

Das mitochondriale Genom und die Besiedlungsgeschichte Europas

Woher stammt die Bevölkerung Europas und wann fand die Besiedlung des Kontinents statt? Dies sind die beiden grundsätzlichen Fragen, denen die Untersuchungen mitochondrialer humaner DNA-Sequenzen an heute lebenden Bevölkerungen gewidmet sind.

Weshalb ist gerade die mitochondriale DNA geeignet solche Fragen zu klären? Der Grund hierfür liegt darin, dass mitochondriale DNA nur über die mütterliche Seite vererbt wird (Matrilinearität). Anders als das chromosomale Genom, das in jedem Individuum aus den elterlichen Anlagen neu zusammengestellt wird (Rekombinationsmöglichkeiten = 2^{23}), bleibt die Sequenzabfolge des mitochondrialen Genoms durch Generationen hinweg in den Töchterlinien unverändert (Abb. 1).

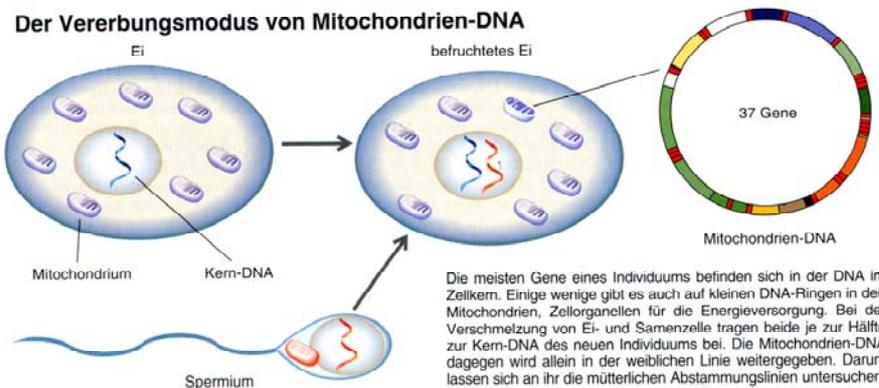


Abb. 1 Vererbung des mitochondrialen Genoms

Unterschiede, die man in den Sequenzabfolgen findet, sind daher ausschließlich auf Neumutationen zurückzuführen. Die Zahl der Sequenzunterschiede stellt damit ein Maß für die verwandtschaftliche Nähe der weiblichen Familienlinien dar, d.h. es kann auf den Zeitpunkt der Trennung der Familienlinien rückgerechnet werden, da die Rate der Neumutationen als konstant angenommen wird (molecular clock = 1 Mutation in 10.000 Jahren). Das bedeutet, dass alle heute lebenden Personen mit gleichen bzw. ähnlichen Sequenzabfolgen sich auf eine gemeinsame Urahnin zurückverfolgen lassen müssen. Diese Urahnin hatte als erste Frau den genetischen Grundtyp und ist damit Begründerin einer geschlossenen Abstammungsgemeinschaft, eines sogenannten Clans (Abb. 2).

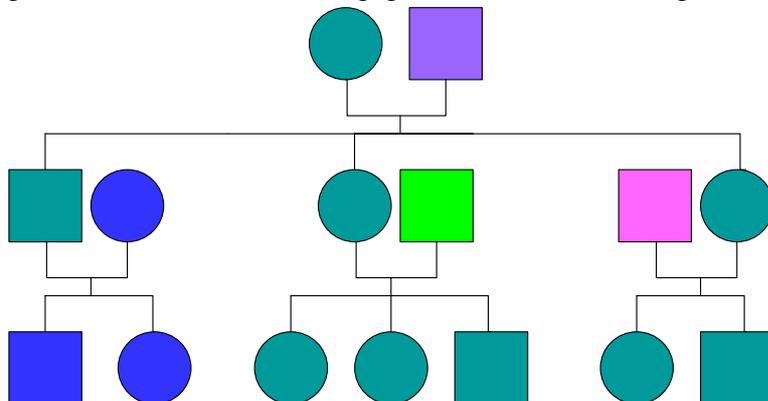


Abb. 2: Individuen mit gleicher Sequenzabfolge im mitochondrialen Genom lassen sich auf eine gemeinsame Urahnin zurückführen

Wissenschaftliche Untersuchungen an europäischen Bevölkerungen zeigten, dass sich nahezu alle in Europa vorkommenden Sequenzmuster (> 95%) einem von sieben Grundtypen

Design, Text und Idee für das Praktikum von Susanne Hummel, Göttingen. Vielen Dank

zuordnen lassen, einer der „Sieben Töchter Evas“. Die Urmutter der anatomisch modernen Menschen selbst soll nach entsprechenden Untersuchungen weltweiter Bevölkerungen vor etwa 150.000 Jahren in Afrika gelebt haben. Diese Theorie, die im Widerspruch zu dem von vielen Stammesgeschichtlern favorisierten Modell des multiregionalen Ursprungs des anatomisch modernen Menschen steht, wurde unter dem Namen „African Eve“ bekannt (Abb. 3). Nachdem die Interpretation der in den achtziger Jahren gesammelten und ausgewerteten Daten, die in die African Eve-Hypothese mündeten, zunächst noch stark umstritten war, festigten die weiteren weltweiten und zahlreichen Untersuchungen jedoch das ursprünglich propagierte Bild einer afrikanischen Urmutter.

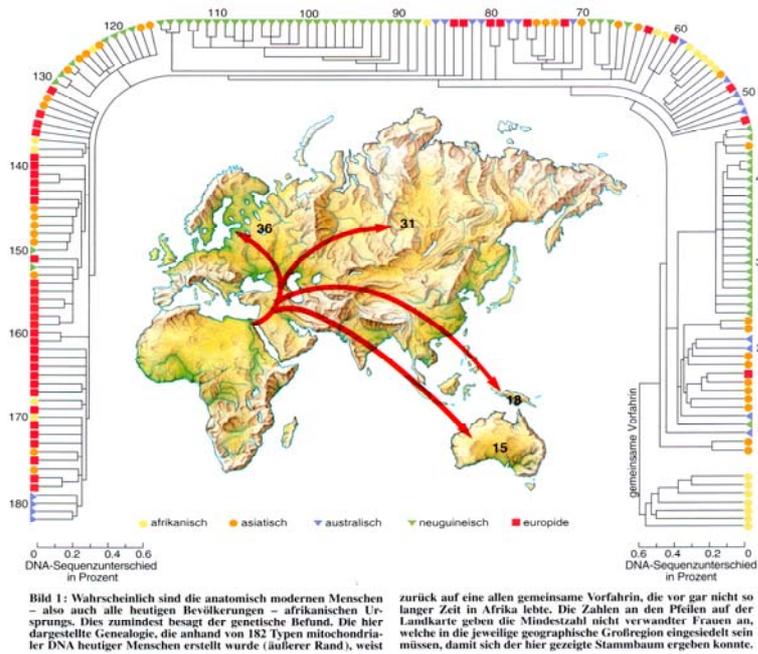


Abb. 3: Ergebnisse der Untersuchung, die zur Hypothese einer „African Eve“ führten.

Mitglieder einer der in Afrika verbreiteten mitochondrialen Linien (L3) waren vor ca. 45.000 Jahren dann auch die ersten, die den europäischen Kontinent besiedelten (Abb. 4). Insgesamt werden zwei große Wanderungsbewegungen nach Europa postuliert.

