Aus dem
Institut für Rechtsmedizin
des Universitätsklinikums Ulm
(Direktor: Prof. Dr. med. E. Miltner)

Selektive Hautschuppenanalyse – Strategien zur Gewinnung von Individual-STR-Profilen aus Hautepithelzellen

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

vorgelegt von
Thomas Sommerer
aus Nürnberg

2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. Peter Wiegand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Möller

Tag der Promotion: 11.02.2011

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1. EINLEITUNG 1

1.1 FALLBESCHREIBUNG 1
1.2 GRUNDLAGEN 1
1.2.1 Histologischer Aufbau der Haut 1
1.2.2 Pathologie der Haut 2
1.2.3 Bedeutung von Hautkontaktspuren in der Forensik 2
1.2.4 Short Tandem Repeats 3
1.2.5 Low Copy Number / Low Template DNA 4
1.2.6 Quantifizierung 5
1.2.7 Besonderheiten der Einzelschuppenanalyse 6
1.3 ZIELE 7

2. MATERIAL UND METHODEN 8

2.1 LABORMATERIALIEN 8
2.2 STUDIENDESIGN 8
2.3 PROBENGEWINNUNG UND UMGANG MIT KLEBEFOLIEN 10
2.4 HÄMATOXYLIN - EOSIN – FÄRBUNG 12
2.5 MAßNAHMEN ZUR VERMEIDUNG VON KONTAMINATIONEN 12
2.6 DNA – EXTRAKTION 13
2.7 QUANTIFIZIERUNG MITTELS REALTIME-PCR 14
2.8 VERWENDETE STR-MULTIPLEX KITS 15
2.8.1 Q8 15
2.8.2 PowerPlex® S5 16
2.8.3 AmpFlSTR® MiniFiler™ 17
2.8.4 AmpFlSTR® SEfiler™ 18
2.9 AUFREINIGUNG DER PCR-AMPLIFIKATE 18
2.10 AUSWERTUNG DER KAPILLARELEKTROPHORESEDATEN 19
2.11 OPTIMIERUNGSVERSUCHE FÜR LTDNA-PROBEN 19
2.12 BILDUNG DER KONSENSUS – ERGEBNISSE 20

3. ERGEBNISSE 21

3.1 VORARBEITEN 21
3.2 GESAMTÜBERBLICK ZU ERFOLGRATEN 23
3.3 GRÖßE DER HAUTSCHUPPEN 24
3.4 INTERPERSONELLER VERGLEICH DER ERFOLGSRATEN 26
3.5 EXTRAKTION 27
3.6 QUANTIFIZIERUNG 28
3.7 VERGLEICH DER ERFOLGSRATEN DER MULTIPLEX-STR-KITS 32
3.8 LOW COPY NUMBER / LOW TEMPLATE DNA PROBEN 33
3.9 ARTEFAKTE 36
3.10 EXEMPLARISCHE DOKUMENTATION 37
3.10.1 Beispiel eines Teilprofils 37
3.10.2 Beispiel eines Vollprofils 40

4. DISKUSSION 42

4.1 PROBENGEWINNUNG UND MATERIAL 42
4.2 ERGEBNISSE 44
4.2.1 Erfolgsraten 44
4.2.2 Interindividuelle Unterschiede 45
4.2.3 Extraktion 45
4.2.4 Quantifizierung 46
4.2.5 Vergleich der Multiplex-STR-Kits 47
4.2.6 Problematik der Low Copy Number Profile / Low Template DNA Proben 48
4.3 AUSBLICK UND SCHLUSSFOLGERUNG 49

5. ZUSAMMENFASSUNG 51

6. LITERATUR 53

7. ANHANG 59

LEBENSLAUF 62

PUBLIKATIONEN / VORTRÄGE 62

DANKSAGUNG 63

Abkürzungsverzeichnis

Aqua bidest.	bidestilliertes Wasser
Amel	Amelogenin
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	Complementary DNA
DAD	DNA-Analysedatei
dC	Desoxycytidin
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Deoxyribonucleiacid, Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
H.E.	Hämatoxylin Eosin
IPC	Interne PCR Kontrolle
kb	Kilobasenpaare
LCN	low copy number
LKA	Landeskriminalamt
LTDNA	Low Template DNA
LS	Längenstandard
M	Molar
mA	Milliampere
miniFiler	AmpFISTR®miniFiler (Applied Biosystems)
miniSTR	Short Tandem Repeat-PCR-Kit mit verkürzten Amplikons
mRNA	messenger ribonucleic acid
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
Q8	hauseigener Short Tandem Repeat-PCR-Kit mit verkürzten Amplikons
RFU	Relative fluorescence units
RT-PCR	Real Time - Polymerase Kettenreaktion
s	Sekunde
S5	PowerPlex® S5 (Promega)
SeFiler	AmpFISTR® SEfiler™ (Applied Biosystems)
snRNA	small nuclear ribonucleic acid
STR	Short Tandem Repeat
U	Unit, Enzymeinheit
µl	Mikroliter
Upm	Umdrehungen pro Minute

1. Einleitung

1.1 Fallbeschreibung

Im Herbst 2005 wurde auf einem Autobahnrastplatz nahe Köln eine 31-jährige Frau vergewaltigt und erwürgt aufgefunden. Versuche, einen genetischen Fingerabdruck des Täters von der Opferkleidung und vom Genitalabstrich des Opfers zu gewinnen, waren trotz einer hohen Anzahl an DNA-Proben in einem privaten forensischen Labor erfolglos. Daraufhin folgte im Frühjahr 2006 eine erneute Aufarbeitung aller vorhandenen Spuren durch das Landeskriminalamt Wiesbaden. Obwohl die aussichtsreichsten Spuren (Tupfer, abgeschnittene Fingernägel, etc.), nicht mehr zur Verfügung standen, fand sich an der Unterwäsche der Frau eine schwache, nicht datenbankverwertbare, da vom Opfer überlagerte, männliche Speichelspur. Um doch noch das vollständige DNA-Profil des Täters zu erhalten, wurden im Weiteren die, eigentlich für die Daktyloskopie und Fasersuche von der Opferkleidung genommenen Klebefolien untersucht. Unter 200 mikroskopisch gesichteten und anschließend einzeln analysierten Hautschuppen fanden sich zwei mit dem der Speichelspur identischem Profil. Eine Abfrage in der Deutschen DNA Datenbank (DAD) führte zu einer versuchten und zwei erfolgten Vergewaltigungen mit derselben Täterspur. Nach Zusammenführung sämtlicher Ermittlungserkenntnisse aus den vier Einzelfällen konnte der Täter innerhalb von nur zwei Wochen gefasst und noch im Sommer 2006 zu einer lebenslänglichen Freiheitsstrafe verurteilt werden.

1.2 Grundlagen

1.2.1 Histologischer Aufbau der Haut

Histologisch handelt es sich bei der Epidermis um mehrschichtiges verhorntes Plattenepithel. Zuinnerst findet sich das einschichtige Stratum basale, darauf folgend das vielschichtige Stratum spinosum. Im Bereich der Plantarfläche der Hände findet in diesen beiden Schichten Zellproliferation statt, an der übrigen Körperoberfläche dagegen nur im Stratum basale. Das Stratum granulosum bildet den Übergang der absterbenden Zellen zum nach außen abschließenden, ca. 8-13 µm dicken Stratum corneum, bestehend aus flachen Hornzellen, die ihren

Nukleus im Zuge der epidermalen Differenzierung verlieren [24, 27]. Folglich ist zu erwarten, aus den stark degradierten Zellen dieser äußersten Schicht kein oder kaum genetisch verwertbares Material zu erhalten; die erfolgreich typisierten Hautschuppen müssen Zellen aus dem Stratum granulosum und Spinosum enthalten [46].

1.2.2 Pathologie der Haut

Pathologische Zustände der Haut beeinflussen ihre Proliferation und Schuppenbildung. So findet bei einigen Krankheiten, z.B. Psoriasis und aktinische Keratose, Parakeratose statt [18, 19, 24], d.h. es finden sich auch im Stratum corneum kernhaltige Zellen. In diesem Fall ist mit einem wesentlich höheren Anteil intakter DNA auch bei der forensischen Betrachtung von Hautschuppen zu rechnen. Ähnlich ist bei hyperkeratotischen Krankheiten wie atopischer Dermatits oder seborrhöischer Dermatose [5, 24] durch die verstärkte Hautschuppung an sich auch mehr genetisches Material zu erwarten. Bei den beiden epidemiologisch häufigsten der genannten Krankheiten, Psoriasis und atopischer Dermatitis, bleibt allerdings zu bedenken, dass die Palmarflächen der Hände, von der Hautkontaktspuren üblicherweise stammen, klassischerweise nicht betroffen sind; ein entsprechender Einfluss auf die Analyse eines genetischen Fingerabdrucks also eines Nachweises bedarf.

1.2.3 Bedeutung von Hautkontaktspuren in der Forensik

Seit Van Oorschot und Jones [42] 1997 zeigen konnten, dass durch einen einzelnen Hautkontakt genug DNA für die erfolgreiche Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks übertragen wird, und diese Ergebnisse in weiteren Arbeiten bestätigt wurden [15, 44, 46, 49], hielt diese Form der Spurengewinnung nicht nur Einzug in die forensische Routine, sondern nimmt nun vielfach ihren umfangreichsten Einzelposten überhaupt ein. Die Entwicklung sensitiverer, aussagekräftigerer und robusterer Verfahren hat zu den heute kommerziell verfügbaren Multiplex-PCR Kits geführt. Untersucht werden dabei kurze, sich wiederholende Elemente, die Short Tandem Repeat (STR) Loci oder Mikrosatelliten. Dies stellt die derzeitige Methode der Wahl zum Identitätsnachweis dar. Findly et al. konnte bereits 1997 in einem in „nature“

publizierten Artikel [12] deren hohe Sensitivität belegen, indem es Ihm gelang, erfolgreich STR-Profile aus einer einzelnen Mundschleimhautzelle zu generieren. Basierend auf diesem Erfolg, schlug er unter anderem als Anwendung und Thema weiterer Forschung vor, Hautschuppen einzeln zu analysieren und motivierte so mit zu dieser Arbeit.

1.2.4 Short Tandem Repeats

Derzeitige Methode der Wahl zum Identitätsnachweis sind die sogenannten Short Tandem Repeats [9]. Je nach Typ bilden ein bis fünf Nukleotide eine Wiederholungseinheit (=Repeat Unit). In der Forensik haben sich dabei Repeats mit einer Länge von vier Basenpaaren als Standard etabliert. Die Sequenz dieser Einheit wiederholt sich auf einem bestimmten Abschnitt der DNA vielfach direkt hintereinander. Individuen unterscheiden sich nun in eben dieser Anzahl an Wiederholungen. Dabei existieren auch Mikrovarianten [9], d.h. Sequenzen, in denen neben den vollständigen Motiven, z.B. durch Deletionen, auch unvollständige vorkommen. Die Anzahl der Wiederholungen ergibt sich aus der mittels Kapillarelektrophorese relativ einfach zu messenden Gesamtlänge des entsprechenden DNA-Abschnitts. Dazu werden Primer mit Zielsequenzen in den invarianten flankierenden Regionen ausgesucht. Durch geschickte Wahl der STR's nebst Primer gelang die Erstellung von Multiplex PCR Kits, die in einer PCR die Allele mehrerer Loci amplifizieren. Die Kombination der kodominant vererbten Allele mehrerer Loci ergibt eine für jeden Menschen mit extrem hoher Wahrscheinlichkeit einzigartiges Muster und dient somit der Identifizierung. Wichtigstes Artefakt in der STR-Analyse sind sogenannte Stutter-Peaks. Bei Ihnen handelt es sich um PCR-Produkte, die sich in ihrer Länge von den nominell zugehörigen Allelen um ein bis zwei Repeat-Motive unterscheiden, und in Ihrer Amplitude gewöhnlich nicht mehr als 15% von diesen erreichen.
Eine besondere Gewichtung dieser Arbeit liegt in der Verwendung sogenannter „miniSTR's“. Hierbei handelt es sich um Multiplex-PCR-Kits mit besonders nahe an den STR's liegenden Primern, mit der Folge verkürzter Amplikons von deutlich unter 300 bp Länge. Wiegand et al. [47] konnte zeigen, dass hierdurch die Sensitivität für degradierte Proben wie auch Proben mit geringem DNA-Gehalt erhöht werden kann. Forensische Spuren unterliegen häufig einer Vielzahl schädigender Faktoren. Die DNA-Stränge werden durch exogene Einflüsse, wie

auch endogen in der Zellapoptose in kurze Fragmente gespalten. Je kürzer nun das Amplikon ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit selbst in einer stark degradierten Probe Fragmente mit einem solchen intakten Abschnitt amplifizieren zu können.

1.2.5 Low Copy Number / Low Template DNA

Mit der von Gill P. geprägten Bezeichnung „Low Copy Number“ (LCN) waren ursprünglich Proben mit einer DNA Masse von typischerweise weniger als 100 pg pro PCR-Reaktion gemeint, sowie deren Analyse mit einer Erhöhung der PCR-Zyklenzahl von 28 auf 34 [15]. Sprachlich genauer wird aktuell unterschieden zwischen der Technik „Low Copy Number“ und dem Probentypus „Low Template DNA“ (LTDNA) [6]. „Low Copy Number“ fasst dabei die Erhöhung der Zyklenzahl auf 34, eine Replikative Analyse sowie die Notwendigkeit einer Methodik zur Interpretation zusammen. „Low Template DNA“ dagegen beschreibt die Eigenschaft einer Probe, lediglich eine geringe Ausgangs-DNA-Menge zu enthalten, meist < 100-200 pg. Es scheint derzeit zwar so, dass die Begrifflichkeit „Low Copy Number“ womöglich sogar völlig verbannt werden dürfte [6], aufgrund ihres etablierten Platzes in der wissenschaftlichen Gemeinschaft soll sie jedoch auch in dieser Arbeit weiter verwandt werden.

In jedem Falle bedarf die Bewertung solcher Proben aufgrund ihres speziellen Charakters einer gesonderten Betrachtung. Sie weisen eine stark erhöhte Neigung zu Unbalanciertheiten innerhalb eines heterozygoten Locus sowie zwischen den Loci auf. Ursache hierfür sind nicht nur stochastische Effekte und der Degradationsgrad der Proben, sondern auch präferentielle Amplifikation eines Allels / Locus in der Frühphase der PCR. Dies führt häufig zum Ausfall einzelner Allele oder ganzer Systeme („drop-out“) [15, 22]. Ebenso treten zusätzliche Allele auf („drop-in“), bedingt durch Amplifikationsfehler ebenfalls in der Frühphase der PCR oder sporadische Kontaminationen, die auch unter strengst sterilen Arbeitsbedingungen nicht zu vermeiden sind und durch die enorme Sensitivität der Methode sichtbar werden. Daneben weisen LCN/LTDNA -Proben eine Neigung zu zwar selteneren aber höheren Stutter-Peaks auf, sie überragen dabei z.T. sogar das zu ihnen gehörige nominelle Allel. Für die kritische Auswertung der Ergebnisse einer solchen Probe setzten sich die Empfehlungen von Gill P. [15] durch und kommen auch in dieser Arbeit zur Anwendung. Mischspuren mit DNA-

Beimengung von mindestens zwei Personen sind aufgrund der reduzierten forensischen Diskriminationsrate nur eingeschränkt verwertbar [4, 7, 15]. Zudem gilt auch unter juristisch-forensicher Betrachtung zu bedenken, dass LCN/LTDNA-Proben keinen Täterausschluss ermöglichen, bzw. es durchaus unklar bleiben kann, ob und in welchem Zusammenhang das gefundene genetische Material überhaupt mit dem Verbrechen steht. Beispielhaft sei hier die Möglichkeit des Sekundär- oder gar Tertiärtransfers biologischer Spuren genannt [7, 25, 26, 33, 42, 45], also die Übertragung genetischen Materials von einer ersten Person auf eine zweite und von dieser wiederum auf ein Objekt, ohne je stattgehabten Kontakt der ersten Person mit dem Objekt.

1.2.6 Quantifizierung

Auf die Quantifizierung forensischer Proben wird zurückgegriffen, um den, nur in einem relativ schmalen Bereich von um die 1 ng an eingesetzter Ausgangs-DNA pro Reaktion optimal funktionierenden Multiplex-PCR Kits möglichst auch diese DNA-Menge zur Verfügung zu stellen. Für diese Arbeit wurde eine Quantifizierung der Proben aber auch aus dem Interesse heraus durchgeführt, um die in einer Hautschuppe enthaltene DNA-Menge einschätzen zu können. Des Weiteren galt zu klären, in wie weit eine Quantifizierung vor der qualitativen STR-Analyse diese bei einem negativen Ergebnis ersetzen, und somit als eine Art Screening-Tool fungieren kann. Derzeitige Methode der Wahl bildet die RealTime-PCR [9]. Dabei werden, je nach Verfahren, einzelne Elemente der PCR mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und dessen Umsatz in Echtzeit, also von Zyklus zu Zyklus, detektiert. Über den Vergleich mit einer mitgeführten Standardreihe bekannter DNA-Konzentrationen kann auf die Ausgangs-DNA-Menge geschlossen werden. Der Einbau einer internen PCR Kontrolle (IPC) ermöglicht zudem elegant den Nachweis eventuell vorhandener PCR-Inhibitoren. Insgesamt handelt es sich bei dem eingesetzten Verfahren der RealTime-PCR um eine sehr sensitive wie auch humanspezifische Methode mit einer Detektionsgrenze von 6 pg, dem Genom einer einzelnen diploiden Zelle entsprechend.

1.2.7 Besonderheiten der Einzelschuppenanalyse

In der unter 1.1 angerissenen Strategie zur Gewinnung genetischen Materials werden nun mehr keine flächigen Abriebe mittels Baumwolltupfer genommen, wie u.a. bei [1, 25, 42, 43, 45, 46] üblich und empfohlen, sondern einzelne Hautschuppen mittels einer sehr feinen Pinzette selektiv ausgewählt und unter mikroskopischer Sichtkontrolle in ein Reaktionsgefäß überführt. Bereits alleine durch theoretische Überlegungen lassen sich wichtige Besonderheiten dieses Ansatzes der Probennahme aufzeigen. Vorrangiges Ziel ist dabei die Gewinnung von Individualprofilen und die Vermeidung von Mischmustern. Die hohe Wertigkeit dieses Zieles ergibt sich durch den Charakter biologischer Spuren. Denn die Problematik in der Realität besteht häufig darin, dass an einem Tatobjekt, z.B. der Kleidung eines Vergewaltigungsopfers, das Verhältnis von Opfer zu Täterspuren extrem auf Seiten der Opferspuren liegt. Für die bisher verwendeten flächigen Abriebe ergeben sich damit im besten Falle Mischmuster mit nunmehr einer biostatistisch eingeschränkten bis wertlosen Aussagekraft. Doch selbst diese Mischmuster lassen sich nur bei einem Anteil an Täter-DNA von mindestens ca. 10 % erzielen. Unterschreitet der Anteil der Täter-DNA diesen Wert, wird sein DNA-Profil völlig maskiert. Sollten Täter- und Opfer-DNA in ähnlicher, aber recht geringer Menge vorliegen, handelt es sich um für Hautkontaktspuren typische low copy number Proben, für die bekannte Verfahren zur Mischmusteranalyse aus in 1.2.5. genannter Charakteristika nicht zur Anwendung kommen dürfen [7, 15].

Nachteilig ist bei der Einzelschuppenanalyse mit einem hohen Ressourcenverbrauch in Form von Arbeitsaufwand, Zeit, Gerätschaften, Reaktionsmaterialien und damit finanziellen Mitteln zu rechnen. Denn die Hautschuppen müssen einzeln unter mikroskopischer Sichtkontrolle ausgewählt und mit einer feinen Pinzette in ein Reaktionsgefäß überführt werden. Statt weniger, schnell erbrachter Tupferabriebe sind etliche dutzend, aufwändig zu gewinnende Proben notwendig. Des Weiteren ist natürlich mit einem deutlich geringeren DNA-Gehalt pro Probe, bis in den Bereich der Sensitivitätsgrenze, zu rechnen. Eine Konsequenz dieser Low Template DNA Proben ist ein aufwändiges konsequent fast steriles Arbeiten, bei gleichzeitig reduzierter juristischer Wertigkeit entsprechender Proben.

Kombiniert wurde die Einzelschuppenanalyse darüber hinaus mit dem Einsatz selbstklebender, transparenter Folie ähnlich wie in [40, 49] beschrieben.

Interessant ist deren Einsatz vor allem, da diese Folien von der Polizei in Deutschland seit Jahren zur klassischen Sicherung von Tatortspuren verwendet werden und somit durch die heutigen sensitiven Verfahren der DNA-Analytik die Aufarbeitung ungeklärter Altfälle möglich ist. Durch die hier durchgeführte Laborstudie soll sowohl eine Kontrolle der Kombination aus „Einzelschuppenanalyse“ und „Klebefolie“ für die Aufarbeitung von Altfällen erfolgen, als auch die Eignung und Praktikabilität dieser Methode für die Asservierung von Spuren aus aktuellen Delikten untersucht werden.

1.3 Ziele

Die beschriebene neue Strategie zur Gewinnung von minimal Täterspuren wirft die unter 1.2.7 genannten Fragen zu deren Vor- und Nachteilen zwangsläufig auf und bedarf somit einer kontrollierten Aufarbeitung. Dem gewichtigen Vorteil der Einzelschuppenanalyse, nämlich die Chance Individualprofile zu erhalten, stehen z.T. nicht unerhebliche Probleme gegenüber. So soll diese Arbeit ebenso dazu dienen, die Möglichkeit der beschriebenen Probengewinnung zu verifizieren und validieren, wie auch Chancen und Risiken erstmals unter kontrollierten Bedingungen aufzuzeigen, um in der forensischen Praxis je nach individueller Situation das geeignete Vorgehen auf Basis einer fundierten Wissenslage auswählen zu können. Verschiedene handwerkliche Varianten zu Probengewinnung und Extraktion sollen beleuchtet werden. Idealerweise soll dadurch insgesamt die Ausbeute an verwertbaren Spurenprofilen, die auch in die DNA-Analysedatei eingestellt werden können, verbessert werden. Neben der Validierung z.T. kommerziell verfügbarer Mulitplex-PCR Kits für diese Anwendung soll auch ein neues Quantifizierungsverfahren auf RealTime-PCR Basis der Firma Promega etabliert werden. Zudem werden die Kombination aus der Asservierungsmethode mittels Klebefolien und die Strategie der Einzelschuppenanalyse auf ihre Praktikabilität geprüft.

