

Aus dem
CharitéCentrum 5
Institut für Rechtsmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. M. Tsokos

Habilitationsschrift

„Hochpolymorphe molekulargenetische Marker in der Transplantationsimmunologie, Anthropologie und Forensik,,

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach: „Forensische Genetik“

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. rer. nat. Marion Nagy

Eingereicht: Juni/2007

Dekan: Professor Dr. med. M. Paul

1. Gutachter: Prof. Dr. med. H. Pfeiffer

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. M. A. Rothschild

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Zusammenfassung	2
1 Einführung	4
1.1 Das HLA-System	6
1.2 Die STR-Systeme	10
2 Zusammenfassung der eigenen Arbeiten im wissenschaftlichen Kontext	14
2.1 Strategien zur Detektion hochpolymorpher HLA-Marker	14
2.2 Strategien zur Detektion hochpolymorpher STR-Marker	19
2.3 Das Chimärismus-Monitoring: STR-Marker in der Transplantationsimmunologie	22
2.4 HLA- und STR-Marker in der evolutionären Anthropologie	35
2.5 HLA- und STR-Marker in der forensischen Genetik	46
3 Abschließende Diskussion und Ausblick	52
4 Abkürzungsverzeichnis	56
5 Literaturverzeichnis	58
6 Ausgewählte Publikationen zu den eigenen Arbeiten	75
Danksagung	
Erklärung	

Zusammenfassung

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeiten wurden Methoden zur Analyse hochpolymorpher HLA- und STR-Marker entwickelt und ihre Anwendung in den verschiedenen Bereichen der Transplantationsimmunologie, Anthropologie und Forensik studiert.

Der kritischste Punkt der PCR-basierten forensischen Analyse aber auch der Chimärismus-Analyse im Niedrigzellbereich ist die DNS-Isolation selbst. In umfangreichen Studien wurde insbesondere die Probenvorbereitung optimiert und ein einfaches, standardisiertes Lyse-Protokoll für nahezu alle biologischen Materialien kreiert. Einzige Ausnahmen waren telogene Haare, Spermaspuren und Knochenmehl. Nach Optimierung und Validierung wurde die automatische, auf Magnetpartikeln basierende DNS-Extraktion bei mehr als 50.000 Routineproben eingesetzt. Es gab keinen Hinweis auf Kontamination oder Anwesenheit eines PCR-Inhibitors. Mit definierten Zellproben konnte bereits aus drei kernhaltigen Zellen ein komplettes STR-Profil aus 9 STR-Markern erstellt werden.

Eine mögliche weitere Reduzierung der Nachweisgrenze des DNS-Analyseverfahrens führte zur Gesamtgenom-Amplifikation (WGA). Die Nachweisgrenze der WGA zur Erlangung eines vollständigen STR-Profils lag bei 100 pg. Unterhalb dieser DNS-Menge wurden heterozygote Imbalancen, Imbalancen zwischen den Loci, Allelverluste sowie zusätzliche Allele detektiert. Gepoolte WGA-DNS verbesserte die Qualität des Multiplex STR-Profils. Ein STR Profil ohne allelische Imbalance, das die Basis für eine akkurate forensische, aber auch Chimärismus-Analyse darstellt, konnte für den Niedrig-DNS-Bereich jedoch nicht erreicht werden.

Schon frühe Studien zur Einführung der HLA-Marker in die forensische Spurenanalyse ergaben eine hohe Sensitivität der verwendeten PCR-SSO Systeme, sogar für degradierte DNS. Die neu etablierte Methodik der Kurzstreckensequenzierung mittels PyrosequencingTM für HLA-Marker ist besonders für den Hochdurchsatz geeignet. Damit können genetische Risikofaktoren komplexer Erkrankungen aber auch Populationsstudien, die HLA-Genotypisierungen großer Kohorten notwendig machen, hochauflösend analysiert werden. Die physikalische Separation von HLA-Allelen ermöglichte die Extraktion einer sehr langen Sequenzregion eines Allels mit den jeweiligen Exon- und Intronabschnitten. Zwei neue HLA-B Allele konnten ohne den sonst für den Nachweis neuer Allele vorgeschriebenen Klonierungsschritt erstmals eindeutig detektiert werden. Studien zur Isolation und Charakterisierung eines erweiterten molekularen Haplotypen durch SNP- und STR-Analysen

in unterschiedlicher Distanz vom HLA-B Extraktionsort, weisen darauf hin, dass es möglich ist, einen über 140 kb langen Haplotypen mittels HSE zu isolieren.

Obwohl die STR-Analyse nicht prospektiv zwischen gesunden Leukozyten des Empfängers oder Zellen des beginnenden leukämischen Rezidivs unterscheiden kann, haben die Ergebnisse zum zellartspezifischen Chimärismus-Monitoring nach Stammzelltransplantation (SZT) deutlich gemacht, dass persistierende oder wiedererscheinende Empfängerzellen ein nahendes Rezidiv bereits weit vor dem klinischen Befund anzeigen. Immunmodulierende Therapien konnten gut dokumentiert werden.

Chimärismus-Analysen sind auch bei der allogenen SZT im Kindesalter ein wichtiger Bestandteil des Posttransplantations-Monitorings. Für zwei wesentliche Grunderkrankungen der pädiatrischen SZT, die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie und die Fanconi-Anämie, sind die dargelegten Ergebnisse einzigartig. Typisierungen von Subfraktionen, wie den Vorläuferzellen bei Leukämien, sind auch hier aussagekräftiger als eine Gesamtzell-Analyse aller nukleären Zellen, zumindest in der Frühphase nach Transplantation. Hinsichtlich des Abstoßungsrisikos und der Transplantatfehlfunktion war die Analyse der T-Zell-spezifischen Population bei allen Patientengruppen aufschlussreich. Immunmodulatorische Maßnahmen müssen bei allen untersuchten Patientengruppen sorgfältig ausgewählt werden, um die therapiebedingte Mortalität zu reduzieren. Das Phänomen eines relativ stabilen gemischten Chimärismus bei einigen Patienten, verbunden mit einer kompletten Remission, bedarf weiterhin der Aufklärung.

Das Phänomen der persistierenden Spender-Zellen im peripheren Blut noch Jahre nach orthotoper Lebertransplantation (OLT) konnte eindeutig nachgewiesen werden. Der beschriebene, klinische Fall einer akuten myeloischen Leukämie nach OLT, war der erste Bericht, der eine transplantatlokalisierte, spenderspezifische Leukämie demonstrierte, diagnostiziert durch STR-Analysen.

Die Anwendung der HLA- und STR-Marker in der Populationsgenetik, am Beispiel der Besiedlungsgeschichte des Pazifik, hat ein sehr komplexes Bild gezeichnet und gezeigt, dass fundierte Darlegungen über Weg, Zeit und Raum von Völkerwanderungen nur das Ergebnis linguistischer, archäologischer, anthropologischer und molekulargenetischer Untersuchungen sein kann. Die ermittelten genetischen Daten unter Einsatz völlig unterschiedlich mutierender Systeme und unterschiedlichen Vererbungslinien gaben Aufschluss über die Geschichte von Populationen, die das heutige Erscheinungsbild der Pazifikbewohner geformt haben.

1 Einführung

Die Neukombination der elterlichen Erbanlagen ist die Grundlage der morphologischen Einzigartigkeit jedes Menschen. Für die meisten phänotypischen Merkmale ist jedoch die Art und Weise der genetischen Determination unbekannt. Humane Variabilitätsmarker waren sehr lange beschränkt auf anthropometrische Messungen. Alphonse Bertillon (1879-80) entwickelte Ende des 19ten Jahrhunderts das erste geschlossene System der Personenidentifizierung. Seine Begrenzung wurde aber schon dadurch offenkundig, weil es zum Beispiel zum Nachweis der biologischen Vaterschaft, bei der es um das Verhältnis von Ähnlichkeit zu Unähnlichkeit geht, praktisch versagte. Demgemäß spielen diese Merkmale in der Rechtsmedizin heute keine Rolle mehr, mit einer Ausnahme, dem Abdruck der Papillarlinien der menschlichen Fingerbeere, dem so genannten Fingerabdruck. Da jeder Mensch einen charakteristischen Fingerabdruck aufweist und sogar eineiige Zwillinge darin verschieden sind, stellt er immer noch die beste Methode zur Identifizierung einzelner Individuen dar. Aber auch hierfür gilt, dass die genetische Grundlage bislang unverstanden und eine zuverlässige statistische Absicherung der Befunde nicht möglich ist.

Es bedeutete daher einen entscheidenden Fortschritt, als Landsteiner 1901 das ABO-Blutgruppensystem entdeckte und später gezeigt werden konnte, dass es sich hier um einen genetischen Polymorphismus im klassischen Sinn handelt, d. h., dass zwei oder mehr unterschiedliche Varianten eines Genlokus existieren. Die Analyse dieser und weiterer Proteinpolymorphismen erfolgt auf der Ebene der Genprodukte. Ihnen kommt aber aufgrund der geringen Anzahl von Allelen nur eine begrenzte Aussagekraft zu, so dass sie heute zum Nachweis der Identität praktisch keine Rolle mehr spielen. Eine Ausnahme bilden die HLA-Antigene, die hochpolymorph sind, und denen zum Beispiel bei der immunologischen Spenderauswahl für Transplantationen eine überragende Bedeutung zukommt.

Es bedeutete einen Quantensprung für die Forensik, als Ende der 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts die Möglichkeit eröffnet wurde, genetische Polymorphismen auf der Ebene der Erbsubstanz, der Desoxyribonukleinsäure (DNS), nachzuweisen. Die Einteilung dieser DNA-Polymorphismen kann gut danach erfolgen, ob es sich um variable Einheiten an einem Locus handelt, oder um Sequenzen, die über das gesamte Genom verteilt sind. Im ersten Fall erhält man mit einer Single Locus Sonde pro Individuum maximal zwei unterschiedliche Fragmente, im anderen Fall mit einer Multi Locus Sonde ein individuelles Bandenmuster.

Zusätzlich kann man die Polymorphismen nach ihrer molekularen Ursache unterscheiden. Es kann sich um Variationen in der Erkennungssequenz von Restriktionsenzymen handeln, die

zu Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP) führen. Zum anderen können es Restriktionenschnittstellen-Polymorphismen (RSP) sein, bei denen die Erkennungssequenz unverändert ist, die Entfernung zwischen zwei Schnittstellen aber wegen der unterschiedlichen Anzahl repetitiver Elemente variabel ist. Diese repetitiven Elemente weisen in der Regel eine tandemartige Organisation auf (VNTR; „variable number of tandem repeats“). So demonstrierten Alec Jeffreys und seine Mitarbeiter [80] 1985 erstmals, dass es möglich ist, mit einer Sonde, die durch 23fache tandemartige Verknüpfung eines 33 Basenpaare langen, häufig wiederkehrenden GC-reichen Sequenzmotivs synthetisiert wurde, gleichzeitig viele einzelne, hypervariable DNS-Orte auf verschiedenen Chromosomen zu erfassen. Nach Autoradiographie lag ein individualspezifisches Bandenmuster vor, das Alec Jeffreys als DNS-„Fingerprint“ bezeichnete, ein genetischer Fingerabdruck also, in seiner Einmaligkeit vergleichbar mit dem Abdruck der Fingerbeere. Die Wahrscheinlichkeitswerte dafür, dass zwei nichtverwandte Individuen denselben DNS-Fingerprint aufwiesen, waren deutlich geringer als der Reziprokwert der Weltbevölkerung, so dass mit Ausnahme monozygoter Zwillinge Individualspezifität angenommen werden konnte.

Wenn auch die RFLP-Methode bei der Analyse polymorpher Regionen einen entscheidenden Fortschritt gegenüber den serologischen und zellulären Techniken darstellte, wie eigene erste Arbeiten dazu belegen [18, 95, 122, 124], stand dem doch ein hoher methodischer Aufwand gegenüber. Die rasche Weiterentwicklung der Molekularbiologie mit der Etablierung der Sequenzierung von Genen und nichtkodierenden Regionen, vor allem aber die Möglichkeit der spezifischen DNS-Vermehrung mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) führte zu einer Revolutionierung der Analysemöglichkeiten polymorpher Regionen [120, 171]. Die PCR erlaubte die spezifische Amplifikation der variablen Regionen und die anschließende Analyse der Sequenzpolymorphismen der Allele. Eine um Größenordnungen gesteigerte Sensitivität sowie die vollständige Automatisierbarkeit der Methode führten letztlich zum Durchbruch der PCR-basierten DNS-Analyse [59, 123, 124, 128]. Damit war dem „biologischen“ ein „molekulargenetischer Fingerabdruck“ gefolgt, d.h., eine Wiedergabe des höchsten Polymorphismus nichtkodierender DNS-Regionen, der so genannten „short tandem repeat“ (STR) Systeme sowie des größten Polymorphismus kodierender DNS-Regionen, des humanen Leukozytenantigen (HLA)-Systems.

1.1 Das HLA-System

Das HLA-System, das auch als Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC, *major histocompatibility complex*) des Menschen bezeichnet wird, kodiert Proteine auf der Zelloberfläche von Leukozyten, deren Hauptdeterminanten als großes Gencluster auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.31) liegen (Abb. 1). Die Entdeckungsgeschichte des HLA-Systems begann 1954 mit der Beobachtung von Dausset [38], wonach Serum polytransfundierter Individuen Antikörper enthielten, die Leukozyten anderer Individuen agglutinierten [149, 205]. Die Definition des ersten HLA-Antigens, „Mac“ (HLA-A2) genannt, erfolgte 1958 [39]. Nach der Entschlüsselung der Blutgruppen wurden Bluttransfusionen Routine und die Transplantation von Gewebe schien ebenfalls kein Problem darzustellen. Die Gewebeabstoßung erfolgte aber wider Erwarten sofort. Diese Abstoßung von transplantiertem Gewebe führte zum Namen *Histokompatibilitätskomplex*.

Das HLA-System weist von allen bekannten menschlichen Genkomplexen die höchste Polygenie und den größten Polymorphismus auf. Der 3,6 Megabasen große Komplex, der ungefähr ein Tausendstel des menschlichen Genoms umfasst, ist unterteilt in drei Hauptregionen bzw. Klassen. Die HLA-Klasse I und II Gene sind als Gencluster angeordnet und durch eine Gruppe von Genen, den so genannten Klasse III Genen, getrennt (Abb.1).

Die Haupthistokompatibilitätsantigene, die für die eigentliche immunologische Funktion des HLA-Systems, die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“, relevant sind, werden durch die HLA-Klasse I und II Gene kodiert.

Es gibt mehrere HLA-Klasse I und II Gene, die Proteine mit unterschiedlichen Peptidbindungsspezifitäten kodieren und für jeden Locus multiple Allele. Derzeit kennt man innerhalb der wichtigsten Klasse I Gene 489 HLA-A, 830 HLA-B und 266 HLA-C Allele (ImMunoGeneTics-Datenbank, http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla_release_2.15.0). Der polymorphste HLA-Klasse II Genort HLA-DRB1 besitzt 463 verschiedene Allele.

Die HLA-Klasse I Region mit ca. 1700 Kilobasen (kb) enthält eine Vielzahl von Genorten (Abb. 1), die so genannten klassischen transplantationsrelevanten HLA-A, -B und -C Gene sowie die nichtklassischen HLA-Gene, oftmals Pseudogene, die nicht exprimiert werden. Die HLA-Klasse I Genorte kodieren für verschiedene Polypeptide der α -Ketten der Klasse I Genprodukte, die mit dem auf Chromosom 15 kodierten, nicht kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin, zellmembranständige Heterodimere bilden [64]. Die genomische Anordnung der Klasse I Gene entspricht dem biochemischen Aufbau der Moleküle. Sie lassen sich auf

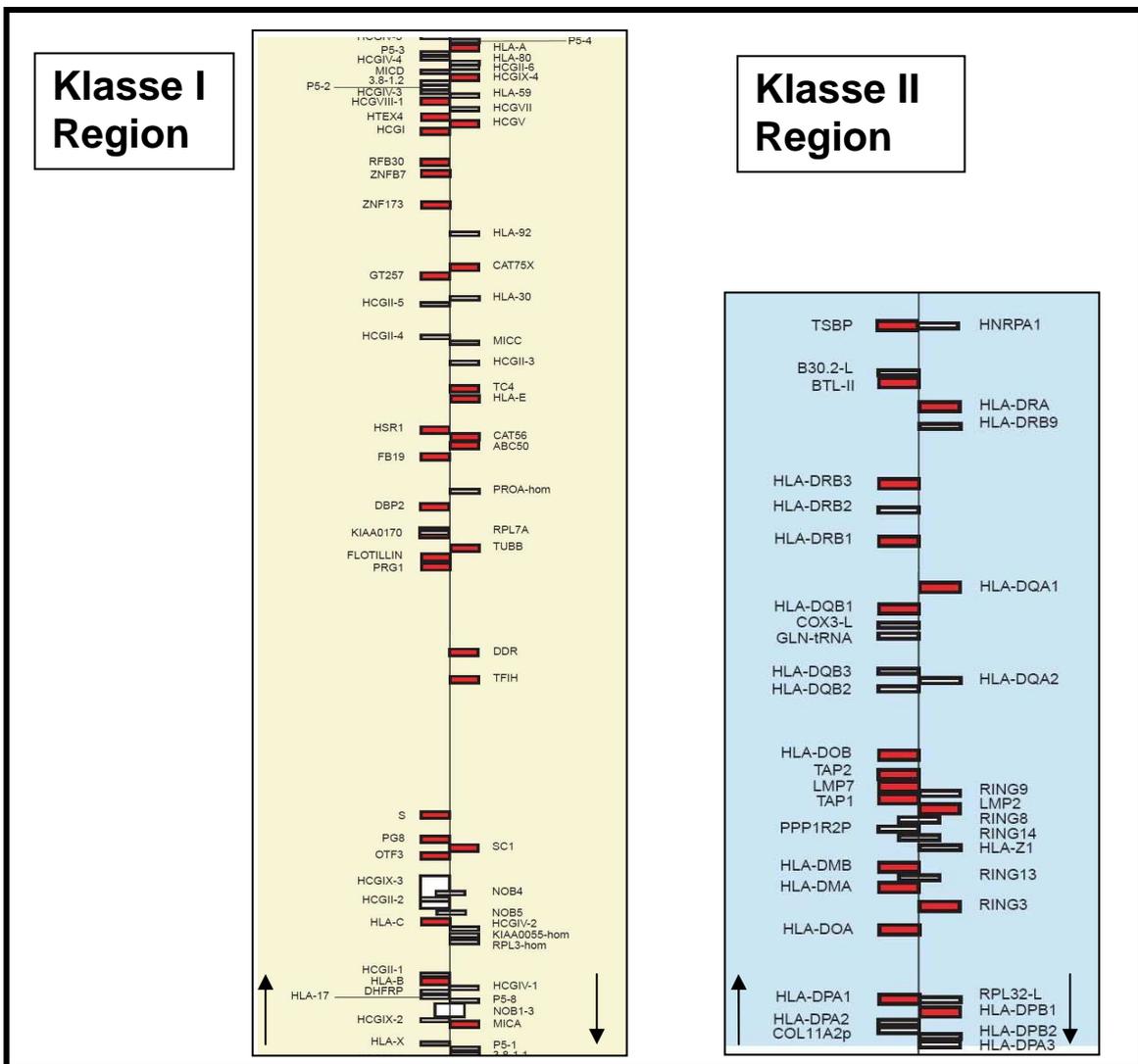
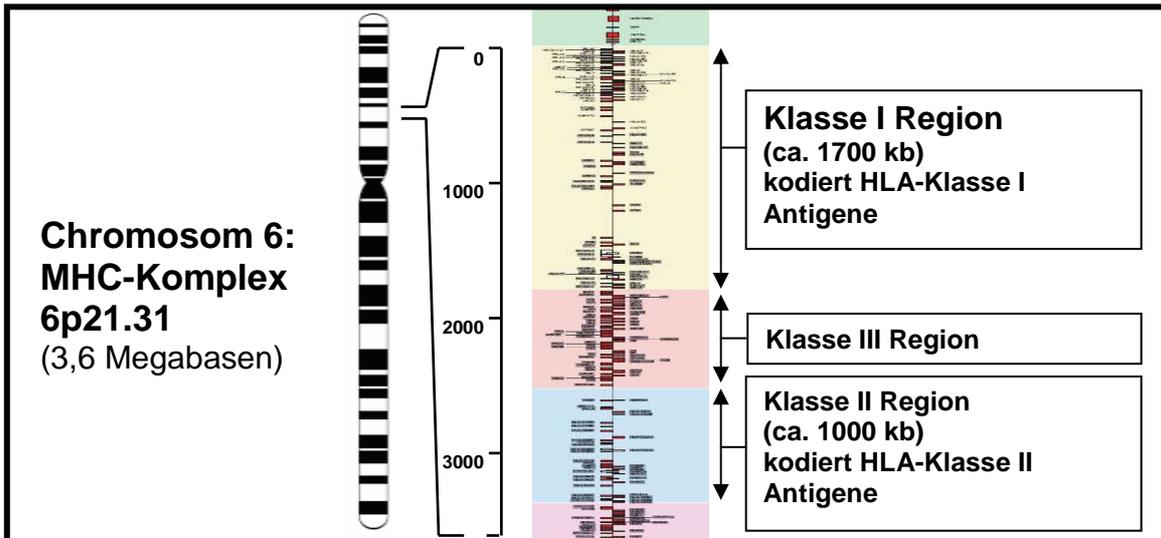


Abb. 1 Der Haupthistokompatibilitätskomplex - MHC *major histocompatibility complex* – des Menschen

Der MHC exprimiert Proteine auf der Zelloberfläche von Leukozyten, deren Hauptdeterminanten als großes Gencluster auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 (6p21.31) kodiert werden. Rot markiert: Gene, alle anderen: Pseudogene, Pfeile: transkriptionelle Orientierung (Ausschnitt aus: Gene Map of the Human Major Histocompatibility Complex [158] <http://www.genetype.com>)

allen kernhaltigen Körperzellen, auf reifen Erythrozyten und in haploider Expression auf Spermien nachweisen. Die Klasse I Genprodukte binden endogene Peptide, präsentieren diese auf der Zelloberfläche dem T-Zellrezeptor und dienen demzufolge als Zielstruktur für die Immunüberwachung.

Die HLA-Klasse II Gene in der ca. 1000 kb umfassenden Region (Abb. 1) kodieren ebenfalls für zellmembranständige Heterodimere, wie die klassischen HLA-DR, -DQ, -DP Antigene, die aus einer α -Kette und einer β -Kette bestehen [93, 215]. Die A-Gene steuern die α -Ketten, die B-Gene die β -Ketten eines jeden HLA-Klasse II Dimers. Die HLA-DQ und -DP Region umfassen jeweils fünf Genorte von denen jeweils nur ein A- bzw. B-Gen (DQA1, DQB1 und DPA1 und DPB1) exprimiert wird. Alle anderen sind Pseudogene. Während diese Genanzahl für alle Individuen gleich ist, weist die HLA-DR Subregion mit einem DRA Genort und neun DRB Genorten, wovon fünf Pseudogene darstellen, einige Besonderheiten auf. Die Anzahl der DRB Gene ist haplotypabhängig. Die genomische Organisation korreliert aber auch bei den Klasse II Genen mit dem biochemischen Aufbau ihrer Genprodukte. Die HLA-Klasse II Genprodukte sind nicht ubiquitär exprimiert, sondern lassen sich hauptsächlich auf B-Lymphozyten, aktivierten T-Zellen, Monozyten, dendritischen Zellen sowie einigen Epithel- und Endothelzellen nachweisen. Sie präsentieren bevorzugt fremde Peptide den CD4-positiven T-Zellen, so genannte Helfer-T-Zellen, die die Wirtszelle nicht abtöten, sondern zur Selbstverteidigung aktivieren.

Die Tatsache, dass bei allen bisher untersuchten Wirbeltieren ein Genkomplex zu finden war, der in seinem Aufbau und in seiner Funktion dem HLA-System des Menschen äquivalent ist, spricht für eine hohe Konservierung des Haupthistokompatibilitätskomplexes während der Evolution. Der Ursprung der HLA-Moleküle liegt wahrscheinlich 500 bis 700 Millionen Jahre zurück und wird kurz nach der evolutionären Entstehung eukaryotischer Organismen eingeordnet ist [17, 65, 139, 145].

HLA-Allele desselben Genortes zeigen eine Nukleotidvariabilität zwischen 5 und 17%, während die Alleldifferenzen auf anderen Genorten weniger als 1% betragen, was bestätigt, dass der gemeinsame Vorfahre der HLA-Allele weit zurückliegt. Viele HLA-Allele sind so alt, dass sie z.B. dem Schimpansen-Allel verwandter sind als einem alternativen humanen Allel, was als Transspezies-Polymorphismus bezeichnet wird. Homologe der HLA-A und -DRB1 Allellinien sind in Schimpansen, Bonobos und humanen Linien konserviert [26]. Eigene HLA-Klasse II DQ-DRB Haplotypanalysen an Rhesusaffen [90] ergaben große

Differenzen zu den humanen Primaten. Die Ergebnisse bestätigen Untersuchungen an anderen nichthumanen Primaten [26], und belegen die frühe Separation der Hominiden.

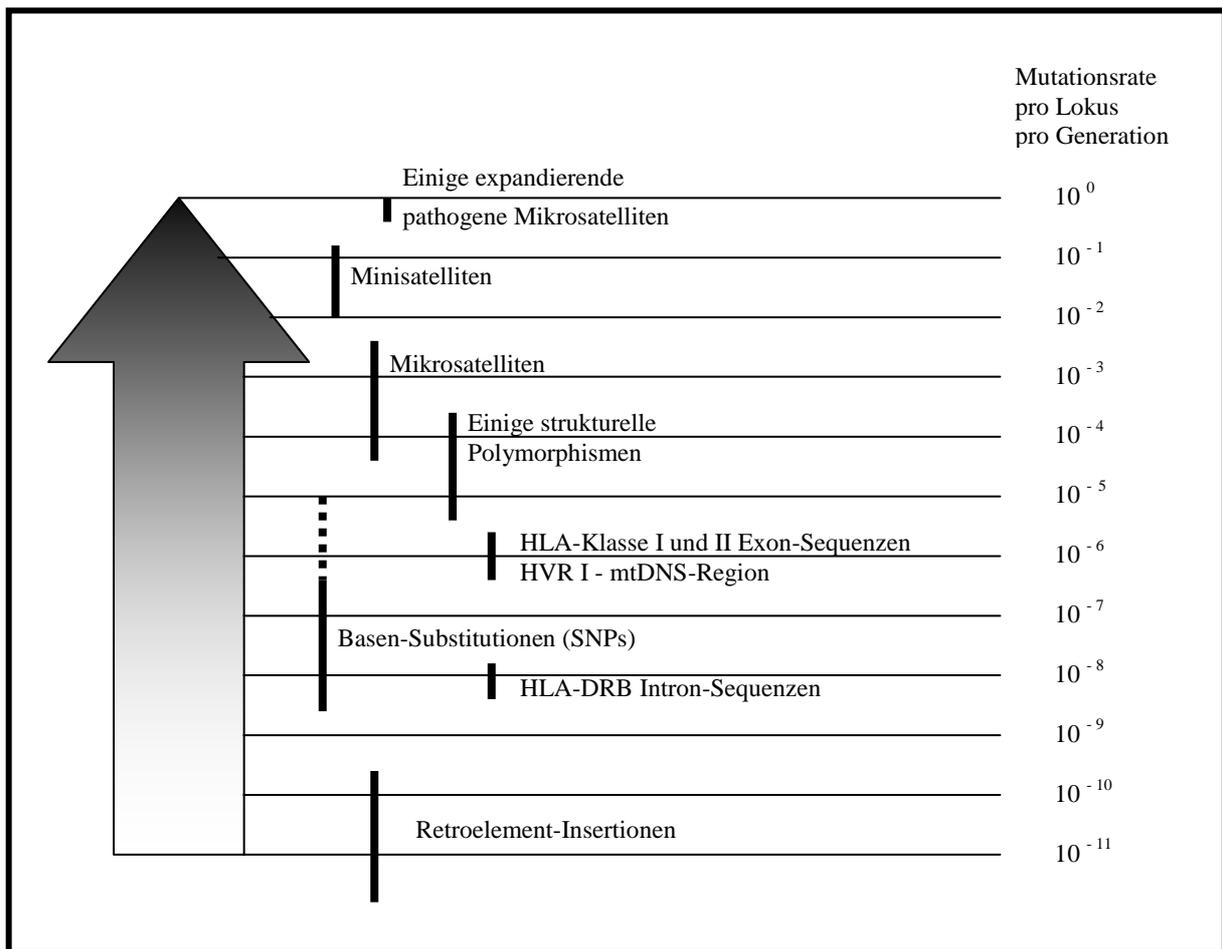


Abb. 2 Überblick über die Mutationsraten verschiedener Klassen von polymorphen Markern (nach Jobling et al. [82])

Die Mutationsrate der HLA-Gene ist generell sehr niedrig (Abb. 2). Sie unterscheidet sich je nach Genort und -bereich, ob es sich um kodierende (Exon) oder nichtkodierende (Intron) Bereiche und in den jeweiligen kodierenden Bereichen, ob es sich um synonyme oder nichtsynonyme Basensubstitutionen der Peptid- und Nichtpeptidbindungsregionen handelt. Selbst in den Intronregionen unterscheidet sich die Mutationsrate, z.B. in der Zahl der Nukleotidsubstitutionen am 5'- und 3'-Ende des Introns [55] je nach Stärke des „hitchhiking“ Effekts des benachbarten, unter Selektionsdruck stehenden Locus. Die Nukleotidsubstitutionsrate der DRB Introne von 2 bis 4×10^{-8} pro Locus und Generation ist sehr niedrig und stimmt mit der Vorstellung überein, dass die Mehrzahl der heutigen Allele

innerhalb der letzten 250 000 Jahre entstanden ist [13]. Die Mutationsrate der Exone liegt pro Peptidbindungsregion bei 0,8 bis $2,7 \times 10^{-6}$ in Abhängigkeit vom Genort.

