

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Rechtsmedizin

**Etablierung von SNaPshot-Assays zur Charakterisierung Y-chromosomaler
Haplogruppen – ein Teilprojekt zur Bestimmung der Ursprungspopulation
unbekannter Tatortspuren**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von
Lisa-Marie Witt
aus Herne
2017

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. M. Poetsch
2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. rer. nat. B. Horsthemke
3. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. J.T. Epplen, Bochum

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Januar 2018

Publikationen

23.11.2012: 11. Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen: Etablierung von SNaPshot-Assays zur Charakterisierung Y-chromosomaler Haplogruppen – ein Teilprojekt zur Bestimmung der Ursprungspopulation unbekannter Tatortspuren.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Grundlagen der Molekularbiologie	8
1.2	Geschichte der DNA-Typisierung	8
1.3	Das menschliche Genom	9
1.3.1	The Human Genome Project (HGP)	9
1.3.2	Das humane Y-Chromosom	9
1.4	Molekularbiologische Marker der forensischen Genetik	10
1.4.1	Short Tandem Repeats (STRs)	10
1.4.2	Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) und Y-chromosomale SNPs als Marker der Populationsgenetik	12
1.5	Haplogruppen im Kontext der Populationsgenetik	13
1.6	Populationen	14
1.6.1	Die Türkei im Überblick	15
1.6.2	Die Balkanregion und der Nahe Osten im Überblick	16
1.6.3	Nord- und Westafrika im Überblick	20
1.6.4	Nordeuropa im Überblick	21
1.7	Zielsetzung	22
2	Material und Methoden	23
2.1	DNA-Proben	23
2.2	DNA-Extraktion	23
2.2.1	Material	23
2.2.2	Methode	24
2.2.3	Laborprotokoll der DNA-Extraktion mittels InnuPREP DNA Mini Kit	24
2.3	DNA-Amplifikation mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.3.1	Material	25
2.3.2	Methode	25
2.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	27

2.4.1	Material	27
2.4.2	Methode.....	28
2.4.3	Laborprotokoll.....	28
2.5	Silberfärbung.....	28
2.5.1	Material	28
2.5.2	Methode.....	29
2.5.3	Laborprotokoll.....	29
2.6	Aufreinigung der PCR-Produkte	29
2.6.1	Material	29
2.6.2	Methode.....	29
2.7	Cycle-Sequenzier-PCR.....	30
2.7.1	Material	30
2.7.2	Methode.....	30
2.7.3	Aufreinigung des Cycle-Sequenzier-PCR-Produkts	31
2.7.3.1	Material	31
2.7.3.2	Methode.....	31
2.7.3.3	Laborprotokoll der Aufreinigung des Cycle-Sequenzier-PCR-Produkts mittels innuPREP DYEpure Kit.....	31
2.8	Minisequenzierung mittels SNaPshot-Assay	32
2.8.1	Material	32
2.8.2	Methode.....	32
2.8.3	Aufreinigung der SNaPshot-PCR-Produkte	33
2.8.3.1	Material	33
2.8.3.2	Methode.....	33
2.9	Kapillarelektrophorese	34
2.9.1	Material	34
2.9.2	Methode.....	34
2.9.3	Laborprotokoll der Sequenzanalyse	34
2.9.4	Laborprotokoll der Fragmentanalyse	35

3	Ergebnisse	36
3.1	Etablierung	36
3.1.1	Y-Multi 4	36
3.1.2	Y-Multi 5	39
3.1.3	Y-Multi 6	43
3.2	Geographische Auswertung	44
3.3	Haplogruppenspezifische Auswertung	49
3.4	Anwendungsbeispiele etablierter SNaPshot-Assays	51
4	Diskussion	52
4.1	Methodik der SNaPshot-Minisequenzierung	52
4.2	Bestimmung von Y-SNPs als Teilprojekt	52
4.3	Haplogruppenverteilung	53
4.3.1	Nord- und Westafrika	53
4.3.2	Balkan, Türkei, Naher Osten und Nordeuropa	55
4.4	Schlussfolgerung zur Anwendbarkeit etablierter Assays	58
5	Zusammenfassung	61
6	Quellennachweise	62
6.1	Literaturverzeichnis	62
6.2	Internetquellen	69
6.3	Herstellerprotokolle	70
A	Anhang	71
A.1	Abkürzungsverzeichnis	71
A.2	Abbildungsverzeichnis	73
A.3	Tabellenverzeichnis	73
A.4	Laborprotokolle	75
A.4.1	Allgemeine Laborprotokolle	75
A.4.1.1	Polymerasekettenreaktion	75
A.4.1.2	Minisequenzierung	76

A.4.2 Laborprotokolle etablierter Assays.....	77
A.4.2.1 Y-Multi 4.....	77
A.4.2.2 Y-Multi 5.....	78
A.4.2.3 Y-Multi 6.....	80
A.5 Primersequenzen	82
A.6 Haplogruppen-Diagramme.....	87
A.7 Tabellen der haplogruppenspezifischen Auswertung.....	91
B Danksagung	95
C Lebenslauf.....	96

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Molekularbiologie

Der menschliche Organismus besteht aus mehreren Trillionen Zellen. Jede kernhaltige Zelle trägt die gesamte Erbinformation in ihrem Zellkern (Nucleus), welche in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA, engl. deoxyribonucleic acid) gespeichert wird. Sie beinhaltet Informationen zur Fortpflanzung, Replikation, sowie zur Herstellung von Proteinen. Die Gesamtheit dieser Informationen wird als genetischer Bauplan bezeichnet und entspricht dem menschlichen *Genom* (Butler, 2010).

Watson und Crick beschrieben im Jahre 1953 erstmals die helikale Organisation und die Doppelstrang-Konfiguration des DNA-Moleküls (Watson et al., 1953). Die DNA liegt dicht gepackt als Chromosomen vor und wird zu gleichen Teilen von Mutter und Vater vererbt. Der diploide Chromosomensatz besteht aus insgesamt 46 Chromosomen und beinhaltet neben 44 Autosomen zwei Gonosomen, die Geschlechtschromosomen. Das Vorliegen identischer (XX) oder verschiedener (XY) Gonosomen definiert das genetische Geschlecht. Der Karyotyp des Menschen, als Gesamtheit der Chromosomen einer Zelle, stellt sich entweder als 46,XX (weiblich) oder 46,XY (männlich) dar. Das Y-Chromosom trägt die genetischen Informationen zur Festlegung des männlichen Geschlechts und dient somit der chromosomalen Geschlechtsdetermination. Die *sex-determining region of the Y chromosome* (SRY), ein auf dem Y-Chromosom lokalisiertes Gen, bedingt die Ausprägung des männlichen Phänotyps. Das Y-Chromosom wird ausschließlich vom Vater auf den Sohn vererbt (Goodfellow et al., 1993).

1.2 Geschichte der DNA-Typisierung

Die DNA-Typisierung basiert auf der Analyse intrazellulär vorliegenden Genmaterials eines Individuums. Hierbei werden hochvariable, individualspezifische Abschnitte des Erbguts untersucht. Sie sind bei jedem Menschen anders und somit in der Gesamtheit einzigartig, wodurch eine Einzelperson nahezu sicher identifiziert werden kann (Roewer, 2013).

In den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts konnten Alec Jeffreys *et al.* einen einschlägigen Erfolg auf dem Gebiet geweblicher DNA-Analysen erzielen (Jeffreys et al., 1985). Sie entdeckten das Vorkommen repetitiver Gensequenzen auf der menschlichen DNA, konstante Basenabfolgen, welche über das gesamte Genom verteilt vorkommen. Die Länge dieser auch als *Repeats* bezeichneten Wiederholungen ist bei jedem Menschen individuell unterschiedlich, sodass Jeffreys dieses personenspezifische DNA-Profil als *DNA-Fingerabdruck* bezeichnete.

Die ursprüngliche Methodik der Genotypisierung nach Jeffreys wurde stets weiterentwickelt und ist heutzutage von rechtlicher Relevanz bei der Zuordnung unbekannter Spuren, der Identifizierung

unbekannter Leichenfunde im Zusammenhang mit Vermisstensuchen oder Masseninglücken, sowie bei der Bestimmung von Verwandtschaftsverhältnissen im Rahmen von Abstammungsanalysen (Butler, 2015).

Heute werden in der forensischen DNA-Typisierung statt der ursprünglich analysierten Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (engl. restriction fragment length polymorphism (RFLP)) sogenannte Mikrosatelliten, *Short Tandem Repeats* (STR), mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction (PCR)) untersucht (Roewer, 2013).

Die technischen Entwicklungen im Bereich der Molekularbiologie haben die DNA-Typisierung soweit reformiert und verbessert, dass die Ergebnisse von DNA-Analysen heute in gerichtlichen Verfahren als Beweismaterial herangezogen werden dürfen. Sie bilden somit die Grundlage für einen Großteil des modernen Arbeitsgebietes der forensischen Genetik (Roewer, 2013).

1.3 Das menschliche Genom

Das menschliche Genom ist die Gesamtheit seiner DNA und besteht aus ungefähr drei Billionen Basenpaaren, wobei circa 99,7% der Basenpaarabfolgen interindividuell identisch sind. Die individuelle Vielfältigkeit wird durch Polymorphismen der Basenabfolge (*Sequenz*) und der Anzahl an Wiederholungen gewisser Nukleotidsequenzen (*Repeats*) bestimmt (Butler, 2010). Die DNA setzt sich aus für Proteine codierenden (ca. 5%) und nicht-codierenden (ca. 95%) Regionen zusammen (Goodwin et al., 2007). Ein Viertel der DNA hat durch die Regulierung codierender Gene eine Co-Funktion in der Proteinsynthese, von circa 20% des Genoms ist die Funktion bislang unbekannt. Der Rest des Genoms besteht aus repetitiven Sequenzen unterschiedlicher Länge, die unter dem Begriff der *Tandem Repeats* zusammengefasst werden (Kapitel 1.4.1) (Goodwin et al., 2007).

1.3.1 The Human Genome Project (HGP)

Im Oktober 1990 startete das *Human Genome Project* (HGP) mit dem Ziel, die DNA des Menschen vollständig zu sequenzieren. Um internationale Forschungsfortschritte voranzutreiben, wurden die erhobenen Daten frei im Internet zugänglich gemacht. Das HGP wurde im April 2003 erfolgreich abgeschlossen. Es ist seither die Grundlage für molekulargenetische Diagnostik und Therapie von Patienten sowie die Basis aktueller biomedizinischer Forschung (<http://www.genome.gov>).

1.3.2 Das humane Y-Chromosom

Das humane Y-Chromosom ist mit einer Länge von knapp 60 Mega-Basenpaaren (Mbp) das zweitkleinste Chromosom des Menschen. Es entzieht sich zu 95% der natürlichen meiotischen Rekombination eines Erbgangs. Die nicht-rekombinanten Regionen werden als *male specific region of the Y-Chromosome* (MSY) oder *non-recombining portion of the Y chromosome* (NRY) bezeichnet (Stumpf et al., 2001). Hier sind unter anderem die Informationen zur Geschlechtsdifferenzierung gespeichert (Skaletsky et al., 2003). Nur ungefähr 5% aller Basenpaare des Y-Chromosoms können

Genmaterial mit der homologen Region des X-Chromosoms, dem zweiten Geschlechtschromosom, austauschen. Diese pseudoautosomalen Regionen sind an den Chromosomenenden lokalisiert (Butler, 2010).

Verglichen mit anderen Chromosomen beinhaltet der codierende Anteil des Y-Chromosoms die wenigsten Gene (Venter et al., 2001). Der nicht-codierende Teil des Y-Chromosoms enthält unter anderem Mikrosatelliten-DNA (engl. short tandem repeats (STRs)) sowie Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphisms (SNPs)) (Kapitel 1.4.2). Diese DNA-Sequenzen unterliegen ausschließlich Veränderungen durch intrachromosomale Mutationsereignisse und werden daher nahezu unverändert vom Vater an seinen Sohn vererbt. Die generationenüberschreitende Beständigkeit ermöglicht es, historische Entwicklungsprozesse anhand des Y-Chromosoms zu untersuchen. Diese Konstanz ist die Forschungsgrundlage im Bereich globaler Migrationsbewegungen, dient der Bestimmung der biogeographischen Herkunft eines Mannes und ist die Basis vieler medizinischer Untersuchungsmethoden im Bereich der Gendiagnostik (Jobling et al., 2003).

In der forensischen Genetik wird dieser patrilineare Erbgang für Abstammungsbegutachtungen genutzt, bei denen das Kind ein Junge ist. Wenn der potentielle Vater nicht für eine Analyse zur Verfügung steht, kann auch der Bruder des potentiellen Vaters, der potentielle väterliche Großvater oder der Bruder des väterlichen Großvaters herangezogen werden. Sie alle weisen dieselben Y-chromosomalen Allele wie der potentielle Vater auf (Mutationsereignisse ausgenommen) (Jobling et al., 2003). Auch in der Kriminologie ist das Y-Chromosom von großer Bedeutung, da mit seiner Hilfe bei Mischspuren nach Vergewaltigungsdelikten männliche von weiblicher DNA abgegrenzt werden kann. Somit sind Y-chromosomale, für das männliche Geschlecht spezifische Marker, zur Analyse von DNA-Tatortspuren in der forensischen Analytik von großer Bedeutung (Jobling et al., 1997). Das weibliche Korrelat zur Patrilinearität des Y-Chromosoms stellt die matrilineal vererbte mitochondriale DNA (mtDNA) dar (Butler, 2010).

1.4 Molekularbiologische Marker der forensischen Genetik

Ein in der forensischen Genetik zu untersuchender Marker muss eine geringe Mutationsrate sowie eine intraindividuell hohe Polymorphie aufweisen und weitestgehend unabhängig von evolutionärem Selektionsdruck sein. Er eignet sich für die Etablierung in der Laborroutine, wenn er leicht reproduzierbar ist, kostengünstig analysiert und gut interpretiert werden kann und laborunabhängig zu untersuchen sowie zu vergleichen ist (Goodwin et al., 2007).

1.4.1 Short Tandem Repeats (STRs)

Bei Mikrosatelliten-DNA oder STRs handelt es sich um repetitive DNA-Sequenzmuster. Sie sind ubiquitär auf den Chromosomen verteilt, wie die Chromosomen in jeweils zweifacher Ausführung

je STR-System, und entsprechen insgesamt etwa 3% des Genoms. Die Wiederholungseinheiten der STRs (*Repeats*) haben eine Länge von nur 2-6 bp (Jasinska et al., 2004). Dabei entspricht ein Allel der Anzahl an Repeats, diese ist zwischen einzelnen Menschen unterschiedlich. Die in der forensischen Genetik verwendeten STRs weisen meist mehr als zehn verschiedene Allele auf. Die Möglichkeit der zeitgleichen Untersuchung mehrere STRs in einer Multiplex-PCR erweist sich in der forensischen DNA-Analyse als Vorteil. Die kurzen STR-Sequenzen sind sehr sensitive Marker, da sie auch in stark degradiertem DNA analysiert werden können. Ihre hohe Polymorphie ermöglicht eine gute interindividuelle Differenzierung und der voneinander unabhängige Erbgang unterschiedlicher STRs macht ein vollständiges DNA-Profilieren bereits mit 12 STR-Loci möglich. Die zurzeit gängigen Untersuchungs-Kits amplifizieren routinemäßig 16 (z.B. PowerPlex® ESX 17 (Promega, 2016)) bis 27 (z.B. PowerPlex® Fusion 6C System (Promega, 2016)) STR-Loci in einer Reaktion. Die STR-Multiplex-PCR wird in der forensisch-genetischen Routine weltweit am häufigsten verwendet (Goodwin et al., 2007).

Autosomale STRs werden nach Mendel'schen Regeln vererbt und sind Gegenstand von Rekombinations- und Mutationsereignissen. Y-Chromosomale STRs sind in nicht-rekombinanten Regionen lokalisiert und entziehen sich aufgrund der gonosomalen Haploidie dieser meiotischen Rekombination (Schneider et al., 1998). Die Typisierung von Y-STRs ist für die Identifikation männlicher DNA unverzichtbar und erlaubt eine interindividuelle Unterscheidung europäischer Populationen mit einer Wahrscheinlichkeit >99% (Roewer et al., 2000).

DNA-Analyse-Datei (DAD)

Anhand von STRs werden DNA-Identifizierungsmuster für die *DNA-Analyse-Datei* (DAD) erhoben. Bei der DAD handelt es sich um eine länderübergreifende Datei der Bundesrepublik Deutschland, die als Hilfsmittel in der Tataufklärung herangezogen wird. Sie besteht seit dem 17. April 1998 und beinhaltet Personen- sowie Spurendatensätze zum Abgleich mit neu eingestellten Datensätzen. Personendatensätze enthalten DNA-Identifizierungsmuster und Geschlecht von Beschuldigten und Verurteilten einer definierten Straftat, Spurendatensätze beinhalten DNA-Identifizierungsmuster bislang nicht zu identifizierender Tatortspuren. Das Vorgehen im Umgang mit erhobenen Daten zur DNA-Identitätsfeststellung wird durch § 81 g Abs. 5 Satz 3 StPO geregelt. Der Datenbestand der DAD beinhaltete zum Jahresende 2016 insgesamt circa 1.167.000 Datensätze (<https://www.bka.de/DE/UnsereAufgaben/Ermittlungsunterstuetzung/DNA-Analyse/DNAstatistik/dnaStatistik.html>). Zur Ermittlung des DNA-Identifizierungsmusters werden zurzeit insgesamt 16 Merkmale (STRs, Kapitel 1.4.1) nicht-codierender DNA-Regionen untersucht.

1.4.2 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) und Y-chromosomale SNPs als Marker der Populationsgenetik

Die Variation eines einzelnen Basenpaares innerhalb des Genoms wird als *Einzelnukleotid-Polymorphismus*, engl. single nucleotide polymorphism (SNP), bezeichnet. Hierbei treten im Vergleich einzelner Individuen zwei (selten auch mehrere) unterschiedliche Basen am gleichen Genlocus auf. Das Genom eines einzelnen Menschen beinhaltet Millionen solcher SNPs (Butler, 2010), pro 1.000 Basen tritt circa 1 SNP auf (Syvänen, 2001).

Ein SNP ist eine Genvariante mit einer geringen Mutationsrate von 2×10^{-8} pro Base pro Generation (Jobling, 2001). Tritt eine Allel-Variation bei $\geq 1\%$ der Bevölkerung auf, handelt es sich definitionsgemäß um einen SNP. Tritt die Basenpaar-Variation seltener auf, so entspricht dies einer Punktmutation. Bei mehr als 90% aller natürlich vorkommenden Nukleotidsequenz-Veränderungen der menschlichen DNA handelt es sich um Einzelnukleotid-Polymorphismen. Der häufigste Austausch findet zwischen den Basen Cytosin und Thymin statt, was möglicherweise auf eine spontane 5-Methylcytosin Desaminierung zurückzuführen ist (Brookes, 1999).

SNPs kommen in nicht-codierenden sowie codierenden DNA-Regionen vor und verteilen sich innerhalb des gesamten Genoms sehr inhomogen (Venter et al., 2001). In den codierenden Regionen können SNPs zu erblichen Erkrankungen führen, wie beispielsweise einer Thrombophilie aufgrund der Faktor-V-Leiden-Mutation. Ferner sind SNPs Grundlage pharmazeutischer Entwicklungen und neuer Therapieformen. Führt ein Polymorphismus innerhalb einer codierenden Region zu einer veränderten Proteinstruktur, so bietet diese ein Angriffspunkt für neue Pharmakotherapeutika. Häufiger sind SNPs jedoch in nicht-codierenden DNA-Abschnitten lokalisiert, nur $<1\%$ der Polymorphismen gehen mit einer tatsächlichen Proteinveränderung einher (Venter et al., 2001). SNPs nicht-codierender DNA-Abschnitte werden als Marker in der Evolutionsforschung eingesetzt, dienen als Grundlage populationsgenetischer Untersuchungen (Syvänen, 2001) und können zu Untersuchungen in der forensischen Genetik herangezogen werden.

Ein biallelischer SNP liefert weniger genetische Informationen als ein multiallelischer STR-Marker. Daher muss für die gleiche Genauigkeit in der Differenzierung einzelner Individuen eine größere Anzahl an Polymorphismen untersucht werden. Werden SNPs für die DNA-Typisierung herangezogen, so müssen 25-45 SNP-Loci analysiert werden, um eine zur STR-Analyse vergleichbare Genauigkeit zu erzielen (Butler, 2010).

Y-chromosomale SNPs (Y-SNPs) werden patrilinear vererbt, was aufgrund von Patrilokalität mit einer geringen geographischen Streuung genetischer Variationen einhergeht. Patrilokalität beschreibt die von circa 70% der modernen Bevölkerung praktizierte Lebensform (Jobling et al., 2003), in der die Frau nach der Hochzeit zu ihrem Mann zieht und sich in der Umgebung seines Geburtsortes ansiedelt statt umgekehrt (Seielstad et al., 1998). Dies führt zu einer geschätzt 8-fach größeren

Migrationsrate von Frauen (Jobling, 2001). Im Vergleich zu matrilineal vererbten mitochondrialen mtSNPs und biparental vererbten autosomalen SNPs, sind Y-SNPs daher besonders anerkannte Marker der Populationsgenetik (Stumpf et al., 2001). Anhand der NRY lässt sich die heutige Vielfalt des modernen Menschen zurückverfolgen und nachvollziehen (Underhill et al., 2001). Wie bei jeder forensischen DNA-Analyse, ist die Aussagekraft eines *matches* bei der Ermittlung eines DNA-Profiles jedoch auch bei Y-SNPs von der Häufigkeit ihres Vorkommens in der Bevölkerung abhängig (Jobling et al., 2003) und unter Berücksichtigung der Mutationsrate des untersuchten Markers zu werten (Jobling, 2001). Zwei zufällig ausgewählte Y-Chromosomen unterscheiden sich durchschnittlich anhand einer einzigen Base pro 3000-4000 bp (Stumpf et al., 2001).

1.5 Haplogruppen im Kontext der Populationsgenetik

Die Populationsgenetik befasst sich mit der generationenüberschreitenden Entwicklung und Verteilung von Genen in Populationen. Dabei ist die Ahnenforschung ein Zweig der Populationsgenetik, welcher sich mit der Abstammung von Personen sowie familiären Verwandtschaftsverhältnissen befasst. Zusammen mit Erkenntnissen bevölkerungsgeschichtlicher Entwicklungen sowie dem Wissen über Klimaveränderungen, prähistorische Anthropologie und Genetik, liefert sie ein umfassendes phylogeographisches Bild der heutigen globalen Populationsstruktur (Underhill et al., 2001). Diese populationsgenetischen Grundlagen sind die Basis der Phylogeographie und Voraussetzung für die im Rahmen dieser Arbeit gezogenen Rückschlüsse und ermittelten Ergebnisse untersuchter Allele.

Die Allelausprägung eines bestimmten Genlocus wird als *Genotyp* bezeichnet (Butler, 2010). Werden Y-chromosomale und mitochondriale DNA untersucht, wird der Begriff des Genotyps, aufgrund ihrer Haploidie, durch den Begriff des *Haplotyps* ersetzt (Butler, 2010). Eine Gruppierung von miteinander in Beziehung stehenden Haplotypen wird als *Haplogruppe* bezeichnet (Wallace et al., 1999) und kann durch Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) definiert werden (Jobling, 2001). Die Anzahl solcher Haplogruppen ist begrenzt, so dass durch ihre Bestimmung Rückschlüsse auf Herkunft und Ursprungspopulation eines Mannes gezogen werden können. Je mehr Y-SNPs untersucht werden und je genauer Haplogruppen unterteilt werden können, desto spezifischer und zuverlässiger sind daraus resultierende Ergebnisse (Jobling, 2001).

Die Nomenklatur von auf Y-SNPs basierenden Haplogruppen war lange nicht standardisiert (Jobling, 2001). Das *Y Chromosome Consortium* (YCC) entwickelte im Jahr 2002 eine Einteilung zur Vereinheitlichung der Nomenklatur Y-chromosomaler Haplogruppen (Y Chromosome Consortium, 2002). Seit 2005 wurde die Nomenklatur dieser Y-Haplogruppen durch die Mitarbeiter der *International Society of Genetic Genealogy* (ISOGG) standardisiert. Es wurden 20 Haplogruppenstämme (A-T) definiert, die durch ihre Aufteilung in Subgruppen mehrerer Ebenen den phylogenetischen Stammbaum bilden. Bei Vorliegen einer Mutation eines oder mehrerer

hierarchisch angeordneter SNPs, wird der Stammbaum entlang seiner Zweige verfolgt und die DNA-Probe einer nachkommenden Untergruppe zugeordnet (<http://www.isogg.org/tree/>).

Das YCC war eine heute nicht mehr aktive Arbeitsgemeinschaft von Wissenschaftlern, mit dem Ziel Informationen bezüglich des Y-Chromosoms (bspw. Nomenklatur und Polymorphismen) bereitzustellen und zu pflegen (http://isogg.org/wiki/Y_Chromosome_Consortium).

1.6 Populationen

Um Untersuchungen bezüglich der Herkunft eines Menschen auswerten und interpretieren zu können, müssen die Ergebnisse im Kontext mit genetischen, paläoanthropologischen und ethnischen Erkenntnissen betrachtet werden (Hammer et al., 1998). Die Herkunft des Menschen wird anhand zweier vorherrschender Theorien diskutiert. Die erste Theorie besagt, dass der Mensch (*Homo sapiens*) afrikanischen Ursprungs sei und sich von dort aus vor circa 100.000 Jahren weltweit verbreitete. Bei seiner Expansion kam es zu keiner oder nur teilweisen Durchmischung seines Genmaterials mit anderen Populationen. Dem zweiten Erklärungsansatz liegt eine multiregionale Entwicklung zugrunde, in der Genvariationen von Populationen mit den unterschiedlichen Ausgangspositionen der Expansion zu begründen seien (Stoneking, 1993). Jüngere Forschungsergebnisse erklären jedoch die erste Hypothese als wahrscheinlicher (de Filippo et al., 2011; Tishkoff et al., 2002; Underhill et al., 2001).

In der Populationsgenetik spielen unterschiedlich motivierte Ortsveränderungen des Menschen eine entscheidende Rolle. Hierbei begünstigten vor allem Entwicklung und Verbreitung der Agrarwirtschaft eine rasante Ausbreitung der Menschheit (Tishkoff et al., 2002). Als ein urzeitliches Beispiel für Migrationsbewegungen sind klimabedingte Veränderungen als Ursache periodischer Wanderbewegungen ganzer Urvölker beschrieben. In jüngster Vergangenheit wird vor allem progrediente Arbeitsmigration als individuell oder familiär motivierte Migration genannt. Des Weiteren wurden Händler zu Migranten und Migrantinnen und Familien flüchteten aufgrund von Kriegen. Verschleppungen oder Vertreibungen führten zu räumlichen Bevölkerungsbewegungen (Kaser, 2011).

In den folgenden Abschnitten werden geographische, historische und ethnische Daten für die im Rahmen dieser Arbeit relevanten Metapopulationen aufgeführt. Sie sollen einen Überblick über die historischen Hintergründe der Populationen und ihre Entstehungsgeschichte verschaffen. Die Haplogruppenverteilungen und Genfrequenzen verschiedener Populationen sind unter der Bedingung der patrilinearen Vererbung des Y-Chromosoms zu betrachten (Seielstad et al., 1998). Die meisten Y-chromosomalen Haplogruppenstämme können bestimmten geographischen Regionen zugeordnet werden, wodurch Rückschlüsse auf das mögliche Herkunftsgebiet eines Mannes gezogen werden können (Brion et al., 2005a).

1.6.1 Die Türkei im Überblick

Die Türkei umfasst eine Fläche von näherungsweise 784.000 Quadratkilometern. Sie gehört geographisch zu Asien sowie westlich des Bosphorus zu Europa. Im Juli 2015 lag die Bevölkerungszahl bei mehr als 79 Millionen Menschen. Die Tüorkinnen und Tüorken machen 70-75% der Ethnien aus. 18% der Bevölkerung gehören der ethnischen Gruppe der Kurden an (<https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/tu.html>).

Im 6. Jahrhundert wurden die Tüorken erstmals in chinesischen Quellen als Bevölkerungsgruppe beschrieben. Ihre Urheimat wird in mittelasiatischen Gebieten vermutet (Matuz, 2006). Anatolien und die Balkanregion standen seit Ende des vierten Jahrhunderts bis in das frühe 13. Jahrhundert unter byzantinischer Herrschaft (synonym: *Oströmisches Reich*). Anschließend übernahmen die Osmanen, die Nachkommen des turkmenischen Stammesführers Osman, für ca. 620 Jahre die Herrschaft über die Balkanvölker (Elger, 2001). Osman formte die ihm vererbte Stammesgesellschaft zu einem Staatswesen. Sein Sohn Orhan leitete später die Eroberungen byzantinischer Herrschaftsgebiete und anatolischer Emirate ein. Der Ursprung des Osmanischen Reiches lag in der Konvertierung des oghusischen Türkvolkes, einem in der Region der heutigen Türkei umherziehenden Nomadenstamm, zum Islam um das Jahr 970. Anfang des 11. Jahrhunderts begannen die islamisierten Oghusen in das byzantinische Grenzgebiet einzudringen. Dieses als Turkmenen bezeichnete Volk gilt als Urahne des türkischen Populationsanteils der heutigen Türkei. Das Gebiet Anatoliens wurde von immer mehr Turkmenen bevölkert, was letztlich zum Ende der Herrschaft des Byzantinischen Reichs führen sollte. Ausgehend von diesem Gebiet weiteten die Osmanen Ende des 13. Jahrhunderts ihre Herrschaft aus und eroberten südosteuropäische Regionen wie Serbien, Mazedonien und Bulgarien. Auch die Regionen Albaniens und Bosniens gehörten zu den vielen durch die Osmanen annektierten Gebieten (Matuz, 2006). Mit Ausnahme von Marokko, beherrschte das Osmanische Reich Anfang des 16. Jahrhunderts den Großteil der arabischen Welt (Elger, 2001). Die Ära der Dynastie Osmans wurde nach dem Ersten Weltkrieg durch das Ausrufen der Republik Türkei im Jahre 1923 beendet. Dies geschah unter der Führung Mustafa Kemal Atatürks (türk.: *Vater der Tüorken*) (Elger, 2001). Abbildung 1-1 zeigt das Gebiet des Osmanischen Reichs Mitte des 16. Jahrhunderts.

