

MİTOKONDRIAL DNA DİZİ ANALİZİ VE ADLİ AMAÇLI KİMLİKLENDİRMEDE KULLANILMASI

Uz.Dr.Faruk Aşıcıoğlu*, Uz.Dr.Ömer Müslümanoğlu*,
Bio.Fatih Akyüz*

* Adalet Bakanlığı Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas
Dairesi

Yazışma Adresi:

Dr.Faruk Aşıcıoğlu
Haseki Cad.Keçihatun Mah.
Küpeşteciler sok.No: 26/7
34300 Haseki -İSTANBUL
Tlf:0212 5865522
Faks:0212 2512304
E.mail: fasicioglu@hotmail.com

ÖZET

Giriş/Amaç

Hücrelerde çekirdek DNA'sına oranla fazla miktarda mitokondrial DNA kopyasının bulunması degrede örneklerden mtDNA elde edilmesi imkanım arttırır. Analizin, pahalı olması ve zaman alması ile değerlendirme için gerekli olan toplumsal genetik verilerin henüz yetersiz olması bu metodun dezavantajlarıdır. Çalışmamızın amacı laboratuvarımızda Türk toplumunun D-loop bölgesinin dizilerinin belirlenmesi için mtDNA dizileme protokolünün oluşturulmasıdır. Sunulan bu ön çalışma sonrasında büyük miktardaki adli popülasyon verilerinin depolandığı bir yapı oluşturmayı planlamaktayız.

Araç ve gereçler

DNA eldesi salting out ve chelex 100 yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. İlk PCR 50 l' lik son hacimde Perkin-Elmer 2700 thermal cyler cihazında 95°C'de 11 dakika ön ısıtmayı takiben 94°C'de 45 saniye denaturasyon, 56°C'de 45 saniye bağlanma. 72°C'de 45 saniye uzama basamaklarını içeren toplam 30 döngü ve 72°C'de 10 dakika son uzama koşullarında gerçekleştirildi. PCR için gereken primerler HVI bölgesi [L 16160 (Primer I),H 16431 (Primer II)]ve HVII bölgesi [L29 (Primer I), H408 (Primer II)] ne uygun olarak sentezlettiler. İlk PCR ürünü DNA'ya fluoresan işaretli dideoksinükleotidler içeren BigDye Terminator kit kullanılarak cycle sequence PCR'ı yapıldı. Cycle sequence sonrası örneklerin kapiller elektroforez işlemi ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazında yapılarak toplanan veriler DNA Sequencing Analysis Software ile analiz edilerek değerlendirildi. Dizilerin karşılaştırılması DNASIS MAX Trial programı kullanılarak gerçekleştirildi.

Bulgular

Dizilenmiş örneklerin Anderson referans dizisine göre farklılıkları ortaya konmuştur.

Sonuç

Dizilerdeki farklılıklar mtDNA'yı STR tiplemesinin yapılamadığı problemleri adli örneklerde oldukça bilgi verici değerli bir yöntem yapmaktadır.

SUMMARY

SEQUENCE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA AND THE USE OF FORENSIC IDENTIFICATION

Background/Aim

Sequence analysis of mitochondrial DNA is an advanced and highly efficient method for the individualisation of the traces. In Forensic studies, the high copy number increase the possibility of recovering mtDNA from highly degraded samples, such as found in mass disasters and buried remains. Disadvantages of this method are expensive and time-consuming analysis and evaluation procedures as well as the necessary stock of population-genetic data which is still insufficient. The aim of this study is set up protocols of mtDNA sequencing in our laboratory/ for determining the sequence of the D-loop region of Turkish individuals. After this presented preliminary article we plan to build up a large stock of forensically established data.

Material and Methods

DNA was extracted by salting out and chelex 100 procedures. The first PCR amplification was conducted with 50 ul reaction in a Perkin-Elmer 2700 thermal cycler using a cycle of preheating at 95°C for 11 min, denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 56°C for 45 sec and elongation at 72°C for 45 sec. A program of 30 cycles was finished at 72°C for 10 min final extension. PCR primers were synthesised convenient to L 16160 (Primer I), H 16431 (Primer II) for HVI region and L29 (Primer I), H408 (Primer II) for HVH region. DNA was sequenced using fluorescent dideoxynucleotides in Big-Dye terminator sequencing ready reaction kit. Cycle sequencing products were separated by capillary electrophoresis and were automatically analysed by the ABI Prism Sequencing Analysis Software (Version 2.1). The DNA sequences from complementary strands were manually checked. Sequence comparison was performed using DNASIS MAX Trial programme.