Die hohe HLA-Diversität des modernen Menschen kann nur durch das Wirken eines enormen Selektionsdruckes erklärt werden. Er erfolgt über zwei wesentliche Szenarien, den Heterozygotenvorteil, d.h. Individuen mit heterozygoten HLA-Haplotypen können aufgrund ihres breiteren Spektrums der Antigenbindungsspezifität besser infektiöse Erkrankungen überleben und der frequenzabhängigen Selektion, d.h. seltene Allele sind bevorteilt, wenn Pathogene versuchen, die Immundetektion in Individuen mit dem höher frequenten Allel zu umgehen. Hughes und Nei [77, 78] fanden in der Region der Antigenbindung die höchste Nukleotidsubstitutionsrate. Zusätzliche Diversität entsteht durch Rekombination innerhalb heterozygoter Gene. Die durchschnittliche Rekombinationsrate, die im einfachsten Fall nur von der physikalischen Distanz zweier Marker abhängig ist, liegt bei 1% und variiert deutlich innerhalb der HLA-Region, mit der höchsten von 1,3% zwischen HLA-DRB1 und -B und 0,8% zwischen HLA-DQB1 und -DPB1 bzw. HLA-B und -A und unter 0,2% zwischen HLA-DRB1 und -DQA1 [10, 178]. Der HLA-Komplex zeigt damit ein hohes Kopplungsungleichgewicht. Die eng benachbarten Genorte werden als Haplotypblock vererbt. Die Anwendung des HLA-Systems in der evolutionären Anthropologie ist damit evident (siehe hierzu Kapitel 2.4).

Neben dem Anwendungsgebiet der Transplantationsimmunologie und der Anthropologie hat das HLA-System aufgrund seines herausragenden Polymorphismus und der Haplotypvererbung auch in der Forensik große Bedeutung bei der Klärung von komplexen Abstammungsfällen und bei der Identifizierung von Individuen (siehe Kapitel 2.5) erlangt.

1.2 Die STR-Systeme

Die STR-Systeme, auch Mikrosatelliten genannt, sind variable Anordnungen kurzer, sich wiederholender Sequenzmotive (Repeats) von 2 bis 7, überwiegend 2 bis 5 Basenpaaren (bp) Länge an einem bestimmten DNS-Lokus, die häufig, über alle Chromosomen verteilt, im Genom vorkommen (Abb. 3). Die Allele an einem STR-Lokus sind damit durch die unterschiedliche Zahl der Sequenzwiederholungen und die absolute Länge des amplifizierten DNS-Fragments in Basenpaaren eindeutig definiert. Sie gehören zu den in allen höheren Organismen, den eukaryontischen Genomen, entdeckten VNTR-Orten. Ihnen ist eines gemein: sie besitzen eine variable Anzahl von sich tandemartig wiederholenden DNS-

und autosomalen STR-Systemen wurden keine signifikanten Unterschiede in der Mutationsrate und in den Eigenschaften des Mutationsprozesses festgestellt, was darauf schließen lässt, dass die allgemeinen Mutationsmechanismen der Mikrosatelliten unabhängig vom Rekombinationsvorgang ablaufen [87]. Es ist weitgehend akzeptiert, dass STR-Mutationen das Ergebnis von DNS-Replikationsfehlern wie Schlingenbildung oder Falschaurichtung eines DNS-Stranges bei fehlender Mismatchreparatur sind.

Die Heterozygotenrate der STR-Systeme liegt mit durchschnittlich 80% deutlich niedriger als bei den hochpolymorphen HLA-Systemen mit weit über 90%. Nur das komplexe STR-System SE33 reicht mit einer Heterozygotenrate von 93% an diese heran. Die Möglichkeit, eine Vielzahl von STR-Systemen in einer Multiplex-Analyse simultan zu analysieren, erhöht jedoch ihre Aussagekraft enorm. Dabei werden in der Regel nur STR-Systeme von verschiedenen Chromosomen eingesetzt, um den Aufwand der Berechnung von Allelassoziationen zu umgehen. Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens des häufigsten kombinierten Genotyps der komplexen Analyse der 15 am häufigsten forensisch genutzten STR-Systeme (D3S1358, vWA, FGA, D8S117, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820, PENTA D, PENTA E, TH01, TPOX, CSF1PO, D16S53) beträgt 1 auf weit mehr als 1 Billion in einer Panmixie-Population, dem mehr als Tausendfachen der Weltbevölkerung, d.h. der Genetische Fingerprint ist wieder einmalig, individualspezifisch. Die einzige Ausnahme sind monozygote Zwillinge. Die hohe individualspezifische Aussagekraft der komplexen autosomalen DNS-Profile macht dabei die Allelfrequenz-Unterschiede zwischen den Populationen bedeutungslos. Für die genannten 15 STR-Systeme liegt der häufigste kombinierte Genotyp für die vier Hauptpopulationen Kaukasier, Schwarze, Hispanier und Asiaten im Bereich von 1 auf 25 Billionen bis 1 auf 150 Billionen. Die Aussagekraft des eingangs von Alec Jeffreys beschriebenen „Fingerprints“ ist damit wieder erreicht.

Im Gegensatz zu den autosomalen STR-Systemen haben Y-chromosomale STR-Systeme eine sehr starke populationsspezifische Struktur (siehe Kapitel 2.4), die qualitätskontrollierte Populationsdatenbanken erforderlich machen (<http://www.yhrd.org>), [167]. Die Datenbank ermöglicht die Frequenzbestimmung eines Y-chromosomalen Haplotyps in verschiedenen Populationspools durch direkte Zählung der beobachteten Haplotypen bzw. durch extrapolierte Populationsfrequenzschätzungen [85, 96, 166, 168].

Darüber hinaus können X-chromosomale STR-Analysen, insbesondere die X-chromosomalen Haplotypen, unter Prüfung des Kopplungsungleichgewichtes zwischen den X-chromosomalen

Loci und direkter Einschätzung in einer entsprechend ausreichend großen Populationsstichprobe, erfasst werden.

Neben dem hohen Polymorphismus zeichnen sich STR-Systeme durch ihre relative Neutralität (wenn sie weit genug entfernt von Genen liegen), ihren einfachen Aufbau und durch hohe Automatisierbarkeit der Nachweisteknik (siehe Kapitel 2.2) aus. Sie sind damit besonders geeignet für die individualspezifische Charakterisierung jedweder Art von DNS-haltigem biologischem Material. Zu nennen sind: die Transplantationsimmunologie mit der Detektion von Chimärismen nach Transplantation (vgl. Kapitel 2.3), die Forensik mit der Identifikation von Personen und Spuren, die Abstammungsbegutachtung mit der Lösung zivilrechtlicher Fragestellungen (siehe Kapitel 2.5) und die Populationsgenetik mit der Charakterisierung von Populationen nach Y-chromosomaler STR-Analytik (siehe Kapitel 2.4).

2 Zusammenfassung der eigenen Arbeiten im wissenschaftlichen Kontext

2.1 Strategien zur Detektion hochpolymorpher HLA-Marker

Aufgrund der großen klinischen Bedeutung der HLA-Sequenzen, insbesondere für die Organ- und Stammzelltransplantation, wurde der HLA-Komplex intensiv studiert und gehört heute zu den am besten erforschten Regionen des menschlichen Genoms. Es existiert eine beispielhafte internationale Kooperation, die zu einer raschen wissenschaftlichen Aufklärung der Genorganisation des Komplexes [115] führte und die Entwicklung standardisierter Typisierungsmethoden schon früh erlaubte. Regelmäßige internationale Histokompatibilitäts-Workshops und Reports seit 1965 führten zur Analyse und Bewertung neuer Methoden. Ein von der WHO anerkanntes Nomenklaturkomitee ermöglichte eine einheitliche Definition der gefundenen Genorte und Allele.

Traditionell wurde die HLA-Typisierung mit serologischen und zellulären Techniken durchgeführt. Nach der Entdeckung der Restriktionsenzyme wurde die HLA-Analyse auf der DNS-Ebene mittels RFLP möglich. Wenn auch die RFLP-Methode in der HLA-Klasse II Methodik einen entscheidenden Fortschritt gegenüber den serologischen und zellulären Techniken darstellte, wie eigene erste Arbeiten dazu belegen [121, 122], so konnten hiermit doch nur wenig mehr Subspezifitäten bei hohem, zeitlichen Aufwand erfasst werden.

Die Einführung der PCR führte hingegen zu einer Revolutionierung der HLA-Typisierung [120, 123, 171]. Sie erlaubte die spezifische Amplifikation der hypervariablen Regionen (HVR) der HLA-Gene und die anschließende Analyse der Sequenzpolymorphismen der Allele. Wesentliche Verfahren sind: 1. die PCR-RFLP-Analyse, eine lokus- oder allelgruppenspezifische PCR mit nachfolgender Restriktionsanalyse der Amplifikate; 2. die PCR-SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) -Analyse, die zur Definition der Allele die sequenzspezifische Konformation der Einzelstrang-DNS im Polyacrylamid-Gel ausnutzt; 3. die PCR-SSP (Sequence Specific Primer) -Analyse, bei der die Allele nur über eine Vielzahl sequenzspezifischer Primer detektiert werden; 4. die PCR-SSO (Sequence Specific Oligonucleotide Typing) -Analyse, eine lokus- oder allelgruppenspezifische PCR mit anschließender Hybridisierung der Amplifikate an allelgruppen- oder allelspezifischen Oligonukleotid-Sonden und 5. die PCR-SBT (Sequence Based Typing) -Analyse, ein direktes Sequenzierverfahren nach lokus- oder allelgruppenspezifischer PCR.

Die ständig steigende Zahl von neu detektierten Allelen führt zu einer stetig wachsenden Zahl erforderlicher Primer für die PCR-SSP-Analyse und von Oligonukleotid-Sonden für die PCR-

SSO-Analyse. Neue Allele werden hiermit nicht direkt erfasst, sondern können nur durch eine ungewöhnliche Amplifikations- bzw. Hybridisierungskonstellation vermutet werden. So ist die Sequenzierung die ideale Typisierungsmethode für diese hochpolymorphen Genorte. Bei einem Minimum an notwendigen Primern ist sie relativ unabhängig von Basensequenzänderungen, neue Allele können nach Klonierung oder einer allelspezifischen PCR direkt erfasst werden. Die Sequenzierung liefert damit die exakte Beschreibung des vorliegenden Allels in homozygoter Konstellation.

Für die DNS-Sequenzierung wurde von Sanger et al. 1977 [173] erstmalig das Kettenabbruch- oder Dideoxynukleotidverfahren eingesetzt. Voraussetzung hierfür war eine Vermehrung des jeweiligen DNS-Abschnitts und Markierung der Sequenzierprodukte mit radioaktiv markierten Nukleotiden, später mit nichtradioaktiven Detektionssystemen in einer Sequenzierreaktion. Parallel dazu wurden verschiedene Gerätesysteme entwickelt, von der herkömmlichen Vertikal-Flachbett-Elektrophorese über das halbautomatische „Direct-Blotting-Electrophoresis“-System bis hin zu der heute angewendeten automatischen Fluoreszenzfarbstoff-Sequenzierung in Kapillar-Systemen, bei der die computergestützte Sequenzanalytik der elektrophoretisch getrennten Reaktionsprodukte sofort nach der jeweiligen Auftrennung erfolgt.

Die ersten Veröffentlichungen zur HLA-Typisierung durch direkte Sequenzierung beruhten ausschließlich auf radioaktiven Methoden [84, 174]. Das erste nichtradioaktive HLA-SBT-Protokoll publizierte Versluis et al. 1993 [206] für den HLA-DPB Genort. Eigene Arbeiten zur Sequenzierung der HLA-DRB1 Region wurden noch radioaktiv durchgeführt. Erste Arbeiten zur nichtradioaktiven Sequenzierung der HLA-DRB1 Region mittels Digoxigenin im „Cycle-Sequencing“-Verfahren nach gruppenspezifischer PCR und anschließendem halbautomatischem „Direct-Blotting-Electrophoresis“-System wurden von mir betreut und in der Promotionsarbeit von Volko Ebeling [45] vorgelegt.

Eine weitere interessante Entwicklung stellt nunmehr die Kurzstreckensequenzierung mittels PyrosequencingTM [1, 169] dar. Sie wurde ursprünglich für die Detektion von Einzelnukleotidpolymorphismen entwickelt, ist aber auch für die Analyse hypervariabler Regionen der HLA-Genorte geeignet. Die polymorphen Bereiche werden dabei als SNP (Single Nucleotide Polymorphism) -Cluster betrachtet, d.h. in konservierte Regionen können Sequenzierprimer gelegt werden oder die Sequenzierprimer selbst werden bereits gruppenspezifisch eingesetzt. Das Prinzip der Methode besteht in der Hybridisierung des Sequenzierprimers an eine Einzelstrang-PCR-Vorlage und dem Einbau des komplementären

Nukleotids mittels DNS-Polymerase. Es folgt eine Reaktionskaskade. Jeder Nukleotideinbau ist verbunden mit der Freisetzung von Pyrophosphat, das equimolar mittels ATP-Sulfurylase in Gegenwart von Adenosin-5'-Phosphorsulfat zu ATP konvertiert und durch die Luziferase-vermittelte Oxydation von Luziferin zu Oxyluziferin zu Licht umgewandelt wird. Dieses wird durch eine Kamera aufgenommen und ist der Zahl der eingebauten Nukleotide proportional. Damit ist die PyrosequencingTM-Reaktion insbesondere für heterozygote Basenkonstellationen geeignet.

Erste Beschreibungen zur Analyse der HLA-DQB1- und -DRB1-Genorte existierten bereits von Ramon et al. [155] und Ringquist et al. [159, 160]. Die Untersuchungen hatten Modellcharakter, d.h., es wurden nur synthetisch hergestellte Oligonukleotide bzw. homozygote Zell-Linien eingesetzt. Das erste sorgfältig ausgearbeitete Protokoll für die HLA-DQB1- und -DRB1-Typisierung, das den spezifischen Problemen besonderer Allelkombinationen in echten Patientenproben Rechnung trägt, wurde von meiner Arbeitsgruppe erarbeitet [47]. Die DQB1-Typisierungsstrategie sieht dabei nur eine generische HLA-DQB1-PCR und sechs nachfolgende PyrosequencingTM-Reaktionen vor. Dagegen ist die HLA-DRB1-Analyse wesentlich komplexer aufgebaut. Angelehnt an die Langstreckensequenzierstrategie besteht sie aus 10 allelgruppenspezifischen Amplikons des Exon 2 [45] mit nachfolgenden sechs PyrosequencingTM-Reaktionen, die auf jede Allelgruppe angepasst, d.h. mit einer spezifischen Nukleotid-Dispensationsreihenfolge versehen sind. Alle Allele der Europäischen Population mit einer Frequenz von >0.1 % können mit diesen Typisierungsprotokollen detektiert werden. Die Methode ist besonders für den Hochdurchsatz geeignet. Je nach Leselänge werden für eine 96-Proben-Platte 15 bis 45 Minuten benötigt. Damit können z.B. genetische Risikofaktoren komplexer Erkrankungen auf Chromosom 6, die HLA-Genotypisierungen großer Patientenkohorten notwendig machen, relativ hochauflösend bei großem Durchsatz analysiert werden, wie eigene Arbeiten belegen [47, 49]. Darüber hinaus sind PyrosequencingTM-Strategien für den hochpolymorphen und komplizierten Klasse I Genort HLA-B erarbeitet worden. Hier findet man einerseits eine hohe Vielfalt von Allelen ohne günstige Clusterung der Polymorphismen und andererseits eine Vielzahl von Sequenzübereinstimmungen mit anderen HLA-Loci. Die teilweise repetitive Sequenzstruktur stellt zusätzlich höchste Anforderungen an das Primer-Design. Die auftretenden Probleme konnten erst durch die Einführung einer „nested PCR“ gelöst werden. Dabei werden in der ersten PCR die wesentlichsten polymorphen Regionen, die Exone 2 und 3, gemeinsam amplifiziert. In einer zweiten PCR werden dann jeweils die beiden Exone

getrennt vermehrt und den PyrosequencingTM-Reaktionen zugeführt. Die vorgelegte PyrosequencingTM-Strategie des HLA-B Genortes ermöglicht eine Allel-Typisierung in mindestens zweistelliger Auflösung und wurde an Standard-Proben validiert. Die Anwendung in einer populationsgenetischen Kleinstudie, der Roro in Papua Neuguinea, an DNS-Proben geringer Qualität und Quantität war bereits erfolgreich (siehe Kapitel 2.4). Alle hier beschriebenen Arbeiten zum PyrosequencingTM von HLA-Genorten wurden von mir betreut und in der Promotionsarbeit von Patricia Entz [48] vorgelegt.

Praktisch alle bisherigen grundlegenden Typisierungsstrategien detektieren die Sequenzpolymorphismen ohne Zuordnung zum Haplotyp. Die Genotyp-Bestimmung erfolgt über das Vorhandensein bzw. Nichtvorhandensein von Amplifikaten oder von Sondenhybridisierungen mit oft verbleibenden Mehrdeutigkeiten. Dieses Problem kann durch allelgruppenspezifische PCR's, die vor die eigentliche Nachweisreaktion gesetzt werden, gelöst werden. Dieser Methode liegt zu Grunde, dass je nach verwendetem Primer nur ein mehr oder weniger begrenzter Ausschnitt des Allels erstellt wird. Klonierungsreaktionen können zu vermehrten Artefaktbildungen führen. Der Vorschlag von Dapprich et al. [36, 37] zielte deshalb darauf ab, bei der haplotypspezifischen Extraktion (HSE), die Sequenzdifferenzen zwischen den Allelen für eine physikalische Separation der diploiden DNS-Probe in ihre haploiden Anteile zu nutzen. Das Prinzip der Methode besteht in der haplotypspezifischen Bindung einer Oligonukleotid-Sonde an hitzedenaturierte genomische DNS. Nach enzymatischer Biotinylierung des Sonden-DNS Komplexes erfolgt die Zugabe von Streptavidin-gebundenen Eisenkugeln, die eine magnetische Separation des haploiden DNS-Doppelstranges ermöglichen. Letzterer kann eine Größe von mehr als 50 kb erreichen [135, 137]. Damit steht eine sehr lange Sequenzregion eines Allels mit den jeweiligen Exon- und Intronabschnitten für die Typisierung zur Verfügung.

Umfangreiche Arbeiten zur Optimierung dieser Extraktionsmethode sowie zur Anpassung von Applikationen wie der PCR-SSO- und PCR-SBT-Verfahren, wurden in meiner Arbeitsgruppe durchgeführt [137]. Zwei neue HLA-B Allele konnten ohne den sonst für den Nachweis neuer Allele vorgeschriebenen Klonierungsschritt erstmals eindeutig detektiert werden [74, 76, 103, 137]. So führte die HLA-B-Typisierung eines Sichelzellanämie-Patienten vor Stammzelltransplantation (SZT) mittels SSP- und SSO-Methoden zu keinem Erfolg. Nach allelspezifischer Extraktion und Sequenzierung wurde ein neues HLA-B*56 Allel mit dreifachem Basenaustausch an den Positionen 538 bis 540 detektiert und vom WHO-Nomenklaturkomitee mit B*5613 benannt [76, 137]. Erfolglos war auch die HLA-B-

Typisierung eines erwachsenen Stammzellspenders. Nach allelspezifischer Extraktion und Sequenzierung wurde ein neues HLA-B*44 Allel mit wiederum dreifachem Basenaustausch, diesmal an den Positionen 204, 205 und 222 detektiert und vom WHO-Nomenklaturkomitee mit B*4440 benannt [74, 137].

Was die Praktikabilität der HLA-Typisierungsmethoden betrifft, ist zu bemerken, dass die PCR-SSO- und -SSP-Analysen immer noch zu den am häufigsten im Labor angewandten Methoden gehören. In vielen eigenen Studien wurde die PCR-SSO-Methode in Populations- [68, 90, 126, 220] und Krankheitsassoziationsstudien [50, 99, 114, 143] eingesetzt. Die PCR-SSP-Methode kann aufgrund des hohen Automatisierungsgrades, z.B. mit Picogreen-Messung in 96er oder 385er Plattenformat und einer entsprechenden Auswertesoftware, bei Krankheitsassoziationsstudien genutzt werden [47, 70, 203], wie eigene Arbeiten in Kooperation mit dem Institut für Klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität Kiel ergaben. Das betrifft insbesondere Fragestellungen, bei denen nur eine niedrigauflösende HLA-Typisierung notwendig ist [70, 114]. Andererseits wird sie für Vortypisierungen und Allelgruppeneinteilungen, wie am Beispiel des HLA-DRB1-Genortes gezeigt, eingesetzt [47, 49]. Dem erforderlichen Auflösungsgrad der Studie entsprechend, können sehr schnell die notwendigen SSP-Primergemische zusammengestellt werden, um z.B. eine Assoziation der spezifischen Mutationen im BTNL2-Genort mit der Erkrankung Sarkoidose von einer HLA-Assoziation abgrenzen zu können. Es konnte eindeutig geklärt werden, dass die krankheitsassoziierte Variante des SNP rs2076530 einen Risikofaktor repräsentiert, der unabhängig von der HLA-DRB1-Diversität ist [203].

Die PCR-SBT-Methode wird vor allem in Großdurchsatz-Laboren zur routinemäßigen, hochauflösenden HLA-Typisierung vor Stammzelltransplantation eingesetzt. Der Einsatz der PCR-SBT-Analyse nach HSE hat, wie bereits beschrieben, einen großen Fortschritt bei der Aufklärung von neuen Allelen erbracht.

Ausgewählte eigene Publikationen in Kapitel 6:

6.1

Entz P, Nürnberg P, Toliat M, Hampe J, **Nagy M**. New Strategies for Efficient Typing of HLA-Class II Loci DQB1 and DRB1 using PyrosequencingTM. Tissue Antigens 65: Januar/2005, 67-80.

6.2

Nagy M, Entz P, Otremba P, Schönemann C, Murphy N, Dapprich J. Haplotype Specific Extraction: A Universal Method to Resolve Ambiguous Genotypes and Detect New Alleles – Demonstrated on HLA-B. Tissue Antigens 69: Februar/2007, 176-180.

2.2 Strategien zur Detektion hochpolymorpher STR-Marker

STR-Systeme werden methodisch durch eine lokusspezifische PCR erfasst. Sie erfolgt mit Primern, die beidseits möglichst nahe der jeweiligen repetitiven Sequenz hybridisieren. Die Allele an einem STR-Lokus sind damit durch die unterschiedliche Zahl der Sequenzwiederholungen und die absolute Länge des amplifizierten DNS-Fragments in Basenpaaren eindeutig definiert. Die STR-Allele werden im hochauflösenden Polyacrylamid-Gel entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Über Längenstandards in jeder Probe wird die Allellänge bestimmt und über Allelleitern, die parallel zur Probe aufgetragen werden, wird das Allel definiert. Die Visualisierung der Allele erfolgt heute lasergestützt in Gel- oder Kapillar-basierten Sequenzierautomaten nach Fluoreszenzfarbstoffmarkierung der PCR-Fragmente. Dies erlaubt die Koamplifikation der verschiedensten STR-Systeme und deren simultane Separation und Detektion, da die PCR-Fragmente mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind und in unterschiedlichen Längenkorridoren auftreten. Dies führt einerseits zur Erstellung hochinformativer STR-Profile, andererseits ermöglicht die Automaten-Plattform einen Hochdurchsatz an Proben. Die statistische Auswertung der Allelhäufigkeit erfolgt auf der Grundlage von Populationsdatenbanken. Eine Erhöhung des Informationsgrades bei STR-Systemen mit komplexer Struktur und variablen „Repeat“-Längen innerhalb des STR-Lokus durch Sequenzierung wird nur selten angestrebt. Die Längen der amplifizierten PCR-Produkte liegen in der Regel in einem Bereich von 100 bis 350 Basenpaaren. Für die Untersuchung stark degradierter DNS-Proben in der Spurenanalyse wurden kürzere STR-Systeme entwickelt [25, 34, 146, 200, 210]. Auch kommerziell hergestellte Kits, wie der Mentepe® Triplex TVD Kit (Biotype AG, Dresden), mit 69 bis 235 bp oder der MiniFiler™-Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) mit 8 verschiedenen STR-Systemen zwischen 75 und 245 bp sind geeignet. Die hochgradige Vermehrung der DNS in der PCR und ein empfindliches Laser-Detektionssystem erlauben die Analyse minimaler DNS-Mengen unterhalb eines Nanogramms (ng). Konfektionierte STR-Multiplex-Kits werden angeboten mit autosomalen (meist 3 bis 16) sowie gonosomalen X- und Y-chromosomal-spezifischen (meist 8 bis 16) STR-Systemen.

Basis für eine sensitive STR-Analytik in großem Durchsatz ist die Präparation hochreiner DNS aus kleinsten Zellmengen jedweder Herkunft und deren Automatisierbarkeit. Grundlegende Schritte der DNS-Präparation sind die Zell- und Kern-Lyse mit hypertonischen Salzlösungen und proteinabbauenden Enzymen bzw. proteinzerstörenden Temperaturen. Die DNS-Anreicherung und -Aufreinigung erfolgt anschließend mit Extraktions- und

Fällungsmethoden, wie der Phenol-Chloroform-Extraktion [16], der Salzfällung [116] oder mittels Säulen- und Batchverfahren. Letztendlich sind nur wenige der beschriebenen Präparationsmethoden automatisierbar [119, 180]. Außerdem können die meisten Systeme nur einer der Anforderungen, wie hohe DNS-Ausbeute, Schnelligkeit der Methode, hoher Durchsatz oder hohe DNS-Qualität, gerecht werden. So war die Methode der Wahl, insbesondere für geringste Spurenmengen, immer noch die gesundheitsgefährdende Phenol-Chloroform-Extraktion allerdings unter hohen Sicherheitsvorkehrungen [31, 72, 136], oftmals verbunden mit weiteren Säulen- oder Membran-Aufreinigungsschritten. Selbst geringste Mengen an DNS-Material konnten so in eigenen Arbeiten noch aus raffiniertem Öl gewonnen und Rückschlüsse auf die Pflanzenspezies gezogen werden [72]. DNS aus alten Knochenmaterialien wird auch heute noch mit dieser Methode gewonnen [31]. Die Automatisierbarkeit ist aber sowohl im forensischen als auch im klinisch-molekularbiologischen Labor nicht nur für den Hochdurchsatz an Proben eminent wichtig, sondern auch zur Minimierung bzw. Verhinderung von Fehlern und Kontaminationen während des Routineprozesses. Eine Darstellung und Einschätzung der derzeit existierenden Hochdurchsatz DNS-Präparationsverfahren wird im eigenen Buchbeitrag in „Molecular Forensics“ gegeben [136].

