



GENOTYPISIERUNG DES TELOGENEN HAARES



Inhalt

-
1. Genotypisierung des telogenen Haares

 2. Die Entscheidung – Sequenzierung des mitochondrialen Genom oder STR-Analyse

 3. Das telogene Haar und seine Entwicklung

 4. Die STR-Analyse

 5. Das mitochondriale Genom und seine partielle Sequenzierung
 - 5.1 Routinemäßig eingesetzte Primer

 - 5.1.1 Grund-PCR

 - 5.1.2 PCR- Überspringen der C-Stretch-Region

 6. Die Bewertung der Sequenzanalyse eines telogenen Haares

 7. Literatur

1. Genotypisierung des telogenen Haares

Die forensische Analyse dient heute in den meisten Fällen einer Identitätsbestimmung: An einem Tatort sind biologische Spuren sicher gestellt worden. Oft gibt es tatverdächtige Personen. Mit den Methoden der DNA-Analyse wird geklärt, ob die Spur von dem oder den Verdächtigen herrührt oder nicht.

Das spezifische Problem der forensischen Analyse ist meist die durch vielerlei Einflüsse bewirkte Zersetzung der Probe und deren geringe Menge. Zersetzung des Probenmaterials heißt auch: Die DNA ist fragmentiert – je höher der Zersetzungsgrad, desto kürzer die verbliebenen Fragmente. Hinzu kommt, dass gerade bei den geringen zur Verfügung stehenden Mengen an Probenmaterial chemische Störfaktoren auf die Analyse einen großen Einfluss haben. Das führt oft dazu, dass die fast immer zur Anwendung kommende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) auch mit an sich genügend Ausgangsmaterial nicht funktioniert. Die forensische Analytik bemüht sich deswegen bei der Auswahl ihrer Methode um zwei Aspekte:

- Sie arbeitet nach Möglichkeit mit biologischem Material, welches noch viel DNA enthält.
- Sie wählt eine Bestimmungsmethode, die mit kleinen DNA-Fragmenten auskommt.

Fast alle Körperzellen enthalten zwei Arten von Genomen, zum einen das im Zellkern befindliche und zum anderen das Mitochondriengenom. Im Zellkern findet sich das jeweils zu 50 % von Vater und Mutter ererbte Genom. Die für Abstammungsanalyse und Identitätsbestimmung benutzten DNA-Marker existieren deswegen in zwei Kopien im Kerngenom – die eine stammt vom Vater, die andere von der Mutter. Anders das Mitochondriengenom: Eine Körperzelle enthält, abhängig vom Typ, zwischen 50 und 10.000 ausschließlich von der Mutter ererbte Mitochondrien; jedes Mitochondrium enthält im Mittel 8 Kopien des mitochon-

drionalen Genoms. Deswegen ist die Analyse des Mitochondriengenoms bei stark zersetztem forensischem Probenmaterial viel aussichtsreicher als die Analyse der Kernmarker.

Eine der häufigsten biologischen Tatortspuren ist das ausgefallene Haar. Es handelt sich dabei meist um telogene Haare, das bedeutet unter anderem: Sie enthalten keine Zellanhaftungen. Trotzdem können sie für die Täteridentifizierung eine bedeutende Rolle spielen. Im Innern des der Wurzel zugewandten Teils des Haares, dem Haarschaft, befinden sich nämlich noch einige wenige Zellen. Diese sind zwar teilweise degradiert, aber vor allem die mitochondriale DNA ist in den meisten Fällen gut typisierbar.

Für die Praxis der Ermittlertätigkeit hat die mt-Analyse also den großen Vorteil, dass man durch ihren Einsatz fast immer einen hochinformativen Genotyp erhält. Dieser gestattet den Vergleich mit der mt-Sequenz der Verdächtigen und erleichtert so die Identifizierung des Täters.

Häufig kennt man allerdings keine verdächtigen Personen. In solch einer Situation wäre dann doch ein STR-Genotyp sehr hilfreich. Damit kann man nämlich auf die Daten der internationalen Gendatei von Straftätern zurückzugreifen. Diese enthält noch keine mt-Sequenzdaten, sondern ausschließlich STR-Genotypen. Trotz der oft zur Anwendung kommenden stark verkürzten STR-Amplifikate funktioniert dieser an sich so vorteilhafte Analysentyp wegen der geringen Menge intakter DNA meist nicht.

