik der Sichelzellenanämie eingesetzt.

Der Einsatz der PCR war zunächst limitiert, bis hitze-stabile-DNA-Polymerasen und automatische Thermocycler verfügbar waren. Dann folgte nahezu exponentieller Anstieg der PCR-Anwendungen (in der forensischen Medizin, in der Krebsforschung, in der Virus-Forschung und –Diagnostik, in der Forschung von Erbkrankheiten, in der Hygiene, der Ökologie, der allgemeinen Mikrobiologie, der Pharmazie und Histologie ebenso wie in Archäologie, Anthropologie oder Evolutionsforschung).

Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der Replikation der DNA in der Zelle. Sie ist eine in vitro Alternative zur Vermehrung der DNA innerhalb lebender Bakterien. Anstatt die DNA in einem Vektor zu klonieren und zu vermehren und dabei biologisches Material anzuziehen, um schließlich das gewünschte Fragment mittels Gelelektrophorese zu isolieren, kann man bei bekannter DNA-Sequenz die PCR direkt einsetzen. In der PCR synthetisiert die DNA-Polymerase neue DNA an einer vorhandenen DNA-Matrize, in der Zelle braucht das Enzym dazu einen RNA-Primer.

Die Nachweisgrenze für PCR-Systeme liegt theoretisch bei einem einzigen DNA-Molekül (Li et al., 1988), in der Praxis sind 500 pg DNA sicher analysierbar (Urquhart et al., 1994).

3.5.1. Prinzip der PCR

Denaturierung

Der ursprüngliche DNA-Doppelstrang (das „Template“) wird durch Hitze (ca. 90°C - 96°C) denaturiert, in Einzelstränge getrennt. Denaturation bei 94 - 96°C 1 Minute lang ist normalerweise genug aber GC-reiche Segmente brauchen noch höhere Temperatur. In den meisten Fällen sind 94°C geeignet.

Annealing (Hybridisation)

Anlagerung von zwei Primer-Oligonukleotiden an Einzelstränge der DNA (37-72°C) (Mertes et al., 1997). Die Annealingtemperatur und Dauer hängen von den zu amplifizierenden Sequenzen ab.

Elongation (Polymerisation)

Mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase wird durch den Einbau von Desoxynukleotridiphosphaten (dNTP) ein neuer, zum Ursprungsstrang komplementärer Strang gebildet. Die 5'-Enden der denaturierten DNA-Stränge sind gekennzeichnet. Die enzymatische Synthese neuer DNA-Stränge beginnt an den 3'-Enden der Primer.

Im ersten Reaktionszyklus entstehen bei der Polymerisation DNA-Moleküle, deren 5'-Ende zwar durch den eingesetzten Primer begrenzt ist, deren 3'-Ende kann aber sehr unterschiedlich sein. Die Polymerisation kann nämlich an jeder beliebigen Stelle der Matrize aufhören. Da sich die Konzentration der Ausgangsmatrize nicht verändert, nimmt die Anzahl dieser DNA-Moleküle mit definiertem 5'- und unbestimmtem 3'-Ende höchstens linear mit der Zykluszahl zu.

Im zweiten Reaktionszyklus dienen auch die Produkte des ersten Zyklus als Matrizen für die DNA-Polymerase, d.h. hier können jetzt die gewünschten DNA-Moleküle entstehen, die auf beiden Seiten durch die eingesetzten Primer begrenzt und damit in ihrer Länge klar definiert sind.

Nach zyklischer Wiederholung dieses Prozesses folgt eine exponentielle Zunahme von gewünschten DNA-Fragmenten. Theoretisch erreicht man nach 30 Zyklen einen Amplifikationsfaktor von etwa 10^9 .

In der Praxis läuft die exponentielle Amplifikation nicht beliebig weiter, nach 20-25 Zyklen ist aufgrund einer sinkenden Effizienz nur noch eine lineare Zunahme zu beobachten. Nach den 20-25 Zyklen werden aufgrund des Aktivitätsverlustes der Taq-Polymerase, des Verbrauches von Primern und Nukleotiden und aufgrund des sog. Plateau-Effekt (Hemmung der DNA-Polymerase durch die steigende Konzentration der Amplifikationsprodukte im Reaktionsansatz) „nur“ Werte um 10^6 erzielt (Ehrlich et al., 1991; Reischl et al., 1993).

3.5.2. Wichtige Bestandteile der PCR

Typischer Reaktionsansatz einer PCR (25-200µl) besteht aus (Mertes et al., 1997):

- DNA-Polymerase (2U/100µl)
- dNTPs (je 200 µM, pH 7)
- 1x Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 0,001% (w/v) Gelatine)
- Primer (je 0,1-1,0 mM)
- DNA-Matrize (> 1µg genomische DNA)

Bei Verwendung von Thermocyclern ohne beheizten Deckel ist eine Mineralölüberschichtung (40-100µl) erforderlich, um Kondensationsvorgänge zu verhindern.

Enzym Taq-Polymerase

Das Bakterium *Thermus aquaticus* (Stamm YT1) lebt im Wasser bei einer Temperatur von 75°C. Seine DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) hat ein Temperaturoptimum von 72°C und ist selbst bei 94°C recht stabil. Stamm YT1 wurde aus einem Geysir im Yellowstone-Nationalpark isoliert.

Aufgrund ihrer Hitzestabilität hat sich die DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermophilus aquaticus* (Taq-DNA-Polymerase) als Amplifikationsenzym besonders bewährt.

Die DNA-Polymerase ergänzt bei dem Elongationsschritt in Anwesenheit von dNTPs den jeweiligen Einzelstrang ausgehend vom 3'-Ende der Primer zum Doppelstrang.

Es empfiehlt sich für das jeweilige PCR-System eine Titrierung von 0,5 - 5 U Taq-DNA-Polymerase durchzuführen. Wird zu viel Enzym eingesetzt, so fördert dies Unspezifität. Zu wenig Enzym verschlechtert hingegen die Produktausbeute. Üblicherweise werden zu einem 100 µl Ansatz 2 - 2,5 U Taq-Polymerase zugesetzt, was ungefähr einer Konzentration 10^{-9} M entspricht (Mertes et al., 1997).

Im allgemeinen ist eine Einheit (Unit) die Enzymmenge, die bei 68-75°C in 30 Minuten 10 nmol dNTPs in säureunlösliches Material überführt.

Magnesium - Chlorid

Die Taq-DNA-Polymerase benötigt freies Magnesium als Kofaktor zum Einbau von Nukleotiden an das 3'-Ende der wachsenden Kette. Die Magnesiumionenkonzentration muß deshalb über der dNTP-Konzentration liegen, da deren negative Ladungen Mg^{2+} -Ionen binden. Üblicherweise liegt die Konzentration des freien Magnesiums etwa um 0,5 - 2,5 mM über der dNTP-Konzentration: Befinden sich z.B. 0,8 mM (0,2 mM für jedes dNTP) dNTPs im Ansatz, so ist eine Mg-Konzentration von ca. 1,5 mM (in Abhängigkeit vom verwendeten PCR-System) optimal. Deshalb sollte bei einer Reduzierung der dNTP-Konzentration ebenfalls die Mg-Konzentration verringert werden. Auch die Anwesenheit von Chelatbildnern in Puffern, wie z. B. EDTA in TE-Puffer, führt zu einer Verringerung der Magnesiumkonzentration.

Im allgemeinen führt eine zu hohe Mg^{2+} -Konzentration zu unspezifischen Produkten.

Puffer

In der PCR werden zumeist zehnfach konzentrierte Puffer eingesetzt, die vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 (v/v) verdünnt werden müssen.

Auch der pH-Wert der Reaktion beeinflusst die Präzision, mit der das Enzym arbeitet.

So arbeitet die Taq-DNA-Polymerase bei einem pH-Wert von 5,7 mit einer Fehlerrate von nur 1/180 000 (Mertes et al., 1997). Jedoch sollte dabei berücksichtigt werden, daß ein niedrigerer pH-Wert auch das DNA-Matrizenmaterial schädigen kann.

Einwertige Kationen wie Natrium und Kalium stimulieren die Aktivität der Polymerase, das Optimum für NaCl liegt bei 40 mM, das für KCl bei 60 mM, Konzentrationen über 100 mM wirken inhibierend.

dNTP

Sie werden aus dMTPs und Pyrophosphaten hergestellt. Sie sind zumeist bereits auf einen neutralen pH-Wert von 7,0 eingestellt.

Die optimale Konzentration hängt von den Amplifikaten, den Primern, der Anzahl der PCR-Zyklen sowie von der Menge des $MgCl_2$ ab.

Obwohl die Taq-DNA-Polymerase bei niedrigeren dNTP-Konzentrationen (10-15 µM) mit höherer Genauigkeit arbeitet, werden üblicherweise Konzentrationen von 20-200 µM je dNTP empfohlen (Mertes et al., 1997).

PRIMER

Bei der Arbeit mit alter DNA treten häufig Probleme auf, ein DNA-Fragment spezifisch, d. h. ohne Entstehung unerwünschter Zusatzbanden zu amplifizieren. Die Spezifität und Effizienz der PCR werden von zahlreichen Parametern beeinflusst, am entscheidendsten von den Primern und deren Annealing-Temperatur. Ein korrektes Primerdesign ist daher eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche PCR.

Mehrere unterstützende Computerprogramme (OLIGO, National BioScience; GeneWorks und PCGene, Intelligenetics) haben sich bei richtiger Primer-Wahl als sehr nützlich erwiesen (Rychlik, 1993).

Beim Entwurf eines Primers sollten einige Gesichtspunkte berücksichtigt werden:

1. Länge der Primer

Primer ab 18 Nukleotide gewährleisten bereits eine ausreichende Spezifität der PCR. Ab ca. 28-30 Nukleotide-Länge ist jedoch keine weitere Zunahme der Spezifität zu verzeichnen.

2. Basenzusammensetzung der Primer

Eine wichtige Rolle spielt das AT/GC-Verhältnis der Primer. Die Schmelztemperatur eines AT-Basenpaares ist niedriger als die eines GC-Paares (Gassen et al., 1991). Schließlich sollte noch beachtet werden, daß sich am 3'- bzw. 5'-Ende der Primer keine Poly(T)-Bereiche befinden, da Thymidin-Reste zur Ausbildung unspezifischer Bindungen neigen.

3. Vermeidung komplementärer Bereiche zwischen den beiden Primern

Primer-Dimere können sich ausbilden, wenn beide Primer an ihren 3'-Enden eine Homologie zueinander aufweisen. Primer-Dimere sind extrem effektive PCR-Vorlagen. Wenn diese während der ersten Amplifikationszyklen entstehen, können Primer-Dimere zum dominierenden Amplifikationsprodukt werden (Chou et al., 1992). Um der Entstehung von Primer-Dimeren vorzubeugen, ist es unerlässlich, die Primer auf Intra- bzw. Inter-Primer-Komplementarität zu überprüfen.

4. Primersequenzen mit signifikanter Sekundärstruktur vermeiden

Vor allem bei längeren Primern muß berücksichtigt werden, daß keine palindromischen Bereiche vorkommen, da diese zur Ausbildung von Haarnadelstrukturen aufgrund selbstkomplementärer Rückfaltung tendieren. Intern zueinander komplementäre Sequenzen sowie „Wooble“-Strukturen sollten am 3'-Enden vermieden werden.

Der T_m -Wert (die Schmelztemperatur) eines Primers ist die Temperatur bei der 50% der Stränge in Lösung separiert wurden.

Beide Primer sollten ähnliche T_m -Werte haben, der am einfachsten nach der $[(A+T) \times 2 + (G+C) \times 4]$ – Regel (Wallace-Regel) berechnet werden kann.

Diese Formel ist allerdings nur für Primer bis ca. 20 Basen Länge geeignet.

Von der Vielzahl von Formeln lautet eine weitere einfache $T_m = 2(A+C) + 4(G+C) - 5^\circ\text{C}$.

Es liefert allerdings nur einen Ausgangspunkt zur anschließenden experimentellen Optimierung der Annealing-Temperatur.

Kompliziertere Formeln berücksichtigen noch Salzkonzentrationen des Puffers sowie weitere thermodynamische Daten von Oligonukleotiden. Für längere Primer (bis 70 Basen) kann die folgende Formel benutzt werden:

$$T_m = 81,5 + 16,6 (\log_{10}[J^+]) + 0,41 (\%G+C) - (600/l) - 0,63 (\%FA),$$

wobei $[J^+]$ Konzentration monovalenter Kationen, l Länge der Oligonukleotide, FA

Formamid. Noch exaktere Berechnungen lassen sich durch sog. „nearest-neighbor“-Analysen erstellen (Scheinert, 1997).

Es wird eine Annealingtemperatur von 5°C unter dem Schmelzpunkt empfohlen (Gassen et al., 1994).

Maniatis et al. (1982) bietet in seinem Buch eine rechnerische Korrektur ($0,65 \times \% \text{Formamid} = ^\circ\text{C}$ um welche die T_m niedriger sein muß) für die Berechnung der Schmelztemperatur, wenn Formamid verwendet wird.

Wenn man 20% Glycerol verwendet, muß die T_m um 5°C niedriger sein (Cayouette et al., 1996).

Die Wahl der Primer-Konzentration kann schwierig sein. Die Primer müssen im Überschuß im Reaktionsansatz vorliegen, damit die doppelsträngige DNA nicht wieder reassoziieren kann. Auf einmal sollte die Primer-Konzentration wegen der Primer-Dimeren so gering wie

möglich gewählt werden. Gewöhnlich sind 0,1-1 μM optimal, höhere Primer-Konzentrationen fördern die Bildung von Primer-Dimeren und unspezifisches Annealing der Primer (White, 1993).

Der maximale Homologie-Bereich zur DNA-Zielsequenz sollte am 3'-Ende lokalisiert sein.

Template-DNA für die PCR

Als Matrize kann zirkuläre und linearisierte DNA dienen.

Die einzusetzende Menge an DNA-Matrize ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden Fragments und der Art der DNA. Je länger das Fragment ist, desto mehr Ausgangsmaterial muß eingesetzt werden, um die gleiche Produktmenge zu erhalten. DNA-Regionen mit stabiler Sekundärstruktur, sog. „hairpin-loops“, oder sehr hohem G/C-Gehalt sind grundsätzlich schwierig, manchmal nur mit hohem unspezifischen Background zu amplifizieren, bisweilen gar nicht amplifizierbar. Durch den Zusatz denaturierender Agentien können solche Strukturen aufgelöst und die Amplifikation zugänglich gemacht werden. In Frage kommen z. B. DMSO (Dimethylsulfoxid), Glycerin, Formamid, TMAC (Tetramethylammoniumchlorid). Ab einer bestimmten Konzentration wirken diese Substanzen allerdings inhibierend auf die Taq-Polymerase.

Günstige DNA-Mengen für ein STR-Standard-Protokoll liegen im Bereich zwischen 1-5 ng bei Durchführung von 28-30 Zyklen. Bei hochaufgereinigter DNA lassen sich die Sensitivitätsgrenzen auch bei Spuren durchaus bis in den Bereich von 100 pg Template-DNA reduzieren (Brinkmann et al., 1993).

3.5.3. PCR der alten DNA als Matrize

Grundvoraussetzungen für die erfolgreiche Durchführung von PCR-Experimenten sind die Qualität und Reinheit der DNA. Optimal ist es, wenn die DNA hochmolekular und proteinfrei ist. Das ist leider nicht der Fall der alten DNA. Die aus alten Knochen extrahierten DNA-Moleküle sind aufgrund von Abbauvorgängen sehr kurz. Sie sind durch die Schädigung durch Mutagene in der Umwelt, wie UV-Strahlung, modifiziert, und sie können stark mit bakterieller DNA verunreinigt sein.

Grundsätzlich sind in einem aDNA-Extrakt aufgrund der liegezeit- und liegemilieubedingten biochemischen Veränderungen keine intakten *target*-Sequenzen von mehr als 500 Bp lang zu erwarten (Eglington et al., 1991). Mit der PCR kann schlecht erhaltene, degradierte DNA in geringsten Mengen untersucht werden.

3.5.3.1. Jumping - PCR

PCR ist fähig, aus einigen teilweise degradierten alten DNA-Molekülen eine intakte DNA zu rekonstruieren. Den Prozeß nennt man „Jumping PCR“ (Pääbo, 1990, 1993).

Bemerkenswerterweise kann die Taq-Polymerase anscheinend vollständige Zielsequenzen synthetisieren, selbst wenn die Kopien der gewünschten Sequenz zerfallen sind, vorausgesetzt, diese Fragmente überlappen sich. Wenn die Konzentration der vervielfältigten DNA-Abschnitte steigt, können sich zwei verschiedene Fragmente mit ihren überlappenden Sequenzen aneinanderlagern und als Primer fungieren. Jedes Fragment wird also ergänzt,

indem es das andere Fragment als Matrize benutzt, so daß selbst unter solchen Bedingungen eine komplette Zielsequenz synthetisiert wird.

In ähnlicher Weise wurde z. B. durch Analyse der mtDNA die phylogenetische Stellung des ausgestorbenen Beutelwolfes *Thylacinus cynocephalus* aufgeklärt.

Mit der PCR wurden sogar Sequenzen aus Fossilien vervielfältigt. DNA wurde aus versteinerten Blättern extrahiert, die man von Felsen abgekratzt hatte. Erstaunlicherweise entstand aus den DNA-Molekülen, die 18 Millionen Jahre alt waren, ein Fragment der korrekten Größe (ungefähr 800 Bp). Ein spektakulärer Fall war die Identifikation der Magnolienpflanze aus dem Miozän. Wer hätte gedacht, daß es jemals möglich wäre, Gene in 18 Millionen Jahre alter DNA detailliert zu untersuchen?

Nach einer anfänglicher Euphorie wurde man sich bewußt, daß es bei der Arbeit mit alter DNA durchaus Beschränkungen und Probleme gibt. Bei derartig altem Material muß man ganz besonders vorsichtig vorgehen. Es empfiehlt sich in solchen Fällen (Proben, die einige Millionen Jahre alt sind) Razemisierungsuntersuchung für das „Screenen“ auf Proben, die amplifizierbare DNA enthalten könnten.

3.5.3.2. Aminosäurerazemisierung

Alle Aminosäuren der Proteine mit Ausnahme von Glycin (Gly) können in zwei optischen isomeren D- und L- Formen existieren, von welchen ausschließlich L-Enantiomer in der Protein-Biosynthese benutzt wird. Die Aminosäuren in den Proteinen nahezu aller lebenden Organismen liegen ausschließlich in der L-Form vor, die nach dem Tod mit einer für jede Aminosäure spezifischen Rate in die D-Form übergeht. L-Aminosäuren machen so eine Razemisation durch, um D-Aminosäure zu produzieren, bis für eine bestimmte Aminosäure das Gleichgewicht zwischen L- und D- Formen vorliegt.

Die Razemisationsrate ist für verschiedene Aminosäure unterschiedlich und hängt von der Anwesenheit von Wasser, von der Temperatur und von der Chelation bestimmter Metall-Ionen mit Proteinen ab. Die Razemisation ist also von den gleichen Faktoren betroffen wie Depurination der DNA, die die Haupt-hydrolytische- und für die Degradation der DNA verantwortliche Reaktion ist (Lindahl et al., 1972; Pusch et al., 1998).

Die Korrelation zwischen Amplifizierbarkeit und Razemisierung wurde bestätigt. Keine DNA Sequenzen können aus einer Probe gerettet werden, wenn die D/L-Rate von Asparagin größer als 0,08 ist (Poinar et al., 1996). Das Razemisation-Ausmaß des Asparagins ist das größte, erst dann folgen Alanin, Leuzin, vorausgesetzt, daß alle Aminosäuren das gleiche Alter haben. Wenn die D/L-Rate für Asparagin kleiner als die von Ala oder Leu ist, gibt es eine Kontamination mit mehr rezenten Aminosäuren.

Anhand dieser Erkenntnisse wurde z. B. auch die Publikation über die Dinosaurus-DNA-Sequenzen korrigiert (Cano et al., 1993; Pääbo et al., 1991).

Die Effizienz der PCR ist 1,0 nur in der Theorie. Bei der Amplifikation der modernen intakten DNA ist die Effizienz 0,7. Im Fall der minimalen Mengen der alten DNA ist die PCR-Effizienz noch deutlich kleiner.

3.5.3.3. Inhibition der PCR

Im Verlauf der biogenen Dekomposition findet zunächst eine Degradierung

der im Organismus vorhandenen DNA durch Enzymaktivität statt. Im Anschluß daran besiedeln Mikroorganismen das Gewebe. Bei der Analyse von aDNA ist daher an mögliche Störungen durch den Eintrag von *Fremd-DNA* zu denken. Die PCR-Reaktion kann durch wesentliche Anteile von Fremd-DNA gestört werden.

Eine Inhibition der Reaktion wird aber auch von unterschiedlichsten *Substanzen aus der Liegemilieu der Knochen (Boden)* wie Huminsäuren oder Gerbsäuren ausgelöst. Die Maillards Produkte der reduzierenden Zucker scheinen mit der PCR-Inhibition zu korrelieren aber es ist nicht bekannt, ob die inhibierende Wirkung direkt von diesen Stoffen kommt (Kelley, 1993). Die an die DNA bindenden Kationen können mit Restriktion und Amplifikation interferieren.

Eine Ursache für das Scheitern einer PCR kann das Verschleppen von *Inhibitoren aus jeder Phase der DNA-Präparation* sein. Beispiele sehr potenter Inhibitoren sind Detergenzien wie SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat), Phenol, EDTA, Heparin,... Nichtionische Detergenzien zur Zellyse und Denaturierung (Tween-20, Triton-100) hemmen in allgemeinen die PCR im Bereich von 0,1-3% (w/v) nicht. Ionische Detergenzien wie SDS hemmen hingegen die PCR bereits bei Konzentrationen von 0,01% (w/v) (Mertes et al., 1997). Eine Akkumulation von Primer-Dimeren kann zur Entstehung eines stark kompetitiven Inhibitors der Reaktion führen, bis hin zu einem völlig negativen Verlauf.

Man kann nicht voraussagen, welche Inhibitoren in einer bestimmten Probe präsent sind. Inhibitorische Stoffe der PCR sind zum großen Teil unbekannt und die Wirkung bisher bekannter Inhibitoren ist oft nicht vollständig verstanden.

3.5.3.4. Test für Inhibition und Test für Amplifizierbarkeit

In einigen Fällen, in welchen ich keine Amplifikate produzieren konnte, habe ich folgenden Test für die Entdeckung der PCR-Inhibition durchgeführt:

Es wurden 10 µl von dem Supernatant in der Extraktion der alten DNA genommen und zusammen mit 5µl moderner DNA amplifiziert. Daneben wurden 5µl moderner DNA in einem gewöhnlichem PCR-Ansatz amplifiziert. Der Ausfall der PCR im ersten Fall (die moderne DNA und der Supernatant aus der Extraktion der alten DNA) hat mir die Anwesenheit eines starken Inhibitors oder auch mehrerer Inhibitoren bewiesen.

Wenn die PCR im ersten Fall nicht ausgefallen ist, habe ich vermutet, daß die DNA-Menge viel zu klein und/oder ihre Degradation zu groß ist, um eine Amplifikation durchführen zu können. Um diese Denkweise bestätigen zu können, verwendete ich bei einigen Proben folgenden *Test für Amplifizierbarkeit*.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, eine sog. Low-stringency PCR durchzuführen. Die PCR wurde unter völlig unstringenten Bedingungen durchgeführt (sehr niedrige Annealing-Temperatur), bei der die Primer in jedem Fall irgendwo auf der DNA binden. Dadurch konnte ich feststellen, ob extrahierte DNA amplifizierbar ist.

Eine geringe oder keine PCR-Ausbeute an spezifischem Fragment kann auch auf eine zu hohe DNA-Ausgangskonzentration zurückzuführen sein, da dann schon sehr früh eine Rehybridisierung der Matrizen mit der Primerhybridisierung konkurrieren kann. Es ist zwar im Fall der alten DNA wenig wahrscheinlich aber diese Möglichkeit wurde auch

berücksichtigt und entsprechende Verdünnungsreihen der Extrakte in einigen Fällen untersucht.

Wenn die Zahl der DNA-Moleküle zu gering war, um ein sichtbares Amplifikat zu erhalten, mußte ich die Reaktion wiederholen und die Zykluszahl erhöhen oder eine biphasische PCR laufen lassen. Einige Techniken der Sensitivitätssteigerung beinhalten allerdings ein deutlich gesteigertes Kontaminations- und Artefaktrisiko. Insbesondere, wenn die biphasische PCR (Doppel-PCR) durchgeführt wird, stellt die Kontaminationsgefahr ein großes Problem dar.

3.5.3.5. Kontaminationsvermeidung und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse

Ich habe mich sehr strikt an mehreren Kriterien der Vermeidung und der Kontrolle der Kontamination gehalten:

- steriles Verbrauchsmaterial und Chemikalien
- Schutzkleidung
- gründliche Bearbeitung des Knochenmaterials (Kapitel 3.2.)
- regelmäßige UV-Bestrahlung der Arbeitsfläche
- räumliche Trennung der Probenaufbereitung, PCR-Ansatz und Detektion
- Durchführung multipler Kontrollen.

Negative und positive Kontrollen der PCR:

Um Kontaminationen bzw. falsch positive Ergebnisse möglichst zu vermeiden bzw. zu erkennen, muß man bei jedem Versuch negative Kontrollen mitführen.

Die einfachste Kontrolle zur Überprüfung, ob die Reaktion richtig angesetzt bzw. vom Thermocycler richtig durchgeführt wurde oder ob die Reagenzien, speziell die Taq-Polymerase, in Ordnung waren, ist das Mitführen einer Positiv-Kontrolle.

1. Kompletter PCR-Ansatz ohne Extrakt (DNA) wurde immer mit anderen Proben zusammen unter gleichen PCR-Bedingungen amplifiziert.
2. PCR vom „mock“ Extrakt aus der leeren Extraktion (ohne DNA-haltiges Material, sonst mit allen Extraktionsschritten und Reagenzien) wurde immer als zusätzliche negative Kontrolle benutzt.
Diese zwei negativen Kontrollen wären für die Untersuchung nur humaner STR-Markern ausreichend. Ich habe aber auch die mitochondrielle DNA analysiert. Da die mitochondrielle DNA-Sequenzen mehr anfällig für die Kontamination als die Primer für die nukleären Sequenzen sind, verwendete ich zusätzlich noch zwei weitere Kontrollen.
3. Als positive Kontrolle wurde Kontroll-DNA K526 (1,0 ng/µl) aus PCR-Kits von FirmaSerac benutzt.
4. Die extrahierte DNA wurde auf ihre humane Herkunft überprüft (Kapitel 3.9.).
- Als eine Negative Kontrolle wurde bei dem Humane-DNA-Test noch zusätzlich die DNA aus Rind genommen.
- Bei dem Human-DNA-Test wurde als positive Kontrolle auch meine eigene DNA (der Experimentator) verwendet.
5. Der Experimentator (M. Zeller) wurde in allen untersuchten STR-Marker typisiert sowie das D-Loop der mtDNA des Experimentators sequenziert.

Kontrollen der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse:

1. Es wurden weitere 1-2 Amplifikate der STR-Marker und 2-3 Amplifikate jedes untersuchten mtDNA-Fragments aus unterschiedlichen Extrakten (Proben) eines und des selben Knochens typisiert, sequenziert.
2. Im Fall des D-Loops wurden zusätzlich die Sequenzen des H- und L-Stranges jeder Probe untersucht.

3.5.4. aDNA – PCR - Strategien

3.5.4.1. Biphasische PCR

In der Regel wird hierbei in einem ersten PCR-Lauf unter sehr stringenten Reaktionsbedingungen die DNA-Sequenz vermehrt. Diese Reaktion ist nicht quantitativ, verändert jedoch entscheidend das Verhältnis von *target*- zu nicht-*target*-Sequenzen. Im zweiten PCR-Lauf kann nun unter weniger stringenten Bedingungen die erwünschte große Menge der Zielsequenz synthetisiert werden.

In Abhängigkeit von spezifischen Eigenschaften der Primer- und der Proben-DNA muß diese Vorgehensweise gelegentlich in umgekehrter Reihenfolge durchgeführt werden, um zu ausreichenden Mengen spezifischer PCR-Produkte zu gelangen.

3.5.4.2. Booster - PCR

Die Booster PCR hat das gleiche Ziel wie reguläre biphasische PCR.

Der Grund für eine Booster-PCR ist im Fall, wenn die Primer selbst bei niedriger Template-DNA-Menge die Amplifikation inhibieren können (Primer-Dimer-Formation), wenn sie in molarem Überschuß sind. Mit der Booster PCR konnten Ruano et al. (1991) ein DNA-Molekül erfolgreich amplifizieren und mit weniger Primer-Dimeren als bei der Standard-PCR.

Man setzt während der wenigen ersten Zyklen 30% der üblichen Primerkonzentration ein, um die unspezifische Primer-Bindung zu vermeiden. Dann folgt eine zweite Amplifikation mit DNA aus den ersten Zyklen und mit höherer Primer-Konzentration (McPherson et al., 1995).

3.5.4.3. Nested - PCR

Diese Strategie einer Zweistufen-PCR kann z.B. in der Weise durchgeführt werden, daß im ersten Schritt nur 15 Zyklen erfolgen und in einem zweiten Schritt mit 25 Zyklen etwa 1/10 des Volumens der ersten Reaktion eingebracht wird, was zu einer Spezifitätserhöhung führt (Wiegand et al., 1994).

Für die ersten 15-25 Zyklen werden zwei „externe“-Primer verwendet, in der zweiten PCR (20-25 Zyklen) binden zwei „interne“-Primer innerhalb der von der ersten PCR amplifizierten DNA-Sequenzen. 5-10% des ersten PCR-Produkts sind in die zweite PCR eingesetzt.

Unspezifische PCR-Produkte erster PCR sind in der zweiten PCR nicht amplifiziert, weil sie nicht die komplementäre Sequenz zu den „internen“-Primern enthalten.

Semi-Nested-PCR funktioniert in den meisten Fällen genauso gut wie Nested-PCR.

Man verwendet in der zweiten PCR ein neues „internes“-Primer und ein Primer aus der ersten PCR (Strom et al., 1998).

3.5.4.4. Hot – Start PCR

Um Mispriming zu reduzieren, kann man Hot-Start PCR machen.

Um eine bessere Spezifität zu erreichen, kann die Polymerase zusätzlich erst nach dem ersten Denaturierungsschritt zugegeben werden. Dadurch wird vermieden, daß unspezifische Primer/Template- oder Primer/Primer-Komplexe, die bei niedrigen, nicht stringenten Temperaturen während der ersten Aufheizphase von Raumtemperatur zum Denaturierungsschritt entstanden sind, von der Taq-Polymerase verlängert werden.

3.5.4.5. PEP (primer-extension-preamplification)

Eine Methode der Sensitivitätssteigerung ist die PEP („primer-extension-preamplification) Methode.

Bei dieser Methode wird bei sehr geringen Template-DNA-Mengen als Ausgangsmaterial zunächst eine Amplifikation mit sog. Random-Primern durchgeführt. Es handelt sich um ein Primer-Set, das zufällig an verschiedensten DNA-Regionen anbindet und diese vervielfältigt. Danach folgt ein Amplifikationsschritt mit locusspezifischen PCR-Primern (Zhang et al., 1992). Der Vorteil ist, daß mit dem gleichen Random-Primer-Set, Preamplifikationen für verschiedene Loci durchgeführt werden können.

In meiner Arbeit habe ich biphasische PCRs und Booster-PCRs verwendet.

3.6. Identifikation und Verwandtschaftsanalyse mittels der STR – PCR - Typisierung

Für die präziseste Identifikation und darauf aufbauende Verwandtschaftsanalyse ist DNA-Typisierung erforderlich. Es kann zum Teil über die Amplifikation von Satelliten-DNA erfolgen, das sogenannte „multi-locus-fingerprinting“. Die bis zu 1000 Bp langen VNTR-Systemen wurden erfolgreich auf schwach degradierte DNA angewendet (Budowle, 1991; Sajantila, 1992). Für stark degradierte und alte DNA aus altem Skelettmaterial sind jedoch die kürzeren STR-Systeme zu bevorzugen (Frégeau, 1993).

STR-Systeme (Kapitel 1.1.2.3.) amplifizieren kurze hypervariable DNA-Sequenzen, die als längenpolymorphe Allele in Erscheinung treten. Da die in der Regel im Abstand von vier Basenpaaren auftretenden Allele (tetranucleotide-repeat) kodominant nach den Mendelschen Regeln vererbt werden (bei relativ geringen Mutationsraten (ca. 0,2%)), sind sie für eine Bestimmung biologischer Verwandtschaft zwischen Individuen in hohem Maße geeignet.

Kann amplifikationsfähige DNA der Individuen aus dem Probenmaterial extrahiert werden, ist es möglich, die biologische Verwandtschaft durch die Anwendung von mehreren STR-Systemen zu beweisen. Indem jedes Individuum der Kindergeneration genau je 50% der Allele beider Individuen der Elterngeneration aufweisen muß, steht der mögliche Ausschluß einer Eltern-Kind-Verwandtschaft bereits nach einer Unstimmigkeit innerhalb eines STR-Systems praktisch fest. Eine Bestätigung von Eltern-Kind-Verwandtschaften kann in Abhängigkeit von den verwendeten STR-Systemen in der Regel nach Untersuchung von vier bis sechs Loci mit 98-99%-iger Wahrscheinlichkeit angegeben werden (Chakraborty, 1993).

Von besonderem Interesse sind Y-chromosomal lokalisierte STR-Loci mittels derer ein kombinierter Geschlechts- und Identitätsnachweis möglich ist.

Analog zur mitochondrialen DNA liegt auch bei Y-lokalisierten Systemen ein uniparentaler Erbgang vor, d.h. alle männlichen Verwandten eines unbekanntes Toten müssen unabhängig vom Verwandtschaftsgrad oder der Generation die gleichen Y-chromosomalen Erbmerkmale aufweisen, so daß wie bei der mtDNA-Analyse auch hier entfernte (männliche) Verwandte zur Identifizierung herangezogen werden können.

Die nationalen DNA-Datenbanken (Kapitel 1.1.2.3.3.) in Deutschland, in den USA (CODIS) und Großbritannien (National DNA database unit) wurden auf STR-Basis etabliert.

3.6.1. Kurze Beschreibung von verwendeten STR - Loci

In dieser Arbeit wurden insgesamt 9 STR-Marker analysiert, davon 1 STR (Amelogenin) dient nur der Geschlechtsbestimmung. Die hier zur Verwandtschaftsanalyse untersuchten 8 STRs sind : TH01, VWA, FGA, FES, F13B, CD4, D8S1132, DYS390.

Zur Geschlechtsbestimmung wurden zunächst Amelogenin und DYS393 Loci benutzt, später Amelogenin und DYS390.

HumTH01

Chromosomale Lokalisation: 11p15.5-p15

Repeat Einheit: AATG

Anzahl der Allele: 7

Allele-Größe: 154 – 178 Bp

Maximale Heterozygotität: 80%

HumVWA

Chromosomale Lokalisation: 12p12-12pter

Repeat Einheit: TCTA/TCTG

Anzahl der Allele: 9

Allele-Größe: 134 – 166 Bp

Maximale Heterozygotität: 80%

HumFES/FPS (FES)

Chromosomale Lokalisation: 15q25-qter

Repeat Einheit: ATTT

Anzahl der Allele: 7

Allele-Größe: 211 – 234 Bp

Maximale Heterozygotität: 69%

HumF13B

Chromosomale Lokalisation: 1q31-q32.1

Repeat Einheit: TTTA

Anzahl der Allele: 6

Allele-Größe: 169 – 189 Bp

Maximale Heterozygotität: 65%

HumFGA

Chromosomale Lokalisation: 4q28

Repeat Einheit: CTTT
 Anzahl der Allele: 13
 Allele-Größe: 176 – 224 Bp
 Maximale Heterozygotität: 86%

HumCD4

Chromosomale Lokalisation: 12pter-p12
 Repeat Einheit: TTTTC
 Anzahl der Allele: 10
 Allele-Größe: 86 – 131 Bp
 Maximale Heterozygotität: 68%

HumD8S1132

Chromosomale Lokalisation: 8
 Repeat Einheit: TCTA
 Anzahl der Allele: 10
 Allele-Größe: 134 – 170 Bp
 Maximale Heterozygotität: 83%

DYS390

Chromosomale Lokalisation: Y
 Repeat Einheit: CTG/AT
 Anzahl der Allele: 10
 Allele-Größe: 191 – 227 Bp

DYS393

Chromosomale Lokalisation: Y
 Repeat Einheit: GATA
 Anzahl der Allele: 8
 Allele-Größe: 116 – 132 Bp

AMELOGENIN

Chromosomale Lokalisation: Xp22.1-22.3; Yp11.2
 Allele-Größe: 106 Bp auf dem X-Chromosom , 112 Bp auf dem Y-Chromosom
 Die Frauen sind homozygot für das 106 Bp – Fragment (XX-Gonosomen).
 Die Männer sind hemizygot für beide Fragmente (XY-Gonosomen).

3.6.2. STR – PCR - Amplifikationen

3.6.2.1. PCR - Kits

Ich habe für die Amplifikation der STR-Loci die konfektionierten PCR-Kits von Firma *Serac* benutzt. Sie enthalten dNTPs, Primer-Mix, Kontroll-DNA K526 (1,0 ng/µl) und Allelleiter. Die für die STRs regelmäßig verwendeten 10xPCR-Puffer mit 1,5mM MgCl₂ und Taq-DNA-Polymerase waren von Firma *Qiagen*, BSA (10mg/ml) von Gibco BRL. Es gibt bei den Kits Standardprotokolle für problemlose PCR-Reaktionen mit moderner DNA. Die optimalen PCR-Reaktionsbedingungen unterscheiden sich aber beträchtlich für verschiedene Templates der alten DNA. Multiple Optimierungsschritte waren notwendig, um verwertbare Amplifikate zu bekommen.

3.6.2.2. PCR - Cycler

PCR-Reaktionen laufen bekannterweise in einem Thermal-Cycler. Es handelt sich um einen Mikroprozessor-gesteuerten Heizblock. Ich habe GeneAmp PCR-System 2 400 von Perkin-Elmer benutzt und Primus 96 von Firma MWG-BIOTECH. In meiner Arbeit wurden immer die PCR-Ansätze von 25µl benutzt.

3.6.2.3. Amplifizierbarkeit der DNA aus weichem Gewebe

Die DNA aus Muskel, Plazenta und Hirn (Kapitel 2.1.) wurde nur nach der Methode von Scholz und Pusch (1997) (Kapitel 3.3.5.) extrahiert. Ich benutzte nur ein STR-Marker HumTH01. Die Frage war schließlich nur, ob die nach der Methode von Scholz und Pusch (1997) extrahierte DNA amplifizierbar wird. Die DNA-Proben wurden nach dem Kit-Standard-Protokoll amplifiziert.

In einen TH01-PCR-Ansatz (25µl) wurden jeweils 3µl (1,0-1,5 µg) DNA eingesetzt. PCR-Mix(4µl) für 1 Probe: 1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94 °C, 15 Sek.; 2.-10.Zyklus (94°C, 20 Sek., 64°C, 20 Sek., 70°C, 60 Sek.); 11.-30. Zyklus (90°C, 20 Sek., 64°C, 20 Sek., 72°C, 60 Sek.).

3.6.2.4. Amplifizierbarkeit der DNA aus rezentem Knochenmaterial

Die DNA aus 7 menschlichen relativ frischen Knochen (Kapitel 2.2.) wurde nach allen drei Extraktionsmethoden (Kapitel 3.3.3., 3.3.4., 3.3.5.) extrahiert.

Die Fähigkeit der extrahierten DNA-Proben, sich zu amplifizieren, wurde mittels der PCR vom Locus TH01 getestet.

Um die drei Extraktionsmethoden dabei auch untereinander beurteilen zu können, gab ich in jeden 25µl PCR-Ansatz die gleiche (nach der Spektrophotometrie) DNA-Menge von 500 ng zu und den gleichen 4µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94 °C, 30 Sek.; 2.-10.Zyklus (94 °C, 20 Sek., 64 °C, 25 Sek., 70°C, 60 Sek.); 11.-30. Zyklus (90 °C, 20 Sek., 64 °C, 25 Sek., 72 °C, 60 Sek.).

3.6.2.5. Amplifizierbarkeit der DNA aus älterem Knochenmaterial

Die DNA aus elf 18 bis 300 Jahre alten Knochen (Kapitel 2.3.) wurde nach drei Extraktionsmethoden (Kapitel 3.3.3, 3.3.4., 3.3.5) extrahiert.