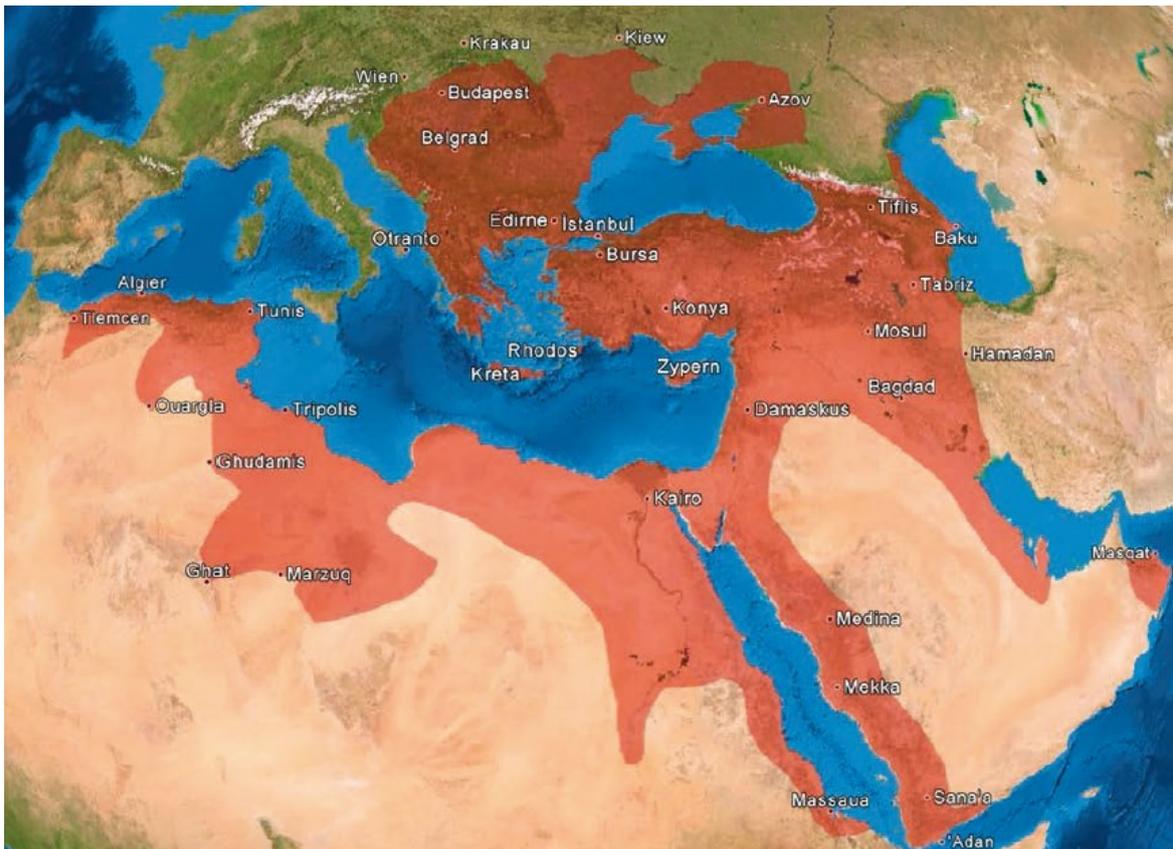


Abbildung 1-1: Das Osmanische Reich Mitte des 16. Jahrhunderts
(Kaser, 2011)

Der türkische Bevölkerungsanteil des Balkans wurde durch die Entstehung der Nationalstaaten im 19. und 20. Jahrhundert aus südosteuropäischen Regionen vertrieben. Die türkischen Volksgruppen flüchteten nach Anatolien, sodass türkische Minderheiten heute nur noch in Mazedonien, Nordgriechenland und Ostbulgarien verzeichnet werden können (Kaser, 2011).

In jüngerer Vergangenheit führten enorme Migrationsbewegungen zu demographischen Veränderungen der Türkei. Beispielsweise brachte der Vertrag von Lausanne im Juli 1923 einen Bevölkerungsaustausch von Muslimen Griechenlands und der christlichen Bevölkerung der Türkei mit sich: 1,2 Millionen orthodoxe Christen verließen die Türkei, im Austausch immigrierten 400.000 Muslime. Seit Ende der fünfziger Jahre des 20. Jahrhunderts kam es zu vermehrter Auswanderung. Ein Beispiel hierfür ist die Migration von 650.000 Türkinnen und Türken im Jahr 1974 nach Deutschland, um als Gastarbeiter tätig zu sein. Auch die türkische Bevölkerung ist seit mehreren Generationen durch Immigration geprägt. Insgesamt stammen circa 4 Millionen türkische Bürger ursprünglich aus dem Kaukasus, von der Krim, von Kreta sowie aus den Balkanländern (Kreiser, 2012).

1.6.2 Die Balkanregion und der Nahe Osten im Überblick

Der Begriff des *Balkans* beschreibt unter rein geographischen Aspekten die europäischen, der Begriff des *Nahen Ostens* die asiatischen Territorien des früheren Osmanischen Reiches (Kaser, 2011). Der

Balkanbegriff wird im deutschen Sprachgebrauch mit dem Terminus *Südosteuropa* gleichgesetzt und lässt sich bis in das 18. Jahrhundert zurückverfolgen. Da eine genaue Definition und Abgrenzung nur schwer möglich ist, wird häufig die Bezeichnung *südöstliches Europa* bevorzugt. Das geographische Territorium schließt die Länder Slowakei, Ungarn, Rumänien, Moldawien, Bulgarien, Griechenland, Albanien, Mazedonien, Kroatien, Bosnien-Herzegowina, Slowenien, Serbien, Montenegro, Kosovo sowie den europäischen Teil der Türkei ein. Es entspricht eine Fläche von knapp einer Million Quadratkilometern, auf der circa 100 Millionen Menschen leben (Kaser, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit umfasst die Metapopulation Balkan die Länder Albanien, Bosnien und Herzegowina, Kosovo, Kroatien, Mazedonien, Rumänien und Serbien.

Der Balkan als geographische Schnittstelle zwischen Europa und Asien war stets durch Eroberungen und Migrationsbewegungen geprägt. Er war ein Einzugsbereich eurasischer Steppenvölker zwischen der unteren Donauregion und dem Mittelmeergebiet, sowie ein Durchzugsgebiet germanischer Stämme in den Jahrhunderten der Völkerwanderung. Die Urbevölkerung des südöstlichen Europas wurde durch eingewanderte Völker verdrängt (Hösch, 2007).

Historische Auslöser großer Migrationsbewegungen waren unter anderem die osmanischen Eroberungszüge des 14. und 15. Jahrhunderts sowie die spätere Zurückdrängung der osmanischen Herrschaft (vgl. Kapitel 1.6.1). Während dieser Zeit bot die Balkanregion vielen jüdischen Bevölkerungsgruppen Zuflucht. Auch die im 13. Jahrhundert beginnende Siedlungsausbreitung der Albaner führte zu Völkerbewegungen bis in süditalienische Gebiete und auf griechische Inseln. Die nicht sesshafte Lebensweise der Roma formte um das Jahr 1100 die Balkangesellschaft, während der Türkenherrschaft entwickelten sich die Roma zu einer noch größeren Bevölkerungsgruppe (Hösch, 2007).

Die 2000 Jahre v. Chr. im südöstlichen Europa lebenden ethnischen Gruppen der Griechen, Illyrer und Thraker werden als die Urbevölkerung Südosteuropas bezeichnet. Noch heute machen sie einen Großteil der gegenwärtig im südöstlichen Europa beheimateten Bevölkerung aus. Unter der Annahme, dass die albanische Population auf die illyrische Bevölkerung zurückzuführen ist, zählt diese heute zu dem am längsten in Südosteuropa lebenden Volksstamm. Die Illyrer immigrierten vermutlich zu Beginn des 2. Jahrtausends v. Chr. aus Asien nach Südosteuropa (Kaser, 2002). Die Population der heutigen Staaten Slowenien, Kroatien, Bosnien-Herzegowina, Serbien, Montenegro, Bulgarien und Mazedonien geht hauptsächlich auf die südslawische Bevölkerung zurück. Sie ist indoeuropäischen Ursprungs und begann sich im 6. und 7. Jahrhundert auf der Balkanhalbinsel niederzulassen (Kaser, 2011).

Epochen unterschiedlicher Herrschaften prägten die Migrationsbewegungen der Balkanregion. Das Gebiet Südosteuropas stand seit dem 3. Jahrhundert v. Chr. unter der Herrschaft des Römischen Reiches, bis das Krisenzeitalter des Römischen Reiches im 3. Jahrhundert n. Chr. zur Bildung des

Byzantinischen Reiches führte. Im Jahr 1453 wurde es durch Eroberungen osmanischer Türken gestürzt und die Ära des Osmanischen Reichs eingeleitet (Ostrogorsky, 1963).

Der deutsche Begriff des *Nahen Ostens* wird synonym für den Begriff *Middle East* des englischen Sprachgebrauchs eingesetzt. Der politisch-historisch geprägte Begriff umschreibt eine nicht eindeutig definierte geographische Region, die etwa dem ehemaligen Territorium des Osmanischen Reiches entspricht (Abbildung 1-2). Mit Ausnahme des Irans und Marokkos umfasst sie Staaten des Vorderen Orients und Nordafrikas. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Staaten Irak, Iran, Israel, Libanon und Syrien zu der Region des Nahen Ostens gezählt.



Abbildung 1-2: Karte des Nahen Ostens. nach der Central Intelligence Agency (CIA) (https://www.cia.gov/library/publications/resources/the-world-factbook/graphics/ref_maps/physical/pdf/middle_east.pdf)

Etwa 10.000 Jahre v. Chr. wurde der vormals im Vorderen Orient sesshafte Neandertaler durch den aus Ostafrika emigrierten modernen Menschen (*Homo sapiens sapiens*) vollständig verdrängt. Die

Umweltbedingungen in der Region begünstigten eine frühere Entwicklung zur Sesshaftigkeit als in anderen Gebieten (Heine et al., 2004).

Im Jahr 622 n. Chr. begann der Prophet Muhammad, die Gebiete des Orients zu verändern. Mit der Unterstützung von Herrschern großer arabischer Reiche, wurde die Ausweitung des muslimischen Staates vorangetrieben. Muhammad bewirkte die Befreiung der Länder Mesopotamien, Syrien, Ägypten sowie Nordafrika von der byzantinischen Herrschaft. Aufgrund der liberalen Haltung der Muslime gegenüber Andersgläubigen, erreichten sie eine große gesellschaftliche Beliebtheit. Die muslimischen Heere expandierten auch außerhalb der arabischen Halbinsel, rückten nach Mesopotamien vor und eroberten von dort aus Syrien und den Iran (Heine et al., 2004), sowie den Irak, Ägypten, Nordafrika und Teile Spaniens (Cavalli-Sforza et al., 1994).

Im 11. Jahrhundert fand eine gewaltsame Invasion Syriens durch Seevölker fraglicher indoeuropäischer Herkunft statt und Hungersnöte unter Nomaden und Bauern führten zu Migrationsbewegungen im Osten des Landes (Scheck et al., 1998). Die Seldschuken, als ein Zusammenschluss türkischer Stämme, hatten die Herrschaft über den Iran übernommen und ihr Reich bis in die arabischen Staaten erweitert. Von den Seldschuken unabhängige, türkische Stämme migrierten in westliche Regionen, ließen sich in nordwestlichen Gebieten des Irans nieder und etablierten sich in Regionen des Kaukasus. Das Gebiet des inzwischen zerbrochenen Imperiums der Seldschuken wurde im 13. Jahrhundert durch eine Invasion der mongolischen Stämme unter der Herrschaft Dschingis Khans bezwungen. Die zerstörerischen Eroberungen der Mongolen durchzogen die islamischen Staaten von Indien bis Syrien. Nach der Verwüstung der zentralen islamischen Staaten formte sich in den zerstörten Gebieten unter anderem die spätere osmanische Herrschaft. Wie die bereits beschriebene Balkanregion, unterlag auch der Nahe Osten ab dem Jahre 1517 für ca. 400 Jahre der Herrschaft des Osmanischen Reiches (Cleveland et al., 2013).

Das Ende des Ersten Weltkriegs führte zur Aufteilung der osmanischen Herrschaftsgebiete auf die Staaten England, Frankreich, Italien und Russland. Der Irak wurde zu einem britischen Kolonialstaat, Syrien und der Libanon wurden zu französischen Mandatsgebieten (Kaser, 2011). Im Jahr 1975 brach im Libanon ein Bürgerkrieg aus, der zu Massenemigrationen nach Europa und Amerika führte (Elger, 2001). Aktuelle politische Entwicklungen im Nahen Osten lassen zukünftig weitere demographische Veränderungen erwarten.

Die Begriffe *Südosteuropa*, *südöstliches* und *südliches Europa* werden in dieser Arbeit synonym verwandt und implizieren, den Balkanbegriff eingeschlossen, keinerlei politische Wertung. Dies gilt ebenfalls für den Terminus des *Nahen Ostens*. Die Begrifflichkeiten dienen ausschließlich geographischen Bezeichnungen.

1.6.3 Nord- und Westafrika im Überblick

Die ältesten Migrationsentwicklungen Afrikas sind auf Veränderungen von Klima und geographischen Gegebenheiten zurückzuführen. Große vorzeitliche Migrationsbewegungen hatten ihren Ursprung am wahrscheinlichsten in Ostafrika, von wo aus der Mensch sich vor ungefähr 44.000 Jahren auf andere Kontinente verbreitete. Die nordafrikanische Bevölkerung stammt ursprünglich aus Gebieten südlich der Sahara (*Subsahara-Afrika*). Die wohl bedeutendste Migrationsbewegung Afrikas stellt die Expansion der Bantu sprechenden Völker dar. Sie hatte ihren Ursprung im westafrikanisch gelegenen Kamerun, von wo aus sie sich in Richtung Südafrika vollzog und circa die letzten 3.000 Jahre überdauerte (Tishkoff et al., 2002). Es wird angenommen, dass diese immense Migrationsbewegung die genetische Vielfalt Zentral- und Westafrikas auslöschte (Berniell-Lee et al., 2009). Bantu ist ein Überbegriff für circa 450 verwandte Sprachen, die im südlichen Afrika gesprochen werden. Es wird vermutet, dass die sprachliche Expansion die Verbreitung der Agrarwirtschaft widerspiegelt (Holden, 2002).

Die Migrationsentwicklungen der jüngeren Vergangenheit sind unter anderem auf Eroberungszüge und wechselnde Machthaber zurückzuführen. Mit Ausnahme von Marokko stand die Region seit Mitte des 16. Jahrhunderts unter der Herrschaft des Osmanischen Reiches (vgl. Kapitel 1.6.1). In den Jahren 1830-1962 wurde der Maghreb im Zuge des europäischen Kolonialismus schließlich vollständig besetzt. Unter dem Gebietsnamen des *Maghrebs* werden die nordafrikanischen Staaten Libyen, Tunesien, Algerien und Marokko zusammengefasst (Elger, 2001). Aufgrund der Kolonialisierung weisen die Länder Marokko und Algerien bis heute einen hohen französischen Bevölkerungsanteil auf. Schon vor der arabisch-islamischen Eroberung des Maghrebs zum Ende des 7. Jahrhunderts, lebte die in Nordafrika sesshafte Bevölkerungsgruppe der Berber in großen Teilen der Region. Bis heute besiedeln sie Gebiete, die sich entlang der Atlantikküste von Ägypten bis zum Nigerbogen erstrecken (Elger, 2001).

Die geographische Nähe Nord- und Ostafrikas zum Mittelmeer begünstigte Migrationsbewegungen. Im 18. Jahrhundert führten geschäftliche Beziehungen zu einem ständigen Austausch und letztlich auch zur Ansiedlung europäischer Migranten in Afrika. Diese Migrationsströme wurden durch die französische Eroberung Algeriens im Jahr 1830 deutlich gefördert (Marx, 2004).

In den vergangenen Jahrhunderten kam es zu vielen Bevölkerungsbewegungen im nordwestlichen Afrika. Im 12. Jahrhundert v. Chr. siedelten sich syrische Seefahrervölker an, im 2. Jahrtausend v. Chr. gelangten griechische Siedler in Regionen des heutigen Libyens und Ende des 15. Jahrhunderts wurde Nordwestafrika durch Entdeckungsfahrten der Portugiesen erschlossen. Im weiteren Sinne markiert dies den Beginn europäischer Kolonialherrschaften in Afrika (Jacob, 1966). Für emigrierende Afrikaner, wird eine mögliche Route entlang des Nils über die ägyptische Sinai-Halbinsel in Richtung Australien vermutet (Forster et al., 2005; Reed et al., 2006), sowie eine

Expansion über die Mündung des Roten Meeres und entlang des Indischen Ozeans diskutiert (Reed et al., 2006).

Eine der Hauptursachen für die Verbreitung afrikanischer Bevölkerungsgruppen in jüngerer Vergangenheit ist die Sklaverei. Seit dem 17. Jahrhundert wurden Millionen Afrikaner und Afrikanerinnen, meist westafrikanischen Ursprungs, nach Europa, Nord- und Südamerika deportiert (Jacob, 1966; Tishkoff et al., 2002).

1.6.4 Nordeuropa im Überblick

Stellvertretend für Nordeuropa, wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich Proben deutscher Herkunft analysiert. In diesem Kapitel werden einige Migrationsströme der europäischen Geschichte aufgeführt.

Die in Europa lebenden Neandertaler wurden erst vor 30.000-40.000 Jahren durch den von Afrika expandierenden *Homo sapiens sapiens* verdrängt (Forster et al., 2005). Vor 6.000-10.000 Jahren emigrierten Bauern aus dem Nahen Osten nach Europa und etablierten sich dort im Zuge agrarwirtschaftlicher Entwicklungen, was die genetische Vielfalt Europas vergrößerte (Cavalli-Sforza et al., 1994; Semino et al., 2000). Es kam zu einer teilweisen Durchmischung mit lokalen Gemeinschaften aus Jägern und Sammlern, obwohl die unterschiedlichen territorialen Voraussetzungen der verschiedenen Lebensformen eine teilweise Segregation der Völker wahrte (Cavalli-Sforza et al., 1994). Im 2. Jahrhundert v. Chr. migrierte das skandinavische Volk der Burguner südwärts nach Polen. Es ließ sich in Mitteleuropa nieder und zog später weiter in westliche Regionen. Im 4. Jahrhundert migrierten die Vandalen, eine frühere Hauptbevölkerungsgruppe Ostgermaniens, in westliche Regionen und weiter nach Nordafrika (Postel, 2004).

In den vergangenen 300 Jahren beeinflussten Asylsuchende und arbeitsbedingte Migrationsströme die europäische Bevölkerungsstruktur. Nach 1685 wurden eine halbe Million Hugenotten aus Frankreich vertrieben. Zu Beginn des 18. Jahrhunderts kam es aufgrund von Kriegen zwischen dem Osmanischen Reich, Österreich und Russland zu Migrationsbewegungen in Südosteuropa und Kleinasien. Um das Jahr 1800 war die europäische Bevölkerungsstruktur durch innereuropäisch umherziehende Wanderarbeiter geprägt. Ein enormes Bevölkerungswachstum führte in den folgenden 50 Jahren zur Verdopplung der europäischen Bevölkerung (Sassen, 2000). Das Ende der Kolonialzeit führte zu Migrationsströmen aus den ehemaligen Kolonien zurück in die Ursprungsländer. Jedoch verhängte der Norden Europas in den 1970er Jahren Zuwanderungsbeschränkungen, um die Migration aus Nicht-EU-Staaten zu limitieren. Deutschland wurde zunächst zu einem Ziel für Migranten östlicher Regionen und wichtigstes Migrationsziel afrikanischer und asiatischer Asylsuchender (Bade, 2000). Seit 1950 führte Arbeitsmigration zu transnationalen Bevölkerungsbewegungen innerhalb Europas. Im Jahre 1970 wurde in Europa eine Zahl von fast 15 Millionen Arbeitsmigranten beschrieben. Ausländer in Nordeuropa sind bis heute

primär innereuropäischer Herkunft (Bade et al., 2008). Die Bevölkerungsstruktur des europäischen Kontinents wurde stets heterogener. Europa hat sich zu einem Einwanderungskontinent entwickelt. Menschen migrieren aus südlichen sowie aus östlichen Regionen und siedeln sich primär in urbanen Regionen an. Im Jahr 1995 lag Deutschland mit 8,8% Ausländeranteil an der Gesamtbevölkerung im europäischen Vergleich auf Rang 5, hinter den Staaten Liechtenstein (38,1%), Luxemburg (33,4%) der Schweiz (18,9%) und Belgien (9%) (Bade, 2004). Die aktuellen politischen Entwicklungen lassen zukünftig weitere demographische Veränderungen auf europäischem Gebiet vermuten.

1.7 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit besteht in der Etablierung von SNaPshot-Assays zur Charakterisierung definierter Y-chromosomaler Haplogruppen als Teilprojekt zur Bestimmung der Ursprungspopulation unbekannter Tatortspuren. In anderen Teilprojekten wurden autosomale SNPs (Poetsch et al., 2013a) und mitochondriale SNPs (noch laufende Dissertation, persönliche Kommunikation Y. Nebel) analysiert.

Die unterschiedlichen Assays sollten anhand der Auswahl und Kombination diverser Y-SNPs erstellt und für die Analyse und Charakterisierung verschiedener Y-Haplogruppen herangezogen werden können. Es handelt sich um Haplogruppen, die in den Regionen Nordeuropas, des Balkans, der Türkei, des Nahen Ostens sowie Nord- und Westafrikas verbreitet sind.

2 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Studie eingesetzten Methoden werden in der chronologischen Reihenfolge ihrer Anwendung aufgeführt.

2.1 DNA-Proben

Es wurden insgesamt 385 männliche DNA-Proben von Männern im Alter von 18-60 Jahren untersucht. Dabei handelte es sich um 349 Mundschleimhautabstriche aus Abstammungsbegutachtungen und 36 Sektionsproben des Instituts für Rechtsmedizin in Essen. Die Proben stammten von Probanden unterschiedlicher Herkunftsländer: Nordeuropa (n=31), Balkan (n=73), Türkei (n=104) Naher Osten (n=63), sowie Nord- (n=65) und Westafrika (n=49). Das Herkunftsland der Probanden war vorher bekannt.

Von allen Personen lag eine schriftliche Einverständniserklärung zur anonymisierten Verwendung ihrer DNA vor. Die Verwendung der DNA-Proben zu Forschungszwecken wurde von der Ethikkommission der Universität Duisburg-Essen genehmigt (Nr. 10-4579). Die Verwendung und Wahrung der Anonymität erfolgten gemäß der Deklaration von Helsinki und der Datenschutzregelung der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen.

Staatliche Veränderungen der jüngeren Vergangenheit wurden in der Deklaration der Proben berücksichtigt: Der Kosovo, als ehemalige Provinz Serbiens, erklärte am 17. Februar 2008 seine Unabhängigkeit (Calic, 2008). Das Herkunftsland von DNA-Proben dieser Region wurde als *Kosovo* bezeichnet. Die Proben waren somit von Proben des Herkunftslandes *Serbien* abzugrenzen. Dies galt auch für Proben, die vor dem Jahr 2008 asserviert wurden. Verwendete DNA-Proben aus Serbien stammten alle aus dem Jahr 2009 oder jüngerer Zeit.

2.2 DNA-Extraktion

2.2.1 Material

Reagenzien	
InnuPREP DNA Mini Kit	Analytik Jena, Jena, Deutschland
Lysis Solution TLS	
Binding Solution TBS	
Proteinkinase K	
Washing Solution HS	
Washing Solution MS	
Elution Buffer	
<i>Spin Filter</i>	
Aqua bidest: LiChrosolv®	Merck, Darmstadt, Deutschland
Geräte	
Vortex L46	GLW, Würzburg, Deutschland
Wasserbad WB7	Memmert, Schwabach, Deutschland
Zentrifuge Galaxy 16 DH	VWR International, Darmstadt, Deutschland)

2.2.2 Methode

Zur DNA-Analyse muss die DNA aus entsprechendem biologischen Material extrahiert werden. Da die DNA an Proteine gebunden vorliegt, muss sie von diesen Proteinen separiert werden. Da auch das Vorhandensein zellulärer Strukturen weitere Analyseschritte behindert, wird die DNA von solchen Bestandteilen getrennt. Für die allgemeine Methode der DNA-Extraktion wird die Zellmembran lysiert und die DNA anschließend gereinigt, separiert und konzentriert (Butler, 2010).

Mit Hilfe eines Watteträgers wurden Mundschleimhautabstriche der Probanden entnommen und das DNA-Material der Mundschleimhautzellen wie beschrieben extrahiert. Die Arbeit mit dem InnuPREP DNA Mini Kit erfolgte nach Herstelleranweisung (Analytik Jena, 2011a). Das eingesetzte InnuPREP DNA Mini Kit basiert auf einem organischen Verfahren zur DNA-Extraktion. Es beinhaltet die Proteinkinase K. Das erstmals 1974 aus einem Pilz gewonnene Enzym führt zur Inaktivierung überschüssiger Proteine durch Hydrolyse (Ebeling et al., 1974).

2.2.3 Laborprotokoll der DNA-Extraktion mittels InnuPREP DNA Mini Kit

- Watteträger in ein Reaktionsgefäß geben. Zugabe von 25 µl Proteinase K und 400 µl TLS Puffer.
- Zur vollständigen Zelllyse: Inkubation des Reaktionsgefäßes im Wasserbad für 10 min bei 56°C.
- 3 min bei 12.000 U/min zentrifugieren.
- Um den Reagenzien-Mix in ein zweites Reaktionsgefäß ohne Trägermaterial zu überführen: Reaktionsgefäß 3 min bei 13.000 U/min *piggy back* zentrifugieren. Dafür ein Loch in den Boden des Reaktionsgefäßes stechen und einem frischen Reaktionsgefäß aufsetzen.
- Zur Fixierung der DNA: Zugabe von 400 µl Binding Solution TBS.
- Pipettieren der Reaktionsflüssigkeit auf einen *Spin Filter*. Dieser sitzt einem weiteren frischen Reaktionsgefäß auf.
- 2 min bei 12000 U/min zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen.
- 500 µl Washing Solution HS auf den *Spin Filter* geben. 1 min bei 12.000 U/min zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen.
- 750 µl Washing Solution MS auf den *Spin Filter* geben. 1 min bei 12.000 U/min zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen.
- *Spin Filter* auf neues Reaktionsgefäß setzen und 200 µl Elution Buffer hinzugeben. Inkubation bei Raumtemperatur für 1 min, kurz bei 8.000 U/min zentrifugieren.

Es liegt ein Endvolumen von 200 µl vor. Das Endprodukt dient als Grundlage weiterer Untersuchungsschritte und wurde bei 5-7 °C im Kühlschrank gelagert oder bei -20 °C tiefgefroren.

2.3 DNA-Amplifikation mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.3.1 Material

Reagenzien	
MgCl ₂ Solution 25 mM	Roche, Mannheim, Deutschland
GeneAmp® 10X PCR Buffer [inkl. 15 mM MgCl ₂]	Applied Biosystems
AmpliTaqGold® 5 U/μl	Applied Biosystems
dNTP-Mix 200μM (äquimolar)	Promega, Mannheim, Deutschland
Primer (Kapitel A.5)	
Geräte	
Thermocycler Biometra TRIO	Biometra, Göttingen, Deutschland

Primer

Die eingesetzten Primer (Oligonukleotide) wurden mit der *PRIMER 6* Software (PRIMER-E) entworfen und von den Firmen Sigma und Biologio bezogen. Die PCR-Primer hatten eine Länge von 18-29 bp. Genauere Angaben finden sich im Anhang A.5.

Bei der verwendeten AmpliTaqGold® DNA-Polymerase (Applied Biosystems) handelt es sich um eine Hot-Start-Polymerase, da sie erst bei Temperaturen über der optimalen Annealing-Temperatur des Primers hitzeaktiviert wird (Applied Biosystems, 2010). Dies verhindert unspezifische Primer-Interferenzen sowie Primer-Artefakte, was zu einer effizienteren und spezifischeren DNA-Amplifikation führt (Chou et al., 1992).

2.3.2 Methode

Allgemeine Methode

Im Jahre 1993 erhielten Kary Mullis und Michael Smith für die Entwicklung des Verfahrens der Polymerasekettenreaktion (PCR, engl. polymerase chain reaction) den Nobelpreis für Chemie (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/). Die PCR ist eine Methode zur exponentiellen in vitro Amplifizierung von DNA-Sequenzen mit Hilfe einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase (Mullis et al., 1986). Die Methode basiert auf repetitiven Zyklen aus Denaturierung des DNA-Doppelstrangs, Primer-Anlagerung (*Hybridisierung*) und Verlängerung dieses Oligonukleotids durch Anlagerung von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTP) (*Elongation*). Die spezifischen Primer lagern sich dem zu untersuchenden DNA-Einzelstrang bei geringeren Reaktionstemperaturen an (*Annealing*) und rahmen die zu amplifizierende DNA-Sequenz. Das Anlagern dieser beiden Primer (*Primer-Hybridisierung*) dient der DNA-Polymerase als Startpunkt zur Extension an den 5'-Enden (*Elongation*). Das in den einzelnen Zyklen entstandene Reaktionsprodukt dient als Ausgangssubstrat für repetitive Reaktionsabläufe. Dies ermöglicht eine exponentielle Vermehrung des zu untersuchenden DNA-Segments bis um den Faktor 10⁶, bevor

Polymeraseaktivität und Substratmenge zum limitierenden Faktor werden. Die aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (taq) isolierte Taq-DNA-Polymerase muss aufgrund ihrer Thermostabilität nach hitzeinduzierten Denaturierungen nicht nachgegeben werden. (Mullis et al., 1986; Saiki et al., 1988).

Eine Möglichkeit zur zeitgleichen Amplifikation von mehr als zwei DNA-Regionen in einer einzigen Polymerasekettenreaktion bietet die Multiplex-PCR. Diese Methode wurde erstmalig im Jahr 1988 von Chamberlain *et al.* beschrieben (Chamberlain et al., 1988). Sie erlaubt es, mehrere DNA-Sequenzen eines DNA-Abschnittes in einem einzigen Amplifizierungsprozess zu vervielfältigen. Da die optimalen Amplifizierungsbedingungen der Primer variieren, entspricht die Multiplex-PCR stets einer Kompromisslösung und geht mit einer geringeren Ergebnisqualität einher. In Einzelfällen ist daher eine Singleplex-PCR zur Überprüfung des Ergebnisses obligat (Sparkes et al., 1996).

Studienspezifische Methode

Alle Proben dieser Studie wurden vorab durch die Y-Multi 1 (SNP M9, M45, M60, M70, M89, M96, M168, M207, M216, M304, SRY10831) typisiert und einem der neun Y-Haplogruppenstämme zugeordnet (Abbildung A-1, Anhang A.6). Nach dem hierarchischen System der Haplogruppentypisierung wurden die Proben anschließend durch untergeordnete Assays (Y-Multi 4, 5, 6) subtypisiert. Die bereits etablierte Y-Multi 1 wurde, wie durch Poetsch *et al.* beschrieben, eingesetzt (Poetsch et al., 2013b). Die Primersequenzen des Y-Multi 1-Mastermixes sind Anhang A.5 zu entnehmen.

Jedes in dieser Studie eingesetzte Primerpaar wurde in einer Singleplex-PCR und anschließender Sequenzierung auf Richtigkeit von Produktgröße und DNA-Sequenz geprüft (Kapitel 2.7). Das allgemeine Singleplex-PCR-Programm findet sich in Tabelle A-1, Anhang A.4. Die Annealingtemperatur variierte primerabhängig zwischen 50 und 62°C. Das allgemeine Multiplex-PCR-Programm der etablierten Assays findet sich in Tabelle A-2, Anhang A.4. Die Annealingtemperatur variierte primerabhängig zwischen 55-62°C bei einer Anzahl von 30 oder 35 PCR-Zyklen. Zum Ausschluss von Verunreinigungen wurde jede PCR unter Einsatz einer Negativkontrolle (Aqua bidest) durchgeführt. Die Primersequenzen finden sich im Anhang A.5.