Human mtDNA Migrations

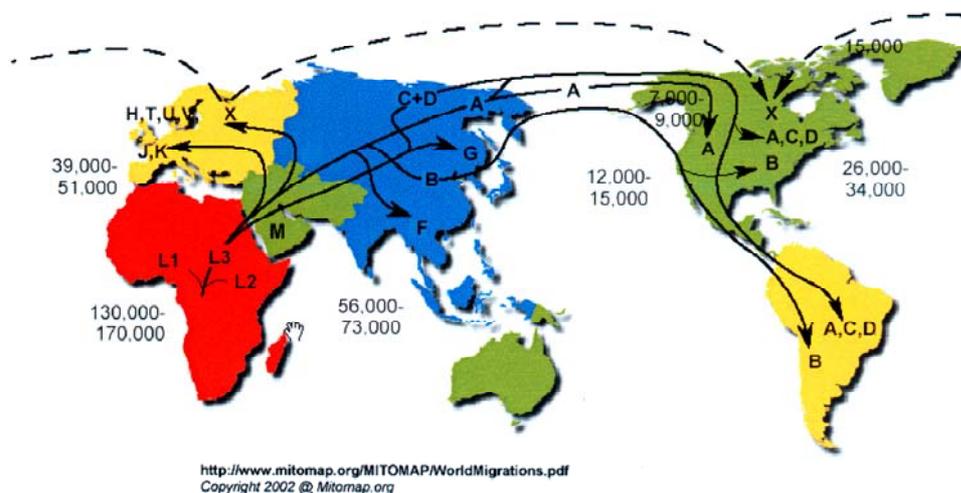


Abb. 4: Weltweite Migration des anatomisch modernen Menschen. Die Ziffern bezeichnen die ungefähren Zeiträume, die Buchstaben die genetisch identifizierbaren Haplogruppen (international gültige Nomenklatur).

Design, Text und Idee für das Praktikum von Susanne Hummel, Göttingen. Vielen Dank

Aus diesen Migrationswellen sind schließlich die sieben „Urmütter“ aller Europäer hervorgegangen, die vor 10.000-45.000 Jahren an verschiedenen Orten des europäischen Kontinents gelebt haben. Die Orte, bzw. die geographischen Regionen haben sich dadurch eingrenzen lassen, dass man das Alter der sieben Haplogruppen zu bestimmen suchte. Ein Maß für das Alter ist die Sequenzvielfalt in der jeweiligen Haplogruppe, d.h. die Anzahl der nachweisbaren Subgruppen. Ist diese Zahl hoch (= zahlreiche Mutationen haben sich ereignet), dann bedeutet dies, die Population älter ist als eine, deren Subgruppenzahl klein ist (Abb. 5).

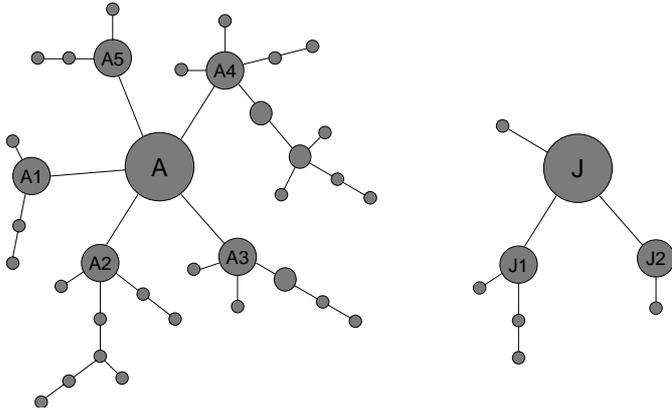


Abb. 5 Alte Populationen (A) weisen eine größere Zahl von Subgruppen in einer Haplogruppe auf, als junge Populationen (J).

Dies bedeutet übrigens nicht zwingend, dass die absolute Zahl der Mitglieder der Haplogruppe in dieser Region am größten sein muss. Die sieben europäischen Urmütter waren – genau wie die postulierte Afrikanische Eva – natürlich nicht die einzigen Frauen, die zu denen errechneten Zeitpunkten an den jeweiligen Orten lebten. Vielmehr ist es so, dass diese Urmütter im Unterschied zu ihren Zeitgenossinnen diejenigen sind, die bis auf den heutigen Tag ungebrochene mitochondriale Linien aufweisen, d.h. eine ununterbrochene Reihe weiblicher Ahnen vorhanden ist. Die heute lebenden Träger genau dieser Sequenzabfolgen sind diejenigen, welche als charakteristisch für eine der Haplogruppen H, V, K, J, T, U oder X identifiziert wurden (Abb. 6).

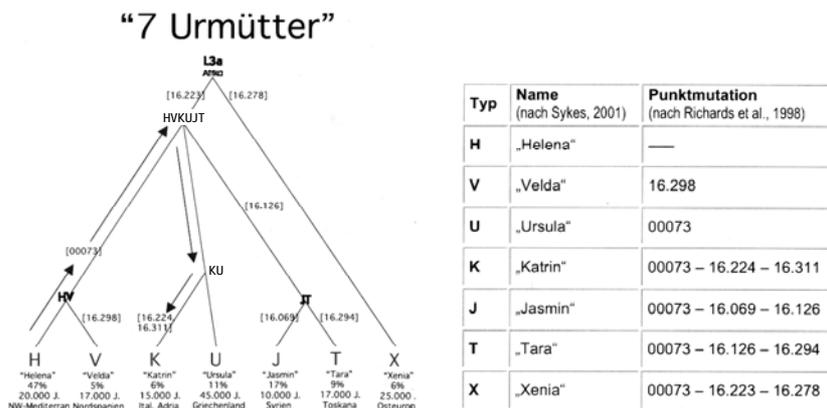


Abb. 6 Phylogenetischer Zusammenhang zwischen den für Europa typischen sieben Haplogruppen und die sie charakterisierenden Sequenzabfolgen (= Punktmutation).

Um der Frage nach der Besiedlung Europas (und anderer Kontinente) nachzugehen wurden die Sequenzpolymorphismen (=Punktmutationen) der sogenannten Hypervariablen Regionen I und II (HVR 1 und HVR 2) des mitochondrialen Genoms untersucht (Abb. 7). Hierbei handelt es sich um ca. 500 und 400 Basenpaare lange Sequenzabschnitte des insgesamt 16.569 Basenpaare umfassenden humanen mitochondrialen Genoms (vgl. Abb. 10, Experiment 2).

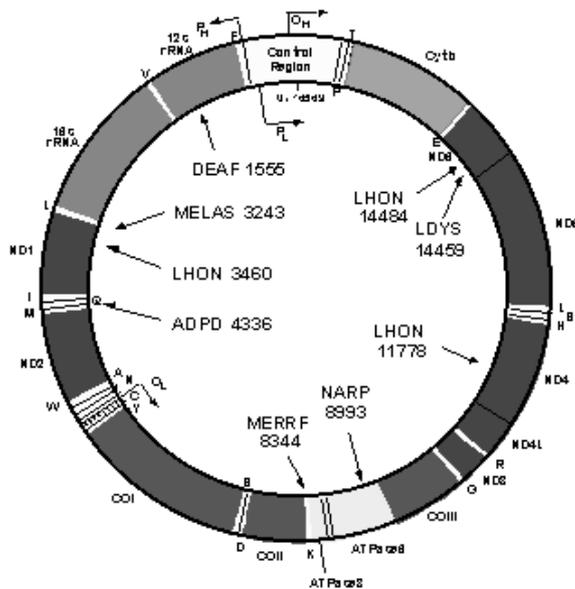


Abb. 7: Schematisch Darstellung des ringförmig organisierten mitochondrialen Genoms. Die nicht-codierenden HVRs 1 und 2 liegen in der sogenannten *Control Region*, die gelegentlich auch als d-loop bezeichnet wird.

