

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Rechtsmedizin  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf  
Direktor: Prof. Dr. med. Klaus Püschel

## VERSUCHE ZUR TÄTERIDENTIFIZIERUNG AN MINIMALSPUREN MITTELS DNA-TYPISIERUNG

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Nora Franke  
aus Hamburg

Hamburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Universität Hamburg am: 06.06.2011  
Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs  
Medizin der Universität Hamburg  
Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. K. Püschel  
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. R. Simon  
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD. Dr. S. Kindler  
.....

# Inhaltsverzeichnis:

<b>1. Arbeitshypothese und Fragestellung</b>	<b>S.6</b>
<b>2. Einleitung</b>	
2.1 Einführung in die Identitätsbestimmung	S.8
2.2 Aufbau des menschlichen Genoms	S.9
2.3 Wissenschaftlicher Hintergrund des hier bearbeiteten Gebiets	S.16
2.4 Grundlagen der hier verwendeten Methoden	S.24
2.4.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	S.24
2.4.2 Funktionsprinzip des Sequencers	S.25
2.4.3 Funktionsprinzip des Light Cyclers	S.26
<b>3. Materialien und Methoden</b>	
3.1 Proben	S.29
3.1.1 Probenumfang	S.29
3.1.2 Anlegen der Spuren	S.30
3.1.2.1 Detektionsgrenze des Sequencers	S.30
3.1.2.2 Blutspuren	S.30
3.1.2.3 Fingerabdrücke von dem Technischen Erkennungsdienst der Polizei Bremerhaven	S.30
3.1.2.4 Fingerabdrücke auf Papier (saugender Spureträger)	S.31
3.1.2.5 Fingerabdrücke auf Glas (nicht saugender Spureträger)	S.32
3.1.2.6 Suche nach PCR-inhibierenden Substanzen in der Spurensicherungsfolie	S.32
3.1.2.7 Blutspuren, auf Folie und Filterpapier	S.32
3.1.2.8 Briefumschläge	S.33
3.1.2.9 Schaltknäufe und Lenkräder	S.33
3.1.2.10 Mobiltelefone	S.34
3.1.2.11 Mundhöhlenabstriche	S.34
3.2. DNA Extraktionsmethoden	S.35
3.2.1 QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit	S.35
3.2.2 QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™	S.36

3.2.3 Gen-IAL® all- tissue DNA- extraktion kit	S.37
3.2.4 DNA IQ™ System	S.37
3.2.5 Untersuchung der Mundhöhlenabstriche	S.38
3.3.PCR (Polymerase Kettenreaktion)	S.40
3.3.1 Material	S.40
3.3.2 Identitätsbestimmung	S.41
3.3.3 Verwendete STR- Systeme	S.41
3.3.4 Die verwendeten Amplifikationskits	S.42
3.4. Kapillarelektrophorese und Detektion der DNA	S.45
3.4.1 Probenvorbereitung	S.45
3.4.2 Analyse	S.46
3.5. DNA-Quantifizierung	S.46
3.5.1 Der Farbstoff: SYBR Green	S.47
3.5.2 Probenvorbereitung	S.47
3.5.3 Durchführung	S.48
3.5.4 Standardkurve	S.48
3.5.5 Anwendung	S.49
3.5.6 Ausschluss von Fehlern	S.49
<b>4.Ergebnisse</b>	
4.1 Standardkurven der Real-time-PCR	S.51
4.2 Vergleich der Ergebnisse der Typisierung und der vorangehenden absoluten Quantifizierung	S.55
4.3 Verdünnungen der DNA 9947A	S.56
4.4 Blutverdünnungen	S.57
4.5 Fingerabdrücke	S.60
4.5.1 Fingerabdrücke, die in Bremerhaven gelegt wurden	S.60
4.5.2 Fingerabdrücke, die im Institut für Rechtsmedizin gelegt wurden	S.63
4.6 Blutspuren auf Spurensicherungsfolie und Filterpapier	S.67
4.7 Briefumschläge	S.68
4.8 Schaltknäufe und Lenkräder	S.69
4.9 Handys	S.73

<b>5. Diskussion</b>	
5.1 Validität der Real-time-PCR Ergebnisse	S.75
5.2. Nutzen der absoluten Quantifizierung vor der PCR und Sequenzlängenbestimmung	S.76
5.3 Bestimmung der besten Extraktionsmethode anhand der Blutverdünnungsproben	S.78
5.5 Fingerabdrücke	S.80
5.6 Briefumschläge	S.84
5.7 Schaltknäufe und Lenkräder	S.84
5.8 Handys	S.85
5.9 Qualitätsstandards zur Vermeidung und Aufdeckung von kontaminiertem Arbeitsmaterial	S.85
<b>6. Zusammenfassung</b>	S.89
<b>7. Anhang: Tabelle 4.2.1</b>	S.90
<b>8. Abkürzungsverzeichnis</b>	S.93
<b>9. Literaturverzeichnis</b>	S.95
<b>10. Danksagungen</b>	S.101
<b>12. Eidesstattliche Versicherung</b>	S.102

# 1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Im Laufe der vergangenen zwei Jahrzehnte hat sich die Erfassung molekular definierter Desoxyribonukleinsäure- (DNA-)Fragmente aus forensisch relevanten Spuren zum Mittel der Wahl bei der Identitätsbestimmung entwickelt. Als biologische Spuren gelten im forensisch-medizinischen Sinne meist sehr kleine Antragsungen von Blut, Sekreten oder Gewebeteilen an Personen oder Sachen, die einen Rückschluss auf die handelnden Personen (z.B. Täter oder Opfer) oder auf einen Handlungshergang (z.B. Straftat) gestatten (Madea 2007)<sup>1</sup>. Diese Rückschlüsse stellen bei vielen Spuren wie Blut, Speichel und größeren Gewebestücken kein Problem mehr dar. Immer häufiger werden forensische Institute beauftragt, aus minimalen Antragsungen an Gegenständen verwertbare genetische „Fingerabdrücke“ zu erstellen.

Bei den Antragsungen, um die es in dieser Arbeit geht, handelt es sich um Epithelrückstände an Gegenständen, die durch Hautkontakt an diesen verbleiben.

Diese Aufträge bergen trotz der weit entwickelten DNA-Extraktions- und Amplifikationskits immer noch Schwierigkeiten, die nicht nur darin bestehen, dass noch wenig Erfahrung in Bezug auf minimale DNA-Spuren vorhanden ist, sondern auch, dass die Sicherung der Spuren oft noch nicht im Hinblick auf eine spätere molekularbiologische Untersuchung stattfindet. Hier ist natürlich besonders von Bedeutung, dass die Spurensicherung die Fingerabdrücke zunächst für die klassische Fingerabdruckidentifizierung nutzbar macht. Hierzu werden die Spurenträger mit verschiedenen Reagenzien unterschiedlich behandelt, z.B. in Ninhydrin gebadet oder mit Rußpulver bestäubt. Solche Behandlungen können zu Verminderungen des DNA-Gehalts oder zu Verunreinigungen der Proben führen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die DNA-Gewinnung aus den Spurenträgern quantitativ und qualitativ von der Sicherung der Spuren bis hin zur Detektion der individuellen Merkmale zu verbessern; und so verbesserte Methoden zur Sicherstellung und Aufbereitung der Spuren der Kriminaltechnik zur Verfügung

---

<sup>1</sup> Madea, (2007) Praxis Rechtsmedizin - Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung- 2.Auflage Springer, Berlin Heidelberg New York:486.

zu stellen. Dies wird auch im Hinblick auf den Fall „Phantom von Heilbronn“ diskutiert werden.

Die Bearbeitung jeder einzelnen Probe stellt einen großen Arbeits-, Material- und damit auch finanziellen Aufwand dar. In Anbetracht der Tatsache, dass häufig in den Proben zu wenig DNA enthalten ist, um ein Profil daraus zu erstellen, wird in dieser Arbeit so vorgegangen, dass der DNA-Gehalt der einzelnen Proben zunächst quantitativ bestimmt wird. Die quantitative DNA-Bestimmung wird mit Hilfe der Real-Time Polymerase Chain Reaktion (PCR) durchgeführt. Dies ist eine Form der PCR, bei der nach jedem Reaktionszyklus der DNA-Gehalt der Probe gemessen wird. Damit kann verhindert werden, dass Proben, die keine oder zu wenig DNA enthalten, weiterbearbeitet werden und so unnötigerweise Kosten und Mühen entstehen. Es wird ebenfalls erarbeitet werden, ob es sinnvoll ist, diese Methode für den forensischen Alltag zu etablieren.

## 2. Einleitung

### 2.1 Einführung in die Identitätsbestimmung

1901 veröffentlichte Karl Landsteiner die Entdeckung, dass Menschen anhand der Erfassung ihrer Blutgruppen nach dem ABO-System unterschieden werden können. Seine Arbeit trug den Titel "Über Agglutinationserscheinungen normaler menschlicher Blute". Er bediente sich zur Feststellung der jeweiligen Blutgruppe einer Immunreaktion der Erythrozytenmembranantigene.

Dieses System blieb zusammen mit dem Rhesus- und dem MN-System die einzige Möglichkeit, Blut einer Personengruppe, nämlich der mit den gleichen Merkmalen, zuzuordnen. Aufgrund der geringen Polymorphie dieser Merkmale war eine eindeutige Zuordnung einer Blutspur zu einem Menschen jedoch unmöglich. Forensisch konnten diese Systeme so nur zum Ausschluss von Verdächtigen eingesetzt werden.

In den 70er Jahren des 20. Jahrhunderts kamen noch die Serumproteinsysteme, Erythrozytenenzymssysteme und das System der Antigene der Leukozyten bzw. Thrombozyten hinzu (Tariverdian, Buselmaier 2004<sup>2</sup>).

Mit der Entdeckung Alec Jeffreys *et al.* im Jahre 1985<sup>3</sup>, dass bestimmte Regionen der menschlichen DNA Sequenzen enthalten, die hintereinander mehrfach wiederholt wurden, brach in der forensischen Genetik ein neues Zeitalter an. Er entdeckte auch, dass die Anzahl der Wiederholungen individualspezifisch ist. Diese Regionen wurden bekannt als „Variable number of tandem repeats“ (VNTRs). Die Technik, die Jeffreys benutzte, um die Längen der VNTRs zu bestimmen, war die Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen-Analyse (RFLP). Hierbei wird die DNA durch Restriktionsenzyme an spezifischen Sequenzen geschnitten. Die entstandenen Fragmente werden elektrophoretisch aufgetrennt und mit spezifischen Sonden hybridisiert.

---

<sup>2</sup> Tariverdian W, Buselmaier G (2004) Humangenetik; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 3.Aufl.: 404-405.

<sup>3</sup> Jeffreys AJ, Royle NJ, Thein SL (1985) Hypervariable minisatellite regions in human DNA. Nature 314: 67-73.

Restriktionsenzyme sind bakterielle Enzyme, die spezifische vier bis acht Basenpaare (bp) lange Sequenzen, die Restriktionsschnittstellen, erkennen und anschließend beide Stränge der DNA an dieser Stelle schneiden (Lodisch 2001<sup>4</sup>).

Erstmals wurde diese neue Identifizierungsmethode 1986 in einem Fall zweier vergewaltigter und ermordeter Mädchen in England angewendet. Dies führte zunächst zwar nur zum Ausschluss eines fälschlicherweise Verdächtigten. Ein Jahr später aber nach einer Untersuchung von über 4000 Männern aus der Gegend, in der die Morde geschehen waren, wurde der tatsächliche Vergewaltiger und Mörder durch die RFLP- Methode identifiziert (Wambaugh 1989<sup>5</sup>).

Inzwischen wurde die Methode der Identifizierung durch RFLPs durch PCR-basierte Methoden abgelöst, weil diese Methoden deutlich sensibler und auch auf degradierte DNA anwendbar sind, da die Wiederholungseinheiten sehr kurz sind.

## **2.2 Aufbau des menschlichen Genoms**

Die menschlichen Körperzellen enthalten einen diploiden Satz von  $2n= 46$  Chromosomen, der sich aus 44 Autosomen und 2 Gonosomen zusammensetzt. Die Chromosomen werden nach ihrer Länge und der Lage des Zentromers (akrozentrisch, submetazentrisch und metazentrisch) in sieben Gruppen von A bis G eingeteilt. Das X- Chromosom wird hierbei der Gruppe C zugeordnet und das Y- Chromosom der Gruppe G. Der kurze Arm wird als p-Arm und der lange als q-Arm bezeichnet.

Die Chromosomen bestehen aus strukturbestimmenden Proteinen (Histone etc.) und DNA, deren Sequenzen sich aus unterschiedlichen Abschnitten zusammensetzen: aus Genen und Pseudogenen, Kontrollelementen und repetitiven DNA-Sequenzen. Ein Gen ist ein Abschnitt auf der DNA, der ein

---

<sup>4</sup> Lodisch H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (2001) Molekulare Zellbiologie, 4. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer Heidelberg Berlin: 233-234.

<sup>5</sup> Wambaugh J (1989) The bloodying - The true story of the Narborough Village Murder. Bantam Books New York.

funktionelles Produkt kodiert. Am Anfang eines jeden Gens befindet sich eine Nukleotidsequenz, die den Transkriptionsstart markiert. Sie wird Promotor genannt. Am Ende eines Gens befindet sich eine Nukleotidsequenz, die das Ende der Transkription anzeigt. Diese ist der Terminator. Zwischen Promotor und Terminator befinden sich Exons und Introns. Exons sind die für Proteine kodierenden Abschnitte des Gens. Die Introns stellen Unterbrechungen der Gene dar, die zwar transkribiert werden, jedoch aus dem Primärtranskript (heterogenous nuclear Ribonukleinsäure (hnRNA)) herausgeschnitten werden. So sind sie Nukleotidsequenzen ohne jegliche Funktion. Promotor und Terminator gehören zu den Kontrollelementen, ebenso wie die DNA-Sequenzen der Enhancer, die die Transkription verstärken, und der Silencer, die sie unterbinden.

Repetitive DNA-Sequenzen sind Sequenzen, bei denen sich Basenfolgen immer wieder gleichförmig oder nahezu gleichförmig wiederholen. Hier gibt es ebenfalls kodierende und nichtkodierende Sequenzen. Kodierende Bereiche der DNA werden in dieser Arbeit keine Beachtung finden, da sie zur Bestimmung der Identität einer Person nicht herangezogen werden dürfen. Sie dürfen ausschließlich am Genprodukt (den Blut-, Serum- und Enzymgruppen) untersucht werden. Zu den nichtkodierenden Bereichen gehören die Satelliten-DNA-Sequenzen. Sie verdanken ihren Namen der Tatsache, dass sie sich bei einer Gleichgewichts-Dichtegradientenzentrifugation von den restlichen DNA-Abschnitten separieren lassen (Britten *et al.* 1968<sup>6</sup>). Es handelt sich bei der Satelliten-DNA um einfache tandemartig wiederholte DNA-Sequenzen, von 2-200 Nucleotiden. Solche Sequenzabschnitte erstrecken sich normalerweise über 10<sup>5</sup> bp. "Mit Hilfe von *In situ*-Hybridisierung an Methaphasechromosomen konnte man die einfachen DNA-Sequenzen spezifischen Chromosomenbereichen zuordnen." (Lodisch *et al.* 2001<sup>7</sup>)

Jede dieser Sequenzen hat also eine bestimmte Lokalisation auf einem bestimmten Chromosom. Sowohl die Grundsequenz als auch die Lokalisation dieser Abschnitte ist innerhalb einer Spezies immer gleich. Die Anzahl an

---

<sup>6</sup> Britten RJ, Kohne DE (1968) Repeated sequences in DNA. Science 161: 529-540.

<sup>7</sup> Lodisch H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE(2001) Molekulare Zellbiologie, Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer Heidelberg Berlin, 4. Aufl.: 330.

Wiederholungen differiert jedoch von Individuum zu Individuum. Der Längenunterschied, der dadurch entsteht, ist Folge eines ungleichen Crossing-over, das im Laufe der Evolution mehrfach stattgefunden hat. Auf dem Längenunterschied basiert der genetische „Fingerabdruck“.

Die Satelliten-DNA wird unterschieden in Mini-Satelliten, deren Wiederholungseinheiten zwischen 6 und 100 bp lang sind und etwa 20-50 mal wiederholt werden und in Mikro-Satelliten, deren Wiederholungseinheiten 2 bis 7 bp lang sind und eine maximale Repeathäufigkeit von 100 aufweisen. Sie sind in den häufigsten Fällen in Introns lokalisiert. Aufgrund ihrer kurzen Grundsequenz werden sie allgemein als short tandem repeats (STRs) oder simple sequence repeats (SSRs) bezeichnet. Als Synonym wird noch der Begriff variable number of tandem repeats (VNTRs) benutzt, der umfassender ist und auch die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLPs) umfasst. Beide Satellitentypen können zur Personenidentifizierung herangezogen werden.

Rechtlich wird die Analyse des genetischen Fingerabdrucks durch das DNA-Identitätsfeststellungsgesetz von 1998 und seine Novellierung 2005 in § 81g der Strafprozessordnung (StPO) geregelt.

In dieser Arbeit werden ausschließlich STR-Systeme angewandt, da diese standardmäßig zur Personenidentifizierung genutzt werden. Sie sind besonders geeignet, weil sie schon mit einer geringen Menge an DNA detektiert werden können.

STR- Systeme werden üblicherweise mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert und anschließend mittels Kapillarelektrophorese detektiert. PCR ist eine Methode, ein spezifisches DNA-Segment zu vervielfältigen, indem die DNA-Synthese in vitro nachgeahmt wird und zyklisch mehrfach hintereinander stattfindet.

Der Umstand, dass STRs nicht kodierende Abschnitte der DNA sind, bringt den Vorteil, dass ihre Mutation keinerlei Selektion unterworfen ist. Das hat einen besonders hohen Polymorphiegrad dieser Sequenzen zur Folge. Die Möglichkeit, anhand der STR-Systeme Verwandtschaftsverhältnisse aufzudecken, ergibt sich aus der Übertragung der Merkmale der Eltern auf ihre Kinder.

Die genetischen Merkmale (Allele) der STR-Systeme werden strikt nach den Mendelschen Gesetzen vererbt (Tariverdian, Buselmaier 2004<sup>8</sup>):

1. Mendelsches Gesetz: Kreuzt man zwei homozygote Linien, die sich in einem oder mehreren Allelpaares unterscheiden, so sind alle F1-Hybride uniform.  
(*Uniformitätsgesetz*)
2. Mendelsches Gesetz: Kreuzt man F1-Hybride, die in einem Allelpaar heterozygot sind, so ist die F2-Generation nicht uniform.  
(*Spaltungsgesetz*)
3. Mendelsches Gesetz: Kreuzt man zwei homozygote Linien untereinander, die sich in zwei oder mehreren Allelpaares voneinander unterscheiden, so werden die einzelnen Allele unabhängig voneinander entsprechend den beiden ersten Mendelschen Gesetzen vererbt.  
(*Unabhängigkeitsregel*)

Bei der Rekombination, die während der Meiose stattfindet, bekommt jede Reproduktionszelle per Zufall je ein Chromosom aus einem Chromosomenpaar. Es gibt also  $2^{23} \approx 8,4$  Millionen verschiedene Kombinationsmöglichkeiten der Chromosomen in einer Ei- oder Spermazelle. Die Kombinationsmöglichkeiten, die sich daraus für mögliche Nachkommen ergeben, sind also  $2^{23} \cdot 2^{23} \approx 7 \cdot 10^{13}$ . Durch diese Rekombination ist ein Höchstmaß an Diversität gewährleistet. STR-Marker sind auf das gesamte Genom verteilt, sie machen etwa 3% des Genoms aus (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001<sup>9</sup>) und tauchen durchschnittlich alle 10.000 Nukleotide auf. Damit ist ihre Anzahl pro Chromosom von der Größe jedes Chromosoms abhängig, wie von Subramanian, Mishra und Singh 2003 bestätigt wurde (Subramanian *et al.* 2003<sup>10</sup>).

Um STR-Marker analysieren zu können, müssen zuerst die sie flankierenden Regionen bestimmt werden. Sind diese Regionen bekannt, können PCR-Primer

---

<sup>8</sup> Tariverdian G, Buselmaier W (2004) Humangenetik Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 3.Aufl.: 179.

<sup>9</sup> International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome, Nature 409: 860-921.

<sup>10</sup> Subramanian S, Mishra RK, Singh L (2003) Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions.

Genome Biology, 4: R13

Online im Internet:

<http://genomebiology.com/2003/4/2/R13> (Stand: 20.02.2007).

synthetisiert werden, womit die Wiederholungseinheiten amplifiziert werden können.

STRs werden nach der Anzahl der wiederholten Nukleotide (Jin *et al.* 1994<sup>11</sup>), in Di- bis Hexanukleotide und nach ihrer Zusammensetzung in *simple repeats*, *compound repeats*, *complex repeats* (Urquhart *et al.* 1993<sup>12</sup>) und *Complex hypervariable repeats* (Urquhart *et al.* 1994<sup>13</sup>) eingeteilt. Bei simple repeats handelt es sich um Einheiten, die in der gleichen Länge und Sequenz wiederholt werden. Compound repeats setzen sich aus zwei oder mehr kombinierten simple repeats zusammen. Complex repeats enthalten mehrere Wiederholungseinheiten unterschiedlicher Längen, sowie unterschiedliche eingestreute einfache Sequenzen. Complex hypervariable repeats bestehen aus vielen Allelen, die in Größe und Sequenz sehr unterschiedlich sind. Meistens werden Tetranucleotide benutzt, da diese groß genug sind, um klar unterscheidbare Trennbilder zu ihren benachbarten Allelen zu gewährleisten.

Um eine internationale Verständigung über die STR-Systeme zu gewährleisten, hat die DNA Kommission der International Society of Forensic Haemogenetics (ISFH), die mittlerweile als International Society of Forensic Genetics (ISFG) bekannt ist, 1994 und 1997 Richtlinien aufgestellt, anhand derer STR-Systeme festgelegt und benannt werden. Diese sind jeweils von Bär *et al.* 1994<sup>14</sup> und 1997<sup>15</sup> im International Journal of Legal Medicine dargestellt worden.

Bär *et al.* 1997:

- Choice of the Strand
- For STR within protein coding regions (as well as in the intron of the Genes), the coding strand should be used. This would apply to STRs such as VWA

---

<sup>11</sup> Jin L, Zhong Y, Chakraborty R (1994) The exact numbers of possible microsatellite motifs. American Journal of human Genetics 55: 582-583.

<sup>12</sup> Urquhart A, Kimpton CP, Gill P (1993) Sequence variability of the tetranucleotide repeat of the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2) locus. Human Genetics 92: 554-562.

<sup>13</sup> Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P (1994) Variation in short tandem repeat sequences - a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. International Journal of legal Medicine 107: 13-20.

<sup>14</sup> Bär W, Brinkmann B, Lincoln P, Mayr WR, Rossi U (1994) DNA recommendations-1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems. International Journal of legal Medicine 107: 159-160.

<sup>15</sup> Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr WR, Olaisen B (1997) DNA recommendations: Further report of the DNA Commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. International Journal of legal Medicine 110: 175-176.

(GenBank: M25716), TPOX (GenBank: M68651), and CSF1PO (GenBank: X14720).

- For repetitive sequences without any connection to protein coding genes like many of the D#S### loci, the sequence originally described in the literature of the first public database entry shall become the standard reference (and strand) for nomenclature. Examples here include D18S51 (GenBank: L18333) and D21S11 (GenBank: M84567).
- If the nomenclature is already established in the forensic field but not in accordance with the aforementioned guideline, the nomenclature shall be maintained to avoid unnecessary confusion. This recommendation applies to the continued use by some laboratories of the 'AATG repeat' strand for the STR marker TH01. The GenBank sequence for TH01 uses the coding strand and therefore contains the complementary 'TCAT repeat' instead.
- **Choice of the Motif and Allele Designation**
- The repeat sequence motif should be defined so that the first 5'-nucleotides that can define a repeat motif are used. For example, 5'-GG TCA TCA TCA TGG-3' could be seen as having 3xTCA repeats or 3xCAT. However, under the recommendations of the ISFH committee only the first one (3xTCA) is correct because it defines the first possible repeat motif.
- Designation of incomplete repeat motifs should contain the number of complete repeats and, separated by a decimal point, the number of basepairs in the incomplete repeat. Examples of 'microvariants' with incomplete repeat units include allele 9.3 at the TH01 locus. TH01 allele 9.1 contains nine tetranucleotide AATG repeats and one incomplete ATG repeat of three nucleotides (Puers *et al.* 1993<sup>16</sup>). Another microvariant example is allele 22.2 at the FGA locus which contains 22 tetranucleotide repeats and one incomplete repeat with two nucleotides (Barber *et al.* 1996<sup>17</sup>).
- Allelic ladders containing sequenced alleles that are names according to the

---

<sup>16</sup> Puers C, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Schumm JW (1993) Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01[AATG]<sub>n</sub> and reassignment of alleles in population analysis by using a locus specific allelic ladder. *American Journal of Human Genetics* 53: 953-958.

<sup>17</sup> Barber MD, McKeown, BJ, Parkin BH (1996) Structural variation in the alleles of a short tandem repeat system at the human alpha fibrinogen locus. *International Journal of Legal Medicine* 108: 180-185.

recommendations listed above should be used as a reference for allele designation in unknown samples. Allelic ladders may be commercially obtained or prepared in house and should contain all common alleles.

Es kommt häufig vor, dass Allele Wiederholungen beinhalten, die nicht vollständig sind. Dadurch kommt es zu so genannten Zwischenallelen. Dies sind die oben genannten Microvariants. Der wohl verbreitetste, ebenfalls oben als Beispiel erwähnte Vertreter dieser Art ist das Allel 9.3 des TH01 Locus. Es handelt sich hierbei um ein STR-System, das Teil einer Intronsequenz des Thyrosinhydroxylase-Gens ist, das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert ist. Darum wird es alternativ auch als TC11 bezeichnet (Puers *et al.* 1993 s.o.). Die ebenfalls oben erwähnten Allelic ladders (Allel-Leitern), sind eine Mischung aller gewöhnlich vorkommenden Allele eines bestimmten STR-Markers. Sie werden wie eine Schablone benutzt, anhand derer die detektierten Allele einer Probe bestimmt werden können. Es ist zur Erstellung einer Allel-Leiter notwendig, die gleichen Primer zu benutzen, die zur Amplifikation benutzt werden, damit die "Schablone" auch genau auf das Produkt der Fragmentlängenbestimmung passt. Ein Primer ist ein einzelsträngiges Oligonukleotid, das an einen Abschnitt, der eine zu ihm komplementäre Sequenz aufweist, hybridisiert werden kann. Es wirkt als Startstelle zur eigenen Verlängerung gemäß den allgemeinen Regeln der Basenpaarung, so dass ein zum Matrizenstrang komplementäres Polynukleotid entsteht (Lodisch *et al.* 2001<sup>18</sup>). Kommerzielle Amplifikationskits beinhalten immer auch Allelleitern, so entfällt die aufwendige Erstellung der Allelleitern.