2. Material und Methoden

2.1 Labormaterialien

Verbrauchsmaterialien

Klebefolien: „filmolux® S23“ 10 x 20 cm (Neschen AG, Bückeburg)

Reaktionsgefäße für die Extraktion: „MicroTubes® 1,5 ml“ (Sarstedt, Nümbrecht)

Reaktionsgefäße für die PCR: „PCR Tube 0,2 ml“ (peqLab, Erlangen)

Reaktionsplatte für die Kapillarelektrophorese: “96 Well Multiply® - PCR Plate“ (Sarstedt, Nümbrecht)

Reaktionsplatte für die RT-PCR: „MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode, 0.1 ml“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

Transparente Abdeckfolie für RT-PCR Reaktionsplatte: „BZO Seal Film“ Art.Nr. 712350 (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf)

Laborgeräte

Auflichtmikroskop: „M650T“ (Wild Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz)

Lichtmikroskop: „Aristoplan“ (Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar)

Fotokamera am Lichtmikroskop: „Pixel-fox®“ (dhs Dietermann & Heuser Solution GmbH, Greifenstein-Beilstein)

Thermoblock: „Thermoblock TB2“ (Whatman Biometra, Göttingen)

Thermomixer: „Thermomixer comfort“ (Eppendorf AG, Hamburg)

Thermozykler: „T1 Thermocycler“ (Whatman Biometra, Göttingen)

Zentrifuge: „Biofuge picoHeraeus“ (Kendro Laboratory Products, Hanau)

Kapillarelektrophorese: „Genetic Analyzer 3130“ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

2.2 Studiendesign

Um realitätsnahe wie auch klar definierte Spuren zu erstellen, mussten zehn Probanden mit Ihren Händen einen kurzen aber kräftigen Kontakt ähnlich [26] zu zuvor gereinigten Textilien unterschiedlicher Art herstellen. Die Stoffstücke wurden daraufhin mit den selbstklebenden transparenten Folien abgeklebt und diese wiederum unter dem Auflichtmikroskop begutachtet. Jede einzelne Hautschuppe wurde durch ein digitales Foto unter dem Lichtmikroskop dokumentiert und

vermessen. Anschließend wurde jede Schuppe in ein einzelnes Reaktionsgefäß überführt. Die Extraktion erfolgte mittels der nachfolgend beschriebenen Verfahren in einem Volumen von 50 µl. Aus diesem Extrakt wurden pro PCR maximal 7 µl entnommen und in eine Multiplex-PCR mit dem kostengünstigen wie sensitiven „Q8“ bei 33 Zyklen eingesetzt. Proben in denen sich kein einziges der zu erwartenden Allele fand, wurden als leer gewertet, Proben mit mehr als zwei der zu erwartenden Allele dagegen wurden als für die weiteren Untersuchungen brauchbar eingestuft. Aus Proben mit einem oder zwei der zu erwartenden Allele wurden erneut 7 µl Extrakt entnommen und ein zweites Mal mit dem „Q8“-Kit bei 33 Zyklen angesetzt. Fand sich in diesem zweiten Durchgang nicht mindestens ein korrektes Allel wurde die Probe ebenfalls als leer gewertet, fand sich dagegen mindestens ein korrektes Allel, wurde die Probe für den nachfolgenden Vergleich der verschiedenen STR-Kits herangezogen. Die auf diese Art selektierten Proben, wurden nun quantifiziert. Auf Grundlage der Quantifizierung sowie des ersten PCR-Durchlaufs mittels Q8 wurde nun das weitere Vorgehen festgelegt: Bei einer DNA-Konzentration von mehr als 18 pg/µl (entspricht 126 pg pro PCR-Reaktion bei Einsatz von 7 µl Extrakt) wurden die weiteren Multiplex-PCR-Ansätze mit 30 Zyklen amplifiziert. Gewählt wurde dieser Cut-Off nach laborinterner Validierung der verwendeten Methoden und Gerätschaften sowie in Anlehnung an P. Gill [15]. Ab ca. 120 pg gemessener DNA-Menge pro PCR-Reaktion konnte bei 30 Zyklen sicher mit einem Vollprofil gerechnet werden. Falls möglich wurden als Masse an eingesetzter DNA pro Reaktion 400 pg angestrebt. Bei einer DNA Konzentration unter 18 pg/µl wurden alle weiteren PCR-Ansätze dieser Probe mit 7 µl Extrakt bei 33 Zyklen amplifiziert. Für Proben im Grenzbereich um 18 pg/µl wurde außerdem das Ergebnis aus der ersten PCR mit dem „Q8“ für die weitere Einteilung zu den 33 oder 30 Zyklen herangezogen. Eine schematische Darstellung dieses Versuchsaufbaus findet sich in Abb.1. Eine Probe wurde zwecks Vergleichbarkeit der Kits stets mit dem gleichen Extraktvolumen und der gleichen Zyklenzahl amplifiziert. Die Lagerung der Extrakte und Amplifikate erfolgte bei kurzfristiger Lagerung (unter einer Woche) bei +4°C. War von einer Lagerdauer von mehr als einer Woche auszugehen, wurden die Proben bei -20°C aufbewahrt. Es wurde darauf geachtet, Auf- und Abtauzyklen auf ein Minimum zu reduzieren. Die Analyse einer Probe mit den verschieden Kits konnte so stets im Laufe einer Woche und ohne zusätzliche Auf-/Abtauzyklen erfolgen. In aller Regel hat sich so

folgende Lagerungscharakteristik ergeben: Nach Durchführung der ersten PCR wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung für einen Zeitraum von max. 2 Monaten bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden die Proben bei 4°C gelagert und innerhalb einer Woche der Quantifizierung bzw. den weiteren PCR's zugeführt.

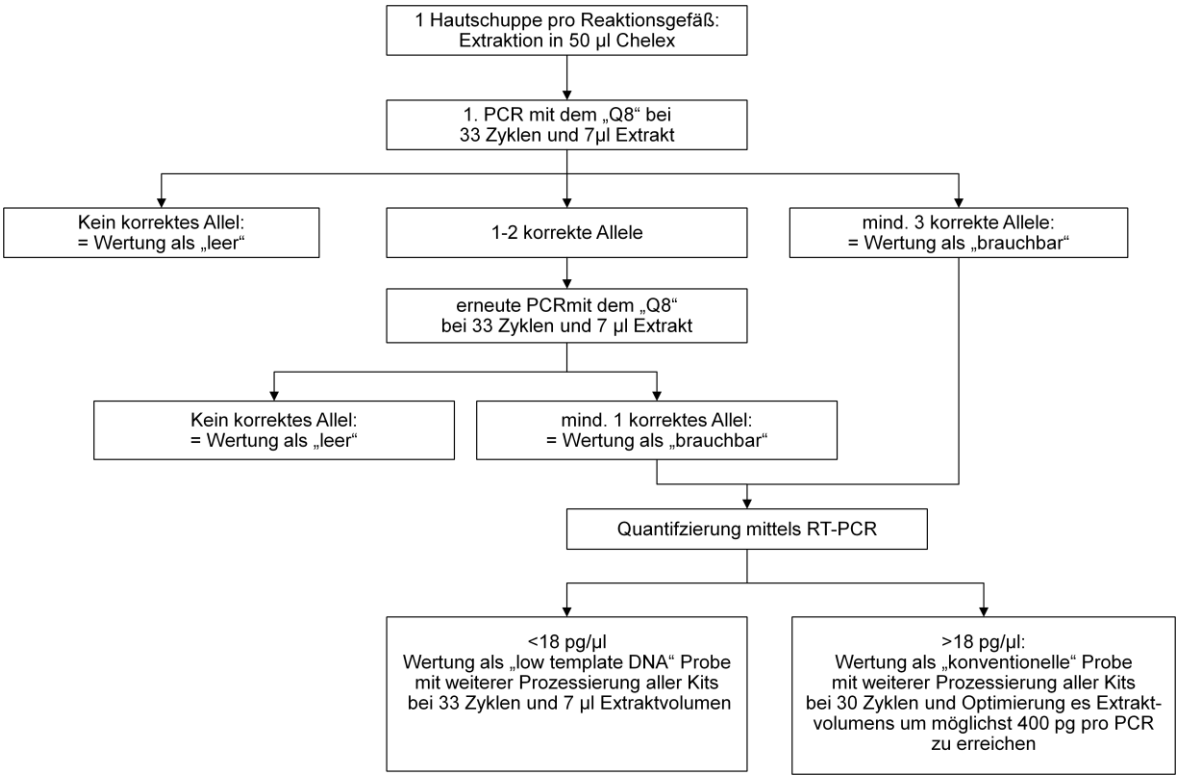


Abb. 1: Schematische Darstellung des Studiendesigns

2.3 Probengewinnung und Umgang mit Klebefolien

Um Aussagen über probandenabhängige Erfolgsraten, Artefakte, Drop-In's und weitere Parameter treffen zu können, war es nötig, künstliche Spuren zu erzeugen, die eindeutig von einer definierten Person mit bekanntem DNA-Profil stammten. Gleichzeitig sollten die angelegten Spuren den Asservaten aus der forensischen Routine möglichst ähnlich sein. Ein typisches Szenario aus der forensischen Routine stellen dabei Vergewaltigungsverbrechen dar. Dabei hinterlässt der in der Regel ohne Handschuhe agierende Täter durch kurzen, heftigen Kontakt Hautepithelzellen an der Opferkleidung. Simuliert wurde dieser Vorgang durch ein eben solches kurzes, kräftiges Ziehen und Halten an einem

zuvor gereinigtem Textilstück ähnlich [26]. Rechtfertigen lässt sich dies auch, da eine Reihe von Arbeiten [1, 4, 17, 25, 32, 32, 42, 45] darauf hindeutet, dass die Übertragung genetischen Materials nicht von der Kontaktzeit, sondern von Eigenschaften des Individuums, der Art des Substrats und dessen Feuchtigkeit, der Intensität des Kontakts, dem Zeitpunkt des letzten Händewaschens, der Wahl von dominanter oder nicht dominanter Hand, der Vorgeschichte dessen was der Proband zuvor mit seinen Händen berührte, der Jahreszeit und weiteren noch unklaren Faktoren abhängig ist. Die so erzeugten Antragungen stammen also direkt von den Händen des Probanden. Um mögliche interindividuelle Unterschiede zu detektieren, wurden Spuren von zehn Probanden an unterschiedlichen Textilien angefertigt. Der jeweilige Kontaktbereich der Stoffstücke wurde selektiv mit selbstklebenden, transparenten Folien abgeklebt und diese wiederum unter dem Auflichtmikroskop auf Hautschuppen abgesucht. Die Eignung von Klebefolien als Asservierungsmethode für DNA-Analytik selbst nach dem Einsatz klassischer daktyloskopischer Verfahren wurde u.a. von [40, 49] wie auch durch gängige Praxis an vielen Landeskriminalämtern v.a. in Deutschland [mündliche Mitteilung: LKA Wiesbaden, LKA München, Rechtsmedizin Universität Ulm] belegt. Des Weiteren wurde im Rahmen der Vorarbeiten zu dieser Arbeit eine Reihe grundlegender Versuche zu Eignung, Effektivität bzgl. der Menge an transferiertem Material und möglicher PCR-Inhibition der verwendeten Klebefolien unternommen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden aus dem Randbereich der Folien keine Proben genommen. Als Vorteilhaft erwies es sich dabei, die Klebefolien auf einem selbst konstruierten Metallrahmen zu fixieren und mit der Klebefläche nach oben gerichtet zu inspizieren. Durch Verkippen des Metallgestells ist es möglich, die dreidimensionale Struktur verdächtiger Antragungen auf der Klebefläche besser einzuschätzen. Da zur Fotodokumentation der Hautschuppen eine Digitalkamera nur für ein Lichtmikroskop und nicht für das Auflichtmikroskop zur Verfügung stand, erfolgte die Sicherung jeder einzelnen Hautschuppe über dieses System. Mit der Software „Pixel-Fox®“ wurden die Hautschuppen in Bezug auf maximalen Durchmesser, Fläche und Umfang vermessen. Wiederum unter dem Auflichtmikroskop wurde jede Hautschuppe einzeln mit einer äußerst feinen Pinzette von der Klebefolie gelöst und unter weiterer Sichtkontrolle unter dem Mikroskop in ein Reaktionsgefäß überführt. Alternativ besteht die Möglichkeit,

besonders bei schwierig mit der Pinzette zu fassenden Hautschuppen, mit einem feinen Skalpell ein kleines Stück Folie mit einer Hautschuppe im Zentrum herauszuschneiden und eben diesen herausgelösten Abschnitt mitsamt der Hautantragung in ein Reaktionsgefäß zu überführen. Für beide Vorgehensweisen erwies es sich als praktikabel, je nach Extraktionsverfahren, entweder 55µl Chelex oder 30 µl Aqua bidest., vorgelegt zu haben, um das Abstreifen der Hautschuppen von der Pinzette zu erleichtern.

2.4 Hämatoxylin - Eosin – Färbung

Für die durchgeführten Hämatoxylin–Eosin-Färbungen gemäß folgendem Protokoll wurden die Klebefolien an mit Distanzstücken versehenen Objektträgern befestigt.

2 min in 100% Isopropanol
2 min in 96% Isopropanol
2 min in 75% Isopropanol
1 min in Aqua dest.
8 min in Hämalaun („Mayer's Hämalaun, Merck; Best.Nr. 109 249)
10 min Spülung mit Leitungswasser
8 min in Eosin
0,5 min in Aqua dest
2 min in 75% Isopropanol
2 min in 96% Isopropanol
2 min in 100% Isopropanol
2 min in Xylol
2 min in Xylol (frische Küvette)

2.5 Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationen

Da von Beginn an mit geringen DNA-Ausbeuten und einer Vielzahl von low copy number Proben zu rechnen war, wurde eine Reihe von Maßnahmen – wie von [15] gefordert - ergriffen, um mögliche Kontaminationen zu vermeiden. Die baulichen Beschaffenheiten entsprachen den Vorgaben getrennter Räumlichkeiten für die einzelnen Arbeitsschritte. Laboreinrichtungen, Tische und Geräte wurden vor und nach den Experimenten mit 10%igem Alkohol gereinigt. Arbeitgeräte wie Pipetten,

Scheren, Pinzetten und der Metallrahmen wurden täglich mit UV Licht (250 nm für 45 min) bestrahlt. Die Pinzette zur Entnahme der Hautschuppen wurde nach jeder einzelnen Hautschuppe intensiv mit 10% Alkohol gereinigt. Die Reaktionsgefäße waren wann immer möglich geschlossen. Für sämtliche Pipettiervorgänge wurden sterile Pipettenspitzen mit aerosoldichten Filtern verwendet. Während der Arbeit wurden Labormantel, Armstulpen, sterile Handschuhe, Haarnetz sowie Mundschutz getragen. Reagenzien wurden auf kleine Volumina aliquotiert, um Mehrfachverwendung zu reduzieren. Jede Probe wurde mehrfach mittels PCR amplifiziert. Für jede Extraktion sowie jeden PCR-Ansatz wurden Leerkontrollen mitgeführt. Deren im Vergleich zu klassischen Laboransätzen veränderte Bedeutung wurde entsprechend den in [15] diskutierten Leitlinien gewürdigt und angewendet.

2.6 DNA – Extraktion

Chelex

Je eine Hautschuppe wurde in ein Reaktionsgefäß zusammen mit 55 µl Chelexlösung 5% (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) und 3 µl Proteinase K (QUIAGEN GmbH, Hilden) gegeben. Einem Teil der Proben wurden zusätzlich je 1,5 µl Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich) zugegeben. Die Inkubation erfolgte im Thermomixer bei 37°C und 450 Upm über Nacht (ca. 14h). Anschließend wurden die Proben 8 Minuten bei 93°C aufgekocht und 15 Minuten bei 13000 Upm zentrifugiert. Der Überstand ohne Chelex-Granulat wurde für Quantifizierung und Multiplex-PCR verwendet.

GEN-IAL®

Bei der zweiten Methode wurde die DNA über alkalische Lyse und Isopropanolfällung mit dem „GEN-IAL® First-DNA all-tissue DNA Kit“ Extraktionskit (GEN-IAL® GmbH, Troisdorf, Deutschland) aus den Hautschuppen extrahiert. Das Protokoll des Herstellers [13] wurde um die Zugabe von 10µl Proteinase K (QUIAGEN GmbH, Hilden) zur Mischung aus „Lyse 1“ und „Lyse 2“ erweitert. Um die Hautschuppen ausreichend zu lysieren, wurde diese Mischung über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag (nach ca. 14h) wurde „Lyse 3“ aus dem GEN-IAL Kit hinzu pipettiert. Im Anschluss wurde der Ansatz gut gemischt und dann für 5 min bei -20°C kalt gestellt. Danach wurde bei 13.000

Upm für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 550 µl Isopropanol versetzt. Das Pellet wurde verworfen. Nach gründlichem Mixen des Gemisches wurde 15 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und anschließend 20 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Nach Verwerfung des Überstands wurde (zur Waschung) 1 ml -20°C kaltes Ethanol zugegeben und danach 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Rest 2 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Die verbliebenen Ethanolreste wurden mit einer Pipette abgenommen und das Pellet 30 min bei 37°C getrocknet. Im Anschluss daran wurde das Pellet in 55 µl Aqua bidest. (HPLC- gereinigt) gelöst und 1h bei 50°C schüttelnd inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren bei 13.000 Upm über 5 min wurde Extrakt aus dem Überstand für die weitere Verarbeitung in die PCR entnommen

2.7 Quantifizierung mittels RealTime-PCR

Die derzeit sensitivste wie auch für den Durchsatz vieler Proben am besten geeignete Methode stellt die RealTime-PCR dar. Verwendet wurde in dieser Arbeit der kommerziell verfügbare Kit Plexor® HY (Promega) auf einem Applied Biosystems 7500 RealTime-PCR System [35, 36].

Der Plexor® HY beruht auf der Interaktion zwischen zwei modifizierten Nukleotiden. Einer der PCR Primer enthält das mit einem Floureszenzmarker versehene Nukleotid iso-dC. Diesem lagert sich bei erfolgreicher PCR das im Reaktionsmix enthaltene, ebenfalls modifizierte Dabcyl-iso-dGTP an und führt bei Einbau in den komplementären DNA Strang zu einer Abnahme der Fluoreszenz. Durch die Verwendung verschiedener Farbstoffe und Primer-Sets ist gleichzeitig die Quantifizierung humaner DNA und humaner männlicher DNA sowie eine Abschätzung möglicher Inhibitoren durch eine Interne PCR Kontrolle (IPC) möglich. Zielsequenz des mit Flourescein als Marker versehenen autosomalen Primers ist eine 99 bp lange multicopy Sequenz auf Chromosom 17 im humanen RNU2 Locus, der für ein an der pre-mRNA Prozessierung beteiligten snRNA codiert. Der Y-chromosomale Primer ist CAL Flour® Orange 560 markiert und amplifiziert eine 133 bp lange Sequenz des hodenspezifischen Proteins, Teil des YSPY Locus. CAL Flour® RED 610 ist der Floureszenzmarker für die IPC, IC5 ist als vierter Farbstoff ebenfalls in allen Wells als Passivreferenz enthalten. Die von 6,4 pg bis 100 ng reichende Standardreihe ermöglicht eine sensitive wie valide

Quantifizierung im genannten Intervall. Die Durchführung folgte den Vorgaben des Technical Manuals [35, 36], einzig das eingesetzte Probenextraktvolumen wurde von 2 µl auf 3 µl erhöht. Entsprechend wurden pro Reaktion 10 µl Master Mix, 1 µl Primer/IPC Mix, 6 µl Aqua bidest. und 3 µl Template-DNA angesetzt. Jede Probe wurde per Doppelbestimmung bei zwei Standardreihen und zwei Leerkontrollen je Lauf quantifiziert. Das PCR-Programm besteht aus einer initialen Denaturierung bei 95°C über 2 min mit darauf folgenden 38 Zyklen aus einer 5 sec Denaturierung bei 95°C und einer 35 sec Annealing- und Extension Phase bei 60°C. Eine dem PCR-Programm folgende Schmelzkurve ermöglicht die Kontrolle der Spezifität der entstandenen Produkte. Zur Auswertung der Rohdaten wurde die Plexor Analysis Software 1.4 verwendet.

2.8 Verwendete STR-Multiplex Kits

2.8.1 Q8

Beim Q8 handelt es sich um einen miniSTR-Multiplex-PCR-Kit mit verkürzten Amplikons für die acht deutschen Datenbanksysteme D3S1358, FGA, TH01, VWA, SE33, D8S1179, D18S51 und D21S11 sowie den Geschlechtsmarker Amelogenin. Pro Reaktion wurde folgender in [29] beschriebene Ansatz für ein Gesamtvolumen von je 10,9 µL verwendet:

1,6 mM $MgCl_2$ (Applied Biosystems)
0,3 µg BSA (Boehringer Mannheim GmbH)
1,25 µl PCR-Buffer II (Applied Biosystems)
0,1 mM je Nukleotid
0,75 µl Primer-Mix
2U Ampli Taq Gold (Applied Biosystems)
1 – 7 µl DNA-Template
0 – 6 µl Aqua bidest.

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Biometra) mit den folgenden Amplifikationszyklen durchgeführt:

Hot Start	11 min bei 95°C
30 bzw. 33 Zyklen:	Denaturierung: 1 min bei 93°C

	Annealing: 1 min bei 59°C
	Elongation: 30 s bei 72°C
abschließende Elongation:	40 min bei 72°C

Für die Elektrophorese auf einem ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) wurde je 10 µl HiDi™ Formamid (Applied Biosystems), 0,5 µl Längenstandard GeneScan™ 500 ROX Size Standard (SERAC, Bad Homburg) sowie 1 µl Amplifikat je Well eingesetzt und für 4 min bei 94°C aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte mit dem Polymer POP7 bei einer Injektionszeit von 16 s, einer Injektionsspannung von 1,2 kV und einer Laufzeit von 800 s Zur Auswertung wurde die Software GeneMapperID v3.2 (Applied Biosystems) verwendet.

2.8.2 PowerPlex® S5

Beim PowerPlex® S5 (Promega) handelt es sich um einen miniSTR-Kit mit auf eine Länge von weniger als 260 bp verkürzten Amplikons für vier autosomale STR Marker (D8S1179, D18S51 TH01 und FGA) sowie den Geschlechtsmarker Amelogenin. Alle diese Marker sind auch im deutschen Datenbanksystem enthalten. Das weitere Vorgehen folgte dem Herstellerprotokoll [37], lediglich das Reaktionsvolumen wurde auf insgesamt 12,5 µl reduziert was einer Halbierung der Reagenzien entspricht. Daraus ergab sich je Reaktion ein Ansatz aus 2,5 µl Master Mix, 1,25 µl Primer Mix und bis zu 7 µl DNA-Template. Fehlendes Volumen wurde durch Aqua bidest. ergänzt.

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Biometra) mit den folgenden Amplifikationszyklen durchgeführt:

Hot Start	2 min bei 96°C
30 bzw. 33 Zyklen:	Denaturierung: 20 sec bei 94°C
	Annealing: 2 min bei 60°C
	Elongation: 90 sec bei 72°C
abschließende Elongation:	45 min bei 60°C

Für die Elektrophorese auf einem ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) wurde je 10 µl HiDi™ Formamid (Applied Biosystems), 0,5 µl LängenStandard (ILS 600®) sowie 1 µl Amplifikat je Well eingesetzt und für 4 min

bei 94°C aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte mit dem Polymer POP7 bei einer Injektionszeit von 5 sec, einer Injektionsspannung von 3kV und einer Laufzeit von 1200 s Zur Auswertung wurde die Software GeneMapperID v3.2 (Applied Biosystems) verwendet.