Aufgabenstellung im Praktikum: „Wer ist meine Urmutter?“

Im Praktikum sollen entsprechende Untersuchungen an drei bekannten Proben und einer möglichen zusätzlichen Zahl studentischer Proben (freiwillig, verbunden mit ca. 13 € Eigenkostenanteil für Auftragssequenzierung) mit dem Ziel der Identifikation der Zugehörigkeit zu einer der europäischen Haplogruppen durchgeführt werden.

Hierzu werden an den fünf Versuchsnachmittagen insgesamt sechs Experimente (DNA-Extraktion, PCR, Elektrophorese der PCR-Produkte, Sequenzierung, RFLP und Analyse der RFLP-Produkte mittels Elektrophorese) durchgeführt. Abschließend findet die Auswertung der Daten und die Zuordnung der Proben zu einer der sieben Haplogruppen statt.

Literatur

(alle Zeitschriftenartikel sind über die Datenbank PUBMED (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>) als free download in der Niedersächsischen SUB erhältlich)

Richards, M., Corte-Real, H., Forster, P., Macaulay, V., Wilkinson-Herbots, H., Demaine, A., Papiha, S., Hedges, R., Bandelt, H. J. and Sykes, B. (1996). Paleolithic and neolithic lineages in the European mitochondrial gene pool. *Am J Hum Genet* 59: 185-203.

Richards M.B., Macaulay V.A., Bandelt H.J., Sykes B.C. (1998) Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann Hum Genet.* 62: 241-60.

Simoni L, Calafell F, Pettener D, Bertranpetit J, Barbujani G. (2000) Geographic patterns of mtDNA diversity in Europe. *Am J Hum Genet* 66:262-78.

Sykes, B. (2001) Die sieben Töchter Evas. Lübbe-Verlag (auch als Taschenbuch erhältlich)

Torroni, A., Richards, M., Macaulay, V., Forster, P., Villems, R., Norby, S., Savontaus, M. L., Huoponen, K., Scozzari, R. and Bandelt, H. J. (2000) mtDNA haplogroups and frequency patterns in Europe. *Am J Hum Genet* 66: 1173-1177.

The Human Family Tree: 10 Adams and 18 Eves

By NICHOLAS WADE

the book of Genesis mentions three of Adam and Eve's children: Cain, Abel and Seth.

But geneticists, by tracing the DNA patterns found in people throughout the world, have now identified lineages descended from 10 sons of a genetic Adam and 18 daughters of Eve.

The human genome is turning out to be a rich new archive for historians and prehistorians, one whose range extends from recent times to the dawn of human existence.

Delvers in the DNA archive have recently found evidence for a prehistoric human migration from Western Asia to North America; identified the people who seem closest to the ancestral human population; and given substantial weight to the whispers, long dismissed by historians, that Thomas Jefferson fathered a family with his slave Sally Hemings.

A new history of Britain and Ireland by Norman Davies, "The Isles," (Oxford University Press) begins with an account of Cheddar man, an 8,980-year-old skeleton from which mitochondrial DNA was recently extracted.

The DNA turned out to match that of Adrian Targett, a teacher in a Cheddar Village school, proving a genetic continuity that, despite numerous invasions, had endured through nine millenniums.

Unlike the DNA test used in forensic cases, which is designed to identify individuals, DNA analysis that seeks to reach back in time usually focuses on lineages, not individuals. From patterns in the DNA data, biologists can often estimate the sizes of ancient populations and even the approximate dates when one group of people split from another.

Though DNA can bear on historical questions, often by acting as a long-range paternity test, its most spectacular use has been in prehistory, where it has added a new dimension to the bare framework provided by archaeology.

The most detailed human family tree so far available is one constructed over many years by Dr. Douglas C. Wallace and his colleagues at the Emory University School of Medicine in Atlanta. Dr. Wallace's tree is based on mitochondrial DNA, tiny rings of genetic material that are bequeathed only by the egg cell and thus through the maternal line.

A counterpart tree for men, based on analysis of the Y chromosome, has been prepared by Dr. Peter A. Underhill and Dr. Peter J. Oefner of Stanford University.

Population geneticists believe that the ancestral human population was very small -- a mere 2,000 breeding individuals, according to a calculation published last December. But the family tree based on human mitochondrial DNA does not trace back to the thousand women in this ancestral population. The tree is rooted in a single individual, the mitochondrial Eve, because all the other lineages fell extinct.

The same is true of the Y chromosome tree, a consequence of the fact that in each generation some men will have no children, or only daughters, so the number of different Y chromosomes may steadily diminish, even if the population stays the same size.

This ancestral human population lived somewhere in Africa, geneticists believe, and started to split up some time after 144,000 years ago, give or take 10,000 years, the inferred time at which both the mitochondrial and Y chromosome trees make their first branches.

Mitochondria, which live inside human cells but outside the nucleus, escape the shuffling of genes that occurs between generations and are passed unchanged from mother to children.

In principle, all people should have the same string of DNA letters in their mitochondria. In practice, mitochondrial DNA has steadily accumulated changes over the centuries because of copying errors and radiation damage.

Because women were steadily spreading across the globe when many of these changes occurred, some changes are found only in particular regions and continents.

Dr. Wallace discovered that almost all American Indians have mitochondria that belong to lineages he named A, B, C and D. Europeans belong to a different set of lineages, which he designated H through K and T through X. The split between the two main branches in the European tree suggests that modern humans reached Europe 39,000 to 51,000 years ago, Dr. Wallace calculates, a time that corresponds with the archaeological date of at least 35,000 years ago.

In Asia there is an ancestral lineage known as M, with descendant branches E, F and G as well as the A through D lineages also found in the Americas.

In Africa there is a single main lineage, known as L, which is divided into three branches. L3, the youngest branch, is common in East Africa and is believed to be the source of both the Asian and European lineages.

Dr. Wallace's mitochondrial DNA lineages are known technically as "haplogroups" but more colloquially as "daughters of Eve," because all are branches of the trunk that stems from the mitochondrial Eve.

The Y chromosome tree has not yet been published by the Stanford researchers, but in a book that came out in March, "Genes, People and Languages," a colleague at the university, Dr. Luca Cavalli-Sforza, sketched a preview of the findings.

The tree is rooted in a single Y chromosomal Adam, and has 10 principal branches, Dr. Cavalli-Sforza reports.

Of these sons of Adam, the first three (designated I, II and III) are found almost exclusively in Africa. Son III's lineage migrated to Asia and begat sons IV-X, who spread through the rest of the world -- to the Sea of Japan (son IV), northern India (son V) and the South Caspian (sons VI and IX).

Dr. Cavalli-Sforza believes these Y chromosome lineages may be associated with the major language groups of the world. The South Caspian population, for example, may have spoken Eurasian, the ancestral tongue of Indo-European (to which English belongs) and most of the continent's other major language families.

Design, Text und Idee für das Praktikum von Susanne Hummel, Göttingen. Vielen Dank

But Dr. Wallace, asked if his mitochondrial DNA lineages also corresponded to the world's major language groups, said he "tended to be more cautious than Luca."

