

Simone Clerici

Dr. sc. hum.

Vergleichende Sequenzanalyse mitochondrialer DNA aus Haarschäften und Wangenschleimhautabstrichen

Geboren am 11.10.1971 in Heidelberg

Reifeprüfung am 11.06.1991

Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1991/1992 bis WS 1996/1997

Vordiplom am 06.10.1993 an der Universität Heidelberg

Diplom am 14.01.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Rechtsmedizin

Doktorvater: Prof. Dr. med. R. Mattern

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Möglichkeiten der Analyse mitochondrialer DNA und ihre spezielle Anwendung in der forensischen Haaranalyse untersucht werden. Das Ziel war es, diese Methode am Institut für Rechtsmedizin und Verkehrsmedizin Heidelberg zu etablieren.

Die Sequenzanalyse mitochondrialer DNA wird hauptsächlich dann benutzt, wenn eine Typisierung der genomischen DNA nicht mehr möglich ist.

Dies trifft auch auf die Haaranalyse zu, die aufgrund der Häufigkeit, mit der Haare als Beweismittel sichergestellt werden von großer Bedeutung in der forensischen Spurenkunde ist. Dabei handelt es sich meist um ausgefallene Haare, die nur wenig oder gar keine genomische DNA enthalten.

Die Ergebnisse der Arbeit sollten ebenfalls zur Erweiterung der bisher bestehenden mtDNA-Datenbanken beitragen, da diese die wichtige Grundlage zur Ermittlung der Häufigkeit der mtDNA-Polymorphismen sind.

Es wurden Haarproben und Wangenschleimhautabstriche von 50 nicht verwandten Personen und von zwei Familien aus dem Rhein-Neckar-Kreis untersucht. Nach der Amplifikation der isolierten DNA durch eine PCR und durch direktes zyklisches Sequenzieren wurden die Sequenzen der hypervariablen Regionen 1 und 2 des Mitochondrien-Genoms bestimmt.

Die Typisierung der mtDNA-Sequenzen ergab 49 verschiedene mtDNA Varianten bzw. Haplotypen für beide hypervariablen Regionen zusammen.

Nur ein Haplotyp wurde bei zwei Personen bestimmt. Die Haplotypen, die jeweils für die Haar- und die Speichelprobe ermittelt wurden, stimmten in 48 Fällen völlig überein. In zwei Fällen wurden allerdings Sequenzen gefunden, die sich in den beiden Proben eines Individuums um eine Base unterschieden.

Dieses besondere Phänomen der mitochondrialen DNA bezeichnet man als Heteroplasmie. Die Heteroplasmie, die früher als sehr seltenes Ereignis angesehen wurde, scheint jedoch, wie auch inzwischen die DNA Kommission der ISFG (International Society for Forensic Genetics) bestätigt hat, sehr verbreitet zu sein. Dies wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt.

Das Auftreten der Heteroplasmie in der Haaranalyse wird neben der allgemein hohen Mutationsrate der Mitochondrien-DNA dadurch begünstigt, daß es sich bei diesen Zellen um die mitotisch aktivsten Zellen des menschlichen Körpers handelt.

Die mtDNA-Haplotypen, die bei der Untersuchung der Familienmitglieder über drei Generationen in der mütterlichen Linie gefunden wurden, waren wie erwartet identisch. Die maternale Vererbung der mitochondrialen DNA wurde dadurch ebenfalls bestätigt.

Als großes Problem in der Laborarbeit erwies sich gerade die Eigenschaft, die die Methode besonders auszeichnet: Die sehr hohe Sensitivität. Denn sie führt zu einer sehr hohen Kontaminationsanfälligkeit. Nur eine große Sorgfalt bei der Ausführung kann diese Kontaminationsgefahr minimieren. Es sollten nur bestimmte Laborbereiche für die Analyse genutzt werden. Bereiche für die Arbeit vor und nach der Amplifikation müssen räumlich streng getrennt sein. Ist in der Negativkontrolle der Amplifikation eine Kontamination aufgetreten, muß die komplette PCR wiederholt werden.

Neben dieser Negativkontrolle sollte auch eine Positivkontrolle mit analysiert werden, deren Ergebnis bereits bekannt ist. Auch sollten die mtDNA-Sequenzen aller Mitarbeiter bekannt sein und mit dem jeweiligen Ergebnis abgeglichen werden.

Ein solcher Aufwand ist allerdings nur mit einer Kombination von automatisierter Analyse und Auswertung der Sequenzierung zu bewältigen.

Die Analyse der mitochondrialen DNA kann eine verlässliche Methode in der forensischen Spurenanalyse darstellen. Vor allem in der Haaranalyse führt sie zu einer enormen Erweiterung der Möglichkeiten. Es genügt schon ein kleiner Teil eines einzelnen Haares, um eine erfolgreiche Typisierung durchführen zu können. Ihre Anwendung ist aber mit

einem gewissen Aufwand verbunden und stellt hohe Qualitätansprüche an die praktische Ausführung im Labor.