2.8.3 AmpFISTR® MiniFiler™

Beim AmpFISTR®miniFiler (Applied Biosystems) handelt es sich um einen miniSTR-Kit mit auf eine Länge von 70 bp bis 283 bp verkürzten Amplikons für acht autosomale STR Marker (D13S317, D7S820, D2S1338, D21S11, D16S539, D18S51, CSF1PO und FGA) sowie den Geschlechtsmarker Amelogenin [28]. Die Primer aller Loci mit Ausnahme von D13S317 sind um „non-nucleotide linkers“ verlängert. Drei der Marker sind auch im deutschen Datenbanksystem enthalten. Das weitere Vorgehen folgte dem Herstellerprotokoll [3], lediglich das Reaktionsvolumen wurde auf insgesamt 14,5 µl reduziert was einer Halbierung der Reagenzien entspricht. Daraus ergab sich je Reaktion ein Ansatz aus 5 µl Master Mix, 2,5 µl Primer Mix und bis zu 7 µl DNA-Template. Fehlendes Volumen wurde gegebenenfalls durch Aqua bidest. ergänzt.

Die PCR wurde in einem Thermocycler (Biometra) mit den folgenden Amplifikationszyklen durchgeführt:

Hot Start	11 min bei 95°C
30 bzw. 33 Zyklen:	Denaturierung: 20 sec bei 94°C
	Annealing: 2 min bei 59°C
	Elongation: 1 min bei 72°C
abschließende Elongation:	45 min bei 60°C

Für die Elektrophorese auf einem ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) wurde je 10 µl HiDi™ Formamid (Applied Biosystems), 0,3 µl Längenstandard (GeneScan™ 500 LIZ®) sowie 1 µl Amplifikat je Well eingesetzt und für 4 min bei 94°C aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte mit dem Polymer POP7 bei einer Injektionszeit von 16 s, einer Injektionsspannung von 1,2 kV und einer Laufzeit von 800 s Zur Auswertung wurde die Software GeneMapperID v3.2 (Applied Biosystems) verwendet.

2.8.4 AmpFISTR® SEfiler™

Beim AmpFISTR® SEfiler™ (Applied Biosystems) handelt es sich um einen STR-Kit mit Amplikons mit einer Länge von 106 bis 353 bp für 11 autosomale STR Marker (D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, TH01, vWA, D2S1338, D3S1358, D16S539, D19S433 und Se33) sowie den Geschlechtsmarker Amelogenin. Es werden somit zusätzlich zu den acht, im deutschen Datenbanksystem enthalten Systemen, drei weitere amplifiziert [11]. Das weitere Vorgehen folgte dem Herstellerprotokoll [2], auch hier wurde das Reaktionsvolumen auf insgesamt 14,5 µl reduziert was einer Halbierung der Reagenzien entspricht. Daraus ergab sich je Reaktion ein Ansatz aus 5 µl Master Mix, 2,5 µl Primer Mix und bis zu 7 µl DNA-Template. Fehlendes Volumen wurde gegebenenfalls durch Aqua bidest. ergänzt.

Die PCR wurde in einem Thermocycler mit den folgenden Amplifikationszyklen durchgeführt:

Hot Start	11 min bei 95°C
30 bzw. 33 Zyklen:	Denaturierung: 20 sec bei 94°C
	Annealing: 2 min bei 59°C
	Elongation: 1 min bei 72°C
abschließende Elongation:	45 min bei 60°C

Für die Elektrophorese auf einem ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) wurde je 10 µl HiDi™ Formamid (Applied Biosystems), 0,3 µl Längenstandard (GeneScan™ 500 LIZ®) sowie 1 µl Amplifikat je Well eingesetzt und für 4 min bei 94°C aufgekocht. Die Elektrophorese erfolgte mit dem Polymer POP7 bei einer Injektionszeit von 16 s, einer Injektionsspannung von 1,2 kV und einer Laufzeit von 1000 s Zur Auswertung wurde die Software GeneMapperID v3.2 (Applied Biosystems) verwendet.

2.9 Aufreinigung der PCR-Amplifikate

Die Aufreinigung des PCR-Produkts einiger ausgewählter Proben erfolgte mit dem „QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gemäß dem Protokoll des Herstellers [38]. Dieses System entfernt fast vollständig alle Enzyme, Salze, Oligomere, überschüssige Primer, Nukleotide und diverse weitere Fremdstoffe und konzentriert doppelsträngige DNA mit einer Länge zwischen 70 bp und 4 kb

auf ein Endvolumen von 9 µl. Das Verfahren beruht aus drei Schritten. In einer ersten Stufe wird in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Salzen und des herrschenden pH-Wertes doppelsträngige DNA an eine Siliciumdioxid-Membran gebunden. Einem zwischengeschalteten Waschschritt folgt die Eluation der DNA von der Salicat-Membran der Säulchen.

2.10 Auswertung der Kapillarelektrophoresedaten

Die Auswertung der Rohdaten aus der Kapillarelektrophorese erfolgte mittels „GenMapper ® ID Software 3.2“ (Applied Biosystems). Für alle kommerziell erhältlichen Kits stehen von Seiten der Hersteller fertige Sets für Bins und Panels bereit. Die weiteren Einstellungen sind ebenfalls den Manuals der Hersteller zu entnehmen [2, 3, 10, 37]. Allele wurden entsprechend laborinterner Validierungen und Standards ab einer RFU von mindestens 50 gewertet. Traten in der Elektrophorese andere, als die erwarteten Allele auf, folgte eine empirisch basierte Einteilung auf Grundlage in drei Kategorien: 1. Die RFU des Artefakts übersteigt den 1,4 fachen RFU Wert des niedrigsten korrekten Allels innerhalb eines Locus. In diese Kategorie wurden auch sämtliche Artefakte bei gleichzeitigem Drop-out eines korrekten Alleles in einem heterozygoten Locus aufgenommen. 2. Die RFU des Artefakts beträgt den 0,7 bis 1,4 fachen RFU Wert des niedrigsten korrekten Allels. 3. Die RFU des Artefakts liegt unter dem 0,7 fachen RFU Wert des niedrigsten korrekten Allels. Eine Differenzierung der Artefakte in Drop-Ins und Stutter-Peaks fand wegen fehlender Relevanz nicht statt.

2.11 Optimierungsversuche für LTDNA-Proben

Neben der Erhöhung der PCR-Zyklenzahl von 30 auf 33 wie von [15] empfohlen und laborintern validiert, wurden von Budowle B. et al. [7] vorgeschlagene Optimierungsversuche unternommen. Es wurde grundsätzlich und für alle Proben nur Formamid mit niedriger Konduktivität verwendet, das PCR-Volumen wurde, nach laborinternen Validierungen, auf die Hälfte des von den Herstellern vorgegebenen Volumens reduziert. Für einige Proben wurde darüber hinaus mit dem Einsatz von 1,5 µl statt 1 µl Amplifikat, einer um die Faktoren 1, 5 und 2 verlängerten Injektionszeit und die Aufreinigung und gleichzeitige Konzentration des Amplifikats mittels beschriebenem „QIAquick® PCR Purification Kit“ experimentiert.

2.12 Bildung der Konsensus – Ergebnisse

Entsprechend den Leitlinien von Gill et al. [15] wurden für alle Proben Konsensusergebnisse aus verschiedenen PCR-Durchläufen gebildet. Gewertet wurden nur Allele, die sich in mindestens zwei unabhängigen PCR-Durchläufen wieder fanden. Da die getesteten Kits verschiedene Systeme abdecken, wurden die Konsensus-Ergebnisse für die einzelnen Systeme zwangsläufig auf einer recht heterogenen Grundlage gebildet: Die Systeme Amelogenin, FGA und D18 werden dabei von allen Kits erfasst. Das Konsensusergebnis für diese Systeme beruht somit auf fünf PCR-Ansätzen. Entsprechend wurden die Systeme D8, D21, TH01 viermal, D3, vWA, Se33 dreimal und D2, D16 nur zweimal erfasst. Ein Konsensusergebnis besteht somit aus elf Loci.

3. Ergebnisse

3.1 Vorarbeiten

Da die Verwendung von Klebefolien in der forensischen Literatur in Hinblick auf moderne DNA-Analytik nur begrenzt beschrieben ist, waren zu Beginn der Arbeit eine Reihe auch von laborinternen Vorarbeiten und das Sammeln von praktischer Erfahrung und Fertigkeiten von Nöten.

Als am praktikabelsten erwiesen sich die in der Materialsammlung angegebenen Folien. Ihr Klebstoff ist weniger stark, als der, in der bisherigen polizeilichen Asservierung weit verbreiteten Kleberollen, und ermöglicht somit einen einfacheren manuellen Umgang. Die Abmessung von ca. 10 cm x 20 cm erlaubt eine sowohl selektive wie auch flächige Asservierung bei gleichzeitiger Wahrung eines Pufferbereichs zum Folienrand, um Kontaminationen zu vermeiden. Trotz dieser Vorteile ist auch die Probengewinnung mittels der Kleberollen möglich und kann, z.B. bei der Aufarbeitung von Altfällen, von Nutzen sein.

Um die Detektierbarkeit von Hautschuppen zu verbessern, wurden Klebefolien mittels Hämatoxyilin–Eosin gefärbt. Praktisch ergab sich aufgrund der unselektiven Anfärbung diverser auf den Folien haftender Partikel kaum ein Nutzen. Daneben machen die nicht zu vertretende Kontaminationsgefahr wie auch der erhebliche Mehraufwand dieses Vorgehen für die Routine unbrauchbar. Weiter prozessierte, mittels Hämatoxyilin–Eosin gefärbte, Hautschuppen zeigten in den STR-Profilen eine auffällig erhöhte Artefaktanfälligkeit. Mögliche Ursache hierfür ist, neben der gesteigerten Kontaminationsgefahr, ein Einfluss der Färbesubstanzen selbst. Entsprechend wurde im Weiteren auf die Anfärbung verzichtet.

Da eine manuelle Methode der Probengewinnung, wie beschrieben, darin besteht, kleine Folienstücke um eine verdächtige Hautschuppe herum auszuschneiden und beides zusammen in ein Extraktionsgefäß zu gegeben, wurden Folie und Kleber auf eine mögliche PCR-Inhibition untersucht. Eine solche Inhibition ließ sich dabei nicht nachweisen. Folienstücke, auf denen die Lage der Hautschuppen mit Filzstift markiert war, zeigten bei Extraktion mit Chelex in der Elektrophorese massivste Artefakte. Folglich ist bei der sehr praktischen Markierung der Lage der Hautschuppen auf der Klebefolie exakt darauf zu achten, keinen Anteil an markierter Klebefolie oder Klebstoff mit in das Extraktionsgefäß zu überführen.

Folgte die Extraktion dem GEN-IAL® Protokoll, waren dagegen auch bei hoher Beimengung von Farbstoff aus dem Filzstift keine vermehrten Artefakte nachweisbar.

Sämtliche Spuren wurden an Kleidungsstücken erzeugt. Der Umgang mit den Klebefolien war dabei abhängig vom Stofftyp der Textilien unterschiedlich praktikabel. Als unpraktisch für die Begutachtung unter dem Mikroskop und das Selektieren der Hautschuppen mit Pinzette erwiesen sich langfaserige, lockere Textilien. Durch die vielen, langen Fasern, die mit an der Klebefolie haften, forderte die Inspektion unter dem Mikroskop eine erhöhte Aufmerksamkeit. Gleichzeitig sind eventuelle Hautschuppen häufig unter Fasern oder Faserknäueln verdeckt und müssen erst mit der Pinzette freigelegt werden. Dagegen waren fest gewebte Stoffe deutlich leichter zu untersuchen. Bei ihnen gibt es auf den Klebefolien deutlich weniger störende Faserbeimengungen und nahezu keine Verdeckung von Hautschuppen. Als tendenziell schwierige Asservate lassen sich somit z.B. Wolltextilien, als relativ leichte dagegen z.B. Baumwolltextilien wie auch Jeans-Stoff klassifizieren.

Ebenfalls im Rahmen der Vorarbeiten wurden Versuche durchgeführt, um die Eignung der Klebefolien einzuschätzen, genetisches Material vom Asservat zu binden. Dazu wurden Textilflächen zunächst mit Wattetupfern (mit Aqua bidst. angefeuchtet) abgerieben und erst anschließend mit den Klebefolien abgeklebt. Auch auf diesen Klebefolien fanden sich Hautschuppen, die sich erfolgreich untersuchen ließen. Beim umgekehrten Vorgehen dagegen, also Tupferabriebe nach Klebefolien, fanden sich in den Analysen aus den Abrieben nur noch Einzelallele.

Ein Ansatzpunkt, um die Anzahl der PCR-Reaktionen und damit der Kosten zu reduzieren, bestand darin, mehrere einzelne Hautschuppen in ein Reaktionsgefäß zu überführen. Auf diese Weise ließen sich erwartungsgemäß höhere Erfolgsraten erzielen. Da dieses Vorgehen jedoch dem Ziel der Individualmustergewinnung zuwiderläuft, wurde in der weiteren Arbeit auf dieses sogenannte „Poolen“ von Hautschuppen verzichtet. Im Rahmen dieser Arbeit und den dazu nötigen Vorversuche wurden ca. 850 Hautschuppen von fünf verschiedenen Probanden analysiert und ca. 1300 PCR’s durchgeführt.

3.2 Gesamtüberblick zu Erfolgraten

In bisherigen Arbeiten zu Hautkontaktspuren war die Zielgröße letztlich immer die Erfolgsrate erfolgreicher STR-Profile pro Flächeneinheit. Hier dagegen interessierte die Erfolgsrate pro Hautschuppe, unabhängig von der Größe der Antragungsflächen und weiterer Faktoren. In die Auswertung dieser Arbeit aufgenommen wurde die Analyse von 449 einzelnen Hautschuppen. Nach dem ersten Durchlauf der Proben mittels Q8 (Abb.2) wurden 384 Proben (=86%) als leer gewertet, 65 Proben (=14%) wurden mittels RealTime-PCR Plexor HY quantifiziert und mit den Kits Q8, Power Plex S5, miniFiler und SeFiler erneut der STR-Analyse zugeführt, um aus den Einzelergebnissen ein Konsensusprofil bilden zu können. Bezogen auf dieses Konsensusprofil (Abb. 2) ließ sich in 15 Proben (=3%) ein Vollprofil, in 17 Proben (=4%) ein Teilprofil mit sechs bis zehn korrekten Systemen, in 10 Proben (=2%) mit drei bis fünf korrekten Systemen, in 15 Proben (=3%) lediglich mit ein bis zwei korrekten Systemen und in 8 Proben (=2%) ohne ein korrektes System, sondern nur noch korrekte einzelne Allele nachweisen.

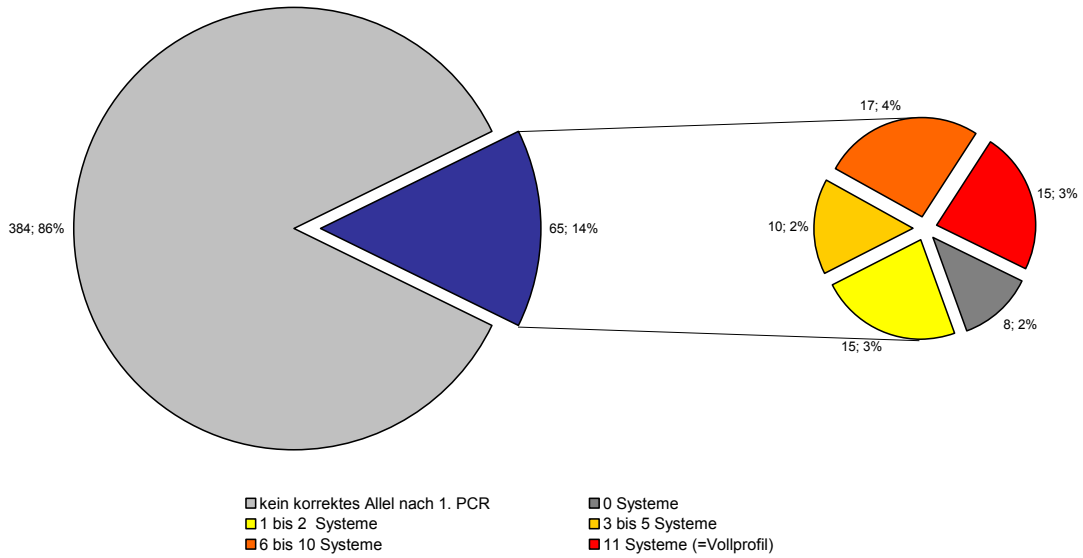


Abb. 2: Gesamtüberblick zu den Erfolgsraten
Anzahl und Anteil der mit allen Kits amplifizierten Proben an den insgesamt generierten Proben, sowie Anzahl und Anteil der Proben aufgeschlüsselt nach der Anzahl korrekt amplifizierter Short-Tandem-Repeat -Systeme (auf Grundlage des Konsensusprofils)

Fasst man nun alle Proben mit mindestens drei korrekten Systemen im Konsensusprofil zusammen, beträgt die Erfolgsquote somit 9%. Die Prozentangaben beziehen sich dabei stets auf die insgesamt analysierten Hautschuppen.

3.3 Größe der Hautschuppen

Vorweg muss für alle Angaben zur Größe der Hautschuppen bedacht werden, dass es sich um 2-dimensonale Angaben einer 3-dimensonalen Struktur handelt. Flächige Schuppen können unter dem Mikroskop flach, also mit einer großen Fläche und Durchmesser oder im rechten Winkel zur Folie aufgestellt und entsprechend kleiner Fläche imponieren. Sie können von runder ebenso wie von planer Gestalt sein, also bei entsprechender Betrachtung ähnliche Abmessung, aber ein erheblich differierendes Volumen besitzen. So ist die Größenangabe einzelner Schuppen mit Vorsicht zu interpretieren, in der Gesamtheit ergeben sich aber brauchbare Größen. Dokumentiert wurden die Größen „maximaler Durchmesser“, „Umfang“ und „Fläche“ einer jeden Schuppe. Aus theoretischen Überlegungen sollte die Fläche am besten mit der tatsächlichen Größe korrelieren und ist somit in Abb. 3 und Abb. 4 angegeben. Leichter vorzustellen, einfacher zu erfassen und für die meisten Belange letztlich hinreichend aussagekräftig ist dagegen der maximale Durchmesser. Abb. 3 zeigt die Erfolgsrate bei der Gewinnung der STR-Profile für Hautschuppen unterschiedlicher Größen, eingeteilt in vier Kategorien. Da alle Proben, also auch die, für die kein Konsensusprofil vorliegt, betrachtet werden sollen, beruhen die Daten auf dem ersten Durchlauf mit dem Q8, bilden somit keine exakte Wiedergabe zu erwartender Erfolgsquoten, sind aber in sich vergleichbar und im relativen Verlauf stimmig. In der Abb. 3 ist der Anteil der Hautschuppen im jeweiligen Größenintervall angegeben, aus denen im Q8 STR-Profil mindestens drei korrekte Allele amplifiziert wurden. Erwartungsgemäß nahm die Erfolgsrate mit der Größe der Schuppen zu. Bei einer Schuppengröße unter 26.0000 µm² (entspricht in etwa einem Maximaldurchmesser von 200 µm) lag die Erfolgsquote deutlich niedriger als in den beiden mittleren Intervallen, deren Quote wiederum von den Hautschuppen mit einer Größe von >53.0000 µm² (entspricht in etwa einem Durchmesser von mindestens 350 µm) übertroffen wird. Der Grenzbereich um 26.000µm² ist

gleichzeitig in etwa der Bereich, ab dem es manuell-handwerklich deutlich einfacher wird, die Partikel aufzunehmen. Etwas detaillierter sind die Ergebnisse in Abb. 4 dargestellt. Grundlage bilden ebenfalls die Daten aus dem ersten Durchgang mit dem Q8. Angeben sind jeweils Anzahl und Anteil an Proben mit einer bestimmten Anzahl korrekt amplifizierter Allele im jeweiligen Größenintervall der Hautschuppen. Zu beachten ist dabei, dass brauchbare STR-Profile zwar mit einer Zunahme der Schuppengröße wahrscheinlicher werden, aber Grundsätzlich auch schon bei sehr kleinen Schuppen bis hin zum Vollprofil möglich sind.

