

**Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand : Prof. Dr. med. Wolfgang Eisenmenger**

**Speziesidentifizierung mittels
vergleichender Sequenzanalyse des
mitochondrialen 12S-rRNA-Gens**

**Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von
Beate Balitzki-Korte
aus
Hamburg**

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wolfgang Eisenmenger

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Hörz
Prof. Dr. Dr. C. Hammer
Prof. Dr. Dr. T. Haferlach

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Katja Anslinger und Dr. Burkhardt Rolf

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen
Prüfung: 24.06.04

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1 Die genetische Information	3
1.2 Die Evolution der Arten	4
1.3 Die Mitochondrien	5
1.4 Identifizierung von Spezies	9
1.5 Zielsetzung der Arbeit	11
2. Material und Methode	13
2.1 Auswahl der Spezies	13
2.1.1 Sequenzanalyse mittels Datenbankrecherche	13
2.1.2 Probenmaterial	14
2.1.3 Probenvorbereitung	15
2.2 Extraktion der DNA	15
2.2.1 DNA-Isolierung mittels der Chelex Methode	16
2.2.2 DNA-Isolierung mittels Phenol/Chloroform	17
2.2.3 DNA-Isolierung mittels First-DNA-Kit® (Genial)	18
2.3 DNA-Aufreinigung	18
2.4 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.4.1 Primer Design	20
2.4.2 Optimierung der PCR-Bedingungen	21
2.4.2.1 Optimierung der "Annealing"-Temperatur	21
2.4.2.2 Optimierung der Primer-Konzentration	21
2.4.2.3 Optimierung der MgCl ₂ -Konzentration	21
2.4.3 PCR-Ansatz	22
2.4.4 PCR-Programme	22
2.4.5 Aufreinigung der PCR-Produkte	23
2.5 Thermozyklische DNA-Sequenzierung	24
2.5.1 Sequenzieransatz	24
2.5.2 Sequenzierprogramm	25
2.5.3 Aufreinigung der Sequenzierprodukte	25

2.6 Elektrophoresetechniken	26
2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.6.2 Kapillar-Gelelektrophorese	26
2.7 Pyrosequenzierung	28
2.7.1 Amplifikation	30
2.7.2 Separation und Aufreinigung des Amplifikates	30
2.7.3 Sequenzierreaktion	30
2.8 Verwendete Chemikalien und Lösungen	32
2.8.1 Chemikalien	32
2.8.2 Lösungen	33
3. Ergebnisse	35
3.1 Auswahl eines DNA-Abschnittes zur Amplifikation	35
3.2 Optimierung der Amplifikationsbedingungen	39
3.2.1 Optimierung der Amplifikationsbedingungen für das 542 bp große Fragment	39
3.2.2 Optimierung der Amplifikationsbedingungen für das 149 bp große Fragment	42
3.3 Erstellung einer Datenbank von 12S-Gen-Sequenzen	43
3.4 Pyrosequenzierung	45
3.5 Kasuistiken	47
3.5.1 Spurenuntersuchung "Tiefkühlkost"	47
3.5.2 Spurenuntersuchung "Mageninhalt"	48
3.5.3 Spurenuntersuchung "Herz"	49
3.5.4 Spurenuntersuchung "Blut"	50
4. Diskussion	52
4.1 Auswahl der Zielsequenz	53
4.2 Optimierung der Amplifikation	55
4.3 Vergleich der beiden Sequenziertechniken	58
4.4 Erstellen der Datenbank mit 12S-Gen-Sequenzen	60
4.5 Kasuistiken	61

5. Zusammenfassung	64
6. Anhang	65
7. Literaturverzeichnis	81
8. Lebenslauf	
9. Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSE	bovine spongiforme Encephalopathie
C	Cytosin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
dNDPs	Desoxynukleotiddiphosphat
dNMPs	Desoxynukleotidmonophosphat
DTT	Dithiothreiol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Dinatriummethyldiamintetraessigsäure-Dihydrat
G	Guanin
g	Gramm
g	Beschleunigung
HGT	Horizontaler-Gen-Transfer
Hz	Hertz
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
M	molar
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mg ²⁺	Magnesium-Kationen
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm ²	Kubikmillimeter
mtDNA	mitochondriale Desoxyribonukleinsäure

mV	Millivolt
ncDNA	nukleäre Desoxyribonukleinsäure
nm	Nanometer
µl	Mikroliter
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pM	pikomolar
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
sek	Sekunden
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
T	Thymin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
T _m	Schmelztemperatur
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TBE	Trishydroxymethylaminomethan Borsäure Ethylendiamintetraazetat
U	Units
UV	ultraviolett
°C	Grad Celsius

Einleitung

1.1 Die genetische Information

Nukleinsäuren sind in allen Organismen die Träger der genetischen Information. Die in ihnen gespeicherte Information in Form des genetischen Codes wird bei jeder Zellteilung weitergegeben und dient als Vorlage für die Proteinbiosynthese. Das Genom einer eukaryotischen Zelle ist im Zellkern lokalisiert und hat beim Menschen eine Länge von circa 3 Milliarden Basenpaaren. Darin enthalten sind in Abhängigkeit vom Organismus 50.000 - 100.000 Gene. Neben diesen in den Chromosomen gespeicherten Informationen besitzt jede eukaryotische Zelle ein extrachromosomales Genom, welches maternal vererbt wird und in den Mitochondrien lokalisiert ist.

Die jüngsten Veröffentlichungen der Sequenzierung des menschlichen Genoms (Lander *et al.* 2001; Venter *et al.* 2001) zeigen eine nahezu komplette Erfassung des menschlichen Genoms mit den darin eingebetteten Genen. Es zeigte sich, dass praktisch alle bisher sequenzierten Gene DNA-Polymorphismen aufweisen.

Wird eine Region des humanen Genoms zweier zufällig ausgesuchter Individuen sequenziert und verglichen, so zeigt sich, dass 99,9 % der untersuchten DNA identisch sind. Von den 0,1 %, die sich unterscheiden, werden mehr als 80 % der Unterschiede in einzelnen Basen dargestellt (Collins *et al.* 1997). Diese als *single nucleotid polymorphisms* (SNPs) bezeichneten Differenzen beruhen auf dem Austausch einzelner Basen untereinander. Da SNPs den größten Anteil der genetischen Variation ausmachen, können sie genutzt werden, um den Weg der vererbten Gene in familiären Untersuchungen zu verfolgen. SNPs können ebenso herangezogen werden, um Aussagen über die Empfänglichkeit gegenüber Krankheiten, wie Krebs, Diabetes und Herzerkrankungen zu formulieren (Brookes 2002).

Bisher wurden ungefähr 4 % der gefundenen SNPs in proteincodierenden Bereichen (Exons) lokalisiert (Marth *et al.* 2001). Diese können einen direkten Einfluss auf das Proteinprodukt eines Gens haben, wenn sie eine Veränderung der Aminosäuresequenz bewirken. SNPs in genregulierenden Regionen sind dazu fähig, das Expressionsniveau der Proteine zu verändern.

1.2 Die Evolution der Arten

Bis ins 19. Jahrhundert prägte Linnés (1707 - 1778) Satz von der "Konstanz der Arten" die Vorstellung, dass alle Arten von "Anbeginn der Schöpfung" existent und in dieser Existenz unwandelbar sind. Erst im 19. Jahrhundert brachten vor allem die Arbeiten von Lamarck (1809) und Darwin (1859) eine Veränderung in der Betrachtung der Entwicklung von Lebensformen. Die darwinistische Evolutionstheorie beschreibt die Mannigfaltigkeit der Arten als Produkt eines Entwicklungsprozesses innerhalb der Erdgeschichte. Alle rezenten Arten stehen demnach in einem mehr oder weniger engen Verwandtschaftsverhältnis und lassen sich letztendlich auf eine gemeinsame Ahnenform zurückführen. Ausgehend von dieser Urform entwickelten sich neue Arten durch Veränderungen in Gestalt, Funktion und Lebensweise. Dieser Prozess wird Evolution genannt, und er ist immer mit einer Veränderung der genetischen Information verbunden. Dieser sich in den Hunderten von Jahrillionen der Erdgeschichte vollzogene Prozess führte zu der Artenvielfalt, wie wir sie heute kennen. Man kann also davon ausgehen, dass je ähnlicher zwei Arten genetisch gesehen sind, desto später erfolgte in ihrer Entwicklungsgeschichte die Separation voneinander. Der Artbegriff wird auf unterschiedliche Weise definiert. Die wichtigste Abgrenzung zwischen Arten ist ihre reproduktive Isolierung. Angehörige verschiedener Arten können demnach keine fortpflanzungsfähigen Nachkommen miteinander zeugen. Die geographische Separation ist im Tierreich die häufigste Ursache zur Ausbildung von Arten; der initiale Prozeß zur Ausbildung einer Art ist die Trennung einer Population. Die damit verbundene Aufteilung des gemeinsamen Genpools kann zu unterschiedlichen Häufigkeiten der Allele innerhalb der Teilpopulationen führen; Mutationen treten neu auf und unterschiedliche Selektionsbedingungen zeigen ihre Wirkungen in ersten

auftretenden Merkmalsdivergenzen und führen zur Bildung unterschiedlicher Rassen. Schätzungen der Anzahl aller heute lebenden Tierarten ergeben Zahlen zwischen 1,5 und 30 Millionen. Linné unternahm 1739 in seiner "Systema naturae" einen ersten Klassifikationsversuch und beschrieb 4.235 Tierarten. Die 1950 von Hennig (Hennig 1982) begründete phylogenetische Systematik vergleicht apomorphe und plesiomorphe Merkmale zwischen verschiedenen Organismen nach bestimmten Kriterien. Dabei entsprechen viele Taxa des heutigen Systems keiner geschlossenen Abstammungsgemeinschaft sondern bezeichnen eine Gruppe von Organismen, die nach Berücksichtigung einer Vielzahl von Merkmalen ein "einheitliches evolutives Organisationsniveau" repräsentieren.

In den letzten Jahren spielen vermehrt molekulare Merkmalsvergleiche, wie die vergleichende DNA-Sequenzanalyse, eine wichtige Rolle bei der Klärung von Verwandtschaftsverhältnissen. Bei der molekularen Stammbaumanalyse hat sich die Sequenz der mitochondrialen DNA als besonders geeignet erwiesen, da sie durch ihre rein maternale Vererbung eine verminderte Rekombinationsrate bei gleichzeitig erhöhter Mutationsrate für definierte Bereiche gegenüber der Kern-DNA aufweist. Als ein Ergebnis der vergleichenden Sequenzanalyse der mtDNA wurde nachgewiesen, dass der Schimpanse unter allen Menschenaffen mit dem Menschen am nächsten verwandt ist (King und Wilson 1975).

1.3 Die Mitochondrien

Mitochondrien sind Organellen der eukaryotischen Zelle, die aufgrund ihrer Funktionen auch als "Kraftwerke" der Zelle bezeichnet werden. An ihren inneren und äußeren Membranen sind einige der wichtigsten physiologischen Zellfunktionen wie Fettsäureabbau, Citratzyklus, Teile des Harnstoffzyklus, aber vor allem die Atmungskette und damit die ATP-Synthese lokalisiert (Moritz *et al.* 1987).

Mitochondrien sind zu rascher Formveränderung fähig und je nach Zelltyp und -zustand überwiegen kugelige, stabförmige oder verzweigt-fädige

Formen. Sie können nur durch Wachstum und Teilung aus bestehenden Mitochondrien hervorgehen. Dabei ist die genetische Information für die Biogenese der Mitochondrien sowohl im mitochondrialen Genom als auch im Zellkern enthalten. Neben den Plastiden der Pflanzen sind die Mitochondrien die einzigen Zellorganellen, die DNA und ein eigenes System der RNA- und Proteinbiosynthese besitzen, das erheblich vom cytoplasmatischen Syntheseapparat abweicht (Henze und Martin 2001).

Die in den Mitochondrien enthaltene DNA, die sogenannte mtDNA, ist doppelsträngig und meist ringförmig. Sie umfasst bei Tieren etwa 14 - 19 Kilobasenpaare, ist bei Pflanzen jedoch wesentlich länger. Die humane mitochondriale DNA ist vollständig sequenziert und besteht aus 16.569 Basenpaaren. Obwohl jedes Mitochondrium in der Regel mehrere Kopien der mtDNA enthält, ist die DNA-Menge pro Organell sehr gering. Dementsprechend macht die Gesamtmenge der mtDNA einer Zelle gewöhnlich weniger als 1 % der Zell-DNA aus.

Trotz des Besitzes eigener genetischer Informationen sind Mitochondrien nicht in der Lage, alle ihre Proteine selbständig zu synthetisieren. So ist bei Säugern fast die gesamte mtDNA codierend und enthält insgesamt 37 Gene: 2 für die rRNAs, 13 für Proteine und 22 für tRNAs. Demnach werden 95 % der mitochondrialen Proteine im Kern codiert, im Cytoplasma gebildet und posttranslational in die Mitochondrien verlagert (Boore 1999). Dazu gehören auch Proteine des genetischen Apparates und die meisten ribosomalen Proteine. Dennoch sind die mitochondrialen Ribosomen kleiner (70S-Typ) als die cytoplasmatischen (80S-Typ).

Trotz der Unterschiede zwischen Pro- und Eukaryoten wird allgemein die Auffassung vertreten, dass prokaryotische Vorfahren am Anfang der Entwicklung der eukaryotischen Zelle standen. Demnach sind Eukaryoten erdgeschichtlich jünger als Prokaryoten, und da diese keine Mitochondrien enthalten, stellt sich die Frage nach der Entstehung dieser Zellorganellen.

Die Endosymbiontenhypothese erklärt die Entstehung der Mitochondrien durch die Annahme, dass sie auf protozytische, intrazelluläre Symbionten

zurückgehen. Die Mitochondrien sollen sich von aerob verstoffwechselnden Purpurbakterien ableiten, die mittels Phagozytose in die Zelle aufgenommen und nachfolgend als Zellorganell integriert wurden (Mereschkowsky 1905).

Die Endosymbiontenhypothese wird von einigen charakteristischen Eigenschaften der Mitochondrien gestützt. So weisen die Mitochondrien eine doppelte Membranhülle auf, bei der sich zudem innere und äußere Membran wesentlich unterscheiden. Zudem zeichnen sie sich durch den Besitz eigener genetischer Informationen in Form der mtDNA und einer eigenen Proteinbiosynthese aus. Weiterhin zeigen viele Beispiele aus der Tier- und Pflanzenwelt, dass die Bildung und Stabilisierung intrazellulärer Symbiosen zwischen Pro- und Eukaryoten durchaus üblich sind. Durch den Transfer von genetischen Informationen aus der mtDNA auf die Kern-DNA (ncDNA) werden die meisten spezifischen Proteine der Mitochondrien in Genen der ncDNA codiert und im Cytoplasma synthetisiert (Doolittle *et al.* 1999, Ochman *et al.* 2000).

Die Punktmutationsrate der mtDNA liegt 6 - 17mal höher als die der ncDNA, was durch einen Mangel an effizienten DNA-Reparaturmechanismen erklärbar ist (Wolstenholme 1992). So konnten beispielsweise mitochondriale DNA-Polymorphismen für verschiedene Holstein-Kuh-Linien gezeigt werden, die mütterlich miteinander verbunden sind (Hauswirth *et al.* 1982). Innerhalb eines Zeitraumes von nur 20 Jahren prägten sich zwei Genotypen aus, die sich im HaeIII-Gen unterscheiden. Diese hohe Mutationsrate lässt sich jedoch nicht auf alle Bereiche der mitochondrialen DNA übertragen. Eine besondere Stellung kommt hier den Regionen der DNA zu, in denen die genetischen Informationen für den Aufbau der ribosomalen RNA (rRNA) gespeichert sind.

Ribosomen werden nach Größe und Masse in zwei Ribosomenklassen unterteilt, die aufgrund ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit in der Ultrazentrifuge in Abhängigkeit von der Zentrifugalbeschleunigung nach der Svedberg Einheit S benannt sind. In Prokaryoten, Plastiden und Mitochondrien treten 70S-Ribosomen auf, während die größeren 80S-

Ribosomen im Cytoplasma der Eukaryoten gefunden werden. Die Ribosomen setzen sich ihrerseits aus zwei verschiedenen großen Untereinheiten zusammen, die sich wiederum aus rRNA und verschiedenen Proteinen zusammensetzen. Die 70S-Ribosomen prokaryotischer Zellen bestehen aus einer 30S- und einer 50S-Untereinheit mit insgesamt 3 rRNAs, der 23S- und 5S-RNA in der großen Untereinheit sowie der 16S-rRNA in der kleineren Untereinheit. Eukaryotische Ribosomen des 80S-Typs bestehen aus einer 40S- und einer 60S-Untereinheit, gebildet aus den 26- oder 28S-, 17- oder 18S-, 5S-rRNAs und verschiedener Proteine. Mitochondrien zeigen ein weites Spektrum der Variabilität in der Größe ihrer rRNAs (Eperon *et al.* 1980).

Ribosomale RNA hat eine primäre funktionale Rolle in der Proteinbiosynthese (Dahlberg 1989). Sie hat zudem eine ausgeprägte sekundäre Struktur, die aus Basenpaarungen innerhalb des Moleküls hervorgeht und essentiell für die Integration der rRNA in das funktionelle Ribosom ist (Noller 1984). Diese Teilung der rRNA in gepaarte und ungepaarte Regionen führt zu der Annahme, dass ein unterschiedlicher Selektionsdruck auf den verschiedenen Bereichen liegt und es einen evolutionären Wechsel zwischen "Stiel" (gepaart) und "Loop" (ungepaart) gibt. Diese variierende Sensibilität für Mutationen führt dazu, dass in den Genen die für rRNAs codieren, ebenfalls unterschiedliche Bereiche differenziert werden können. Es kommt zur Ausprägung hochkonservierter und hochpolymorpher Abschnitte. Physiologische Vergleiche des 16S-rRNA-Gens belegen, dass hochkonservierte Sequenzen prinzipiell in gepaarten Regionen des Moleküls gefunden werden (Woese *et al.* 1980).

Genetische Studien an mtDNA von Hefebakterien demonstrieren, dass Punktmutationen in rRNA-Genen zu funktionellen Veränderungen der Ribosomen bis hin zur Deaktivierung führen können (Woese *et al.* 1983).

Diese besondere Mischung der mitochondrialen ribosomalen RNA-Gene aus hochkonservierten und hochpolymorphen Bereichen macht sie zu geeigneten Untersuchungsobjekten für entwicklungsgeschichtliche Fragestellungen. So

wurde anhand des 16S-rRNA-Gens die Phylogenie der Bakterien untersucht was zu ihrer überraschenden Unterteilung in zwei Abstammungslinien führte, den Archaeobakterien und Eubakterien, die mehr als 3 Billionen Jahre alt sind (Fox *et al.* 1980).

1.4 Identifizierung von Spezies

Die Frage nach der Herkunft von biologischem Ausgangsmaterial wird heute zumeist über proteinchemische Tests beantwortet (Schleyer und Oepen 1995). Zur Bestimmung der Proteine eignen sich elektrophoretische und immunologische Verfahren. Dazu gehören unter anderem Enzymimmunoassays (ELISA), Radioimmunassays und die Doppelimmundiffusion nach Ouchterlony. Dieser Test macht sich das Agglutinationsverhalten von Antikörper und Antigen zunutze. In einem Gel werden Antikörper und Antigen gegeneinander aufgetragen und bilden in ihrem Äquivalenzbereich bei Übereinstimmung eine sogenannte Präzipitationsbande aus. Die Analyse von biologischem Material mittels immunologischer Verfahren beschränkt sich heute zumeist auf die Unterscheidung zwischen humaner und nicht-humaner Herkunft. Um eine biologische Art identifizieren zu können, müssen Antikörper gegen diese Spezies im Test enthalten sein. Da die Antikörperproduktion sehr aufwendig und teuer ist, ist die Möglichkeit zur immunologischen Untersuchung auf wenige Arten begrenzt. Die Antikörper sind außerdem von geringer Stabilität und erlauben meist nur die taxonomische Charakterisierung auf Familien-Niveau. Ferner kann es zu unspezifischen Reaktionen durch Proteine eng verwandter Arten kommen. Für forensische Fragestellungen kommt erschwerend hinzu, dass für die Analyse mittels immunologischer Techniken eine vergleichsweise große Menge Material benötigt wird und oft die Qualität der Spur für immunologische Tests nicht ausreicht. Bei vielen Fragestellungen ist mit der Charakterisierung einer Probe als nicht-humanen Ursprungs meist auch schon das Ende der Untersuchung erreicht. Unter besonderen Umständen ist es jedoch nötig, eine biologische Spur bis zu ihrem Ursprung zurück zu verfolgen. Das wird zum Beispiel bei Verkehrsunfällen mit Wild, Knochenfunden oder Mageninhalten notwendig.

Die Entwicklungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie ermöglichen die Unterscheidung verschiedener Spezies auf der Grundlage ihrer DNA, die viel stabiler als Proteine ist und zudem eine genauere Identifizierung ermöglicht. Dabei machte man sich zunächst die aus der Molekulargenetik stammende Erkenntnis zunutze, dass einzelsträngige DNA-Moleküle artgleicher Individuen weitgehend *miteinander* hybridisieren, während die DNA artungleicher Lebewesen schwächer oder gar nicht hybridisiert. Bei der *dot-blot*-Hybridisierung der DNA aus einer biologischen Spur mit der DNA verschiedener bekannter Arten dient die Spur-DNA bzw. die Kontroll-DNA als Sonde (Baur *et al.* 1987). Die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion ermöglichte erstmals die *in vitro* Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnittes (Mullis *et al.* 1986, Saiki *et al.* 1988). Zunächst bildeten vorwiegend Fragmentlängen-Polymorphismen die Grundlagen der forensischen DNA-Analyse. Für die Untersuchung des biologischen Ursprungs einer Probe wurde die mitochondriale DNA zum Objekt der Forschung, da sie durch ihre besondere Struktur beständiger ist als Kern-DNA, phylogenetisch hochkonservativ ist, trotzdem polymorphe Bereiche ausgeprägt sind und sie überdies in jeder Zelle in größerer Kopienanzahl vorliegt. Die Amplifikation des Gens für die ribosomale 28S-RNA auf der mt-DNA zeigte Unterschiede in der Banden-Anzahl nach elektrophoretischer Auftrennung zwischen humanen und tierischen Proben. Die Beobachtungen erlaubten dennoch nur Aussagen zur Differenzierung von humaner und nicht-humaner Proben (Naito *et al.* 1992).

