

Fachbereich Biologie

**Anwendung moderner Methoden der forensischen Molekulargenetik
bei Mutationen in der Abstammungsbegutachtung und
spurenkundlichen Fragestellungen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

vorgelegt von

Miriam Müller

aus Nordhorn

-2009-

Dekan: Professor Dr. rer. nat. Christian Klämbt

Erster Gutachter: Professor Dr. rer. nat. Christian Klämbt

Zweiter Gutachter: Professor Dr. med. Dr. h.c. Bernd Brinkmann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2009

Tag der Promotion: 24.04.2009

**Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit**

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung.....	1
1.1 Mikrosatelliten.....	1
1.1.1 Genese.....	2
1.1.2 Mutationsraten.....	4
1.1.3 Funktion und Einsatz.....	5
1.2 DNA-Polymorphismen	5
1.3 Genetischer Fingerabdruck.....	7
1.3.1 Entdeckung, Technik und Anwendung	7
1.3.2 Die STR-Systeme D3S1358, FGA, ACTBP2 und VWA	10
1.4 Forensische Molekulargenetik	14
1.4.1 Abstammungsbegutachtung.....	15
1.4.1.1 Durchführung der Abstammungsbegutachtung.....	15
1.4.1.2 Mutationen in Abstammungsfällen	16
1.4.2 Spurenkunde und Identifizierung.....	18
1.4.2.1 Spurenkundliche Untersuchungen	18
1.4.2.2 Differenzierung der Spuren.....	19
2 Ziele der Arbeit.....	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Chemikalien.....	23
3.1.2 Geräte	24
3.1.3 Lösungen und Puffer	26
3.1.4 Gebrauchswaren.....	29
3.1.5 Enzyme	30
3.1.6 Fertige Reaktionssysteme (Kits).....	30
3.1.7 Fluoreszenzfarbstoffe.....	31
3.1.8 Synthetische Oligonukleotide	31

3.1.9	Herkunft der Proben	35
3.1.10	GenBank und andere Internetquellen.....	36
3.2	Methoden.....	37
3.2.1	Blutvortest nach Kastle-Meyer.....	37
3.2.2	Lasermikrodissektion (LMD).....	38
3.2.2.1	Herstellung von Chromosomenpräparaten für die Lasermikrodissektion	38
3.2.2.2	Herstellung von Gewebeschnitten für die Lasermikrodissektion	39
3.2.2.3	Durchführung der Lasermikrodissektion.....	39
3.2.3	Abriebe	41
3.2.3.1	Anlegen der standardisierten Abriebspuren	41
3.2.3.2	Durchführung der Abriebe.....	42
3.2.4	Präparation von Nukleinsäuren	44
3.2.4.1	Extraktion genomischer DNA aus getrockneten Blutflecken, Speichelproben und Abrieben	44
3.2.4.2	Extraktion genomischer DNA aus lasermikrodisseziertem Gewebe mittels QIAamp® DNA Micro Kit	45
3.2.4.3	Aufreinigung und Aufkonzentration der DNA- Extrakte.....	45
3.2.5	Quantifizierung genomischer DNA mittels Quantifiler® Human DNA Quantification Kit	46
3.2.6	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	46
3.2.7	Elektrophoretetechniken.....	50
3.2.7.1	Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	50
3.2.7.2	Kapillargelelektrophorese.....	52
3.2.8	Klonierung von PCR-Amplikonen mittels TA-Klonierung.....	53
3.2.9	Quantifizierung von Plasmid-DNA mittels UV/VIS- Spektrometer.....	54
3.2.10	Sequenzanalyse.....	55

4	Ergebnisse – Mutationen in der Abstammungsbegutachtung	57
4.1	Flankierende Marker als Werkzeug zur Charakterisierung von STR-Mutationen.....	57
4.1.1	Zwei ungewöhnliche Fallkonstellationen	65
4.1.2	Multiplex-PCR mit flankierenden Markern	67
4.1.3	Anwendung der Multiplex-PCR und der Lasermikrodissektion auf Einzelchromosomen	69
4.2	Primerbindungsstellenmutation im STR-System FGA	74
5	Ergebnisse – Spurenkunde	83
5.1	Optimierung von Abrieben	83
5.1.1	Befeuchtungsmittel.....	85
5.1.2	Beschichtungen.....	88
5.1.3	Wiederfindungsrate	91
5.1.4	Einfluss der Lagerungsdauer auf Abriebspuren	93
5.2	Ergebnisse der spurenkundlichen Untersuchungen einer Stechhilfe zur Blutentnahme.....	95
5.3	Ergebnisse zur Bestimmung des Ursprungs eines Leberkarzinoms nach Organtransplantation.....	99
6	Diskussion	105
6.1	Mutationen in der Abstammungsbegutachtung	105
6.1.1	Mutationscharakterisierung mithilfe flankierender Marker	105
6.1.2	Anwendung der flankierenden Marker auf Einzelzellen bzw. Einzelchromosomen.....	112
6.1.3	Primerbindungsstellenmutation im STR-System FGA.....	116
6.2	Spurenkundliche Fragestellungen	119
6.2.1	Optimierung von Abrieben.....	119
6.2.2	Spezielle Anwendungen spurenkundlicher Techniken	123
6.2.2.1	Stechhilfe zur Blutentnahme	123
6.2.2.2	Bestimmung des Ursprungs eines Leberkarzinoms nach Organtransplantation.....	124
7	Zusammenfassung	128
8	Literaturverzeichnis	130

9	Anhang	144
9.1	Mutationsraten für die vier STR-Systeme	144
9.2	123-bp-Ladder	144
9.3	Sequenzen der STR-Systeme ApoA11 und ACTBP2 des Ausschlussfalls	145
9.4	Übersicht über die untersuchten STR-Loci im Ausschlussfall.....	146
9.5	Informationen über die ausgewählten flankierenden Marker von D3S1358, FGA, ACTBP2 und VWA	147
9.6	Verwendete Allelbezeichnungen für die flankierenden Marker	148
9.7	Systembezogene Übersicht über die eingesetzten Methoden zur Mutationscharakterisierung.....	157
9.8	Familien-bezogene Stammbäume aus der Haplotypen-Analyse	158
9.9	Zwei besondere Fallkonstellationen.....	211
9.10	Charakterisierung der 103 mittels Haplotypen-Analyse untersuchten Mutationen	212
9.11	Normalisierte Werte der 16 Beschichtungen mit Wasser und SDS 1% nach kapillargelelektrophoretischer Analyse	213
9.12	Wiederfindungsrate der jeweiligen Befeuchtungsmittel und Befeuchtungsmittel-Beschichtungskombinationen bezogen auf den Mittelwert der Quantifizierungen	214
9.13	Elektropherogramm des manuell präparierten Tumorbereichs.....	215

Danksagung

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Mechanismus des <i>slipped strand mispairing</i>	3
Abbildung 1.2	Mechanismus des <i>unequal crossing over</i> bzw. des <i>unequal sister chromatid exchange</i>	4
Abbildung 1.3	Elektropherogramm eines typischen DNA-Profiles mit Bezeichnungen der 12 untersuchten DNA-Systeme	9
Abbildung 1.4	Häufige Sequenzvarianten des STR-Systems D3S1358	11
Abbildung 1.5	Häufige Sequenzvarianten des STR-Systems FGA.....	11
Abbildung 1.6	Sequenzvarianten des STR-Systems ACTBP2.....	12
Abbildung 1.7	Häufige Sequenzvarianten im STR-System VWA.....	13
Abbildung 1.8	Fallbeispiel einer Mutationscharakterisierung anhand des kleinstschrittigen ganzzahligen Mutationsereignisses bzw. einer nicht möglichen Mutationscharakterisierung	17
Abbildung 3.1	Verteilung der Zellen in der Mikrotiterplatte.....	35
Abbildung 3.2	Das Reaktionsprinzip des Kastle-Meyer-Blutvortests.....	37
Abbildung 3.3	Exemplarische Darstellung der Anwendung der Lasermikrodissektion.....	40
Abbildung 3.4	Kunstlederstück vor der Bearbeitung und Muster des Kunstleders	41
Abbildung 3.5	Durchführung der Abriebe	43
Abbildung 3.6	Prinzip der kapillargelelektrophoretischen Analyse	53
Abbildung 4.1	Prinzip der Charakterisierung von Mutationen anhand der familien-spezifischen Haplotypen	58
Abbildung 4.2	Beispiel eines Stammbaums mit den postulierten familien-spezifischen Haplotypen der Kategorie 1.....	60
Abbildung 4.3	Beispiel eines Stammbaums mit den postulierten familien-spezifischen Haplotypen der Kategorie 2.....	61
Abbildung 4.4	Beispiel eines Stammbaums mit den postulierten familien-spezifischen Haplotypen (Kategorie 3a).....	62

Abbildung 4.5	Beispiel eines Stammbaums mit den postulierten familien-spezifischen Haplotypen (Kategorie 3b).....	62
Abbildung 4.6	Mittels Haplotypen-Analyse detektierte Rekombination	63
Abbildung 4.7	Sequenzen der Allele von Kind, Mutter und Vater im Fall der ungeraden 15.3→15-Mutation im STR-System ACTBP2.....	66
Abbildung 4.8	Beispielhaftes Elektropherogramm der Multiplex-PCR für ACTBP2 und die fünf flankierenden Systeme	68
Abbildung 4.9	Metaphase im Mikroskop	70
Abbildung 4.10	Elektropherogramm der selbst entwickelten Multiplex mit 100 Zellen (~600pg)	72
Abbildung 4.11	Blauer Farbkanal des AmpFISTR® Profiler® PCR Amplification Kit mit drei STR-Systemen.....	75
Abbildung 4.12	Roter Farbkanal des AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit mit drei STR-Systemen.....	76
Abbildung 4.13	Gelber Farbkanal des genRES MPX-2 Kit mit drei STR-Systemen	76
Abbildung 4.14	Sequenzen der Allele von Mutter und Kind im STR-System FGA.....	78
Abbildung 4.15	Sequenzen der Allele von Vater und Kind im STR-System FGA	79
Abbildung 4.16	FGA-Allel 21.....	80
Abbildung 4.17	Exemplarische Elektropherogramme (blauer Kanal) des AmpFISTR® Profiler® PCR Amplification Kit.....	81
Abbildung 5.1	Normalisierte Werte für die 12 Befeuchtungsmittel	86
Abbildung 5.2	Normalisierte Werte der fünf Befeuchtungsmittel nach kapillargelelektrophoretischer Analyse	87
Abbildung 5.3	Normalisierte Werte der fünf Befeuchtungsmittel nach Doppelbestimmung des Zellkern-DNA-Gehalts.....	87
Abbildung 5.4	Normalisierte Werte der 16 Beschichtungen mit Wasser nach Doppelbestimmung des Zellkern-DNA-Gehalts.....	89

Abbildung 5.5	Normalisierte Werte der 16 Beschichtungen mit SDS nach Doppelbestimmung des Zellkern-DNA-Gehalts.....	90
Abbildung 5.6	Wiederfindungsrate der jeweiligen Befeuchtungsmittel auf Baumwolltupfern	92
Abbildung 5.7	Durchschnittlicher Zellkern-DNA-Gehalt der mit Wasser und der mit SDS 1% durchgeführten Abriebe an vier Zeitpunkten.....	93
Abbildung 5.8	Vorder- und Rückansicht der Stechhilfe.....	96
Abbildung 5.9	Aufsicht auf das Gerät und auf die Schutzkappe, Metaldisk mit Lanzetten und Innenansicht der rückseitigen Gehäuseklappe	97
Abbildung 5.10	Exemplarisches Elektropherogramm einer LMD-Probe	102
Abbildung 5.11	Elektropherogramm einer LMD-Probe mit zufällig ausgewähltem Gewebe.....	103
Abbildung 6.1	Mikrofasertuch (200x vergrößert)	121

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Hauptklassen von tandemartig wiederholter DNA beim Menschen.....	1
Tabelle 3.1	Fluoreszenzfarbstoffe für die Kapillargelelektrophorese.....	31
Tabelle 3.2	Primer zur Amplifizierung der STR-Systeme ACTBP2, FGA und DXS6800.....	32
Tabelle 3.3	Primer zur Amplifizierung der flankierenden Marker von D3S1358	33
Tabelle 3.4	Primer zur Amplifizierung der flankierenden Marker von FGA	33
Tabelle 3.5	Primer zur Amplifizierung der flankierenden Marker von ACTBP2	34
Tabelle 3.6	Primer zur Amplifizierung der flankierenden Marker von VWA.....	34
Tabelle 3.7	Universalprimer zur Sequenzanalyse.....	35
Tabelle 3.8	Übersicht über die getesteten Befeuchtungsmittel und Beschichtungen.....	42
Tabelle 3.9	Zusammensetzung der Mastermixe für die PCR.....	47
Tabelle 3.10	Zusammensetzung der Primer-Mixe für die Multiplex-PCR der flankierenden Systeme von ACTBP2	47
Tabelle 3.11	Zusammensetzung der Mastermixe für die Multiplex-PCR der flankierenden Marker von ACTBP2.....	48
Tabelle 3.12	Amplifizierungsbedingungen der PCR-Ansätze mit unmarkierten und fluoreszenz-markierten Primern	48
Tabelle 3.13	Amplifizierungsbedingungen der PCR-Ansätze für die flankierenden Marker.....	49
Tabelle 3.14	Rezepte für das Kontroll- und das Trenngel.....	50
Tabelle 4.1	Ergebnisse der Haplotypen-Analyse (Anzahl der Mutationen)	64
Tabelle 5.1	Die 11 getesteten Befeuchtungen für Abriebspuren im Vergleich zu Wasser	84
Tabelle 5.2	Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen.....	84

Tabelle 5.3	Die 16 getesteten Beschichtungen für Abriebspuren	88
Tabelle 5.4	Gehalt an Zellkern-DNA in den LMD-Proben	100
Tabelle 5.5	DNA-Profile von Spenderin und Empfänger	101
Tabelle 6.1	Charakterisierung der untersuchten Mutationen	109

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
AgNO ₃	Silbernitrat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
Betain	Cocoamidopropyl Betain
bidest.	zweifach destilliert
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
BW	Baumwolle
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CE	Kapillargelelektrophorese
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
cM	Centimorgan
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
d	days (Tage)
DAD	DNA-Analyse Datei
dest.	destilliert
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
f	femto
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GTG	<i>G-bands by Trypsin using Giemsa</i>

h	Stunde
HiDi-Formamid	reines Formamid
HNO ₃	Salpetersäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HT	Haplotyp
i.d.R.	in der Regel
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactopyranosid
kbp	Kilobasenpaar(e)
KM	Kastle-Meyer
konz.	konzentriert
L	Liter
LIF	laserinduzierte Fluoreszenz
LMD	Lasermikrodissektion
M	mol pro Liter (mol/l)
Mbp	Megabasenpaar(e)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
μ	mikro
n	nano
Na	Natrium
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
o. g.	oben genannten
p	pico
PAA	Polyacrylamid
PAG	Polyacrylamidgel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
rfu	<i>relative fluorescence unit</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sec	Sekunde
Seq	Sequenzierung
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
sog.	sogenannt(e)
s.o.	siehe oben
SSM	<i>slipped strand mispairing</i>
SSR	<i>simple sequence repeat</i>
STR	<i>short tandem repeat</i>

T	Thymin
T _M	Schmelztemperatur
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit(s) (Einheit(en))
UEC	<i>unequal crossing over</i>
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
v/v	Volume per volume
w/v	Weight per volume
V	Volt
vgl.	vergleiche
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Mikrosatelliten

Das humane Genom besteht zu über 95% aus nicht-codierender DNA, der sogenannten ‚Junk‘-DNA, die übrigen 5% umfassen Gene (Bejerano et al. 2004). Etwa 2% des menschlichen Genoms bilden „aktiv“ Proteine zur Steuerung der Körperfunktionen, wobei in sog. ‚Hot Spots‘ zahlreiche besonders aktive Gene vorliegen (International Human Genome Sequencing Consortium 2004).

Mehr als ein Drittel der DNA (35,3%) besteht aus repetitiven Wiederholungseinheiten, in denen eine immer gleiche Abfolge von verschiedenen Basen wiederholt wird (Venter et al. 2001). Anhand der Größe der Sequenzabfolgen unterscheidet man Satelliten-DNA, Minisatelliten-DNA und Mikrosatelliten-DNA (s. Tab. 1.1). Mikrosatelliten-DNA liegt i.d.R. zwischen Genen oder im intragenen Bereich, nur selten kommt sie in codierenden Abschnitten eines Gens vor (Stallings et al. 1991; Strachan & Read 2005).

Tabelle 1.1 Hauptklassen von tandemartig wiederholter DNA beim Menschen (modifiziert nach: Strachan & Read 2005)

DNA-Klasse	Größe der Bereiche	Länge der Wiederholungseinheit	wichtige chromosomale Loci; Status der Transkription
Satelliten-DNA	100 kbp bis mehrere Mbp	5 -171 bp	besonders an Centromeren; nicht transkribiert
Minisatelliten-DNA	0,1 bis 20 kbp	9-64 bp	bei allen Chromosomen an den Telomeren oder in deren Nähe; überwiegend nicht transkribiert
Mikrosatelliten-DNA	~ 100 bp	1-10 bp	verstreut auf allen Chromosomen; einfache Sequenzwiederholungen

Mikrosatelliten-DNA, die synonym auch als *short tandem repeats* (STR) bezeichnet wird, sind kurze Folgen von tandemartigen Wiederholungseinheiten einer einfachen Sequenz. Sie machen etwa 0,5% des gesamten humanen Genoms aus (Cichon 2002). Anhand der Länge werden die Wiederholungseinheiten als Di-, Tri-, Tetra-

bzw. Pentanukleotide bezeichnet. Dinukleotidwiederholungen kommen dabei häufiger vor, während Tri- und Tetranukleotidwiederholungen seltener auftreten; sie erweisen sich häufig als hochpolymorph (Sheffield et al. 1995). Darüber hinaus wurden auch hochpolymorphe Mikrosatelliten mit einem Pentanukleotidmotiv beschrieben (Bacher & Schumm 1998).

Mikrosatelliten können anhand der Motive ihrer Wiederholungseinheiten unterteilt werden in perfekte Mikrosatelliten, z.B. (CT)₁₄, nicht perfekte Mikrosatelliten, z.B. (CT)₁₁GT(CT)₄, unterbrochene Mikrosatelliten, z.B. (CT)₁₁GGG(CT)₄ und zusammengesetzte Mikrosatelliten, z.B. (CT)₁₁(GAT)₆ (Goldstein & Schlotterer 1999).

1.1.1 Genese

Man nimmt an, dass die Mikrosatelliten im Verlauf der Evolution durch eine Replikationsverschiebung (auch: ‚*replication slippage*‘ oder ‚*slipped strand mispairing*‘) während der DNA-Replikation entstanden sind (Levinson & Gutman 1987a), wobei es zur Deletion oder Insertion einer Wiederholungseinheit kommt (s. Abb. 1.2).

I.d.R. werden die durch *replication slippage* entstandenen Fehler (= Mutationen) durch komplexe Reparaturmechanismen korrigiert, einige Mutationen entgehen jedoch den zahlreichen Mechanismen (Eisen & Hanawalt 1999). So entstehen Allele, die sich vom ursprünglichen Allel nur durch eine Wiederholungseinheit unterscheiden (Strachan & Read 2005).

Dieses Mutationsmodell gilt heute als Hauptmechanismus für die Entstehung von Mikrosatelliten (Levinson & Gutman 1987a; Morral et al. 1993; Brinkmann et al. 1998; Ellegren 2000a; Zhu et al. 2000; Klintschar et al. 2004).

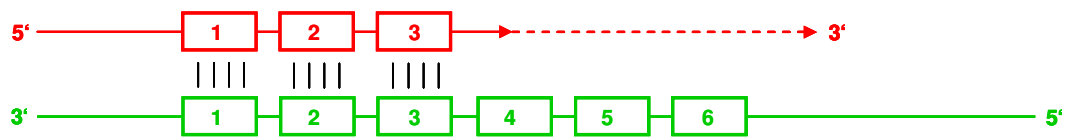
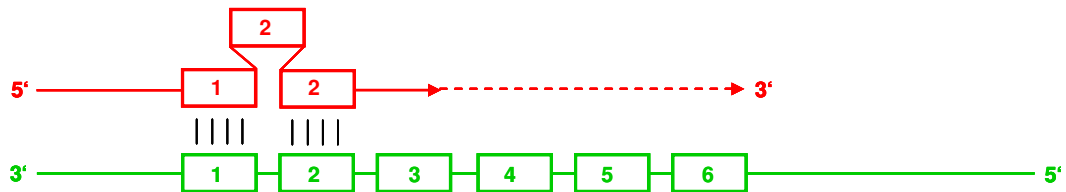
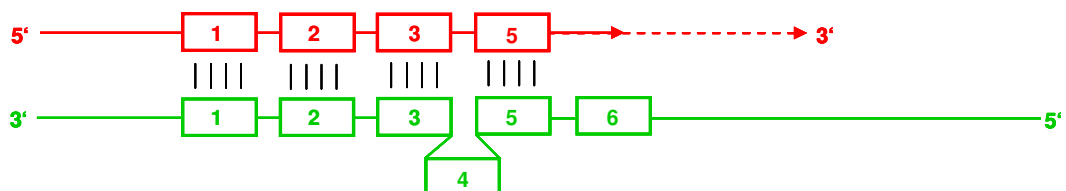
Normale Replikation**Rückwärtsverschiebung führt zu Insertion****Vorwärtsverschiebung führt zu Deletion**

Abbildung 1.1 Mechanismus des *slipped strand mispairing* (modifiziert nach Strachan & Read 2005)

Durch Aufwölbung des nichtgepaarten Bereichs, der eine (oder mehrere) Wiederholungseinheit(en) des neusynthetisierten (Insertion) oder des ursprünglichen (Deletion) DNA-Stranges enthält, kommt es zu einem mutierten Allel, das eine Wiederholungseinheit mehr oder weniger aufweist als das Ausgangsallel.

Insertionen werden in der forensischen Molekulargenetik als Gewinn- und Deletionen als Verlustmutationen bezeichnet; diese Begriffe werden daher in dieser Arbeit synonym verwendet.

Als weiteres Mutationsmodell zur Entstehung von Mikrosatelliten wird der Mechanismus des ungleichen Crossing-Overs (*unequal crossing over*; UEC) bzw. des ungleichen Austauschs zwischen Schwesterchromatiden (*unequal sister chromatid exchange*; UESCE) angenommen (s. Abb. 1.3) (Smith 1976; Harding et al. 1992).

Sie treten vor allem in Regionen des Genoms auf, in denen große Bereiche tandemartiger Wiederholungen vorliegen. Bedingt durch die starke Homologie zwischen den Wiederholungseinheiten ist eine inkorrekte Anlagerung zwischen nichtparallelen Wiederholungen der Nicht-Schwester- oder Schwesterchromatiden möglich. Die Chromatiden sind dabei um ein ganzzahliges Vielfaches der Wiederholungseinheit gegeneinander verschoben. Erfolgt nun ein Crossing-Over, kommt es zu einem reziproken

Sequenzaustausch, d.h. es kommt auf einem Chromatid zu einer Insertion und auf dem anderen zu einer Deletion derselben Länge (s. Abb. 1.3).

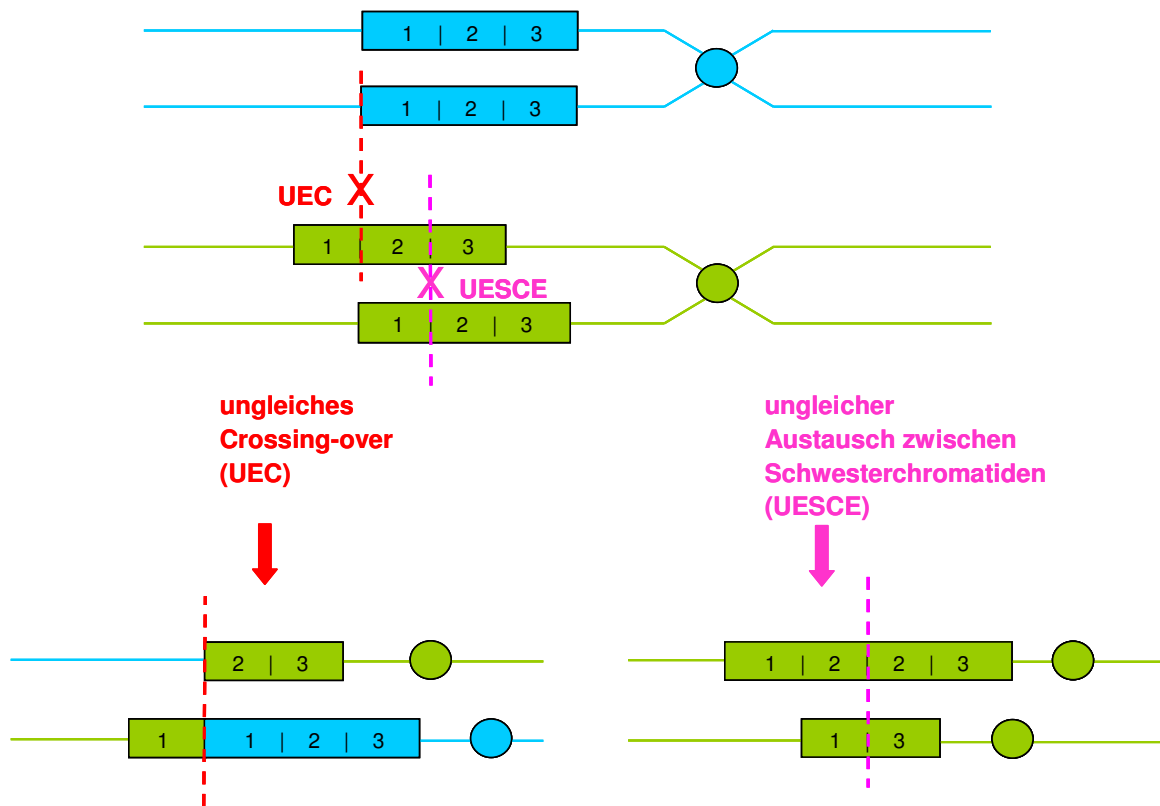


Abbildung 1.2 Mechanismus des *unequal crossing over* bzw. des *unequal sister chromatid exchange* (modifiziert nach Strachan & Read 2005)

Durch ungleiche Paarung von Schwester- oder Nicht-Schwesterchromatiden, Strangbrüchen und erneuter Verknüpfung kommt es zu mutierten Allelen mit anderen Anzahlen von Wiederholungseinheiten.

1.1.2 Mutationsraten

Mutationen treten innerhalb der STRs im Vergleich zu anderen „neutralen“ Regionen der DNA häufig auf. Dies ist zum einen bedingt durch ihre repetitive Struktur, die *replication slippage* während der Replikation begünstigt, und zum anderen dadurch, dass sie keinem Selektionsdruck unterliegen (Strachan & Read 2005). Die Mutationsraten von Mikrosatelliten-Loci liegen in der Größenordnung von 10^{-3} bis 10^{-5} pro Locus und Generation (Schlotterer 1998; Ellegren 2000a; Xu et al. 2000). Sie liegen somit bedeutend höher als die Mutationsrate von Basensubstitutionen, die etwa um den Faktor 100 bis 10.000 niedriger liegen.

Die Anzahl der Wiederholungseinheiten, das Wiederholungsmotiv, die Länge der Wiederholungseinheiten, die flankierenden Sequenzen und Unterbrechungen der Mikrosatelliten sind einige bedeutende Faktoren, die die Mutationsrate von Mikrosatelliten beeinflussen können (Schlotterer 1998; Bull et al. 1999).

1.1.3 Funktion und Einsatz

Die biologische Funktion der STRs ist bislang weitgehend ungeklärt (Strachan & Read 2005). Nichtsdestotrotz sind einige Funktionen der Mikrosatelliten beschrieben worden, u.a. ein Einwirken auf die Genregulation (Lu & Ferl 1993; Meloni et al. 1998; Akai et al. 1999; Kashi & Soller 1999; Albanese et al. 2001; Rothenburg et al. 2001), die homologe Rekombination (Wahls et al. 1990; Benet et al. 2000; Majewski & Ott 2000), die DNA-Replikation (Lapidot et al. 1989; Rao 1996) und die Zellteilung (Naveilhan et al. 1994). Weiterhin ist für einige Mikrosatelliten, insbesondere Trinukleotide, bekannt, dass sie zur Entwicklung bestimmter menschlicher Krankheiten (Myotonische Dystrophie, Chorea Huntington, Fragiles X-Syndrom) führen. Eine Expansion von Trinukleotiden wurde in elf Mikrosatelliten-Loci gefunden, von denen neun mit Krankheiten assoziiert sind (Hummerich & Lehrach 1995; Sutherland & Richards 1995; Freudenreich et al. 1997).

Mikrosatelliten sind darüber hinaus die hauptsächlichen Marker für die Genomkartierung, Elternschaftskontrollen und Populationsanalysen.

1.2 DNA-Polymorphismen

Als DNA-Polymorphismus bezeichnet man die Sequenzvariabilität von Allelen, wenn an einem bestimmten Locus in einer Population mehr als eine Variante (ein Allel) mit einer Häufigkeit von $\geq 1\%$ auftritt – das ist häufiger als sich allein durch das wiederholte Auftreten von Neumutationen erklären ließe (Krawczak 1999; Strachan & Read 2005).

Im Genom treten zwei Typen von DNA-Polymorphismen auf (Butler 2005):

- Längenpolymorphismus bezeichnet das Vorkommen einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungseinheiten an einem Genomort innerhalb von Individuen (STR);
- Sequenzpolymorphismus bezeichnet das Vorkommen unterschiedlicher Basen an einer bestimmten Stelle im Genom bei vielen Individuen (SNP).

Der Polymorphiegrad eines STR-Locus spiegelt die im Verlauf der Evolution stattgefundenen Mutationen wider.

Einzelnukleotidpolymorphismen (*„single nucleotide polymorphism“*; SNP) kommen noch häufiger als STRs vor (ca. 4 Millionen SNPs/Humangenom) und machen somit etwa 90% der interindividuellen genetischen Variabilität aus (Cichon 2002). Sie treten in nicht-codierenden Bereichen recht häufig auf, da sie innerhalb von Introns oder zwischen Genen liegen und ein Basenaustausch (Nukleotidsubstitution) bzw. Insertionen oder Deletionen (Indel-Polymorphismen) somit keinerlei Auswirkungen auf Genprodukte haben.

Im Gegensatz zu Mikrosatelliten sind SNPs biallelische Marker und haben somit einen geringen Einzelinformationsgehalt (Strachan & Read 2005). So liegt der Nachteil gegenüber hochpolymorphen STRs in der niedrigen Aussagekraft eines einzelnen SNPs, was allerdings mit einer höheren Anzahl eingesetzter SNPs kompensiert werden kann (Werner et al. 2004). Der Vorteil der SNPs gegenüber STRs liegt in ihrer großen Stabilität in der Laboranwendung sowie ihrer Beständigkeit in der Vererbung (Krawczak 1999; Sobrino et al. 2005).

Zudem mutieren SNPs etwa 100- bis 10.000-mal langsamer als STRs, sind also über längere Zeiträume stabil als STRs. Daher sind Mikrosatelliten geeignet, um Evolutionsabläufe über einen Zeitraum von einigen hundert bis einigen tausend Jahren zu erforschen, während SNPs für evolutive Zeitspannen von mehreren Millionen Jahren genutzt werden können.

In der Humangenetik haben sich SNPs als sehr geeignete Hilfsmittel für Assoziationsstudien erwiesen (Strachan & Read 2005) und werden vermehrt zur Identifizierung von Genen verwendet, die komplexen multifaktoriellen Krankheitsbildern zugrunde liegen (Gray et al. 2000).

Der genetische Fingerabdruck wird über die Analyse von Längenpolymorphismen verschiedener STR-Loci bestimmt.

1.3 Genetischer Fingerabdruck

1.3.1 Entdeckung, Technik und Anwendung

Die erste Beschreibung des genetischen Fingerabdrucks (= DNA-Profil) erfolgte von Jeffreys und Mitarbeitern (1985), die entdeckten, dass bestimmte repetitive Bereiche der DNA sich individuell unterscheiden und somit eine Unterscheidung von Personen ermöglichen. Im Rahmen einer Abstammungsbegutachtung kam der genetische Fingerabdruck im selben Jahr erstmals zur Anwendung. Tautz (1989) zeigte, dass der genetische Fingerabdruck auch aus Mikrosatelliten bestimmt werden kann, da die Anzahl der Repeateinheiten innerhalb eines Mikrosatelliten-Locus bei verschiedenen Individuen variiert. Seit Mitte der 90er Jahre werden die STRs zur Abstammungsbegutachtung beim Menschen verwendet (Alford et al. 1994).

Venter et al. (2001) beschrieben, dass alle Menschen zu 99,99% identische Erbanlagen tragen; die 0,01% individueller genetischer Unterschied, z.B. durch die unterschiedliche Anzahl der Wiederholungseinheiten in den STRs oder durch SNPs, werden zu einem Bruchteil zur Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks verwendet.

Als genetischer Fingerabdruck wird ein DNA-Profil eines Individuums (s. Abb. 1.4) bezeichnet, das für dieses in hohem Maße charakteristisch ist. Dazu werden derzeit acht bis 15 STR-Loci untersucht, die unabhängig voneinander kodominant gemäß den Mendelschen Regeln vererbt werden. Dabei wird die Anzahl der Wiederholungseinheiten an diesen Loci auf beiden vorliegenden Chromosomen bestimmt und zur Allelbezeichnung verwendet (Bär et al. 1994; Bär et al. 1997).

Die Typisierung kann mittels PCR erfolgen, da die flankierenden Bereiche hochkonserviert und größtenteils humanspezifisch sind, während die Anzahl der Wiederholungseinheiten variabel und individualspezifisch ist und somit die Unterscheidung von Personen möglich macht (Roewer & Epplen 1992; Urquhart et al. 1994; Benecke 1997). Hier wird allerdings auch eine Limitierung der Methode deutlich: Punktmutationen in primerbindenden Bereichen können zur präferenziellen Amplifikation nur eines Allels (*allelic imbalance*) oder sogar zum Ausfall eines Allels („stummes Allel“,

„Null-Allel“) nach der kapillargelelektrophoretischen Analyse führen (Primmer et al. 1995; Jarne & Lagoda 1996; Dakin & Avise 2004; Heinrich et al. 2004; Dauber et al. 2006; Ricci et al. 2007; Vanderheyden et al. 2007). Da in einem solchen Fall nur das Allel amplifiziert wird, welches keine Punktmutation aufweist, erhält man für dieses STR-System ein falsch-homozygotes Ergebnis (*„false homozygosity“*).

Ein Individuum wird für ein STR-System als „homozygot“ bezeichnet, wenn es auf beiden Chromosomen dieselbe Anzahl von Wiederholungseinheiten aufweist, während „heterozygot“ das Auftreten einer unterschiedlichen Anzahl von Wiederholungseinheiten für dieses System bezeichnet (Butler 2005).

Die zur Erstellung eines genetischen Fingerabdrucks verwendeten STRs müssen folgende Voraussetzungen erfüllen, um effektiv im Rahmen forensisch-medizinischer Fragestellungen verwendet werden zu können:

- relativ stabile Polymorphismen mit Mutationsraten in einer Größenordnung von etwa 10^{-3} (Brinkmann et al. 1998; Dauber et al. 2003; Hohoff et al. 2006; Hohoff et al. 2009)
- eine breite chromosomale Verteilung
- kurze Sequenzlängen (bis 400 bp)
- hohe Heterozygotie-Raten
- einheitliche Repeatmotive und
- Kompatibilität mit Multiplex-PCRs,

um so das eindeutige und verlässliche Erkennen von Allelen zu ermöglichen (Sajantila et al. 1999; Moretti et al. 2001b; Rowold & Herrera 2003). Zudem reichen wenige vorliegende DNA-Moleküle aus, um mittels PCR aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen (Queller et al. 1993) (vgl. Abschnitt 1.4.2). Es wurden im Wesentlichen STRs mit einem Tetranukleotidmotiv ausgewählt, da diese häufig hochpolymorph auftreten (Edwards et al. 1992; Wiegand et al. 1993; Kimpton et al. 1996) und außerdem, im Vergleich zu STRs mit Dinukleotidmotiv, eine geringere Anfälligkeit für PCR-Artefakte, v.a. für sog. *„Stutterpeaks“*, zeigen (Butler 2005), die die Interpretation der Ergebnisse unter Umständen erschweren könnten.

Weiterhin liegen die STR-Systeme, die zur Erstellung von DNA-Profilen genutzt werden, zumeist in nicht-codierenden Bereichen des Genoms und unterliegen daher keinem evolutiven Druck. Als Folge daraus werden sie seit Millionen von Jahren

stabil vererbt und bieten sich somit als geeignete Objekte sowohl für die Abstammungsbegutachtung, als auch für die Evolutionsforschung an.

Im Gegensatz zu anderen DNA-Analysen, die durchaus Rückschlüsse z.B. auf Prädispositionen für Krankheiten des Individuums zulassen, können anhand des DNA-Profiles keine Eigenschaften des Individuums abgeleitet werden. Nur über den Locus Amelogenin (Sullivan et al. 1993; Mannucci et al. 1994) wird das Geschlecht bestimmt (in deutschen Strafverfahren zulässig seit 2005). Bestimmte Abweichungen in der Anzahl der Chromosomen, wie z.B. beim Down-Syndrom (Trisomie 21), werden ebenfalls als Verdachtsdiagnosen offenbart, die einer cytogenetischen Bestätigung bedürfen.

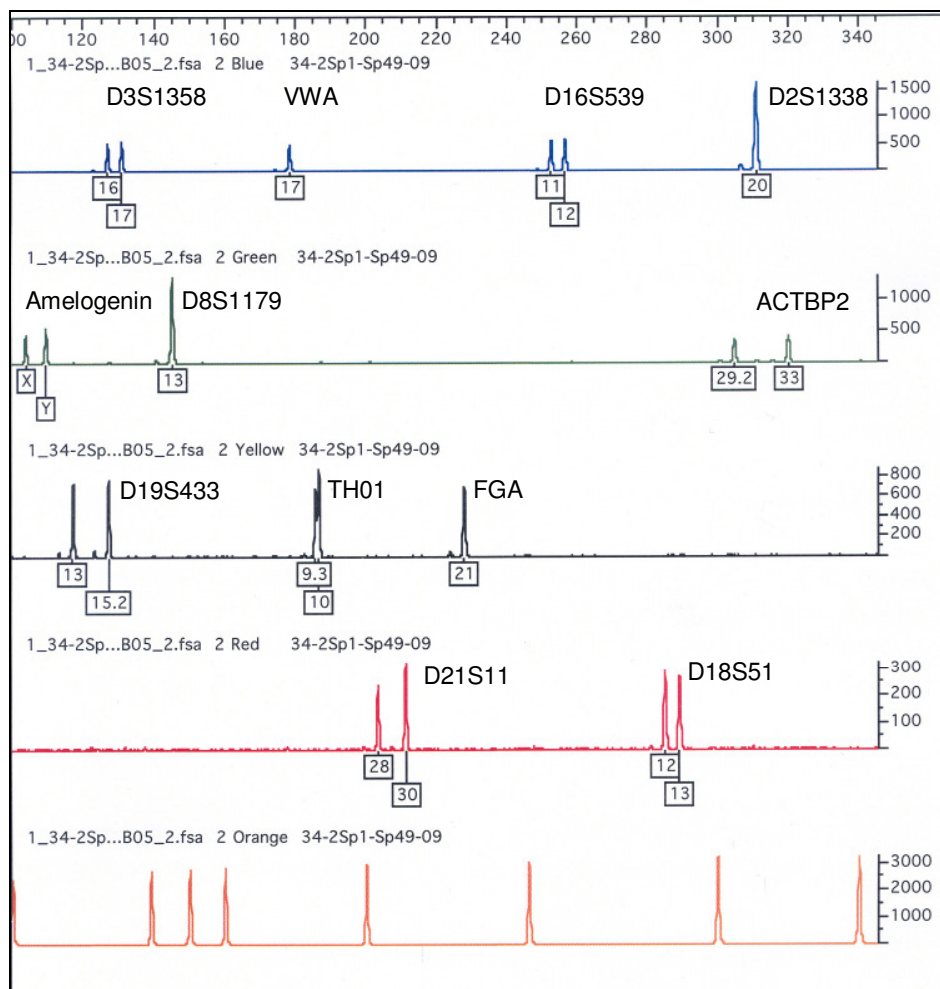


Abbildung 1.3 Elektropherogramm eines typischen DNA-Profiles (= genetischer Fingerabdruck) mit Bezeichnungen der 12 untersuchten DNA-Systeme

Für die forensische Routine hat sich die Untersuchung der Systeme ACTBP2 (= HumACTBP2; Polymeropoulos et al. 1992), D21S11 (Sharma & Litt 1992), VWA

(= HumVWF31A; Kimpton et al. 1992), TH01 (HumTH01; Edwards et al. 1991; Polymeropoulos et al. 1991) und FGA (= HumFIBRA; Mills et al. 1992) als praktikabel erwiesen. Deshalb wurden sie zunächst als die STR-Systeme ausgewählt, die seit 1998 in der vom Bundeskriminalamt geführten nationalen DNA-Analyse-Datei (DAD) gespeichert werden. Um europaweit eine Übereinstimmung hinsichtlich der STR-Systeme zu erreichen, wurde die Datenbank ab 2002 verbindlich um die Systeme D3S1358 (Li et al. 1993), D8S1179 (Sheffield et al. 1995) und D18S51 (Straub et al. 1993) erweitert. Ab 2009 soll eine weitere Ergänzung um die Systeme D2S1338 (Garofano et al. 1999b), D16S539 (Sheffield et al. 1995) und D19S433 (Garofano et al. 1999a) erfolgen (vgl. Abb. 1.13). Auch in der Abstammungsbegutachtung kommen die genannten STR-Systeme zum Einsatz.

Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Menschen bei Untersuchung der acht DAD-Systeme von 2002 den gleichen genetischen Fingerabdruck aufweisen, liegt bei etwa 1:60 Milliarden (Brinkmann 2004). Somit ist die eindeutige Identifikation einer Person mittels DNA-Profil gegeben.

Die vier STR-Systeme D3S1358, FGA, ACTBP2 und VWA werden im Folgenden genauer beschrieben, da sie im Rahmen einiger in dieser Arbeit durchgeführten Projekte, u.a. zur Kategorisierung von Mutationen, genauer untersucht wurden. Ein Auswahlkriterium war das Vorliegen einer relativ hohen Mutationsrate in diesen Systemen; zum anderen handelt es sich um zusammengesetzte Mikrosatelliten mit zahlreichen Sequenzvarianten (s. Beschreibung der STR-Systeme und Anhang 9.1).

1.3.2 Die STR-Systeme D3S1358, FGA, ACTBP2 und VWA

D3S1358

Der STR-Locus D3S1358 ist ein zusammengesetzter (*compound*) Mikrosatellit mit Tetranukleotidwiederholungseinheiten. Er findet sich auf dem Chromosom 3 in der Lokalisation p3 (Li et al. 1993), Basenposition (Celera): 45520628-45520758. Einige der vorkommenden Sequenzvarianten sind in Abb. 1.5 dargestellt.

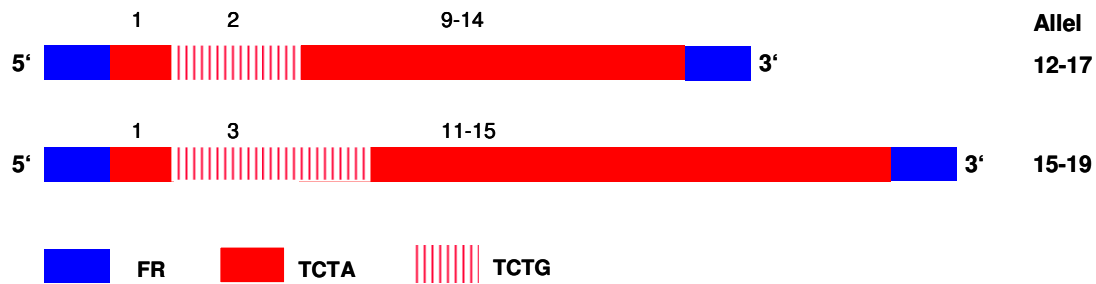


Abbildung 1.4 Häufige Sequenzvarianten des STR-Systems D3S1358;
FR = flankierende Region

Die Allele 8 bis 21 sind bisher beobachtet worden; die häufig auftretenden Allele 12 bis 19 zeigen eine Normalverteilung („unimodal“), die Heterozygotierate beträgt 79% und der Diskriminationsindex 0,92. Dieser gibt das Potenzial eines Systems an, über Individualmerkmale Personen voneinander unterscheiden zu können (Madea 2003). Die Mutationsrate für das STR-System D3S1358 liegt etwa im Bereich von 2×10^{-3} (Hohoff et al. 2009).

FGA

Das STR-System FGA (= FIBRA) ist ebenfalls ein Mikrosatellit zusammengesetzter Struktur aus repetitiven Tetranukleotiden. Er ist Teil der Intronsequenz des humanen Alpha-Fibrinogen-Gens mit der chromosomalen Lokalisation 4q28 (Mills et al. 1992), Basenposition (Celera): 152837431-152837711. Die häufigsten Sequenzvarianten sind in Abb. 1.6 dargestellt. Durch Deletion des TTCT-Tetranukleotids zum Dinukleotid TT, entstehen bei den Allelen mit 13- bis 18-facher Wiederholung der CTTT-Repeatsequenz die .2-Zwischenallele, wie z.B. 20.2 bis 25.2.

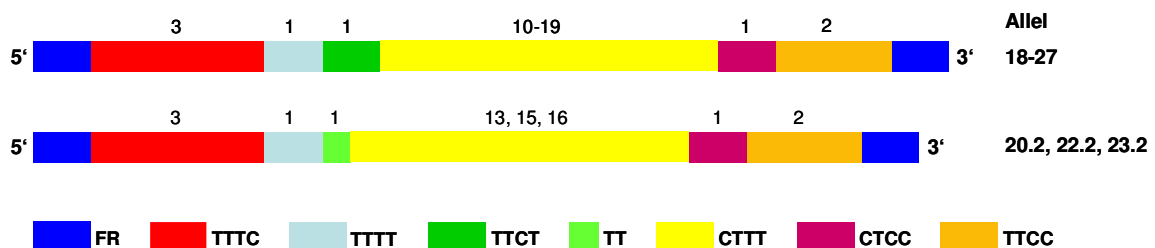


Abbildung 1.5 Häufige Sequenzvarianten des STR-Systems FGA;
FR = flankierende Region

Das FGA-System hat eine hohe Polymorphie, bisher wurden über 80 verschiedene FGA-Allele beobachtet, die von Allel 12.2 bis 51.2 reichen. Die Verteilung der Allele ist unimodal, der Heterozygotiegrad liegt bei etwa 85% und der Diskriminationsindex bei 0,96 (Barbarii et al. 2004). Die Mutationsrate für FGA ist mit etwa $4,2 \times 10^{-3}$ (Dauber et al. 2003; Hohoff et al. 2006) dreimal so hoch wie die durchschnittliche Mutationsrate autosomaler STRs.

ACTBP2

Das STR-System ACTBP2 (= SE33) ist auf Chromosom 6 (6q13); Basenposition (Celera): 89404757-89405057, lokalisiert und ist Teil des humanen β -Actin verwandten Pseudogens 2 (Moos & Gallwitz 1983; Polymeropoulos et al. 1992; Mullokandov et al. 1997; Wenda et al. 2005). Es wurde ein weiteres Pseudogen, ACTBP8 (Mullokandov et al. 1997), beschrieben, das identisch zu ACTBP2 ist (Wenda et al. 2005). Die drei Hauptkategorien der Sequenzvarianten sind in Abb. 1.7 dargestellt. Durch Insertion eines Hexamers treten .2-Zwischenallele auf; weiterhin sind Ein- oder Zwei-Basen-Deletionen innerhalb der flankierenden Sequenz bekannt. Daraus resultieren weitere Varianten: .1- bzw. .3-Allele. ACTBP2 hat einen außerordentlich hohen Polymorphiegrad, es finden sich über 30 häufige Längenvarianten und über 100 verschiedene Sequenzvarianten (Rolf et al. 1997). Bisher wurden die Allele 4.2 (Hohoff et al. 2006) bis 49 (Klein et al. 2003) beschrieben. Die Heterozygotierate liegt bei 95% und der Diskriminationsindex bei 0,96 (Heinrich et al. 2004). Somit ist ACTBP2 der informativste Marker, den man bisher routinemäßig benutzt. Das ACTBP2-System weist – aufgrund der „einfachen“ Allele der Kategorie 1 und der zusammengesetzten Allele der Kategorie 2 – eine bimodale Allelverteilung auf.

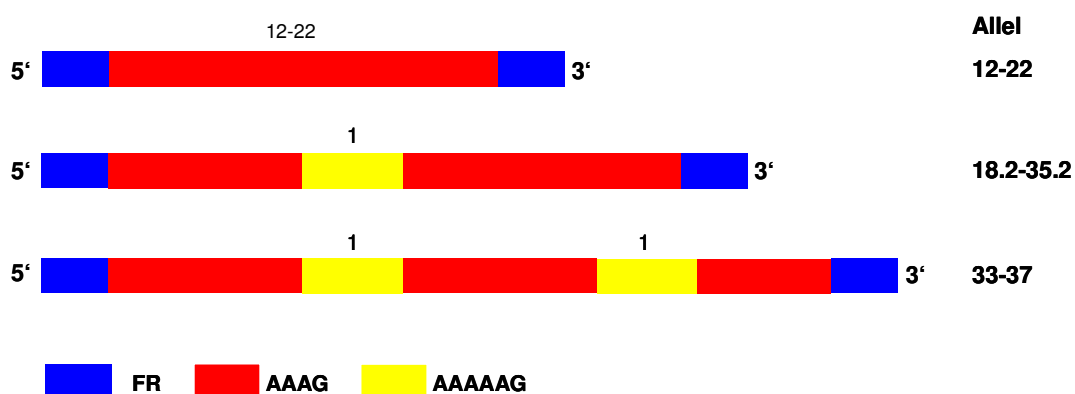


Abbildung 1.6 Sequenzvarianten des STR-Systems ACTBP2;
FR = flankierende Region

In aktuellen Untersuchungen weist ACTBP2 eine Mutationsrate von $8,93 \times 10^{-3}$ auf (B. Brinkmann, unveröffentlichte Daten), die somit fast fünfmal höher ist als die durchschnittliche Mutationsrate anderer autosomaler Mikrosatelliten. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Dauber et al. (2003), die bei ACTBP2 eine viermal höhere Mutationsrate als für andere STRs beobachtet haben. Diese Beobachtung lässt sich dadurch erklären, dass in ACTBP2 sehr lange Allele vorkommen und daher die durchschnittliche Anzahl der Wiederholungseinheiten höher liegt (Brinkmann et al. 1998).

VWA

Der STR-Locus VWA ist ein zusammengesetzter Mikrosatellit mit Tetranukleotidwiederholungen. Er liegt auf Chromosom 12 (12p12-ter), Basenposition (Celera): 7712720-7712873, innerhalb einer Intronsequenz (Intron 40) des von-Willebrand-Faktor-Gens (Blutgerinnungsfaktor), das mehrere Polymorphismen aufweist (Kimpton et al. 1992).

Das Repeatmotiv wird in der Literatur unterschiedlich angegeben: TCTA (van Amstel & Reitsma 1990), GATA (Pena et al. 1994) oder ATCT (Casana et al. 1995; Haddad & Sparrow 1997). Die Richtlinien der „International Society of Forensic Haemogenetics“ (Bär et al. 1997) sehen vor, dass bereits etablierte Nomenklaturen beibehalten werden. Da VWA eines der ersten STR-Systeme war, die für die forensische Anwendung genutzt wurden, wird das Repeatmotiv TCTA für die Allelbezeichnung verwendet.

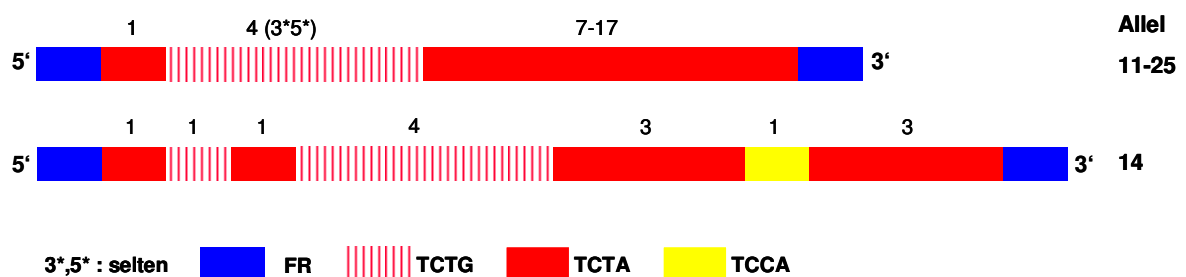


Abbildung 1.7 Häufige Sequenzvarianten im STR-System VWA;
FR = flankierende Region

Die Sequenzvarianten sind in Abb. 1.9 dargestellt. Das STR-System VWA weist eine unimodale Allelverteilung auf, die Heterozygotierate liegt bei 80% und der Diskriminationsindex bei 0,93 (Madea 2003). Die Mutationsrate für VWA liegt bei etwa $2,65 \times 10^{-3}$ (Dauber et al. 2003; B. Brinkmann, unveröffentlichte Daten) und ist somit doppelt so hoch wie die durchschnittliche Mutationsrate autosomaler STRs.

Der Bestimmung von DNA-Profilen kommt in der forensischen Molekulargenetik eine wesentliche Bedeutung zu.

1.4 Forensische Molekulargenetik

Die forensische Molekulargenetik lässt sich untergliedern in

- Abstammungsbegutachtung sowie
- Spurenkunde und Identifizierung

Die Abstammungsbegutachtung umfasst im Wesentlichen die Untersuchungen zur Feststellung der Vaterschaft („Vaterschaftstest“) oder Mutterschaft. Werden nur die Proben eines Elternteils und des Kindes untersucht, bezeichnet man diese Konstellation als „Defizienzfall“.

Spezielle Fragestellungen zu Verwandtschaftsverhältnissen fallen ebenfalls in den Bereich der Abstammungsbegutachtung. Hier können teilweise nicht nur die Untersuchungen autosomaler STR-Systeme, sondern auch X- oder Y-chromosomale STR-Systeme sowie die Sequenzierung der mitochondrialen DNA, die maternal vererbt wird, zum Einsatz kommen (Carracedo et al. 2000; Szibor et al. 2003; Shewale et al. 2004).

Untersucht werden i.d.R. Speichel- oder Blutproben der involvierten Personen.

Die Spurenkunde im Bereich der forensischen Molekulargenetik bezieht sich im Wesentlichen auf die Charakterisierung von Spurenmaterial und die anschließende Gewinnung von ausreichend humanem Zellmaterial, um den genetischen Fingerabdruck des Spurenverursachers bestimmen zu können.

Die Spurensicherung erfolgt üblicherweise durch Kriminalbeamte, die die Spuren bzw. Asservate an den Ereignisorten so sichern, dass sie möglichst unverändert der Bearbeitung zugeführt werden können. Die zur Untersuchung vorliegenden Spuren bzw. Asservate umfassen die gesamte Bandbreite von Zellmaterial bzw. Objekten, an die Zellmaterial angetragen werden kann.

1.4.1 Abstammungsbegutachtung

1.4.1.1 Durchführung der Abstammungsbegutachtung

Im Rahmen der Abstammungsbegutachtung werden die genetischen Fingerabdrücke der in die Fragestellung einbezogenen Personen bestimmt.

Dabei wird die Abstammung über ein Ausschlussverfahren ermittelt, d.h. besitzt ein Kind ein Erbmerkmal, das es von seiner Mutter nicht geerbt haben kann (weil diese es nicht aufweist), muss es von seinem Vater stammen. Hat es ein als Vater in Frage kommender Mann („Putativvater“) gleichfalls nicht, ist er als Vater auszuschließen.

Die Ausschlusswahrscheinlichkeit gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Mann, der nicht der biologische Vater des Kindes ist, als solcher erkannt wird. Die Ausschlusswahrscheinlichkeit hängt von der Anzahl und der Variabilität der untersuchten STR-Systeme ab. Je mehr STR-Systeme untersucht werden, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, mit der sämtliche falschen Eltern ausgeschlossen werden können (Jamieson 1994; Fung et al. 2002).

Laut Richtlinien der Bundesärztekammer für Abstammungsgutachten müssen mindestens 12 voneinander unabhängige STR-Systeme untersucht werden, die auf wenigstens zehn verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind. Es muss eine kombinierte Allgemeine Vaterschaftsausschlusschance (AVACH) von mindestens 99,99% erreicht werden. Bei Auftreten von drei und mehr Ausschlusskonstellationen auf verschiedenen Chromosomen kann die Abstammung vom Putativvater ausgeschlossen werden.

Bei weniger als drei Ausschlusskonstellationen muss das mögliche Vorliegen von Mutationen bzw. „stummen Allelen“ überprüft und in die biostatistische Berechnung

einbezogen werden. Im Bedarfsfall müssen weitere STR- oder andere Polymorphismen untersucht werden.

Bei Nichtausschluss erfolgt eine biostatistische Berechnung des Wahrscheinlichkeitswertes unter Berücksichtigung der paternal vererbten Merkmale. Ein W-Wert $\geq 99,9\%$ entspricht einer „praktisch erwiesenen Vaterschaft“ (Bundesärztekammer 2002).

1.4.1.2 Mutationen in Abstammungsfällen

Im hiesigen Institut werden pro Jahr mehrere hundert Abstammungsfälle begutachtet. Durchschnittlich werden in diesem Untersuchungsgut jährlich 25 *de novo* Mutationen (= Neumutationen) in den analysierten STR-Systemen (CSF1PO, D7S820, D8S1179, D21S11, D2S1338, D3S1358, D13S317, D16S539, TH01, D18S51, D19S433, TPOX, VWA, D5S818, FGA, ACTBP2) beobachtet.

Bei ungefähr 90% der Mutationen in humanen STR-Systemen handelt es sich um Ein-Schritt-Mutationen, gefolgt von Zwei-Schritt-Mutationen. Nur eine geringe Anzahl sind Mehr-Schritt-Mutationen (Di Rienzo et al. 1994; Brinkmann et al. 1998; Kayser et al. 2000; Xu et al. 2000). Nach Sajantila et al. (1999) sind etwa 70% der Mutationen Ein-Schritt-Mutationen. Huang et al. (2002) dagegen beschrieben 63% der beobachteten Mutationen in STRs mit Dinukleotidwiederholungseinheiten als Zwei- und Mehr-Schritt-Mutationen.

Zudem ist bekannt, dass Mutationen in der männlichen Keimbahn häufiger stattfinden als in der weiblichen Keimbahn (Brinkmann et al. 1998; Sajantila et al. 1999; Nachman & Crowell 2000; Ascioglu et al. 2004).

Hinsichtlich der Auswirkung von STR-Mutationen wurde sowohl ein überwiegendes Vorkommen von Verlustmutationen (Brinkmann et al. 1998; Huang et al. 2002), als auch eine etwa gleich große Anzahl von Gewinn- und Verlustmutationen (Sajantila et al. 1999; Ellegren 2000a) beschrieben.

Im Hinblick auf den Mutationsmechanismus (vgl. Abschnitt 1.1.1) gibt es sowohl Hinweise auf *replication slippage*, als auch auf *unequal crossing over* (Smith 1976; Bullock et al. 1986; Levinson & Gutman 1987a; Levinson & Gutman 1987b; Morral et al. 1991; Harding et al. 1992; Mahtani & Willard 1993; Rosato et al. 1996; Li et al.

2002). Für ganzzahlige Ein-Schritt-Mutationen ist *Slippage* der weithin angenommene Mutationsmechanismus (Levinson & Gutman 1987a; Morral et al. 1993; Brinkmann et al. 1998; Ellegren 2000b; Klintschar et al. 2004).

Um die beobachteten mutierten Allele zuordnen zu können – und somit Aussagen hinsichtlich der Parameter Ursprung, Auswirkung, Grad und Mechanismus – zu erhalten, wird die von Brinkmann et al. (1998) vorgeschlagene Annahme verwendet:

Wenn es zwei mögliche Zuordnungen des mutierten Allels gibt, wird das kleinstschrittige ganzzahlige Mutationsereignis angenommen (s. Abb. 1.8a).

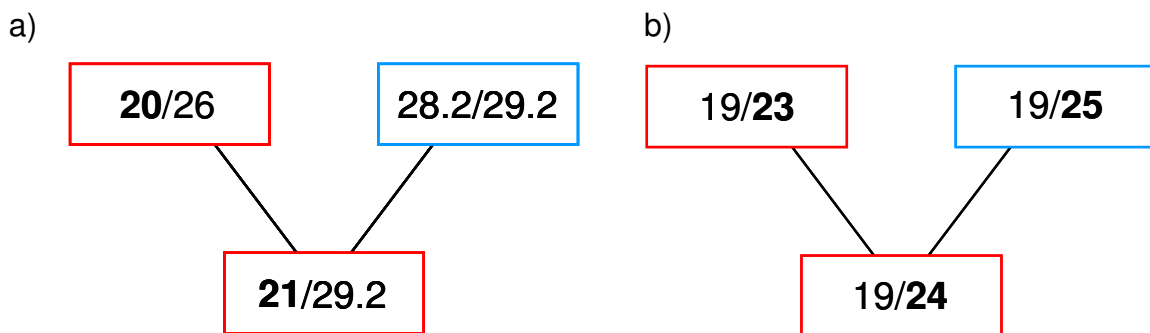


Abbildung 1.8 Fallbeispiel einer Mutationscharakterisierung anhand des kleinstschrittigen ganzzahligen Mutationsereignisses (a) bzw. einer nicht möglichen Mutationscharakterisierung (b)

a) In diesem Fall wird eine maternale 1-Schritt-Insertion (20 → 21) angenommen, da dies das kleinstschrittige Mutationsereignis ist. Die Möglichkeit einer maternalen 5-Schritt-Deletion erscheint unwahrscheinlich, ebenso wie eine paternale Mutation, die sogar zwei Mutationsereignisse voraussetzen würde.

b) Anhand der Allelkonstellation ist es in einem solchen Fall nicht möglich, das mutierte Allel einem Elternteil zuzuordnen.

Weiterhin werden die in ein Mutationsereignis involvierten Allele im hiesigen Institut routinemäßig sequenziert, um z.B. über die Sequenzstruktur Aufschluss hinsichtlich der o.g. Parameter der Mutation zu erhalten.

Es gibt allerdings auch Allelkonstellationen, in denen das mutierte Allel nicht einzuordnen ist (s. Abb. 1.8b). Falls in einem solchen Fall auch die Sequenzstruktur keine weiteren Aussagen ermöglicht, gelten solche Mutationen bislang als ungeklärt. Von Klintschar und Mitarbeitern (2004) wurde eine Methode veröffentlicht, die es ermöglichen soll, Mutationen, die innerhalb von Familien mit einer ungünstigen Allel-

konstellation (vgl. Abb. 1.11) auftreten, eindeutig einordnen zu können. Dabei macht man sich zunutze, dass Gruppen von Allelen, die gemeinsam auf einem kurzen Chromosomenabschnitt auftreten, mit einer geringen Wahrscheinlichkeit einer Rekombination unterliegen, sondern eher als Block (= Haplotyp) gekoppelt vererbt werden (Strachan & Read 2005).

Dieser Ansatz wurde im Rahmen dieser Arbeit für die vorliegenden Mutationsfälle in den STR-Systemen D3S1358, FGA, ACTBP2 und VWA mit fünf bis sieben flankierenden Markern verfolgt.

1.4.2 Spurenkunde und Identifizierung

1.4.2.1 Spurenkundliche Untersuchungen

Die spurenkundlichen Untersuchungen umfassen eine weite Bandbreite an verschiedenen Fragestellungen. Sie sind an zwei Grundvoraussetzungen gebunden: zum einen müssen Individuen anhand ihres genetischen Fingerabdrucks unterschieden werden können und zum anderen muss von der Spur auf den Spurenleger rückgeschlossen werden können. Hauptziel der molekulargenetischen Analyse ist die Gewinnung qualitativ und quantitativ ausreichender DNA-Mengen zur erfolgreichen Darstellung eines genetischen Fingerabdrucks.

Als „Spuren“ werden im forensisch-medizinischen Sinne im Wesentlichen kleine Antragungen von Blut, Sekreten oder Gewebeteilen an Personen oder Gegenständen bezeichnet, die einen Rückschluss auf die beteiligten Personen oder auf den Tathergang zulassen (Madea 2003).

Die Schwierigkeit der Spurenterforschungen ist direkt verknüpft mit der Beschaffenheit der Spur, den Lagerungsbedingungen (Umwelteinflüsse), der Lagerungszeit und der zumeist nur in sehr geringer Menge vorliegenden Substanz. Diese Einflüsse zeigen die Limitierung der spurenkundlichen Untersuchungen auf, da z.B. durch Umwelteinflüsse, v.a. Hitze und Feuchtigkeit, die vorliegende DNA degradiert wird (Lindahl 1993). Durch die Degradierung werden die DNA-Stränge in kleine Stücke fragmentiert und können so möglicherweise in der PCR nicht mehr amplifiziert werden. Im ungünstigsten Fall ist die DNA so stark degradiert, dass sämtliche Spurenter-

tersuchungen negativ ausfallen. Folglich sind die STR-Systeme mit den längsten Amplikonen in einer Multiplex-PCR die ersten, die bei Vorliegen stark degradierter DNA ausfallen (Brinkmann 2004).

Eine geringe Anzahl oder die starke Degradierung vorliegender DNA-Moleküle kann zum sogenannten ‚*allelic drop-out*‘ bzw. ‚*locus drop-out*‘ führen, was den Ausfall des Amplifizierungsprodukts von einem Allel (‚*allelic drop-out*‘) oder sogar beiden (‚*locus drop-out*‘) bezeichnet (Findlay et al. 1998; Balogh et al. 2003).

Um – trotz der vorgenannten Schwierigkeiten – noch bestmögliche Ergebnisse hinsichtlich der vorliegenden Spuren zu erzielen, wurden alle Analyseschritte im Hinblick auf die geringen DNA-Mengen optimiert. So haben z.B. die verwendeten kommerziell erhältlichen Kits für die Multiplex-PCRs eine maximale Amplikonlänge von etwa 350 bp und die unteren Nachweisgrenzen liegen im Bereich von 200 bis 500 pg (Gebrauchsanleitungen für Mentype[®] Nonaplex^{QS} Kit (Biotype, Dresden) bzw. AmpFISTR[®] Profiler[®] PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt)). Das bedeutet, etwa 50 bis 100 diploide Zellen reichen aus, um ein komplettes DNA-Profil zu erhalten. Sogar mit deutlich geringeren Mengen können noch sehr gute Ergebnisse erzielt werden, die durch zumindest teilweise erfolgreiche Amplifizierung einzelner Systeme die Erstellung eines DNA-Teilprofils ermöglichen, so dass anhand der vorliegenden Ergebnisse auch Recherchen in der DAD erfolgen können, Aussagen hinsichtlich einer Tatbeteiligung bzw. Ausschlüsse formuliert werden können (Sajantila & Budowle 1991).

1.4.2.2 Differenzierung der Spuren

DNA-Spuren werden hinsichtlich der Anzahl der Spurenverursacher unterschieden in „reine“ Spuren und Mischspuren.

Als „reine“ DNA-Spuren werden Spuren bezeichnet, in denen ausschließlich das Zellmaterial einer Person nachgewiesen werden kann. Das DNA-Profil dieser Spur wird zur Speicherung in der DAD übermittelt. Falls die detektierte Spur mit dem DNA-Profil eines möglichen Tatverdächtigen übereinstimmt, kann anhand der durch populationsgenetische Studien erhaltenen Allelfrequenzen berechnet werden, mit welcher Häufigkeit dieses DNA-Profil in einer Population auftritt.

Es treten allerdings auch sogenannte DNA-Mischspuren auf, bei denen zwei oder mehr Personen ihr Zellmaterial angetragen haben. Bei Mischspuren mit Spurenverursachern unterschiedlichen Geschlechts können selektiv beispielsweise Y-chromosomale STRs untersucht werden.

Generell ist die Extraktion der DNA und somit die Erstellung des DNA-Profiles aus jeder kernhaltigen Körperzelle möglich. Daher sind alle Körperflüssigkeiten (Blut, Urin, Sekrete), aber auch Körpergewebe (Muskulatur, innere Organe, Haut, Knochen, Zähne) und Haare geeignet, um das DNA-Profil einer Person zu bestimmen. Des Weiteren können nahezu alle Gegenstände, mit denen Personen in Kontakt gekommen sind (Kleidungsstücke, Werkzeuge, Trinkgefäße etc.), als Spurenläger untersucht werden.

Blut- und Sekretspuren enthalten i.d.R. ausreichend Zellmaterial, um das DNA-Profil des Spurenverursachers erfolgreich bestimmen zu können.

Bei Blutspuren liefern die Leukozyten das DNA-Material, da die Erythrozyten keine Zellkerne und somit auch keine DNA aufweisen. Als Vortests für Blut haben sich der Kastle-Meyer-Test (s. Abschnitt 3.2.1) und der Luminol-Test etabliert, die beide hochsensitiv sind und Blutverdünnungen von 1:10.000 (Johnston et al. 2008) bis 1:100.000 (Webb et al. 2006; Tobe et al. 2007) detektieren können.

Zur Gruppe der Sekretspuren gehören neben Speichelspuren auch Sperma- und Vaginalsekretspuren. In Speichelspuren liegen Mundschleimhautzellen bzw. -zellpartikel vor, die genügend DNA zur Analyse enthalten. Speichelspuren kommen überall vor, wo – im weitesten Sinne – ein Mundkontakt mit dem Spurenverursacher stattgefunden hat, z.B. Rand eines Trinkgefäßes, Zigarettenkippe, Briefmarke, angebissenes Nahrungsstück, auch Bissspuren. Bei Sexualdelikten sind Sperma und Scheidensekret i.d.R. die vorliegenden Körpersekrete.

Epidermale Hautzellen bzw. Hautschüppchen können im Zusammenhang mit Kratz-, Schlag- und Greifverletzungen gelegentlich unter den Fingernägeln der beteiligten Personen (sowohl Täter, als auch Opfer) gesichert werden. Hautepithelzellen werden weiterhin an nahezu alle Gegenstände, mit denen Personen in Kontakt gekommen sind, angetragen und können von dort abgenommen und für die molekulargenetischen DNA-Untersuchungen eingesetzt werden. Dabei können zwei Arten von Hautabriebspuren unterschieden werden (Schöneberg et al. 2003):

- Kontaktspuren können durch einmaliges Berühren oder Anfassen von Gegenständen entstehen, so dass an der Oberfläche des Asservates kleinste Hautschuppen lose aufliegen. Die Übertragung setzt eine gewisse Intensität des Hautkontaktes voraus.
- Gebrauchsspuren entstehen durch wiederholten Kontakt mit Gegenständen, so dass es z.B. in Vertiefungen von Gegenständen zu einer Ansammlung von Zellmaterial (Haut, Schweiß, Talg) kommt. Dies ermöglicht es, Besitzverhältnisse, z.B. von Werkzeugen oder Bekleidung, zu klären.

In jüngster Vergangenheit hat die Anzahl der Abriebspuren, die spurenkundlich untersucht werden, deutlich zugenommen. Dies liegt zum einen daran, dass die mit der Spurensicherung betrauten Kriminalbeamten immer besser im Umgang mit Spuren geschult sind, und zum anderen, dass die oftmals geringen Zellantragungen mittlerweile ausreichen, um mit den immer sensitizer werdenden molekulargenetischen Analysen noch ein auswertbares DNA-Profil zu erhalten.

