

WESTFÄLISCHE WILHELMS-UNIVERSITÄT MÜNSTER

Fachbereich Biologie

Anwendung moderner Methoden in der forensischen Molekulargenetik

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

vorgelegt von

Karolin Hoppe
geb. in Münster
- 2007 -

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Norbert Sachser

Erster Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wolf-Michael Weber

Zweit Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. hc. Bernd Brinkmann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2007

Tag der Promotion: 14.12.2007

**Meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit**

INHALTSVERZEICHNIS	I-IV
ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	V-VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII-IX

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Forensische Molekulargenetik	1
1.2 Der „genetische Fingerabdruck“	2
1.3 Das autosomale STR-System D10S2325	5
1.4 Das autosomale STR-System ACTBP2	5
1.5 Y-chromosomale STR-Systeme, hier: DYS385.....	6
1.6 Populationsstudien	9
1.7 Mutationsmechanismen der STRs	12
1.8 Mutationsraten der STRs	17
1.9 Die mitochondriale DNA	18
1.10 Quantifizierung von DNA	21
1.11 <i>Real-time</i> PCR	23
2. ZIELE DER ARBEIT.....	29
3. MATERIAL UND METHODEN	31
3.1 Material	31
3.1.1 Chemikalien	31
3.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe	32
3.1.3 Fertige Reaktionssysteme (Kits)	32
3.1.4 Geräte	32
3.1.5 Gebrauchswaren	33
3.1.6 Puffer und Lösungen	33
3.1.7 Sterilisierung von Lösungen und Gebrauchswaren	35
3.1.8 Enzyme	35
3.1.9 Vektor	35
3.1.10 Bakterienstamm	36
3.1.11 Kulturmedien	36

3.1.12 Lagerung von Bakterienstämmen.....	36
3.1.13 Synthetische Oligonukleotide	36
3.1.13.1 Primer	37
3.1.13.2 Sonden	38
3.1.14 Herkunft der Proben	38
3.1.13 GenBank und andere Internetquellen	38
3.2 Methoden	39
3.2.1 Präparation von Nukleinsäuren	39
3.2.1.1 DNA-Extraktion aus getrockneten Blutflecken	39
3.2.1.2 DNA-Extraktion aus Speichelproben	39
3.2.1.3 DNA-Extraktion aus Zellmaterial an diversen Spurentägern	40
3.2.1.3 DNA-Extraktion aus Zahn-Dentin	40
3.2.2 Aufreinigung und Aufkonzentrierung der DNA-Extrakte	41
3.2.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	41
3.2.3.1 Quantifizierung von Plasmid-DNA mittels UV/VIS- Spektrophotometer.....	41
3.2.3.2 Quantifizierung von PCR-Produkten mittels <i>real-time</i> PCR	42
3.2.3.2.1 Quantifizierung von gDNA mittels ACTBP2- Assay und von mtDNA mittels mtDNA-Assay	42
3.2.3.2.2 Quantifizierung von gDNA mittels Quantifiler® Human DNA Quantification Kit.....	44
3.2.4 Primer- und Sondenkonstruktion	44
3.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion	45
3.2.6 Elektrophoresetechnik	47
3.2.6.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	47
3.2.6.2 Kapillargelelektrophorese	48
3.2.7 Klonierung von PCR-Fragmenten mittels TA-Klonierung	49
3.2.7.1 Adenylierung der Amplifikate	49
3.2.7.2 Aufreinigung der adenylierten PCR-Produkte.....	50
3.2.7.3 Ligation über Thymin-Überhänge	50
3.2.7.4 Transformation	50
3.2.7.5 Minipräparation von Plasmid-DNA.....	51
3.2.7.6 Restriktionsenzymatische Modifikation von Nukleinsäuren ..	52
3.2.8 Sequenzanalyse	52

4. POPULATIONSGENETISCHE STUDIEN DES AUTOSOMALEN STR-SYSTEMS D10S2325 ..	54
4.1 Einleitung	54
4.2 Ergebnisse	54
4.3 Diskussion.....	59
5. SUBLOCUS-SPEZIFISCHE AMPLIFIKATION VON DYS385	64
5.1 Einleitung	64
5.2 Ergebnisse	66
5.3 Diskussion.....	68
6. VALIDIERUNG EINES NEUARTIGEN STR-MULTIPLEX-ASSAYS.....	74
6.1 Einleitung	74
6.2 Ergebnisse	76
6.3 Diskussion.....	80
7. ANWENDUNG DER <i>REAL-TIME</i> PCR ZUR UNTERSUCHUNG VON SPURENMATERIAL.....	86
7.1 Einleitung	86
7.2 Validierung	86
7.3 Ergebnisse	90
7.4 Diskussion.....	94
8. Etablierung eines real-time PCR-Assays zur Quantifizierung von mtDNA...98	
8.1 Einleitung	98
8.2 mtDNA-Assay-Design	99
8.3 Konstruktion eines mtDNA-Plasmid-Standards.....	100
8.4 Validierung	103
8.5 Quantifizierung von mtDNA und direkte Sequenzierung der PCR-Produkte	105
8.5.1 Ergebnisse	105
8.5.2 Diskussion.....	109
8.6 Quantifizierung von mtDNA aus Zahndentin für die Altersbestimmung.....	111
8.5.1 Ergebnisse	111
8.5.2 Diskussion.....	113

9. ZUSAMMENFASSUNG	115
10. LITERATURVERZEICHNIS	118
11. ANHANG.....	124
11.1 Vektorkarte des <i>pGEM[®]-T Easy Vectors</i>	124
11.2 Ergebnistabellen D10S2325.....	125
11.3 Ergebnisse des Quantifiler [®] Human DNA Quantification Kits, der ACTBP2-Monoplex und des ACTBP2-Assay	141

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1	Der genetischen Fingerabdruck.....	2
Abb. 1.2	Schematische Darstellung eines <i>short tandem repeats</i> (STRs).....	4
Abb. 1.3	Das autosomale STR-System D10S2325.....	5
Abb. 1.4	Das STR-System ACTBP2	6
Abb. 1.5	Das Y-Chromosom	7
Abb. 1.6	Das Y-chromosomale STR-System DYS385.....	9
Abb. 1.7	a) reguläre Vererbung; b) Ausschluss oder Mutation.....	13
Abb. 1.8	Darstellung des <i>slipped-strand-mispairing</i>	14
Abb. 1.9	Darstellung des ungleichen Austausches zwischen Schwester- chromatiden	16
Abb. 1.10	Repeat-Gewinn oder -Verlust?	17
Abb. 1.11	Schematische Darstellung der mitochondrialen DNA	18
Abb. 1.12	Das Prinzip der real-time PCR mit einer <i>TaqMan</i> -MGB-Sonde	25
Abb. 1.13	Beispiel für einen Amplifikationsplot des Quantifiler® Human DNA Quantification Kit	26
Abb. 1.14	Die Kalibrationsgerade	27
Abb. 4.1	Grafische Darstellung der Allelverteilungen des STR-Systems D10S2325 in der deutschen (n=616) und der kurdischen (n=250) Population	58
Abb. 4.2	Zwei paternale Mutationen im STR-System D10S2325.....	59
Abb. 4.3	Mögliches Mutationsmodell zur Entstehung der drei D10S2325- Allele beim Vater der Familie 46	61
Abb. 5.1	Das Y-chromosomalen STR-Systems DYS385	64
Abb. 5.2	Sequenz des Y-chromosomalen STR-Systems DYS385.....	65
Abb. 6.1	DNA-Profil der Zelllinien-DNA 9947A.....	74
Abb. 6.2	Elektropherogramm des Vaters der Familie 14.....	77
Abb. 7.1	Sequenz des ACTBP2-Locus	86
Abb. 7.2	Optimierung der einzusetzenden Primer-Menge in das ACTBP2- Assay	87
Abb. 7.3	Optimierung der einzusetzenden Sonden-Konzentration in das ACTBP2-Assay	88
Abb. 7.4	Optimierung der einzusetzenden Menge an markierten Primer 1 in das ACTBP2-Assay	89

Abb. 7.5	Elektropherogramm nach der <i>real-time</i> PCR-Amplifikation.....	90
Abb. 7.6	Vergleich ACTBP2-Assay vs. Quantifiler	92
Abb. 7.7	Peak-Imbalance	94
Abb. 8.1	Der Aufbau eines Zahns	98
Abb. 8.2	Zielsequenz des mtDNA-Assays	100
Abb. 8.3	Schematische Darstellung des Plasmids pGEM-HV1 (K16).....	101
Abb. 8.4	Restriktionsverdau der mtDNA-Plasmide.....	102
Abb. 8.5	Sequenzvergleich der DYS19-Plasmide KD2 und KD5 mit der Anderson-Sequenz	102
Abb. 8.6	Temperaturprogramme für die <i>real-time</i> PCR.....	103
Abb. 8.7	Kalibrationsgerade des mtDNA-Assays und Amplifikationsplot der IPC.....	105
Abb. 8.8	Heteroplasmie an Position 16412 der mtDNA	108
Abb. 8.9	Kalibrationsgerade des mtDNA-Assays und Amplifikationsplot der IPC.....	111
Abb. 8.10	Zusammenhang von mtDNA-Kopien aus dem Zahndentin und Alter.....	113

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1.1	Berechnung der Häufigkeit eines bestimmten DNA-Profiles in der deutschen Bevölkerung	12
Tab. 1.2	Auswertung des <i>real-time</i> PCR-Assays unter Berücksichtigung der IPC.....	28
Tab. 3.1	Fluoreszenzfarbstoffe für die Kapillargelelektrophorese und die <i>real-time</i> PCR (Applied Biosystems)	32
Tab. 3.2	Primer für die genomische, Y-chromosomale, mitochondriale PCR bzw. <i>real-time</i> PCR.....	37
Tab. 3.3	Primer für die Sequenzanalyse.....	37
Tab. 3.4	<i>TaqMan</i> -Sonden für die <i>real-time</i> PCR.....	38
Tab. 3.5	Zusammensetzung der Mastermixe für die <i>real-time</i> PCR	43
Tab. 3.6	Verdünnungen des Standard des ACTBP2-Assays bzw. des mtDNA-Assay	43
Tab. 3.7	Temperaturprogramm des ACTBP2- bzw. mtDNA-Assays.....	44
Tab. 3.8	Zusammensetzung der Mastermixe für die PCR	45

Tab. 3.9	PCR-Konditionen der verschiedenen Primer-Paare	46
Tab. 4.1	Das Auftreten von sehr langen Allelen im STR-Systems D10S2325 .	55
Tab. 4.2	Allel-Frequenz des STR-Systems D10S2325	57
Tab. 5.1	Frequenzen der DYS385*a-b*-Haplotypen	67
Tab. 5.2	Typisierungsergebnisse des Y-STRs DYS385	71
Tab. 6.1	Informationen zu den 14 STR-Systemen und Amelogenin des Humantype Chimera [®] II Kits (Biotype).....	75
Tab. 6.2a	Allelfrequenzen der STR-Systeme D2S1360, D3S444, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517 und D8S1132.....	78
Tab. 6.2b	Allelfrequenzen der STR-Systeme D10S2325, D12S391, D18S51, D19S246, D20S480, D21S226 und D22S689.....	79
Tab. 6.3a	Typisierungsergebnisse der STR-Systeme Amelogenin, D2S1360, D3S444, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517 und D8S1132	82
Tab. 6.3b	Typisierungsergebnisse der STR-Systeme D10S2325, D12S391, D18S51, D19S246, D20S480, D21S226 und D22S689	84
Tab. 7.1	Ergebnisse des <i>intra-assays</i>	91
Tab. 7.2	Einteilung der Typisierungsergebnisse	93
Tab. 8.1	Ergebnisse in der Validierungsphase des mtDNA-Assays.....	104
Tab. 8.2	Ergebnisse des mtDNA-Assays	106
Tab. 8.3	Ergebnisse der Sequenzierung.....	108
Tab. 8.4	Ergebnisse des mtDNA-Assays zur Quantifizierung von mtDNA aus Zahndentin.....	112

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APD	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AVACH	Allgemeine Vaterschaftsausschlusschance
bp	Basenpaare
bidest.	zweifach destilliertes Wasser
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
bzg.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CV	<i>coefficient of variation</i> (Variations-Koeffizienz)
°C	Grad Celsius
DAD	DNA-Analyse-Datei
dest.	destilliert
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
f	femto
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung
GD	<i>gene diversity</i>
h	Stunde
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
kb	Kilobasen
Kd	Kind
konz.	Konzentriert
Km	Mutter
L	Liter
LIF	Laser-induzierte-Fluoreszenz
LB	Luria-Bertani
M	mol pro liter (mol/l)
m	milli
Mb	Megabasen

MEC	<i>mean exclusion chance</i> (Allgemeine Vaterschaftsausschlusschance)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MCS	<i>multiple cloning site</i> (multiple Klonierungsstelle)
min	Minute
MSY	<i>male-specific region on Y</i> (Männer-spezifische Region auf dem Y-Chromosom)
mtDNA	mitochondriale DNA
μ	mikro
n	nano
NRY	<i>non-recombining region on Y</i> (nicht rekombinierende Region auf dem Y-Chromosom)
OD	optische Dichte
p	pico
PAA-Gel	Polyacrylamid-Gel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	<i>power of discrimination</i> (Diskriminationskraft)
PV	Eventual-Vater
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SRY	<i>sex-determining region on Y</i> (Geschlechts-determinierende Region auf dem Y-Chromosom)
STR	<i>short tandem repeat</i>
sog.	sogenannt
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
T _M	Schmelztemperatur
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U	Unit (Einheit)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
UNG	Uracil-N-glycosylase
UV	Ultraviolett
V	Volt
vs.	versus
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Forensische Molekulargenetik

Die forensische Molekulargenetik wird als Spezialgebiet der Rechtsmedizin eingesetzt, um z.B. Gerichten bei der Aufklärung von Straftaten als auch in Zivilprozessen wie bei Vaterschaftsfeststellungsklagen zu helfen. Dabei wird die DNA-Analyse (nach engl. deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsaure) für die individuelle Identifizierung verwendet, wie sie in der Spurenkunde, bei der Abstammungsbegutachtung und bei der Identifikation benötigt wird:

Bei der Spurenkunde wird aus eventuell am Tatort zurückgelassenen Zellmaterialien - den sogenannten Spuren wie z.B. Blut oder Speichel - der „genetische Fingerabdruck“ bestimmt. Dieser kann dann direkt für einen Vergleich mit einem Tatverdächtigen oder für die Speicherung oder Recherche in der DNA-Analyse-Datei¹ (DAD) verwendet werden.

Bei der Abstammungsbegutachtung werden Verwandtschaftsverhältnisse - wie z.B. eine Vaterschaft - durch direkten Vergleich der DNA-Profile mit nachfolgender biostatistischer Berechnung der möglichen verwandten Personen aufgeklärt.

Bei der Identifikation von unbekanntem Leichen, Skeletten oder Teilen davon, die bei Massenerdbeben (z.B. dem Terroranschlag auf das WorldTradeCenter am 11.09.2001 oder dem Tsunami am 26.12.2004 im Indischen Ozean) vorkommen, wird mit Hilfe molekulargenetischer Techniken der „genetische Fingerabdruck“ (siehe Abs. 1.2) bestimmt. Dieser wird dann für einen Abgleich mit verwandten Personen (indirekte Identifikation) bzw. mit *ante mortem* Proben (z.B. Speichel an einer

¹ Die DNA-Analyse-Datei ist eine 1998 errichtete Verbunddatei aller deutschen Länder und des Bundes, die vom Bundeskriminalamt (BKA) in Wiesbaden zentral betrieben wird (§3 DNA-Identitätsfeststellungsgesetz). Sie enthält die DNA-Profile von Tatverdächtigen (bis zum Abschluss der Untersuchungen), von verurteilten Straftätern, die eine Straftat von erheblicher Bedeutung (> 1 Jahr Haftstrafe, insbes. Vergehen gegen die sexuelle Selbstbestimmung, gefährlichen Körperverletzung, Diebstahl in besonders schwerem Fall oder Erpressung) begangen haben und von tatrelevanten Spuren, die noch keiner Person zugeordnet werden konnten. Mit Hilfe der DAD ist es möglich, durch einen Person-Spur-Treffer eine Person mit einer Tatortspur und somit ggfs. mit der begangenen Straftat in Verbindung zu bringen. Werden nur Spur-Spur-Treffer erzielt, ist das ein Hinweis für die Polizei, dass dieselbe Person mehrere Taten begangen haben muss.

Zahnbürste, direkte Identifikation), die erwiesenermaßen von dem Vermissten stammen oder dessen Zellmaterial tragen, verwendet.

1.2 Der „genetische Fingerabdruck“

Mitte der achtziger Jahre fand A. Jeffrey heraus, dass bestimmte Regionen der DNA aus sich immer wiederholenden DNA-Sequenzen aus 10 bis 100 Basenpaaren (bp) aufgebaut sind und dass sich die Anzahl dieser Wiederholungseinheiten (4 bis 40) von Mensch zu Mensch unterscheidet (Jeffrey et al., 1985). Zur Untersuchung dieser VNTRs (engl. *variable number of tandem repeats*, auch Minisatelliten genannt) etablierte Jeffrey die RFLP-Methode (engl. *restriction fragment length polymorphism*), bei der mit spezifischen Restriktionsendonukleasen DNA-Fragmente erzeugt wurden. Diese wurden anschließend in einem Gel elektrophoretisch aufgetrennt und nach einem Southern-Blot mittels radioaktiv-markierten DNA-Sonden, die simultan an multiplen, nicht näher identifizierbaren Loci hybridisieren (*multi locus* Sonden), visualisiert (Abb.1.1). So wird aus der DNA eines Menschen ein spezifisches Bandenmuster - der sogenannte „genetische Fingerabdruck“ - generiert, der wie der echte Fingerabdruck individualspezifisch ist. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen (eineiige Zwillinge ausgenommen) einen identischen „kompletten genetischen Fingerabdruck“ aufweisen, wurde als verschwindend gering gesehen, ließ sich aber nie exakt berechnen.

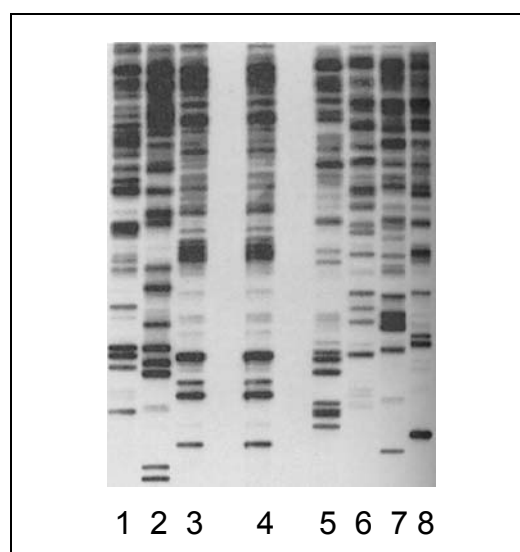


Abb. 1.1: Der genetischen Fingerabdruck
Dieser wurde mittels der RFLP-Methode mit *multi locus* Sonden bestimmt. 4: Tatortspur; 1-3, 5-8: Tatverdächtige.

Eine Weiterentwicklung stellten die *single locus* Sonden dar, die nur noch an einem diskreten Locus hybridisieren und damit eine exakte Biostatistik ermöglichten. Diese RFLP-Methoden weisen allerdings einige gravierende Nachteile auf: Für die Untersuchung wird eine sehr große Menge an frischer, gut erhaltener DNA benötigt. Oft sind die Tatortspuren aber längere Zeit bestimmten Umwelteinflüssen (Hitze, UV-Strahlen, Feuchtigkeit, etc.) ausgesetzt, die eine Zerlegung (Degradierung) der DNA in ihre Einzelteile verursachen können. Neben der Degradierung der DNA liegt diese in den sogenannten Mikrospuren (kleinste Mengen an Blut, Gewebe, Sekret, Haaren etc.) meistens auch nur in sehr geringer Menge vor. Außerdem ist die RFLP-Methode sehr zeit- und kostenaufwändig, sie ist schwer zu automatisieren und aufgrund mangelnder Standards nicht per se von Labor zu Labor vergleichbar.

Daraufhin wurden relativ kurze VNTRs, die sogenannten Mikrosatelliten, für die DNA-Typisierung verwendet. Diese Mikrosatelliten sind kurze, nicht kodierende DNA-Sequenzen (siehe Abb. 1.2), die sich aufgrund ihrer geringen Länge von maximal 400 bp auszeichnen für die Arbeit mit degradiertem DNA eignen. Da die tandemartigen Wiederholungseinheiten aus nur 2 – 6 bp bestehen, werden diese Mikrosatelliten auch als *short tandem repeats* (STRs) bezeichnet. Die STRs sind hoch-polymorph, d.h. viele Individuen und ihre homologen Körperchromosomen unterscheiden sich in der Anzahl der gefundenen Wiederholungseinheiten. In Anlehnung an die Empfehlung der *International Society of Forensic Haemogenetics* (Bär et al. 1994 und 1997) erfolgt die Nomenklatur der STRs entsprechend der Anzahl ihrer Wiederholungseinheiten. Manche STR-Systeme - wie z.B. ACTBP2 (Abs. 1.3) - erhalten ihre Diversität aber nicht nur durch die unterschiedliche Anzahl von Wiederholungseinheiten, sondern z.B. auch durch den Einschub von zusätzlichen Basen zwischen die Wiederholungseinheiten.

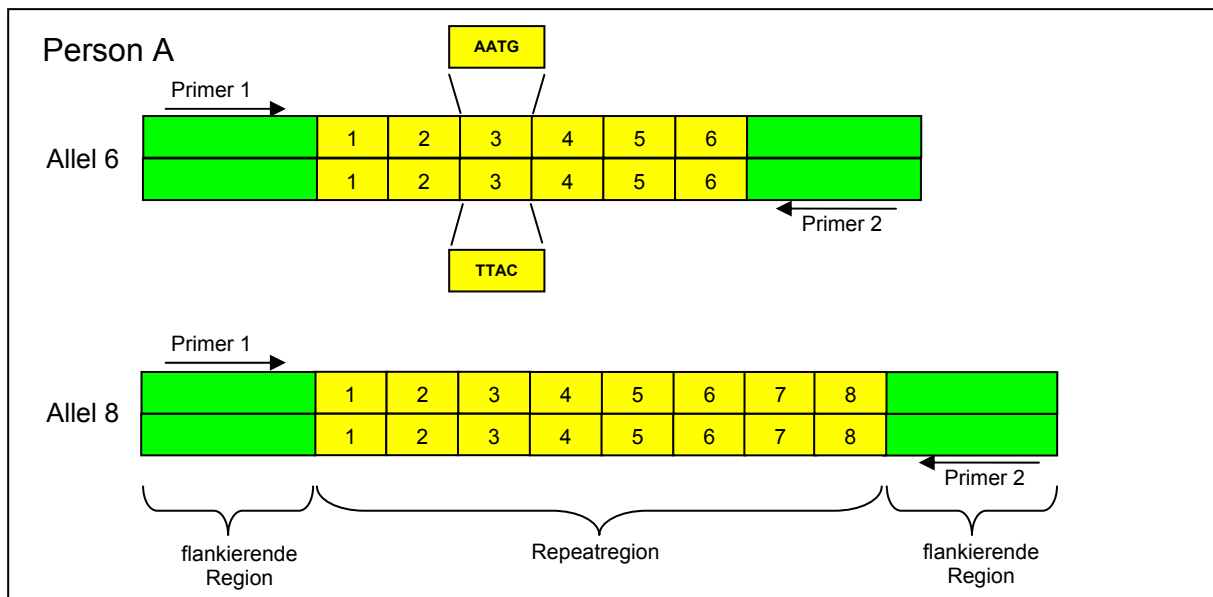


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines *short tandem repeats* (STRs)

Die flankierenden Regionen, die konstant sind und die bei der PCR als Bindungsstellen für die Primer dienen, sind grün dargestellt. Die Repeatregion (Bereich in dem die Wiederholungseinheiten liegen), deren Wiederholungseinheiten in diesem Beispiel aus den 4 Basen AATG (komplementärer Strang: TTAC) aufgebaut sind, ist gelb markiert. Die untersuchte Person A weist die Allele 6 und 8 auf.

Die STR-Typisierung wird mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, nach engl.: *polymerase chain reaction*) durchgeführt. Hierbei wird die DNA sequenzspezifisch amplifiziert (vermehrt). Die Amplifikation erfolgt in drei Schritten: Zuerst erfolgt durch Hitze die Trennung des DNA-Doppelstranges in seine Einzelstränge (Denaturierung), an die im zweiten Schritt die spezifischen Oligonukleotide - sogenannte Primer - binden (Annealing). Anschließend verlängert das Enzym *Taq*-DNA-Polymerase die Primer komplementär zur Matrize (Elongation). Durch zyklische Wiederholungen dieser drei Schritte wird die DNA-Sequenz exponentiell vermehrt. So entstehen aus einem einzigen DNA-Abschnitt bereits nach 20 Reaktionszyklen über eine Million identischer Kopien, die im Gegensatz zu der einzelnen Startsequenz detektierbar sind. Das PCR-Verfahren ist somit optimal für die Analyse der häufig vorkommenden Minimal Spuren mit sehr geringem DNA-Gehalt geeignet.

Neben der Amplifikation eines einzelnen STR-Systems (Monoplex-PCR) können auch mehrere STR-Systeme mit verschiedenen Primerpaaren gleichzeitig in einem Reaktionsansatz amplifiziert werden (Multiplex-PCR).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die autosomalen STR-Systeme D10S2325 und ACTPB2 und das Y-chromosomale STR-System DYS385 näher untersucht. Die

Beschreibung dieser STR-Systeme erfolgt in den folgenden Abschnitten (1.3, 1.4 und 1.5).

1.3 Das autosomale STR-System D10S2325

Das STR-System D10S2325 (Abb. 1.3), liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 10 - Position 31,07 cM (www.ncbi.nih.gov, UniSTS: 36532; chr10:12,833,139-12,833,158). Es handelt sich hierbei um einen Pentanukleotid-STR, dessen Wiederholungseinheit aus dem Motiv TCTTA besteht (Lee et al. 1998). Bisher wurden 10 Allele mit 7 bis 16 Wiederholungseinheiten (Hou et al. 2001) bzw. 12 Allele mit 6 bis 17 Wiederholungseinheiten (Wiegand et al. 1999) in der deutschen Bevölkerung beschrieben. In einer thailändischen Population wurden die Allele 6 bis 18 (Bhoopat et al. 2006) und in einer Population aus dem Süd-Westen von China die Allele 6 bis 17, zwei Varianten des Allels 19 und das Allel 21 beobachtet (Hou et al. 2001). Bislang veröffentlichten nur Becker et al. (2007) eine maternale Mutationsrate von $2,0 \times 10^{-3}$ für D10S2325.

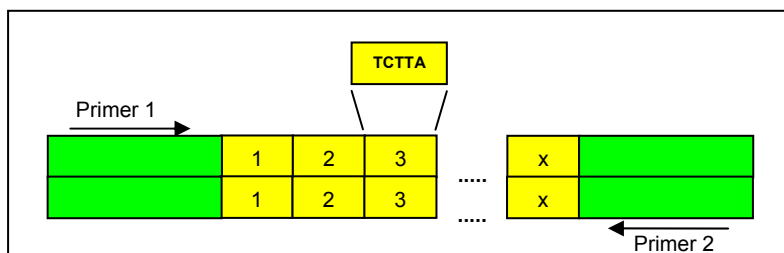


Abb. 1.3: Das autosomale STR-System D10S2325
D10S2325 ist ein Pentanukleotidrepeat, dessen Wiederholungseinheiten aus den fünf Basen TCTTA aufgebaut sind.

1.4 Das autosomale STR-System ACTBP2

Bei dem STR-System ACTBP2, das seit 1998 unter der alten Bezeichnung SE33 (Wiegand et al. 1993) Bestandteil der DAD ist, handelt es sich um ein Tetranukleotid-STR, dessen Wiederholungseinheit aus den vier Basen AAAG besteht (http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/str_ACTBP2.htm). In der Literatur werden zwei unterschiedliche Lokalisationen angegeben. Laut Warne et al. (1991) ist es auf dem Chromosom 5 lokalisiert, nach Polymeropoulos et al. (1992) und Mullokandov et al. (1997) dagegen auf Chromosom 6. Untersuchungen von Wenda et al. (2004) bestätigten durch die Typisierung von ACTBP2 und anderer Marker des Chromosom 6, dass das STR-System ACTBP2 auf dem Chromosom 6 im Bereich des β -Aktin-

Pseudogens 2 (6q13) liegt. Die exakte Position ist nach BLAT chr6:89,043,539-89,043,825 (<http://genome.brc.mcw.edu/cgi-bin/hgBlat>). ACTBP2 ist nicht nur längenpolymorph, sondern weist auch eine enorme Vielfalt an Sequenzstrukturen auf (Abb.1.4). Die Strukturen der ACTBP2-Allele lassen sich in drei Klassen einteilen. Die Allele der Klasse I weisen einen ununterbrochenen Repeatbereich mit dem AAAG-Motiv auf. Der Repeatbereich der Allele der Klasse II ist durch einen Hexanukleotid (AAAAAG) und der Repeatbereich der Allele der Klasse III durch zwei Hexanukleotide unterbrochen. Die Position dieser Insertionen variiert von Allel zu Allel. Bisher wurden die Allele 4.2 (Hohoff et al. 2006) bis Allel 49 (Klein et al. 2003) veröffentlicht. Die ACTBP2-Nomenklatur wird ausschließlich von der Amplikonlänge abgeleitet, die unterschiedlichen Allelstrukturen finden keine Berücksichtigung.

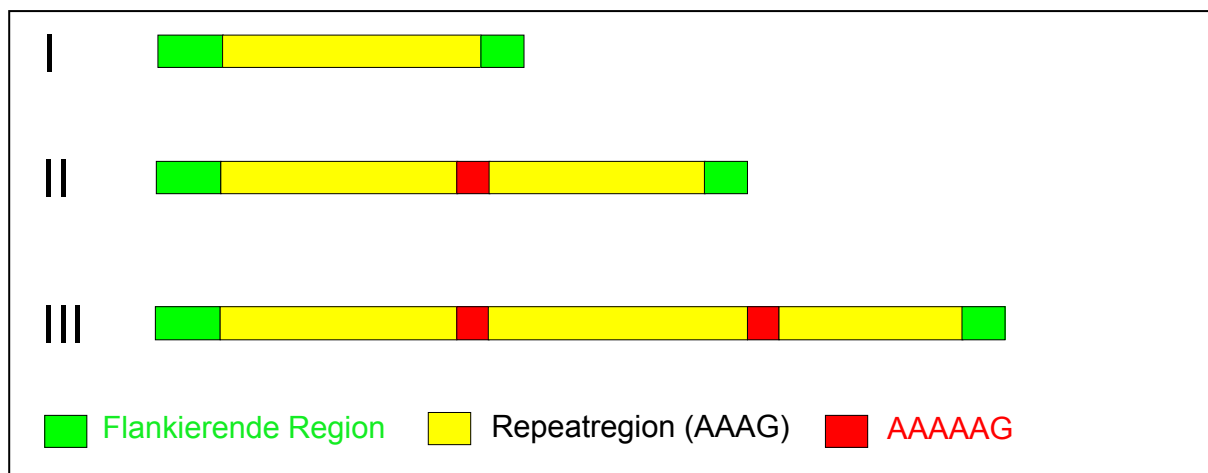


Abb. 1.4: Das STR-System ACTBP2

Die ACTBP2-Allele lassen sich aufgrund ihrer Sequenzstrukturen in drei Klassen gliedern: Klasse I: Repeatbereich ist ununterbrochen; Klasse II: Insertion eines Hexanukleotids innerhalb des Repeatbereichs; Klasse III: Insertion von zwei Hexanukleotiden innerhalb des Repeatbereichs

1.5 Y-chromosomale STR-Systeme, hier: DYS385

Mit ca. 60 Millionen Basenpaaren ist das akrozentrische Y-Chromosom (Abb. 1.5) das zweitkleinste Chromosom des Menschen. Im Gegensatz zum X-Chromosom besitzt es wesentlich weniger Gene. Einige dieser Gene haben einen homologen Partner auf dem X-Chromosom, andere sind dagegen Y-Chromosom-spezifisch (Delbridge & Graves 1999). Es gibt insgesamt 78 Y-Chromosom-spezifische Gene, die für insgesamt 27 distinkte Proteine kodieren (Jobling & Tyler-Smith 2003, Skaletsky et al. 2003). Eines dieser Gene ist z.B. das SRY-Gen (*sex-determining region on Y*), das für die Ausprägung des männlichen Geschlechts und die

männliche Fertilität mitverantwortlich ist. Das Fehlen eines Y-Chromosoms führt zur Ausprägung eines weiblichen Geschlechts. Menschen mit dem Genotyp XY weisen also immer einen männlichen, mit dem Genotyp X0 dagegen einen weiblichen Phänotyp auf.

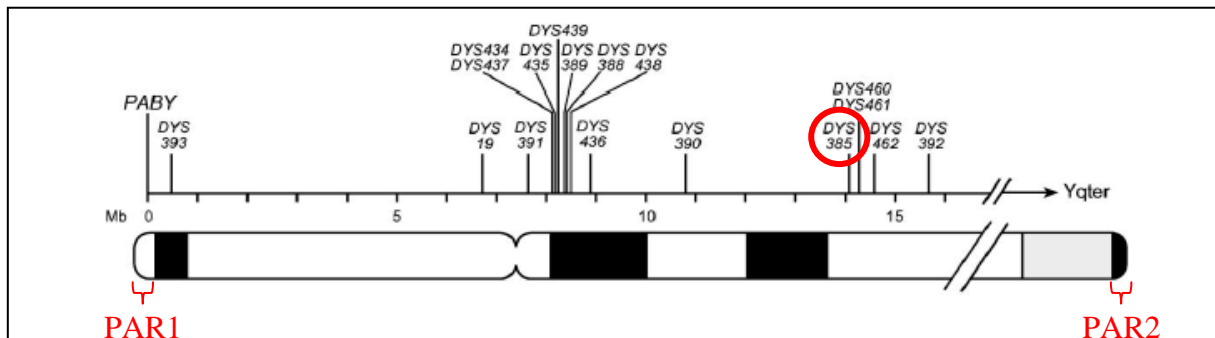


Abb. 1.5: Das Y-Chromosom

Die Lokalisationen einiger Y-STRs sind angegeben. Das STR-System DYS385, das in dieser Arbeit untersucht wird, sowie die pseudoautosomalen Regionen, PAR1 und PAR2, sind farblich hervorgehoben (modifiziert nach Bosch et al. 2002).

Auf dem Y-Chromosom gibt es wie auf dem X-Chromosom zwei pseudoautosomale Regionen, PAR1 und PAR2 (Rappold 1993; Delbridge & Graves 1999). Der Begriff „pseudoautosomal“ bezieht sich darauf, dass die PARs in beiden Geschlechtern gleich oft vorhanden sind, so wie dies sonst bei den Autosomen der Fall ist. Nur zwischen den PAR1 bzw. den PAR2 der Geschlechtschromosomen kann während der männlichen Meiose homologe Rekombination stattfinden, der Großteil des Y-Chromosoms wird unverändert vom Vater auf den Sohn vererbt.

Die restlichen 95% des Y-Chromosoms wurden bislang häufig als NRY (*non-recombining region on Y*) bezeichnet, da sie keine Rekombination mit dem X-Chromosom eingehen. Die Arbeitsgruppe von David Page führte in ihrer *Nature*-Publikation die Bezeichnung MSY (*male-specific region on Y*) ein, da zahlreiche Rekombinationen innerhalb des eigenen DNA-Stranges des Y-Chromosoms vorkommen (Skaletsky et al. 2003; Rozen et al. 2003).

Es sind inzwischen zahlreiche Y-STRs entdeckt worden (Ayub et al. 2000; Kayser et al. 2000; Zarrabeitia et al. 2003; Kayser et al. 2004), die innerhalb der MSY-Region etwa alle 65 kb vorkommen (Ayub et al. 2000). Eine Übersicht über Y-STRs bietet die *Short Tandem Repeat DNA Internet DataBase* (STRbase, http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/y_strs.htm). Da die Minisatelliten eine sehr

hohe Mutationsrate aufweisen (z.B. MSY1: $2 - 11 \times 10^{-2}$ pro Locus und pro Generation; Jobling et al. 1998), sind die Mikrosatelliten mit ihrer Mutationsrate von $2,6 \times 10^{-3}$ (B. Brinkmann, unveröffentlichte Daten) bzw. $2,8 \times 10^{-3}$ (Kayser et al. 2000) für die Evolutionsforschung eher geeignet. Außerdem gibt es noch die Möglichkeit der Untersuchung von Y-SNPs (*single nucleotide polymorphism*).

Die forensische Untersuchung des Y-Chromosoms dient u.a. zur Geschlechtsbestimmung einer Spur. Der Marker Amelogenin ist sowohl auf dem X- als auch auf dem Y-Chromosom lokalisiert und liefert unterschiedlich lange PCR-Produkte für X und Y. Bisher ist Amelogenin der am häufigsten angewandte Marker zur Geschlechtsbestimmung an Spuren und in Vaterschaftsfällen (Mannucci et al. 1994).

Mit Hilfe des Y-Chromosoms lassen sich Stammbäume der väterlichen Linie erstellen, da es weitestgehend unverändert von Vater zu Sohn vererbt wird. Durch die rein paternale Vererbung des Y-Chromosoms ist es auch möglich, eine Vaterschaftsanalyse durchzuführen, wenn die Vergleichsspeichelprobe des möglichen Vaters fehlt. In diesem Fall werden die Y-chromosomalen Merkmale durch die Untersuchung seiner männlichen Verwandten ermittelt.

Bei der Aufklärung von Sexualdelikten können die Y-STRs sehr hilfreich sein, denn mit autosomalen STR-Systemen können kleinste Beimengungen fremder, männlicher DNA z.B. in einem Vaginalabstrich nicht immer nachgewiesen werden. Die im Überschuss vorhandene weibliche DNA wird bei der PCR bevorzugt vermehrt (präferentielle Amplifikation), so dass die Fremd-DNA nicht oder nur sehr schlecht detektiert werden kann. Da die Y-STRs ausschließlich die männliche DNA nachweisen, spielt der Anteil der weiblichen DNA kaum eine Rolle und auch eine Separation der Spermien von den weiblichen Zellen ist nicht nötig. Bereits wenige Spermienköpfe, die in einem Vaginalabstrich gefunden werden, können somit für eine erfolgreiche Typisierung ausreichen. Durch die hohe Sensitivität der Nachweismethode ist es sogar möglich, Übergangsepithelzellen eines vasktomierten Täters nachzuweisen (Prinz et al. 1997).

Das Y-Chromosom kann auch in der molekularen Anthropologie und Populationsgenetik für die Rekonstruktion von prähistorischen Prozessen des männlichen Teils der Bevölkerung verwendet werden.

Einige der etablierten Y-STRs (DYS385, YCAII) liegen auf dem Y-Chromosom dupliziert vor und liefern bei der PCR-Amplifikation zwei differenzierbare Allele (Kayser et al. 1997). Das Y-STR-System **DYS385** (Abb. 1.6) weist einen der höchsten Polymorphie-Grade auf und wurde daher schon für viele forensische und populationsgenetische Studien verwendet. **DYS385** ist auf einem etwa 190 kb großem Fragment lokalisiert, das invertiert dupliziert auf dem Y-Chromosom vorliegt. Die beiden Kopien dieses Fragmentes sind zu 99,97 % identisch - der Repeatbereich von **DYS385** ausgenommen. Die zwei Kopien des STR-Systems **DYS385** werden als Subloci **DYS385*a** und **DYS385*b** bezeichnet und sind etwa 40 kb voneinander entfernt. Jede Wiederholungseinheit von **DYS385** besteht aus den vier Basen GAAA. Bisher wurden die Allele 7 bis 24 und 28 (http://www.cstl.nist.gov/biotech/strbase/str_y385.htm) beobachtet. Die publizierten Mutationsraten von **DYS385** liegen zwischen $1,95 \times 10^{-3}$ (Hohoff et al. 2007) und $3,96 \times 10^{-3}$ (Dupuy et al. 2004).