Dr. Wallace has recently been exploring the root of the mitochondrial tree. In an article published in March in *The American Journal of Human Genetics*, he and colleagues identify the *Vasikela Kung* of the northwestern Kalahari desert in southern Africa as the population that lies nearest to the root of the human mitochondrial DNA tree. Another population that seems almost equally old is that of the *Biaka pygmies* of Central Africa.

Both peoples live in isolated regions, which may be why their mitochondrial DNA seems little changed from that of the ancestral population. "We are looking at the beginning of what we would call *Homo sapiens*," Dr. Wallace said.

One of the most vexed issues in human prehistory is the timing and number of migrations into the Americas. Dr. Joseph Greenberg, a linguist at Stanford University, has proposed three migrations, corresponding to the three language groups of the Americas, known as Amerind, Na-Dene and Eskimo-Aleut. Dr. Wallace's mitochondrial DNA data broadly support this general thesis, though the arrival of the Amerind-speakers seems more complex than a single migration.

Of the A through D lineages found in American Indians, A, C and D also occur in Siberian peoples, suggesting that their ancestors were the principal source of the Amerind-speakers' migration. But the B lineage, though it is found elsewhere in Asia, has not turned up in Siberia, a hint that the B people may have taken a sea route to the Americas and then merged there with their A-, C- and D-carrying cousins.

In 1998, Dr. Wallace and his colleagues discovered the X pattern, a rare European lineage, among the northern Native Americans such as the Ojibwa and Sioux. At first they assumed it came from intermarriage with modern Europeans. But the American X lineage turned out to be pre-Columbian and its owners would have arrived in America either 15,000 or 30,000 years ago, depending on certain genetic assumptions.

The European X lineage seems to have originated in Western Asia around 40,000 years ago. Dr. Wallace suggests a part of this group may have made their way to America via Siberia, even though no traces of the X-lineage have yet turned up in eastern Asia. A trans-Atlantic route is a possible alternative.

When modern humans first started to leave Africa, about 50,000 years ago by present reckoning, they probably consisted of small groups of hunter-gatherers a few hundred strong.

In their determined exploration of the world before them, they must have overcome, with the primitive means at their disposal, the extreme rigors of climate, terrain and perhaps the archaic human populations like the fearsome Neanderthals who had preceded them out of Africa.

The biologist Edward O. Wilson, in a recent interview with *The Wall Street Journal*, mused that a new basis for spiritual values might be found -- not in the usual religious sources but in what he sees as the inspiring story of human origins and history.

"We need to create a new epic based on the origins of humanity," he said, adding: "Homo sapiens have had one hell of a history! And I am speaking both of deep history -- evolutionary, genetic history -- and then, added on to that and interacting with it, the cultural history recorded for the past 10,000 years or so."

Many of the biologists who are reconstructing the human past certainly believe their work has a value that transcends genetics.

Although their lineage trees are based on genetic differences, most of these differences lie in the regions of DNA that do not code for genes and have no effect on the body.

"We are all Africans at the Y chromosome level and we are really all brothers," Dr. Underhill said.

Dr. Wallace remarked that since he started working on mitochondrial DNA in the late 1970's: "What I have found astounding is that it clearly shows we are all one human family. The phylogeny in Africa goes back to the origins of our species, but the fingers of L3 are touching Europe and Asia, saying that we are all closely related."

Whether or not genetic prehistory is suitable material for a modern origin myth, it is about to be made available to a wider public.

Last month a company called Oxford Ancestors set up business with the offer to tell customers which of the seven daughters of Eve they are descended from. (Almost all Europeans belong to only seven of the nine mitochondrial lineages found in Europe). The test (see www.oxfordancestors.com) requires sending in a sample of cells brushed from the inside of the cheek. For a mere \$180, anyone of European ancestry can establish the start of a genealogy far senior to Charlemagne's.

The company's founder is Dr. Bryan Sykes, a human geneticist at the University of Oxford in England. On the reasonable basis that the founders of Dr. Wallace's mitochondrial DNA lineages were real women, Dr. Sykes gave them names and sketched in details of their likely dates and origin. Thus people found to belong to haplogroup U will be told they are descended from Ursula, who lived about 45,000 years ago in Northern Greece. Ancestor of the X's is Xenia, who lived 25,000 years ago in the Caucasus mountains.

As if fulfilling Dr. Wilson's suggestion, Dr. Sykes said he had "worked out a mythological framework for these seven women," in respect of the arduous times in which they must have lived and the triumph of spreading their mitochondrial DNA to almost all the inhabitants of Europe.

He is now working on tests to identify other lineages around the world, including 14 in Africa, and 16 in Eurasia and the Americas. "I don't think this stuff should be confined to academics," he said.

Experiment 1: DNA-Extraktion

Um die genetischen Eigenschaften eines Individuums PCR-gestützt analysieren zu können, reichen kleine Mengen an DNA. Mundschleimhautabstriche (Abb. 8) haben sich als besonders geeignet für eine schnelle und unkomplizierte DNA-Extraktion erwiesen. Dazu wird ein Wattestäbchen intensiv an den Wangeninnenseiten gerieben, anschließend die Schleimhautzellen in Wasser gelöst. Durch Zugabe des Enzyms Proteinase K werden die Proteine aufgebrochen, das folgende Erhitzen auf 95°C denaturiert nun die Proteinfragmente und das Enzym selbst. Die Zugabe des Harzgranulates Chelex sorgt dafür, dass alle möglicherweise störenden Komponenten aus der Lösung entfernt werden können, so dass nur die DNA in wässriger Lösung (=Überstand) verbleibt.

Die **Arbeitsschritte** im Einzelnen:

- Wattetupfer an Wangeninnenseite intensiv reiben
- Wattetupfer abschneiden
- in 2 ml Eppendorfgefäß
- 200 µl Chelex (5%ig, rühren) zufügen
- bei RT für 10 min schütteln
- Baumwolle entfernen (vorher mit Pipettenspitze vollständig ausdrücken)
- 2 µl Proteinase K zugeben
- bei 56 °C für 20 min schütteln
- kurz vortexen
- bei 95 °C für 8 min inkubieren (Wasserbad)
- zentrifugieren, 12.000 rpm für 3 min
- Überstand in neues 2 ml Eppendorfgefäß
- DNA-Extrakt fertig für PCR-Gebrauch

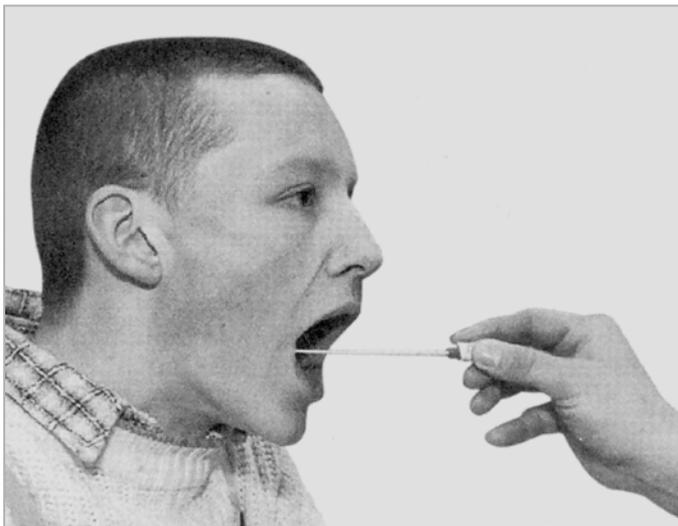


Abb. 8: Anfertigung eines Mundhöhlenschleimhautabstriches an einem Wattestäbchen

Experiment 2: PCRs für HVR1 und HVR2

Die Zuordnung der verschiedenen mitochondrialen Linien zu einer der sieben Stammlinien (Urmütter) erfolgt durch eine Analyse der sogenannten Hypervariablen Regionen 1 und 2 (HVR 1 und 2) mithilfe der Polymerase Chain Reaction (PCR; *engl.* für Polymerase Kettenreaktion).