Unsere hier angebotene Analytik kombiniert beide Methoden: Mit Hilfe der sogenannten DAPI-Methode färben wir das Spurhaar an und zählen die im Wurzelendstück vorhandenen Kerne. Ist deren Zahl höher als ca. 30, so können wir die STR-Analyse mit Erfolg anwenden, liegt die Zahl darunter, müssen wir dem Einsender nicht die Kosten für eine fehlgeschlagene STR-Analyse in Rechnung stellen und sequenzieren sofort die mt-DNA.

2. Die Entscheidung – Sequenzierung des mitochondrialen Genoms oder STR-Analyse

Die DAPI-Färbung

Diese Färbemethode lässt die DNA intakt für alle möglichen, weiterführenden Analysen. Der Arbeitsvorgang ist wegen seiner Einfachheit sehr leicht kontaminationsfrei zu halten. Abbildung 1 zeigt Aufnahmen verschiedener Klassen von telogenen Haaren, in denen man die unterschiedliche Dichte an Zellkernen erkennen kann.

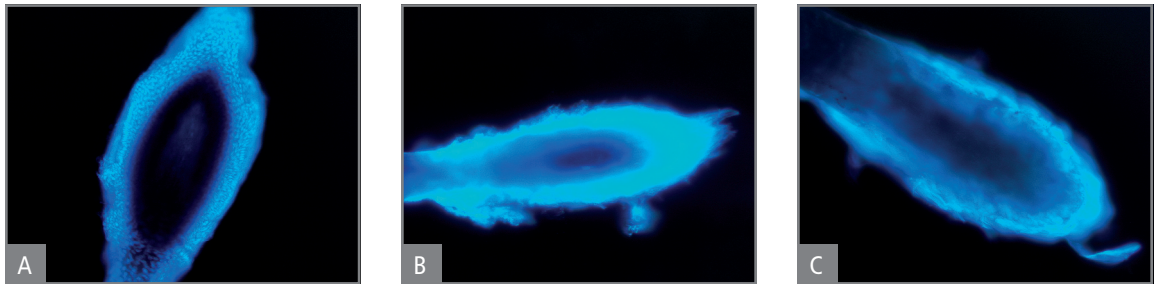
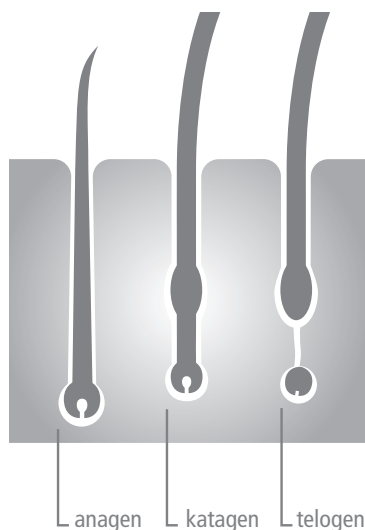


Abbildung 1. **A)** zeigt ein DAPI-gefärbtes Haar mit sehr vielen Kernen ($n > 30$). Mit beiden Kits ergab sich ein komplettes Profil. Die HVI- und HVII-Sequenzen waren einwandfrei. **B)** zeigt ein Haar mit nur einigen wenigen Kernstrukturen. Hier konnten wir mit dem Kit genRes MPX-4SEv4.1 nur 8 der 12 Markerloci nachweisen. Dagegen zeigte der forensische Kit MPX-SP1v2.0 seinen kompletten Genotyp mit 5 Markern. Die HVI- und HVII-Sequenzen waren einwandfrei. In Abbildung **C)** ist ein Haar ohne erkennbare Kerne dargestellt. Beide Kits lieferten keine Signale, abgesehen vom Amelogenin im MPX-SP1v2.0. Die Sequenzierungen von HVI und HVII waren einwandfrei.

Nach Maßgabe dieser DAPI-Ergebnisse und nach Rücksprache mit dem Einsender entscheiden wir, ob wir eine STR-Untersuchung oder direkt eine mt-Sequenzierung durchführen. Für eine STR-Untersuchung stehen wahlweise die beiden SERAC-STR-Kits (siehe Kapitel 4) zur Verfügung.

3. Das telogene Haar und seine Entwicklung

Während seiner Entwicklung durchläuft das Haar drei verschiedene, mikroskopisch erkennbare Zustände.



