

Rechtsmedizin 2004 · 14:473–484
 DOI 10.1007/s00194-004-0297-8
 Online publiziert: 18. November 2004
 © Springer Medizin Verlag 2004

Redaktion

B. Madea · Bonn

Die Beiträge der Rubrik „Weiterbildung · Zertifizierte Fortbildung“ sollen dem Facharzt als Repetitorium dienen und dem Wissensstand der Facharztprüfung für den Arzt in Weiterbildung entsprechen. Die Rubrik beschränkt sich auf gesicherte Aussagen zum Thema.



Zertifizierte Fortbildung online bei Springer!

Mit dem in 2004 in Kraft getretenen GKV-Modernisierungsgesetz sind Vertragsärzte wie auch im Krankenhaus tätige Ärzte verpflichtet, sich regelmäßig fachlich fortzubilden. Der Gesetzgeber fordert, dass der Vertragsarzt innerhalb von fünf Jahren 250 Fortbildungspunkte erwirbt und der Nachweis erstmalig bis zum 30. Juni 2009 zu erbringen ist.

Das CME-Angebot mit der gedruckten Zeitschrift und dem Online-Dienst cme.springer.de bietet die Möglichkeit, die Fragen am Ende dieses Beitrags online zu beantworten und somit wichtige Zertifizierungspunkte zu sammeln. Die Teilnahme an diesem Angebot ist Bestandteil Ihres Individualabonnements.

Für diese Fortbildungseinheit erhalten Sie drei Fortbildungspunkte, wenn Sie 70% der Fragen richtig beantwortet haben bzw. Ihr Ergebnis nicht unter dem Durchschnitt aller Teilnehmer liegt. Hinweise zur Bescheinigung und den Lösungen finden Sie online unter cme.springer.de. Reichen Sie Ihre Teilnahmebestätigung zur Erlangung des Fortbildungszertifikats bei Ihrer zuständigen Ärztekammer ein.

Diese Initiative ist zertifiziert von der Landesärztekammer Hessen und der Nordrheinischen Akademie für Ärztliche Fort- und Weiterbildung und damit auch für andere Ärztekammern anerkennungsfähig.

Für Rückfragen stehen wir Ihnen jederzeit zur Verfügung:

Springer Medizin Verlag GmbH
Fachzeitschriften Medizin/Psychologie
CME-Helpdesk, Tiergartenstraße 17
69121 Heidelberg
E-Mail: cme@springer-sbm.com

cme.springer.de

B. Rolf¹ · P. Wiegand²

¹ Institut für Rechtsmedizin, Ludwig-Maximilian-Universität München

² Abteilung Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Ulm

Analyse biologischer Spuren

Teil III: Mitochondriale DNA und Y-chromosomale STR

Zusammenfassung

Die Analyse der mitochondrialen DNA (mtDNA) und von Y-chromosomalen STR zur Untersuchung von biologischen Spuren ist heute weit verbreitet. Speziell bei Spuren mit zu geringem Gehalt an nukleärer DNA, wie z. B. telogenen oder wurzellosen Haaren, Knochen, Zähnen oder stark degradierten Proben, ist die Sequenzierung von mtDNA die Methode der Wahl. Aufgrund der maternalen Vererbung, der großen Sensitivität und dem Auftreten von Heteroplasmien unterscheidet sich die mtDNA von der Kern-DNA. Dieser Artikel beleuchtet die verschiedenen Aspekte der Biologie und Genetik der mtDNA und die forensische Spurenkunde mit Hilfe der mtDNA. Y-chromosomale STR sind besonders bei den Untersuchungen von Mischspuren ein wertvolles Werkzeug. Bei Mischspuren mit einem Überschuss an weiblicher DNA kann für den männlichen Anteil der Mischung ein Muster erstellt werden. Daher sind die Y-STRs in der Spurenkunde eine sinnvolle Ergänzung zur Untersuchung der autosomalen STR-Marker.

Schlüsselwörter

Mitochondriale DNA · mtDNA · Heteroplasmie · Y-STRs · Biologische Spuren

Analysis of biological stains. Part III: mitochondrial DNA and Y-chromosomal STR

Abstract

The analysis of mitochondrial DNA and of Y-chromosomal STR markers to investigate biological stains is widely used today. Especially for stain material that does not contain sufficient nuclear DNA, such as telogen or rootless hair, bones, teeth, or severely degraded samples, sequencing of mtDNA has become the method of choice. The maternal segregation, the high sensitivity, and the presence of heteroplasmic sites makes mtDNA investigations different from nuclear DNA testing. This article highlights the various aspects of the biology and genetics of mtDNA and forensic stain investigations using mtDNA. Y-chromosomal STR are especially valuable for the investigation of mixed stains. In cases of mixed stain samples with an excess of female DNA, it is possible to determine a profile for the male contributor to the stain. Therefore, Y-STRs are a useful complement to the investigation of autosomal STR markers.

Keywords

Mitochondrial DNA · mtDNA · Heteroplasmy · Y-STRs · Biological stains

Mitochondriale DNA

Biologie der mitochondrialen DNA

Ein kleiner Teil des menschlichen Genoms liegt nicht in den Zellkernen vor (Kern-DNA bzw. nukleäre DNA), sondern in den Mitochondrien. Mitochondrien sind Zellorganellen, die durch eine Doppelmembran vom Rest der Zelle getrennt sind. Sie enthalten die Enzyme der Atmungskette, des Fettabbaus, der oxidativen Phosphorylierung und des Zitronensäurezyklus. Man geht davon aus, dass sich die Mitochondrien aus intrazellulären Symbionten bakteriellen Ursprungs entwickelt haben (sog. Endosymbiontentheorie).