Die Identifizierung einer Spezies mittels Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen beruht auf dem Auftreten eines für die Art spezifischen Bandenmusters durch Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen und nachfolgender Auftrennung der Fragmente in einem Agarosegel. Bei der Identifizierung verschiedener Arten konnten so erstmals auch Mischungen unterschiedlicher Spezies detektiert werden (Zehner *et al.* 1998). Amplifiziert wurde hier das gesamte Cytochrom b-Gen auf der mitochondrialen DNA mit einer Gesamtlänge von 981 – 1.140 Basenpaaren. Die vergleichende Sequenzanalyse dieses Gens erlaubt die Identifizierung 44 verschiedener

Arten auch aus Materialien, die bisher als problematisch eingestuft wurden (Parson *et al.* 2000).

Mit dem Auftreten der BSE-Problematik in den 80er Jahren hat der Nachweis von Spezies eine neue Bedeutung in der Lebensmittelindustrie erfahren. Im Vordergrund steht hier vor allem die Frage nach der korrekten Etikettierung von Lebensmitteln und dem Nachweis von Tiermehl als Zusatz in Tierfutter. Zur Analyse von Lebensmitteln hat sich die Real-Time-PCR-Methode (TaqMan™-Technologie) bewährt. Diese Methode erlaubt eine Identifizierung, während der PCR mittels fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden die spezifisch an eine Zielsequenz binden (Laube *et al.* 2001).

Die Entwicklung dieser verschiedensten Methoden zur Speziesidentifizierung anhand von DNA-Untersuchungen in den vergangenen Jahren zeigt vor allem, dass ein großer Bedarf nach der korrekten, einfachen, schnellen und günstigen Beantwortung der Frage des biologischen Ursprung einer Probe besteht.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zur molekulargenetischen Artdifferenzierung entwickelt. Besondere Berücksichtigung fand dabei die in der forensischen Praxis wegen fortgeschrittener Degradierung meist schlechte Qualität der zu untersuchenden Proben. Auf dieser Grundlage sollte die Möglichkeit der Analyse eines kleinen DNA-Fragmentes konzipiert werden. Zudem sollte die Unterscheidung der verschiedenen Arten auf Grund einzelner Basenaustausche realisiert werden.

Im Einzelnen war dazu die Klärung folgender Sachverhalte notwendig:

- Ermittlung eines geeigneten DNA-Fragmentes auf der mtDNA, das speziesübergreifend konstante Bereiche für die Anlagerung des Hin- und Rückprimers zulässt.
- Optimierung und Standardisierung der Methoden zur Amplifikation dieses Bereiches mit den zur Verfügung stehenden Geräten.
- Gewinnung von Sequenz-Daten bekannter Spezies.
- Überprüfung und eventuell Modifizierung der erzielten Ergebnisse.

Darüber hinaus war es durch die freundliche Leihgabe der Firma Pyrosequencing möglich, neben der in einem forensischen Labor üblichen Methode der Sequenzierung nach Sanger die Methode der Pyrosequenzierung zu testen.

2. Material und Methode

2.1 Auswahl der Spezies

Tabelle A1 im Anhang zeigt die Auswahl der untersuchten Spezies und deren systematische Einordnung. Ausgesucht wurden solche Arten, die für die forensische Praxis von Bedeutung sind, da sie in Form von Mageninhalten oder Blutspuren relevant sein können. Alle ausgewählten Tiere gehören in die Abteilung der Chordata und zum Stamm der Vertebrata. Es wurden Vertreter der Klasse der Mammalia, der Aves und der Pisces untersucht.

2.1.1 Sequenzanalyse mittels Datenbankrecherche

Für alle Spezies wurde zunächst versucht, anhand einer Datenbankrecherche bereits vorhandene Sequenzen zu ermitteln (Altschul *et al.* 1990, 1997). Dazu wurde ein 542-Basenpaar großes DNA Fragment des 12S rRNA Gens humaner mtDNA in das Nukleotid-Sequenz-Suchprogramm Entrez des National Center der Biotechnologie eingegeben (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Das Ergebnis dieser Suche ist in Tabelle A2 im Anhang dargestellt. Die gefundenen Sequenzen wurden in Microsoft Word formatiert und über das Internet mit dem Programm MultAlin (<http://www.prodes.toulouse.inra.fr/multalin>) so in Übereinstimmung zueinander gebracht, dass die homologen Basen der einzelnen Sequenzen untereinander stehen (*engl. "aligned"*). Mit Hilfe des Computerprogramms GeneDoc wurden diese aufeinander angepassten Sequenzen ausgewertet und passende Primerbindungsstellen gesucht, die sowohl die Amplifikation des 542-Basenpaar großen Fragments als auch die Amplifikation eines kleineren Abschnittes innerhalb des ausgewählten DNA-Bereichs zulassen.

2.1.2 Probenmaterial

Um die in den Datenbanken gefundenen Sequenzen zu verifizieren oder gegebenenfalls zu korrigieren und um die Anzahl an Sequenzen zu vervollständigen, wurde aus insgesamt 91 Proben unterschiedlicher Herkunft die DNA extrahiert, ein Teil des 12S-Gens amplifiziert und anschließend sequenziert (siehe Kapitel 2.5). Tabelle A3 im Anhang gibt eine Übersicht über das Probenmaterial. Dabei sind die Säugetiere mit 8 Arten, die Fische mit 2 Arten und die Vögel mit 3 Arten vertreten.

In Tabelle 1 sind die wesentlichen Inhalte der Tabellen A1, A2 und A3 (siehe Anhang) zusammengefasst dargestellt.

Spezies	Name. des Datenbankeintrags vorhandener Sequenzen	Länge der Sequenz (bp)	Position des 12S- rRNA-Gens	Proben- material
Bos taurus	BOVMT	16338	431-1385	Gewebe
Canis familiaris	CFU96639	16727	70-1023	
Cervus elaphus				Speichel
Dama dama				Speichel
Equus caballus	MIECCOMP	16660	71-1045	Blut
Felis catus	U20753	17009	936-1895	
Gallus gallus	MIGGX	16775	1297-2272	Gewebe
Homo sapiens	HUMMTCG	16569	650-1603	Blut
sapiens	AF347015	16571		
Lepus capensis				Gewebe
Mus musculus	MUSMTCG	16295	70-1024	Blut
Oryctolagus cuniculus	OCAJ1588	17245	70-1026	Gewebe
Ovis aries	NC001941	16616	69-1026	Gewebe
	AF010406			
Struthio camelus	AF338715	16595	70-1035	
Sus scrofa	AF034253	16613	1246-2205	Gewebe
	AF304203			

Tabelle 1: Auflistung der untersuchten Spezies, ihrer Datenbankeinträge und Sequenzinformationen aus den Tabellen A1, A2 und A3 (siehe Anhang)

2.1.3 Probenvorbereitung

Der Einsatz von Knochen erforderte als einziges Probenmaterial eine Vorbehandlung, um die Extraktion der DNA zu ermöglichen und die Gefahr der Kontamination zu vermindern. Da der Knochen zu Mehl vermahlen wird, muss er vor Beginn der Untersuchungen gut getrocknet werden, was mehrere Tage dauern kann.

Zunächst wird mit einer Säge ein etwa 2 cm² großes Knochenstück entnommen, von dessen Oberfläche mit Schleifpapier die oberste Schicht entfernt wird. Anschließend wird das Knochenstück mit dem Hammer grob zertrümmert und in der Knochenmühle (Retsch MM2000) für 2 min bei einer Amplitude von 70 – 80 Hz zu feinem Mehl zermahlen.

2.2 Extraktion der DNA

Zur Isolierung der DNA wurden verschiedene Methoden angewandt. Ausschlaggebend für die Wahl einer Technik war das Ausgangsmaterial selbst, sowie dessen Alter und Zustand. Dabei ist die Chelex-Isolierung die schnellste der aufgeführten Methoden und wurde deswegen und wegen der einfachen Handhabung in den meisten Fällen favorisiert. Nur bei Proben, die als problematisch gelten, wie z. B. Haare und Knochen, oder bei denen im Chelex-Extrakt keine DNA nachgewiesen werden konnte, wurde eine der anderen Isolierungsmethoden angewandt. Bei allen Arbeitsweisen zur Isolierung der DNA wurde zusätzlich Proteinase K zum Abbau der Proteine eingesetzt. Da diese Protease die Taq-Polymerase bei der anschließenden PCR abbauen könnte, muss sie vor der PCR entfernt oder inaktiviert werden. Dies geschieht entweder durch Hitzedenaturierung bei 95 °C oder durch eine Phenolextraktion.

2.2.1 DNA-Isolierung mittels der Chelex-Methode

Die Extraktion der DNA mittels Chelex ermöglicht in den meisten Fällen eine einfache und schnelle Isolierung der DNA aus den verschiedensten Materialien, wie z.B. Blut, Gewebe und Speichel.

Die DNA Extraktion beruht auf dem von Walsh *et al.* 1991 beschriebenen Prinzip der Bildung von Chelatkomplexen. Dabei dient das Styrolharz Chelex[®] 100 (Bio-Rad Laboratories) als Chelator mit hoher Affinität zu polyvalenten Kationen. Der pH-Wert des Chelexharzes liegt im basischen Bereich (pH 10 - 11).

Durch das Erhitzen der Proben auf 100 °C werden die Zellmembranen aufgebrochen und die DNA freigesetzt und gleichzeitig denaturiert. Durch Proteinase K Zugabe wurde der Lyseeffekt erhöht (Wiegand *et al.* 1993). Die Zugabe von Chelex bewirkt dabei, dass zum einen das Aufbrechen der Zellmembranen im basischen Milieu erleichtert und zum anderen die Degradierung der DNA durch die Hitzeeinwirkung bei Chelexzugabe vermindert wird. Das geschieht vermutlich über die im Chelexharz enthaltenen gepaarten Iminodiacetationen, die die zur Degradierung der DNA nötigen Metallionen binden (Singer-Sam *et al.* 1989). Die so gewonnene DNA ist mit ihren 500 – 2.000 Basenpaaren im Vergleich zu anderen Isolierungsmethoden niedermolekular und eignet sich daher nur zur Amplifikation relativ kurzer DNA-Abschnitte.

Die hohe Affinität des Chelex zu Kationen kann zur Hemmung der PCR führen. Daher ist das Abzentrifugieren der Chelexkügelchen am Ende der Isolierung Voraussetzung für den Erfolg einer anschließenden PCR.

Durchführung:

10 µl Blut oder ein ca. 3 mm² großes Stück Gewebe werden zusammen mit 1 ml *aqua bidest.* in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und bei Raumtemperatur 15 min stehen gelassen. Nach 5 min Zentrifugation bei 11.000 g werden ca. 950 µl des Überstandes entfernt und verworfen. Der

verbleibende Rest wird mit 300 µl Chelex (5 %) und 80 µl Proteinase K Lösung (25 mM) versetzt und 10 min im Heizblock (Thermomixer 5436, Eppendorf) bei 56 °C inkubiert. Anschließend werden die Ansätze geschüttelt und 8 min bei 100 °C im Heizblock inkubiert. Die Chelexkügelchen werden für 5 min bei 11.000 g abzentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA kann direkt in der PCR eingesetzt werden (vgl. Kapitel 2.4).

2.2.2 DNA-Isolierung mittels Phenol/Chloroform

Diese Methode der DNA-Gewinnung eignet sich besonders, wenn große Mengen des Probenmaterials eingesetzt werden können. Die extrahierte DNA ist je nach Qualität des Ausgangsmaterials hochmolekular. Die Nachteile dieser Methode liegen in dem hohen Aufwand und dem Einsatz toxischer Substanzen, wie Phenol und Chloroform. Durch die Phenolextraktion wird die Proteinase K zerstört. Durch anschließende Zentrifugation werden die Protease und andere Proteine in der Phenolphase von der DNA in der wässrigen Phase getrennt. Phenolspuren, die die PCR stören könnten, werden durch Extraktion mit Chloroform entfernt. Die Fällung der DNA erfolgt über Ethanol.

Durchführung:

1 g des Gewebes werden mit 2 ml Lyse-Mix-Puffer (siehe Kapitel 2.8.2) und 50 µl Proteinase K (25 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 56 °C inkubiert. Dem Lysat werden 2 ml Phenol zugesetzt und 10 min im Überkopfschüttler rotiert und anschließend 8 min bei 4.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgetrennt und 1 ml Phenol sowie 1 ml Chloroform zugegeben und nach 10 min Rotation erneut 8 min bei 4.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wird einmal wiederholt und anschließend der Überstand mit 2 ml Chloroform versetzt, 10 min rotiert und 8 min bei 4.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird mit dem $2\frac{1}{2}$ fachen Volumen 70 %igen Ethanols gemischt eine halbe Stunde bei -20 °C inkubiert und dann bei 8.000 g für 8 min in ein 1,5 ml Gefäß fraktioniert zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wird, bis sich die gesamte DNA in dem Reaktionsgefäß befindet. Diese wird bei 56 °C getrocknet und anschließend in 50 µl *aqua bidest.* resuspendiert.

Bei der Isolierung von DNA aus Knochen wird ein spezieller Knochen-Lyse-Puffer (siehe Kapitel 2.8.2) verwendet und neben der Zugabe von 100 µl Proteinase K (25 mg/25 ml) noch 100 µl DDT (1 M) zugegeben.

2.2.3 DNA-Isolierung mittels First-DNA-Kit® (Genial)

Dieser DNA-Isolierungs-Kit ermöglicht die Gewinnung hochmolekularer DNA aus schwierigem Material, wie z. B. Haaren. Die Extraktion findet ohne den Einsatz giftiger Chemikalien statt. Zudem werden Hemmstoffe, wie Zellreste, Proteine und Kohlehydrate gefällt und pelletiert. Die DNA wird ferner mit 70% igem Alkohol von Salzen gereinigt.

Durchführung:

Abweichend vom Protokoll des Herstellers wird bei Haaren die Oberfläche des Probenmaterials vor Beginn der Extraktion gereinigt. Dazu wird das Material in 1 ml 70 %igem Ethanol für eine halbe Stunde inkubiert, anschließend der Alkohol entfernt und die Probe mit 1 ml *aqua bidest.* versetzt. Nach halbstündiger Inkubation wird das Wasser entfernt und die DNA nach dem Präparations-Protokoll des Herstellers isoliert. Bei Haaren oder schwierigem Material wird dem 1. Protokollschritt noch 20 µl DDT (1 M) zugegeben.

Für die DNA-Präparation aus Knochen bietet der Hersteller ein erweitertes Protokoll an, das eine Dekalzifizierung der Knochen vorsieht.

2.3 DNA-Aufreinigung

Um eine Hemmung der PCR durch im Probenmaterial befindliche Inhibitoren auszuschließen, wird bei Proben, die keine Amplifikationsergebnisse zeigen, eine zusätzliche Aufreinigung der DNA durch Ultrafiltration durchgeführt. Die von der Firma Amicon angebotene Microcon YM-100® Filter Methode eignet sich zur Elimination von niedermolekularen Bestandteilen. Die DNA wird

dabei an einer Cellulosemembran dialysiert, Hemmstoffe abzentrifugiert und anschließend die DNA in Wasser resuspendiert.

Durchführung:

Der Extrakt aus der DNA-Isolierung wird mit 300 ml *aqua bidest.* versetzt, auf dem Friktionsschüttler durchmischt und anschließend bei 11.000 g 5 min zentrifugiert. Die Microcon-Säule wird auf ein Reaktionsgefäß gesetzt und der Überstand auf den Filter gegeben. Es folgt eine Zentrifugation bei 3.000 g für 15 min. Die Säule wird auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und zum Lösen der DNA 60 µl *aqua bidest.* auf den Filter gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 1 min wird die Säule umgedreht und erneut bei 3.000 g für 3 min zentrifugiert.

2.4 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion stellt eine *in vitro* Technik dar, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen flankiert werden, vervielfältigen kann (Mullis und Falcoona 1987, Saiki *et al.* 1988). Um DNA mit Hilfe der PCR amplifizieren zu können, benötigt man Oligonucleotidprimer. Das sind kurze DNA-Fragmente, die komplementär zu definierten DNA-Bereichen sind und bestimmte zu amplifizierende DNA-Segmente als Start- und Stoppsignal flankieren. In Gegenwart von Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs) können DNA-Polymerasen unter geeigneten Versuchsbedingungen die Primer zu Sequenzen verlängern, die zur einzelsträngig denaturierten DNA komplementär sind, so dass am Ende alle DNA-Moleküle doppelsträngig vorliegen. Der Doppelstrang wird durch Erhitzen wieder aufgespalten und nach erneuter Anlagerung der Primer kann die Polymerase unter entsprechenden Temperaturbedingungen wiederum komplementäre Stränge bilden. Dieser temperaturgesteuerte Mechanismus wird im Thermocycler (GeneAmp 2400, Applied Biosystems) circa 30 mal wiederholt, so dass am Ende mehrere Kopien des gewünschten DNA-Stranges vorliegen. Das Prinzip der Methode beruht im Wesentlichen auf 3 Schritten:

1. Denaturierung der DNA (93 – 100 °C)
2. Anlagerung der Primer an die DNA (37 – 65 °C)
3. Verlängerung der Primer (72 °C)

alle drei Schritte zusammen bilden einen PCR-Zyklus.

2.4.1 Primer Design

Der größere zu amplifizierende Abschnitt auf der mtDNA umfasst 542 Basenpaare und befindet sich im Gen für die 12S-rRNA.

Die Primer, die für die PCR ausgewählt wurden, sind 19 Nukleotide lang und zeigen keine Bereiche mit ausgeprägten Sekundärstrukturen oder sich wiederholenden Motiven.

Als Primer wurden folgende Oligonukleotide eingesetzt:

12S-SEQ-H: 5' CAAACTGGGATTAGATACC 3'

12S-SEQ-R: 5' GCTTACCTTGTTACGACTT 3'

Für die Amplifikation des verkürzten Fragmentes wurde der Rück-Primer näher an den Hin-Primer gelegt, so dass ein 149-Basenpaar großes Fragment entstand.

Der Rück-Primer für das kurze Fragment besteht aus folgenden Basen:

12S-SEQ-KR: 5' TAGAACAGGCTCCTCTAG 3'

2.4.2 Optimierung der PCR-Bedingungen

2.4.2.1 Optimierung der "Annealing"-Temperatur

Der zweite Schritt der PCR ist entscheidend für die Spezifität einer PCR. Die "Annealing"-Temperatur eines Primers sollte 3 - 5°C unter seiner Schmelztemperatur (T_m) liegen.

Diese wird wie folgt abgeschätzt:

$$T_m = 2\text{ °C} \times (A+T) + 4\text{ °C} \times (G+C)$$

Bei einer berechneten T_m von 64 °C für die Vervielfachung des großen Fragments und 60 °C für die Amplifikation des kleinen Fragments, wurde die Amplifikation in dem Temperaturbereich von 50 °C – 65 °C getestet (siehe Kapitel 3.2).

2.4.2.2 Optimierung der Primer-Konzentration

Experimentell wurde die optimale Primerkonzentration in Abhängigkeit zum oben angegebenen Temperaturbereich getestet, wobei die Primerkonzentration in den Reaktionsansätzen folgende Werte betrug:

0,2 µM, 0,4 µM, 0,5 µM, 1 µM, 1,4 µM, 2 µM.

2.4.2.3 Optimierung der MgCl₂-Konzentration

Mg²⁺-Ionen bilden mit den dNTPs einen löslichen Komplex, der ausschlaggebend ist für den Einbau der Oligonukleotide. Zudem stimulieren sie die Polymeraseaktivität. Grundsätzlich gilt, dass zu hohe Konzentrationen von MgCl₂ die Entstehung unspezifischer Produkte fördert, während das Minimieren der Konzentration die Ausbeute verringert. Die MgCl₂-

Konzentration hat damit entscheidenden Einfluss auf die Spezifität und Ausbeute der PCR.

Innerhalb des angegebenen Temperaturbereiches wurden $MgCl_2$ -Konzentrationen von

1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM

getestet.

2.4.3 PCR-Ansatz

Der experimentell optimierte Reaktionsansatz setzt sich folgendermaßen zusammen:

REAGENZ	INGESETZTE MENGE IN μL	ENDKONZENTRATION
10x Puffer	5,0	1x
dNTPs	5,0	200 μM
$MgCl_2$	4,0	2 mM
AmpliTaq Gold	0,5	2,5 U
Primer Mix	5,0	1 μM
DNA/aqua bidest.	auf 50 μl Gesamtvolumen auffüllen	

2.4.4 PCR-Programme

Bei der chemisch modifizierten AmpliTaq Gold handelt es sich um ein Taq-Inhibitor-Gemisch, dessen Aktivierung erst mit der thermischen Zerstörung der Taq-Inhibitorbindung beginnt. Aus diesem Grund ist der initiale Denaturierungsschritt der PCR auf 10 min verlängert. Die

Amplifikationsreaktion wurde im Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems) mit folgenden Programmen durchgeführt:

Für das 542 bp Fragment:

95 °C	10 min		
95 °C	1 min	}	30 x
60 °C	1 min		
72 °C	30 sek		
72 °C	10 min		
∞ 4 °C			

Für das 149 bp Fragment:

95 °C	10 min		
95 °C	1 min	}	30 x
55 °C	1 min		
72 °C	20 sek		
72 °C	10 min		
∞ 4 °C			

2.4.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um die DNA-Fragmente für die anschließende Sequenzierung zu reinigen, wurden überschüssige Primer, Nukleotide, Polymerasen und Salze aus dem Ansatz mit den Amplifikaten entfernt. Dazu wurde der "QIAquick PCR Purifikation Kit" der Firma Qiagen genutzt, der auf dem Prinzip der selektiven Bindungseigenschaften von Silikamembranen beruht. Die DNA wird in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an die Membran gebunden, während andere Komponenten die Membran passieren. Die so gereinigten Amplifikate werden in *aqua bidest.* resuspendiert und müssen dann bei -20 °C gelagert werden, da es ohne Puffersystem zur Degradierung der DNA kommen könnte.