Die Leistungsfähigkeit eines Polymorphismus hängt von der Anzahl verschiedener Allele im System und deren Frequenz in der Population ab. Diese Leistungsfähigkeit eines Polymorphismus wird als Diskriminationsindex (DI) bezeichnet. Zum Beispiel wird dem System TH01 ein DI von 0,91 zugeordnet, dem System SE33 einer von 0,99. Der Informationsgehalt des System SE33 ist also höher als der von TH01.

Soll nun aus den gesammelten Daten berechnet werden, wie aussagekräftig

---

<sup>18</sup> Lodisch H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE (2001) Molekulare Zellbiologie, Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer Heidelberg Berlin, 4. Aufl.: 1197.

das Ergebnis für eine bestimmte Fragestellung ist, muss in Kenntnis der Häufung der einzelnen Allelfrequenzen und mit Hilfe des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts die Häufigkeit des Merkmalskomplexes berechnet werden. Die einzelnen Häufigkeiten der Allelfrequenzen können unter anderem unter

<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase> (Butler 2005)<sup>19</sup>

nachgelesen und zur Berechnung herangezogen werden. Es gibt nationale, aber auch paneuropäische Datenbanken, die die Genhäufigkeiten auflisten (Gill *et al.* 2003<sup>20</sup>).

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht besagt, dass die Häufigkeit des homozygoten Genotyps für ein Allel der Frequenz  $p$  bzw.  $q$  gleich  $p^2$  bzw.  $q^2$  ist; die Häufigkeit des heterozygoten Genotyps mit Allelen der Frequenzen  $p$  und  $q$  gleich  $2pq$  ist.

Die Gesamthäufigkeit aller Allele eines STR-Lokus beträgt 1. Die Häufigkeiten aller detektierten Merkmalskomplexe werden miteinander multipliziert, um zu ermitteln, wie häufig dieser Gesamtmerkmalskomplex in der Bevölkerung vorkommt.

Die Häufigkeiten werden in Datenbanken zusammengefasst, die im Internet eingesehen werden können, wie auf der oben angegebenen Website. In solchen Gendateien wird angegeben, unter wie vielen Personen dieser Merkmalskomplex einmal auftaucht. Dieser Wert ergibt sich aus dem Kehrwert der Häufigkeit des Gesamtmerkmalskomplexes.

### **2.3. Wissenschaftlicher Hintergrund des hier bearbeiteten Gebiets**

Der schnellen technischen Entwicklung ist es zu verdanken, dass die Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks aus Blut, Speichel, Sperma und vielen Geweben kein Problem mehr darstellt. Auch aus mikroskopisch geringen

---

<sup>19</sup> Butler JM (2005) Forensic DNA Typing: Biologie, Technologie, and Genetics of STR Markers 2<sup>nd</sup> edn. Elsevier Academic Press Burlington London: 473-496.

<sup>20</sup> Gill P, Foreman L, Buckleton JS, Triggs CM, Allen H (2003) A comparison of adjustment methods to test the robustness of an STR DNA database comprised of 24 European Populations. Forensic Science International 131: 184-196.

Mengen dieser Proben lassen sich dank PCR und sehr sensitiven Amplifikationskits noch gute STR-Profile erstellen.

Bei mittlerweile 80 % der Proben, die die forensischen Institute erreichen, handelt es sich um sogenannte Kontaktsuren. Hierbei handelt es sich um Asservate oder von Asservaten gewonnene Spurenräger, bei denen die Vermutung besteht, dass der Täter Hautkontakt mit den Asservaten hatte. Die Annahme, dass sich die DNA des Täters an den Gegenständen befindet, ergibt sich meistens aus Hand- oder Fingerabdrücken, die auf den Gegenständen sichergestellt wurden, jedoch nicht für eine herkömmliche Täteridentifizierung anhand von Fingerabdrücken ausreichen, da sie verwischt oder unvollständig sind.

Teilweise erhält das forensische Labor die Spurenräger im Original (z.B. Papierstücke, Handys ect.), teilweise werden durch die Spurensicherung der Polizei Wattetupferabriebe von größeren oder unhandlicheren Gegenständen (z.B. Lenkräder, Schaltknäufe) angefertigt und an das forensische Labor versandt.

Eine besondere Herausforderung stellen vorbehandelte Fingerabdrücke dar, mit denen man es im forensischen Alltag zu tun hat. In der Studie von Balogh *et al.* 2003<sup>21</sup> wird untersucht, ob es möglich ist, aus Fingerabdrücken auf Papier STR-Profile zu erstellen. Es werden dazu vorbehandelte und nicht vorbehandelte Fingerabdrücke genommen. Unter optimalen Bedingungen (keine Kontamination, die Position der Fingerabdrücke auf dem Papier ist bekannt) werden in den unterschiedlichen Kategorien (unterschiedliche Berührungsdauer, unterschiedlicher Tageszeitpunkt, 3-5 Tage Abstand zwischen Spurenllegung und Extraktion) in 80-93% erfolgreich STR-Profile erstellt. Bei Versuchen aus vorbehandelten Fingerabdrücken STR-Profile zu erstellen, lag die Erfolgsrate nur bei 47%. Alessandrini *et al.* berichten 2003<sup>22</sup> über ihre Studie, in der sie versuchten, STR-Profile aus Fingerabdrücken zu erstellen, die auf hartem Untergrund (Glas, Holz und Metall) gelegt wurden. Ein vollständiges Profil konnte nur in 31,8% der Fälle erstellt werden, in 13,6% der

---

<sup>21</sup> Balogh MK, Burger J, Bender K, Schneider PM, Alt KW (2003) STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. *Forensic Science International* 137: 188-195.

<sup>22</sup> Alessandrini F, Cecati M, Pesaresi M, Turchi C, Carle D, Tagliabarracci A (2003) Fingerprints as evidence for a genetic profile: Morphological study on fingerprints and analysis of exogenous and individual factors affecting DNA typing. *Journal of forensic Science* 48: 586-592.

Fälle konnte kein einziges Allel detektiert werden.

Auch das Institut für Rechtsmedizin Hamburg erreichten in den Jahren 2006 und 2007 mehrfach solche Spureenträger. Es war jedoch nach den zurzeit gängigen Methoden nicht möglich, aus den Zellen, die diesen Gegenständen vermutlich anhafteten, verwertbare STR-Profile zu erstellen.

Die hier zur Bearbeitung herangezogenen Proben sind im Hinblick auf die gestiegenen Anforderungen im Bereich der Täteridentifizierung ausgesucht worden.

Verschiedene Studien haben sich mit dem Thema beschäftigt, ob es möglich ist, aus den minimalen Zellantragungen auf Gegenständen, die von einem einzigen Hautkontakt einer Person mit diesen Gegenständen herrühren, verwertbare STR-Profile zu erstellen.

Dieses Forschungsgebiet wird aufgrund der geringen DNA Menge, die zur Verfügung steht, Low-Copy-Number (LCN) DNA testing genannt. Bei LCN DNA handelt es sich um DNA Mengen, die geringer sind als 100pg (Gill *et al.* 2000<sup>23</sup>). Es ist jedoch nicht von Bedeutung, ob diese DNA aus Epithelzellen, Körperflüssigkeiten oder Geweben stammt. In einer Körperzelle befinden sich ca. 6 pg genomische DNA (Butler 2005)<sup>24</sup>. Die Bestrebungen auf diesem Gebiet gehen in verschiedene Richtungen: Zum einen muss bei der Sicherung der Spuren besonders darauf geachtet werden, dass keinerlei Kontaminationen auftreten. Weitergehend muss die Aufbereitung der DNA optimiert werden, so dass aus den Spurenlägern die größtmögliche Menge DNA gewonnen und diese von PCR Inhibitoren gereinigt werden kann. Dann wird die Erstellung der PCR-Profile verbessert, indem immer sensitivere PCR-Kits und Primer benutzt werden.

Van Oorschot<sup>25</sup> berichtet 1997 in Nature in seiner Veröffentlichung "DNA fingerprints from fingerprints" erstmals, dass es gelungen ist, aus der in

---

<sup>23</sup> Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J (2000) An investigation of the rigour of interpretation rules for STRs derived from less than 100pg of DNA. *Forensic Science International* 112: 17-40.

<sup>24</sup> Butler JM (2005) *Forensic DNA Typing: Biologie, Technologie, and Genetics of STR Markers* 2<sup>nd</sup> edn. Elsevier Academic Press Burlington London S. 56.

<sup>25</sup> Oorschot van RAH, Jones MK (1997) DNA fingerprints from fingerprints. *Nature* 378: 767.

Fingerabdrücken enthaltenen DNA ein STR-Profil zu erstellen. Neben dieser Entdeckung berichtet er von noch zwei weiteren: Die Menge an DNA, die Personen durch Hautkontakt an Gegenständen hinterlassen, variiert von Person zu Person. Sie hängt von ihrem "shedder-status" ab. Die Personen werden hiernach in zwei Kategorien eingeteilt: in good und poor DNA shedder. Weiter berichtet van Oorschot davon, dass es möglich ist, DNA dritter Personen über zweite auf Gegenstände zu übertragen. Diese sekundäre Übertragung stellt besonders in LCN-DNA-Fällen ein großes Risiko für Fehlinterpretationen der STR-Profile dar.

Dass auf diesem Gebiet der Bedarf an Forschung groß ist, zeigen neben anderen die Veröffentlichungen von Ladd *et al.* 1999<sup>26</sup>. Ladd gelang es nicht, die Beobachtungen von Oorschots zu bestätigen. Es gelang nur in etwa 50% der Fälle ein komplettes STR- Profil der primär auf Gegenstände übertragenen DNA zu erstellen. Ein komplettes Profil der sekundär übertragenen DNA zu erstellen, gelang in keinem der Versuche.

2002 gelang es Lowe *et al.*<sup>27</sup>, die Beobachtungen von Oorschots unter Idealbedingungen (gereinigte Gegenstände und vor dem Versuch gewaschene Hände) zu bestätigen. Bright und Petricevic (2004)<sup>28</sup> bestätigten ebenfalls die von van Oorschot beobachtete unterschiedliche Veranlagung von Menschen, DNA an Gegenständen zu hinterlassen. Sie weisen jedoch darauf hin, dass es noch nicht bekannt ist, womit diese Veranlagung zusammenhängt, zumal die Vermutungen darüber weit auseinander gehen.

In der LCN DNA Forschung wird ein besonderes Augenmerk auch auf die Möglichkeiten der Kontamination eines Tatortes nicht nur nach der Tat, sondern auch während und vor ihr gelegt. Allele von Personen, die lange Zeit vor der Tat am Tatort waren oder die nie dort waren, aber mit einem der Tatbeteiligten oder einem, der vor der Tat am Tatort war, Hautkontakt hatten, könnten detektiert werden. Diese Verunreinigen lassen sich durch genaueres Arbeiten nicht vermeiden. Die Allele in Mixturen müssen, wenn möglich, anhand von Peak-

---

<sup>26</sup> Ladd C, Adamowicz MS, Bourke MT, Scherzinger CA, Lee HC (1999) A systematic analysis of secondary DNA transfer. *Journal of Forensic Science* 44(6): 1270-1272.

<sup>27</sup> Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G, Gill P (2002) The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Science International* 129: 25-34.

<sup>28</sup> Bright J-A, Petricevic SF (2004) Recovery of trace DNA and its application to DNA profiling of shoe insoles. *Forensic Science International* 145: 7-12.

Größen nach der Fragmentlängenanalyse einander zugeordnet werden (Gill *et al.* 1998<sup>29</sup>). Nachträgliche Verunreinigungen dagegen lassen sich durchaus vermeiden.

Howitt<sup>30</sup> benennt als Quellen nachträglicher Kontaminationen Polizeibeamte, die den Tatort betreten, Beamte der Spurensicherung, die Proben für Laboruntersuchungen sicherstellen, das Laborpersonal, das die Proben bearbeitet, und mit DNA kontaminierte Materialien, die für die Bearbeitung der Proben eingesetzt werden.

Die Kontaminationen müssen von anderen Artefakten unterschieden werden. Beim Arbeiten mit LCN DNA können drei bestimmte Typen der Artefaktbildung häufig beobachtet werden:

- Es werden zusätzliche Allele detektiert, die durch oben beschriebene Verunreinigungen in die Probe gebracht werden. Dieses Phänomen bezeichnet man als „allele drop in“.
- Durch stochastische Effekte bei der DNA-Amplifikation fallen vorhandene Allele weg. Es handelt sich hierbei um „allele drop out“. Dadurch kann ein Heterozygot fälschlicherweise als Homozygot eingeordnet werden.
- Stutter peaks treten auf, die häufig höher sind, als die üblichen 5-10% des eigentlichen Peaks<sup>31</sup>. Bei Stutterpeaks handelt es sich um Peaks, die eine Wiederholungseinheit kürzer sind als das eigentliche Allel. Sie kommen dadurch zustande, dass bei der Amplifikation ein Strangschlupf entsteht, wodurch eine Wiederholungseinheit nicht amplifiziert wird. Da dieser Strang beim nächsten Zyklus zum Matrizenstrang wird, vermehrt sich der Fehler auf diese Weise.

Wegen der genannten Unterschiede des LCN DNA-Genotyping im Gegensatz zum Genotyping von DNA, die in größeren Mengen vorhanden ist, beschäftigte

---

<sup>29</sup> Gill P, Sparkes R, Pinchin R, Clayton T, Whitaker J, Buckleton J (1998) Interpreting simple STR mixtures using allelic peak areas. *Forensic Science International* 91: 41-53.

<sup>30</sup> Howitt T. 2003; Ensuring the integrity of results: A continuing challenge in forensic DNA analysis. Online:

<http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp14proc/oralpresentations/Howitt.pdf> (Stand 20.04.2007).

<sup>31</sup> Whitaker JP, Clayton TM, Urquhart AJ, Millican ES, Downes TJ, Kimpton CP, Gill P (1995) Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples. *Bio Techniques* 18: 670-677.

sich Gill 2000<sup>32</sup> mit dem Umgang mit LCN DNA.

Damit „Allele drop in“ detektiert werden kann, sollte eine laborinterne Gendatei mit Allelen aller Mitarbeiter angelegt werden. Anhand der in der Probe vorhandenen Allele kann die Quelle der Kontamination bestimmt werden. Zusätzlich sollte bei Verdacht auf „Allele drop in“ eine zweite Amplifikation stattfinden, da die Wahrscheinlichkeit, dass die Probe ein zweites Mal das gleiche Extra-Allel enthält, unter einem Prozent liegt (Taberlet *et al.* 1996<sup>33</sup>). Durch das wiederholte Amplifizieren kann der „Allele drop out“ identifiziert werden. Dass das gleiche Allel ein zweites Mal wegfällt, ist auch sehr unwahrscheinlich. Zusätzlich muss nach Gill auch immer eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitlaufen. Eine Positivkontrolle ist eine Kontrolle, die alle PCR-Reagenzien und eine bestimmte Menge einer DNA enthält, deren Allele bekannt sind. Anhand dieser Kontrolle können mögliche Fehler, die während der PCR aufgetreten sind, aufgedeckt werden. Eine Negativkontrolle enthält alle PCR-Reagenzien und Wasser. Durch sie werden Kontaminationen die beim Ansetzen und während der PCR entstehen, sichtbar gemacht. Die üblichen 28 PCR-Zyklen reichen bei LCN DNA nicht aus, um STR-Profile zu erstellen.

Findlay *et al.* 1997<sup>34</sup> erreichten bessere Resultate dadurch, dass er die Anzahl an PCR-Zyklen von üblichen 28 auf 34 erhöhte. Eine weitere Erhöhung der Zykluszahl hätte eine zu große Steigerung der PCR-Fehlerrate zur Folge. Schneider legte 2007<sup>35</sup> wissenschaftliche Standards für Laboranforderungen und Qualitätssicherung fest. Um Kontaminationen zu vermeiden, ist es notwendig, Prä- und Post-PCR Bereiche einzurichten. Die Auswertung der PCR muss ebenfalls in einem separaten Bereich stattfinden. Jedem dieser Bereiche ist eigenes Arbeitsmaterial zugeordnet. Die Richtung, in der sich die Proben bewegen, ist immer vom Prä- in den Post-PCR-Bereich, nie umgekehrt. Prä- und Post-PCR Bereich sind auch unterschiedliche Kittel zugeordnet, die dort

---

<sup>32</sup> Gill P, Whitaker J, Flaxman C, Brown N, Buckleton J (2000) An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. *Forensic Science International* 112:17-40.

<sup>33</sup> Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24: 3189-3194.

<sup>34</sup> Findlay I, Taylor P, Quirke P, Frazier R, Urquhart A (1997) DNA fingerprinting from single cells. *Nature* 389: 555-556.

<sup>35</sup> Schneider PM (2007) Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Science International* 165: 238-243.

getragen werden.

Die wissenschaftlichen Standards und möglichen Fehlerquellen werden in dieser Arbeit berücksichtigt.

Die Erfindung der Real-Time-PCR stellt eine mögliche Vereinfachung in der LCN DNA-Analyse dar. Real-Time-PCR macht es möglich, die Vervielfältigung der DNA über die Messung des Fluoreszenzanstiegs in jedem Zyklus zu verfolgen und durch einen automatischen Vergleich mit einer Standardkurve die Ausgangskonzentration zu bestimmen (Horsman *et al.* 2006<sup>36</sup>).

Bei der Analyse der Proben stellt zu viel oder zu wenig DNA in einer Probe oft ein Problem dar, so dass eine Alleldetektion des Amplifikats unmöglich wird, was eine Wiederholung der PCR und der Fragmentlängenanalyse unter ergebnisangepassten Bedingungen erfordert (Moretti *et al.* 2000<sup>37</sup>). Nicklas und Buel erwähnten 2003<sup>38</sup> erstmals, dass es sinnvoll sein könnte, die Real-Time-PCR für die Quantifizierung von forensischen Proben zu benutzen, um die DNA-Menge, die in der PCR eingesetzt werden soll, vor der Fragmentlängenanalyse bestimmen zu können. Ein weiterer Vorteil ist, dass das Amplifikat vernichtet werden kann, ohne den PCR-Bereich zu verunreinigen, denn es kann in seinen geschlossenen Probenbehältern verworfen werden (Tringali *et al.* 2004<sup>39</sup>). Alonso *et al.* berichten 2004<sup>40</sup>, dass Real-Time-PCR besonders für die Quantifizierung von LCN und hoch degradiertes DNA geeignet ist, da die Geräte besonders sensibel sind und schon minimale DNA Mengen detektieren.

Die Verbesserung der Techniken der DNA-Extraktion und Amplifikation führt dazu, dass nun auch geringe Kontaminationen der Arbeitsmaterialien der

---

<sup>36</sup> Horsman KM, Hickey JA, Cotton RW, Landers JP, Maddox LO (2006) Development of a human-specific real-time PCR assay for the simultaneous quantitation of total genomic and male DNA. *Journal of Forensic Science* 51/4: 758-765.

<sup>37</sup> Moretti TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keyes KM, Smerick JB, Budowle B (2000) Validation of STR typing by capillary electrophoresis. *Journal of Forensic Science* 46: 647-660.

<sup>38</sup> Nicklas JA, Buel E (2003) Development of an Alu-based, real time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. *Journal of Forensic Science* 48/5: 282-291.

<sup>39</sup> Tringali G, Barbaro A, Insirello E, Cormaci P, Roccazzello AM (2004) Rapid and efficacious real-time quantitative PCR assay for quantitation of human DNA in forensic samples. *Forensic Science International* 146/8: 177-181.

<sup>40</sup> Alonso A, Martín P, Albarrán C, García O, de Simón LF, García-Hirschfeld J, Sancho M, de la Rúa C, Fernández-Piqueras J (2004) Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Science International* 139: 141-149.

Spurensicherung als relevante Spuren fehlgedeutet werden können. Das bekannteste Beispiel hierfür ist der Fall des „Phantoms“ von Heilbronn: Am 25.04.2007 wurde die Polizeibeamtin Michèle Kiesewetter während ihres Dienstes in Heilbronn getötet, ihr Kollege wurde dabei schwer verletzt. Von dem Täter fehlt bis heute jede Spur. Jedoch fand die Sonderkommission (Soko) „Parkplatz“, die zur Untersuchung des Tötungsdeliktes gegründet wurde, auf dem Spurenlager, der zur Sicherstellung genetischer Spuren verwendet wurde DNA, die bereits an anderen Tatorten unterschiedlichster Verbrechen sichergestellt worden war. So stand die weibliche DNA, die vermeintlich am Polizeiauto des Opfers sichergestellt wurde, in Verbindung mit über 40 Straftaten (Deutscher Bundestag 2009)<sup>41</sup>, die in Deutschland, Österreich und Frankreich seit dem Jahr 1993 begangen worden waren. Am 27.3.2009 teilte das zuständige Landeskriminalamt (LKA) mit, dass es sich bei den Spuren vermutlich um die DNA einer Mitarbeiterin der Firma handele, die die Wattestäbchen herstellt, die zur Sicherung der Spuren verwendet worden waren. Es handelt sich also nicht um Tatortspuren sondern um Kontaminationen. Bis 2004 habe den Wattestäbchen ein Zertifikat beigegeben, das DNase-, RNase- und DNA-Freiheit garantierte, womit sie zur Sicherung von DNA-Spuren geeignet gewesen seien (Innenministerium Baden-Württemberg 2009)<sup>42</sup>.

Trotz der insgesamt 300 Leerproben (unbenutzte Wattetupfer), die zum Zweck der Qualitätssicherung extrahiert und amplifiziert worden waren, wurde die DNA der unbekanntes weiblichen Person (uwP) nicht in ihnen gefunden und es ergab sich kein Hinweis auf eine Kontamination im Produktionsprozess der Wattestäbchen (Innenministerium Baden-Württemberg 2009)<sup>43</sup>.

Die Häufung der Funde der DNA der uwP an Tatorten, besonders an solchen,

---

<sup>41</sup> Deutscher Bundestag Drucksache 16/13072 (18. 05. 2009) Antwort der Bundesregierung auf die Kleine Anfrage der Abgeordneten Jerzy Montag, Silke Stokar von Neuforn, Monika Lazar, weiterer Abgeordneter und der Fraktion BÜNDNIS 90/DIE GRÜNEN – Drucksache 16/12815 – Konsequenzen aus der „Phantom Panne“ für die DNA-Analyse-Datei.

<sup>42</sup> Innenministerium Baden-Württemberg (2009) Meldung: Weiter Wirbel um Wattestäbchen – DNA-Freiheit zeitweise garantiert.

[http://www.innenministerium.baden-wuerttemberg.de/de/Meldungen/206276.html?\\_min=\\_im&template=min\\_meldung\\_html&referer=82713](http://www.innenministerium.baden-wuerttemberg.de/de/Meldungen/206276.html?_min=_im&template=min_meldung_html&referer=82713)  
(Stand: 9.12.09)

<sup>43</sup> Landtag von Baden-Württemberg (27. 03. 2009) Antrag der Abg. Reinhold Gall u. a. SPD und Stellungnahme des Innenministeriums. Einkauf von Untersuchungsmitteln zur Spurenanalyse nach Kriminalfällen. Drucksache 14 / 4259

bei denen die Täterschaft gänzlich geklärt war, führte dazu, dass dem Verdacht nachgegangen wurde, dass es sich doch um Verunreinigungen des Arbeitsmaterials handelte. Der gemeinsame Nenner aller Ermittlungen, bei denen die DNA der uwP aufgetaucht war, waren die Wattetupfer der Firma aus Bayern. Daraufhin wurden von allen Mitarbeiterinnen Mundschleimhautabstriche genommen und die daraus extrahierte DNA mit der der uwP verglichen. Die DNA konnte einer Mitarbeiterin der Firma zugeordnet werden.

Als Folge wurde vom Innenministerium Baden-Württemberg ein Expertenkreis „Qualitätssicherung bei der DNA-Analyse“ gegründet, der sich auf Qualitätsstandards für die DNA-Analyse geeinigt hat. Demnach sollen nur noch Wattestäbchen benutzt werden, die mit Ethylenoxid sterilisiert wurden, und die über ein zentrales Logistikzentrum beschafft werden. Weiterhin wird mit der Analyse von Leerproben die Qualität der Wattestäbchen überprüft (Innenministerium Baden-Württemberg 2009)<sup>44</sup>.

Die Notwendigkeit der Etablierung und Einhaltung von Qualitätsstandards und wie diese aussehen sollten, wird in Abschnitt fünf dieser Arbeit diskutiert.

## **2.4 Grundlagen der hier verwendeten Methoden**

### 2.4.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR):

Eine Polymerase Kettenreaktion erfolgt in einem Thermocycler. Dies ist ein Gerät, das nach einem vorgegebenen Programm seine Innentemperatur verändert und so eine Vervielfältigung der DNA ermöglicht.

Die PCR wird vorbereitet, indem zu der zu amplifizierenden gelösten DNA ein Gemisch verschiedener Primer, ein Puffer und eine hitzeresistente DNA-Polymerase hinzugefügt wird.

Primer sind künstlich hergestellte DNA-Sequenzen, die zu bekannten Regionen auf der DNA komplementär sind. Wird die DNA in ihre zwei Stränge gespalten und die Temperatur wieder auf die optimale Primerbindungstemperatur

---

<sup>44</sup> Baden-Württemberg Innenministerium Pressestelle Internet: <http://www.im.baden-wuerttemberg.de>  
Pressemitteilung 7. Juli 2009 DNA-Arbeitsmittel. Expertenkreis beim Innenministerium einigt sich auf zukunftsweisende Qualitätsstandards.

gesenkt, binden die Primer zu ihren Komplementär-Regionen auf der DNA und verhindern so eine Wiedervereinigung der Mutterstränge. Die Primer sind fluoreszent markiert, um eine spätere Detektion zu ermöglichen. Damit beide Stränge amplifiziert werden, befindet sich in jedem Primermix ein Primer für die eine Richtung und einer für die entgegengesetzte Richtung, da die Elongation der Stränge immer in 3´- 5´- Richtung stattfindet.

Der Puffer enthält die für die Amplifikation erforderlichen Desoxyribonucleotide, sowie  $MgCl_2$  und Bovine Serum Albumin (BSA) (Bestandteile, die der Optimierung der PCR dienen).

Zu Beginn der Reaktionen erfolgen die Aktivierung der Taq-Polmerase (eine hitzebeständige DNA-Polymerase, die in Bakterien vorkommt, die in heißen Quellen leben) und die Denaturierung der DNA bei 94°C: hierbei werden die zwei DNA-Stränge voneinander getrennt. Es folgt die Primer-Bindungsphase. Da die Primer im Überschuss in der Lösung vorhanden sind, binden sie an die DNA, bevor es den Muttersträngen gelingt, sich wiederzuvereinigen.

Anschließend folgt die Amplifikation. Hierzu dient die Taq-Polymerase. Sie synthetisiert nach Bindung an die Primer an beiden Strängen in 5´-3´- Richtung je einen Tochterstrang. Ist dieser Schritt abgeschlossen, ist ein Zyklus beendet und ein neuer kann beginnen. Wie viele Zyklen notwendig sind, hängt von dem DNA-Gehalt der Probe ab. Ist der Gehalt hoch, werden weniger Zyklen benötigt als bei einem geringen DNA-Gehalt. Bei welcher Temperatur die Primerbindung und die DNA Synthese stattfinden, hängt von den jeweiligen Schmelzpunkten der Primer ab.