2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

2.4.1 Material

Reagenzien	
Bromphenolblau	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Borat Puffer (Tris-Borat Ladepuffer)	GE Healthcare, Uppsala; Schweden
Amersham 100 bp Ladder	GE Healthcare
Ammoniumpersulfat	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Polyacrylamid	
Acrylamid	Promega
Methylenbisacrylamid	Promega
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris	Merck
Aqua bidest: LiChrosolv®	Merck
Geräte	
Elektrophoresekammer Multiphor II	GE Healthcare
Electrophoresis Power Supply - EPS 1001	GE Healthcare
Kühlung MultiTemp II	Pharmacia LKB, Uppsala; Schweden
Dichlordimethylsilan beschichtete Glasplatte	Sigma-Aldrich
Trägerfolie des Polyacrylamid-Gels Bond PAG Folie	GE Healthcare
Filterpapierstreifen IEF Sample Application Piece	GE Healthcare

Polyacrylamid-Gel Zusammensetzung

Die Stammlösung beinhaltet Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Borat Puffer. Das Grundgerüst des Polyacrylamid-Gels wurde aus monomerem Acrylamid und dem quervernetzenden Agens Methylenbisacrylamid gebildet. Als Katalysatoren der Polymerisation des Polyacrylamid-Gels dienten Ammoniumpersulfat und TEMED.

Die detaillierte Zusammensetzung des eingesetzten Polyacrylamid-Gels war wie folgt:

- 6,6 ml 30% Polyacrylamid, 3% C
 29,1 g Acrylamid, 0,9 g Methylenbisacrylamid ad 100 ml (Aqua bidest)
- 5,0 ml 35mM Tris-Sulfat-Puffer (pH 9)
- 230 µl 10% Ammoniumpersulfat
- 23 µl TEMED
- 11,6 ml Aqua bidest

Nach Entgasen der Lösung, Zugabe der Katalysatoren:

- 170 µl 10% Ammoniumpersulfat
- 12 µl TEMED

Die Lösung wurde auf eine mit Dichlordimethylsilan silanisierte Glasplatte gegeben, um ein späteres Anhaften des Gels zu verhindern. Eine mit Trägerfolie bezogene zweite Glasplatte wurde dem Gel aufgelegt. Die Einlage von 0,8 mm Spacern bestimmte die Dicke des Gels. Zum Auspolymerisieren wurde das Gel für mindestens 30 min bei 4°C inkubiert.

2.4.2 Methode

Um ein erfolgreiches Ergebnis der durchgeführten PCR zu sichern, werden die amplifizierten DNA-Fragmente auf ein Trennmedium aufgetragen und in einem elektrischen Feld aufgetrennt. Liegt die DNA in einer Pufferlösung vor, bewegt sich das Molekül aufgrund seines negativ geladenen Phosphatrückgrats nach Anlegen einer Spannung in dem entstandenen elektrischen Feld (Butler, 2010). Die Separation der PCR-Produkte ist unter anderem abhängig von der strukturellen Porengröße des Gels sowie von der angelegten Spannung (Haas et al., 1994). Je höher die angelegte Spannung, desto schneller wandern die Moleküle. Das feinporige Grundgerüst eines Polyacrylamid-Gels ist ein gutes Medium zur Auftrennung kurzer DNA-Fragmente (Sajantila et al., 1993).

2.4.3 Laborprotokoll

In regelmäßigen Abständen wurden Filterpapierstreifen auf das Polyacrylamid-Gel aufgelegt und je 3 µl PCR-Produkt aufgetragen. Als Referenz wurde ein 100 bp Längenstandard (Ladder) aufgetragen (3 µl, 1:25 verdünnt). Das Polyacrylamid-Gel wurde einer gekühlten Keramikplatte (10°C) der Elektrophoresestation aufgelegt. Zur Markierung einer Lauffront wurden in Bromphenolblau getränkte Elektrodenstreifen eingesetzt. Unter Berücksichtigung dieses Verlaufsmarkers, wurde die elektrophoretische Auftrennung bei einem konstanten Stromfluss (I 60 mA) und einer Leistung von 25 W für 20-30 min durchgeführt. Zur Visualisierung der PCR-Produkt-Banden wurde das Gel anschließend mit Silber gefärbt (Kapitel 2.5).

2.5 Silberfärbung

2.5.1 Material

Reagenzien	
Salpetersäure (HNO ₃) 1%	Merck
Silbernitrat (AgNO ₃) 0,2%	Merck
Formaldehyd 34%	Merck
Natriumcarbonatlösung (Na ₂ CO ₃) 1000 ml Aqua bidest + 30 g Na-Carbonat	Merck
Essigsäure (CH ₃ COOH) 10%	Merck
Glycerin-Lösung 5%	Merck
Aqua bidest: LiChrosolv [®]	Merck
Geräte	
Schüttelplatte	IKA, Staufen, Deutschland

2.5.2 Methode

Zur visuellen Ergebniskontrolle wurden die in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten DNA-Fragmente gefärbt und die Amplifizierung der DNA-Fragmente dokumentiert. Die Farbintensität der entstandenen PCR-Produkte wurde mit der Färbung der parallel auf dem Gel aufgetrennten Ladder verglichen. Dies ermöglichte eine Abschätzung der amplifizierten PCR-Produktmenge, um den benötigten Proben-Einsatz in der sich anschließenden SNaPshot- oder Sequenzierungs-PCR zu definieren.

2.5.3 Laborprotokoll

- Fixierung der DNA-Fragmente (Oxydation):
Zugabe von 1%iger Salpetersäure für 3 min Gel vollständig bedecken.
- 3x spülen mit Aqua bidest
- Anfärben der DNA-Fragmente:
Zugabe von 0,2%iger Silbernitratlösung für 20 min. Gel vollständig bedecken.
- 3x spülen mit Aqua bidest
- Entwicklung (Reduktion):
200 µl 34%iges Formaldehyd in 200 ml 3%ige Natriumcarbonatlösung.
Dauer abhängig von der gewünschten Farbintensität der PCR-Produkt-Banden
- Stoppen des Reduktionsprozesses:
10%ige Essigsäure für 2 min. Gel vollständig bedecken.
- Aushärtung des Gels:
5%ige Glycerin-Lösung für 30 min. Gel vollständig bedecken.

2.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

2.6.1 Material

Reagenzien	
Fast AP™	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Thermosensitive Phosphatase 1 U/µl	
Exonuclease I, 20 U/µl	Fermentas
Geräte	
Biometra Trio-Thermoblock™	Biometra

2.6.2 Methode

Nach visueller Kontrolle der PCR-Produkte durch die erfolgte Silberfärbung wurden die amplifizierten DNA-Proben aufgereinigt. In den weiteren Analyseschritten wurden nur PCR-Produkte eingesetzt, welche sich auf dem Gel in der zu erwartenden DNA-Fragmentgröße darstellten. Eine blasse Silberfärbung des PCR-Produkts (quantitativer Produktnachweis) wurde in

der anschließenden SNaPshot-Minisequenzierungs-PCR durch höheren Produkt-Einsatz kompensiert. Bei unzureichender Färbung wurde die Probe erneut amplifiziert.

Um das PCR-Produkt von störenden organischen Substanzen zu befreien, wird es durch die Reagenzien Exonuclease I und Fast APTM Thermosensitive Phosphatase aufgereinigt. Die Exonuclease I inaktiviert enzymatisch die im PCR-Produkt überschüssig vorliegenden Nukleotide und baut einzelsträngig vorliegende Primer-Oligonukleotide in 3'→5' Richtung ab (Fermentas, 2011a). Die Fast APTM Thermosensitive Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung an den 5'- und 3'- Enden von DNA und Nukleotiden (Fermentas, 2011b). Im Anschluss kann das Produkt zur Sequenzierung via SNaPshot-PCR eingesetzt werden.

Die Aufreinigung erfolgte laut Herstelleranweisung unter Einsatz eines Thermocyclers. Dem PCR-Produkt (Gesamtvolumen 5 µl) wurden 10 U Exonuclease I und 1 U Fast APTM Thermosensitive Phosphatase hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37°C erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme (15 min bei 80°C). Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Produkt in der SNaPshot-PCR eingesetzt.

2.7 Cycle-Sequenzier-PCR

2.7.1 Material

Reagenzien	
BigDye Terminator v1.1 Ready Reaction Mix	Applied Biosystems
Magic Dye	Red Rabbit, Luckenwalde, Deutschland
Primer	Biomers, Ulm, Deutschland
Geräte	
Flex Cycler PCR Thermocycler	Analytik Jena

2.7.2 Methode

Die eingesetzte Cycle-Sequenzier-PCR basiert auf der Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Zur Sequenzierung eines DNA-Abschnittes werden eine thermostabile DNA-Polymerase, Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs), fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) und (anders als bei der konventionellen PCR) nur ein Primer eingesetzt. Das PCR-Programm besteht aus einem zyklischen Temperaturprofil aus *Denaturierung*, *Annealing* und *Elongation*, in dem letztlich ein einzelner DNA-Strang amplifiziert wird. Durch das Vorliegen nur eines Primers, wird die vorliegende DNA unidirektional amplifiziert. Anders als bei der PCR kann ein amplifizierter DNA-Strang somit nicht als Template für weitere Zyklen dienen, so dass die Cycle-Sequenzier-PCR nicht exponentiell verläuft. Das intermittierende Einbauen von ddNTPs führt zu Kettenabbrüchen (*Dye Terminator*) und somit zu DNA-Fragmenten in verschiedenen Größen, die sich um nur jeweils eine Base unterscheiden und später mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt

werden. Die Gesamtheit aller amplifizierte und fluoreszenzmarkierte Fragmente entschlüsselt schließlich die einzelne Basenpaarabfolge der vorliegenden DNA (Craxton, 1991).

Ansatz der Cycle-Sequenzier-PCR:

- 0,5-3µl aufgereinigte DNA, je nach Intensität der Produktfärbung laut Gelprotokoll
- 1 µl Magic Dye
- 1 µl Ready-Reaction Mix
- 30 µMol Primer
- Gesamtvolumen ad 10 µl (Aqua bidest)

Die Cycle-Sequenzier-PCR wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Tabelle 2-1). Die eingesetzten PCR-Primer mit zugehörigen Primersequenzen sind dem Anhang zu entnehmen (Anhang A.5).

Tabelle 2-1: PCR-Programm Sequenzierung

Aktivierung der Hot-Start DNA-Polymerase	96°C	60 s
25 Zyklen	Denaturierung	96°C 10 s
	Annealing	50°C 5 s
	Elongation	60°C 10 s
Programmende	4°C	---

2.7.3 Aufreinigung des Cycle-Sequenzier-PCR-Produkts

2.7.3.1 Material

Reagenzien	
innuPREP DYEpure Kit	Analytik Jena
Geräte	
Vortex	Cenco Instruments, Breda, Niederlande
Zentrifuge Galaxy DH 16	VWR-International, Darmstadt, Deutschland

2.7.3.2 Methode

Im Anschluss an die Cycle-Sequenzier-PCR folgte die Aufreinigung mit dem innuPREP DYEpure Kit nach Herstelleranweisung (Analytik Jena, 2011a). Das Reagenz entfernt überschüssige fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate aus dem Sequenzieransatz, um Überlagerungen in der sich anschließenden Kapillarelektrophorese zu reduzieren.

2.7.3.3 Laborprotokoll der Aufreinigung des Cycle-Sequenzier-PCR-Produkts mittels innuPREP DYEpure Kit

- 300 µl Dye Removal Buffer in ein Reaktionsgefäß pipettieren.
Cycle-Sequenzier-PCR-Produkt (Kapitel 2.7) hinzufügen und vermischen.
- *Spin Column* auf ein Auffanggefäß setzen und Reaktionsgemisch zugeben.
- 3 min bei 12.000 U/min zentrifugieren. Das Filtrat verwerfen.

- *Spin Filter* auf ein Elution Tube setzen. Zugabe von 12 μ l Aqua bidest.
- 5 min bei Raumtemperatur inkubieren.
- 1 min bei 8.000 U/min zentrifugieren.

Das Eluat enthält die aufgereinigte DNA und kann anschließend in der Sequenzieranalyse mittels Kapillarelektrophorese eingesetzt werden (Kapitel 2.9).

2.8 Minisequenzierung mittels SNaPshot-Assay

2.8.1 Material

Reagenzien	
ABI Prism® SNaPshot™ Multiplex Kit: SNaPshot® Multiplex Ready Reaction Mix	Applied Biosystems
SNaPshot® Primer-Mix	Biomers
Geräte	
Flex Cycler PCR Thermocycler	Analytik Jena

2.8.2 Methode

Allgemeine Methode

Das grundlegende Prinzip der Minisequenzierung zur der Ermittlung von DNA-Nukleotidsequenzen basiert auf der 1977 beschriebenen Sequenziermethode nach Sanger. Zur Synthetisierung der DNA-Probe werden spezifische Primer, eine DNA-Polymerase sowie ein Nukleotidmix aus Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und 2',3'-Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) benötigt. Dabei verhindert das Fehlen der 3'-Hydroxygruppe der ddNTPs bei ihrer Anlagerung die weitere Verknüpfung von Nukleotiden mit dem 5'-Phosphatende eines nächsten Nukleotids, wodurch der Einbau eines ddNTPs einen spezifischen Kettenabbruch induziert und die weitere DNA-Synthese hemmt (Sanger et al., 1977).

Die daran angelehnte SNaPshot-Reaktion basiert auf der Sequenzierung durch Anlagerung einer einzelnen Base (SBE, engl. single base extension). Der SNaPshot-PCR werden ausschließlich ddNTPs zugefügt, dNTPs liegen in der Reaktion nicht vor. Ein einzelnes ddNTP bindet in der Reaktion an das 3'-Ende eines hybridisierten Oligonukleotids (Extensions-Primer), welches genau eine Base vor dem zu untersuchenden Polymorphismus liegt. Aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxygruppe dieses ddNTPs ist keine Anlagerung eines weiteren Nukleotids mehr möglich, wodurch nur eine einzelne, sich direkt dem Extensions-Primer anschließende Base vorliegt. Eine spezifische Fluoreszenzmarkierung der vier verschiedenen ddNTPs dient der späteren Differenzierung im Elektropherogramm. Die Farbgebung eines ermittelten *Peaks* korreliert mit der entsprechenden Base. Eine fünfte Farbe macht den für die spätere Kapillarelektrophorese

(Kapitel 2.9) notwendigen Größenstandard kenntlich (Quintáns et al., 2004). Die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe sind Tabelle 2-2 zu entnehmen (Applied Biosystems, 2000b).

Neben der Sequenzierung einzelner SNPs (Singleplex), ermöglicht die SNaPshot-PCR auch die gleichzeitige Analyse mehrerer SNPs (Multiplex). Sanchez *et al.* konnten die erfolgreiche SNaPshot-Minisequenzierung von 35 Y-chromosomalen SNPs in einer einzigen Multiplex-Reaktion nachweisen (Sanchez et al., 2003).

Tabelle 2-2: Fluoreszenzfarbstoffe der ddNTPs sowie des Längenstandards LIZ120 des ABI PRISM®SNaPshot®-Multiplex-Kits

Didesoxynukleotid (ddNTP)	Fluoreszenzfarbstoff	farbliche Darstellung im Elektropherogramm
ddATP	dR6G	grün
ddCTP	dTAMRA™	schwarz
ddUTP	dROX™	rot
ddGTP	dR110™	blau
Längenstandard	LIZ®	orange

Studienspezifische Methode

Das Laborprotokoll der SNaPshot-PCR (Tabelle A-3) sowie das verwendete Programm des Thermocyclers finden sich im Anhang A.4.1.2. Es ist an die Herstellerempfehlung des ABI Prism® SNaPshot™ Multiplex Kits angelehnt und wurde für Singleplex- und Multiplex-Reaktionen eingesetzt (Applied Biosystems, 2000). Der jeweils eingesetzte SNaPshot-Primer-Mix ist dem Anhang A.4.2 zu entnehmen. Im Multimix wurden die Extensions-Primer unverdünnt eingesetzt. Die SNaPshot-Primersequenzen finden sich im Anhang A.5.

2.8.3 Aufreinigung der SNaPshot-PCR-Produkte

2.8.3.1 Material

Reagenzien	
rAPid Alkaline Phosphatase 1 U/μl	Roche
Geräte	
Flex Cycler PCR Thermocycler	Analytik Jena

2.8.3.2 Methode

In einer SNaPshot-PCR kann die vorliegende Ligase auch unwillkürliche Verknüpfungen von DNA-Fragmenten verursachen, wodurch unspezifische Farbausschläge in der sich anschließenden Kapillarelektrophorese entstehen (Kapitel 2.9). Um Artefakte zu minimieren, wird das PCR-Produkt mit der rAPid Alkaline Phosphatase aufgereinigt. Sie dephosphoryliert das für die Ligase notwendige 5'-Ende der Fragmente und reduziert somit mögliche Verknüpfungsstellen.

Die Aufreinigung des PCR-Produkts geschah nach Herstelleranweisung (Roche Diagnostics, 2006). Nach Zugabe der rAPid Alkaline Phosphatase wurde das Reagenz zur Induktion der Dephosphorylierung inkubiert (10 min bei 37°C) und anschließend hitzeinaktiviert (2 min bei 75°C).

2.9 Kapillarelektrophorese

2.9.1 Material

Reagenzien	
Genetic Analyzer <i>Performance Optimized Polymer</i> , 4%; POP-4™	Applied Biosystems
Längenstandard GeneScan™ 120 LIZ™	Applied Biosystems
Aqua bidest: LiChrosolv®	Merck
Geräte	
ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer Kapillarlänge 47 cm	Applied Biosystems
GeneMapper® ID Software 3.2	Applied Biosystems

2.9.2 Methode

Die Kapillarelektrophorese stellt ein zuverlässiges, reproduzierbares und hochauflösendes Verfahren zur Auftrennung von DNA-Fragmenten dar, bei dem die geladenen DNA-Fragmente bei einer anliegenden Spannung im elektrischen Feld nach physikalischen Parametern wie Ladung und Größe aufgetrennt werden. Da die große Oberfläche der Kapillare gute Hitzeregulation zulässt, ermöglichen hohe angelegte Spannungen eine schnelle und genaue Fragmentanalyse (Mansfield et al., 1996).

Die kapillarelektrophoretische DNA-Sequenzierung sowie die DNA-Fragmentanalyse der fluoreszenzmarkierten SNaPshot-PCR-Produkte wurde mit dem ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer durchgeführt (Kapillare 47 cm, 48 sample tube rack). Die Kapillare wurde mit dem polymeren Trennmedium Genetic Analyzer POP-4™ gefüllt. Unter Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Längenstandards mit DNA-Fragmenten definierter Referenzgrößen, wurde die Größenbestimmung der analysierten Fragmente durchgeführt.

Der Argon-Laser des Analyzers stimuliert die fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotidtriphosphate der SNaPshot-PCR während ihrer Passage durch die Kapillare, so dass die induzierte ddNTP-spezifische Lichtemission unterschiedlicher Wellenlängen spektroskopisch erfasst, durch einen CCD-Sensor (engl. charge-coupled device) detektiert und anschließend digitalisiert werden kann (Applied Biosystems, 2012).

2.9.3 Laborprotokoll der Sequenzanalyse

Das gesamte aufgereinigte Cycle-Sequenzier-PCR-Produkt wurde, in Abhängigkeit der Länge des DNA-Fragments, mit einer Laufzeit von 15-20 min kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Die

graphische Darstellung der analysierten Daten erfolgte mit der *Sequencing Analysis Software* Version 5.2 (Applied Biosystems, 2012).

2.9.4 Laborprotokoll der Fragmentanalyse

Es wurden 0,5 µl aufgereinigtes SNaPshot-PCR-Produkt mit 0,5 µl GeneScan™ 120 LIZ® Längenstandard und 12 µl Aqua bidest in einem Reaktionsgefäß vorbereitet. Der GeneScan™ 120 LIZ® Längenstandard besitzt neun graduierte Referenz-Fragmente (15, 20, 25, 35, 50, 62, 80, 110, 120 bp). Nach Denaturierung der DNA (2 min, 96°C) wurden die Proben unter dem Dye Set E5 Modul und dem Matrix Standard DS-02 aufgetrennt (Laufzeit 15 min). Die graphische Darstellung zur Haplotypisierung der analysierten Daten erfolgte mit der GeneMapper® ID Software 3.2 (Applied Biosystems, 2012). Die Auswertung erfolgte durch zwei voneinander unabhängige Personen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung

Es konnten insgesamt fünf SNaPshot-Assays zur Charakterisierung Y-chromosomaler Haplogruppen etabliert werden. Y-Multi 4 entspricht einem Assay zur Minisequenzierung afrikanischer Proben, Y-Multi 5 dient der Minisequenzierung von zusammengefassten Proben aus den Regionen des Balkans, der Türkei sowie dem Nahen Osten und Y-Multi 6 entspricht einem Assay zur Haplogruppenbestimmung männlicher Proben Nordeuropas. Der Etablierungsprozess ergab die Splittung der Multimixe Y-Multi 5 und Y-Multi 6.

Im Etablierungsprozess wurden relative Primer-Konzentrationen, Primer-Konstellationen und $MgCl_2$ -Konzentration, sowie Annealingtemperatur und Anzahl Reaktionszyklen des Thermocyclers variiert. Ein optimales Gleichgewicht dieser Parameter soll ungleichmäßige oder fehlende Amplifikationsergebnisse verhindern und eine Reproduzierbarkeit der Testergebnisse sicherstellen (Henegariu et al., 1997). In Multiplex-Reaktionen sind Primer-Interaktionen zu verhindern und PCR-Produkte in gleichem Maße zu amplifizieren (Sanchez et al., 2005).

Die Sequenzierung sämtlicher SNPs enthaltenden DNA-Fragmente ergab die erwartete DNA-Basenabfolge. In den dazu notwendigen Singleplex-PCRs konnten die primerspezifischen PCR-Einstellungen ermittelt werden, wobei die initialen Bedingungen in Abhängigkeit von GC-Gehalt und Schmelztemperatur der Primer festgelegt wurden. Anschließend wurden die Primer unverdünnt und in äquimolarer Menge, in einem Mastermix für die Multiplex-PCR zusammengeführt. Das entsprechende allgemeine Laborprotokoll ist Kapitel A.4.1 zu entnehmen.

Zur Etablierung der SNaPshot-Assays wurden die Primerpaare der zu untersuchenden SNPs vorab in Singleplex-SNaPshot-PCRs getestet (Kapitel 2.8). Anschließend wurden die Extensions-Primer unverdünnt in einem Mastermix zusammengeführt. Das entsprechende allgemeine Laborprotokoll ist Kapitel A.4.1 zu entnehmen.

Die anfänglichen Etablierungsschritte wurden genutzt, um Basenpaar-Positionen der entsprechenden Panels und Bins, also der voreingestellten erwarteten Fragmentgröße (Primer plus Base des Polymorphismus) sowie der erwarteten Base, in der Analysesoftware GeneMapper® ID Software 3.2 zu definieren.

3.1.1 Y-Multi 4

Die Y-Multi 4 ist ein Assay zur Minisequenzierung von Haplogruppen afrikanischen Ursprungs aus Regionen Nord- und Westafrikas. Sie subtypisiert die Y-Haplogruppen B und E, wobei ein Fokus auf Haplogruppenast E1b1 lag (Abbildung A-2, Anhang A.6). Die DNA-Fragmentgrößen der

Multiplex-PCR-Produkte lagen zwischen 83-279 bp. Die eingesetzten PCR-Primer hatten eine Länge von 20-25 Nukleotiden. Die Länge der Extensions-Primer lag zwischen 18-60 Nukleotiden.

Etablierungsprozess

Der erste Primer-Mix der Multiplex-PCR Y-Multi 4 beinhaltete 13 Primerpaare zur Amplifizierung der SNPs M2, M33, M35, M75, M108, M112, M146, M150, M152, M182, M215, p2 und p147. In Abhängigkeit der vorangegangenen Singleplex-PCRs, wurde der Primereinsatz im Multiplex-PCR-Mix für alle Primerpaare in gleicher Konzentration (je 2,8 μM), mit Ausnahme von M75 (4,8 μM), gewählt.

Die Primer-Anzahl der Y-Multi 4 wurde während der Etablierung nicht verändert. In der PCR traten keine Überlagerungsartefakte auf. Geringfügige Primerinteraktionen konnten durch Modifizierung der Programmeinstellungen (MgCl_2 -Konzentration, PCR-Zyklusanzahl) sowie durch Konzentrationsänderungen der Primer behoben werden. Aufgrund mangelhafter Amplifizierung wurden die Konzentrationen der Primerpaare M35 und M75 erhöht. Während der Etablierung des Y-Multi 4-SNaPshot-Multimixes lieferten alle Extensions-Primer qualitativ und quantitativ gute Amplifizierungsergebnisse. In der anfänglichen Testphase wurden pro Multiplex-PCR-Ansatz 3-5 männliche DNA-Proben eingesetzt, deren gute Probenqualität aus vorausgegangenen DNA-Analysen bekannt war.

Die beste Primer-Performance der vorausgegangenen Singleplex-PCRs lag bei einer Annealingtemperatur von 60°C, sodass diese Temperatur für die erste Y-Multi-4 Multiplex-PCR übernommen wurde. Die PCR-Zyklusanzahl variierte zwischen 30 und 35 Zyklen, wobei die beste PCR-Produktausbeute bei einer Zyklusanzahl von 35 lag (PCR-Programm Tabelle A-2: Zyklusanzahl 35, Annealingtemperatur 60°C). Bei einem DNA-Einsatz von 1-3 ng wurde aufgrund positiver Erfahrungswerte eine MgCl_2 -Gesamtkonzentration von 1,8 mM gewählt. Bei geringerer MgCl_2 -Konzentration (1,7 mM), einer Zyklusanzahl von 35 und einer Annealingtemperatur von 60°C, waren in der sich anschließenden visuellen Ergebniskontrolle (Polyacrylamid-Gel) keine DNA-Produkte nachweisbar. Aufgrund der schlechteren Amplifikationsperformance bei geringeren MgCl_2 -Konzentration, wurden entsprechende Ansätze verworfen. Zugunsten der Effizienz wurde eine endgültige MgCl_2 -Gesamtkonzentration von 1,8 μM für den Mastermix der Y-Multi 4 Multiplex-PCR festgelegt. Der Multiplex-PCR-Mastermix konnte problemlos etabliert werden.

Im ersten SNaPshot-PCR-Multimix wurden 11 der 13 Extensions-Primer in gleichen Konzentrationen von 2,4 μM eingesetzt. Aufgrund von schlechter Amplifikationsperformance von M75 und M33 in anderen Etablierungsarbeiten, wurden die SNaPshot-Primereinsätze initial erhöht (M75 4,8 μM , M33 3,2 μM). Im ersten Ansatz waren die SNPs M152, p147, p2, M146, M2, M150, M33 und M112 nachweisbar und ließen sich im Elektropherogramm klar abgrenzen. Die SNaPshot-

Primer-Konzentrationen der SNPs p2, M2, M146, M150, M33 und M112 mussten während des gesamten Etablierungsprozesses nicht mehr verändert werden.

Das DNA-Fragment für den SNP M215 stellte sich in der Multiplex-PCR gut dar, allerdings konnte in der Kapillarelektrophorese kein Peak dargestellt werden. Um eine mögliche Überlagerung durch andere Allele auszuschließen, wurde der Extensions-Primer um 2 bp verlängert und in einer höheren Konzentration (3,6 μM) eingesetzt. Das Endergebnis blieb jedoch mangelhaft. Aufgrund der hierarchischen Abfolge des SNPs M215 auf M35 (Y-Multi 4 Haplogruppen-Diagramm: Abbildung A-2, Anhang A.6) konnte das Ergebnis dennoch als ausreichend etabliert gewertet werden: Da das Allel G des SNPs M35 nur auftreten kann, wenn M215 einem C entspricht, bietet diese Abhängigkeit eine zusätzliche Kontrollmöglichkeit. Im Falle eines M35-G muss auch der übergeordnete SNP M215 das variante Allel aufweisen. Da nur bei M35-G kein M215-Peak im Elektropherogramm darstellbar war (Abbildung 3-2), konnte eine Unzuverlässigkeit ausgeschlossen werden, wenn auch der konkurrierende SNP M2 das Wildtypallel zeigte. Dabei war M2 im gesamten Etablierungsprozess zuverlässig. Die beschriebene doppelte Rückversicherung erlaubte es somit, einzelne unklare SNPs in der Evaluation des gesamten Analyseergebnisses als ausreichend etabliert zu werten, obschon ihre Darstellung mangelhaft war. Voraussetzung ist die Berücksichtigung aller analysierten SNPs des entsprechenden Haplogruppen-Diagrammes.

M35 stellte sich anfangs auch nach Konzentrationserhöhung des Multiplex-PCR-Primerpaares nicht im SNaPshot-Assay dar. Zur Validierung wurden erneute Singleplex-PCRs (PCR-Zyklusanzahl 30 und 35, MgCl_2 -Konzentration 1,8 mM) gestartet. Anschließend wurde auch die Konzentration des SNaPshot-Primers im SNaPshot-Multimix erhöht, sodass der SNP im Elektropherogramm zwar klein, aber nachweisbar war.

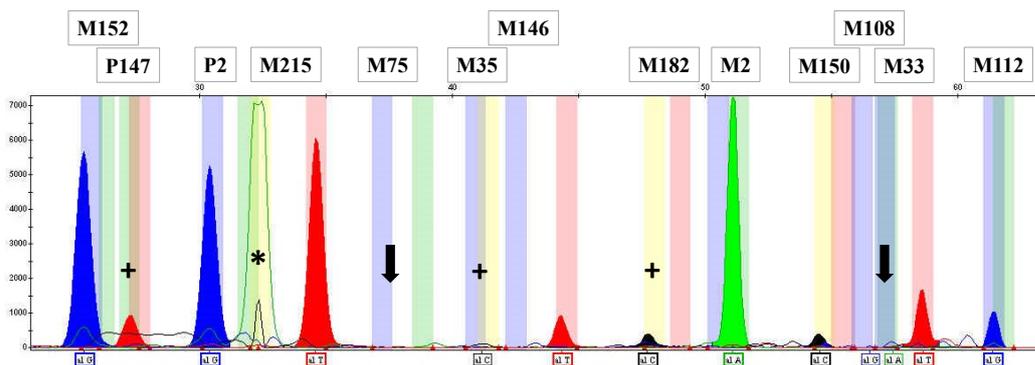


Abbildung 3-1: Elektropherogramm der Y-Multi 4 während des Etablierungsprozesses

Abbildung 3-1 zeigt das Elektropherogramm der Y-Multi 4 im Verlauf des Etablierungsprozesses. Die Pfeile markieren M75 und M108 vor Modifizierung ihrer SNaPshot-Primer, das Plus-Zeichen markiert SNPs, deren Peak-Größe durch Erhöhung der Extensionsprimer-Konzentrationen noch

verbessert werden sollte und das *Sternchen* markiert ein während der Etablierung konstantes Artefakt A.