Results

Sequenced samples were compared with Anderson Reference Sequences and differentiations were presented.

Conclusion

The sequence diversity make mtDNA a valuable tool enabling useful information at the problematic Forensic samples that may not be amenable to STR typing.

Giriş

Hücresel DNA'nın %0.5 'e yakını mitokondrial DNA'dır. Paramecium, Hydra gibi lineer yapı gösteren birkaç organizma dışında mitokondrial DNA 14 ile 2400 kb arasında değişen uzunlukta sirküler bir yapı gösterir (1,2). İnsan mitokondrial DNA'sı çift zincirli, halka yapısında, 16569 baz çifti uzunluğunda bir moleküldür (1,3)- Dört nükleotidden her biri halka yapısında eşit oranlarda yer almaz. Mitokondrial DNA'nın guanin ve adenozinden zengin zincirine H-zinciri (heavy-ağır zincir), sitozin ve timinden zengin olanına ise L-zinciri (light-hafif zincir) adı verilir. Mitokondrial DNA'da 13'ü protein, 22'si tRNA ve 2'si rRNA kodlayan toplam 37 gen bulunmaktadır (1,3). Aslında adli genetikçilerin ilgi duyduğu alan kodlayan bu bölgenin dışında kalan ve "displacement loop" ya da kısaca "D-loop" denilen, yaklaşık 1000 bp uzunluğunda, proteinleri, tRNA'lan ve rRNA'lan kodlamayan ve dizi değişkenliği (sekans varyasyonu) gösteren bölgedir. Bu bölge ağır ve hafif zincir promotorlarını, transkripsiyonu düzenleyici elementleri, mitokondrial transkripsiyon faktörlerinin bağlanma noktalarını ve TAS'lan (termination associated sequence) içerir (4,5,6). Bu bölge içerisinde iki aşın değişken bölge tanımlanmış olup bunlardan adli genetikte kullanılan HVI (Hiper variable) bölgesi 16024-16365 bp, HV II bölgesi ise 73-340 baz çiftleri arasında yer alır (7,8,9,10,11).

Mitokondrial DNA nükleer DNA'ya göre yaklaşık 6-17 kez daha yüksek mutasyon oranına sahiptir(1,3,12,13,14). Bu durum mtDNA polimeraz etkinliğinin düşük olmasından ve DNA tamir sisteminin olmamasından ötürü mutasyonların kalıcı olmasından kaynaklanmaktadır (15). Kontrol bölgesindeki en yaygın mutasyon tipi tek baz substitüsyonudur. Transition transversiyondan yaklaşık kırk kez fazla görülür. Küçük insersiyonlar ve delesyonlar 302-310 ve 16183-16194 arasındaki iki homopolimerik bölgede yaygındır (poli C bölgesi). Uzunluk heteroplazmisi ise homopolimerik bölgedeki tekrarlayan baz sayısındaki değişimle kendini gösterir ve nokta heteroplazmisinden daha yaygındır (2). Evrim süresince bazı baz aralıklarının mutasyona daha yatkın bazılarının ise daha stabil oldukları bilinmektedir (16,17,18,19). Ayrıca saç gibi bazı vücut dokularının mtDNA dizisinin diğer dokulara göre daha fazla değişkenlik gösterdiği bilinmektedir.

MtDNA maternal yolla kalıtılır ve rekombinasyona uğramaz (2,15,20). Çünkü ovumun zona pellusida tabakasını sadece spermin baş kısmı geçer. Oysa mitokondriler spermin kuyruk kısmında yer alırlar. Bu nedenle paternite olgularında mtDNA kullanım alam bulamaz (3). Ancak son zamanlarda az miktarda paternal mtDNA'nın fertilize yumurtaya transfer olduğunu söyleyen bazı yayınlar bulunmaktadır (21,22,23).

