Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Ulm
amtierender Leiter: Prof. Dr. med. Erich Miltner

Optimierung der DNA-Analyse für degradierte biologische Spuren

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Kathrin Verena Müller
geboren in Geislingen an der Steige

2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: PD Dr. Peter Wiegand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Möller

Tag der Promotion: 11. Dezember 2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung und theoretischer Teil…….....1
1.1 Einleitung…….....1
1.2 DNA-Degradation im Humanhaar…….....9
1.3 „alte“ DNA……..... 20
1.4 Optimierung des Extraktionsverfahrens……..... 26
1.5 Optimierung der Amplifikationsreaktion…….…….. 27
1.6 Autosomaler STR-Kit „Q8“…….. 35
1.7 Y-chromosomaler STR-Kit „Y13“..... 36
1.8 Fragestellung der Dissertation……..... 38
2 Material und Methoden……..40
2.1 Optimierung des Extraktionsverfahrens…… 40
2.2 Optimierung der Amplifikationsreaktion…….....45
2.3 Entwicklung des Multiplex-Kits Q8……..... 56
2.4 Entwicklung des Multiplex-Kits Y13…….…….60
3 Ergebnisse…… 64
3.1 Optimierung des Extraktionsverfahrens…… 64
3.2 Optimierung der Amplifikationsreaktion…….... 69
3.3 STR-Multiplex Q8……..... 79
3.4 STR-Multiplex Y13…… 85
4 Diskussion……...89
4.1 „altes“ Spurenmaterial……..89
4.2 PCR-Additive……...101
4.3 DNA-Polymerasen……..104
4.4 Optimierung der DNA-Isolation……109
4.5 kommerzielle und beliebte Extraktionsverfahren……...123
4.6 Typisierung von Haarschaft-DNA……125
4.7 STR-Multiplex Q8..... 131
4.8 STR-Multiplex Y13……..136
4.9 Schlussbetrachtung..... 139
5 Zusammenfassung…….……....142

6 Literaturverzeichnis……..144

7 Anhang……168

7.1 PCR-Additive und inhibitorische Substanzen……168

7.2 Charakteristiken der getesteten Polymerasen…….....176

7.3 Extraktionsprotokoll…….....180

7.4 verwendete Chemikalien und Lösungen……...….181

Danksagung……...183

Lebenslauf……..184

1. Eigene Publikationen.....185

2. Vorträge..... 186

3. Abstract und Poster.....187

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata – destilliertes Wasser
aDNA	ancient DNA – alte DNA
AS	Aminosäure
bp	basepair – Basenpaar, Größenangabe für Nukleinsäuren
BLOTTO	bovine lacto transfer optimizer
BSA	bovine serum albumine – Rinderserum-Albumin
C	Cytosin
Ca^{2+}	Kalziumion
CDTA	Cyclohexandiamintetraacetat – Cyclohexandiamintetraessigsäure
$dc^{7}GTP$	7-deaza-dGTP
dCTP	2´-Desoxycytidin 5´-triphosphat
ddNTP	2´,3´-Didesoxynukleosid 5´-triphosphat
dGMP	2´-Desoxyguanosin 5´-monophosphat
dGTP	2´-Desoxyguanosin 5´-triphosphat
dNMP	2´-Desoxynukleosid 5´-monophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid – Deoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxynukleosid 5´-Triphosphat – Desoxynukleotid
dsDNA	double-stranded DNA – doppelsträngige DNA
DTT	threo-1,4-Dimercapto-2,3-butandiol – Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraacetat – Ethylendiamintetraessigsäure
F	forward Primer
6-FAM	6-Carboxyfluorescein
FL	Fluorescein
G	Guanin
gp32	T4 gene 32 protein
GT	Gefriertemperatur
h	Stunde

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IgG	Immunoglobulin G
JOE	6-Carboxy-4´,5´-dichloro-2´,7´-dimethoxyfluorescein
KAP	keratin associated protein
kb	Kilobasenpaar
K_3PO_4	Kaliumphsphat
LCN	low copy number
LNA	locked nucleic acid
LPA	linear polyacrylamide
LS	Längenstandard
M	Molar
Mg^{2+}	Magnesiumion
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
mg, µg	Milligramm, Mikrogramm
MIC	minimum inhibitory concentration
min	Minute
ml, µl	Milliliter, Mikroliter
Mn^{2+}	Manganion
mM, µM, pM	millimolar, mikromolar, picomolar
mtDNA	mitochondriale DNA
NaAc	Natriumacetat
nuDNA	nuclear DNA – nukleäre DNA
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
PEP	primer-extension preamplification
PCR	polymerase chain reaction – Polymerase-Kettenreaktion
PD	power of discrimination - Diskriminationsindex
R	reverse Primer
ROX	Carboxy-X-rhodamin
rfu	relative fluorescence unit
rpm	rounds per minute – Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RV-PCR	reduced volume PCR
s	Sekunde

SAM	S-Adenosylmethionine
SDS	Sodiumdodecylsulfat
ssDNA	single-stranded DNA – einzelsträngige DNA
ssB	single-stranded DNA binding protein
STR	short tandem repeat
T	Thymin
Taq	*Thermus aquaticus*
TET	4,7,2´,7´-Tetrachloro-6-carboxyfluorescein
Tfl	*Thermus flavus*
T_M	melting temperature – Schmelztemperatur, Temperatur, bei der etwa 50% der DNA-Moleküle denaturiert sind
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
Tth	*Thermus thermophilus*
U	unit, Einheit für die biologische Aktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen einer gelösten Substanz pro Volumen einer Lösung

1 Einleitung und theoretischer Teil

1.1 Einleitung

1.1.1 degradierte und LCN-DNA

Die Suche und Sicherung von Spuren und Beweismitteln an Tatorten ist häufig der einzige und wichtigste Ansatzpunkt zur Aufklärung einer Straftat. Heutzutage werden an Tatorten vermehrt auch biologische Spuren abgenommen, die eine Herausforderung in der forensischen Spurenkunde darstellen. Zu diesen Spuren zählen unter anderem Spuren, die wenige kernhaltige Zellen aufweisen mit einer zum Teil beträchtlichen DNA-Degradation [8,22,35,48,62,115,149,168,205]. Die Degradation kann Folge eines naturgemäßen Abbauprozesses sein, wie er bei der Entwicklung einiger humaner Gewebe stattfindet, beispielsweise bei Haaren, Knochen und Hautzellen. Dieser programmierte Zelltod, Apoptose genannt, spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung eines multizellulären Organismus, in einigen Reaktionen des Immunsystems und in der Tumorgenese.

Haare, die mit einem Tatort oder mit einem Verbrechen in Verbindung gebracht werden, sind wichtige forensische Beweisstücke. Früher wurden die Haare morphologisch charakterisiert oder es wurde eine ABO-Typisierung durchgeführt [79,88,133,184]. Bei der mikroskopischen Untersuchung der Haare wird die Farbe, Größe, Verteilung und das Muster der Pigmentgranula innerhalb der Cortexzellen, das Aussehen der Medulla, der Durchmesser und der physikalische Zustand des Haarschaftes sowie die Anzeichen einer chemischen Behandlung beschrieben. Zudem spielt die dreidimensionale Konfiguration, die Gesamtlänge und Struktur des Haares, sowie die Existenz von Spurenmaterial, das möglicherweise am Haarschaft haftet, eine wichtige Rolle [156]. Für die individuelle Identifikation reicht die mikroskopische Untersuchungsmethode jedoch nicht aus, da bereits intra-individuelle Unterschiede in der Haarmorphologie existieren [67,156]. Obwohl die morphologischen Unterschiede zwischen den Individuen in der Regel größer sind als die intra-individuellen Unterschiede, ist es dennoch schwierig, Haare von zwei verschiedenen Individuen morphologisch sicher zu unterscheiden. Daher besteht,

nicht nur bei der Haaranalyse, die Notwendigkeit der genetischen Short Tandem Repeat (STR)-Analyse mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Kapillarelektrophorese.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Haaranalyse stellt neben der DNA-Degradation die Möglichkeit einer chemischen Haarbehandlung dar. Permanent gefärbte Haare zeigen unter dem Elektronenmikroskop eine geschädigte Kutikula (siehe Abb. 8). Vermutlich gestaltet sich die STR-Typisierung gefärbter Haare daher schwierig, da die Färbemittel ebenso die DNA-Moleküle im Haar angreifen und andere chemische Reaktionen hervorrufen, deren Produkte die Haaranalyse erschweren. Sowohl der Aufbau als auch die Entwicklung des Haares und die daraus resultierende DNA-Degradation sowie die Mechanismen der Haarfärbung sind in Abschnitt 1.2 näher beschrieben.

DNA-Modifikationen finden täglich in lebenden Zellen statt, werden aber durch spezielle Reparatursysteme rasch wieder korrigiert [33,55,106]. In totem Gewebe findet keine Korrektur mehr statt, DNA-Modifikationen häufen sich und führen zu einer erschwerten STR-Analyse. Spurenmaterial, das längere Zeit im Freien gelagert und der Witterung ausgesetzt war, zeigen häufig eine besonders hohe DNA-Degeneration. Bakterielle, biochemische und oxidative Prozesse, begünstigt durch Wärme, Feuchtigkeit sowie einige chemische Bestandteile des Bodens tragen in erheblichem Maße zur DNA-Degradation bei (siehe Abschnitt 1.3).

1.1.2 inhibitorische Substanzen

Nicht nur degradierte und/oder low copy number (LCN)-DNA bereiten Schwierigkeiten in der Spurenanalyse und Dateninterpretation, sondern auch intrinsische und extrinsische Substanzen können u.a. auf die Amplifikationsreaktion störend wirken. Eine Schwierigkeit in der Spurenanalyse liegt in der zum Teil beträchtlichen Verunreinigung des Untersuchungsmaterials. Die verunreinigende Substanz kann die DNA-Extraktion und/oder PCR beeinträchtigen. Huminstoffe im Boden beispielsweise, aber auch Farbstoffe in Textilien zählen zu diesen inhibitorischen Substanzen [89]. Huminstoffe, ein Gemisch von komplexen Polyphenolen, werden während der Dekomposition von organischer Materie produziert und inhibieren die PCR bei Konzentrationen von

0,1 ng/µl [100]. Huminstoffe sind allgegenwärtig im Boden, aber auch im Wasser, und können jegliches Material kontaminieren, das der Umwelt ausgesetzt ist [179]. Chemische Verbindungen, die natürliche Bestandteile des Spurenmaterials sind, wie beispielsweise das Haarpigment Melanin [6,57,65,113,114,133,142,144,184, 199,200,203,204], Melanin und Myoglobin im Gewebe [21,166,199], Hämoglobin und seine Derivate, aber auch Immunoglobulin G (IgG), anti-Gerinnungsfaktoren und Lactoferrin im Blut [63,151,199] können die Spurenanalyse zusätzlich beeinträchtigen oder komplett inhibieren. Kotproben lassen sich aufgrund der vorhandenen Abbauprodukte des Hämoglobins, beispielsweise Bilirubin, Gallensalze und Häm, sowie der komplexen Polysacchariden schwer typisieren [1,2,3,100,120,199]. Neben Blut und Kot können weitere Körperflüssigkeiten wie Harn, Schleim und Sperma die für die PCR notwendige DNA-Polymerase inhibieren [136]. Weitere PCR-Inhibitoren beschreibt Wilson, unter anderem Kollagen in Nahrungsmitteln, Polysaccharide in Pflanzen, Proteinasen und Kalziumionen in der Milch [199].

1.1.3 Prä-PCR-Methoden

Häufig werden Prä-PCR-Methoden eingeführt, um den Effekt der inhibitorischen Substanzen auszulöschen bzw. zu reduzieren [147]. Die Prä-PCR-Verfahren bestehen aus allen Vorgehensweisen, die vor der Detektion der PCR-Produkte stattfinden, wie Optimierung der Probenabnahme, der Probenverarbeitung und der DNA-Amplifikation. Dieser breit gefächerte Optimierungsschritt deutet auf die diversen Einwirkungsweisen der verschiedenen inhibitorischen Substanzen hin. Die inhibitorischen Mechanismen können grob unterteilt werden in (1) Inaktivierung der thermostabilen DNA-Polymerase, (2) Degradation oder Abfangen von Nukleinsäuren, (3) Störung der Zelllyse [199]. Ein Inhibitor kann jedoch mehr als einen inhibitorischen Mechanismus aufweisen und sowohl auf physikalischem als auch chemischem und enzymatischem Wege eine Inhibition hervorrufen. Obwohl viele biologische Spuren bekannt dafür sind, dass sie inhibitorische Substanzen enthalten, die die Spurenanalyse beeinträchtigen, bleiben die Identitäten und biochemischen Mechanismen vieler Inhibitoren unklar. Eine Grundvoraussetzung für die Entwicklung einer effizienten Probenaufarbeitung ist

die Identifizierung der inhibitorischen Substanzen und ihre Wirkungsmechanismen. Ist der Inhibitor und seine Wirkungsweise bekannt, kann gezielt eine Strategie gewählt werden, um den inhibitorischen Effekt aufzuheben bzw. zu mildern. In der weiteren Entwicklung wird ein schnelles, robustes, anwenderfreundliches Prä-PCR-Verfahren verlangt. Dies scheint jedoch aufgrund der großen Zahl an unterschiedlichen inhibitorischen Substanzen nicht durchführbar.

Eine optimierte DNA-Isolierung ist eine Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche STR-Typisierung [132]. Eine Optimierung der Probenaufbereitung bedeutet, entfernen von inhibitorischen Substanzen, die eine Störung der Zelllyse oder eine Reduktion der Amplifikationseffizienz verursachen, indem sie das Amplifikationsvermögen der DNA-Polymerase minimieren oder Reaktionskomponenten abfangen, erhöhen der Konzentration der Template-DNA, herstellen einer homogenen Probe für die Amplifikation, um die Reproduzierbarkeit zu sichern [147,199]. Kurzum, Ziel ist es, den höchsten Ertrag, die höchste Konzentration und Reinheit der DNA zu erhalten (siehe Abschnitt 1.4). Die meisten Aufarbeitungsverfahren sind zeit-, arbeitsaufwendig und teuer und liefern oft nicht die gewünschte Template-Qualität und -Quantität, da die verschiedenen biochemischen, immunologischen, physikalischen und physiologischen Verfahren unterschiedlich auf die PCR-Analyse wirken.

Häufig können während der DNA-Isolation trotz aufwendiger Aufreinigungsverfahren die inhibitorischen Substanzen nicht immer vollständig entfernt werden ohne mit einem damit verbundenen zu großen DNA-Verlust, so dass bei der Analyse von Spuren mit geringer DNA-Quantität weitere PCR-Modifikationen eingeführt werden müssen, um die inhibitorische Wirkung intrinsischer oder extrinsischer Substanzen abschwächen zu können (siehe Abschnitt 1.5).
Stören die inhibitorischen Substanzen die PCR, dürfte bei der Detektion der PCR-Produkte ein Signalverlust primär für die längeren PCR-Produkte beobachtet werden [49]. Das Ergebnis kann dem von Proben mit degradierter DNA ähnlich sehen. Daher kann gegebenenfalls schwer unterschieden werden, ob das Fehlen der längeren STR-Produkte auf degradierte DNA oder auf Vorhandensein von inhibitorischen Substanzen zurückzuführen ist. Eine interne Amplifikationskontrolle

sollte eingeführt werden, um die Präsenz inhibitorischer Substanzen nachweisen und so auch falsch negative Amplifikationsergebnisse identifizieren zu können. Der inhibitorische Effekt kann ermittelt werden, indem zum einen die Konzentration der PCR-Komponente erhöht wird, die möglicherweise von der Inhibition betroffen ist [199]. Eine Amplifikationssteigerung nach Erhöhung der Konzentration bestätigt den inhibitorischen Einfluss auf die PCR-Komponente. Zum anderen können verschiedene Konzentrationen der Probe in die PCR eingesetzt werden, um die Stärke der inhibitorischen Substanz bewerten zu können.

Das Testen und Einsetzen verschiedener Polymerasen, die auf verschiedene Inhibitoren unterschiedlich sensibel reagieren, führt ebenso zu einer gesteigerten Amplifikationsleistung. Es wurde sogar berichtet, dass dieselbe *Taq* DNA-Polymerase (Enzym aus *Thermus aquaticus*) von verschiedenen Herstellern in unterschiedlichem Maße von Huminsäuren aus Bodenproben inhibiert wurde [199]. Die verschiedenen Polymerasen benötigen für ihre vollständige Aktivität einen unterschiedlich chemisch zusammengesetzten Reaktionsmix. Ist der PCR-Ansatz auf die Polymerase nicht richtig eingestellt oder sind die Reaktionsbedingungen ungünstig, kann eine Reduktion der Amplifikationsleistung erwartet werden, auch wenn genügend DNA in guter Qualität und keine PCR-Inhibitoren vorliegen. Die hoch spezifische Aktivität, Genauigkeit und Temperaturspanne der thermostabilen *Taq* DNA-Polymerase macht sie zu dem am meist gebrauchten Enzym für die PCR. Die thermostabilen DNA-Polymerasen von *Thermus aquaticus* binden an kurze doppelsträngige DNA (dsDNA)-Fragmente ohne Sequenzspezifität. Da das Enzym vermutlich das Hauptziel PCR-inhibitorischer Substanzen ist und die Schlüsselkomponente in der Amplifikationsreaktion darstellt, wirkt sich jeder Faktor, der die enzymatische Aktivität aufgrund Degradation, Denaturierung, Aktivitätsreduktion stört, auf das Amplifikationsvermögen aus [147]. Höhere *Taq* DNA-Polymerase-Konzentrationen als 1-2 U im Reaktionsgemisch dürfte die Synthese von unspezifischen Produkten verursachen. Wenn sich jedoch inhibitorische Substanzen im Reaktionsansatz befinden, d.h. wenn das DNA-Template nicht hoch aufgereinigt ist und beispielsweise noch Spuren von Salzen, Guanidin, Proteasen, organischen Lösungsmitteln oder SDS enthält, sind höhere Mengen an *Taq* DNA-Polymerase (2-3 U) nötig, um einen besseren Ertrag an Amplifikationsprodukten zu erhalten.

Die Wirkung der Inhibitoren kann bekanntlich ebenso durch Zugabe von PCR-Additiven in das Reaktionsgemisch kompensiert werden. PCR-Modifikationen müssen ferner für Templates mit hohen Schmelztemperatur (T_M)-Werten aufgrund eines hohen Guanin- und Cytosin- (GC)-Gehalts oder für Templates mit Sekundärstrukturen und langen Templates über 20 kb eingeführt werden. PCR-Additive können auf die Amplifikation auf vielerlei Weise einwirken, durch Erhöhung oder Erniedrigung der thermischen Stabilität des DNA-Templates, Einwirken auf die Fehlerrate der DNA-Polymerase, Einwirken auf die Spezifität des Systems, Reduzierung der Amplifikationsinhibition. Die PCR-Additive können grob in fünf Gruppen eingeteilt werden [147]: (1) Proteine wie Rinderserum-Albumin (BSA) und T4 gene 32 protein (gp32), (2) organische Lösungsmittel wie Dimethylsulfoxid (DMSO) und Formamid, (3) nicht-ionische Detergenzien wie Tween 20 und Triton X, (4) biologisch kompatibel gelöste Stoffe wie Betain und Glycerol, (5) Polymere wie Polyethylenglykol (PEG) und Dextran. Die Wirkungsweisen der PCR-Additiven sind im Anhang 7.1 (Tab. 21 und 22) beschrieben.

GC-reiche Templates haben eine relativ hohe T_M. Daher erfolgt bei der PCR eine nicht gleichförmige Denaturierung und Annealen der Primer, wenn die Templates einen unterschiedlichen GC-Gehalt haben. Die Primer für die GC-reichen Fragmente binden zum Teil unspezifisch, so dass Extraprodukte generiert werden. Eine Erhöhung der Temperatur führt zu keiner Verbesserung, da die unterschiedlichen T_M der Templates weiter existieren. Einige Additive wie DMSO oder Glycerol reduzieren die Bildung intramolekularer Wasserstoffbrücken in dsDNA, indem sie an der Bildung dieser Bindungen beteiligt sind. Die Adenin- und Thymin- (AT)-Basenpaare werden stabilisiert, die Stabilität der GC-Basenpaare gesunken. Dadurch werden die T_M Werte reguliert [97]. Eine Manipulation der Stabilität von Basensequenzen ist jedoch nur mit einer wässrigen Lösung möglich, in der die verschiedenen Stabilitäten der AT- und GC-Basenpaare geändert werden können mit geringster Störung der anderen Eigenschaften der nativen DNA-Helix [116].

1.1.4 STR-Multiplex-Kits mit verkürzten Amplikons

Die Zahl der Spuren mit degradierter und LCN-DNA, die an Tatorten abgenommen werden, nimmt stetig zu. Diese Spuren sind aufgrund der geringen Sensitivität und recht langen PCR-Produkten mit kommerziellen Kits schwer zu analysieren. Aufgrund der zum Teil beträchtlichen DNA-Degradation können die Primerbindestellen auf den DNA-Bruchstücken fehlen, so dass in dem Fall kein Produkt entsteht. Eine Reduktion der Amplikonlängen ist von großem Interesse für Spuren mit degradierter DNA (siehe Abschnitt 1.6 und 1.7) [8,10,11,35,47,49,72,75,101, 115,137,195,197].

Die störende Wirkung von PCR-Inhibitoren, die während der DNA-Isolation nicht abgetrennt werden können, wird ebenso durch eine Reduktion der PCR-Produkte verringert. Viel wurde bis heute berichtet über die falsch positiven Typisierungsergebnisse infolge Kontamination, wenig jedoch über die falsch negativen Ergebnisse infolge Inhibition. Eine Coamplifikation mit einer internen Positivkontrolle erkennt eine PCR-Inhibition und ermöglicht den Ausschluss falsch negativer Ergebnisse [50]. Parallel positive Kontrollen sind nicht so sicher wie coamplifizierte Kontrollen, bei der ein Bereich innerhalb der Primerbindestellen durch eine andere Sequenz ersetzt wird. Aufgrund anschließender Hybridisierung dieser Sequenz ist es möglich zu bestimmen, ob die PCR aufgrund inhibitorischer Substanzen falsch negativ ausfiel. Bei den parallel positiven Kontrollen wird exogene DNA zum PCR-Ansatz hinzugefügt. Das Problem dabei ist, dass bei einem Übermaß an exogener DNA zur Template-DNA trotz Inhibition die Kontrolle keine Inhibition anzeigt und das Ergebnis fälschlicherweise falsch negativ ausfällt.

Neben der Reduktion der Amplikonlängen ist die Sensitivität des Multiplex-Kits entscheidend für eine erfolgreiche Typisierung. Die Sensitivität wird nicht nur durch die Fluoreszenzfarbstoffe beeinflusst, sondern auch durch die Primerbinderegionen selbst.

Neben einer möglichst hohen Sensitivität soll die Aussagekraft (Differenzierungschance) bei der Verwendung neuer STR-Multiplex-Systeme hoch liegen. Daher muß die Heterozygotenrate, die möglichst hoch sein sollte, und der Diskriminationsindex der STR-Systeme überprüft werden. Der Diskriminationsindex (power of discrimination, PD) gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der zwei zufällig aus einer Population ausgewählte Individuen verschiedene

Genotypen aufweisen [13]. Je höher der Diskriminationswert eines Systems ist, desto besser ist dieses System zur Unterscheidung von zwei verschiedenen Individuen geeignet. Der Diskriminationsindex liegt üblicherweise im Bereich von 0,8 bis 0,99.

Die Untersuchung mitochondrialer DNA (mtDNA) von Spuren mit wenig und hoch degradierter DNA zeigt eine höhere Erfolgsrate verglichen zur Untersuchung nukleärer DNA (nuDNA), da mehrere tausend Kopien der mtDNA in einer einzelnen Zellen vorkommen [149]. Während der Keratinisierung des Haares erfolgt eine Apoptose der präcorticalen Zellen. Die Apoptose betrifft in erster Linie nuDNA, mtDNA dagegen liegt in den Zellen aufgrund der doppelten Mitochondrienmembran und der ringförmigen Struktur geschützter vor, so dass eine mtDNA-Typisierung der Haarschäfte eine größere Erfolgsrate mit sich bringen würde als die nuDNA-Typisierung [66]. Daher lassen sich auch Haare, insbesondere Haarschäfte verlässlicher mit mtDNA-Typisierung analysieren [6,13,35,66,78,79,88,101,133,142,156,200]. Eine größere Mitochondrienzahl als im Haar ist nur noch im Knochenmark zu finden [140] und/oder in den Epithelzellen des Darms [67], da während der Entwicklung der Matrixzellen im Haar eine hohe mitochondrielle Aktivität benötigt wird und somit eine große Anzahl an Mitochondrien vorhanden sein muß [67,156]. Roberts et al berichten, dass jede produktive Matrixzelle etwa 1000 mtDNA-Moleküle enthält. Dennoch, mtDNA ist weitaus weniger polymorph als STRs der nuDNA. Des Weiteren können die Ergebnisse nicht mit der Deutschen DNA-Datenbank verglichen werden. Ein Vergleich kann nur erfolgen, wenn es einen Verdächtigen gibt. Daher ist die Entwicklung neuer sensitiver STR-Konzepte mit reduzierten Amplikonlängen forensisch relevant, die geeignet sind für die Typisierung verunreinigter Spuren mit degradierter und LCN-DNA. Durch die Verwendung dieser STR-Konzepte entfällt das Problem der geringen Polymorphie und des Fehlens einer existierenden Datenbank. Zudem ist eine mtDNA-Untersuchung arbeitsaufwendig und teuer [49]. Ein weiteres Problem bei der Haaranalyse mittels mtDNA-Typisierung stellt die Heteroplasmie bzw. der somatische Mosaizismus dar [13,88,101,140]. Grund dafür ist ein Engpass in der Anzahl der mtDNA Moleküle und der gleichzeitigen hohen Rate an Zellteilungen in den Haar-formenden Zellen [69]. Dies erklärt das höhere Auftreten von Heteroplasmie in Haaren als in anderen Geweben. Bei der Untersuchung der Haare einer Person konnte in 30% bzw. in 42% der Haare

mutante mtDNA-Sequenzen (Punktmutation) nachgewiesen werden, auch wenn homoplasmatische mtDNA-Sequenzen im Blut beobachtet wurden [13,101]. Ein Auftreten von bis zu sechs verschiedenen mtDNA-Sequenzen in Haaren einer Person wurde beobachtet [101].

1.2 DNA-Degradation im Humanhaar

1.2.1 Aufbau des Haares

Die menschliche Kopfhaut besitzt durchschnittlich 100 000 bis 150 000 Haarfollikel in drei Entwicklungsstadien [140,156]. Haare bestehen aus einer äußeren **Kutikula**, dem **Cortex** und der zentralen **Medulla** (Abb. 1 und 2) [101,113,155]. Die Hauptstrukturproteine des menschlichen Haares sind die Keratine. Keratin besteht aus verschiedenen Aminosäuren (AS). Die AS Cystein bildet Disulfidbrücken untereinander aus, die für die mechanische Stabilität des Haares verantwortlich sind. Keratin ist ein fibrilläres Protein und ist in Wasser und Salzlösungen praktisch unlöslich. Aminosäureketten bilden eine rechtsgängige α-Helix, je drei dieser Helices bilden eine linksgängige Superhelix (Protofibrille). Elf Protofibrillen vereinigen sich zu einer Mikrofibrille, die sich wiederum zu Bündeln vereinigen (Makrofibrillen), die die Zellen des Haares umgeben (Abb. 2). Robbins beschreibt ausführlich die chemische Zusammensetzung des Haares [155]. Die **Medulla** (Haarmark) besteht hauptsächlich aus luftgefüllten Zellen und ist besonders reich an Proteinen und Lipiden. Reste abgebauter Kerne und Mitochondrien sind vorhanden [101]. Der **Cortex** (Rinde), der etwa 80% des Haares ausmacht, besteht aus vielen keratinisierten Faserbündeln und Resten abgebauter Kerne und Organellen. Das Keratin wird im Cortex durch am Keratin gebundene Proteine (KAP = keratin associated proteins) zusammengehalten [113]. Das natürliche Haarpigment, das Melanin, ist im Cortex gelagert und weniger in der Medulla. Es haftet über Polypeptidreste am Keratin.

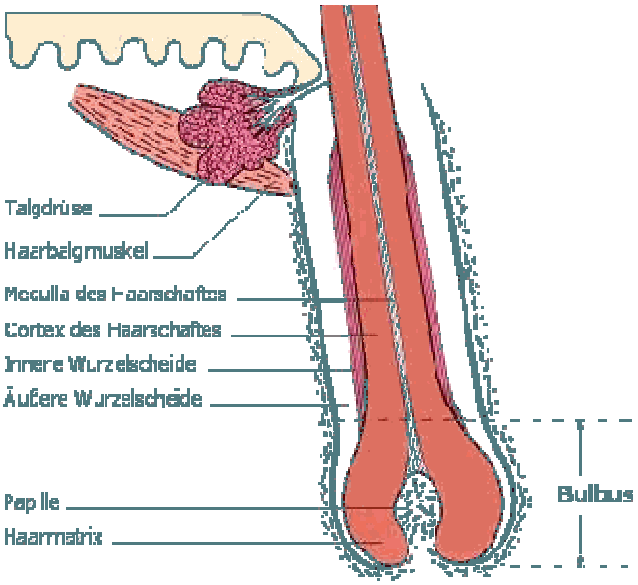


Abb. 1 Aufbau des Haares

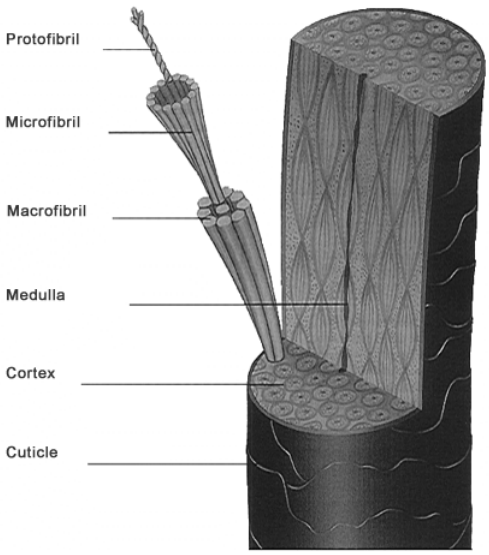


Abb. 2 Zusammensetzung des Haarschafts

Die **Kutikula** (Schuppenschicht) besteht aus mehreren Lagen keratinisierter Schuppen, ähnlich überlappender Dachziegeln, dessen freie Enden zum distalen Ende des Haares hin orientiert sind. Die Kutikula enthält weder Zellkerne, Mitochondrien noch Haarpigmente [101,155]. Das Melanin schützt das Haar nicht mit der Relevanz gegen UV-Strahlung wie die Pigmente der Hautzellen. Ein geringfügiger fotochemischer Schutz der Haarproteine, vor allem im kurzwelligen Bereich (254 bis 350 nm) dürfte gegeben sein [155]. Haarpigmente schaffen einen Schutz, indem sie die Strahlung absorbieren, filtern und anschließend die Energie in Wärme umwandeln. Aufgrund dieses Prozesses wird das Melanin degradiert bzw. gebleicht. Produziert wird das Melanin in speziellen Organellen der Melanozyten, den Melanosomen, und gelangt über „dendritische“ Fortsätze in die keratinisierten Zellen/Keratinozyten [57,156]. Vollständig ausdifferenzierte Melanozyten sind hauptsächlich im Haarbulbus zu finden. Die Melanogenese ist eine komplexe Synthese, bei dem viele Gene beteiligt sind [83,84,134]. Präcorticale Zellen nehmen vermutlich Mitochondrien und Melanosomen aus den dendritischen Fortsätzen auf, wenn sie von der Wurzel zum Haarschaft wandern, und differenzieren in diesem Prozess zu Cortexzellen [156]. Die Cortexzellen beginnen gleich danach mit der Synthese des Keratins, wofür Mitochondrien benötigt werden.

Das Melanin der Säuger wird unterteilt in Eumelanin und Phaeomelanin [155]. Eumelanin, ein Polyanion, findet man hauptsächlich im braunen, schwarzen Haar.

Es führt zu einer stärkeren Lichtschwächung als die Pheomelanine, und ist unlöslich in sauren und alkalischen Lösungen. Phaeomelanin, ein Dipolarion, ist das Haarpigment blonder und roter Haare und ist nur löslich in alkalischen Lösungen. Die Haarfarbe ist außerdem abhängig von der Anordnung/Verteilung, Menge, Größe, Form und Dichte des Melanins so wie von dem Auftreten von Vakuolen in der Medulla und von der Haardicke [101,142]. Darüber hinaus kann die Haarfarbe bei hormonellen, ernährungsbezogenen und Stoffwechsel-Störungen variieren [134]. Der hormonelle Einfluss auf die Haarentwicklung darf dabei nicht unterschätzt werden [150]. Androgene sind für den Bartwuchs in der Pubertät verantwortlich und für den Rückgang des Haarwachstums auf der Kopfhaut im Alter. Blondes und rotes Haar enthält viel Phaeomelanin und wenig Eumelanin, schwarzes Haar vice versa. Verschiedene Mischungen dieser beiden Pigmente existieren im Haar mit unterschiedlichen Farbtönen. Eine visuelle Einschätzung des Melaningesamtgehalts ist nicht möglich [142]. Sonnenlicht und andere Umwelteinflüsse sowie das in permanenten Färbemitteln vorhandene Hydrogenperoxid verursachen eine Degradation des Melanins, mit der Folge, dass es wasserlöslich wird. Dieser Vorgang verhindert die Abtrennung des Melanins von der DNA während der Extraktion und das Haarpigment wird zusammen mit der DNA isoliert. In grauen oder weißen Haaren ist die Melaninproduktion in der Wurzel beendet. Das Ergrauen der Haare ist ein irreversibler Prozess, gelegentlich wird aber ein Wiederauftreten der Pigmente beobachtet [134]. Das Ergrauen ist im Wesentlichen erblich bedingt, es spielen aber auch noch andere Faktoren eine Rolle. Es wird angenommen, dass aufgrund eines Verlustes einiger natürlicher Schutzmechanismen die Melanozyten in den Haarfollikeln zerstört werden. Zwischenprodukte der Melanogenese scheinen eine zytotoxische Aktivität zu haben [134]. Ein Verlust der Haarpigmentation ist ebenso ein allgemein bekanntes postmortem Phänomen, bei dem die Haarpigmente mit der Zeit abgebaut werden [6].

Menschenhaare können von Tierhaaren durch die Breite des Markstranges unterschieden werden. Bei Menschenhaaren beträgt sie etwa $^{1}/_{5}$ bis ¼, bei Tierhaaren ½ bis ⅔ der Haarbreite. Ebenso Tierhaare von verschiedenen Arten, beispielsweise Hund und Katze, können voneinander unterschieden werden [164].

1.2.2 Entwicklung des Haares

Die telogene Haarwurzel ist Teil der letzten Entwicklungsphase, die jedes Haar durchläuft. Die meisten Haare, die an Tatorten gefunden werden, befinden sich in dieser letzten Phase [6,13,75,79,88,113,101,114,140,200]. Das Haarwachstum kann in drei Entwicklungsphasen, die **anagene**, **katagene** und **telogene** Phase, eingeteilt werden (Abb. 3) [64,101,140,150,155,156].

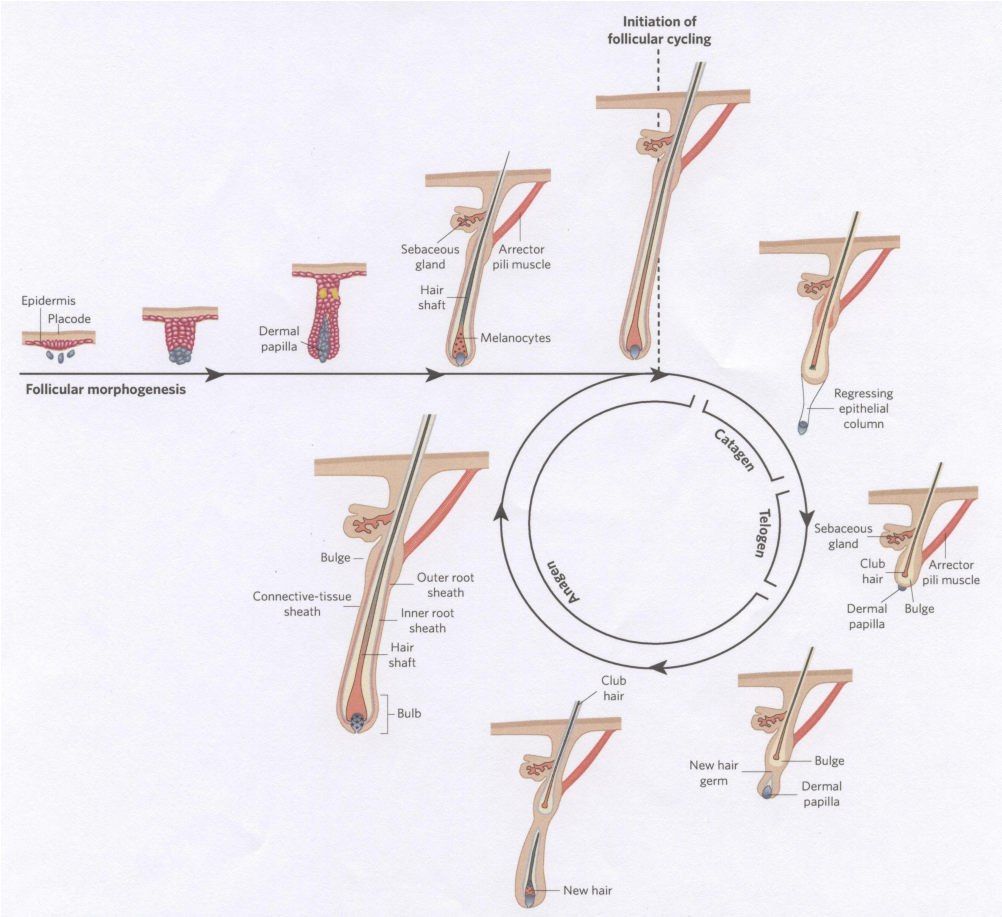


Abb. 3 Entwicklungsphasen des Haares [64]

In der **anagenen** Phase (Wachstumsphase) ist die Haarwurzel fest mit der Haarpapille verbunden und wird mit Nährstoffen versorgt. Matrixzellen, die sich am Grunde des Haarfollikels befinden, d.h. im Haarbulbus, teilen sich permanent und formen neue Haarsubstanz. Etwa 75-95% aller Haarfollikel in der menschlichen Haut befinden sich beim gesunden Haarwachstum in der anagenen Phase [113]. Die Telogenfollikel machen etwa 10-20%, die Katagenfollikel etwa 0-3% der Kopfbehaarung aus [101]. Das Verhältnis von Anagen- zu Telogenfollikeln kann

sich im pathologischen Fall (Krankheit, Mangelernährung, Drogenmissbrauch) umkehren. Das Haar bekommt seine Festigkeit durch den hohen Gehalt an Keratin. Während des Keratinisierungsprozesses, der bereits im Haarfollikel beginnt, findet ein programmierter Zelltod statt. Der Verlust des Zytoplasmas präcorticaler Zellen, Zerstörung von Organellen und Dehydrierung sind charakteristisch für diese Apoptose, so dass im Haarschaft nur noch abgebaute Kerne gefunden werden können (Abb. 4). Man erkennt im Haarschaft eine deutliche Degeneration der Zellkerne und eine Zunahme des fibrillären Keratins von proximal nach distal. Die Pigmentgranula, die in den wurzelnahen Melanosomen gebildet werden, sind im Haarschaft zwischen den Keratinfasern gelagert.

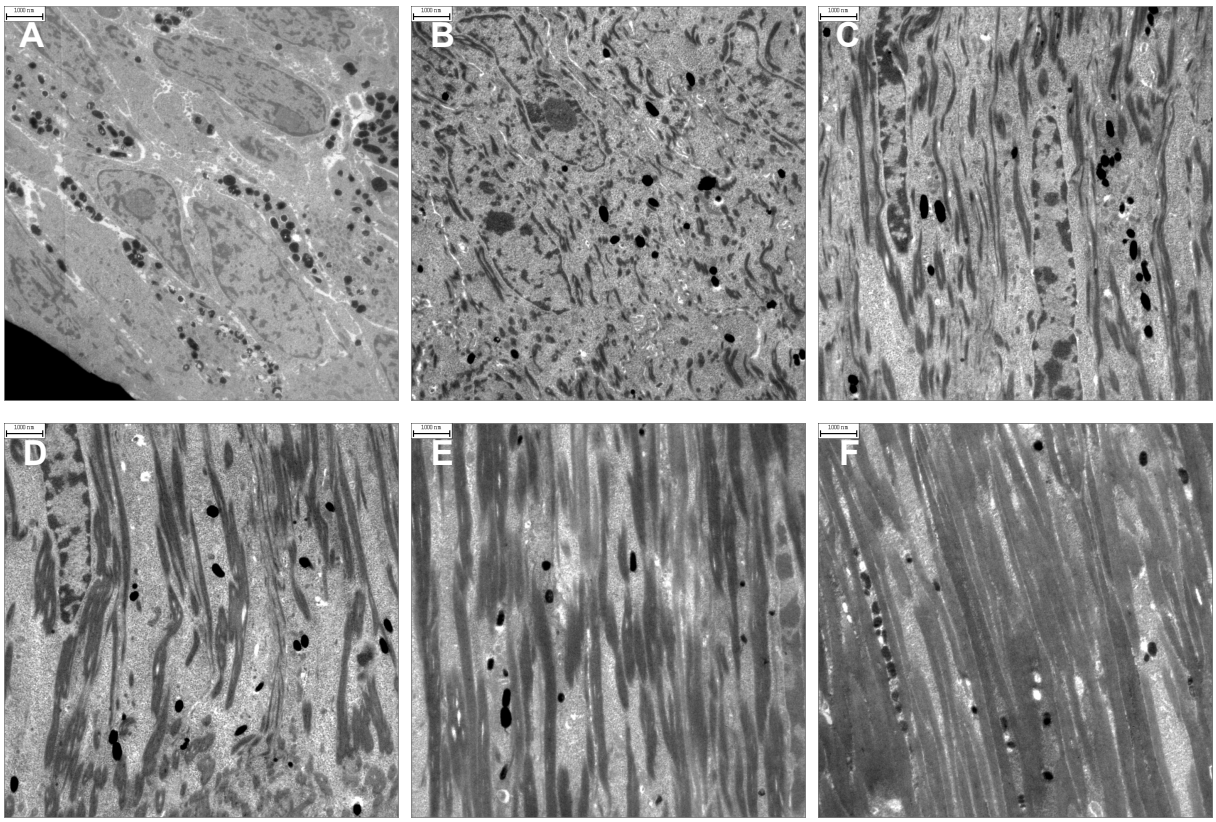


Abb. 4 A-F elektronenmikroskopische Aufnahmen des Haarschaftes von proximal nach distal.

Die anagene Phase dauert bei Kopfhaaren etwa 3-6 Jahre, bei Schamhaaren 1-1,5 Jahre. In der folgenden **katagenen** Phase (Übergangsphase) wechselt das Haar von der aktiven Phase in die Ruhephase, die Mitoseaktivität in den Matrixzellen wird beendet. Das Haar wird nicht mehr mit Nährstoffen versorgt und das Haarwachstum ist gestoppt. Die Zellen des Bindegewebes lösen sich auf und

werden teilweise wieder resorbiert. Diese Übergangsphase dauert etwas 3-4 Wochen. In der **telogenen** Phase (Ruhephase) verliert die Haarwurzel ihren Bulbus und keratinisiert vollständig, das bedeutet Apoptose findet auch hier statt. Der Keratinisierungsprozess verursacht einen Verlust an nuDNA, da spezifische Deoxyribonukleasen an den Verbindungsstellen zwischen den Nukleosomen den Doppelstrang spalten [113,114]. Aufgrund dieser Nuklease-Aktivität entstehen < 200 Basenpaare (bp) DNA-Fragmente, die um Histon-Proteine gewickelt sind und die die obere Grenze der Amplikonlängen nach der Amplifikation von DNA aus keratinisiertem Haar darstellen. Die Haarwurzel zieht sich zu Beginn der telogenen Phase zurück und das Haar fällt nach etwa 3-4 Monaten bei Kopfhaaren und 1-1,5 Jahren bei Schamhaaren aus. Prinzipiell hängt die Länge der Telogenphase von der Körperregion und vom Alter des Menschen ab. Ein neues Haar wird anschließend im Haarfollikel gebildet. 70 bis 150 telogene Kopfhaare werden gewöhnlich pro Tag verloren. Gerade diese telogenen Haare werden vorwiegend an Tatorten gefunden. Ausgerissene Haare befinden sich gewöhnlich in der anagenen Phase und haben normalerweise follikuläres Material an ihrer Wurzeloberfläche haften (Abb. 5 und 6).

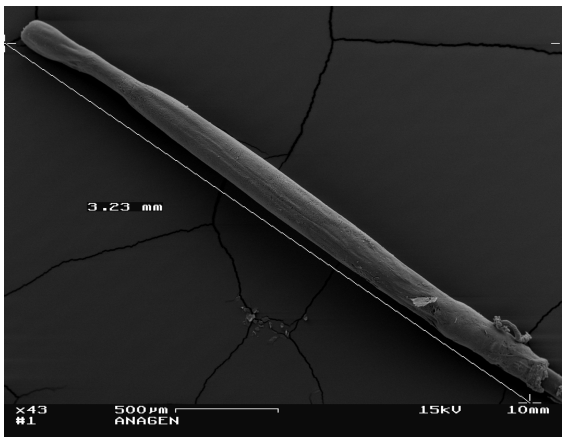


Abb. 5 elektronenmikroskopische Aufnahme einer anagenen Wurzel

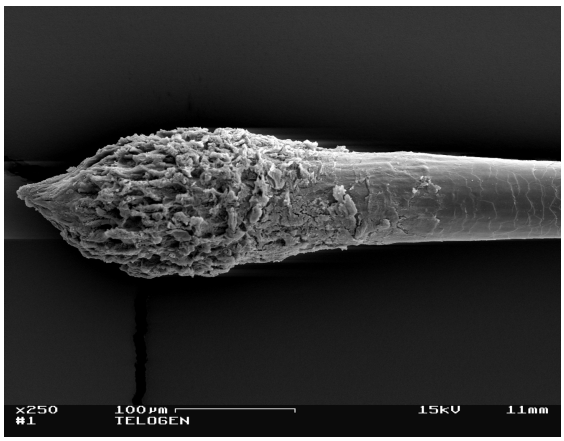


Abb. 6 elektronenmikroskopische Aufnahme einer telogenen Wurzel

Während genügend DNA von anagenen Haarwurzeln isoliert werden kann, ist es bedeutend schwieriger DNA von Haaren mit telogener Wurzel zu isolieren, da hauptsächlich nur noch pyknotische Kerne mit teilweise hochdegradierter DNA vorhanden sind [22]. Als Pyknose wird die Schrumpfung des Zellkerns bezeichnet mit verstärkter Färbbarkeit des Chromatins. Im Haarschaft selbst befindet sich nur

eine äußerst geringe Menge degradierte DNA, nicht nur wegen Apoptose, sondern auch wegen chemischen und durch Sonnenlicht (UV-Strahlung) verursachten Oxidationsprozessen. Sonnenlicht und ultraviolettes Licht greifen das Haarpigment und die Haarproteine an [155]. Das macht die Analyse der Haarschäfte äußerst schwierig [79,101,133,184,200].

Die Lokalisation der genomischen DNA im Haarschaft ist nicht klar [113]. Kernhaltige Zellen im Haarschaft sind in geringer Menge in der Medulla zu finden [19]. Kernhaltige Zellen in der Kutikula und im Cortex sind eher selten.

Haare sind im Vergleich zu anderem Spurenmaterial wegen den chemischen Eigenschaften der Kutikula relativ resistent gegen Degradation [6,43,66,67]. Das Keratin schirmt die DNA vor freiem Wasser ab, Voraussetzung der hydrolytischen Deaminierung. Im Gegensatz zum porösen Knochen wird DNA im Haar vor Bakterien geschützt. Möglicherweise verhindern zudem die Keratinozyten im Haarschaft die vollständige Zell-Autolyse, andere Moleküle im Haarschaft, beispielsweise Melanin, dürften Schutz liefern. Die Aufbewahrung der Haare bei Raumtemperatur (RT) anstelle Gefriertemperatur (GT) bringt keine/kaum Nachteile. Trotzdem erfolgt mit der Zeit eine Biodegradation. Umweltfaktoren wie Sonnenlicht, Luftverschmutzung, Wind, aber auch Shampoonieren, Bürsten der Haare verursachen histologische Veränderungen in der Haarkutikula und im Cortex [43,155]. Es entstehen Spalten in der Kutikula, die sich bis in den Cortex ziehen. Melaningranula können auf der Haaroberfläche entdeckt werden. Nach einigen Jahren nach dem Ausfall des Haares bzw. nach dem Tod des Haarträgers haben sich die Schuppen der Kutikula komplett abgelöst und Poren reichen bis in die Medulla. Häufig sind Pilze die Hauptzersetzer. Die Räume zwischen den Makrofibrillen im Cortex werden stets größer und nach etwa 25 Jahren existiert nur noch der äußere Cortex, der innere Cortex und die Medulla sind verschwunden. Die Präsenz von hydrophilen AS im inneren Cortex und in der Medulla erleichtert die Wasseradsorption und beschleunigt die Haardegradation und damit implizierten DNA-Degeneration.

1.2.3 Mechanismen der Haarfärbung

Es gibt drei Arten an Haarfärbemethoden [155,185,207,208]. Die **temporären** Haarfärbemittel enthalten künstliche Farbmoleküle von ziemlich hoher relativer Molmasse, welche sich an die Haaroberfläche anlagern. Sie haben zum Keratin eine schwache Affinität und werden recht schnell bei der Haarwäsche wieder abgewaschen. Die Analyse temporär gefärbter Haare gestaltet sich daher nicht schwieriger als die nicht gefärbter Haare, da die Farbmoleküle leicht vor der Extraktion vom Haar abgewaschen werden können.

Die **semi-permanente** Haarfärbemittel enthalten Farbmoleküle mit niedriger relativer Molmasse. Sie dringen relativ tief in die Haarfaser ein und haben zum Keratin eine hohe Affinität. Die Farbmoleküle werden daher erst nach mehreren Haarwäschen abgewaschen. Diese Farbstoffe sind gewöhnlich nicht-ionische oder kationische Substanzen mit geringer Wasserlöslichkeit. Daher ist die semi-permanente Haarfärbung möglicherweise nachteilig für die Haaranalyse, da die Farbmoleküle vor der Extraktion nicht vollständig entfernt werden können und teilweise zusammen mit der DNA isoliert werden. Die künstlichen Farbmoleküle können die anschließende PCR-Reaktion erschweren.

Da 40% aller Frauen und viele Männer Haarfärbemittel verwenden und telogene Haare häufig an Tatorten gefunden werden, ist es notwendig, auf die chemischen Reaktionen während des Färbevorgangs und deren Folge für die DNA Analyse näher einzugehen [185]. Die Farbstoffe der **permanenten** Haarfärbemittel werden direkt auf dem und im Haar gebildet. Ungefärbte Vorstufen mit geringer relativer Molmasse dringen in das Haar ein, und es entstehen durch Oxidationsreaktionen und Kupplungsvorgängen bzw. Kondensationen große Farbmoleküle, welche nicht mehr aus dem Haar gewaschen werden können. Die ungefärbten Vorprodukte der permanenten Färbemittel werden ihrer chemischen Beschaffenheit nach in Oxidationsbasen (Entwickler) und Nuancierer (Kuppler) eingeteilt. Es handelt sich hierbei in beiden Gruppen um aromatische Verbindungen. Initiiert werden diese chemischen Reaktionen durch das in den permanenten Färbemitteln enthaltene Hydrogenperoxid, das zudem das natürliche Melanin oxidativ zerstört, das dadurch farblos wird (siehe Abb. 7). Bei der permanenten Färbung erfolgt demnach neben dem eigentlichen Färben eine Blondierung der Haare.

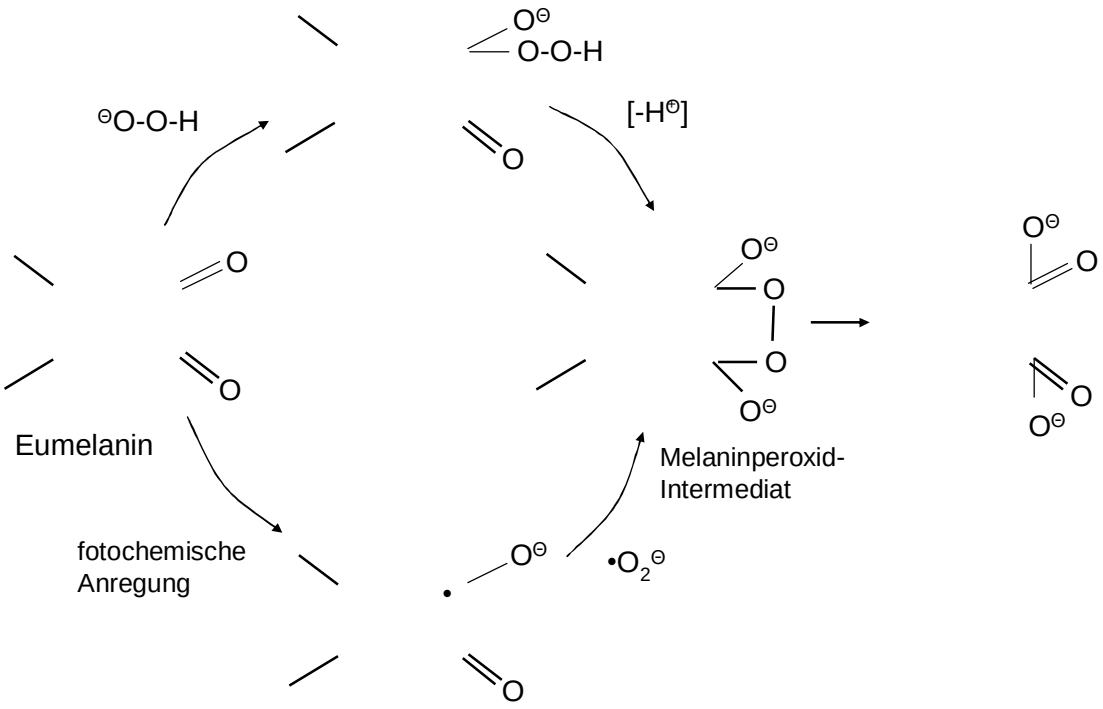


Abb. 7 Oxidation der nativen Melaninpigmente [155]

Die nativen Melanin-Granula befinden sich in den Kutikula- und besonders in den Cortexzellen. Da sie über Polypeptidreste am Keratin haften, sind diese Oxidationsprozesse recht komplexe chemische Reaktionen. Dieses chemisch veränderte Melanin kann während der Extraktion aufgrund der nun wasserlöslichen Form nicht mehr von der DNA getrennt werden und verursacht eine schwerwiegende Inhibition in der anschließenden Amplifikationsreaktion [113,203]. Die großen künstlichen Farbmoleküle können vor der Extraktion zwar nicht aus dem Haar entfernt werden, doch setzen sie sich zusammen während der Extraktion mit den Zelltrümmern ab, so dass sie keine Hinderung der Haaranalyse darstellen.

Das Wasserstoffperoxid richtet zudem, wie es elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, beträchtliche Schäden an der Kutikula an (Abb. 8). Möglicherweise werden weitere Haarsubstanzen, darunter auch die DNA selbst durch das H_2O_2 chemisch verändert.