2.5 Thermozyklische DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte nach der von Sanger *et al.* (1977) erstmals beschriebenen Methode. Dabei verlängert eine Polymerase die Primer mit den bekannten vier dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP). Im Ansatz außerdem enthalten sind Didesoxynucleotidtriphosphate (ddNTPs), Analoge zu den dNTPs, deren Einbau zum Abbruch der Sequenzierreaktion führt. Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Ketten, die jeweils mit dem zuletzt eingebauten, zum Abbruch führenden ddNTP enden.

Abbildung 1 zeigt die schematische Darstellung der Reaktion, die im Prinzip den drei Reaktionsschritten der PCR gleicht.

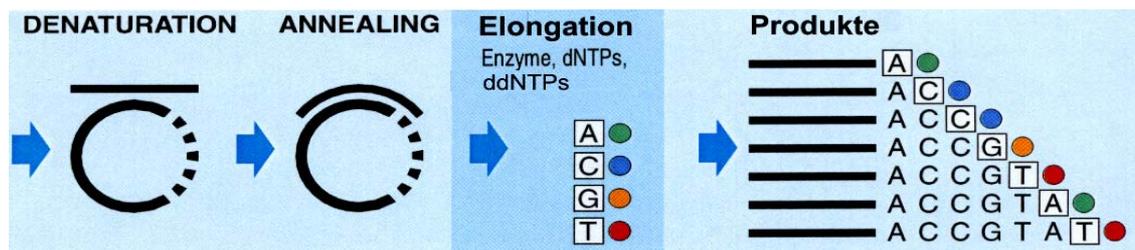


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Sequenzierreaktion (modifiziert aus: *Automated DNA Sequencing, Chemistry Guide Applied Biosystems*)

Die Sequenzierung der Amplifikate erfolgte mittels des "Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit". Da die ddNTPs in diesem Kit alle mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, kann die Sequenzierreaktion in einem Ansatz durchgeführt werden.

2.5.1 Sequenzieransatz

Der Kit enthält alle für die Sequenzierung nötigen Reagenzien, wie die dNTPs, farbstoffmarkierte ddNTPs, $MgCl_2$, Puffer und eine AmpliTaq DNA-Polymerase (FS). Als Primer wurden die beiden Primer 12S-SEQ-H und 12S-SEQ-R diesmal einzeln eingesetzt.

Für die Sequenzierreaktion wurde folgender Ansatz pipettiert:

Sequenzier-“Ready Reaction-Mix”	4 µl
Amplifikat	2 µl
<i>aqua bidest.</i>	12 µl
Primer (0,15 µM)	2 µl

2.5.2 Sequenzierprogramm

Die Reaktion wurde im Thermocycler (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems) mit folgendem Programm durchgeführt:

95 °C	10 sek	} 25 x
55 °C	15 sek	
60 °C	2 min	
∞ 4 °C		

2.5.3 Aufreinigung der Sequenzierprodukte

Danach erfolgt eine Aufreinigung der Sequenzierprodukte mit dem Centri-Sep-System (Princeton Separations), um überschüssige ddNTPs, dNTPs, Primer und Polymerase aus dem Ansatz zu entfernen. Das genutzte Prinzip der Gelfiltration ist bei Sambrook *et al.* 1989 beschrieben. Das Gel besteht aus einem unlöslichen aber stark hydratisierenden Polymer, welches kleinere Moleküle aufnimmt, während große Moleküle nicht aufgenommen werden können und die Säule damit schneller passieren können.

Anschließend wurden jeweils 4 µl Sequenzierprodukt in 20 µl TSE Puffer aufgenommen, 2 1/2 min bei 100 °C denaturiert und mittels Kapillarelektrophorese analysiert.

2.6 Elektrophoresetechniken

2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Der Nachweis der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente erfolgte durch Auftrennung in einem 3 %igen Agarosegel (1,5 g Agarose auf 50 ml TBE Puffer) mit 0,005 % Ethidium-Bromid. Dazu wurden 6 µl PCR Produkt mit 2 µl Ladepuffer (Serva Blue G) gemischt auf das Gel gegeben (8 x 11 cm) und bei einer Spannung von 100 mV ca. 30 min aufgetrennt. Die Identifizierung und Charakterisierung der resultierenden Banden erfolgte mittels UV-Licht. Als Standard diente eine 50 – 2.000 bp Leiter (Bio-Rad).

2.6.2 Kapillar-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Daten mittels der Kapillarelektrophorese wurde das ABI Prism 310 Genetic Analyzer System der Firma Applied Biosystems genutzt. Hierbei handelt es sich um ein mikroprozessorgesteuertes Elektrophorese- und Fluoreszenz-Detektions-System.

Die mit unterschiedlichen Farbstoffen markierten Amplifikate bewegen sich nach Anlegen einer Spannung durch die mit Polymer gefüllte Kapillare an einem Argonlaser vorbei, dessen Hauptemissionen bei Wellenlängen von 488 nm und 514,5 nm liegt. Die Abbildung 2 zeigt eine Übersicht des ABI Prism 310 Systems.

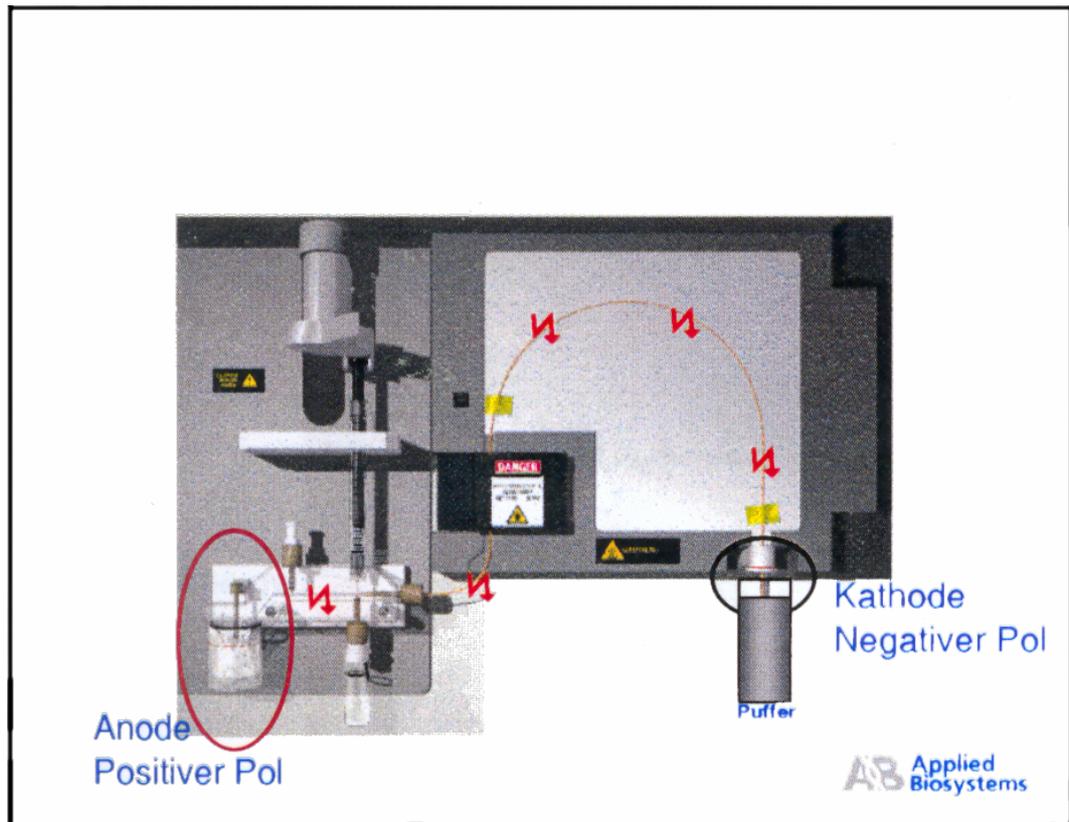


Abbildung 2: ABI Prism 310 Genetic Analyzer (aus: ABI Prism Kurs Fragmentanalyse Applied Biosystems)

Der Argonlaser regt die markierten Amplifikate an und das emittierte Licht wird auf einen CCD-Chip projiziert ("Charge Coupled Device"), der die Intensität von vier nicht überlappenden Wellenlängen-Bereichen detektieren kann. Jeder Bereich korrespondiert dabei mit dem Emissionsmaximum der in der Sequenzierreaktion eingesetzten vier Fluoreszenz-Farbstoffe.

Zur Analyse der Sequenzieransätze wurde das "virtuelle-Filter-Set-E" genutzt, dessen Wellenlängenbereiche in Tabelle 2 dargestellt sind.

Terminator	Farbstoff	Farbe	Wellenlänge (nm)
A	dichloro[R6G]	Grün	565-575
C	dichloro[ROX]	Rot	620-630
G	dichloro[R110]	Blau	535-545
T	dichloro[TAMRA]	gelb (schwarz)	590-600

Tabelle 2: Bei der Kapillar-Gelelektrophorese verwendete Filter Set E mit den korrespondierenden Farbstoffen aus dem "Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit"

2.7 Pyrosequenzierung

Zur Darstellung der ermittelten Sequenzunterschiede wurde die Methode der Pyrosequenzierung zur Untersuchung kurzer DNA-Amplifikate genutzt. Die Pyrosequenzierung ist eine Sequenziermethode, die auf der Detektion des während der DNA-Synthese gebildeten Pyrophosphats basiert. Dabei werden dem Reaktionsansatz die einzelnen Nukleotide nacheinander zugesetzt. Eine DNA-Polymerase verlängert den Sequenzierstrang mit dem komplementären dNTP. Dieser Einbau des Nukleotids ist verbunden mit der Freisetzung einer äquimolaren Menge von anorganischem Pyrophosphat (Abbildung 3).

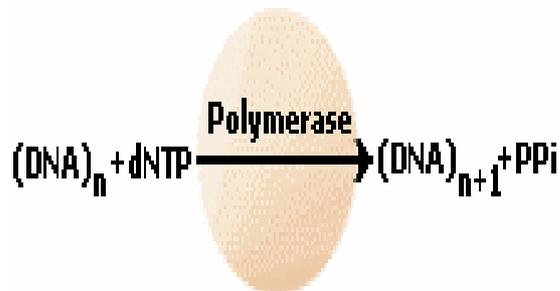


Abbildung 3 : Freisetzung von Pyrophosphat nach Einbau eines Nukleotids

Das freiwerdende Pyrophosphat (PPi) wird im weiteren Verlauf (Abbildung 4) enzymatisch durch die ATP-Sulfurylase mit APS zu ATP umgeformt. Das ATP dient dann wiederum als Energielieferant für die durch die Luciferase katalysierte Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin. Bei diesem Schritt wird detektierbares Licht freigesetzt, dessen Ausbeute in linearer Beziehung zur Menge an gebildetem Pyrophosphat und somit zur Anzahl der eingebauten dNTPs steht.

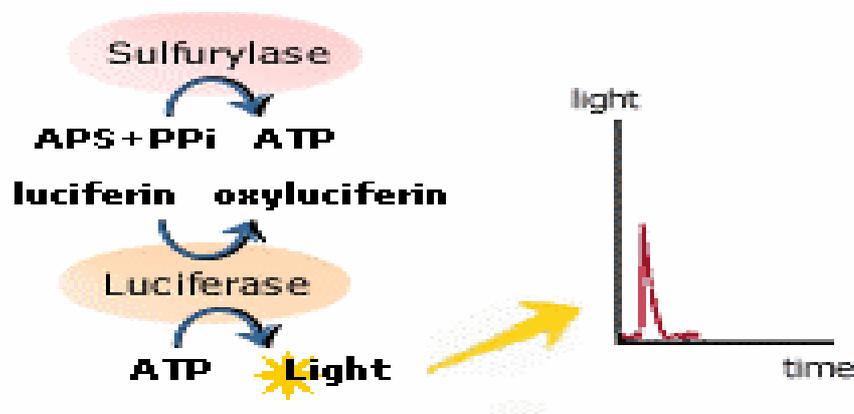


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Enzymkaskade bei der Pyrosequenzierung

Die einzelne Zugabe der vier dNTPs ermöglicht die Zuordnung des Lichtsignals zu einem dNTP und damit die Ermittlung der zugrunde liegenden Sequenz. Da das Nukleotid dATP der Luciferase als Substrat dient und so zu falsch-positiven Ergebnissen führen könnte, wird anstelle von dATP dATP α S verwendet.

Durch das Enzym Apyrase werden nicht eingebaute dNTPs zunächst zu dNDPs und schließlich zu dNMPs abgebaut. Dadurch werden Waschschrte zwischen den einzelnen Nukleotidzugaben überflüssig.

Das detektierte Lichtsignal wird als Peak in einem sogenannten Pyrogramm dargestellt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit der SQA Software (Pyrosequencing AB).

2.7.1 Amplifikation

Die Amplifikation des DNA-Abschnittes erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie im Kapitel 2.4 beschrieben. Abweichend von dieser Vorschrift werden beide 3'- 5'- Primer 12S-SEQ-R und 12S-SEQ-KR (Rückprimer) biotinyliert, da dieser Strang in der folgenden Sequenzierreaktion als Vorlage genutzt wird.

2.7.2 Separation und Aufreinigung des Amplifikates

Das biotinylierte PCR-Produkt wird an Streptavidin-Sepharose™-Chromatographiematerial gebunden. Die Trennung und Aufreinigung erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers mit dem PSQ™ 96 Sample Preparation Kit. Dazu werden 10 µl des PCR-Produktes, 20 µl *aqua bidest.*, 3 µl Streptavidin-Sepharose™ und 40 µl Binding-Puffer in einer 96-well-PCR-Platte 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nachfolgend werden die an die Streptavidin-Sepharose™ gebundenen Amplifikate mit dem Vakuum Prep tool (Pyrosequencing) aufgenommen, in NaOH denaturiert und mit dem Waschpuffer gereinigt.

2.7.3 Sequenzierreaktion

Der Primer, der für Sequenzierreaktion verwendet wurde, ist 19 Nukleotide lang, zeigt keine Bereiche mit ungewöhnlichen Sequenzabschnitten oder sich wiederholenden Motiven. Seine Spezifität für das 12S-Gen der mitochondrialen DNA wurde mittels Datenbankrecherche nachgewiesen.

Er hat die folgende Sequenz:

12S-SEQUENZH: 5' ATTAGATACCCCACTATGC 3'

Das einsträngige, gewaschene Amplifikat wird in eine PSQ HS 96 Platte überführt und mit 45 µl Annealing Puffer und 3 µl (15pM) Sequenzier-Primer (12S-SEQ-H) für 2 min bei 80 °C inkubiert.

Nach Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur können sie im Pyrosequenzer untersucht werden.

2.8 Verwendete Chemikalien und Lösungen

2.8.1 Chemikalien

Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
AmpliTaq Gold	Applied Biosystems, Weiterstadt
Borsäure	Merck, Darmstadt
Chelex [®] 100 Resin	Bio-Rad Laboratories, Californien
Chloroform	Merck, Darmstadt
Desoxynukleotidtri- phosphate (dNTPs)	Roche, Mannheim
Dinatriummethyldiamintetra- Essigsäure-Dihydrat (EDTA)- Lösung (steril)	Sigma, Steinheim
Dinatriummethyldiamintetra- Essigsäure-Dihydrat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat-Natrium-Salz (SDS)	Serva, Heidelberg
Ethanol	Merck, Darmstadt
GeneScan Polymer 6	Applied Biosystems, Weiterstadt
KCl	Fluka, Steinheim
Mg-Acetat	Sigma, Steinheim
MgCl ₂ -Lösung	Applied Biosystems, Weiterstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
PCR Buffer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Phenol	Q-Biogene, Illkirchen
Primer	OligoFactory, Weiterstadt
Proteinase K	Q-Biogene, Illkirchen
Streptavidin-Sepharose [™]	Amersham Bioscience Ltd.,
Template Suppression Reagent (TSE)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Tris(hydroxymethyl)- aminomethan (TRIS)	Serva, Heidelberg
Tween [™] 20 (Polyoxyethylensorbitan)	Sigma, Steinheim
50-2000 bp Leiter	Bio-Rad Laboratories, Californien

2.8.2 Lösungen

Lyse-Mix-Puffer	
Tris-HCl pH 7,6	(1 M)
EDTA	(0,5 M)
NaCl	(5 M)
SDS	(10 %)
Proteinase K	(20 ^{mg} / _{ml})

Knochen-Lyse-Puffer	
Tris	(1 M)
KCl	(1 M)
SDS	(10 %)
EDTA steril	(0,5 M)

dieser Puffer wird unter der Laminar flow (Fa. BDK) steril angesetzt

TBE-Puffer 10x	
Tris	108,9 g
EDTA	9,3 g
Borsäure	55,4 g
in 1 l <i>aqua bidest.</i> lösen	

Binding-Puffer	
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
NaCl	2 M
Tween TM 20	0,1 %

pH-Wert 7,6 mit 1 M HCl einstellen

Annealing-Puffer	
Tris	20 mM
Mg-Acetat	2 mM

pH-Wert 7,6 mit 4 M Essigsäure einstellen

Denaturierungslösung

NaOH	0,2 M
------	-------

Waschpuffer

Tris	10 mM
------	-------

pH-Wert 7,6 mit 4 M Essigsäure einstellen

3. Ergebnisse

3.1 Auswahl eines DNA-Abschnittes zur Amplifikation

Für die Amplifikation eines kurzen, hochpolymorphen DNA-Abschnittes innerhalb des 12S-Genes ist es notwendig, hochkonservierte Bereiche zu finden, an die der Primer binden kann. Dazu wurden zunächst alle publizierten mitochondrialen DNA-Sequenzen in der Datenbank Medline gesucht und miteinander verglichen. Es wurden zwei Primerbindungsstellen definiert, die je nach Spezies ein ca. 540-Basenpaar großes Fragment begrenzen. Beide Primerbindungsstellen zeigen eine hohe Konserviertheit in allen untersuchten Arten. Es ist also zu erwarten, dass die Primer universell einsetzbar sind. Beide Primer besitzen 19 Basenpaare und weisen keine sich wiederholenden Motive auf, zeigen aber eine ausgewogene Basenzusammensetzung. Abbildung 5 zeigt das "Alignment" des ausgewählten Bereiches verschiedener Arten. Die gelb markierten Bereiche zeigen in allen Sequenzen vollständige Übereinstimmung in den 12S-Gen-Sequenzen der unterschiedlichen Arten.