Die Amplifizierbarkeit der DNA wurde wieder mittels der PCR des sensitivsten Locus TH01 getestet.

Für die DNA-Proben wurden gleiche PCR-Bedingungen angewendet, wie in dem Kapitel 3.6.2.4.

3.6.2.6. Biphassische Amplifikation der DNA aus 150-300 jährigen Knochen

Nach verschiedenen Versuchen kam ich zur einer erfolgreichen Modifikation der Extraktionsmethode von Scholz und Pusch (1997), die in dem Kapitel 3.3.6. beschrieben ist. Diese modifizierte Extraktionsmethode wurde dann an allen weiteren untersuchten Knochen angewendet.

Eine Form biphasischer PCR der Loci TH01, FES, F13B, AMG, DYS393 wurde benutzt,

die auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Die biphasischen PCRs in Kombination mit der modifizierten Extraktionsmethode haben bei den 150-300 jährigen Knochen in allen Fällen erfolgreiche Amplifikationen gebracht.

Ich habe in der ersten PCR 25-30 Zyklen zum Teil mit verdünnten Proben (nur die Hälfte des Extraktes), meistens mit dem ganzen (10 µl) Extrakt durchgeführt.

In der zweiten PCR habe ich 5-10% vom I. PCR-Produkt genommen und wieder 25-30 Zyklen mit gleichen Bedingungen laufen lassen.

Die PCR-Mix und sonstige PCR-Laufbedingungen jedes Locus entsprechen den bei Kits verfügbaren Protokollen.

3.6.2.7. STR – PCR - Amplifikation der 800–5 000 jährigen DNA aus Knochen

Neun STR-Loci habe ich diesmal amplifiziert: TH01, VWA, FGA, FES, F13B, CD4, D8S1132, DYS390, Amelogenin.

Die in dem Kapitel 3.6.2.5. beschriebene PCR-Strategie hat bei der DNA-Typisierung dieser Knochenproben-Gruppe keinen Erfolg gebracht.

Nach einigen Alternativ-Versuchen bin ich zu ungefähr 50%-igem Erfolg der STR-Typisierung gekommen. In allen Fällen wurde eine bestimmte Form biphasischer PCR verwendet.

TH01

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-7.Zyklus (94°C, 20 Sek., 64°C, 30 Sek., 70°C, 60 Sek.); 8.-15. Zyklus (90°C, 20 Sek., 64°C, 30 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Min.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,5µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-12.Zyklus (94°C, 20 Sek., 64°C, 30 Sek., 70°C, 60 Sek.); 13.-35. Zyklus (90°C, 20 Sek., 64°C, 30 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

VWA

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 15 Sek.; 2.-15.Zyklus (94°C, 45 Sek., 50°C, 30 Sek., 72°C, 30 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,5µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 15 Sek.; 2.-35.Zyklus (94°C, 45 Sek., 50°C, 30 Sek., 72°C, 30 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

FES

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 15 Sek.; 2.-15.Zyklus (94°C, 30 Sek., 54°C, 30 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,5µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml),

0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 15 Sek.; 2.-35. Zyklus (94°C, 30 Sek., 54°C, 30 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

F13B

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1.-5. Zyklus (96°C, 30 Sek., 60°C, 30 Sek., 70°C, 60 Sek.); 6.-15. Zyklus (90°C, 30 Sek., 60°C, 30 Sek., 70°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus der I. PCR, 4,5 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1.-10. Zyklus (96°C, 30 Sek., 60°C, 30 Sek., 70°C, 60 Sek.);

11.-35. Zyklus (90°C, 30 Sek., 60°C, 30 Sek., 70°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

FGA

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 5,25µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer, 0,75 µl MgCl₂ (50mM), 0,5µl BSA (10 mg/ml),

0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 45 Sek.; 2.-15. Zyklus (94°C, 30 Sek., 60°C, 30 Sek., 72°C, 50 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 5,25µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer, 0,75 µl MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 45 Sek.; 2.-35. Zyklus (94°C, 30 Sek., 60°C, 30 Sek., 72°C, 50 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

CD4

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,3 µl PCR-Mix (0,8 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-15. Zyklus (94°C, 30 Sek., 63°C, 30 Sek., 72°C, 45 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,3 µl PCR-Mix (0,8 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-35. Zyklus (94°C, 30 Sek., 63°C, 30 Sek., 72°C, 45 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

D8S1132

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 95°C, 10 Min.; 2.-15. Zyklus (93°C, 30 Sek., 61°C, 30 Sek., 72°C, 40 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,5 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 95°C, 10 Min.; 2.-35. Zyklus (94°C, 30 Sek., 61°C, 30 Sek., 72°C, 45 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

DYS390

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)). PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 1 Min.; 2.-15. Zyklus (94°C, 45 Sek., 55°C, 30 Sek., 72°C, 40 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,5 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2µl Taq-Polymerase (5U/µl)). PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 1 Min.; 2.-35. Zyklus (94°C, 45 Sek., 55°C, 30 Sek., 72°C, 40 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Amelogenin

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,0 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-15. Zyklus (94°C, 30 Sek., 63°C, 30 Sek., 72°C, 40 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,0 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-35. Zyklus (94°C, 30 Sek., 63°C, 30 Sek., 72°C, 40 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

3.6.2.8. STR-PCR-Typisierung des Knochenmaterials aus Kirchheim am Ries

Die PCR-Methoden, die ich bisher verwendet habe waren nicht ausreichend, um erfolgreiche Amplifikationen der STR-Marker durchführen zu können. Bei dieser Untersuchung mußte ich nach noch feineren PCR-Verfahren suchen. Ich brauchte zusätzlich spezielle PCR-Bedingungen für einige wenige Proben für eine gelungene Amplifikation einzelner STR-Marker. Nicht nur jedes STR-Marker, sondern auch einige Proben einzeln brauchten besondere PCR-Optimierung, um verwertbare Amplifikate zu bekommen. Ich werde hier allerdings nur die PCR-Verfahren beschreiben, die für die meisten Proben bei jedem STR-Marker funktioniert haben. Die erweiterten Optimierungen für einige Proben weichen davon nur gering ab.

Booster-PCR von TH01

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,26 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-10. Zyklus (94°C, 30 Sek., 62°C, 30 Sek., 70°C, 60 Sek.); 11.-15. Zyklus (90°C, 30 Sek., 64°C, 60 Sek., 70°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 15 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 5,55µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75mM ist, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-12. Zyklus (94°C, 30 Sek., 64°C, 60 Sek., 70°C, 60 Sek.); 13.-35. Zyklus (93°C, 30 Sek., 64°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster-PCR von VWA

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,26 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-15.Zyklus (94°C, 45 Sek., 49°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 15 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 5,55 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75 mM war, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-35.Zyklus (94°C, 45 Sek., 50°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 15 Minuten.

Booster-PCR von FES

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,26 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-15.Zyklus (94°C, 30 Sek., 52°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 15 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 5,55 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75 mM war, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-35.Zyklus (94°C, 30 Sek., 54°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 15 Minuten.

Booster-PCR von F13B

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,26 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1.-5. Zyklus (95°C, 30 Sek., 59°C, 60 Sek., 70°C, 60 Sek.); 6.-15.Zyklus (93°C, 30 Sek., 59°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 15 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 5,55 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75mM war, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1.-10. Zyklus (95°C, 30 Sek., 60°C, 60 Sek., 70°C, 60 Sek.); 11.-35.Zyklus (93°C, 30 Sek., 60°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 15 Minuten.

Booster-PCR von FGA

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 5,25 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer Mix, 2,5µl 10xPCR Puffer, 0,75µl MgCl₂ (50mM), 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,26 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 15 Zyklen (94°C, 30 Sek., 59°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 6,3 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer, 1,75 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75 mM ist, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 35 Zyklen (94°C, 30 Sek., 60°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster-PCR von CD4

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,3 µl PCR-Mix (0,8 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,26 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 15 Zyklen (94°C, 30 Sek., 62°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.);

1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 6,3 µl PCR-Mix (0,8 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75mM ist, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 35 Zyklen (94°C, 30 Sek., 63°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.);

1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster-PCR von D8S1132

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,26 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 95°C, 10 Minuten; 10 Zyklen (94°C, 30 Sek., 60°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 5,65 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75mM ist, 0,6 µl BSA (10 mg/ml), 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 95°C, 10 Min.; 35 Zyklen (94°C, 30 Sek., 61°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster-PCR von Amelogenin

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,0 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,26 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 10 Zyklen (94°C, 30 Sek., 63°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 5,1 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75mM ist, 0,55 µl BSA (10 mg/ml), 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 35 Zyklen (94°C, 30 Sek., 63°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster-PCR von DYS390

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,5 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,26 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 12 Zyklen (94°C, 45 Sek., 55°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 5,55 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75mM ist, 0,5 µl BSA (10 mg/ml), 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 35 Zyklen (94°C, 45 Sek., 55°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

3.6.2.9. STR – PCR - Typisierung an Skelletindividuen aus Niederstotzingen

Ich stelle hier Amplifikationsbedingungen vor, die mit Ausnahme von wenigen Proben verwertbare PCR-Ergebnisse geliefert haben. Es handelt sich um eine andere Strategie des Booster-PCR-Verfahrens als in dem Kapitel 3.6.2.8. Ich brauchte aber wie in Fällen von Kirchheim am Ries zusätzlich spezielle PCR-Bedingungen für einige Proben, um verwertbare PCR-Amplifikate zu bekommen.

Booster – PCR - Methode von TH01

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 5,6 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75mM ist, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,36 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 2.-10.Zyklus (94°C, 30 Sek., 64°C, 60 Sek., 70°C, 60 Sek.); 11.-15. Zyklus (94°C, 30 Sek., 64°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.);

1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,6µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, , 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 2.-11.Zyklus (94°C, 30 Sek., 63°C, 60 Sek., 70°C, 60 Sek.); 12.-35. Zyklus (93°C, 30 Sek., 64°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.);

1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster – PCR - Methode von VWA

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 6,6 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 2 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 2,0 mM war, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,36 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 2.-20.Zyklus (94°C, 45 Sek., 50°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,6µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 2.-35.Zyklus (94°C, 45 Sek., 49°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster – PCR – Methode von FES

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 6,6 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 2 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 2.0 mM war, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,36 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 2.-15.Zyklus (94°C, 30 Sek., 54°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,6µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 2.-35.Zyklus (94°C, 30 Sek., 53°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster – PCR – Methode von F13B

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 6,6 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 2 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 2,0 mM war, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,36 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 95°C, 1 Min.; 2.-6. Zyklus (95°C, 30 Sek., 59°C, 60 Sek., 70°C, 60 Sek.); 7.-15. Zyklus (93°C, 30 Sek., 60°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.);
1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,6µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 95°C, 1 Min.; 2.-11. Zyklus (95°C, 30 Sek., 59°C, 60 Sek., 70°C, 60 Sek.); 12.-35. Zyklus (93°C, 30 Sek., 60°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.);
1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster – PCR – Methode von FGA

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 5,35 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5µl 10xPCR Puffer, 0,75µl MgCl₂ (50mM), 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,36 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 1 Min.; 2.-20. Zyklus (94°C, 30 Sek., 60°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 5,35 µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer, 0,75 µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,5mM ist, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 1 Min.; 2.-10. Zyklus (94°C, 30 Sek., 59°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 11.-35. Zyklus (94°C, 30 Sek., 60°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.);
1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster – PCR – Methode von CD4

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 5,4 µl PCR-Mix (0,8 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75mM ist, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,36 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 1 Min.; 2.-20. Zyklus (94°C, 30 Sek., 63°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 5,35 µl PCR-Mix (0,8 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 1 Min.; 2.-16. Zyklus (94°C, 30 Sek., 62°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 17.-35. Zyklus (94°C, 30 Sek., 63°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.);
1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster – PCR – Methode von D8S1132

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 5,6 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75mM ist, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,36 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 95°C, 10 Minuten; 20. Zyklen (94°C, 30 Sek., 61°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 5,7 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 1µl MgCl₂, so daß die Endkonzentration 1,75mM ist, 0,6 µl BSA (10 mg/ml), 0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 95°C, 10 Minuten; 2.-16. Zyklus (94°C, 30 Sek., 60°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 17.-35. Zyklus (94°C, 30 Sek., 61°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.);
1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster – PCR – Methode von Amelogenin

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,1 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,36 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 20 Zyklen (94°C, 30 Sek., 63°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,1 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5 µl BSA (10 mg/ml), 0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 35 Zyklen (94°C, 30 Sek., 63°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

Booster – PCR – Methode von DYS390

I. PCR: 10µl DNA-Extrakt, 4,6 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,24 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,36 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 20 Zyklen (94°C, 45 Sek., 55°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,6 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5 µl BSA (10 mg/ml), 0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 60 Sek.; 35 Zyklen (94°C, 45 Sek., 55°C, 60 Sek., 72°C, 60 Sek.); 1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

3.6.3. Die Geschlechtsbestimmung am Skelettmaterial

Die Geschlechtsbestimmung ist von Bedeutung in der klinischen Praxis, in der Forensik und in der Anthropologie. Einige Methoden können dafür benutzt werden: anthropologische Messungen, Histologie, Chromosomale Analyse und die DNA-Analyse (Southern-Blot, Dot-Blot, PCR). Die Wahl der Methode hängt von dem Ursprung der Proben ab. In der Forensik ist die PCR die Methode der Wahl.

Die häufigsten Fragestellungen bei Skelettfunden sind:

- Menschliche oder tierische Knochen?
- **Geschlecht?**
- Alter?
- Körperhöhe?
- Liegezeit?
- Hinweis auf Krankheiten oder Todesursache?
- Knochenverletzungen zu Lebzeiten oder nach dem Tode?
- Knochenveränderungen durch Hitzeeinwirkung?
- Anzahl der Personen?

Neue Fragen betreffen *Identifikation und Verwandtschaftsanalyse*.

Gleich an der zweiten Stelle steht allerdings die Frage des Geschlechts.

Zur morphologischen Geschlechtsbestimmung am besten geeignet sind Becken, Schädel, Oberschenkelknochen, aber auch andere lange Röhrenknochen, I. Halswirbel, Schlüsselbein, Schulterblatt, Kehlkopf u.a.m.

Der zytologische Nachweis angefärbter Y-Chromosomen aufgrund vieler Einschränkungen nicht mehr Methode der Wahl. Stattdessen werden spezifische DNA-Abschnitte mittels PCR amplifiziert. Die Gonosomen (X- und Y-Chromosomen) sind geschlechtsdeterminierend. Über die X- und Y-chromosomale Marker habe ich im Kapitel 1.1.2.3. geschrieben. In meiner Arbeit habe ich Amelogenin, DYS390, DYS393 für die Geschlechtsbestimmung verwendet.

3.6.4. Untersuchung des forensischen Materials

In dem Kapitel 2.6. sind drei Proben aus der Gerichtsmedizin im Saarland beschrieben. Ich sollte das Geschlecht bestimmen und die STR-Typisierbarkeit überprüfen.

Probe 1 (1,2g) und Probe 2 (0,8g) sind Knochenfragmente aus menschlichen Skeletten. Probe 3 (0,3g) ist eine Ausnahme in dieser Arbeit. Es handelt sich nämlich um mumifizierte menschliche Muskulatur.

Wegen der beschränkten Menge des Materials wurde die Geschlechtstypisierung nur mittels Amelogenins und die STR-Typisierbarkeit mittels TH01 Locuses durchgeführt.

Aus der ersten Probe wurden 2 Extrakte gewonnen (einmal für Amelogenin, einmal für TH01), aus der zweiten und dritten Probe jeweils 1 Extrakt (eine Hälfte wurde für Amelogenin, eine Hälfte für TH01 verwendet).

Es war nötig, in allen Fällen und für beide DNA-Marker eine biphasische PCR anzuwenden. Es wurden in der ersten PCR 20 Zyklen durchgeführt. In der zweiten PCR habe ich einmal 5µl, einmal 10µl vom I. PCR-Produkt genommen und wieder 35 Zyklen mit gleichen Bedingungen laufen lassen.

Die PCR-Mix und sonstige PCR-Laufbedingungen jedes Locuses entsprechen den bei Kits (Firma *Serac*) verfügbaren Protokollen mit der Ausnahme, daß ich zu jedem PCR-Ansatz 0,5µl BSA (10 mg/ml) zugegeben habe.

3.6.5. Untersuchung von Knochen und Zähnen aus Schönau und Ellwangen

Die gelieferte Menge des Materials (Kapitel 2.4.) war minimal (0,4 – 1,07g pro Probe).

Das Interesse der Osteologen aus dem Landesdenkmalamt in Konstanz war schließlich nur das selbe wie das der Gerichtsmedizin im Saarland (Kapitel 3.6.4.).

Aus Knochenfragmenten wurde jeweils einmal DNA extrahiert und eine Hälfte des Extraktes für Amelogenin und eine Hälfte für TH01 eingesetzt. Aus Zähnen wurden jeweils zwei DNA-Extrakte gewonnen (einmal für Amelogenin, einmal für TH01).

Die Probenvorbereitung, Extraktionen, PCR-Amplifizierungen wurden für die DNA aus Knochen und für die DNA aus Zähnen unter gleichen PCR-Bedingungen durchgeführt.

PCR - Amplifikation des Amelogenins

I. PCR: 5µl DNA-Extrakt (der ganze Extrakt), 4,0 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 25 Zyklen (94°C, 30 Sek., 63°C, 40 Sek., 72°C, 40 Sek.);
1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

II. PCR: einmal 5µl, einmal 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,1 µl PCR-Mix (1 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml),

0,3 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 35 Zyklen (94°C, 30 Sek., 63°C, 40 Sek., 72°C, 40 Sek.);

1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

PCR - Amplifikation des TH01 - Markers

I. PCR: 5µl DNA-Extrakt (der ganze Extrakt), 4,5µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-6.Zyklus (94°C, 30 Sek., 64°C, 40 Sek., 70°C, 60 Sek.); 7.-20. Zyklus (90°C, 30 Sek., 63°C, 40 Sek., 72°C, 60 Sek.);

1 Zyklus 72°C, 10 Min..

II. PCR: einmal 5µl, einmal 10µl aus dem I. PCR-Produkt, 4,6µl PCR-Mix (1,0 µl Nukleotid-Mix, 0,3 µl Primer-Mix, 2,5 µl 10xPCR Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 0,5µl BSA (10 mg/ml), 0,3µl Taq-Polymerase (5U/µl)).

PCR-Programm: 1 Zyklus 94°C, 30 Sek.; 2.-15. Zyklus (94°C, 30 Sek., 64°C, 40 Sek., 70°C, 60 Sek.); 16.-35. Zyklus (90°C, 30 Sek., 64°C, 40 Sek., 72°C, 60 Sek.);

1 Zyklus 72°C, 10 Minuten.

3.7. Untersuchung des entarteten Meningeoms des Schädels

Im allgemeinen werden Tumoren heute als typisch moderne Zivilisationskrankheiten angesehen, die durch Umweltverschmutzung oder den Streß der heutigen Zeit erklärt werden. Sicherlich haben derartige Faktoren eine Auswirkung auf die Häufigkeit von Tumoren; dennoch sind sie auch an mittelalterlichen und sogar an wesentlich älteren Skelettresten zu finden. Die Bevölkerungen vergangener Zeiten litten ebenso an Tumoren.

Im Rahmen dieser Arbeit gab es eine hoch interessante Möglichkeit, **ein entartetes Meningeom des Schädels (Hochmittelalter)** (Kapitel 2.7.) molekularbiologisch zu untersuchen. Das Ziel war, durch die „Comparative Genomic Hybridization“ (CGH) genomische Imbalance(-n) in dem Tumor mit zytogenetischer Auflösung darzustellen.

3.7.1. „Comparative Genomic Hybridization“

Die „Comparative Genomic Hybridization“ (CGH) erlaubt eine simultane Erfassung unterschiedlicher genetischer Veränderungen und ist daher als Screening-Methode geeignet. Genetische Veränderungen sind grundlegend an der neoplastischen Transformation der Gewebe beteiligt. Im Zuge einer zunehmenden Instabilität des Genoms der Tumorzellen während der Tumorprogression kommt es dann zur Häufung von Genschäden. Bestimmten Malignitätsgraden sind spezifische genetische Änderungen zuzuordnen. Sie sind unter anderem in Form von Amplifikationen, Deletionen und Rearrangements einzelner Gene oder vollständiger Chromosomen zu finden.

Der Prinzip eines CGH-Experimentes:

Die DNAs aus Tumor und Normalgewebe werden isoliert und enzymatisch mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (Tumor=grün, Normal=rot). Beide DNAs werden zu gleichen Massenteilen gemischt und in Gegenwart von humaner cot1-DNA und „unspezifischer“ Fischesperma-DNA präzipitiert, gereinigt, denaturiert und preannealt. Normale Metaphasechromosomen (auf einem Objektträger aufgebracht) werden denaturiert, dehydratisiert und mit der zuvor hergestellten DNA-Mischung hybridisiert. Nach der mehrere Tage dauernden Hybridisierung werden ungebundene und unspezifisch gebundene DNA-Fragmente durch stringentes Waschen entfernt und die DNA mit einem dritten, blauen Fluoreszenzfarbstoff (DAPI) gegengefärbt.

Während der Hybridisierung konkurrieren die markierten einzelsträngigen DNA-Fragmenten des Tumors und der Normalprobe um freie Bindungsstellen auf denaturierten Chromosomen und binden in einer Verdrängungsreaktion, entsprechend ihrer Häufigkeit in den Ursprungsproben, an den Chromosomen an.

Die auf den Chromosomen gebundenen DNA-Fragmente werden mit einem Fluoreszenzmikroskop visualisiert und die Hybridisierungsqualität wird beurteilt.

Die Fluoreszenzen werden dann mit einer hochauflösenden lichtempfindlichen CCD-Kamera festgehalten. Dabei wird der für jedes Fluorochrom benötigte Anregungsfilter mit einem Filterrad automatisch vorgewählt und je ein monochromes Fluoreszenzintensitätsbild für die Farbe Rot (Normalprobe), Grün (Tumor) und Blau (Gegenfärbung) aufgenommen. Die gewonnenen Bilddaten werden mittels computergestützter digitaler Bildverarbeitung aufbereitet und der Auswertung zugeführt.

Durch das Übereinanderlegen der farbigen Einzelbilder kann die hybridisierte Metaphase in ein RGB-Falschfarbenbild überführt werden. An diesem Bild können bereits semiquantitative Aussagen über die erhöhte oder verminderte Bindung der grünen Tumor-DNA an der chromosomalen DNA getroffen werden. Homologe Chromosomen sind durch identische Hybridisierungsmuster charakterisiert. Zu diesem Zeitpunkt ist jedoch die Zuordnung der auffälligen Loci zum chromosomalen Ursprung noch nicht möglich, da in dem RGB-Bild noch nicht eindeutig die Chromosomen identifiziert werden können. Chromosomen mit geringer Hybridisierungsstärke in den Heterochromatinblöcken nahe des Centromers fallen durch eine starke Blaufärbung in diesen Regionen auf (Chromosomen 1, 9, 16, Y).

Um die Chromosomen zu identifizieren, wird das CGH-Präparat mit einem blauen DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff (DAPI) eingefärbt. Dieser Farbstoff bindet an AT-reichen DNA-Regionen. Anhand des invertierten s/w-Bildes für die Farbe blau ist die Identifizierung der Chromosomen durch ihr G-ähnliches Bänderungsmusters möglich. Die Chromosomen können computergestützt erkannt und zu einem Karyogramm ausgelegt werden. Die Identifizierung orientiert sich unter anderem an folgenden Kriterien: Chromosomenlänge, Längenverhältnis des kurzen zum langen Arm (p/q-Verhältnis) und Lage des Centromers.

Überwiegt im Tumor eine DNA-Sequenz, so hybridisiert diese DNA häufiger auf der homologen chromosomalen DNA. Auf fluoreszenzmikroskopischen Bildern erkennt man dies an der Überlegenheit des Fluorochroms der Tumorprobe (grünliche Farbnuancen). Im umgekehrten Fall (Verlust von DNA-Sequenzen im Tumor) erscheint der betrachtete chromosomale Abschnitt vermindert Grün und die Fluoreszenz der Normalprobe überwiegt (rötliche Farbnuancen). Das numerische Grün/Rot (G/R)-Verhältnis gibt Aufschluß über die Kopienzahl des betrachteten Chromosomenbereiches in der Tumorprobe.

Liegt im Tumor ein Chromosom in dreifacher Ausführung (Trisomie) statt in doppelter Ausführung vor, so beträgt das G/R-Verhältnis für dieses Chromosom $3/2=1,5$. Im Falle eines Chromosomenverlustes beträgt das G/R-Verhältnis $1/2=0,5$. Im Normalfall konkurrieren

gleiche Kopienmengen des Tumors und der Normalprobe um den Hybridisierungslocus und binden statistisch betrachtet gleichhäufig. Es resultiert dann eine gelbliche Mischfärbung und ein G/R-Verhältnis von $2/2=1,0$. Die Fluoreszenzdaten werden mit einer Spezialsoftware ausgewertet. Dabei werden die Intensitäten der Fluoreszenz Grün (Tumor) und Rot (Referenz) entlang der medialen Chromosomenachse abgelesen und zueinander in Bezug gesetzt.

In einem CGH-Experiment wird jedes Chromosom auf eventuelle chromosomale Aberrationen hin untersucht. Um ein statistisch abgesichertes CGH-Ergebnis zu erhalten müssen die Chromosomen aus 5-10 Metaphasen untersucht werden. Dies schließt die Berechnung des Mittelwertes des G/R-Verhältnisses und der Standardabweichung an jedem Punkt der Chromosomenachse für jedes Chromosom ein. Letztlich erhält man ein CGH-Summenkaryogramm, in dem jedes Chromosom durch eine gemittelte G/R-Kurve neben einem Idiogramm dargestellt wird. Der Zugewinn/Verlust chromosomalen Materials wird durch grüne Balken rechts / rote Balken links neben dem Idiogramm dargestellt und die involvierten Genloci sind am Idiogramm einfach ablesbar. Zudem kann eine Aussage über die Kopienzahl der jeweiligen Loci anhand des G/R-Wertes getroffen werden.

3.7.2. DOP – PCR (Degenerate oligonucleotide - primed PCR)

Die Probenentnahme folgte genau aus dem Meningeom-Bereich. Die DNA wurde extrahiert, konzentriert und gereinigt (Kapitel 3.3.6.). Vor der CGH-Analyse wurde zunächst eine spezifische PCR „DOP-PCR“ durchgeführt. DOP-PCR ist Grundlage für die CGH-Methode und z.B. für die subtraktive Hybridisierung und Klonierung. Sie ist für alle Spezies geeignet.

Viele Experimente und Untersuchungen wie z.B. mit alter DNA gestalten sich schwierig, da nicht genügend DNA des zu untersuchenden Organismus zur Verfügung steht. Die Methode der „Degenerate Oligonucleotid Primer (DOP)“ –PCR bietet eine exzellente Möglichkeit zur vollständigen Amplifikation der gesamten DNA. Mit der DOP-PCR kann unbekannte DNA effizient amplifiziert werden.

Mit Hilfe der DOP-PCR können mehrere Produkte gleichzeitig amplifiziert werden. Die DOP-Primer bestehen aus Gruppen teilweise degenerierter Oligonukleotide, deren Sequenzen nur an bestimmten Positionen übereinstimmen, während andere Basen völlig unterschiedlich sind. Die Ausgangs-DNA kann daher viele Bindestellen für diese Primer enthalten.

Es wird nur ein Primer eingesetzt. Das verwendete Oligonukleotid hat eine Länge von 22 Basen und enthält zwischen den beiden definierten Endsequenzen eine „Random Hexamer“ Sequenz. Zunächst werden mit der zu amplifizierenden DNA 5 PCR-Zyklen mit niedriger Stringenz durchgeführt. Durch eine langsame Erhöhung der Temperatur bis zur optimalen Inkubationstemperatur der Polymerase wird die Elongation der gebundenen Primer bewirkt. Während dieser Zyklen werden von der gesamten DNA PCR-Produkte mit flankierenden Primersequenzen hergestellt, so daß die gesamte Primerlänge für die darauffolgenden 35 stringenten Zyklen ausgenutzt wird. Die Erhöhung der Bindungstemperatur führt zu einer effizienten Amplifikation.

DOP-Primer (6MW): 5'-CCGACTCGANNNNNNATGTGG-3'.

Ich habe unterschiedliche PCR-Ansätze von 20 µl ausprobiert:

5-10µl DNA, immer 2,05µl 10X-Puffer mit 1,5mM MgCl₂, 2,05µl Primer (20µM), 2,05µl dNTP-Mix (von jedem 2mM), 2,05µl MgCl₂ (25 mM), 0,2-0,8µl Taq-Polymerase (5U/µl), 0,5µl BSA (10mg/ml), ster. Wasser.

Das verwendete DOP-PCR-Programm:

1 Zyklus (94°C/1 Min.), 10 Zyklen (94°C/1 Min., 40°C/1 Min., 72°C/4 Min.),

30 Zyklen (94°C/1 Min., 56°C/1 Min., 72°C/2 Min.), 1 Zyklus (72°C/5 Min.).

Mit einigen Proben wurden nicht nur biphasische PCR, sondern auch mehrere (bis 12) DOP-PCR hintereinander durchgeführt.

3.8. Polyacrylamidgelelektrophorese und Silberfärbung

Im Anschluß an die Amplifikation werden die PCR-Produkte entweder über ihre Größe oder über die Größe bestimmter Restriktionsfragmente, über ihre Hybridisierungseigenschaften oder über ihre Sequenz nachgewiesen. Folglich unterwirft man die Amplifikate entweder einer Gelelektrophorese, einer Hybridisierung oder einer Sequenzierung.

Das PCR-Produkt kann oft direkt im Agarose- oder Polyacrylamid-Gel detektiert werden, so daß aufwendige Hybridisierungs- oder Sequenzier- Verfahren nicht mehr durchgeführt werden müssen.

Die Analyse von PCR-Produkten erfolgt in der Regel über eine Gelelektrophorese. Soll lediglich ein Nachweis über das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer bestimmten Sequenz geführt werden, ist eine horizontale Agarosegelelektrophorese ausreichend. Muß die Größe von PCR-Produkten bis auf ein Basenpaar genau bestimmt werden, wie dies bei den verwandtschaftsanzeigenden STR-Sequenzen erforderlich ist, erfolgt die Trennung der PCR-Produkte auf den höher auflösenden Polyacrylamid-Gelen. Deswegen habe ich nur Polyacrylamidgele benutzt. Eine Alternative bietet die software-gesteuerte Fragmentlängenanalyse (Kimpton et al., 1993) an einem Sequenziergerät.

3.8.1. Elektrophorese

Neben Fällungsverfahren, Chromatographie und Zentrifugation ist Elektrophorese die wichtigste Trennmethode für Proteine und Nucleinsäuren.

Im Gegensatz zu den amphoteren Proteinen sind die Nucleinsäuren Makromoleküle, die aufgrund des Phosphodiester- Grundgerüsts im neutralen bis alkalischen pH-Bereich als Polyanionen vorliegen. Elektrophoretische Trennungen von Nucleinsäuren werden bevorzugt als Zonen-Elektrophoresen in kontinuierlichen Systemen durchgeführt, die Laufrichtung ist dabei immer zur Anode.

Durch den Überschuß negativer Ladungen verhalten sich DNA und RNA elektrophoretisch wesentlich einheitlicher als Proteine.

Die Auftrennung nativer, doppelsträngiger DNA findet primär nach der Größe statt, wobei der Einfluß der Basenzusammensetzung und -sequenz gering ist. Die Größe der DNA-Moleküle wird also zu einem wichtigen Faktor, wenn man die Elektrophorese in einem Gel ablaufen läßt. Ein solches Gel, das gewöhnlich aus Agarose, Polyacrylamid oder einer Mischung dieser beiden Substanzen besteht, enthält ein kompliziertes System

von Poren, und durch diese Öffnungen müssen die DNA-Moleküle wandern, um die positive Elektrode zu erreichen. Je kleiner ein DNA-Fragment ist, desto schneller kann es sich durch das Gel bewegen.

Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Moleküls hängt von seiner Form und von seiner elektrischen Ladung ab. Leider haben die meisten DNA-Moleküle die gleiche Form und annähernd die gleiche Ladung.

Einzelsträngige DNA und RNA bilden unter nicht denaturierenden Bedingungen sequenzabhängige Sekundärstrukturen aus, die einen starken Einfluß auf die elektrophoretische Mobilität haben. Sie werden daher fast ausschließlich unter Zusatz von Denaturierungsmitteln wie Harnstoff oder Formamid getrennt.

3.8.2. Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Polyacrylamid-Gele, erstmals 1959 von Raymond und Weintraub (1959) für Elektrophorese eingesetzt, sind chemisch und mechanisch besonders stabil.

Durch chemische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit einem Vernetzer – meist N,N'-Methylenbisacrylamid – erhält man ein klares durchsichtiges Gel mit sehr geringer Elektrosmose. Alternative Vernetzer wurden aufgelistet, wie z. B. N,N'-Bisacryloylcystamin.

Die Bildung von Polyacrylamidgelen entsteht durch die Polymerisation der Acrylamid-Monomere zu langen Ketten und der kovalenten Bindung einer crosslinking-Reagenz. Die Polymerisation des Acrylamids hängt von dem Vorhandensein dieser crosslinking-Reagenz und der Bildung von drei Radikalen ab. Der gewöhnlicherweise benutzte „crosslinker“ ist N,N'-methylene-bis-acrylamid (bis).

Ammoniumpersulfat (APS) wird meistens zur Bildung der drei zur Polymerisation notwendigen Radikale benutzt und wird normalerweise mit dem „Beschleuniger“ N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) angewendet.

TEMED fördert die Bildung von Sauerstoff-freien Radikalen und, bei einem Gemisch aus Acrylamid, Bis und APS zugefügt, beschleunigt es den Polymerisationsvorgang.

Die Trennungseigenschaft eines Polyacrylamidgeles hängt von der Porengröße ab. Diese wird bestimmt von dem Verhältnis von Acrylamid zu den Bis-Monomeren. Mit der Veränderung dieses Verhältnisses und der Gesamtkonzentration von Acrylamid kann die Porengröße speziell für die zu trennenden spezifischen Moleküle hergestellt werden.

Bei Polyacrylamidgelen ist die Katalysatormenge von Bedeutung. Bei zu hohen Katalysatormengen besteht die Gefahr, daß die Polymerisation des Gels bereits während des Gießens einsetzt und daß Trennartefakte hervorgerufen werden. Andererseits wird bei zu geringem Ammoniumpersulfat die Polymerisation verzögert, was zu nicht verfestigten Gelen bzw. zu Gelen mit schlechten mechanischen Eigenschaften führt.

Die Darstellung der STR-Merkmale erfolgte im Anschluß an die PCR mittels Elektrophorese im hochauflösenden Polyacrylamidgel. Die geringen Längenunterschiede der Allele stellen erhöhte Anforderungen an die Trennfähigkeit eingesetzter Elektrophoreseverfahren.

Hier wurden die Längendifferenzen zwischen benachbarten Allelen eindeutig detektiert.

Auf dem fertigen Gel müssen die standardisierten Allel-Leitern deutlich ablesbar sein.

Die Amplifikate konnte ich dann entsprechend zuordnen und die Allele definieren.

Die Auflösungsgrenze für PCR-Fragmente < 300 Bp liegt bei 1-2 Bp.

Für jeden Lokus brauchte ich ein Gel einer bestimmten Konzentration. Im Prinzip, je größer ein STR ist, um so kleiner ist die Gelkonzentration.

Hier wurde 6%-iges Polyacrylamidgel (30 ml) für FGA, DYS390 Loci verwendet:

16,034 ml bidist. H₂O
 6,0 ml 30% Acryl-PDA
 3,0 ml 0,28M CHES
 4,86 ml (<500mM)Tris-Formiat
 225 µl APS (10%)
 11,45 µl TEMED

Für CD4 und DYS393 Loci brauchte ich ein 7,5%-iges Polyacrylamidgel (30 ml):

14,39 ml bidist. H₂O
 7,5 ml von 30% Acryl-PDA
 3,0 ml 0,28M CHES
 4,86 ml von (< 500mM) Tris-Formiat
 225 µl APS (10%)
 11,45 µl TEMED

Für Loci TH01, VWA, FES, F13B und D8S1132 wurde 6,4%-iges Polyacrylamidgel (30 ml) gegossen:

15,517 ml bidist. H₂O
 6,4 ml 30% Acryl-PDA
 3,0 ml 0,28M CHES
 4,86 ml (<500mM) Tris-Formiat
 225 µl APS (10%)
 11,45 µl TEMED

Amelogenin-Amplifikate migrierten in einem 9%-igen Polyacrylamidgel (15,11 ml):

7,5 ml bidist. H₂O
 4,5 ml 30% Acryl-PDA
 3,0 ml 500mM Tris-Sulfat
 105µl APS (10%)
 5,3 µl TEMED

Ein im Rahmen meiner Arbeit angewendetes Verfahren war eine hochauflösende Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) auf einer horizontalen, gekühlten (14°C) Keramikplatte über eine Trennstrecke von etwa 25 cm.

Die Elektrophorese-Bedingungen für große Gele (30 ml) : 1 000V, 40 mA, 5 W, Laufzeit 3,5 Stunden.

Die Elektrophorese-Bedingungen für kleine Gele (16 ml) : 1 000V, 20 mA, 3 W, Laufzeit 3,5 Stunden.

Die Elektrophorese-Bedingungen fürs Gel für Amelogenin sind abweichend: 1 000V, 20 mA, 10 W, Laufzeit 45 Minuten.

3.8.3. Silberfärbung

Es gibt fünf wichtige Methoden, um Nukleinsäure nachzuweisen:

- durch Bindung von Fluoreszenzfarbstoffen,
- durch Markierung mit radioaktiven Nukleotiden,
- durch Markierung mit fluoreszierenden Nukleotiden,
- durch Markierung der Nukleinsäuren mit spezifischen Proteinen,
- durch *konventionelle Färbung* (Martin, 1996).

Hochempfindliche Färbetechnik für die Anfärbung von Nukleinsäuren (auch von Proteinen) in Polyacrylamidgelen ist die Silberfärbung.

Alternativ zur Silberfärbung kann auch eine Ethidiumbromidfärbung durchgeführt werden, wobei letztere etwa zehnfach weniger sensitiv ist. Als weitere Alternative wäre eine Anfärbung mit dem Farbstoff SYBR Green I möglich (Scarpetta, 1996). Durch Einsatz dieses Farbstoffes läßt sich eine der Silberfärbung vergleichbare aber nicht bessere Sensitivität erreichen.

Für die Darstellung der PCR-Produkte habe ich regelmäßig Silberfärbung verwendet. Für alle amplifizierte Fragmente verwendete ich nach der Polyacrylamidgelelektrophorese folgendes Färbungsrezept:

<u>Inkubationsschritt</u>	<u>Lösung</u>	<u>Inkubationszeit</u>
1. Fixierung:	1% Salpetersäure	10 Minuten
2. Färbung:	0,2% AgNO ₃ -Lösung	20 Minuten
3. Spülen:	bidestiliertes Wasser	10 Sekunden
4. Spülen:	bidestiliertes Wasser	10 Sekunden
5. Entwicklung	0,28M Na ₂ CO ₃ mit 0,037% Formaldehyd	individuell (bis die Allelleiter gut sichtbar ist)
	(wenn nötig, die Lösung wechseln)	
6. Stoppen:	10% Essigsäure	3 Minuten
7. Spülen:	bidestiliertes Wasser	2 Minuten
8. Imprägnieren:	5% Glycerin	5 Minuten

Bei der Färbung (2. Schritt) lagern sich positiv geladene Silberionen an die negativ geladenen Phosphatreste der DNA an. Die nicht-gebundenen Silberionen werden nach der Färbung ausgespült.

Bei der Entwicklung (5. Schritt) dissoziiert Natriumcarbonat in Wasser zu folgenden Ionen: Na⁺, (HCO₃)⁻, (OH)⁻, und (CO₃)²⁻. Diese Ionen liefern das basische Milieu, welches zur Oxidation von Formaldehyd benötigt wird. Das Formaldehyd wird bei Anwesenheit von Wasser, (OH)⁻ Ionen und einem reduzierbaren Stoff (Ag⁺) zu Ameisensäure oxidiert. Die Ameisensäure wirkt reduzierend auf die Silberionen, die unter Aufnahme der Elektronen ausfallen. (Ag⁺ + e⁻ → Ag⁰ → Silber fällt aus)

Die Färbung wird gestoppt, da die Essigsäure der Redoxreaktion die notwendigen (OH)⁻ Ionen entzieht.