Das **anagene Haar** ist ein aktives, wachsendes Haar. Es bleibt in dieser Phase rund 1.000 Tage. Es ist fest verwachsen und verankert in der dermalen Papille. Es führt deswegen nach dem Ausreißen Zellmaterial mit sich, aus dem eine DNA-Analyse sehr leicht und sicher anzufertigen ist.

Das **katagene Haar** stellt die nächste Entwicklungsstufe dar. Es handelt sich dabei um ein 3–4 wöchiges Übergangsstadium, währenddessen sich der Haarbulbus von der Papille trennt. Die Zellproduktion wird allmählich eingestellt.

Dies ist der Übergang zum **telogenen Haar**. In dieser Phase ist das Haar über sein nun kolbenförmiges Ende wohl noch im Follikel verankert, aber nicht mehr über Zellen verwachsen. Im Laufe weiterer 3–4 Wochen wird dieses telogene Haar durch ein nachwachsendes Haar verdrängt und fällt aus. Es enthält also keine Zellanhaftungen, aber in Wurzelnähe einige Zellkerne.

Die geringe Anzahl der Zellkerne und der Umstand, dass diese in das Keratingerüst des Haares eingeschlossen sind, machen die DNA-Untersuchung schwierig. Nur Speziallaboratorien beherrschen diese Form der Identitätsanalyse.

4. Die STR-Analyse

Wir wenden routinemäßig die beiden folgenden STR-Kits der Firma SERAC an:

- genRES MPX-4SE v4.1 zur Identitäts- und Elternschaftsbegutachtung
Enthaltene Mikrosatellitenmarker: vWA; D21S11; D19S433; AMG; TH01; D16S539; D18S51; D8S1179; D2S1338; FGA; D3S1358; SE33;
- genRES MPX-SP1v2.0 – forensischer Kit mit verkürzten Amplifikaten
Enthaltene Mikrosatellitenmarker: AMG; vWA; TH01; D3S1358; D8S1179;

Wenn wir diese beiden Kits ohne Vorauswahl der telogenen Haare nach DAPI-Färbung für die Genotypisierung einsetzen, erhalten wir die in Tabelle 1 dargestellten Ergebnisse:

N=40	Kompletter Genotyp (%)	partieller Genotyp (%)	nicht auswertbar (%)
genRES MPX 4SEv4.1	28	28	44
genRES MPX SP1v2.0	52	48	0

Bei 40 nach Maßgabe der DAPI-Färbung getroffenen Entscheidungen haben wir bis auf zwei Fälle die STR-Typisierbarkeit richtig prognostiziert.

5. Das mitochondriale Genom und seine partielle Sequenzierung

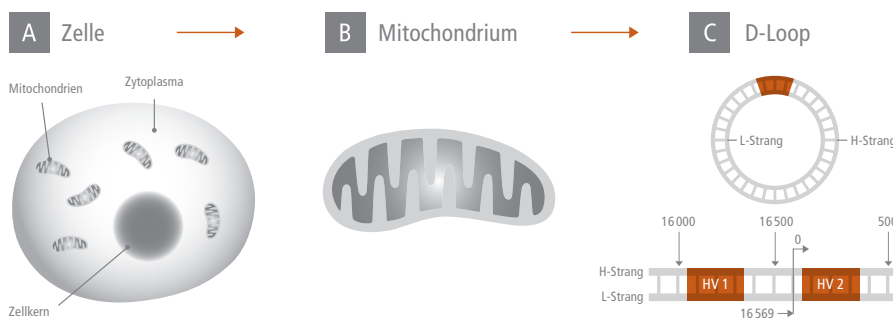


Abbildung 2. A) stellt stark schematisiert und nicht maßstabgerecht eine Zelle mit Mitochondrien dar. B) Mitochondrium – stark schematisiert. C) Mitochondriales Genom und der HV I- und HV II Ausschnitt

Das mitochondriale Genom ist ein doppelsträngiges DNA-Molekül (H-Strang und L-Strang). Es besteht aus 16.569 Basen. Es enthält 37 Gene, von denen 28 auf dem H-Strang liegen und 7 auf dem L-Strang. Sie codieren für Gene des Mitochondrien-eigenen Replikationsapparates und den Energiestoffwechsel. Für die Identitätsbegutachtung ist in erster Linie ein nichtkodierender Bereich auf dem H-Strang von Bedeutung – der sogenannte D-Loop oder Replikationsursprung des H-Strangs. Hier beobachtet man eine beträchtliche Neumutationsfrequenz und damit eine hohe genetische Variabilität. Letztere macht diese Region so nützlich für Abstammungs- und Identitätsuntersuchungen. Die erwähnte Variabilität beschränkt sich fast ausschließlich auf die beiden HV I (Position 16.024–16.356) und HV II (Position 73–340) genannten Regionen (siehe Abbildung). HV steht für hypervariabel.