		12S-SEQ-H										
		*	20	*	40							
Kaninchen	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	ACTATGCT	TAGCCCTAAACTTTGATAAATT	: 50						
Schwein	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	ACTATGCT	TAGCCCTAAACCCAAATAGTT	: 50						
Hund	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	ACTATGCT	TAGCCCTAAACATAGATAAATT	: 50						
Katze	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	TACTATGCT	TAGCCCTAAACTTAGATAGTT	: 50						
Pferd	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	ACTATGCT	TAGCCCTAAACTAAAATAGCT	: 50						
Rind	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	ACTATGCT	TAGCCCTAAACACAGATAAATT	: 50						
Schaf	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	ACTATGCT	TAGCCCTAAACACAAATAAATT	: 50						
Maus	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	ACTATGCT	TAGCCATAAACCTAAATAAATT	: 50						
Schimpanse	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	ACTATGCT	TAGCCCTAAACTTCAACAGTT	: 50						
Mensch	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	ACTATGCT	TAGCCCTAAACCTCAACAGTT	: 50						
Huhn	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	ACTATGCT	TAGCCCTAAATCTAGATACCT	: 50						
Strauss	:	CAA	ACTGGGATTAGATACCC	ACTATGCT	TAGCCCTAAATCATGATACTT	: 50						
		CAA				ACTGGGATTAGATACCCc	ACTATGCTTAGCCc	TAAAc	AtA	tT		
		60	*	80	*	100						
Kaninchen	:	TCAT--	AACAAAAT	TATT	CGCCAGAGAACTACAAGCC--	AAAGCTTAAAA	: 96					
Schwein	:	ACAT--	AACAAAAT	TATT	CGCCAGAGTACTACTCGCA--	ACTGCCTAAAA	: 96					
Hund	:	TTAC--	AACAAAAT	TAA	TCGCCAGAGGACTACTAGCA--	ATAGCTTAAAA	: 96					
Katze	:	ACCCTA	AACAAAAT	TAT	CGCCAGAGAACTACTAGCA--	ATAGCTTAAAA	: 98					
Pferd	:	TACCACA	AACAAAGCT	TAT	TCGCCAGAGTACTACTAGCA--	ACAGCCTAAAA	: 98					
Rind	:	ACATA-	AACAAAAT	TATT	CGCCAGAGTACTACTAGCA--	ACAGCTTAAAA	: 97					
Schaf	:	ATAAA-	AACAAAAT	TATT	CGCCAGAGTACTAC-CGCA--	ACAGCCCGAAA	: 96					
Maus	:	AAATTT	AACAAAAT	TAT	TGCCAGAGAACTACTAGCC--	ATAGCTTAAAA	: 98					
Schimpanse	:	AAATT-	AACAAAAT	GCT	CGCCAGAACACTACGAGCC--	ACAGCTTAAAA	: 97					
Mensch	:	AAATC-	AACAAAAT	GCT	CGCCAGAACACTACGAGCC--	ACAGCTTAAAA	: 97					
Huhn	:	CCCAT-	CACA	CAT	TATCCGCCTGAGAACTACGAGCA	CAAACGCTTAAAA	: 99					
Strauss	:	ACCC--	CACCTA	AGT	TATCCGCCGAGAACTACGAGCA	CAAACGCTTAAAA	: 98					
		aACaaAa				tat	cGCCaGAg	ACTAC	aGC	A	GC	taAAA
				12S-SEQ-KR								
		*	120	*	140	*						
Kaninchen	:	CTCA	AAGGACTTGGCGGTGCTTT	TATACCC	ACCTAGAGGAGCCTGTTCCGT	: 146						
Schwein	:	CTCA	AAGGACTTGGCGGTGCTT	CACATCC	ACCTAGAGGAGCCTGTTCTAT	: 146						
Hund	:	CTCA	AAGGACTTGGCGGTGCTTT	TATATCC	CTAGAGGAGCCTGTTCTAT	: 146						
Katze	:	CTCA	AAGGACTTGGCGGTGCTTT	TACATCC	CTAGAGGAGCCTGTTCTAT	: 148						
Pferd	:	CTCA	AAGGACTTGGCGGTGCTTT	TACATCC	CTAGAGGAGCCTGTTCCAT	: 148						
Rind	:	CTCA	AAGGACTTGGCGGTGCTTT	TATATCC	CTAGAGGAGCCTGTTCTAT	: 147						
Schaf	:	CTCA	AAGGACTTGGCGGTGCTTT	TATACCC	CTAGAGGAGCCTGTTCTAT	: 146						
Maus	:	CTCA	AAGGACTTGGCGGTACTTT	TATATCC	ATCTAGAGGAGCCTGTTCTAT	: 148						
Schimpanse	:	CTCA	AAGGACTTGGCGGTGCTT	CATATCC	CTAGAGGAGCCTGTTCTGT	: 147						
Mensch	:	CTCA	AAGGACTTGGCGGTGCTT	CATATCC	CTAGAGGAGCCTGTTCTGT	: 147						
Huhn	:	CTCT	AAGGACTTGGCGGTGCC	CAACCC	ACCTAGAGGAGCCTGTTCTAT	: 149						
Strauss	:	CTCT	AAGGACTTGGCGGTGCC	TAA	CCACCTAGAGGAGCCTGTTCTAT	: 148						
		CTCa				AAGGACTTGGCGGTg	Ctt	A	A	CC	CTAGAGGAGCCTGTTct	T
		160	*	180	*	200						
Kaninchen	:	AATCGATAAA	CCCGATA	TAA	ACCCTACCACTCTT	TGCCAACTCAGCCTATA	: 196					
Schwein	:	AATCGATAAA	CCCGATA	TAG	ACCTTACCAACCCTT	TGCCAATTCAGCCTATA	: 196					
Hund	:	AATCGATAAA	CCCGATA	TAA	ACCCTACCACTCTT	TGCCAATTCAGCCTATA	: 196					
Katze	:	AATCGATAAA	CCCGATA	TAT	ACCTTACCACTCTT	TGCCAATTCAGCCTATA	: 198					
Pferd	:	AATCGATAAA	CCCGATA	TAA	ACCCTACCACTCTT	TGCCAATTCAGCCTATA	: 198					
Rind	:	AATCGATAAA	CCCGATA	TAA	ACCCTACCACTCTT	TGCCAATTCAGCCTATA	: 197					
Schaf	:	AATCGATAAA	CCCGATA	TAA	ACCCTACCACTCTT	TGCCAATTCAGCCTATA	: 196					
Maus	:	AATCGATAAA	CCCGCT	CTAC	CTACCACTCTT	TGCCAATTCAGCCTATA	: 198					
Schimpanse	:	AATCGATAAA	CCCGAT	CA	ACCCTACCACTCTT	TGCCAATTCAGCCTATA	: 193					
Mensch	:	AATCGATAAA	CCCGAT	CA	ACCCTACCACTCTT	TGCCAATTCAGCCTATA	: 193					
Huhn	:	AATCGATAA	ATCCACG	ATTC	ACCCTACCACTCTT	TGCCAATTCAGCCTATA	: 199					
Strauss	:	AATCGATAA	ATCCACG	ATTC	ACCCTACCACTCTT	TGCCAATTCAGCCTATA	: 197					
		AATCGATAAa				CCcCGaT	ACC	ACCa	cTtGC	a	CAG	CTaT

```

          *      220      *      240      *
Kaninchen : TACCGCCATCTTCAGCGAACC-CTAAA-AAGGAGCAAAAGTAAGCTCAAT : 244
Schwein   : TACCGCCATCTTCAGCAAACC-CTAAA-AAGGAACAATAGTAAGCAAAAT : 244
Hund      : TACCGCCATCTTCAGCAAACC-CTCAA-AAGGTAGAACAGTAAGCAAAAT : 244
Katze     : TACCGCCATCTTCAGCAAACC-CTAAA-AAGGAAGAAAAGTAAGCAAAAG : 246
Pferd     : TACCGCCATCTTCAGCAAACC-CTAAACAAGGTACCGAAGTAAGCAAAA : 247
Rind      : TACCGCCATCTTCAGCAAACC-CTAAAAA-CGAAAAAAAGTAAGCGTAAT : 245
Schaf     : TACCGCCATCTTCAGCAAACC-CTAAAAAAGGGACAAAAGTAAGCTCAAT : 245
Maus      : TACCGCCATCTTCAGCAAACC-CTAAA-AAGGTATTAAAGTAAGCAAAAG : 246
Schimpanse : TACCGCCATCTTCAGCAAACC-CTGATGAAGGTTACAAAGTAAGCGCAAG : 242
Mensch    : TACCGCCATCTTCAGCAAACC-CTGATGAAGGCTACAAAGTAAGCGCAAG : 242
Huhn      : TACCGCCGTCGCCAGCCACCTCTAATGAAAGAACAAACAGTGAGCTCAAT : 249
Strauss   : TACCGCCGTCGCCAGCCGCTC--ATGAGAGAACAAATAGCGAGCAAAAT : 245
          TACCGCCaTcttCAGC aaCC Ct A AagG a AGtaAGC cAA

```

```

          260      *      280      *      300
Kaninchen : TA--CCACCGTAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATAGAGTGGAGAG : 292
Schwein   : CAT-AGCACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAGCTTATGGGTTGGAAAG : 293
Hund      : CAT-TTTACATAAAAAAGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGAGGTGGGAAG : 293
Katze     : TATCTTAACATAAAAAAGTTAGGTCAAGGTGTAGCTCATGAGATGGGAAG : 296
Pferd     : TATCC-AACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGGGATGGAGAG : 296
Rind      : TAT-GATACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGAAATGGGAAG : 294
Schaf     : AAT-AACACATAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGGAGTGGGAAG : 294
Maus      : AAT-CAAACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCAATGAAATGGGAAG : 295
Schimpanse : TA--CCCACGTAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCTATGAGGCGGCAAG : 290
Mensch    : TA--CCCACGTAAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATGAGGTGGCAAG : 290
Huhn      : AGCC-CTCGCTAATAAGACAGGTCAAGGTATAGCCTATGGGGTGG-GAG : 297
Strauss   : AGCCACCCGCTAACAAAGACAGGTCAAGGTATAGCATATGGAGTGG-AAG : 294
          a C taAA A GttAGGTCAAGGTgTA C ATg tGG AG

```

```

          *      320      *      340      *
Kaninchen : CAATGGGCTACATTTCTACTTCAAGAATAT-----ACGAA : 327
Schwein   : AAATGGGCTACATTTCTACATGAGTATA-----TCCACCAC--ACGAA : 335
Hund      : AAATGGGCTACATTTCTACCCAAGAACA-----TTT----C--ACGAA : 331
Katze     : CAATGGGCTACATTTCTAAAATTAGAAC-----ACC----C--ACGAA : 334
Pferd     : AAATGGGCTACATTTCTACCCTAAGAACAAGAACTTTAACCCGGACGAA : 346
Rind      : AAATGGGCTACATTTCTACACCAAGAGAA-----TCAAGC-----ACGAA : 335
Schaf     : AAATGGGCTACATTTCTAC-CCAAGAAA-----TTAAT----ACGAA : 334
Maus      : AAATGGGCTACATTTCTTATAAAGAACA-----TT-----ACTAT : 332
Schimpanse : AAATGGGCTACATTTCTACCCCAGAAAATT-----ACGAT : 326
Mensch    : AAATGGGCTACATTTCTACCCCAGAAAATT-----ACGAT : 326
Huhn      : AAATGGGCTACATTTCTAACATAGAA--CAA-----ACGAA : 332
Strauss   : AAATGGGCTACATTTCTAACATAGAATACAC-----ACGAA : 331
          aAATGGGCTACATTTCTa a A ACgA

```

```

          360      *      380      *      400
Kaninchen : AGCCCTTATGAAACTCTAAGGGCCAAGGAGGATTTAGTAGTAAATTA-A : 376
Schwein   : AGTTTTTATGAAACT--AAAAACCAAGGAGGATTTAGCAGTAAAT-CGA : 382
Hund      : TGTTTTTATGAAATT--AAAAACTGAAGGAGGATTTAGTAGTAAATTA-A : 378
Katze     : GATCCTTACGAAACT--AAGTATTAAGGAGGATTTAGTAGTAAATTTGA : 382
Pferd     : AGTCTCCATGAAACT--GGAGACTAAAGGAGGATTTAGCAGTAAATTA-A : 393
Rind      : AGTTATTATGAAACC--AATAACCAAGGAGGATTTAGCAGTAAACTA-A : 382
Schaf     : AGCCATTATGAAATT--AATAGCCAAAGGAGGATTTAGCAGTAAACTA-A : 381
Maus      : ACCCTTTATGAAACT--AAAGGACTAAGGAGGATTTAGTAGTAAATTA-A : 379
Schimpanse : AACCTTTATGAAACC-TAAGGGTCGAAGGTGGATTTAGCAGTAAACTA-A : 374
Mensch    : AGCCCTTATGAAACT-TAAGGGTCGAAGGTGGATTTAGCAGTAAACTG-A : 374
Huhn      : AAAGGATGTGAAACC-CGCCCTTAGAAGGAGGATTTAGCAGTAAAGTG-A : 380
Strauss   : AGAGGATATGAAATC-A-TCCTCAGAAGGCGGATTTAGCAGTAAATA-G : 378
          a tatGAAA AAGG GGATTTAG AGTAAA t a

```

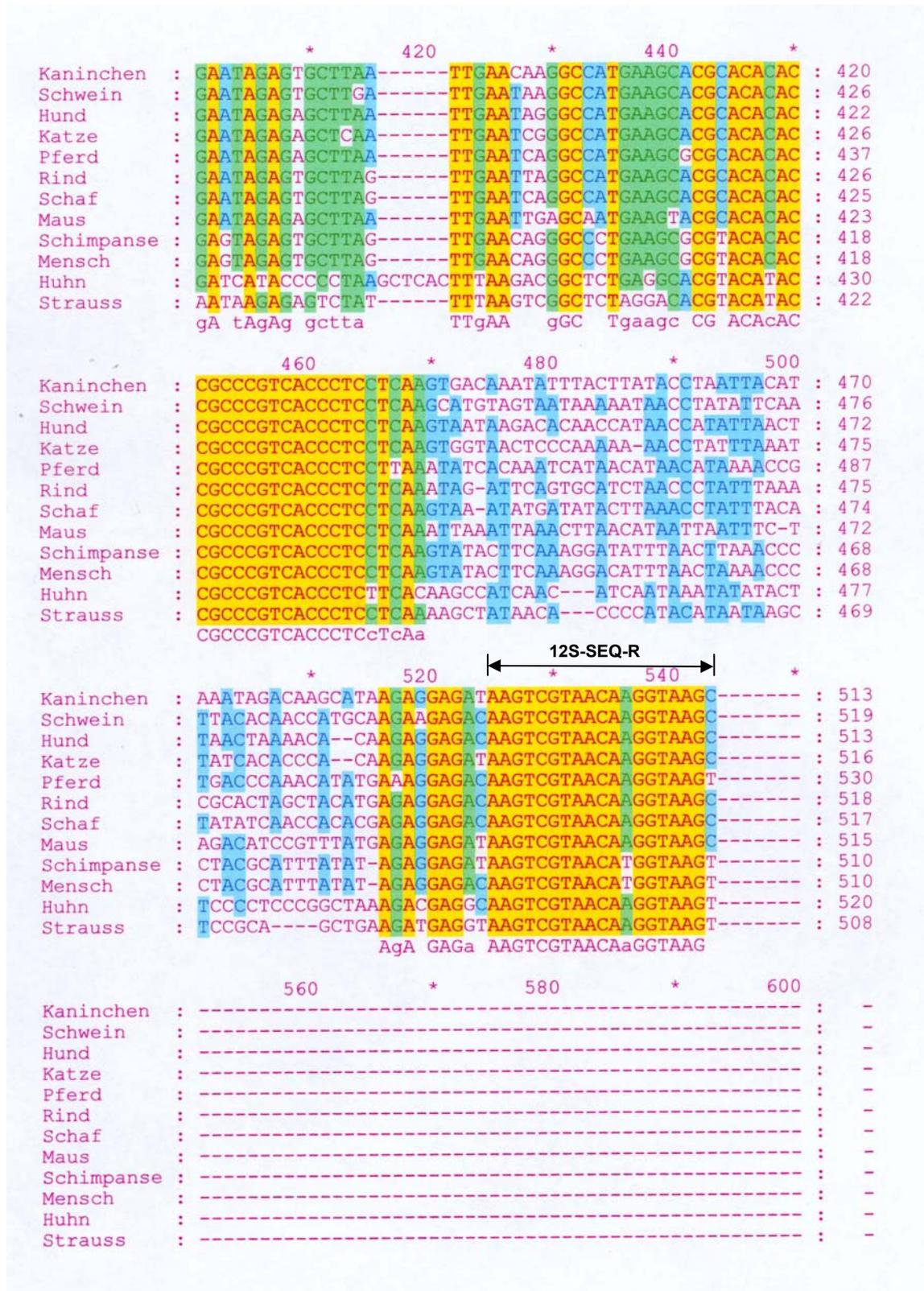


Abbildung 5: Vergleich der 12S-Gen-Sequenz unterschiedlicher Arten

3.2 Optimierung der Amplifikationsbedingungen

Da der zu amplifizierende Bereich innerhalb der mtDNA neu definiert wurde, mussten auch die Amplifikationsbedingungen für diesen Abschnitt ermittelt werden. Folgende Parameter wurden hierbei variiert:

“Annealing”-Temperatur : 50 °C, 55 °C, 60 °C

MgCl₂-Konzentration: 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM

Primer-Konzentration : 0,2 µM, 0,4 µM, 0,5 µM, 1 µM, 1,4 µM, 2 µM

Dabei wurde zunächst bei den einzelnen “Annealing”-Temperaturen die MgCl₂-Konzentration variiert. Anschließend wurde bei optimaler Temperatur und MgCl₂-Konzentration die ideale Primer-Konzentration experimentell bestimmt.

3.2.1 Optimierung der Amplifikationsbedingungen für das 542 bp große Fragment

Die theoretisch berechnete “Annealing”-Temperatur für die Primer zur Amplifikation des größeren Fragmentes liegt bei 64 °C. Tatsächlich zeigte sich, dass bei 50 °C und 55 °C ein etwa 700-Basenpaar großes unspezifisches Produkt gebildet wurde, das bei hohen Magnesiumchlorid-Konzentrationen sogar als einzige Bande im Agarosegel sichtbar war.

Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse der Amplifikation humaner DNA aus Blut bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen für die drei Temperaturbereiche und konstanter Primerkonzentration von 1 µM.

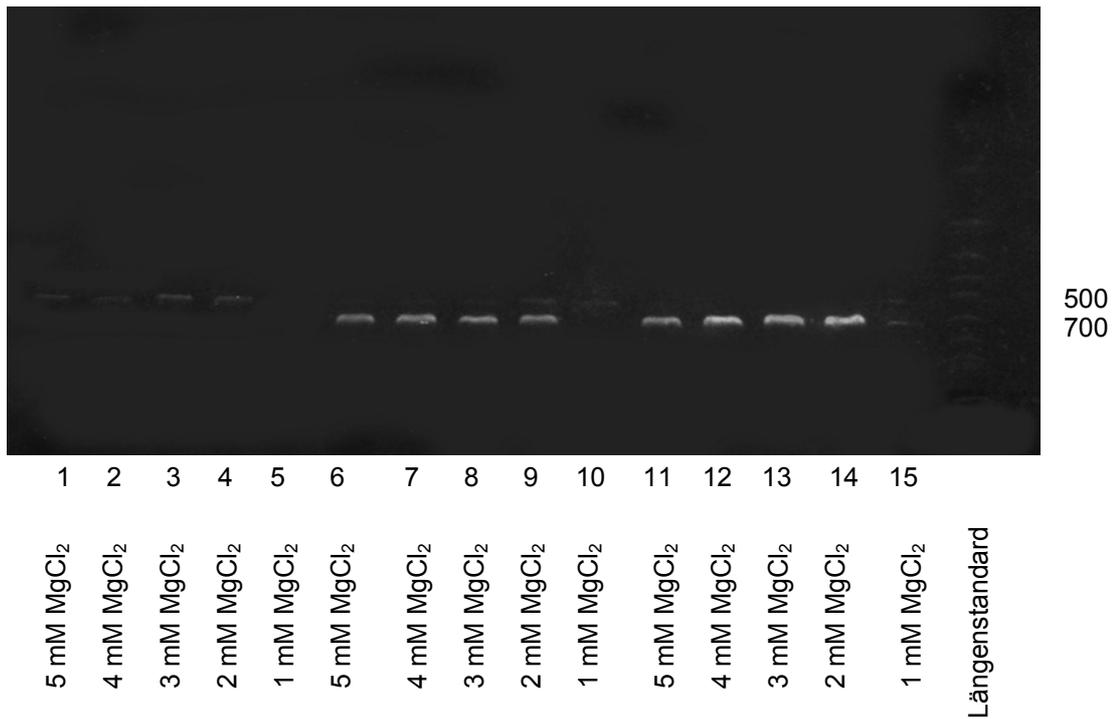


Abbildung 6: Optimierung der Amplifikationsbedingungen: Agarosegel von Amplifikaten aus humaner DNA bei variierender "Annealing"-Temperatur und MgCl₂-Konzentration bei einer Primerkonzentration von 1 µM. (Spur 1 - 5: 60 °C, Spur 6 – 10: 55 °C, Spur 11 - 15: 50 °C).

Bei einer Temperatur von 60 °C und einer Magnesiumchloridkonzentration von 2 mM konnten keine unspezifischen Anteile mehr nachgewiesen werden (Abbildung 7). Für die ebenfalls getestete Primerkonzentration wurden die optimalen Ergebnisse bei einer Konzentration von 1 µM erzielt.

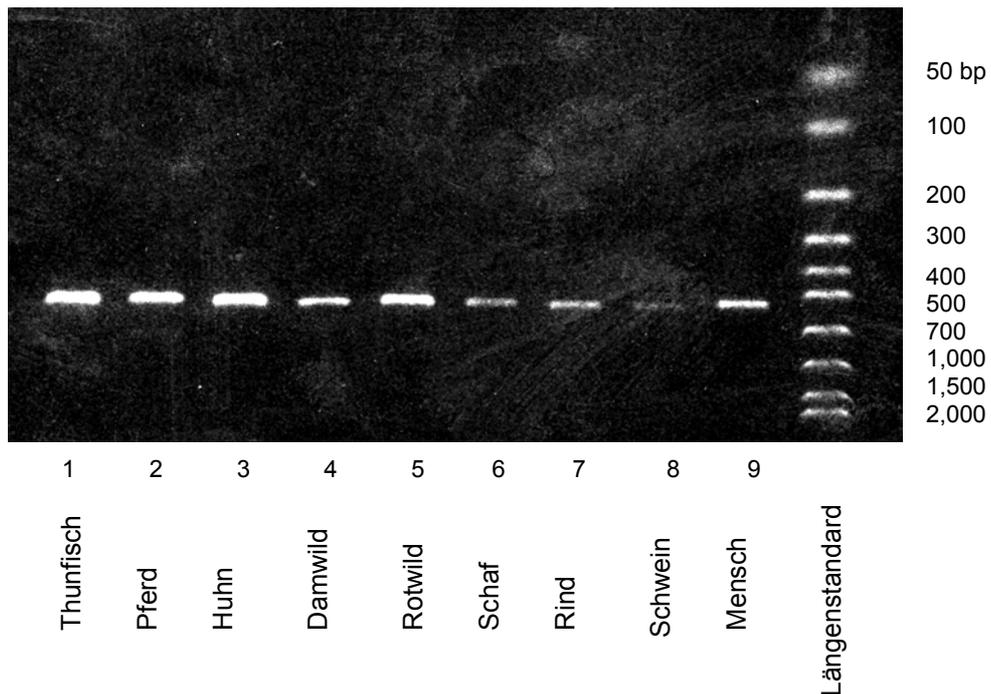


Abbildung 7: Optimierte PCR-Protokolle ("Annealing"-Temperatur: 60 °C, $MgCl_2$ -Konzentration: 2 mM, Primerkonzentration: 1 μM).

Aus den Ergebnissen zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurde für die Amplifikation des 542 bp großen Sequenzabschnittes aus der mtDNA folgender Reaktionsansatz etabliert:

1x Puffer (ABI)
 200 μM dNTPs
 2 mM $MgCl_2$
 1 μM Primer
 2,5 U AmpliTaq Gold
 30 μl *aqua bidest.* / DNA

bei einem Gesamtvolumen von 50 μl und einer "Annealing"-Temperatur von 60 °C.