Der kritischste Punkt der PCR-basierten forensischen Analyse ist die DNS-Isolation. Es wurde deshalb von uns nach einer DNS-Präparationsmethode mit hoher Sicherheit gesucht, um möglichst jedwede Form von Kontamination zu verhindern. Ein völlig in sich abgeschlossenes Extraktionssystem mit UV-Sterilisationsmöglichkeit zwischen den Läufen und Sicherheitscheckabfragen wurde dazu ausgewählt. Es beinhaltet die Zell-Lyse unter Verwendung chaotroper Reagenzien, die Bindung der DNS an Silica-beschichtete, magnetische Partikel und die Elution der DNS nach mehrfachen Waschschritten.

In umfangreichen Studien wurden insbesondere die Probenvorbereitung und Zell-Lyse optimiert. Außerdem wurde ein einfaches, standardisiertes Lyse-Protokoll für nahezu alle biologischen Materialien kreiert [133]. Nach Optimierung und Validierung wurde die M48 BioRobot® Station bei mehr als 50.000 Routineproben eingesetzt. Es gab keinen Hinweis auf Kontamination oder Anwesenheit eines PCR-Inhibitors. Bereits mit DNS, die aus drei Zellen isoliert wurde, das entspricht einem Minimum von ca. 20 Pikogramm (pg), konnte ein komplettes STR-Profil aus 9 STR-Systemen (AmpFlSTR Profilerplus Kit, PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) erstellt werden. Das ergab eine Studie mit definierten Zellproben. Für die Detektion eines 1% igen Anteils in einer forensischen oder klinischen

Mischprobe sind damit mindestens 300 Zellen notwendig. Da für die DNS-Isolierung ein Minimum an Elutionsvolumen notwendig ist und ein Zehntel davon in der PCR-Analyse zum Einsatz kommt, müssen zur Detektion dieses Anteils in einer Mischprobe mindestens 3000 Zellen vorliegen. Damit können vollständige STR-Profile für die meisten klinischen und forensischen Fragen erstellt werden. Nur bei Analysen im Niedrigzellbereich, wie den CD34-positiven Zellen in klinischen Blutproben, oder den Extrakten aus Kontakt-DNS-Spuren in der Forensik, kann der Grenzbereich unterschritten werden. Ergibt sich ein Hinweis auf ein Partialprofil, wird die Amplifikation mit einer aufkonzentrierten Probe wiederholt. Ein Informationsverlust bei diesen kritischen Spuren ist damit auf ein Minimum begrenzt [133].

Die Suche nach einer weiteren Verbesserung der Nachweisgrenze des DNS-Analyseverfahrens führte zur Gesamtgenom-Amplifikation, „whole genome amplification (WGA)“ genannt, mittels GenomiPhi DNA Amplification Kit (Amersham Biosciences). Sie ist eine aussichtsreiche Methode, um große Mengen an DNS aus Proben mit limitierter DNS-Menge zu generieren. Es wurde die Genauigkeit der Methode über alle analysierten STR Loci eines Multiplex PCR-Verfahrens untersucht. Die Amplifikationsunterschiede innerhalb eines Locus und über alle analysierten Loci wurden in Abhängigkeit von der Menge an Ausgangs-DNS, dem spezifischen STR Locus und der Allellänge untersucht. Die Nachweisgrenze der WGA-Reaktion zur Erlangung eines vollständigen STR-Profiles lag bei 1 ng und damit deutlich über der Nachweisgrenze unseres Verfahrens von 20 pg. Im Bereich unterhalb 1 ng wurden unbalancierte STR Amplifikationen an einem Locus und zwischen den Loci, Allelverluste und das Auftreten zusätzlicher Allele detektiert. Eine Verbesserung der Qualität des Multiplex STR-Profiles konnte durch den Einsatz von gepoolter WGA-DNS nachgewiesen werden. Ein vollständiges STR Profil ohne allelische Imbalance innerhalb eines Locus – die Basis für eine akkurate forensische als auch Chimärismus-Analyse - konnte für den Niedrig-DNS-Bereich nicht erreicht werden [134]. Gill et al. [62] verwendeten ein anschauliches Modell, um die stochastischen Variationen, die mit einer DNS Analyse assoziiert sind, zu simulieren. Sie demonstrierten, dass heterozygote Imbalance und Allelverlust hauptsächlich eine Funktion des stochastischen Effektes der molekularen Pre-PCR Selektion ist, d.h., die Zahl der DNS-Moleküle n_t , die nach t Amplifikationen produziert werden, ist vor allem eine Funktion der Ausgangs-Moleküle n_0 , die am Start der PCR zur Verfügung stehen. Damit lag der kritischste Punkt der PCR-basierten Analyse im Niedrig-DNS-Bereich in der DNS-Isolierung selbst, die so viel hoch gereinigte DNS, wie möglich erbringen muss. Auf die

Bedeutung der DNS-Extraktion und ihren Einfluss auf die Nachweisgrenze des DNS-Analyseverfahrens wurde bereits zu Beginn dieses Kapitels eingegangen.

Ausgewählte eigene Publikationen in Kapitel 6:

6.3

Nagy M, Otremba P, Krüger C, Bergner S, Anders P, Henske B, Prinz M, Roewer L. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. *Forensic Science International* 152: August/2005, 13-22.

6.4

Nagy M, Rascon J, Massenkeil G, Ebell W, Roewer L. Evaluation of whole-genome amplification of low-copy-number DNA in chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation using STR marker typing. *Electrophoresis* 27: August/2006, 3028-3037.

2.3 Das Chimärismus-Monitoring: STR-Marker in der Transplantationsimmunologie

Der Begriff Chimäre leitet sich aus dem griechischen Wort *Chimaira*, die Ziege ab. Das feuerschnaubende Ungeheuer der griechischen Sage bestand nach Homer aus dem Kopf eines Löwen, dem Körper einer Ziege und dem Schwanz einer Schlange.

Im Bereich der allogenen SZT wird als Chimärismus eine Konstellation bezeichnet, bei der Empfänger- und Spenderzellen im Organismus gleichzeitig vorkommen. Nach erfolgreicher SZT, einer Bluttransfusion ähnlichen Übertragung von Knochenmark- oder Blutstammzellen eines HLA-identen Spenders, ist idealerweise die Blutbildung und das gesamte immunologische System eines Patienten durch gesunde Zellen des Spenders ersetzt worden, während alle anderen Körperzellen weiterhin Empfängerstatus zeigen. Jede allogene Transplantation muss durch eine Konditionierung eingeleitet werden. Diese hat die Aufgabe, bei Patienten mit malignen hämatologischen Systemerkrankungen durch eine myeloablative Therapie mit hochdosierten Zytostatika in Kombination mit einer fraktionierten Ganzkörperbestrahlung sowohl die malignen Zellen als auch das gesunde Immunsystem des Empfängers zu zerstören, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern. Seit 1998 werden auch dosisreduzierte Konditionierungsverfahren (RIC-SZT) eingesetzt, bei denen die Immunsuppression im Vordergrund steht und deren Wirksamkeit auf einem immunologischen Effekt, dem so genannten „Transplantat-Gegen-Leukämie“ Effekt (GvL), beruht. Nach allogener Transplantation erhalten alle Patienten eine immunsuppressive Therapie zur Prophylaxe der „Transplantat-Gegen-Wirt-Erkrankung“ (GvHD).

Zur Dokumentation der erfolgreichen Ansiedlung von Spenderzellen im Knochenmark, im Weiteren als Engraftment bezeichnet, werden Chimärismus-Analysen durchgeführt. Ein

kompletter Spender-Chimärismus (CC) liegt vor, wenn nur Spenderzellen im Untersuchungsgut zu finden sind. Ein gemischter Chimärismus (MC) liegt vor, wenn die Zellen von Spender und Empfänger gleichzeitig in der Probe nachweisbar sind (Abb. 4). Untersucht werden in der Regel die kernhaltigen Zellen im peripheren Blut und in Knochenmarkpunkaten.

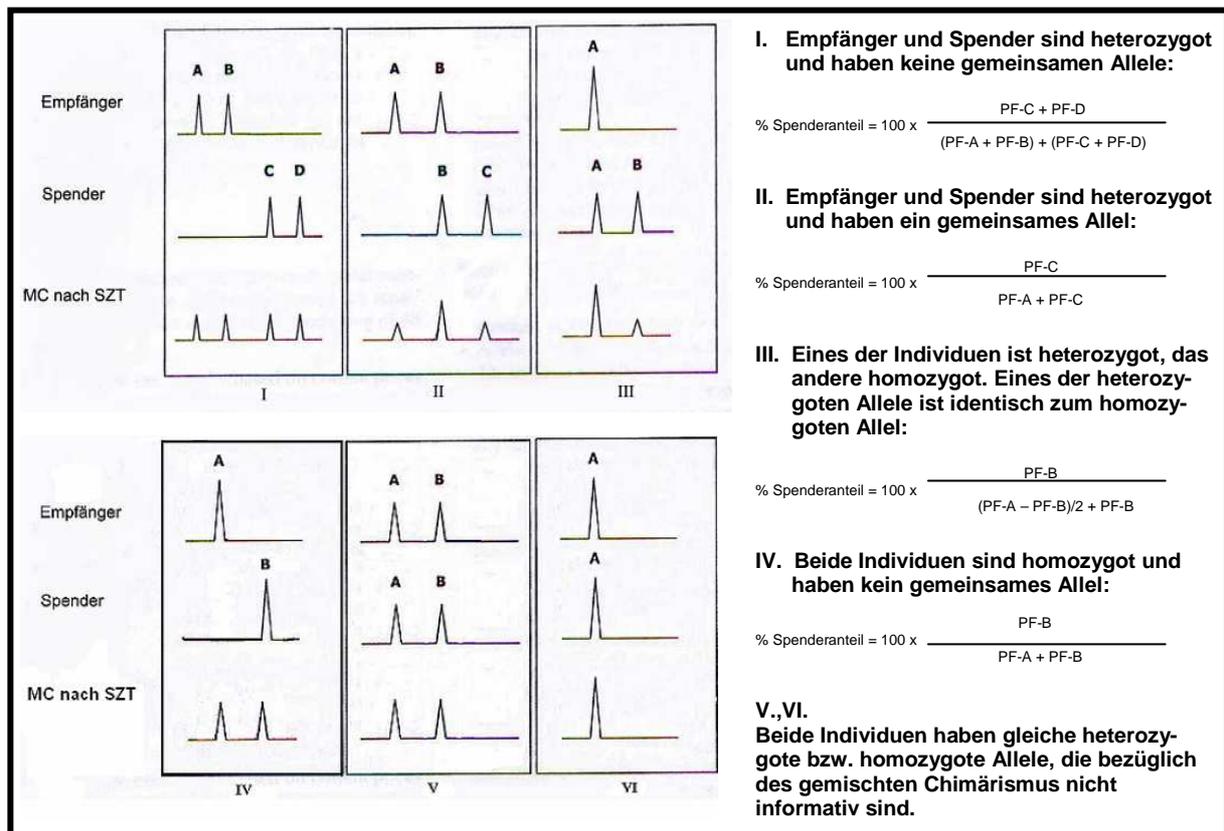


Abb. 4 Schematische Darstellung der Chimärismus-Konstellationen nach allogener Stammzelltransplantation (PF = Peakfläche)

Die Chimärismus-Analyse beruht auf der Ermittlung eines Zellmarkers, der mindestens einen zuverlässigen Unterschied zwischen Spender und Empfänger anzeigt. Das waren in den Anfängen der Knochenmarktransplantation ABO-Inkompatibilitäten [184], Isotypen von Immunglobulinen [211], Geschlechtsdifferenzen [100], zytogenetische Aberrationen [208] sowie HLA-Differenzen [110] bis hin zum klassischen Minisatelliten-Fingerprint bzw. dem methodisch vorteilhaftere Oligonukleotid-Sonden-Fingerprint [91], wie eigene Arbeiten dazu belegen [123, 127, 165]. Heute werden die wesentlich sensitiveren, PCR-basierten STR-Systeme (siehe Kapitel 2.2) als Standard-Marker verwendet. Die Zahl der jeweils

untersuchten Systeme schwankt bei verschiedenen Zentren zwischen 5 [176] und 15 [71]. In der Regel wird dann das Chimärismus-Monitoring nur mit einem der informativen STR-Systeme durchgeführt. Die Sensitivitätsgrenze schwankt zwischen 1 und 5%, je nach Empfindlichkeit des verwendeten Monitoring-Systems [197].

Weitere methodische Verbesserungen ergaben sich aus der Erstellung eines individualspezifischen STR-Profiles. So konnte vor allem in größeren eigenen Studien [83, 92, 101, 105, 106, 107, 108, 156, 189, 195] durch Koamplifikation von neun STR-Systemen und dem Amelogenin-System mit dem AmpFlSTR Profilerplus Kit (PE Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) eine hohe Diskriminierungskapazität sowohl bei der unverwandten als auch bei der verwandten Transplantation erreicht werden. Bei gleichem Geschlecht waren in eigenen Untersuchungen mindestens zwei der neun STR-Systeme informativ und mindestens ein System „hochinformativ“, d.h. die differierenden Allele von Spender und Empfänger unterschieden sich in ihrer Größe um mehr als vier Basen [129]. Eine Falschinterpretation als Folge so genannter „Stotterpeaks“, die durch einen Einbaufehler der Taq-Polymerase entstehen, konnte damit vermieden werden. Darüber hinaus erbringt die Erstellung eines individualspezifischen Profils eine hohe Sicherheit. Kontaminationsprobleme, die sich in der Routine gerade bei Verdünnungsprozeduren von hochkonzentrierten Proben oder bei der Analyse von Proben im Niedrigzellbereich ergeben, können damit eindeutig identifiziert und Fehlbefunde damit vermieden werden. So wurde in unserem Labor nach umfangreichen experimentellen Untersuchungen zur Sensitivität der DNS-Analyse (siehe Kapitel 2.2) ein optimiertes Monitoring-System aufgebaut, die vollautomatisierte „Beads“-basierte DNS-Aufreinigungstechnologie, gekoppelt mit dem hochsensitiven AmpFlSTR Profilerplus STR-Analysesystem [133].

Das Chimärismus-Monitoring nach Stammzelltransplantation (SZT)

Die Veröffentlichungen zum Chimärismus-Verlauf nach SZT bei Leukämien sind relativ zahlreich. In der „prä DNS-Ära“ wurde seine Bedeutung bei Leukämie-Patienten durch mehrere Forschungsgruppen beschrieben [14, 144]. Nach der SZT wurde sowohl ein CC, als auch ein MC beobachtet. Eine eindeutige Beziehung des Chimärismus-Verlaufs zum Rezidiv konnte damals nicht nachgewiesen werden. Über die Aussagefähigkeit der VNTR-RFLP für das Chimärismus-Monitoring von Leukämien wurde ausführlich berichtet [190, 214]. Die Methode erwies sich als zuverlässig, sowohl für die Engraftment-Dokumentierung nach Myeloablation, als auch für den MC-Nachweis im posttransplantativen Verlauf, wie eigene Untersuchungen bestätigten. [59, 123, 165]

Auf die prognostische Bedeutung der Untersuchungsfrequenz wurde erstmals bei Ramirez et al. [154] und Bader et al. [6] hingewiesen. In ihren Studien an Patienten mit akuter lymphatischer (ALL) und akuter myeloischer Leukämie (AML) sowie dem myelodysplastischen Syndrom (MDS) konnte eine eindeutige Relevanz der Analysehäufigkeit für die korrekte Einschätzung der Chimärismus-Konstellation nachgewiesen werden.

Erste Hinweise auf die Prädiktivität bestimmter Zellreihen wurden von Zetterquist et al. [218] in CD19-Zellen bei Patienten mit prä-B-ALL gegeben. Ein MC in CD34-Zellen des Knochenmarks wurde in einer Studie von Thiede et al. [196] als zuverlässiger Rezidiv-Marker bei Patienten mit lymphatischen und myeloischen Leukämien, wie auch zu gleicher Zeit in eigenen Untersuchungen an Patienten mit akuten Leukämien nach RIC-SZT [105, 131] bewertet.

Die zellartspezifische Chimärismus-Analyse ist besonders von der Empfindlichkeit des Monitoring-Systems abhängig. Hier kommen oftmals deutlich geringere Zellzahlen im Analysegrenzbereich zur Untersuchung. Für ein engmaschiges Kontrollsystem ist damit auch ein sensitives Zellseparationssystem wichtig [105, 134]. Deshalb wurde insbesondere mit Blick auf die Isolierung von Minorzellkomponenten aus kleinen Blutmengen nach pädiatrischer SZT für unsere Studien eine optimierte, nichtautomatisierte Separationsmethode mit antikörperbeschichteten Eisenkugeln (Deutsche Dynal GmbH, Hamburg) ausgewählt und optimiert, um Zellverluste durch Totvolumen und übermäßige Waschprozesse, wie sie bei den getesteten Zellsortern (MCB 1200, HTI bio-X GmbH; autoMACS, Miltenyi Biotec GmbH) bzw. der M48 BioRobot® Station auftraten, zu vermeiden. Die Reinheit der spezifischen Zellpopulationen wurde in der Validierungsphase der Methode per FACS-Analyse (Becton Dickinson, Heidelberg) kontrolliert und mit $\geq 93\%$ bestimmt [83, 105].

Ein weiteres Problem vieler Studien liegt in gemischten Patienten-Gruppen, d.h., in der Zusammenfassung von Patienten mit verschiedenen Grunderkrankungen oder in Multi-Center-Studien. Es liegt jetzt eine eigene Studie zur Veröffentlichung vor, die ein prospektives linienspezifisches Chimärismus-Monitoring in einer großen monozentrischen ALL-Patienten-Gruppe mit einer langen Nachbetrachtungszeit darlegt. 105 adulte ALL-Patienten erhielten eine allogene SZT zwischen 1995 und 2004 in der SZT-Einheit der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie der Charité. Einschluss-Kriterium war das Vorhandensein von Chimärismus-Daten von isolierten Zellfraktionen mindestens bis Tag 90 nach SZT, so dass letztendlich 66 Patienten zur Untersuchung kamen. Werden die spezifischen Zellpopulationen des Blutes CD4, CD8 und CD19 separat betrachtet,

so ergibt sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen einem MC <5% Empfänger-Anteil am Tag +180 und dem krankheitsfreien Überleben für jede dieser Zellpopulationen. Die durchschnittliche Zeit bis zur Detektion eines kompletten Spender-Chimärismus in den CD34-spezifischen Zellen des Knochenmarks war verglichen mit der aller anderen untersuchten Zellpopulationen des Blutes fast dreimal so lang. Diese besondere Relevanz eines relativ stabilen niedrigen CD34-Empfänger-Anteils im Knochenmark für das krankheitsfreie Überleben zeigt sich insbesondere auch in den 16 Patienten mit einem Langzeit-Überleben von mehr als 3 Jahren. Ein Jahr nach SZT zeigten noch 7 von 13 Patienten einen MC mit 3-20% Empfänger-Anteil ohne jegliches Anzeichen eines Rezidivs. Im Vergleich dazu war ein MC von >20% Empfänger-Anteil in den CD34-spezifischen Zellen des Knochenmarks signifikant korreliert mit dem Auftreten eines Rezidivs.

Die beschriebenen eigenen Arbeiten zur prognostischen Bedeutung der Chimärismus-Analytik nach adulter SZT sowie die in den folgenden Abschnitten dargelegten zur RIC-SZT von Leukämie- und Nierenzellkarzinom (NCC) -Patienten sind das Ergebnis einer langjährigen Kooperation zwischen der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Abteilung Knochenmarktransplantation und der Genetischen Forschungsabteilung des Institutes für Rechtsmedizin der Charité [101, 105, 106, 107, 108, 129, 131].

Das Chimärismus-Monitoring nach RIC-SZT und immunmodulierenden Therapien

Die erhebliche Nichtrezidiv-Mortalität nach hochdosierter Radio- und Chemotherapie hatte die allogene SZT auf jüngere Patienten ohne Komorbidität begrenzt. Die Entwicklung eines dosisreduzierten Konditionierungsregimes führte zu einer Reduktion der Nichtrezidiv-Mortalität bei Patienten mit malignen hämatologischen Systemerkrankungen und erweiterte die Indikation zur allogenen SZT auf nichthämatologische Erkrankungen, wie z.B. das NCC und auf ältere Patienten mit Komorbiditäten. Das intensitätsreduzierte Konditionierungsregime erfolgt in der Regel ohne Bestrahlung und unter Einsatz angepasster Zytostatikatherapien. Die Spenderlymphozytengabe (DLI) nach Transplantation soll einen MC in ein stabiles Spenderzell-Engraftment überführen. Arbeiten zur Anwendung von immunmodulierenden Therapien, wie der teilweise oder vollständige Entzug der Immunsuppression oder die DLI-Gabe, hatten bereits nach herkömmlicher myeloablativer SZT auf die Bedeutung des Chimärismus-Monitorings hingewiesen [7, 8].

Gerade das präparativ-experimentelle Regime der RIC-SZT machte es notwendig, die Kinetik des Spenderzell-Engraftments, aber auch das Potential der immunmodulierenden Therapien

zur Etablierung eines vollständigen Spender-Chimärismus und Förderung eines GvL-Effektes besser zu erfassen, indem man ein engmaschiges Chimärismus-Monitoring von Leukozytensubpopulationen erstellt [105, 106, 108, 131].

Akute Leukämien im fortgeschrittenen Stadium sollten aufgrund der raschen Kinetik des leukämischen Rezidivs keine Kandidaten für ein dosisreduziertes Konditionierungsregime sein. Eigene und Literaturdaten zeigten aber, dass einige Hochrisiko-Patienten mit akuten Leukämien geheilt werden konnten, indem eine vergleichsweise intensive aber noch gut tolerierte Konditionierungstherapie [105, 108, 111, 181, 191] angewendet wurde. Die beobachtete hohe MC-Rate der Patienten beweist den noch nichtmyeloablativen Charakter des Regimes. Der MC war dabei hauptsächlich in den Leukozytensubpopulationen zu finden und zeigte ein sehr diverses Engraftment. Während dieses sich in den CD14/15-positiven Zellen nicht vom myeloablativen Regime unterschied, war das Engraftment der T-Helfer- und -Suppressor-Lymphozyten bei der RIC-SZT deutlich verzögert. Auch bei fortgeschrittener akuter Leukämie kann die RIC-SZT zu einem stabilen Engraftment und kompletter Remission führen [105, 131, 195].

Die Frührezidiv-Erkennung bei akuten Leukämien wird oft erschwert durch das Fehlen eines Markers und die Progression der Erkrankung. Bei allen Patienten, die ein Rezidiv entwickelten, wurde ein MC detektiert. Während die Vollblut-Analyse noch einen CC ermittelte, konnte die Analyse der Leukozyten-Subpopulationen bereits diesen MC nachweisen. Er zeigte in unseren Studien ein Rezidiv an, bevor eine morphologische Diagnose gestellt werden konnte, im Mittel 8 Wochen vor der Diagnose des klinischen Rezidivs [105, 131]. Die myeloischen CD14/15-positiven Empfängerzellen im peripheren Blut von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) und AML waren frühzeitige Indikatoren eines Rezidivs und genauso sensitiv wie die bcr-abl-Analyse im Knochenmark vor dem zytogenetischen oder hämatologischen Rezidiv.

Tierversuche haben einen stabilen MC nach RIC-SZT und immunsuppressiver Therapie demonstriert [188]. Neuere und vor allem eigene klinische Daten [105, 111, 131] zeigen, dass ein stabiler MC nach dosisreduzierter Konditionierung nicht etabliert werden kann. Alle Patienten mit persistierenden Empfängerzellen erlagen einem leukämischen Rezidiv, was möglicherweise auf immunologische Differenzen zwischen Mensch und Tier zurückzuführen ist.

Bei akuten Leukämien ist die Rezidivrate noch sehr hoch. Man findet häufig einen instabilen MC, der durch DLI in einen CC konvertieren kann, was zu einem geringeren Rezidivrisiko zu führen scheint. 55% der akuten Hochrisiko-Leukämie-Patienten in unserer Studie konvertierten nach DLI in einen CC, wobei 2/3 der Patienten in kompletter Remission leben. Bei allen anderen Patienten persistierte der MC trotz DLI und sich entwickelnder GvHD und führte zum Rezidiv [105]. Letztendlich konnte ein bereits vorhandenes klinisches Rezidiv durch DLI kaum beeinflusst werden, das betrifft die AML und noch mehr die ALL. So konnte ein zeitweiser Anstieg der myeloischen CD14-Empfängerzellen in der AML und CD19-Empfängerzellen in der c-ALL verhindert werden, ja es kam sogar kurzzeitig zu einer Abnahme der Empfängerzellen. Damit konnte ein deutlicher Einfluss der DLI auf die Rezidiv-Kinetik gezeigt werden, eine Remission der Patienten wurde aber nicht erreicht [105, 131].

Nur frühzeitige Interventionen vor dem klinischen Rezidiv können die Prognose dieser Patienten verbessern. Aus diesem Grund werden sie mit prophylaktischen DLIs nach SZT behandelt. Eine neue eigene Studie zur prophylaktischen DLI von 26 ALL-Patienten nach SZT zeigte, dass 92% der behandelten Patienten mit MC zum CC konvertierten, 62% der Patienten sind in kompletter Remission. Die prophylaktische DLI scheint eine effektive Behandlungsstrategie bei Hochrisiko-ALL Patienten zu sein, um Rezidiven vorzubeugen und eine komplette Remission nach SZT zu ermöglichen [101].

Ein deutlicher GvL-Effekt bei einer zusätzlichen Interferon-Alpha-Therapie konnte bei einem CML-Patienten zum Zeitpunkt eines progressiven hämatologischen Rezidivs gezeigt werden [131]. Es kam zu einem sehr schnellen Abfall der myeloischen und nach mehrfacher DLI-Therapie auch der verbliebenen lymphoiden Empfängerzellen. Bereits 5 Wochen nach Interferon-Start konnte ein kompletter Spender-Chimärismus diagnostiziert werden. Bei einem weiteren CML-Rezidiv-Patienten wurde erst 6 Monate nach der letzten DLI-Gabe und einer aufgrund von Nebeneffekten gering dosierten Interferon-Therapie ein vollständiger Spender-Chimärismus und damit ein rezidivfreies Überleben erreicht. Noch 3 Monate nach der letzten DLI-Gabe lag der Empfänger-Anteil in den myeloischen Zellpopulationen bei 80% [131]. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Effekt der Immunmodulation durch das engmaschige, populationsspezifische Chimärismus-Monitoring gut dokumentiert werden kann. Es zeigt aber auch gerade am Beispiel des letzteren CML-Patienten, dass es oftmals sehr schwierig ist, Ursache und Wirkung genau zu definieren und Langzeiteffekte nicht ausgeschlossen werden können.