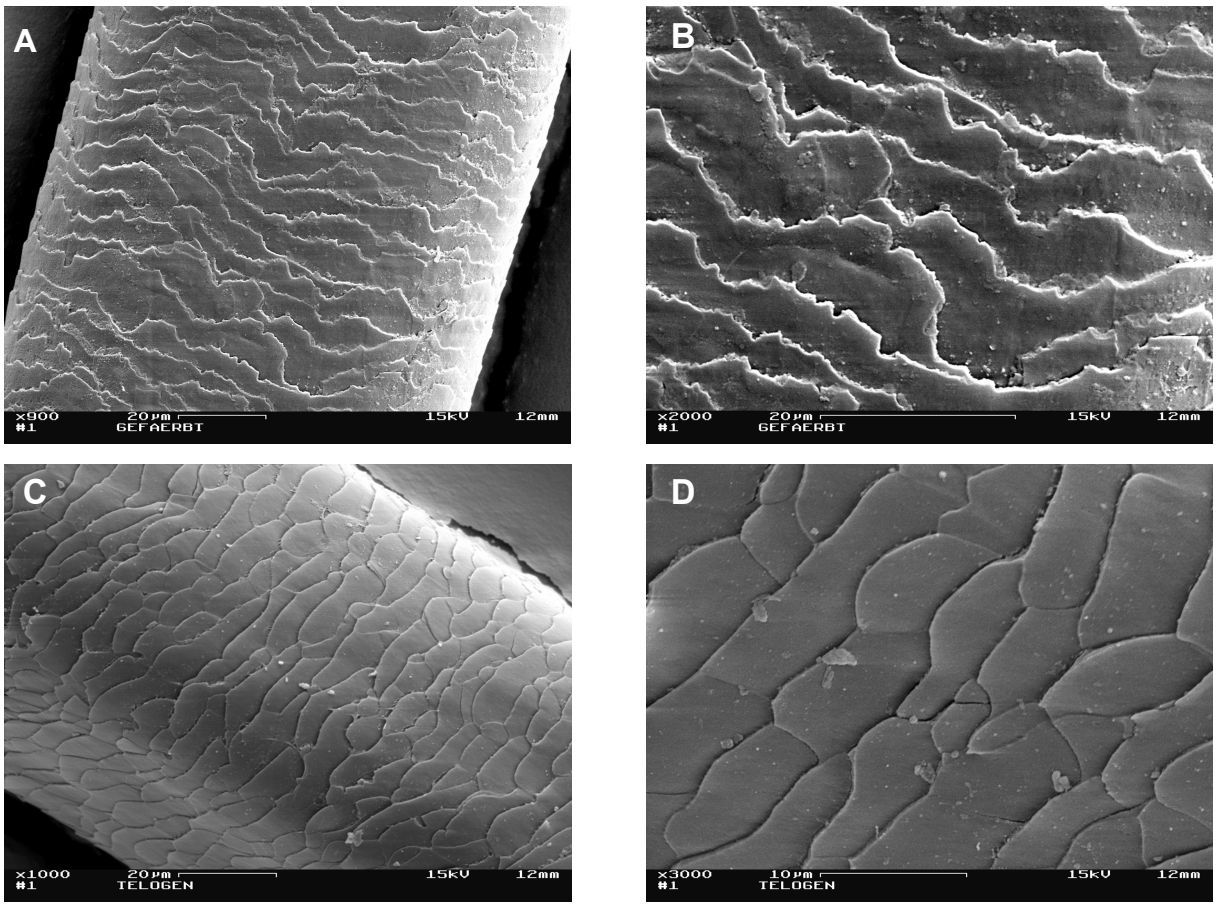


Abb. 8 A) Kutikula eines permanent gefärbten Haares, **B)** Nahaufnahme der Kutikula, **C)** Kutikula eines ungefärbten Haares, **D)** Nahaufnahme der Kutikula

Beim Blondieren der Haare kommt es ferner zu Veränderung der ursprünglichen Haareigenschaften, da neben dem Melanin-Abbau chemische Reaktionen an den Polypeptidketten des Haares stattfinden, beispielsweise an den Cystin-Brücken, Amid- und Amino-Gruppen sowie an den Wasserstoffbrücken- und Salzbindungen. Das Haar ist daher spröder, rauher, schwieriger auskämmbar, poröser und benötigt daher längere Trocknungszeiten, seine Widerstandsfähigkeit und Reißfestigkeit sind vermindert und seine Dehnungsfähigkeit erhöht. Die Haarfaser absorbiert leichter Farbstoffe, ist leichter dauerzuwellen und besitzt einen höheren Gehalt an anionischen Gruppierungen, die kationische Substanzen binden können.

Nach der angegebenen Einwirkzeit des Färbemittels erfolgt keine wesentliche Aufhellung mehr, teils durch den fortgeschrittenen Zerfall des Peroxids, teils durch das übrig gebliebene native Phaeomelanin, das relativ resistent gegen den Angriff des Oxidationsmittels ist.

Die chemische und fotochemische Degradation dürfte bei Phaeomelanin in ähnlicher Weise vonstatten gehen wie beim Eumelanin. Besonders das wasserlösliche Eumelanin in natürlich schwarzem Haar kann bereits durch spontane und allmähliche Oxidation mit der Luft in die wasserlösliche Form überführt werden. Phaeomelanin scheint gegen Oxidationen resistenter zu sein [134]. Daher gibt man blaue Pigmente zu Bleichungsmitteln, da sonst das Haar nach dem Bleichen einen orangen Ton erhalten würden. Spezielle Abtrennungen der Melanine können aufgrund der geringen DNA-Menge in Haaren nicht durchgeführt werden. Das H_2O_2 greift vermutlich auch das Erbgut im Haar an [113]. Das H_2O_2 reagiert schneller mit Melanin als mit Haarproteinen [155]. Da das Haar in erster Linie jedoch aus Proteinen besteht, erfolgt ebenso eine Oxidation der Haarmatrix und der Kutikula während des Bleichens. Permanente Haarfärbung und häufiges Haarewaschen führt zu einer Reduktion der hochmolekularen DNA im Haar und daher zu einer erschwerten bzw. undurchführbaren STR-Analyse [113]. Die Färbemittel enthalten darüber hinaus Ammonium, welches das Haar anschwellen lässt, d.h. die Schuppen der Kutikula divergieren und das H_2O_2 und die Vorstufen der Farbmoleküle können in das Haar eindringen. Dies ist die Ursache für die Haarschädigung bei der permanenten Haarfärbung. Trotz kosmetischer Pflegeprodukte können sich die Schuppen der Kutikula nicht wieder dauerhaft anlegen, das Haar verliert seinen natürlichen Glanz und kann nicht mehr gut gekämmt werden. Zusätzlich ist in den Färbemitteln wegen des Geruchs Parfüm beigemischt. Tenside veranlassen eine gute Verteilung der Färbemittel im Haar.

Die Häufigkeit der Anwendung der verschiedenen Färbemittel kann variieren, da sie produktabhängig ist. Temporäre Haarfärbemittel können nach jeder Haarwäsche wieder angewendet werden, semipermanente überstehen 5-6 Shampoowäschen, permanente sollten erst wieder angewendet werden, wenn die Haare soweit nachgewachsen sind, dass eine wiederholte Färbung notwendig ist. Das Haarwachstum beträgt im Durchschnitt etwa 1 cm pro Monat. Es wurde nachgewiesen, dass Haarfärbemittel kein Risiko für die Verwender darstellen.

Bei den temporären und semipermanenten Haaren existiert in den Haaren eines einzelnen Individuums eine Selektivität in der Affinität, im chemischen Verhalten der Farbmoleküle, in der Beständigkeit der Farberhaltung, Widerstandsfähigkeit gegenüber Sonnenlicht und Haarwäschen [207,208].

1.3 „alte“ DNA

Die DNA-Analyse alter Spuren bringt große Kontaminationsgefahr mit sich. Bereits wenige „fremde“ Zellen können zu falsch positiven Typisierungsergebnissen führen, da die DNA in alten Spuren in der Regel degradiert und in LCN vorliegt [32,38,66,69,70,75,81,88,180,200]. Nach dem Ableben des Organismus kommen Prozesse in Gang, die zu einer DNA-Degradation führen. Ursache der DNA-Degradation sind nicht nur äußere Umwelteinflüsse, sondern ebenso Vorgänge, die in dem toten Körper selbst initialisiert werden. Der Zerfall des menschlichen Körpers ist ein ziemlich komplexer Prozess [15]. Er beginnt mit der Autolyse, gefolgt von Fäulnis und Verwesung. Der Hauptteil der DNA-Degradation geschieht innerhalb der Autolyse, einige Stunden oder Tage nach dem Tod des Organismus. Die Autolyse ist ein nicht-bakterieller Selbstverdau absterbender Zellen durch Enzyme, die aus den Lysosomen freigesetzt werden. Die Fäulnis dagegen ist eine anaerobe bakterielle Zersetzung des organischen Materials, oft begleitet von einer Gasproduktion und typischer unangenehmer Geruchsentwicklung. Verwesung ist die im weiteren Verlauf eintretende aerobe bakterielle Leichenzersetzung, meist mit einem stechend-muffigen Geruch. Die Prozesse werden von der Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit und von der Bodenbeschaffenheit beeinflusst.

Der Verlust der Enzymregulation und die Milchsäurebildung in der Autolyse verbessert die Aktivität mancher Enzyme, wie beispielsweise die der Hydrolasen. Die meisten dieser Enzyme sind selbst auffällig resistent gegen Autolyse, werden jedoch rasch durch Bakterien zerstört. DNA in toten Zellen wird durch Nukleasen zerstört, die zu der großen Enzymgruppe der Hydrolasen gehören. Es gibt zwei Arten davon, die Endonukleasen und die Exonukleasen. Die erste zersetzt die DNA, indem sie sie in kleinere Fragmente teilt, wohingegen Exonukleasen ein Nukleotid nacheinander vom terminalen Ende abtrennen und folglich die Fragmente allmählich gekürzt werden. Weitere chemische Reaktionen, die über einen längeren Zeitraum zu einem DNA-Zerfall führen, sind Oxidation und Hydrolyse [33,55,106]. Die hydrolytische und oxidative Zerstörung der DNA wird in lebenden Zellen repariert, nicht aber in vitro.

1.3.1 DNA-Hydrolyse

Am häufigsten findet bei hydratisierter DNA eine Depurinierung statt, d.h. es werden besonders die Purine Adenin und Guanin abgespalten, die Pyrimidine Cytosin und Thymin sind stabiler. Nach den Basenverlusten ist die DNA instabil und es kommt innerhalb weniger Tage zu einer DNA-Spaltung infolge β-Elimination. Daher degradiert die DNA in totem Gewebe über längere Zeit vollständig zu kurzen Fragmenten.

Eine weitere DNA-Modifikation wird durch hydrolytische Deaminierung verursacht, die hauptsächlich an den Resten der Cytosine und 5-Methylcytosine erfolgt, wobei 5-Methylcytosine 3-4fach schneller deaminiert werden als Cytosine. Dabei wird das Cytosin in Uracil umgewandet, das 5-Methylcytosin in Thymin.

Das Cytosin wird gelegentlich in lebenden Zellen durch die DNA-Methyltransferase zu 5-Methylcytosin umgewandelt. In einer Säugerzelle mit 3% methylierter Cytosinresten, erfolgt eine hydrolytische Deaminierung zu 10% an 5-Methylcytosinen und zu 90% an den Cytosinen [106]. In einer menschlichen Zelle liegt die Halbwertszeit eines Cytosinrestes für einzelsträngige DNA (ssDNA) bei etwa 200 Jahren (37°C, pH 7,4). Die dsDNA bietet jedoch Schutz gegen Deaminierungen, so dass die Halbwertszeit auf 30000 Jahren steigt [106]. Aufgrund der verminderten Korrekturmöglichkeit für das 5-Methylcytosin und der höheren Rate der deaminierten 5-Methylcytosine entstehen spontane Punktmutationen, d.h. GC^m → GT → AT-Übergänge. Als Folge entsteht eine Unterrepräsentation der CpG-Dinukleotiden im Säugergenom.

Selten erfolgt eine hydrolytische Deaminierung des Adenins und des Guanins [106]. Das Adenin wird dabei zu Hypoxanthin und das Guanin zu Xanthin umgewandelt. Bisher wurden in lebenden Zellen für Hypoxanthine, nicht aber für Xanthine Reparaturenzyme identifiziert. Die Xanthin-Deoxyribosen-Bindungen sind zugänglicher für eine spontane DNA-Hydrolyse, so dass die seltene Guanin-Deaminierung innerhalb von Tagen oder Wochen in einer nicht-enzymatischen Reaktion zu einer apurinen Stelle konvertiert.

1.3.2 DNA-Oxidation

Eine weitere Ursache der DNA-Modifikation und -Degradation stellt die DNA-Oxidation dar. Zellen sind während des normalen Metabolismus aktivem Sauerstoff ausgesetzt. Dies verursacht bedeutende Genomschäden [106]. Eine äußerst mutagene Basenumwandlung ist die Oxidation des freien Desoxyguanosintriphosphats (dGTP) zu 8-Hydroxy-dGTP, das rasch zu 8-Hydroxy-dGMP degradiert. Da während der DNA-Synthese in lebenden Zellen das Triphosphat nicht mehr zur Verfügung steht, kommt es zu einem Replikationsstop.
Eine weitere schwerwiegende Mutation ist das durch Hydroxylradikale oder Superoxidradikale verursachte 8-Hydroxyguanin, das bevorzugt mit Adenin anstelle Cytosin basenpaart. Aufgrund des O_2-Metabolismus in den Mitochondrien ist die mtDNA besonders betroffen und enthält daher mehr 8-Hydroxyguanin als die nuDNA. Zusätzlich fehlen der mtDNA schützende Histone. Folge sind hohe Mutationsrate, rasche Evolution, Verschlechterung der Organellen mit dem Alter, mehrere maternell vererbte Krankheiten.
Ein Basenverlust aufgrund einer Oxidationsreaktion stellt die Ringsättigung des Pyrimidins dar [106]. Es formen sich Thymin-, Cytosinglykole und Pyrimidinhydrate. Die Basenderivate verlieren ihre planare Ringstruktur und sind nicht kodierend. Dieser Vorgang findet bedeutend öfters statt als die Bildung von 8-Hydroxyguanin.
Eine weitere interessante Form der durch Sauerstoffradikale verursachten DNA-Schädigung ist die Helixverzerrung. Es entstehen 8,5´-Cylcopurindeoxyribonukleoside durch zusätzlicher kovalenter Bindung zwischen der Base und dem Zucker-Phosphat-Rückrat sowie durch Bildung kovalenter Purindimere.

1.3.3 nicht-enzymatische DNA-Methylierung

Darüber hinaus finden in der lebenden Zelle fortwährend nicht-enzymatische DNA-Methylierungen statt, die jedoch in der Regel rasch korrigiert werden. Verursacht werden diese Trans-Methylierungen im Zellkern durch kleinere reaktive Moleküle wie beispielsweise S-Adenosylmethionine (SAM), das als Kofaktor für

enzymatische DNA-Methylierungen fungiert, und der Enzymcofaktor N^5-Methyltetrahydrofolsäure.

Die enzymatische Methylierung der DNA ist ein wichtiger Mechanismus für eine sich ändernde Gen-Expression in Säugerzellen. Die Methylierung erfolgt an der C5-Position des Cytosins. Die enzymatische und nicht-enzymatische Methylierung erfolgt an unterschiedlichen Stellen, so dass es zu keiner Überlappung kommt. Dies garantiert, dass die enzymatischen Methylierungen nicht versehentlich durch ein spezifisches DNA-Reparatur-Enzym wieder entfernt werden.

1.3.4 Mutagene, Carzinogene, Alterung

Die DNA-Reparatur ist im lebenden Organismus nicht immer vollständig effektiv, es können spontane Mutagene und folglich Carzinogene entstehen. Beisteuernde Faktoren sind das fehlerhafte Ablesen der Template-DNA während der Replikation und das geschädigte Auftreten modifizierter Nukleotide im Template.

Die hydrolytische Deaminierung des Cytosins zu Uracil und die Oxidation von Guanin zu 8-Hydroxyguanin sind die Haupttypen der spontanen, direkt prämutagenen Ereignisse in lebenden Zellen [55,67,106].

Superoxidradikale (O_2^-) und H_2O_2 werden in allen aeroben Zellen als Ergebnis des normalen Metabolismus gebildet. Aus diesen Molekülen entstehen, durch Metallionen katalysiert, hochreaktive Hydroxylradikale (•OH). Ionenstrahlen können ebenso aus zellulärem Wasser Hydroxyradikale produzieren [55].

Sie verursachen Basenausfälle, Zuckerausfälle, Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche, „abasic“ Stellen, DNA-Protein-Querverbindungen. Diese Modifikationen werden in der Regel recht schnell wieder korrigiert. Doch können Störungen in der DNA-Reparatur zu ernsthaften biologischen Konsequenzen führen. Hydroxylradikale sind auch in der Bildung von DNA-Protein-Querverbindungen involviert, beispielsweise zwischen den Basen Cytosin, Thymin und den Aminosäuren Glycin, Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Threonin, Lysin, Tyrosin. Sauerstoff unterdrückt die DNA-Protein-Verknüpfung mit Ausnahme der Thymin-Tyrosin-Verbindung, da O_2 mit einem zentralen Carbon des Radikals reagiert und so die Dimerization hindert. O_2 kann nicht an Thymin- und Tyrosinradikale binden. Hydroxylradikale verursachen 70% der durch Strahlen

verursachten Letalität und DNA-Schäden in oxiden Zellen. Die von Guanin abgeleiteten Basen machen 45% der Gesamtmenge aller modifizierten Basen aus. Dies zeigt die hohe Reaktivität von •OH mit Guanin in Zellen. Hydroxylradikale entstehen in vivo durch Reaktion des H_2O_2 mit an Chromatin gebundenen Übergangsmetallionen. Hydrogenperoxid allein produziert keine der hier aufgezeigten Basenprodukte in der DNA. In kultivierten menschlichen Zellen werden nach γ-Bestrahlung oder H_2O_2-Behandlung nur Thymin-Tyrosin-Bindungen beobachtet, da Sauerstoff vorhanden ist [55].
Neben den fehlcodierenden Basenderivaten sind weitere in erster Linie zytotoxische Modifikationen wie bereits oben erwähnten apurinische Stellen, Thyminglycol, 3-Methyladenin für „single-site“ Mutationen verantwortlich [106]. Der aufsummierte Effekt der Replikation und Transkription dieser modifizierten DNA ist ein wichtiger besteuernder Faktor für spontane Carzinogenese. Aufgrund der teilweise ineffizienten DNA-Reparatur wird spekuliert, dass die zelluläre Alterung eine Konsequenz des allmählichen DNA-Zerfalls ist, neben der Telomerverkürzung [31,106,119]. Dies nachzuweisen, gilt aber als schwierig.

1.3.4 Schutz der DNA

Die DNA-Degradation steigt proportional mit der Länge der postmortalen Periode. Umweltbedingungen üben jedoch einen größeren Einfluss auf den Erhalt der DNA aus als die Zeit [33]. Eine erhöhte Umgebungstemperatur an der Todesstätte und/oder Infektionskrankheiten sind die Hauptfaktoren für das Auftreten einer disproportionalen Autolyse [15]. Die fortgeschrittene Degradation durch Infektionen kann Folge bakteriellen Wachstums sein oder einfach wegen der erhöhten Körpertemperatur, verbunden mit der Infektionskrankheit zum Zeitpunkt des Todes. Die Aufbewahrung von Gewebe in absolutem Ethanol oder wasserfreiem Aceton sowie das Einbetten in Paraffin erhält hochmolekulare DNA. Die Aufbewahrung von Gewebe in einer nicht gepufferten 4% Formalinlösung führt aufgrund der entstehenden Ameisensäure zu schweren DNA-Schäden [15]. Daher sollte die Formalinlösung mit Phosphat-Puffer gepuffert werden.
Die oxidative und hydrolytische Zerstörung der DNA kann zu einer starken DNA-Degradation in totem Gewebe führen, die in Mikrosatelliten-Artefakten oder sogar

zum Totalverlust des erwarteten DNA-Fragments resultiert. Eine oxidative Zerstörung der DNA wird u.a. durch UV-Strahlung verursacht. UV-Bestrahlung wirkt sich jedoch nur auf Oberflächen von Geweben aus. Bestrahlung der DNA mit UV-Licht liefert Pyrimidin-Dimere zwischen benachbarten Pyrimidin-Basen, insbesondere Thymin-Basen. Die Basen können keine Wasserstoffbrücken-bindungen mehr ausbilden und können daher nicht mehr als Primer oder Template für die DNA-Analyse fungieren [68].

In feuchter Umgebung scheint die DNA-Quantität leicht reduziert, die DNA-Qualität jedoch zeigt eine dramatische Abnahme [33]. Eine zweifache Reduktion der Depurinierung, die häufig bei hydratisierter DNA stattfindet, erfolgt durch die Adsorption der DNA an Hydroxyapatit. Daher können alte Knochen zum Teil noch recht gut analysiert werden [33,56,92,106]. Generell schützen harte und trockene Gewebe wie Knochen und Zähne die DNA gegen chemische Reaktionspartner und mikrobiellen Befall. Erhöhte Stabilität der Fossilien-DNA ist gewährleistet durch eine teilweise DNA-Dehydration und Ausschluss von Sauerstoff sowie von Mikroorganismen, die die DNA nahezu komplett metabolisieren können. „Trockene“ DNA weist keine Doppelhelix-Konformation mehr auf, da dafür einige Wassermoleküle nötig sind. Die Basen können leicht zerstört werden, die DNA ist äußerst verwundbar und rehydriert an Luft rasch. Die teilweise DNA-Dehydratation und die Abwesenheit von Mikroorganismen begünstigen zwar die DNA-Erhaltung, doch diese Vorteile werden bei hohen Temperaturen zunichte gemacht [33]. Niedrige Temperaturen verlangsamen die meisten chemischen Reaktionen und reduzieren den mikrobiellen Befall. Auch wirken sich neutrale oder leicht alkalische pH-Werte in der Probe und Probenumgebung positiv auf den DNA-Erhalt aus. Mit sinkenden pH-Werten in der Umgebung, wird nicht nur die DNA selbst, sondern auch die schützende Materie (Knochen, Zähne) zerstört.

Eine Korrelation zwischen DNA-Erhalt und Lagerungszeit existiert demnach aufgrund der zahlreichen Faktoren, die den DNA-Erhalt beeinflussen, nicht. Günstige Lagerungsbedingungen können in gewissem Maße chemische und physikalische Reaktionen verlangsamen. Eine gewisse Geschwindigkeit der chemischen Reaktionen wie Oxidation kann jedoch sogar unter optimalen Bedingungen nicht gestoppt werden.

1.4 Optimierung des Extraktionsverfahrens

Mit kommerziell erhältlichen Extraktionsverfahren und STR-Konzepten können verunreinigte, stark degradierte Minimalspuren nicht oder nur sehr schwer typisiert werden. Die DNA-Extraktion ist wichtiger Bestandteil für eine erfolgreiche Spurenanalyse. Gehen während der Extraktion zu viele der wertvollen DNA-Moleküle verloren oder werden inhibitorische Substanzen ungenügend von der DNA abgetrennt, ist eine erfolgreiche Typisierung häufig nicht gewährleistet. Vorwiegend bei der DNA-Isolation aus problematischen Spuren fällt ein DNA-Verlust aufgrund der ohnehin bereits gering vorhandenen Menge mehr ins Gewicht. Liegt die DNA in ausreichender Quantität vor, kann häufig durch eine einfache Verdünnung der Probe die Wirkung inhibitorischer Substanzen reduziert bzw. entfernt werden [198]. Eine Verdünnung ist jedoch bei Proben mit LCN-DNA nicht durchführbar. Zwischenzeitlich wurden für eine erfolgreiche Entfernung der inhibitorischen Substanzen zahlreiche Experimente durchgeführt wie Isolierung der Zellen vor der Lyse mittels Dielectrophorese [139], da die Auftrennung über Filter oder über Zentrifugation arbeits-, zeitaufwendig und verlustreich sind. Um PCR-fähiges Material zu erhalten, wird eine teilweise umfangreiche Aufreinigung nötig [100].

Eine Vielzahl an unterschiedlichen Extraktionsmethoden ist bekannt. Jedes Extraktionsverfahren hat seine Vorzüge, bringt aber auch Nachteile mit sich. Das nicht arbeits- und zeitaufwendige Verfahren beispielsweise führt zu einer raschen DNA-Isolation, jedoch auch häufig zu Einbußen der DNA-Qualität und Quantität. Extraktionsmethoden, die auf eine größtmögliche DNA-Menge abzielen, bringen eine verringerte DNA-Qualität mit sich und umgekehrt. Ein einheitliches Verfahren zu finden ist schwierig, da eine Unmenge an verschiedenen Spurenarten existiert. Jede Spur ist chemisch unterschiedlich aufgebaut, so dass DNA aus Blut anders isoliert werden muß als beispielsweise DNA aus Knochen, da Knochen intensiver lysiert werden müssen, damit die DNA freigesetzt wird. Die unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der verschiedenen inhibitorischen Substanzen verlangen obendrein stets Veränderungen in der DNA-Extraktion. Teilweise müssen zusätzlich aufwendige Aufreinigungsverfahren angewendet werden. Häufig sind die Inhibitoren unbekannt, so dass die Extraktionsmethode nicht

gezielt abgeändert werden kann, um eine bessere Abtrennung der Inhibitoren zu gewährleisten.

1.5 Optimierung der Amplifikationsreaktion

Bei der Amplifikationsreaktion können eine Vielzahl an Modifikationen durchgeführt werden, die nicht nur den PCR-Ansatz selbst, sondern auch das PCR-Programm betreffen. Eine „Touchdown“ bzw „Stepdown“-PCR gebraucht beispielsweise ein Zyklenprogramm mit variierenden Annealing-Temperaturen. Die Annealing/Extension-Temperatur ist bei der Touchdown-PCR während der anfänglichen 5-10 Zyklen einige Grade, typisch 3-10°C, höher als die T_M der Primer. In den restlichen PCR-Zyklen wird die Annealing/Extension-Temperatur reduziert auf die T_M der Primer. Eine Touchdown-PCR verbessert die Spezifität der anfänglichen Primer-Matrizen-Duplexbildung und führt daher zu einer größeren Spezifität der PCR-Endprodukte.

Der anfängliche Denaturierungsschritt ist für eine erfolgreiche Amplifikation ausschlaggebend. Bei einer unvollständigen Denaturierung der DNA kann das Template in den ersten Amplifikationszyklen nicht effizient benutzt werden, was zu einem schwachen Ertrag an PCR-Produkten führt [160]. Der folgende Denaturierungsschritt ist in der Regel kürzer, da die im ersten Amplifikationszyklus synthetisierten PCR-Produkte bedeutend kürzer sind als die Template-DNA und somit vollständig denaturiert werden.

Das Massengleichgewicht zwischen Produkt, Template, *Taq* DNA-Polymerase, Primer und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) verändert sich mit jedem Zyklus. Ebenso sind die Hybridisierungs-Wechselwirkungen zwischen den komplementären DNA-Molekülen wie Primer, Template sowie Produkt während der PCR unter kontinuierlichem Fluss. Das Annealing der frühen Zyklen fordert Primer, das genomische Template auf ihre komplementäre Sequenz hin zu untersuchen (Screening Phase). Bei den anschließenden Zyklen ist das zuvor synthetisierte Produkt das bevorzugte Template (Amplification Phase). Der große Überschuss der neu amplifizierten Produkte liefert perfekte komplementäre Stellen für beide Primer. Die Menge an genomischer DNA ist dabei vernachlässigbar. Das Verhältnis der PCR-Reagenzien zum Template ist in den ersten wenigen PCR-

Zyklen am höchsten und nimmt mit der Produkt-Anhäufung, nicht aber mit dem Reagenzien-Verbrauch ab. Der Überschuss an Primer und dNTPs zum Template ist im Grunde genommen konstant. Die Polymerase weist in der Regel den geringsten Überschuss aller Reaktionskomponenten auf. Nach der PCR befinden sich im Reaktionsgemisch mehr Template-Moleküle als Enzymmoleküle. Es ist anzunehmen, dass mit der Anhäufung der Reaktionsprodukte das Enzym vollständig beschäftigt ist und das Primer-Template-Verhältnis abnimmt, was das Selbst-Annealing der Stränge fördert. Falls das Selbst-Annealing signifikant wird oder die Enzym-Menge begrenzt ist, fängt die Reaktion an sich zu sättigen und endet exponentiell. In den letzten Zyklen hybridisiert das amplifizierte Produkt in hoher Konzentration und blockiert so die Primer von der komplementären Stelle. Die Anhäufung der Amplifikationsprodukte und weiterer Endprodukte wie Pyrophosphat während der späteren PCR-Zyklen übt einen inhibitorischen Effekt auf die DNA-Polymerasen aus und es entsteht folglich die Plateau-Phase. Durch Zugabe von Pyrophosphatase könnte die PCR in Richtung der PCR-Produkte gelenkt werden. Thermisches Zykling über diese Phase hinaus kann die Amplifikation umlenken und es werden unerwünschte Ziele vervielfältigt, die während der ersten wenigen Zyklen nicht bevorzugt waren. Eine Erhöhung der anfänglichen Menge an *Taq* DNA-Polymerase führt zu einem Verlust der PCR-Spezifität, da Primer promiskuitiv verlängert werden. Nach dem letzten PCR-Zyklus werden die Proben gewöhnlich bei 72°C einige Minuten inkubiert. In diese Inkubationszeit fügt die terminale Transferase-Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase ein A-Nukleotid an die 3´-Enden der PCR-Produkte. Eine vollständige Adenin-Addition kann erreicht werden durch Verlängerung der finalen Extension, Erhöhung der *Taq* DNA-Polymerase, Veränderung der Primer-Sequenz.

Sekundärstruktur des DNA-Templates beeinflusst ebenso die Genauigkeit der DNA-Polymerase, da sie die Polymeraseaktivität vermindern und die Proofreading-Funktion des Enzyms sperren [4]. Um die DNA-Denaturierung zu erleichtern kann neben einigen Additiven wie Betain, Glycerol, Formamid oder DMSO das 7-deaza-dGTP (dc^7GTP) verwendet werden. Da DMSO und Formamid die Polymerase um etwa 50% inhibieren, sollte gleichzeitig die *Taq* DNA-Konzentration erhöht werden. Bei der Verwendung des dc^7GTP sollte dGTP zu 75% durch das dc^7GTP ersetzt sein [129]. Das dc^7GTP reduziert die Zahl von Wasserstoffbrückenbindungen mit komplementären Desoxycytidintriphosphaten

(dCTPs) und hindert die Bildung stabiler intramolekularer Quadruplexe und Purin-Triplexe. Dadurch wird eine GG-Hoogsteen-Basenpaarung unmöglich. Beim dc^{7}GTP ist das N-7 des Guaninrings durch ein Methinrest ersetzt und hindert so die Hoogsteen-Brückenbildung, nicht aber die Watson-Crick-Basenpaarung [111]. Die Hoogsteen-Basenpaarung ist eine Erweiterung der Watson-Crick-Basenpaarung, indem sich noch eine dritte Base anlagert. Insgesamt handelt es sich also um eine Drei-Strang-Struktur. Dennoch werden nur die zusätzlichen Wasserstoffbrücken Hoogsteen-Basenpaare genannt, um sie von den unveränderten Watson-Crick-Basenpaaren zu unterscheiden.

Suboptimale Reaktionsbedingungen wie beispielsweise unpassende Primer, schlecht angepasste Zeitspannen oder Temperaturbedingungen, variable Polymerase-Qualität und unsachgemäße Mg^{2+}-Konzentration führen zu schlechten Amplifikationsergebnissen [99,199]. Mg^{2+}-Ionen haben während der PCR-Reaktion drei Aufgaben: Erstens, sie fungieren als Cofaktor der Polymerasen, zweitens, sie bilden lösliche Komplexe mit den Nukleotiden und drittens, sie stabilisieren die spezifische und unspezifische Aufnahme der Primer durch die Matrizen-DNA. Freies Magnesium kann mit negativ geladenen Ionen oder Ionengruppen wie beispielsweise Phosphatgruppen assoziieren. Da innerhalb der PCR-Reaktion das DNA-Template, die Primer, vor allem aber die dNTPs Hauptquellen von Phosphatgruppen sind, wird mit Erhöhung der dNTP- und Primer-Konzentrationen, die Konzentration freier Mg^{2+}-Ionen verringert. Die Mg^{2+}-Konzentration sollte etwa 0,5 bis 1 mM höher sein als die dNTP-Konzentration. Falls die DNA-Probe mehr als 0,1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) enthält oder andere Chelate, sollte die $MgCl_2$-Konzentration in Reaktionsgemisch proportional erhöht werden. Es ist sehr wichtig, die Konzentration der Mg^{2+}-Ionen im PCR-Ansatz richtig einzustellen. Eine zu geringe Mg^{2+}-Konzentration führt zu einer unvollständigen Amplifikation und geringem Gehalt an PCR-Produkten, da die Aktivität der Polymerase verringert ist und die Primer schlechter an die Matrizen-DNA gebunden werden. Eine zu hohe Mg^{2+}-Konzentration führt zu einer hohen und daraus resultierenden nicht spezifischen Aktivität der Polymerase. Des Weiteren binden die Primer unspezifisch an die Matrizen-DNA. Zusätzliche unspezifische PCR-Produkte sind die Folge.

Temperaturschwankungen über den Thermozykler verteilt können ebenso Ursache für eine schwache Amplifikation sein. Eine hervorragende

Temperaturkonsistenz ist für die sensitive und spezifische Untersuchung wichtig und sollte regelmäßig überprüft werden. Um die PCR optimieren zu können, müssen in erster Linie die chemischen Reaktionen hinterfragt werden. Da das Enzym die Schlüsselposition in der Amplifikationsreaktion einnimmt und den Hauptangriffspunkt vieler inhibitorischer Substanzen darstellt, sollten die katalytischen Strategien der Polymerase bekannt sein. Einige Veröffentlichungen beschreiben Struktur, Mechanismus und Replikationsgenauigkeit der DNA-Polymerasen [23,51,104,177,178]. Enzyme, zu denen auch die Polymerasen zählen, können langsam ablaufende chemische Reaktionen bis zu einem Faktor von etwa 10^8-10^9 katalysieren. Enzyme besitzen im aktiven Zentrum exakt definierte Bereiche für ihre Substrate, wodurch die Übergangszustände der chemischen Intermediate spezifisch stabilisiert werden. Sie besitzen daher für das Substrat und die Art der chemischen Reaktion eine hohe Affinität und Spezifität. Bei Abweichungen von ihren biologischen Temperatur-, Puffer- und pH-Bedingungen sowie KCl-Konzentrationen, Art und Konzentrationen der M^{2+}-Ionen zeigen sie deshalb auch eine geringe Stabilität und katalytische Funktionalität. Eine genaue Beschreibung der Polymeraseaktivität ist in Abschnitt 1.5.1 beschrieben.

Eine Optimierung der Amplifikationsreaktion ist besonders bei der LCN-Typisierung ausschlaggebend. Die hohe Sensitivität der LCN-PCR ermöglicht die Analyse einzelner Zellen [9,159]. Daher bringt die LCN-Typisierung eine hohe Kontaminationsgefahr sowie eine komplizierte Dateninterpretation mit sich, da die Ergebnisse nicht immer vollständig reproduzierbar sind [38]. Es gibt folgende Gründe für eine nicht Reproduzierbarkeit der DNA-Profile [33]: (i) Mangel an Quantität. Zu Beginn der Amplifikationsreaktion sind nicht genügend DNA-Moleküle vorhanden. Falls die PCR mit zu wenig Template-DNA startet, treten häufiger Artefakte auf und das Ergebnis ist nicht reproduzierbar. (ii) Mangel an Qualität. Es sind zwar genügend Kopien der DNA vorhanden, aber sie sind chemisch so stark modifiziert, dass kein reproduzierbares Ergebnis generiert werden kann. Die Annahme beim Auftreten unbeständiger Allele, eine Kontamination liege vor, muß kritisch betrachtet werden. Zufällige Artefakte oder nicht-systematische Kontaminationen können durch Wiederholung der Amplifikation ausgeschlossen werden.

1.5.1 Polymeraseaktivität

Da die enzymatische Aktivität der verschiedenen Polymerasen in ähnlicher Weise ablaufen, wird hier die Polymeraseaktivität am Beispiel der Polymerase I aus *Escherichia coli* (*E. coli)* beschrieben, da es das erste Enzym war, dessen Röntgenstrukturen aufgeklärt wurden. Die *E. coli* Polymerase I weist drei enzymatische Aktivitäten auf [23,51,104,177,178]. Die N-terminale Domäne (AS 1-312) besitzt eine 5´-3´-Nukleaseaktivität, die mittlere Domäne (AS 324-517) eine 3´-5´-Exonukleaseaktivität, und auf der C-terminalen Domäne (AS 521-928) ist die Polymeraseaktivität lokalisiert. Die Polymerasedomäne ähnelt in der Topographie ihrer Teritärstruktur einer leicht geöffneten rechten Hand und besteht aus drei Subdomänen, die die DNA-bindende Spalte formen [51]. Abgeleitet von der Handfläche, dem Daumen und den Fingern einer Hand werden sie als so genannte *palm*-, *thumb*- oder *finger*- Subdomäne bezeichnet.
DNA-Polymerasen benötigen für ihre Aktivität Metallionen, normalerweise Mg^{2+}-Ionen. Im geschlossenen ternären Komplex (Enzym-DNA-dNTP-Komplex) haben alle Familien der DNA-Polymerasen, die Substrat gebunden haben, in ihrem aktiven Zentrum, das in der *palm*-Subdomäne lokalisiert ist, zwei Metallionen gebunden, um die Phosphor-Transfer-Reaktion zu katalysieren. Als Ligand fungieren drei Carboxylatgruppen von den essentiellen Aminosäuren Glutamat und/oder Aspartat. Durch die Wechselwirkung mit den M^{2+}-Kationen sind diese negativ geladenen Aminosäuren vor allem für den Nukleotidtransfer von großer Bedeutung. Das Fehlen ihrer negativen Ladung im katalytischen Zentrum kann von dem Enzym nicht kompensiert werden, die Katalysegeschwindigkeit würde drastisch abnehmen. Zudem interagiert ein Metallion mit den drei Phosphaten der Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs), das andere mit dem α-Phosphat der ddNTPs und der 3´-Hydroxyl-Gruppe des Primers (siehe Abb. 9). Das Metallion, das am Primer gebunden ist, aktiviert die 3´-Hydroxyl-Gruppe des Primers, um den nukleophilen Angriff des 3´-O-Atoms des Riboserests des letzten 3´-Primer-dNMPs auf das α-Phosphoratoms des komplementären dNTP-Substrats im aktiven Zentrum zu erleichtern. Die zwei Metallionen zusammen stabilisieren die im Übergangszustand sich anhäufende negative Ladung. Nach der Rückkehr in die „offene“ Konformation dissoziieren die M^{2+}-Kationen und das Pyrophosphat als Nebenprodukt von dem Enzym-Komplex. Das Metallion, das anfänglich am dNTP

gebunden war, stabilisiert die negative Ladung des Pyrophosphats und erleichtert dessen Austritt. Nachdem die 3´OH-Gruppe des eingebauten Desoxynukleosidmonophosphats (dNMP) der Primer/Template-DNA wieder in der katalytisch aktiven Position lokalisiert ist, kann ein weiterer Einbauzyklus beginnen. Dieses Ereignis geschieht in einer Rate von mehreren hundert Basen pro Sekunde, abhängig von der intrinsischen Prozessivität des Enzyms.

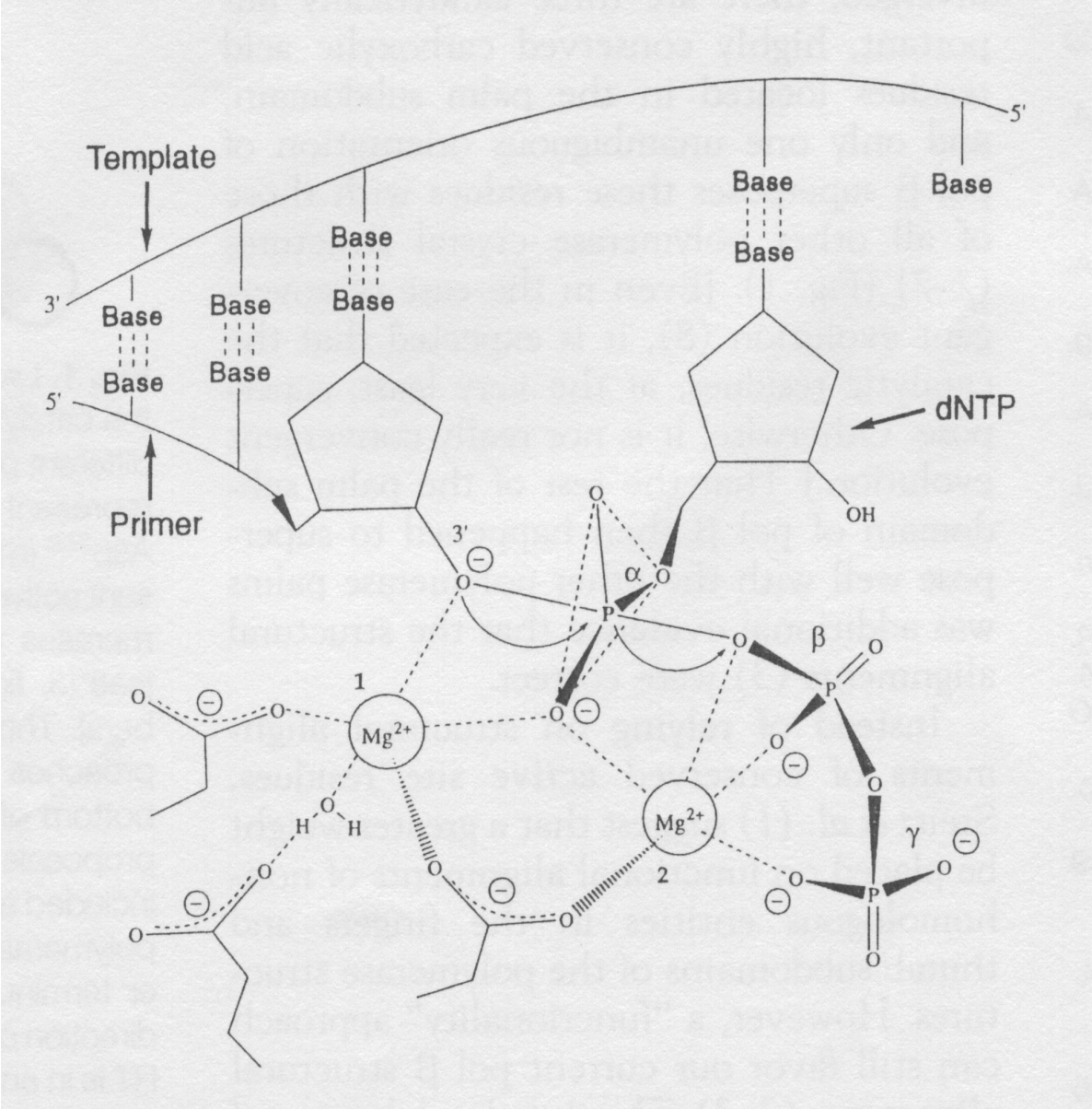


Abb. 9 Übergangszustand der beiden Metallionen für die Polymerasereaktion [177]

Die Polymerasen binden im ersten Schritt die Primer/Template-DNA an das aktive Zentrum der Polymerasedomäne. Beteiligt dabei sind neun Nukleotide am 5´Ende des Templates und sieben Nukleotide am 3´Ende des Primers, wobei der vom

aktiven Zentrum distale Teil der Duplex-DNA mit Resten in der *thumb*-Domäne bindet, der andere Teil der Duplex-DNA mit Resten in der *palm*-Domäne. Es handelt sich dabei um polare oder geladene Bindungen, hauptsächlich mit dem Ribosephosphatrückgrad der Stränge. Das Binden der DNA löst eine Konformationsänderung in der *thumb*-Domäne aus. Die Domäne formt einen Zylinder, der nahezu komplett die DNA umgibt. Das Einwickeln der *thumb*-Domäne um die DNA bleibt während der Nukleotiden-Anlagerung, des Nukleotiden-Einbaus und der DNA-Translokation bestehen, so dass die Rate der DNA-Dissoziation während der Polymerisation gering ausfallen dürfte.

Anschließend wird in einem zweiten Schritt ein zur Template-DNA komplementäres dNTP gebunden. Mit hoher Genauigkeit muß die DNA-Replikation vonstatten gehen. Dies wird als erstes durch die spezifischen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen gewährleistet. Das Binden nicht-komplementärer Basen ist daher unwahrscheinlich, da die Interaktionen ungünstig sind. Darüber hinaus bildet das Enzym im aktiven Zentrum Wasserstoffbrückenbindungen mit einem Basenpaar in der kleinen Rinne der DNA-Doppelhelix. Diese Interaktion misst, ob ein Basenpaar mit richtigem Abstand zueinander im aktiven Zentrum geformt wurde. Die drei Basenpaare am Ende der Duplex-DNA nehmen eine A-Konformation an, so dass die kleine Rinne erweitert und dadurch gut zugänglich wird. Die DNA liegt hauptsächlich in der B-Konformation vor.

Zudem löst das Binden eines Nukleosidtriphosphats im aktiven Zentrum der DNA-Polymerase eine Veränderung in der Konformation hervor, die *finger*-Subdomäne rotiert um ~46° in Richtung der Primer/Template DNA, schließt den Spalt und formt eine dichte Tasche, in die nur ein richtig förmiges Basenpaar leicht passt. Diese Konformationsänderung des ternären Komplexes von einer „offenen“ in eine „geschlossene“ Form ist für die katalytische Aktivität der Polymerisation notwendig und ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Im offenen binären und ternären Komplex kommt die Aminosäure Tyrosin 671 (Tyr671) in der O-Helix der *finger*-Domäne an dem ersten Basenpaar der Primer/Template DNA zu liegen. Im geschlossenen ternären Komplex verlässt die Seitenkette des Tyr671 dieses Primerpaar und die erste einzelsträngige Base kann sich vor das herankommende ddNTP positionieren. Das Tyr671 bringt demnach die erste einzelsträngige Base nahe an das aktive Zentrum. Die erste Base des einzelsträngigen Templates dreht

sich im geschlossenen ternären Komplex im Ribosephosphatrückgrad, so dass sie von der Duplex-DNA wegzeigt. Im offenen binären und ternären Komplex ist die erste Base ungeordnet. Das ddNTP ist in im geschlossenen ternären Komplex komplett begraben und nicht mehr wie in der offenen ternären Form zugängig für Lösungsmittel. In der geschlossenen ternären Form ist das ddNTP neben den drei Carboxylatresten des aktiven Zentrums lokalisiert.

Falls trotzdem ein falsches Nukleotid in den Strang eingebaut wurde, wird es von der Exonuklease-Domäne, die an der Polymerisations-Reaktion selbst nicht teilnimmt, wieder vom 3´Ende der DNA über Hydrolyse entfernt. Viele Polymerasen besitzen einen solchen „Proofreading"-Mechanismus. Das aktive Zentrum dieser Exonuklease liegt nahe am aktiven Zentrum der Polymerase. Nachdem ein Nukleotid eingebaut wurde, wandert die DNA um ein Basenpaar weiter. Dort bilden Wasserstoffbrücken-Akzeptoren im Enzym mit dem Basenpaar in der kleinen Rille der DNA Wasserstoffbrücken aus, ein Vorgang wie er auch im Polymerisierungszentrum stattfindet (siehe oben). Falls eine falsche Base eingebaut wurde, stellt das Enzym seine Arbeit ein. Diese Pause liefert zusätzliche Zeit, damit der DNA-Strang zur Exonukleasestelle wandern kann. Zudem verlässt gelegentlich der wachsende Strang das Polymerasezentrum und wandert zum Exonukleasezentrum. Da fehlgepaarte Basen schwache Wasserstoffbrücken ausbilden, verlassen sie aufgrund der größeren strukturellen Schwankungen wahrscheinlicher als korrekte Basenpaare das Polymerasezentrum.

Die Polymerase I entfernt jedoch auch ab und dann korrekte Basen, etwa eine von 20 durch Hydrolyse. Obwohl das Entfernen korrekter Basen vom energetischen Gesichtspunkt her unwirtschaftlich ist, steigert der „Proofreading"-Mechanismus die Replikationsgenauigkeit um den Faktor 1000.

Die *Taq* DNA-Polymerase ist ein thermophiles Enzym mit einer Halbwertszeit von 9 min bei 97,5°C [51]. Sie ist ein monomeres Enzym mit 832 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 94 KDa. Trotz unterschiedlicher kinetischer Eigenschaften der *E. coli* und *Taq* DNA-Polymerasen weisen vermutlich beide Polymerasen einen identischen Reaktionsmechanismus auf, da sich die Tertiärstrukturen der beiden Polymerasen sehr stark ähneln, besonders die der Polymerasedomänen. Die *Taq* DNA-Polymerase bevorzugt als M^{2+}-Kationen Mg^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}. Im Gegensatz zur *E. coli* DNA-Polymerase besitzt die *Taq* DNA-Polymerase keine 3´-5´-Exonukleaseaktivität. Ihre entsprechende Zwischen-

domäne (AS 298-421) ist kleiner und kompakter. Der Grund der fehlenden 3´-5´-Exonukleaseaktivität liegt höchstwahrscheinlich in der Thermophilie der *Taq* DNA-Polymerase, die Reaktionstemperatur für die thermophile *Taq* DNA-Polymerase liegt bei 65-75°C, für die mesophile *E. coli* DNA-Polymerase bei 22-37°C. Durch den Selektionsdruck einer sehr viel höheren Umgebungstemperatur hat sich die Anzahl der Aminosäuren verringert. Durch die fehlende 3´-5´-Exonukleaseaktivität besitzt die *Taq* DNA-Polymerase eine geringere Replikationsgenauigkeit und eine höhere Mutationsrate pro eingebauten dNTPs ($2x10^{-4}$ - $8x10^{-6}$) als die *E. coli* DNA-Polymerase (10^{-6}-10^{-12}). Die Mutationsrate kann auch von dem pH-Wert, der dNTP-Konzentration und der Art und Konzentration der M^{2+}-Kationen beeinflusst werden.

Während der Amplifikationsreaktion können Zusatzbanden, so genannte shadow bands entstehen. Eine in vivo Heterogenität kann ausgeschlossen werden, da die Mutationsrate der STRs relativ hoch liegt und zudem das nach der ersten PCR aufgereinigte Produkt nach erneuter Amplifikation wiederum shadow bands zeigt [74]. Die Entstehung von Zusatzbanden benötigt vermutlich eine Pause in der DNA-Replikation [128]. Daher könnte möglicherweise eine thermostabile Polymerase mit höherer Prozessivität die shadow bands reduzieren bzw. ganz eliminieren.

1.6 autosomaler STR-Kit „Q8“

Der erste Multiplex-Kit (Q8) soll für einen deutschlandweiten Abgleich aus den acht autosomalen Systemen der Deutschen DNA-Datenbank D3S1358, FGA, TH01, VWA, SE33/ACTBP2, D8S1179, D18S51, D21S11 und dem Geschlechtstypisierungsmarker Amelogenin bestehen.

Die deutsche DNA-Datenbank wurde 1998 mit Sitz in Wiesbaden gegründet und beinhaltete die fünf STR Marker SE33/ACTBP2, D21S11, VWA, TH01, FGA/FIBRA. Im Jahre 2001 wurde sie auf 8 Markern ausgeweitet, hinzu kamen die STR-Systeme D3S1358, D8S1179, D18S51. Die potenziellen Erweiterungs-marker D2S1338, D16S539 und D19S433 für einen europäischen Abgleich sind im Gespräch.

Die Amplikonlängen im Q8-Multiplex sollten im Vergleich zu einigen kommerziellen Multiplex-Kits reduziert werden und die Nachweissensitivität durch geeignete Wahl der Fluoreszenzfarben und Primerbindestellen erhöht werden. Werden für die Analyse eines Längenpolymorphismus mehrere Primerpaare verwendet, werden aufgrund der Verschiedenheit in der Primerbinderegion die Primer-Template-Interaktionen unterschiedlich beeinflusst und folglich werden verschiedene Produkterträge erkennbar. Mutationen, hauptsächlich Punktmutationen, treten selten in einer Primerbindestelle auf und können zu verschiedenen Genotypen führen, falls zwei verschiedene Primerpaare für dasselbe System verwendet werden. Daher sollten die Spurenextrakte mindestens zweimal amplifiziert werden und es sollten alternative Primerpaare für die Routinearbeit eingesetzt werden, um den Genotypen zu sichern [77]. Eine seltene Mutation in der Primerbindestelle auf dem Geschlechtstypisierungsmerkmal Amelogenin oder eine Deletion des 6 bp längeren Y-loci resultiert in falsch weiblichen oder irreführenden Ergebnissen [59]. In manchen Fällen ist das Geschlecht der Probe bedeutsam, so dass zur Absicherung weitere Regionen auf dem X- und Y- Chromosom amplifiziert werden.

1.7 Y-chromosomaler STR-Kit „Y13“

Der zweite Multiplex-Kit (Y13) besteht aus Y-chromosomalen STRs. Er soll die Systeme DYS391, DYS439, DYS390, DYS385 a+b, DYS389 I/II, DYS392, DYS388, DYS393, DYS19, DYS437, DYS438 beinhalten. Die Amplikonlängen sollten so kurz wie möglich gewählt werden für die Analyse von Spuren mit degradierter DNA.

Eine Untersuchung Y-chromosomaler STR-Marker spielt eine entscheidende Rolle beispielsweise bei Vergewaltigungsfällen [11,34,73,91,102,152,170]. Mayntz-Press et al konnten mit Hilfe der Y-STR-Typisierung 5-6 Tage nach dem Koitus Spermien im Muttermund nachweisen [110]. Die Mischspuren bestehen aus den Samen des Vergewaltigers und den Zellen des Opfers. Durch eine differentielle Lyse ist es zwar möglich, die Spermien von den restlichen Zellen zu trennen, doch ist die Trennung nicht immer vollständig [152]. Überdies können die männlichen Zellen vasektomierter und azoospermischer Männer nicht von den weiblichen

getrennt werden. Eine Untersuchung mit autosomalen Markern ist wegen dem Mischungsverhältnis, Überschuss an weiblicher DNA und geringer Anteil an männlicher DNA, schwierig. Ein männliches Profil kann bis zu einem Mischungsverhältnis von etwa 1:20 nachgewiesen werden. Bei einem Mischungsverhältnis von 1:100 erscheint nur noch das weibliche Profil. Durch die Anwendung eines gonosomalen Y-STR-Kits ist es möglich, männliche DNA bis zu einem Mischungsverhältnis von etwa 1:4000 nachzuweisen [145]. Daher ist eine Y-chromosomale STR-Typisierung von großem Vorteil, falls die Spur aus einem oder mehreren Samen-Spender besteht, aus Ejakulat vasektomierter oder azoospermischer Männer, aus anderen gemischten Körperflüssigkeiten und Zellen wie beispielsweise Speichel-Haut, Haut-Schweiß.

Überdies spielen die Y-STR-Marker eine große Rolle in der Ahnenforschung, Untersuchung männlicher Stammlinien [105], oder bei Vaterschaftstest, vor allem wenn der Putativvater nicht zugängig ist. Die Aussagekraft ist bei der Verwendung autosomaler STRs weitaus geringer, falls Kinder oder Eltern als Vergleichspersonen nicht herangezogen werden können, sondern ein Abgleich mit Verwandten erfolgt.

Die am häufigsten benutzten Loci sind die, die den minimalen Haplotypen zusammensetzen: DYS19, DYS389, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, DYS385 [102]. Die Diversität des minimalen Haplotypen [157] liegt weltweit zwischen 0,5699 für Zriba in Tunesien, 0,7076 für Andon Poci in Albanien und 1,00000 für Wien in Österreich, Alcamo in Italien oder Ankara in der Türkei (Y-STR Haplotype Reference Database, www.yhrd.org). Die SWGDAM (scientific working group on DNA analysis methods) hat neulich empfohlen, den Haplotypen um die Loci DYS438 und DYS439 zu erweitern.

Y-chromosomale STRs stellen einen einzelnen Haplotypen dar [73]. Man darf die individuellen Allelfrequenzen nicht miteinander multiplizieren. Wenn es einen Treffer mit der Verwendung der Y-Haplotypen Analyse gibt, benötigt man die Frequenz des Y-STR Haplotypen in der Population. In Europa existiert eine Y-STR DNA-Datenbank, die den „erweiterten Haplotypen“ beinhaltet, der im Vergleich zum minimalen Haplotypen zusätzlich den Y-STR Marker YCAII enthält (siehe auch http://ystr.charite.de). DYS385, DYS389 und YCAII haben verdoppelte Regionen und können folglich zwei polymorphe Peaks liefern. Mit der Verwendung dieses „erweiterten Haplotyps“ ist es möglich, 74-90% der männlichen Individuen

in verschiedenen europäischen Populationen zu unterscheiden [34]. Viele Datenbanken liefern Haplotypen-Frequenzen für riesige Regionen, nicht aber für Subpopulationen. Um zukünftige Anhäufungen verschiedener Nomenklaturen zu vermeiden und den Daten-Austausch zwischen den Laboren zu ermöglichen, sollten Richtlinien für die Y-STR Allelnomenklatur ausgegeben werden [73].
Einziger Nachteil bei der Y-chromosomalen Typisierung ist die fehlende Rekombination. Die potentielle Unterscheidungskapazität eines Y-STR Multiplexes kann gesteigert werden durch die Analyse einer großen Anzahl an Y-STRs oder/und durch die Verwendung hoch polymorpher Y-STR Marker.

1.8 Fragestellung der Dissertation

Das Ziel in dieser Studie war die Entwicklung eines optimalen Extraktionsverfahrens insbesondere für die Isolation von DNA aus problematischen Spuren, d.h. Spuren mit degradierter und LCN-DNA und/oder potenziellen inhibitorischen Substanzen. Da Haare in der telogenen Phase häufig am Tatort hinterlassen werden und die DNA in der Regel sowohl in LCN als auch hoch degradiert vorliegt, erfolgte die Optimierung der DNA-Isolation an Haaren mit telogener Wurzel und an Haarschäften. Dazu wurden mehrerer Methoden getestet. Es galt dabei, nicht nur eine größtmögliche Menge an DNA aus Haaren zu isolieren, sondern auch die Abtrennung des PCR-Inhibitors Melanin zu gewährleisten.
Da elektronenmikroskopische Bilder eine deutliche Beschädigung der Haaroberfläche nach der Färbung zeigen und die Färbemittel möglicherweise die DNA angreifen und dadurch zusätzlichen Einfluss auf die Typisierung haben, lag die Konzentration zudem auf der STR-Typisierung gefärbter und ungefärbter Haare. Das Extraktionsverfahren soll anschließend an weiteren biologischen Spuren getestet werden, die eine Herausforderung in der forensischen Spurenkunde darstellen.