Nach der Färbung wurde jedes Gel über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

3.9. Humane – Herkunft - Test der untersuchten DNA

Bei der Untersuchung der Kern-DNA-Marker hatte ich keine Bedenken über die humane Herkunft der extrahierten DNA. Ich benutzte schließlich die STR-Marker, die humanspezifisch oder primatspezifisch sind.

Die Situation wurde allerdings problematischer, wenn ich die mitochondrielle DNA aus altem über lange Jahre bodengelagertem Knochenmaterial untersuchte. Das mitochondrielle Genom menschlicher und tierischer Zellen stimmt nämlich in zahlreichen Merkmalen mit prokaryotischen Genomen überein. Und die mikrobielle Kontamination der alten (bodengelagerten) Knochen ist durchaus möglich.

Weil in meiner Arbeit auch die mitochondrielle DNA aus alten Knochen untersucht wurde, war es doch nötig, ein DNA-Test auf die humane Herkunft der extrahierten DNA durchzuführen.

Ein 120 Bp langer humanspezifischer Fragment der mtDNA (aus der Region V) wurde mit der PCR amplifiziert.

Die verwendeten Primer (Cattaneo et al., 1999):

Mit-Primer A (20-mer): ATG CTA AGT TAG CTT TAC AG

Mit-Primer B (20-mer): ABA GTT TCA TGC CCA TCG TC

Das verwendete PCR-MIX (5,4 µl):

2,5 µl 10X Puffer mit 2,0 mM MgCl₂ (pH=8,6) aus PCR-Optimization-Kit von Firma Boehringer Mannheim

1,5 µl dNTP (0,2 mM)

0,6 µl Primer A (25 µM)

0,6 µl Primer B (25 µM)

0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5U/µl) von Firma Qiagen

Die verwendeten PCR-Bedingungen:

1x: 95°C, 1 Minute

35x: 95°C, 45 Sekunden

56°C, 1 Minute

72°C, 1 Minute

1x: 72°C, 10 Minuten.

Auf dem Polyacrylamidgel wurde jedes amplifizierte Fragment nach der Silberfärbung mit einem 100 Bp-DNA-Längestandard verglichen.

Längenstandarts (im hiesigen Fall 100 Bp-DNA-Leiter von GibcoBRL), bestehend aus DNA-Fragmenten mit bekannter Größe wurden parallel zu untersuchten PCR-Ansätzen auf ein Gel aufgetragen. Durch den Vergleich der Wanderungsdistanzen von Fragmenten des Längenstandarts und der untersuchten Proben war es möglich, die Größe von PCR-Produkten zu kontrollieren.

3.10. Identifikation und Verwandtschaftsanalyse mittels der D-Loop-mtDNA - Sequenzierung

Die Merkmalbestimmung ist leider wesentlich schwieriger als bei der Kern-DNA, weil es auf der mtDNA-Kette nur wenige Orte gibt, die mit üblichen PCR-Methoden und anschließender elektrophoretischer Trennung zu bestimmen sind.

Deswegen muß man sequenzieren.

Eine deutliche Häufung von Sequenzvarianten weist die sog. D-Loop-Region (ca. 1.2 kb) der mtDNA auf, die Amplifikation und anschließende Sequenzierung dieses Abschnittes hat sich zur Methode der Wahl bei der forensischen Identifizierung entwickelt.

Näheres zu der mtDNA und D-Loop habe ich in dem Kapitel 1.5. geschrieben.

Die multiplen PCR-Kontrollen und die Kontrollen der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die auch hier beschriebenen mtDNA-Analysen betreffen, habe ich detailliert in dem Kapitel 3.5.4.5. erklärt.

3.10.1. PCR - Amplifikation des D - Loops der mtDNA

Wesentliche Voraussetzung für die PCR ist die Bereitstellung geeigneter Oligonukleotidprimer und geeigneter Enzyme.

3.10.1.1. Auswahl der Miniprimer

Mit den folgenden Primern wurde der gesamte nicht-kodierende Bereich in überlappenden Abschnitten amplifiziert und gelesen:

273 Bp-Abschnitt:

L 15990: 5'-TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC-3'

H 16263: 5'-GTT GGT ATC CTA GTG GGT GA-3'

231 Bp-Abschnitt:

L 16267: 5'-CCA AAG CCA CCC CTC ACC-3'

H 16498: 5'-CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG-3'

217 Bp-Abschnitt:

L 00029: 5'-GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C-3'

H 00246: 5'-AAA GTG GCT GTG CAG ACA TTC A-3'

277 Bp-Abschnitt:

L 00340: 5'-TGG CCA CAG CAC TTA AAC AC-3'

H 00617: 5'-TGA TGT GAG CCC GTC TAA AC-3'

3.10.1.2. Symmetrische PCR

In meiner Arbeit wurden nur symmetrische PCR-Reaktionen durchgeführt. Die beiden Primer-Moleküle lagen immer in derselben Molarität in der Lösung vor. Das Ergebnis waren

doppelsträngige DNA-Moleküle. Die Cycle-Sequenzierung ermöglicht es, doppelsträngige DNA-Moleküle einzusetzen.

3.10.1.3. Spezifischer PCR - Ansatz

Da es keine allgemeingültigen Regeln für die Vorhersage der Amplifikationseffizienz eines bestimmten Template/Primer-Paars gibt, müssen die optimalen Pufferzusammensetzungen und mögliche Zusätze experimentell ermittelt werden. Ich habe PCR-Optimisation-Kit von der Firma Boehringer Mannheim benutzt, davon später nach den Optimierungsschritten nur Puffer.

Für die Amplifikationen der mtDNA-Abschnitten hat am besten 10X Puffer G (pH=8,6; mit 2,0 mM MgCl₂) funktioniert.

Nach einigen Versuchen habe ich die geeignete Primer-Konzentration gefunden. In allen PCR-Ansätzen jedes hier untersuchten mtDNA-Abschnittes wurde 0,625 µl von jedem Primer eingesetzt, so daß die Endkonzentration jedes Primers 0,5 µM war.

In allen Fällen wurden PCR-Ansätze von 25 µl benutzt.

Die *PCR-MIX-Zusammensetzung* pro Probe wurde (mit Ausnahme von spezifischen Primern) für die Amplifikation aller vier Abschnitte des D-Loops identisch (5,45 µl):

2,5 µl 10X Puffer mit 2,0 mM MgCl₂, pH=8,6
 1,5 µl dNTP (0,2 mM)
 0,625 µl Primer L (20 µM)
 0,625 µl Primer H (20 µM)
 0,2 µl Taq-Polymerase (5U/µl)

Einige wenige Proben aus Kirchheim am Ries und Niederstotzingen brauchten zusätzlich 0,5 µl BSA (10 mg/ml).

Der ganze DNA-Extrakt (10µl) wurde für eine PCR verwendet wie bei STR-Typisierung.

3.10.1.4. PCR - Programm

Die verwendeten PCR-Cycler sind im Kapitel 3.6.2.2. beschrieben.

Die optimierten PCR-Bedingungen für die Amplifikation der einzelnen D-Loop-Abschnitte sind ziemlich ähnlich. Sie unterscheiden sich nur in der Annealing-Temperatur, die von Primern abhängig ist.

Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation des 273 Bp – Fragments und des 231 Bp - Fragments:

1x: 94°C, 1 Minute
 35x: 94°C, 45 Sekunden
 54°C, 1 Minute
 72°C, 1 Minute
 1x: 72°C, 10 Minuten

Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation des 217 Bp – Fragments:

1x: 94°C, 1 Minute
 35x: 94°C, 45 Sekunden
 55°C, 1 Minute
 72°C, 1 Minute
 1x: 72°C, 10 Minuten

Die PCR-Bedingungen für die Amplifikation des 277 Bp – Fragments:

- 1x: 94°C, 1 Minute
 35x: 94°C, 45 Sekunden
 52°C, 1 Minute
 72°C, 1 Minute
 1x: 72°C, 10 Minuten

Nach Abschluß der PCR wurden die amplifizierten mtDNA-Fragmente auf einem 6%-igen Polyacrylamidgel (Kapitel 3.8.2.) mit der Silberfärbung (Kapitel 3.8.3.) sichtbar gemacht. Die einzelnen Banden wurden auf dem Gel mit einem 100 Bp-DNA-Längenstandard verglichen, um festzustellen, ob ich gewünschte Fragmente (richtiger Länge) amplifiziert habe.

Mit bisherigen Techniken (PCR und PAGE) wird die genaue Basenfolge nicht bestimmt. Es bietet sich dazu die direkte Sequenzierung amplifizierter DNA an. Nicht nur Punktmutationen, sondern auch Deletions- und Translokationsbruchpunkte oder Polymorphismen werden damit exakt bestimmbar. Zwingende Voraussetzung für eine direkte Sequenzierung von PCR-Produkten ist ein einheitliches PCR-Produkt.

3.10.2. Reinigung der PCR - Produkte

Bevor PCR-Produkte direkt sequenziert werden können, müssen unerwünschte Nebenprodukte (überschüssige freie Primer, nichteingebaute Nukleotide, Polymerase, Proteine aus dem Puffer z.B. BSA, kleine Moleküle und Puffer-Salze) entfernt werden.

Zur Reinigung des PCR-Produktes bieten sich verschiedene Aufreinigungsmethoden:

1. Fällung mit 4M Ammoniumacetat (Primerabtrennung bis 5 pmol, Ausbeute 98%)
2. Filter Membran des Centricon-100, Microcon-100 (Primerabtrennung bis 15 pmol, Ausbeute 95%), Centricon-30 Säulen sind für Reinigung der PCR-Fragmente von ca. 1000 Bp.
3. Gelsäulen des QiaQuick-PCR-Purification-Kit (Primerabtrennung bis 25 pmol, Ausbeute 70-80%)
4. Agarose Gelelution (Ausbeute: 30-50%)

Ich habe Centricon-100 benutzt.

Die Centricon-100 Mikrokonzentratoren (Amicon) enthalten eine spezielle Membran, die nur Oligonukleotide mit bis zu einer Länge von ca. 50 Nukleotiden passieren können. Für DNA Proben in einer Größe von über 150 Basenpaaren bietet die Centricon-100 Einheit eine effiziente und sehr effektive Möglichkeit der Konzentrierung und Reinigung. Durch diese Verdünnung wird der Salzgehalt schon nach einer einzigen Filtration ausreichend reduziert. PCR-Reaktionskomponenten, die eine nachfolgende Sequenzierung der Amplifikationsprodukte stören, werden hier während eines einzigen Zentrifugationsschritt nahezu quantitativ aus dem Amplifikationsansatz abgetrennt.

Schritt 1.: Centricon-Säule wird einmal mit 2 ml sterilem Wasser bei 7 000 rpm 4 Minuten lang gewaschen.

Schritt 2.: 2 ml steriles Wasser mit ganzem PCR-Produkt wird bei 6 000 rpm 10 Minuten lang zentrifugiert.

Schritt 3.: Den Abfall (Wasser mit unerwünschten Substanzen) im Behälter nach der Zentrifugation wegwerfen. Die Säule umkehren und 2 Minuten lang bei 3 000 rpm zentrifugieren.

Ein sauberes PCR-Produkt (ungefähr 25µl) wurde gewonnen, bereit für die Sequenzierung.

3.10.3. Sequenzierung

DNA-Sequenzierung ist die Bestimmung der Abfolge von „Basen in einem DNA – Molekül“.

Die Entschlüsselung der DNA-Sequenz begann 1968 mit der Entdeckung von Restriktionsendonukleasen. Diese Enzyme können DNA spezifisch schneiden und damit in kleine DNA-Fragmente zerlegen. Die Entwicklung hochauflösender Polyacrylamidgele, welche die Trennung von zwei Untereinheiten zulassen, die sich nur um eine einzige Base voneinander unterscheiden, schuf die Grundlage für alle heute gängigen Sequenzierverfahren.

Seit Ende der 70-er Jahre die ersten zuverlässigen Methoden zur Bestimmung von Nucleinsäuresequenzen entwickelt wurden, hat die Technik der DNA-Sequenzierung rasch eine fundamentale Bedeutung in allen Bereichen der biochemischen Forschung erlangt (Reischl et al., 1993).

Es gibt zwei Sequenzierungsmöglichkeiten :

1. Chemische DNA–Sequenzierung nach Maxam Gilbert (die basenspezifische chemische Spaltung endmarkierter DNA) (Maxam, Gilbert, 1977)
2. Enzymatische DNA–Sequenzierung nach Sanger mit einer DNA-Polymerase (die Kettenabbruch – Methode über Einbau von Didesoxynukleotiden) (Sanger et al., 1977)

Die erstmals von Sanger et al. (1977) beschriebene Methode stellt aufgrund ihrer relativ einfachen Durchführung, ihrer universellen Einsatzmöglichkeit und nicht zuletzt auch aufgrund ihrer apparativen Verbindungsmöglichkeiten mit der PCR-Reaktion für die meisten Anwendungen die Methode der Wahl dar.

Es gibt zwei Wege, wie man PCR-Produkte sequenzieren kann:

Indirekte Methoden - Doppelsträngige PCR-Produkte werden in geeignete Plasmide subkloniert. Dann: Denaturierungsschritt und Sanger-Sequenzierung.

Direkte Methoden - Die Sanger Sequenzierung kann für die Matrizenvermehrung mit einer PCR gekoppelt werden. Man nennt das direkte Sequenzierung. DNA oder RNA müssen in diesem Fall nicht kloniert werden, bevor man sie sequenziert.

3.10.3.1. Sanger - Sequenzierungsmethode

Prinzip der Sanger - Methode

Sangers Methode kann die PCR ein- oder doppelsträngiger DNA erfolgen, letztere muß jedoch durch irreversible Denaturierung in die einsträngige Form überführt werden (abgesehen von der neuen Methode der „Cycle-Sequenzierung“).

DNA-Polymerasen synthetisieren bei Vorlage eines Templates (z. B. PCR-Produkt), das z.B. ein DNA-Einzelstrang ist, einen basenkomplementären Gegenstrang. Da die Ziel-DNA meistens als Doppelstrang vorliegt, muß sie in einem ersten Schritt denaturiert werden, d.h. der Doppelstrang wird in zwei Einzelstränge (mit Hitze) aufgeschmolzen. Bei der klassischen Methode wird eine Denaturierung durch Zugabe von Alkali (NaOH) erreicht.

Die Polymerase benötigt für den Synthesestart ein kurzes, einzelsträngiges DNA-Stück, Primer, welcher zu einem Bereich des Templates komplementär ist. Dieser Primer wird an das Template durch Wasserstoffbrückenbildung gebunden (Annealing). Das Primer-Template-Hybrid dient als Startmolekül für die Polymerase, welche dann den Gegenstrang durch Einbau komplementärer Basen in Form von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP's) synthetisiert (Elongation). Dabei bilden jeweils die Basen A und T bzw. G und C ein komplementäres Paar.

Bietet man dem Enzym für die Einbaureaktion ein definiertes Gemisch aus Desoxy- und Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTP's) an, so wird die Kettenverlängerung an dem Primer immer dann abgebrochen, wenn ein Didesoxynukleotid eingebaut wird.

ddNTP's enthalten Di-desoxyribose als Zucker und besitzen somit nicht nur eine fehlende 2'-OH-Gruppe, sondern auch eine fehlende 3'-OH-Gruppe. Gerade über diese 3'-OH-Gruppen findet die Verknüpfung mit den 5'-Phosphatgruppen der neu einzubauenden Nukleotide statt. Wenn ein solches Nukleotid (ddNTP) an ein vorhergehendes „normales“ Nukleotid (dNTP) geknüpft wird, ist die Elongationreaktion gestoppt.

Praktisch läßt man in vier getrennten Reaktionen die zu sequenzierende DNA reagieren mit:

- Primer
- Sequenzierenzym
- Reaktionspuffer
- allen vier dNTP's
- jeweils eines der vier ddNTP's.

Der Wettbewerb zwischen ddNTP's und dNTP's ist hauptsächlich abhängig von der Konzentration des verwendeten ddNTPs. Der Einbau der ddNTPs erfolgt nach dem Zufallsprinzip.

Neue DNA-Stränge sind von DNA-Polymerasen in 5'-3'-Richtung synthetisiert. Auf diese Weise entstehen alle möglichen unterschiedlich langen Syntheseprodukte, deren 5'-Ende vom Primer und deren 3'-Ende vom jeweiligen Di-Desoxy-Nukleotid gebildet wird. Das heißt, daß die neusynthetisierten DNA-Moleküle (unterschiedlich lang) alle ein gemeinsames 5'-Ende, aber verschiedene 3'-Enden haben.

In einem Ansatz findet man DNA-Fragmente, die alle am 3'-Ende mit dem Didesoxynukleotid „A“ enden, in den anderen Ansätzen entsprechende DNA-Fragmente, die mit einem „C“, einem „G“ bzw. mit einem „T“ enden.

Die DNA-Fragmente werden unter Zugabe von Formamid und mit der 90°C Hitze denaturiert und nach Abkühlung auf einem denaturierenden Sequenziergel analysiert.

Wenn es radioaktiv markiert war (eines dNTP's), dann wird die Lage der aufgetrennten Einzelstrangmoleküle im Gel durch „autoradiographische“ Darstellung ermittelt. Neuerdings werden aber zur Markierung der Sequenzierungsprodukte nichtradioaktive Reportermoleküle wie Biotin, Digoxigenin oder Fluoreszenzmarkierungen eingesetzt.

Wenn ein Multifluorophorsystem verwendet wurde, können alle vier Reaktionen nach ihrer Vereinigung in einer einzigen Spur aufgetragen werden.

Eines der modernsten Verfahren ist eine Modifikation der Sangers Methode, die Cycle-Sequenzierung, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde.

3.10.3.2. Cycle – Sequenzierung

Die „Cycle-Sequenzierung bringt für die DNA-Sequenzierung ähnliche Vorteile, wie die PCR für die DNA-Amplifizierung. Sie ist einfach durchzuführen, vereinfacht die Probenvorbereitung und ermöglicht selbst mit geringsten Mengen von DNA (im fmol-Bereich), auch schwierigste DNA-Sequenzen zuverlässig zu analysieren.

Dieser Methode liegt die Sanger-Methode zu Grunde, jedoch kann auf den Alkali-Denaturierungsschritt verzichtet werden. Die Denaturierung der DNA erfolgt durch Erhitzen des Reaktionsansatzes auf 96°C. Eine Cycle-Sequenzierung kann deshalb nur mit thermostabilen Polymerasen durchgeführt werden (Gassen, 1991).

Anders als bei der klassischen Sequenzierung, bei welcher der Template-Strang in nur einer Reaktionsfolge aus den drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Kettenverlängerung kopiert wird, werden bei der Cycle-Sequenzierung die Kopien durch mehrmalige Wiederholung (20-30mal) dieses Zykluses erzeugt. Die Sequenzierungsreaktion kann in einem PCR-Thermocycler erfolgen. Durch den Denaturierungsschritt entfällt die Notwendigkeit einer vorhergehenden Einzelstrangpräparation. Durch die wiederholten Denaturierungsschritte können mit dieser Methode auch doppelsträngige DNA-Templates wie PCR-Produkte, Lambda-DNA, Cosmid-DNA oder direkt aus Bakterienkolonien isolierte Plasmid-DNA sequenziert werden.

Vorteile der Cycle-Sequenzierung:

- Der Bedarf an Template-DNA beträgt nur ca. 1/5 von der anderer Methoden. Man benötigt viel weniger Matrizen-DNA, in der Regel 50 fmol.
- Das Primerannealings hat durch hohe Temperaturführung hohe Spezifität.
- Die Auflösung von Sekundärstrukturen ist insbesondere bei problematischen Templates gut. Einzelsträngige Nucleinsäuren können aufgrund intramolekularer Basenpaarung Haarnadelstrukturen ausbilden. Diese Sekundärstruktur kann man destabilisieren, indem man die Temperatur erhöht. Aufgrund der erhöhten Reaktionstemperatur kommt es weniger zu Artefakten, die auf Sekundärstruktur der Matrize zurückzuführen sind. Die Sekundärstruktur kann die Mobilität im Gel behindern.
- Es gibt geringe Fehlerrate beim Ansetzen und Durchführen der Reaktionen.
- Die Reaktionen können leicht automatisiert werden.
- Automatische Sequenzierer reagieren äußerst empfindlich auf Verunreinigungen der Matrize.

Die Nachteile der zyklischen Sequenzierung:

- Die erhältlichen hitzestabilen Polymerasen sind weniger prozessiv als die T7-DNA-Polymerase; sie lesen daher homopolymere Basenfolgen wie Oligo(T) schlechter

- Die Sequenzdaten, die mit der zyklischen Sequenzierung gewonnen werden, sind generell qualitativ schlechter als bei der konventionellen Sequenzierung; dies wird jedoch bei der automatischen Sequenzierung durch die Signalverstärkung mit dem Computer mehr als wettgemacht.

Generell ist die zyklische Sequenzierung immer noch unbeständiger und unzuverlässiger als das konventionelle Verfahren.

Aus diesen Gründen benutzt man die zyklische Sequenzierung ausschließlich, wenn man automatisch sequenziert oder nur wenig Matrizen-DNA zur Verfügung steht. Das trifft zum Beispiel auf die Sequenzierung von PCR Produkte. Man kann PCR-Produkte schneller direkt sequenzieren, als sie zunächst zu subklonieren.

Typisches Zyklusprofil einer Cycle-Sequenzierung (generell 25 Zyklen):

1. 92-96-98°C Denaturierung (DNA-Doppelstränge der Template-Moleküle werden aufgeschmolzen)
2. 50-55°C Annealing (Sequenzierprimer hybridisieren spezifisch an die einzelsträngige Template- Nukleinsäure)
3. 60-70-72°C Elongation (Sanger-Kettenabbruchreaktion mit Taq-DNA-Polymerase)

Nach einigen Optimierungen habe ich folgende Cycle-Sequencing-Bedingungen für alte DNA aus Knochen erfolgreich angewendet:

40 Zyklen:

1. 95°C, 30 Sekunden
2. 55°C, 30 Sekunden
3. 60°C, 4 Minuten

Typischer Reaktionsansatz für Cycle-Sequenzierung:

- Puffer
- DNA-Template
- dNTPs
- ein Primer
- thermostabiles Enzym
- fluoreszenzmarkierte ddNTPs

In meiner Arbeit am besten funktionierender Reaktionsansatz (20 µl):

10-14,4 µl von gereinigtem PCR-Produkt
 4 µl BigDye Terminator Ready Reaction Mix von Firma Perkin Elmer
 1,6 µl Primer (was entspricht 3,2 pmol)
 0-4,4 µl steriles Wasser

BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix enthält:

A-Dye Terminator markiert mit dichloro[R6G]
 C-Dye Terminator markiert mit dichloro[ROX]
 G-Dye Terminator markiert mit dichloro[R110]
 T-Dye Terminator markiert mit dichloro[TAMRA]
 dNTPs (dATP, dCTP, dITP, dUTP)
 AmpliTaq DNA Polymerase, FS
 MgCl₂
 Tris-HCl-Puffer (pH=9,0)

Der Einsatz fluoreszenzmarkierter Komponenten wird im Umfeld der DNA-Sequenzierung

in Verbindung mit Taq-DNA-Polymerase und der Technik der Cycle-Sequenzierung wesentlich erweitert, da mit der linearen Amplifikation des Templates auch eine lineare Amplifikation des Fluoreszenzsignals verbunden ist.

Im Reaktionspuffer ist entweder der Sequenzierprimer markiert, oder die Didesoxynukleotide sind unterschiedlich markiert. Für das Taq-Cycle-Sequencing von PCR-Fragmenten sind die Dye-Terminatoren die ideale Markierungsvariante, da so unspezifische Terminationsstellen unmarkiert und damit für die Sequenzanalyse unproblematisch bleiben. Ich habe auch „BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ verwendet.

Template – DNA

Der zu sequenzierende Strang der DNA wird meist als „Template“ oder auch als „Matrize“ bezeichnet.

Die Qualität der eingesetzten DNA ist entscheidend für den Erfolg der gesamten Sequenzierungsreaktion. Die enzymatische Reaktion wird schon durch geringe Mengen von Verunreinigungen gestört. Dies kann entweder zu geringen Syntheseraten oder auch zu unspezifischem Einbau führen. Deswegen wurden alle PCR-Produkte vor dem Sequenzieren gereinigt (Kapitel 3.10.2.).

Über diese PCR-ähnliche Reaktionsfolge sind für Cycle-Sequenzierungsreaktionen selbst sehr geringe Mengen an Template-Nukleinsäure ausreichend (im fmol-Bereich).

Primer

Voraussetzung für die Sequenzierung nach Sanger ist die richtige Auswahl des Primers. Für die Auswahl geeigneter Primersequenzen gelten ähnliche Regeln wie bei PCR-Primern (Kapitel 3.5.2.).

Es gibt vier verschiedene Strategien zur Verfügung:

1. *Interner Sequenzierprimer (Nested Primer):* Die beiden unmarkierten PCR-Primer flankieren die Hybridisierungsstelle des internen markierten Sequenzierprimers (3 unterschiedliche Primer, 1 davon markiert). Es kann nicht die gesamte Sequenz der Amplifikationsprodukte bestimmt werden, da sich die Hybridisierungsstelle des Sequenzierprimers nicht am Ende, sondern innerhalb der PCR-Produkte befindet.
2. *2-Primer-Strategie:* Für die PCR-Reaktion und die anschließende Sequenzierungsreaktion werden die gleichen Primer eingesetzt. Dazu sind also zwei unterschiedliche Primer synthetisiert und eines davon markiert. So kann die gesamte Sequenz der Amplifikationsprodukte bestimmt werden.
3. *4-Primer-Strategie:* Die PCR-Primer (unmarkiert) und die Cycle-Sequenzierprimer (Biotin-, Digoxigenin- oder Fluoreszenz-markiert) haben die gleiche Sequenz. Die Sequenzierungstechniken beginnen hier, wie bei der 2-Primer-Strategie, an den Enden der PCR-Produkte, und die Sequenzierungsprodukte enthalten die Markierung desjenigen Primers, von dem aus sie synthetisiert wurden. Werden hier zwei unterschiedlich markierte Cycle-Sequenzierprimer eingesetzt, enthält man im Rahmen einer einzigen Sequenzierungsreaktion zwei gegenläufige, unterschiedlich markierte Sequenzleitern.
4. *Fluoreszenzmarkierte Didesoxy- Nukleotide (Dye Terminator):* Die PCR-Reaktion wird mit zwei unmarkierten Primern durchgeführt. Nach Reinigung der PCR-Produkte wird

zur Cycle-Sequenzierung ein modifiziertes PCR-Reaktionsgemisch verwendet, das neben der Taq-DNA-Polymerase und den beiden unmarkierten PCR-Primern einen bestimmten Anteil von fluoreszenzmarkierten Didesoxy-Nukleotiden enthält.

Es reicht ein Sequenzierprimer für die Cycle-Sequenzierung. Wenn man aber beide Stränge der mtDNA sequenziert, muß man jeweils ein geeignetes Primer benutzen. Beide Stränge (H und L) aller vier untersuchten mtDNA-Abschnitte (Kapitel 3.10.1.1.) wurden für jede Probe sequenziert.

Ich habe die Strategie Nr. 4 verwendet. Hier wurden die gleichen Primer für die Cycle-Sequenzierung benutzt wie für die PCR.

Enzym

Die Taq-DNA-Polymerase und die gentechnisch hergestellte Form „AmpliTaq“ setzt man vorwiegend bei der Sequenzierung einsträngiger DNA-Moleküle ein, die stabilen Sekundärstrukturen ausbilden (z.B. doppelsträngige Bereiche im gleichen Molekül). Mit diesem thermostabilen Enzym kann die Polymerisierungsreaktion bei höheren Temperaturen durchgeführt werden, welche die Bildung von Sekundärstrukturen verhindern. Taq-DNA-Polymerase hat hohe Prozessivität und Thermostabilität, gute Lesbarkeit von großen Sequenzbereichen. Das Enzym erlaubt die bequemste und modernste Art der Sequenzierung, die Cycle-Sequenzierung.

Eine Weiterentwicklung der Sequenzier-Polymerasen stellen Enzyme dar, welche sowohl die Thermostabilität der Taq-Polymerase als auch die hohe Prozessivität der T7 Sequenase in einem Enzym vereinen. Zu diesen neuen Enzymen gehören: SequiTherm, THERMOSequenase und die AmpliTaq DNA-Polymerase-FS, wobei FS für die Fluoreszenz Sequenzierung steht.

AmpliTaq DNA-Polymerase-FS ist ein hitzestabiles Enzym aus dem Bakterium *Thermus Aquaticus*. Sie ist eine rekombinante Doppelmutante der Wildtyp AmpliTaq -Polymerase. Durch eine Mutation (G46D) verliert das Enzym seine 5'-3'-Nuklease-Aktivität. Die zweite Mutation im aktiven Zentrum des Enzyms (F667Y) führt zu einer Veränderung seiner Akzeptanz gegenüber Didesoxynukleotiden. Diese können damit leichter eingebaut werden.

3.10.3.3. Ethanolfällung

Nach der Cycle-Sequenzierung habe ich nicht eingebaute markierte Nucleotide und sonstige überschüssige Reaktionssubstanzen durch eine Ethanolfällung entfernt.

Schritt 1.: 50 µl 95% Ethanol und 2 µl 3M NaOAc (pH=4,6) werden in eine 1,5 ml Tube pipettiert.

Schritt 2.: Nach der Cycle-Sequenzierung die ganze Probe dazugeben, gut durchmischen, kurz vortexen und 15 Minuten bei der Raumtemperatur stehen lassen.

Schritt 3: 20 Minuten bei 12 000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren.

Schritt 4: Supernatant wegwerfen, und mit jeweils 250 µl 70% Ethanol reinigen, kurz vortexen und 5 Minuten bei 12 000 rpm und Raumtemperatur zentrifugieren.

Schritt 5: Supernatant wegwerfen. Die DNA wird dann an der Luft getrocknet.

In diesem Stadium ist die Reaktion bei -20 C bis zu einer Woche stabil.

Direkt vor der Gelelektrophorese resuspendiert man die Probe in einem Auftragspuffer für das Gel und erhitzt sie, um die DNA zu denaturieren. Das Erhitzen ist nicht nötig, wenn das Auftragspuffer z.B. denaturierendes Formamid enthält.

3.10.3.4. ABI Prism 377 DNA Sequenzer

Seit 1986 gibt es die ersten automatischen DNA-Sequenzer, die auf der multifluophoren Laser-Scanning-Technologie von Applied Biosystems beruhen.

ABI PRISM Systeme 373, 377, 310 bieten ein breites Spektrum an Möglichkeiten für die automatische Analyse Fluoreszenz-markierter DNA. Mit diesen Systemen kann DNA sequenziert und die Länge von DNA-Fragmenten genau bestimmt, bzw. DNA-Fragmente quantifiziert werden.

Die automatischen Sequenzer sind in der Gerichtsmedizin, in der Humangenetik, der Genomforschung, Tier- und Pflanzenzüchtung, medizinischen Grundlagenforschung, AIDS- und Krebsforschung sowie natürlich der genetischen und molekularbiologischen Grundlagenforschung eingesetzt.

Diese ABI PRISM Systeme sind Microprozessor gesteuerte Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektions-Systeme. Ein Argonlaser, dessen Hauptemissionen bei Wellenlängen von 488 nm und 514,5 nm liegt, ist das Kernstück der Detektionseinheit. Der Laserstrahl wird durch Spiegel auf das Trennsystem gerichtet. Erreicht ein markiertes DNA-Fragment den Bereich, den der Laserstrahl trifft, so wird dieses zur Aussendung der Fluoreszenzstrahlung angeregt, welche mit einer Linse fokussiert wird.

Ich hatte die Möglichkeit, ABI 377 zu benutzen. Die Auftrennung der DNA in dem ABI PRISM 377 System erfolgt über Polyacrylamid-Gele.

Probenaufbereitung fürs Sequenziergel:

Das trockene Pellet wurde nach der Ethanol-fällung vor dem Auftragen aufs Gel in 4 µl Formamid-Loading-Dye von der Firma Amershan gelöst.

Sequenzgele sind lange, dünne Polyacrylamidgele. Sie enthalten einen Puffer für die Elektrophorese sowie Harnstoff, um die DNA zu denaturieren und so Artefakte zu verringern, die aufgrund von DNA-Sekundärstruktur auftreten.

Die kleinen Moleküle Harnstoff und Formamid sind in hohen Konzentrationen in der Lage, die Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren aufzubrechen. Man kann sie nicht in Agarose-Gelen verwenden, da sie verhindern, daß die Gelmatrix erhärtet. Sie werden aber erfolgreich in Polyacrylamid-Gelen eingesetzt. Hochkonzentrierter Harnstoff zerstört – allein oder zusammen mit Formamid – vollständig die intramolekulare Basenpaarung in der RNA oder DNA. Das ist besonders für Sequenzgele wichtig, bei denen die Auflösung so gut sein muß, daß man Fragmente unterscheiden kann, die in der Länge nur in einem einzigen Nukleotid differieren.

Beim ABI 377 sind die Gele 0,2 mm dick. Meine Sequenziergele waren 36 cm lang.

Im Rahmen meiner Arbeit habe ich 5%-iges Polyacrylamidgel / 7M Harnstoff (50 ml) verwendet:

21 g Harnstoff

8,4 ml 30-ige Acrylamid-Lösung (Acrylamid : Bisacrylamid; 29 : 1)

6 ml 10X TBE Puffer (11 TBE Puffer: 108 g Tris Base, 55 g Borsäure, 7,4 g Na₂EDTA)

20 ml bidist. Wasser

(Zunächst läßt man 35,6 ml Harnstoff-Lösung mit 6 ml 10X TBE Puffer gründlich (5 Min.) filtrieren. Dann werden erst 8,4 ml Acrylamid-Lösung zugegeben.)

Zum Schluß noch:

350 µl 10%-APS

15 µl TEMED

ABI 377 System bietet die Möglichkeit, variable Gelsysteme mit unterschiedlichen Trennstrecken und Laufgeschwindigkeiten einzusetzen.

Der ABI 377 kann Fluoreszenz gleichzeitig bei vier verschiedenen Wellenlängen erfassen, die den Emissionswellenlängen vier verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe entsprechen. Ein wesentlicher Vorteil der automatischen Sequenzierung besteht in der automatischen Datenerfassung. Der ABI 377 beleuchtet das Gel mit einem Argonlaser und registriert dann die Fluoreszenzstrahlung der markierten DNA.

Das System 377 besitzt die Möglichkeit einer Temperaturkontrolle. So kann das Trennsystem während der Elektrophorese auf eine konstante Temperatur, welche mindestens 5°C über Raumtemperatur liegt, eingestellt werden.

In dem System 377 übernimmt eine CCD-Kamera die Datenaufnahme, nachdem das Licht in einem Hohlspiegel prismatisch aufgespalten wurde.

Auf den ersten Blick sieht das noch unbearbeitete Datenmaterial aus dem ABI 377 nicht sehr ermutigend aus. Jede Spur enthält eine Folge von Farbbanden, von denen jede einem einzigen Nucleotid entspricht. Diese Rohdaten werden mit der angeschlossenen Software zu einem sogenannten Elektropherogramm verarbeitet, der bekanntesten Ausgabeform.

3.10.3.5. Sequenzdatenbanken

Primäre Datenbanken enthalten Originaldaten aus der Biologie. Das können DNA-Sequenzen sein oder Proteinstrukturinformationen aus der Kristallographie. Sekundäre Datenbanken versuchen, den Wert primärer Datenbanken zu erhöhen.

Die meisten primären Daten sind DNA-Sequenzen. Weltweit arbeiten drei Gruppen zusammen:

1. Das European Molecular Biology Laboratory
2. Genbank
3. DNA Databank of Japan

Vergleich von Sequenzen mit einer Datenbank:

Die beiden Programme, die am häufigsten benutzt werden, um eine unbekannte Sequenz mit einer Sequenzdatenbank abzugleichen, sind FASTA und BLAST.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sucht mit einem Ansatz, der auf der Übereinstimmung kurzer Sequenzfragmente sowie auf einem leistungsfähigen Statistikmodell beruht, nach den besten lokalen Übereinstimmungen zwischen der unbekannt Sequenz und der Datenbank. BLAST kann nur kontinuierliche Sequenzen einander zuordnen; eine Zuordnung, an der Insertionen und Deletionen beteiligt sind, wird als eine Folge von Übereinstimmungen einzelner Fragmente gewertet.

Da BLAST und FASTA unterschiedlich arbeiten, lohnt es sich in der Regel, beide Programme laufen zu lassen: Unter Umständen findet eines signifikante Übereinstimmungen, die das andere übersieht, und umgekehrt.

Programm BLASTN (Sondentyp n, Art der Datenbank n) vergleicht eine Nucleotidsequenz mit einer Datenbank für Nucleotidsequenzen.

BLAST - ADRESSEN :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
(die Heimatadresse von Blast am NCBI in den USA)

<http://genome.eerie.fr/blast/blast-query.html>

(ein französischer Server)

<http://www.crihan.fr/www/blast.html>

(ein weiterer französischer Server)

http://ulrec3.unil.ch/software/EPFLBLAST_form.html

(ein Server in der Schweiz)

FASTA – ADRESSEN :

<http://genome.eerie.fr/fasta/fasta-query.html>

(ein französischer Server)

<http://www.crihan.fr/www/fasta.html>

(ein weiterer französischer Server)

Ich habe zusätzlich noch die von dem Institut für Gerichtsmedizin in Magdeburg errichtete Datenbank benutzt, um die mtDNA-Sequenzen zu vergleichen:

<http://www.d-loop-base.de>

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Vergleich der drei getesteten Extraktionsmethoden und Leistung des eigenen Extraktionsverfahrens

Für die Extraktion der DNA aus Knochenmaterial wurden zunächst ausschließlich die Extraktionsmethoden verwendet, die ursprünglich für die Extraktion von DNA aus Weichgewebe entwickelt worden waren. Ihre Effizienz war nicht befriedigend. So wurden weitere Methoden entwickelt.

In der Literatur wurden mehrere vorgestellt, z. B.:

Methode von Graham (1978)

Proteinase-Methode von Pääbo (1988)

Silica-Methode von Boom (1990)

Chelex-Methode von Walsh (1991)

Methode von Hochmeister (1991)

Methode von Lee (1991)

Phosphatpuffer-Methode von Persson (1992)

Methode von Fisher (1993)...usw.

Eine sehr effiziente Extraktionsmethode der DNA aus alten Geweben ist auch die modifizierte Version des Protokolls von Blin et al. (1976) (Kelley, Pääbo, 1993).

Die Methoden bergen unterschiedliche Verwägbarkeiten in sich, deswegen ist die ständige Suche nach neuen, leistungsfähigeren Methoden notwendig.

Nachteil der Proteinase-Methode von Pääbo zum Beispiel ist, daß sie sehr viele Schritte mit vielen Lösungen und Wechseln von Reaktionsgefäßen beinhaltet, wodurch die Kontaminationsgefahr und die Gefahr des DNA-Verlustes deutlich erhöht wird.

Coquoz (1999, persönliche Mitteilung) zusammen mit japanischem Kollegen versuchten im *Institut de la police scientifique et de criminologie* in Lausanne (Schweiz) ein Jahr lang mit der Silica-Methode weiterzukommen, aber ohne Erfolg.

Ich habe drei Extraktionsmethoden getestet; die von Hochmeister et al. (1991), von Lee et al. (1991) und von Scholz und Pusch (1997).

Zuerst war es nötig, die in der Forensik völlig unbekannt Methode von Scholz und Pusch (1997) zu beherrschen und für unsere Laborverhältnisse anzupassen. Die Einarbeitung in dieses Extraktionsverfahren folgte an weichem Gewebe (Muskel, Plazenta, Hirn).

Diese drei Extraktionsmethoden wurden im Rahmen dieser Arbeit angewendet an frischem Knochenmaterial und an elf unterschiedlichen bodengelagerten Knochen aus unterschiedlichen Gräbern mit der Liegezeit von 18 bis 300 Jahre.

4.1.1. Extraktion der DNA aus weichen Geweben

Mit der Extraktionsmethode von Scholz und Pusch (1997), in der Form wie sie im Kapitel 3.3.5. beschrieben ist, konnte ich problemlos die DNA aus Muskel, Plazenta und Hirn extrahieren. Mit diesem Versuch (drei Proben pro Gewebe) habe ich die in unserem Labor

zum erstenmal verwendete Methode getestet. Nach der spektrophotometrischen Messung habe ich im Durchschnitt zufriedenstellende DNA Ausbeute erhalten.