In den Mitochondrien findet sich ein eigenes, kreisförmiges Genom, die mitochondriale DNA (mtDNA). Im Vergleich zur DNA aus dem Zellkern ist die mtDNA sehr klein, sie weist nur 16.569 Basenpaare auf im Gegensatz zu 3,3 Milliarden Basenpaaren im Zellkern. Für alle Gene auf der mtDNA ist die Funktion bzw. das Genprodukt bekannt; Introns kommen auf der mtDNA nicht vor. Es gibt 13 proteinkodierende Gene sowie 2 ribosomale RNA- (rRNA-) und 22 Transfer-RNA- (tRNA-)Gene. Die beiden Stränge der zirkulären mtDNA haben eine asymmetrische G/C-Verteilung; in der Folge spricht man von einer schweren (H-) und einer leichten (L-)Kette (engl. H=“heavy“ und L=“light“, **Abb. 2**). Die in der Kern-DNA häufig auftretenden Längenpolymorphismen finden sich so gut wie gar nicht in der mtDNA. Die Kontrollregion kodiert nicht für Proteine bzw. tRNAs oder rRNAs und erstreckt sich von Position 16.024-576, also über knapp 1100 bp. Innerhalb der Kontrollregion liegt auch der sog. „displacement loop“ bzw. kurz „D-loop“, der im Rahmen der Replikation der mtDNA von Bedeutung ist. Für die forensische Praxis werden zumeist 2 Bereiche der Kontrollregion sequenziert, die sog. **hypervariablen Regionen I und II** (kurz HV1 und HV2) zwischen den Nukleotidpositionen 57-372 und 16.024-16.383, da sich in diesem Bereich die meiste **Sequenzvariation** findet. Da die Sequenz der mtDNA schneller mutiert als die nukleäre DNA, lassen sich in diesen beiden Bereichen in der Regel mehrere Unterschiede zwischen nichtverwandten Personen finden. Durchschnittlich unterscheiden sich 2 Europäer in ca. 8 Sequenzpositionen (**Abb. 1**)

Die Vererbung der Mitochondrien und auch der mtDNA erfolgt maternal. Die Mitochondrien der Eizelle werden an die Kinder weitergegeben. In dem Teil der Spermien, der in die Eizelle aufgenommen wird, befinden sich keine Mitochondrien. In der Folge weisen Söhne und Töchter die mtDNA der Mutter auf, die Söhne geben diese DNA aber nicht an ihre Nachkommen weiter. Über mehrere Generationen betrachtet, haben dann alle Angehörigen einer mütterlichen Linie dieselbe mtDNA. Rekombination zwischen der väterlichen und mütterlichen mtDNA findet praktisch nicht statt. Obwohl in den letzten Jahren einige Arbeiten erschienen sind, in denen die Möglichkeit der Rekombination zwischen paternaler und maternaler mtDNA diskutiert wird, sind diese Ereignisse so selten (wenn es sie überhaupt gibt), dass sie für forensische Fragestellungen kei-

Im Vergleich zur DNA aus dem Zellkern ist die mtDNA sehr klein

Für die forensische Praxis werden zumeist 2 Bereiche der Kontrollregion sequenziert

- ▶ **Hypervariable Regionen I und II**
- ▶ **Sequenzvariation**

Die Vererbung der Mitochondrien und auch der mtDNA erfolgt maternal

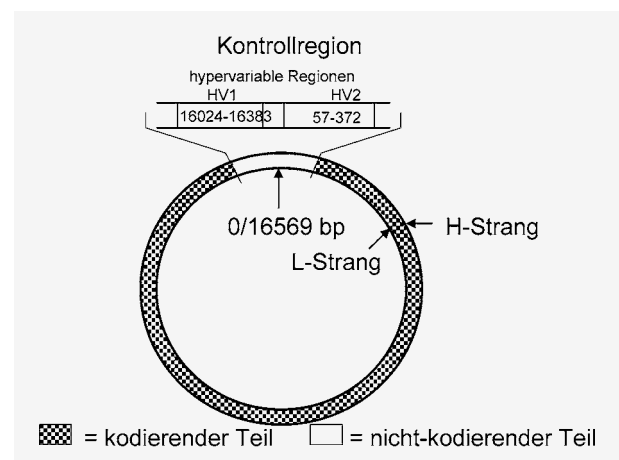


Abb. 1 ▶ Karte der mitochondrialen DNA

Tabelle 1

Vergleich zwischen nukleärer und mtDNA		
Eigenschaft	Nukleäre DNA	mtDNA
Größe	~3,3 Milliarden bp	16.569 bp
Anzahl Kopien pro Zelle	2	Bis >1000
Ploidiegrad	Diploid	Haploid
Struktur	Linear, als Chromosom verpackt	Zirkulär
Vererbung	Je 50% Vater und Mutter	Rein maternal
Mutationsrate	Niedrig	Mindestens 5- bis 10-mal höher
Rekombination	Ja	Nein

ne Rolle spielen [3]. Bei Identifikationen mit Hilfe der mtDNA kann aufgrund der Vererbung leicht eine Vergleichsprobe von Familienangehörigen mit in die Untersuchung einbezogen werden. Im Spurenfall erweist sich die Vererbung der mtDNA aber als Nachteil, denn wenn Verwandte in der mütterlichen Linie des Tatverdächtigen ebenfalls als Spurenverursacher in Frage kommen, kann zwischen diesen Personen mit Hilfe der mtDNA nicht differenziert werden.

Eine Vielzahl von degenerativen Erkrankungen z. B. des ZNS, des Herzens, der Muskeln, der Leber etc. konnten auf Mutationen der mtDNA zurückgeführt werden. Dabei sind sowohl Basenaustausche als auch Insertions-/Deletionspolymorphismen die Ursache. Erkrankungen, die auf Basenaustausche zurückzuführen sind, werden – wie die mtDNA selbst – auch mütterlich vererbt.

Aufgrund der mitochondrialen Fähigkeit zur Selbstduplikation kommen in einer Zelle mehrere Mitochondrien vor (aber nur 1 Zellkern), und die Mitochondrien enthalten jeweils eine Vielzahl von Kopien der mitochondrialen DNA (im Gegensatz zu nur 2 Kopien der Kern-DNA im Zellkern). Je nach Zellart kann so das Verhältnis Kern-DNA zu mtDNA 1:1000 oder sogar höher betragen. Aus diesen Gründen ist die mtDNA in der Rechtsmedizin besonders für Untersuchungen geeignet, bei denen die Menge an Ausgangsmaterial limitiert ist, denn die höhere Kopienzahl pro Zelle wirkt sich direkt auf die Sensitivität und Nachweisgrenze der Untersuchung aus. Dies trifft besonders auf altes und degradiertes Spurenmaterial zu wie Knochenfunde, stark fäulnisveränderte Leichen oder Gewebe sowie auf telogene oder wurzellose Haare.

In **■ Tabelle 1** sind die Eigenschaften der mtDNA im Vergleich zur nukleären DNA noch einmal zusammengestellt.

Nomenklatur

Die heute übliche Nomenklatur geht zurück auf die erste publizierte Sequenz der humanen mtDNA [1]. Alle Basen des mitochondrialen Genoms wurden von 1–16.569 durchnummeriert. Die mtDNA-Sequenz wurde von Andersen et al. 1981 in der Zeitschrift Nature publiziert. Diese Sequenz wird heute als ► **„Andersen-Sequenz“** oder auch als ► **Cambridge Reference Sequence** (CRS) bezeichnet. Das Ergebnis einer Sequenzierung wird dann als Unterschied zur Andersen-Sequenz angegeben. Dabei wird immer auf den L-Strang Bezug genommen. Zum Beispiel ist die Position 16.189 ein T in der Andersen-Sequenz. Wird aber in der Probe ein C gefunden, gibt man 16.189C als Ergebnis an. Positionen ohne Unterschied zu Andersen werden nicht erwähnt.