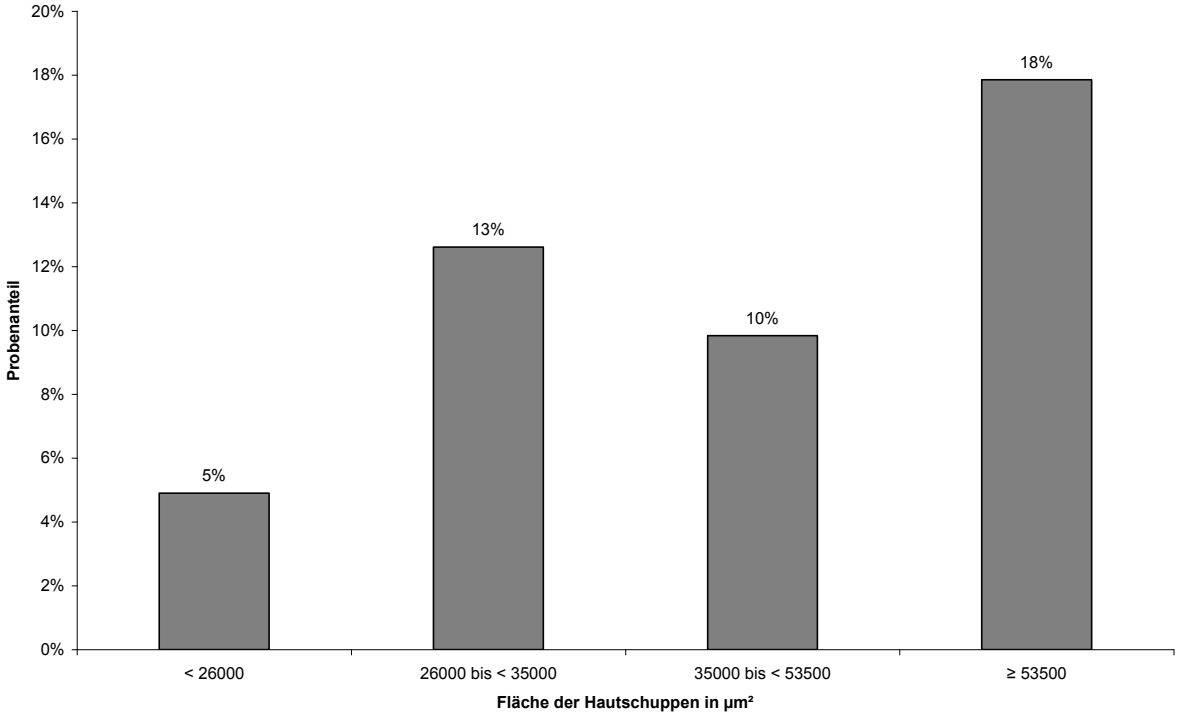


Abb. 3: Erfolgsraten und Schuppengröße
Anteil der Proben mit mindestens drei korrekten Allelen der ersten Polymerase-Kettenreaktion, aufgeschlüsselt nach Größe der Hautschuppen

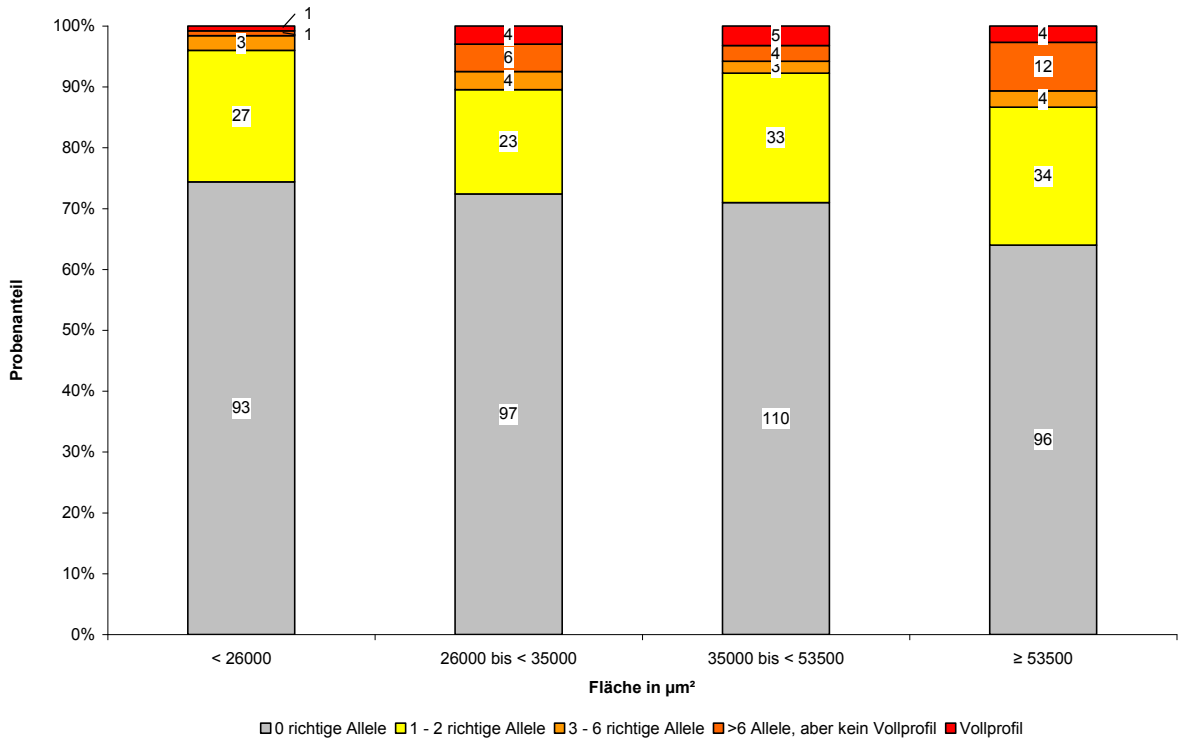


Abb. 4: Erfolgsraten und Schuppengröße
Anzahl der Proben, eingeteilt in fünf Kategorien bezüglich der Anzahl der in der ersten Polymerase-Kettenreaktion korrekt amplifizierten Allele, aufgeschlüsselt nach Größe der Hautschuppen

3.4 Interpersoneller Vergleich der Erfolgsraten

Den in Abb.5 dargestellten interindividuell unterschiedlichen Erfolgsraten liegen die Daten aus der ersten PCR mittels Q8 zugrunde. Aufgetragen ist der Anteil der Proben mit mindestens einem korrekten System. Für einen Vergleich lohnend sind dabei insbesondere Proband 2 und 4, da für beide eine gleich hohe Fallzahl vorliegt, bei einer im Mittel gleichen Größe der Hautschuppen (Median des max. Durchmessers jeweils 250 µm). Ein interindividueller Unterschied ist deutlich zu erkennen. Aber auch bei den Probanden 1, 3 und 5 lassen sich trotz der geringeren Fallzahl und leicht differierender Durchschnittsgröße (Median des max. Durchmesser: Proband 1: 315µm; Proband 3: 250µm; Proband 5: 290µm) Unterschiede erkennen, insbesondere da aufgrund der Schuppengröße von Proband 1 bei ihm eigentlich von einer höheren Erfolgsrate auszugehen wäre.

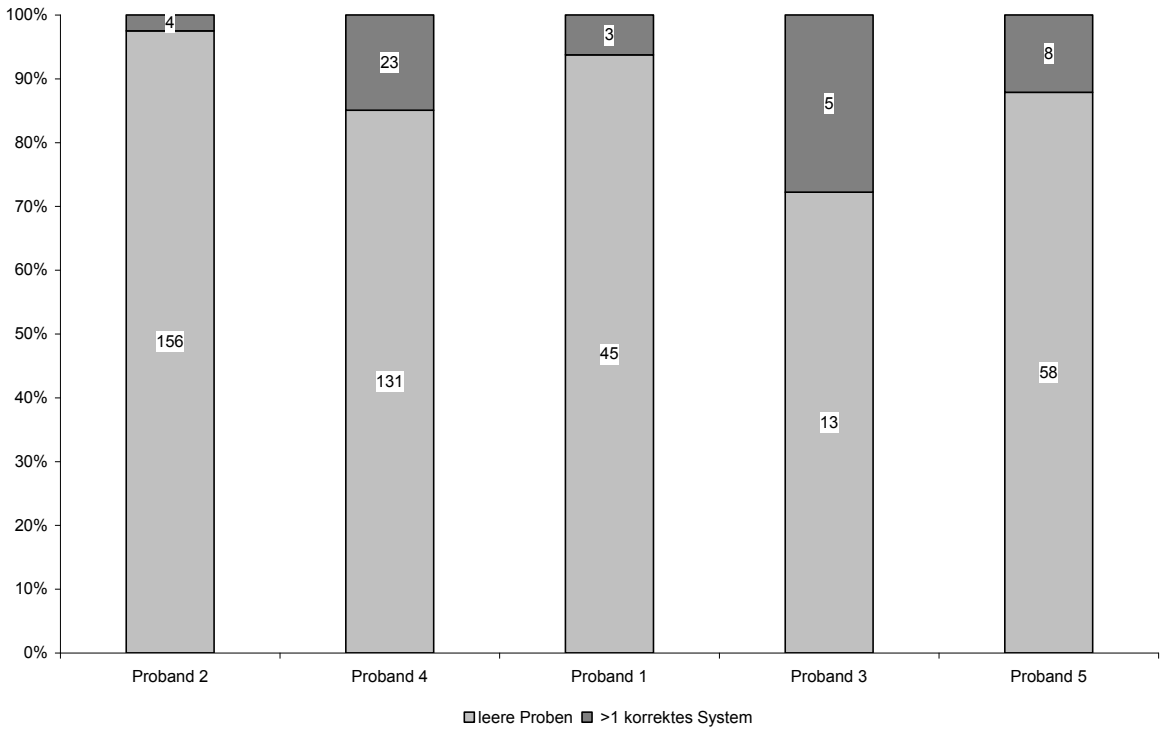


Abb. 5: Interindividueller Vergleich der Erfolgsraten
Anzahl und Anteil der Proben mit mindestens einem korrekten Short-Tandem-Repeat-System in der ersten Polymerase-Kettenreaktion, je Proband aufgetragen. Als „leer“ wurden alle Proben ohne ein einziges komplett richtiges Short-Tandem-Repeat -System gewertet.

3.5 Extraktion

Zu Beginn der Arbeit und im Rahmen der Vorarbeiten wurden die beiden Extraktionsmethoden Chelex und GEN-IAL in gleichem Umfang genutzt. Da das erheblich arbeitsaufwändigere GEN-IAL Verfahren für diese Art von Proben subjektiv keinen Vorteil bei den Erfolgsraten erbrachte, wurden sämtliche der weiteren Arbeit zugrunde liegenden Proben mittels des beschriebenen Chelex Verfahrens extrahiert. Innerhalb der Chelex-Extraktion wurde einem Teil der Proben DTT bei der Extraktion zugefügt. Abb. 6 zeigt die Erfolgsraten je Proband und „mit“ und „ohne“ DTT-Zugabe (2µl / Extraktion) mit dem Kriterium mindestens dreier korrekter Allele in der ersten PCR mittels Q8. Innerhalb der Probanden zeigt sich weder bei Proband 2 noch bei Proband 4 ein relevanter Unterschied, ebenso wenig bei einer gemeinsamen (aufsummierten) Betrachtung der beiden Probanden.

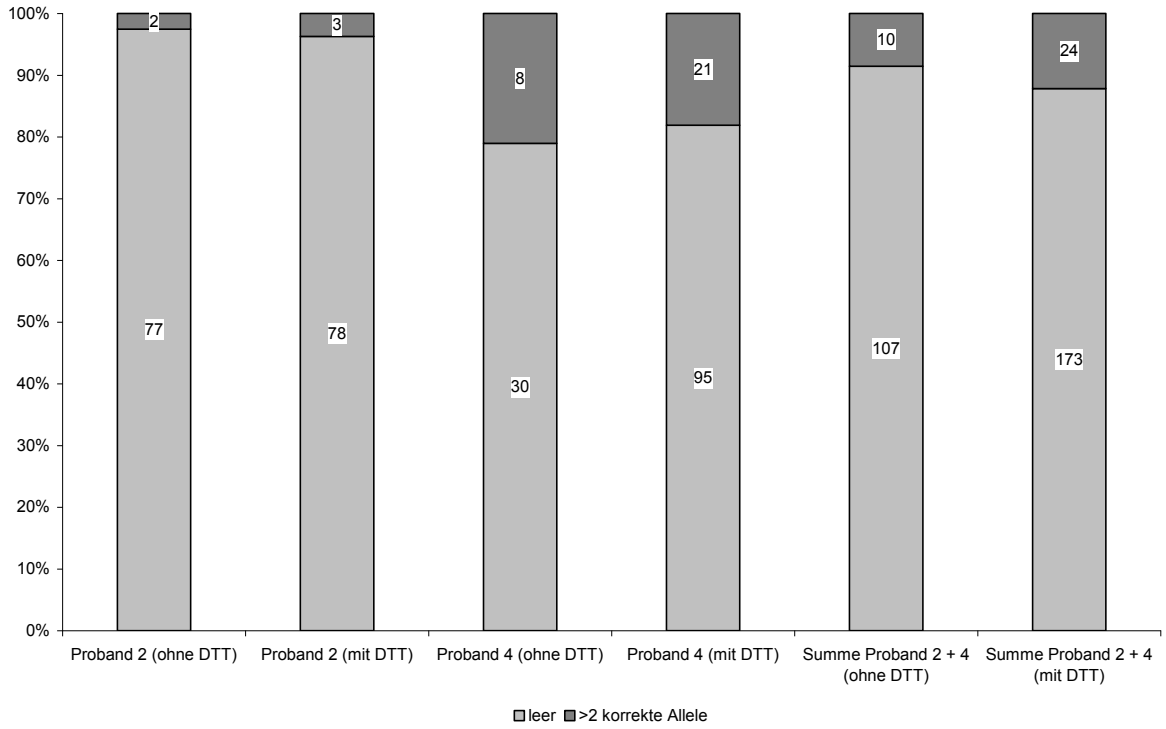


Abb. 6: Erfolgsraten mit und ohne Zugabe von Dithiothreitol während der Extraktion
Anzahl und Anteil der Proben mit mehr als zwei korrekten Allelen in der ersten Polymerase-Kettenreaktion, für Proband 2 und 4 sowie deren Summe aufgetragen. Als „leer“ wurden alle Proben gewertet, die nur zwei oder weniger korrekte Allele enthielten.

3.6 Quantifizierung

Die Quantifizierung der mittels des ersten Q8 PCR-Durchlaufs selektierten Proben erfolgte durch den RealTime-PCR Kit Plexor® HY in einer Doppelbestimmung je Probe. Abb. 7 gibt eine Übersicht zum gemessenen DNA-Gehalt pro Hautschuppe und deren Verteilung. Durch die Quantifizierung und Hochrechnung des DNA-Gehalts auf jede einzelne Hautschuppe lassen sich, wenn auch recht fehlerbehaftete, Überlegungen zum Anteil kernhaltiger Zellen stellen. Da das Volumen der Hautschuppen nicht messbar ist, muss es abgeschätzt werden. Dafür soll stark vereinfachend eine kugelförmige Gestalt mit bekannten, da gemessenem, Radius angenommen werden. Bei einer angenommenen Größe je Zelle von ca. 10 µm x 8 µm x 5 µm lässt sich so aus dem Volumen der Hautschuppe und dem Volumen einer durchschnittlichen Zelle auf die Gesamtanzahl an Zellen je Hautschuppe schließen. Die Anzahl der Zellen mit intaktem Kern ergibt sich dagegen aus den gemessenen DNA-Mengen, wobei ca. 6 pg der DNA-Menge eines diploiden Chromosomensatzes einer intakten Zelle

entsprechen. So gerechnet lag der Anteil kernhaltiger Zellen je Hautschuppe für alle Proben deutlich unter 30%, für gut 90% der Proben unter 10%.

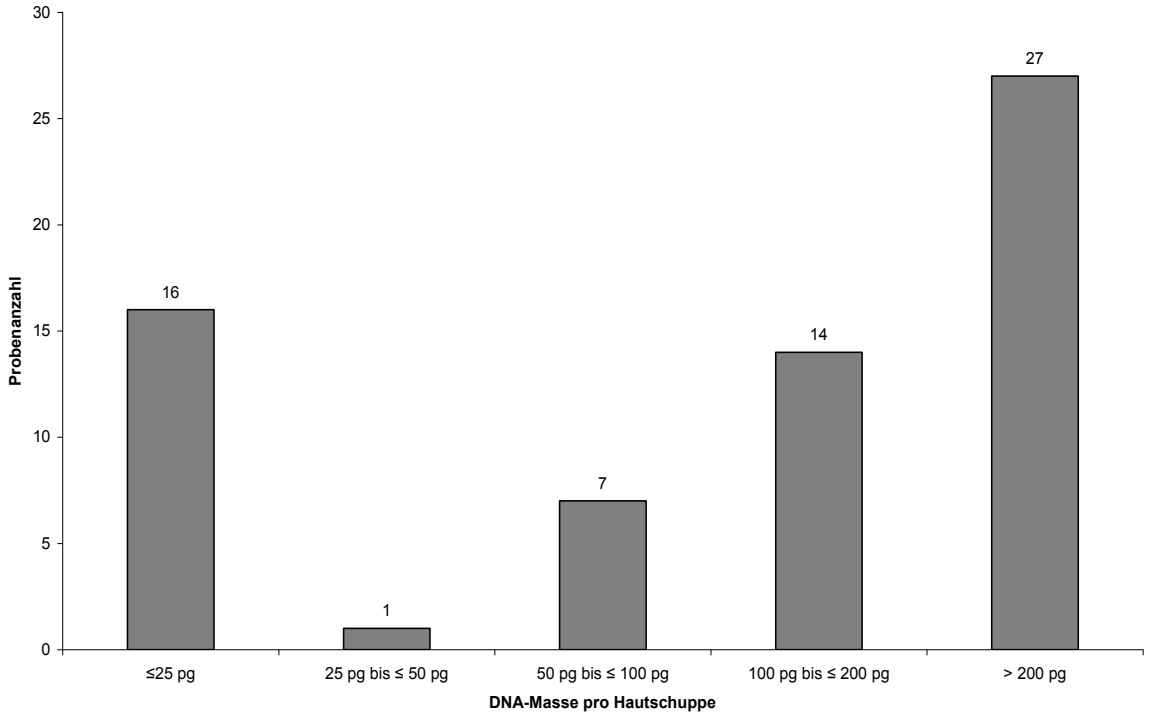


Abb. 7: Verteilung des Desoxyribonukleinsäure -Gehalts pro Hautschuppe
Anzahl der Hautschuppen im entsprechenden Masseintervall
(1.Quartile: 45 pg; Median: 167 pg; 3. Quartile: 635 pg; Maximum: 65 ng; Angaben pro Hautschuppe)

Die im Weiteren angegebenen DNA-Mengen beziehen sich stets auf die tatsächlich in jede Multiplex-PCR eingesetzt Masse. Tab. 1 erlaubt einen Überblick über die Erfolgsraten der einzelnen Kits und des Konsensusergebnisses in Abhängigkeit von der quantifizierten DNA-Menge in absoluten wie relativen Zahlen.

Den Zusammenhang von mittels RT-PCR gemessener DNA-Menge und Typisierungserfolg im Konsensusergebnis zeigt Abb. 8. Ab einer pro Reaktion eingesetzten DNA-Menge von 50 pg konnte bei allen Proben ein mindestens datenbankverwertbares Profil mit mindestens fünf korrekten Systemen erzielt werden. Bei einer Ausgangsmasse von <12 pg ließen sich lediglich in einem Teil der Proben einzelne Systeme korrekt amplifizieren. Bereits im Intervall von 12 pg bis 25 pg ließ sich bei über der Hälfte der Proben ein datenbankverwertbares Profil inklusive eines Vollprofils generieren.

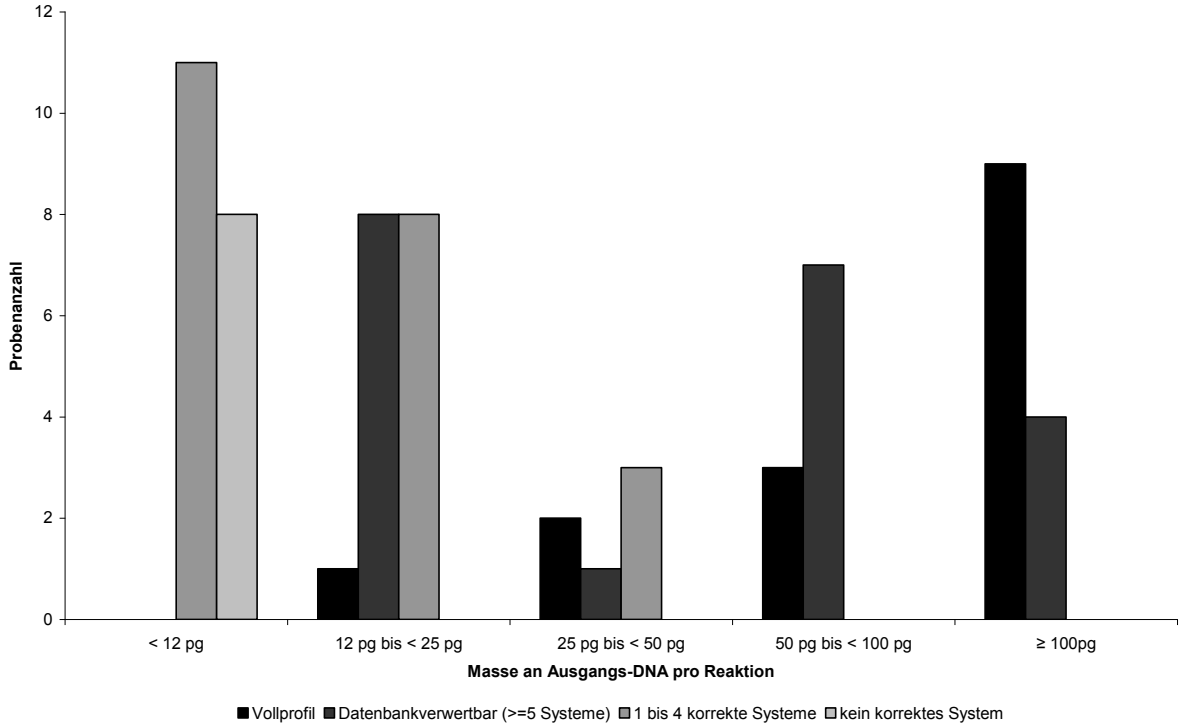


Abb. 8: Quantifizierungsdaten und Qualität der Konsensus- Short-Tandem-Repeat - Profile
Anzahl der Proben mit unterschiedlicher Anzahl korrekter Systeme im Konsensusprofil, aufgetragen in Abhängigkeit von der Desoxyribonukleinsäure - Ausgangsmasse pro Polymeraser-Kettenreaktion

Tab. 1: Quantifizierung und STR-Profile
Anzahl bzw. relativer Anteil der Proben, aufgeschlüsselt nach Güte des Short-Tandem-Repeat -Profils je Kit und eingesetzter Desoxyribonukleinsäure -Menge je Polymerase-Kettenreaktion

		Probenanzahl im jeweiligen Masse-Intervall						relativer Anteil der Proben im jeweiligen Masse-Intervall					
	korrekte Systeme	<12 pg	12pg bis <25pg	25pg bis <50pg	50pg bis <100pg	≥ 100pg	zusammengefasst: alle Proben <100pg	<12 pg	12pg bis <25pg	25pg bis <50pg	50pg bis <100pg	≥ 100pg	zusammengefasst: alle Proben <100pg
Konsensus	0	8	0	0	0	0	8	0,42	0,00	0,00	0,00	0,00	0,15
	1 bis 4	11	8	3	0	0	22	0,58	0,47	0,50	0,00	0,00	0,42
	≥ 5	0	8	1	7	4	16	0,00	0,47	0,17	0,70	0,31	0,31
	Vollprofil	0	1	2	3	9	6	0,00	0,06	0,33	0,30	0,69	0,12
Q8 1.Lauf (alle mit 33x)	0	8	0	1	0	0	9	0,42	0,00	0,17	0,00	0,00	0,17
	1 bis 4	11	14	2	1	0	28	0,58	0,82	0,33	0,10	0,00	0,54
	≥ 5	0	2	1	5	5	8	0,00	0,12	0,17	0,50	0,38	0,15
	Vollprofil	0	1	2	4	8	7	0,00	0,06	0,33	0,40	0,62	0,13
Q8 2.Lauf	0	7	3	0	0	0	10	0,37	0,18	0,00	0,00	0,00	0,19
	1 bis 4	11	8	3	2	0	24	0,58	0,47	0,50	0,20	0,00	0,46
	≥ 5	1	4	1	4	5	10	0,05	0,24	0,17	0,40	0,38	0,19
	Vollprofil	0	2	2	4	8	8	0,00	0,12	0,33	0,40	0,62	0,15
S5	0	11	1	1	0	0	13	0,58	0,06	0,17	0,00	0,00	0,25
	1 bis 4	8	14	2	4	1	28	0,42	0,82	0,33	0,40	0,08	0,54
	5 (=Vollprofil)	0	2	3	6	12	11	0,00	0,12	0,50	0,60	0,92	0,21
miniFiler	0	13	0	0	0	0	13	0,68	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25
	1 bis 4	6	13	2	0	0	21	0,32	0,76	0,33	0,00	0,00	0,40
	≥ 5	0	4	2	6	2	12	0,00	0,24	0,33	0,60	0,15	0,23
	Vollprofil	0	0	2	4	11	6	0,00	0,00	0,33	0,40	0,85	0,12
SeFiler	0	12	2	0	0	0	14	0,63	0,12	0,00	0,00	0,00	0,27
	1 bis 4	7	10	3	0	0	20	0,37	0,59	0,50	0,00	0,00	0,38
	≥ 5	0	5	1	8	4	14	0,00	0,29	0,17	0,80	0,31	0,27
	Vollprofil	0	0	2	2	9	4	0,00	0,00	0,33	0,20	0,69	0,08

3.7 Vergleich der Erfolgsraten der Multiplex-STR-Kits

Aus Tab. 1 sowie weiterer Tabellen und Diagramme im Anhang ist eine Vielzahl an Details zu den einzelnen STR-Kits ersichtlich. Im Weiteren soll eine Erläuterung nur der wichtigsten Ergebnisse erfolgen. Tab. 2 zeigt die im Mittel korrekt typisierten Allele jedes einzelnen Kits. Da erhebliche Unterschiede in der Anzahl, der zu erwartenden Allele, sowohl zwischen den Kits als auch durch die unterschiedliche Allelzahl der Probanden bestehen, sind sowohl der Median der absolut typisierten Allele, als auch der Median des Anteils der korrekten Allele an den jeweils möglichen, angeben. Da die Anwendung der Kits für Proben mit einem DNA-Gehalt von deutlich über 100 pg für keines der getesteten Produkte eine Herausforderung darstellt, finden sich in gleicher Tabelle Werte für einen entsprechend begrenzten Pool an Proben. In beiden Fällen werden die meisten Allele durch den miniFiler, gefolgt vom Q8, detektiert. Der S5 liegt aufgrund seiner geringen Anzahl an Systemen absolut gesehen erwartungsgemäß zurück, der SeFiler dagegen gewinnt bei den absoluten Zahlen wegen seiner vielen Systeme die ihm v.a. durch die Proben mit hoher DNA-Menge zugute kommen. Von der Selektion der Proben auf <100 pg / Reaktion profitiert in besonderem Maße der miniFiler, so detektiert er als einziger Kit in diesem Versuch mehr korrekte Allele, als durch die Konsensusergebnisse erfasst werden.