M75 konnte weder initial, noch nach Primer-Konzentrationserhöhung amplifiziert werden. Da Singleplex-PCR und Minisequenzierung gute Ergebnisse lieferten, wurde das PCR-Produkt einer Y-Multi 4 eingesetzt, um eine M75 SNaPshot-Singleplex-PCR durchzuführen. Der experimentelle Ansatz lieferte kein ausreichend spezifisches Ergebnis. Daraufhin wurde der M75 SNaPshot-Primer um 4 bp verlängert (M75s2) und lieferte nach Titration seiner Primer-Konzentration ein verwertbares Ergebnis in der Minisequenzierung.

Aufgrund eines unzureichenden M182-Signals im Elektropherogramm, wurde die SNaPshot-Primer-Konzentration titriert, bis der Polymorphismus klar abgrenzbar darstellbar war. M108 war artefaktüberlagert, sodass der SNaPshot-Primer zur besseren Differenzierung um 26 bp verlängert wurde (M108.1). Bei persistierend schwachem Signal von M108.1 diente der zuverlässige SNP M152 als Rückversicherung (Y-Multi 4 Haplogruppen-Diagramm: Abbildung A-2, Anhang A.6). Bei überschießendem Signal und Überlagerung von p147 in der Minisequenzierung wurde die Konzentration des SNaPshot-Primers M152 auf 2 μM reduziert und p147 schrittweise erhöht.

Abbildung 3-2 zeigt ein exemplarisches Minisequenzierungsergebnis der Y-Multi 4 zur Y-chromosomalen Haplogruppenbestimmung nach abgeschlossener Etablierung. Der *Pfeil* markiert das beschriebene Fehlen des M215-Peaks bei Vorliegen eines M35-G.

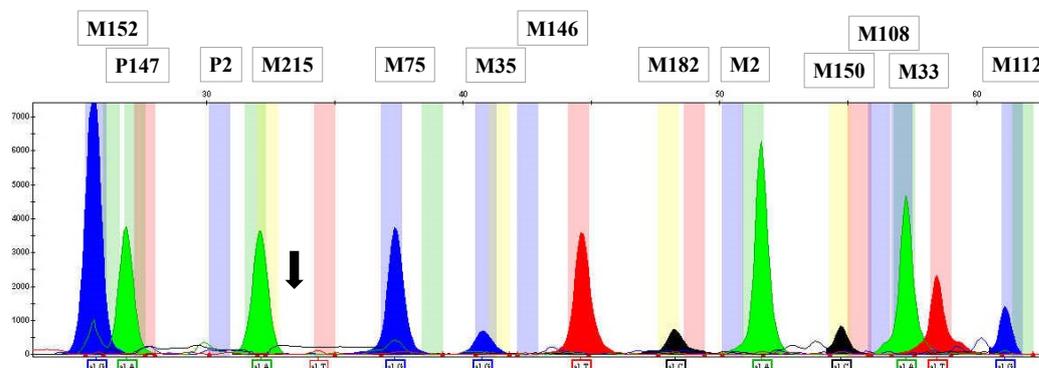


Abbildung 3-2: Elektropherogramm der Y-Multi 4 nach abgeschlossener Etablierung

Die endgültigen Daten zu Primerkonzentrationen, MgCl_2 -Konzentrationen, Annealingtemperatur und Zyklenzahl sind dem Laborprotokoll zu entnehmen (Anhang A.4.2.1).

Im Anschluss an die Etablierung konnten anhand der Y-Multi 4 insgesamt 126 männliche Proben den Haplogruppenstämmen E (n=124) und B (n=2) sowie ihren Subgruppen zugeordnet werden.

3.1.2 Y-Multi 5

Mit der Y-Multi 5 wurde ein Assay zur Minisequenzierung von Y-Haplogruppen der Regionen des Balkans, der Türkei sowie des Nahen Ostens etabliert. Die Y-Multi 5 dient der Subtypisierung der

großen Y-Haplogruppenzweige I und J, sowie der orientierenden Einteilung der Haplogruppen G und H (Abbildung A-3, Anhang A.6). Die DNA-Fragmentgrößen der Multiplex-PCR-Produkte lagen zwischen 68-194 bp. Die PCR-Primer hatten eine Länge von 20-29 Nukleotiden. Die Länge der Extensions-Primer betrug 19-59 Nukleotide. Da der Multiplex-PCR-Primer p3741 ein DNA-Fragment amplifiziert, auf dem zwei SNPs (p37.2, p41.2) lokalisiert sind, wurden 16 SNPs auf insgesamt 15 amplifizierten DNA-Fragmenten untersucht.

Etablierungsprozess

Der initiale Primer-Mix der Multiplex-PCR Y-Multi 5 beinhaltete zunächst 14 Primerpaare (M12, M21, M26, M67, M69, M170, M172, M201, M253, M267, M285, p58, p215, p287). In Abhängigkeit von den vorangegangenen Singleplex-PCRs, wurden die Primer im Multiplex-PCR-Mix, mit Ausnahme von M170 (4,8 μ M) und M12 (4,0 μ M), für fast alle Primerpaare in gleicher Konzentration (je 2,8 μ M) eingesetzt. Die Programmeinstellungen der ersten Multiplex-PCR wurden wie folgt gewählt: Annealingtemperatur 60°C, PCR-Zyklusanzahl 35, 1,8 mM MgCl₂ (allgemeines Multiplex-PCR-Programm: Tabelle A-2). Anfänglich wurden pro Multiplex-PCR-Ansatz fünf männliche DNA-Proben eingesetzt, von denen eine gute Probenqualität aus vorausgegangenen DNA-Analysen bekannt war. Diese Proben wurden aufgrund bekannter Polymorphismen zur Austestung der eingesetzten SNPs gewählt. Im ersten SNaPshot-PCR-Multimix wurden 11 der 14 Extensions-Primer in gleichen Konzentrationen von 2,8 μ M eingesetzt. Aufgrund kleiner Peaks in den SNaPshot-Singleplex-PCRs, wurden die initialen SNaPshot-Primer-Konzentration von M170, M172 und M12 auf 4,0 μ M erhöht.

Aufgrund von Artefakten und mangelnder Abgrenzbarkeit einzelner SNPs, wurde die erste Minisequenzierung verworfen und die relativen Primer-Konzentrationen im Multiplex-PCR-Multimix verändert. Für ein homogenes Analyseergebnis wurde der Primereinsatz überschüssiger Peaks (bspw. M201, M267) reduziert und der Primereinsatz schwacher Loci erhöht (bspw. M21, M253, p215). Dem neuen Y-Multi 5 Multiplex-PCR-Mix wurde ein 15. Primer (p3741) hinzugefügt. M201, M285, p287 und p58 lieferten zuverlässige Analyseergebnisse. Die Konzentrationen der anderen SNPs wurden experimentell verändert, sodass die Einzelprimerkonzentrationen (a/b) eines Primerpaares variierten (2-4,8 μ M je Einzelprimer). Zur Maximierung der Produktausbeute und Minimierung störender Nebenprodukte, wurden PCR-Zyklusanzahl und Annealingtemperatur des PCR-Programms in verschiedenen Konstellationen kombiniert (PCR-Zyklus: 30/35, Annealingtemperatur: 55°C, 58°C, 60°C) und der MgCl₂-Einsatz variiert (Gesamt-MgCl₂: 1,5-1,9 mM). Die Multiplex-PCRs wurden mit drei männlichen DNA-Proben getestet.

PCR-Produkte konnten nur bei einer Annealingtemperatur von 60°C und 1,9 mM MgCl₂ amplifiziert werden. Die differenzierte Konzentrationsänderung der Einzelprimer a/b führte zu keiner Ergebnisverbesserung. Nur M285, p287, M201 und M267 waren zuverlässig und differenzierbar darstellbar, p58 eindeutig, aber unbeständig.

Abbildung 3-3 zeigt eines der ersten Minisequenzierungsergebnisse des Y-Multi 5-Multimixes. Die *Pfeile* markieren die in diesem Multimix nicht darstellbaren SNPs (M69, M12, M21, M253, P215, M67, P37, P41).

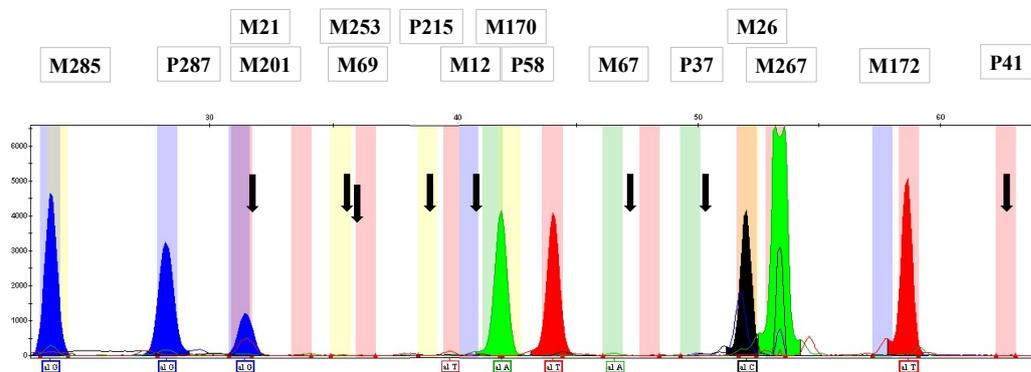


Abbildung 3-3: Elektropherogramm der anfänglich ungesplitteten Y-Multi 5

Für einen balancierten PCR-Produktertrag aller SNPs, wurden Y-Multi 5-Multiplex-PCR- und SNaPshot-PCR-Multimix gesplittet und die Primer-Konzentrationen titriert (Y-Multi 5A 2-4,8 μ M, Y-Multi 5B 2,8-3,2 μ M):

- Y-Multi 5A (M26, M170, M172, M201, M267, M285, p58, p215, p287)
- Y-Multi 5B (M12, M21, M67, M69, M253, p3741)

Das Polyacrylamid-Gel korrelierte jedoch nicht mit der zu erwartenden Anzahl von DNA-Fragmenten, Peaks der Minisequenzierung waren zu klein und somit unspezifisch und überschießend große Peaks führten zu Artefakten, sodass keine sichere Differenzierung der einzelnen Polymorphismen möglich war. In der Y-Multi 5A waren M170 und p215 nicht, M172 nur vage darstellbar. M26 stellte sich gut dar, war jedoch von M267 überlagert. In der Y-Multi 5B wurde M69 von M253 überlagert und M12 war nicht darstellbar. Da effizient zu amplifizierende Loci durch ihre maximale Enzym- und Nukleotidausschöpfung das Substratangebot schwacher Loci verringern (Henegariu et al., 1997), wurden entsprechende Primer zwischen Y-Multi 5A und Y-Multi 5B ausgetauscht (bspw. M69 und M12 von Y-Multi 5B in Y-Multi 5A).

Nach Austausch von SNPs zwischen Y-Multi 5A und -5B, war p287 (Y-Multi 5A) unzuverlässig nachweisbar und M69 (Y-Multi 5A) stellte sich nur bei p58- und M267-Polymorphismen dar (Abbildung 3-4). Der *Pfeil* markiert den SNP M69, die *Sternchen* markieren die Polymorphismen.

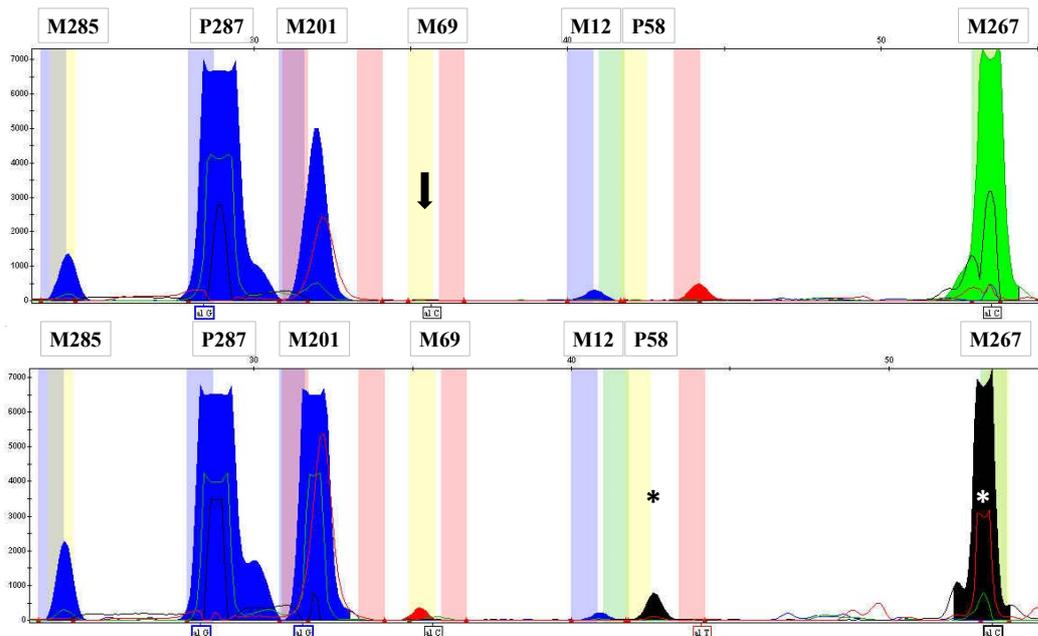


Abbildung 3-4: Elektropherogramm der Y-Multi 5A mit inkonstant darstellbarem SNP M69

In der Y-Multi 5B waren nur M67 und p37.2 nachweisbar. Die Überlagerung des M267-Polymorphismus durch M26 (anfänglich Y-Multi 5A) führte zu einer weiteren Trennung der SNPs (M26 von Y-Multi 5A in Y-Multi 5B). Hier war M26 nicht konstant nachweisbar (Abbildung 3-5), was die Auswertung bei zuverlässigem P41.2 jedoch nicht beeinträchtigte. Abbildung 3-5 zeigt ein exemplarisches Minisequenzierungsergebnis einer männlichen DNA-Probe mit den Y-Multi 5 SNaPshot-Assays nach Abschluss des Etablierungsprozesses. Der Pfeil markiert diesen nur inkonstant amplifizierbaren SNP M26.

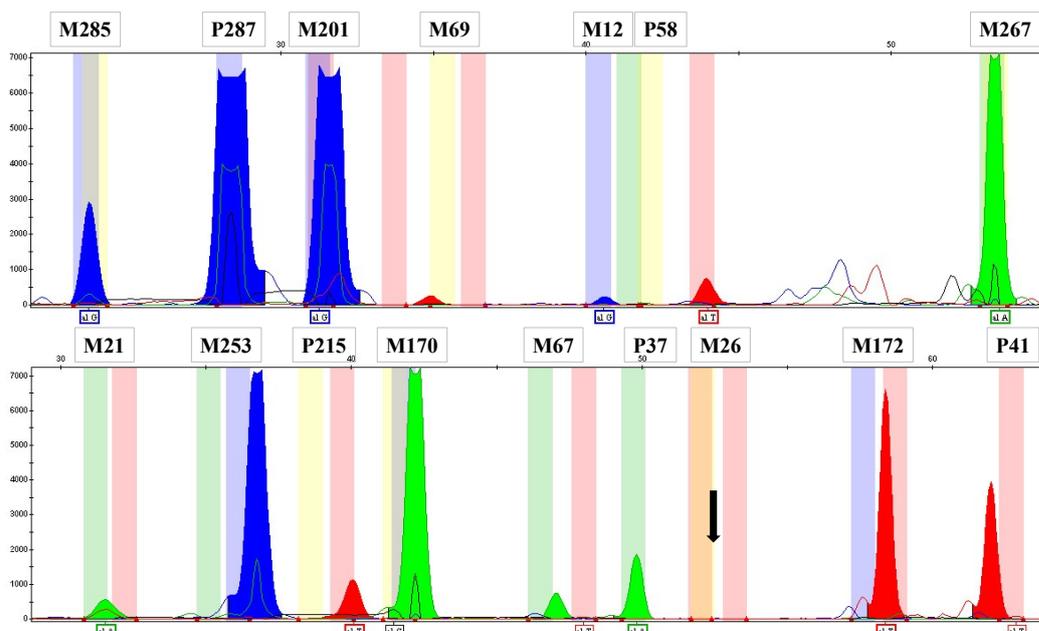


Abbildung 3-5: Elektropherogramm der Y-Multi 5A und Y-Multi 5B einer DNA-Probe nach Abschluss des Etablierungsprozesses

Der endgültige Y-Multi 5A- und Y-Multi 5B Multiplex-PCR- und SNaPshot-Multiplex-Primer-Mix sowie die endgültigen Daten zu Primerkonzentrationen, MgCl₂-Konzentrationen, Annealingtemperatur und Zyklenzahl sind dem Laborprotokoll zu entnehmen (Anhang A.4.2.2).

Im Anschluss an die Etablierung konnten anhand der Y-Multi 5 insgesamt 161 männliche Proben den Haplogruppen G (n=18), H (n=16), I (n=26) und J (n=101) bzw. ihren Untergruppen zugeordnet werden.

3.1.3 Y-Multi 6

Mit der Y-Multi 6 wird ein Assay zur Minisequenzierung von Y-Haplogruppen der Regionen Nordeuropas etabliert. Die Y-Multi 6 subtypisiert die Haplogruppe R mit ihren Hauptästen R1a und R1b und dient der orientierenden Einteilung der Haplogruppen K, L, Q und T1 (Abbildung A-4, Anhang A.6). Die DNA-Fragmentgrößen der Multiplex-PCR-Produkte lagen zwischen 61-229bp. Die Multiplex-PCR-Primer hatten eine Länge von 18-27 Nukleotiden. Die Länge der Extensions-Primer betrug 19-62 Nukleotide.

Etablierungsprozess

Der erste Primer-Mix der Multiplex-PCR Y-Multi 6 beinhaltete zunächst 17 Primerpaare zur Amplifizierung der SNPs M17, M20, M27, M73, M124, M147, M173, M242, M269, M317, M320, M343, M412, ps21, p77, L23 und L131.

Trotz mehrfacher Veränderungen der Primer- und MgCl₂-Konzentrationen sowie diversen Variationen im PCR-Programm gelang es nicht, alle SNPs in einem Assay darzustellen. Daher wurden die SNPs in verschiedenen Zusammenstellungen auf zwei Multiplex-Ansätze aufgeteilt. Durch zahlreiche Veränderungen der Primerkonzentrationen und der Annealingtemperatur konnten schließlich zwei Assays etabliert werden.

- Y-Multi 6C (M20, M173, M242, M343, ps21, p77, L23)
- Y-Multi 6D (M17, M27, M73, M124, M147, M269, M317, M412, L131)

Da der SNP M320 im gesamten Etablierungsprozess schwer darstellbar war und zu Interferenzen führte, wurde er vollständig aus der Y-Multi 6 ausgeschlossen. Er definiert die Haplogruppe T1a1 in der Endstrecke eines Astes des Haplogruppen-Diagramms der Y-Multi 6 (Abbildung A-4, Anhang A.6). P77 definiert die Haplogruppe T1a2 derselben Ebene des phylogenetischen Stammbaumes und liefert zusammen mit den hierarchisch übergeordneten SNPs ps21 und L131 auch ohne M320 indirekt Informationen zur genaueren Subtypisierung der Haplogruppe T1. Somit konnte zugunsten einer guten Primerperformance der gesamten Y-Multi 6-Multiplex-PCR auf die Minisequenzierung von M320 verzichtet werden.

Abbildung 3-6 zeigt ein exemplarisches Minisequenzierungsergebnis einer männlichen DNA-Probe mit den Y-Multi 6 SNaPshot-Assays. Der endgültige Y-Multi 6C- und Y-Multi 6D Multiplex-PCR-

und SNaPshot-Multiplex-Primer-Mix sowie die endgültigen Daten zu Primerkonzentrationen, $MgCl_2$ -Konzentrationen, Annealingtemperatur und Zyklenzahl sind dem Laborprotokoll zu entnehmen (Anhang A.4.2.3).

Im Anschluss an die Etablierung konnten anhand der Y-Multi 6 insgesamt 96 männliche Proben den Haplogruppen L (n=7), R (n=76) und T (n=13) bzw. ihren Subgruppen zugeordnet werden.

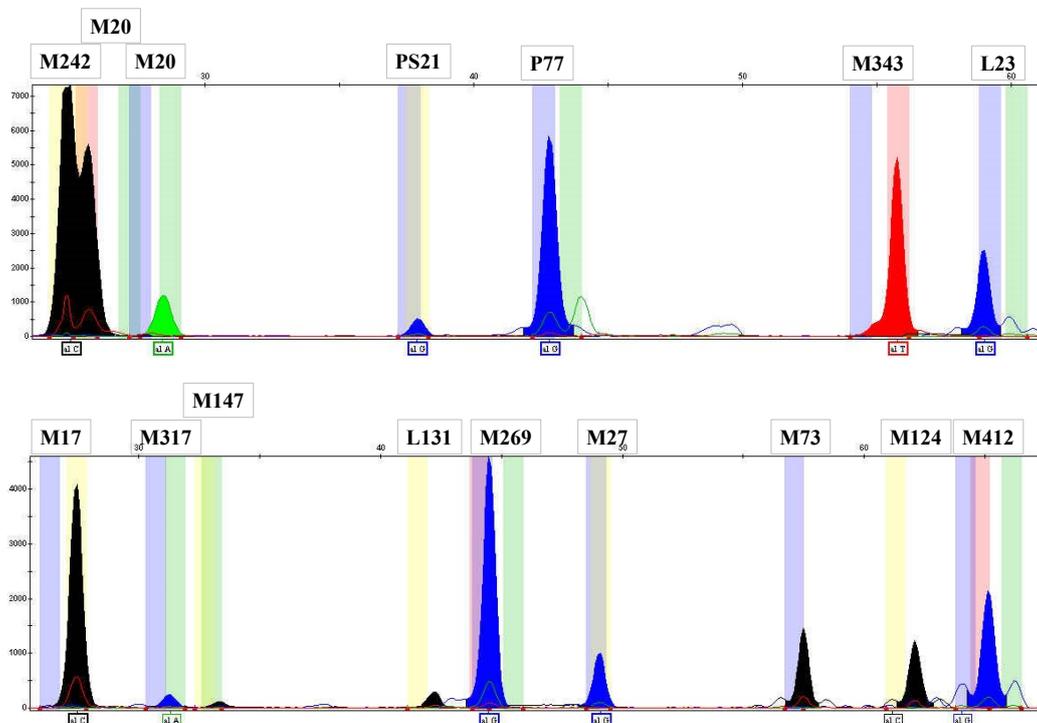


Abbildung 3-6: Elektropherogramm der Y-Multi 6C und Y-Multi 6D einer DNA-Probe nach Abschluss des Etablierungsprozesses

3.2 Geographische Auswertung

In diesem Kapitel wird die regional ermittelte Haplogruppenverteilung der insgesamt 385 DNA-Proben 22 verschiedener Herkunftsländer dargestellt. Dabei werden die Metapopulationen Nord- und Westafrika, Balkan, Naher Osten, Türkei und Nordeuropa entsprechend der drei etablierten Multiplex-Assays betrachtet. Die Prozentwerte in Abbildungen und Tabellen sind gerundet. Die Summe der Prozentwerte ergibt daher möglicherweise nicht 100%.

Nordafrika

Die 65 Proben Nordafrikas stammten aus Marokko (n=51), Tunesien (n=10) und Algerien (n=4). Der Großteil nordafrikanischer Proben war Haplogruppe E (und Subhaplogruppen) zuzuordnen (64,6%). 21,5% der Proben waren Subgruppen der Haplogruppe J zugehörig. Vor allem in Proben Marokkos war Hg J (23,6%), primär Hg J1, vertreten. 56,9% aller Proben Nordafrikas wurden der spezifischen Haplogruppe E1b1b1 zugeordnet. Es konnte gezeigt werden, dass diese Haplogruppe in nordafrikanischen Ländern am häufigsten vorkommt (50-70%). Vereinzelt Proben (Algerien n=1,

Marokko (n=2) gehörten in Haplogruppe R. Abbildung 3-7 veranschaulicht die Haplogruppenverteilung Nordafrikas.

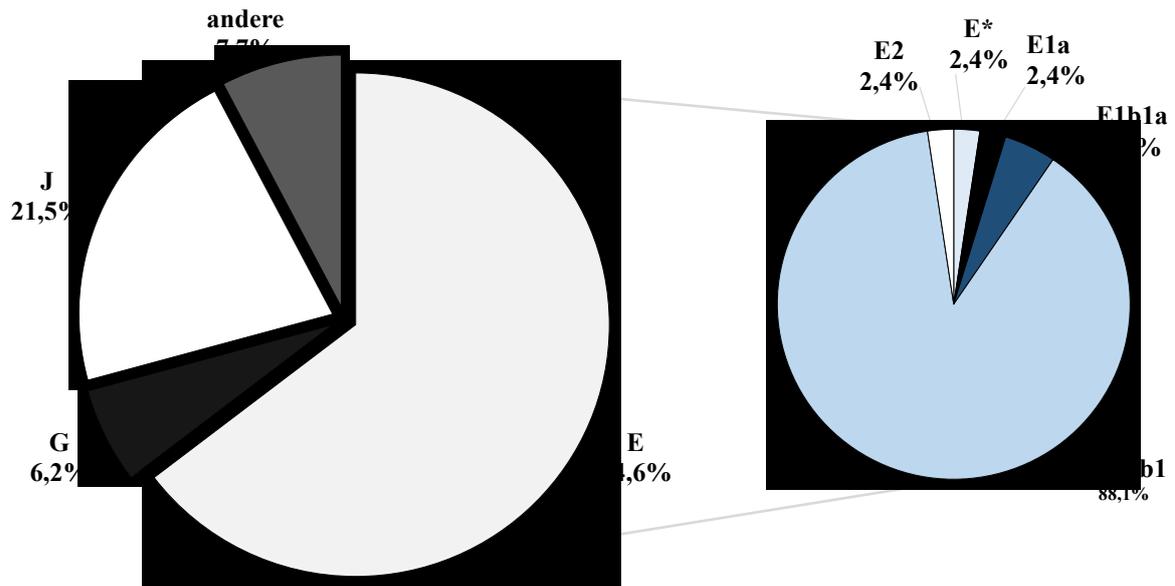


Abbildung 3-7: Haplogruppenverteilung innerhalb Nordafrikas

Westafrika

Die 49 Proben Westafrikas stammten aus Ghana (n=17), Guinea (n=6), Kamerun (n=11), Nigeria (n=14) und Sierra Leone (n=1). Sie wurden zu 96% Haplogruppe E (und Subgruppen) zugeordnet. 74% aller Proben entsprachen Haplogruppe E1b1a, 11% waren Hg E2 zuzuordnen. 13% der Proben aus Haplogruppe E konnten anhand der Y-Multi 4 nicht genauer differenziert werden. Nur zwei ghanaische Proben konnten keinen Subgruppen der Hg E zugeordnet werden (1x B*, 1x R1b). Verglichen mit Nordafrika, wurde für Proben Westafrikas eine homogenere Haplogruppenverteilung ermittelt. Dies wird durch Abbildung 3-8 verdeutlicht.

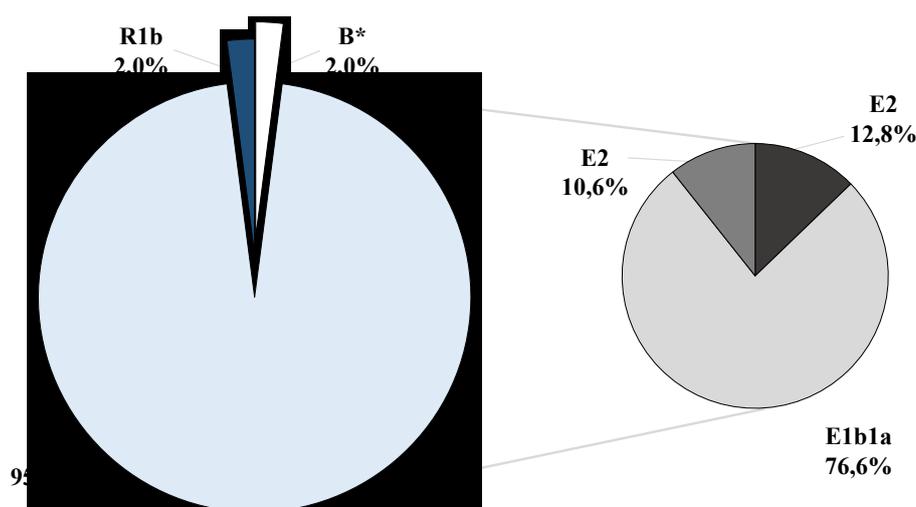


Abbildung 3-8: Haplogruppenverteilung innerhalb Westafrikas

Die genauen Haplogruppenverteilungen der Metapopulationen Nordafrika und Westafrika gehen aus Tabelle 3-1 hervor.

Tabelle 3-1: Detaillierte Haplogruppenverteilungen innerhalb der Metapopulationen Nord- und Westafrika

		Metapopulationen							
		Nordafrika			Westafrika				
		Algerien (n=4)	Marokko (n=51)	Tunesien (n=10)	Ghana (n=17)	Guinea (n=6)	Kameru n(n=11)	Nigeria (n=14)	Sierra Leone (n=1)
Haplogruppen	B*				0,059				
	B1a		0,02						
	E				0,059	0,5	0,091	0,071	
	E*		0,02						
	E1a		0,02						
	E1b1a	0,5	0,039		0,765	0,167	0,818	0,857	1
	E1b1b1		0,55	0,7					
	E2			0,1	0,059	0,333	0,091	0,071	
	E2*	0,25							
	G*		0,02						
	G2		0,039						
	J1*		0,059						
	J1e		0,157	0,1					
	J2*		0,02	0,1					
	R1b	0,25			0,059				
R1b1b		0,039							
T		0,02							

Balkan

Die 73 Proben des Balkans stammten aus Albanien (n=1), Bosnien und Herzegowina (n=4), Kosovo (n=24), Kroatien (n=9), Mazedonien (n=8), Rumänien (n=2) und Serbien (n=25). Anhand der analysierten Proben war aufgrund der heterogenen Haplogruppenverteilung keine spezifische Haplogruppe für die Balkanregion zu definieren. Es waren die fünf großen Haplogruppenstämme E, H, I, J und R sowie vereinzelt Hg T1b nachweisbar.

Tabelle 3-2: Detaillierte Haplogruppenverteilungen innerhalb der Balkanregion

		Metapopulationen						
		Albanien (n=1)	Bosnien und Herzegowina (n=4)	Kosovo (n=24)	Kroatien (n=9)	Mazedonien (n=8)	Rumänien (n=2)	Serbien (n=25)
Haplogruppen	E1b1b1	1	0,25	0,208		0,375		0,16
	H			0,083				0,36
	I*		0,25	0,083	0,444			
	I2			0,83	0,111	0,125	0,5	0,08
	J1e				0,111		0,5	
	J2*			0,042	0,111			0,08
	J2a2		0,25	0,333		0,125		0,12
	L*							0,04
	R1a1		0,25					
	R1b1b			0,167	0,222	0,25		0,12
T1b					0,125		0,04	

Der größte Bevölkerungsanteil des Balkans war mit 26% aller Proben der Haplogruppe J (und Subgruppen) zuzuordnen, wovon zweidrittel dieser Proben Hg J2a2 zugehörig waren. Haplogruppe H war mit 15,1%, Haplogruppe I mit 19,2% und Haplogruppe R mit 16,4% vertreten.