Da die inhibitorischen Substanzen nicht immer vollständig während der DNA-Extraktion von der DNA abgetrennt werden können und ein zeit- und arbeitsaufwendiges Aufreinigungsverfahren vermutlich einen zu großen DNA-Verlust verursacht, galt zudem die Optimierung der Amplifikationsreaktion. Als

künstlicher PCR-Inhibitor fungierte Hämin bzw. Melanin bei der Verwendung der Haarextrakte. Gleichzeitig sollte die PCR für Spuren mit degradierter und LCN-DNA optimiert werden. Dazu wurden verschiedene Hot-Start Polymerasen, Puffer, PCR-Additive und weitere Reaktionskomponenten in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Modifikationen im PCR-Programm können zudem zu einer erfolgsversprechenden Typisierung beitragen.

Die Entwicklung zweier STR Multiplex-Kits (Q8 und Y13) soll die Sensitivität und den Produktertrag bei der Amplifikation von DNA aus diesen problematischen Spuren erhöhen. Um den Typisierungserfolg von Spuren mit degradierter DNA zu erhöhen, wurde zum einen der Schwerpunkt auf die Reduktion der Amplikonlängen gelegt. Da in der forensischen Fallarbeit häufig Spuren mit LCN-DNA analysiert werden müssen, sollten die beiden Multiplex-Kits eine hohe Nachweissensitivität aufweisen. Eine hohe Sensitivität bringt die Gefahr der Generierung falscher Allele mit sich. Daher sollten beide Kits robuste Typisierungsergebnisse liefern, die Reproduzierbarkeit eines Profils sollte gewährt sein.

Der Q8-Multiplex soll die acht autosomalen Systeme der Deutschen DNA-Datenbank D3S1358, FGA, TH01, VWA, SE33/ACTBP2, D8S1179, D18S51, D21S11 und den Geschlechtstypisierungsmarker Amelogenin beinhalten, um einen deutschlandweiten Abgleich zu ermöglichen. Die Richtigkeit der Produkte, die Sensitivität und der Ertrag des Multiplex-Kits Q8 soll mit den kommerziellen Kits genRES® MPX-2 (Serac, Bad Homburg), Mentype® Nonaplex^{QS} (Biotype AG, Dresden) und AmpFℓSTR® SGM PLUS® PCR Amplification Kit (ABI, Foster City, USA) verglichen werden.

Der Y13-Multiplex besteht aus Y-chromosomalen STRs. Er beinhaltet die Systeme DYS391, DYS439, DYS390, DYS385 a+b, DYS389 I/II, DYS392, DYS388, DYS393, DYS19, DYS437, DYS438. Durch die Anwendung eines gonosomalen Y-STR-Kits ist es möglich, männliche DNA in einer Mischspur mit Überschuss an weiblicher DNA zu analysieren, bei der die Typisierung mit autosomaler Marker nicht mehr realisierbar wäre. Die Sensitivität des Y13 und die PCR-Erträge sollen mit dem kommerziellen Kit PowerPlex® Y System (Promega) verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Optimierung des Extraktionsverfahrens

Eine Optimierung der DNA-Extraktion erfolgte in erster Linie an telogenen Haaren und Haarschäften. Die Haare wurden an Kleidungsstücken von Personen abgesammelt, von denen ebenso eine Mundspeichelprobe als Vergleichsspur vorlag. Unter den insgesamt 36 Versuchspersonen befanden sich acht Personen, die sich regelmäßig ihre Haare färbten. Es wurden nur bereits ausgefallene Haare gesammelt, um sicherzustellen, dass es sich um Haare in der telogenen Phase handelt. Unter dem Mikroskop wurden die Haarwurzeln begutachtet und deren Entwicklungsstatus dokumentiert. Nur die sicher eingestuften Haare mit telogener Wurzel wurden für die weitere Studie zur Optimierung des Extraktionsverfahrens herangezogen. Für die Untersuchung der Haarschäfte wurde mindestens ein Zentimeter des telogenen Wurzelbereichs abgeschnitten. Die Haarfarbe, der physikalisch-chemische Zustand des Haares und die Haarlänge wurden notiert, die zwischen zwei und 30 Zentimetern variierte. Der Haarschaft wurde mit Zellstoff, getränkt mit 10%igem Ethanol, kräftig abgerieben, um mögliche Kontaminationen auf der Haaroberfläche zu entfernen. Die Wischrichtung erfolgte dabei stets von proximal nach distal, um zu vermeiden, dass sich mögliche Kontaminationen unter die Schuppen der Kutikula festsetzen. Haarwurzeln und verschmutzte Haarschäfte wurden zudem zweimal in sterilem Wasser eingeweicht. Gesäuberte und ungesäuberte Haare wurden analysiert und deren Ergebnisse verglichen. Der Zellstoff wurde exemplarisch auf mögliche fremde oder körpereigene Zellen untersucht. Um einen besseren Überblick über den Einfluss des Färbens auf die Auswertung der Haare zu bekommen, wurden einige native Haare abgesammelt und im Labor künstlich gefärbt. Überdies wurden Haarschäfte künstlich mit Blut oder Speichel kontaminiert, um zu sehen, ob sich diese fremden Zellen wieder vollständig vom Haar waschen lassen.

Haare, die an einem Tatort gefunden wurden oder mit einer Straftat in Verbindung gebracht werden konnten, wurden unter dem Mikroskop betrachtet und es wurden nur die humanen Haare analysiert, die sich nicht in einem extrem schlechten

Zustand befanden, d.h. die nicht lange der Witterung ausgesetzt waren und daher nur wenige oder keine morphologischen Veränderungen zeigten.

Für die Optimierung der DNA-Extraktion aus Haaren wurde unter anderem

(i) der All-Tissue DNA-Kit (GEN-IAL, Troisdorf) verwendet mit kombinierter Glasmilch-Aufreinigung (Dianova, Hamburg) und einleitendem optimierten Lyseverfahren.

Zudem wurden weitere Extraktionsmethoden getestet wie

(ii) ChargeSwitch®Forensic DNA Purifaction Kit (Invitrogen),

(iii) Invisorb®Spin Forensic Kit (Invitek) [18] und eine einfache

(iv) GENI-AL Extraktion [90]. Zudem wurde

(va) ein TN_{CA}-Lysepuffer verwendet [75], gefolgt von einer Chelex-Extraktion (BioRad) [192] und Fällung mit LPA (linear polyacrylamide) (Protokoll vom BKA, siehe Anhang 7.4) („Chelex 1“). Dieses Protokoll wurde zusätzlich mit einem anderen

(vb) Lyseverfahren getestet, wie es für Haare mit der optimierten GEN-IAL-Extraktion angewandt wurde („Chelex 2“).

In den ersten Versuchsserien wurde DNA aus zehn Haaren mit dem Phenol-Chloroform-Verfahren isoliert. Die Typisierungsergebnisse zeigten ähnliche Erfolgsraten verglichen zu der nicht toxischen GEN-IAL-Extraktion. Zudem konnte die GEN-IAL-Extraktion verbessert werden mit einer Aufreinigung über Silika-Partikel. Daher wurde in der Hauptuntersuchung auf die Phenol-Chloroform-Methode verzichtetet, da sie überdies zeitaufwendig, schwierig zu handhaben und toxisch ist.

Die DNA von 20 Haaren mit telogener Wurzel und Haarschäften wurden mit GEN-IAL, Invisorb und „Chelex 2“ extrahiert, 30 Haarproben mit „Chelex 1“, 40 Proben mit ChargeSwitch und über 300 Proben mit GEN-IAL in Kombination mit der Silika-Aufreinigung.

Die einzelnen Extraktionsmethoden wurden zum einen genau nach den Anweisungen des Herstellers getestet, zum anderen wurde ein modifizierter Lyseschritt vorgeschaltet, um eine komplette und schnelle Lyse der Haare zu

gewährleisten. Für diesen Zweck wurden die Reagenzien Proteinase K, DTT und Harnstoff konzentrationsabhängig getestet.
Weiterhin wurden die verschiedenen Extraktionsmethoden teilweise kombiniert angewandt.
Bei der Extraktionsmethode (i) wurden die Haare zuerst mit einem Lysepuffer überschichtet (siehe Anhang 7.3). Zum Lysepuffer wurden 20 µl einer 20 mg/ml-konzentrierten Proteinase K -Lösung (Qiagen, Hilden) und 40 µl einer 1 M DTT-Lösung (Sigma-Aldrich) pipettiert. Es folgte eine Inkubation der Proben über Nacht bei 56°C. Falls die Haare am nächsten Tag noch nicht vollständig lysiert waren, wurde weiteres DTT und Proteinase K zugegeben. Mit der DNA-Extraktion sollte erst fortgefahren werden, wenn das Haar komplett aufgelöst vorliegt. Erst dann wird ein weiterer Lysepuffer zur Probe pipettiert. Nach kurzem Vermischen wird die Probe fünf Minuten bei -20°C inkubiert und anschließend für 15 Minuten mit 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wird verworfen und der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in das 514 µl absolutes Isopropanol mit 10,3 µl einer 1,5 M Natriumacetat-Lösung (pH 5,0) und 4,4 µl Silika-Suspension vorgelegt wurde. Nach vorsichtigem Vermischen wird die Probe unter gelegentlichem Schütteln bei RT inkubiert, damit die DNA an die Glasmilch binden kann. Danach wird die Probe für 15 Minuten mit 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 1 ml 70%igem eiskaltem (-20°C) Ethanol gewaschen und anschließend für etwa 30 Minuten bei 37°C getrocknet. Das Silika-DNA-Pellet wird in 30 µl HPLC-H_2O eluiert, vorsichtig vermischt und für etwa 30 Minuten bei 50°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert, damit sich die DNA von den Silika-Partikeln vollständig lösen kann. Anschließend wird das Eluat für höchstens fünf Minuten mit 13000 rpm zentrifugiert, damit sich die Glasmilch absetzt. Sieben Mikroliter des Überstandes werden für die Amplifikationsreaktion eingesetzt.

Nachdem die Extraktionsmethode für die DNA-Isolation aus Haaren optimiert vorlag, wurde das Verfahren an weiteren problematischen Spuren, d.h. an verunreinigten Spuren oder an Spuren mit degradierter und LCN-DNA angewandt. DNA wurde unter anderem aus feuchten Zigarettenkippen, Hautabrieben, Knochen, Kot, feucht verpackten Abriebtupfern und aus weiteren Spuren aus der Fallarbeit, die mit kommerziellen Methoden schlecht oder nicht zu typisieren waren, isoliert und analysiert.

Um die einzelnen Extraktionsverfahren, Kombinationen und Modifikationen bewerten zu können, wurden die Proben nach der DNA-Isolation analysiert. Die PCR wurde durchgeführt, indem zum einen ein selbst entwickelter „Short Amplicon“ Multiplex, Vorläufer-STR-Multiplex des späteren Q8, verwendet wurde, zum anderen für vergleichende Zwecke zwei kommerzielle Kits mit unterschiedlichen Amplikonlängen wie der genRES® MPX-2 Kit (Serac, Bad Homburg) und AmpFℓSTR® SGM PLUS® PCR Amplification Kit (ABI, Foster City, USA).

Die Proben, die mit dem Vorläufer-STR-Multiplex des späteren Q8 analysiert wurden, wurden in einem 12,5 µl Reaktionsvolumen amplifiziert, das 1x PCR Puffer II, 3 mM $MgCl_2$, 5 U Ampli*Taq*Gold Polymerase (ABI, Weiterstadt), 3 µg BSA (Sigma München), 0,2 mM von jedem Nukleotid und 0,6 µl des Primermixes enthielt.

Der „Short Amplicon“ Multiplex, Vorläufer des Q8, beinhaltet die Systeme D3S1358, FGA, TH01, VWA, SE33 and Amelogenin. D3S1358, FGA, Amelogenin wurden mit der Fluoreszenzfarbe FAM markiert und TH01, VWA, SE33 wurden JOE-markiert. Alle Primer waren 1x HPLC aufgereinigt und wurden zu einer Konzentration von 100 pmol/µl verdünnt. Die folgenden Konzentrationen für jedes Primerpaar wurden für den Multiplex verwendet: 5,22 µM Amelogenin, 7,46 µM TH01, 6,72 µM D3S1358, 14,93 µM VWA, 14,93 µM FGA, 20,90 µM SE33. Die thermischen Zyklenbindungen waren 11 Minuten bei 95°C, gefolgt von 33 Zyklen bei 93°C für eine Minute, 59°C für eine Minute, 72°C für 30 Sekunden. Danach erfolgte eine finale Extension bei 72°C für 40 Minuten und ein Herabkühlen auf 15°C.

Die Amplifikationsreaktionen mit den zwei kommerziellen Kits wurden genau nach Protokoll angesetzt.

Die Elektrophorese erfolgte am ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) mit dem Polymer POP4 und mit der Genescan Software. Die Proben für die Elektrophorese wurden vorbereitet mit 10 µl Hi-Di Formamid (Applied Biosystems), 0,5 µl GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystems) und 1 µl des PCR Produktes. Die Analyse der STR-Proben erfolgte mit dem Modul D, welches eine elektrokinetische Injektion auf die Einzelkapillare für fünf Sekunden bei 15000 Volt erzeugt. Die STR-Allele wurden anschließend

bei 15000 Volt für etwa 20 Minuten mit einer Lauftemperatur von 60°C aufgetrennt.

Die Optimierung der DNA-Isolation aus Knochen wurde nebenher parallel angestrebt.
Folgende Extraktionskits für Knochen wurden getestet:

- All-Tissue DNA-Kit (GEN-IAL)
- All-Tissue DNA-Kit (GEN-IAL) mit anschließender Glasmilch-Aufreinigung
- Invisorb®Spin Forensic Kit (Invitek)
- ChargeSwitch®Forensic DNA Purifaction Kit (Invitrogen)
- Dialyse-Aufreinigung mittels Nitrocellulose Membran [93]
- Qiagen´s Blood Maxi Kit [52]
- Kombination von NucleoSpin®Tissue XS (Macherey-Nagel) und NucleoSpin®-Food (Macherey-Nagel)

Die Entkalzifizierung der Knochen erfolgte mit einer 0,5 M EDTA-Lösung mit einem pH-Wert von 7,5. Falls sich das EDTA nicht vollständig löst, sollte die Lösung alkalischer eingestellt werden.
Alternativ zur EDTA-Lösung wurde eine 0,5 M CDTA-Lösung (1,2-Cyclohexylendinitrilotetraacetat) getestet. Der Vorteil einer CDTA-Lösung liegt im Vergleich zu einer EDTA-Lösung an der deutlich höheren Komplexbildungskonstanten. CDTA bildet demnach mit Ca^{2+}-Ionen stabilere Komplexe als EDTA. Da CDTA in Wasser nur wenig löslich ist, sollte die Lösung auf einen pH-Wert zwischen 10 und 11 eingestellt werden. In alkalischen Lösungen ist CDTA leicht löslich, so dass eine Konzentration von 0,5 M oder höher angesetzt werden kann.
Die Menge an Knochenmehl, das für die DNA-Extraktion verwendet wurde, betrug 0,14 - 4,4 g.
Um eine optimierte DNA-Isolation aus Knochen zu gewährleisten, wurde später für eine vollständige Lyse des Knochenmehls bei der Extraktion mit dem Invisorb®Spin Forensic Kit (Invitek) zusätzlich 30 µl DTT, bei der Extraktion mit dem ChargeSwitch®Forensic DNA Purifaction Kit (Invitrogen) 20 µl DTT und 16 µl Proteinase K zugegeben.

2.2 Optimierung der Amplifikationsreaktion

Für die Optimierung des PCR-Ansatzes wurden viele Reaktionsparameter systematisch abgeändert. Gestartet wurde von Standard-PCR-Bedingungen. Die Konzentrationen der Reaktionsvariablen Polymerase, Puffer, Primer, Mg^{2+}-Ionen und dNTPs wurden schrittweise abgeändert. Die thermischen Zyklenbedingungen wie Zeit und Temperatur jedes Schrittes wurden modifiziert. Zudem wurden verschiedene Puffer, Polymerasen und PCR-Additive getestet. Weiterhin wurden unterschiedliche Kombinationen an Polymerasen und PCR-Additiven erprobt.
Um eine PCR-Optimierung aufgrund der veränderten Reaktionsparameter sicherzustellen, wurden die modifizierten Amplifikationsbedingungen mehrmals angewandt.
Später wurden die PCR-Optimierungen auch an Spuren mit degradierter und LCN-DNA aus der Fallarbeit angewandt oder an Spuren, bei denen die Präsenz einer inhibitorischer Substanz angenommen wurde.

2.2.1 Puffer und Hot-Start Polymerasen

Die Puffer und Hot-Start Polymerasen sowie die gebrauchsfertigen PCR-Kits, die in dieser Studie zur Optimierung der Amplifikationsreaktion getestet wurden, sind in Tabelle 1, 2 und 3 aufgelistet.

Tab. 1 folgende Puffer wurden getestet

Puffer	**Pufferbestandteile**
GeneAmp 10x PCR Buffer II (Applied biosystems)	100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl
GoldSt*r Buffer (Promega)	100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl, 15 mM $MgCl_2$, 1% Triton® X-100, 8 mM dNTPs, 1,6 mg/ml BSA
10x PCR Buffer (Qiagen)	Tris-HCl (pH 8,7), KCl, $(NH_4)_2SO_4$, 15 mM $MgCl_2$
10x Thermo-Start® Standard Buffer (ABgene)	kein $MgCl_2$
10x Thermo-Start® High performance (HP) Buffer (ABgene)	

10x HotMaster *Taq* Buffer (Eppendorf)	25 mM $MgCl_2$
10x PCR Buffer (Sigma)	100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl; 0,01% Gelatine
10x Nova*Taq* Hot Start Buffer (Novagen)	
MasterAmp AmpliTherm 10x PCR Buffer (Epicentre)	100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 500 mM KCl
10x Reaction Buffer (Genecraft)	670 mM Tris-HCl (pH 8,8), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 15 mM $MgCl_2$, 0,1% Tween-20
MasterAmp *Tth* 20x PCR Buffer (Epicentre)	400 mM $(NH)_2SO_4$, 1 M Tris-HCl (pH 9,0 bei 25°C)
MasterAmp *Tfl* 20x PCR Buffer (Epicentre)	400 mM $(NH_4)SO_4$, 1 M Tris-HCl (pH 9,0 bei 25°C)
5x Colorless Go*Taq*® Flexi Buffer (Promega)	pH 8,5
10x Reaktionspuffer Y (Peqlab)	200 mM Tris-HCl (pH 8,55), 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% Tween 20, 20 mM $MgCl_2$
10x Reaktionspuffer S (Peqlab)	100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl, 0,1% Tween 20, 15 mM $MgCl_2$
5x KAPAHiFi™ High Fidelity Buffer (Peqlab)	beide KAPAHiFi-Puffer mit höherem Salzgehalt
5x KAPAHiFi™ GC Buffer (Peqlab)	[bei GC-reichen Templates oder stabilen Sekundärstrukturen]
5x KAPA2G™ Buffer A (Peqlab)	[für Templates mit einem GC-Gehalt < 65%]
5x KAPA2G™ Buffer B (Peqlab)	[bei Präsenz von anionischen Inhibitoren]
5x KAPA2G™ Buffer GC (Peqlab)	[bei GC-reichen Templates oder stabilen Sekundärstrukturen]

Tab. 2 folgende Hot-Start Polymerasen wurden getestet

Hot-Start Polymerase	Aufbewahrungspuffer	Enzymeigenschaften	Pre-Heating und finale Extension
AmpliTaq Gold (Applied biosystems)	20 mM Tris-HCl (pH 9,0), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Tween®20, 50% (w/v) Glycerol	5´-3´Exonuklease-Aktivität, keine 3´-5´Exonuklease-Aktivität (Proofreading)	Pre-Heating: 95°C für 5-10 min, finale Extension: 60-72°C für ≥10 min
AccuPrime™ Taq DNA Polymerase (Invitrogen)	20 mM Tris-HCl (pH 8,4), 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, Stabilizer, 50% (w/v) Glycerol	Regelung der Aktivierung/Inaktivierung erfolgt durch Antikörper	Pre-Heating: 94°C für 15 s bis 2 min [Ein Pra-Heating ≤ 2 min ist theoretisch nicht nötig, da Hitze-Aktivierung der anfänglichen Template-Denaturierung entspricht]
HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen)	20 mM Tris-HCl (pH 9,0), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, Stabilizer, 0,5% (w/v) Tween®20, 50% (w/v) Glycerol, 0,5% (w/v) Nonidet®P-40	5´-3´Exonuklease-Aktivität, keine 3´-5´Exonuklease-Aktivität (Prozfreading), Extensionrate: 2-4 kb/min (72°C), Halbwertszeit: 10 min bei 97°C 60 min bei 94°C, 3´Acenylierung-Aktivität, self-priming-Aktivität, 2,5 U pru PCR-Ansatz	Pre-Heating: 95°C für 15 min, finale Extension: 72°C für 10 min
HotStarTaq Plus DNA Polymerase (Qiagen)			Pre-Heating: 95°C für 5 min, finale Extension: 72°C für 10 min
Thermo-Start® DNA Polymerase (AEgene)	20 mM Tris-HCl (pH 9,2), 100 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Tween®20, 50% (w/v) Glycerol, 0,5% Nonidet®P-40	5´-3´Exonuklease-Aktivität, keine 3´-5´Exonuklease-Aktivität (Prozfreading), chemisch modifiziert, 3´Acenylierung-Aktivität, 1,25 U pro PCR-Ansatz	Pre-Heating: 95°C für 15 min oder kein Pre-Heating, aber Denaturierung für 2 min anstelle von 10-30 s (für die ersten 7-8 Zyklen), finale Extension: 72°C für 5 min
HotMaster™ Taq DNA Polymerase (Eppendorf)	25 mM Tris-HCl (pH 8,0), 35 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% Tween®20, 50% Glycerol, Stabilizer, 0,5% Igepal®CA-630,	keine Endonuklease- und Exonuklease-Aktivität, Regelung der Aktivierung/Inaktivierung erfolgt durch Antikörper, 0,5-´,5 U pro PCR-Ansatz	Pre-Heating: 94°C für ≤ 2 min, Primer-Extension sollte bei 65°C erfolgen (60°C-70°C)
JumpStart™ Taq DNA Polymerase (Sigma)	15 mM Tris-HCl (pH 7.5), 75 mM KCl, 0,05 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 50% Glycerol, 0,25% Tween®20, 0,25% Igepal™CA-630	Regelung der Aktivierung/Inaktivierung erfolgt durch Antikörper, 0,5-´,5 U pro PCR-Ansatz	Pre-Heating: 94°C für 1 min, finale Extension: 72°C für 1 min

Hot-Start Polymerase	Aufbewahrungspuffer	Enzymeigenschaften	Pre-Heating und finale Extension
NovaTaq™ Hot Start DNA Polymerase (Novagen)		keine Endonuklease- und Exonuklease-Aktivität, chemisch modifiziert	Pre-Heating: 95°C für 7-10 min
MasterAmp™ AmpliTherm™ DNA Polymerase (Epicentre)	50% Glycerol mit 1 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween®20, 0,5% NP-40	keine 5'-3'Exonuklease-Aktivität, keine 3'-5'Exonuklease-Aktivität (Proofreading), terminale Transferase-Aktivität, keine reverse Transkriptase-Aktivität (Mn^{2+}-abhängig), Extensionrate (72°C): 2-4 kb//min, Prozessivität: 5-10 Basen, Halbwertszeit: 10 min (97°C), 40 min (95°C), 1,25 U pro PCR-Ansatz	Pre-Heating: 92-95°C für 3-5 Minuten, optimale Aktivität zwischen 70°C und 74°C, finale Extension: 68-72°C für 10-30 min
SupraTherm DNA Polymerase (Genecraft)	10 mM K_2PO_4-Puffer (pH 7,0), 50% Glycerol (v/v), 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,01% Tween 20, 1 mM DTT	5'-3'Exonuklease-Aktivität, 3'-5'Exonuklease-Aktivität (Proofreading)	Pre-Heating: 95°C für 5 min
MasterAmp™ Tth DNA Polymerase (Epicentre)	50% Glycerol mit 1mM DTT, 50mM Tris-HCl (pH 7,5), 100mM NaCl, 0,1mM EDTA, 0,5% Tween 20, 0,5% NP-40	5'-3'Exonuklease-Aktivität, keine 3'-5'Exonuklease-Aktivität (Proofreading), terminale Transferaseaktivität, reverse Transkriptase-Aktivität (Mn^{2+}-abhängig), Extensionrate (72°C): 2-4 kb//min, Prozessivität: 50-60 Basen, Halbwertszeit: 10 min (97°C), 40 min (95°C), 1,25 U pro PCR-Ansatz	Pre-Heating: 92-95°C für 3-5 min, finale Extension: 68-72°C für 10-30 min, optimale Aktivität zwischen 70°C und 74°C
MasterAmp™ Tfl DNA Polymerase (Epicentre)	50% Glycerol mit 1 mM DTT, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5% Tween 20, 0,5% NP-40	5'-3'Exonuklease-Aktivität, keine 3'-5'Exonuklease-Aktivität (Proofreading), terminale Transferaseaktivität, keine reverse Transkriptase-Aktivität (Mn^{+2}-abhängig), Extensionrate (72°C): 2-4 kb//min, Prozessivität: 50-60 Basen, Halbwertszeit: 10 min (97°C), 40 min (95°C), 0,5 U pro PCR-Ansatz	Pre-Heating: 92-95°C für 3-5 min, finale Extension: 68-72°C für 10-30 min, optimale Aktivität zwischen 70°C und 74°C

Hot-Start Polymerase	Aufbewahrungspuffer	Enzymeigenschaften	Pre-Heating und finale Extension
Sawady `Hot` Taq-DNA-Polymerase (Peqlab)	10 mM Tris-HCl (pH 7,5 bei 25°C), 55% (w/v) Glycerin, 50 mM KCl, 0,1 mM EDTA		
GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega)		5'-3'Exonuklease-Aktivität, Regelung der Aktivierung/Inaktivierung erfolgt durch Antikörper, 1,25 U pro 50 µl PCR-Ansatz	Pre-Heating: 94-95°C für 2-3 min, finale Extension: 72-74°C für 5 min
KAPA2G™ Robust Hot Start DNA Polymerase (Peqlab)		5'-3'Exonuklease-Aktivität, keine 3'-5'Exonuklease Aktivität (Proofreading), Regelung der Aktivierung/Inaktivierung erfolgt durch Antikörper, 0,5-1,0 U pro 25 µl PCR-Ansatz	Pre-Heating: 95°C für 30 s, finale Extension: 72°C für 30-60 s/kb
KAPAHiFi™ Hot Start DNA Polymerase (Peqlab)		3'-5'Exonuklease Aktivität (Proofreading), Regelung der Aktivierung/Inaktivierung erfolgt durch Antikörper, Prozessivität > 100 Basen, Extensionsrate: 3-4,5 kb/min, 0,5 U pro 25 µl PCR-Ansatz	Pre Heating: 95°C für 2-5 min und 98°C für 20 s in jedem Zyklus!! finale Extension: 72°C für 1-5 min

Tab. 3 folgende gebrauchsfertige PCR-Kits wurden getestet

gebrauchsfertig für die PCR	Inhalt	Pre-Heating und finale Extension
Illustra Hot Start Mix RTG (beads) (GE Healthcare)	1,75 Units der PuReTaq™ DNA Polymerase, 1,65 µg des Hot Start Activators, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0 be RT), 50 mM KCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 µm dATP, dCTP, dGTF, dTTP, Stabilizers (einschließlich BSA)	Pre-heating: 94-95°C für 2 min, finale Extension: 68-72°C für 5 min
Advantage®-HF 2 (High-Fidelity) PCR Kit (Clontech)	50x Advantage-HF 2 Polymerase Mix aus TITANIUM™ Taq DNA Polymerase (mit einen TaqStart Antikörper) und einer kleinen Menge einer anderen Polymerase mit Proofreading in 50% Glycerol, 15 mM Tris-HCl (pH 7,5), 75 mM KCl, 1 mM EDTA, 10x HF2 PCR Puffer (zur Amplifikation von Fragmenten bis zu ~3,5 kb), 10x Advantage® 2 PCR Puffer, 10x HF dNTP Mix	Annealing und Extension ist zu einem Schritt zusammengefasst und erfolgt bei 68°C
KAPA Blood PCR MasterMix (Peqlab)	gebrauchsfertiger 2x PCR-Mastermix mit einer speziell entwickelten DNA-Polymerase (0,04 U/µl) der zweiten Generation für die Amplifikation vor DNA direkt aus Vollblut, außer Primer und Template (Blut) mit dem MasterMix A: Verwendung für Assays, bei denen hochsensitive Fluoreszenz-Detektionssysteme zum Einsatz kommen mit dem MasterMix B: Für hohe Ausbeuten sowie GC-reiche Templates, Verwendung für Assays, bei denen eine Analyse mittels Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromid zum Einsatz kommt	
Multiplex PCR Kit (Qiagen)	gebrauchsfertiger Mastermix aus Puffer mit HotStarTaq® DNA Polymerase, $MgCl_2$ (6 mM), dNTPs	Pre-Heating: 95°C für 15 min, finale Extension: 72°C für 10 min

Die gebräuchlichsten Enzyme sind Modifikationen der nativen hitzestabilen DNA Polymerase aus dem wärmeliebenden *Thermus aquaticus*, das in der Nähe von heißen Quellen und Geysiren lebt. Darunter zählen die Ampli*Taq* Gold (Applied biosystems), AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen), HotStar*Taq* DNA Polymerase (Qiagen), HotStar*Taq* Plus DNA Polymerase (Qiagen), HotMaster™ *Taq* DNA Polymerase (Eppendorf), JumpStart™ *Taq* DNA Polymerase (Sigma), Nova*Taq*™ Hot Start DNA Polymerase (Novagen), SupraTherm DNA Polymerase (Genecraft), PuRe*Taq*™ DNA Polymerase aus dem illustra Hot Start Mix RTG (GE Healthcare), Go*Taq*® Hot-Start DNA Polymerase (Promega), KAPA2G™ Robust Hot Start DNA Polymerase (Peqlab) und die TITANIUM™ *Taq* DNA Polymerase aus dem Advantage®-HF 2 (High-Fidelity) PCR Kit (Clontech).
MasterAmp™ *Tth* DNA Polymerase (Epicentre) stammt aus *Thermus thermophilus*, MasterAmp™ *Tfl* DNA Polymerase (Epicentre) aus *Thermus flavus*.
Die MasterAmp™ AmpliTherm™ DNA Polymerase (Epicentre) stammt aus einem unbekannten thermophilen Bakterium.
Thermo-Start® DNA Polymerase (ABgene) ist eine chemisch modifizierte patentierte Version der Thermoprime Plus DNA Polymerase.
Die Herkunft der Sawady `Hot` *Taq*-DNA-Polymerase (Peqlab), der KAPAHiFi™ Hot Start DNA Polymerase (Peqlab) und der zweiten Polymerase aus dem Advantage®-HF 2 (High-Fidelity) PCR Kit (Clontech) sowie die Polymerase aus dem KAPA Blood PCR MasterMix (Peqlab) ist nicht angegeben.
Weitere Eigenschaften der einzelnen Polymerasen sind in Anhang 7.2 (Tab. 23) beschrieben.
Alle Polymerasen werden in einer Konzentration von 5 U/µl geliefert bis auf die JumpStart™ *Taq* DNA Polymerase (Sigma) mit einer Konzentration von 2,5 U/µl sowie der MasterAmpTM *Tfl* DNA Polymerase (Epicentre) und der KAPAHiFi™ Hot Start DNA Polymerase (Peqlab) mit 1 U/µl.

Zum einen wurden die unterschiedlichen Puffer getestet:
Die Ampli*Taq* Gold (AB) wurde getestet in Kombination mit

- GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
- GoldSt*r Buffer (Promega)
- 10x PCR Buffer (Qiagen)
- 10x Thermo-Start® Standard Buffer (ABgene)

- 10x Thermo-Start® High performance (HP) Buffer (ABgene)
- 10x HotMaster *Taq* Buffer (Eppendorf)
- 10x PCR Buffer (Sigma)
- 10x Nova*Taq* Hot Start Buffer (Novagen)

Darüber hinaus wurden die Enzyme mit dem mitgelieferten, für das Enzym angepassten Puffer genau nach den Anweisungen der Hersteller getestet:

- Ampli*Taq* Gold (AB) mit dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
- AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) mit dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
- HotStar*Taq* (Qiagen) mit dem 10x PCR Buffer (Qiagen)
- HotStar*Taq* Plus (Qiagen) mit dem 10x PCR Buffer (Qiagen)
- ThermoStart (ABgene) mit dem 10x Thermo-Start® Standard Buffer (ABgene) und dem 10x Thermo-Start® High performance (HP) Buffer (ABgene)
- HotMaster *Taq* (Eppendorf) mit dem 10x HotMaster *Taq* Buffer (Eppendorf)
- JumpStart *Taq* (Sigma) mit dem 10x PCR Buffer (Sigma)
- Nova*Taq* (Novagen) mit dem Nova*Taq* Hot Start Buffer (Novagen)
- MasterAmp™ AmpliTherm™ DNA Polymerase (Epicentre) mit dem MasterAmp AmpliTherm 10x PCR Buffer (Epicentre)
- SupraTherm DNA Polymerase (Genecraft) mit dem 10x Reaction Buffer (Genecraft)
- Go*Taq*®Hot-Start DNA Polymerase (Promega) mit dem GoldSt*r Buffer (Promega) bzw. mit dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
- Sawady `Hot` *Taq*-DNA-Polymerase (Peqlab) mit dem 10x Reaktionspuffer Y (Peqlab) und dem 10x Reaktionspuffer S (Peqlab)
- KAPA2G™ Robust Hot Start DNA Polymerase (Peqlab) mit dem 5x KAPA2G™ Buffer A (Peqlab), dem 5x KAPA2G™ Buffer B (Peqlab) und dem 5x KAPA2G™ Buffer GC (Peqlab)
- KAPAHiFi™ Hot Start DNA Polymerase (Peqlab) mit dem 5x KAPAHiFi™ High Fidelity Buffer (Peqlab) und dem 5x KAPAHiFi™ GC Buffer (Peqlab)
- Illustra Hot Start Mix RTG (GE Healthcare)
- KAPA Blood PCR MasterMix (Peqlab)

- Advantage-HF 2 Polymerase Mix (Clontech) mit dem 10x HF 2 Buffer (Clontech) und dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
- MasterAmp™ *Tfl* DNA Polymerase (Epicentre) mit dem MasterAmp™ *Tfl* 20x Buffer (Epicentre)
- MasterAmp™ *Tth* DNA Polymerase (Epicentre) mit dem MasterAmp™ *Tth* 20x Buffer (Epicentre)

Die Enzyme wurden ebenso kombiniert in den Amplifikationsansatz eingesetzt und an Zelllinien-DNA getestet (Tab. 4). Dazu wurden in der ersten Testphase die Polymerasen in gleichen Mengenverhältnissen zum PCR-Ansatz zugegeben. Die Pre-Heating-Zeiten wurden in der Regel auf die kürzere Zeit eingestellt. Falls die Typisierungsergebnisse vielversprechend waren, wurden Spurenextrakte aus der Fallarbeit mit dieser Polymerasekombination amplifiziert.

Tab. 4 Polymerasekombinationen und die dazu geprüften Puffer

Polymerasen	**Puffer**
Ampli*Taq* Gold (AB) + Nova*Taq* (Novagen)	GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
Ampli*Taq* Gold (AB) + MasterAmp™ AmpliTherm™ DNA Polymerase (Epicentre)	GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
	MasterAmp AmpliTherm 10x PCR Buffer (Epicentre)
	GoldSt*r Buffer (Promega)
	10x PCR Buffer (Sigma)

Die Amplifikation mit der Ampli*Taq* Gold (AB) und dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB) erfolgte stets genau nach dem vom Hersteller vorgegebenem PCR-Programm. Als nächstes wurde einer Time-Release PCR getestet, bei der kein Pre-Heating stattfindet, die Zyklenzahl wird jedoch erhöht.

Dazu wurde die Time-Release PCR mit der Ampli*Taq* Gold (AB) optimal eingestellt, so dass die Ergebnisse vergleichbar waren zu den Ergebnissen, die nach einer „normalen“ Amplifikationsreaktion erkennbar waren.

Mit der Time-Release PCR konnten so Enzymkombinationen getestet werden, die deutlich unterschiedlich lange Pre-Heating-Zeiten haben. Da die Enzyme zusammen in einem Puffer optimal arbeiten müssen, wurden solche Enzyme

kombiniert, die in einem Puffer mit demselben pH-Wert ideal arbeiten können (Tab. 5).

Tab. 5 weitere Polymerasekombinationen und die dazu geprüften Puffer

Ampli*Taq* Gold (AB) + MasterAmp™ AmpliTherm™ DNA Polymerase (Epicentre)	GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
	MasterAmp AmpliTherm 10x PCR Buffer (Epicentre)
Ampli*Taq* Gold (AB) + ThermoStart (ABgene)	GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
	10x Thermo-Start® Standard Buffer (ABgene)
Ampli*Taq* Gold (AB) + JumpStart *Taq* (Sigma)	GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
	10x PCR Buffer (Sigma)
Ampli*Taq* Gold (AB) + HotMaster *Taq* (Eppendorf)	GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
	10x HotMaster *Taq* Buffer (Eppendorf)

Aufgrund einer möglichen Optimierung der PCR-Effizienz durch eine Polymerasekombination, wurden ebenso Polymerasen kombiniert, die aufgrund unterschiedlicher Puffer-pH-Bereiche theoretisch nicht zusammenpassen (Tab. 6 und 7).

Tab. 6 zusätzlich getestete Polymerasenkombinationen

Polymerasen I	**Polymerase II**
MasterAmp™ *Tfl* DNA Polymerase (Epicentre)	Ampli*Taq* Gold (AB)
MasterAmp™ *Tth* DNA Polymerase (Epicentre)	

Tab. 7 weitere erprobte Polymerase- und Pufferkombinationen

Polymerase I	**Polymerase II**	**Puffer**
MasterAmp™ *Tfl* DNA Polymerase (Epicentre)	Nova*Taq* (Novagen)	10x Nova*Taq* Hot Start Buffer (Novagen)
MasterAmp™ *Tth* DNA Polymerase (Epicentre)	Nova*Taq* (Novagen)	
MasterAmp™ *Tfl* DNA Polymerase (Epicentre)	Nova*Taq* (Novagen)	MasterAmp™ *Tth* bzw *Tfl* 20X Buffer (Epicentre)
MasterAmp™ *Tth* DNA Polymerase (Epicentre)	Nova*Taq* (Novagen)	

Das Pre-Heating wurde in Anwendung dieser Polymerasekombinationen auf drei Minuten eingestellt.

2.2.2 PCR-Additive

Der Einsatz von PCR-Additiven erfolgte vorwiegend bei Spuren aus der Fallarbeit, bei denen die Präsenz einer inhibitorischen Substanz angenommen wurde. Zudem fungierte Hämin (0,25%ige Lösung) von der Firma MoBiTec, Göttingen als künstlicher Inhibitor. Hämine sind Komplexverbindungen der Häme mit dem Eisen-Ion in der Oxidationsstufe (+III) und einem Chlorid-Ion als axialen Liganden.
Bei der Verwendung von Proteinen als PCR-Additive wird empfohlen, keine pflanzlichen bzw. mikrobiellen Proteine zu verwenden [165]. Zwei ausführliche Tabellen über die möglichen Additive mit ihren Wirkungsweisen sind in Anhang 7.1 aufgeführt.

In dieser Studie wurden folgende Substanzen getestet:

- Betain (Trimethylglycin)
- BSA
- DMSO (Detergenz)
- DTT
- 5x Enhancer Solution P (Peqlab)
- Formamid
- Fremd-DNA (Katzen-DNA)
- Glycerol
- Igepal®CA-630
- 5x KAPA Enhancer 1 (Peqlab)
- 25x KAPA Enhancer 2 (Peqlab)
- MasterAmp™ 10x PCR Enhancer mit Betain (Epicentre)
- Nonidet®P-40 (Detergenz)
- 5x OptiZyme Enhancer (Invitek)
- Q-Solution (Qiagen)
- 20x Super Enhancer for PCR (Genecraft)
- 5x *Taq*Master® PCR Enhancer (Eppendorf)

- gp32 (Roche Diagnostics GmbH)
- Triton® X-100
- Tween®20 (Detergenz)
- Seifenlösung (selbst hergestellt)
- Milchpulver-Lösung (selbst hergestellt)
- Milch-Lösung (selbst hergestellt)
- Würfelzucker-Lösung (selbst hergestellt)

Das gp32 wurde in einer Konzentration von 5 µg/µl in einem Aufbewahrungspuffer mit 20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 50% Glycerol (v/v), pH etwa 8,0 geliefert.

Hemmkonzentrationsbestimmung erfolgten mit Hilfe der Amplifikation einer DNA-Mischung aus der weiblichen Zelllinie 9947A und der männlichen Zelllinie 9948 (Promega, Madison/USA) im Verhältnis 10:1. Die niedrige Komponente betrug dabei 20 pg (33 Zyklen) bzw. 50 pg (30 Zyklen). Es wurden stets Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.3 Entwicklung des Multiplex-Kits Q8

Die Primersequenzen für den Multiplex Q8 wurden ausgewählt und mit dem AutoDimer Programm auf Primer-Dimere und Hairpins geprüft [186]. Ein Abgleich der Primersequenz mit dem Genom erfolgte über BLAST, ein Programm, das über http//:www.ncbi.nlm.nih.gov zugänglich ist.
Die Primerpaare wurden einzeln getestet. Primerpaare, die erfolgreiche Amplifikationsergebnisse lieferten, wurden anschließend kombiniert für die PCR angesetzt.
Die Primer für den Q8-Primermix wurden in HPLC-H_2O lysiert, so dass sie eine Konzentration von 100 pmol/µl hatten. Schließlich wurden folgende Konzentrationen für die einzelnen Primerpaare für den Multiplex eingesetzt: Amelogenin: 4,79 µM; TH01: 6,39 µM; D3S1358: 5,43 µM; VWA: 17,57 µM; FGA: 13,42 µM; SE33: 13,42 µM; D8S1179: 8,63 µM; D18S51: 6,39 µM; D21S11: 7,99 µM.

Die Primersequenzen sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tab. 8 STR-Primersequenzen für Q8

Locus		STR-Primersequenzen (5´nach 3´)
Amel	F	**FAM**-CCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG
	R	AGCTTAAACTGGGAAGCTGGTGG
D3S1358	F	ACTGCAGTCCAATCTGGGT
	R	**FAM**-GAAATCAACAGAGGCTTGCA
FGA	F	GAACTCACAGATTAAACTGTAAC
	R	**FAM**-TGATTTGTCTGTAATTGCCAGC
THO1	F	**JOE**-GTCACAGGGAACACAGACTC
	R	ATTCCCATTGGCCTGTTCCT
VWA	F	AGAATAATCAGTATGTGACTTGGATTG
	R	**JOE**-CAGATGATAAATACATAGGATGGATG
SE33	F	**JOE**-GAAAGAGACAAAGAGAGTTAG
	R	ACATCTCCCCTACCGCTATAG
D8S1179	F	**TET**-TTTTTGTATTTCATGTGTACATTCGT
	R	GATTATTTTCACTGTGGGGAATAGA
D18S51	F	**TET**-GCACTTCACTCTGAGTGAC
	R	GGAGATGTCTTACAATAACAG
D21S11	F	**TET**-AAATATGTGAGTCAATTCCCCAAG
	R	GTTGTATTAGTCAATGTTCTCCAG

Die Entwicklung und die erste Testphase des Q8-Multiplexes erfolgten zuerst an Zelllinien-DNA, danach wurden telogene Haare und Haarschäfte bekannter Personen analysiert. Die LCN-Typisierungsergebnisse von den Haarextrakten wurden mit den Mundschleimhautabrieben als Referenzproben von den Haarspendern verglichen. Erst als diese Testphase abgeschlossen war und das Q8-Konzept optimiert war, erfolgte eine Analyse weiterer problematischer Spuren aus der Fallarbeit. Über 30 Proben mit degradierter oder LCN-DNA wurden untersucht und gleichzeitig mit dem fertig gestellten Q8 und für vergleichende Zwecke mit dem kommerziellen genRES® MPX-2 (Serac) amplifiziert. DNA wurde mit dem GEN-IAL Protokoll (GEN-IAL GmbH, Troisdorf) isoliert. Extrakte von telogenen Haaren, die Hauptbestandteil des Untersuchungsmaterials darstellten,

wurden zusätzlich mit einer Silika-Suspension (Dianova, Hamburg) aufgereinigt (siehe dazu 2.1). Weitere Spuren waren Speichelspuren an Trinköffnungen und feuchten Zigarettenkippen, Mischspuren aus Hautzellen, Kot und Erbrochenes.

2.3.1 Q8-Allelleiter

Die Allelleiter für den Q8-Multiplex wurde anfangs aufwendig hergestellt (Tab. 9).

Tab. 9 PCR-Ansatz für die Erstellung der Q8-Allelleiter

System	Probe	Aqua (µl)	DNA (µl)	$MgCl_2$ (µl)	BSA (µl)	Puffer (µl)	dNTP (µl)	Primer (µl)	*Taq* (µl)
Amel	♂-MSP 1:5	6	1	0,7	0,3	1,25	0,5	0,2	0,4
Mix 1	MPX2-Allell 1:10 000 000	6	1	0,7	0,3	1,25	0,5	0,9 Mix1	0,4
Mix 2	MPX2-Allell 1:2 000 000	6	1	0,7	0,3	1,25	0,5	0,3 Mix2	0,4

Die finale Extension erfolgte bei 72°C für 2 h, um eine unvollständige Adenylierung zu vermeiden.
Die Primermischungen für die Erstellung der Q8-Allelleiter wurden sorgfältig ausgewählt und waren letztlich wie folgt:

Primermix 1:	TH01	0,35 µl	Primermix 2:	D21S11	0,6 µl
	D3S1358	0,34 µl		SE33	0,84 µl
	VWA	1,1 µl			
	FGA	0,84 µl			
	D8S1179	0,5 µl			
	D18S51	0,4 µl			

Anschließend wurde Amel:Mix1:Mix2 im Verhältnis 1:1:2 gemischt.
0,5 µl der fertigen Allelleiter wird mit 10 µl Hi-Di Formamid (AB) und 0,5 µl GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard (AB) verimpft und zusammen mit den Proben über die Kapillarelektrophorese aufgetrennt.

Später stellte die Firma Serac/genFOR GmbH freundlicherweise eine klonierte Q8-Allelleiter zu Verfügung.

2.3.2 Validierung des Muliplex-Kits Q8

Für die Validierung des Q8-Multiplex-Kits wurden etwa 50 Extrakte aus Haaren, Knochen, Hautzellenmischspuren, Erbrochenem, Kot, Blut und Speichel analysiert (Tab. 10).

Tab. 10 Anzahl und Spezifität der einzelnen untersuchten Proben

Haut	Knochen	Haare	Erbrochenes	Kot	Blut	Speichel
33	2	3	1	1	2	12

DNA wurde wiederum mit dem GEN-IAL Protokoll isoliert. Haar- und Knochenextrakte wurden zusätzlich über Silika-Partikel aufgereinigt. Die Q8-Profile wurden mit den Amplifikationsergebnissen verglichen, die mit den kommerziellen Kits genRES® MPX-2 (Serac) und Mentype® Nonaplex^{QS} (Biotype AG, Dresden) generiert wurden. Die PCR erfolgte dabei genau nach den Anweisungen der Hersteller, die Zyklenzahl war bei allen drei Multiplex-Kits gleich.

Die Amplifikation erfolgte mit einem 11,05 µl Reaktionsvolumen und bestand aus 1,1X PCR Buffer II, 1,6 mM $MgCl_2$, 2 U Ampli*Taq*Gold Polymerase (ABI, Weiterstadt), 3 µg BSA (Sigma, München), 0,11 mM der einzelnen Nukleotide, 0,9 µl Q8-Primermix.
Für die Amplifikation von Haarextrakten wurde aufgrund des Inhibitionseffekts des Melanins die $MgCl_2$-Konzentration für einen PCR-Ansatz auf 3 mM und die Ampli*Taq*Gold Polymerase auf 5 U erhöht.
Das endgültige PCR-Programm war folgendes: Denaturierung 11 min bei 95°C, gefolgt von 30 bzw. 33 Zyklen bei 93°C für 1 min, 59°C für 1 min, 72°C für 30 s; abschließend bei 72°C für 40 min.

Die Elektrophorese erfolgte auf dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) mit dem Polymer POP4 und der Genescan Software,

sowie auf dem ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) mit dem Polymer POP7 und der GeneMapper® *ID* Software v3.2. Die Proben wurden für die Analyse mit 10 µl Hi-Di Formamid (Applied Biosystems), 0,5 µl GeneScan™ 500 ROX™ Längenstandard (Applied Biosytems) und mit 1 µl des PCR Produktes vorbereitet. Die Auftrennung der Proben erfolgte auf dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer mit dem Modul C (Q8) bzw. D (MPX2 und Nonaplex), welche eine elektrokinetische Injektion auf der einzelnen Kapillare von fünf Sekunden bei 15000 Volt ausführen, und auf dem ABI Prism 3130 Genetic Analyzer mit dem Modul Any4dye (Q8) und F (MPX2 und Nonaplex), welche eine elektrokinetische Injektion auf den vier Kapillaren von fünf Sekunden bei 3000 Volt ausführen. Die STR-Allele wurden daraufhin auf beiden Analyzern bei 15000 Volt für etwa 20 Minuten mit einer Lauftemperatur von 60°C getrennt.

2.4 Entwicklung des Multiplex-Kits Y13

Für die einzelnen Loci wurden verschiedene Primer-Sequenzen getestet. Primer-Dimere und Hairpin-Formationen wurden mit Hilfe des Programms AutoDimer ausgeschlossen [186]. Von den einzelnen Loci wurden als erstes Single PCRs durchgeführt. Die Primerpaare wurden zur Optimierung der Amplifikationsreaktion in gleichen Mengen, aber auch in unterschiedlichem Mengenverhältnissen in den PCR-Ansatz pipettiert. Nach und nach erfolgte eine Addition der Primerpaare, so dass final ein Multiplex aus elf Primerpaaren konzipiert wurde, der zu insgesamt 13 Amplifikationsprodukten führte. Es fand eine ständige Anpassung der Primerpaarmengen im Multiplex statt. Die Primersequenzen und Repeatstrukturen der Systeme sind in Tabelle 11 aufgelistet. Die Entwicklung des Multiplex-Kits Y13 erfolgte in erster Linie an der männlichen Zelllinien-DNA 9948 und an Mundschleimhautabstrichen männlicher Personen aus dem Labor. Die Generierung unspezifischer Produkte durch den Y13-Multiplex wurde an nicht-humanen Proben überprüft.

Tab. 11 Primersequenzen und Repeatstruktur der einzelnen Systeme für den Multiplex Y13

Loci		Primersequenz (5'-3')	Allel	Länge (bp)	Diver -sität	Repeatstruktur
DYS19	F	**JOE**-CTA CTG AGT TTC TGT TAT AGT	10-19	131-163	0,72	$[TAGA]_3TAGG[TAGA]_{7-16}$
	R	GGT TAA GGA GAG TGT CAC TA				
DYS391	F	**FAM**-TCA TAC ACC CAT ATC TGT CTG	6-14	70-102	0,49	$[TCTA]_{6-14}$
	R	ATA GGT AGG CAG GCA GAT AGG				
DYS390	F	**FAM**-TAT ATT TTA CAC ATT TTT GGG CC	17-28	186-230	0,61/ 0,73	komplex, 4er Repeat
	R	TGA CAG TAA AAT GAA AAC ATT GC				
DYS385 a/b	F	AGC ATG GGT GAC AGA GCT A	7-28	240-306	0,96	$[GAAA]_{7-22}$, Sequenz längerer Repeats unbekannt
	R	**FAM**-CCA ATT ACA TAG TCC TCC TTT C				
DYS389I	F	**TET**-CCA ACT CTC ATC TGT ATT ATC T	9-17	82-114	0,61	$[TCTG]_3[TCTA]_{6-14}$
DYS389II	R	AGA TAG ATT GAT AGA GGG AGG	24-34	197-237	0,75	4er Repeat
DYS392	F	**TET**-CAA CTA ATT TGA TTT CAA GTG TTT G	6-17	120-153	0,596	$[TAT]_{6-17}$
	R	AAA CCT ACC AAT CCC ATT CCT T				
DYS437	F	**JOE**-GAC TAT GGG CGT GAG TGC AT	13-17	178-194	0,583	$[TCTA]_{7-11}.TCTG]_2[TCTA]_4$
	R	GAC CCT GTC ATT CAC AGA TGA				
DYS438	F	**FAM** TGG GGA ATA GTT GAA CGG TAA	6-14	139-179	0,594	$[TTTTC]_{6-14}$
	R	CTG GGA AGT GGA GGT TGT G				
DYS439	F	**FAM**-TAG GTG GAG ACA GAT AGA TGA T	9-14	109-129	0,639	$[GATA]_2taca[GATA]_3$ N14[GATA]gat[GATA]aatagaa $[GATA]_{9-14}$
	R	GCC TGG CTT GGA ATT CTT				
DYS388	F	**TET**-GTG AGT TAG CCG TTT AGC GA	10-18	162-186		$[ATT]_{10-18}$
	R	CAG GAG AAT GGC GTG AAC C				
DYS393	F	**JOE**-GGT CTT CTA CTT GTG TCA ATA C	9-17	80-112	0,363	$[AGAT]_{9-17}$
	R	GGT ATG TCT CAT AGG AAA GAC				

Anschließend erfolgte eine Optimierung der Amplifikationsreaktion, wobei unterschiedliche Menge an PCR-Reagenzien (BSA, dNTP, Primer, *Taq* DNA-Polymerase, A. dest., $MgCl_2$) eingesetzt wurden. Die Verwendung verschiedener Puffer zeigte eine bessere Amplifikation der längeren Systeme, aber eine schlechtere Amplifikation der kürzeren Systeme mit dem GoldSt*r Buffer (Promega). Die Nova*Taq*™ Hot Start DNA Polymerase (Novagen) mit dem zugehörigen 10x Nova*Taq* Hot Start Buffer (Novagen) war vergleichbar mit dem Standard-PCR Ansatz. Daher wurde eine weitere Optimierung der Amplifikationsansatzes durch Verwendung anderer Puffer und Polymerasen hier nicht weiter verfolgt. Die Amplifikationsreaktion wurde zudem bei verschiedenen Annealing-Temperaturen verfolgt (54°C bis 60°C).
Neben dem Standard-PCR-Programm, wie es beim Q8-Konzept angewendet wird, wurde ein zusätzliches PCR-Programm getestet, wie es beim PowerPlex® Y System (Promega) vom Hersteller empfohlen wird.

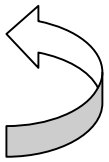
Die lyophilisierten Primer wurden auf eine Konzentration von 100 pmol/µl eingestellt.
Der fertig gestellte Primermix Y13 hatte folgende Primerzusammensetzung:

Primermix:	DYS391 (FAM)	je 2,7 µl
	DYS439 (FAM)	je 1,8 µl
	DYS390 (FAM)	je 2,1 µl
	DYS385a+b (FAM)	je 4,2 µl
	DYS389I+II (TET)	je 1,2 µl
	DYS392 (TET)	je 0,6 µl
	DYS388 (TET)	je 0,5 µl
	DYS393 (JOE)	je 1,5 µl
	DYS19 (JOE)	je 4,2 µl
	DYS437 (JOE)	je 0,6 µl

Die Amplifikation erfolgte mit einem 8,05 µl Reaktionsvolumen und bestand aus 1,6x PCR Buffer II, 1,6 mM $MgCl_2$, 2 U Ampli*Taq*Gold Polymerase (ABI, Weiterstadt), 3 µg BSA (Sigma, München), 0,22 mM von jedem Nukleotid, 0,9 µl Y13-Primermix.

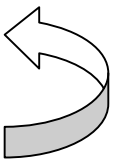
Das finale PCR-Programm war wie folgt:

1. 95°C für 11 min
2. 96°C für 2 min
3. 94°C für 1 min
4. 60°C für 1 min
5. 70°C für 90 s



10 Zyklen

6. 90°C für 1 min
7. 60°C für 1 min
8. 70°C für 90 s



20 bzw. 23 Zyklen

9. 60°C für 1 h
10. 4°C Pause

Die Elektrophorese erfolgte auf dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) mit dem Polymer POP4 und der Genescan Software, sowie auf dem ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) mit dem Polymer POP7 und der GeneMapper® *ID* Software v3.2. Die Proben wurden für die Analyse mit 10 µl Hi-Di Formamid (Applied Biosystems), 0,5 µl GeneScan™ 500 ROX™ Längenstandard (Applied Biosytems) und mit 1 µl des PCR Produktes vorbereitet. Die Auftrennung der Proben erfolgte wie bei den Proben, die mit dem Q8-Multiplex analysiert wurden, da dieselben Fluoreszenzfarben gewählt wurden.