Die PCR ist ein Verfahren, durch das *in vitro* eine Amplifikation (=Vervielfältigung) kurzer definierter DNA-Abschnitte herbeigeführt werden kann (Abb.9). Dafür wird ein Reaktionsgemisch aus DNA, Primern, dNTPs und *Taq*-DNA-Polymerase in einer gepufferten Lösung hergestellt, das zyklisch wiederkehrend drei verschiedene Temperaturstufen angesetzt wird. Im Zuge der ersten Temperaturstufe von 94°C wird die zu untersuchende DNA in zwei Einzelstränge gespalten (= Denaturierung). Während der zweiten Temperaturstufe von 58°C lagern die sogenannten Primer (einzelsträngige synthetische DNA-Stücke, die die Zielsequenz definieren) an die aufgespaltenen DNA-Einzelstränge an (= Hybridisierung od. Annealing). Im Verlauf der dritten Temperaturstufe bei 72°C werden durch die *Taq*-DNA-Polymerase von den Primern (= einzelsträngigen Startermolekülen) ausgehend neue DNA-Stränge synthetisiert, indem dNTPs (= Mix aus den Einzelbasen dATP, dCTP, dGTP und dTTP) komplementär zur Matrize (= Proben-DNA) zusammengefügt werden. Jetzt ist der erste Zyklus beendet und die Zahl der DNA-Doppelstränge ist verdoppelt worden. Idealerweise kommt es mit jedem weiteren Zyklus zu weiteren Verdoppelungen der Zielsequenz, es findet also eine exponentielle Vermehrung (i) der Zielsequenz statt. Nach 20 Zyklen wäre demnach bereits eine Vermillionenfachung der Zielsequenz erreicht. Praktisch läuft dieser Prozess jedoch nicht ideal ab (ii), so dass die Vermehrungsrate geringer ist. Entsprechend müssen ca. 35 PCR-Zyklen für die Analyse von DNA aus Mundschleimhautabstrichen eingesetzt werden.

$$(i) y = a 2^n$$

$$(ii) y = a (1.7)^n$$

mit: y = Ertrag an Zielsequenzen; a = Ausgangsmenge an Zielsequenzen; n = Zyklenzahl

Die **Arbeitsschritte zur Herstellung der beiden PCR-Reaktionsgemische** (je 50 µl Endvolumen) im Einzelnen:

16.3 µl mtDNA-Reaktionsmix¹
1.25 µl Primerset HVR 1 oder HVR 2²
3 µl DNA
29.45 µl Ampuwa

Die zu durchlaufenden **Temperaturstufen (=PCR-Reaktionsparameter)**:

initial: 94 °C für 11 min (= dient der Aktivierung der *Taq*-DNA-Polymerase)
cycling: 94 °C für 1 min; 58 °C für 1 min; 72 °C für 1 min 35 PCR-Zyklen
soak: 10 °C für 10 min (= kühlt die Proben auf Kühlschranktemperatur)

¹ 16.3 µl mtDNA-Reaktionsmix = [5 µl Buffer II, 4 µl MgCl₂ (= 2 mM), 7 µl dNTPs (= 170 µM), 0.3 µl AmpliTaq Gold (=1.5 U)]

² HVR 1 - Primerset mit mtH16026 und mtL16364 (= je 0.25 µM)
HVR 2 - Primerset mit mtH034 und mtL185 (= je 0.25 µM)

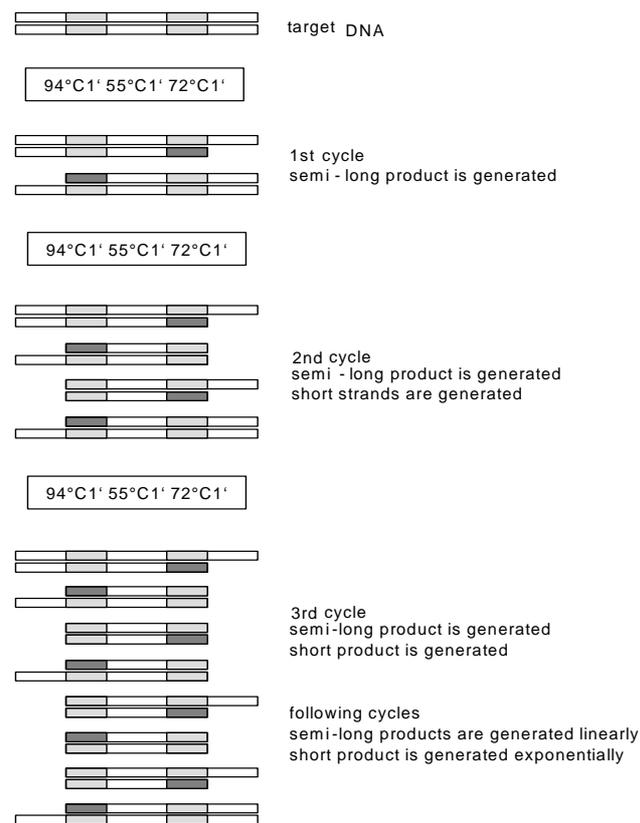


Abb. 9: Schema einer PCR-gestützten *in vitro* Amplifikation definierter DNA-Abschnitte

HVR 1 – Sequenz

Die Hypervariable Region 1 (HVR 1) der mitochondrialen DNA erstreckt sich zwischen den Nukleotidpositionen 16019 und 16569 (Abb. 10 oben). Die für die Zuordnung zu einer der sieben Urmutterlinien relevanten Mutationen finden sich an den Positionen 16069, 16126, 16223, 16224, 16278, 16294 und 16298 (grün markiert). Die Primer mtH16026 und mtL16364 (blau markiert) rahmen diesen relevanten Bereich ein, so dass er vollständig amplifiziert wird. Die Polymorphismen im 339 bp-Amplifikat werden durch eine Direktsequenzierung³ analysiert.

HVR 2 – Sequenz

Die Hypervariable Region 2 der mitochondrialen DNA erstreckt sich zwischen den Nukleotidpositionen 1 und 400 (Abb. 10 unten). Die für die Zuordnung zu einer der sieben Urmutterlinien relevante Mutation (A>G) findet sich an Nukleotidposition 073 (grün markiert). Durch die Primer mtH034 und mtL185 wird dieser Bereich definiert und amplifiziert. Die Ausprägung der Sequenz an Position 073 im 152 bp-Amplifikat findet durch eine RFLP-Analyse (= Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) statt.

³ Dieser letzte Analyseschritt wird bei einem kommerziellen Anbieter als Auftragssequenzierung durchgeführt. Die Auswertung des Datenmaterials erfolgt im Praktikum.