Auf einen weiteren sehr problematischen Effekt dieser Therapien muss hingewiesen werden. Die Toxizität der immunmodulierenden Therapien ist sehr hoch. Obwohl die DLI in eskalierenden Dosen gegeben wurde, hatte die Hälfte unserer Patienten nach SZT und praktisch alle Patienten nach RIC-SZT eine GvHD entwickelt [101, 105, 106, 131]. Diese höhere Inzidenz der GvHD nach DLI wurde in anderen Studien am Menschen aber auch in Tiermodellversuchen sowohl nach SZT als auch RIC-SZT beobachtet [32, 42]. Keiner der Patienten mit GvHD starben nach DLI an transplantationsbezogenen Ursachen. Das zwingt letztendlich zur Diskussion hinsichtlich der Optimierung der GvHD-Prophylaxe, einer sorgfältigen Selektion von Patienten mit hohem Rezidiv-Risiko und eines patientenspezifischen DLI-Timings. Letzteres heißt, eine ausreichende Zeit zwischen der Absetzung der Immunsuppression und der 1. DLI-Applikation, längere Intervalle zwischen den Infusionen [101], eine optimale DLI-Dosis und eine lange Nachbeobachtungszeit der Patienten [105] einzuplanen. Erste Konsequenzen wurden bereits daraus gezogen. So wurde eine kombinierte GvHD-Prophylaxe eingesetzt, die die GvHD effektiv reduzierte, der Zeitpunkt der ersten DLI auf ≥ 100 Tage gesetzt und die initiale Zelldosis reduziert [101, 106]. In der näheren Zukunft könnten darüber hinaus ex-vivo Manipulationen von Spender-Lymphozyten durch CD8-Depletion oder der Transfer von leukämie-reaktiven spezifischen T-Zellklonen einen GvL-Effekt erhöhen und das GvH (Transplantat gegen Wirt)-Risiko reduzieren [101].

Das Chimärismus-Monitoring nach adulter RIC-SZT bei metastasierendem NCC

Metastasierende NCCs haben aufgrund der tumorimmanenten Resistenz auf konventionelle Therapien eine sehr schlechte Prognose [3]. Die Reaktion auf eine kombinierte Chemoimmuno-Therapie ist bei nur minimaler Verlängerung der Überlebensrate sehr begrenzt. Komplette Remissionen sind selten. Das macht die Behandlung des NCC offen für experimentelle Therapien wie die RIC-SZT und die DLI. Das Ziel dieser allogenen Therapien ist, einen „Transplantat-Gegen-Tumor“ (GvT) -Effekt zu induzieren. Die Analyse der Literaturdaten [15, 20, 73, 150, 161, 201] zur RIC-SZT nach metastasierendem NCC und ebenso eigene Erfahrungen [107] zeigen einen GvT-Effekt nach Chimärismus-Konversion mit meist später Effektivität. Zeitgleich mit der radiologisch kontrollierten Tumor-Antwort dominierten die Spender-T-Lymphozyten in der Chimärismus-Analyse. Patienten mit einem persistierenden MC bis weit nach dem 100.Tag hingegen zeigten simultan mit einer rapiden Tumor-Progression ein schnelles Ansteigen der Empfängerzellen [107]. Die viel versprechende Tumor-Reaktions-Rate von über 50% der ersten Studie von Childs et al. [33]

konnte nicht erreicht werden. Die eigenen Daten demonstrieren darüber hinaus eine hohe Morbidität und Mortalität der RIC-SZT trotz reduziertem Konditionierungsregime bei diesen Patienten.

Das Chimärismus-Monitoring nach pädiatrischer SZT

Nach sechsjähriger Kooperation zwischen der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Abteilung Pädiatrische KMT des Campus Virchow-Klinikum und der Genetischen Forschungsabteilung des Institutes für Rechtsmedizin der Charité zur prognostischen Bedeutung der Chimärismus-Analytik nach pädiatrischer Knochenmarktransplantation liegen nun auch hier die ersten Ergebnisse in ausführlicher Darstellung vor (Rascon, Jelena, Promotionsarbeit), [134, 156]. Die krankheitsspezifischen Veröffentlichungen sind in Vorbereitung.

Im Untersuchungszeitraum von 1999 bis 2005 wurden 168 Kinder in der Kinderklinik der Charité allogotransplantiert, wobei 113 Kinder die Einschluss-Kriterien 1. krankheitsspezifische Standardkonditionierung und GvHD Prophylaxe entsprechend den vorgeschriebenen Therapie-Protokollen, 2. Chimärismus-Monitoring von mindestens 5 Monaten, 3. Zugehörigkeit zu den nachstehend aufgeführten Patientengruppen, erfüllten. Untersucht wurden drei Patientengruppen: 69 Kinder und Jugendliche mit lymphoblastischen oder myeloischen Leukämien, davon 43 mit ALL und 26 mit einer AML, CML bzw. MDS, 22 Knaben mit einer frühkindlichen X-chromosomalen Adrenoleukodystrophie (ALD) als exemplarisches Beispiel für eine metabolische Erkrankung und 22 Patienten mit Fanconi-Anämie in Aplasie, MDS- oder AML-Phase als Beispiel für eine Erkrankung mit radio- und chemosensitiver Chromosomenaberration. Das Chimärismus-Monitoring wurde im peripheren Blut und im Knochenmark sowohl in den kernhaltigen Gesamtzellen als auch in den CD3-, CD19- und CD34-spezifischen Zellpopulationen durchgeführt.

Nach Auswertung aller Daten wurde das Auftreten eines MC zunächst univariat hinsichtlich assoziierter Merkmale und multivariat hinsichtlich aller in Frage kommenden Faktoren der Transplantation untersucht. Es wurde nach der Häufigkeit des MC nach allogener SZT in den gesamten kernhaltigen Zellen sowie in spezifischen Zellpopulationen und nach der Prädiktivität dieser Analysen hinsichtlich der Kinetik des Spenderzell-Engraftments, des Monitorings von Therapieeffekten, einer möglichen Rezidiv-Beeinflussung, der Stabilität und Funktion des Transplantates, eines drohenden Transplantatverlustes und des Gesamtüberlebens gefragt. Untersucht wurde das Chimärismus-Monitoring bei kindlichen Leukämien nach klassischer, myeloablativer Konditionierung. Der Median des

Transplantatanwachsens entsprach den ermittelten Werten bei der Erwachsenen-Transplantation [105, 131]. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der in den ersten vier Wochen nach SZT nachgewiesene MC die Kinetik des Transplantatanwachsens widerspiegelt und deshalb bei der Einschätzung der Chimärismus-Konstellation, wie bei der adulten Transplantation, unberücksichtigt bleiben kann. Trotz myeloablativer Konditionierung wurde bei 79% der ALL- und 58% der AML-Patienten ein MC in mindestens einer der untersuchten Zellpopulationen detektiert. Dieser MC konvertierte nach unterschiedlichen therapeutischen Maßnahmen, aber vor allem ohne Therapie in einen CC. Auffällig war, dass in der Mehrheit der ALL-Fälle und in 50% der AML-Fälle der CC-Überführung ohne therapeutische Maßnahmen kurz zuvor eine aGvHD nachgewiesen und damit ein GvH-Effekt für die CC-Überführung festgestellt werden konnte. Nur jeweils ein ALL- und ein AML-Patient zeigten ein persistierendes Empfängerprofil in kompletter Remission. Für die Diskussion eines möglichen stabilen MC ist hier natürlich die Patientenzahl zu gering. Andererseits weisen diese Ergebnisse auf die Problematik der Chimärismus-Analyse hin, nicht zwischen restlichen gesunden Leukozyten des Empfängers oder einer refraktären und rezidivierenden Erkrankung des Patienten unterscheiden zu können. Es konnte nur eine signifikante Korrelation des MC mit einer hohen ALL-Rezidivwahrscheinlichkeit ermittelt werden. Ein AML-Rezidiv entwickelte sich im Beobachtungszeitraum bei nur einem Patienten und dies war mit einem MC gekoppelt. In einzelnen Fällen konnte gut demonstriert werden, dass Modifikationen der Immunsuppression bzw. adoptive Therapiestrategien ein sich anbahnendes Rezidiv umkehren können. Darüber hinaus wurde eine signifikante Korrelation zwischen dem Gesamtüberleben und dem MC mit >5% Empfänger-Anteil am Tag +200 nach SZT in den CD34-Zellen des Blutes festgestellt. Ein molekulargenetischer MRD (minimale Resterkrankung) -Marker existierte bei 28% der Patienten. Ein positiver MRD-Marker korrelierte sowohl mit dem Nachweis eines gemischten Chimärismus als auch mit dem Auftreten eines Rezidivs. Signifikante Aussagen zur Abhängigkeit eines MC- und MRD-Verlaufs konnten allerdings aufgrund der geringen Patientenzahl nicht getroffen werden.

Die ALD ist eine Stoffwechselerkrankung, der ein Defekt in der peroxisomalen β -Oxidation von sehr langkettigen Fettsäuren zugrunde liegt [118]. Sie lässt sich durch allogene SZT erfolgreich behandeln. Ein erhöhtes Niveau der langkettigen Fettsäuren im Blut führt zur Aktivierung eigener Gliazellen und einer entzündlichen Demyelinisierung im Zentralnervensystem und/oder zu einer Nebenniereninsuffizienz. Die Wirksamkeit des Transplantates liegt vermutlich im Austausch der aktivierten Gliazellen des Empfängers durch

Spenderzellen [98]. Dabei scheint die Effektivität der SZT hinsichtlich des Progresses der Grunderkrankung von der bereits vor der Transplantation vorliegenden Ausprägung der psychoneurologischen Symptomatik [179] und der Menge der angesiedelten Spenderzellen nach Transplantation abhängig zu sein. Da die therapie- (myeloablative Konditionierung) und infektionsbedingte Mortalität noch bei 15% der Patienten zum Tod führt, wird die Anwendung der toxisitätsreduzierten Konditionierung bei ALD-Patienten bereits diskutiert [151]. Erste, aber nicht ausführliche Ergebnisse zum Chimärismus-Verlauf liegen nur aus der Multicenter-Studie von Peters et al. [152] vor, wobei 86% der ALD-Patienten ein volles oder partielles spenderspezifisches Engraftment zeigten. Weitergehende Untersuchungen wurden bisher nicht beschrieben, so dass unsere vorliegende Studie einzigartige Angaben zum Chimärismus-Verlauf im Zusammenhang mit dem ALD-Progress nach klassischer myeloablativer Konditionierung zeigt. Bei 82% der Patienten wurde in mindestens einer der untersuchten spezifischen Zellpopulationen des Blutes ein MC festgestellt und das trotz myeloablativer Konditionierung. Der hohe Anteil eines gemischten Chimärismus insbesondere im T-Zell-Kompartiment noch bis zu 70 Tagen nach Transplantation lässt den Schluss zu, dass weitere Dosisreduzierungen bei der Konditionierung das schnelle Engraftment wirklich gefährden, welches die Voraussetzung für die erfolgreiche Funktion der Spenderzellen und Verbesserung der neurologischen Symptomatik nach SZT ist [97] und letztlich zur Transplantatabstoßung führen kann. Bislang zeigte sich nur eine Abstoßungskonstellation in 22 Transplantationen. Der MC konvertierte nach unterschiedlichen therapeutischen Maßnahmen, aber vor allem ohne Therapie, in einen CC. Bei allen drei Patienten mit dauerhaften, stabilen MC-Werten trotz Cyclosporin A-Entzug und anhaltender kompletter Remission waren die eigenen T-Zellen noch fünf Jahre nach SZT nachweisbar, allerdings mit langsamer aber stetiger Zunahme des Empfänger-Anteils in allen untersuchten Zellpopulationen. Es bleibt die Frage, wie lange die Spenderzell-Zahl bei diesen Patienten noch ausreicht, um eine ALD-Progression verhindern zu können und ob eine spezifische Zellpopulation dafür prädiktiv ist. Eine signifikante Korrelation zwischen Chimärismus und Prä-Transplantationscharakteristiken und Post-Transplantationsereignissen konnte nicht festgestellt werden. Zum Zeitpunkt der Auswertung befanden sich 82% der Patienten mit CC und 60% der Patienten mit MC in einer anhaltenden kompletten Remission bei einem Median der Beobachtungszeit von 968 bzw. 1943 Tagen.

Die Zahl der Publikationen, die sich mit dem Chimärismus-Verlauf nach SZT bei Fanconi-Anämien beschäftigten, ist gering. Die umfangreichsten Studien mit 19 bzw. 22 meist mit

Geschwisterspendern transplantierten Patienten wurde von Socie et al. [182] und Ayas et al. [5] publiziert. Darüber hinaus gibt es diverse Einzelfallstudien [19, 46, 117, 170, 216, 221]. Aufgrund der bei der Fanconi-Anämie vorliegenden Chromosomeninstabilität führt eine konventionelle myeloablative Konditionierung zu einer außerordentlichen Toxizität und damit hohen Mortalität. Das in unserer Analyse untersuchte Patientenkollektiv stellt eine bisher einzigartig große Patientengruppe mit sowohl HLA-identischen Geschwisterspendern als auch unverwandten Spendern dar. Es wurden dabei neue Wege einer dosisreduzierten Konditionierung, der bestrahlungsfreien, Fludarabin-basierten Konditionierung zur Vermeidung von sowohl Fanconi-spezifischen Sensitivitäten als auch Transplantatabstoßungen beschritten. Über die Analyse des Chimärismus-Verlaufs eines solchen Patientenkollektivs wurde bisher noch nicht berichtet. Auch unter diesen noch experimentellen Protokollen zeigte sich ein stabiles Engraftment bei 50% der Patienten. Die anderen Patienten zeigten einen MC, der in vier Fällen zur Abstoßung bzw. Transplantatversagen führte. Hier erwies sich der MC als starker, wenn auch noch nicht signifikanter Hinweis. Der MC konnte nach unterschiedlichen therapeutischen Maßnahmen sowie ohne therapeutische Maßnahme in einen CC überführt werden. Die Auswirkungen von Re-Transplantationen und adoptiven Therapiestrategien konnten sehr gut durch das zellartspezifische Chimärismus-Monitoring dokumentiert werden. Bei fünf der Patienten zeigte sich ein überaus stabiler MC der T-Zell-Population über einen Zeitraum von mehr als zwei Jahren, verbunden mit einer kompletten Remission. Der Anteil an Spenderzellen nahm dabei langsam aber stetig zu. Des Weiteren ergab sich eine Relevanz der Stammzellquelle Knochenmark für die Entwicklung eines MC und ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen akuter GvHD und dem CC. Alle Patienten mit MC hatten entweder keine aGvHD oder eine nur sehr milde. Es zeigte sich außerdem ein deutlicher Hinweis auf den Zusammenhang zwischen Therapietod und CC. Es wurde deutlich, dass Dosisreduzierungen bei dieser Erkrankung eines sorgfältigen Chimärismus-Monitorings vor allem der T-Zell-Subfraktion über einen sehr langen Zeitraum bedürfen. Immunmodulatorische Maßnahmen müssen sehr sorgfältig ausgewählt werden, um die therapiebedingte Mortalität zu reduzieren. Das Phänomen eines relativ stabilen MC bei einigen Patienten, verbunden mit einer kompletten Remission, bedarf weiterhin der Aufklärung.

Das Chimärismus-Monitoring nach Leber-Transplantation (OLT)

Die in diesem Abschnitt dargelegten Arbeiten zur Chimärismus-Analyse nach orthotoper Leber-Transplantation (OLT) sind das Ergebnis einer langjährigen Kooperation zwischen der

Klinik für Allgemein- Visceral- und Transplantationschirurgie und der Genetischen Forschungsabteilung des Institutes für Rechtsmedizin der Charité [83, 92, 189].

Im Gegensatz zur allogenen SZT spielen Chimärismus-Analysen nach OLT eigentlich nur eine untergeordnete Rolle. Makrochimärismen werden praktisch nur beim Auftreten einer GvHD detektiert, eine relativ seltene aber schwere und meist letale Komplikation mit einem Vorkommen von 0,5-1%. In einer retrospektiven Studie von Leber-Transplantationen an der Charite fanden sich 0,3 % der Patienten mit histologisch diagnostizierter GvHD, die einherging mit einem detektierten Makrochimärismus. Alle Patienten waren resistent gegen das klassische immunsuppressive Regime der Hoch-Dosis Corticosteroid-Gabe und verstarben nach Ausbruch der GvHD an Infektionen [92].

Die Mehrheit der Organ-Transplantations-Empfänger braucht eine lebenslange immunsuppressive Therapie zur Aufrechterhaltung der Transplantatfunktion. Das Phänomen der persistierenden Spender-Zellen im peripheren Blut, in Lymphknoten und Knochenmark noch Jahre nach OLT, Mikrochimärismus genannt, soll eine Rolle bei der Toleranzinduktion spielen und möglicherweise zu einer Reduktion der Rejektionsepisoden und der immunsuppressiven Therapie und damit zur Langzeit-Akzeptanz des Transplantates führen [35, 83]. Nach OLT konnten Spenderzellen im peripheren Blut des Empfängers nachgewiesen werden [140, 186]. Darüber hinaus konnte in unserer Studie ein Mikrochimärismus in CD34-positiven Zellpopulationen gezeigt werden [83], was spekulieren lässt, dass hämatopoetische Stammzellen aus der Leber in der Frühphase nach Lebertransplantation im Knochenmark des Empfängers anwachsen. Dies würde bedeuten, dass diese Zellen der HvG (Wirt-Gegen-Transplantat) Reaktion entkommen sind. Die Patienten ohne Mikrochimärismus hatten signifikant mehr Episoden einer akuten Rejektion und brauchten einen höheren Blutspiegel an Immunsuppressiva als die Gruppe mit Mikrochimärismus [83]. Unsere vorgelegten Ergebnisse einer zweijährigen, wesentlich umfangreicheren Studie zur Chimärismus-Detektion gehen noch weiter in ihrer Aussage. Sie lassen den Schluss zu, dass nicht nur das bloße Vorhandensein eines Mikrochimärismus als prognostischer Indikator nach OLT eine Bedeutung hat, sondern dass vielmehr eine ausreichende Menge an Spenderzellen notwendig ist, um eine Rolle bei der Toleranzinduktion spielen zu können.

Insbesondere neue immunsuppressive Therapien bedingen ein besseres Posttransplantations-Überleben und führen zu einer wachsenden Zahl an Transplantationen. Leider steigt auch die Frequenz der malignen Erkrankungen nach Transplantation [141, 194]. Unser beschriebener, klinischer Fall einer akuten myeloischen Leukämie, drei Jahre nach OLT, war der erste

Bericht, der eine transplantatlokalisierte, spenderspezifische Leukämie demonstrierte [189]. Dies wurde diagnostiziert durch STR-Analysen von Speichel-, Leber- und zellseparierten Leukämiezellen des Patienten. Zusätzlich wurden karyologische Veränderungen im Leukämieklon mittels STR-Analyse beobachtet. Trotzdem blieb ungelöst, wann die leukämische Transformation stattfand. Es gab weder einen Hinweis auf eine Leukämie zum Zeitpunkt des Spendertodes, noch entwickelte einer der Kadavernieren-Empfänger eine Leukämie. Hämatopoetische Vorläuferzellen können mit der transplantierten Leber transferiert werden, wie die Studien zum Mikrochimärismus gezeigt haben. So wird die Hypothese der leukämischen Transformation der spenderspezifischen hämatopoetischen Vorläuferzellen im Empfänger favorisiert. Die immunsuppressive Therapie kann den leukämischen Progress erleichtert haben. Und nicht zuletzt muss spekuliert werden, dass die Gegenwart von spenderspezifischen CD34-Zellen, wie in obigen Studien diskutiert, in Langzeit-Überlebens-LTX-Empfängern bei der Toleranzinduktion Bedeutung haben können. Sie würden damit den leukämischen Progress, trotz einer Reduktion der immunsuppressiven Therapie, ermöglichen.

Ausgewählte eigene Publikationen in Kapitel 6:

6.5

Massenkeil G*, **Nagy M***, Lawang M, Rosen O, Genvresse I, Geserick G, Dörken B, Arnold R. Reduced intensity conditioning transplants. Reduced intensity conditioning and prophylactic DLI can cure patients with high-risk acute leukaemias if complete donor chimerism can be achieved. Bone Marrow Transplantation 31: März/2003, 339-345.

*Massenkeil and Nagy contributed equal.

6.6

Massenkeil G, Roigas J, **Nagy M**, Wille A, Stroszczyński C, Mapara MY, Loening S, Dörken B, Arnold R. Nonmyeloablative stem cell transplantation in metastatic renal cell carcinoma: delayed graft-versus-tumor effect is associated with chimerism conversion but transplantation has high toxicity. Bone Marrow Transplantation 34: August/2004, 309-316.

2.4 HLA- und STR-Marker in der evolutionären Anthropologie

Das HLA-System ist, wie bereits im Kapitel 1.1 ausgeführt, durch einen extrem hohen Polymorphismus, ausgeprägte Polygenie und eine „en bloc“ Vererbung gekennzeichnet, was auf kein anderes menschliches Erbmerkmalssystem zutrifft. Aufgrund der beschriebenen Eigenschaften ist das HLA-System sehr gut geeignet, die Vielfalt der ethnischen Identitäten genetisch zu charakterisieren, die Durchmischung einer Population festzustellen und Hypothesen zum Ursprung sowie zur Richtung und zeitlichen Dimension von

Völkerwanderungen abzuleiten. So werden anhand von Allelfrequenzen genetische Distanzen ermittelt, mit denen verwandtschaftliche Beziehungen von Populationen charakterisiert werden können.

Der hohe Grad des Kopplungsungleichgewichtes zwischen den HLA-Allelen ist ein weiterer wichtiger Parameter zur Charakterisierung von Populationen. Die Existenz eines Kopplungsungleichgewichtes in einer Population kann anzeigen, dass ein bestimmter HLA-Haplotyp gerade in die Population eingeführt wurde (durch Gründer-Effekt oder Populationsfusion), und seitdem noch nicht genug Zeit vergangen ist, ein Gleichgewicht zu erlangen oder aber, dass diese bestimmte Kombination von Allelen durch Selektion begünstigt wurde.

In unseren anthropologischen Projekten standen die HLA-Klasse II Polymorphismen im Fokus des Interesses. Die evolutionäre Geschichte der HLA-Klasse II Polymorphismen reflektiert Selektionsdrücke für verschiedene Genorte und unterschiedliche genetische Mechanismen [52]. Der HLA-DRB1 Genort z.B. zeichnet sich durch einen sehr hohen Polymorphiegrad aus, der aus seiner großen Bedeutung bei der Fremdpeptidpräsentation resultiert. Ein weiteres Charakteristikum ist sein starkes Kopplungsungleichgewicht zu den benachbarten Genorten DQA1 und DQB1, das aus dem sehr kurzen Abstand von 50 bzw. 70 kb und dem starken Selektionsdruck herrührt. So liegt das relative Kopplungsungleichgewicht, RD, für die Allelkombinationen DRB1*1501-DQB1*0602 in der deutschen Population z.B. bei 1,0. In 513 bzw. 485 Meiosen des DRB1-DQA1- und DQA1-DQB1-Abschnittes wurde nach Begovich et al. [10] kein Rekombinationsereignis gefunden, was die enge Kopplung dieser Gene beweist. Die Kopplung zum DPB1-Lokus ist hingegen aufgrund des größeren Abstandes der Genorte von 500 kb und der schwächeren Selektionsintensität deutlich geringer und damit für Populationsstudien nicht in dem Maße relevant. Aufgrund der außergewöhnlichen Verteilung der DPB1-Allele in verschiedenen Populationsgruppen, hervorgerufen durch sehr frühe differentielle Selektion nach der Separation der Hauptpopulationsgruppen, ist der HLA-DPB1 Genort aber selbst geeignet, Herkunft und Migration von distinkten Populationen rückzuverfolgen [58].

In einem ersten anthropologischen Projekt wurde das Wirken populationsgenetischer Einflüsse sowie kultureller und ethnologischer Bedingungen auf die Diversität des Genpools einer isolierten Bevölkerungsgruppe im Rahmen von Untersuchungen an Yanomami-Indianern in Süd-Venezuela bearbeitet. Hier existiert ein komplexes Netzwerk verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen den Dörfern als Folge verschiedener

gesellschaftlicher Szenarien wie Frauentausch, Dorfspaltungen, wechselnde Allianzen bis hin zu Kriegen zwischen den Dörfern. Der soziale Status in der Gesellschaft ist hauptsächlich bestimmt durch das Verwandtschaftssystem. Polygynie ist weit verbreitet, besonders unter den Stammesoberhäuptern. Die Frauen werden zumeist ausgewählt unter den Schwestern der ersten Frau. Dieses Kreuz-Cousin Heirats-System ist die vorherrschende Heiratsregel. Innerhalb der untersuchten Gruppe, die wahrscheinlich von engen männlichen Verwandten gegründet wurde, ist die Y-chromosomale STR-Variabilität extrem eingeschränkt. Parallele Untersuchungen der autosomalen HLA-DQA1- und DQB1-Systeme zeigten dagegen die überlebensnotwendige Variabilität an. Sie kann auf das Heiratsverbot für Verwandte 1. Grades zurückgeführt werden [162].

In einem zweiten, wesentlich umfangreicheren anthropologischen Projekt, in enger Kooperation mit dem Max-Planck-Institut (MPI) für Humanethologie, Andechs-Erling durchgeführt und unterstützt durch die Chiang Ching Kuo Foundation Taipeh, Taiwan, ging es um die Problematik der Besiedlungsgeschichte des Westpazifiks. Grundlage der Kooperation war die enge Zusammenarbeit mit dem in der Region tätigen Arzt und Ethnologen Wulf Schiefenhövel.

Der Kolonialisierung Ozeaniens war eine Vielzahl von Studien der letzten Jahre mit linguistischen, archäologischen und anthropologischen und nicht zuletzt auch genetischen Beweismitteln gewidmet. Es wird angenommen, dass die Besiedlungsgeschichte dieses riesigen Gebietes in zwei Hauptmigrationsstufen verlief. Die erste, vor 50.000 bis 60.000 Jahren, beinhaltete die Okkupation von Australien und Neuguinea, die zum damaligen Zeitpunkt eine zusammenhängende Landmasse, die so genannte Sahul, bildete. Die zweite, jüngere Migrationswelle, begann vor etwa 5.000 bis 8.000 Jahren, als geschickte Seefahrer das landwirtschaftlich entwickelte Südostchina verließen und über die Philippinen und Indonesien nach Melanesien migrierten. Polynesien soll den letzten Teil der Expansion gebildet haben, der in der Besiedlung so weit entfernter Regionen des Pazifiks wie Hawaii, den Osterinseln und Neuseeland in den letzten 1.500 Jahren führte [11, 12]. Man findet heute zwei verschiedene linguistische Gruppen in diesem Gebiet, bezeichnet als nichtaustronesisch sprechende Gruppen (Papua-Sprache) und austronesisch sprechende Gruppen (AN), die man in Melanesien nebeneinander vorfindet.

Die Papua sprechenden Nichtaustronesier bevölkern fast das gesamte Neuguinea bis auf einige nördliche und südöstliche Küstenregionen. Hier und in vielen Inselgebieten Melanesiens sollen die Papua-Völker durch die austronesisch sprechenden Seefahrer

verdrängt worden sein. Die austronesische Sprache wird darüber hinaus in weit entfernten Regionen wie Taiwan, den Osterinseln, Neuseeland und Madagaskar (Abb. 5), aber auch in so dichtbevölkerten Gebieten wie Malaysia, Indonesien und den Philippinen gesprochen [198].