Die Sensitivität und die Typisierungsergebnisse des Multiplex-Kits Y13 wurden mit dem PowerPlex® Y System (Promega) verglichen. Dazu erfolgte eine Analyse von Mischspuren mit Überschuss an weiblicher DNA und unterschiedlichen Mischungsverhältnissen, wobei die männliche DNA stets 400 pg betrug. Das höchste Mischungsverhältnis betrug 1:500. Die Mischungen bestanden zum einen aus Zelllinien, zum anderen wurden die Mischspuren künstlich aus Blut- bzw. Mundspeichelproben hergestellt. Dazu erfolgte zuvor eine Quantifizierung der Proben über RealTime-PCR (Plexor® HY System, Promega). Weitere künstlich hergestellte Mischspuren wurden mit dem Y13- und PPY-Kit typisiert. Des Weiteren wurden etwa 30 Proben aus der Fallarbeit mit den beiden Kits vergleichend analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung des Extraktionsverfahrens

Es hat sich unter den verschiedenen Extraktionsmethoden gezeigt, dass eine leicht abgeänderte GEN-IAL-Extraktion mit anschließender Glasmilch-Aufreinigung die geeignete Methode für die DNA-Isolation aus Haaren, aber auch aus anderen biologischen Spuren mit degradierter und LCN-DNA sowie aus verunreinigten Spuren ist. Wird DNA aus Haaren mit der GEN-IAL Extraktion in Kombination einer Silika-Aufreinigung isoliert, können bei 85% der telogenen Haare und bei 60% der Haarschäfte zumindest Teilprofile mit mindestens zwei STRs beobachtet werden (siehe Tab. 12). Bei der Auswertung lagen die Peaks über einem Schwellenwert von 50 rfu (relative fluorescence unit) und die Systeme waren reproduzierbar.
Die Haarextrakte wurden mit einem MiniSTR-Multiplex analysiert (D3S1358, FGA, TH01, VWA, SE33 und Amelogenin). Falls nur die wenigsten informativen STRs TH01 und D3S1358 typisiert werden können, beträgt der „combined PD“ 0,995. Der PD-Wert aller fünf STRs ist 0,9999999.

Tab. 12 Erfolgsraten, die durch die verschiedenen Extraktionsmethoden erhalten wurden

Extraktionsmethode	Erfolgsrate (≥ 2 STR Systeme) in %	
	telogenes Haar	Haarschaft
Genial	35	25
ChargeSwitch	55	30
Genial + Aufreinigung mit Silica	85	60
Chelex 1	30	15
Chelex 2	30	15
Invisorb	40	25

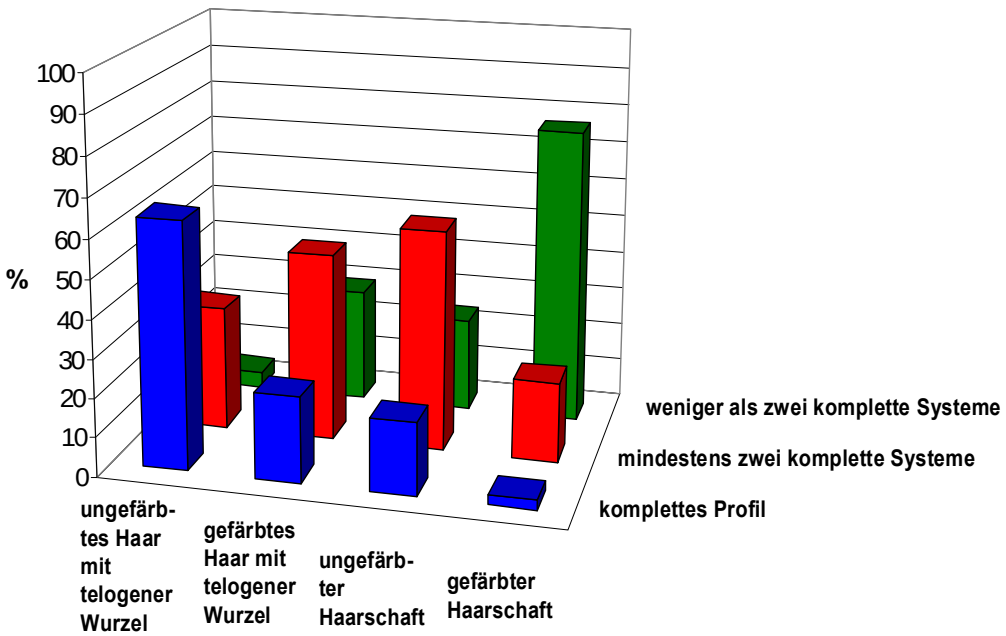
Chelex 1: Chelex Extraktion, Lyse mit TN_{Ca}-Buffer + Aufreinigung mit LPA
Chelex 2: Chelex Extraktion, Lyse nach Genial + Aufreinigung mit LPA

Die Typisierungserfolg war reduziert, falls das Haar nicht vollständig lysiert war oder eine geeignete Aufreinigung nach der Haarlyse nicht durchgeführt wurde. In den Lysepuffer sollte daher Dithiothreitol (DTT) zugegeben werden, da ohne

dieses Reagenz das Haar nicht oder nur sehr schlecht verdaut wird. Das DTT spaltet die Disulfidbrücken, über die das Keratin im Cortex stark vernetzt ist.

Es hat sich in dieser Studie herausgestellt, dass der Erfolg, DNA im Haar zu analysieren, nicht nur zwischen den Individuen, sondern auch zwischen verschiedenen Haaren eines Individuums variiert. Nichtsdestotrotz gibt es deutliche individuelle Unterschiede mit reproduzierbaren Ergebnissen.

Elektronenmikroskopische Fotos von gefärbten und ungefärbten Haaren zeigen einen deutlichen Angriff der Färbemittel auf die Kutikula (siehe Abb. 8). Die äußere Schicht des gefärbten Haares ist beträchtlich geschädigt. Die Vermutung, gefärbte Haare sind schlechter zu analysieren hat sich bestätigt. Die Profile der gefärbten Haare waren nahezu ausnahmslos schlechter als die der ungefärbten Haare. Abbildung 10 zeigt die resultierenden Erfolgsraten für gefärbte Haarschäfte und Haare mit telogener Wurzel verglichen zu den ungefärbten.



Ergebnisse/Proben	telogene Haarwurzel		Haarschaft	
	ungefärbt	gefärbt	ungefärbt	gefärbt
komplettes Profil	63,8%	22,1%	18,6%	2,7%
mindestens zwei komplette Systeme	31,9%	48,4%	57,1%	20,6%
weniger als zwei komplette Systeme	4,3%	29,5%	24,2%	76,7%

Abb. 10 Erfolgsrate der miniSTR-Typisierung, unterteilt in Kategorien

Allele wurden wiederum als solche akzeptiert, wenn sie den Schwellenwert von 50 rfu erreicht hatten, und die Systeme mussten reproduzierbar sein, obwohl eine Mundspeichelprobe als Vergleichsspur vorlag.
In den „kompletten Profilen“ wurden alle Profile korrekt typisiert. Falls mindestens zwei Systeme analysiert werden konnten, wurden die Profile als Teilprofile gewertet. Profile galten als nicht analysierbar, falls sie weniger als zwei komplette Systeme oder einen intensiven Hintergrund zeigten. Sporadische Kontaminationen oder Allel-Dropouts erschienen ab und zu, was jedoch bei Haaren mit degradierter und LCN-DNA sowie bei 33 Zyklen nicht unerwartet ist.

Nicht nur künstlich gefärbte Haare zeigen im Vergleich zu nativen Haaren eine Senkung der Typisierungsergebnisse. Graue und weiße Haare, die in dieser Studie analysiert wurden, konnten durchschnittlich besser typisiert werden als pigmentierte Haare (Daten nicht gezeigt).
Darüber hinaus war das Extrakt bei häufig permanent gefärbten Haaren nach der Silika-Aufreinigung noch verfärbt. Die durch das H_2O_2 oxidierten natürlichen Pigmente konnten nicht vollständig entfernt werden. Die Zugabe einer Kontroll-DNA (Zelllinien-DNA) in das verfärbte Extrakt eines öfters permanent gefärbten Haares, zeigte eine deutliche Inhibition der Amplifikationsreaktion. Nach der Optimierung der PCR konnte diese Inhibition jedoch eliminiert werden (siehe Abschnitt 3.2).
Die Glasmilch störte die Amplifikationsreaktion kaum, in kleineren Mengen konnte überhaupt keine Inhibitionswirkung festgestellt werden. Vor der Anwendung des Haarextrakts sollte die Probe jedoch kurz abzentrifugiert werden.
Die Typisierungsergebnisse der Haare, die an Tatorten gefunden oder mit einem Verbrechen in Verbindung gebracht wurden, fielen schlechter aus als die Ergebnisse von Haaren der freiwilligen Spender (Daten nicht gezeigt).
Da die Profile einiger Haare zwar reproduzierbar waren, aber nicht als sicher eingestuft werden konnten, weil teilweise entsprechende Vergleichsproben fehlten, dürfte in Wirklichkeit die Erfolgsrate dieser an Tatorten gesicherten Haare etwas schlechter ausfallen.

Wegen der hohen Degradation gibt es nur eine geringe Chance, die längeren PCR-Produkte von den Haarschäften analysieren zu können, wohingegen es für Haare mit telogenen Wurzeln durchaus möglich ist (Abb. 11 und 12).

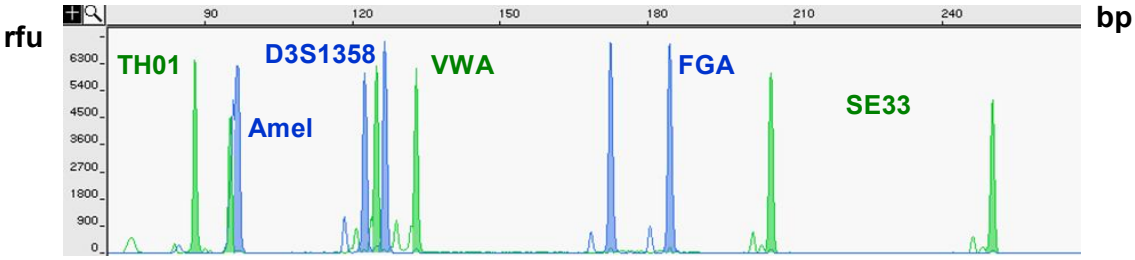


Abb. 11 MiniSTR Profil von einem Haar mit telogener Wurzel

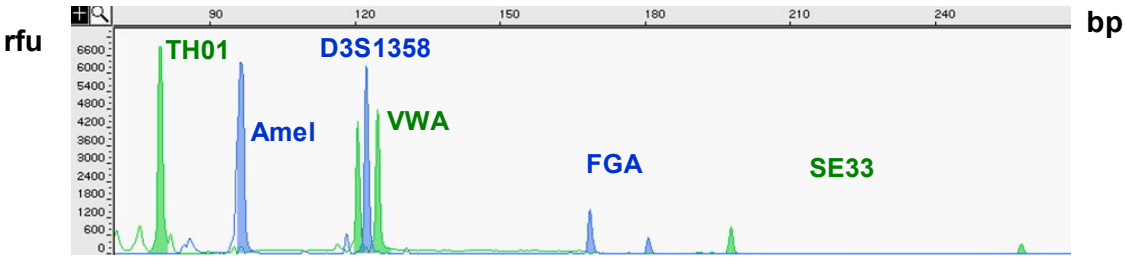


Abb. 12 MiniSTR Profil von einem Haarschaft

Neben einer optimalen DNA-Isolation aus biologischen Spuren mit degradierter und LCN-DNA, ist die Analyse der Spurenextrakte mit einem sensitiven MiniSTR-Multiplex ausschlaggebend.

Abbildung 13 zeigt die Profile einer Person. Dasselbe Extrakt aus einem Haar mit telogener Wurzel wurde gleichzeitig mit den drei PCR-Kits (A) MiniSTR-Multiplex, (B) MPX2, (C) SGM amplifiziert. Panel A zeigt ein komplettes Profil, in dem die längeren STR-Systeme schwächer erscheinen als die kürzeren. Wenn dasselbe Extrakt mit dem MPX2-Kit amplifiziert wird, wird ein Partialprofil generiert, die längeren Systeme fehlen vollständig. Die längeren Systeme fehlen ebenso in Panel C. Des Weiteren scheint der SGM-Kit weniger nachweissensitiv zu sein.

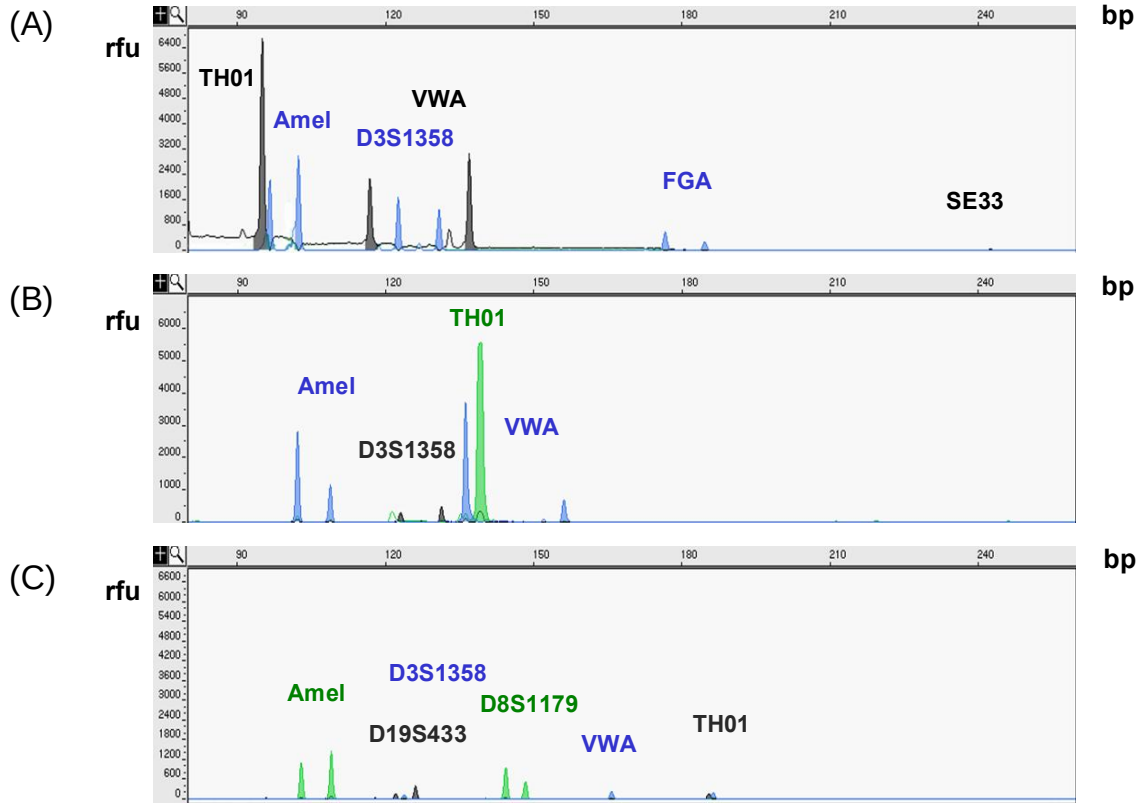


Abb. 13 STR-Profile von einem Haar mit telogener Wurzel. PCR erfolgte mit (A) dem miniSTR-Multiplex, (B) MPX2 und (C) SGM

Knochen konnten mit CDTA besser und schneller entkalzifiziert werden als mit EDTA. CDTA bildet mit Ca^{2+} stabilere Komplexe als EDTA. Die Typisierungsergebnisse waren wie bei der Haaranalyse besser bei vollständig lysierten Knochen. Daher lag die Erfolgsrate geringfügig höher bei Knochen, die mit CDTA entkalzifiziert wurden. Die Extraktionsverfahren Qiagen´s Blood Maxi Kit, GEN-IAL in Kombination mit einer Glasmilch-Aufreinigung, ChargeSwitch und Invisorb stellten sich als geeignete Methoden zur DNA-Isolation aus Knochen heraus (Daten nicht gezeigt).

Bei der Analyse der Knochenextrakte konnte gelegentlich eine PCR-Inhibition festgestellt werden, die durch eine Silika-Aufreinigung nicht immer vollständig aufgehoben werden konnte. Das Extrakt war teilweise bräunlich.

3.2 Optimierung der Amplifikationsreaktion

3.2.1 LCN-PCR

Eine Optimierung des PCR-Ansatzes ist gerade bei biologischen Spuren mit degradierter und LCN-DNA ausschlaggebend.
Bei einer LCN-PCR wird in erster Linie gewöhnlich die Zyklenzahl erhöht (siehe Abb. 14).

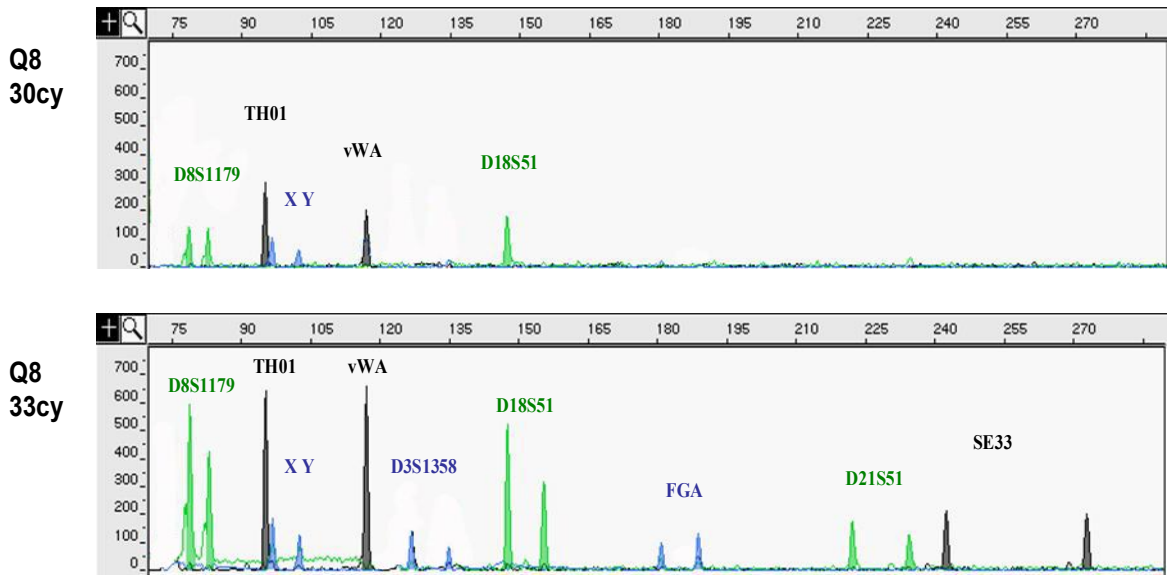


Abb. 14 STR-Profile von einer alten Blutspur, die mit dem Q8 Konzept mit 30 und 33 Zyklen analysiert wurde

Die Typisierungsergebnisse, die mit den kommerziellen Kits mit Standardamplifikationsbedingungen und mit zusätzlichen PCR-Zyklen aus demselben Extrakt generiert wurden, zeigen ebenso eine erhöhte Sensitivität mit der Anwendung der LCN-Typisierung, insbesondere mit der Erhöhung der Zyklenzahl (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Hot-Start Polymerasen

Einige Hot-Start Polymerase und ihre mitgelieferten Puffer wurden zuerst an Zelllininenmischungen getestet. Falls die Amplifikationsreaktion erfolgsversprechend und an den Zelllinien gut eingestellt war, wurden Spurenextrakte aus der Fallarbeit mit dem neuen Enzym analysiert.

Die Ampli*Taq* Gold (Applied biosystems) arbeitet effizient im

11. GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB),
12. GoldSt*r Buffer (Promega),
13. 10x PCR Buffer (Sigma) und im
14. MasterAmp AmpliTherm 10x PCR Buffer (Epicentre).

Die anderen Puffer wie der 10x PCR Buffer (Qiagen), 10x Thermo-Start® Standard Buffer (ABgene), 10x Thermo-Start® High performance (HP) Buffer (ABgene), 10x HotMaster *Taq* Buffer (Eppendorf) und 10x Nova *Taq* Hot Start Buffer (Novagen) sind für die Ampli*Taq* Gold (AB) aufgrund des abweichenden pH-Wertes nicht geeignet.

Da möglicherweise viele inhibitorische Substanzen auf den pH-Wert während der Amplifikationsreaktion einwirken, wurde die Pufferkapazität erhöht. Eine Erhöhung der Pufferkonzentration mit einhergehender Erhöhung der Pufferkapazität des GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB) führte in Anwesenheit verschiedener inhibitorischer Substanzen zu keiner Amplifikationssteigerung. Bereits bei der Amplifikation von Zelllinien-DNA konnten durch Erhöhung der Pufferkonzentration keine optimalen Reaktionsbedingungen mehr erzeugt werden.

Von den getesteten Polymerasen zeigten

15. Ampli*Taq* Gold (AB) mit GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB),
16. Accuprime DNA Polymerase (Invitrogen) mit GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB),
17. Nova*Taq* (Novagen) mit Nova*Taq* Hot Start Buffer (Novagen),
18. JumpStart *Taq* (Sigma) mit 10x PCR Buffer (Sigma) und

19. Go*Taq*®Hot-Start DNA Polymerase (Promega) mit GoldSt*r Buffer (Promega) bzw. dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)

die besten Typisierungsergebnisse.

Die Polymerase-Kombination

20. Ampli*Taq* Gold (AB) + Nova*Taq* (Novagen) mit dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB)
21. Ampli*Taq* Gold (AB) + MasterAmp™ AmpliTherm™ DNA Polymerase (Epicentre) mit dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB) oder MasterAmp AmpliTherm 10x PCR Buffer (Epicentre) oder GoldSt*r Buffer (Promega) oder 10x PCR Buffer (Sigma)

zeigen ähnliche, aber keine besseren Typisierungsergebnisse als die Amplifikation desselben Extrakts mit der Polymerase Ampli*Taq* Gold (AB) allein.

Die Polymerase-Kombination Ampli*Taq* Gold (AB) + JumpStart *Taq* (Sigma) mit GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB) bzw. 10x PCR Buffer (Sigma) in Verbindung mit einer Time-Release PCR erwies sich als erfolgsversprechend. Es konnten teilweise bessere Typisierungsergebnisse typisiert werden. 50 pg einer Mischung zweier Zelllinien 9948 und 9947A im Verhältnis 1:10 konnte mit diesem PCR-Konzept analysiert werden, ein vollständiges Profil ohne Zusatzallele konnte generiert werden. Das Amplifikationsergebnis eines Haarextrakts ähnelte dem, das mit mehr Ampli*Taq* Gold (AB) und Mg^{2+}-Ionen generiert wurde.

Die Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) arbeitet im 5x Colorless Go*Taq*® Flexi Buffer (Promega) nicht so effektiv wie im GoldSt*r Buffer (Promega) bzw. dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB). Das Enzym zeigte sich gegenüber einer Reihe an verschiedenen inhibitorischen Substanzen recht unempfindlich.
Die Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) erwies sich insbesondere bei Blutspuren als effektiv. Aufgrund der Amplifikationsinhibition durch den roten Blutfarbstoff sind Blutspuren gelegentlich schwer zu analysieren. Die Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) scheint bei Weitem gegen den Farbstoff unempfindlicher zu sein als die Ampli*Taq* Gold (AB). Ein Nachteil besteht jedoch in der sequenzabhängigen Arbeitsweise des Enzyms, die Loci waren nach der Amplifikation nicht ausbalanciert.

Die AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) arbeitet noch in Präsenz niedriger Häm-Konzentrationen, bei denen die Ampli*Taq* Gold (AB) bereits inhibiert wird.

Eine weitere Möglichkeit die Analyse von Blutspuren zu erleichtern, lag in der Verringerung der Ausgangsmenge an Blut-DNA mit der damit verbundenen Senkung der Blutfarbstoffkonzentration im PCR-Ansatz und gleichzeitiger Erhöhung der Zyklenzahl. Dadurch konnte die Erfolgsrate bei der Analyse von Blutspuren mit der Ampli*Taq* Gold (AB) deutlich verbessert werden. Eine Erhöhung der Konzentration der Ampli*Taq* Gold (AB) führte bei Blutspuren zu einer geringfügig höheren PCR-Effizienz.

Bei Knochenextrakten und weiteren Spuren mit LCN-DNA erfolgte eine Optimierung der Amplifikationsreaktion durch die Kombination von 0,4 µl Ampli*Taq* Gold (AB) und 0,4 µl AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen).

Die Verwendung der MasterAmp™ *Tfl* DNA Polymerase (Epicentre) und MasterAmp™ *Tth* DNA Polymerase (Epicentre) brachten keinen Amplifikationserfolg. Es traten bereits Schwierigkeiten bei der Amplifikation von Zelllinien auf. Auffallend war die nötige hohe Ausgangsmenge an Template-DNA.
Eine Kombination der MasterAmp™ *Tfl* DNA Polymerase (Epicentre) bzw. MasterAmp™ *Tth* DNA Polymerase (Epicentre) und der Ampli*Taq* Gold (AB) war aufgrund der unterschiedlichen pH-Werte der Puffer nicht möglich.
Eine Analyse mit dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB) brachte keine Verbesserung der Erfolgsrate, mit dem MasterAmp™ *Tth* 20x Buffer (Epicentre) bzw. MasterAmp™ *Tfl* 20x Buffer (Epicentre) fiel das Typisierungsergebnis schwach oder negativ aus.

Mit der Kombination MasterAmp™ *Tfl* DNA Polymerase (Epicentre) und Nova*Taq* (Novagen) sowie der Kombination MasterAmp™ *Tth* DNA Polymerase (Epicentre) und Nova*Taq* (Novagen) mit dem 10x Nova*Taq* Hot Start Buffer (Novagen) bzw. MasterAmp™ *Tth* bzw *Tfl* 20x Buffer (Epicentre) konnten vorwiegend Teilprofile generiert werden.

Der Advantage®-HF 2 PCR Kit (Clontech) zeigte nach einer längeren Optimierungsphase ähnliche, zum Teil auch bessere Typisierungsergebnisse für Haarextrakte als die Ampli*Taq* Gold (AB).
Die Kombination des Advantage-HF 2 Polymerase Mixes und des GeneAmp 10x PCR Puffers II (AB) zeigten schlechtere Typisierungsergebnisse.

Bei den weiteren getesteten Polymerasen, Polymerasenkombinationen sowie Polymerase und Pufferkombinationen konnten keine Optimierung der Amplifikationsreaktion erzielt werden. Einige Enzyme arbeiten sequenzabhängig, so dass bei der Anwendung der neuen Polymerasen teilweise eine Abänderung der Primersequenzen nötig wäre. Andere wiederum benötigen eine hohe Ausgangsmenge an DNA und/oder hohe Qualität, wie sie in der forensischen Fallarbeit nicht immer erwartet werden können.
Darüber hinaus sind wenige Enzyme nicht sonderlich robust und liefern keine zuverlässigen Ergebnisse oder konnten von Beginn an mit Hilfe einer Zelllinienmischung nicht optimal eingestellt werden.

3.2.3 PCR Additive

Aufgrund der Vielfalt an inhibitorischen Substanzen ist es generell schwierig ein optimales PCR-Additiv ausfindig zu machen, das die inhibitorische Wirkung all dieser unterschiedlichen Inhibitoren aufhebt.
Die Wirkungsweisen der PCR-Additive wurden vorwiegend an künstlichem Hämin getestet, aber auch an Spurenextrakten, bei denen die Anwesenheit inhibitorischer Substanzen bekannt ist, wie Blutspuren, Kot, Haare und Knochen.
Speziell bei der Amplifikation von DNA aus Haaren konnte durch eine Erhöhung der Ampli*Taq* Gold (AB) und der $MgCl_2$-Konzentration eine Steigerung der Erfolgsrate erzielt werden, nicht aber durch Zugabe eines PCR-Additivs. Aufgrund der Inhibitionswirkung des Melanins werden die kürzeren Systeme bevorzugt amplifiziert, die längeren Systeme sind schwach ausgeprägt bzw. es kommt zu Allel-Dropouts. Eine Erhöhung der $MgCl_2$-Konzentration bewirkte eine Verschiebung der Amplifikationsleistung in Richtung der längeren Systeme, das

Profil bekam aufgrund der Reduktion der Inhibitionswirkung ein gleichmäßigeres Erscheinungsbild.

Bei der Analyse von Spuren mit inhibitorischen Substanzen führte eine erhöhte Zugabe von **BSA** zu keiner Aufhebung der Inhibition. Bei der Haaranalyse konnte ebenso mit Erhöhung der BSA-Konzentration keine oder eine nur geringfügige Verbesserung erzielt werden. Bei der Amplifikation einer Zelllinienmischung wurden bei erhöhter BSA-Konzentration alle Peaks reduziert. Zu viel BSA setzt demnach die Amplifikationsleistung der Polymerase herab. Eine Reduktion des Hemmeffekts von künstlichem Hämin konnte durch BSA nicht erreicht werden. Zu viel BSA führt zu einem milchigen Amplifikat.

Formamid brachte ebenso keine Verbesserung. Teilweise führte die Zugabe von Formamid in den PCR-Ansatz zu einem schlechteren Ergebnis. Eine Reduktion des Hemmeffekts vom künstlichen Hämin konnte demnach durch Formamid nicht erzielt werden.

Auch das **DTT** konnte die inhibitorische Wirkung des künstlichen Hämins nicht aufheben. 0,3 µl DTT führte in einem 12,5 µl PCR-Ansatz bereits zu einer Reduktion der Amplifikationsleistung der Ampli*Taq* Gold (AB).

Das **gp32** (Roche) hatte keinen Einfluss auf den PCR-Ertrag und auf die PCR-Sensitivität, war jedenfalls nicht effizienter als BSA. Untersucht wurden vorwiegend Blutspuren. Eine Reduktion des Hemmeffekts vom künstlichen Hämin konnte durch gp32 nicht erzielt werden.

Seifenlösung (Flüssigseife Baktolin, Bode Chemie Hamburg) führte bereits in geringen Mengen (0,3 µl Seifenlösung in einem 12,5 µl PCR-Ansatz) zu einer PCR-Inhibition.

Milchpulver-Lösung (Kaffeeweißer Almsana, Plus Vertriebs GmbH, Mülheim an der Ruhr) beeinflusste nicht die Amplifikationsreaktion. Eine Reduktion des Hemmeffekts des künstlichen Hämins konnte weder durch Zugabe einer gesättigten noch einer stark verdünnten Milchpulver-Lösung in den PCR-Ansatz erzielt werden.

Geringe Mengen (0,3 µl bis 1 µl) einer **Milch-Lösung** führten zu keiner Reduktion des Hemmeffekts vom künstlichen Hämin. 1 µl Milch in einem 12,5 µl Ansatz störte bereits die Amplifikationsreaktion.

Die Zugabe von 0,3 µl bis 3 µl einer gesättigten **Zucker-Lösung** (Würfelzucker REWE, REWE-Handelsgruppe GmbH, Köln) führte zu keiner Reduktion des Hemmeffekts, störte die Amplifikationsreaktion aber nicht.

Auch die Zugabe von

22. 5x KAPA Enhancer 1 (Peqlab),
23. 25x KAPA Enhancer 2 (Peqlab),
24. 5x Enhancer Solution P (Peqlab),
25. MasterAmpTM 10x PCR Enhancer mit Betain (Epicentre),
26. 20x Super Enhancer for PCR (Genecraft),
27. Q-Solution (Qiagen),
28. 5x OptiZyme Enhancers (Invitek) und
29. 5x *Taq*Master® PCR Enhancer (Eppendorf)

sowie der weiteren geprüften PCR-Additive führten zu keine Reduktion des Hemmeffekts des künstlichen Hämins oder der anderen potenziellen Inhibitoren.

Im Folgenden wurden Hemmkonzentrationsbestimmungen des künstlichen Hämins mit und ohne BSA und/oder gp32 bestimmt (siehe Tab. 13 und 14).

Tab. 13 Amplifikation von 500 pg Zelllinien-DNA erfolgte mit dem SEfiler Kit (AB) (30 Zyklen)

Enkonzentration des Hämins	ohne Additiv	0,3 µl BSA
31 µM	Ø	
20 µM	Ø	Ø
15 µM	Ø bis ±	Ø
8 µM	±	±
6 µM	√	

Amplifiziert wurde eine Zelllinien-DNA-Mischung aus 9947A und 9948 im Verhältnis 1:10, mit Überschuss an weiblicher DNA. Aufgrund der nötigen Reproduzierbarkeit wurden die Proben wiederholt analysiert. Die erste Spalte in Tabelle 13 und 14 zeigt die Endkonzentration des künstlichen Hämins im PCR-Ansatz an.

Ø bedeutet, die Probe konnte nicht analysiert werden,

± bedeutet, es waren mindestens zwei Systeme reproduzierbar und

√ bedeutet, das Profil war vollständig.

Die grau hinterlegten Kästchen zeigen die nicht durchgeführten Hemmkonzentrationsbestimmungen an.

Tab 14 Amplifikation von 500 pg Zelllinien-DNA mit dem Q8-Konzept und der Ampli*Taq* Gold (AB) (30 Zyklen)

Häminkonzentration	ohne Additiv	0,3µl BSA	0,6µl BSA	0,1µl gp32	0,3µl gp32	0,5µl gp32	0,3µl BSA + 0,1µl gp32	0,3µl BSA + 0,2µl gp32
31 µM		Ø		Ø	Ø		Ø	
20 µM	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø		Ø
15 µM	Ø	± bis Ø	± bis Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø
12 µM	±	±	±	±	±			
10 µM	±	±	±	±	±			
9 µM	±	±	±	±	±			
8 µM		±	±	±	±	±		±
7 µM		±	±	±	±			
6 µM		√	√	√	√		√	

Weitere Ergebnisse der Hemmkonzentrationsbestimmung von Hämin:

- Eine Erhöhung des GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB) im PCR-Ansatz führte zu keiner Änderung der Hemmkonzentration von Hämin für die Ampli*Taq* Gold (AB). Wurde der PCR-Ansatz mit zu viel Puffer angesetzt, fiel das Amplifikationsergebnis auch ohne das künstliche Hämin negativ aus.
- Wurde der GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB) durch den 10x PCR Buffer (Sigma) ersetzt, konnte ein Teilprofil erst ab einer Häminkonzentration im PCR-Ansatz von 10 µM und niedriger erwartet werden. Der GoldSt*r Buffer (Promega) führte zu keiner Änderung der Hemmkonzentration von Hämin für die Ampli*Taq* Gold (AB).
- Eine Erhöhung der $MgCl_2$-Konzentration von 1,4 mM auf 3 mM und gleichzeitiger Erhöhung der Ampli*Taq* Gold-Konzentration (AB) von 0,16 U/µl auf 0,4 U/µl führte zu keiner Änderung der Hemmkonzentration des künstlichen Hämins. Eine geringfügige Reduktion des Hemmeffekts konnte jedoch bei einer Polymerasekonzentration von 0,8 U/µl beobachtet werden,

es konnten teilweise Teilprofile trotz der Präsenz einer Häminkonzentration von 15 µM generiert werden.

- Die Zugabe von 5 U der Accuprime DNA Polymerase (Invitrogen) in den Amplifikationsansatz ermöglichte die Generierung eines vollständiges Profils trotz Anwesenheit einer Häminkonzentration von 38 µM. Ein Teilprofil konnte noch bei einer Häminkonzentration von 61 µM erstellt werden.
- Eine weitere Polymerase-Kombination wie der Multiplex PCR Kit (Qiagen) und 2 U Ampli*Taq* Gold (AB) lieferte ein vollständiges Profil bei einer Häminkonzentration von 15 µM, ein Teilprofil bei 20 µM und kein Ergebnis ab 38 µM.
- Wurde zu dieser Kombination, Multiplex PCR Kit (Qiagen) und 2 U Ampli*Taq* Gold (AB), noch zusätzlich 5 U der Accuprime DNA Polymerase (Invitrogen) hinzugefügt, konnte bei einer Häminkonzentration von 61 µM noch ein vollständiges Profil beobachtet werden.
- Die Sawady `Hot` *Taq*-DNA-Polymerase (Peqlab) schien ebenfalls gegenüber dem künstlichen Hämin etwas unempfindlicher zu sein als die Ampli*Taq* Gold (AB). Ein vollständiges Profil konnte trotz einer Häminkonzentration von 15 µM mit dem 10x Reaktionspuffer Y oder S generiert werden.

Die Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) zeigte sich gegenüber des künstlichen Hämins recht unempfindlich (siehe Tab. 15). Die erste Spalte zeigt die Verdünnungen der Häminlösungen, von denen jeweils 1 µl in den 12,5 µl PCR-Ansatz pipettiert wurden. Die zweite Spalte zeigt die Endkonzentration des künstlichen Hämins im PCR-Ansatz.

Tab. 15 Amplifikation von 500 pg Zelllinien-DNA mit der Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) (30 Zyklen)

Hämin		Typisierungsergebnis
Ausgangslösung	Endkonzentration	
unverdünnt	307 µM	Ø
1:2-Verdünnung	153 µM	Ø
1:5-Verdünnung	61 µM	±
1:8-Verdünnung	38 µM	√
1:10-Verdünnung	31 µM	√
1:15-Verdünnung	20 µM	√
1:20-Verdünnung	15 µM	√
1:25-Verdünnung	12 µM	√

Spuren aus der Fallarbeit, die mit der Ampli*Taq* Gold (AB) nicht oder schlecht zu analysieren waren, wurden anschließend mit der Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) untersucht. Die Typisierungsergebnisse für alte Blutspuren fielen weitaus aussichtsreicher aus als mit der Ampli*Taq* Gold (AB). Andere Spuren wie Zigarettenkippen, Hautmischspuren und Kot konnten nicht erfolgreicher analysiert werden. Dies unterstreicht wiederum die Unempfindlichkeit der Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) gegenüber dem roten Blutfarbstoff sowie dessen Abbauprodukte in alten Blutspuren.

Da die Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) trotz Anwesenheit des künstliches Hämins bzw. des roten Blutfarbstoffs DNA effizient amplifiziert, jedoch sequenzabhängig arbeitet, wurde die Kombination dieses Enzyms und der Ampli*Taq* Gold (AB) getestet, mit dem Ziel, ein ausgewogenes Profil aus Blutspuren zu erhalten (Tab. 16). Alte Blutspuren aus der Fallarbeit konnten mit dieser Polymerase-Kombination positiv analysiert werden.

Tab. 16 Kombination der Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) (0,5 U pro PCR-Ansatz) und der Gold*Taq* (2 U pro PCR-Ansatz) [Pre-heating 3 min bei 95°C]

Hämin		Typisierungsergebnisse
Ausgangslösung	Endkonzentration	
1:5-Verdünnung	61 µM	Ø
1:10-Verdünnung	31 µM	√
1:15-Verdünnung	20 µM	√
1:20-Verdünnung	15 µM	√
1:25-Verdünnung	12 µM	√

Der KAPA Blood PCR MasterMix (Peqlab) setzt eine hohe Ausgangsmenge an Template-DNA voraus. Vollblut kann nach Angaben des Herstellers direkt ohne vorherige DNA-Extraktion in den PCR-Mix pipettiert werden. Ein Abzentrifugieren der Zelltrümmer nach der Amplifikation wird vorgeschlagen.
In diese Studie konnte mit dieser Methode Blut nicht analysiert werden.
Die Zugabe von 0,5 U Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) in den PCR-Ansatz führte zu einer deutlichen Verbesserung der Amplifikationsergebnisse. DNA, die aus anderen Spuren isoliert wurde, konnte mit dem KAPA Blood PCR MasterMix (Peqlab) nicht analysiert werden, auch nicht nach Zugabe von 0,5 U Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) und/oder 1 U Ampli*Taq* Gold (AB) pro Amplifikationsansatz.
Die Typisierungsergebnisse fielen zudem negativ aus, wenn Blut direkt in den PCR-Mix pipettiert wird mit der Enzymkombination 0,5 U Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) und 2 U Ampli*Taq* Gold (AB).

3.3 STR Multiplex Q8

Der Q8-Kit beinhaltet die neun aktuellen DNA-Datenbank-Systeme (D3S1358, FGA/FIBRA, D8S1179, D18S51, D21S11, TH01, VWA, SE33/ACTBP2 und Amelogenin). Die Primer sind mit den sensitiven Fluoreszenzfarben FAM (D3S1358, FGA, Amelogenin), JOE (TH01, VWA, SE33) und TET (D8S1179, D18S51, D21S11) markiert (Abb. 15).

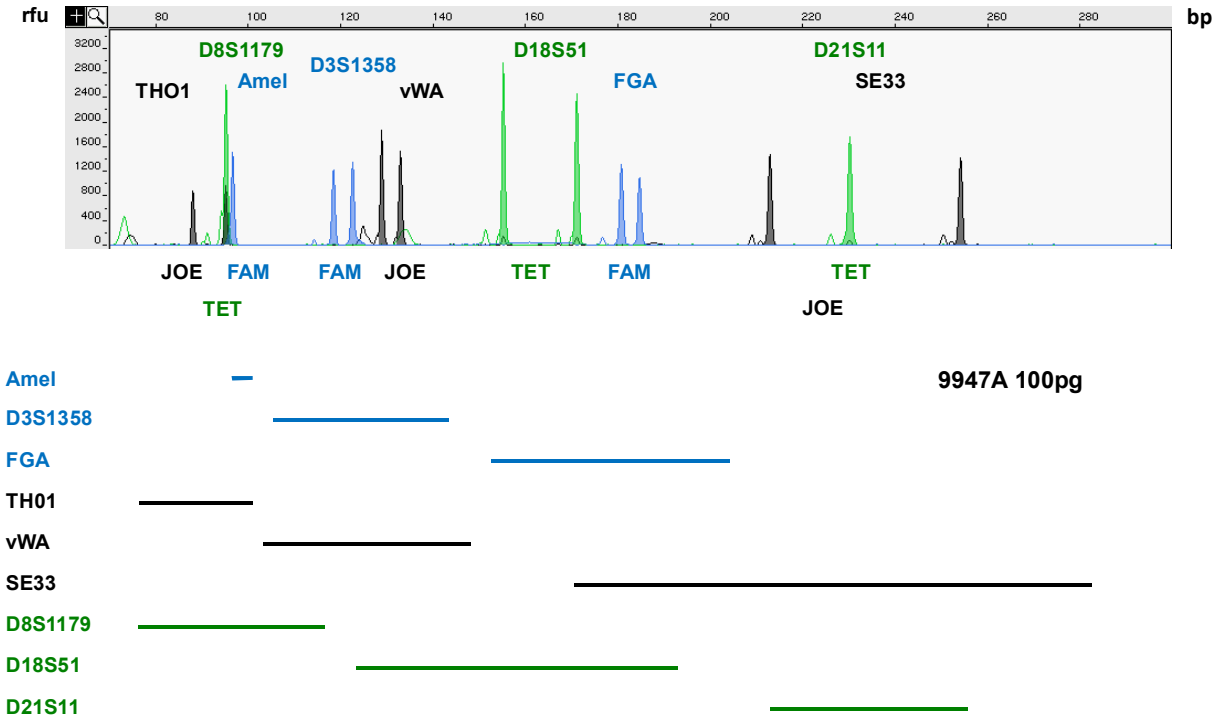


Abb. 15 Q8-Profil der Zelllinie 9947A mit einer Ausgangsmenge von 100 pg

Im Vergleich zu dem kommerziellen MPX2-Kit (Serac, Bad Homburg) sind die Amplikonlängen für TH01, VWA, SE33/ACTBP2, D8S1179, D18S51 um bis zu 180 bp gekürzt. Zwei Primersequenzen (D3S1358 und FGA) wurden vom MPX2-Kit übernommen (siehe Tab. 17).

Tab. 17 Vergleich der Amplikonlängen des Q8 und der kommerziellen Kits MPX2 (Serac), Nonaplex (Biotype) und SGM (ABI)

PCR-Kit/ System	Q8 (bp)	MPX2 (bp)	Nonaplex (bp)	SGM (bp)
Amel	96, 102 **(FAM)**	102, 108 **(FAM)**	83, 86 **(FAM)**	103, 109 **(JOE)**
D3S1358	106-143 **(FAM)**	106-143 **(NED)**	152-190 **(HEX)**	108-144 **(FAM)**
FGA	153-204 **(FAM)**	153-204 **(NED)**	190-243 **(NED)**	209-262 **(NED)**
TH01	76-100 **(JOE)**	120-144 **(JOE)**	92-116 **(HEX)**	166-191 **(NED)**
VWA	104-149 **(JOE)**	124-168 **(FAM)**	108-153 **(NED)**	154-199 **(FAM)**
SE33	164-282 **(JOE)**	206-323 **(FAM)**	206-323 **(HEX)**	—
D8S1179	74-116 **(TET)**	256-296 **(JOE)**	105-146 **(FAM)**	124-165 **(JOE)**
D18S51	124-191 **(TET)**	242-310 **(NED)**	282-351 **(FAM)**	263-331 **(JOE)**
D21S11	213-254 **(TET)**	204-244 **(JOE)**	187-227 **(FAM)**	193-233 **(JOE)**
D16S539	—	—	—	230-270 **(FAM)**
D2S1338	—	—	—	290-342 **(FAM)**
D19S433	—	—	—	101-136 **(NED)**

Vergleicht man die DNA-Profile von Erbrochenem, das mit dem Q8- und MPX2-Kit amplifiziert wurde, erkennt man eine deutliche Verbesserung der Typisierungsergebnisse mit Anwendung des Q8-Multiplex-Kits. Die Systeme D8S1179, D18S51 und SE33 können aufgrund der reduzierten Amplikonlängen deutlich besser analysiert werden (Abb. 16). Zudem zeigte der Q8-Multiplex im Gegensatz zum MPX2-Kit eine höhere Nachweissensitivität.

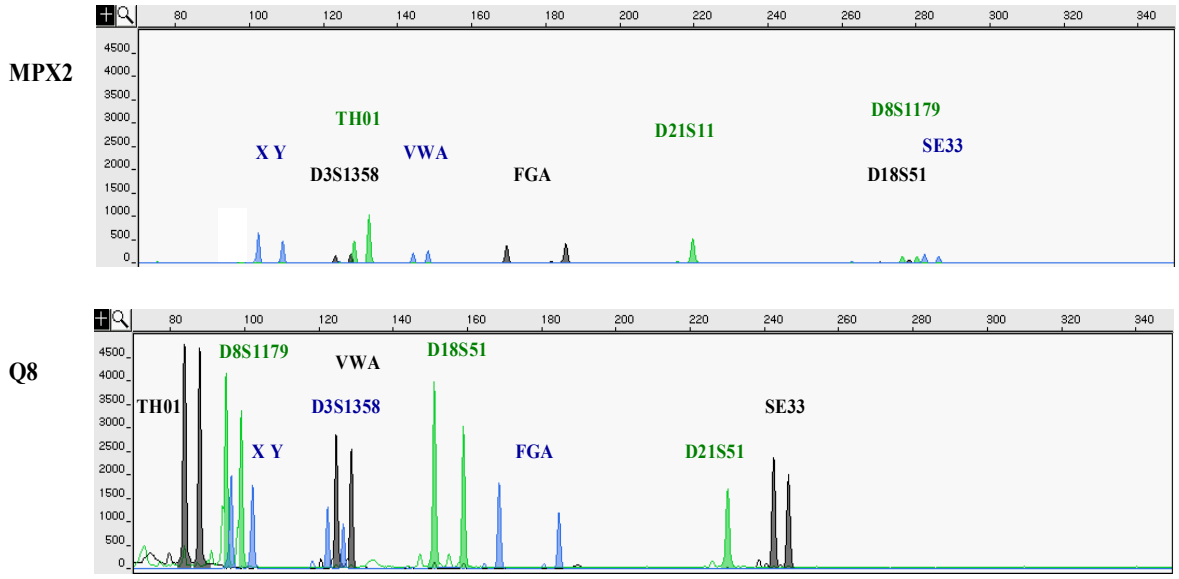


Abb. 16 STR-Profil von Erbrochenem. PCR erfolgte gleichzeitig mit dem MPX2-und dem Q8-Konzept

Das nächste Beispiel zeigt noch deutlicher, dass Spuren mit degradierter und LCN-DNA mit Hilfe des sensitiven Q8-Konzeptes erfolgsversprechender analysiert werden konnten als mit dem kommerziellen MPX2-Kit (Serac). Ein Haarschaft konnte im Gegensatz zum MPX2-Kit mit dem Q8-Multiplex vollständig typisiert werden (Abb. 17). Beim MPX2-Kit kam es nicht nur in den langen Systemen zu Allel-Dropouts, auch die kürzeren Systeme wurden nur sehr schwach bzw. nicht amplifiziert.

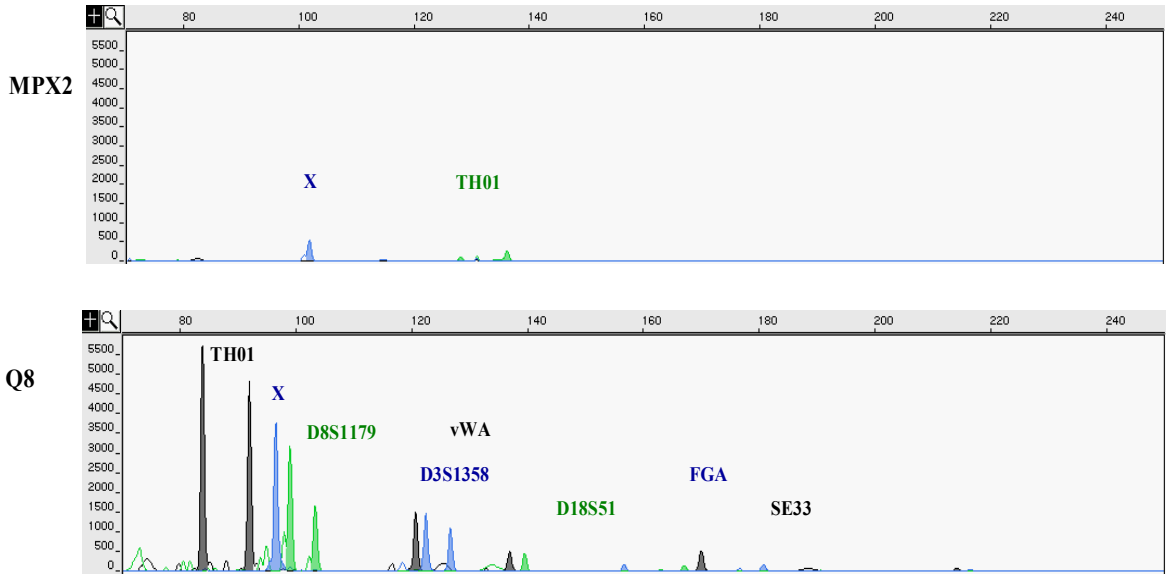


Abb. 17 STR-Profil eines Haarschaftes. Die PCR erfolgte mit dem Q8- und MPX2-Kit

Die Erfolgsraten lagen mit der Anwendung des Q8-Konzeptes für nahezu alle 30 Spuren mit degradierter und LCN-DNA, die in der ersten Testphase analysiert wurden, deutlich höher (Tab. 18).

Tab. 18 Vergleich der Erfolgsraten der einzelnen Systeme des Q8 und des kommerziellen Kits MPX2 (Serac)

System/ Kit	Amel (%)	D3S1358 (%)	FGA (%)	D8S1179 (%)	D18S51 (%)	D21S11 (%)	TH01 (%)	VWA (%)	SE33 (%)	Ø (%)	Verhältnis (%)
Q8	90	88	88	95	98	83	98	90	86	91	100
MPX2	90	84	84	71	55	74	87	77	48	74	81

Die Erfolgsrate war durchschnittlich 20% niedriger, falls die Extrakte mit dem MPX2- anstelle des Q8-Kits amplifiziert wurden.

3.3.1 Validierung des Multiplex-Kits Q8

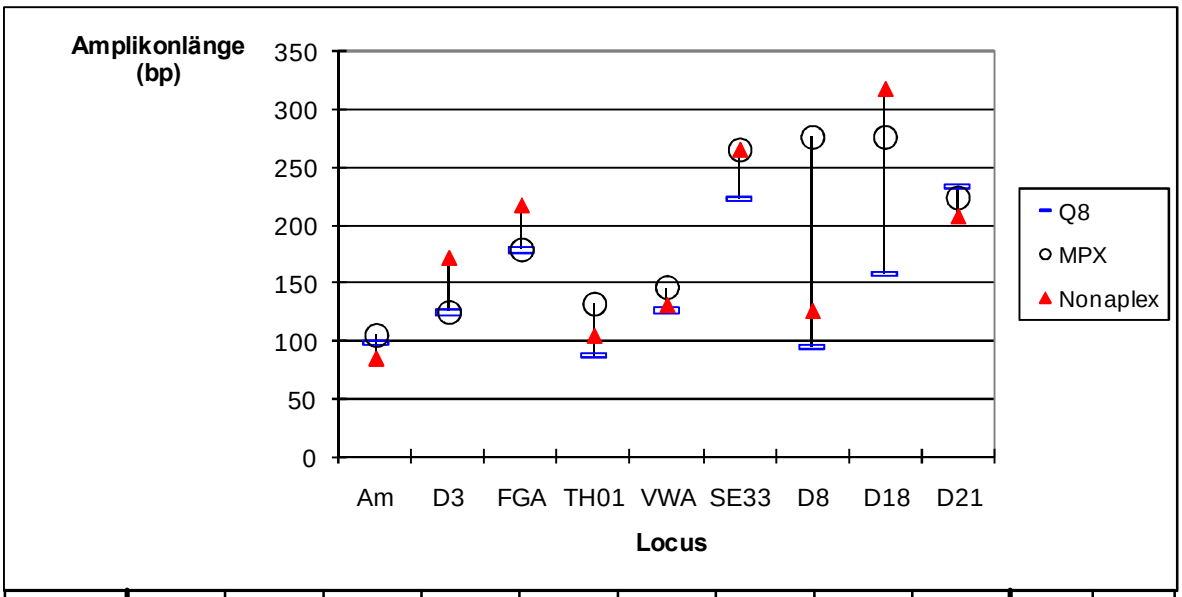
Während der Validierung des Q8-Multiplex-Kits zeigten wiederum Spuren mit degradierter DNA eine höhere Erfolgsrate in den Systemen mit verkürzten Amplikonlängen (Tab. 19 und Abb. 18). Die Systeme SE33, TH01, VWA, D8S1179 und D18S51 liegen im Vergleich zum MPX2- (Serac) und Nonaplex-Kit (Biotype) im Q8-Multiplex verkürzt vor.

Tab. 19 Vergleich der Erfolgsraten der einzelnen Systeme des Q8 und der kommerziellen Kits MPX2 und Nonaplex

System/ Kit	Amel (%)	D3S1358 (%)	FGA (%)	D8S1179 (%)	D18S51 (%)	D21S11 (%)	TH01 (%)	VWA (%)	SE33 (%)	Ø (%)	Verhältnis (%)
Q8	85	79	76	86	76	62	85	77	74	78	100
MPX2	92	65	70	61	43	61	82	69	35	64	82
Nonaplex	61	63	41	54	30	43	74	60	49	53	68

Peaks wurden als solche gewertet, wenn sie den Schwellenwert von 50 rfu erreicht haben.

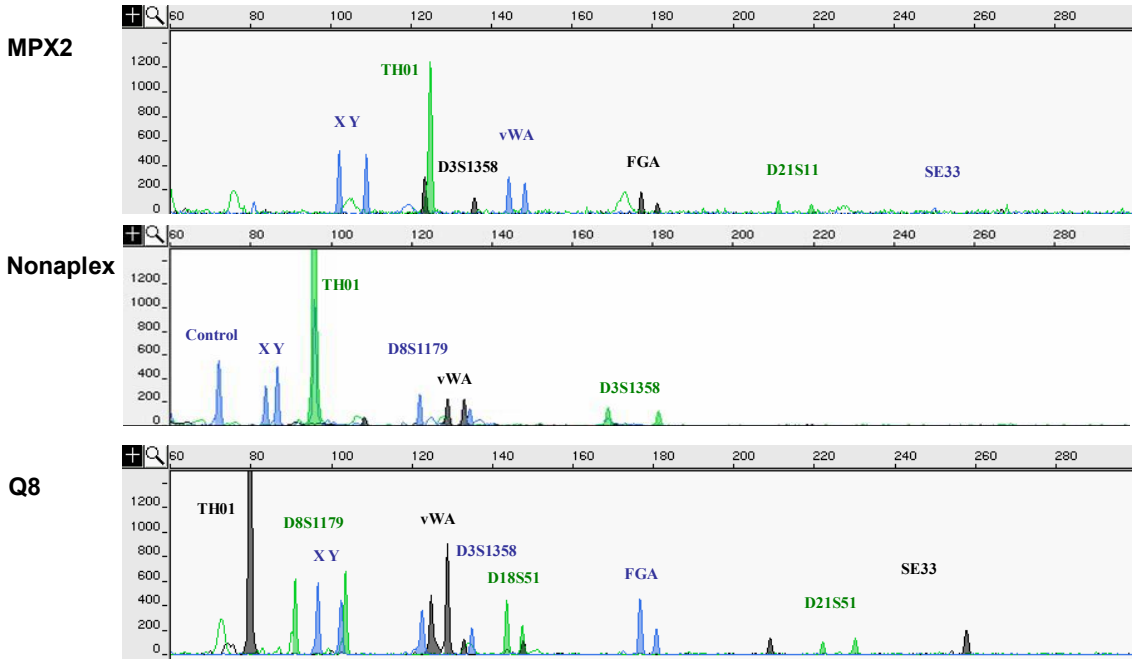
Spuren, die mit dem Q8-Multiplex analysiert wurden, liefern um 18% erfolgreichere Typisierungsergebnisse als wenn sie mit dem MPX2-Kit analysiert wurden und 32% erfolgreichere Typisierungsergebnisse im Vergleich zum Nonaplex (Tab. 19). Die durchschnittliche Amplikonlängen der einzelnen Systeme der drei Multiplex-Kits sind in Abbildung 18 übersichtlich zusammengestellt und graphisch dargelegt. Die Amplikonlängen des Q8-Multiplex-Kits wurden im Vergleich zum MPX2-Kit durchschnittlich um 23% gekürzt, der Nonaplex-Kit um 6%.