3.2.2 Optimierung der Amplifikationsbedingungen für das 149 bp große Fragment

Für die Amplifikation des kleineren Fragmentes zeigten sich im Agarosegel die deutlichsten Banden bei einer "Annealing"-Temperatur von 55 °C. (Abbildung 8)

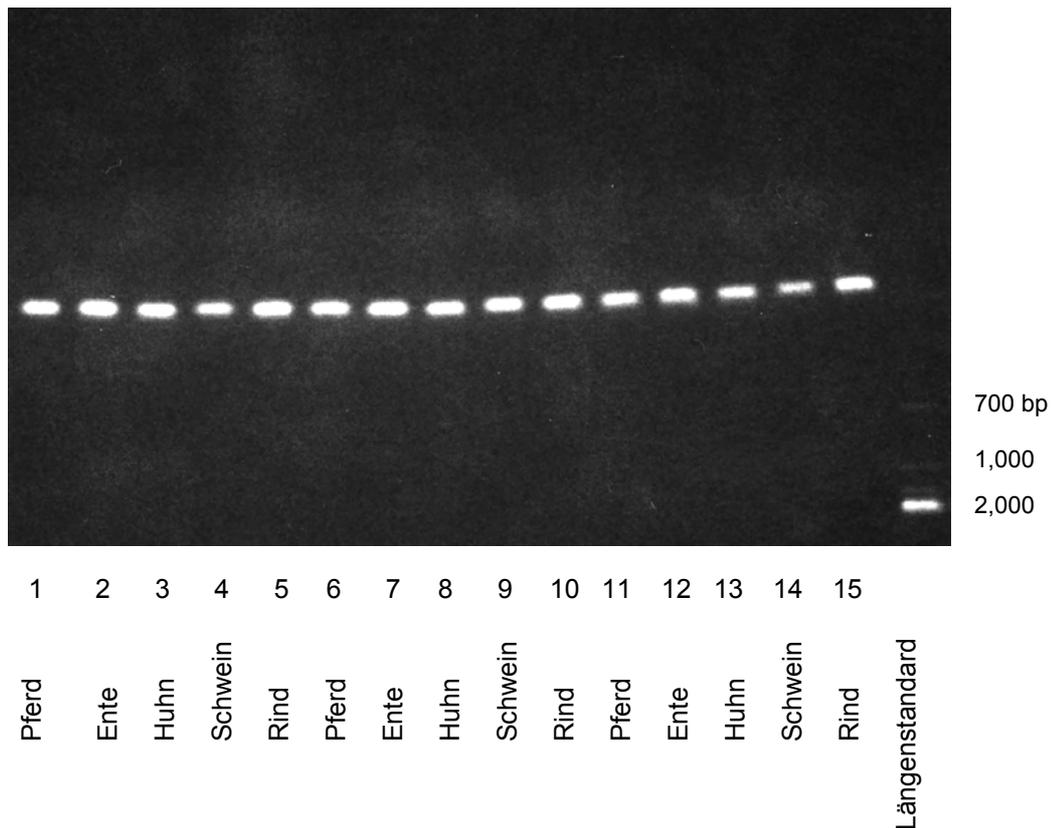


Abbildung 8: Optimierung der Amplifikationsbedingungen: Agarosegel von gewünschten Amplifikaten bei variierender $MgCl_2$ -Konzentration und einer "Annealing"-Temperatur von 55°C, sowie einer Primerkonzentration von 1 μM . (Spur 1 - 5: 2 mM $MgCl_2$, Spur 6 – 10: 1 mM $MgCl_2$, Spur 11 – 15: 3 mM).

Aus den Ergebnissen zur Optimierung der PCR-Bedingungen wurde für die Amplifikation des 149 bp großen Sequenzabschnittes aus der mtDNA folgender Reaktionsansatz etabliert:

1x Puffer (ABI)
200 µM dNTPs
2 mM MgCl₂
1 µM Primer
2,5 U AmpliTaq Gold
30 µl *aqua bidest.* / DNA

bei einem Gesamtvolumen von 50 µl und einer "Annealing"-Temperatur von 55 °C.

3.3 Erstellung einer Datenbank von 12S-Gen-Sequenzen

Das amplifizierte DNA-Produkt wird durch thermozyklische DNA-Sequenzierung untersucht (vgl. Kapitel 2.5). Die ermittelten Sequenzen wurden mit dem Programm "Sequenz Navigator" (ABI) ausgewertet und mit den bereits in den Datenbanken gefunden Sequenzen verglichen. Es zeigte sich, wie erwartet, dass innerhalb der einzelnen Arten eine hohe Homologie der Sequenzen aufgefunden wurde. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse des Sequenzvergleiches der in Datenbanken recherchierten Sequenzen mit den experimentell ermittelten Daten exemplarisch am Beispiel für die Sequenzen des mitochondrialen 12S-Gen des Schafes. Die als "Schaf" bezeichnete Sequenz stellt ihrerseits die übereinstimmende Sequenz aus 5 identischen, experimentell ermittelten Sequenzen von Schaf-Gewebeproben dar (siehe Anhang, Tabelle A3).

		* 20 * 40 *	
Schaf	:	CAAACGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAATAATTA	: 51
Ovis	:	CAAACGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAATAATTA	: 51
NC001941	:	CAAACGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAATAATTA	: 51
		CAAACGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAATAATTA	
		* 60 * 80 * 100	
Schaf	:	TAAAAACAAAATTATTTCGCCAGAGTACTACCGCAACAGCCCGAAACTCAA	: 102
Ovis	:	TAAAAACAAAATTATTTCGCCAGAGTACTACCGCAACAGCCCGAAACTCAA	: 102
NC001941	:	TAAAAACAAAATTATTTCGCCAGAGTACTACCGCAACAGCCCGAAACTCAA	: 102
		TAAAAACAAAATTATTTCGCCAGAGTACTACCGCAACAGCCCGAAACTCAA	
		* 120 * 140 *	
Schaf	:	GGACTTGGCGGTGCTTTATACCCTTCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGAT	: 153
Ovis	:	GGACTTGGCGGTGCTTTATACCCTTCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGAT	: 153
NC001941	:	GGACTTGGCGGTGCTTTATACCCTTCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGAT	: 153
		GGACTTGGCGGTGCTTTATACCCTTCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGAT	
		* 160 * 180 * 200	
Schaf	:	AAACCCCGATAAACCTCACCAATCCTTGCTAATACAGTCTATATACCGCCA	: 204
Ovis	:	AAACCCCGATAAACCTCACCAATCCTTGCTAATACAGTCTATATACCGCCA	: 204
NC001941	:	AAACCCCGATAAACCTCACCAATCCTTGCTAATACAGTCTATATACCGCCA	: 204
		AAACCCCGATAAACCTCACCAATCCTTGCTAATACAGTCTATATACCGCCA	
		* 220 * 240 *	
Schaf	:	TCTTCAGCAAACCTAAAAAGGGACAAAAGTAAGCTCAATAATAACACAT	: 255
Ovis	:	TCTTCAGCAAACCTAAAAAGGGACAAAAGTAAGCTCAATAATAACACAT	: 255
NC001941	:	TCTTCAGCAAACCTAAAAAGGGACAAAAGTAAGCTCAATAATAACACAT	: 255
		TCTTCAGCAAACCTAAAAAGGGACAAAAGTAAGCTCAATAATAACACAT	
		* 260 * 280 * 300	
Schaf	:	AAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGGAGTGGGAAGAAATGGGCTACA	: 306
Ovis	:	AAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGGAGTGGGAAGAAATGGGCTACA	: 306
NC001941	:	AAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGGAGTGGGAAGAAATGGGCTACA	: 306
		AAAGACGTTAGGTCAAGGTGTAACCTATGGAGTGGGAAGAAATGGGCTACA	
		* 320 * 340 *	
Schaf	:	TTTTCTACCCAAGAAAATTTAATACGAAAGCCATTATGAAATTAATAGCCA	: 357
Ovis	:	TTTTCTACCCAAGAAAATTTAATACGAAAGCCATTATGAAATTAATAGCCA	: 357
NC001941	:	TTTTCTACCCAAGAAAATTTAATACGAAAGCCATTATGAAATTAATAGCCA	: 357
		TTTTCTACCCAAGAAAATTTAATACGAAAGCCATTATGAAATTAATAGCCA	
		* 360 * 380 * 400	
Schaf	:	AAGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAATCAGGCC	: 408
Ovis	:	AAGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAATCAGGCC	: 408
NC001941	:	AAGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAATCAGGCC	: 408
		AAGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGAGTGCTTAGTTGAATCAGGCC	
		* 420 * 440 * 46	
Schaf	:	ATGAAGCAGCACACACCCGCCGTCACCCCTCCTCAAGTAAATATGATATAC	: 459
Ovis	:	ATNAAGCAGCACACACCCGCCGTCACCCCTCCTCAAGTAAATATGATATAC	: 459
NC001941	:	ATGAAGCAGCACACACCCGCCGTCACCCCTCCTCAAGTAAATATGATATAC	: 459
		ATGAAGCAGCACACACCCGCCGTCACCCCTCCTCAAGTAAATATGATATAC	
		* 480 * 500 *	
Schaf	:	TTAAACCTATTTACATATATCAACCACAGAGAGGAGACAAGTCGTAACAA	: 510
Ovis	:	TTAAACCTATTTACATNNATCAACCACAGAGAGGAGACAAGTCGTAACAA	: 510
NC001941	:	TTAAACCTATTTACATATATCAACCACAGAGAGGAGACAAGTCGTAACAA	: 510
		TTAAACCTATTTACATATATCAACCACAGAGAGGAGACAAGTCGTAACAA	
		* 520 * 540	
Schaf	:	GGTAAGCATACTGAAAGTGTGCTTGGATAAAC	: 543
Ovis	:	GGTAAGCATACTGAAAGTGTGCTTGGATAAAC	: 543
NC001941	:	GGTAAGCATACTGAAAGTGTGCTTGGATAAAC	: 543
		GGTAAGCATACTGAAAGTGTGCTTGGATAAAC	

Abbildung 9: Sequenzvergleich innerhalb einer Spezies am Beispiel Schaf ("Schaf": übereinstimmende Sequenz aus experimentell ermittelten Daten, "Ovis" und "NC001941": bereits publizierte Sequenzen)

Die experimentell ermittelten Sequenzen für die unterschiedlichen Spezies und deren Vergleich mit bereits bekannten Sequenzen zeigen keinerlei Abweichungen in der Basenabfolge innerhalb einer Art. Es kann daher für jede untersuchte Spezies eine Sequenz erstellt werden, die für alle

untersuchten Tiere dieser Art übereinstimmt. Diese Sequenzen sind im Anhang (A4) dargestellt.

3.4 Pyrosequenzierung

Die Methode der thermozyklischen DNA-Sequenzierung erzielt in den Bereichen kurz nach der Primerbindungsstelle ungenaue Ergebnisse. Da dieser Bereich für die Speziesdifferenzierung aber aufgrund seiner hohen Polymorphologie sehr interessant ist, wurde die Technik der Pyrosequenzierung zur Untersuchung dieser Bereiche herangezogen. Dieses Verfahren eignet sich besonders zur Detektion kurzer DNA-Abschnitte. Für die Amplifikation wurden die bereits bei der thermozyklischen Sequenzierung erprobten Primer genutzt, wobei der Rückprimer biotinyliert war. Der damit ebenfalls biotinylierte Strang des amplifizierten Fragmentes wurde dann in der Sequenzierreaktion als "Template" genutzt. Es wurden die dem Primer folgenden 20 Basen untersucht, wobei die dNTPs in der Reihenfolge T, A, C, G in 20facher Wiederholung dem Sequenzieransatz zugegeben wurden. Die Abbildungen 10, 11 und 12 zeigen die Ergebnisse der Sequenzierung des amplifizierten 12S-Gen am Beispiel der Pyrogramme für Pferd, Schwein und Ente. Die Höhe der Peaks ist dabei proportional zur Anzahl der eingebauten dNTPs und wurde mit Hilfe der SQA Software ausgewertet.

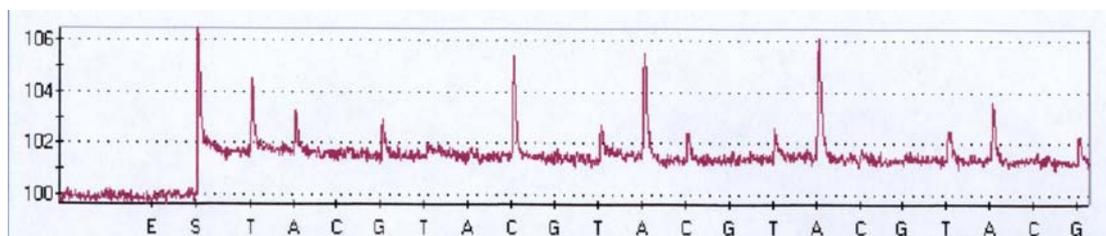


Abbildung 10: Pyrogramm für die Sequenzierung einer Gewebeprobe aus dem Pferd
Sequenz der Probe: TTAGCCCTAAACTAAAATAG

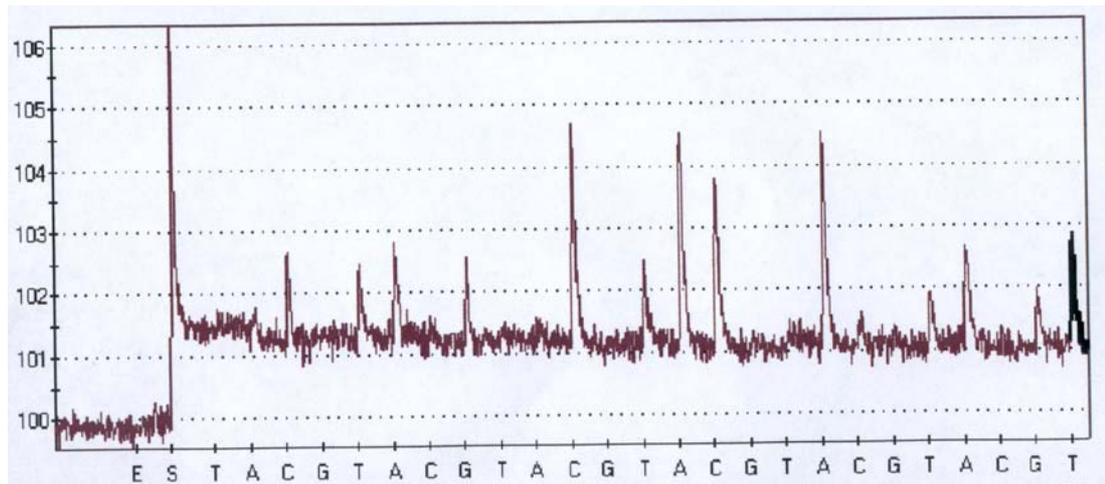


Abbildung 11: Pyrogramm für die Sequenzierung einer Gewebeprobe aus dem Schwein
Sequenz der Probe: CTAGCCCTAAACCCAAATAGTT

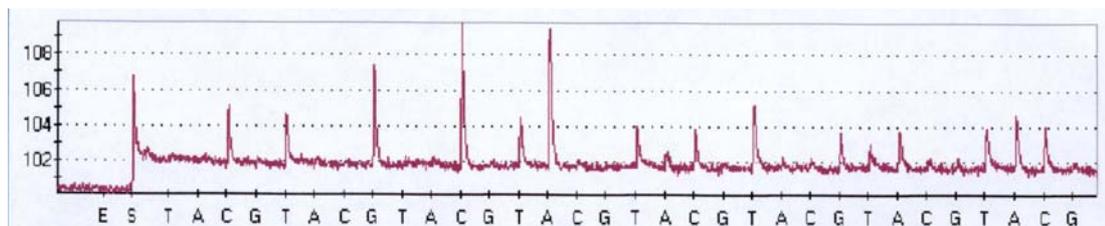


Abbildung 12: Pyrogramm für die Sequenzierung einer Gewebeprobe aus der Ente
Sequenz der Probe: CTGGCCCTAAATCTTGATAC

Die mittels der Pyrosequenzierung erhobene Basenabfolge beschränkt sich meist auf die ersten 20 Basen nach dem Sequenzier-Primer, die aber aufgrund der großen Unterschiede des ausgewählten Bereiches ausreichen, um verschiedene Spezies voneinander unterscheiden zu können. In Tabelle 3 sind die aus den Pyrogrammen detektierten Sequenzen dargestellt. Die rot gekennzeichneten Basen stellen SNPs dar, die für diese Art spezifisch sind. Die grün markierten Positionen sind für eine Klasse charakteristisch.

Spezies	Sequenz
Mensch	T T A G C C C T A A A C C T C A A C A G
Kaninchen	T T A G C C C T A A A C T T T G A T A A
Schaf	T T A G C C C T A A A C A C A A A T A A T T A
Hase	T T A G C C C T A A A C C T A A A T A A T T T
Rind	T T A G C C C T A A A C A C A G A T A A T T A
Pferd	T T A G C C C T A A A C T A A A A T A G C T T A
Schwein	C T A G C C C T A A A C C C A A A T A G T T
Lachs	C T A G C C C G T A A A C T T T G A T G G A A
Pute	C T G G C C C T A A A T C T T G A T A C T A A
Ente	C T G G C C C T A A A T C T T G A T A C T T A C
Huhn	C T A G C C C T A A A T C T A G A T A C C T C C C

Tabelle 3: Darstellung der aus den Pyrogrammen ermittelten Sequenzen für die verschiedenen Arten. Rot kennzeichnet artspezifische Sequenzunterschiede, grün markiert für eine Tierklasse charakteristische Positionen.

3.5 Kasuistiken

In der forensischen Praxis wird die Möglichkeit zur Speziesidentifizierung in den verschiedensten Fällen erforderlich. Im Folgenden werden einige Beispiele aus der rechtsmedizinischen Routine dargestellt. Dabei wurde in allen Beispielen die Methode der Pyrosequenzierung angewandt.

3.5.1 Spurenuntersuchung "Tiefkühlkost"

In folgendem Fall stand zur Diskussion, ob der des Mordes an seiner Frau Verdächtige, sein Opfer zerteilt und verzehrt hat. Bei der Durchsuchung der Wohnung wurden Fleischstücke aus der Tiefkühltruhe gesichert.

Zur Klärung der Frage nach dem biologischen Ursprung eines in der Kühltruhe gefundenen Hautstücks wurde ein ca. 10 x 4 cm großes tiefgefrorenes Gewebestück molekularbiologisch untersucht.

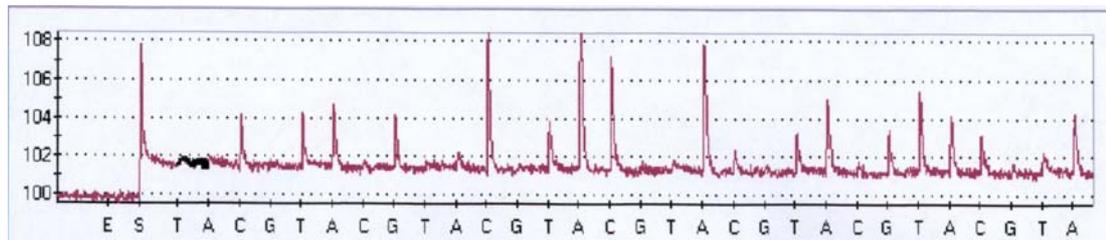


Abbildung 14: Pyrogramm eines untersuchten Mageninhaltes

Die ermittelte Basenabfolge erwies sich als identisch mit der Sequenz vom Schwein.

Probe : C T A G C C C T A A A C C C A A A T A G T T A C A
 Sequenz Schwein: C T A G C C C T A A A C C C A A A T A G T T

Das dem Mageninhalt entnommene Gewebestück konnte damit als Schweinefleisch identifiziert werden.

3.5.3 Spurenuntersuchung "Herz"

Während der Pflege des Grabes seiner verstorbenen Frau entdeckte ein Mann eine Plastiktüte, welche in dem Grab verscharrt wurde. Die Tüte enthielt einen Gewebeklumpen, dessen rechtsmedizinische Begutachtung ergab, dass es sich um ein Herz handelte.

Zur Klärung der Frage nach dem biologischen Ursprung des gefundenen Herzens, wurde ein kleines Gewebestück molekularbiologisch untersucht.

Nach Ausschluss einer humanen Herkunft über die Analyse des Amelogeninsystems, wurde das 12S-Gen der mitochondrialen DNA amplifiziert und anschließend sequenziert. Das analysierte Pyrogramm ist in Abbildung 15 dargestellt.

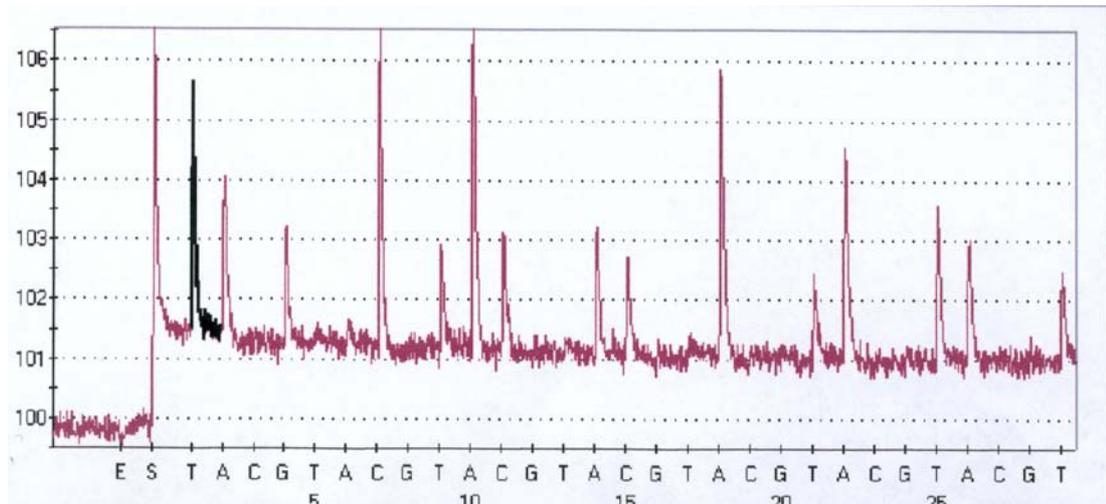


Abbildung 15: Pyrogramm des Gewebestücks aus dem gefundenen Herzen.