<i>Gewebe</i>	<i>Die extrahierte DNA</i>
Muskel	912 ng / μ l
Plazenta	1083 ng / μ l
Hirn	394,2 ng / μ l

4.1.2. Extraktion der DNA aus rezenten Knochen

Das verwendete Material ist im Kapitel 2.2. beschrieben. Dieses Knochenmaterial war nur ein paar Tage alt, mit Ausnahme von der Probe Nr.9, die 2 Jahre alt war.

An diesen Knochenproben wurden drei Extraktionsmethoden getestet und verglichen, die in den Kapiteln 3.3.3.; 3.3.4.; 3.3.5. beschrieben sind. Alle drei Methoden basieren im Prinzip auf der Phenol / Chloroform-Extraktion. Die Extraktionsmethode für alle Körpergewebe und -flüssigkeiten mit der besten DNA-Ausbeute, -reinheit und Lagerungsstabilität ist nach wie vor die klassische Phenol/Chloroform-Extraktion (Gill et al., 1985). DNA, die mit einer Phenol Extraktion gewonnen wird, ist bekanntlich durch Spuren von organischen Stoffen kontaminiert. Das Problem wird durch Alkoholpräzipitation gelöst. Kommerziell verfügbare Kits zur Gewinnung und Reinigung der DNA (z.B. GeneClean, QIAamp, InViSorb) weisen Vorteile wie Nicht-Toxizität und Schnelligkeit auf, dennoch fallen niedrigere Ausbeuten und geringere Reinheit sowie die teilweise begrenzte Lagerungsstabilität der DNA-Extrakte negativ ins Gewicht. Diese Methoden basieren auf dem Prinzip der Adsorption und Elution. Gewöhnlich bindet eine Silica-Matrix selektiv die DNA aus dem lysierten Zellmaterial. Nachfolgend wird die gebundene DNA gewaschen und anschließend eluiert.

Alle drei Methoden erlaubten aus jedem rezenten Knochen erfolgreich DNA zu extrahieren.

<i>Konzentration der extrahierten DNA nach der spektrophotometrischen Messung</i>			
	<i>Extraktionsmethode von Hochmeister et al. (1991)</i>	<i>Extraktionsmethode von Lee et al. (1991)</i>	<i>Extraktionsmethode von Scholz und Pusch (1997)</i>
Nr.1	1042,5 ng / μ l	1313 ng / μ l	1084 ng / μ l
Nr.2	624 ng / μ l	803,2 ng / μ l	511,6 ng / μ l
Nr.3	1009 ng / μ l	1313,7 ng / μ l	1207,2 ng / μ l
Nr.4	815,2 ng / μ l	1020,6 ng / μ l	943,5 ng / μ l
Nr.5	843,1 ng / μ l	985 ng / μ l	613,8 ng / μ l
Nr.6	976 ng / μ l	1101,3 ng / μ l	1003,4 ng / μ l
Nr.7	404 ng / μ l	810,2 ng / μ l	644,5 ng / μ l
Nr.8	1039,8 ng / μ l	1210,7 ng / μ l	1104,2 ng / μ l
Nr.9	190,5 ng / μ l	280,5 ng / μ l	240,75 ng / μ l

Nach diesen Ergebnissen war die Extraktionsmethode von Lee et al. (1991) bei allen Knochenproben am erfolgreichsten, die Methode von Scholz und Pusch (1997) belegt

auf meiner persönlichen Rangskala den zweiten Platz. Alle drei Extraktionsverfahren haben insgesamt an rezemtem Knochenmaterial gut funktioniert.

Nächste Steigerung, um die drei Extraktionsmethoden zu testen, war die Untersuchung von altem Knochenmaterial (18 bis 300 Jahre alt).

4.1.3. Extraktion der DNA aus älteren Knochen

Das untersuchte 18 bis 300 Jahre alte Knochenmaterial wurde im Kapitel 2.3. beschrieben. Alle drei in den Kapiteln 3.3.3.; 3.3.4.; 3.3.5. beschriebenen Extraktionsmethoden wurden wieder getestet und verglichen.

Konzentration der extrahierten DNA nach der spektrophotometrischen Messung			
Probe	<i>Extraktionsmethode von Hochmeister et al. (1991)</i>	<i>Extraktionsmethode von Lee et al. (1991)</i>	<i>Extraktionsmethode von Scholz und Pusch (1997)</i>
1	31 ng / µl	79 ng / µl	48 ng / µl
2	19 ng / µl	82 ng / µl	37 ng / µl
3	24 ng / µl	76 ng / µl	56 ng / µl
4	33 ng / µl	93 ng / µl	71 ng / µl
5	16,5 ng / µl	62 ng / µl	37 ng / µl

Bei den Proben 1-5 (Knochen 18-49 Jahre alt) könnte ich die spektrophotometrischen Auswertungen als zuverlässiges Verfahren bezeichnen. Nach diesen Ergebnissen funktioniert die Methode von Lee et al. (1991) am besten von allen drei Methoden. Dann scheint die Methode von Scholz und Pusch (1991) deutlich besser funktioniert zu haben als die Methode von Hochmeister et al. (1991).

Bei den weiteren Proben 6-11 (Knochen 150-300 Jahre alt) waren spektrophotometrische Daten in Beziehung zu bisherigen Messungen sehr widersprüchlich.

Man nimmt ein Absorptionsspektrum auf, da sonst z.B. eine Verunreinigung mit Phenol (Absorption bei 230 nm) oder anderen Stoffen, die ähnlich absorbieren wie DNA, nicht erkannt wird.

Nach Fisher et al. (1993) kann man nicht generell sagen, aus welchem Knochentyp die DNA am besten amplifiziert wird. Das stimmt nach meiner Erfahrung. Es sind aber immer alte Knochen mit möglichst dickem Compacta-Anteil, die Hoffnung auf eine erfolgreiche Typisierung geben können. Hier wurden, wenn man die Wahl hatte, auch im Hinblick auf postmortale Kontamination bei der Untersuchung von Knochen (Kapitel 2.5., 2.8., 2.9.) kompakte Bereiche großer Langknochen zur Probenentnahme gewählt. Fisher et al. (1993) haben auch festgestellt, daß die UV-Spektrophotometrie weder für die Quantitäts- noch für die Qualitätsbestimmung der alten DNA in Extrakten geeignet ist.

Die Einführung einer weiteren Methode zur Bestimmung der Quantität und Qualität der extrahierten DNA (Kapitel 3.4.) war notwendig.

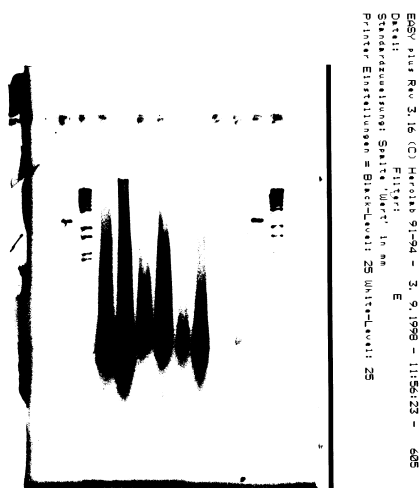
4.1.4. Ergebnisse der Restriktionsanalyse

Nach der Spaltung der extrahierten, bis zu 50 Jahre alten DNA mit Eco RI Enzym und anschließender Agarose-Gel-Elektrophorese (Kapitel 3.4.2.) mit Ethidiumbromidfärbung

bekam ich keine sichtbare Ergebnisse mit der DNA aus der Extraktion von Hochmeister et al. (1991) und von Scholz, Pusch (1997). Nach den Ergebnissen der Restriktionsanalyse liefert die Extraktionsmethode von Lee et al. (1991) die qualitativ beste DNA. Zusätzlich auch nach den spektrophotometrischen Ergebnissen ist die Extraktionsmethode von Lee et al. (1991) die erfolgreichste Extraktionsmethode (von allen drei getesteten Methoden) der DNA aus den Knochen bis zu 50 Jahre alt.

Nach der Restriktionsanalyse der extrahierten DNA aus älteren Knochen (18-300 Jahre alt) habe ich auf dem Agarose-Gel in keinem Fall was gesehen, unabhängig vom Extraktionsverfahren. Hier konnte ich auch feststellen, daß die spektrophotometrischen Messungen unzuverlässig bis sinnlos sind.

Weil ich auf dem Agarose-Gel nichts sehen konnte, bedeutet es noch nicht, daß die Restriktionsanalyse erfolglos war (McNally et al., 1989). In Fällen, in denen keine DNA auf dem Gel nach der Elektrophorese zu sehen ist, können doch genügende Mengen an alter DNA vorhanden sein (Brown et al., 1992). Das wurde später beobachtet, wenn die gleichen DNA-Extrakte STR-PCR-Ergebnisse lieferten.



Kurze Bildbeschreibung

Von links nach rechts: λ , pUC 18, DNA aus 10 tägigem Femur, DNA aus 5 tägigem Femur, DNA aus 30 tägigem Femur, DNA aus 10 tägigem Humerus, DNA aus 2 jährigem Femur, DNA aus 2 tägigem Femur, λ , pUC 18.

Ich konnte in Fällen von weichem Gewebe und frischen Knochen klar beobachten, daß die isolierte DNA im gelelektrophoretischen Vergleich zu Phagen-DNA hochmolekular und mit der eingesetzten Restriktionsendonuklease (Eco RI = Escherichia Coli BS 5) vollständig spaltbar ist.

Bei den meisten älteren Proben war auf dem Agarose Gel nach der Spaltungsreaktion nichts zu sehen. Die Visualisierung der DNA in Agarosegelen erfolgt durch Ethidiumbromidfärbung. Das Detektionslimit liegt bei diesem interkallierenden Farbstoff allerdings im Bereich von etwa 5-10 ng DNA (Brinkmann et al., 1997). Es kann also daran liegen, daß die Ethidiumbromidfärbung für die alte DNA-Proben nicht genug sensitiv ist. Weiter sind z.B. Nukleotid-Modifikationen in der alten DNA durch UV-Strahlung; Basen- und Zucker-Modifikationen durch Oxidationsreaktionen und Basendeamidation verursacht.

Das Restriktionsenzym erkennt nur die nicht-modifizierte Nukleotidsequenz und kann deshalb nur nichtmodifizierte DNA verdauen. DNA-Cross-Linking reduziert die Effizienz

der Extraktion und kann sogar die DNA unextrahierbar machen. Die DNA wurde extrahiert wie im Kapitel 4.1.5. gezeigt wurde. Sie liegt allerdings nicht als hochmolekulare DNA vor. Während sich kurze DNA-Abschnitte als bemerkenswert stabil erweisen, sind die riesigen Moleküle von bis zu einigen hundert Megabasen Länge, aus denen die chromosomale DNA besteht, sehr empfindlich. Sie lassen sich durch enzymatische Einwirkung, mechanische Scherung durch unterschiedlichste Umwelteinflüsse (Kapitel 1.2.2.2. und 1.2.3.) sehr leicht in kleinere Fragmente zerlegen. Im Laufe der Zeit liegt in Knochen nur sehr stark degradierte DNA vor.

Wenn die hochmolekulare DNA auf dem Agarose-Gel sichtbar ist, kommt diese eher von Mikroorganismen. Da ich bei der aDNA nichts auf dem Agarose Gel gesehen habe, kann ich auf die sehr sauber funktionierende Extraktion und Reinigung hinweisen, die in meiner Arbeit appliziert wurde. Die Quantifizierung der isolierten alten DNA aus Knochen ist sehr schwierig, weil die Mengen extrem klein sind und die Distribution der DNA-Fragmente sehr variabel (Perry III et al., 1988). Die Ethidium-Bromid-Färbung ist nicht sensitiv genug, um die kleinen DNA-Spuren zu detektieren, die für die PCR aber ausreichend sein können.

Ich verzichtete auf irgendwann verwendete Slot-Blot (Dot-Blot)-Quantifizierung von Human-DNA im Extrakt. Es ist sehr hoch wahrscheinlich, daß ich nach Verwendung einer Oligo-Sonde (wenn auch humanspezifisch) ein Signal bekomme, und das sowohl im Fall, dass auch nur eine fremde-DNA im Extrakt ist, wie auch im Fall, dass eine fremde- und die der Probe eigene DNA im Extrakt ist, und wie natürlich im idealen Fall, dass sich im Extrakt nur die der Probe eigene DNA befindet. Je kleiner die humanspezifischen Oligo-Sonden sind, um so höher (auf jeden Fall) ist die Wahrscheinlichkeit, ein positives Signal der Hybridisierung zu bekommen. Es ist auch bisher noch unklar, wie groß die Mengen der fremden DNA und der endogenen DNA sind, bzw. in welchem Verhältnis sie in einem DNA-Extrakt vorliegen können. Und die Spezifität der Hybridisierung ist bei alter DNA noch mehr reduziert durch die chemischen Modifikationen innerhalb der DNA.

Coquoz und Fridez (1995) versuchten die aus Haaren extrahierte mtDNA durch Slot-Blotting zu quantifizieren. Sie haben festgestellt, daß man die Slot-Blot-Hybridisation als Quantifikationstechnik nicht routinemäßig verwenden kann, weil sie nicht genug sensitiv ist. Nach ihrer Meinung muß man nach anderen Methoden suchen.

Die genaue Konzentrationsbestimmung der alten DNA ist extrem schwierig oder sogar unmöglich (Kelley und Pääbo, 1993). Meine Erfahrungen können es nur bestätigen. Deswegen habe ich die Spektrophotometrie und die Spaltungreaktion mit anschließender Agarose-Gel-Elektrophorese ausgelassen und den Extrakt direkt mit der PCR analysiert.

4.1.5. Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA

Um die drei Extraktionsmethoden noch mal vergleichen zu können, vor allem in Beziehung zu alten (150-300 jährigen) Knochen, habe ich die Amplifizierbarkeit der extrahierten DNA als Kriterium herangezogen.

Indirekte Methoden der Analyse der alten DNA wie Hybridisationstechniken sind für die aDNA ungeeignet, weil die Spezifität der Hybridisation reduziert ist wegen der chemischen Modifikationen innerhalb des aDNA-Templates (Brown et al., 1992). Hochmeister et al. (1991) haben bei der aDNA-Typisierung aus alten Knochen gezeigt,

daß die PCR die erfolgreichere Methode als RFLP ist. Für eine RFLP-Analyse gibt es in alten Knochen nicht genügend DNA und die extrahierte DNA ist nicht von ausreichender Qualität. Wie schon erwähnt, sind direkte Messungen des Zustandes von alter DNA problematisch. Da in alten Geweben nur sehr wenig DNA vorhanden ist, muß sie durch Amplifikation mit der PCR über die Nachweisgrenze so gut wie aller Detektionssysteme gehoben werden. Dadurch können natürlich nur indirekte Aussagen über die DNA im Gewebe gemacht werden, weshalb in den meisten Fällen die Amplifizierbarkeit selbst ein einziges Maß für die DNA-Erhaltung verwendet wird. Direkte Methoden wie PCR und Sequenzierung sind Methoden der Wahl bei der Arbeit mit alter DNA.

Unter den PCR-amplifizierbaren DNA-Systemen weisen die Short Tandem Repeat (STR)-Loci oder Mikrosatelliten eine Reihe von Vorzügen auf, die sie für eine hochinformativ und effiziente Identifizierung besonders qualifizieren (Kapitel 1.1.2.3.). Sie sind sehr polymorph mit Diskriminations-Indices über 0,7, ihre Allele sind definiert, d.h. numerisch speicherbar. Die STR-Typisierungen der alten DNA sind auch möglich, wenn auch bekannterweise die aDNA stark degradiert ist (Hummel et al., 1991; Zierdt et al., 1996; Schultes et al., 1997).

Der TH01 Marker der DNA aus weichen Geweben wurde problemlos amplifiziert (Kapitel 3.6.2.3.). Die Extraktionsmethode von Scholz und Pusch (1997) scheint gut funktioniert zu haben, die extrahierte DNA war qualitativ und quantitativ für eine STR-PCR-Typisierung ausreichend.

<i>Gewebe</i>	<i>TH01 Locus</i>
Muskel	6/6
Plazenta	7/9.3
Hirn	5/9

Die Extrakte aus rezenten Knochen wurden auch unter gleichen Bedingungen einer PCR vom TH01 Locus unterworfen (Kapitel 3.6.2.4.). Alle 7 menschlichen Knochen (Kapitel 2.2.) konnten STR-PCR-typisiert werden, wenn die DNA nach der Methode von Lee et al. (1991) und nach der Methode von Scholz und Pusch (1997) extrahiert wurde. Die nach der Methode von Hochmeister et al. (1991) extrahierte DNA hat in einigen Fällen keine Amplifikate erbracht.

Proben	TH01 - Typisierung		
	<i>Extraktionsmethode von Hochmeister et al. (1991)</i>	<i>Extraktionsmethode von Lee et al. (1991)</i>	<i>Extraktionsmethode von Scholz und Pusch (1997)</i>
3	7/9	7/9	7/9
4	6/6	6/6	6/6
5	-	6/8	6/8
6	5/6	5/6	5/6
7	-	9/9.3	9/9.3
8	-	6/7	6/7
9	7/9.3	7/9.3	7/9.3

Auch die DNA aus älteren Knochen (18-49 Jahre alt) (Kapitel 2.3.) wurde

auf ihre Amplifizierbarkeit getestet. Die im Kapitel 3.6.2.4. beschriebene PCR-Reaktion hat problemlos funktioniert.

Proben	TH01 - Typisierung		
	Extraktionsmethode von Hochmeister et al. (1991)	Extraktionsmethode von Lee et al. (1991)	Extraktionsmethode von Scholz und Pusch (1997)
1	-	6/6	6/6
2	-	5/6	5/6
3	-	6/9.3	6/9.3
4	-	6/7	6/7
5	-	8/9.3	8/9.3

Als Konsequenz aus den vorigen Ergebnissen und aus den PCR-Ergebnissen der 18 bis 50 jährigen DNA habe ich die Extraktionsmethode von Hochmeister et al. (1991) nicht weiter verwendet.

Typisch für diese Methode ist der Dekalzifizierungsschritt (Kapitel 3.3.3.). Hochmeister et al. (1991) haben den Schritt der Dekalzifikation von Hagelberg et al. (1989) benutzt. Pfeiffer et al. (1999), wie auch Fisher et al. (1993) und Hagelberg (1994) behaupten aufgrund ihrer Ergebnisse, daß der Schritt der Dekalzifizierung nicht notwendig ist und daß die Extraktion ohne Dekalzifikation einfacher, schneller und die Menge der isolierten DNA doppelt so groß ist. Ich kann mich ihrer Behauptung nur anschließen.

Je nach Knochen, Lagerungsbedingungen und Extraktionsmethode kann man Mikrogramm-Mengen der DNA aus einem Gramm des Knochens extrahieren (Hochmeister et al., 1991). Nach Pääbo (1993) und nach meiner gesamten Erfahrung in dieser Arbeit sind nur ein oder wenige intakte Moleküle der DNA im alten Gewebe zu finden.

Die Extraktionsmethode von Lee et al. (1991) und von Scholz und Pusch (1997) wurde weiter benutzt.

Der TH01-DNA-Marker ließ sich aus 150-300 jährigen Knochen mit der Methode, die im Kapitel 3.6.2.4. beschrieben ist, in keinem Fall amplifizieren. Ich versuchte mit der biphasischen PCR die TH01 Amplifikate der 300 jährigen DNA zu bekommen. Auf diese Weise kann man den Effekt von Inhibitoren minimisieren. Die zweite PCR hat hier nämlich ein verbessertes Ratio (DNA-Template/Inhibitoren).

Auch Ruano et al. (1989) und Hummel et al. (1992) hatten bessere Ergebnisse mit biphasischer PCR.

Bestimmte DNA-Extrakte aus alten Knochen brauchen, um positive Amplifikationsergebnisse zu liefern, eine biphasische PCR. Dazu nimmt man nach 35-40 Zyklen eine kleine Menge vom PCR-Produkt für eine neue zweite PCR mit frischem Pufferansatz und wieder mit 35-40 Zyklen (Horai et al., 1989).

Die Zahl der Zyklen kann man reduzieren und die Effizienz der PCR noch erhöhen, wenn man Booster-Verfahren anwendet, wie ich später feststellen konnte.

Nach Erfahrungen in dieser Arbeit liefert aber die Extraktionsmethode von Lee et al. (1991) die qualitativ beste DNA aus Knochen, die jünger als 50 Jahre sind.

Die nach der Lees et al. (1991) Methode gewonnenen 300-jährigen DNA-Extrakte brachten trotzdem keine Amplifikate.

Ionische Detergenzien wie SDS (es wurde bei der Exktraktion von Lee et al. (1991) benutzt.) hemmen die PCR bereits bei Konzentrationen von 0,01% (w/v). Diese inhibitorische Wirkung könnte jedoch durch Zusatz nichtionischer Detergenzien (z.B. 0,5% Tween-20) aufgehoben werden (Mertes et al., 1997).

Auch die Methode (Kapitel 3.3.5.) von Scholz und Pusch (1997) brachte aus den 300 jährigen Knochen keine amplifizierbare DNA.

4.1.6. Leistung der eigenen Extraktionsmethode

Erst die Modifikation der Methode von Scholz und Pusch (1997) ermöglichte die Amplifikation der 300-jährigen und älteren DNA. Die größere Menge an Knochenpulver (1g) und die Einführung der zusätzlichen Reinigungs- und Konzentrierungsschritte war notwendig.

Die modifizierte Extraktionsmethode (Kapitel 3.3.6.) wurde dann für alle weiteren alten Knochen verwendet. Diese Methode benutzt keine Proteinase K, im Gegenteil zu der Methode von Hochmeister et al. (1991) und von Lee et al. (1991). Manche Extrakte enthalten soviel Protein, daß eine einmalige Phenolextraktion nicht ausreicht, um die Nukleinsäuren vollständig zu reinigen. Man könnte dieses Problem durch mehrfaches Wiederholen der Behandlung umgehen, was vermieden werden soll, weil jedes Mischen und Zentrifugieren einen gewissen Anteil der DNA-Moleküle brechen läßt und es immer Verluste an DNA gibt. Statt dessen behandelt man den Extrakt vor der Phenolextraktion mit einer Protease (z.B. Proteinase K). Diese Enzyme bauen die Polypeptide zu kleineren Molekülen ab, die sich mit Phenol leichter entfernen lassen. Durch Zugabe von Proteinase K werden die wasserlöslichen Proteinanteile verdaut, so daß schließlich nur die DNA übrigbleibt. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß die Zugabe von Proteinase K während der Extraktion der DNA aus altem Knochenmaterial nicht nötig ist. Alte Knochenproben in meiner Arbeit haben nie soviel Protein enthalten, daß ich die Phenolextraktion hätte wiederholen müssen. Schließlich verläuft die Proteolyse bekannterweise generell schneller als die Hydrolyse des DNA-Moleküls (Gill et al. 1985, Bär et al. 1988). DNA „überlebt“ besser als nicht-kollagene Proteine der Knochen (Waite et al., 1997).

Wenn man mit hohen Konzentrationen an EDTA und purem Phenol arbeitet, können die Phasen nach der Zentrifugation umgekehrt sein (wässrige Phase unten, Phenol-Phase oben). Dies konnte ich an der leicht bräunlichen Farbe der wässrigen Phase erkennen. Dieses Problem konnte ich mit der Zugabe von sterilem Wasser, um die wässrige Phase weniger dicht zu machen, lösen.

Die Extrakte der DNA aus Knochenmaterial liegen stark verdünnt vor, deshalb ist es wichtig, sich mit den Methoden zur Erhöhung der DNA-Konzentration zu befassen. Ein wesentlicher Schritt ist die Reinigung der extrahierten DNA. Es gibt verschiedene Vorschläge in der Richtung, wie z.B eine Reinigung der DNA über Sucrose-bzw.Cäsium-Chlorid-Gradient (Pääbo, 1989; Bruce et al., 1992), chromatographische Methoden (Williams et al., 1992; Tuross, 1994), verschiedene Fällungsmethoden, Centricon-Konzentratoren. Eine andere Möglichkeit der Konzentrierung des DNA-Extraktes ist die Extraktion mit 2-Butanol (Keller et al., 1989), wie sie z.B. in der Methode von Hochmeister et al. (1991) verwendet wird. Einige methodische Vorschläge wären z. B. etwas zeit- und kostenaufwendig, zu komplex mit dem Risiko, bei allen den Schritten immer wieder etwas von der DNA-Menge zu verlieren.

Thomas et al. (1994) konnten mit Ion-Umtausch-Chromatographie PCR-Inhibitoren aus der extrahierten DNA von 150 Jahre altem Knochen entfernen und den Extrakt mit Centricon-30 konzentrieren.

Gill et al. (1994) haben nach der Extraktion der DNA aus Knochen die Ethanolfällung (30µl Volumen) und anschließend noch die Konzentrierung mit Centricon-30 durchgeführt.

Coquoz und Fridez (1995) haben auch die Reinigung mit Centricon-30 durchgeführt, um das inhibierende Melanin zu beseitigen. Sie bekamen nicht nur keine besseren Ergebnisse, im Filtrat hat sich sogar detektierbare DNA befunden.

Ich habe zwei Möglichkeiten ausprobiert (Kapitel 3.3.6.1.).

Nach Zeugin und Hartley (1985) nimmt die Effizienz der Ethanol-fällung mit sinkender DNA-Konzentration ab. Bei DNA-Konzentrationen $< 1\mu\text{g/ml}$ werden nur 70% der DNA ausgefällt. Diese numerischen Angaben variieren allerdings je nach Literatur. Ich habe mich trotzdem für die Fällung mit 3M Natriumacetat & Ethanol entschieden, weil sie geeignet für geringe DNA-Konzentrationen sind, die Verluste sind am geringsten. Die Fällung erlaubt dazu noch nicht nur Reinigung, sondern auch Konzentrierung des Extraktes.

Nach Higuchi et al. (1988) ist die Ultrafiltration mit Centricon-100 eine echte Alternative zur Ethanol-fällung nach der Phenol-Chloroform-Extraktion, weil bei Fällungen ein Teil von DNA verloren geht. Ich habe außer im Bezug auf Geschwindigkeit keine weiteren Vorteile nach der Verwendung von Centricon-100-Mikrokonzentratoren beobachtet.

Die Ethanol-Präzipitation halte ich im Vergleich zu Centricon-100 als Methode für gleichwertig und viel billiger.

Wenn kleine Mengen der DNA ($< 1\mu\text{g}$) oder sehr verdünnte Lösungen präzipitiert werden, sollte man für die erste Präzipitation dreifache Volumen von absolutem Ethanol benutzen und die anschließende Inkubation auf die ganze Nacht verlängern (Keller et al., 1989). Ich habe hier nur 2,5-fachen Volumen von absolutem Ethanol benutzt und die erste Inkubation bei -20°C von 30 Minuten auf 2 Stunden verlängert. Mit längerer Inkubation habe ich keine Verbesserung beobachtet.

Ein anderer Faktor, der die DNA-Präzipitation beeinflusst, ist die Zentrifugationsdauer.

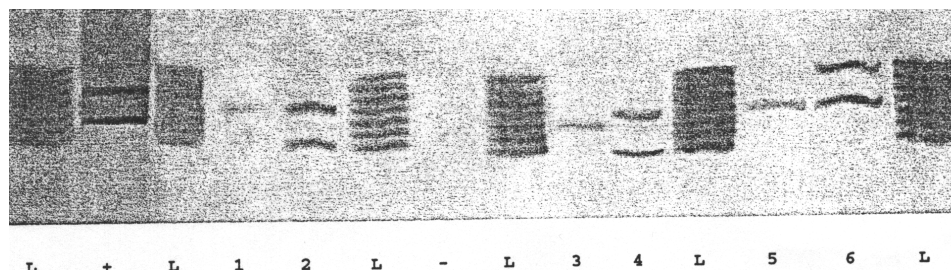
Wenn sie nur 5 Minuten dauert, sind die DNA-Verluste 15-75%. Daher wurde von Gill et al. (1985) die Zentrifugationsdauer auf 25-30 Minuten erhöht. Hier wurde auch 25 Minuten zentrifugiert.

Huminsäuren sind heterogene Mischungen aromatischer Moleküle mit einer Häufung an reaktiven Karboxyl- und Hydroxyl-Gruppen und einem typischen Fluoreszenz-Muster auf dem Agarose-Gel unter dem UV-Licht. Die Tatsache, daß ich nichts derartiges auf dem Agarose-Gel beobachtet habe, läßt vermuten, daß die hier verwendete Reinigungsmethode der DNA-Extrakte zuverlässig ist.

Erst die modifizierte Form (Kapitel 3.3.6.) des Extraktionsverfahrens nach Scholz und Pusch (1997) lieferte aus allen 300-jährigen Knochen (Kapitel 2.3.) amplifizierbare DNA. Die biphasische PCR hat sich als notwendig für die Amplifikation der DNA älter als 150 Jahre gezeigt.

Proben	TH01	FES	F13B	AMG	DYS393
6	6/8	11/12	6/10	Frau	-
7	6/6	10/10	6/6	Frau	-
8	6/6	11/11	8/10	Frau	-
9	7/9.3	8/11	7/10	Frau	-
10	8/9.3	11/14	8/10	Frau	-
11	6/9.3	8/11	9/10	Frau	-

Mit der verwendeten Form biphasischer PCR (Kapitel 3.6.2.6.) hatte ich in den meisten Fällen keine Schwierigkeiten mit Stutter-Banden.

FES**Legende:**

L = Allel-Leiter

- = negative Kontrolle

+ = positive Kontrolle (K562 – Zellen-Linie mit 10a/12 Genotyp)

<i>Spur</i>	<i>Probe</i>	<i>Allel-Typ</i>
1	Caput (300 Jahre alt)	11/11
2	Humerus (300 Jahre alt)	8/11
3	Vertebrae (300 Jahre alt)	10/10
4	Caput (300 Jahre alt)	8/11
5	Caput (300 Jahre alt) – interne Kontrolle	11/11
6	Femur (300 Jahre alt)	11/14

Allgemein können folgende Standardverfahren für die Analyse von PCR-Produkten angewandt werden (Wink et al., 1994):

-Gelelektrophorese

-Restriktionsanalyse

-Hybridisierungsanalyse

-Sequenzierung

-Expression.

STR-PCR-Amplifikate wurden in dieser Arbeit regelmäßig auf den Polyacrylamidgelen nach Silberfärbung visualisiert. Über die Sensitivität der Silberfärbung gegenüber anderen Möglichkeiten habe ich im Kapitel 3.8.3. geschrieben. Außerdem ermöglichen Polyacrylamidgele auch eine Steigerung der Trennqualität. Man kann sowohl denaturierende als auch nicht-denaturierende Gelsysteme verwenden. In nicht-denaturierenden Gelsystemen können Fragmente mit gleicher Länge aber unterschiedlicher Sequenz differenziert werden. Ich benutzte nicht-denaturierende Gele. Auch wegen der hohen Aussagekraft der STR-Systeme erscheint eine „Subtypisierung“ durch Sequenzierung nicht erforderlich, da der damit verbundene analytische Aufwand in keinem Verhältnis zur erwarteten Verbesserung der Aussage stände (Schmitter Hermann, 1997).

Das eigene leistungsfähige Extraktionsverfahren mit zuverlässigen Reinigungsschritten wurde anschließend in dieser Arbeit als einzige Extraktionsmethode verwendet.

4.2. DNA-Typisierung an Knochen aus Schönau und Ellwangen

Das Material wurde im Kapitel 2.4. beschrieben.

Kapitel 3.6.5. stellt die Fragestellung und verwendete PCR-Reaktionen vor.

Die Menge des gelieferten Materials war ungenügend. Ich hatte 50% und weniger der notwendigen Menge (1g) an Material für eine Extraktion und eine STR-Typisierung. Es wäre ein möglicher Grund, vermute ich, weswegen ich nicht alle vier Proben in beiden Markern typisieren konnte.

Grab	Knochenproben		Zähne	
	AMG	TH01	AMG	TH01
Grab Nr.4 Schönau	weiblich	-	weiblich	-
Grab Nr.10 Schönau	-	-	-	-
Grab Nr.9 Schönau	-	-	weiblich	5/5
Grab in Ellwangen	weiblich	7/7	Kein Zahn zur Verfügung	

Die PCR-Produkte bei Amelogenin sind kleiner (Kapitel 3.6.1.) als TH01-Amplifikate. Es gibt somit eine größere Wahrscheinlichkeit, eher Amelogenin-Sequenzen aus altem Knochenmaterial amplifizieren zu können als TH01 oder andere STRs.

Im Fall von Grab Nr.4 bestätigte die Zahnuntersuchung das Geschlechtsergebnis aus Knochenfragment. Die Zähne wurden als Kontrolle der Reproduzierbarkeit eingesetzt, wegen des Mangels an Knochen. Gleichzeitig konnte ich feststellen, daß Zähne noch mehr für die Untersuchung historischer Individuen geeignet sind als Knochen. Es liegt wahrscheinlich an der größeren Härte und kompakteren Struktur des Zahngewebes.

Die Typisierung am Knochenfragment aus Ellwangen war völlig erfolgreich und das auch bei der Hälfte der notwendigen Menge des Knochenpulvers für die Extraktion der DNA.

Es läßt vermuten, daß die Bodenlagerungsbedingungen in Ellwangen wahrscheinlich besser waren als in Schönau oder man hatte gerade das „Glück-Stück“ des Knochens, in dem die DNA besonders gut erhalten war. Nach meinen Erfahrungen gibt es auch innerhalb eines Knochens unhomogene DNA-Erhaltung.

4.3. DNA-Analyse des forensischen Materials

Im Kapitel 2.6. sind drei Proben aus der Gerichtsmedizin Saarland beschrieben.

Die Fragestellung und verwendete PCR-Reaktionen sind im Kapitel 3.6.4. vorgestellt.

Die gelieferte Menge des Materials war sehr unbefriedigend. Pro Extraktion stand 15-50% der benötigten Menge an Material zur Verfügung. Das könnte ein wesentlicher Grund des partiellen Mißerfolges sein.

Proben	AMG	TH01
1. Knochen	weiblich	-
2. Knochen	-	-
3. Mumifizierte Muskulatur	-	-

Probe Nr.1 war eine in gutem Zustand dicke helle Compacta aus dem Kiefer. Die Analyse des TH01 ist offensichtlich an Mangel des Materials gescheitert. 0,5g Knochenpulver reichten nicht.

Probe Nr.2 war ein feuchtes hellbraunes Knochenteilchen, das hart aber sehr dünn war.

Bereits diese Indizien liessen positive Resultate wenig wahrscheinlich erscheinen. Die Menge

von 0,4g Knochenpulver dieser Qualität lieferte weder für Amelogenin- noch für TH01-Typisierung ausreichende Menge der DNA.

Probe Nr.3 war mumifizierte Muskulatur. Ich hatte zwar keine Erfahrungen mit mumifiziertem Gewebe, aber die verfügbare Menge von 0,15g pro Extraktion war sicherlich nicht viel. Hier ist die Analyse nicht nur an Mangel des Materials gescheitert. Die mumifizierte Muskulatur hat schon optisch hinsichtlich ihres Zustandes (wie ein Klümpchen trockenes Bodens) sehr schlechten Eindruck gemacht. Es gibt Berichte, die mumifizierte Gewebe als schwierigeres Ausgangsmaterial als Knochen bezeichnen. Das mumifizierte Weichgewebe enthält durch die Degradation während des Mumifizierungsprozesses mehr inhibitorische Substanzen als Knochen (Cooper , 1992). Die inhibierenden Stoffe sind wahrscheinlich reduzierende Zucker (Pääbo , 1990) oder das Übermaß an mitextrahierter mikrobakterieller DNA (Jeffreys et al., 1992). Sicherlich gibt es aber auch relativ gut erhaltene DNA in mumifiziertem Gewebe. Dies hängt wahrscheinlich von der Art der Mumifizierung ab, wie auch von einer ganzen Reihe von Umwelteinflüssen. Jeffreys (1984) und Pääbo (1985) haben berichtet, daß mummifizierte Gewebe Quelle der klonierbaren DNA sein kann. Allerdings nur sehr kurze Sequenzen können gewonnen werden.

Die Mumifikation menschlicher Leichen war bereits im vorigen Jahrhundert Gegenstand wissenschaftlicher Erörterungen (Toussaint, 1857).

Von praktischer gerichtsmedizinischer Bedeutung ist die sog. natürliche Mumifikation. Erfolgt der Austrocknungsvorgang so schnell, daß Fäulnisprozesse und Madenfraß unterbleiben, spricht man von primärer Mumifikation (Berg, 1975).

Bei der sekundären Mumifikation wird der durch Fäulnis und Madenfraß bedingte Zersetzungsgrad durch Austrocknung fixiert. Unter 5 Stadien der Dekomposition rangiert die Mumifikation an 3. Stelle (Galloway, 1997); es wird unterschieden zwischen Mumifikationen mit einem gewissen Erhalt der inneren Strukturen, Mumifikationen des äußeren Gewebes mit Verlust der inneren Organe durch Autolyse/Fäulnis oder Insektenaktivität sowie Mumifikationen mit Knochenfreilegung. Als extrem kurze Zeiträume der Mumifikation sind 8 bis 10 bzw. 17 Tage angegeben worden (Emson, 1991; Franchini, 1939).

Eine vollständige Mumifikation in mäßig warmer, trockener Umgebung dauert mindestens 3 Monate (Sledzik et al., 1997). Mumifizierung von Leichen wird bevorzugt im Bereich von Luftschächten, Schornsteinen, zugigen Bodenräumen sowie in Wüsten- und hochgelegenen Steppengebieten beobachtet (Strauch, 1928).

Die Kenntnisse über den Vorgang der Mumifikation sind jedoch noch lückenhaft.

4.4. Untersuchung des entarteten Meningeoms des Schädels

Der Schädel mit Meningeom ist im Kapitel 2.7. bildlich dargestellt und beschrieben.

Die Zielsetzung und Interesse an dieser Analyse sind im Kapitel 3.7. vorgestellt.

Die praktisch applizierte DOP-PCR-Methode ist im Kapitel 3.7.2. erklärt.

Nach der Extraktion der DNA wurden mit einigen Proben sogar mehrere (2-12) DOP-PCR hintereinander durchgeführt, leider erfolglos. Deswegen konnte ich nicht die CGH-Analyse (Kapitel 3.7.1.) realisieren.

Die DNA wurde offensichtlich im Tumorbereich des Knochens aus Hohem Mittelalter nicht mehr erhalten. Es liegt sicher nicht am Alter des Knochens. Nach meinen Erfahrungen sind das Alter und die DNA-Erhaltung in keiner linearen Korrelation. Es konnten wie immer

unbekannte starke PCR-Inhibitoren (Kapitel 3.5.4.3.) sein, die man mit BSA nicht beseitigen konnte. Der Test für Inhibition (Kapitel 3.5.4.4.) hat aber gezeigt, daß es nicht an Inhibitoren liegt. Die DNA im Tumorgewebe war vielleicht für die Degradation besonders anfällig oder die Bodenlagerungsbedingungen waren für die DNA-Erhaltung besonders schlecht. Über die DNA-Erhaltung in Knochen und über die Einflüsse vom Boden habe ich in den Kapiteln 1.2.2.2.; 1.2.2.3. geschrieben.

4.5. Kern-DNA-Typisierung an 800 - 5 000 Jahre alten Knochen

An diesem Knochenmaterial (Kapitel 2.5.) wurde die Leistung meines Extraktionsverfahrens (Kapitel 3.3.6.) weiter getestet und die Kern-DNA-STR-Marker amplifiziert.

Die applizierten PCR-Verfahren wurden im Kapitel 3.6.2.7. beschrieben.

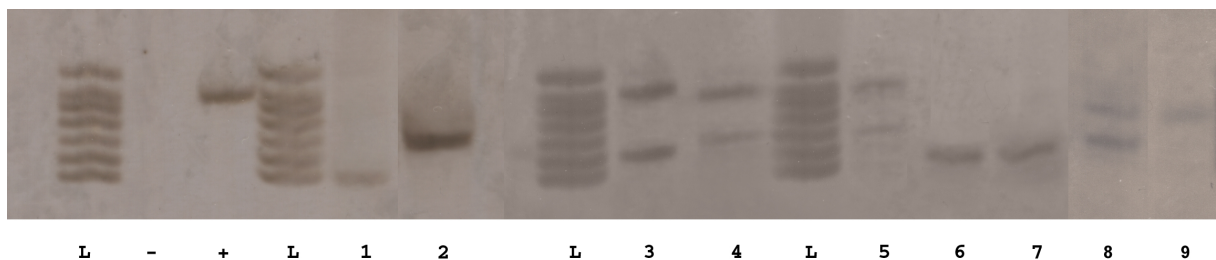
Nach der an den 150-300 jährigen Knochen verwendeten Form biphasischer PCR habe ich in einigen Fällen viel Stutter-Banden beobachtet. Deswegen habe ich die PCR etwas modifiziert. In der ersten PCR wurden regelmäßig nur 15 Zyklen durchgeführt und in der zweiten PCR 35 Zyklen. In jede PCR wurde 0,5µl BSA (10mg/ml) zugegeben und die Annealing- und Elongation-Zeiten um 10-15 Sekunden erhöht.