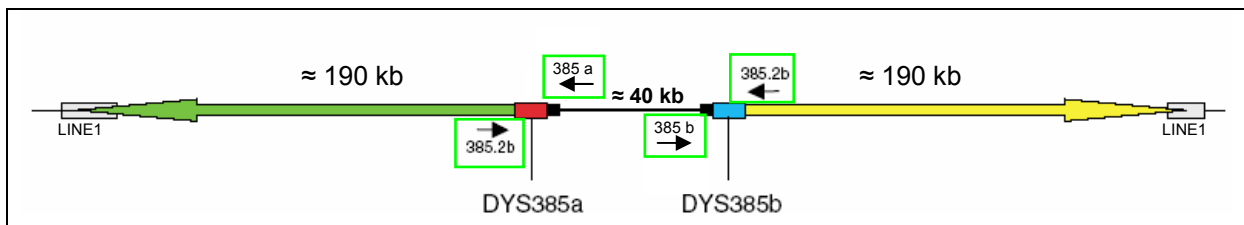


Abb. 1.6: Das Y-chromosomale STR-System **DYS385**

DYS385 ist auf einem etwa 190 kb großem Fragment lokalisiert, das invertiert dupliziert auf dem Y-Chromosom vorliegt und von zwei LINE1-Sequenzen umgeben ist. Die zwei Kopien von **DYS385** werden als Subloci **DYS385 a** (rot) und **DYS385 b** (blau) bezeichnet, die etwa 40kb voneinander getrennt liegen. Die Lokalisation der Primer für die Sublocus-spezifische Amplifikation von **DYS385** ist durch die grüne Umrandung hervorgehoben (Abb. modifiziert nach Kittler et al. 2003).

1.6 Populationsstudien

Für die rechtsmedizinische Routine werden nur solche STR-Systeme eingesetzt, die neben einer stabilen, wenig störanfälligen und reproduzierbaren Amplifizierbarkeit mittels PCR möglichst viele verschiedene, leicht unterscheidbare Allele aufweisen. Außerdem müssen diese STR-Systeme vor ihrem Routine-Einsatz in umfangreichen

Populationsstudien untersucht werden, um die entsprechenden Allelfrequenzen² in den relevanten Bevölkerungsgruppen zu bestimmen.

Für eine Populationsstudie werden die Genotypen eines STR-Systems von so vielen unverwandten Personen einer Population³ wie möglich bestimmt. Anschließend wird geprüft, ob sich die untersuchte Population bezüglich dieses einen STR-Systems im populationsgenetischen Gleichgewicht befindet. Von einem stabilen populationsgenetischen Gleichgewicht kann man dann ausgehen, wenn die ermittelten Genotypen (Heterozygote und Homozygote) in einem ganz bestimmten Verhältnis (ergibt sich aus den Allelfrequenzen) zueinander stehen. Dieses Gleichgewicht wird durch das Hardy-Weinberg-Gesetz (1908) beschrieben. Dieses Gesetz formuliert die Beziehung zwischen den Häufigkeiten der Allele und der Genotypen und besagt, dass der prozentuelle Anteil bestimmter Gene bzw. Allele im Genpool⁴ einer Population über Generationen hinweg konstant bleibt, solange nicht andere Faktoren als die geschlechtliche Rekombination auf sie einwirken. Es gilt allerdings nur für autosomale Gene bzw. Allele und für ideale Populationen. In einer idealen Population hat jedes Individuum die gleiche Chance, sich mit jedem Individuum des anderen Geschlechts mit gleicher Fruchtbarkeit zu paaren (= Panmixie), es treten keine Mutationen auf, eine Selektion ist ausgeschlossen und es findet kein Genimport oder -export statt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Programm HWE Analysis, Version 3.2 (Christoph Puers, Münster) zur Überprüfung der Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gesetzes für das STR-System D10S2325 für eine deutsche und eine kurdische Population verwendet. Dieses Programm liefert u.a. Werte für folgende statistische Parameter: Heterozygotie bzw. Homozygotie, AVACH (Allgemeine Vaterschaftsausschlusschance bzw. MEC: mean exclusion chance) und Diskriminationskraft (PD: power of discrimination). Die beobachtete Heterozygoten- und Homozygotenrate sollte im Bereich der erwarteten Heterozygoten- und Homozygotenrate plus/minus der 1,96 fachen Standardabweichung liegen. Die Allgemeine Vaterschaftsausschlusschance (AVACH) ist ein Maß für die

² Allelfrequenz: die (relative) Häufigkeit, mit der ein Allel in einer Population auftritt

³ Population: Gruppe von Individuen in einem bestimmten (zusammenhängenden) Gebiet, die sich sexuell miteinander fortpflanzen oder zumindestens miteinander fortpflanzen könnten

⁴ Genpool: Gesamtheit aller Gene bzw. deren Allele innerhalb einer Population

durchschnittliche Effizienz eines Systems unter Berücksichtigung aller möglichen Kombinationen. Ein AVACH-Wert von 90% bedeutet z.B., dass mit diesem System im Durchschnitt 90% aller Nicht-Väter erkannt werden. Die Diskriminationskraft wird für die Individualisierung in Spurenfällen angegeben und gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der sich zwei Individuen in ihrem Phänotyp unterscheiden.

Außerdem wurden die Daten der deutschen und die der kurdischen Population mit Hilfe der Software RxC (<http://www.marksgeneticsoftware.net>), die den „Exakten Fisher-Test“ durchführt, miteinander verglichen. Dieser Test ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit, welcher auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate liefert. Von einer Ähnlichkeit zweier Populationen in Bezug auf die Allelfrequenzen kann gesprochen werden, wenn der ermittelte Wert größer als 5% ist.

Befindet sich die Population für das untersuchte STR-System im populationsgenetischen Gleichgewicht, so können die Allelfrequenzen für Häufigkeitsberechnungen verwendet werden. Die Frage, wie häufig bzw. wie selten ein spezielles DNA-Profil in einer bestimmten Population auftritt, stellt sich, wenn z.B. ein Tatverdächtiger als Verursacher einer Tatortspur in Frage kommt, d.h. wenn das DNA-Profil des Tatverdächtigen mit dem DNA-Profil aus der Tatortspur übereinstimmt. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Individuen (eineiige Zwillinge ausgenommen) einen komplett identischen „genetischen Fingerabdruck“ aufweisen, ist statistisch gesehen verschwindend gering. Die Häufigkeit eines DNA-Profiles wird durch Multiplikation der einzelnen Allelfrequenzen erhalten. Das DNA-Profil aus dem Beispiel in Tab. 1.1 kommt statistisch nur einmal unter etwa 386 Milliarden unverwandten Personen vor. Da die Weltbevölkerung etwa 6 Milliarden Menschen umfasst, ist dieser Zahlenwert somit ein wichtiges Indiz gegen den Tatverdächtigen (Weltbevölkerung: $\approx 6,7$ Milliarden, Quelle: www.weltbevoelkerung.de). Der genetische Fingerabdruck dient aber nicht nur der Überführung eines Tatverdächtigen, sondern mindestens ebenso häufig dazu, einen Beschuldigten rasch aus dem Kreis der Verdächtigen zu streichen, wenn sein DNA-Profil nicht zu dem tatrelevanten Profil passt.

Tab. 1.1: Berechnung der Häufigkeit eines bestimmten DNA-Profiles in der deutschen Bevölkerung

Die Frequenzen der Allele eines STR-Systems werden miteinander multipliziert und bei heterozygotem Genotyp noch verdoppelt (q^2 bzw. $2pq$). Die daraus resultierenden Genotypenfrequenzen werden wiederum miteinander multipliziert. Der Kehrwert dieser kumulativen Häufigkeit gibt dann den Wert „einer unter ... unverwandten Personen“ an.

STR-System	Allel(e)	Multiplikation der Allelfrequenzen	Genotypenfrequenz
ACTBP2	24.2 / 28.2	$0,0322 \times 0,0776 \times 2$	0,0050
D21S11	30 / 31.2	$0,2424 \times 0,0934 \times 2$	0,0453
VWA	14 / 15	$0,0976 \times 0,102 \times 2$	0,0200
TH01	6 / 7	$0,2234 \times 0,1604 \times 2$	0,0717
FIBRA	20 / 22	$0,1415 \times 0,1903 \times 2$	0,0539
D3S1358	17 / 18	$0,2160 \times 0,1525 \times 2$	0,0659
D8S1179	13 / 14	$0,3270 \times 0,208 \times 2$	0,1360
D18S51	12 / 12	$0,1286^2$	0,0165
			—————
		kumulative Häufigkeit	$2,6 * 10^{-12}$
		$\cong 1$ unter	$3,9 * 10^{11}$

1.7 Mutationsmechanismen der STRs

Die zahlreichen unterschiedlichen Allele eines STR-Systems resultieren theoretisch aus einigen wenigen „Ursprungsallelen“ durch langsame Veränderung über mehrere tausend Jahre (Wiegand et al. 2000). Auf die möglichen Entstehungsmechanismen der verschiedenen Alleltypen wird im Folgenden eingegangen.

Die Vererbung der Allele erfolgt nach den Mendel'schen Gesetzen, d.h. das Kind erbt ein Allel vom Vater und eines von der Mutter (Abb. 1.7 a). In dem Beispiel in Abb. 1.7 b besitzt das Kind ein Allel, das weder die Mutter noch der Vater aufweist. Es kann demnach entweder ein Ausschluss des Putativvaters (PV) vorliegen oder während der Reifung des Spermiums ist es zu einer Mutation des väterlichen Allels 16 zum Allel 15 gekommen. Bei Vaterschaftsuntersuchungen wird nur dann von dem Vorhandensein einer Mutation gesprochen, wenn nur eine einzelne Ausschlusskonstellation vorliegt.

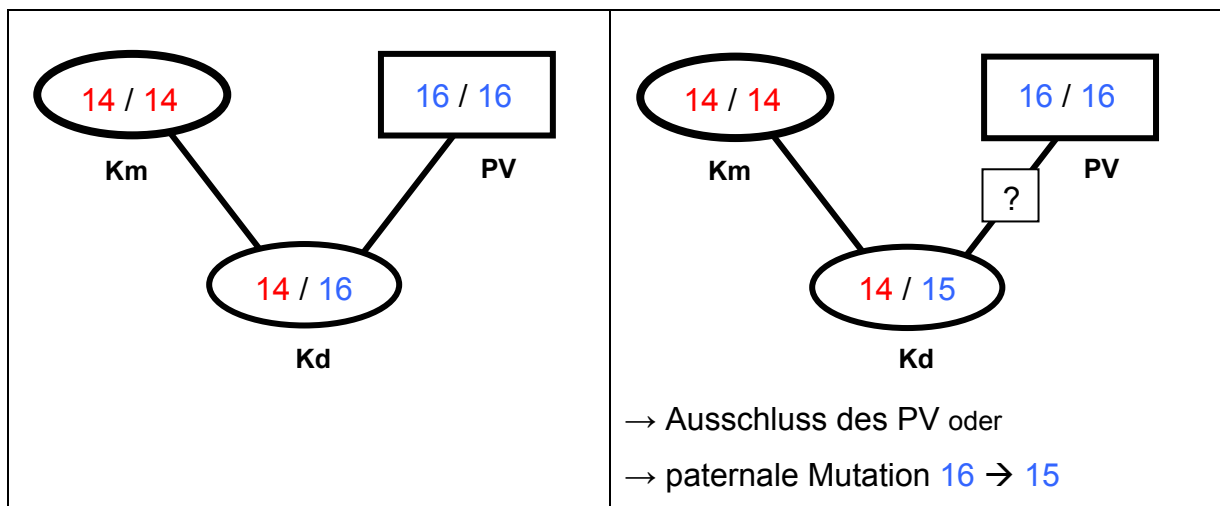


Abb. 1.7: a) reguläre Vererbung (Mendel'scher Allel-Transfer): Das Kind (Kd) erbt das Allel 14 von der Mutter (Km), das Allel 16 vom Putativ-Vater (PV); b) Ausschluss des PV oder Mutation des väterlichen Allels 16 zum kindlichen Allel 15

Bisher gibt es keine Hinweise darauf, dass homologe Rekombination innerhalb eines STR-Systems stattfindet. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass jegliche Veränderung des Allels von der Mutter bzw. vom Vater auf Mutationen zurückzuführen ist. Die Entstehung unterschiedlicher Allele beruht hauptsächlich auf Fehlern bei der Replikation (*slipped strand mispairing*) und auf Problemen bei deren Reparatur (Levinson & Gutman 1987; Eisen & Hanawalt 1999). Beim *slipped strand mispairing* dissoziieren die beiden komplementären DNA-Stränge während der DNA-Replikation und verschieben sich beim Wiederanlagern, so dass bei einem der beiden Stränge eine Schleife ausgebildet wird (Abb. 1.8). Kommt es zur Rückwärtsverschiebung des neusynthetisierten Stranges, so bildet dieser eine Schleife aus und es kommt zu einer Insertion in diesem Strang (Abb. 1.8 b). Eine Vorwärtsbewegung führt dagegen zu einer Schleifenbildung des Matrizen-Stranges und somit zu einer Deletion im neusynthetisierten Strang (Abb. 1.8 c). Neben diesen Repeatverlängerungen (= Repeat-Gewinn) bzw. -verkürzungen (Repeat-Verlust) kann eine verschobene Replikation auch große Deletionen oder Duplikationen verursachen, indem es zur Fehlpaarung zwischen nicht zusammenhängenden Wiederholungssequenzen kommt (Strachan & Read 1996).

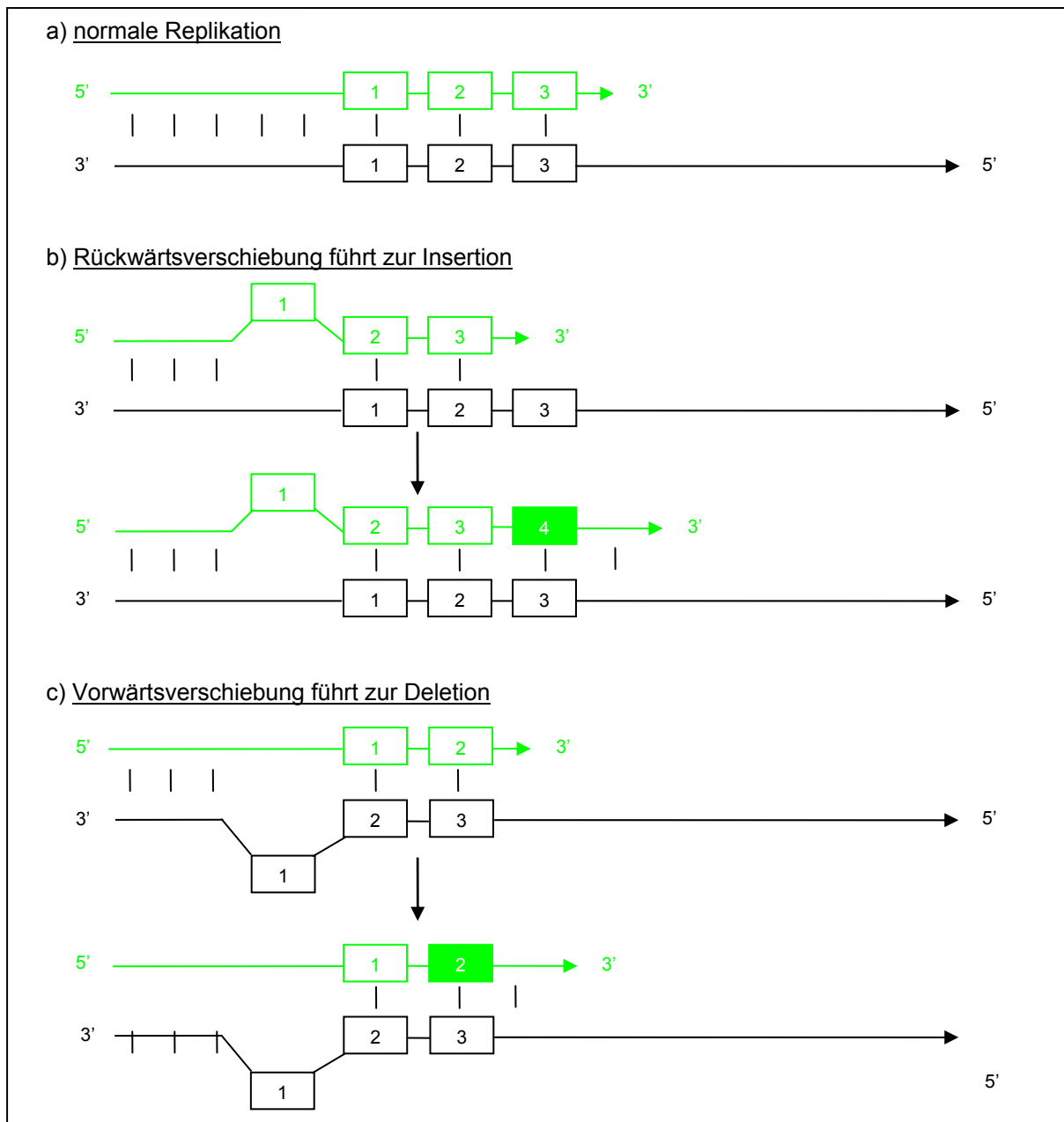


Abb. 1.8: Darstellung des *slipped strand mispairing*

Der untere der dargestellten Stränge (schwarz) ist der Matrizen-Strang, der obere (grün) der neu synthetisierte. Die Rückwärtsverschiebung (b) verursacht eine Insertion, die Vorwärtsverschiebung (c) eine Deletion im neu synthetisierten Strang. Modifizierte Darstellung nach Strachan und Read (1996).

Bei nicht-repetitiven DNA-Abschnitten können Replikationsfehler durch die 3'-5'-Exonuclease-Aktivität der DNA-Polymerase oder durch Mismatch-Reparatursysteme korrigiert werden (Eisen & Hanawalt 1999). Dies ist besonders bei STRs mit größeren Repeat-Einheiten (Tri-, Tetra-, Penta- und Hexanukleotid-Mikrosatelliten) nicht möglich, da die entstehenden DNA-Schleifen zu weit von der DNA-Polymerase entfernt sind und die Korrektur nur wenige Basen vom aktiven Zentrum des Enzyms ausgehend möglich ist. Auch die Korrektur mit Hilfe des *Mismatch*-Reparatursystems

ist hier nicht möglich, da es nur kleine Basenfehlpaarungen mit bis zu drei Basen Länge erkennt und repariert (Eisen & Hanawalt 1999).

Eine andere Erklärung für die Entstehung unterschiedlicher Allele liefert das Model des *unequal crossing over*. In diesem Model wird angenommen, dass die Mutationen Ergebnisse von intra-allelischen Prozessen, wie z.B. dem ungleichen Austausch zwischen Schwesterchromatiden (*unequal crossing over*), sind. Während der Meiose lagern sich die Schwesterchromatiden an den homologen Bereichen – wie z.B. den repetitiven Tandemsequenzen der STRs - nicht korrekt aneinander. Dies führt zu einem ungleichen *crossing-over* und somit zu einem ungleichen Austausch chromosomaler Abschnitte. Als Folge daraus kann es zu einer Insertion auf der einen und zu einer Deletion auf der anderen Schwesternchromatide (Abb. 1.9 a) kommen, so dass schließlich Gameten entstehen, von denen zwei ein längeres Allel, die beiden anderen ein kürzeres Allel enthalten. Kommt es zur Paarung zwischen nicht allelischen repetitiven Bereichen, die ebenfalls eine starke Sequenzhomologie aufweisen, kann dies nach Strachan und Read (1996) sogar zur Duplikation bzw. zum Verlust des Locus führen („Null-Allel“) (Abb. 1.9 b).

Bisher konnte jedoch das Mutationsmodell des *unequal crossing over* in der forensischen Molekulargenetik noch nicht bewiesen werden. Klitschar et al. (2004) sind der Meinung, dass *unequal crossing over* eine Rolle bei der Entstehung von Mutationen spielt, da die meisten Studien dieses Mutationsmodel zwar nicht beweisen, aber auch nicht ausschließen konnten. Sie schlagen vor, die vorliegenden Haplotypen mittels flankierender Marker zu untersuchen.

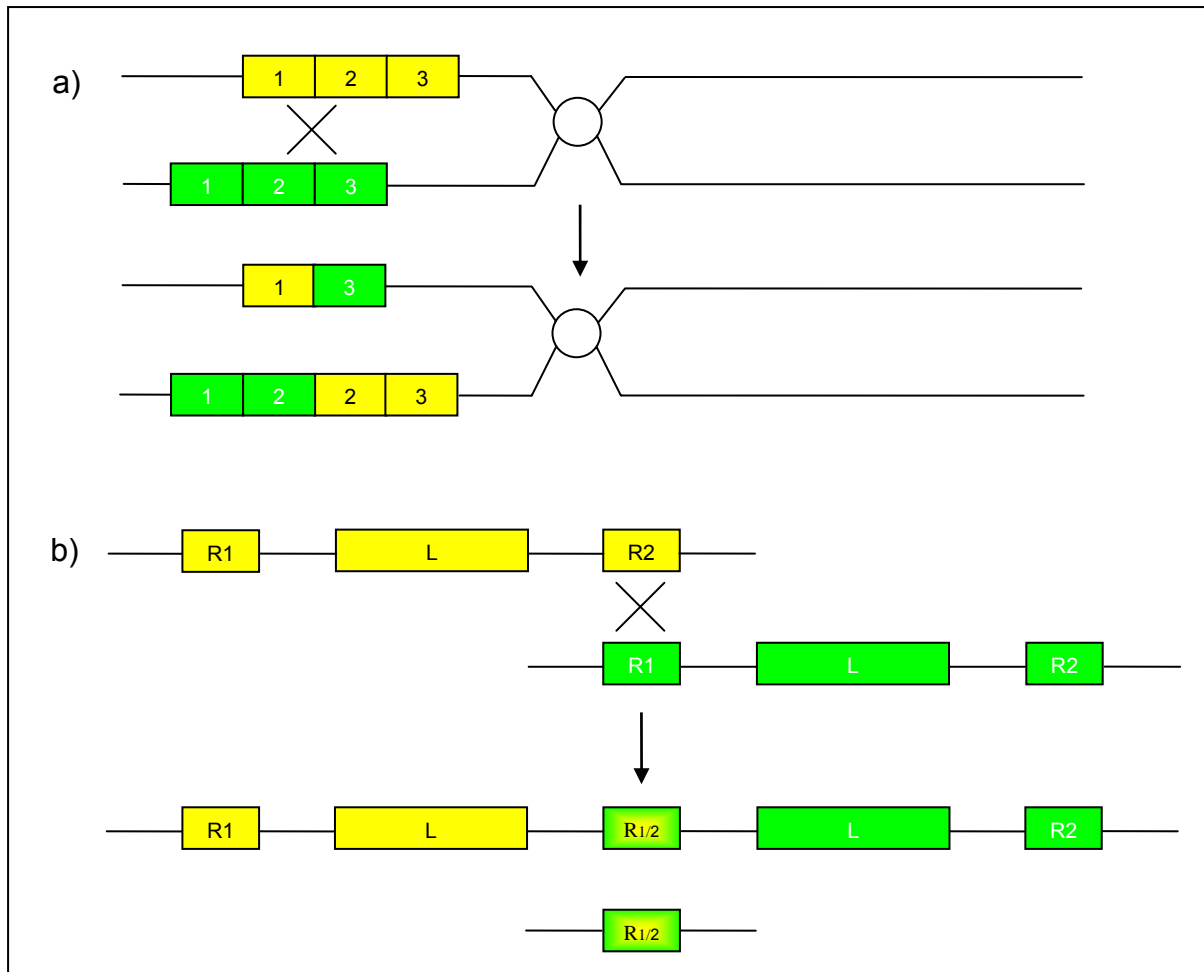


Abb. 1.9: Darstellung des ungleichen Austausches zwischen Schwesterchromatiden

a) Die Mutation führt zu einer Repeatverlängerung bzw. zum Repeatverlust. b) Die ursprüngliche Fehlpaarung der Chromatiden kann aufgrund starker Sequenzhomologien zwischen nichtallelen, kurzen repetitiven Bereichen (R1, R2) zu einer Duplikation bzw. zum Verlust des Locus (L) führen („Null-Allel“). Modifizierte Darstellung nach Strachan und Read (1996).

Die meisten der beobachteten Mutationen zeigen den Gewinn bzw. den Verlust von einer Wiederholungseinheit. Diese Ein-Schritt-Mutationen umfassen 90% der STR-Mutationen. Die restlichen Prozent bilden hauptsächlich die Zwei-Schritt-Mutationen. Nur eine sehr kleine Anzahl sind Mehr-Schritt-Mutationen (Brinkmann et al. 1998). Im Allgemeinen mutieren lange Allele häufiger als kurze, da mit zunehmender Wiederholungsanzahl die Mutationsrate ansteigt (Brinkmann et al. 1998). Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass in einer repetitiven Sequenz mit vielen Wiederholungseinheiten *slipped strand mispairing* an mehreren Stellen stattfinden kann (Asicoglu et al. 2004). Zudem ist bekannt, dass paternale Mutationen etwa 4-6x häufiger vorkommen als maternale (Sajantila et al. 1999, Henke and Henke 1999, Brinkmann et al. 1998). Dies lässt sich damit erklären, dass die DNA eines durchschnittlichen Spermiums etwa sechzehnmal häufiger repliziert

wurde als die DNA in der Oozyte. Diese Beobachtungen wurde auch in anderen Arten gemacht (Asicoglu et al. 2004).

Je nach Genotypen-Kombination ist die Charakterisierung als paternale oder eine maternale Mutation nicht ohne weiteres möglich. In dem Beispiel in Abb. 1.10 weist der Vater die Allelkombination 15 / 20, die Mutter 15 / 18 und das Kind 15 / 19 auf. Hier kann man nicht sofort sagen, welchen Ursprungs das mutierte Allel 19 des Kindes ist, denn das Kind kann das Allel 15 sowohl vom Vater als auch von der Mutter ererbt haben. Das Allel 19 kann daher durch einen Repeat-Verlust des väterlichen Allels 20 oder durch einen Repeat-Gewinn des mütterlichen Allels 18 entstanden sein.

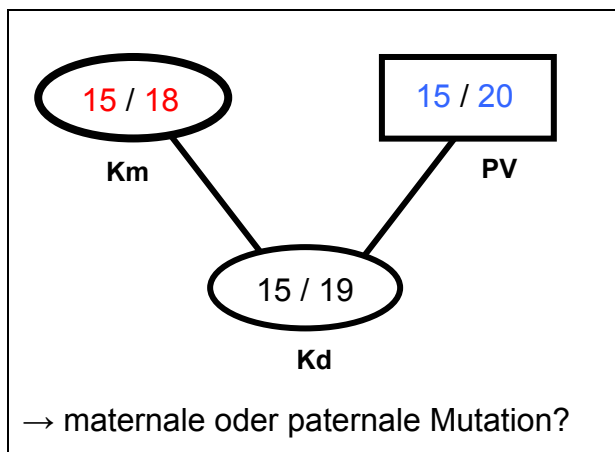


Abb. 1.10: Repeat-Gewinn oder -Verlust?

Das Kind (Kd) weist die Allele 15 und 19 auf. Beide Elternteile besitzen ebenfalls das Allel 15, so dass das Kind dieses Allel sowohl vom Vater (PV) als auch von der Mutter (Km) ererbt haben kann. Das Allel 19 kann daher durch einen Repeat-Verlust des väterlichen Allels 20 oder durch einen Repeat-Gewinn des mütterlichen Allels 18 entstanden sein.

1.8 Mutationsraten der STRs

Bei der Etablierung eines neuen STR-Systems für die rechtsmedizinische Routine muss neben umfangreichen Populationsstudien auch durch Analyse zahlreicher Meiosen die spezifische Mutationsrate berechnet werden. Dazu werden Familien, die aus Vater, Mutter und mindestens einem Kind bestehen, untersucht.

Das Auftreten eines Allel-Unterschiedes wie in Abb. 1.7 b und Abb. 1.10 ist ein Hinweis auf eine mögliche Mutation. Da die durchschnittliche Mutationsrate bei etwa

0,1% liegt (Butler 2005), müssen mindestens 1000 Eltern-Kind-Allel-Transfers untersucht werden, bevor überhaupt eine Mutation beobachtet wird. Brinkmann et al. (1998) untersuchten insgesamt 10844 Eltern-Kind-Allel-Transfers in 9 STR-Systemen und beobachteten nur 23 Mutationen.

1.9 Die mitochondriale DNA

Je nach Art und Alter des Spurenmaterials steht die Zellkern-DNA nicht immer in ausreichender Qualität und Quantität zur Verfügung, z.B. bei ausgefallenen Haaren, die nur noch eine telogene Haarwurzel besitzen, Knochen, Zähne oder altem Spurenmaterial kann die Zellkern-DNA soweit degradiert vorliegen, dass eine STR-Analyse nicht erfolgreich verläuft. In diesen Fällen wird die mitochondriale DNA (mtDNA) untersucht.

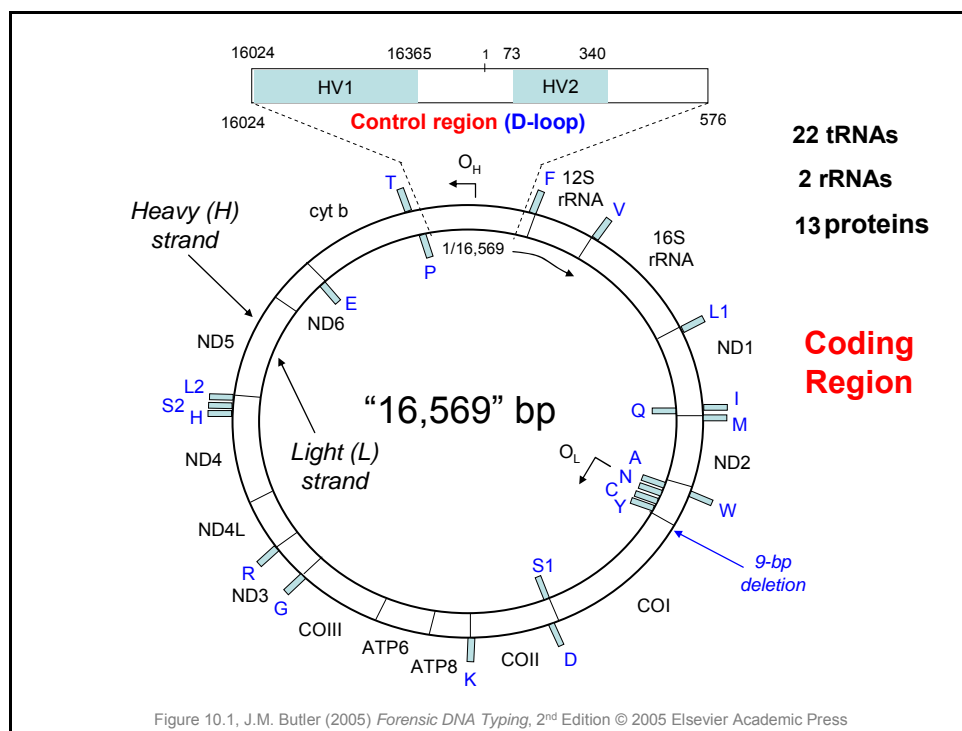


Abb. 1.11: Schematische Darstellung der mitochondrialen DNA
modifiziert nach J.M. Butler (2005)

Die mtDNA befindet sich in den Mitochondrien, deren Hauptfunktion die Energieversorgung der Zelle ist. Sie ist ein zirkuläres, doppelsträngiges DNA-Molekül (Abb. 1.11), das aus einem *heavy-strand* (H-Strang) und einem *light-strand* (L-Strang) aufgebaut ist. Diese Namen resultieren daraus, dass der H-Strang sehr viel von dem schwereren Nukleotid Guanin enthält, der L-Strang dagegen nicht.

Aufgrund ihrer ringförmigen Struktur ist die mtDNA relativ unempfindlich gegenüber DNA-degradierenden Umwelteinflüssen. So können auch noch sehr alte Spuren (z.B. archäologische Knochenfunde) für eine mtDNA-Typisierung verwendet werden. Die mtDNA besteht i.d.R. aus 16569 Basenpaaren. Es können aber auch mehr oder weniger Basenpaare vorhanden sein, je nachdem, ob eine Person Mutationen (Insertion oder Deletion) aufweist. Die 37 Gene der mtDNA kodieren für 24 RNAs und 13 Proteine, die für die oxidative Phosphorylierung und damit die zelluläre Energiegewinnung benötigt werden. Außerdem weist die mtDNA eine 1122 bp große Kontrollregion auf, die auch als *non-coding-region* bezeichnet wird. Innerhalb der Kontrollregion befindet sich der sog. *Displacement loop* (kurz: D-loop), der den Replikationsursprung für den H-Strang beinhaltet und somit für die Replikation der mtDNA von Bedeutung ist. Aufgrund der Tatsache, dass bestimmte Regionen dieses nicht kodierenden Bereichs, der nicht lebenswichtig für die Zell-Funktion ist, bei unverwandten Personen unterschiedliche Sequenzen aufweisen können, werden die Regionen auch als hypervariable Region 1 und 2 (HV1 und HV2) bezeichnet.

Je nach Energiebedarf besitzen Zellen in unterschiedlichen Körpergeweben wenige bis mehrere Tausend Mitochondrien, von denen jedes Mitochondrium 1 bis 15 Kopien der mtDNA aufweist, durchschnittlich 500 Kopien (Sato and Kuroiwa 1991). Dagegen gibt es nur zwei Kopien der Zellkern-DNA, d.h. einen diploiden Chromosomen-Satz (Ausnahme: Gameten).

Die mtDNA wird anders als die Zellkern-DNA rein maternal vererbt, da bei der Befruchtung der Eizelle nur der Spermienkopf nicht aber das Mittel- und das Schwanzstück, in denen die paternalen Mitochondrien enthalten sind, mit der Eizelle verschmilzt. Sollte es dennoch mal zu einer Übertragung einer paternalen mtDNA kommen, so führen die bis zu 100.000 maternalen mtDNA-Moleküle zu einer extremen Verdünnung (Chen et al. 1995). Außerdem wird jedes paternale mtDNA-Molekül, das doch in die Eizelle eindringt, wegen seiner bei der Spermatogenese erfolgten Ubiquitin-Markierung erkannt und durch einen zellulären Vorgang des Embryos selektiv zerstört (Sutovsky et al. 1999). Trotz dieser Mechanismen wurde vor einigen Jahren die sogenannte paternale Vererbung von mtDNA bei einigen Tierarten (z.B. Mäusen, Gyllensten et al. 1991) und in einem Fall beim Menschen entdeckt. Schwartz, M. & Vissing, J. (2002) berichten, dass durch eine bestimmte

Mutation der väterlichen mtDNA der Sohn 90 % der Muskel-mtDNA vom Vater geerbt hatte, während die Blut-mtDNA von der Mutter stammte. Dieser Fall scheint aber eine Ausnahme zu sein und nach zusätzlichen Untersuchungen (Taylor et al. 2003, Filosto et al. 2003, Schwartz et al. 2004) wird weiterhin davon ausgegangen, dass die mtDNA rein maternal vererbt wird.

Für die mtDNA-Typisierung wird die Sequenzierung, d.h. die genaue Bestimmung der Basenabfolge der HV1- und HV2-Region durchgeführt. Die ermittelte mtDNA-Sequenz wird dann mit einer Referenzsequenz, der sogenannten Anderson-Sequenz oder *revised Cambridge Reference Sequence* (rCRS; GenBank-Eintrag AC_000021; Anderson et al. 1981 und 1999) abgeglichen. Diese Anderson-Sequenz stellt die häufigste Sequenz innerhalb der europäischen Bevölkerung dar. Eventuell vorhandene Basenunterschiede (Sequenzpolymorphismen) ermöglichen die Zuordnung zwischen Spur und Spurenverursacher. Dabei ist zu beachten, dass alle Verwandten der mütterlichen Linie dieselbe mtDNA-Sequenz aufweisen solange es zu keiner Mutation gekommen ist.

Im Vergleich zu der STR-Analyse ist die Aussagekraft der mtDNA-Sequenzierung wesentlich geringer. Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei zufällig ausgewählte Individuen der deutschen Bevölkerung die gleiche HV1-Sequenz haben, liegt durchschnittlich bei weniger als 2 % (Pfeiffer et al. 1999). Dennoch ist es in manchen Fällen aufgrund der hohen mtDNA-Ausgangsmenge und der geringeren Anfälligkeit für Degradierungen aussichtsreicher, ein Ergebnis mit der mtDNA-Analyse als mit der STR-Untersuchung zu erzielen.

Aufgrund des geringen Individualisierungsgrades wird die mtDNA nur in Spezialfällen typisiert, z.B. wenn autosomale STR-Systeme wegen fortgeschrittener DNA-Degradierung nicht mehr nachweisbar sind oder wenn die an einem Tatort gefundene biologische Spur zu wenig nukleäre DNA enthält (wie z.B. in telogenen Haaren oder Zähnen). Aufgrund der i.d.R. rein maternalen Vererbung und der nahezu unveränderten Weitergabe über mehrere Generationen eignet sich die mtDNA bei der Aufklärung von Verwandtschaftsverhältnissen, wenn nur Verwandte der mütterlichen Linie zur Verfügung stehen (Gill 1994). Zudem ermöglicht die tausendfach höhere Kopienzahl von mtDNA häufig auch eine Typisierung in alten

Knochenfunden, so wie im Falle der über 70 Jahre alten Knochen der Zarenfamilie (Gill et al. 1994) und der mindestens 30.000 Jahre alten Knochen eines Neandertalers (Krings et al. 1997).

Neben der forensischen Molekulargenetik kommt die mtDNA-Analyse auch besonders in der Anthropologie zum Einsatz. Da die mtDNA mit einer sehr konstanten Rate mutiert, kann man relativ genau sagen, wie nah (zeitlich gesehen) zwei Volksstämme miteinander verwandt sind, d.h. wann sich die Vorläufer dieser Stämme trennten. Mit Hilfe der Eigenschaften der mtDNA (und auch des Y-Chromosoms) versucht das 2005 gestartete Genographic-Projekt (<https://www3.nationalgeographic.com/genographic>), welches Erbgut von Menschen auf allen Kontinenten untersucht, genauere Erkenntnisse über die Verwandtschaftsbeziehungen der verschiedenen Bevölkerungsgruppen sowie den Ablauf der Besiedlung der Erde durch den *Homo sapiens* zu gewinnen.

1.10 Quantifizierung von DNA

Die Quantifizierung von DNA ist besonders für die Untersuchung von Tatortspuren von großer Wichtigkeit. Neben der Ermittlung der DNA-Menge ist auch die Überprüfung der Qualität der Extraktionsmethode und die Bestimmung des Degradierungs-Grades der DNA von Bedeutung.

Die DNA-Konzentration kann mit Hilfe eines **Spektrophotometers** bestimmt werden, indem man die optische Dichte (OD) bei 260 nm misst. Dieses Verfahren scheitert in der forensischen Anwendung allerdings häufig wegen zu geringen DNA-Konzentrationen und zu kleinen Extraktionsvolumina. Die Ergebnisse können außerdem durch Kontamination mit nicht-humaner DNA verfälscht werden.

Die Quantifizierung mittels **QuantiBlot™** (Applied Biosystems) beruht auf der Hybridisierung einer biotinylierten Sonde an immobilisierte DNA. Bei dieser Sonde handelt es sich um eine Primaten-spezifische Alpha-Satelliten DNA-Sequenz des Locus D17Z1. An das daran gekoppelte Biotin kann ein Meerrettich-Peroxidase-Streptavidin-Konjugat binden, das in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid und eines *Enhancers*, wie z.B. Phenol, Luminol oxidiert. Das freiwerdende Licht schwärzt einen

Röntgenfilm. Zur Quantifizierung der Probe wird deren Signalintensität mit der einer humanen Standardreihe verglichen. Der Nachteil dieser Methode beruht allerdings auf der subjektiven Beurteilung der Signalintensität und der fehlenden Automatisierbarkeit. Eine Weiterentwicklung dieser Methode stellt der **AluQuant™-Kit** (Promega) dar. Durch eine Reihe enzymatischer Prozesse wird ATP gebildet, das als Substrat in einer Luciferase-Reaktion zur Emission von Licht führt. Dieses Licht wird mit einem Luminometer detektiert und mit dem Signal einer Standard-DNA-Probe mit bekannter Konzentration verglichen. Mit beiden Methoden ist es nicht möglich, eine Aussage über die tatsächliche Amplifizierbarkeit der aus einer forensischen Probe extrahierten DNA zu machen.