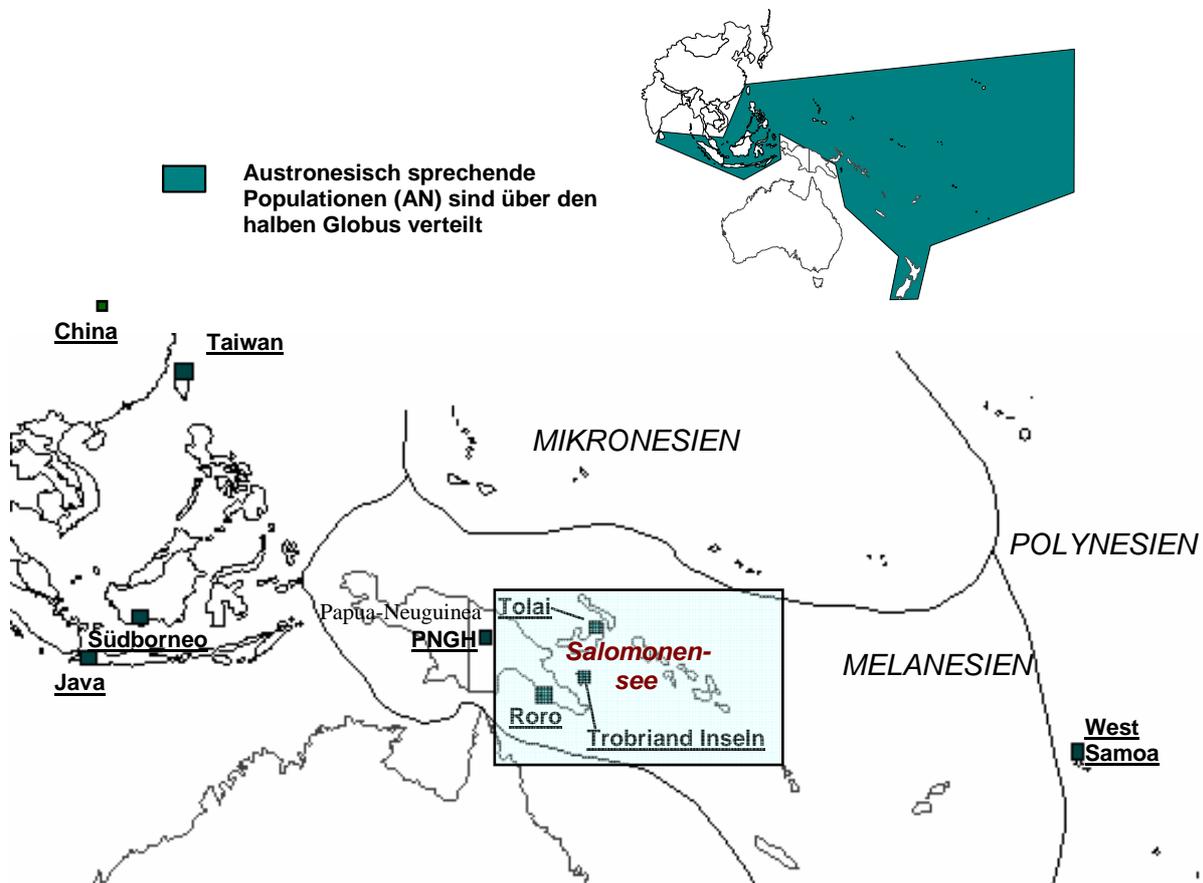


Abb. 5: Geographische Lokalisation der untersuchten Populationen des Westpazifik; PNGH = Population des Papua-Neuguinea Hochlandes

In einer ersten Auswertung unseres Projekt zur Besiedlungsgeschichte des Westpazifiks standen die Trobriander, ein traditionelles austronesisch-sprachiges Inselvolk in der Salomonensee, im Fokus unseres Interesses mit der Fragestellung: Stammen die Trobriander aus Südostasien [126]? In einer Zeit, wo kulturelle Änderungen bereits zu fundamentalen sozialen und ökonomischen Veränderungen geführt haben, leben die Bewohner der Trobriand-Inseln auch heute noch wie von den frühen Ethnologen (B. Malinowski 1915-1918) beschrieben. Im Gegensatz zu ihrer austronesischen Kultur und Sprache, lässt ihre physische Erscheinung eine Mischung aus beiden Ursprüngen, Papua und Austronesiern, vermuten.

Die HLA-Klasse II Ergebnisse der Trobriand-Population zeigen eine sehr eingeschränkte Variabilität des HLA-DRB1- und -DPB1-Genortes, wobei besonders letzterer zu 98% das Asien-spezifische Allel DPB1*0501 zeigt. Diese stark verminderte Diversität kann möglicherweise eine begrenzte genetische Diversität bzw. begrenzte Zahl der Gründer-Population reflektieren, gefolgt von einer Bevölkerungsexplosion ohne späteren Genfluss aus der Peripherie. Die HLA Klasse II Haplotypen der Trobriander sind die gleichen, wie die hauptsächlich in Asien vorkommenden. Die Trobriand-Population scheint charakterisiert zu sein durch das Allel-Repertoire der kolonisierten Population – möglicherweise Südostasien – bei relativ strenger geographischer Isolation. Von 150 untersuchten Trobriandern, es wurden genealogische Daten bis zur dritten Generation berücksichtigt, gaben nur fünf von ihnen an, dass ein Eltern- oder Großelternanteil nicht von den Trobriand-Inseln stammt. Und dies trotz ihres Austauschsystems während ihrer Seereisen über hunderte von Kilometern.

In einer noch umfangreicheren Studie zum HLA-Klasse II Polymorphismus von acht distinkten Populationen Asiens bzw. Ozeaniens wurde versucht, die Herkunft und Wanderrouen der AN bis in die Salomonensee aufzuspüren [220]. Es wurden Allel-Heterozygotie-, Haplotyp- sowie Genotypfrequenzen berechnet, das Hardy-Weinberg Gleichgewicht geprüft, genetische Distanzen zwischen jedem Populationspaar [138] bestimmt und phylogenetische Bäume auf der Grundlage der Neighbour-Joining-Methode [53, 168, 183] konstruiert, um die genetischen Beziehungen zwischen den Populationen aufzuzeigen. Daneben wurde insbesondere die Frage des ausreichenden Probenumfanges diskutiert, da Probenzahlen adäquater Größe von unverwandten Individuen insbesondere in kleinen Populationen oftmals schwierig zu erreichen sind, aber Fehler der Probensammlung (genetische Drift) möglichst ausgeschlossen werden sollten. Dazu wurde die Ungleichung zur Analyse der Probengrößenanforderung für STR-Systeme nach Chakraborty [29] unter Annahme eines neutralen Mutationsmodells verwendet. Obgleich man nicht selektive Neutralität für die analysierten HLA-Genorte annehmen kann, hat die Analyse ausreichende Hinweise für die Diskussion des Probenumfanges gegeben. Es zeigte sich, dass Allele mit Frequenzen <5% nur zufällig im Probengut einiger untersuchter Populationen gefunden wurden. Da seltene Allele aber nur sehr wenig zur genetischen Distanz von Populationen beitragen, ist der Fehler bei der Berechnung gering, wenn man einige seltene Allele übersieht.

Neben den Trobriandern waren wir insbesondere an zwei weiteren distinkten kulturellen und sprachlichen Gruppen innerhalb der AN-Populationen interessiert, den Tolai und den Roro. Die Tolai sind austronesisch sprechende Bewohner des nördlichsten New Britain mit

melanesischem Phänotyp. Die Roro sind eine austronesisch sprechende Population, völlig different zur austronesischen Sprache der Trobriander, mit dominant papuanischem Phänotyp in der Zentralprovinz des südwestlichen Neuguinea umgeben von papuanischen Populationen. Um die beiden Hauptgruppen Melanesiens, die austronesisch-sprachige und die Papua-Gruppe zu vergleichen, wurde zusätzlich eine Population des Papua-Neuguinea-Hochlandes analysiert. Außerdem wurden austronesisch sprechende Populationen außerhalb Melanesiens, d.h., von Westsamoa und Taiwan und zwei Malayo-polynesische Populationen von Java und Südborneo in die Untersuchungen einbezogen, um sie mit den austronesisch sprechenden Melanesiern zu vergleichen.

Die Unterschiede in der Allelverteilung zwischen den kulturell ähnlichen austronesisch sprachigen Populationen der Trobriander und Roro können wie auch die beschriebenen deutlichen linguistischen Unterschiede aus einer relativ frühen Trennung während der Migration von Südost-Asien und einer nachfolgenden unabhängigen Entwicklung dieser beiden Populationen resultieren. Die Populationsgröße der Trobriand-Insulaner wird mit 25.000, die der Roro mit etwa 6.000 beziffert. Diese niedrige effektive Populationsgröße kann zur Fixierung einer geringen Zahl von Allelen führen, deren Frequenz sich durch Isolation weiter erhöht.

Das Dendogramm unter Einbeziehung aller untersuchten Populationen zeigt eine kurze Distanz zwischen den beiden AN-Populationen Roro und Trobriander. Beide zeigen eine viel größere genetische Nähe zu den Bewohnern des 4000 km entfernt liegenden Westsamoa als zu der nur 400 km nahen Tolai-Population. Diese ist charakterisiert durch eine typisch melanesische Verteilung der HLA-Klasse II Allele, was sich in der sehr kurzen genetischen Distanz zu den anderen melanesischen Populationen niederschlägt [56, 57]. Obwohl die physische Statur der Trobriander zum Beispiel auf ein genetisches Gemisch von Papua- und AN-Population hinweist, kann dies durch die HLA-Analysen nicht bestätigt werden. Die Population des Papua-Neuguinea-Hochlandes unterscheidet sich in starkem Maße von allen anderen untersuchten Populationen.

Die Populationen der Trobriander, Roro, Tolai, Westsamoa sowie der Taiwan-Aborigines sind charakterisiert durch eine stark reduzierte Diversität der HLA-Genorte, was die Isolation der zum Teil traditionell lebenden ethnischen Gruppen unterstreicht. Die geringe Diversität kann allerdings auch das Ergebnis von Allelverlusten aufgrund von Krankheit oder Umweltstress sein, mit späterer direkter positiver Selektion als Antwort auf infektiöse Pathogene, die wenige Allele zu hohen Frequenzen treiben. Die bekannten Krankheitsmuster

sind typisch für endogame Populationen mit traditionellem Lebensstil. So werden die häufigsten Erkrankungen der Roro- und Trobriand-Population durch Infektionen verursacht. Der Einfluss dieser Erkrankungen auf die HLA-Allel-Verteilung der Populationen ist noch nicht untersucht. Noch unveröffentlichte Ergebnisse zur Malaria-Disposition der Trobriand-Population (12% der Infektionen sind hier Malaria-Erkrankungen der meist leichteren Form) zeigen weder das bekannte, gegen schwere Malaria protektiv wirkende HLA-B*53 Allel noch das von der Aminosäure-Sequenz her ähnliche HLA-B*1513 Allel bei insgesamt ebenfalls sehr eingeschränkter Diversität am HLA-B Locus. Die reduzierte Diversität kann damit sicherlich nicht durch Selektion allein sondern nur als Summe aller Einflüsse, wie kleine Gründerpopulation, starke Isolation und „bottle necks“ während der Migration und Selektion erklärt werden.

Das vorherrschende „Asien“-spezifische Merkmal HLA-DPB1*0501 in der Trobriand- und Roro- Population, neben der von Taiwan und Westsamoa sowie die kurze genetische Distanz zu den taiwanesischen Aborigines liefern Hinweise darauf, dass der Ursprung der austronesischen Odyssee Südostasien war und das Taiwan möglicherweise dabei eine bedeutende Rolle gespielt haben könnte.

Molekulargenetische Studien in der Anthropologie setzen gut charakterisierte Populations-Stichproben, eine enge Zusammenarbeit zwischen Anthropologen und molekularbiologisch arbeitenden Wissenschaftlern, aber vor allem den kombinierten Einsatz unterschiedlicher genetischer Marker, die möglichst in gleicher Dichte auf die Populationen angewendet werden, voraus.

In unseren Untersuchungen zur Besiedlungsgeschichte des Westpazifiks wurde erstmals versucht, diesen Forderungen annähernd zu entsprechen [68, 125]. Es wurden erstmalig nichtkodierende matrilineare HVRI-Regionen und patrilinäre STR-Regionen des Y-Chromosoms sowie die kodierende autosomale HLA-Klasse II-Region auf Chromosom 6 in dieser komplexen Studie gemeinsam analysiert. Dieser neue Untersuchungsansatz umfasste damit erstmals verschiedene Kompartimente des menschlichen Genoms mit sowohl unterschiedlichem Erbgang als auch unterschiedlicher Sensitivität populationsgenetischer Prozesse.

Mitochondriale DNS (mtDNS) ist ein exzellentes Werkzeug für das Studium der evolutionären Geschichte des Menschen. Dies resultiert vor allem aus ihrer Evolutionsrate [27, 207, 209], insbesondere der nichtkodierenden Kontroll-Region, der hypervariablen Region

(HVR) I mit einer Mutationsrate von 3.6×10^{-6} pro Base und 20-jähriger Generationszeit [82, 148]. Frühe Studien zum mtDNA Polymorphismus im Pazifik konnten eine spezifische Mutation, die 9 Basenpaar-Deletion zwischen dem mtDNA Cytochromoxydase II- und dem Lysyl-tRNA-Gen, detektieren. Im Pazifik ist diese Deletion zusätzlich assoziiert mit einer Anzahl von spezifischen Einzelbasenaustauschen in der hypervariablen Region des mitochondrialen Genoms, dem Austausch der Basen „TTAC“ an den Positionen 16189, 16217, 16247 und 16261 der mtDNA-Referenz-Sequenz von Anderson et al. [4] durch „CCGT“. Diese mtDNA-Substitution „CCGT“, bekannt als polynesisches Motiv, wurde in alten humanen Skelettresten und lebenden Populationen des Pazifiks [67, 113] gefunden.

Zum Zeitpunkt der Studie waren nur sehr wenige Daten zum Y-chromosomalen Polymorphismus in Asien bzw. Ozeanien verfügbar. Sie hatten nur einen geringen Informationsgrad und betrafen Y-chromosomale RFLPs [185], die Y-chromosomale Alu-Insertion (YAP) [69, 81] und eine Anzahl von Y-chromosomalen Punktmutationen [177, 217]. Erst durch Underhill et al. [202] wurden 1997 vier informative Y-chromosomale Punktmutationen in Ozeanien entdeckt. Darüber hinaus gab es die sich schnell entwickelnden STR-Marker des Y-Chromosoms zur Untersuchung von männlichen Linien [40, 85, 163, 164]. In unserer Studie wurde ein sieben STR-Systeme umfassender Y-chromosomaler Haplotyp analysiert. Die einzelnen Systeme wurden nach den Kriterien der hohen genetischen Diversität und Verfügbarkeit von weltweiten Vergleichsdaten ausgewählt [41, 54, 85] und besitzen im Vergleich zu den mtDNA- und HLA-Systemen eine mindestens 1000-fach höhere Mutationsrate von 2 bis 3×10^{-3} [87], (siehe Abb. 2).

Um die genetischen Verwandtschaften der AN-Populationen zu untersuchen, wurden Individuen von acht geographischen Orten Asiens und des Pazifik zur Untersuchung ausgewählt: die bereits beschriebenen Aborigines aus Taiwan sowie Bewohner Javas, beide als mögliche Nachkommen der frühen austronesischen Siedler, Bewohner des Neuguinea-Hochlandes als nichtaustronesisch sprechende Nachkommen einer wesentlich früheren Expansion, die Roro, Trobriand-Insulaner und Tolai, als austronesisch sprechende Bewohner Melanesiens, die Westsamoaner als polynesische Population, sowie die Han-Chinesen als Repräsentanten einer asiatischen Festland-Population. Sie wurden hinsichtlich ihrer mitochondrialen-, HLA- und Y-chromosomalen Polymorphismen analysiert.

Die Sequenzinformationen der mtDNA-Analyse zeigten eine hohe Haplotyp-Diversität bei den Proben aus China, Java und dem Papua-Neuguinea-Hochland, einhergehend mit einem größeren Alter dieser Populationen. Im Vergleich dazu wurde bei allen anderen untersuchten

Populationen Melanesiens und Polynesiens eine deutlich niedrigere Diversität beobachtet, was auf evolutionsgenetisch deutlich jüngere Populationen hinweist. Das polynesisches Motiv mit der 9 Basenpaar-Deletion und der Basentranslation CCGT wurde in den folgenden Populationen in abnehmender Stärke gefunden: Westsamoaner, Roro, Trobriander und Tolai. Keiner der Taiwanesen zeigte dieses Motiv, aber 20% trugen den CCAT-mtDNS-Typ, der sehr häufig in Polynesien auftritt und als Vorfahre des polynesischen Motivs betrachtet wird [113, 157]. Dagegen zeigte keine der Papua-Neuguinea-Hochland Proben die 9 Basenpaar-Deletion oder einen der beschriebenen Kontrollregion-Polymorphismen.

Die vollständige Y-chromosomale, sieben Lokus-Haplotyp-Information wurde mit einer durchgängig hohen Diversität detektiert, was entweder auf eine große männliche Gründerpopulation hinweist oder alternativ eine Besiedlung von wenigen männlichen Gründerlinien zeigt, denen aber genug Zeit zur Diversifizierung blieb. Für alle paarweisen Populationsvergleiche galt dabei, dass die Interpopulations-Varianz geringer war, als die Intrapopulations-Varianz. Beeindruckend war die große Interpopulations-Differenz der Samoaner zu allen anderen Populationen und nur erklärbar mit der hohen Frequenz der sehr kurzen Allele im System DYS390, die durch Deletionen in der repetitiven Sequenz charakterisiert sind und in den China-, Taiwan- und Java-Proben nicht auftraten. Eine Aussage darüber, wo die Mutation entstanden ist, konnte nicht getroffen werden [54].

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen HLA-Ergebnissen zeigte die Haplotyp-Analyse der HLA-DRB1-DQB1-Loci den häufigsten Haplotypen der Trobriander und Roro mit DRB1*08032-DQB1*0601 an. Dieser findet sich hochfrequent in Asien und bei den australischen Aborigines, was auf einen gleichen Ursprung dieser Populationen hindeutet.

Insgesamt ergaben die HLA- und mtDNS-Daten ein ähnliches Bild und unterstützen die Ansicht, dass die Proto-Polynesier aus einer frühen asiatischen Population, möglicherweise Taiwan, expandierten. Die hohe Y-Diversität steht im starken Gegensatz zu der allmählichen Abnahme der mtDNS-Diversität, von West nach Ost, was möglicherweise auf unterschiedliche Migrationswege von Männern und Frauen zurückgeführt werden kann. Unsere Resultate zeigen, dass die demographische Expansion der Austronesier einen „genetischen Fußabdruck“ auf den Inseln des Pazifiks hinterlassen hat. Eine einfache Korrelation zwischen Sprachen und Genen gibt es jedoch nicht. So ergab sich nur eine sehr geringe genetische Affinität zwischen der austronesisch sprechenden Java-Population einerseits und den austronesischen Populationen der Roro, Trobriander und Westsamoas andererseits, die das polynesisches mtDNS-Motiv und asiatische HLA-Marker tragen. Und

obwohl die Tolai von New Britain zur austronesischen Sprachgruppe gehören, zeigen sie nur eine geringe genetische Ähnlichkeit zu den nicht weit entfernt liegenden austronesischen Populationen der Roro und Trobriander in Melanesien. Wie bereits beschrieben, sind viele melanesische Inseln bereits vor der Ankunft der AN besiedelt gewesen. Die soziale Organisation der Tolai zeigt z.B. viele Elemente, die typisch für Papua-Gesellschaften sind [51]. Die austronesische Sprache könnte durch diese Papua-Völker Melanesiens übernommen worden sein, um den Handel mit den austronesischen Neuankömmlingen zu erleichtern. Die Y-chromosomalen Daten weisen auf eine massive männliche Einwanderung auf die melanesischen Inseln und Küstenregionen Papua-Neuguineas sowie Polynesiens hin.

Eines der Probleme, das assoziiert ist mit dem Einsatz der Y-chromosomalen Mikrosatelliten in der Populationsgenetik, ist die hohe Mutationsrate. Diese verhindert, Ereignisse rückzuverfolgen, die älter als 5.000 bis 8.000 Jahre sind. Idealerweise sollten deshalb die Y-STR-Analysen kombiniert werden mit langsamer mutierenden Y-chromosomalen Markern, wie z.B. biallelen Markern (siehe Abb. 2). Viele neue Marker wurden seitdem entdeckt. So auch informative Punktmutationen, die in Populationsstudien des Pazifiks einbezogen werden können. Ihre Mutationsraten liegen noch weit unter denen der mtDNS-Region bei meist 10^{-7} bis 10^{-9} pro Locus und Generation (Abb. 2). Allgemein liegen sie so niedrig, dass trotz der derzeitigen Populationsgröße von ca. 6 Milliarden, ein wiederholtes Auftreten oder die Umkehr einer gegebenen Mutation unwahrscheinlich sind. Damit können SNPs die Identität der Herkunft anzeigen, das heißt, sie sind geeignet, über frühe gemeinsame Vorfahren von Populationen eine Aussage zu treffen. Die Identität des Zustandes hingegen, das sind populationsgeschichtlich gesehen, Zeiträume von wenigen Tausend Jahren, kann von den schnell mutierenden Y-STR-Systemen charakterisiert werden.

In weitergehenden Untersuchungen des Y-Chromosoms unter breiter Einbeziehung solcher SNPs fanden Kayser et al. [86, 88] Beweise für eine Populationsexpansion in Polynesien vor etwa 2.200 Jahren. Nach den zwei bisher existierenden Hypothesen über die Besiedlung Polynesiens, dem „Express-Zug“ nach Polynesien [43, 178] mit einer frühen und schnellen Expansion der polynesischen Vorfahren aus Asien über Melanesien und dem „Melanesischen Modell“ [147], welches von einer langen Geschichte der kulturellen und genetischen Interaktionen unter den Südasiaten, Melanesiern und Polynesiern ausging, wird von Kayser et al. [86] das Modell des „langsamen Bootes“ vorgeschlagen mit einer asiatischen Herkunft der polynesischen Vorfahren, aber mit einer ausreichenden Zeit der Vermischung, um erst danach die Weite des Pazifiks zu kolonisieren.

Neueste Untersuchungen zur Verteilung zweier Y-chromosomaler Haplotypen in Südostasien und Melanesien einerseits und ihre Abwesenheit in Australien und dem Papua-Neuguinea-Hochland andererseits, weisen darauf hin, dass die Populationsexplosion für beide Haplotypen vor ca. 4.000 bis 6.000 Jahren mit der austronesischen Expansion nach Melanesien stattgefunden haben muss und die geschichtliche Entwicklung von Australien und Melanesien damit unabhängig voneinander war. Diese Einschätzung steht in vermeintlich starkem Widerspruch zu unseren autosomalen HLA-Ergebnissen, die für verschiedene melanesische Populationen und australische Aborigines eine enge Verwandtschaft aufgezeigt haben [68, 126, 220]. Dieser Widerspruch lässt sich damit erklären, dass die Y-chromosomalen Daten die letzten Tausend Jahre unabhängiger Geschichte von Australien und Neuguinea reflektieren, während die autosomalen HLA-Genorte die lange vorausgehende Periode der gemeinsamen Vorfahren und Geschichte charakterisieren.

Für eine Vertiefung und Präzisierung der Hypothesen zur Besiedlungsgeschichte des Pazifik erscheint hinsichtlich der HLA-Region die Einbeziehung der Klasse I Gene und hier insbesondere der extrem polymorphe HLA-B Genort interessant und viel versprechend zu sein. Er besitzt eine hohe Rekombinationsfrequenz [104, 109], die sich insbesondere in einer hohen Intralokus-Rekombination zeigt. Die im Kapitel 2.1 von uns nachgewiesenen neuen HLA-B Allele [74, 76, 137] sind höchstwahrscheinlich dadurch entstanden. So kann das Allel B*5613 des Patienten nordafrikanischer Herkunft über eine Intralokus-Rekombination im Exon 3 aus dem Allel B*5601 und den Allelen B *4402 oder B*4501 entstanden sein, die einen sehr langen Sequenzabschnitt mit dem neuen Allel gemeinsam aufweisen. Dieses Allel und seine Entstehungsgeschichte könnten für die Pazifik-Besiedlung von Interesse sein. Das B*56 Merkmal ist evolutionsbiologisch ein sehr altes HLA-Merkmal, das z.B. mit sehr hoher Frequenz in australischen Aborigines und im Hochland von Papua-Neuguinea vorkommt [79]. Andererseits können die anthropologischen Studien möglicherweise einen Beitrag zur Aufklärung der Entstehungsgeschichte dieses Allels leisten. Die durch uns etablierte neue Methodik der Kurzstreckensequenzierung mittels PyrosequencingTM [47] kann dabei hilfreich sein, noch vorhandenes, stark degradiertes Probenmaterial in die Studie einzubeziehen.

Ausgewählte eigene Publikationen in Kapitel 6:

6.7

Hagelberg E, Kayser M, **Nagy M**, Roewer L, Zimdahl H, Krawczak M, Lio P, Schiefenhövel W. Molecular genetic evidence for the human settlement of the Pacific: analysis of mitochondrial DNA, Y chromosome and HLA markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences* 354: Januar/1999, 141-152.

6.8

Zimdahl H, Schiefenhövel W, Kayser M, Roewer L, Nagy M. Towards understanding the origin and dispersal of Austronesians in the Solomon Sea: HLA class II polymorphism in seven distinct populations of Asia-Oceania. *European Journal of Immunogenetics* 26: Dezember/1999, 405-416.

2.5 HLA- und STR-Marker in der forensischen Genetik

Das Arbeitsgebiet der Forensischen Genetik befasst sich mit der Untersuchung biologischer Spuren und ihrer Zuordnung zu Spurenverursachern im Strafprozess, der Identifizierung unbekannter Toter und der Abstammungsbegutachtung im zivilrechtlichen und privaten Auftrag.

Die molekulargenetischen Identifizierungsmethoden in der Forensik befanden sich zu Beginn der DNS-Ära zunächst im rechtsfreien Raum. Im Dezember 1988 wurde sie das erste Mal zur Überführung eines Beschuldigten in Deutschland eingesetzt. Aber erst im September 1990 fällte der Bundesgerichtshof ein Grundsatzurteil, das die DNS-Analyse zur Aufklärung schwerer Verbrechen als Beweismittel zuließ. 1992 fand die erste Massenanalyse in der Bundesrepublik zur Aufklärung eines Mordes statt. Erste Fehlanalysen führten zum Beschluss des Bundesgerichtshofes, dass der genetische Fingerabdruck nicht als ausschließliches Beweismittel verwendet werden darf. Größte Anstrengungen wurden deshalb hinsichtlich der Standardisierung der RFLP-Methodik unternommen. So führte unsere Arbeitsgruppe DNS-Analysen mit der chemisch synthetisierten Oligonukleotid-Sonde (GTG)₅, einer optimalen Multilokus-Fingerprint-Sonde für humane DNS [2, 175], in Multizentrenstudien durch [18, 95]. Des Weiteren erfolgten Untersuchungen zur somatischen Stabilität und Mutationsrate [142] und zur statistischen Auswertung von DNS-Fingerprints mittels eines genetischen Faktorenmodells [94].

Zeitgleich erlangte das HLA-System aufgrund seines herausragenden Polymorphismus große Bedeutung bei der Klärung komplexer Abstammungsfälle und der Identifizierung von Individuen im Rahmen der forensischen Spurenkunde. Alle Kriterien, die an ein genetisches System für die volle forensische Anerkennung gestellt wurden, wie die bekannte chromosomale Position (Kapitel 1.1), ein gesicherter Erbgang, eine geringe Neumutationsrate, eine reproduzierbare Nachweistechnik (Kapitel 2.1) waren erfüllt. Neben dem hohen Polymorphiegrad hatte das HLA-System zu dieser Zeit eine Reihe von weiteren Vorteilen. Ursprünglich von klinischer Notwendigkeit bestimmt, war die HLA-Region sehr gut studiert worden und gehörte zu den am besten erforschten Regionen des menschlichen Genoms.

Internationale Kooperationen führten zur schnellen Entwicklung standardisierter Typisierungsmethoden. Bereits Anfang der neunziger Jahre wurde ein umfangreiches Ringversuchs- und Akkreditierungssystem für die HLA-Labore auf nationalem und europäischem Niveau aufgebaut, das die Labore hinsichtlich der Einhaltung der Standards für Histokompatibilität entsprechend ihrer Anwendungsbereiche, wie z.B. der Abstammungsbegutachtung, im dreijährigen Rhythmus prüfte. Diese herausragende Stellung des HLA-Systems, insbesondere aber der schnelle Einsatz der PCR-Technik in routinemäßige Typisierungsstrategien der hochpolymorphen Genorte, prädestinierten es am Anfang der Neunziger Jahre auch für den Einsatz im Strafprozess.