Neben Basenaustauschen lassen sich auch Insertionen bzw. Deletionen in der mtDNA beobachten. Auch für diese Fälle gibt es eine Nomenklaturvereinbarung. Eine fehlende Base wird durch ein d gekennzeichnet, z. B. bedeutet 125d, dass die Base mit der Nummer 125 deletiert ist. Bei Insertionen wird die eingefügte Base nach der vorangehenden Position mit dem Suffix.1 und dem Kürzel der Base selbst benannt. Ein Beispiel: Eine Insertion von einem A nach der Position 16.095 wird als 16.095.1A bezeichnet. Da diese Re-

Wenn Verwandte in der mütterlichen Linie des Tatverdächtigen als Spurenverursacher in Frage kommen, kann zwischen diesen Personen mit Hilfe der mtDNA nicht differenziert werden

Je nach Zellart kann das Verhältnis Kern-DNA zu mtDNA 1:1000 oder höher betragen

- **„Andersen-Sequenz“**
- **Cambridge Reference Sequence**

► IUPAC-Codes

Die Untersuchung von mtDNA ist aufgrund der hohen Sensitivität der Methode extrem kontaminationsanfällig

► Maßnahmen

Vorkommen von zwei (oder mehr) unterschiedlichen mtDNA-Sequenzen in einem Individuum

► Sequenzheteroplasmie

► Längenheteroplasmie

gel für Bereiche mit mehreren gleichen Basen nacheinander, sog. homopolymeren Bereichen, nicht eindeutig wäre, hat man hier vereinbart, dass die Insertion per Definition am Ende des Bereichs erfolgt. Eine Insertion im C-Stretch von 311–315 ist dann immer eine Insertion hinter der letzten Base und somit 315.1C und eine 2. Insertion in diesem Bereich ist 315.2. Heteroplasmatische Befunde können nach den ► **IUPAC-Codes** benannt werden, z. B. Y für eine C/T-Heteroplasmie oder mit einem N.

Vermeidung von Laborkontaminationen

Obwohl eine gute Laborpraxis zur Vermeidung von Kontaminationen für alle Arten von DNA-Untersuchungen wichtig ist, ist die Untersuchung von mtDNA aufgrund der hohen Sensitivität der Methode extrem kontaminationsanfällig. Daher soll hier kurz dargestellt werden, welche ► **Maßnahmen** im Labor notwendig sind, um Kontaminationen möglichst zu vermeiden [13].

- Es müssen getrennte Prä- und Post-PCR-Bereiche vorhanden sein.
- Reagenzien und Geräte sollten durch UV-Licht und chemisch dekontaminiert werden.
- Während der Extraktion und der PCR-Amplifikation sollen geeignete Negativ- und Reagenzienkontrollen mitgeführt werden.
- Eine Positivkontrolle sollte während der PCR und der Sequenzierreaktion mitgeführt werden.
- Jede Untersuchung sollte 2 mal durchgeführt werden. Ergebnisse, die sich nicht reproduzieren lassen, sollen im Gutachten als solche gekennzeichnet werden.
- Spurenmaterial und Vergleichsmaterial sollten nicht gleichzeitig untersucht werden. Wenn die Untersuchung nicht in getrennten Bereichen erfolgen kann, sollte zuerst das Spurenmaterial und danach die Vergleichsprobe untersucht werden.
- Die erhaltenen Befunde sollten mit den Sequenzen des Laborpersonals verglichen werden.
- Das Laboratorium sollte an geeigneten Ringversuchen teilnehmen.

Heteroplasmie

Mit Heteroplasmie bezeichnet man das Vorkommen von zwei (oder mehr) unterschiedlichen mtDNA-Sequenzen in einem Individuum. Aufgrund der Mutationsrate der mtDNA und dem Vorliegen von mehreren Kopien der mtDNA in der Zelle führt eine Mutation von einem mtDNA-Molekül zu Heteroplasmie. Je nach Verhältnis der beiden Varianten zueinander wird diese Heteroplasmie dann bei der Sequenzierreaktion sichtbar oder bleibt unterhalb der Nachweisgrenze. Dabei ist zu unterscheiden zwischen Sequenzheteroplasmie und Längenheteroplasmie.

Von ► **Sequenzheteroplasmie** spricht man, wenn in der Sequenzierreaktion an einer Position zwei Signale erhalten werden. Wird ein solcher Befund im Spurenmaterial und in der Vergleichsprobe beobachtet, ergibt sich ein weiterer Hinweis darauf, das Spurenmaterial und Vergleichsprobe von einer Person bzw. aus einer mütterlichen Linie stammen. Die **▣ Abb. 2** zeigt eine heteroplasmatische Position. Treten mehrere solche Positionen in einer Sequenz auf, muss man auch eine Kontamination oder Mischung, d. h. das Vorliegen von mtDNA von zwei verschiedenen Personen, in Betracht ziehen. Prominentes Beispiel für eine Heteroplasmie ist der Zar Nikolaus II. Bei der Identifikation der Knochenfunde im Vergleich mit lebenden maternalen Angehörigen ergab sich eine heteroplasmatische Position an der Stelle 16.169 bei dem Knochenfund, die in den Vergleichsproben nicht nachgewiesen wurde [4].

► **Längenheteroplasmie** wird vor allem bei den Polycytosinsträngen beobachtet, die es sowohl in der HV1 wie auch in der HV2 gibt. Liegen verschieden lange Moleküle als Template für die Sequenzierreaktion vor, überlagern sich die Sequenzierprodukte ab dieser Position, die Sequenz kann nicht mehr gelesen werden (**▣ Abb. 3**). In der HV1 ist dies besonders oft der Fall bei Sequenzen mit der Variante 16.189C. Dieser Austausch führt

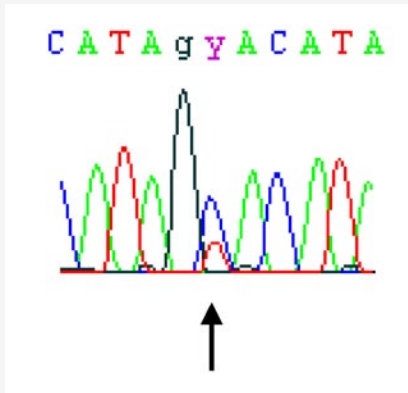


Abb.2 ▲ Sequenzheteroplasmie in der mtDNA. Elektropherogramm einer Sequenzierreaktion, der Pfeil zeigt eine Stelle mit einer C/T-Heteroplasmie (Y=C oder T)