Heute geht praktisch jeder forensischen Analyse eine PCR voraus. Damit vervielfältigt man ein definiertes Teilstück der Ziel-DNA. Anfang und Ende des Amplifikates werden durch spezifische Primer (Oligonukleotide) bestimmt. In der forensischen Analytik versucht man möglichst mit einheitlichen Versuchsbedingungen zu arbeiten. Dazu gehört auch die Auswahl der Primer. Die Benennung der Positionen im mitochondrialen Genom folgt einer international einheitlichen Nomenklatur (Abb. 2, Kap. 5.1). Weil sich nur ganz wenige Zellen im Haarschaft befinden und zudem die Isolation der DNA aus dem Haar problematisch ist, wendet man häufig eine besonders wirkungsvolle PCR-Strategie an, nämlich die sogenannte Nested-PCR (Abb. 3).

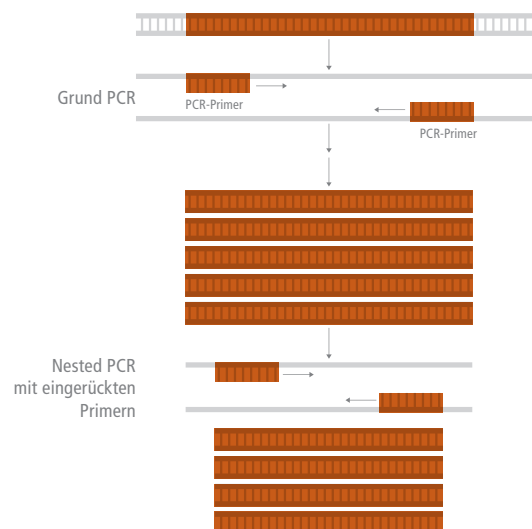


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Nested-PCR

5.1 Routinemäßig eingesetzte Primer

5.1.1 Grund-PCR

Region	Bezeichnung	Sequenz
HVI	L15997 (forward)	5'-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3'
	H16395 (reverse)	5'-CAC GGA GGA TGG TGG TCA AG-3'
HVII	L00029 (forward)	5'-GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C-3'
	H408 (reverse)	5'-CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A-3'

5.1.2 PCR – Überspringen der C-Stretch Region

Region	Bezeichnung	Sequenz
HVI	L16209	5'-CCC CAT GCT TAC AAG CAA GT-3'
	H16395	5'-TGA TTT CAC GGA GGA TGG TG-3'
	H16164	5'-TTT GAT GTG GAT TGG GTT T-3'
	L15997	5'-CAC CAT TAG CAC CCA AAG CT-3'
HVII	L331	5'-CCC CGC TTC TGG CCA CAG CA-3'
	H408	5'-CTG TTA AAA GTG CAT ACC GCC A-3'
	H285	5'-GGG GTT TGG TGG AAA TTT TTT G-3'
	L29	5'-GGT CTA TCA CCC TAT TAA CCA C-3'

M13-Anhangssequenz der forward-Primer: TGT AAA ACG ACG GCC AGT

M13-Anhangssequenz der reverse-Primer: CAG GAA ACA GCT ATG ACC

Damit gelingt praktisch immer die Amplifikation der HVI- und HVII-Bereiche aus telogenen Haaren.

Ein zusätzliches analytisches Problem stellen gelegentlich die Mutationen im sogenannten C-Stretch dar: Relativ häufig wird die Base T in Position 15189 gegen C ausgetauscht. Das führt zu einer Sequenz mit 10 hintereinander liegenden Cs. Als Folge davon ist die Sequenz nach dem C-Stretch nicht mehr lesbar. Das bedeutet, man kann diese Sequenzen nicht mehr durch eine reverse Sequenzierung bestätigen. Das gleiche gilt für den C-Stretch im HVII. Um diesen Unsicherheitsfaktor auszuräumen, wenden wir eine vom FBI genutzte Strategie an: Entsprechend dem in Abb 4 gezeigten Prinzip amplifizieren wir die jeweils vor und nach dem C-Stretch liegende Sequenz mit zusätzlichen Primern und sequenzieren diese den C-Stretch nicht mehr enthaltenden Amplifikate.