#### 2.4.2 Funktionsprinzip des Sequencers

Für die Analyse der amplifizierten Probe wird ein Sequencer benutzt. Es handelt sich hierbei um ein Gerät, das mit Hilfe einer Kapillar-Gelelektrophorese DNA-Molekül-Fragmente entsprechend ihrer Länge auftrennt und detektiert. Das System besteht aus einer Kathode auf der Seite der Probe, einer Anode am Pumpenblock und einer mit Polymer gefüllten Kapillare, die in der Nähe der Anode ein Detektionsfenster hat.

Der Prozess der Elektrophorese läuft in vier Schritten ab: Zuerst wird die

Kapillare durch eine Spritze mit dem Polymer gefüllt. Im zweiten Schritt wird die Probe elektrophoretisch in die Kapillare injiziert. Der dritte Schritt ist die Elektrophorese. Hierbei wird die Kathode in ein Puffergefäß eingeführt, um einen Stromfluss zu ermöglichen. Durch Anlegen einer Spannung wird die Wanderung und somit die Auftrennung der DNA-Fragmente durch die Kapillare ermöglicht. Die kürzesten Fragmente gelangen am schnellsten durch die Kapillare, die längeren entsprechend ihrer Länge erst später.

Der vierte Schritt ist die DNA-Fragmentlängenbestimmung. Hierbei wird durch das Detektionsfenster mittels eines Lasers die Fluoreszenz der Primer angeregt. Das von ihnen abgestrahlte Licht wird von einer Charge-Coupled-Device- (CCD-) Kamera aufgefangen und in Daten umgewandelt.

#### 2.4.3 Funktionsprinzip des Light Cyclers

Innerhalb der vergangenen Jahre hat sich die Technik der Real-Time-PCR aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit, Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zur wichtigsten Methode der sequenzunabhängigen Quantifikation von Nucleinsäuren entwickelt.

Das Prinzip der Technik entspricht dem der PCR, jedoch wird hier der Fluoreszenzanstieg der gebundenen Primer kontinuierlich gemessen. Dadurch kann anhand des Fluoreszenzanstiegs verschiedener Standard-DNA-Konzentrationen, die in jedem Lauf mit amplifiziert werden, eine Standardkurve errechnet werden, aus der Effizienz und Fehlerrate bestimmt werden. Gleichzeitig wird der Fluoreszenzanstieg der Proben gemessen und protokolliert.

Da verschiedene Faktoren die Effektivität der PCR beeinflussen, kann die PCR-Effizienz nicht durch die theoretische PCR Formel

$$N_n = N_0 \cdot 2^n$$

ausgedrückt werden, sondern wird durch die genauere Formel

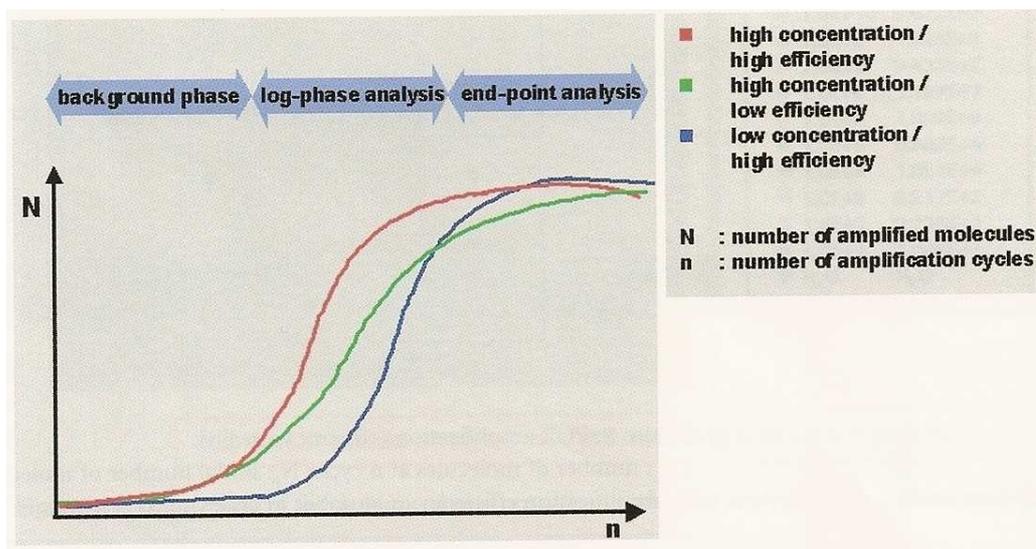
$$N_n = N_0 \cdot (E_{const.})^n$$

ausgedrückt.

Die Amplifikationskurve bildet drei Phasen ab. Die erste Phase ist die

Backgroundphase. Diese Phase dauert an, bis die Fluoreszenzaktivität der Probe die Hintergrundfluoreszenz des Probensystems übersteigt. Die zweite Phase ist die exponentiell-logarithmische Phase. Sie beginnt, wenn die Probe durch ihre nun angestiegene Fluoreszenz detektierbar wurde, und endet, wenn die Reaktion in die Plateauphase eintritt, in der sich die Effizienz der Reaktion vermindert. Dies geschieht, weil einer der Reaktionsbestandteile z.B. Primer, DNA-Polymerase oder Nukleotide aufgebraucht ist. Die Phasen der Real Time PCR sind graphisch in Abb. 1 dargestellt.

Abb.: 1 Light-Cycler 2.0 Handbook<sup>45</sup>



Alle Messungen, die zur Berechnung der Konzentration der Probe herangezogen werden, werden während der Log-Linear-Phase gemacht, da nach Übergang in die Plateauphase die Effizienz variabel wird und nach der Formel

$$N_n = N_o \cdot (E_{\text{var.}})^n$$

berechnet werden müsste, weshalb hier keine Berechnung mehr stattfinden kann.

Da die Fluoreszenz jeder Probe in jedem Zyklus einmal gemessen wird, kann die Log-Linear- Phase gut erfasst und zur Berechnung der Konzentration

<sup>45</sup> Light-Cycler 2.0 Handbook (2006)Roche.

herangezogen werden.

Die Messung erfolgt bei 530 nm.

Dazu wird zunächst der Crossing Point (CP) ermittelt. Er entspricht der Zahl des Zyklus', bei dem die Fluoreszenz der Probe erstmals vor der Hintergrundaktivität hervortritt und so messbar wird (Detektionslimit). Die DNA-Konzentration der unterschiedlichen Proben ist am Detektionslimit identisch. Die Konzentration an diesem Punkt ist von allen weiteren messbaren Punkten am ehesten proportional zur Ausgangskonzentration. So ermöglicht die Anzahl der Zyklen, die bis zum Erreichen des Detektionslimits benötigt werden, einen Rückschluss auf die Ausgangskonzentration der einzelnen Proben.

### 3. Materialien und Methoden

#### 3.1 Proben

##### 3.1.1 Probenumfang

Tabelle 3.1

<u>Experiment</u>	<u>Bedingung</u>	<u>Anzahl der Proben</u>
9947A 10ng/µl	Verdünnung	
	1ng/5 µl	1
	0,5ng/5 µl	1
	0,25ng/5 µl	1
	0,125ng/5 µl	1
	0,06ng/5 µl	1
	0,03ng/5 µl	1
Blutspuren	Verdünnung	
	1:10	4x5
	1:50	4x5
	1:100	4x5
Fingerabdrücke		
	von der Spurensicherung der Polizei	
	Bremerhaven gesichert	
	auf Glasplatte (Rußpulver)	6
	auf Papier (Ninhydrin)	6
	im Institut gesichert	
	einen Tag alt, auf Papier (Ninhydrin)	15
	einen Tag alt, auf Glasplatte (Rußpulver)	
	mit Wattetupfer abgerieben	8
	mit Folie abgeklebt	8
	nach abkleben mit Tupfer abgerieben	4
500pg/5µl	DNA in AE	2
	in extrahierter Folie	2
Blut auf	Spurensicherungsfolie	6
	Filterpapier	6
Briefumschläge		10
Schaltknäufe	Klebefolie	5
	Wattetupfer	5
Lenkräder	Klebefolie	5
	Wattetupfer	5
Handys		8

### 3.1.2 Anlegen der Spuren

#### 3.1.2.1 Detektionsgrenze des Sequencers

Um die untere Detektionsgrenze des Sequencers festzustellen, wurden die Verdünnungen der Zelllinien DNA 9947A, die zur Erstellung der Standardkurven des Light-Cyclers genutzt werden, amplifiziert und ihre Fragmentlängen bestimmt.

#### 3.1.2.2 Blutspuren

Für die Bestimmung der Extraktionsmethode, die die größte DNA-Ausbeute bietet, wurden Blutspuren auf Filterpapier aufgebracht. Da die Methode besonders für geringe DNA-Mengen verwendet werden soll, wurde eine Blutverdünnungsreihe angelegt. Frisch abgenommenes Blut wurde in einem Verhältnis von 1:10, 1:50 und 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

Es wurden je Verdünnung 20 Spuren von je 10 µl gelegt. Die Spuren wurden getrocknet und zerschnitten. Die zerschnittenen Spuren wurden je in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Pro Extraktionsmethode wurden fünf Spuren je Verdünnung extrahiert.

Die verwendeten Extraktionsmethoden waren:

- QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen)
- QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ (Qiagen)
- Gen-IAL® all- tissue DNA- extraktion kit (Gen-IAL)
- DNA IQ™ System (Promega)

#### 3.1.2.3 Fingerabdrücke von dem Technischen Erkennungsdienst der Polizei Bremerhaven

Die Mitarbeiter der Polizei Bremerhaven haben am 7.11.2006 und am 24.11.2006 Fingerabdruckspuren auf Standard DIN A4 Druckerpapier und eine Glasplatte gelegt. Die Fingerabdrücke wurden am 20.12.2006 so gesichert, wie es bei der Spurensicherung üblich ist. Hierzu wurde das Papier zur Sichtbarmachung der Fingerabdrücke in Ninhydrinlösung getaucht und danach getrocknet. Es wurden im Institut je drei der Fingerabdrücke ausgeschnitten,

zerkleinert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Fingerabdrücke auf der Glasplatte wurden in Bremerhaven zur Sichtbarmachung mit Rußpulver durch einen Fingerabdruckpinsel bestäubt und anschließend mit einer aufgeklebten Klebefolie von der Glasplatte abgezogen. Die Klebefolie wurde auf eine Beweismittelkarte geklebt. Im Institut wurden je drei der Fingerabdrücke ausgeschnitten und danach die Klebefolie wieder von der Beweismittelkarte abgezogen. Die Beweismittelkarte wurde zuerst mit einem in 96%igen Ethanol getränkten Wattetupfer abgerieben, um die Klebeschicht anzulösen, danach wurde die Klebeschicht der Klebefolie mit dem gleichen Wattetupfer aufgenommen. Der Wattetupfer wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Abbildung 2 zeigt die Spurenkarten, auf denen die mit Rußpulver behandelten Fingerabdrücke aus Bremerhaven aufgeklebt und den Papierbogen, auf dem die mit Ninhydrin behandelten Fingerabdrücke sichtbar sind.

Abbildung 2: Fingerabdrücke



#### 3.1.2.4 Fingerabdrücke auf Papier (saugender Spureträger)

Die Probanden berührten den Standard-Druckerpapier Bogen einige Sekunden mit ihren Fingerkuppen. Danach wurde das Papier mit Ninhydrinlösung besprüht und über Nacht getrocknet.

Die nun sichtbaren Abdrücke wurden ausgeschnitten, zerkleinert und jeweils in

ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

### 3.1.2.5 Fingerabdrücke auf Glas (nicht saugender Spureträger)

Die Probanden berührten die Glasplatte einige Sekunden mit ihren Fingerkuppen. Die Fingerabdrücke wurden mit Grafitpulver sichtbar gemacht, indem es mit einem Fingerabdruckpinsel auf die Proben aufgebracht wurde. Der Pinsel wurde vom Technischen Erkennungsdienst der Polizei Bremerhaven hierzu zur Verfügung gestellt, nachdem er nach mehrfachem Gebrauch an Tatorten ausgemustert worden war, um das Risiko der Übertragung der DNA von Tatort zu Tatort zu minimieren. Hier wird bei der Allellängenbestimmung darauf geachtet, ob Allele gefunden werden, die keiner Person zugeordnet werden können, wie von Proff *et al.* (2006)<sup>46</sup> beschrieben. Die Glasplatte wurde mit Spurensicherungsfolie abgeklebt.

Der Fingerabdruck wurde ausgeschnitten. Die Klebeschicht des Teils der Folie, auf der sich der Fingerabdruck befand, wurde mit 96%igem Ethanol angelöst und mit einem Wattetupfer abgerieben. Der Tupfer wurde mit der Klebeschicht in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

### 3.1.2.6 Suche nach PCR inhibierenden Substanzen in der Spurensicherungsfolie

Die Klebeschicht zweier Folien ohne DNA wurde mit der Methode QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ behandelt. Vor der Quantitativen DNA-Analyse mittels Light-Cycler wurden je 5 µl dieser Proben mit je 15 µl Light-Cycler-Mastermix und 5 µl 0,5 ng/5 µl 9947A DNA versetzt. Zum Vergleich wurden zwei Proben im Light-Cycler gemessen, die die gleiche Zusammensetzung haben, aber an Stelle der 5 µl Folienextrakt wurden 5 µl AE-Puffer eingesetzt.

### 3.1.2.7 Blutspuren auf Folie und Filterpapier

10 µl Blut wurden mit einer Pipette auf Filterpapier und auf Klebefolie aufgebracht. Nachdem das Filterpapier getrocknet war, wurde es in kleine Stücke geschnitten und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Die Klebeschicht

---

<sup>46</sup> Proff C, Schmitt C, Schneider PM, Foerster G, Rothschild MA (2006) Experiments on the DNA contamination risk via latent fingerprint brushes. International Congress Series 1288: 601-603.

der Folien wurde mit etwa 1 ml 96%igem Ethanol angelöst und mit einem in 96%igen Ethanol getränkten Wattetupfer von der Folie entfernt. Der Wattetupfer wurde getrocknet und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

#### 3.1.2.8 Briefumschläge

Aus den Gummierungen der Briefumschläge, die von den Probanden angeleckt und zugeklebt worden waren, wurden ca. 1 cm<sup>2</sup> große Stücke herausgeschnitten. Die zwei aufeinander klebenden Papierstücke wurden voneinander getrennt, zerschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt.

#### 3.1.2.9 Schaltknäufe und Lenkräder

Um die Methode zu ermitteln, die für die Sicherung von DNA an Lenkrädern und Schaltknäufen optimal ist, wurden zwei für die Sicherung von Zellantragungen an Gegenständen gängige Sicherungsmethoden ausprobiert. Hier wurden Autos verwendet, die vorwiegend von einer Person gefahren werden.

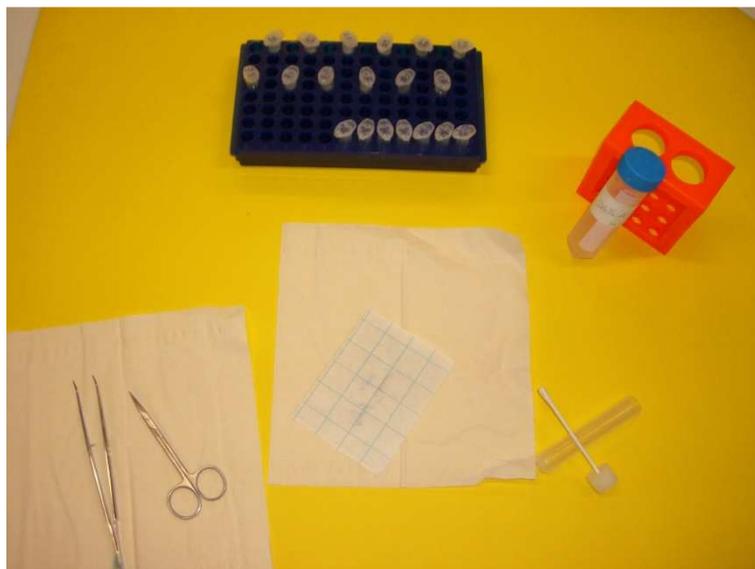
Bei der ersten Methode handelt es sich um eine DNA-Sicherung durch Spurensicherungsfolie: die Zellen, die sich an den Lenkrädern und Schaltknäufen der untersuchten Autos befinden, werden gesichert mit Hilfe der Spurensicherungsfolie Filmolux der Firma Neschen International. Hierbei wird die Folie um einen Teil des Lenkrades geklebt, festgedrückt, wieder abgezogen und an einer weiteren Stelle aufgeklebt. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis das gesamte Lenkrad abgeklebt ist. Bei den Schaltknäufen ist der Vorgang der gleiche.

Die Proben werden weiterverarbeitet, indem die Klebeschicht der Folie durch 1 ml 96%iges Ethanol angelöst und mit einem Wattetupfer abgerieben wird. Der Wattetupfer wird samt Klebeschicht in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lenkräder und Schaltknäufe werden nach vierwöchiger regelmäßiger Benutzung durch ihre Besitzer jeweils mit einem in 96%igen Ethanol getauchten Wattetupfer abgerieben. Die Wattetupfer werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Abbildung 3 zeigt die Materialien, die benötigt werden, um die Klebeschicht von der Folie (auf dem rechten Papiertuch) zu entfernen und mit einem in 96%igem

Ethanol (rechts oben) getauchten Wattetupfer (rechts unten) in ein Reaktionsgefäß (links oben) zu überführen. Hierzu werden Schere und Pinzette benötigt. Alle Materialien werden vor Gebrauch gereinigt, in regelmäßigen Abständen mit UV-Licht bestrahlt und sind nach Herstellerangaben frei von DNAsen und RNAsen.

Abbildung 3: Arbeitsmaterial für die Verarbeitung der Spuren



#### 3.1.2.10 Mobiltelefone

Es sind nur Telefone verwendet worden, die vorwiegend oder ausschließlich von einer Person benutzt werden.

Die Handys der Probanden wurden mit einem in 96%igem Ethanol getränkten Wattetupfer abgerieben. Der Wattetupfer wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

#### 3.1.2.11 Mundhöhlenabstriche

Von allen Probanden sind Mundhöhlenabstriche genommen worden, um eine Zuordnung der in den Proben gefundenen genetischen Merkmale zu den ihren zu ermöglichen. Die Mundhöhlenabstriche wurden mit der Chelex-Methode extrahiert.

## **3.2 DNA Extraktionsmethoden:**

### 3.2.1. QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit

Materialien:

Geräte:

Blockthermostat

Mikroliterzentrifuge

Verbrauchsmaterial:

QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit

Ethanol 96%

Es handelt sich hierbei um die Methode, die im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf standardmäßig zur Extraktion von DNA aus biologischen Spuren verwendet wird.

Die Extraktion wurde mit dem QIAamp® DNA Mini Kit von Qiagen nach den Angaben des Herstellers<sup>47</sup> durchgeführt. Diese Methode basiert darauf, dass die DNA sich unter bestimmten Pufferbedingungen selektiv an eine Silica Membran bindet, die in den Boden eines Spin Column eingelassen ist, wodurch die Isolierung der DNA ermöglicht wird.

Vorbereitung:

Puffer AW 1 durch einmalige Zugabe von 125 ml 100% Ethanol nach Angaben des Herstellers vorbereiten.

Puffer AW 2 durch einmalige Zugabe von 160 ml Ethanol nach Angaben des Herstellers vorbereiten.

Sollte in den Puffern ATL oder AL ein Präzipitat vorhanden sein, müssen diese kurz auf 56°C erhitzt werden, damit sich das Präzipitat wieder löst.

Der Elutionspuffer AE wird auf 70°C vorgewärmt.

Durchführung:

Der Spureträger wird in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K zuerst geschüttelt und danach 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Darauf wird zu dem Gemisch 200 µl AL Puffer gegeben, es wird geschüttelt und bei 70°C zehn Minuten inkubiert. Danach werden 210 µl 96%iges Ethanol hinzugegeben, die Probe wird wieder geschüttelt und

---

<sup>47</sup> QIAamp®DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook QIAGEN 02/2003.

anzentrifugiert. Die Lösung wird ohne Spureträger auf ein Spin Column gegeben, das in einem 2 ml Sammelgefäß platziert ist. So wird die Lösung eine Minute bei 8 000 rpm zentrifugiert. Das Spin Column wird in ein neues Sammelgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl des Waschpuffers 1 eine weitere Minute bei 8 000 rpm zentrifugiert. Wieder wird das Spin Column in ein neues Sammelgefäß gesteckt und nach Zugabe von 500 µl des Waschpuffers 2 drei Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert. Das Spin Column wird nun in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 50 µl auf 70°C erwärmtem AE-Puffer und einer Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur wird durch erneutes Zentrifugieren von einer Minute bei 8 000 rpm die DNA aus dem Spin Column gelöst und befindet sich nun in Lösung im Reaktionsgefäß.

### 3.2.2 QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™

Bei dieser Methode handelt es sich um die oben beschriebene QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit Extraktion, die um einen Schritt erweitert wurde. Die Extraktion wird nach der QIAamp® DNA Mini Kit Gebrauchsanleitung<sup>48</sup> und nach Castella *et al.*<sup>49</sup> und Sinclair, McKechnie<sup>50</sup> durchgeführt.

Die Vorbereitung und die Materialien entsprechen den bei der QIAamp® DNA Mini Kit Methode beschriebenen.

Der Schritt, der hinzukommt, dient der Reinigung der DNA. Nachdem die Probe bei 56°C 30 Minuten mit 180 µl ATL und 20 µl Proteinase K inkubiert worden ist, wird die Probe mit Spureträger auf ein QIAshredder™ Spin Column überführt und 5 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Die Säule besteht aus einem Biopolymersieb, das in ein Spin Column eingebettet ist. Das Spin Column befindet sich in einem 2 ml Reaktionsgefäß. Nach dem Zentrifugieren wird das Biopolymersieb aus dem Reaktionsgefäß entfernt und verworfen. Nun werden zu dem Filtrat, in dem die DNA enthalten ist, 200 µl AL- Puffer gegeben. Von hier an wird der Rest der Extraktion wie oben beschrieben durchgeführt.

---

<sup>48</sup> QIAamp®DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook QIAGEN 02/2003.

<sup>49</sup> Castella V, Dimo-Simonin N, Brandt-Casadevall C, Mangin P (2006) Forensic evaluation of the QIAshredder/Qiaamp DNA extraktion procedure. Forensic Science International 156: 70-73.

<sup>50</sup> Sinclair K, McKechnie VM (2004) DNA extraction from stamps and envelope flaps using QIAamp and QIAshredder. J. Forensic Sci.45: 229-230.

### 3.2.3 Gen-IAL® all- tissue DNA- extraktion kit

Als zweite Extraktionsmethode wurde das Gen- IAL® all- tissue DNA- extraction Kit von GenIAL verwendet. Es basiert auf einer Dichtegradientenisolierung und wird nach Herstellerangaben durchgeführt<sup>51</sup>.

Hierzu wird die Spur in einem Reaktionsgefäß der Firma Eppendorf mit 500 µl Lyse 1, 50 µl Lyse 2 und 10 µl Enzym 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Danach werden 375 µl Lyse 3 hinzugegeben, das Gemisch wird 20 Sekunden geschüttelt und 5 Minuten bei -20°C ruhen gelassen. Daraufhin wird es 20 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß gefüllt und 2 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Abweichend von der Gebrauchsanleitung wird dieser Schritt zwei Mal wiederholt, um eine größtmögliche Befreiung der Lösung von Verunreinigungen zu erzielen. Der Überstand wird wieder in ein 2 ml Reaktionsgefäß gefüllt und mit 0,8 Vol. Isopropanol vermischt und geschüttelt. Das Reaktionsgefäß wird 15 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vollständig entfernt. Auf das DNA-Pellet werden 300 µl 70%iges Ethanol von einer Temperatur von -20°C gegeben und es wird fünf Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert. Nun wird der Überstand verworfen, das Pellet wird bei Zimmertemperatur getrocknet und in 50 µl TE- Puffer gelöst.

### 3.2.4 DNA IQ™ System

Die dritte untersuchte Methode ist das DNA IQ™ System von Promega. Dieses Kit beruht auf einer Reaktion, bei der die DNA an geladene metallische Kügelchen bindet und so von Verunreinigungen befreit werden kann.

Die Extraktion wird gemäß der Gebrauchsanleitung durchgeführt<sup>52</sup>.

Vor jeder Isolierung muss der Lysis Buffer zuerst angesetzt werden. Für 1000 µl werden 100 µl 1M DTT, 100 µl Proteinase K und 800 µl Incubation Buffer vermischt. Die Proben werden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit

---

<sup>51</sup> GEN- IAL First- DNA Institut für angewandte Laboranalysen GMBH ALL- tissue DNA- Kit, Handbuch für DNA- Extraktionen(2003).

<sup>52</sup> DNA IQ™ System- Small Sample Casework Protocol, INSTRUCTION FOR USE OF PRODUCTS DC6700 AND DC6701 Promega Corporation Madison, WI 53711- 5399 USA Revised 4/06.

einer der Probe entsprechenden Menge Lysis Buffer vermischt:

Wattetupfer	250 µl
Filterpapier der Größe 1cm <sup>2</sup>	150 µl

Probe und Lösung werden 30 Minuten bei 70 °C inkubiert. Um nun die DNA-haltige Lösung von dem ursprünglichen Träger zu trennen, wird die Lösung aus ihrem Gefäß in ein neues exzentriert, wobei der Träger in dem alten Gefäß verbleibt und samt Gefäß verworfen wird. Die DNA-haltige Lösung wird mit 7 µl Resin, der Suspension, die die geladenen Kügelchen enthält, vermischt, nachdem das Resin durch Schütteln gut gemischt wurde. Die Resin-DNA-Lösung wird für 3 Sekunden geschüttelt und bei Raumtemperatur fünf Minuten inkubiert, wobei sie jede Minute einmal für zwei Sekunden geschüttelt wird. Nach den 5 Minuten wird sie in einen Magnethalter gestellt, wo sich die an das Resin gebundene DNA sofort von der Lösung separiert. Die Flüssigkeit wird abpipettiert und verworfen, ohne das Pellet zu berühren oder es mit in die Pipette zu saugen. Auf das Resin werden nun 100 µl des vorbereiteten Lysis Buffers gegeben und es wird für zwei Sekunden bei höchster Geschwindigkeit geschüttelt. Die Probe wird zurück in den Magnethalter gestellt und der gesamte Lysis Buffer wird entfernt. Anstelle von 100 µl Lysis Buffer wird dieser Vorgang nun dreimal mit 100 µl 1x Wash Buffer wiederholt. Danach wird das Resin/DNA Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und mit 50 µl Elution Buffer vermischt und geschüttelt. Die Mischung inkubiert bei 65°C für fünf Minuten, damit sich die DNA von dem Resin lösen kann und in den Elution Buffer übergeht. Um nun die reine DNA haltige Lösung zu erhalten, wird das 65°C warme DNA/Resin/Elution Buffer Gemisch geschüttelt und in den Magnethalter gestellt, wo sich das Resin sofort absetzt und die DNA-haltige Lösung abpipettiert und in ein Aufbewahrungsgefäß überführt wird.