Die ermittelte Basenabfolge erwies sich als identisch mit der Sequenz vom Schaf.

Probe : T T A G C C C T A A A C A C A A A T A A T T A T
 Sequenz Schaf: T T A G C C C T A A A C A C A A A T A A T T A

Die Probe konnte damit als Gewebestück aus dem Herzen eines Schafes identifiziert werden.

3.5.4 Spurenuntersuchung "Blut"

Bei der Leiche einer auf der Autobahn gefundenen jungen Frau entstand die Frage, ob es sich tatsächlich um Selbstmord handelte, da auf der Fahrbahn in Fahrtrichtung vor der Autobahnbrücke, von der die Frau gesprungen sein sollte, Blutspuren sichergestellt wurden. Sollte es sich bei der Spur um Blut von der Toten handeln, würden sich Zweifel an der Suizidtheorie ergeben und es wäre damit eventuell ein Indiz für eine Fremdbeteiligung gegeben.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit demonstriert, dass es möglich ist, verschiedene Arten durch die Analyse sehr kurzer Fragmente ihrer 12S-Gen-Sequenz zu identifizieren. Dazu reicht die Sequenzierung des gewünschten Fragmentes mit Hilfe eines universell verwendbaren Primerpaares. Für degradierte DNA wurde ein alternativer Rückprimer getestet, der die Amplifikation eines kürzeren Sequenzabschnittes ermöglicht. Es wurden insgesamt 91 Proben verschiedener Tiere analysiert. Darunter waren 8 Säugetier-Arten, 2 Fisch-Arten und 3 Vogel-Arten.

Die Speziesidentifizierung mittels DNA wurde bereits durch mehrere Autoren beschrieben (Anderson *et al.* 1981, Kocher *et al.* 1989 und 1991, Chikune *et al.* 1994, Forrest *et al.* 1994, Zehner *et al.* 1998, Parson *et al.* 2000) und ersetzt die Artbestimmung durch proteinbiochemische Tests. Letztere nutzen das Agglutinationsverhalten von Antikörpern und Antigenen. Das Antigen ist dabei ein Protein aus der Probe, das bei der Isolierung des Materials unter Belastung steht und durch Lagerzeiten und Lagerbedingungen angegriffen oder zerstört sein kann. Die Produktion der Antikörper ist außerdem sehr aufwendig und teuer und die Antikörper besitzen eine begrenzte Haltbarkeit. Zudem ist die Analyse begrenzt auf ein Sortiment von Spezies, die getestet werden können und die Proteine verwandter Arten können zu Kreuzreaktionen führen. Daneben verbraucht die proteinbiochemische Untersuchung einer Probe sehr viel Probenmaterial, das damit anderen nachstehenden Analysen nicht mehr zur Verfügung steht. Die nächste Generation von Tests zur Speziesidentifizierung beurteilt die Proben auf Ebene der DNA. Die mtDNA wurde dabei zum beliebten Untersuchungsobjekt, weil die Anzahl der Mitochondrien in einer Zelle bis zu 2.500 Stück erreichen kann und jedes Mitochondrium mehrere Kopien der DNA enthält. Damit steht der Untersuchung von Beginn an eine hohe Kopienzahl der DNA zur Verfügung, im Gegensatz zum diploiden Chromosomensatz des Zellkerns. Die mitochondriale DNA unterscheidet sich von der Kern-DNA durch ihre ringförmige Struktur und ihrem engeren Windungszustand der Doppelhelix ("Supercoiling"). Das macht sie

unempfindlicher gegenüber degradierenden, äusseren Einflüssen. Da die mtDNA bei den meisten Tieren rein maternal vererbt wird, besteht keine Möglichkeit zur Rekombination mit dem väterlichen Material. Zudem liegt die Rate der Nukleotid-Substitution in mitochondrialem Genom zehnmal höher als in der Kern-DNA (Roy *et al.* 1994). Die meisten der genannten Autoren nutzen dabei die gesamte mitochondriale DNA oder die Sequenzen ganzer Gene. Das Schneiden dieser Sequenzen mittels Restriktionsenzymen erlaubt dann die Differenzierung vieler Arten durch unterschiedliche Bandenmuster im Agarosegel.

Die bisher übliche Nutzung der mtDNA beruht auf der Amplifikation und Sequenzierung großer DNA-Fragmente. Dabei ist auch hier die starke Degradierung des zur Verfügung stehenden Materials durch extreme Lagerbedingungen ein limitierender Faktor der Methode. Zudem können eng verwandte Arten nicht mehr voneinander unterschieden werden (Zehner *et al.* 1998). Alle bisher angewendeten Methoden zur Speziesidentifizierung mittels der mtDNA verwenden DNA-Sequenzen, die für Proteine codieren. Dabei codieren jeweils drei Basen eine Aminosäure ("Triplet"). Während die Spezifität für eine Aminosäure vor allem in den ersten beiden Basen begründet ist, besitzt die Position der letzten Base eine gewisse Freiheit und wird als Wobbel-Base bezeichnet (Crick 1966). Für ein und dieselbe Aminosäure können also verschiedene Basentriplets codieren. Die protein-codierenden DNA-Sequenzen können damit eine größere Variabilität aufweisen als die hochkonservierten Bereiche der rRNA-codierenden Sequenzen, weil diese nicht mehr in eine Aminosäuresequenz übersetzt werden.

4.1 Auswahl der Zielsequenz

Die besondere Funktion und der Aufbau der Ribosomen richteten das Interesse auf die Aufklärung ihrer Sekundärstruktur mit Hilfe der vergleichenden Sequenzanalyse. Daher sind heute bereits viele der mitochondrialen Gensequenzen in Datenbanken veröffentlicht. Dies gilt insbesondere für die Sequenzen der großen rRNAs.

Bei der Auswahl der zu amplifizierenden Zielsequenz wurden zunächst bereits publizierte mitochondriale Sequenzen unterschiedlicher Arten miteinander verglichen. Da die Primerbindungsstellen in möglichst allen zu untersuchenden Spezies identisch sein sollten, war die Detektion hochkonservierter Bereiche erforderlich. Trotzdem sollten genügend polymorphe Bereiche zur Verfügung stehen, die eine spätere Unterscheidung der Arten ermöglichen. Der Bereich des 12S-Gens erfüllte alle diese Voraussetzungen. Das Gen codiert eine ribosomale RNA und keine Proteine. Das bedeutet, die genetische Information der Basenabfolge wird nicht in eine Aminosäuresequenz übersetzt, sondern die RNA ist die funktionelle Einheit, die eine essentielle Aufgabe in der Proteinbiosynthese besitzt. Dabei bilden rRNAs sekundäre Strukturen aus, die grundlegend für die Integration in das aktive Ribosom sind. In Abbildung 17 ist ein Modell der Sekundärstruktur der 12S-rRNA von Fischen als Beispiel für den Aufbau einer rRNA dargestellt.

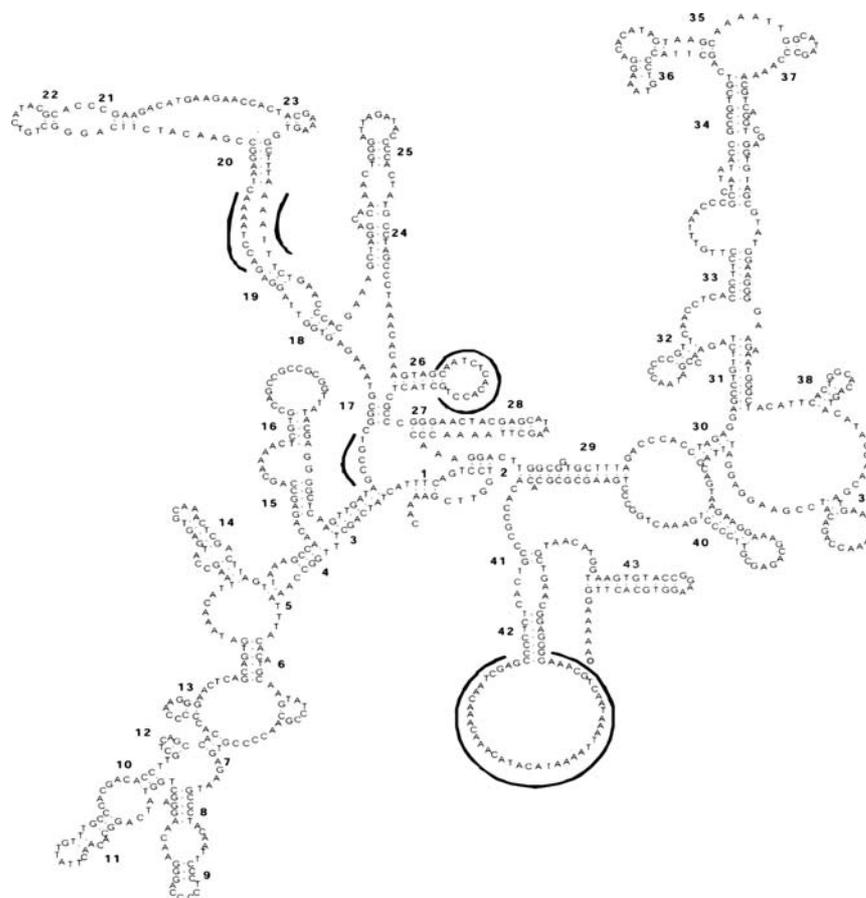


Abbildung 17: Modell der Sekundärstruktur der 12S-rRNA bei Fischen mit gekennzeichneten hochpolymorphen "Loop"-Regionen (aus: Wang und Lee 2002)

Die sekundäre Struktur der rRNAs entsteht durch Basenpaarungen innerhalb des Moleküls. Bereiche solcher Basenpaarungen werden als "Stiel" bezeichnet. Mutationen innerhalb dieser Stielregionen würden zu Fehlpaarungen der Basen und damit zu Veränderungen der Struktur einer rRNA führen. Diese Mutationen könnten im schlimmsten Fall zum Verlust der Funktion und darüber zu Fehlern in der Proteinbiosynthese führen. In den ungepaarten Bereichen der rRNA kommt es zur Ausprägung von Schleifen, den sogenannter "Loops". Die ribosomale RNA kann also in zwei verschiedene Bereiche unterteilt werden: zum einen Regionen, die durch die Paarungen der Basen des RNA-Stranges charakterisiert sind ("Stiel") und andererseits Teile, in denen die Basenabfolge solche Paarungen nicht zulässt ("Loop"). Im Gegensatz zum Stiel sind Austausch der Basen im "Loop" tolerierbarer, auf den beiden differierenden Bereichen wirken somit unterschiedliche Selektionsdrücke. Diese variierende Sensibilität für Mutationen der rRNA ist übertragbar auf die Gene, die für die RNA codieren. In den Genen für die rRNA finden sich demnach hochkonservierte Bereiche, deren Basenabfolge während der Evolution kaum Veränderungen erfährt und Regionen, die Mutationen eher tolerieren und zwischen verschiedenen Spezies große Differenzen aufweisen, also hochpolymorph sind.

Das Gen für die 12S-rRNA ist je nach Tierart auf einem anderen Abschnitt der mtDNA lokalisiert (siehe Tabelle A2 im Anhang) und umfasst ebenfalls abhängig von der Spezies zwischen 975 und 945 Basenpaaren. Ein 542-Basenpaar großer Abschnitt wurde für die Sequenzanalysen ausgesucht. Der von hochkonservierter Regionen flankierte Bereich zeigt sowohl unveränderte als auch in den unterschiedlichen Spezies stark variierende Abschnitte. Die wiederkehrenden einheitlichen Sequenzen ermöglichten ferner die Verlegung der Primerbindungsstelle des Rückprimers zur Amplifikation des kürzeren Fragments mit 149 Basenpaaren.

4.2 Optimierung der Amplifikation

Für die Amplifikation der beiden unterschiedlich langen Sequenzabschnitte aus dem 12S-rRNA Gen wurde jeweils nur ein Primerpaar, bestehend aus dem Hin- und dem Rück-Primer, entworfen. Dabei ist der Hin-Primer für die

Amplifikation beider Fragmente identisch und enthält 19 Nukleotide. Der Rück-Primer für das 542 bp-Fragment besteht aus 19 Nukleotiden und der Rück-Primer für das 149 bp-Fragment aus 18 Nukleotiden. Die Sequenzen der Primer zeigen keine Bereiche, welche die Ausbildung sekundärer Strukturen begünstigen würden. Um zu vermeiden, dass es zu Fehlpaarungen zwischen den Primern und der Template-DNA kommt, wurde darauf geachtet, dass keine sich wiederholenden Motive innerhalb der Primersequenzen auftreten. Die Entwicklung eines zweiten alternativen Rück-Primers vermindert zudem den Misserfolg der Amplifikation durch Mutationen in der Primerbindungsstelle.

Für die erfolgreiche Vermehrung eines DNA-Abschnittes in der PCR sind hauptsächlich zwei Faktoren ausschlaggebend. Das ist einmal die "Annealing"-Temperatur, also die Temperatur, bei der die Bindung zwischen Primer und DNA-Vorlage stattfindet. Sie ist bestimmend für die Spezifität der PCR und sollte 3 - 5°C unter der Schmelztemperatur (T_m) des Primers liegen. Weiteres Absenken der "Annealing"-Temperatur erniedrigt die Stringenz der Primeranlagerung und kann zur Bindung an eine unspezifische Stelle der DNA führen und damit zur Bildung unerwünschter Nebenprodukte. Die experimentell ermittelten "Annealing"-Temperaturen von 55 °C für das kürzere und 60 °C für das längere Fragment liegen beide unter dem berechneten Schmelztemperaturen von 60 °C (149 bp) und 64 °C (542 bp).

Besondere Bedeutung besitzt zudem die Konzentration des Magnesiumchlorids, das entscheidenden Einfluss auf die Spezifität und Ausbeute der PCR hat. Dabei gilt, dass zu hohe $MgCl_2$ -Konzentrationen die Entstehung unspezifischer Produkte fördern. Für die Optimierung der PCR-Bedingungen wurden daher verschiedene Konzentrationen des $MgCl_2$ und unterschiedliche "Annealing"-Temperaturen getestet. Die Optimierung der Primerkonzentration ermöglichte darüber hinaus eine Erhöhung der Ausbeute in der Amplifikation.

Für die Amplifikation des kleineren Fragmentes konnten so ohne Probleme die idealen Amplifikationsbedingungen ermittelt werden.

Bei der Optimierung der PCR-Schritte für das größere Fragment konnte bei den niedrigen "Annealing"-Temperaturen eine weitere, unspezifische Bande im Agarosegel nachgewiesen werden. Dieses etwa 700-Basenpaar große Fragment wurde mit Erhöhung der $MgCl_2$ -Konzentration zur Hauptbande. Dieses Ergebnis ist überraschend, da unter gleichwertigen Bedingungen die Amplifikation eines größeren Sequenzabschnittes zugunsten kleinerer Abschnitte verschoben sein sollte. Für das 542-Basenpaar-Fragment bedeutet dies, dass bei der Annahme, dass eine weitere Bindungsstelle für den Primer existiert, die Ausbeute des 542 bp-Fragments höher sein sollte als die des 700 bp-Fragments. Dies war nicht der Fall. Erklärbar ist dieses Phänomen mit der Annahme, dass die Template-DNA für das 700 bp-Fragment in höherer Kopienanzahl vorliegt als die Vorlage für das gewünschte Amplifikat und dadurch die Unspezifität der Primerbindungsstelle ausgeglichen wird. Eine Begründung für diese Erscheinung könnte die Evolution der mitochondrialen DNA bieten. Über die Entwicklung eukaryotischer Zellen gibt es unterschiedliche Theorien. Übereinstimmung besteht darin, dass die Mitochondrien durch Endosymbiose in die eukaryotische Zelle gelangten. Dies bedeutete einen enormen Zuwachs an neuen Eigenschaften. Zudem fand ein erheblicher horizontaler Gentransfer (HGT) statt, ein Austausch ganzer Gene zwischen verschiedenen Zellen und deren Integration in das fremde Genom, der maßgeblich an der Evolution der Eukaryoten beteiligt war. Vermutlich waren die ribosomalen Komponenten nicht an diesem Gentransfer beteiligt, da sie im Verbund arbeiten und alleine stehend funktionslos sind (Woese *et al.* 2003). Nach Aufnahme der Mitochondrien in die eukaryotische Zelle fand dennoch eine Verlagerung der mitochondrialen DNA in den Kern statt. Da die Mitochondrien in jeder Zelle in hoher Anzahl vorliegen, fand dieser Gentransfer gleichfalls sehr oft statt, so dass wir heute frühere mitochondriale Gene in vielfacher Kopienanzahl auf der Kern-DNA finden können. Diese sogenannten Pseudogene stellen eine scheinbar funktionslose DNA-Sequenz dar, die eine starke Homologie zu einem funktionellen Gen aufweisen, was auf einen gemeinsamen Ursprung beider Sequenzen schließen lässt. Pseudogene enthalten keine Introns, was darauf hindeutet, dass sie erst nach der Transkription, dem

”Herausschneiden” nicht-codierter DNA-Abschnitte, ins Kern-Genom integriert wurden.

Durch die Erhöhung der “Annealing”-Temperatur wurde die Spezifität der Amplifikation gesteigert, so dass schließlich nur das gewünschte Fragment gebildet wurde.

4.3 Vergleich der Sequenziertechniken

Die hier beschriebene Sequenzierung des mitochondrialen 12S-Gens nutzt erstmals, neben der herkömmlichen Methode der thermozyklischen Sequenzierung, die Identifizierung von Spezies durch Pyrosequenzierung (Nordström *et al.* 2000). Wie bereits im Kapitel 2 beschrieben, unterscheiden sich beide Methoden grundlegend in ihren Arbeitsweisen und zeigen daher auch verschiedene Vor- und Nachteile.

Die 1977 von Fred Sanger entwickelte DNA-Sequenzierung ist die gängigste Methode zur Analyse eines DNA-Abschnittes (Sanger *et al.* 1977). Sie ähnelt der PCR, weil auch hier eine DNA-Polymerase dazu genutzt wird, nach Vorlage eines einzelsträngigen DNA-Templates einen neuen Doppelstrang zu bilden. Der gezielte Kettenabbruch mit verschiedenen durch Fluoreszenzfarbstoffe markierten Nukleotiden macht die Analyse der Produkte möglich. Die Pyrosequenzierung beruht auf einer Enzymkaskade, die als Endprodukt detektierbares Licht liefert. Diese Methode wird hauptsächlich in der klinischen Medizin eingesetzt. Dort werden SNP’s genutzt, um die genetische Prädisposition für bestimmte Krankheiten zu ermitteln (Alderborn *et al.* 2000). Die Sequenzierung von 20 – 100 Basen des 16S-rRNA-Gen ermöglicht die Zuordnung von Bakterien zu einer taxonomischen Gruppe (Ronaghi 2001).

Im Gegensatz zur Pyrosequenzierung können bei der thermozyklischen Methode beide Stränge der DNA sequenziert werden; es besteht also die Möglichkeit, zwei komplementäre Sequenzen zu synthetisieren. Dabei ist es

möglich, die Amplifizier-Primer auch als Sequenzier-Primer einzusetzen. Da bei der Pyrosequenzierung nur der 5'-3'-Strang analysiert wird, sollte ein neuer Sequenzier-Primer entwickelt werden, der möglichst nahe an dem zu detektierenden Bereich liegt.

Bei der Sequenzierung nach Sanger sind häufig die ersten Basen nach der Primerbindungstelle schwer darstellbar und die Reaktion des Hin-Primers erzielt meist bessere Ergebnisse als die des Rück-Primers. Dieses Phänomen könnte ähnliche Gründe haben wie die bereits für die Sequenzierung des humanen mitochondrialen D-Loops beschriebene Erscheinung. Die Ursache dafür liegt wahrscheinlich in dem unterschiedlichen Verhältnis zwischen Purin- und Pyrimidin-Basen in den beiden DNA-Strängen (Parson *et al.* 1998). Während diese Methode gut geeignet ist, um Amplifikate von bis zu 1.000 Basenpaaren zu untersuchen, ist die Pyrosequenzierung vorzugsweise zur Darstellung kurzer Sequenzabschnitte oder einzelner Basen verwendbar. Da die verschiedenen Nukleotide einzeln zugesetzt werden und ein erfolgter Einbau sofort in einem Lichtsignal resultiert, müssen nicht eingebaute Nukleotide umgehend wieder abgebaut werden, bevor die Injektion der nächsten Base erfolgt. Dieser Abbau erfolgt über Enzyme, deren Aktivität im zeitlichen Verlaufe der Sequenzierung nachlässt und die damit mögliche Anzahl an Wiederholungen der Nukleotidzugabe limitieren.

