

Analyse der mitochondrialen DNA (mtDNA) zur Identifizierung von Knochen oder Leichenteilen

Dr. Katja Anslinger, Dr. Burkhard Rolf

Institut für Rechtsmedizin der Ludwigs-Maximilians-Universität München

Eigenschaften und Struktur der mtDNA

Der größte Teil der DNA einer menschlichen Zelle findet sich im Zellkern (nukleäre DNA). Darüber hinaus besitzen aber auch die Mitochondrien, Zellorganellen, die auf Grund ihrer Funktion im Stoffwechsel auch als Kraftwerke der Zelle bezeichnet werden, ein eigenes, kleines Genom. Hierbei handelt es sich um ein ringförmig geschlossenes, in sich verdrehtes Nukleinsäuremolekül von 16569 bp Größe ("Supercoiled-Struktur"). Es unterscheidet sich in wesentlichen Punkten von der DNA des Zellkerns:

Die spezielle Struktur des mitochondrialen Genoms macht es resistenter gegen DNA-abbauende Umwelteinflüsse wie Feuchtigkeit und große Hitze. Es ist somit im Vergleich zur Kern-DNA degradationsunempfindlicher.

Während jede Zelle nur einen Zellkern besitzt, finden sich - je nach Gewebe - pro Zelle bis zu einige tausend Mitochondrien. Die mtDNA liegt also in höherer Kopienzahl vor, pro Zelle gerechnet existiert hier mehr potentielles Untersuchungsmaterial.

Die Vererbung erfolgt in rein mütterlicher (maternal) Linie, d.h. die mtDNA wird von der Mutter auf alle ihre Kinder vererbt. Da die mtDNA der Spermien bei der Befruchtung nicht in die Eizelle eindringt, werden auch keine väterlichen mtDNA-Merkmale vererbt.

Aus o.g. Gründen stellt das Arbeiten mit mtDNA eine effektive Methode in der Rechtsmedizin dar. Zum Zwecke der Identifizierung von älteren oder stark verwesten Leichenteilen bzw. Knochenresten muß meist auf Analyse der mtDNA zurückgegriffen werden, da die DNA des Zellkerns für eine erfolgreiche STR-Analyse zu stark degradiert ist. Das gleiche gilt für die Bearbeitung von Spurenmaterial mit geringstem DNA-Gehalt, wie beispielsweise ausgefallene Haare oder Haarschäfte. Liegt kein biologisches Material der Vergleichspersonen selbst vor (Zahnbürsten, Rasierer, Zigartentippen, Blut- oder Speichelproben), muß zum Vergleich auf Proben von Personen der gleichen mütterlichen Linie zurückgegriffen werden.

Zur Beantwortung forensischer Fragestellungen beschränkt man sich meist auf die Sequenzierung, d.h. die genaue Bestimmung der Basenabfolge, von zwei ca. 400bp großen Bereichen der Kontrollregion des mitochondrialen Genoms. Auf Grund der Tatsache, daß Individuen verschiedener mütterlicher Linien sich in der Basenabfolge in diesen Regionen unterscheiden lassen, werden diese auch hypervariable Region 1 und 2 (abgekürzt HVR 1 und 2) genannt. Die HVR 1 reicht von Position 16000 bis 16400, die HVR 2 von Position 00040 bis 00400 des mitochondrialen Genoms (s. Abb. 1). Beim Arbeiten mit stark zerstörter DNA werden lediglich 200bp große Abschnitte untersucht, so daß die gesamte Sequenz aus vier Fragmenten zusammengesetzt werden muß (Abb. 2).