### 3.2.5 Untersuchung der Mundhöhlenabstriche

Um den Probanden eindeutig identifizieren und eventuelle Verunreinigungen der von ihm genommenen Proben erkennen zu können, wird von jedem Probanden ein Mundhöhlenabstrich genommen, indem mit einem Wattetupfer die Wangenschleimhaut abgerieben wird.

Der Wattetupfer wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Mundhöhlenabstriche werden mit der Chelex-Methode extrahiert. Dies ist die standardmäßig verwendete Extraktionsmethode für derartige Proben im Institut für Rechtsmedizin des UKE. Chelex ist ein Ionenaustauscherharz und ist ein Chelatbildner mit einer hohen Affinität zu polyvalenten Metallionen. Es ist aus Styrol-Divenylbenzol-Kopolymeren zusammengesetzt, an die gepaarte Iminodiacetat-Gruppen gebunden sind.

Durch die Zugabe von Chelex sollen chelatbildende Metallionen gebunden werden, die ansonsten als Katalysatoren für die Zerstörung der DNA während des Kochens agieren würden.

Der stark alkalische pH-Wert der Chelex-Lösung und das Erhitzen der Probe auf 100°C führen zu einer Denaturierung der DNA, so dass diese nicht mehr für die RFLP-Analyse verwendbar ist. Die PCR-Amplifizierung von STR-Systemen mit ihren kurzen Fragmentlängen wird dagegen nicht beeinträchtigt. Die Chelex-Methode eignet sich nicht für die Extraktion von DNA aus Blutproben oder aus Spurenrägern, da keine Abtrennung von kontaminierenden Stoffen erfolgt und der Spurenräger (Wattetupfer) in dem Isolat verbleibt.

Die Durchführung erfolgt nach Walsh *et al.*<sup>53</sup>

Geräte:

Blockthermostat

Vortex

Chemikalien:

Chelex 100 (Biorad)

Proteinase K (Roche)

Durchführung:

In einem 50 ml Falcon-Röhrchen wird eine 5%ige Chelex-Suspension in Aqua dest. angesetzt. Von einem Wattetupferabrieb der Wangenschleimhaut wird etwa die Hälfte abgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben; es wird ein Extraktionsleerwert in Form eines unbenutzten Wattetupfers mit angesetzt.

Auf diese Wattetupfer werden je 500 µl Chelexsuspension pipettiert. In jedes

---

<sup>53</sup> Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extractions of DNA for PCR-Based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.

Röhrchen werden 2 µl Proteinase-K-Lösung pipettiert, die Proben werden geschüttelt. In die Deckel der Reaktionsgefäße wird je ein Loch gestochen, um Wasserdampf während des Kochens entweichen zu lassen.

Die Proben werden bei 56°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend aus dem Heizblock entnommen, dieser wird auf 100°C ein gestellt, die Proben werden nach Erreichen der Temperatur für 6 Minuten wieder in den Heizblock gestellt.

Die Proben werden für 10 Sekunden geschüttelt und für zwei Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend kann die DNA, die sich im Überstand befindet, direkt für die PCR-Reaktion eingesetzt werden. Wird die PCR nicht direkt im Anschluss an die Extraktion angesetzt, sondern erst einen Tag später, müssen die Proben jeweils wieder geschüttelt und zentrifugiert werden.

### **3.3 PCR ( Polymerase Kettenreaktion)**

#### **3.3.1 Material Reagenzien**

Argus *S<sup>QS</sup>* PCR Amplifikation Kit (Biotype®)<sup>54</sup>  
Nonaplex QS PCR Amplifikation Kit (Biotype®)<sup>55</sup>  
Powerplex- ES PCR Amplifikation Kit (Promega®)<sup>56</sup>  
Mini- STR- System:

Primer, von der Firma Metabion hergestellt und vor Gebrauch im Institut je nach Bedarf angemischt werden.

Puffer: Reaktionsgemisch A (Mentype®)( RemA)/ Gold Star Buffer (Promega®)

Taq- Polymerase: Taq 2 (Mentype®)/ Hot Fire Pol®)

#### **Verbrauchsmaterial**

PCR Softstrips 0,2 ml (Biozym®)

#### **Geräte**

Biometra® Tpersonal Thermocycler  
Biometra® PersonalCycler Thermocycler

---

<sup>54</sup> Mentype®Argus *S<sup>QS</sup>* PCR-Amplifikation Kit Handbook; ©Biotyp AG Dezember 2004.

<sup>55</sup> Mentype®Nonaplex III PCR-Amplifikation Kit Handbook; ©Biotyp AG Dezember 2004.

<sup>56</sup> PowerPlex® 16 and PowerPlex® ES Monoplex Systems Technical Bulletin No.D017 Promega Corporation 8/03.

### 3.3.2 Identitätsbestimmung

Um zu bestimmen, ob eine DNA-Spur individuell zugeordnet werden kann, werden ausgewählte DNA-Sequenzen der Probe und der zuzuordnenden Person ermittelt und miteinander verglichen.

Diese Sequenzen sind zwei bis sieben Basenpaare lange, sich maximal 100-fach wiederholende, polymorphe Einheiten, die aufgrund der beschriebenen Struktur Short Tandem Repeats (STRs) genannt werden. Da die Anzahl der Wiederholungen individuell variiert, können sie zur Identitätsbestimmung herangezogen werden. Die minimale und die maximale Wiederholungszahl bilden die Eckpunkte der Allelleitern, anhand derer die individuelle Allelzuordnung erfolgt.

### 3.3.3 Verwendete STR- Systeme

1997 wurde eine über das Internet zugängliche Datenbank<sup>57</sup> erstellt, die es seit Juli 1997 ermöglicht, über die ständig wachsende Zahl von STR- Systemen auf dem Laufenden zu bleiben. Diese Seite wird von der DNA Technologies Group of the National Institute of Standards and Technology (Butler *et al.* 1997<sup>58</sup>, Ruitberg *et al.* 2001<sup>59</sup>) betrieben. Alle hier angewendeten Systeme sind in dieser Datenbank erfasst.

**TH01**<sup>60</sup> ist Teil einer Intronsequenz des Tyrosinhydrolase- Gens, das eine chromosomale Lokation von 11p15-15.5 hat. Die Größe umfasst 179-203 Basenpaare, die Wiederholungssequenz ist (AATG)<sub>n</sub>. In Europa variiert die Anzahl der Wiederholungen von 5 bis 10, so werden die Allele auch mit den Zahlen 6-10 bezeichnet. Durch den Verlust eines Adenins der Kernsequenz des Allels 10 ist in Europa eine eingefügte ATG Sequenz häufig. Das zugehörige Allel trägt den Namen 9.3.

**VWA** ist Teil einer Intronsequenz des von-Willebrand-Faktors

---

<sup>57</sup> Butler JM, Reeder DJ, (1997) Short tandem repeat DNA internet database  
Online im Internet  
<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase> (Stand 20.02.2007).

<sup>58</sup> Butler JM, Ruitberg CM, Reeder DJ (1997) Proceedings from the eighth international symposium on human identification, Madison, Wisconsin: Promega Corporation: 38-47.

<sup>59</sup> Ruitberg CM, Reeder DJ, Butler JM (2001) STRBase: A Short Tandem Repeat DNA Database for the Human Identity Testing Community. *Nucleic Acids Research* 29: 320-322.

<sup>60</sup> Wiegand P, Klein R, Braunschweiger G, Hoff C, Brinkmann B (2006) Short amplicon STR multiplex for stain typing, *Int. Journal of Legal Medicine*. 120(3): 160-164.

(Blutgerinnungsfaktor) mit der chromosomalen Lokalisation 12p12-pter. Es handelt sich hierbei um einen kombinierten Repeat mit der Sequenz TCTA TCTG TCTA. Die Größe umfasst 157- 197 bp. Die Allele reichen von 11- 24 Wiederholungen.

**FGA**<sup>61</sup> ist Teil der Intronsequenz des Fibrinogen-Gens mit der chromosomalen Lokation 4q28. Die Kernsequenz lautet TTTC TTTT CTTT CTCC TTCC. Die Allelleiter erstreckt sich von 11-28, Zwischenallele sind vorhanden.

**D21S11** ist eine kombinierte, komplizierte Wiederholungssequenz auf dem Chromosom 21. Es liegt außerhalb der Introns und weist zahlreiche Zwischenallele auf.

**SE33**<sup>62</sup> liegt auf dem Chromosom 5 und hat die Lokalisation 5pter-5qter in einem dem  $\beta$ -Aktin verwandten Pseudogen.

**D3S1358**<sup>63</sup> liegt auf Chromosom 3 in der Lokalisation p3. Es handelt sich um einen kombinierten Repeat mit den Kernsequenzen TCTG und TCTA.

**D8S1179** ist Teil des Chromosoms 8 und trägt die Kernsequenz TCTA

**D18S51**<sup>64</sup> hat auf Chromosom 18 die Lokalisation 18q21.3.

**Amelogenin** Intronsequenz des Amelogeningens auf dem X und dem Y Chromosom. Die homologen Gene haben eine unterschiedliche Länge. Es gibt zwei Allele dieses STR-Systems, eines für das X und eines für das Y Chromosom. Dieser STR-Marker wird zur Geschlechtsbestimmung benutzt.

### 3.3.4 Die verwendeten Amplifikationskits

Die oben beschriebenen STR-Systeme werden industriell in verschiedene Multiplex-Kits zusammengefasst. Es ist auch möglich, die Systeme einzeln zu amplifizieren, was den Vorteil höherer Sensitivität bringt, jedoch zeitintensiver ist und mehr Probenmaterial verbraucht.

Es wurden unterschiedliche Kits ausprobiert, um das optimale Kit für diese Zwecke zu finden: von der Firma Biotype Mentype Nonaplex QS®-PCR

---

<sup>61</sup> Butler JM, Shen Y, McCord B (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. Journal Forensic Science 48 (5): 1054-64.

<sup>62</sup> Polymeropoulos MH, Rath DS, Xiao H, Merrill CR (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2). Nucleic Acids Research. 20(6):1432.

<sup>63</sup> Wiegand P, Klein R, Braunschweiger G, Hoff C, Brinkmann B,(2006) Short amplicon STR multiplex for stain typing. International Journal of Legal Medicine 120(3): 160-164.

<sup>64</sup> Butler JM, Shen Y, McCord B (2003) The development of reduced Size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. Journal of Forensic Science 48 (5): 1054-64.

Amplifikation Kit und ArgusS QS PCR Amplifikation Kit. Die Amplifikation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Von der Firma Powerplex wurde Powerplex ES benutzt. Zusätzlich wurde eine weitere im Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg entwickelte Primermischung mit teilweise verkürzten Fragmentlängen verwendet.

Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, beträgt das Gesamtvolumen jedes PCR- Ansatzes 10 µl und enthält je nach DNA-Gehalt der Probe je 2- 4 µl DNA, die Volumendifferenz wird mit Aqua dest. auf 10 µl ausgeglichen.

Für alle hier benutzen Biotype® Produkte wurde der folgende Mastermix angesetzt:

Tabelle 3.3.1 Mastermix für Biotype® Produkte

Aqua dest.	2,8- 4,8 µl
Puffer( RemA)	2 µl
Primer Mix	1 µl
Taq- Polymerase (Taq-2)	0,2 µl
DNA	2-4 µl

Die Amplifikation erfolgt im Thermocycler nach dem vorgeschriebenen Programm:

Tabelle 3.3.2:Amplifikationsprogramm des Biotype® Produkte

1. 94°C	00:10:00		Aktivierung der Taq- Polymerase
2. 94°C	00:00:30		Denaturierung
3. 60°C	00:02:00	2.- 4. 30-34 Zyklen	Primerbindung
4. 72°C	00:01:15		Amplifikation
5. 68°C	01:00:00		Release
6. 10°C		bis zum Ende	

Für das System Powerplex- ES wurde folgender Mastermix angesetzt:

Tabelle 3.3.3: Mastermix für Powerplex- ES

Aqua dest.	3,8 µl
Puffer (Gold- Star)	1 µl
Primer	1 µl
Taq- Polymerase (Hot Fire Pol)	0,2 µl
DNA	4 µl

Das Programm hierfür ist:

Tabelle 3.3.4: Amplifikationsprogramm für Powerplex-ES

Temperatur,	Dauer (hh:mm:ss), ggf. Wiederholungen,			Vorgang
1. 95°C	00:10:00			Aktivierung der Taq- Polymerase
2. 94°C	00:01:00			Denaturierung
3. 56°C	00:01:00	2.- 4.	30-34 Zyklen	Primerbindung
4. 72°C	00:01:30			Amplifikation
5. 90°C	00:01:00			
6. 56°C	00:01:00			
7. 72°C	00:01:30			
8. 60°C	00:00:30			Release
9. 10°C		bis zum Ende		

Für das im Institut entwickelte Mini-STR System wurde folgender Mastermix verwendet:

Die Primer müssen vor Verwendung auf 20 pg/µl verdünnt werden.

Tabelle 3.3.5: Mastermix für das Mini-STR System

Aqua dest.	Abhängig von den Primern und dem Puffer	
Puffer	Gold- Star: 1 µl; RemA: 2 µl	
Primer (20µM/l)		
	FGA	0,25 µl
	D18S51	0,5 µl
	SE33	0,25 µl
	TH01	0,18 µl
	D3S1358	0,36 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl	
DNA	2-4 µl	

Die Zusammenstellung der Primer ist je nach Bedarf variabel. Die Amplifikationstemperatur für die Primer TH01 und D3S1358 ist mit 60°C um 4°C höher als die der anderen Primer dieses Systems. Es ist also notwendig, zwei Mastermixe und somit zwei PCRs anzusetzen.

Hierfür wird folgendes Programm genutzt:

Tabelle 3.3.6: Amplifikationsprogramm für das Mini-STR System

Temperatur,	Dauer (hh:mm:ss), ggf. Wiederholungen,			Vorgang
1. 94°C	00:10:00			Aktivierung der Taq- Polymerase
2. 94°C	00:00:45			Denaturierung
3. 60/56°C	00:00:45	2.- 4.	30-34 Zyklen	Primerbindung
4. 72°C	00:01:00			Amplifikation
5. 68°C	00:30:00			Release
6. 10°C		bis zum Ende		

### **3.4 Kapillarelektrophorese und Detektion der DNA**

#### 3.4.1 Probenvorbereitung

##### Reagenzien

- 10x Genetic Analyzer Buffer mit EDTA (ABI)
- HI-DI-Formamid (ABI)
- Performance Optimised Polymer (POP) 4 (ABI)
- Matrix FL-JOE-TMR-CXR (Promega)
- Matrix Standard Set DS- 32 (ABI)
- Gene Scan TM-HD 400 ROX Size Standard (ABI)
- Reinstwasser Lichrosolve (Merck)

##### Materialien

- ABI 310 Kapillaren, 47cm x 50 µm (ABI)
- Glasspritze 1 ml
- Genetic Analyzer 0,5 ml Sample Tubes (ABI)
- Genetic Analyzer Septa for 0,5 ml Sample Tubes (ABI)

##### Geräte

- ABI Prism Genetic Analyzer 310\*
- Power Macintosh G3 mit Periphergeräten
- HLC Heizblock-Thermostat

Die Probenvorbereitung erfolgt im Post PCR- Labor.

Der Mastermix für jede Probe besteht aus 0,5 µl ILS 600 für alle Powerplex Systeme/0,5 µl HD400 für alle Biotype und Mini-STR Systeme + 20 µl deionisiertem Wasser. Der Mastermix wird in ein 500 µl Sample Tube pipettiert, und 2 µl des Amplifikats werden hinzugegeben. Das Sample Tube wird mit einem Septum verschlossen.

Die Probe wird nun für 2 Minuten auf 94°C erhitzt und danach im Kühlschrank mindestens 5 Minuten auf 4°C abgekühlt.

Alle Arbeitsschritte am Sequencer erfolgen nach Herstellerangaben. Hierzu gehören das Einstellen der Analyseparameter über den Computer, der die Software steuert, sowie die Eingabe der Proben in das Gerät.

### 3.4.2 Analyse

Es laufen immer eine Negativ- und eine Positivkontrolle mit bekannten Allelen parallel zu den Proben im Sequencer, so dass eventuelle Fehler und Verunreinigungen, die während der PCR oder ihres Ansatzes geschehen sind, erkannt werden können.

Für die Analyse der Powerplexansätze werden folgende Parameter eingestellt:

Modul: GS STR POP 4 (1 ml) F

Matrix: Promegaset F

Längenstandard: ILS 600

Für die Analyse aller andern Ansätze werden diese Parameter benötigt:

Modul: GS STR POP 4 (1 ml) D

Matrix: FAM, HEX, NED, ROX SET D

Längenstandard: HD400

Die einzelnen Allellängen werden mittels des zugegebenen Längenstandards durch die GeneScan® Analysis Software bestimmt. Um nun Aufschluss über die einzelnen Allele zu erhalten, die sich in der Probe befinden, werden die Ergebnisse mit sogenannten Allelleitern verglichen. Die Allelleitern enthalten nahezu alle bekannten Allele eines bestimmten STR-Systems.

Die Allelleiter wird als Schablone über die detektierten und von der Software sichtbar gemachten Fragmente gelegt, so dass man anhand der beschrifteten Allelleitern aus den Gebrauchsanleitungen der PCR Amplifikations-Kits die Namen des Fragments ablesen kann.

### **3.5 DNA-Quantifizierung**

Die Quantifizierung wird durch eine Real-Time-PCR ermöglicht, die es erlaubt die Vervielfältigung der DNA in den einzelnen Proben in Echtzeit zu beobachten. Die Methode wird nach der Extraktion von DNA aus Spureträgern an den so gewonnenen Extrakten durchgeführt. So kann vor der nachfolgenden PCR-Amplifikation festgestellt werden, ob und gegebenenfalls wie viel DNA in der Probe vorhanden ist, um so das weitere Vorgehen bestimmen zu können.

### 3.5.1 Der Farbstoff: SYBR® Green

SYBR Green wird zur Detektion doppelsträngiger (ds) DNA eingesetzt. Es besitzt die Strukturformel  $C_{32}H_{37}N_4S^+$ . Hierbei handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der unspezifisch durch Interkalation an dsDNA bindet. Nach Spaltung der DNA im ersten Schritt eines PCR Zyklus liegt die DNA einzelsträngig vor. Während der Bindung der Primer und der darauf folgenden Elongation der Tochterstränge lagern sich die Farbstoffmoleküle zwischen benachbarten Basenpaaren ein. Wie bei Zipper *et al.* (2004)<sup>65</sup> beschrieben, emittiert der Farbstoff durch die Bindung an die DNA seine Fluoreszenz bei einem Emissionsmaximum von  $\lambda_{e_{max}} = 521$  nm. Hierzu wird er zunächst bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{a_{max}} = 494$  nm angeregt. Da der Farbstoff auch ungebunden eine geringe Menge an Fluoreszenz emittiert, entsteht die in 2.4.3 erwähnte fluoreszente Hintergrundaktivität. Am Ende eines jeden PCR Zyklus wird die Aktivität der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 530$  nm gemessen. Die Aktivität ist direkt proportional zur Konzentration der in der Probe enthaltenen DNA.

### 3.5.2 Probenvorbereitung

#### Reagenzien

QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen)

Amelogenin-Primer<sup>66</sup> (Metabion)

Amel A forward (20 pmol/μl):

5'- CCC TGG GCT CTG TAA AGA ATA GTG-3'

Amel B reward (20 pmol/μl):

5'-ATC AGA GCT TAA ACT GGG AAG CTG-3'

Standard DNA 9974A (♀ Promega Stock, Konzentration 10ng/μl)

#### Materialien

Light Cycler® Capillaries (20 μl) (Roche Diagnostics)

---

<sup>65</sup>Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32 (12): e103.

<sup>66</sup>Mannucci A, Sullivan KN, Ivanov PL, Gill P (1994) Forensic application of rapide and quantitative sex test by amplifikation of the X –Y homologous gene Amelogenine. *International Journal of Legal Medicine* 106: 190-193.

## Light Cycler Centrifuge Adapters (Roche Diagnostics)

### Geräte

Light Cycler 2.0 (Roche Applied Science)

Periphergeräte

### 3.5.3 Durchführung

Die Probenvorbereitung erfolgt im Prä-PCR-Bereich. Die Kapillaren werden in den Zentrifugen-Adaptoren platziert.

Alle Proben und Reagenzien werden vor Benutzung geschüttelt.

Es wird ein Mastermix angesetzt, der aus SYBR® Green, Aqua dest. und Primer besteht. Der Primer wird aus Amel A, Amel B metabion International AG und deionisiertem Wasser in einem Verhältnis von 1/10 angesetzt.

Von dem Mastermix werden pro Probe 15 µl in je eine Light Cycler® Kapillare pipettiert und 5 µl Probe dazugegeben.

Tabelle 3.5.2: Ansatz für Light Cycler Proben

Volumen je Probe	20 µl
SYBR® Green	10 µl
Aqua dest.	4,6 µl
Primer	0,4 µl
DNA	5 µl

Die Kapillaren werden anzentrifugiert.

SYBR®Green enthält die für eine PCR notwendigen Bestandteile: Nucleotide, PCR Puffer, Taq-DNA-Polymerase.

### 3.5.4 Standardkurve

In jedem Light Cycler Lauf werden für die absolute Quantifizierung fünf bis sechs verschiedene bekannte Konzentrationen gemessen und aus ihnen eine Standardkurve berechnet. Hierzu werden zunächst bekannte DNA-Mengen mit TE-Puffer gemischt, so dass eine Konzentrationsreihe von 1 ng/5 µl, 0,5 ng/5 µl, 0,25 ng/5 µl, 0,125 ng/5 µl, 0,06 ng/5 µl und 0,03 ng/5 µl entsteht.

Jede Konzentration wird doppelt bestimmt und beide Werte werden zur Berechnung der Standardkurve herangezogen.

Die Standardkurve und die aus ihr berechneten Werte der Effizienz und der

Fehlerrate geben Aufschluss über die Aussagekraft der errechneten Werte der unbekannt Proben. Daher ist es wichtig, dass die Standardkonzentrationen in ihrer Größenordnung etwa den erwarteten Konzentrationen der unbekannt Proben entsprechen.

Die Standardkurve wird als Funktion angegeben, bei der der jeweilige CP-Wert (Y- Achse) dem Logarithmus der Konzentration (X- Achse) gegenübergestellt wird.

### 3.5.5 Anwendung

Um zu optimalen Ergebnissen zu gelangen, müssen die Einstellungen für das Amplifikationsprogramm experimentell ermittelt und auf die Bestandteile der Reaktion eingestellt werden.

Das vierstufige Programm wurde im Institut für Rechtsmedizin im Rahmen einer Magisterarbeit anhand der Herstellervorgaben entwickelt und etabliert. Für das hier benutzte System musste lediglich die optimale Primerbindungs-Temperatur ermittelt werden. Folgende Parameter wurden für die Real-Time PCR benutzt:

Tabelle 3.5.2: Amplifikationsprogramm des Light Cyclers

Schritt	Zykluszahl	Zieltemperatur (°C)	Dauer (hh:mm:ss)	Temperaturanstieg(°C/s)
Denaturierung:	1	95	00:15:00	20
Amplifikation:	50	95	00:00:15	20
		58	00:00:20	20
		72	00:00:10	20
			->Einzelmessung	
Schmelzkurve:	1	95	00:00:00	20
		65	00:00:15	20
		95	00:00:00	0,1
			->kontinuierliche Messung	
Kühlung:	1	40	00:00:3	

### 3.5.6 Ausschluss von Fehlern

Übliche Fehlerquellen sind:

Die Verunreinigung der Proben durch Fremd-DNA, die während der Vorbereitungsphase in die Kapillaren gelangt. Dieser Fehler wird dadurch sichtbar gemacht, dass in jedem Lauf eine Negativkontrolle bestehend aus dem Mastermix und Aqua dest. mitläuft. Nur wenn der Leerwert tatsächlich leer ist, werden die Ergebnisse verwendet. Außerdem werden die Proben nach der

quantitativen DNA-Bestimmung auf ihre spezifischen Merkmale hin im Sequencer untersucht. Hier werden Verunreinigungen qualitativ sichtbar und können beispielsweise dem Laborpersonal zugeordnet werden.

Die Bildung von Primer-Dimeren ist eine zweite mögliche Fehlerquelle. Hierbei binden die Primer aneinander. Dieser Fehler kann dadurch detektiert werden, dass nach jedem Lauf eine Schmelzkurvenanalyse stattfindet. Die Probe wird soweit erhitzt, dass die DNA vollständig schmilzt, wodurch in der Fluoreszenzdetektion zuerst ein starker Anstieg der Fluoreszenz detektiert wird und danach ein Abfall bis auf das Niveau der Backgroundphase. Im Idealfall sollte hier ein Peak entstehen. Sollten zwei Peaks entstehen, deutet das darauf hin, dass in diesem Lauf Primerdimere entstanden sind. Dieser Lauf kann zur Auswertung nicht herangezogen werden.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Standardkurven der Real-time-PCR

Entsprechend der Gebrauchsanweisung des QuantiTect SYBR-Green<sup>67</sup> wurde die Annealing Temperatur der Proben 5-8°C niedriger als der T<sub>m</sub>-Wert der Primer eingestellt. In diesem Bereich wurde die Temperatur experimentell bestimmt, bei der die Proben mit einer geringen Fehlerrate verdoppelt werden. Die Fehlerrate sollte unter 0,06 und die Effizienz bei 2 liegen, damit die in den Proben vorhandene DNA bei jedem Zyklus verdoppelt wird und möglichst wenig Artefaktbildung auftritt, die das Messresultat verfälscht. Unter Berücksichtigung dieser Vorgaben wurde die Annealing-Temperatur auf 58°C festgelegt.

Sechs der Standardkurven der Light-Cycler-Läufe, die dicht hintereinander gelaufen sind, werden in Diagramm 4.1.1 verglichen.

Die Werte ergeben sich aus Doppelbestimmungen einer abfallenden Konzentrationsreihe von 1 ng/5 µl, 0,5 ng/ 5 µl, 0,25 ng/5 µl, 0,125 ng/5 µl, 0,06 ng/5 µl und 0,03 ng/5 µl. Die Werte für die Konzentrationen 1 ng/5 µl bis 0,06 ng/5 µl sind sechsmal doppelt bestimmt worden, das heißt, es liegen pro Konzentration 12 Werte vor. Die Wertepaare, die in einem Lauf bestimmt wurden, sind in Tabelle 4.1.1 übereinander angegeben und durch Schattierungen zueinander in Bezug gesetzt worden. Die Werte für die Konzentration 0,03 ng/5 µl wurden dreimal doppeltbestimmt. Es liegen also für diese Konzentration drei Wertepaare vor, die in der Tabelle 4.1.1 in den Läufen 111206aug, 181206NF und 040107NF jeweils als die zwei letzten grün unterlegten Wertepaare aufgetragen sind. Als Standard-DNA wurde die DNA 9947A (♀, Promega Stock-Konzentration 10 ng/µl) verwendet und entsprechend verdünnt.