Die Hg E1b1b1 trat in der Balkanregion mit einer Häufigkeit von 19,2% auf. Die genaue Haplogruppenverteilung der Metapopulation Balkan geht aus Tabelle 3-2 hervor.

Türkei

Es wurden insgesamt 104 DNA-Proben türkischer Männer analysiert. Die genaue Haplogruppenverteilung der analysierten Proben geht aus Abbildung 3-9 hervor. Die erhobenen Daten ergaben eine geographische Häufung der Haplogruppenstämme J (28,8%) und R (32,7%). Innerhalb des Haplogruppenstammes J war die Subhaplogruppe J2* mit 50 % (n=15) am häufigsten vertreten und entsprach mit 14,4% der häufigsten Haplogruppe aller türkischen Proben. Die zweithäufigste Haplogruppe war Hg R1b1b (13,5%), am dritthäufigsten traten Haplogruppe E1b1b1 und Haplogruppe G (nicht genauer subtypisiert) auf (je 11,5%). 16 weitere Proben wurden insgesamt 7 unterschiedlichen Haplogruppen zugeordnet, die nur vereinzelt nachgewiesen wurden oder nicht genauer subtypisiert werden konnten (Haplogruppen C, H, I2*, I2a1a, L*, T*, T1b). Aufgrund der ermittelten Haplogruppenvielfalt der Türkei konnten zwar Schwerpunkte in der Haplogruppenverteilung ermittelt werden, eine spezifische Haplogruppe konnte jedoch nicht definiert werden.

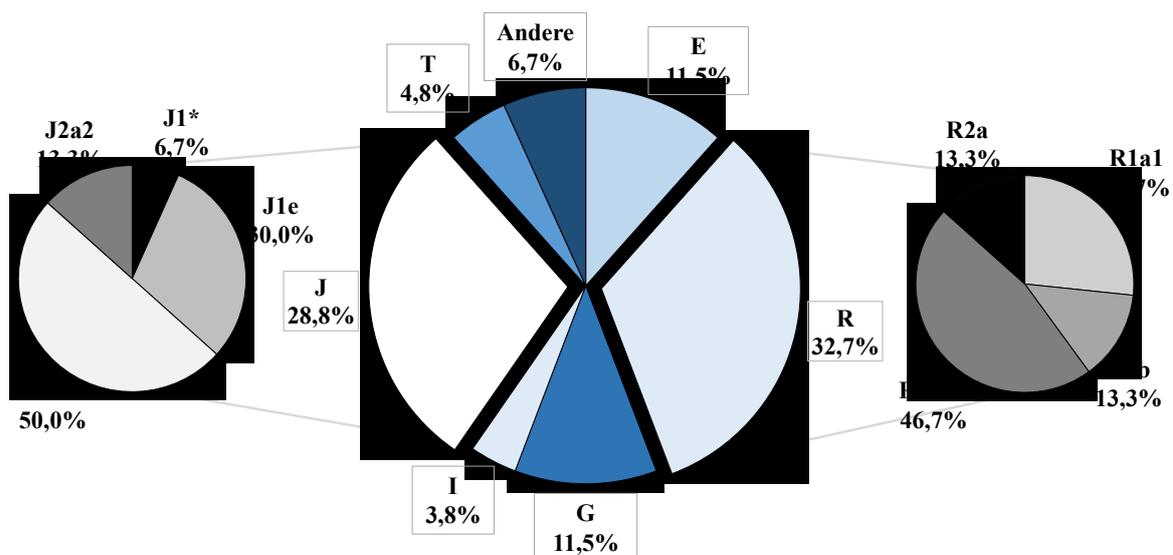


Abbildung 3-9: Haplogruppenverteilung innerhalb der Türkei

Naher Osten

Die 63 Proben des Nahen Ostens stammten aus dem Irak (n=17), dem Iran (n=6), Israel (n=1), dem Libanon (n=32) und Syrien (n=7). Die genaue Y-Haplogruppenverteilung innerhalb der Länder geht aus Tabelle 3-3 hervor. Die ermittelte Haplogruppenverteilung zeigte ein vermehrtes Auftreten der Hg J*, die in 58,7% der Proben des Nahen Ostens auftrat. Davon war jeweils ein Drittel der Proben der Hg J2 sowie Hg J2a2 zuzuordnen (n=12). Mit je 19% entsprachen sie den zwei insgesamt häufigsten Haplogruppen des Nahen Ostens. Haplogruppe R (Subtypisierungen einschließlich) hatte den zweitgrößten Anteil an Proben des Nahen Ostens (12,7%), ein länderspezifisches Auftreten war

jedoch nicht abgrenzbar. Nur 9,5% der Population, vor allem Proben libanesischer Herkunft, waren dem drittgrößten Haplogruppenstamm E zuzuordnen.

Tabelle 3-3: Detaillierte Haplogruppenverteilungen der Metapopulation Naher Osten

		Metapopulationen				
		Irak (n=17)	Iran (n=6)	Israel (n=1)	Libanon (n=32)	Syrien (n=7)
Haplogruppen	E1b1b1		0,167		0,094	
	E2				0,063	
	G*				0,031	
	G2				0,031	
	H		0,167		0,031	
	J1*				0,094	
	J1e	0,236			0,188	
	J2*	0,353	0,167		0,125	0,143
	J2a2	0,176		1	0,156	0,429
	L*	0,118				
	L1					0,143
	R1a1	0,059	0,333			
	R1b				0,031	
	R2a				0,094	0,143
T1b	0,059	0,167		0,063	0,143	

Nordeuropa

In der Analyse nordeuropäischer Proben (n=31) war Haplogruppe R am häufigsten nachweisbar (58,1%), wobei sie meist den zwei Haplogruppenästen R1a1 und R1b1b1a zuzuordnen waren. Zusammen mit dem Haplogruppenstamm I (25,8%) entsprachen sie den drei häufigsten Haplogruppen Nordeuropas. Haplogruppe E1b1b1 (9,7%) trat selten auf und Hg A und J1* wurden nur einmalig nachgewiesen, so dass die ermittelte Haplogruppenverteilung der nordeuropäischen DNA-Proben insgesamt als homogen beschrieben werden konnte. Die genaue Haplogruppenverteilung innerhalb Nordeuropas geht aus Abbildung 3-10 hervor.

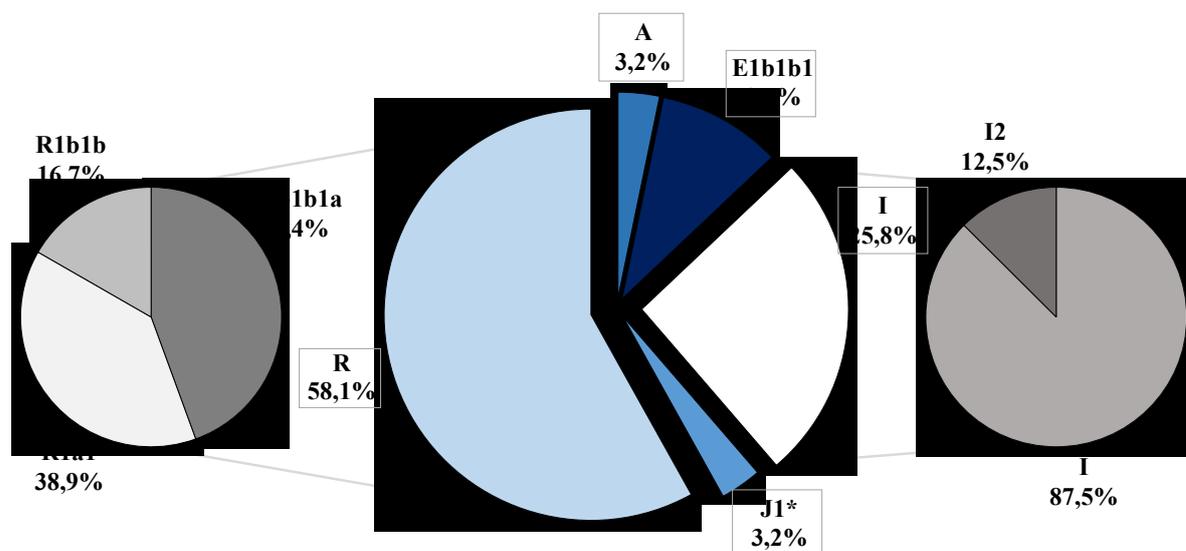


Abbildung 3-10: Haplogruppenverteilung innerhalb Nordeuropas

3.3 Haplogruppenspezifische Auswertung

Es werden die im Rahmen der durchgeführten Studie am häufigsten vorkommenden Haplogruppen dargestellt. Von den insgesamt 385 analysierten DNA-Proben waren 78,2% den Haplogruppen E (n=124), J (n=101) und R (n=76) zuzuordnen. Eine detaillierte Verteilung dieser Haplogruppen, sowie weitere, seltener typisierte Haplogruppen, sind dem Anhang zu entnehmen (Anhang A.7).

Haplogruppe E

Der durch den SNP M96 (Y-Multi 1) definierten Haplogruppe E und Subgruppen waren 32,2% aller untersuchten männlichen DNA-Proben zuzuordnen, wovon 30,6% der Hg E1b1a und 56,5% der Hg E1b1b1 entsprachen. Die restlichen Proben (n=16) des Haplogruppenstammes E verteilten sich auf Hg E1a und Hg E2 oder konnten durch die Y-Multi 4 nicht genauer subtypisiert werden (Hg E*, n=7).

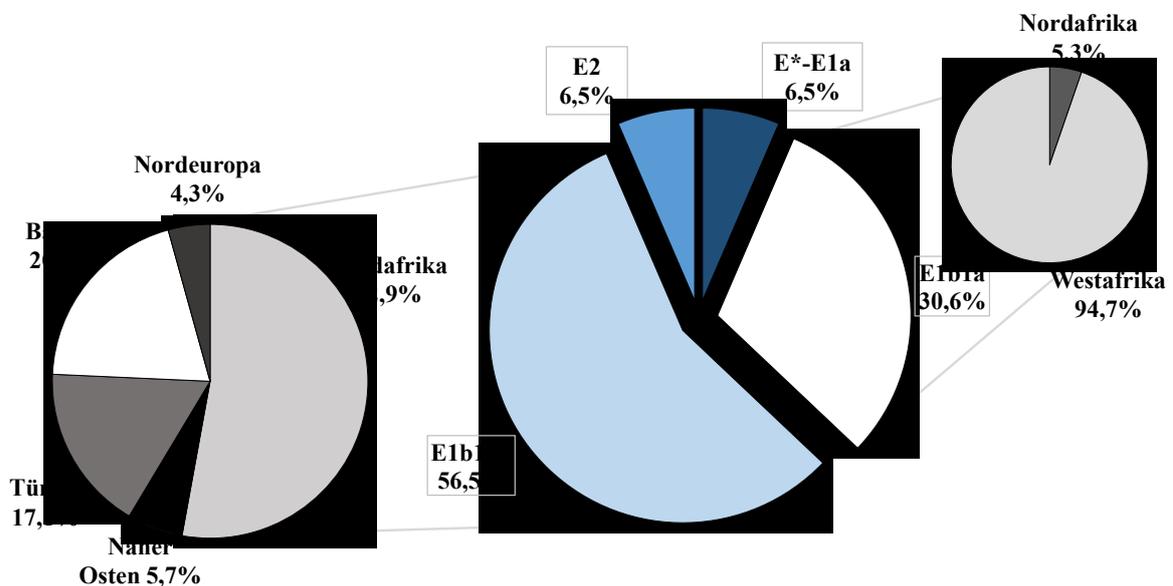


Abbildung 3-11: Haplogruppe E und Subgruppen mit ihren Häufigkeiten in den untersuchten Metapopulationen

Haplogruppe E1b1a (n=38) war zu 94,7% in Westafrika zu finden und trat nur in 2 marokkanischen Proben auf, niemals jedoch weiter nördlich. Hg E1b1b1 (n=70) war vermehrt in Regionen Nordafrikas zu finden, wobei ein Großteil der Proben marokkanischer Herkunft war. Ein Fünftel dieser Proben entstammten der Balkanregion, jeweils knapp ein Fünftel war tunesischer und türkischer Herkunft. Ein Vorkommen in Nordeuropa sowie dem Nahen Osten war nur vereinzelt nachweisbar (n=7). In westafrikanischen Proben war Hg E1b1b1 nicht vertreten. Abbildung 3-11 veranschaulicht die Aufteilung von Haplogruppe E (einschließlich Subhaplogruppen).

Haplogruppe J

Die durch den SNP M304 (Y-Multi 1) definierte Haplogruppe J sowie ihre Subgruppen fanden sich in 26,2% aller untersuchten männlichen DNA-Proben (n=101), darunter Hg J2 (23,7%), Hg J2a2 (28,7%), Hg J1e (29,7%).

Haplogruppe J2 (n=33) trat primär in Proben der Türkei (45,5%) sowie des Nahen Ostens (36,4%) auf und wurde nur vereinzelt in Proben Nordafrikas und der Balkanstaaten nachgewiesen. Hg J2a2 (n=29) war vor allem in Regionen des Nahen Ostens (41,4%) und den Balkanstaaten (44,8%) zu finden, gut ein Viertel dieser Proben stammten aus dem Kosovo. Sie konnte weder in Proben afrikanischer, noch nordeuropäischer Herkunft nachgewiesen werden.

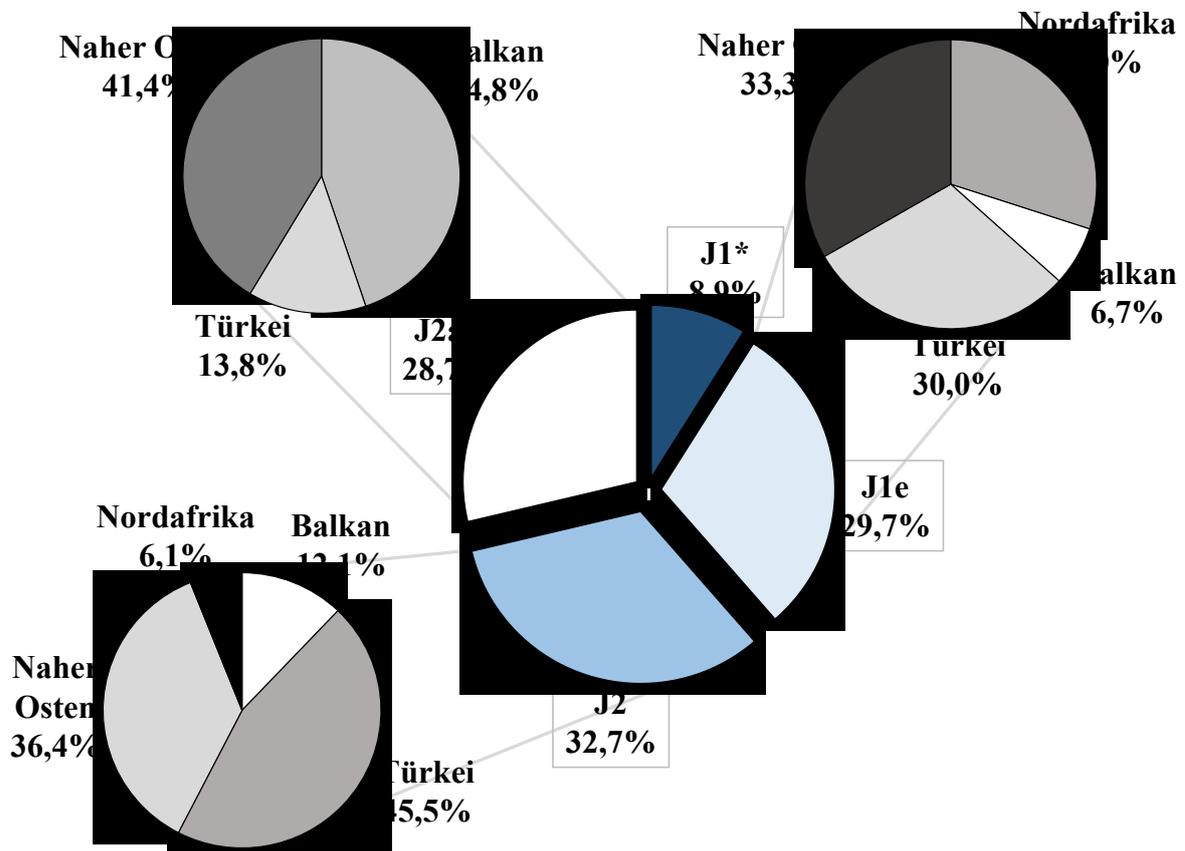


Abbildung 3-12: Haplogruppe J und Subgruppen mit ihren Häufigkeiten in den untersuchten Metapopulationen

Hg J1e (n=30) trat in den Regionen Nordafrikas (30%, davon 88,9% in Marokko), der Türkei (30%) und des Nahen Ostens (33,3%) mit vergleichbarer Häufigkeit auf. Auf dem Balkan war sie nur in zwei Proben (6,7%) nachweisbar. Abbildung 3-12 veranschaulicht die Aufteilung von Haplogruppe J (einschließlich Subhaplogruppen).

Haplogruppe R

Der durch den SNP M207 (Y-Multi 1) definierten Haplogruppe R und Subgruppen waren 19,7% aller untersuchten männlichen DNA-Proben (n=76) zuzuordnen. Es erfolgte die Subtypisierung in die fünf Haplogruppenäste R1a1, R1b, R1b1b, R1b1b1a und R2a. Aufgrund der geringen Probenanzahlen wurde auf eine detaillierte Beschreibung der geographischen Verteilung von Hg R1b (n=6) und R1b1b1a (n=8) verzichtet.

Innerhalb des Haplogruppenstammes R trat Hg R1b1b am häufigsten auf (40,8%). Die Ergebnisse lassen eine für (Südost-) Europa (90,3%) spezifische Haplogruppe vermuten (Balkan 35,5%,

Türkei 45,2%, Nordeuropa 9,7%), welche auch in Nordafrika (9,7%), aber nicht in Proben des Nahen Ostens nachweisbar war. Hg R1a1 (n=19) hingegen war eine in Nordeuropa häufig vorkommende Haplogruppe und trat in keiner Probe Afrikas auf. Sie war vor allem in nordeuropäischen (36,8%) und türkischen (42,1%) Proben zu finden. HgR2a (n=12) trat zwar im Nahen Osten auf, war jedoch am häufigsten (66,7%) in Proben türkischer Herkunft zu finden. Abbildung 3-13 veranschaulicht die Aufteilung von Hg R (einschließlich Subhaplogruppen).

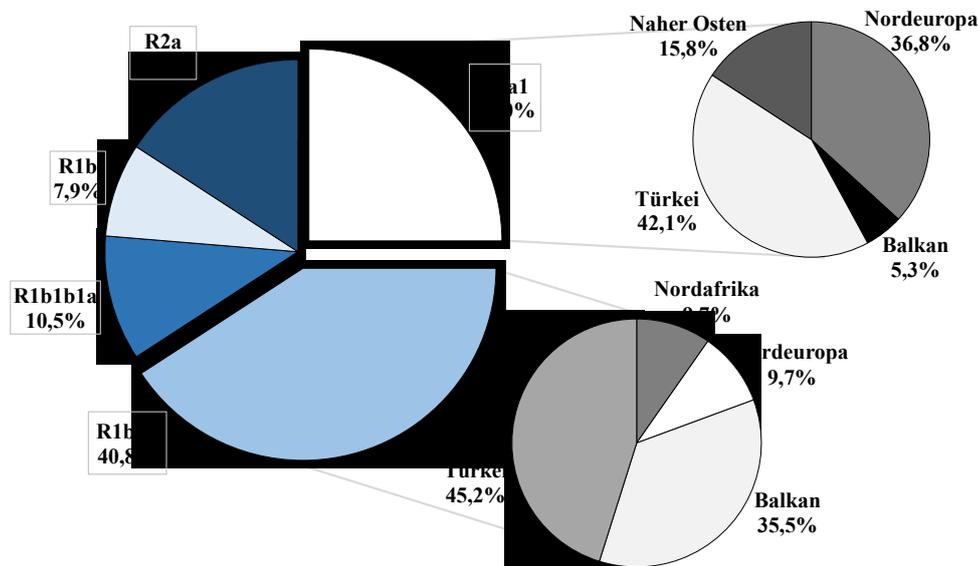


Abbildung 3-13: Haplogruppe R und Subgruppen sowie ihre Häufigkeiten in den untersuchten Metapopulationen

3.4 Anwendungsbeispiele etablierter SNaPshot-Assays

Nach erfolgreicher Etablierung der SNaPshot-Assays und Untersuchung von DNA-Proben zur Bestimmung Y-chromosomaler Haplogruppen von Männern unterschiedlicher Herkunftsländer, wurden die Ergebnisse mit denen von Analysen autosomaler Haplogruppen identischer männlicher Proben verglichen (Poetsch et al., 2013a). Die Ergebnisse der Kombination zweier Bestandteile des Teilprojekts zur Bestimmung der Ursprungspopulation unbekannter Tatortspuren sind in Tabelle 3-4 aufgeführt.

Tabelle 3-4: Korrelation zwischen Herkunftsland und ermittelter Herkunftsregion anhand autosomaler und Y-chromosomaler SNPs

Herkunftsland	Bestimmung möglicher Herkunftsregionen durch autosomale SNPs (Poetsch et al., 2013a)	Haplotypisierung durch Y-SNPs (Assays dieser Studie)	Bestimmung einer wahrscheinlichen Herkunftsregion unter Berücksichtigung autosomaler sowie Y-SNPs
Kosovo	Balkan oder Türkei	J2a2	Balkan ✓
Libanon	Naher Osten oder Nordafrika	E1b1b1	Nordafrika ✓
Irak	Naher Osten oder Nordafrika	J2a2	Naher Osten ✓
Polen	Balkan oder Nordeuropa	R1a1	Nordeuropa ✓
Iran	Naher Osten oder Türkei	J1e	kein Informationsgewinn
Irak	Balkan oder Naher Osten	J2	kein Informationsgewinn

✓ = Eindeutige Zuordnung. Die ermittelte Herkunftsregion schließt das tatsächliche Herkunftsland ein.

4 Diskussion

Kayser *et al.* beschrieben die Erstellung eines Täterprofils anhand einer hinterlassenen Tatortspur durch die DNA-abhängige Ermittlung äußerlicher Merkmale (Kayser *et al.*, 2009). Eine weitere Möglichkeit zur Erstellung eines Täterprofils stellt die Bestimmung der populationsspezifischen Haplogruppe dar, die zusätzliche Informationen in polizeilichen Ermittlungsarbeiten liefern kann (Lessig *et al.*, 2005). Die Bestimmung der Ursprungspopulation kann anhand von individuellen Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) durchgeführt werden. Ihre unterschiedlichen Ausprägungen dienen in der Gesamtheit als Grundlage zur Differenzierung einzelner Individuen (Syvänen *et al.*, 1993). SNPs können global repräsentiert sein oder spezifisch für geographische Regionen stehen (Coutinho *et al.*, 2014).

In dieser Arbeit wurden Y-chromosomale SNPs verschiedener Populationen untersucht. Laut der Polizeilichen Kriminalstatistik (2014) der Bundesrepublik Deutschland waren ca. 74% aller Täter männlich, wobei es sich in 29% der Fälle um nichtdeutsche Tatverdächtige handelte. Diese vorliegenden Daten polizeilicher Ermittlungen untermauern das große Interesse an Fortschritten in den Untersuchungen männlicher Tatortspuren.

4.1 Methodik der SNaPshot-Minisequenzierung

Zur Analyse der Y-chromosomalen Einzelnukleotid-Polymorphismen *der non-recombining portion of the Y chromosome* wurde die SNaPshot-Minisequenzierung eingesetzt. Die Methode ist gut praktikabel, da sie die gleichzeitige Analyse mehrerer SNPs (Multiplexing) ermöglicht und nur eine Effizienzoptimierung der Reaktionsbedingungen erfordert. Die hochauflösende kapillarelektrophoretische Auftrennung (Mansfield *et al.*, 1996) der Produkte geschieht automatisch und somit zeiteffizient, benötigte Sequenzer (bspw. ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer) sind in den meisten forensischen Laboren etabliert (Brion *et al.*, 2005a; Vallone *et al.*, 2004) und entsprechende SNPs und Primer sind kostengünstig, so dass die SNaPshot-Minisequenzierung ein ökonomisches Verfahren zur Ermittlung der Allel-Frequenzen multipler SNPs darstellt (Norton *et al.*, 2002).

4.2 Bestimmung von Y-SNPs als Teilprojekt

Mikrosatellitenpolymorphismen des Y-Chromosoms (Y-STRs) sind etablierte Marker zur interindividuellen Identifizierung (Oldroyd *et al.*, 1995) und Vaterschaftsbegutachtung (Lessig *et al.*, 2005). Durch die geringe Mutationsrate von SNPs kann ihre Konstellation zur Definition von Abstammungslinien herangezogen werden (Jobling, 2001). Autosomale SNPs bieten gegenüber Y-chromosomalen- oder mtSNPs den Vorteil, dass bereits eine geringe Anzahl dieser häufig vorkommenden SNPs zuverlässige Ergebnisse liefert (Phillips *et al.*, 2007). Anders als bei mtDNA oder Y-DNA, können anhand von SNPs autosomaler DNA auch Rückschlüsse auf genetische Strukturen innerhalb von Populationen gezogen werden (Seldin *et al.*, 2006). Im Hinblick auf

forensische Fragestellungen bieten mtSNPs wiederum den Vorteil, dass sie auch bei stark degradiert vorliegender DNA sowie geringer DNA-Menge noch erfolgreich analysiert werden können (bspw. Knochen, Zähne) (Morley et al., 1999). Durch das Vorhandensein von 103-104 Kopien der mitochondrialen DNA-Sequenz in jedem Zellkern, ist ihre Analyse gegenüber autosomaler DNA (zwei Kopien pro Zellkern) deutlich sensitiver (Shen et al., 2008). Verglichen mit autosomaler- und mtDNA, sind Y-SNPs wiederum am besten zur geographischen Differenzierung der Ursprungspopulation des vermeintlichen Täters geeignet (Jobling, 2001). Bedingt durch verschiedene weibliche und männliche Migrationsmuster aufgrund praktizierter Patrilokalität (Jobling et al., 2003) sowie aufgrund unterschiedlicher Mutationsraten von mtDNA, Y-DNA und autosomaler DNA, ist eine Kombination der drei Marker zur Bestimmung der Ursprungspopulation sinnvoll (Seielstad et al., 1998). Auch die unterschiedlichen Verteilungsstrukturen bezüglich Vielfalt und Variabilität der drei DNA-Systeme innerhalb und zwischen Populationen und Kontinenten (Seielstad et al., 1998) sprechen für eine Kombination der drei DNA-Systeme zur individuellen Haplogruppenbestimmung. Neben der durchgeführten Analyse Y-chromosomaler Haplogruppen wurden in weiteren Teilprojekten autosomale SNPs (Poetsch et al., 2013a) sowie mitochondriale SNPs (Dissertation in Vorbereitung, persönliche Kommunikation Y. Nebel) untersucht. Tabelle 3-4 (Kapitel 3.4) zeigt beispielhaft, wie die Kombination der Analyseergebnisse von Y-SNPs und autosomalen SNPs die Aussagekraft bezüglich der Ursprungspopulation eines Individuums verbessern kann.

Nach erfolgreicher Etablierung der SNaPshot-Assays und Untersuchung von DNA-Proben zur Bestimmung Y-chromosomaler Haplogruppen von Männern unterschiedlicher Herkunftsländer, wurden die Ergebnisse mit denen von Analysen autosomaler Haplogruppen identischer männlicher Proben verglichen (Poetsch et al., 2013a). Die Ergebnisse der Kombination zweier Bestandteile des Teilprojekts zur Bestimmung der Ursprungspopulation unbekannter Tatortspuren sind in Tabelle 3-4 aufgeführt.

4.3 Haplogruppenverteilung

Die über viele Jahre nicht standardisierte Nomenklatur der Y-Haplogruppen führte zu verschiedenartigen Begrifflichkeiten in der Literatur. Im Jahr 2002 erstellte das Y Chromosome Consortium (YCC) ein einheitliches System zur Beschreibung des Y-chromosomalen Haplogruppenstammbaumes (Y Chromosome Consortium, 2002). Um Bezüge zu anderen Autoren herstellen zu können, wird die Nomenklatur des YCCs als Referenz verwendet.

4.3.1 Nord- und Westafrika

Afrikanische Populationen sind genetisch vielfältiger und komplexer substrukturiert als andere Populationen (Campbell et al., 2008; Jorde et al., 2000) und weisen überwiegend die Y-chromosomalen Haplogruppen A, B und E auf. Der SNP-Mix der Y-Multi 4 für Proben Nord- und

Westafrikas diene nur der Subtypisierung der Y-Haplogruppen E und B, da Haplogruppe A vor allem in Süd- und Ostafrika vorkommt (de Filippo et al., 2011; Underhill et al., 2001).

Cruciani *et al.* beschreiben ein mit 73% häufiges, sowie innerhalb des Kontinentes weit verbreitetes Auftreten der Hg E, wobei das Vorkommen dieser Haplogruppe geographische Unterschiede aufweist (Cruciani et al., 2002). Laut Trombetta *et al.* ist Hg E die häufigste Y-chromosomale Haplogruppe Afrikas (Trombetta et al., 2011). Hier zeigt sich eine hohe Übereinstimmung zu den afrikanischen Proben dieser Studie (78,1% Haplogruppe E Subhaplogruppen). Da 71,8% aller Proben der Hg E afrikanischer Herkunft waren, belegt auch dies die Bedeutung dieser Haplogruppe für afrikanische Populationen.

Das Auftreten der Haplogruppe E1b1a ist auf den afrikanischen Kontinent beschränkt (Cruciani et al., 2004), wobei ein westafrikanischer Ursprung ihrer Verbreitung vermutet wird (Semino et al., 2004). Auch Trombetta *et al.* (~80%) und Berniell-Lee *et al.* (76%) beschreiben Haplogruppe E1b1a als die häufigste Haplogruppe West- und Zentralafrikas (Berniell-Lee et al., 2009; Trombetta et al., 2011). Es wird vermutet, dass Hg E1b1a einer Fährte der Expansion der Bantusprachen entspricht (Berniell-Lee et al., 2009; de Filippo et al., 2011; Semino et al., 2004). Diese Beschränkung auf (West-) Afrika wird von den Daten dieser Studie klar bestätigt.

Haplogruppe E1b1 ist die am weitesten verbreitete Y-Haplogruppe Afrikas (Semino et al., 2004; Trombetta et al., 2011) und tritt mit einer Häufigkeit von <25% auch in Europa und Westasien auf (Cruciani et al., 2004). Subhaplogruppe E1b1b1 tritt am häufigsten in Nordafrika auf, nordwärts entlang der Gebiete des Nahen Ostens kommt sie immer seltener vor (El-Sibai et al., 2009; Semino et al., 2000), wobei sie auch vereinzelt in Europa beschrieben wird. Aufgrund der besonderen Vielfalt von Hg E1b1b1 in Ostafrika, wird diese Region als ihr Ursprungsort vermutet, von wo aus sie sich möglicherweise vor Millionen Jahren in Richtung Nordafrika und Balkan ausgebreitet haben soll (Cruciani et al., 2004). Underhill *et al.* beschreiben eine in der Mittelsteinzeit stattgefundene Expansion dieser Haplogruppe von Süd- nach Nordafrika, weiter in Richtung des östlichen Mittelmeerraumes, bis nach Europa (Underhill et al., 2001). Dabei verlief die nördliche Expansion am ehesten über die Meerenge von Gibraltar in Richtung der iberischen Halbinsel (El-Sibai et al., 2009), obschon sie, als natürliche Grenze, den genetischen Austausch stark reduzierte (Bosch et al., 2001). In den eigenen Ergebnissen zeigten sich ähnliche Häufigkeitsfrequenzen der Hg E1b1b1, die von Nordafrika (52,9%), über die Balkanregion (20%) in Richtung Europa (Nordeuropa 4,3%) abnahmen. In westafrikanischen Proben trat sie nicht auf.