MtDNA her hücrede bir adet bulunan nükleer DNA'nın tersine 1000-10000 kopya halinde bulunur. Ayrıca mitokondriler iki koruyucu membrana sahiptirler. Bu iki nedenden dolayı çevresel etkenlere nükleer DNA'ya oranla çok daha dayanıklıdırlar. Bu özellik mtDNA'yı nükleer DNA'nın elde edilemediği, inceleme konusu biyolojik materyalin çok sınırlı miktarda olduğu, degrades olduğu ve uzun yıllar beklemiş olduğu olgularda oldukça yararlı kılmaktadır (15,24,25).

mtDNA'nın D-loop bölgesi hemen hemen sadece nokta mutasyonlara sahne olduğu için kimliklendirme çalışmaları sadece tüm zincirin dizilenmesi sureti ile mümkün olmaktadır (26). MtDNA analizi diğer dizileme (sequence) analizleri gibi büyüklükleri farklı DNA fragmanlarının son bazlarının belirlenmesi ve sıraya dizilmesi esasına dayanmaktadır (SANGER metodu).

mtDNA dizilemesinin adli amaçlı kimliklendirmedeki önemi açıktır. Bu nedenle sunduğumuz ön çalışma ile laboratuvarımızda mtDNA dizileme protokolü oluşturularak standardize bir sistem oturtulması amaçlanmıştır.

Araç ve gereçler

İzolasyon

DNA izolasyonu Adli Tıp Kurumu Biyoloji İhtisas Dairesine gelen sağlıklı kişilerden alınan tam kan örneklerinden, salting-out yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışılan iki örnek grubundan birincisi anne ve çocuğundan oluşurken ikincisi anne, çocuk ve annenin kız kardeşinden oluşmaktaydı.

PCR

İlk PCR'da mtDNA'nın hedef alınan bölgesinin çift zincirli olarak çoğaltılması amaçlandı. Bu reaksiyon için toplam 50 ul son hacme uygun olarak her bir örnek için 393 ul Premix [ddH₂O, 1mM dNTP mix, 10 uM primer I, 10 uM primer II, 10X PCR Buffer II (PE Biosystems, Foster city, CA, USA) kullanılarak hazırlandı], 5 ul MgCl₂ (25 mM), 0,5 ul TaqGold DNA Polimeraz (5 Unit/ul), 0,2ul %5'lik BSA, 5ul DNA kullanıldı PCR Perkin-Elmer 2700 thermal cycler cihazında (PE Biosystems, Foster city, CA, USA) 95°C'de 11 dakika ön ısıtmayı takiben 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 56°C'de 45 saniye bağlanma. 72°C'de 45 saniye uzama basamaklarını içeren toplam 30 döngü ve 72°C'de 10 dakika son uzama şartlarında gerçekleştirildi. Bu amaçla kullanılmak üzere mtDNA'nın her iki aşın değişken bölgesindeki dizilemeyi hedeflediğimiz bölgelere uygun 4 adet primer sentezlettilirdi. Bu primerler. mtDNA'nın FIV1 bölgesi için

L 16160 (Primer I) 5'-ATAAAACCCAATCCACATCA-3' Mw:63202 Tm:5L,5 c
C:10uM

H 16431 (Primer II) 5'-CGAGGAGAGTAGCACTCTTG-3' Mw:6182.1 Tm:55,0 c
C:10uM

mtDNA'nın HV2 bölgesi için

L29 (Primer I) 5'-CTCACGGGAGCTCTCCATGCAT-3' Mw:6671.4 Tm:62.5 c
C:10uM

H408 (Primer II) 5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA-3' Mw:6703.4 Tm:57.3 c
C:10uM baz dizisine sahiptir.

PCR sonrası purifikasyon MicroCone filtre veya Qiaquick Purification kiti (Qiagen. GmbH. Hilden, Germany) kullanılarak gerçekleştirildi. Amplifikasyonun başansı PCR ürünü %2'lik agaroz jelde yürütülerek gözlemlendi.

Cycle Sequencing PCR

Birinci PCR reaksiyonu ile çoğaltılan ve purifiye edilen mtDNA fragmanları floresan işaretli dideoksinükleotidler içeren BigDye Terminator kit (PE Biosystems. Foster city. CA. USA) kullanılarak CycleSequence PCR'ı yapıldı.