Der Erfolg bei der Typisierung von autosomalen STR-Marker der Kern-DNA war nur ungefähr 50%-ig.

TH01 Locus war am sensitivsten.

<i>Probe</i>	<i>TH01</i>	<i>VWA</i>	<i>FES</i>	<i>F13B</i>	<i>FGA</i>	<i>CD4</i>	<i>D8S1132</i>
1	5/9.3	15/15	10/10	-	-	-	-
2	8/9	16/18	-	10/10	22/27	-	-
3	6/9.3	-	9/11	-	19/20	-	20/24
4	7/9	-	-	-	-	6/10	17/21
5	-	-	8/11	-	-	5/10	18/20
6	8/8	16/20	-	-	22/24	-	-
7	6/8	-	9/13	-	21/25	-	-
8	6/9	-	-	8/10	21/21	10/10	-
9	6/8	16/18	-	6/8	-	10/11	18/20

TH01



Legende:

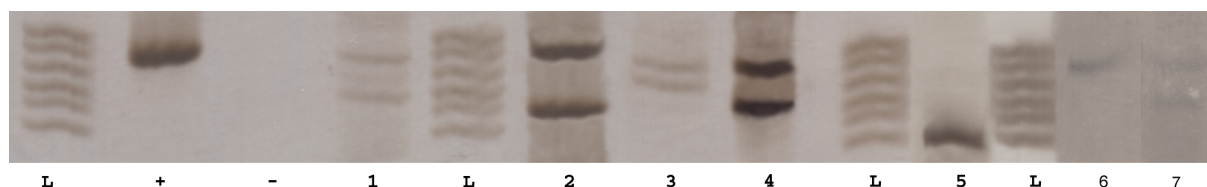
L = Allel-Leiter

- = negative Kontrolle

+ = positive Kontrolle (K562 – Zellen-Linie mit 9.3/9.3 Genotyp)

<i>Spur</i>	Probe	<i>Allel-Typ</i>
1	Zahn (400 Jahre alt)	5/5
2	Knochenfragment aus Ellwangen (300 Jahre alt)	7/7
3	Humerus (300 Jahre alt)	6/9.3
4	Caput (300 Jahre alt)	7/9.3
5	Caput (300 Jahre alt) – interne Kontrolle	7/9.3
6	Vertebrae (300 Jahre alt)	6/6
7	Vertebrae (300 Jahre alt) – interne Kontrolle	6/6
8	Femur (5 000 Jahre alt)	6/8
9	Femur (4 500 Jahre alt)	8/8

F13B



Legende:

L = Allel-Leiter

- = negative Kontrolle

+ = positive Kontrolle (K562 – Zellen-Linie mit 10/10 Genotyp)

<i>Spur</i>	Probe	<i>Allel-Typ</i>
1	Femur (300 Jahre alt)	8/10
2	Caput (300 Jahre alt)	7/10
3	Humerus (300 Jahre alt)	9/10
4	Caput (300 Jahre alt)	8/10
5	Vertebrae (300 Jahre alt)	6/6
6	Femur (800 Jahre alt)	10/10
7	Femur (4 500 Jahre alt)	8/10

Speziell für die aDNA-Analyse gilt, daß das Fehlen des PCR-Produkts oft aus anderen Gründen als die wirkliche Abwesenheit der spezifischen Sequenz verursacht sein kann. PCR kann einfach inhibiert werden (Ansorg et al., 1978; Pääbo, 1990; Cooper, 1992). Ethanol-Präzipitation oder andere Reinigungsmethoden der DNA reichen in bestimmten Fällen nicht, um die inhibierenden Substanzen zu beseitigen.

Pääbo (1988, 1990) empfiehlt zur Beseitigung der Inhibitoren BSA und Verdünnung der Extrakte.

Thomas et al. (1994) sind der Meinung, daß diese Modifikationen die Inhibitoren nur sehr selten überwinden. Sie bevorzugen die Ion-Umtausch-Chromatographie zum Auswaschen der Inhibitoren.

Die Verdünnung des Extraktes hat der PCR der alten DNA in meinen Fällen nicht geholfen. Die Kollision-Frequenz der DNA und der Primer ist damit nämlich reduziert und der Kontakt zwischen beiden Primern erhöht. Das ist günstig für die Primer-Dimer-Ausbildung und für andere Artefakte.

Ich habe in schwierigen Fällen ein Inhibitions-Test durchgeführt (Kapitel 3.5.4.4.). Ich konnte meistens mit der Zugabe von 0,5µl BSA (10mg/ml) in jede PCR die Inhibition überwinden. Albumin bildet Komplexe mit vielen Substanzen wie z.B: Hem, Färbemittel, Fettsäure,...Das BSA von Gibco BRL (molecular biology grade, in 10 mg/ml-Lösung) wurde benutzt. Dieses BSA ist acetyliert, um die Nukleasen und Proteasen zu entfernen. Es gibt eine interessante Studie über den Effekt von unterschiedlichen BSA auf die Amplifikation (Comey et al., 1994).

Oorschot et al. (1994) haben auch positive Amplifikation-Erfahrungen gemacht, wenn sie in den PCR-Ansatz BSA zusätzlich benutzt haben. Sie benutzen seitdem BSA routinemäßig in ihrem Labor.

Schon Hagelberg et al. (1989) und Hochmeister et al. (1991) haben gezeigt, daß BSA unbekannte Inhibitoren der PCR überwinden kann.

Pääbo (1988) hat auch BSA benutzt, um die 7 000-jährigen mtDNA-Sequenzen zu amplifizieren.

Nach Erfahrungen während meiner Arbeit kann ich nur von einem häufigen positiven Einfluß von BSA auf die PCR-Amplifikation alter DNA sprechen. Ich hatte nämlich auch Fälle, in welchen bestimmte inhibitorische Substanzen mit BSA nicht zu überwinden waren. In einigen Fällen gab es keine Inhibitoren. Die Ergebnisse des Testes auf Amplifizierbarkeit (Kapitel 3.5.4.4.) zeigten, daß offensichtlich die starke Degradation der alten DNA zu partiellen Mißerfolgen bei der Amplifikation führte.

An dieser Knochengruppe habe ich festgestellt, daß das Alter eines Knochens für den Erfolg einer DNA-Analyse nicht entscheidend ist. Die DNA aus den jüngsten Knochen in der Gruppe (800 Jahre alt) war am schwierigsten zu typisieren. An den ältesten Knochen dagegen (4 500 und 5 000 Jahre alt) habe ich mit STR-Typisierung mehr Erfolg gehabt. Die Mengen an Material waren diesmal sehr großzügig und für alle notwendige Experimente völlig ausreichend. Alle Proben wurden aus dem Kompakta-Teil der langen Knochen entnommen. Der Zustand der Knochen war optisch sehr gut. Aber das ist, wie ich später bei der Untersuchung an Knochen aus Kirchheim am Ries gesehen habe, kein zufriedenstellender Zeichen, dem man vertrauen kann.

Alte DNA besteht offensichtlich aus einer weit höheren Kopienzahl kurzer als langer Fragmente. Das wird bei der Amplifikation von DNA-Stücken unterschiedlicher Länge sichtbar. Bei längeren Fragmenten ist oft ein schwächeres Amplifikationssignal und damit eine geringere Kopienzahl zu beobachten. Dieses Zeichen ist aber kein Regelfall und kann deshalb nicht als ein Testkriterium für ihre Authentizität eingesetzt werden. In einigen wenigen Fällen habe ich Stutter-Banden beobachten können. Die meisten Stutter-Banden waren ein Repeat (4 Bp) kürzer als die Hauptbande. Was die Intensität der Stutter-Banden gegenüber der Hauptbanden betrifft, kann man keine allgemeine Aussage machen. In einigen Fällen waren die Stutter-Banden sogar von stärkerer Intensität als die richtige Bande.

Die alte DNA ist stark fragmentiert und mehr oder weniger beschädigt. Man betrachtet folglich ein Mosaik von DNA-Stücken, von denen einige nur leicht, andere stärker und wieder andere stark beschädigt sind. Das Ausmaß des Schadens entscheidet, ob und wie gut einzelne Fragmente amplifiziert werden. So kann man davon ausgehen, daß ein beträchtlicher Anteil der DNA-Stücke entweder mit geringer Effizienz oder überhaupt nicht amplifiziert wird. Dies legt z.B. die Beobachtung nahe, daß bei manchen Extrakten nach 40 PCR-Zyklen die Amplifikationsbande schwächer ist als es von einem einzelnen intakten Molekül zu erwarten wäre. Hier scheint die Amplifikationseffizienz durch Basenschäden reduziert.

Das Geschlecht konnte zwar in allen Fällen bestimmt werden (Kapitel 4.7.), aber die autosomale STR-Typisierung der Kern-DNA war nur in der Hälfte der Fälle dieser Untersuchungsgruppe möglich. Teilweise resultiert dies aus der Inhibition (bei 800 jährigen Knochen), meistens aber infolge von Mangel an Qualität und Quantität der DNA in den Knochen.

Ich habe gezeigt, daß die Analyse der Kern-DNA bei den Knochen mit derartiger Liegezeit und mit unterschiedlichsten Bodenlagerungsbedingungen nicht immer möglich ist. Die STR-Typisierung zeigte nur einen 50%-igen Erfolg. Die DNA wird ausgehend von langen Stücken zu immer kürzeren Fragmenten hin zerlegt. Ist die nukleäre DNA allerdings in Bruchstücke unter 150 Basenpaare Länge zerfallen, gelingt gewöhnlich auch mit PCR-Methoden keine Typisierung mehr. Amplifikation der DNA aus gut erhaltenen Proben kann allerdings auch Fragmente bis zu 500 Bp lang liefern (Pääbo et al., 1989). Es wurde eine umgekehrte Relation zwischen der Amplifizierbarkeit und der Länge des amplifizierten Fragments der alten DNA beobachtet. Außerdem gibt es nur zwei Kopien der Kern-DNA pro Zelle.

Daraus leitete sich die Notwendigkeit zur *Analyse der mtDNA* ab (Kapitel 3.10.1.), die schließlich in jeder Körperzelle tausendfach häufiger vorliegt als die Kern-DNA (Kapitel 1.1.3.).

Das bisher übriggebliebene Knochenmaterial wurde erfolgreich für die Suche nach optimalen PCR-Bedingungen der D-Loop-Fragmente (Kapitel 3.10.1.1.) verwendet. Die Entwicklung der mtDNA-Methodik war nämlich notwendig für die Kern-Aufgabe dieser Forschung, für die Verwandtschaftsbestimmung der Individuen aus multiplen Bestattungen. Ich konnte dabei feststellen, daß die mtDNA-Sequenzen aus altem Knochenmaterial auch in den Fällen problemlos zu gewinnen sind, wenn die Analyse der Kern-DNA-Marker nicht mehr möglich ist.

4.6. Humane Herkunft der extrahierten DNA

Forensische Spezialisten beschäftigen sich oft mit der Fragestellung, ob bestimmte sterbliche Überreste menschlicher Herkunft sind.

Es ist oft möglich, dieses morphologisch oder auch histologisch zu beantworten.

In schwierigeren Fällen wurden immunologische Tests herangezogen (Dix et al., 1991; Cattaneo et al., 1992; Guglich et al., 1994; Crouse et al., 1995; Murray et al., 1995).

Die klassischen Methoden für die Spezies-Identifikation basieren meistens auf Protein-Identifikation, entweder mittels Präzipitation, Elektrophorese oder Agglutinationstechniken. Alle diese Methoden sind für alte degradierte Proben ungeeignet, nicht zu sprechen von historischem Knochenmaterial.

Die DNA-Analyse liefert heutzutage die plausibelsten Verifizierungen.

Die Entwicklung der molekularen Biologie ermöglichte z.B., mit Alu-Repeats oder mit Alpha-Satelliten, die Primaten-DNA-Sequenzen zu identifizieren. Müllenbach et al. (1993) beschreiben eine andere Strategie für die Identifizierung von menschlichen oder nicht-menschlichen Geweben nach Langzeitlagerung in schlecht erhaltenem Zustand.

Diese genetischen Marker sind aber für altes Knochenmaterial wegen ihrer kleinen Sensitivität (man braucht einige ng DNA) nicht geeignet.

Marker für Spezies-Identifikation sollten genügend spezies-variabel sein, so daß eine Spezies charakteristische Variante(n) besitzt und daß genügend Homogenität der Variante(n)

innerhalb einer Spezies existiert. Die spezies-spezifische repetitive DNA-Sequenzen haben diese Eigenschaften.

Guglich et al. (1994) haben für die Spezies-Identifikation repetitive spezies-spezifische Satelliten-DNA-Muster benutzt, die nach der Restriktion der gesamten DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen entsteht.

Wie ich schon im Kapitel 3.9. erwähnt habe, hatte ich bei der STR-Typisierung keine Bedenken hinsichtlich der Human-Spezifität der untersuchten Proben.

Die STR-Marker sind mindestens primatspezifisch.

Crouse et al. (1995) haben an 23 Spezies (Primaten, auch nicht-Primaten) neun humane STR-Marker angewendet. Sie haben gezeigt, daß humane STR-Primer bei nicht-Primaten-DNA keine komplementäre Sequenz finden. Die STR-Amplifikate sind nur bei Primaten entstanden. Bei den meisten STRs liegen die PCR-Produkte der Primaten-DNA außerhalb des humanen Allel-Leiters, so daß keine Allelbestimmung möglich ist.

Locus TH01 läßt sich anhand geringer DNA-Mengen (0,01 – 10 ng), aus einer Reihe forensischer Proben menschlichen Ursprungs extrahiert und mittels PCR, horizontaler Polyacrylamidgele und Silberfärbung verläßlich detektieren. Es wurde gezeigt, daß seine Primer, mit Ausnahme von zwei höherer Primaten (Gorilla, Schimpanze), humanspezifisch sind (Oorschot et al., 1994).

Der Human-DNA-Test war nötig, vor allem wegen der Ähnlichkeit des mtDNA-Genoms menschlicher Zellen mit prokaryotischen Genomen.

Bataille et al. (1999) haben dazu eine interessante Methode präsentiert. Anhand der phylogenetisch polymorphen Cytochrom b-Gen-Region (309 Bp) kann man Spezies unterscheiden (Barallon, 1998). Das amplifizierte 259 Bp lange Fragment des D-Loops bewies die humane Herkunft der Probe. Die menschlichen Proben ergeben auf dem Agarose-Gel zwei Banden (259 Bp und 309 Bp) und die nicht-humanen Proben von Säugetieren nur eine Bande (309 Bp).

Die D-Loop-Region hat eine Substitution-Rate um $4,7 \times 10^{-8}$ pro Stelle und Jahr (Brown et al., 1982) und so trägt sie große Mengen an Sequenz-Divergenz zwischen unterschiedlichen Spezies.

Cronin et al. (1991) haben auch mtDNA für die Spezies-Identifikation benutzt.

Intraspezifische Variationen der mtDNA können bei eng verwandten Spezies problematisch werden. Das kann z. B. vorteilhaft bei der Identifikation der geographischen Abstammung einer Probe sein.

Das hier verwendete 120 Bp lange Fragment der mtDNA ist allerdings nicht nur humanspezifisch, sondern auch kurz genug, um in sehr altem Knochenmaterial intakt zu bleiben.

Ein negatives Ergebnis kann hier die Abwesenheit der menschlichen DNA oder einfach die Abwesenheit der DNA im Material überhaupt bedeuten. Das ist vielleicht ein kleiner Nachteil gegenüber der Methodik, die von Bataille et al. (1999) beschrieben wurde.

Die extrahierte DNA aus allen Knochenproben (150 - 300, 800 - 5 000 Jahre alt, Knochenproben aus Kirchheim am Ries und aus Niederstotzingen) wurde auf ihre Human-Spezifität untersucht. Das angewendete Verfahren ist im Kapitel 3.9. beschrieben. In allen Fällen habe ich problemlos mit einfachem PCR-Mix und mit einer einzigen PCR-Reaktion das 120 Bp lange humanspezifische mtDNA-Fragment amplifiziert. Keine einzige Zusatzbande wurde beobachtet. Mit diesen Ergebnissen habe ich zuverlässig die humane Spezifität der isolierten DNA aus meinem ganzen Knochenmaterial bewiesen.

4.7. Molekularbiologische Geschlechtstypisierung an altem Skelettmaterial

Die STR-Geschlechtsmarker und ihre Anwendung habe ich in den Kapiteln 1.1.2.3. beschrieben.

In Fällen von 150-300 jährigen Knochen (Kapitel 3.6.2.6.) habe ich für die Geschlechtstypisierung außer Amelogenin DYS393 Locus benutzt.

Alle Proben waren weiblich (Kapitel 4.1.6.).

Der Locus DYS393 habe ich aber bei allen weiteren Untersuchungen mit DYS390 umgetauscht. DYS393 gibt nämlich ein positives Signal bei weiblichem DNA-Material unter relativ niedrigeren Stringenz-Bedingungen der PCR (Gusmao et al., 1999).

Die DYS390-Sequenzen sind etwas kürzer (108-132 Bp) als die von DYS393 (191-227 Bp) und deswegen geeigneter für alte DNA, und DYS390 ist doppelt so polymorph als DYS393 (Kayser et al., 1997). Z.B. Locus DYS19 ist zwar auch sehr polymorph wie DYS390 und sogar um 17 Bp kürzer, aber kann nicht reamplifiziert werden. Schon nach wenigen Reamplifikationszyklen erscheinen viele Stutter-Banden (Gusmao et al., 1999).

Bei der Amplifikation und Reamplifikation von DYS390 habe ich wie auch Gusmao et al. (1999) keine Artefakte beobachtet.

Der Polymorphismus auf dem Y-Chromosom ist deutlich kleiner als auf allen anderen Chromosomen und sogar mehr begrenzend ist die Entdeckung, daß auf vielen von diesen polymorphen Stellen häufig Mutationen vorkommen (Mitchell R.J., 1996).

Es ist bekannt, daß Y-Chromosomensequenzen stark populationspezifisch (Jobling et al., 1997) sind, was umfangreiche Populationstudien für die Y-Datenbank benötigt.

Die Population-Dynamik der männlichen Trägersubstanzen des Y-Chromosoms ist different von der der weiblichen, was die Predisposition des genetischen Driftes erhöht (Santos et al., 1996). Für die Allel-Frequenzen-Rechnung braucht man die Untersuchung an breiter regionaler Population. Da Y-Systeme aber nicht unabhängig voneinander vererbt werden, sind bei der statistischen Auswertung weniger die einzelnen Allelhäufigkeiten, sondern vielmehr die Haplotypfrequenzen von Bedeutung.

Die Y-chromosomalen STRs stellen aufgrund ihres rein väterlichen, hemizygoten Erbganges sehr effektive Werkzeuge dar, die in der Paternitäts-, Spurenanalyse und bei der Geschlechtsbestimmung eingesetzt werden können.

Die Anwendung der Y-STRs für die Paternitäts-Analyse ist auf 50% der Fälle reduziert, bei der das getestete Kind männlich ist. Die Y-Marker bieten sich vor allem, wenn der Vater fehlt (z.B. verstorben). Da können die Vaterschaftsbestimmung die männlichen Verwandten des z.B. verstorbenen Vaters ermöglichen. Man sieht die Ähnlichkeit mit der mtDNA, mit der man die Verwandtschaft mütterlicherseits bestimmen kann.

Um Fehlinterpretationen auszuschließen (keine Amplifikation Y-Markers kann sowohl auf ungenügende Qualität/Quantität der DNA, als auch auf weibliche DNA hindeuten), wurde in dieser Arbeit das Amelogenin-System untersucht, das mit ein und dem selben Primerpaar ein monomorphes Fragment auf dem X-Chromosom amplifiziert (weiblich) und zwei Fragmente beim Mann, nämlich wiederum ein monomorphes auf dem X-Chromosom und ein zweites, längeres auf dem Y-Chromosom. Während die Sequenz auf dem Y-Chromosom 112 Bp umfaßt, liegt die Sequenz auf dem X-Chromosom mit einer 6-Bp-Deletion als 106 Bp langer Abschnitt vor (Nakahori, 1991). Die Typisierung mit Amelogenin zulässt zwar eine Unterscheidung zwischen männlicher und weiblicher DNA, aber keine weitere Individualisierung. Die Amelogenin-Sequenzen sind relativ kurz, man kann deswegen auch die stark degradierte DNA typisieren. Die Untersuchung nur von Amelogenin-Gens benutzten auch Gill et al. (1994) zur Geschlechtstypisierung an dem nah zu Ekaterinburg (Russia) gefundenen Skelettmaterial der Romanov-Familie.

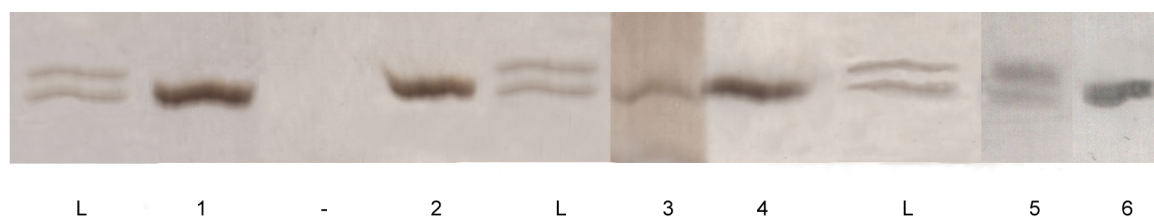
Ich habe in allen Fällen (800-5 000 jährige Knochen, Knochen aus Kirchheim am Ries und aus Niederstotzingen) das Geschlecht mit Amelogenin und DYS390 erfolgreich typisiert.

<i>Probe</i>	<i>Amelogenin</i>	<i>DYS390</i>
1 (800 Jahre alt)	weiblich	-
2 (800 Jahre alt)	weiblich	-
3 (800 Jahre alt)	weiblich	-
4 (1 400 Jahre alt)	weiblich	-
5 (4 500 Jahre alt)	weiblich	-
6 (4 500 Jahre alt)	weiblich	-
7 (4 500 Jahre alt)	weiblich	-
8 (4 500 Jahre alt)	weiblich	-
9 (5 000 Jahre alt)	männlich	21

Außer der einzigen Probe (Probe Nr.9 in diesem Kapitel) waren alle anderen Proben weiblich. Das war etwas beunruhigend, bis ich auf den 5 000 Jahre alten Knochen eines Mannes gestoßen bin. Bei weiteren Untersuchungen (Gräber in Kirchheim am Ries und in Niederstotzingen) wurden sogar einige Männer typisiert.

Unabhängig von der simplen oder der biphasischen PCR kann nämlich eine von zwei Allelen nicht amplifiziert werden. Wenn nur die 112 Bp Allele amplifiziert wird, ist die Geschlechtsbestimmung nicht beeinträchtigt. Wenn nur die 106 Bp Allele amplifiziert wurde, konnte die größere Allele einfach nicht amplifiziert werden. Um solches Risiko zu reduzieren, habe ich die Geschlechtsbestimmung immer wiederholt und zusätzlich auch ein Y-spezifisches Marker DYS390 untersucht. Läßt sich ein Y-chromosomales Merkmal nachweisen, ist der Spurenverursacher männlich. Es scheint unwahrscheinlich, daß die Y-chromosomal spezifischen Sequenzen, die in einem weiblichen Genom mit der Probabilität 1:3 000 vorkommen (Cooke et al., 1979), falsch positive Ergebnisse produzieren.

Amelogenin

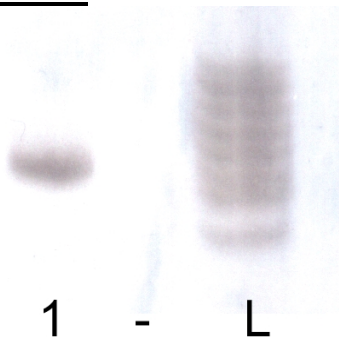


Legende:

L = Leiter (männlich)

- = negative Kontrolle

<i>Spur</i>	<i>Probe</i>	<i>Geschlecht</i>
1	Humerus (300 Jahre alt)	weiblich
2	Caput (300 Jahre alt)	weiblich
3	Vertebrae (300 Jahre alt)	weiblich
4	Femur (300 Jahre alt)	weiblich
5	Femur (5 000 Jahre alt)	männlich
6	Femur (4 500 Jahre alt)	weiblich

DYS390

„5 000 Jahre altes Individuum“ liefert im DYS390-System positives Signal.

Die Anthropologen bestimmen *meistens relativ* einfach das Geschlecht eines vollständigen adulten Skelettes, aber mit den Kinderskeletten geht es nicht. Die Kinder haben nämlich noch nicht die Unterschiede des Pelvis-Knochens entwickelt. Es gibt aber auch unkomplette adulte Skelette und intermediäre Skelettypen, bei denen eine morphologische Geschlechtsbestimmung schwierig sein kann. Eine sichere Geschlechtszuordnung ist mittels DNA möglich.

Skelette aus Gräbern von Kirchheim am Ries

Individuum	MORPHOLOGIE		<u>DNA</u>	AMG	DYS390
81	männlich		männlich	männlich	22
87	männlich		männlich	männlich	22
88	weiblich		weiblich	weiblich	-
279	weiblich		weiblich	weiblich	-
282	? Kind		<i>weiblich</i>	weiblich	-
286	? Kind		<i>männlich</i>	männlich	22
289	männlich		<i>weiblich</i>	weiblich	-

Die PCR-Bedingungen sind im Kapitel 3.6.2.8. beschrieben.

Skelette aus einem alamannischen Adelsgrab in Niederstotzingen

Individuum	MORPHOLOGIE		<u>DNA</u>	AMG	DYS390
3a	männlich		männlich	männlich	18
3b	männlich		männlich	männlich	24
3c	männlich		weiblich	weiblich	-

Die PCR-Bedingungen sind im Kapitel 3.6.2.9. beschrieben.

Es war möglich, in allen untersuchten Fällen aus Kirchheim am Ries und aus Niederstotzingen das Geschlecht zu bestimmen. Die DNA-Ergebnisse waren alle reproduzierbar. Die Ergebnisse der DNA-Analyse stimmen mit der morphologischen Typisierung nicht ganz überein.

3c-Person (Kapitel 4.6.2.1.) ist zum Beispiel kein Mann, sondern eine Frau, die genauso wie die zwei Männer (3a, 3b) mit Waffen bestattet ist. Diese Entdeckung ist mit Sicherheit

für archäologische, anthropologische Studien historischer Populationen äußerst interessant. ***Die Ergebnisse zeigen, daß die molekularbiologische Geschlechtsbestimmung ein überlegenes Verfahren gegenüber Archäologie und Morphologie ist.***

Wenn die Y-Bande beim Amelogenin nicht zu sehen ist und nach morphologischer Geschlechtsbestimmung ein Mann zu erwarten ist (wie z. B. im Fall 289 von Kirchheim am Ries und im Fall 3c von Niederstotzingen), muß man über zwei Gründe nachdenken:

1. „allelic drop-out“
2. Deletion des Amelogenin-Gens auf dem Y-Chromosom

Lassen et al. (1996) versuchten die partielle Nicht-Amplifikation mit der Verwendung von drei Primern (mit einem gemeinsamen und zwei allel-spezifischen Primern in einer Reaktion) zu überwinden. Sie sind allerdings zum Schluß gekommen, daß das Verfahren einerseits sehr kompliziert ist. Andererseits die Amplifikationsfähigkeit für solche langen Fragmente (218 Bp für Y-chromosomale Sequenz, 330 Bp für X-chromosomale Sequenz) bei alter DNA sehr reduziert ist.

Man kann spekulieren, daß das Y-Amelogenin-Gen bei einem Individuum deletiert wurde. In ganzer Welt-Population ist die Frequenz für derartigen Deletion-Polymorphismus 0,6% (Santos et al., 1998). Wenn auch die Allel-Frequenzen der historischen Populationen unbekannt sind, ist diese Deletion als Ursache eher unwahrscheinlich.

Untersuchungen von Kayser et al., (1997) lassen vermuten, daß die Mutationsrate für Y-chromosomale Loci ähnlich der für die autosomalen Loci ist.

Die zytogenetischen Analysen haben gezeigt, daß die heterochromosomale Region des langen Y-chromosomalen Armes eine erhöhte Länge-Fluktuation zeigt. Das läßt sich erklären durch die erhöhte Frequenz des Schwester-Chromatiden-Austausches bei repetitiver DNA und durch den Mangel an chromosomaler Paarung während der Meiose (Vogel et al., 1986). Kayser et al. (1997) haben z. B. zwei Individuen jeweils mit zwei Allelen für DYS19 Locus, ein Individuum mit zwei Allelen im DYS390 System und eine Triplikation der Allelen im DYS385. In hier präsentierten Untersuchungen kam ein solches Ereignis nicht vor.

Einige molekulare Methoden der Geschlechtstypisierung wurden für medizinische und forensische Zwecke entwickelt (Aasen et al., 1990; Akane et al., 1992; Cui et al., 1994; Ebensperger et al., 1989; Handyside et al., 1990; Kogan et al., 1987; Nakahori et al., 1991; Norby et al., 1992; Witt et al., 1989). Diese Methoden sind zum großen Teil für alte DNA ungeeignet. Einige benötigen die Amplifikation der Fragmente, die viel zu lang sind und die man aus altem Knochenmaterial nicht erhalten kann.

Fattorini et al. (1993) haben die X- und Y-spezifischen α -Satelliten aus alten Knochen versucht zu amplifizieren. Es ist ihnen bei einigen 10 bis 12 jährigen Knochen nicht gelungen.

Die α -Satelliten sind wahrscheinlich zu groß für die Untersuchung der älteren DNA. Andere Methoden verlassen sich in ihrer Geschlechtsbestimmung auf die Anwesenheit oder Abwesenheit des Y-spezifischen Produktes, z. B. PCR-Amplifikation der alphoiden Sequenzen auf dem Y-Chromosom (Honda, 1990; Hummel et al., 1991, 1993).

Die Anwesenheit des PCR-Produktes der alphoiden Sequenzen deutet auf das männliche Geschlecht, aber kein PCR-Produkt zeigt nicht unbedingt das weibliche Geschlecht. Es kann sich einfach um eine niedrige Qualität oder Quantität der DNA oder um Inhibitoren handeln. Beides kommt bei der alten DNA häufig vor. Es ist notwendig, Proben, die kein PCR-Signal aufweisen, mit einem weiteren Primersystem zu untersuchen, um den Nachweis über das grundsätzliche Vorhandensein amplifikationsfähiger alter DNA (aDNA) im Extrakt zu führen.

Die Geschlechtstypisierung an Leichenteilen, an juvenilen skelettierten Leichen, deren äußerer Betrachtung allein keine sichere Sexualdiagnose ermöglicht, aber auch an alten Skeletten, kann heute mit molekulargenetischen Methoden durchgeführt werden.

4.8. Verwandtschaftsbestimmung an Skeletten aus multiplen Bestattungen in Kirchheim am Ries und in Niederstotzingen

Skelette aus Gräbern von Kirchheim am Ries

Die Gräber von Kirchheim am Ries und die Knochenproben sind im Kapitel 2.8. beschrieben.

Die Knochen aus Kirchheim am Ries waren zwar nur 1 200 – 1 400 Jahre alt, aber sie waren erheblich schwieriger zu typisieren als die älteren (4 500 – 5 000 Jahre alt), vorher untersuchten Knochen (Kapitel 2.5.).

Die genaue Beschreibung von STR-PCR-Amplifikationen befindet sich im Kapitel 3.6.2.8.

Die Knochen waren zum Teil extrem hart (wie Elfenbein) mit grünlichen und gelbbräunlichen Verfärbungen. Bei diesem schwierigen Knochenmaterial habe ich doch einen Erfolg erzielt und zwar mit einem feineren Verfahren als bisher, mit sog. Booster-PCR (Kapitel 3.5.5.2.).

Ich habe in jeder ersten PCR (10-15 Zyklen) um 20% weniger des Primer-Mixes verwendet. Dabei ist die Primer-Konzentration nicht leicht zu schätzen, da sie im fertigen Kit nicht präzise angegeben ist. In der ersten PCR wurde die Annealing-Temperatur um 1-2°C niedriger als es in der Kit-Einleitung steht (ausgenommen Amelogenin und DYS390). In beiden PCR wurden regelmäßig zusätzlich 0,5µl BSA (10mg/ml) und um 0,25U mehr an Taq-Polymerase pro PCR-Ansatz (25µl) benutzt.

In den zweiten PCR-Reaktionen habe ich zusätzlich Magnesiumchlorid zugegeben, so daß die Endkonzentration im PCR-Ansatz um 0,25mM höher wurde. Die zweite PCR bestand immer aus 35 Zyklen. Die Zeiten für Denaturation, Annealing und Elongation wurden regelmäßig um einige Sekunden (bis zu 1 Minute) erhöht.

Mit diesen Modifikationen der PCR-Programme und der Zusammensetzung der PCR-Ansätze konnte ich mit einer Ausnahme in allen Fällen die STR-Marker amplifizieren und auswerten.

STR -Kern – DNA – Analyse

Grab	CD4	FES	F13B	FGA	TH01	VWA	D8S1132
81	10/10	11/13	10/11	26/29	6/?	16/18	22/22
87	6/10	10/11	7/10	26/29	8/9.3	16/18	17/22
88	5/10	10/11	8/10	24/26	6/9.3	14/18	19/23
279	6/10	9/13	7/10	20/26	8/9.3	15/17	20/22
282	6/10	8/13	8/10	20/27	6/9.3	17/21	16/22
286	6/10	11/13	10/10	22/26	7/9.3	17/17	19/22
289	10/10	10/13	8/10	22/27	8/9.3	17/19	17/22

Analyse des D-Loops der mitochondrialen DNA

Grab	Position 16356	Position 16358	Position 72	Position 73	Position 195	Position 499
81	C	-	-	G	C	A
87	C	-	-	G	C	A
88	C	-	-	G	C	A
279	-	G	C	-	-	-
282	C	-	-	G	C	A
286	-	G	C	-	-	-
289	C	-	-	G	C	A

MtDNA-Sequenz-Unterschiede zur Referenzsequenz von Anderson (1981)

Interpretation der Ergebnisse:

Die mtDNA-Analyse zeigt (und die Kern-DNA-Typisierung unterstützt es), daß die Frau 279 mit signifikanter Wahrscheinlichkeit Mutter des Kindes 286 ist. Diese Frau und ihr Kind sind mit den anderen 5 untersuchten Personen nicht mütterlich verwandt.

Die restlichen 5 Personen haben eine identische D-loop Sequenz, mit identischen Unterschieden zu der Referenz-Sequenz von Anderson. Sie sind mit hoher Wahrscheinlichkeit alle 5 mütterlicherseits verwandt. In welcher mütterlichen Beziehung die Personen 81, 87, 88, 289 genau stehen (Brüder, Schwestern, Cousins, Cousinen, Tante, Nichte,...) kann man aus den vorliegenden Daten nicht präzise sagen.

Nach den STR-Ergebnissen sind die Männer 81, 87 sehr wahrscheinlich nicht Väter der Kinder 282, 286. Die Frau 289 und auch die Frau 88 kann nach der mtDNA-Sequenz die Mutter des Kindes 282 sein. Die STR Ergebnisse schliessen diese Mutterschaft aber für die Frau 88 aus. Demzufolge ist mit höherer Wahrscheinlichkeit die Frau 289 die Mutter des Kindes 282.

Es ist sehr schwierig eine statistische Möglichkeit der Verwandtschaft historischer Individuen zu berechnen. Es gibt keine Daten über Allel-Frequenzen in alten Populationen. Dafür müßte man dann Allel-Frequenzen der modernen Population verwenden (siehe schriftliche Einleitung zu den Loci in ihren Kits). Es ist sehr wahrscheinlich, daß die alten Populationen sehr klein waren und die Allel-Frequenzen von STRs wegen des zufälligen genetischen Driftes fluktuiert haben. Nach der statistischen Konsultation mit Biostatistischem Zentrum in Bonn muß ich in der Zukunft deutlich mehr Marker untersuchen, um mathematisch hochsignifikante Verwandtschaftsaussagen machen zu können.

Skelette aus einem alamannischen Adelsgrab in Niederstotzingen

Niederstotzingen, die Gräber von Niederstotzingen und das in dieser Arbeit untersuchte Grab Nr.3 sind im Kapitel 2.9. beschrieben.

Die Knochen aus Niederstotzingen stammen aus der Zeit der Merovinger, wie die Knochen aus Kirchheim am Ries. Sie sind also auch ungefähr 1 200 bis 1 400 Jahre alt.

Die PCR-Reaktionen mußten wieder speziell für diese Knochen-Gruppe optimiert werden. Die bisher verwendeten PCR-Verfahren, die z. B. an den Proben aus Kirchheim am Ries funktioniert haben, waren nicht auf die DNA-Proben aus Niederstotzingen übertragbar. Dieses Knochenmaterial war ähnlich schwierig molekularbiologisch zu untersuchen wie

das von Kirchheim am Ries. Die genaue Beschreibung von STR-PCR-Reaktionen befindet sich im Kapitel 3.6.2.9..

Im Prinzip war wieder die Booster-PCR (Kapitel 3.5.5.2.) die Methode der Wahl. In jeden PCR Ansatz habe ich regelmäßig 0,5 µl BSA (10 mg/ml) zugegeben. Die ersten PCR-Reaktionen hatten 15-20 Zyklen und die zweiten Amplifikationen 35 Zyklen. Diesmal wurden in den ersten PCRs völlig stringente Bedingungen benutzt. Dagegen war in den zweiten PCRs die Annealing-Temperatur während 10-15 Zyklen oder während aller 35 Zyklen um 1°C niedriger. Die Stringenz wurde bei der Analyse von Amelogenin und DYS390 niemals verändert. In den meisten Fällen (außer FGA, AMG, DYS390) habe ich in der ersten PCR die Konzentration von Magnesiumchlorid erhöht, so daß die Endkonzentration im PCR-Ansatz 1,75 - 2,0 mM war. Die Konzentration der Taq-Polymerase wurde in allen Fällen und in beiden PCR erhöht. In den ersten PCR benutzte ich um 0,75U mehr Taq-Polymerase, in den zweiten PCR um 0,5U mehr. Die Zeiten für Denaturation, Annealing und Elongation wurden wieder um einige Sekunden (bis zu 1 Minute) erhöht.

Auf diese Art und Weise war es möglich, die STR-Marker aller drei Individuen erfolgreich zu amplifizieren und auszuwerten.

STR – Kern – DNA - Analyse

<i>Individuum</i>	<i>CD4</i>	<i>FES</i>	<i>F13B</i>	<i>FGA</i>	<i>TH01</i>	<i>VWA</i>	<i>D8S1132</i>
3a	10/13	11/11	8/10	21/29	9/9.3	14/15	20/24
3b	6/10	10/11	8/11	19/29	8/11	14/15	20/22
3c	6/10	10/11	8/10	20/29	9/9.3	15/15	18/24

Analyse des D-Loops der mitochondrialen DNA

<i>Individuum</i>	<i>Position 16 356</i>	<i>Position 72</i>	<i>Position 499</i>	<i>Position 527</i>
3a	-	C	A	G
3b	C	C	A	G
3c	C	C	A	G

MtDNA-Sequenz-Unterschiede zur Referenzsequenz von Anderson (1981)

Interpretation der Ergebnisse:

Die Personen 3b und 3c sind mütterlich verwandt. Der Mann 3b ist offensichtlich nicht der Vater der Frau 3c. Der Mann 3b könnte sehr wahrscheinlich Onkel oder Cousin (mütterlicherseits) von der Frau 3c sein. Nach der Art und Weise wie sie im Grab liegen könnten 3b und 3c eine besondere Beziehung haben. Die Männer 3a, 3b sind weder mütterlicher- noch väterlicherseits verwandt. Es ist aber hoch wahrscheinlich, daß der junge Mann 3a den gleichen Vater haben könnte wie die junge Frau 3c (uneheliche Geschwister).

PCR – Amplifikation der alten DNA und PCR-Artefakte

Bei den üblicherweise wenigen Molekülen in einer aDNA Präparation führt eine Routine-PCR (wie z.B. bei Blut-Spuren,...) zu keinen Ergebnissen. Die geeigneten PCR-Strategien für die alte DNA habe ich im Kapitel 3.5.5. vorgestellt. Im Vergleich zur Nested-PCR ist die Effizienz der PEP-Methode (primer-extension-preamplification)

zur Sensitivitätssteigerung geringer, da der Preamplifikationsschritt nicht locuspezifisch erfolgt. Nach der heute verfügbaren Literatur sind Booster-PCR und Nested-PCR die Methoden der Wahl für die Amplifikation der alten DNA. Ich habe mich für die *Booster-PCR* entschieden.