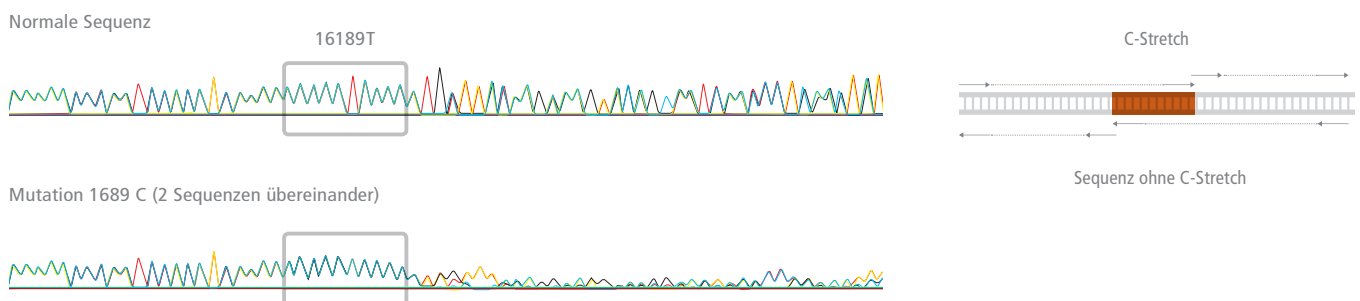


Abbildung 4. Amplifikationsstrategie zum Überspringen der kritischen C-Stretch-Region

Der nächste Schritt des Verfahrens ist die Sequenzierung der Amplifikate. Grundsätzlich werden die Amplifikate von HVI und HVII in beide Richtungen sequenziert. Echte Varianten im Genom werden bei beiden Sequenzierungen gefunden – die eine Reaktion bestätigt die andere.

6. Die Bewertung der Sequenzanalyse eines telogenen Haares

Das mitochondriale Genom ist natürlich wegen seiner geringen Größe eines der ersten sequenzierten Genome gewesen. Die erste komplette Sequenz stammt von Anderson (1). Sie ist auch als Bezugs-genom für die mitochondriale Genotypisierung festgelegt worden. Die bei einer Person festgestellten Abweichungen von dieser Bezugssequenz bezeichnet man als deren mitochondrialen Haplotyp. In einem typischen Analyseergebnis unterscheidet sich dieser Haplotyp in 6–8 Basen von der Anderson-Sequenz. Spezielle Computerprogramme erlauben eine schnelle und sichere Bestimmung des Haplotyps. Weltweit stehen inzwischen mindestens zwei Datenbanken zur Verfügung, in denen zahlreiche mitochondriale Haplotypen (> 4.000) aufgezeichnet sind. Sie erstrecken sich auf praktisch alle menschlichen Rassen. Diese Datenbanken wachsen stetig.

Prinzipiell gibt es zwei mögliche Ergebnisse beim Vergleich des mitochondrialen Spurhaplotyps mit dem eines Verdächtigen:

- Die Haplotypen sind identisch
- Die Haplotypen sind nicht identisch

Beim ersten Ergebnistyp wird mit Hilfe der Datenbanken ermittelt, wie häufig der gefundene Haplotyp ist. Daraus lässt sich ableiten, wie hoch die statistische Wahrscheinlichkeit dafür ist, dass die beiden Untersuchungsproben von der gleichen Person stammen. Die üblichen Aussagewahrscheinlichkeiten sind nicht so hoch wie die bei entsprechenden STR-Analysen.

Man muss berücksichtigen, dass Vollgeschwister den gleichen mitochondrialen Haplotyp aufweisen. Das bedeutet, die Spur könnte z. B. auch von einem Bruder des Verdächtigen gelegt worden sein. Dieser sogenannte maternale Vererbungsmodus bringt es auch mit sich, dass Mutter und mütterliche Großmutter eines Probanden den gleichen mitochondrialen Haplotyp haben wie dieser – ein bei vielen forensischen Problemen hilfreicher Sachverhalt.