Haare, Zähne und Nägel können in den meisten Fällen morphologisch gut erkannt werden. Telogene Haare enthalten wurzelnah pyknotische Zellkerne, so dass die Gewinnung von amplifizierbarem DNA-Material nicht immer gegeben ist. Auch Zähne und Nägel benötigen aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Beschaffenheit einer speziellen Behandlung.

2 Ziele der Arbeit

Die forensische Molekulargenetik hat als wichtigste praktische Anwendungsgebiete die Abstammungsbegutachtung und die Spurenkunde. Um den stetig steigenden Anforderungen dieser Bereiche gerecht zu werden, müssen immer neue Methoden und Verfahren etabliert und validiert werden.

Ziel dieser Arbeit ist es zunächst, durch Etablierung und Anwendung forensischer Methoden, Mutationen, die bei Abstammungsbegutachtungen beobachtet wurden, zu charakterisieren. Dies soll in den STR-Systemen D3S1358, FGA, ACTBP2 und VWA, in denen die meisten Mutationen beobachtet wurden, mithilfe flankierender Marker über die Erstellung familien-spezifischer Haplotypen erfolgen. Für Ein-Kind-Familien, in denen diese Methode *a priori* keine Einordnung der Mutation erlaubt, sollen darüber hinaus Einzelchromosomen isoliert und die flankierenden Marker mit einer selbst entwickelten Multiplex-PCR amplifiziert werden. Schließlich sollen zwei Fälle untersucht werden, in denen eine Punktmutation im primerbindenden Bereich als Ursache für ein sog. stummes Allel und die dadurch verursachte scheinbare Ausschlusskonstellation vermutet wird. Unter Anwendung forensisch etablierter Methoden sollen die Punktmutationen, die zum Auftreten der stummen Allele geführt haben, identifiziert werden.

Der zweite Teil dieser Arbeit hat die Entwicklung und Anwendung forensischer Methoden bei spurenkundlichen Fragestellungen zum Ziel. Dabei soll zunächst die üblicherweise verwendete Technik der Spurensicherung im Hinblick auf die essenziellen Parameter Befeuchtungsmittel und Tupferbeschichtung systematisch untersucht und optimiert werden. Des Weiteren sollen spurenkundliche Methoden in zwei speziellen forensisch-medizinischen Fragestellungen zum Einsatz kommen. Dabei werden zum einen z.B. von Diabetes-Patienten benötigte Stechhilfen zur Abschätzung einer möglichen Infektionsgefahr durch gemeinsamen Gebrauch von verschiedenen Personen spurenkundlich untersucht. Durch hochsensitive (Vor-)Untersuchungen sollen so kleinste Blutantragungen bzw. geringste Antragungen von anhaftendem Zellmaterial detektiert werden. Zum anderen soll bei einer transplantierten Leber der Ursprung eines Karzinoms durch Einsatz der Lasermikrodissektionstechnik geklärt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in p. A. Qualität bezogen.

Acrylamid 2x	BIO RAD, München
Agar-Agar	ROTH, Karlsruhe
Amberlite	SERVA, Mannheim
Ampicillin Natriumsalz	ROTH, Karlsruhe
Bisacrylamid	SERVA, Mannheim
BSA	Sigma, München
Chelex [®] 100	BIO RAD, München
CHES	ICN Biomedicals Inc., Eschborn
Cocoamidopropyl Betain	Cosmetix, Münster
dNTPs (je 2,5 mM)	Amersham Pharmacia, Freiburg
DNA-ExitusPlus [™]	AppliChem, Darmstadt
Ethanol 96%	Apotheke, UKM Münster
GeneScan [™] 500 ROX [™] Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
GeneScan [™] 600 LIZ [®] Size Standard	Applied Biosystems, Darmstadt
Glycerin	SERVA, Mannheim
Glycogen	Roche, Mannheim
Hexadecyltrimethylammoniumbromid	Sigma, München
HiDi-Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Griesheim

Internal Lane Standard 600	Promega, Mannheim
IPTG	ROTH, Karlsruhe
LB-Broth	ROTH, Karlsruhe
MgCl ₂ (25 mM)	Applied Biosystems, Darmstadt
Phenolphthalein	Sigma-Aldrich, München
Piperazindiacrylamid	BIO RAD, München
Rotiphorese [®] Gel 40 (29:1)	ROTH, Karlsruhe
Silbernitrat	ROTH, Karlsruhe
TEMED	SERVA, Mannheim
Tris-Hydrochlorid	Promega, Mannheim
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich, München
X-Gal	ROTH, Karlsruhe
10x PCR Gold Buffer	Applied Biosystems, Darmstadt
123 bp Längenmarker	GibcoBRL/Invitrogen, Karlsruhe
9947A DNA (10 ng/μl)	Promega, Mannheim
9948 DNA (10 ng/μL)	Promega, Mannheim

3.1.2 Geräte

ABI PRISM [™] 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI PRISM [™] 3100 Avant Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI PRISM [™] 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Biofuge primo	Heraeus, Hanau
Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Brutschrank B12	Heraeus, Hanau
CellCut Plus Mikrodissektion	Olympus, Hamburg
DIGITAL-pH-Meter 646	Knick, Berlin

GeneAmp PCR System 9600	Applied Biosystems, Darmstadt
GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt
Inhalationsgerät PARI TurboBOY N	Pari GmbH, Starnberg
Inkubationsschüttler Certomat®IS	B. Braun Biotech, Melsungen
Kühlgerät LKB 2219 MultiTemp II	Pharmacia, Freiburg
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Multiphor II-Elektrophoresekammer	Amersham, Freiburg
MultiDrive™ XL power supply	Pharmacia, Freiburg
Rotations-Vakuum-Konzentrator RVC 2-18	ILMVAC, Ilmenau
SmartCut Mikrodissektion	Olympus, Hamburg
TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV/VIS Spektrometer Lambda 11	Perkin Elmer, Wiesbaden
VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 25T	H+P, Oberschleißheim
Vortexer VF2	IKA, Staufen
Zeiss Axio Imager + AxioCam MRc5	Zeiss, Oberkochen
Zeiss Axioskop	Zeiss, Oberkochen
Zentrifuge mini spin	Eppendorf, Hamburg

3.1.3 Lösungen und Puffer

Die Lösungen und Puffer gebrauchsfertiger Kits und Restriktionsendonukleasen wurden nach Herstellerangaben benutzt und sind hier nicht gesondert aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben, gibt die Konzentration in % die Masse pro Volumen (w/v) an.

Acryl-PDA 30%

291 g Acrylamid 2x

9 g Piperazindiacrylamid

5 g Amberlite

ad 1000 ml Aqua bidest.

CHES 0,28 M

58,04 g CHES

mit Tris pH 9,0

ad 1000 ml Aqua dest.

dNTP-Lösung

2,5 mM dATP

2,5 mM dCTP

2,5 mM dGTP

2,5 mM dTTP

} hergestellt aus
100 mM-Stammlösungen

Essigsäure 7,5%

75 ml Eisessig

ad 1000 ml Aqua dest.

Fixativ

15 ml Methanol

5 ml Eisessig

Glycerinlösung 65%	130 ml Glycerin 4,9 g MgSO ₄ 0,242 g Tris/HCl, pH 8,0 ad 200 ml Aqua dest.
Kastle-Meyer-Reagenz	2 g Phenolphthalein 20 g Kaliumhydroxid 100 ml HPLC-Wasser 20 g Zinkpulver
LB-Agar 1,5%	500 ml Aqua dest. 12,5 g LB-Broth 7,5 g Agar-Agar
Salpetersäure 2%	30 ml 65% HNO ₃ ad 1000 ml Aqua dest.
Natriumcarbonat 0,28 M	30 g Na ₂ CO ₃ 2,4 ml Formaldehyd (37%) 0,4 ml Natriumthiosulfat ad 1000 ml Aqua dest.
Natriumthiosulfat 0,025 M	200 mg Natriumthiosulfat ad 50 ml Aqua dest.

Silbernitratlösung 0,1%	1 g AgNO ₃ 1,5 ml Formaldehyd (37% (w/v)) ad 1000 ml Aqua dest.
Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5	10 mM Tris 1 mM EDTA-Na (Titriplex III) ad 1000 ml Aqua dest.
Tris-EDTA-Puffer, pH 8,0	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,1 mM EDTA-Na (Titriplex III) 20 µg/ml Glycogen
Tris-Borat-Puffer, pH 9,0	314,4 g Tris 43,8 g Borsäure ad 5000 ml Aqua bidest. 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Tris-Formiat-Puffer 0,5 M	60,5 g Tris mit Ameisensäure pH 9,0 ad 1000 ml Aqua dest.
Tris-Sulfat-Puffer, 0,4 M, pH 9,0	48,4 g Tris mit konz. Schwefelsäure (96%) pH 9,0 ad 1000 ml Aqua bidest.

Wasserstoffperoxid 3%	1 ml Wasserstoffperoxid (30%) ad 10 ml HPLC-Wasser
-----------------------	---

3.1.4 Gebrauchswaren

Alle verwendeten Einmalartikel, z.B. Reaktionsgefäße (0,2 ml, 0,5 ml, 1 ml), Pipettenspitzen, Filterspitzen, sind nicht gesondert aufgeführt und wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

Absolute QPCR Seal	ABgene, Hamburg
Chamois Swab	Techspray, Amarillo/USA
Chamois Swab, single head	MG Chemicals, Surrey/Canada
Chromatographiepapier Sorte 2043b	Schleicher & Schuell, Dassel
Fiber Optic Swab	ITW Chemtronics, Kennesaw/USA
Fiber Optic Swab (ø1,25 mm, ø2,5 mm)	Techspray, Amarillo/USA
Foam Over Cotton Swab	MG Chemicals, Surrey/Canada
Gel-Fix [®] for PAG (Folie)	SERVA, Mannheim
Glasobjektträger	Engelbrecht, Edermünde
Membrane Slides for Lasermicrodissection	MMI, Glattbrugg/Schweiz
Microcon [®] YM-100	Millipore, Eschborn
Neutrale Abstrichtupfer, steril	Sarstedt, Nümbrecht
Nylon Swab	MAST Diagnostica, Reinfeld
OmniSwab	Whatman, Dassel
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim
PERFORMA [®] DTR Gel Filtration Cartridges	MoBiTec, Göttingen
Polybeutel mit Druckverschluss	Gustav Schramm GmbH, Bremen
PP-PCR-Platten, 96-well, mit halbem Rand	Greiner-Bio-One, Frickenhausen

Rayon-Tupfer am Kunststoffstab	Mibius, Düsseldorf
Rührspatel	Sarstedt, Nümbrecht
Sample Application Pieces	SERVA, Mannheim
Satessa Duo Cosmetic Pads mit Microfaser	CMC, Düren
Schwammtupfer	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Nylon Flocked Swab	Sarstedt, Nümbrecht
Thermo-Fast [®] 96 Non-Skirted, Low Profile	ABgene, Hamburg
Trockenbeutel mit Silica Gel (5 g)	hobby-photo, Saarbrücken
Tubes with adhesive lid, with diffusor	MMI, Glattbrugg/Schweiz
Ultra Clear Cap Strips	ABgene, Hamburg
Wattestäbchen, kleiner Kopf	Karl Beese, Barsbüttel
Wattestieltupfer mit Baumwollbeschichtung	Nuova APTACA, Canelli/Italien

3.1.5 Enzyme

<i>EcoRI</i>	Roche, Mannheim
Goldstar [®] DNA-Polymerase	Eurogentec, Köln
Proteinase K	Roche, Mannheim
Ampli <i>Taq</i> Gold [™]	Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.6 Fertige Reaktionssysteme (Kits)

AmpFISTR [®] Profiler [®] PCR Amplification Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
AmpFISTR [®] Yfiler [®] PCR Amplification Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
BigDye [®] Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Gen Elute [™] Plasmid Miniprep Kit	Sigma, München
Mentype [®] Nonaplex ^{QS}	Biotype AG, Dresden

pGEM [®] -T Easy Vector System	Promega, Mannheim
QIAamp [®] DNA Micro Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Multiplex PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quantifiler [®] Human DNA Quantification Kit	Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.7 Fluoreszenzfarbstoffe

Tabelle 3.1 Fluoreszenzfarbstoffe für die Kapillargelelektrophorese

Kurzbezeichnung	chemischer Name	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
6-FAM [™]	6-Carboxyfluorescein	490	520
HEX	Hexa-chlor-6-carboxyfluorescein	535	553
TAMRA [™]	N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin	560	583
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	587	607
LIZ	nicht bekannt	638	655

3.1.8 Synthetische Oligonukleotide

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Oligonukleotide von der Firma Biomers, Ulm, hergestellt und lyophilisiert geliefert. Es wurde eine Stammlösung von 100 pmol/μl hergestellt, aus der dann die Gebrauchslösungen (10 pmol/μl bzw. 5 pmol/μl) gefertigt wurden. Die Stammlösungen und die Gebrauchslösungen wurden bei -20 °C gelagert.

Die Primer wurden größtenteils aus der Literatur bzw. aus Internetdatenbanken (<http://www.gdb.org>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) übernommen. Die mithilfe des im Internet verfügbaren Programms Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) konstruierten Primer, sind mit * gekennzeichnet.

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind im Folgenden aufgeführt:

Tabelle 3.2 Primer zur Amplifizierung der STR-Systeme ACTBP2, FGA und DXS6800

Name	Sequenz
ACTBP2-P1-FAM (Polymeropoulos et al. 1992) (Eurogentec, Köln)	5'- 6-FAM -AAT-CTG-GGC-GAC-AAG-AGT-GA-3'
ACTBP2-P1-HEX (Polymeropoulos et al. 1992)	5'- HEX -AAT-CTG-GGC-GAC-AAG-AGT-GA-3'
ACTBP2-P2 (Polymeropoulos et al. 1992)	5'-ACA-TCT-CCC-CTA-CCG-CTA-TA -3'
FGA-P1 (Barber et al. 1996) (Eurogentec, Köln)	5'-GCC-CCA-TAG-GTT-TTG-AAC-TCA-3'
FGA-P2 (Barber et al. 1996) (Eurogentec, Köln)	5'-TGA-TTT-GTC-TGT-AAT-TGC-CAG-C-3'
FGA_Promega_fwd	5'-GGC-TGC-AGG-GCA-TAA-CAT-TA-3'
FGA_Promega_fwd_FAM	5'- 6-FAM -GGC-TGC-AGG-GCA-TAA-CAT-TA -3'
FGA_Promega_rev	5'-ATT-CTA-TGA-CTT-TGC-GCT-TCA-GGA-3'
FGA_rev_MM*	5'-GGG-ACC-ACA-GCC-ACA-TAC-TT-3'
DXS6800_P1 (Wiegand et al. 2003)	5'- 6-FAM -GTG-GGA-CCT-TGT-GAT-TGT-GT-3'
DXS6800_P2 (Wiegand et al. 2003)	5'-AGA-ACC-TAC-GTT-GAA-ATA-TTG-G-3'

Tabelle 3.3 Primer zur Amplifizierung der flankierenden Marker von D3S1358

Name	Sequenz
D3S2407_fwd	5'- 6-FAM -TGTACCCTATAGAAGTAAGACCAGG-3'
D3S2407_rev	5'-GGAGTTCAAGGTTACAGTCAGC-3'
D3S2304_fwd	5'- TAMRA -GCGACACAGCGAGACTCTA-3'
D3S2304_rev	5'-AATATGGGGGTGGGAGGCA-3'
D3S1767_fwd	5'- 6-FAM -ATGCTGTATTTCAACACACAGG-3'
D3S1767_rev	5'-AATTAGGCACGGTAGCACAC-3'
D3S2420_fwd	5'- 6-FAM -ACAAGTGCGAAACTCTGCCT-3'
D3S2420_rev	5'-CAGGAGCCTCTAAGTCAGCA-3'
D3S3582_fwd	5'- TAMRA -CGATGTGGCTCTGAACTC-3'
D3S3582_rev	5'-AGGGCCTGTTTCCCTAAG-3'
D3S688_fwd	5'- 6-FAM -GTCAGTCACTTTCATCTGCTCTCC-3'
D3S688_rev	5'-TGGAGAGTAGATGAAGAGAGGGTG-3'

Tabelle 3.4 Primer zur Amplifizierung der flankierenden Marker von FGA

Name	Sequenz
D4S2428_fwd	5'- 6-FAM -AAGTTTGGAAATCAATATTGTGG-3'
D4S2428_rev	5'-CAGAAACCATGGACCAAAC-3'
D4S3021_fwd	5'- 6-FAM -ACTGGCCTGATGTGGTGA-3'
D4S3021_rev	5'-GGTGCCTGATAGCCTGAA-3'
D4S2976_fwd	5'- TAMRA -TTCCACCCCAAAGA-3'
D4S2976_rev	5'-CAAAGGTTTTTAACATCCCA-3'
D4S2631_fwd	5'- 6-FAM -TTCAATACTCCTGTATCACAAAGG-3'
D4S2631_rev	5'-TGAGACACAATCTGAGCTATGC-3'
D4S1629_fwd	5'- TAMRA -TGGTTCTGCTTTTTCTCTCC-3'
D4S1629_rev	5'-TTTAACAGACAAATGACAAATCTG-3'

Tabelle 3.5 Primer zur Amplifizierung der flankierenden Marker von ACTBP2

Name	Sequenz
D6S272_fwd	5'-HEX-AGC-TCT-GAA-AAT-GCA-AAG-CA-3'
D6S272_rev	5'-ACT-GTG-AGC-GTT-TGT-GTC-TG-3'
D6S257_fwd	5'-HEX-GAG-AAC-TCG-TCC-TTT-GGT-CC-3'
D6S257_rev	5'-TGA-GAA-AAT-GTT-CAG-GCT-AAA-GAT-A-3'
D6S460_fwd	5'- 6-FAM -CCACGCTAATGACCATAATT-3'
D6S460_rev	5'-GTTTCAGTGGGCTCTCACCCCTT-3'
D6S1609_fwd	5'- 6-FAM -TAT-AGC-ACA-GAG-CCT-GAT-ACA-CTT-G-3'
D6S1609_rev	5'-TAG-CCA-TTT-TGC-CCA-GTC-3'
D6S462_fwd	5'- 6-FAM -GTG-ACA-TCA-TAG-GGA-GGC-TG-3'
D6S462_rev	5'-ACT-GGA-GTT-GGG-GGA-CAT-3'
D6S300_fwd	5'- TAMRA -AGA-TAC-ATT-GAC-ATT-CTT-CCG-C-3'
D6S300_rev	5'-TCA-AAA-GCC-AAA-AGC-CTA-CT-3'

Tabelle 3.6 Primer zur Amplifizierung der flankierenden Marker von VWA

Name	Sequenz
D12S1673_fwd	5'- 6-FAM -GAG-GTG-CAT-TTT-CCA-GGG-3'
D12S1673_rev	5'-GGG-TCC-AGC-ATG-TTC-ATC-3'
D12S374_fwd	5'- 6-FAM -CTC-CAG-GCT-CAT-CCA-TAT-TG-3'
D12S374_rev	5'-TCG-ATG-ATC-AGT-GAT-GTT-AAG-C-3'
STR1_fwd (Casana et al. 1995)	5'- HEX -CTA-TTT-ATC-ATC-TAT-CCT-CTA-3'
STR1_rev (Casana et al. 1995)	5'-CAG-ACA-GAT-AGA-TAC-ATA-CAT-3'
STR2_fwd (Casana et al. 1995)	5'- 6-FAM -TGT-ACC-TAG-TTA-TCT-ATC-CTG-3'
STR2_rev (Casana et al. 1995)	5'-GTG-ATG-ATG-ATG-GAG-ACA-GAG-3'
D12S1623_fwd	5'- 6-FAM -TGC-AGT-GAG-ATC-GCA-CC-3'
D12S1623_rev	5'-TCC-AAC-CTG-GGC-AAC-AAT-AG-3'
D12S397_fwd	5'- HEX -TTC-AGA-TAG-AGG-GAA-AGG-CA-3'
D12S397_rev	5'-GCT-TGC-AGA-CAG-CCT-ATT-GT-3'
D12S391_fwd	5'- 6-FAM -AACAGGATCAATGGATGCAT-3'
D12S391_rev	5'-TGGCTTTTAGACCTGGACTG-3'

Tabelle 3.7 Universalprimer zur Sequenzanalyse

Name	Sequenz
M13 (uni) (Interactiva, Ulm)	5'-TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-3'
M13 (rev) (Interactiva, Ulm)	5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-3'

3.1.9 Herkunft der Proben

Die Blut- bzw. Speichelproben stammen aus dem Untersuchungsgut des Instituts für Rechtsmedizin bzw. wurden von Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin freiwillig gespendet.

Die Zellen für die Einzelzellanalyse stammen aus dem Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Freiburg. Es handelte sich dabei um mittels FACS ausgewählte Leukozyten aus Blut eines männlichen Freiwilligen. Die Plattenbelegung ist in Abb. 3.1 dargestellt.

Die Chromosomenpräparationen für die Lasermikrodissektion wurden vom Institut für Humangenetik der Ruhr-Universität Bochum anonymisiert zur Verfügung gestellt.

Das Lebergewebe für die Lasermikrodissektion stammte aus dem Dipartimento di Medicina Legale (DIMEL) der Universität Genua und wurde in Kooperation mit dem hiesigen Institut untersucht.

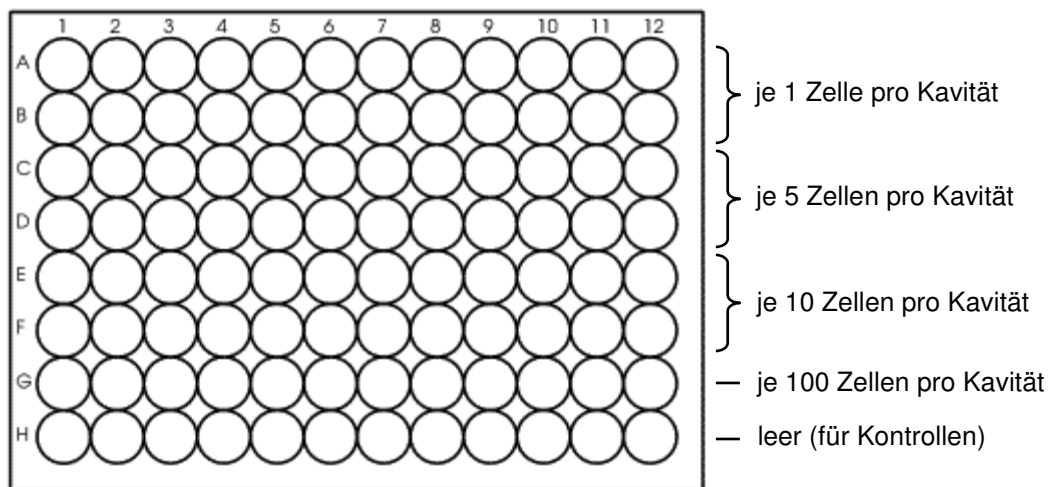


Abbildung 3.1 Verteilung der Zellen in der Mikrotiterplatte

3.1.10 GenBank und andere Internetquellen

Die in dieser Dissertation beschriebenen Internetadressen (URL) und Rechercheergebnisse in Internetdatenbanken (z.B. GenBank des *National Center for Biotechnology Information*: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) waren zum Zeitpunkt des Abfassens dieser Arbeit gültig. Aufgrund der immensen Dynamik des Internets kann keine Garantie für den dauerhaften Verbleib dieser Informationsinhalte an den angegebenen Orten übernommen werden.

3.2 Methoden

Sämtliche Proben, in denen nur geringe DNA-Mengen zu erwarten waren, wurden besonders sorgfältig behandelt, um Kontaminationen auszuschließen. D.h. es wurde im prä-PCR-Bereich ausnahmslos mit Filterspitzen, UV-bestrahlten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien gearbeitet.

3.2.1 Blutvortest nach Kastle-Meyer

An den Abrieben der Stechhilfe wurde jeweils ein Blutvortest durchgeführt. Bei dem Blutvortest nach Kastle-Meyer handelt es sich um eine Enzym-Substrat-Reaktion, deren Reaktionsprinzip auf der pseudoperoxidatischen, katalytischen Wirkung des Hämoglobins in den Erythrozyten beruht. Das Hämoglobin katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid; der hierbei frei werdende Sauerstoff wird auf reduziertes Phenolphthalein (= „Kastle-Meyer-Reagenz“) übertragen, das durch die Oxidation in ein rosafarbenes Reaktionsprodukt überführt wird (Abb. 3.2).

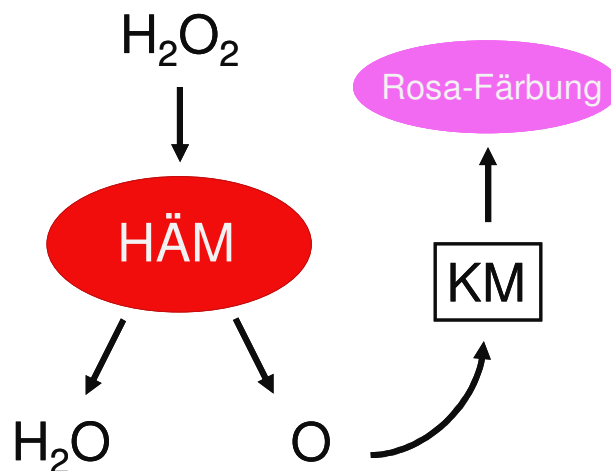


Abbildung 3.2 Das Reaktionsprinzip des Kastle-Meyer-Blutvortests

Bei frischen Blutspuren tritt bei positivem Reaktionsausfall sofort eine Rosa-Färbung und Schaumbildung auf; bei gealterten Blutspuren kann die Reaktion verzögert sein.

Aufgrund der hohen Nachweissensitivität ($\sim 1:10000$) können auch noch stark verdünnte Blutspuren detektiert werden.

Falsch-positive Reaktionen können – vor Zugabe des Wasserstoffperoxids – durch Vorliegen chemischer Oxidantien oder pflanzlicher Peroxidasen auftreten, und etwa 1 min nach Zugabe aller Reagenzien durch Autooxidation der Luft. Sehr stark verdünnte oder sehr alte Blutantragungen können einen negativen Reaktionsausfall bedingen.

Der Blutvortest wird i.d.R. indirekt durchgeführt, d.h. die Blut-verdächtige Antragung bzw. der Bereich, in dem man Blutantragungen vermutet, wird mit der Ecke eines gefalteten Filterpapiers abgerieben und nacheinander wird je ein Tropfen der drei Lösungen (Ethanol 96%, Kastle-Meyer-Reagenz, Wasserstoffperoxid 3%) mit einer Pasteur-Pipette aufgetropft. Bei sehr schwachen Spuren kann der Blutvortest direkt am Untersuchungsmaterial durchgeführt werden. Dazu wird ein kleines Stückchen des verdächtigen Bereichs direkt auf ein Filterpapier gelegt und dann wie oben beschrieben getestet.

3.2.2 Lasermikrodissektion (LMD)

3.2.2.1 Herstellung von Chromosomenpräparaten für die Lasermikrodissektion

Vom Institut für Humangenetik der Ruhr-Universität wurden Lymphozyten aus peripherem Blut kultiviert und anschließend aufgearbeitet. Einige Milliliter dieser Zellsuspension wurden zur Verfügung gestellt.

Um für die Lasermikrodissektion einzelner Chromosomen geeignete Präparate herzustellen, wurde die Zellsuspension zunächst durch Abschätzung der Zelldichte (optische Kontrolle der Trübung) mit Fixativ auf die gewünschte Zelldichte eingestellt. Bei zu hoher Zelldichte wurde die Suspension mit Fixativ weiter verdünnt, bei zu geringer Zelldichte wurden die Zellen zentrifugiert und in weniger Fixativ resuspendiert.

Auf die kalten, feuchten Objektträger (Membrane Slides for Lasermicrodissection, Molecular Machines & Industries, Glattbrugg/Schweiz), die zuvor 24 h zum Entfetten

in Ethanol eingelegt worden waren, wurden aus etwa 10 cm Höhe vier bis fünf Tropfen der Zellsuspension mit einer Pasteurpipette aufgetropft.

Da die Spreitung der Chromosomen von der Luftfeuchtigkeit abhängig ist, wurde die Zellsuspension im Nebel aufgetropft, der von einem Inhalationsgerät (PARI Turbo-BOY N, Pari GmbH, Starnberg) erzeugt wurde. Je mehr Luftfeuchtigkeit vorhanden ist, desto langsamer verdunstet das Fixativ und desto ausgeprägter ist die Spreitung der Chromosomen. Nach dem Auftropfen beginnt das Fixativ zu verdampfen. Bei diesem Vorgang werden die Chromosomen gespreitet und Cytoplasmareste entfernt.

Für einige Präparate wurde anschließend vom Institut für Humangenetik der Ruhr-Universität Bochum eine GTG-Färbung der Präparate durchgeführt, um die einzelnen Chromosomen besser unterscheiden zu können. Dabei erfolgte nach Trypsin-Verdau eine Giemsa-Färbung der getrockneten Präparate.

3.2.2.2 Herstellung von Gewebeschnitten für die Lasermikrodissektion

Ein Stück transplantiertes Lebergewebe mit Metastasen wurde dem Verstorbenen bei der durchgeführten Obduktion in Genua, Italien, entnommen. Dieses Gewebe wurde tiefgekühlt nach Münster überführt und hier für 48 h in 4%-igem Formalin fixiert. Anschließend wurde es wie folgt weiter aufgearbeitet und gefärbt: das in Formalin fixierte Gewebe wurde gewässert und ins Autotechnicon überführt, wo es über die aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 99,9%) und Xylol in flüssiges Paraffin eingebracht und in Paraffin-Blöckchen gegossen wurde.

Mittels eines Microtoms wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht (Membrane Slides for Lasermicrodissection, Molecular Machines & Industries, Glattbrugg/Schweiz). Die Schnitte wurden mit Hämatoxylin gefärbt, um die Zellkerne besser identifizieren zu können.

3.2.2.3 Durchführung der Lasermikrodissektion

Die Lasermikrodissektionsgeräte SmartCut Mikrodissektion und CellCut Plus Mikrodissektion (beide: Olympus, Hamburg) wurden nach Herstellerangaben zur Lasermikrodissektion verwendet. Dazu wurden zunächst die Chromosomen-Präparate bzw.

Gewebe-Schnitte wie beschrieben (Abschnitte 3.2.2.1 und 3.2.2.2) angefertigt und in den Strahlengang des Mikroskops gebracht. Weiterhin wurde ein offenes Eppendorfgefäß (Tubes with adhesive lid, with diffusor, MMI, Glattbrugg/Schweiz), dessen Innenseite mit einer adhäsiven Folie beschichtet ist, über dem Objektträger in der dafür vorgesehenen Vorrichtung befestigt.

Über die „Scan“-Funktion wurde der ausgewählte Bereich des Objektträgers auf dem Bildschirm dargestellt. Anschließend konnte der Bereich markiert werden, der mithilfe des Lasers ausgeschnitten werden sollte. Die Intensität, die Geschwindigkeit und der Focus des Lasers wurden an das jeweilige Präparat angepasst. Nachdem der ausgewählte Bereich mit dem Laser geschnitten worden war, wurde der Deckel des Eppendorfgefäßes auf das Präparat abgesenkt und wieder angehoben, so dass sich der ausgeschnittene Bereich im Deckel des Eppendorfgefäßes befand. Der Sammelerfolg konnte direkt über Fokussierung der jeweiligen Ebenen überprüft werden (vgl. Abb. 3.3).

Diese Eppendorfgefäße mit den ausgeschnittenen Bereichen konnten direkt für die DNA-Extraktion (3.2.4.2) verwendet werden.

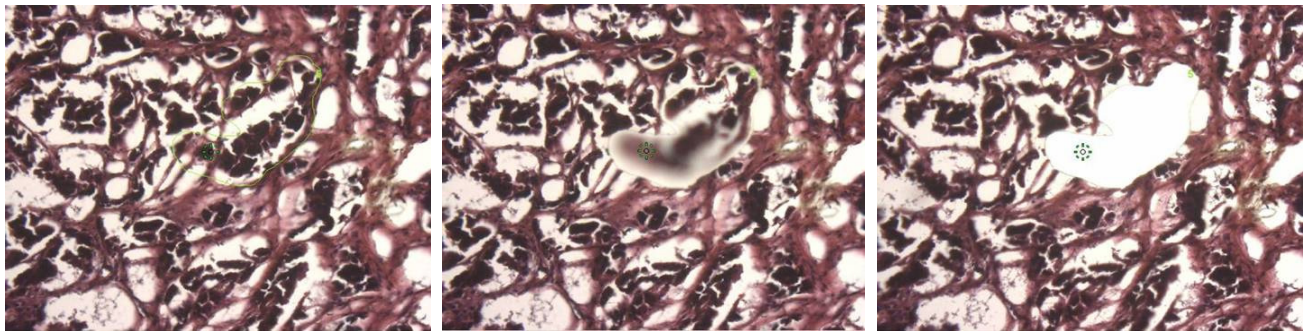


Abbildung 3.3 Exemplarische Darstellung der Anwendung der Lasermikrodissektion

3.2.3 Abriebe

3.2.3.1 Anlegen der standardisierten Abriebspuren

Um reproduzierbare, artifizielle Abriebspuren herzustellen, wurde ein Stück Kunstleder mit Muster (s. Abb. 3.4) benutzt. Das Muster ermöglichte die Erstellung von Abriebspuren auf vordefinierten, rechteckigen Stücken derselben Größe ($\sim 4 \text{ cm}^2$). Das Kunstleder wurde zur besseren Handhabung zunächst in etwa $50 \times 50 \text{ cm}$ große Stücke zerschnitten. Um eventuell vorhandene Zell- und DNA-Antragungen zu entfernen, wurden die Stücke mit DNA-ExitusPlusTM (AppliChem, Darmstadt) behandelt und anschließend für 15 Minuten UV-bestrahlt.

Da es praktisch nicht möglich ist, standardisierte Hautabriebspuren anzulegen, wurde eine geringe Menge Speichel (jeweils $5 \mu\text{l}$) auf die Kunstlederrechtecke appliziert, um damit Abriebspuren zu simulieren.

Eine Mitarbeiterin des Instituts für Rechtsmedizin spendete etwa 5 ml Speichel, von denen je $5 \mu\text{l}$ Speichel pro Rechteck mit einer Pipette appliziert und innerhalb des Rechteckes mithilfe eines Rührspatels verteilt wurden (Abb. 3.5). Dadurch sollte erreicht werden, dass die Zellen sich nicht komplett an einer Stelle befinden, sondern zufällig verteilt auf dem gesamten Bereich verteilt waren.



Abbildung 3.4 (a) Kunstlederstück vor der Bearbeitung und (b) Muster des Kunstleders; der rot umrandete Bereich stellt exemplarisch ein Rechteck dar, in das $5 \mu\text{l}$ Speichel appliziert wurden

Die Kunstlederstücke wurden über Nacht getrocknet und anschließend mit Silica-Gel-Tütchen, um möglicherweise noch vorhandene Feuchtigkeit zu absorbieren, in Plastikbeutel verpackt und lichtgeschützt bei Raumtemperatur gelagert.

3.2.3.2 Durchführung der Abriebe

Die Abriebe der artifiziell angelegten Spuren wurde randomisiert und standardisiert durchgeführt. Alle verwendeten Tupfer wurden vor Anfertigung der Abriebe ca. 15 min UV-bestrahlt. Die Baumwoll-Wattestiertupfer wurden mit einem der 12 getesteten Befeuchtungsmittel (s. Tab. 3.8) befeuchtet; für den Vergleich der 16 getesteten Tupfer-Beschichtungen (s. Tab. 3.8) wurden diese mit UV-bestrahltem HPLC-Wasser bzw. mit SDS-Lösung befeuchtet. Dann wurde jedes Kunstleder-Rechteck mit der in Abbildung 3.6 dargestellten Technik zur Sicherung der DNA abgerieben. Die Abriebe wurden innerhalb eines Tages durchgeführt.

Tabelle 3.8 Übersicht über die getesteten Befeuchtungsmittel und Beschichtungen

Befeuchtungsmittel	Beschichtungen
Aqua dest.	Baumwolle
SDS 1%	Baumwolle (fest gewickelt)
Xylol	Baumwolle (lose gewickelt)
Betain 10%	Viskose
Isopropanol abs.	Nylon
CTAB 1%	Nylon (beflockt)
TE-Puffer	Leder (schmal)
3M KCl-Lösung	Leder (breit)
Tween [®] 20	Schaumstoff über Baumwolle
5M Guanidinium-HCl-Lösung	Schwammtupfer
Brillenputztuch	Mikrofaser
Isopropanol 80%	Glasfaser (2,5 mm)
	Glasfaser (1,25 mm)
	Fließtupfer
	Glasfaser-Plättchen
	Mikrofaser-Pads

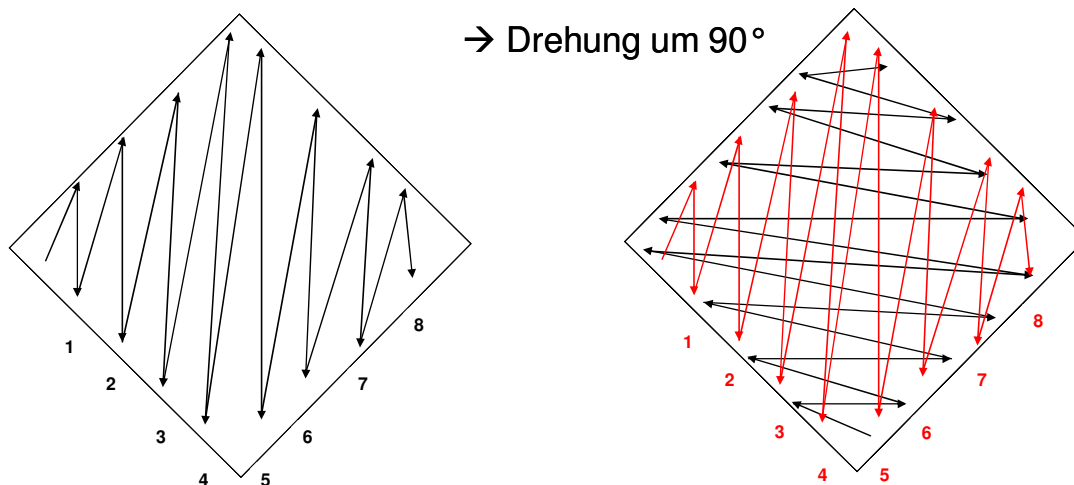


Abbildung 3.5 Durchführung der Abriebe

Das befeuchtete Tupferende wurde jeweils 8-mal hin und her von einer Längsseite des Rechtecks zur anderen geführt, dann wurde das Rechteck um 90° gedreht und das schon beschriebene Procedere noch einmal durchgeführt. Es wurde versucht, immer einen vergleichbaren Druck auszuüben.

Der komplette Watteanteil der Wattestieltupfer wurde abgeschnitten und mit jeweils $450\ \mu\text{l}$ Chelex und $50\ \mu\text{l}$ Proteinase K bei 37°C ü.N. extrahiert (vgl. Abschnitt 3.2.4.1). Die Extrakte wurden einer anschließenden Aufreinigung mittels Microcon[®]YM-100 (Millipore, Eschborn) (vgl. 3.2.4.3) unterzogen. Es folgte eine Quantifizierung der Zellkern-DNA mithilfe des Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kits (Applied Biosystems, Darmstadt). Anschließend wurde eine Monoplex-PCR für das STR-System ACTBP2 (vgl. Abschnitt 3.2.6) durchgeführt. Die Amplifikate wurden kapillargelelektrophoretisch unter Verwendung des ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Darmstadt) analysiert und anschließend mittels Genotyper-Software ausgewertet. Falls die dargestellten Peaks eine Höhe von über 5000 rfu aufwiesen, wurden die entsprechenden Proben 1:10 verdünnt und erneut analysiert. Für negative Proben wurden die PCR und die kapillargelelektrophoretische Analyse wiederholt. Um eine statistische Auswertung der Ergebnisse mithilfe der SPSS-Software Version 14.0 (SPSS GmbH Software, München) durchführen zu können, wurden die erhaltenen rfu-Werte über den internen Längenstandard normiert, damit sie untereinander verglichen werden können.

3.2.4 Präparation von Nukleinsäuren

3.2.4.1 Extraktion genomischer DNA aus getrockneten Blutflecken, Speichelproben und Abrieben

Die DNA-Extraktion erfolgte nach einer von Singer-Sam et al. (1989) beschriebenen und in einigen Punkten vom Institut für Rechtsmedizin Münster modifizierten Methode.

Das Styrolharz Chelex[®] 100 wird verwendet, um mehrwertige Metallionen durch gepaarte Iminodiacetatgruppen zu chelatisieren und so die Degradierung der DNA bei hohen Temperaturen zu verhindern. Zusätzlich werden hydrophobe Zellbestandteile durch Chelex[®] 100 gebunden. Zur Verstärkung der Lyse kann bei älteren Blut- oder Speichelproben zusätzlich Proteinase K hinzugegeben werden, die bewirkt, dass alle DNasen sowie Membranproteine hydrolysiert werden.

Ein ca. 5 mm² kleiner Blutfleck wurde in 1000 µl HPLC-Wasser überführt, durchmischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 3 min bei 14000 x g zentrifugiert und der Überstand auf etwa 15 µl reduziert. Nach Zugabe von 200 µl Chelex (5% (w/v)) wurden die Proben wiederum durchmischt und zur Lyse über Nacht bei 37°C oder für 30 min bei 56°C im Wasserbad inkubiert und anschließend für 8 min gekocht.

Die Speichelproben wurden durch Abrieb der Mundschleimhaut mit Wattetupfern entnommen. Von dem getrockneten Material wurde ein etwa 2 mm³ großes Stück in 200 µl Chelex (5% (w/v)) überführt und kurz durchmischt. Anschließend wurden die Proben zur Lyse über Nacht bei 37°C oder für 30 min bei 56°C im Wasserbad inkubiert und hinterher für 8 min gekocht.

Bei älteren Blut- und Speichelproben wurden jeweils 50 µl Chelex durch Proteinase K (2 mg/ml) ersetzt.

Von den Kunstleder-Abrieben wurde jeweils der komplette Watteanteil des Tupfers in 400 µl Chelex überführt und nach Zugabe von 50 µl Proteinase K kurz durchmischt. Die Proben wurden zur Lyse über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend für 8 min gekocht.

Von den Abrieben der Stechhilfe wurden die kompletten Abriebbereiche der Watte-
stäbchen mit kleinem Kopf (Karl Beese, Barsbüttel) in 150 µl Chelex überführt und
nach Zugabe von 50 µl Proteinase K kurz durchmischt. Die Proben wurden für
30 min bei 56 °C inkubiert und anschließend für 8 min gekocht.

Nach dreiminütiger Zentrifugation der o.g. Proben bei 14000 x g konnte der Über-
stand direkt in die PCR (Abschnitt 3.2.6) eingesetzt werden.

3.2.4.2 Extraktion genomischer DNA aus lasermikrodisseziertem Gewebe mittels QIAamp[®] DNA Micro Kit

Die DNA-Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben. Es wurden 25 µl Buffer AE
(Empfehlung: 20 bis 30 µl) verwendet und die Inkubationszeit vor dem finalen
Zentrifugationsschritt wurde auf 5 min (Empfehlung: 1 min) verlängert.

3.2.4.3 Aufreinigung und Aufkonzentration der DNA-Extrakte

DNA-Extrakte aus Speichelproben, die nach Wiederholung der PCR negativ waren,
und alle DNA-Extrakte von Abrieben wurden mittels Microcon[®] YM-100 (Millipore)
aufgereinigt und aufkonzentriert.

Der vorhandene Extrakt wurde mit HPLC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 500 µl
aufgefüllt und komplett auf eine Membran aus regenerierter Zellulose mit einer spezi-
fischen Porengröße gegeben und zentrifugiert (14000 x g, 12 min). Nach Zugabe von
500 µl HPLC-Wasser wurde erneut zentrifugiert (14000 x g, 12 min). Salze und
andere niedermolekulare Bestandteile (z.B. PCR-Inhibitoren) passieren die Membran,
die DNA bleibt aufgrund ihrer Größe auf der Membran liegen.

Das Filtrat wurde verworfen, nach Zugabe von 60 µl HPLC-Wasser auf den Filter
wurde dieser umgedreht auf ein neues Eppendorf-Gefäß gesetzt und die aufgereinig-
te DNA zurück zentrifugiert (1000 x g, 3 min).

3.2.5 Quantifizierung genomischer DNA mittels Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit

Die Quantifizierung der DNA-Extrakte erfolgte mittels Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit, das auf der Verwendung einer TaqMan[®]-Sonde basiert, im ABI PRISM[™]7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Als Modifikation wurde das empfohlene Reaktionsvolumen von 25 µl pro Ansatz (23 µl Mastermix + 2 µl DNA-Extrakt) auf 13,5 µl (11,5 µl Mastermix + 2 µl DNA-Extrakt) reduziert.

3.2.6 Polymerase-Ketten-Reaktion

Für die Amplikonlängenbestimmungen wurden fluoreszenz-markierte Primer verwendet, für die Sequenzreaktion wurden unmarkierte Primer verwendet.

Die Amplifizierung erfolgte nach der PCR-Methode von Saiki et al. (1988), die mithilfe der thermostabilen *Thermophilus aquaticus*-DNA-Polymerase arbeitet.

0,5 bis 2 µl (s. Tab. 3.9 und 3.11) der zu (re-)amplifizierenden DNA-Extrakte wurden in Eppendorfgefäße zu dem aliquotierten Mastermix gegeben. Die Zusammensetzungen der Mastermixe für die entsprechenden Primerpaare sind in den Tabellen 3.9 und 3.11 dargestellt.

Tabelle 3.9 Zusammensetzung der Mastermixe für die PCR

	ACTBP2	FGA	DXS6800	Flankierende Marker von D3S1358, FGA, ACTBP2, VWA	
				2 µl	1 µl
DNA-Extrakt	1 µl	2 µl	Einzelzellen	2 µl	1 µl
MgCl ₂ [25 mM]	0,75 µl	1,5 µl	0,4 µl	1,5 µl	0,75 µl
BSA [10 mM]	0,5 µl	0,5 µl	0,13 µl	1 µl	0,5 µl
10x Puffer	1,25 µl	2 µl	0,63 µl	2,5 µl	1,25 µl
dNTPs [0,2 mM]	0,5 µl	2 µl	0,5 µl	2 µl	1 µl
Forward Primer [10 pmol/µl]	0,13 µl	0,5 µl	0,13 µl	1 µl	0,5 µl
Reverse Primer [10 pmol/µl]	0,13 µl	0,5 µl	0,13 µl	1 µl	0,5 µl
Ampli Taq Gold™ DNA- Polymerase [5 U/µl]	0,15 µl	0,3 µl	0,1 µl	0,3 µl	0,15 µl
HPLC-Wasser	ad 12,5 µl	ad 25 µl	-	ad 25 µl	ad 12,5 µl

Tabelle 3.10 Zusammensetzung der Primer-Mixe für die Multiplex-PCR der flankierenden Systeme von ACTBP2

Primer-Mix I:	20 x D6S460*
	5 x D6S1609*
	5 x D6S300*
	1 x D6S462*
	0,1 x ACTBP2-HEX
	10 x D6S272*
Primer-Mix II:	20 x D6S460*
	1 x D6S1609*
	1 x D6S300*
	0,5 x D6S462*
	0,1 x ACTBP2-HEX
	10 x D6S272*

* alle gekennzeichneten Primer weisen eine Konzentration von 10 pmol/µl auf

Tabelle 3.11 Zusammensetzung der Mastermixe für die Multiplex-PCR der flankierenden Marker von ACTBP2

	Flankierende Marker – ACTBP2 (Multiplex)	Flankierende Marker – ACTBP2 (Multiplex)*
DNA-Extrakt	1 µl / Einzelzellen	1 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1,5 µl / 0,5 µl	} Reaction-Mix 5 µl
BSA [10 mM]	1 µl / 0,35 µl	
10x Puffer	2,5 µl / 0,85 µl	
dNTPs [0,2 mM]	2 µl / 0,7 µl	
AmpliTaq Gold™ DNA- Polymerase [5 U/µl]	0,3 µl / 0,1 µl	
Primer-Mix I bzw. Primer-Mix II	12 µl / 4 µl (nur PM I)	1 µl
HPLC-Wasser	ad 25 µl / -	ad 25 µl / 12 µl

* hier wurde das QIAGEN Multiplex PCR Kit (Qiagen, Hilden) verwendet

Neben den zu untersuchenden Proben wurden eine Leerkontrolle und eine Positivkontrolle mitamplifiziert. Die Leerkontrolle enthielt Wasser anstelle eines DNA-Extraktes und diente dem Ausschluss einer möglichen Kontamination. Die Positivkontrolle enthielt Zelllinien-DNA und diente der Kontrolle des korrekten Ablaufs der PCR.

Die Proben wurden im Thermocycler mit den in den Tabellen 3.12 und 3.13 angegebenen Bedingungen amplifiziert.

Tabelle 3.12 Amplifizierungsbedingungen der PCR-Ansätze mit unmarkierten und fluoreszenz-markierten Primern

	ACTBP2	FGA	DXS6800
Initiale Denaturierung	94 °C 10 min	94 °C 4 min	95 °C 11 min
Anzahl der Zyklen	30	35	30
1. Denaturierung	93 °C 30 sec	94 °C 30 sec	93 °C 1 min
2. Annealing	61 °C 30 sec	57 °C 1 min	60 °C 1 min
3. Elongation	72 °C 30 sec	72 °C 1 min	72 °C 1 min
Finale Extension	72 °C 30 min	72 °C 10 min	72 °C 30 min

Tabelle 3.13 Amplifizierungsbedingungen der PCR-Ansätze für die flankierenden Marker

	Flankierende Marker von D3S1358, FGA, ACTBP2, VWA	Flankierende Marker – ACTBP2 (Multiplex)
Initiale Denaturierung	95°C 11 min	95°C 15 min
Anzahl der Zyklen	30	30
1. Denaturierung	94°C 1 min	93°C 1 min
2. Annealing	61°C 1 min	58°C 1 min 30sec
3. Elongation	72°C 1 min	72°C 1 min
Finale Extension	60°C 80 min	72°C 45 min

Die Amplifizierung der männlichen Einzelzellen mittels des AmpFISTR® Yfiler® PCR Amplification Kits erfolgte nach Herstellerangaben. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde von 25 µl auf 5,75 µl reduziert.

Die Amplifizierung der Proben in den Fällen mit entgegengesetzter Homozygotie erfolgte mittels AmpFISTR® Profiler® PCR Amplification Kits nach Herstellerangaben. Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde von 25 µl auf 6,25 µl reduziert. Des Weiteren wurden als Annealing-Temperaturen 60°C, 55°C und 50°C statt 59°C verwendet.

Die Amplifizierung der lasermikrodissezierten Proben im Fall der Organtransplantation erfolgte mittels Mentype® Nonaplex^{QS} (Biotype AG, Dresden). Das Gesamtvolumen des Ansatzes wurde von 25 µl auf 12,5 µl reduziert.

Von den PCR-Ansätzen mit Gesamtvolumina von 12 bzw. 25 µl wurden je 4 µl des Amplifikats auf ein 9,3%-iges Polyacrylamidgel aufgetragen, von den PCR-Ansätzen mit kleineren Gesamtvolumina wurden je 2 µl des Amplifikats aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (Abschnitt 3.2.7.1).

Um die Allele der zur Sequenzierung bestimmten Proben einzeln zu isolieren, wurden je 8 µl des PCR-Produktes auf ein 6,4%-iges PAA-Gel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und silbergefärbt (Abschnitt 3.2.7.1).

Zur Längenbestimmung wurde der 123 bp-Ladder mit auf das Gel aufgetragen (s. Anhang 9.2).

3.2.7 Elektrophoresetechniken

3.2.7.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Es wurde eine horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese nach Allen et al. (1989) unter nicht-denaturierenden Bedingungen in einem diskontinuierlichen Puffersystem durchgeführt. Die Trenneigenschaften des Gels sind von der eingesetzten Acrylamid-Menge und von physikalischen Parametern (z. B. der Stromstärke) abhängig.

Zur Erfolgskontrolle der PCR wurden 9,3%-ige Gele, zur Auftrennung heterozygoter Proben wurden 6,4%-ige Gele verwendet.

Die Gele wurden nach folgenden Rezepturen auf PAG-Folie zwischen zwei mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen.

Tabelle 3.14 Rezepte für das Kontroll- und das Trenngel

Kontrollgel:	Trenngel:
9,3% Acrylamid (w/v)	6,4% Acrylamid (w/v)
3,5 ml Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	8,7 ml Acryl-PDA 30%
3 ml Tris-Sulfat-Puffer 0,4 M	4 ml CHES 0,28 M
105 µl APS 10%	6,6 ml Tris-Formiat 0,5 M
5,3 µl TEMED	300 µl APS 10%
	15,5 µl TEMED
ad 15 ml Aqua bidest.	ad 40,6 ml Aqua bidest.

Die Kontrollgele maßen 12 cm x 26 cm bei einer Stärke von 0,45 mm und boten ca. 10 cm Trennstrecke, die Trenngele maßen 26 cm x 24 cm bei einer Stärke von 0,75 mm und boten ca. 22 cm Trennstrecke. Als Elektrodenstreifen wurden Filterpapierstreifen (26 cm x 1 cm) benutzt, die mit Tris-Borat-Puffer getränkt waren.

Auf das Gel wurden Glasfasergewebeplättchen (ca. 0,5 cm²) aufgelegt, auf die jeweils 4 µl (Kontrollgel) bzw. 8 µl (Trenngel) des Amplifikats aufgetragen wurden. Zur Längenbestimmung wurde der 123 bp-Längenmarker mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte für die Kontrollgele bei 1000 V, 25 mA und 15 W bis die Bromphenolblau-markierte Lauffront die Anode erreichte. Für die Trenngele wurde zunächst für 90 min eine Leistung von 5 W verwendet, für weitere 90 min eine Leistung von 10 W und letztendlich eine Leistung von 15 W, bis die Bromphenolblau-markierte Lauffront die Anode erreichte. Die Spannung lag für den gesamten Lauf bei 1000 V und die Stromstärke bei 40 mA.

Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung wurden die Gele nach folgendem Protokoll angefärbt:

- | | |
|----------------------------------|---|
| 1. 2%-ige Salpetersäure | ca. 2 min (bis sich die Lauffront gelb färbt) |
| 2. Spülen mit Aqua dest. | 2 x 20 sec |
| 3. 0,1%-iges Silbernitrat | 20 min |
| 4. Spülen mit Aqua dest. | 2 x 20 sec |
| 5. Natriumcarbonat 0,28 M (4 °C) | bis zur optimalen Anfärbung der Gele |
| 6. 7,5%-ige Essigsäure (4 °C) | 3 min |
| 7. Spülen mit Aqua dest. | 2 min |
| 8. 5%-iges Glycerin | 5 min |
| 9. Lufttrocknen | ca. 24 h |

Die durch das Trenngel dargestellten heterozygoten DNA-Merkmale wurden mit einem sterilen Skalpell einzeln ausgeschnitten, mit 100 µl HPLC-Wasser gewaschen und anschließend mit 50 µl HPLC-Wasser gut durchmischt. 2 µl des Überstands wurden dann zur Reamplifizierung erneut in eine PCR (Abschnitt 3.2.6) eingesetzt.

3.2.7.2 Kapillargelelektrophorese

Bei der Kapillargelelektrophorese befindet sich die Gelmatrix in einer Kapillare mit einem Innendurchmesser von 20 bis 100 μm . Da die Oberfläche im Vergleich zum Gelvolumen sehr groß ist, ist eine schnelle Abgabe der bei der Elektrophorese entstehenden Wärme möglich. Es kann mit sehr hohen Spannungen (bis zu 800 V/cm) gearbeitet werden, ohne dass das Gel zu schmelzen droht. Durch die hohe Spannung werden die Laufzeiten so verkürzt, dass eine Probe in wenigen Minuten analysiert ist.

Mit der laserinduzierten Fluoreszenz (LIF) können fluoreszenz-markierte DNA-Amplikone detektiert werden, wodurch selbst sehr geringe Mengen (bis 10 fg) noch nachweisbar sind. Die erhaltenen Rohdaten aus der Analyse einer Probe werden mit dem internen Längenstandard abgeglichen und ermöglichen so eine softwaregestützte Auswertung der Daten.

Die Verwendung der Kapillargelelektrophorese zur automatisierten Analyse von Amplikonlängen nach Durchführung einer Multiplex-PCR im Bereich der forensischen Molekulargenetik wurde 1998 erstmals beschrieben (Mansfield et al. 1998; Moretti et al. 2001a). Das Prinzip der kapillargelelektrophoretischen Analyse ist in Abb. 3.7 dargestellt.

In dieser Arbeit wurde die Kapillargelelektrophorese nach Herstellerangaben mit dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer bzw. ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (beide Applied Biosystems) und der entsprechenden Software (GeneScan® Analysis Software Version 3.1) durchgeführt, um die Amplikonlängen in den STR-Systemen ACTBP2 und FGA, die Amplikonlängen der flankierenden Marker von D3S1358, FGA, ACTBP2 und VWA der einzelnen Proben zu bestimmen bzw. um die im Rahmen der Einzelzellanalysen und der Abriebspuren durchgeführten Amplifizierungen zu überprüfen.

Weiterhin wurden die DNA-Amplikone aus der Sequenzanalyse (Abschnitt 3.2.10) mittels Kapillargelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt und das basenspezifische 3'-Ende mittels der LIF (laserinduzierten Fluoreszenz) detektiert.

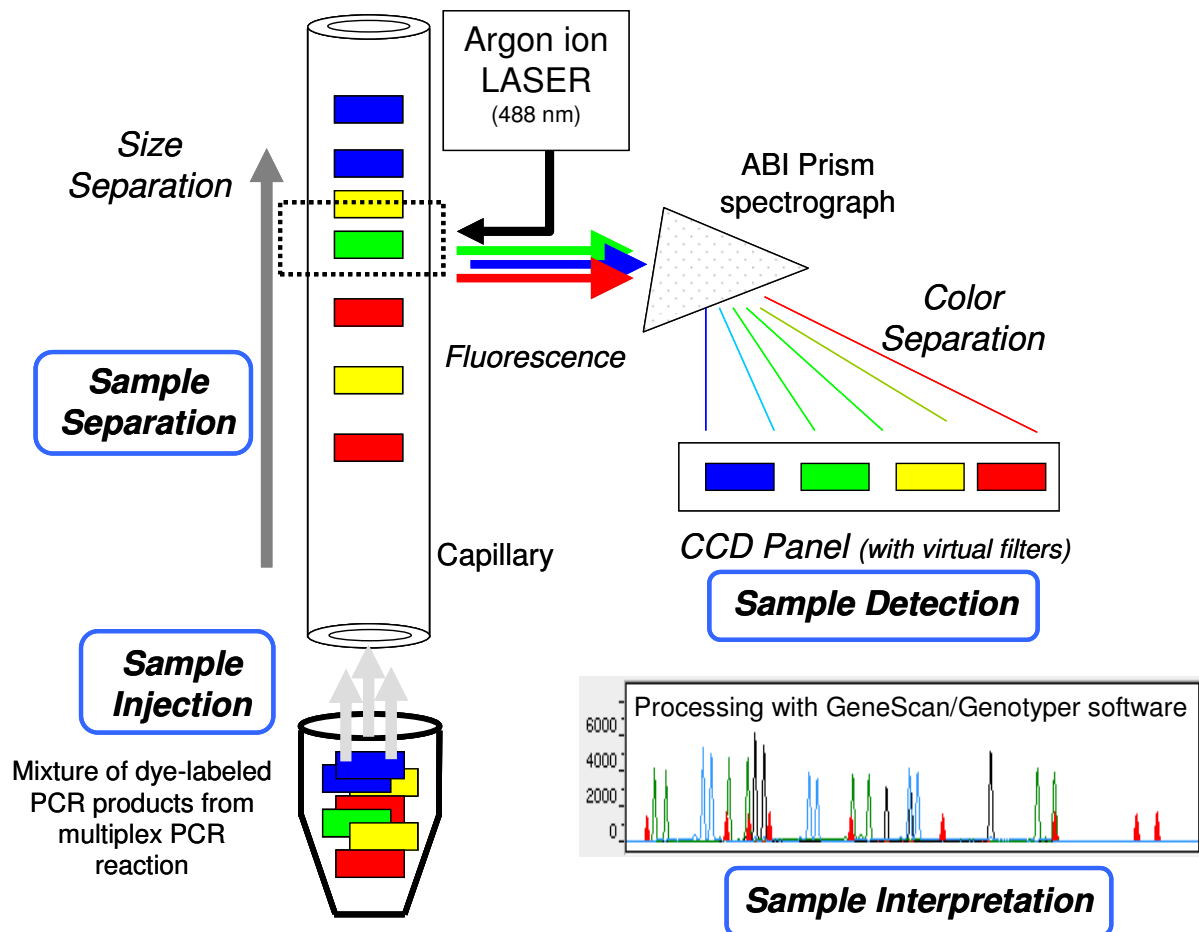


Abbildung 3.6 Prinzip der kapillargelelektrophoretischen Analyse (übernommen aus Butler 2005)

3.2.8 Klonierung von PCR-Amplikonen mittels TA-Klonierung

In dieser Arbeit wurde die TA-Klonierung im Fall der entgegengesetzten Homozygotie im STR-System FGA zum Trennen der Iso-Allele 25 (Abschnitt 4.2) verwendet.

Die TA-Klonierung beruht auf der Entdeckung, dass die *Taq*-DNA-Polymerase Amplikone mit einem überhängenden Adenosin produziert (Clark 1988).

Zur Klonierung der PCR-Produkte wurde das pGEM[®]-T Easy Vector System (Promega, Mannheim) verwendet. Dieses System enthält einen Vektor, der mit *EcoRV* linearisiert wurde und am 3'-Ende einen Thymin-Überhang besitzt.

Adenylierung der Amplifikate

Die amplifizierten Iso-Allele 25 (Abschnitt 4.2) des STR-Systems FGA sollten kloniert werden. Vor der TA-Klonierung mussten sie wieder adenyliert werden, da in der Zeit zwischen PCR-Amplifizierung und Klonierung die Phosphodiesterbindungen des Adenosins zum PCR-Produkt hydrolysiert sein können.

Dazu wurde dem Amplifikat auf Eis dATP [0,2 mM] sowie 5 U GoldStar® DNA-Polymerase (Eurogentec, Köln) hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 70 °C im TRIO-Thermoblock (Biometra, Göttingen) inkubiert.

Aufreinigung der adenylierten PCR-Produkte

Zum Entfernen der überschüssigen PCR-Bestandteile, z. B. nicht-eingebaute Primer, wurden die Proben mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Es wurde ein Volumen von 30 µl eluiert.

Ligation, Transformation und Minipräparation von Plasmid-DNA wurden mithilfe des Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Restriktionsenzymatische Modifizierung von Nukleinsäuren

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA zur Überprüfung der korrekten Klonierung wurde mit dem Enzym *EcoRI* nach den etablierten molekularbiologischen Standardmethoden durchgeführt, wie sie beispielsweise in der Veröffentlichung von Sambrook (1989) beschrieben sind.

3.2.9 Quantifizierung von Plasmid-DNA mittels UV/VIS-Spektrometer

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) mithilfe des UV/VIS Spektrophotometers Lambda 11 (Perkin Elmer). Hierfür wurde die Plasmid-DNA 1:10 mit HPLC-Wasser verdünnt und deren Extinktion bei 260 nm (Nukleinsäuren), 280 nm (Proteine) und 320 nm (Hintergrund) gegen HPLC-Wasser als Referenz gemessen.

Die Nukleinsäurekonzentration lässt sich mithilfe folgender Formel berechnen:

$$C \text{ [ng/}\mu\text{l]} = (\text{OD}_{260\text{nm}} - \text{OD}_{320\text{nm}}) \times f \times d$$

mit f = Verdünnung,

d = Faktor; 50ng/ μ l für doppelsträngige DNA

Die Reinheit der DNA-Lösung ergibt sich aus dem Verhältnis $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen, ansonsten liegt eine Verunreinigung durch Proteine oder RNA vor.

3.2.10 Sequenzanalyse

Um bei den Fällen der entgegengesetzten Homozygotie im STR-System FGA die DNA-Sequenzen der involvierten Allele zu ermitteln, wurden die PCR-Produkte bzw. die Plasmide sequenziert.

Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxymethode von Sanger und Mitarbeitern (1977) durchgeführt. Dabei wurden zusätzlich zu den dNTPs auch fluoreszenzmarkierte ddNTPs (Didesoxynucleosid-5'-triphosphate) in die PCR eingesetzt. Diese Modifikation erlaubt es, alle vier ddNTPs in einer Reaktion statt in vier getrennten Reaktionen durchzuführen. Werden diese markierten ddNTPs in den DNA-Strang eingebaut, kommt es zu einem Kettenabbruch, da die für die Kettenverlängerung benötigte 3'-Hydroxyl-Gruppe fehlt. Es entstehen unterschiedlich lange DNA-Amplikone, die alle das durch den Sequenzierprimer definierte 5'-Ende besitzen. Jedoch variiert das entstandene Amplikon in der Länge und besitzt ein basenspezifisches 3'-Ende, das mit dem jeweiligen ddNTP endet.

Die DNA wurde mit 10 pmol der unmarkierten FGA-Primer (vgl. Tabelle 3.2) bzw. 5 pmol Universalprimer (Plasmid-DNA) (vgl. Tabelle 3.7), mit 4 μ l BigDye[®] Terminator v 1.1 (Applied Biosystems) und HPLC-Wasser auf ein Volumen von 20 μ l gebracht. Es wurde das folgende Sequenzierprogramm durchgeführt:

Denaturierung	10 sec	96 °C	} 30 Zyklen
Annealing	5 sec	50 °C	
Elongation	4 min	60 °C	

Die Proben wurden über PERFORMA[®] DTR-Säulen (MoBiTec, Göttingen) aufgereinigt, bei 60 °C im Rotations-Vakuum-Konzentrator (ILMVAC) eingetrocknet und in 20 µl HiDi-Formamid aufgenommen. Die Sequenzanalyse erfolgte mittels ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben mit der Sequencing Analysis Software Version 3.0.

4 Ergebnisse – Mutationen in der Abstammungsbegutachtung

4.1 Flankierende Marker als Werkzeug zur Charakterisierung von STR-Mutationen

Um Mutationen, die bei routinemäßig durchgeführten Vater- und Mutterschaftsuntersuchungen beobachtet werden, eindeutig der Keimbahn des Vaters oder der Mutter zuordnen zu können, sollten flankierende polymorphe STRs der hochpolymorphen Systeme D3S1358, FGA, ACTBP2 und VWA ausgewählt und zur Bestimmung des mutierten Haplotypen herangezogen werden.

Diese vier Systeme wurden ausgewählt, weil sie im Vergleich zu anderen STRs relativ hohe Mutationsraten (vgl. Abschnitt 1.3.2 und Anhang 9.1) aufweisen und somit im hiesigen Institut eine große Stichprobe an Fällen, in denen eines dieser vier STR-Systeme eine Mutation aufweist, vorhanden ist.

Es sollte nicht nur der Ursprung der Mutation (paternal oder maternal), sondern ebenso die Auswirkung (Gewinn oder Verlust einer Wiederholungseinheit), der Grad (1-Schritt- oder 2-Schritt-Mutation) und der Mechanismus der Mutation (*slipped strand mispairing* oder *unequal crossing over*) identifiziert werden.

Nur Fälle, in denen die Mutation in die biostatistische Auswertung einbezogen wurde und die Vaterschaft „praktisch erwiesen“ war, wurden untersucht.

Es wurden flankierende, polymorphe *short tandem repeats* des STR-Systems, das die Mutation aufweist, mit einer genetischen Distanz von $\pm 8\text{cM}$ ausgewählt und – mittels mehrerer Monoplex-PCR-Ansätze – amplifiziert.

Dabei wurden sowohl für die elterlichen, als auch für alle vorliegenden kindlichen Proben die flankierenden STR-Systeme amplifiziert und, indem die gekoppelten Befunde ermittelt wurden, die erhaltenen Allele zur Konstruktion der elterlichen Haplotypen verwendet (s. Abb. 4.1). Da die elterlichen Haplotypen kodominant vererbt werden, ist bei der Untersuchung von mehreren Kindern die Wahrscheinlichkeit höher, dass sich alle vier elterlichen Haplotypen identifizieren lassen. Diese Identifizierung soll eine eindeutige Charakterisierung des mutierten Allels erlauben und damit auch eindeutige Aussagen hinsichtlich der o.g. Parameter (Ursprung, Auswirkung und Grad der Mutation) erlauben.

Falls in einem der Fälle UEC der zugrunde liegende Mutationsmechanismus war, würde man dies detektieren, da dann die stromauf- und stromabwärts gelegenen flankierenden Marker den unterschiedlichen elterlichen Haplotypen angehören müssten (Jeffreys et al. 1998; Klintschar et al. 2004).

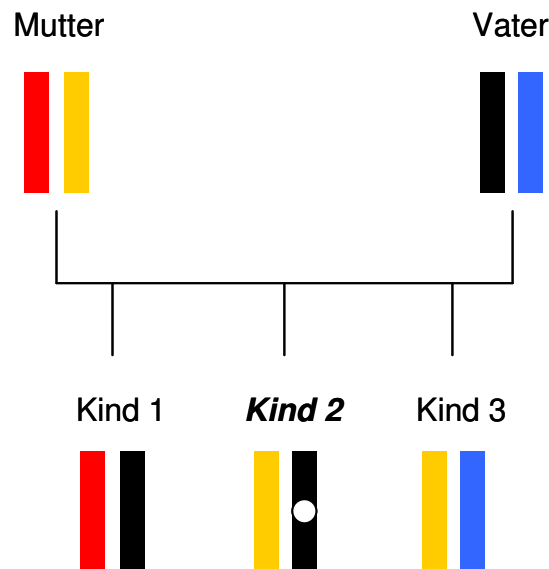


Abbildung 4.1 Prinzip der Charakterisierung von Mutationen anhand der familien-spezifischen Haplotypen

In den drei Kindern konnten alle elterlichen Haplotypen identifiziert werden. So lässt sich die Mutation des 2. Kindes (symbolisiert durch den Kreis) eindeutig dem schwarz dargestellten paternalen Haplotypen zuordnen.

Die Untersuchung der flankierenden Marker kann im Hinblick auf Familien mit nur einem Kind *a priori* keine Einordnung der Mutation ermöglichen, da die elterlichen Haplotypen nicht sicher bestimmt werden können. Dennoch wurden zusätzlich zu den untersuchten Mehr-Kind-Familien 40 Ein-Kind-Familien ausgewählt und typisiert, um möglichst viele Informationen über diese bislang nicht forensisch etablierten Marker zu erhalten. Die Auswahl der flankierenden Marker erfolgte anhand der genetischen Distanz (max. Entfernung vom mutierten STR-System ± 8 cM), um eine gekoppelte Vererbung der flankierenden Marker sicherzustellen, und der Wiederholungseinheit (Tetra > Tri > Di; s. Anhang 9.5).

Im STR-System D3S1358 wurden 22 Mutationsfälle, die insgesamt 99 Personen umfassten, ausgewählt. Im STR-System FGA wurden 40 Familien (insgesamt 171

Proben) ausgewählt. In einem Fall gab es zwei Geschwisterkinder mit einer Mutation, so dass 41 Mutationen untersucht wurden. Im STR-System ACTBP2 gab es 26 Familien (insgesamt 144 Personen), in denen ein Kind eine Mutation aufwies. In zwei Fällen wiesen je zwei Geschwisterkinder einer Familie eine Mutation auf, so dass hier 28 Mutationen untersucht wurden. Im STR-System VWA wurden die Proben von insgesamt 66 Personen, die 12 unterschiedlichen Familien (= 12 Mutationen) angehörten, untersucht.