Bei der **Endpunkt-PCR** wird eine DNA-Sequenz exponentiell vermehrt. Je nach Anfangsmenge ist ein Amplifikat nach 30 – 40 Zyklen in der Gelelektrophorese nachweisbar. Theoretisch kann man dann von der Menge des PCR-Produktes auf die eingesetzte DNA-Menge zurückschließen. Allerdings führen durch die exponentielle Amplifizierung bereits kleine Unterschiede in der Amplifizierungseffizienz zwischen Proben mit gleicher Ausgangsmenge zu starken Unterschieden in der Produktmenge. Daher stellt die Endpunkt-PCR kein adäquates Mittel zur DNA-Quantifizierung dar.

Bei der **kompetitiven, semi-quantitativen PCR** wird neben der Zielsequenz ein Standard in demselben Ansatz mitamplifiziert. Beide Amplifikate werden danach einer Endpunktbestimmung mittels Gelelektrophorese unterzogen. Die Zielsequenz wird dabei aufgrund seiner unbekanntenen Konzentration immer in einer konstanten Menge eingesetzt, der Standard in der Regel dagegen in Konzentrationen zwischen 10^1 und 10^9 Kopien pro Reaktion. Liegt der Standard im Überschuss vor, wird die Amplifizierung der Zielsequenz unterdrückt, und umgekehrt. Liegen Standard und Zielsequenz dagegen annähernd stöchiometrisch vor, so können sie beide nebeneinander nachgewiesen werden. Gleiche Signalintensitäten weisen dabei auf die gleiche Amplifikatmenge und Ausgangskonzentration hin. Der Nachteil dieser Methode liegt in der hohen Zahl der benötigten PCR-Ansätze (ca. 5 - 6 pro Probe). Inzwischen wird diese Art der Quantifizierung zunehmend durch die *real-time* PCR (Abs. 1.11) verdrängt.

1.11 Real-time PCR

Die **real-time PCR** ist eine Methode, bei der die Bildung von Amplifikaten während der PCR kontinuierlich verfolgt werden kann (Higuchi et al. 1993). Sie kann neben der Analyse der Gen-Expression und dem Nachweis verschiedener Allele auch zur Quantifizierung von DNA, z.B. zum quantitativen Nachweis pathogener Mikroorganismen, verwendet werden. Man kann dabei zwei verschiedene Arten der Detektion unterscheiden: die unspezifische und die spezifische Detektion.

Bei der **unspezifischen Detektion** interkaliert ein Fluoreszenzfarbstoff, wie z.B. SYBR-Green I[®], in die kleinen Furchen der doppelsträngigen DNA. Einmal pro Zyklus wird das Fluoreszenzsignal bei 530 nm gemessen. Während der exponentiellen Phase der PCR steigt das Signal proportional zur Menge der amplifizierten DNA an. Da SYBR-Green I[®] sich an jede doppelsträngige DNA anlagert, werden auch unspezifische PCR-Produkte, wie Primer-Dimere, detektiert. Die Spezifität des Nachweises wird durch eine Schmelzpunktanalyse der Amplikate zwischen 60°C und 90°C erreicht. Diese wird am Ende der PCR durchgeführt, wobei die Fluoreszenzabnahme mit steigender Temperatur kontinuierlich gemessen wird. Die Änderung der Fluoreszenz hat für jedes Produkt ein charakteristisches Maximum, die Schmelztemperatur des Produktes. Primer-Dimere haben einen niedrigeren Schmelzpunkt als die spezifischen Amplikate. Im Vergleich zur Sonden-spezifischen PCR ist diese Nachweismethode wesentlich kostengünstiger.

Bei der **spezifischen Detektion** werden fluoreszenzmarkierte Oligonukleotide - sogenannte Sonden - verwendet, die aufgrund ihrer Komplementarität zur Targetsequenz eine spezifische Detektion gewährleisten. Es gibt verschiedene Arten von Sonden, wie z.B. *Molecular Beacons* oder *TaqMan*-Sonden. In dieser Arbeit erfolgte die Detektion der DNA nach dem *TaqMan*-Prinzip (Abb. 1.12, Livak et al. 1995) mittels modifizierter *TaqMan*-Sonden. Diese sind am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluorophor (FAM oder VIC) und am 3'-Ende mit einem nichtfluoreszierenden *Quencher* (NFQ, „Fluoreszenzunterdrücker“) markiert. Außerdem befindet sich am 3'-Ende noch ein *minor groove binder* (MGB) bzw. ein *black hole quencher* (BHQ). Der MGB bzw. der BHQ erhöhen die Schmelztemperatur, ohne jedoch die Sondenlänge zu erhöhen.

Die Spezifität des *real-time* PCR-Assays wurde zusätzlich noch durch die Verwendung von LNA-Basen (*Locked Nucleic Acid*) gesteigert. Diese verändern die Konformation der Doppelhelix und stabilisieren komplementäre Basenpaarungen, so dass durch die resultierende Erhöhung der Schmelztemperatur (T_m) eine Steigerung der Spezifität des Assays erreicht wird.

Während der *Annealing*-Phase (Abb. 1.12 a) der PCR lagert sich die modifizierte *TaqMan*-Sonde spezifisch an die komplementäre Sequenz zwischen Vorwärts- und Rückwärts-Primer an. Der Reporter-Fluorophor der Sonde (R) wird durch UV-Licht einer Halogenlampe angeregt. Durch die räumliche Nähe von Reporter und *Quencher* (NFQ, nicht fluoreszierender *Quencher*) findet ein „Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer“ (FRET) statt, so dass der *Quencher* die Fluoreszenz-Emission des Reporters unterdrückt (Cardullo et al. 1988). Während der Elongation (Abb. 1.12 b) wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der *Taq*-DNA-Polymerase abgebaut, so dass der Reporter vom *Quencher* getrennt wird und der FRET nicht mehr stattfinden kann. Dadurch kann der Reporter Photonen emittieren (1.12 c), deren Intensität proportional zur gebildeten DNA-Menge ist (nichtspezifische DNA-Amplikone werden nicht detektiert). Durch die Blockade der Sonde am 3'-Ende kann diese nicht verlängert werden.

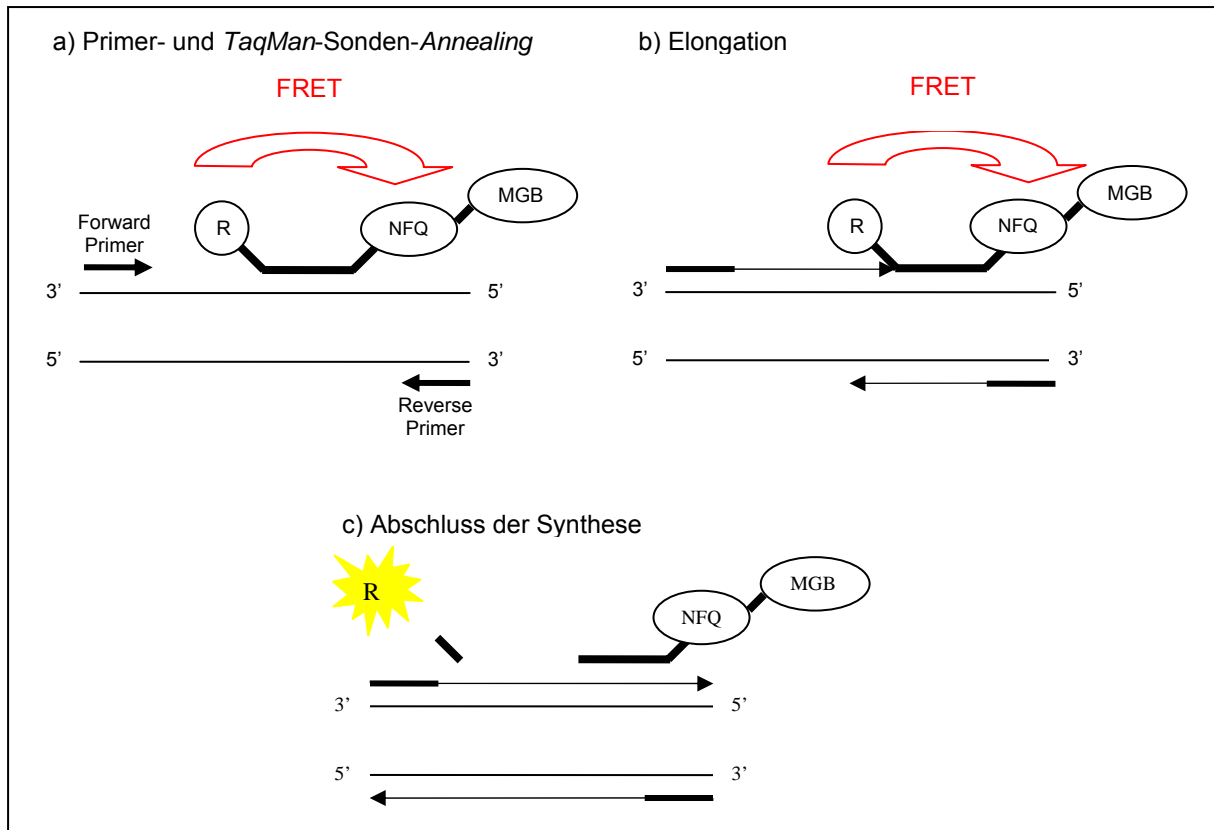


Abb. 1.12: Das Prinzip der real-time PCR mit einer TaqMan-MGB-Sonde

Die Fluoreszenz kann in einem Thermocycler mit entsprechender Detektionsoptik nach jedem PCR-Zyklus gemessen werden, ohne dass das Reaktionsgefäß geöffnet werden muss. Ein *post-PCR-handling* (z.B. Gelelektrophorese), wie bei der Endpunkt-PCR, ist nicht mehr nötig. Gegenüber der ursprünglichen PCR nach Saiki et al. (1988) wird die Spezifität durch die Verwendung der TaqMan-Sonde deutlich erhöht. Der größte Vorteil der *real-time* PCR liegt aber in der Analyse der DNA-Menge während der exponentiellen Phase der Amplifikation (Abb. 1.13). In dieser Phase verläuft die Amplifikation optimal, da die Substrate noch in ausreichender Menge vorhanden sind, so dass eine Verdopplung der DNA pro Zyklus stattfinden kann. Das System ist komplett automatisierbar und sehr schnell, da durch die Verwendung von Mikrotiterplatten gleichzeitig bis zu 96 Proben in zwei Stunden ausgewertet werden können.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes kann mittels der relativen oder der absoluten Quantifizierung erfolgen. Bei der **relativen Quantifizierung** wird z.B. die Expression eines Gens in einer Zellkultur nach einem Stimulus relativ zu einer experimentellen Kontrollgruppe bestimmt. Bei der **absoluten Quantifizierung** wird eine

Verdünnungsreihe eines Standards mit bekannter Konzentration erstellt, um mit dieser die Konzentration unbekannter Proben zu bestimmen. Zum Ausschluss einer Kontamination des Mastermixes wird eine Leerkontrolle, d.h. eine Probe, die nur den Mastermix und keine DNA enthält (NTC: *no template control*) mituntersucht. Abb. 1.13 zeigt den sigmoidalen Verlauf der relativen Fluoreszenz (Rn) über 40 Zyklen für den Standard des Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (ABI), der in dieser Arbeit verwendet wurde. Für die Standardverdünnungsreihe wurden 0,023 ng/µl bis 50 ng/µl menschlicher DNA eingesetzt. Je größer die eingesetzte DNA-Menge ist, desto früher tritt das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrundrauschen heraus, d.h. desto niedriger ist die Zykluszahl. Während der ersten Zyklen der PCR gibt es kleine Schwankungen der Fluoreszenzsignale um die sogenannte *baseline* (Grundlinie) des Amplifikations-Plots. Ein Anstieg der Fluoreszenz über die *baseline* zeigt die Bildung eines PCR-Produktes. Der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz einen Schwellenwert (*threshold*) übersteigt und somit das Signal zum ersten Mal aus dem Hintergrundrauschen hervortritt, ist definiert als *threshold cycle* (C_T).

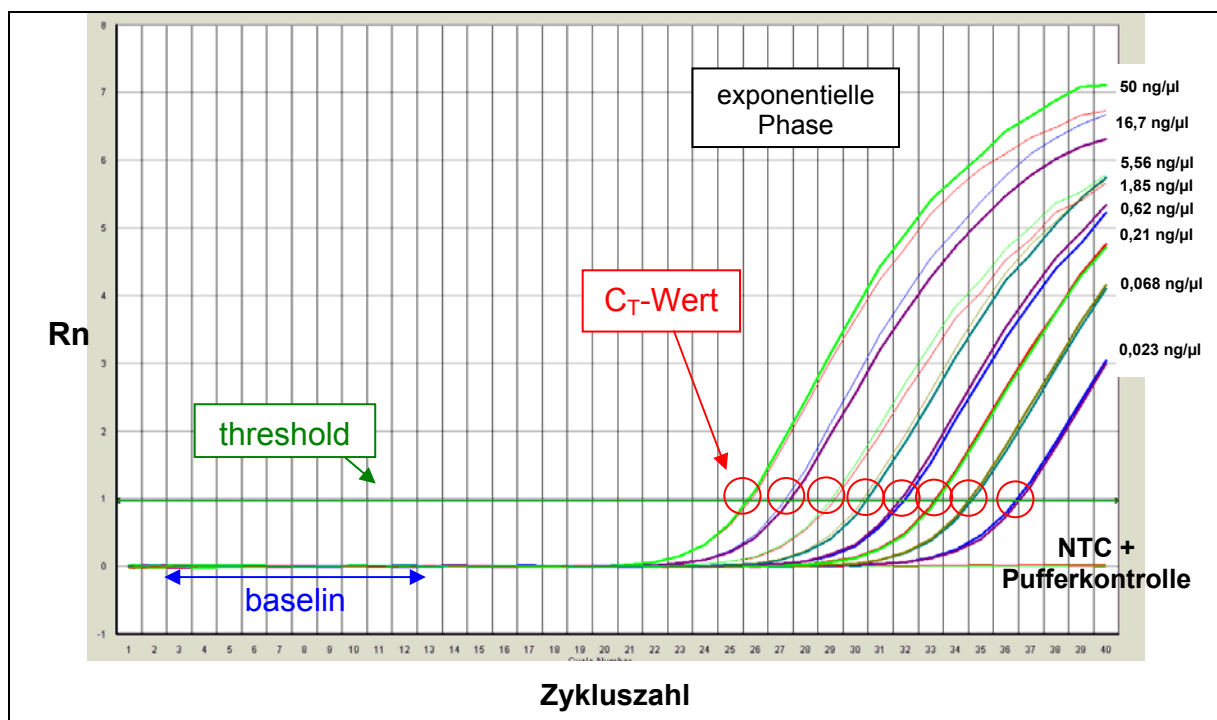


Abb. 1.13: Beispiel für einen Amplifikationsplot des Quantifiler® Human DNA Quantification Kit
Die relative Fluoreszenzintensität (Rn) wurde gegen die Zykluszahl aufgetragen. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. NTC: *no template control*.

Trägt man die gemessenen C_T -Werte des Standards gegen den Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge auf, so erhält man durch lineare Regression eine

Kalibrationsgerade (Abb. 1.14), mit der man von dem gemessenen C_T -Wert einer unbekannt Probe auf deren Konzentration zurückschließen kann.

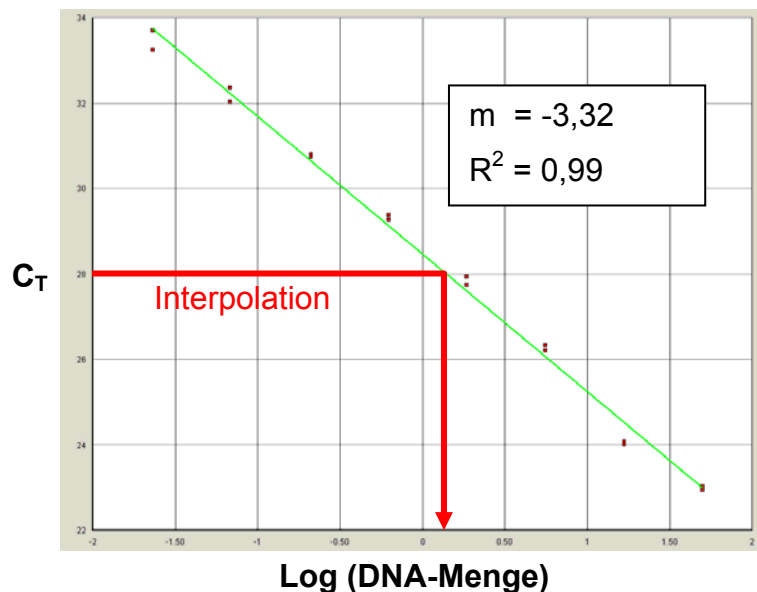


Abb. 1.14: Die Kalibrationsgerade

Die durch die *real-time* PCR bestimmten C_T -Werte wurden gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. In der Abbildung sind die Steigung (m), der Korrelationskoeffizient (R^2) und die Interpolation dargestellt.

Die lineare Regression und die Ableitung der Konzentration der unbekannt Proben erfolgt mit Hilfe der ABI PRISM 7000 SDS Software (Applied Biosystems), nachdem *baseline* und *threshold* definiert wurden. Diese wurden so variiert, dass eine möglichst optimale Steigung $m = -3,32$ und ein Korrelationskoeffizient $R^2 > 0,99$ erreicht wurden, da dann die *real-time* PCR optimal verlief. Aus der Steigung ist es möglich, die Amplifizierungseffizienz der PCR-Reaktionen mit $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ zu ermitteln. Diese weist im Optimalfall den Faktor 2 auf (2 = Verdopplung), der bei einer Steigung von $m = -3,32$ erreicht wird.

Der *TaqMan*-Mastermix enthält neben MgCl_2 , BSA und Nukleotiden eine *Hot-start*-DNA-Polymerase. Dadurch wird eine hohe Sensitivität und Spezifität erreicht. Die Polymerase besitzt keine enzymatische Aktivität bei Raumtemperatur und wird durch einen 15 minütigen Hitzeschritt aktiviert. Zur Verhinderung von *carry-over* Kontaminationen von vorherigen *real-time* Amplifikaten enthält der Mastermix (Ausnahme: Quantifiler® Human DNA Quantification Kit) dUTP und das Enzym Uracil-N-glycosylase (UNG). Die dUTP werden neben den dTTP in die neusynthetisierte DNA eingebaut. Das Enzym UNG baut in dem zweiminütigen 50°C -

Schritt diese, bei der vorherigen *real-time* PCR entstandene und somit dUTP enthaltende DNA ab. Der ebenfalls im Mastermix als passiver Standard enthaltene Fluorophor ROX (6-Carboxy-X-rhodamin) normiert Schwankungen der Fluoreszenz, die z.B. durch Pipettierunterschiede von Vertiefung zu Vertiefung auftreten können. Daraus ergibt sich die relative Fluoreszenz R_n . Außerdem ist diese passive Referenz essentiell, wenn verschiedene *TaqMan*-Sonden mit unterschiedlichen Reporter-Farbstoffen in einem Reaktionsansatz kombiniert werden.

Zur Detektion von eventuell vorhandenen PCR-Inhibitoren im DNA-Extrakt kann man neben den vorher erwähnten Reagenzien noch eine Interne-PCR-Kontrolle (IPC, *internal PCR control*) verwenden. Diese Template-DNA ist eine synthetische, nicht natürlich vorkommende Sequenz, die mittels eines Primerpaares und einer mit dem Fluoreszenzfarbstoff VIC markierten *TaqMan*-MGB-Sonde amplifiziert wird. Zur Auswertung der Befunde dient die folgende Tabelle 1.2.

Tab. 1.2: Auswertung des *real-time* PCR-Assays unter Berücksichtigung der IPC

<i>real-time</i> PCR-Assay	IPC	Interpretation
keine Amplifikation	Amplifikation	keine Template-DNA vorhanden
keine Amplifikation	keine Amplifikation	Mastermix nicht in Ordnung
Amplifikation (geringer C_T -Wert, hoher ΔR_n)	keine Amplifikation	zu hohe DNA-Konzentration eingesetzt
Amplifikation (hoher C_T -Wert, geringer ΔR_n)	keine Amplifikation	PCR-Inhibitoren im DNA-Extrakt vorhanden
Amplifikation	Amplifikation (identischer C_T -Wert bei den Standardwerten und den Proben)	PCR verlief erfolgreich, keine Inhibition
Amplifikation	Amplifikation (C_T -Wert größer als bei den Standardwerten)	sehr schwache - starke Inhibition

In dieser Arbeit wurde sowohl ein *real-time* PCR-Assay für die Quantifizierung von Zellkern-DNA als auch für die Quantifizierung von mtDNA entwickelt. Neben der Bestimmung der Konzentration wurden die PCR-Produkte für die Typisierung des STR-Systems ACTBP2 bzw. für die Sequenzierung eines Bereiches der HV1/HV2-Region der mtDNA eingesetzt.

2. ZIELE DER ARBEIT

Wie schon in der Einleitung dieser Arbeit geschildert wurde, stellt die forensische Molekulargenetik ein breit gefächertes Teilgebiet des Faches Rechtsmedizin dar. Für ihren Einsatz in der Spurenkunde und der Abstammungsbegutachtung müssen immer wieder neue STR-Systeme etabliert werden, um z.B. die Individualisierungsfähigkeit zu steigern. Aber auch die Entwicklung neuer Verfahren zur Überprüfung der Quantität und Qualität der extrahierten DNA ist besonders für die Spurenkunde von zentraler Bedeutung. Aus der Vielfalt der Fragestellungen in diesem Bereich, kristallisierten sich vier Schwerpunkte für diese Arbeit heraus:

I. Populationsgenetische Studien des autosomalen STR-Systems

D10S2325

Zum jetzigen Zeitpunkt wurden verschiedene Populationsstudien für das STR-System D10S2325 durchgeführt, aber noch keine, die die Allelfrequenzen der kurdischen Bevölkerung sowie jene der in Westfalen lebenden Deutschen bestimmt. Inwieweit das pentamere STR-System D10S2325 einen effizienten Marker für die forensische Fallarbeit darstellen könnte, soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

II. Forensische Anwendung der Sublocus-spezifischen Amplifikation von DYS385

Bei der Untersuchung des Y-chromosomalen STR-Systems DYS385, das aufgrund einer Locus-Duplikation zwei Allele liefert, fiel eine Inkompatibilität auf, die eine Klärung erfordert. Als Vorarbeit für die Aufklärung dieser Mutation soll eine populationsgenetische Studie an westfälischen Männern durchgeführt werden. Dazu sollen durch Etablierung einer neuen sublocus-spezifischen Amplifikation erstmalig die 'wahren' DYS385-Haplotypen bestimmt und so die Individualisierungseffizienz von DYS385 für die Abstammungsbegutachtung und Spurenkunde gesteigert werden.

III. Validierung eines neuartigen STR-Multiplex-Assays

Neben der Amplifikation eines einzelnen STR-Systems (Monoplex) können auch mehrere STR-Systeme (Multiplex) gleichzeitig in einem Reaktionsansatz amplifiziert werden. Diese STR-Multiplexe können selbst hergestellt oder kommerziell bezogen werden. Bevor eine Firma eine entwickelte STR-Multiplex auf den Markt bringt, führt sie mit ausgewählten Laboren sogenannte Betatests durch. Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Betatest des Humantype Chimera[®] II Kits der Firma Biotype (Dresden) durchgeführt werden, um seine Praxistauglichkeit zu erproben.

IV. Etablierung neuer *real-time* PCR-Assays

1. Anwendung der *real-time* PCR zur Untersuchung von Spurenmaterial

Am Ort eines Verbrechens kommt es häufig zur Antragung geringster Mengen von DNA an Kleidung und/oder an Werkzeugen. Bei der molekulargenetischen Untersuchung wird das STR-System ACTBP2, das die beste Nachweissensitivität bei Spuren aufweist, typisiert. Für die Quantifizierung der Spuren-DNA wird bisher der Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) verwendet. Um diesen eventuell später zu ersetzen, soll hier nun ein *real-time* PCR-Assay entwickelt werden, das eine Human-DNA-Quantifizierung unter Verwendung des ACTBP2-Systems mit dem Vorteil einer direkt anschließenden ACTBP2-Genotypisierung ermöglicht.

2. Etablierung und Anwendung eines *real-time* PCR-Assays zur Quantifizierung von mtDNA

Bei 'schwierigen Spuren' (z.B. telogenen Haaren oder Zähnen) wird als *ultima ratio* häufig die mtDNA untersucht. Hier soll nun ein *real-time* PCR-Assay entwickelt werden, der eine mtDNA-Quantifizierung ermöglicht. Die erhaltenen PCR-Produkte sollen dann direkt nach der Quantifizierung zur Typisierung mittels Sequenzierung eingesetzt werden. Außerdem soll danach der entwickelte mtDNA-Assay zur Quantifizierung von mtDNA aus Zahndentin verwendet 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
Agarose	SERVA, Mannheim
Amberlite	SERVA, Mannheim
Ampicillin Natriumsalz	ROTH, Karlsruhe
Bisacrylamid	SERVA, Mannheim
BSA (DNase frei)	Sigma, München
Chelex [®] 100	BIO RAD, München
dNTPs	Amersham Pharmacia, Freiburg
flüssiger Stickstoff	Westfalen AG, Münster
Formamid	Sigma, München
genRES [®] LS500ROX	Serac, Manfred R. Hofmann GmbH, Bad Homburg
Glycogen	Roche, Mannheim
Glycerol	SERVA, Mannheim
HiDi-Formamid	Applied Biosystems, Darmstadt
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Griesheim
IPTG	ROTH, Karlsruhe
K562 DNA (600µg/ml)	Promega, Mannheim
LB-Pulver	ROTH, Karlsruhe
MgCl ₂	Applied Biosystems, Darmstadt
qPCR MasterMix Plus	Eurogentec, Köln
Reaction Buffer (10x)	Eurogentec, Köln
Silbernitrat	ROTH, Karlsruhe
SuRE/Cut Buffer H	Roche, Mannheim

TEMED	SERVA, Mannheim
X-Gal	ROTH, Karlsruhe
123 bp-Längenmarker	GibcoBRL/Invitrogen, Karlsruhe

3.1.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Tab. 3.1: Fluoreszenzfarbstoffe für die Kapillargelelektrophorese und die *real-time* PCR (Applied Biosystems)

Kurzbezeichnung	chemischer Name	Absorptionsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]
6-FAM	6-Carboxyfluoreszein	494	522
ROX	6-Carboxy-X-rhodamin	587	607
TAMRA	N,N,N',N'-Tetramethyl-6-carboxyrhodamin	560	582
VIC	nicht bekannt	538	554

3.1.3 Fertige Reaktionssysteme (Kits)

BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Humantype Chimera® I	Biotype, Dresden
Humantype Chimera® II	Biotype, Dresden
Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma, München
Microcon® YM-30 Kit	Millipore, Eschborn
NucleoSpin® DNA Trace Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® DNA Trace bones buffer set	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Tissue Kit	Macherey-Nagel, Düren
<i>TaqMan</i> ® Exogenous Internal Positive Control	Applied Biosystems, Darmstadt
Qiaquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Quantifiler® Human DNA Quantification Kit	Applied Biosystems, Darmstadt

3.1.4 Geräte

ABI PRISM™ 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt

Analysenmühle A 14	Faust, Berlin
Biofuge primo	Heraeus, Hanau
Biofuge 13	Heraeus, Hanau
Brutschrank B12	Heraeus, Hanau
DIGITAL-pH-Meter 646	Knick, Berlin
Drehinkubator GFL 7601	Laborbedarf Willers, Münster
Handbohrer	KaVo Dental GmbH, Berlin
Inkubationsschüttler Certomat® IS	B. Braun Biotech, Melsungen
Labofuge 400R	Heraeus, Hanau
Multiphor II-Elektrophoresekammer	Amersham, Freiburg
MultiDrive™ XL power supply	Pharmacia, Freiburg
Reinbank BSB 6A	Gelaire® <i>Flow Laboratories</i> , Meckenheim
Thermocycler Trioblock	Biometra, Göttingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Überkopfschüttler Sky Line RM-2L	ELMI, Erfurt
UV/VIS Spektrometer Lambda 11	Perkin Elmer, Wiesbaden
VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 25T	H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim
Wasserbad	Laborbedarf Willers, Münster

3.1.5 Gebrauchswaren

ABsolute QPCR Seal	ABgene, Hamburg
Bohreraufsätze	KaVo Dental GmbH, Berlin
Hedström Feile	Chic-Dental GmbH, Köln
Nervnadeln	Chic-Dental GmbH, Köln
PAG-Folie (Gel-Fix® for PAG)	SERVA, Mannheim
Performa® DTR Gel Filtrations Cartridges	Edge BioSystems, Gaithersburg, USA
PP-PCR-Platten, 96 well, mit halbem Rand	Greiner <i>bio-one</i> , Solingen
Sinterdiamant Kronentrenner	Chic-Dental GmbH, Köln

3.1.6 Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen gebrauchsfertiger Kits und Restriktionsendonukleasen wurden nach Herstellerangaben benutzt und sind hier nicht gesondert aufgeführt.

Acryl-Bis	291 g Acrylamid 2x 9 g Bisacrylamid 5 g Amberlite ad 1000 ml Aqua bidest.
Acryl-PDA	291 g Acrylamid 2x 9g Piperazindiacrylamid 5 g Amberlite ad 1000 ml Aqua bidest.
Dephosphorylierungs-Puffer (10x)	0,5 M Tris 50 mM MgCl ₂ pH 8,5 mit HCl einstellen
dNTP-Lösung	2,5 mM dATP 2,5 mM dCTP 2,5 mM dGTP 2,5 mM dTTP Lagerung bei -20°C
Glycerinlösung 65% (v/v)	Glycerin 0,1 M MgSO ₄ 10 mM Tris/HCl, pH 8
Natriumcarbonat	0,28 M Na ₂ CO ₃ 0,24% Formalin 0,04% Natriumthiosulfat ad 1000 ml Aqua dest.
Silbernitrat	0,1% AgNO ₃ 0,0525% Formalin ad 1000 ml Aqua dest.

T ₁₀ E _{0,1} -Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,1 mM Na ₂ EDTA (pH 8,0) 20 µg/ml Glycogen
Tris-Borat-Puffer, pH 9,0	0,5 M Tris 0,28 M Borsäure ad 5000 ml Aqua bidest. 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Tris/HCL-Puffer, pH 8,0	5 mM Tris, mit HCl auf pH 8,0 einstellen
Tris-Sulfat-Puffer, pH 9,0	0,37 M Tris 0,2% konz. Schwefelsäure (96%) ad 1000 ml Aqua bidest.

3.1.7 Sterilisierung von Lösungen und Gebrauchswaren

Lösungen und Gebrauchswaren wurden für 20 min bei 121°C und 10,5 Pa im VARIOKLAV Dampfsterilisator Typ 25T (H+P Labortechnik AG, Oberschleißheim) sterilisiert.

3.1.8 Enzyme

<i>Eco</i> RI	Roche, Mannheim
Exonuklease I	Roche, Mannheim
<i>GoldTaq</i> -DNA-Polymerase	Eurogentec, Köln
Phosphatase, <i>Alkaline from shrimp</i> (SAP)	Sigma, München
Proteinase K	Roche, Mannheim

3.1.9 Vektor

Zum Klonieren von PCR-Fragmenten wurde der Vektor pGEM[®]T Easy (Promega, Mannheim) verwendet. Die Vektorkarte befindet sich im Anhang.

3.1.10 Bakterienstamm

Als Bakterienstamm zur Amplifikation von Plasmiden diente *Escherichia coli* JM109 (Genotyp: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*(r_K^- , m_K^+), *relA1*, *supE44*, Δ (*lac-proAB*), [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI^{qZ}* Δ M15] (Messing et al. 1981).

3.1.11 Kulturmedien

LB-Medium	25 g LB-Pulver in 1 l Aqua bidest.
LBA-Medium	50 µg/ml Ampicillin in LB-Medium
Agar-Platten	1,5% (w/v) Agar in LB-Medium
Zusätze zur Selektion	Ampicillin (50 µg/ml)
Zusätze für Agar-Platten	0,5 mM IPTG 0,1% (w/v) X-Gal

Die Medien wurden mit Aqua bidest. angesetzt und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen auf etwa 50°C wurden Ampicillin, IPTG und X-Gal zugegeben. Agar-Platten und Flüssigmedien wurden bei 4°C gelagert.

3.1.12 Lagerung von Bakterienstämmen

Bakterienstämme wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37°C inkubiert und dann bei 4°C gelagert. Rekombinante Bakterienklone wurden dauergelagert, indem 500 µl einer Über-Nacht-Kultur mit 500 µl 65% Glycerinlösung (v/v) versetzt und bei -20°C aufbewahrt wurden.

3.1.13 Synthetische Oligonukleotide

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Oligonukleotide von der Firma MWG-Biotech hergestellt und lyophilisiert geliefert. Es wurde eine Stammlösung von

100 pmol/μl hergestellt, aus der dann die Gebrauchslösungen (20 pmol/μl bzw. 5 pmol/μl) gefertigt wurden. Die Stammlösung und die Gebrauchslösungen wurden bei -20°C gelagert.

3.1.13.1 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in den folgenden Tabellen aufgeführt:

Tab. 3.2: Primer für die genomische, Y-chromosomale, mitochondriale PCR bzw. *real-time* PCR

Name	Sequenz
ACTBP2-P1 (Polymeropoulos et al. 1992)	5' - AAT-CTG-GGC-GAC-AAG-AGT-GA-3'
ACTBP2-P1-FAM (Polymeropoulos et al. 1992)	5' - 6-FAM-AAT-CTG-GGC-GAC-AAG-AGT-GA-3'
ACTBP2-P2 (Polymeropoulos et al. 1992)	5' - ACA-TCT-CCC-CTA-CCG-CTA-TA-3'
D10 for (Hou et al. 2001)	5' - CTC-ACG-AAA-GAA-GCC-TTC-TG-3'
D10 rev (Hou et al. 2001)	5' - GAG-CTG-AGA-GAT-CAC-GCA-CT-3'
DYS385a (Kittler et al. 2003)	5' - TGT-TGT-TGA-CTG-TGG-TAG-GTA-3'
DYS385b (Kittler et al. 2003)	5' - GGA-ATG-CAA-TTT-CCC-TTT-AT-3'
DYS385.2B (Kittler et al. 2003)	5' - CCA-ATT-ACA-TAG-TCC-TCC-TTT-C-3'
DYS385-P1-FAM (Bhoopat et al. 2003)	5' - 6-FAM-GAG-AAA-GAG-GAA-AGA-GAA-AGA-AAG-G-3'
DYS385-P2 (Bhoopat et al. 2003)	5' - ATC-TAT-TCC-AAT-TAC-ATA-GTC-CTC-C-3'
mtP1-16262	5' - CTC-ACC-CAC-TAG-GAT-ACC-AAC-AAA-3'
mtP2-16439	5' - GCA-CTC-TTG-TGC-GGG-ATA-TT-3'

Tab. 3.3: Primer für die Sequenzanalyse (falls sie nicht den Amplifikationsprimern entsprechen)

Name	Sequenz
DYS385-P1 (Bhoopat et al. 2003)	5' - GAG-AAA-GAG-GAA-AGA-GAA-AGA-AAG-G-3'
M13 (uni)	5' - TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-3'
M13 (rev)	5' - CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-3'
mtP1-16262	5' - CTC-ACC-CAC-TAG-GAT-ACC-AAC-AAA-3'
mtP2-16439	5' - GCA-CTC-TTG-TGC-GGG-ATA-TT-3'

3.1.13.2 Sonden

Tab. 3.4: TaqMan-Sonden für die *real-time* PCR

Bei der mtDNA-LNA-Sonde sind die LNA-Basen (*Locked Nucleic Acid*) unterstrichen. Modifikation am 3'-Ende: *black hole quencher* (BHQ)

Name	Sequenz
ACTPB2- <i>TaqMan</i> -Sonde	nicht bekannt (Applied Biosystems)
mtDNA-LNA-Sonde	5' - 6 - FAM - ATT - T <u>C</u> A - <u>C</u> G <u>G</u> - <u>A</u> G <u>G</u> - <u>A</u> TG - GT - BHQ - 1 - 3'

3.1.14 Herkunft der Proben

Die Blut- bzw. Speichelproben und die verschiedenen Spuren stammen aus dem Untersuchungsgut des Instituts für Rechtsmedizin in Münster. Die extrahierten Zähne wurden uns nach Zustimmung durch die Probanden von der Zahnklinik des Universitätsklinikums Münster zur Verfügung gestellt.

3.1.15 GenBank und andere Internetquellen

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

3.2 Methoden

3.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

Bei diesen Methoden erfolgt die Extraktion sowohl von nukleärer (gDNA) als auch von mitochondrialer DNA (mtDNA; Ausnahme: Minipräparation von Plasmid-DNA).

3.2.1.1 DNA-Extraktion aus getrockneten Blutflecken

Die Extraktion erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin[®] Tissue Kit (Macherey-Nagel): Ein 15 bis 30 mm² kleiner Blutfleck wurde in 180 µl T1 Puffer für 10 min bei 94°C inkubiert. Nach Abkühlen der Probe wurde diese mit 25 µl Proteinase K versetzt und für 1 h im Schüttelbad bei 56°C inkubiert. Zum Lysieren der Zellen wurden 200 µl Puffer B3 hinzugefügt und für 10 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden 210 µl Ethanol (96%) zu der Probe gegeben. Die Lösung wurde auf die NucleoSpin[®]Tissue Säule überführt, die dann für 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert wurde. Anschließend wurden 500 µl eines Waschpuffers (BW) auf die Säule gegeben und wieder 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert. Durch Zugabe von 600 µl Puffer B5 und 1minütiger Zentrifugation bei 11.000 x g wurde die Säule erneut gewaschen. Die Silica-Membran wurde durch nochmaliges Zentrifugieren getrocknet. Zum Eluieren der DNA von der Säule wurden 100 µl vorgewärmter Puffer BE (70°C) auf die Säule gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 11.000 x g zentrifugiert.

3.2.1.2 DNA-Extraktion aus Speichelproben

Die DNA-Extraktion erfolgte nach einer von Singer-Sam et al. (1989) beschriebenen und in einigen Punkten vom Institut für Rechtsmedizin Münster modifizierten Methode. Hierbei wird Chelex[®] 100 verwendet, ein Styrolharz, das mehrwertige Metallionen komplexiert und so die Degradierung der DNA bei hohen Temperaturen verhindert.

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. Zur Lyse der Mundschleimhautzellen wurden die Proben über Nacht bei 37°C oder für 30 min bei 56°C im Wasserbad inkubiert und anschließend für 8 min gekocht.

Bei älteren Speichelproben kann zur Verstärkung der Lyse zusätzlich 50 µl Proteinase K (2 mg/ml) vor der Inkubation im Wasserbad hinzugefügt werden (Walsh et al. 1991).

Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 14.000 x g konnte der Überstand direkt in die PCR (Abschnitt 3.2.5) bzw. *real-time* PCR (Abschnitt 3.2.3.2) eingesetzt werden.

3.2.1.3 DNA-Extraktion aus Zellmaterial an diversen Spurentägern

Für diese Arbeit musste die DNA aus diversen Spurentägern wie z.B. Zigarettenfiltern und Flaschenhalsabrieben extrahiert werden. Dazu wurden kleine Stücke von dem Spurentäger abgeschnitten und für die DNA-Extraktion mit Chelex[®] 100 (siehe Abs. 3.2.1.2) eingesetzt. Lagen z.B. Handschuhe als Spurentäger vor, so wurden diese mit einem befeuchteten Wattestieltpuffer abgerieben und ein Stück dieses Abriebs wurde für die Extraktion eingesetzt.

3.2.1.4 DNA-Extraktion aus Zahn-Dentin

Zur Vorbereitung für die DNA-Extraktion wurden die vorliegenden Zähne zunächst mit Hilfe eines Handbohrers mit verschiedenen Bohraufsätzen komplett von eventuell noch vorhandenem Zahnfleisch gereinigt. Die Zahnwurzel wurde mit einem Kronentrenner vom restlichen Zahn abgetrennt und die Nerven mit einer Nervnadel gezogen, so dass nur noch das Zahn-Dentin vorlag. Dieses wurde zur Dekontamination von Fremd-DNA jeweils für 5 min zuerst in Natriumhypochloritlösung (NaOCl) und dann in 96% Ethanol eingelegt. Nach dem Verdampfen des Alkohols wurde das gereinigte Zahndentin unter flüssigem Stickstoff in der Analysenmühle A 14 (Faust) zermahlen.