Tab. 2: Übersicht zu den im Mittel korrekt typisierten Allelen je Kit
Für die Spalte „LTDNA-Profile“ (low template deoxyribonucleiacid) werden nur Proben mit <100 pg / Reaktion entsprechend Definition berücksichtigt.

	alle Proben		nur LTDNA-Profile	
Kit	Median der korrekt typisierten Allele	Median des Anteils korrekter Allele an den möglichen	Median der korrekt typisierten Allele	Median des Anteils korrekter Allele an den möglichen
Konsensus	12	57%	8	39%
Q8	9	53%	7,5	44%
S5	6	67%	4	44%
miniFiler	10	59%	9	53%
SeFiler	8	36%	6,5	30%

3.8 Low Copy Number / Low Template DNA Proben

Da, wie bereits erwähnt, die Typisierung von Proben mit > 100 pg pro PCR-Reaktion bei einer Standardzyklenzahl von 30 keine besondere Herausforderung darstellt, wird an dieser Stelle eine gesonderte Betrachtung aller Proben vorgenommen, die in die Low Copy Number Definition fallen und entsprechend mit 33 Zyklen prozessiert wurden. Abb. 9 zeigt die Typisierungserfolge innerhalb des Q8, aufgeschlüsselt nach den, entsprechend der Länge ihrer Amplikons von links nach rechts sortierten, Systemen. Die höchste Rate für einen korrekten Locus bildet das Amylogenin-System, gefolgt von TH01 und vWA. Die hohe Ausfallrate im System D18S51 wurde in der routinemäßigen Anwendung des Q8-Multiplex im DNA-Labor des Rechtsmedizinischen Instituts der Universität Ulm in einer derartigen Häufung nicht beobachtet. Unter Vernachlässigung des D18S51-Locus ergibt sich jedenfalls eine sichtbare Abnahme des Amplifikationserfolges eines Systems mit zunehmender Amplikonlänge. Se33 als Locus mit den längsten Amplikons weist entsprechend auch die niedrigste Erfolgsrate auf. Drop-Ins und daraus resultierende inkorrekte Ergebnisse für einen Locus zeigen kein erkennbares Muster und sind über die Systeme gleichmäßig verteilt. Da die genauen Amplikonlängen der kommerziellen Kits durch die Verwendung von zwischen Primer und Fluoreszenzmarker eingefügten nicht-nukleotidischen Molekülen („nonnucleotide linkers“) unbekannt sind, sowie fehlender Offenlegung der Primersequenzen, kann die Amplikonlänge der einzelnen Systeme nur grob abgeschätzt bzw. vermutet werden. Auf eine wage Ergebnisinterpretation wird an dieser Stelle somit verzichtet, im Anhang finden sich jedoch Diagramme und Werte für alle Kits, die Abb. 9 entsprechen.

Trotz fehlender Informationen zur exakten Amplikonlänge jedes einzelnen Systems der kommerziellen Kits, lassen sich die verwendeten Multiplex-STR-Kits bzgl. ihrer durchschnittlichen Amplikonlänge in eine Reihenfolge bringen. Der Kit mit den insgesamt kürzesten Amplikons ist der AmpFISTR®miniFiler, gefolgt von Q8 und PowerPlex® S5. Der AmpFISTR® SEfiler™ dagegen stellt einen etablierten Vertreter konventioneller Multiplex-STR-Kits dar. Die in Tab. 2 angegebenen Werte bezüglich der erfolgreich amplifizierten Systeme entsprechen dieser Reihenfolge. Das etwas schlechtere Abschneiden des S5 lässt sich möglicherweise durch die geringe Anzahl integrierter Systeme und damit reduzierter Wahrscheinlichkeit intakte DNA-Abschnitte in degradierten Proben

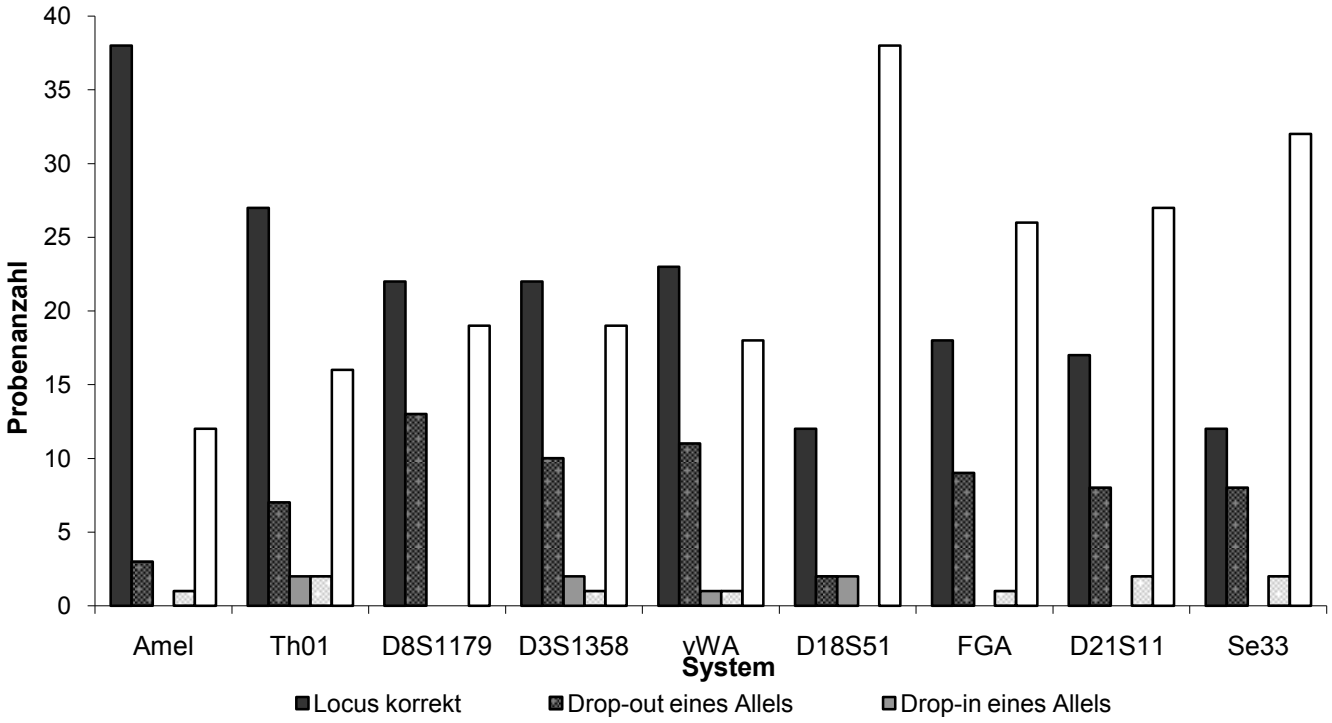


Abb. 9: Q8 – Erfolgsübersicht je System
Sortierung entsprechend der Amplikonlänge (von links nach rechts, beginnend mit dem Kürzesten). Die Einteilung der Ergebnisse erfolgt dabei in folgende Gruppen, die Bezeichnung „Drop-in“ beinhaltet ebenfalls Stutter-Peaks sowie weitere Artefakte:
- „Locus korrekt“
- „Drop-out eines Allels“ von zwei möglichen
- „Drop-in“ eines Allels mit eine Signalintensität < 0,7 der RFU (relative fluorescence unit) des schwächsten korrekten Allels, zusätzlich zu den beiden korrekten Allelen
- „inkorrektes Ergebnis“ für das Auftreten eines Drop-in’s mit einer RFU von ≥ 0,7 im Vergleich zum schwächsten korrekten Allel an diesem Locus oder Auftreten eines Drop-ins beliebiger RFU bei gleichzeitigem Drop-out mindestens eines korrekten Allels oder für einen Drop-in an einem homozygotem Locus
- „Drop-out beider Allele“ (oder eines homozygoten Locus) ohne gleichzeitigen Drop-in

vorzufinden erklären. Entgegengesetzt profitiert der SeFiler nicht von einer hohen Empfindlichkeit, sondern von der, durch die vielen integrierten Systeme erhöhte Wahrscheinlichkeit, dass benötigte intakte DNA-Abschnitte vorhanden sind. In einem direkten Vergleich von AmpFISTR®miniFiler als Vertreter der miniSTR-Kits und AmpFISTR® SEfiler als konventionellem STR-Kit und einer weiteren Fokusierung auf Proben mit einem DNA-Gehalt von < 50 pg / Reaktion erweißt sich der miniFiler mit einem gut doppelt so hohen Anteil korrekt amplifizierter Allele als der Kit mit der höheren Profilgüte. Faktoren für ein insgesamt möglichst

aussagekräftiges Ergebnis bei hoher Sensitivität sind somit die Kürze der Amplikons wie auch Anzahl verwendeter Systeme eines STR-Multiplex-Kits.
Die Bedeutung replikativer Analysen von LTDNA Proben ist in Abb. 10 zu sehen. Dargestellt sind für das Konsensusergebnis die Anzahl erfolgreich typisierter Proben, aufgeschlüsselt nach den einzeln STR-Systemen. Da durch die verwendeten Kits z.T. recht unterschiedliche Systeme abgedeckt werden, ergibt sich für das Konsensusergebnis, wie in Kapitel 2.11 beschrieben, dass die hier enthaltenen Ergebnisse für die einzelnen System durch eine unterschiedliche Anzahl an replikativen PCR's gebildet werden. Amelogenin, FGA und D18S51 werden fünffach erfasst, TH01, D8S1179 und D21S11 vierfach, vWA, D3S1358 und SE33 dreifach und D16S539 und D2S1338 zweifach. In Abb.10 ist grundsätzlich ein steigender Typisierungserfolg mit zunehmender Anzahl an replikativen STR-Analysen ersichtlich. Sind die Unterschiede zwischen den aus

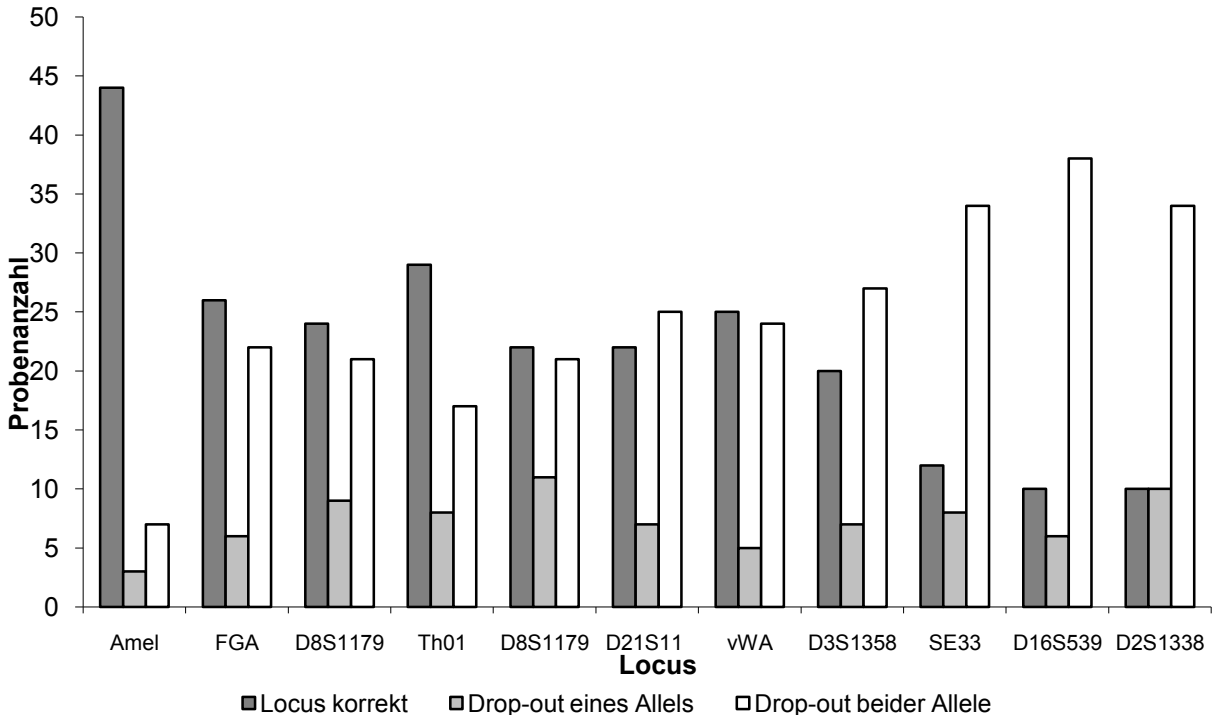


Abb. 10: Konsensusergebnis – Anzahl erfolgreicher Proben je System
Sortierung der Systeme nach der Anzahl der Replikationen:
5 x : Amel, FGA, D18S51
4 x : TH01, D8S1179, D21S11
3 x : vWA, D3S1358, SE33
2 x : D16S539, D2S1338
Die Kategorisierung der Ergebnisse erfolgt in folgende Gruppen:
- „Locus korrekt“
- „Drop-out eines Alllels“ von zwei möglichen
- „Drop-out beider Allele“ (oder eines homozygoten Locus) ohne gleichzeitigen Drop-in

fünf, vier und drei Wiederholungen generierten Systemen eher gering und nur in der Tendenz zu erkennen, sinkt die Erfolgsrate der Systeme bei nur zwei replikativen PCR's deutlich. Außer Acht gelassen wird bei dieser Betrachtung freilich die Komplexität weiterer Einflussfaktoren auf das Konsensusergebnis: Die Anzahl an Replikationen unterschlägt, durch welche Zusammensetzung an Kits mit ihrer je unterschiedlichen Sensitivität, ein System erfasst wird. Dennoch bleibt die Beobachtung eines steigenden Typisierungserfolges für das Konsensus-Profil bei zunehmender Anzahl replikativer Analysen. Ein deutlicher Zugewinn an Information lässt sich vor allem von der zweifachen auf die dreifache Erfassung eines Systems erkennen.

3.9 Artefakte

Vorweg bleibt anzumerken, dass relevante Artefakte ausschließlich in den als low-template-DNA klassifizierten Proben und da wiederum jeweils nur in einem einzelnen Kit auftraten, sich die weitere Betrachtung folglich auf low-template-DNA Proben und den Vergleich der verwendeten STR-Kits beschränkt. Artefakte wie Drop-In's, Stutter-Peaks, spontane Kontaminationen oder fehlerhafte PCR-Produkte werden zugunsten der Übersichtlichkeit zusammengefasst betrachtet. Dies entspricht auch der praktischen Relevanz. Tab. 3 gibt die Anzahl aller Artefakte je Kit und ihr Verhältnis zu den korrekt amplifizierten Allelen an. Die wenigsten Artefakte produziert dabei der miniFiler; Q8 und SeFiler liegen auf vergleichbar niedrigem Niveau, für den S5 wurde relativ gesehen eine erhöhte Artefaktanfälligkeit beobachtet. Durch die replikative Analyse ergab sich kein einziger Drop-In in den Konsensusprofilen.

Tab.3: Artefakte

Kit	Summe der Artefakte aus allen Proben bei 33 Zyklen	Summe korrekter Allele aus allen Proben bei 33 Zyklen	Quotient aus Summe Artefakte / Summe korrekter Allele
Konsensus	0	507	0
Q8	22	424	0,05
S5	22	245	0,09
miniFiler	15	472	0,03
SeFiler	23	510	0,05

3.10 Exemplarische Dokumentation

3.10.1 Beispiel eines Teilprofils

Im Weiteren soll exemplarisch eine Hautschuppe mit in vielerlei Hinsicht charakteristischen Eigenschaften und Ergebnissen mit den dazu gehörigen Elektrophorese-Diagrammen gezeigt werden. Die abgebildete Hautschuppe (Abb. 11) typischer Morphologie ist dabei von relativ geringer Größe bei einem ungefähren Durchmesser von unter 0,2 mm. Aus der Quantifizierung ergab sich ein Gesamt-DNA-Gehalt von 175 pg, einer pro PCR-Reaktion eingesetzten Masse von 25 pg entsprechend. Zur Auswertung findet sich in Tab.4 ein, aus einem Mundschleimhautabrieb erstelltes Referenzprofil (Proband 4). Im nachfolgenden sind die gewonnen STR-Profile sämtlicher Kits abgebildet (Abb. 12). Sehr häufig treten Inbalancen innerhalb eines heterozygoten Locus auf (z.B. S5: FGA), es kommt zum Ausfall („Drop-out“) einzelner Allele (z.B. Q8: vWA) wie ganzer Systeme (z.B. miniFiler: D7S820). Stutter-Peaks sind erhöht (z.B. S5: D18S51) und es treten vereinzelt zusätzliche Allele auf („Drop-in“) (z.B. Q8: TH01). Das beste Ergebnis mit 10 korrekten Allen (= 4 korrekte Systeme) erzielte der miniFiler, gefolgt von Q8 und S5. Der Kit mit den längsten Amplikons, der SeFiler, detektiert in dieser Probe kein einziges Allel. Es besteht für diese Probe somit eine recht große Bandbreite der Ergebnisse zwischen den Kits. Dass insbesondere für Systeme mit längeren Amplikons mit einem Ausfall gerechnet werden muss, zeigt sich in diesem Beispiel v.a. im Q8.

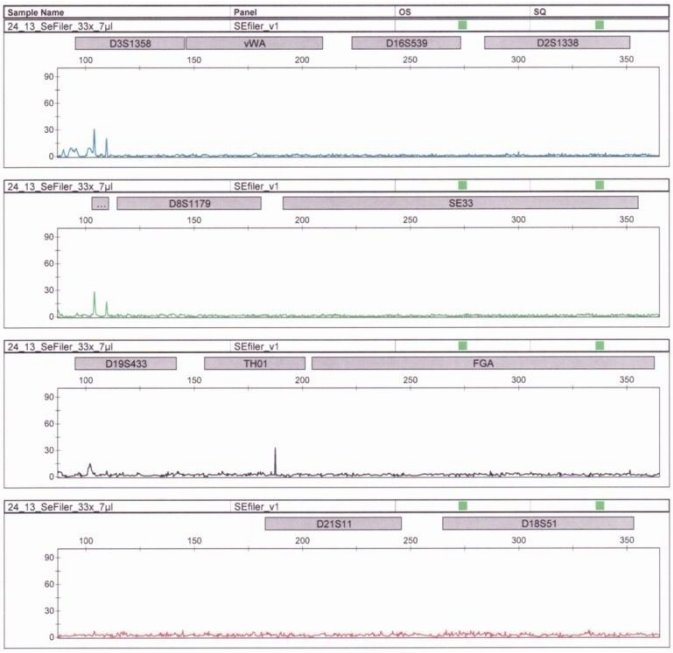
Daraus ergibt sich ein Konsensusprofil mit sieben, mindestens zweimal korrekt typisierten Allelen, bei insgesamt 21 möglichen. In diesem Fall entspricht das zwei komplett korrekten Loci (Amy, TH01) sowie vier z.T. korrekten Loci (FGA, D8, D18, vWA).