Insgesamt wurden somit 480 Proben ausgewählt, die sich auf 100 Familien verteilten. Hiervon waren 40 Familien Ein-Kind-Familien (D3S1358: 12; FGA: 21; ACTBP2: 4; VWA: 3). Die Ergebnisse dieser 100 Familien mit 103 Mutationen werden hier vorgestellt. Die Lagerdauer der Proben variierte von einem Jahr bis zu 14 Jahren.

Nach Durchführung der Monoplex-PCRs und kapillargelelektrophoretischer Analyse der entsprechenden flankierenden Marker (vgl. Abschnitte 3.1.8, 3.2.6 und 3.2.7) wurden die erhaltenen Amplikonlängen in „Allele“ umbenannt. Die Bezeichnung der Allele erfolgte somit nicht, wie in der forensischen Genetik üblich, anhand der Anzahl der Wiederholungseinheiten, da die Amplikone nicht sequenziert wurden. Das kürzeste detektierte Amplikon innerhalb eines Systems wurde mit einer willkürlichen Allelbezeichnung versehen und entsprechend alle weiteren detektierten Allele innerhalb der STR-Systeme bezeichnet (s. Anhang 9.6).

Somit konnten aus den erhaltenen Allelen, die die Kinder aufwiesen, die elterlichen gekoppelt vererbten Allele bestimmt und die familien-spezifischen Haplotypen erstellt werden. Anhand eines unveränderten Haplotyps bei einem Elternteil kann die Mutation dem anderen elterlichen Haplotypen zugeordnet werden.

Drei Fallkategorien können nach der Haplotypen-Analyse unterschieden werden:

1. Fälle, in denen die Charakterisierung der Mutation mithilfe der familien-spezifischen Haplotypen eindeutig gelang
2. Fälle, in denen die Charakterisierung der Mutation mithilfe der familien-spezifischen Haplotypen aufgrund einer ungünstigen Konstellation nicht gelang

3. Familien mit nur einem Kind, in denen die Einordnung der Mutation *a priori* mithilfe der familien-spezifischen Haplotypen nicht erfolgreich sein kann. Hier können wiederum die Fälle voneinander differenziert werden, in denen die Allelkonstellation eine Annahme hinsichtlich der Einordnung der Mutation erlaubt (s. Abb. 4.3, Kategorie 3a), wenn die vorliegenden Allele dies rechtfertigen, bzw. die Ein-Kind-Familien, in denen keine Aussage hinsichtlich des mutierten Allels gemacht werden kann. (s. Abb. 4.4, Kategorie 3b).

In Abb. 4.2 ist ein Beispiel eines Stammbaumes mit den ermittelten Haplotypen dargestellt, in dem die Einordnung der Mutation erfolgreich verlief (Kategorie 1.).

E246/2001

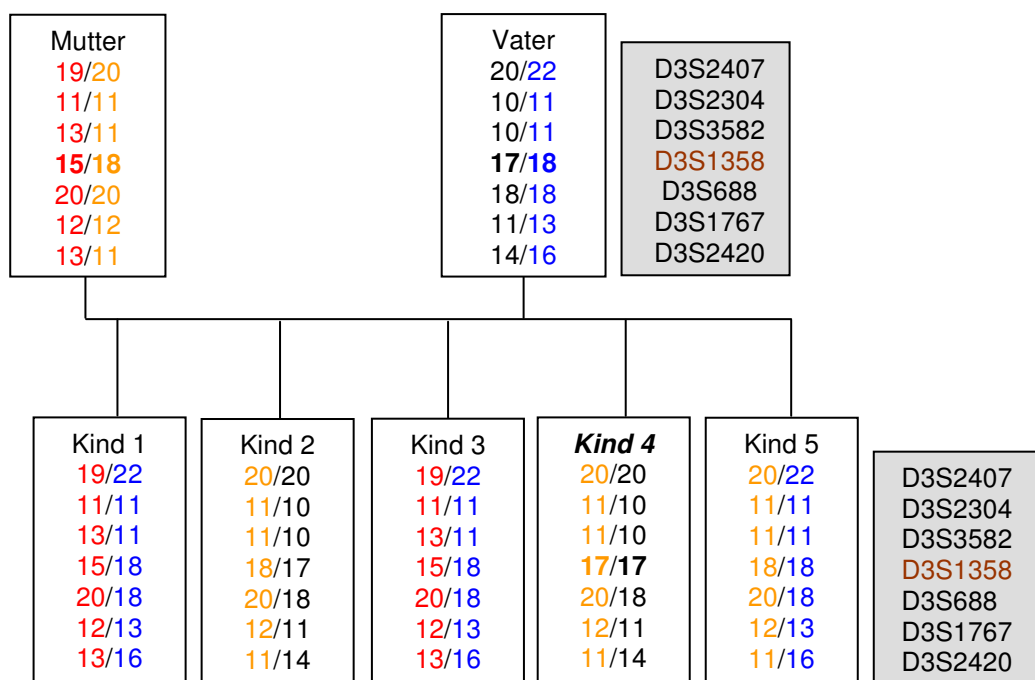


Abbildung 4.2 Beispiel eines Stammbaums mit den postulierten familien-spezifischen Haplotypen der Kategorie 1.

Die beiden maternalen Haplotypen sind in rot und orange dargestellt, die paternalen in schwarz und blau. Der paternale schwarze Haplotyp wurde unverändert an Kind 4 vererbt, somit ist das mutierte Allel 17 maternalen Ursprungs (18 → 17).

Bei Ein-Kind-Familien ist *a priori* keine Einordnung der Mutationen mittels familien-spezifischer Haplotypen möglich. Es kann aber auch bei Mehr-Kind-Familien kritische Allelkonstellationen innerhalb einer Familie geben, die – obwohl die parental Haplotypen eindeutig bestimmt werden konnten – keine Einordnung der Mutation erlauben (s. Abb. 4.3). Dies ist der Fall, wenn beide Elternteile dasselbe Allel aufwei-

sen (hier: 24 im roten maternalen und schwarzen paternalen Haplotyp) und genau jeweils diesen Haplotyp an das Kind mit dem mutierten Allel vererbt haben (Kategorie 2.).

E002/2003

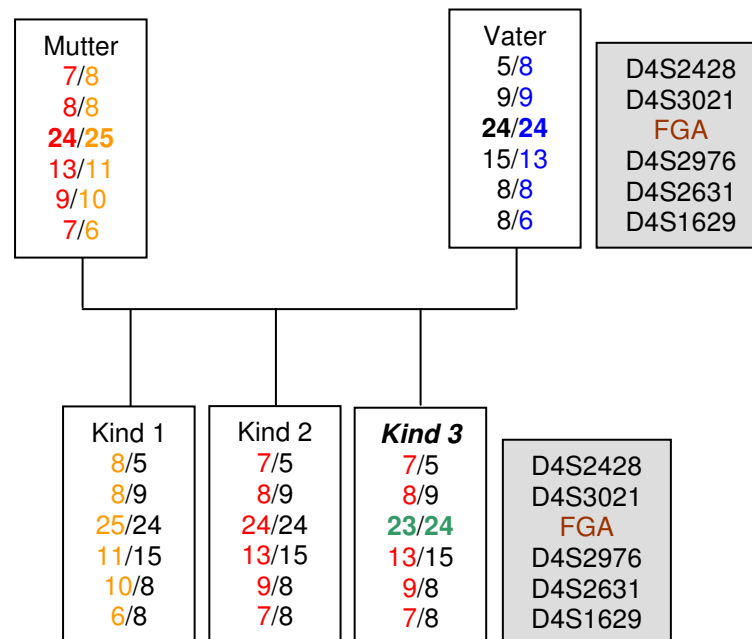


Abbildung 4.3 Beispiel eines Stammbaums mit den postulierten familien-spezifischen Haplotypen der Kategorie 2.

Die beiden maternalen Haplotypen sind in rot und orange dargestellt, die paternalen in schwarz und blau. Da das mutierte FGA-Allel 23 und Allel 24 des Kindes keinem der elterlichen Haplotypen sicher zugeordnet werden kann, sind sie grün dargestellt.

In den Ein-Kind-Familien kann eine Einordnung der Mutation mithilfe der familien-spezifischen Haplotypen nicht gelingen, da die „wahren“ elterlichen Haplotypen nicht durch Geschwisterkinder verifiziert werden können. Auch dann, wenn die beobachteten Allele der Eltern sehr divers sind, kann das mutierte Allel nicht eindeutig einem Haplotypen zugeordnet werden.

In einigen Fällen können die Mutationen allerdings aufgrund der Allelkonstellationen mit einer recht hohen Wahrscheinlichkeit eingeordnet werden, da beispielsweise eine Ein-Schritt-Mutation (hier: 24 → 25) wahrscheinlicher wäre als eine Drei-Schritt-Mutation (hier: 22 → 25; s. Abb. 4.4).

D40/99

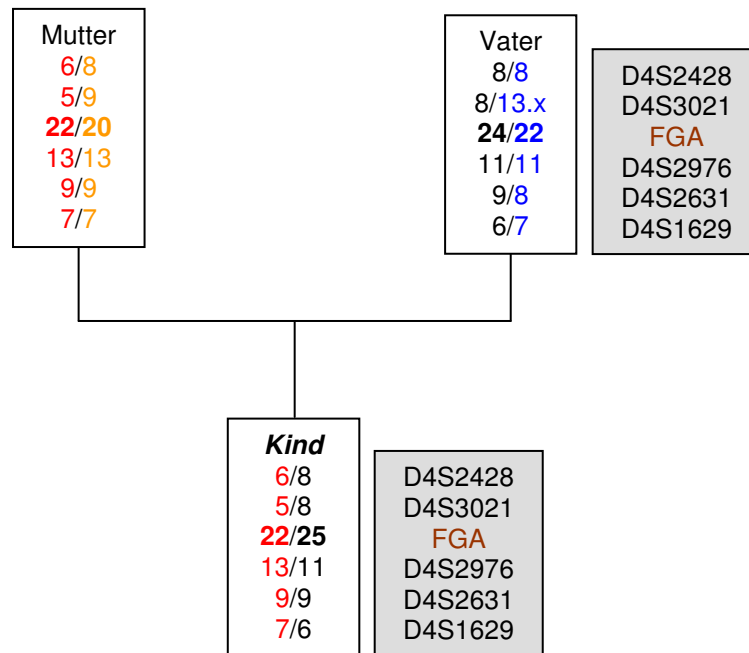


Abbildung 4.4 Beispiel eines Stammbaums mit den postulierten familien-spezifischen Haplotypen (Kategorie 3a)

Ein Beispiel für eine ungünstige Allelkonstellation in einer Ein-Kind-Familie, die keine Aussage hinsichtlich des mutierten Allels zulassen, zeigt Abb. 4.5.

G72/23

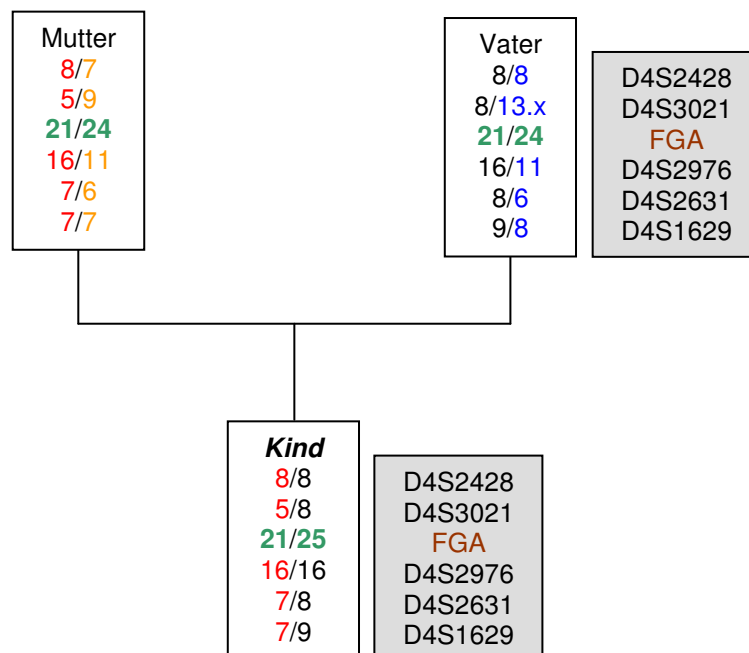


Abbildung 4.5 Beispiel eines Stammbaums mit den postulierten familien-spezifischen Haplotypen (Kategorie 3b)

In einigen Fällen wurden bei Kindern von Mehr-Kind-Familien mehr als vier verschiedene elterliche Haplotypen detektiert (s. Abb. 4.6). Diese Beobachtungen lassen sich durch Crossing-Over erklären, das zwischen zwei untersuchten Markern stattgefunden haben muss. Insgesamt wurden in den kindlichen Proben 65 Rekombinationen beobachtet, in zwei dieser Proben gab es sogar zweimaliges Crossing-Over. Es wurde am häufigsten zwischen den STR-Systemen D6S272 bzw. D6S257 und D6S460 für die *de novo*-Mutationen im STR-System ACTBP2 beobachtet. Dies lässt sich durch den großen Abstand von etwa 15 bis 20 cM zwischen den Loci D6S272 bzw. D6S257 und ACTBP2 begründen.

E226/2002

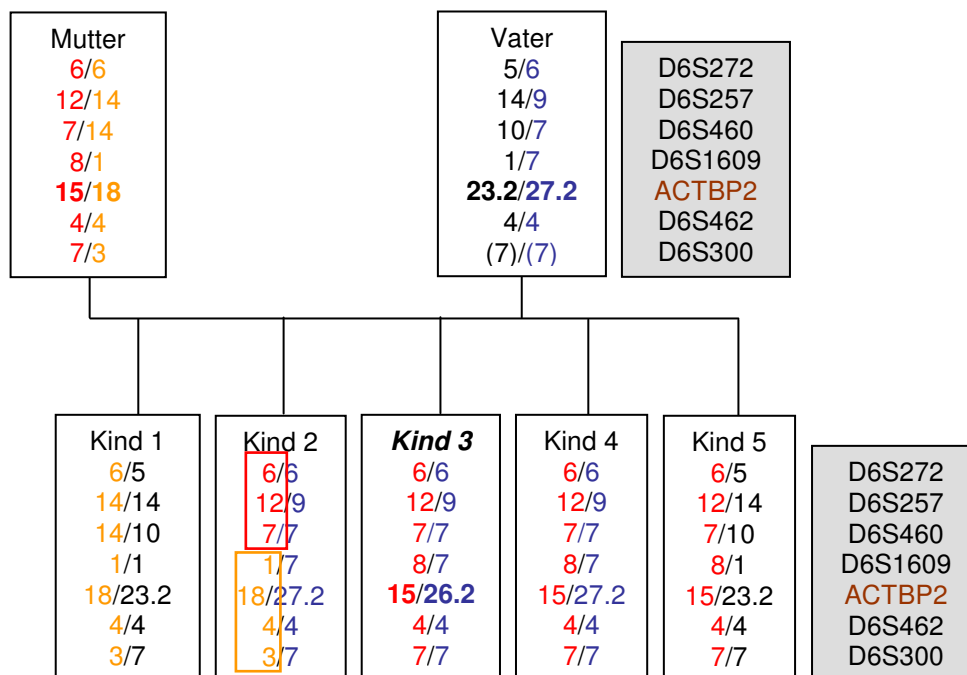


Abbildung 4.6 Mittels Haplotypen-Analyse detektierte Rekombination

Kind 2 weist stromaufwärts von D6S460 den hier rot dargestellten maternalen Haplotyp und stromabwärts den orange-farbenen maternalen Haplotyp auf (durch Kästchen hervorgehoben). Dies lässt sich durch Rekombination erklären.

Die Ergebnisse mit fallbezogenen Haplotypen sind in Anhang 9.8 sämtlich aufgeführt. In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der Haplotypen-Analyse zusammengefasst. Insgesamt konnten 53 von 55 (~ 84%) der analysierten Mutationen aus Mehr-Kind-Familien mithilfe der familien-spezifischen Haplotypen eindeutig geklärt werden.

Tabelle 4.1 Ergebnisse der Haplotypen-Analyse (Anzahl der Mutationen)

	Mehr-Kind-Familien		Ein-Kind-Familien	gesamt
	geklärt	ungeklärt		
D3S1358	8	2	12	22
FGA	17	3	21	41
ACTBP2	20	2	4	26
VWA	8	1	3	12
gesamt	53	8	40	101

Von diesen 53 Mutationen waren 48 paternalen und 5 maternalen Ursprungs (Verhältnis ~ 10:1). Zwei weitere Fälle führten zu unerwarteten Ergebnissen, die nicht in dieser Tabelle aufgeführt sind und in Abschnitt 4.1.1 separat dargestellt werden. 23 der Mutationen waren Gewinn- und 30 Verlust-Mutationen (plus 2 Mutationen, vgl. Abschnitt 4.1.1) (Verhältnis ~ 1:1). Allesamt waren 1-Schritt-Mutationen, so dass 2- oder Mehr-Schritt-Mutationen deutlich seltener auftreten als bislang angenommen (Sajantila et al. 1999; Brinkmann et al. 1998). Die Tatsache, dass es sich bei allen geklärten Mutationen um 1-Schritt-Mutationen handelt, steht im Einklang mit der ‚*replication slippage*‘-Theorie. Dieses Modell liefert die beste Erklärung für die beobachteten *de novo*-Mutationen. Nur in einer der 103 untersuchten Mutationen, bei der der Ursprung des Allels nicht bestimmt werden konnte, wurde eine seltene 2-Schritt-Mutation beobachtet (s. Stammbaum E405/2002). Es gab keinen Fall, bei dem stromauf- und stromabwärts des mutierten Allels die unterschiedlichen elterlichen Haplotypen beobachtet wurden – somit gab es keinen Hinweis auf UEC als Mutationsmechanismus.

Von diesen 53 Mutationen wiesen fünf Sequenzen auf, die ebenfalls eine eindeutige Charakterisierung der Mutationen erlaubten. Diese stimmten sämtlich mit den per Haplotypen-Analyse erhaltenen Ergebnissen überein. Von den 48 übrigen Mutationen wiesen 39 eine Allelkonstellation auf, die – durch die von Brinkmann und Mitarbeitern (1998) aufgestellten Annahmen – als „geklärt“ galten. Die vorliegenden Sequenzen standen mit den Annahmen komplett im Einklang.

Von den acht ungeklärten Mehr-Kind-Familien konnte eine Mutation durch Sequenzierung geklärt werden, die anderen wiesen eine ungünstige Allelkon-

stellation auf, so dass auch die bereits erläuterten Annahmen zur Einordnung von Mutationen (Abschnitt 1.4.1.2) nicht weiterhalfen. Bei den 40 Ein-Kind-Familien konnten zwei durch Sequenzierung und 25 durch Annahmen geklärt werden.

Da die postulierte Annahme von Brinkmann et al. (1998) durch die Haplotypen-Analyse bestätigt wurde, kann man annehmen, dass diese Regel auch bei Ein-Kind-Familien zur korrekten Mutationseinordnung führt.

Somit konnten insgesamt – durch Kombination von Allelkonstellation, Sequenzierung und Haplotypen-Analyse – 87 der 103 (~ 84%) untersuchten Mutationen eindeutig geklärt werden (s. Anhang 9.10).

Die Anwendung flankierender Marker zur Erstellung familien-spezifischer Haplotypen ist zur Charakterisierung von Mutationen bei Mehr-Kind-Familien ein sehr hilfreiches Werkzeug. Da die flankierenden Marker jedoch bei Ein-Kind-Familien keine Möglichkeit boten, die knapp 20% verbliebenen Mutationsfälle zu klären, sollte die Anwendung der flankierenden Marker auf Einzelchromosomenebene übertragen werden. Die durchgeführten Versuche und entsprechenden Ergebnisse sind in den Abschnitten 3.2.2.1 und 4.1.3. zu finden.

4.1.1 Zwei ungewöhnliche Fallkonstellationen

In zwei der mithilfe der flankierenden Marker untersuchten Mutationen wurden ungewöhnliche Ergebnisse beobachtet, die hier separat dargestellt werden sollen. Bei beiden Fällen handelte es sich um eine scheinbare paternale Mutation im STR-System ACTBP2.

Im ersten Fall wies die Mutter die Allele 15 und 17, der Vater die Allele 15.3 und 22 auf. Das Kind trug die Allele 15 und 17. Somit gab es – theoretisch betrachtet – die folgenden Alternativen: entweder eine Mehr-Schritt-Mutation vom paternalen Allel 22 zu 15 bzw. 17 oder eine „ungerade“ nicht-ganzzahlige Mutation vom paternalen Allel 15.3 zu einem der kindlichen Allele oder ein Ausschluss.

In diesem Fall wurden insgesamt 16 STR-Systeme untersucht, in keinem weiteren System wurde ein zusätzlicher Ausschluss beobachtet.

Die Haplotypen-Analyse (vgl. Anhang 9.9) zeigte eindeutig, dass das Kind den orange-farbenen mütterlichen und den schwarz dargestellten väterlichen Haplotypen erbt hat. Da die „Allele“ der flankierenden Marker des paternalen Haplotyps unverändert vorliegen, wurde eine paternale 15.3 → 15-Mutation angenommen.

Die Sequenzierung (Abb. 4.7) ergab, dass Vater und Kind dieselbe komplexe Allelstruktur aufwiesen, mit der Ausnahme, dass im kindlichen Allel 15 drei Adeninbasen innerhalb der Repeatstruktur deletiert waren.

Somit wurde hier erstmals eine „ungerade“ Mutation einer nicht vollständigen Wiederholungseinheit innerhalb des Repeatbereichs beobachtet.

Person	Allel	Sequenz		
		5'-flankierende Region	Repeatbereich	3'-flankierende Region
Kind 2	15	...(AAAG) ₂ AG (AAAG) ₃ AAAG	(AAAG) ₂ ---G (AAAG) ₉ G (AAAG) ₃	(GAAAG) (AAAG) ₂ AG...
	17	...(AAAG) ₂ AG (AAAG) ₃ AG	(AAAG) ₁₇	(GAAAG) (AAAG) ₂ AG...
Mutter	15	...(AAAG) ₂ AG (AAAG) ₃ AG	(AAAG) ₁₅	(GAAAG) (AAAG) ₂ AG...
	17	...(AAAG) ₂ AG (AAAG) ₃ AG	(AAAG) ₁₇	(GAAAG) (AAAG) ₂ AG...
Vater	15.3	...(AAAG) ₂ AG (AAAG) ₃ AAAG	(AAAG) ₂ AAAG (AAAG) ₉ G (AAAG) ₃	(GAAAG) (AAAG) ₂ AG...
	22	...(AAAG) ₂ AG (AAAG) ₃ AG	(AAAG) ₂₂	(GAAAG) (AAAG) ₂ AG...

Abbildung 4.7 Sequenzen der Allele von Kind, Mutter und Vater im Fall der ungeraden 15.3→15-Mutation im STR-System ACTBP2

Im zweiten Fall wies der Vater die Allele 27.2 und 28.2 auf, das Kind die Allele 15 und 17. Die mütterliche Probe lag nicht vor. In diesem Fall kam theoretisch entweder eine „ungerade“ Mehr-Schritt-Mutation oder ein Ausschluss in Betracht.

Es wurden zunächst 16 STR-Systeme untersucht, in keinem anderen System wurde ein weiterer Ausschluss beobachtet. Nachdem 17 zusätzliche STR-Systeme (Übersicht über die untersuchten STR-Systeme im Anhang 9.4) untersucht worden waren, gab es eine weitere Inkompatibilität in ApoA11 (Kind: 27.3/32.2; Vater: 27.1/31.3 (interne Nomenklatur)).

Zunächst wurde dies als weitere Mutation betrachtet; der Wahrscheinlichkeitswert für die Vaterschaft lag bei 99,8%.

Die Haplotypen-Analyse (Anhang 9.9) ergab eindeutig, dass das Kind keinen der väterlichen Haplotypen ererbt hat; es weist nur in zwei der sechs flankierenden STR-Systeme von ACTBP2 überhaupt ein Allel auf, das auch der Vater trägt. Somit wurden durch die Haplotypen-Analyse drei weitere Inkompatibilitäten auf Chromosom 6 identifiziert, die stark darauf hindeuteten, dass der Putativvater als biologischer Vater des Kindes ausgeschlossen werden kann.

Die ACTBP2- und ApoA11-Allele wurden ebenfalls sequenziert und wiesen in der Allelstruktur starke Unterschiede auf (vgl. Anhang 9.3), die nur durch äußerst komplexe Mutationsvorgänge zu erklären gewesen wären.

Letztendlich führte dies zu dem Ergebnis, dass mithilfe der flankierenden Marker ein zunächst vermuteter Ausschluss bewiesen werden konnte.

Durch die Haplotypen-Analyse konnten in beiden Fällen jeweils eine der denkbaren Möglichkeiten soweit gestützt werden, dass die Fälle – insgesamt gesehen – als geklärt betrachtet werden konnten.

4.1.2 Multiplex-PCR mit flankierenden Markern

Die Erstellung familien-spezifischer Haplotypen kann nur bei Mehr-Kind-Familien erfolgreich sein, da mehrere Kinder erforderlich sind, um die vorliegenden Allele der einzelnen Marker, die jeweils gekoppelt vererbt werden (= Haplotyp), einem elterlichen Chromosom zuordnen zu können.

Da diese Möglichkeit bei Ein-Kind-Familien nicht gegeben ist, sollten die Haplotypen mit einzelnen Chromosomen bestimmt werden. Dafür musste zunächst eine Multiplex-PCR der flankierenden Marker – inklusive des STR-Systems mit dem mutierten Allel – etabliert werden. Dies wurde für das STR-System ACTBP2 und die sechs flankierenden Marker (vgl. Tab. 3.5) durchgeführt.

Die möglichen Interaktionen der bereits für die Monoplex-PCRs der flankierenden STR-Systeme vorliegenden Primer wurden zunächst mithilfe des Software-Programms FastPCR überprüft (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>). Die Primer des Systems D6S275 ließen sich – aufgrund der verwendeten Sequenz – nicht mit den anderen vorliegenden Primerpaaren in Einklang bringen;

somit wurde dieses System nicht in die Multiplex-PCR integriert. Für die übrigen flankierenden Marker D6S460, D6S1609, D6S462 (alle blauer Kanal), D6S272, ACTBP2 (beide grüner Kanal) und D6S300 (gelber Kanal) ließ sich eine Multiplex-PCR etablieren, die erfolgreich alle involvierten STR-Systeme amplifizierte (s. Abb. 4.8)

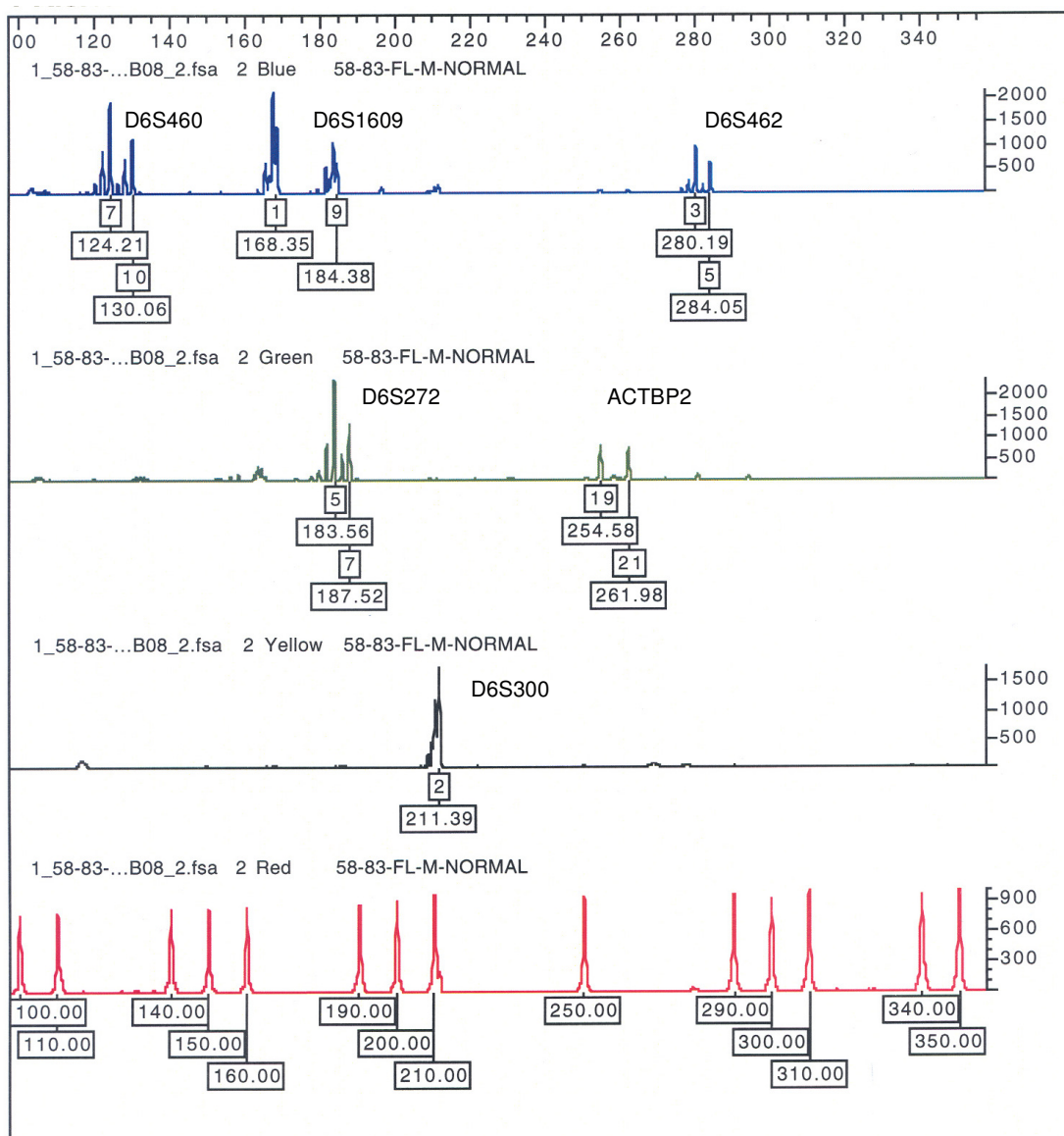


Abbildung 4.8 Beispielhaftes Elektropherogramm der Multiplex-PCR für ACTBP2 und die fünf flankierenden Systeme

Da die Monoplex-PCRs der flankierenden Marker alle unter denselben PCR-Bedingungen durchgeführt wurden (vgl. Tab. 3.13), konnten diese erfolgreich auf die Multiplex-PCR übertragen werden. Das Protokoll für die Multiplex-PCR ist in den Tabellen 3.10 und 3.11 beschrieben.

Im Vergleich dazu wurde das „Multiplex PCR Kit“ (Qiagen, Hilden) getestet (Tab. 3.11), dem nur die Primer zugegeben werden müssen. Das Kit wurde laut Herstellerangaben speziell für eigene Multiplex-Ansätze entwickelt. Die Ergebnisse fielen allerdings schlechter aus (z.B. ‚*allelic*‘ und ‚*system drop-out*‘, Imbalance; hier nicht gezeigt) als mit den selbst zusammengestellten Reagenzien, so dass dieser Ansatz nicht weiter verfolgt wurde.

Eine wichtige Anforderung an die Multiplex-PCR war ihre untere Nachweisgrenze. Sie sollte empfindlich genug sein, um mehrere Abschnitte eines einzelnen Chromosoms amplifizieren zu können. Dies sollte die Amplifizierung der flankierenden Marker auf einem einzelnen Chromosom ermöglichen und damit den Haplotypen eindeutig in einem Ansatz zu bestimmen.

Diese Technik auf ein einzelnes Chromosom zu übertragen, um den vorliegenden Haplotypen zu erhalten, stellt eine große Herausforderung dar.

4.1.3 Anwendung der Multiplex-PCR und der Lasermikrodissektion auf Einzelchromosomen

Dazu mussten einerseits einzelne Chromosomen isoliert und andererseits die Multiplex-PCR schrittweise für immer kleinere Ausgangskopienzahlen optimiert werden.

Um einzelne Chromosomen zu erhalten, wurden gefärbte und ungefärbte Chromosomenpräparate (vgl. Abschnitt 3.2.2.1) hergestellt, die unter dem CellCut-System (CellCut Plus Mikrodissektion, Olympus, Hamburg) identifiziert und mithilfe eines Lasers disseziert werden konnten. Da es sich bei dem Gerät um eine Leihstellung für wenige Wochen handelte, konnten die Bedingungen, die zur Identifizierung des Chromosoms 6 benötigt wurden, nicht optimiert werden.

Mit der LMD-Technik gelang es, Metaphasen sicher zu identifizieren und den Bereich nur eines Chromosoms auszuschneiden. Aber es erwies sich abschließend, dass zur sicheren Identifizierung eines bestimmten Chromosoms (hier: Chromosom 6) langjährige experimentelle Erfahrung (Auftropfbedingungen) und optimale Geräteparameter (Vergrößerung des Mikroskops) erforderlich sind (s. Abb. 4.9).

Somit gelang es mit der Lasermikrodissektion nicht, ein ganz bestimmtes Einzelchromosom zu isolieren.

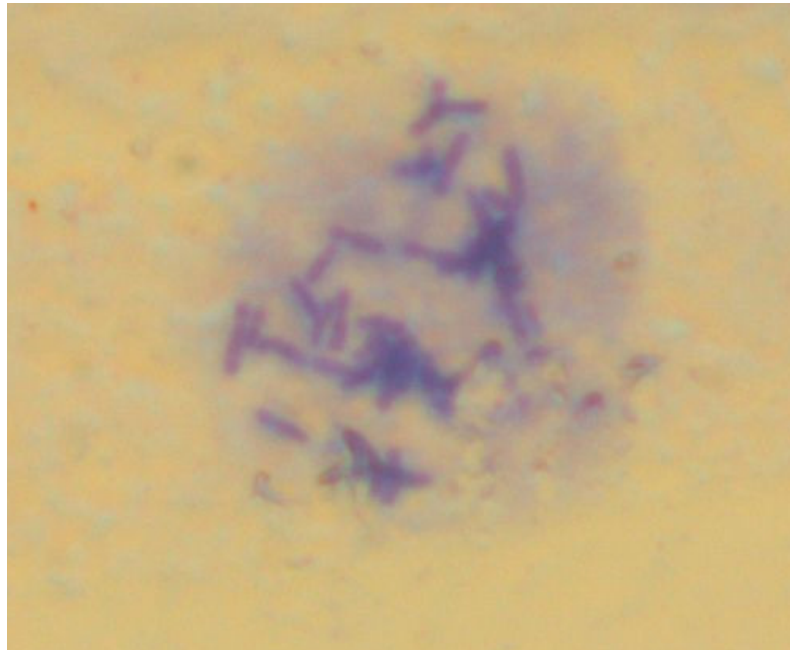


Abbildung 4.9 Metaphase im Mikroskop (GTG-gefärbt; 900x); die Bänderung der einzelnen Chromosomen ist nicht zu erkennen

Um dennoch austesten zu können, ob die Sensitivität der PCR so hoch ist, dass Bereiche einzelner Chromosomen mittels PCR erfolgreich amplifiziert werden könnten, wurde zunächst eine im hiesigen Institut etablierte Monoplex-PCR für das STR-System DXS6800 an Einzelzellen (Tab. 3.2) durchgeführt.

Da es sich bei dem STR-System um einen auf dem X-Chromosom lokalisierten Bereich handelt und die vorliegenden Einzelzellen von einer männlichen Person stammten, lag also pro Kavität der Mikrotiterplatte nur eine Kopie des X-Chromosoms vor.

Die PCR wurde in einer Multititerplatte durchgeführt, in der 24 Kavitäten nur eine Zelle enthielten (s. Abb. 3.1). In 12 dieser 24 vorliegenden Einzelzellen (50%) konnte erfolgreich der Bereich des STR-Systems DXS6800 amplifiziert werden.

Da Monoplex-PCRs i.d.R. eine höhere Sensitivität aufweisen als Multiplex-PCRs (Brinkmann 2004) wurde nach der erfolgreichen X-chromosomalen Monoplex-Amplifizierung ebenfalls an männlichen Einzelzellen eine kommerziell erhältliche Multiplex-PCR (AmpFISTR[®] Yfiler[®] Multiplex Kit, Applied Biosystems, Darmstadt), die

16 auf dem Y-Chromosom lokalisierten STRs amplifiziert, durchgeführt. Bei wiederum 24 vorliegenden männlichen Einzelzellen verlief diese Amplifizierung für eine Einzelzelle komplett erfolgreich, d.h. alle 16 involvierten Y-STR-Systeme wurden erfolgreich und korrekt amplifiziert, bei sechs weiteren Proben wurden immerhin fünf oder mehr der involvierten Y-STR-Systeme erfolgreich amplifiziert.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Sensitivität sowohl einer Monoplex-PCR, als auch einer Multiplex-PCR unter optimalen Bedingungen hoch genug sein kann, um Bereiche einzelner Chromosomen zu amplifizieren.

Um zu zeigen, ob die selbst entwickelte Multiplex-PCR der flankierenden STR-Systeme von ACTBP2 ebenfalls eine so hohe Sensitivität aufweist, dass sie sich auf Einzelzell- bzw. Einzelchromosomenebene anwenden lässt, wurden wiederum Einzelzellen für diese PCR genutzt. Hier lagen diploide Zellen vor, so dass sich in jeder Kavität der Multititerplatte zwei Kopien des Chromosoms 6 befanden.

Die selbst entwickelte Multiplex-PCR der flankierenden STR-Systeme von ACTBP2 lieferte für 100 Zellen pro Kavität durchweg komplette und korrekte Ergebnisse (s. Abb. 4.10). In wenigen Proben wurden ‚*system drop-out*‘ bzw. ‚*allelic drop-out*‘ beobachtet. Bei zehn Zellen pro Kavität gelang bei 24 Reaktionsansätzen nur für einen die Darstellung von drei STR-Systemen und zwei zusätzlichen mit ‚*allelic drop-out*‘, für 17 Proben konnten nur für ein bis drei der involvierten STR-Systeme positive Resultate erhalten werden, während sechs Proben komplett negativ waren. Bei den Kavitäten, die fünf bzw. nur eine Zelle(n) enthielten, fielen die Ergebnisse sämtlich negativ aus.

Somit liegt die untere Nachweisgrenze für die selbst entwickelte Multiplex-PCR bei etwa 600 pg.

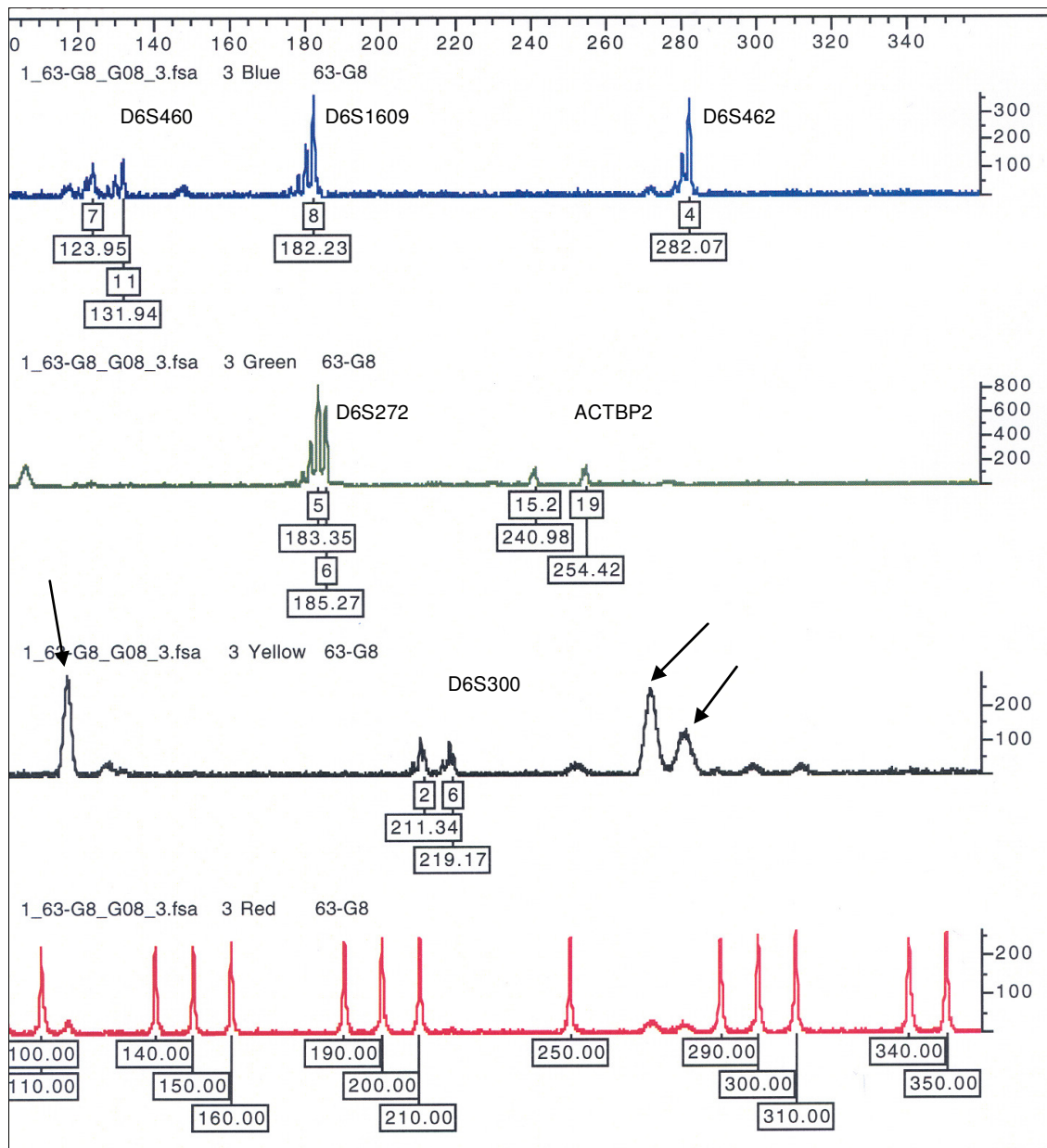


Abbildung 4.10 Elektropherogramm der selbst entwickelten Multiplex mit 100 Zellen (~600pg); die Pfeile (→) weisen auf unspezifische Peaks hin.

Zur Erstellung der familien-spezifischen Haplotypen gab es für Ein-Kind-Familien die Überlegung, die Haplotypen anhand einzelner Chromosomen zu bestimmen.

Es wurde zuerst eine Multiplex-PCR für das STR-System ACTBP2 und fünf der flankierenden Systeme erfolgreich entwickelt und etabliert. Parallel wurde versucht, einzelne 6er-Chromosomen aus Metaphasen-Präparaten mittels LMD auszuschneiden. Da die Spreitung und Färbung der Chromosomen nicht optimal war, konnte die Isolierung eines bestimmten Einzelchromosoms nicht wie geplant durchgeführt werden.

Um zu zeigen, dass die Sensitivität einer PCR so hoch sein kann, dass ein einzelnes Chromosom zur Amplifizierung prinzipiell ausreicht, wurde an männlichen Einzelzellen sowohl eine Monoplex-PCR für das X-chromosomale STR-System DXS6800, als auch eine kommerziell erhältliche Multiplex-PCR für 16 Y-chromosomale STR-Systeme (AmpFISTR®Yfiler® PCR Amplification Kit, Applied Biosystems, Darmstadt; untere Nachweisgrenze ≤ 100 pg) durchgeführt. Es gelang in beiden Ansätzen, aus den einzeln vorliegenden X- bzw. Y-Chromosomen die entsprechenden STR-Systeme erfolgreich zu amplifizieren.

Das Austesten der Sensitivität der selbst entwickelten Multiplex-PCR wurde ebenfalls in den Multititerplatten (Abb. 3.1) durchgeführt. Hier gelang die Durchführung der Multiplex-PCR für einen Großteil der Kavitäten, die 100 männliche Zellen enthielten. Somit wurde gezeigt, dass die untere Nachweisgrenze für die Multiplex-PCR bei etwa 600 pg liegt. Dies entspricht der Größenordnung von kommerziell erhältlichen Multiplex-PCR-Kits für autosomale STRs, in denen die unteren Nachweisgrenzen mit 250 bis 500 pg angegeben werden.

Prinzipiell kann die Amplifizierung einzelner Chromosomen mittels Multiplex-PCR gelingen und die selbst entwickelte Multiplex-PCR liegt – hinsichtlich der unteren Nachweisgrenze – im selben Bereich wie kommerziell erhältliche Multiplex-PCR-Kits. Somit fehlt nun nur noch die Anwendung der selbst entwickelten Multiplex-PCR auf isolierte 6er-Chromosomen.

4.2 Primerbindungsstellenmutation im STR-System FGA

Das Auftreten einer Punktmutation in den flankierenden primerbindenden Bereichen kann zu einer verminderten Primeranlagerung während der PCR führen, insbesondere am 3'-Ende des Primers (Beginn der Extension). Dadurch erfolgt eine präferenzielle Amplifizierung eines der beiden vorliegenden Allele, was zu imbalancierten Allelpeaks (Abb. 4.13; System FGA) oder sogar zum Ausfall eines Allels nach der kapillargelelektrophoretischen Analyse führen kann („stummes Allel“, „Null-Allel“) (Primmer et al. 1995; Jarne & Lagoda 1996; Dakin & Avise 2004; Heinrich et al. 2004; Dauber et al. 2006; Ricci et al. 2007; Vanderheyden et al. 2007).

In Abstammungsfällen kann das Vorliegen eines stummen Allels zu einer augenscheinlichen Ausschlusskonstellation in einem der untersuchten STR-Systeme führen (Heinrich et al. 2004; Dauber et al. 2006); durch Verwendung alternativer Primer und anschließender Sequenzierung kann die Punktmutation möglicherweise identifiziert werden.

In diesem Projekt wurden zwei Familien untersucht, die im Rahmen der Abstammungsbegutachtung im hiesigen Institut untersucht worden waren, und bei denen das Vorliegen einer sog. „entgegengesetzten Homozygotie“, verursacht durch eine Mutation in der Primerbindungsstelle von FGA, angenommen wurde.

Bei dem ersten Fall handelte es sich um einen Defizienzfall, d.h. nur die Proben eines Elternteils (hier: Mutter) und des Kindes lagen zur Untersuchung vor.

Nach der routinemäßig durchgeführten Multiplex-PCR mit dem AmpFISTR® Profiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) ergab sich ein isolierter Ausschluss im STR-System FGA, in dem die Mutter scheinbar homozygot das Allel 25 aufwies, während das Kind das Allel 21 trug (s. Abb. 4.11). Da die Wahrscheinlichkeit für eine Vier-Schritt-Mutation extrem gering ist, galt die vorliegende Konstellation zunächst als Ausschluss.

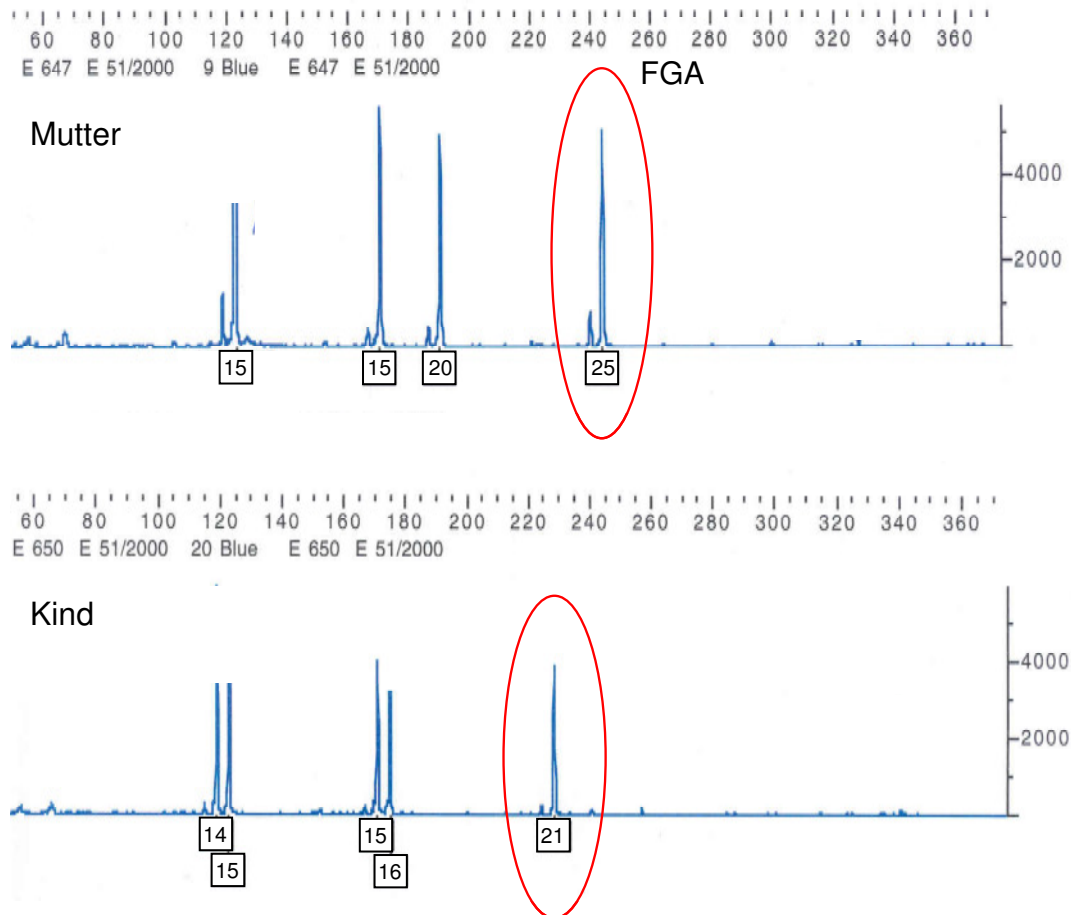


Abbildung 4.11 Blauer Farbkanal des AmpFISTR® Profiler® PCR Amplification Kit mit drei STR-Systemen; Ergebnisse der beiden Proben aus dem ersten Fall

Nach Amplifizierung der Proben in einer FGA-Monoplex-PCR mit anderen Primersequenzen und anschließender Auftrennung der Proben im nativen Gel ergab sich für beide Proben ein heterozygoter Befund: Mutter 24/25, Kind 21/24.

Im zweiten Fall handelte es sich um einen „Triofall“, d.h. die Proben beider Elternteile und des Kindes waren vorhanden. Auch hier ergab sich nach Durchführung der Multiplex-PCR mit dem AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) ein isolierter Ausschluss für FGA, in dem der Vater das Allel 22 homozygot aufwies, die Mutter und das Kind jeweils das Allel 25 homozygot (Abb. 4.12). Auch diese Allelkonstellation wurde vorerst als Ausschluss gewertet, da die Wahrscheinlichkeit für eine Drei-Schritt-Mutation ebenfalls sehr gering ist.

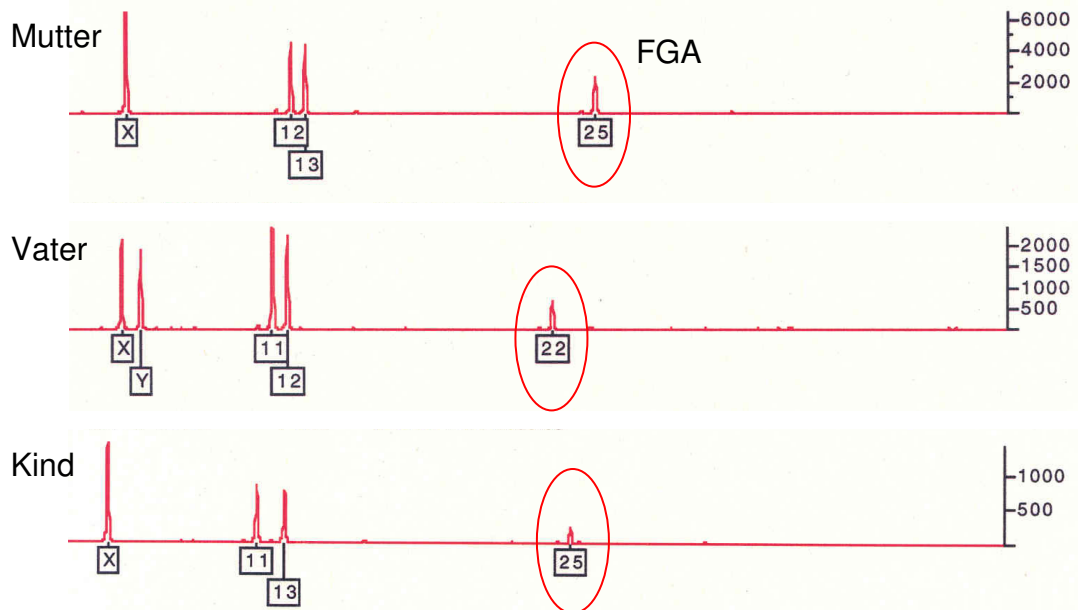


Abbildung 4.12 Roter Farbkanal des AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit mit drei STR-Systemen; Ergebnisse der Proben aus dem zweiten Fall

Bei Analyse dieser Proben durch ein anderes Multiplex-Kit (genRES MPX-2, Serac, Bad Homburg) mit anderen Primersequenzen wurde für die paternale Probe ein heterozygoter Allelbefund (22/25) erhalten, während die kindliche Probe immer noch homozygot (25) erschien (Abb. 4.13). Dies wäre durch Vererbung des Allels 25 von Vater und Mutter an das Kind zu erklären – in diesem Fall müsste das Kind Träger des mütterlichen Allels 25 mit unveränderter Sequenz und des väterlichen Allels 25 mit einer vermuteten Punktmutation im primerbindenden Bereich sein.

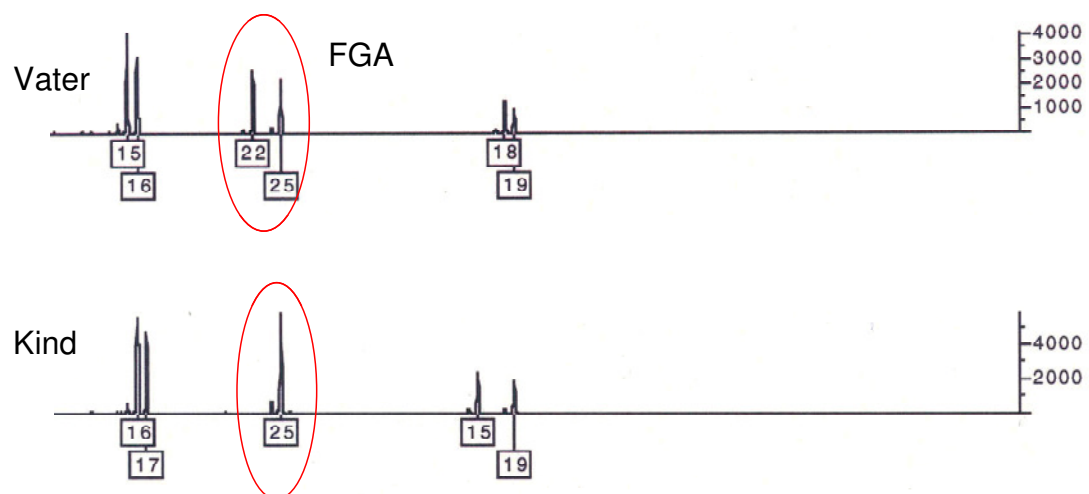


Abbildung 4.13 Gelber Farbkanal des genRES MPX-2 Kit mit drei STR-Systemen; Ergebnisse der Proben aus dem zweiten Fall

Die Primersequenzen der verwendeten Multiplex-PCR-Kits sind nicht publiziert, ihre ungefähre Lage kann nur anhand der Länge des Amplikons abgeschätzt werden. Es wurde ein Primerpaar zur Amplifizierung und anschließender Sequenzierung des STR-Systems FGA verwendet (vgl. Tab. 3.2; Quelle: STRbase; http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/str_FGA.htm; Promega, aus: PowerPlex[®] 16 Multiplex-Kit), das ein etwa 100 bp längeres Amplikon produziert, um die vermutete Punktmutation auf diesem Weg identifizieren zu können.

Unter Verwendung dieses neusynthetisierten Primers konnte für den ersten Fall gezeigt werden, dass Mutter und Kind im „stummen“ Allel 24 eine T→G-Transversion aufweisen, die als Ursache für das stumme Allel im ersten Multiplex-Ansatz angenommen werden kann (s. Abb. 4.14).

Im zweiten Fall konnte für das Allel 25 des Vaters und des Kindes dieselbe Transversion an exakt der gleichen Stelle wie im ersten Fall identifiziert werden. Da das Kind zweimal das Allel 25 ererbt hat – einmal unverändert von der Mutter und einmal mit der Punktmutation des Vaters – mussten die PCR-Produkte kloniert werden, um diese sogenannten „Iso-Allele“ trennen zu können. Die Sequenzen für die Allele von Vater und Kind sind in Abb. 4.15 dargestellt.

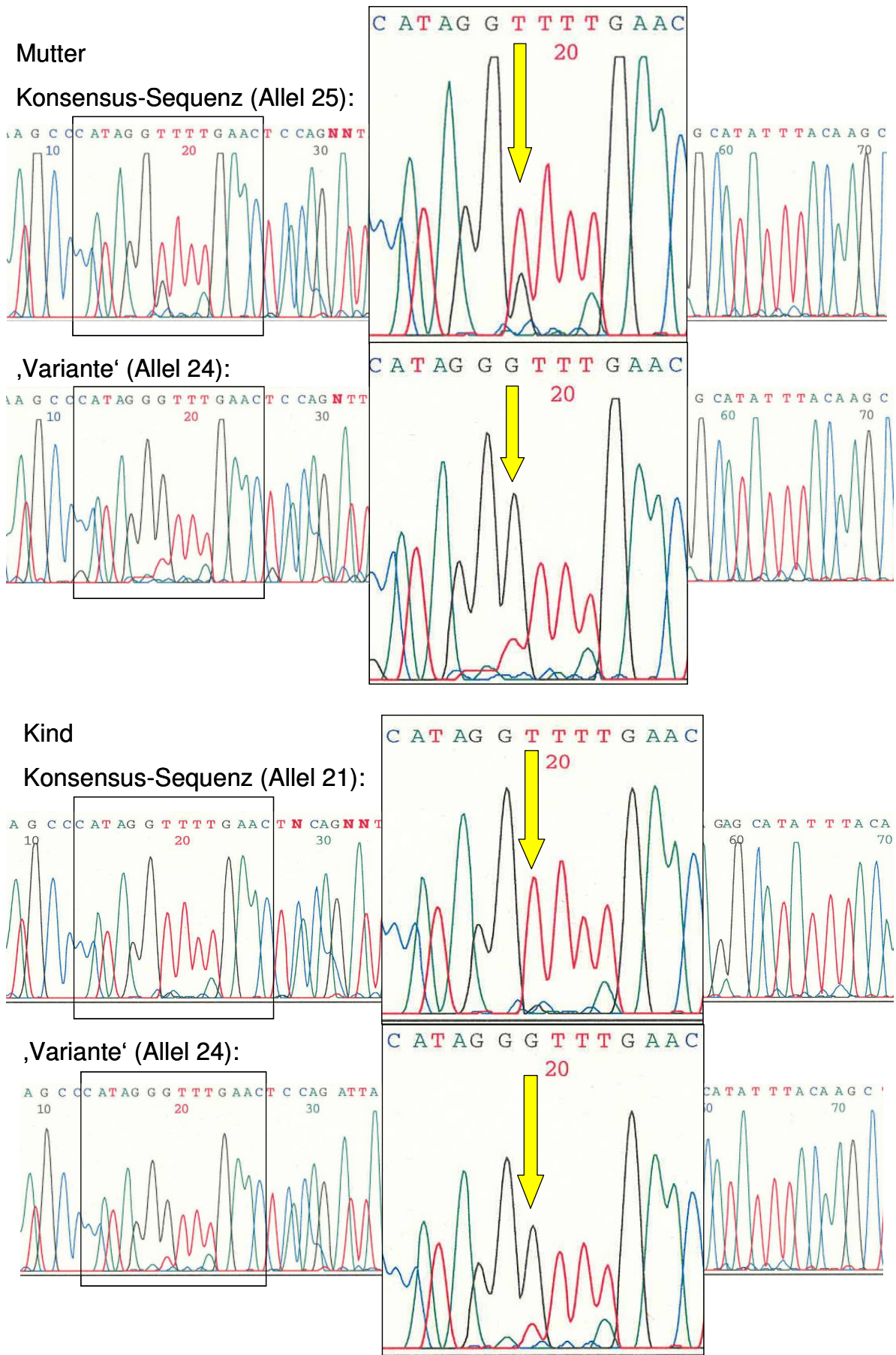


Abbildung 4.14 Sequenzen der Allele von Mutter und Kind im STR-System FGA

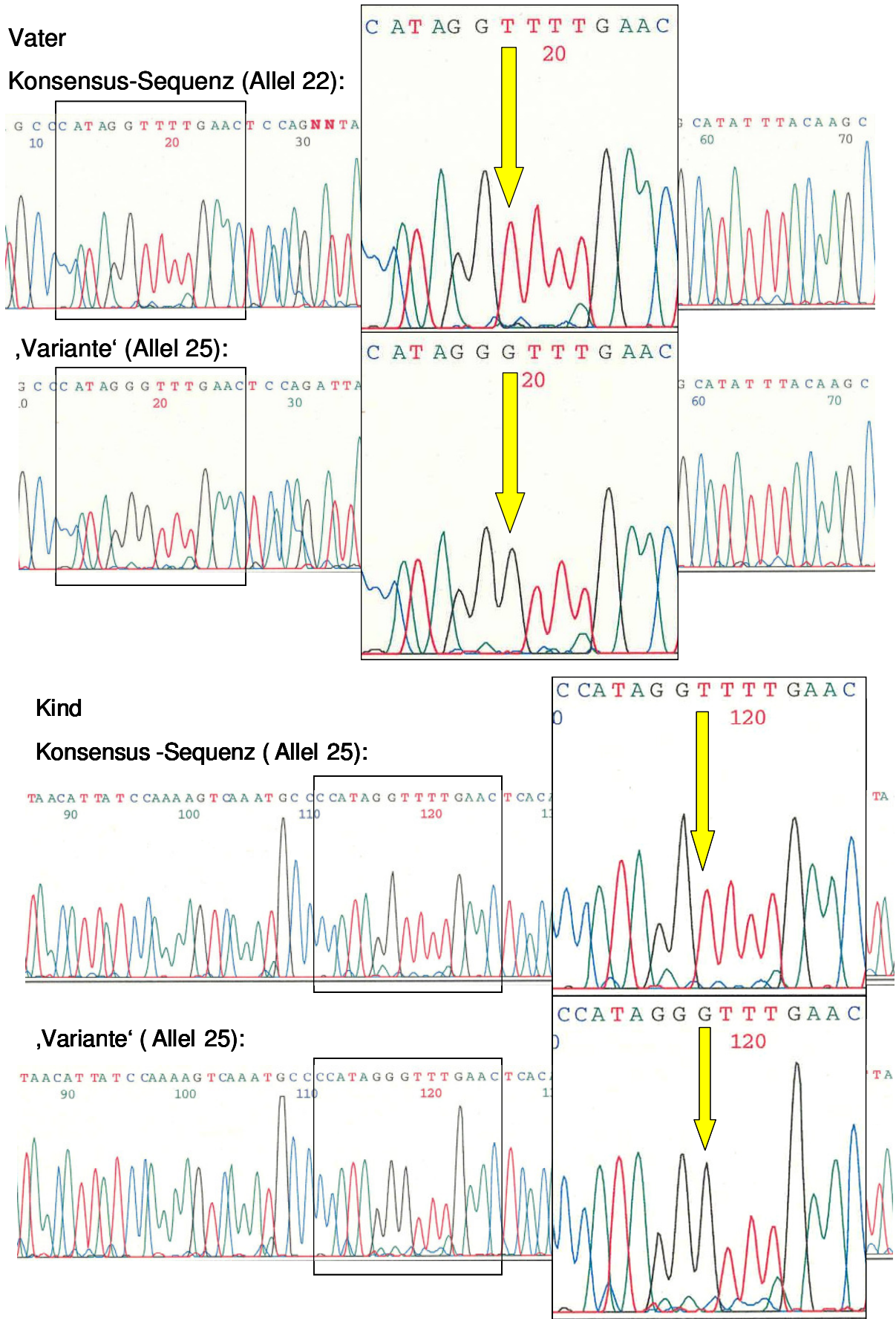


Abbildung 4.15 Sequenzen der Allele von Vater und Kind im STR-System FGA

Die Primersequenzen der zunächst durchgeführten Multiplex-PCRs (AmpFISTR® Profiler® bzw. Identifiler® PCR Amplification Kit) sind patentrechtlich geschützt und nicht bekannt.

Es kann dennoch gesagt werden, dass die Lage der gefundenen Punktmutation mit hoher Wahrscheinlichkeit eine prominente Position am 3'-Ende des Vorwärtsprimers in den verwendeten Kits sein muss (s. Abb. 4.16). Diese vermutete Lage des Vorwärtsprimers wäre problemlos vereinbar mit der Länge der Amplikone (für Allel 21: ~ 230 bp).

```

2761 attaggacat cttactggc attcatggaa ggctgcaggg cataacatta tccaaaagtc
2821 aaatgccccca taggctttga actcacagat taaactgtaa ccaaataaaa attaggcata
2881 tttacaagct agtttctttc tttctttttt ctctttcttt ctttctttct ttctttcttt
2941 ctttctttct ttctttcttt ctttctcctt ccttcctttc ttcctttctt ttttgctggc
3001 aattacagac aaatcactca gcagctactt caataacat attttcgatt tcagaccgtg
3061 ataataccta caaccgagtg tcagaggatc tgagaagcag aattgaagtc ctgaagcgca
3121 aagtcataga aaaagtacag catatccagc ttctgcagaa aaatgtaga gctcagttgg

```

Abbildung 4.16 FGA-Allel 21 (GenBank-Eintrag M64982) mit den zur Sequenzierung verwendeten Primersequenzen (grau hinterlegt); die vermutete Lage des Vorwärtsprimers aus den verwendeten Multiplex-Kits ist gelb hinterlegt. Die T2835G-Trans-version ist grün hervorgehoben.

Da die während der PCR verwendete Annealing-Temperatur entscheidend für die Anlagerung der Primer ist, wurde anschließend der Effekt der Modifikation der Annealing-Temperatur (59 °C, 55 °C, 50 °C) studiert. Dies wurde mittels AmpFISTR® Profiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) exemplarisch durchgeführt, da der AmpFISTR® Identifiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) dieselben Primersequenzen enthält und dieselbe Annealing-Temperatur von 59 °C verwendet wird.

In Abbildung 4.17 ist gezeigt, dass eine Reduzierung der Annealing-Temperatur von 59 °C (vom Hersteller empfohlen) auf 55 °C im STR-System FGA bereits ein deutlich erkennbares heterozygoten Ergebnis liefert, während bei 50 °C einige Systeme kein Ergebnis mehr liefern (hier nicht dargestellt) und zusätzlich einige unspezifische Zusatzprodukte entstehen.

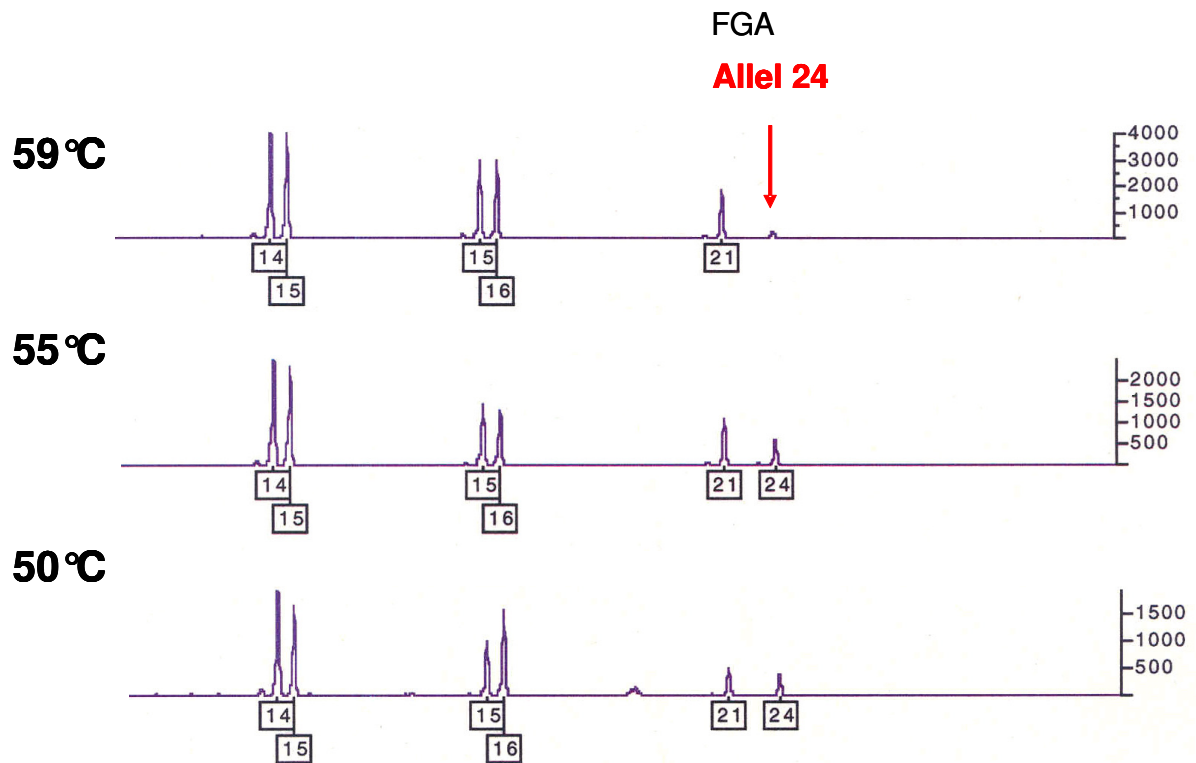


Abbildung 4.17 Exemplarische Elektropherogramme (blauer Kanal) des AmpFISTR® Profiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) für die Kindesprobe aus dem ersten Fall. Das Amplifizierungsergebnis für das STR-System FGA ist stark imbalanciert.

Bei Reduzierung der Annealing-Temperatur von 59°C auf 55°C wird ein balancierter heterozygoter Befund erzielt.

Es wurden 101 weitere Proben aus der Abstammungsbegutachtung mittels einer FGA-Monoplex-PCR untersucht, in denen mindestens ein Elternteil sowie das Kind einen homozygoten Befund aufweisen; kein weiterer Fall mit entgegengesetzter Homozygotie wurde identifiziert, so dass es sich um eine seltene Punktmutation im primerbindenden Bereich von FGA handeln muss.

Dieses Phänomens eines „stummen Allels“ wurde für das STR-System FGA (~ 10.000 meiotische Transfers im hiesigen Institut) mit einer Häufigkeit von ca. 0,02% abgeschätzt.

Exemplarisch konnte gezeigt werden, dass die Reduzierung der Annealing-Temperatur von 59°C auf 55°C in diesen Fällen mit entgegengesetzter Homozygotie das Mittel der Wahl sein kann, eine tatsächlich vorliegende Heterozygotie zu identifizieren, ohne Qualitätsverlust zu erleiden.