Die DNA-Extraktion aus dem Zahn-Dentin erfolgte mittels des NucleoSpin® DNA Trace Kit in Kombination mit dem NucleoSpin® DNA Trace bones buffer set von Macherey-Nagel (Düren) nach Herstellerangaben. Dabei werden die homogenisierten Proben mit einer Lösung aus chaotropen Ionen in Gegenwart von Proteinase K lysiert. Die DNA wird an die Silica-Membran der NucleoSpin DNA trace F Säule gebunden, wobei dieser Bindungsprozess reversibel und spezifisch für Nukleinsäuren ist. Verunreinigungen werden durch Waschschriffe mit zwei verschiedenen Isopropanol-haltigen Puffern beseitigt. Saubere genomische DNA wird schließlich unter niedrigen Ionenkonzentrationen in einem alkalischen Puffer eluiert.

3.2.2 Aufreinigung und Aufkonzentrierung der DNA-Extrakte

Zur Aufreinigung und Aufkonzentration verunreinigter, alter und/oder wenig DNA-enthaltender DNA-Extrakte wurde der Microcon® YM-30 Kit der Firma Millipore nach Herstellerangaben verwendet.

Dabei wird der Extrakt über eine Membran (besteht aus regenerierter Zellulose) mit einer spezifischen Porengröße (30.000 NMWL = Nominale Molekulargewichtsgrenze) zentrifugiert. Aufgrund ihrer Größe kann die DNA diese Membran nicht passieren, Salze und andere Bestandteile dagegen schon. Die Elution erfolgt durch Zugabe von 60 µl HPLC-Wasser auf die umgedrehte Säule und anschließende Zentrifugation.

3.2.3 Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

3.2.3.1 Quantifizierung von Plasmid-DNA mittels UV/VIS-Spektrophotometer

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

Die Nukleinsäurekonzentration errechnet sich aus der OD_{260nm} , der Verdünnung (f) und dem Faktor d (für doppelsträngige DNA $d = 50ng/\mu l$):

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

Die Reinheit der DNA-Lösung ergibt sich aus dem Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} . Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Ansonsten liegt eine Proteinkontamination vor.

3.2.3.2 Quantifizierung von DNA-Extrakten mittels *real-time* PCR

In dieser Dissertation wurden zwei Methoden zur Quantifizierung von Spurenmaterial entwickelt. Das STR-System ACTBP2 wurde für die Quantifizierung von genomischer DNA (ACTBP2-Assay) und ein Teil der HV1-Region für die Quantifizierung von mtDNA (mtDNA-Assay) verwendet. Die Ergebnisse der Quantifizierung der genomischen DNA wurden mit dem Quantifizierungsergebnissen, die mit Hilfe des Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) erzielt wurden, verglichen.

3.2.3.2.1 Quantifizierung von gDNA mittels ACTBP2-Assays und von mtDNA mittels mtDNA-Assays

Die ACTBP2-*TaqMan*-Sonde war am 5'-Ende mit VIC (Reporter) und am 3'-Ende mit dem MGB-Komplex (*minor groove binder*, *Quencher*) markiert, die mtDNA-LNA-Sonde dagegen mit 6-FAM als Reporter und einem *black hole quencher* (BHQ) als Quencher. An einigen Stellen der mtDNA-LNA-Sonde waren sogenannte LNA-Basen (*Locked Nucleic Acid*) eingebaut, um die Bindung der Sonde an den Matrizenstrang und somit die Spezifität des Assays zu steigern.

Die Zusammensetzung der Mastermixe gibt die Tabelle 3.5 auf der folgenden Seite an:

Tab. 3.5: Zusammensetzung der Mastermixe für die *real-time* PCR

	ACTBP2-Assay	mtDNA-Assay
qPCR MasterMix Plus (2x)	6,75 μ l	
forward Primer (P1)	150 nM [20 pmol/ μ l]	900 nM [50 pmol/ μ l]
forward Primer fluoreszenzmarkiert (P1-FAM)	150 nM [20 pmol/ μ l]	-
reverse Primer (P2)	300 nM [20 pmol/ μ l]	900 nM [50 pmol/ μ l]
10x Exo IPC Mix	-	0,3375 μ l
50x Exo IPC DNA	-	0,0675 μ l
ACTBP2-Sonde [5 pmol/μl]	50 nM	-
mtDNA-Sonde [10 pmol/μl]	-	50 nM
HPLC-Wasser	ad 11,5 μ l	

Der qPCR MasterMix Plus (2x, Eurogentec) enthielt 2,5 mM MgCl₂, BSA, Nukleotide, *AmpliTaq HotGoldStar* DNA-Polymerase, den passiven, internen Standard ROX und das Enzym AmpErase[®] UNG.

Beim mtDNA-Assay wurde zusätzlich noch eine Interne PCR-Kontrolle (IPC) mituntersucht. Es wurde nur $\frac{1}{4}$ der vom Hersteller angegebenen Menge an den IPC-Komponenten eingesetzt.

Der Standard des ACTBP2-Assays und der des mtDNA-Assays wurden mit T₁₀E_{0,1}-Puffer in den folgenden Verdünnungen eingesetzt:

Tab. 3.6: Verdünnungen des Standard des ACTBP2-Assays bzw. des mtDNA-Assay

ACTBP2-Assay	mtDNA-Assay
Stammlösung [200 ng/ μ l]	Stammlösung [10 ⁸ Kopien/ μ l]
50 ng/ μ l	10 ⁶ Kopien/ μ l
16,7 ng/ μ l	10 ⁵ Kopien/ μ l
5,56 ng/ μ l	10 ⁴ Kopien/ μ l
1,85 ng/ μ l	10 ³ Kopien/ μ l
0,62 ng/ μ l	10 ² Kopien/ μ l
0,21 ng/ μ l	
0,068 ng/ μ l	
0,023 ng/ μ l	

In die Vertiefungen der PP-PCR-Platten (Greiner) wurden 11,5 μ l des jeweiligen Mastermixes vorgelegt, in den dann 2 μ l der Standardverdünnungsreihe, des T₁₀E_{0,1}-Puffers (Pufferkontrolle), Wasser (NTC, *no template control*) bzw. der DNA-Extrakte

gegeben wurde. Bei der Standardreihe, der Pufferkontrolle und dem NTC wurden immer Doppelwerte pipettiert. Die Mikrotiter-PCR-Platte wurde mit einer Folie (Absolute QPCR Seal, ABgene) beklebt, in das Gerät ABI PRISM™ 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) eingesetzt und das dem jeweiligen Assay entsprechende Programm (siehe Tab. 3.7) wurde gestartet:

Tab. 3.7: Temperaturprogramm des ACTBP2- bzw. mtDNA-Assays

Die in Klammern angegebenen Werte wurden erst später zur Verbesserung der Sensitivität des ACTBP2-Assays eingeführt.

	ACTBP2-Assay	mtDNA-Assay
UNG-Aktivierung	50 °C	2 min
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
1. Denaturierung	95 °C	15 sec
2. Annealing	60 °C 60 sec	60 °C 90 sec
3. Elongation	(72 °C 60 sec)	72 °C 90 sec
Finale Extension	(72 °C 30 min)	72 °C 30 min

Die Konzentrationen der gDNA bzw. die Kopienzahl der mtDNA der Proben wurden automatisch von der ABI Prism 7000 SDS Software (Applied Biosystems) bestimmt.

3.2.3.2 Quantifizierung von gDNA mittels des Quantifiler® Human DNA Quantification Kit

Die Quantifizierung der DNA-Extrakte erfolgte wie im im Protokoll des Herstellers beschrieben, nur das von Applied Biosystems empfohlene Reaktionsvolumen von 25 µl (23 µl Mastermix + 2 µl DNA-Extrakt) wurde auf 13,5 µl (11,5 µl Mastermix + 2 µl DNA-Extrakt) reduziert.

3.2.4 Primer- und Sondenkonstruktion

Für das ACTBP2-Assay wurden die Primer nach Polymeropoulos et al. (1992) verwendet und die Sonde wurde von Frau Astrid Potratz (Applied Biosystems) entwickelt. Beim mtDNA-Assay wurden die Primer und die Sonde mit Hilfe der Primer 3 Software Version 4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu>) konstruiert. Die zusätzliche Modifikation des DNA-Rückgrades mit LNA-Basen erfolgte durch die Firma Eurogentec.

3.2.5 Polymerase-Ketten-Reaktion

Sowohl für die PCR-basierten DNA-Typisierungen der STR-Systeme D10S2325, DYS385, ACTBP2 als auch für die Klonierung des Standards für das mtDNA-Assay war es erforderlich, bestimmte DNA-Bereiche zu amplifizieren. Außerdem mussten die Primer der *real-time* PCR vor dem Einsatz in einer Endpunkt-PCR getestet werden. Dazu wurde zur Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenzen die PCR-Methode nach Saiki et al. (1988) gewählt, die mit Hilfe der thermostabilen *Thermophilus aquaticus*-DNA-Polymerase arbeitet.

Zumeist wurden jeweils 1 bis 2 µl der zu amplifizierenden DNA-Extrakte in 500 µl Eppendorfgefäße zu dem aliquotierten Mastermix gegeben. Die Zusammensetzung der Mastermixe für die entsprechenden Primerpaare ist in Tabelle 3.8 dargestellt:

Tab. 3.8: Zusammensetzung der Mastermixe für die PCR

	D10S2325 (modifiziert nach Hou et al. 2001)	DYS385		ACTBP2-Monoplex (modifiziert nach Popymeropoulos et al. 1992)	mtDNA
		1. PCR (modifiziert nach Kittler et al. 1998)	2. PCR (modifiziert nach Bhoopat et al. 2003)		
DNA-Extrakt	2 µl	1 µl	1 µl (des PCR-Produktes der 1. PCR)	2 µl	2 µl
MgCl ₂ [25 mM]	1,5 µl	3 µl	1,5 µl	1,5 µl	1,5 µl
BSA [10 mM]	0,5 µl	1µl	0,5	1 µl	1 µl
10 x Puffer	2,5 µl				
dNTPs [10 mM]	2 µl				
Forward Primer [20 pmol/µl]	0,5 µl	0,5 µl	0,375	1,5 µl	1 µl
Reverse Primer [20 pmol/µl]	0,5 µl	0,5 µl	0,375	1,5 µl	1 µl
GoldTaq-DNA-Polymerase [5 U/µl]	0,4 µl	0,25 µl	0,3	0,3 µl	2,5 µ
HPLC-Wasser	ad 25 µl				

Bei manchen Primerpaaren war der Forward Primer fluoreszenz-markiert, um eine spätere Längenbestimmung der PCR-Produkte mittels Kapillargelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.6.2) zu ermöglichen.

Es wurde neben den zu untersuchenden Proben stets 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 Ansätze wurden im Thermocycler Trioblock (Biometra, Göttingen) mit den folgenden Programmen (Tab. 3.9) amplifiziert:

Tab. 3.9: PCR-Konditionen der verschiedenen Primer-Paare

	D10S2325 (modifiziert nach Hou et al. 2001)	DYS385		ACTBP2-Monoplex (modifiziert nach Popymeropoulus et al. 1992)	mtDNA
		1. PCR (modifiziert nach Kittler et al. 1998)	2. PCR (modifiziert nach Bhoopat et al. 2003)		
Initiale Denaturierung	94°C 1 min	94°C 3 min 2 min		94°C 10 min	95°C 10 min
Anzahl der Zyklen	30				
1. Denaturierung	94°C 30 sec	94°C 30 sec 1 min		93°C 30 sec	95°C 15 sec
2. Annealing	55°C 30 sec	56°C 30 sec	55°C 1 min	61°C 30 sec	60°C 1 min
3. Elongation	72°C 30 sec	72°C 1 min		56°C 30 sec	
Finale Extension	72°C 30 min	72°C 7 min 10 min		72°C 30 min	72°C 30 min

Die STR-Multiplex-Assays Humantype Chimera[®] I und II (Biotype, Dresden) wurden gemäß Hersteller-Angaben durchgeführt.

3.2.6 Elektrophoresetechniken

3.2.6.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Erfolgskontrolle der PCR wurde eine horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese nach dem Verfahren von 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 Trennparametern (z.B. der Stromstärke) abhängig.

Zur Erfolgskontrolle der PCR wurden 8 %ige Gele und für die Typisierung der Allele (bei D10S2325) wurden 7,5 %ige Gele verwendet. Die Gele wurden nach folgender Rezeptur auf PAG-Folie zwischen zwei mit Ethanol gereinigte Glasplatten gegossen:

Kontrollgel: 8 %

8 % Acryl-Bis
8 mM Tris-Sulfat, pH 9,0
ad 15 ml Aqua bidest.

Typisierungsgel: 7,5 %

30 % Acryl-PDA
8 mM Tris-Sulfat, pH 9,0
ad 15 ml Aqua bidest.

Zum Starten der Polymerisation wurden 0,34 % (v/v) APS und 0,035 % (v/v) TEMED hinzugefügt.

Die Kontrollgele maßen 12 cm x 26 cm bei einer Stärke von 0,45 mm und boten ca. 10 cm Trennstrecke, die Typisierungsgele maßen 24 cm x 26 cm x 0,75 mm und boten ca. 20 cm Trennstrecke. Als Elektrodenstreifen wurden Filterpapierstreifen (26 cm x 1 cm) benutzt, die zuvor mit einem Tris-Borat-Puffer (1x) getränkt waren.

Auf das Gel wurden Glasfasergewebeplättchen (ca. 0,5 cm²) aufgelegt, auf welche jeweils 4 µl (Kontrollgel) bzw. 8 µl (Typisierungsgel) des Amplifikats aufgetragen wurden. Zur Längenbestimmung wurde der 123 bp-Längenmarker oder die D10S2325-Allelleiter mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte bei den Kontrollgelen bei 1000 V, 25 mA und 15 W bis dessen Bromphenolblau markierte Lauffront die Anode erreichte. Bei den Typisierungsgelen verlief die Elektrophorese in 3 Schritten. Sie startete mit 5 W, wurde nach dem 1. Drittel der Laufstrecke auf 10 W und nach dem 2. Drittel auf 15 W erhöht. Die Spannung wurde die ganze Zeit konstant bei

1000 V und die Stromstärke bei 40 mA vorgegeben. Die Elektrophorese war nach ca. 3 h beendet, sobald die Lauffront die Anode erreichte.

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

- | | | |
|----|---------------------------------------|---|
| 1. | 2% HNO ₃ | ca. 3 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. | Na ₂ CO ₃ (4°C) | bis zur optimalen Anfärbung der Gele |
| 6. | 7,5%ige Essigsäure (4°C) | 3 min |
| 7. | Spülen mit Aqua dest. | 2 x 20 sec |
| 8. | 5%iges Glycerin | 5 min |
| 9. | Lufttrocknen | ca. 24 h |

3.2.6.2 Kapillargelelektrophorese

Zur Bestimmung der Länge der PCR-Produkte, die zuvor mit einem Primerpaar, dessen *Forward* Primer fluoreszenz-markiert war, amplifiziert wurden, wurde eine Kapillargelelektrophorese durchgeführt.

Bei der Kapillargelelektrophorese werden die Amplifikate elektrophoretisch in einer mit einem Polymer (Gelmatrix) gefüllten Kapillare, die einen Innendurchmesser von 20-100 µm aufweist, der Größe nach aufgetrennt. 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 beginnt. Durch die hohe Spannung werden die Laufzeiten so verkürzt, dass eine Probe in wenigen Minuten analysiert ist. Wandert das Amplifikat an dem Laser vorbei, wird der Farbstoff zur Fluoreszenzemission angeregt, die von einer Detektionseinheit analysiert wird. Mit Hilfe eines internen Standards und der entsprechenden Software werden die Fragmentlängen der Amplifikate automatisch ermittelt. Diese Methode ist sehr sensitiv, denn mit der Laser-induzierten Fluoreszenz (LIF) können selbst noch sehr

geringe Mengen (bis 10 fg) von fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmenten nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurde die Kapillargelelektrophorese nach Herstellerangaben durchgeführt. Es wurde i.d.R. 1 µl des Amplifikats (die Plasmid-DNA musste zuvor aufgrund ihrer sehr hohen Konzentration stark mit HPLC-Wasser verdünnt werden) mit 12 µl Formamid und 0,5 µl Längenstandard genRES[®]LS500ROX (Serac) gemischt und dann für 3 min bei 94°C denaturiert. Die Probe wurde dann mit Hilfe des ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) und der GeneScan[®] Analysis Software Version 3.1.2 analysiert.

3.2.7 Klonierung von PCR-Fragmenten mittels TA-Klonierung

In dieser Arbeit wurde die TA-Klonierung zur Herstellung der Standards für das mtDNA-Assay (Abschnitt 3.2.3.2) verwendet. Ebenfalls wurden die langen D10S2325-Allele 21 bis 23 vor der Sequenzierung kloniert, um eine saubere Auftrennung der PCR-Produkte zu erhalten.

Die sogenannte TA-Klonierung basiert auf der Entdeckung, dass die *Taq*-DNA-Polymerase Amplikone mit einem überhängenden Adenosin produziert (Clark 1988). Verwendet man nun linearisierte Vektoren mit einem Thymin-Überhang, so lassen sich die PCR-Fragmente leichter klonieren als bei Verwendung linearisierter Vektoren mit glatten Enden.

Zur Klonierung der PCR-Produkte wurde das pGEM[®]-T Easy Vector System der Firma Promega nach Herstellerangaben verwendet. Dieses System enthält einen Vektor, der mit *EcoRV* linearisiert wurde und am 3'-Ende einen Thymin-Überhang besitzt, der kompatibel zu dem 3'-Adenin-Überhang des PCR-Produktes ist.

3.2.7.1 Adenylierung der Amplifikate

Das durch PCR amplifizierte mtDNA-Fragment (Abschnitt 3.2.5) musste vor der TA-Klonierung wieder adenyliert werden, da in der Zeit zwischen PCR-Amplifikation und

Klonierung die Phosphodiester-Bindungen des Adenosins zum PCR-Produkt hydrolysieren.

Dazu wurde dem Amplifikat auf Eis dATP [0,2 mM] sowie 5 U *GoldTaq*-DNA-Polymerase hinzugefügt und dieser Ansatz wurde für 30 min bei 70°C im Thermomixer compact (Eppendorf) inkubiert.

3.2.7.2 Aufreinigung der adenylierten PCR-Produkte

Zum Entfernen der überschüssigen PCR-Mastermix-Bestandteile sowie der bei der Adenylierung (Abschnitt 3.2.7.1) zusätzlich zugefügten Komponenten wurden die Proben mit Hilfe des Qiaquick PCR Purification Kits (Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

Hierzu wurden die Proben in 150 µl Puffer PB aufgenommen und auf die Säule gegeben. Es wurde 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert, anschließend wurde die Säule mit 750 µl Puffer PE gewaschen und wieder für 1 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Die DNA wurde anschließend nach 10 minütiger Inkubation mit 25 µl EB Puffer und 1 minütiger Zentrifugation bei 14.000 x g von der Säule eluiert.

3.2.7.3 Ligation über Thymin-Überhänge

Die amplifizierten (Abschnitt 3.2.5), adenylierten (Abschnitt 3.2.7.1) und aufgereinigten (Abschnitt 3.2.7.2) DNA-Fragmente konnten direkt mit den komplementären Enden des pGEM[®]-T Easy Vectors ligiert werden. Dafür wurden für eine 10 µl Reaktion 5 µl 2x Rapid-Ligation-Puffer, 1 µl Vektor, 3 µl Insert und 3 Units T4-Ligase vermischt. Der Ligationsansatz wurde dann für 1 h bei 23°C im Thermomixer compact der Firma Eppendorf inkubiert.

3.2.7.4 Transformation

Für die Transformation eines Ligationsansatzes wurden 40 µl kompetenter *E.coli*-Zellen des Stammes JM109 auf Eis aufgetaut, mit 4 µl des Ligationsansatzes vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 45 sec bei 42°C

im Thermomixer compact der Firma Eppendorf (nicht geschüttelt) einem Hitzeschock ausgesetzt und nach 2 min Inkubation auf Eis mit 300 µl LB-Medium vermischt. Die so transformierten Bakterien wurden dann auf dem Inkubationsschüttler Certomat®IS für 90 min bei 37°C und 150rpm inkubiert. Anschließend wurden die transformierten Zellen auf LB/Amp/IPTG/X-Gal-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.7.5 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Minipräparation wurde mit Hilfe des Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma, München) durchgeführt.

Nach der Anzucht der transformierten Zellen (Abschnitt 3.2.7.4) konnten die positiven Bakterienklone durch ein Blau-Weiß-Screening ermittelt werden. Diese Methode beruht auf der Unterbrechung des lacZ-Gens, das für die β-Galactosidase codiert. Wird das Insert korrekt in den Vektor kloniert, so ist das lacZ-Gen durch diese Insertion zerstört und β-Galactosidase wird nicht gebildet. Die Klone bleiben nach Inkubation mit IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) und X-Gal (5-Bromo-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid) weiß, da X-Gal nicht umgesetzt werden kann.

Eine weiße Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Impföse von einer Agarplatte genommen, und zur Inkubation in LBA-Medium gegeben. Diese Kultur wurde über Nacht bei 37°C auf dem Inkubationsschüttler Certomat®IS (300 rpm) herangezogen.

3 ml der Übernachtskultur wurden für 1 min bei 12.000 x g und 23°C zentrifugiert. Das so entstandene Zell-Pellet wurde in 200 µl Resuspensions-Lösung aufgenommen. Für die Zellyse wurden 200 µl Lysis-Puffer und für die Neutralisation 350 µl Neutralisation/Binding Solution verwendet. Die Zellreste wurden für 10 min bei 12.000 x g und 23°C abzentrifugiert und die DNA im Überstand wurde anschließend durch einminütige Zentrifugation bei 12.000 x g und 23°C an die Säulenmembran gebunden. Die Säule wurde vorher mit 500 µl Column Prep. Solution und Zentrifugation (1 min, 12.000 x g, 23°C) gewaschen und so für die DNA-Bindung vorbereitet. Die Membran wurde mit 750 µl Wash Solution (1 min, 12.000 x g, 23°C) gewaschen und anschließend durch erneute Zentrifugation (2 min, 12.000 x g, 23°C)

getrocknet. Die DNA wurde mit 75 µl 5 mM Tris/HCl, pH 8 eluiert (1 min, 12.000 x g, RT).

3.2.7.6 Restriktionsenzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

Zur Kontrolle, ob das korrekte DNA-Fragment in den Vektor kloniert wurde, wurde ein Kontrollverdau mit dem Enzym *EcoRI* nach den etablierten molekularbiologischen Standardmethoden, wie sie beispielsweise in der Veröffentlichung von Sambrook et al. (1989) beschrieben sind, durchgeführt.

Die Restriktionsansätze enthielten standardgemäß 1/10 Volumen des vorgeschriebenen 10 x Enzympuffers, 5 Units Enzym und 8 µl der Plasmidlösung. Die Ansätze wurden mit HPLC-Wasser auf ein Volumen von 20 µl gebracht und dann für 3 Stunden bei 37°C im Thermomixer compact der Firma Eppendorf (nicht geschüttelt) inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte anschließend für 20 min bei 65°C. Die Restriktionsansätze wurden auf 8%ige PAA-Gele aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Silber angefärbt (vergleiche 3.2.6.1).

Der Exo/SAP-Restriktionsverdau zur Aufreinigung der *real-time* PCR-Produkte des mtDNA-Assays wurde mit 2,5 U SAP und 1 U Exonuklease durchgeführt.

3.2.8 Sequenzanalyse

Zur Ermittlung der DNA-Sequenzen der DYS385-Allele und der PCR-Produkte des mtDNA-Assays sowie zur Kontrolle einer erfolgreichen Klonierung der Standards für das mtDNA-Assay wurden die PCR-Produkte bzw. die Plasmide jeweils sequenziert.

Die Sequenzierung wurde nach einer von Sanger et al. (1977) beschriebenen Methode durchgeführt, wobei die Modifizierung darin bestand, dass zusätzlich zu den dNTP fluoreszenzmarkierte ddNTP (Didesoxynucleosid-5'-triphosphate) in die PCR eingesetzt wurden. Werden diese markierten ddNTP 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-Fragmente, die alle das durch den Sequenzierprimer definierte 5'-Ende besitzen. Jedoch variiert das entstandene Fragment in der Länge und besitzt ein basenspezifisches 3'-Ende, das mit dem jeweils eingebauten ddNTP endet.

Die DNA-Fragmente werden mittels Kapillargelelektrophorese (Abschnitt 3.2.6.2) der Länge nach getrennt, und das basenspezifische 3'-Ende wird mit Hilfe der LIF (Laser-induzierten Fluoreszenz) detektiert.

Die DNA wurde mit 5 pmol Sequenzierprimer (vergleiche 3.1.13.1) und mit 4 µl Original BigDye™ (Applied Biosystems) auf ein Volumen von 20 µl gebracht. Es wurde folgendes Sequenzier-Programm im Thermocycler Trioblock (Biometra) 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 aufgereinigt, bei 70°C eingedampft, in 20 µl HiDi-Formamid aufgenommen und für 3 min bei 94°C denaturiert. Die Sequenzierung wurde im ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben mit der GeneScan® Analysis Software Version 3.1.2 durchgeführt.

4. POPULATIONSGENETISCHE STUDIEN DES AUTOSOMALEN STR-SYSTEMS D10S2325

4.1 EINLEITUNG

Das autosomale STR-System D10S2325 ist ein Beispiel für die selteneren STR-Systeme mit Pentanukleotid-Wiederholungen, die offenbar weniger Stotterbanden (*stutter-peaks*) erzeugen als kürzere Wiederholungseinheiten (P. Wiegand et al. 1999, Bacher et al. 1998). Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine populationsgenetische Studie und eine Meiosenstudie am System D10S2325 für eine deutsche und eine kurdische Population durchgeführt werden, um zu prüfen, ob dieses System ein vielversprechender Marker für die forensische Fallarbeit ist.

4.2 ERGEBNISSE

Für diese populationsgenetische Studie und die anschließende Meiosenstudie wurden 160 aus dem westfälischen Raum stammende Familien und 76 hauptsächlich aus dem Nordirak stammende Familien (kurdische Immigranten) mit dem Humantype Chimera[®] I Kit (Biotype) und einer D10S2325-Monoplex (Abs. 3.2.5) untersucht. Bei den Westfalen wurden sowohl Familien mit Kindern als auch einige Frauen und Männer ohne Kinder im STR-System D10S2325 typisiert. Die Vaterschaftswahrscheinlichkeit betrug bei jedem Putativvater mindestens 99,99%, wodurch die eindeutige Verwandtschaft von Vater und Kind als praktisch bewiesen angesehen werden konnte. Die Anzahl der Kinder variierte je nach Familie, besonders die kurdischen Familien wiesen bis zu neun Kindern auf.

Das STR-System D10S2325 weist geringe Amplikonlängen von 118 bp (Allel 7) bis 198 bp (Allel 23) sowohl in der Monoplex als auch im Chimera[®] I Kit (Biotype) auf. Die durch diese zwei Amplifikationen ermittelten Ergebnisse waren identisch und sind im Anhang dargestellt. Die *stutter-peaks* waren typischerweise niedriger als 0,75%. Insgesamt konnten 444 Deutsche und 337 Kurden typisiert werden. In der deutschen Population wurden die Allele 7 bis 17 und 23 beobachtet, in der kurdischen Population die Allele 7 bis 16, 21 bis 23. Die langen Allele 21 bis 23


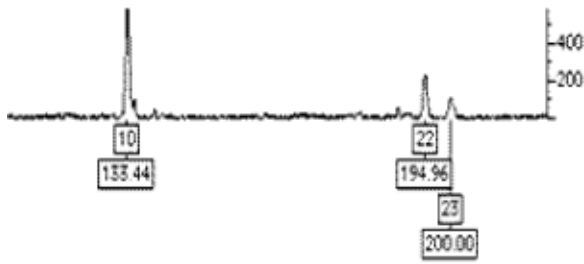
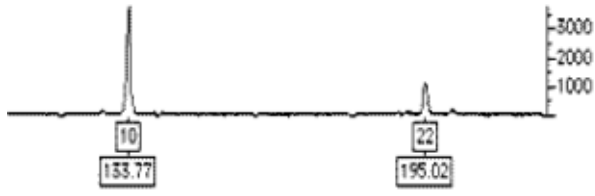


wurden vor der Sequenzierung mittels pGEM®-T Easy Vector System (Promega) kloniert (Abs. 3.2.7). Die Sequenzierung (Abs. 3.2.8) der Allele 7 bis 17 und 21 bis 23 bestätigte ein ununterbrochenes TCTTA-Wiederholungsmotiv.

Die langen Allele 21 bis 23 fielen bei einem Mann aus Westfalen und bei zwei kurdischen Familien auf (Tab. 4.1). Das lange Allel wurde dabei im Verhältnis zu dem kürzeren Allel mit einer geringeren Intensität amplifiziert. Bei der Familie 16 wies der Vater drei D10S2325-Allele auf und vererbte die Allele 22 und 23 an sein Kind. Bei der Familie 46 wies der Vater ebenfalls drei D10S2325-Allele auf und gab die Allele 22 und 23 an das Kind 2 weiter. Jeweils eins der langen Allele vererbte er an das Kind 3 (Allel 22) und das Kind 8 (Allel 23). Da bei diesen zwei Familien die Phänomene von drei Allelen, die Vererbung von zwei Allelen und eine paternale Mutation vorlag, wurden die Träger der langen Allele aus der Populationsstudie und der Meiosenstudie ausgeschlossen. Der Westfale (Familie 156) mit dem Allel 23 wurde in die Studie aufgenommen.

Tab. 4.1: Das Auftreten von sehr langen Allelen im STR-System D10S2325

Bei drei Familien wurden die langen Allele 21 bis 23 beobachtet. Die Elektropherogramme zeigen, dass diese im Verhältnis zum ersten Allel mit einer geringeren Intensität amplifiziert wurden. () : Allel mit geringerer Intensität

Population	Person	Genotyp	Elektropherogramm
Westfalen Familie 156	Kind	7/12	
	Mutter	7/10	
	Vater	12/(23)	
Kurden Familie 16	Kind	10/22/(23)	
	Mutter	10/11	
	Vater	10/(22/23)	

Kurden Familie 46	Kind 1	10/21	<p>Kind 1 Familie 46</p> 
	Kind 2	10/(22/23)	<p>Kind 2 Familie 46</p> 
	Kind 3	10/22	<p>Kind 3 Familie 46</p> 
	Kind 4	7/10	
	Kind 5	7/10	
	Kind 6	7/10	
	Kind 8	10/(23)	<p>Kind 8 Familie 46</p> 
	Vater	7/(22/23)	<p>Vater Familie 46</p> 

Die Daten der unverwandten Elternteile dienen für die Berechnung der Allelfrequenzen und zur Überprüfung der Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gesetzes. Dazu wurde das Programm HWE Analysis, Version 3.2 (Christoph Puers, Rechtsmedizin Münster) verwendet. Es wurden folgende statistische Parameter berechnet: die beobachtete (H_{obs}) sowie die erwartete Heterozygotenrate (H_{exp}), die Allgemeine Vaterschaftsausschlusschance (AVACH) und die Diskriminationskraft

(PD). Die Ergebnisse sind in der Tab. 4.2 und in der Abb. 4.1 dargestellt. Es gab keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die beobachtete Heterozygotenrate lag im Bereich der erwarteten Heterozygotenrate. Die AVACH betrug bei den Westfalen 73,6% und bei den Kurden 72,7%, die Diskriminationskraft 96,7% bzw. 96,1%.

Tab. 4.2: Allel-Frequenzen des STR-Systems D10S2325

Neben den Allel-Frequenzen wurden auch die statistischen Parameter für die Westfalen (n = 616) und die Kurden (n = 250) berechnet; H_{obs} : beobachtete Heterozygotenrate, H_{exp} : erwartete Heterozygotenrate, AVACH: Allgemeine Vaterschaftsaus-schlusschance, PD: Diskriminationskraft.

Allel	Frequenz [%] Westfalen	Frequenz [%] Kurden
7	16,2	16,4
8	4,2	4,0
9	11,0	14,4
10	13,8	16,8
11	13,1	17,2
12	17,9	12,8
13	12,3	8,4
14	7,0	5,2
15	3,7	4,0
16	0,3	0,8
17	0,2	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-
21	-	-
22	-	-
23	0,2	-
H_{obs}	0,88	0,84
H_{exp}	0,871	0,869
AVACH	0,736	0,727
PD	0,967	0,961

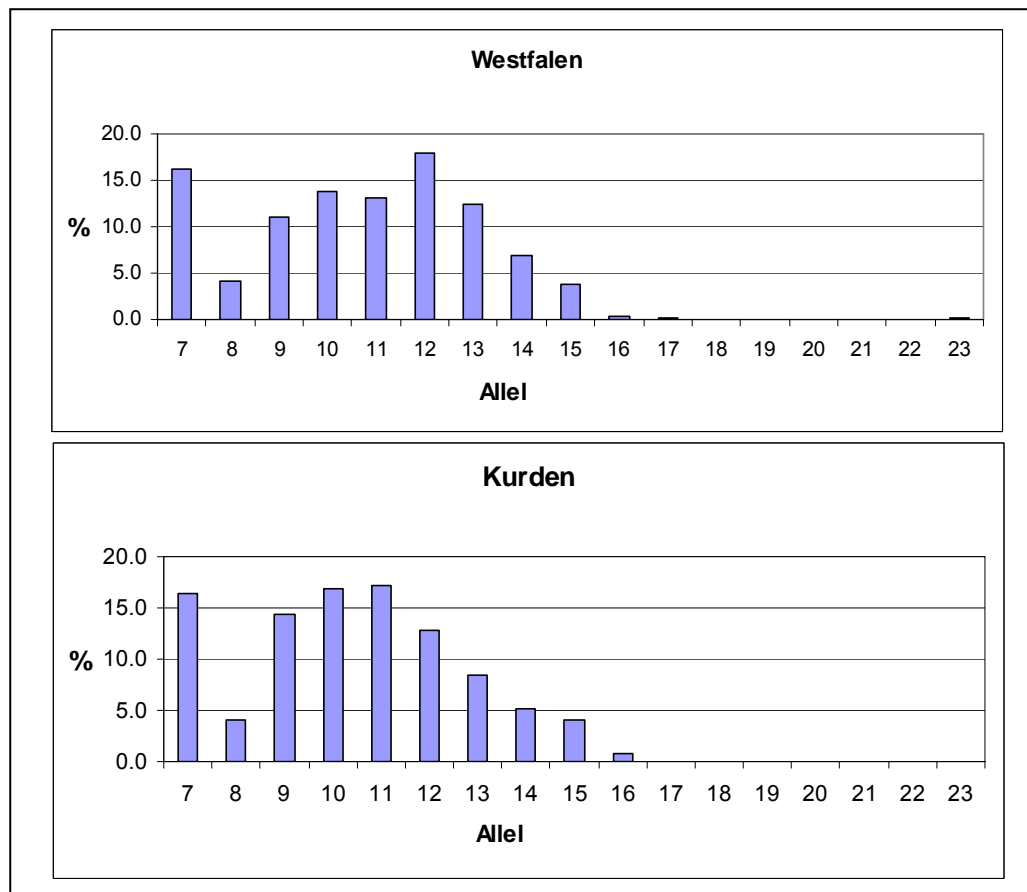


Abb. 4.1: Grafische Darstellung der Allelverteilungen des STR-Systems D10S2325 in der deutschen (n = 616) und der kurdischen (n = 250) Population

Außerdem wurden die populationsgenetischen Daten der deutschen und die der kurdischen Population mit Hilfe der Software RxC miteinander verglichen. Dieser Test lieferte einen p-Wert von 27,1%.

In der deutschen Population kamen am häufigsten die Allele 12 (17,9%), 7 (16,2%) und 10 (13,8%) vor, bei den Kurden die Allele 11 (17,2%), 10 (16,8%) und 7 (16,4%).

Neben der populationsgenetischen Studie wurde eine Meiosenstudie durchgeführt. Dazu wurden in der deutschen Population 132 maternale und 130 paternale meiotische Transfers untersucht. Es wurden insgesamt zwei paternale Mutationen (Abb. 4.2) beobachtet. Dies entspricht einer gesamten Mutationsrate von 0,76% (95% C.I. 0,21 – 2,73) bzw. einer paternalen Mutationsrate von 1,54% (95% C.I. 0,42 – 5,44). Im ersten Mutationsfall (Familie 84, Abb. 4.2) erfolgte eine Mutation vom paternalen Allel 14 zum kindlichen Allel 13 (Repeat-Verlust), beim zweiten Fall (Familie 109, Abb. 4.2) eine Mutation vom paternalen Allel 7 zum kindlichen Allel 8

(Repeat-Gewinn). Der Vater der Familie 84 war zum Zeitpunkt der Zeugung des Kindes fünfundzwanzig und der Vater der Familie 109 achtunddreißig Jahre alt.

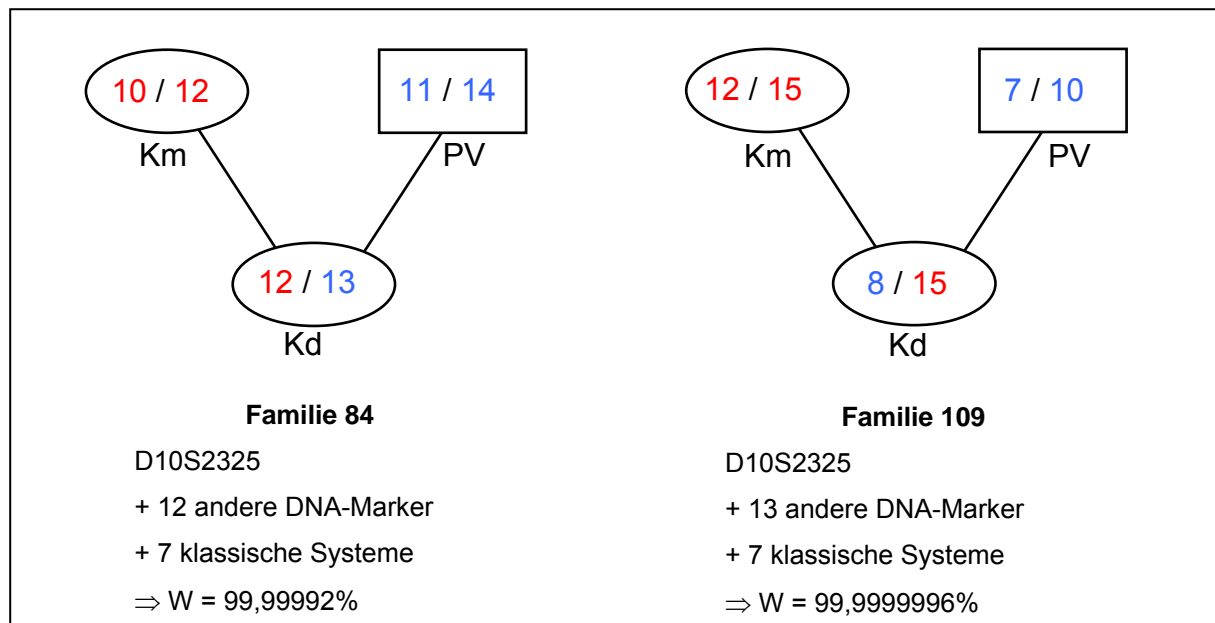


Abb. 4.2: Zwei paternale Mutationen im STR-System D10S2325

Bei der Untersuchung von 132 maternalen und 130 paternalen meiotischen Transfers wurden zwei Mutationen beobachtet. Im ersten Mutationsfall lag ein Repeat-Verlust (14→13; Familie 84) vor, beim zweiten Fall ein Repeat-Gewinn (7→8; Familie 109). Bei beiden Familien betrug die Vaterschaftswahrscheinlichkeit - selbst nach biostatistischer Einbeziehung der Mutation - mehr als 99,99%.

In der kurdischen Population wurde bei der Untersuchung von 163 maternalen und 171 paternalen meiotischen Transfers keine Mutation beobachtet. Dies entspricht einer apparenten Mutationsrate von 0%.