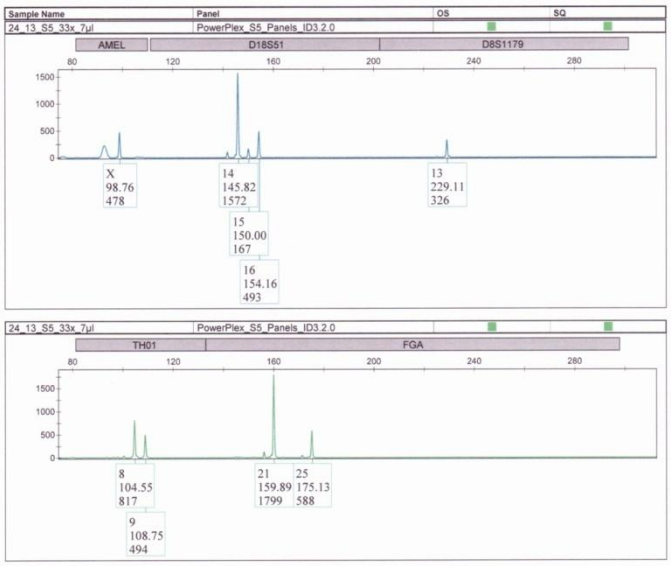
Abb. 11: Hautschuppe unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung
Maße (ca.): Durchmesser 180 µm, Fläche: 23.000 µm²; Umfang: 600 µm;
der Maßstabsbalken im rechten unteren Bildeck misst 100 µm

Tab. 4: Referenzprofil Proband 4 aus einem Mundschleimhautabrieb

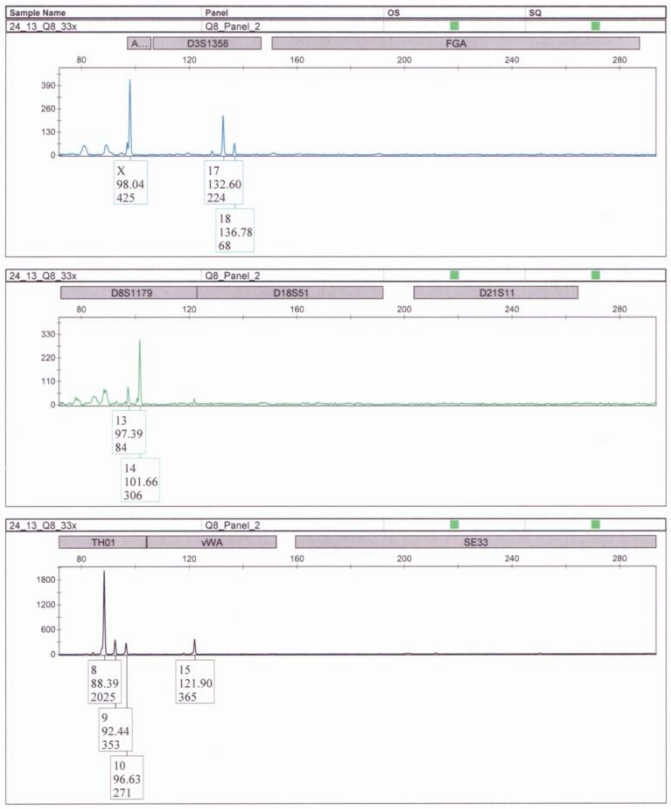
Amel	X	D16S539	11 ; 14	vWA	14 ; 15	D2S1338	16 ; 19	D18S51	14 ; 16
D3S1358	17 ; 18	D8S1179	13 ; 14	Se33	17 ; 19	CSF1PO	12 ; 13	D21S11	28 ; 29
D19S433	13 ; 15	Th01	8 ; 9	FGA	21 ; 25	D7S820	10 ; 12	D13S317	12; 13



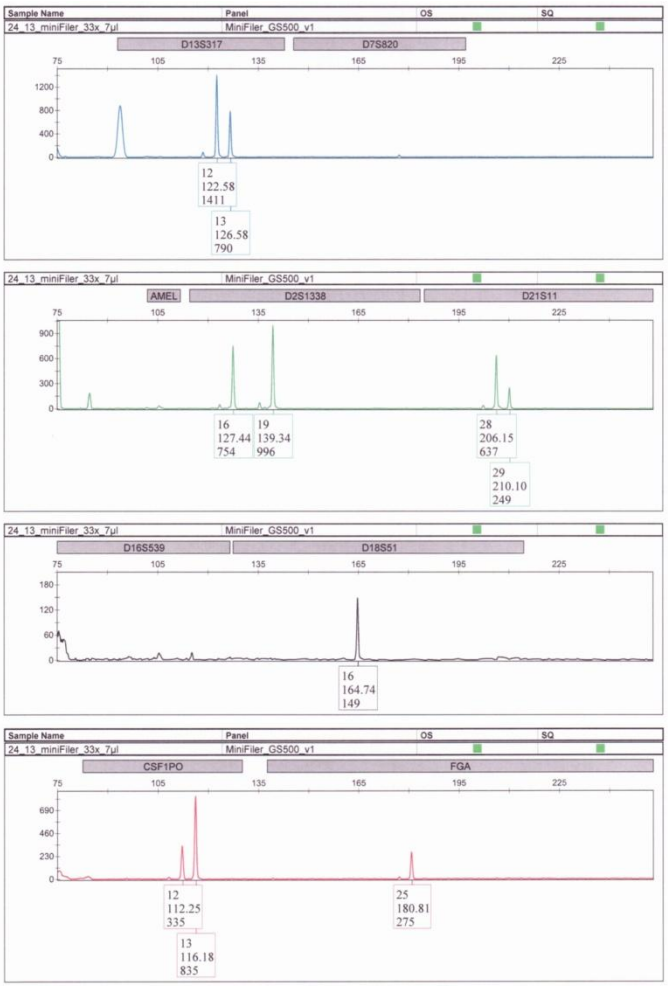
A



B



C



D

Abb. 12: Short-Tandem-Repeat -Profile einer einzelnen Hautschuppe (Abb. 10), analysiert auf einem ABI 3130 Genetic Analyzer, ausgewertet mit der ABI GenMapper ® ID Software v3.2.

A: SeFiler B: S5

C: Q8 D: miniFiler

3.10.2 Beispiel eines Vollprofils

Dass mit dem vorgestellten Verfahren nicht nur Teilprofile, wie in Kapitel 3.10.1 vorgestellt, sondern auch Vollprofile, z.T. sogar bei lediglich 30 PCR-Zyklen, möglich sind, soll abschließend durch folgendes Beispiel belegt werden. Die in Abb. 13 dokumentierte Hautschuppe ist mit einer Länge von ca. 0,3 mm etwas größer als das Beispiel aus 3.10.1 bei sonst recht ähnlicher Morphologie und stammt zudem vom selben Probanden. Bei einer gemessenen Gesamt-DNA-Menge von ca.4 ng dieser Hautschuppe ergab sich folglich ein pro PCR-Reaktion eingesetzte Masse von 360 pg DNA. Somit waren bereits 30 PCR-Zyklen ausreichend, um mit allen verwendeten Kits Vollprofile zu erzielen. Für den Abgleich der gewonnen STR-Profile aus Abb. 14 dient das bekannte Referenzprofil aus Tab. 4. Wie ersichtlich konnte für alle Kits zuverlässig ein Vollprofil ohne relevante Artefakte bei ruhiger Baseline erzielt werden. Unbalanciertheiten an heterozygoten Loci bildeten die Ausnahme.

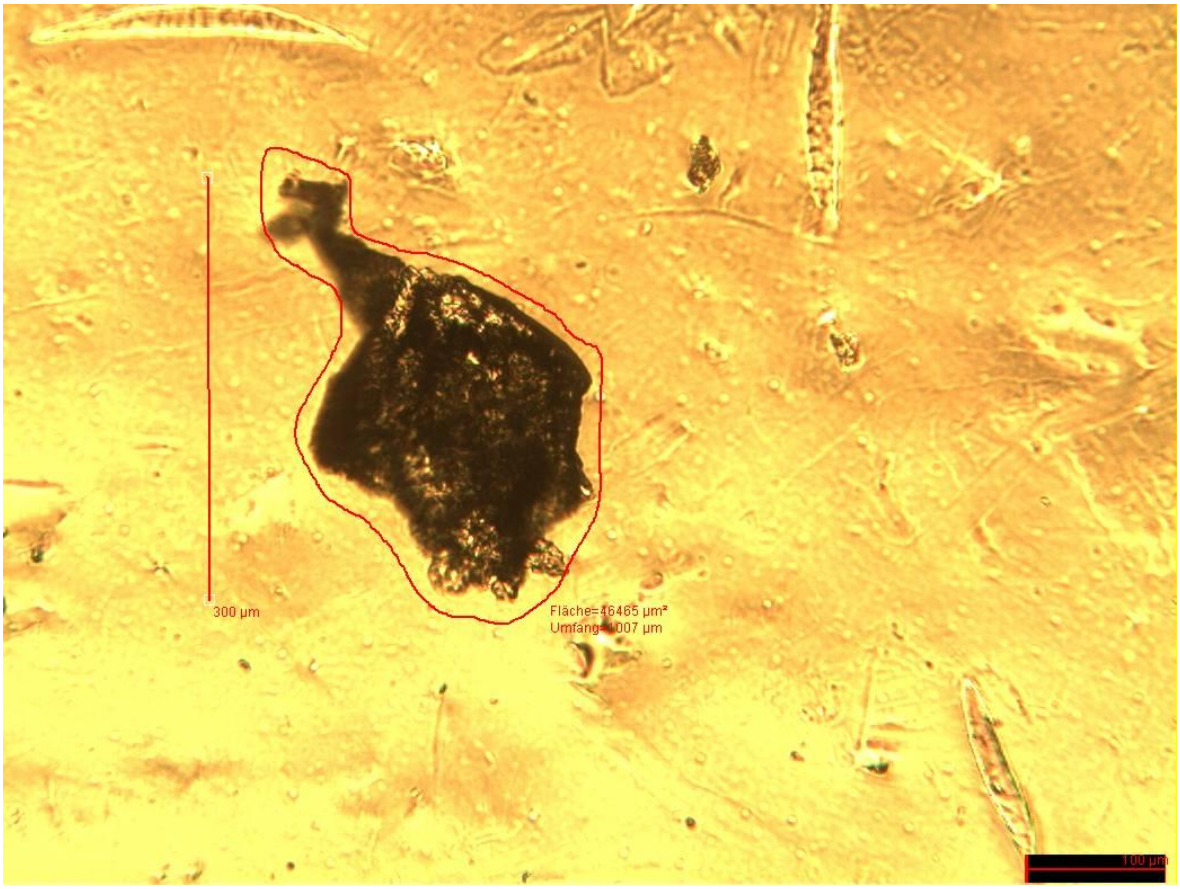
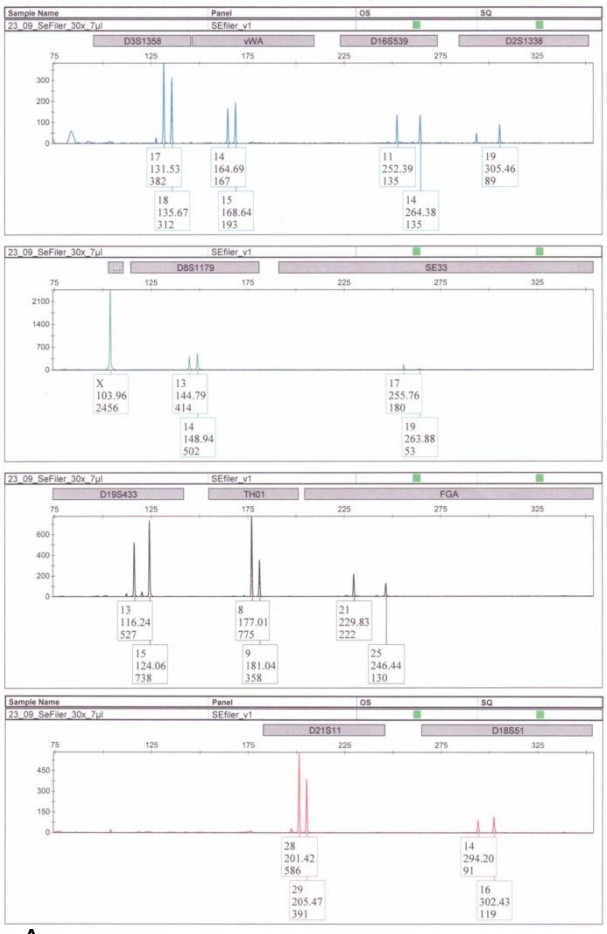
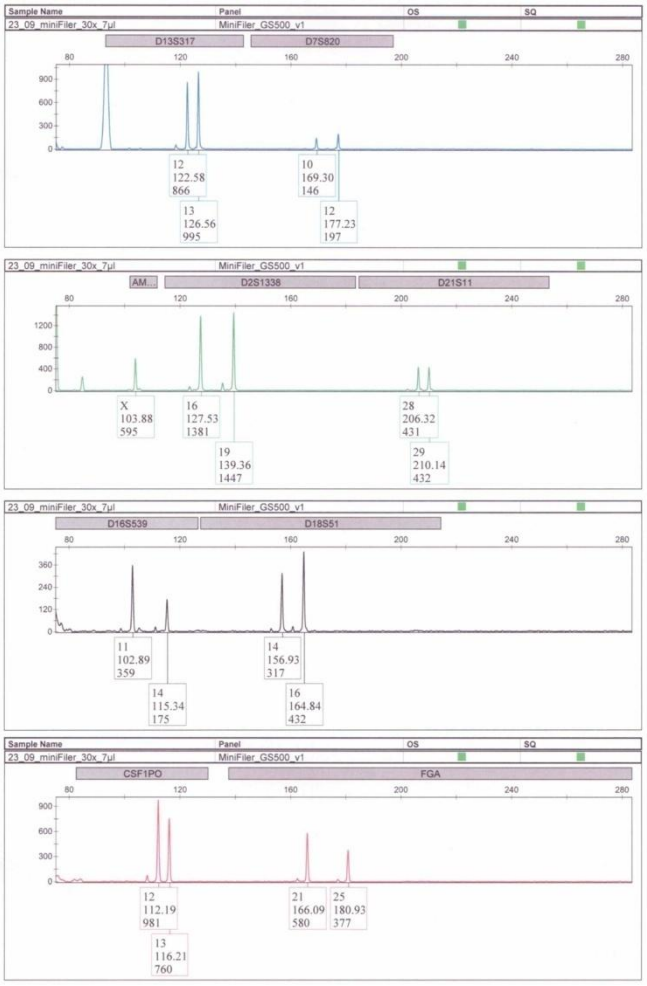


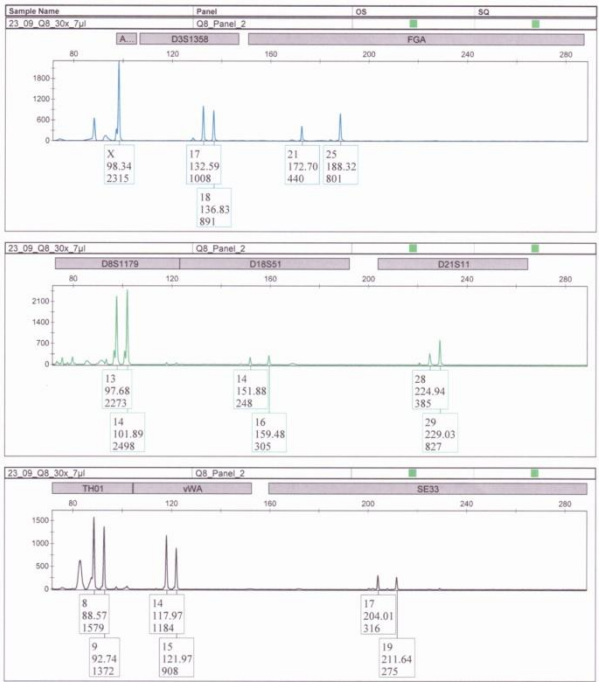
Abb. 13: Hautschuppe unter dem Mikroskop bei 100facher Vergrößerung
Maße (ca.): Durchmesser 0,3mm, Fläche: 46.000 µm²; Umfang: 1000 µm;
der Maßstabsbalken im rechten unteren Bildeck misst 100 µm



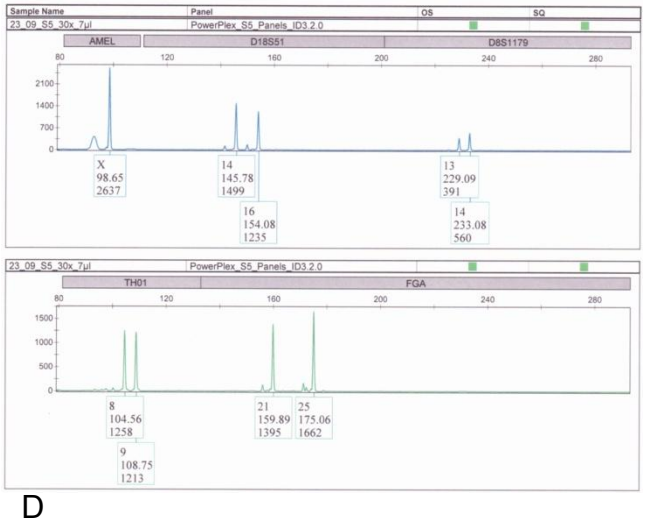
A



B



C



D

Abb. 14: Short-Tandem-Repeat -Profile einer einzelnen Hautschuppe (Abb. 13), analysiert auf einem ABI 3130 Genetic Analyzer, ausgewertet mit der ABI GenMapper ® ID Software v3.2.

A: SeFiler B: miniFiler

C: Q8 D: S5

4. Diskussion

4.1 Probengewinnung und Material

Hautkontaktspuren stellen heutzutage dank enorm sensitiver Nachweisverfahren einen großen Anteil an den in der genetischen Forensik untersuchten Asservaten. Einem DNA-Labor stellen sich dabei unter anderem zwei grundsätzliche Fragen, die bereits sehr früh im Prozesse der Probengewinnung angegangen werden müssen: Welche handwerkliche Methode ist geeignet, möglichst viel genetisches Ausgangsmaterial von einem wie auch immer gearteten Beweisstück für die weiteren Untersuchungen sicherzustellen? Und welche Strategien existieren, um eventuelle Mischmuster, die durch Kontakte mehrere Personen mit dem Objekt entstehen, zu vermeiden?

Ein bei der Spurensicherung der Polizei seit vielen Jahren beliebtes Verfahren besteht im Abkleben von Asservaten oder immobilen Objekten direkt am Tatort mit transparenten Klebefolien. An der Klebeseite anhaftenden Partikel, wie z. B. Textilfasern, werden in der traditionellen Daktyloskopie untersucht. [40, 49] bestätigten die Eignung solcher Klebefolien auch für die DNA-Analytik als Medium zum Transport genetischen Materials von einem Objekt in ein Reaktionsgefäß, selbst nach Behandlung der Folien mit zur Detektion klassischer Fingerabdrücke üblicher Verfahren. [40] kam zu dem Ergebnis, dass durch Klebefolien mehr DNA-Menge übertragen wird, als durch Tupferabriebe, gleichzeitig aber schlechtere STR-Profile resultieren. Die widersprüchlichen Ergebnissen dieser Arbeit stellen allerdings die einzige systematische Untersuchung überhaupt zur Effektivität von Klebefolien in der genetischen Forensik dar, in der Routinearbeit einiger Landeskriminalämter wird aber ebenfalls ein Vorteil der Folien gegenüber Tupferabrieben beobachtet [mündliche Mitteilung: LKA Wiesbaden, LKA München, Rechtsmedizin Universität Ulm]. Im Rahmen der Vorarbeiten zu dieser Arbeit ergaben sich ebenfalls Hinweise zugunsten der Klebefolien. Angelegte Spuren wurden zunächst mit Aqua bidest. angefeuchteten Wattetupfern abgerieben und anschließend mit den Folien abgeklebt. Von den Folien ließen sich komplette STR-Profile gewinnen. Bei umgedrehter Reihenfolge dagegen resultierten die Tupferabriebe nur noch in sehr schwachen Teilprofilen.

Der zweite wichtige Aspekt, die Vermeidung von Mischmustern mit ihren geringen Diskriminationsraten, ergibt sich zum Einen aus der Problematik, dass z.B. ein

Tatwerkzeug von mehreren Personen berührt worden sein kann, und zum Anderen aus der häufigen Konstellation der Maskierung eines schwachen (Täter-) Profils durch ein starkes (Opfer-)profil. Ein typisches wie häufiges Szenario hierfür stellt ein Vergewaltigungsverbrechen dar, während dessen der Täter nur einen kurzzeitigen Kontakt mit der möglicherweise bereits mehrere Tage getragenen Kleidung des Opfers eingeht. Das genetische Material des Opfers wird bei der Erstellung flächiger Tupferabriebe das Tätermaterial weit überwiegen und ein mögliches Täterprofil verdecken. Die Verwendung von Y-STR-Markern bildet hier einen Ansatzpunkt, allerdings mit dem Nachteil fehlender Abgleichmöglichkeiten in (inter)nationalen Datenbanken und ist entsprechend nur bei Vorhandensein eines Tatverdächtigen Ziel führend. Die Hauptidee dieser Arbeit bestand nun darin, Mischmuster schon bei der Anarbeitung der Asservate zu vermeiden, um so doch die klassischen datenbankverwertbaren STR-Marker verwenden zu können. Bei der Generierung künstlicher Spuren konnte auf bekannte aber doch sehr artefizielle Anordnungen wie bei [1, 25, 32, 33, 43] zugunsten möglichst realitätsnaher Asservate ähnlich [26] verzichtet werden. Zu Textilien verschiedenster Art erfolgte ein kurzer, fester Kontakt durch die Hände eines Probanden. Anschließend wurde der Kontaktbereich mit Klebefolien gesichert und unter dem Mikroskop betrachtet. Einzelne, meist deutlich unter 1 mm messende Hautschuppen wurden in je ein Reaktionsgefäß überführt und anschließend erfolgreich weiterprozessiert. Mischmuster konnten auf diese Art und Weise für sämtliche Proben vermieden werden. Bereits [12] wähnte die Möglichkeit eines solchen Vorgehens, ohne jedoch, dass dies seitdem versucht worden wäre.

Durch dieses an sich sehr einfache Vorgehen lässt sich außerdem eine weitere lang offene Frage zumindest zum Teil mit beantworten, nämlich die, nach der Herkunft genetischen Materials in Kontaktspuren. Als möglicher Ursprung der DNA wurden zum einen kontinuierlich abgeschilferte Hautschuppen, aber auch Talg- und Schweißsekrete und durch Kontakt der Hände mit Nase, Augen und Mund an ersteren deponierte Speichel und sonstige Sekretantragungen gehandelt [33, 43, 44]. Die erfolgreiche STR-Typisierung einzelner mikroskopisch gesicherter Hautschuppen bestätigt die Hypothese vom Ursprung der DNA aus eben solchen und ergänzt die Arbeit von Kita T. et al. [20], der zudem sezernierten Schweiß als DNA-Quelle ausmachte. Darüber, ob zusätzlich noch DNA aus obig genannten Quellen stammt, kann weiter spekuliert werden. Zu bedenken bleibt in jedem Falle

die Beschränkung der in dieser Arbeit präsentierten Methode auf Hautschuppen von einer Größe von ca. 100 µm Durchmesser. Kleinere Antragungen unbekannter Quelle waren zwar unter dem Mikroskop sichtbar, ließen sich aber auch mit einer sehr feinen Pinzette nicht gezielt fassen. Sie dürften zwar nur selten und pro Stück dann auch nur wenig intakte DNA enthalten, in ihrer Summe unter Umständen aber eben doch zu beispielsweise aus Tupferabrieben gewonnenen Profilen beitragen.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 Erfolgsraten

Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen auf der mikroskopischen Selektion, Extraktion, und fünffach replizierten PCR von knapp 500 einzelnen Hautschuppen. Insgesamt konnte aus gut 10 % der Proben zumindest ein Teilprofil mit mindestens drei korrekten Systemen bis hin zum Vollprofil (3 %) gewonnen werden. Die Erfolgsquote der von ca. 100 µm bis 1,2 mm im Durchmesser messenden Hautschuppen nahm mit zunehmender Größe ebenfalls zu, doch auch bei unter 200 µm Durchmesser ließen sich Vollprofile erzielen.