Haplogruppe B ist ebenfalls eine afrikaspezifische Haplogruppe, die zwar in ganz Afrika, dafür jedoch seltener auftritt (Underhill et al., 2001). Sie war in nur jeweils einer Probe Nord- und Westafrikas nachweisbar. Wie bereits für Hg E1b1a beschrieben, wird auch für Hg B2b ein Zusammenhang zwischen ihrer Verbreitung und der Expansion der Banu-Sprachen vermutet (de

Filippo et al., 2011). Das im Vergleich zu publizierten Studien (Berniell-Lee et al., 2009) seltenere Vorkommen der Hg B2a, lässt sich mit der geringen Probenanzahl (n=114) dieser Studie erklären.

Vor Einführung der einheitlich Nomenklatur der Y-Haplogruppen (Y Chromosome Consortium, 2002) fassten Cruciani *et al.* und Underhill *et al.* die Haplogruppen F-J zur *Haplogruppe VI* zusammen und beschrieben ihr geringes Vorkommen in Nordafrika, ein gänzlich Fehlen in subsaharischen Regionen (Cruciani et al., 2002), sowie ein geringes Auftreten in Westafrika (Underhill et al., 2001). Die Angaben korrelieren mit den eigenen Ergebnissen, in denen ein Auftreten von 27,7% (Hg G und J) in nordafrikanischen Proben (mit 83,3% primär in Marokko) ermittelt wurde, sie jedoch nicht in Proben Westafrikas auftraten.

4.3.2 Balkan, Türkei, Naher Osten und Nordeuropa

Der Ursprung der Haplogruppe J liegt am ehesten im Nahen Osten (Semino et al., 2004). Laut eigenen Ergebnissen waren Hg J und Hg R (mit Subhaplogruppen) die am weitesten verbreiteten Haplogruppen des Nahen Ostens. El-Sibai *et al.* beschrieben die Hg J1, J2, R1b, E1b1b1 und I als die häufigsten Haplogruppen der Region (El-Sibai et al., 2009). Die Subtypisierung der eigenen Proben zeigte jedoch eine diskret abweichende Häufigkeitsverteilung: J2, J1, T1b, E1b1b1/R1/R2a (in absteigender Reihenfolge). Allerdings ist zu beachten, dass El-Sibai *et al.* die Länder Jordanien, Libanon, Palästina und Syrien unter dem zusammenfassenden Begriff der *Levante* analysierte, die Proben des Nahen Ostens aus dieser Studie jedoch aus den Ländern Irak, Iran, Israel, Libanon und Syrien stammten. Die unterschiedliche Anzahl untersuchter Proben (diese Studie: n=63 Proben, El-Sibai *et al.*: 1879 Proben) lässt eine Verallgemeinerung sowie ein Vergleich mit El-Sibai *et al.* nur eingeschränkt zu (El-Sibai et al., 2009).

Haplogruppe J1 und Haplogruppe J2 entsprechen den zwei großen Haplogruppenästen der Hg J. Sie treten in unterschiedlicher Häufigkeit in den Gebieten des Nahen Ostens, Nordafrikas und Europas auf (Semino et al., 2004).

Aufgrund der möglichen Assoziation von Hg J1 mit der Expansion arabischer Völker, ist Hg J1 seltener in Europa (ein Einzelfall in den nordeuropäischen Probe) und häufiger im Nahen Osten und Nordafrika vertreten (Semino et al., 2004). Dies ist gut mit den Ergebnissen dieser Studie zu vereinbaren (Hg J1 zu 30,8% in Marokko und Tunesien, Hg J2 zu 3,2% in nordafrikanischen Ländern). Laut Cinniöglü *et al.* kommt Hg J1 mit 9% in der Türkei vor, was mit den Ergebnissen der türkischen Proben (Häufigkeit des Auftretens 10,6%) gut übereinstimmt (Cinniöglü et al., 2004).

Die Haplogruppe J2 ist eine der häufigsten Haplogruppen Europas (Lessig et al., 2005; Semino et al., 2004). Sie tritt häufig im Libanon, der Türkei, Syrien oder dem Iran auf und ist mit einer geringen Häufigkeitsfrequenz auch in Europa zu finden (Nasidze et al., 2003). Es wird vermutet, dass die Ausbreitung anatolischer Bauern in südeuropäische Gebiete zu einem vermehrten Auftreten der Haplogruppe beitrug (Semino et al., 2004). Die untersuchten Proben der Hg J2 (Subtypisierungen

einschließlich) stammten häufig aus dem Nahen Osten (38,7%), der Türkei (30,6%) und den Balkanstaaten (27,4%). Die Häufigkeit, mit der Hg J2 auftritt, nimmt charakteristisch vom Nahen Osten in Richtung Westeuropa ab (Cinnioğlu et al., 2004; Semino et al., 2004). Dabei war Hg J1 (mit Subhaplogruppen) mit einer Frequenz von 28,1% im Libanon genauso häufig vertreten, wie die als spezifischer beschriebene Hg J2 (einschließlich Subhaplogruppen), was mit den Ergebnissen von Semino *et al.* zu vereinbaren ist, da sie ein vergleichbar häufiges Auftreten der Hg J1 und J2 im Nahen Osten beschreiben (Semino et al., 2004). Die von der arabischen Halbinsel ausgegangene muslimische Expansion könnte zu einer Verbreitung des Haplogruppenstammes J in den Libanon geführt haben (Zalloua et al., 2008b). Laut El-Sibai *et al.* ist Hg J2 von allen Ländern des Nahen Ostens am häufigsten im Libanon vertreten (El-Sibai et al., 2009), die Ergebnisse dieser Studie zeigten hingegen ein häufigeres Auftreten in Syrien (57,1%) und dem Irak (52,9%). Trotz divergenter intraregionaler Haplogruppenverteilungen war Hg J2 insgesamt am häufigsten im Nahen Osten vertreten (Frequenz=0,387). Die Subhaplogruppe J2b ist an die Spuren der menschlichen Expansion aus südlichen Balkanstaaten in Richtung Westen geknüpft und tritt am häufigsten in der Balkanregion auf (Semino et al., 2004). In den vorliegenden Ergebnissen kam Hg J2 (nicht genauer subtypisiert) jedoch nur zu 12,1% in Balkanländern vor (vgl. Anteil Naher Osten an Proben der Hg J2: 36,4%, kein Auftreten in Proben Nordeuropas). Aufgrund der niedrigen Probenanzahl der Balkanstaaten (n=4) liegt jedoch kein repräsentatives Ergebnis vor. Verglichen mit der Gesamtheit untersuchter Proben, trat Hg J2 (ohne Subhaplogruppen) am häufigsten in der Türkei auf. Ein nur vereinzelt Auftreten in Nordafrika (n=2) ist mit Ergebnissen von Zalloua *et al.* zu vereinbaren. Sie beschreiben eine von Europa ausgehende Verringerung des Vorkommens von Hg J2* in Richtung Nordafrika (Zalloua et al., 2008a).

Haplogruppe I ist eine nahezu auf Europa begrenzte Haplogruppe (Semino et al., 2000). Sie hat ihren Ursprung am ehesten in der Balkanregion (Cinnioğlu et al., 2004) und gehört zu den häufigsten europäischen Haplogruppen (Lessig et al., 2005; Rootsi et al., 2004) mit einem Maximum in Zentralosteuropa (Semino et al., 2000). Mit sinkender Häufigkeitsfrequenz tritt sie auch in Mittel- und Nordeuropa sowie in westlichen Regionen der Türkei auf (Cinnioğlu et al., 2004). Die anhand der untersuchten Proben ermittelte Verteilung von Hg I war mit den beschriebenen Haplogruppenverteilungen gut zu vereinbaren: Hg I und Untergruppen in 25,8% aller deutschen Proben, 14,0% aller Proben des Balkangebiets und 3,8% der Proben türkischer Herkunft, kein Nachweis in Afrika oder dem Nahen Osten.

Haplogruppe IIa wird im Zusammenhang mit dem letzteiszeitlichen Maximum und den dadurch induzierten Migrationsbewegungen betrachtet: Sie tritt am häufigsten in Skandinavien auf und kommt mit wachsender Entfernung immer seltener vor (Rootsi et al., 2004). In den untersuchten Proben konnte sie jedoch nicht subtypisiert werden. Selbst Proben deutscher Herkunft waren nur Haplogruppe I (22,6%) oder Hg I2 (3,2%) zuzuordnen. Haplogruppe I2a1 entspricht dem häufigsten

Haplogruppenast der Hg I in Osteuropa und der Balkanregion (Rootsi et al., 2004). Von allen der Hg I2 zugeordneten Proben, stammten 77,8% aus den Balkanstaaten, obwohl umgekehrt nur 9,6% der Proben aus der Balkanregion Haplogruppe I2 zugehörig waren.

Haplogruppe G tritt häufig im nordöstlich der Türkei gelegenen Kaukasus auf (Nasidze et al., 2003). Hg G (Subgruppen zusammengefasst) wurde in 11,5% der untersuchten Proben türkischer Herkunft ermittelt, was mit einer beschriebenen Häufigkeit ihres Vorkommens von 10,9% in der gesamten Türkei (Cinnioğlu et al., 2004) zu vereinbaren ist. Haplogruppe G ist in Europa sehr selten und für die Region des Nahen Ostens nur in der Türkei und dem Libanon beschrieben (Nasidze et al., 2003). In den untersuchten Proben war sie entsprechend nur in Proben libanesischer und türkischer Herkunft zu finden. Obwohl beschrieben ist, dass Hg G vom Nahen Osten in Richtung Europa immer seltener auftritt (Semino et al., 2000), kam diese Haplogruppe relativ häufiger in türkischen Proben vor. Die Expansion der Hg G nach Europa ist durch Migration von Völkern des Mittelmeerraumes bedingt (Underhill et al., 2001) und stützt die ermittelte Haplogruppenverteilung. Auch Cruciani *et al.* berichten ein verbreitetes Auftreten der Haplogruppe in Mitteleuropa und dem Nahen Osten (Cruciani et al., 2002). Wie in der Literatur beschrieben (Cruciani et al., 2002), war Hg G auch in dieser Studie nur selten (6,2%) in Proben aus Regionen Nordafrikas zu finden.

Haplogruppe R1* ist in West- und Mitteleuropa weit verbreitet (Lessig et al., 2005; Nasidze et al., 2003). Übereinstimmend mit Cinnioğlu *et al.* und Nasidze *et al.* entsprach sie in dieser Studie dem am häufigsten vorkommenden Haplogruppenast dieser Region (Cinnioğlu et al., 2004; Nasidze et al., 2003). Haplogruppe R1a1 (einschließlich Subtypisierung) ist häufig vor allem in (Ost-) Europa zu finden, wobei die große Haplogruppenvielfalt ihre ursprüngliche Herkunft in der Region der heutigen Ukraine vermuten lässt (Lessig et al., 2005; Semino et al., 2000). In den eigenen Proben war Hg R1a1 hauptsächlich in nordeuropäischen und türkischen Proben zu finden, wobei Hg R1a1 22,6% der deutschen Proben, aber nur 7,7% der Proben türkischer Herkunft entsprach. Diese Haplogruppenverteilung könnte unter anderem durch Arbeitsmigration in Richtung Mitteleuropa oder Flüchtlinge im Rahmen des Balkankonflikts im 20. Jahrhundert bedingt sein (Hösch, 2007).

Haplogruppe R1b1b (früher R1b3) ist eine der häufigsten Haplogruppen der Türkei (Cinnioğlu et al., 2004). In den eigenen Ergebnissen war sie nach Hg J2* (14,4%) die zweithäufigste Haplogruppe (13,5%) türkischer Proben. Übereinstimmend mit Cinnioğlu *et al.* (40-80%) konnte in dieser Studie ein häufiges Auftreten (90,3%) innerhalb Europas (Türkei einschließlich) ermittelt werden (Cinnioğlu et al., 2004). In Proben Nordeuropas kam Hg R1b1b1a mit 25,8% jedoch häufiger vor, als Hg R1b1b (9,7%). Haplogruppe R (mit Subtypisierungen) war mit insgesamt 58,1% der häufigste Haplogruppenhauptstamm nordeuropäischer Proben.

Haplogruppe T1 ist zwar selten, dafür jedoch in ganz Europa zu finden (Cruciani et al., 2002). Hg T (Subgruppen einschließlich) war nur in 1,5% (n=8) aller untersuchten europäischen Proben (Türkei einschließlich) nachweisbar, davon war die Hälfte türkischer Herkunft.

Haplogruppe E1b1b1 (vgl. Kapitel 4.3.1) zählt zu den häufigsten Haplogruppen Europas (Lessig et al., 2005). Sie wurde in der Mittelsteinzeit aus Afrika nach Europa gebracht (Underhill et al., 2001). Dies kann ein im Vergleich zu untersuchten afrikanischen Proben (Hg E1b1b1 anteilig 32,5% gesamt) niedrigeres Auftreten der Hg E1b1b1 in Proben Europas (12,2%, Türkei einschließlich) erklären. Hg E1b1b1 war mit 19,2% in Proben der Balkanregion und mit 11,5% in Proben der Türkei zu finden. Das Untersuchungsergebnis türkischer Proben korrelierte mit dem von Underhill *et al.* beschriebenen Vorkommen der Hg E in außer-afrikanischen Regionen (Underhill et al., 2001).

Haplogruppe L ist vermutlich indischen Ursprungs, tritt jedoch auch im Nahen Osten auf (Karafet et al., 2005). In dieser Studie war sie nur in europäischen Proben nachweisbar, dann wie in der Literatur beschrieben vor allem in Proben des Nahen Ostens.

4.4 Schlussfolgerung zur Anwendbarkeit etablierter Assays

Die in dieser Studie etablierten SNaPshot Assays (Y-Multi 4, Y-Multi 5, Y-Multi 6) haben eine hohe Sensitivität und amplifizieren auch geringste DNA-Mengen oder degradierte DNA zuverlässig. Somit eignet sich die Methode zur Untersuchung von DNA-Material unterschiedlicher Tatorte in forensischen Fällen sowie historischen Funden und liefert zusätzliche Informationen anhand einer einzigen vorliegenden Spur.

Das Ergebnis der Y-chromosomalen Abstammungslinie eines Individuums ist hier als Teilergebnis zu betrachten. Zusammen mit den Ergebnissen der beiden weiteren Methoden (Analyse autosomaler SNPs, Bestimmung der Abstammungslinie anhand von mtDNA) kann eine Eingrenzung der Populationszugehörigkeit erfolgen. Da SNPs global repräsentiert oder spezifisch für geographische Regionen sein können (Coutinho et al., 2014), sind einige Haplogruppen deutlich aussagekräftiger als andere und entsprechend manche Populationen deutlich leichter zu ermitteln als andere. Somit müssen entsprechende SNPs unter Berücksichtigung ihrer unterschiedlichen Allelfrequenzen zwischen Populationen ausgewählt werden. Hierfür sind Informationen über die Zusammensetzung untersuchter Metapopulationen entscheidend (Rogalla et al., 2015). Entsprechend wurden schon eine Reihe von Assays publiziert, die mit Hilfe von autosomalen, mitochondrialen oder Y-chromosomalen SNPs Aussagen über die Zugehörigkeit zu einer Population erlauben (z.B. (Coutinho et al., 2014; Poetsch et al., 2013a; Rogalla et al., 2015).

So kann bei Ermittlung des Haplogruppenstammes E wahrscheinlich von einer afrikanischen Herkunft ausgegangen werden, im Falle von Haplogruppe E1b1a und – etwas eingeschränkter – Hg E2 am ehesten von Westafrika. Haplogruppe E1b1b1 lässt eher auf einen nordafrikanischen

Ursprung schließen, obwohl auch außer-afrikanische Regionen wie der Balkan oder die Türkei als Herkunftsgebiete in Betracht gezogen werden müssen. Muss eine Entscheidung zwischen Nordafrika und dem Nahen Osten getroffen werden, weist Haplogruppe E1b1b1 deutlich auf Nordafrika hin (Kapitel 3.4, Tabelle 3-4). Ergänzend zu untersuchten Y-SNPs, ist die Zuordnung zu einer afrikanischen, insbesondere westafrikanischen, Bevölkerung auch anhand autosomaler SNP Assays gut möglich (Poetsch et al., 2013a).

Haplogruppen J (inkl. Subhaplogruppen) und Hg I haben eine geringere Aussagekraft. Bei Ermittlung der Haplogruppe J2 kann zwar mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine Herkunft aus der Türkei oder dem Nahen Osten geschlossen werden und auch bei Vorliegen der Haplogruppe J2a2 sind die Balkanregion sowie der Nahe Osten wahrscheinliche Herkunftsgebiete, jedoch ist eine konkretere geographische Eingrenzung nicht möglich. Allerdings kann bei Vorliegen von Hg J (und Subhaplogruppen) eine westafrikanische Herkunft eher verworfen werden und ein nordafrikanischer oder nordeuropäischer Ursprung wäre eher die Ausnahme. Muss eine Entscheidung zwischen Nordafrika oder dem Nahen Osten getroffen werden, weist Haplogruppe J2a2 auf den Nahen Osten hin. Muss die Entscheidung zwischen Türkei, Nahen Osten oder Balkanregion differenziert werden, liefert Haplogruppe J2 keine zusätzlichen Informationen (Kapitel 3.4, Tabelle 3-4). Eine Abgrenzung zwischen Nordafrika, Nahem Osten, der Türkei und der Balkanregion ist auch anhand autosomaler SNPs nur sehr schwer möglich (Poetsch et al., 2013a; Rogalla et al., 2015).

Wird anhand der Y-Multi 5 die Haplogruppe I ermittelt, so ist eine europäische Herkunft wahrscheinlich und am ehesten auf die Balkanregion beschränkt, wobei auch ein nordeuropäischer Ursprung in Erwägung gezogen werden sollte.

Die Haplogruppen R und T (sowie Untergruppen) und die selteneren Haplogruppen K, L und Q zeigen eine breite geographische Verteilung in den untersuchten Populationen. Sie dienen dem wahrscheinlichen Ausschluss einer afrikanischen Herkunft, da sie nicht in westafrikanischen und selten in nordafrikanischen Proben nachgewiesen wurden, zur genaueren Diskriminierung zwischen Türkei, Nahem Osten oder Balkan sind sie jedoch nicht geeignet.

Grundsätzlich ist die Analyse Y-chromosomaler Haplogruppen ein wesentlicher Bestandteil der Bestimmung der Ursprungspopulation unbekannter, männlicher DNA von Tatorten. Um die Aussagekraft über die geographische Herkunft eines Mannes zu erhöhen und eine wahrscheinliche Herkunftsregion genauer einzugrenzen, ist eine Kombination der drei DNA-Systeme (Y-SNPs, mtSNPs, autosomale SNPs) sinnvoll (Kapitel 3.4, Tabelle 3-4). Somit ist die Ermittlung Y-chromosomaler Haplogruppen als ein Element in der Bestimmung der Ursprungspopulation einer unbekanntenen Tatortspur zu werten.

Sobald eine Gesetzesänderung in Deutschland die Verwendung der beschriebenen Methode in polizeilichen Ermittlungen erlaubt, sollen die etablierten Assays im Institut für Rechtsmedizin Essen zur Analyse geeigneter Fälle herangezogen werden.

5 Zusammenfassung

Eine der wichtigsten Methoden in der internationalen Verbrechensbekämpfung ist die Erstellung individualspezifischer Desoxyribonukleinsäure-Profile (engl. deoxyribonucleic acid (DNA)), anhand derer Tatortspuren einem Tatverdächtigen zugeordnet werden können. Gibt es keine Hinweise auf mögliche Tatverdächtige, so kann die Ursprungspopulation einer unbekanntes DNA-Spur des Tatortes für die polizeilichen Ermittlungsarbeiten von großer Bedeutung sein. Bei männlichen Spuren liefert, neben autosomalen Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphisms (SNPs)) und Polymorphismen mitochondrialer DNA (mtDNA), die Y-chromosomale Haplogruppe einen wichtigen Hinweis auf die ursprüngliche Herkunft des Spurenlegers. Sie ist über die Allelausprägung bestimmter Einzelnukleotid-Polymorphismen auf dem Y-Chromosom definiert. Das Vorkommen sowie die Verteilung solcher Haplogruppen kann in unterschiedlichen Populationen stark variieren.

In dieser Studie wurden drei Minisequencing-Assays mit insgesamt 45 SNPs des Y-Chromosoms zusammengestellt und etabliert. Der Prozess der Etablierung beinhaltete das Erstellen zuverlässiger Multiplex-Polymerasekettenreaktionen-Assays (engl. polymerase chain reaction (PCR)) und SNaPshot-Multiplex-PCR-Assays, die auch geringe DNA-Mengen sowie degradierte DNA zuverlässig analysieren können. Die Kombination der Y-SNPs in den Minisequencing-Assays erlaubt eine eindeutige Zuordnung zu bestimmten, im Vorfeld ausgesuchten Y-Haplogruppen. Anschließend wurden die erstellten Minisequencing-Assays verifiziert, indem die Verteilung der Y-chromosomalen Haplogruppen in insgesamt 385 Personen aus Nordeuropa, vom Balkan, aus der Türkei, dem Nahen Osten, sowie aus Nord- und Westafrika bestimmt wurde.

Dabei konnten metapopulationsspezifische Haplogruppen (Hg), wie beispielsweise Hg E1b1a für Westafrika, ermittelt werden. Es zeigte sich allerdings auch, dass andere Haplogruppen in mehreren Metapopulationen in etwa gleichen Anteilen vorkommen, wie zum Beispiel Haplogruppe J1e in Nordafrika, dem Nahen Osten und der Türkei. Anhand einiger Beispiele konnte nachgewiesen werden, dass die Y-chromosomalen Haplogruppen eine wichtige Ergänzung zur Analyse autosomaler SNPs sind.

6 Quellennachweise

6.1 Literaturverzeichnis

1. Bade, K. J. (2000): Europa in Bewegung: Migration vom späten 18. Jahrhundert bis zur Gegenwart. München: C. H. Beck.
2. Bade, K. J. (2004): Sozialhistorische Migrationsforschung. In: Bade, K.J., Oltmer, J. (Hrsg.): Studien zur historischen Migrationsforschung. Band 13. Göttingen: V&R unipress.
3. Bade, K. J., Emmer, P. C., Lucassen, L., Oltmer, J. H. (2008): Enzyklopädie Migration in Europa, 2. Auflage. Paderborn: Verlag Ferdinand Schöningh.
4. Berniell-Lee, G., Calafell, F., Bosch, E., Heyer, E., Sica, L., Mouguiama-Daouda, P., van der Veen, L., Hombert, J. M., Quintana-Murci, L., Comas, D. (2009): Genetic and demographic implications of the Bantu expansion: insights from human paternal lineages. *Mol Biol Evol* 26, 1581-1589.
5. Bosch, E., Calafell, F., Comas, D., Oefner, P. J., Underhill, P. A., Bertranpetit, J. (2001): High-resolution analysis of human Y-chromosome variation shows a sharp discontinuity and limited gene flow between northwestern Africa and the Iberian Peninsula. *Am J Hum Genet* 68, 1019-1029.
6. Brion, M., Sanchez, J. J., Balogh, K., Thacker, C., Blanco-Verea, A., Børsting, C., Stradmann-Bellinghausen, B., Bogus, M., Syndercombe-Court, D., Schneider, P. M. (2005a): Introduction of a single nucleotide polymorphism-based "Major Y-chromosome haplogroup typing kit" suitable for predicting the geographical origin of male lineages. *Electrophoresis* 26, 4411-4420.
7. Brion, M., Sobrino, B., Blanco-Verea, A., Lareu, M. V., Carracedo, A. (2005b): Hierarchical analysis of 30 Y-chromosome SNPs in European populations. *Int J Legal Med* 119, 10-15.
8. Brookes, A. J. (1999): The essence of SNPs. *Gene* 234, 177-186.
9. Butler, J. M. (2010): Fundamentals of forensic DNA typing. Burlington, San Diego, USA; London, UK: Academic Press, ein Imprint des Elsevier Verlages.
10. Butler, J. M. (2015): The future of forensic DNA analysis. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370
11. Calic, M. J. (2008). Kosovo: Der jüngste Staat in Europa. In: Aus Politik und Zeitgeschichte, Beilage zur Wochenzeitung 'Das Parlament' 32/2008, 33-40.
12. Campbell, M. C., Tishkoff, S. A. (2008): African genetic diversity: implications for human demographic history, modern human origins, and complex disease mapping. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 9, 403-433.
13. Cavalli-Sforza, L. L., Menozzi, P., Piazza, A. (1994): The history and geography of human genes. Princeton: Princeton University Press.
14. Chamberlain, J. S., Gibbs, R. A., Rainer, J. E., Nguyen, P. N., Thomas, C. (1988): Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acids Res* 16, 11141-11156.

15. Chou, Q., Russell, M., Birch, D. E., Raymond, J., Bloch, W. (1992): Prevention of pre-PCR mispriming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res* 20, 1717-1723.
16. Cinnioglu, C., King, R., Kivisild, T., Kalfoğlu, E., Atasoy, S., Cavalleri, G. L., Lillie, A. S., Roseman, C. C., Lin, A. A., Prince, K., Oefner, P. J., Shen, P., Semino, O., Cavalli-Sforza, L. L., Underhill, P. A. (2004): Excavating Y-chromosome haplotype strata in Anatolia. *Hum Genet* 114, 127-148.
17. Cleveland, W. L., Bunton, M. (2013): *A History of the Modern Middle East*; 5th Edition. Boulder, USA: Westview Press.
18. Coutinho, A., Valverde, G., Fehren-Schmitz, L., Cooper, A., Romero, M. I. B., Espinoza, I. F., Llamas, B., Haak, W. (2014): AmericaPlex26: a SNaPshot multiplex system for genotyping the main human mitochondrial founder lineages of the Americas. *PLoS One* 9, e93292.
19. Craxton, M. (1991): Linear amplification sequencing, a powerful method for sequencing DNA. *Methods* 3, 20-26.
20. Cruciani, F., La Fratta, R., Santolamazza, P., Sellitto, D., Pascone, R., Moral, P., Watson, E., Guida, V., Colomb, E. B., Zaharova, B., Lavinha, J., Vona, G., Aman, R., Cali, F., Akar, N., Richards, M., Torroni, A., Novelletto, A., Scozzari, R. (2004): Phylogeographic analysis of haplogroup E3b (E-M215) Y chromosomes reveals multiple migratory events within and out of Africa. *Am J Hum Genet* 74, 1014-1022.
21. Cruciani, F., Santolamazza, P., Shen, P., Macaulay, V., Moral, P., Olckers, A., Modiano, D., Holmes, S., Destro-Bisol, G., Coia, V., Wallace, D. C., Oefner, P. J., Torroni, A., Cavalli-Sforza, L. L., Scozzari, R., Underhill, P. A. (2002): A back migration from Asia to sub-Saharan Africa is supported by high-resolution analysis of human Y-chromosome haplotypes. *Am J Hum Genet* 70, 1197-1214.
22. de Filippo, C., Barbieri, C., Whitten, M., Mpoloka, S. W., Gunnarsdottir, E. D., Bostoen, K., Nyambe, T., Beyer, K., Schreiber, H., de Knijff, P., Luiselli, D., Stoneking, M., Pakendorf, B. (2011): Y-chromosomal variation in sub-Saharan Africa: insights into the history of Niger-Congo groups. *Mol Biol Evol* 28, 1255-1269.
23. Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., Lang, H. (1974): Proteinase K from *Tritirachium album limber*. *Eur J Biochem* 47, 91-97.
24. El-Sibai, M., Platt, D. E., Haber, M., Xue, Y., Youhanna, S. C., Wells, R. S., Izaabel, H., Sanyoura, M. F., Harmanani, H., Bonab, M. A., Behbehani, J., Hashwa, F., Tyler-Smith, C., Zalloua, P. A., The Genographic Consortium. (2009): Geographical Structure of the Y-chromosomal Genetic Landscape of the Levant: A coastal-inland contrast. *Ann Hum Genet* 73, 568-581.
25. El-Sibai, M., Platt, D. E., Haber, M., Xue, Y., Youhanna, S. C., Wells, R. S., Izaabel, H., Sanyoura, M. F., Harmanani, H., Bonab, M. A. (2009): Geographical Structure of the Y-chromosomal Genetic Landscape of the Levant: A coastal-inland contrast. *Ann Hum Genet* 73, 568-581.
26. Elger, R. (2001): *Kleines Islam-Lexikon: Geschichte, Alltag, Kultur*; 3. Auflage. München: C. H. Beck.
27. Forster, P., Matsumura, S. (2005): Did early humans go north or south? *Science* 308, 965-966.

-
28. Gomes, V., Sánchez-Diz, P., Amorim, A., Carracedo, Á., Gusmão, L. (2010): Digging deeper into East African human Y chromosome lineages. *Hum Genet* 127, 603-613.
 29. Goodfellow, P. N., Lovell-Badge, R. (1993): SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 27, 71-92.
 30. Goodwin, W., Linacre, A., Hadi, S. (2007): An introduction to forensic genetics. Chichester, UK: John Wiley & Sons.
 31. Haak, W., Balanovsky, O., Sanchez, J. J., Koshel, S., Zaporozhchenko, V., Adler, C. J., Der Sarkissian, C. S. I., Brandt, G., Schwarz, C., Nicklisch, N., Dresely, V., Fritsch, B., Balanovska, E., Villems, R., Meller, H., Alt, K. W., Cooper, A., The Genographic Consortium. (2010): Ancient DNA from European early neolithic farmers reveals their near eastern affinities. *PLoS Biol* 8, e1000536.
 32. Haas, H., Budowle, B., Weiler, G. (1994): Horizontal polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Electrophoresis* 15, 153-158.
 33. Hammer, M. F., Karafet, T., Rasanayagam, A., Wood, E. T., Altheide, T. K., Jenkins, T., Griffiths, R. C., Templeton, A. R., Zegura, S. L. (1998): Out of Africa and back again: nested cladistic analysis of human Y chromosome variation. *Mol Biol Evol* 15, 427-441.
 34. Heine, P., Nissen, H. J. (2004): Von Mesopotamien zum Irak: Kleine Geschichte eines alten Landes; 2. Auflage (2., überarbeitete Auflage). Berlin: Klaus Wagenbach.
 35. Henegariu, O., Heerema, N. A., Dlouhy, S. R., Vance, G. H., Vogt, P. H. (1997): Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 23, 504-511.
 36. Holden, C. J. (2002): Bantu language trees reflect the spread of farming across sub-Saharan Africa: a maximum-parsimony analysis. *Proc R. Soc. Lond. B* 269, 793-799.
 37. Hösch, E. (2007): Geschichte des Balkans; 2. Auflage. München: C. H. Beck.
 38. Jacob, E. G. (1966): Grundzüge der Geschichte Afrikas; 7. Auflage. Darmstadt: Wissenschaftl. Buchgesellschaft.
 39. Jasinska, A., Krzyzosiak, W. J. (2004): Repetitive sequences that shape the human transcriptome. *FEBS Lett* 567, 136-141.
 40. Jeffreys, A. J., Wilson, V., Thein, S. L. (1985): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314, 67-73.
 41. Jobling, M. A. (2001): Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. *Forensic Sci Int* 118, 158-162.
 42. Jobling, M. A., Pandya, A., Tyler-Smith, C. (1997): The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med* 110, 118-124.
 43. Jobling, M. A., Tyler-Smith, C. (2003): The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature Rev Genet* 4, 598-612.
 44. Jorde, L. B., Watkins, W. S., Bamshad, M. J., Dixon, M. E., Ricker, C. E., Seielstad, M. T., Batzer, M. A. (2000): The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data. *Am J Hum Genet* 66, 979-988.