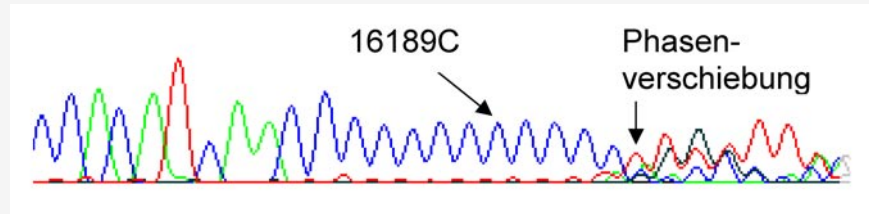


Abb.3 ▲ Längenheteroplasmie in der mtDNA. Elektropherogramm einer Sequenzierreaktion der hypervariablen Region 1 um Position 16.189. In der Abbildung sind der T/C-Austausch an Position 16.189 und die Phasenverschiebung der Sequenzierreaktion am Ende des C-Stranges durch einen Pfeil hervorgehoben

zu einem besonders langen C-Strang, der oft aus mehreren unterschiedlich langen Strängen besteht (■ Abb. 3).

Interpretation der Befunde

Die Interpretation der Befunde einer mtDNA-Untersuchung sollte immer auf einer ► **Doppelbestimmung jeder Probe** basieren. Wann immer möglich, sollten Strang und Gegenstrang sequenziert werden. Die zu beantwortende Frage lässt sich dann häufig auf die Formel reduzieren:

- Stammen Spurenmaterial und Vergleichsprobe von einer Person bzw. aus einer mütterlichen Linie?
- Oder aber:
- Stammen Spurenmaterial und Vergleichsprobe von verschiedenen Personen bzw. aus unterschiedlichen mütterlichen Linien?

Für einen Einschluss ist zu fordern, dass beide Sequenzen identisch sind, also vollkommen übereinstimmen. In diesem Fall kann sich eine statistische Interpretation anschließen. Ein Ausschluss sollte auf mehreren Sequenzunterschieden basieren. Dazwischen gibt es eine ► „Grauzone“, und zwar wenn sich die Sequenz von Spurenmaterial und Vergleichsprobe nur an 1 Position unterscheiden bzw. eine von beiden Sequenzen heteroplasmatisch ist. In so einem Fall kann man weder von einem direkten Ausschluss noch von einem Einschluss sprechen. Im Gutachten sollten beide Möglichkeiten offen gelassen bzw. abgewogen werden. Hier ist dann zu berücksichtigen, wie viel Generationen zwischen Spur und Vergleichsprobe liegen (z. B. Probe fraglicher Enkel, Vergleich mit Großmutter) oder ob z. B. eine Blutspur mit einer Speichelprobe der möglicherweise gleichen Person verglichen wird. Da die Mutationsraten der einzelnen Positionen der mtDNA nicht bekannt sind, und da auch nicht bekannt ist, über wie viele Generationen Heteroplasmien stabil vererbt werden bzw. wie schnell eine Heteroplasmie durch „Bottleneck (Flaschenhals)“-Effekte zu einer einzelnen Sequenz wird, ist es schwierig, diese Fälle mit einem Likelihood-Quotienten zu interpretieren.

Statistische Auswertung

Bei der statistischen Auswertung von mtDNA Befunden wird die ► **Häufigkeit der beobachteten Variante in der relevanten Bevölkerungsstichprobe** angegeben. Da mtDNA haploid ist, d. h. pro Zelle nur ein mtDNA-Typ vorliegt (die Tatsache, dass dieser mtDNA-Typ in vielen identischen Kopien vorliegt, spielt für diese Betrachtung keine Rolle) und die Vererbung somit ohne Rekombination erfolgt, wird die Häufigkeit nicht wie bei den

► Doppelbestimmung jeder Probe

Für einen Einschluss ist zu fordern, dass beide Sequenzen identisch sind
Ein Ausschluss sollte auf mehreren Sequenzunterschieden basieren
► „Grauzone“

► Häufigkeit der beobachteten Variante in der relevanten Bevölkerungsstichprobe

► Referenzdatenbank

► Online-Abfrage

Haare enthalten keine Zellen

► Telogene Haare

Aufgrund der besseren Nachweisbarkeit der mtDNA eignet sich diese besonders für die Untersuchung von telogenen Haaren

mtDNA macht nur Sinn, wenn es Vergleichspersonen gibt, die als Spurenleger in Frage kommen

In Knochenfunden lassen oft nur noch kleine Fragmente der ursprünglich vorhandenen DNA nachweisen

Wenn zu wenig morphologische Hinweise gefunden werden, wird die

STR-Loci durch Multiplikation der Häufigkeiten der einzelnen Varianten ermittelt. Die Häufigkeit der beobachteten Sequenzvariante (des sog. Haplotyps) wird in einer **Referenzdatenbank** ermittelt. In der Folge ist die statistische Aussagekraft bei mtDNA-Untersuchungen geringer als bei STR-Untersuchungen der Kern-DNA. Auf Basis von „ n “ untersuchten Personen in einer Datenbank ist die kleinste Häufigkeit, die man beobachten kann, eben nur 1 in n (wenn eine Sequenz bisher nicht in der Datenbank vorhanden ist). Da die üblichen laborinternen Datenbanken oder auch die öffentlich zugängliche Datenbank des FBI, die „mtDNA population database“ [4] im Höchsthafte einige hundert bis wenige tausend Sequenzen enthalten, ist man mit diesen Werten weit von den 1 in mehreren Millionen, wie man bei Kern-DNA erwarten kann, entfernt. Da aber mtDNA primär in Fällen untersucht wird, in denen sich keine Kern-DNA nachweisen lässt, machen diese Untersuchungen trotzdem Sinn. Die **Online-Abfrage** von Häufigkeiten in der D-Loop-Base des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Magdeburg ist nicht mehr möglich (früher unter <http://www.D-Loop-Base.de>). In Kürze wird vom Institut für Gerichtliche Medizin Innsbruck eine Online-Datenbank ins Netz gestellt, die zuverlässige Häufigkeitsabfragen ermöglichen soll (<http://www.empop.org>) [7].