Das Hauptproblem der Nested-PCR ist die präferentielle Amplifikation (Kapitel 3.5.4.6.).

Es ist sehr wahrscheinlich, daß die zweite PCR die Disparität der ungleichen Mengen an kurzem und längerem Produkt noch erhöhen wird. Die Konsequenz ist dann „allelic drop-out“ und falsche Typisierungsergebnisse (Schmitt et al., 1994).

Lassen et al. (1996) hält auch die Booster-PCR für die Analyse der alten DNA aus Knochen für die bessere Methode als die Nested-PCR.

Die PCR-Reaktionen wurden in meiner Forschung in Singleplex-Ansätzen durchgeführt, da Singleplex-Ansätze eine höhere Nachweisempfindlichkeit besitzen (Kayser, 1997). Multiplex-PCR-Methoden haben den Vorteil, daß durch die kombinierte Amplifikation mehrerer Loci die Arbeitsabläufe zeitökonomischer und kostengünstiger gestaltet werden können. Ein wesentlicher Nachteil ist die geringere Nachweissensitivität (Limit ca. 1 ng Template-DNA) und das erhöhte Artefaktisiko in Form von Zusatzbanden und präferentieller Amplifikation bis zum „Locus drop-out“ (Lygo et al., 1994). Auch aus diesen Gründen habe ich mit einzelnen STRs gearbeitet.

Die Qualität der extrahierten DNA und der Anteil an fremder DNA haben entscheidenden Einfluß auf PCR-Artefakte (Nebenprodukte).

Durch die Methode selbst können Kunstprodukte entstehen (z. B. Doppelungsmuster, Stutter Bands).

Die Amplifikation der DNA mittels der PCR-Technik kann wesentlich schneller und zuverlässiger in vitro durchgeführt werden als mit der klassischen Technik der Klonierung.

Im Gegensatz zur molekularen Klonierung ergibt sich aber ein Nachteil der PCR.

Wie alle biochemischen Prozesse verläuft die DNA-Replikation in der Zelle nicht fehlerfrei. Bisweilen fügt die DNA-Polymerase ein falsches Nukleotid an die wachsende DNA-Kette an. Die Rate dieses Fehleinbaus, gemessen in einem natürlich replizierten DNA-Molekül, beträgt etwa 1 von 10^9 Nukleotiden. Die in vivo DNA-Replikation wird von der Zelle sehr sorgfältig auf den Einbau falscher Basen hin geprüft, um einer Entstehung von Mutationen entgegenzusteuern. In vitro besitzt die in der PCR benutzte Taq-DNA-Polymerase diese 3'-5'-Exonukleaseaktivität des „Korrekturlesens“ nicht.

Fehler können bei der PCR-Reaktion durch die Nuklease-Funktion der Polymerasen oder durch das Anhängen zusätzlicher Nukleotide eintreten. Bei der Wahl einer falschen Temperatur kann es zu gefährlichen Nebenreaktionen kommen.

Durch Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten wurde ermittelt, daß bei einer PCR von 20 Zyklen ca. 1 Nukleotid pro 700 neu synthetisierten Basen falsch eingebaut wird.

Das entspricht einer Fehlerhäufigkeit von 0,25%. Hauptsächlich treten Basenaustausche, bevorzugt Cytosin gegen Thymin, auf, Deletionen oder Insertionen einer Base kommen sehr selten, komplexere Mutationen gar nicht vor.

Die Berichte über die Fehlerabschätzung der Taq-DNA-Polymerase schwanken zwischen 1/5600 und ca. 1/83000 Fehleinbauten pro eingebautem Nukleotid pro Zyklus.

Bei den für die PCR-Methode typischen Temperaturen und Salzkonzentrationen baut das Enzym etwa alle 2×10^4 Nukleotide ein falsches Nukleotid ein. Das ist bei einer Massenanalyse von PCR-Produkten kein schwerwiegender Nachteil, da Moleküle mit demselben falsch eingebauten Nukleotid nur einen sehr kleinen Anteil an der Gesamtzahl der synthetisierten Moleküle bilden. Der Fehleinbau wirkt sich jedoch aus, wenn PCR-Fragmente für eine Klonierung verwendet werden sollen.

Ein Fehler in einer bestimmten Sequenz-Position eines DNA-Templates kann bei der PCR durch andere DNA-Templates storniert werden. Die Klonierung neigt mehr daraus folgende Fehler zu machen. Jeder Klon entsteht nämlich aus einem einzigen vervielfältigten Molekül. Dieses Problem kann man verringern, wenn man die PCR mit einer großen statt mit einer kleinen Anzahl Matrizenmoleküle beginnt. Das geht bei alter DNA als Matrize nicht.

Mit zunehmender Zyklenzahl steigt auch die Gesamtzahl der Polymerisationsfehler durch die Taq-Polymerase, da sich jeder Fehler in den Folgegenerationen manifestiert. Da die Wahrscheinlichkeit, mit der eine falsche Base eingebaut wird, sinkt, wenn weniger Enzymmoleküle im Ansatz vorliegen, empfiehlt es sich, die Menge an eingesetztem Enzym auf niedrige Konzentrationen hin zu optimieren. Auch die Annealing- sowie Extensionszeiten sollten deshalb reduziert werden.

Bei nicht-optimierten PCR-Bedingungen treten insbesondere bei alten Knochen mit hochdegradierter oder kontaminierter DNA, die auch nach aufwendigen Extraktionsverfahren nur unzureichend aufgereinigt werden können, häufig Zusatzbanden, Schattenbanden (sog. Slippage-Banden) oder Ladder-Banden auf.

Auch nach Systemoptimierung können noch PCR-Artefakte entstehen, bedingt durch Polymerasefehler und stark degradierte modifizierte alte DNA. Bei hochdegradierter alter DNA entstehen Nukleotid-DNA-Modifikationen durch Oxidation von Pyrimidinen und intermolekulare Austauschprozesse (Pääbo, 1989). Solche Reaktionsbedingungen können nicht nur zu Zusatzbanden oder Polymeraseinhibierung führen, sondern auch zu Musterveränderungen.

Der wesentliche Nachteil ist, daß aufgrund der hohen Empfindlichkeit selbst die geringste Kontamination zu falschen positiven Ergebnissen führen kann. Im Labor selbst können durch Kontaminationen mit fremder DNA atypische Resultate verursacht werden. Um diese Artefakte zu vermeiden, habe ich einiges unternommen (Kapitel 3.5.4.5.).

Wenn man ein Schmier sieht, der von *slot* startet, ist wahrscheinlich die Degradation der DNA ein möglicher Grund dafür. Weder die Zugabe von 10% DMSO oder von 5% Formamid noch die Erhöhung der Annealing-Temperatur half dieses Problem zu lösen. Die DNA-Konzentration zu reduzieren ist als die Lösung dieses Phänomens bei alter DNA nicht zu empfehlen. In dem Fall wurde eine neue Extraktion durchgeführt.

Bei der STR-Typisierung kommen vor allem zwei PCR-Artefakt-Typen vor:

1. Präferentielle - Amplifikation

Bei präferentieller Amplifikation ist eines von beiden Allelen präferentiell amplifiziert. Man bekommt in solchen Fällen als Ergebnis z.B. einen falschen Homozygot. Die Gründe sind unterschiedlich. Die präferentielle Amplifikation kommt bei degradierter DNA öfter vor. Die stochastische Fluktuation der Kopien-Anzahl der Allelen kann z.B. dazu führen. Die präferentielle Amplifikation kommt vor, wenn es z.B. zwischen beiden Allelen einen signifikanten GC% Unterschied gibt. Unter bestimmten Bedingungen kann dann nur eine von beiden Allelen denaturiert werden (unterschiedliche Denaturierung).

Ein weiterer Grund präferentieller PCR ist der Länge-Unterschied (die Größe) zwischen zwei Allelen. Das kürzere Allel wird dann präferentiell vermehrt und das vor allem, wenn die Menge der Taq-Polymerase klein ist.

Ein anderer Grund wäre, wenn ein Primer deutlich besser funktioniert als das Andere („mismatches“ zwischen Primer und spezifisches Allel-Template) (Walsh et al., 1992). Intakte Moleküle sind präferentiell amplifiziert (Pääbo et al., 1989).

Es gibt bei der PCR weitere Möglichkeiten für die Entstehung von Artefakt-Produkten, wie z.B.:

Ruano et al. (1991) weisen auf die Tatsache hin, daß eine zu hohe Primer- und Polymerasekonzentration Ursache für Artefakte in Form von Dimeren sein können, vor allem wenn sie von niedrigen Matrix-DNA Konzentrationen, langen Hybridisationszeiten und Elongation begleitet werden.

Der Anteil an Produkten, welche die erwartete Länge überschreiten, nimmt mit steigender Konzentration der DNA-Matrize und sinkender Zahl der PCR-Zyklen überproportional zu. Es kann günstiger sein, die in den Reaktionsansatz eingesetzte DNA-Menge zu reduzieren und gleichzeitig die Anzahl der Zyklen zu erhöhen, um noch eine ausreichende Produktausbeute zu gewährleisten.

Gezielte PCR-Optimierungen zur Reduktion bzw. Vermeidung von PCR-Artefakten, zur Erhöhung der PCR-Spezifität, waren unvermeidbar.

2. *Stutter - Bands*

Eine Charakteristik der STR-PCR-Typisierung an altem Skelettmaterial ist die Formation der „stutter bands“.

Die bei vielen STRs auftretenden, genau eine Repeatlänge kürzere Zusatzbande zu jedem Allel, erscheinen auch unter denaturierenden Laufbedingungen des DNA-Sequenzers. Es handelt sich also nicht um Elektrophorese Artefakte, sondern um PCR-Artefakte. Diese Zusatzbanden werden von einigen Autoren bei der Analyse von STRs auf DNA-Sequenzern beschrieben (Schmitt et al., 1996).

Stutter-Banden sind durch enzymatisches „slippage“ während der PCR verursacht (Hite et al., 1996; Clayton et al., 1998). Diese Zusatzbanden zeigen sich als „Schattenbanden“, die dadurch entstehen, daß die Polymerase in den ersten PCR-Zyklen bei der Elongation des neusynthetisierten Stranges z.B. ein Repeat ausläßt. Die „slippage“- Artefakte sind die Fragmente, die exakt ein oder mehrere repetitive Motive kürzer oder auch länger sind als das Original.

Die Stutter Banden treten je nach System und Primerdesign in unterschiedlicher Häufigkeit auf. Sie sind besonders häufig bei 2 Bp-Repeat-Sequenzen festzustellen (Murray et al., 1993). Stutter-Banden sind generell einfach zu unterscheiden, weil sie normalerweise schwächere Bande ausstellen. Bei der Analyse der alten und sehr degradierten DNA kann die Anzahl und die Menge der Stutter-Produkte die Menge der korrekten Produkte übersteigen (Schultes et al., 1997; Odelberg, 1993). Das erschwert deutlich die allelische Determination der Probe. In solchen Fällen war es am besten, eine neue Extraktion (aus anderem Knochen des Individuums oder auch aus dem selben Knochen des Individuums) durchzuführen. Nur die richtigen Banden sind reproduzierbar. Es gibt Unterschiede der DNA-Erhaltung nicht nur unter Knochen aus unterschiedlichen Gräbern und unter Knochen aus einem Grab, sondern auch in einem und demselben Knochen. Der Einfluß eines Mikromilieus (kleine lokale Variationen) spielt offensichtlich eine erhebliche Rolle für die Erhaltung der DNA in Knochen.

Die Stutter-Banden waren in der Regel 1-3 Repeats kürzer als Original-Fragmente.

Die Annealing-Stringenz läßt sich wegen der Zusatz-Banden auch nicht beliebig reduzieren. Um das Mispriming zu vermeiden, wurde die Annealing-Temperatur meistens nur um 1°C reduziert.

Nach der Typisierung an 300 -jährigen Knochen habe ich festgestellt, daß eine niedrigere Zykluszahl (andere Form der biphasischer PCR) für weitere Untersuchungen der alten DNA nötig ist, um Stutter-Banden zu vermeiden. Nach meiner Erfahrungen sind insgesamt 45 - 50 PCR-Zyklen notwendig, um verwertbare Amplifikate alter DNA zu bekommen. 40 oder auch mehr Zyklen sind notwendig, um aDNA zu amplifizieren (Hummel S. et al., 1992).

Ich konnte (oft erst nach Wiederholungen der Experimente) das Problem der Stutter-Banden zum Teil oder ganz lösen. Die Primer- oder die dNTP-Konzentration wurde in keinem Fall erhöht. Ich habe mich auf eine relativ kleine Erhöhung von Magnesiumchlorid- (bis zu 1,75 - 2,0 mM im PCR-Ansatz) und Taq-Polymerase-Konzentration (1-2U im PCR-Ansatz) beschränkt.

Ich habe keine Stutter-Banden, die länger als das richtige PCR-Produkt wären, beobachtet. Solche „ghost bands“ entstehen, wenn die Primer an andere falsche Regionen binden. Heteroduplex-Formation könnte z. B. auch ein Grund für diese „ghost bands“ sein. Außerdem entstehen sie wahrscheinlich nur, wenn die Menge der DNA im PCR-Ansatz zu groß ist. Und in meiner Arbeit hatte ich gerade das gegenteilige Problem. Nur reproduzierbare Banden (Allele) wurden für meine Auswertung herangezogen.

Es gibt Inhibitoren der PCR, welche man nicht durch konventionelle Methoden (Extraktion mit organischen Lösungen, Ethanolpräzipitation, Reinigung mit der Microcon-100-Filtration, die Reextraktion oder die Chromatographie) entfernen kann. Im Kapitel 3.5.4.3. ist „Inhibition der PCR“ vorgestellt.

Die Wirkungsweise von PCR-fördernden Substanzen ist zumeist nicht oder nur unbefriedigend aufgeklärt. Darüber hinaus ist ihre Wirkung nicht garantiert.

Ammoniumsulfat erhöht die Spezifität einer PCR, sinkt das Optimum der Annealingtemperatur aber, reduziert es die Effizienz der PCR.

Dies ist für alte DNA eher ungeeignet.

Sehr gut untersucht ist z. B. der enzymstabilisierende Einfluß von Glycerin. So erhöht sich die Halbwertszeit von Taq-DNA-Polymerase bei 95°C in Gegenwart von 10% Glycerin von 40 Minuten auf über 60 Minuten (Mertes et al., 1997). Bei der Analyse alter DNA ist die Taq-Polymerase im Überschuß als Alternative interessanter.

DMSO (Dimethylsulfoxid) wird zur Auflösung störender Sekundärstrukturen innerhalb der Matrize PCR-Ansätzen hinzugegeben. Die Spezifität der PCR läßt sich sehr gut mit Formamid oder DMSO steigern. DMSO hat aber inhibierenden Einfluß auf das Enzym. So sinkt die Aktivität der Taq-DNA-Polymerase in Gegenwart von 10% DMSO auf 53% (Sarkar et al., 1990).

Der Zusatz von 1,5-2 mM Spermidin Endkonzentration verbessert (erlaubt) die Amplifikation von „dirty DNA“ (Scheinert et al., 1997). Man kann versuchen, die inhibitorische Aktivität zu beseitigen, z. B. mit der Hot-Start-PCR, mit der Zugabe von BSA, mit höheren Mengen an Taq-Polymerase (Beraud-Colomb et al., 1995; Goodyear et al., 1994).

Die Hot-Start-Methode ist unnötig arbeitsaufwendig und erhöht die Gefahr der Kontamination.

Ich habe Bovin-Serum-Albumin in allen untersuchten Fällen (Knochen älter als 300 Jahre) verwendet. Über BSA und seinen in den meisten Fällen positiven Einfluß auf den Erfolg der aDNA-PCR habe ich bereits im Kapitel 4.5.1. geschrieben.

Die erhöhte Konzentration der Taq-Polymerase bei der Individuen-Typisierung von Kirchheim am Ries und von Niederstotzingen hatte einen positiven Einfluß auf die PCR-Reaktionen. Wenn man eine sehr geringe Konzentration der DNA zur Verfügung hat, kann die erhöhte Zugabe von Taq-Polymerase ein wirksamer Weg sein, um die Amplifizierbarkeit der DNA zu verbessern.

Die STR-PCR-Amplifikationen in dieser Arbeit wurden nur mit 1-2 U der Taq-Polymerase durchgeführt. Im Vergleich brauchten Pääbo et al. (1988) für die Amplifikation der DNA aus 7 000 Jahre altem Hirngewebe 12,5 U von Taq-Polymerase. Fisher et al. (1993) benutzten auch bis zu 6,25 U/25µl, um 210 Bp der mtDNA amplifizieren zu können.

Phänomene wie (Kapitel 3.5.4.1.) „PCR-Jumping“ (Pääbo et al., 1990) zeigen Hinweise

auf eine allgemeine Beschädigung vieler DNA-Moleküle in den Extrakten alter DNA. Dabei induzieren Basenschäden oder DNA-Enden ein „Springen“ des extendierten Primers zwischen komplementären Bereichen verschiedener DNA-Fragmente. Niedrigere Stringenz während der ersten Zyklen hilft PCR-Jumping zu reduzieren. So wird in den ersten Zyklen das Verhältnis humane/mikrobielle DNA zu Gunsten der humanen DNA beeinflusst. Diese Vorgehensweise habe ich bei der Untersuchung vom Knochenmaterial aus Kirchheim am Ries benutzt. Sie war allerdings nicht im positiven Sinne übertragbar auf die Proben von Niederstotzingen.

Bei der Untersuchung von Individuen aus Niedersotzingen habe ich eine positive Wirkung auf die Amplifizierbarkeit der alten DNA festgestellt, wenn die Annealing-Stringenz in den zweiten PCR (während 10-15 Zyklen oder während aller 35 Zyklen) leicht (um 1°C) reduziert wurde.

Fattorini et al. (1993) haben auch gezeigt, daß eine erfolgreiche Amplifikation mit weniger als 10pg (es entspricht weniger als zwei Zellen) DNA möglich ist, wenn man die Annealing-Stringenz während der letzten Zyklen reduziert.

In allen PCR-Reaktionen wurde die Zeit für Denaturierung, Annealing und Elongation um einige Sekunden erhöht. Eine unvollständige Denaturierung bewirkt nämlich eine schnelle Renaturierung der Matrizen und damit ineffektive Primerhybridisierung, was verminderte Produktausbeute bedeutet. Ruano et al. (1991) weisen auf die Tatsache hin, daß eine zu hohe Primer- und Polymerase-Konzentration Ursache für Artefakte in Form von Dimeren sein kann, vor allem wenn sie von niedrigen Matrix-DNA-Konzentrationen, langen Hybridisationszeiten und Elongation begleitet wird. Ich hatte keine derartigen Probleme. Die hier verwendete Primer- und Taq-Polymerase-Konzentration war nicht hoch und die verlängerte Zeit für Annealing und Elongation bis zu 1 Minute sind offensichtlich für die niedrigen Matrix-DNA-Konzentrationen günstig.

Generell muß man sagen, daß bei dieser extrem sensitiven Methodik erhöhte Kontaminationsrisiken mit fremder DNA bestehen. Ich habe allerdings ausreichende Kontrollen der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und strenge Maßnahmen mit multiplen Kontrollen gegen Kontamination eingeführt. Die genauen Informationen dazu sind im Kapitel 3.5.4.5.

Die STR-Marker sind ein sehr gutes Werkzeug in der Forensik für die Identifikation und die Verwandtschaftsbestimmung (Alford et al., 1994; Gill et al., 1994; Gunn et al., 1997).

Von der STR-Typisierung habe ich im Kapitel 1.1.2.3. geschrieben.

Die in meiner Arbeit verwendeten autosomalen Loci (**TH01, VWA, FES, F13B, FGA, CD4, D8S1132,**) sind im Kapitel 3.6.1. beschrieben.

Der gonosomale Marker DYS390 ist in dieser Hinsicht nur väterlicherseits interessant. Amelogenin ermöglicht keine Individualisierung. Es dient nur zur Aussage: „Frau oder Mann?“. Über die gonosomalen Marker habe ich schon reichlich in den Kapiteln 1.1.2.3. und 4.7. geschrieben.

Die autosomalen Loci, die ich verwendet habe, wurden in der Anfangszeit dieser Forschung in der Forensik routinemäßig benutzt. Mit der Zeit sind einige neue polymorphe STR-Marker dazugekommen.

Das Meeting von EDNAP (the European DNA Profiling Group) in Kopenhagen hat TH01 und VWA Loci als allgemein in allen Europäischen forensischen Laboratorien verwendete Loci angenommen. In allen Laboratorien, die an den europäischen und internationalen Qualitäts-Kontroll-Untersuchungen beteiligt waren, haben beide Loci reproduzierbare Ergebnisse geliefert. Deswegen würde ich auch in der Zukunft diese zwei Marker weiter benutzen. Bei der Untersuchung von VWA-System hatte ich mehr Problemen

mit Stutter-Banden als z.B. bei der Analyse von TH01, F13B oder FES.

Nach Kimpton et al. (1995) ist FES Locus etwas problematisch. Auf dem denaturierenden Polyacrylamidgel erscheinen nämlich Doppelt-Banden. Ich habe allerdings nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel benutzt. Die Amplifikation dieses Locuses war etwas schwieriger als die von FGA oder D8S1132. Es kann daran liegen, daß FES etwas größer ist. FES Locus ist weiter nicht sehr polymorph. Die Anzahl der Allele ist z.B. kleiner als bei FGA und D8S1132 und die Frequenz des Allels 11 beträgt noch dazu 42,86%. Die Größe der Allele dieses Markers, seine geringe Polymorphie und zusätzlich schwierige Typisierung seiner Allel-Varianten sind Gründe, weshalb ich diesen Marker nicht mehr benutzen werde. Die hochpolymorphen Marker FGA und D8S1132 sind auch für die zukünftigen Untersuchungen interessant.

Ich habe weiter F13B Locus untersucht. Der Polymorphismus von F13B wurde 1992 zum ersten Mal von Nishimura und Murray beschrieben. Der Fragmentlängenbereich von 169 bis 189 Bp entspricht einer der wichtigsten Voraussetzungen für eine erfolgreiche Amplifikation alter DNA. Noch in den 1998-1999 Jahren wurde über das große Interesse sowohl der Biologen als auch der Rechtsmediziner am System F13B berichtet (Pawlowski et al., 1999). Dieses System wurde am Anfang meiner Doktorarbeit und wird zum Teil noch immer in der forensischen Praxis angewendet. Allerdings hat dieses STR-System trotz relativ hoher Heterozygotie (75%) eine kleine Anzahl der Allele (6). Aus diesem Grund würde ich bei den zukünftigen Untersuchungen der historischen Individuen diesen Marker mit einem polymorpheren STR-System ersetzen.

Die Größe der CD4 Locus-Amplifikate ist für alte DNA sehr geeignet (nur 86-131 Bp). Die Anzahl der Allele (10) ist auch sehr befriedigend. Leider ist aber die Homogenität der Distribution der Allele von CD4 sehr schlecht (z. B. die Frequenz des Allels 5 ist 34,74%; die Frequenz des Allel 6 ist 30,53% und die Frequenz des Allels 10 ist 30,69%). Das heißt, Kombinationen nur von diesen drei Allelen befinden sich in über 95% der Population. Aus diesem Grund wird es nötig, auch diesen Marker zu ersetzen.

Für die zukünftige Forschung sollten also CD4, FES und F13B Loci ersetzt werden. Kurzfragmentige STRs sind zu bevorzugen. Mit kurzen STRs steigt nämlich die Nachweischance für kleinste Mengen hochdegradierter DNA. Loci mit niedriger Mutationsrate zeigen große Unterschiede in den Distributionen der Allel-Frequenzen von Population zu Population. Solche Systeme sind daher sehr attraktiv. Insbesondere die hochvariablen Systeme mit bis zu 30 verschiedenen Allelen verbinden die Vorteile von großer Präzision bei der Typisierung mit hohem Diskriminationsvermögen bei gleichzeitiger Eignung für forensische Materialien (Rolf et al., 1997).

Einige neue hochpolymorphe STR Loci wurden untersucht, wie z. B.:

STR LOCUS	Chromosom. Lokalisation	Anzahl der Allele	Größe der Allele (Bp)	Heterozy- gosität (%)	Referenz
D8S639	8p21-p11	25	316-371	85%	Seidl et al. (1999)
D11S488	11q24.1-q25	24	242-302	91%	Seidl et al. (1999)
D18S535	18	8	130-158	76%	Wiegand et al. (1999)
D1S1656	1	14	125-168	90%	Wiegand et al. (1999)
D10S2325	10	12	113-168	88%	Wiegand et al. (1999)
D8S639	8	14	317-373	86%	Seidl et al. (1995)

Der Nachteil von D8S639, D11S488 und D8S639 ist, daß der Fragmentlängenbereich für alte DNA zu groß ist und daß Loci D8S639 und D11S488 zu viele Inter-Allele, die sich nur um 1 Bp unterscheiden, besitzen. Bei Locus D8S639 wurde Mikroheterogenität entdeckt (Seidl et al., 1995). Das sind schon ausreichende Argumente, weswegen diese Loci für die Arbeit mit alter DNA ungeeignet sind.

Das kombinierte Diskriminationsvermögen von D18S535, D1S1656, D10S2325 ist 0,9999. Das ist excellent. Die Größe der Allele dieser Loci ist unter 170 Bp. Bei sehr degradiertes DNA aus menschlichen Knochen (Alter nicht angegeben) lieferte dieses „Trio“ reproduzierbare und bessere Ergebnisse als mit dem Locus SE33. So wäre dieses Trio sehr wünschenswert für die Analysen der alten degradierten DNA. Es wurde allerdings die Sequenzvariabilität innerhalb des D1S1656-Repeats (sog. Mikroheterogenität) gefunden. Weiter waren D1S1656 und D18S535 viel anfälliger, die Stutter-Banden zu bilden als D10S2325. Deswegen würden wir bei der zukünftigen Arbeit mit alter DNA eher nur Locus D10S2325 in Betracht ziehen.

Ferner wäre z.B. der Locus D1S1656 (122-160 Bp) eine Alternative. Die Auswahl ist relativ groß, weil die Forschung an neuen, für die Forensik geeigneten, leistungsfähigen STR-Loci ununterbrochen weiter geht.

Ich habe in meiner Arbeit immerhin 7 autosomale STRs benutzt und zusätzlich DYS390 mit Amelogenin. Die BKA (Bundeskriminalamt) in Deutschland benutzt nur 5 STR-Marker für ihre Datenbank (TH01, VWA, FGA, D21S11 und SE33).

In einem EDNAP (European DNA profiling group)-Bericht (Gill et al., 1994) wurde allerdings das extrem polymorphe System SE33 (mehr als 30 Allele) als problematisch dargestellt. Es wurde ausdrücklich berichtet, daß die Standardisierung von SE33 in der Forensik nicht möglich ist, es sei denn, eine gleiche Leiter und gleiche elektrophoretische Systeme würden benutzt. Das SE33-System wurde auch in die Analysen des Datenbanksystems in den USA nicht eingeführt. Die BKA in Deutschland dagegen analysiert SE33 für ihre Datenbank standartmäßig.

In meiner zukünftiger Arbeit würde ich weiter auf die SE33-Analyse aus folgenden Gründen verzichten:

- problematische Trennung der Allele

- „Interallele“

- viel zu komplex, unpraktisch (Steht in DNA recommendations- 1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems; Int J Legal Med 107, 1994, 159-160).

- zu große Amplifikate (230-330 Bp)

- ich müßte die Allele sequenzieren, sogar die Allele in der Leiter sollten sequenziert werden, bei weiteren Tests, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu beweisen, müßte ich möglichst genau gleiche elektrophoretische Bedingungen verwenden.

(Steht in DNA recommendations- 1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems; Int J Legal Med 107, 1994, 159-160)

Gill et al. (1994) haben zur Verwandtschaftsbestimmung 5 STR-Systeme (TH01, VWA, F13A, FES, SE33) und die 740 Nukleotid-Sequenz des D-Loops verwendet.

Trübner et al. (1998) haben die Identifikation eines Skelettfundes nach neunjähriger Liegezeit mittels der Untersuchung von 5 STR-Marker (TH01, VWA, FGA, CD4, D3S1358) durchgeführt.

Clayton et al. (1995) haben für die Identifikation der menschlichen Körperteile nach der Massenkatastrophe im April 1993 bei Waco in Texas nur 4 autosomale STR-Marker (TH01, VWA, FES, F13A) und Amelogenin für die Geschlechtsbestimmung benutzt. Nach ihren Ergebnissen war VWA Locus am einfachsten zu typisieren. Während meiner Arbeit war VWA Locus eher schwieriger zu untersuchen als andere verwendete Loci. Amelogenin wurde auch bei Clayton et al. (1995) in allen Fällen problemlos typisiert. Der von ihnen verwendete STR-Quadruplex hatte genügendes Diskriminationsvermögen.

Schultes et al. (1997) haben DNA aus der Bronze-Zeit auch mittels nur 4 STR-Marker (TH01, CD4, FES, D3S366) typisiert.

Eine postmortem Paternität-Analyse wurde mit 6 STRs (TH01, VWA, FES, F13B, TPOX, CSF1PO) durchgeführt (Nakamura et al., 1995). Dabei sind 4 STRs, die auch in dieser Arbeit untersucht wurden. TPOX und CSF1PO wurden hier nicht untersucht. Hier wurden sogar drei autosomale STRs FGA, CD4 und D8S1132 untersucht. DYS390, das hier verwendet wurde, dient auch noch zur Verwandtschaftsbestimmung väterlicherseits. Dabei ist zu erwähnen, daß z.B. allein D8S1132 mehr polymorph als TPOX oder CSF1PO ist. Der Locus CD4 ist auch z.B. mehr polymorph als TPOX. Der hier verwendete FGA Locus ist auch polymorpher als TPOX. Außerdem haben alle drei Loci (FGA, D8S1132, CD4) höhere Heterozygotität als die beiden Loci TPOX und CSF1PO. Außerdem wären Allele des CSF1PO für die aDNA-Analysen zu groß.

Insgesamt kann man sagen, daß die 8 STRs (7 autosomale STRs und 1 Y-STR), die ich hier verwendet habe, für eine Verwandtschaftsbestimmung der Individuen aus multiplen Bestattungen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit ausreichend waren.

Identifikation und Verwandtschaftsbestimmung mittels der Sequenzierung der D-Loop-mtDNA

Amplifikation aus alten sterblichen Überresten ist erfolgreicher mit mitochondrialer als mit Kern-DNA. Der Grund liegt an der Kopienzahl der mtDNA-Molekülen pro Säuger-Zelle (1 000 – 10 000). Die hohe Kopienanzahl der mtDNA-Moleküle erlaubt eine Analyse von einigen wenigen pg der DNA (Holland et al., 1994(b)). Wenn die DNA viel zu degradiert ist und in minimalen Mengen vorliegt oder wenn direkte Verwandte nicht zur Verfügung stehen, kann man mit der mtDNA-Analyse noch erfolgreich sein.

Pääbo (1989) konnte z.B. aus 4 000 Jahre altem mumifiziertem Gewebe und Hagelberg et al. (1990) aus 750 Jahre alten Knochen mtDNA sequenzieren.

Die Sensitivität der D-Loop-mtDNA-Analyse (Kapitel 1.1.3.) wurde z. B. gezeigt, wenn die Sequenz einer einzelnen Haarwurzel zu bekommen war. Die Sequenz war identisch mit der Sequenz aus peripherem Blut des Individuums (Higuchi et al., 1988).

Sequenzierung – Vorzugsmethode über SSO-Typisierung:

DNA-Sequenzpolymorphismen, die auf dem punktuellen Austausch von Nukleotiden beruhen, können mittels Sondenhybridisierung geschnittener DNA (RFLP), mit Dot-Blot-Nachweis oder direkter Sequenzierung analysiert werden. Wallace et al. (1991) zeigten in ihrer Publikation über die mtDNA-Restriktionsstellen, daß man mit der mtDNA-Sequenzierung viermal mehr Polymorphismen detektieren kann als mittels RFLP.

Es existieren zwei Möglichkeiten, DNA-Sequenzpolymorphismen via PCR darzustellen, zum einen die sequenzspezifische Hybridisierung des PCR-Produkts mit Oligonukleotid-Sonden (SSO-Technik), bzw. dessen selektive Amplifikation mit spezifischen Primern (SSP-Technik) und zweitens die direkte Sequenzierung des PCR-Produkts.

Mitochondriale SSO-Typisierung (SSO=sequence-specific oligonucleotides) ist zwar für eine Unterscheidung zwischen zwei Individuen exzellent, aber wenn man sehr kleine Mengen der degradierten DNA zur Verfügung hat, ist die Sequenzierung des D-Loops informativer (Holland et al., 1992).

PCR – Vorzugsmethode über Klonierung:

Die Sequenzierung eines PCR-Produktes kann direkt oder nach einer Klonierung erfolgen. Ein Vorteil der hier verwendeten direkten Sequenzierung ist, daß DNA nicht kloniert werden muß, bevor man sie sequenziert. Klonierung wäre die klassische Methode vor der Sequenzierung. Mit der direkten Sequenzierung der PCR-Produkte spart man sich den etwas mühsamen Weg über die Vervielfältigung der DNA in Bakterien (Klonierung). Neben dem korrekten PCR-Produkt durch unspezifische Hybridisierung der PCR-Primer entsteht auch eine geringe Menge an unspezifischen Nebenprodukten. Durch die Sequenzierung läßt sich überprüfen, ob das gewünschte Fragment als Hauptprodukt vorliegt. Ein geringer Anteil an Nebenprodukten stört die Lesbarkeit einer Sequenzierreaktion nur unwesentlich. Hingegen kann eine Klonierung der PCR-Produkte erheblich durch solche Nebenprodukte, die unter Umständen effektiver ligieren, gestört werden. Klonierung ist mit kleinsten Mengen alter DNA, die im Extrakt vorliegen, sehr schwierig. Chemisch modifizierte DNA kann nicht effizient kloniert werden. Pääbo et al. (1988) zeigten, daß die PCR die Vorzugsmethode für die alte DNA ist und nicht die Klonierung.

PCR - Amplifikation des D – Loops:

Es war in allen untersuchten Fällen möglich, alle vier Fragmente des D-Loops zu amplifizieren. Der im Kapitel 3.10.1.3. beschriebene PCR-Ansatz funktionierte mit hinreichender Genauigkeit für alle Proben. In einigen Fällen war die Zugabe von BSA (200 µg/ml) zur Stabilisierung der Enzymaktivität notwendig. Alle PCR-Reaktionen waren symmetrische PCR (Kapitel 3.10.1.2.). In keinem Fall war eine biphasische PCR erforderlich. Holland et al. (1992) verwendeten Doppel-PCR, um genügende Mengen des PCR-Produkts für die Sequenzierung zu bekommen. Sie konnten gleichfalls mit 200 µg/ml BSA bestimmte Inhibitoren oder deren Auswirkungen beseitigen.

Die Wahl der Primer für die PCR-Reaktion und die anschließende Cycle-Sequenzierungsreaktion ist sowohl von der Art der verwendeten Markierung, als auch von der Art der zu sequenzierenden Template-DNA abhängig (Zhang und Kousoulas, 1993). In meiner Arbeit verwendeten Primern sind im Kapitel 3.10.1.1. beschrieben.

Die gleichen Primer wurden auch bei der Cycle-Sequenzierung benutzt.

Die im Kapitel 3.10.1.4. vorgestellten PCR-Bedingungen waren optimal. Keine Zusatzbanden oder sonstige Artefakte wurden auf Polyacrylamidgel beobachtet.

Heutzutage existiert keine exakte Methode, um die mtDNA direkt zu quantifizieren. Slot-Blot-Hybridisation-Technik ist nicht spezifisch und kann nicht die humane von nicht-humaner DNA trennen (Mörnstad et al., 1999). Deswegen habe ich hier wie bei den STR-Markern einen indirekten Weg benutzt. Die Menge der mtDNA wurde nach der Intensität der Amplifikate-Banden auf dem Polyacrylamidgel nach der Silberfärbung beurteilt.

Die automatische Sequenzierung reagiert auf Verunreinigungen sehr viel empfindlicher als manuelles Sequenzieren. Daher kann geschlußfolgert werden, daß eine Reihe von Methoden der Matrizenpräparation, die beim manuellen Sequenzieren vollkommen ausreichen, bei der automatischen Sequenzierung gehäuft zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Alle DNA-Matrizen wurden immer effizient mit Centricon-100 Säulen gereinigt.

Asymmetrische PCR als Alternative:

Falls PCR-Reaktionen speziell für die Sequenzierung durchgeführt werden, könnten sie asymmetrisch erfolgen, da die einzelsträngige DNA die Matrize für die Cycle-Sequenzierung ist. Bei asymmetrischen PCR-Reaktionen befinden sich die beiden PCR-Primer-Moleküle in ungleichen Molaritäten, z. B. $0,5\mu\text{M}$ / $50\mu\text{M}$, im Ansatz. Man erhält zum größeren Teil einzelsträngige DNA-Moleküle und nur zu einem kleineren Anteil doppelsträngiger DNA-Moleküle. Es entsteht so lange doppelsträngige DNA, bis der limitierende Primer aufgebraucht ist. Der verbleibende Primer bindet sich weiterhin und löst nach wie vor die DNA-Synthese aus, aber jetzt entsteht nur noch einer der beiden Stränge. Obwohl sich dieser Strang mit linearer statt mit exponentieller Geschwindigkeit anreichert, entsteht ausreichend einzelsträngige DNA für die Sequenzierung. Die einzelsträngige DNA kann dann direkt ohne Denaturierung in die Sequenzierung eingesetzt werden. Weiterhin kommt es wahrscheinlich zu keiner Konkurrenzhemmung des Gegenstranges mit dem Sequenzierprimer im Annealingsschritt der Sequenzierung. Diese PCR-Alternative könnte in Frage kommen, wenn z. B. das Sequenzierergebnis schwach lesbar wäre.

Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Sequenzierungsergebnisse der mtDNA:

Bei der Typisierung von alter DNA ist eine hohe Sensitivität und Zuverlässigkeit der Methode wünschenswert, da das Untersuchungsmaterial nur in minimalen Mengen zur Verfügung steht und durch Umweltfaktoren, Inhibitoren und Degradation beeinträchtigt ist.

Ein DNA-Sequenzierautomat bietet diese hohe Sensitivität. Die Detektionssensitivität des Sequenzers ist mindestens zehn Mal so hoch wie die von PAGE mit anschließender Silberfärbung.

Analog zur Vermehrung von doppelsträngiger DNA kann man die PCR auch zur Sequenzierung nach der Sanger-Methode mittels Kettenabbruchreagenzien einsetzen. Die Taq-Polymerase akzeptiert fluoreszierende Didesoxynukleotide als Abbruchreagenzien. Die verwendete Cycle-Sequenzierung, ihre Vorteile und Nachteile, der Sequenzierungs-Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen wurden im Kapitel 3.10.3.2. vorgestellt. Bei der Sequenzierung benutzte ich die spezifische Markierung am 3'-Ende durch die DyeTerminatoren (3'-markierte didesoxy-Nukleotiden). Der Dichlororhodamin-Farbstoff war der Akzeptor im fertigen Kit. Dichlororhodamin-Farbstoffe sind eine signifikante Verbesserung im Vergleich zu den konventionellen Rhodamin-Farbstoffen. Sie erlauben insbesondere eine spezifische Markierung nur der gewünschten Sequenzierungsprodukte am 3'-Ende und darüberhinaus ein einfaches Handling mit einer „Ein-Topf-Reaktion“. DyeTerminatoren sind für das Taq-Cycle-Sequencing von PCR-Fragmenten die ideale Markierungsvariante, da so unspezifische Terminationsstellen unmarkiert und damit für die Sequenzanalyse unproblematisch bleiben.

Es werden 30 Zyklen empfohlen, die man im Prinzip erhöhen kann, wenn nur wenig Matrize vorhanden ist. Ich habe regelmäßig 40 Zyklen benutzt.

In einigen Fällen war offensichtlich nicht genügend DNA vorhanden, die Produkte der Markierungsreaktion wurden länger, so daß in Primernähe weniger markierte Produkte durch ddNTP abgebrochen wurden. Das führte dazu, daß die Sequenz in der Nähe des Primers nur schlecht lesbar war.

Setzt man der Markierungsreaktion Mn^{2+} (etwa $1\mu\text{l}$ 100 mM MnCl_2) zu, verbessert man die primernahen Sequenzen. In Anwesenheit von Manganionen baut das Enzym häufiger ddNTPs ein; dadurch verkürzt sich die durchschnittliche Länge der terminierten Ketten. Mit Mn^{2+} erhält man die Sequenz 20-200 Nucleotide hinter dem Primer.