Bei der Analyse von Mischungen unterschiedlicher Proben oder Heteroplasmien gibt es erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Methoden. Finden sich in einer Zelle zwei verschiedene Mitochondrien-Populationen, die sich durch einzelne Basenaustausche unterscheiden, spricht man von einer Heteroplasmie, die bei Auswertung von thermozyklischen Sequenzen als übereinander liegende Peaks im Elektropherogramm sichtbar werden. Bei einer Mischspur würden sich im besten Fall an mehreren Positionen der Sequenz solche Überlappungen finden lassen. Da bei der Pyrosequenzierung die sofortige Signalgebung erfolgt, werden die beiden Basen einer heteroplasmischen Position bzw. Mischspur hintereinander detektiert. In der Folge ergibt sich für die beiden

Sequenzen eine Verschiebung des Leserasters, somit wird eine Mischspur in diesem Fall fast bei jeder Nukleotidinjektion ein Signal und als Ergebnis eine nicht auswertbare Sequenz erzeugen. Eine Heteroplasmie ist mit dem Prinzip der Pyrosequenzierung also nicht zu identifizieren.

4.4 Erstellen der Datenbank mit 12S-Gen-Sequenzen

Das Ziel dieser Arbeit war, eine Methode zu entwickeln, die es ermöglicht, Spezies auf Ebene der DNA zu identifizieren und die darüber hinaus eine hohe Toleranz gegenüber der Qualität der Proben besitzt.

Zur Speziesidentifizierung wurde ein Teil der Sequenz des mitochondrialen 12S-Gens ausgewählt. Für die meisten der zu untersuchenden Tiere finden sich heute bereits Sequenzen in Datenbanken, da die mitochondriale DNA bevorzugt für phylogenetische Studien genutzt wird. Die Möglichkeit des Vergleiches mit bereits existierenden Sequenzen ist unabdingbar, um unbekannte Proben einordnen zu können.

Die experimentell ermittelten Daten wurden zunächst ebenso über eine Datenbanksuche überprüft. Dazu wurde die BLAST Software genutzt. Als ein Resultat der Suche erschien eine Liste der Datenbankeinträge, welche nach ihrer Übereinstimmungs-Quote zur eingegeben Sequenz sortiert war. Die zuerst angezeigte Sequenz wird als MSP-Sequenz (maximum-scoring segment pair) definiert und zeigt die höchste Übereinstimmung. Für die untersuchten Spezies zeigten alle MSP-Sequenzen vollkommene Deckung mit der experimentell gewonnen Sequenz.

Auf der Grundlage der recherchierten und der erarbeiteten Sequenzen war es möglich, für alle untersuchten Spezies eine übereinstimmende Sequenz zu erstellen, die den Abgleich mit einer unbekannt Probe und damit ihre Identifizierung ermöglicht.

Der Vergleich zeigt, dass die ersten 20 Basen nach dem Hin-Primer so viele Sequenzvariationen aufweisen, dass die Analyse dieses kurzen Stückes mittels Pyrosequenzierung ausreicht, um die Spezies zu erkennen.

4.5 Kasuistiken

Der enorme Bedarf im forensischen Alltag zur einfachen, schnellen und vor allem genauen Speziesidentifizierung wurde mit der Entwicklung der Analyse des 12S-rRNA-Gens Rechnung getragen.

So konnten die erzielten Ergebnisse bereits in der Praxis getestet werden. Dabei erwies sich die entwickelte Identifizierungsmethode als sehr gut anwendbar.

Bei allen zu beurteilenden Proben wurde zunächst überprüft, ob eine humane Herkunft ausgeschlossen werden kann.

Die humane Geschlechtsbestimmung mit Hilfe des Amelogenin-Systems ist in der Forensik ein anerkanntes Verfahren. Es gibt zwei humane Amelogenin-Gene, die beide in einzelnen Kopien auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert sind und einen Längenpolymorphismus aufweisen. Das Y-chromosomale Gen ist um 6 Basenpaare länger, als das X-chromosomale Gen (Nakahori *et al.* 1991). Auf dieser Grundlage basiert die Geschlechtsbestimmung mittels des Amelogenins-Systems. Amelogenin-Primer für das humane Gen konnten bisher auch erfolgreich an Primaten getestet werden (Ensminger und Hoffmann 2002). Höhere Säugetiere besitzen generell zwei Amelogenin-Gene, AMGX und AMGY, die auf dem X- und Y-Chromosom lokalisiert sind (Lau *et al.* 1989). Die Ausprägung dieser Allele variiert stark zwischen den einzelnen Säugetierarten. So weisen die meisten Mammalia keinen Längenpolymorphismus der beiden Allele auf, zeigen aber eine Verkürzung der Gene gegenüber dem humanen Amelogenin-System (Iwase *et al.* 2001).

Vögel besitzen ein ähnliches System von geschlechtsbestimmenden Genen, die als CHD-Gen (Chromo-helicase-DNA-binding-protein) bezeichnet werden. Die meisten Vögel besitzen zwei verschiedene Allele des Gens, charakterisiert als CHD-W und CHD-Z. Nach dem Schneiden des Gens mit Restriktionsenzymen zeigen weibliche Vögel drei Banden im Agarosegel, während männliche Vögel eine oder zwei Banden aufweisen (Griffith *et al.* 1996). Mit der Anwendung dieses Systems gelingt zum Beispiel die Unterscheidung der Geschlechter von Ara-Vögeln (Bermudez-Humaran *et al.* 2002) und Falken-Vögeln (Ito *et al.* 2003).

Ein fehlendes Ergebnis im Nachweis des Amelogenin-Systems kann neben Problemen in der DNA-Extraktion oder DNA-Amplifikation im besten Fall also schon einen Hinweis über die mögliche Tierklasse des Spurverursachers geben, wobei die meisten Säugetier-Arten ein vom humanen Amelogenin-System abweichendes Muster oder gar kein Muster ergeben. Das letztere gilt in jedem Fall für Vögel und Fische. So ergab die Untersuchung des auf der Autobahn gefundenen Blutes keine Ergebnisse im Amelogenin-System und konnte durch die Speziesuntersuchung als Vogelblut identifiziert werden. Dabei konnte der Kreis der möglichen Spurenverursacher auf drei Familien eingeschränkt werden.

Da das Amelogenin-System in Genen des Zellkerns codiert wird, liegen sie nur in einfacher Kopie vor, während das mitochondriale Genom je nach Anzahl der Mitochondrien in bis zu 1.000facher Kopienanzahl vorliegen kann. Sollte das Amelogenin-System aufgrund der schlechten Qualität oder des geringen DNA-Gehaltes der Probe ausfallen, wäre es trotzdem möglich, den Ursprung einer Spur als human zu erkennen, da ebenfalls eine humane Sequenz der mitochondrialen 12S-rRNA erstellt wurde. Der Abgleich mit der humanen Sequenz ist vor allem für solche Fälle unentbehrlich, bei denen das Vorkommen von humanem Material einbezogen werden muss. Dies kann insbesondere für die Untersuchung von Mageninhalten gelten, bei deren Entnahme in jedem Fall die Vermischung mit humanem Gewebe oder Blut in Betracht zu ziehen ist. Die hier untersuchten Mageninhalte zeigten dieses Problem jedoch nicht.

Während die Untersuchung des "Autobahn-Blutes" bis zur Ebene der Klasse gelang, wurden alle anderen Materialien bis auf die Rangstufe der Art identifiziert. Da es sich bei den Spezies um domestizierte Arten handelt, ist diese große Übereinstimmung nicht weiter verwunderlich, da die meisten Tiere, die in Laboren untersucht werden, ebenfalls nicht mehr dem Wildtyp angehören und auch bei den experimentell gewonnenen Daten natürlich gezüchtete Tiere untersucht wurden. Der Prozess der Domestikation einer Tierart ist vor allem gekennzeichnet durch die künstliche Zucht und der Entfernung aus dem natürlichen Lebensraum der Spezies. Damit verbunden ist ein erheblicher Eingriff in die natürliche Selektion sowie eine extreme Begrenzung des Genpools. Als Folge davon ist eine den domestizierten Formen eigene Parallelentwicklung von Eigenschaften zu beobachten. Dazu gehört zum Beispiel das Auftreten von Hängeohren und als "Holländerscheckung" bezeichnete, zur Mitte hell werdende Körperzeichnung bei unterschiedlichen Tierarten. Für die Speziesidentifizierung bedeutet das vor allem, dass durch die Züchtung und die Beschränkung des Genpools eine Homogenität der DNA eintritt und damit Sequenzunterschiede innerhalb einer Art selten werden.

Die Untersuchung des Vogelblutes war damit die erste Untersuchung von Wildtypen einer bestimmten Klasse. Die Identifizierung bis hin zu den drei möglichen Familien zeigt damit vielleicht schon die Grenzen der Methode, die aber immer noch einen riesigen Fortschritt gegenüber herkömmlichen Techniken bedeutet.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung einer Methode zur molekulargenetischen Artdifferenzierung. Der in forensischen Proben meist fortgeschrittenen Degradierung der DNA sollte dabei besondere Beachtung zukommen.

Innerhalb der mitochondrialen DNA einer jeden Tierart befindet sich die genetische Information der ribosomalen RNA (rRNA), die eine wichtige, primär funktionale Rolle in der Zellphysiologie einnimmt. Die Gene dieser rRNA lassen sich in hochkonservierte und hochpolymorphe Bereiche einteilen. Während die konservierten Regionen kaum Mutationen zulassen, werden in den polymorphen Abschnitten je nach Grad der Verwandtschaft große Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierarten beobachtet. Individuen einer Art zeigen diese Unterschiede nicht. Daher werden diese Abweichungen dazu genutzt, biologische Materialien unbekannter Herkunft einer bestimmten Tierart zuzuordnen.

Mit der Amplifikation und anschließender Sequenzierung eines Bereiches innerhalb des mitochondrialen 12S-Gens sowie der Auswertung bereits publizierter Sequenzen gelang die Erstellung einer Datenbank mit Konsensussequenzen, die den Abgleich und die Identifizierung unbekannter Proben ermöglichen.

In einigen Untersuchungen der forensischen Routine konnte die entwickelte Methode eingesetzt werden und erzielte sehr gute Ergebnisse.

6. Anhang

Tabelle A1 Systematische Einordnung der untersuchten Spezies

Abteilung	Stamm	Unterstamm	Klasse	Ordnung	Unterordnung	Familie	Unterfamilie	Gattung	Art	Dt. Name
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Lagomorpha		Leporidae		Lepus	europaeus (Pallas)	Feldhase
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Lagomorpha		Leporidae		Oryctolagus	cuniculus (Lilljeborg)	Wiedkaninchen
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Artiodactyla	Nonruminantia	Suidae		Sus	scrofa (Linné)	Wildschwein
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Artiodactyla	Ruminantia	Bovidae	Bovinae	Bos	taurus (Linné)	Rind
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Artiodactyla	Ruminantia	Bovidae	Caprinae	Ovis	Aries (Linné)	Schaf
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Artiodactyla	Ruminantia	Bovidae	Odocoillinae	Capreolus	Capreolus (Linné)	Reh
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Artiodactyla	Ruminantia	Bovidae	Cervinae	Dama	Dama (Linné)	Damhirsch
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Artiodactyla	Ruminantia	Bovidae	Cervinae	Cervus	Elaphus (Linné)	Rothirsch
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Perissodactyla		Equidae		Equus	Caballus (Linné)	Pferd
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Rodentia	Sciurognathi	Muridae	Murinae	Mus	Musculus (Linné)	Maus
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Carnivora	Caroidea	Canidae		Canis	Familiaris (Linné)	Hund
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Carnivora	Felidea	Felidae		Felis	Catus (Linné)	Katze
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Mammalia	Primata				Homo	sapiens	Mensch
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Aves	Struthioniformes	Rheae	Struthionidae		Struthio	Camelus (Linné)	Strauß
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Aves	Anseriformes		Anatidae	Anatinae	Anser	Anser (Linné)	Graugans
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Aves	Anseriformes		Anatidae	Anatinae	Anas	Platyrynchus (Linné)	Stockente
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Aves	Columbiformes		Columbidae	Columbinae	Streptopelia	Turtur (Linné)	Turkeltaube
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Aves	Galliformes	Galli	Phasianidae	Phasianiae	Gallus	Gallus (Linné)	Huhn
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Aves	Galliformes	Galli	Phasianidae	Percicinae	Perdix	Perdix (Linné)	Rebhuhn
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Aves	Galliformes	Galli	Phasianidae	Percicinae	Coturnix	Coturnix (Linné)	Wachtel
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Aves	Galliformes	Galli	Phasianidae	Meleagridinae	Meleagris	Gallopavo (Linné)	Truthahn

Abteilung	Stamm	Unterstamm	Klasse	Ordnung	Unterordnung	Familie	Unterfamilie	Gattung	Art	Dt. Name
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Pices	Salmoniformes		Salmonidae		Salmo	Salar (Linné)	Lachs
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Pices	Salmoniformes		Salmonidae		Salmo	Gairdneri (Richardson)	Regenbogen-Forelle
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Pices	Clupeiformes		Clupeidae		Cipea	Harengus (Linné)	Hering
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Pices	Clupeiformes		Clupeidae		Sardina	Pilchardus (Walbaum)	Sardine
Chordata	Vertebrata	Gnathostoma	Pices	Perciformes		Scombridae		Thunnus	Thynnus (Linné)	Thunfisch

Tabelle A2: Ergebnisse aus der Datenbankrecherche

Species	Accession No.	Länge (bp)	12S
Oryctolagus	OCAJ1588	17245	70-1026
	NC001913	17245	
Sus	AF304203	15977	1246-2205
	SSJ002189	16680	
Bos	BOVMT	16338	431-1385
	MIBTXX	16338	
Cervus	AF091699	959	
	D34627	301	
	CEUMTFVLA	2682	
Ovis	NC001941	16616	69-1026
	AF010406	16616	
	AF091699	959	
Lepus	ABO58612	832	
	ABO58613	832	
	ABO59258	839	
	LEU421471	17734	
	NC001913	17734	
Pan	D38113	16554	72-1020
	CHPMTE		
Gorilla gorilla	GORMTC	16364	72-1020
Homo sapiens sapiens	HUMMTCG	16569	650-1603
	AF347015	16571	
Canis	CFU96639	16727	70-1023
Felis	U20753	17009	936-1895
Mus	MUSMTCG	16295	70-1024
Equus	MIECCOMP	16660	71-1045
Struthio	AF338715	16595	70-1035
	SCMITSEQ1	9193	
	SCMITOGEN	16591	
Gallus	MIGGX	16775	1297-2272
Salmo salar	U12143	16665	1075-2020
	NC001960	16665	
Clupea	MICH12SR	326	
Anas	AF173485	393	
	AF173486	393	

	AFU88732	984
	APU59666	982
	DUKMTRG	538
	DUKTGRG	3919
Anser	ARU83734	988
	BSU83735	985
Perdix	AF222589	964
	AF222590	965
Streptopelia	AF483298	397
	AF483304	396
Cortunix	AF222574	974
	AP003195	16697
	MICCND6	2814
Meleagris	MGA490508	403
	MGU83741	971

Tabelle A3: Probenmaterial

Gattung	Probenmaterial	Probennummer	DNA- Isolierungsmethode
Lepus	Gewebe	10, 60, 61, 62, 63	Chelex
Oryctolagus	Gewebe	6, 70, 71, 85, 86	Chelex
Sus	Haare	11, 12, 13, 29, 30,	Genial
	Gewebe	31, 32, 33, 34, 35, 58, 59, 72, 73, 74	Chelex
Bos	Gewebe	7, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 46, 47, 48 49, 50, 51, 52, 53, 64, 65, 66, 67	Chelex
		8, 9, 54, 55, 56, 57, 80	Chelex
Dama	Speichel	1	Chelex
Cervus	Speichel	2, 3, 4	Chelex
Equus	Gewebe	16	Chelex
	Blut	19	Chelex
Anas	Gewebe	80, 81, 82, 83, 84	
Gallus	Gewebe	14, 17, 36, 37, 39, 40, 38, 68, 69, 87, 37	Chelex
		5, 41, 42, 43, 44, 45	Chelex
Salmo salar	Gewebe	15, 75, 76, 77, 78	Chelex
Thunnus	Gewebe	18, 88, 89, 90, 91	Chelex

Anhang 4: Darstellung der für verschiedene Tiere ermittelten übereinstimmenden Sequenzen

Sequenz Mensch:

```

Mensch : CAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACCTCAACAGTTAAAT : 54
          *           20           *           40           *

Mensch : CAACAAACTGCTCGCCAGAACACTACGAGCCACAGCTTAAAACTCAAAGGACC : 108
          60           *           80           *           100

Mensch : TGGCGGTGCTTCATATCCCTCTAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGATAAACCCCG : 162
          *           120           *           140           *           160

Mensch : ATCAACCTCACCACCTCTTGCTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCT : 216
          *           180           *           200           *

Mensch : GATGAAGGCTACAAAGTAAGCGCAAGTACCCACGTAAGACGTTAGGTCAAGGT : 270
          220           *           240           *           260           *

Mensch : GTAGCCCATGAGGTGGCAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCAGAAAACCTACG : 324
          280           *           300           *           320

Mensch : ATAGCCCTTATGAACTTAAGGGTCGAAGGTGGATTTAGCAGTAAACTGAGAGT : 378
          *           340           *           360           *           3

Mensch : AGAGTGCTTAGTTGAACAGGGCCCTGAAGCGGTACACACCGCCCGTCACCCTC : 432
          80           *           400           *           420           *

Mensch : CTCAAGTATACTTCAAAGGACATTTAACTAAAACCCCTACGCATTTATATAGAG : 486
          440           *           460           *           480

Mensch : GAGACAAGTCGTAACATGGTAAGTGTACTGGAAAGTGCACTTGGACGAACCAGA : 540
          *           500           *           520           *           540

Mensch : GTGTAGCTTAACACAAAGCACCC : 563
          *           560

```

Sequenz Kaninchen:

```
Kaninchen : CAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACTTTGATAATT : 50
              *          20          *          40          *
Kaninchen : TCATAACAAAATTATTTCGCCAGAGAACTACAAGCCAAAGCTTAAAACCTCA : 100
              60          *          80          *          100
Kaninchen : AAGGACTTGGCGGTGCTTTATACCCACCTAGAGGAGCCTGTTCCGTAATC : 150
              *          120         *          140         *
Kaninchen : GATAAACCCCGATAAACCTACCCTCTTTGCCAACTCAGCCTATATACC : 200
              160         *          180         *          200
Kaninchen : GCCATCTTCAGCGAACCCATAAAAAGGAGCAAAGTAAGCTCAATTACCAC : 250
              *          220         *          240         *
Kaninchen : CGTAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAGCCCATAGAGTGGAGAGCAATGGGC : 300
              260         *          280         *          300
Kaninchen : TACATTTTCTACTTCAGAATATACGAAAGCCCTTATGAAACTCTAAGGGC : 350
              *          320         *          340         *
Kaninchen : CAAAGGAGGATTTAGTAGTAAATTAAGAATAGAGTGCTTAATTGAACAAG : 400
              360         *          380         *          400
Kaninchen : GCCATGAAGCACGCACACACCCGCGTCACCCTCCTCAAGTGACAAATAT : 450
              *          420         *          440         *
Kaninchen : TTACTTATACCTAATTACATAAATAGACAAGCATAAGAGGAGATAAGTCG : 500
              460         *          480         *          500
Kaninchen : TAACAAGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGACATTT : 539
              *          520         *
```

Sequenz Schaf:

```
Schaf : CAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAAATAATTATAAA : 55
      *          20          *          40          *
Schaf : AACAAAATTATTGCCCAGAGTACTACCGCAACAGCCGAAACTCAAAGGACTTGG : 110
      60          *          80          *          100          *
Schaf : CGGTGCTTTATACCCCTTCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAA : 165
      120          *          140          *          160
Schaf : ACCTACCAATCCTTGCTAATACAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCTA : 220
      *          180          *          200          *          220
Schaf : AAAAAGGGACAAAAGTAAGCTCAATAATAACACATAAAGACGTTAGGTCAAGGTG : 275
      *          240          *          260          *
Schaf : TAACCTATGGAGTGGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCAAGAAAATTTAATA : 330
      280          *          300          *          320          *
Schaf : CGAAAGCCATTATGAAATTAATAGCCAAGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAAT : 385
      340          *          360          *          380
Schaf : AGAGTGCTTAGTTGAATCAGGCCATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCC : 440
      *          400          *          420          *          440
Schaf : TCAAGTAAATATGATATACTTAAACCTATTTACATATATCAACCACACGAGAGGA : 495
      *          460          *          480          *
Schaf : GACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGATAAAC : 543
      500          *          520          *          540
```

Sequenz Hase :

```
Hase : CAAACTGGGATTAGATACCCCATTTATGCTTAGCCTTAAACCTAAATAATTCCTA : 55
      *          20          *          40          *
Hase : ACAAATTTATTCGCCAGAGAACTACAAGCCAGAGCTTAAACTCAAAGGACTTGG : 110
      60          *          80          *          100          *
Hase : CGGTGCTTTATACCCGCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAA : 165
      120          *          140          *          160
Hase : ACCTTACCACTCTTTGCCAACTCAGCCTATATACGCCATCTTCAGCAAACCTA : 220
      *          180          *          200          *          220
Hase : AAAAGGAGCAAAGTAAGCTTAATCATCACCATAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTA : 275
      *          240          *          260          *
Hase : GCCTATAGAGTGGAAAGTAATGGGCTACATTTTCTACTTTAGAACACACGAAAGC : 330
      280          *          300          *          320          *
Hase : CCCTATGAAACCCTAGGAGCCAAAGGAGATTTAGCAGTAAATTAAGAATAGAGT : 385
      340          *          360          *          380
Hase : GCTTAATTGAACAAGGCCATGAAGCACGCACACCCGCCCGTCGCCCTCCTCAAG : 440
      *          400          *          420          *          440
Hase : TACTGAATATTAATTATAGTTAATTCCTGAACAAGCAGGTATAAGAGGAGATAAG : 495
      *          460          *          480          *
Hase : TCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGACACA : 534
      500          *          520          *
```