Untersuchung von Haaren

Haare, speziell ausgefallene und auch abgeschnittene Haare, enthalten keine Zellen. In der Folge ist auch der Gehalt an Zellkern-DNA äußerst gering. Bei ausgefallenen Haaren hat die ehemals zellhaltige Wurzel einen Abbauprozess durchlaufen, bei dem sich die Wurzel fast vollständig zurückbildet. Am Ende dieses Prozesses fällt das Haar aus. Diese Haare werden **telogene Haare** genannt. Im Rahmen der natürlichen Erneuerung der Haare verliert ein Mensch jeden Tag viele hundert dieser telogenen Haare; sie werden daher häufig an Tatorten gefunden. Aufgrund der oben erläuterten besseren Nachweisbarkeit der mtDNA eignet sich diese nun besonders für die Untersuchung von telogenen Haaren. Neben telogenen Haaren werden auch abgeschnittene oder abgebrochene Haare gefunden. In der Literatur sind Erfolgsraten von bis zu 75% beschrieben [10]. Allerdings ist gerade bei Haaren zu beachten, dass einzelne Individuen Heteroplasmien aufweisen können, die von Haar zu Haar oder von Haaren zu Speichel zu Unterschieden führen [14]. Trotz der hohen Erfolgsrate von mtDNA-Untersuchungen bei Haaren gibt es ein großes Interesse, nukleäre DNA an Haaren zu typisieren. Der Nachteil der mtDNA bei Spuren von Straftaten ohne Tatverdächtigen ist, dass die erhaltenen Sequenzen nicht mit der DNA-Analyse-Datei abgeglichen werden können. mtDNA macht nur dann Sinn, wenn es Vergleichspersonen gibt, die als Spurenleger in Frage kommen.

Untersuchung von Knochen

Neben Haaren sind auch Knochen für die Untersuchung von Zellkern-DNA häufig nur bedingt geeignet. Obwohl Knochen aus kernhaltigen Zellen gebildet werden, den Osteoblasten, lassen sich in Knochenfunden oft nur noch kleine Fragmente der ursprünglich im lebenden Menschen vorhandenen DNA nachweisen. Grund ist die Degradation, der Abbau der DNA durch enzymatische und weitere chemische Prozesse während der Alterung/Lagerung des Knochens. Auch hier bewährt sich dann die Untersuchung der mtDNA, da aufgrund der oben ausgeführten besseren Nachweisbarkeit oft noch Resultate erzielt werden können, auch wenn keine oder zu wenig Kern-DNA vorhanden ist. In der Literatur sind viele Beispiele für erfolgreiche Typisierungen – auch von sehr altem Material – bekannt [2].

Identifizierung

Bei Leichenfunden, Skelettfunden oder auch bei Massenkatastrophen wie Tunnelbränden oder Flugzeugabstürzen ist es häufig nötig, eine Identifikation des aufgefundenen Materials vorzunehmen. Bei Skelettfunden stellt sich z. B. die Frage, ob das Skelett von einer vermissten Person stammt oder ob dies auszuschließen ist. Wenn zu wenig morphologische Hinweise gefunden werden, weil z. B. der Schädel fehlt und somit kein Zahnstatus

erhoben werden kann, wird die Identifikation in der Regel mit molekularbiologischen Methoden durchgeführt. Die einfachste und direkteste Vorgehensweise ist der Vergleich mit biologischem Material der vermissten Person selbst. Häufig kann z. B. auf eine Zahnbürste mit anhaftenden Zellen aus der Mundschleimhaut zurückgegriffen werden; aber auch getragene Kleidungsstücke, Rasierapparate und Ähnliches eignen sich.

Wenn kein Vergleichsmaterial der vermissten Person selbst erhalten werden kann, lässt sich eine Identifikation unter Einbeziehung von Angehörigen durchführen. Durch den Vergleich mit den Eltern der vermissten Person kann über eine Abstammungsanalyse die Identität geklärt werden. Aber auch Geschwister oder Kinder einer vermissten Person können vergleichend untersucht werden. Diese Aussagen gelten für die Kern-DNA. Wenn das aufgefundene Material schon stark degradiert ist, kann es vorkommen, dass keine ausreichende Menge an DNA in guter Qualität aufgefunden wird. In solchen Fällen wird eine Identifikation mit Hilfe von mtDNA durchgeführt. Sollen Verwandte in die Untersuchung mit einbezogen werden, ist die maternale Vererbung der mtDNA zu berücksichtigen. Wie schon ausgeführt, weisen alle Personen einer mütterlichen Linie dieselbe mtDNA auf, somit können z. B. Mütter oder Großmütter vergleichend untersucht werden, nicht aber die Väter.

Bestimmung der ethnischen Abstammung mit der mtDNA

In einem evolutionärem Zusammenhang kann man die Entwicklung der heutigen Diversität der mtDNA als eine Folge von Mutationen ansehen, die in verschiedenen maternalen Linien aufgetreten sind. Da diese maternalen Linien zugleich auch Migrationsereignisse von Frauen aus Afrika in die verschiedenen Kontinente repräsentieren, lassen sich ► **Haplogruppen** definieren, die eine hohe geographische Spezifität haben. Die Untersuchung der mtDNA eignet sich daher, um die ethnische Abstammung eines Spurenlegers zu bestimmen. Gerade in Fällen mit unbekanntem Spurenverursacher kann es für die Ermittlungsbehörden von Interesse sein, die Herkunft des Spurenverursachers zu kennen. Inzwischen gibt es Softwarelösungen, die es ermöglichen, mtDNA-Sequenzen auf ihre geographische Herkunft hin zu untersuchen [12]. Einschränkend muss aber gesagt werden, dass diese Zuordnungen zwar eine Eingrenzung der geographischen bzw. ethnischen Abstammung erlauben, z. B. auf die Herkunft aus Afrika oder aus Fernost, Unterscheidungen zwischen verschiedenen Europäern aber kaum möglich sind.

Speziesbestimmung

Neben der Zuordnung einer Spur zu einer Person kann es hin und wieder auch von Bedeutung sein festzustellen, ob eine Spur von einem Menschen oder von einem Tier stammt sowie von welchem Tier eine Spur stammt. Neben den früher üblichen immunologischen Verfahren haben sich heute molekularbiologische Verfahren für diese Fragestellung etabliert. In der Regel wird ein Abschnitt der mitochondrialen DNA durch Sequenzierung untersucht, da verschiedene Spezies sich in der Abfolge der Basen auf der DNA unterscheiden. Die erhaltene Sequenz kann dann im Abgleich mit laborinternen Datenbanken bzw. Internetdatenbanken einer Spezies zugeordnet werden [9].

Eine mögliche Anwendung ist z. B. die Untersuchung eines aufgefundenen Knochenfragments auf tierischen oder menschlichen Ursprung.