45. Karafet, T. M., Lansing, J. S., Redd, A. J., Reznikova, S., Watkins, J. C., Surata, S. P., Arthawiguna, W. A., Mayer, L., Bamshad, M., Jorde, L. B., Hammer, M. F. (2005): Balinese Y-Chromosome Perspective on the Peopling of Indonesia: Genetic Contributions from Pre-Neolithic Hunter-Gatherers, Austronesian Farmers, and Indian Traders. *Hum Biol* 77, 93-114.
46. Kaser, K. (2002): *Südosteuropäische Geschichte und Geschichtswissenschaft*; 2. Auflage. Wien, AUT; Köln, Weimar: Böhlau Verlag.
47. Kaser, K. (2011): *Balkan und Naher Osten: Einführung in eine gemeinsame Geschichte. Zur Kunde Südosteuropas II/40*. Wien, AUT; Köln, Weimar: Böhlau Verlag.
48. Kayser, M., Schneider, P. M. (2009): DNA-based prediction of human externally visible characteristics in forensics: motivations, scientific challenges, and ethical considerations. *Forensic Sci Int Genet* 3, 154-161.
49. Kreiser, K. (2012): *Geschichte der Türkei: Von Atatürk bis zur Gegenwart*. München: C. H. Beck.
50. Lessig, R., Zoledziwska, M., Fahr, K., Edelmann, J., Kostrzewa, M., Dobosz, T., Kleemann, W. J. (2005): Y-SNP-genotyping—a new approach in forensic analysis. *Forensic Sci Int* 154, 128-136.
51. Mansfield, E. S., Vainer, M., Enad, S., Barker, D. L., Harris, D., Rappaport, E., Fortina, P. (1996): Sensitivity, reproducibility, and accuracy in short tandem repeat genotyping using capillary array electrophoresis. *Genome Res* 6, 893-903.
52. Marx, C. (2004): *Geschichte Afrikas. Von 1800 bis zur Gegenwart*. Paderborn: Ferdinand Schöningh.
53. Matuz, J. (2006): *Das Osmanische Reich: Grundlinien seiner Geschichte*, 4. Auflage. Darmstadt: Wissenschaftl. Buchgesellschaft.
54. Mendez, F. L., Karafet, T. M., Krahn, T., Ostrer, H., Soodyall, H., Hammer, M. F. (2011): Increased resolution of Y chromosome haplogroup T defines relationships among populations of the Near East, Europe, and Africa. *Hum Biol* 83, 39-53.
55. Morley, J. M., Bark, J. E., Evans, C. E., Perry, J. G., Hewitt, C. A., Tully, G. (1999): Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *Int J Legal Med* 112, 241-248.
56. Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51, 263-273.
57. Nasidze, I., Sarkisian, T., Kerimov, A., Stoneking, M. (2003): Testing hypotheses of language replacement in the Caucasus: evidence from the Y-chromosome. *Hum Genet* 112, 255-261.
58. Norton, N., Williams, N. M., Williams, H. J., Spurlock, G., Kirov, G., Morris, D. W., Hoogendoorn, B., Owen, M. J., O'Donovan, M. C. (2002): Universal, robust, highly quantitative SNP allele frequency measurement in DNA pools. *Hum Genet* 110, 471-478.
59. Oldroyd, N. J., Urquhart, A. J., Kimpton, C. P., Millican, E. S., Watson, S. K., Downes, T., Gill, P. D. (1995): A highly discriminating octoplex short tandem repeat polymerase chain reaction system suitable for human individual identification. *Electrophoresis* 16, 334-337.

-
60. Onofri, V., Alessandrini, F., Turchi, C., Pesaresi, M., Buscemi, L., Tagliabracci, A. (2006): Development of multiplex PCRs for evolutionary and forensic applications of 37 human Y chromosome SNPs. *Forensic Sci Int* 157, 23-35.
61. Ostrogorsky, G. (1963): *Geschichte des byzantinischen Staates*; 3. Auflage. München: C. H. Beck.
62. Phillips, C., Salas, A., Sanchez, J. J., Fondevila, M., Gómez-Tato, A., Álvarez-Dios, J., Calaza, M., Casares de Cal, M., Ballard, D., Lareu, M. V., Carracedo, A. (2007): Inferring ancestral origin using a single multiplex assay of ancestry-informative marker SNPs. *Forensic Sci Int Genet* 1, 273-280.
63. Poetsch, M., Blöhm, R., Harder, M., Inoue, H., von Wurmb-Schwark, N., Freitag-Wolf, S. (2013a): Prediction of people's origin from degraded DNA—presentation of SNP assays and calculation of probability. *Int J Legal Med* 127, 347-357.
64. Poetsch, M., Wiegand, A., Harder, M., Blöhm, R., Rakotomavo, N., Freitag-Wolf, S., von Wurmb-Schwark, N. (2013b): Determination of population origin: a comparison of autosomal SNPs, Y-chromosomal and mtDNA haplogroups using a Malagasy population as example. *Eur J Hum Genet* 21, 1423-1428.
65. Postel, V. (2004): *Die Ursprünge Europas: Migration und Integration im frühen Mittelalter*. Stuttgart: Kohlhammer.
66. Quintáns, B., Álvarez-Iglesias, V., Salas, A., Phillips, C., Lareu, M. V., Carracedo, A. (2004): Typing of mitochondrial DNA coding region SNPs of forensic and anthropological interest using SNaPshot minisequencing. *Forensic Sci Int* 140, 251-257.
67. Reed, F. A., Tishkoff, S. A. (2006): African human diversity, origins and migrations. *Curr Opin Genet Dev* 16, 597-605.
68. Roewer, L. (2013): DNA fingerprinting in forensics: past, present, future. *Investig Genet* 4, 22.
69. Roewer, L., Kayser, M., de Knijff, P., Anslinger, K., Betz, A., Cagliá, A., Corach, D., Füredi, S., Henke, L., Hidding, M., Kärigel, H. J., Lessig, R., Nagy, M., Pascali, V. L., Parson, W., Rolf, B., Schmitt, C., Szibor, R., Teifel-Gredin, J., Krawczak, M. (2000): A new method for the evaluation of matches in non-recombining genomes: application to Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes in European males. *Forensic Sci Int* 114, 31-43.
70. Rogalla, U., Rychlicka, E., Derenko, M. V., Malyarchuk, B. A., Grzybowski, T. (2015): Simple and cost-effective 14-loci SNP assay designed for differentiation of European, East Asian and African samples. *Forensic Science International: Genetics* 14, 42-49.
71. Rootsi, S., Magri, C., Kivisild, T., Benuzzi, G., Help, H., Bermisheva, M., Kutuev, I., Barac, L., Peričić, M., Balanovsky, O., Pshenichnov, A., Dion, D., Grobei, M., Zhivotovsky, L. A., Battaglia, V., Achilli, A., Al-Zahery, N., Parik, J., King, R., Cinnioglu, C., Khusnutdinova, E., Rudan, R., Balanovska, E., Scheffrahn, W., Simonescu, M., Brehm, A., Goncalves, R., Rosa, A., Moisan, J.-P., Chaventre, A., Ferak, V., Füredi, S., Oefner, P. J., Shen, P., Beckman, L., Mikerezi, I., Terzic, R., Primorac, D., Cambon-Thomsen, A., Krumina, A., Torroni, A., Underhill, P. A., Santachiara-Benerecetti, A. S., Villems, R., Semino, O. (2004): Phylogeography of Y-chromosome haplogroup I reveals distinct domains of prehistoric gene flow in Europe. *Am J Hum Genet* 75, 128-137.

-
72. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
 73. Sajantila, A., Lukka, M. (1993): Improved separation of PCR amplified VNTR alleles by a vertical polyacrylamide gel electrophoresis. *Int J Legal Med* 105, 355-359.
 74. Sanchez, J. J., Børsting, C., Hallenberg, C., Buchard, A., Hernandez, A., Morling, N. (2003): Multiplex PCR and minisequencing of SNPs—a model with 35 Y chromosome SNPs. *Forensic Sci Int* 137, 74-84.
 75. Sanchez, J. J., Børsting, C., Morling, N. (2005): Typing of Y chromosome SNPs with multiplex PCR methods. *Methods Mol Biol* 297, 209-228.
 76. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
 77. Sassen, S. (2000): *Migranten, Siedler, Flüchtlinge: Von der Massenauswanderung zur Festung Europa*; 3. Auflage. Frankfurt am Main: Fischer Taschenbuchverlag.
 78. Scheck, F. R., Odenthal, J. (1998): *Syrien - Hochkulturen zwischen Mittelmeer und Arabischer Wüste*. Köln: Dumont Reiseverlag.
 79. Schneider, P. M., Meuser, S., Waiyawuth, W., Seo, Y., Rittner, C. (1998): Tandem repeat structure of the duplicated Y-chromosomal STR locus DYS385 and frequency studies in the German and three Asian populations. *Forensic Sci Int* 97, 61-70.
 80. Seielstad, M. T., Minch, E., Cavalli-Sforza, L. L. (1998): Genetic evidence for a higher female migration rate in humans. *Nat Genet* 20, 278-280.
 81. Seldin, M. F., Shigeta, R., Villoslada, P., Selmi, C., Tuomilehto, J., Silva, G., Belmont, J. W., Klareskog, L., Gregersen, P. K. (2006): European population substructure: clustering of northern and southern populations. *PLoS Genet* 2, e143.
 82. Semino, O., Magri, C., Benuzzi, G., Lin, A. A., Al-Zahery, N., Battaglia, V., Maccioni, L., Triantaphyllidis, C., Shen, P., Oefner, P. J., Zhivotovsky, L. A., King, R., Torroni, A., Cavalli-Sforza, L. L., Underhill, P. A., Santachiara-Benerecetti, A. S. (2004): Origin, diffusion, and differentiation of Y-chromosome haplogroups E and J: inferences on the neolithization of Europe and later migratory events in the Mediterranean area. *Am J Hum Genet* 74, 1023-1034.
 83. Semino, O., Passarino, G., Oefner, P. J., Lin, A. A., Arbuzova, S., Beckman, L. E., De Benedictis, G., Francalacci, P., Kouvatsi, A., Limborska, S., Marcikae, M., Mika, A., Mika, B., Primorac, D., Santachiara-Benerecetti, A. S., Cavalli-Sforza, L. L., Underhill, P. A. (2000): The genetic legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in extant Europeans: A Y chromosome perspective. *Science* 290, 1155-1159.
 84. Shen, M., Zhang, L., Bonner, M. R., Liu, C. S., Li, G., Vermeulen, R., Dosemeci, M., Yin, S., Lan, Q. (2008): Association between mitochondrial DNA copy number, blood cell counts, and occupational benzene exposure. *Environ Mol Mutagen* 49, 453-457.
 85. Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Ginger Fewell, H. D., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S.-F., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., McPherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P.,

- Pepin, K., Rock, S., Rohlfing, T., Scott, K., Schultz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S.-P., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Rozen, S., Page, D. C. (2003): The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423, 825-837.
86. Sparkes, R., Kimpton, C., Watson, S., Oldroyd, N., Barnett, L., Arnold, J., Thompson, C., Hale, R., Chapman, J., Urquhart, A., Gill, P. (1996): The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. *Int J Legal Med* 109, 186-194.
87. Stoneking, M. (1993): DNA and recent human evolution. *Evol Anthropol* 2, 60-73.
88. Stumpf, M. P. H., Goldstein, D. B. (2001): Genealogical and evolutionary inference with the human Y chromosome. *Science* 291, 1738-1742.
89. Syvänen, A.-C. (2001): Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat Rev Genet* 2, 930-942.
90. Syvänen, A.-C., Sajantila, A., Lukka, M. (1993): Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. *Am J Hum Genet* 52, 46-59.
91. Tishkoff, S. A., Williams, S. M. (2002): Genetic analysis of African populations: human evolution and complex disease. *Nat Rev Genet* 3, 611-621.
92. Trombetta, B., Cruciani, F., Sellitto, D., Scozzari, R. (2011): A new topology of the human Y chromosome haplogroup E1b1 (E-P2) revealed through the use of newly characterized binary polymorphisms. *PLoS One* 6, e16073.
93. Underhill, P. A., Passarino, G., Lin, A. A., Shen, P., Mirazon Lahr, M., Foley, R. A., Oefner, P. J., Cavalli-Sforza, L. L. (2001): The phylogeography of Y chromosome binary haplotypes and the origins of modern human populations. *Ann Hum Genet* 65, 43-62.
94. Vallone, P. M., Just, R. S., Coble, M. D., Butler, J. M., Parsons, T. J. (2004): A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int J Legal Med* 118, 147-157.
95. Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W., Li, P. W., Mural, R. J., Sutton, G. G., Smith, H. O., Yandell, M., Evans, C. A., Holt, R. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P., Ballew, R. M., Huson, D. H., Wortman, J. R., Zhang, Q., Kodira, C. D., Zheng, X. H., Chen, L., Skupski, M., Subramanian, G., Thomas, P. D., Zhang, J., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C., Broder, S., Clark, A. G., Nadeau, J., McKusick, V. A., Zinder, N., Levine, A. J., Roberts, R. J., Simon, M., Slayman, C., Hunkapiller, M., Bolanos, R., Delcher, A., Dew, I., Fasulo, D., Flanigan, M., Florea, L., Halpern, A., Hannenhalli, S., Kravitz, S., Levy, S., Mobarry, C., Reinert, K., Remington, K., Abu-Threideh, J., Beasley, E., Biddick, K., Bonazzi, V., Brandon, R., Cargill, M., Chandramouliswaran, I., Charlab, R., Chaturvedi, K., Deng, Z., Di Francesco, V., Dunn, P., Eilbeck, K., Evangelista, C., Gabrielian, A. E., Gan, W., Ge, W., Gong, F., Gu, Z., Guan, P., Heiman, T. J., Higgins, M. E., Ji, R. R., Ke, Z., Ketchum, K. A., Lai, Z., Lei, Y., Li, Z., Li, J., Liang, Y., Lin, X., Lu, F., Merkulov, G. V., Milshina, N., Moore, H. M., Naik, A. K., Narayan, V. A., Neelam, B., Nusskern, D., Rusch, D. B., Salzberg, S., Shao, W., Shue, B., Sun, J., Wang, Z., Wang, A., Wang, X., Wang, J., Wei, M., Wides, R., Xiao, C., Yan, C., Yao, A., Ye, J., Zhan, M., Zhang, W., Zhang, H., Zhao, Q., Zheng, L., Zhong, F., Zhong, W., Zhu, S., Zhao, S., Gilbert, D., Baumhueter, S., Spier, G., Carter, C., Cravchik, A., Woodage, T., Ali, F., An, H., Awe, A., Baldwin, D., Baden, H., Barnstead, M., Barrow, I., Beeson, K., Busam, D., Carver, A., Center, A., Cheng, M. L., Curry, L., Danaher, S., Davenport, L., Desilets, R., Dietz, S., Dodson, K., Doup, L., Ferriera, S., Garg, N.,

- Gluecksmann, A., Hart, B., Haynes, J., Haynes, C., Heiner, C., Hladun, S., Hostin, D., Houck, J., Howland, T., Ibegwam, C., Johnson, J., Kalush, F., Kline, L., Koduru, S., Love, A., Mann, F., May, D., McCawley, S., McIntosh, T., McMullen, I., Moy, M., Moy, L., Murphy, B., Nelson, K., Pfannkoch, C., Pratts, E., Puri, V., Qureshi, H., Reardon, M., Rodriguez, R., Rogers, Y. H., Romblad, D., Ruhfel, B., Scott, R., Sitter, C., Smallwood, M., Stewart, E., Strong, R., Suh, E., Thomas, R., Tint, N. N., Tse, S., Vech, C., Wang, G., Wetter, J., Williams, S., Williams, M., Windsor, S., Winn-Deen, E., Wolfe, K., Zaveri, J., Zaveri, K., Abril, J. F., Guigo, R., Campbell, M. J., Sjolander, K. V., Karlak, B., Kejariwal, A., Mi, H., Lazareva, B., Hatton, T., Narechania, A., Diemer, K., Muruganujan, A., Guo, N., Sato, S., Bafna, V., Istrail, S., Lippert, R., Schwartz, R., Walenz, B., Yooseph, S., Allen, D., Basu, A., Baxendale, J., Blick, L., Caminha, M., Carnes-Stine, J., Caulk, P., Chiang, Y. H., Coyne, M., Dahlke, C., Mays, A., Dombroski, M., Donnelly, M., Ely, D., Esparham, S., Fosler, C., Gire, H., Glanowski, S., Glasser, K., Glodek, A., Gorokhov, M., Graham, K., Gropman, B., Harris, M., Heil, J., Henderson, S., Hoover, J., Jennings, D., Jordan, C., Jordan, J., Kasha, J., Kagan, L., Kraft, C., Levitsky, A., Lewis, M., Liu, X., Lopez, J., Ma, D., Majoros, W., McDaniel, J., Murphy, S., Newman, M., Nguyen, T., Nguyen, N., Nodell, M., Pan, S., Peck, J., Peterson, M., Rowe, W., Sanders, R., Scott, J., Simpson, M., Smith, T., Sprague, A., Stockwell, T., Turner, R., Venter, E., Wang, M., Wen, M., Wu, D., Wu, M., Xia, A., Zandieh, A., Zhu, X. (2001): The sequence of the human genome. *Science* 291, 1304-1351.
96. Wallace, D. C., Brown, M. D., Lott, M. T. (1999): Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238, 211-230.
97. Watson, J. D., Crick, F. H. C. (1953): Molecular structure of nucleic acids. *Nature* 171, 737-738.
98. Y Chromosome Consortium. (2002): A nomenclature system for the tree of human Y-chromosomal binary haplogroups. *Genome Res* 12, 339-348.
99. Zalloua, P. A., Platt, D. E., El-Sibai, M., Khalife, J., Makhoul, N., Haber, M., Xue, Y., Izaabel, H., Bosch, E., Adams, S. M., Arroyo, E., López-Parra, A. M., Aler, M., Picornell, A., Ramon, M., Jobling, M. A., Comas, D., Bertranpetit, J., Wells, R. S., Tyler-Smith, C., The Genographic Consortium. (2008a): Identifying genetic traces of historical expansions: Phoenician footprints in the Mediterranean. *Am J Hum Genet* 83, 633-642.
100. Zalloua, P. A., Xue, Y., Khalife, J., Makhoul, N., Debiante, L., Platt, D., Royyuru, A. K., Herrera, R. J., Hernanz, D. F. S., Blue-Smith, J., Wells, R. S., Comas, D., Bertranpetit, J., Tyler-Smith, C., The Genographic Consortium. (2008b): Y-chromosomal diversity in Lebanon is structured by recent historical events. *Am J Hum Genet* 82, 873-882.

6.2 Internetquellen

Bundeskriminalamt: <https://www.bka.de/DE/UnsereAufgaben/Ermittlungsunterstuetzung/DNA-Analyse/DNAstatistik/dnaStatistik.html>, Stand 26.04.2017

MLA style: "The Nobel Prize in Chemistry 1993". *Nobelprize.org*. Nobel Media AB 2014: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/, Stand 17.01.2016

National Human Genome Research Institute: <http://www.genome.gov>, Stand 06.01.2016

Polizeiliche Kriminalstatistik 2014: https://www.bka.de/SharedDocs/Downloads/DE/Publikationen/PolizeilicheKriminalstatistik/2014/pks2014ImkBericht.pdf?__blob=publicationFile&v=1, Stand April 2015

The World Factbook 2013-14. Washington, DC: Central Intelligence Agency, 2013: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/geos/tu.html>, Stand 14.01.2016

The World Factbook 2013-14. Washington, DC: Central Intelligence Agency, 2013:
https://www.cia.gov/library/publications/resources/the-world-factbook/graphics/ref_maps/physical/pdf/middle_east.pdf, Stand 23.01.2016

Y-DNA Haplogroup Tree 2016, Version: 11.12, Date: 12.01.2016, <http://www.isogg.org/tree/>,
Stand: 13.01.2016

Y Chromosome Consortium, ISOGG Wiki, http://isogg.org/wiki/Y_Chromosome_Consortium,
Stand 19.02.2016

6.3 Herstellerprotokolle

ABI Prism® SNaPshot™-Multiplex-Kit Protocol (2000) Applied Biosystems

AmpliTaqGold® DNA-Polymerase, LD Hot Start, Strong Finish™ Protocol (2010) Applied Biosystems

DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis. User Guide (2012) Applied Biosystems by Life Technologies Corporation

Exonuclease I (Exo I). Product information (2011a) Fermentas

FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase. Certificate of Analysis (2011b) Fermentas

innuPrep DNA Mini Kit Manual (2011a) Analytik Jena

PowerPlex® ESX 17 System, Technical Manual (2016) Promega

PowerPlex® Fusion 6C System, Technical Manual (2016) Promega

rAPid Alkaline Phosphatase *User's Manual Version 2.0* (2006) Roche Diagnostics

A Anhang

A.1 Abkürzungsverzeichnis

®	Registered Trademark
°C	Grad Celsius
ca.	circa
µl	Mikroliter
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A	Base <i>Adenosin</i>
AgNO ₃	Silbernitrat
Aqua bidest.	lat.: aqua bidestillata; Bidestilliertes Wasser/ steriles Wasser
bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
Hg	Haplogruppe
C	Base <i>Cytosin</i>
CCD	engl. charge-coupled device
CH ₃ COOH	Essigsäure
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat
ddATP	2',3'-Dideoxyadenosin-5'-Triphosphat
ddCTP	2',3'-Dideoxycytidin-5'-Triphosphat
ddGTP	2',3'-Dideoxyguanosin 5'-Triphosphat
ddTTP	2',3'-Dideoxythymidin 5'-Triphosphat
Del.	Deletion
dGTP	2'-Desoxyguanosin 5'-Triphosphat
DNA	engl. deoxyribonucleic acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	2'-Desoxythymidin 5'-Triphosphat
engl.	englisch
f	engl. forward
G	Base <i>Guanin</i>
Hg	Haplogruppe
HGP	Human Genome Project
HNO ₃	Salpetersäure
inkl.	inklusive
Ins.	Insertion
M	Molar (Stoffmengenkonzentration c in Mol pro Liter)
Mbp	Mega-Basenpaare (= 1.000.000 Basenpaare)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute/Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mt	mitochondrial
MSY	engl. male specific region of the Y-chromosome
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
NRY	engl. non-recombining portion of the Y chromosome
PCR	engl. polymerase chain reaction; Polymerasekettenreaktion
r	engl. reverse
RFLP	engl. restriction fragment length polymorphism

s	Sekunde
s.d.	engl. self-designed
SNP	engl. single nucleotide polymorphisms
SRY	engl. sex-determining region of the Y-chromosome
STR	engl. short tandem repeat
T	Base <i>Thymin</i>
TM	Unregistered Trademark
türk.	türkisch
U	engl. enzyme unit; Enzymeinheit
U/min	Umdrehungen pro Minute
v. Chr.	vor Christus
n. Chr.	nach Christus
vgl.	vergleiche
VNTR	engl. variable number tandem repeats
z.B.	zum Beispiel

A.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Das Osmanische Reich Mitte des 16. Jahrhunderts	16
Abbildung 1-2: Karte des Nahen Ostens. nach der Central Intelligence Agency (CIA).....	18
Abbildung 3-1: Elektropherogramm der Y-Multi 4 während des Etablierungsprozesses.....	38
Abbildung 3-2: Elektropherogramm der Y-Multi 4 nach abgeschlossener Etablierung	39
Abbildung 3-3: Elektropherogramm der anfänglich ungesplitteten Y-Multi 5	41
Abbildung 3-4: Elektropherogramm der Y-Multi 5A mit inkonstant darstellbarem SNP M69.....	42
Abbildung 3-5: Elektropherogramm der Y-Multi 5A und Y-Multi 5B einer DNA-Probe nach Abschluss des Etablierungsprozesses.....	42
Abbildung 3-6: Elektropherogramm der Y-Multi 6C und Y-Multi 6D einer DNA-Probe nach Abschluss des Etablierungsprozesses.....	44
Abbildung 3-7: Haplogruppenverteilung innerhalb Nordafrikas	45
Abbildung 3-8: Haplogruppenverteilung innerhalb Westafrikas	45
Abbildung 3-9: Haplogruppenverteilung innerhalb der Türkei.....	47
Abbildung 3-10: Haplogruppenverteilung innerhalb Deutschlands.....	48
Abbildung 3-11: Haplogruppe E und Subgruppen mit ihren Häufigkeiten in den untersuchten Metapopulationen.....	49
Abbildung 3-12: Haplogruppe J und Subgruppen mit ihren Häufigkeiten in den untersuchten Metapopulationen.....	50
Abbildung 3-13: Haplogruppe R und Subgruppen sowie ihre Häufigkeiten in den untersuchten ...	51
Abbildung A-1: Haplogruppen-Diagramm-Übersicht mit Y-Multi 1-Multimix.....	87
Abbildung A-2: Haplogruppen-Diagramm Y-Multi 4	88
Abbildung A-3: Haplogruppen-Diagramm Y-Multi 5	89
Abbildung A-4: Haplogruppen-Diagramm Y-Multi 6	90

A.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: PCR-Programm Sequenzierung	31
Tabelle 2-2: Fluoreszenzfarbstoffe der ddNTPs sowie des Längenstandards LIZ120 des ABI PRISM®SNaPshot®-Multiplex-Kits	33

Tabelle 3-1: Detaillierte Haplogruppenverteilungen innerhalb der Metapopulationen Nord- und Westafrika	46
Tabelle 3-2: Detaillierte Haplogruppenverteilungen innerhalb der Balkanregion	46
Tabelle 3-3: Detaillierte Haplogruppenverteilungen der Metapopulation Naher Osten	48
Tabelle 3-4: Korrelation zwischen Herkunftsland und ermittelter Herkunftsregion anhand autosomaler und Y-chromosomaler SNPs	51
Tabelle A-1: Allgemeines Singleplex-PCR-Programm	75
Tabelle A-2: Allgemeines Multiplex-PCR-Programm.....	75
Tabelle A-3: SNaPshot-PCR-Programm.....	76
Tabelle A-4: Primer-Mix und SNaPshot-Primer-Mix Y-Multi 4.....	77
Tabelle A-5: Primer-Mix und SNaPshot-Primer-Mix Y-Multi 5A.....	78
Tabelle A-6: Primer-Mix und SNaPshot-Primer-Mix Y-Multi 5B.....	79
Tabelle A-7: Primer-Mix und SNaPshot-Primer-Mix Y-Multi 6C.....	80
Tabelle A-8: Primer-Mix und SNaPshot-Primer-Mix Y-Multi 6D.....	81
Tabelle A-9: Primersequenzen Y-Multi 1	82
Tabelle A-10: Primersequenzen Y-Multi 4.....	83
Tabelle A-11: Primersequenzen Y-Multi 5	84
Tabelle A-12: Primersequenzen Y-Multi 6 (Teil 1).....	85
Tabelle A-13: Primersequenzen Y-Multi 6 (Teil 2).....	86
Tabelle A-14: Detaillierte Verteilung der Haplogruppe E (und Subhaplogruppen)	91
Tabelle A-15: Detaillierte Verteilung der Haplogruppe J (und Subhaplogruppen)	92
Tabelle A-16: Detaillierte Verteilung der Haplogruppe R (und Subhaplogruppen)	93
Tabelle A-17: Detaillierte Verteilung seltenerer Haplogruppen	94

A.4 Laborprotokolle

A.4.1 Allgemeine Laborprotokolle

A.4.1.1 Polymerasekettenreaktion

Singleplex-PCR

- 0,2-0,5 ng DNA-Einsatz
- je 0,4 µM Primer a/b
- 1,5-1,9 mM MgCl₂ (aus 1,25 µl GeneAmp® 10X PCR Buffer + MgCl₂ Solution)
- 0,5 Units/reaction AmpliTaqGold® Polymerase
- 200µM dNTPs (äquimolar)
- Gesamtvolumen ad 12,5 µl (Aqua bidest)
- PCR-Programm laut Tabelle A-1

Tabelle A-1: Allgemeines Singleplex-PCR-Programm

Aktivierung der Hot-Start DNA-Polymerase	95°C	8 min
30 Zyklen	Denaturierung	94°C 30 s
	Annealing	50/55/60/62°C 1 min
	Elongation	72°C 2 min
	abschließende PCR-Produkt Synthese	72°C 30 min
Programmende	4°C	---

Multiplex-PCR

- 1-3 ng DNA-Einsatz
- 1 µl Primer-Mix (Konzentrationsangaben siehe Laborprotokolle Anhang A.4.2)
- 1,5-2,0 mM MgCl₂ (aus 1,25 µl GeneAmp® 10X PCR Buffer + MgCl₂ Solution)
- 0,5 Units/reaction AmpliTaqGold® Polymerase
- 200µM dNTPs (äquimolar)
- Gesamtvolumen ad 12,5 µl (Aqua bidest)
- PCR-Programm laut Tabelle A-2

Tabelle A-2: Allgemeines Multiplex-PCR-Programm

Aktivierung der Hot-Start DNA-Polymerase	95°C	8 min
30/35 Zyklen	Denaturierung	94°C 30 s
	Annealing	55/58/60/62°C 1 min
	Elongation	72°C 2 min
	abschließende PCR-Produkt Synthese	60°C 60 min
Programmende	4°C	---

A.4.1.2 Minisequenzierung

- 2 µl SNaPshot Multiplex Ready Reaction Mix
- 0,5-2 µl aufgereinigtes PCR-Produkt, je nach Intensität der Produktfärbung laut Gelprotokoll
- 1 µl SNaPshot-Primer-Mix
- Gesamtvolumen ad 7 µl (Aqua bidest)
- SNaPshot-PCR-Programm laut Tabelle A-3

Tabelle A-3: SNaPshot-PCR-Programm

Denaturierung		96°C	60 s
25 Zyklen	Denaturierung	96°C	10 s
	Annealing	50°C	5 s
	Elongation	60°C	10 s
Programmende		4°C	---

A.4.2 Laborprotokolle etablierter Assays

A.4.2.1 Y-Multi 4

Multiplex-PCR

- Laborprotokoll laut Anhang A.4.1.1
- Primer-Mix Tabelle A-4. 1,8 mM Gesamt-MgCl₂.
- PCR-Programm Tabelle A-2, Zyklenanzahl 35, Annealingtemperatur 60°C.