HVR 1



HVR 2

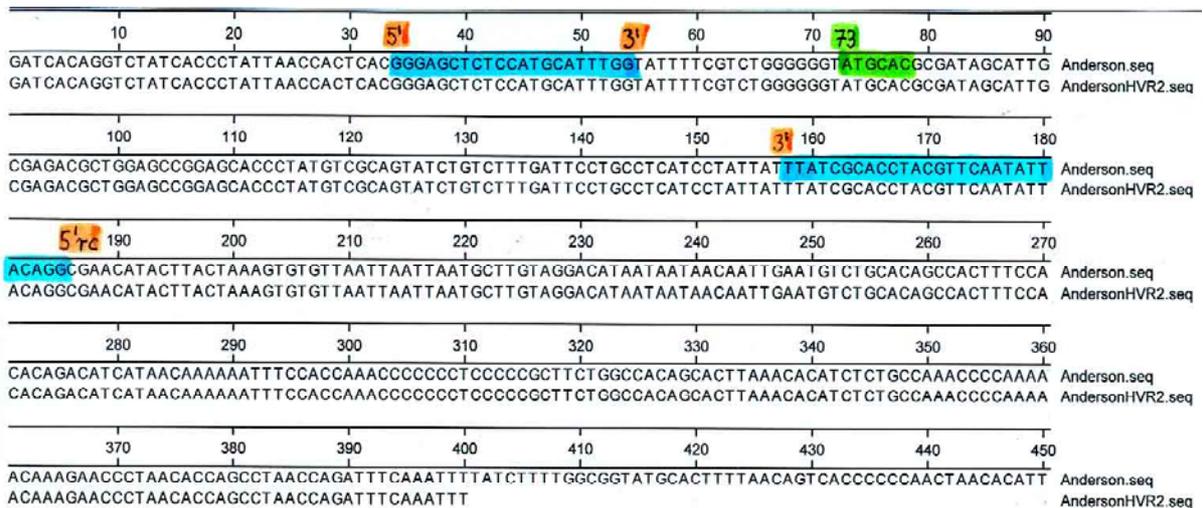


Abb. 10: Sequenzen, Primer (blau) und polymorphe Nukleotidpositionen (grün) der Hypervariablen Regionen 1 und 2 des humanen mitochondrialen Genoms.

Experiment 3: Elektrophorese der PCR-Produkte von HVR1 und HVR 2

DNA-Moleküle, und damit auch PCR-Produkte, lassen sich in einer Agarosegelmatrix entsprechend ihren Längen auftrennen. Die Auftrennung erfolgt durch Anlegen einer Spannung, so dass die negativ geladenen DNA-Moleküle im elektrischen Feld auf die positiv geladene Elektrode (=Anode) hin wandern (Abb. 11). Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der Beschaffenheit der Trennmatrix, des Elektrophoresepuffers, der Größe der DNA-Moleküle und der angelegten Spannung. Die Wegstrecke, die von einem Molekül in einem Zeitraum Δt zurückgelegt wird, ist umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichtes, d.h. große Moleküle wandern langsam, kleine schnell.

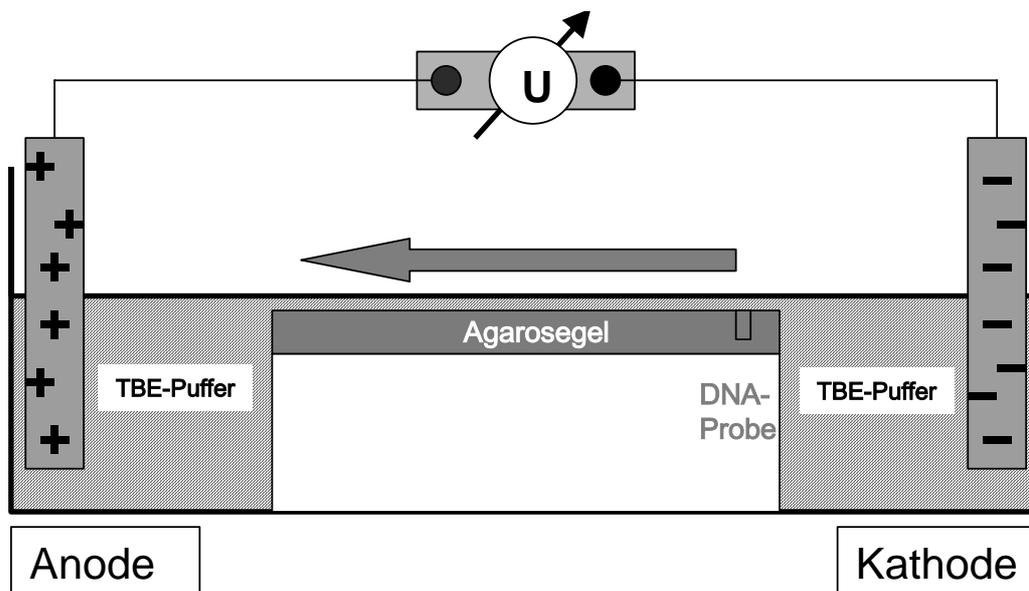


Abb 11.: Seitliche Ansicht einer Elektrophoresekammer zur Auftrennung von DNA

Um die DNA sichtbar zu machen, muss ein Farbstoff (= Ethidiumbromid, Vorsicht carcinogen bei Hautkontakt, Handschuhe!!) in die doppelsträngigen DNA-Moleküle eingelagert werden. Die Einlagerung von EtBr in die DNA erfolgt indirekt durch Färbung der Gelmatrix. EtBr-gefärbte DNA leuchtet unter UV-Lichtbestrahlung (254nm, Vorsicht Schutzbrille!!) orange. Zur Dokumentation des Ergebnisses wird eine Polaroidfotografie angefertigt. Die **Arbeitsschritte** im Einzelnen:

Herstellung eines Agarosegels (2.5 %ig) (siehe auch Abb. 12)

- 2 g Agarose in Erlenmeyerkolben geben
- 80 ml 1x TBE-Puffer zugeben
- auf dem Heizrührer aufkochen (Rührmagnet!) (250 °C)
- zwischenzeitlich Elektrophoresekammer zusammenbauen (Brücken und 2 Kämme)
- flüssige Agarose in Ethidiumbromid-Erlenmeyerkolben umgießen
- beim Umgießen 3 µl Ethidiumbromid zugeben, mischen
- Gel in Elektrophoresekammer gießen
- Nach ca. 20 Min. mit 1x TBE-Puffer überschichten
- vorsichtig die Kämme ziehen

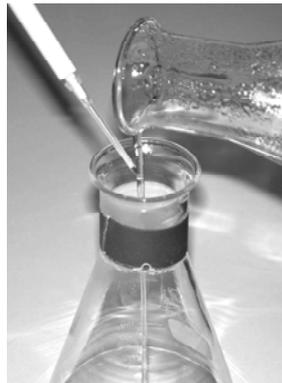
Design, Text und Idee für das Praktikum von Susanne Hummel, Göttingen. Vielen Dank

Auftragen von Proben auf ein Agarosegel und Fotografieren (siehe auch Abb. 12)

- je 10 μl gereinigte Probe mit ca. 1-2 μl Bromphenolblau versetzen
- gefärbte Proben vorsichtig in Geltaschen einpipettieren
- 5 μl gefärbten Längenstandard auftragen
- Elektrophorese an die Stromversorgung (ca. 110 V) anschließen
- die Laufzeit beträgt je nach gewünschter Laufweite und Prozentigkeit des Gels 30-60 Min.
- Gel im UV-Licht fotografieren, 3 Sek., Bl. 8