Die beiden hier untersuchten Fälle veranschaulichen die Notwendigkeit für alternative Primersysteme mit bekannten Sequenzen in der Abstammungsbegutachtung. Durch die Verwendung eines alternativen Primerpaares konnten die zuvor „stummen Allele“ in beiden Fällen amplifiziert und somit identifiziert werden. Da die vorliegende Punktmutation äußerst selten auftritt, kann sie zudem als zusätzlicher Hinweis für eine Verwandtschaft gewertet werden (Ricci et al. 2007).

5 Ergebnisse – Spurenkunde

5.1 Optimierung von Abrieben

Die Sicherung von Kontaktsuren, aber auch z.B. von Blut- oder Spermasuren von fest installierten Oberflächen (z.B. Fliesenfußboden, Fensterscheibe) erfolgt in der Praxis, indem handelsübliche Baumwollwattestieftupfer mit destilliertem Wasser befeuchtet werden, mit denen die Objekte anschließend – zum Abnehmen möglicherweise anhaftenden Zellmaterials – kleinflächig abgerieben werden (Wiegand & Rolf 2003). Der Watteanteil wird dann teilweise oder komplett für die DNA-Extraktion eingesetzt.

Bisher wurde der Frage, ob mit diesen Materialien beim Abrieb von Kontaktsuren am meisten amplifizierbare DNA gewonnen werden kann – sofern dies von chemisch-physikalischen Parametern beeinflusst wird – nicht systematisch nachgegangen.

Es wurden bereits verschiedene Abriebtechniken publiziert (Sweet et al. 1997; Pang & Cheung 2007), ebenso wie Techniken zur Visualisierung von Kontaktsuren (Almog et al. 2000; Anslinger et al. 2004). Von Wurmb-Schwark et al. (2006) veröffentlichten, dass durch Verwendung eines kommerziell erhältlichen Extraktionspuffers bei Abrieben der Hautoberfläche eine höhere DNA-Ausbeute erzielt wird. Zur grundlegenden Frage, ob sich durch die Wahl des Befeuchtungsmittels bzw. der Beschichtung der Abriebmaterialien die Ausbeute an amplifizierbarer Zellkern-DNA signifikant erhöhen lässt, wurde jedoch bislang keine systematische Studie publiziert.

Daher wurde in dieser Arbeit der Frage nachgegangen, ob destilliertes Wasser das beste Befeuchtungsmittel für Abriebe ist und ob Tupfer mit Baumwollkopf optimal sind oder ob es ein Lösungsmittel bzw. eine Beschichtung gibt, mit dem/der deutlich mehr amplifizierbare Zellkern-DNA für die molekulargenetischen Untersuchungen gewonnen werden kann.

Es wurden elf Befeuchtungsmittel ausgewählt, die komplementäre chemische Eigenschaften zu Wasser aufweisen (u.a. hydrophob, tensidisch, gepuffert; s. Tab. 5.1), um so den Einfluss der chemischen Parameter zu überprüfen. Diese wurden im Vergleich zu destilliertem Wasser getestet. Des Weiteren wurden 15 verschiedene

Beschichtungen (s. Tab. 5.3) aus Natur- und synthetischen Fasern im Vergleich zu herkömmlich verwendeten Baumwolltupfern getestet (Tab. 5.3).

Weiterhin ist bislang nicht bekannt, in welcher Größenordnung sich die Wiederfindungsrate von Abriebspuren befindet und welchen Effekt Lagerungszeiten auf bereits gesicherte Abriebe haben. Daher wurden diese beiden Punkte ebenfalls beleuchtet.

Tabelle 5.1 Die 11 getesteten Befeuchtungen für Abriebspuren im Vergleich zu Wasser

Befeuchtungsmittel	Chemische Eigenschaft
SDS 1%	tensidisch (anionisch)
Xylol	hydrophob
Betain 10%	tensidisch (amphoterisch)
Isopropanol abs.	nicht wässrig
CTAB 1%	tensidisch (kationisch)
TE-Puffer 1x	gepuffert
KCl-Lösung 3M	hochsalzig
Tween20 1%	tensidisch (nicht-ionisch)
Guanidinium-HCl-Lösung 5M	chaotrop
Isopropanol 80%	protisch
Brillenputztuch	Außengruppenvergleich

In Tab. 5.2 sind die durchgeführten Untersuchungen dargestellt.

Tabelle 5.2 Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen

Anzahl der Abriebe	Anzahl der vergleichend getesteten Parameter	Doppelbestimmung der Quantifizierung	Eingesetzte Menge der DNA-Extrakte für die PCR
10	12 (Befeuchtungsmittel)	nein	10 µl
35	5 (Befeuchtungsmittel)	ja	500 pg
5	16 (Beschichtungen) + H ₂ O	ja	500 pg
5	16 (Beschichtungen) + SDS	ja	500 pg

Zunächst wurden standardisierte Abriebspuren angelegt. Dies erfolgte, wie im Abschnitt 3.2.3.1 beschrieben, durch gleiche Mengen Speichelauftragungen auf Kunstleder.

Nach DNA-Extraktion, Aufreinigung, Quantifizierung und Amplifizierung der Proben (Monoplex-PCR des hochsensitiven STR-Systems ACTBP2) (je 10 pro Lösungsmittel) (vgl. Abschnitte 3.1.8, 3.2.4.1, 3.2.4.3, 3.2.5, 3.2.6) wurde je 1 μ l der PCR-Produkte kapillargelelektrophoretisch analysiert. Um eine Vergleichbarkeit der erhaltenen kapillarelektrophoretischen Resultate (Peakhöhen [rfu]) sicher zu stellen, wurden die rfu-Werte für den erhaltenen Peak normiert. Dies erfolgte, indem aus der Höhe des 250-bp-Peaks des internen Längenstandards, der jeder Probe zugesetzt wurde, der Mittelwert für alle Proben dieses kapillargelelektrophoretischen Laufs ermittelt wurde.

Dieser 250-bp-Peak des Längenstandards wurde verwendet, da sich das erwartete PCR-Produkt ebenfalls in diesem Längenbereich (\sim 280 bp) befindet.

Aus der Höhe des 250-bp-Peaks der einzelnen Probe im Verhältnis zum Mittelwert aller Proben wird der Korrekturfaktor gebildet, mit dem die Höhe des Allelpeaks normiert wird.

5.1.1 Befeuchtungsmittel

Die normalisierten Werte (Peakhöhen [rfu]) für die zehn ersten Abriebe, die mit 12 getesteten Befeuchtungsmitteln durchgeführt wurden, sind in Abb. 5.1 dargestellt.

Man sieht, dass mehrere Befeuchtungsmittel starke Schwankungen und Streuungen aufweisen (z.B. TE-Puffer, Tween) und die Mittelwerte sich stark unterscheiden. Betain und Brillenputztuch liefern sämtlich negative Ergebnisse, so dass sie nicht für Abriebe geeignet sind. Andere Befeuchtungsmittel hingegen weisen sowohl einen hohen Mittelwert, als auch wenig Streuung auf.

Es wurden vier Befeuchtungsmittel im Vergleich zu destilliertem Wasser ausgewählt, die hohe rfu-Werte, zugleich aber auch keine große oder ungleichmäßige Streuung aufwiesen: SDS 1%, Xylol, Isopropanol abs. und Isopropanol 80% (in Abb. 5.1 durch rote Umrandung hervorgehoben).

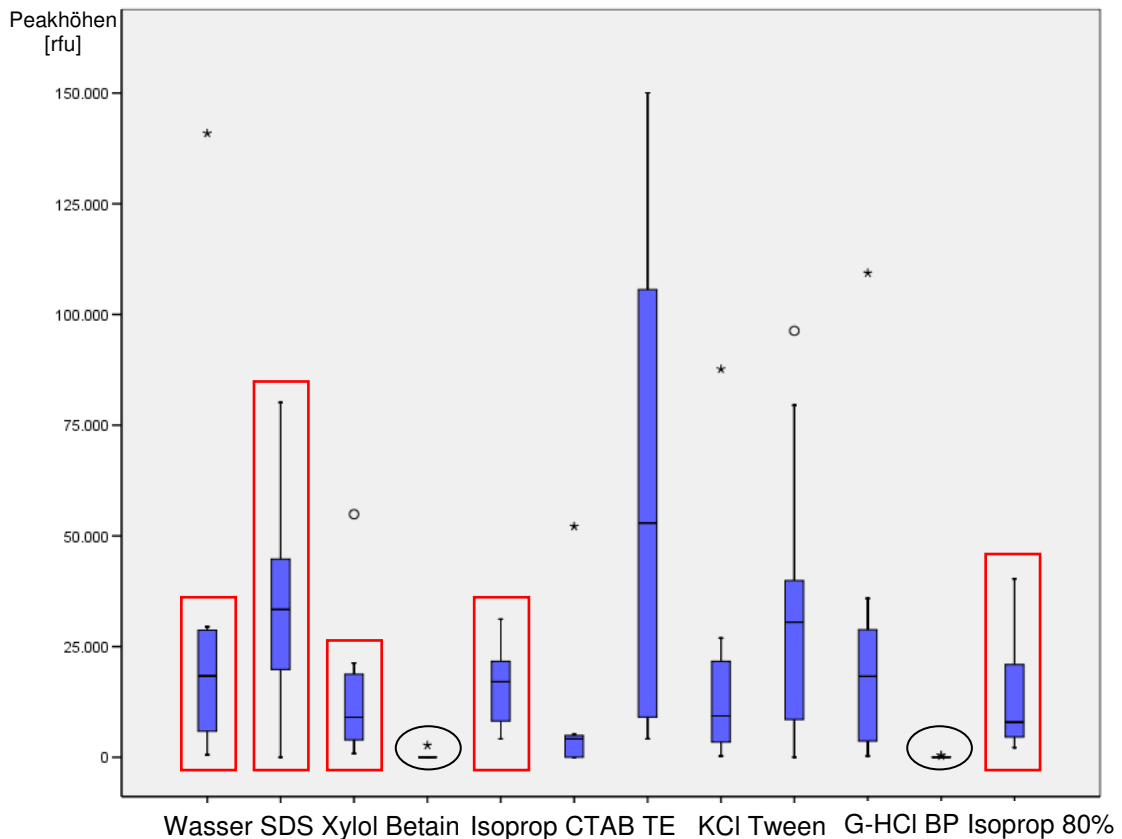


Abbildung 5.1 Normalisierte Werte für die 12 Befeuchtungsmittel (je zehn Proben)

Die Darstellung erfolgt hier mittels Boxplots, d.h. die Boxen sind durch das obere und untere Quartil begrenzt, die Linie innerhalb der Box ist der Median, durch die *Whisker* werden die Extremwerte begrenzt.

Nach Einengung auf diese fünf Befeuchtungsmittel wurden mit diesen jeweils 25 weitere Abriebe durchgeführt und wie oben beschrieben untersucht, so dass für jedes Befeuchtungsmittel insgesamt 35 Abriebe untersucht wurden.

Die erhaltenen rfu-Werte wurden wieder normalisiert (s.o.). Die Ergebnisse sind in Abb. 5.2 dargestellt.

Zusätzlich wurde der Gehalt an Zellkern-DNA der einzelnen Proben mittels Quanti-filer[®] Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) bestimmt; die Ergebnisse sind in Abb. 5.3 dargestellt.

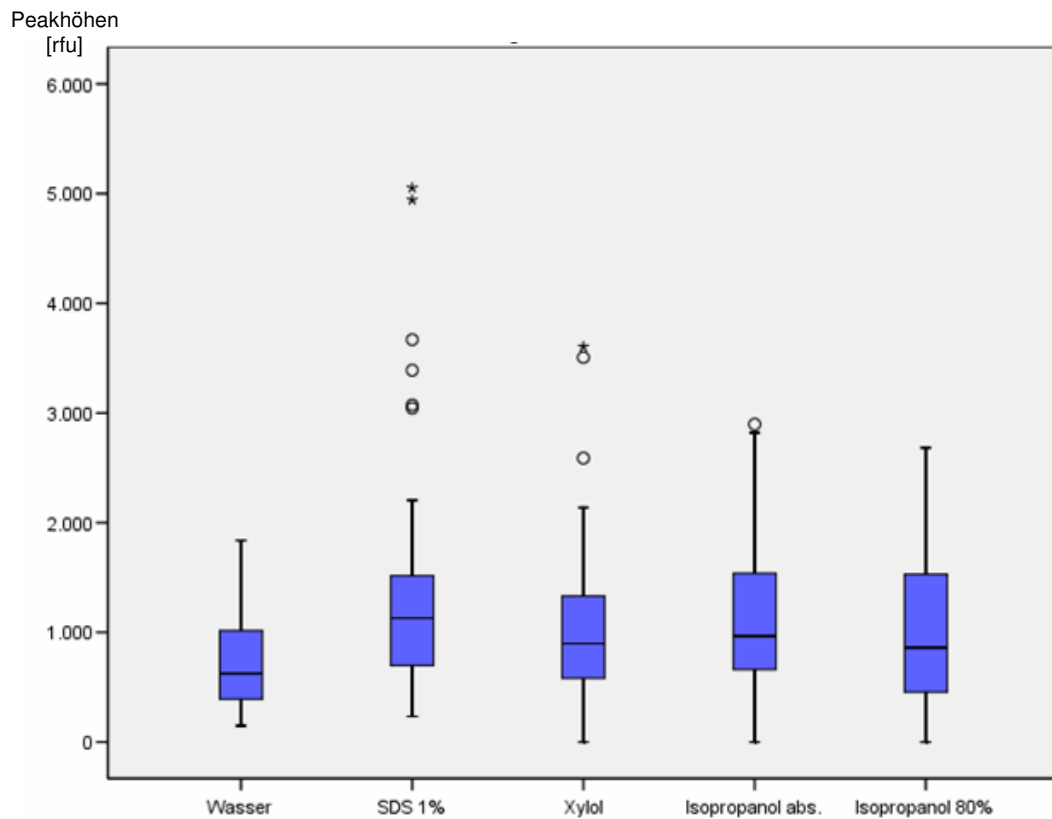


Abbildung 5.2 Normalisierte Werte der fünf Befeuchtungsmittel nach kapillargel-elektrophoretischer Analyse

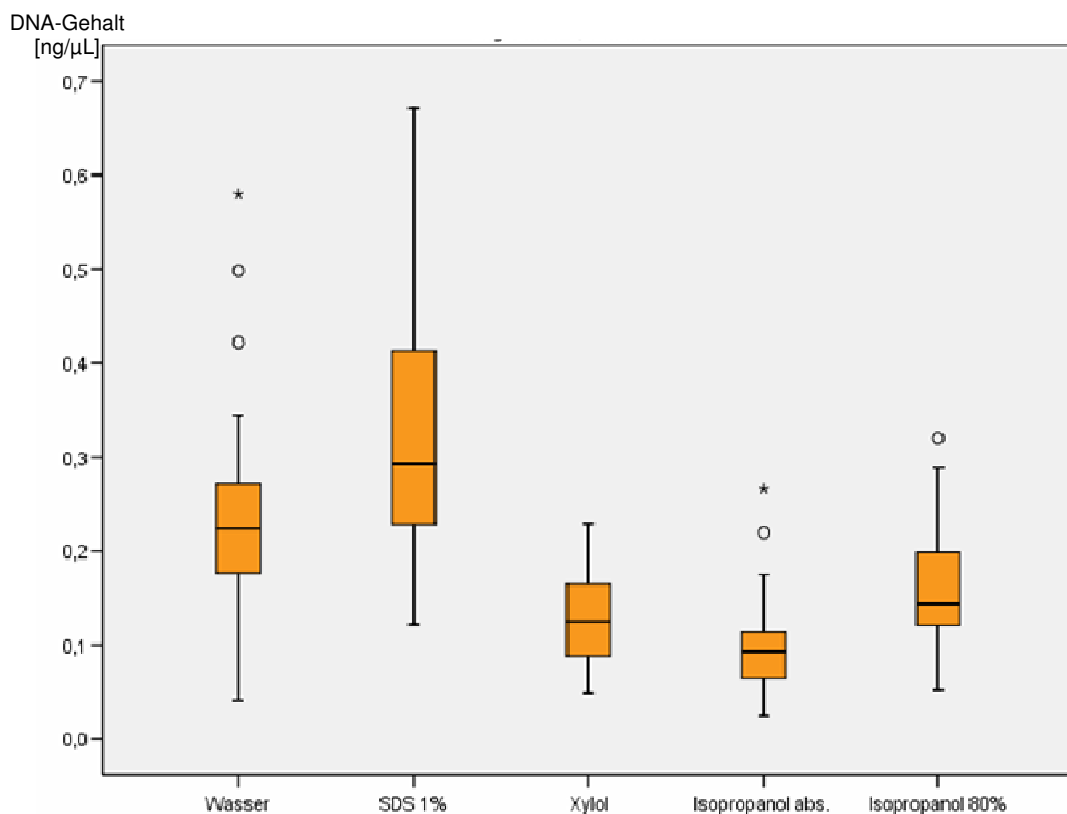


Abbildung 5.3 Normalisierte Werte der fünf Befeuchtungsmittel nach Doppelbestimmung des Zellkern-DNA-Gehalts

Der Mann-Whitney-U-Test wurde als Signifikanz-Test für die vier Befeuchtungsmittel im Vergleich zu destilliertem Wasser durchgeführt und es zeigte sich, dass sowohl für die Quantifizierungsergebnisse (Abb. 5.2), als auch für die normierten Ergebnisse der kapillargelelektrophoretischen Auswertung (Abb. 5.3) SDS-Lösung als Befeuchtungsmittel signifikant bessere Ergebnisse liefert als destilliertes Wasser. Somit kann gesagt werden, dass die Abriebe, die mit SDS-Lösung durchgeführt wurden, unter den beschriebenen Bedingungen signifikant mehr amplifizierbare Zellkern-DNA liefern als Abriebe mit destilliertem Wasser.

Die anderen drei Befeuchtungsmittel Xylol, Isopropanol abs. und Isopropanol 80% zeigten untereinander und gegenüber destilliertem Wasser keine signifikanten Unterschiede.

5.1.2 Beschichtungen

In einer vorläufigen Studie hinsichtlich der Tupperbeschichtung wurden 15 Beschichtungen (vgl. Tab. 5.3) im Vergleich zu den herkömmlich verwendeten Baumwolltupfern getestet.

Tabelle 5.3 Die 16 getesteten Beschichtungen für Abriebspuren

Nr.	Beschichtungen
1	Baumwolle
2	Baumwolle (fest gewickelt)
3	Baumwolle (lose gewickelt)
4	Viskose
5	Nylon
6	Nylon (beflockt)
7	Leder (schmal)
8	Leder (breit)
9	Schaumstoff über Baumwolle
10	Schwammtupfer
11	Mikrofaser
12	Glasfaser (2,5 mm)
13	Glasfaser (1,25 mm)
14	Fließtupfer
15	Glasfaser-Plättchen
16	Mikrofaser-Pads

Aufgrund der Ergebnisse der ersten Tests mit den verschiedenen Befeuchtungsmitteln wurden hier pro Beschichtung zehn Abriebe durchgeführt, davon jeweils fünf mit Wasser und fünf mit SDS 1%.

Nach Quantifizierung (Doppelbestimmung) ergaben sich die in Abb. 5.4 und 5.5 dargestellten Ergebnisse für die in Tabelle 5.3 aufgeführten Beschichtungen.

Die Ergebnisse der kapillargelelektrophoretischen Analyse mit anschließender Normierung der rfu-Werte sind im Anhang 9.11 dargestellt.

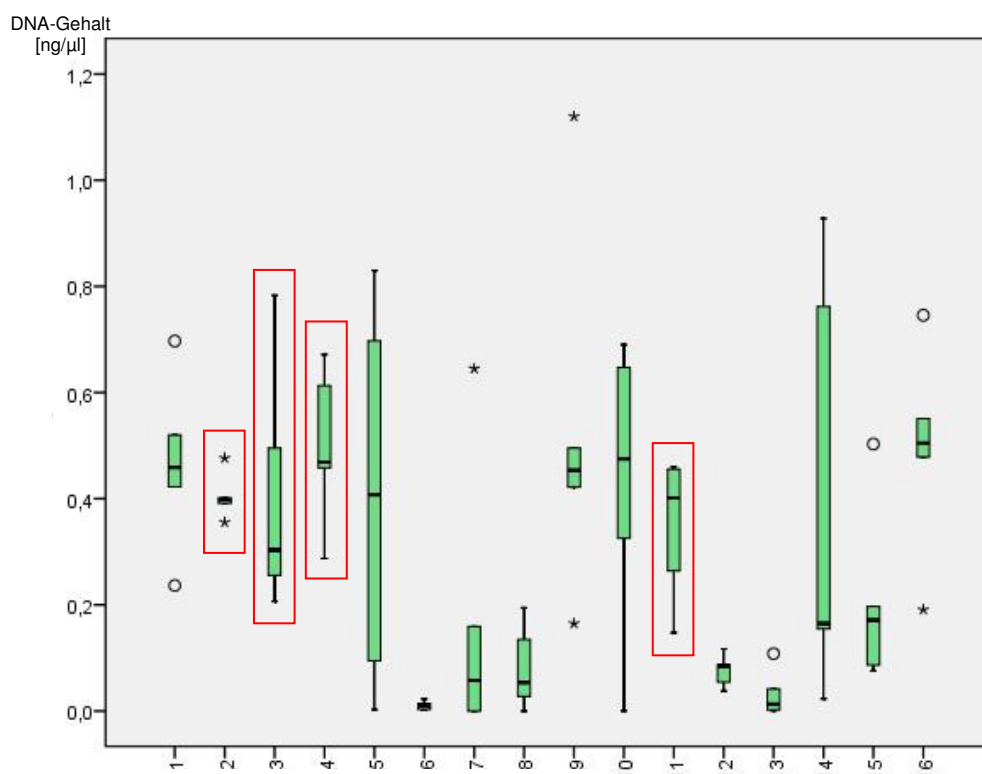


Abbildung 5.4 Normalisierte Werte der 16 Beschichtungen mit Wasser nach Doppelbestimmung des Zellkern-DNA-Gehalts

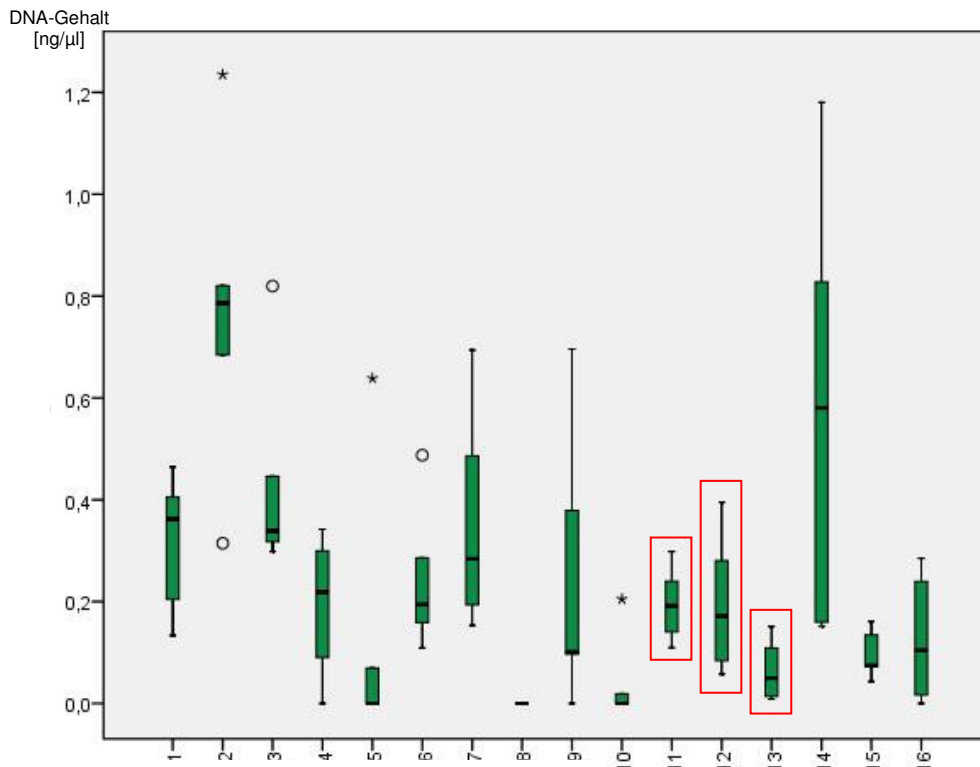


Abbildung 5.5 Normalisierte Werte der 16 Beschichtungen mit SDS nach Doppelbestimmung des Zellkern-DNA-Gehalts

Es ist zu erkennen, dass einige Befeuchtungsmittel-Beschichtungskombinationen stark schwanken und streuen. Die Mittelwerte unterscheiden sich stark, einige Kombinationen liefern sämtlich oder nahezu komplett negative Ergebnisse, so dass sie nicht für Abriebe geeignet sind. Bei einigen Kombinationen treten jedoch ein hoher Mittelwert und wenig Streuung auf.

Da für die unterschiedlichen Beschichtungen die beiden Befeuchtungsmittel Wasser und SDS-Lösung im Vergleich getestet wurden, lagen Ergebnisse für 32 Kombinationen vor. Eine fundierte statistische Auswertung der Ergebnisse konnte bisher nicht erfolgen, da für jede Kombination nur eine Stichprobe mit $n=5$ getestet worden war.

Zur Weiterführung dieser vorläufigen Studie mit 16 Beschichtungen und zwei Befeuchtungsmitteln sollen aufgrund des großen Material- und Zeitaufwandes nur einige vielversprechende Kombinationen ausgewählt werden, mit denen weitere Abriebe durchgeführt werden sollen.

Das Ziel dieser Studie war, eine alternative Befeuchtungsmittel-Beschichtungskombination zu erhalten, mit der mehr amplifizierbare DNA aus Abriebspuren erhalten wird. Somit wurden als wichtige Kriterien zur Auswahl weniger Befeuchtungsmittel-Beschichtungskombinationen ein hoher Mittelwert des DNA-Gehalts, das Fehlen von „Nullwerten“, möglichst keine „Ausreißer“ und wenig Streuung festgelegt.

Auf Grundlage dieser Kriterien (Quantifizierungsergebnisse (s. Abb. 5.4 und 5.5) und kapillargelelektrophoretische Ergebnisse (s. Anhang 9.11)) lassen sich vier Beschichtungen (Baumwolle fest gewickelt (2), Baumwolle lose gewickelt (3), Viskose (4), Mikrofaser (11)) in Kombination mit Wasser und drei Beschichtungen (Mikrofaser (11), Glasfaser 2,5 mm (12), Glasfaser 1,25 mm (13)) in Kombination mit SDS 1% auswählen.

Die hier getroffene Auswahl erfolgte auch auf Grundlage der kapillargelelektrophoretischen Auswertungen, die mit den hier gezeigten Tendenzen in gutem Einklang standen.

Anhand dieser reduzierten Auswahl an Befeuchtungsmittel-Beschichtungskombinationen können weitere Abriebe angefertigt werden, um eine sinnvolle statistische Analyse mit einer signifikant hohen Datenmenge durchzuführen.

Die Tatsache, dass die Abriehtupfer mit Mikrofaserbeschichtung mit beiden getesteten Befeuchtungsmitteln sehr gute Ergebnisse liefern, kann als deutlicher Hinweis darauf gewertet werden, dass die Mikrofaseroberfläche sehr gut geeignet ist, um Zellmaterialien und/oder DNA-Moleküle von Oberflächen abzunehmen.

5.1.3 Wiederfindungsrate

Des Weiteren wurde die Wiederfindungsrate für den applizierten Speichel an den Abrieben bestimmt. Damit wird angegeben, welche Menge des applizierten Speichels nach dem Abrieb gefunden wird. Es ist bislang nicht bekannt, in welcher Größenordnung sich diese Wiederfindungsrate für Abriebspuren bewegt.

Die Abriebspuren wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten angelegt, somit wurden auch unterschiedliche Mengen Zellkern-DNA im applizierten Speichel nachge-

wiesen: zum ersten Zeitpunkt waren es 148 ng Zellkern-DNA in 5 µL Speichel, zum zweiten Zeitpunkt 97,5 ng in 5 µL Speichel.

Abbildung 5.6 ist zu entnehmen, in welchem Rahmen sich die Wiederfindungsrate für die verschiedenen Befeuchtungsmittel befindet. Hier fand sich mit einer mittleren Wiederfindungsrate von 13,7% des detektierten Zellkern-DNA-Gehalts aller durchgeführten Abriebe der höchste Wert für SDS 1%, was in Übereinstimmung mit dem guten Abschneiden bzgl. Quantifizierung und kapillargelelektrophoretischer Analyse steht.

In Anhang 9.12 ist die entsprechende Tabelle mit allen Ergebnissen zusammenfassend dargestellt. Die erhaltenen Wiederfindungsraten für die verschiedenen Beschichtungen-Befeuchtungsmittelkombinationen sind ebenfalls im Anhang 9.12 aufgeführt.

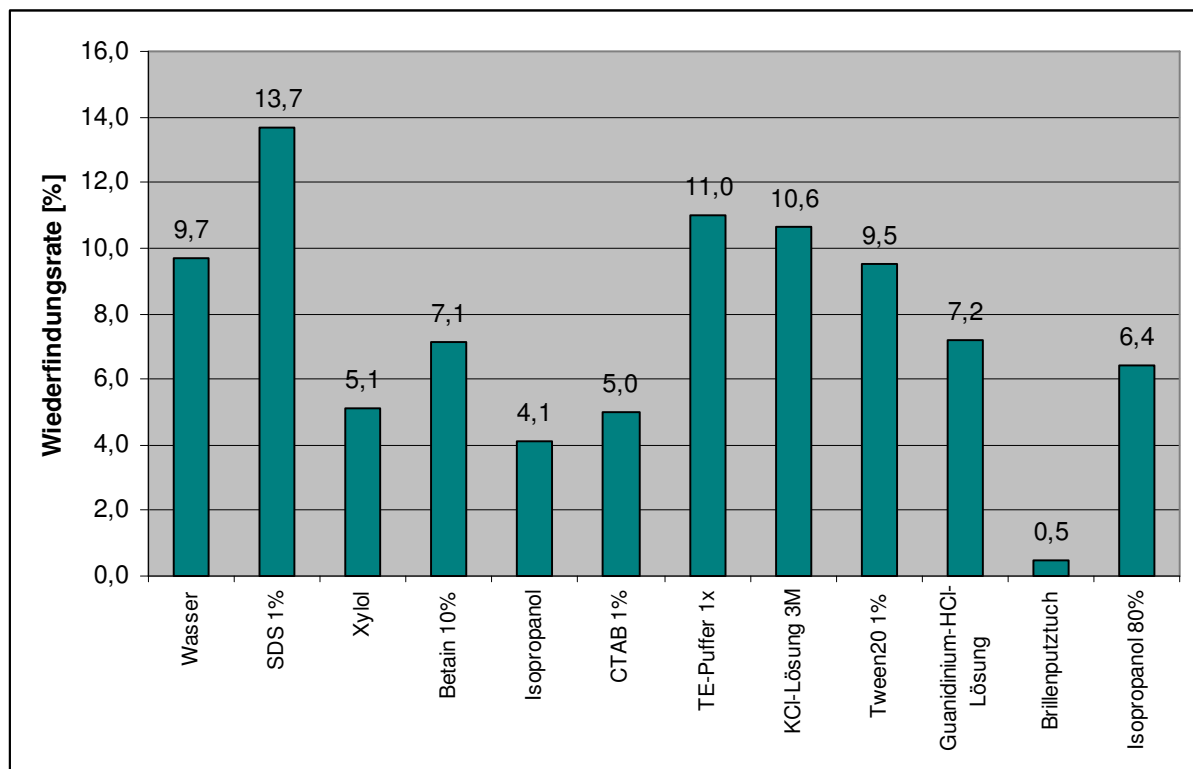


Abbildung 5.6 Wiederfindungsrate der jeweiligen Befeuchtungsmittel auf Baumwolltupfern (Mittelwert der Quantifizierungen)

5.1.4 Einfluss der Lagerungsdauer auf Abriebspuren

Da nicht bekannt ist, in welchem Zeitraum mittels Baumwollabriebtupfern gesichertes Spurenmaterial degradiert, und da z.T. Lagerungszeiträume gesicherter Abriebe von bis zu einem Jahr bestehen, bevor Spuren der molekulargenetischen Untersuchung zugeführt werden, sollte dies im Rahmen der Abriebstudie untersucht werden.

Um einen „Alterungseffekt“ zu simulieren, wurden nach Anlegen der Abriebspuren (für die verschiedenen Beschichtungen) jeweils 40 Abriebe mit destilliertem Wasser und mit SDS 1% durchgeführt. Diese Abriebe wurden trocken und dunkel bei RT gelagert.

Zu vier verschiedenen Zeitpunkten ($t = 0$ Tage, 51 Tage (~ 6 Wochen), 86 Tage (~ 3 Monate) und 183 Tage (~ 6 Monate)) wurden jeweils zehn Abriebe extrahiert, aufgereinigt und in einer Doppelbestimmung mittels Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) quantifiziert. Die erhaltenen DNA-Konzentrationen der Zellkern-DNA zu den verschiedenen Zeitpunkten sind in Abbildung 5.7a) für Wasser und in Abbildung 5.7b) für SDS 1% dargestellt.

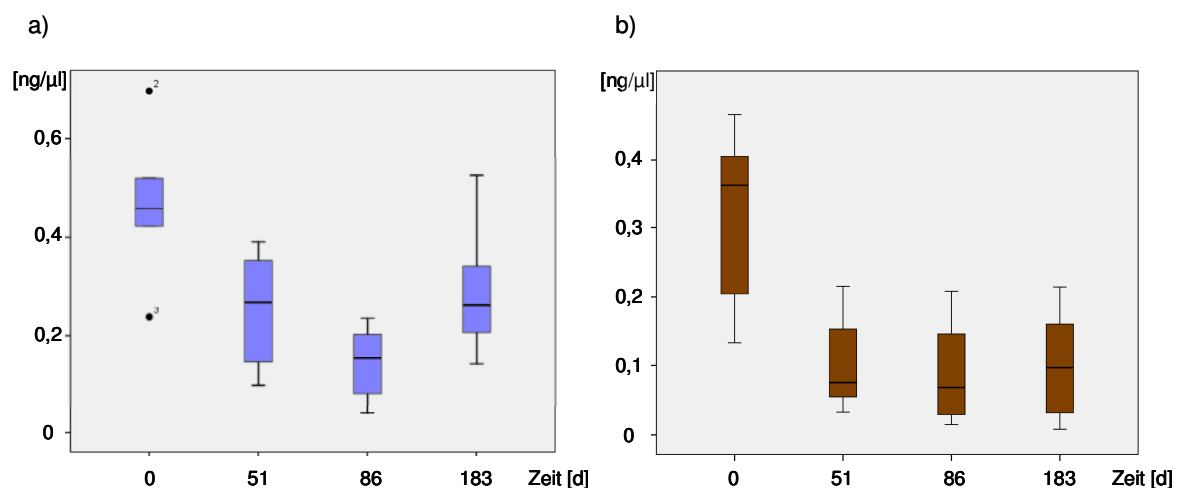


Abbildung 5.7 Durchschnittlicher Zellkern-DNA-Gehalt der mit Wasser (a) und der mit SDS 1% (b) durchgeführten Abriebe an vier Zeitpunkten (jeweils $n=10$)

Der mittlere Gehalt an Zellkern-DNA nahm für die mit Wasser durchgeführten Abriebe vom ersten zum dritten Zeitpunkt bei Abrieben beider Lösungsmittel stetig ab und zum vierten Zeitpunkt augenscheinlich wieder zu.

Die statistische Auswertung wurde mit einer Varianz-Analyse mithilfe des Kruskal-Wallis-Tests (für Wasser: $p=0,003$; für SDS: $p=0,03$) durchgeführt, der ergab, dass sich die Werte vom Zeitpunkt 0 für beide Befeuchtungsmittel signifikant von den anderen drei Zeitpunkten unterscheiden. Diese wiederum unterscheiden sich untereinander nicht.

Es kann gesagt werden, dass es – unabhängig von der Wahl des Befeuchtungsmittels – vom Zeitpunkt der erfolgten Spurensicherung durch einen Abrieb, auch bei empfohlener Lagerung (trocken, dunkel, RT) innerhalb von sechs Wochen zu einer signifikanten Abnahme des DNA-Gehaltes kommt, so dass deutlich weniger Zellkern-DNA nachgewiesen werden kann. Ab diesem Zeitpunkt wird die Zellkern-DNA allerdings nicht im signifikant messbaren Bereich weiter abgebaut.

Im Rahmen dieser Abriebstudien konnten einige wichtige Erkenntnisse gewonnen werden, die allerdings bisher nur unter den genannten Bedingungen gelten. Bevor die Aussagen dieser Modellstudie auf die Spurenkunde in der Realität übertragen werden können, müssen weitere Versuche, z.B. „echte“ Hautabriebe, durchgeführt werden.

5.2 Ergebnisse der spurenkundlichen Untersuchungen einer Stechhilfe zur Blutentnahme

Eine in Münster ansässige Firma, die Medizinprodukte entwickelt und vertreibt, hat eine Stechhilfe entwickelt, die von Diabetes-Patienten zur Blutentnahme zur Bestimmung des Glukosegehaltes im Blut verwendet wird.

Im Wesentlichen sollen diese Stechhilfen individuell, zum heimischen Gebrauch, bei den Patienten eingesetzt werden. Darüber hinaus sollte – auch im Rahmen der Markteinführung des Gerätes – potenziellen Kunden die Anwendung demonstriert werden bzw. sollte die Stechhilfe möglicherweise auch in Kliniken und Arztpraxen eingesetzt werden. Dabei würde ein Gerät durch verschiedene Personen benutzt werden. Somit war es obligat, eine potenzielle Infektionsgefahr durch diesen gemeinsamen Gebrauch über möglicherweise angetragenes DNA-haltiges Zellmaterial, insbesondere Blut, abschätzen zu können. Durch die hochsensitiven spurenkundlichen (Vor-)Untersuchungen sollten mögliche anhaftende Blutpartikel (s. Abschnitt 3.2.1) bzw. vorliegendes Zellmaterial an exponierten Stellen der Stechhilfe detektiert werden.

Auf der Vorderseite des Gerätes befindet sich das Display, das z.B. die Tiefe des Stiches anzeigt, weiterhin der Auslöser und zwei Tasten (,+’ bzw. ,-') zur Einstellung der Stichtiefe. An der Seite befindet sich ein Schieber, mit dem die Lanzetten, die zum Stechen benutzt werden, geladen werden (vgl. Abb. 5.8 a) und b)).

Nach dem Laden einer neuen Lanzette, die jeweils einzeln steril in einer Disk mit insgesamt 68 Lanzetten (s. Abb. 5.9) vorliegen, wird der Auslöser-Knopf gedrückt, während die Fingerkuppe sich vor der Öffnung befindet. Durch den Stich in die Fingerkuppe wird ein Tropfen Kapillarblut freigesetzt und kann zur Messung des Blutglukose-Spiegels eingesetzt werden. Bei Benutzung durch mehrere Personen wird zum Schutz vor Kontaminationen eine festsitzende Einmal-Schutzkappe (s. Abb. 5.9) über die Lanzetten-Öffnung gelegt.

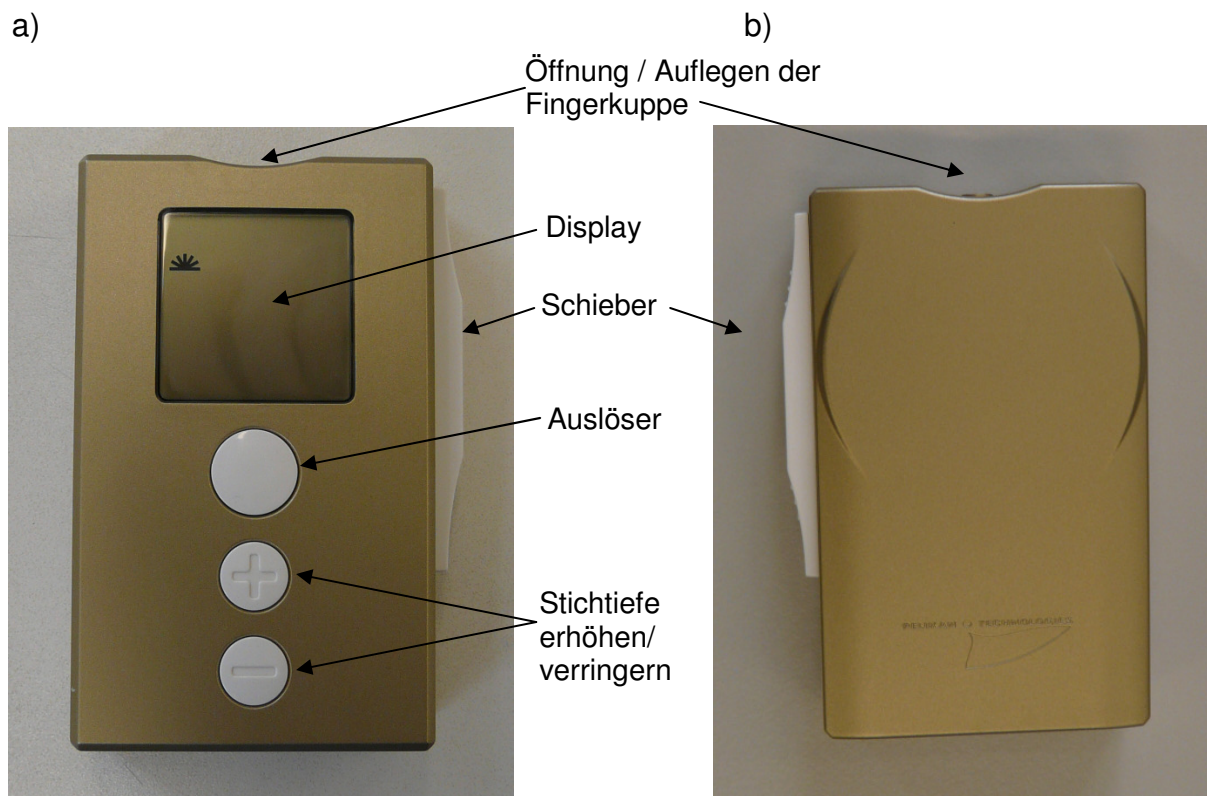


Abbildung 5.8 Vorder- (a) und Rückansicht (b) der Stechhilfe

Vor Durchführung der molekulargenetischen Untersuchungen wurden Verdünnungen einer Blutprobe (1:25, 1:250, 1:2500 – je 1,5µL) einer Mitarbeiterin des hiesigen Instituts mit bekannten Allelwerten auf die Aluminiumseite einer Disk appliziert, um zu prüfen, ob der KM-Blutvortest und die nachfolgende DNA-Analytik von dieser Matrix negativ beeinflusst werden. Derartige Einflüsse sind von manchen Metalloberflächen bekannt (hausinterne Studien; Ergebnisse nicht publiziert).

Die Blutvortests verliefen für die Verdünnungen von 1:25 und 1:250 positiv, für die 1:2500-Verdünnung fiel das Testergebnis negativ aus. Auch die nachfolgenden DNA-Analysen mittels Monoplex-PCR des hochsensitiven STR-Systems ACTBP2 und kapillargelelektrophoretischer Analyse verliefen für die Verdünnungen von 1:25 und 1:250 positiv und für die 1:2500-Verdünnung negativ.

Diese Ergebnisse ergaben größenordnungsmäßig die erwarteten unteren Nachweisgrenzen; somit konnte ausgeschlossen werden, dass der KM-Blutvortest oder die weiteren durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen prinzipiell von der Metalloberfläche beeinflusst wurden.

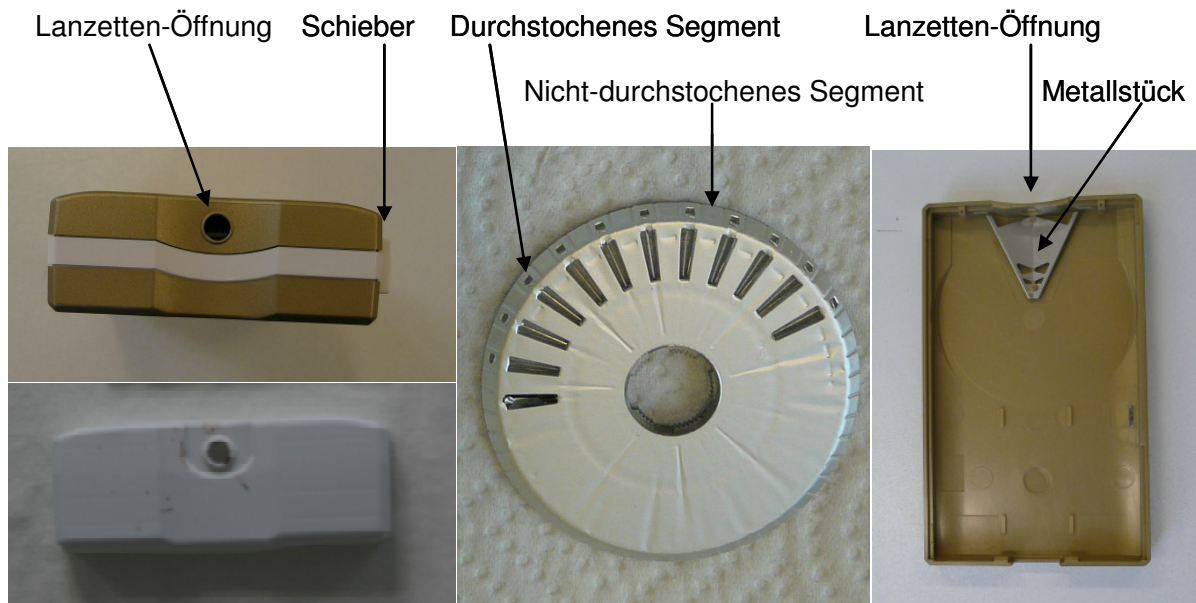


Abbildung 5.9 Aufsicht auf das Gerät und auf die Schutzkappe, Metalldisk mit Lanzetten (\varnothing 5,5 cm) und Innenansicht der rückenseitigen Gehäuseklappe (ca. 10 x 6 cm)

Des Weiteren wurde bewusst eine Fehlbedienung des Geräts simuliert: nach dem Stechen mittels Lanzette und Bildung eines erkennbaren Blutropfens an der Fingerkuppe wurde dieser an der Öffnung der Schutzkappe abgestreift.

Auch bei diesen Blutantragungen verliefen der KM-Test und die DNA-Untersuchungen positiv, so dass auch hier ausgeschlossen werden kann, dass die Kunststoffoberfläche die Nachweisreaktionen stört. Somit sind keine falsch negativen Ergebnisse zu erwarten.

Weiterhin wurden an diesem Gerät Abriebe der Chassis und der Disks durchgeführt; es konnten weder Blutantragungen noch DNA-haltiges Material gesichert werden.

Nachdem ein Einfluss des Blutvortests und der nachfolgenden molekulargenetischen Untersuchungen durch gerätespezifische Eigenschaften ausgeschlossen werden konnte, wurde eine Blutentnahme bei fünf weiteren Probanden durchgeführt.

Das Gerät wurde nach Herstellerangaben bedient. Um eine Kontamination der Geräte durch zusätzliche Zellantragungen, z.B. Hautepithelzellen der Hände, Speichelantragungen, durch den Gerätebediener zu vermeiden, wurden die Blutentnahmen mit den gleichen Schutzmaßnahmen wie Spurensicherungen vorgenommen (u.a. Mundschutz, Handschuhe).

Nach Benutzung der Stechhilfe durch die Probanden wurde die Schutzkappe entfernt und darunter liegende Bereiche, die möglicherweise kontaminiert wurden, abgerieben. Diese exponierten Bereiche sind die Öffnungsaußenseite der rückseitigen Gehäuseklappe, die Öffnungsinnenseite der rückseitigen Gehäuseklappe inklusive Metallstück, die durchstochenen Diskbereiche (kumulativ) und die nicht-durchstochenen Diskbereiche (kumulativ). Sämtliche hier benutzte Geräte zeigten ein negatives Ergebnis beim Kastle-Meyer-Blutvortest (Abschnitt 3.2.1).

Des Weiteren wurden dieselben Abriebe für eine DNA-Extraktion (Abschnitt 3.2.4.1) mit anschließender Quantifizierung der Zellkern-DNA durch den Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) (Abschnitt 3.2.5) sowie für die Amplifizierung des hochsensitiven STR-Systems ACTBP2 (Abschnitte 3.1.8 und 3.2.6) eingesetzt. Die Produkte der Amplifizierungen wurden zuerst mittels PAGE (Abschnitt 3.2.7.1) und nachfolgend kapillargelelektrophoretisch (Abschnitt 3.2.7.2) analysiert.

Sowohl bei der Quantifizierung, als auch bei der kapillargelelektrophoretischen Analyse konnte keine menschliche Zellkern-DNA detektiert und visualisiert werden.

An den untersuchten Bereichen der Geräte konnte weder Blut noch DNA-haltiges Material entdeckt werden. Somit gelangte der Hersteller zu dem Schluss, dass die Infektionsgefahr beim regelrechten Gebrauch der Stechhilfe durch verschiedene Personen unter Verwendung der Schutzkappe vernachlässigt werden kann.

5.3 Ergebnisse zur Bestimmung des Ursprungs eines Leberkarzinoms nach Organtransplantation

Einem 42-jährigen Mann mit Leberzirrhose im Endstadium, verursacht durch eine Infektion mit Hepatitis B und C, und einem einzelnen Leberkarzinom war die Spenderleber einer 73-jährigen Frau transplantiert worden.

Vor der Transplantation wurden Gewebebiopsien der Donor-Leber entnommen, die keine auffälligen Befunde zeigten. Vier Monate nach der Transplantation wurden bei einer Kontrolluntersuchung mehrere hepatozelluläre Knoten diagnostiziert. Neun Monate nach der Organtransplantation verstarb der Mann – trotz Chemotherapie – an einem metastasierenden Leberkarzinom.

Es sollte geklärt werden, ob mit der transplantierten Leber das hepatozelluläre Karzinom übertragen wurde und somit bei den vorgeschalteten Untersuchungen übersehen wurde oder ob der Ursprung des Karzinoms beim Empfänger selber lag, da er bereits ein Leberkarzinom aufgewiesen hatte und dies als am häufigsten auftretende Komplikation bei der o.g. Diagnose und Therapie bekannt ist (Pfeiffer et al. 1997; Schlitt et al. 1999; Vivarelli et al. 2002; Kotlyar et al. 2006). Um den Ursprung des Leberkarzinoms zu identifizieren, sollten mithilfe der Lasermikrodissektion einzelne metastasierende Zellen aus histologischen Schnitten des Tumorgewebes ausgewählt und daraus das DNA-Profil bestimmt werden. Falls das Karzinom zusammen mit der Leber transplantiert worden wäre, sollte man nur die Zellen – und somit das DNA-Profil der Spenderin – detektieren. Falls der Ursprung des Karzinoms beim Mann selber lag, würden nur seine DNA-Merkmale nachgewiesen werden.

Teile des Lebergewebes mit metastasierenden Bereichen wurden bei der durchgeführten Obduktion entnommen und für die nachfolgenden histologischen Präparationen zunächst in Formalin fixiert. Anschließend erfolgte eine histologische Aufarbeitung und Herstellung von Gewebeschnitten für die Lasermikrodissektion (LMD) (vgl. Abschnitt 3.2.2.2).

Die herkömmliche Technik, d.h. manuelles Abtrennen des metastasierenden Gewebes, wurde im Vergleich zur Technik der LMD getestet, um die Fragen zu klären, ob eine der beiden Techniken eindeutige Ergebnisse hinsichtlich des Ursprungs

des Leberkarzinoms liefert und ob es Vorteile der LMD-Technik gegenüber der herkömmlichen Technik gibt.

Die herkömmlich verwendete Technik inklusive aller nachfolgenden Analysen wurde im Dipartimento di Medicina Legale der Universität Genua durchgeführt. Sie beinhaltet die DNA-Extraktion aus dem manuell präparierten Bereich des Leberkarzinoms, Multiplex-PCR mit einem kommerziell erhältlichen Kit (PowerPlex[®]16 System, Promega, Madison/USA) und anschließender kapillargelelektrophoretischer Analyse.

Für die LMD wurden im hiesigen Institut insgesamt zehn Gewebeschnitte auf Membranobjektträgern (Membrane Slides for Lasermicrodissection, MMI, Glattbrugg/Schweiz) angefertigt (Abschnitt 3.2.2.2). Zunächst wurden zehn bis 20 Zellen mittels LMD in insgesamt neun Reaktionsgefäßen gesammelt (s. Tab. 5.4; Proben 1 bis 9), wobei darauf geachtet wurde, nur Zellen aus dem metastasierenden Gewebe auszuschneiden.

Zum direkten Vergleich wurden zufällig ausgewählte Bereiche ausgeschnitten (s. Tab. 5.4; Proben 10 und 11).

Tabelle 5.4 Gehalt an Zellkern-DNA in den LMD-Proben

Probe	Probenbezeichnung	Zellkern-DNA [ng/μL]
1	01 LMD	*
2	02 LMD	<u>0,02</u>
3	03 LMD	0,003
4	04 LMD	<u>0,28</u>
5	Sanfilippo 1a	<u>0,02</u>
6	Sanfilippo 2a	<u>0,006</u>
7	Sanfilippo 3a	<u>0,009</u>
8	Sanfilippo 4a	<u>0,02</u>
9	Sanfilippo 5a	0,002
10	LMD-01	0,01
11	LMD-02	0,09

Die Proben wurden mittels des QIAamp® DNA Micro Kits (Qiagen, Hilden) extrahiert (vgl. Abschnitt 3.2.4.2) und anschließend wurde der DNA-Gehalt bestimmt (Quantifiler® Human DNA Quantification Kit, Applied Biosystems, Darmstadt; vgl. Abschnitt 3.2.5).

Mit Ausnahme von Probe 1 konnte in den anderen Proben menschliche Zellkern-DNA nachgewiesen werden, wobei die Proben allesamt einen sehr geringen Gehalt an menschlicher Zellkern-DNA aufwiesen; z.T. mit Unterschieden um einen Faktor 10 (s. Tab. 5.4).

Es wurden die sechs Proben mit dem höchsten DNA-Gehalt ausgewählt (Proben 2, 4 bis 8) und die Extrakte von jeweils zwei Proben vereinigt (02 LMD + 04 LMD; Sanfilippo 1a + Sanfilippo 4a; Sanfilippo 2a + Sanfilippo 3a). Für diese drei vereinigten Extrakte und für die Extrakte der zwei zufällig ausgewählten Bereiche (Proben 10 und 11) wurde eine Multiplex-PCR unter Verwendung des Mentype® Nonaplex^{QS} Kits (Biotype, Dresden) mit anschließender kapillargelelektrophoretischer Analyse (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt.

Die Darstellung menschlicher DNA-Merkmale gelang für alle Proben, wobei einige DNA-Merkmale schwach ausgeprägt bzw. ausgefallen waren. Alle Proben wiesen ein Mischprofil von Spenderin und Empfänger (Sollwerte siehe Tab. 5.5) auf (exemplarisch: Abb. 5.10.). Die Allele der Spenderin waren nur schwach ausgeprägt bzw. gar nicht nachweisbar (z.B. bei D21S11), so dass davon ausgegangen werden kann, dass im ausgeschnittenen Gewebe mehr Zellmaterial vom Empfänger als von der Spenderin vorhanden war. Teilweise wurden weitere DNA-Merkmale detektiert, die weder der Spenderin noch dem Empfänger zuzuordnen waren (hier z.B. Allel 14 bei D3S1358 und Allel 20 bei ACTBP2).

Tabelle 5.5 DNA-Profile von Spenderin und Empfänger

	ACTBP2	AML	D8S1179	D21S11	D18S51	TH01	D3S1358	VWA	FGA
Spenderin	16/17	X	13/15	30/31.2	12/14	8/9	16/17	16/19	22/24
Empfänger	17/29.2	X/Y	14/15	27/31	12/18	9.3	15/16	16/18	20/24

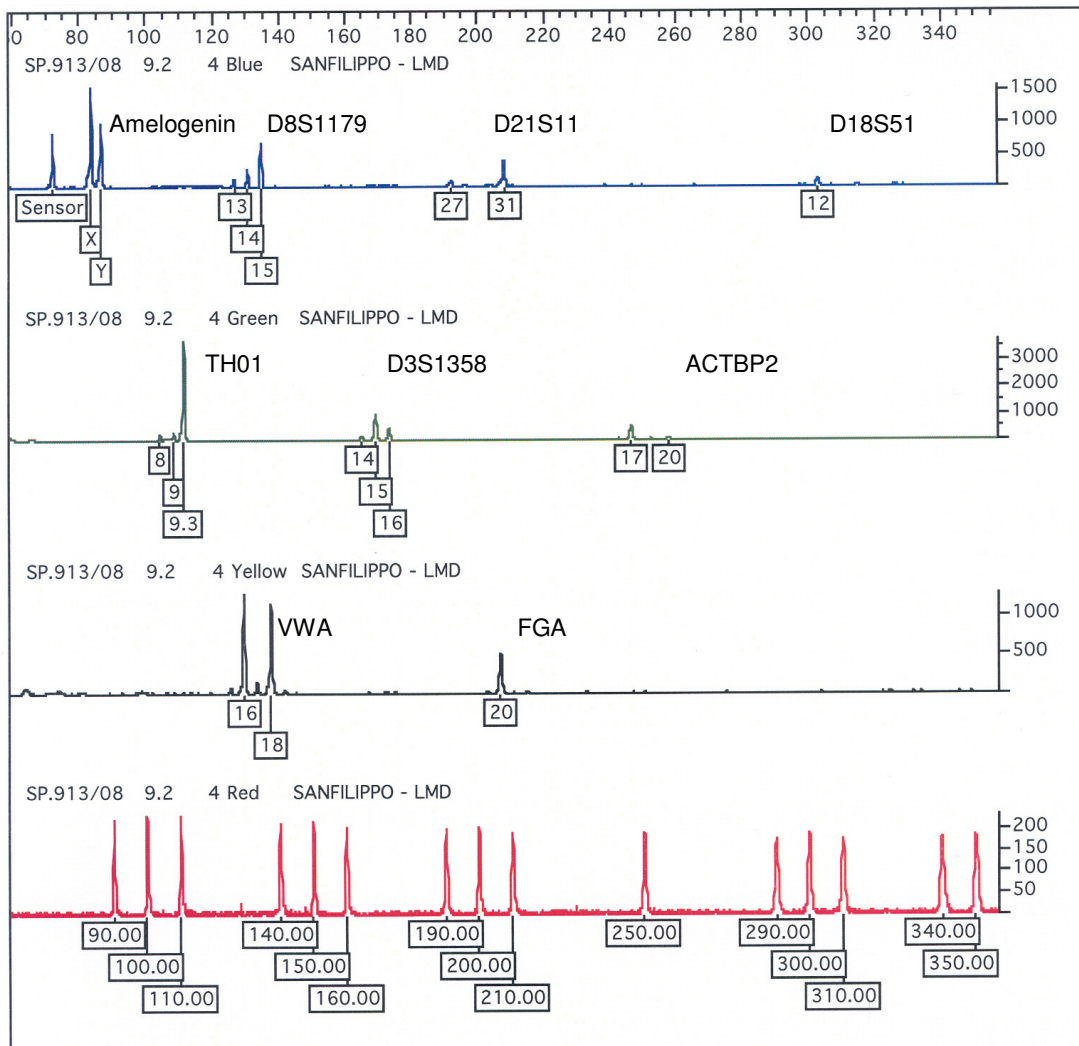


Abbildung 5.10 Exemplarisches Elektropherogramm einer LMD-Probe

Die zufällig ausgewählten und ausgeschnittenen Bereiche zeigten im Elektropherogramm ebenfalls eine Mischung. Hier gelang es allerdings ausnahmslos alle Allele der beiden Personen zu detektieren. Auch hier waren die Allele des Empfängers stärker ausgeprägt als die der Spenderin.

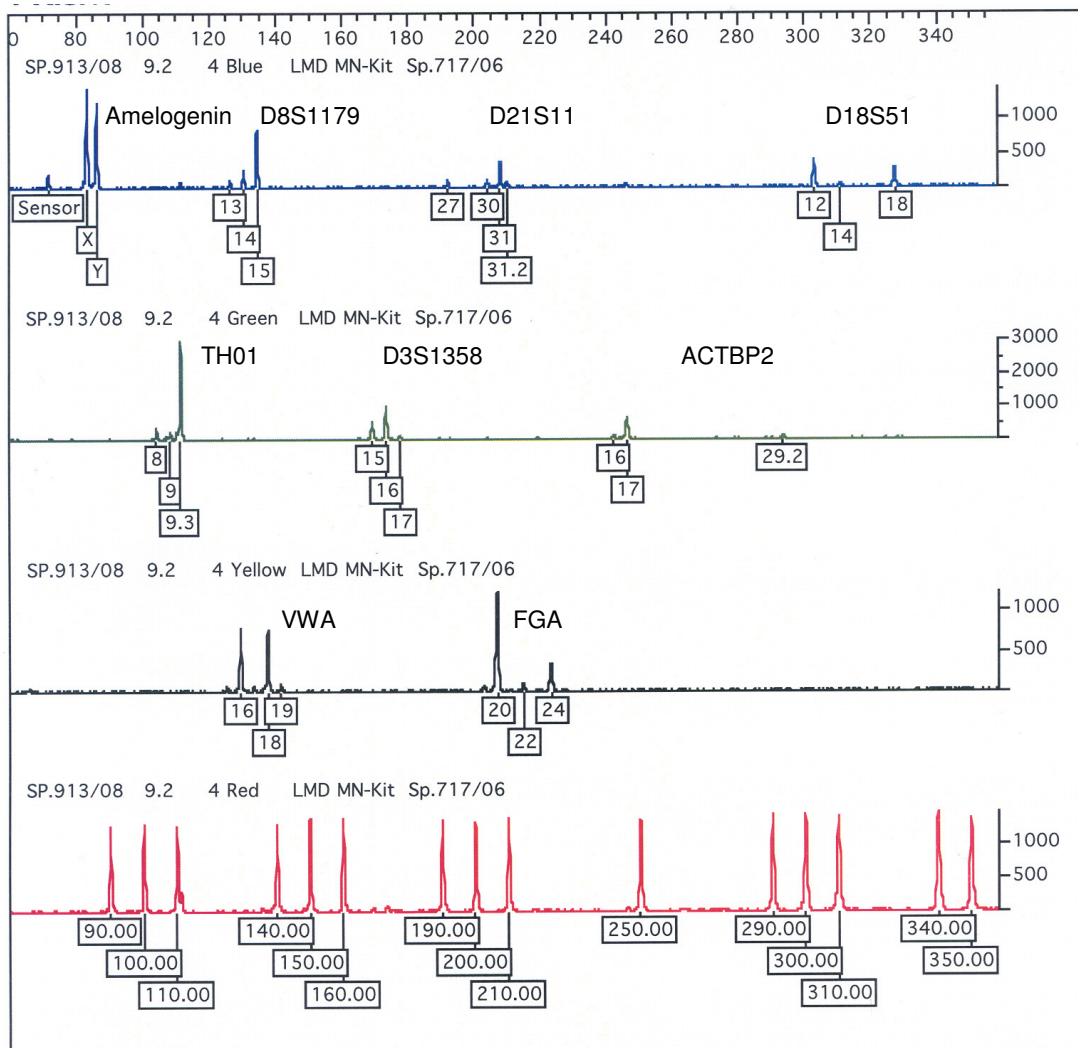


Abbildung 5.11 Elektropherogramm einer LMD-Probe mit zufällig ausgewähltem Gewebe

Die manuell präparierten Proben zeigten ebenfalls eine Mischung der DNA-Merkmale von Spenderin und Empfänger, wobei auch hier die Allele des Empfängers komplett nachgewiesen werden konnten und stärker ausgeprägt waren als die Allele der Spenderin, soweit sie detektiert wurden (s. Anhang 9.13).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich in allen untersuchten Proben Mischungen aus Spender- und Empfängermerkmalen zeigten, unabhängig von der angewandten Technik.

In fast allen Proben, die mittels LMD erhalten worden waren, konnte Zellkern-DNA nachgewiesen und amplifiziert werden. Somit wurde gezeigt, dass die LMD als Methode geeignet ist, um ausreichend Zellmaterial für DNA-Analysen zu gewinnen.

Obwohl bei der LMD ausschließlich tumoröses Gewebe ausgewählt und gezielt ausgeschnitten wurde, fanden sich in allen Proben Mischspuren von Spenderin und Empfänger.

Es war zwar erkennbar, dass der Anteil an vorliegender DNA vom Empfänger deutlich höher gewesen sein muss als der der Spenderin, dieses Verhältnis war aber auch in den herkömmlich präparierten und in den zufällig ausgeschnittenen Gewebereichen des Tumors erkennbar.

Somit wurde gezeigt, dass die LMD-Technik in diesem Fall keinen Vorteil gegenüber der manuellen Präparation bzw. einer zufälligen Auswahl des untersuchten Gewebereiches hat. Das erwünschte Ergebnis – ein reines DNA-Profil der Tumorzellen von Spenderin oder Empfänger, um den Ursprung des Tumors eindeutig feststellen zu können – konnte nicht erzielt werden.

6 Diskussion

6.1 Mutationen in der Abstammungsbegutachtung

6.1.1 Mutationscharakterisierung mithilfe flankierender Marker

Die im hiesigen Institut im Rahmen der Abstammungsbegutachtung beobachteten Mutationen werden derzeit über die Allelkonstellation anhand des kleinstschrittigen denkbaren Ereignisses innerhalb der Familie (Brinkmann et al. 1998) bzw. über die Sequenzierung der involvierten Proben – soweit möglich – charakterisiert.

Da anhand dieser Methoden nicht immer eindeutige Aussagen in Bezug auf die Parameter Ursprung, Auswirkung, Grad und Mechanismus der Mutationen möglich sind, wurde als Technik zur Mutationscharakterisierung die Verwendung flankierender STR-Marker etabliert, die – über die gekoppelte Vererbung – die Erstellung familien-spezifischer Haplotypen erlaubt und somit eine Charakterisierung der Mutation ermöglicht.

Von Klitschar et al. (2004) wurde prinzipiell anhand weniger Mutationsfälle (n=4) in den STR-Systemen D8S1179, D18S51, D21S11 und ACTBP2 gezeigt, dass diese Methodik erfolgreich für Mutationseinordnungen durchgeführt werden kann. Für ACTBP2 verwendeten Klitschar und Mitarbeiter insgesamt acht flankierende Marker, von denen fünf ebenfalls auch hier genutzt wurden (D6S272, D6S460, D6S1609, D6S462 und D6S300). Die Anwendbarkeit auf eine größere Stichprobenzahl und auf weitere STR-Systeme wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Es wurden insgesamt 103 Mutationsereignisse in den vier STR-Systemen D3S1358, FGA, ACTBP2 bzw. VWA untersucht. Zur Sicherstellung der gekoppelten Vererbung wurden flankierende Marker gewählt, die eine genetische Distanz von wenigen Centimorgan aufwiesen. Auf Grundlage dieser Vorgabe wurden 27 STR-Systeme als flankierende Marker ausgewählt, von denen 16 eine Dinukleotid-, zwei eine Trinukleotid- und neun eine Tetranukleotidwiederholungseinheit aufwiesen. Während die Auswertung der STR-Systeme mit Tri- und Tetranukleotidwiederholungseinheiten problemlos verlief, zeigten die STR-Systeme mit Dinukleotidwiederholungseinheiten

teilweise hohe *Stutterpeaks*, die die Interpretation der Ergebnisse erschwerten; die verwendeten 24 flankierenden Marker waren eindeutig auswertbar. Es konnten drei flankierende STR-Systeme mit einer Dinukleotidwiederholungseinheit (D4S3049, D12S99, D12S1625), die zunächst ausgewählt worden waren, nicht zur Erstellung der Haplotypen verwendet werden. Diese sind nicht aufgeführt.

Bei der Etablierung dieser Methode sollte somit darauf geachtet werden, möglichst flankierende STR-Systeme mit einer Tetranukleotidwiederholungseinheit auszuwählen.

Mittels der Haplotypen-Analyse können *a priori* nur Mutationen in Mehr-Kind-Familien geklärt werden. Grund dafür ist, dass zur Ermittlung der „wahren“ elterlichen Haplotypen und somit die Zuordnung des mutierten Allels zu einem dieser Haplotypen nur möglich ist, wenn mehrere kindliche Haplotypen vorliegen. In Ein-Kind-Familien lässt die Haplotypen-Analyse also *a priori* keine Einordnung zu. Weiterhin können ungünstige Allelkonstellationen innerhalb von Mehr-Kind-Familien dazu führen, dass auch die Haplotypen-Analyse keine Aussage erlaubt.

Von den 103 untersuchten Mutationen traten 63 in Mehr-Kind-Familien auf, die übrigen 40 Ein-Kind-Familien wurden untersucht, um möglichst viele Informationen über die forensisch nicht etablierten flankierenden STR-Marker zu erhalten.

Es gelang mithilfe der flankierenden Marker 55 der 63 Mutationen (etwa 87%) aus Mehr-Kind-Familien über die Haplotypen-Analyse eindeutig zu klassifizieren.

Im Vergleich dazu gelang es mittels Sequenzierung – und somit über möglicherweise vorliegende Sequenzvarianten – sechs Mutationen der Mehr-Kind-Familien (etwa 10%) und insgesamt acht der 103 untersuchten Mutationen eindeutig zu klären. Die Sequenzierungsergebnisse der übrigen Fälle lieferten keinen Hinweis, dass die in vielen Fällen angenommene Mutationseinordnung, die über das kleinstschrittigste Ereignis erfolgte, nicht korrekt sein könnte.

Es gab fünf Fälle, in denen sowohl die Haplotypen-Analyse, als auch die Sequenzierung eine Mutationscharakterisierung erlaubte. Die Ergebnisse hinsichtlich der Mutation stimmten allesamt überein.

Die Ergebnisse der Mutationscharakterisierung unter Annahme des kleinstschrittigen denkbaren Ereignisses standen sämtlich mit den Ergebnissen aus der Haplotypen-Analyse und den Sequenzierungen im Einklang, was die Zuverlässigkeit der Haplotypen-Analyse zusätzlich stützt.

Die Haplotypen-Analyse über flankierende Marker kann somit als hilfreiches Werkzeug zur Mutationseinordnung in Abstammungsfällen betrachtet werden, das relativ leicht und kostengünstig durchgeführt werden kann – auch zusätzlich zu den routinemäßig durchgeführten Sequenzierungen.

Der Ursprung der Mutation lag in 49 der 63 Mehr-Kind-Fälle beim Vater, nur in fünf Fällen wurde ein maternaler Ursprung bewiesen (Verhältnis ~ 10:1).

Diese Beobachtungen stehen im Einklang damit, dass männliche Individuen höhere Mutationsraten der Mikrosatelliten-DNA im Vergleich zu weiblichen zeigen, wobei eine fast 10-fach höhere paternale Mutationsrate bislang noch nicht beschrieben wurde (Nachman & Crowell 2000: 4:1; Sajantila et al. 1999: 100% paternal; Brinkmann et al. 1998: 5:1 bis 6:1; Weber & Wong 1993: 3,75:1). Dies ist möglicherweise damit zu begründen, dass in den angeführten Publikationen ein deutlich kleinerer Umfang an Mutationen (max. n=23) untersucht wurde.

Ein großer Teil der Mutationen tritt bei der Entstehung der Samenzellen auf (Venter et al. 2001). Da ein „typisches“ Spermium etwa 16-mal häufiger als eine Eizelle repliziert wird (Brinkmann et al. 1998), erklärt sich so die deutlich höhere paternale Mutationsrate.