System/ Kit	Amel (bp)	D3 (bp)	FGA (bp)	D8 (bp)	D18 (bp)	D21 (bp)	TH01 (bp)	VWA (bp)	SE33 (bp)	Ø (bp)	ratio (%)
Q8	99 FAM	124 FAM	178 FAM	95 TET	159 TET	234 TET	88 JOE	126 JOE	226 JOE	148	77
MPX2	105 FAM	124 NED	178 NED	276 JOE	278 NED	224 JOE	132 JOE	146 FAM	267 FAM	192	100
Nonaplex	85 FAM	171 HEX	216 NED	126 FAM	318 FAM	207 FAM	104 HEX	131 NED	267 HEX	181	94

Abb. 18 durchschnittliche Amplikonlängen der einzelnen Loci von insgesamt 54 Proben (Am: Amelogenin; D3: D3S1358; D8: D8S51; D18: D18S51; D21: D21S11)

Eine Kotspur, die mit einem Verbrechen in Verbindung gebracht werden konnte, konnte mit Hilfe des sensitiven Q8-Multiplex analysiert werden (Abb. 19). Im Gegensatz zu den zwei kommerziellen Kits MPX2 und Nonaplex-Kit konnte ein vollständiges Profil mit dem Q8-Multiplex erzeugt werden. Die Recherche in der Datenbank brachte eine Treffermeldung und ein in der Datei erfasster Mann konnte als Spurenverursacher zugeordnet werden.



kit\locus	Amel	D3S1358	FGA	D8S1179	D18S51	D21S51	TH01	vWA	SE33
MPX2	X,Y	15,18	22,23			28,30	6	16,17	18
Nonaplex	X,Y	15,18		12,15			6	(11),16,17	
Q8	X,Y	15,18	22,23	12,15	12,13	28,30	6	16,17	18,30.2

Abb. 19 STR-Profil von Kot. PCR erfolgte mit dem MPX2-, Nonaplex- und Q8-Kit

3.4 Der STR Multiplex „Y13“

Für den Y13-Kit wurden folgende Y-chromosomale STR-Systeme zu einem Multiplex zusammengefasst: DYS391, DYS439, DYS438, DYS390, DYS385 a+b, DYS389 I+II, DYS392, DYS388, DYS393, DYS19 und DYS437.

Die Systeme DYS391, DYS439, DYS438, DYS390, DYS385 a+b wurden mit der Fluoreszenzfarbe FAM markiert, DYS389 I+II, DYS392, DYS388 mit TET, DYS393, DYS19, DYS437 mit JOE (Abb. 20).

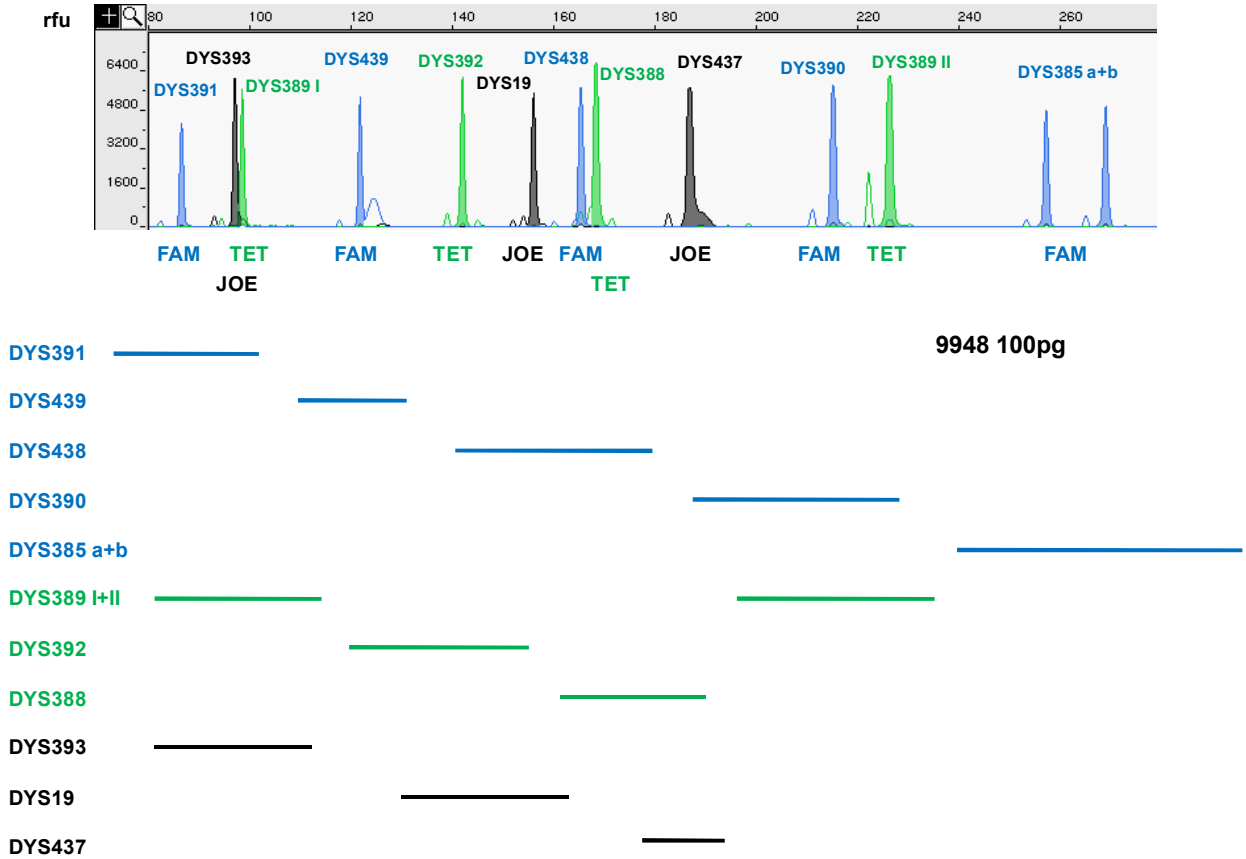


Abb. 20 Y13-Profil der Zelllinie 9948 mit einer Ausgangsmenge von 100 pg

Eine vergleichende Studie mit dem PowerPlex® Y System (Promega) zeigt bei Mann-Frau-Mischspuren mit einem großen Anteil weiblicher DNA eine ähnliche bzw. minimal schlechtere Sensitivität für den Y13-Multiplex (Abb. 21). Bei der Analyse von Mischspuren mit 400 pg männlicher DNA und Überschuss an weiblicher DNA konnten mit dem Y13-Multiplex bis zu einem Mischungsverhältnis von 1:200 ein vollständiges Profil beobachtet werden, beim PowerPlex® Y lag das Verhältnis höher.

Die Analyse einer Zelllinienmischung (9948 und 9947A) im Verhältnis 1:100 ergab eine geringfügig erfolgreichere Typisierung der männlichen Zelllinie mit dem PowerPlex® Y, wobei 50 pg ♂-DNA und 5 ng ♀-DNA bzw. 100 pg ♂-DNA und 10 ng ♀-DNA in den PCR-Ansatz pipettiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Dasselbe Ergebnis konnte mit derselben Zelllinienmischung im Verhältnis 1:200 festgestellt werden, wobei die männliche Zelllinie 50 pg betrug.

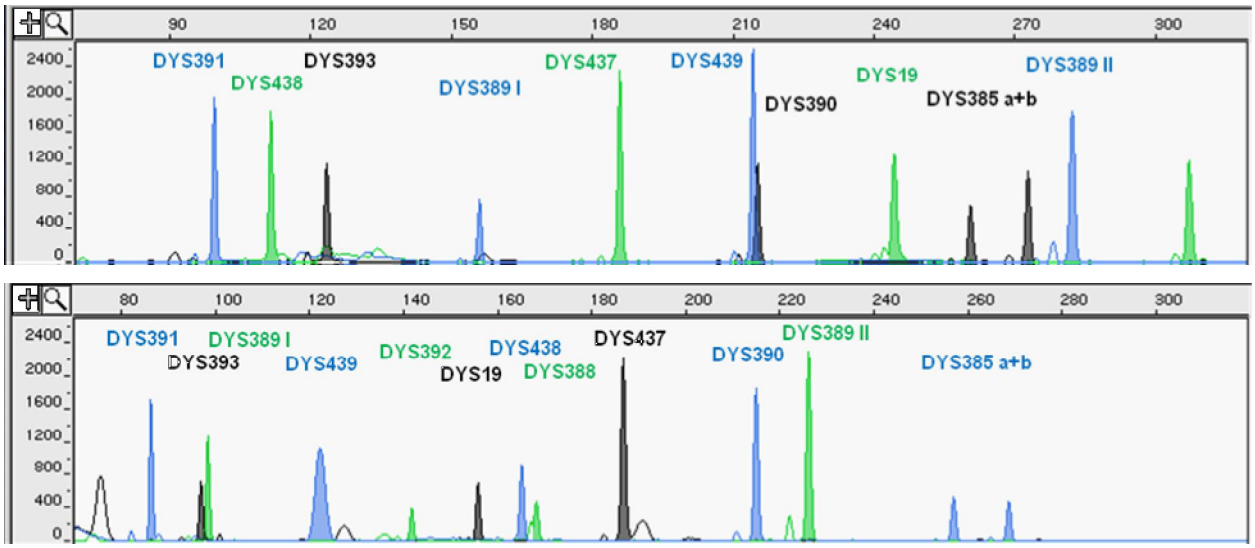


Abb. 21 Profil einer Mischspur mit 400 pg männlicher DNA (9948) und Überschuss an weiblicher DNA (20 ng). Die Analyse erfolgte mit dem Y13-Multiplex und dem PowerPlex® Y System (Promega)

Mann-Mann-Mischspuren konnten mit beiden Multiplex-Kits gleich gut analysiert werden. Die Mischspuren wiesen dabei unterschiedliche Mischungsverhältnisse auf, wobei die eine männliche Komponente zwischen 50 pg und 100 pg, die andere zwischen 50 pg bis 1 ng lag.

Wurden Spuren mit degradierter DNA und geringer DNA-Quantität untersucht, stieg im Vergleich zum PowerPlex® Y die Erfolgsrate in der Typisierung der Spur mit dem Y13-Multiplex. So konnten Spuren mit männlicher DNA aus der Fallarbeit, die aufgrund der starken DNA-Degradation und geringen DNA-Menge mit dem PowerPlex® Y System schlecht typisiert werden konnten, mit dem Y13-Multiplex teilweise erfolgreich analysiert werden.

Im Vergleich zum PowerPlex® Y System wurden die Amplikonlängen im Y13-Multiplex um 21% gekürzt (Tab. 20).

Tab. 20 durchschnittliche Amplikonlänge (in bp) der einzelnen Systeme und ihre Markierung

System/Kit	Y13	PowerPlex® Y
DYS391	84 (FAM)	97 (FL)
DYS439	120 (FAM)	212 (FL)
DYS438	161 (FAM)	106 (JOE)
DYS390	209 (FAM)	209 (TMR)
DYS385 a+b	276 (FAM)	281 (TMR)
DYS389 I	96 (TET)	154 (FL)
DYS389 II	218 (TET)	274 (FL)
DYS392	140 (TET)	306 (JOE)
DYS388	176 (TET)	
DYS393	93 (JOE)	119 (TMR)
DYS19	158 (JOE)	246 (JOE)
DYS437	186 (JOE)	185 (JOE)
Ø (bp)	158	199
Verhältnis (%)	79	100

4 Diskussion

4.1 „altes“ Spurenmaterial

Charakteristisch für „alte“ Spuren ist die hohe Beschädigung und Degradation der DNA (ancient DNA, abgekürzt aDNA), ihre LCN-Menge, Vorhandensein von Kontaminationen mit exogener DNA aus anderen Organismen oder mit fremder humaner DNA, Koexistenz einer Zahl an potentiellen Inhibitoren wie beispielsweise Huminsäuren, Fulvinsäuren, biologisch degradierte Produkte und Kollagen [63,100,120,121,123, 125,136,166,199].
An Nukleinsäuren finden ständig chemische Reaktionen statt wie beispielsweise nicht-enzymatische Methylierungen, Hydrolyse- und Oxidationsreaktionen. Diese DNA-Modifikationen werden im lebenden Organismus durch spezielle Reparatursysteme wieder korrigiert, nicht aber in totem Gewebe [33,55,106]. Während der Nekrose, provozierter Zelltod, und der Apoptose, programmierter Zelltod, erfolgt zudem eine enzymatische Degradation, wobei die nach dem Zelltod freigesetzten Nukleasen die DNA abbauen. UV-Strahlung, Feuchtigkeit, Wärme und Mikroorganismen begünstigen eine beträchtliche DNA-Degeneration. Besonders bei der Analyse älterer Spuren gestaltet sich daher aufgrund der Fragmentierung der DNA-Stränge eine Amplifikation der langen Sequenzen schwierig [8,10,35,47,72,75,101,115,195,197]. LCN-DNA und potenzielle inhibitorische Substanzen können zudem die Analyse dieser Spuren erschweren.

4.1.1 Typisierung von degradierter und LCN-DNA

Bei Spuren, die wenige kernhaltige Zellen enthalten, wird bevorzugt die Verwendung der so genannten LCN-PCR eingesetzt [32,38,62,69,70,180]. Die LCN-Typisierung ist das Analysieren von Proben, die sich unterhalb der stochastischen Schwelle (Interpretationsschwelle), oberhalb der Detektions-schwelle befinden [32]. So kann ein DNA-Profil von winzigen Spuren eines Beweismaterials wie Fingerabdrücken erstellt werden [205]. Nicht nur Absonderungen von Drüsenporen, sondern auch Epithelzellen werden auf die

Oberfläche übertragen. Jede Epithelzelle enthält etwa 5 pg nukleäre DNA. Umso rauer die Oberfläche ist, desto besser ist die zelluläre Anhaftung auf die Oberfläche, was bessere Profile liefert. Viele der oberflächlich anhaftenden Zellen werden durch den sachten Luftstrom, der durch das Aufsprühen der Chemikalien entsteht, oder durch natürliche Winde wieder abgeschuppt. Die vielen Reaktionsparameter, die den PCR-Ertrag beeinflussen, können systematisch angepasst werden, so dass die Detektion weniger Templates erleichtert wird.

Methoden, die zu einer möglichen Optimierung der LCN-Typisierung führen, sind (1) Reduktion des PCR-Volumens, um die Amplikons zu konzentrieren, (2) Filtration der Amplikons, um die Ionen (Salze) zu entfernen, die mit der DNA wettstreiten, wenn sie in die Kapillare eingespritzt werden, verbessert demnach die elektrokinetische Injektion, (3) Verwendung von Formamid mit geringer Leitfähigkeit, (4) Zugabe von größeren Mengen an PCR-Produkt zu dem denaturierenden Formamid, (5) Erhöhung der Injektionszeit bei der Elektrophorese [32,62]. Die Signalintensität kann dadurch teilweise erhöht werden. Allel-Dropouts, -Dropins, Heterozygoten-Ungleichgewicht, erhöhte Stutter (über 14%) werden jedoch dadurch nicht komplett beseitigt. Weitere Optimierungsvorschläge, die zu einer verbesserten Sensitivität der LCN-Typisierung führen, sind eine verbesserte Spurenabnahme beispielsweise durch bessere Wattestieltupfer, eine DNA-Extraktion in kleinere Volumen, sensitivere Fluoreszenzfarbstoffe (High Sensitivity Energy Transfer Dye Labeling – Etdyes), neben erhöhter Zyklenzahl Erhöhung der Polymerase-Konzentration, Verwendung von miniSTRs, da kürzere Amplikons besser amplifiziert werden, Verwendung von mtDNA aufgrund einer höheren Kopienzahl pro Zelle [38].

Da die ersten PCR-Zyklen ausschlaggebend für den Amplifikationserfolg sind, wäre eine Zwei-Stufen-PCR eine weitere Überlegung gerade bei der Analyse von LCN-DNA [117]. Durch die zu Beginn der Zwei-Phasen-PCR durchgeführte lineare PCR, bei der nur ein Primer eingesetzt wird, wird ein Strang bevorzugt amplifiziert. In der anschließenden exponentiellen PCR mit einem Primerpaar, bindet ein Primer an die Sequenz am 5´Ende des Primers für die lineare PCR und der zweite Primer an eine Zielsequenz auf der Template DNA. Möglicherweise wäre mit dieser Methode die Artefaktbildung reduziert. Nachteilig ist jedoch die Erhöhung der Kontaminationsrisiken. Gewöhnlich wird die Sensitivität der LCN-PCR durch eine Erhöhung der Zyklenzahl oder durch den Gebrauch von so genannten

„nested“ Primer erhöht [19,38,62,69,70,113,127,180]. Für eine Ausgangsmenge von weniger als 100 pg DNA zeigte sich das Optimum bei 34 PCR-Zyklen [69,70]. Mehr Zyklen resultieren in einer Erhöhung der PCR-Fehler, aber nicht in einer Erhöhung der PCR-Sensitivität; zu wenige Zyklen führen zu einer Abnahme der Sensitivität. Bei Spuren mit LCN-DNA konnte im Rahmen dieser Arbeit ein Optimum bei 33 PCR-Zyklen festgestellt werden. Diese Spuren waren reproduzierbar und die Artefaktproduktion erwies sich als geringfügig. Nur wenige Proben zeigten keinen Anstieg in der Sensitivität mit 33 anstelle 30 PCR-Zyklen. Die Typisierungsergebnisse waren jedoch in diesem Fall meist negativ, so dass sich im Spurenextrakt möglicherweise keine DNA befand oder die DNA lag hoch degradiert vor.

Aufgrund der erhöhten Anzahl an PCR-Zyklen konnten einige Spuren aus der Fallarbeit analysiert werden. Mit der Verwendung der LCN-PCR mit 33 Zyklen, konnten mehrfach Profile, kompetent für den DNA-Meldeboden, generiert werden. Die Recherche in der Datenbank brachte eine Treffermeldung und ein in der Datei erfasster Mann konnte als Spurenverursacher zugeordnet werden (siehe Abb. 19).

Mit Hilfe der nested PCR kann die Vermehrung falscher Produkte auf ein Minimum reduziert werden [180]. Dazu verdünnt man die Produkte der ersten Amplifikationsreaktion und setzt sie im zweiten Zyklus als Ziel-DNA ein; dabei wählt man einen Primersatz, der mit Sequenzen korrespondiert, die nahe bei, aber innerhalb von denen der ersten Reaktion liegen. Diese Methode ist jedoch zeitaufwendig und birgt eine größere Kontaminationsgefahr.

Die primer-extension preamplification (PEP)- Methode ist eine weitere Möglichkeit, mit der die Sensitivität gesteigert werden kann ohne an Spezifität zu verlieren [13]. Dabei werden Zufallsprimer, eine geringe Annealing-Temperatur und eine hohe Zyklenzahl eingesetzt. Die Zufallsprimer (random primer) haben eine zufällige Basenzusammensetzung und können theoretisch an jeder Stelle im Genom binden. Dadurch können 80% der genomischen DNA amplifiziert werden. Nach der PEP-Reaktion können die PEP-Produkte für die spezifische Amplifikation eingesetzt werden. Die Erfolgsrate der Typisierungsergebnisse von Haarschäften konnte durch die Präamplifikation ernorm erhöht werden [13]. Es wurden jedoch Single-PCRs angesetzt. Vermutlich würde die PEP-Methode bei STR-Multiplexen eine deutliche Loci-imbalance ergeben. Mit dieser Methode scheint darüber hinaus das Artefaktrisiko erhöht zu sein. Die Anwendung des GenomiPhi DNA

Amplification Kits (Amersham Bioscience), bei dem mit Verwendung von Zufallsprimern eine lineare Amplifikation des gesamten Genoms stattfindet, erbrachte in dieser Studie für LCN-DNA keinen größeren Typisierungserfolg in der anschließenden spezifischen Amplifikation.

Bei der Anwendung einer RV (reduced volume)-PCR wird die isolierte DNA vor der Amplifikation in den PCR-Tubes auf ein Reaktionsvolumen von weniger als 5 µl getrocknet [113]. Das entsprechende Volumen des PCR-Mastermixes wird dann in die PCR-Tube zugegeben. Eine Verringerung des PCR-Volumens erhöht den Typisierungserfolg für Spuren mit degradierter und LCN-DNA. Stochastische Effekte scheinen reduziert zu sein, da die anfängliche DNA weniger verdünnt und auch die PCR-Komponenten konzentrierter vorliegen. Daher wurde das Reaktionsvolumen der Multiplex-Kits Q11 und Y13 reduziert. Die Verringerung des PCR-Volumens unter 11 µl führte in dieser Studie jedoch bei der Analyse von Haaren zu einer reduzierten Erfolgsrate. Eine Reduktion des PCR-Volumens bringt zwar eine Konzentrierung der DNA mit sich, doch werden die potenziellen PCR-Inhibitoren ebenfalls konzentriert. Darüber hinaus kann die Reaktion vermutlich in einem so geringen Volumen schlechter ablaufen. Bei Verwendung eines größeren PCR-Volumens müssen die Inkubationszeiten erhöht werden, damit ein adäquates thermisches Gleichgewicht des Reaktionsgemisches gewährleistet ist.

Verkürzte Amplikonlängen erhöht die Erfolgsrate der Analyse von Spuren mit degradierter DNA. Einer Reduktion der Amplikonlängen sind Grenzen gesetzt [113]. Zum einen beträgt die Mindestgröße des PCR-Produktes die Repeatlänge plus die Primerlängen. Aufgrund der eingeschränkt möglichen Verwendung an Fluoreszenzfarbstoffen mit höchstens fünf verschiedenen pro Multiplex-Kit, kann die Amplikonlänge nur soweit reduziert werden, dass es zu keiner Überschneidung innerhalb einer Fluoreszenzfarbe kommt. Zum anderen müssen die PCR-Produkte, die von neuen Primer generiert wurden, für eine gesicherte Allelbezeichnung mit den gängigen Produkten verglichen werden, da Insertionen oder Deletionen in der Sequenz zwischen der neuen und gängigen Primerbinderegionen auftreten können. Eine Mutation in der Primerbinderegion kann Ursache eines Allelausfalles sein.

Eine interessante Methode zur simultanen Amplifikation mehrerer Loci mit verkürzten PCR-Produkten stellt das Verfahren von Bender et al dar [22]. Die

DNA-Analyse an telogenen Haaren erfolgt mit einem Kit aus elf Systemen, wobei die Primer für fünf Systeme mit Biotin gelabelt sind. Nach der PCR erfolgt eine Auftrennung der beiden Sets durch das Binden der mit Biotin gelabelten Amplifikate an Streptavidin-ummantelte Sepharose. Anschließend werden zwei verschiedene Läufe auf der Kapillargelelectrophorese durchgeführt. Dieses Verfahren gewährleistet das simultane Amplfizieren von elf Systemen mit kurzen Ampliconlängen ohne die Verwendung eines 5-Farben-Moduls. Diese Methode erhöht jedoch ebenso die Kontaminationsrisiken und führt möglicherweise während der Auftrennung zu einem DNA-Verlust, der gerade bei Spuren mit LCN-DNA kritisch ist.

Wegen der geringen Ausgangsmenge an DNA-Molekülen und der erhöhten Zyklenzahl können Allelausfälle - ein Allel eines heterozygoten Locus wird bevorzugt amplifiziert, sporadische Kontaminationen - Allele werden amplifiziert, die nicht in Verbindung zur Verbrecherspur stehen, falsche Allele, verursacht durch „Slippage“-Artefakte während der ersten PCR-Zyklen als stochastische Effekte auftreten [6,13,33,69,70,101,113,168]. Slippage-Artefakte dürfen 15% des eigentlichen Allels nicht überschreiten [195].

Allel-Dropouts entstehen möglicherweise beim Übertragen der LCN-DNA vom Extrakt in den Amplifikationsansatz. Bei Spurenextrakten mit LCN-DNA beinhalten demnach dieselben Extraktvolumen, die für die PCR eingesetzt werden, nicht dieselben DNA-Mengen. Allel-Dropouts sind überdies Folge von Amplifikationsproblemen oder DNA-Degradation [38]. Allel-Dropouts erschienen ab und zu, was jedoch beispielsweise bei der Analyse von Haaren mit degradierter und LCN-DNA nicht unerwartet ist [6,13,33,69,70,101,113,168].

Fremdallele entstehen nicht nur aufgrund von sporadischen Kontaminationen [101, 149]. Eine vorzeitige Beendigung der Primerextension aufgrund eines Templateknicks (nicking) bzw. aufgrund DNA-Degradation oder eine vorzeitige Dissoziation der *Taq* DNA-Polymerase vom Primer-Template-Komplex kann zu verkürzten Produkten führen. Die Entstehung von Zusatz- oder Stotterbanden, so genannte shadow bands, entstehen ebenso aufgrund von Slippage und Rekombination [74,128,135,149]. Löst sich die *Taq* DNA-Polymerase während der Elongation von der Template-DNA im Repeat-Bereich und eine Region des Primer-Template-Komplexes denaturiert, kann es zu einer Schleifenbildung des nicht-basengepaarten Template-Stranges kommen und die Polymerase wandert

ein, selten mehrere Repeats weiter. Dadurch entstehen um einen oder mehrere Repeats kürzere oder seltener längere Produkte als die eigentlichen Allele. Dieser Prozess wird als Slippage bezeichnet. Tritt dieser Slippage-Mechanismus bereits im ersten PCR-Zyklus auf, können die Peakhöhen der Zusatzbanden die Peakhöhen der eigentlichen Allele sogar übertreffen. Beim Rekombinations-prozess hybridisieren die teilweise verlängerten PCR-Produkte mit einem anderen Template, vor allem in der Repeat-Region, so dass Produkte verschiedener Länge entstehen. Dieser Prozess wird durch Schäden an der DNA gefördert (siehe Abb. 22).

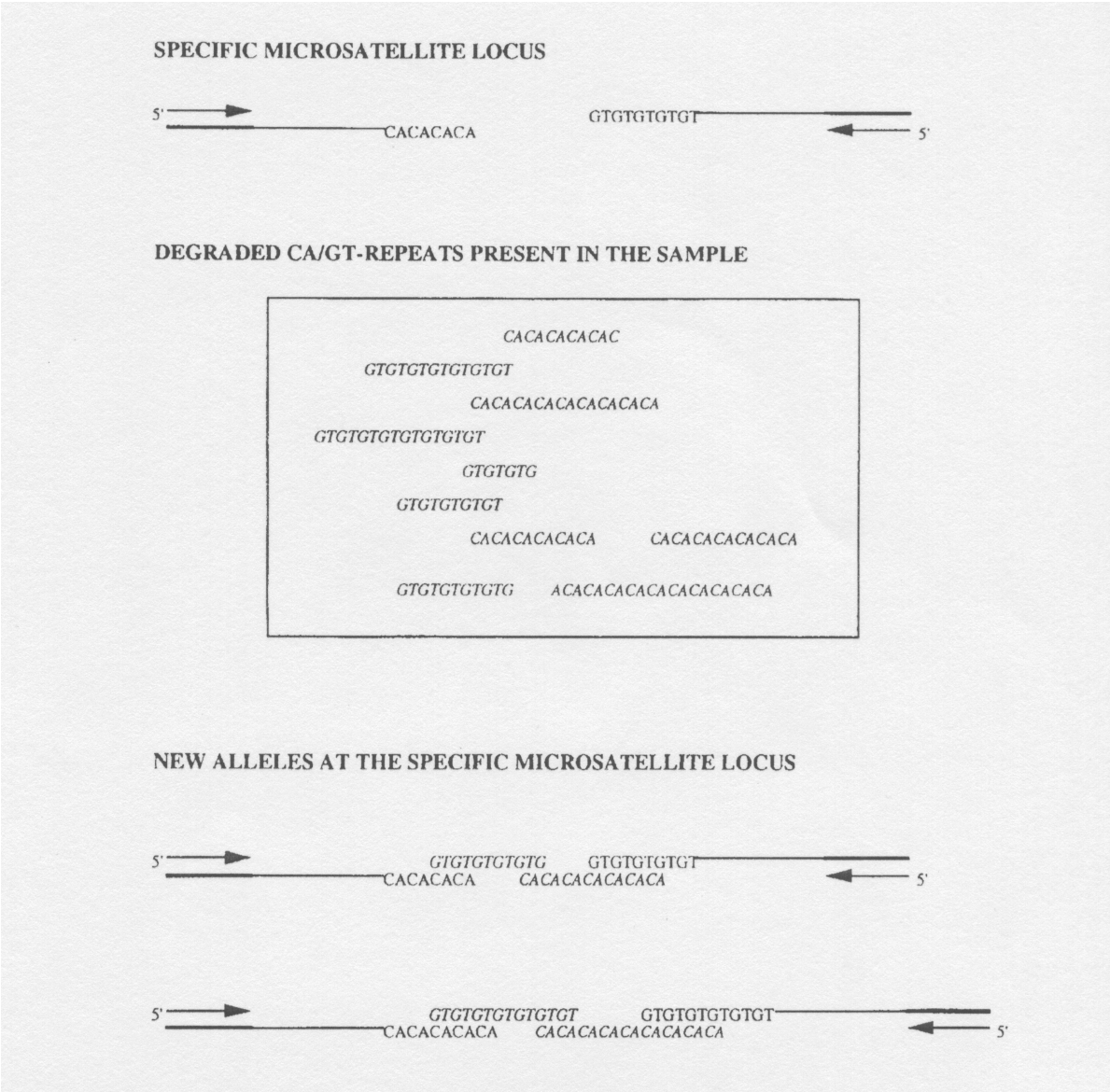


Abb. 22 hypothetischer Mechanismus für die Generierung neuer Mikrosatelliten-Allele von degradierter DNA [149]

Diese „neuen“ Templates können dann soweit vervollständigt werden, dass wieder beide Primer an den DNA-Strang binden und die Neusynthese eines komplementären DNA-Stranges erfolgen kann. Auf diese Weise können „fremde“ Allele entstehen, die nicht replizierbar sind, aber in der Regel länger sind als die eigentlich erwarteten Allele.

Die shadow bands sind bei der Amplifikation von Repeats aus Dinukleotiden intensiver als bei Tetranukleotiden und Pentanukleotiden. Daher scheint Slippage wahrscheinlicher als Rekombination [74,128]. Darüber hinaus müsste bei der Rekombination längere und kürzere Produkte entstehen, es werden jedoch hauptsächlich kürzere shadow bands generiert. Eine Erhöhung der PCR-Zyklenzahl begünstigt die Generierung der Zusatzbanden.

LCN-DNA in der PCR führen in einer sequenzabhängigen Art und Weise teilweise zu falschen Basen-Substitutionen [4]. So baut die Polymerase gegenüber einem beschädigten C-Nukleotid anstelle G- ein A-Nukleotid ein. Diese künstliche G zu A-Mutation findet vorwiegend in GC-reichen Sequenzen statt. Eine konzentrationsabhängige Basensubstitution wird möglicherweise zudem durch Basenschäden und DNA-Fragmentierung verursacht [4]. Degradierte DNA ist Ursache von PCR-Jumping, das in abnormale DNA-Sequenzen resultieren kann [4,13,135]. Wird aufgrund DNA-Degradation die Primerextension vorzeitig beendet, kann der verlängerte Primer im nächsten Zyklus an eine andere homologe Sequenz binden. Das teilweise verlängerte Molekül agiert als neuer Primer und kann ein Chimären-Molekül amplifizieren, falls die DNA-Fragmente sich innerhalb eines heterozygoten Loci befinden. LCN mit intakter DNA weisen ähnliche PCR-Fehler auf [4]. Außer Schädigung der DNA spielen demnach noch weitere Faktoren eine Rolle.

Aufgrund der stochastischen Effekte wie Allel-Dropout, Allel-Dropin, erhöhte Stutter, Heterozygotenungleichgewicht, gestaltete sich die Dateninterpretation der LCN-Proben in dieser Studie teilweise schwierig. Die stochastischen Effekte steigen mit der Amplikonlänge. Daher produzieren die wiederholten Analysen disharmonische Ergebnisse häufiger bei längeren PCR-Produkten als bei kürzeren.

Um die LCN-Profile interpretieren zu können und eindeutige Genotypen von solchen kritischen Spuren zu erhalten, muß die PCR-Amplifikation mehrfach wiederholt werden. Für die Analyse und Interpretation von LCN-DNA eignet sich

der „Multiple-Tube-Ansatz“ [180]. Pro Extrakt werden drei PCRs durchgeführt. Ein Allel wird erst als solches erkannt, wenn es 2x (von 3x) beobachtet wird. Falls das Ergebnis unsicher scheint, erfolgen weitere Amplifikationsreaktionen. Nachteil dieser Methode ist die nötige Verdünnung der DNA. Um die DNA nicht verdünnen zu müssen, kann eine PCR mit 28 Zyklen durchgeführt werden [96]. Werden keine Profile oder Teilprofile beobachtet, erfolgt eine Reamplifikation der Probe mit weiteren sechs Zyklen nach der Zugabe neuer/frischer DNA-Polymerase. Die Profile sind zuverlässig und eine Anwendung ist möglich, wenn Extrakt fehlt.
Negativkontrollen können nicht als Indikator für geringfügige Kontamination angewandt werden [69,114]. Grund ist die äußerst sensitive Methode der LCN-PCR, mit der bereits ein einzelnes DNA-Molekül detektiert werden kann. Ein Molekül kann jedoch nicht mehr als ein Tube kontaminieren. Negativkontrollen erkennen demnach systematische (beispielsweise kontaminiertes Wasser, kontaminierter PCR Puffer), nicht aber sporadische (individuelle Kontamination eines PCR Tubes) Kontamination [38].
Aufgrund der ansteigenden Sensitivität der STR-Konzepte, muß gewährleistet sein, dass bei der Spurenentnahme keine fremden DNA-haltigen Zellen auf Beweisspuren übertragen werden. Kriminaltechniker müssen am Tatort penibel arbeiten und Handschuhe tragen, um das Übertragen von beispielsweise Epithelzellen der Hand auf das Beweismaterial zu vermeiden. Die Gefahr eines Sekundärtransfers ist relativ gering, soweit Schutzmaßnahmen eingehalten werden (Handschuhe, Mundschutz) [196]. Der Übertragungserfolg der Epithelzellen hängt vom Individuum ab, d.h. vom personellen Abschuppungsstatus und von der Trockenheit der Haut, von den spezifischen Aktivitäten des Überträgers vor dem Transfer wie beispielsweise Händewaschen, von der Substratoberfläche, vom Übertragungsdruck auf das Substrat [38,127,141, 196,205]. Falls Epithelzellen von Fingerabdrücken analysiert werden müssen, sollten zur Entwicklung der Fingerabdrücke Chemikalien verwendet werden, die kaum bzw. nicht die DNA-Typisierung beeinträchtigen. Die Übertragung von DNA-reichen Körperflüssigkeiten wie beispielsweise Speichel, Schweiß auf Beweisspuren mit LCN-DNA macht die Analyse der Spur in der Regel unmöglich.

Aufgrund der niedrigen Erfolgsrate, der großen Kontaminationsgefahr, der komplexen Interpretation, der wegen des unbekannten Zeitpunktes der

Spurenablagerung nicht beweiskräftigen, aber interessanten Information ist es fraglich, ob die LCN-Typisierung lohnend ist [38].
LCN-Typisierungen können nur beurteilt werden innerhalb des Kontextes eines Falles, was Interpretationen und Spekulationen über Ereignisse durch den Analysten nötig macht. Die Zellart und der Zeitpunkt der Zellantragung wären interessant [62].
Generell sind für eine erfolgreiche Amplifikation die optimal eingestellten Konzentrationen der PCR-Komponenten sowie die Wahl der Komponenten selbst ein wichtiger Anhaltspunkt. Suboptimale Reaktionsbedingungen wirken sich besonders bei Spuren mit degradierter und LCN-DNA aus.
In der Screening-Phase kommt es häufig aufgrund des großen Primer-Template-Verhältnisses zu Primer-Primer-Kollisionen, Primer-Template-Kollisionen sind merklich reduziert. Es treten Primer-Dimer-Bildungen auf und andere Artefakte. Die Primer-Dimer-Bildungen konnten jedoch ausgeschlossen bzw. deutlich eingeschränkt werden, indem alle Primer eines Multiplex-Kits gegeneinander mit Hilfe des Programms „AutoDimer“ abgeglichen werden [186]. Eine Booster-PCR, bei der anfänglich beide Primer verdünnt eingesetzt werden, führt zusätzlich zu einer Optimierung der Screening Phase [13,158]. In den nächsten Zyklen wird die Primer-Menge erhöht. Diese Prozedur wurde entworfen, um ein Wenigfaches des gewünschten Ziels während der Screening-Phase zu amplifizieren, das dann das bevorzugte Template für die Amplifikation wird. Eine Booster-PCR dürfte Primer-Dimer-Bildungen deutlich reduzieren.

4.1.2 inhibitorische Substanzen

Während der Extraktion werden inhibitorische Substanzen gelegentlich zusammen mit der DNA isoliert, da sie nicht immer vollständig abgetrennt werden können. Es gibt eine Vielfalt an inhibitorischen Substanzen, die unterschiedliche Wirkungen haben. Einige Inhibitoren beeinflussen die Zelllyse [199,200]. Daher sollte bereits bei der Extraktion auf eine vollständige Lyse des Probematerials geachtet werden. Der Verlust der Zellwandintegrität reicht für eine Amplifikation der DNA nicht aus. Eine enzymatische Degradation der zellulären Trümmer ist häufig nötig. Falls die Zelllyse schwach ausfällt oder die DNA nicht ausreichend von strukturellen und

DNA-bindenden Proteinen getrennt ist, kann es zu einer PCR-Inhibition bzw. im schlimmsten Fall zu einem DNA-Verlust kommen. Hohe Konzentrationen an Salz beispielsweise führen zu einer unvollständigen Lyse. Proteolytische Enzyme, denaturierende Reagenzien, phenolische Komponenten von der Probe selbst oder von dem organischen DNA-Aufreinigungsverfahren können die für die Lyse notwendigen Enzyme degradieren oder die Amplifikation inhibieren, indem sie an die DNA-Polymerasen binden oder sie denaturieren [199].

Andere Inhibitoren zerstören die Nukleinsäure beziehungsweise binden daran, so dass die anschließende Amplifikationsreaktion gehemmt ist. Möglicherweise kommt es aufgrund einer DNA-Inhibitor-Interaktion zu einem DNA-Verlust bereits während der Extraktion, so dass DNA zusammen mit dem Zellmaterial verworfen wird [199]. Die DNA-Sequestration und Degradation kann überwunden werden, indem die Ziel-DNA so schnell wie möglich nach der Zelllyse von den zerstörerischen Komponenten physikalisch-chemisch getrennt wird. Hitze und Proteasen können verwendet werden, um die Nukleasen zu zerstören, müssen jedoch vor der Zugabe der Polymerase eliminiert werden, um die enzymatische Inaktivierung der Polymerasen zu verhindern [199]. In Kot beispielsweise können sich aber auch bakterielle Nukleasen befinden, die extrem hitzestabil sind und nur durch Behandlung in Formaldehydlösung für 1 h neutralisiert werden können [199].

Mittlerweile sind viele inhibitorische Substanzen bekannt, doch ist man sich teilweise noch über ihre Wirkungsweise im Unklaren [121,199]. Häufig können nur Vermutungen der inhibitorischen Wirkung einer Substanz aufgestellt werden. Bakterielle Zellen, Zelltrümmer, Proteine und Polysaccharide verursachen eine Abschirmung der DNA durch die Bildung hoch-molekularer Komplexe, so dass die Ziel-DNA für die Polymerase unzugänglich wird [146,199]. Pollen verdauen vermutlich enzymatisch eine essentielle Reaktionskomponente. Die inhibitorische Wirkung von Harnstoff im Urin beruht möglicherweise auf die Denaturierung der DNA-Polymerase. Verschiedene Komponenten des Blutes verursachen eine Inhibition, darunter Häm ein Abbauprodukt des Hämoglobins [1,2,3,21]. Daher sind alte Blutspuren teilweise schwer zu analysieren. Vermutlich reguliert Häm die DNA-Polymerase-Aktivität und koordiniert in Erythrozyten die Synthese der Komponenten im Hämoglobin durch eine Rückkoppelungs-Inhibition wie sie bei der hepatischen Häm-Biosynthese erfolgt [12,24,85,154,169,206]. Zusätzlich

konkurriert Häm um das Template, belagert die Nukleotide und agiert möglicherweise als Chelat und fängt Mg^{2+}-Ionen ab [1,2]. Hämoglobin und Lactoferrin, Komponenten in Erythrozyten und Leukozyten, inhibieren direkt die DNA-Polymerase. Weitere Blutkomponenten und Abbauprodukte des Hämoglobins wie Gallensalze, Bilirubin, $CaCl_2$, EDTA, $FeCl_3$, Heparin und Hämin weisen einen inhibitorischen Effekt auf. Bilirubin, Hämin, Heparin lagern sich vermutlich ans Template [1]. IgG interagiert ebenso mit einzelsträngiger DNA [147]. Diese Interaktion wird durch Erhitzen verstärkt. Daher ist ein Erhitzen bei der Blutprobenverarbeitung oder eine Hot-Start-PCR nicht ratsam. Ca^{2+} und Fe^{3+} konkurrieren mit Mg^{2+} um die Bindestellen im aktiven Zentrum der Polymerase. Gallensalze enthalten polare und nicht polare Regionen, vermutlich senken sie die Amplifikationskapazität der Polymerase. Da Myoglobin ebenfalls Häm enthält, gilt Muskelgewebe ebenso als PCR-inhibitorisch [21].

In unsere Studie zeigte sich vermehrt eine direkte Inhibition der Polymerase durch Hämoglobin. In verwestem Blut und Gewebe bilden sich Komplexe aus eisenhaltigem Häm und Serumproteine. Die inhibitorischen Substanzen werden möglicherweise beim Proteinase K Verdau dieser Häm-Blutprotein-Komplexe produziert und mit der DNA isoliert. Die PCR-Inhibition durch Inaktivierung der Polymerase ist ein reversibler Prozess [3].

In altem Tierkot befinden sich neben den Abbauprodukten des Hämoglobins Maillard-Produkte, die in alten DNA-Spuren häufig vorkommen sollen [143]. Die Maillard-Reaktion, Kondensation der Carbonylgruppen von Kohlenhydraten mit primären Aminen, führt zu extensiver Querverbindungen von Makromolekülen wie Proteinen, aber auch Nukleinsäuren. Die Glucose-Protein Querverbindungen müssen gespalten werden, da die DNA innerhalb dieser Kondensationsprodukte eingeschlossen ist.

Spermaspuren führen gelegentlich zu einer PCR-Inhibition wegen der Anwesenheit von vaginalen Mikroorganismen. Zwei Mechanismen dafür sind möglich. Die Primer-Extension kann durch kleine, einzelsträngige, mikrobielle DNA-Fragmenten gehindert sein, die an die Zielsequenz binden, oder aber die Primerkonzentration ist reduziert aufgrund eines nicht-spezifischen Bindens an mikrobieller DNA [199].

Generell gelten hohe Konzentrationen an nicht-Ziel-DNA als inhibitorisch für die PCR. Möglicherweise hindern sie die spezifische Interaktion zwischen Polymerase und Ziel-DNA.

Der Puder der Laborhandschuhe soll auch unspezifisch an die DNA binden und dadurch die Amplifikation hindern [199]. Daher sollten Laborhandschuhe ohne Puder verwendet werden.

Da das Binden der DNA an mineralische Komponenten wie Glas oder Kieselerde Basis vieler Extraktionsmethoden ist, ist die Nichtverfügbarkeit der DNA aufgrund des Bindens an potenziell komplexen Probenkomponenten wie an den Bodensatz in Umweltproben eine berechtigte Erläuterung der Inhibition [199]. Huminkomponenten, hauptsächlich Huminsäuren und Fulvinsäuren sind die bei weitem bekanntesten Inhibitoren [183]. Sie finden sich in Wasser, Erde, Bodensatz. Bereits Spuren dieser Inhibitoren können die PCR hemmen. Da die Anwesenheit von Huminsäuren mit dem Feuchtigkeitsgrad positiv korreliert, kann die geringe Erfolgsrate auch auf hydrolytische Schäden der DNA zurückzuführen sein und nicht nur auf den inhibitorischen Effekt der Huminsäuren. Möglicherweise binden die phenolischen Gruppen der Huminkomponenten an Amide oder sie oxidieren und formen ein Quinon, das kovalent an DNA oder Proteine bindet [199]. Dadurch werden die Aktivität und Prozessivität lytischer Enzyme, aber auch der Polymerasen während der PCR reduziert. Huminsubstanzen haben zudem die Fähigkeit Metallionen zu binden und mit einer Vielzahl an organischen Komponenten zu interagieren [179]. Eine Chelatbildung der Huminsäuren oder ähnlicher Substanzen mit Mg^{2+}-Ionen konnte jedoch in dieser sowie einer anderen Studie nicht festgestellt werden [183]. Die Huminsäuren zeigen je nach ihrem Ursprung Unterschiede in ihrer MIC (minimum inhibitory concentration). Die MIC ist zudem abhängig von dem kommerziellen Hersteller eines Enzyms, da die Enzyme unterschiedlich empfindlich auf einen Inhibitor reagieren.

Eine Auftrennung der Huminkomponenten von der DNA vor der Amplifikationsreaktion ist günstig. Eine physikalisch-chemische Trennungen oder Inaktivierungen der inhibitorischen Substanzen gelingt nicht immer. Eine Verdünnung der Probe nutzt die Sensitivität der PCR aus und führt dann zu einem Erfolg, wenn die Konzentration der inhibitorischen Substanz relativ zur Ziel-DNA reduziert wird, die DNA selbst aber noch in ausreichender Menge für die Amplifikationsreaktion vorliegt. Diese Methode ist daher für Spuren mit LCN-DNA

nicht geeignet. Eine vollständige Trennung der Inhibitoren von der DNA beispielsweise über Säulen führt zwangsläufig zu einem DNA-Verlust und dies ist gerade bei Spuren mit wenig und degradierter DNA problematisch [142]. Spezielle Inhibitoren der Inhibitoren und konkurrierende Substrate können in diesem Fall Abhilfe schaffen, die inhibitorische Wirkung lindern und die Amplifikation erleichtern. Es wird in der Regel eine Komponente in den PCR-Ansatz eingeführt, dessen Affinität zum Inhibitor größer ist als die der essentiellen Reaktionskomponente, die inhibiert wird [199]. Falls die Reaktionskomponente bekannt ist, die durch den Inhibitor abgefangen wird, kann auch eine simple Konzentrationserhöhung dieser Komponente zu einer höheren PCR-Effizienz führen.

4.2 PCR-Additive

In manchen Fällen kann der DNA-Ertrag und die Spezifität der Amplifikationsreaktion durch Zugabe von PCR-Additiven geringfügig verbessert werden. Die PCR-Additive werden direkt in den PCR-Ansatz zugegeben, mit dem Ziel, die vorhandenen inhibitorischen Substanzen zu binden, so dass sie keinen Einfluss mehr auf die Amplifikationsreaktion haben.

PCR-Additive sollten in einem breiten Konzentrationsbereich die Amplifikation maximieren [41]. Nach einer bestimmten Konzentration des Additivs befindet sich die Amplifikation auf seinem maximalen Wert ein. Die „leveling-off“-Konzentration für fast jedes Additiv stimmt überein mit der Konzentration, bei der die höchste PCR-Spezifität stattfindet. Erhöht man die Konzentration der Additive, sinkt die Spezifität. Bei einer für jedes Additiv charakteristischen Obergrenze kommt es zu einem PCR-Stopp („cutoff-Konzentration“). PCR-Additive können ebenso kombiniert eingesetzt werden [131]. Einige Kombinationen führen zu einer besseren PCR-Effizienz. Die Kombinationen zeigen, dass die Additive ihren Effekt über einen jeweils verschiedenen Mechanismus ausüben.

Die meisten PCR-Inhibitoren weisen phenolische Gruppen auf [100]. Aufgrund der Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen diesen phenolischen Gruppen und dem Sauerstoff von Peptidbindungen kommt es vermutlich zu einer Inaktivierung der Proteine, darunter auch der Enzyme [100]. Daher werden häufig Proteine als

PCR-Additive verwendet, da sie anstelle der Polymerase an die phenolischen Gruppen binden und so die Inaktivierung der Polymerase verhindern [2,131,165]. Es hat sich gezeigt, dass nur tierische Proteine wie Albumine, Lysozyme, Lactatdehydrogenasen, Phosphorylasen, Makroglobuline, nicht aber pflanzliche oder mikrobielle Proteine dazu in Frage kommen [165].

Proteine, die fest an ssDNA binden, senken die Schmelztemperatur der Duplex-DNA und fördern deren Entwinden. Sie sind äußerst hitzebeständig, ein Erhitzen auf 100°C führt zu keiner irreversiblen Konformationsänderung. Darüber hinaus schützen sie ssDNA vor Nukleaseverdau. Solche DNA entwindende Proteine wie beispielsweise das aus den Phagen T4 stammende gp32 sind essentiell für die enzymatische Replikation einzelsträngiger Phagen-DNA in T4 infizierten Zellen. Es wird vom Gen 32 des Phagen T4 Genoms kodiert. Während der Amplifikationsreaktion mindert gp32 die PCR-Inhibition und erhöht zudem die PCR-Effizienz, indem es vermutlich direkt mit der Polymerase interagiert, was in einer Aktivitätssteigerung resultiert, oder indem es durch Binden an der Nukleinsäure Sekundärstrukturen reduziert und dadurch die Prozessivität des Enzyms erhöht [87]. Durch den Gebrauch von gp32 verbessert sich besonders der Ertrag der langen PCR-Produkte [87,171,190]. Artefakte, die auf einer Interaktion der Primer beruhen, werden ebenso vermieden [190]. Es wird berichtet, dass das gp32 den Ertrag der PCR-Produkte von Proben erhöht, die mit Huminsäure kontaminiert sind. Nach Auskunft des Herstellers soll der inhibitorische Effekt der Huminsäuren um den Faktor 7 reduziert werden, wenn das Protein in einer Konzentration von 2,5 µg/100 µl eingesetzt wird. In Anwesenheit des gp32 können PCR-Proben mit höherem Blut-Gehalt erfolgreich amplifiziert werden [136]. In dieser Studie konnte die inhibitorische Wirkung des künstlichen Hämins durch gp32 nur geringfügig reduziert werden.

Ein anderes Protein, das „single-stranded DNA binding protein“ (ssB) aus *E. coli* ist unentbehrlich für die Replikation des *E. coli* Chromosoms. Das ssB Protein bindet an der Replikationsgabel an den isolierten DNA-Strang, wodurch längere ssDNA-Abschnitte entstehen. Die DNA wird dadurch entwunden und die Replikation initiiert. Das ssB Protein senkt die Schmelztemperatur der Duplex-DNA um nahezu 40°C. Eine optimale Synthese wird geschaffen, wenn die DNA mit dem entwindenden Protein ssB bedeckt ist. Dabei ist die ssDNA um das ssB Molekül gewickelt (etwa 32 Nukleotide pro Protein-Molekül). Die Zahl der

Nukleotide, die an einem der vier Untereinheiten des ssB-Tetramers gebunden sind, wird auf acht geschätzt. Das ssB Protein steigert ebenso die Genauigkeit mehrerer DNA-Polymerasen, ein direkter Einfluss des ssB Proteins auf die enzymatische Aktivität DNA-spezifischer Proteine wurde in mehreren Fällen gezeigt [193].

Proteine wie beispielsweise das gp32 oder BSA schützen darüber hinaus die DNA-Polymerase vor Proteinase K, da sie als alternatives Substrat dienen [100]. Da in vielen Studien der inhibitorische Effekt einiger Substanzen wie des roten Blutfarbstoffes durch gp32 nicht erfolgreicher aufgehoben werden konnte als mit BSA und BSA das bei weitem kostengünstigere Additiv ist, wird es bevorzugt verwendet. BSA aus unterschiedlichen Quellen variiert in der Aufhebung der Inhibition einiger Substanzen [100]. Es ist dafür bekannt, dass es die Adhäsion der Enzyme an die Tubewand und Pipettenspitzen verhindert. Ein Erhitzen bis zu 65°C führt zu keiner irreversiblen Konformationsänderung. Des Weiteren kann BSA aufgrund hydrophober Kräfte, verursacht durch den großen Lysin-Gehalt, Lipide und Anionen binden. Daher wird zudem die inhibitorische Wirkung von Lipiden und Anionen, beispielsweise von SDS, das für die Zelllyse verwendet wird, durch Zugabe von BSA in die PCR-Reaktion ausgeschaltet. BSA kann daher eine Vielzahl an Substanzen binden und verhindert dadurch ihr Binden und Inaktivieren der *Taq* DNA-Polymerase. Die Zugabe von BSA und einer extra Menge an *Taq* Polymerase konnte die inhibitorische Wirkung der Huminsubstanzen reduzieren [179,199]. Die extra Zugabe der *Taq* Polymerase erwies sich dabei jedoch als effizientere Methode [179]. Die inhibitorische Wirkung des künstlichen Hämins konnte durch BSA in dieser Studie nur geringfügig reduziert werden.

Ferri et al behaupten, dass die inhibitorische Wirkung des Melanins durch BSA bewältigt werden kann [60]. Dies konnte in unseren Versuchsreihen jedoch ebenso nicht bestätigt werden.

Die Zugabe von PCR-Additiven zur Optimierung der Amplifikationsreaktion ist nicht nur aufgrund inhibitorischer Substanzen, sondern auch aufgrund der Amplifikation GC-reicher Abschnitte nötig. Zahlreiche Publikationen beschreiben die Schwierigkeit der Typisierung genomischer DNA mit GC-reichen Fragmenten, die zur Bildung von Sekundärstrukturen neigen [14,20,45,82,129,163,175,176, 188,202]. Die Pufferkomponente KCl stabilisiert diese ungewünschten Sekundärstrukturen [76]. Um die Sekundärstrukturen eliminieren zu können, muß

entweder die KCl-Konzentration im Amplifikationsansatz verringert werden oder Additive wie beispielsweise DMSO, Betain, Glycerol oder nicht-ionische Detergenzien zum PCR-Ansatz hinzugefügt werden [42]. Nicht-ionische Detergenzien können jedoch auch einen ungünstigen Effekt auf die Annealing-Spezifität haben [199]. Die Detergenzien bewirken eine größere Löslichkeit potenziell vorhandenener Inhibitoren im PCR-Ansatz, die ansonsten möglicherweise aggregiert und ausgefallen wären.

Es wurde in verschiedenen Studien von Substanzen berichtet, die einmal als Inhibitor, einmal als Vermittler fungieren [199]. In unterschiedlichen Konzentrationen kann zudem dasselbe Substrat als beides, Inhibitor und Vermittler agieren. Die Autoren, die nicht-Ziel-DNA als Vermittler annehmen, vermuten, dass diese DNA die Sensitivität der Amplifikation dadurch verbessert, da sie während der Präzipitation als Träger für die Ziel-DNA wirkt. In dieser Studie konnte weder eine Inhibition noch eine PCR-Optimierung durch nicht-Ziel-DNA festgestellt werden.

In dieser Studie konnte nicht ein Additiv gefunden werden, das zumindest gegen eine inhibitorische Substanz effektiv ist. Es konnten lediglich geringfügige Optimierungen festgestellt werden. Aufgrund der Vielzahl an verschiedenen inhibitorischen Substanzen in den unterschiedlichen Spurenarten, die an Tatorten gefunden und gesichert werden, und der zahlreichen verschiedenartigen Wirkungsweisen dieser Inhibitoren ist es nicht möglich ein PCR-Additiv zu finden, das die inhibitorische Wirkung der vielen verschiedenen Kontaminationen neutralisiert und dadurch den Typisierungserfolg erhöht. Möglicherweise stabilisieren die meisten Additive das Enzym oder verhindern die Bildung von Sekundärstrukturen, die durch GC-reiche DNA verursacht wird. Eine Reduktion der inhibitorischen Wirkung vieler Substanzen ist dadurch selten zu erwarten.

4.3 DNA-Polymerasen

Eine große Zahl an DNA-Polymerasen aus extrem thermophilen Bakterien ist bekannt [199]. Sie zeigen Unterschiede in ihrer Prozessivität und Amplifikationsgenauigkeit. Eine Verkürzung der Amplifikationsreaktion kann durch die Verwendung einer Polymerase mit hoher Prozessivität erreicht werden [187].