4.3 DISKUSSION

Das autosomale STR-System D10S2325 ist - neben den kommerziell erhältlichen Systemen Penta D und Penta E (Promega) - ein Beispiel für ein STR-System mit Pentanukleotid-Wiederholungen, die offenbar weniger Stotterbanden (*stutter-peaks*) erzeugen als kürzere Wiederholungseinheiten (Wiegand et al. 1999, Bacher et al. 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurden eine populationsgenetische Studie und eine Meiosenstudie am System D10S2325 für eine deutsche und eine kurdische Population durchgeführt.

Insgesamt konnten 444 Deutsche und 337 Kurden typisiert werden. Zusätzlich zu den schon für andere deutsche Populationen beschriebenen D10S2325-Allelen 6-17 (Wiegand et al. 1999; Hou et al. 2001) wurden in dieser Studie noch die Allele 21 und 23 detektiert. Die Allele 19 und 21 wurden zuvor erstmals in einer chinesischen Population (Hou et al. 2001) und die Allele 18, 21 und 22 in einer Population aus dem Norden Thailands (Bhoopat et al. 2006) beschrieben. Die Sequenzierung bestätigte ein ununterbrochenes TCTTA-Wiederholungsmotiv.

Die sehr langen Allele 21 bis 23 fielen bei einem Mann aus Westfalen und bei zwei kurdischen Familien auf. Der Westfale (Familie 156) wies das Allel 23 auf, das aus 23 ununterbrochenen TCTTA-Wiederholungseinheiten aufgebaut ist. Bei der kurdischen Familie 16 wies der Vater drei D10S2325-Allele auf. Diese drei Allele sind vermutlich aus einer früheren Duplikation eines der langen Allele mit anschließendem Repeat-Verlust bzw. -Gewinn bei einem der duplizierten Allele entstanden (Abb. 4.3). Der Vater hat auch die zwei langen Allele 22 und 23 an das Kind vererbt, wobei die Allele eine geringere Peakhöhe aufwiesen als das Allel 10 (= Präferentielle Amplifikation). Kürzere Allele werden oft bevorzugt vermehrt. Das Phänomen der drei Allele (Rolf et al. 2002) zeigte außerdem der Vater der kurdischen Familie 46. Eine Verwandtschaft dieser Familien 16 und 46 ist nicht bekannt. Der Vater vererbte ebenfalls die Allele 22 und 23 an sein zweites Kind. Eine weitere Auffälligkeit war, dass zwei andere Kinder (Kind 3 und Kind 8) von diesem Vater nur eins der langen Allele, also 22 oder 23, erhalten haben. Hier ist es eventuell während der Reifung der Spermien zum Verlust eines der zwei langen Allele gekommen. Eine andere Erklärung wäre, dass das Chromosom 10 bei diesen Personen dreimal vorliegt. Enthält nun die männliche Gamete bei der Befruchtung fälschlicherweise zwei Chromosome mit den Allelen 22 und 23, so weist das Kind die Allele 22 und 23 zusätzlich zu dem mütterlichen Allel auf. Bei dem Kind 3 beinhaltete die paternale Gamete dagegen nur ein Chromosom mit dem Allel 22 bzw. bei dem Kind 8 ein Chromosom mit dem Allel 23. Bei dem Kind 1 kam es vermutlich während der Spermatogenese zu der Mutation des Allels 22 zum Allel 21, so dass das Kind den Genotyp 10/21 aufweist. Das Vorhandensein dieser „Trisomie 10“ ließe sich durch Untersuchungen von weiteren STR-Systemen, die auf dem Chromosom 10 lokalisiert sind, herausfinden. Bisher wurde von 5 Lebendgeburten, einer Totgeburt und 3 Föten berichtet, die eine Trisomie 10 aufweisen (Hahnemann et al. 2005).

Beim Menschen ist Triploidie relativ häufig, allerdings sterben Triploide meistens als Föten frühzeitig ab oder der Tod tritt kurz nach der Geburt ein. Bei den Überlebenden treten dann später oft schwere Entwicklungsstörungen auf, so z.B. bei der Trisomie 13 (Pätan-Syndrom), Trisomie 18 (Edward-Syndrom) oder Trisomie 21 (Down-Syndrom).

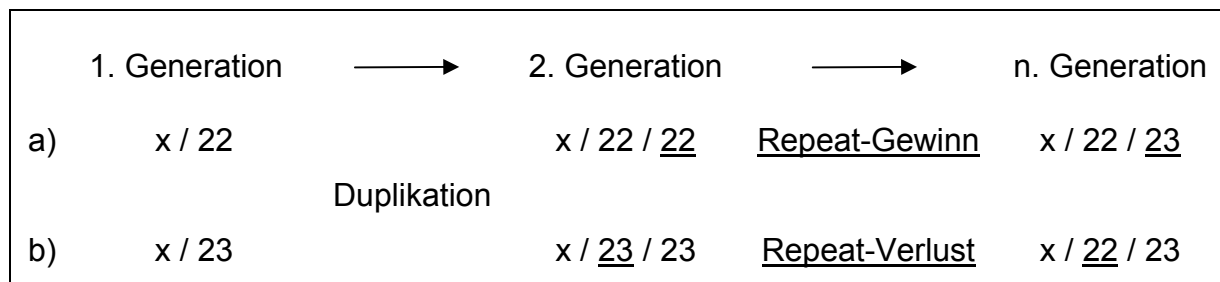


Abb. 4.3: Mögliches Mutationsmodell zur Entstehung der drei D10S2325-Allele beim Vater der Familie 46

- a) In der 1. Generation lag der Genotyp x / 22 vor (x: ein unbekanntes D10S2325-Allel). Es kam zur Duplikation des Allels 22. Nach n Generationen kam es zur Mutation eines der Allele, so dass nun die drei D10S2325-Allele x / 22 / 23 (n > 2, x kann, muss aber nicht immer den gleichen Allelwert aufweisen).
- b) Ähnlicher Verlauf wie bei Beispiel a), nur die 1. Generation wies den Genotyp x / 23 auf und es folgte auf eine Duplikation ein Repeat-Verlust

Ein dritter Erklärungsansatz für diese drei Allele ist, dass das Allel 23 ein PCR-Artefakt des Allel 22 ist. Diese Artefakte sind reproduzierbar, zeigen sich aber in einer geringeren Intensität. Da das Kind 8 der Familie 46 nur das Allel 23 und nicht die Allele 22 und 23 aufweist, ist diese Erklärung hinfällig.

Die Ergebnisse der populationsgenetischen Studie zeigen, dass D10S2325 sehr informativ in beiden Populationen ist. Es gab keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die beobachtete Heterozygotenrate lag im Bereich der erwarteten Heterozygotenrate plus/minus der 1,96 fachen Standardabweichung. Die AVACH betrug bei den Westfalen 73,6% und bei den Kurden 72,7%, die Diskriminationskraft 96,7% bzw. 96,1%. Wiegand et al. (1999) bestimmten für eine deutsche Population aus der Region Halle/Saale mit einer AVACH von 74% und einer Diskriminationskraft von 96% fast identische Werte. Hou et al. (2001) beobachteten eine AVACH von 63,7% und eine Diskriminationskraft von 95,3% bei einer deutschen Population aus dem Raum Bremen.

Die pentameren STR-Systeme Penta D und Penta E weisen eine AVACH von 72% bzw. 76% und eine Diskriminationskraft von 94% bzw. 97% in einer kaukasoiden-

amerikanischen Population auf (Bacher et al. 1998). Somit scheint D10S2325 mit einer $AVACH_{\text{Westfalen}}$ von 73,6% und einer Diskriminationskraft $_{\text{Westfalen}}$ von 96,7% etwas effizienter als Penta D und fast ebenso effizienz wie Penta E zu sein.

Beim Vergleich der deutschen und der kurdischen Allelfrequenzen wurde eine Ähnlichkeit der beiden Populationen festgestellt. Der Vergleich der populationsgenetischen Daten erfolgte mit Hilfe der Software RxC. Dieses Programm führt den „exakten Fisher-Test“ durch, der ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit ist. Er liefert auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate. Dieser Test lieferte einen p-Wert von 27,1%. Dies bedeutet, dass beide Populationen in Bezug auf die Allelfrequenzen ähnlich sind.

Neben der populationsgenetischen Studie wurde eine Meiosenstudie durchgeführt. Es wurden insgesamt zwei paternale Mutationen (Abb. 4.2) bei der Untersuchung von 132 maternalen und 130 paternalen meiotischen Transfers beobachtet. Dies entspricht einer gesamten Mutationsrate von 0,76% (95% C.I. 0,21 – 2,73) bzw. einer paternalen Mutationsrate von 1,54% (95% C.I. 0,42 – 5,44). In der kurdischen Population wurde bei der Untersuchung von 163 maternalen und 171 paternalen meiotischen Transfers keine Mutation beobachtet, was einer apparenten Mutationsrate von 0% entspricht. Bisher haben erst Becker et al. (2007) Mutationsraten für D10S2325 (maternale Mutationsrate: 0,2%, paternale Mutationsrate: 0%) veröffentlicht.

Die paternale Mutationsrate von 1,54% (95% C.I. 0,42 – 5,44) in der deutschen Population ist unerwartet hoch für ein pentameres STR-System. Im Vergleich dazu weist das pentamere STR-System Penta D eine maternale Mutationsrate von 0,04% bzw. das pentamere STR-System Penta E eine maternale von 0,13% und eine paternale von 0,05% auf (Henke et al. 2006). Selbst der hoch polymorphe Marker ACTBP2 weist nur eine paternale Mutationsrate von 0,68% (Brinkmann et al. 1998) auf. Um die Mutationsrate für D10S2325 genauer bestimmen zu können, müssen zukünftig weitere meiotische Transfers untersucht werden.

Bei den paternalen Mutationen in der deutschen Population lag bei der Familie 84 ein Repeat-Verlust (14→13) und bei der Familie 109 ein Repeat-Gewinn (7→8) vor. Im

Gegensatz dazu beobachteten Hohoff et al. (2007) eine fast doppelt so große Anzahl an Repeat-Gewinnen ($n = 20$) wie an Repeat-Verlusten ($n = 12$). Die Aussage, dass mit zunehmender Wiederholungsanzahl die Mutationsrate ansteigt (Brinkmann et al. 1998), kann aufgrund des relativ geringen Probenvolumens dieser Studie weder bestätigt noch widerlegt werden. Aufgrund der geringen Probenanzahl, kann auch keine Aussage über eine bestehende Abhängigkeit von Zeugungsalter und Mutation gemacht werden. Hohoff et al. (2007) beobachteten, dass mit zunehmendem Alter des Vater die Mutationsrate steigt. Bei den zwei paternalen Mutationen in dieser Studie waren die Väter zum Zeitpunkt der Zeugung 25 bzw. 38 Jahre alt. Das häufigere Auftreten von paternalen im Vergleich zu maternalen Mutationen (Sajantila et al. 1999, Henke and Henke 1999, Brinkmann et al. 1998), das durch die etwa 16x häufigere Replikation der Spermien-DNA begründet ist, kann auch für D10S2325 bestätigt werden.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie kann zusammenfassend gesagt werden, dass das autosomale, pentamere STR-System D10S2325 ein sehr nützlicher Marker für die Vaterschaftsanalyse darstellt. Auch für Spurenfälle scheint es aufgrund der Diskriminationskraft von mehr als 90% und seiner geringen Amplikonlänge von 118 bp (Allel 7) bis 198 bp (Allel 23) sehr wertvoll zu sein. Besonders wegen der geringen Anfälligkeit für *stutter-peaks* (typischerweise bei weniger als 0,75%) sollte es sich für die Untersuchung von Mischspuren eignen.

5. FORENSISCHE ANWENDUNG DER SUBLOCUS-SPEZIFISCHEN AMPLIFIKATION VON DYS385

5.1 EINLEITUNG

Das Y-STR-System DYS385 liegt als duplizierter Locus vor und liefert bei der PCR-Amplifikation zwei differenzierbare Allele (Kayser et al. 1997). Seine zwei Kopien werden als Subloci DYS385*a und DYS385*b bezeichnet und sind etwa 40 kb voneinander entfernt (Abb. 5.1).

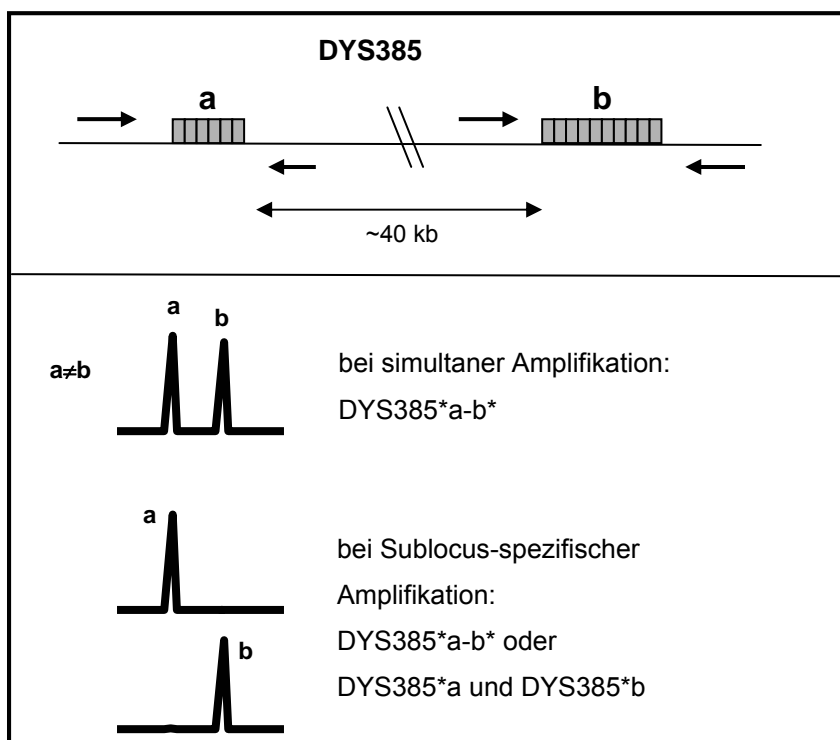


Abb. 5.1: Das Y-chromosomale STR-System DYS385
(modifiziert nach Gusmao et al. 2006)

Mit der konventionellen PCR nach Bhoopat et al. (2003) ist es nicht möglich zu bestimmen, welches Allel des Haplotypen DYS385*11-14 dem Sublocus DYS385*a bzw. dem Sublocus DYS385*b zuzuordnen ist. Bisher wurde zuerst immer das kleinere dann das größere Allel genannt. Kittler et al. (1998) beschrieben eine Methode, mit der die Subloci separat voneinander amplifiziert werden können. Zur Unterscheidung der beiden Subloci legte die DNA-Kommission der Fachgesellschaft „ISFG“ (Gusmao et al. 2006) folgende Schreibweise fest: DYS385*a und DYS385*b.

5. FORENSISCHE ANWENDUNG DER SUBLOCUS-SPEZIFISCHEN AMPLIFIKATION DYS385 65

Die Sequenz von DYS385 und die Bindungsstellen für die PCR-Primer nach Bhoopat et al. (2003) und Kittler et al. (1998) sind in der folgenden Abb. 5.2 dargestellt. Jede Wiederholungseinheit von DYS385 besteht aus den vier Basen GAAA. In der Abb. 5.2 ist für den Sublocus b die Wiederholungseinheit TTTC angegeben, da die Subloci invertiert zueinander vorliegen.

DYS385*a (AC007379)						
10861	AATGTTTGTA	TCTATGTTGT	TGACTGTGGT	AGGTA	CTAGC	CTCATGTGGC TATTGAGCAC
10921	TTGAAATTTG	GCTAGTGTGA	CTGAATAACT	GAATTTTTTAA	TCTATGCTTA	ATAAACTACA
10981	TGTGCATAAT	GACTACCATA	CAGGGTAGCA	TAATTCTAAG	GTACATGGCT	GGTATCTGTT
11041	GCTTAACTCT	TACTACCAA	GGAAATTTCT	GGCTTGAAGG	GATATTAAGA	AACAATCTAC
11101	GGCCACGCA	TGATGGTCCT	TGCCAGTAAT	CCCAGCAATT	TGGAAGGCTA	AAGTGGGTAT
11161	ATCACTTAAG	ATAAGGAGTT	TGAGATCAGC	CTGGACAACA	TAATGAAAAC	CTTTATTTAC
11221	TAAAAATACA	AAAACCTGCC	AGGTCTGTTG	ACAAGTGCAT	GTAATCCCAG	CTACTTGGGA
11281	GGCTGAGGCA	GGGTAATTGT	TTGAACCTGA	AATGTAAAGG	GTGTCATGAA	CTGAAATGAT
11341	GGCACTGCAA	TCCAGCATGG	GTGACAGAGC	TAGACACCAT	GCCAAACAAC	AACAAAGAAA
11401	AGAAATGAAA	TTCAGAAAGG	AAGGAAGGAA	GGAGAAAGAA	AGTAAAAAAG	AAAGAAAGAG
11461	AAAAAGAGAA	AAAGAAAGAA	AGAGAAGAAA	GAGAAAGAGG	AAAGAGAAAG	AAAGGAAGGA
11521	AGGAAGGAAG	GAAGGAAAAG	AAAGAAAGAA	AGAAAGAAAG	AAAGAAAGAA	AGAAAGAAAG
11581	AAAGAAAGAA	AGAGAAAAAG	AAAGGAGGAC	TATGTAATTG	GAATAGATAG	ATTATTTTTT
.....						
DYS385*b (AC007379)						
126721	TTTTAAAAAA	TAATCTATCT	ATTCCAATTA	CATAGTCCTC	CTTTCTTTTT	CTCTTTCTTT
126781	CTTTCTTTCT	TTCTTTCTTT	CTTTCTTTCT	TTCTTTCCCT	TCCTTCCTTC	CTTCCTTCCT
126841	TTCTTTCTCT	TTCTCTTTTC	TC	TTTTCTTTCT	CTTTCTTTCT	TTTTCTCTTT
126901	TTCTTTTTTA	CTTCTTTTCT	CCTTCCTTCC	TTCTTTCTG	AATTTCAATTT	CTTTCTTTG
126961	TTGTTGTTTG	GCATGGTGTC	TAGCTCTGTC	ACCCATGCTG	GATTGCAGTG	CCATCATTTT
127021	AGTTCATGAC	ACCCTTTACA	TTTCAGGTTT	AAACAATTAC	CCTGCCTCAG	CCTCCCAAGT
127081	AGCTGGGATT	ACATGCACTT	GTCAACAGAC	CTGGCAAGTT	TTTGTATTTT	TAGTAAATAA
127141	AGGTTTTTCAT	TATGTTGTCC	AGGCTGATCT	CAAACCTCCT	ATCTTAAGTG	ATATACCCAC
127201	TTTAGCCTTC	CAAATTGCTG	GGATTACTGG	CAAGGACCAT	CATGCGTGGC	CCGTAGATTG
127261	TTTCTTAATA	TCCCTTCAAG	CCAGAAATTT	CCTTTGGTAG	TAAGAGTTAA	GCAACAGATA
127321	CCAGCCATGT	ACCTTAGAAT	TATGCTACCC	TGTATGGTAG	TCATTATGCA	CATGTAGTTT
127381	ATTAAGCATA	GATTAAAAAT	TCAGTTATTC	AGTCACACTA	GCGATAGTTT	TAAGGAAAGA
127441	AATAAAGGGA	AATTGCATTC	CTAGTCTCTG	ACAAAAACAGA	TTTAAAATAT	TTTACTTAG

Abb. 5.2: Sequenz des Y-chromosomalen STR-Systems DYS385

Hier ist die Sequenz des Y-STRs DYS385 (GenBank Nr. AC007379 und AC007379) dargestellt. Die **Repeatregion**, die Bindungsstellen für die Primer nach **Bhoopat et al. (2003)** und **Kittler et al. (1998)** sind hervorgehoben.

In dieser Arbeit sollte zunächst eine populationsgenetische Studie an unverwandten Männern durchgeführt werden. Hierfür sollte sowohl die konventionelle PCR nach Bhoopat et al. (2003) als auch eine Sublocus-spezifischen Amplifikation für die Typisierung verwendet werden. Die PCR-Produkte der Sublocus-spezifischen Amplifikation nach Kittler et al. (1998) wurden im Anschluss in die Amplifikation nach Bhoopat et al. (2003) eingesetzt. Mit dieser Methode sollten die 'wahren' DYS385-Haplotypen bestimmt und so die Individualisierungseffizienz von DYS385 für die Abstammungsbegutachtung und Spurenkunde gesteigert werden.

Im Anschluss an die populationsgenetische Studie sollte ein Mutationsfall untersucht werden, bei dem mit der konventionellen Amplifikation für den Vater der Haplotyp DYS385*14-15 und für den Sohn der Haplotyp DYS385*12-14 bestimmt wurde. Mit Hilfe der Sublocus-spezifischen Amplifikation sollten die 'wahren' DYS385-Haplotypen ermittelt werden, um zu klären, ob der Haplotyp des Sohnes durch zwei gekoppelte Mutationen (14→12 und 15→14) oder durch eine 3-Schritt-Mutation (15→12) entstanden ist.

5.2 ERGEBNISSE

Für diese Studie wurden 119 unverwandte Männer aus Deutschland sowohl mit der konventionellen als auch mit der Sublocus-spezifischen Amplifikation (Abs. 3.2.5) untersucht. Mit beiden Methoden wurden die gleichen DYS385-Allele detektiert (Tab. 5.2). Allerdings war es nun mit der Sublocus-spezifischen Amplifikation möglich, die 'wahren' DYS385-Haplotypen zu bestimmen. Es konnten mit der Sublocus-spezifischen Amplifikation 48 verschiedene Haplotypen detektiert werden, mit der konventionellen Amplifikation nur 35. Bei den 119 Proben konnte bei 64 Proben der Haplotyp bestätigt werden, bei den restlichen 55 Proben (grau markiert) musste der bisherige DYS385-Haplotyp revidiert werden. Bei der Person 1 konnte z.B. geklärt werden, dass der Sublocus DYS385*a das Allel 13 und der Sublocus DYS385*b das Allel 11 aufweist. Somit liegt der Haplotyp DYS385*a-b*13-11 vor. Bei der Person 48 wurde dagegen der Haplotyp DYS385*a-b*11-13 bestätigt.

5. FORENSISCHE ANWENDUNG DER SUBLOCUS-SPEZIFISCHEN AMPLIFIKATION DYS385 67

Am Sublocus DYS385*a wurden die Allele 9 bis 19 und am Sublocus DYS385*b die Allele 9 bis 20 detektiert. Die Frequenzen der Haplotypen wurden berechnet und sind in Tab. 5.1 dargestellt. Die *gene diversity* (GD) wurde nach Nei et al. (1983) mit der folgenden Formel berechnet: $GD=1-n/(n-1)\sum p_i^2$, wobei p_i die Frequenz des i-ten Haplotypen und n die Anzahl der untersuchten Personen ist. Die *discriminatory capacity* (DC) ist gleich dem Quotienten aus der Anzahl der verschiedenen Haplotypen und der Anzahl der untersuchten Personen (Cavalli-Sforza and Edwards 1967). Nach der konventionellen Amplifikation liegt die *gene diversity* bei 92,8% und die *discriminatory capacity* bei 29%. Bei der Sublocus-spezifischen Amplifikation beträgt die *gene diversity* 95,3% und die *discriminatory capacity* 41%. Am häufigsten kommt der Haplotyp DYS385*a-b*14-11 mit 14,3% gefolgt von den Haplotypen DYS385*a-b*11-14 und DYS385*a-b*14-14 mit jeweils 6,7%. Auch der Haplotyp DYS385*a-b*14-13 tritt mit 5,9% sehr oft auf.

Tab. 5.1: Frequenzen der DYS385*a-b*-Haplotypen

Haplotyp DYS385 *a-b*	Frequenz [%]	Haplotyp DYS385 *a-b*	Frequenz [%]	Haplotyp DYS385 *a-b*	Frequenz [%]	Haplotyp DYS385 *a-b*	Frequenz [%]
9-14	0,8			13-16	1,7	16-13	1,7
9-17		17-9	0,8	13-17	0,8	17-13	0,8
10-10	0,8			13-18	1,7		
10-14	1,7	14-10	0,8	14-14	6,7		
10-15	0,8			14-15	3,4		
11-11	2,5			14-16	1,7	16-14	1,7
11-12		12-11	0,8	14-20	0,8		
11-13	2,5	13-11	3,4	15-15	2,5		
11-14	6,7	14-11	14,3	15-16	0,8	16-15	0,8
11-15	0,8	15-11	4,2	15-18	1,7		
11-16		16-11	3,4	16-16	1,7		
11-17	0,8	17-11	0,8	16-17	0,8		
12-14	0,8	14-12	2,5	16-18	3,4		
12-15	0,8	15-12	1,7	16-19	0,8		
12-18	0,8			17-17	0,8		
13-13	1,7			17-18	0,8	18-17	0,8
13-14	0,8	14-13	5,9	17-19	1,7		
13-15		15-13	1,7				

Im Anschluss an diese populationsgenetische Studie wurde ein Mutationsfall untersucht, bei dem mittels der konventioneller Amplifikation der väterliche Haplotyp DYS385*14-15 und der kindliche Haplotyp DYS385*12-14 bestimmt wurde. Nach der Sublocus-spezifischen Amplifikation konnte für den Vater der Haplotyp DYS385*a-b*14-15 bestätigt werden. Der Haplotyp des Sohnes wurde dagegen revidiert, denn

dieser weist im Sublocus a das Allel 14 und im Sublocus b das Allel 12 auf. Diese Typisierungsergebnisse konnten durch Sequenzierung der Allele (Abs. 3.2.8) bestätigt werden. In diesem Fall liegt also eine 3-Schritt-Mutation vom väterlichen Allel 15 zum kindlichen Allel 12 vor.

5.3 DISKUSSION

Mit der konventionellen Amplifikation von DYS385 war es bisher nicht möglich, die Subloci von DYS385 voneinander zu unterscheiden. Kittler et al. (1998) entwickelten eine Sublocus-spezifische Amplifikation, bei der die bislang nicht unterscheidbaren Subloci DYS385*a und DYS385*b separat amplifiziert werden und so die 'wahren' DYS385-Haplotypen bestimmt werden konnten.

In dieser Arbeit wurde zuerst eine populationsgenetische Studie mit deutschen Männern durchgeführt. Bei 64 der insgesamt 119 Proben konnte der Haplotyp bestätigt werden. Die Haplotypen der restlichen 55 Proben mussten revidiert werden, denn durch die Subtypisierung von DYS385 war es möglich, den 'wahren' DYS385-Haplotypen zu bestimmen. Insgesamt konnten mit der Sublocus-spezifischen Amplifikation 48 verschiedene Haplotypen detektiert werden, mit der konventionellen Amplifikation nur 35. Niederstätter et al. (2005) untersuchten 133 unverwandte Personen und konnten die Anzahl der verschiedenen Haplotypen von 27 auf 34 erhöhen. Schneider et al. (1998) beobachteten bei 146 unverwandten Männern 36 und Bosch et al. (2002) bei 800 Männern 45 verschiedene Haplotypen mit der konventionellen Amplifikation.

Bei dem Sublocus DYS385*a wurden die Allele 9 bis 19 und bei dem Sublocus DYS385*b die Allele 9 bis 20 detektiert. Schneider et al. (1998) berichteten bisher von den Allelen 10 bis 20, Lessig und Edelman et al. (1998) von den Allelen 9 bis 19 und Bosch et al. (2002) von den Allelen 9-20. Diese drei Arbeitsgruppen machten allerdings keine Unterscheidung zwischen den beiden Subloci. Da die beiden Subloci gekoppelt vererbt werden, ist eine Berechnung der Frequenzen der einzelnen Allele für DYS385 nicht möglich, so dass die Haplotypenfrequenzen berechnet wurden.

Am häufigsten kam der Haplotyp DYS385*a-b*14-11 mit 14,3% gefolgt von den Haplotypen DYS385*a-b*11-14 und DYS385*a-b*14-14 mit jeweils 6,7% vor. Auch der Haplotyp DYS385*a-b*14-13 trat mit 5,9% sehr oft auf. Die Arbeitsgruppe um Schneider et al. (1998) beobachtete bei der Untersuchung von 146 Deutschen eine Frequenz von 33,8% für den Haplotypen DYS385*11-14, wobei sie keine Sublocus-spezifische Amplifikation durchgeführt haben. Die addierte Frequenz von 21% (n = 119) für den Haplotyp DYS385*11-14 aus dieser Studie weicht etwa um 1/3 von der von Schneider et al. (1998) beobachteten Frequenz von 33,8% (n = 146) ab. Lessig et al. (1998) konnten eine noch größere Frequenz für den Haplotypen DYS385*11-14 (41,2%, n = 250) in einer deutschen Population beobachten. Auch sie nahmen keine Sublocus-spezifische Amplifikation vor.

Die Eingabe des Haplotypen DYS385*11-14 in die Y-STR-Datenbank (YHRD, <http://www.ystr.org/index.html>, Willuweit et al. 2007) zeigte, dass etwa 25% der Europäer diesen Haplotypen aufweisen. Die YHRD beinhaltet zurzeit die Daten von 464 Populationen (296 europäische, 71 asiatische, 27 afrikanische, 15 amerikanische, 13 afroeurasische, 41 vermischte und 1 Eskimo-Population(en)). Diese umfangreichen Daten ermöglichen die Ermittlung von Haplotypfrequenzen aus der Kombination von mehreren Y-STRs. Bei der Untersuchung von acht Y-STRs erhält man den sogenannten „Minimalen Haplotypen“ (*minimal haplotype*), bei bis zu 11 Y-STRs, den „Erweiterten Haplotypen“ (*extended haplotype*). Aufgrund der umfangreichen biostatistischen Berechnungsmodule der YHRD können Aussagen über die Herkunft des jeweiligen Haplotypen gemacht werden.

Die Berechnung der *gene diversity* (GD) und der *discriminatory capacity* (DC) zeigte eine Steigerung der *gene diversity* von 2,5% (92,8% → 95,3%) und eine Steigerung von 12% (29% → 41%) der *discriminatory capacity*. Diese Werte sind ein Maß für die Effizienz des Systems, je höher die Effizienz desto besser eignet sich dieses System für die forensische Fallarbeit. Schneider et al. (1998) detektierten mit der konventionellen Amplifikation eine GD von 87% in der deutschen Population. Durch diese Steigerungen konnte gezeigt werden, dass mittels der Subtypisierung die Individualisierungseffizienz von DYS385 für die Abstammungsbegutachtung und Spurenkunde gesteigert wird. Mit der konventionellen Amplifikation wurden daher keine falschen Haplotypen, sondern nur ein Verlust an Informationen erhalten.

Niederstätter et al. (2004) detektierten ebenfalls eine Steigerung der Diskriminationskraft durch die Verwendung der Sublocus-spezifischen Amplifikation. Diese Arbeitsgruppe fand wie Kittler et al. (2003) heraus, dass ein Zusammenhang zwischen dem „wahren Haplotypen“ und der auf Y-SNPs (*single nucleotide polymorphism*) basierenden Haplogruppe besteht.

Durch Anwendung dieser Sublocus-spezifischen Amplifikation konnten auch bei dem Mutationsfall die 'wahren' DYS385-Haplotypen bestimmt werden. Für den Vater konnte der Haplotyp DYS385*a-b*14-15 bestätigt werden. Der Haplotyp DYS385*12-14 des Sohnes wurde dagegen revidiert, denn dieser weist im Sublocus a das Allel 14 und im Sublocus b das Allel 12 auf (DYS385*a-b*14-12). In diesem Fall liegt also eine 3-Schritt-Mutation vom väterlichen Allel 15 zum kindlichen Allel 12 vor. Bislang wurde in der Literatur (Gusmao et al. 2005) nur von einer 4-Schritt-Mutation des Y-STRs DYS438 (10→6) berichtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass bei Verwendung der Sublocus-spezifischen Amplifikation das STR-System DYS385 einen geeigneten Marker für die Abstammungsbegutachtung und Spurenkunde darstellt.

Tab. 5.2: Typisierungsergebnisse des Y-STRs DYS385

In grau sind die Proben hervorgehoben, bei denen durch die Sublocus-spezifische Amplifikation ein anderer DYS385-Haplotyp als mit der Sublocus-unspezifischen Amplifikation erhalten wurde.

Person	konventionelle Amplifikation DYS385*	Sublocus spezifische Amplifikation DYS385*a-b*
1	11-13	13-11
2	11-15	15-11
3	11-12	12-11
4	13-14	14-13
5	13-14	14-13
6	16-18	16-18
7	13-14	14-13
8	14-15	14-15
9	11-14	14-11
10	13-16	13-16
11	17-19	17-19
12	13-14	14-13
13	11-14	14-11
14	14-16	16-14
15	13-16	13-16
16	12-15	15-12
17	13-16	16-13
18	11-14	14-11
19	14-14	14-14
20	14-14	14-14
21	15-16	15-16
22	16-16	16-16
23	15-18	15-18
24	13-14	14-13
25	13-18	13-18
26	14-15	14-15
27	12-15	15-12
28	12-14	14-12
29	15-15	15-15
30	15-18	15-18
31	13-15	15-13
32	11-14	14-11
33	14-14	14-14
34	13-14	14-13
35	15-15	15-15
36	11-13	13-11
37	13-15	15-13
38	10-14	10-14
39	11-16	16-11
40	11-17	17-11
41	9-17	17-9
42	11-11	11-11
43	17-19	17-19

5. FORENSISCHE ANWENDUNG DER SUBLOCUS-SPEZIFISCHEN AMPLIFIKATION DYS385 72

Person	konventionelle Amplifikation DYS385*	Sublocus spezifische Amplifikation DYS385*a-b*
44	16-18	16-18
45	11-14	14-11
46	15-16	16-15
47	12-14	14-12
48	11-13	11-13
49	13-17	13-17
50	14-14	14-14
51	11-14	14-11
52	16-16	16-16
53	11-14	14-11
54	11-13	11-13
55	11-14	14-11
56	11-16	16-11
57	16-18	16-18
58	11-14	14-11
59	12-14	12-14
60	11-14	14-11
61	13-13	13-13
62	11-14	14-11
63	13-13	13-13
64	11-11	11-11
65	11-17	11-17
66	11-14	14-11
67	14-14	14-14
68	10-14	14-10
69	16-17	16-17
70	14-14	14-14
71	14-14	14-14
72	14-14	14-14
73	10-15	10-15
74	11-14	14-11
75	9-14	9-14
76	13-18	13-18
77	17-18	17-18
78	14-15	14-15
79	11-15	15-11
80	14-16	14-16
81	14-15	14-15
82	10-14	10-14
83	14-20	14-20
84	16-19	16-19
85	11-15	15-11
86	11-14	14-11
87	11-16	16-11
88	16-18	16-18
89	11-14	14-11

Person	konventionelle Amplifikation DYS385*	Sublocus spezifische Amplifikation DYS385*a-b*
90	10-10	10-10
91	11-13	13-11
92	13-14	14-13
93	11-15	15-11
94	12-18	12-18
95	11-16	16-11
96	11-13	13-11
97	14-16	14-16
98	11-14	14-11
99	15-15	15-15
100	11-14	14-11
101	14-16	16-14
102	13-14	13-14
103	11-14	11-14
104	11-14	11-14
105	11-14	11-14
106	17-17	17-17
107	11-13	11-13
108	11-15	11-15
109	11-15	15-11
110	11-14	11-14
111	17-18	18-17
112	11-14	11-14
113	13-16	16-13
114	12-15	12-15
115	11-14	11-14
116	11-14	11-14
117	11-11	11-11
118	12-14	14-12
119	11-14	11-14
GD	92,8%	95,3%
DC	29%	41%

6. VALIDIERUNG EINES NEUARTIGEN STR-MULTIPLEX-ASSAYS

6.1 EINLEITUNG

Neben der Amplifikation eines einzelnen STR-Systems (Monoplex) können auch mehrere STR-Systeme (Multiplex) gleichzeitig in einem Reaktionsansatz amplifiziert werden. Diese STR-Multiplexe können selbst hergestellt oder kommerziell bezogen werden. Es gibt bereits verschiedene STR-Multiplex-Assays (z.B. Nonaplex QS, Biotype), mit denen die 8 STR-Systeme der DNA-Analyse-Datei (ACTBP2, VWA, FGA, TH01, D21S11, D3S1358, D8S1179 und D18S51) und Amelogenin untersucht werden können. Die Firma Biotype hat einen STR-Multiplex-Assay (Humantype Chimera[®] II Kit) entwickelt, das insgesamt 14 STR-Systeme und Amelogenin amplifiziert. Die Abb. 6.1 zeigt das DNA-Profil der Zelllinien-DNA 9947A [1 ng/μl].

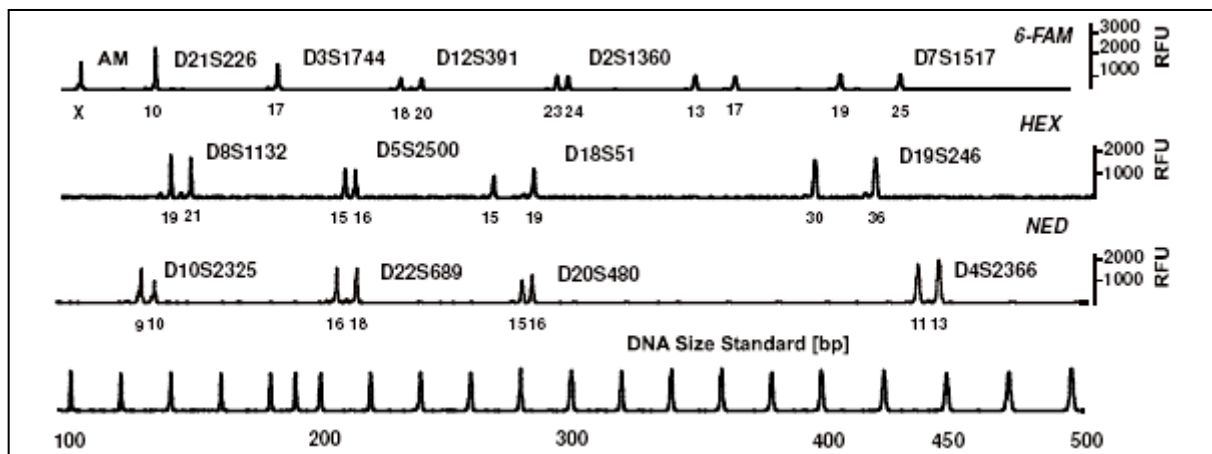


Abb. 6.1: DNA-Profil der Zelllinien-DNA 9947A (Becker et al. 2007)

1 ng der Zelllinien-DNA wurden mit dem Humantype Chimera[®] II Kit (Biotype) untersucht; RFU: *relative fluorescence unit*; bp: *base pair*

Die 14 STR-Systeme setzen sich aus 13 tetrameren STRs (D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D12S391, D18S51, D19S246, D20S480, D21S226, D22S689) und einem pentameren STR (D10S2325, siehe auch Kap. 4) zusammen. Die Tab. 6.1 zeigt die STR-Loci mit ihren Repeatmotiven und Allelen.

Tab 6.1: Informationen zu den 14 STR-Systemen und Amelogenin des Humantype Chimera® II Kits (Biotype) Quelle: Gebrauchsanleitung des Humantype Chimera® II Kits

STR-System	GenBank® Accession	Referenz- allel	Repeatmotiv des Referenzalleles	bekannte Allele
D2S1360	G08130	23	[TATC] ₉ [TGTC] ₉ [TATC] ₅	19-31
D3S1744	G08246	16	[TCTA] ₂ TA [TCTA] ₁₂ TCA	13-22
D4S2366	G08339	12	[ATAG] ₉ ATTG [ATAG] ₂	9-15
D5S2500	G08468	12	[ATAG] ₁₂	9-18
D6S474	G08540	17	[TAGA] ₅ TGA [TAGA] ₁₂	13-18
D7S1517	G18365	17	[GAAA] ₁₁ CAAA [GAAA] ₂	16-28
D8S1132	G08685	20	[TCTA] ₉ TCA [TCTA] ₉	13.1-27
D10S2325	G08790	12	[TCTTA] ₁₂	6-21
D12S391	G08921	19.3	[AGAT] ₅ GAT [AGAT] ₇	15-28
D18S51	L18333	13	[AGAA] ₁₃	5.3-42
D19S246	L13118	33	ATAGATAC [ATAG] ₄ ATAC [ATAG] ₇ [ATAC] ₁₁ ACAGATAC[ATAG] ₃ ACAG	27-39
D20S480	G08049	15	[TATC] ₁₃ ATC [TATC] ₅	12-19
D21S226	M93147	10	[TATC] ₁₀	7-11
D22S689	G08087	19	[TAGA] ₁₅ [CAGA] ₃ TAGA	12-20
Amelogenin X	M55418			
Amelogenin Y	M55419			

Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor der Markteinführung des Humantype Chimera® II Kits (Biotype) an dessen Betatest teilgenommen, an dem insgesamt 10 Labore aus Deutschland beteiligt waren. Die vereinigten Ergebnisse dieser Studie wurden durch Becker et al. (2007) publiziert.