Hinsichtlich ihrer Auswirkung lagen 23 Gewinn- und 31 Verlustmutationen vor. Dieses ungefähre Verhältnis von 1:1 steht im Einklang mit der Vorstellung vom *Slippage*-Mutationsmodell, das keine Präferenz hinsichtlich der Auswirkung der Mutation zeigt (Xu et al. 2000).

Die Tatsache, dass es sich bei den 87 der 103 untersuchten Mutationen, die eine Mutationseinordnung erlauben, um 1-Schritt-Mutationen handelt, bestätigt das *Slippage*-Modell sowie publizierte Angaben (Di Rienzo et al. 1994; Brinkmann et al. 1998; Kayser et al. 2000; Xu et al. 2000).

Nur in einem der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Fälle (E405/2002) war eine seltene 2-Schritt-Mutation das kleinstmögliche Mutationsereignis. Auch wenn diese Mutation keinem der Elternteile mittels Haplotypen-Analyse zugeordnet werden konnte, konnten die elterlichen Haplotypen ermittelt und so dargestellt werden, dass es sich um eine 2-Schritt-Mutation handeln muss.

Es wurde gezeigt, dass 2-Schritt-Mutationen deutlich seltener auftreten als bislang angenommen, nämlich mit einer Häufigkeit von etwa 1% (im Gegensatz zu 5% (Brinkmann et al. 1998) bzw. 30% (Sajantila et al. 1999)). Theoretisch wäre in mehreren der untersuchten Mutationsfälle auch eine Mehr-Schritt-Mutation denkbar gewesen; dies konnte aber in keinem Fall bestätigt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass >2-Schritt-Mutationen extrem selten sind.

Es gab keine Hinweise, die auf *unequal crossing over* (UEC) als Mutationsmechanismus hindeuten. Dies bestätigt die bereits von Klitschkar et al. (2004) beschriebenen Beobachtungen. Die Verwendung von flankierenden Markern hätte unterschiedliche parentale Haplotypen stromauf- und stromabwärts des STR-Systems geliefert und somit dieses Mutationsmodell bestätigt. Dennoch muss eine Mutation, die durch UEC verursacht wurde, nicht zwangsläufig durch die Methode der flankierenden Marker detektiert werden. Es sind z.B. elterliche Allelkombinationen der flankierenden Marker denkbar (z.B. homozygote Befunde), die das Erkennen von UEC erschweren könnten.

In den untersuchten Fällen gab es keine mutierte Probe, bei der ein Crossing-Over zwischen dem mutierten STR-System und einem der beiden angrenzenden flankierenden Systeme beobachtet wurde. Dies wäre als Hinweis auf UEC als Mutationsmechanismus zu werten gewesen.

In einigen Familien wurden in kindlichen Proben Haplotypkombinationen detektiert, die sich nicht mit exakt vier elterlichen Haplotypen erklären ließen. Dies konnte in allen Fällen als Hinweis auf stattgefundene Rekombination eingeordnet werden. In den Fällen, in denen dies auftrat, konnten die „wahren“ elterlichen Haplotypen über die Geschwisterkinder bestimmt werden bzw. – falls die parentalen Haplotypen nicht eindeutig bestimmt werden konnten – wurde dadurch keine Mutationscharakterisierung verhindert. Die Rekombinationen wurden häufig zwischen den

STR-Systemen D6S272 bzw. D6S257 und D6S460 für die Mutationen im STR-System ACTBP2 beobachtet. Dies kann begründet werden durch den großen Abstand (etwa 15 bis 20 cM) zwischen den STR-Systemen D6S272 bzw. D6S257 und ACTBP2.

Die Haplotypen konnten in nahezu allen Fällen stabil bestimmt werden, so dass die angenommene maximale genetische Distanz von ± 8 cM eine gekoppelte Vererbung i.d.R. sicherstellt. Somit sollte bei der Etablierung dieser Methode für andere STR-Systeme darauf geachtet werden, einen Abstand von nicht mehr als 10 cM zwischen den flankierenden Markern und dem mutierten STR-System einzuhalten, um eine gekoppelte Vererbung erwarten zu können.

Tabelle 6.1 zeigt eine Gesamtübersicht der 103 Mutationen. Sie kombiniert die Ergebnisse der Haplotypen-Analyse, der Sequenzierungen und der Annahme, dass das kleinstschrittige das tatsächlich stattgefundenere Mutationsereignis ist (systembezogene Tabellen s. Anhang 9.7 und Anhang 9.10).

Tabelle 6.1 Charakterisierung der untersuchten Mutationen

Ursprung	paternal	77
	maternal	8
	ungeklärt	17
Auswirkung	Gewinn	47
	Verlust	51
	ungeklärt	4
Grad	1-Schritt-Mutation	100
	2-Schritt-Mutation	1
	3-bp-Mutation	1
	ungeklärt	-
Mechanismus	SSM	101
	ungeklärt	1
Ausschluss*		1
Total		103

* Fall E158/2000

In dieser Gesamttabelle spiegeln sich die für die erfolgreich mittels Haplotypen-Analyse untersuchten Mehr-Kind-Familien erhaltenen Ergebnisse wider:

- Verhältnis paternal – maternal 10:1
- Verhältnis Gewinn – Verlust 1:1
- ~99% Ein-Schritt-Mutationen
- *Replication slippage* als Hauptmutationsmechanismus

Die Betrachtung der einzelnen Parameter (Ursprung, Auswirkung, Grad und Mechanismus) zeigt, dass >80% der mutierten Allele hinsichtlich ihres Ursprungs eingeordnet werden konnten; hinsichtlich der anderen Parameter konnten deutlich mehr Mutationen eingeordnet werden.

Die Tatsache, dass 100 der 103 Mutationen Ein-Schritt-Mutationen sind, führt zu der Annahme, dass der Mutationsgrad das wesentliche Kriterium zur Charakterisierung von Mutationen darstellt.

In einem Fall mit einer isolierten Ausschlusskonstellation im STR-System ACTBP2 (E158/2000) wurde der bereits vermutete Ausschluss über die flankierenden Marker bestätigt. In einer weiteren Familie (E049/1998) wurde die Probe eines Kindes untersucht, das über die bereits erfolgten Untersuchungen ausgeschlossen worden war. Auch dieser Ausschluss bestätigte sich über die Haplotypen-Analyse.

Somit wurde gezeigt, dass auch die Untersuchung mehrerer STRs, die auf einem Chromosom lokalisiert sind, einen Hinweis auf eine möglicherweise vorliegende Ausschlusskonstellation erlaubt. Aufgrund bekannter genetischer Phänomene, wie z.B. der uniparentalen Disomie, wird in den Richtlinien zur Abstammungsbegutachtung die Untersuchung von 12 Loci, die auf mindestens zehn verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind, gefordert.

In dem zuerst genannten Ausschlussfall wurden 33 STR-Systeme untersucht und nur zwei (ACTBP2 und ApoA1) wiesen eine Inkompatibilität zwischen dem Kind und dem Putativvater auf, die allerdings nur durch komplexe Mutationsvorgänge hätten erklärt werden können. Die beiden Systeme sind zudem auf unterschiedlichen Chromosomen (6 und 11) lokalisiert, so dass ein genetisches Phänomen, wie beispielsweise die o.g. uniparentale Disomie, ausgeschlossen werden kann.

Dass es sich in diesem Fall um einen Defizienzfall ohne die Probe der Mutter handelte, erschwerte die Bewertung der erhaltenen Befunde. Die flankierenden Marker verstärkten die Annahme eines Ausschlusses, da das Kind kaum Allele aufwies, die bei dem Putativvater vorlagen. Somit wurde gefolgert, dass es sich um eine Ausschlusskonstellation handeln muss.

Innerhalb der Mehr-Kind-Familien wurden fünf weitere Defizienzfälle untersucht, die alle problemlos mithilfe der flankierenden Marker geklärt werden konnten.

In einem weiteren mittels flankierender Marker untersuchten Fall wurde erstmalig eine „ungerade“ Mutation entdeckt. Eine nicht-ganzzahlige Mutation innerhalb der Wiederholungseinheit von STR-Systemen wurde bislang nicht beschrieben. Nach der Sequenzierung zeigte sich, dass ein Adenin-Triplett innerhalb der Wiederholungseinheiten mit einem AAAG-Motiv deletiert wurde. Bislang gibt es kein Mutationsmodell, das diese ungewöhnliche Mutation erklären würde. Nach Ball et al. (2005) ist bekannt, dass Mikrodeletionen und -insertionen (≤ 20 bp) vorkommen, deren Genese allerdings nicht immer bekannt ist.

Die Zielsetzung dieser Arbeit, Mutationen in den Systemen D3S1358, FGA, ACTBP2 und VWA mithilfe flankierender Marker eindeutig kategorisieren zu können, konnte erfüllt werden.

Für die praktische Anwendung ist die selbst entwickelte Multiplex-PCR mit den Primern aller flankierenden Marker des STR-Systems ACTBP2 ein deutlicher Vorteil.

Zudem bietet es sich an, für andere routinemäßig untersuchte STR-Systeme, in denen *de novo* Mutationen auftreten, ebenfalls mithilfe flankierender Marker Haplotypen zu erstellen und die Mutationen zu analysieren.

Die Übertragung der Haplotypen-Analyse auf Einzelzellen bzw. Einzelchromosomen wird im Folgenden diskutiert.

6.1.2 Anwendung der flankierenden Marker auf Einzelzellen bzw. Einzelchromosomen

In den untersuchten Fällen ließen sich nicht alle beobachteten Neumutationen unter Einsatz der flankierenden Marker klären. Ebenso erlaubt diese Methode bei Ein-Kind-Familien über familien-spezifische Haplotypen wegen der fehlenden Geschwisterkinder keine Aussage. Eine Alternative besteht darin, sie direkt aus einzelnen Chromosomen abzuleiten.

In haploiden Zellen liegt jeweils nur eine Kopie der Chromosomen vor. Praktisch ließen sich solche Untersuchungen also nur für Spermien durchführen; bei weiblichen Personen (sowohl Mutter, als auch bei weiblichen Nachkommen) wäre die Gewinnung haploider Zellen (Eizellen) sehr schwierig.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob es möglich ist, einzelne Chromosomen direkt mittels Lasermikrodissektion zu isolieren und anschließend mit einer selbst entwickelten Multiplex-PCR zu untersuchen.

Diese Multiplex-PCR, die sowohl die ausgewählten flankierenden STR-Systeme, als auch das forensisch etablierte STR-System, das die Mutation aufweist, enthält, musste zudem entwickelt werden. Dies wurde für das STR-System ACTBP2, das auf dem Chromosom 6 lokalisiert ist, exemplarisch durchgeführt. Die einzeln isolierten 6er-Chromosomen sollten als Template für die Multiplex-PCR dienen.

Somit würde man aus isolierten 6er-Chromosomen mittels Multiplex-PCR direkt die individuellen Haplotypen der Eltern und des Kindes gewinnen und könnte die Mutation zweifelsfrei einem elterlichen Haplotypen zuordnen.

Das Einzelchromosom sollte mithilfe der Lasermikrodissektion aus Metaphasen-Präparaten ausgeschnitten werden. Da die speziell für das verwendete Gerät (Cell-Cut Plus Mikrodissektion, Olympus, Hamburg) entwickelten Objektträger eine Folie aufweisen, auf die in diesem Fall die Zellsuspension aufgetropft wurde, mussten die Auftropfbedingungen, die u.a. die Spreitung der Chromosomen bestimmen, an diese veränderten Voraussetzungen angepasst werden. Dies gelang durch die zeitliche

Begrenzung nur eingeschränkt, da das Lasermikrodissektionsgerät im Rahmen einer Leihstellung nur wenige Wochen im hiesigen Institut zur Verfügung stand.

Bei Chromosomenpräparaten, deren Auftropfbedingungen (Luftfeuchtigkeit, Auftropfwinkel) nicht optimiert sind, ist die Spreitung der Chromosomen nicht perfekt. Die Identifizierung der richtigen Chromosomen ist erschwert, auch wenn eine GTG-Färbung dies erleichtern sollte. Die Sensitivität dieser Färbung hängt von der Qualität der Präparate ab, d.h. auch bei Chromosomenpräparaten, die nicht hinreichend getrocknet sind, kann es zur Darstellung unscharfer Banden kommen, die eine eindeutige Identifizierung der Chromosomen im Zweifelsfall nicht mehr zulassen.

Mit der maximal möglichen Vergrößerung des Mikroskops am Lasermikrodissektionsgerät ließ sich zudem die GTG-Bänderung kaum erkennen und folglich beispielsweise das 6er-Chromosom nicht identifizieren.

Die Isolierung einzelner Chromosomen, die in humangenetischen Laboratorien etabliert ist, musste im hiesigen Institut unter ungünstigen Bedingungen erst erarbeitet werden. Die beiden zentralen Punkte – Auftropfbedingungen, die die Spreitung der Chromosomen bestimmen, und Vergrößerung des Mikroskops – ließen sich nicht soweit optimieren, dass eine Identifizierung eines ganz bestimmten Chromosoms (hier: 6) möglich wurde. Es gelang jedoch einzelne Chromosomen mittels Laser-mikrodissektion auszuschneiden.

Da Metaphasen-Präparate in der forensischen Molekulargenetik nicht eingesetzt werden und die o.g. Arbeiten in Kooperation mit dem Institut für Humangenetik der Ruhr-Universität Bochum erfolgten, kann empfohlen werden, dass die Identifizierung der entsprechenden Chromosomen intensiv unter der Anleitung eines Cytogenetikers geübt bzw. direkt von einem Cytogenetiker durchgeführt werden sollte.

Eine Alternative dazu stellen FISH-gefärbte Metaphasen-Präparate dar, die hier nicht verwendet wurden, da nicht bekannt ist, welchen Einfluss die Färbung möglicherweise auf nachfolgende Analyseschritte (z.B. PCR) hätte. Allerdings wäre der deutliche Vorteil dieser Methode, dass man auch bei nicht optimalen Spreitungs- und Vergrößerungsbedingungen die entsprechend gefärbten Chromosomen erkennen und ausschneiden könnte.

Da ein Großteil der genannten Methoden im hiesigen Institut nicht etabliert ist und somit auch die apparativen Ausstattungen nicht gegeben sind, sollte die Auswahl und Isolierung der gewünschten Chromosomen für diese Anwendung daher eher als Dienstleistung beispielsweise in humangenetischen Instituten durchgeführt werden.

Die Entwicklung und Etablierung der Multiplex-PCR konnte erfolgreich für fünf flankierende STR-Systeme von ACTBP2 durchgeführt werden. Das weiterhin noch – in den Monoplex-PCR-Ansätzen – untersuchte STR-System D6S257 konnte nicht in die Multiplex-PCR integriert werden, da beide Primer mit nahezu allen anderen verwendeten Primern interagieren und Primer-Dimere bilden, so dass die gewünschten PCR-Produkte nicht amplifiziert bzw. nur in sehr geringer Menge vorliegen würden.

Die Verwendung des „Multiplex PCR Kit“ (Qiagen, Hilden), das speziell für selbst entwickelte Multiplex-PCRs empfohlen wird, lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Das selbst entwickelte Multiplex-PCR-Protokoll (s. Tab. 3.11 und 3.13) hingegen lieferte für alle Systeme reproduzierbare und korrekte Befunde, so dass hier die besseren Amplifizierungsbedingungen für die flankierenden STR-Systeme vorlagen.

Die Amplifizierungen der einzelnen flankierenden STR-Systeme konnten allesamt erfolgreich mit denselben Reagenzien-Konzentrationen durchgeführt werden, so dass diese auf die Multiplex-PCR übertragen werden konnten. Die optimalen Konzentrationen der Primerpaare (s. Tab. 3.10) wurden empirisch ermittelt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bedingungen für eigen entwickelte Multiplex-PCRs aus zuvor erfolgreich durchgeführten Monoplex-PCRs z.T. übertragen werden können. Nichtsdestotrotz erfordert die Etablierung einer Multiplex-PCR mit mehreren autosomalen STR-Systemen eine intensive Optimierung verschiedener Bedingungen.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Sensitivität dieser Multiplex-PCR mit einer unteren Nachweis-Grenze von ≤ 600 pg im Bereich der kommerziell erhältlichen Multiplex-Kits (Mentype[®] Nonaplex^{QS} Kit (Biotype, Dresden) bzw. AmpFISTR[®] Profiler[®] PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt)) liegt.

Da dies bei nur einem vorliegenden Chromosom nicht ausreichen würde, muss die Sensitivität der Multiplex-PCR noch erhöht werden, z.B. über Modifizierung der Amplifizierungsbedingungen und der eingesetzten Konzentrationen der verwendeten

Reagenzien. Eine Erhöhung der Anzahl der PCR-Zyklen oder auch Aufreinigungen im prä- bzw. post-PCR-Bereich sind ebenfalls möglich.

Die Sensitivität einer PCR kann prinzipiell so hoch sein, dass ein einzelnes Chromosom ausreicht, um erfolgreich STR-Systeme zu amplifizieren – dies wurde zunächst anhand einer X-chromosomalen PCR, die mit männlichen Einzelzellen durchgeführt wurde, gezeigt. Für 50% der untersuchten Zellen konnten hier Ergebnisse dargestellt werden.

Um zu zeigen, dass die Sensitivität einer Multiplex-PCR entsprechend hoch sein kann, wurde ebenfalls an den männlichen Einzelzellen eine kommerziell erhältliche Y-chromosomale Multiplex-PCR, die 16 Y-chromosomale STR-Systeme enthält, durchgeführt. Hier gelang die Darstellung der kompletten Y-STR-Systeme bei einer von 12 Einzelzellen. Die untere Nachweisgrenze des Y-Multiplex-Kits (AmpFISTR® Yfiler® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt)) wird vom Hersteller mit ≤ 100 pg angegeben und steht somit im Einklang mit den Ergebnissen.

Die Diskrepanz zwischen den Resultaten der X-Monoplex- (50% erfolgreich) und der Y-Multiplex-PCR (8,3% erfolgreich) kann dadurch erklärt werden, dass Monoplex-PCRs generell sensitiver sind als Multiplex-PCRs (Brinkmann 2004).

Dieses Ergebnis zeigt auch, dass die PCRs solch kleiner Mengen stochastischen Schwankungen unterliegen.

Da in Reihe A der Multititerplatte – im Vergleich zu Reihe B – nahezu alle Y-STR-Befunde negativ waren, lässt dies auch die Vermutung zu, dass in den Randbereichen einer Multititerplatte das Temperaturprofil im Thermocycler nicht optimal verläuft.

Die Anwendung einer Duplex-PCR auf Einzelzellen bzw. Spermien wurde bereits 1988 von Li et al. gezeigt. Sie konnten 61% für beide untersuchten Loci typisieren. Holtkemper et al. (2001) amplifizierten zwei Bereiche des Y-Chromosoms an einzelnen Spermien mit einer Erfolgsquote von $>50\%$. Blake et al. (1999) erreichten bei einer Multiplex-PCR für zwei Exons und zwei STRs für 46% der untersuchten Zellen ein komplettes Profil. Findlay et al. (1997) zeigten, dass die Durchführung einer Multi-

plex-PCR mit sechs STR-Systemen einzelnen Mundschleimhautzellen, die sie durch Mikromanipulation erhalten hatten, prinzipiell möglich ist. Sie erhielten für 50% der untersuchten Einzelzellen ein komplettes DNA-Profil. Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, eine Multiplex-PCR mit sechs STR-Systemen soweit zu optimieren, dass eine Zelle ausreicht, um komplette Ergebnisse zu erhalten. Kloosterman und Kersbergen (2003) hingegen erhielten bei Einsatz einer kommerziell erhältlichen Multiplex-PCR mit zehn STR-Systemen (AmpFISTR® SGM Plus®, Applied Biosystems, Darmstadt) bei Einzelzellen kein komplettes DNA-Profil.

Die Erfolgsquote, die bei vier der genannten Arbeitsgruppen jeweils bei ungefähr 50% liegt, und auch die negativen Ergebnisse von Kloosterman und Kersbergen (2003) machen deutlich, dass die Anwendung einer Multiplex-PCR auf Einzelzellebene eine große Herausforderung darstellt.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Isolierung einzelner Chromosomen – unter bestimmten Bedingungen – möglich ist. Die Sensitivität der selbst entwickelten Multiplex-PCR muss noch erhöht werden, um die erfolgreiche Amplifizierung dieser Einzelchromosomen zu gewährleisten. Es wurde gezeigt, dass ein einzelnes Chromosom prinzipiell ausreicht, um positive Befunde mittels Multiplex-PCR zu erhalten.

6.1.3 Primerbindungsstellenmutation im STR-System FGA

Das Auftreten stummer Allele durch Punktmutationen im primerbindenden Bereich ist bekannt (Heinrich et al. 2004; Dauber et al. 2006; Ricci et al. 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fälle untersucht, in denen zum einen eine Mutter-Kind- und zum anderen eine Vater-Kind-Paarung dieselbe Punktmutation aufwies, die durch Verwendung alternativer Primer und anschließender Sequenzierung identifiziert wurde.

Somit konnten die Fälle, die zunächst eine Ausschlusskonstellation zeigten, aufgeklärt werden. Weiterhin kann das gemeinsame Vorliegen derselben Punktmutation – im Gegensatz zum vermuteten Ausschluss – als zusätzlicher Hinweis für eine Verwandtschaft gewertet werden (Ricci et al. 2007).

Das Vorliegen einer möglichen Punktmutation wurde an weiteren 101 Proben, die einen homozygoten Befund im STR-System FGA aufweisen, mit dem neu-synthetisierten Primerpaar untersucht. Es wurden keine weiteren „falsch homozygoten“ Proben gefunden. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die identifizierte Punktmutation in den beiden o.g. Fällen eine seltene T→G-Transversion mit einer ungefähren Häufigkeit von 0,02% darstellt (2 Mutationen in 10.400 meiotischen Transfers) und es sich somit nicht um eine polymorphe Basenposition handelt (Häufigkeit $\leq 1\%$). Die Häufigkeitsangabe von 0,02% für das Auftreten stummer Allele im STR-System FGA steht im Einklang mit in der Fachliteratur angegebenen Werten (Ricci et al. 2007: 0,03%). Daher besteht keine Notwendigkeit, die bisher verwendeten Primersequenzen in den kommerziell erhältlichen und für die Abstammungsbegutachtung verwendeten Multiplex-Kits zu ändern.

Die Fälle verdeutlichen allerdings, dass homozygote Befunde in der Abstammungsbegutachtung einer besonderen Aufmerksamkeit bedürfen und – sofern sie zu Ausschlusskonstellationen wie in den untersuchten Fällen mit nur einem isolierten Ausschluss – der Überprüfung unter Verwendung alternativer Primerpaare bedürfen.

Eine weitere Möglichkeit, einer vermuteten Punktmutation nachzugehen, ist eine Veränderung der Annealing-Temperatur. Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduzierung der Annealing-Temperatur von 59°C auf 55°C bei Verwendung des in der Abstammungsbegutachtung eingesetzten AmpFISTR® Profiler® PCR Amplification Kits (Applied Biosystems, Darmstadt), das dieselben Primersequenzen enthält wie das ebenfalls verwendete AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt), in den Fällen mit entgegengesetzter Homozygotie zu den tatsächlich vorliegenden heterozygoten Befunden führten.

Die erniedrigte Annealing-Temperatur ermöglicht also – trotz Basenaustauschs – das Anlagern des Vorwärtsprimers und somit die Amplifizierung des Allels. Bei niedrigerer Annealing-Temperatur entstehen aber auch unspezifische PCR-Produkte, da die Primer sich auch an nicht perfekt passende Sequenzen anlagern. Somit führte die deutlich erniedrigte Annealing-Temperatur von 50°C zu unspezifischen Nebenprodukten, die zu einem erheblichen Qualitätsverlust der kapillargelelektrophoretischen Analyse führen.

Es kann empfohlen werden, die Amplifizierungen bei Verwendung der beiden o.g. Kits bei Verdacht auf das Vorliegen eines stummen Allels mit einer modifizierten Annealing-Temperatur von 55°C durchzuführen, da dies sowohl zu heterozygoten Befunden – bei Vorliegen eines Basenaustauschs – führt, als auch die gesamte Qualität der Befunde nicht beeinflusst.

Diese Modifizierung erfordert zudem keinen zusätzlichen materiellen oder zeitlichen Aufwand, so dass sie problemlos in den Laborablauf integriert werden kann.

Im Rahmen der Abstammungsbegutachtung werden *de novo*-Mutationen beobachtet. In dieser Arbeit wurden die verschiedenen Aspekte der Mutationscharakterisierung beleuchtet und Methoden aufgezeigt, mit denen eine Eingruppierung und damit eine Identifizierung der Mutationen erfolgen kann.

Die mittels Haplotypen-Analyse erhaltenen Ergebnisse hinsichtlich der Mutationscharakterisierung und in Bezug auf die verschiedenen Parameter liefern – ebenso wie die Identifizierung der Punktmutationen – wichtige Befunde für die rechtsmedizinische Praxis bei der Abstammungsbegutachtung. Die Kenntnis über Mutationsmechanismen und -raten *in vivo* sind im Hinblick auf populationsgenetische Fragen essenziell, z.B. wird die Mutationsrate zur Kalibrierung der molekularen Uhr verwendet. Zudem können Ergebnisse über Mutationsprozesse in Mikrosatelliten-Loci einen wichtigen Anteil an der Darstellung populationsdemographischer und -geschichtlicher Informationen haben.

6.2 Spurenkundliche Fragestellungen

6.2.1 Optimierung von Abrieben

Die Sicherung von DNA-Spuren durch Abriebe erfolgt in der Praxis mit destilliertem Wasser und Wattestiel tupfern mit Baumwollkopf.

Eine systematische Studie, bei der andere Befeuchtungsmittel im Vergleich zu destilliertem Wasser und andere Tupfer im Vergleich zu Baumwolltupfern getestet wurden, gibt es bislang nicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden elf alternative Befeuchtungsmittel und 15 alternative Tupferbeschichtungen vergleichend getestet.

Da es praktisch keine Möglichkeit gibt, standardisierte Hautabriebspuren anzulegen, wurde jeweils 5 µl Speichel auf definierten Kunstlederstücken appliziert.

Von den elf getesteten Befeuchtungsmitteln, die aufgrund ihrer komplementären Eigenschaften im Vergleich zu Wasser (s. Tab. 5.1) ausgesucht wurden, wurden anhand statistischer Parameter (Mittelwert, Streuung etc.) vier Befeuchtungsmittel ausgewählt, mit denen weitere Abriebe durchgeführt wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass SDS 1% als Befeuchtungsmittel unter den genannten Bedingungen signifikant mehr amplifizierbare Zellkern-DNA liefert als destilliertes Wasser. Die mit Wasser durchgeführten Abriebe zeigen keine signifikanten Unterschiede zu den übrigen drei Befeuchtungsmitteln.

Dieser Befund steht in Einklang mit der Veröffentlichung von Von Wurmb-Schwark et al. (2006), die mit detergenzhaltigem Extraktionspuffer (Invisorb Forensic Kit, Invitek, Berlin) eine höhere DNA-Ausbeute erhielten als mit destilliertem Wasser, und lässt sich mit den chemischen Eigenschaften des SDS erklären. Da SDS ein Tensid ist, können bei der Verwendung als Befeuchtungsmittel bei Abrieben möglicherweise die anhaftenden Zellen im Ganzen besser solubilisiert werden. Dies lässt sich durch die Reduzierung der Oberflächenspannung des Wasserfilms bei Abrieben erklären, wodurch mit SDS auch Bereiche zugänglich werden, die mit destilliertem Wasser verwehrt bleiben.

Da es sich bei SDS 1% um eine ungiftige und günstig zu beziehende Lösung handelt, wäre denkbar, das bisher verwendete destillierte Wasser im Rahmen der Spurensicherung zu ersetzen.

Es muss in weiteren Studien überprüft werden, ob sich die erhaltenen Befunde auf reale Spuren übertragen lassen.

Analog zu den Befeuchtungsmitteln wurden 15 Tupferbeschichtungen getestet. Auf Grundlage der bereits vorliegenden Ergebnisse mit den Befeuchtungsmitteln wurden hier direkt die Beschichtungen einmal in Kombination mit destilliertem Wasser und einmal mit SDS 1% durchgeführt.

Bislang wurde nur eine geringe Anzahl an Abrieben pro Befeuchtungsmittel-Beschichtungskombination durchgeführt, da der Material- und Zeitaufwand sehr erheblich ist.

Anhand der Ergebnisse konnte eine Einengung auf wenige Kombinationen erfolgen, mit denen weitere Abriebe durchgeführt werden müssen, um eine Gesamtanzahl zu erhalten, die eine statistische Aussage erlaubt.

Die Abriebtupfer mit Mikrofaserbeschichtung zeigten sowohl bei Verwendung mit destilliertem Wasser, als auch mit SDS sehr viel versprechende Ergebnisse, die als deutlicher Hinweis darauf gewertet werden können, dass die Mikrofaseroberfläche sehr gut geeignet ist, um Zellmaterialien bzw. DNA-Moleküle von Oberflächen abzunehmen.

Dies lässt sich durch die Zusammensetzung aus vielen feinen Fasern erklären, die nur ein Drittel des Durchmessers von Baumwollfasern betragen und somit eine größere Oberfläche als andere Beschichtungen aufweisen. Dadurch können sie mehr Material aufnehmen (s. Abb. 6.1).



Abbildung 6.1 Mikrofaserstuch (200x vergrößert)

(Quelle: http://www.teleskop-service.de/Celestronseiten/Mikroskop/Celestron_Mikroskope.htm)

Die Auswertung der Abriebanalysen – sowohl bei den getesteten Befeuchtungsmitteln, als auch bei den Beschichtungen – erfolgte über zwei Methoden: über die Quantifizierung der extrahierten Zellkern-DNA und über die normalisierten Peakhöhen nach der kapillargelelektrophoretischen Analyse. Die erfolgten statistischen Auswertungen ergaben für beide Methoden jeweils die gleichen Resultate, so dass die Ergebnisse doppelt bestätigt wurden.

Um signifikante Ergebnisse im Vergleich zur Wasser-Baumwolle-Kombination zu erhalten, müssen weitere Versuche mit den ausgewählten Kombinationen durchgeführt werden. Zur Übertragung dieser Ergebnisse auf „echte“ Spuren müsste zunächst noch an Hautabriebspuren (z.B. von Türgriffen, Telefonhörern), die nicht aus der Fallarbeit stammen, gezeigt werden, dass auch hier signifikant bessere Resultate erzielt werden.

Weiterhin kann an verschiedene Mischungen der Befeuchtungsmittel gedacht werden, die – in Kombination mit der besten Beschichtung – durch ihre chemischen Eigenschaften die Sicherung von DNA gegebenenfalls noch weiter verbessern als SDS.

Im Rahmen dieser Abriebstudie wurde des Weiteren die Wiederfindungsrate (Raymond et al. 2008) der applizierten DNA bestimmt, da bislang nicht bekannt war, in welcher Größenordnung sie liegt.

Für nahezu alle Befeuchtungsmittel lag sie etwa im Bereich von 5 bis 10%.

Es kann gesagt werden, dass die Wiederfindungsrate bei Abrieben somit – abhängig von der Oberfläche – gering ist. Dies lässt sich in diesem Fall zum einen damit erklären, dass der applizierte Speichel in das verwendete Kunstlederstück eingezogen ist und somit die aufgetragene DNA nicht mehr an der Oberfläche zugänglich ist. Dies trifft bei einem Großteil der im Rahmen von Abrieben verwendeten Objekte, wie z.B. Trinkgefäße, Fenstergriffe etc., nicht zu, da sie eine harte Oberfläche aufweisen. Zum anderen ist möglich, dass während der Extraktion und der anschließenden Aufreinigung ein Teil der DNA verloren geht.

Bei den verschiedenen Befeuchtungsmittel-Beschichtungskombinationen schwankten die Wiederfindungsraten sehr stark im Bereich von 0 bis fast 50%. Dies lässt sich dadurch erklären, dass hier für jede Kombination bislang nur fünf Abriebe durchgeführt wurden und somit vorerst keine statistische Aussage möglich ist.

Weiterhin wurde eine mögliche Abhängigkeit zwischen dem Zeitpunkt der durchgeführten Abriebe und dem Zeitpunkt der erfolgten Analysen überprüft, da in der Praxis die Sicherung der Spuren durch Polizeibeamte erfolgt und bis zur Analyse in den Laboren z.T. einige Wochen oder sogar Monate vergehen. Bislang ist nicht bekannt, ob die Lagerungszeiten einen signifikanten Einfluss auf den DNA-Gehalt haben.

Es wurden standardisierte Abriebe mit destilliertem Wasser und mit SDS-Lösung zum Zeitpunkt 0 durchgeführt, sachgemäß getrocknet und anschließend dunkel und bei RT gelagert. An vier verschiedenen Zeitpunkten (0 Tage, 6 Wochen, 3 Monate, 6 Monate) wurden die Watteteile der Abriebtupfer einer DNA-Extraktion zugeführt und der Zellkern-DNA-Gehalt quantifiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass der Zellkern-DNA-Gehalt vom Zeitpunkt 0 bis zum ersten Zeitpunkt (6 Wochen)– unabhängig von der Wahl des Befeuchtungsmittels – signifikant abnahm, was durch eine DNA-Degradierung innerhalb der ersten sechs Wochen ab dem Zeitpunkt der Spurensicherung erklärt werden kann. Ab diesem Zeitpunkt allerdings erfolgt keine weitere DNA-Degradierung im signifikant messbaren Bereich.

Daraus kann gefolgert werden, dass eine unmittelbare spurenkundliche Untersuchung von Abriebspuren zu einem deutlich höheren DNA-Gehalt und somit – in einigen Fällen – auch zu besseren Ergebnissen führen würde als dies nach längeren Lagerungszeiten von mehr als sechs Wochen der Fall ist.

6.2.2 Spezielle Anwendungen spurenkundlicher Techniken

6.2.2.1 Stechhilfe zur Blutentnahme

Eine kommerziell erhältliche Stechhilfe zur Blutentnahme bei Diabetes-Patienten wurde zur Abschätzung einer möglichen Infektionsgefahr über Blutpartikel bei Gebrauch durch mehrere Personen spurenkundlich untersucht. An exponierten Stellen des Gerätes konnten keine Blutantragungen und/oder amplifizierbares Zellmaterial nachgewiesen werden.

Um auszuschließen, dass einige Metalloberflächen den KM-Blutvortest und die nachfolgenden DNA-Analytik beeinflussen können, wurde zunächst überprüft, ob dies bei der Disk des Geräts, die eine Aluminiumseite aufweist, bzw. bei der Schutzkappe aus Kunststoff zutraf.

Die zunächst durchgeführten Blutvortests und nachfolgenden DNA-Analysen mittels PCR und Kapillargelelektrophorese lieferten für die Blutverdünnungen 1:25 und 1:250 jeweils Ergebnisse, während die 1:2500-Verdünnung negativ war. Diese Nachweisgrenze steht nahezu im Einklang mit Publikationen von (Tobe et al. 2007; Johnston et al. 2008) und Tobe et al. (2007). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der KM-Blutvortest oder die weiteren durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen negativ von der Metalloberfläche beeinflusst wurden.

Bei den durchgeführten Untersuchungen konnte – abgesehen von bewussten Blutantragungen – kein Blut- oder zellhaltiges Material nachgewiesen werden.

Die Kunststoffkappe, die bei Verwendung des Gerätes durch mehrere Personen verwendet wird, wurde mit einer Wulst innerhalb des Lochs, das sich über der

Lanzettenöffnung befindet, so konstruiert, dass keine Blutpartikel bzw. kein DNA-haltiges Zellmaterial in die Stechhilfe gelangen kann.

Weiter kann gefolgert werden, dass die Infektionsgefahr bei regelrechtem Gebrauch der Stechhilfe durch verschiedene Personen sehr gering ist – wenn auch die spurenkundlichen Untersuchungen auf humaner Zellebene keine erweiterte Aussage z.B. hinsichtlich einer Übertragung von Viren erlaubt.

6.2.2.2 Bestimmung des Ursprungs eines Leberkarzinoms nach Organtransplantation

In dem hier untersuchten Fall sollte mittels Lasermikrodissektion bestimmt werden, ob der Ursprung des Leberkarzinoms, an dem der Empfänger einer Spenderleber erkrankt und auch verstorben war, bei dem Empfänger selber oder bei der Spenderin lag. Weiterhin wurden die Ergebnisse mit manuell präparierten Bereichen des Karzinoms, deren Nachteil die nicht klare Trennung von Leber- und Karzinomgewebe ist, nach den molekulargenetischen Analysen zur Bestimmung des DNA-Profiles verglichen.

Es wurde erwartet, unter Einsatz der Lasermikrodissektion einzelne Zellen des Leberkarzinoms zu isolieren, aus denen ein reines DNA-Profil zur Festlegung des Ursprungs des Leberkarzinoms detektiert werden könnte, da dies bereits bei vergleichbaren Fragestellungen gezeigt wurde (Finkelstein et al. 2003; Flemming et al. 2003; Altamari et al. 2005). Die Lasermikrodissektion sollte es ermöglichen, nur Zellen des Leberkarzinoms auszuwählen – und somit keine gesunde Leberzellen bzw. Blutgefäße, die von der Spenderin stammen, mit zu untersuchen.

Da mittels Lasermikrodissektion nur wenige Zellen ausgeschnitten wurden, konnten in den extrahierten Proben nur geringe Mengen an humaner Zellkern-DNA nachgewiesen werden. Nach Durchführung der Multiplex-PCR und der kapillargelelektrophoretischen Analyse wurden sehr schwache DNA-Profile erhalten, die ‚*allelic*‘ bzw. ‚*system drop-out*‘ aufwiesen. Insbesondere die Allele der Spenderin waren nur schwach ausgeprägt bzw. gar nicht nachweisbar.

Die erhaltenen DNA-Teilprofile zeigten sämtlich Mischspuren mit den Allelen von Empfänger und Spenderin. Da die Allele des Empfängers allerdings in allen Proben stärker ausgeprägt waren als die der Spenderin, kann gefolgert werden, dass mehr Zellmaterial von dem Empfänger in den Proben vorlag als von der Spenderin.

Zum Teil wurden zusätzliche DNA-Merkmale nachgewiesen, die weder der Spenderin noch dem Empfänger zuzuordnen waren, z.B. Allel 14 bei D3S1358 und Allel 20 bei ACTBP2 (Abb. 5.11). Da das zur Verfügung stehende Zellmaterial nur in geringer Menge vorlag (<100 pg = ‚*low copy number*‘-Bereich) (Smith & Ballantyne 2007) und somit bekannte Phänomene wie deutlich stärker ausgeprägte *Stutterpeaks*, die über der allgemein angenommenen Grenze von 15% des Hauptpeaks liegen (Butler 2005), auftreten, kann so beispielsweise das Auftreten des Allels 14 erklärt werden. Weiterhin kann bei Proben im *low copy number*-(LCN-)Bereich auch ‚*drop-in*‘ von Allelen durch geringste Zellantragungen auftreten (Gill 2001; Smith & Ballantyne 2007). Da alle mitgeführten Negativ-Kontrollen negativ waren, kann eine Kontamination ausgeschlossen werden. Das detektierte Allel 20 bei ACTBP2 wies eine Peakhöhe von 89 rfu auf und ist als ein ‚*drop-in*‘-Allel, das im LCN-Bereich stochastisch auftritt, zu erklären.

Da die transplantierte Leber zunächst nur Zellen der Spenderin aufwies und somit auch z.B. kleinste Kapillarblutgefäße aus ihrem Zellmaterial bestehen, lässt sich erklären, dass man in allen lasermikrodissezierten Proben auch geringe Anteile von ihr findet – auch wenn bewusst nur Zellen bzw. Zellbereiche ausgeschnitten wurden, die zu den metastasierenden Bereichen gehörten.

Die Gewebeschnitte wiesen eine Dicke von 4 µm auf, so dass möglicherweise unter den ausgewählten Zellbereichen kleinste Teile von Blutgefäßen lagen, die die DNA der Spenderin tragen, und so ebenfalls ausgeschnitten und mitamplifiziert wurden.

Auch bei den Proben mit den zufällig ausgewählten Zellbereichen sind die Allele des Empfängers stärker ausgeprägt als die der Spenderin. Hier lässt sich mehr DNA nachweisen als in den Proben mit gezielt ausgeschnittenen Zellen, da zufällig ein großer Zellbereich (>100 Zellen) ausgeschnitten wurde. Bei diesen Proben ließen sich alle Allele des Empfängers und der Spenderin nachweisen. Hier konnte deutlich gezeigt werden, dass mehr Zellmaterial vom Empfänger als von der Spenderin vorlag (vgl. Abb. 5.11 und 5.12).

Der Empfänger wies bereits vor der Lebertransplantation ein einzelnes Leberkarzinom auf. Da bekannt ist, dass als Komplikation das Wiederauftreten eines Leberkarzinoms die am häufigsten auftretende neoplastische Komplikation bei der bei ihm gestellten Diagnose und durchgeführten Therapie ist (Pfeiffer et al. 1997; Schlitt et al. 1999; Vivarelli et al. 2002; Kotlyar et al. 2006), liegt der Schluss nahe, dass die Krebszellen von dem Empfänger selbst stammten.

Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass der größere Zellanteil von dem Empfänger stammt.

Allerdings konnte diese Annahme auch mithilfe der eingesetzten Lasermikrodissektionstechnik nicht eindeutig bewiesen werden, da es nicht gelang, ein reines DNA-Profil des Empfängers aus den lasermikrodissezierten Gewebeproben zu erhalten.

Bei den LMD-Proben schien der Anteil der Allele des Empfängers relativ höher zu sein als bei den Proben mit zufällig ausgewählten Bereichen. Um dies zu bestätigen und möglicherweise ein reineres DNA-Profil zu erhalten, müssten deutlich mehr Zellen des Karzinombereichs genau ausgewählt und ausgeschnitten werden. Dadurch würde man auch die aufgetretenen *drop-out*-Phänomene reduzieren. Der Erhalt eines komplett reinen DNA-Profils scheint – nach den bisherigen Ergebnissen – unwahrscheinlich, so dass man möglicherweise die Dicke der Gewebeschnitte reduzieren müsste, um selbst geringste Anteile der Spenderin nicht fälschlicherweise zu detektieren.

Insgesamt betrachtet wurde durch Einsatz der Lasermikrodissektion kein reineres DNA-Profil erhalten als bei den zufällig ausgewählten Zellbereichen bzw. den manuell präparierten Bereichen. Die Mischungen der Allele von beiden Beteiligten wurden in allen Proben nachgewiesen, unabhängig von der verwendeten Technik.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden spurenkundliche Techniken eingesetzt, um verschiedenste Fragen aus der klinischen Rechtsmedizin zu bearbeiten. Es wurde aufgezeigt, dass die Methoden hinsichtlich der Anforderungen an geringste Zellantragungen optimiert werden und dadurch wichtige Aussagen gemacht werden

konnten, es aber noch einen großen Wissens- und Forschungsbedarf insbesondere hinsichtlich der Reproduzierbarkeit von Ergebnissen gibt.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zur Mutationscharakterisierung von Mutationen in einem der vier STR-Systeme D3S1358, FGA, ACTBP2 und VWA zunächst die Anwendung flankierender Marker zur Erstellung familien-spezifischer Haplotypen bei einer aussagekräftigen Stichprobenzahl etabliert werden. Es konnte gezeigt werden, dass diese Methode in einem Großteil der Fälle eindeutige Aussagen hinsichtlich der Mutationscharakterisierung erlaubt. Die Methode, die für Ein-Kind-Fälle *a priori* keine Einordnung der Mutation erlaubt, wurde dahingehend erweitert, dass eine Multiplex-PCR exemplarisch für das STR-System ACTBP2 und fünf flankierende Marker etabliert wurde, die hinsichtlich der unteren Nachweisgrenze und Sensitivität mit kommerziell erhältlichen Multiplex-Kits vergleichbar ist. Weiterhin wurde die Anwendung einer Multiplex-PCR bei Einzelzellen bzw. Einzelchromosomen erfolgreich durchgeführt.

Des Weiteren wurden durch Einsatz alternativer Primer und Sequenzierung in zwei Fällen Punktmutationen im primerbindenden Bereich, die zum Auftreten von Null-Allelen führten, entdeckt.

Der zweite Teil der Arbeit umfasste die Entwicklung und Anwendung forensischer Methoden in spurenkundlichen Fragestellungen. Zum einen wurde systematisch untersucht, ob es eine Alternative zu den üblicherweise für Abriebe verwendeten Hilfsmitteln destilliertes Wasser und Baumwolltupfer gibt, mit denen signifikant mehr Zellmaterial gesichert werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass die Wahl sowohl des Befeuchtungsmittels, als auch der Beschichtung einen bedeutenden Einfluss auf die Menge an gesicherter DNA hat. Mit SDS als Befeuchtungsmittel kann unter den gegebenen Bedingungen signifikant mehr Zellmaterial als mit destilliertem Wasser gewonnen werden. Für die Beschichtungen zeigte sich im Rahmen der durchgeführten Modellstudie ein positiver Trend für Mikrofasertupfer, der weiter verifiziert werden muss. Zusätzlich wurden die Parameter Wiederfindungsrate und Einfluss der Lagerungszeit auf Abriebe bestimmt, denen bislang nicht nachgegangen wurde.

Zum anderen konnte durch Einsatz spurenkundlicher Methoden gezeigt werden, dass durch den gemeinsamen regelrechten Gebrauch einer Stechhilfe zur Blut-

entnahme durch mehrere Personen kein Blut- bzw. Zellmaterial an exponierte Stellen des Gerätes angetragen wird.

Bei einer klinisch-rechtsmedizinischen Fragestellung sollte durch Einsatz der Laser-mikrodissektionstechnik der Ursprung eines Leberkarzinoms nach Transplantation des Organs bestimmt werden. Es konnte gezeigt werden, dass deutlich mehr Zellmaterial des Empfängers vorlag, was auf einen Ursprung des Karzinoms im Empfänger hinweist.

8 Literaturverzeichnis

Akai, J., Kimura, A.; Hata, R.I. (1999) Transcriptional regulation of the human type I collagen alpha2 (COL1A2) gene by the combination of two dinucleotide repeats. *Gene*, 239, 1, 65-73.

Albanese, V., Biguet, N.F., Kiefer, H., Bayard, E., Mallet, J.; Meloni, R. (2001) Quantitative effects on gene silencing by allelic variation at a tetranucleotide microsatellite. *Hum Mol Genet*, 10, 17, 1785-1792.

Alford, R.L., Hammond, H.A., Coto, I.; Caskey, C.T. (1994) Rapid and efficient resolution of parentage by amplification of short tandem repeats. *Am J Hum Genet*, 55, 1, 190-195.

Allen, R.C., Graves, G.; Budowle, B. (1989) Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *BioTechniques*, 36-44.

Almog, J., Sears, V.G., Springer, E., Hewlett, D.F., Walker, S., Wiesner, S., Lidor, R.; Bahar, E. (2000) Reagents for the chemical development of latent fingerprints: scope and limitations of benzo[f]ninhydrin in comparison to ninhydrin. *J Forensic Sci*, 45, 3, 538-544.

Altimari, A., Gruppioni, E., Fiorentino, M., Petraroli, R., Pinna, A.D., Petropulacos, K., Ridolfi, L., Costa, A.N., Grigioni, W.F.; Grigioni, A.D. (2005) Genomic allelotyping for distinction of recurrent and de novo hepatocellular carcinoma after orthotopic liver transplantation. *Diagn Mol Pathol*, 14, 1, 34-38.

Anslinger, K., Selbertinger, U., Bayer, B., Rolf, B.; Eisenmenger, W. (2004) Ninhydrin treatment as a screening method for the suitability of swabs taken from contact stains for DNA analysis. *Int J Legal Med*, 118, 2, 122-124.

Ascioglu, F., Oguz-Savran, F.; Ozbek, U. (2004) Mutation rate at commonly used forensic STR loci: paternity testing experience. *Dis Markers*, 20, 6, 313-315.

Bacher, J.; Schumm, J.W. (1998) Development of Highly Polymorphic Pentanucleotide Tandem Repeat Loci with Low Stutter. *Profiles in DNA*, 3-5.

Ball, E.V., Stenson, P.D., Abeyasinghe, S.S., Krawczak, M., Cooper, D.N.; Chuzhanova, N.A. (2005) Microdeletions and microinsertions causing human genetic disease: common mechanisms of mutagenesis and the role of local DNA sequence complexity. *Hum Mutat*, 26, 3, 205-213.

Balogh, M.K., Burger, J., Bender, K., Schneider, P.M.; Alt, K.W. (2003) STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. *Forensic Sci Int*, 137, 2-3, 188-195.

Bär, W., Brinkmann, B., Budowle, B., Carracedo, A., Gill, P., Lincoln, P., Mayr, W.; Olaisen, B. (1997) DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *International Society for Forensic Haemogenetics. Int J Legal Med*, 110, 4, 175-176.

Bär, W., Brinkmann, B.; Budowle, B. (1994) DNA recommendations: 1994 report concerning further recommendations of the DNA commission of the ISFH regarding PCR-based polymorphisms in STR systems. *Int J Legal Med*, 107, 1, 159.

Barbarii, L.E., Rolf, B., Constantinescu, C., Hohoff, C., Calistru, P.; Dermengiu, D. (2004) Allele frequencies of 13 short tandem repeat (STR) loci in the Romanian population. *Forensic Sci Int*, 141, 2-3, 171-174.

Barber, M.D., McKeown, B.J.; Parkin, B.H. (1996) Structural variation in the alleles of a short tandem repeat system at the human alpha fibrinogen locus. *Int J Legal Med*, 108, 4, 180-185.

Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., Stephen, S., Kent, W.J., Mattick, J.S.; Haussler, D. (2004) Ultraconserved Elements in the Human Genome. *Science*, 304, 5675, 1321-1325.

Benecke, M. (1997) DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. *Naturwissenschaften*, 84, 5, 181-188.

Benet, A., Molla, G.; Azorin, F. (2000) d(GA·TC)_n microsatellite DNA sequences enhance homologous DNA recombination in SV40 minichromosomes. *Nucl.Acids Res.*, 28, 23, 4617-4622.

Blake, D., Tan, S.L.; Ao, A. (1999) Assessment of multiplex fluorescent PCR for screening single cells for trisomy 21 and single gene defects. *Mol Hum Reprod*, 5, 12, 1166-1175.

Brinkmann, B. (2004) Forensische DNA-Analytik. *Dtsch Arztebl*, 101, 34-35, 2329-2335.

Brinkmann, B., Klintschar, M., Neuhuber, F., Huhne, J.; Rolf, B. (1998) Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am J Hum Genet*, 62, 6, 1408-1415.

Bull, L.N., Pabon-Pena, C.R.; Freimer, N.B. (1999) Compound microsatellite repeats: practical and theoretical features. *Genome Res*, 9, 9, 830-838.

Bullock, P., Miller, J.; Botchan, M. (1986) Effects of poly[d(pGpT).d(pApC)] and poly[d(pCpG).d(pCpG)] repeats on homologous recombination in somatic cells. *Mol Cell Biol*, 6, 11, 3948-3953.

Bundesärztekammer. (2002) Richtlinien für die Erstattung von Abstammungsgutachten. *Dtsch Arztebl*, 99, 10, 665-667.

Butler, J.M. (2005) Forensic DNA typing : biology, technology, and genetics of STR markers.

Carracedo, A., Bär, W., Lincoln, P. et al. (2000) DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Forensic Science International*, 110, 2, 79-85.

Casana, P., Martinez, F., Aznar, J.A., Lorenzo, J.I.; Jorquera, J.I. (1995) Practical application of three polymorphic microsatellites in intron 40 of the human von Willebrand factor gene. *Haemostasis*, 25, 6, 264-271.

Cichon, S. (2002) Variabilität im menschlichen Genom: Bedeutung für die Krankheitsforschung. *Dtsch Arztebl*, November 15, A-3091.

Clark, J.M. (1988) Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucl.Acids Res.*, 16, 20, 9677-9686.

Dakin, E.E.; Avise, J.C. (2004) Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, 5, 504-509.

Dauber, E.M., Parson, W., Glock, B.; Mayr, W.R. (2006) Two apparent mother/child mismatches at the D3S1358 and the SE33 (ACTBP2) locus. *International Congress Series*, 1288, 456-458.

Dauber, E.M., Bär, W., Klintschar, M., Neuhuber, F., Parson, W., Glock, B.; Mayr, W.R. (2003) Mutation rates at 23 different short tandem repeat loci. *International Congress Series*, 1239, 565-567.

Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M.; Freimer, N.B. (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 8, 3166-3170.

Edwards, A., Civitello, A., Hammond, H.A.; Caskey, C.T. (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet*, 49, 4, 746-756.

Edwards, A., Hammond, H.A., Jin, L., Caskey, C.T.; Chakraborty, R. (1992) Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 12, 2, 241-253.

Eisen, J.A.; Hanawalt, P.C. (1999) A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and processes. *Mutat Res*, 435, 3, 171-213.

Ellegren, H. (2000a) Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet*, 16, 12, 551-558.

Ellegren, H. (2000b) Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat Genet*, 24, 4, 400-402.

Findlay, I., Matthews, P.; Quirke, P. (1998) Multiple genetic diagnoses from single cells using multiplex PCR: reliability and allele dropout. *Prenat Diagn*, 18, 13, 1413-1421.

Findlay, I., Taylor, A., Quirke, P., Frazier, R.; Urquhart, A. (1997) DNA fingerprinting from single cells. *Nature*, 389, 6651, 555-556.

Finkelstein, S.D., Marsh, W., Demetris, A.J., Swalsky, P.A., Sasatomi, E., Bonham, A., Subotin, M.; Dvorchik, I. (2003) Microdissection-based allelotyping discriminates de novo tumor from intrahepatic spread in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 37, 4, 871-879.

Flemming, P., Tillmann, H.L., Barg-Hock, H., Kleeberger, W., Manns, M.P., Klempnauer, J.; Kreipe, H.H. (2003) Donor origin of de novo hepatocellular carcinoma in hepatic allografts. *Transplantation*, 76, 11, 1625-1627.

Freudenreich, C.H., Stavenhagen, J.B.; Zakian, V.A. (1997) Stability of a CTG/CAG trinucleotide repeat in yeast is dependent on its orientation in the genome. *Mol Cell Biol*, 17, 4, 2090-2098.

Fung, W.K., Chung, Y.K.; Wong, D.M. (2002) Power of exclusion revisited: probability of excluding relatives of the true father from paternity. *Int J Legal Med*, 116, 2, 64-67.

Garofano, L., Pizzamiglio, M., Bizzaro, G.P., Donato, F., Rossetti, M.; Budowle, B. (1999a) Italian population data on two new short tandem repeat loci: D6S477 and D19S433. *Forensic Sci Int*, 101, 3, 203-208.

Garofano, L., Pizzamiglio, M., Donato, F., Biondi, F., Rossetti, M.; Budowle, B. (1999b) Italian population data on two new short tandem repeat loci: D2S1338 and Penta E. *Forensic Sci Int*, 105, 2, 131-136.

Gill, P. (2001) Application of low copy number DNA profiling. *Croat Med J*, 42, 3, 229-232.

Goldstein, D.B.; Schlotterer, C. (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. 368.

Gray, I.C., Campbell, D.A.; Spurr, N.K. (2000) Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet*, 9, 16, 2403-2408.

Haddad, A.P.; Sparrow, R.L. (1997) Two novel alleles of the ATCT variable number tandem repeat locus VWF.VNTR I in intron 40 of the von Willebrand factor gene. *Br J Haematol*, 96, 2, 298-300.

Harding, R.M., Boyce, A.J.; Clegg, J.B. (1992) The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics*, 132, 3, 847-859.

Heinrich, M., Muller, M., Rand, S., Brinkmann, B.; Hohoff, C. (2004) Allelic drop-out in the STR system ACTBP2 (SE33) as a result of mutations in the primer binding region. *Int J Legal Med*, 118, 6, 361-363.

Hohoff, C., Schurenkamp, M.; Brinkmann, B. (2009) Meiosis study in a population sample from Nigeria: allele frequencies and mutation rates of 16 STR loci. *Int J Legal Med*,.

Hohoff, C., Schurenkamp, M., Borchers, T., Eppink, M.; Brinkmann, B. (2006) Meiosis study in a population sample from Afghanistan: allele frequencies and mutation rates of 16 STR loci. *Int J Legal Med*, 120, 5, 300-302.

Holtkemper, U., Rolf, B., Hohoff, C., Forster, P.; Brinkmann, B. (2001) Mutation rates at two human Y-chromosomal microsatellite loci using small pool PCR techniques. *Hum Mol Genet*, 10, 6, 629-633.

Huang, Q.Y., Xu, F.H., Shen, H., Deng, H.Y., Liu, Y.J., Liu, Y.Z., Li, J.L., Recker, R.R.; Deng, H.W. (2002) Mutation patterns at dinucleotide microsatellite loci in humans. *Am J Hum Genet*, 70, 3, 625-634.

Hummerich, H.; Lehrach, H. (1995) Trinucleotide repeat expansion and human disease. *Electrophoresis*, 16, 9, 1698-1704.

International Human Genome Sequencing Consortium. (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431, 7011, 931-945.

Jamieson, A. (1994) The effectiveness of using co-dominant polymorphic allelic series for (1) checking pedigrees and (2) distinguishing full-sib pair members. *Anim Genet*, 25 Suppl 1, 37-44.

Jarne, P.; Lagoda, P.J.L. (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11, 10, 424-429.

Jeffreys, A.J., Neil, D.L.; Neumann, R. (1998) Repeat instability at human minisatellites arising from meiotic recombination. *EMBO J*, 17, 14, 4147-4157.

Jeffreys, A.J., Wilson, V.; Thein, S.L. (1985) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, 316, 6023, 76-79.

Johnston, E., Ames, C.E., Dagnall, K.E., Foster, J.; Daniel, B.E. (2008) Comparison of presumptive blood test kits including hexagon OBTI. *J Forensic Sci*, 53, 3, 687-689.

Kashi Y.; Soller M. (1999) Functional roles of microsatellites and minisatellites. 10-23.

Kayser, M., Roewer, L., Hedman, M. et al. (2000) Characteristics and frequency of germline mutations at microsatellite loci from the human Y chromosome, as revealed by direct observation in father/son pairs. *Am J Hum Genet*, 66, 5, 1580-1588.

Kimpton, C., Walton, A.; Gill, P. (1992) A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Hum Mol Genet*, 1, 4, 287.

Kimpton, C.P., Oldroyd, N.J., Watson, S.K., Frazier, R.R., Johnson, P.E., Millican, E.S., Urquhart, A., Sparkes, B.L.; Gill, P. (1996) Validation of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification systems for individual identification. *Electrophoresis*, 17, 8, 1283-1293.

Klein, R., Braunschweiger, G., Junge, A.; Wiegand, P. (2003) A very long ACTBP2 (SE33) allele. *Int J Legal Med*, 117, 4, 235-236.

Klitsch, M., Dauber, E.M., Ricci, U., Cerri, N., Immel, U.D., Kleiber, M.; Mayr, W.R. (2004) Haplotype studies support slippage as the mechanism of germline mutations in short tandem repeats. *Electrophoresis*, 25, 20, 3344-3348.

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

Kotlyar, D.S., Campbell, M.S.; Reddy, K.R. (2006) Recurrence of diseases following orthotopic liver transplantation. *Am J Gastroenterol*, 101, 6, 1370-1378.

Krawczak, M. (1999) Informativity assessment for biallelic single nucleotide polymorphisms. *Electrophoresis*, 20, 8, 1676-1681.

Lapidot, A., Baran, N.; Manor, H. (1989) (dT-dC)_n and (dG-dA)_n tracts arrest single stranded DNA replication in vitro. *Nucleic Acids Res*, 17, 3, 883-900.

Levinson, G.; Gutman, G.A. (1987a) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Biol Evol*, 4, 3, 203-221.

Levinson, G.; Gutman, G.A. (1987b) High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res*, 15, 13, 5323-5338.

Li, H., Schmidt, L., Wei, M.H., Hustad, T., Lerman, M.I., Zbar, B.; Tory, K. (1993) Three tetranucleotide polymorphisms for loci: D3S1352; D3S1358; D3S1359. *Hum Mol Genet*, 2, 8, 1327.

Li, H.H., Gyllensten, U.B., Cui, X.F., Saiki, R.K., Erlich, H.A.; Arnheim, N. (1988) Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature*, 335, 6189, 414-417.

Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A.; Nevo, E. (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Mol Ecol*, 11, 12, 2453-2465.

Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 6422, 709-715.

Lu, G.; Ferl, R.J. (1993) Homopurine/homopyrimidine sequences as potential regulatory elements in eukaryotic cells. *Int J Biochem*, 25, 11, 1529-1537.

Madea, B. (2003) *Praxis Rechtsmedizin : Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung ; mit 172 Tabellen.*

Mahtani, M.M.; Willard, H.F. (1993) A polymorphic X-linked tetranucleotide repeat locus displaying a high rate of new mutation: implications for mechanisms of mutation at short tandem repeat loci. *Hum Mol Genet*, 2, 4, 431-437.

Majewski, J.; Ott, J. (2000) GT Repeats Are Associated with Recombination on Human Chromosome 22. *Genome Res*, 10, 8, 1108-1114.

Mannucci, A., Sullivan, K.M., Ivanov, P.L.; Gill, P. (1994) Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int J Legal Med*, 106, 4, 190-193.

Mansfield, E.S., Robertson, J.M., Vainer, M. et al. (1998) Analysis of multiplexed short tandem repeat (STR) systems using capillary array electrophoresis. *Electrophoresis*, 19, 1, 101-107.

Meloni, R., Albanese, V., Ravassard, P., Treilhou, F.; Mallet, J. (1998) A tetranucleotide polymorphic microsatellite, located in the first intron of the tyrosine hydroxylase gene, acts as a transcription regulatory element in vitro. *Hum Mol Genet*, 7, 3, 423-428.

Mills, K.A., Even, D.; Murray, J.C. (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human alpha fibrinogen locus (FGA). *Hum Mol Genet*, 1, 9, 779.

Moos, M.; Gallwitz, D. (1983) Structure of two human beta-actin-related processed genes one of which is located next to a simple repetitive sequence. *EMBO J*, 2, 5, 757-761.

Moretti, T.R., Baumstark, A.L., Defenbaugh, D.A., Keys, K.M., Brown, A.L.; Budowle, B. (2001a) Validation of STR typing by capillary electrophoresis. *J Forensic Sci*, 46, 3, 661-676.

Moretti, T.R., Baumstark, A.L., Defenbaugh, D.A., Keys, K.M., Smerick, J.B.; Budowle, B. (2001b) Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J Forensic Sci*, 46, 3, 647-660.

Morral, N., Nunes, V., Casals, T., Chillon, M., Gimenez, J., Bertranpetit, J.; Estivill, X. (1993) Microsatellite haplotypes for cystic fibrosis: mutation frameworks and evolutionary tracers. *Hum Mol Genet*, 2, 7, 1015-1022.

Morral, N., Nunes, V., Casals, T.; Estivill, X. (1991) CA/GT microsatellite alleles within the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene are not generated by unequal crossingover. *Genomics*, 10, 3, 692-698.

Mullochandov, M., Cass, I., Achary, P.M.; Klinger, H.P. (1997) Assignment of ACTBP8 (alias ACTBP2) within or close to human chromosome band 6q13 using a radiation hybrid panel. *Cytogenet Cell Genet*, 78, 1, 46-47.

Nachman, M.W.; Crowell, S.L. (2000) Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics*, 156, 1, 297-304.

Naveilhan, P., Baudet, C., Jabbour, W.; Wion, D. (1994) A theory that may explain the Hayflick limit--a means to delete one copy of a repeating sequence during each cell cycle in certain human cells such as fibroblasts. *Mech Ageing Dev*, 75, 3, 205-213.

Pang, B.C.; Cheung, B.K. (2007) Double swab technique for collecting touched evidence. *Leg Med (Tokyo)*, 9, 4, 181-184.

Pena, S.D., de Souza, K.T., de Andrade, M.; Chakraborty, R. (1994) Allelic associations of two polymorphic microsatellites in intron 40 of the human von Willebrand factor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 2, 723-727.

Pfeiffer, H., Ortmann, C., Klein, A.; Brinkmann, B. (1997) Origin of hepatocellular carcinoma recurring after allotransplantation revealed by microsatellite analysis. *J Clin Pathol*, 50, 9, 792-794.

Polymeropoulos, M.H., Rath, D.S., Xiao, H.; Merrill, C.R. (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2). *Nucleic Acids Res*, 20, 6, 1432.

Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Rath, D.S.; Merrill, C.R. (1991) Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH). *Nucleic Acids Res*, 19, 13, 3753.

Primmer, C.R., Moller, A.P.; Ellegren, H. (1995) Resolving genetic relationships with microsatellite markers: a parentage testing system for the swallow *Hirundo rustica*. *Mol Ecol*, 4, 4, 493-498.

Queller, D.C., Strassmann, J.E.; Hughes, C.R. (1993) Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology & Evolution*, 8, 8, 285-288.

Rao, B.S. (1996) Regulation of DNA replication by homopurine/homopyrimidine sequences. *Mol Cell Biochem*, 156, 2, 163-168.

Raymond, J.J., van Oorschot, R.A., Walsh, S.J.; Roux, C. (2008) Trace DNA analysis: do you know what your neighbour is doing? A multi-jurisdictional survey. *Forensic Sci Int Genet*, 2, 1, 19-28.

Ricci, U., Melean, G., Robino, C.; Genuardi, M. (2007) A single mutation in the FGA locus responsible for false homozygosities and discrepancies between commercial kits in an unusual paternity test case. *J Forensic Sci*, 52, 2, 393-396.

Roewer, L.; Eppelen, J.T. (1992) Rapid and sensitive typing of forensic stains by PCR amplification of polymorphic simple repeat sequences in case work. *Forensic Sci Int*, 53, 2, 163-171.

Rolf, B., Schurenkamp, M., Junge, A.; Brinkmann, B. (1997) Sequence polymorphism at the tetranucleotide repeat of the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2) locus. *Int J Legal Med*, 110, 2, 69-72.

Rosato, E., Peixoto, A.A., Gallippi, A., Kyriacou, C.P.; Costa, R. (1996) Mutational mechanisms, phylogeny, and evolution of a repetitive region within a clock gene of *Drosophila melanogaster*. *J Mol Evol*, 42, 4, 392-408.

Rothenburg, S., Koch-Nolte, F., Rich, A.; Haag, F. (2001) A polymorphic dinucleotide repeat in the rat nucleolin gene forms Z-DNA and inhibits promoter activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 16, 8985-8990.

Rowold, D.J.; Herrera, R.J. (2003) Inferring recent human phylogenies using forensic STR technology. *Forensic Sci Int*, 133, 3, 260-265.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B.; Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 4839, 487-491.

Sajantila, A., Lukka, M.; Syvanen, A.C. (1999) Experimentally observed germline mutations at human micro- and minisatellite loci. *Eur J Hum Genet*, 7, 2, 263-266.

Sajantila, A.; Budowle, B. (1991) Identification of individuals with DNA testing. *Ann Med*, 23, 6, 637-642.

Sambrook J. (1989) *Molecular cloning - a laboratory manual*. 1-3.

Sanger, F., Air, G.M., Barrell, B.G., Brown, N.L., Coulson, A.R., Fiddes, C.A., Hutchinson, C.A., Slocombe, P.M.; Smith, M. (1977) Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature*, 265, 5596, 687-695.

Schlitt, H.J., Neipp, M., Weimann, A. et al. (1999) Recurrence patterns of hepatocellular and fibrolamellar carcinoma after liver transplantation. *J Clin Oncol*, 17, 1, 324-331.

Schlotterer, C. (1998) Genome evolution: are microsatellites really simple sequences? *Curr Biol*, 8, 4, R132-4.

Schöneberg, A., Gerl, L., Oesterreich, W., Bastisch, I., Gerhard, M., Kärigel, H., Fesefeldt, A.; Pflug, W. (2003) DNA-Analyse von Hautabriebspuren - Möglichkeiten und Grenzen. *Kriminalistik*, 57. Jahrgang, 497-499.

Sharma, V.; Litt, M. (1992) Tetranucleotide repeat polymorphism at the D21S11 locus. *Hum Mol Genet*, 1, 1, 67.

Sheffield, V.C., Weber, J.L., Buetow, K.H., Murray, J.C., Even, D.A., Wiles, K., Gastier, J.M., Pulido, J.C., Yandava, C.; Sunden, S.L. (1995) A collection of tri- and tetranucleotide repeat markers used to generate high quality, high resolution human genome-wide linkage maps. *Hum Mol Genet*, 4, 10, 1837-1844.

Shewale, J.G., Nasir, H., Schneida, E., Gross, A.M., Budowle, B.; Sinha, S.K. (2004) Y-chromosome STR system, Y-PLEX 12, for forensic casework: development and validation. *J Forensic Sci*, 49, 6, 1278-1290.

Singer-Sam J., Tanguay R.L.; Riggs A.D. (1989) Use of Chelex to improve the PCR signal from a small number of cells. *Amplifications: A Forum for PCR Users*, 3, 11.

Smith, G.P. (1976) Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, 191, 4227, 528-535.

Smith, P.J.; Ballantyne, J. (2007) Simplified low-copy-number DNA analysis by post-PCR purification. *J Forensic Sci*, 52, 4, 820-829.

Sobrinho, B., Brion, M.; Carracedo, A. (2005) SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. *Forensic Sci Int*, 154, 2-3, 181-194.

Stallings, R.L., Ford, A.F., Nelson, D., Torney, D.C., Hildebrand, C.E.; Moyzis, R.K. (1991) Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, 10, 3, 807-815.

Strachan, T.; Read, A.P. (2005) *Molekulare Humangenetik*.

Straub, R.E., Speer, M.C., Luo, Y., Rojas, K., Overhauser, J., Ott, J.; Gilliam, T.C. (1993) A Microsatellite Genetic Linkage Map of Human Chromosome 18. *Genomics*, 15, 1, 48-56.

Sullivan, K.M., Mannucci, A., Kimpton, C.P.; Gill, P. (1993) A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *BioTechniques*, 15, 4, 636-8, 640-1.

Sutherland, G.R.; Richards, R.I. (1995) Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9, 3636-3641.

Sweet, D., Lorente, M., Lorente, J.A., Valenzuela, A.; Villanueva, E. (1997) An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. *J Forensic Sci*, 42, 2, 320-322.

Szibor, R., Krawczak, M., Hering, S., Edelmann, J., Kuhlisch, E.; Krause, D. (2003) Use of X-linked markers for forensic purposes. *Int J Legal Med*, 117, 2, 67-74.

Tautz, D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res*, 17, 16, 6463-6471.

Tobe, S.S., Watson, N.; Daeid, N.N. (2007) Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. *J Forensic Sci*, 52, 1, 102-109.

Urquhart, A., Kimpton, C.P., Downes, T.J.; Gill, P. (1994) Variation in short tandem repeat sequences--a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. *Int J Legal Med*, 107, 1, 13-20.

van Amstel, H.K.; Reitsma, P.H. (1990) Tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene. *Nucleic Acids Res*, 18, 16, 4957.

Vanderheyden, N., Mai, A., Gilissen, A., Cassiman, J.J.; Decorte, R. (2007) Identification and sequence analysis of discordant phenotypes between AmpFISTR SGM Plus and PowerPlex 16. *Int J Legal Med*, 121, 4, 297-301.

Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W. et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science*, 291, 5507, 1304-1351.

Vivarelli, M., Bellusci, R., Cucchetti, A., Cavrini, G., De Ruvo, N., Aden, A.A., La Barba, G., Brillanti, S.; Cavallari, A. (2002) Low recurrence rate of hepatocellular carcinoma after liver transplantation: better patient selection or lower immunosuppression? *Transplantation*, 74, 12, 1746-1751.

von Wurmb-Schwark, N., Malyusz, V., Fremdt, H., Koch, C., Simeoni, E.; Schwark, T. (2006) Fast and simple DNA extraction from saliva and sperm cells obtained from the skin or isolated from swabs. *Leg Med (Tokyo)*, 8, 3, 177-181.