Y-chromosomale STRs

Biologie des Y-Chromosoms

Mit ca. 60 Mill. Basenpaaren ist das Y-Chromosom nach dem Chromosom 21 das kleinste Chromosom des Menschen. Der paternale Erbgang des Y-Chromosoms bedingt, dass dieses Chromosom mit Ausnahme der beiden telomer lokalisierten pseudoautosomalen Regionen unverändert in der väterlichen Erblinie weitergegeben wird. Bis 1998 sind nur 32 Gene auf ihm entdeckt worden. Nur „pseudoautosomale“ Bereiche des Y-Chromosoms können normalerweise rekombinieren, obwohl es gelegentlich in der Evolution vorkommt,

Identifikation mit molekularbiologischen Methoden durchgeführt. Vergleich mit biologischem Material der vermissten Person

Identifikation unter Einbeziehung von Angehörigen

► Haplogruppen

Klärung, ob eine Spur von einem Menschen oder von einem Tier stammt sowie von welchem Tier

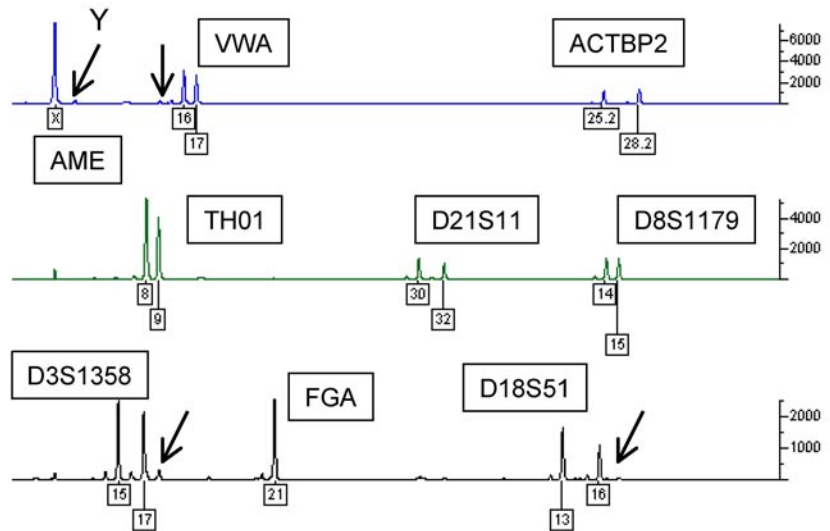


Abb. 4 ▲ Untersuchung von autosomalen STR-Markern bei einer Mischspur. Amplifiziert wurde der MPX2 Kit der Fa. Serac, die Pfeile deuten auf die mögliche Beimischung der DNA einer männlichen Person

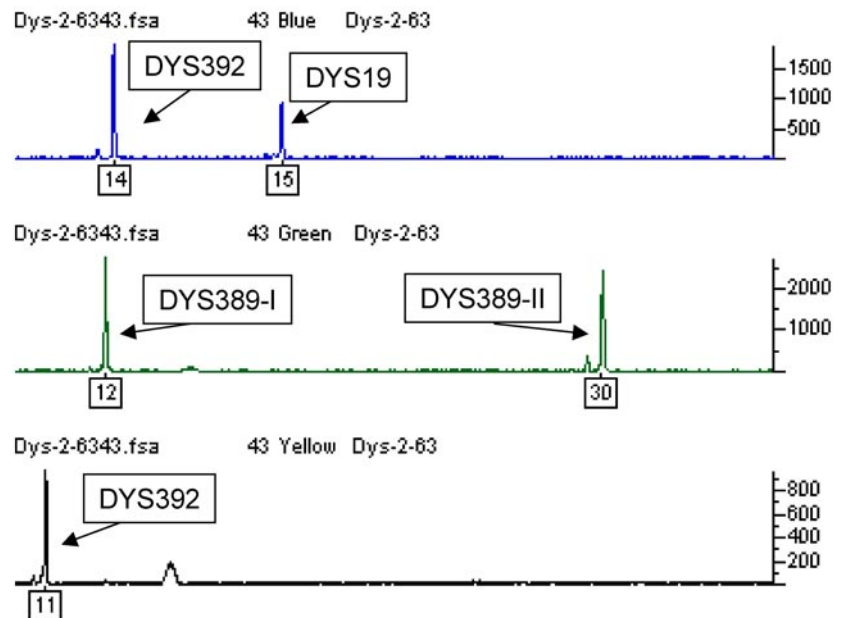


Abb. 5 ▲ Untersuchung von Y-chromosomalen STR-Markern bei einer männlich/weiblich Mischspur. Amplifiziert wurde der DYSplex-2 Kit der Fa. Serac

dass autosomale Regionen auf den nicht rekombinierenden Y-Bereich duplizieren, so im Falle des DXYS156-Locus, der sowohl auf dem X- wie auf dem Y-Chromosom vorkommt. Im Jahr 2003 ist die Sequenz des Y-Chromosoms publiziert worden. Die etwa 95% des Y-Chromosoms, die keinen Austausch mit dem X-Chromosom unterhalten, wurden bisher als „Non-Recombining Region“ (NRY) bezeichnet. Die Forschergruppe um D. Page, die hauptsächlich für die Sequenzierung in diesem hochrepetitiven Sequenzteil des Y-Chromosoms verantwortlich war, schlug vor die NRY-Region in ► „Male Specific Region“ (MSY) umzubenennen, da durch die Sequenzierungsergebnisse interne Rekombinationsereignisse aufgezeigt werden konnten. Der MSY-Region konnten 78 Gene zugeordnet werden.

► „Male Specific Region“

Y-chromosomale STR

Die längenpolymorphen STR-Marker sind über das gesamte Genom verteilt. Man findet sie sowohl auf den Autosomen als auch auf den Gonosomen. Y-chromosomale STRs nehmen aufgrund ihres abweichenden Erbgangs eine Sonderstellung ein. Die heute am meisten verwendeten forensischen Marker sind DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385I/II [9], für die es auch von verschiedenen kommerziellen Anbietern Multiplex-Kits gibt.

Die beiden Loci DYSS389 I u. II sowie DYS385 I u. II stellen duplizierte Regionen dar, für die sich somit jeweils 2 Allele typisieren lassen. Hierbei weist das System DYS385 eine für Y-STRs relativ hohe Variabilität auf. Somit ist dieses System besonders diskriminativ für forensische Individualisierungen. Insgesamt betrachtet, sind die forensisch relevanten Y-STRs weniger polymorph als die etablierten autosomalen STRs.

Die forensische Anwendung Y-chromosomaler STR-Marker wurde erstmals 1992 von Roewer und Epplen beschrieben [11]. Seitdem haben die Y-STRs eine große Bedeutung in der forensischen Genetik erlangt, speziell bei der Untersuchung von Mischspuren und bei der Untersuchung von paternalen Erbgängen [5].