Sequenz Rind:

```
Rind : CAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACACAGATAATTACATAA : 56
      *      20      *      40      *
Rind : ACAAATTTATTCGCCAGAGTACTACTAGCAACAGCTTAAAACCTCAAAGGACTTGGC : 112
      60      *      80      *      100      *
Rind : GGTGCTTTATATCCTTCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCCCGATAAAC : 168
      120      *      140      *      160
Rind : CTCACCAATTCTTGCTAATACAGTCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCCCTAAAA : 224
      *      180      *      200      *      220
Rind : AGGAAAAAAGTAAGCGTAATTATGATACATAAAAAACGTTAGGTCAAGGTGTAACC : 280
      *      240      *      260      *      280
Rind : TATGAAATGGGAAGAAATGGGCTACATTCTCTACACCAAGAGAATCAAGCACGAAA : 336
      *      300      *      320      *
Rind : GTTATTATGAAACCAATAACCAAGGAGGATTTAGCAGTAAACTAAGAATAGAGTG : 392
      340      *      360      *      380      *
Rind : CTTAGTTGAATTAGGCCATGAAGCACGCACACACCGCCCGTCACCCTCCTCAAATA : 448
      400      *      420      *      440
Rind : GATTCAGTGCATCTAACCTATTTAAACGCACTAGCTACATGAGAGGAGACAAGTC : 504
      *      460      *      480      *      500
Rind : GTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAGTGTGCTTGGA : 539
      *      520      *
```

Sequenz Schwein:

```
          dd
          *      20      *      40      *
Schwein : CAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCCTAAACCCAAATAGTTACA : 53

          60      *      80      *      100
Schwein : TAACAAACTATTTCGCCAGAGTACTACTCGCAACTGCCTAAAACCTCAAAGGAC : 106

          *      120      *      140      *      16
Schwein : TTGGCGGTGCTTCACATCCACCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAAACCC : 159

          0      *      180      *      200      *
Schwein : CGATAGACCTTACCAACCCTTGCCAATTCAGCCTATATACCGCCATCTTCAGC : 212

          220      *      240      *      260
Schwein : AAACCCATAAAAAGGAACAATAGTAAGCACAATCATAGCACATAAAAACGTTAG : 265

          *      280      *      300      *      3
Schwein : GTCAAGGTGTAGCTTATGGGTTGGAAAGAAATGGGCTACATTTTCTACATGAG : 318

          20      *      340      *      360      *
Schwein : TATATCCACCACACGAAAGTTTTTATGAAACTAAAACCCAAGGAGGATTTAG : 371

          380      *      400      *      420
Schwein : CAGTAAATCGAGAATAGAGTGCTTGATTGAATAAGGCCATGAAGCACGCACAC : 424

          *      440      *      460      *
Schwein : ACCGCCCGTCACCCCTCCTCAAGCATGTAGTAATAAAAATAACCTATATTCAAT : 477

          480      *      500      *      520      *
Schwein : TACACAACCATGCAAGAAGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGCATACTGGAAAG : 530

          540
Schwein : TGTGCTTGGATTAC : 544
```

Sequenz Pferd:

```

      *           20           *           40           *
Pferd : CAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCTTAGCCCTAAACTAAAATAGCTTACCA : 55

      60           *           80           *           100           *
Pferd : CAACAAAGCTATTTCGCCAGAGTACTACTAGCAACAGCCTAAAACCTCAAAGGACTT : 110

      120           *           140           *           160
Pferd : GCGGTGCTTTACATCCCTCTAGAGGAGCCTGTTCCATAATCGATAAACCCCGAT : 165

      *           180           *           200           *           220
Pferd : AAACCCACCATCCCTTGCTAATTGAGCCTATATACCGCCATCTTCAGCAAACCC : 220

      *           240           *           260           *
Pferd : TAAACAAGGTACCGAAGTAAGCACAAATATCCAACATAAAAACGTTAGGTCAAGG : 275

      280           *           300           *           320           *
Pferd : TGTAGCCCATGGGATGGAGAGAAATGGGCTACATTTTCTACCCTAAGAACAAGAA : 330

      340           *           360           *           380
Pferd : CTTTAACCCGGACGAAAGTCTCCATGAAACTGGAGACTAAAGGAGGATTTAGCAG : 385

      *           400           *           420           *           440
Pferd : TAAATTAAGAATAGAGAGCTTAATTGAATCAGGCCATGAAGCGCGCACACCCGC : 440

      *           460           *           480           *
Pferd : CCGTCACCCTCCTTAAATATCACAAATCATAACATAACATAAAAACCGTGACCCAA : 495

      500           *           520           *           540           *
Pferd : ACATATGAAAGGAGACAAGTCGTAACAAGGTAAGTATACCGGAAGGTGTACTTGG : 550

Pferd : ATAAC : 555

```

Sequenz Lachs:

Lachs : CAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCGTAAACTTTGATGGAAACATA : 55

Lachs : CAACTGACATCCGCCAGGGGACTATAAGCGCCAGCTTAAAACCCAAAGGACTTGG : 110

Lachs : CGGTGCCTCAGACCCACCTAGAGGAGCCTGTTCTAGAACCGATAACCCCGTTCA : 165

Lachs : ACCTCACCACCTCTTGTTTCCCGCCTATATACCACCGTCGTCAGCTTACCCTG : 220

Lachs : TGAAGCCTTATAGTAAGCAAATGGGCAAACCCAAAACGTCAGTCGGAGGTGT : 275

Lachs : AGCGCATGGGGTGGGAAGAAATGGGCTACATTCTCTAAATTAGAGCACTACGAAC : 330

Lachs : CACGCTGTGAAACCAGCGTCCAAAGGTGGATTTAGCAGTAAATAG-AAAATAGAG : 384

Lachs : AGTTCTCTTGAAACTGGCTCTGAGGCGGCACACACCCGCGTCACTCTCCCCAA : 439

Lachs : GTTCAATTAACCCTTCTAACTAAGAAATTAACCGAACAAAGGGGAGGCAAGTCGT : 494

Lachs : AACATGGTAAGTG : 507

Sequenz Pute

Pute : CAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCCTGGCCCTAAATCTTGATACTAATATAC : 56

Pute : TCACGTATCCGCCTGAGAACTACGAGCACAAACGCTTAAACTCTAAGGACTTGGC : 112

Pute : GGTGCCCTAAACCCACCTAGAGGAGCCTGTCTGTAAATCGATAATCCACGATCCAC : 168

Pute : CCAACCACCTCTTGCCAACACAGCCTACATACCGCCGTGCCAGCCCACCTAAAAT : 224

Pute : GAAAGATCAATAGTGAGCTCAATAGTCCCACTAACAAGACAGGTCAAGGTATAGCC : 280

Pute : CATGAGGTGGAAGAAATGGGCTACATTTTCTAACATAGAACAGACGAAAAAGGGCG : 336

Pute : TGAAACTCGCCCTTGGAAGGAGATTTAGCAGTAAAGTAAGACCATACTTCTCTTA : 392

Pute : AGCCTACTTAAAGACGGCCCTGGGGCAGTACATACCGCCCGTCACCCTCCTCACA : 448

Pute : AGCTATCAATTTCAATAAATAATACCCAACCCTAGCTAAAGATGAGGTAAGTCGTA : 504

Pute : ACAAGGTAAGCGTACCGGAAGGTGCGCTTAGACTAC : 540

Sequenz Ente:

```
Ente : CAAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCCTGGCCCTAAATCTTGATACTTACCCTA : 56
      *          20          *          40          *
Ente : CCGAAGTATCCGCCAGAGAACTACGAGCACAAACGCTTAAACTCTAAGGACTTGG : 112
      60          *          80          *          100          *
Ente : CGGTGCCCTAAACCCACCTAGAGGAGCCTATTCTGTAATCGATGATCCACGATCAA : 168
      120          *          140          *          160
Ente : CCCAACCGCCCCTTGCCAAGCACAGCCTACATACCGCCGTCGCCAGCCCACCTCGA : 224
      *          180          *          200          *          220
Ente : ATGAGAGCGCAACAGTGGGCGCAACAGCACCCCGCTAATAAGACAGGTCAAGGTAT : 280
      *          240          *          260          *          280
Ente : AGCCTATGGGACGGAAGAAATGGGCTACATTCCTATGCATAGGGCAACACGGAAA : 336
      *          300          *          320          *
Ente : GAAGTATGAAACTGCTTCTAGAAAGGAGATTAGCAGTAAAGCGGGACAATAAAGC : 392
      340          *          360          *          380          *
Ente : TCGCTTTAAGCCGGCCCTAGGGCACGTACATACCGCCCGTCACCCTCCTCATAAGC : 448
      400          *          420          *          440
Ente : CACACCCCCACATAATTAATACCTCGTAAATGCCAAAGATGAGGTAAGTCGTAACA : 504
      *          460          *          480          *          500
Ente : AGGTAAGTGTACCGGAAGGTGTAAGTACTAGAAATACTCAAGACGTAGCTATAACC : 556
      *          520          *          540          *
```

Sequenz Huhn:

```
Huhn : CAACTGGGATTAGATACCCCACTATGCCTAGCCCTAAATCTAGATACCTCCCATC : 56
      *      20      *      40      *
Huhn : ACACATGTATCCGCCTGAGAACTACGAGCACAAACGCTTAAAACTCTAAGGACTTG : 112
      60      *      80      *      100      *
Huhn : GCGGTGCCCAAACCCACCTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATAATCCACGATTC : 168
      120      *      140      *      160
Huhn : ACCCAACCACCCCTTGCCAGCACAGCCTACATACCGCCGTCGCCAGCCACCTCTA : 224
      *      180      *      200      *      220
Huhn : ATGAAAGAACAACAGTGAGCTCAATAGCCCCTCGCTAATAAGACAGGTCAAGGTAT : 280
      *      240      *      260      *      280
Huhn : AGCCTATGGGGTGGGAGAAATGGGTACATTTTCTAACATAGAACAAACGAAAAAG : 336
      *      300      *      320      *
Huhn : GATGTGAAACCCGCCCTTAGAAGGAGGATTTAGCAGTAAAGTGAGATCATACCCCC : 392
      340      *      360      *      380      *
Huhn : TAAGCTCACTTTAAGACGGCTCTGAGGCACGTACATACCGCCCGTCACCCTCTTCA : 448
      400      *      420      *      440
Huhn : CAAGCCATCAACATCAATAAATATATACTTCCCCTCCCGGCTAAAGACGAGGCAAG : 504
      *      460      *      480      *      500
Huhn : TCGTAACAAGGTAAGTGTACCGGAAGGTGCACTTAGACTAC : 545
      *      520      *      540
```

7. Literaturverzeichnis

Alderborn A, Kristofferson A, Hammerling (2000) Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing.

Genome Res 10:1249-1258

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman, DJ (1990) Basic local alignment search tool.

J Mol Biol 215:403-410

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.

Nucleic Acids Res 25:3389-3402

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome.

Nature 290:457-464

Bär W (1994) Past, present and future trends in forensic DNA technologies in europe.

Acta Medicinæ legalis 64:20-25

Baur C, Teifel-Greding J, Liebhardt E (1987) Spezifizierung hitzedenaturierter Fleischproben durch DNA-Analyse.

Arch Lebensmittelhy 38:172-174

Bermudez-Humaran LG, Garcia-Garcia A, Leall-Garza CH, Riojas-Valdes VM, Jaramillo-Rangel G, Montes-de-Oca-Luna R (2002) Molecular sexing of monomorphic endangered Ara birds.

J Exp Zool 292:677-680

Boore JL (1999) Animal mitochondrial genomes.

Nucleic Acids Research 8:1767-1780

Brookes AJ (2002) 4th International Meeting on Single Nucleotide Polymorphism and Complex Genome Analysis. Various uses for DNA variations.

Eur J Hum Genet 10:153-155

Carr SM, Marshall D (1991) Detection of intra-specific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by the polymerase chain reaction.

Can J Fish Aquat Sci 48:48-52

Chikune K, Tabata T, Saito M, Monma M. (1994) Sequencing of mitochondrial cytochrome b genes for the identification of meat species.

Anim Sci Technol 65:571-579

Collins FS, Guyer MS, Charkravarti A (1997) Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation.

Science 278:1580-1581.

Crick FH (1966) Codon--anticodon pairing: the wobble hypothesis.

J Mol Biol 19:548-555.

Dahlberg AE (1989) The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis.

Cell 57:525-9

Darwin C (1859) *The Origin of Species by means of Natural Selection, or the preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. London

Doolittle WF (1999) Phylogenetic classification and the universal tree.

Science 284:2124-2128

Ensminger AL, Hoffmann SM (2002) Sex identification assay useful in great apes is not diagnostic in a range of other primate species.

Am J Primatol 56:129-134

Eperon IC, Anderson S, Nierlich D (1980) Distinctive sequence of human mitochondrial ribosomal RNA genes.

Nature 286:460-467

Fletcher SM, Dolton P, Harris-Smith PW (1984) Species identification of blood and saliva stains by enzyme-linked-immuno-assay (ELISA) using monoclonal antibody.

J Forensic Science 29:67-74

Forrest AAR, Carnegie PR (1994) Identification of gourmet meat using FINS (forensically informative nucleotide sequencing).

Biotechniques 17:24-26

Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, Gibson J, Maniloff J, Dyer TA, Wolfe RS, Balch WE, Tanner RS, Magrum LJ, Zablen LB, Blakemore R, Gupta R, Bonen L, Lewis BJ, Stahl DA, Luehrsen KR, Chen KN, Woese CR (1980) The phylogeny of prokaryotes.

Science 209:457-463

Griffiths R, Daan S, Dijkstra C (1996) Sex identification in birds using two CHD genes.

Proc R Soc Lond B Biol Sci 263:1251-1256

Hauswirth WW, Laipis PJ (1982) Mitochondrial DNA polymorphisms in a maternal lineage of Holstein cows.

Proc Natl Acad Sci 79:4686-4690

Hennig W.(1982) Phylogentische Systematik.

Parey, Berlin Hamburg

Henze K, Martin W (2001) How are mitochondrial genes transferred to the nucleus?

Trends Genet 17:383-387

Ito H, Sudo-Yamaji A, Abe M, Murase T, Tsubota T (2003) Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in falconiformes.

Zool Science 20:339-344

Iwase M, Satta Y, Takahata N (2001) Sex-chromosomal differentiation and amelogenin genes in mammals.

Mol Biol Evol 18:1601-1603

King MC, Wilson AC (1975) Evolution at two levels in humans and chimpanzees.

Science 188:107-116

Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Pääbo S, Villablanca FX, Wilson AC (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers.

Proc Natl Acad Sci 86:6196-6200

Kocher TD, Irwin DM, Wilson AC (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals.

J Mol Evol 32:128-144

Krebs HA, Johnson WA (1937) The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues.

Enzymologia 4:148-156

Lamarck de JB (1809) Philosophie zoologique. Paris

Lander ES *et al.* (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome.

Nature 409:860-921

Lau EC, Mohandas TK, Shapiro LJ, Slavkin HC, Snead ML (1989) Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes.

Genomics 4:162-168

Laube I, Butschke A, Zagon J, Spiegelberg A, Schauzu M, Bögl KW, Kroh LW, Broll H (2001) Nachweisverfahren für Rindfleisch in Lebensmitteln unter Anwendung der TaqMan™-Technology.

Bundesgesundheitsblatt GesundheitsforschGesundheitsschutz D01 10.1007

Linné v C (1735) Systema naturae. Holmiae

Marth G, Yeh R, Minton M, Donaldson R, Li Q, Duan S, Davenport R, Miller RD, Kwok PY (2001) Single-nucleotide polymorphisms in the public domain: how useful are they?

Nat Genet 27:371-372

Mereschkowsky C (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche.

Biol Zentralbl 25:593-604

Moritz C, Dowling TE, Brown WM (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics.

Annu Rev Ecol Syst 18: 269-292

Mullis K, Faloona FA, Scharf S, Saiki R, Horn G, Ehrlich H, (1986) Specific synthesis of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Methods of Enzymology* 155:335-350

Mullis K, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase catalysed chain reaction.

Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51:263-273

Naito E, Dewa K, Ymanouchi H, Kominami R (1992) Ribosomal ribonucleic acid (rRNA) gene typing for species identification.

J Forensic Sciences 37:396-403

Nakahori Y, Takenaka O, Nakagome Y (1991) A human X-Y homologous region encodes "amelogenin".

Genomics 9:264-269

Noller FH (1984) Structure of Ribosomal RNA.

Ann Rev Biochem 53:119-162

Nordström T, Nourizad K, Ronaghi M, Nyren P.(2000) Method enabling pyrosequencing on double-stranded DNA.

Anal Biochem 282:186-193.

Nota Y, Takenaka O (1999) DNA extraction from urine and sex identification of birds.

Molecular Ecology 8:1237-1239

Ochman H, Lawrence JG, Groisman ES (2000): Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation.

Nature 405:299-304

Oliver DH, Thompson RE, Griffin CA, Eshleman JR (2000) Use of single nucleotide polymorphisms (SNP) and real-time polymerase chain reaction for bone marrow engraftment analysis.

J Mol Diagn 2:202-208

Parson W, Parsons TJ, Scheithauer R, Holland MM (1998) Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case.

Int J Legal Med 111:124-32

Parson W, Pegoraro K, Niederstätter H, Föger M, Steinlechner M (2000) Species identification by means of the cytochrome b gene.

Int J Legal Med 114:23-28

Ronaghi M, Nygren M, Lundeberg J, Nyren P (1999) Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing.

Anal Biochem 267:65-71

Ronaghi M (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing.

Genome Res 11:3-11

Roy MS, Geffen E, Smith D, Ostrander EA, Wayne RK (1994) Patterns of differentiation and hybridization in north American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci.

Mol Biol Evol 10:1115-1135

Saiki R K, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf FJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science 239:487-491

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning.

A laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors.

Proc Natl Acad Sci 74:5463

Schleyer F, Oepen I (1995) Blut-Untersuchungen. Bestimmung der Blutart. Humanbiologische Spuren. In: Schleyer F, Oepen I, Henke J (eds) Kriminalistikverlag, Heidelberg, 20-32

Singer-Sam J, Tanguay RL, Riggs AD (1989) Use of chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. Amplifications: A Forum for PCR Users Issue 3:11

Sloof P, Van den Burg J, Voogd A, Benne R, Agostinelli M, Borst P, Gutell R, Noller H (1985) Further characterization of the extremely small mitochondrial ribosomal RNAs from trypanosomes: a detailed comparison of the 9S and 12S RNAs from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma brucei* with rRNAs from other organisms. Nucleic Acids Res 13:4171-4190

Steinlechner M, Berger B, Niederstätter H, Parson W (2002) Rare failures in the amelogenin sex test. Int J Legal Med 116:117-120

Teifel-Greding J, Baur C, Josephi E, Liebhardt E (1988) Speziesidentifizierung an der Spur mit molekularbiologischen Methoden. Beiträge zur Gerichtlichen Medizin 47:545-550

Venter JC *et al.* (2001) The sequence of the human genome. Science: 291:1304-1351

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques 10:506-513

Wang HY, Lee SC (2002) Secondary structure of mitochondrial 12S rRNA among fish and its phylogenetic applications. Mol Biol Evol 19:138-48

Wiegand P, Bajanowski T, Brinkmann B (1993) DNA typing of debris from finger nails. Int J Legal Med 106:81-83

Woese CR, Magrum LJ, Gupta R, Siegel RB, Stahl DA, Kop J, Crawford N, Brosius J, Gutell R, Hogan JJ, Noller HF (1980) Secondary structure model for bacterial 16S ribosomal RNA phylogenetic, enzymatic and chemical evidence.

Nucleic Acids Res 8:2275-2293

Woese CR, Gutell R, Gupta R, Noller HF (1983) Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids.

Microbiol Rev 47:621-669

Woese CR (2002) On the evolution of cells.

Proc Natl Acad Sci 99:8742-8747

Wolstenholme DR (1992) Animal mitochondrial DNA: structure and evolution.

International Review Cytology 141:173-216

Zehner R, Zimmermann S, Mebs D (1998) RFLP and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man: methodology and forensic application.

Int J Legal Med 111:323-327

Danksagung

Ich danke:

Herrn Prof. Dr. W. Eisenmenger dem Leiter des Instituts für Rechtsmedizin in München für die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen.

Frau Dr. Anslinger und Herrn Dr. Rolf für die Betreuung der Arbeit.

Frau Birgit Bayer für die praktischen Hilfen.

Frau Monika Czerny, Susanne Ring und Uschi Bruckmoser für die täglichen Hilfen.

Herrn Herbert Koch bei der Unterstützung der grafischen Bearbeitung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Gerke für das Interesse an dieser Arbeit und die ideelle Unterstützung.

Frau Dr. Rauch für das Sammeln der Mageninhalte.

Der Fleischerei Schlagbaur für die Bereitstellung der Fleischproben.

Frau Angie Beutner für das Korrekturlesen.

Meinem Mann Stefan und meiner Tochter Nella.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Beate Balitzki-Korte
Geburtsdatum	29. September 1968
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	verheiratet, ein Kind
Anschrift	Schiffenberger Weg 9e 35435 Wettenberg

Schulbildung

1975 – 1977	Grundschule Vermoor, Hamburg
1977 – 1979	Eichendorf Grundschule, Bielefeld
1979 – 1985	Brodhagenschule, Bielefeld
1985 – 1988	Martin-Niemöller-Schule, Bielefeld

Ausbildung

1988 – 1990	Chemisch-Technische-Assistentin Höhere Berufsfachschule Bielefeld
-------------	--

Studium

1991 – 1999	Studium der Diplom-Biologie, Universität Bielefeld
-------------	---

Promotion

2000 – 2001	Institut für Neuropathologie, Ludwig-Maximilians-Universität München
2001 – 2003	Institut für Rechtsmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München

Wettenberg, 10.11.2003

Beate Balitzki-Korte