Das erste kommerziell vertriebene PCR-System war ein HLA-Kit, das HLA-DQA1-System, mit einer sehr bescheidenen Anzahl von Allelen. Deshalb wurden aufgrund der wissenschaftlich weit fortgeschrittenen HLA-PCR- und STR-Technik in unserem Labor bereits die hochpolymorphen HLA-DRB1 und -DPB1-Systeme sowie die STR-Systeme D12S66/67 und DYS19 in die Spurenanalyse und Abstammungsbegutachtung eingeführt [18, 95, 127, 128]. Die Systeme waren evaluiert, lokale Datenbanken erstellt und Delta-Werte als Parameter für das Kopplungsungleichgewicht zwischen HLA-DRB1 und -DPB1 von uns ermittelt [123, 124, 162]. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei unverwandte männliche Individuen zufällig den gleichen „häufigsten kombinierten Genotyp“ besitzen, lag für diese PCR-Strategie schon bei 1 auf 11 Millionen. Studien zur HLA-DRB1- und -DPB1-Analyse ergaben eine hohe Sensitivität der verwendeten PCR-SSO Systeme mit einer Nachweisgrenze von weniger als 1 ng. Bei PCR-Produkten von ≤ 280 Basenpaaren war diese Methodik auch für degradierte DNS anwendbar. Selbst in DNS-Mischungen konnten die HLA-DRB1 Allele bis zu einem Mischungsverhältnis von 1:10 noch eindeutig nachgewiesen werden [219].

Erst nach dem Beschluss des Bundesverfassungsgerichtes im Jahre 1995, in dem auf der Grundlage der Strafprozessordnung (StPO) § 81a festgelegt wurde, dass die Probe des Beschuldigten nur im nichtkodierenden Bereich der DNS untersucht und mit Spurenmaterial verglichen werden darf, wurde die HLA-Analyse aus dem Strafprozess verdrängt. Danach wurden große Anstrengungen hinsichtlich Standardisierung und Kommerzialisierung von STR-Systemen unternommen. So befasste sich die DNS-Kommission der „International Society for Forensic Haemogenetics“ erstmals 1997 mit dem Einsatz von STR Systemen [9] in der Forensik. Es folgten Richtlinien der „International Society for Forensic Genetics (ISFG)“ für mitochondriale DNS-Typisierungen [28], für Y-chromosomale STR-Systeme [61, 66] und zur Problematik der Interpretation von autosomalen Mischspuren [63].

Im Jahre 1997 wurde die DNS-Analyse erstmals per Gesetz, dem Strafverfahrensänderungsgesetz (StVÄG, § 81 der StPO), geregelt. Bereits Anfang 1998 wurde eine bundesweite Gen-Datei beim BKA eingerichtet, die im September 1998 durch das „DNA-Identitäts-Feststellungsgesetz“ legalisiert wurde. Es regelt die Speicherung, Verarbeitung und Nutzung der erhobenen DNS-Daten. Mehrfach modifiziert, liegt es nun seit 2005 in der novellierten Form vor. Es dürfen nunmehr alle Tatortspuren ohne richterlichen Beschluss untersucht und DNS-Proben vom Beschuldigten entnommen werden, wenn er mehrere minderschwere Straftaten begangen hat. Darüber hinaus wurde auch die so genannte Reihenuntersuchung auf eine gesetzliche Grundlage gestellt.

Nachdem anfangs nur fünf STR-Systeme in die deutsche Gen-Datei eingegeben werden konnten, wurde die Zahl, nicht zuletzt aufgrund der Harmonisierungsbestrebungen innerhalb Europas, sehr schnell auf 16 autosomale STR-Systeme erhöht. Weitere Harmonisierungen sind vorgesehen, da nur durch eine enge Abstimmung und durch Schaffung von europäischen Standards ein wirkungsvoller Schutz der Bevölkerung vor gefährlichen Straftaten gewährleistet ist. Im Februar 2007 kam es zur Einigung der Innenminister der EU, die Kooperation bei automatisierten Informationsabgleichen, wie den Ergebnissen von DNS-Tests, auf die gesamte Europäische Union auszuweiten.

Im Gegensatz zum beschriebenen Einsatz der DNS-Analyse im Strafprozess ist der Einsatz der DNS-Analyse im Zivilverfahren lange weder gesetzlich noch von wissenschaftlichen Gremien geregelt worden. Erst im Jahre 2002 wurden in Deutschland Richtlinien erstellt [158], die die DNS-Analyse auch als alleiniges Verfahren in der Abstammungsbegutachtung erlaubten. Eine gesetzliche Grundlage für die DNS-Analyse im Zivilverfahren gibt es bis heute nicht. Anfang 2007 stellte das Bundesverfassungsgericht jedoch in seinem Urteil auf eine Verfassungsbeschwerde klar, dass mit einem heimlichen Vaterschaftstest das informationelle Selbstbestimmungsrecht des Kindes verletzt wird und damit heimlich vorgenommene Vaterschaftstests rechtswidrig und als Beweismittel vor Gericht nicht verwertbar sind.

Das kleinste aller Chromosomen, das Y-Chromosom, steht schon lange im Fokus des Interesses (siehe auch Kapitel 2.4). Es gibt eine Vielzahl von Y-chromosomalen STR-Systemen [89]. Sie haben den immensen Vorteil gegenüber autosomalen Systemen, dass sie bei Sexualdelikten, den in der Regel stark unterrepräsentierten männlichen Anteil in der Mischspur ohne zusätzlichen und mit Verlusten verbundenen, differentiellen Lyseschritt eindeutig charakterisieren können [136, 166]. So konnte in einem Vergewaltigungsfall auch

nach differentieller Lyse einer Mischprobe mit Epithel- und Spermazellen kein männliches autosomales Profil erstellt werden. Mittels Y-chromosomaler STR-Analyse konnte aber ein 7-Lokus Haplotyp ermittelt werden, der mit einem der Tatverdächtigen übereinstimmte [166]. In einem anderen Fall wurde eine männliche Person wegen Vergewaltigung seiner Freundin zu mehrjähriger Haft verurteilt. Nachdem die auf privater Initiative durchgeführte Y-chromosomale Analyse des noch nicht in die Untersuchung einbezogenen Vaginalsekretausstrichs einen Y-chromosomalen Haplotypen ergab, der nicht mit dem Verurteilten übereinstimmte, wurde die Wiederaufnahme des Verfahrens erreicht (Fall aus der eigenen Gutachtertätigkeit).

Mehrfachvergewaltigungen bleiben aber auch mit der Y-chromosomalen Haplotyp-Analyse problematisch in ihrer Auswertung, da es sich um Haplotypmischungen handelt. Wolf et al. [212] interpretierten mathematisch diese Y-chromosomalen DNS-Mischungen. Es wurde eine Adaptation der existierenden Theorie von Mischungskonstellationen auf die haploide Situation präsentiert. Die Simulationen, vorgenommen anhand der YHRD-Datenbank, weisen darauf hin, dass Y-Haplotypen für die Unterscheidung zwischen männlichen Spurenverursachern und Nichtverursachern nicht besonders prädestiniert zu sein scheinen. Das Prinzip der haplotypspezifischen Extraktion, bisher auf das HLA-System des Chromosoms 6 (siehe Kapitel 2.1) in diversen eigenen Studien angewendet, könnte hier einen Ausweg aus der Problematik darstellen. Noch unveröffentlichte eigene Studien zur Isolation und Charakterisierung eines erweiterten molekularen Haplotypen auf Chromosom 6, wurden auf der 85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, „DNA in Forensics“, Innsbruck 2006, vorgestellt. So zeigten die SNP- und STR-Analysen in unterschiedlicher Distanz vom HLA-B Genort (maximal 70 kb in sowohl 3'- als auch 5'-Richtung), eine eindeutig homozygote Konstellation der vor HSE heterozygoten DNS-Probe. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass es möglich ist, einen erweiterten molekularen Haplotypen mittels HSE zu isolieren. Eine erste Machbarkeitsstudie zur HSE von Y-Haplotypen war bereits sehr hoffnungsvoll. So gelang es uns, aus einer Mischung zweier männlicher DNS-Proben mit unterschiedlichen Y-chromosomalen Haplotypen genau den gewünschten STR-Haplotypen mittels HSE zu isolieren und mittels Multiplex-Y-STR-Analyse zu charakterisieren. Für die HSE wurde ein Y-SNP genutzt. Der unerwünschte Haplotyp war gar nicht oder nur deutlich schwächer nachweisbar.

Auf die Populationsabhängigkeit Y-chromosomaler Haplotypen wurde bereits im Abschnitt 1.2 und 2.4 eingegangen.

Auf X-chromosomale STR-Analysen [112, 192, 193], die in Defizienzfällen, in Vaterschafts-Fällen mit mehreren nahen Blutsverwandten, in Inzuchtfällen und auch in Fällen von Mutterschaftstests einen erheblichen Beitrag leisten, soll hier nicht näher eingegangen werden.

Der Tsunami über Südost-Asien im Jahre 2004 resultierte in einer Massenkatastrophe nie da gewesenen Ausmaßes. Hier war die außerordentlich große Opferzahl von 250.000 verknüpft mit weiteren hohen Anforderungen an die Opfer-Identifikation [187]. Die Auswertung dieser Katastrophe führte zu vielfältigen Diskussionen unter den forensischen Genetikern und Pathologen über eine bessere Vorbereitung der wissenschaftlichen Gemeinschaft auf Ereignisse dieses Ausmaßes und letztlich zur Erarbeitung von nationalen und internationalen Richtlinien der Opfer-Identifikation nach Massenkatastrophen (<http://www.interpol.int/Public/DisasterVictim/default.asp>), [22, 24, 199]. In den nunmehr vorliegenden Richtlinien der ISFG [153] werden Anleitungen für forensische Labore für den Fall einer Massenkatastrophe gegeben. Die Arbeiten zur Optimierung und Validierung eines vollständig automatisierten DNS Präparationsverfahrens in der Forensik bis hin zur Knochenaufarbeitung [133], dargelegt in Kapitel 2.2, waren ein eigener kleiner Beitrag zu dieser besonderen Problematik. Eine Darstellung und Einschätzung der derzeit existierenden Hochdurchsatz DNS-Präparationsverfahren wurde im eigenen Buchbeitrag in „Molecular Forensics“ gegeben [136].

Bleibt die Frage, wo bei dieser Vielzahl von hochempfindlichen und mehr oder weniger individualspezifischen STR Systemen die HLA-Analyse in der Abstammungs- und Spurenbegutachtung einzuordnen ist. Sie wird heute nur noch in Strafprozessen richterlich angeordnet, wenn es in „Altfällen“ um den Abgleich früherer Spurenergebnisse geht. In unserem Institut sind 20% der Abstammungsbegutachtungen Defizienzfälle. Viele dieser Fälle können nur unter Einbeziehung der HLA-Analyse gelöst werden, d.h., bei der Abstammungsbegutachtung von problematischen Defizienzfällen sowie Fällen mit STR-Mutationen bleibt die HLA-Analyse mit niedriger Mutationsrate und hoher individualspezifischer Aussage eine wichtige Methode [44, 130]. Voraussetzung dafür ist das Vorhalten der HLA-Analyse auf höchstem methodischem Niveau.

Die Detektion einer Vielzahl von individualspezifischen Informationen aus biologischen Materialien ist eine wesentliche Aufgabe der forensischen Genetik. Die Grundlage dafür wird bereits im ersten Schritt, der Probenvorbereitung, gelegt. In Kapitel 2.2 wurde bereits auf die Testung verschiedener DNS-Präparationsverfahren eingegangen. So ist es uns durch diverse Studien zur Spurenvorbereitung und Zell-Lyse gelungen, die gesamte Breite der forensischen

Proben von Blutspuren über Zigarettenkippen bis zu einzelnen Haaren mit dem gleichen Protokoll zu bearbeiten und der automatischen Extraktion zuzuführen. Einzige Ausnahmen für ein verändertes Lyseprotokoll sind telogene Haare, Spermaspuren und Knochenmehl, die danach ebenfalls der automatischen DNS-Extraktion zugeführt werden [133, 136]. Aus Studien mit definierten Zellproben konnte bereits mit DNS, die aus drei Zellen isoliert wurde, ein komplettes STR-Profil aus 9 STR-Systemen erstellt werden [133]. Die Suche nach einer weiteren Verbesserung der Nachweisgrenze des DNS-Analyseverfahrens führte zur Gesamtgenom-Amplifikation. Die in unseren Studien verwendete WGA-Methode mittels GenomiPhi DNA Amplification Kit führte wie in Kapitel 2.2 ausführlich beschrieben zu heterozygoten Imbalancen und Allelverlusten. Ein vollständiges STR Profil ohne allelische Imbalance, die Basis für eine akkurate forensische Analyse, konnte auch durch Einsatz von gepoolter WGA-DNS für den Niedrig-DNS-Bereich nicht erreicht werden [134].

Je sensitiver die Methoden werden, umso wichtiger ist ein sicheres Laborkontrollsystem. So werden in unserem Labor definierte Zellsets zwischen 50 und 10.000 Zellen aus dem Chimärismus-Monitoring nach SZT täglich genutzt, um die automatische Extraktion bis hin zur STR-Analyse auf ihre Sensitivität hin zu überprüfen. Alle Bearbeitungsstufen vom Probeneingangsbereich bis zur Gutachtenerstellung werden als unabhängiger Doppelvorgang geführt. Damit können menschliche Fehler auf ein Minimum reduziert werden, ganz ausschließen wird man sie leider nie können [133, 134].

Ausgewählte eigene Publikationen in Kapitel 6:

6.3

Nagy M, Otremba P, Krüger C, Bergner S, Anders P, Henske B, Prinz M, Roewer L. Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. *Forensic Science International* 152: August/2005, 13-22.

6.4

Nagy M, Rascon J, Massenkeil G, Ebell W, Roewer L. Evaluation of whole-genome amplification of low-copy-number DNA in chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation using STR marker typing. *Electrophoresis* 27: August/2006, 3028-3037.

3 Abschließende Diskussion und Ausblick

Die Etablierung der PCR-Methodik in der Medizin führte zu einer Revolutionierung der Analysemöglichkeiten polymorpher Regionen. Hochpolymorphe STR-Marker haben eine neue Ära in der Forensik begründet, der PCR-gestützte Nachweis der HLA-Polymorphismen hat den Antigen-Nachweis in der Transplantationsimmunologie weitgehend verdrängt und beide DNS-Polymorphismen haben die Populationsgenetik tiefgreifend verändert. Die transplantationsrelevanten HLA-Regionen werden routinemäßig für die Spender/Empfänger-Auswahl sequenziert, Abstammungsbegutachtungen können je nach Fall durch Anwendung von STR- und HLA-Systemen gelöst werden. Selbst bloße Kontaktsuren können Hinweise auf Personen am Tatort geben. Die Sensitivität der DNS-Präparations- und STR-Analyse-Verfahren ist enorm hoch. Drei Zellen oder 20 pg DNS des Spurenlegers am Tatort reichen aus, um routinemäßig ein STR-Profil zu erstellen und den Tatverdächtigen als Spurenverursacher festzustellen. Y-chromosomale STR-Profile weisen eindeutig männliche Täterprofile in Sexualdelikten nach.

Obwohl die STR-Analyse nicht prospektiv unterscheiden kann zwischen gesunden Leukozyten des Empfängers oder Zellen des beginnenden leukämischen Rezidivs, haben die Ergebnisse zum zellartspezifischen Chimärismus-Monitoring nach SZT deutlich gemacht, dass persistierende oder wiedererscheinende Empfängerzellen ein nahendes Rezidiv bereits weit vor dem klinischen Befund anzeigen. Immunmodulierende Therapien konnten gut dokumentiert werden.

Chimärismus-Analysen von Leukozytensubpopulationen sollten deshalb ein Bestandteil der monatlichen Verlaufskontrollen von Patienten mit Hochrisiko-Leukämien bis zu einem Jahr nach Transplantation sein. Bei Patienten mit MC und drohendem Rezidiv, sowie bei Patienten unter Immuntherapie sollte generell ein engmaschiges, wenn notwendig sogar wöchentliches, linienspezifisches Chimärismus-Monitoring durchgeführt werden. Darüber hinaus sollten die Knochenmarkpunktate generell einem CD34-spezifischen Monitoring unterzogen werden.

Auch bei der allogener SZT im Kindesalter stellen Chimärismus-Analysen einen wichtigen Bestandteil des Posttransplantations-Monitorings dar. Für zwei wesentliche Grunderkrankungen der pädiatrischen SZT, der ALD und der Fanconi-Anämie sind die dargelegten Ergebnisse zum Chimärismus-Monitoring einzigartig. Typisierungen von Subfraktionen, wie den Vorläuferzellen bei Leukämien, die Ausgangspunkte der malignen Transformation sind, waren auch hier aussagekräftiger als eine Gesamtzell-Analyse aller nukleären Zellen,

zumindest in der Frühphase nach Transplantation. Hinsichtlich des Abstoßungsrisikos und der Transplantatfehlfunktion ist die Analyse der T-Zell-spezifischen Population bei allen Patientengruppen aufschlussreich. Viele noch offene Fragen, wie die nach der Bedeutung eines MC vor allem in den T-Zellkompartimenten bei ALD und Fanconi-Anämie, bedürfen der Untersuchung eines noch größeren Patientenkollektivs.

Im Gegensatz zur allogenen SZT spielen Chimärismus-Analysen nach OLT eigentlich nur eine untergeordnete Rolle. Makrochimärismen wurden praktisch nur beim Auftreten einer GvHD detektiert. Das Phänomen der persistierenden Spender-Zellen im peripheren Blut, Mikrochimärismus genannt, noch Jahre nach OLT, konnte eindeutig nachgewiesen werden. Seine Rolle bei der Toleranzinduktion wurde hinreichend diskutiert. Die vorgelegten Ergebnisse lassen sogar den Schluss zu, dass nicht nur das bloße Vorhandensein eines Mikrochimärismus als prognostischer Indikator nach OLT eine Bedeutung hat, sondern dass vielmehr eine ausreichende Menge an Spenderzellen notwendig ist, um eine Rolle bei der Toleranzinduktion spielen zu können. Hier sind weiterreichende Studien notwendig, und es bleibt die Frage, ob das Verhältnis von Spender- und Empfängerzellen zueinander oder die eigentliche Spenderzellmenge die entscheidende Rolle spielt.

Der beschriebene, klinische Fall einer akuten myeloischen Leukämie, drei Jahre nach OLT, war der erste Bericht, der eine transplantatlokalisierte, spenderspezifische Leukämie demonstrierte, diagnostiziert durch STR-Analysen von Speichel-, Leber- und zellseparierten Leukämiezellen des Patienten. Trotzdem blieb ungelöst, wann die leukämische Transformation stattfand. Hämatopoetische Vorläuferzellen können mit der transplantierten Leber transferiert werden, wie die Studien zum Mikrochimärismus gezeigt haben. So wird die Hypothese der leukämischen Transformation der spenderspezifischen hämatopoetischen Vorläuferzellen im Empfänger favorisiert.

Die Anwendung der hochpolymorphen molekulargenetischen HLA- und STR-Marker in der Populationsgenetik, am Beispiel der Besiedlungsgeschichte des Pazifik, hat ein sehr komplexes Bild gezeichnet und gezeigt, dass fundierte Darlegungen über Weg, Zeit und Raum von Völkerwanderungen nur das Ergebnis linguistischer, archäologischer, anthropologischer, kultureller und weiterführender molekulargenetischer Untersuchungen, die hier in enger Kooperation mit Anthropologen und Medizinern erstellt wurden, sein kann. Die ermittelten genetischen Daten unter Einsatz völlig unterschiedlich mutierender Systeme und unterschiedlichen Vererbungslinien gaben Aufschluss über die Geschichte von Populationen, die das heutige Erscheinungsbild der Pazifikbewohner geformt haben.

Die Identifizierungsmethoden in Transplantationsimmunologie, Anthropologie und Forensik entwickeln sich weiter.

Die durch uns etablierte neue Methodik der Kurzstreckensequenzierung mittels PyrosequencingTM für HLA-Marker ist besonders für den Hochdurchsatz geeignet. Damit können genetische Risikofaktoren komplexer Erkrankungen auf Chromosom 6, aber auch Populationsstudien, die HLA-Genotypisierungen großer Kohorte notwendig machen, relativ hochauflösend analysiert werden. Die physikalische Separation von HLA-Allelen ermöglichte die Extraktion einer sehr langen Sequenzregion eines Allels mit den jeweiligen Exon- und Intronabschnitten. Zwei neue HLA-B Allele konnten ohne den sonst für den Nachweis neuer Allele vorgeschriebenen Klonierungsschritt erstmals eindeutig detektiert werden.

Die SNP-Technologie ist auch im forensischen Labor angekommen. Der praktische Vorteil autosomaler SNP-Analysen in der Forensik besteht vor allem in der kürzeren DNS-Zielsequenz, der Nachteil in der niedrigen Heterozygotierate. Die theoretische Verfügbarkeit von Tausenden von Markern und ihr Potential für eine Hochdurchsatz-Testung wie der Mikroarray-Technologie machen sie trotz alledem zu einer beachtenswerten Typisierungsstrategie in der Forensik. Vor allem die Katastrophe des World Trade Center hatte zur raschen Entwicklung der SNP-Multiplex-Analyse in der Forensik [23, 60] geführt, um noch weitere, mit den Mini-STR-Systemen nicht mehr identifizierbare, sterbliche Überreste zu identifizieren [102]. SNP-Multiplexe werden aber weder in der Forensik noch in der Chimärismus-Analyse die STR-Analyse verdrängen, da sie weder deutlich informativer noch sensitiver als die beschriebenen STR-Verfahren sind. Auf die Vorteile spezifischer SNPs in der Populationsgenetik wurde hinreichend eingegangen.

Die Gesamtgenom-Amplifikation ist eine aussichtsreiche Methode, um große Mengen an DNS aus Proben limitierter DNS-Menge zu generieren. Die Nachweisgrenze der WGA zur Erlangung eines vollständigen STR-Profiles lag bei 100 pg. Darunter wurden heterozygote Imbalancen und Imbalancen zwischen verschiedenen Loci, Allelverluste und zusätzliche Allele detektiert. Gill et al. [62] demonstrierten in einem anschaulichen Modell, dass heterozygote Imbalance und Allelverlust hauptsächlich eine Folge des stochastischen Effektes der molekularen Pre-PCR Selektion ist, d.h. die Zahl der DNS-Moleküle, die nach der Amplifikation produziert werden, sind vor allem eine Funktion der Zahl der Ausgangsmoleküle am Start. Damit liegt der kritischste Punkt der PCR-basierten Analyse im Niedrig-DNS-Bereich in der DNS-Isolierung selbst, die so viel hoch gereinigte DNS wie möglich

erbringen muss. Auf unsere Bestrebungen, die DNS-Extraktion deshalb erfolgreich zu optimieren, wurde bereits eingegangen.

Ein weiteres neues Kapitel der Forensik ist bereits aufgeschlagen worden, das der molekulargenetischen Kodierung von phänotypischen Informationen von Individuen wie z.B. Haar-, Augen- und Hautfarbe. In Rotterdam ist eigens für diese Fragestellungen ein Institut für Forensische Molekularbiologie eingerichtet worden. Die erste Euphorie über das genetische Phantombild hat sich jedoch gelegt, nach dem erste wissenschaftliche Ergebnisse darlegten, wie komplex die genetische Kodierung sichtbarer Merkmale ist. Andererseits steht der Einsatz dieser zukünftigen Informationen in der polizeilichen Ermittlung im drastischen Widerspruch zur derzeitigen deutschen Gesetzeslage des § 81a der StPO, die die Untersuchung von DNS nur im nichtkodierenden Bereich erlaubt.

Die Möglichkeit der physikalischen Separation von Allelen könnte nicht nur bei der HLA-Typisierung von mehrdeutigen Genotypen eine neue Dimension erreicht haben und HLA-Haplotyp-Analysen ohne Familienstudien in Krankheitsassoziations- und anthropologischen Arbeiten in Aussicht stellen, sondern auch in der Forensik zusätzlich Informationen aus den problematischen Mischspuren ermöglichen. Was für eine Vereinfachung, wenn es möglich wäre, alle wesentlichen Spurenkomponenten einer Mischspur separat isolieren zu können. Insbesondere die Y- und mtDNS-Haplotyp-Analyse in Mischungen wäre damit sehr erfolgreich zu lösen. Exemplarisch wurde eine Studie auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 durchgeführt, die sehr lange Sequenzabschnitte der separierten Allele für nachfolgende Typisierungsstrategien vorlegte. Eine erste Machbarkeitsstudie zur Extraktion eines Y-chromosomalen Haplotypen aus männlichen DNS-Mischungen und deren Charakterisierung über eine Y-STR-Multiplex-Analyse liegen bereits vor.

4 Abkürzungsverzeichnis

ALD	X-chromosomale Adrenoleukodystrophie
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
AN	Austronesische Sprachgruppe (austronesisch sprechend)
bp	Basenpaare
CC	Complete Chimerism , nur Spenderzellen nachweisbar
CML	Chronische Myeloische Leukämie
CODIS	Combined DNA Index System des FBI der Vereinigten Staaten von Amerika mit 13 STR-Systemen (D3S1358, VWA, FGA, D8S117, D21S11, D18S58, TH01, D13S317, D7S820, CSF1PO, D16S539, D5S818, TPOX)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DLI	Donor Lymphocyte Infusion (Spender Lymphozyten Infusion)
GvHD	Graft versus Host Disease (Transplantat-Gegen-Wirt-Erkrankung)
GvH	Graft versus Host (Transplantat-Gegen-Wirt-Reaktion)
GvL	Graft versus Leukemia Effekt (Transplantat-Gegen-Leukemie-Effekt)
GvT	Graft versus Tumor Effekt (Transplantat-Gegen-Tumor-Effekt)
HLA	Humanes Leukozytenantigen System
HSE	haplotypspezifische Extraktion
HvG	host versus graft (Wirt gegen Transplantat - Reaktion)
HVR	Hypervariable Region
ISFG	International Society for Forensic Genetics
kb	Kilobasen
MC	Mixed Chimerism , Zellen von Spender und Empfänger nachweisbar
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MPI	Max-Planck-Institut
MRD	Minimal Residue Disease (minimale Resterkrankung)
MRT	Magnetresonanztomographie
mtDNS	mitochondriale DNS
ng	Nanogramm

NCC	N ierencell c arcinom
OLT	O rthotope L eber t ransplantation
PCR	P olymerase C hain R eaction (Polymerasekettenreaktion)
pg	P ikogramm
RIC-SZT	SZT nach dosisreduziertem Konditionierungsregime (R educed i ntensity conditioning)
RFLP	R estriction F ragment L ength P olymorphism
RSP	R estriction S ite P olymorphism
SBT	S equence B ased T yping
SNP	S ingle N ucleotide P olymorphism
SSO	S equence S pecific O ligonucleotide Typing
SSP	S equence S pecific P rimer
StPO	S traf p rozess o rdnung
STR	S hort T andem R epeats (Kurze tandemartige Wiederholungen)
SZT	S tamm z ell t ransplantation nach Hochdosiskonditionierung
VNTR	V ariable N umber of T andem R epeats
WGA	W hole G enome A mplification

5 Literaturverzeichnis

1. Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyren P, Uhlen M, Lundeberg J (2000) Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem* 280: 103-110.
2. Ali S, Muller CR, Epplen JT (1986) DNA finger printing by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Hum Genet.* 74: 239-243.
3. Amato RJ (2000) Chemotherapy for renal cell carcinoma. *Semin Oncol* 27: 177-186.
4. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.
5. Ayas M, Al-Jefri A, Al-Mahr M, Rifai S, Al-Seraihi A, Tbakhi A, Mustafa M, Khairy A, Moussa E, Iqbal A, Shalaby L, El-Solh H (2005) Stem cell transplantation for patients with Fanconi anemia with low-dose cyclophosphamide and antithymocyte globulins without the use of radiation therapy. *Bone Marrow Transplant* 35: 463-466.
6. Bader P, Beck J, Frey A, Schlegel PG, Hebarth H, Handgretinger R, Einsele H, Niemeyer C, Benda N, Faul C, Kanz L, Niethammer D, Klingebiel T (1998) Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant* 21: 487-495.
7. Bader P, Klingebiel T, Schaudt A, Theurer-Mainka U, Handgretinger R, Lang P, Niethammer D, Beck JF (1999) Prevention of relapse in pediatric patients with acute leukemias and MDS after allogeneic SCT by early immunotherapy initiated on the basis of increasing mixed chimerism: a single center experience of 12 children. *Leukemia* 13: 2079-2086.
8. Bader P, Dückers G, Kreyenberg H, Hoelle W, Kerst G, Lang P, Greil J, Niethammer D, Beck J, Klingebiel T (2002) Monitoring of donor cell chimerism for the detection of relapse and early immunotherapeutic intervention in acute lymphoblastic leukemias. *Ann Hematol* 82: 25-27.
9. Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr W, Olaisen B (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int J Legal Med* 110: 175-176.
10. Begovich AB, McClure GR, Suraj VC, Helmuth RC, Fildes N, Bugawan TL, Erlich HA, Klitz W (1992) Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region. *J Immunol* 148: 249-258.
11. Bellwood P (1989) The colonization of the Pacific: some current hypotheses. In: Hill AVS, Serjeantson SW (Hrsg) *The Colonization of the Pacific: A Genetic Trail*. Oxford University Press, 1-59.
12. Bellwood P (1995) Austronesian Prehistory in Southeast Asia: Homeland, Expansion and Transformation. In: Bellwood P, Fox JJ, Tryon D (Hrsg) *The Austronesians*. Canberra: Australia National University, 96-111.
13. Bergstrom TF, Erlandsson R, Engkvist H, Josefsson A, Erlich HA, Gyllensten U (1999) Phylogenetic history of hominoid DRB loci and alleles inferred from intron sequences. *Immunol Rev* 167: 351-365.