PCR reaksiyonu 4 ul Terminator Ready Reaction Mix, 0,5 ul Sequencing Primer (10 mM). 4,5 ul ddH₂O, 1 ul PCR ürünü (1. PCR sonucu elde edilen ürün) kullanılarak 96°C'de 10 saniye denatürasyon, 50°C'de 5 saniye bağlanma, 60°C'de 4 dakika uzama reaksiyonlarını içeren 25 döngü olarak gerçekleştirildi. İleri yönde dizilemede HVI bölgesi için L 16160, HV 2 için L29, geri yönde dizilemede ise FIV I bölgesi için H 16431, HV 2 için H408 primerleri kullanıldı. CycleSequencing purifikasyonu 80 ul %95'lük Etanol, 2ul NaAC/EDTA 10 ul ddH₂O veya DyeEx Spin Kit (Qiagen, GmbH, Hilden, Germany) kullanılarak yapıldı.

Kurutulan örnekler örnek basma 20 ul formamid eklenerek ABI Prism 310 Genetic Analyzer cihazında (PE Biosystems, Foster city, CA, USA) 47 cm' lik kapilerde; Seq POP6 Rapid (İmi) E modülü seçilerek 50°C'de 36 dakika elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Toplanan veriler DNA Sequencing Analysis Software ile analiz edilerek değerlendirildi.

Bulgular

Dizilen örnekler Anderson referans dizisi ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Veriler Tablo 1'de görülmektedir. Anderson referans dizisinin HV1 bölgesindeki 16294 ve 16296 pozisyonlarında sitozin (C) yer alırken birinci örneğimizde anne ve çocuğum aynı pozisyonlarda timin (T) taşıdığı, HV2 bölgesinde ise 200 ve 263 pozisyonlarında referans dizide adenin (A) yer alırken anne ve çocuğun aynı pozisyonlarda guanin (G) taşıdığı görülmektedir. Ayrıca anne ve çocukta HV2 bölgesinde 315 pozisyonunda bir sitozin (C) insersiyonu saptanmıştır. Birinci örnekte saptanan HV1 bölgesindeki "C-T" baz değişimi Şekil 1 'de verilmiştir.

İkinci örneğimizde Anderson referans dizisinin HV1 bölgesindeki 16223 pozisyonundaki sitozin (C) yerine tüm bireylerde timin (T) bazının yer aldığı. 16391 pozisyonundaki guaninin (G) yerine ise tüm bireylerde adenin (A) geldiği görülmektedir. Ayrıca HV2 bölgesinde 199,204 ve 250 pozisyonlarında referans dizide timin (T) yer alırken anne, kız kardeş ve çocuğun aynı pozisyonlarda sitozin (C) taşıdığı, 263 pozisyonunda ise referans dizide adenin (A) yer alırken her üç bireyin bu pozisyonda guanin (G) taşıdığı görülmektedir. Ek olarak her üç bireyde 309 ve 315 pozisyonlarında bir adet sitozin (C) insersiyonu yer almaktadır.

Tartışma

Adli genetik laboratuvarları sıklıkla eser miktarda biyolojik materyal içeren örneklerle çalışmak zorunda kalmaktadır. Cinsel saldırı sonrasında kurban üzerinden ya da olay yerinden elde edilebilen tek bir saç teli bu duruma örnek olabilir. Materyal sınırlı olunca materyalde mevcut hücre sayısı, dolayısı ile de çekirdek DNA miktan çok az olmaktadır. Bir çok olguda inceleme konusu materyaldeki DNA'nın degrede olduğu da bilinmektedir. Bu durum elde edilen DNA'nın miktanını ve kalitesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle yetersiz çekirdek DNA bulunan olgularda mtDNA son derece yaygın kullanım alanı bulmuştur (2).

Özellikle aşağıda sıralanan bir çok durumda mtDNA aydınlatıcı olmaktadır:

- 1.Eski kemikler, köksüz kıl gibi çekirdek DNA'nın bulunmadığı veya degrede olduğu durumlar (degrede örneklerde dahi mtDNA'dan sonuç alınabilmesi sert bir membrana sahip mitokondrilerin olumsuz çevresel koşullara daha dayanıklı olması yanında, her hücrede sadece bir nükleus bulunur iken çok sayıda mitokondrinin bulunmasındandır),
- 2.Kitlesele ölümler,
- 3.Ebeveynlerin bulunamadığı durumlar yöntemin kullanıldığı diğer alanlardır.