Wahls, W.P., Wallace, L.J.; Moore, P.D. (1990) The Z-DNA motif d(TG)₃₀ promotes reception of information during gene conversion events while stimulating homologous recombination in human cells in culture. *Mol Cell Biol*, 10, 2, 785-793.

Webb, J.L., Creamer, J.I.; Quickenden, T.I. (2006) A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. *Luminescence*, 21, 4, 214-220.

Weber, J.L.; Wong, C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet*, 2, 8, 1123-1128.

Wenda, S., Dauber, E.M., Schwartz, D.W., Jungbauer, C., Weirich, V., Wegener, R.; Mayr, W.R. (2005) ACTBP2 (alias ACTBP8) is localized on chromosome 6 (band 6q14). *Forensic Sci Int*, 148, 2-3, 207-209.

Werner, F.A.O., Durstewitz, G., Habermann, F.A. et al. (2004) Detection and characterization of SNPs useful for identity control and parentage testing in major European dairy breeds. *Anim Genet*, 35, 1, 44-49.

Wiegand, P., Berger, B., Edelmann, J.; Parson, W. (2003) Population genetic comparisons of three X-chromosomal STRs. *Int J Legal Med*, 117, 1, 62-65.

Wiegand, P., Budowle, B., Rand, S.; Brinkmann, B. (1993) Forensic validation of the STR systems SE 33 and TC 11. *Int J Legal Med*, 105, 6, 315-320.

Wiegand, P.; Rolf, B. (2003) Analyse biologischer Spuren Teil I: Funktionelle Blutspurenmorphologie, Körpersekrete, Haare. Detektions- und Nachweismethoden. *Rechtsmedizin*, Volume 13, Number 2 / April 2003, 103-113.

Xu, X., Peng, M.; Fang, Z. (2000) The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nat Genet*, 24, 4, 396-399.

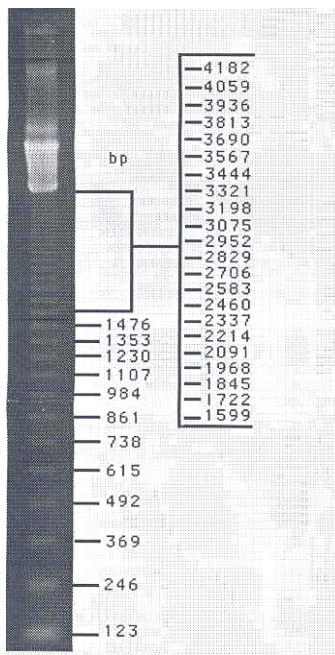
Zhu, Y., Strassmann, J.E.; Queller, D.C. (2000) Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genet Res*, 76, 3, 227-236.

9 Anhang

9.1 Mutationsraten für die vier STR-Systeme

System	Paternale Mutationsrate [%]	Maternale Mutationsrate [%]	Mutationsrate gesamt [%]
D3S1358	0,25	0,03	0,14
FGA	0,47	0,07	0,74
ACTBP2	1,70	0,08	0,89
VWA	0,45	0,08	0,27

9.2 123-bp-Ladder



123 bp DNA Ladder
3 µg/lane
1.5% agarose gel
stained with ethidium bromide

9.3 Sequenzen der STR-Systeme ApoA11 (oben) und ACTBP2 (unten) des Ausschlussfalls (E158/2000)

Person	Amplikonlänge [bp]	Nomenklatur (im Haus)	Sequenz
Kind 1	267,56	28.1	(AAAG) ₂ G (AAAG) ₃ AAGA (AAAG) ₃ G (AAAG) ₃ G (AAAG) ₁₃ AAA--TAGAAAG
	280,77	31.3	(AAAG) ₂ G (AAAG) ₃ AAGA (AAAG) ₄ G (AAAG) ₃ G (AAAG) ₁₅ AAAAAATAGAAAG
Kind 2	265,68	27.3	(AAAG) ₂ G (AAAG) ₃ AAGA (AAAG) ₄ G (AAAG) ₃ G (AAAG) ₁₁ AAAAAATAGAAAG
	283,68	32.2	(AAAG) ₂ G (AAAG) ₄ --G- (AAAG) ₃ G (AAAG) ₃ G (AAAG) ₁₇ AAA--TAGAAAG
Kind 3	263,79	27.1	(AAAG) ₂ G (AAAG) ₃ AAGA (AAAG) ₃ G (AAAG) ₃ G (AAAG) ₁₂ AAA--TAGAAAG
	267,54	28.1	n.u.
Kind 4	263,69	27.1	(AAAG) ₂ G (AAAG) ₃ AAGA (AAAG) ₃ G (AAAG) ₃ G (AAAG) ₁₂ AAA--TAGAAAG
	265,49	27.3	n.u.
Vater	263,88	27.1	(AAAG) ₂ G (AAAG) ₃ AAGA (AAAG) ₃ G (AAAG) ₃ G (AAAG) ₁₂ AAA--TAGAAAG
	280,84	31.3	(AAAG) ₂ G (AAAG) ₃ AAGA (AAAG) ₄ G (AAAG) ₃ G (AAAG) ₁₅ AAAAAATAGAAAG

n.u. nicht untersucht

Person	Allel	Sequenz		
		5'-flankierende Region	Repeatbereich	3'-flankierende Region
Kind 2	15	... (AAAG) ₂ AG (AAAG) ₃ AAAG	(AAAG) ₁₅	(GAAAG) (AAAG) ₂ AG...
	17	... (AAAG) ₂ AG (AAAG) ₃ AAAG	(AAAG) ₁₇	(GAAAG) (AAAG) ₂ AG...
Vater	27.2	... (AAAG) ₂ AG (AAAG) ₃ AAAG	(AAAG) ₁₁ AAAAAAG (AAAG) ₁₅	(GAAAG) (AAAG) ₂ AG...
	28.2	... (AAAG) ₂ AG (AAAG) ₃ AAAG	(AAAG) ₁₁ AAAAAAG (AAAG) ₁₆	(GAAAG) (AAAG) ₂ AG...

9.4 Übersicht über die untersuchten STR-Loci im Ausschlussfall (E158/2000)

STR-System	Chromosom	Allele des Putativvaters	Allele des Kindes 2
D3S1358	3	17/18	17
VWA	12	16/17	16
FGA	4	22/23	20/22
TH01	11	6/7	6
TPOX	2	9	9/11
CSF1PO	5	11	10/11
D5S818	5	11/12	10/12
D13S317	13	11	8/11
D7S820	7	11/12	10/12
ACTBP2	6	27.2/28.2	15/17
D16S539	16	9/11	9
D2S1338	2	20/26	20/25
D8S1179	8	10	10/12
D21S11	21	30/31	28/30
D18S51	18	13/17	13/15
D19S433	19	14/15	15
Penta E	15	13/20	13
Penta D	21	9/11	9
D1S1656	1	11/16	16
D8S1132	8	17/22	17/22
D12S391	12	17/19	17/18
FES	15	10A/12	12
F13B	1	9/10	9/10
CD4	12	5/10	10
D7S517	7	19/21	19/20
D10S2325	10	7/12	12/13
ApoA1*	11	27.1/31.3	27.2/32.2
D3S1744	3	15/20	16/20
D2S1360	2	22/25	22/30
D6S474	6	13/16	15/16
D5S2500	5	12/15	11/15
D21S2055	21	19.1/26	26/28
D4S2366	4	12/13	12

*: die Nomenklatur wird hausintern verwendet;

die beiden beobachteten Ausschlüsse sind **gelb** hervorgehoben

9.5 Informationen über die ausgewählten flankierenden Marker von D3S1358, FGA, ACTBP2 und VWA

	Abstand zum entsprechenden STR-System [cM]	Wiederholungseinheit [-mer]
D3S2407	4,2	Tri
D3S2304	2,8	Tetra
D3S3582	1,4	Di
D3S688	2,5	Di
D3S1767	0,2	Tetra
D3S2420	0,9	Tri
D4S2428	2,8	Tetra
D4S3021	0,6	Di
D4S2976	0,3	Di
D4S2631	0,5	Tetra
D4S1629	2,8	Tetra
D6S272	21	Di
D6S257	15,4	Di
D6S460	5,5	Di
D6S1609	3	Di
D6S462	3	Di
D6S300	7,5	Di
D12S1673	0,3	Di
D12S374	0,1	Tetra
STR1	0,0002	Tetra
STR2	0,0006	Tetra
D12S1623	1	Di
D12S397	2,2	Tetra
D12S391	6,1	Di

9.6 Verwendete Allelbezeichnungen für die flankierenden Marker

D3S1358

D3S2407	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
10	176
11	179
12	182
13	185
14	188
15	191
16	194
17	197
18	200
19	203
20	206
21	209
22	212
23	215
Interne Kontroll-DNA	
20/22	

D3S2304	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
10	104
11	108
12	112
Interne Kontroll-DNA	
11	

D3S1767	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
10	237
11	241
12	245
13	249
14	253
15	257
Interne Kontroll-DNA	
12/13	

D3S2420	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
10	80
11	83
12	86
13	89
14	92
15	95
16	98
17	101
Interne Kontroll-DNA	
11/12	

D3S3582	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
10	219
11	221
12	223
13	225
14	227
15	229
16	231
17	233
Interne Kontroll-DNA	
12/17	

D3S688	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
10	70
11	72
12	74
13	76
14	78
15	80
16	82
17	84
18	86
19	88
20	90
21	92
Interne Kontroll-DNA	
19/21	

FGA

D4S2428	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
5	108
6	112
7	116
8	120
9	124
9947A (Zelllinien-DNA)	
7/8	

D4S3021	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
5	221
6	223
7	225
8	227
9	229
10	231
11	233
12	235
13	237
13.x	238
14.x	240
9947A (Zelllinien-DNA)	
7/13.x	

D4S2976	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
5	104
6	106
7	108
8	110
9	112
10	114
11	116
12	118
13	120
14	122
15	124
16	126
17	128
9947A (Zelllinien-DNA)	
11/13	

D4S2631	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
4	187
5	191
6	195
7	199
8	203
9	207
10	211
11	215
12	219
9947A (Zelllinien-DNA)	
6/8	

D4S1629	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
5	137
6	141
7	145
8	149
9	153
9947A (Zelllinien-DNA)	
7	

ACTBP2

D6S272	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
0	173
1	175
2	177
3	179
4	181
5	183
6	185
7	187
8	189
9947A (Zelllinien-DNA)	
6	

D6S257	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
0	139
1	141
2	143
3	145
4	147
5	149
6	151
7	153
8	155
9	157
10	159
11	161
12	163
13	165
14	167
15	169
16	171
17	173
18	175
19	177
20	179
21	181
22	183
9947A (Zelllinien-DNA)	
11/14	

D6S460	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
1	112
2	114
3	116
4	118
5	120
6	122
7	124
8	126
9	128
10	130
11	132
12	134
13	136
14	138
15	140
16	142
9947A (Zelllinien-DNA)	
7/11	

D6S1609	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
0	166
0.1	167
1	168
1.1	169
2	170
3	172
4	174
5	176
6	178
6.1	179
7	180
7.1	181
8	182
8.1	183
9	184
9.1	185
186	10
187	10.1
188	11
9947A (Zelllinien-DNA)	
1/8.1	

D6S462	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
0	274
1	276
2	278
3	280
4	282
5	284
6	286
9947A (Zelllinien-DNA)	
5	

D6S300	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
0	189
1	191
2	193
3	195
4	197
5	199
6	201
7	203
8	205
9	207
9947A (Zelllinien-DNA)	
3/5	

VWA

D12S1673	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
0	102
1	104
2	106
3	108
4	110
5	112
9947A (Zelllinien-DNA)	
1/4	

D12S374	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
0	271
1	275
2	279
3	283
9947A (Zelllinien-DNA)	
2/3	

D12S1623	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
3	213
4	215
5	217
6	219
7	221
8	223
9	225
10	227
11	229
12	231
13	233
9947A (Zelllinien-DNA)	
9/10	

D12S397	
„Allel“	Amplikonlänge (ca.) [bp]
0	180
1	184
2	188
3	192
4	196
5	200
6	204
7	208
8	212
9	216
10	220
11	224
12	228
13	232
14	236
9947A (Zelllinien-DNA)	
1/13	

STR1	
Allel*	Amplikonlänge (ca.) [bp]
6	94
7	98
8	102
9	106
10	110
11	114
12	118
13	122
9947A (Zelllinien-DNA)	
10/12	

STR2	
Allel*	Amplikonlänge (ca.) [bp]
10	151
11	155
12	159
13	163
14	167
15	171
9947A (Zelllinien-DNA)	
12	

: Nomenklatur basiert auf Anzahl der Wiederholungseinheiten (durch Sequenzierung ermittelt)

Anmerkung: bei D12S391 handelt es sich um ein etabliertes forensisches System, daher ist es hier nicht aufgeführt

9.7 Systembezogene Übersicht über die eingesetzten Methoden zur Mutationscharakterisierung

	HT	HT+Seq	Seq	Annahme	ungeklärt	gesamt	
D3S1358							
Mehr-Kind	6	2	-	-	2	10	
Ein-Kind	-	-	2	5	5	12	22
FGA							
Mehr-Kind	17	-	-	-	3	20	
Ein-Kind	-	-	-	15	6	21	41
ACTBP2							
Mehr-Kind	19	1	1	-	1	22	
Ein-Kind	-	-	-	4	-	4	26 (+2)
VWA							
Mehr-Kind	6	2	-	-	1	9	
Ein-Kind	-	-	-	1	2	3	12
gesamt							
Mehr-Kind	48	5	1	-	7	61	
Ein-Kind	-	-	2	25	13	40	101 (+2)

9.8 Familien-bezogene Stammbäume aus der Haplotypen-Analyse

Im Folgenden sind die familien-spezifischen Haplotypen in Form von Stammbäumen dargestellt. Die maternalen Haplotypen sind **rot** und **orange**-farben dargestellt, die paternalen schwarz und **blau**. Wenn ein Allel nicht sicher einem Haplotypen zugeordnet werden kann, ist es **grün** hervorgehoben. Zur besseren Übersicht wurden die Allele den Haplotypen entsprechend untereinander angeordnet und nicht, wie sonst üblich, zuerst das kleinere und dann das größere Allel. Die Marker sind von stromaufwärts nach stromabwärts angegeben. Das Kind, das die Mutation aufweist, ist **fett** und *kursiv* hervorgehoben, die Allele des betreffenden Systems von Mutter, Vater und Kind sind **fett** hervorgehoben. Schwach bzw. sehr schwach ausgeprägte Ergebnisse sind in Klammern () bzw. Doppelklammer (()) dargestellt. Ein * bedeutet, dass kein Ergebnis erhalten wurde. Unter den Stammbäumen ist jeweils die Einordnung der Mutation – soweit möglich – angegeben.

Die durch Annahmen geklärten Ein-Kind-Familien wurden anhand des kleinstschrittigen denkbaren Mutationsereignisses (Brinkmann et al. 1998) geklärt.

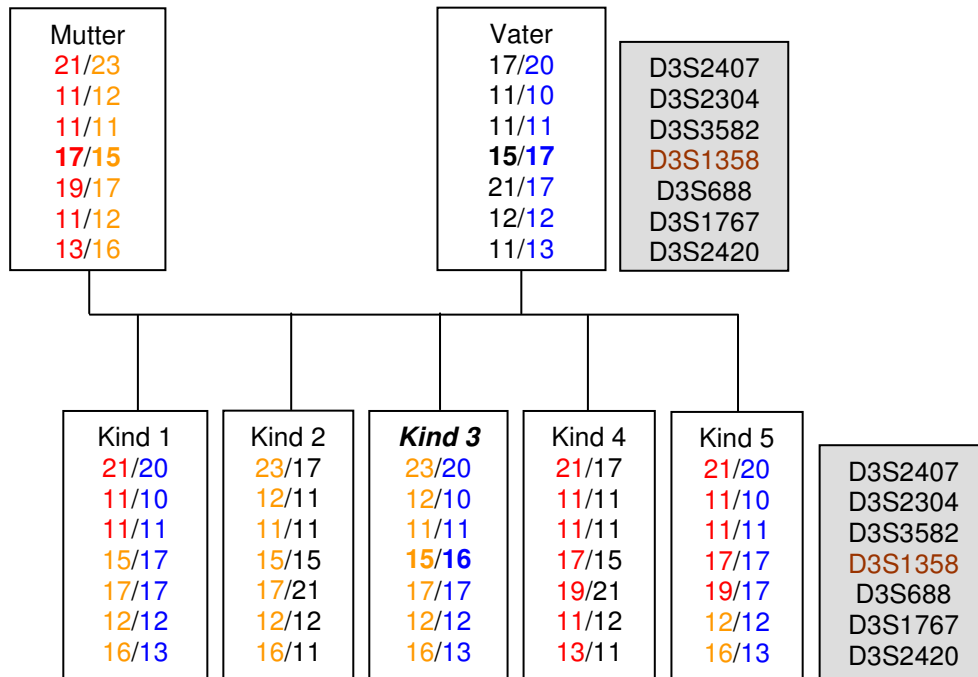
Die Stammbäume sind entsprechend der aufgestellten Kategorien (s. unten) sortiert und innerhalb der Kategorien nochmals systembezogen.

- Kategorie 1. Fälle, in denen die Charakterisierung der Mutation mithilfe der familien-spezifischen Haplotypen eindeutig gelang,
- Kategorie 2. Fälle, in denen die Charakterisierung der Mutation mithilfe der familien-spezifischen Haplotypen aufgrund einer ungünstigen Konstellation nicht gelang,
- Kategorie 3. Familien mit nur einem Kind, in denen die Einordnung der Mutation *a priori* mithilfe der familien-spezifischen Haplotypen nicht erfolgreich sein kann. Hier können wiederum die Fälle weiterhin voneinander differenziert werden, in denen die Allelkonstellation eine Annahme hinsichtlich der Einordnung der Mutation erlaubt, wenn die vorliegenden Allele dies rechtfertigen bzw. die Ein-Kind-Familien, in denen keine Aussage hinsichtlich des mutierten Allels gemacht werden kann.

Geklärte Mehr-Kind-Familien (Kategorie 1.)

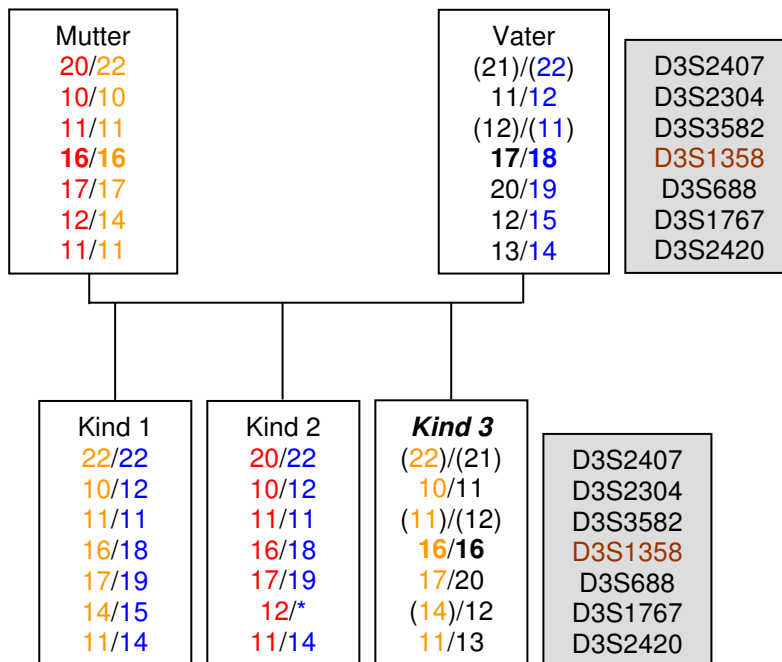
D3S1358

E049/1997



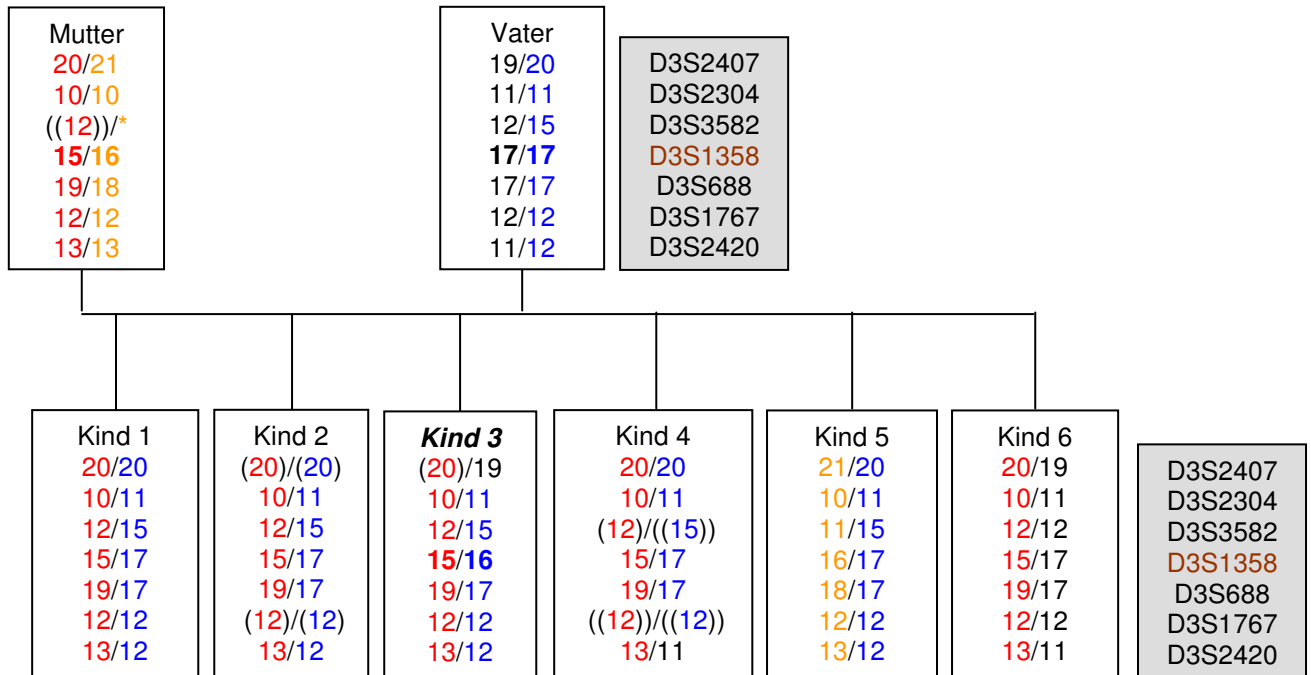
→ paternal 17 → 16

E085/1998



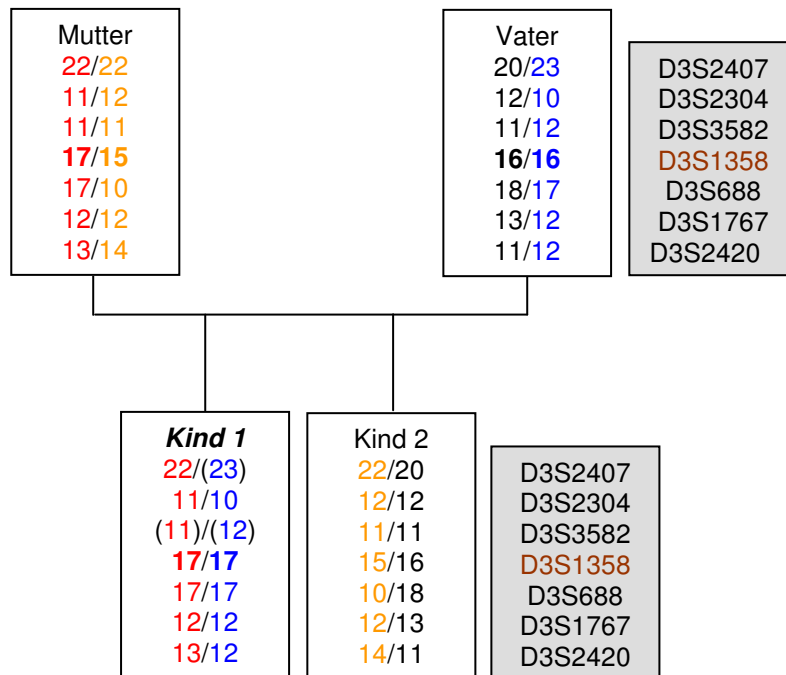
→ paternal 17 → 16

E130/1998a



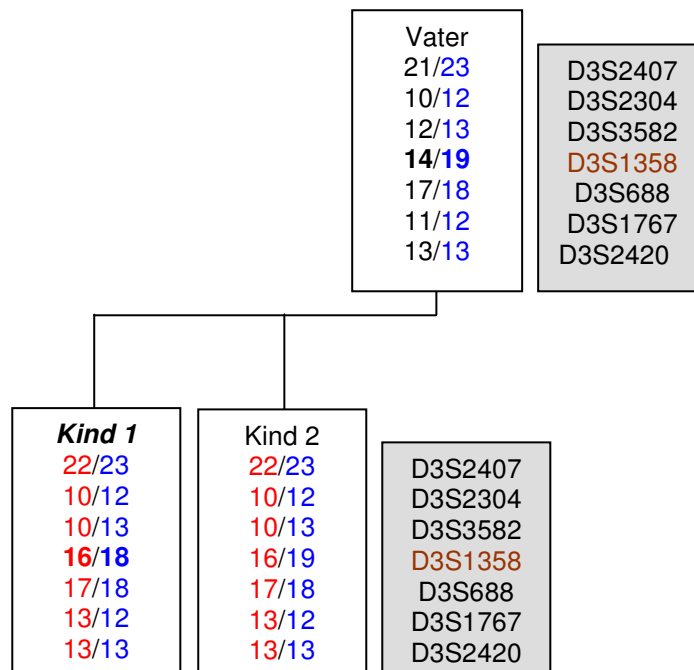
→ paternal 17 → 16

E292/1998



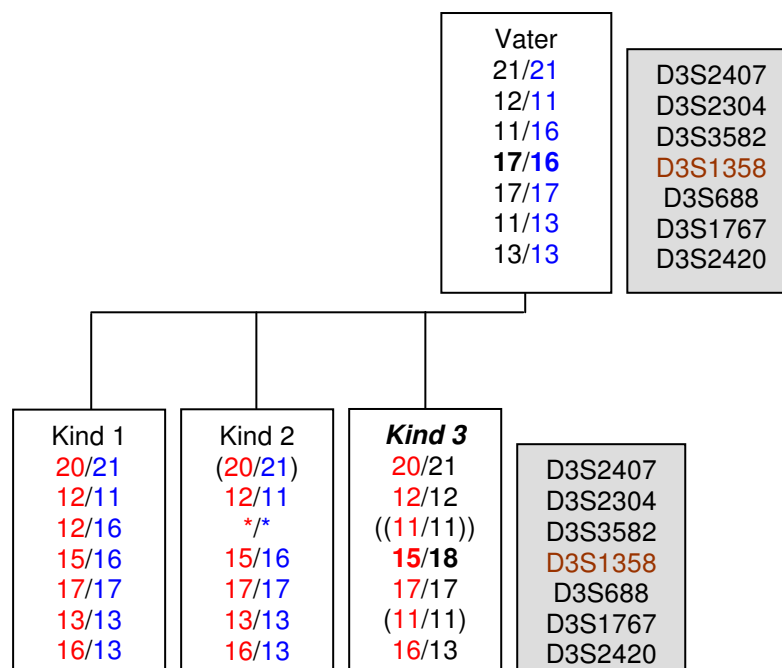
→ paternal 16 → 17

D027/04



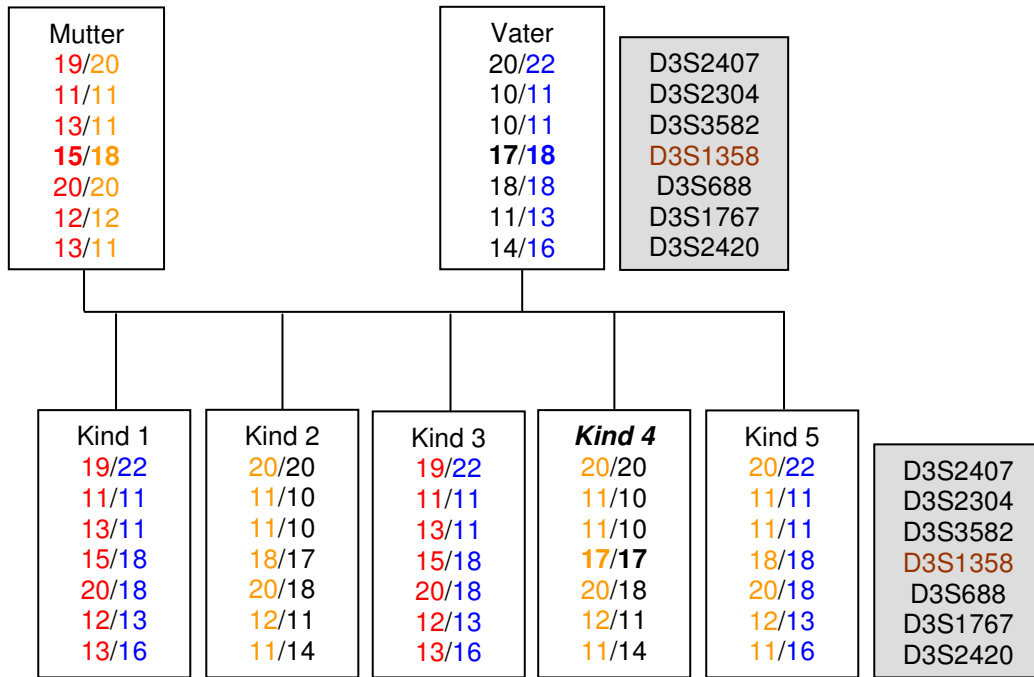
→ paternal 19 → 18; Defizienzfall

E082/2000



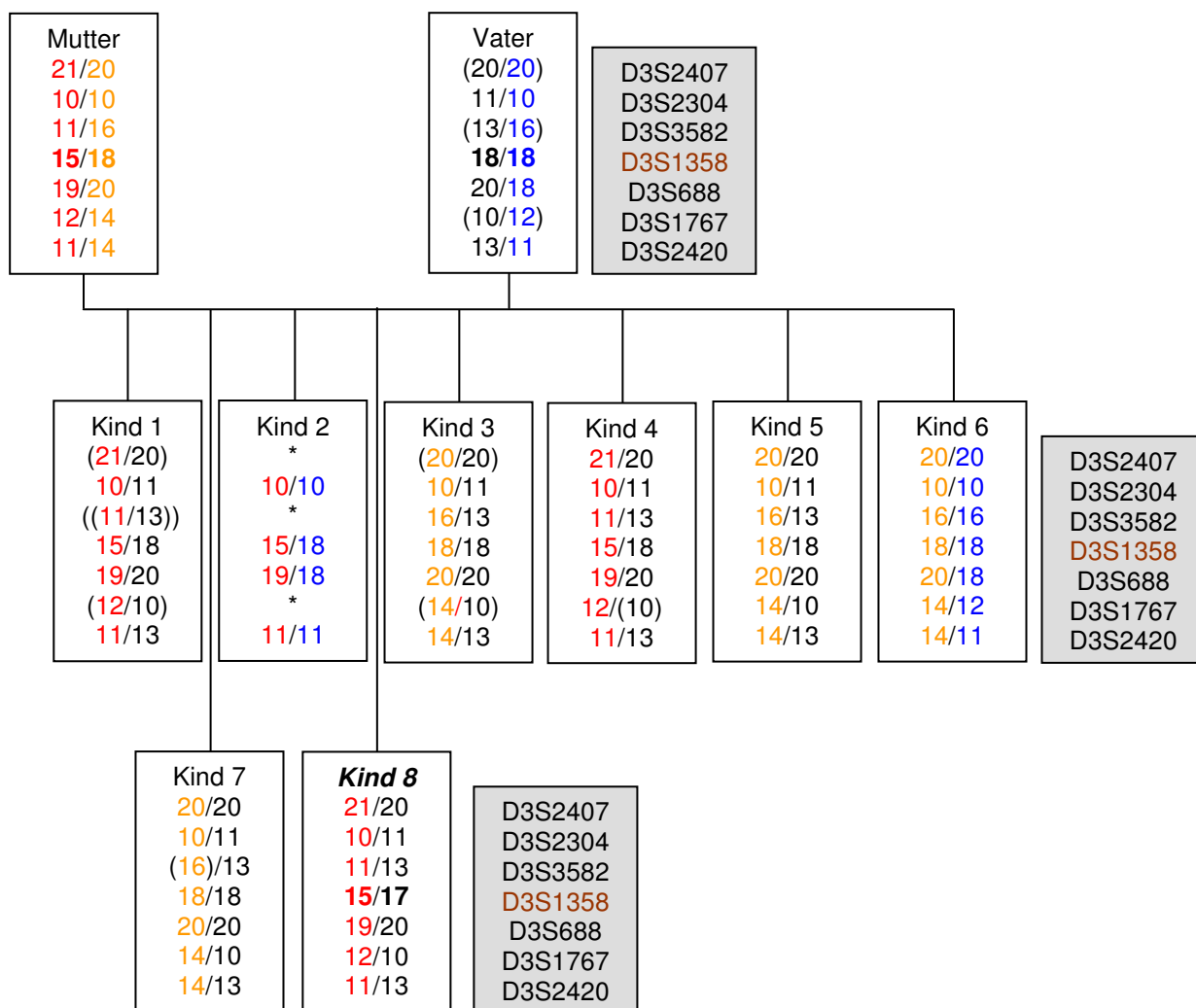
→ paternal 17 → 18; Defizienzfall

E246/2001



→ maternal 18 → 17

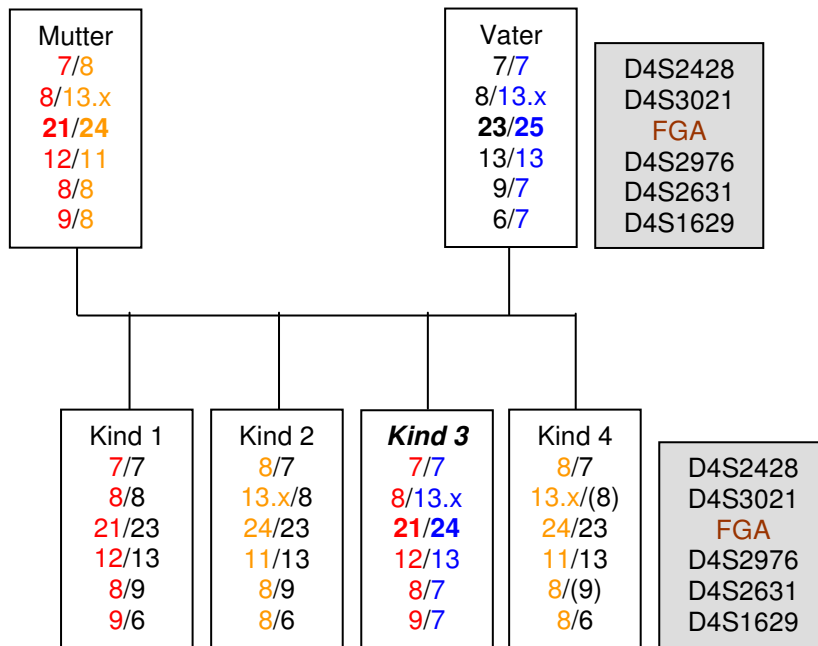
E062/1998a



→ paternal 18 → 17

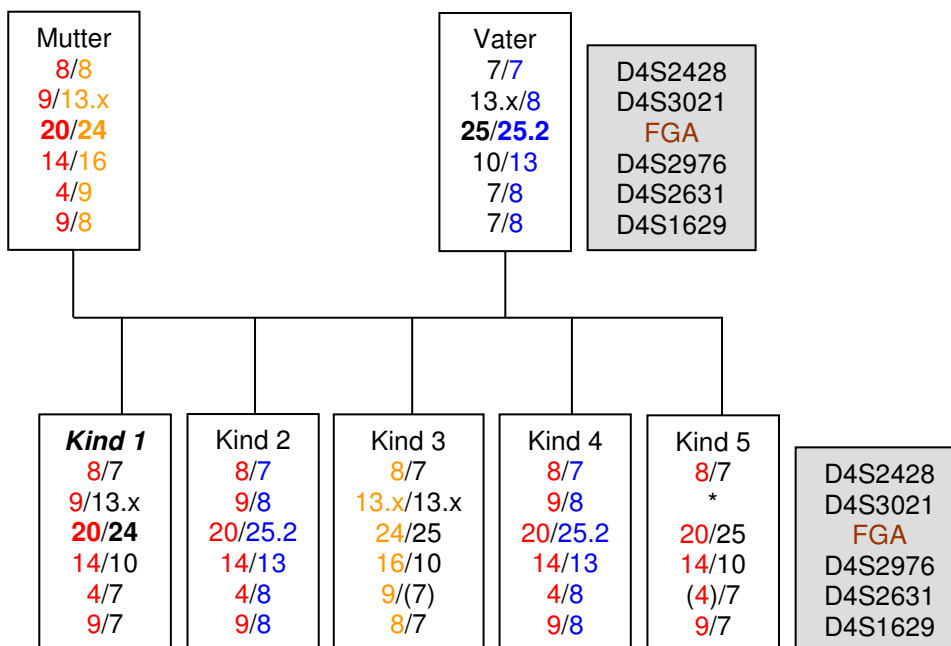
FGA

E007/1998



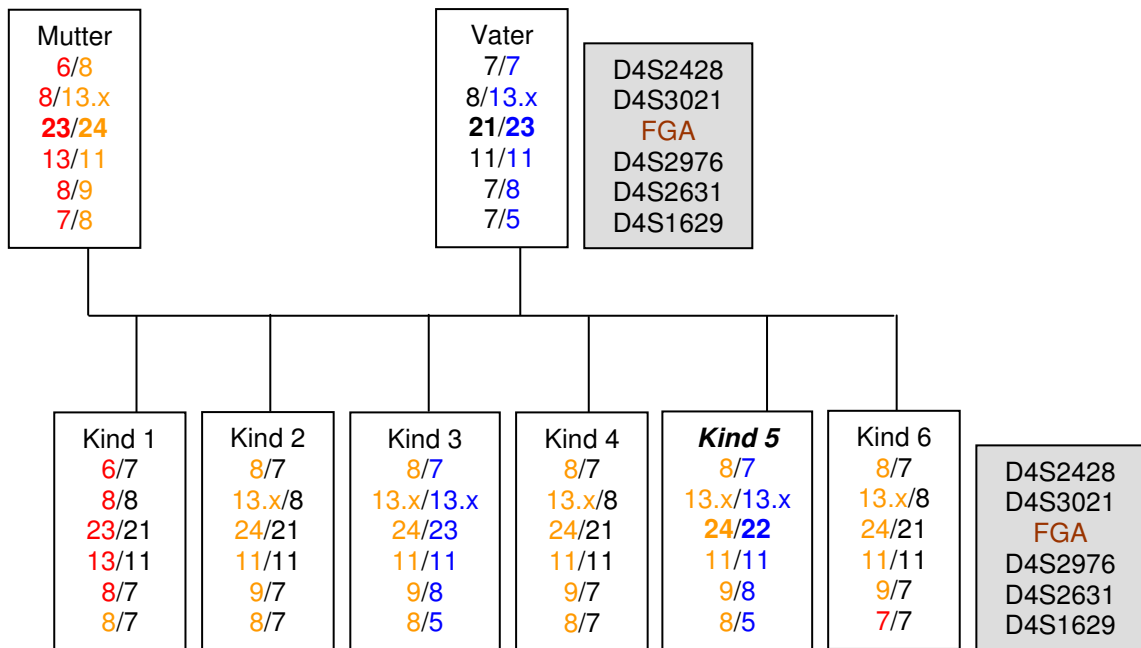
→ paternal 25 → 24

E040/1998



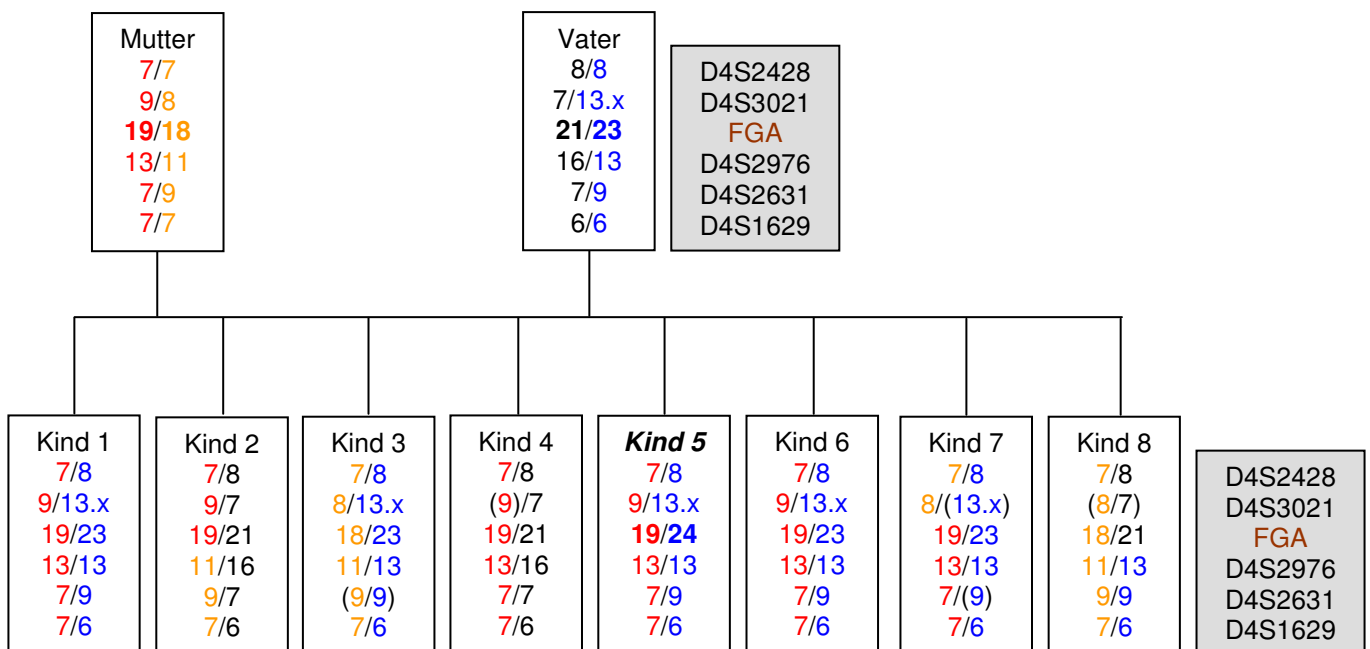
→ paternal 25 → 24

E126/1998



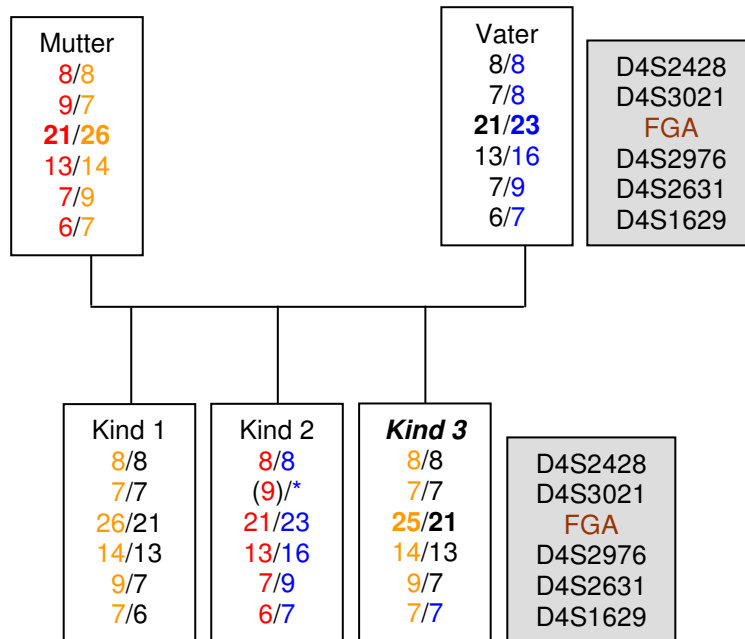
→ paternal 23 → 22

E156/1998



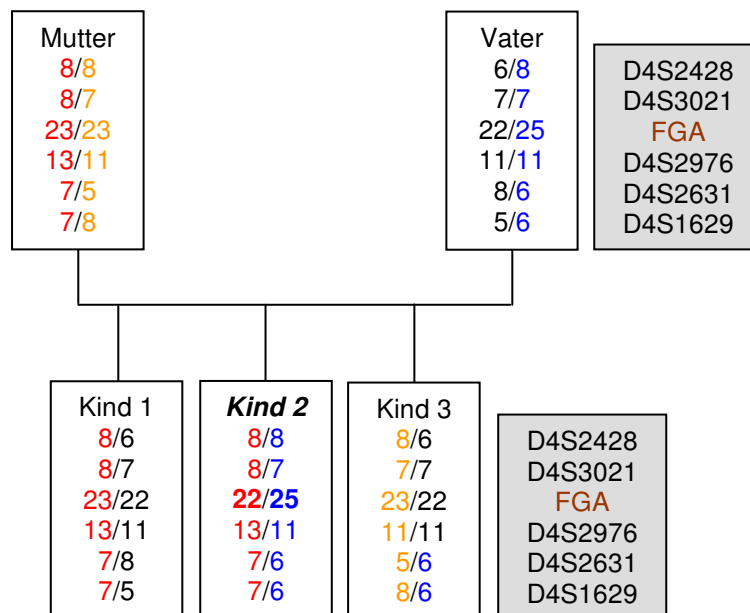
→ paternal 23 → 24

E184/1998



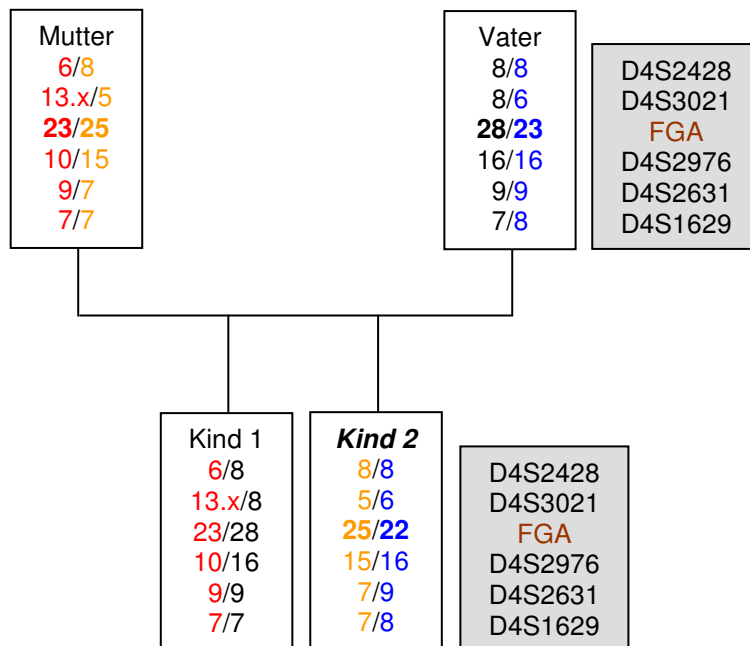
→ maternal 26 → 25

E316/1998



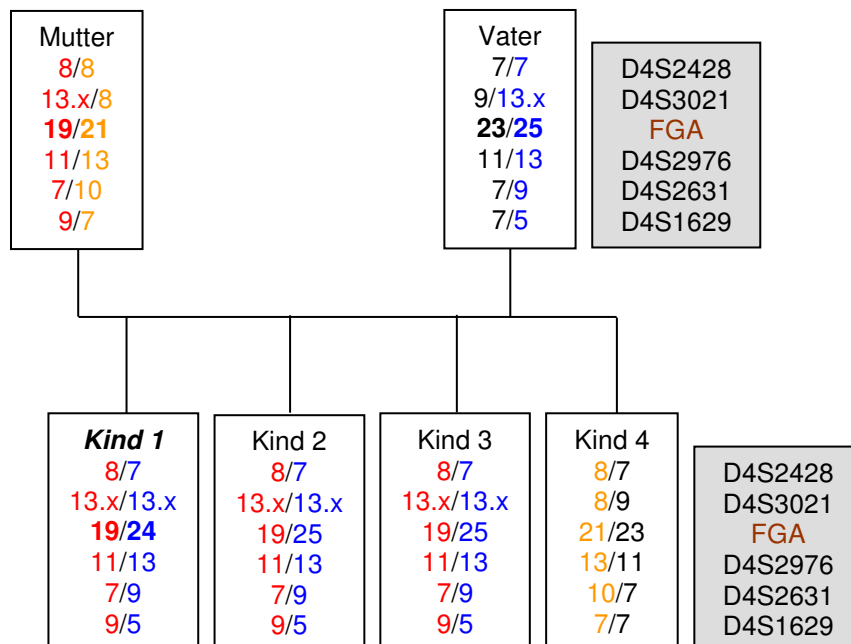
→ maternal 23 → 22

E094/2001



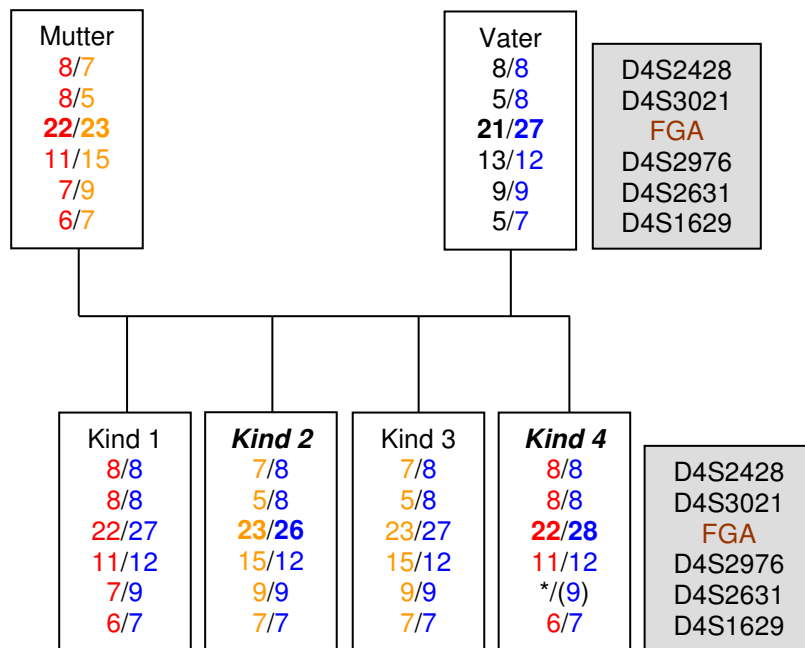
→ paternal 23 → 22

E295/1998



→ paternal 25 → 24

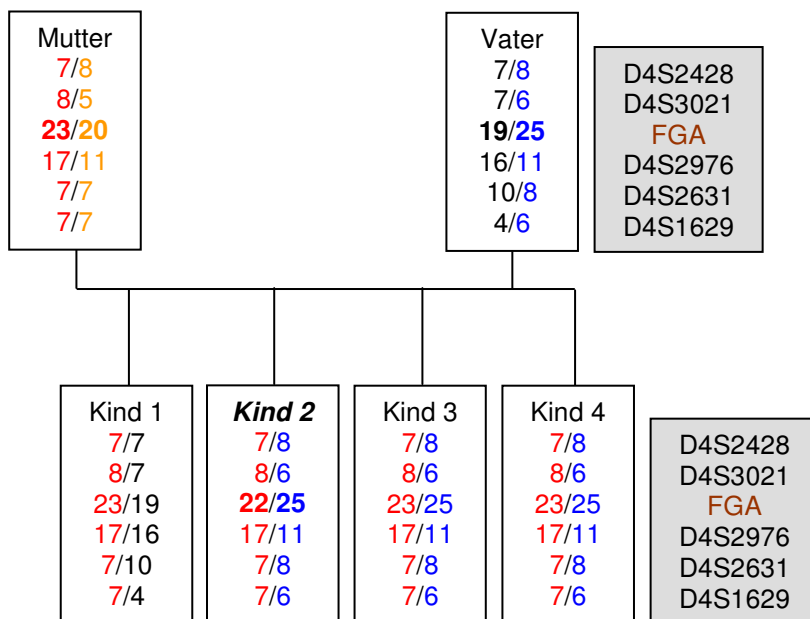
E113/2002a+b



→ paternal 27 → 26 (Kind 2)

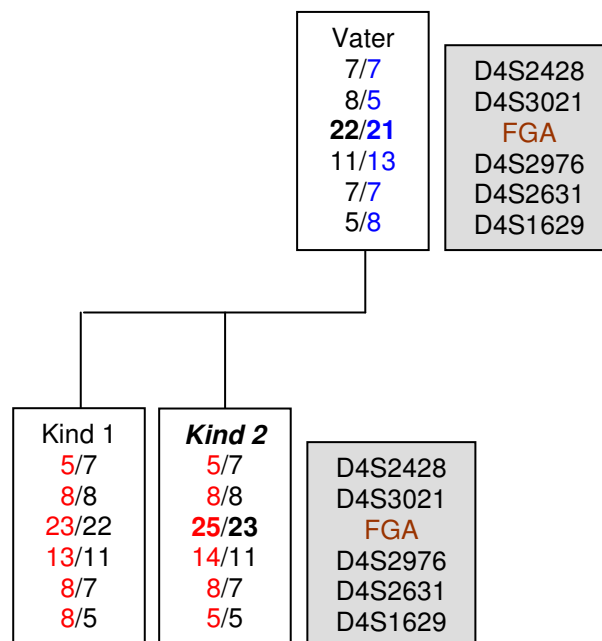
→ paternal 27 → 28 (Kind 4)

E233/2001



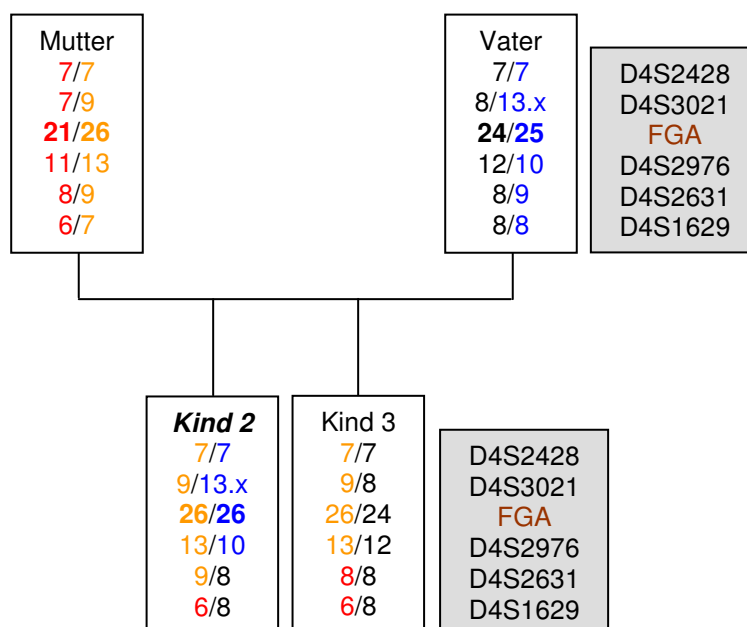
→ maternal 23 → 22

E296/2001



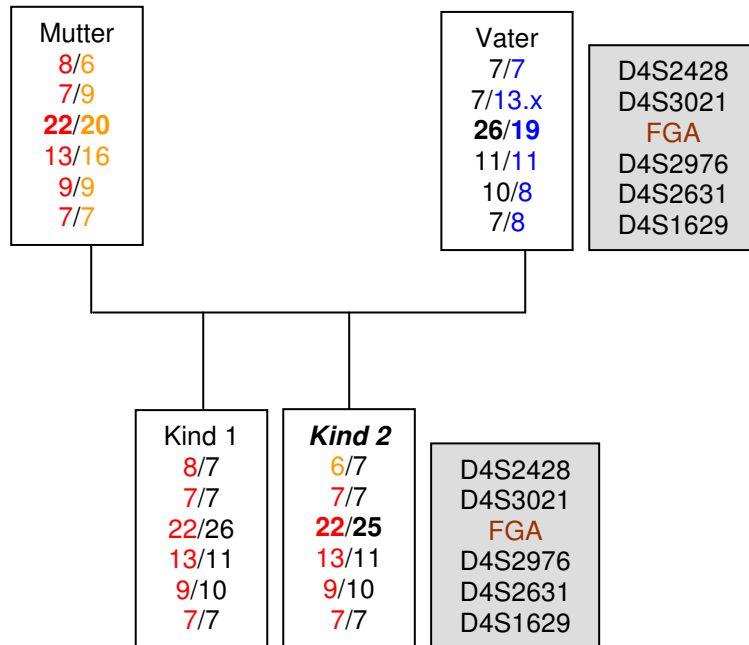
→ paternal 22 → 23; Defizienzfall

E344/2002



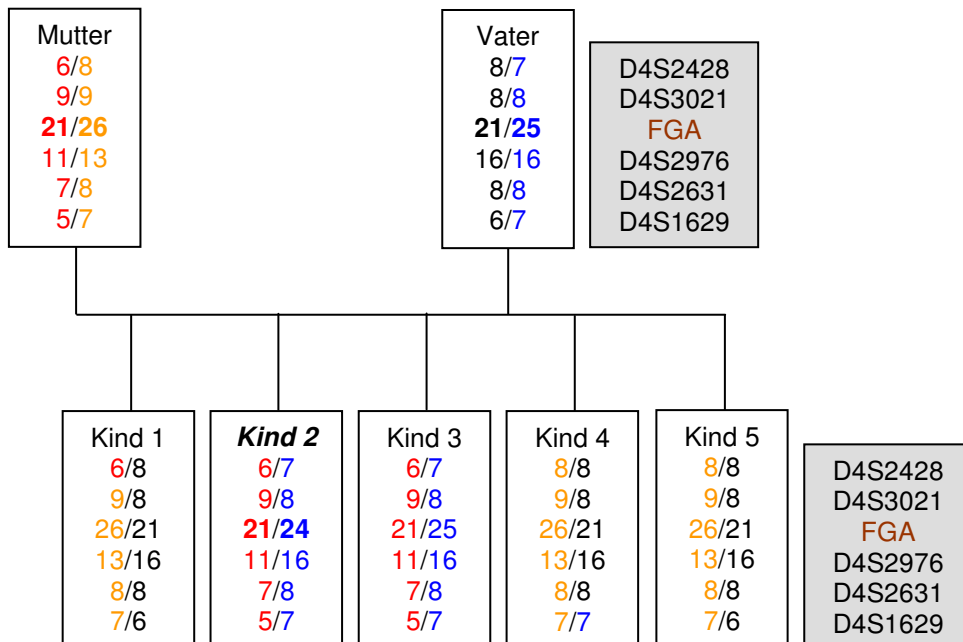
→ paternal 25 → 26

D249/02



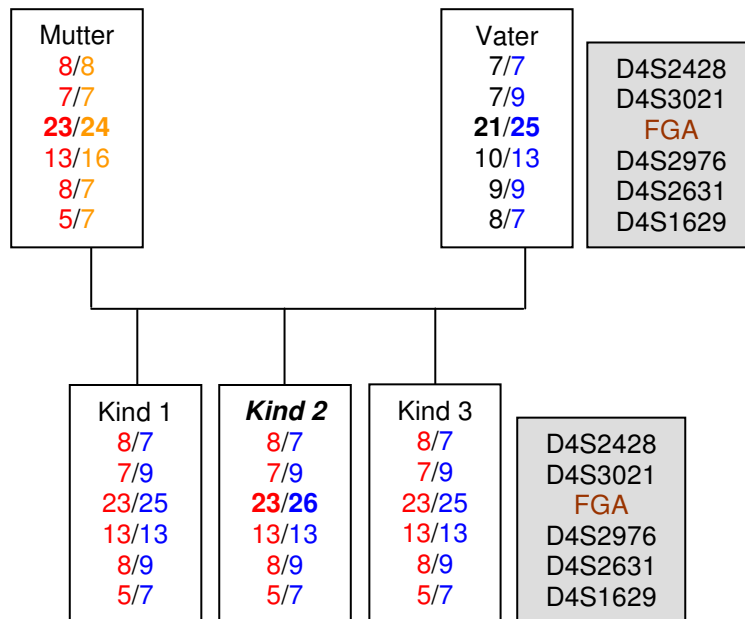
→ paternal 26 → 25

E346/2002



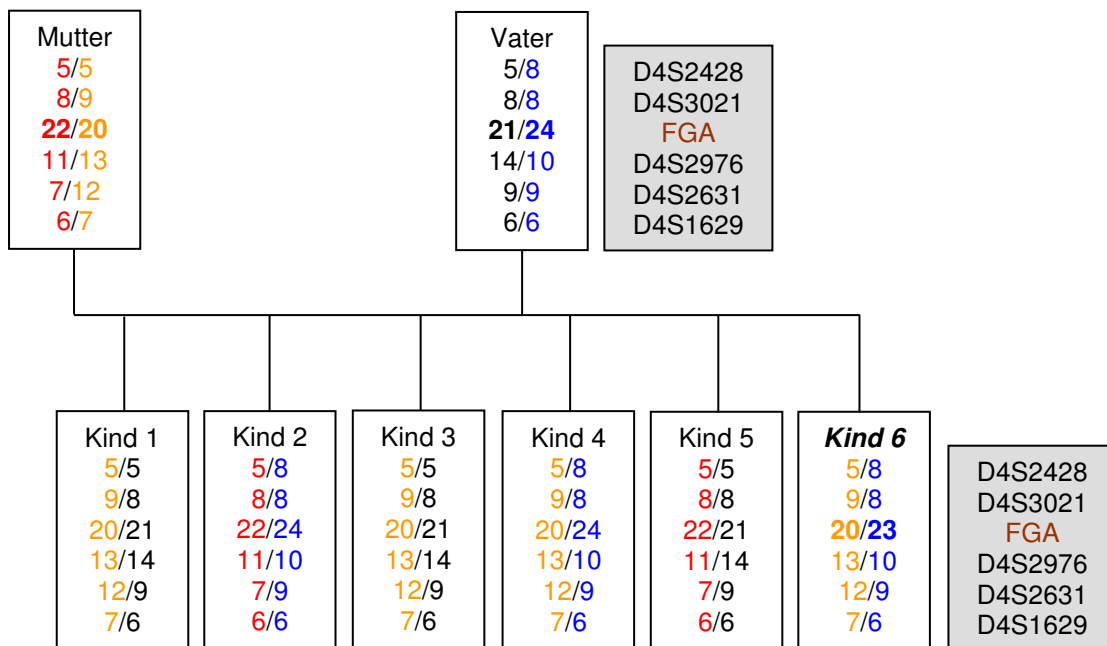
→ paternal 25 → 24

E222/2003



→ paternal 25 → 26

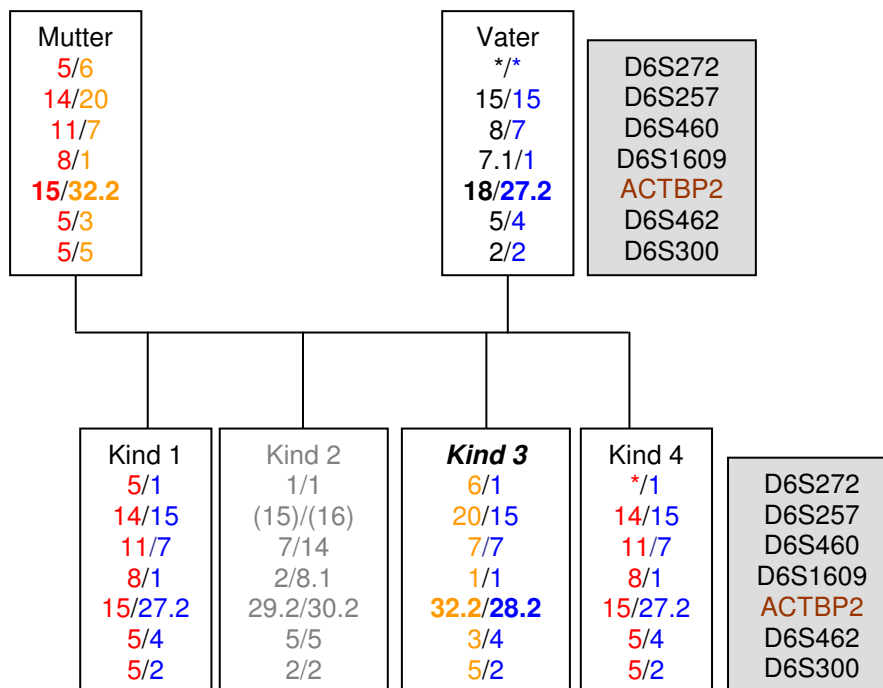
E259/04



→ paternal 24 → 23

ACTBP2

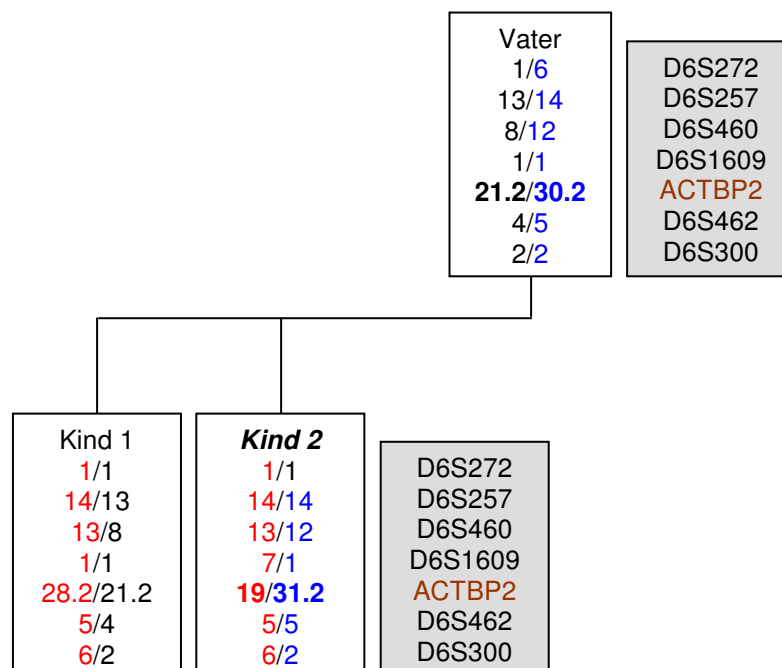
E049/1998



→ paternal 27.2 → 28.2

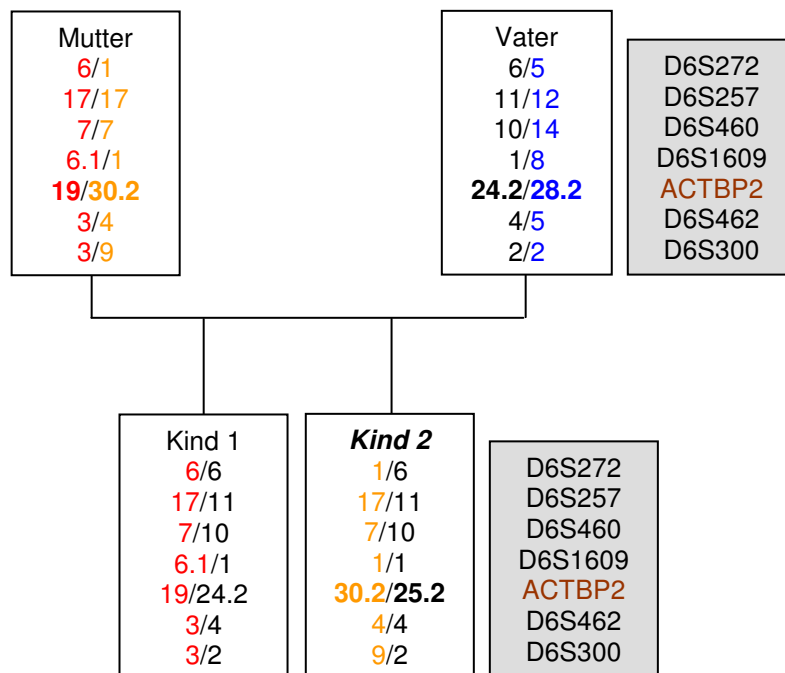
→ paternal Ausschluss für Kind 2 bestätigt