Die Ergebnisse der sechs Läufe werden in Tabelle 4.1.1 dargestellt.

---

<sup>67</sup> QuantiTect SYBR Green PCR Handbook 11/2005.

Y: CP-Werte

X: Konzentration in ng/5 µl

Tabelle 4.1.1: Standardkurven

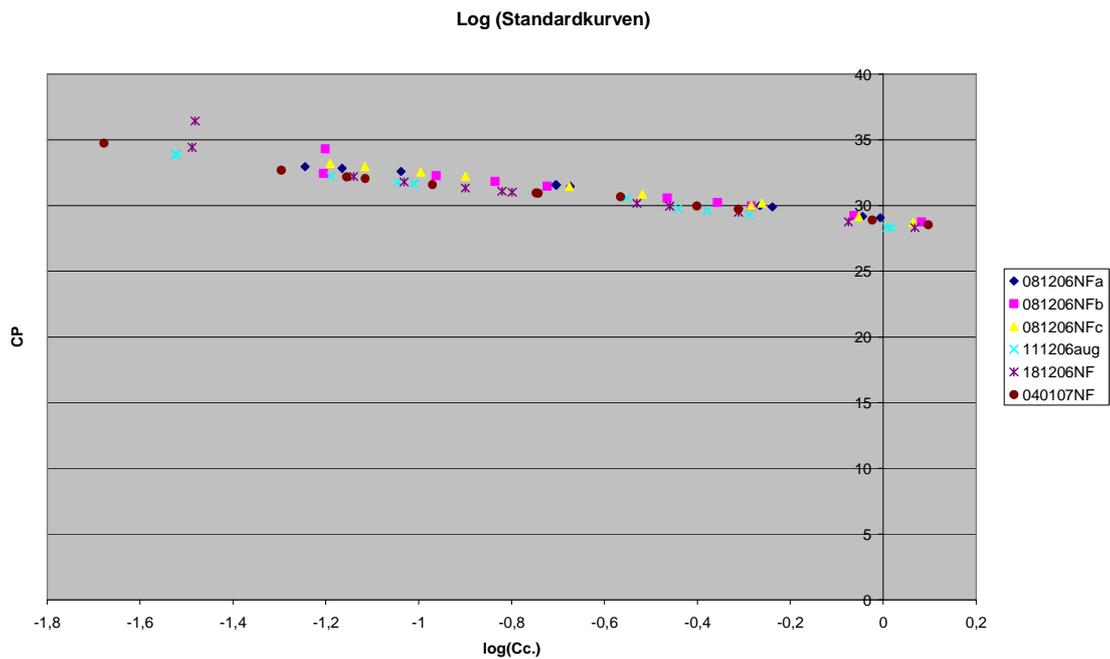
081206NFa	081206NFa	081206NFb	081206NFb	081206NFc	081206NFc
Y	X	y	x	y	x
29,07	0,986	28,74	1,21	28,71	1,16
29,16	0,903	29,23	0,865	29,14	0,886
29,9	0,577	29,97	0,52	30	0,52
29,99	0,543	30,22	0,44	30,2	0,548
31,46	0,212	31,46	0,189	30,87	0,303
31,56	0,198	30,58	0,343	31,45	0,211
32,58	0,0916	31,83	0,146	32,96	0,0766
31,57	0,197	32,27	0,109	32,56	0,101
32,82	0,0684	34,32	0,0629	32,24	0,126
32,95	0,0569	32,44	0,0624	33,2	0,0645
111206aug	111206aug	181206NF	181206NF	040107NF	040107NF
Y	X	y	x	y	x
28,32	1,04	28,75	0,841	28,54	1,25
28,33	1,02	28,31	1,17	28,88	0,947
29,3	0,515	29,49	0,488	29,96	0,397
29,6	0,418	29,95	0,347	29,71	0,488
29,8	0,362	30,17	0,295	31,59	0,107
30,58	0,28	31,08	0,151	30,93	0,181
31,65	0,0977	32,21	0,0724	32,18	0,07
31,65	0,0978	31,79	0,093	30,95	0,179
32,24	0,0648	31,01	0,159	30,66	0,272
31,76	0,0901	31,33	0,126	32,05	0,0767
33,87	0,0301	34,43	0,0325	34,74	0,021
33,89	0,0299	36,43	0,033	32,69	0,0506

Die durchschnittliche Fehlerrate der Standardkurven beträgt 0,05 und die Effizienz 2. Die Standardabweichung der Fehler beträgt dabei 0,034 und der Effizienz 0,135.

Ebenfalls wurde der Tm-Wert der einzelnen Proben bestimmt und auf Bildung von Primerdimeren überprüft. In keinem der Läufe sind Primerdimere aufgetreten.

Im Diagramm 4.1.1 sind die Logarithmen der gemessenen Konzentrationen den CP Werten gegenübergestellt. Auf der Ordinate sind die CP-Werte der einzelnen Läufe und auf der Abszisse die DNA-Konzentrationen in ng/5 µl aufgetragen.

Diagramm 4.1.1: Graphische Darstellung der Werte aus Tab. 4.1.1



Die Standardabweichung (SD) und Standardfehler (SE) der einzelnen Konzentrationen sind in Tabelle 4.1.2 angegeben

Tabelle 4.1.2: Standardabweichungen und Standardfehler

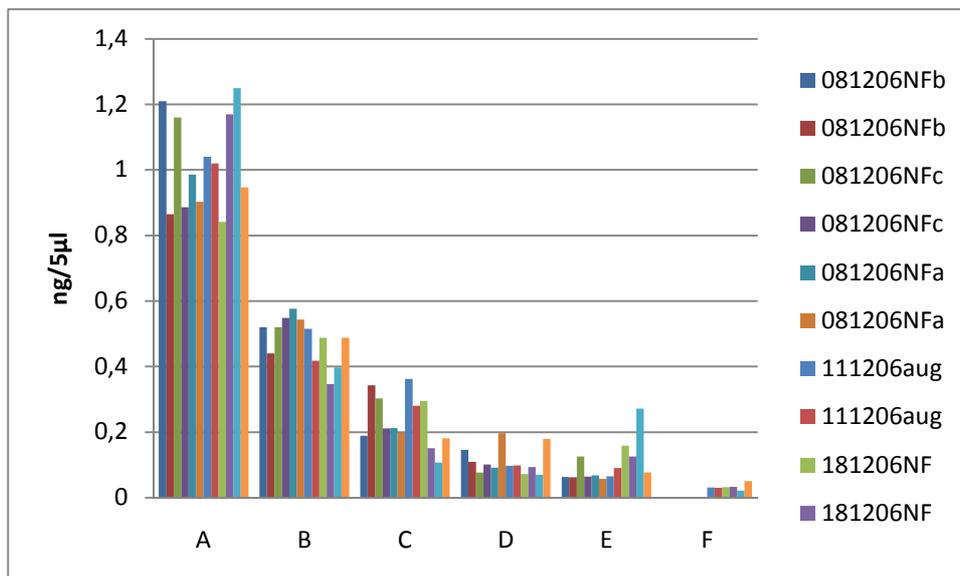
Konzentration (ng/5 µl)	SD	SE
1	0,143	0,041
0,5	0,069	0,02
0,25	0,079	0,023
0,125	0,050	0,012
0,06	0,066	0,018
0,03	0,015	0,004

Diagramm 4.1.2 stellt die gemessenen Konzentrationen der Standardverdünnungen einander direkt gegenüber. Auf der Abszisse sind die Proben aufgetragen, die einzeln gemessen wurden. Sie sind absteigend danach angeordnet, für welchen Wert sie den Standard bilden. Auf der Ordinate sind die tatsächlich gemessenen Werte in ng/5 µl angegeben.

Beschriftung der Abszisse	Verdünnung für Standardwert [ng/5 µl]
A	1
B	0,5
C	0,25
D	0,125
E	0,06
F	0,03

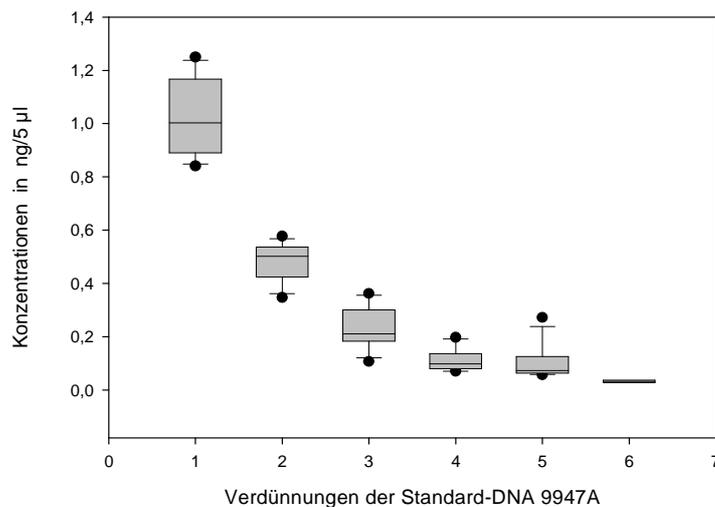
Je zwei der aufeinander folgenden Messdaten stammen aus einem Light Cycler-Lauf, so wie in der Beschriftung der Tabelle angegeben.

Diagramm 4.1.1



Um die Aussage dieses Diagrammes zu verdeutlichen, wurden die gemessenen Werte in Diagramm 4.1.2 in Form eines Boxplots dargestellt:

Diagramm 4.1.2



Die ansteigenden Zahlen auf der Abszisse sind jeweils einer Konzentration zugeordnet:

- 1: 1 ng/5 µl
- 2: 0,5 ng/5 µl
- 3: 0,25 ng/5 µl
- 4: 0,125 ng/5 µl
- 5: 0,06 ng/5 µl
- 6: 0,03 ng/5 µl

Die asymptotische Annäherung der Konzentrationen und die geringe Menge an Extremwerten (einer bei der Konzentration 0,06 ng/5 µl) sind deutlich zu sehen. Weiterhin ist auch auf die geringe Höhe der Boxen zu beachten, was auf die gute Reproduzierbarkeit der Messergebnisse hindeutet.

#### **4.2 Vergleich der Ergebnisse der Typisierung und der vorangehenden absoluten Quantifizierung**

Tabelle 4.2.1 (siehe Anhang) gibt in absteigender Konzentration die mit der Real-time-PCR gemessenen Konzentrationen an und die den einzelnen Proben zugehörigen Ergebnisse der Fragmentlängenbestimmung. Aus dieser Tabelle ergibt sich der Zusammenhang zwischen Ausgangskonzentration der DNA und Detektierbarkeit der gesuchten Allele.

Diagramm 4.2.1 gibt die Tabelle in Zusammenfassung wieder:



+	Es konnten alle Allele detektiert werden
-	Es konnten keine Allele detektiert werden
½	Es wurde ein Allel von zweien detektiert

Tabelle 4.3.1

	SE33	FGA	TH01	D3S1179	D18S51
1 ng/5 µl	+	-	+	+	-
0,5 ng/ µl	+	+	+	+	+
0,25 ng/ 5µl	+	+	+	+	+
0,125 ng/ 5µl	+	+	+	+	+
0,06 ng/5 µl	-	+	+	½	+
0,03 ng/5 µl	+	½	-	-	+

#### **4.4 Blutverdünnungen**

Zur Bestimmung der ertragreichsten Extraktionsmethode wurde wie in 3.1 beschrieben eine Verdünnungsreihe der Verdünnungen 1/10, 1/50 und 1/100 mit Blut angelegt. Es wurden pro Verdünnung und Extraktionsmethode 5 Proben angelegt.

Die Ergebnisse der absoluten Quantifizierung der Extraktionsprodukte der einzelnen Verdünnungen sind in Tabelle 4.4.1 angegeben.

Bei der Verdünnung 1/100 der Probe Q3 bei der Extraktionsmethode QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit ist keine DNA detektiert worden.

Bei den Proben, die mit der Methode QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ extrahiert wurden, ist in jeder Probe jeder Verdünnung DNA gemessen worden.

Es konnte keine DNA bei der Probe P5 der Verdünnung 1/100 der Extraktionsmethode DNA IQ™ System von Promega gemessen werden.

Ebenfalls konnte bei den Proben G3 und G4 der Verdünnung 1/50 und bei der Probe G5 der Verdünnung 1/100 keine DNA detektiert werden.

Q	Extraktion mit dem QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit
Q/Qsh	Extraktion mit QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™
P	Extraktionsmethode DNA IQ™ System von Promega
G	Extraktion mit First® all- tissue DNA- extraktion kit von GenIAL

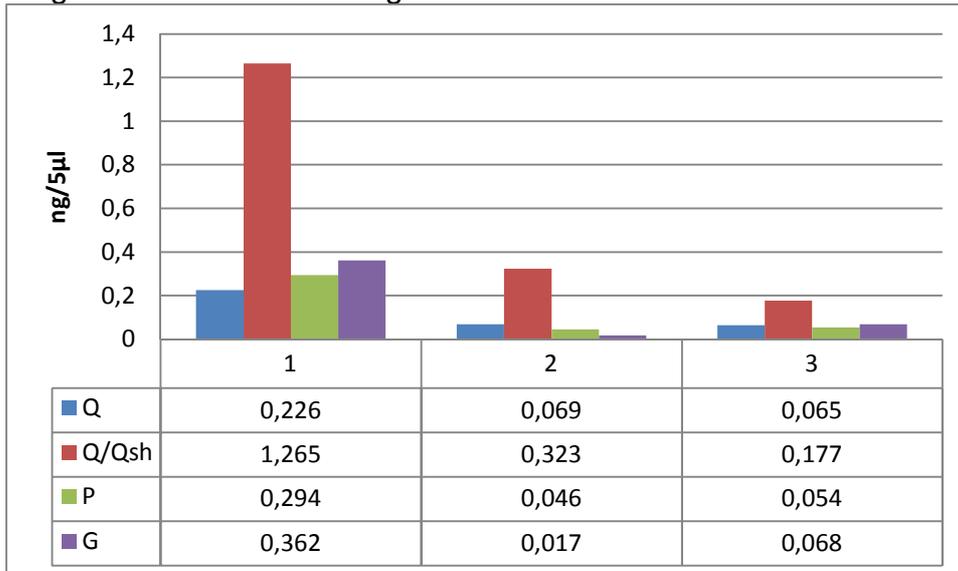
Tabelle 4.4.1: DNA-Ertrag der unterschiedlichen Extraktionsmethoden

Probe/Verd.	1/10 [ng/5 µl]	1/50 [ng/5 µl]	1/100 [ng/5 µl]	CP 1/10	CP 1/50	CP 1/100
Q1	0,099	0,135	0,079	32,44	32,13	33,65
Q2	0,369	0,048	0,089	30,47	33,61	33,58
Q3	0,276	0,04	0	30,9	33,84	-
Q4	0,162	0,104	0,081	31,68	32,51	33,59
Q5	0,226	0,02	0,076	31,19	34,74	33,77
Q/Qsh1	1,32	0,355	0,152	28,61	30,61	32,03
Q/Qsh2	0,986	0,175	0,245	29,04	31,74	31,16
Q/Qsh3	1,42	0,472	0,151	28,51	32,15	32,63
Q/Qsh4	1,35	0,369	0,23	28,58	30,55	31,27
Q/Qsh5	1,25	0,246	0,144	28,59	31,21	32,14
P1	0,184	0,141	0,089	31,49	32,07	33,3
P2	0,261	0,04	0,053	30,98	33,84	35,74
P3	0,075	0,003	0,06	33,05	36,88	34,8
P4	0,289	0,025	0,069	30,83	34,47	34,15
P5	0,663	0,022	0	29,62	34,64	-
G1	0,375	0,018	0,097	30,45	34,85	33,06
G2	0,253	0,004	0,084	31,03	33,97	33,47
G3	0,566	0	0,063	29,85	-	34,52
G4	0,122	0	0,096	32,09	-	33,1
G5	0,496	0,062	0	30,04	33,25	-

Um einen besseren Vergleich anstellen zu können, wird der Mittelwert der Konzentrationen jeder Extraktionsmethode und Verdünnung angegeben. Die Ergebnisse sind in Diagramm 4.4.2 dargestellt.

Eine graphische Darstellung der Mittelwerte der Konzentrationen lässt die Unterschiede noch deutlicher werden:

Diagramm 4.4.2 Darstellung der Mittelwerte der detektierten DNA- Menge



Verdünnung 1: 1/10; 2: 1/50; 3: 1/100

Die Verdünnungen 1:50 und 1:100 derjenigen zwei Extraktionsmethoden, die den höchsten DNA-Gehalt und niedrigsten Crossing point aufweisen, wurden mit Nonaplex QS PCR Amplifikation Kit amplifiziert. Es sind die Methoden QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit und QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™. Die Peakhöhen sind proportional zu den vom Light-Cycler berechneten Konzentrationen. Das bedeutet, dass die Proben, die mit der Extraktionskombination QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ extrahiert wurden, die höchsten Peaks haben.

Tabelle 4.4.3 stellt die Ergebnisse der DNA-Typisierung dar. Die letzte Zeile gibt den tatsächlichen Genotyp für die untersuchten Systeme an.

Tabelle 4.4.3: Auswertung des Elektropherogramms der Proben gewonnen aus den Blutspuren

Probe/Allel	D8S1179	D21S11	D18S51	TH01	D3S1358	SE33	vWA	FGA
1:50Q1	-	-;32	35	7	(12);14	17;22	15;16	23;28
1:50Q2	-	[30];32	35	7	(12);14	17;22	15;16	23;28
1:50Q3	12	-;32	35	7	12;-	-	15;16	23;28
1:50Q4	-	-;30	35	7	(12);14	17;22	15;16	23;28
1:50Q5	-	-	[35]	-	-;[14]	[17];-	15;16	23;28
1:100Q1	12	-;32	35	7	12;14	17;22	15;16	23;(28)
1:100Q2	12	-;32	35	7	-	-	15;16	-
1:100Q3	12	30;32	35	7	12;14	-	[15];-	23;28
1:100Q4	12	30;-	35	7	-;14	-;22	-	23;-
1:100Q5	12	-	35	-	-	17;-	15;16	-;28
1:50Q/sh1	12	30;32	35	7	12;14	17;22	15;16	23;28
1:50Q/sh2	12	30;32	35	7	12;14	17;22	15;16	23;28
1:50Q/sh3	12	30;32	35	7	12;14	17;22	(15);16	23;28
1:50Q/sh4	12	30;32	35	7	12;14	17;22	15;16	23;28
1:50Q/sh5	12	30;32	35	7	12;14	17;22	15;16	23;28
1:100Q/sh1	12	30;32	35	7	12;14	17;22	15;16	23;28
1:100Q/sh2	12	[30];32	35	7	12;14	17;22	15;16	-;28
1:100Q/sh3	12	30;32	35	7	12;14	17;22	15;16	23;28
1:100Q/sh4	12	30;32	35	7	12;14	(17);22	15;16	23;-
1:100Q/sh5	[12]	30;-	35	7	(12);14	17;22	15;16	23;28
Vorh. Allele	12	30;32	35	7	12;14	17;22	15;16	23;28

(x);y	Peak des Allels x ist deutlich kleiner als Peak des Allels y
[x]	Peakgröße des Allels x beträgt knapp 100 RFU
[x];y	Peakgröße des Allels x beträgt knapp 100 Einheiten und ist deutlich kleiner als Peak des Allels y
-	Es konnte kein Allel detektiert werden
Vorh. Allele	Allele, des Probanden der hier bestimmten STR-Systeme

## **4.5 Fingerabdrücke**

### 4.5.1 Fingerabdrücke, die in Bremerhaven gelegt wurden

Die Fingerabdrücke, die von der Polizei Bremerhaven, wie in 3.1 beschrieben, gesichert worden waren, wurden mit der Methode QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ extrahiert und mit dem Light-Cycler quantifiziert. Darauf wurden sie mit dem Sequencer mit dem Multiplex-Kit Argus S<sup>QS</sup> und zwei Singleplex Systemen auf die vorhandenen Allele hin untersucht.

Die durchschnittliche DNA-Menge, die in den Proben enthalten ist beträgt, 0,156 ng/5 µl.

Dabei beträgt die durchschnittliche Menge der DNA, die in den Fingerabdrücken, die auf der Folie waren, 0,065 ng/5 µl und die der Fingerabdrücke, die auf Papier gelegt wurden, 0,254 ng/5 µl. Damit beträgt der DNA-Gehalt der Proben, die auf dem Spureträger Folie waren 25,59% des DNA-Gehaltes der Proben, deren Spureträger das Papier war.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit dem Light-Cycler und dem Sequencer sind in Tabelle 4.5.1 dargestellt.

Fingerabdruck wurde auf Papier gelegt, und mit Ninhydrin besprüht.  
 Fingerabdruck wurde auf einer Glasplatte gelegt und mit Rußpulver bestäubt und von der Glasplatte mit einer Klebefolie abgezogen.  
 es sind Peaks aufgetreten, die nicht zugeordnet werden konnten.  
 Peak x ist deutlich kleiner als Peak y.

Tabelle 4.5.1: Auswertung des Elektropherogramms zu den Proben aus Bremerhaven

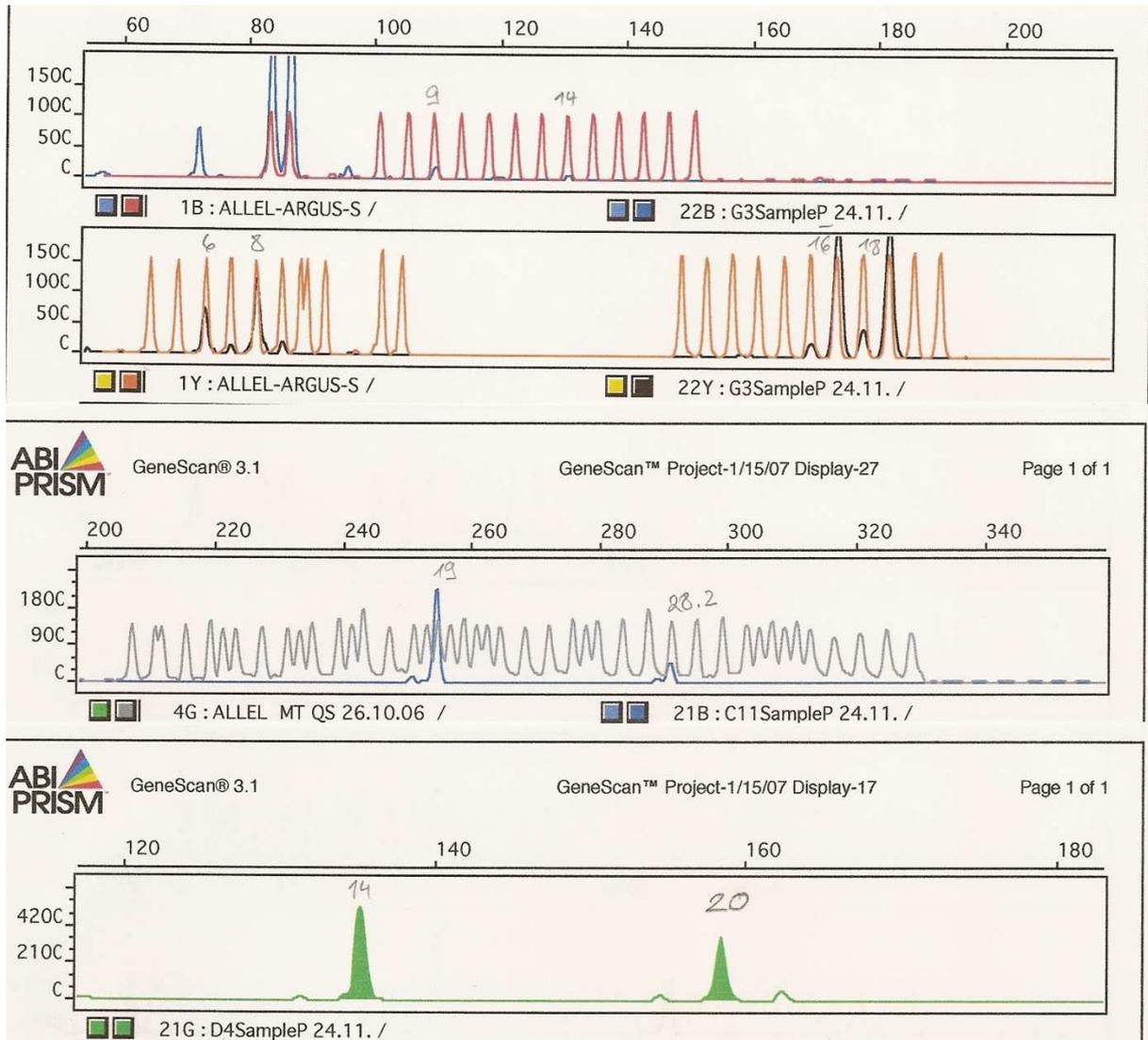
Q/sh	D8S1179	TH01	D3S1358	D18S51	SE33	CP	ng/5 µl
P 1	9;14	6;8	16;18	14;20	19;28.2	30	0,384
P 2	9;14	6;8	16;18	14;20	19;28.2	29,63	0,518
P 3	9;14	6;-	16;18	14;20	19;28.2	30,17	0,335
P 4	9;-v	-;8	16;-	14;20	19;28.2	33,43	0,034
P 5	-	6;8	16;18	14;20	19;28.2	32,49	0,057
P 6	9;14	6;8	16;18	14;20	19;28.2	30,85	0,193
F 1	9;14v	6;8	(16);18v	-	19;28.2	32,92	0,044
F 2	-v	6;8v	16v	20	-	33,12	0,04
F 3	-	6;8v	16;-	-	-	33,78	0,029
F 4	-;(14)	-	16;-	-	-	34,75	0,021
F 5	(9);-	6;8v	-	14	28,2	31,93	0,084
F 6	9;-v	-;8	(16);18v	-	-	31	0,172

Es konnten von den Proben, deren Spureträger Papier war, 54 von 60 (90%) der Allele detektiert werden. Bei den Proben, deren DNA auf Folie gesichert wurde,

konnten 18 von 60 Allelen (30%) detektiert werden.

In Abbildung 4.5.1 ist beispielhaft für die in Tabelle 4.5.1 angegebenen Ergebnisse das Elektropherogramm für die Probe P2 angegeben:  
 Blau mit roter Allelleiter ist das System D8S1179.  
 Schwarz mit gelber Allelleiter sind links TH01 und rechts D3S1358.  
 Blau mit grauer Allelleiter ist SE33 und Grün ist D18S51.