Da es sich um die Präsentation einer neuen Methode zur Spurennahme handelt, beschränken sich die Vergleichsmöglichkeiten vorwiegend auf Tupferabriebe. Arbeiten zu diesem Thema geben jedoch letztlich Erfolgsquoten bei einem definierten Kontakt auf definierter Fläche an, um Einflussfaktoren wie Kontaktzeit, vorheriges Händewaschen etc. zu untersuchen. Entsprechend variieren auch die Erfolgsquoten erheblich. Die von 1997 stammende und auf mittlerweile veralteten Methoden beruhende Arbeit von Herber B. et al. [17] legt einen höheren Typisierungserfolg für Kopfhautschuppen nahe. Diese weisen jedoch andere Charakteristika auf, z.B. Größe oder Talggehalt, sind entsprechend mit von den Handflächen stammenden Hautschuppen nur begrenzt vergleichbar. Des Weiteren besitzen sie kaum praktische Relevanz in der Routinearbeit forensischer Spuren und zeigen lediglich, dass sich Hautschuppen von unterschiedlichen Ursprungsregionen auch in der DNA-Analytik unterscheiden.

4.2.2 Interindividuelle Unterschiede

Erheblich differierende Erfolgsraten aus Hautkontaktspuren im Vergleich zwischen verschiedenen Probanden führten zur Hypothese von „good“ und „poor sheddern“ [1, 25, 26, 45], wenn auch die neueste und umfassendste Untersuchung zu diesem Thema [33] die Existenz von zumindest permanenten „guten Schuppern“ (=„good shedder“), also Personen die gute genetische Fingerabdrücke hinterlassen, in Zweifel zieht und ein weit komplexeres Zusammenspiel von weiteren Faktoren nahe legt. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Vergleich von Proben fünf verschiedener Probanden bezüglich der erzielten Erfolgsraten einzelner Hautschuppen zeigten sich erhebliche interpersonelle Unterschiede. So wiesen Hautschuppen von Proband 4 eine sechsmal höhere Wahrscheinlichkeit auf ein erfolgreiches STR-Profil auf als solche von Proband 2. Daher lässt sich folgern, dass zumindest ein Faktor für den Schupper Status (=„sheder-status“) einer Person in der Qualität der abgeschilferten Hautschuppen begründet ist. Daneben dürfte die Quantität der Schuppen sowie das Vorhandensein extrem kleiner Schuppenpartikel [4] und DNA aus sonstigen Quellen zum Gesamtergebnis beitragen.

Weitere untersuchte Faktoren für den Typisierungserfolg aus Hautkontaktspuren bilden neben dem Substrat [25, 32, 45, 46], die spezifische Aktivitäten und Umwelt des Individuums beim Kontakt. Zu diesen spezifischen Aktivitäten werden v.a. der Zeitpunkt des letzten Händewaschens [25, 32, 33, 42], Quantität und Qualität vorangegangener Kontakte [4], verwendete Hand (rechts – links) [33, 43] gerechnet. Auch ein Einwirken der Umwelt bleibt durch tages- [33] wie auch jahreszeitlich [17] abhängige Schwankungen zu vermuten. Der Einfluss all dieser, hier nicht näher untersuchten Faktoren ist unterschiedlich stark und nur zum Teil gut belegt, so dass sich durch die Komplexität dieser Variablen keine präzise Vorhersage treffen lässt, insbesondere da in der forensischen Routine diese Variablen meist auch noch Unbekannte sind. Was bleibt, ist eine nur mehr fragliche Relevanz dieser Erkenntnisse für die tägliche Fallarbeit.

4.2.3 Extraktion

Aus der Überlegung, DNA-Verluste während der Extraktion gering zu halten, wurde ein modifiziertes Chelex Protokoll verwendet. Die Zugabe von 2 µl DTT beeinflusste die Erfolgsquoten nachfolgender STR-Typisierungen nicht messbar.

Für Kopfhautschuppen dagegen erziehlte [17] durch Zugabe von DTT und Tween 20 deutlich bessere Ergebnisse. Erklären ließe sich dies aber neben den Unterschieden in den weiteren verwendeten Methoden schon allein durch die unterschiedliche Natur von Kopfhautschuppen z.B. durch einen höheren Talggehalt oder gar einer sie umgebenden Schicht aus solchem [17].

4.2.4 Quantifizierung

Zur Quantifizierung von 65 Hautschuppen wurde der kommerziell erhältliche Kit Plexor® HY (Promega) auf einem Applied Biosystems 7500 RealTime-PCR System herangezogen. Laut [23] reicht die Sensitivität des Kits zuverlässig bis unter 3,8 pg. Die Standard-DNA ist eine Mischung aus mehreren männlichen DNAs, in [31] beschrieben Probleme durch Verwendung von DNA aus Zellreihen werden somit vermieden. Im Mittel (Median) enthielt eine der, entsprechend der Versuchsanordnung bereits vorselektierten, Hautschuppen 170 pg DNA, gut ein Drittel weniger als 50 pg, das Maximum betrug 16 ng, das Minimum 10 pg. Damit liegen die gemessenen Werte deutlich unter denen für Kopfhautschuppen (Mittelwert 4,7 ng / Schuppe) [17], wobei hier keine Quantifizierung einzelner Schuppen vorgenommen wurde, sondern mehrere, noch dazu deutlich größere Kopfhautschuppen zusammen analysiert wurden. Methode war die im Vergleich zur RealTime-PCR weniger sensitive und präzise DNA-Sonden-Hybridisierung. Andere Arbeiten zu Hautkontaktspuren geben letztlich stets die gemessene DNA-Menge pro untersuchter Fläche an [1, 40, 44]. Ihre Werte schwanken erheblich zwischen 10 pg und 3 ng pro Fingerabdruck. Als Anhaltspunkt für diese Arbeit eignen sie sich nur insofern, als dass sie ähnlich geringe DNA-Mengen für Hautkontaktspuren angeben, wenn ein wirklicher Vergleich aufgrund diverser Unterschiede, vor allem der völlig andere Spurencharakter, aber auch Asservierungsmethoden, Quantifizierungsverfahren, etc., nur begrenzt sinnvoll ist.
Die Qualität der STR-Profile korrelierte auch in dieser Arbeit mit den gemessenen DNA-Mengen. Für alle Proben mit einem DNA-Gehalt von 50 pg pro PCR-Reaktion konnte ein Voll- oder Teilprofil mit mindestens fünf korrekten Systemen erstellt werden. Im Bereich von 12 pg bis 50 pg pro Reaktion galt dies für etwas mehr als die Hälfte der Proben. Bei weniger als 12 pg pro Reaktion führte dies im Konsensusprofil nur vereinzelt zu korrekten Systemen. Diese Werte liegen etwas unter bekannten, aus Verdünnungen von Zelllinien-DNA gewonnenen Werten [15,

22], entsprechen aber der allgemeinen Erfahrung, eines geringeren Typisierungserfolgs tatsächlicher forensicher Spuren im Vergleich zu reiner, undegradierter Zelllinien-DNA.

Grundsätzlich kritisch bewertet werden müssen nach Nielsen et al. [35] die mittels RealTime-PCR gewonnenen Werte. Er zeigte erheblich Unstimmigkeiten beim Vergleich verschiedener Methoden mit der UV-Spektrometrie als Referenz. Aber auch RealTime-PCR Kits konkurrierender Hersteller, namentlich der hier verwendeten Plexor® HY (Promega) und der weit verbreitete Quantifiler (Applied Biosystems) differieren konstant aber erheblich [23]. Insgesamt bleibt also eine eingeschränkte Vergleichbarkeit zwischen Werten verschiedener Methoden und die Notwendigkeit einer, an die Gegebenheiten eines jeden einzelnen Labors angepassten Validierung.

4.2.5 Vergleich der Multiplex-STR-Kits

Beim Vergleich der in dieser Arbeit verwendeten Multiplex-STR-PCR Kits, ist zu bedenken, dass sie z.T. für sehr unterschiedliche Zwecke konzipiert sind. Während der SeFiler als ein robuster, breit etablierter Standard - Kit [11]mit den längsten Amplikons aber auch meisten Systemen aufwartet, zielt am anderen Ende der Spektrums der Plexor S5 mit lediglich fünf integrierten Systemen bei erheblich verkürzten Amplikons und Verwendung sensitiver Fluoreszenzmarker auf einen Einsatz als eine Art kostengünstiges Screening - Werkzeug. Der AmpFISTR®miniFiler dagegen ist ein hoch spezialisierter wie sensitiver [28], da extrem verkürzter miniSTR-Kit mit neun integrierten Systemen, von denen allerdings lediglich vier im deutschen Datenbanksystem enthalten sind. Dies macht ihn nützlich bei vorhandener Abgleichmöglichkeit mit einem dringend Tatverdächtigen, ohne einen solchen ist sein Einsatz aber unüblich, nicht zuletzt auch aufgrund der enormen Kosten. Mit dem Q8 steht ein weiterer sensitiver miniSTR Kit mit noch dazu offen gelegten Primersequenzen und –konzentrationen [29] zur Verfügung, der den Vorteil bietet, sämtliche deutschen Datenbanksysteme zu erfassen, aber nicht kommerziell vertrieben wird.

Da bei Hautkontaktspuren grundsätzlich äußerst niedrige DNA-Mengen erwartet werden dürfen [1, 4, 21, 25, 26, 32, 33, 34, 40, 42, 44, 46], stellt eine hohe Sensitivität das Hauptkriterium für der Vergleich der Kits dar. Die Erkenntnis, dass eine Verkürzung der Amplikonlängen [46, 47, 48] zu einem höheren

Amplifikationserfolg schwacher und v.a. degradierter Proben führt, hat zur Entwicklung oben genannter miniSTR-Kits geführt. Deren Überlegenheit bei „schwachen Spuren“ wurde für Knochen, Haaren, Erbrochenem, etc. nachgewiesen [8, 10, 16, 30, 47, 48]. Auch in dieser Arbeit wurden vom Kit mit den kürzesten Amplikons, dem AmpFISTR®miniFiler, im Mittel die meisten korrekten Allele detektiert, gefolgt von Q8, SeFiler und Plexor S5. Der letzte Rang des S5, der ja auch sehr kurze Amplikons besitzt, erklärt sich durch die geringe Systemanzahl, im Gegenzug profitiert der SeFiler trotz langer Amplikons von seinen vielen (elf) Systemen. Das schwache Abschneiden des S5 mit im Mittel lediglich halb so vielen detektierten Allelen im Vergleich zu AmpFISTR®miniFiler und Q8 muss unter der besonderen oben erläuterten Intention dieses Kits gesehen werden. Die Abhängigkeit der Erfolgsrate von der Amplikonlänge zeigt sich auch beim Vergleich der Systeme innerhalb eines jeden Kits. Davon weicht lediglich die hohe Ausfallsrate des Systems D18S51 im Q8 ab, die in dessen routinemäßiger Anwendung des im DNA-Labor des Rechtsmedizinischen Instituts der Universität Ulm mit einer derartige Häufung jedoch nicht beobachtet wurde und am ehesten auf eine Charge mit zu niedriger Primerkonzentration im Reaktionsmix zurückzuführen sein dürfte. Es bleiben somit zwei wichtige Einflussfaktoren für die zu erwartende Aussagekraft eines Multiplex-PCR-Kits in der Anwendung bei einzelnen Hautschuppen, nämlich die Amplikonlänge und die Anzahl integrierter Systeme.

4.2.6 Problematik der Low Copy Number Profile / Low Template DNA Proben

Da gut 80% der überhaupt weiter analysierten Hautschuppen aufgrund der geringen DNA Menge als „Low Template DNA“ Proben / „Low Copy Number Profile“ eingestuft wurden, soll für diese eine gesonderte Betrachtung erfolgen. [6, 15] zeigte, dass Proben mit unter 100 pg zwar mit Standardmethoden typisiert werden können, eine Steigerung der Zyklenzahl auf 34 jedoch nötig ist. Damit einhergehende Probleme wie ein Anstieg des Unausgewogenheit heterozygoter Loci (=Imbalance) wie auch der Loci untereinander, erhöhte Stutter-Peaks, sowie das spontane auftreten vereinzelter zusätzlicher Allele und Kontaminationen traten auch in dieser Arbeit auf. Dass nicht allein stochastische Effekte durch ungleiche Verteilung an Ausgangs-DNA-Menge zum Ausfall von Allelen und Systemen

führen kann, sonder vielmehr präferentielle Amplifikationen in der Frühphase der PCR in Drop-Out's resultieren zeigte [22] für Proben mit weniger als 100 pg pro Reaktion.

Neben der vermehrten Zyklenzahl werden von [7] eine Reihe weiterer Maßnahmen zur Steigerung der Sensitivität angeführt. Die Reduktion des PCR-Volumens sowie die Verwendung von Formamid mit niedriger Konduktivität wurden von vornherein standardmäßig für alle Proben berücksichtigt. Die im Weiteren empfohlene Verlängerung der Injektionszeit, das Einsetzen von mehr Amplifikat in die Elektrophorese sowie der Gebrauch von Microcon Filtern brachte für ausgewählte Proben dieser Arbeit keinen Benefit. Grund hierfür dürfte sein, dass die genannten Parameter bereits hinsichtlich maximaler Sensitivität optimiert waren. Die Verwendung von Microcon Filtern verspräche nur bei ausgeprägten Artefakten wie Dye-Blobs und unruhiger Baseline eine Verbesserung, beides war jedoch nicht gegeben.

Als äußerst relevant stellte sich dagegen die von [7, 15, 22, 45] geforderte Replikative Analyse der Low Template DNA Proben heraus. Drei oder gar vier Wiederholungen einer jeden Probe mit Bildung eines Konsensus-Profils waren auch hier zur Steigerung von Empfindlichkeit und Validität der Ergebnisse unerlässlich.

Neue Ansätze zur Sensitivitätssteigerung wie „Nested-PCR“ [15], „Whole Genome Amplification“ [14, 41] oder die Zugabe frischer PCR-Reagenzien nach 30/33 Zyklen für weitere Zyklen wurden nicht durchgeführt. Für all diese genanten Methoden muss zudem mit einer weiter erhöhten Artefaktanfälligkeit gerechnet werden.

4.3 Ausblick und Schlussfolgerung

Es konnte gezeigt werden, dass die Gewinnung von STR-Profilen aus einzelnen Hautschuppen bereits mit Standardmethoden möglich ist und damit einen grundsätzlichen Ansatzpunkt zur Vermeidung von Mischmustern bietet. Da wegen der geringen Erfolgsraten ein hoher personeller wie finanzieller Aufwand nötig ist, bleibt diese Strategie wohl auf Kapitaldelikte mir schwieriger Spurenlage und erwarteten Mischantragungen beschränkt. Praktikabler scheint vielmehr ein komplementärer Einsatz und die Sequenz verschiedener Formen der

Materialgewinnung, um ihre jeweiligen Stärken und Schwächen, auf den jeweiligen Spurenfall abgestimmt, nutzen zu können. Die Möglichkeiten reichen von der hier erarbeiteten Einzelschuppenanalyse, als der selektivsten Form, über kleinflächige Tupferabriebe [1, 45, 46] bis hin zu speziellen Waschverfahren ganzer Kleidungsstücke [39].

Bedacht werden muss auch die Wahl und Strategie hinsichtlich der Methoden. Während der Vorzug von miniSTR-Kits gegenüber konventionellen Kits relativ klar ist, muss der Einsatz der Quantifizierung abgewogen werden. Der hier vorgestellte Plexor HY auf RealTime-PCR Basis zeichnet sich zwar durch eine der STR-Typisierung überlegenen Sensitivität [23] aus, führt aber dennoch unweigerlich zum Verbrauch des knappen Ausgangsmaterials. Ob nicht stattdessen der Einsatz eines zwar weniger sensitiven aber mit dem möglichen Gewinn konkreter Informationen verbundenen Multiplex-STR-Kits, wie den kostengünstigen Q8 oder Plexor S5, als Screening-Tool den Vorzug erhalten sollte, ist derzeit noch nicht klar abzusehen und bleibt somit vorerst im Entscheidungsbereich eines jeden einzelnen DNA-Labors.

Weiterhin zu bedenken bleibt die begrenzte juristische Wertigkeit aller Spuren mit nur sehr geringen DNA-Mengen, zu denen eben auch die große Mehrzahl der Hautschuppen zählt. Sie können nur zum Nachweis, nicht jedoch zum Ausschluss eines Täters führen [15]. Unabhängig von der DNA-Menge, ist der Nachweis einer einzelnen Hautschuppe eines Tatverdächtigen zu dessen Überführung mit eventuell daraus resultierender Verurteilung nicht ausreichend. Hierfür sollten mindestens zwei entsprechende Schuppen oder weitere Indizien gefunden werden. Offen für weitere Forschung bleiben zudem Fragen ob der Bedeutung eines möglichen Sekundärtransfers [25, 26, 42], also die Übertragung genetischen Materials z.B. von Person 1 auf Person 2 auf ein Objekt. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit scheint es nahe liegend, dass die Übertragung einzelner Hautschuppen zumindest eine Komponente eines möglichen Sekundärtransfers darstellt.

5. Zusammenfassung

Eine der wichtigsten Spurenarten für die Überführung von Verbrechern besteht aus Hautkontaktspuren der Täter mit einem Objekt, z.B. einer Waffe. Neben dem klassischen Fingerabdruck entwickelte sich v.a. der sogenannte genetische Fingerabdruck als potentes Instrument. Dank moderner Verfahren genügen winzige Partikel abgeschilferter Haut zur zweifelsfreien Identifizierung eines Individuums. Untersucht wird dabei mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) auf Short Tandem Repeats (STR), kurze sich wiederholende Abschnitte unterschiedlicher Länge im menschlichen Genom. Ein häufiges Problem in der Praxis stellt die Tatsache dar, dass sich an einem Tatwerkzeug Spuren mehrerer Personen finden. Die resultierenden Mischmuster verhindern eine eindeutige Profilbestimmung und zwingen zur Suche nach Strategien zur Vermeidung ebensolcher Mischmuster. Der Ansatz dieser Arbeit besteht darin, keine flächigen Abriebe vom untersuchten Asservat zu nehmen, sondern einzelne Hautschuppen einer Größe von unter 0,5 mm unter dem Mikroskop selektiv aufzunehmen und separat zu analysieren. Ca. 500 Hautschuppen wurden einzeln mittels eines modifizierten Chelex-Protokolls extrahiert. Aus dem Extrakt wurde Volumen für eine vergleichende STR-Analyse mit vier verschiedenen Kits entnommen. Dabei wurde auf die kommerziell verfügbaren Produkte PowerPlex® S5 (Promega), AmpFlSTR®miniFiler (Applied Biosystems), AmpFlSTR® SEfiler™ (Applied Biosystems), sowie den selbst entwickelten Multiplex-Kit „Q8“ zurückgegriffen. Während der AmpFlSTR® SEfiler™ einen Vertreter klassischer Multiplex-STR-Kits darstellt, handelt sich bei den übrigen um so genannte „miniSTR-Kits“ mit z.T. stark verkürzten Amplikons. Des Weiteren unterscheiden sie sich in der Anzahl integrierter STR-Systeme. Eine Quantifizierung der Desoxyribonukleinsäure (DNS) je Probe erfolgte durch den auf RealTime-PCR basierenden Plexor® HY (Promega).

Aus den insgesamt analysierten 500 Hautschuppen konnte lediglich in ca. 10 % der Fälle ein Vollprofil oder ein datenbankverwertbares Profil mit mindestens fünf korrekten Systemen erzielt werden. Mischmuster wurden stets vermieden. Die gemessenen DNA-Mengen waren mit im Mittel 170 pg sehr gering, wiesen jedoch eine große Variabilität von unter 25 pg bis maximal 60 ng auf. Für gut 80 % der erfolgreich (teil-) typisierten Hautschuppen musste die PCR-Zyklenzahl auf 33 erhöht werden. Diese aufgrund der geringen DNA-Ausgangsmasse von < 100 pg

„Low Template DNA“ (LTDNA) genannten Proben, zeigten die für „Low Copy Number Profile“ üblichen Phänomene erhöhter Stutter-Peaks, Unbalanciertheiten sowohl heterozygoter Loci als auch im Vergleich zwischen den Loci, Drop-Outs einzelner Allele oder ganzer Loci sowie das Auftreten vereinzelter zusätzlicher Allele. All dies zwang, der Profilbildung aus einer Hautschuppe eine replikative, mindestens dreifache, Analyse zu Grunde zulegen. Die Chance auf eine korrekte Typisierung stieg mit Abnahme der Amplikonlänge. Entsprechend wiesen die miniSTR-Kits eine höhere Erfolgsrate auf. Des Weiteren unterschied sich die Wahrscheinlichkeit eines Typisierungserfolges zwischen verschiedenen Probanden erheblich. Die postulierte Einteilung in „good shedder“ und „poor shedder“ liegt folglich nicht nur in der Menge der abgeschilferten Hautschuppen eines Individuums begründet, sondern auch in deren Qualität.

Trotz der v.a. durch die geringe DNA-Ausgangsmenge bedingten Probleme konnte gezeigt werden, dass eine Analyse einzelner kleinster Hautschuppen bereits mit Standardmethoden bei Erhöhung der PCR-Zyklenzahl auf 33 möglich ist. Das beschriebene Vorgehen eignet sich somit als Strategie zur Vermeidung komplexer Mischmuster. Hoher personeller wie finanzieller Aufwand beschränkt es jedoch vermutlich auf komplexe Kapitalverbrechen. Sinnvoll scheint vielmehr eine Kombination mit verschiedenen anderen Strategien zur Probennahme, wie selektiven Abrieben, um der speziellen Spurenlage eines jeden einzelnen Falles gerecht zu werden.