Da das Y-Chromosom – ebenso wie die mtDNA – haploid ist, wird es im Ganzen vom Vater an alle seine Söhne weiter gegeben. Es wird nicht wie bei den autosomalen STRs nur eines der beiden väterlichen Merkmale vererbt. Somit besitzen alle Nachkommen einer männlichen Linie, von seltenen Mutationen einmal abgesehen, den gleichen Y-chromosomalen Haplotyp. Aus dieser Tatsache der Y-STRs ergeben sich Vorteile bei der Bearbeitung spezieller Fragestellungen:

Untersuchung von Mischspuren

Eine Stärke Y-chromosomaler Markersysteme ist ihre Verwendung bei der Mischspurenanalyse. Bei ► **Sexualdelikten** finden sich häufig Spuren, bei denen nur wenige Zellen des männlichen Täterverdächtigen zusammen mit vielen Zellen des Opfers auftreten. Nach der Extraktion solcher Spuren erhält man dann einen Überschuss von „weiblicher“ DNA. Für diese Spuren sind die Y-STRs besonders geeignet; denn bei der STR-Typisierung mit autosomalen Markern erhält man zumeist nur die DNA-Merkmale der weiblichen Person.

■ **Abbildung 4** zeigt das Muster einer Mischspur mit einer geringen Beimengung männlicher DNA. Im geschlechtsbestimmenden Amelogeninsystem findet sich ein schwaches Signal für ein Y-Chromosom, in den übrigen 8 Merkmalssystemen findet sich nur teilweise ein Hinweis auf zusätzliche Merkmale. Somit werden aufgrund des ungünstigen Mischungsverhältnisses die männlichen Anteile kaum gefunden. Mit Hilfe von Y-STRs kann diese Konkurrenzsituation umgangen werden, da hier nur die „männliche“ DNA vermehrt wird. Die Erstellung eines Musters der Nebenkomponente der Mischung wird so möglich. ■ **Abbildung 5** zeigt das Ergebnis der Untersuchung von 5 Y-chromosomalen Systemen an dieser Spur. Hier kann ein vollständiges Muster erstellt werden.

Statistische Auswertung

Dass die Y-chromosomalen Merkmale gemeinsam, sprich als Haplotyp vererbt werden, ist für die statistische Beurteilung zwingend zu berücksichtigen. Analog zur mtDNA dürfen die Allelhäufigkeiten der einzelnen Marker nicht durch Multiplikation zu einer gemeinsamen Häufigkeit kombiniert werden. Es liegt eine Kopplungsgruppe vor, für die die Häufigkeit in einer Referenzstichprobe abgeschätzt werden muss. Dazu sind – wie bei der mtDNA – spezielle Datenbanken notwendig, in denen möglichst viele Haplotypen unverwandter Personen, getrennt nach ethnischer Zugehörigkeit, eingespeichert vorliegen. Die ► **größte europäische Datenbank**, etabliert und verwaltet vom Institut für Rechtsmedizin der Humboldt Universität Berlin-Charité, kann über das Internet unter <http://www.yhrd.org> abgefragt werden. In dieser Datenbank sind zurzeit 13.986 Haplotypen aus 94 europäischen Populationen gespeichert.

Die am meisten verwendeten forensischen Marker sind DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385I/II

Da das Y-Chromosom haploid ist, wird es im Ganzen vom Vater an alle seine Söhne weiter gegeben

► Sexualdelikte

► Größte europäische Datenbank

- ▶ **Haplotypfrequenzen**
- ▶ **Ethnische Abstammung**

Analog zur mtDNA ist die statistische Aussagekraft bei Y-STR-Untersuchungen geringer als bei STR-Untersuchungen der Autosomen. Auf der Basis von „ n “ untersuchten Personen in der Datenbank ist die kleinste Häufigkeit, die man beobachten kann, auch hier nur 1 in n , für den Fall, dass der Haplotyp nicht in der Datenbank vorhanden ist. Da es auch Datenbanken mit ▶ **Haplotypfrequenzen** der asiatischen (<http://www.yhrd.org>) bzw. für die US-amerikanische Bevölkerung (<http://www.yhrd.org>) gibt, kann man mit Hilfe der Y-STRs auch Hinweise auf die ▶ **ethnische Abstammung** eines Spurenverursachers erhalten. Wenn der Haplotyp einer anonymen Tatortspur in der europäischen Datenbank nicht vorkommt, aber im Gegensatz z. B. in der asiatischen Datenbank relativ häufig ist, kann dies als Hinweis auf eine mögliche asiatische Herkunft des Spurenverursachers gewertet werden.

Korrespondierender Autor

B. Rolf

Institut für Rechtsmedizin, Ludwig-Maximilian-Universität München, Frauenlobstraße 7a, 80337 München
E-Mail: burkhard.rolf@rechts.med.uni-muenchen.de

Interessenkonflikt: Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen.

Literatur

1. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG et al. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457–465
2. Anslinger K, Weichhold G, Keil W et al. (2001) Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int J Legal Med* 114:194–196
3. Eyre-Walker A, Awadalla P (2001) Does human mtDNA recombine? *J Mol Evol* 53:430–435
4. Gill P, Ivanov PL, Kimpton C et al. (1994) Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet* 6:130–135
5. Jobling MA, Pandya A, Tyler-Smith C (1997) The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med* 110:118–124
6. Monson KL, Miller KWP, Wilson MR et al. (2002) The mtDNA population database: an integrated software and database resource. *Forensic Science Communications Online*. Available: www.fbi.gov/hq/lab/fsc/backissu/april2002/miller1.htm
7. Parson W, Brandstatter A, Alonso A et al. (2004) The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organisation, results and perspectives. *Forensic Sci Int* 139:215–226
8. Parson W, Pegoraro K, Niederstatter H et al. (2000) Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int J Legal Med* 114:23–28
9. Pascali VL, Dobosz M, Brinkmann B (1999) Coordinating Y-chromosomal STR research for the Courts. *Int J Legal Med* 112:1
10. Pfeiffer H, Hühne J, Ortman C et al. (1999) Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts – success rates and sequence comparisons. *Int J Legal Med* 112:287–290
11. Roewer L, Epplen J (1992) Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeat sequences in case work. *Forensic Sci Int* 53:163–171
12. Röhl A, Brinkmann B, Forster L, Forster P (2001) An annotated mtDNA database. *Int J Legal Med* 115:29–39
13. Tully G, Bär W, Brinkmann B et al. (2001) Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int* 124:83–91
14. Tully G, Barritt SM, Bender K et al. (2004) Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding mitochondrial DNA heteroplasmy and segregation in hair shafts. *Forensic Sci Int* 140:1–11

Fragen zur Zertifizierung (nur eine Antwort ist möglich)

1. Welche Aussage zur Biologie der Mitochondrien ist falsch?

- a) Bei mtDNA handelt es sich um sog. Kern-DNA.
- b) In den Mitochondrien findet sich ein kreisförmiges Genom.
- c) Das mtDNA-Genom besteht aus etwa 16.500 Basenpaaren.
- d) Die beiden Stränge der zirkulären mtDNA haben eine asymmetrische G/C-Verteilung.
- e) In der mtDNA finden sich kaum Längenpolymorphismen.