Polymerasen sind gewöhnlich unterhalb ihrer optimalen Temperatur bereits aktiv. Mit der Verwendung so genannter Hot-Start-Polymerasen können die Ergebnisse der DNA-Amplifikation beträchtlich verbessert werden, da die Bildung nichtspezifischer Amplifikationsprodukte und Primer-Dimer Artefakte reduziert werden. Diese Hot-Start Polymerasen sind chemisch verändert und werden durch ein Vorheizen vor der eigentlichen PCR aktiviert [122]. Die Ampli*Taq* Gold™ DNA-Polymerase (AB) wird beispielsweise durch Inkubation bei 95°C für zehn oder elf Minuten aktiviert. Bei der Temperaturerhöhung sinkt der pH-Wert. Der Puffer für Ampli*Taq* Gold™ DNA-Polymerase (AB) hat bei RT einen pH-Wert von 8,3. Erreicht der PCR-Ansatz durch Temperaturerhöhung während der PCR einen pH Wert ≤ 7, wird das Enzym chemisch modifiziert und aktiviert. Eine andere Möglichkeit ist die Inaktivierung der Polymerasen durch einen Antikörper wie beispielsweise bei JumpStart™ *Taq* DNA-Polymerase (Sigma). Beim Erhitzen löst sich der Antikörper und das Enzym wird aktiv, beim Abkühlen bindet der Antikörper an die Polymerase und inaktiviert es dadurch wieder.

Eine optimale Amplifikationsreaktion liefert einen hohen Ertrag der PCR-Produkte sowie hohe Spezifität [122]. Die Berechnung der optimalen Annealing-Temperatur ist von großer Bedeutung [162]. Bei strengen Primer-Annealing-Temperaturen und relativ geringer Primer-, *Taq* DNA-Polymerase- und $MgCl_2$-Konzentration ist die Bildung unspezifischer PCR-Produkte unwahrscheinlich. Diese Bedingungen jedoch bringen einen reduzierten Produktertrag mit sich. Nichtspezifische PCR-Produkte resultieren aus Mispriming und Primer-Oligomerisation, suboptimale Reaktionsbedingungen und/oder mit dem Auslösen von Reaktionen bei Umgebungstemperaturen. Die ungewünschten PCR-Produkte wettstreiten mit den Zielsequenzen für dNTPs und Primer und reduzieren daher den Ertrag der spezifischen Zielprodukten. Für die Erstellung eines Multiplex-Kits muß gewährleistet sein, dass die Primer ähnliche T_M haben um ausbalancierte Allele zu erhalten. Ist dies nicht der Fall, muß die Annealing-Temperatur niedrig gewählt werden, was unspezifische Produkte zur Folge hat.

Für die Optimierung der PCR-Reaktion ist ein hitzebeständiges Enzym mit hoher Prozessivität und Amplifikationsgenauigkeit sowie Unempfindlichkeit gegen eine Vielzahl an Inhibitoren ausschlaggebend. Eine Erhöhung der PCR-Effizienz kann zudem durch Zugabe einer Kombination aus zweier Polymerasen und mehr in die PCR-Reaktion erhöht werden [20].

Während der PCR-Reaktion ist der pH-Wert des Puffers zumindest genauso wichtig wie in anderen biochemischen Reaktionen. Da die Amplifikationsreaktion mit großen Temperaturschwankungen verbunden ist, sollte ein Puffer mit großer Pufferkapazität verwendet werden. Der Hauptbestandteil der Puffer ist das Tris-HCl [Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid: $C_4H_{11}NO_3$•ClH]. Tris-HCl hat eine gute Pufferkapazität zwischen pH 7,2 und 9,0 (bei 20°C), zeigt jedoch eine relativ starke Temperaturabhängigkeit $\Delta pK_S/\Delta t$: -0.028 pH-Einheiten pro 1°C.

Da die meisten inhibitorischen Substanzen Carboxylgruppen besitzen und somit (schwache) Säuren darstellen, kommt der pH-Wert des Puffers vermutlich außerhalb seines optimalen Puffer-pH-Wert-Bereiches zu liegen, falls der Inhibitor in großer Menge präsent ist. Durch das Verschieben des pH-Wertes ändert sich die Aktivität der Polymerase, da viele Polymerasen pH-Wert-abhängig arbeiten.

Eine künstliche Erhöhung der Pufferkapazität führte jedoch zu keiner Amplifikationssteigerung, möglicherweise aufgrund der einhergehenden Konzentrationssenkung der anderen PCR-Komponenten und/oder der abgeänderten Abhängigkeit des pH-Wertes des Puffers von der Temperatur und der damit verbundenen Polymerase-Aktivität.

Die verschiedenen Polymerasen werden von inhibitorischen Substanzen in unterschiedlichem Ausmaß beeinflusst. Es wurde beispielsweise beobachtet, dass die *Taq* DNA-Polymerase von bestimmten Inhibitoren inaktiviert wurde, wohingegen bei *Tth* DNA-Polymerase keine oder nur eine geringfügige Inhibition festgestellt wurde [1,2,21,71,94,147,194]. 1% (v/v) Blut beispielsweise genügt für eine totale Inhibition der *Taq* Polymerase, wohingegen für eine Inhibition der *Tth* Polymerase 4% (v/v) Blut benötigt werden [136]. Eine neue Polymerase, die Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) scheint ebenso um einiges weniger sensitiv auf den roten Blutfarbstoff zu reagieren als die Ampli*Taq* Gold (AB). Ein Nachteil besteht jedoch in der sequenzabhängigen Arbeitsweise des Enzyms, die Loci waren nach der Amplifikation nicht ausbalanciert. Daher müssen bei Verwendung dieser Polymerase möglicherweise die Sequenzen einiger Primer abgeändert werden.

Die Inhibition konnte jedoch ebenso durch Verdünnung der Blutprobe und gleichzeitiger Erhöhung der PCR Zyklenzahl auf 33 deutlich reduziert werden.

Für die Amplifikation von Haarextrakten hat sich eine Erhöhung Ampli*Taq* Gold (AB) und der $MgCl_2$-Konzentration bewährt.

In dieser Studie wurden verschiedene Polymerasen, Puffer und deren Kombinationen getestet, um die beste Konstellation ausfindig zu machen, die von inhibitorischen Substanzen am wenigsten beeinflusst wird und gerade bei Spuren mit wenig und degradierter DNA effizient ist.

Die meisten der hier vorgestellten Polymerasen sind modifizierte Enzyme aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Das Bakterium lebt in heißen Quellen und Geysiren mit Temperaturen von 70 bis 80°C und einem pH-Wert von 8 bis 9 [29,46]. In diesem Temperaturbereich liegt die einträglichste katalytische Aktivität der aus dem Bakterium isolierten Polymerasen. Grund dafür ist die Schmelztemperatur des DNA-Templates, die genau in diesem Bereich liegt, so dass der Nukleotiden-Einbau rasch vonstatten gehen kann. Bei Temperaturen über 80°C nimmt die katalytische Aktivität wieder ab, nicht aber aufgrund der Denaturierung der DNA-Polymerase, sondern wegen der vollständigen Denaturierung des Templates. Denn die DNA-Polymerase hat eine reduzierte Aktivität bei einzelsträngigen DNA-Strängen. Das pH-Optimum des Enzyms liegt bei 7 bis 8. Größte Aktivität der Polymerase wird erreicht mit Tris-HCl-Puffer mit einem pH-Wert von 7,8, die niedrigste mit Kaliumphosphat-Puffer. Alle bekannten Polymerasen benötigen divalente Kationen. Optimale Aktivität wurde bei 10 mM Mg^{2+} beobachtet. Mangan ist nur teilweise effektiv und zeigt eine optimale Aktivität bei 2 mM, Kalziumionen sind komplett ineffektiv. Monovalente Kationen wie geringe Mengen an KCl (60 mM) und NaCl (40 mM) stimulieren die katalytische Aktivität der Polymerase. Beide Salze inhibieren die Aktivität der Polymerase über 100 mM. Daher sollte Salze während der DNA-Isolation abgewaschen werden, damit sie die Polymerase-Aktivität nicht stören.

Es gibt zwar eine Vielzahl an weiteren thermophilen Bakterien, doch ist das Bakterium *Thermus aquaticus* weit verbreitet und leicht zu isolieren.

Thermus flavus und *Thermus thermophilus* beispielsweise besitzen ebenso eine thermostabile Polymerase mit 94 kDa [130,161]. Das Enzym besitzt eine Halbwertszeit von 40 min bei 95°C und repliziert DNA bei 70-74°C.

Eine Besonderheit bei der Polymerase aus *Thermus thermophilus* ist der Einbau von Nukleotiden in das DNA-Template in Anwesenheit von Magnesium und in das RNA-Template in Anwesenheit von Mangan.

Die PCR-Effizienz sank u.a. drastisch bei der Verwendung der Polymerase Ampli*Taq* Gold (AB) mit dem 10x Thermo-Start® Standard Buffer (ABgene),

Thermo-Start® High performance (HP) Buffer (ABgene), HotMaster *Taq* Buffer (Eppendorf) oder Nova *Taq* Hot Start Buffer (Novagen). Möglicherweise sind die pH-Werte auch dieser Puffer für das Enzym zu hoch. Da pro +1°C der pH-Wert um 0,028 sinkt und das Enzym erst unter pH 7 aktiviert wird, liegt die Vermutung nahe, dass durch die Anwendung der Puffer mit höherem pH-Wert die pH 7-Schwelle nicht erreicht wird und das Enzym daher inaktiviert bleibt. Die Kombination Ampli*Taq* Gold (AB) und Puffer mit bekanntem pH-Wert über 8,3 bestätigte die Korrelation des pH-Wertes des Puffers und der PCR-Effizienz.

Bei der Kombination zweier oder mehrerer Polymerasen muß gewährleistet sein, dass das chemische Umfeld auf beide bzw. alle Polymerasen abgestimmt ist. Daher sank die PCR-Effizienz in der Anwendung der Polymerase-Kombination Ampli*Taq* Gold (AB) und Nova*Taq* (Novagen) mit dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB), da die Enzyme für ihre volle Aktivität unterschiedliche pH-Werte benötigen. Die Polymerasen Ampli*Taq* Gold (AB) und MasterAmp™ AmpliTherm™ DNA Polymerase (Epicentre) sind dahingegen schwierig zu kombinieren, da ihre Aktivierungszeit unterschiedlich lange dauert. Die Puffer GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB) oder MasterAmp AmpliTherm 10x PCR Buffer (Epicentre) oder GoldSt*r Buffer (Promega) oder 10x PCR Buffer (Sigma) haben einen optimalen pH-Wert für beide Polymerasen.

Um das Problem der unterschiedlich langen Aktivierungszeiten der Polymerasen zu umgehen, besteht die Möglichkeit, entweder die kürzere Aktivierungszeit zu wählen, so dass das Enzym mit der längeren Aktivierungszeit erst nach und nach aktiviert wird, oder eine Time-Release PCR durchzuführen. Im Gegensatz zur Hot-Start PCR erfolgt kein, in seltenen Fällen ein verkürztes Pre-Heating mit gleichzeitiger Erhöhung der Zyklenzahl. Die Time-Release PCR konnte erfolgreich an der Polymerase Ampli*Taq* Gold (AB) mit dem GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB) eingestellt werden, die PCR erfolgte anstelle mit 30 mit 40 Zyklen, das Pre-Heating wurde auf eine Minute gekürzt. Die Polymerase-Kombination Ampli*Taq* Gold (AB) und JumpStart *Taq* (Sigma) mit GeneAmp 10x PCR Buffer II (AB) bzw. 10x PCR Buffer (Sigma) in Verbindung mit einer Time-Release PCR erwies sich ebenso als erfolgreich. Es konnten teilweise bessere Typisierungsergebnisse mit dieser Polymerase-Kombination typisiert werden als mit der Ampli*Taq* Gold (AB) allein. Haarextrakte konnten erfolgreich analysiert werden, die Ergebnisse waren denen mit erhöhter Konzentration der Ampli*Taq* Gold (AB) und Magnesiumionen

ähnlich. Eine Erhöhung der Artefaktproduktion wurde dabei nicht festgestellt. Vermutlich reagiert die JumpStart *Taq* (Sigma) aufgrund des Antikörpers nicht so empfindlich auf Melanin sowie auf andere inhibitorische Stoffe wie die Ampli*Taq* Gold (AB).

Die MasterAmp™ *Tfl* DNA Polymerase (Epicentre) und MasterAmp™ *Tth* DNA Polymerase (Epicentre) sind angeblich gegen inhibitorische Substanzen relativ unempfindlich [1,2,21,71,94,194]. Es hat sich aber gezeigt, dass diese Enzyme eine hohe Ausgangsmenge an Template-DNA benötigen. Daher scheinen die zwei Polymerasen in der forensischen Spurenanalyse nicht geeignet zu sein.

Der Advantage®-HF 2 PCR Kit (Clontech) konnte zuerst nicht optimal für unseren Q8-Multiplex eingestellt werden. Nach einer längeren Optimierungsphase zeigte der Kit zum Teil eine höhere Erfolgsrate als die Ampli*Taq* Gold (AB). Das Problem war zu Beginn der Testphase die Zusammenlegung der Annealing und Extension zu einem Schritt (68°C). Mit der Anwendung des Multiplex-Kits Q8 mussten dieser Schritt wieder geteilt werden.

Die Steigerung der Erfolgsrate durch Anwendung von Polymerasekombinationen macht deutlich, dass vermehrt auf solche Kombinationen zugegriffen werden sollte, da dadurch nicht nur Zelllinien und Spuren ohne potenzielle inhibitorische Substanzen, sondern vor allem Spuren mit LCN-DNA und einer breiten Spanne an Inhibitoren effizient analysiert werden können.

4.4 Optimierung der DNA-Isolation

Die beste Strategie, um die Reproduzierbarkeit der STR-Typisierung von Proben zu erhöhen, ist die Optimierung der DNA-Extraktion, um die höchst mögliche Menge an DNA mit bestmöglicher Qualität zu erhalten, eine Grundvoraussetzung einer erfolgreichen anschließenden STR-Typisierung [132]. Gerade bei Spuren mit degradierter LCN-DNA sollte durch das Extraktionsverfahren eine größtmögliche Menge an DNA isoliert werden, da bereits minimale DNA-Verluste große Auswirkung auf den Typisierungserfolg ausüben. Die gegebenenfalls vorhandenen inhibitorischen Substanzen sollten dabei von der DNA abgetrennt werden ohne die schon ohnehin nur geringfügig vorhandene DNA zu dezimieren. Nicht nur die Menge, sondern auch die Qualität (Degradation und inhibitorische Substanzen)

der extrahierten DNA steht in Verbindung zu Allel-Dropouts und zum Ausmaß der Bildung von so genannten „shadow bands“ bzw. Zusatzbanden [168].

Es werden für die DNA-Extraktion aus der breiten Spanne an Spurenarten, die üblicherweise an Tatorten gefunden werden, verschiedene Methoden beschrieben. Die meisten Verfahren werden aber nur einer Anforderung gerecht, hoher DNA-Ertrag, hohe DNA-Qualität, schnelle Durchführung des Verfahrens oder hoher Durchsatz. Eine Extraktion mit rascher und effizienter Entfernung der Inhibitoren wird gewünscht, ist aber kaum umsetzbar. Die Isolation reiner DNA aus komplexen Spuren ist verbunden mit einem arbeits- und zeitaufwendigen Extraktionsverfahren. Methoden über Ionen-Austausch, Längen-Ausschluss oder Sorption wird generell angeraten bei der DNA-Isolation von relativ sauberen Proben. Die Entdeckung der inhibitorischen Substanzen und deren Inhibitionsmechanismen sind Voraussetzung für das Entwickeln vereinfachter und verbesserter Extraktionsverfahren.

Die meisten inhibitorischen Substanzen wie beispielsweise Polysaccharide, Harnstoff, Huminsäuren und Hämoglobin zeigen eine ähnliche Löslichkeit wie die DNA und werden daher bei gewöhnlichen Extraktionsmethoden nicht von der DNA getrennt [121].

Wie wichtig eine effektive Aufreinigungsmethode ist, zeigt die Anwendung des KAPA Blood PCR MasterMix (Peqlab). Vollblut kann nach Angaben des Herstellers direkt ohne vorherige DNA-Extraktion in den PCR-Ansatz pipettiert werden. Dieses Verfahren ist für EDTA-Blut geeignet, nicht aber für Blut, das in Tubes mit Heparin gesammelt wurde, da Heparin ein PCR-Inhibitor darstellt. In dieser Studie konnte EDTA-Blut auf diese Weise nicht optimal analysiert werden. Ursache des geringen Typisierungserfolgs sind neben Salze und inhibitorische Komponenten im Überstand des Amplifikats, das auf die Kapillarelektrophorese geladen wird, hauptsächlich das Hämoglobin, das bereits die Amplifikationsreaktion hindert. Andere Spuren konnten mit diesem Verfahren ebenso nicht analysiert werden, da möglicherweise die Menge an Template-DNA nicht ausreichend war.

Eine effektive Aufreinigungsmethode stellt die in Agarose eingebettete DNA-Präparation dar [121,144]. Ganze Zellen werden dabei in Agarose eingebettet und einem Lyse-Puffer ausgesetzt. Große DNA-Moleküle verbleiben im Agarose-Block, wohingegen Zelltrümmer und Kontaminationen während den Lyse- und

Waschschritten aus dem Block diffundieren. Man erhält hoch aufgereinigte DNA. Melanin beispielsweise kann über Agarose-Gele von der DNA abgetrennt werden, da Melanin bzw. die Abbauprodukte und die DNA negativ geladen sind und das Melanin verglichen zur DNA ein recht kleines Molekül ist [144]. Dieses Verfahren ist jedoch zeit- und arbeitsaufwendig.

Eine weitere Aufreinigungsmethode stellt die Aufreinigung über Säulen dar [78,183]. Die Aufreinigung über Säulen steht in Verbindung mit einem DNA-Verlust, der gerade bei Spuren mit LCN-DNA kritisch zu betrachten ist [142].

Das Entfernen von Inhibitoren kann ebenso über ein Harz erfolgen [5,174]. Die Aufreinigung der Proben durch Anwendung der Harz-Methode führt jedoch zu einem erheblichen Verlust der DNA, so dass dieses Verfahren ebenso am besten für Proben geeignet ist mit bedeutender Ausgangsmenge an DNA.

Eine interessante DNA-Aufreinigung ohne Verlust an Sensitivität stellt das Binden und Waschen der DNA an streptavidinbeschichteten magnetischen Beads dar [108].

Eine andere Möglichkeit zur DNA-Fällung und gleichzeitigen DNA-Aufreinigung ist neben der Ethanolfällung die Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid (CTAB)-Fällung [133].

Der Einsatz von Filtervorrichtungen kann ebenso zur Aufreinigung der DNA herangezogen werden. Dazu dienen Membrane, bei denen eine Trennung der DNA von anderen Molekülen und Inhibitoren über das Molekulargewicht erfolgt oder über DNA-Bindungseigenschaften der Membran, beispielsweise über Anionen-Austausch [95,113,146].

Bei der Haaranalyse zeigte sich eine größere Erfolgsrate nach einer DNA-Isolation und -Aufreinigung über Silika-Partikel als nach der recht gebräuchlichen Phenol-Chloroform-Methode [181]. Dies dürfte zum einen an einer besseren Abtrennung der Melanine liegen, zum anderen an einem nur geringfügigen DNA-Verlust während der Extraktion. Eine Isolation und Aufreinigung der DNA über Silika-Partikel scheint generell für Spuren mit degradierter und LCN-DNA wie Knochen und Haare vorteilhaft [95,132,168,181]. Die Effizienz dieses Aufreinigungsverfahren konnte in dieser Studie bestätigt werden. Eine GEN-IAL-Extraktion mit anschließender Aufreinigung über Silika-Partikel zeigte sich gerade für die Isolation von LCN-DNA aus Spuren mit potenziellen inhibitorischen Substanzen erfolgsversprechend [123,125].

Eine Spur mit LCN-DNA, die häufig an Tatorten gefunden wird oder mit Verbrechen in Verbindung gebracht werden kann, stellt das telogene Haar dar. Die Analyse von Haaren mit intakter Wurzel wird mittlerweile routinemäßig in die Laborarbeit einbezogen [78]. Daher galt die Optimierung des nicht-organischen Extraktionsverfahrens in erster Linie an telogenen Haaren und Haarschäften; später wurde LCN-DNA aus weiteren Spuren mit dieser optimierten Methode isoliert. Der DNA-Gehalt im Haar korreliert nicht mit dem Erfolg der STR-Genotypisierung. Der Typisierungserfolg ist neben der DNA-Menge vom Schweregrad der DNA-Degradation abhängig sowie von vorhandenen inhibitorischen Substanzen. Der DNA-Ertrag im Haarschaft anagener und telogener Haare ist ähnlich dem in telogenen Wurzeln. Da DNA im Haarschaft zum distalen Ende hin öfters und länger äußeren Einflüssen wie Sonnenlicht, chemischen Substanzen während des Waschens und Färbens ausgesetzt ist, muß die DNA im distalen Haar in einem höher degradiertem Zustand vorliegen als in der telogenen Haarwurzel. Innerhalb weniger Millimeter von der telogenen Wurzel entfernt sinkt die DNA-Qualität rapide, so dass nur noch wenige intakte DNA-Moleküle im Haarschaft zu finden sind. Im Haarschaft selbst verschlechtert sich die DNA-Qualität geringfügig zur Haarspitze hin. Das bedeutet demnach, dass der Keratinisierungsprozess einen größeren Effekt auf die DNA-Degradation ausübt als Umweltfaktoren. Während des Keratinisierungsprozesses degeneriert die genomische DNA nicht gänzlich, teils hochmolekulare DNA befindet sich im Haarschaft [78].

Da kortikale Zellkerne zwischen den harten Keratinfilamenten eingeschlossen sind, empfiehlt es sich einen umfangreichen Protein-Degradationsprozess in die DNA-Extraktion einzugliedern, um die Disulfidbrücken aufzubrechen.

Die nukleäre DNA kann mit DAPI (4´-6-diamidino-2-phenylindole) sichtbar gemacht werden [28]. Das fluoreszente Molekül bindet an dsDNA, zwischen A und T Basenpaaren. Unter dem Fluoreszenzmikroskop können die Zellkerne gezählt werden. Mit Hilfe dieses Färbevorgangs können Haare ausselektiert werden, die für die PCR-Analyse nicht geeignet sind.

4.4.1 Dekontamination der Spurenhaare

Da die Kontaminationsgefahr gerade bei Spuren mit LCN-DNA beträchtlich ist, müssen vor der DNA-Isolation mögliche Kontaminationen externer Quellen ausgeschlossen werden, d.h. die Spur muß soweit als möglich von fremden Zellen gereinigt werden, und es müssen durch sorgfältige Arbeit und mitführenden Kontrollen neuartige Kontaminationen ausgeschlossen werden.
Aufgrund der Gefahr des Vorhandenseins von fremden kernhaltigen Zellen auf der Haaroberfläche ist im Gegensatz zu Mc Nevin et al eine Reinigung des Haarschaftes vor der Extraktion unumgänglich. Zusatzallele werden nicht nur bei degradierter DNA oder bei nicht degradierter DNA im Picogrammbereich beobachtet, sondern können auch durch einzelne Zellen auf der Haaroberfläche verursacht sein. Da bei Spuren mit wenig und degradierter DNA die Gefahr einer Kontamination mit fremder exogener DNA groß ist, muß eine Dekontamination erfolgen [75,88,200]. Bereits das in die Haare Greifen bringt Gefahr mit sich, ein falsches Typisierungsergebnis zu erhalten, falls die Haaroberfläche vor der Extraktion nicht gesäubert wurde. Aufgrund der hydrophoben Natur der Proteine der keratinisierten Kutikulazellen ist ein wasserdichter Verschluss um das Haarcortex gelegt [66]. Daher sind die Haare widerstandsfähig gegen das Eindringen kontaminierender DNA. Ältere Haare verlieren diesen Schutz. Blut oder Speichel, das künstlich auf die Haaroberfläche verschmiert wurde, konnte jedoch in dieser Studie nicht vollständig abgewaschen werden. Dies zeigt auch folgender Fall. An einem Tatort wurden mit Blut verschmierte Haare gesichert. Da unsicher war, ob das Blut dem Haarspender zuzuordnen ist oder aber einer anderen Person, mußte das Blut vor der Untersuchung des Haares gründlich abgewaschen werden. Trotz gründlichen Abreibens des Haarschaftes mit 10%igem Ethanol und Einweichen des kompletten Haares mit der Wurzel in HPLC-Wasser konnten die Blutzellen nicht komplett vom Haar abgewaschen werden. Möglicherweise lagert sich exogene DNA unter die Schuppen der Kutikula. Der Waschprozess selbst hat keinerlei Einfluss auf den DNA-Gehalt im Haar [6]. Eine Ethanol-Waschung ist günstig, Waschschritte mit dem Detergenz SDS sollten vermieden werden, da es die aus Haaren isolierbare genomische DNA-Menge vermindert [101]. Eine Ultraschallreinigung verursacht möglicherweise eine DNA Degradation und ist demnach nicht geeignet.

Mit einer differenziellen Lyse der Haare können Kontaminationen recht gut entfernt werden [88]. Das Keratin ist aufgrund seiner Disulfidbrücken widerstandsfähig gegen eine „Milde Lyse“ ohne DTT. Durch die „Milde Lyse“ werden demnach nur die anhaftenden kontaminierenden Zellen auf dem Haar entfernt. Eine anschließende Lyse mit DTT führt dann zum Auflösen des Haares und Freikommen der DNA im Haar. Bei Haarwurzeln mit möglichem anhaftendem Gewebe sollte dieses Reinigungsverfahren jedoch nicht angewandt werden. Weiterhin gilt abzuwägen, welche Haare vor der Extraktion einem Waschprozess unterzogen werden müssen. Auf der Haaroberfläche befinden sich ebenso körpereigene Zellen, entweder Hautzellen, die über Berührung auf das Haar übertragen werden oder aber Zellen aus dem Öl der Talgdrüsen. Der Erfolg eine Genotypisierung an Haarschaft-DNA durchzuführen, ist abhängig vom Haarspender, das bedeutet wie gut Hautzellen übertragen werden, wie groß die Talgdrüsenproduktion ist, aber auch wie das Haar selbst beschaffen ist [114]. Da exogene DNA zudem zugänglicher ist für Umwelteinflüsse wie häufiges Waschen und andere Haarbehandlungen, kommt es zu den unbeständigen Ergebnissen zwischen den Spendern. Da die Gefahr jedoch sehr groß ist, dass sich auch fremde kernhaltige Zellen auf dem Haar befinden, und des Weiteren häufig Shampoo, Styling-Produkte (Lotionen und Gele), Cremes, Haarspray auf der Haaroberfläche klebt [155], müssen in der Regel die Haare vor der Extraktion einem Waschprozess unterzogen werden. Die Haarschäfte wurden daher vor der Lyse mit 10%igen Ethanol gewaschen, um eventuelle Verunreinigungen abzuwaschen. Zudem wurden sie einige Stunden in HPLC-H_2O gelegt.

4.4.2 Lyse der Spurenhaare

Eine vollständige Lyse und der damit verbundenen Freisetzung größtmöglicher DNA-Mengen ist entscheidend für Analyse von Spuren mit degradiertet und LCN-DNA.

Bei der Haarverarbeitung wird im ersten Schritt ein Haar in einen Lyse-Puffer gegeben. Der Lyse-Puffer enthält vermutlich unter anderem EDTA, SDS (Sodiumdodecylsulfat), Proteinase K und DTT. EDTA ist ein Chelat, das oft in Enzymlösungen gemischt wird. Es bildet stabile Kationen mit Schwermetallen, die

eine Inhibition der Enzymaktivität verursachen können (siehe Abb. 23). Im Lysepuffer schützt das EDTA die DNA vor Nukleasen, indem es das freie Magnesium bindet.

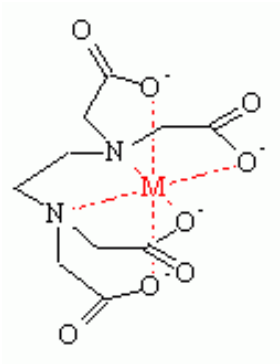


Abb. 23 Ethylendiamin-tetraacetat-Komplex (EDTA-Komplex)

Proteinase K und SDS brechen die Zellwände auf und zerstören die Proteine, die die DNA schützen. Proteinase K, isoliert aus dem Pilz *Tritirachium album*, besitzt zwei Calciumbindungsstellen. Erst wenn sich Calcium gebunden hat, entfaltet das Enzym seine vollständige Aktivität. Gleichzeitig schützt es isolierte Nukleinsäuren, da Ribonukleasen ebenfalls abgebaut werden. Die Proteinase K benötigt zwar für ihre Aktivität zwei gebundene Calcium-Ionen, diese müssen jedoch nicht löslich vorliegen [Qiagen]. Daher inhibiert EDTA nicht das Enzym. Proteinase K ist bei 37°C etwa sechs Stunden aktiv, bei höheren Temperaturen sinkt zwar die Aktivitätszeit, die Aktivität selbst ist jedoch erhöht. Die Aktivität erhöht sich überdies in Anwesenheit denaturierender Reagenzien wie beispielsweise Guanidinthiocyanat, Guanidinhydrochlorid, Harnstoff.

Harnstoff führt zur Entfaltung von Proteinen, indem H-Brücken gelöst werden und dadurch die Tertiär- und Quartiärstruktur des Proteins zerstört wird. Harnstoff verursacht wie andere Amide ein Aufquellen der Haare, so dass Reaktionen im Haar besser ablaufen können [155]. Bei der Haarlyse konnte durch Zugabe von Harnstoff keine Besserung erzielt werden, obwohl das Keratin ein Strukturprotein darstellt. Möglicherweise denaturiert Harnstoff in höheren Konzentrationen ebenso die Proteinase K, was nicht zu einer Erhöhung der enzymatischen Aktivität, sondern eher zu einer Reduktion der Lyse-Effizienz führt. Der pH-Wert der 1 M bis 8 M Harnstofflösung beträgt 5 - 5,5. Es wird zwar angegeben, dass DNA nicht oberhalb pH 8,5 an Glasmilch bindet, möglicherweise darf der pH-Wert auch nicht zu niedrig sein. Zudem besitzt Harnstoff eine hohe Wasserbindefähigkeit.

Die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptiden werden durch das reduzierende Mittel Dithiothreitol ($C_4H_{10}O_2S_2$, DTT) gebrochen, so dass gerade die Lyse von Haaren durch DTT erleichtert wird, da das Keratin im Cortex über Disulfidbrücken stark vernetzt ist (siehe Abb. 24).

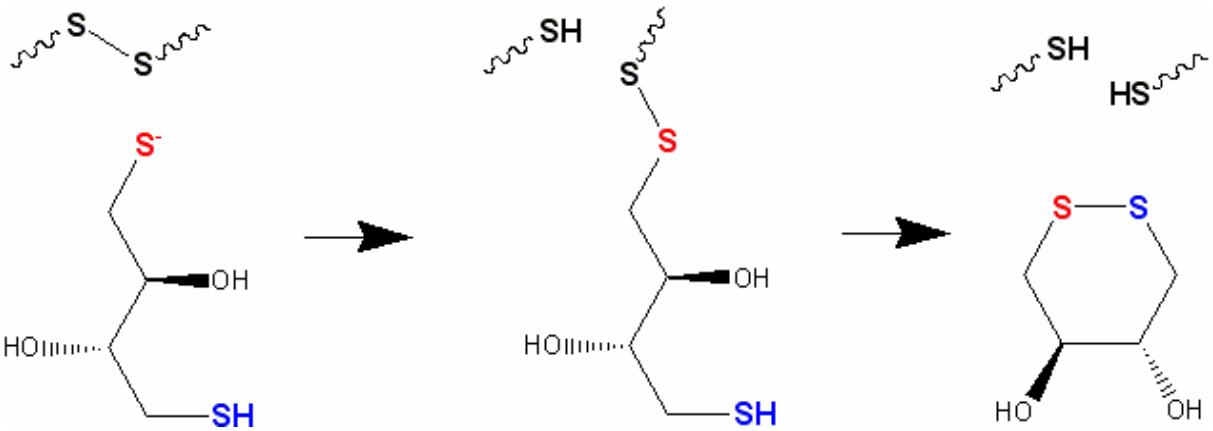


Abb. 24 Reduktion der Disulfidbrücken durch DTT

DTT stabilisiert und aktiviert überdies bestimmte Enzyme und wird daher oft im Aufbewahrungspuffer von Polymerasen gefunden [201]. *Taq* Polymerasen enthalten vier Cystein-Reste. DTT (10 mM) interagiert mit der Sulfhydryl-Gruppe der Cysteine und schützt sie dadurch, so dass das Enzym in einem stabilisierten Zustand vorliegt [131]. DTT reduziert vermutlich auch beträchtlich den isolierten DNA-Betrag, da Deoxyribose zu Dideoxyribose reduziert wird, die von der *Taq* Polymerase nicht mehr erkannt wird. Daher sollte nach der Haarlyse rasch mit der DNA-Extraktion fortgefahren werden.

Einen Unterschied in der DNA-Typisierung konnten Mc Nevin et al nach der Haarlyse mit und ohne DTT nicht bemerken [113]. Während der Extraktion wurde der DNA-Gehalt nach den einzelnen Wasch- und Lyseschritten ermittelt. Angeblich befindet sich die DNA in den Kutikulazellen der weniger stark quervernetzten Kutikulaschicht oder in Epidermiszellen, die zwischen den Kutikulaschichten eingeschlossen sind, da in der Waschlösung von Haaren die größte DNA-Menge nachgewiesen werden konnte [113,114]. Erst nach Zugabe von DTT zum Lysepuffer wurde das Haar vollständig lysiert und es konnte wieder wenig DNA festgestellt werden. Verdau und Lyse der Haare liefern demnach keine

besseren Profile als simples Waschen oder Einweichen der Haare, damit DNA vom Haar ausgeschwemmt wird. Möglicherweise wurde die inhibitorische Wirkung des Melanins unterschätzt. McNevin et al berichten zwar von einer inhibitorischen Substanz in den Haarzellen, die nach einer organischen Extraktion durch Ultrafiltration über Microcon-Säulen entfernt werden konnte. Sie vermuten jedoch ebenso im Extrakt Inhibitoren aus den Lysepuffern, da sogar Mundspeichelproben erst nach der Ultrafiltration analysiert werden konnten. Daher ist es fraglich, wo die Quelle der inhibitorischen Substanzen liegt und in diesem Fall der Typisierungserfolg mit der Haarlyse in Verbindung gebracht werden kann. Bei der Lyse der Haare wird neben DNA auch Melanin freigesetzt. Da sich das Melanin nicht in der Kutikula befindet, sondern hauptsächlich im Cortex, in geringen Mengen auch in der Medulla, wird dieses Haarpigment erst bei einer fortgeschrittenen Haarlyse freigesetzt. Daher findet man den größten Melanin-Gehalt im Extrakt, wenn das Haar vollständig lysiert wurde. In dieser Studie hat sich gezeigt, dass Haare, die nicht vollständig aufgelöst waren, keine bzw. nur schlechte Typisierungserfolge zeigten. Haare, die zusätzlich mit DTT behandelt wurden, waren in wenigen Stunden komplett aufgelöst und die Erfolgsrate stieg beträchtlich. Daher ist anzunehmen, dass die noch einigermaßen intakte DNA hauptsächlich in der Medulla lokalisiert ist [19,133]. In der Kutikula sind keine Kerne nachweisbar [133]. Im Cortex befinden sich vermutlich nur noch wenig und zum größten Teil hoch degradierte DNA-Moleküle. Um an die DNA zu gelangen, die in der Medulla eingeschlossen ist, müssen der Cortex und die Kutikulaschichten aufgebrochen werden. Dies steht ebenso im Gegensatz zu den Behauptungen von Uchihi et al. Angeblich keratinisieren die Schichten der Kutikula, die bereits im Haarfollikel gebildet werden, relativ früh, so dass Endonukleasen wenig Zeit haben DNA zu zerstören und intakte DNA daher hauptsächlich in der Kutikula zu finden ist [184].

Bestimmte chemisch behandelte Haare, beispielsweise chemisch geglättete Haare, sind widerstandsfähig gegen chemisch-enzymatische Methoden, so dass das Haar mit der Verwendung von DTT, Proteinase K, Detergenzien und Hitze unvollständig lysiert wird [200]. Daher ist es sinnvoll, vor dem chemisch-enzymatischen Verdau das Haar physikalisch zu zermahlen. Eine schlechtere Lyse konnte in dieser Studie ebenfalls bei gefärbten Haaren bestätigt werden.

Tween® 20 (Polysorbat 20) und andere Detergenzien werden zum Lösen von Proteinen eingesetzt. Detergenzien werden ebenso zur Stabilisierung von Emulsionen und Suspensionen benutzt. Vermutlich ist Tween® 20 jedoch gar nicht in der Lage, das stark quervernetzte Keratin zu spalten.

4.4.3 DNA-Isolation und Entfernung inhibitorischer Substanzen

Nach der Lyseinkubation wird ein weiterer Puffer (Salzlösung) auf die Probe pipettiert. Durch die Zugabe der Salzkonzentration und durch Kühlen bei GT fallen die Zelltrümmer aus, die DNA bleibt in Lösung. Nach einer kurzen Zentrifugation setzen sich die Zelltrümmer (auch das Keratin, das wie alle fibrillären Proteine in Wasser und Salzlösungen unlöslich ist) ab und das Erbgut sowie andere Substanzen (wie beispielsweise globuläre Proteine) bleiben im Puffer gelöst. Der Überstand wird in ein weiteres Tube überführt, das 1 Volumen Isopropanol, 1/50 Volumen NaAc (1,5 M) und Glasmilch enthält, das Pellet wird verworfen. Die DNA und andere negativ geladenen Moleküle binden auf der Glasmilch.
Nach der Zelllyse ist es notwendig, die freie DNA zu reinigen.
Das Prinzip der Reinigung über Glasmilch, einer wässrigen Suspension kleinster Siliziumpartikel, beruht auf dem Binden der DNA bei hoher Salzkonzentration und dem Lösen bei niedriger Salzkonzentration. Verwendet werden dabei chaotrope Salze. Chaotrope Salze sind Salze, die die geordneten Wasserstoff-brückenbindungen in Wasser auflösen. Indem die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden, stören die chaotropen Salze die Wasserstruktur und sorgen für Unordnung (Zunahme der Entropie). Bei Aminosäuren vermindern sie damit hydrophobe Effekte und wirken denaturierend auf Proteine, da die treibende Kraft der Proteinentfaltung die Zusammenlagerung der hydrophoben Aminosäuren in Wasser ist. Die Löslichkeit der Proteine wird dabei mit zunehmender Konzentration erhöht. Globuläre Proteine bilden in H_20 und verdünnten Salzlösungen einen inneren hydrophoben und einen äußeren hydrophilen Teil aus und sind in dieser Form darin löslich. Durch den Zusatz schwach- oder nichtpolarer Lösungsmittel (z.B. Alkohol oder Aceton) kommt es ebenso wie durch hohe Neutralsalzkonzentrationen zur Entfernung der Hydrathülle und damit zur Ausflockung (Aussalzung) der Proteine. Solche kosmotropen (anti-chaotrope)

Salze werden zur Fällung oder Kristallisation von Proteinen, aber auch zu deren Stabilisierung verwendet, da sie im Gegensatz zu den chaotropen Salzen den hydrophoben Effekt der Aminosäuren verstärken. Die Hofmeister-Reihe ordnet Ionen bezüglich ihrer Wirkung zum Aussalzen und gemäß der Stärke des chaotropen Effekts (Abb. 25).

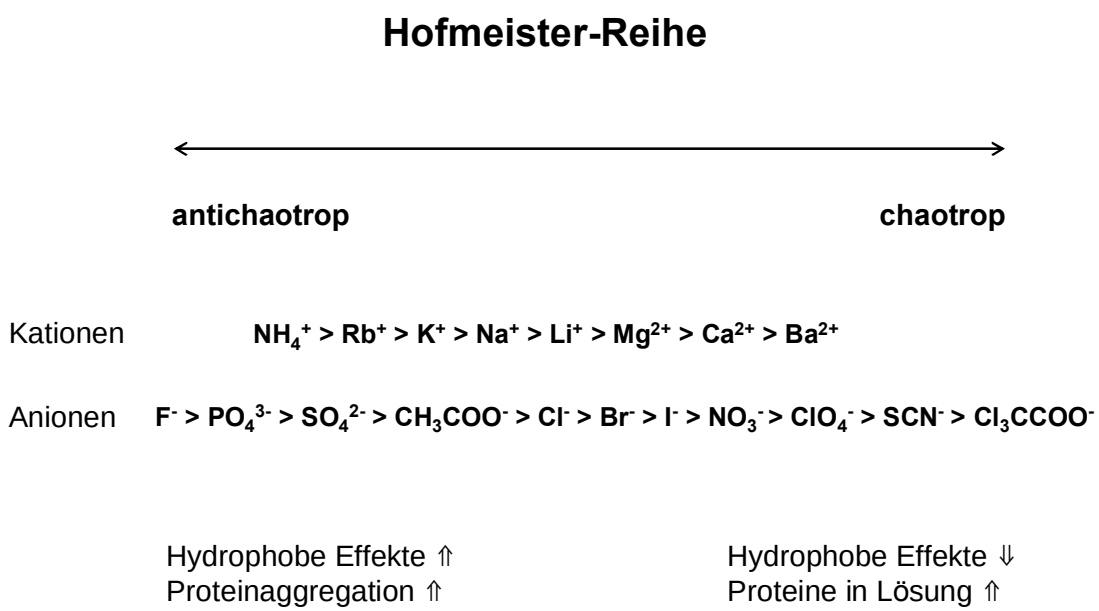


Abb. 25 Hofmeister-Reihe

Nukleinsäuren sind in Wasser gut löslich. Durch die Zugabe eines chaotropen Salzes wird die Hydrophilie des Wassers reduziert, was ein begünstigtes Binden der Nukleinsäuren über Wasserstoffbrücken an die Silika-Partikel zur Folge hat. Bei der Elution der DNA mit A. dest. führt die Abwesenheit der chaotropen Salze zu einem Überangebot an OH-Gruppen im Wasser, d.h. zu einer Erhöhung der Hydrophilie, so dass die Nukleinsäuren die Affinität zu den Silika-Partikeln verlieren. Die Kationen der chaotropen Salze sättigen in hohen Konzentrationen die negative Ladung auf der Oberfläche der Glasmilch ab und laden es positiv auf, eine Grundvoraussetzung dafür, dass die Nukleinsäuren überhaupt binden können. Die Bindungskapazität der Glasmilch liegt bei etwa 1-2 µg DNA pro 1 µl Glasmilch, wobei das chaotrope Salz mindestens 3 M sein sollte. Die verwendete Glasmilch Ultra Clean 15 UltraBIND (Dianova) hat eine Bindungskapazität von 1µg pro µl UltraBIND.

Als chaotropes Salz wurde Natriumacetat (1,5 M) eingesetzt. Lithiumsulfat (Li_2SO_4) oder höhere Konzentration des NaAc (4 M) brachten keine Verbesserung. Durch Li_2SO_4 sollte die DNA effizienter ausgefällt werden als mit NaAc. Lithium- und Sulfat-Ionen sind in Wasser gut löslich und lassen sich von der Glasmilch wieder leicht abwaschen. Dadurch wird die DNA auch wieder sehr gut eluiert. Zusätzlich verursachen sie ein Ausfällen der DNA, so dass beim Waschschritt mit 70%igem Ethanol die DNA nicht abgewaschen wird. Durch eine Erhöhung der NaAc-Konzentration können möglicherweise mehr DNA-Moleküle an die Glasmilch binden. Es scheint, die Glasmilch ist bereits bei 1,5 M NaAc-Lösung gesättigt. Vielleicht wäre die Verwendung von Glasmilch mit kleinerem Porendurchmesser sinnvoll, da die reaktive Oberfläche größer wird.

Die DNA bindet oberhalb von einem pH-Wert 8,5 äußerst ineffizient an die Glasmilch, da zum einen die Glasmilch nur schwach positiv aufgeladen wird, zum anderen das Überangebot an OH-Ionen mit der DNA um einen Bindeplatz an die Silika-Partikel konkurrieren. Saure Lösungen dürften während der DNA-Aufreinigung kaum stören, führen jedoch zu einer beschleunigten DNA-Degradation. Ein pH Wert beträchtlich niedriger als 7 kann strukturelle Schäden an der extrahierten DNA verursachen. Zu der DNA-Lösung wird zusätzlich 100%iges Isopropanol pipettiert, so dass DNA-Moleküle, aber auch wasserlösliche Proteine ausfallen, da sie in Isopropanol nicht löslich sind, und besser auf der Glasmilch über ionische Wechselwirkungen binden kann. Die NaAc-Konzentration dürfte für eine Ausfällung der DNA und anderer Proteine zu niedrig sein. Damit die DNA an die Partikel adsorbieren kann, wird ein maximaler pH-Wert von 7,5 benötigt, der erreicht wird durch Zugabe von Natriumacetat (pH 4,5) [168]. Die Silika-Partikel haben weitere wichtige Effekte. Zum einen kann die DNA sehr leicht wieder abgewaschen werden, zum anderen unterstützen die Silika-Partikel und das chaotrope Salz die DNA-Präzipitation. Eine Inkubation mit leichtem Schütteln bei RT ermöglicht das Binden der DNA an die Glasmilch. Ein zu starkes Schütteln, Vortexen oder ein zu starkes oder langes Zentrifugieren würde aufgrund der Scherkräfte zu DNA-Brüchen führen [109]. Da Melanin ebenso negativ geladen ist, bindet das übrig gebliebene wasserlösliche Melanin neben der DNA teilweise an die Silika-Partikel und kann nicht vollständig abgewaschen werden. Würde man versuchen, das wasserlösliche Melanin komplett von der DNA zu isolieren, würde man einen zu großen DNA-Verlust in Kauf nehmen. Der Inhibitionseffekt kann

sehr gut in der folgenden Amplifikationsreaktion neutralisiert werden, indem mehr Magnesiumchlorid und *Taq* Polymerase zum Ansatz pipettiert wird. Neben dem Haarpigment Melanin existiert eine Vielzahl an weiteren inhibitorischen Substanzen, die während der Extraktion nicht vollständig abgetrennt werden können und daher in der anschließenden Amplifikationsreaktion zu Beeinträchtigungen führen. Sogar Spuren an Chemikalien, die bei der DNA-Extraktion verwendet werden wie beispielsweise Phenol, EDTA, Proteinase K und Salze können die *Taq* DNA-Polymerase stark inhibieren. Daher muß nach dem Binden der DNA an die Glasmilch eine Entsalzung der DNA erfolgen. Salze in den Lysepuffern erleichtern das Fällen der Proteine während des Extraktionsverfahrens. Kationen wie Na^+ wirken sich auf die Schmelztemperatur dsDNA aus und ändern damit die optimalen PCR-Bedingungen. In unserem Verfahren erfolgte der Waschprozess mit 70%igem eiskalten Ethanol, damit Salze, restliches Isopropanol, Metabolite und andere makromolekulare Zellkomponenten, eventuell auch Proteine entfernt werden. Eine Isopropanol-Fällung der DNA und Ethanol-Behandlung des DNA-Pellets mit 70% Ethanol ist gewöhnlich effektiv in der Entfernung dieser Spurenkontaminationen. DNA, aber auch wasserlösliche Proteine sind in Ethanol nicht löslich, jedoch in A. dest. Daher kommt es zu einem geringfügigen DNA-Verlust während des Waschprozesses mit 70% Ethanol. Die Zugabe von NH_4Ac in den 70%igen Ethanol dürfte den DNA-Verlust beim Waschschritt minimieren. Wenn das Pellet getrocknet wird, verflüchtigt sich das Salz als Ammoniak und Essigsäuredampf. Möglicherweise wird jedoch die DNA ineffizienter gereinigt, da die Löslichkeit für die verunreinigten Substanzen durch das Salz herabgesetzt ist.

Bei der Elution mit A. dest. werden neben den DNA-Molekülen wasserlösliche Proteine gelöst, die aufgrund der Zugabe von Isopropanol bzw. der Salzkonzentration ausgefallen sind. Diese Proteine stören jedoch vermutlich kaum in der anschließenden Amplifikationsreaktion.

Das mehrmalige Eluieren, Vereinigen der Eluate und wieder Eindampfen auf ein geringeres Volumen dürfte die DNA-Ausbeute vermutlich kaum erhöhen, da bereits bei einer zweiten Elution keine/kaum DNA im Eluat festgestellt werden konnte.

Im Gegensatz zu der Meinung von Höss et al stört die Glasmilch die Amplifikationsreaktion nicht bzw. kaum.

Mit diesem optimierten Extraktionsverfahren war es möglich, genügend DNA aus Haaren mit telogener Wurzel und Haarschäften, aber auch aus anderen problematischen Spuren zu isolieren. Durch die integrierte Glasmilch-Aufreinigung werden die störenden inhibitorischen Substanzen größtenteils entfernt [25,27,80,109,123,125]. Spurenmaterial wie Knochen und Haare benötigen aufgrund der beachtlichen Gerüstsubstanzen lediglich eine längere Lyse-Inkubation. Das Binden der DNA an die Glasmilch ist mit über 99% ein vollständiger Prozess und die Elution der DNA ist mit 10 µl Puffer geringer Ionenstärke pro mg Glasmilch-DNA-Komplex über 90% effizient [191]. Diese Werte können jedoch aufgrund der verschiedenen Porendurchmesser der verwendeten Silika-Partikel variieren. Der DNA-Ertrag ist beinahe unabhängig von der Ausgangsmenge an DNA im Picogramm und Nanogramm Bereich (linear) [27]. Während der Glasmilch-Aufreinigung gehen nur sehr kleine DNA Fragmente (weniger als 40-60 bp) gelegentlich verloren [27]. Die Zugabe von Träger-DNA zur Probe resultiert in einem leichten, aber signifikanten Anstieg im Ertrag. Die DNA-Bindekapazität der Silika-Partikel ist hoch (über 20 µg/40 µl Silika-Partikel). Ein DNA-Molekül kann mehrere hundert Silika-Partikel mit einem Durchmesser von 2-10 µm binden und ein Partikel kann an mehrere DNA-Moleküle binden. Daher führt ein Überschuss an DNA zu einem komplexen Aggregat, das nicht mehr aufgelöst werden kann.

DNA aus Knochen konnte ebenfalls mit diesem Extraktionsverfahren in Kombination mit der Glasmilchaufreinigung erfolgreich isoliert werden. Knochenmaterial muß jedoch vor der Zelllyse entkalzifiziert werden. Dies erfolgt mit einer EDTA-Lösung. Noch wirkungsvoller als EDTA zeigte sich CDTA. CDTA ist zum einen in höheren Konzentrationen in destilliertem Wasser löslich, zum anderen bildet es stärkere Komplexe mit den Calciumionen, so dass der Knochen schneller und vollständiger entkalzifiziert werden konnte. Die EDTA-Lösung ist nicht immer gesättigt nach einer Standardinkubation von 24 h [168].

4.5 kommerzielle und beliebte Extraktionsverfahren

4.5.1 Chelex® 100

Bei dem Extraktionsverfahren Chelex® 100 erfolgt die Zelllyse durch Erhitzen (100°C) und durch Alkalität der Chelex-Suspension (pH 10-11). Chelex ist ein Chelatharz mit hoher Affinität für polyvalente Metallionen, die sonst die Degradation freier DNA katalysieren. Vorsicht ist jedoch geboten mit diesem Extraktionsverfahren, zu langes Erhitzen reduziert den DNA-Ertrag und dies ist besonders bei Spuren mit degradierter DNA und geringem DNA-Gehalt kritisch. Des Weiteren dürften die meisten PCR-Inhibitoren wie beispielsweise das Melanin durch dieses Extraktionsverfahren nicht abgetrennt werden. Andere Inhibitoren jedoch wie das Hämatin, das aus Blutspuren isoliert wird und die Amplifikation von DNA inhibiert, wird unwirksam, da die polyvalenten Eisenkationen, die mit dem Hämatin verbunden sind, an das Chelatharz gebunden werden [89].

Da die Zugabe von Proteinase K zur Chelex-Suspension für eine vollständige Lyse der Haare nicht ausreicht, wurde dem Chelex-Verfahren ein zusätzlicher Lyseschritt vorgeschoben. Die Lyse erfolgte zum einen mit einem TN_{ca}-Puffer, der Proteinase K und Ca^{2+} enthält anstelle EDTA oder Chelex [75]. Es erfolgte eine vollständige Auflösung des Haares. Zum anderen wurde das Lyseverfahren getestet, wie es für Haare mit der optimierten GEN-IAL-Extraktion angewandt wurde. Mit diesem Verfahren gelang eine schnellere Haarlyse als mit der Verwendung des TN_{ca}-Puffers. Der Grund dafür ist vermutlich die höhere Konzentration an DTT (143 mM anstelle 39 mM) und an Proteinase K (1429 µg/ml anstelle 250 µg/µl) im Lysepuffer. Theoretisch kann nach einer vollständigen Lyse der Haare für beide Lysevefahren dieselbe Erfolgsrate erwartet werden. In der Praxis zeigt sich jedoch einen höheren Amplifikationserfolg nach dem Lyseverfahren, wie es für Haare mit der optimierten GEN-IAL-Extraktion angewandt wurde. Vermutlich schützt das EDTA, das im TN_{ca}-Puffer fehlt, die LCN-DNA vor Nukleasen.

Die Funktion des Linearen Polyacrylamids (LPA) kann der der Silika-Partikel gleichgestellt werden. Es verbessert die Ausfällung der DNA in Lösungen. DNA-Fragmente kleiner als 20 bp werden nicht ausgefällt und bleiben in der Lösung. Polyacrylamid ist zwar nicht toxisch, aber unpolymerisiertes Acrylamid, ein

Neurotoxin, kann in dem polymerisierten Acrylamid präsent sein. Daher muß LPA vorsichtig gehandhabt werden.

4.5.2 InViSorb™ Forensic-Kit

Die Typisierungsergebnisse von Haaren, die mit dem Invisorb-Kit behandelt wurden, waren eingeschränkter und weniger erfolgreich als die, bei denen eine GEN-IAL-Extraktion kombiniert mit der Silika-Aufreinigung durchgeführt wurde, obwohl die Haarlyse mit Zugabe von Proteinase K und DTT vollständig war. Möglicherweise geht während des Bindens der DNA an den Filter und der Waschprozesse wertvolle DNA verloren. Bei der anschließenden Elution der DNA ist ebenfalls ein DNA-Verlust zu erwarten. Für die Elution ist ein großes Volumen von 80-120 µl vorgegeben. Folglich liegt die DNA sehr verdünnt vor.

4.5.3 ChargeSwitch®Forensic DNA Purifaction Kit

Die Haarlyse mit dem ChargeSwitch Kit war erst vollständig als zusätzlich DTT und Proteinase K zum Lysepuffer pipettiert wurden. Die Aufreinigung über magnetische Beads ist eine geeignete Methode, um inhibitorische Substanzen zu entfernen. Die Funktionsweise ist ähnlich wie bei den Silika-Partikeln. Die Beads sind bei niedrigen pH-Werten positiv geladen und können die negativ geladene DNA binden. Proteine und andere Kontaminationen werden nicht gebunden und werden während des Waschprozesses entfernt. Für die Elution der DNA wird durch Zugabe des Elutionspuffers der pH-Wert auf 8,5 erhöht. Dadurch werden die Beads neutralisiert und die DNA geht in Lösung. Da jedoch ein großes Elutionsvolumen von 150 µl vorgegeben wird, liegt die DNA folglich sehr verdünnt vor. Eine Reduktion des Elutionsvolumens ist möglich, indem der DNA-Beads-Komplex mit 20-40 µl resuspendiert wird und die Amplifikationsreaktion direkt auf dieser Suspension durchgeführt wird [53]. Die anfängliche Erhitzung in der PCR reicht aus, die DNA von den Beads zu lösen. Wie sich diese Methode jedoch bei Spuren mit geringer DNA-Quantität auswirkt, ist nicht nachgewiesen.

4.5.4 GEN-IAL-Extraktion

Eine einfache GEN-IAL-Extraktion ist dahingegen bei degradierten biologischen Spuren nachteilig, da zum einen bei Spuren mit inhibitorischen Substanzen keine ausreichende Aufreinigung der DNA erfolgt. Zum anderen ist die Ausfällung der DNA aufgrund der fehlenden Silika-Partikel und des chaotropen Salzes als Präzipitationshilfe reduziert, so dass letztlich ein größerer DNA-Verlust zu erwarten ist als bei der GEN-IAL-Extraktion mit Silika-Aufreinigung.

4.5.5 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform Extraktion war in dieser Studie vergleichbar effizient wie die GEN-IAL-Extraktion. Das Verfahren ermöglichte ebenso die Isolation von degradierter und LCN-DNA aus Haaren [101]. Die GEN-IAL-Extraktion mit Silika-Aufreinigung brachte geringfügig höhere Erfolgsraten mit sich. Zudem wurde die GEN-IAL-Extraktion mit Silika-Aufreinigung der Phenol-Chloroform-Extraktion bevorzugt, da das Verfahren ungiftig und leicht durchführbar ist.