Sonuçları rapor etmeden önce çalışılan bölge en az iki kez dizilenmiş olmalıdır. Eğer şüpheli örnek ile karşılaştırılacak kişiden alınan örnek iki baz farklılığı gösteriyor ise bu iki örneğin aynı kaynaktan gelmediği şeklinde rapor edilir. Baz farklılığı ne kadar fazla ise bu bulgu daha güvenilir olacaktır. Tam tersi olarak her iki örnek, dizilenen tüm bazlar itibarı ile tamamen birbirinin aynı ise potansiyel olarak aynı kaynaktan geldikleri düşünülür. Her iki dizi arasında aynı bölgede heteroplazmi mevcudiyeti bu bulguyu daha da güçlendirir. Heteroplazminin şüpheli örnekte bulunup karşılaştırma örneğinde bulunmaması veya tam tersi iki örnek arasında matemal bağın bulunmadığı anlamına gelmez. Her iki dizi arasında tek baz farklılığının tespiti halinde ise alınan sonucun iki örneğin aynı kaynaktan geldiği ya da gelmediği hususunda kesin sonuç vermeye imkan tanımadığı, ancak her iki örnek kan gibi aynı biyolojik materyal ise dışlamanın daha olası olduğu şeklinde rapor edilmesi uygundur (9).

Yöntem çok hassas olup çok az miktarda ki DNA ile sonuç verebildiğinden laboratuvar koşulları en küçük bir kontaminasyon olasılığını dahi engelleyecek şekilde sağlanmalıdır (27). Ayrıca sıklıkla mtDNA çalışılmasına gerek duyulan kemik örneklerinin mezardan çıkarılması sırasında insandan kontaminasyon mümkün olduğu gibi doğal çürüme sürecinde bakteri, fungus ve insektisitlerle kontaminasyonda sıklıkla görülebilmektedir (28). Yöntemin zaman alıcı ve masraflı olması yanında hala yeterli popülasyon genetiği verileri bulunmaması ise diğer dezavantajlardır (9,26,29,30).

İnsan mtDNA dizisi ilk olarak Anderson ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olup bu dizi halen tüm dünyada ilk yayınlayanın adına izafeten Anderson dizisi ya da Cambridge dizisi (CRS-Cambridge Reference Sequence) adı ile referans dizi olarak kullanılmaktadır. Değerlendirmede ilk aşama, çalışılan mtDNA dizisinin referans dizi ile karşılaştırılmasıdır. Örneğin, bir nolu olgumuzda referans dizide HVI bölgesinde 16294 nolu nükleotid C (Sitozin) iken çalışılan örnekte anne ve çocukta T (Timin) geldiği görülmektedir. Bu bireylerin mtDNA dizisi 16294T olarak kodlanır. Eğer iki dizi arasında başka baz farklılığı yok ise bu örnek 16294T dışında referans dizi ile identiktir şeklinde rapor edilir.

Bilimsel veriler mtDNA'yı özellikle STR tiplemesinin yapılamadığı problemleri adli örneklerde oldukça bilgi verici ve değerli bir yöntem yapmaktadır. Ancak mtDNA'nın adli amaçlı kullanımı için geniş veri tabanına dayanan ulusal mtDNA popülasyon verilerine ihtiyaç vardır.