6.2 ERGEBNISSE

Für den Betatest des Humantype Chimera[®] II Kits (Biotype) wurden 27 Familien mit je einem Kind und eine Familie mit zwei Kindern untersucht. Die Amplifikation der STR-Systeme D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517, D8S1132, D10S2325, D12S391, D18S51, D19S246, D20S480, D21S226, D22S689 und Amelogenin wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Vaterschaftswahrscheinlichkeit betrug bei jedem Putativvater mindestens 99,99%, wodurch die eindeutige Verwandtschaft von Vater und Kind als praktisch bewiesen angesehen werden konnte. Als Beispiel ist in Abb. 6.2 das Elektropherogramm des Vaters der Familie 14 dargestellt. Die kompletten Ergebnisse sind in den Tabellen 6.3a und 6.3b am Ende dieses Kapitels angegeben.

Die Daten der nicht-verwandten Elternteile dienten für die Berechnung der Allelfrequenzen und zur Überprüfung der Gültigkeit des Hardy-Weinberg-Gesetzes. Dazu wurde das Programm HWE Analysis, Version 3.2 (Christoph Puers, Münster) verwendet. Es wurden folgende statistische Parameter berechnet: die beobachtete (H_{obs}) sowie die erwartete Heterozygotenrate (H_{exp}), die Allgemeine Vaterschaftsausschlusschance (AVACH) und die Diskriminationskraft (PD). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 6.2a und 6.2b dargestellt. Die beobachtete Heterozygotenrate lag im Bereich der erwarteten Heterozygotenrate und es gab keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die kleinste AVACH betrug 30,1% im STR-System D21S226, die größte AVACH von 78,5% wies das STR-System D12S391 auf. Die Diskriminationskraft reichte von 73,9% (D21S226) bis 96,4% (D12S391).

In der Familie 1 konnte in dem STR-System D8S1132 eine paternale Mutation vom väterlichen Allel 24 zum kindlichen Allel 23 beobachtet werden. Bei den untersuchten 58 meiotischen Transfers entspricht dies einer Mutationsrate von $17,5 \times 10^{-3}$ (95% C.I. $3,1 - 92,8 \times 10^{-3}$).

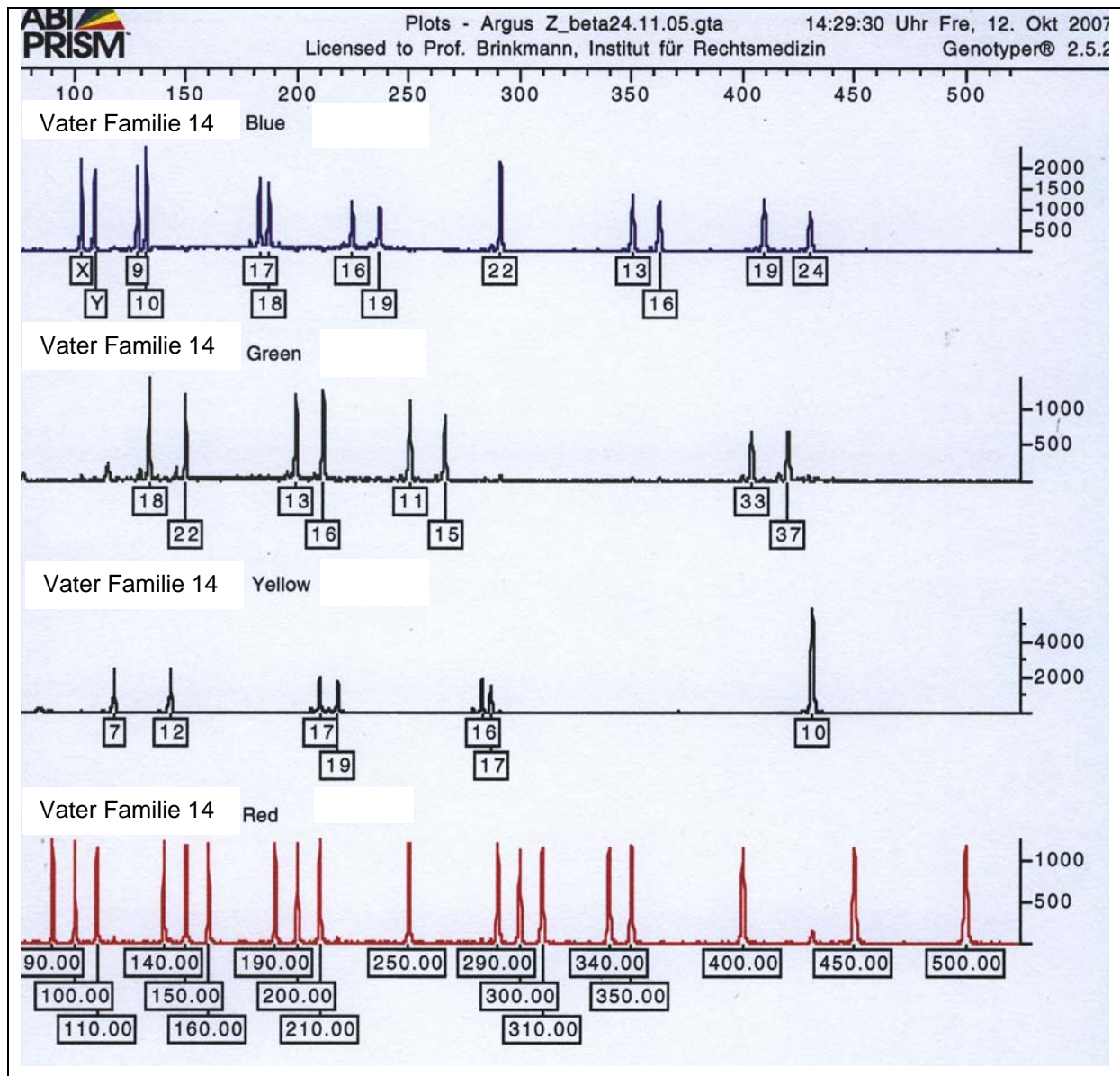


Abb. 6.2: Elektropherogramm des Vaters der Familie 14

1,5 µl des DNA-Extraktes des Vaters der Familie 14 wurden mit dem Humantype Chimera® II Kit (Biotype) untersucht. Der Humantype Chimera® II Kit wurde ursprünglich als Argus Z bezeichnet.

Tab. 6.2a: Allelfrequenzen der STR-Systeme D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517 und D8S1132

(H_{obs} : beobachtete Heterozygotenrate; H_{exp} : erwarteten Heterozygoten-rate; SE: Standardabweichung; AVACH: Allgemeine Vaterschaftsausschlusschance; PD: Diskriminationskraft)

System Allel	D2S1360	D3S1744	D4S2366	D5S2500	D6S474	D7S1517	D8S1132
7							
8							
9			0,357	0,009			
10			0,250	0,045			
11			0,063	0,277			
12			0,116	0,143			
13			0,125	0,045	0,277		
14		0,116	0,080	0,080	0,214		
15		0,071	0,009	0,286	0,089		
16		0,116		0,089	0,277		0,018
17		0,241		0,027	0,107		0,098
17.3							
18		0,232			0,036	0,045	0,196
18.3							
19		0,107				0,116	0,116
19.3							
20	0,134	0,116				0,080	0,188
21	0,063					0,125	0,089
22	0,348					0,125	0,196
23	0,125					0,098	0,045
24	0,036					0,134	0,036
25	0,125					0,205	0,018
26	0,054					0,054	
27	0,045					0,018	
28	0,054						
29	0,018						
H_{obs}	0,821	0,929	0,804	0,821	0,804	0,964	0,750
H_{exp}	0,824	0,839	0,777	0,809	0,787	0,882	0,860
AVACH	0,657	0,664	0,567	0,619	0,571	0,745	0,705
PD	0,943	0,934	0,904	0,090	0,895	0,954	0,952

Tab. 6.2b: Allelfrequenzen der STR-Systeme D10S2325, D12S391, D18S51, D19S246, D20S480, D21S226 und D22S689

(H_{obs} : beobachtete Heterozygotenrate; H_{exp} : erwarteten Heterozygotenrate;
SE: Standardabweichung; AVACH: Allgemeine Vaterschaftsausschlusschance;
PD: Diskriminationskraft)

System Allel	D10S2325	D12S391	D18S51	D19S246	D20S480	D21S226	D22S689
7	0,161						
8	0,036					0,179	
9	0,125					0,196	
10	0,161		0,018			0,616	
11	0,143		0,009			0,009	
12	0,116		0,116				
13	0,188		0,098		0,027		0,027
14	0,045		0,152		0,071		0,045
15	0,027	0,063	0,152		0,277		0,063
16		0,027	0,188		0,313		0,375
17		0,143	0,089		0,223		0,330
17.3		0,009					
18		0,098	0,116		0,063		0,134
18.3		0,009					
19		0,143	0,036		0,027		0,018
19.3		0,018					
20		0,134	0,018				0,009
21		0,134					
22		0,089	0,009				
23		0,071					
24		0,027					
25		0,027					
26		0,009					
27				0,223			
28							
29							
30				0,045			
31							
32				0,045			
33				0,107			
34				0,080			
35				0,027			
36				0,241			
37				0,152			
38				0,071			
39				0,009			
H_{obs}	0,911	0,893	0,893	0,875	0,786	0,518	0,696
H_{exp}	0,867	0,902	0,880	0,849	0,772	0,555	0,732
AVACH	0,716	0,785	0,741	0,686	0,549	0,301	0,497
PD	0,949	0,964	0,952	0,942	0,895	0,739	0,869

6.2 DISKUSSION

Es gibt bereits verschiedene STR-Multiplex-Assays (z.B. Nonaplex QS, Biotype), mit denen die 8 STR-Systeme der DNA-Analyse-Datei (ACTBP2, VWA, FGA, TH01, D21S11, D3S1358, D8S1179 und D18S51) und Amelogenin untersucht werden können. Zur Steigerung der Diskriminationskraft (PD) in Spurenfällen bzw. der Allgemeinen Vaterschaftsausschlusschance (AVACH) in Vaterschaftsfällen ist es manchmal sinnvoll, noch zusätzliche STR-Systeme zu untersuchen (Grubwieser et al. 2007). Aus diesem Grund hat die Firma Biotype einen STR-Multiplex-Assay entwickelt, das außer dem bekannten STR-System D18S51, das überlappend in anderen Multiplex-Kits (z.B. Identifiler) enthalten ist, und dem Geschlechtsmarker Amelogenin noch 13 bisher unkonventionelle STR-Systeme amplifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde vor der Markteinführung des Humantype Chimera[®] II Kits (Biotype) an dessen Betatest teilgenommen, an dem insgesamt 10 Labore aus Deutschland beteiligt waren.

Die beobachtete sowie die erwartete Heterozygotenrate, die Allgemeine Vaterschaftsausschlusschance und die Diskriminationskraft wurden ermittelt. Die beobachtete Heterozygotenrate lag im Bereich der erwarteten Heterozygotenrate. Insgesamt gab es keine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Die sehr kleine AVACH von 30,1% bzw. die kleine Diskriminationskraft von 73,9% im STR-System D21S226 relativieren sich durch die zusätzlichen Informationen, die die anderen 13 STRs liefern.

In der Familie 1 konnte in dem STR-System D8S1132 eine paternale Mutation beobachtet werden. Die ermittelte Mutationsrate von $17,5 \times 10^{-3}$ (95% C.I. 3,1 – $92,8 \times 10^{-3}$) ist etwa dreimal so groß wie die Mutationsrate von $4,5 \times 10^{-3}$, die die Arbeitsgruppe um Hering et al. (2001) beobachtet hat. In dem Betatest des Humantype Chimera[®] II Kit wurde von einem anderen Labor auch noch eine zweite Mutation im STR-System D8S1132 beobachtet. Dies entspricht dann einer Mutationsrate von $4,1 \times 10^{-3}$ (Becker et al. 2007), die insgesamt bei den 488 untersuchten Meiosen durch die 10 Labore beobachtet wurde.

Im Vergleich zu anderen Populationsgenetischen Studien (z.B. Hou et al. 2001 und Kuzniar et al. 2006) wurden ähnliche Allelfrequenzen ermittelt. Auch konnten keine neuen Allele beobachtet werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Humantype Chimera[®] II Kit eine sehr gute Ergänzung zu den bereits etablierten STR-Multiplex-Assays, wie z.B. dem Nonaplex QS (Biotype) oder Identifiler (Applied Biosystems), darstellt. Insbesondere bei dem Auftreten von Mutationen in Vaterschaftsfällen ist es zur Steigerung des Wahrscheinlichkeits-Wertes ratsam, zusätzliche STR-Systeme zu den 8 DAD-Systemen zu untersuchen. Ferner ist es auch in Defizienzfällen (=spezielle Art einer Abstammungsuntersuchung, wenn ein Elternteil nicht getestet werden kann) sehr wichtig, so viele Systeme wie möglich zu analysieren.

Tab. 6.3a: Typisierungsergebnisse der STR-Systeme Amelogenin, D2S1360, D3S1744, D4S2366, D5S2500, D6S474, D7S1517 und D8S1132

Kd: Kind; Kd1: erstes Kind; Kd2: zweites Kind; Km: Kindesmutter; PV: Putativvater; graue Markierung: aufgetretene paternale Mutation

Familie	Person	Amelogenin	D2S1360	D3S1744	D4S2366	D5S2500	D6S474	D7S1517	D8S1132
1	Kd	X/Y	22/23	14/17	9	11	13/14	20/21	22/23
	Km	X	23/26	17/18	9	11/15	13/14	19/21	19/22
	PV	X/Y	22/27	14/19	9	11/16	13/14	20/21	17/24
2	Kd	X/Y	22/23	17	9	11/14	13/16	19/23	21/25
	Km	X	20/22	15/17	9/11	11/14	13/16	19/23	24/25
	PV	X/Y	23/25	14/17	9/10	11/16	13/14	18/19	18/21
3	Kd	X/Y	22/25	18/20	9	10/15	13/14	19/20	18/20
	Km	X	25	18/20	9	10/11	13/14	19/22	18/20
	PV	X/Y	22/25	14/20	9	15/17	13/14	20/21	20
4	Kd	X	23/25	16/19	9/10	12/13	14/15	19/20	21/22
	Km	X	24/25	16/19	9	11/12	13/14	20	19/21
	PV	X/Y	23/24	16/17	10	11/13	15/16	19/25	18/22
5	Kd	X/Y	20/27	16/17	10/13	11/12	14/18	19/23	21/22
	Km	X	20/25	16/18	9/10	12/15	14	19/23	22
	PV	X/Y	25/27	17/19	10/13	11/14	13/18	19/24	21/22
6	Kd	X/Y	20/22	14/19	9/12	11/17	14	21/25	16/17
	Km	X	22/25	14/16	9/12	11/16	13/14	19/21	16/18
	PV	X/Y	20/21	17/19	9/12	16/17	13/14	19/25	17/21
7	Kd	X/Y	22/23	15/17	9	12/15	13/16	26	20/25
	Km	X	22/29	15/20	9/13	14/15	13/14	24/26	20
	PV	X/Y	22/23	17	9/13	12	16	25/26	22/25
8	Kd	X/Y	25/28	16/18	9/10	10/11	13/17	18/20	19
	Km	X	22/25	17/18	10	10/16	13	18/23	18/19
	PV	X/Y	26/28	16/19	9/14	11/15	16/17	20/24	18/19
9	Kd	X/Y	20/25	15/20	10/12	11/15	17/18	21/26	18/21
	Km	X	20/22	15	10	11/12	17	21/25	18
	PV	X/Y	23/25	17/20	9/12	13/15	14/18	24/26	19/21
10	Kd	X/Y	22	17/20	9/13	11/12	13/14	21	20/22
	Km	X	20/22	16/17	9/12	12	14/16	21/25	20
	PV	X/Y	22/25	18/20	11/13	11/15	13	21/23	17/22
11	Kd	X	22/28	14/19	13/14	11/15	14/16	22/25	18/22
	Km	X	23/28	17/19	10/14	11/15	14/15	19/22	18
	PV	X/Y	22	14/17	9/13	11/15	16	25	19/22
13	Kd	X/Y	20/22	17/18	10	12/15	13	18	20/23
	Km	X	20	15/18	9/10	12/15	13/17	18/25	20
	PV	X/Y	22/23	17/18	10/14	11/15	13	18/24	21/23
14	Kd	X	22	18	9/10	13/15	15/16	22/24	18/20
	Km	X	22	18/19	9/11	11/15	15/17	22/24	19/20
	PV	X/Y	22	17/18	10	13/16	13/16	19/24	18/22
15	Kd	X/Y	20/22	16/19	11	10/11	14/16	21/22	20
	Km	X	22/23	16/17	9/11	10/12	14/16	20/21	20
	PV	X/Y	20/21	16/19	10/11	11/15	13/14	22/24	18/20
16	Kd	X/Y	21/22	17/18	10/14	11/12	15/16	22/25	18/22
	Km	X	21	18	9/14	11/15	15/17	23/25	22
	PV	X/Y	22/28	17/20	9/10	12	16	20/22	18
17	Kd	X	22	18/20	9/10	11/15	16	21/26	20
	Km	X	22/23	14/20	10	11	16	25/26	20/22
	PV	X/Y	21/22	16/18	9/12	11/15	16/17	21/25	18/20

Familie	Person	Amelogenin	D2S1360	D3S1744	D4S2366	D5S2500	D6S474	D7S1517	D8S1132
18	Kd	X/Y	23	17	9/10	11/15	13/16	22/25	22/23
	Km	X	20/23	17/20	10/14	15	13/16	22/25	20/22
	PV	X/Y	23/26	17/18	9/11	11	16	22/23	18/23
19	Kd	X/Y	22/26	14/17	10/13	12/16	15	23/27	18/22
	Km	X	22/26	17/19	9/13	12/14	14/15	21/27	21/22
	PV	X/Y	22	14/17	10	11/16	13/15	23/24	18/19
20	Kd	X/Y	22/26	14/18	9/12	10/16	14/16	22/26	18/22
	Km	X	22	14/18	9/10	14/16	14/18	20/22	18/20
	PV	X/Y	22/26	15/18	12/13	10/11	14/16	26/27	20/22
21	Kd	X	20/22	14/20	12/13	11/15	13/18	22/24	17
	Km	X	20/25	18/20	12/13	10/15	13/16	24/25	17
	PV	X/Y	22/28	14/18	12/14	11/15	15/18	22/24	17
22	Kd	X	21/29	18/20	9/15	11/15	14/16	18/21	17/18
	Km	X	22/29	15/20	9/13	11/15	13/16	21/25	18
	PV	X/Y	21/26	18/20	10/15	11/15	13/14	18/25	17/20
23	Kd	X/Y	23/24	14/20	9/13	13/15	15/17	22	22/23
	Km	X	23/27	15/20	9/13	13/15	16/17	22/25	23/24
	PV	X/Y	21/24	14/18	9/10	15	15/17	22/25	21/22
24	Kd	X	20/25	18/20	9/10	11/15	13/17	24/25	17/20
	Km	X	20/25	17/20	9/10	15	13/16	24/25	19/20
	PV	X/Y	22/25	18/19	9/14	11/15	13/17	20/25	17/19
25	Kd	X/Y	27	14/18	9/10	9/12	13/14	21/23	22
	Km	X	20/27	17/18	10/13	12/16	13/14	21/26	16/22
	PV	X/Y	22/27	14/18	9/13	9/14	14/16	19/23	19/22
26	Kd	X	20/22	16/17	12/14	12/14	13/16	23/24	19/22
	Km	X	20/22	17	12/14	12/17	13/16	24/25	19/23
	PV	X/Y	20	16/17	12/14	12/14	15/16	23/24	22
27	Kd	X	22/24	14/19	11/12	11/15	16	23	18
	Km	X	22/23	14/18	11/13	15	13/16	21/23	18/22
	PV	X/Y	22/24	18/19	9/12	11/14	16	23/25	17/18
28	Kd	X/Y	22/28	14/19	9	11/15	15/16	21/22	20/22
	Km	X	22	17/19	9/12	12/15	13/15	21/25	21/22
	PV	X/Y	22/28	14/16	9/10	11/14	16/17	22/25	19/20
29	Kd1	X/Y	22/28	16/18	9/12	13/15	14/17	22	23/24
	Kd2	X/Y	23/28	16/18	10/13	13/15	14/16	19/24	17/21
	Km	X	22/28	16/18	9/10	13/16	14/17	19/22	21/24
	PV	X/Y	22/23	16/18	12/13	15	14/16	22/24	17/23

Tab. 6.3b: Typisierungsergebnisse der STR-Systeme D10S2325, D12S391, D18S51, D19S246, D20S480, D21S226 und D22S689

Kd: Kind; Kd1: erstes Kind; Kd2: zweites Kind; Km: Kindesmutter; PV: Putativvater

Familie	Person	D10S2325	D12S391	D18S51	D19S246	D20S480	D21S226	D22S689
1	Kd	10/12	18/21	13/18	27/34	14/16	10	14/17
	Km	10/12	21	15/18	27	14/15	10	14/16
	PV	7/10	18/24	13/15	32/34	16	10	17
2	Kd	11	17/20	14/18	37	14/15	8	17
	Km	11/13	16/20	12/18	32/37	15/17	8/10	17
	PV	11	17/24	14/18	37/38	14/15	8	16/17
3	Kd	7/10	21	16/17	27/34	17	9/10	16/17
	Km	7/12	21/24	16/17	27/37	17/18	8/10	17
	PV	10/14	19/21	12/16	27/34	16/17	9/10	16/17
4	Kd	7/8	15/18.3	12/15	27/33	16	10	15/18
	Km	8/11	16/18.3	14/15	27/33	15/16	10	18
	PV	7/9	15/18	12/19	27/36	16	9/10	15/17
5	Kd	10	18/19	12/13	27	15/16	10	17
	Km	10/14	18/22	13/17	27/37	15	10	16/17
	PV	10/11	19/20	12	27/34	16	9/10	17/18
6	Kd	10/11	21	12/18	33/36	15/17	8/10	16
	Km	11/12	17/21	12/13	33/36	15/16	8/10	16
	PV	10/13	21	13/18	33/36	14/17	10	16
7	Kd	7/13	17/19	15/18	27/38	13/17	10	16/17
	Km	7/13	19/20	14/18	27/38	13/14	9/10	16
	PV	7/13	17/21	14/15	36/38	16/17	10	16/17
8	Kd	9/13	17/23	14/19	34/37	15	8/9	17/18
	Km	12/13	17/23	15/19	27/34	15/16	8/10	15/17
	PV	9/10	21/23	14/18	37/38	15/17	9/10	17/18
9	Kd	9/11	22/25	14/15	32/38	16	10	15/16
	Km	7/9	15/22	14/15	37/38	16/17	10	15/18
	PV	9/11	17/25	15/16	32/39	15/16	10	16
10	Kd	10/15	15/17	12/16	27/33	14/15	10	14/17
	Km	7/15	15/20	12/20	33/37	14/19	10	14/16
	PV	10/11	17/19	12/16	27/35	15	10	16/17
11	Kd	14/15	19/21	16	33/37	15/16	8/10	14/18
	Km	7/14	19/23	14/16	33/37	16/17	10	14/16
	PV	10/15	21/22	16/17	34/37	15	8/10	18
13	Kd	7/12	18/20	13/18	27/38	16/17	10	17
	Km	10/12	18/20	10/13	27/33	17	10	16/17
	PV	7/13	18/20	13/18	36/38	15/16	10	13/17
14	Kd	7/12	19/20	11/17	33/36	15/16	9/10	17/19
	Km	12/13	19/20	13/17	27/36	15/16	10	17/18
	PV	7/12	16/19	11/15	33/37	16/17	9/10	17/19
15	Kd	13/14	17/20	16/17	34/36	15	9	13/19
	Km	10/14	17/23	16	27/34	15/16	9	13/16
	PV	11/13	20/21	14/17	36/37	15/19	9	16/19
16	Kd	13/14	17/18	16	27/33	16/17	8/10	16/17
	Km	12/14	18/19	15/16	33/36	16/17	10	16/17
	PV	9/13	17/23	16	27	16/17	8/10	16/17
17	Kd	8/10	20/21	12	27/36	13/14	8/10	16/17
	Km	8/10	20	12/16	27/37	14/17	8/10	16/17
	PV	10	20/21	12/13	30/36	13/16	10	16/17

Familie	Person	D10S2325	D12S391	D18S51	D19S246	D20S480	D21S226	D22S689
18	Kd	7/9	19.3/23	14/18	27/36	16/17	9/10	16/18
	Km	9/13	18/19.3	14/16	36/36	17	9/10	16
	PV	7/12	20/23	18/19	27/36	15/16	8/9	16/18
19	Kd	9/12	17/19	13/16	35/36	14/16	9/10	15/17
	Km	11/12	19/25	16/20	30/36	14/18	8/9	15
	PV	9/10	17	13/17	35/37	15/16	9/10	17
20	Kd	10/15	17/22	14/17	27/36	17/18	8/10	14/17
	Km	10/11	17/21	14/15	27/34	16/18	8/10	17
	PV	11/15	22	13/17	32/36	16/17	10	14/18
21	Kd	8/11	18/23	18/19	36/36	15/17	10	16/18
	Km	8/13	21/23	16/18	36/36	16/17	10	17/18
	PV	11/13	17/18	16/19	36/36	15	10	14/16
22	Kd	12/13	15/19	14/16	33/38	16	9	17/18
	Km	7/12	19/20	14/18	37/38	16	9/10	15/17
	PV	9/13	15/17	16/18	27/33	13/16	9/10	18/20
23	Kd	10/11	15/19	14/15	35/36	15/17	8/10	16
	Km	10/11	15/17	15	36/36	17	9/10	16
	PV	7/11	18/19	14	27/35	15/19	8/10	16
24	Kd	7/9	19/22	15/16	27/33	15/16	8/11	16/17
	Km	7/13	19/20	12/16	27/34	15	8	16/17
	PV	9	22/23	15/17	33/36	16/17	8/11	15/17
25	Kd	9	17.3/22	16/17	30/32	16/18	10	16/17
	Km	7/9	15/17.3	16/22	30/33	15/18	8/10	13/17
	PV	9/11	19/22	17	32/36	16/17	10	16/17
26	Kd	8/13	19/21	14/18	36/37	15/18	9	16/18
	Km	8/13	19/22	14/15	36/37	15/17	9	16/18
	PV	13	18/21	14/18	33/37	16/18	8/9	16/17
27	Kd	7/9	18/25	14/15	27/37	15/18	10	16/18
	Km	9/10	19.3/25	12/14	27	15/16	8/10	16/18
	PV	7/12	18/19	15/16	30/37	16/18	10	16/17
28	Kd	13	15/22	15/16	27/36	17/18	8/10	16
	Km	13	15/17	14/15	30/36	15/18	8/10	16
	PV	12/13	22	10/16	27/36	15/17	9/10	16
29	Kd1	7	19/26	12/13	36/38	14/17	10	17/18
	Kd2	7/9	17/20	12/13	36/36	14/17	10	16/17
	Km	7/9	17/19	12/18	34/36	14/16	9/10	16/17
	PV	7/13	20/26	13/15	36/38	15/17	10	17/18

7. ANWENDUNG DER *REAL-TIME* PCR ZUR UNTERSUCHUNG VON SPURENMATERIAL

7.1 EINLEITUNG

Am Ort eines Verbrechens kommt es häufig zur Antragung geringster Mengen von DNA an Kleidung oder Werkzeugen. Für die molekulargenetische Untersuchung wird das STR-System ACTBP2, das hier die beste Nachweissensitivität bei Spuren aufweist, typisiert. Dafür ist es aber äußerst wichtig, die DNA in ausreichender Qualität und Quantität vorliegen zu haben. Um die Quantität der DNA zu bestimmen ist heutzutage die *real-time* PCR das Mittel der Wahl.

Für die Quantifizierung der Spuren-DNA wird bisher der Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems), das ebenfalls nach dem TaqMan-Prinzip arbeitet, verwendet. Um diesen eventuell später zu ersetzen soll hier nun ein *real-time* PCR-Assay entwickelt werden, das eine Human-DNA-Quantifizierung unter Verwendung des ACTBP2-Systems und - aus demselben Ansatz - eine ACTBP2-Genotypisierung ermöglicht.

7.2 VALIDIERUNG

Dem ACTBP2-Assay (Abb. 7.1) liegt die ACTBP2-Sequenz des Allels 26.2, die der GenBank des *National Center for Biotechnology* (V00481) entnommen wurde, zugrunde.

```

5' - AATCTGGGCGACAAGAGTGA AACTCCGTCAAAGAAAGAAAGAGACAAAGAGAGT
TAGAAAGAAAGAAAGAGAGAGAGAGAAAGGAAGGAAGGAAGAAAAAGAAAGAAAAAGAAA
GAAAGAGAAAGAAAGAAAGAGAAA GAAA GAAA GAAA GAAA GAAA GAAA GAAA GA
AA GAAA GAAA GAAAA GAAA GAAA GAAA GAAA GAAA GAAA GAAA GAAA GA
AA GAAA GAAA GAAA GAAA GAAA GAAAGGAAGGAAAGAAAGAGCAAGTTAC TATAGCGGTAG
GGGAGATGT - 3'

```

Abb. 7.1: Sequenz des ACTBP2-Locus

Darstellung der von den ACTBP2-Primern amplifizierte Sequenz des ACTBP2-Locus (Allel 26.2, GenBank Nr. V00481). Die komplexe Repeatregion, die ACTBP2-Primer und die ACTBP2-TaqMan-Sonde sind farblich hervorgehoben.

Diese Sequenz enthält die ACTPB2-Primer nach Polymeropoulos et al. (1992), die in die etablierte ACTBP2-Monoplex eingesetzt werden und deshalb auch für diese *real-time* PCR verwendet werden sollen. Der *real-time* Ansatz soll mittels TaqMan-Technologie durchgeführt werden. Dazu wurde die TaqMan-Sonde von Frau Astrid Potratz (Applied Biosystems) entwickelt. Zur Validierung der einzusetzenden Primer-Menge wurden drei verschiedene Konzentrationen (900 nM, 300 nM und 50 nM) getestet. Die TaqMan-Sonde wurde in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 150 nM eingesetzt. Als Standard für das ACTBP2-Assay wurde der Standard des Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) in 8 verschiedenen Verdünnungen (23 pg – 50 ng) eingesetzt. Die gemessenen C_T -Werte des Standards wurden gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentration aufgetragen, so dass durch lineare Regression eine Kalibrationsgerade (Abb. 7.2) ermittelt werden konnte.

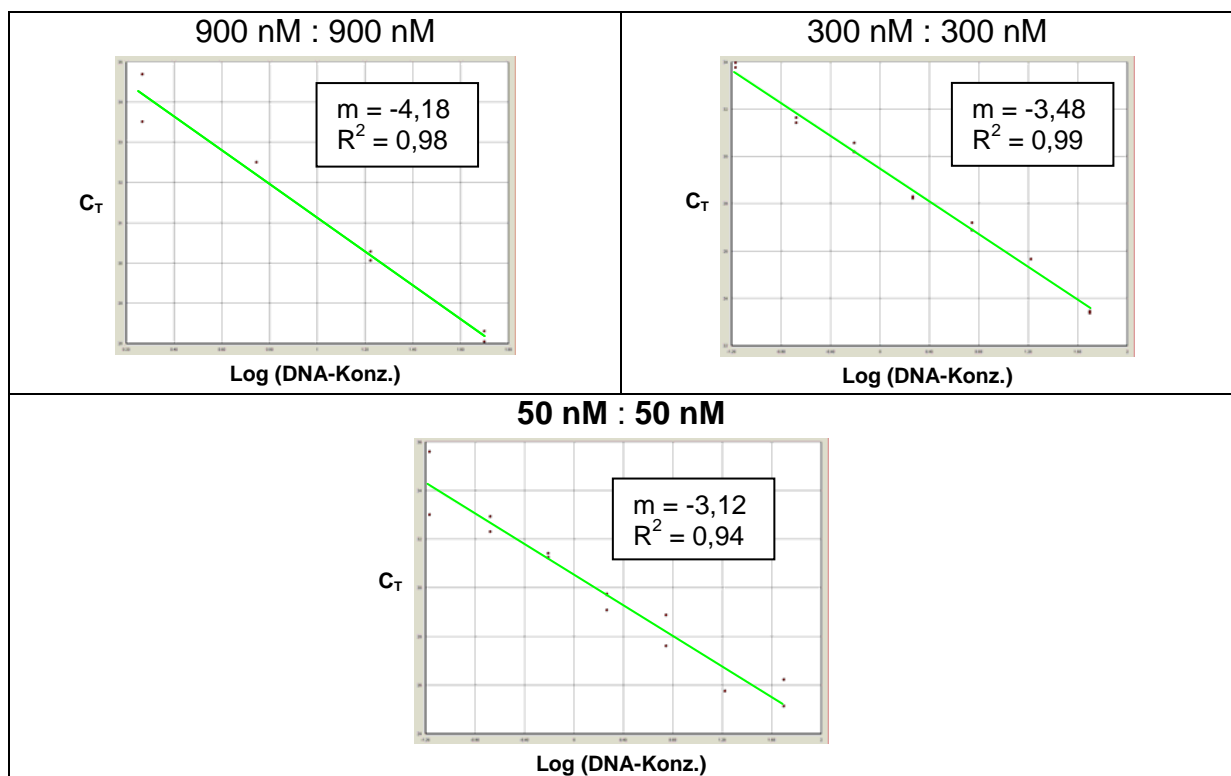


Abb. 7.2: Optimierung der einzusetzenden Primer-Menge in das ACTBP2-Assay

Es wurden drei verschiedene Konzentrationen von P1 und P2 (900 nM, 300 nM und 50 nM) in den Mastermix eingesetzt.

In Hinsicht auf die Steigung und den Korrelationskoeffizienten hat sich das Verhältnis 300 nM:300 nM als optimal erwiesen.

Im Anschluss erfolgte die Optimierung der einzusetzenden Taqman-Sonden-Menge. Neben der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 150 nM wurden noch Konzentrationen von 100 nM und 50 nM getestet (siehe Abb. 7.3). Hier zeigte die Konzentration von 50 nM Sonde die besten Ergebnisse.

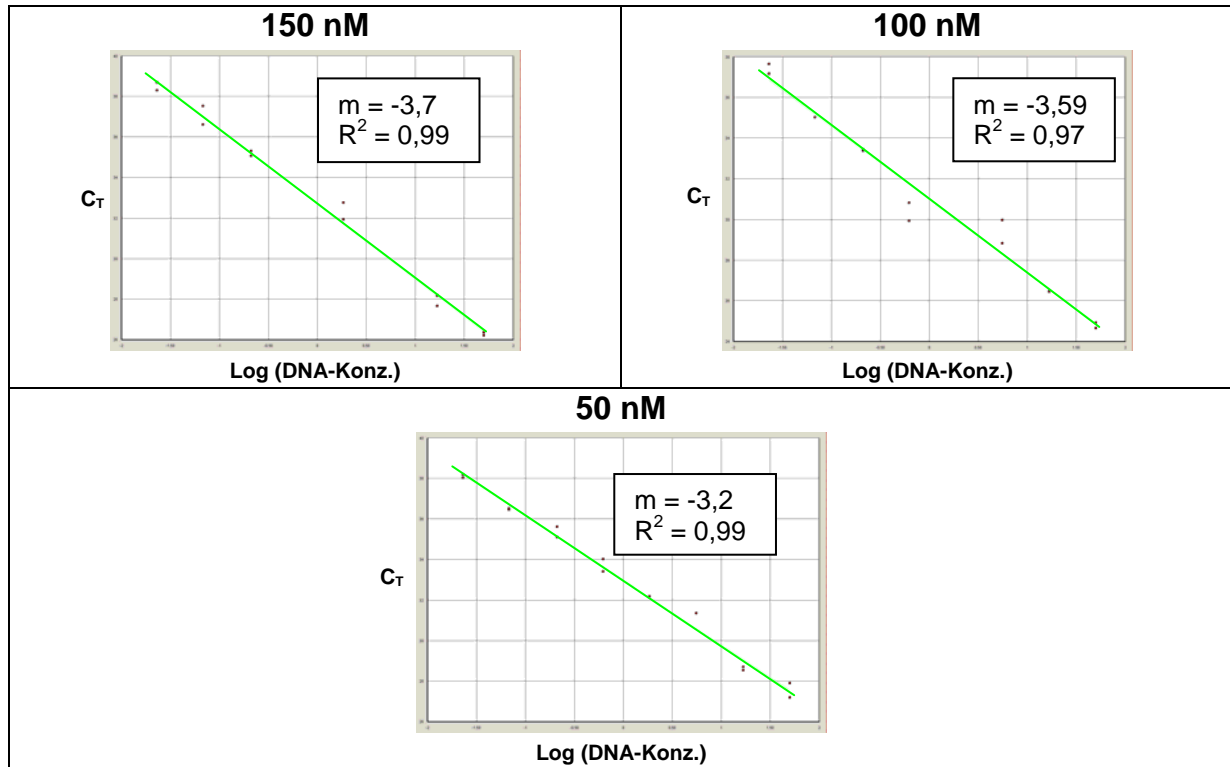


Abb. 7.3: Optimierung der einzusetzenden Sonden-Konzentration in das ACTBP2-Assay
Es wurden drei verschiedene TaqMan-Sonden-Konzentrationen (300 nM, 150 nM und 50 nM) in den Mastermix eingesetzt.

Das Besondere und Neue an dem zu entwickelnden Assay sollte die Kombination von Quantifizierung und Typisierung sein. Dazu war es nötig zu testen, ob die Menge des für die Genotypisierung benötigten FAM-markierten Primer 1 die *real-time* PCR negativ beeinflusst und welches Mischungsverhältnis von markierten (m) zu unmarkierten (um) Primer 1 (100% m, 75% m : 25% um, 50% m : 50% um und 25% m : 75% um) optimal ist. Normalerweise wird in die ACTBP2-Monoplex 100% an markierten Primer 1 eingesetzt. Hier (Abb. 7.4) zeigte sich allerdings, dass nur bei der 100%igen Verwendung von markiertem Primer 1 die Steigung und der Korrelationsfaktor nicht die optimalen Werte aufweisen. Als optimal erwiesen sich die Mischungsverhältnisse 75% : 25%, 50% : 50% und 25% : 75%. Allerdings kam es bei den Mischungsverhältnisse 75% : 25% und 25% : 75% zum Ausfall der Standardverdünnungen von 5,56 ng/µl und 1,85 ng/µl.