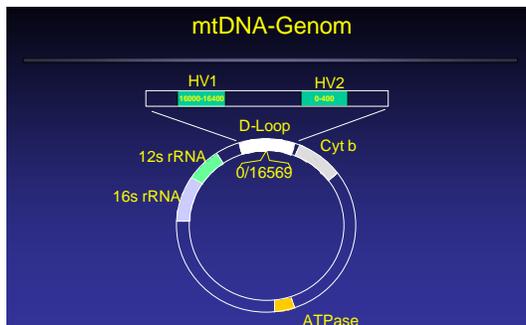


Abb. 1

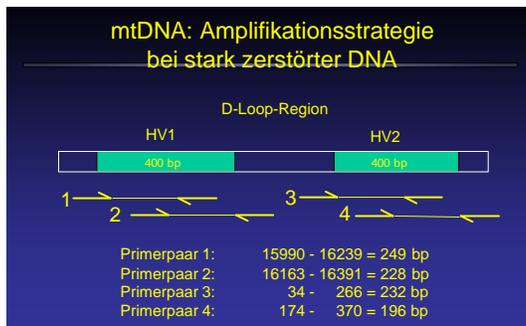


Abb. 2

Befundinterpretation

Zur vereinfachten Darstellung der Sequenzierungsergebnisse werden nicht alle 800 analysierten Basen angegeben, sondern man beschränkt sich im Abgleich mit der vom Erstbeschreiber Anderson ermittelten Konsensussequenz, auch Anderson-Sequenz genannt, auf die Angabe der Positionen mit abweichenden Befunde.

Zeigen die zu identifizierende Probe und die Vergleichsprobe, oder - im Spurenfalle - das Haar vom Tatort und die Vergleichsperson, vollständig identische Basenabfolgen in beiden Bereichen, so ist es möglich, daß Verwandtschaft in mütterlicher Linie besteht. Im Spurenfalle ist nicht auszuschließen, daß das Haar von der entsprechenden Person stammt. Nach biostatistischer Berechnung kann diese Übereinstimmung dann gewürdigt und gegen eine zufällige Übereinstimmung abgewogen werden. Bei mehr als zwei Unterschieden kann Verwandtschaft über die mütterliche Linie bzw. die entsprechende Person als Spurenleger ausgeschlossen werden (Abb. 3). Bei einem Unterschied muß das mögliche Auftreten einer Mutation bedacht werden.

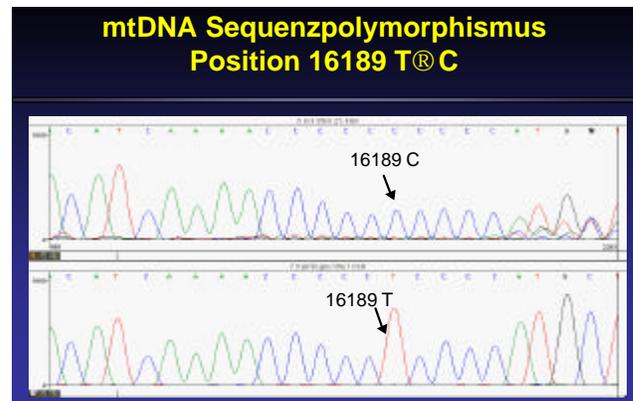


Abb. 3

Vermeidung von Kontaminationen:

Da beim Arbeiten mit geringsten Mengen degradierter DNA ein hohes Kontaminationsrisiko gegeben ist, sind für Untersuchungen auf Ebene der mtDNA hohe Sicherheitsvorkehrungen nötig:

Um Kreuzkontaminationen zu vermeiden, werden die zu vergleichenden Proben immer zeitlich getrennt im Labor bearbeitet. Die Analyse der Probe mit höherem DNA-Gehalt bzw. besserer DNA-Qualität (meist Vergleichsprobe) wird dabei stets zuletzt durchgeführt.

Die einzelnen Untersuchungsschritte werden in getrennten Räumen durchgeführt.

Alle Reagenzien und Gefäße werden autoklaviert und nur einmal benutzt.

Darüber hinaus werden, um Kontamination aller verwendeter Reagenzien definitiv auszuschließen, stets Negativkontrollen, daß heißt Kontrollen, die nur die Reagenzien selbst aber keine DNA enthalten, bei jedem Schritt der Analyse mitgeführt. Sie dürfen zu keiner Zeit ein Ergebnis bringen.

Die Ergebnisse werden mit einer internen Datenbank abgeglichen, in der sowohl die mt-DNA-Sequenzen aller Personen gespeichert sind, die zu dem Labor Zutritt haben, als auch alle bisher in unserem Institut untersuchten mt-DNA-Profile.

Das Arbeiten mit Handschuhen, Mundschutz und in Laborbekleidung versteht sich von selbst.