2. Welche Aussage zu den Mitochondrien ist richtig?

- a) Für nur wenige Gene der mtDNA ist die Funktion bekannt.
- b) Der „displacement loop“ (D-loop) liegt außerhalb der Kontrollregion.
- c) Im D-loop kommt es vermehrt zur Rekombination zwischen mütterlicher und väterlicher mtDNA.
- d) Je nach Zellart kommen in einer Zelle 100–1000 Mitochondrien vor.
- e) Die mtDNA ist diploid.

3. Welche Aussage zu den hypervariablen Regionen der mtDNA ist falsch?

- a) Für forensische Untersuchungen werden zumeist 2 Bereiche der Kontrollregion sequenziert.
- b) Die Sequenz der mtDNA mutiert schneller als die Sequenz der nukleären DNA.
- c) Zwei Europäer unterscheiden sich durchschnittlich in 2 Sequenzpositionen.
- d) Die Vererbung der mtDNA erfolgt maternal.
- e) In der mtDNA können Heteroplasmien auftreten.

4. Welche Aussage zu mtDNA-Untersuchungen ist falsch?

- a) Die mtDNA-Sequenz wurde von Anderson et al. 1981 veröffentlicht.
- b) Aufgrund der geringen Kopienanzahl sind die Kontaminationsrisiken bei mtDNA-Untersuchungen eher gering.
- c) Als Heteroplasmie wird das Vorkommen von mindestens 2 unterschiedlichen mtDNA-Sequenzen in einem Individuum bezeichnet.
- d) Heteroplasmien sind nicht immer nachweisbar.
- e) Man unterscheidet Längen- und Sequenzheteroplasmien.

5. Welche Aussage zur Befundinterpretation und statistischen Auswertung einer mtDNA-Untersuchung ist richtig?

- a) Für die Interpretation der mtDNA-Befunde genügt eine Einzelbestimmung.
- b) Für einen Einschluss ist zu fordern, dass beide Sequenzen identisch sind.
- c) Für einen gesicherten Ausschluss genügt ein Unterschied in einer Sequenzposition.
- d) Die Häufigkeit der mtDNA-Varianten wird durch Multiplikation berechnet.
- e) Die statistische Aussagekraft der mtDNA-Befunde ist grundsätzlich größer als bei STR-Untersuchungen der Kern-DNA.

6. Welche Aussage zur Untersuchung biologischer Spuren mit mtDNA-Analyse ist falsch?

- a) mtDNA-Analysen eignen sich besonders für die Untersuchung telogener Haare.
- b) Für die mtDNA-Untersuchung telogener Haare und von Haarschäften

sind in der Literatur Erfolgsraten von mehr als 50% beschrieben.

- c) mtDNA-Sequenzen können nicht mit der beim BKA geführten DNA-Analyse-Datei abgeglichen werden.
- d) Die DNA-Typisierung von Knochenfunden auf der Ebene der mtDNA ist weniger aussichtsreich als die Untersuchung von Kern-DNA.
- e) mtDNA-Analysen können auch bei Massenkatastrophen sinnvoll sein.

7. Welche Aussage zur mtDNA-Untersuchung in der forensischen Praxis ist falsch?

- a) mtDNA-Untersuchungen sind bei stark degradierter DNA in der Regel erfolgreicher als die Typisierung von Kern-DNA-Systemen.
- b) Für Identifikationen mittels mtDNA-Sequenzierung können Verwandte aus der väterlichen Linie als Vergleichspersonen einbezogen werden.
- c) Für die mtDNA-Sequenzen lassen sich Haplogruppen mit geographischer Spezifität definieren.
- d) mtDNA-Analytik kann zur ethnischen Eingrenzung eines Spurenverursachers verwendet werden.
- e) Mittels mtDNA-Sequenzierung können auch Speziesunterscheidungen erfolgen.

8. Welche Aussage zur DNA des Y-Chromosoms ist richtig?

- a) Das Y-Chromosom ist das kleinste Chromosom des Menschen.
- b) Das Y-Chromosom wird paternal vererbt.
- c) Das Größe des Y-Chromosoms liegt bei etwa 6 Mio. Basenpaaren.



Wichtige Hinweise:

Geben Sie die Antworten bitte ausschließlich online über unsere Webseite ein: cme.springer.de

Die Lösungen zu dieser Fortbildungseinheit erfahren Sie online auf unserer Webseite.

Beachten Sie bitte, dass per Fax, Brief oder E-Mail eingesandte Antworten nicht berücksichtigt werden können.

Hier steht eine Anzeige
This is an advertisement

- d) Auf dem Y-Chromosom gibt es keine rekombinativen Bereiche.
- e) Längenpolymorphe DNA-Bereiche sind auf dem Y-Chromosom nicht vorhanden.

9. Welche Aussage zu Y-chromosomalen STRs ist falsch?

- a) DYS19 gehört zu den am meisten verwendeten Y-STRs.
- b) Das STR-System DYS385 ist eines der polymorphsten Y-STR-Systeme.
- c) Die forensisch relevanten Y-STRs sind weniger polymorph als die etablierten autosomalen STRs.
- d) Die Anwendung von Y-STRs ist bei Vergewaltigungsfällen nicht sinnvoll.
- e) Y-STRs sind seit mehr als 10 Jahren für die forensische Genetik verfügbar.

10. Welche Aussage zu Y-chromosomalen DNA-Typisierungen ist falsch?

- a) Y-chromosomale Markersysteme können insbesondere bei Mischspuren aussagekräftig verwendet werden.
- b) Auch bei einem erheblichen Überschuss an „weiblicher“ DNA kann in Mischspuren mit geringem Anteil an „männlicher“ DNA ein komplettes Y-chromosomales DNA-Profil erzielt werden.
- c) Die Allelhäufigkeiten der einzelnen Y-STRs können zu einer Gesamthäufigkeit multipliziert werden.
- d) Für Y-STRs sind Haplotypdatenbanken im Internet verfügbar.
- e) Mittels Y-STRs können ethnische Zuordnungen durchgeführt werden.