6. Literatur

[1] Alessandrini F., Cecati M. Pesaresi M., Turchi C., Carle F., Tagliabracci A.: Fingerprints as evidence for a genetic profile: morphological study on fingerprints and analysis of exogenous and individual factors affecting DNA typing; Journal of Forensic Sciences 48 (2003) 586-592

[2] Applied Biosystems: AmpFlSTR® SEFiler™ PCR Amplification Kit User Guide; Part Number 4335145 Rev. D (08/2006)

[3] Applied Biosystems: AmpFlSTR® MiniFiler™ PCR Amplification Kit User Guide; Part Number 4374618 Rev. B (03/2007)

[4] Balogh M.K., Burger J., Bender K., Schneider P.M:, Alt K.W.: Fingerprints from Fingerprints; International Congress Series 1239 (2003) 953-957

[5] Bayerl C. in: Moll I.: Duale Reihe Dermatologie, 6. Auflage, Thieme, Stuttgart, 158-165 (2005)

[6] Buckleton J., : Validation issues around DNA typing of low level DNA; Forensic Science International: Genetics 3 (2009) 255-260

[7] Budowle B., Hobson D.L., Smerick J.B., Smitz J.A.L.: Low Copy Number – Consideration and Caution; 12th International Symposium on Human Identification (2001)

[8] Butler J.M., Shen Y., McCord B.R.: The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA; Journal of Forensic Sciences 48 (2003) 1054–1064

[9] Butler J.M.: Forensic DNA Typing - 2nd Edition, Elsevier, New York, London, Paris(2006)

[10] Chung D.T., Drábek J., Opel K.L., Butler J.M., McCord B.R.: A study on the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the STR miniplex primer sets; Journal of Forensic Sciences 49 (2004) 733–740

[11] Coticone S.R.: Development of the AmpF‘STR1 SEfiler PCR amplification kit: a new multiplex containing the highly discriminating ACTBP2 (SE33) locus; Journal of legal medicine 118 (2004) 224–234

[12] Findlay I., Taylor A., Quirke P.: DNA fingerprinting from single cells; Nature 389/9 (1997) 555

[13] GEN-IAL GmbH: All-tissue DNA-Kit: Handbuch für DNA-Extraktionen aus menschlichem und tierischem Gewebe (11/2007)

[14] Giardina E., Pietrangeli I., Martone C., Zampatti S., Marsala P., Gabriele L., Ricci O., Solla G., Asili P., Arcudi G., Spinella A., Novelli G.: Whole genome amplification and real-time PCR in forensic casework; BMC genomics 10 (2009) 159

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

[16] Grubwieser P.: A new ‘‘miniSTR-multiplex’’ displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DANN; Journal of legal medicine 120 (2006) 115–120

[17] Herber B., Herold K.: DNA typing of human dandruff; Journal of Forensic Sciences 43 (1998) 648-656

[18] Herz E. in: Moll I.: Duale Reihe Dermatologie, 6. Auflage, Thieme, Stuttgart, 306-307 (2005)

[19] Jung E.G. in: Moll I.: Duale Reihe Dermatologie, 6. Auflage, Thieme, Stuttgart, 462-471 (2005)

[20] Kita T., Yamaguchi H., Yokoyama M., Tanaka T., Tanaka N.: Morphological study of fragmented DNA on touched objects; Forensic Science International: Genetics 3 (2008) 34-36

[21] Kloosterman A.D., Kersbergen P.: Efficacy and limits of genotyping low copy number DNA samples by multiplex PCR of STR loci; International Congress Series 1239 (2003) 795-798

[22] Kobayashi R., Satoh k:, Takahashi K., Itoh Y.: The risk of missing one allele with very low DNA quantities using PCR; International Congress Series 1261 (2004) 634

[23] Krenke B. E., Nassif N., Sprecher C. J., Knox C., Schwandt M., Storts D. R.: Developmental validation of a real-time PCR assay for the simultaneous quantification of total human and male DNA; Forensic Science International: Genetics 3 (2008) 14-21

[24] Kumar V., Cotran R.S., Robbins S.L.: Robbins Basic Pathology, 7th edition, Saunders, Philadelphia, 789-808 (2004)

[25] Lowe A., Murray C., Whitaker J., Tully G., Gill P.: The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces; Forensic Science International 129 (2002) 25-34

[26] Lowe A., Murray C., Richardson P., Wivell R., Gill P., Tully G., Whitaker J.: Use of low copy number DNA in forensic inference; International Congress Series 1239 (2003) 799-801

[27] Moll I. in: Moll I.: Duale Reihe Dermatologie, 6. Auflage, Thieme, Stuttgart, 2-15 (2005)

[28] Mulero J.J., Chang C.W., Lagacé R., Wang D., Bas J.L., McMahon T.P., Hennessy L.K.: Development and Validation of the AmpFlSTR® MiniFilerTM PCR Amplification Kit: A MiniSTR Multiplex for the Analysis of Degraded and/or PCR Inhibited DNA; Journal of Forensic Sciences 53 (2008) 838 - 852

[29] Müller K., Klein R. , Miltner E., Wiegand P.: Q8—A short amplicon multiplex including the German DNA database systems; Forensic Science International: Genetics Volume 1 , Issue 2 (2007) 205 - 207

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

[31] Nielsen K., Smidt Mogensen H., Hedman J., Niederstätter H., Parson W., Morling N.: Comparison of five DNA quantification methods; Forensic Science International: Genetics 2 (2008) 226-230

[32] Pesaresi M., Buscemi L., Alessandrini F., Cecati M., Tagliabracci A.: Qualitative and quantitative analysis of DNA recoverd from fingerprints; International Congress Series 1239 (2003) 947-951

[33] Phipps M., Petricevic S.: The tendency of individuals to transfer DNA to handled items; Forensic Science International 168 (2007) 162-168

[34] Prinz M., Schiffner L., Sebestyen J.A., Bajda E., Tamariz J., Shaler R.C., Baum H., Caragine T.: Maximization of STR DNA typing success for touched objects; International Congress Series 1288 (2006) 654-653

[35] Promega Corporation: Plexor® HY System for the Applied Biosystems 7500 and 7500 FAST Real-Time PCR Systems Technical Manual #TM293 (2007)

[36] Promega Corporation: Validation Guide for the Plexor® HY System, #GE295, Promega Corporation (2007)

[37] Promega Corporation: PowerPlex® S5 System Technical Manual, DMD021 (06/2008)

[38] QIAGEN®: MinElute® Handbook (03/2008)

[39] Schulz M.M., Reichert W.: A strategy for STR-analysis of cryptic epithelial cells on several textiles in practical casework; Progress in Forensic Genetics 8 (2000) 514-516

[40] Schulz M.M., Reichert W.: Archived or directly swabbed latent fingerprints as a DNA source for STR typing; Forensic Science International 127 (2002) 128-130

[41] Sun G., Kaushal R, Pal P, Wolujewicz M, Smelser D, Cheng H, Lu M, Chakraborty R, Jin L, Deka R.: Whole-genome amplification: relative efficiencies of the current methods; Legal Medicine 7 (2005) 279-86

[42] van Oorschot R.A.H., Jones M.K.: DNA fingerprints from fingerprints; Nature 387 (1997) 767

[43] van Oorschot R.A.H., Phelan D.G., Furlong S., Scarfo G.M., Holding N.L., Cummins M.J.: Are you collecting all the available DNA from touched objects?; International Congress Series 1239 (2003) 803-807

[44] Van Rentergeum P, Leonard D., De Greef C.: Use of latent fingerprints as a source of DNA for genetic identification; Progress in Forensic Genetics 8 (2000) 501-503

[45] Wickenheiser R.A.: Trace DNA: a review, discussion of theory, and application of the transfer of trace quantities of DNA through skin contact; Journal of Forensic Sciences 47 (2002) 442-450

[46] Wiegand P., Trübner K., Kleiber M.: STR typing of biological stains on strangulation tools; Progress in Forensic Genetics 8 (2000) 508-510

[47] Wiegand P.: Less is more - length reduction of STR amplicons using redesigned primers; Journal of legal medicine 114 (2001) 285-287

[48] Wiegand P.: Short amplicon STR multiplex for stain typing; Journal of legal medicine 120 (2006) 160-164

[49] Zamir A., Springer E., Glattstein B.: STR typing of DNA extracted from adhesive tape after processing for fingerprints; Journal of Forensic Sciences 45 (2000) 687-988

7. Anhang

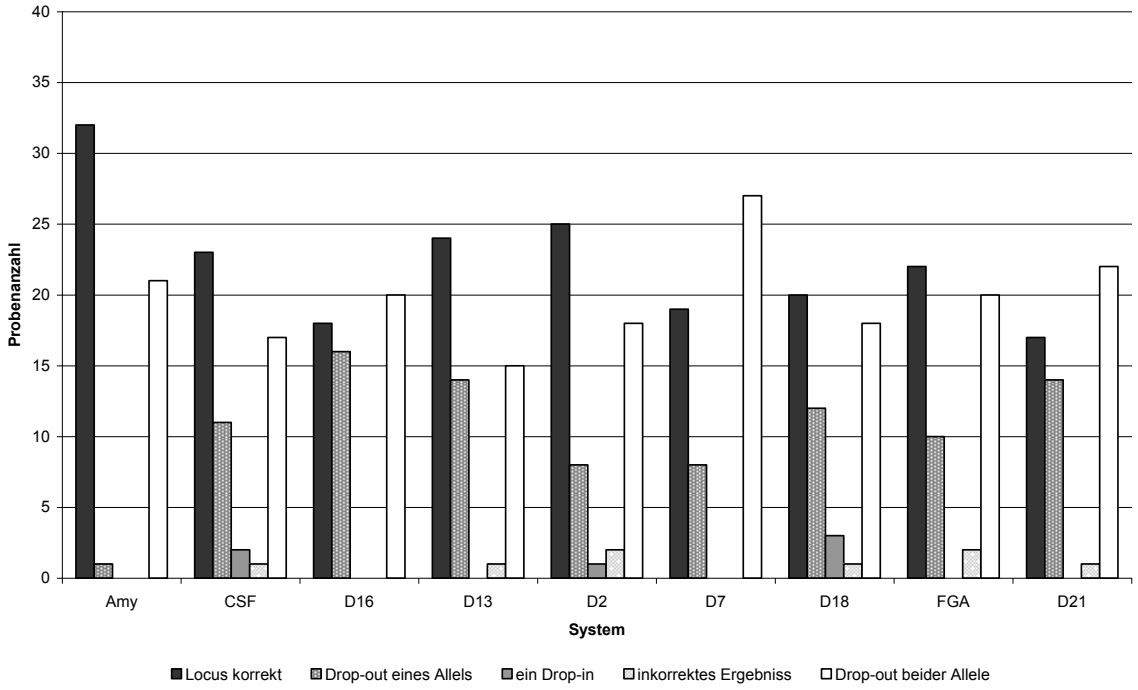


Abb. 15: miniFiler unter low copy number – Bedingungen
– Vergleichende Übersicht zum Amplifikationserfolg der einzelnen Systeme

Sortierung entsprechend der (vermuteten) Amplikonlänge (von links nach rechts, beginnend mit dem kürzesten). Die Einteilung der Ergebnisse erfolgt dabei in folgende Gruppen, die Bezeichnung „Drop-in“ beinhaltet ebenfalls Stutter-Peaks sowie weitere Artefakte:

- „Locus korrekt“
- „Drop-out eines Alllels“ von zwei möglichen
- „Drop-in“ eines Allels mit eine Signalintensität < 0,7 der RFU (relative fluorescence unit) des schwächsten korrekten Allels, zusätzlich zu den beiden korrekten Allelen
- „inkorrektes Ergebniss“ für das Auftreten eines Dro-ins mit einer RFU von ≥ 0,7 im Vergleich zum schwächsten korrekten Allel an diesem Loucs oder Auftreten eines Drop-ins beliebiger RFU bei gleichzeitigem Drop-out mindestens eines korrekten Allels oder für einen Drop-in an einem homozygotem Locus

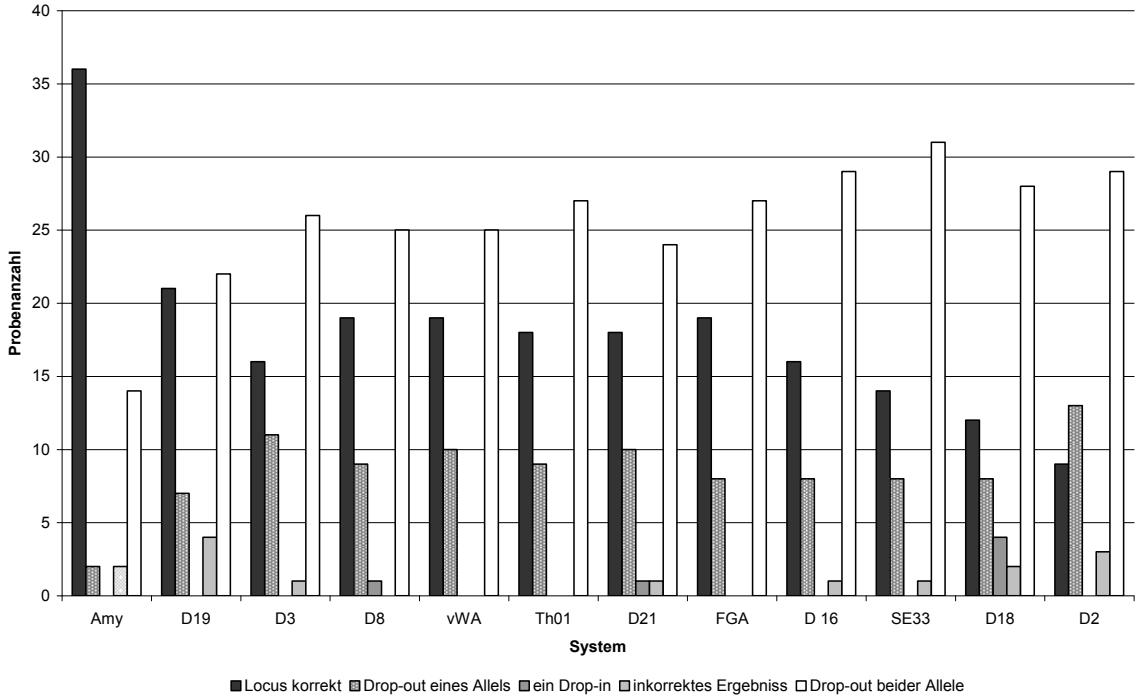


Abb. 16: SeFiler unter low copy number – Bedingungen
– Vergleichende Übersicht zum Amplifikationserfolg der einzelnen Systeme. Sortierung entsprechend der Amplikonlänge (von links nach rechts, beginnend mit dem kürzesten). Die Einteilung entspricht Abb. 15.

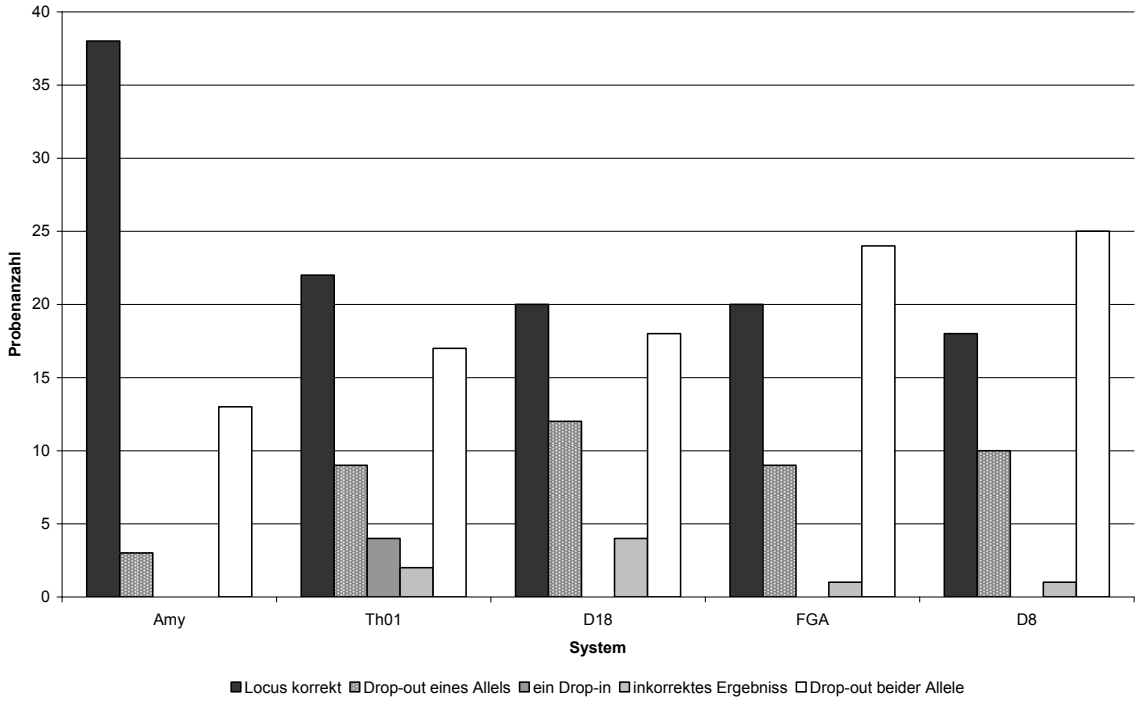


Abb. 17: PowerPlex S5 unter low copy number - Bedingungen
– Vergleichende Übersicht zum Amplifikationserfolg der einzelnen Systeme
Sortierung entsprechend der Amplikonlänge (von links nach rechts, beginnend mit dem kürzesten). Die Einteilung entspricht Abb. 15.

Tab. 5: Übersicht zur Anzahl erfolgreich amplifizierter Proben unter low copy number - Bedingungen, aufgeschlüsselt nach Systemen und im Vergleich der Kits untereinander
Die Kategorisierung des Typisierungserfolgs entspricht Abb. 15-17

Kit	Typisierungserfolg	Amy	D3	FGA	D8	D18	D21	Th01	vWA	SE33	D13	D7	D2	D 16	CSF	D19
Konsensus	Locus korrekt	44	20	26	22	24	22	29	25	12			10	10		
	Drop-out eines Allels	3	7	6	11	9	7	8	5	8			10	6		
	Drop-in eines Allels	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0		
	inkorrektes Ergebniss	0	0	0	0	0	0	0	0	0			0	0		
	Drop-out beider Allele	7	27	22	21	21	25	17	24	34			34	38		
Q8	Locus korrekt	35	18	13	20	15	17	26	23	12						
(1.PCR)	Drop-out eines Allels	3	13	13	8	6	5	10	11	2						
	Drop-in eines Allels	0	0	1	1	0	0	0	1	2						
	inkorrektes Ergebniss	1	0	2	1	0	0	0	1	3						
	Drop-out beider Allele	15	23	25	24	33	32	18	18	35						
Q8	Locus korrekt	38	22	18	22	12	17	27	26	12						
(2.PCR)	Drop-out eines Allels	3	10	9	13	2	8	7	11	8						
	Drop-in eines Allels	0	2	0	0	2	0	2	0	0						
	inkorrektes Ergebniss	1	1	1	0	0	2	2	0	2						
	Drop-out beider Allele	12	19	26	19	38	27	16	17	32						
S5	Locus korrekt	38		20	18	20		22								
	Drop-out eines Allels	3		9	10	12		9								
	Drop-in eines Allels	0		0	0	0		4								
	inkorrektes Ergebniss	0		1	1	4		2								
	Drop-out beider Allele	13		24	25	18		17								
miniFiler	Locus korrekt	32		22	0	20	17	0			24	19	25	18	23	
	Drop-out eines Allels	1		10	0	12	14	0			14	8	8	16	11	
	Drop-in eines Allels	0		0	0	3	0	0			0	0	1	0	2	
	inkorrektes Ergebniss	0		2	0	1	1	0			1	0	2	0	1	
	Drop-out beider Allele	21		20	0	18	22	0			15	27	18	20	17	
SeFiler	Locus korrekt	36	16	19	19	12	18	18	19	14			9	16		21
	Drop-out eines Allels	2	11	8	9	8	10	9	10	8			13	8		7
	Drop-in eines Allels	0	0	0	1	4	1	0	0	0			0	0		0
	inkorrektes Ergebniss	2	1	0	0	2	1	0	0	1			3	1		4
	Drop-out beider Allele	14	26	27	25	28	24	27	25	31			29	29		22

Lebenslauf

Angaben zur Person

Nachname, Vorname	**Sommerer, Thomas**
Adresse	Staufenring 29, 89073 Ulm, Deutschland
Telefon	+49 73 1 / 4 03 16 65
E-Mail	thomas.sommerer@uni-ulm.de
Staatsangehörigkeit	deutsch
Geburtsdatum	19.09.1983
Geburtsort	Nürnberg
Religion	evang.-luth.
Geschlecht	männlich
Familienstand	ledig

Publikationen / Vorträge

Veranstaltungstitel	30. Spurenworkshop
Veranstalter	Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin e. V. Institut für Rechtsmedizin Universität Zürich
Autoren	T. Sommerer, H. Schneider, E. Miltner, P. Wiegand
Titel	Selektive Hautschuppenanalyse – Teil 1: Strategien zur Gewinnung von Individual-STR-Profilen
Journal	Forensic Science International: Genetics
Ausgabe	4 (2010), Seite 200–205
Autoren	Müller K., Sommerer T., Miltner E., Schneider H., Wiegand P.
Titel	Casework testing of the multiplex kits AmpF'STR SEfiler PlusTM PCR amplification kit (AB), PowerPlex S5 System (Promega) and AmpF'STR MiniFilerTM PCR amplification kit (AB)
Journal	International Journal of Legal Medicine
Ausgabe	01/2011 (online)
Autoren	Schneider H., Sommerer T., Miltner E., Wiegand P.
Titel	Hot flakes in cold cases

Berufsserfahrung

Datum	September 2003 bis Juni 2004
Beruf oder Funktion	Zivildienst
Wichtigste Tätigkeiten und Zuständigkeiten	- Mobile Soziale Hilfsdienste - Kinderbetreuung - Schwabacher Tafel - Pflege
Name und Adresse des Arbeitgebers	Familien- und Altenhilfe Schwabach e.V. Weissenburger Str. 18, 91126 Schwabach

Schul- und Berufsbildung

Datum	seit Oktober 2004
Bezeichung	Studium der Humanmedizin Universität Ulm derzeit 11. Fachsemester (Praktisches Jahr)
Erworbene Qualifikation	1. Ärztliche Prüfung (2006)
Datum	1994 bis 2003
Bezeichnung	Wolfram-von-Eschenbach-Gymnasium Schwabach
Erworbene Qualifikation	Abitur (2003)
Datum	1990 bis 1994
Bezeichung	Grundschule Unterreichenbach

Ulm, den 11.02.2011

....
Thomas Sommerer

DANKSAGUNG

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Zunächst gilt dieser Herrn Prof. Dr. Erich Miltner für die Möglichkeit, in seiner Abteilung diese Arbeit überhaupt anfertigen zu können.
Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Peter Wiegand für die Überlassung des Themas, seine Geduld, wertvolle Ratschläge, die wirklich jederzeit vorbildliche Betreuung und nicht zuletzt das freundschaftliche Verhältnis bedanken.
Dem LKA Wiesbaden, v.a. in Person von Dr. Harald Schneider, danke ich für die Kooperation, die diese Arbeit sowie damit verbundenen Veröffentlichungen mit möglich machten.
Ebenso danke ich dem gesamten Team des DNA-Labors der genetischen Forensik sowohl für den großartigen Beistand, wie auch die überaus freundliche Aufnahme im Team. Insbesondere danke ich Dr. Rachel Klein und Dr. Katrin Müller für die Unterstützung durch Ihr Fachwissen, ihre Ideen, Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik. Elke Zimmermann bin ich durch Ihre kompetente Einarbeitung in die gesamte Laborarbeit zu besonderem Dank verpflichtet. Genauso möchte ich mich natürlich auch bei Anja Gass und allen weiteren Mitarbeitern des Laborteams für die vielen Anregungen hinsichtlich meiner Arbeit auf der einen Seite, aber auch die wirklich zu jedem Zeitpunkt freundlich-nette Zusammenarbeit und Arbeitsatmosphäre bedanken!
Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, ohne die mein Studium und meine Doktorarbeit niemals möglich geworden wäre.
Ebenfall ein großer Dank geht an die Menschen, die mich während dieser Zeit mit vielen aufbauenden Worten versorgt und überhaupt mit zu dieser Arbeit motiviert haben.
Allen einen wirklich herzlichen Dank!