Abb. 4.5.1: Elektropherogramm für die Proben P2



#### 4.5.2 Fingerabdrücke, die im Institut für Rechtsmedizin gelegt wurden

Wie in 3.1 beschrieben legten 5 Personen Fingerabdrücke auf Papier. Diese wurden mit Ninhydrin besprüht und über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt, damit sich die Farbe der Fingerabdrücke entwickeln konnte. Die Proben wurden mit QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ extrahiert und anschließend mit dem Light-Cycler und dem Sequencer untersucht. Der durchschnittliche DNA-Gehalt beträgt 0,165 ng/5 µl. Person V muss jedoch als Ausreißer betrachtet werden. Wird Person V nun aus den Betrachtungen herausgenommen, so beträgt der durchschnittlich gemessene DNA-Gehalt der Proben 0,205 ng/5 µl

Die Ergebnisse der quantitativen DNA-Messungen sind in Tabelle 4.5.3 dargestellt.

Tabelle 4.5.3: Quantifikation der DNA aus den Proben „Fingerabdrücke auf Papier“

	CP	ng/5 µl
I 1	32.86	0,109
I 2	32.22	0,164
I 3	31.59	0,243
II 1	31.22	0,307
II 2	30.75	0,412
II 3	32.95	0,103
III 1	32.54	0,134
III 2	31.26	0,299
III 3	31,08	0,335
IV 1	33.06	0,096
IV 2	32.60	0,129
IV 3	32.54	0,133
V 1	35,2	0,003
V 2	35,82	0,001
V 3	35,85	0,001

I : 1.Person  
II: 2.Person  
III: 3.Person  
IV: 4.Person  
V: 5.Person

Die Ergebnisse der Typisierung der Proben der Personen I-V sind in Tabelle 4.5.4 zusammengefasst.

Tabelle 4.5.4: Auswertung des Elektropherogramms der Proben:  
Fingerabdrücke

	D8S1179	TH01	D3S1358	SE33	D18S51
I 1	11;14	6;8	15;16	-	13;17
I 2	11;14	6;8	15;16	20;30.2	13;17
I 3	11;14	6;8	15;16	20;30.2	13;17v
II 1	-	9;9.3v	(15);16	-	12
II 2	11;14v	9;9.3v	15;16	-	12
II 3	11;14v	9;9.3v	15;16	-	12
III 1	12;15v	6;-v	15;16	18;28.2	17;19
III 2	12;15	6;9.2v	15;16	-	17;19
III 3	12;15	6;9.3v	15;16	18;28.2	17;19
IV 1	8;14	6;9.2v	16	18;30.2v	13;18
IV 2	(8);14v	6;9v	16v	18;30.2v	13;18v
IV 3	8;14v	6;9v	16	18;30.2	13;18
V 1	13	-;9.3	-;16	-	-
V 2	-	-	-	-	-
V 3	-	-	-;16	-	-

Von den 141 Allelen konnten 105 (74,5%) detektiert werden. 17 Systeme konnten nicht und in vieren konnte nur ein Allel von zweien detektiert werden. Von den komplett nicht detektierten Systemen entfallen 8 (47,1%) auf das System SE33, 3 (17,6%) auf D8S1179 und ebenso viele auf D18S51, 2 (11,8%) entfallen auf TH01 und eins (5,9%) auf TH01. Auch hier muss wieder berücksichtigt werden, dass Person V einen Ausreißer darstellt: Wird bei der Betrachtung der Tabelle Person V ausgenommen, so handelt es sich nur noch um 114 Allele, von denen 101(88,6%) detektiert werden konnten. 10 der 13 (76,9%) nicht detektierten Allele entfallen auf das System SE33, zwei (15,4%) auf das System D8S1179 und eins (7,7%) auf das System TH01.

Um zu ermitteln, welches die bessere Möglichkeit ist, DNA von einer festen, nichtsaugenden Oberfläche zu entfernen, wird DNA in Form von Fingerabdrücken auf eine Glasplatte aufgebracht und mit Rußpulver bestäubt. Es werden pro Person vier Fingerabdrücke mit einer Folie und vier mit einem Wattetupfer von der Glasplatte entfernt. Zusätzlich werden pro Person zwei der Stellen, an denen sich die Fingerabdrücke befinden, die mit einer Folie von der

Glasplatte abgenommen wurden, mit einem Wattetupfer abgerieben. Die Proben werden mit der Extraktionsmethode QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ extrahiert, anschließend mit dem Light-Cycler quantifiziert und dem Sequencer analysiert.

Es wurde ein durchschnittlicher DNA-Gehalt von 0,027 ng/5 µl gemessen. Es entfallen 33,8% auf die Fingerabdrücke, die mit einer Folie gesichert wurden; auf die, die mit Wattetupferabrieb gesichert wurden entfallen 34,4%.

31,8% entfallen auf die Proben, deren DNA mit einem Wattetupfer gesichert wurde, nachdem die Fingerabdrücke mit einer Folie von der Glasplatte abgezogen worden waren.

Die qualitative Analyse ist in Tabelle 4.5.6 dargestellt. Von den 180 zu erwartenden Allelen sind 69 nicht detektiert worden, in 17 Systemen ist immer nur eines von zwei Allelen detektiert worden. Der Ausfall beträgt 82,2% der Allele, das heißt 17,8% der Allele waren detektierbar.

Von den Proben, die mit der Spurensicherungsfolie von der Glasplatte entfernt wurde, sind 6,9% der Allele detektierbar, (5 von 72). Von den Spuren, die mit Wattetupfern von der Glasplatte abgerieben wurden, sind 24 von 72 Allelen detektierbar, das entspricht 33,3%.

In den Proben, die durch Abreiben mit einem Wattetupfer der Stellen, an denen sich die Fingerabdrücke befunden haben, gewonnen wurden, wurden 12 von 36 (33,3%) Allelen detektiert.

I	1. Person
II	2. Person
F	Fingerabdruck von Glasplatte mit Spurensicherungsfolie entfernt
T	Fingerabdruck mit Tupfer von Glasplatte entfernt
G	Nach F Stelle, an der an der die Folie geklebt hat, mit Tupfer abgerieben

Tabelle 4.5.6 Auswertung des Elektropherogramms der Proben beschrieben in 3.1.2.4 und 3.1.2.5

	D8S1179	TH01	D3S1358	D18S51	SE33	ng/5 µl
I F1	-	-	-	13;-	-	0,013
I F2	-	-	-	-	-	0,089
I F3	-	6;[9]	-	-	-	0,0000067
I F4	14;-	-	-	-	-	0,000025
I T1	-	6;9	16	-	-	0,007
I T2	-	6;9	16	13;-	-	-
I T3	14;-	6;9	16	13;18	18;30.2	0,088
I T4	-	-	-	13;18	18;-	0,017
I G1	-	-	-	-;18	-	0,006
I G2	-	-	-	13;18	-	0,003
II F1	-	-	-	-	-	0,037
II F2	-	-	-	-	-	0,027
II F3	-	9;-	-	-	-	0,013
II F4	-	-	-	-	-	-
II T1	-	-	-	16;v	-	-
II T2	-	8;-	-	-	-	0,024
II T3	-	8;-	-	13;-	-	0,034
II T4	-	8;-	16		-	0,013
II G1	-	8;-	-	13;-	-;29.2,	0,149
II G2	12;-	8;-	16	[13];-	-	0,011

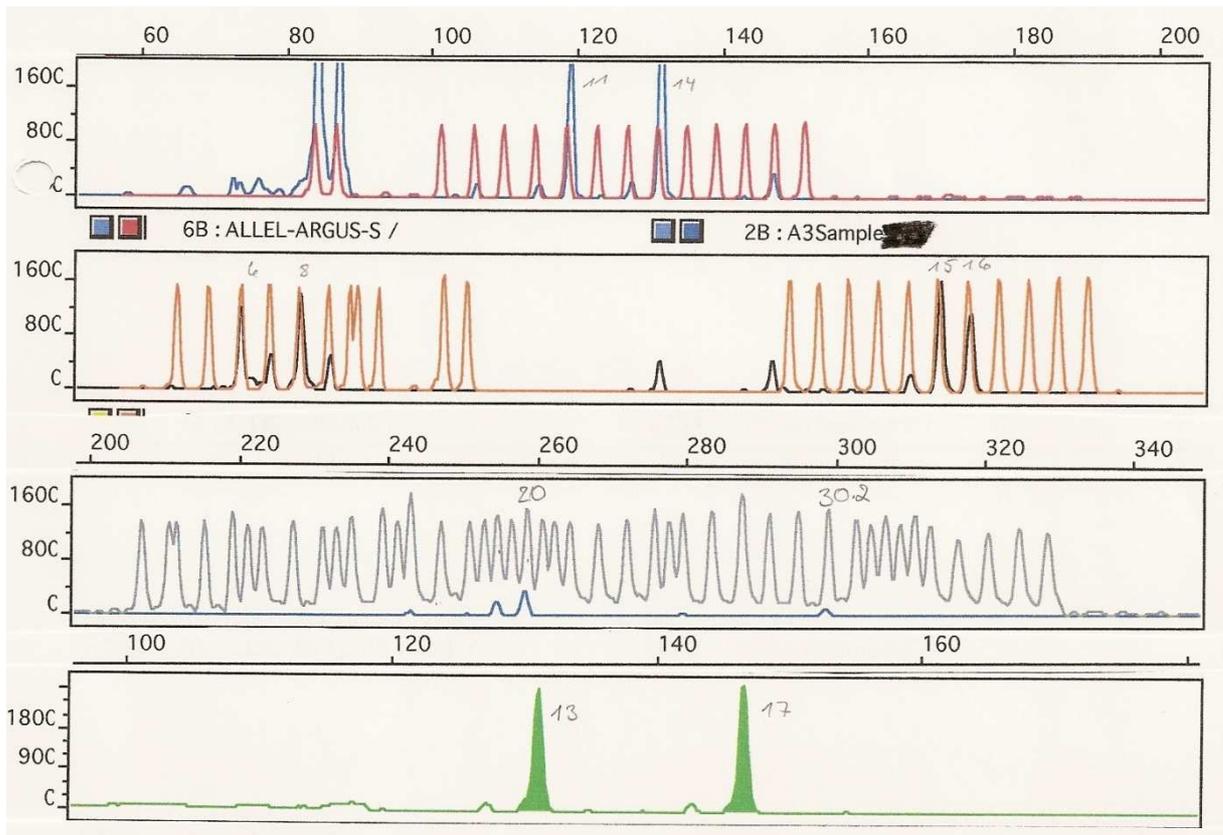
Beispielhaft ist in Abbildung 4.5.2 ein Elektropherogramm der Fragmentlängenanalyse aus Tabelle 4.5.4 angegeben:

Blau mit roter Allelleiter ist das System D8S1179.

Schwarz mit gelber Allelleiter sind links TH01 und rechts D3S1358.

Blau mit grauer Allelleiter ist SE33 und Grün ist D18S51.

Abbildung 4.5.2: Elektropherogramm aus Proben der Tabelle 4.5.4



#### **4.6 Blutspuren auf Spurensicherungsfolie und Filterpapier**

Blut wurde auf sechs Folien und sechs Stücken Filterpapier aufgebracht. Die Spureträger wurden wie in 3.1 beschrieben behandelt und extrahiert.

Die Blutspuren wurden mit dem Light-Cycler gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.6.1 dargestellt.

Die Proben, die aus dem Filterpapier extrahiert wurden, haben einen durchschnittlichen CP von 32 und eine durchschnittliche Konzentration von 0,14 ng/5 µl. Die Proben, die aus der Folie extrahiert wurden, haben einen durchschnittlichen CP von 35,9 und eine durchschnittliche Konzentration von 0,017 ng/5 µl.

Tabelle 4.6.1: Quantifikation der DNA aus den Proben: Blutspuren auf Spurensicherungsfolie und Filterpapier

	CP	ng/5 µl
P1	31,49	0,128
P2	32,57	0,085
P3	31,14	0,233
P4	32,67	0,161
P5	32,15	0,115
P6	32,02	0,126
F1	39,08	0,007
F2	34,61	0,024
F3	36,25	0,012
F4	35,89	0,014
F5	34,66	0,024
F6	35,12	0,019

#### **4.7 Briefumschläge**

Die Briefumschläge wurden mit der Methode QIAamp® DNA Mini Kit / QIAshredder™ extrahiert. Anschließend wurden sie quantitativ im Light-Cycler und qualitativ im Sequencer nach einer Amplifikation mit Argus S<sup>QS</sup> gemessen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.7.1 dargestellt.

In den Proben, die mit QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ extrahiert wurden, konnten alle erwarteten Allele nachgewiesen werden. Aufgrund der großen interindividuellen Unterschiede ist es hier nicht sinnvoll eine durchschnittliche DNA-Konzentration anzugeben.

Tabelle 4.7.1: Ergebnisse des Elektropherogramms und der Quantitativen DNA-Messung der Proben: Briefumschläge

Qsh/ Argus S	D8S1179	TH01	D3S1358	Cc. in ng	CP
1	13;14	6;8	17	1,55	27,92
2	11;15	8;9,3	14	0,95	28,58
3	11;14	9;9,3	15;16	3,81	26,7
4	12;13	8;9	16	0,70	28,99
5	11;16	7;9,3	15;16	8,4	25,63
6	13	7;9,3	14;16	1,88	27,66
7	13;14	8;9,3	16;18	0,93	28,62
8	13	9,3	14;17	0,29	30,22
9	12;15	6;9	15;16	14,9	24,85
10	11;14	6;8	15;16	1,23	28,23

#### 4.8.Schaltknäufe und Lenkräder

Wie in 3.1. beschrieben wurden die Schaltknäufe (SK) und Lenkräder (LR) mit Folie abgeklebt und später nach erneuter Benutzung der Autos mit einem Wattetupfer abgerieben. Danach wurden die Spureträger mit der Methode QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ extrahiert, mit dem Light-Cycler® quantitativ und dem Sequencer nach Amplifikation mit Argus S<sup>QS</sup> qualitativ gemessen. Die Proben, die mit einem Wattetupfer gesichert worden waren, wurden zusätzlich mit drei Mini-STR-Systemen amplifiziert und gemessen.

Die Ergebnisse der quantitativen DNA-Analyse der Proben, deren DNA mit der Folie gesichert worden war, und der Typisierung mittels Sequencer, sind in Tabelle 4.8.1 dargestellt.

Zusätzlich zu den Allelen des Besitzers wurden noch weitere Merkmale detektiert, die nicht zugeordnet werden konnten.  
x;(y): Allel y ist deutlich kleiner als Allel x

Tabelle 4.8.1: Ergebnisse des Elektropherogramms der Proben: LR und SK

Q/sh	D8S1179	TH01	D3S1358	ng/5 µl
1 LR	11;14	9;9.3v	15;16	8,5
1 SK	11;(14)	9;9.3	15;16	0,0339
2 LR	-; 14	6;9	16	3,08
2 SK	-; 14	6;9	16	0,0388
3 LR	12;13v	-	16v	0,462
3 SK	-	-	16v	0,318
1auto II LR	-	-	-	0,0302
1auto II SK	-	9;9.3v	15;16	0,0849
4 LR	-	6;-	-;16v	0,0565
4 SK	-	-	-	0
5 LR	13	-	-	0,0349
5 SK	13v	9.3v	14;17v	0,0298

Von den 64 Allelen in Tabelle 4.8.1 wurden 27 nicht detektiert. Das entspricht 42,2%.

Davon gehören 15 (46,9%) zu den Allelen, die in den Lenkradproben und 12 (37,5%) zu denen, die in den Schaltknäufproben zu erwarten wären. Im Light-Cycler wurden DNA-Konzentrationen zwischen 0,03 und 8,5 ng/5 µl gemessen. In einer Probe konnte keine DNA detektiert werden. Die durchschnittliche DNA-

Konzentration lag bei 1,06 ng/5 µl.

In Tabelle 4.8.2 sind die Ergebnisse der quantitativen Analyse des Wattetupferabriebs der Lenkräder und der Schaltknäufe angegeben. Die Werte liegen zwischen 6 und 0,292 ng/5 µl. Die durchschnittliche DNA-Konzentration liegt bei 2,98 ng/5 µl. Der durchschnittliche DNA-Gehalt der Proben deren DNA mit Folien gesichert wurden, beträgt 35,57% des DNA Gehaltes der Proben, die durch einen Wattetupferabrieb gesichert wurden.

Tabelle 4.8.2 zeigt zusätzlich die Ergebnisse der Typisierung der extrahierten Proben, deren DNA durch einen Wattetupferabrieb sichergestellt wurde.

Es konnten 4 von 88 Allelen nicht detektiert werden. Das bedeutet, dass 4,5% der Allele waren nicht detektierbar waren. Es entfallen dabei jeweils zwei der Allele auf die Schaltknäufe und zwei auf die Lenkräder. Zusätzlich zu den Allelen der Besitzerin des Autos 2 konnten noch die Allele ihres Mannes nachgewiesen werden, der das Auto zwei Wochen vorher benutzt hatte.

M: Allele des Ehemannes, die ebenfalls detektiert wurden, sind hinter dem Pluszeichen angegeben.

Tabelle 4.8.2: Ergebnisse des Elektropherogramms und der Quantitativen DNA-Untersuchung der Proben: Lenkräder und Schaltknäufe

Abrieb Q/sh	D8S1179	TH01	D3S1358	D3S1358	SE33	ng/5 µl
1 LR	11;14	9;9.3	15;16	12	14;15	4,86
1 SK	11;14	9;9.3	15;16	12	14;15	6
2 LR	8;14+13M	6;9+8M	16;17	13;18+15;17M	18;30.2+22.2;25.2M	4,29
2 SK	8;14+13M	6;9+8M	16;17M	13;18+15;17M	18;30.2+22.2;25.2M	1,27
3 LR	12;13	6;9v	16	13;16	26.2;29.2	3,32
3 SK	12;13	6;9	16	13;16v	26.2;29.2	1,01
4 LR	13	7;9.3	14;16	14;18	19;27.2	5,45
4 SK	13	7;9.3	14;16	14;18	-	2,78
5 LR	13	9.3	14;17	14	-	0,542
5 SK	13	9.3	14;17	14	17;(28.2)	0,292

In Tabelle 4.8.3 sind die Allele der Besitzer der Autos angegeben, sowie die des Ehemannes (M) der Besitzerin des Autos 2.

Tabelle 4.8.3 Allele der Probanden der Proben: Lenkräder und Schaltknäufe

1	11;14	9;9.3	15;16	12	14;15
2	8;14	6;9	16;17	13;18	18;30.2
3	12;13	6;9	16	13;16	26.2;29.2
4	13	7;9.3	14;16	14;18	19;27.2
5	13	9.3	14;17	14	17;28.2
M	13;14	6;8	17	15;17	22.2;25.2

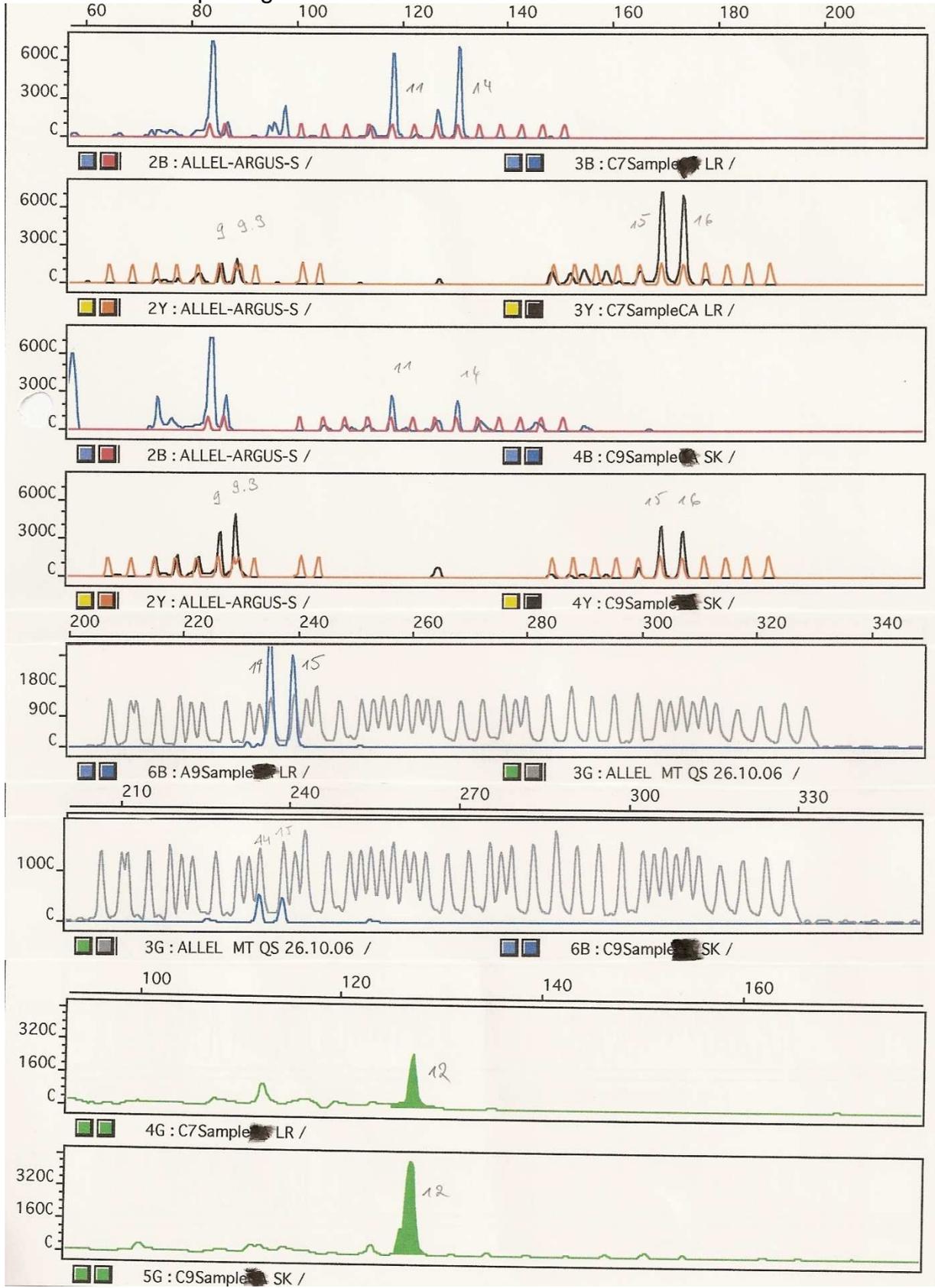
Beispielhaft ist in Abbildung 4.8.1 ein Elektropherogramm der  
 Fragmentlängenanalyse aus Tabelle 4.8.2 angegeben:

Blau mit roter Allelleiter ist das System D8S1179.

Schwarz mit gelber Allelleiter sind links TH01 und rechts D3S1358.

Blau mit grauer Allelleiter ist SE33 und Grün ist D18S51.

Abb.4.8.1: Elektropherogramm aus der Proben aus Tab.4.8.2



## 4.9 Handys

Die Mobiltelefone wurden mit einem in 96%igen Alkohol getränkten Wattetupfer abgerieben. Die Wattetupfer wurden mit der Extraktion QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ extrahiert. Die Menge der DNA wurde mit dem Light-Cycler gemessen. Die Messergebnisse sind in Tabelle 4.9.1 angegeben.

Die Konzentrationen bewegen sich zwischen 5,92 und 0,348 ng/5 µl. Der durchschnittliche DNA-Gehalt beträgt 1,55 ng/5 µl. Der durchschnittliche CP beträgt 29,32.

Zusätzlich wurden die Proben mit Argus S<sup>QS</sup> und zwei Singleplex Systemen amplifiziert und mit dem Sequencer gemessen.

Es konnten alle Allele der Handybesitzer detektiert werden. Zusätzlich zu den Allelen der Person 3 konnten auf ihrem Handy die Allele ihres Mannes detektiert werden. Auch auf anderen Handys waren zusätzliche Allele nachweisbar, die jedoch nicht zugeordnet werden konnten.

Tabelle 4.9.1: Ergebnisse des Elektropherogramms und der Quantitativen DNA-Analyse

	D8S1179	TH01	D3S1358	D3S1358	SE33	Cc. [ng]
1	12;15v	6;9.2v	15;16v	17;19v	18;28.2v	1,12
2	13;14v	6;8	15;16	15;17	18;28.2	5,92
3	8;14+13M	6;9	16+17M	13;18+15;17M	18;30.2+22.2;25.2M	0,681
4	13v	9.3;	14;17	14	17;28.2	0,584
5	12;13v	8;9	16	13;16	26.2;29.2	0,348
6	11;14v	6;8	15;16	13;17	20;30.2	0,731
7	13;14	(6);9.3	14;15	13	19;28.2	2,41
8	13	7;9.3	14;16	14;18	19;27.2	0,585

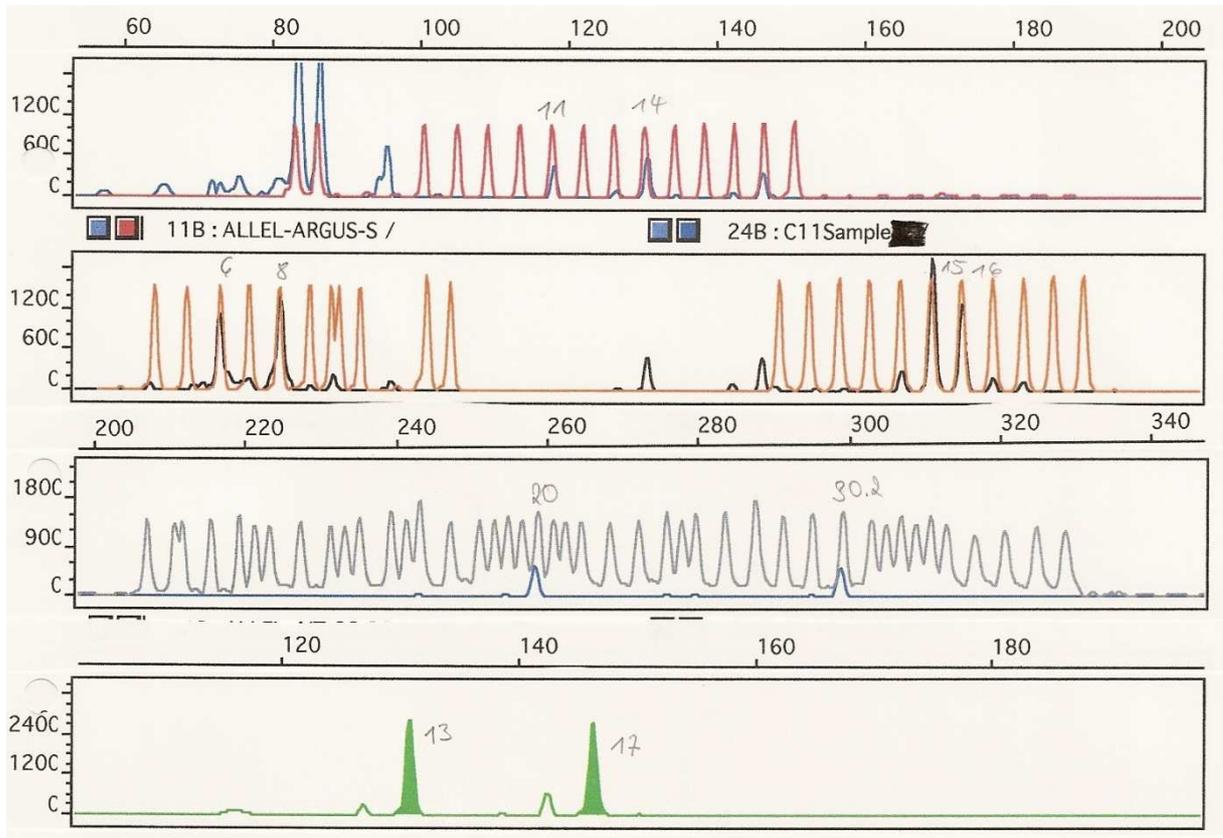
Beispielhaft ist in Abbildung 4.9.1 ein Elektropherogramm der Fragmentlängenanalyse aus Tabelle 4.9.1 angegeben:

Blau mit roter Allelleiter ist das System D8S1179.