In den Fällen mit zu wenig Matrize waren die Signale zu schwach. Mit kräftigeren Fluoreszenzfarbstoffen könnte man mit geringeren Mengen an Matrizen-DNA arbeiten oder in einer entsprechenden Reaktion kräftigere Signale erhalten.

In einigen Fällen war wahrscheinlich die Qualität der DNA schlecht. Nach etwa 100 Basen wurde das Sequenzmuster schwächer, war aber relativ akzeptabel. Durch Wiederholen der Experimente konnten eindeutige Ergebnisse erzielt werden.

In einem Fall wurde eine Art der Kotermination beobachtet. Wenn die Polymerase aufhört, die Kette zu verlängern, ohne ein ddNTP einzubauen, spricht man von falschen Abbrüchen, die auch als "Koterminationen" bezeichnet werden. Ich habe die Reaktion mit einer neu hergestellten Matrize wiederholt. Neben dem Einbau eines ddNTP sind mehrere Gründe denkbar, warum die Polymerase eine Kette nicht weiter verlängert hat. Ist die Matrize im Überschuß, werden die Nucleotide im Reaktionsansatz zu schnell aufgebraucht, so daß man zu viele kurze Moleküle und vorzeitige Abbrüche bekommt. Das war mit alter DNA kein Thema. Koterminationen können auch dadurch verursacht werden, daß zu verschiedenen Zeiten in der Reaktion nicht die richtige Temperatur herrschte. Das ist jedoch im vorliegenden Fall eher unwahrscheinlich. Die Polymerase kann aber auch durch Verunreinigungen in ihrer Funktion behindert werden. Das kann dazu führen, daß sich die Polymerase häufiger von der Matrize löst und es vermehrt zu Koterminationen kommt.

Einige Elektrophoretogramme zeigten einen kleinen Peaks-Hintergrund unter den primären Peaks. Dieses Problem wurde von Parson et al. (1998) beschrieben. Man könnte in Fällen mit einem stärkeren Peaks-Hintergrund die dNTP-Konzentration im PCR-Ansatz etwas reduzieren (weniger als 200 mM). Sullivan et al. (1991) haben positive Erfahrungen in der Richtung. Sie haben die dNTP-Konzentration in zweiter und asymmetrischer PCR reduziert.

Bei allen meinen Fällen sind die Sequenzierungs-Ergebnisse des L-Stranges der mtDNA von besserer Qualität als die Sequenzen des H-Stranges. Diese Erfahrung ist identisch mit Erfahrungen von Szibor et al. (1999) und Parson et al. (1998).

Einige Sequenzierung-Diskrepanzen zwischen H- und L-Strang wurden mit manuellem Vergleich der Sequenz-Elektrophoretogramme gelöst.

Sequenzierungsfehler in Veröffentlichungen sind wahrscheinlich vor allem auf Kompressionen zurückzuführen; es müssen daher unbedingt immer beide Stränge einer Matrize (also in beide Richtungen) sequenziert werden. Kompressionen sind Bereiche im Gel, in denen das regelmäßige Bandenmuster durch das ungewöhnliche Wanderungsverhalten bestimmter Banden gestört wird. In Extremfällen kann sich sogar die Reihenfolge zweier Banden umkehren. Beide Stränge der amplifizierten Regionen wurden in dieser Arbeit sequenziert und miteinander verglichen, um die Vertrauenswürdigkeit der Daten zu sichern. Unabhängige Amplifikationen aus ein und demselben Extrakt haben gleiche Sequenzen geliefert. Zusätzlich lieferten die Amplifikationen aus unterschiedlichen Extrakten (Proben) ein und desselben Knochens auch gleiche Ergebnisse. So kann ich behaupten, daß auch hier präsentierte Ergebnisse der mtDNA-Sequenzierung in allen untersuchten Fällen reproduzierbar waren. Gill et al. (1994) haben bei ihrer Verwandtschaftsbestimmung die Sequenzierung nur einmal wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Hier wurde die Sequenzierung ein- bis dreimal (je nach verfügbarer Menge des Materials) wiederholt. Positive und negative Kontrollen waren selbstverständlicher, regelmäßiger Teil des Experiments. Meine mtDNA wurde auch sequenziert. Weitere Maßnahmen, um die eventuelle Kontamination zu verhindern, habe ich im Kapitel 3.5.4.5. vorgestellt.

D – Loop – Polymorphismen

Ich habe einige Abweichungen von der Anderson-Referenz-Sequenz (1981) gefunden (Kapitel 4.8.).

Bekannterweise ist HV1 polymorpher als HV2. Es wurde in europäischen Ländern festgestellt, aber auch z.B. in indischer Population (Bamshad M. et al., 1996) usw.

Die meisten variablen Positionen der Individuen aus Kirchheim am Ries befinden sich aber in HV2 Region, die der Individuen aus Niederstotzingen in HV3 Region. Alle beobachteten Polymorphismen sind Substitutionen. Aus insgesamt 9 Substitutionstypen waren 7 Transitionen (4 davon vom Typ C→T und 3 vom Typ G→A) und nur 2 Transversionen (beide vom Typ G→C). Ich habe somit unter Transversionen eine Präferenz für G→C – Typ beobachtet und unter Transitionen eine leichte Präferenz für Pyrimidine-Substitution.

Die Pyrimidine-Substitutionen waren alle vom C→T – Typ.

Lutz et al. (1998) haben in ihrem Population-Studium ähnliches festgestellt. Die Nukleotid-Substitutionen machten 90% aller Sequenz-Variationen in der mtDNA aus. Sie haben 75% Transitionen und nur 15% Transversionen gefunden. Unter Transitionen waren Pyrimidine-Substitutionen häufiger und C→T-Transitionen kommen besonders in hoher Frequenz vor. Unter Transversionen haben sie keinen Präferenz-Typ beobachtet.

Honda et al. (1995) haben in ihrer Arbeit am häufigsten die Substitution C→G, dann die Substitution C→T beobachtet.

D`Aloja et al. (1995) haben keine Deletionen und Insertionen gefunden. Die häufigsten Mutationen (76%) waren in ihrer Untersuchung C→T oder T→C Transitionen.

Auch weitere Autoren (z.B. Pfeiffer et al., (1998)) haben als häufigste Mutationen in koreanischer Population Substitutionen und davon Transitionen gefunden.

Rousselet et al. (1998) haben bei der Untersuchung von 50 Individuen aus Frankreich die Transition A→G in der Position 263 und C-Insertionen zwischen den Positionen 310 und 314 systematisch bei allen Individuen (wie auch Piercy et al. (1993) in britischer Population) gefunden. Keiner dieser Polymorphismen wurde bei den hier untersuchten Individuen beobachtet.

Bestimmte Substitutionen scheinen gekoppelt zu sein. Z. B. Substitution auf der Position 16294 und 16296 (Lutz et al., 1998). Die Anzahl der hier untersuchten Individuen ist jedoch nicht groß genug, um mir ähnliche Aussagen erlauben zu können.

Die Nukleotid-Substitutionen akkumulieren sich in mitochondrieller DNA mit viel höherer Rate als in der Kern-DNA (Brown et al., 1979). Dies resultiert wahrscheinlich aus niedrigerer DNA-Reparatur-Effizienz und aus höherer Frequenz der DNA-Replikation-Fehler in der mtDNA. Der daraus resultierende hohe Polymorphismus des D-Loops ist für die Forensik vorteilhaft.

Die hohe Mutationsrate der mtDNA ist eine generelle Charakteristik der mtDNA-Evolution. Die Evolutionsrate des D-Loops der mtDNA wurde als 1%-ige Divergenz pro 10 000 (Lundstrom et al., 1992) bis 30 000 Jahre (Ward et al., 1991) zwischen zwei Vererbungen eingeschätzt.

Nach Howell et al. (1996) kommt eine D-Loop-Mutation nach jeder 125. Generation vor, wenn die Divergenz-Rate von Lundstrom et al. (1992) richtig ist. Die mitochondrielle Vererbung der sequenzierten Region kann sich mit 0,4 – 1 Substitution in 5 000 Jahren ändern.

Die Sequenz-Substitution-Rate des D-Loops hat große Bedeutung für die Forensik und auch für die humane Evolutionsforschung. Parsons et al. (1997) berichten in ihrem Artikel über die direkte Messung der Intergeneration-Substitution-Rate in humanem D-Loop-Bereich. Sie haben 134 unabhängige mtDNA-Abstammungen durch direkte Sequenzierung der PCR-Produkte untersucht (vor allem Großmutter-Enkelkind, Mutter-Kind, Zwillinge).

Nach ihrer Beobachtung kommt die Substitution-Rate mit 1/33 Generationen (eine sehr hohe Substitution-Rate) vor. Ihre Ergebnisse deuten auf extrem schnelle Segregation der D-Loop-Sequenz-Varianten zwischen den Generationen bei Menschen.

Kein Fall väterlicher Übertragung der mtDNA wurde hier gefunden.

Bei statistischen Auswertungen sollte man die Wahrscheinlichkeit möglicher Mutation innerhalb der selben Abstammung berücksichtigen. Es gibt allerdings keine signifikante Populations-Daten (auch nicht in modernen Populationen), um das Potential des D-Loops für die Verwandtschaftsanalyse einschätzen zu können. Auch existiert kein statistisches Modell, um die Signifikanz der Übereinstimmung zwischen mtDNA-Sequenzen zu kalkulieren (Holland et al., 1994(b); Lutz et al. (1996)). Ich konnte deswegen die Sequenzen nur mit Datenbanken vergleichen.

Weil die Rekombination in der mtDNA-Vererbung abwesend ist, ist eine große Population-Datenbank notwendig, um die Identitäts-Wahrscheinlichkeit für forensische Zwecke zu berechnen. Ein anderer Grund ist der schnelle evolutionäre Drift der mtDNA (aufgrund ihrer Populations-Größe von $\frac{1}{4}$ im Vergleich zu Kern-DNA-Loci).

Die Sequenzierung-Ergebnisse der mtDNA allein reichen sowieso für eine Identifizierung nicht. Noch fehlen relevante Sequenzdatenbanken und die Integrität der mütterlichen Vererbung wurde noch nicht hinreichend bewiesen.

Parsons et al. (1997) haben gezeigt, daß die D-Loop-Sequenz-Unterschiede zwischen mütterlichen Verwandten recht häufig vorkommen können. Mechanismen und Modelle zur mtDNA-Mutations-Entstehung und -fixierung stehen bisher nicht zur Verfügung. Offensichtlich sind viele weitergehende Studien nötig, um Mechanismus und Vorkommen der mtDNA-Mutationen zu verstehen.

Die D-Loop-Sequenz der Person „3a“ aus dem Grab von Niederstotzingen unterscheidet sich von der D-Loop-Sequenz der restlichen zwei Individuen („3b“, „3c“) aus dem gemeinsamen Grab nur in einem einzigen Nukleotid. Man könnte spekulativ mehrere Möglichkeiten in Betracht ziehen. Wenn sich zwei Proben nur in einem oder zwei Nukleotiden unterscheiden, sollte man einerseits an eventuelle Heteroplasmie denken (Wilson et al., 1997). Andererseits sind es im Laufe der Liegezeit vor allen Dingen pH-Wert und Bodenfeuchte, aber auch UV-Strahlung, die weiter schädigenden Einfluß auf die Struktur der DNA haben und zu Änderungen der ursprünglichen Basensequenz führen können. Eine große Portion von Pyrimidinen, vor allem Thyminen, ist in alter DNA modifiziert (Pääbo, 1989). Bei der Interpretation von Sequenzabweichungen in Evolutionsstudien sollte die Möglichkeit einer durch physikochemische Faktoren induzierten „postmortalen Mutation“ beachtet werden. Eine weitere mögliche Quelle der Sequenz-Mikroheterogenität könnte auch väterliche Vererbung der mtDNA sein. Es wurde in einer Maus mit der Frequenz 10^{-4} in Zusammenhang mit dem mütterlichen Beitrag detektiert (Gyllensten et al., 1991). Solche mütterliche/väterliche Heteroplasmie könnte vielleicht auch bei Menschen vorkommen. Vorausgesetzt, daß man einige mtDNA-Moleküle eines Individuums in ein und derselben Reaktion amplifiziert, bliebe wahrscheinlich jeder potentielle väterlicher Sequenz-Beitrag undetektiert als Hintergrund.

Bei Wiederholungen des Experimentes habe ich immer wieder gleiche Ergebnisse bekommen. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse läßt mich eher zu der Überzeugung kommen, daß die „3a“ Person tatsächlich nicht mütterlich verwandt mit den Personen „3b“, „3c“ ist.

Heteroplasmie

Heteroplasmie (Kapitel 1.1.5.5.) ist sehr selten oder abwesend in normaler Population (Monnat et al., 1985). Aus ihren Studien resultiert, daß die Heteroplasmie in mitochondrielle Krankheiten verwickelt ist.

Eine Nukleotid-Position wird dann als Heteroplasmie betrachtet, wenn der sekundäre Peak mehr als 40% der Höhe des primären Peak hat und genau unter dem primären Peak liegt. Heteroplasmie muß dann mit einer Reverse-Sequenzierung bestätigt werden. Man muß

natürlich auch eventuelle externe Kontamination in Betracht ziehen. Bei meiner Arbeitsweise habe ich extreme Maßnahmen ergriffen, um jede mögliche Kontamination zu vermeiden (Kapitel 3.5.4.5.).

Bendall et al. (1996) haben die Rate der heteroplasmischen Punkt-Mutationen gerechnet. Sie geben an, daß die Mutationsrate in der HV1-Region des D-Loops zwischen $1,2 \times 10^{-6}$ und $2,7 \times 10^{-5}$ pro Nukleotidstelle und pro Generation ist.

In beiden hypervariablen Regionen des D-Loops (HV1 und HV2) kommen „Polyzytosin-Stretches“ vor, in welchen es oft Heteroplasmie gibt (Parson et al., 1998). Torroni et al. (1994) haben Insertionen von Zytosinen (+C, +2C, +3C) innerhalb der Kette von sechs Zytosinen zwischen den Positionen 568 und 573 gefunden. Sie haben weitere Insertionen von Zytosinen (+C, +2C) innerhalb der Kette von sechs Zytosinen zwischen den Positionen 303 und 309 festgestellt. Zwischen den Positionen 311-315 (innerhalb der Kette mit fünf Zytosinen) wurden auch C-Insertionen (+C, +2C) gefunden. Lutz S. et al. (1998) haben auch in diesen Abschnitten des D-Loops C-Insertionen beobachtet. Die Heteroplasmie betrifft mtDNA-Moleküle mit unterschiedlicher Anzahl der Zytosinen in „C-stretch“. Nach Bendall et al., 1995, zeigen „C-stretches“ von mehr als 10 Zytosinen gewöhnlich eine Längen-Heteroplasmie innerhalb der Kette. Von mir untersuchte mtDNA-Fragmente beinhalten höchstens sechs Zytosine. Eine Längen-Heteroplasmie wurde in diesen C-Ketten nicht beobachtet. Ich habe keine Deletion oder Insertion, somit keinen Längen-Polymorphismus beobachtet.

Weiterhin erwähnt seien Berichte über sog. „stille“ *Heteroplasmie*. In der mtDNA-Kontroll-Region von Zar Nikolaj II wurde „single“- heteroplasmischer Polymorphismus gefunden (Gill et al., 1994). Comas et al. (1995) fanden gleichfalls ein Individuum mit zwei heteroplasmischen Punkt-Mutationen. Ivanov et al. (1996) haben berichtet, daß die selbe Heteroplasmie wie bei Zar Nikolaj II auch bei seinem Bruder gefunden wurde. Diese Heteroplasmie hat sich nach weiteren vier Generationen (mütterlicherseits) aufgelöst. Derzeit wird allgemein über Vermutung diskutiert, daß Heteroplasmie viel häufiger im D-Loop vorkommt, als es bisher berichtet wurde. Der Mangel an beobachteten Heteroplasmien läßt sich durch die schwierige Detektion mittels direkter Sequenzierung erklären. Es gibt sehr wenige beobachtete stille Heteroplasmien in humaner mtDNA. Das bedeutet insgesamt, daß entweder stille Heteroplasmien sehr selten sind oder sie lassen sich mittels direkter Sequenzierung nicht einfach erkennen. Direkte Sequenzierung ist wahrscheinlich keine geeignete Methode zur Detektion der Heteroplasmie-Frequenz. Es ist schwierig, die Heteroplasmie von verschiedenen Sequenzierungsartefakten zu unterscheiden.

5. Zusammenfassung

Es ist eine große Herausforderung, verwandschaftliche Beziehungen von Individuen und Bevölkerungen historischer Epochen aufzuhellen. Die Anlage von Gendatenbanken für historische Individuen könnte langfristig neben Geschlechts- und Verwandtschaftsdiagnosen von Einzelindividuen auch Interpopulationsvergleiche gestatten, wie dies an Rezentpopulationen möglich ist.

Forensische Bedeutung dieser Forschung

Diese Forschungsarbeit hat erhebliche forensische Bedeutung. Mit meinem Verfahren kann ich die menschlichen sterblichen Reste in einzelnen Gräbern oder in Massengräbern identifizieren, die väterliche und auch die mütterliche Verwandtschaft bestimmen. Die Sequenzierung der mitochondrialen DNA ist sehr hilfreich bei der Identifizierung von unbekanntem Leichen und Skeletten sowie bei Spuren von historischer Bedeutung. Die Methodik der mtDNA ermöglicht die Identifizierung von Mikrospuren und von degradiertem biologischen Material, wenn die Kern-DNA-Analyse versagt. Wenn nahe Verwandte für den Vergleichszweck nicht zur Verfügung stehen (Vater, Mutter, Geschwister, Kinder), kann die mtDNA-Sequenz von fernen Cousins, Cousinen direkt verglichen werden mit der Sequenz der sterblichen Reste, um die Identifikation durchzuführen. Entfernte mütterliche Verwandtschaft kann das Referenzmaterial für direkten Vergleich liefern. Das kann auch verschiedene andere praktische Anwendungen im forensischen Bereich haben. Ein sehr großes Problem ist der schwarze Markt mit Kindern, deren Verwandte (mütterlicherseits) könnten durch mt-DNA-Analyse gefunden werden.

Interdisziplinäre Aspekte genetisch-forensischer Wissenschaft

Der direkte Zugang zur DNA liegt jetzt auch für die historischen Wissenschaften offen. Mit der aDNA-Analyse könnte zukünftig auch die Lücke zwischen dem historischen Material und der Untersuchung rezenter Menschen geschlossen werden.

Die Methodik dieser Forschung hat ohne Zweifel erhebliche Bedeutung für Medizin, Anthropologie, Archäologie, Sozialgeschichte, Ethnologie, sowie für die umweltgeschichtlich orientierten Wissenschaften.

Wünschenswert ist z. B. zu wissen, wie die Geschlechtsverteilung der Toten sowie die auf sie bezogene Sterblichkeit gewesen sind. Doch sind der Geschlechtsbestimmung auf archäologischem Wege schnell Grenzen gesetzt. Die anthropologische Forschung, deren Untersuchungen sich nur auf das Skelettmaterial beziehen, scheint auf den ersten Blick eine bessere Ausgangsbasis zu haben. Die standard-osteologischen Methoden der Geschlechtsbestimmung sind billig und schnell, wenn die Skelette der Erwachsenen komplett und die Knochen gut erhalten sind. Die Trefferquote der morphologischen Geschlechtstypisierung bei gut erhaltenen Skeletten liegt generell um die 80% bis über 90% (St. Hoyme et al., 1989). Die Morphologie ist oft ineffektiv bei intermediären Adultskeletten, bei Kinderskeletten und bei Knochenfragmenten. Die DNA-Geschlechtsbestimmung an Kinderskeletten könnte z. B. Archäologen mit der Einbeziehung solcher Daten erlauben, die „mortality analysis“ zu erweitern.

Mit der Forschung an altem Skelettmaterial erhält der Begriff „interdisziplinäres Arbeiten“ in der Forensik eine neue Dimension: Auf DNA-Kongressen tagen gleichzeitig Mediziner, Genetiker, Mathematiker, Ökologen, Botaniker, Zoologen und Anthropologen.

Die Verwandtschaftsbestimmung, die Geschlechtsbestimmung an Skeletten anhand der DNA-Analyse sind nicht immer ideal, besonders im Fall von vielen Individuen, unter Terrain-Bedingungen oder wenn die Geschwindigkeit und die Kosten eine Rolle spielen. Die DNA-Untersuchung an altem Knochenmaterial ist nämlich sehr zeit- und kostenaufwendig. Der Verbrauch des Knochenmaterials kann unter Umständen auch erheblich werden.

Wenn auch naturgemäß die Wahrscheinlichkeit umfangreicherer postmortaler Umsetzungen mit der Länge der Liegezeit steigt, so wird sich doch voraussichtlich aus Einzelkriterien des Dekompositionsgrades keine allgemein gültige Beziehung zwischen der Zerstörung der organischen Substanz und dem Alter von Knochen finden lassen. Es wurde kein linearer Zusammenhang der Amplifizierbarkeit mit dem Alter der Knochen gefunden. Die Erhaltung der DNA und ihre Amplifizierbarkeit scheinen eher mit den individuellen klimatischen und sonstigen Bedingungen der Lagerung eines Fundstücks zusammenzuhängen. Für die Differenzen in der Knochenerhaltung zwischen den Fundorten können neben den erfaßten Sedimenteigenschaften klimatische Differenzen und unterschiedliche mechanische Belastungen während der Liegezeit von Bedeutung sein. Die DNA-Erhaltung in Knochen ist noch variabler. Jede neue Untersuchung erfordert deswegen mindestens eine individuelle Anpassung der PCR-Reagenzien und der PCR-Bedingungen. Aus diesen Gründen kann die DNA-Typisierung an altem Knochenmaterial kein Routine-Verfahren werden.

Zukunft der DNA - Typisierung in der Forensik ?

Wegen der vielen möglichen Anwendungsbereiche der DNA-Typisierung und ihrer Aussagekraft in Kriminal- und Verwandtschaftsfällen wird sie eine immer größere Bedeutung bei Ermittlungen, gerichtlichen Streitfällen und auch historischen Fragen spielen. Einige zukünftige Entwicklungen und Fortschritte für den forensischen Einsatz von Typisierungen nichtkodierender DNA sind heute schon absehbar. Erstens werden in den nächsten Jahren technische Verbesserungen anwendungsreif, die vor allem zu immer kleineren Apparaten führen.

Besonders viel versprechend scheint die DNA-Chip-Technologie zu sein.

Grundlage der DNA-Chip-Technologie ist, wie bei der Southern- oder Northern-Blot-Hybridisierung, die komplementäre Basenpaarung zwischen einzelsträngigen DNA- oder RNA-Moleküle aus biologischem Material und einer bekannten, definierten Nukleinsäuresequenz (Gensonde, Oligonukleotid und andere mehr) zu einem Doppelstrang. Im Unterschied zu den herkömmlichen Hybridisierungsverfahren, mit denen nur wenige Gene gleichzeitig untersucht werden können, ermöglicht die DNA-Chip-Technologie die simultane Analyse von Tausenden von Genen. Auf einem DNA-Chip, auch „Microarray“ genannt, können Tausende bis Hunderttausende von spezifischen Gensonden, in hoher Dichte angeordnet werden. Die kleinen „Chips“ werden auf die winzigen Bahnen eingefräst. In diesen Bahnen vollzieht sich die Elektrophorese mittels minimaler elektrischer Ströme innerhalb von Sekunden, und das ganze Gerät ist nicht größer als ein heutiges PC-Towergehäuse. So können hunderte bis tausende von DNA-Proben innerhalb von Minuten (statt Stunden) aufgetrennt werden. Der erhöhte Probendurchsatz erlaubt es zudem, immer mehr DNA-Typisierungen von immer mehr Menschen zu erstellen.



Totentanz aus E.H. Langlois, 1852.

LITERATURVERZEICHNIS

- Aasen E., Medrano J.F.: „Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats.“; *Biotechnology* 8, 1990, 1279-1281.
- Alford R.L., Hammond H.A., Coto I., Caskey C.T.: „Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats.“; *Hum Genet* 55, 1994, 190-195.
- D'Aloja E., Boschi I., Moschetti A., Dobosz M., Pascali V.L., Fiori A.: „Mitochondrial HVRI Polymorphism in Italy.“; *Advances in Forensic Haemogenetics* 6, Springer Verlag, 1995, 20-22.
- Akane A., Shiono H., Matsubara K., Nakahori Y., Seki S., Nagafuchi S.: „Sex identification of forensic specimens by polymerase chain reaction (PCR): two alternative methods.“; *Forensic Sci Int* 49, 1991, 81-88.
- Akane A., Seki S., Shinono H., Nakamura H., Hasegawa M., Kagawa M., Matsubara K., Nakahori Y., Nagafuchi S., Nakagome Y.: „Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene.“; *Forensic Sci Int* 52, 1992, 143-148.
- Anderson S., Bankier A.T., Barrell B.G., De Bruijn M.H.L., Coulson A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe B.A., Sanger F., Schreier P.H., Smith A.J.H., Staden R., Young I.G.: „Sequence and organisation of the human mitochondrial genome.“; *Nature* 290, 1981, 457-465.
- Badone E., Farquhar R.M.: „Application of neutron activation analysis to the study of element concentration and exchange in fossil bones“; *Journal of Radioanal. Chem.* 69; 1982; N° 1-2; 296-299.
- Bailey D., Affara N., Ferguson-Smith M.: „The X-Y homologous gene amelogenin maps to the short arms of both the X and Y chromosomes and is highly conserved in primates.“; *Genomics* 14, 1992, 203-205.
- Baird M., Balazs I., Giusti A., Miyazaki L., Nicholas L., Wexler K., Kanter E., Glassberg I., Allen F., Rubinstein P., Sussman L.: „Allele frequency distribution of two highly polymorphic DNA sequences in three ethnic groups and its application to the determination of paternity.“; *Am. J. Hum. Genet.* 39, 1986, 489.
- Balazs I., Baird M., Clyne M., Meade E.: „Human population genetic studies of five hypervariable DNA loci.“; *Am. J. Hum. Genet.* 44, 1989, 182.
- Bamshad M., Fraley A.E., Crawford M.H., Cann R.L., Busi B.R., Naidu J.M., Jorde L.B.: „MtDNA variation in caste populations of Andhra Pradesh India.“; *Hum. Biol.* 68, 1996, 1-28.
- Barallon R.: „Species determination by analysis of the cytochrome b gene.“; In: Lincoln P.J., Thomson J. (eds.), *Forensic DNA Profiling Protocols*, Humana Press, Totowa, New Jersey, 1998, 251-260.

Bär W., Kratzer A., Mächler M., Schmid W.: „Postmortem stability of DNA“; *Forensic Sc Int* 39, 1988, 59-70.

Bär W., Dissing J.; *Elektrophoresis* 4, 1983, 282-283.

Bataille M., Crainic C., Leterreux M., Durigon M., de Mazancourt P.: „Multiplex amplification of mitochondrial DNA for human and species identification in forensic evaluation.“; *Forensic Sci Int* 99, 1999, 165-170.

Bell L.S.: „Palaeopathology and diagenesis: an sem evaluation of structural changes using backscattered electron imaging.“; *J. Archaeol. Sci.* 17, 1990, 85-102.

Bendall K.E., Sykes B.C.: „Length heteroplasmy in the first hypervariable segment of the human mtDNA control region.“; *Am J Hum Genet* 57, 1995, 248-256.

Bendall K.E., Macaulay V.A., Baker J.R., Sykes B.C.: „Heteroplasmic Point Mutations in the Human mtDNA Control Region.“; *Am. J. Hum. Genet.* 59, 1996, 1276-1287.

Benninghoff A.: „Lehrbuch der Anatomie des Menschen.“; 11. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München-Berlin-Wien, 1975, 199-211.

Benzinger E.A., Emerick E., Grigsby N., Lovekamp M.L., Logeman R., Salle P.J., Boster K.L., Rehnstrom A., Riech A.K., Small A.T., Glasner J.A., Coons T.M., Beroldinger C.: „An illustrated Guide to RFLP Troubleshooting.“; *J Forensic Sci* 43 (3), 1998, 665-679.

Beraud-Colomb E., Roubin R., Martin J., Maroc N., Gardeisen A., Trabuchet G.: „Human B-globin gene polymorphism characterized in DNA extracted from ancient bones 12,000 years old.“; *Am J Hum Genet* 57, 1995, 1267-1274.

Berg S., Specht W.: „Untersuchungen zur Bestimmung der Liegezeit von Skeletteilen“; *Deutsche Zeitschrift für gerichtliche Medizin*, 1958, Bd. 47, 209-241.

Berg S.: „Leichenzersetzung und -zerstörung.“ In: Müller B. (Hrsg.) *Gerichtliche Medizin* 1. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York; 1975, 62 ff.

Berghaus G., Brinkmann B., Rittner C., Staak M. (eds.): „DNA-Technology and its forensic application.“; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1990, 41-49.

Berlot-Picard F.: „Les empreintes génétiques en criminalistique.“; *Analysis Magazine*, 1993, Vol.21, N° 6, 18-22.

Bertram S., Gassen G.: „Gentechnische Methoden.“; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York; 1991; 1-2, 6, 7, 244-246, 301.

Bethell P.H., Smith J.U.: „Trace-element analysis of an inhumation from Sutton Hoo, using Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry: An evaluation of the technique applied to analysis of organic residues“; *J. A. S.* 16, 1989, 47-55.

Blin N., Stafford D.W.; *Nucleic Acids Res.* 3, 1976, 2303.

Blumenauer H.: „Werkstoffprüfung“; Leipzig, 3.Auflage, 1984, 87.

Bodenteich A., Mitchell L.G., Polymeropoulos M.H., Merrill C.R.: „Dinucleotide repeat in the human mitochondrial D-Loop.“; Hum. Mol. Genet. 1, 1992, 1-140.

Bodenteich A. et al. (1992) und Lutz S. et al. (1998) beschreiben CA-Repeat-Insertionen und –Deletionen in der Position 514-523.

Boom R., Sol C., Salimans M., Jansen C., Wertheim-van Dillen P. & van der Noordaa J.: „Rapid and simple method for purification of nucleic acids.“; J. Clin. Microbiol. 28, 1990, 495-503.

Bourke M.T., Scherczinger C.A., Ladd C., Lee H.C.: „NaOH treatment to neutralize inhibitors of Taq polymerase.“; J Forensic Sci 44 (5), 1999, 1046-1050.

Bradley H.C.: „Autolysis and atrophy.“; Physiol. Rev. 18, 1938, 173.

Brinkmann B., Wiegand P.: „DNA-Analysen.“; Spurenkunde in Kriminalistik Nr.3, 1993, 191-194.

Brinkmann B., Wiegand P.: „Medicolegal implications of PCR based VNTRs; In: Proceedings from the Fourth International Symposium on Human Identification.“; Promega Corporation, Madison, USA, 1993, 149-160.

Brinkmann B., Wiegand P.: „DNA-Technologie in der Medizinischen Kriminalistik.“; Verlag Schmidt-Römhild, Lübeck, 1997, 52-55, 95.

Brown W.M., George M.J., Wilson A.C.: „Rapid evolution of animal mitochondrial DNA.“; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1979, 1967-1971.

Brown W.M., Prager E.M., Wang A., Wilson A.C.: „Mitochondrial DNA Sequences of Primates: Tempo and Mode of Evolution.“; Journal of Molecular Evolution 18, 1982, 225-239.

Brown T.A., Brown K.A.: „Ancient DNA and the archaeologist.“; Antiquity 66, 1992, 10-23.

Brown T. A.: „Gentechnologie für Einsteiger.“; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford, 1993, 41-44, 65-75.

Budowle B., Adams D.E., Comey C.C., Merrill C.R.: „Mitochondrial DNA: a possible genetic material suitable for forensic analysis.“; In: Lee H.C., Gaensslen R.E.: DNA and other polymorphisms in Forensic Science, Year Book Medical Publishers USA; 1990; 76-97.

Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.C.: „Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed high-resolution PAGE.“; Am. J. Hum. Genet. 48, 1991, 137-144.

Buel E., Wang G., Schwartz M.: „PCR amplification of animal DNA with human X-Y primers used in gender determination.“; J Forensic Sci 40, 1995, 641-644.

- Buoncristiani M., von Beroldingen C., Sensabaugh G.F.: „Effects of UV damage on DNA amplification by the polymerase chain reaction.“; In: Polesky H.F., Mayr W.R. (eds) *Advances in Forensic Haemogenetics*, Vol. 3, Berlin Springer Verlag, 1990, 151-153.
- Cann R.L., Stoneking M., Wilson A.C.: „Mitochondrial DNA and human evolution.“; *Nature* 325, 1987, 31-36.
- Cano R.J., Poinar H.N., Roubik D., Poinar Jr. P.O.: „Isolation and partial characterization of DNA from the bee *Proplebeia dominicana* (Apidae: Hymenoptera) in 25-40 million year old amber.“; *Med. Sci. Res.* 20, 1992, 249-251.
- Cano R.J., Poinar H.N., Pieniasek N.J., Acra A., Poinar G.O.: „Amplification and Sequencing of DNA from a 120-135-million-year-old weevil.“; *Nature* 363, 1993, 536-538.
- Casarino L., De Stefano F., Mannucci A., Canale A.: „HLA-DQA1 and amelogenin coamplification: a handy tool for identification.“; *J Forensic Sci* 40(3), 1995, 456-458.
- Cattaneo C., Gelsthorpe K., Phillips P., Sokol R.J.: „Reliable identification of human albumin in ancient bone using ELISA and monoclonal antibodies.“; *Am. J. Phys. Anthropol.* 87, 1992, 366-372.
- Cattaneo C., DiMartino S., Scali S., Craig O.E., Grandi M., Sokol R.J.: „Determining the human origin of fragments of burnt bone: a comparative study of histological, immunological and DNA techniques.“; *Forensic Sci. Int.* 102, 1999, 181-191.
- Cayouette M., Gackstetter T., Moores J.: „The Effects of Various Additives on Experimentally Determined PCR Annealing Temperatures.“; *Strategies* 9, 1996, 33-35.
- Chakraborty R., Jin L.: „Determination of relatedness between individuals using DNA-fingerprinting.“; *Hum. Biol.* 65, 1993, 875-895.
- Clayton T.M., Whitaker J.P., Sparkes R., Gill P.: „Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling.“; *Forensic Sci* 91, 1998, 55-70.
- Chou Q., Russell M., Birch D.E., Raymond J., Bloch W.: „Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplification.“; *Nucleic Acids Res* 20, 1992, 1717-1723.
- Comas D., Pääbo S., Bertranpetit J.: „Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA.“; *Genome Res.* 5, 1995, 89-90.
- Comey C.T., Koons B.W., Presley K.W., Smerick J.B., Sobieralski C.A., Stanley D.M., Baechtel F.S.: „Dna Extraction Strategies for Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis.“; *Journal of Forensic Sciences* 39 (5), JSFCA, 1994, 1254-1269.
- Cooke H.J., Schmidtke J., Gosden J.R.: „Characterization of human Y-chromosome repeated and related sequences in higher primates.“; *Chromosoma* 87, 1982, 491-502.
- Cooke H.J., Noel E.: „Confirmation of Y / autosome translocations using recombinant DNA.“; *Hum. Genet.* 50, 1979, 39-44.

Cooper A., Mourer-Chauvire C., Chambers G.K., von Haeseler A., Wilson A.C., Pääbo S.: „Independent origins of New Zealand moas and kiwis.“; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1992, 8741-8744.

Cooper A.: „Removal of colourings, inhibitors of PCR, and the carrier effect of PCR contamination from ancient DNA samples.“; Ancient DNA Newsletter 1, 1992, 31-32.

Coquoz R.: „La PCR en criminalistique“, Schweizerische Rundschau für Medizin (PRAXIS) 83, 1994, N° 20, 624-629.

Coquoz R., Fridez F.: „Mitochondrial DNA Quantification in animal Blood and Hair by Slot-Blotting.“; Advances in Forensic Haemogenetics 6, Springer Verlag, 1995, 26-28.

Cronin M.A., Palmisciano D.A., Vyse E.R., Cameron D.G.: „Mitochondrial DNA in Wildlife Forensic Science: Species Identification of Tissues.“; Wildlife Society Bulletin Vol. 19(1), 1991, 94-105.

Crouse C.A., Schumm J.: „Investigation of species specificity using nine PCR-based human STR systems.“; J. Forensic Sci. 40, 1995, 952-956.

Cui K.H., Warnes G.M., Jeffreys R., Matthews C.D.: „Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification.“; Lancet 343, 1994, 79-82.

Czarnetzki A.: „Stumme Zeugen ihrer Leiden.“; Attempto Verlag, 1996, 156.

Day M. H.: „Der Mensch der Vorgeschichte.“; Delphin Verlag, 1977, 32-33, 48-49.

DeSalle R., Gatesy J., Wheeler W., Grimaldi D.: „DNA sequences from a fossil termite in Oligo-Miocene amber and their phylogenetic implications.“; Science 257, 1992, 1933-1936.

Dix J.D., Stout S.D., Mosley J.: „Bones, blood, pellets, glass and no body.“; J. Forensic Sci. 36, 1991, 949.

Driesel A.J.: „Einsatz von DNA-Sonden zur Erfassung genetischer Defekte beim Menschen.“; Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, 1985, 14.

Eastoe J.E.: „The chemical composition of bone“; In: Long, C. (HRSG.) Biochemist Handbook; 1971; 715-720.

Ebensperger C., Studer R., Epplen J.T.: „Specific amplification of the ZFY gene to screen sex in man.“; Hum. Genet. 82, 1989, 289-290.

Edwards A., Hammond H.A., Jin L., Caskey C.T., Chakraborty R.: „Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups.“; Genomics 12, 1992, 241-253.

Ehrlich H.A., Gelfand D., Sninsky J.: „Recent advances in the polymerase chain reaction.“; Science 252, 1991, 1643-1651.

Emson H.E.: „The case of the empty body.“; Am J Forensic Med Pathol 12, 1991, 332-333.

- Engström A.: „Aspects of the molecular structure of bone“; In: Bourne, G.H. (Hrsg.) *The Biochemistry and physiology of bone.*, 1972, Vol. 1 Structure, Chap. 7, 241-244.
- Eglington G., Logan G.A.: „Molecular preservation.“; *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 333, 1991, 315-328.
- Fattorini P., Cacció S., Gustincih S., Florian F., Altamura B.M., Graziosi G.: „Sex identification by polymerase chain reaction of α -satellite in aged tissue samples.“; *Electrophoresis* 14, 1993, 23-26.
- Fisher D.L., Holland M.M., Mitchell L., Sledzik P.S., Wilcox A.W., Wadhams M., Weedn V.W.: „Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States civil war bone.“; *J Forensic Sci* 38, 1993, 60-68.
- Fouret P.J., Nicolas G., Lecomte D.: „Detection of the 4977 Base Pair Mitochondrial DNA Deletion in Paraffin-Embedded Heart Tissue Using the Polymerase Chain Reaction - A New Method to Probe Sudden Cardiac Death Molecular Mechanisms?“; *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, Vol. 39; N° 3; 1994; 693-698.
- Franchini A.: „Un caso di mummificazione naturale precoce.“; *Zacchia II*: 419-425. Ref.: Reinhardt (1940) *Dtsch Z Ges Gerichtl Med* 33, 53-54.
- Frégeau C.J., Fourney R.M. : „DNA typing with fluorescently tagged STRs: A sensitive and accurate approach to human identification.“; *Biotechniques* 15, 1993, 100-119.
- Friedberg E.C.: „DNA Repair.“; *Freeman & Co.*, New York, 1985.
- Galloway A.: „The process of decomposition: a model from the Arizona-Sonoran desert.“; In: Haglund W.D., Sorg M.H. (eds) *Forensic taphonomy. The postmortem fate of human remains.* CRC Press, Boca Raton Boston London New York Washington, 1997, 139-150.
- Gassen H.G., Sachse G.E.: „PCR Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion.“; *Gustav Fisher Verlag*, 1994, 8-9.
- Geneser F.: „Histologie.“; *Deutscher Ärzte – Verlag*, Köln, 1990, 216-225, 236.
- Germann U.: „DNA-Fingerprinting.“; *Kriminalistik Schweiz* 10, 1997, 673-676.
- Gill P., Jeffreys A.J., Werrett D.J.: „Forensic applications of DNA fingerprints.“; *Nature* 318, 1985, 577-579.
- Gill P., Ivanov P.L., Kimpton C., Piercy L., Benson N., Tully G., Evett I., Hagelberg E., Sullivan K.: „Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis.“; *Nature Genet.* 6; 1994; 130-135.
- Gill P., Urquhart A., Millican E., Oldroyd N., Watson S., Sparkes R., Kimpton C.P.: „Criminal intelligence databases and interpretation of STR-s.“; *Advances in Forensic Haemogenetics* 6, Springer Verlag, 1995, 235-236.
- Ginther C., Issel-Tarver L., King M.C.: „Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth.“; *Nature Genet.* 2; 1992; 135-138.