14. Bertheas MF, Lafage M, Levy P, Blaise D, Stoppa AM, Viens P, Mannoni P, Maraninchi D (1991) Influence of mixed chimerism on the results of allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Blood* 78: 3103-3106.
15. Blaise D, Bay JO, Faucher C, Michallet M, Boiron JM, Choufi B, Cahn JY, Gratecos N, Sotto JJ, Francois S, Fleury J, Mohty M, Chabannon C, Bilger K, Gravis G, Viret F, Braud AC, Bardou VJ, Maraninchi D, Viens P (2004) Reduced-intensity preparative regimen and allogeneic stem cell transplantation for advanced solid tumors. *Blood* 103: 435-441.
16. Blin N, Stafford DW (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 3: 2303-2308.
17. Bodmer WF (1992) HLA 1991. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Hrsg) HLA 1991. Proceedings of the 11th International Histocompatibility Workshop and Conference. Oxford: University Press, Vol. 1, 7-15.
18. Böhm I, Krawczak M, Nürnberg P, Hampe J, Hundrieser J, Pöche H, Peters C, Slomski R, Kwiatkowska J, Nagy M, Pöpperl A, Epplen J-T, Schmidtke J (1993) Oligonucleotide DNA Fingerprinting: Results of a Multi-Center Study on reliability and validity. *Exs* 67: 257-260.
19. Boulad F, Gillio A, Small TN, George D, Prasad V, Torok-Castanza J, Regan AD, Collins N, Auerbach AD, Kernan NA, O'Reilly RJ (2000) Stem cell transplantation for the treatment of Fanconi anaemia using a fludarabine-based cytoreductive regimen and T-cell-depleted related HLA-mismatched peripheral blood stem cell grafts. *Br J Haematol* 111: 1153-1157.
20. Bregni M, Doderio A, Peccatori J, Pescarollo A, Bernardi M, Sassi I, Voena C, Zaniboni A, Bordignon C, Corradini P (2002) Nonmyeloablative conditioning followed by hematopoietic cell allografting and donor lymphocyte infusions for patients with metastatic renal and breast cancer. *Blood* 99: 4234-4236.
21. Brinkmann B, Klitsch M, Neuhuber F, Huhne J, Rolf B (1998) Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet* 62: 1408-1415.
22. Budimlija ZM, Prinz MK, Zelson-Mundorff A, Wiersema J, Bartelink E, MacKinnon G, Nazzaruolo BL, Estacio SM, Hennessey MJ, Shaler RC (2003) World Trade Center human identification project: experiences with individual body identification cases. *Croat Med J* 44: 259-263.
23. Budowle B, Planz J, Campbell R, Eisenberg A (2004) SNPs and microarray technology in forensic genetics: development and application to mitochondrial DNA. *Forensic Sci Rev* 16: 22-36.
24. Budowle B, Bieber FR, Eisenberg AJ (2005) Forensic aspects of mass disasters: strategic considerations for DNA-based human identification. *Leg Med (Tokyo)* 7: 230-243.
25. Butler JM, Shen Y, McCord BR (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J Forensic Sci* 48: 1054-1064.
26. Cadavid LF, Watkins DI (1997) Class I Genes in Nonhuman Primates. In: Blancher A, Klein J, Socha WW (Hrsg) Molecular Biology and Evolution of Blood Group and MHC Antigens in Primates. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 340-357.

27. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC (1987) Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325: 31-36.
28. Carracedo A, Bar W, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider P, Budowle B, Brinkmann B, Gill P, Holland M, Tully G, Wilson M (2000) DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int* 110: 79-85.
29. Chakraborty R (1992) Sample size requirements for addressing the population genetic issues of forensic use of DNA typing. *Hum Biol* 64: 141-159.
30. Chakraborty R, Kimmel M, Stivers DN, Davison LJ, Deka R (1997) Relative mutation rates at di-, tri-, and tetranucleotide microsatellite loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1041-1046.
31. Chandler D, Tinschert S, Lohan K, Harrop K, Goldblatt J, Nagy M, Hummel S, Braun H-S, Laing N, Nürnberg P (2001) Refinement of the chromosome 5p locus for craniometaphyseal dysplasia. *Hum Genet* 108: 394-397.
32. Childs R, Epperson D, Bahceci E, Clave E, Barrett J (1999) Molecular remission of chronic myeloid leukaemia following a non-myeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplant: in vivo and in vitro evidence for a graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol* 107: 396-400.
33. Childs R, Chernoff A, Contentin N, Bahceci E, Schrupp D, Leitman S, Read EJ, Tisdale J, Dunbar C, Linehan WM, Young NS, Barrett J (2000) Regression of metastatic renal-cell carcinoma after non-myeloablative allogeneic peripheral-blood stem-cell transplantation. *N Engl J Med* 343: 750-758.
34. Chung DT, Drabek J, Opel KL, Butler JM, McCord BR (2004) A study on the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the STR Miniplex primer sets. *J Forensic Sci* 49: 733-740.
35. Crosbie OM, Reynolds M, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C (1999) In vitro evidence for the presence of hematopoietic stem cells in the adult human liver. *Hepatology* 29: 1193-1198.
36. Dapprich J, Cleary MA (2000) Patent applications US20010031467 and EU00984206.3, Generation Biotech, Lawrenceville, NJ and Princeton University, Princeton, NJ.
37. Dapprich J, Cleary MA, Gabel HW, Akkapeddi A, Iglehart B, Turino C, Beaudet L, Lian J, Murphy NB (2006) A rapid, automatable method for molecular typing. In: Hansen JA (Hrsg) *Immunobiology of the Human MHC. Proceedings of the 13th International Histocompatibility Workshop and Conference, IHWC 2001*. IHWG Press, Seattle, WA, USA: Vol. 2, 93-96.
38. Dausset J (1954) Leuko-agglutinins. IV leukoagglutinins and blood transfusion. *Vox Sang* 4: 190-198.
39. Dausset J (1958) Iso-leuko-anticorps. *Acta haemat* 20: 156-166.
40. Deka R, Jin L, Shriver MD, Yu LM, Saha N, Barrantes R, Chakraborty R, Ferrell RE (1996) Dispersion of human Y chromosome haplotypes based on five microsatellites in global populations. *Genome Res* 6: 1177-1184.
41. De Knijff P, Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, Honda K, Jobling M, Krawczak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Pandya A, Parson W, Penacino G, Perez-Lezaun A,

- Piccinini A, Prinz M, Schmitt C, Schneider PM, Szibor R, Teifel-Greding J, Weichhold G, Roewer L (1997) Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. *Int J Legal Med* 110: 134-149.
42. De Lima M, Bonamino M, Vasconcelos Z, Colares M, Diamond H, Zalberg I, Tavares R, Lerner D, Byington R, Bouzas L, da Matta J, Andrade C, Carvalho L, Pires V, Barone B, Maciel C, Tabak D (2001) Prophylactic donor lymphocyte infusions after moderately ablative chemotherapy and stem cell transplantation for hematological malignancies: high remission rate among poor prognosis patients at the expense of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 27: 73-78.
 43. Diamond JM (1988) Express train to Polynesia. *Nature* 336: 307-308.
 44. Ebeling V, Roewer L, Nagy M (1995) Ein isolierter Ausschluß im HLA-DRB1-System: ein Fallbeispiel aus der Paternitätsbegutachtung. 74. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Aachen.
 45. Ebeling V (1997) Zur Methode der nichtradioaktiven DNS-Sequenzierung von PCR-Produkten des HLA-DRB1-Genortes. Dissertation, Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität Berlin.
 46. Elhasid R, Ben Arush MW, Katz T, Gan Y, Shechter Y, Sami I, Postovsky S, Reisner Y, Rowe JM (2000) Successful haploidentical bone marrow transplantation in Fanconi anemia. *Bone Marrow Transplant* 26: 1221-1223.
 47. Entz P, Nürnberg P, Toliat MR, Hampe J, Nagy M (2005) New Strategies for Efficient Typing of HLA-Class II Loci DQB1 and DRB1 using Pyrosequencing™. *Tissue Antigens* 65: 67-80.
 48. Entz P (2006) Strategien zur HLA Typisierung mit Pyrosequencing™. Dissertation, Fakultät III, Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin.
 49. Entz P, Blaumeiser B, Betz RC, Lambert J, Seymons K, Eigelshoven S, Hanneken S, Kruse R, Nürnberg P, Nagy M, Nöthen MM (2006) Investigation of the HLA-DRB1 locus in alopecia areata. *Eur J Dermatol* 16: 363-367
 50. Epplen C, Frank G, Gomolka M, Nagy M, Nürnberg P, Epplen J-T (1994) Dinucleotide repeat polymorphism in the IL2 and IL5RA genes. *Hum Mol Genet* 3: 679-685.
 51. Epstein AL (1991) Tolai. In: Hays TE (Hrsg) *Encyclopedia of world cultures*. Boston, MA, Oceania, Hall&Co, Vol. II, 333-336.
 52. Erlich HA, Gyllensten UB (1991) Shared epitopes among HLA class II alleles: gene conversion, common ancestry and balancing selection. *Immunol Today* 12: 411-414.
 53. Felsenstein J (1989) Phylip-Phylogeny Inference Package (ZVersion 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
 54. Forster P, Kayser M, Meyer E, Roewer L, Pfeiffer H, Benkmann H, Brinkmann B (1998) Phylogenetic resolution of complex mutational features at Y-STR DYS390 in aboriginal Australians and Papuans. *Mol Biol Evol* 15: 1108-1114.
 55. Fu Y, Liu Z, Lin J, Chen W, Jia Z, Pan D, Xu A (2003) Extensive polymorphism and different evolutionary patterns of intron 2 were identified in the HLA-DQB1 gene. *Immunogenetics* 54: 761-766.
 56. Gao X, Bhatia K, Trent RJ, Serjeantson SW (1992) HLA-DR, DQ nucleotide sequence polymorphisms in five Melanesian populations. *Tissue Antigens* 40: 31-37.

57. Gao X, Serjeantson SW (1992) Analysis of 2600 HLA-DR, DQ haplotypes in Asia-Oceania. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Hrsg) HLA 1991. Proceedings of the 11th International Histocompatibility Workshop and Conference. Oxford: University Press, Vol. 2, 229-232.
58. Gao X, Veale A, Serjeantson S (1992) AB1: a novel HLA-DPB1 allele found in one third of an Australian population. *Immunogenetics* 36: 64-66.
59. Geserick G, Nagy M (2000) Analyse hochpolymorpher Marker. In: Kulozik AE, Hentze MW, Hagemeyer C, Bartram CR (Hrsg) Molekulare Medizin. Grundlagen-Pathomechanismen-Klinik. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 197-204.
60. Gill P (2001) An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. *Int J Legal Med* 114: 204-210.
61. Gill P, Brenner C, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Jobling MA, de Knijff P, Kayser M, Krawczak M, Mayr WR, Morling N, Olaisen B, Pascali V, Prinz M, Roewer L, Schneider PM, Sajantila A, Tyler-Smith C (2001) DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on forensic analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Sci Int* 124: 5-10.
62. Gill P, Curran J, Elliot K (2005) A graphical simulation model of the entire DNA process associated with the analysis of short tandem repeat loci. *Nucleic Acids Res* 33: 632-643.
63. Gill P, Brenner CH, Buckleton JS, Carracedo A, Krawczak M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Schneider PM, Weir BS; DNA commission of the International Society of Forensic Genetics (2006) DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. *Forensic Sci Int* 160: 90-101.
64. Grey HM, Kubo R, Colon SM (1973) The small subunit of HLA-A antigens is beta-2-microglobulin. *J Exp Med* 138: 1608-1612.
65. Gu X, Nei M (1999) Locus specificity of polymorphic alleles and evolution by a birth-and-death process in mammalian MHC genes. *Mol Biol Evol* 16: 147-156.
66. Gusmao L, Butler JM, Carracedo A, Gill P, Kayser M, Mayr WR, Morling N, Prinz M, Roewer L, Tyler-Smith C, Schneider PM; DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (2006) DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Sci Int* 157: 187-197.
67. Hagelberg E, Clegg JB (1993) Genetic polymorphisms in prehistoric Pacific islanders determined by analysis of ancient bone DNA. *Proc Biol Sci* 252: 163-170.
68. Hagelberg E, Kayser M, Nagy M, Roewer L, Zimdahl H, Krawczak M, Lio P, Schiefenhövel W (1999) Molecular genetic evidence for the human settlement of the Pacific: analysis of mitochondrial DNA, Y chromosome and HLA markers. *Phil Trans R Soc Lond Biol Sci* 354: 141-152.
69. Hammer MF (1994) A recent insertion of an alu element on the Y chromosome is a useful marker for human population studies. *Mol Biol Evol* 11: 749-761.
70. Hampe J, Valentonyte R, Manaster C, Teuber M, Jenisch S, Entz P, Nagy M, Schreiber S (2004) Nonelectrophoretic method for high-throughput HLA-DRB1 group genotyping. *Biotechniques* 36: 148-151.

71. Hancock JP, Goulden NJ, Oakhill A, Steward CG (2003) Quantitative analysis of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation using immunomagnetic selection and fluorescent microsatellite PCR. *Leukemia* 17: 247-251.
72. Hellebrand M, Nagy M, Mörsel JT (1998) Determination of DNA traces in rapeseed oil. *Z Lebensm Unters Forsch A* 206: 237-242.
73. Hentschke P, Barkholt L, Uzunel M, Mattsson J, Wersäll P, Pisa P, Martola J, Albini N, Wernerson A, Söderberg M, Remberger M, Thörne A, Ringdén O (2003) Low-intensity conditioning and hematopoietic stem cell transplantation in patients with renal and colon carcinoma. *Bone Marrow Transplant* 31: 253-261.
74. Heymann GA, Hoppe B, Nagy M, Schoenemann C, Kiesewetter H, Salama A (2005) B*4440: a novel HLA-B allele identified by sequence-specific oligonucleotide hybridization and sequence-specific amplification. *Tissue Antigens* 65: 195-198.
75. Holtkemper U, Rolf B, Hohoff C, Forster P, Brinkmann B (2001) Mutation rates at two human Y-chromosomal microsatellite loci using small pool PCR techniques. *Hum Mol Genet* 10: 629-633.
76. Hoppe B, Heymann GA, Schoenemann C, Nagy M, Kiesewetter H, Salama A (2004) Description of a novel HLA-B allele, B*5613, identified during HLA-typing using sequence-specific oligonucleotide hybridization and sequence-specific amplification. *Tissue Antigens* 64: 616-618.
77. Hughes AL, Nei M (1988) Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 335: 167-170.
78. Hughes AL, Nei M (1989) Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 958-962.
79. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T (1991) Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Hrsg) *HLA 1991. Proceedings of the 11th International Histocompatibility Workshop and Conference*. Oxford: University Press, Vol. 1, 1065-1220.
80. Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.
81. Jobling MA, Tyler-Smith C (1995) Fathers and sons: the Y chromosome and human evolution. *Trends Genet* 11: 449-456.
82. Jobling MA, Hurles ME, Tyler-Smith C (2004) The diversity of the human genome. In: Jobling MA, Hurles ME, Tyler-Smith C (Hrsg) *Human Evolutionary Genetics*. Garland Science press, New York, Abingdon, 50, 45-86, 123-152.
83. Junge G, Neumann UP, Joka M, Nagy M, Neuhaus R, Langrehr JM, Neuhaus P (2002) Microchimerism in Patients after Orthotopic Liver Transplantation: A prognostic indicator? *Transplant Proc* 34: 1542-1543.
84. Kaneoka H, Lee DR, Hsu KC, Sharp GC, Hoffman RW (1991) Solid-phase direct DNA sequencing of allele-specific polymerase chain reaction-amplified HLA-DR genes. *Biotechniques* 10: 30-34.
85. Kayser M, de Knijff P, Dieltjes P, Krawczak M, Nagy M, Zerjal T, Pandya A, Tyler-Smith C, Roewer L (1997) Applications of microsatellite-based Y chromosome haplotyping. *Electrophoresis* 18: 1602-1607.

86. Kayser M, Brauer S, Weiss G, Underhill PA, Roewer L, Schiefenhovel W, Stoneking M (2000) Melanesian origin of Polynesian Y chromosomes. *Curr Biol* 10: 1237-1246.
87. Kayser M, Roewer L, Hedman M, Henke L, Henke J, Brauer S, Krüger C, Krawczak M, Nagy M, Dobosz T, Szibor R, De Knijff P, Stoneking M, Sajantila A (2000) Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *Am J Hum Genet* 66: 1580-1588.
88. Kayser M, Brauer S, Weiss G, Schiefenhovel W, Underhill PA, Stoneking M (2001) Independent histories of human Y chromosomes from Melanesia and Australia. *Am J Hum Genet* 68: 173-190.
89. Kayser M, Kittler R, Erler A, Hedman M, Lee AC, Mohyuddin A, Mehdi SQ, Rosser Z, Stoneking M, Jobling MA, Sajantila A, Tyler-Smith C (2004) A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. *Am J Hum Genet* 74: 1183-1197.
90. Khazand M, Peiberg C, Nagy M, Sauermann U (1999) Mhc-DQ-DRB haplotype analysis in the rhesus macaque: evidence for a number of different haplotypes displaying a low allelic polymorphism. *Tissue Antigens* 54: 615-624.
91. Knowlton RG, Brown VA, Braman JC, Barker D, Schumm JW, Murray C, Takvorian T, Ritz J, Donis-Keller H (1986) Use of highly polymorphic DNA probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation. *Blood* 68: 378-385.
92. Kohler S, Pascher A, Junge G, Sauer IM, Nagy M, Schönemann C, Koch M, Neumann U, Pratschke J, Neuhaus P (2007) Graft versus host disease after liver transplantation - a single center experience and review of literature. *Liver Transplantation*, Submitted.
93. Kratzin H, Yang CY, Gotz H, Pauly E, Kolbel S, Egert G, Thinnies FP, Wernet P, Altevogt P, Hilschmann N (1981) Primärstruktur menschlicher Histokompatibilitätsantigene der Klasse II. 1. Mitteilung Aminosäuresequenz der N-terminalen 198 Reste der α -Kette des HLA-DW2,2; DR2,2-Alloantigens. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 362: 1665-1669.
94. Krawczak M, Bockel B (1992) A genetic factor model for the statistical analysis of multilocus DNA fingerprints. *Electrophoresis* 13: 10-17.
95. Krawczak M, Böhm I, Nürnberg P, Hampe J, Hundrieser J, Pöche H, Peters C, Slomski R, Kwiatkowska J, Nagy M, Pöpperl A, Epplen J-T, Schmidtke J (1993) Paternity Testing With Oligonucleotide Multilocus Probe (CAC)₅/(GTG)₅: A Multi-Center Study. *Forensic Sci Int* 59: 101-117.
96. Krawczak M (2001) Forensic evaluation of Y-STR haplotype matches: a comment. *Forensic Sci Int* 118: 114-115.
97. Krivit W, Lockman LA, Watkins PA, Hirsch J, Shapiro EG (1995) The future for treatment by bone marrow transplantation for adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, globoid cell leukodystrophy and Hurler syndrome. *J Inher Metab Dis* 18: 398-412.
98. Krivit W, Aubourg P, Shapiro E, Peters C (1999) Bone marrow transplantation for globoid cell leukodystrophy, adrenoleukodystrophy, metachromatic leukodystrophy, and Hurler syndrome. *Curr Opin Hematol* 6: 377-382.
99. Lantermann A, Hampe J, Kim WH, Winter TA, Kidd M, Nagy M, Fölsch UR, Schreiber S (2002) Investigation of HLA-DPA1 genotypes as predictors of inflammatory bowel

- disease in the German, South African and South Korean populations. *Int J Colorectal Dis* 17: 238-244.
100. Lawler SD, Baker MC, Harris H, Morgenstern GR (1984) Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow using the sex chromosomes as markers of cellular origin. *Br J Haematol* 56: 431-443.
 101. Lutz C, Massenkeil G, Nagy M, Neuburger S, Tamm I, Rosen O, Dörken B, Arnold R (2007) Prophylactic donor lymphocyte infusions to prevent relapse in adult acute lymphoblastic leukemias after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. Submitted.
 102. Marchi E (2004) Methods Developed to Identify Victims of the World Trade Center Disaster. *Am Lab* 30-36.
 103. Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI (2002) Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Eur J Immunogenet* 29: 463-515.
 104. Martinez-Laso J, Moscoso J, Zamora J, Martin-Villa M, Lowy E, Vargas-Alarcon G, Serrano-Vela JJ, Gomez-Casado E, Arnaiz-Villena A (2004) Different evolutionary pathway of B*570101 and B*5801 (B17 group) alleles based in intron sequences. *Immunogenetics* 55: 866-872.
 105. Massenkeil G, Nagy M, Lawang M, Rosen O, Genvresse I, Geserick G, Dörken B, Arnold R (2003) Reduced intensity conditioning transplants. Reduced intensity conditioning and prophylactic DLI can cure patients with high-risk acute leukaemias if complete donor chimerism can be achieved. *Bone Marrow Transplant* 31: 339-345.
 106. Massenkeil G, Nagy M, le Coutre P, Heine F, Rosen O, Dörken B, Arnold R (2004) Nonmyeloablative stem cell transplantation in patients with ALL and AML results in low nonrelapse mortality despite high rate of infections and GvHD. *Hematol J* 5: 395-402.
 107. Massenkeil G, Roigas J, Nagy M, Wille A, Stroszczyński C, Mapara MY, Loening S, Dörken B, Arnold R (2004) Nonmyeloablative stem cell transplantation in metastatic renal cell carcinoma: delayed graft-versus-tumor effect is associated with chimerism conversion but transplantation has high toxicity. *Bone Marrow Transplant* 34: 309-316.
 108. Massenkeil G, Nagy M, Neuburger S, Tamm I, Lutz C, Le Coutre P, Rosen O, Wernecke KD, Dörken B, Arnold R (2005) Survival after reduced-intensity conditioning is not inferior to standard high-dose conditioning before allogeneic haematopoietic cell transplantation in acute leukaemias. *Bone Marrow Transplant* 36: 683-689.
 109. McAdam SN, Boyson JE, Liu X, Garber TL, Hughes AL, Bontrop RE, Watkins DI (1994) A uniquely high level of recombination at the HLA-B locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5893-5897.
 110. McCann SR, Lawler M (1993) Mixed chimaerism; detection and significance following BMT. *Bone Marrow Transplant* 11: 91-94.
 111. Mc Sweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, Chauncey TR, Gooley TA, Hegenbart U, Nash RA, Radich J, Wagner JL, Minor S, Appelbaum FR, Bensinger WI, Bryant E, Flowers ME, Georges GE, Grumet FC, Kiem HP, Torok-Storb B, Yu C, Blume KG, Storb RF (2001) Hematopoietic cell

- transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood* 97: 3390-3400.
112. Meier-Sundhausen G, Roewer L, Nagy M, Geserick G (1998) HUMARA and HPRT - Extensive characterization of two polymorphic X-Chromosomal Short Tandem Repeat systems for Forensic Applications. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin, Hannover.
 113. Melton T, Peterson R, Redd AJ, Saha N, Sofro AS, Martinson J, Stoneking M (1995) Polynesian genetic affinities with Southeast Asian populations as identified by mtDNA analysis. *Am J Hum Genet* 57: 403-414.
 114. Mhashilkar AM, Doebis C, Seifert M, Busch A, Zani C, Soo Hoo J, Nagy M, Ritter T, Volk H-D, Marasco WA (2002) Intrabody-mediated phenotypic knockout of major histocompatibility complex class I expression in human and monkey cell lines and in primary human keratinocytes. *Gene Ther* 9: 307-319.
 115. MHC sequencing consortium (1999) Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. *Nature* 401: 921-923.
 116. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
 117. Mital MK, Curtis A, Spencer V, Barge D, Skinner R (1999) Delayed engraftment and mixed chimerism after HLA-identical sibling donor BMT in Fanconi anaemia. *Bone Marrow Transplant* 24: 201-204.
 118. Moser HW (1995) Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* 120: 1485-1508.
 119. Moss D, Harbison SA, Saul, DJ (2003) An easily automated, closed-tube forensic DNA extraction procedure using a thermostable proteinase. *Int J Legal Med* 117: 340-349.
 120. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
 121. Nagy M, Menzel GR, Coutelle C, Scholz D, Anders P, Seidel D (1990) HLA-DR typing using RFLP's: Retrospective study after living kidney transplantation. *Compendium European Histocompatibility Conference, Strasbourg*, 156-158.
 122. Nagy M, Mayr WR, Menzel GR (1991) HLA-DR: Serology versus Restriction Fragment Length Polymorphism. *Vox Sang* 61: 59-61.
 123. Nagy M, Roewer L (1992) Die PCR-Analyse. *Ann Univ Sarav Med* 9: 145-152.
 124. Nagy M, Roewer L, Nürnberg P, Bockel B, Krawczak M, Geserick G (1995) Strategies in paternity testing and forensic case work - the Charité experience. In: Jacob B, Bonte W (Hrsg) *Advances in Forensic Sciences*, Verlag Dr. Köster, Berlin Vol. 6: 90-94.
 125. Nagy M, Zimdahl H, Shailer NFJ, Hagelberg E, Kayser M, Roewer L, Medicus G, Schiefenhövel W (1996) Zur Besiedlungsgeschichte der Trobriandinseln-Molekularbiologische Analyse der HLA-Region sowie mitochondrialer und Y-chromosomaler Sequenzen. 2. Kongreß der Gesellschaft für Anthropologie, Berlin.
 126. Nagy M, Zimdahl H, Krüger C, Anders P, Kayser M, Roewer L, Schiefenhövel W (1997) Are the Trobrianders emigrants of South-East Asia? In: Charron D (Hrsg) *Genetic diversity of HLA. Functional and Medical Implication*, EDK, Sèvres, France, Vol 2, 185-188.