Schwarz mit gelber Allelleiter sind links TH01 und rechts D3S1358.

Blau mit grauer Allelleiter ist SE33 und Grün ist D18S51.

Abb.4.9.1: ein Elektropherogramm der Fragmentlängenanalyse aus Tabelle 4.9.1



## 5. Diskussion

### 5.1 Validität der Real-time-PCR Ergebnisse

Um die Qualität der Ergebnisse der durchgeführten Real-time-PCR zu bewerten, werden die drei Validierungseigenschaften „robustness“, „reliability“ und „reproducibility“ herangezogen. Sie werden an den Ergebnissen der Standardkurven untersucht, die in 4.1 dargestellt sind.

Bei jedem Lauf wurde eine Negativkontrolle (Leerwert) amplifiziert. In der Negativkontrolle sind 15 µl Mastermix und 5 µl deionisiertes, destilliertes Wasser enthalten. Zur Validierung werden nur Läufe herangezogen, in deren Negativkontrolle keine DNA detektiert wird. Die Validität der Real-time-PCR wird anhand der in Abschnitt 4.1 dargestellten Standardkurven diskutiert.

„Robustness“ beschreibt die Eigenschaft einer Methode, in einem hohen Prozentsatz der Fälle zu Resultaten zu führen.

Diese Eigenschaft ist gegeben, da in keiner Messung Werte der Standardkurven nicht bestimmt werden konnten.

Die Zuverlässigkeit („reliability“) einer Methode beschreibt die Eigenschaft dieser Methode, die untersuchten Merkmale richtig anzugeben. Die gemessenen Konzentrationen verhalten sich proportional zu den Peakhöhen, die im Sequencer gemessen werden.

Die Reproduzierbarkeit („reproducibility“) einer Methode beschreibt ihre Eigenschaft, bei wiederholter Bestimmung der gleichen Probe zu ähnlichen Ergebnissen zu gelangen.

Die relativen Standardabweichungen der einzelnen Konzentrationen betragen:

1 ng	15,16
0,5 ng	14,28
0,25 ng	33,55
0,125 ng	37,22
0,06 ng	61,10
0,03 ng	29,30

Die durchschnittliche Standardabweichung ist zwar mit 31,77 recht hoch, kann aber auf Ungenauigkeiten beim Pipettieren und stochastische Fehler zurückgeführt werden. Je niedriger die Konzentrationen sind, desto stärker sind

sie stochastischen Fehlern unterworfen.

Da die Fehlerrate durchschnittlich bei 0,05 und die Effizienz bei 2 liegt, kann dennoch mit den Messwerten gearbeitet werden.

Wie die Ergebnisse in 4.2 zeigen, können die Proben, die eine Konzentration von 0,06 ng/5 µl haben, sicher im Sequencer detektiert werden. Proben, die eine Konzentration von 0,03 ng/5 µl haben, können noch zum großen Teil detektiert werden. Aus diesem Grunde wird die Spanne der Konzentrationen, die zur Erstellung der Standardkurven herangezogen wird, auf 1 ng/5 µl – 0,03 ng/5 µl festgelegt.

Es konnten bei Proben mit deutlich weniger DNA noch einzelne Allele detektiert werden.

## **5.2 Nutzen der absoluten Quantifizierung vor der PCR und Sequenzlängenbestimmung**

Soll ein Täterprofil anhand minimaler DNA-Spuren erstellt werden, ergibt sich das Problem, dass die DNA nur in geringen Mengen (50-80 µl) an Elutionspuffer gelöst werden kann, um eine möglichst hohe Konzentration der DNA in der Lösung zu erreichen. Bei einer so geringen Probenmenge bleibt nicht viel Spielraum dafür, mehrere PCRs anzusetzen und mehrere Typisierungen durchzuführen, um die richtige Menge an einzusetzendem Probenmaterial zu bestimmen.

Es wäre also gut, die DNA-Konzentration in der Probe zu kennen, um auf diese Weise eine Strategie für den weiteren Umgang mit der Probe bestimmen zu können, ohne Probenmaterial und Reagenzien und damit Geld zu verschwenden. Die DNA-Konzentration kann mittels Light-Cycler bestimmt werden. Ist keine DNA messbar, kann eventuell komplett auf weitere PCRs verzichtet werden.

Es ist notwendig, zu überprüfen, ob die im Light-Cycler gemessene DNA-Konzentration mit den Ergebnissen der Typisierung korreliert.

In Tabelle 4.2.1 (s. Anhang) wird deutlich, dass mit steigender DNA-Konzentration die Wahrscheinlichkeit steigt, dass möglichst alle Allele gleich bei der ersten PCR richtig amplifiziert werden.

Anhand der Ergebnisse des Light-Cyclers wurde die Menge an DNA-Extrakt bestimmt, die eingesetzt werden musste, um die PCR anzusetzen, die der Typisierung vorangeht.

Es wurde von Proben, in denen ein DNA-Gehalt von mehr als 1 ng/5 µl bestimmt wurde, 2 µl Probe eingesetzt. War der DNA-Gehalt geringer als 1 ng/5 µl, wurden 4 µl der Probe für den Ansatz der PCR benutzt. Dies hat sich bewährt, da zu viel DNA in der Probe zu genauso unbrauchbaren Ergebnissen führt wie zu wenig.

Bei den rotmarkierten Zellen muss von Fehlern ausgegangen werden. Der letzten rotmarkierten Zeile liegt wahrscheinlich ein Fehler der RT-PCR zugrunde. Bei allen anderen liegt der Fehler wahrscheinlich in der PCR, die der Typisierung vorangeht.

Das System SE33 führt häufiger und schon bei relativ hohen Konzentrationen zu einzelnen Misserfolgen in der Detektion der Allele. Später, bei sehr geringen Konzentrationen, fällt das System SE33 nahezu serienmäßig aus. Hier ist zu überlegen, ob die Amplifikationsbedingungen für dieses System optimiert werden können.

Wie aus Tabelle 4.2.1 weiter hervorgeht, bedeutet eine besonders niedrige Konzentration nicht zwangsläufig, dass es ausgeschlossen ist, einige Allele zu detektieren. Wird die PCR häufig wiederholt, könnte man also durchaus zu einem verwertbaren Ergebnis gelangen. Es müsste jedoch diskutiert werden, ob das Ergebnis die entstehenden Kosten für den hohen Materialverbrauch rechtfertigt.

Die Real-Time-PCR gibt aber den Hinweis, dass von solchen Proben besonders viel der DNA-Lösung eingesetzt werden muss, um mit einer größeren Wahrscheinlichkeit zu einem Ergebnis zu gelangen. Außerdem können Proben mit einem höheren DNA-Gehalt sparsamer angewendet werden, so dass eine Verschwendung des für die Verbrechensbekämpfung wertvollen genetischen Materials verhindert werden kann.

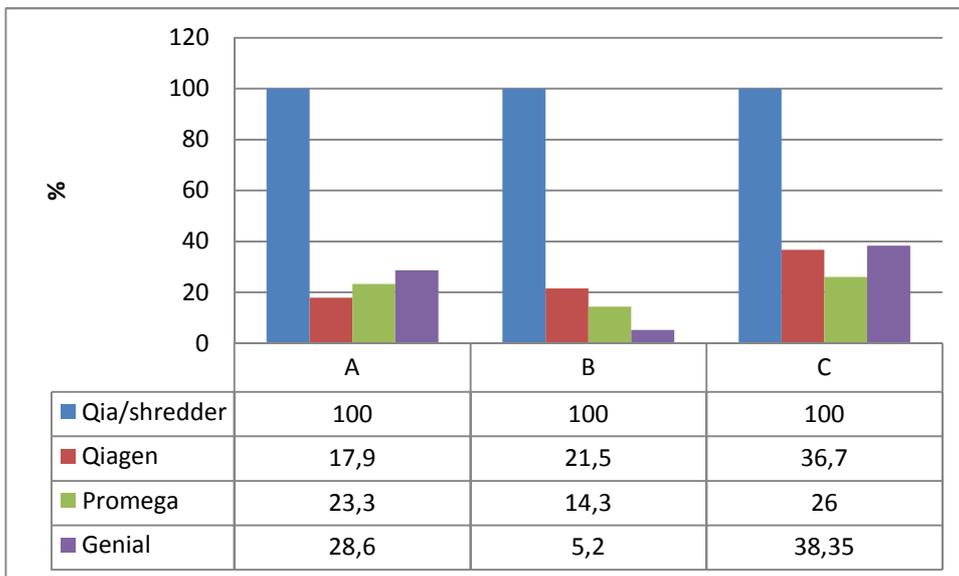
### 5.3 Bestimmung der besten Extraktionsmethode anhand der Blutverdünnungsproben

Die Extraktionsmethode, die zur weiteren Bearbeitung der Proben herangezogen wird, wurde ermittelt, indem die Ergebnisse der quantitativen und qualitativen Analyse ausgewertet wurden.

Die durchschnittlichen DNA-Konzentrationen der ertragreichsten Methode, QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™, werden jeweils als 100% definiert und den durchschnittlichen Erträgen der anderen Methoden in Diagramm 5.3.1 gegenübergestellt:

Diagramm 5.3.1: Vergleich der DNA- Ausbeute der einzelnen Extraktionsmethoden

A	Verdünnung 1/10
B	Verdünnung 1/50
C	Verdünnung 1/100



Bei allen drei Verdünnungen wurden mit den Methoden QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit, Gen-IAL® all- tissue DNA- extraktion kit und DNA IQ™ System von Promega jeweils geringere DNA-Mengen extrahiert, als mit QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™.

Die Methode QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ hebt sich mit ihren Ergebnissen also deutlich von den Ergebnissen der anderen

Extraktionsmethoden ab. Um zu bestätigen, dass die deutlich höhere DNA-Konzentration der Proben nicht durch Kontaminationen zustande kommt, wurden die Proben mit den Verdünnungen 1/50 und 1/100 amplifiziert und im Sequencer typisiert.

Zusätzlich wurden die Proben mit den Verdünnungen 1/50 und 1/100 der Extraktionsmethode QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit, die in Spurenfällen standardmäßig im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf angewandt wird, mit einem Multiplex Kit amplifiziert und mittels Sequencer typisiert. So kann ein Vergleich zwischen den beiden Extraktionsmethoden über die Zuverlässigkeit des Erscheinens der Allele und deren Größe angestellt werden. Die Methode QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit wurde ausgewählt, obwohl sie bei der größten Verdünnung nur den dritthöchsten DNA-Gehalt erbrachte. Die Methode Gen-IAL® all-tissue DNA-extraktion kit erbrachte zwar den zweithöchsten DNA-Gehalt. Bei der Verdünnung 1/50 enthielt die Probe dieser Extraktionsmethode jedoch einen so geringen DNA-Gehalt, dass die Extraktion mit QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit als zuverlässiger in der DNA-Ausbeute erscheint.

Die Anzahl der nicht detektierten Allele der Extraktionsmethode QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit der Verdünnung 1/50 beträgt 15 von 65, das entspricht 23,1%. Dabei sind 7 STR-Systeme komplett ausgefallen und bei 6 ist jeweils nur ein Allel betroffen.

Vier Allele sind in einer geringfügigen Konzentration vorhanden.

Bei der Verdünnung 1/100 der gleichen Extraktion ist ein Ausfall von 25 der 65 Allele zu beobachten. Dies entspricht 38,5%. Hier sind 8 Systeme komplett ausgefallen und 9 teilweise. Ein Allel ist in einer geringfügigen Konzentration vorhanden.

Bei den Proben, die mit der Extraktionsmethode QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ extrahiert wurden, die 1/50 verdünnt worden waren, sind 100 % der Allele detektiert worden. Kein Allel hat eine Ausprägung von weniger als 100 RFU.

Bei der Extraktion der Verdünnung 1/100 sind 3 von 65 Allelen nicht detektiert worden. Dies entspricht 4,6%. Zwei der detektierten Allele sind nur geringfügig ausgeprägt.

Da in den Proben, die mit QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ extrahiert wurden, keine extra Allele oder sonstige Verunreinigungen aufgetreten sind, kann davon ausgegangen werden, dass die Light-Cycler Ergebnisse, die in Tabelle 4.4.1 und 4.4.2 angegeben sind, ausschließlich von der DNA stammen, die in der Blutprobe vorhanden war, und nicht durch äußere Einflüsse beeinträchtigt wurde. Weitere Indizien für den deutlich höheren DNA-Gehalt der Proben sind zum einen die seltener auftretenden stochastischen Effekte - hier vor allem der Allel „drop out“ - und zum anderen die deutlich zuverlässigere Detektion und Peakhöhe der detektierten Allele. Würde eine weitere PCR dieser Proben angesetzt werden, wäre möglicherweise wieder ein Ausfall von ähnlicher Höhe zu beobachten wie bei der ersten. Es wäre aber nicht damit zu rechnen, dass dieselben Allele ausfielen. So könnten dann innerhalb zweier Läufe des Sequencers alle Allele nachgewiesen werden.

Die Extraktionsmethode QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ zeigt sich also auch auf Ebene des Sequencers gegenüber der bislang in solchen Fällen verwendeten Extraktionsmethode überlegen.

Zur weiteren Bearbeitung der Proben wurde daher die Extraktionsmethode QIAGEN QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ angewendet.

## **5.5 Fingerabdrücke**

Der durchschnittliche DNA-Gehalt der Bremerhavener Proben, die aus mit Ninhydrin behandeltem Papier extrahiert wurden, ist immer höher als der der Spuren, die auf eine Glasplatte gelegt, mit Rußpulver bestäubt und mit Spurensicherungsfolie abgezogen wurden.

Um zu ermitteln, ob bei dieser Beobachtung eine Gesetzmäßigkeit vorliegt, wurden auf sechs Spurensicherungsfolien jeweils 10 µl Blut aufgetragen und verteilt. Zum Vergleich wurden sechs 10 µl große Blutspuren auf Filterpapier gelegt. Die Klebeschicht der Spurensicherungsfolien wird, wie in 3.1 beschrieben, von einem Wattetupfer aufgenommen und mit QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ extrahiert, so wie auch die Blutspuren auf Filterpapier mit dieser Methode extrahiert werden.

Die Blutspuren auf Folie haben nur 12% des DNA-Gehalts, der in den Extrakten

der Blutspuren auf Filterpapier vorhanden war. Diese Beobachtung legt zwei Vermutungen nahe: Erstens, dass bei der Extraktion der Folienproben, sich die DNA nicht von der Klebeschicht lösen kann, weil sie in diese eingeschlossen ist. Die DNA bleibt auf dem Spurenläger und wird mit ihm verworfen. Zweitens, dass in der Klebefolie PCR-inhibierende Substanzen vorhanden sind, so dass die Amplifikation scheitert und der DNA-Gehalt deshalb so gering ist. Diese Vermutung wurde geprüft, indem die Klebeschicht zweier Folien ohne DNA wie in 3.1. beschrieben mit der Methode QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ behandelt wurden. Vor der quantitativen DNA-Analyse mittels Light-Cycler, wurden je 5 µl dieser Proben mit je 15 µl Light-Cycler-Mastermix und 5 µl 0,5 ng/5 µl 9947A DNA versetzt. Zum Vergleich werden zwei Proben im Light-Cycler gemessen, die die gleiche Zusammensetzung haben, aber an Stelle der 5 µl Folienextrakt werden 5 µl AE-Puffer eingesetzt.

Die Ergebnisse unterscheiden sich, wie in Tabelle 4.5.7 angegeben, nicht voneinander. Es gibt einen Ausreißer. In einer der beiden Folien ist deutlich mehr DNA enthalten, als in den anderen drei Proben. Dieses Ergebnis kann durch Kontamination der Probe verursacht worden sein. Die Ergebnisse deuten nicht darauf hin, dass in der Folie PCR-inhibierende Substanzen vorhanden sind.

Als nächstes wurde untersucht, ob es eine bessere Methode ist, die Fingerabdrücke direkt von einem festen, nicht saugenden Gegenstand abzureiben, als ihn mit Folie abzukleben. Dazu wurden wie in 3.1 beschrieben, Fingerabdrücke auf eine vorher gereinigte Glasplatte gelegt und mit Rußpulver bestäubt. Je vier Fingerabdrücke wurden mit einem Wattetupfer von der Glasplatte abgerieben und mit Folie abgeklebt und abgezogen. Bei pro Person zwei Fingerabdrücken, die mit der Folie gesichert wurden, wurde die Stelle, an der die Fingerabdrücke waren, mit je einem Wattetupfer abgerieben. Die Ergebnisse sind in 4.5 dargestellt. Bei den Proben, die mit Wattetupfern abgerieben wurden, wurde etwas mehr DNA extrahiert als bei den Folien. In den Extrakten der Wattetupfer, mit denen die Fingerabdruckreste abgerieben wurden, nachdem vorher die Fingerabdruckfolie von der Glasplatte abgerieben worden war, wurde in nicht unerheblichem Ausmaß DNA detektiert. Sollten in Zukunft Fingerabdrücke mit Folie gesichert werden, aus denen ein

DNA-Profil erstellt werden soll, sollte zusätzlich die Stelle, an der sich die Folie befand, mit einem Wattetupfer abgerieben werden. Die Spuren sollten dann im Rahmen der Extraktion wieder zusammengeführt werden, um ein detektierbares Ergebnis zu erhalten.

Bei den Proben, die zum direkten Vergleich von Folien und Filterpapier als Spurenträger entstanden sind, wurde das Blut direkt auf die Folien gegeben. Es konnte kein DNA-Verlust entstehen. Es wird also davon ausgegangen, dass eine weitere Verschlechterung der Ergebnisse der Folienproben dadurch auftritt, dass die DNA in der Klebeschicht eingeschlossen bleibt und nicht in Lösung gehen kann.

Um sowohl eine fingerabdruck-, als auch eine DNA-basierte Täteridentifizierung zu gewährleisten, sollte darüber nachgedacht werden, eine andere Klebefolie zu benutzen, deren Klebeschicht sich vollkommen auflösen lässt, oder eine Möglichkeit zu finden, die Klebeschicht dieser Folie komplett aufzulösen.

Die Menge der DNA, die von den Spurentägern gewonnen werden kann, ist abhängig von dem Material, auf dem die Spuren gelegt worden sind. So bleibt auf einem saugenden Untergrund wie Papier grundsätzlich mehr DNA hängen als auf einem nichtsaugenden wie Glas. Dies zeigen sowohl die Fingerabdrücke aus Bremerhaven - es ist durchschnittlich bei den Fingerabdrücken auf Papier mehr DNA detektiert worden als bei den Fingerabdrücken auf Glas - als auch die Fingerabdrücke, die im Institut für Rechtsmedizin der Universität Hamburg gelegt wurden. Der DNA-Gehalt der Proben ist mit durchschnittlich 0,165 ng/5 µl relativ hoch. Person 5 stellt einen Ausreißer dar, durch die Person 5 steigt die relative Standardabweichung von 52,84 auf 77,68. Und der Allelausfall steigt von 11,2 auf 25,5%, der durchschnittliche DNA-Gehalt sinkt von 0,205 ng/5 µl auf 0,165 ng/5 µl. Die vergleichsweise guten Ergebnisse der Extraktionen der Fingerabdrücke zeigen, dass die Extraktion mit QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ geeignet ist, um Fingerabdrücke mit dem Ziel der DNA-basierten Täteridentifizierung zu bearbeiten. Auch das Multiplexsystem Argus S<sup>QS</sup> und die beiden Singleplex Systeme sind dazu geeignet. Es sollten aber, um ein komplettes Täterprofil zu erstellen, noch weitere Singleplex Systeme hinzu genommen werden, da Singleplex Systeme im Allgemeinen die höchste Sensitivität aufweisen.

Da der sogenannte shedder status jeder Person unterschiedlich ist und auch davon abhängt, ob die betreffende Person etwa eingefettete Hände hat oder nicht, kann nicht mit Sicherheit vorausgesagt werden, ob es möglich ist, aus Fingerabdrücken ein verwertbares DNA-Profil zu erstellen oder nicht. Hieraus ergibt sich die weitere Schwierigkeit festzulegen, wie mit den Spuren umgegangen wird, die man an einem Tatort findet. Sollte zugunsten einer genetischen Untersuchung darauf verzichtet werden, die Spuren mit Mitteln zur Sichtbarmachung von Fingerabdrücken zu behandeln und damit eine Verminderung des DNA-Gehalts der Spuren in Kauf zu nehmen? Um zum Vorgehen eine Empfehlung abgeben zu können, sollte eine statistische Untersuchung stattfinden, die die Häufigkeit vergleicht, mit der Personen in Spurenfällen anhand von Fingerabdrücken, beziehungsweise anhand von DNA-Technik den vorhandenen Spuren zugeordnet werden konnten. Es ist jedoch zu beachten, dass Spuren-DNA auch durch sekundäre Übertragung an einen Ort gelangen kann, ein Fingerabdruck wird in den meisten Fällen direkt auf einen Gegenstand übertragen.

Es sind bei Fällen, bei denen DNA aus Fingerabdrücken gewonnen wird, immer die Einschränkungen zu beachten, die Schulz und Reichert 2002<sup>68</sup> gemacht haben:

- Very often, the surfaces are contaminated and mixed profiles are obtained.
- One can not always know whether the fingerprint-DNA is relevant to the case or not, since the perpetrator may have worn gloves and the fingerprints found could be from an innocent person who had been on the side of crime long before.
- The DNA found can also come from saliva or other cells on the sampled surface.
- The sample could be contaminated by the police during the visualization and archiving process.
- Skin contact to other biological materials, such as blood or saliva, could influence the results. [...]

---

<sup>68</sup> Schulz MM, Reichert W (2002) Archived or directly swabbed latent fingerprints as a DNA source for STR typing. Forensic Science International 127: 128-130.

Es ist auch zu beachten, dass, wie bei Proff *et al.*(2006)<sup>69</sup> festgestellt wird, ein besonders großes Kontaminationsrisiko in den mehrfach verwendeten Fingerabdruckpinseln liegt. Die DNA kann hierbei von Tatort zu Tatort getragen werden. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte allerdings keine sekundäre Übertragung von DNA festgestellt werden, obwohl der benutzte Fingerabdruckpinsel schon mehrfach an Tatorten verwendet worden war. Es wurde lediglich in der Probe IIT1 im System D18S51 (vergl. Tabelle 4.5.4) ein Allel detektiert, das nicht zugeordnet werden konnte.

## **5.6 Briefumschläge**

Die Briefumschläge wurden mit der Methode QIAamp® DNA Mini Kit / QIAshredder™ extrahiert.

Der Misserfolg bei der Typisierung der Proben, die mit der bislang auf Spuren angewandten Methode QIAamp® DNA Mini Kit extrahiert wurden, kann möglicherweise mit Verunreinigungen zusammenhängen, die sich in der Probe befinden und die Amplifikation oder Detektion negativ beeinflussen. Diese Verunreinigungen, sollten solche vorhanden sein, werden anscheinend von dem zusätzlichen Reinigungsschritt der Methode QIAamp® DNA Mini Kit / QIAshredder™ herausgefiltert.

Der hohe DNA-Gehalt und vor allem der Detektionserfolg von 100% der Allele sprechen dafür, dass QIAamp® DNA Mini Kit / QIAshredder™ die geeignete Extraktionsmethode ist.

## **5.7 Schaltknäufe und Lenkräder**

Um die beste Methode für die Sicherstellung der Proben zu bestimmen, werden zwei im Alltag der Spurensicherung durch die Polizei gängige Sicherungsmethoden miteinander verglichen.

Die DNA für den ersten Versuch wurde mit der Spurensicherungsfolie gesichert, für den zweiten mit einem in 96%igem Alkohol getränkten Wattetupfer. Obwohl die höchste DNA-Ausbeute in einer Probe detektiert wurde, die mit Folie

---

<sup>69</sup> Proff C, Schmitt C, Schneider PM, Foerster G, Rothschild MA (2006) Experiments on the DNA contamination risk via latent fingerprint brushes. International Congress Series 1288: 601-603.

gesichert wurde, ist dennoch die Sicherungsmethode der Wahl der Abrieb mit einem in 96%igem Ethanol getränkten Wattetupfer, denn die detektierte DNA-Menge der Folienproben beträgt etwas mehr als ein Drittel der mit einem Wattetupfer gesicherten Menge.

Besonders von Bedeutung für diese Einschätzung ist auch die Tatsache, dass von den Wattetupferproben nur 4,5% der Allele nicht detektiert werden konnten, im Gegensatz dazu aber 42,2% der Allele der Folienproben nicht detektiert wurden.

Lenkräder und Schaltknäufe wurden vor der Probenentnahme nicht mit Materialien oder Reagenzien behandelt, die der Visualisierung von Fingerabdrücken dienen. Nach Balogh et.al<sup>70</sup> haben diese Mittel eine deutlich negative Auswirkung auf den DNA-Gehalt der Proben. In dieser Studie sank die Detektion der DNA, die aus den Fingerabdrücken gewonnen wurde, von 80-93% bei unbehandelten Fingerabdrücken auf 47% bei behandelten Fingerabdrücken.

## **5.8 Handys**

Da die durchschnittliche DNA-Konzentration der Proben mit 1,55 ng/5 µl relativ hoch ist und die Detektion der Allele im Sequencer 100% beträgt, wird davon ausgegangen, dass die hier verwendete Methodik optimal für die Erstellung eines DNA-Profiles von dem Spureträger Mobiltelefon ist.

## **5.9 Qualitätsstandards zur Vermeidung und Aufdeckung von kontaminiertem Arbeitsmaterial**

Der Fall des „Phantoms“ von Heilbronn zeigt, wie wichtig es ist, höhere Qualitätsansprüche an das Arbeitsmaterial zu stellen, wenn mit minimalen DNA-Spuren gearbeitet wird, als es der Fall war, als man nur aus großen

---

<sup>70</sup> Balogh MK, Burger J, Bender K, Schneider PM, Alt KW (2003) STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. Forensic Science International 137: 188-195.