Golenberg E.M., Giannasi D.E., Clegg M.T., Durbin M., Henderson D., Zurawski G.: „Chloroplast DNA sequence from a Miocene *Magnolia* species.“; *Nature* 344, 1990, 656-658.

Goodyear P. D., MacLaughlin-Black S., Mason I.J.: „A reliable method for the removal of co-purifying PCR inhibitors from ancient DNA.“; *Biotechniques* 16(2), 1994, 232-235.

Graham D.E.: „The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses.“; *Analyt. Biochem.* 85, 1978, 609-613.

Grupe G.: „Multielementanalyse. Ein neuer Weg für die Paläodemographie. Materialien zur Bevölkerungswissenschaft.“; Wiesbaden; 1986; Sonderheft 7; 5-8, 32-33, 75-77.

Guglich E.A., Wilson P.J., White B.N.: „Forensic application of repetitive DNA markers to the species identification of animal tissues.“; *J. Forensic Sci.* 39, 1994, 353-361.

Gunn P.R., Truemann K., Stapleton P., Klarkowski D.B.: „DNA Analysis in disputed parentage: The occurrence of two apparently false exclusions of paternity, both at short tandem repeat (STR) loci, in the one child.“; *Electrophoresis* 18, 1997, 1650-1652.

Gusmao L., González-Neira A., Brión M., Lareu M.V., Carracedo A.: „Robustness of the Y STRs DYS19, DYS389 I and II, DYS390 and DYS393: optimization of a PCR pentaplex.“; *Forensic Sci Int* 106, 1999, 163-172.

Gyllensten U., Wharton D., Josefsson A., Wilson A.C.: „Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice.“; *Nature* 352, 1991, 255-257.

Hackett C.J.: „Microscopical focal destruction (tunnels) in excavated human bones.“; *Med. Sci. Law* 21, 1981, 243-265.

Hagelberg E., Sykes B., Hedges R.: „Ancient bone DNA amplified.“; *Nature* 342, 1989, 485.

Hagelberg E., Clegg J.B.: „Isolation and characterization of DNA from archaeological bone.“; *Proceedings of the Royal Society of London (series B)* 244, 1991, 45-50.

Hagelberg E., Clegg J.B.: „Genetic polymorphisms in Prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA.“; *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 252, 1993, 163-170.

Hagelberg E., Quevedo S., Turbon D., Clegg J.B.: „DNA from ancient Easter Islanders.“; *Nature* 369, 1994, 25-26.

Hagelberg E.: „Mitochondrial DNA from Ancient Bones.“ In: Hummel S., Herrmann B.: *Ancient DNA.* ; Springer Verlag New York Inc., 1994, 195-202.

Hagelberg E., Gray I.C., Jeffreys A.J.: „Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis.“; *Nature* 352, 1991, 427-429.

Handt O., Richards M., Trommsdorff M., Kilger C., Simanainen J., Georgiev O., Bauer K., Stone A., Hedges R., Schaffner W., Utermann G., Sykes B., Pääbo S.: „Molecular genetic analyses of the Tyrolean ice man.“; *Science* 264, 1994, 1775-1778.

Handyside A.H., Kontogianni E.H., Hardy K., Winston R.M.L.: „Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification.“; *Nature* 344, 1990, 768-770.

Hänni C., Laudet V., Sakka M., Begue A., Stehelin D.: „Amplification de fragments d'ADN mitochondrial à partir de dents et d'os humains anciens.“; *C. R. Acad. Sci. Paris* 310, 1990, 365-370.

Hardy Ch., Vigne J.D., Casane D., Dennebouy N., Mounolou J.C., Monnerot M.: „Origin of European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in a Mediterranean island : Zooarchaeology and ancient DNA examination.“; *J. evol. Biol.* 7, 1994, 217-226.

Hauge X.Y., Litt M.: „A study of the origin of „shadow“ bands seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR.“; *Hum. Mol. Genet.* 2, 1993, 411-415.

Hermann B., Gruppe G., Hummel S., Piepenbrink H., Schutkowski H.: „Prähistorische Anthropologie.“; Springer Verlag Heidelberg, 1990, 315-327.

Herrmann B., Hummel S.: „Ancient DNA.“; Springer Verlag New York Inc., 1994, 195-196.

Higuchi R., Bowman B., Freiberger M., Rider O.A., Wilson A.C.: „DNA sequence from the quagga, an extinct member of the horse family.“; *Nature* 312, 1984, 282-284.

Higuchi R., von Beroldingen C.H., Sensabaugh G.F., Erlich H.A.: „DNA - Typing from single hairs.“; *Nature* 332, 1988, 543-546.

Hite J.M., Eckert K.A., Cheng K.C.: „Factors affecting fidelity of DNA synthesis during PCR amplification of $d(C-A)_n d(G-T)_n$ microsatellite repeats.“; *Nucleic Acids Res* 24, 1996, 2429-2434.

Hochmeister M.N., Budowle B., Borer U.V., Eggmann U., Comey C.T., Dirnhofer R.: „Typing of DNA extracted from compact bone from human remains.“; *Journal of Forensic Sciences* 36, 1991, 1649-1661.

Holland M.M., Roby R.K., Fisher D.L., Ruderman J., Bryson C.K., Lofts R.S.: „The Identification of Human Remains Using Mitochondrial DNA Sequencing.“; *Advances in Forens. Haematogenetic* 5, 1994 (a), 137.

Holland M.M., Roby R.K., Fisher D.L., Ruderman J., Lee D.A., Bryson C.K., Kupferschmid T., Lofts R.S., Eisenberg A.J.: „Identification of Human Remains Using Mitochondrial DNA Sequencing: Potential Mother-Child Mutational Events.“; *Advances in Forensic Haematogenetic* 5, 1994 (b), 399-406.

Holtz J., Schmidt W.: „Sequenzierung in der humanen mitochondrialen Kontrollregion.“; Poster P 051 bei 75. DGRM-Jahrestagung, 24.-28.9.1996, Universität Zürich.

Honda K., Nakatome M., Harihara S., Zaw Tun, Islam M.N., Bai H., Ogura Y., Kuroki H., Yamazaki M., Terada M., Misawa S., Wakasugi C.: „Detection of Sequence Variants in Hypervariable Segments of mtDNA in the Asian Population.“; *Advances in Forensic Haemogenetics* 6, Springer Verlag, 1995, 29-31.

- Honda K., Harihara S., Nakamura T., Hirai M., Misawa S.: „Sex identification by analysis of DNA extracted from hard tissues.“; *Jpn. Forensics J.* 44(4), 1990, 293-301.
- Horai S.K., Hayasaka K., Murayama N., Wate H., Koike & N. Nakai: „DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis.“; *Proc. Japan. Acad.* 65, 1989, 229-233.
- Horai S., Hayasaka K.: „Intraspecific Nucleotide Sequence Differences in the Major Noncoding Region of Human Mitochondrial DNA.“; *Am. J. Hum. Genet.* 46, 1990, 828-842.
- Howell N., Kubacka I., Mackey D.A.: „How Rapidly Does the Human Mitochondrial Genome Evolve?“; *Am. J. Hum. Genet.* 59, 1996, 501-509.
- Hummel S., Herrmann B.: „Y-chromosomal DNA from ancient bones.“; In B. Herrmann and S. Hummel (eds.): *Ancient DNA*. New York: Springer-Verlag, 1993, 205-210.
- Hummel S., Herrmann B.: „Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human bone.“; *Naturwissenschaften* 78, 1991, 266-267.
- Hummel S., Nordsiek G., Herrmann B.: „Improved Efficiency in Amplification of Ancient DNA and Its Sequence Analysis.“; *Naturwissenschaften* 79, 1992, 359-360.
- Hummel S., Nordsiek G., Rameckers J., Lassen C., Zierdt H., Baron H., Herrmann B.: „aDNA – Ein neuer Zugang zu alten Fragen.“; *Z. Morph. Anthrop.* 81, 1995, 41-65.
- Ibelgaufts H.: „Gentechnologie von A bis Z.“; VCH Verlagsgesellschaft mbH, D-6940 Weinheim, 1990, 365-366.
- Ivanov P.L., Wadhams M.J., Roby R.K., Holland M.M., Weedn V.W., Parsons T.J.: „Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II.“; *Nat. Genet.* 12, 1996, 417-420.
- Jancziewski D.N.: „Molecular phylogenetic inference from saber-toothed cat fossils of Rancho La Brea.“; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, 9769-9773.
- Jeffreys A.J.: „Raising the dead and buried.“; *Nature* 312, 1984, 198.
- Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L.: „Hypervariable minisatellite regions in human DNA,“; *Nature* 314, 1985, 67-73.
- Jeffreys A.J., Allen M.J., Hagelberg E., Sonnberg A.: „Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA Analysis.“; *Forensic Science International* 56, 1992, 65-76.
- Jobling M.A., Pandya A., Tyler-Smith C.: „The Y-chromosome in forensic analysis and paternity testing.“; *Int J Legal Med* 110, 1997, 118-124.
- Kapeller K.: „Cytomorfologia.“; Vydavateľstvo Osveta, Bratislava, 1990, 90-91.
- Kayser M., Caglia A., Corach D., Fretwell N., Gehrig C., Graziosi G., Heidorn H., Herrmann S., Herzog B., Hidding M., Honda K., Jobling M., Krawczak M., Leim K., Meuser S., Meyer

E., Oesterreich W., Pandya A., Parson W., Penacino G., Perez-Lezaun A., Piccinini A., Prinz M., Schmitt C., Schneider P.M., Szibor R., Teifel-Greding J., Weichhold G., de Knijff P.,

Keller G.H., Manak M.M.: „DNA Probes.“; Stockton Press, New York, 1989, 32-33.

Kelley T., Pääbo S.: „DNA sequences from old tissue remains.“; *Methods in enzymology* 224, 1993, 413.

Kimpton C.P., Gill P., Walton A., Urquhart A., Millican E.S., Adams M.: „Automated DNA profiling employing multiplex amplification of Short Tandem Repeat loci.“; *PCR Meth. Appl.* 3, 1993, 13-22.

Kimpton C., Gill P., D'Aloja E., Andersen J.F., Bär W., Holgersson S., Jacobsen S., Johnsson V., Kloosterman A.D., Lareu M.V., Nellesmann L., Pfitzinger H., Phillips C.P., Rand S., Schmitter H., Schneider P.M., Sternersen M., Vide M.C.: „Report on the second EDNAP collaborative STR exercise.“; *Forensic Sci Int* 71, 1995, 137-152.

Klepinger L.L., Kuhn J.K., Williams W.S.: „An elemental analysis of archeological bone from Sicily as a test of predictability of diagenetic change.“; *Am. J. Phys. Anthropol.*, 1986; N° 70, 325-331.

Kloosterman A. D., Budowle B., Daselaar P.: „PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus.“; *Int. J. Leg. Med.* 105, 1993, 257-264.

Knese K.H.: „Mechanik und Festigkeit des Knochengewebes.“; In: Diethelm, Olsson, Strnad, Vietzu Zuppinger, (Hrsg.), *Handbuch der medizinischer Radiologie*; 1970; Bd. IV, Teil 1, Skelettanatomie, 439-441.

Knippers R., Phillipsen P., Schäfer K.P., Fanning E.: „Molekulare Genetik.“; 5. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1990, 502.

Kogan S.C., Doherty M., Gitschier J.: „An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences.“; *N. Engl. J. Med.* 317(16), 1987, 985-990.

Krause D., Schneider V., Blaha R.: „Leichenschau am Fundort.“; 4. Auflage – Wiesbaden; Ullstein Medical, 1998, 38.

Krings M., Stone A., Schmitz R.W., Krainitzki H., Stoneking M., Pääbo S.: „Neandertal DNA Sequences and the Origin of Modern Humans.“; *Cell Press; Cell*; Vol. 90, 1997, 19-30.

Kube E., Schmitter H.: „DNA-Analyse-Datei. Bemerkungen zu Grundlagen und Möglichkeiten.“; *Kriminalistik* 6, 1998, 415-418.

Kunkel L.M., Smith K.D., Boyer S.H.: „Organization and heterogeneity of sequences within a repeating unit of human Y-chromosome DNA.“; *Biochemistry* 18, 1979, 3343-3353.

Kurosaki K., Matsushita T., Ueda S.: „Individual DNA Identification from Ancient Human Remains.“; *Am. J. Hum. Genet.* 53, 1993, 638-643.

- Lambert J.B., Vlasak S., Simpson S.V., Szpunar C.B., Buikstra J.E.: „Bone diagenesis and dietary analysis.“; *J. of Human Evolution*; 1985; N°14, 477-482.
- Lambert J.B., Xue L., Buikstra J.E.: „Physical removal of contaminative inorganic material from buried bone.“; *J. A. S.*; 1989; N° 16, 427-436.
- Langlois E.H.: Steinantrieb in: ders., *Essai historique, philosophique et pittoresque sur les danses des morts*, Bd. 2, Lebroument, Rouen.
- Lareu M.V., Phillips C.P., Pestoni C., Barros F., Munoz J., Carracedo A.: „Anomalous Electrophoretic behaviour of HUMACTBP2 (SE33).“; *Advances in Forensic Haemogenetics* 5, Springer Verlag, 1994, 121-123.
- Lassen Cadja, Hummel S., Herrmann B.: „PCR Based Sex Identification of Ancient Human Bones by Amplification of X- and Y- Chromosomal Sequences: A Comparison.“; *Ancient Biomolekules* Vol. 1(1), Overseas Publishers Association Amsterdam B. V., 1996, 25-33.
- Lee H.C., Pagliaro E.M., Berka K.M., Folk M.L., Anderson D.T., Ruano G., Keith T.P., Phipps P., Herrin G.L., Garner D., Gaensslen R.E.: „Genetic markers in human bone: I. deoxyribonucleic acid (DNA) analysis.“; *Journal of Forensic Sciences* 36, 1991, 320-330.
- Letensorer J.M.: „Le Paléolithique de l’agenais.“; *CNRS Cahiers du Quatenaire*, Bordeaux; 1981; N° 3, 48.
- Lewin B.: „Gene - Lehrbuch der molekularen Genetik.“; VCH Verlag, Weinheim, 1988.
- Li H., Gyllensten U.B., Cui X., Saiki R.K., Erlich H.A., Arnheim N.: „Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells.“; *Nature* 335, 1988, 414-417.
- Lindahl T., Nyberg B.: „Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid.“; *Biochemistry* 11 (19), 1972, 3610-3618.
- Lundstrom R., Tavaré S., Ward R.H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1992, 5961.
- Lundstrom L., Tavaré S., Ward R.H.: „Estimating substitution rates from molecular data using the coalescent.“; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1992, 5961-5965.
- Lutz S., Weisser H.J., Heizmann J., Pollak S.: „mtDNA as a tool for identification of human remains, Identification using mtDNA“; *Int. J. Legal Med.* 109; 1996; 205-209.
- Lutz S., Weisser H.J., Heizmann J., Pollak S.: „Identifizierung menschlicher Überreste durch Amplifikation und Sequenzierung mitochondrialer DNA.“; *Poster bei 75. DGRM-Jahrestagung an der UNI-Zürich*, 1996 (a).
- Lutz S., Weisser H.J., Heizmann J., Pollak S.: „Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany.“; *Int. J. Legal Med.* 111, 1998, 67-77.

Lygo J.E., Johnson P.E., Holdaway D.J., Woodroffe S., Whitaker J.P., Clayton T.M., Kimpton C.P., Gill P.: „The validation of short tandem repeat loci for use in forensic casework.“; *Int J Leg Med* 107, 1994, 77-89.

Lyngstadaas S., Risnes S., Nordbo H., Flones A.: „Amelogenin gene similarity in vertebrates: DNA sequences encoding amelogenin seem to be conserved during evolution.“; *J Comp Physiol Bio* 160, 1990, 469-472.

MacGregor A.G.: „Bone, antler, ivory, and horn.“; *The technology of skeletal materials*, London, 1983, 23.

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

Martin R.: „Elektrophorese von Nukleinsäuren.“; *Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg Berlin Oxford*, 1996, 123, 76.

Maxam A., Gilbert W.: „A new method of sequencing DNA.“; *Proceedings of the National Academy of Science, USA* 74, 1977, 560-564.

McNally L., Shaler R.C., Baird M., Balazs I., Kobilinsky L., De Forest P.: „The Effects of Environment and Substrata on Deoxyribonucleic Acid (DNA): The Use of Casework Samples from New York City.“; *Journal of Forensic Sciences* 34 (5), JFSCA, 1989, 1070-1077.

McPherson M.J., Hames B.D., Taylor G.R.: „PCR 2 A practical approach.“; *IRL Press Oxford New York Tokyo*, 1995, 4, 12.

Meißner C., von Wurmb N., Oehmichen M.: „Zunahme der 4977bp-Deletion der mitochondrialen DNA mit steigendem Lebensalter.“; *Vortrag von 75. DGRM-Jahrestagung an der UNI-Zürich*; 1996.

Mertes G., Schäfer T., Schild T. A., Schmidt G., Schuster D., J. vom Stein : „ Automatische genetische Analytik.“; *VCH Verlagsgesellschaft mbH; D-69451 Weinheim*, 1997, 66-69, 37-38.

Miller O.J., Drayana D., Goodfellow P.: „Report of the committee on the genetic constitution of the X and Y chromosomes.“; *Cytogenet Cell Genet* 37, 1984, 176-205.

Mitchell R.J., Earl L., Fricke B.: „Y-chromosome specific polymorphisms; disequilibrium and haplotype distributions in four human populations.“; *AJPA Suppl.* 21, 1995, 155.

Mitchell R.J.: „Y-chromosome haplotype diversity and population histories.“; *AJPA Suppl.* 22, 1996, 171.

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

Möller A., Wiegand P., Grüşchow C., Seuchter S.A., Baur M.P., Brinkmann B.: „Population data and forensic efficiency values for the microsatellite systems HumVWA, HumMBP and HumFABP.“; *Int J Leg Med* 106, 1994a, 183-189.

Mörnstad H., Pfeiffer H., Yoon C., Teivens A.: „Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age.“; *Int J Legal Med* 112, 1999, 98-100.

Murray V., Monchawin C., England P.R.: „The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR.“; *Nucleic Acids Res* 21, 1993, 2395-2398.

Murray B.W., Clymont R.A., Strobeck C.: „Forensic identification of ungulate species using restriction digests of PCR-amplified mitochondrial DNA.“; *J. Forensic Sci.* 40, 1995, 943-951.

Müllenbach R., Makuch D., Wagner H.J., Blin N.: „Application of DNA filter hybridization and PCR to distinguish between human and non-human tissues of poor quality.“; *Int J Leg Med* 105, 1993, 307-309.

Müller E.: „Der Zelltod.“; *Hdb. Allg. Path.* II/1, H.W. Altmann, Springer Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1995, 613.

Müller U., Lalande M., Donlon T., Latt S.A.: „Moderately repeated DNA sequences specific for the short arm of the human Y chromosome are present in XX males and reduced in copy number in an XY female.“; *Nucleic Acids Res* 14, 1986, 1325-1340.

Nakahori Y., Hamano K., Iwaya M., Nakagome Y.: „Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer.“; *Am. J. Med. Genet.* 39, 1991, 472-473.

Nakahori Y., Tadenka O., Nakagome Y.: „A human X-Y homologous region encodes „Amelogenin“.“; *Genomics* 9, 1991, 264-269.

Nakamura S., Sawaguchi T., Sawaguchi A.: „Forensic Application of STR Polymorphic Markers.“; In: Carracedo A., Brinkmann B., Bär W.: *Advances in forensic Haemogenetics* 6, 16th Congress of the International Society for Forensic Haemogenetics, Santiago de Compostela, Springer Verlag, 1995, 589-591.

Neuffer-Müller Christiane: „Der alamannische Adelsbestattungsplatz und die Reihengräberfriedhöfe von Kirchheim am Ries. (Ostalbkreis); Kommissionsverlag Konrad Theiss Verlag Stuttgart, 1983, 9-17, 102-115.

Newnham J.: „Weltweit erste DNA-Datenbank in Großbritannien.“; *Kriminalistik* 10, 1996, 646-647.

Norby S., Eriksen B.: „Sex identification of forensic samples using PCR analysis for the presence of Y-chromosome specific DNA sequences.“; *Adv. Forensic Haemogenet.* 4, 1992, 38-40.

Odelberg S.J., White R.: „A method of accurate amplification of polymorphic CA-repeat sequences.“; *PCR Methods Appl* 3, 1993, 7-12.

Oorschot R., Gutowski S., Robinson S.: „HUMTH01: Amplification, species specificity, population genetics and forensic applications.“; *Int J Legal Med* 107, 1994, 121-126.

- Orrego C., King M.C., In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.): „PCR Protocols.“; Academic Press, London and San Diego, 1990, 416-426.
- Pääbo S.: „Molecular Cloning of Ancient Egyptian Mummy DNA.“; Nature 314, 1985, 644-645.
- Pääbo S., Higuchi R.G., Wilson A.C.: „Ancient DNA and the Polymerase Chain Reaction.“; Journal of Biological Chemistry Vol. 264, N° 17, 1989, 9709-9712.
- Pääbo S., Gifford J.A., Wilson A.C.: „Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year-old brain.“; Nucleic Acids Res. 16, 1988, 9775-9787.
- Pääbo S.: Ancient DNA: extraction, characterization, molecular cloning and enzymatic amplification.“; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86. 1989, 1939-1943.
- Pääbo S., Irwin D.M., Wilson A.C.: „DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification.“; J. Biol. Chem. 265, 1990, 4718-4721.
- Pääbo S.: „Ancient DNA.“; Scientific American, November 1993, 86-92.
- Pääbo S.: „Amplifying ancient DNA.“ In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) PCR Protocols. Academic Press, San Diego, 1990, 159-166.
- Parker R.B., Toots H.: „Trace element in bones as paleobiological indicators.“; In: Behrensmeyer, A.K. u. Hill, A.P. (Hrsg.) Fossils in the making. Vertebrate taphonomy and paleoecology, 1980, 197-207.
- Parker S.: „Skelette.“; Gerstenberg Verlag, 1988, 6, 62.
- Parsons T.J., Muniec D.S., Sullivan K., Woodyatt N., Alliston-Greiner R., Wilson M.R., Berry D.L., Holland K.A., Weedn V.W., Gill P., Holland M.M.: „A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region.“; Nature Genetics 15, 1997, 363-368.
- Parson W., Parsons T.J., Scheithauer R., Holland M.M.: „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, 1998, 124-132.
- Pate D.F., Hutton J.T.: „The use of soil chemistry data to address post-mortem diagenesis in bone mineral.“; J. A. S.; 1988; N° 15, 729.
- Paulsen P.: „Alamannische Adelsgräber von Niederstotzingen.“; Verlag Müller & Gräff Kommissionsverlag Stuttgart; 1967; S.13-18, 182-185.
- Pawlowski R., Szczerkowska Z., Hauser R.: „Die Optimierung der Amplifikations- und Detektionsbedingungen der Allele des HumF13B-Systems. Eine Populationsanalyse.“; Rechtsmedizin 9, 1999, 86-89.
- Peick M.: „Energie für den Tod.“; Laborjournal 10, 1999, 21.

Perry W.L.III, Bass W.M., Riggsby W.S., Sirotkin K.: „The autodegradation of DNA in Human Rib Bone and Its Relationship to the Time Interval Since Death.“; *Journal of Forensic Sciences, JFSCA*, 33(1), 1988, 144-153.

Persson P.: „A method to recover DNA from ancient bones.“; *Ancient DNA Newslett.* 1.1, 1992, 25-27.

Pfeiffer H., Hühne J., Seitz B., Brinkmann B.: „Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth.“; *Int J Legal Med* 112, 1999, 142-144.

Pfeiffer H., Steighner R., Fisher R., Mörnstad H., Yoon C.L., Holland M.M.: „Mitochondrial DNA extraction and typing from isolated dentin-experimental evaluation in a Korean population.“; *Int J Legal Med* 111, 1998, 309-313.

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

Pflug W.: „Zuordnung von Schußwaffen mittels DNA-Analyse.“; *Kriminaltechnik* Nr.12, 1997, 799-802.

Piercy R., Sullivan K.M., Benson N., Gill P.: „The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification“; *Int. J. Leg. Med.* 106, 1993, 85-90.

Poinar G. O. et al. (1982) *Science* 215, 1241-1242.

Poinar H.N., Höss M., Bada J.L., Pääbo S.: „Amino Acid Racemization and the Preservation of Ancient DNA.“; *Science* 272, 1996, 864-866.

Price D.T.: „Bone, chemistry and the human past.“; In: Price D.T. (Hrsg.) *The chemistry of prehistoric human bone*, 1989, 1-9.

Price D.T., Schoeninger M.J., Armelagos G.J.: „Bone chemistry and past behaviour: an overview.“; *J. of Human Evolution*; 1985; N° 14, 420-421.

Prinz M., Loch C., Schmitt C., Staak M.: „DNA-Typisierung nach Mehrfachvergewaltigung.“; *Rechtsmedizin* Nr. 3, 1993, 148-151.

Prinz M., Boll K., Baum H., Shaler B.: „Multiplexing of Y chromosomal specific STRs and performance for mixed samples.“; *Forensic Sci Int* 85, 1997, 209-218.

Puers C., Hammond H.A., Jin L., Caskey T., Schumm J.W.: „Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HumTH01 (AATG) and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder.“; *Am J Hum Genet* 53, 1993, 953-958.

Pusch C., Scholz M.: „Detecting Prehistoric Human DNA: Construction and Screening of a Small-Scale Plasmid Library Reveals a New Repetitive and Tandemly Organized 25 bp Motif.“; *Ancient Biomolecules* 00, 1998, 1-19.

Raymond S., Weintraub L.; *Science* 130, 1959, 711.

- Reischl U., Hell W.: „Moderne Methoden der Nukleinsäure-Diagnostik.“; Lab.-Med. 17, 1993, 456-464.
- Ritter H.: „On the statistics of the „genetic fingerprint.“; Int. J. Leg. Med. 104, Springer Verlag, 1991, 307-308.
- Roewer L.: „Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study.“; Int J Legal Med 110 (3), 1997, 125-133, 141-149.
- Roewer L., Arnemann J., Spurr N.K., Grzeschik K.H., Epplen J.T.: „Simple repeat sequences on the human Y-chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts.“; Hum Genet 89, 1992, 389-394.
- Ruano G., Brash D., Kidd K.: „PCR: The first few cycles.“; Amplifications 7, 1991, 1-4.
- Ruano G., Fenton W., Kidd K.K.: „Biphasic amplification of very diluted DNA samples via „booster“ PCR.“; Nucl. Acids Res. 17, 1989, 5407.
- Runia L.T.: „Strontium and Calcium distribution in Plants: Effect on paleodietary studies.“; J. A. S.; 1987 (a); N°14, 599-608.
- Runia L.T.: „The chemical analysis of prehistoric bone.“; B.A.R. Int. Ser. 363. Oxford, 1987 (b), 92.
- Russel P.J.: „Genetik.“; Springer Verlag Berlin Heidelberg New York; 1983, 120.
- Rychlik W.: „Selection of primers for polymerase chain reaction. In: White B.A. (ed.) PCR protocols; Methods in Molecular Biology 15, 1993, 31-40.
- Sajantila A., Ström M., Budowle B., Karhunen P.J., Peltonen L.: „The PCR and post-mortem forensic identity testing: application of amplified D1S80 and HLA-DQ α loci to the identification of fire victims.“; Forensic Sci Int 51, 1991, 23-34.
- Sajantila A.: „DNA Analysis in Forensic Medicine: application of the PCR to the identification of individuals.“; Dissertation, Helsinki, 1992.
- Sakalová S., Lipsic T.: „Hematologia a Transfuziologia.“; Vydavateľstvo Osveta, Bratislava, 1995, 34-35.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: „Molecular Cloning.“; A laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Book 1, 1989, 6.12.
- Sanchez-Hanke M., Augustin C., Schürenkamp M., Püschel K.: „Möglichkeiten der DNA-Typisierung aus Fingernagelanhaftungen nach Kratzen.“; Rechtsmedizin Nr. 6, 1996, 161-164.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R.: „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.“; Proceedings of the National Academy of Science USA 74, 1977, 5463-5467.

- Santos F.R., Bianchi N.O., Pena S.D.J.: „Worldwide distribution of human Y-chromosome haplotypes.“; *Genome Res.* 6, 1996, 601-613.
- Santos F.R., Pandya A., Tyler-Smith C.: „Reliability of DNA-based sex tests.“; *Nat Genet* 18, 1998, 103-104.
- Sarkar G., Kapelner S., Sommer S.S.: „Formamide can dramatically improve the specificity of PCR.“; *Nucl. Acids Res.* 18, 1990, 7465.
- Savolainen P., Rosen B., Holmberg A., Leitner T., Uhlén M., Lundeberg J.: „Sequence Analysis of Domestic Dog Mitochondrial DNA for Forensic Use.“; *Journal of Forensic Sciences* 42 (4); 1997; 593-600.
- Scarpetta M.A.: „Use of SYBR Green I stain in place of silver stain for detection of D1S80 AMP-FLPs on GeneAmp Detection Gels.“; *Resolutions* 11, 1996, 1-5.
- Schatt W. (Hrsg. Autorenkollektiv): „Einführung in die Werkstoffwissenschaft.“; 6.Auflage, Heidelberg, 1987, 351.
- Schachtschabel P., Blume H.D., Brümmer G., Hartge K.H., Schwertmann U.: „Lehrbuch der Bodenkunde.“; 12. Neubearb. Aufl., Stuttgart, 1989, 14, 64, 108, 116-117.
- Scheinert P.: „Primerdesign und Wahl stringenter Reaktionsbedingungen.“; *BioTec* 4, 1997, 52-54.
- Scheinert P., Schalk H.J., Kroll C.: „Optimierung der PCR-Amplifikation komplexer Mischungen durch spezifitätssteigernde Additive und Temperaturgradienten-PCR.“; *BioTec* 5, 1997, 54-55.
- Schmitt C., Schmutzler A., Prinz M., Staak M.: „High sensitive DNA typing approaches for the analysis of forensic evidence: comparison of nested variable number of tandem repeats (VNTR) amplification and a short tandem repeats (STR) polymorphism.“; *Forensic Sci Int* 66, 1994, 129-141.
- Scholz M., Pusch C.: „An efficient isolation method for high-quality bone-sampled ancient DNA.“; *Technical Tips Online* T01045, 1997.
- Schultes T., Hummel S., Herrmann B.: „Recognizing and Overcoming Inconsistencies in Microsatellite Typing of Ancient DNA Samples.“; *Ancient Biomolecules*, Vol. 1, Overseas Publishers Association OPA, 1997, 227-333.
- Schultes T., Hummel S., Herrmann B.: „Recognizing and overcoming inconsistencies in microsatellite typing of ancient DNA samples.“; *Ancient Biomol* 1, 1997, 227-233.
- Schultes T., Hummel S., Herrmann B.: „Zuordnung isolierter Skelettelemente mittels aDNA-typing.“; *Anthrop Anz* 55, 1997, 207-216.
- Seidl C., Müller S., Jäger O., Seifried E.: „Sequence analysis and population data of short tandem repeat polymorphisms at loci D8S639 and D11S488.“; *Int J Legal Med* 112, 1999, 355-359.

Seidl C., Jäger O., Seifried E.: „A Tetraplex PCR system for the analysis of paternity cases.“; In: Carracedo A., Brinkmann B., Bär W.: *Advances in forensic Haemogenetics* 6, 16th Congress of the International Society for Forensic Haemogenetics, Santiago de Compostela, Springer Verlag, 1995, 142-144.

Sensabaugh G. F., von Beroldingen C.: „Genetic Typing of Biological Evidence using the Polymerase chain reaction.“; In: Farley M. A., Harrington J.J. (eds) *Forensic DNA Technology*, Chelsea, Mich.:Lewis Publishers, 1971, 63-82.

Sidow A., Wilson A., Pääbo S.: „Bacterial DNA in *Clarkia* fossils“, in: G. Erlington &G. Curry (eds), „*Molecules through time*“; Vol.333, Royal Society of London, 1991, 429-433.

Sledzik P.S., Micozzi M.S.: „Autopsied, embalmed, and preserved human remains: distinguishing features in forensic and historic contexts.“ In: Haglund W.D., Sorg M.H. (eds) *Forensic taphonomy. The postmortem fate of human remains*. CRC Press, Boca Raton Boston London New York Washington, 1997, 483-495.

Smith J.C., Anwar R., Riley J., Jenner D., Markham A.F., Jeffreys A.J.: „Highly polymorphic minisatellite sequences: Allele frequencies and mutation rates for five locus specific probes in a Caucasian population.“; *J. Forensic Sci. Soc.* 30, 1990, 19.

Schmitt C, Prinz M.: „Anwendbarkeit eines DNA-Sequenzierautomaten für die PCR-Typisierung von forensischen Spuren.“; *Rechtsmedizin* 6, Springer Verlag, 1996, 45-48.

Stephan E.: „Die chemische Analyse von prähistorischen Knochen und Sedimenten aus vier zeitlich und regional unterschiedlichen Fundorten. Vergleichende Untersuchungen zum Erhaltungszustand von Knochen und der Eignung von Spurenelementen zur Nahrungsrekonstruktion“; Magisterarbeit an der Geowissenschaftlichen Fakultät in Tübingen; 1992.

St. Hoyme L.E., Iscan M.Y.: „Determination of sex and race: accuracy and assumptions.“ In MY Iscan and KAR Kennedy (eds.): *Reconstruction of Life from the Skeleton*. New York: Alan R. Liss, 1989, 53-93.

Stoneking M.: „Ancient DNA: How Do You Know When You Have It and What Can You Do with It ?“; *Am. J. Hum. Genet.* 57, 1995, 1259-1262.

Strachan T., Read A.P.: „Molekulare Humangenetik.“; Spektrum Akademischer Verlag GmbH- Heidelberg, Berlin, Oxford, 1996, 241-242.

Strassmann G.: „Über Leichenveränderungen, autolytische, Fäulnis- und Verwesungsvorgänge.“; *Dtsch. Z. gerichtl. Med.* 3, 1924, 359-371.

Strom Ch.M., Rechitsky S.: „Use of Nested PCR to Identify Charred Human Remains and Minute Amounts of Blood.“; *J Forensic Sci* 43(3), 1998, 696-700.

Sullivan K.M., Hopgood R., Lang B., Gill P.: „Automated amplification and sequencing of human mtDNA.“; *Electrophoresis* 12, 1991, 17-21.

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

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

Thomas M. G., Schaffner W., Wilson A.C., Pääbo S.: „DNA phylogeny of the extinct marsupial wolf.“; *Nature* 340, 1989, 465-467.

Thomas M. G., Hesse S.A., Al-Mahdawi S., Bui T.D., Moniz C.F., Farzaneh F.: „A Reliable Method for the Removal of Co-Purifying PCR Inhibitors from ancient DNA.“; *Biotechniques* Vol. 16, Nr. 2, 1994, 233-234.

Toussaint: „Die mumification der Leichen.“; *Kasper's Vierteljahresschr.* 11, 1857, 203-233.

Trübner K., Wiegand P., Krüger A., Kleiber M.: „Leichenidentifizierung mittels DNA-Analyse.“; *Kriminalistik* 11, 1998, 745-747.

Tutsch-Bauer E.: „Gentechnologische Methoden in der Rechtsmedizin.“; *Münch. med. Wschr.* 133, Nr.27, MMV Medizin Verlag GmbH München, 1991, 429-431.

Tyler-Smith C., Taylor L., Müller U.: „Structure of hypervariable tandemly repeated DNA sequence on the short arm of the human Y chromosome.“; *J Mol Biol* 203, 1988, 837-848.

Urist M.R.: „Biochemistry of calcification.“; In: Bourne G.H. (Hrsg.) *The biochemistry and physiology of bone.*; 1976; Vol. IV Calcification and Physiology, 18-19.

Urquhart A.J., Oldroyd N.J., Downes T., Barber M., Alliston-Greiner R., Kimpton C.P., Gill P.D.: „Selection of STR loci for forensic identification systems.“; *Advances in Forensic Haemogenetics* 6, Springer Verlag, 1995, 115-117.

Urquhart A., Kimpton C.P., Downes T.J., Gill P.: „Variation in short tandem repeat sequences-a survey of twelve microsatellite loci for the use as forensic identification markers.“; *Int J Legal Med* 107, 1994, 13-20.

Vaughan J.: „The physiology of bone.“; 3. Aufl. Oxford; 1981; 6-9, 59-69, 92-101.

Vergnaud G., Page D., Simmler M.C., Brown L., Rouyer F., Noel B., Botstein D., Chapelle A., Weissenbach J.: „A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization.“; *Am J Hum Genet* 38, 1986, 109-124.

Vogel F., Motulsky A.G.: „Human genetics.“; Springer Verlag Berlin Heidelberg New York, 1986.

Waite E.R., Child A.M., Craig O.E., Collins M.J., Gelsthorpe K., Brown T.A.: „A preliminary investigation of DNA stability in bone during artificial diagenesis.“; *Bull. Soc. Géol. France* 168 (5), 1997, 547-554.

Wallace D.C., Lott M.T., Torroni A., Shoffner J.M.: „Report of the committee on human mitochondrial DNA.“; *Cytogenet. Cell Genet.* 58, 1991, 1103-1123.

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

Walsh P.S., Erlich H.A., Higuchi R.: „Preferential PCR Amplification of Alleles: Mechanisms and Solutions.“; PCR Methods and Applications 1, 1992, 241-250.

Ward R.H., Frazier B.L., Dew-Jaeger K., Pääbo S.; Ibid. 88, 1991, 8720.

Watson J., Spencer J., Marshall Graves J., Snead M., Lau E.: „Autosomal localization of the amelogenin gene in monotremes and marsupials: Implications for mammalian sex chromosome evolution.“; Genomics 14, 1992, 785-789.

Werner J.: „Forensische Histologie.“; Verlag Max Schmidt-Römhild Lübeck, 1977, 52.

White B. (ed.): „PCR Protocols: current methods and applications. In: Methods in Molecular Biology.“; Vol. 15, Humana Press, Totowa New Jersey, 1993.

Wiegand P., Rand S., Bajanowski T.: „Möglichkeiten der DNA-Typisierung an exhumierten Leichengewebe.“; Rechtsmedizin Nr. 3, 1992, 10–13.

Wiegand P., Madeja M., Brinkmann B.: „Investigation on vaginal cell/sperm mixtures from microscopical slides. In: Bär W., Fiori A., Rossi U. (eds.) Advances in Forensic Haemogenetics 5; Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York, 1994, 256-258.

Wiegand P., Bajanowski T., Brinkmann B.: „DNA typing of debris from fingernails.“; Int J Leg Med 106, 1993, 81-84.

Wiegand P., Lareu M.V., Schürenkamp M., Kleiber M., Brinkmann B.: „D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics.“; Int J Legal Med 112, 1999, 360-363.

Williams C.T., Potts P.J.: „Elements distribution maps in fossil bones.“; Archeometry 30; 1988; N°2.

Wilson M.R., Polansky D.P., Butler J., DiZinno J.A., Replogle J., Budowle B.: „Extraction, PCR amplification and sequencing of mitochondrial DNA from human hair shafts.“; BioTechniques 14; 1995; 662-669.

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

Wink M., Wehrle H.: „PCR in medizinischen und biologischen Labor. Handbuch für den Praktiker.“; GIT Verlag GmbH, Darmstadt D-64220, 1994, 24-32, 35-36.

Witt M., Erickson R.P.: „A rapid method for detection of Y-chromosomal DNA from dried blood specimens by the polymerase chain reaction.“; Hum. Genet. 82, 1989, 271-274.

Wolfe J., Darling S.M., Erickson R.P., Craig D.W., Buckle V.J., Rigby P.W.J., Willard H.F., Goodfellow P.N.: " Isolation and characterization of an alphoid centromeric repeat family from the human Y chromosome."; J. Mol. Biol. 182: 477-485.

Zeichmann W., Müller-Wegener U.: „Bodenchemie“; Wissenschaftsverlag, Mannheim /Wien / Zürich; 1990; 23,32-33, 38, 101, 182-183, 201.

Zhang L., Cui X., Schmitt K.: „Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis.“; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1992, 5847-5851.

Zierdt H., Hummel S., Herrmann B.: „Amplification of human short tandem repeats from medieval teeth and bone samples.“; Hum. Biol. 68, 1996, 185-199.