4.6 Typisierung von Haarschaft-DNA

Die Erfolgsrate bei der mtDNA-Typisierung liegt wie bei der nuDNA-Typisierung bei Haaren mit telogener Wurzel höher als bei Haarschäften [156]. Die telogene Wurzel ist eine reichhaltige Quelle an mtDNA-Molekülen, zum distalen Ende hin nimmt die Zahl der mtDNA-Moleküle ab. Die Erfolgsrate steigt mit der Länge des Haares ohne Wurzel, bei Haaren mit telogener Wurzel existiert kein Zusammenhang zwischen Länge oder Durchmesser oder Volumen und Erfolgsrate. Die Form der Medulla hat keinen Einfluss auf die Erfolgsrate, obwohl anzunehmen ist, dass bei Fehlen der Medulla mehr mtDNA-Moleküle vorhanden sind. Chemische Behandlungen haben bei der mtDNA-Typisierung im Gegensatz zur nuDNA-Typisierung keinen Effekt auf den Amplifikationserfolg. Da mtDNA in den Zellen aufgrund der doppelten Mitochondrienmembran und der ringförmigen Struktur geschützter vorliegt als nuDNA, dürften sich äußere Einflüsse nicht oder

nur geringfügig auf die mtDNA-Typisierung auswirken. Möglicherweise dürfte jedoch eine teilweise Degradation der mtDNA stattfinden.

Pfeiffer führte eine mtDNA-Sequenzierung an Scham-, Achsel- und Kopfhaarschäften durch [140]. Die Erfolgsrate war bei den Kopfhaarschäften (75%) am größten, gefolgt von den Schamhaar- (66%) und Achselhaarschäften (52%). Die telogene Phase der Scham- und Achselhaare dauert länger als die Wachstumsphase. Die Körperhaare wachsen 0,37 mm pro Tag und können etwa 7 cm lang werden. Kopfhaare dagegen wachsen etwa mit derselben Geschwindigkeit, können aber eine Länge von mehr als 100 cm erreichen. Daher dürfte die Anzahl an Mitochondrien im Kopfhaar größer sein als in den Scham- bzw. Achselhaaren. Die Erfolgsrate hängt nicht signifikant mit dem Geschlecht des Haarspenders sowie der Länge, dem Durchmesser, des Volumens, der Farbe des Haares zusammen. Männliche Haare zeigen nur eine geringfügig höhere Erfolgsrate als weibliche Haare. Männliche Haare sind durchschnittlich zwar kürzer als weibliche, doch haben sie in der Regel einen größeren Durchmesser. Heteroplasmie konnte weder in den Mundspeichelproben noch in den Kopf-, Achsel- und Schamhaaren beobachtet werden. Dies scheint demnach nur selten vorzukommen. Im Gegensatz zur mtDNA-Typisierung lag die Erfolgsrate der nuDNA-Typisierung in dieser Studie bei Körperhaaren höher als bei Kopfhaaren.

Die nuDNA-Analyse von Haaren mit telogener Wurzel und Haarschäften gestaltet sich deshalb schwierig, da die DNA-Moleküle nur in begrenzter Menge vorliegen. Äußere Einflüsse führen neben der Apoptose zu einer starken DNA-Degradation. Zudem findet eine Oxidation des Melanins innerhalb der Haarfaser statt, die entweder spontan oder durch Hydrogenperoxid in permanenten Haarfärbemitteln hervorgerufen wird. Das Melanin kann in seiner oxidierten Form die PCR komplett inhibieren. Diese inhibitorische Wirkung ist aufgrund der geringen nuDNA-Menge bei der nuDNA-Typisierung offensichtlicher als bei der mtDNA-Typisierung. Häufig permanent gefärbte Haare zeigen einen deutlich reduzierten DNA-Gehalt [78]. Vermutlich werden durch das H_2O_2, ähnlich wie die Disulfidbrücken bei den Proteinen, die Wasserstoffbrücken innerhalb der DNA-Moleküle aufgelöst, die DNA fragmentiert, so dass kleinere DNA-Moleküle beim Waschen möglicherweise aus der Haarfaser gelangen. Das Haar wird ebenso durch häufiges und langes Waschen in seiner Struktur zerstört. Daher ist in den Haarspitzen weniger DNA als im Wurzelbereich, bedingt durch Waschschritte und Witterungseinflüsse [78].

Dieser DNA-Verlust dürfte jedoch eher gering ausfallen. Haarschäfte dürften hauptsächlich deshalb schwieriger zu analysieren sein als Haare mit telogener Wurzel, da die DNA-Degradation und Melanin-Oxidation zur Haarspitze hin zunehmen. Einen Einfluss der nativen Haarfarbe oder einer chemischen Behandlung auf die DNA-Ausbeute konnte nicht immer festgestellt werden [13,101]. Chemisch behandelte Haare ergaben jedoch in den meisten Fällen aufgrund der hohen Degradation kein Ergebnis [13]. Vermutlich beeinträchtigt chemisch behandeltes Haar überdies den enzymatischen Proteinase K-Verdau.

In dieser Studie zeigte sich ebenso kein Zusammenhang zwischen natürlicher Haarfarbe und DNA-Quantität. Eine Haaranalyse gestaltete sich jedoch bei dunklen Haaren schwieriger als bei hellen und grauen Haaren. Möglicherweise kann als Ursache dafür die spontane Oxidation des Melanins durch UV-Strahlung in dunklen Haaren in Betracht gezogen werden, das auf die Amplifikationsreaktion störend wirkt.

Eine Analyse von Haarschäften ist aufgrund der hoch degradierten LCN-DNA zwar äußerst schwierig, aber durchaus möglich. Eine erhöhte Erfolgsrate bei der Typisierung von Spuren mit LCN-DNA wie beispielsweise Haare mit telogener Wurzel und Haarschäfte kann u.a mit einer Erhöhung der Zyklenzahl oder einer semi-nested PCR erzielt werden [19,118,133]. Eine Erhöhung der Zyklenzahl kann eine Artefaktbildung mit sich bringen. Die Artefaktbildung bei der Typisierung von Haarschäften resultiert aus der teilweisen starken Degradation der DNA-Moleküle, die Folge von Apoptose, UV-Strahlung und oxidativen Prozessen sind [101]. Diese falschen Artefakte sind nicht reproduzierbar.

Die Zahl der Melanosomen, die im Haarschaft vorhanden sind, nimmt mit dem Alter ab. Daher nimmt auch der inhibitorische Effekt ab und Haare älterer Personen können erfolgsversprechender typisiert werden. Einen Bezug des Typisierungserfolges mit dem Alter des Haarträgers konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden, da der Typisierungserfolg deutlich vom Individuum abhängt. Daher müsste eine Abhängigkeit des Typisierungserfolgs vom Alter untersucht werden, indem über lange Zeit die Haare jeweils einer Person analysiert werden müssten. Der Amplifikationserfolg liegt aber grundsätzlich bei dunklen Haaren niedriger als bei hellen Haaren. Daher können graue und weiße Haare in der Regel erfolgsversprechender analysiert werden als pigmentierte Haare und das Fehlen der Pigmentierung tritt gewöhnlich erst im Alter auf. Der Typisierungserfolg

korreliert demnach auch mit der Herkunft des Haares, möglicherweise aufgrund des Pigmentierungsgrades (Dichte der Melanine) und der damit verbundenen möglichen Inhibition. Die natürliche Pigmentierung variiert in den verschiedenen Populationsgruppen. Das Haar unterliegt nach dem Tod des Trägers zersetzende Veränderungen durch mikrobische und autolytische Aktionen. Dieser Zerfall wurde in anagenen und katagenen Wurzeln, nicht aber in telogenen Wurzeln beobachtet. Telogene Wurzeln scheinen für den Zerfall nicht zugänglich zu sein; telogene Haare lebender und toter Personen zeigen einen ähnlichen Amplifikationserfolg. Möglicherweise ist der PCR-Ertrag verglichen zu den telogenen Haaren lebender Personen bei toten Personen etwas reduziert.

4.6.1 Melanin-Einfluss

Haarschäfte und Haare mit telogener Wurzel sind nicht nur aufgrund ihrer degradierten LCN-DNA schwer zu analysieren, sondern ebenfalls aufgrund des Haarpigments Melanin, das als PCR-Inhibitor bekannt ist [133]. Aufgrund der DNA-Degradation und der Melanin-Oxidation nimmt die Erfolgsrate für eine STR-Typisierung im Haar distal ab. Daher können Haare mit telogener Wurzel besser analysiert werden als Haarschäfte [184]. Eine Erhöhung der Haarschaftlänge für die STR-Typisierung bringt zwar eine höhere DNA-Menge mit sich, jedoch ebenso eine höhere Menge des störenden Melanins. Kurze Haarschäfte konnten aufgrund der äußerst geringen DNA-Menge in dieser Studie nicht oder nur schwer analysiert werden. Zelllinien-DNA, die zu diesem Haarextrakt zugegeben wurde, konnte jedoch erfolgreich typisiert werden. Es konnte demnach keine oder nur eine geringfügige Inhibition durch Melanin festgestellt werden. Bei der Analyse langer Haarschäfte war die Erfolgsrate jedoch ebenso niedrig. Die Amplifikation von Zelllinien-DNA im Haarextrakt war aufgrund der hohen Melanin-Konzentration gestört bzw. nicht möglich. Nach Erhöhung der Mg^{2+}- und Polymerase-Konzentration stieg der Typisierungserfolg für die Haarschaft-DNA. Die Zelllinien-DNA konnte problemlos analysiert werden. Abgesehen von der Inhibition durch Melanin ist der Typisierungserfolg bei längeren Haarschäften vermutlich aufgrund der teilweise hoch degradierten DNA nur geringfügig höher als bei kurzen Haarschäften.

Ein Haar von 1 cm Länge wiegt durchschnittlich 60 µg bzw. 0,06 mg [142]. Schwarzes, stark pigmentiertes Haar beinhaltet etwa 12 µg Melanin, hauptsächlich Eumelanin, pro mg Haar. Demnach beinhaltet ein Haar von 1 cm etwa 0,72 µg bzw. 720 ng Melanin. Etwa 15 ng des Haarpigments Eumelanin in einem 100 µl PCR-Ansatz inhibiert die Amplifikationsreaktion vollständig [57,184].

Der Gesamtmelaningehalt in hellblonden Haaren beträgt etwa 2 µg pro mg Haar [142]. Schwarzes Haar ist nicht nur aufgrund des höheren Gesamtmelaningehalts, sondern auch aufgrund der Inhibitionswirkung des Eumelanins schwieriger zu analysieren als helles Haar, da Eumelanin im Gegensatz zum Pheomelanin leicht mit der Luft zu einem wasserlöslichen Molekül oxidiert und daher nicht mehr von der DNA während der Extraktion getrennt werden kann und die anschließende PCR-Reaktion hemmt [203]. Aus diesem Grund ist es aufwendig blondiertes, natürlich schwarzes Haar zu analysieren, wohingegen blondiertes, natürlich weißes Haar typisiert werden kann. Weißes Haar enthält keine Pigmente. Auch Zugabe von DNA zum Extrakt der blondierten braunen Haare brachte kein PCR-Resultat.

Eumelanine als Polyanionen und Pheomelanine als Zwitterionen können möglicherweise Kationen binden [142]. Daher besteht der Verdacht, dass das Haarpigment im PCR-Ansatz die Magnesiumionen abfängt und dadurch die Polymerase nicht aktiviert wird. Pheomelanin im PCR-Ansatz stört um den Faktor 10 weniger als Eumelanin. Daher können auch menschliche Nägel besser typisiert werden [113,142]. Erhöht man in der PCR die Mg^{2+}-Konzentration, entstehen unspezifische Produkte. Nicht aber bei der Anwesenheit von Melanin im PCR-Ansatz. Eine Erhöhung der $MgCl_2$-Konzentration auf 3 mmol (normal ~1,4 mmol) hebt die Melanin-Inhibition auf ohne Produktion unspezifischer Allele, was für die Chelateigenschaften des Melanins spricht. Als Chelatbildner fängt Melanin während der Amplifikationsreaktion Magnesiumionen ab, die als Cofaktoren für die Polymerase fungieren. Zudem assoziieren die Pigmente trotz negativer Ladungen möglicherweise mit genomischer DNA und hemmen so während der PCR die Amplifikation dieser DNA-Fragmente. Vermutlich ermöglichen intrinsische und beständige freie Radikale, dich sich innerhalb der Melanin-Makromoleküle befinden, entweder die direkte Interaktion mit der DNA oder zumindest eine Art Polarisation des Moleküls. Die Interaktion kann nicht sehr stark sein, da sie durch ein elektrisches Feld rasch wieder aufgehoben werden kann [142,144]. Eine

direkte Inhibition der Polymerase durch Melanin ist ebenso bekannt, wurde auch in dieser Studie nachgewiesen [57,123,125,204]. Möglicherweise binden Melanin-Moleküle in das aktive Zentrum der Polymerase und inaktiviert sie dadurch. Melanin beeinflusst weder die Thermostabilität der *Taq* DNA-Polymerase noch das Primer-Annealing zur Template-DNA. Eine Erhöhung der Polymerase-Menge in die Amplifikationsreaktion erhöhte deutlich die Erfolgsrate für die Typisierung von Haaren mit telogener Wurzeln und Haarschäften. Die Interaktion des Melanins und der Polymerase ist reversibel.

Eine Verbesserung bzw. Aufhebung der Melanininhibition konnte gegen der Behauptung von Giambernardi et al nach Zugabe von BSA in dieser Studie nicht festgestellt werden [65]. Auch die Zugabe von BSA oder Trockenmilch in einem mehr als 1000fachen Überschuss gegenüber der Polymerase führte zu keiner Beseitigung der Inhibition [57]. Die Erhöhung der BSA-Konzentration über 1 µg/µl führte zu einem milchigen Amplifikat. Die Effizienz der Amplifikation sank bei diesen hohen BSA-Konzentrationen. Möglicherweise sinkt in Anwesenheit hoher BSA-Konzentrationen die Konzentration der PCR-Komponenten in der PCR-Lösung.

Die minimal inhibierende Melanin-Konzentration hängt von der Entfernung zwischen den Primerbindestellen ab, d.h. die inhibierende Konzentration nimmt mit der zu amplifizierenden Amplikonlänge ab. Die PCR langer Amplikons ist gegenüber Melanin wie aller inhibitorischer Substanzen empfindlicher als gegenüber kurzen. Entweder ist die Elongationsrate durch das Binden des Melanins an die Polymerase herabgesetzt oder die Interaktion der Polymerase und der DNA-Template ist gestört.

Eine Entfernung des Melanins ist über Bio-Gel P-60 Säulen möglich, da wasserlösliches Melanin vollständig adsorbiert wird, wohingegen die DNA durchpassiert [204]. Dabei dürfte es jedoch zu einem DNA-Verlust kommen.

Die Menge an vorhandener Ziel-DNA spielt eine große Rolle für eine effiziente Amplifikation in Gegenwart von Inhibitoren [65,142,204]. Für mtDNA liegen die Hemmkonzentrationen von Melanin höher als für genomische DNA, möglicherweise da eine größere Menge an mtDNA in der Zelle vorliegt als nuDNA. Die Melaninkonzentration im Haar reicht nicht aus die Amplifikation von mtDNA-Abschnitten zu inhibieren. Mögliche Ausnahmen können sein: Stark pigmentierte anagene Haarwurzeln mir unreifen Melanosomen, permanent gefärbte Haare mit

degradierten und somit höheren Anteil an wasserlöslichen Pigmenten, Haarspuren mit Lichtalterung [142].

4.7 STR-Multiplex Q8

Bei der Entstehung eines neuen STR-Konzeptes muß gleichzeitig auf Reproduzierbarkeit, Genauigkeit, Beständigkeit, Allel-Gleichgewicht und Stutterintensität geachtet werden. Bei der Entwicklung von Multiplex-Kits müssen die Primersequenzen so gewählt werden, dass Sekundärstrukturen wie Haarnadelschleifen und die Bildung von Primer-Dimere vermieden werden [35,36]. Darüber hinaus sollten die T_M-Werte der Primer eines Multiplex-Kits ähnlich liegen. Die Elongation durch die Polymerase kann unterbrochen werden, wenn der Primer und die Template-DNA nicht komplementär gebunden sind. Die Primerelongation während der PCR wird manchmal durch einen einzelnen Basen-Mismatch zwischen Primer und Template-DNA beendet. Dieser inhibitorische Effekt auf die enzymatische Extension wird teilweise ausgenutzt, um die Komplementarität des Oligonukleotids und der Zielsequenz einschätzen zu können. Vorsicht ist geboten beim Primerdesign, um diese Form der vorzeitigen Termination zu verhindern. Aufgrund möglicher Sequenzmutationen an den neuen Primerbindestellen müssen die PCR-Produkte mit einem anderen Multiplex verglichen werden, dessen Primer andere Bindestellen aufweisen. Allel-Dropouts weisen auf eine Mutation in der Primerbindestelle hin.

Wird eine DNA-Sequenz vor den Templates künstlich eingebaut, die als Ziel für einen Primer des Primerpaares dient, kann die Zahl der Primer für den Multiplex reduziert werden [30]. Auf diese Weise benötigt man für einen Multiplex mit n Systemen lediglich n+1 Primer.

Nach der Synthese der Primer empfiehlt es sich, eine zweifache HPLC- oder PAGE-Aufreinigung durchzuführen. Sind die Primer ungenügend aufgereinigt, entstehen „dye blobs“, die teilweise die Interpretation von LCN-DNA-Profilen erschweren. Farbstoffmoleküle, die sich von den Primern mit der Zeit wieder gelöst haben, können die Polymerase inhibieren. Die Zugabe von BSA in den PCR-Ansatz reduziert diesen inhibitorischen Effekt [36]. Die Fluoreszenzfarbstoffe lösen sich ohne BSA schneller von den 5´Enden der Primer. Die Abspaltung der

Fluoreszenzfarbstoffe wird reduziert, indem die Primer anstelle in destilliertem Wasser mit einem pH von 5,0 in einer leicht basischen Lösung wie beispielsweise TE-Puffer mit einem pH-Wert von 8,0 gelöst sind. Farbstoffartefakte, sogenannte dye blobs, entstehen in Lösungen mit pH < 7,0 schneller. Das Lösen der Primer in Puffer anstelle destillierten Wassers birgt jedoch die Gefahr einer bakteriellen Kontamination und ist daher weniger geeignet. Eine Aufreinigung der Amplifikate über Säulen nach der PCR-Reaktion und vor der Elektrophorese kann sinnvoll sein, um die dye blobs zu entfernen.

Eine Reduktion der Amplikonlängen führt bei degradierten biologischen Spuren zu einer höheren PCR-Effizienz. Neben der Amplikonlänge beinflussen noch mehrere Faktoren die PCR-Effizienz. Fluoreszenzfarbstoffe, die Primerbinderegionen, PCR-Komponenten, die Anzahl der PCR-Zyklen und schließlich das PCR-Programm selbst tragen im erheblichen Maße zur Qualität des STR-Konzeptes bei. Bei der Entwicklung eines STR-Konzeptes müssen alle Variationen an PCR-Bedingungen und Komponenten geprüft werden, um die optimale Einstellung für eine erfolgreiche Typisierung gerade von Spuren mit degradierter und LCN-DNA und von Spuren, verunreinigt mit inhibitorischen Substanzen, zu erhalten. Für die Entwicklung des Multiplex-Kits Q8 wurde eine Reihe an verschiedenen PCR-Primern mit unterschiedlichen Sequenzen getestet, die nicht nur nahe an der Repeatregion liegen, sondern auch die Amplifikation des Locus durch ihre günstige Sequenz fördern. Der Q8 wurde speziell für Spuren mit wenig und degradierter DNA entwickelt [124,126]. Die Amplikonlängen sind verglichen mit kommerziell erhältlichen Kits deutlich verkürzt. Im Vergleich zu dem kommerziellen MPX2-Kit wurden die PCR-Produkte um durchschnittlich 23% gekürzt, im Vergleich zum Nonaplex-Kit um durchschnittlich 17%. Die Systeme SE33, TH01, D8S1179 und D18S51 liegen im Vergleich zum MPX2- und Nonaplex-Kit im Q8-Multiplex verkürzt vor, daher sind die Erfolgsraten dieser Loci im Q8-Kit höher als in den anderen beiden kommerziellen Kits. Eine Korrelation der Erfolgsrate eines Systems und der Amplikonlänge wird bei der Analyse von Spuren mit degradierter DNA deutlich. Die Wahrscheinlichkeit, dass die Amplifikation durch PCR-Inhibitoren gestört wird, liegt bei längeren Amplikons höher als bei kürzeren. Eine Reduktion der Amplikonlängen ist daher ebenso für Spuren mit inhibitorischen Substanzen vorteilhaft.

Ein exemplarisches Ergebnis unseres Konzeptes zeigt Abbildung 19. Der Kotextrakt wurde gleichzeitig mit dem MPX2-, Nonaplex- und Q8-Kit amplifiziert. Es gab Übereinstimmung zwischen den kommerziellen Kits und dem Q8-Multiplex. Mehr Loci konnten mit dem Q8 analysiert werden verglichen zu den zwei kommerziellen Kits MPX2 und Nonaplex. Der Typisierungserfolg hängt dabei aber nicht alleine von der Reduktion der Amplikonlängen ab. Um die Erfolgsrate für den Q8-Multiplex zu erhöhen, wurden die sensitiven Fluoreszenzfarbstoffe FAM, JOE und TET verwendet. In den Systemen D3S1358 und FGA sind beispielsweise trotz derselben Amplikonlängen im Q8 und MPX2-Kit die Erfolgsraten der beiden Systeme im Q8-Multiplex höher, da im Q8-Kit beide Systeme mit der Fluoreszenzfarbe FAM markiert sind und im MPX2-Kit mit NED.

Am System Amelogenin in den drei Multiplex-Kits wird deutlich, dass der Typisierungserfolg eines Systems von weiteren Faktoren abhängt außer der Amplikonlänge und der verwendeten Fluoreszenzfarbe. Das System Amelogenin wird im Q8-Kit länger amplifiziert als im Nonaplex-Kit und kürzer als im MPX2-Kit. Da die Primer in allen drei Kits FAM-markiert sind, dürfte die höchste Erfolgsrate für das System Amelogenin im Nonaplex-Kit zu erwarten sein, gefolgt vom Q8- und MPX2-Kit. Dies ist jedoch nicht der Fall. Der Typisierungserfolg eines Systems hängt zudem von der Primersequenz und Primerkonzentration des Loci im Multiplex sowie von Primersequenzinteraktionen und der eingesetzten Polymerase ab, die möglicherweise sequenzabhängig arbeitet. Aufgrund der sensitiven Primerbinderegionen können ebenso Minimalspuren mit dem Q8-Multiplex recht gut analysiert werden.

Schließlich wurde das Q8-Konzept weiter optimiert, indem die PCR-Komponenten in verschiedenen Mengen zum PCR-Ansatz pipettiert wurden, um die beste Zusammensetzung und Konzentration ausfindig zu machen, wie in Material und Methoden aufgelistet.

Der Q8 Multiplex wird mittlerweile in die Fallarbeit routinemäßig eingesetzt. Spuren mit degradierter DNA und geringer DNA-Menge können erfolgsversprechend analysiert werden. Aufgrund seiner Robustheit und Beständigkeit liefert der Multiplex Q8 adäquate Typisierungsergebnisse.

4.7.1 Ausblick

Eine weitere Reduktion der Amplikonlängen wird in Zukunft angestrebt werden. Die Primer werden dabei so nah wie möglich an die Repeatstruktur gelegt. Damit es zu keiner Überlappung der gleich markierten Loci kommt, kann den Primern am 5´-Ende eine DNA-Sequenz, die im menschlichen Genom nicht vorkommt, oder ein Moleküle angehängt werden, das die Laufeigenschaften des Amplikons verändert.

Zusätzlich besteht die Möglichkeit, in die Primer so genannte „locked nucleic acids“ (LNAs) einzubauen, die eine stärkere Hybridisierung mit der Template-DNA hervorrufen. Eine neuartige Abwandlung der Primer für eine Erhöhung der Affinität stellen die LNAs (locked nucleic acid) dar [16,17,54,172,182,189]. LNAs werden als Oligonukleotide definiert, die mindestens ein LNA-Monomer, d.h. ein 2´-O,4´-C-Methylen-β-ribofuranosyl-Nukleotid enthalten. Die LNA-Monomere sind demnach modifizierte RNA-Nukleotide. Die Ribose ist dabei durch eine zusätzliche Brücke ausgestattet, die das 2´ und das 4´ Kohlenstoffatom verbindet, so dass ein bizyklisches RNA-Analogon geformt wird. Die LNAs binden sehr effizient an die komplementären Nukleinsäuren, liefern eine verminderte Empfänglichkeit für Nukleasen und sind kommerziell verfügbar. Sie weisen eine sehr hohe thermische Stabilität auf. Dies darf bei der Primersynthese nicht außer Acht gelassen werden, da die Schmelztemperatur teilweise stark erhöht werden kann, falls mehrere LNA Basen in den Primer eingebaut werden. In kurzen Oligonukleotiden wird gewöhnlich lediglich eine LNA Base zentral eingesetzt. Die erhöhte Stabilität der LNAs beruht möglicherweise auf eine günstige Entropieverteilung wegen des präorganisierten (präzise positionierten) LNA, kombiniert mit dem effizienteren Stapeln der Nukleobasen. Die Einführung zu vieler Modifikationen bringt eine radikale Veränderung in der Helix-Konformation mit sich und wirkt sich nachteilig auf die Amplifikation aus [16,17]. Bei der Anwendung LNAs muß sichergestellt werden, dass die Position der LNA-Monomere die Polymerase-Aktivität nicht beeinflußt und die LNA-Primer aufgrund der stärkeren Affinität und Duplex-Konformationsänderung der LNA-Primer/Template keine leichten Fehlpaarungen eingehen. Ballantyne et al substituierten 1-3 LNA Nukleotide für die entsprechenden DNA Nukleotide, die Nukleotid-Sequenzen des Primers bleibt unverändert [16,17]. Nur Adenin wurde zu LNA konvertiert, da Adenin unter den

LNAs die schwächste Bindung erzeugt. Die LNAs wurden überwiegend an die 5´Region des Primers eingefügt, da dieses Design vermutlich eine erhöhte Spezifität und Amplifikation mit sich bringt. LNAs sollten in Zukunft weiter erforscht werden. Tolstrup et al stellen eine Software vor, welches sich mit den Schlüsselfragen im Design optimaler LNA Oligonukleotide befasst und mit dem unter Berücksichtigung mehrerer Parameter optimale LNA Oligonukleotide gebastelt werden können [182]. Das Programm OligoDesign ist frei zugänglich unter http://Inatools.com. Die Synthese ist jedoch bedauerlicherweise unverschämt teuer.

Eine Doppelmarkierung der Primer würde zu einem stärken Lichtsignal führen, was gerade bei den schwächeren Fluoreszenzfarbstoffen sinnvoll scheint. Eine sterische Hinderung der internen Marker muß dabei ausgeschlossen werden, der optimale Abstand des internen Farbstoffes zum Farbstoff am 5´Ende des Primers muß ermittelt werden.

In der Zwischenzeit wurde der Multiplex Q8 um drei Systeme D2S1338, D16S539, D19S433 erweitert (Q11), die für einen europäischen Abgleich im Gespräch sind. Das Konzept wurde dabei von vier auf fünf Farben umgestellt. Die neuen Systeme wurden mit ATTO565 (rot) markiert, die Fluoreszenzfarbe TET wurde mit ATTO550 (schwarz) ersetzt, die Fluoreszenzfarbe FAM (blau) und JOE (grün) blieben erhalten und der Längenstandard wurde mit Dy630 (Dyomics=Orn) markiert. Der Multiplex Q11 soll im weiteren Verlauf mit dem AmpFℓSTR®SEfiler Plus™ (AB) verglichen werden.

Eine Inhibitionskontrolle und der Marker SRY wurden dem Q11-Multiplex ergänzt. Beide Marker wurden FAM-markiert und vor dem System Amelogenin platziert. Bei der Inhibitionskontrolle handelt es sich um eine parallel positive Kontrolle, da eine coamplifizierte Inhibitionskontrolle zeit- und arbeitsaufwendig ist. Vorsicht ist allerdings geboten, dass nicht zu viel exogene DNA zum Mix zugefügt wird, da sonst trotz Inhibition eine Amplifikation der exogenen DNA erfolgt und das falsch negative Typisierungsergebnis nicht erkannt wird.

Der Marker SRY ermöglicht die Erkennung eines männlichen Profils bei schwachem Amelogenin. Das SRY zeigt anfangs eine unvollständige Adenylierung. Um eine vollständige Adenylierung zu gewährleisten wird häufig ein GTTTCTT- Schwanz oder nur ein G bzw. GTGTCTT ans 5´Ende der reversen, nicht gelabelten Primer angehängt [11]. Die Zugabe von 4 µl eines Gemisches aus

0,25 U *Taq* DNA Polymerase und 1x PCR Puffer nach der PCR und Inkubation bei 72°C für 45 Minuten verbessert die Adenylierung [138]. In dieser Studie konnte durch den Einbau der GTTTCTT-Sequenz keine vollständige Adenylierung erzielt werden, erst durch die Veränderung der Primersequenz.

4.8 Der STR Multiplex Y13

Mikrosatelliten (Repeats aus 1-6 bp) können einfach oder komplex zusammengebaut sein. Einfache Mikrosatelliten bestehen aus einer Art sich wiederholender Einheit in einer nicht unterbrochenen (homogenen) Matrix. Die durchschnittliche Repeatzahl korreliert mit der Repeatvarianz [91]. Komplexe Mikrosatelliten bestehen aus mehr als einer Art sich wiederholender Repeats und/oder enthalten Unterbrechungen. Die durchschnittliche Repeatzahl der längsten homogenen Matrix, die normalerweise der polymorphe Part darstellt, korreliert mit der Repeatvarianz. Die Anwesenheit weiterer Repeats steigert die Varianz über den Wert, der für einfache Mikrosatelliten mit einer Repeatzahl der homogenen Matrix erwartet wird, unter den Wert, der für einfache Mikrosatelliten mit einer Repeatzahl des ganzen Komplexes erwartet wird.
Die meisten Y-STR Marker sind single-copy Loci [37]. Trotzdem treten gelegentlich Y-STR Duplikationen und Triplikationen auf. Grund dafür sind die wenigen Gene auf dem Y-Chromosom und die vielen euchromatischen Regionen. Die Sequenzen in den euchromatischen Regionen treten zahlreich öfters als einmal auf, häufig im palindromischen Muster. So entstehen Insertions-Polymorphismen in weiten Bereichen des Y-Chromosoms. Eine Anhäufung dieser Insertionen erfolgt durch fehlende Rekombination. Der Duplikation- und Divergenz-Prozess läuft ab wie folgt: Ein Abschnitt a wird verdoppelt und an anderer Stelle eingebaut. Abschnitt a mutiert zu Abschnitt b, indem es eine Repeat-Einheit verliert oder gewinnt. Single-Step-Mutationen sind bei STR-Markern am häufigsten. Die durchschnittliche Mutationsrate liegt bei etwa $2{,}8 \times 10^{-3}$ Veränderungen pro Generation [73]. Marker, die nahe beieinander auf dem Y-Chromosom lokalisiert sind, können auf diese Art zusammen dupliziert werden. Die Unterscheidung, ob die Probe von mehreren männlichen Personen verursacht wurde oder ob es sich bei den doppelten Allelen um Duplikationen handelt, ist

teilweise schwierig zu interpretieren. Umso mehr Loci mehr als ein Allel aufweisen, umso wahrscheinlicher handelt es sich bei der Probe um ein Gemisch. Falls mehr als ein Locus multiple Allele zeigt, muß abgeklärt werden, ob die Loci in unmittelbarer Nähe auf dem Chromosom lokalisiert sind. Falls dies der Fall ist, scheint eine Duplikation wahrscheinlicher. Unterscheiden sich die Allel um eine Repeateinheit, handelt es sich vermutlich um Duplikationen. Eine Locus Duplikation erschwert zwar teilweise die Probeninterpretation, kann aber auch eine größere Klarheit liefern zwischen zweier Proben, da die Duplikation in beiden Proben auftreten muß [37].

Hoch polymorphe STR-Loci bringen eine hohe Mutationsrate mit sich, da eine Korrelation zwischen dem Grad des Polymorphismus und der Mutationsrate eines Locus existiert [103]. Spontane Mutationen in der Keimbahn können auftreten. Daher ist bei Vaterschaftstests Vorsicht geboten, damit es zu keinem falschen Ausschluss kommt wegen Differenzen auf dem Y-Chromosom zwischen dem Putativvater und dem Sohn. Die Locus-spezifischen Mutationsraten liegen zwischen 0,0 und 19,0 x 10^{-3} pro Generation und die durchschnittliche Mutationsrate liegt bei 3,9 x 10^{-3}. Das Alter des Vaters spielt dabei keine Rolle, das heißt ein älterer Erzeuger führt eine Mutation in der Keimbahn nicht wahrscheinlicher mit sich [103]. Wegen dem Unterschied der Allelfrequenzen unter Populationen können allelspezifische oder locusspezifische Mutationsraten bis zu einem gewissen Grad variieren.

Viele STR-Multiplexe enthalten den Marker Amelogenin, um neben der Identität das Geschlecht zu identifizieren [39]. Der Amelogenin Locus ist ein „single copy gene“, das im X- und Y-Chromosom homolog existiert und sich in der Länge und Sequenz unterscheidet. Das X-Chromosome besitzt eine 6 bp Deletion, das Amplifikationsprodukt des X-Chromosoms ist demnach um 6 bp kürzer als das des Y-Chromosoms. Eine Mutation in der Primerbinderegion des Y-Chromosoms würde zu einem falschen, nämlich weiblichen Ergebnis führen. Der Dropout ist jedoch eher Folge einer Deletion, nicht einer Punktmutation in der Primer-Annealing Region. Die Deletion bei 5 von 77 Männern aus dem Nepal beispielsweise erstreckte sich auf dem kurzen Arm (p-Arm) über 2,3 Mb von dem sY1242 Locus bis zum sY2180 Locus [39]. In diesem Abschnitt befindet sich der Locus Amelogenin. Die Vermutung, dass diese fünf Individuen dieselbe Haplogruppe haben, konnte bestätigt werden. Die Deletion ist vorherrschender in

einer charakteristischen Region in der Welt, besonders im indischen Subkontinent. Die Deletion lässt auf einen gemeinsamen Vorfahren schließen [39]. Ob die Deletion in anderen Populationen an eine gemeinsame Abstammung gebunden ist oder aber an unabhängige Mutationen, muß erst noch untersucht werden. Daher ist es ungünstig Primer für diesen Bereich zu designen.

In den Y-STR Multiplex sollten keine Primer für die autosomale oder X-chromosomale Typisierung hinzugefügt werden, da bei Mischspuren aus weiblichen und männlichen Zellen das Primerpaar für die X-chromosomale oder autosomale Typisierung „off-scale“ Allele und hohen Hintergrund verursacht, falls die weibliche DNA im großen Überschuss präsent ist [145].

Der Typisierungserfolg liegt bei Mischspuren mit hohem Anteil weiblicher DNA und geringem Anteil männlicher DNA bei der Y-chromosomalen Typisierung deutlich höher als bei der autosomalen Typisierung. Durch die Anwendung des Y-STR-Multiplex-Kits können so auch nach Vergewaltigungen ein Profil der männlichen DNA erstellt und die Zahl der männlichen Spurenverursacher festgestellt werden. Bei Vergewaltigungsfällen enthalten etwa 13% der untersuchten Proben männliche DNA von mehr als einem Samenspender [145]. Diese Zahl liegt vermutlich noch etwas höher, da die Locuskombinationen mehrere gängige Haplotypen in jeder ethnischen Gruppe widerspiegelt und in Bandenvergewaltigungen häufig Brüder und andere männlichen Verwandten involviert sind.

Die Ergebnisse der Y-STR-Typisierung können nicht nur einen einzelnen Verdächtigen entlasten, sondern auch alle seine Brüder, wenn sie denselben Vater haben.

Der Multiplex Y13 konnte erfolgreich bei Mischspuren mit weiblicher und männlicher DNA angewandt werden. Dabei lag das Mischungsverhältnis, bei dem noch ein vollständiges männliches Profil erzeugt werden konnte, beim PowerPlex® Y geringfügig höher als beim Y13-Multiplex. Möglicherweise ist dies auf die verschiedenen Puffersysteme zurückzuführen. In beiden STR-Multiplexen wurde die Polymerase Ampli*Taq* Gold verwendet und der GoldSt*r Buffer im PowerPlex® Y bzw. der GeneAmp 10x PCR Buffer II im Multiplex Y13.

Mann-Mann-Mischspuren konnten mit beiden Y-STR-Multiplex-Kits erfolgreich analysiert werde. Der Erfolg der Y-chromosomalen Typisierung war dabei in beiden Kits deckungsgleich, da möglicherweise das Mischungsverhältnis nicht so hoch gelegt wurde wie bei den Mann-Frau-Mischspuren.

Aufgrund der Reduktion der Amplikonlängen im Multiplex Y13 um 21% im Vergleich zum PowerPlex® Y lag der Typisierungserfolg bei Spuren mit degradier männlicher DNA beim Multiplex Y13 höher als beim PowerPlex® Y. Aufgrund der sensitiven Fluoreszenzfarben FAM, JOE und TET konnten Spuren mit männlicher LCN-DNA erfolgreich analysiert werde.

Die Diversität des minimalen Haplotypen liegt weltweit zwischen 0,5699 für Zriba in Tunesien und 1,00000 für Wien in Österreich, Alcamo in Italien oder Ankara in der Türkei (Y-STR Haplotype Reference Database, www.yhrd.org). Die SWGDAM (scientific working group on DNA analysis methods) hat neulich empfohlen, den Haplotypen um die Loci DYS438 und DYS439 zu erweitern.

In Europa existiert eine Y-STR DNA-Datenbank, die den „erweiterten Haplotypen“ beinhaltet, der im Vergleich zum minimalen Haplotypen zusätzlich den Y-STR Marker YCAII enthält (siehe auch http://ystr.charite.de). DYS385, DYS389 und YCAII haben verdoppelte Regionen und können folglich zwei polymorphe Peaks liefern. Mit der Verwendung dieses „erweiterten Haplotyps“ ist es möglich, 74-90% der männlichen Individuen in verschiedenen europäischen Populationen zu unterscheiden [34].

4.9 Schlussbetrachtung

Bei abschließender Betrachtung der vorliegenden Ergebnisse lassen sich folgende Punkte festhalten:

- Eine optimale DNA-Isolation ist eine Grundvoraussetzung einer erfolgreichen STR-Typisierung. Gerade bei Spuren mit degradierter und LCN-DNA bzw. mit intrinsischen oder extrinsischen inhibitorischen Substanzen ist es um so wichtiger, den DNA-Verlust während der Extraktion so gering wie möglich zu halten und gleichzeitig die Inhibitoren von der DNA zu trennen. Eine GEN-IAL-Extraktion mit kombinierter Glasmilch-Aufreinigung ist prädestiniert dafür. Optimiert und getestet wurde

dieses Extraktionsverfahren vorwiegend an Haaren mit telogener Wurzeln und Haarschäften. Der Inhibitor Melanin konnte damit in den meisten Fällen vollständig entfernt werden und gleichzeitig konnte der isolierte DNA-Ertrag gesteigert werden. Dieses Verfahren konnte ebenso bei weiteren Spuren aus der Fallarbeit mit degradierter und LCN-DNA sowie für verunreinigte Spuren bzw. Spuren mit potenziellen inhibitorischen Substanzen erfolgreich angewandt werden. Dieses Extraktionsverfahren ist somit eine für die forensische Spurenkunde erfolgreiche Methode der DNA-Isolation.

- Da inhibitorischen Substanzen während der DNA-Extraktion nicht immer vollständig von der DNA getrennt werden und die anschließende PCR hemmen können, wurden einige PCR-Additive, sozusagen Inhibitoren der Inhibitoren, und Kombinationen aus Additiven getestet. Es konnte kein Additiv gefunden werden, das effektiv ist gegen eine inhibitorische Substanz. Eine geringfügige Reduktion des inhibitorischen Effekts konnte gelegentlich festgestellt werden.

  Es konnten jedoch DNA-Polymerasen und Polymerase-Kombinationen ausfindig gemacht werden, die gegen eine Vielzahl an inhibitorischen Substanzen nahezu immun sind. Gleichzeitig können sie in der forensischen Fallarbeit angewandt werden, da sie sehr effizient arbeiten und nur eine geringe Ausgangsmenge an DNA benötigen. Darunter zählen die AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) und die Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega).

  Das Erkennen eines Inhibitors und seiner hemmenden Wirkungsweise ist ausschlaggebend für eine erfolgreiche Amplifikationsreaktion. Kennt man die Wirkungsweise der inhibitorischen Substanz, können weitere PCR-Optimierungen erfolgen. Melanin beispielsweise lagert sich nicht nur an die DNA-Polymerase, sondern fängt zudem Mg^{2+}-Ionen ab. So konnte durch eine Erhöhung beider Reaktionskomponenten trotz Präsenz des Inhibitors Melanin eine effiziente PCR erzielt werden.
- Der STR-Multiplex Q8 konnte aufgrund seiner reduzierten Amplikonlängen erfolgreich bei Spuren mit degradierter DNA angewandt werden. Da er aus den acht autosomalen Systemen der Deutschen DNA-Datenbank und dem Geschlechtstypisierungsmarker Amelogenin besteht, ist ein deutschland-weiter Abgleich möglich. Bedingt durch seine hohe Sensitivität und

Beständigkeit konnten Spuren mit LCN-DNA erfolgreich analysiert werden. Da heutzutage an Tatorten immer häufiger biologische Spuren gesichert werden, die degradierte DNA und/oder geringe DNA-Mengen enthalten, ist das Q8-Konzept eine für die forensische Genetik erfolgreiche Methode der DNA-Typisierung.

- Eine Y-chromosomale STR-Typisierung ist von großem Vorteil, falls die biologische Spur aus einer Mischspur mit Überschuss an weiblicher DNA und geringem Anteil männlicher DNA besteht. Der Multiplex Y13 konnte zudem aufgrund seiner kurzen Amplikonlängen erfolgreich bei Spuren mit degradierter DNA einer männlichen Person angewandt werden.

5 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Optimierung des DNA-Extraktionsverfahrens und der Amplifikationsreaktion. Zudem wurden zwei Multiplex-Konzepte für die Y-chromosomale und autosomale STR-Typisierung erstellt. Biologische Spuren mit degradierter DNA und geringer DNA-Menge sowie Spuren mit potenziellen inhibitorischen Substanzen bildeten den Untersuchungsschwerpunkt.

Eine GEN-IAL-Extraktion mit kombinierter Glasmilch-Aufreinigung zeigte sich erfolgsversprechend in der DNA-Isolation und im Entfernen inhibitorischer Substanzen.

Eine PCR-Opitimierung über die Verwendung von PCR-Additiven war eingeschränkt möglich. Die PCR-Effizienz konnte jedoch u.a. durch Enzyme wie die AccuPrime™ *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) und Go*Taq*® Hot Start Polymerase (Promega) aufgrund der geringen Empfindlichkeit gegenüber einer Vielzahl an inhibitorischen Substanzen, die eine direkte Hemmung des Enzyms verursachen, deutlich gesteigert werden. Eine Konzentrationserhöhung der Reaktionskomponenten, führte zudem zu einer PCR-Optimierung, falls der Inhibitor eine oder mehrere Reaktionskomponenten abfängt. So war beispielsweise die PCR trotz Präsenz des Melanins effizient, sobald die Konzentration der Ampli*Taq* Gold™ DNA-Polymerase (AB) und der Magnesiumionen erhöht wurde.

Der erste STR-Multiplex (Q8) besteht aus den autosomalen Systemen D3S1358, FGA, TH01, VWA, SE33/ACTBP2, D8S1179, D18S51, D21S11 und dem Geschlechtstypisierungsmarker Amelogenin. Aufgrund seiner reduzierten Amplikonlängen konnte er erfolgreich bei Spuren mit hoch degradierter DNA wie Haare mit telogener Wurzel und Knochen angewandt werden. Seine Sensitivität und Robustheit ermöglichte die Typisierung von Spuren mit geringem DNA-Gehalt. Des Weiteren ist der Multiplex Q8 informativ und beinhaltet die Deutschen DNA-Datenbankmarker, so dass ein Abgleich der Typisierungsergebnisse mit der nationalen Datenbank stattfinden kann.

Mittlerweile ist der Multiplex Q8 um die drei Systeme D2S1338, D16S539, D19S433 erweitert worden, die für einen europäischen Abgleich im Gespräch sind (Multiplex Q11). Eine interne Inhibitionskontrolle und der Marker SRY wurden ergänzt.

Der zweite Multiplex (Y13) besteht aus Y-chromosomalen STRs. Er beinhaltet die Systeme DYS391, DYS439, DYS390, DYS385 a+b, DYS389 I/II, DYS392, DYS388, DYS393, DYS19, DYS437, DYS438. Der Multiplex Y13 konnte aufgrund seiner kurzen Amplikonlängen erfolgreich bei Spuren mit degradierter männlicher DNA angewandt werden. In Mischspuren mit Überschuss an weiblicher DNA und geringem Anteil männlicher DNA konnte das Y-chromosomale STR-Profil der männlichen Person detektiert werden.

Da an Tatorten heutzutage vermehrt biologische Spuren gesichert werden, die eine Herausforderung in der forensischen Spurenkunde darstellen, sollte auch in Zukunft die Optimierung der DNA-Isolation und Amplifikationsreaktion angestrebt werden. Der Nachweis inhibitorischer Substanzen und die Erforschung derer Hemmwirkungen kann dafür eine wichtige Errungenschaft sein. Sensitive STR-Multiplexe mit reduzierten Amplikonlängen tragen zu einer erfolgreichen Typisierung bei, könnten jedoch weiter optimiert werden, indem beispielsweise durch eine Doppelmarkierung der Primer die Sensitivität des STR-Kits gesteigert wird. Des Weiteren könnte man den Primern am 5´-Ende eine DNA-Sequenz, die im menschlichen Genom nicht existiert, oder ein Moleküle anhängen, das die Laufeigenschaften des Amplikons verändert, so dass es bei dem Versuch, die Primer so nah wie möglich an die Repeatstruktur zu legen, zu keiner Überlappung der PCR-Produkte kommt. Eine neuartige Abwandlung der Primer für eine Erhöhung der Affinität und daraus resultierenden stärkeren Hybridisierung mit der Template-DNA stellen die LNAs (locked nucleic acid) dar. LNAs werden als Oligonukleotide definiert, die mindestens ein LNA-Monomer, d.h. ein 2´-O,4´-C-Methylen-β-ribofuranosyl Nukleotid enthalten.
Aufgrund der vielen biologischen Spurenarten und der massigen Zahl an bisher bekannten inhibitorischen Substanzen mit der breit gefächerten Bande an Wirkungsweisen wird deutlich, wie schwierig es sein wird, diese Vorhaben zu erzielen. Aber der Weg dahin ist bereits ein bedeutender Schritt, der sich lohnt, für eine erfolgreiche Spurenanalyse und Aufdeckung einer Straftat.

6 Literaturverzeichnis

1. Abu Alu-Soud W, Jönsson LJ, Radström P: Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. J Clin Microbiol 38(1): 345-350 (2000)

2. Abu Alu-Soud W, Radström P: Purifaction and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. J Clin Microbiol 39(2): 485-493 (2001)

3. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K: Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. J Forensic Sci 39(2): 362-372 (1994)

4. Akbari M, Hansen MD, Halgunset J, Skorpen F, Krokan HE: Low Copy Number DNA Template Can Render Polymerase Chain Reaction Error Prone in a Sequence-Dependent Manner. J Mol Diagn 7(1): 36-39 (2005)

5. Amicosante M, Richeldi L, Trenti G, Paone G, Campa M, Bisetti A, Saltini C: Inactivation of Polymerase Inhibitors for *Myobacterium tuberculosis* DNA Amplification in Sputum by using capture resin. J Clin Microbiol 33(3): 629-630 (1995)

6. Amory S, Keyser C, Crubézy E, Ludes B: STR typing of ancient DNA extracted from hair shafts of Siberian mummies. Forensic Sci Int 166: 218-229 (2007)

7. Annunziata O, Asherie N, Lomakin A, Pande J, Ogun O, Benedek GB: Effect of polyethylene glycol on the liquid-liquid phase transition in aqueous protein solutions. Proc Natl Acad Sci 99(22): 14165-14170 (2002)

8. Anslinger K, Bayer B, Rolf B: Comparative investigation of hair roots with the genRES®MPX-SP1-, genRES®MPX-SP2- and genRES®MPX-2-kits. Forensic Sci Med Path 3: 41-44 (2007)

9. Arnheim N, Li H, Cui X: PCR analysis of DNA sequences in single cells: Single sperm gene mapping and genetic disease diagnosis. Genomics 8: 415-419 (1990)

10. Asamura H, Fujimori S, Ota M, Fukushima H: MiniSTR multiplex systems based on non-CODIS loci for analysis of degraded DNA samples. Forensic Sci Int 173: 7-15 (2007)

11. Asamura H, Sakai H, Ota M, Fukushima H: MiniY-STR quadruplex systems with short amplicon lengths for analyzing degraded DNA samples. Forensic Sci Int: Genetics 1(1): 56-61 (2007)

12. Astner I, Schulze JO, van den Heuvel J, Jahn D, Schubert WD, Heinz DW: Crystal structure of 5-aminolevulinate synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans. EMBO J 24(18): 3166-3177 (2005)

13. Baasner A: Etablierung der Primer-Extension Preamplification (PEP) zur Steigerung der PCR-Sensitivität in der forensischen Spurenanalyse und die experimentelle Untersuchung der Genorte HumF13A1 und HumVWA an nukleärer Haarschaft-DNA. Inaugural-Dissertation, Hohe Medizinische Fakultät, Universität Köln (1997)

14. Bachmann B, Lüke W, Hunsmann G: Improvement of PCR amplified DNA sequencing with the aid of detergents. Nucleic Acids Res 18(5): 1309 (1990)

15. Bär W, Kratzer A, Mächler M, Schmid W: Postmortem stability of DNA. Forensic Sci Int 39: 59-70 (1988)

16. Ballantyne KN, van Oorschot RAH, Mitchell RJ: Locked nucleic acids: Increased trace DNA amplification success with improved primers. Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series 1(1): 4-6 (2008)

17. Ballantyne KN, van Oorschot RAH, Mitchell RJ: Increased amplification success from forensic samples with locked nucleic acids (Publikation in Vorbereitung)

18. Balogh MK, Burger J, Bender K, Schneider PM, Alt KW: Fingerprints from fingerprints. Int Congr Series 1239: 953-957 (2003)

19. Barbaro A, Falcone G, Barbaro A: DNA typing from hair shaft. Progress in Forensic Genetics 8: 523-525 (2000)

20. Baskaran N, Kandpal RP, Bhargava AK, Glynn MW, Bale A, Weissman SM: Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. Genome Res 6: 633-638 (1996)

21. Bélec L, Authier J, Eliezer-Vanerot MC, Piédouillet C, Si Mohamed A, Gherardi RK: Myoglobin as a polymerase chain reaction (PCR) inhibitor: A limitation for PCR from skeletal muscle tissue avoided by the use of *thermus thermophilus* polymerase. Muscle Nerve 21(8): 1064-1067 (1998)

22. Bender K, Schneider PM: Validation and casework testing of the BioPlex-11 for STR typing of telogen hair roots. Forensic Sci Int 101: 52-59 (2006)

23. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Biochemistry. WH Freeman and Company, New York (2002). Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=stryer.TOC&depth=2

24. Bickers DR: Treatment of the porphyrias: mechanisms of action. J Invest Dermatol 77(1): 107-113 (1981)

25. Böddinghaus B, Wichelhaus TA, Brade V, Bittner T: Removal of PCR inhibitors by silica membranes: Evaluating the amplicor *Mycobacterium tuberculosis* kit. J Clin Microbiol 39(10): 3750-3752 (2001)

26. De Boer SH, Ward LJ, Li X, Chittaranjan S: Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. Nucleic Acids Res 23(13): 2567-2568 (1995)

27. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PME, van der Noordaa J: Rapid and simple method for purifaction of nucleic acids. J Clin Microbiol 28(3): 495-503 (1990)

28. Bourguignon L, Hoste B, Bonnen T, Vits K, Hubrecht F: A fluorescent microscopy-screening test for efficient STR-typing of telogen hair roots. Forensic Sci Int: Genetics 3(1): 27-31 (2008)

29. Brock TD, Freeze H: *Thermus aquaticus* gen. n. and sp. n., a Non-sporulating Extreme Thermophile. J Bacteriol 98(1): 289-297 (1969)

30. Broude NE, Zhang L, Woodward K, Englert D, Cantor CR: Multiplex allele-specific target amplification based on PCR suppression. Proc Natl Acad Sci USA 98: 206-211 (2001)

31. Brüderlein S, Müller K, Melzner J, Högel J, Wiegand P, Möller P: Different rates of telomere attrition in peripheral lymphocytes in a pair of dizygotic twins with hematopoietic chimerism. Aging Cell 7(5): 663-666 (2008)

32. Budowle B, Hobson DL, Smerick JB, Smith JAL: Low copy number – consideration and caution. Proceedings of the Twelfth International Symposium on Human Identification (2001). Available at: http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp12proc/contents/budowle.pdf

33. Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W: DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. Electrophoresis 20: 1722-1728 (1999)

34. Butler JM, Schoske R, Vallone PM, Kline MC, Redd AJ, Hammer MF: A novel multiplex for simultaneous amplification of 20 Y chromosome STR markers. Forensic Sci Int 129: 10-24 (2002)

35. Butler JM, Shen Y, McCord BR: The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. J Forensic Sci 48: 1054-1064 (2003)

36. Butler JM: Constructing STR Multiplex Assays. Methods Mol Biol 297: 53-66 (2005)

37. Butler JM, Decker AE, Kline MC, Vallone PM: Chromosomal duplications along the Y-Chromosome and their potential impact on Y-STR interpretation. J Forensic Sci 50(4): 853-859 (2005)

38. Butler JM: Introduction to Low Copy Number (LCN) DNA Testing Issues. Part of Forensic DNA Workshop at the Mid-Atlantic Association of Forensic Scientists meeting (Richmond, VA) (2006). Available at: http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/pub_pres/LCNintro_MAAFSworkshop_May2006.pdf

39. Cadenas AM, Regueiro M, Gayden T, Singh N, Zhivotovsky LA, Underhill PA, Herrera RJ: Male amelogenin dropouts: phylogenetic context, origins and implications. Forensic Sci Int 166: 155-163 (2007)

40. Carninci P, Nishiyama Y, Westover A, Itoh M, Nagaoka S, Sasaki N, Okazaki Y, Muramatsu M, Hayashizaki Y: Thermostabilization and thermoactivation of thermolabile enzymes by trehalose and its application for the synthesis of full length cDNA. Proc Natl Acad Sci 95: 520-524 (1998)

41. Chakrabarti R, Schutt CE: The enhancement of PCR amplification by low molecular weight amides. Nucleic Acids Res 29(11): 2377-2381 (2001)

42. Chakrabarti R, Schutt CE: The enhancement of PCR amplification by low molecular-weight sulfones. Gene 274: 293-298 (2001)

43. Chang BS, Hong WS, Lee E, Yeo SM, Bang IS, Chung YH, Lim DS, Mun GH, Kim J, Park SO, Shin DH: Ultramicroscopic observations on morphological changes in hair during 25 years of weathering. Forensic Sci Int 151: 193-200 (2005)

44. Chase JW, Williams KR: Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. Ann Rev Biochem 55: 103-136 (1986)

45. Chevet E, Lemaître G, Katinka MD: Low concentrations of tetramethylammonium chloride increase yield and specificity of PCR. Nucleic Acids Res 23(16): 3343-3344 (1995)

46. Chien A, Edgar DB, Trela JM: Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*. J Bacteriol 127(3): 1550-1557 (1976)

47. Chung DT, Drábek J, Opel KL, Butler JM, McCord BR: A Study on the Effects of Degradation and Template Concentration on the Amplification Efficiency of the STR Miniplex Primer Sets. J Forensic Sci 49(4): 733-740 (2004)

48. Chung U, Lee HY, Park MJ, Yang WI, Cho SH, Shin KJ: Evaluation of Nine Non-CODIS MiniSTR Loci to aid Analysis of Degraded DNA. Korean J Leg Med 30(2): 160-167 (2006)

49. Coble MD, Butler JM: Characterization of new miniSTR loci to aid analysis of degraded DNA. J Forensic Sci 50: 43-53 (2005)

50. Cone RW, Hobson AC, Huang MW: Coamplified positive control detects inhibition of polymerase chain reactions. J Clin Microbiol 30(12): 3185-3189 (1992)

51. Czubayko M : Herstellung der *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase und Untersuchung ihrer dNTP-Substrataffinität. Rer nat Dissertation, Universität Braunschweig (2000)

52. Davoren J, Vanek D, Konjhodzic R, Crews J, Huffine E, Parsons TJ: Highly effective DNA extraction method for nuclear STR testing of skeletal remains from mass graves. Croat Med J 48: 514-521 (2007)

53. Deggerdal A, Larsen F: Rapid Isolation of PCR-Ready DNA from Blood, Bone Marrow and Cultured Cells, Based on Paramagnetic Beads. BioTechiniques 22: 554-557 (1997)

54. Devor EJ: Locked nucleic acids (LNAs). Integrated DNA Technologies, Innovation & Precision in nucleic acid synthesis (2005). Available at http://www.idtdna.com/support/technical/technicalbulletinpdf/locked_nucleic_acids.pdf