Referanslar

1. Zischler H. Mitochondrial DNA: Diversity analysis and possible pitfalls. in: Epplen JT, Lubjuhn T, ed. DNA Profiling and DNA fingerprinting. 1st ed. Basel: Birkhäuser Verlag. 1999; 117-31.
2. Carracedo A, Bär W, Lincoln P, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider P, Budowle B, Brinkmann B, Gill P, Holland M, Tully G, Wilson M: DNA commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci Int.* 2000; 110: 79-85.
3. Krawczak M, Schmidtke J. DNA fingerprinting. 2nd ed. New York: Springer-Verlag. 1998; 11.
4. Ojala D, Montaya J, Attardi G: tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondrial DNA. *Nature Genet.* 1981; 99: 470-74.
5. Chang DD, Clayton DA: Precise identification of individual promoters for transcription of each strand of human mitochondrial DNA. *Celi.* 1984; 36: 635-43.
6. Passarge E: *Color Atlas of Genetics*, 2nd ed. Stuttgart: Thieme, 2001; 124-31.
7. Sullivan KM, Hopgood R, Gill P: Automated amplification and sequencing of human mitochondrial DNA. *Electrophoresis.* 1991; 12: 17-21.
8. Wilson MR, DiZinno JA, Polansky D, Replogle J, Bodovle B: Validation of mitochondrial sequencing for forensic casework analysis. *Int. J. Legal Med.* 1995 ; 108 (2): 68-74.
9. Piercy R, Sullivan KM, Benson N, Gill P : The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int. J. Legal Med.* 1993 :106: 85-90.
10. Lutz S, Weisser HJ, Heizmann J, Pollak S: Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *Int. J. Legal Med.* 1998 ;111 (2): 67-77.
11. Parson W, Parsons TJ, Scheithauer R, Holland MM: Population data for 101 Austrian Caucasian mitochondrial DNA d-loop sequences: application of mtDNA sequence analysis to a forensic case. *Int. J. Legal Med.* 1998 ; 111: 124-132.
12. Tully G, Bär W, Brinkmann B, Carracedo A, Gill P, Morling N, Parson W, Schneider P: Consideration by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int.* 2001; 124: 83-91.
13. Epplen JT, Lubjuhn T: *DNA Profiling and DNA Fingerprinting.* Basel: Birkhäuser Verlag, 1999; 117-131.
14. Parson TJ, Muniec DS, Sullivan K, Allison Greiner R, Wilson MR, Berry DL, Holland KA, Weedn VW, Gill P, Holland MM: A high observed substitution rate in the Human mitochondrial DNA control region. *Nature Genet.* 1997; 363-68.
15. Barallon R. Species determination by analysis of the Cytochrome b gene. In: Lincoln PJ, Thomson J, ed. *Forensic DNA profiling protocols.* 1st ed. New Jersey: Humana Press. 1988; 251-260.
16. Hasegawa M, Horai S: Time of the deepest root for polymorphism in human mitochondrial DNA. *Int. J. Mol. Evol.* 1991 ;32: 37-42.
17. Wakeley J: Substitution rate variation among sites in hypervariable region 1 of human mitochondrial DNA. *Int. J. Mol. Evol.* 1993; 37: 613-23.
18. Excoffier L, Yang Z: Substitution rate variation among sites in the mitochondrial DNA hypervariable region 1 of humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 1999; 16: 1357-68.

19. Mayer S, Weiss G, VonHaeseler A: Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics*. 1999;152: 1103-10.
20. Wilson AC, Cann RL, Carr SM, George M, Gyllenstein UR, Helm-Bychowski KM, Higuchi RG, Palumbi SR, Prager EM, Sage RD, Stoneking M: Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol J Linn Soc*. 1985;26:375-400.
21. Walker-Eyre A, Smith NH, Smith JM: How clonal are human mitochondria. *Proc. R. Soc. Lond*: 1999; B 266:477-83.
22. Awadalla P, Walker-Eyre A, Smith JM: Linkage disequilibrium recombination in hominoid mitochondrial DNA. *Science*. 1999;286:2524-25.
23. Parsons TJ, Irwin JA: Questioning evidence for recombination in human mitochondrial DNA. *Science*. 2000; 288:1931.
24. Robin ED, Wong R: Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *J. Cellular Physiol*. 1988;136:507-13.
25. Steighner RJ, Holland M: Amplification and sequencing of Mitochondrial DNA in Forensic case work. in: Lincoln PJ, Thomson J, ed. *Forensic DNA profiling protocols*. 1st ed. New Jersey: Humana Press, 1988; 213-23.
26. Witting H, Augustin C, Baasner A, Bulnheim U, Dimo-Simonin N, Edelmann J, Hering S, Jung S, Lutz S, Michael M, Parson W, Poetsch M, Schneider PM, Weichhold G, Krause D: Mitochondrial DNA in the central European Human Identification with the help of the forensic mt-DNA Loop-Base Database. *Forensic Sci. Int*. 2000;113:113-18.
27. Bar W, Brinkmann B, Budowle B, Carrecado A, Gill P, Holland M, Lincoln PJ, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider PM, Tully G, Wilson M: DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Sci. Int*. 2000;110:79-85.
28. Hagelberg E. Mitochondrial DNA from ancient bones. in: Herrmann B, Hummel S. ed. *Ancient DNA*. Heidelberg: Springer-Verlag Inc, 1994; 195-204.
29. Roussalet F, Mangin P: Mitochondrial DNA polymorphism: a study of 50 French Caucasian individuals and application to forensic casework. *Int. J. Legal Med*. 1998; 111: 292-98.
30. Seo Y, Stradmann-Bellinghausen B, Rittner C, Takahama K, Schneider PM: Sequence polymorphism of mitochondrial DNA control region in Japanese. *Forensic Sci. Int*. 1998; 97 (2-3): 155-64.