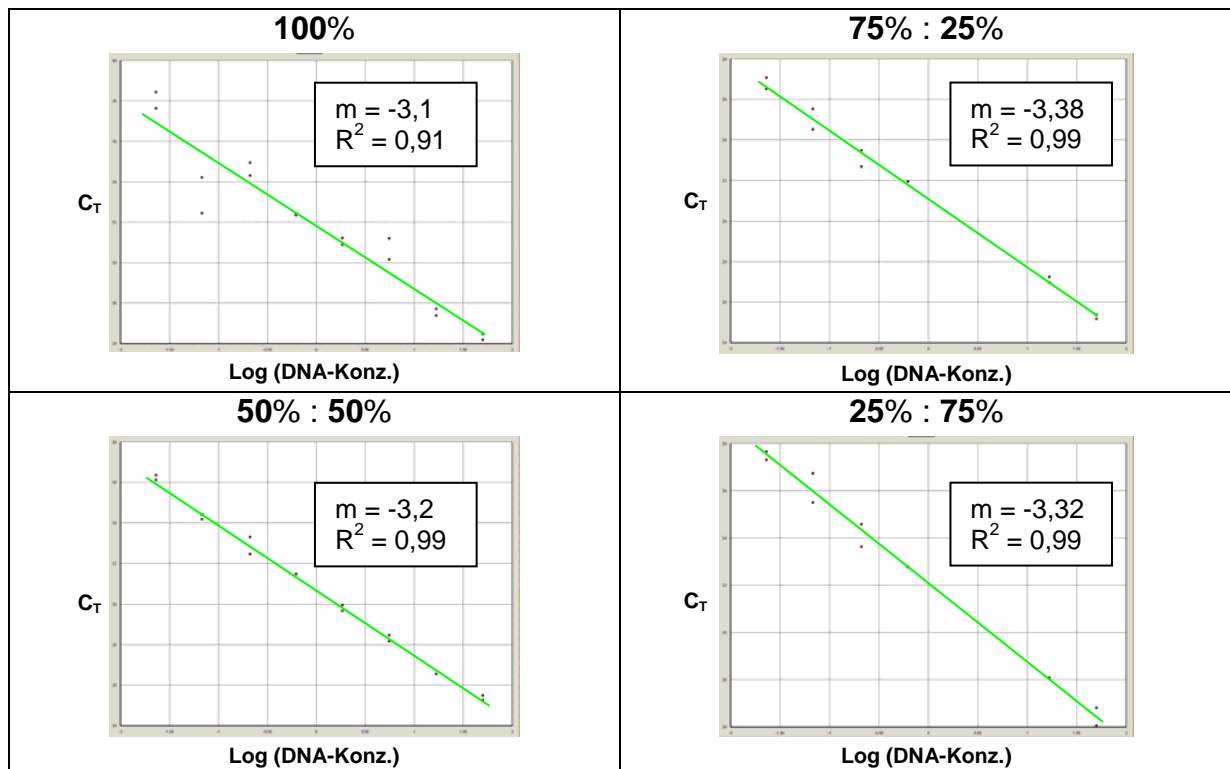


Abb. 7.4: Optimierung der einzusetzenden Menge an markierten Primer 1 in das ACTBP2-Assay
Es wurden vier verschiedene Mischungsverhältnissen von markierten zu unmarkierten P1 (100%, 75% : 25%, 50% : 50% und 25% : 75%) ausgetestet.

Zur Einschätzung der optimalen Assaybedingung reicht der Vergleich der Steigung und des Korrelationsfaktors nicht aus. Auch die Ergebnisse der Genotypisierung zur Einschätzung der einzusetzenden Menge an markiertem Primer 1 mussten herangezogen werden. Dazu erfolgte eine *real-time* Amplifikation der Zelllinien-DNA 007 mit den drei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen. Die PCR-Produkte wurden direkt nach der *real-time* PCR-Amplifikation elektrophoretisch (Abs. 3.2.6.1) aufgetrennt, um die für die Fragmentlängenanalyse mittels Kapillargelelektrophorese (Abs. 3.2.6.2) benötigte Menge an PCR-Produkt abzuschätzen. Die Ergebnisse der Genotypisierung auf dem ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer sind in der Abbildung 7.5 dargestellt. Bei den Mischungsverhältnissen 75% : 25% und 25% : 75% trat eine *Peak-Imbalance* auf, d.h. das kürzere Allel wurde präferentiell amplifiziert. Daher wurde für ein optimal verlaufendes ACTBP2-Assay zukünftig eine Mischung von 50% markiertem und 50% unmarkiertem Primer 1 verwendet.

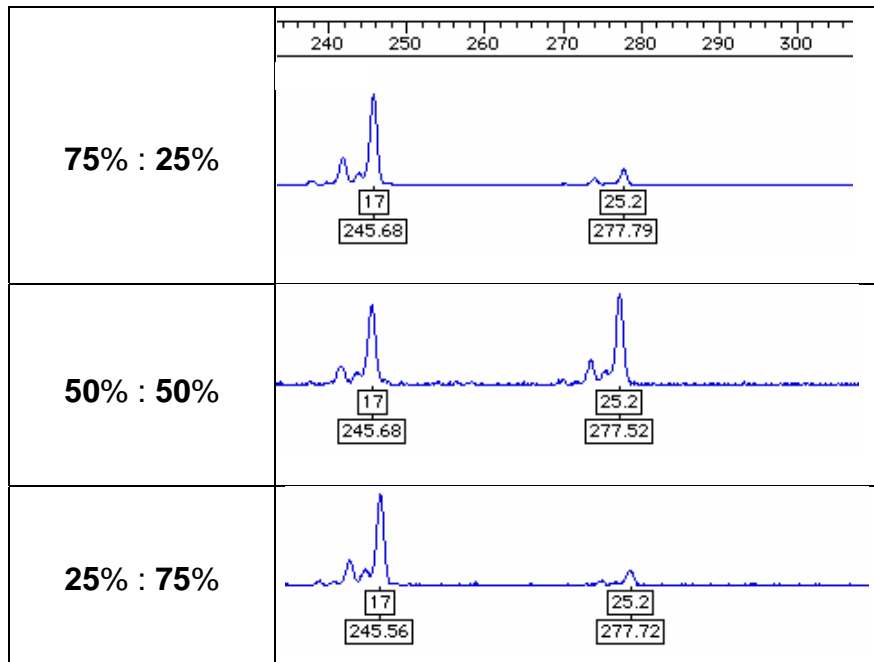


Abb. 7.5: Elektropherogramm nach der *real-time* PCR-Amplifikation

Es wurden 3 verschiedene Mischungsverhältnissen von markierten zu unmarkierten Primer 1 (75% : 25%, 50% : 50% und 25% : 75%) in die *real-time* PCR eingesetzt und anschließend direkt genotypisiert.

7.3 ERGEBNISSE

Nach erfolgter Optimierung wurde die *real-time* PCR mit jeweils 300 nM Primer (50% des Primer 1 war markiert) und 50 nM Taqman-Sonde wie unter Absatz 3.2.3.2.1 beschrieben durchgeführt. Die NTC (*no template control*, Kontrolle ohne Template-DNA) und die Pufferkontrolle zeigten wie erwartet in keinem der Experimente ein Signal, so dass eine Kontamination des Mastermixes bzw. des T₁₀E_{0.1}-Puffers ausgeschlossen werden konnte. Die gemessenen C_T-Werte des Standards wurden gegen den Logarithmus der eingesetzten Konzentration aufgetragen, so dass durch lineare Regression eine Kalibrationsgerade erhalten werden konnte. *Baseline* und *threshold* wurden so definiert, dass die Steigung und der Korrelationskoeffizient möglichst optimal waren. Der Korrelationskoeffizient war in allen Experimenten größer als 0,99 und die Steigung betrug durchschnittlich -3,28. Aus der Steigung konnte die Amplifizierungseffizienz der PCR-Reaktionen mit $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ ermittelt werden. Die Effizienz betrug im Durchschnitt 2,02 (maximale Effizienz ist gleich 2 \cong Verdopplung), was bedeutet, dass die *real-time* PCR optimal verlief.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit im *intra-assay* wurde die Zelllinien-DNA 007 zweimal auf derselben Mikrotiterplatte amplifiziert. Es wurden verschiedene C_T -Werte und somit Konzentrationen ermittelt (Tab. 7.1 a)). Der Variations-Koeffizient CV (*coefficient of variation*) berechnet sich aus dem Verhältnis von Standardabweichung zu gemessenem C_T -Werte bzw. zu errechneter Konzentration. Der CV für die C_T -Werte beträgt 0,59%, der CV für die Konzentration ist dagegen wesentlich höher (16,34%), was durch die Logarithmierung erklärt werden kann.

Tab. 7.1: Ergebnisse des *intra-assays*

Die Zelllinien-DNA 007 wurde jeweils zweimal auf einer Mikrotiterplatte amplifiziert. CV: Variations-Koeffizient (*coefficient of variation*); STABW: Standardabweichung; C_T : *threshold cycle*

Probe	C_T -Wert	Quantität [ng:µl]
007	37,93	0,0280
007	38,25	0,0222
Mittelwert	38,09	0,0251
STABW	0,23	0,0041
CV [%]	0,59	16,3395

Um die Anwendbarkeit des Assays zu untersuchen wurden der Standard mit der Konzentration 0,62 ng/µl und 140 DNA-Extrakte aus abgeschlossenen Spurenfällen untersucht. Es handelte sich um 44 Blutspuren, 25 Zigarettenreste, 54 Abriebe und 17 sonstige Spuren (z.B. Handschuhe). Die kompletten Ergebnisse befinden sich im Anhang.

Die mit dem ACTBP2-Assay quantifizierten Proben wurden ebenfalls mit dem Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems) quantifiziert (siehe Abs. 3.2.3.2.2). Die NTC zeigte wie erwartet kein Signal. Der Korrelationskoeffizient war in allen Experimenten größer als 0,99 und die Steigung betrug durchschnittlich -3,17. Aus der Steigung konnte eine Amplifizierungseffizienz von durchschnittlich 2,07 (maximale Effizienz ist gleich 2 \cong Verdopplung) ermittelt werden, was bedeutet, dass auch hier die *real-time* PCR optimal verlief.

Um beide Quantifizierungs-Assays miteinander zu vergleichen, wurden die Ergebnisse grafisch aufgetragen (Abb. 7.6). Die ermittelten Konzentrationen weichen stark voneinander ab, wobei meistens der Quantifiler® Human DNA Quantification

Kit eine höhere Konzentration liefert. Legt man eine Ausgleichsgerade durch die bestimmten Konzentrationen, so weist diese eine Steigung von 0,179 und einen Korrelationsfaktor von 0,249 auf. Es gab auch zwei Proben, bei denen mit dem Quantifiler® Human DNA Quantification Kit eine sehr hohe Konzentration (281,18 ng/µl und 15,92 ng/µl) ermittelt wurde und bei denen das ACTBP2-Assay negativ verlief. Diese sind nicht mit einbezogen worden, um eine bessere graphische Darstellung der restlichen Proben zu erhalten.

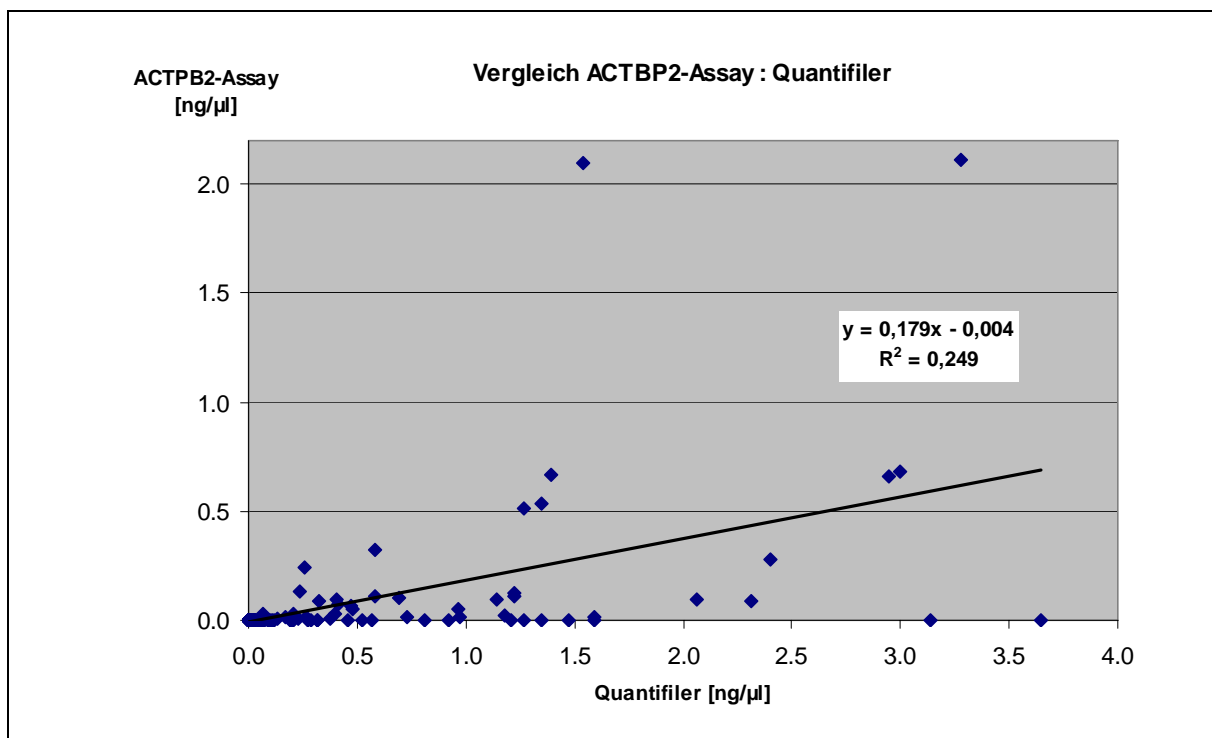


Abb. 7.6: Vergleich ACTBP2-Assay vs. Quantifiler

Die mit Hilfe des ACTBP2-Assays bzw. mittels Quantifilers ermittelten Konzentrationen der Spurenextrakte sind hier gegeneinander aufgetragen. Die Steigung der Ausgleichsgeraden und der Korrelationsfaktor (R^2) sind dargestellt.

Im Anschluss an die Quantifizierung erfolgte eine ACTBP2-Genotypisierung der PCR-Produkte. Die so ermittelten Genotypen wurden mit den Genotypen, die durch eine ACTBP2-Monoplex bestimmt wurden, verglichen. Beim Auswerten der Daten fielen im Vergleich zu der Monoplex sehr stark ausgeprägte Stotterbanden (*stutter-peaks*) auf (siehe Abb. 7.7). Auffallend war, dass 24 von den 103 Proben, deren Konzentrationsbestimmung mit dem ACTBP2-Assay negativ verlief, trotzdem typisiert werden konnten. Davon konnten zwei Proben nicht mit der ACTBP2-Monoplex typisiert werden. Die gesamten Typisierungsergebnisse sind ebenfalls in der Tabelle im Anhang dargestellt und können in vier Gruppen (Tab. 7.2) unterteilt werden. Bei einer Übereinstimmung stimmen die Ergebnisse der Genotypisierung

der PCR-Produkte des ACTPB2-Assays und die der PCR-Produkte der ACTBP2-Monoplex vollständig überein (auch wenn beide Ergebnisse negativ waren). Eine partielle Übereinstimmung lag vor, wenn ein bzw. mehrere Allele bei einer der beiden Varianten der Genotypisierung nicht detektiert werden konnten. Man spricht dabei von einem allelischen *drop-out*. Es konnte auch beobachtet werden, dass es keine Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Varianten der Genotypisierung gab oder dass nur eine Variante einen ACTBP2-Befund lieferte (ein ACTBP2-Befund positiv).

Tab. 7.2: Einteilung der Typisierungsergebnisse

Die Typisierungsergebnisse, die durch die Genotypisierung der PCR-Produkte des ACTPB2-Assays bzw. der ACTBP2-Monoplex erhalten wurden, wurden verglichen und in vier Gruppen unterteilt.

Kriterium	Anzahl	%
komplette Übereinstimmung	89	63,1
partielle Übereinstimmung	11	7,8
keine Übereinstimmung	3	2,1
ein ACTBP2-Befund negativ	38	27,0
	141	100,0

Die meisten Übereinstimmungen zwischen den zwei Genotypisierungs-Varianten zeigten die Blutspuren und die Zigarettenreste. Bei 27 dieser 89 Proben trat eine *Peak-Imbalance* auf, d.h. das größere ACTBP2-Allel wies eine geringere Peakhöhe als das kürzere Allel auf. Abb. 7.7 zeigt dieses Phänomen am Beispiel der Probe 43. Mit Hilfe der ACTPB2-Monoplex (Abb. 7.7 a) konnte der Genotyp 20/28.2 bestimmt werden. Nach der Genotypisierung der PCR-Produkte des ACTBP2-Assays (Abb. 7.7 b) konnte dieses Ergebnis ebenfalls ermittelt werden, allerdings fiel - im Vergleich zu der Monoplex - eine sehr stark ausgeprägte Stotterbande (*stutter-peak*) auf. Außerdem betrug die Peakhöhe des Allels 28.2 nur 16,6% der Peakhöhe des Allels 20. Durch einen zusätzlichen Elongationsschritt und eine finale Elongation bei der PCR konnte diese *Peak-Imbalance* etwas reduziert werden (Abb. 7.7 c).

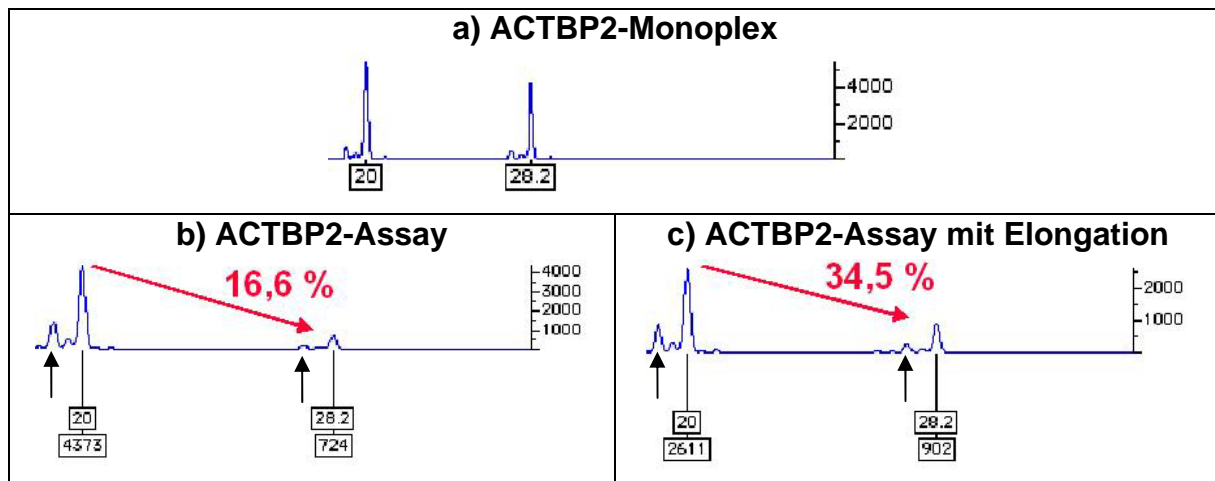


Abb. 7.7: Peak-Imbalance

Bei der Probe 43 lieferte die ACTBP2-Monoplex (a) den Genotyp 20/28.2. Nach der Genotypisierung der PCR-Produkte des ACTBP2-Assays (b) konnte dieses Ergebnis ebenfalls ermittelt werden. Allerdings betrug die Peakhöhe des Allels 28.2 nur 16,6% der Peakhöhe des Allels 20. Diese *Peak-Imbalance* konnte durch einen zusätzlichen Elongationsschritt und eine finale Elongation bei der PCR etwas reduziert werden auf 34,5% (c). Die schwarzen Pfeile zeigen *stutter-peaks* an.

Bei 11 der 141 Proben kam es zu einem bzw. mehreren allelischen *drop-outs*, d.h. das bzw. die größeren Allele konnten nicht detektiert werden. Dieses Phänomen wurde besonders bei Zigarettenresten beobachtet. Bei drei Proben, einem Zigarettenrest und zwei Abrieben, lieferten beide Typisierungs-Methoden unterschiedliche Ergebnisse. Bei zwei Proben, bei denen mit dem Quantifiler® Human DNA Quantification Kit eine sehr hohe Konzentration ermittelt wurde und bei denen das ACTBP2-Assay negativ verlief, handelte es sich um ein Papiertaschentuch (281,18 ng DNA/μl) und eine Blutspur (15,92 ng DNA/μl). Ansonsten konnte menschliche Zellkern-DNA sowohl bei einer als auch bei beiden Genotypisierungsvarianten nicht nachgewiesen werden. Dies trat besonders häufig bei Abrieben und Handschuhen auf. Erwartungsgemäß lieferten die zwei verschimmelten Blutspuren (Probe 44 und 45) bei keiner Genotypisierungsmethode ein positives Ergebnis.

7.4 DISKUSSION

Im Rahmen dieses Projektes sollte ein *real-time* PCR-Assay entwickelt werden, das eine Human-DNA-Quantifizierung unter Verwendung des ACTBP2-Systems und - direkt im Anschluss aus demselben Ansatz - eine ACTBP2-Genotypisierung ermöglicht.

Normalerweise wird ein *real-time* PCR-Assay so entwickelt, dass ein nur 50 bis 150 bp kurzes Produkt amplifiziert wird, denn je kleiner das zu amplifizierende DNA-Molekül ist, desto höher ist seine Amplifizierungseffizienz. Außerdem ist es so möglich, selbst stark degradierte DNA in forensischen oder archäologischen Proben zu untersuchen. Da aber sowohl eine Quantifizierung als auch eine Genotypisierung aus demselben Ansatz erreicht werden sollte, musste als Zielregion die ACTBP2-Region, die eine Länge von mindestens 203 bp (Allel 4.2) aufweist, für das *real-time* PCR-Assay gewählt werden. Daher wurde zu Beginn geprüft, ob trotz der großen Amplikonlänge nicht doch eine optimale Amplifizierbarkeit der Zielregion erreicht werden konnte.

Die Standardgeraden wiesen alle im Mittel eine Steigung von -3,28 auf und einen Korrelationskoeffizienten von mehr als 0,99 auf. Die Amplifizierungseffizienzen betragen im Durchschnitt 2,02 (maximale Effizienz ist gleich 2 \cong Verdopplung). Diese Werte weisen auf eine hervorragende Amplifizierungseffizienz hin.

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit des ACTBP2-Assays wurde eine Probe mehrmals in einem Analysevorgang (*intra-assay*) untersucht. Dabei sollten bei den Bestimmungen der Konzentration kaum Schwankungen vorkommen, da die Konzentration mit derselben Standardreihe bestimmt wurde. Der CV für die C_T -Werte beträgt 0,59%, der CV für die daraus abgeleitete Konzentration war dagegen höher (16,34%). Andere Publikationen wie z.B. die von Gahan et al. (2001) wiesen einen CV für die Konzentration von 11,3% auf, Lui et al. (2002) ebenfalls einen von bis zu 17%.

Der Vergleich der durch den Quantifiler® Human DNA Quantification Kit und der durch das ACTBP2-Assay ermittelten Konzentration zeigte eine enorme Abweichung voneinander. Dabei lieferte meistens der Quantifiler® Human DNA Quantification Kit eine höhere Konzentration. Eine mögliche Erklärung für diesen Konzentrationsunterschied ist, dass die amplifizierte Region des Quantifiler® Human DNA Quantification Kit nur 62 bp lang ist, die des ACTBP2-Assays dagegen mindestens 202 bp (Allel 4.2). Das Allel 19 (260 bp) im System ACTBP2, das z.B. auch der Standard des Quantifilers aufweist, wird laut der Steigungen und Korrelationsfaktoren der Standardverdünnungsreihen optimal amplifiziert. Jedoch können wesentlich längere Allele schlechter amplifiziert werden, so dass die Sensitivität des ACTBP2-

Assays geringer wird. Dies würde auch erklären, warum bei einigen Proben die sehr langen Allele ausfielen (allelische *drop-outs*).

Die Genotypisierung der PCR-Produkte des ACTBP2-Assays war generell möglich, nur kam es zum Auftreten von *stutter-peaks* und sogar von *Allel-Imbalance* und allelischen *drop-outs*. *Stutter-peaks* sind kleine Peaks, meistens genau eine Wiederholungseinheit kürzer als das Allel. Sie entstehen während der Amplifizierung der Allele durch die DNA-Polymerase (Butler 2005) und können gerade bei der Untersuchung von Mischspuren sehr problematisch sein. Eine mögliche Ursache für das Auftreten von *Allel-Imbalance* und allelischen *drop-outs* ist, dass längere Allele schlechter amplifiziert werden als kürzere. So kommt es bei einigen Proben zur Ausbildung unterschiedlicher Peakhöhen (*Allel-Imbalance*) und bei anderen sogar zum totalen Ausfall des längeren Allels (allelischer *drop-out*).

Bei drei Proben lieferten beide Typisierungsmethoden unterschiedliche Ergebnisse, was bei einem Einsatz in der Routinearbeit schwerwiegende Folgen hätte. Ein solcher Unterschied könnte durch rein stochastische Effekte, die bei Proben mit einer sehr geringen DNA-Konzentration ($< 0,05$ ng/ μ l) auftreten können, begründet sein. Bei diesen drei Proben konnte mittels des ACTBP2-Assays eine Konzentration von 0,324 ng/ μ l (Probe 64) bzw. gar keine Zellkern-DNA detektiert werden (Proben 76 und 84). Bei zwei Proben (Papiertaschentuch: 281,18 ng/ μ l; Blutspur: 15,92 ng/ μ l; Konzentration laut Quantifiler® Human DNA Quantification Kit) lag eine sehr hohe DNA-Konzentration vor. Diese könnte ursächlich dafür sein, dass mittels des ACTBP2-Assays und der anschließenden Genotypisierung keine Zellkern-DNA detektiert werden konnte. Auch zu große DNA-Mengen können inhibierend auf die PCR wirken. Negative Ergebnisse bei der Konzentrationsbestimmung und der Genotypisierung in beiden Methoden lassen sich auch durch die Spurenart erklären. Häufig ist an Abrieben bzw. an Spuren wie Handschuhen DNA in nicht ausreichender Qualität und Quantität vorhanden, so dass eine Amplifikation der Zielregion nicht möglich ist.

Das aufgetretene Problem der geringeren Sensitivität des ACTBP2-Assays, die sich in negativer Quantifizierung, *Allel-Imbalance* und allelischen *drop-outs* zeigt, lässt sich eventuell durch die Optimierung der Amplifikationsparameter verbessern. Eine

Optimierung der Amplifikationsparameter hätte sehr wahrscheinlich auch zur Folge, dass das Auftreten von *Allel-Imbalance* und allelischen *drop-outs* minimiert wird. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, erbrachte das Einbringen eines zusätzlichen Elongationsschrittes und die finale Elongation in die PCR einen Teilerfolg. Eine vollständige Behebung lässt sich wahrscheinlich nur durch die Reduktion der Länge der zu amplifizierenden Region realisieren, was aber zur Folge hat, dass die Genotypisierung nicht mehr ohne weiteres möglich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zum jetzigen Zeitpunkt eine direkte Genotypisierung der *real-time* PCR-Produkte möglich ist, aber dass das ACTBP2-Assay den Quantifiler® Human DNA Quantification Kit und die ACTBP2-Monoplex noch nicht ersetzen kann.

8. ETABLIERUNG EINES *REAL-TIME* PCR-ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG VON MTDNA

8.1 EINLEITUNG

Bei 'schwierigen Spuren' (z.B. telogenen Haare oder Zähnen) wird als *ultima ratio* häufig die mtDNA untersucht. In Rahmen dieser Arbeit soll ein *real-time* PCR-Assay entwickelt werden, das neben der Quantifizierung von mtDNA auch eine Typisierung mittels Sequenzierung der PCR-Produkte ermöglicht. Außerdem soll dieses entwickelte mtDNA-Assay zur Quantifizierung von mtDNA aus Zahndentin verwendet werden.

Zähne (Abb. 8.1) bestehen aus einem Dentinkern, der im Kronenbereich von Zahnschmelz und im Wurzelbereich von Wurzelzement umgeben ist. Das Dentin umschließt wiederum den inneren Teil des Zahns, die Pulpa (auch Zahnmark genannt), die von Blutgefäßen und Nervenfasern durchzogen wird. Es wird von den Odontoblasten, die an der Grenze zwischen Dentin und Pulpa sitzen, gebildet. Die Zellfortsätze der Odontoblasten, die Tomes'schen Fasern, ragen in die bei der Dentinbildung entstehenden Kanälchen hinein.

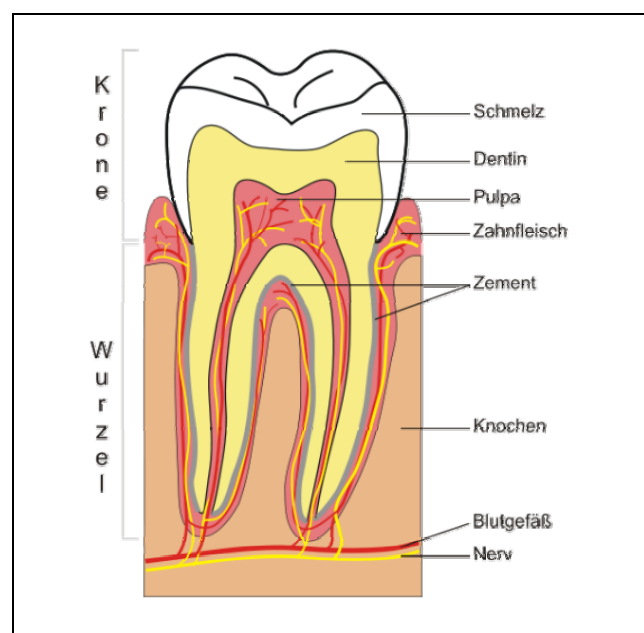


Abb. 8.1: Der Aufbau eines Zahns
schematische Darstellung nach <http://de.wikipedia.org>

Nach dem Abschluss der Zahnbildung wird von den Odontoblasten das sogenannte Sekundär-Dentin produziert, das sich an den Wänden der Dentinkanälchen ablagert. Die Odontoblastenfortsätze enthalten zahlreiche Mitochondrien (Smith et al. 1993), die durch die umgebenden Zahnhartsubstanzen (Zahnschmelz und Wurzelzement) vor extremen Umwelteinflüssen geschützt werden. Durch diesen Schutz bleibt die mtDNA auch dann noch gut erhalten, wenn andere Gewebe des menschlichen Körpers aufgrund ihrer hochgradigen Zersetzung für eine DNA-Analyse nicht mehr geeignet sind. Mörnstad et al. (1999) fanden heraus, dass die Konzentration mitochondrialer DNA im Dentin mit steigendem Lebensalter eines Menschen abnimmt. Sie nahmen an, dass dies aufgrund der zunehmenden Verschließung der Dentinkanälchen durch das Sekundär-Dentin und der daraus resultierenden Zerstörung der Odontoblasten inklusive der enthaltenen mtDNA der Fall ist.

Die Quantifizierung der amplifizierten mtDNA erfolgte bei Mörnstad et al. (1999) mittels semi-quantitativer PCR mit anschließender Endpunktbestimmung. Dies ist theoretisch möglich, allerdings führen durch die exponentielle Amplifizierung bereits kleine Unterschiede in der Amplifizierungseffizienz zwischen Proben mit gleicher Ausgangsmenge zu starken Unterschieden in der Produktmenge. Daher stellt diese Methode im Vergleich zur *real-time* PCR kein adäquates Mittel zur DNA-Quantifizierung dar.

In dieser Arbeit soll ein mtDNA-Assay für die Quantifizierung von mtDNA etabliert werden und schließlich zum Einen für die Sequenzierung der Proben und zum Anderen zur Überprüfung der Ergebnisse von Mörnstad et al. (1999) verwendet werden.

8.2 MTDNA-ASSAY-DESIGN

Dem mtDNA-Assay (Abb. 8.2) liegt die mtDNA-Sequenz, die der GenBank des *National Center for Biotechnology* (AC_000021) entnommen wurde, zugrunde. Als Zielbereich wurde die Sequenz der Kontroll-Region der mtDNA gewählt, die einen Teil der HV1-Region umfasst. Dieser Bereich, der viele Polymorphismen aufweist,

8. ETABLIERUNG EINES *REAL-TIME* PCR-ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG VON MTDNA 100

wurde bewusst gewählt, um eine spätere Individualisierung der Proben durch Sequenzierung der *real-time* PCR-Produkte zu erreichen. Die Primer und die TaqMan-Sonde wurden mit Hilfe der Primer 3 Software Version 4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu>) entworfen. Beim Primer-Design wurden folgende Parameter beachtet:

- die Primer sollten eine Länge von etwa 20 Nucleotiden aufweisen,
- die Schmelztemperatur (T_m) von jedem Oligonucleotid sollte annähernd gleich sein,
- es muss vermieden werden, dass die Primer untereinander komplementär sind, besonders nicht am 3'-Ende, da sich sonst Primer-Dimere bilden können, und somit die Effizienz der Reaktion verringert wird.

```
5' - CTCACCCACTAGGATACCAACAAA CCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAGC  
CATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCCATGGATGACCCCCCTC  
AGATAGGGGTCCCTTGACC ACCATCCTCCGTGAAAT CAATATCCCGCACAAGAGTGC - 3'
```

Abb. 8.2: Zielsequenz des mtDNA-Assays

Hier ist der Bereich der Kontroll-Region der mtDNA (16262 - 16439) dargestellt, der im mtDNA-Assay amplifiziert wird. Die Regionen, an die die mtDNA-Primer (mtP1-16262 und mtP2-16439) und die mtDNA-LNA-Sonde binden, sind farblich hervorgehoben.

Beim TaqMan-Sonden-Design wurde - wie von Applied Biosystems empfohlen - darauf geachtet, dass die Schmelztemperatur (T_m) der Sonde höher als die der Primer ist und dass keine Komplementarität zu den Primern besteht. Ebenfalls durfte der GC-Gehalt am 3'-Ende nicht zu hoch sein und sich kein G am 5'-Ende - aufgrund eines möglichen auto-quenching des Reporters befinden. Zur Steigerung der Spezifität des mtDNA-Assays wurde außerdem die TaqMan-Sonde an einigen Stellen mit LNA-Basen (Locked Nucleic Acids: siehe Abs. 3.1.13.2) modifiziert. Diese verändern die Konformation der Doppelhelix und stabilisieren komplementäre Basenpaarungen, was in einer Erhöhung des T_m -Wertes resultiert (Petersen und Wengel 2003). Durch diese Erhöhung des T_m -Wertes wird eine Steigerung der Spezifität des Assays erreicht.

8.3 KONSTRUKTION EINES MTDNA-PLASMID-STANDARDS

Als Standard für die *real-time* PCR kann genomische oder Plasmid-DNA verwendet werden. Der Nachteil der genomischen DNA liegt u.a. in der schwierigen Handhabung von kleinsten Konzentrationen hochmolekularer DNA begründet. Dieses Problem tritt bei der Verwendung von Plasmid-DNA nicht auf. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Standard kloniert, d.h. Plasmid-DNA für die Quantifizierung verwendet.

Die Primer mtP1-16262 und mtP2-16439 führen zur Amplifikation eines 177 bp großen DNA-Segments. Um die Amplifikation unspezifischer Produkte zu verhindern, wurde eine Optimierung der Reaktionsbedingungen der PCR vorgenommen. Dabei wurden die Annealing-Temperatur, die Taq-DNA-Polymerase-Konzentration, die Primer-Konzentration und / oder die Template-Menge variiert.

Die Zelllinien-DNA K562 wurde amplifiziert (Abs. 3.2.5) und das resultierende PCR-Produkt wurde adenyliert (Abs. 3.2.7.1), aufgereinigt (Abs. 3.2.7.2) und wie unter Abs. 3.2.7.3 beschrieben in den pGEM[®]-T Easy Vector kloniert. Es wurden insgesamt 20 mtDNA-Klone mit der erwarteten Zielsequenz in einer Übernachtskultur angezogen und die Plasmid-DNA (Abb. 8.3) isoliert (Abs. 3.2.7.5).

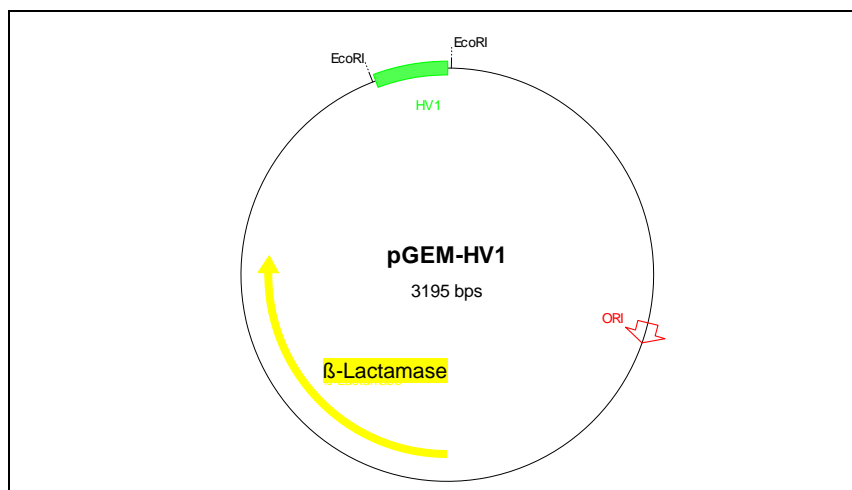


Abb. 8.3: Schematische Darstellung des Plasmids pGEM-HV1 (K16)
Das Plasmid pGEM-HV1 beinhaltet die mtDNA-Teilsequenz 16262 bis 16439 (177 bp).

Mit *EcoRI* (3.2.7.6) konnte aus den Plasmiden K16 - K20 jeweils ein Fragment der erwarteten Größe (177 bp) herausgeschnitten werden (Abb. 8.4), bei den restlichen Klonen war kein Insert erkennbar. Ungeschnittene Plasmid-DNA lässt sich im

8. ETABLIERUNG EINES *REAL-TIME* PCR-ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG VON MTDNA 102

verwendeten PAA-Gel im Gegensatz zum Agarosegel nicht gut darstellen, deshalb ist sie hier nur als Schmier sichtbar.

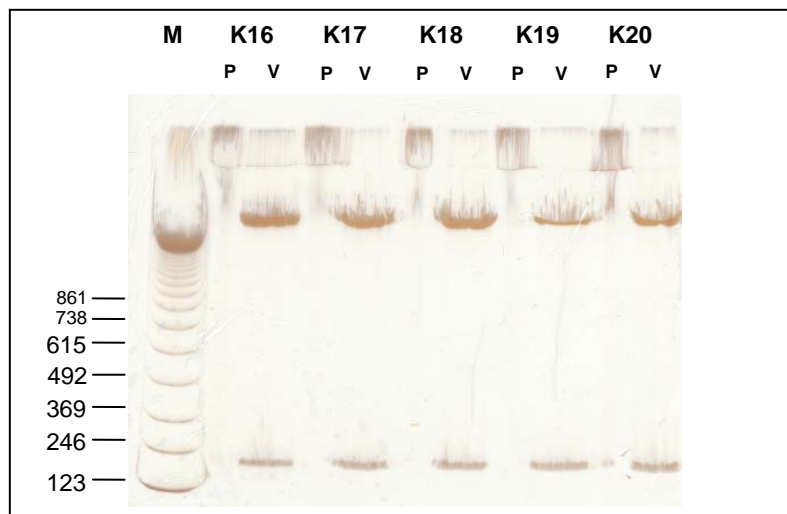


Abb. 8.4: Restriktionsverdau der mtDNA-Plasmide

Die Plasmid-DNA der Klone K16 – K20 wurde mit *EcoRI* verdaut und auf ein 8%iges PAA-Gel aufgetragen. M: 123 bp Längenmarker, P: ungeschnittene Plasmid-DNA, V: geschnittene Plasmid-DNA

Anschließend wurden die Plasmide K16 bis K20 mit den flankierenden Primern M13 (uni) und M13 (rev), deren Anlagerungsstellen sich auf dem pGEM[®]-T Easy Vector befinden, auf beiden Strängen sequenziert (Abs. 3.2.8). Abb. 8.5 zeigt das Sequenzierergebnis am Beispiel des Klons K16, der später als Standard für das mtDNA-Assay eingesetzt wurde. Die Zelllinien-DNA K562 weist bekanntermaßen drei Polymorphismen (Sequenzunterschiede zur Anderson-Sequenz) an den Positionen 16294, 16296 und 16324 auf. Dies konnte durch die Sequenzierung bestätigt werden.