127. Nagy M (1998) DNA-Multilokus-Polymorphismen. In: Bein G, Nagy M, Waßmuth R, Wegener S (Hrsg) Technisches Handbuch Histokompatibilität & Immungenetik, Erlangen, S 235-238.
128. Nagy, M (1998) Paternitätsdiagnostik. In: Bein G, Nagy M, Waßmuth R, Wegener S (Hrsg) Technisches Handbuch: Histokompatibilität & Immungenetik, Erlangen 209-211.
129. Nagy M, Massenkeil G, Anders P, Hahne C, Krüger C, Otremba P, Arnold R, Geserick G (2000) Short tandem repeat analysis to monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation. In: Sensabaugh GF, Lincoln PJ, Olaisen B (Hrsg) Progress in Forensic Genetics 8. Proceedings of the 18th International ISFH Congress, San Francisco, Elsevier Science B.V. Amsterdam, 561-563.
130. Nagy M, Roewer L, Waltz H, Geserick G (2000) Defizienzfälle - höchste Ansprüche an die Abstammungsbegutachtung. Wissenschaftliche Tagung der Arbeitsgemeinschaft für Abstammungsbegutachten in der Bundesrepublik Deutschland, Hamburg.
131. Nagy M, Massenkeil G, Lawang M, Anders P, Hahne C, Krüger C, Otremba P, Arnold A (2003) Leukocyte chimerism monitoring of high-risk leukemia patients after stem cell transplantation and adoptive immunotherapy. In: Strauch H, Pragst F (Hrsg) Beiträge des Wissenschaftlichen Symposiums Rechtsmedizin. Festschrift für Gunther Geserick zum 65. Geburtstag. Verlag Dr. Dieter Helm, Heppenheim, 49-60.
132. Nagy M, Otremba P, Dapprich J, Roewer L (2004) Die allel-spezifische Separation von HLA-Genotypen. Tagung der AG der Sachverständigen für Abstammungsgutachten in der BRD e.V. und der Deutschsprachigen Arbeitsgruppe in der ISFG, Leipzig.
133. Nagy M, Otremba P, Krüger C, Bergner S, Anders P, Henske B, Prinz M, Roewer L (2005) Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. Forensic Sci Int 152: 13-22.
134. Nagy M, Rascon J, Massenkeil G, Ebell W, Roewer L (2006) Evaluation of whole-genome amplification of low-copy-number DNA in chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation using STR marker typing. Electrophoresis 27: 3028-3037.
135. Nagy M, Entz P, Otremba P, Murphy N, Dapprich J (2006) Isolation of Extended Molecular Haplotypes. 85.Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin und DNA in Forensics, Innsbruck.
136. Nagy M (2007) Automated DNA Extraction Techniques for Forensic Analysis. In: Rapley R, Whitehouse D (Hrsg) Molecular Forensics. John Wiley & Sons, Ltd., 37-58.
137. Nagy M, Entz P, Otremba P, Schönemann C, Murphy N, Dapprich J (2007) Haplotype Specific Extraction: A Universal Method to Resolve Ambiguous Genotypes and Detect New Alleles – Demonstrated on HLA-B. Tissue Antigens 69: 176-180.
138. Nei M (1972) Amer Naturalist 106: 283-292.
139. Nei M, Hughes AL (1992) Balanced polymorphism and evolution by the birth-and-death process in the MHC loci. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Hrsg) HLA 1991. Proceedings of the 11th International Histocompatibility Workshop and Conference. Oxford: University Press, Vol. 2, 27-38.
140. Nierhoff D, Horvath HC, Mytilineos J, Golling M, Bud O, Klar E, Opelz G, Voso MT, Ho AD, Haas R, Hohaus S (2000) Microchimerism in bone marrow-derived CD34(+) cells of patients after liver transplantation. Blood 96: 763-767.

141. Nuckols JD, Stenzel TT, Olatidoye BA, Tuttle-Newhall JE, Clavien PA, Howell DN (2000) The pathology of liver-localized post-transplant lymphoproliferative disease: a report of three cases and a review of the literature. *Am J Surg Path* 24: 733-741.
142. Nürnberg P, Roewer L, Neitzel H, Sperling K, Popperl A, Hundrieser J, Poche H, Epplen C, Zischler H, Epplen JT (1989) DNA fingerprinting with the oligonucleotide probe (CAC)₅/(GTG)₅: somatic stability and germline mutations. *Hum Genet* 84: 75-78.
143. Oexle K, Oberle J, Finckh B, Kohlschütter A, Nagy M, Seibel B, Seissler J, Hübner C (1996) Islet cell antibodies in diabetes mellitus associated with a mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) gene mutation. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 104: 212-217.
144. Offit K, Burns JP, Cunningham I, Jhanwar SC, Black P, Kernan NA, O'Reilly RJ, Chaganti RS (1990) Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* 75: 1346-1355.
145. Ohta T (1992) Diversifying selection, gene conversion, and random drift: interactive effects on polymorphism at MHC loci. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Hrsg) *HLA 1991. Proceedings of the 11th International Histocompatibility Workshop and Conference*. Oxford: University Press, Vol. 2, 20-27.
146. Ohtaki H, Yamamoto T, Yoshimoto T, Uchihi R, Ooshima C, Katsumata Y, Tokunaga K (2002) A powerful, novel, multiplex typing system for six short tandem repeat loci and the allele frequency distributions in two Japanese regional populations. *Electrophoresis* 23: 3332-3340.
147. O'Shaughnessy DF, Hill AV, Bowden DK, Weatherall DJ, Clegg JB (1990) Globin genes in Micronesia: origins and affinities of Pacific Island peoples. *Am J Hum Genet* 46: 144-155.
148. Parsons TJ, Muniec DS, Sullivan K, Woodyatt N, Alliston-Greiner R, Wilson MR, Berry DL, Holland KA, Weedn VW, Gill P, Holland MM (1997) A high observed substitution rate in the human mitochondrial DNA control region. *Nat Genet* 15: 363-368.
149. Payne R, Rolfs MR (1958) Fetomaternal leukocyte incompatibility. *J Clin Invest* 37: 1756-1763.
150. Pedrazzoli P, Da Prada GA, Giorgiani G, Schiavo R, Zimbelli A, Giralid E, Landonio G, Locatelli F, Siena S, della Cuna GR (2002) Allogeneic blood stem cell transplantation after a reduced-intensity, preparative regimen: a pilot study in patients with refractory malignancies. *Cancer* 94: 2409-2415.
151. Peters C, Steward CG (2003) Hematopoietic cell transplantation for inherited metabolic diseases: an overview of outcomes and practice guidelines. *Bone Marrow Transplant* 31: 229-239.
152. Peters C, Charnas LR, Tan Y, Ziegler RS, Shapiro EG, DeFor T, Grewal SS, Orchard PJ, Abel SL, Goldman AI, Ramsay NK, Dusenbery KE, Loes DJ, Lockman LA, Kato S, Aubourg PR, Moser HW, Krivit W (2004) Cerebral X-linked adrenoleukodystrophy: the international hematopoietic cell transplantation experience from 1982 to 1999. *Blood* 104: 881-888.
153. Prinz M, Carracedo A, Mayr WR, Morling N, Parsons TJ, Sajantila A, Scheithauer R, Schmitter H, Schneider PM (2007) DNA Commission of the International Society for

- Forensic Genetics (ISFG): Recommendations regarding the role of forensic genetics for disaster victim identification (DVI). *Forensic Sci Int: Genetics* 1: 3-12.
154. Ramirez M, Diaz MA, Garcia-Sanchez F, Velasco M, Casado F, Villa M, Vicario JL, Madero L (1996) Chimerism after allogeneic hematopoietic cell transplantation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 18: 1161-1165.
 155. Ramon D, Braden M, Adams S, Marincola FM, Wang L (2003) Pyrosequencing trademark: A one-step method for high resolution HLA typing. *J Transl Med* 1: 9-19.
 156. Rascon J, Ambrasiene D, Savinas A, Rageliene L, Nagy M (2006) Analysis of short tandem repeat polymorphism for chimerism monitoring after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Laboratorine Medicina* 30: 36-44.
 157. Redd AJ, Takezaki N, Sherry ST, McGarvey ST, Sofro AS, Stoneking M (1995) Evolutionary history of the COII/tRNA^{Lys} intergenic 9 base pair deletion in human mitochondrial DNAs from the Pacific. *Mol Biol Evol* 12: 604-615.
 158. Richtlinien für die Erstattung von Abstammungsgutachten. *Dtsch Arztebl* 99: B541-B543.
 159. Ringquist S, Alexander AM, Rudert WA, Styche A, Trucco M (2002) Pyrosequence-based typing of alleles of the HLA-DQB1 gene. *Biotechniques* 33: 166-175.
 160. Ringquist S, Alexander AM, Styche A, Pecoraro C, Rudert WA, Trucco M (2004) HLA class II DRB high resolution genotyping by pyrosequencing: comparison of group specific PCR and pyrosequencing primers. *Hum Immunol* 65: 163-174.
 161. Rini BI, Zimmermann T, Stadler WM, Gajewski TF, Vogelzang NJ (2002) Allogeneic stem-cell trans-plantation of renal cell cancer after nonmyeloablative chemotherapy: feasibility, engraftment, and clinical results. *J Clin Oncol* 20: 2017-2024.
 162. Roewer L, Nagy M, Schmidt P, Epplen J-T, Herzog-Schröder G (1993) Microsatellite and HLA class II oligonucleotide typing in a population of Yanomami Indians. In: Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT, Jeffreys AJ (Hrsg) *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, 221-230.
 163. Roewer L, Kayser M, Dieltjes P, Nagy M, Bakker E, Krawczak M, De Knijff P (1996) Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of Y-chromosome specific microsatellites in two closely related human populations. *Hum Mol Genet* 5: 1029-1033.
 164. Roewer L, Kayser M, Nagy M, De Knijff P (1996) Male identification using Y-chromosomal STR polymorphisms. In: Carracedo A, Brinkmann B, Bär W (Hrsg) *Advances in Forensic Haemogenetic*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 124-126.
 165. Roewer L, Nagy M, Geserick G (1999) Der genetische Fingerabdruck. *Humboldt-Spektrum* 6: 4-15.
 166. Roewer L, Kayser M, de Knijff P, Anslinger K, Cagliá A, Corach D, Füredi S, Henke L, Hidding M, Kärger HJ, Lessig R, Nagy M, Pascali VL, Parson W, Rolf B, Schmitt C, Szibor R, Teifel-Greding 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.
 167. Roewer L, Krawczak M, Willuweit S, Nagy M, Alves C, Amorim A, Anslinger K, Augustin C, Betz A, Bosch E, Cagliá A, Carracedo A, Corach D, Dekairelle AF, Dobosz T, Dupuy BM, Füredi S, Gehrig C, Gusmaõ L, Henke J, Henke L, Hidding M, Hohoff C, Hoste B, Jobling MA, Kärger HJ, de Knijff P, Lessig R, Liebeherr E, Lorente

- M, Martínez-Jarreta B, Nievas P, Nowak M, Parson W, Pascali VL, Penacino G, Ploski R, Rolf B, Sala A, Schmidt U, Schmitt C, Schneider PM, Szibor R, Teifel-Greding J, Kayser M (2001) Online reference database of European Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes. *Forensic Sci Int* 118: 106-113.
168. Roewer L, Krüger C, Willuweit S, Nagy M, Rodig H, Kokshunova L, Rothämel T, Kravchenko S, Jobling MA, Stoneking M, Nasidze I (2007) Y-chromosomal STR haplotypes in Kalmyk population samples. *Forensic Sci Int*, online, PMID: 17314020.
 169. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P (1998) A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281: 363-365.
 170. Rossi G, Giorgiani G, Comoli P, Nobili B, Salvaneschi L, De Stefano P, Maccario R, Locatelli F (2003) Successful T-cell-depleted, related haploidentical peripheral blood stem cell transplantation in a patient with Fanconi anaemia using a fludarabine-based preparative regimen without radiation. *Bone Marrow Transplant* 31: 437-440.
 171. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
 172. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
 173. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
 174. Santamaria P, Boyce-Jacino MT, Lindstrom AL, Barbosa JJ, Faras AJ, Rich SS (1992) HLA class II "typing": direct sequencing of DRB, DQB, and DQA genes. *Hum Immunol* 33: 69-81.
 175. Schäfer R, Zischler H, Birsner U, Becker A, Epplen JT (1988) Optimized oligonucleotide probes for DNA fingerprinting. *Electrophoresis* 9: 369-374.
 176. Schraml E, Daxberger H, Watzinger F, Lion T (2003) Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Vienna experience. *Leukemia* 17: 224-227.
 177. Seielstad MT, Hebert JM, Lin AA, Underhill PA, Ibrahim M, Vollrath D, Cavalli-Sforza LL (1994) Construction of human Y-chromosomal haplotypes using a new polymorphic A to G transition. *Hum Mol Genet* 3: 2159-2161.
 178. Serjeantson SW (1989) HLA genes and antigens. In: Hill AVS, Serjeantson SW (Hrsg) *The colonization of the Pacific: A genetic trail*. Oxford University Press: 120-173.
 179. Shapiro E, Krivit W, Lockman L, Jambaque I, Peters C, Cowan M, Harris R, Blanche S, Bordigoni P, Loes D, Ziegler R, Crittenden M, Ris D, Berg B, Cox C, Moser H, Fischer A, Aubourg P (2000) Long-term effect of bone-marrow transplantation for childhood-onset cerebral X-linked adrenoleukodystrophy. *Lancet* 356: 713-718.
 180. Silva JT, Wong CY, Dileanis JL, Dunn CM, Impraim CC, Automated DNA extraction from frozen blood using the abbott M1000 for HLA-DRB sequencing based typing, *Hum Immunol* 64: 95.
 181. Slavin S, Nagler A, Naparstek E, Kapelushnik Y, Aker M, Cividalli G, Varadi G, Kirschbaum M, Ackerstein A, Samuel S, Amar A, Brautbar C, Ben-Tal O, Eldor A, Or R (1998) Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative

- to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood* 91: 756-63.
182. Socie G, Gluckman E, Raynal B, Petit T, Landman J, Devergie A, Brison O (1993) Bone marrow transplantation for Fanconi anemia using low-dose cyclophosphamide/thoracoabdominal irradiation as conditioning regimen: chimerism study by the polymerase chain reaction. *Blood* 82: 2249-2256.
 183. Sokal RR, Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationship. *University of Kansas Scientific Bulletin* 38: 1409.
 184. Sparkes MC, Crist ML, Sparkes RS, Gale RP, Feig SA (1977) Gene markers in human bone marrow transplantation. *Vox Sang* 33: 202-205.
 185. Spurdle AB, Woodfield DG, Hammer MF, Jenkins T (1994) The genetic affinity of Polynesians: evidence from Y chromosome polymorphisms. *Ann Hum Genet* 58: 251-263.
 186. Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Murase N, Ricordi C, Ildstad S, Ramos H, Todo S, Tzakis A, Fung JJ (1993) Cell migration and chimerism after whole-organ transplantation: the basis of graft acceptance. *Hepatology* 17: 1127-1152.
 187. Steinlechner M, Parson W, Rabl W, Grubwieser P, Scheithauer R (2005) DNS-Laborstrategie zur Identifizierung von Katastrophenopfern. Typisierung von Opferproben aus Sri Lanka und Ante-mortem-Datenabgleich nach der Tsunami-Katastrophe. *Rechtsmedizin* 15: 473-478.
 188. Storb R, Yu C, Wagner JL, Wagner JL, Deeg HJ, Nash RA, Kiem HP, Leisenring W, Shulman H (1997) Stable mixed hematopoietic chimerism in DLA-identical littermate dogs given sublethal total body irradiation before and pharmacological immunosuppression after marrow transplantation. *Blood* 89: 3048-3054.
 189. Subklewe M, Nagy M, Schoch C, Jenisch S, Siebert R, Gesk S, Neuhaus P, Dörken B, Schmidt CA (2004) xtramedullary manifestation of a donor-derived acute myeloid leukemia in a liver transplant patient. *Leukemia* 18: 2050-2053.
 190. Suttorp M, Schmitz N, Dreger P, Schaub J, Löffler H (1993) Monitoring of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation with unmanipulated marrow by use of DNA polymorphisms. *Leukemia* 7: 679-687.
 191. Sykes M, Preffer F, McAfee S, Saidman SL, Weymouth D, Andrews DM, Colby C, Sackstein R, Sachs DH, Spitzer TR (1999) Mixed lymphohaemopoietic chimerism and graft-versus-lymphoma effects after non-myeloablative therapy and HLA-mismatched bone-marrow transplantation. *Lancet* 353: 1755-1759.
 192. Szibor R, Krawczak M, Hering S, Edelmann J, Kuhlisch E, Krause D (2003) Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med* 117: 67-74.
 193. Szibor R, Hering S, Kuhlisch E, Plate I, Demberger S, Krawczak M, Edelmann J (2005) Haplotyping of STR cluster DXS6801-DXS6809-DXS6789 on Xq21 provides a powerful tool for kinship testing. *Int J Legal Med* 119: 363-369.
 194. Thalhammer-Scherer R, Wieselthaler G, Knoebl P, Schwarzinger I, Simonitsch I, Mitterbauer G, Berlakovich GA, Mannhalter C, Haas OA, Mayer G, Muehlbacher F, Wolner E, Klepetko W, Lechner K, Jaeger U (1999) Post-transplant acute myeloid leukemia (PT-AML). *Leukemia* 13: 321-326.

195. Thiede C, Florek M, Bornhauser M, Ritter M, Mohr B, Brendel C, Ehninger G, Neubauer A (1999) Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant* 23: 1055-1060.
196. Thiede Ch, Lutterbeck K, Oelschlagel U, Kiehl M, Steudel Ch, Platzbecker U, Brendel C, Fauser AA, Neubauer A, Ehninger G, Bornhauser M (2002) Detection of relapse by sequential monitoring of chimerism in circulating CD34+ cells. *Ann Hematol* 81 Suppl 2: 27-28.
197. Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, Mohr B, Florek M, Kroschinsky F, Geissler G, Naumann R, Ritter M, Prange-Krex G, Lion T, Neubauer A, Ehninger G (2003) Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 15: 293-302.
198. Tryon D (1995) Proto-Austronesian and the major Austronesian Subgroups. In: Bellwood P, Fox JJ, Tryon D (Hrsg) *The Austronesians*. Canberra: Australia National University, 17-38.
199. Tsokos M, Lessig R, Grundmann C, Benthaus S, Peschel O (2006) Experiences in tsunami victim identification. *Int J Legal Med* 120: 185-187.
200. Tsukada K, Takayanagi K, Asamura H, Ota M, Fukushima H (2002) Multiplex short tandem repeat typing in degraded samples using newly designed primers for the TH01, TPOX, CSF1PO, and vWA loci. *Leg Med* 4: 239-245.
201. Ueno NT, Cheng YC, Rondón G, Tannir NM, Gajewski JL, Couriel DR, Hosing C, de Lima MJ, Anderlini P, Khouri IF, Booser DJ, Hortobagyi GN, Pagliaro LC, Jonasch E, Giralt SA, Champlin RE (2003) Rapid induction of complete donor chimerism by the use of a reduced-intensity conditioning regimen composed of fludarabine and melphalan in allogeneic stem cell transplantation for metastatic solid tumors. *Blood* 102: 3829-3836.
202. Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL, Oefner PJ (1997) Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res* 7: 996-1005.
203. Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A, Nagy M, Gaede KI, Franke A, Haesler R, Koch A, Lengauer T, Seegert D, Reiling N, Ehlers S, Schwinger E, Platzer M, Krawczak M, Müller-Quernheim J, Schürmann M, Schreiber S (2005) Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation BTNL2. *Nat Genet* 37: 357-364.
204. Van Leeuwen JE, van Tol MJ, Joosten AM, Wijnen JT, Verweij PJ, Khan PM, Vossen JM (1994) Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood* 83: 3059-3067.
205. Van Rood JJ, Eernisse JG, van Leeuwen A (1958) Leukocyte antibodies in sera from pregnant woman. *Nature* 181: 1735-1736.
206. Versluis LF, Rozemuller E, Tonks S, Marsh SG, Bouwens AG, Bodmer JG, Tilanus MG (1993) High-resolution HLA-DPB typing based upon computerized analysis of data

- obtained by fluorescent sequencing of the amplified polymorphic exon 2. *Hum Immunol* 38: 277-283.
207. Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson AC (1991) African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science* 253: 1503-1507.
 208. Walker H, Singer CR, Patterson J, Goldstone AH, Prentice HG (1986) The significance of host haemopoietic cells detected by cytogenetic analysis of bone marrow from recipients of bone marrow transplants. *Br J Haematol* 62: 385-391.
 209. Wallace DC (1995) Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease, and aging. *Am J Hum Genet* 57: 201-223.
 210. Wiegand P, Kleiber M (2001) Less is more - length reduction of STR amplicons using redesigned primers. *Int J Legal Med* 114: 285-287.
 211. Witherspoon RP, Schanfield MS, Storb R, Thomas ED, Giblett ER (1978) Immunoglobulin production of donor origin after marrow transplantation for acute leukemia or aplastic anemia. *Transplantation* 26: 407-408.
 212. Wolf A, Caliebe A, Junge O, Krawczak M (2005) Forensic interpretation of Y-chromosomal DNA mixtures. *Forensic Sci Int* 152: 209-213.
 213. Xu X, Peng M, Fang Z (2000) The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nat Genet* 24: 396-399.
 214. Yam PY, Petz LD, Knowlton RG, Wallace RB, Stock AD, de Lange G, Brown VA, Donis-Keller H, Blume KG (1987) Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation. *Transplantation* 43: 399-407.
 215. Yang C, Kratzin H, Gotz H, Thinnies FP, Kruse T, Egert G, Pauly E, Kolbel S, Wernet P, Hilschmann N (1982) Primärstruktur menschlicher Histokompatibilitätsantigene der Klasse II. 2. Mitteilung Aminosäuresequenz der N-terminalen 179 Reste der β -Kette des HLA DW2/DR2-Alloantigens. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 363: 671-676.
 216. Yoshimasu T, Tanaka R, Suenobu S, Yagasaki H, Yoshino H, Ueda T, Hisakawa H, Ishii T, Mitsui T, Ebihara Y, Manabe A, Iseki T, Maekawa T, Nakahata T, Asano S, Tsuji K (2001) Prompt and durable hematopoietic reconstitution by unrelated cord blood transplantation in a child with Fanconi anemia. *Bone Marrow Transplant* 27: 767-769.
 217. Zerjal T, Dashnyam B, Pandya A, Kayser M, Roewer L, Santos FR, Schiefenhover W, Fretwell N, Jobling MA, Harihara S, Shimizu K, Semjiddmaa D, Sajantila A, Salo P, Crawford MH, Ginter EK, Evgrafov OV, Tyler-Smith C (1997) Genetic relationships of Asians and Northern Europeans, revealed by Y-chromosomal DNA analysis. *Am J Hum Genet* 60: 1174-1183.
 218. Zetterquist H, Mattsson J, Uzunel M, Nasman-Bjork I, Svenberg P, Tammik L, Bayat G, Winiarski J, Ringden O (2000) Mixed chimerism in the B cell lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant* 25: 843-851.
 219. Zimdahl H, Krüger C, Anders P, Geserick G, Roewer L, Nagy M (1998) Evaluation and Application of highly informative and sensitive HLA-DRB and HLA-DPB INNO-LIPA Typing Systems in Forensic Practice. In: Olaisen B, Brinkmann B, Lincoln PJ, (Hrsg) *Progress in Forensic Genetics* 7. Elsevier Science B.V., 221-224.

220. Zimdahl H, Schiefenhövel W, Kayser M, Roewer L, Nagy M (1999) Towards understanding the origin and dispersal of Austronesians in the Solomon Sea: HLA class II polymorphism in seven distinct populations of Asia-Oceania. *Eur J Immunogenet* 26: 405-416.
221. Zwaan CM, Van Weel-Sipman MH, Fibbe WE, Oudshoorn M, Vossen JM (1998) Unrelated donor bone marrow transplantation in Fanconi anaemia: the Leiden experience. *Bone Marrow Transplant* 21: 447-453.

6 Ausgewählte Publikationen zu den eigenen Arbeiten

6.1

Entz P, Nürnberg P, Toliat M, Hampe J, **Nagy M**

New Strategies for Efficient Typing of HLA-Class II Loci DQB1 and DRB1 using PyrosequencingTM. Tissue Antigens 65: Januar/2005, 67-80.

6.2

Nagy M, Entz P, Otremba P, Schönemann C, Murphy N, Dapprich J

Haplotype Specific Extraction: A Universal Method to Resolve Ambiguous Genotypes and Detect New Alleles – Demonstrated on HLA-B. Tissue Antigens 69: Februar/2007, 176-180.

6.3

Nagy M, Otremba P, Krüger C, Bergner S, Anders P, Henske B, Prinz M, Roewer L

Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. Forensic Science International 152: August/2005, 13-22.

6.4

Nagy M, Rascon J, Massenkeil G, Ebell W, Roewer L

Evaluation of whole-genome amplification of low-copy-number DNA in chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation using STR marker typing. Electrophoresis 27: August/2006, 3028-3037.

6.5

Massenkeil G*, **Nagy M***, Lawang M, Rosen O, Genvresse I, Geserick G, Dörken B, Arnold R

Reduced intensity conditioning transplants. Reduced intensity conditioning and prophylactic DLI can cure patients with high-risk acute leukaemias if complete donor chimerism can be achieved. Bone Marrow Transplantation 31: März/2003, 339-345.

*Massenkeil and Nagy contributed equal.

6.6

Massenkeil G, Roigas J, **Nagy M**, Wille A, Stroszczyński C, Mapara MY, Loening S, Dörken B, Arnold R

Nonmyeloablative stem cell transplantation in metastatic renal cell carcinoma: delayed graft-versus-tumor effect is associated with chimerism conversion but transplantation has high

toxicity. Bone Marrow Transplantation 34: August/2004, 309-316.

6.7

Hagelberg E, Kayser M, **Nagy M**, Roewer L, Zimdahl H, Krawczak M, Lio P, Schiefenhövel W
Molecular genetic evidence for the human settlement of the Pacific: analysis of mitochondrial
DNA, Y chromosome and HLA markers. Philosophical Transactions of the Royal Society of
London, Series B, Biological Sciences 354: Januar/1999, 141-152.

6.8

Zimdahl H, Schiefenhövel W, Kayser M, Roewer L, **Nagy M**
Towards understanding the origin and dispersal of Austronesians in the Solomon Sea: HLA
class II polymorphism in seven distinct populations of Asia-Oceania. European Journal of
Immunogenetics 26: Dezember/1999, 405-416.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Kollegen PD Dr. Lutz Roewer für die vielen anregenden Diskussionen und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Weiterhin gilt mein Dank Prof. Dr. med. Gunther Geserick, ehemaliger Direktor des Institutes für Rechtsmedizin, für seine Unterstützung, die es ermöglichte, in seiner Einrichtung meinen wissenschaftlichen Interessen uneingeschränkt nachzugehen und insbesondere in der letzten Phase meiner Arbeit, Prof. Dr. med. Michael Tsokos, Direktor des Institutes für Rechtsmedizin, für seine zielgerichteten Unterstützung und kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinen Mitarbeitern im Labor: Carmen Krüger, Petra Otremba, Petra Anders, Corinna Hahne und Bärbel Henske sowie im Sekretariat: Marion Meschkat, die mit ihrer intensiven Arbeit und ihrem Verständnis in manch problematischer Situation in besonderem Maße zum Erfolg der Projekte beigetragen haben.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den Diplomandinnen, Doktorandinnen und Doktoranden, ohne deren Hilfe, die wissenschaftlichen Arbeiten nicht erhoben und so erfolgreich abgeschlossen werden konnten: Manfred Kayser, Heike Zimdahl, Volko Ebeling, Patricia Entz, Elena Rascon, Sascha Willuweit.

Bedanken möchte ich mich für die langjährige Zusammenarbeit mit der Leiterin des HLA-Labors des Institutes für Transfusionsmedizin der Charité, Frau Dr. rer. nat. Constanze Schönemann und ihren Mitarbeitern.

Frau Prof. Dr. med. Renate Arnold gilt mein besonderer Dank für eine fast 15-jährige intensive Kooperation mit der Medizinischen Klinik, Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie der Charité und ihrem langjährigen Kollegen PD Dr. med. Gero Massenkeil für die Diskussionen und gemeinsamen Arbeiten zum Chimärismus nach adulter SZT.

Ein großer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Wolfram Ebell und seinen Kollegen Dr. med. Jörn Sven Kühl und Dr. med. Gabriele Strauss für die langjährige und intensive Kooperation mit der Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Abteilung Pädiatrische KMT der Charité.

Grundlage der Ergebnisse zur evolutionären Anthropologie war die sehr enge und konstruktive Zusammenarbeit mit dem Arzt und Ethnologen Wulf Schiefenhövel (MPI für Humanethnologie, Andechs-Erling). Ihm gilt ein besonders herzlicher Dank.

Natürlich waren besonders mein Ehemann Gabor Nagy mit seinem grenzenlosen Verständnis in arbeitsintensiven Zeiten und meine Eltern mit ihrer liebevollen fortwährenden Unterstützung, insbesondere auch meines Vaters, Dr. rer. nat. Hermann Reutgen, bei der ersten kritischen Durchsicht des Manuskripts eine große Hilfe!

Erklärung

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,
- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....
Datum

.....
Unterschrift