Gel kochen



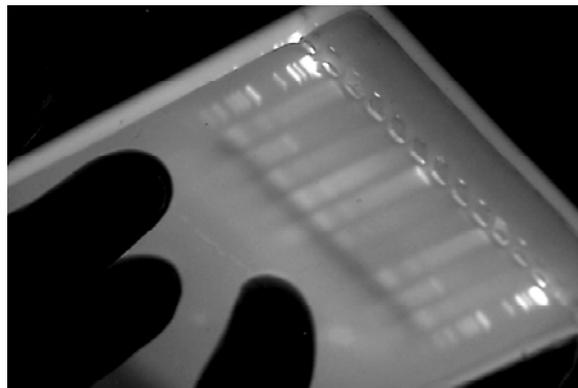
Gel mit EtBr färben



Gel giessen



Proben auf das Gel laden



Gel im UV-Licht

Abb. 12: Übersicht zu den einzelnen Arbeitsschritten der Agarosegelelektrophorese

Experiment 4: Aufreinigung aller PCR-Produkte der HVR 1 und Vorbereitung der Sequenzierreaktion

Mithilfe der PCR wurden ausreichende Kopienzahlen der beiden HVRs hergestellt. HVR 1 soll durch einen kommerziellen Anbieter sequenziert werden. Die Sequenzierung wird als sogenannte Direktsequenzierung, die auch als Taq-Cycle-Sequencing (Abb. 13) bezeichnet wird, durchgeführt. Um eine Direktsequenzierung erfolgreich durchführen zu können, ist es nötig, die PCR-Produkte zu reinigen. Dies erfolgt in Zentrifugationssäulen, die mit einer Silikat-Matrix gefüllt sind. An die Matrixpartikel bindet zunächst die DNA, während alle Komponenten, die den Sequenzierungsvorgang stören würden, passieren (= überschüssige dNTPs, Taq-Polymerase und PCR-Pufferkomponenten). Diese werden mit den ersten drei Durchläufen verworfen. An die Silikatmatrix bleibt die DNA während dieser ersten Schritte gebunden. Wird abschließend reines Wasser (HPLC-grade) auf die Säule aufgetragen, lösen sich die DNA-Moleküle von den Silikatpartikeln, so dass sich im vierten und letzten Durchlauf (= Eluat) nur noch das hochreine PCR-Produkt befindet.

Folgende **Arbeitsschritte** sind durchzuführen:

Reinigung des PCR-Produktes

- 40 µl PCR Produkt HVR 1
- + 200 µl Puffer PB
- kurz vortexen
- Zentrifugationssäule in Sammelgefäß platzieren (2 ml)
- PCR-Produkt und Puffer PB auf Zentrifugationssäule pipettieren, Filter nicht berühren
- 14.000 rpm 1 min
- 1. Durchlauf verwerfen
- + 750 µl PE Puffer auf Zentrifugationssäule pipettieren
- 14.000 rpm 1 min
- 2. Durchlauf verwerfen
- ohne weitere Zugabe von Puffer 14.000 rpm 1 min
- 3. Durchlauf verwerfen
- Zentrifugationssäule auf neues 2-ml Eppendorf stecken
- 40 µl Puffer EB (=10mM TrisHCl, pH 8.5) auf die Zentrifugationssäule pipettieren, Filter nicht berühren
- 3 Min. warten, damit DNA in Lösung gehen kann
- 14.000 rpm 1 min
- Eluat bereit für Taq-Cycle-Sequencing Reaktion

Vorbereiten der Sequenzierreaktion (in 0.2 ml-Gefäßen)

- 5 µl gereinigtes PCR-Produkt (ca. 80 ng DNA)
- 2 µl mtH16026 Primer (= 20 pmol)

Experiment 5: RFLP-Analyse von HVR 2 (np 073)

Mithilfe von Restriktionsenzymen kann doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen (Restriktionsstellen) geschnitten werden. Enzyme, die mitten in den Doppelstrang hineinschneiden können, werden auch als Endonucleasen bezeichnet. Die meisten bekannten Ennucleasen, deren systematische Nomenklatur sich aus dem Namen der Bakterienspezies ableitet, aus denen sie isoliert werden (Eco RI = aus *Escherichia coli*), benötigen palindromische Sequenzen, um die DNA aufspalten zu können. Palindromische Sequenzen sind solche, deren Basenabfolge gerade so ist, dass die Sequenz des upper-strands und des revers-komplementären lower-strands genau gleich sind.

Beispiel: upper-strand 5' - ...ACGT... - 3'
 lower-strand 3' - ...TGCA... - 5'

Die Nukleotidposition (np) 073 der HVR 2 kann entweder wie in der Anderson-Referenzsequenz vorliegen (Abb. 14), oder es kann anstelle des A ein G realisiert sein. Ist letzteres der Fall, liegt die Basenabfolge ...GTGCAC... vor. Hierbei handelt es sich um ein Palindrom im oben gezeigten Sinne, das also grundsätzlich für eine RFLP-Analyse geeignet ist. Um die np 073 untersuchen zu können, musste nun eine Endonuklease gefunden werden, die diese Basenabfolge schneidet. Eine entsprechend geeignete Restriktionsendonuklease liegt mit ApaL I vor. Sie zerteilt einen DNA-Doppelstrang nach dem in Abb. 15 vorgestellten Muster.

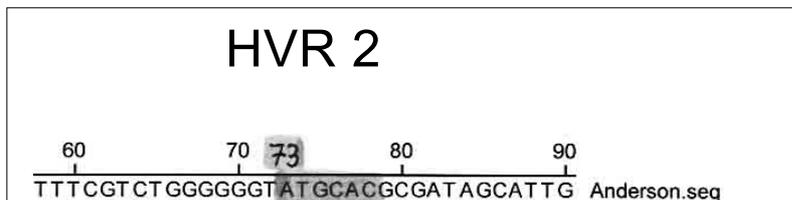


Abb. 14 : Basenabfolge um die Nukleotidposition 073 der HVR 2 in der Anderson-Referenzsequenz (= Haplogruppen H und V). In den anderen Haplogruppen ist anstelle des A ein G realisiert.

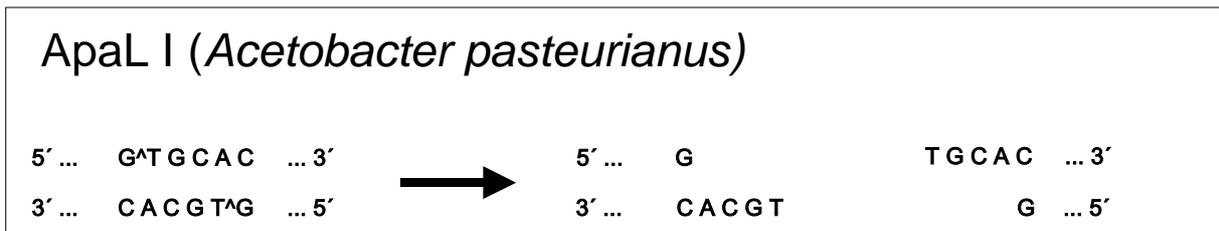


Abb 15: Restriktionsmuster von ApaL I. Nach Inkubation der DNA-Doppelstränge mit dem Enzym bei 37°C entstehen Fragmente mit sogenannten „sticky ends“. Geschnitten werden solche Sequenzen, die den Haplogruppen K, U, J, T und X zuzuordnen sind. Ungeschnitten bleiben Sequenzen der Haplogruppen H und V.