E115/2001



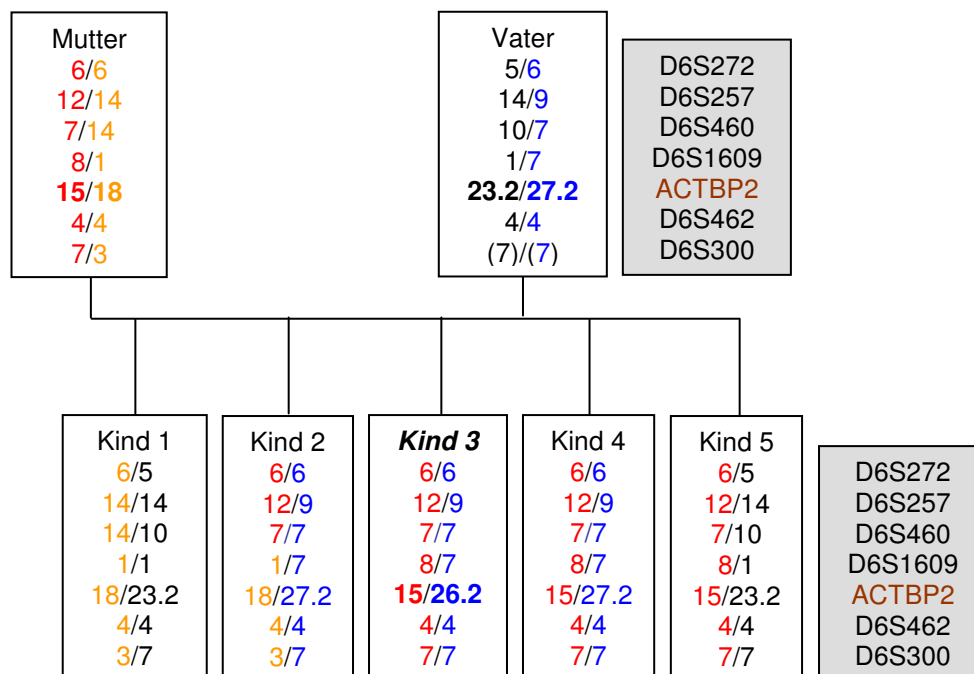
→ paternal 30.2 → 31.2; Defizienzfall

E338/2002



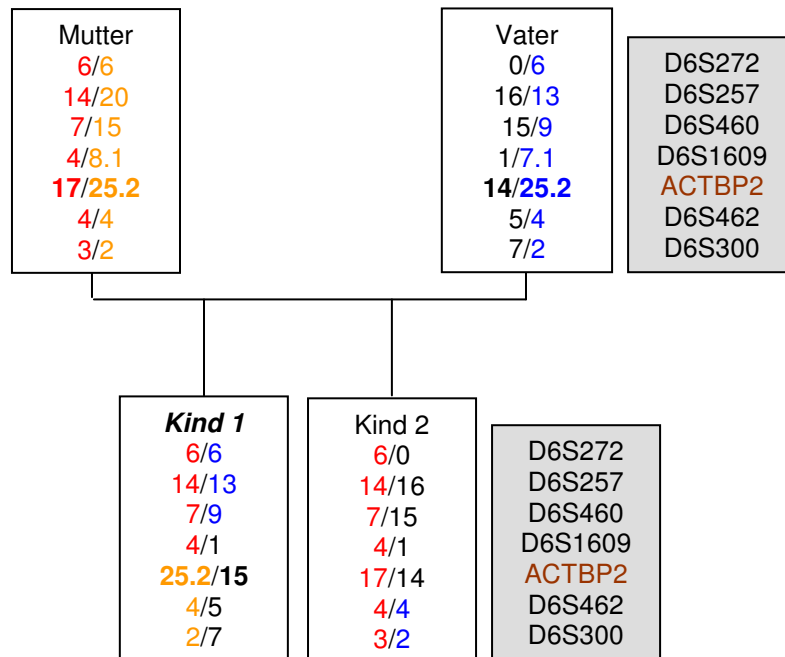
→ paternal 24.2 → 25.2

E226/2002



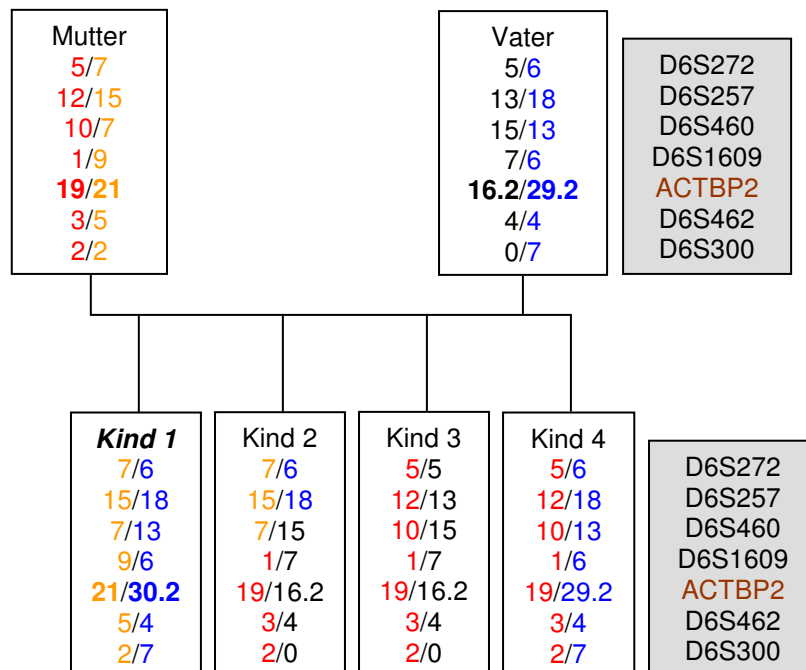
→ paternal 27.2 → 26.2

E140/1998



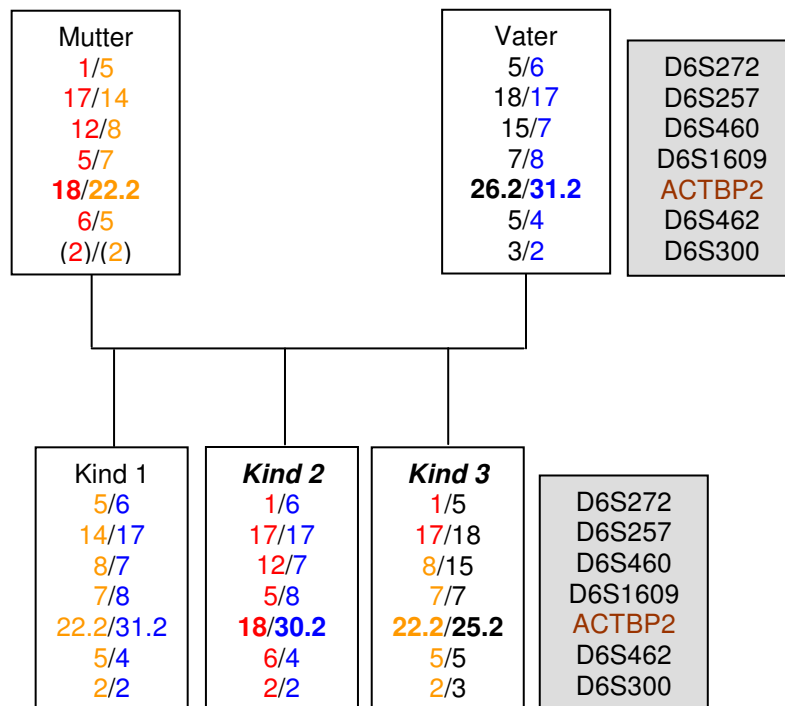
→ paternal 14 → 15

E332/2002



→ paternal 29.2 → 30.2

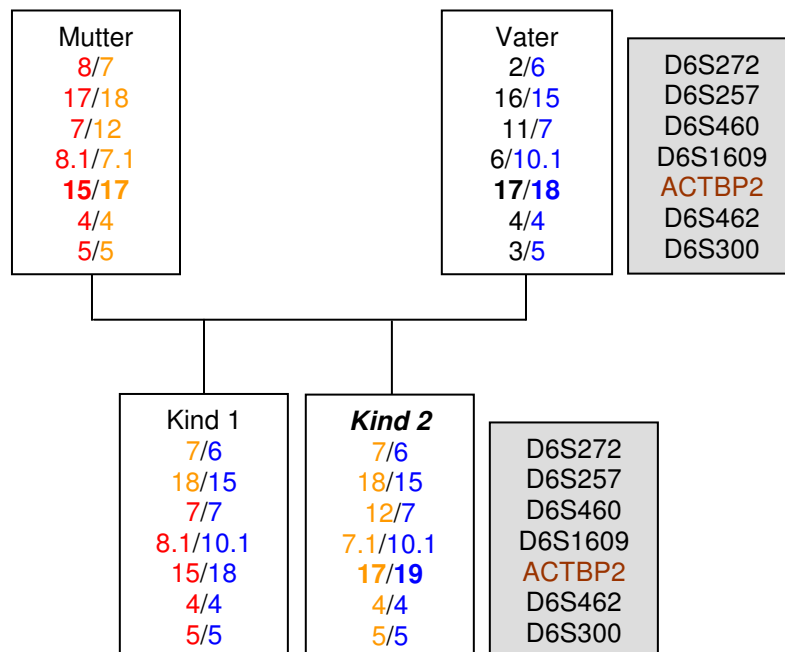
E342/2002



→ paternal 31.2 → 30.2 (Kind 2)

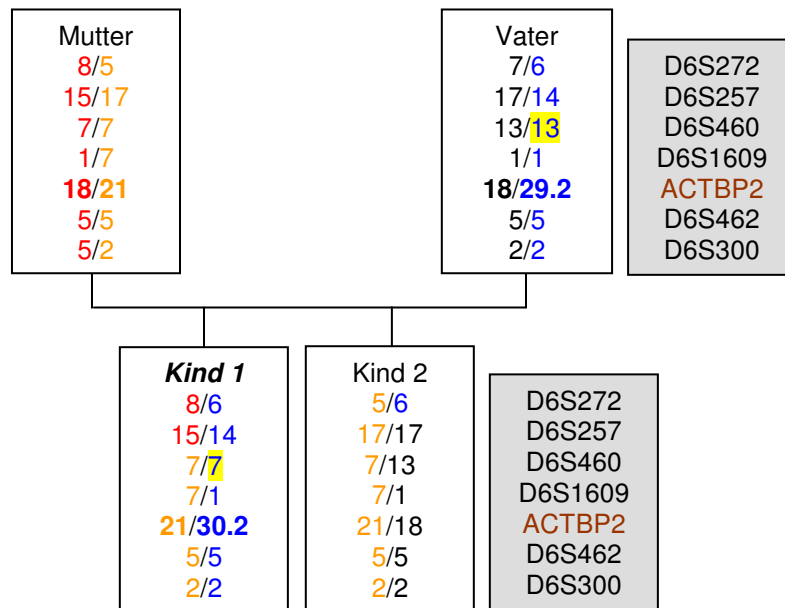
→ paternal 26.2 → 25.2 (Kind 3)

E027/1997



→ paternal 18 → 19

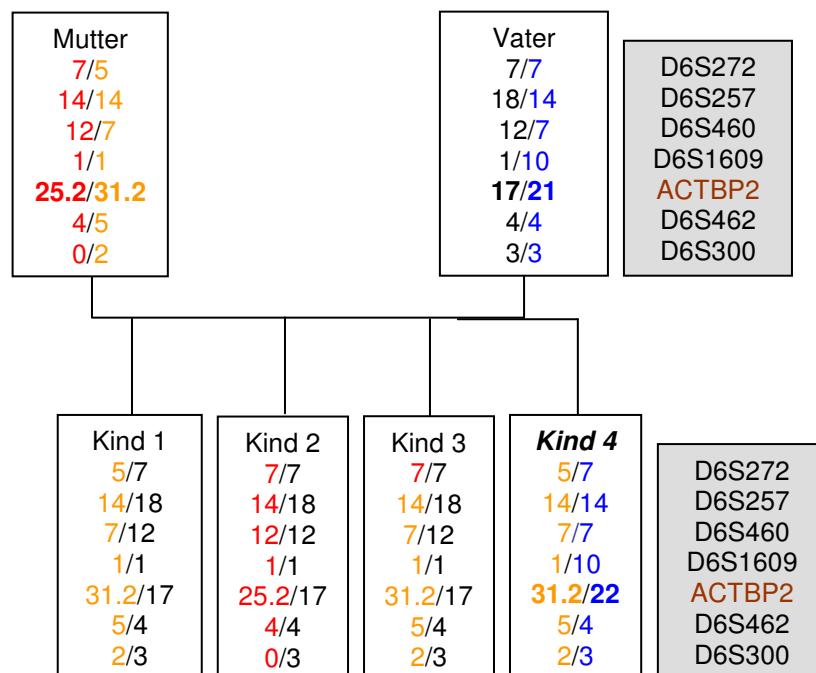
E100/2002



→ paternal 29.2 → 30.2

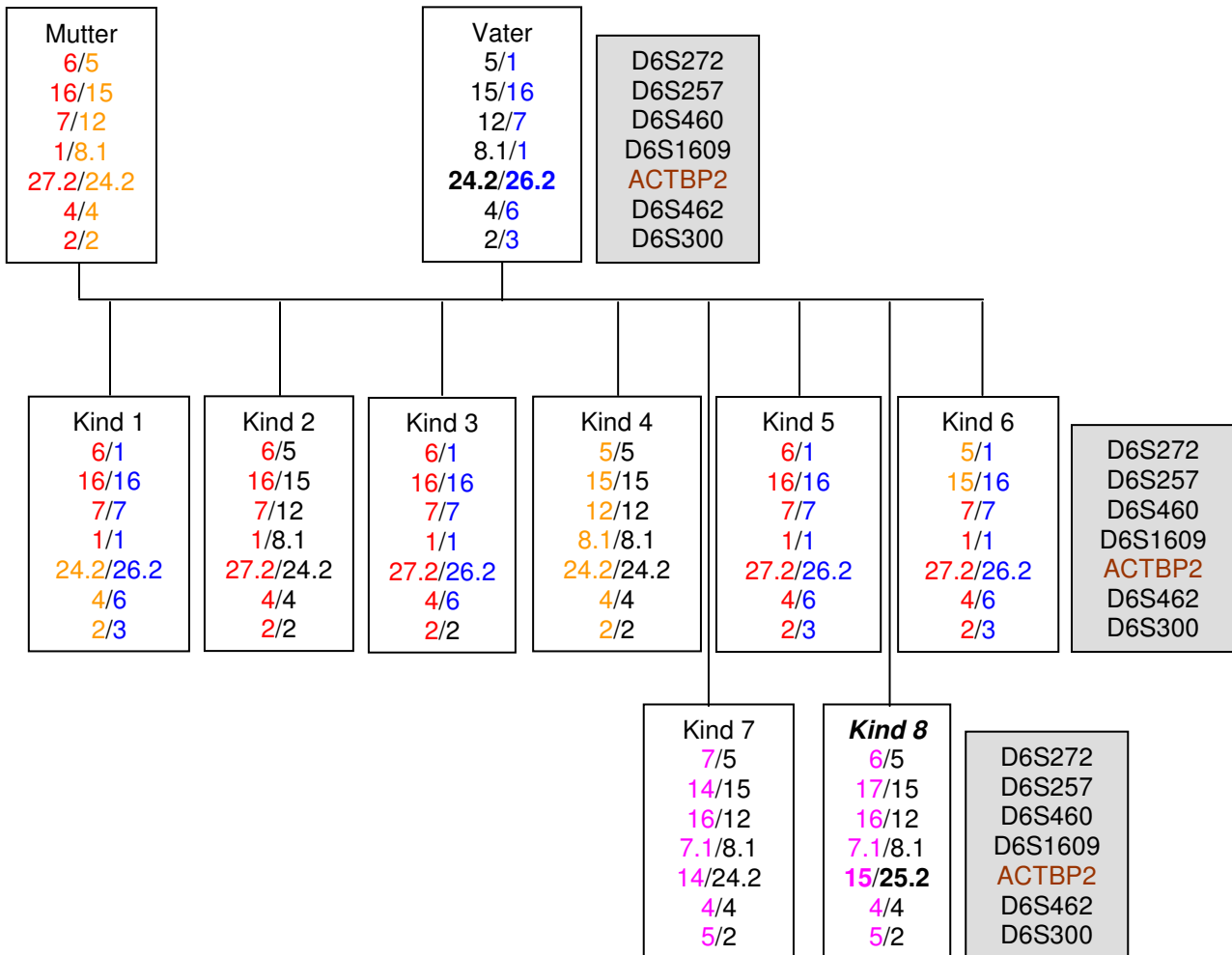
→ Kind 1 weist möglicherweise im System D6S460 ein Null-Allel des Vaters auf (gelb hinterlegt).

E263/2002



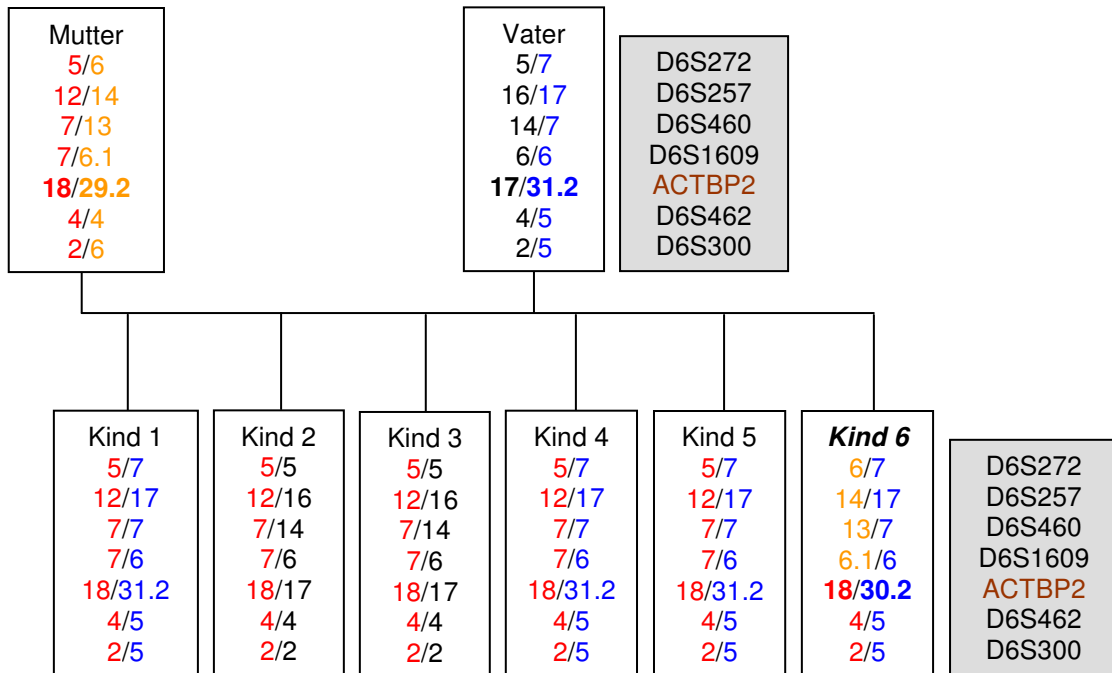
→ paternal 21 → 22

E165/2003a



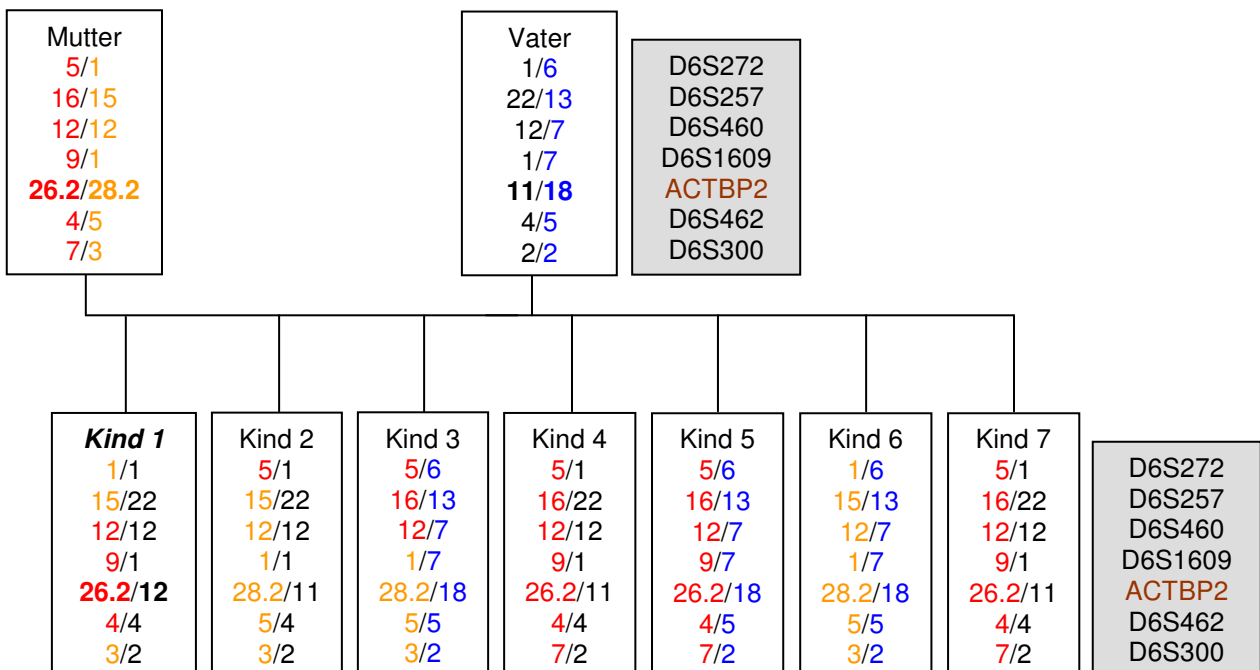
→ paternal 24.2 → 25.2

E307/2002



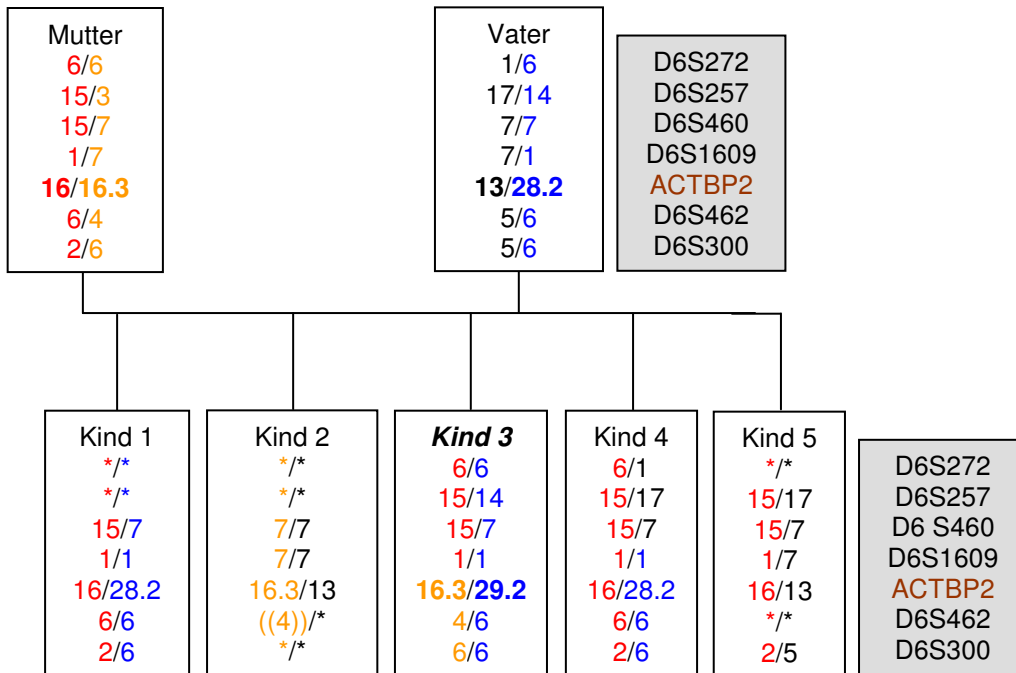
→ paternal 31.2 → 30.2

E029/2002



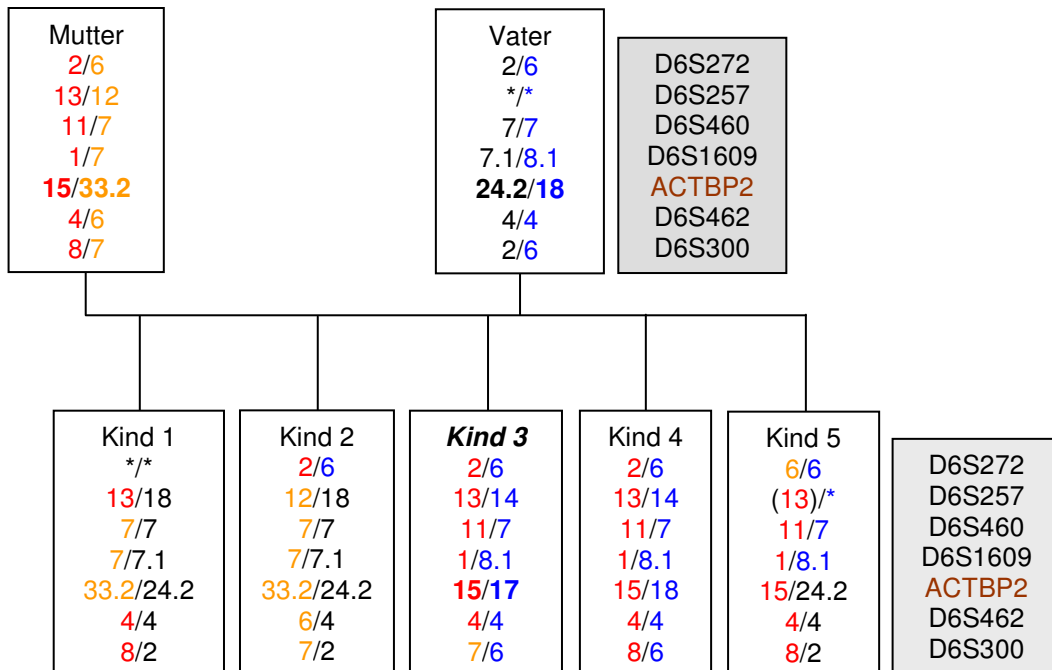
→ paternal 11 → 12

E040/2003



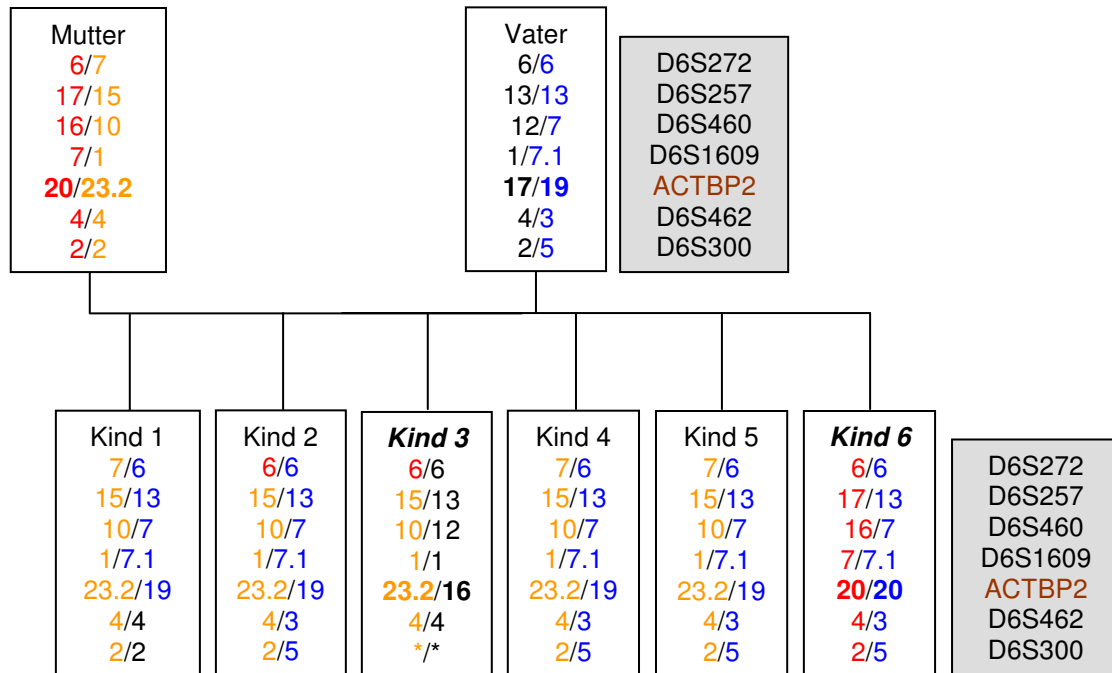
→ paternal 28.2 → 29.2

E040/1998



→ paternal 18 → 17

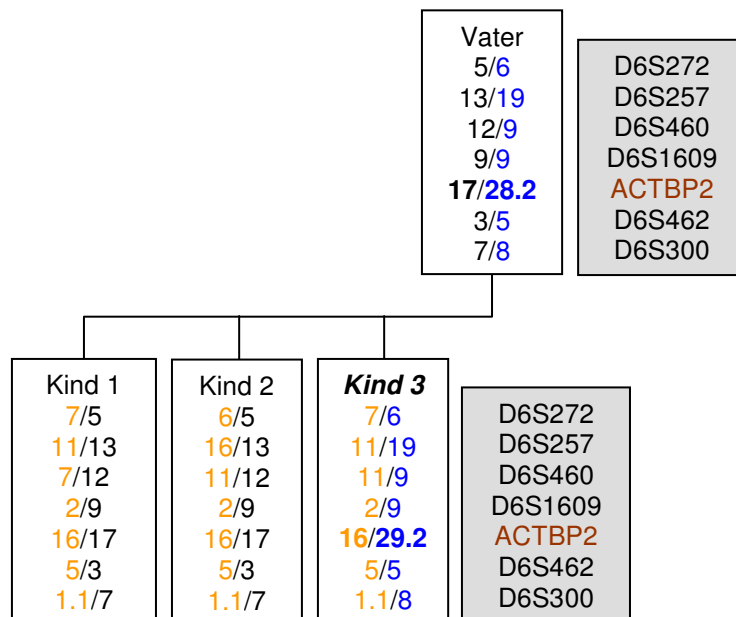
E084/1998



→ paternal 17 → 16 (Kind 3)

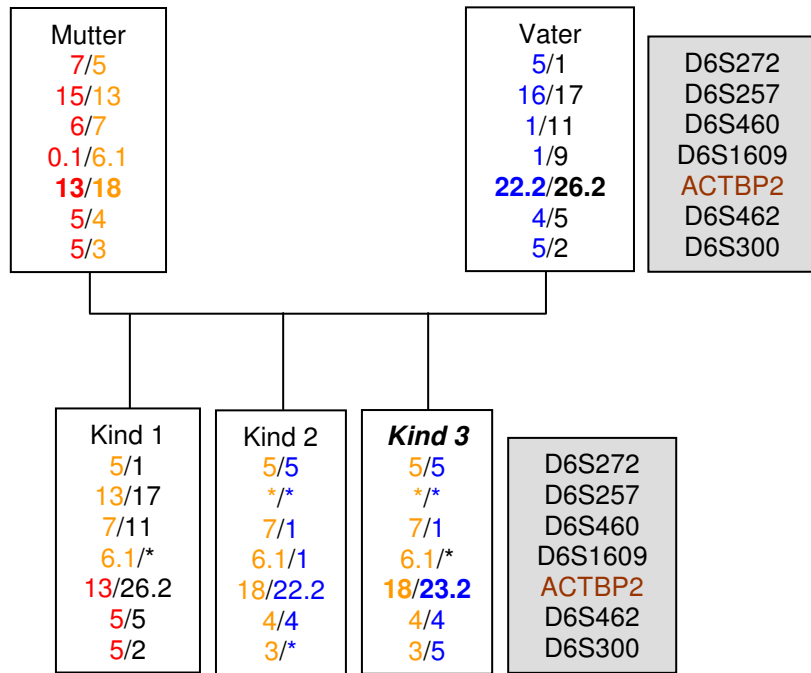
→ paternal 19 → 20 (Kind 6)

E068/2004



→ paternal 28.2 → 29.2; Defizienzfall

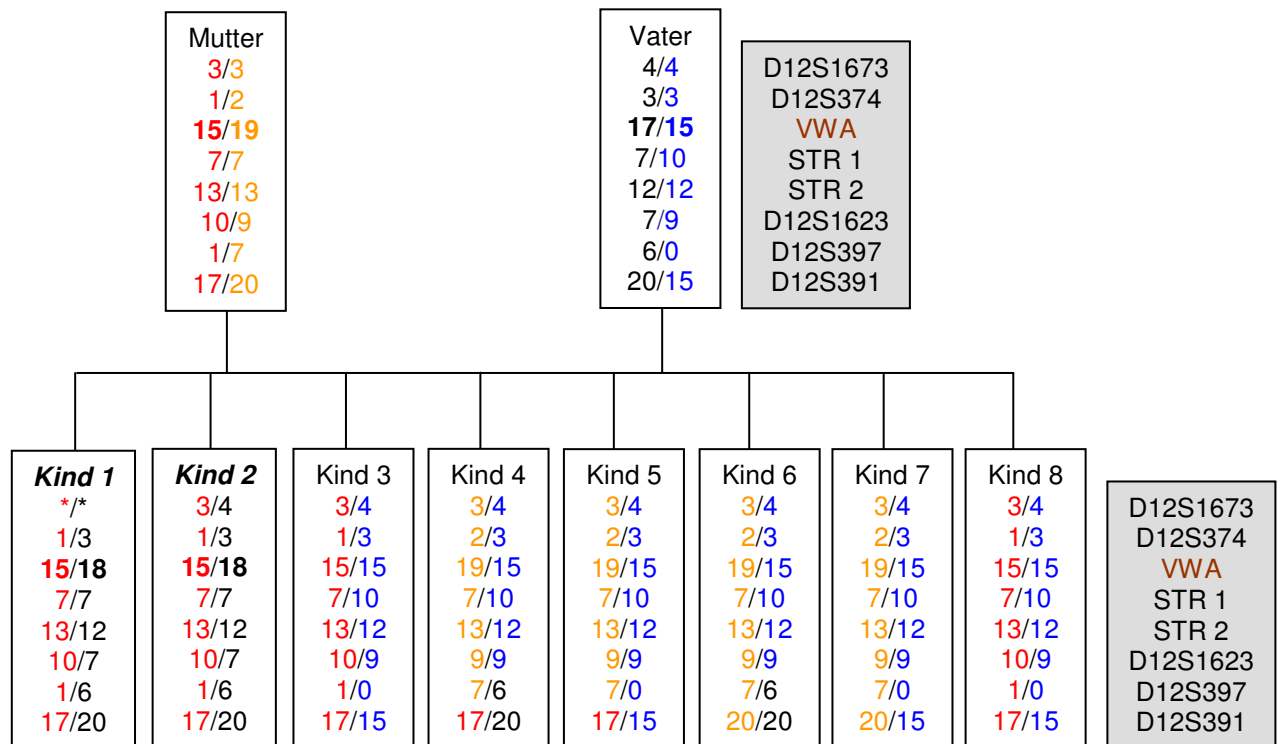
E345/2003



→ paternal 22.2 → 23.2

VWA

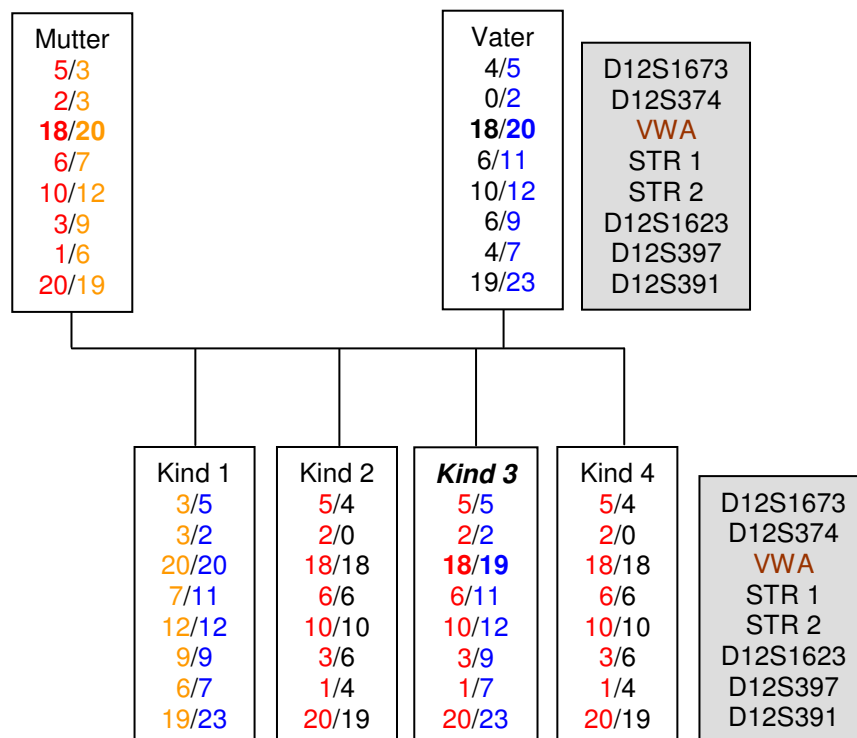
E102/1998



→ paternal 17 → 18

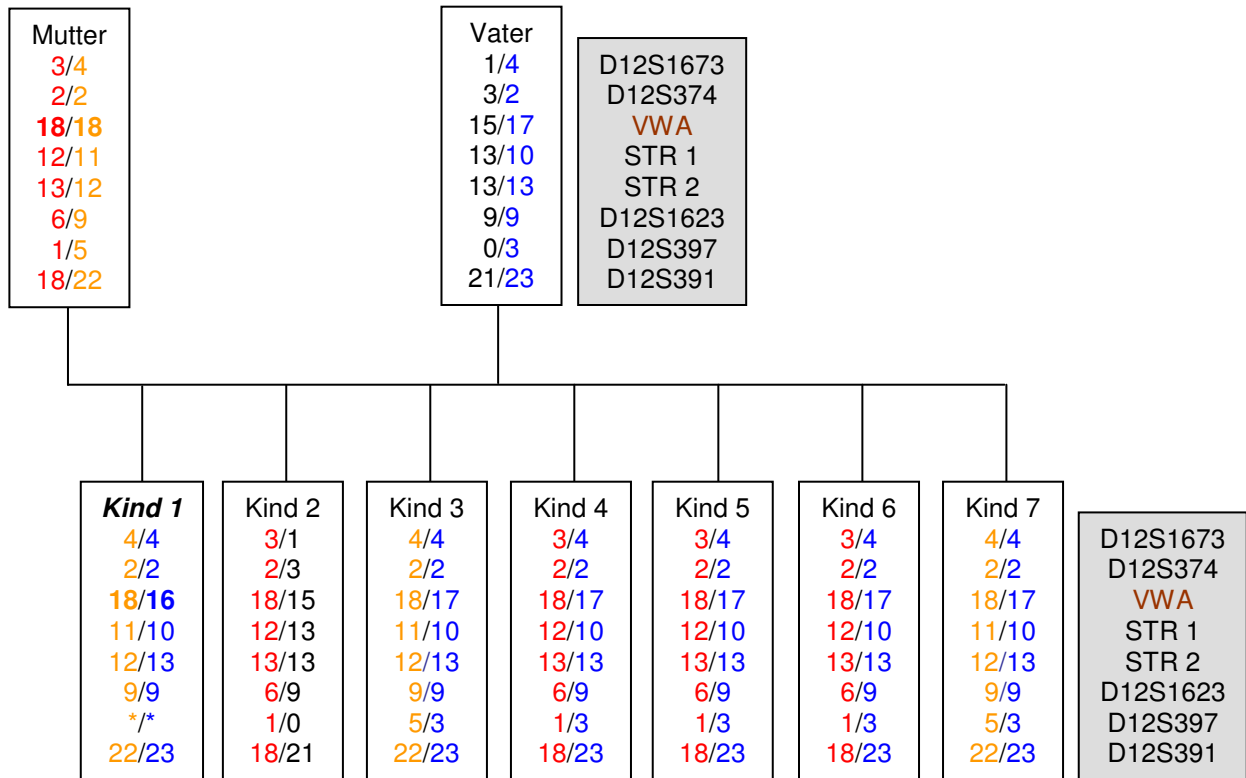
→ Kinder 1 und 2: eineiige Zwillinge

E029/1997



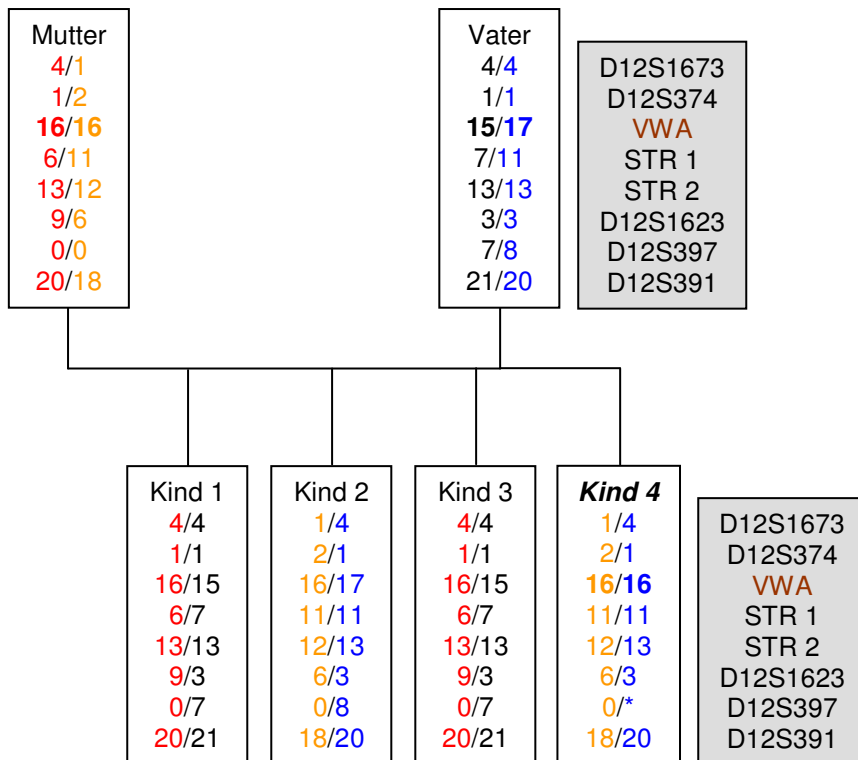
→ paternal 20 → 19

E176/1998



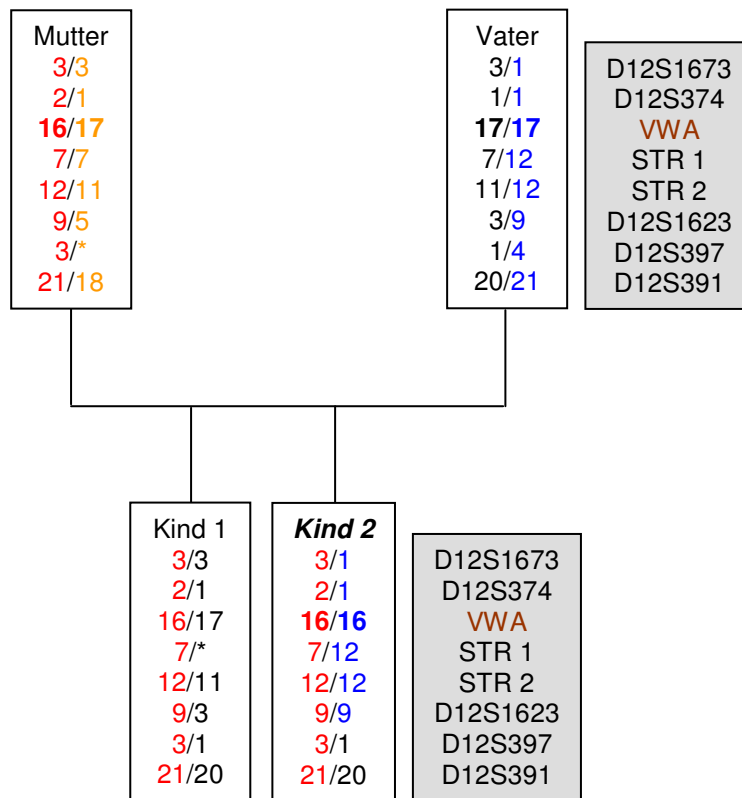
→ paternal 17 → 16

E334/1998



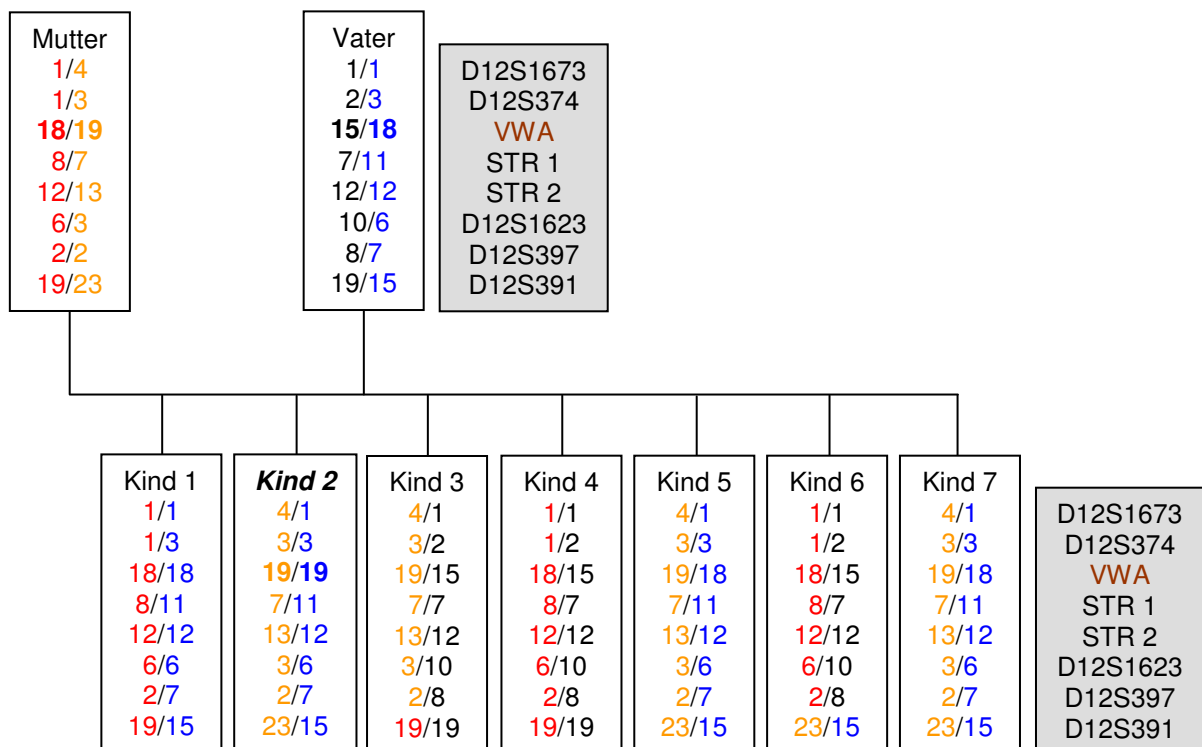
→ paternal 17 → 16

E101/2000



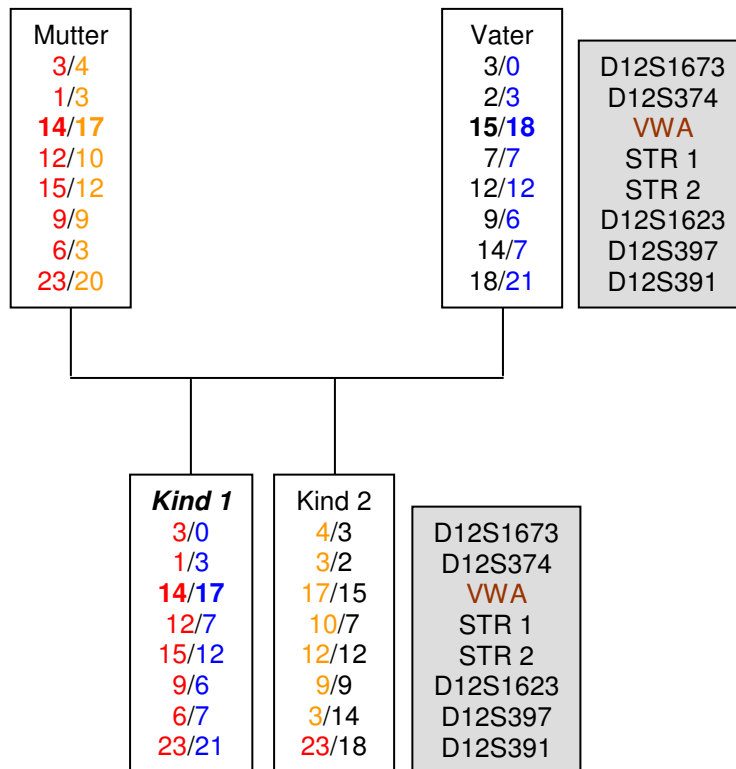
→ paternal 17 → 16

E190/2001



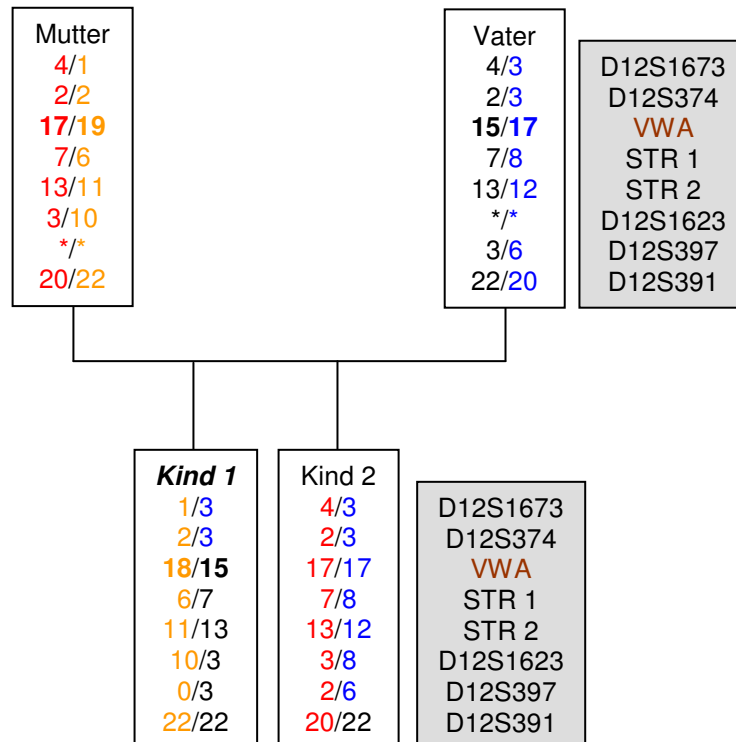
→ paternal 18 → 19

E226/1998



→ paternal 18 → 17

E130/2002

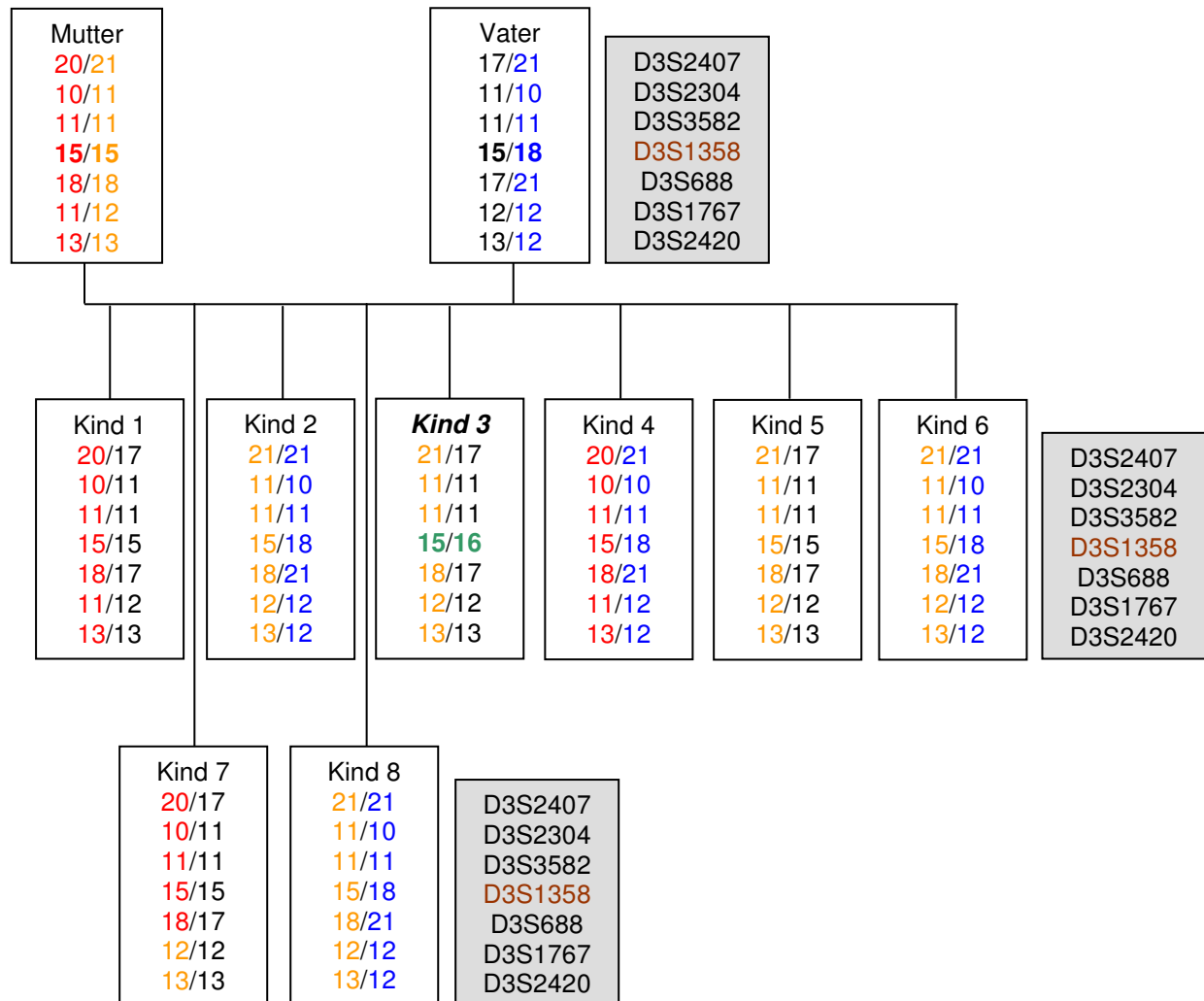


→ maternal 19 → 18

Ungeklärte Mehr-Kind-Familien (Kategorie 2.)

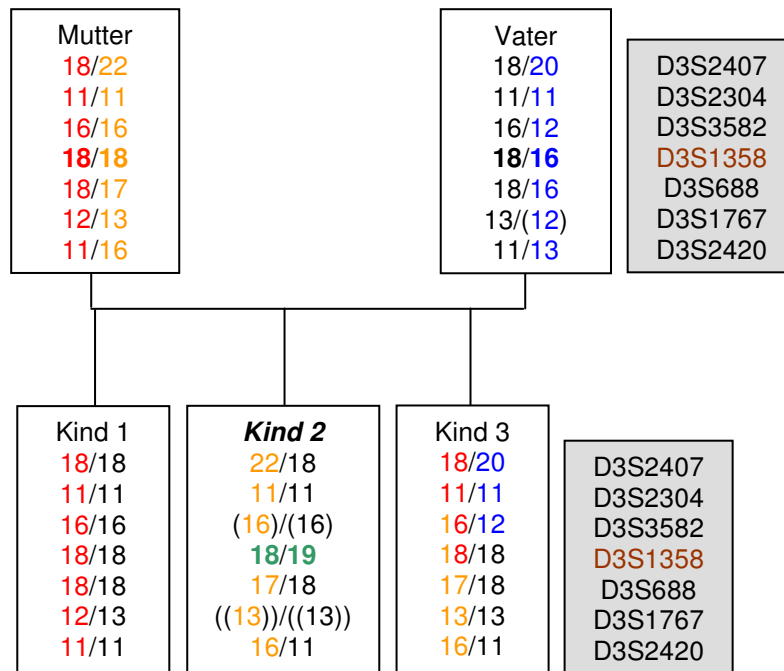
D3S1358

E189/2001



→ Ursprung ungeklärt, 1-Step- und Gewinnmutation

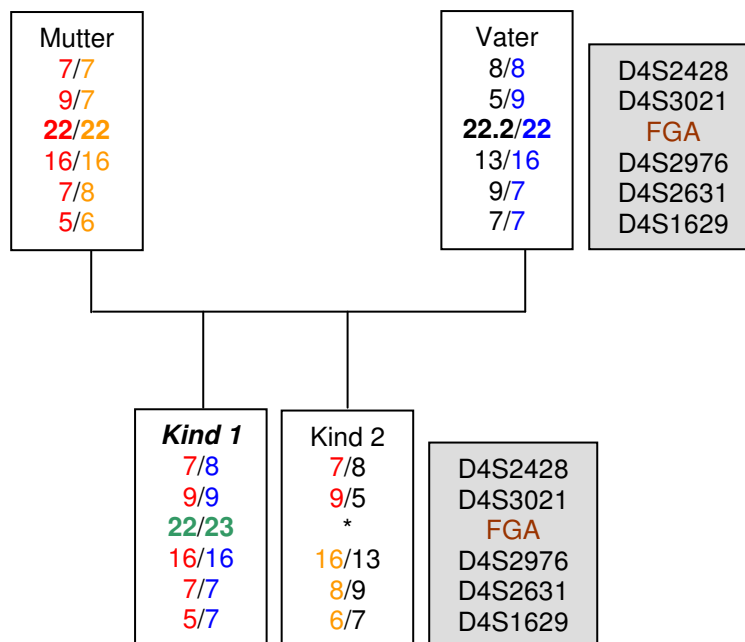
E247/1998



→ Ursprung ungeklärt, 1-step- und Gewinn-Mutation

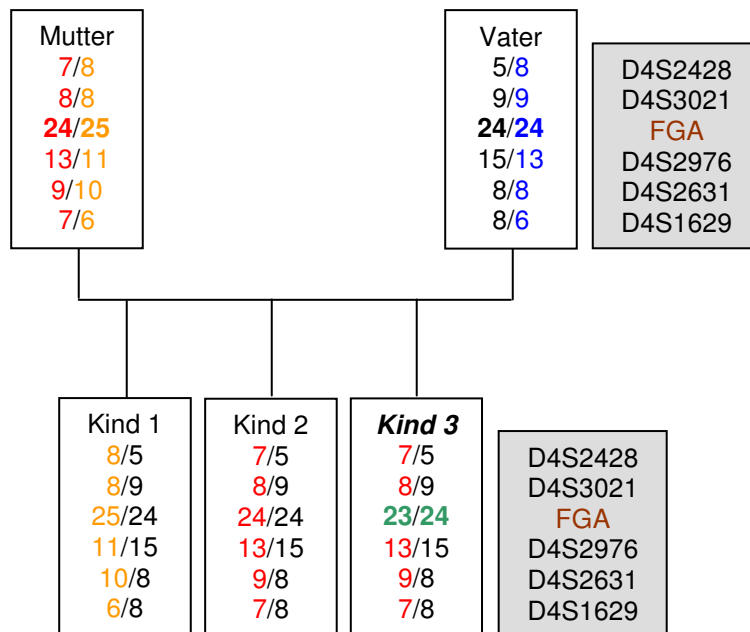
FGA

BG11/50



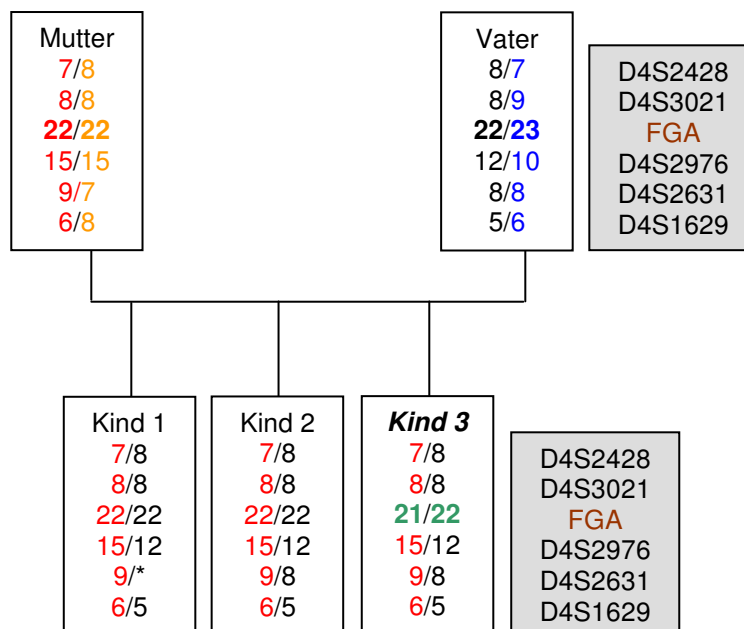
→ Ursprung ungeklärt, 1-Step- und Gewinnmutation

E002/2003



→ Ursprung ungeklärt, 1-Step- und Verlustmutation

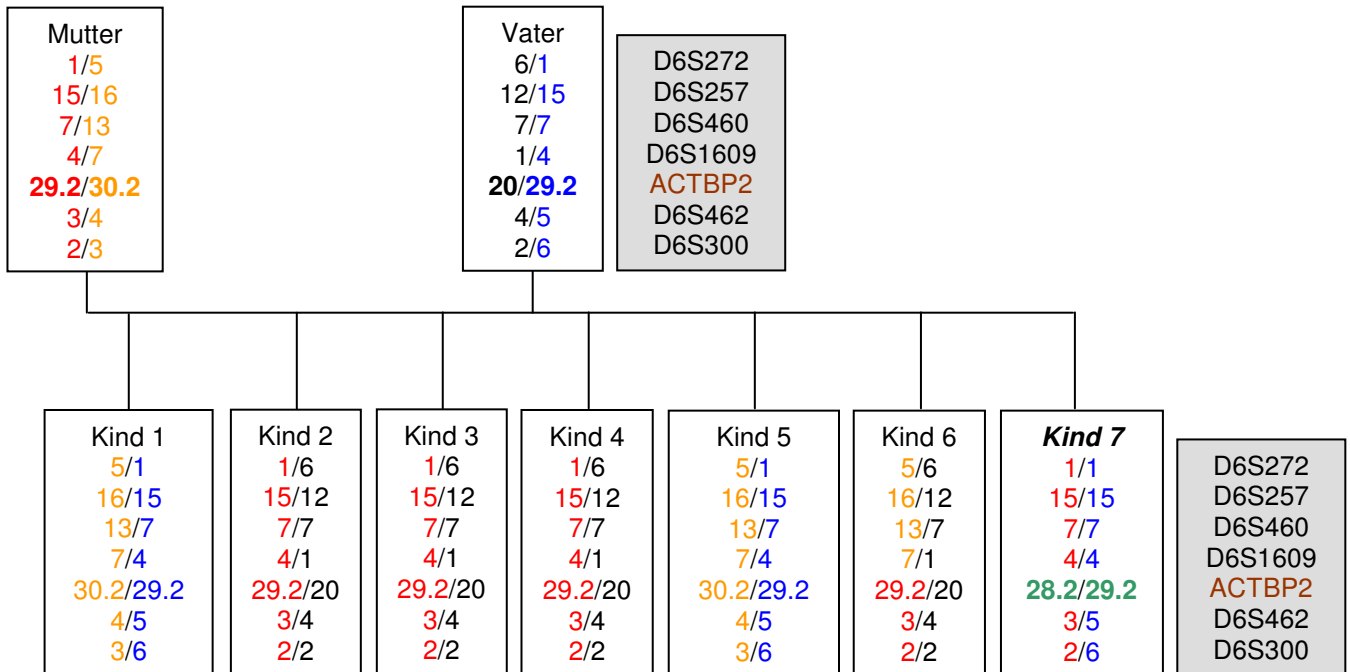
E182/04



→ Ursprung ungeklärt, 1-Step- und Verlustmutation

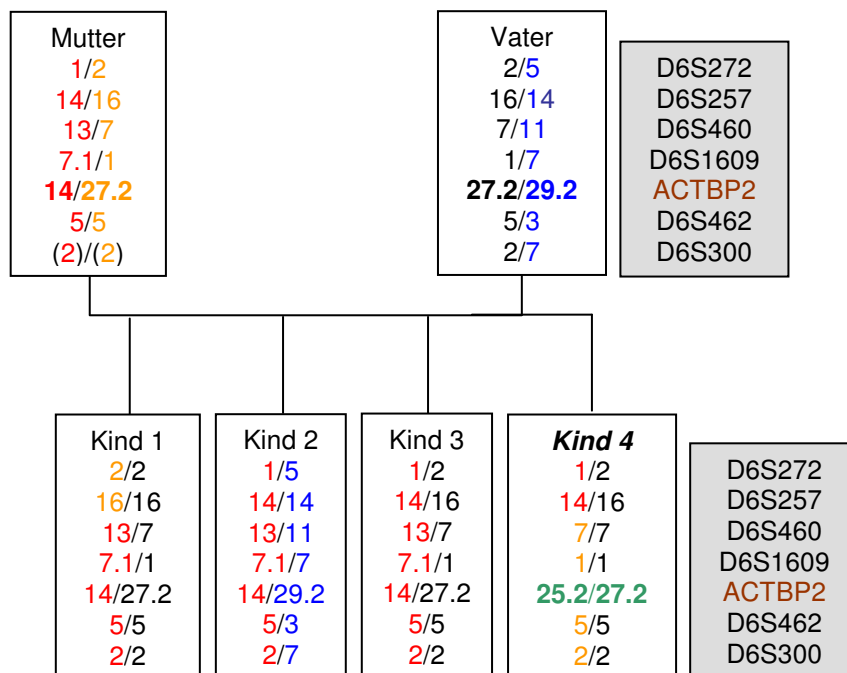
ACTBP2

E074/2002



→ Ursprung ungeklärt, 1-Step- und Verlustmutation

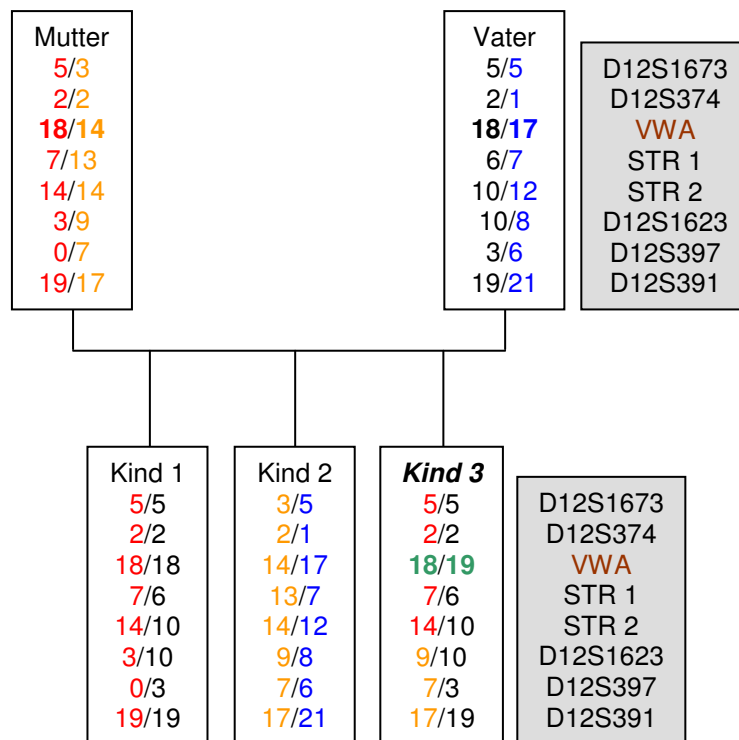
E405/2002



→ Ursprung ungeklärt, 2-Step- und Verlustmutation

VWA

E330/1998

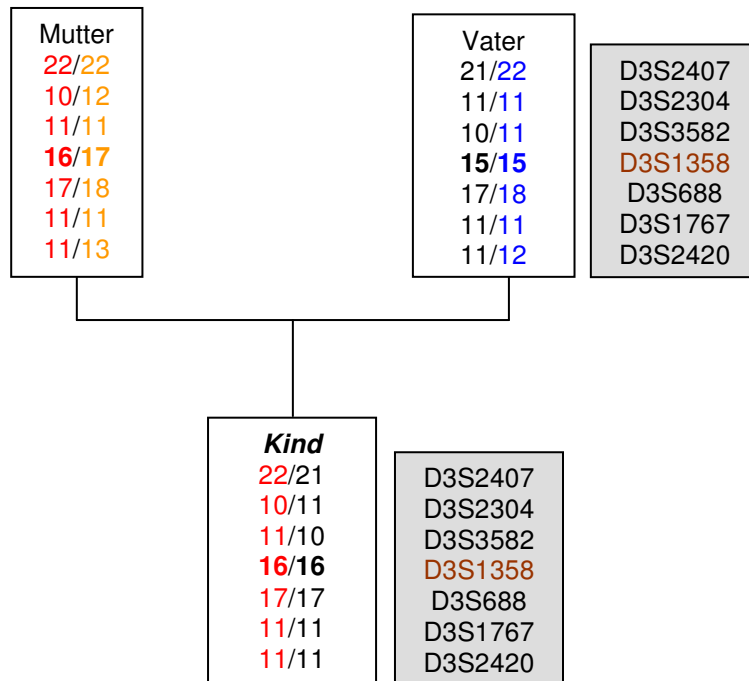


→ Ursprung ungeklärt, 1-Step- und Verlustmutation

Ein-Kind-Familien (Kategorie 3a)

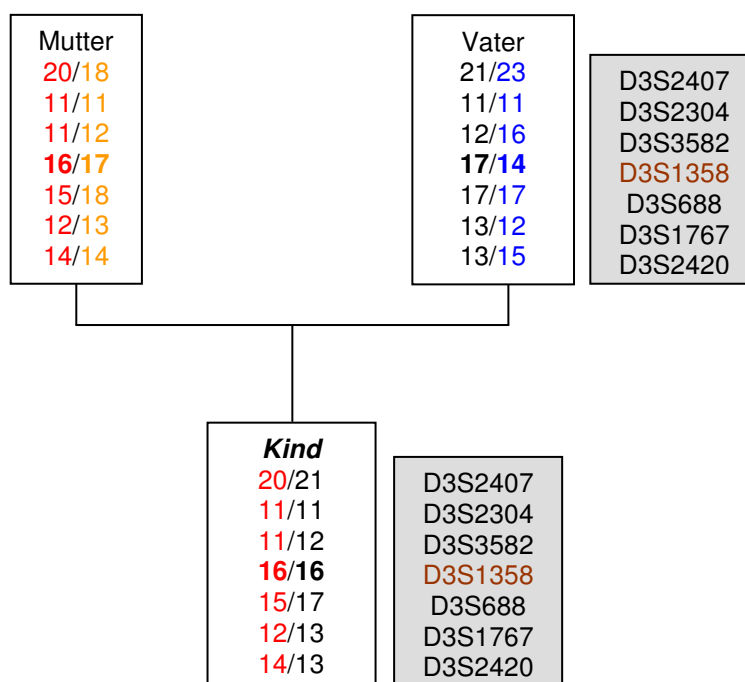
D3S1358

BG42/67



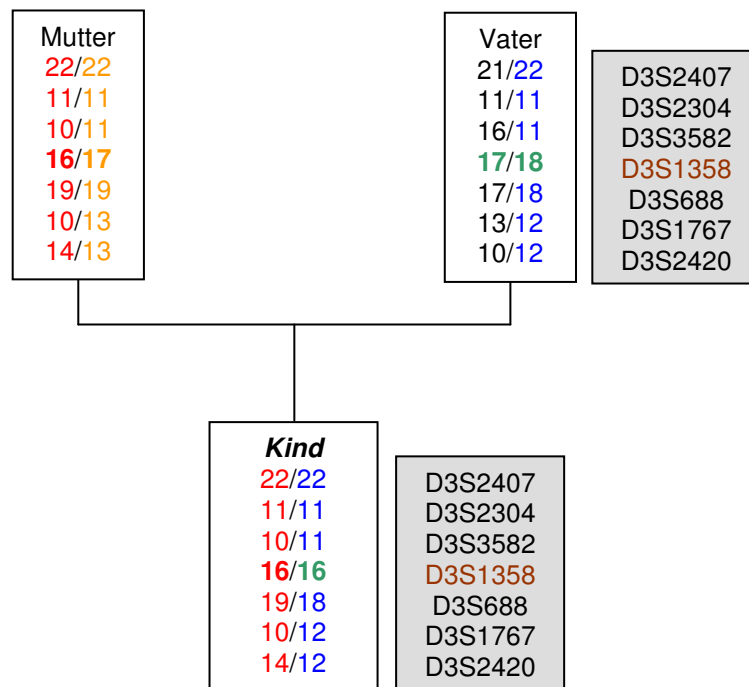
→ geklärt durch Annahmen, paternal 15 → 16

G262/99



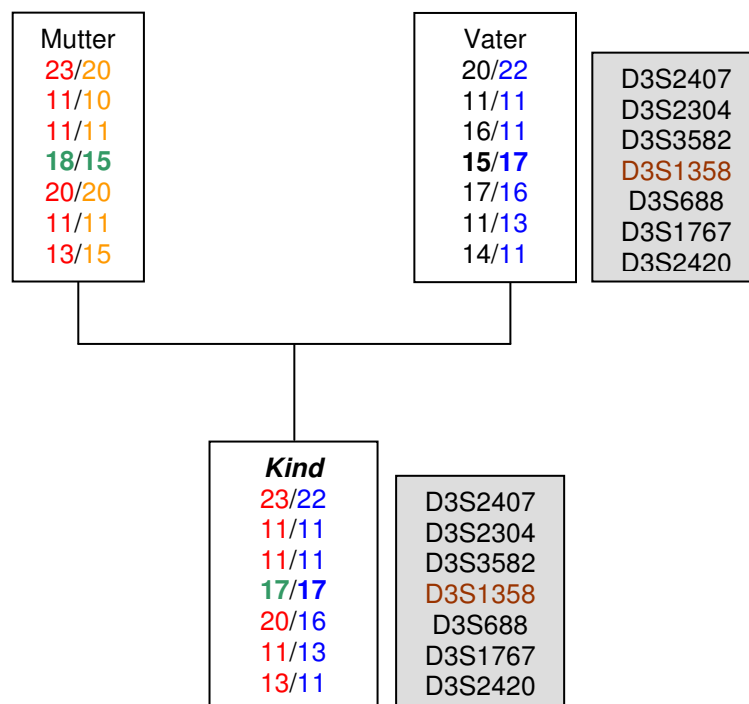
→ geklärt durch Annahmen, paternal 17 → 16