SNaPshot-Multiplex-PCR

- Laborprotokoll laut Anhang A.4.1.2
- Der eingesetzte Y-Multi 4 SNaPshot-Primer-Mix ist Tabelle A-4 zu entnehmen.

Tabelle A-4: Primer-Mix und SNaPshot-Primer-Mix Y-Multi 4

SNP	Multiplex-PCR-Primerpaar	Konzentration (je Primer)	SNaPshot-Primer	Konzentration
M2	y-m2a; y-m2b	2,8 µM	M2	2,4 µM
M33	y-m33a; y-m33b	2,8 µM	M33	3,2 µM
M35	M35a; M35b	4,4 µM	M35	4,0 µM
M75	y-m75a; y-m75b	6,0 µM	M75s2	4,8 µM
M108.1	M100.18a; M108.1b	2,8 µM	M108s2	2,4 µM
M112	M112a; M112b	2,8 µM	M112	2,4 µM
M146	M146a; M146b	2,8 µM	M146	2,4 µM
M150	M150a; M150b	2,8 µM	M150	2,4 µM
M152	M152a; M152b	2,8 µM	M152	2,0 µM
M182	M182a; M182b	2,8 µM	M182	3,2 µM
M215	y-m215a; y-m215b	2,8 µM	M215s2	3,6 µM
P2	P2a; P2b	2,8 µM	P2	2,4 µM
P147	P147a; P147b	2,8 µM	P147	3,6 µM
Primer-Gesamtvolumen 20,6 µl			Primer-Gesamtvolumen 9,7 µl	
Gesamtvolumen ad 25 µl (Aqua bidest)			Gesamtvolumen ad 25 µl (Aqua bidest)	

A.4.2.2 Y-Multi 5

A.4.2.2.1 Y-Multi 5A

Multiplex-PCR

- Laborprotokoll laut Anhang A.4.1.1
- Primer-Mix Tabelle A-5. 2,0 mM Gesamt-MgCl₂.
- PCR-Programm Tabelle A-2. Zyklenanzahl 35, Annealingtemperatur 60°C.

SNaPshot-Multiplex-PCR

- Laborprotokoll laut Anhang A.4.1.2
- Der eingesetzte Y-Multi 5A SNaPshot-Primer-Mix ist Tabelle A-5 zu entnehmen.

Tabelle A-5: Primer-Mix und SNaPshot-Primer-Mix Y-Multi 5A

SNP	Multiplex-PCR-Primerpaar	Konzentration (je Primer)	SNaPshot-Primer	Konzentration
M12	y-m12a; y-m12b	4,0 µM	M12	5,2 µM
M69	y-m69a; y-m69b	3,6 µM	M69	4,8 µM
M201	y-m201a; y-m201b	2,0 µM	M201	3,2 µM
M267	y-m267a; y-m267b	2,0 µM	M267	3,2 µM
M285	y-m285a; y-m285b	2,8 µM	M285	3,6 µM
P58	y-p58a; y-p58b	2,8 µM	P58	4,8 µM
P287	y-287a; y-p287b	1,6 µM	P287	1,2 µM
Primer-Gesamtvolumen 9,4 µl			Primer-Gesamtvolumen 6,5 µl	
Gesamtvolumen ad 25 µl (Aqua bidest)			Gesamtvolumen ad 25 µl (Aqua bidest)	

A.4.2.2.2 Y-Multi 5B**Multiplex-PCR**

- Laborprotokoll laut Anhang A.4.1.1
- Primer-Mix Tabelle A-6. 1,8 mM Gesamt-MgCl₂.
- PCR-Programm Tabelle A-2. Zyklenanzahl 30, Annealingtemperatur 60°C.

SNaPshot-Multiplex-PCR

- Laborprotokoll laut Anhang A.4.1.2
- Der eingesetzte Y-Multi 5A SNaPshot-Primer-Mix ist Tabelle A-6 zu entnehmen.

Tabelle A-6: Primer-Mix und SNaPshot-Primer-Mix Y-Multi 5B

SNP	Multiplex-PCR-Primerpaar	Konzentration (je Primer)
M21	y-m21a; y-m21b	3,2 µM
M26	y-m26a; y-m26b	4,4 µM
M67	y-m67a; y-m67b	2,8 µM
M170	y-m170a; y-m170b	4,8 µM
M172	y-m172a; y-m172b	4,0 µM
M253	y-m253a; y-m253b	2,0 µM
P215	y-p215a; y-p215b	4,0 µM
P3741	y-p3741a; y-p3741b	2,8 µM
Primer-Gesamtvolumen		12,6 µl
Gesamtvolumen ad 25 µl (Aqua bidest)		

SNaPshot-Primer	Konzentration	
M21	4,0 µM	
M26	4,0 µM	
M67	4,0 µM	
M170	3,2 µM	
M172	3,2 µM	
M253	2,4 µM	
P37.2	4,0 µM	
P41.2	2,4 µM	
P215	4,8 µM	
Primer-Gesamtvolumen		8,0 µl
Gesamtvolumen ad 25 µl (Aqua bidest)		

A.4.2.3 Y-Multi 6

A.4.2.3.1 Y-Multi 6C

Multiplex-PCR

- Laborprotokoll laut Anhang A.4.1.1
- Primer-Mix Tabelle A-7. 1,5 mM Gesamt-MgCl₂.
- PCR-Programm Tabelle A-2. Zyklenanzahl 35, Annealingtemperatur 60°C.

SNaPshot-Multiplex-PCR

- Laborprotokoll laut Anhang A.4.1.2
- Der eingesetzte Y-Multi 5A SNaPshot-Primer-Mix ist Tabelle A-7 zu entnehmen.

Tabelle A-7: Primer-Mix und SNaPshot-Primer-Mix Y-Multi 6C

SNP	Multiplex-PCR-	Konzentration	SNaPshot-Primer	Konzentration
M20	y-m20a; y-m20b	2,8 µM	M20	4,0 µM
M173	y-m173a; y-m173b	3,2 µM	M173	4,8 µM
M242	y-m242a; y-m242b	1,6 µM	M242	2,4 µM
M343	y-m343a; y-m343b	1,6 µM	M343	2,0 µM
PS21	y-ps21a; y-ps21b	2,0 µM	PS21	2,4 µM
P77	y-p77a; y-p77b	1,6 µM	P77	2,0 µM
L23	y-l23a; y-l23b	1,6 µM	L23	2,4 µM
Primer-Gesamtvolumen 7,2 µl			Primer-Gesamtvolumen 5,0 µl	
Gesamtvolumen ad 25 µl (Aqua bidest)			Gesamtvolumen ad 25 µl (Aqua bidest)	

A.4.2.3.2 Y-Multi 6D**Multiplex-PCR**

- Laborprotokoll laut Anhang A.4.1.1
- Primer-Mix Tabelle A-8. 1,5 mM Gesamt-MgCl₂.
- PCR-Programm Tabelle A-2. Zyklenanzahl 30, Annealingtemperatur 58°C.

SNaPshot-Multiplex-PCR

- Laborprotokoll laut Anhang A.4.1.2
- Der eingesetzte Y-Multi 5A SNaPshot-Primer-Mix ist Tabelle A-8 zu entnehmen.

Tabelle A-8: Primer-Mix und SNaPshot-Primer-Mix Y-Multi 6D

SNP	Multiplex-PCR-Primerpaar	Konzentration (je Primer)	SNaPshot-Primer	Konzentration
M17	y-m17a; y-m17b	3,2 µM	M17s2	3,6 µM
M27	y-m27a; y-m27b	2,4 µM	M27	2,4 µM
M73	y-m73a; y-m73b	3,2 µM	M73	2,4 µM
M124	y-m124a; y-m124b	2,0 µM	M124	2,0 µM
M147	y-m147a; y-m147b	2,8 µM	M147	2,0 µM
M269	y-m269a; y-m269b	3,2 µM	M269	3,2 µM
M317	y-m317a; y-m317b	2,0 µM	M317	2,4 µM
M412	y-m412a; y-m412b	2,0 µM	M412	2,0 µM
L131	y-l131a; y-l131	2,8 µM	L131	2,4 µM
Primer-Gesamtvolumen 11,8 µl			Primer-Gesamtvolumen 5,6 µl	
Gesamtvolumen ad 25 µl (Aqua bidest)			Gesamtvolumen ad 25 µl (Aqua bidest)	

Tabelle A-13: Primersequenzen Y-Multi 6 (Teil 2)

SNP	Mutation	PCR-Primer Sequenz (5'→3') (F) = Forward Primer (R) = Reverse Primer	SNaPshot-Primer Sequenz (5'→3') 5' Tail wird klein geschrieben und in Klammern angegeben	Literaturnachweis
P77	G/A (lit.) <i>G/A^f</i>	(F) GAAACACTTGTTTATGGCCG (R) TCGATCTCCTGACCTCGTGAT	(tcagtcagtcagtcagtcagt)-CCGGGCGCGGTGGCTCAC	(Mendez et al., 2011)
L23	G/A (lit.) <i>G/A^f</i>	(F) TACTCAGGAGGCTGAGGCA (R) TGGGGACAAAGGATATTCTG	(tcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagtcagt)- GGGCGACAGAGCGAGACT	s.d.
L131	C/T (lit.) <i>C/T^f</i>	(F) TGGTCTTTGCCCTGGGTATTT (R) TAGGCTGGGGGACAAAAAAA	(tcagtcagtcagtcagtcag)-CCTGGGTATTTCTTCCT	(Mendez et al., 2011)

A.6 Haplogruppen-Diagramme

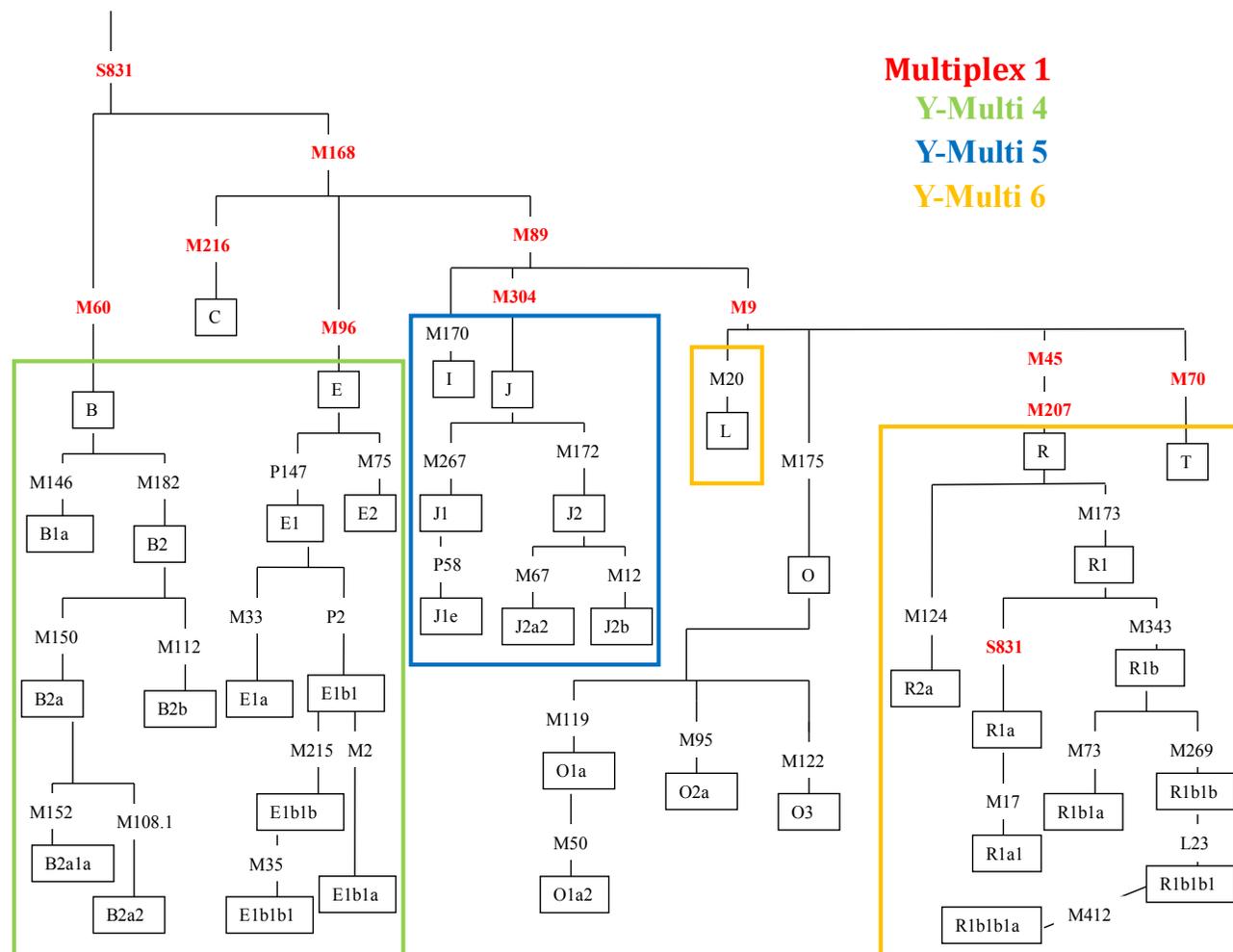


Abbildung A-1: Haplogruppen-Diagramm-Übersicht mit Y-Multi 1-Multimix

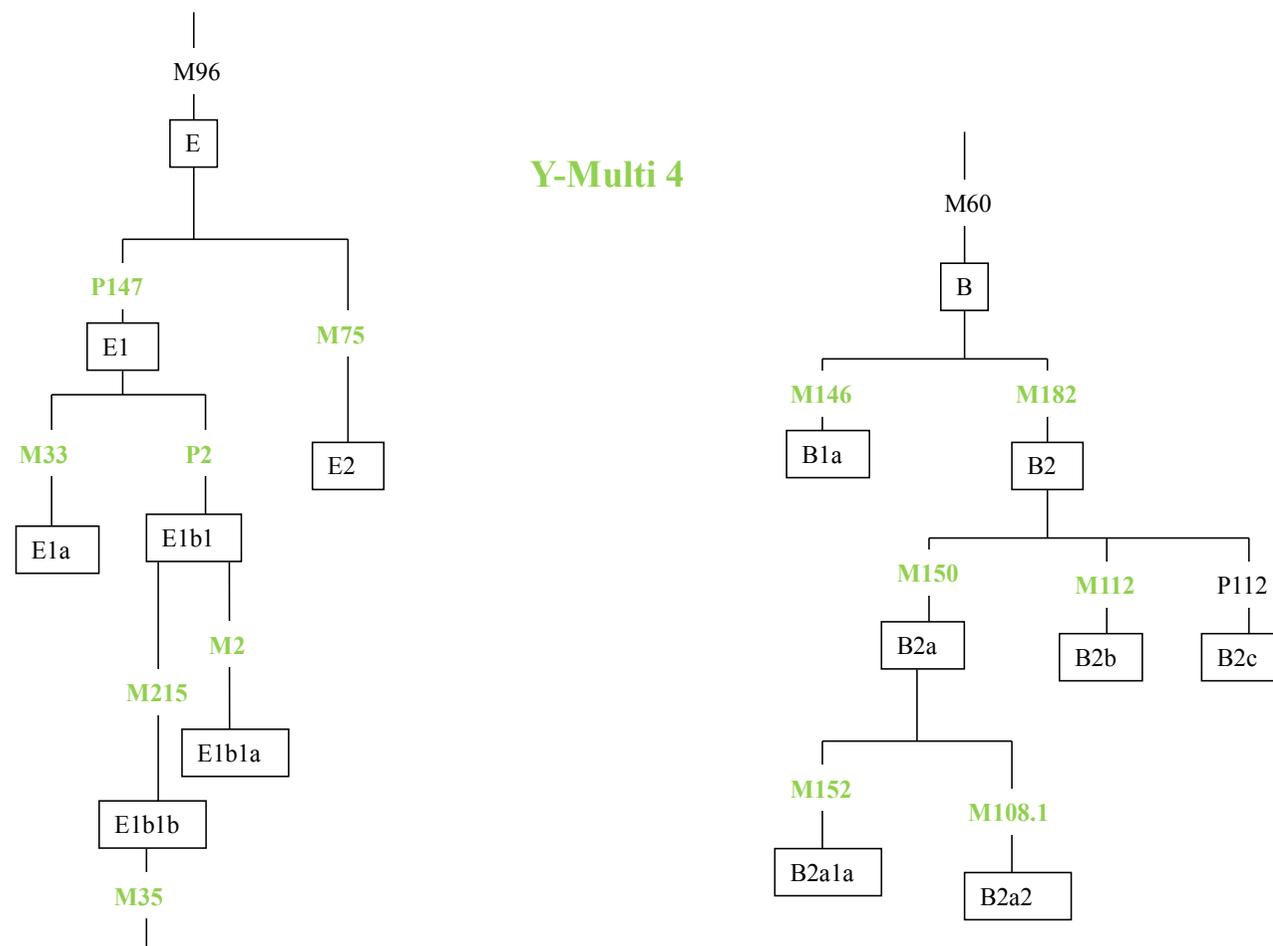


Abbildung A-2: Haplogruppen-Diagramm Y-Multi 4

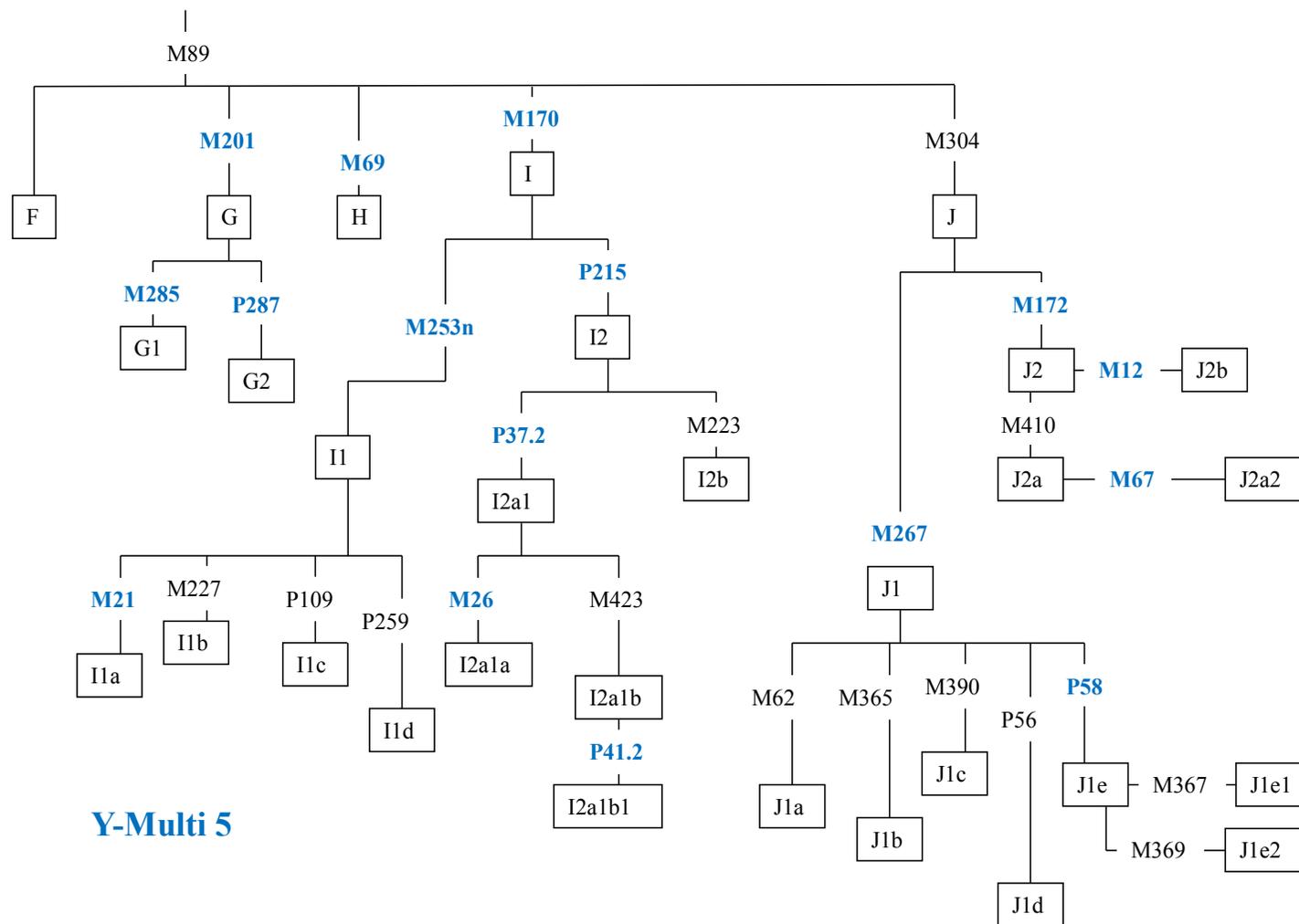


Abbildung A-3: Haplogruppen-Diagramm Y-Multi 5

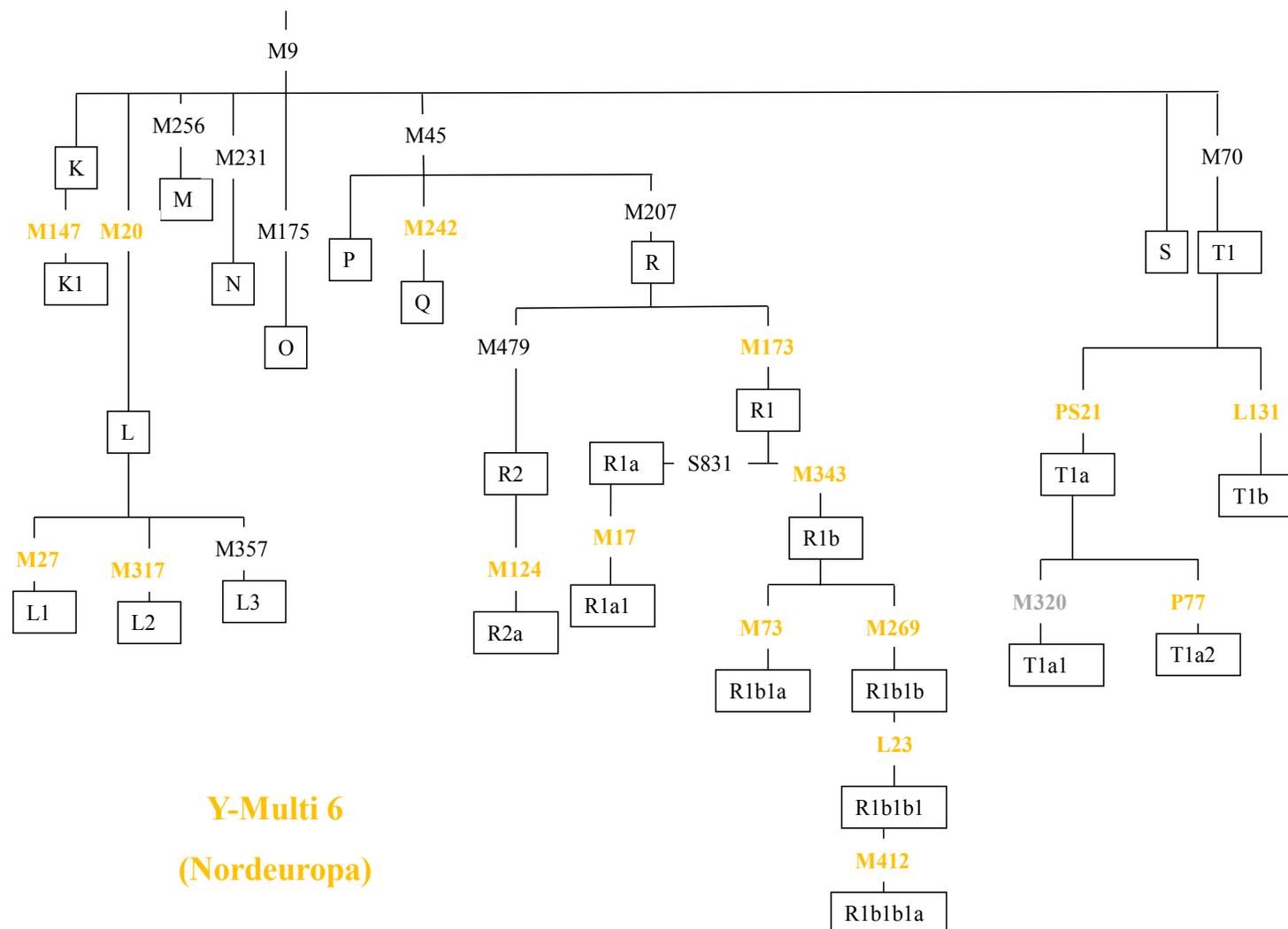


Abbildung A-4: Haplogruppen-Diagramm Y-Multi 6

*Aufgrund eines erschwerten Etablierungsprozesses ist M320 nicht im endgültigen Y-Multi 6 Multimix enthalten

A.7 Tabellen der haplogruppenspezifischen Auswertung

Tabelle A-14: Detaillierte Verteilung der Haplogruppe E (und Subhaplogruppen)

		Haplogruppen					
		E* (n=1)	E (n=6)	E1a (n=1)	E1b1a (n=38)	E1b1b1 (n=70)	E2 (n=8)
Länder und Regionen	Nordafrika (gesamt)	1		1	2	37	1
	Algerien					2	
	Marokko	1		1	2	28	
	Tunesien					7	1
	Westafrika (gesamt)		6		36		5
	Ghana		1		13		1
	Guinea		3		1		2
	Kamerun		1		9		1
	Nigeria		1		12		1
	Sierra Leone				1		
	Balkan (gesamt)					14	
	Albanien					1	
	Bosnien und Herzegowina					1	
	Kosovo					5	
	Mazedonien					3	
	Serbien					4	
	Türkei					12	
	Naher Osten (gesamt)					4	2
	Iran					1	
	Libanon					3	2
	Nordeuropa (gesamt)					3	
	Deutschland					3	

Tabelle A-15: Detaillierte Verteilung der Haplogruppe J (und Subhaplogruppen)

		Haplogruppen			
		J1* (n=9)	J1e (n=30)	J2 (n=33)	J2a2 (n=29)
Länder und Regionen	Nordafrika (gesamt)	3	9	2	
	Marokko	3	8	1	
	Tunesien		1	1	
	Balkan (gesamt)		2	4	13
	Bosnien und Herzegowina				1
	Kosovo			1	8
	Kroatien		1	1	
	Mazedonien				1
	Rumänien		1		
	Serbien			2	3
	Türkei	2	9	15	4
	Naher Osten (gesamt)	3	10	12	12
	Irak		4	6	3
	Iran			1	
	Israel				1
	Libanon	3	6	4	5
	Syrien			1	3
	Nordeuropa (gesamt)	1			
	Deutschland	1			

Tabelle A-16: Detaillierte Verteilung der Haplogruppe R (und Subhaplogruppen)

		Haplogruppen				
		R1a1 (n=19)	R1b (n=6)	R1b1b (n=31)	R1b1b1a (n=8)	R2a (n=12)
Länder und Regionen	Nordafrika (gesamt)			3		
	Algerien			1		
	Marokko			2		
	Westafrika (gesamt)		1			
	Ghana		1			
	Balkan (gesamt)	1		11		
	Bosnien und Herzegowina	1				
	Kosovo			4		
	Kroatien			2		
	Mazedonien			2		
	Serbien			3		
	Türkei	8	4			8
	Naher Osten (gesamt)	3	1	14		4
	Irak	1				
	Iran	2				
	Libanon		1			3
	Syrien					1
	Nordeuropa (gesamt)	7		3	8	
	Deutschland	7		3	8	

Tabelle A-17: Detaillierte Verteilung seltenerer Haplogruppen

		Haplogruppen																
		A (n=1)	B* (n=1)	B1a (n=1)	C (n=1)	G* (n=5)	G2 (n=13)	H (n=16)	I (n=7)	I* (n=7)	I2 (n=8)	I2* (n=1)	I2a1a (n=3)	L* (n=6)	L1 (n=1)	T (n=1)	T* (n=1)	T1b (n=11)
Länder und Regionen	Nordafrika (gesamt)																	
	Algerien					1												
	Marokko			1		1	2										1	
	Westafrika (gesamt)																	
	Ghana		1															
	Balkan (gesamt)																	
	Bosnien und Herzegowina									1								
	Kosovo							2		2	2							
	Kroatien									4	1							
	Mazedonien										1							1
	Rumänien										1							
	Serbien							9			2			1				1
	Nordeuropa (gesamt)	1								7	1							
	Deutschland	1								7	1							
	Türkei				1	2	10	3				1	3	3			1	4
	Naher Osten (gesamt)					1	1	2							2			4
	Irak														2			1
	Iran							1										1
	Libanon					1	1	1										2
	Syrien														1			1

B Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. med. Thomas Bajanowski, für die Realisierung meiner Promotion im Essener Institut für Rechtsmedizin. Ohne die zur Verfügung gestellten Gegebenheiten und Strukturen, sowie die wertvollen Mitarbeiter, wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein ganz besonderer Dank für eine hervorragende, allzeit zuverlässige und ausdauernde wissenschaftliche Betreuung gilt Prof. Dr. rer. nat. Micaela Poetsch. Die aufgebrauchte Zeit, die ständige Unterstützung und geduldige Beratung, sowie die Präsenz als Doktormutter habe ich immer sehr zu schätzen gewusst.

Birgit Perrey, Heike Schäfer und Violetta Seel möchte ich für die herzliche Arbeitsatmosphäre, die geduldige Einarbeitung und Anleitung sowie die fleißige Unterstützung im Labor danken. Ohne ihre Hilfe zwischen PCR, Gelelektrophorese und ABI, wäre mir die Verwirklichung der Promotion nicht geglückt.

Außerdem gilt mein Dank all den Probanden, die einwilligten, ihre DNA für Forschungszwecke zur Verfügung zu stellen, und somit das Ausgangsmaterial für diese Arbeit lieferten.

Im privaten Kreise danke ich meiner Familie, meiner Mutter und meinem Vater, sowie dem lieben Joh, dass sie mich nie gelenkt, aber stets begleitet haben, dass sie meine Pläne, Ziele und Entscheidungen respektieren und mich in jeglicher Umsetzung unterstützen, und dass sie es schaffen, mich niemals den Blick für die wichtigen Dinge aus den Augen verlieren zu lassen.

Mein besonderer Dank gilt meinem persönlichen Motivationsgeber und geliebten Bruder Timo für seine akribische Hilfe bei jeglichen Korrekturarbeiten, viele Word-Tutorials, anspornende Gespräche und gemeinsam geschmiedete Pläne, sowie vor allem für seine herrlich positive Art, wann immer ich sie am meisten gebrauchen kann.

Ich danke all meinen lieben Freundinnen und Freunden, die mich mit ihrer tollen Gesellschaft immer bei Laune halten und die Zeit fernab von Uni und Doktorarbeit so wunderbar lebenswert machen. Besonders danke ich meiner lieben Freundin Saraa, die meinen Alltag mit ihrem ansteckenden Optimismus und Frohsinn ständig bereichert und es schafft, jeden Anflug von schlechter Laune im Keim zu ersticken.

C Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.