55. Dizdaroglu M: Oxidativ damage to DNA in mammalian chromatin. Mutation Research 275: 331-342 (1992)

56. Dobberstein RC, Huppertz J, von Wurmb-Schwark N, Ritz-Timme S: Degradation of biomolecules in artificially aged teeth: Implications for age estimation based on aspartic acid racemization and DNA analysis. Forensic Sci Int 179: 181-191 (2008)

57. Eckhart L, Bach J, Ban J, Tschachler E: Melanin Binds Reversibly to Thermostable DNA Polymerase and Inhibits Its Activity. Biochem Biophys Res Commun 271: 726-730 (2000)

58. Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D: New insights on trehalose: a multifunctional molecule. Glycobiology 13(4): 17R-27R (2003)

59. Esteve A, Niederstätter H, Parson W: “GenderPlex”, a PCR-multiplex for reliable gender determination of degraded human DNA samples and complex gender constellations. Int J Legal Med (zur Publikation angenommen)

60. Ferri G, Colalongo C, Bini C, Pelotti S, Pappalardo G: DNA typing of hair shafts by microwave irradiation: Real or deceptive evidence? Int J Legal Med 115(2): 118-120 (2001)

61. Forbes BA, Hicks KE: Substances interfering with direct detection of *Myobacterium tuberculosis* in clinical specimens by PCR: Effects of bovine serum albumin. J Clin Microbiol 34(9): 2125-2128 (1996)

62. Forster L, Thomson J, Kutranov S: Direct comparison of post-28-cycle PCR purifaction and modified capillary electrophoresis methods with the 34-cycle “low copy number” (LCN) method for analysis of trace forensic DNA samples. Forensic Sci Int: Genetics 2: 318-328 (2008)

63. Franchis R, Cross NCP, Foulkes NS, Cox TM: A potent inhibitor of Taq Polymerase copurifies with human genomic DNA. Nucleic Acids Res 16(21): 10355 (1988)

64. Fuchs E: Scratching the surface of skin development. Nature 445: 834-842 (2007)

65. Giambernardi TA, Rodeck U, Klebe RJ: Bovine Serum Albumin Reverses Inhibition of RT-PCR by Melanin. BioTechniques 25: 564-566 (1998)

66. Gilbert MTP, Menez L, Janaway RC, Tobin DJ, Cooper A, Wilson AS: Resistance of degraded hair shafts to contaminant DNA. Forensic Sci Int 156: 208-212 (2006)

67. Gilbert MTP, Tomsho LP, Rendulic S, Packard M, Drautz DI, Sher A, Tikhonov A, Dalén L, Kuznetsova T, Kosintsev P, Campos PF, Higham T, Collins MJ, Wilson AS, Shidlovskiy F, Buigues B, Ericson PGP, Germonpré M, Götherström A, Iacumin P, Nikolaev V, Nowak-Kemp M, Willerslev E, Knight JR, Irzyk GP, Perbost CS, Fredrikson KM, Harkins TT, Sheridan S, Miller W, Schuster SC: Whole-genome shotgun sequencing of mitochondria from ancient hair shafts. Science 317(5846): 1927-1930 (2007)

68. Gilgen M, Höfelein C, Lüthy J, Hübner Ph: Hydroxyquinoline overcomes PCR inhibition by UV-damaged mineral oil. Nucleic Acids Res 23(19): 4001-4002 (1995)

69. Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J: An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100pg of DNA. Forensic Sci Int 112: 17-40 (2000)

70. Gill P: Application of Low Copy Number DNA Profiling. Croat Med J 42: 229-232 (2001)

71. Gouws P: International Grant report: The effect of PCR inhibitors in complex food samples. Microbiology today 56: 121 (2005)

72. Grubwieser P, Mühlmann R, Berger B, Niederstätter H, Pavlic M, Parson W: A new „MiniSTR-multiplex“ displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. Int J Legal Med 120: 115-120 (2006)

73. Gusmão 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 (ISFG): An update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. Forensic Sci Int 157: 187-197 (2006)

74. Hauge XY, Litt M: A study of the origin of ´shadow bands´seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR. Human Molec Genet 2(4): 411-415 (1993)

75. Hellmann A, Rohleder U, Schmitter H, Wittig M: STR typing of human telogen hairs – a new approach. Int J Legal Med 114: 269-273 (2001)

76. Hengen PN: Methods and reagents: Optimizing multiplex and LA-PCR with betaine. TiBS 22: 225-226 (1997)

77. Hering S, Nixdorf R, Dreßler J: Identification of more sequence variations in the D8S1179 locus. Forensic Sci Int 149: 275-278 (2005)

78. Heywood DM, Skinner R, Cornwell PA: Analysis of DNA in hair fibers. J Cosmet Sci 54: 21-27 (2003)

79. Higuchi R, von Beroldingen CH, Sensabaugh GF, Erlich HA: DNA typing from single hairs. Nature 332: 543-546 (1988)

80. Höss M, Pääbo S: DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purifaction method. Nucleic Acids Res 21(16): 3913-3914 (1993)

81. Hummel S: Ancient DNA typing. Springer, Berlin Heidelberg New York (2003)

82. Hung T, Mak K, Fong K: A specificity enhancer for polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res 18(16): 4953 (1990)

83. Inazu M, Mishima Y: Detection of Eumelanogenic and Pheomelanogenic Melanosomes in the Same Normal Human Melanocyte. J Invest Dermatol 100: 172-175 (1993)

84. Ito S: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analysis of Eu- and Pheomelanin in Melanogenesis Control. J Invest Dermatol 100: 166-171 (1993)

85. Iwasa F, Sassa S, Kappas A: δ-Aminolaevulinate synthase in human HepG2 hepatoma cells. Biochem J 262: 807-813 (1989)

86. Jacobs KA, Rudersdorf R, Neill SD, Dougherty JP, Brown EL, Fritsch EF: The thermal stability of oligonucleotide duplexes is sequence independent in teraalkylammonium salt solutions: application to identifying recombinant DNA clones. Nucleic Acids Res 16(10): 4637-4650 (1988)

87. Jefferies D, Farquharson C: Effects of choice of reverse-transcriptase enzyme and use of T4 gene 32 protein on banding patterns in agarose gel differential display. Analyt Biochem 308: 192-194 (2002)

88. Jehaes E, Gilissen A, Cassiman JJ, Decorte R: Evaluation of a decontamination protocol for hair shafts before mtDNA sequencing. Forensic Sci Int 94: 65-71 (1998)

89. Jung MJ, Comey CT, Baer DB, Budowle B: Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQα gene. Int J Legal Med 104: 145-148 (1991)

90. Junge A, Lederer T, Braunschweiger G, Madea B: Validation of the multiplex kit *gen*RESMPX-2 for forensic casework analysis. Int J Legal Med 117: 317-325 (2003)

91. 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: A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. Ann J Hum Genet 74: 1183-1197 (2004)

92. Kemp BM, Smith DG: Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. Forensic Sci Int 154: 53-61 (2005)

93. Kiesslich J, Radacher M, Neuhuber F, Meyer HJ, Zeller KW: On the use of Nitrocellulose membranes for dialysis-mediated purifaction of ancient DNA from human bone and teeth extracts. Ancient Biomol 4(2): 79-87 (2002)

94. Kim CH, Khan M, Morin DE, Hurley WL, Tripathy DN, Kehrli M Jr, Oluoch AO, Kakoma I: Optimization of the PCR for detection of *Staphylococcus aureus nuc* gene in bovine milk. J Dairy Sci 84: 74-83 (2001)

95. Kim K, Kim KY, Jeon E, Togloom A, Cho YO, Lee MS, Lkhagvasuren G, Choi JH, Tumen D, Park AJ, Kim KC, Park KW, Kim JH, Noh M, Yoo KJ, Lee KH: Technical Note: Improved ancient DNA purifaction for PCR using ion-exchange columns. Am J Phys Anthropol 136: 114-121 (2008)

96. Kloostermann AD, Kersbergen P: Efficacy and limits of genotyping low copy number (LCN) DNA samples by multiplex PCR of STR loci. J Soc Biol 197(4): 351-359 (2003)

97. Kovárová M, Dráber P: New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions. Nucleic Acids Res 28(13): e70,i-iv (2000)

98. Krauss G, Sindermann H, Schomburg U, Maass G: *Escherichia coli* single-strand deoxyribonucleic acid binding protein: Stability, specificity, and kinetics of complexes with oligonucleotides and deoxyribonucleic acid. Bochemistry 20: 5346-5352 (1981)

99. Krawetz SA, Pon RT, Dixon GH: Increased efficiency of the Taq polymerase catalyzed polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res 17(2): 819 (1989)

100. Kreader CA: Relief of Amplification Inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein. Appl Environ Microbiol 62(3): 1102-1106 (1996)

101. Lach C: Sequenzanalysen der drei humanen autosomalen STR-Systeme CD4, DHFRP2 und D8S306 für die DNA-Typisierung und ihre experimentelle Untersuchung an nukleärer DNA aus Haarschaften. Inaugural-Dissertation, Hohe Medizinische Fakultät, Universität Köln (2002)

102. Leat N, Ehrenreich L, Benjeddou M, Cloete K, Davison S: Properties of novel and widely studied Y-STR loci in three South African populations. Forensic Sci Int 168: 154-161 (2007)

103. Lee HY, Park MJ, Chung U, Lee HY, Yang WI, Cho SH, Shin KJ: Haplotypes and mutation analysis of 22 Y-chromosomal STRs in Korean father-son pairs. Int J Legal Med 121: 128-135 (2007)

104. Li Y, Korolev S, Waksman G: Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. EMBO J 17(24): 7514-7525 (1998)

105. Lim SK, Xue Y, Parkin EJ, Tyler-Smith C: Variation of 52 new Y-STR loci in the Y Chromosome consortium worldwide panel of 76 diverse individuals. Int J Legal Med 121: 124-127 (2007)

106. Lindahl T: Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362: 709-715 (1993)

107. Lis JT, Schleif R: Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. Nucleic Acids Res 2(3): 383-389 (1975)

108. Maher N, Dillon HK, Vermund SH, Unnasch TR: Magnetic bead capture eliminates PCR inhibitors in samples collected from airborne environment, permitting detection of *Pneumocystis carinii* DNA. Appl Environ Microbiol 67(1): 449-452 (2001)

109. Marko MA, Chipperfield R, Birnboim HC: A procedure for large-scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder. Analyt Biochem 121: 382-387 (1982)

110. Mayntz-Press KA, Sims LM, Hall A, Ballantyne J: Y-STR profiling in extended interval (≥3 days) postcoital cervicovaginal samples. J Forensic Sci 53(2): 342-348 (2008)

111. McConlogue L, Brow MAD, Innis MA: Structure-independent DNA amplification by PCR using 7-deaza-2´-deoxyguanosine. Nucleic Acids Res 16(20): 9869 (1988)

112. McKeown BJ: An acetylated (nuclease-free) bovine serum albumin in a PCR buffer inhibits amplification. BioTechniques 17: 246-248 (1994)

113. McNevin D, Wilson-Wilde L, Robertson J, Kyd J, Lennard C: Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair: Part 1. Review of current status and knowledge gaps. Forensic Sci Int 153: 237-246 (2005)

114. McNevin D, Wilson-Wilde L, Robertson J, Kyd J, Lennard C: Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair: Part 2. An optimised genomic DNA extraction procedure reveals donor dependence of STR profiles. Forensic Sci Int 153: 247-259 (2005)

115. Meissner C, Bruse P, Mueller E, Oehmichen M: A new sensitive short pentaplex (ShoP) PCR for typing of degraded DNA. Forensic Sci Int 166: 121-127 (2007)

116. Melchior WB, von Hippel PH: Alteration of the relative stability of dA · dT and dG · dC base pairs in DNA. Proc Nat Acad Sci 70(2): 298-302 (1973)

117. Meyerhans A, Vartanian JP, Wain-Hobson S: Strand specific PCR amplification of low copy number DNA. Nucleic Acids Res 20(3): 521-523 (1992)

118. Möller A, Brinkmann B: Extraction and PCR amplification of DNA from hair shafts. In: Bär W, Fiori A, Rossi U (Hrsg) Advances in Forensic Haemogenetics 5. Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 336-338 (1993)

119. Möller P, Mayer S, Mattfeldt T, Müller K, Wiegand P, Brüderlein S: Sex-related differences in length and erosion dynamics of human telomeres favor females. Aging 1(7): 1-7 (2009)

120. Monteiro L, Gras N, Megraud F: Magnetic Immuno-PCR assay with inhibitor removal for direct detection of *Helicobacter pylori* in human feces. J Clin Microbiol 39(10): 3778-3780 (2001)

121. Moreira D: Efficient removal of PCR inhibitors using agarose-embedded DNA preparations. Nucleic Acids Res 26(13): 3309-3310 (1998)

122. Moretti T, Koons B, Budowle B: Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase. BioTechniques 25(4): 716-722 (1998)

123. Müller K, Klein R, Miltner E, Wiegand P: Improved STR typing of telogen hair root and hair shaft DNA. Electrophoresis 28: 2835-2842 (2007)

124. Müller K, Klein R, Miltner E, Wiegand P: Q8-A short amplicon multiplex including the German DNA database systems. Forensic Sci Int: Genetics 1(2): 205-207 (2007)

125. Müller K, Brugger C, Klein R, Miltner E, Reuther F, Wiegand P: STR typing of hairs from domestic cats. Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series 1(1): 607-609 (2008)

126. Müller K, Braunschweiger G, Klein R, Miltner E, Wiegand P: Validation of the short amplicon multiplex Q8 including the German DNA database systems. J Forensic Sci 54(4): 862-865 (2009)

127. Murray C, Lowe A, Richardson P, Wivell R, Gill P, Tully G, Whitaker J: Use of Low copy number (LCN) DNA in forensic inference. Proceedings of the Twelfth International Symposium on Human Identification (2001). Available at: http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp12proc/contents/murray.pdf

128. Murray V, Monchawin C, England PR: The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. Nucleic Acids Res 21(10): 2395-2398 (1993)

129. Musso M, Bocciardi R, Parodi S, Ravazzolo R, Ceccherini I: Betaine, dimethyl sulfoxide, and 7-deaza-dGTP, a powerful mixture for amplification of GC-rich DNA sequences. J Mol Diagn 8(5): 544-550 (2006)

130. Myers TW, Gelfand DH: Reverse Transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. Biochem 30(31): 7661-7666 (1991)

131. Nagai M, Yoshida A, Sato N: Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. Biochem Int 44(1): 157-163 (1998)

132. Nagy M, Otremba P, Krüger C, Bergner-Greiner S, Anders P, Henske B, Prinz M, Roewer L: Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purifaction technology in forensics. Forensic Sci Int 152: 13-22 (2005)

133. Nozawa H, Yamamoto T, Uchihi R, Yoshimoto T, Tamaki K, Hayashi S, Ozawa T, Katsumata Y: Purifaction of nuclear DNA from single hair shafts for DNA analysis in forensic sciences. Legal Med 1: 61-67 (1999)

134. Ortonne JP, Prota G: Hair melanins and hair color: Ultrastructural and biochemical aspects. J Invest Dermatol 101: 82S-89S (1993)

135. Pääbo S, Irwin DM, Wilson AC: DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification. J Biol Chem 265(8): 4718-4721 (1990)

136. Panaccio M, Lew A: PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. Nucleic Acids Res 19(5): 1151 (1991)

137. Park MJ, Lee HY, Chung U, Kang SC, Shin KJ: Y-STR analysis of degraded DNA using reduced-size amplicons. Int J Legal Med 121: 152-157 (2007)

138. Parkin EJ, Kraayenbrink T, van Driem GL, Tshering of Gasel K, de Knijff P, Jobling MA: 26-Locus Y-STR typing in a Bhutanese population sample. Forensic Sci Int 161: 1-7 (2006)

139. Perch-Nielsen IR, Bang DD, Poulsen CR, El-Ali J, Wolff A: Removal of PCR inhibitors using dielectrophoresis as a selective filter in a microsystem. Lab Chip 3: 212-216 (2003)

140. Pfeiffer H, Hühne J, Ortmann C, Waterkamp K, Brinkmann B: Mitochondrial DNA typing from human axillary, pubic and head hair shafts – succes rates and sequence comparisons. Int J Legal Med 112: 287-290 (1999)

141. Phipps M, Petricevic S: The tendency of individuals to transfer DNA to handled items. Forensic Sci Int 168: 162-168 (2007)

142. Pötsch L, Bender K: Untersuchungen zu möglichen Mechanismen einer PCR-Hemmung in Haarextrakten durch Melanine. Rechtsmedizin 11: 42-45 (2001)

143. Poinar HN,Hofreiter M, Spaulding WG, Martin PS, Stankiewicz BA, Bland H, Evershed RP, Possnert G, Pääbo S: Molecular coproscopy: dung and diet of the extinct ground sloth *Nothrotheriops shastensis*. Science 281: 402-406 (1998)

144. Price K, Linge C: The presence of melanin in genomic DNA isolated from pigmented cell lines interferes with successful polymerase chain reaction: a solution. Melanoma Res 9: 5-9 (1999)

145. Prinz M, Ishii A, Coleman A, Baum HJ, Shaler RC: Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex. Forensic Sci Int 120: 177-188 (2001)

146. Queiroz APS, Santos FM, Sassaroli A, Hársi CM, Monezi TA, Mehnert DU: Electropositive filter membrane as an alternative for the elimination of PCR inhibitors from sewage and water samples. Appl Environ Microbiol 67(10): 4614-4618 (2001)

147. Radström P, Knutsson R, Wolffs P, Lövenklev M, Löfström C: Pre-PCR processing: Strategies to generate PCR-compatible samples. Mol Biotechnol 26(2):133-146 (2004)

148. Rajendrakumar CSV, Suryanarayana T, Reddy AR: DNA helix destabilization by proline and betaine: possible role in the salinity tolerance process. FEBS Lett 410(2-3): 201-205 (1997)

149. Ramos MD, Lalueza C, Girbau E, Pérez-Pérez A, Quevedo S, Turbón D, Estivill X: Amplifying dinucleotide microsatellite loci from bone and tooth samples of up to 5000 years of age: more inconsistency than usefulness. Hum Genet 96: 205-212 (1995)

150. Randall VA, Thornton MJ, Messenger AG, Hibberts NA, Loudon ASI, Brinklow BR: Hormones and Hair Growth: Variations in Androgen Receptor Content of Dermal Papilla Cells Cultured from Human and Red Deer (*Cervus Elaphus*) Hair Follicles. J Invest Dermatol 101: 114-120 (1993)

151. Ratnamohan VM, Cunningham AL, Rawlinson WD: Removal of inhibitors of CSF-PCR to improve diagnosis of herpesviral encephalitis. J Virol Methods 72: 59-65 (1998)

152. Redd AJ, Agellon AB, Kearney VA, Contreras VA, Karafet T, Park H, de Knijff P, Butler JM, Hammer MF: Forensic value of 14 novel STRs on the human Y chromosome. Forensic Sci Int 130: 97-111 (2002)

153. Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS, Pace NR: Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 58(10): 3417-3418 (1992)

154. Riddle RD, Yamamoto M, Engel JD: Expression of delta-aminolevulinate synthase in avian cells: separate genes encode erythroid-specific and nonspecific isozymes. Proc Natl Acad Sci USA 86: 792-796 (1989)

155. Robbins CR: Chemical and Physical Behavior of Human Hair. Springer, New York Berlin Heidelberg (2002)

156. Roberts KA, Calloway C: Mitochondrial DNA amplification success rate as a function of hair morphology. J Forensic Sci 52(1): 40-47 (2007)

157. Rodig H, Roewer L, Gross A, Richter T, de Knijff P, Kayser M, Brabetz W: Evaluation of haplotype discrimination capacity of 35 Y-chromosomal short tandem repeat loci. Forensic Sci Int 174: 182-188 (2008)

158. Ruano G, Fenton W, Kidd KK: Biphasic amplification of very dilute DNA samples via `booster` PCR. Nucleic Acids Res 17(13): 5407 (1989)

159. Ruano G, Kidd KK, Stephens JC: Haplotype of multiple polymorphisms resolved by enzymatic amplification of single DNA molecules. Proc Natl Acad Sci 87: 6296-6300 (1990)

160. Ruano G, Brash DE, Kidd KK: PCR: The first few cycles. Amplifications: A forum for PCR users (The Perkin-Elmer Corporation) 7: 1-4 (1991)

161. Rüttimann C, Cotorás M, Zaldívar J, Vicuña R: DNA polymerases from the extremely thermophilic bacterium *Thermus thermophilus* HB-8. Eur J Biochem 149: 41-46 (1985)

162. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE: Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. Nucleic Acids Res 18(21): 6409-6412 (1990)

163. Sarkar G, Kapelner S, Sommer SS: Formamid can dramatically improve the specificity of PCR. Nucleic Acids Res 18(24): 7465 (1990)

164. Sato H, Matsuda H, Kubota S, Kawano K: Statistical comparison of dog and cat guard hairs using numerical morphology. Forensic Sci Int 158: 94-103 (2006)

165. Satoh Y, Takasaka N, Hoshikawa Y, Osaki M, Ohfuji S, Ito H, Kaibara N, Kurata T, Sairenji T: Pretreatment with Restriction Enzyme or Bovine Serum Albumin for Efective PCR Amplification of Epstein-Barr Virus DNA in DNA Extracted from Paraffin-Embedded Gastric Carcinoma Tissue 36(11): 3423-3425 (1998)

166. Satyamoorthy K, Li G, Van Belle PA, Elder DE, Herlyn M: A versatile method for the removal of melanin from ribonucleic acids in melanocytic cells. Melanoma Res 12: 449-452 (2002)

167. Schablik M, Feher Z, Zsindely A, Szabo G: The effect of polyethylene glycol upon DNA uptake in Neurospora crassa. Acta Biol Acad Sci Hung 32(1): 83-86 (1981)

168. Schmerer WM, Hummel S, Herrmann B: Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. Electrophoresis 20: 1712-1716 (1999)

169. Schmidt D, Pape W, Stich W: Der erythrozytäre Delta-Aminolävulinsäure-Metabolismus unter Einwirkung von Hämstoffwechselprodukten. Buch, Band XXVI: 333-338 (1973)

170. Schoske R, Vallone PM, Kline MC, Redman JW, Butler JM: High-throughput Y-STR typing of U.S. populations with 27 regions of the Y chromosome using two multiplex assays. Forensic Sci Int 139: 107-121 (2004)

171. Schwarz K, Hansen-Hagge T, Bartram C: Improved yields of long PCR products using gene 32 protein. Nucleic Acids Res 18(4): 1079 (1990)

172. Simeonov A, Nikiforov TT: Single nucleotide polymorphism genotyping using short, fluorescently labeled locked nucleic acid (LNA) probes and fluorescence polarization detection. Nucleic Acids Res 30(17): e91, 1-5 (2002)

173. Singer MA, Lindquist S: Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. Trends Biotechnol 16: 460-468 (1998)

174. Sørensen E, Hansen SH, Eriksen B, Morling N: Application of thiopropyl sepharose 6B for removal of PCR inhibitors from DNA extracts of a thigh bone recovered from the sea. Int J Legal Med 117(4): 245-247 (2003)

175. Spiess AN, Ivell R: A highly efficient method for long-chain cDNA synthesis using trehalose and betaine. Analyt Biochem 301: 168-174 (2002)

176. Spiess AN, Mueller N, Ivell R: Trehalose is a potent PCR enhancer: Lowering of DNA melting temperature and thermal stabilization of *Taq* Polymerase by the Disaccharide Trehalose. Clin Chem 50(7): 1256-1259 (2004)

177. Steitz TA, Smerdon SJ, Jäger J, Joyce CM: A unified polymerase mechanism for nonhomologous DNA and RNA polymerases. Science 266: 2022-2025 (1994)

178. Steitz TA: A mechanism for all polymerases. Nature 391: 231-232 (1998)

179. Sutlović D, Gojanović MD, Anđelinović Š, Gugić D, Primorac D: Taq Polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. Croat Med J 46(4): 556-562 (2005)

180. Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J: Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. Nucleic Acids Res 24(16): 3189-3194 (1996)

181. Takayanagi K, Asamura H, Tsukada K, Ota M, Saito S, Fukushima H: Investigation of DNA extraction from hair shafts. Int Congr Ser 1239: 759-764 (2003)

182. Tolstrup N, Nielsen PS, Kolberg JG, Frankel AM, Vissing H, Kauppinen S: OligoDesign: optimal design of LNA (locked nucleic acid) oligonucleotide capture probes for gene expression profiling. Nucleic Acids Res 31(13): 3758-3762 (2003)

183. Tsai YL, Olson BH: Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. Appl Environ Microbiol 58(7): 2292-2295 (1992)

184. Uchihi R, Tamaki K, Kojima T, Yamamoto T, Katsumata Y: Deoxyribonucleic Acid (DNA) Typing of Human Leukocyte Antigen (HLA)-DQA1 from Single Hairs in Japanese. J Forensic Sci 37: 853-859 (1992)

185. Umbach W: Kosmetik. Entwicklung, Herstellung und Anwendung kosmetischer Mittel. Wiley, Weinheim, S. 287-310 (2002)

186. Vallone PM, Butler JM: AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. BioTechniques 37: 226-231 (2004)

187. Vallone PM, Hill CR, Butler JM: Demonstration of rapid multiplex PCR amplification involving 16 genetic loci. Forensic Sci Int: Genetics 3: 42-45 (2008)

188. Varadaraj K, Skinner DM: Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. Gene 140: 1-5 (1994)

189. Vester B, Wengel J: LNA (Locked nucleic acid): High-affinity targeting of complementary RNA and DNA. Biochemistry 43(42): 13233-13241 (2004)

190. Villalva C, Touriol C, Seurat P, Trempat P, Delsol G, Brousset P: Increased yield of PCR products by addition of T4 gene 32 protein to the SMART™ PCR cDNA synthesis system. BioTechniques 31(1): 81-86 (2001)

191. Vogelstein B, Gillespie D: Preparative and analytical purifaction of DNA from agarose. Proc Natl Acad Sci 76(2): 615-619 (1979)

192. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R: Chelex® 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. BioTechniques 10(4): 506-513 (1991)

193. Weiner JH, Bertsch LL, Kornberg A: The Deoxyribonucleic acid unwinding protein of Escherichia coli. J Biol Chem 250(6): 1972-1980 (1975)

194. Wiedbrauk DL, Werner JC, Drevon AM: Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. J Clin Microbiol 33(10): 2643-2646 (1995)

195. Wiegand P, Kleiber M: Less is more – length reduction of STR amplicons using redesigned primers. Int J Legal Med 114: 285-287 (2001)

196. Wiegand P, Klintschar M, Klein R, Müller K, Immel U, Stiller D: STR Analysis of transferred biological stains from different surfaces. In: Rechtsmedizin, Bd 15, 4. Aufl, Springer, Berlin Heidelberg, S. 319 (2005)

197. Wiegand P, Klein R, Braunschweiger G, Hohoff C, Brinkmann B: Short amplicon STR multiplex for stain typing. Int J Legal Med 120: 160-164 (2006)

198. Wilcox MH, Reynolds MT, Hoy CM, Brayson J: Combined cervical swab and urine specimens for PCR diagnosis of genital *Chlamydia trachomatis* infection. Sex Tranm Inf 76: 177-178 (2000)

199. Wilson IG: Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. Appl Environ Microbiol 63(10): 3741-3751 (1997)

200. Wilson MR, Polanskey D, Butler J, DiZinno JA, Replogle J, Budowle B: Extraction, PCR Amplification and Sequencing of Mitochondrial DNA from Human Hair Shafts. BioTechniques 18(4): 662-669 (1995)

201. Winkler M, Glieder A, Klempier N: Enzyme stabilizer DTT catalyzes nitrilase analogue hydrolysis of nitriles. Chem Commun: 1298-1300 (2006)

202. Winship PR: An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. Nucleic Acids Res 17(3): 1266 (1989)

203. Yoshii T, Tamura K, Ishiyama I: Presence of a PCR-inhibitor in Hairs. Jpn J Legal Med 46(5): 313-316 (1992)

204. Yoshii T, Tamura K, Taniguchi T, Akiyama K, Ishiyama I: Water-soluble Eumelanin as a PCR-inhibitor and a Simple Method for its Removal. Jpn J Legal Med 47: 323-329 (1993)

205. Yu PH, Wallace MM: Effect of 1,2-indanedione on PCR-STR typing of fingerprints deposited on thermal and carbonless paper. Forensic Sci Int 168: 112-118 (2007)

206. Zhang L, Guarente L: Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. EMBO J 14(2): 313-320 (1995)

207. Zviak C, Milléquant J: Hair Coloring: Non-Oxidation Coloring. In: Bouillon C, Wilkinson J (Hrsg) The Science of Hair Care, Taylor&Francis, S. 251-275 (2005)

208. Zviak C, Milléquant J: Oxidation Coloring. In: Bouillon C, Wilkinson J (Hrsg) The Science of Hair Care, Taylor&Francis, S. 277-312 (2005)

7 Anhang

7.1 PCR-Additive

Tab. 21 PCR-Additive und ihre Wirkungsweisen, aufgeteilt in fünf Gruppen nach Radström et al [147]

PCR-Additive	**Wirkungsweise**	**Lit.**
Proteine wie BSA, gp32 und ssB	● Fungieren als Ziel für Proteinasen und reduzieren dadurch die PCR-Inhibition, die vermutlich aufgrund einer Degradation der DNA-Polymerase durch Proteinasen verursacht wird. ● Reduzieren den inhibitorischen Effekt von Substanzen mit Phenolgruppen (Melanin, Hämin), indem sie vermutlich die inhibitorischen Komponenten binden. Phenolgruppen fangen u.a. Mg^{2+}-Ionen ab und binden an Proteine, so auch an die DNA-Polymerase. ● Da BSA oft für die Stabilisierung von Proteinen in Lösung benutzt wird, dürfte es auch die DNA-Polymerase stabilisieren. ● Das „single-stranded DNA binding protein“ (ssB) aus *E. coli*, aber auch das aus den Phagen T4 stammende „T4 gene 32 protein“ (gp32) beeinflussen in vivo nicht nur die DNA-Replikation, sondern auch die Rekombination und DNA-Reparatur. In vitro verbessern sie mehrere molekularbiologische Prozesse durch Destabilisierung von DNA-Sekundärstrukturen und Erhöhung der Prozessivität der Polymerasen. Zudem verbessert das gp32 im Blut die Zugänglichkeit der DNA-Polymerase, falls eine große Menge an koaguliertem organischem Material in der PCR-Probe vorhanden ist.	[2,3,44, 61,87, 98,100, 112,131, 136,165, 171,179, 193]

Organische Lösungsmittel wie DMSO, Formamid und 2-Pyrrolidon	● Beeinflussen die thermische Stabilität der Primer und das thermische Aktivitätsprofil der DNA-Polymerase und erhöhen dadurch die Amplifikationsspezifität. Der Einfluss auf die thermische Stabilität wird verursacht durch die Fähigkeit der organischen Lösungsmittel, DNA in Lösung zu destabilisieren. Es ist schon länger bekannt, dass einige organische Lösungsmittel die DNA-Doppelhelix entwinden können. Möglicherweise binden organische Additive wie das Formamid in der großen und kleinen Rinne der DNA und destabilizieren dadurch die Template Doppelhelix. 2-Pyrrolidon dürfte aufgrund der zyklischen Struktur des Pyrrolidonrings eine besonders große Affinität für die Rinnen des doppelsträngigen Templates haben. Es dürfte darüber hinaus die sterische Abstoßung mit Nachbargruppen des DNA-Rückgrats aufgrund einer eingeschränkten freien Rotation minimieren. DMSO stabilisiert zudem thermisch die Nukleinsäuren gegen Depurinierung. Zu viel DMSO führt zur Inhibition der Polymerase. Formamid wird häufig bei GC-reichen Fragmenten verwendet, 1,25%-5% erhöht die PCR Spezifität, mehr als 10% Formamid bzw. DMSO verursacht eine PCR-Inhibition.	[2,14,20, 41,42,82, 97,129, 153,163, 188,199, 202]
Nicht-ionischen Detergenzien wie Tween 20, Triton X und Nonidet P-40 bzw. Igepal®CA-630	● Die Aktivität der *Taq* DNA-Polymerase wird stimuliert und die falsche Termination des Enzyms reduziert. ● Stabilisieren die Polymerase. ● Verhindern das Binden der Reagenzien an die Tubewand. ● Können den Schmelzpunkt der dsDNA verändern und verhindern die Bildung von Sekundärstrukturen und das Annealen von DNA-Strängen.	[2,14, 188]

Biologisch kompatibel gelöste Stoffe wie Glycerol und Betain (Trimethylglycin)	● Werden von Organismen und zellulären Systemen benutzt, um die biologische Aktivität unter extremen Bedingungen zu erhalten. ● Glycerol ist ein eindickendes Reagenz, d.h. es kann H_2O-Moleküle binden. Dadurch wird die Viskosität erhöht und die Schmelztemperatur gesunken. Zudem verbessert es die hydrophoben Interaktionen zwischen den Proteindomänen, erhöht die thermische Übergangstemperatur der Proteine und stabilisiert Enzyme. Daher wird Glycerol in den Aufbewahrungspuffer der thermostabilen Enzyme beigefügt. ● Sie erhöhen die Effizienz und Spezifität der Amplifikationsreaktion. ● Sie senken die Strangtrennungstemperatur und erleichtern dadurch das Annealing der Primer an die Template-DNA, da die Bildung von Sekundärstrukturen reduziert wird, die durch GC-reiche Regionen verursacht wird. Betain ist ein natürliches Aminosäureanalog. Es destabilisiert ebenso wie Trehalose nicht nur die DNA-Doppelhelix, sondern trennt die verdrehte DNA-Helix ohne die Polymerase-DNA-Interaktion zu stören und ohne auf die Annealing-Temperatur der Primer zum Template oder auf die Halbwertszeit der Polymerase einzugreifen. Es wird angenommen, dass Betain auf die Extensionsreaktion einwirkt, indem es an die AT-Paare in der großen Rinne bindet oder indem es durch Binden innerhalb der kleinen Rinne die Hydratation der GC-Paare erhöht und somit GC-reiche DNA destabilisiert. ● Eine zu hohe Glycerolkonzentration führt zu einer Inhibition der Polymerase.	[2,20,42, 76,129, 131,175, 188]

Polymere wie Dextran und PEG (Polyethylene glycol)	● Erleichtern die Amplifikation in ähnlicher Weise wie die organischen Lösungsmittel. PEG besitzt wie BSA Enzym-stabilisierende Eigenschaften, das dem Erhalt der Enzymaktivität dient und somit die Amplifikation verbessert. ● PEG wird gewöhnlich bei der Fällung von Makromolekülen verwendet. Es soll nützlich sein bei geringen DNA-Template-Konzentrationen. Es fördert die makromolekulare Assoziation durch Lösungsmittelausschluss, so dass die Amplifikationsreaktion konzentrierter vonstatten gehen kann. Hohe PEG-Konzentrationen verändern die Konformation der DNA-Moleküle zu kompakten Formen.	[2,7,107, 167]

Tab. 22 weitere PCR-Additive und ihre Wirkungsweisen

PCR-Additve	**Wirkungsweise**	**Literatur**
BioStab PCR optimizer (II) von Biochemika	● Für GC-reiche Fragmente. ● Ermöglicht die Verwendung einer breiten Annealing-Temperaturenspanne, dadurch werden die Spezifität und der Ertrag der PCR erhöht.	Biochemika
Bovine Lacto Transfer Technique Optimizer (BLOTTO)	● Verhindert das nicht-spezifische Binden von Proteinen und Nukleinsäuren. ● Wurde bisher nur bei der Amplifikation pflanzlicher DNA nachgewiesen. ● Zudem kann BLOTTO den inhibitorischen Effekt von Huminsubstanzen aus dem Boden aufheben, die an verschiedene organische Substanzen adsorbieren, Komplexe mit Metallionen bilden und demnach möglicherweise Mg^{2+}-Ionen abfangen.	[26]
Chicken Egg White Lysozyme	● Wirkungsweise unbekannt.	[165]
dc^7GTP	● Für GC-reiche Fragmente. ● Wird neben dGTP im Verhältnis 3:1 (dc^7GTP:dGTP) in PCR eingesetzt. ● Verhindert Hoogstenformierung. ● Erleichtert Amplifizierung von Templates mit stabilen Sekundär-strukturen.	[111,129]
DTT	● Stabilisiert und aktiviert Enzyme. ● Verringert aber PCR-Effizienz.	[131,201]
5x Enhancer Solution P von Peqlab	● Verbessert die Amplifikations-ergebnisse von GC-reichen Templates. ● Die Denaturierungseigenschaften der DNA werden geändert.	Peqlab

Equine Plasma α_2 Macroglobulin	● Wirkungsweise unbekannt.	[165]
Fremd-DNA	● Inhibitoren binden nicht nur an die zu amplifizierende DNA, sondern auch an die Fremd-DNA.	
Gelatine	● Stabilisiert Polymerase. ● Verhindert das Binden der Reagenzien an die Tubewand.	
5x KAPA Enhancer 1 von Peqlab	● Verbessert Reaktionseffizienz und Spezifität. ● Erleichtern die Amplifikation GC-reicher Templates.	Peqlab
25x KAPA Enhancer 2 von Peqlab		
MasterAmp™ 10x PCR Enhancer with betaine von Epicentre	● Für GC-reiche Fragmente. ● Reduziert die Bildung von Sekundärstrukturen. ● Betain schützt die Polymerase vor thermischer Denaturierung.	Epicentre
5x OptiZyme Enhancer von Invitek	● Stabilisiert Enzyme und Enzymkomplexe. ● Schützt Biomoleküle vor Denaturierung durch Hitze oder anderen Stressbedingungen.	Invitek
Perfect Match® DNA Polymerase Enhancer von Stratagene	● Destabilisiert fehlerhafte Primer-Matrix-Komplexe, verringert Sekundärstrukturen.	Stratagene
Prolin	● Senkt die T_M in einer konzentrationsabhängigen Art und Weise und destabilisiert dadurch die DNA-Doppelhelix.	[148]
Pyrophosphatase	● Baut Pyrophosphat ab und lenkt dadurch die PCR in Richtung PCR-Produkte.	

Q-Solution von Qiagen	● Für GC-reiche Fragmente. ● Verhindert Bildung von Sekundärstrukturen.	Qiagen
Rabbit Muscle Lactate Dehydrogenase	● Wirkungsweise unbekannt.	[165]
Rabbit Muscle Phosphorylase b	● Wirkungsweise unbekannt.	[165]
RecA Protein von Epicentre	● Bindet an einzelsträngige DNA. ● Komplex bindet an doppelsträngige DNA. ● Fördert homologe Rekombination.	Epicentre
Polyamine wie Spermin und Spermidin	● Polyamine binden an die DNA und verhindern somit in höheren Konzentrationen die Amplifikationsreaktion. ● In geringen Konzentrationen jedoch erleichtert Spermidin die Amplifikation durch Ausfällen der Inhibitoren.	[199]
Single-Stranded DNA Binding Protein (SSB) von Epicentre	● Bindet an einzelsträngige DNA. ● Verringert Bildung von Sekundärstrukturen. ● Stimuliert Polymerase.	[44,98]
20x Super Enhancer for PCR von Genecraft	● Für GC-reiche Fragmente. ● Reduziert die Bildung von Sekundärstrukturen. ● Effizienter als DMSO und Betain.	Genecraft
5x *Taq*Master® PCR Enhancer von Eppendorf	● Stabilisiert Polymerase. ● Schützt Enzyme vor Austrocknung, Hitze, pH-Wert-, Salzkonzentrations-Änderungen. ● Macht Enzyme weniger sensitiv auf exogene PCR-Inhibition-Kontaminationen (Huminsäuren aus Bodenproben, Blutbestandteile usw.). ● Im Gegensatz zu DMSO, Glycerol ist	Eppendorf

	der Enhancer angeblich chemisch stabil und inert. ● Ändert nicht die optimale Primer-Annealing-Temperatur oder Schmelzverhalten der Template-DNA. ● Für Fragmente mit ungleichem (reichem) GC-Gehalt und unsauberen Templates.	
TMAC (Tetramethylammonium chlorid)	● Erhöht PCR-Spezifität, da es das nicht-spezifische Binden der Primer eliminiert. ● Für Fragmente mit ungleichem GC-Gehalt. ● TMAC ist nicht von der Sequenz des Templates abhängig und führt ebenso bei GC-armen Fragmenten zu einer Optimierung der PCR-Amplifikation, indem es die AT-Basenpaare stabilisiert. ● Zudem wirkt TMAC vermutlich direkt auf die katalytische Eigenschaft der DNA Polymerase ein.	[20,45,82, 86,97,116]
Trehalose	● Verringert T_M. Durch die Senkung der Schmelztemperatur der DNA wird zum einen die Polymerase Elongation gefördert, zum anderen werden Sekundärstrukturen eliminiert, die teilweise in ssDNA bestehen bleiben und die Elongation stoppen können. ● Stabilisiert Polymerase. Die thermische Stabilität der Polymerasen kommt zustande aufgrund einer Reduktion der Zahl an Wasserstoff-brücken zwischen Protein und Wassermoleküle.	[40,58,173, 175,176]

7.2 Charakteristiken der getesteten Polymerasen

Tab. 23 Eigenschaften der DNA-Polymerasen

DNA-Polymerase	Eigenschaften
Nova*Taq*™ Hot Start DNA Polymerase (Novagen)	● Ist eine Hitze-aktivierte thermostabile DNA Polymerase. ● Liefert angeblich verbesserte Spezifität und höheren Ertrag als andere Standard DNA Polymerasen. Das Enzym kann die Produktion von nicht-spezifischen Reaktionsprodukten wie beispielsweise Primer-Dimere oder fehlgepaarte Produkte eliminieren. ● Wird in einer Konzentration von 5 U/µl geliefert.
JumpStart™ *Taq* DNA Polymerase (Sigma)	● Ist eine optimierte Mischung einer hoch-leistungsfähigen *Taq* DNA Polymerase und einem JumpStart *Taq* Antikörper, ein neutralisierender monoklonaler Antikörper gegen die *Taq* DNA Polymerase. Die Polymerase wird durch Bindung des Antikörpers an das Enzym inaktiviert. Sobald die Temperatur im ersten Denaturierungsschritt über 70°C steigt, dissoziiert der Komplex und die Polymerase wird unbeschränkt aktiv. ● Der Gebrauch von mehr als 5% v/v DMSO (Dimethylsulfoxid) oder irgendeines anderen PCR Additivs zusammen mit der JumpStart *Taq* wird nicht empfohlen, da das Additiv den Enzym-Antikörper Komplex stören könnte. DMSO beschleunigt die Strang-Renaturierung und gibt vermutlich der Nukleinsäure die nötige Stabilität gegen Depurinierung. Als PCR-Kosolvent verbessert DMSO den Ertrag, besonders in langen PCR Produkten. ● Die Polymerase wird in einer Konzentration von 2,5 U/µl geliefert.

HotMaster™ *Taq* DNA Polymerase (Eppendorf)	● Besteht aus einer Polymerase und einem Inhibitor (HotMaster), der an die Bindungsstelle für Substrate in der DNA Polymerase in einer temperaturabhängigen Art und Weise bindet und dadurch blockiert. Inaktivierte Polymerase-Inhibitor Komplexe werden bei Temperaturen < 40°C gebildet, da die Bindungsaffinität von HotMaster zur *Taq* Polymerase größer ist als die Bindungsaffinität der Matrizen-DNA zur *Taq* Polymerase. Zwischen 40°C und 55°C wettstreiten die Matrizen-DNA und HotMaster Inhibitor um die Bindung an die *Taq* Polymerase. Dies verschiebt die Bindungsgleichung in Richtung spezifisch mit Primer ausgestatteten Matrizen DNA - *Taq* Polymerase Komplexen. Bei Temperaturen über 55°C ist der Inhibitor vollständig von der *Taq* Polymerase durch die spezifisch mit Primer ausgestatteten Matrizen DNA vertrieben und die Enzymaktivität ist wieder hergestellt. Der HotMaster Inhibitor kann mehrere Temperaturzyklen mit reversibler Hitzeaktivierung durchlaufen und eine ausdauernde Temperaturkontrolle während der PCR liefern. Diese innovative Hot Start/Cold Stop Technologie liefert eine ultimative Temperaturkontrolle vom ersten bis zum letzten PCR-Zyklus und eliminiert die ungewünschten nicht-spezifischen Amplicons. ● Das Enzym hat eine Konzentration von 5 U/µl.
illustra Hot Start Mix RTG beads (GE Healthcare)	● Die Primer sind von der Polymerase durch so genannte Hot Start Activator Proteine abgetrennt, wodurch die Primer nicht unspezifisch während des Reaktionsansatzes binden können.

Go*Taq*®Hot-Start DNA Polymerase (Promega)	● Besitzt eine 5´-3´Exonuklease Aktivität und wird durch einen Antikörper in ihrer Aktivität blockiert. Das Erhitzen der Polymerase für zwei Minuten bei 94°C denaturiert den Antikörper und aktiviert das Enzym. ● Die Polymerase mit einer Konzentration von 5 U/µl wurde zusammen mit dem 5x Colorless Go*Taq*® Flexi Reaktionspuffer geliefert.
Sawady `Hot` *Taq*-DNA-Polymerase (Peqlab)	● Das Enzym ist unterhalb 70°C inaktiviert. ● Wird mit einer Konzentration von 5 U/µl zusammen mit einem Verdünnungspuffer (20 mM Tris-HCl mit pH 8,0 bei 25°C, 100 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 55% (v/v) Glycerin, 0,5% Tween-20, 0,5% Nonidet P40), einem 10x Reaktionspuffer Y (200 mM Tris-HCl mit einem pH von 8,55, 160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% Tween 20, 20 mM $MgCl_2$) und einem 10x Reaktionspuffer S (100 mM Tris-HCl mit einem pH von 8,8, 500 mM KCl, 0,1% Tween 20, 15 mM $MgCl_2$) sowie einer 5x Enhancer Lösung P geliefert. Mit der Verwendung des Puffers Y ist der Ertrag an Amplifikationsprodukten besonders hoch, mit der Verwendung des Puffers S soll die Spezifität besonders hoch sein. Der Enhancer führt bei GC-reichen Templates zu einer deutlichen Verbesserung der PCR-Ergebnisse.
KAPA2G™ Robust Hot Start DNA Polymerase (Peqlab)	● Weist im Vergleich zur Wiltyp *Taq* Polymerase eine Aminosäuremutation auf. Daher soll das Enzym gegenüber einer breiten Spanne an Templates und Fragmentlängen robuster sein. ● Ist unempfindlicher gegenüber vielen bekannten PCR-Inhibitoren.

Advantage-HF 2 Polymerase Mix	● Besteht aus zwei Polymerasen. Die TITANIUM™ *Taq* DNA Polymerase ist ein HotStart Enzym, dessen Aktivität durch einen Antikörper kontrolliert wird. Eine N-terminale Deletion mit einhergehender mangelnder Nuklease-Aktivität unterscheidet dieses Enzym von der *Taq* DNA Polymerase. Der *Taq*Start Antikörper erkennt native und N-terminale Deletionsmutaten der *Taq* Polymerase. Es ist ein monoklonaler Antikörper (1,1 µg/µl), der bei RT an die Polymerase bindet und diese dadurch inhibiert. Wird der Komplex erhitzt, denaturiert der Antikörper, die Polymerase-Aktivität wird hergestellt und die Amplifikationsreaktion beginnt. Die Aktivitätsherstellung ist vollständig und reversibel, die Polymerase bewahrt ihre Aktivität während der PCR. Die Funktion des *Taq*Start Antikörpers bleibt nach Zugabe von DMSO erhalten, nicht aber von Formamid und anderen Reagenzien. Glycerol (übermäßig), Salze, extreme pH-Werte und andere Abweichungen der Reaktionsbedingungen reduzieren die Effektivität des Antikörpers und/oder der Polymerase. ● Zudem beinhaltet der Mix eine kleine Menge einer anderen Polymerase.

7.3 Extraktionsprotokoll

GEN-IAL-Extraktion in Kombination mit einer Aufreinigung über Silika-Partikel:

Haarschäfte mit 10%igem Ethanol abreiben, Wurzeln ggf. in A. dest. reinigen

30. Haare in Tubes in etwa 1 cm Stücke schneiden.
31. Zugabe von 200 µl Lyse 1, 20 µl Lyse 2, 20 µl Proteinase K (20 mg/ml) und 40 µl DTT (1 M).
32. Inkubation im Thermomixer bei 65°C über Nacht.
33. Falls Haar am nächsten Tag noch sichtbar, Zugabe von 10 µl Proteinase K, weitere Inkubation.
    Falls Haar vollständig lysiert, Zugabe von 204 µl Lyse 3, 20 s leicht vortexen.
34. 5 min bei -20°C kühlen.
35. 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren.
36. Überstand (514 µl) in ein neues Tube überführen mit 514 µl Isopropanol, 10,3 µl NaAc (1,5 M; pH 5) und 4,4 µl Glasmilch,
    vorher Gemisch gründlich vortexen.
37. Gemisch leicht vortexen, anschließend 15 min bei RT unter gelegentlichem Schütteln inkubieren.
38. 15 min bei 13000 rpm zentrifugieren.
39. Überstand verwerfen,
    auf das Pellet 1000 µl eiskaltes 70%iges Ethanol pipettieren,
    anschließend 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren,
    Überstand verwerfen,
    2 min bei 13000 rpm zentrifugieren,
    Ethanolreste mit Pipette abnehmen.
40. Pellet bei geöffnetem Reaktionsgefäß für ca. 30 min bei 37°C im Thermoblock trocknen lassen.
41. Das Pellet in 30 µl A. dest. aufnehmen und 45 min bei 50°C schüttelnd inkubieren (Lösen der DNA).
42. Pellet leicht vortexen und 5 min bei 13000 rpm zentrifugieren, den Überstand für die PCR verwenden.

Größere Mengen an Glasmilch kann PCR stören.

Mit der Extraktionsmethode konnten so auch Katzenhaare analysiert werden [125]. Da auch Katzen ständig Haare verlieren, die anhaftend an Kleidungsstücken an Tatorten hinterlassen oder vom Ort des Verbrechens aufgenommen werden, kann ein Tatverdächtiger über die STR-Typisierung von Katzenhaaren in Verbindung mit einer Straftat gebracht werden.

7.4 verwendete Chemikalien und Lösungen

			aus Stammlösung:
TN_{Ca}-Lysepuffer:	10 mM	Tris-HCl (pH8,0)	
	100 mM	NaCl	10x TN_{Ca}
	1 mM	$CaCl_2$	
	2 %	SDS	10 % SDS
	39 mM	DTT	1 M DTT
	250 µg/ml	ProtK	10 mg/ml ProtK

Stammlösungen:

10x TN_{Ca}:	100 mM Tris-HCl (pH 8,0)	3,03 g Tris
	1000 mM NaCl	14,61 g NaCl
	10 mM $CaCl_2$ *$2H_2O$	0,37 g $CaCl_2$*$2H_2O$

mit HCl auf pH 8,0 einstellen und mit H_2O auf 250 ml auffüllen

bzw.:	100 mM Tris-HCl (pH 8,0)	10 ml Tris
	1000 mM NaCl	20 ml NaCl
	10 mM $CaCl_2$ *$2H_2O$	1 ml $CaCl_2$*$2H_2O$

mit HCl auf pH 8,0 einstellen und mit H_2O auf 100 ml auffüllen

10% SDS: 10 g SDS in 100 ml H_2O lösen

1 M DTT: 1 M DTT 0,1542 g DTT

in 1 ml 10 mM NaAc-Lösung lösen

NaAc-Lösung: 10 mM NaAc (pH 5,2) 0,08 g NaAc

mit Essigsäure auf pH 5,2 einstellen und mit H_2O auf 100 ml auffüllen

10 mg/ml ProtK: 10 mg Proteinase K in 1 ml H_2O lösen

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde durch das BMBF-Förderprogramm BioChance Plus gefördert und finanziert.

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Peter Wiegand und Prof. Dr. med. Erich Miltner für die Aufnahme in das Institut und Überlassung des Arbeitsplatzes.

Danken möchte ich Herrn PD Dr. Peter Wiegand für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für seine Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bin ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Möller dankbar.

Allen Mitarbeiterinnen aus dem DNA-Labor danke ich für die freundliche Hilfsbereitschaft in allen Belangen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, ohne die ein Studium und eine Doktorarbeit niemals möglich geworden wären. Ich danke ihnen für die fortwährende Unterstützung und Ermunterung auch an trüben Tagen.

Lebenslauf

geboren am 11. Juni 1979 in Geislingen an der Steige
Familienstand ledig

Berufspraxis

seit 2005	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Ulm, seit 2006 gefördert durch das BMBF-Förderprogramm BioChance Plus

Studium und Schulausbildung

10/1999 -11/2004	Biologiestudium an der Universität Ulm Studienschwerpunkte: Chemie, Anthropologie, Tierphysiologie, Neurobiologie Diplomarbeit in experimenteller Ökologie mit dem Thema „Neozoen in Gewächshäusern“ Abschluss: Diplom-Biologie mit der Note sehr gut
1990 – 1999	Helfensteingymnasium Geislingen an der Steige Abschluss: Abitur mit der Note 1,9
1986 – 1990	Grundschule Deggingen

weitere Tätigkeiten

2004	Studentische Hilfskraft, Betreuung des Praktikums Tierbestimmungsübungen für das 2. Fachsemesters Biologie an der Universität Ulm und zeitgleich Studentische Hilfskraft, Herstellung einer eigenen universitären Säugetierschädelsammlung
03-04/2003	sechswöchiges Praktikum beim LKA Baden-Württemberg im Kriminaltechnischen Institut

1. Eigene Publikationen

Peer-reviewed Publications

1. Möller P, Mayer S, Mattfeldt T, **Müller K**, Wiegand P, Brüderlein S
   Sex-related differences in length and erosion dynamics of human telomeres favor females.
   Aging 1(7): 1-7 (2009)

2. **Müller K**, Braunschweiger G, Klein R, Miltner E, Wiegand P
   Validation of the short amplicon multiplex Q8 including the German DNA database systems.
   J Forensic Sci 54(4): 862-865 (2009)

3. Brüderlein S, **Müller K**, Melzner J, Högel J, Wiegand P, Möller P
   Different rates of telomere attrition in peripheral lymphocytes in a pair of dizygotic twins with hematopoietic chimerism.
   Aging Cell 7(5): 663-666 (2008)

4. **Müller K**, Brugger C, Klein R, Miltner E, Reuther F, Wiegand P
   STR typing of hairs from domestic cats.
   Forensic Sci Int: Genetics Supplement Series 1(1): 607-609 (2008)

5. **Müller K**, Klein R, Miltner E, Wiegand P
   Q8-A short amplicon multiplex including the German DNA database systems.
   Forensic Sci Int: Genetics 1(2): 205-207 (2007)

6. **Müller K**, Klein R, Miltner E, Wiegand P
   Improved STR typing of telogen hair root and hair shaft DNA.
   Electrophoresis 28: 2835-2842 (2007)

7. Wiegand P, Klintschar M, Klein R, **Müller K**, Immel U, Stiller D
   STR Analysis of transferred biological stains from different surfaces.
   In: Rechtsmedizin, Bd 15, 4. Aufl, Springer, Berlin Heidelberg, S. 319 (2005)

eingereichte Publikation

Müller K, Sommerer T, Miltner E, Schneider H, Wiegand P
Casework testing of the multiplex kits AmpFℓSTR® SEfiler Plus™ PCR Amplification Kit (AB), PowerPlex® S5 System (Promega) and AmpFℓSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit (AB)
Forensic Science Int: Genetics

2. Vorträge

1. **Müller K**, Sommerer T, Miltner E, Schneider H, Wiegand P
   Vergleich der Multiplex-Kits AmpFℓSTR® SEfiler Plus™ PCR Amplification Kit (AB), PowerPlex® S5 System (Promega) und AmpFℓSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit (AB)
   für den 29. Spurenworkshop der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Münster (2009)

2. **Müller K**, Klein R, Miltner E, Wiegand P
   Q8, a short amplicon multiplex including the German DNA database systems
   für das 85th Annual Meeting of the German Society of Legal Medicine and DNA in Forensics in Innsbruck (2006)

3. **Müller K**, Klein R, Miltner E, Wiegand P
   MiniSTR-Typisierung an telogenen Haarwurzeln und Haarschäften
   für den 26. Spurenworkshop der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Rostock (2006)

3. Abstract und Poster

1. **Müller K**, Edelmann J, Miltner E, Wiegand P
   Chimärismusanalyse mit optimierten PCR-Konzepten
   für den 28. Deutschen Krebskongress in Berlin (2008)

2. **Müller K**, Brugger C, Klein R, Miltner E, Wiegand P
   STR typing of hairs from domestic cats
   für den 22nd Congress of the International Society for Forensic Genetics (ISFG) in Kopenhagen (2007)

3. Wiegand P, Klintschar M, Klein R, **Müller K**, Immel U, Stiller D
   STR analysis of transferred biological stains from different surfaces
   für das 6th International Symposium on Advances in Legal Medicine combined with the 84th Annual Congress of the German Society of Legal Medicine in Hamburg (2005)

weitere Tagungen

28. Spurenworkshop der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Salzburg (2008)

27. Spurenworkshop der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin in Frankfurt (2007)

Deggingen, den 9. August 2009

Kathrin Müller