Mengen an Zellen ein genetisches Täterprofil erstellen konnte. Sind große Mengen DNA in einer Probe vorhanden, werden kleine DNA Mengen, wie sie aus Kontaktsuren gewonnen werden, durch die großen überlagert, so dass jene nicht mehr detektierbar sind. Auch wenn kleine Mengen kontaminierender DNA (z.B. aus Kontaktsuren) der eigentlichen DNA (aus Blut oder Spermasuren), die in großen Mengen vorhanden ist, beigemischt sind, konkurrieren die DNA-Stränge um die zur Amplifikation hinzugefügten Reagenzien (z.B. Primer und die Taq-Polymerase), so dass die kontaminierende DNA stochastisch gesehen schon nicht ins Gewicht fällt. Anders ist es bei LCN DNA-Analyse. Hier werden winzige Mengen DNA (<100pg) nachgewiesen. Für eine relevante Kontamination reicht es aus, wenn jemand die Verpackung des Spurenrägers berührt und der Spurenräger beim Entnehmen aus der Verpackung die Stelle berührt, die vorher von der fraglichen Person berührt worden war, um eine Kontamination zu verursachen, die später zu einer Trugsur führen kann. Um Kontaminationen im Labor zu verhindern, gibt es Veröffentlichungen zu Laborstandards. Hier wurde die von Schneider (2007)<sup>71</sup> zitiert. Es müssen jetzt aber noch Standards für die zur Spurensicherung und deren Verarbeitung verwendeten Materialien und standardisierte Vorgehensweisen bei der Spurensicherung etabliert werden. Es dürfen nur Produkte zur Spurensicherung verwendet werden, die garantiert DNA-frei sind, dazu muss der Begriff DNA-frei definiert werden. Zählt zum Beispiel nur menschliche DNA, oder auch tierische, oder aber auch pflanzliche? Denn Warte besteht aus Baumwolle, einem pflanzlichen Produkt. Weiterhin sollte auch die Außenseite der Behälter der Spurenräger so wenig wie möglich von Menschen berührt werden, was durch eine weitgehende Maschinisierung der Arbeitsabläufe bei der Herstellung der Spurenräger erreicht werden kann. Bei der Weiterverarbeitung der Spuren sollte darauf geachtet werden, dass der Spurenräger die Außenseite des Behälters nicht berührt. Der Expertenkreis „Qualitätssicherung bei der DNA-Analyse“ fordert, dass nur noch Wattestäbchen eines Herstellers benutzt werden, die zuvor mit

---

<sup>71</sup> Schneider PM (2007) Scientific standards for studies in forensic genetics. Forensic Science International 165: 238-243

Ethylenoxid sterilisiert worden sind. Dies ist ein sinnvoller Vorschlag, da Shaw et al. (2008)<sup>72</sup> diese Form der Sterilisation als effektivste in Bezug auf DNA-Entfernung ermittelt haben.

Der zentrale Einkauf der Wattestäbchen über die Polizei dient nicht nur dazu, dass das verwendete Material übersichtlicher wird, sondern vereinfacht den einzelnen Abteilungen den Arbeitsalltag insoweit, als sich nicht jede Abteilung mit den Qualitätsstandards der Firmen auseinandersetzen muss, solange es noch keine Vereinheitlichung für die Produktqualität gibt.

Weiterhin müssen, wie auch vom Expertenkreis gefordert, Leerproben der Arbeitsmaterialien extrahiert, amplifiziert und analysiert werden, um Verunreinigungen aufzuspüren.

Über die Forderungen des Expertenkreises hinaus sollte unter Berücksichtigung des Datenschutzes eine Datenbank erstellt werden, in der anonym die genetischen Merkmale der Mitarbeiter der Firmen erfasst werden, die an der Herstellung der Materialien, die zum Zwecke der DNA-Analyse verwendet werden, beteiligt sind. Mit einer solchen Datenbank wäre die „Phantomjagd“ wahrscheinlich beendet gewesen, bevor in massivem Ausmaß Geld und Zeit auf die Ermittlungen verwendet worden wären.

Die genetischen Merkmale der Mitarbeiter der Spurensicherung und des Laborpersonals sollte in einer laborinternen Datenbank gespeichert werden, so wie es in den meisten Labors bereits der Fall ist. So können Kontaminationen, die bei der Sicherung der Spuren und der Weiterverarbeitung entstehen, erkannt und als Trugspur aus der Ermittlung eliminiert werden.

Weiter sollte eine Datenbank erstellt werden, in der Fälle, bei denen Kontaminationsverdacht besteht, eingetragen werden. Das betrifft sowohl die genetischen Merkmale, die in Verdacht stehen, eine Kontamination zu sein, als auch die verwendeten Materialien. Wäre im „Phantomfall“ früher bekannt gewesen, dass bei all den Fällen die gleichen Wattetupfer benutzt worden waren, wäre der Kontaminationsverdacht sicherlich schneller aufgetaucht. All diese Maßnahmen sollten nicht nur für Wattetupfer gelten sondern für das gesamte Arbeitsmaterial, das zur Sicherung und Weiterverarbeitung der Spuren

---

<sup>72</sup> Shaw K, Sesardić I, Bristol N, Ames C, Dagnall K, Ellis C, Whittaker F, Daniel B (2008) Comparison of the effects of sterilisation techniques on subsequent DNA profiling. *International Journal of Legal Medicine*. 2008 Jan;122(1):29-33.

und Spureträger verwendet wird. Wichtig ist es weiterhin, sich über die möglichen Risikofaktoren für Kontaminationen klar zu werden. Bei Borst et al. (2004)<sup>73</sup> werden als solche Reagenzien, Wegwerfartikel und Material, Umweltfaktoren (z.B. Luft oder Labortische) und insuffiziente Kommunikation beschrieben. All diese Faktoren einschließend sollten Richtlinien und Standards verfasst werden, die Kontaminationen seltener und eine schnelleren Aufdeckung von Kontaminationen einfacher machen.

---

<sup>73</sup> Borst A, Box A T A, Fluit A C (2004) False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: Suggestions for a prevent and destroy strategy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23: 289-299

## 6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, durch Kombination verschiedener Methoden ein Verfahren zu entwickeln, das zur Täteridentifizierung deutlich besser geeignet ist als die bisher angewendeten Methodenkombinationen.

Die Ergebnisse sind durch eine Gegenüberstellung verschiedener Spurensicherungs- und Extraktionstechniken sowie Analysemethoden erzielt worden.

Bei der Spurensicherung muss immer das Material des Spurenträgers berücksichtigt werden, um eine Entscheidung für die richtige Sicherungstechnik zu treffen. Es muss aber auch berücksichtigt werden, dass der DNA-Gehalt der Proben durch Behandlung mit Reagenzien und Materialien, die der Sichtbarmachung von Spuren dienen, gesenkt werden kann, wodurch eine Täteridentifizierung anhand von DNA-Merkmalen erschwert oder unmöglich gemacht wird.

Die Extraktionstechnik QIAamp® DNA Mini Kit/ QIAshredder™ hat in allen Fällen die besten Ergebnisse erbracht, kann also in Spurenfällen wie den beschriebenen oder ähnlich gearteten Fällen benutzt werden.

Durch die der Amplifikation und Typisierung vorgelagerte quantitative Bestimmung des DNA-Gehalts der Proben mittels Real-time-PCR kann eine Strategie für die qualitative Analyse der Proben entwickelt werden.

Für die qualitative Analyse minimaler DNA-Spuren hat sich eine Kombination aus dem Multiplex-System Argus S<sup>QS</sup> und den Singleplex-Systemen D18S51 und SE33 als praktikabel erwiesen. Es müssen aber noch weitere Systeme bestimmt werden, um ein vollständiges genetisches Täterprofil erstellen zu können.

Die Steigerung der Sensitivität der DNA-Detektion, der DNA-Ausbeute bei der Extraktion und die Senkung der DNA-Degradation bei der Sicherung der Spuren sollten weiterhin forciert werden.

## 7. Anhang: Tabelle 4.2.1

	System wurde nicht bestimmt
-	Allel konnte nicht detektiert werden
(x);y	Allel x ist deutlich kleiner, als Allel y
[x]	Peakhöhe ist nur knapp 100 RFU
xyz	hier liegt wahrscheinlich ein Fehler bei der RT-PCR oder der PCR vor

Tabelle 4.2.1

ng/5 µl	D8S1179	TH01	D3S1358	D18S51	SE33	D21S11	vWA	FGA
14,9	12;15	6;9	15;16					
8,4	11;16	7;9.3	15;16					
6	11;14	9;9.3	15;16	12	14;15			
5,92	13;14	6;8	15;16	15;17	18;28.2			
5,45	13	7;9.3	14;16	14;18	19;27.2			
4,86	11;14	9;9.3	15;16	12	14;15			
4,29	8;14	6;9	16;17	13;18	18;30.2			
3,81	11;14	9;9.3	15;16					
3,32	12;13	6;9	16	13;16	26.2;29.2			
2,78	13	7;9.3	14;16	14;18	-			
2,41	13;14	(6);9.3	14;15	13	19;28.2			
1,88	13	7;9.3	14;16					
1,55	13;14	6;8	17					
1,27	8;14	6;9	16;17	13;18	18;30.2			
1,23	11;14	6;8	15;16					
1,12	12;15	6;9.2	15;16	17;19	18;28.2			
1,01	12;13	6;9	16	13;16	26.2;29.2			
0,952	11;15	8;9.3	14					
0,927	13;14	8;9.3	16;18					
0,731	11;14	6;8	15;16	13;17	20;30.2			
0,704	12;13	8;9	16					
0,681	8;14	6;9	16	13;18	18;30.2			
0,585	13	7;9.3	14;16	14;18	19;27.2			
0,584	13	9.3	14;17	14	17;28.2			
0,542	13	9.3	14;17	14	-			
0,518	9;14	6;8	16;18	14;20	19;28.2			
0,472	12	7	12;14	35	17;22	30;32	(15);16	23;28
0,412	11;14	9;9.3	15;16	12	-			
0,384	9;14	6;8	16;18	14;20	19;28.2			
0,369	12	7	12;14	35	17;22	30;32	15;16	23;28
0,355	12	7	12;14	35	17;22	30;32	15;16	23;28
0,348	12;13	8;9	16	13;16	26.2;29.2			

0,335	9;14	6;8	16;18	14;20	19;28.2			
0,335	12;15	6;9.3	15;16	17;19	18;28.2			
0,307	-	9;9.3	(15);16	12	-			
0,299	12;15	6;9.2	15;16	17;19	-			
0,285	13	9.3	14;17					
0,292	13	9.3	14;17	14	17;(28.2)			
0,246	12	7	12;14	35	17;22	30;32	15;16	23;28
0,245	12	7	12;14	35	17;22	[30];32	15;16	28
0,243	11;14	6;8	15;16	13;17	20;30.2			
0,23	12	7	12;14	35	(17);22	30;32	15;16	23
0,193	9;14	6;8	16;18	14;20	19;28.2			
0,175	12	7	12;14	35	17;22	30;32	15;16	23;28
0,172	-	-	-	-	-			
0,164	11;14	6;8	15;16	13;17	20;30.2			
0,152	12	7	12;14	35	17;22	30;32	15;16	23;28
0,151	12	7	12;14	35	17;22	30;32	15;16	23;28
0,149	-	8	-	13	29.2,			
0,144	(12);-	7	(12);14	35	17;22	30	15;16	23;28
0,135	-	7	(12);14	35	17;22	32	15;16	23;28
0,134	12;15	6;-	15;16	17;19	18;28.2			
0,133	8;14	6;9	16	13;18	18;30.2			
0,129	(8);14	6;9	16	13;18	18;30.2			
0,109	11;14	6;8	15;16	13;17				
0,104	-	7	(12);14	35	17;22	30	15;16	23;28
0,103	11;14	9;9.3	15;16	12	-			
0,0964	8;14	6;9.2	16	13;18	18;30.2			
0,0893	-	-	-	-	-			
0,089	12	7	-	35	-	32	15;16	-
0,0881	14	6;9	16	13;18	18;30.2			
0,0835	(9);-	6;-	-	14	28,2			
0,0805	12	7	14	35	22	30	-	23
0,0762	12	-	-	35	17;-	-	15;16	28
0,079	12	7	12;14	35	17;2	32	15;16	23;(28)
0,0573	-	6;8	16;18	14;20	19;28.2			
0,0476	-	7	(12);14	35	17;22	32	15;16	23;28
0,0443	9;-	-;8	16;-	-	19;28.2			
0,0401	12	7	12	35	-	32	15;16	23;28
0,0399	-	6;8	-	20	-			
0,0373	-	-	-	-	-			
0,0342	-	6;8	-	14;20	19;28.2			
0,0335	-	8	-	13	-			
0,0291	-	6;8	-	-	-			
0,0267	-	-	-	-	-			
0,0239	-	8	-	-	-			

0,0209	-(14)	6;8	16;-	-	-			
0,02	-	-	[14]	[35]	[17]	-	15;16	23;28
0,0171	-	-	-	13;18	18			
0,0132	-	-	-	13	-			
0,0131	-	8	16		-			
0,0127	-	9	-	-	-			
0,0107	12	8	16	[13]	-			
0,0067	-	6;9	16	-	-			
0,00593	-	-	-	18	-			
0,00332	13	9.3	16	-	-			
0,00295	-	-	-	13;18	-			
0,00103	-	-	-	-	-			
0,00098	-	-	[15];16	-	-			
0,000025	14	-	-	-	-			
0,0000067	-	6;[9]	-	-	-			
0	12	7	12;14	35	-	30;32	[15]	23;28
0	-	-	-	-	-			
0	-	-	-	16	-			

## 8. Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AE	Tris-Cl <sup>+</sup> EDTA (Elutionspuffer)
AMEL	Amelogenin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser (a.d.)
BSA	Bovine Serum Albumin
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
CCD	Charge Coupled Device
CP	Crossing Point
DI	Diskriminationsindex
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETOH	Ethanol
g	Gramm
G	Guanin
hnRNA	heterogenous nuclear RNA
ISFH	International Society of Forensic Haemogenetics
ISFG	International Society of Forensic Genetics
JOE	6-Carboxy- 4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein
l	Liter
LCN	Low-Copy Number
LKA	Landeskriminalamt
LR	Lenkrad
m	Milli- ( $10^{-3}$ )
μ	Mikro- ( $10^{-6}$ )
n	Nano- ( $10^{-9}$ )
p	Pico- ( $10^{-12}$ )
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	Potentia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Konzentration)
POP	Performance Optimized Polymer
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	rotations per minute
SD	Standardabweichung
SE	Standardfehler
SK	Schaltknauf
Soko	Sonderkommission
SSR	Simple Sequence Repeats

StPO	Strafprozessordnung
STR	Short Tandem Repeats
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tris-EDTA
Tm	Hybridisierungstemperatur der Primer
uwP	unbekannte Weibliche Person
VNTR	Variable number of tandem repeats

## 9. Alphabetisches Literaturverzeichnis:

**Alessandrini F, Cecati M, Pesaresi M, Turchi C, Carle D, Tagliabarracci A** (2003) Fingerprints as evidence for a genetic profile: Morphological study on fingerprints and analysis of exogenous and individual factors affecting DNA typing. *Journal of forensic Science* 48: 586-592.

**Alonso A, Martín P, Albarrán C, García O, de Simón LF, García-Hirschfeld J, Sancho M, de la Rúa C, Fernández-Piqueras J** (2004) Real-Time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Science International* 139: 141-149.

**Balogh MK, Burger J, Bender K, Schneider PM, Alt KW** (2003) STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. *Forensic Science International* 137: 188-195.

**Bär W, Brinkmann B, Lincoln P, Mayr WR, Rossi U** (1994) DNA recommendations-1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems. *International Journal of legal Medicine* 107: 159-160.

**Bär W, Brinkmann B, Budowle B, Carracedo A, Gill P, Lincoln P, Mayr WR, Olaisen B** (1997) DNA recommendations: Further report of the DNA Commission of the ISFG regarding the use of short tandem repeat systems. *International Journal of legal Medicine* 110: 175-176.

**Barbar MD, McKeown, BJ, Parkin BH** (1996) Structural variation in the alleles of a short tandem repeat system at the human alpha fibrinogen locus. *International Journal of Legal Medicine* 108: 180-185.

**Borst A, Box A T A, Fluit A C** (2004) False-positive results and contamination in nucleic acid amplification assays: Suggestions for a prevent and destroy strategy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 23: 289–299

**Bright J-A, Petricevic SF** (2004) Recovery of trace DNA and its application to DNA profiling of shoe insoles. *Forensic Science International* 145: 7-12.

**Britten RJ, Kohne DE** (1968) Repeated Sequences in DNA. *Science* 161: 529-540.

**Butler JM, Ruitberg CM, Reeder DJ** (1997) Proceedings from the Eighth International Symposium on Human Identification, Madison, Wisconsin: Promega Corporation: 38-47.

**Butler JM, Shen Y, McCord B** (2003) The Development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *Journal of Forensic Science* 48 (5): 1054-64.

**Butler JM** (2005) Forensic DNA Typing: Biologie, technologie, and genetics of STR markers 2<sup>nd</sup> edn. Elsevier Academic Press Burlington London  
56  
473-496.

**Castella V, Dimo-Simonin N, Brandt-Casadevall C, Mangin P** (2006) Forensic evaluation of the QIAshredder/Qiaamp DNA extraktion prosedure. Forensic Science International 156: 70-73.

**Deutscher Bundestag Drucksache 16/13072** (18. 05. 2009) Antwort der Bundesregierung auf die Kleine Anfrage der Abgeordneten Jerzy Montag, Silke Stokar von Neuforn, Monika Lazar, weiterer Abgeordneter und der Fraktion BÜNDNIS 90/DIE GRÜNEN – Drucksache 16/12815 – Konsequenzen aus der „Phantom Panne“ für die DNA-Analyse-Datei.

**DNA IQTM System-** Small sample casework protocol, instruction for use of products DC6700 AND DC6701 Promega Corporation Madison, WI 53711- 5399 USA Revised 4/06.

**Findlay I, Taylor P, Quirke P, Frazier R, Urquhart A** (1997) DNA fingerprinting from single cells. Nature 389: 555-556.

**GEN- IAL First- DNA** Institut für angewandte Laboranalysen GMBH ALL- tissue DNA- Kit, Handbuch für DNA-Extraktionen(2003).

**Gill P, Sparkes R, Pinchin R, Clayton T, Whitaker J, Buckleton J** (1998) Interpreting simple STR mixtures using allelic peak areas. Forensic Science International 91: 41-53.

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

**Gill P, Foreman L, Buckleton JS, Triggs CM, Allen H** (2003) A comparison of adjustment Methods to test the robustness of an STR DNA database comprised of 24 European Populations. Forensic Science International 131: 184-196.

**Horsman KM, Hickey JA, Cotton RW, Landers JP, Maddox LO** (2006) Development of a human-specific Real-Time PCR assay for the simultaneous quantitation of total genomic and male DNA. Journal of Forensic Science 51/4: 758-765.

**Innenministerium Baden-Württemberg** Pressestelle Internet:  
<http://www.im.baden-wuerttemberg.de> Pressemitteilung 7. Juli 2009 DNA- Arbeitsmittel. Expertenkreis beim Innenministerium einigt sich auf zukunftsweisende Qualitätsstandards.

**International Human Genome Sequencing Consortium** (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome, Nature 409: 860-921.

**Jeffreys** AJ, Royle NJ, Thein SL (1985) Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314: 67-73.

**Jin** L, Zhong Y, Chakraborty R (1994) The exact numbers of possible microsatellite motifs. *American Journal of Human Genetics* 55: 582-583.

**Ladd** C, Adamowicz MS, Bourke MT, Scherzinger CA, Lee HC (1999) A systematic analysis of secondary DNA transfer. *Journal of Forensic Science* 44(6): 1270-1272.

**Landtag von Baden-Württemberg** (27. 03. 2009) Antrag der Abg. Reinhold Gall u. a. SPD und Stellungnahme des Innenministeriums. Einkauf von Untersuchungsutensilien zur Spurenanalyse nach Kriminalfällen. Drucksache 14 / 4259

**Light-Cycler 2.0 Handbook** (2006) Roche.

**Lodisch** H., Berk A., Zipursky S.L., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J.E.; *Molekulare Zellbiologie*; Spektrum Akademischer Verlag Gustav Fischer Heidelberg Berlin 2001; 4. Auflage  
233-234,  
330,  
1197,  
1190.

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

**Madea**, (2007) *Praxis Rechtsmedizin - Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung*- 2.Auflage Springer, Berlin Heidelberg New York: 486.

**Mannucci** A, Sullivan KN, Ivanov PL, Gill P (1994) Forensic application of rapid and quantitative sex test by amplification of the X-Y homologous gene Amelogenin. *International Journal of Legal Medicine* 106: 190-193.

**Mentype®Argus S<sup>QS</sup>** PCR-Amplifikation Kit Handbook; ©Biotyp AG Dezember 2004.

**Mentype®Nonaplex III** PCR-Amplifikation Kit Handbook; ©Biotyp AG Dezember 2004.

**Moretti** TR, Baumstark AL, Defenbaugh DA, Keyes KM, Smerick JB, Budowle B (2000) Validation of STR typing by capillary electrophoresis. *Journal of Forensic Science* 46: 647-660.

**Nicklas** JA, Buel E (2003) Development of an Alu-based, Real Time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. *Journal of Forensic Science* 48/5: 282-291.

**Oorschot** van RAH, Jones MK (1997) DNA fingerprints from fingerprints. *Nature* 378: 767.

**Polymeropoulos** MH, Rath DS, Xiao H, Merrill CR (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2). *Nucleic Acids Research*. 20(6):1432.

**Proff** C, Schmitt C, Schneider PM, Foerster G, Rothschild MA (2006) Experiments on the DNA contamination risk via latent fingerprint brushes. *International Congress Series* 1288: 601-603.

**PowerPlex® 16 and PowerPlex® ES** Monoplex systems technical bulletin No.D017 Promega Corporation 8/03.

**Puers** C, Hammond HA, Jin L, Caskey CT, Schumm JW (1993) Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01[AATG]<sub>n</sub> and reassignment of alleles in population analysis by using a locus specific allelic ladder. *American Journal of Human Genetics* 53: 953-958.

**QIAamp®DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit Handbook** QIAGEN 02/2003.

**QuantiTect SYBR Green PCR Handbook** 11/2005

**Roche Light-Cycler 2.0 Handbook**

**Ruitberg** CM, Reeder DJ, Butler JM (2001) STRBase: A short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Research* 29: 320-322.

**Shaw** K, Sesardić I, Bristol N, Ames C, Dagnall K, Ellis C, Whittaker F, Daniel B (2008) Comparison of the effects of sterilisation techniques on subsequent DNA profiling. *International Journal of Legal Medicine*. 2008 Jan;122(1):29-33.

**Schneider** PM (2007) Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Science International* 165: 238-243.

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

**Sinclair** K, McKechnie VM (2004) DNA extraction from Stamps and envelope flaps using QIAamp and QIAshredder, *Journal of Forensic Science*.45: 229-230.

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

**Tariverdian W, Buselmaier G (2004)** *Humangenetik*; Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 3.Aufl: 179, 404-105.

**Tringali G, Barbaro A, Insirello E, Cormaci P, Roccazzello AM (2004)** Rapid and efficacious Real-Time quantitative PCR assay for quantization of human DNA in forensic samples. *Forensic Science International* 1468: 177-181.

**Urquhart A, Kimpton CP, Gill P (1993)** Sequence variability of the tetranucleotide repeat of the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2) locus. *Human Genetics* 92: 554-562.

**Urquhart A, Kimpton CP, Downes TJ, Gill P (1994)** Variation in short tandem repeat sequences - a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *International Journal of legal Medicine* 107: 13-20.

**Wiegand P, Klein R, Braunschweiger G, Hoff C, Brinkmann B (2006)** Short amplicon STR multiplex for stain typing, *International Journal of Legal Medicine*. 120(3): 160-164.

**Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991)** Chelex 100 as a medium for simple extractions of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10: 506-513.

**Wambaugh J (1989)** *The Blooding - The true story of the Narborough Village Murder*. Bantam Books New York.

**Whitaker JP, Clayton TM, Urquhart AJ, Millican ES, Downes TJ, Kimpton CP, Gill P (1995)** Short tandem repeat typing of bodies from a mass disaster: high success rate and characteristic amplification patterns in highly degraded samples. *Bio Techniques* 18: 670-677.

**Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F (2004)** Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Research* 32 (12): e103.

### **Internetquellen:**

**Butler JM, Reeder DJ, (1997)** Short tandem repeat DNA internet database  
Online im Internet:  
<http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase>  
(Stand 20.02.2007).

**Howitt T. 2003;** Ensuring the integrity of results: A continuing challenge in forensic DNA analysis.  
Online im Internet:  
<http://www.promega.com/geneticidproc/ussymp14proc/oralpresentations/Howitt.pdf>  
(Stand 20.04.2007).

**Innenministerium Baden-Württemberg (2009)** Weiter Wirbel um Wattestäbchen – DNA-Freiheit zeitweise garantiert  
Online im Internet:  
[http://www.innenministerium.baden-wuerttemberg.de/de/Meldungen/206276.html?\\_min=\\_im&template=min\\_meldung\\_html&referer=82713](http://www.innenministerium.baden-wuerttemberg.de/de/Meldungen/206276.html?_min=_im&template=min_meldung_html&referer=82713)  
(Stand: 9.12.09)

### **Promega**

Online im Internet:  
[http://www.promega.com/techserv/apps/hmnid/referenceinformation/popstat/custat\\_Allelefreq.htm](http://www.promega.com/techserv/apps/hmnid/referenceinformation/popstat/custat_Allelefreq.htm)  
(Stand 20.04.2008)

**Subramanian S, Mishra RK, Singh L (2003)** Genome-wide analysis of microsatellite repeats in humans: their abundance and density in specific genomic regions. *Genome Biology*, 4: R13  
Online im Internet:  
<http://genomebiology.com/2003/4/2/R13>  
(Stand: 20.02.2007).

### **Bildnachweis:**

Abb.1:  
Roche Light-Cycler 2.0 Handbook

## 10. Danksagungen

Hiermit möchte ich allen danken, die an der Entstehung meiner Doktorarbeit beteiligt waren.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Klaus Püschel für sein Interesse an dieser Arbeit und die Übernahme des Promotionsverfahrens und an Frau Dr. rer. nat. Christa Augustin, die meine Arbeit betreut hat und für Erklärungen, Anleitung und Korrekturlesen sehr viel Zeit aufgebracht hat.

Für die Möglichkeit den Light Cyclor zu benutzen, möchte ich mich beim Institut für Anatomie des UKE bedanken.

Ein weiterer Dank geht an die Spurensicherung der Polizei Bremerhaven für das zur Verfügung gestellte Material.

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Beck-Bornholdt danke ich für die Anleitung und Betreuung während des Schreibens.

Allen Probanden bin ich für die Bereitstellung ihrer Autos, Handys, Fingerabdrücke und Wangenschleimhautepithelien zu großem Dank verpflichtet.

Weiterhin bedanke ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre vielfältige Unterstützung und stetige Ermutigung.

Vielen Dank!

## **12.EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Verfügung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, den 08.02.2010

Nora Franke