BG11/62



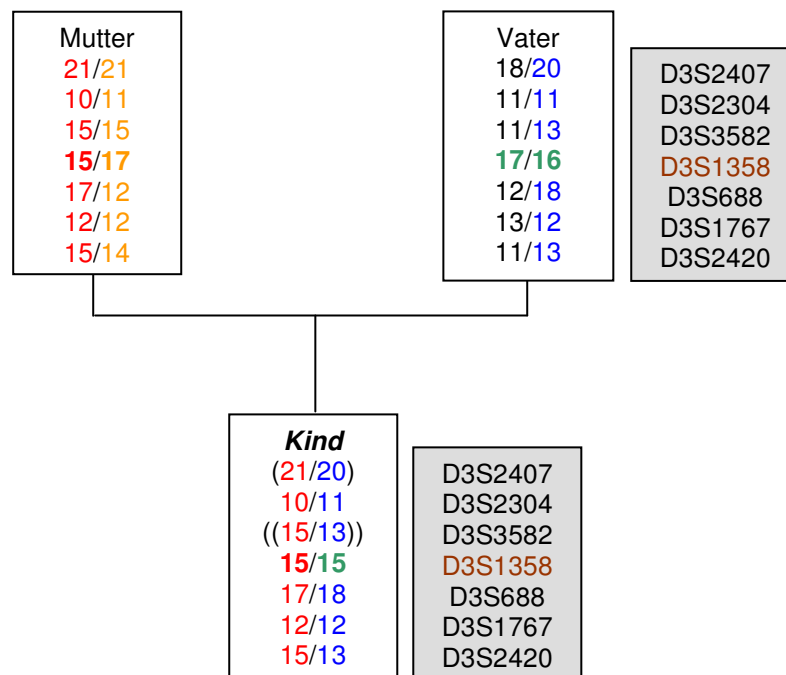
→ paternal durch Annahmen, nur Verlust möglich, Grad ungeklärt

BG21/23



→ maternal durch Annahmen, Auswirkung und Grad ungeklärt

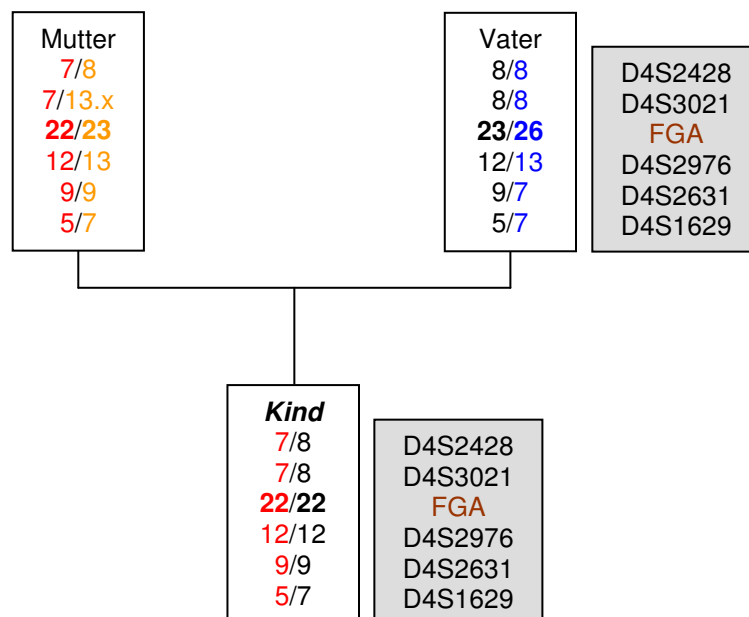
E046/2003



→ paternal durch Annahmen, nur Verlust möglich, Grad ungeklärt

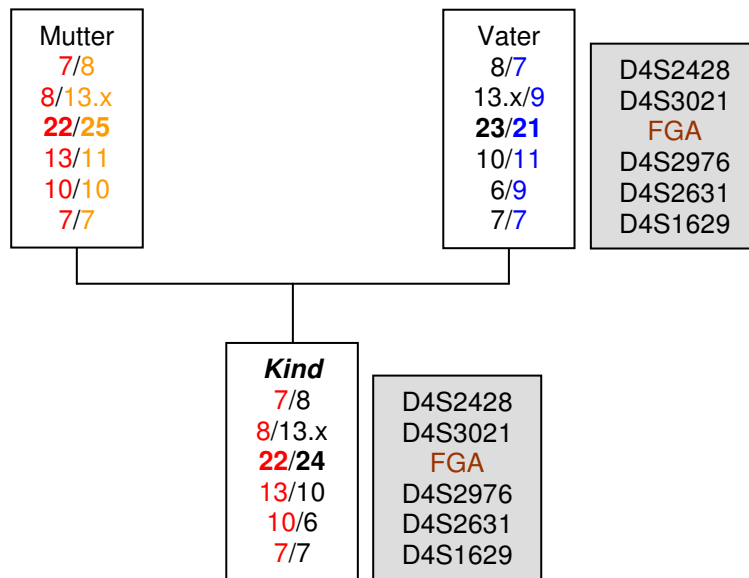
FGA

BG72/44



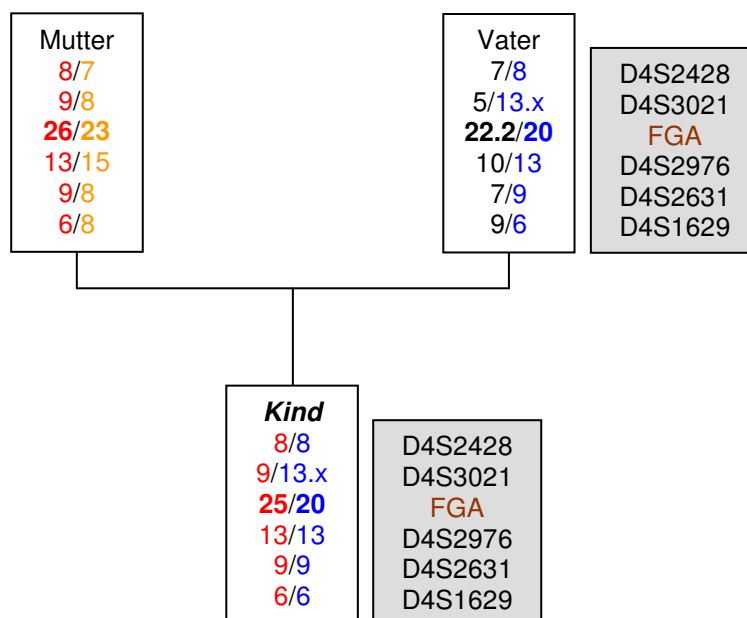
→ geklärt durch Annahmen, paternal 23 → 22

BG62/30



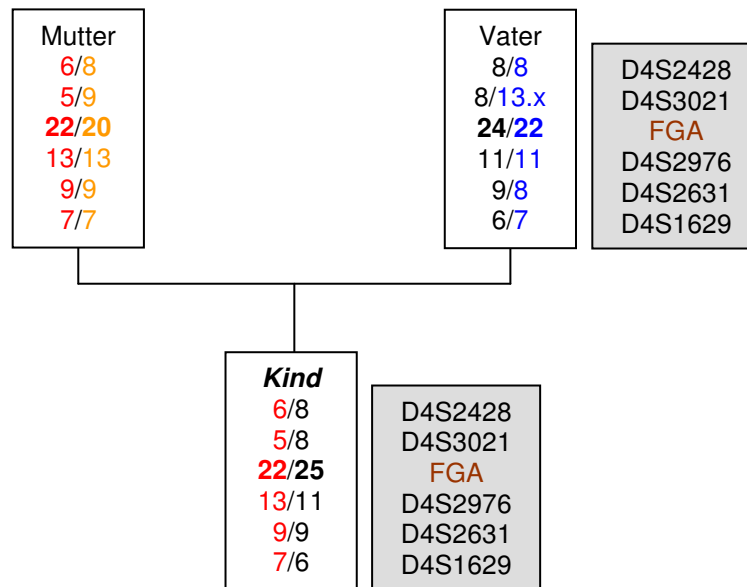
→ geklärt durch Annahmen, paternal 23 → 24

90/12



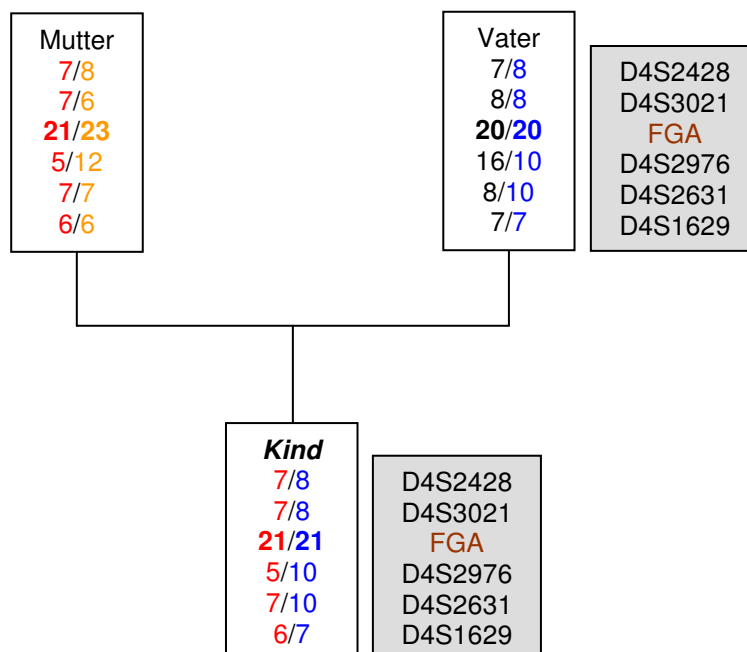
→ geklärt durch Annahmen, maternal 26 → 25

D40/99



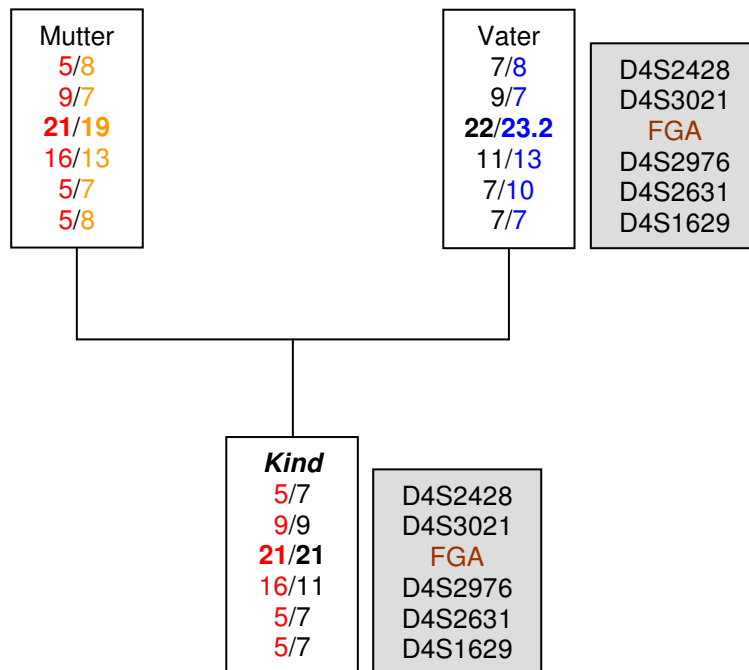
→ geklärt durch Annahmen, paternal 24 → 25

G355/96



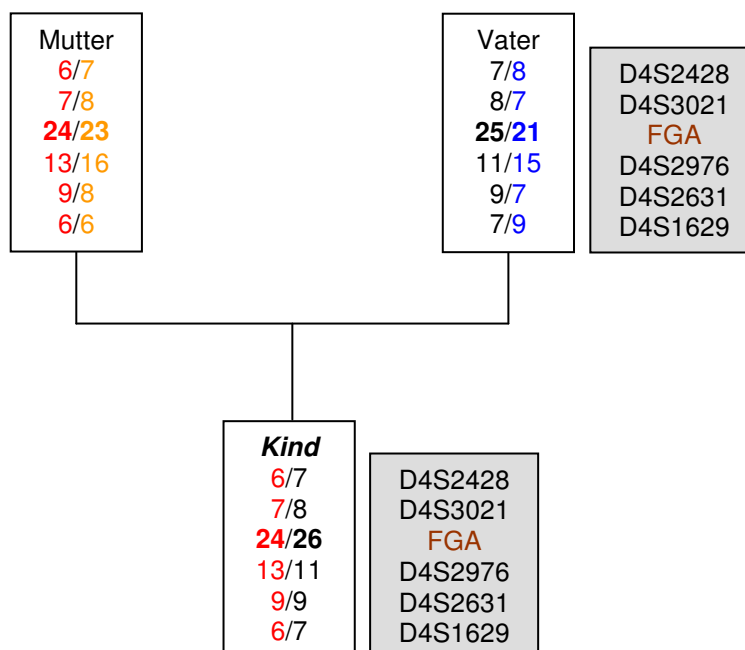
→ geklärt durch Annahmen, paternal 20 → 21

G87/98



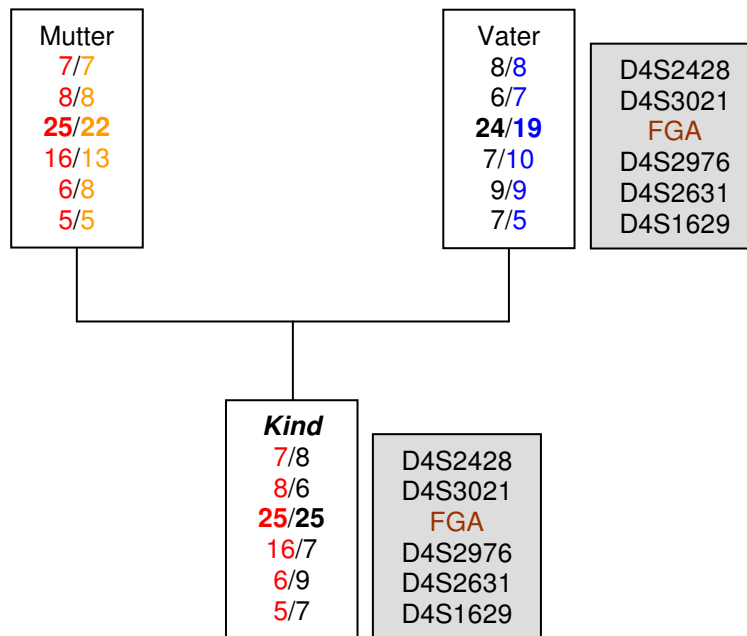
→ geklärt durch Annahmen, paternal 22 → 21

G111/98



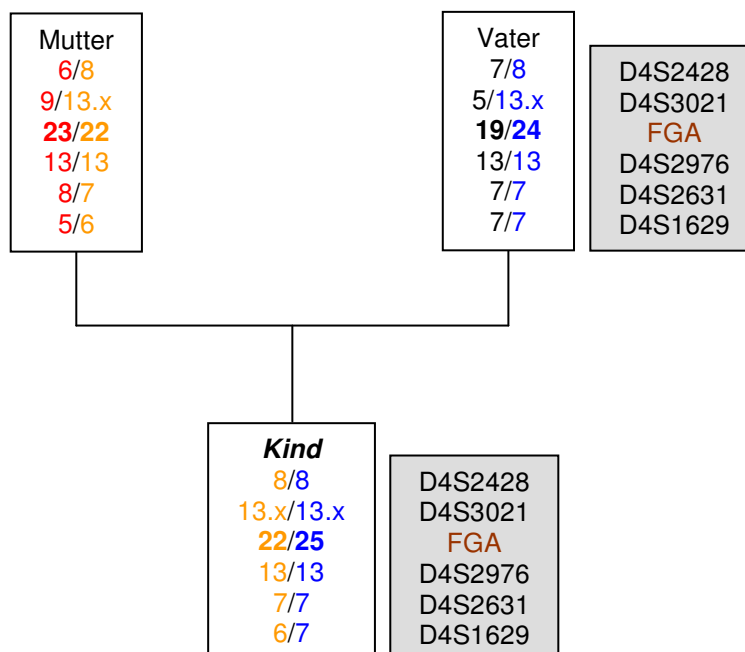
→ geklärt durch Annahmen, paternal 25 → 26

E407/2002



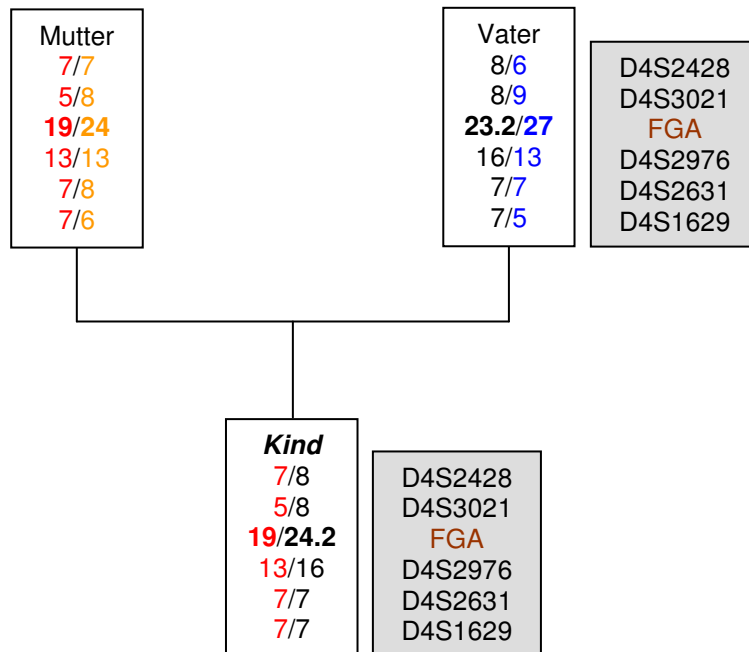
→ geklärt durch Annahmen, paternal 24 → 25

D56/00a



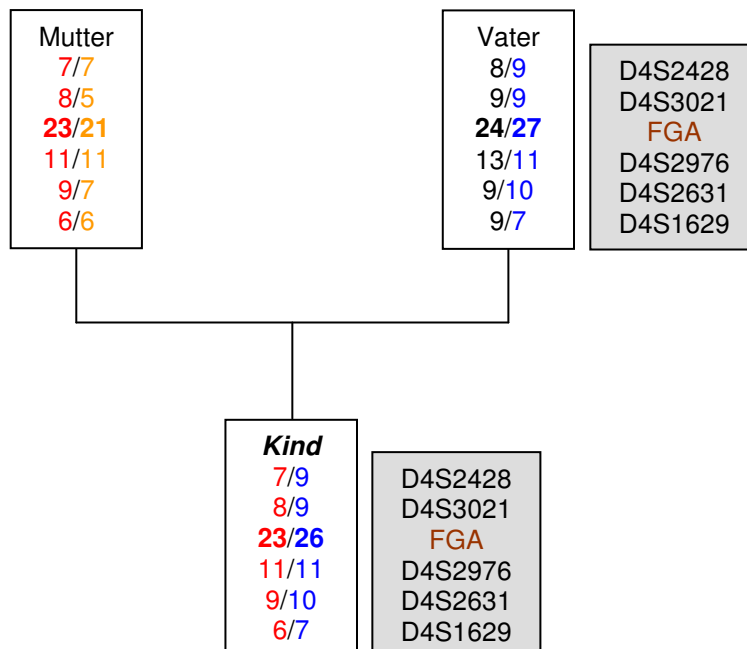
→ geklärt durch Annahmen, paternal 24 → 25

E171/04



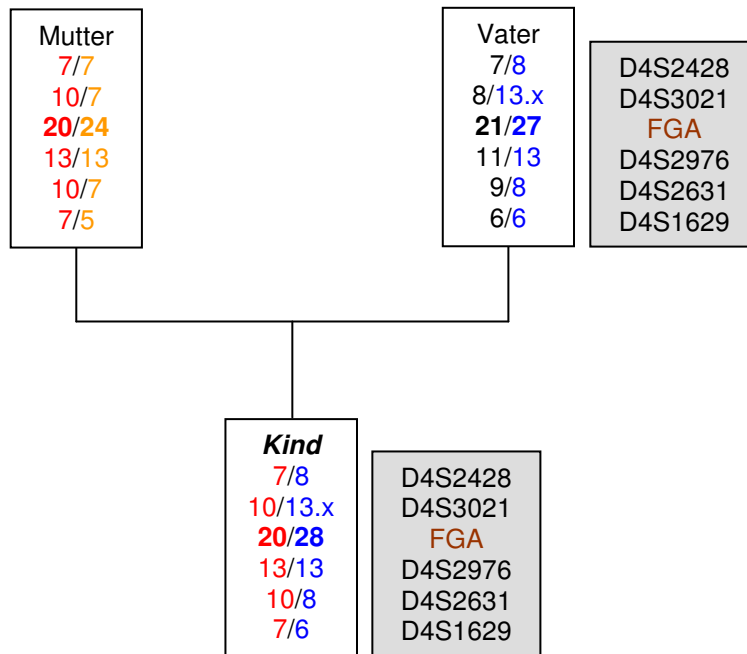
→ geklärt durch Annahmen, paternal 23.2 → 24.2

D296/02



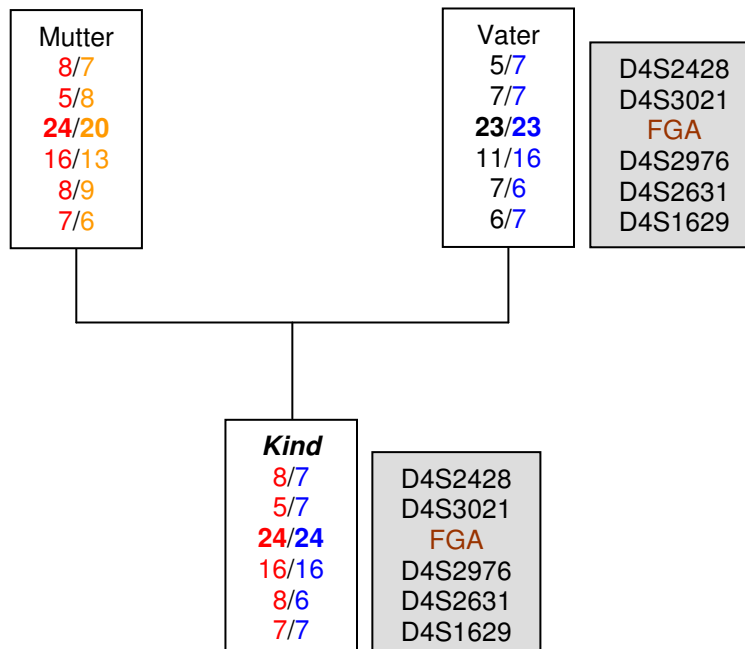
→ geklärt durch Annahmen, paternal 27 → 26

D104/03



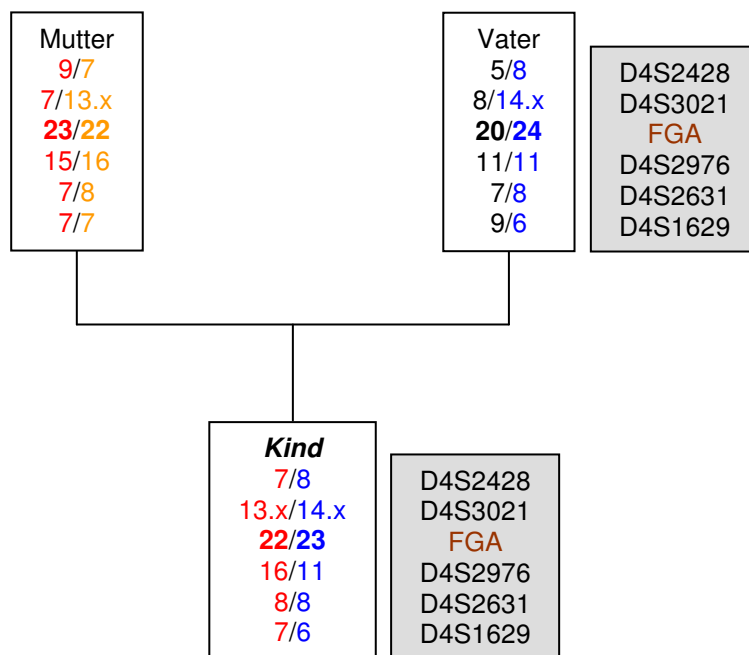
→ geklärt durch Annahmen, paternal 27 → 28

D150/03



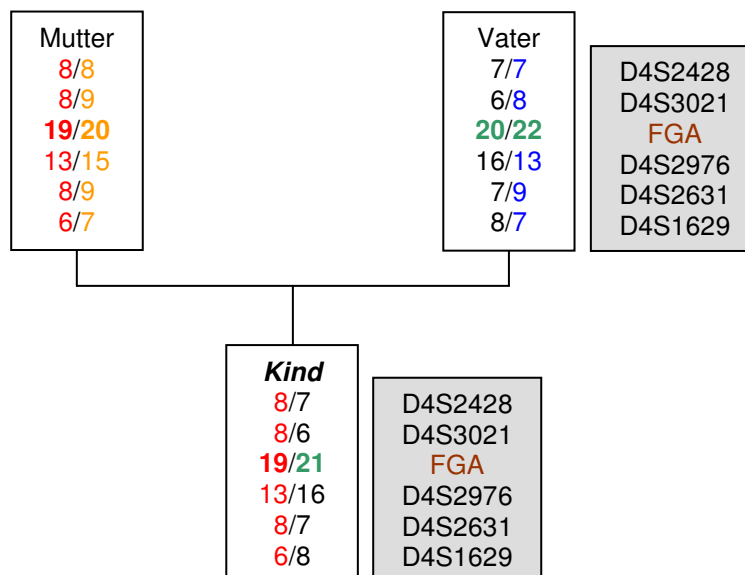
→ geklärt durch Annahmen, paternal 23 → 24

D141/02



→ geklärt durch Annahmen, paternal 24 → 23

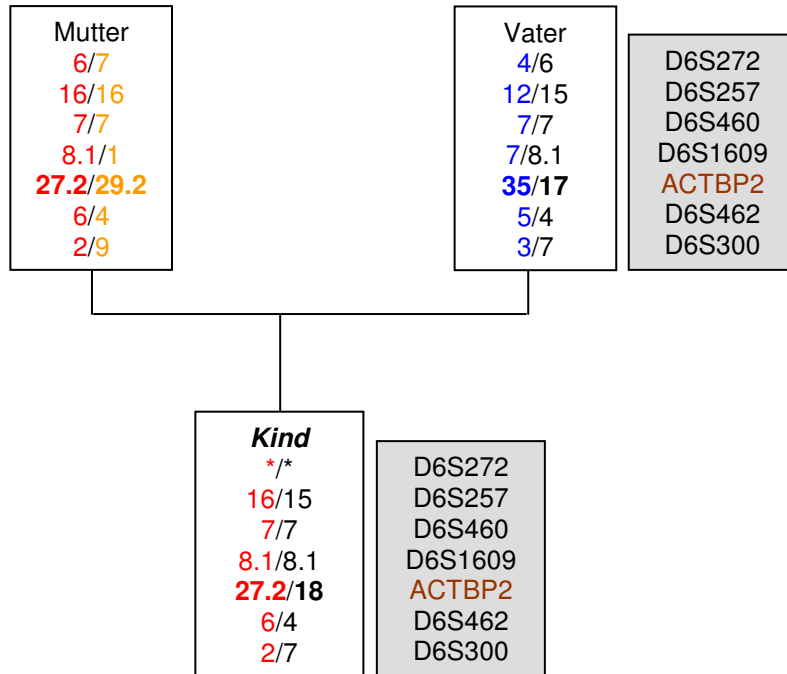
D363/03



→ paternal durch Annahmen, nur 1-Schritt möglich, Auswirkung ungeklärt

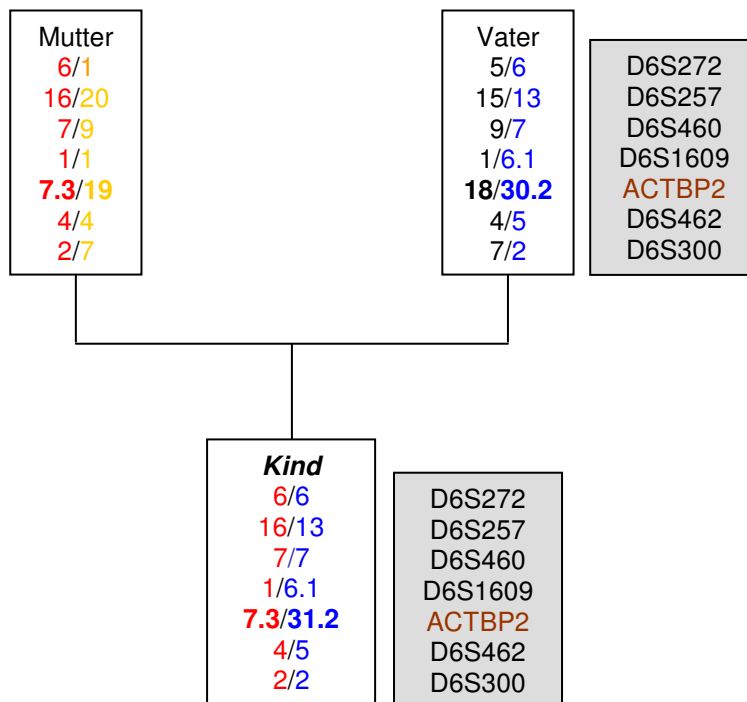
ACTBP2

D010/96M



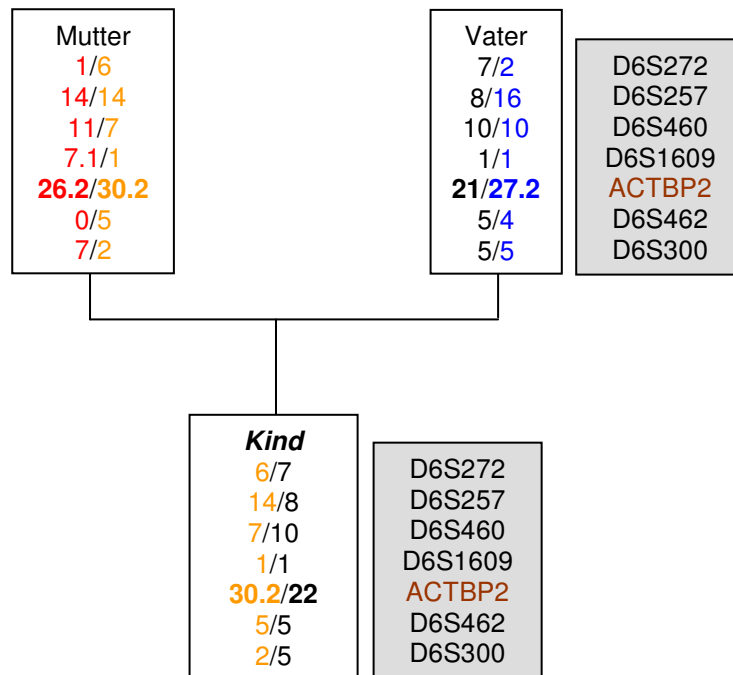
→ geklärt durch Annahmen, paternal 17 → 18

E166/2001



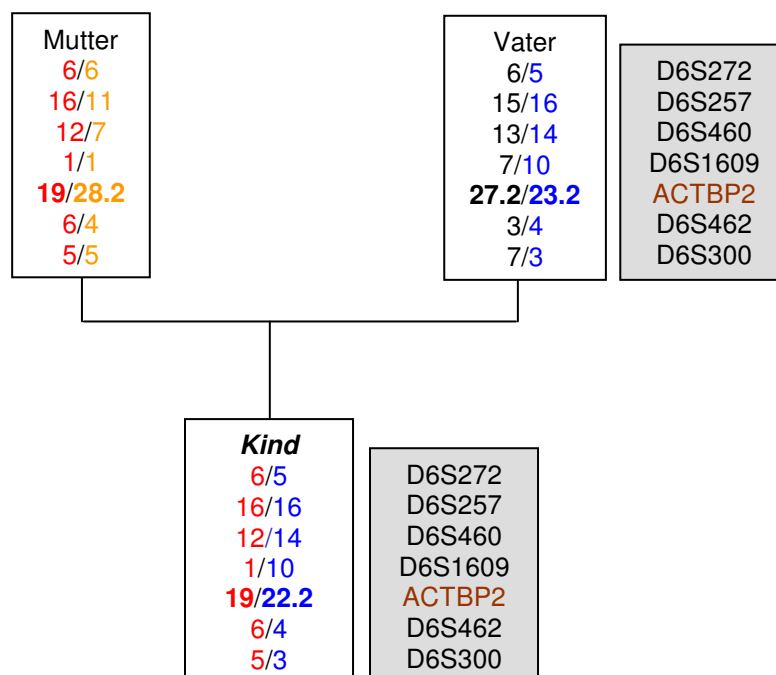
→ geklärt durch Annahmen, paternal 30.2 → 31.2

(BG) 167/1996M



→ geklärt durch Annahmen, paternal 21 → 22

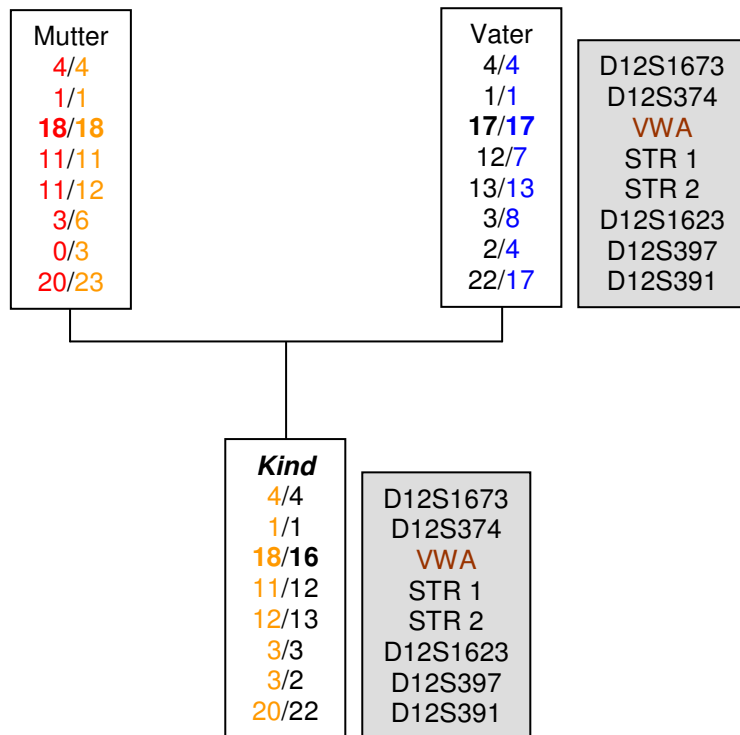
D044/95M



→ geklärt durch Annahmen, paternal 23.2 → 22.2

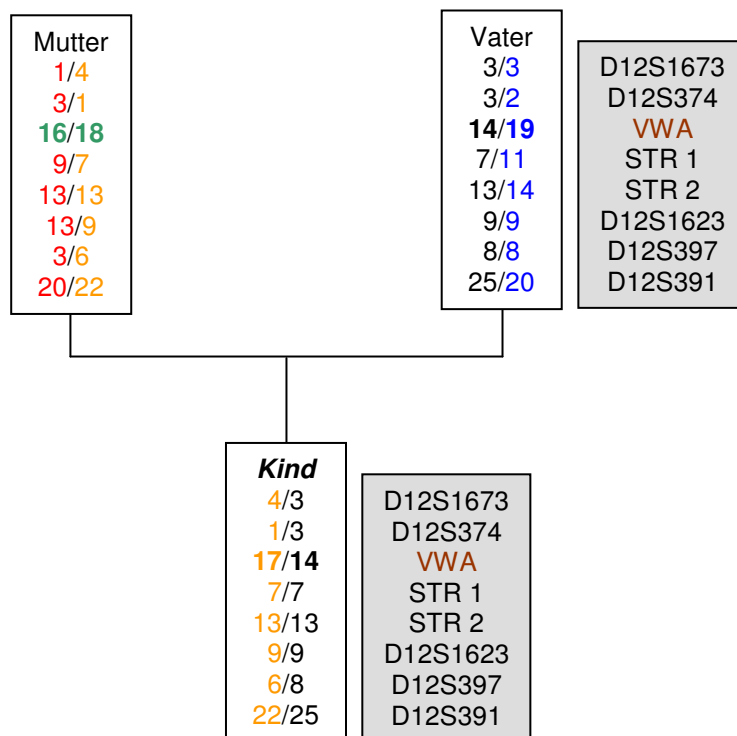
VWA

E007/2001



→ geklärt durch Annahmen, paternal 17 → 16

E223/2001

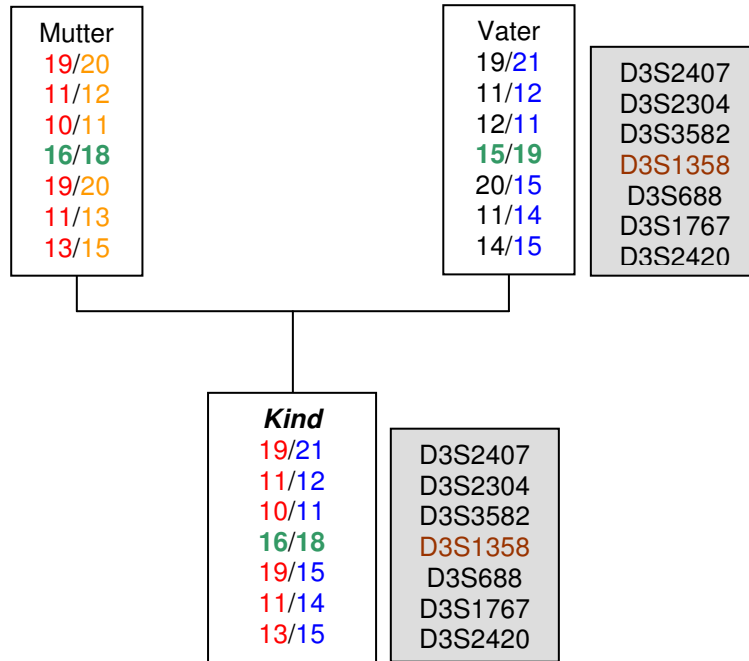


→ maternal durch Annahmen, nur 1-Schritt möglich, Auswirkung ungeklärt

Ein-Kind-Familien (Kategorie 3b)

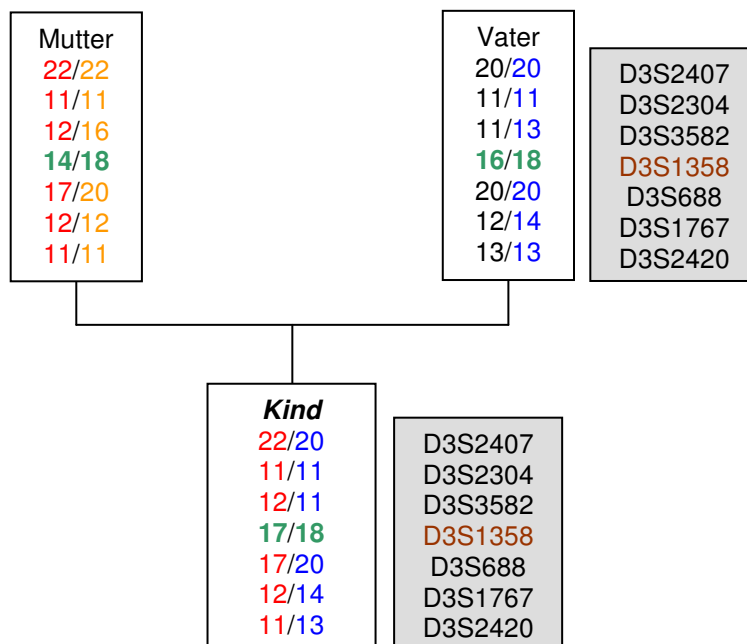
D3S1358

G57/98



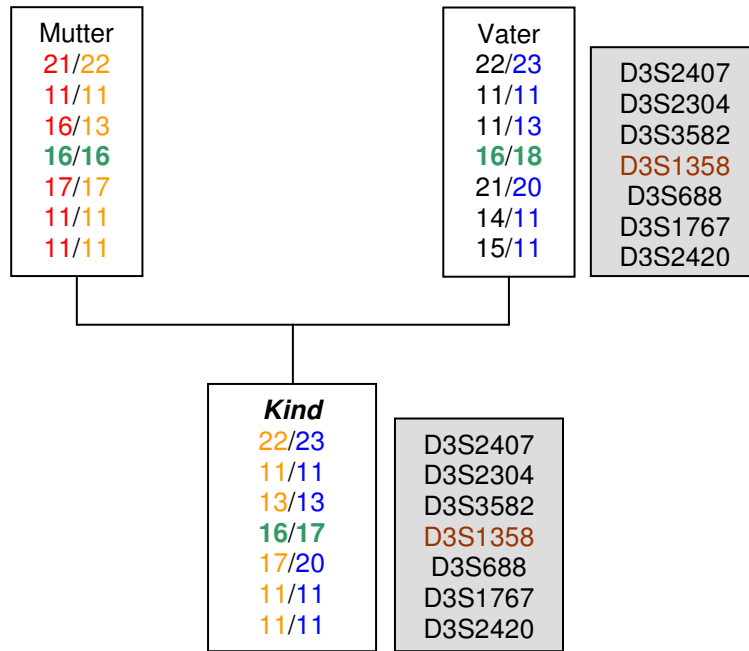
→ ungeklärt; paternal nach Annahmen

D157/01



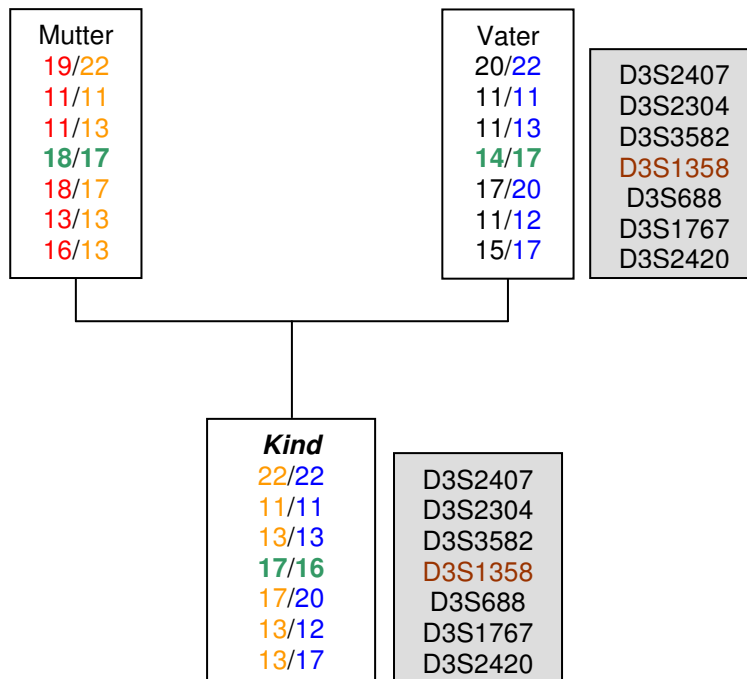
→ ungeklärt

G120/99



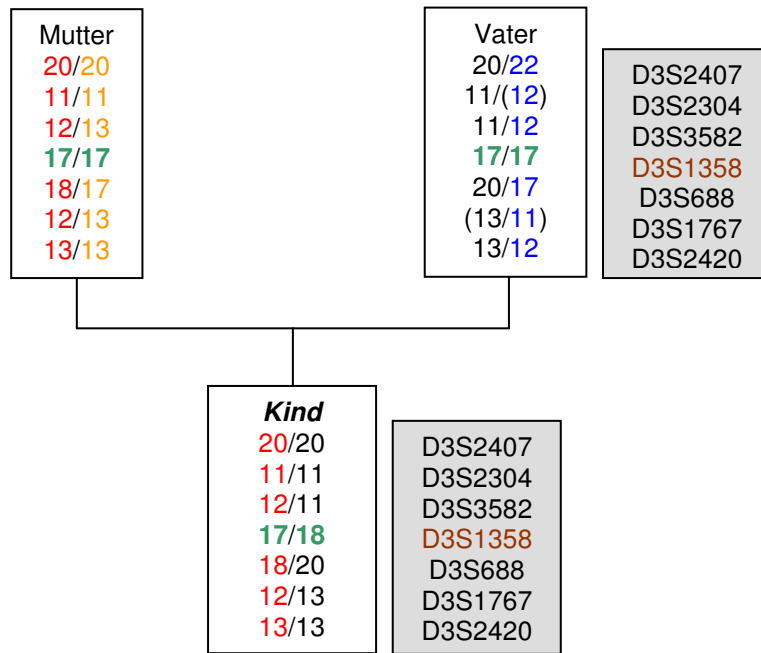
→ ungeklärt

BG20/78



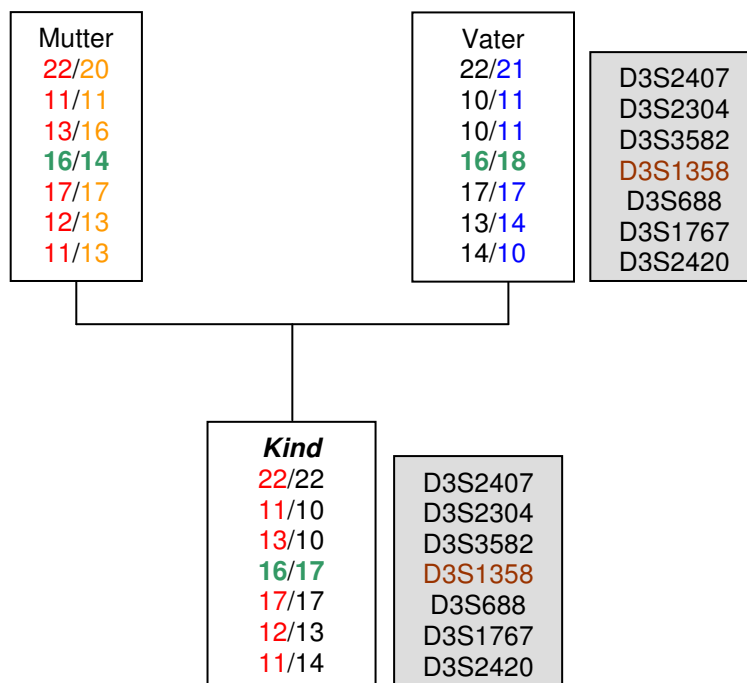
→ ungeklärt

E089/2000



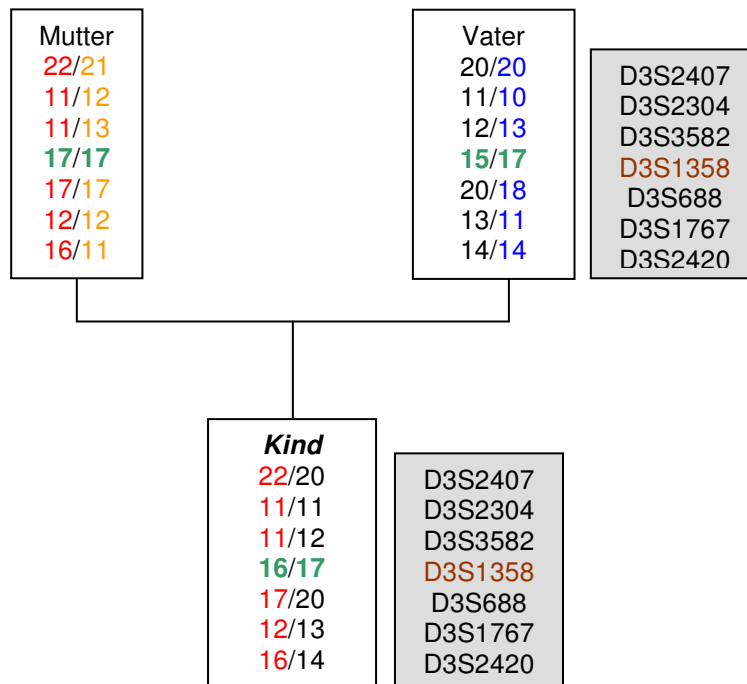
→ ungeklärt

D396/03



→ ungeklärt

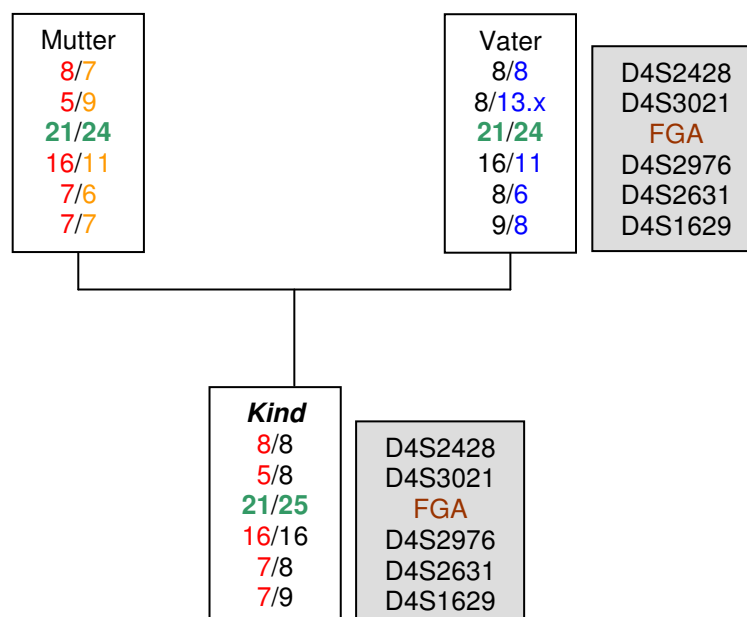
G7/02



→ ungeklärt

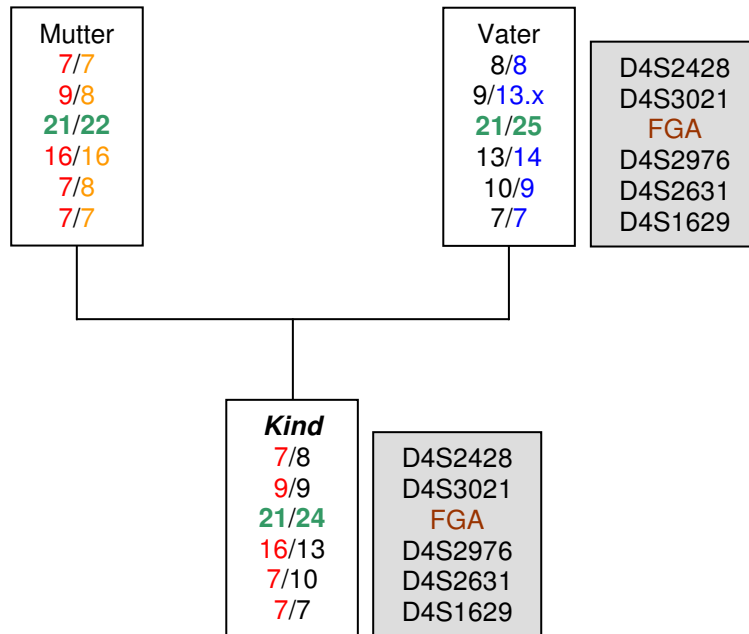
FGA

BG72/23



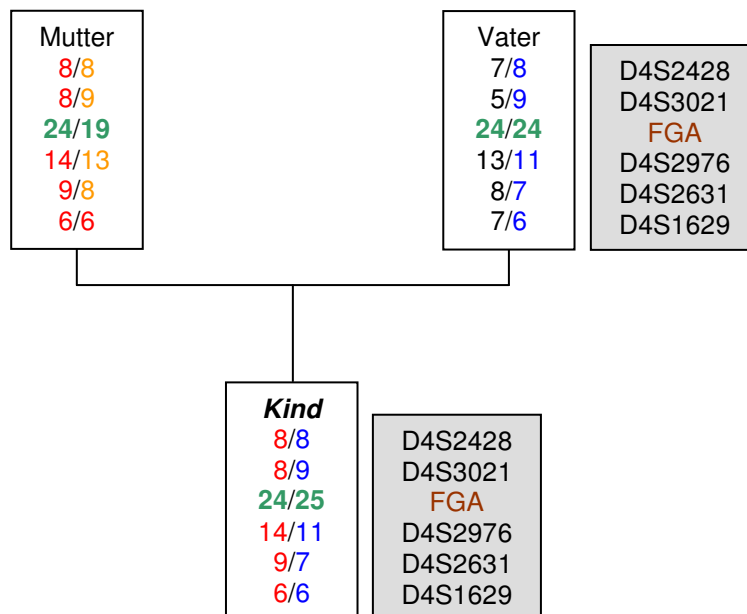
→ ungeklärt

BG71/22



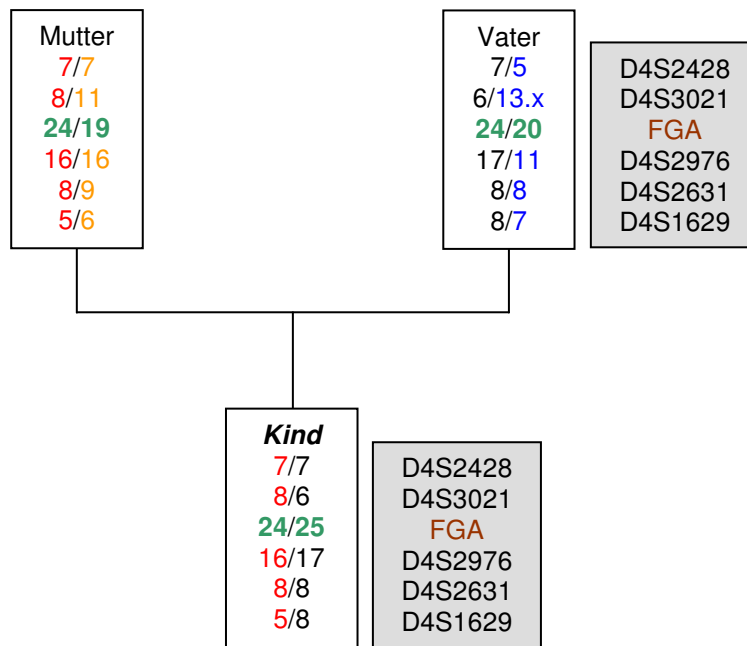
→ ungeklärt

BG61/78



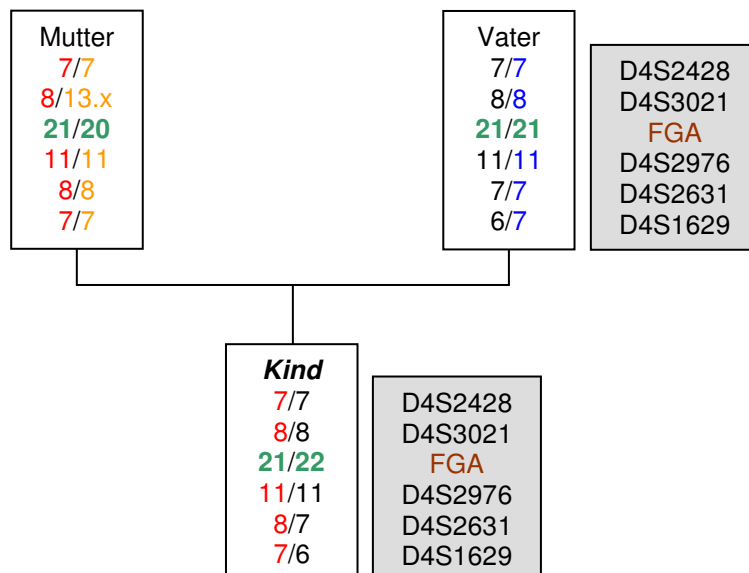
→ ungeklärt

D33/98



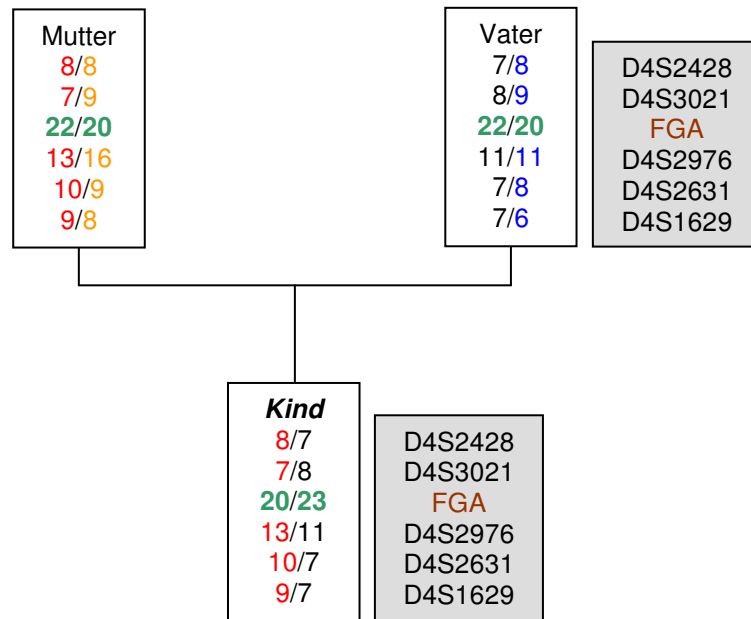
→ ungeklärt

G137/97



→ ungeklärt

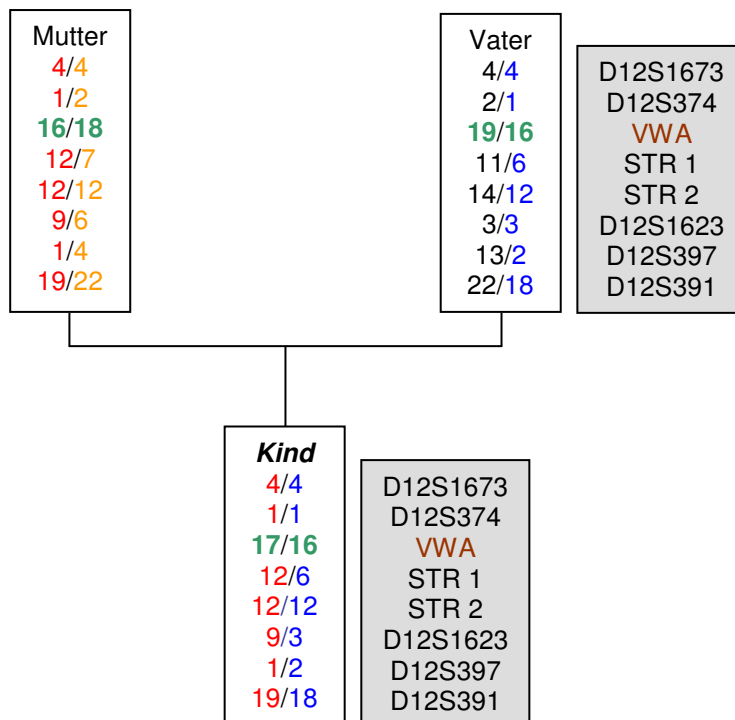
BG40/29



→ ungeklärt

VWA

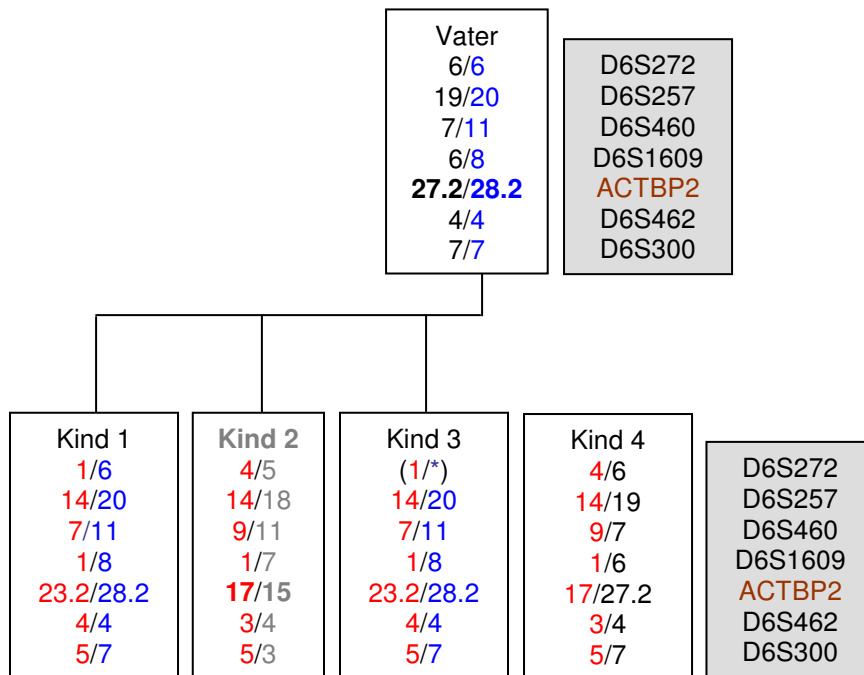
E260/1998



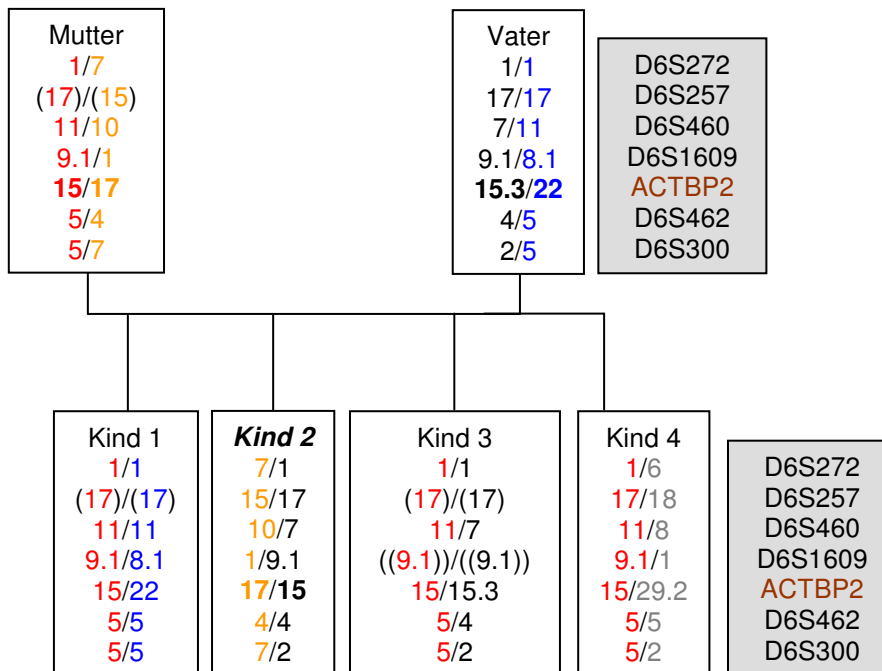
→ ungeklärt

9.9 Zwei besondere Fallkonstellationen

E158/2000



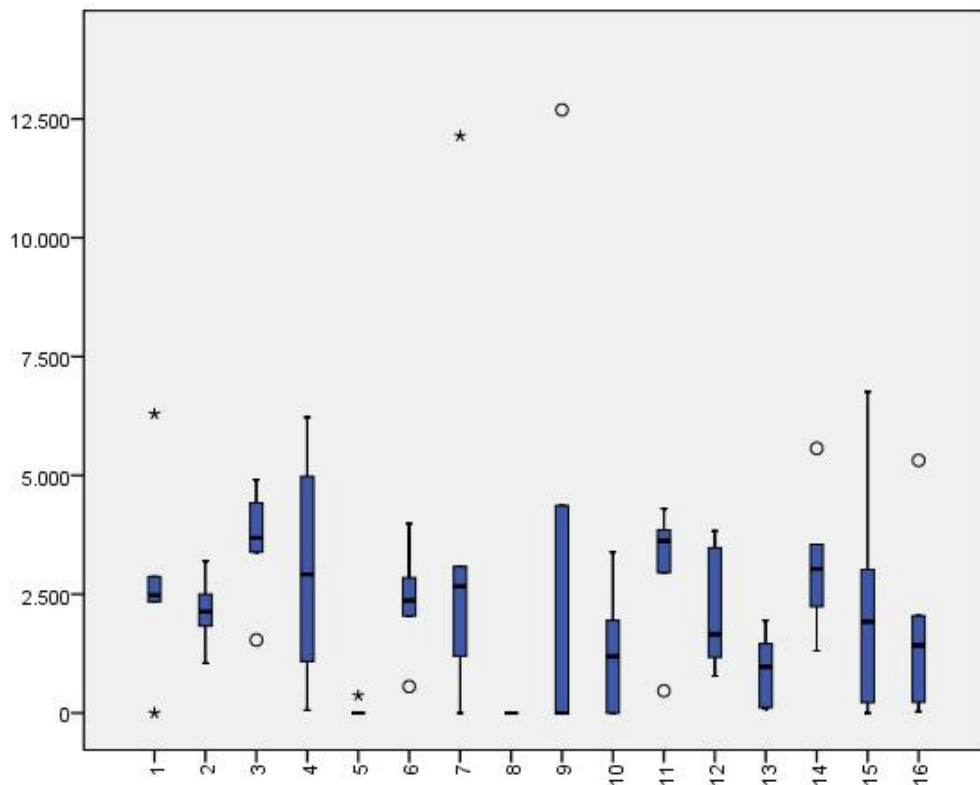
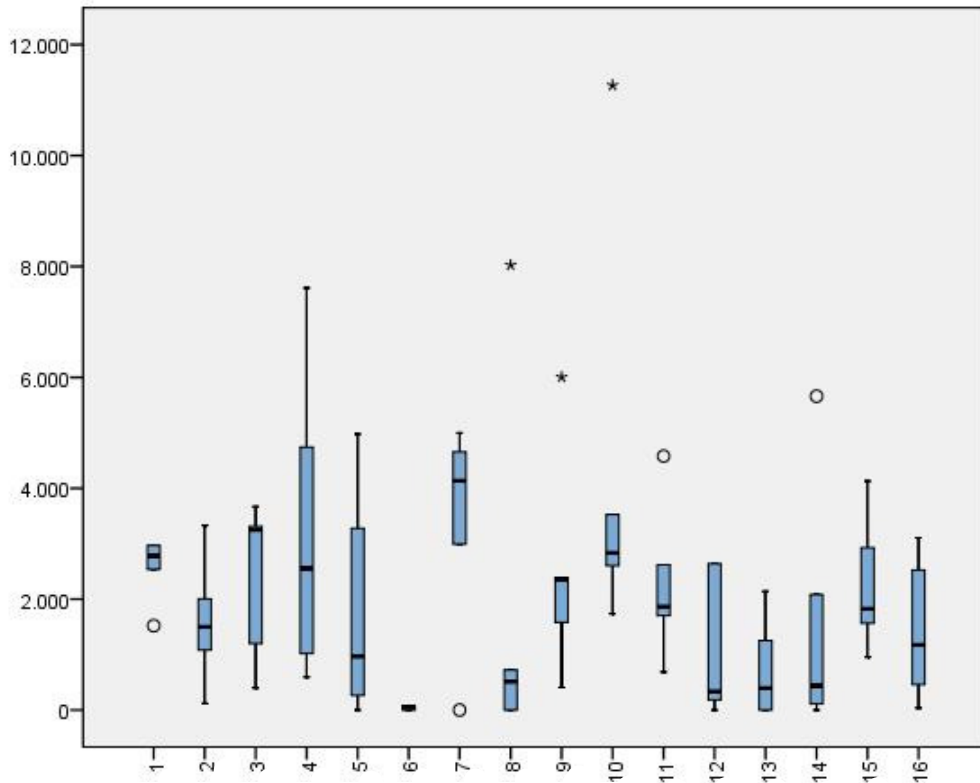
E335/2003



9.10 Charakterisierung der 103 mittels Haplotypen-Analyse untersuchten Mutationen

		D3S1358	FGA	ACTBP2	VWA	gesamt
Ursprung	paternal	14	29	26	8	77
	maternal	2	4	-	2	8
	ungeklärt	6	8	1	2	17
Auswirkung	Gewinn	7	20	17	3	47
	Verlust	14	20	10	7	51
	ungeklärt	1	1	-	2	4
Grad	1-Schritt-Mutation	22	41	25	12	100
	2-Schritt-Mutation	-	-	1	-	1
	3-bp-Mutation	-	-	1	-	1
	ungeklärt	-	-	-	-	-
Mechanismus	SSM	22	41	26	12	101
	ungeklärt	-	-	1	-	1
Ausschluss				+1		+1
Total		22	41	28	12	103

9.11 Normalisierte Werte der 16 Beschichtungen mit Wasser (oben) und SDS 1% (unten) nach kapillargelelektrophoretischer Analyse



9.12 Wiederfindungsrate der jeweiligen Befeuchtungsmittel und Befeuchtungsmittel-Beschichtungskombinationen bezogen auf den Mittelwert der Quantifizierungen

	Anzahl Abriebe	Mittelwert [ng/ μ L]	Wiederfindungsrate [%]
Wasser	35	0,239	9,7
SDS 1%	35	0,337	13,7
Xylol	35	0,125	5,1
Betain 10%	10	0,176	7,1
Isopropanol	35	0,101	4,1
CTAB 1%	10	0,123	5,0
TE-Puffer 1x	10	0,271	11,0
KCl-Lösung 3M	10	0,262	10,6
Tween20 1%	10	0,234	9,5
Guanidinium-HCl-Lösung	10	0,177	7,2
Brillenputztuch	10	0,012	0,5
Isopropanol 80%	35	0,158	6,4

	Befeuchtungsmittel	Mittelwert [ng/ μ L]	Wiederfindungsrate [%]
Baumwolle "normal"	Wasser	0,467	28,7
Baumwolle "fest"	Wasser	0,405	24,9
Baumwolle "locker"	Wasser	0,409	25,2
Viskose (Rayon)	Wasser	0,500	30,8
Nylon	Wasser	0,406	25,0
Nylon (beflockt)	Wasser	0,011	0,6
Leder (schmal)	Wasser	0,172	10,6
Leder (breit)	Wasser	0,082	5,1
Schaumstoff über BW	Wasser	0,531	32,7
Schwammtupfer	Wasser	0,428	26,3
Mikrofaser	Wasser	0,346	21,3
Glasfaser (2,5mm)	Wasser	0,076	4,7
Glasfaser (1,25mm)	Wasser	0,033	2,0
Fließtupfer (OmniSwab)	Wasser	0,407	25,0
Glasfaser-Plättchen	Wasser	0,207	12,7
Mikrofaser-Pads	Wasser	0,494	30,4
Baumwolle "normal"	SDS 1%	0,314	19,3
Baumwolle "fest"	SDS 1%	0,768	47,3
Baumwolle "locker"	SDS 1%	0,444	27,3
Viskose (Rayon)	SDS 1%	0,195	12,0
Nylon	SDS 1%	0,142	8,7
Nylon (beflockt)	SDS 1%	0,247	15,2
Leder (schmal)	SDS 1%	0,362	22,3
Leder (breit)	SDS 1%	0	0,0
Schaumstoff über BW	SDS 1%	0,255	15,7
Schwammtupfer	SDS 1%	0,045	2,8
Mikrofaser	SDS 1%	0,196	12,1
Glasfaser (2,5mm)	SDS 1%	0,198	12,2
Glasfaser (1,25mm)	SDS 1%	0,066	4,1
Fließtupfer (OmniSwab)	SDS 1%	0,579	35,7
Glasfaser-Plättchen	SDS 1%	0,097	6,0
Mikrofaser-Pads	SDS 1%	0,129	7,9

9.13 Elektropherogramm des manuell präparierten Tumorbereichs