Folgende **Arbeitsschritte** sind für den **ApaL I -Verdau von HVR 2- Produkten** auszuführen:

- 2 µl NEB4 Puffer
- 2 µl ApaL I
- 2,5 µl Ampuwa
- 1,5 µl BSA (1:10 Verdünnung (1 mg/ml) der Stocklösung (10 mg/ml))
- 7 µl HVR 2- Produkt
- Inkubation 2h 37°C (oder über Nacht)

Experiment 6: Elektrophorese der RFLP-Analyse von HVR 2

Nach Inkubation der PCR-Produkte aus HVR 2 liegen die Sequenzen der Haplogruppen K, U, J, T und X geschnitten vor. Um das Analyseergebnis festzustellen, wird wieder eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Nach der UV-Lichtbestrahlung werden bei den Haplogruppen K, U, J, T und X je zwei Banden von 42 und 110 Basenpaaren (bp) Länge zu erkennen sein. Für Proben der Haplogruppen H und V bleibt das 152 bp lange PCR-Produkt ungeschnitten (Abb. 16).

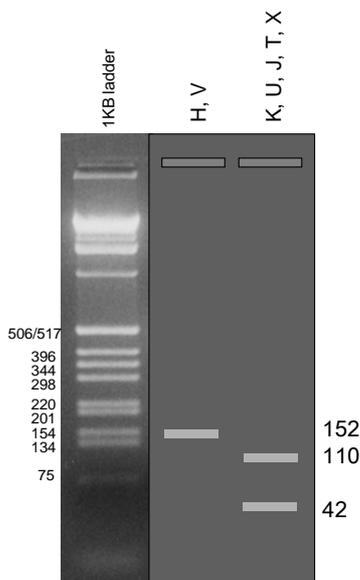


Abb. 16: Erwartete Ergebnisse nach RFLP-Analyse des PCR-Produktes der humanen mitochondrialen HVR 2.

Herstellung eines Agarosegels (2.5 %ig)

- 2 g Agarose in Erlenmeyerkolben geben
- 80 ml 1x TBE-Puffer zugeben
- auf dem Heizrührer aufkochen (Rührmagnet!) (250 °C)
- zwischenzeitlich Elektrophoresekammer zusammenbauen (Brücken und 2 Kämme)
- flüssige Agarose in Ethidiumbromid-Erlenmeyerkolben umgießen
- beim Umgießen 3 µl Ethidiumbromid zugeben, mischen
- Gel in Elektrophoresekammer gießen
- nach ca. 20 Min. mit 1x TBE-Puffer überschichten
- vorsichtig die Kämme ziehen

Auftragen von Proben auf ein Agarosegel und Fotografieren

- je 10 µl RFLP-Verdauprodukt mit ca. 1-2 µl Bromphenolblau versetzen
- gefärbte Proben vorsichtig in Geltaschen einpipettieren
- 5 µl gefärbten Längenstandard auftragen
- Elektrophorese an die Stromversorgung (ca. 110 V) anschließen
- die Laufzeit beträgt je nach gewünschter Laufweite und Prozentigkeit des Gels 30-60 Min.
- Gel im UV-Licht fotografieren, 3 Sek., Bl. 8

Auswertung

Die Auswertung der Daten hat die Zuordnung der Proben zu einer der sieben europäischen Haplogruppen H, V, K, U, J, T und X zum Ziel. Etwa 95% aller Europäer gehören einer dieser Haplogruppen an.

Zu diesem Zweck werden die Daten der Taq-Cycle-Sequenzierreaktion der HVR 1 entweder computergestützt oder manuell ausgewertet. Die Sequenzpolymorphismen, die in allen untersuchten Proben gefunden werden, werden in die Tabelle auf der folgenden Seite eingetragen. Als Bezugssystem für die Feststellung der Sequenzpolymorphismen dient die Anderson-Referenzsequenz⁴. Aus der RFLP-Analyse der Nukleotidposition 073 der HVR 2 hat sich ebenfalls bereits eine Eingruppierung zu entweder H bzw. V oder zu einer der Haplogruppen K, U, J, T und X vornehmen lassen. Auch hier diene die Anderson-Referenzsequenz als Bezugssystem. Diese Daten werden ebenfalls in die folgende Tabelle eingeschrieben.

Um die Zuordnung zu ermöglichen, zeigt Abb. 17 nochmals die phylogenetischen Zusammenhänge zwischen den Haplogruppen, sowie die zugehörigen polymorphen Nukleotidpositionen.

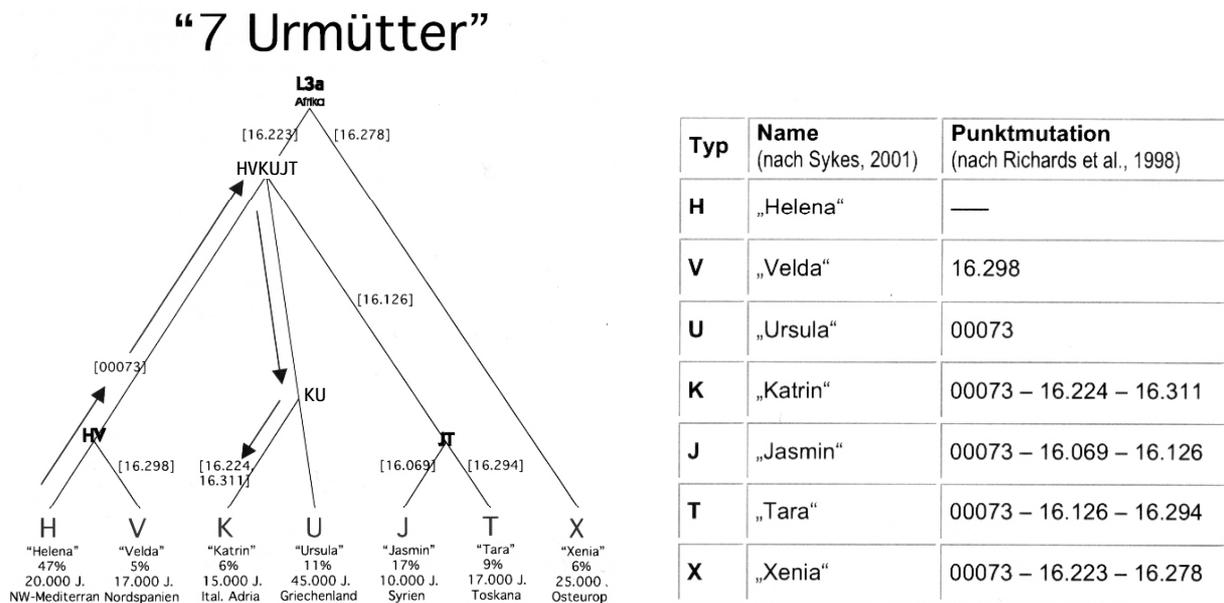


Abb. 17 Stammbaum der sieben europäischen mitochondrialen Haplogruppen mit den tabellarisch gelisteten Punktmutationen. Die Kombinationen der Punktmutationen sind charakteristisch für die jeweilige Haplogruppe. Zusätzliche Mutationen in den HVRs zeigen die Zugehörigkeit des Individuums zu einer Untergruppe der jeweiligen Haplogruppe an.

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(5806): 457-65.