Beim zweiten Ergebnistyp ist eine genauere Interpretation der Ergebnisse nötig: Wenn z. B. die beiden Haplotypen sich nur in einer Base unterscheiden, könnten die beiden Proben wegen der vergleichsweise hohen Mutationsrate im mitochondrialen D-Loop evtl. trotzdem von einem Individuum stammen. Die Berechnung der Aussagesicherheit ist ganz von den individuellen Befunden abhängig: Es gibt Stellen in den beiden betrachteten Sequenzen (HV I, HV II), die bekanntermaßen sehr häufig mutieren wie die Poly-C-Bereiche in HV I 16184-16193 und HV II 302-310, und es gibt Positionen, die nur extrem selten mutieren wie HV II 73. Gelegentlich weisen auch verschiedene Haare desselben Individuums unterschiedliche mt-Haplotypen auf.

Die Sequenzen unterscheiden sich dann in einer oder seltener in zwei Basen. Ursache kann auch hier eine Neumutation in einem der Haare sein. Dies bzw. die hohe Neumutationsrate kann auch dazu führen, dass sich in einer Position die mitochondriale Sequenz der Referenz oder Vergleichsperson von derjenigen der Spurprobe unterscheidet, obwohl die Proben vom gleichen Individuum stammen: Unterschiedliche Gewebe von einer Person können ebenfalls unterschiedliche Sequenzen aufweisen. Wir haben bei 29 Personen jeweils 5 telogene Haare, 5 anagene Haare, einen Speichelabstrich, Blut und Harnsediment untersucht. In keinem Fall konnten wir zwischen den verschiedenen Geweben Unterschiede im mitochondrialen Haplotyp nachweisen.

In der wissenschaftlichen Literatur wird seit langem das Phänomen der Heteroplasmie diskutiert: Eine Zelle oder die Mischung aus vielen Zellen zeigt bei der Sequenzanalyse von HV I und HV II gelegentlich gleichzeitig zwei unterschiedliche Haplotypen. Die Unterschiede manifestieren sich meistens auch hier nur in einer Basenposition. Die größte Variabilität zeigen natürlich auch dabei die Sequenzen in den beiden erwähnten Poly-C-Bereichen. Deren Instabilität führt am häufigsten zur Heteroplasmie. Beobachtet man im telogenen Spurhaar einen solchen heteroplasmatischen Unterschied an einer Base, ansonsten aber einen mit dem Verdächtigen identischen Haplotyp, so kann die Spur doch durchaus vom Tatverdächtigen stammen. Sind beide Proben – Tatverdächtiger und Haar – an einer Position heteroplasmatisch und auch sonst identisch, so erhöht dies die Wahrscheinlichkeit der Identitätszuordnung erheblich.

In europäischen und US-amerikanischen Gerichten spielt inzwischen die Mitochondrienanalyse eine bedeutende Rolle. In den meisten Fällen sind Haare und Knochen das Spur- und Untersuchungsmaterial. Es geht fast immer um Identitätsuntersuchungen. Die Methoden sind nicht so standardisiert wie die STR-Analysen. Aber seit Jahren zeigen weltweit organisierte Ringversuche, wie zuverlässig dieses Verfahren ist. In den USA und in Europa werden den technischen, analytischen und informationstechnischen Fortschritten entsprechend regelmäßig Empfehlungen für den Umgang mit dem mitochondrialen D-Loop in wissenschaftlichen Zeitschriften publiziert (2, 3).

7. Literatur

1. Sequence and organization of the human mitochondrial genome.
Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG.
Nature 290 (1981) 457–463
2. Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles.
Tully G, Bär W, Brinkmann B, Carracedo A, Gill P, Morling N, Parson W, Schneider P.
Forensic Science International 124 (2001) 83–91
3. Guidelines for Mitochondrial DNA (mtDNA) Nucleotide Sequence Interpretation – Standards and Guidelines. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods (SWGDM).
Forensic Science Communications Vol 2 No 2 (2003)

Labor für Abstammungsbegutachtungen Prof. Dr. Klaus Olek

Ahstraße 4

45879 Gelsenkirchen

Tel. + 049 209 9443798

Fax + 049 209 9443799

Marie-Curie-Straße 1

53359 Rheinbach

Tel. + 049 2226 871650

Fax + 049 2226 871604

info@lfa-gmbh.de

www.lfa-gmbh.de