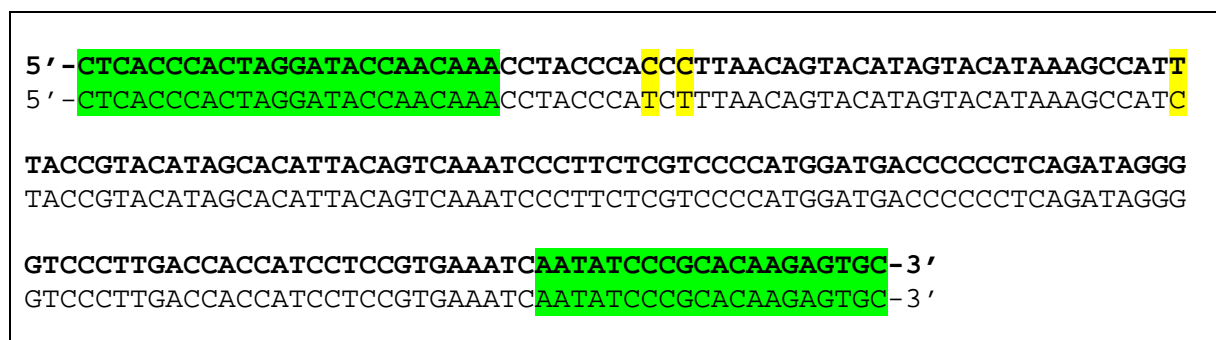


Abb. 8.5: Sequenzvergleich der DYS19-Plasmide KD2 und KD5 mit der Anderson-Sequenz

Die **Anderson-Sequenz der mtDNA** (GenBank-Zugangsnummer AC_000021) und das Sequenzierergebnis des Plasmids K16 sind hier untereinander dargestellt. Die **mtDNA-Primer** (mtP1-16262 und mtP2-16439) und die beobachtete **Polymorphismen** an den Positionen 16294, 16296 und 16324 sind farblich hervorgehoben.

8.4 VALIDIERUNG

Während der Validierungsphase (Ergebnisse siehe Tab. 8.1) wurden zuerst verschiedene Primer- und Sondenkonzentrationen mit dem Standard-Temperaturprogramm der *real-time* PCR ausgetestet.

50 °C	2 min	} 40 Zyklen	50 °C	2 min	} 40 Zyklen
<u>95 °C</u>	<u>10 min</u>		<u>95 °C</u>	<u>10 min</u>	
95 °C	15 sec		95 °C	15 sec	
<u>60 °C</u>	<u>60 sec</u>		60 °C	90 sec	
72 °C	30 min		<u>72 °C</u>	<u>90 sec</u>	
			72 °C	30 min	

Abb. 8.6: Temperaturprogramme für die *real-time* PCR

a) Standard-Temperaturprogramm; b) validiertes Temperaturprogramm

Als Standard für das mtDNA-Assay wurde das klonierte Plasmid pGEM-HV1 in fünf verschiedenen Verdünnungen (10^6 bis 10^2 Kopien/ μ l) eingesetzt. Da die Amplifizierungseffizienz auch beim scheinbar besten Primer-Sonden-Verhältnis von jeweils 900 nM Primer und 50 nM Sonde nur 92,1 % (Tab. 8.1, E [%]) betrug, wurde das Temperaturprogramm dahingegen verändert, dass die Annealingzeit von 60 sec auf 30 sec halbiert wurde, dafür aber ein Elongationsschritt von 30 sec bei 72 °C hinzugefügt wurde. Außerdem wurden noch verschiedene Annealing-Temperaturen ausgetestet, um zu prüfen, ob eine geringere Temperatur eventuell die Amplifizierungseffizienz steigert. Da dies nicht der Fall war, wurde die Annealing-Temperatur bei 60 °C belassen und es wurde daraufhin getestet, ob eventuell die Konfiguration des Plasmid-Standards eine Auswirkung auf die Amplifizierungseffizienz hat. Dafür wurde der Standard unverdaut (zirkuläres Plasmid) bzw. mit SphI (Linearisierung des Plasmids) oder EcoRI (Herausschneiden des Inserts) verdaut (siehe Abs. 3.2.7.6) eingesetzt. Ein weiterer Versuch der Verbesserung der Amplifizierungseffizienz bestand in der Verlängerung der Annealing-Phase von 30 sec auf 90 sec (Abb. 8.6).

Zukünftig wurde das mtDNA-Assay mit 900 nM Primer und 50 nM Sonde, mit linearisiertem Standard und einem validierten Temperaturprogramm (Abb. 8.6),

durchgeführt, da mit dieser Konstellation die beste Amplifizierungseffizienz erreicht wurde.

Tab. 8.1: Ergebnisse in der Validierungsphase des mtDNA-Assays

Während der Validierungsphase wurden zur Steigerung der Amplifizierungseffizienz verschiedene Primer- bzw. Sondenkonzentrationen und andere Parameter ausgetestet (m = Steigung der Ausgleichsgeraden; R² = Korrelationskoeffizient; E = Amplifizierungseffizienz)

zu validierende Konstante	m	R²	E	E [%]
Primerkonzentration P1 [nM] / P2 [nM]				
50 / 50	-5.73	0.96	1.5	74.7
50 / 300	-4.63	0.99	1.6	82.2
50 / 900	-4.58	0.99	1.7	82.7
300 / 50	-5.48	0.96	1.5	76.1
300 / 300	-4.41	0.99	1.7	84.3
300 / 900	-4.88	0.98	1.6	80.1
900 / 50	-4.86	0.93	1.6	80.3
900 / 300	-4.55	0.99	1.7	82.9
900 / 900	-4.34	0.99	1.7	85.0
Sondenkonzentration				
150	-4.24	0.97	1.7	86.1
100	-3.91	0.99	1.8	90.1
50	-3.77	0.99	1.8	92.1
Annealing-Temperatur				
60 °C	-4.49	0.99	1.7	83.5
55 °C	-4.96	0.99	1.6	79.5
50 °C	-4.48	0.99	1.7	83.6
Standard-Konformation				
zirkulär	-4.26	0.99	1.7	85.8
linearisiert	-3.84	0.99	1.8	91.1
Insert herausgetrennt	-3.57	0.99	1.9	95.3
Dauer der Annealing-Phase				
60 sec	-3.42	0.95	2.0	98.0
90 sec	-3.44	0.99	2.0	97.6
120 sec	-3.54	0.99	1.9	95.8

8.5 QUANTIFIZIERUNG VON MTDNA UND DIREKTE SEQUENZIERUNG DER PCR-PRODUKTE

8.5.1 Ergebnisse

Nach erfolgter Validierung wurde die *real-time* PCR mit jeweils 900 nM Primer und 50 nM Taqman-Sonde wie unter Absatz 3.2.3.2.1 beschrieben durchgeführt. Zur Detektion von möglichen Inhibitoren wurde eine interne PCR-Kontrolle (IPC) parallel zum mtDNA-Assay mit untersucht. Die vom Hersteller angegebene Menge an IPC wurde um $\frac{1}{4}$ reduziert. Die NTC (*no template control*) und die Pufferkontrolle zeigten wie erwartet kein Signal, so dass eine Kontamination des Mastermixes bzw. des T₁₀E_{0,1}-Puffers ausgeschlossen werden konnte. Der Korrelationskoeffizient der Kalibrationsgeraden lag bei 0,99 und die Steigung betrug -3,49 (Abb. 8.7 a). Aus der Steigung konnte die Amplifizierungseffizienz der PCR-Reaktionen mit $E = 10^{-1/\text{Steigung}}$ ermittelt werden. Die Effizienz betrug 1,9 ($\cong 96,7\%$), was bedeutet, dass die *real-time* PCR annähernd optimal verlief. Der C_T-Wert der IPC lag bei den Verdünnungen der Standardreihe (Abb. 8.7 b) zwischen 23 und 27, d.h. störende Inhibitoren waren nicht vorhanden.

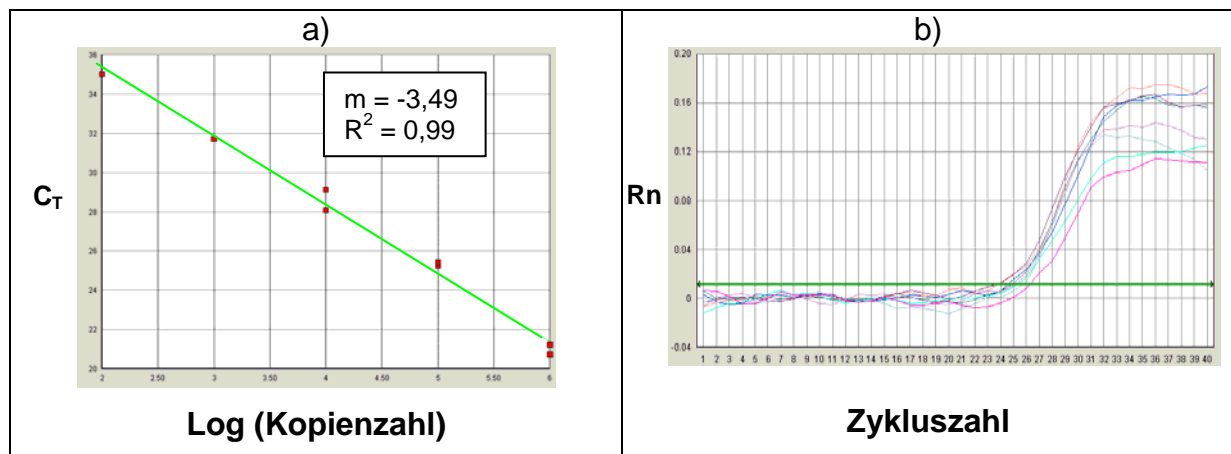


Abb. 8.7: Kalibrationsgerade des mtDNA-Assays und Amplifikationsplot der IPC

- a) Die durch die *real-time* PCR bestimmten C_T-Werte der Standardverdünnungen wurden gegen den Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen. m: Steigung; R²Korrelationskoeffizient
 b) Die relative Fluoreszenzintensität (Rn) der IPC-Werte wurde gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die C_T-Werte liegen zwischen 23 und 27.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit im *intra-assay* wurde die Zelllinien-DNA 007 zweimal auf derselben Mikrotiterplatte amplifiziert. Der CV für die C_T-Werte betrug 5,3 %, der CV für die Kopienzahl war dagegen wesentlich höher (87 %).

Außer den bereits erwähnten Proben wurden noch 35 DNA-Extrakte (27 Speichelproben und jeweils 2 Haare von 4 unterschiedlichen Spendern) in Doppelbestimmungen untersucht. Die Ergebnisse der Quantifizierung und die der IPC befinden sich in der Tab. 8.2. Es konnten 36 bis $16,4 \times 10^5$ Kopien mtDNA/ μ l detektiert werden. Nur bei einer Probe verlief die Quantifizierung negativ. Die C_T -Werte der IPC lag bei den meisten Proben zwischen 25 und 29. Diese C_T -Werte entsprechen denen der Standardverdünnungsreihe, d.h. hier war kein Inhibitor vorhanden. Bei den vier Proben 14, 19, 21 und 24 lag der C_T -Wert der IPC bei mehr als 30, demzufolge ist bei diesen Proben eine Inhibition nicht auszuschließen.

Tab. 8.2: Ergebnisse des mtDNA-Assays

Es wurden 27 DNA-Extrakte aus Speichelproben und 8 DNA-Extrakte aus Haaren in Doppelbestimmungen mit dem mtDNA-Assay untersucht. STAB: Standardabweichung; neg.: negatives Quantifizierungsergebnis; graue Markierung: Proben mit hohem C_T -Wert bei der IPC

Probe	Mittelwert Konzentration [Kopien/ μ l]	STAB Konzentration [Kopien/ μ l]	Mittelwert C_T -Wert der IPC	STAB IPC
1	7763	1986	27,19	0,25
2	neg.	neg.	28,18	0,21
3	1617	763	26,49	0,20
4	45868	18807	25,76	1,10
5	6375	2776	25,76	0,25
6	497213	74652	26,49	0,78
7	4782	2093	26,44	0,16
8	13930	2693	27,75	0,37
9	460	134	28,06	0,54
10	116	110	26,53	1,00
11	39162	15786	25,68	0,13
12	4915	1066	26,76	0,04
13	3301	2443	27,66	0,15
14	707738	10220	31,81	1,45
15	4110	1834	27,05	0,04
16	416	11	28,86	0,74
17	3065	261	27,20	0,20
18	75733	6279	26,76	0,29
19	305	417	37,99	0,49
20	71858	2596	26,04	0,68
21	1642500	130815	30,62	0,82
22	254911	4157	26,88	0,69
23	47049	510	27,03	0,49
24	36	29	32,70	0,18
25	455	113	28,60	0,40
26	194	23	26,72	0,59

8. ETABLIERUNG EINES *REAL-TIME* PCR-ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG VON MTDNA 107

Probe	Mittelwert Konzentration [Kopien/ μ l]	STAB Konzentration	Mittelwert CT-Wert der IPC	STAB IPC
27	39154	13560	24,66	1,04
Haar 1.1	716	76	25,94	1,17
Haar 1.2	780	642	26,59	0,02
Haar 2.1	16262	6585	26,62	0,73
Haar 2.2	1241	119	26,67	0,04
Haar 3.1	532	279	27,22	1,07
Haar 3.2	447	286	22,53	3,66
Haar 4.1	180	210	26,25	0,56
Haar 4.2	341	156	25,22	1,20

Direkt im Anschluss an die Quantifizierung der mtDNA wurden die PCR-Produkte des mtDNA-Assays sequenziert. Dazu wurden die PCR-Produkte einer Probe (jeweils Doppelbestimmungen) vereinigt und dann in einen Exo/SAP-Restriktionsverdau (Abs. 3.2.7.6) eingesetzt, um eventuell überschüssigen Primer und TaqMan-Sonden zu entfernen. Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung (Abs. 3.2.6.2) der PCR-Produkte, die danach mit den Primern mtP1-16262 und mtP2-16439 auf beiden Strängen sequenziert (Abs. 3.2.8) wurden. Bei 15 Proben (14 x Speichel, 1 x Haar) verlief die direkte Sequenzierung erfolgreich (Tab. 8.3). Bei den restlichen Proben ließ sich keine erfolgreiche Sequenzierung durchführen. Ein Vergleich der Ergebnisse dieser direkten Sequenzierung mit den Ergebnissen der Sequenzierung, die während der Routinearbeit im Institut für Rechtsmedizin durchgeführt wurde, erbrachte eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse für den mtDNA-Abschnitt 16262 bis 16410. Es gab keinen signifikanten Unterschied (z.B. in der Peakhöhe) zwischen den Ergebnissen nach 40 PCR-Zyklen und der konventionellen Sequenzierung mit 30 PCR-Zyklen (nicht gezeigt).

Tab. 8.3: Ergebnisse der Sequenzierung

Bei 15 Proben verlief die Sequenzierung, die auf beiden Strängen mit den Primern mtP1-16262 und mtP2-16439 durchgeführt wurde, erfolgreich. Abweichungen zur Anderson-Sequenz sind mit der jeweiligen Basenposition und Base dargestellt. R: A/G-Heteroplasmie

Probe	Mittelwert Konzentration [Kopien / µl]	Mittelwert C _T -Wert der IPC	Mitotyp	sequenzierte Region
3	1617	26,49	16304C, 16398A, 16412R	16262-16439
4	45868	25,76	16304C, 16311C, 16412R	16262-16439
6	496907	26,49	16286T, 16399G, 16412R	16262-16439
10	116	26,53	16412R	16262-16439
12	4915	26,76	16298C, 16360T, 16412R	16262-16439
15	4110	27,05	16311C, 16412R	16262-16439
16	416	28,86	16320T, 16355T, 16412R	16262-16439
17	3065	27,20	16362C, 16412R	16315-16439
18	75733	26,76	16298C, 16412R	16262-16439
20	71858	26,04	Anderson	16262-16439
21	1642500	30,62	16291T, 16293G, 16412R	16262-16439
22	254911	26,88	16356C, 16412R	16262-16439
24	36	32,70	16298C	16262-16439
25	455	28,60	Anderson	16330-16402
Haar 2.1	16262	26,62	Anderson	16331-16384

Der Bereich 16411 bis 16439 wurde erstmals in dieser Arbeit sequenziert. Hier fiel auf, dass bei 11 der 15 Proben an der Position 16412 eine A/G-Heteroplasmie vorlag (Abb. 8.8).

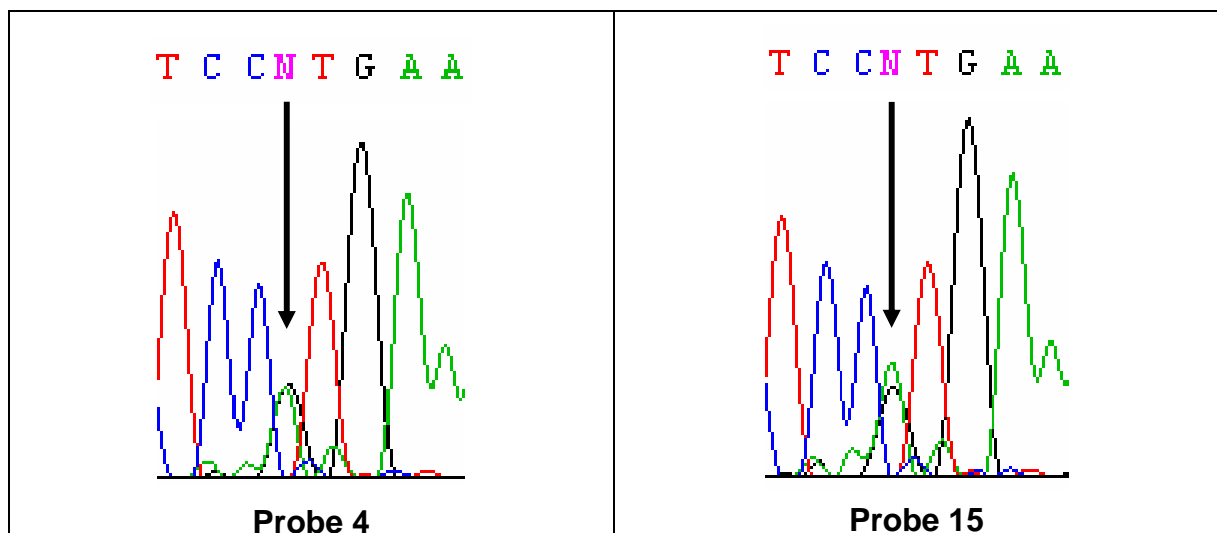


Abb. 8.8: Heteroplasmie an Position 16412 der mtDNA

An Position 16412 lag bei 11 der 15 Proben eine A/G-Heteroplasmie vor (Anderson: 16412G).

8.5.2 Diskussion

Die bisher genutzten Techniken zur DNA-Quantifizierung sind entweder nicht human-spezifisch (z.B. UV-Spektrum) oder nur auf humane Zellkern-DNA beschränkt (z.B. Quantifiler® Human DNA Quantification Kit). Bei 'schwierigen Spuren' (z.B. telogene Haare oder Zähne) wird als *ultima ratio* häufig die mtDNA untersucht. Hier sollte nun ein innovatives *real-time* PCR-Assay entwickelt werden, das eine exakte mtDNA-Quantifizierung mit niedriger unterer Nachweisgrenze ermöglicht. Es sollte ferner geprüft werden, ob sich die erhaltenen PCR-Produkte für eine direkte Sequenzierung eignen.

Als Standard für die *real-time* PCR wählen viele Autoren genomische DNA (z.B. Ruiz-Ponte et al. 2000; Lambert et al. 2002; Lui et al. 2002; Adams et al. 2003). Von Vorteil ist dabei, dass keine Zusatzarbeit durch Klonierung geleistet werden muss. Der Nachteil liegt u.a. aber in der schwierigen Handhabung von kleinsten Konzentrationen hochmolekularer, genomischer bzw. mitochondrialer DNA begründet. In dieser Arbeit wurde daher ein Standard für das mtDNA-Assay kloniert.

Es konnte ein *real-time* PCR-Assay mit einer ca. 96,7 % igen Amplifizierungseffizienz etabliert werden. Alonso et al. (2004) publizierten ein mtDNA-Assay mit einer Steigung von durchschnittlich -3,7476 und eines mit einer Steigung von durchschnittlich -4,003, was einer Effizienz von 92,4 % bzw. 88,9 % entspricht. Timken et al. (2005) haben zur Quantifizierung von mtDNA ein Duplex-*real-time* PCR-Assay mit einer Effizienz von 91,7 % und ein Monoplex-*real-time* PCR-Assay mit einer Effizienz von 87,7 % entwickelt.

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit des mtDNA-Assays wurde eine Probe mehrmals in einem Analysevorgang (*intra-assay*) untersucht. Dabei sollten bei den Bestimmungen der Kopienzahl kaum Schwankungen vorkommen, da die Kopienzahlen mit derselben Standardreihe bestimmt wurden. Der CV für die C_T -Werte beträgt 5,3 %.

Es konnten 36 bis 1.642.500 Kopien detektiert werden. Der Messbereich lag zwischen 100 und 10^6 Kopien. Timken et al. (2005) konnten Konzentrationen ab 10 bis 15 Kopien mtDNA/ μ l nachweisen. Bei der Probe 2 verlief die Quantifizierung negativ. Das kann zum einen an einer zu niedrigen mtDNA-Konzentration, zum

8. ETABLIERUNG EINES *REAL-TIME* PCR-ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG VON MTDNA 110

anderen an einer schlechten mtDNA-Qualität liegen. Ein Inhibitor, der sich negativ auf die PCR auswirken könnte, kann aufgrund der guten simultanen Amplifikation der IPC ausgeschlossen werden. Inhibitoren lagen augenscheinlich nur in den vier Proben 14, 19, 21 und 24 vor. Diese können zum einen die PCR störende Substanzen aber auch zu hohe mtDNA-Konzentrationen sein. Bei den Proben 14 und 21 scheint eine zu hohe mtDNA-Konzentration inhibierend auf die Amplifikation der IPC gewirkt zu haben.

Bei 20 der 35 Proben verlief die direkte Sequenzierung der *real-time* PCR-Produkte erfolglos. Ein Zusammenhang zwischen der mtDNA-Kopienzahl und einer nicht erfolgreichen Sequenzierung bestand scheinbar nicht, denn sowohl Proben mit einer geringen (z.B. Haar 4.1: 180 Kopien/ μ l) als auch mit einer hohen mtDNA-Konzentration (z.B. Probe 23: 47049 Kopien/ μ l) konnten nicht sequenziert werden. Bei den Proben 14 und 19 können die vorhandenen Inhibitoren ursächlich für die negativen Sequenzierergebnisse sein.

Bei den restlichen 15 Proben waren die durch die direkte Sequenzierung der *real-time* PCR-Produkte erhaltenen Sequenzen im mtDNA-Abschnitt 16262 bis 16410 identisch zu denen, die mittels der konventionellen Sequenzierung im Bereich von 16262 bis 16410 erhalten wurden. Der Bereich 16411 bis 16439 wurde erstmals in dieser Arbeit untersucht. Auffällig war, dass bei 11 der 15 sequenzierten Proben an der Position 16412 eine Heteroplasmie von A und G bestand. Brandstätter et al. (2003) berichten, dass sich an den Positionen 16093, 16153, 16293 und 16337 sogenannte heteroplasmatische Hotspots befinden, da an diesen Stellen schon bei sehr vielen Personen eine Heteroplasmie beobachtet wurde. Ob die Position 16412 auch zu diesen heteroplasmatischen Hotspots gehört, muss noch durch Sequenzierungen weiterer Proben mit alternativen Primern geklärt werden.

8.6 QUANTIFIZIERUNG VON MTDNA AUS ZAHNDENTIN FÜR DIE ALTERSBESTIMMUNG

8.6.1 Ergebnisse

Die *real-time* PCR zur Quantifizierung von mtDNA aus Zahndentin erfolgte wie unter Absatz 3.2.3.2.1 beschrieben. Zur Detektion von möglichen Inhibitoren wurde ebenfalls eine interne PCR-Kontrolle (IPC) parallel zum mtDNA-Assay mit untersucht. Eine Kontamination des Mastermixes bzw. des $T_{10}E_{0,1}$ -Puffers konnte ausgeschlossen werden, da weder die NTC (*no template control*) noch die Pufferkontrolle in einem der Experimente ein Signal zeigten. Der Korrelationskoeffizient der Kalibrationsgeraden war immer größer als 0,99 und die Steigung betrug durchschnittlich -3,91 (Abb. 8.9 a). Die durchschnittliche Effizienz betrug 1,8 ($\cong 90,1\%$), was bedeutet, dass die *real-time* PCR annähernd optimal verlief. Der C_T -Wert der IPC lag bei den Verdünnungen der Standardreihe (Abb. 8.9 b) zwischen 24 und 29, d.h. störende Inhibitoren waren auszuschließen.

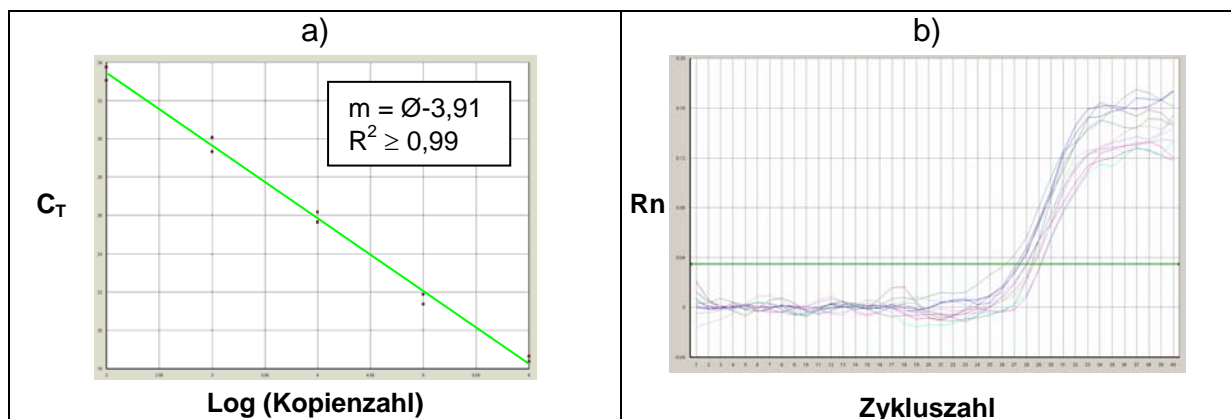


Abb. 8.9: Kalibrationsgerade des mtDNA-Assays und Amplifikationsplot der IPC

- a) Die durch die *real-time* PCR bestimmten C_T -Werte der Standardverdünnungen wurden gegen den Logarithmus der Kopienzahl aufgetragen. In der Abbildung sind die Steigung (m) und der Korrelationskoeffizient (R^2) dargestellt.
- b) Die relative Fluoreszenzintensität (R_n) der IPC-Werte wurde gegen die Zykluszahl aufgetragen. Die C_T -Werte liegen zwischen 23 und 29.

Der CV für die C_T -Werte betrug im *intra-assay* 0,76 % und im *inter-assay* 0,03 %. Die CV für die Kopienzahl waren aufgrund der logarithmischen Auftragung dagegen höher (11,6 % im *intra-assay* und 9,19 % im *inter-assay*).

8. ETABLIERUNG EINES *REAL-TIME* PCR-ASSAYS ZUR QUANTIFIZIERUNG VON mTDNA 112

Neben der Standardverdünnungsreihe und der Zelllinien-DNA 007 wurde die mtDNA aus dem Dentin von 50 Zähnen quantifiziert. Dazu wurde die mtDNA wie unter Abs. 3.2.1.4 beschrieben aus dem Zahndentin extrahiert. Es wurden Vierfachbestimmungen durchgeführt. Die Kopienzahl wurde pro Gramm Dentin angegeben, um die Werte zu normieren. Die Ergebnisse der Quantifizierung sind in der Tab. 8.4 aufgeführt. Bei allen Proben lag der C_T -Wert der IPC zwischen 24 und 29, d.h. störende Inhibitoren waren nicht vorhanden.

Tab. 8.4: Ergebnisse des mtDNA-Assays zur Quantifizierung von mtDNA aus Zahndentin

Es wurden 50 mtDNA-Extrakte aus dem Zahndentin in Vierfachbestimmungen mit dem mtDNA-Assay untersucht. SZ: Schneidezahn; EZ: Eckzahn; PM: Prämolare

Zahn	Zahn- typ	Alter	Mittelwert der Quantität [Kopien/g]	Zahn	Zahn- typ	Alter	Mittelwert der Quantität [Kopien/g]
1	SZ	50	11895	26	SZ	70	2193271
2	SZ	65	14887	27	SZ	70	685459
3	SZ	50	7170	28	SZ	59	1776370
4	SZ	49	74304	29	SZ	59	1866250
5	SZ	56	7781	30	SZ	73	23240
6	SZ	54	120278	31	SZ	73	242373
7	PM	13	52775	32	SZ	73	1090373
8	PM	73	159115	33	SZ	53	120746
9	SZ	52	260294	34	SZ	53	700342
10	SZ	54	141764	35	EZ	52	3256168
11	PM	84	1845389	36	SZ	50	11393143
12	SZ	66	51081	37	SZ	50	6057821
13	SZ	64	21260	38	SZ	55	1728650
14	SZ	69	13628215	39	PM	44	85036
15	PM	54	1060030	40	SZ	42	770193
16	SZ	47	3507144	41	SZ	42	12218561
17	PM	52	1248703	42	SZ	55	3354036
18	SZ	47	2540351	43	SZ	69	1837241
19	SZ	85	425489	44	SZ	69	5500591
20	SZ	84	7125437	45	SZ	69	3118895
21	SZ	84	2091634	46	SZ	69	70050
22	SZ	100	6903187	47	SZ	67	3671469
23	PM	100	7869351	48	SZ	54	25942559
24	PM	100	10897161	49	SZ	54	2093
25	SZ	70	5802117	50	SZ	54	196436

Trägt man das Alter des Zahndonors gegen den Logarithmus der ermittelten Kopienzahlen auf, so erhält man die in Abb. 8.10 dargestellte Grafik.

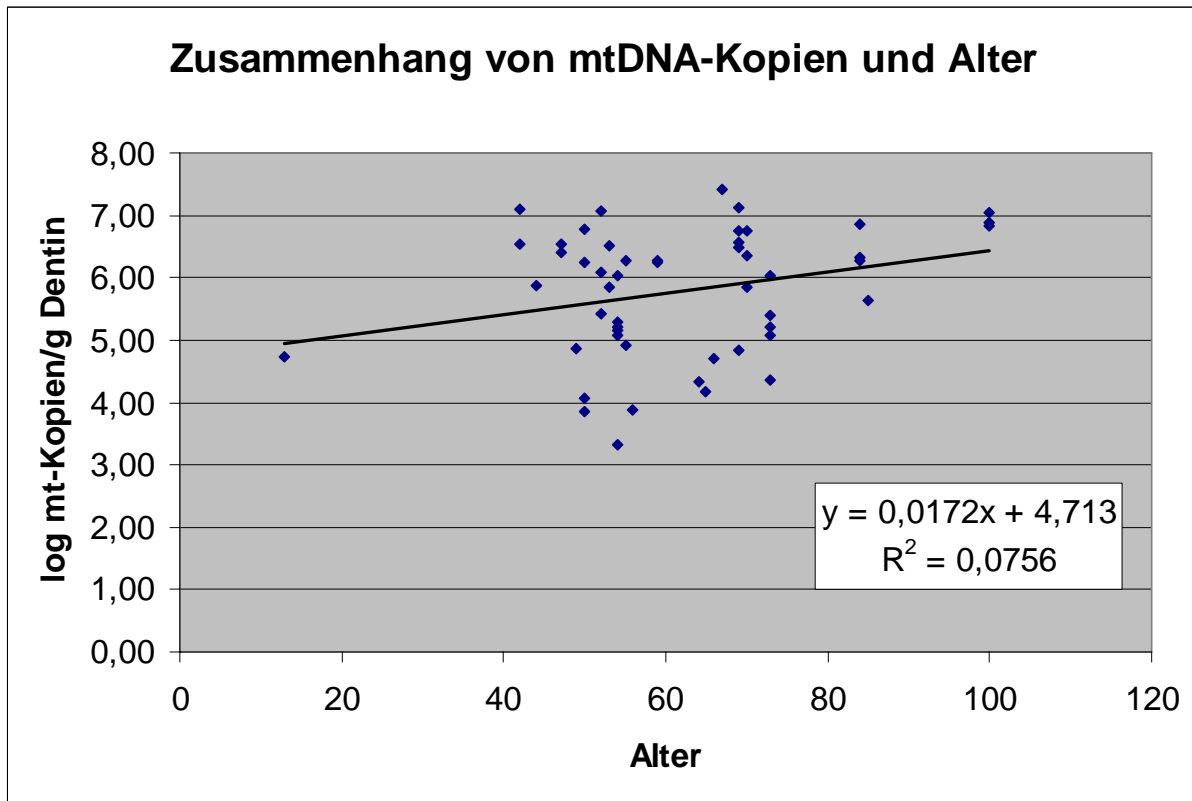


Abb. 8.10: Zusammenhang von mtDNA-Kopien aus dem Zahndentin und Alter

Das Alter des Zahndonors und der Logarithmus der ermittelten mtDNA-Kopienzahl sind hier gegeneinander aufgetragen. m: Steigung der Ausgleichsgeraden; R^2 : Korrelationsfaktor

Die ermittelten Konzentrationen weichen stark voneinander ab. Zieht man eine Ausgleichsgerade durch die gegeneinander aufgetragenen Werte, so weist diese eine Steigung von 0,0172 und einen Korrelationsfaktor von 0,0756 auf, d.h. es liegt keine lineare Korrelation vor.

8.6.2 Diskussion

In diesem Projekt sollte die bewährte Methode der *real-time* PCR für die Quantifizierung der mtDNA aus Zahndentin verwendet werden. Die Ergebnisse von Mörnstad et al. (1999), welche besagen, dass die Konzentration der mitochondrialen DNA im Dentin mit steigendem Lebensalter eines Menschen abnimmt, sollten überprüft werden.

Die durchschnittliche Effizienz des mtDNA-Assays betrug 1,8 (\cong 90,1 %), was bedeutet, dass die *real-time* PCR annähernd optimal verlief. Der C_T -Wert der IPC lag sowohl bei den Verdünnungen der Standardreihe als auch bei den untersuchten mtDNA-Extrakten zwischen 24 und 29, d.h. störende Inhibitoren waren auszuschließen.

Zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit des mtDNA-Assays wurde sowohl eine Probe mehrmals in einem (*intra-assay*) als auch in verschiedenen Analysevorgängen (*inter-assay*) untersucht. Dabei sollten bei den Bestimmungen der Kopienzahl im gleichen *real-time* PCR-Lauf (*intra-assay*) kaum Schwankungen vorkommen, da die Kopienzahlen mit derselben Standardreihe bestimmt wurden. Der CV für die C_T -Werte beträgt 0,74 %, der CV für die Kopienzahl war dagegen wesentlich höher (11,6 %). Gahan et al. (2001) berichten von einem ähnlichen CV von 11,3 % und Timken et al. (2005) von einem CV von 16 %. Der *inter-assay* Variations-Koeffizient CV lag für die C_T -Werten durchschnittlich bei 0,3 % und bei der Kopienzahl bei 9,19 %. Gahan et al. (2001) berichten im *inter-assay* von einem CV für die Kopienzahl von 17,2 %

Insgesamt wurde die mtDNA aus dem Dentin von 50 Zähnen isoliert und quantifiziert. Das Alter des Zahndonors wurde jeweils gegen die ermittelte mtDNA-Kopienzahl aufgetragen. Es konnte kein linearer Zusammenhang zwischen dem Alter des Zahnspenders und der mtDNA-Menge erkannt werden. Im Gegensatz zu Mörnstad et al. (1999) wurde tendenziell eher eine Zunahme als eine Abnahme der mtDNA-Konzentration mit steigendem Lebensalter beobachtet. Eine logische Erklärung hierfür wäre, dass mit steigendem Alter und zunehmender Dentin-Dichte immer mehr Mitochondrien für die Synthese des Sekundär-Dentins gebildet werden und daher eine Zunahme der mtDNA-Konzentration zu beobachten ist.

9. ZUSAMMENFASSUNG

Ein Spezialgebiet der Rechtsmedizin ist die forensische Molekulargenetik, die in der Spurenkunde und der Abstammungsbegutachtung zum Einsatz kommt. Die Aufgaben der forensischen Forschung bestehen u.a. in der Etablierung neuer STR-Systeme und in der Entwicklung neuer Verfahren zur Überprüfung der Quantität und Qualität der zu untersuchenden DNA. Aus diesem Aufgabenbereich haben sich vier Projekte herauskristallisiert, die im Rahmen dieser Promotion bearbeitet wurden:

I. Populationsgenetische Studien des autosomalen STR-Systems D10S2325

Das autosomale STR-System D10S2325 ist - neben den kommerziell erhältlichen Systemen Penta D und Penta E (Promega) - ein Beispiel für die selteneren STR-Systeme mit Pentanukleotid-Wiederholungen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte mittels einer populationsgenetischen Studie gezeigt werden, dass sich dieses System für den Einsatz in der Vaterschaftsanalyse eignet. Es ist ebenfalls ein sehr nützlicher Marker für die Spurenkunde, da es zum einen eine hohe Diskriminationskraft aufweist und zum anderen sich aufgrund seiner geringen Amplikonlänge gut für die Untersuchung von degradierten Spuren eignen sollte. Mittels der Meiosenstudie konnte zum ersten Mal eine paternale Mutationsrate von 1,54% (95% C.I. 0,42 – 5,44) bestimmt werden. Bisher haben erst Becker et al. (2007) Mutationsraten für D10S2325 (maternale Mutationsrate: 0,2%, paternale Mutationsrate: 0%) veröffentlicht. Aufgrund der beobachteten Allelfrequenzen wurde eine Ähnlichkeit der deutschen und der kurdischen Population erkannt. Außerdem konnte das lange Allel 23 zum ersten Mal beobachtet und sequenziert werden.

II. Forensische Anwendung der Sublocus-spezifischen Amplifikation von DYS385

Mit Hilfe der Sublocus-spezifischen Amplifikation war es in diesem Institut erstmalig möglich, die 'wahren' DYS385-Haplotypen zu bestimmen. Es konnten im Vergleich zur konventionellen Amplifikation 7 zusätzliche Haplotypen detektiert werden, wodurch die *gene diversity* (GD) um 2,5% und die *discriminatory capacity* um 12%

gesteigert werden konnten. Außerdem wurde beobachtet, dass in der deutschen Population am häufigsten der Haplotyp DYS385*11-14 mit 21% (DYS385*a-b*14-11 mit 14,3% und DYS385*a-b*11-14 mit 6,7%) auftritt. Diesen Haplotypen weisen laut der Y-STR-Datenbank insgesamt 25% der Europäer auf. Neben diesen Erkenntnissen konnte durch die Bestimmung der 'wahren' DYS385-Haplotypen auch ein Mutationsfall mit einer sehr seltenen 3-Schritt-Mutation aufgeklärt werden.

III. Validierung eines neuartigen STR-Multiplex-Assays

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Betatest des Humantype Chimera[®] II Kits (Biotype) durchgeführt, um seine Praxistauglichkeit zu erproben. Dieser Kit erwies sich als sehr gute Ergänzung zu den bereits etablierten STR-Multiplex-Assays, wie z.B. dem Nonaplex QS (Biotype) oder dem Identifiler (Applied Biosystems). Sein Einsatz kann sowohl zur Steigerung des Wahrscheinlichkeits-Wertes beim Auftreten von Mutationen in Vaterschaftsfällen als auch für die Untersuchung von Defizienzfällen empfohlen werden.

IV. Etablierung neuer *real-time* PCR-Assays

1. Anwendung der *real-time* PCR zur Untersuchung von Spurenmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein *real-time* PCR-Assay entwickelt, das eine Human-DNA-Quantifizierung unter Verwendung des ACTBP2-Systems und - direkt im Anschluss aus demselben Ansatz - eine ACTBP2-Genotypisierung ermöglicht. Das Assay wies sehr gute Amplifizierungs-Effizienzen auf, jedoch wurden Abweichungen in der Konzentration bei dem Vergleich mit den Ergebnissen des Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kits beobachtet. Die Ergebnisse der Genotypisierung der *real-time* PCR-Produkte waren bei 63,1% der Proben identisch zu den Ergebnissen der ACTBP2-Monoplex. Bei einigen dieser Proben fiel allerdings das Vorhandensein von *Allel-Imbalance* und *stutter-peaks* auf. Bei 11% der Proben kam es zu allelischen *drop-outs* und bei 2,1% wurden unterschiedliche Ergebnisse erhalten. Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten durch rein stochastische Effekte, die bei Proben mit einer sehr geringen DNA-Konzentration (< 0,05 ng/µl, z.B. Spuren) auftreten können, begründet sein. Außerdem stellen die *stutter-peaks* und die Phänomene des *Allel-Imbalance* und des allelischen *drop-outs* ein Problem bei

der Untersuchung von Spuren, insbesondere von Mischspuren, dar. Daher kann das ACTBP2-Assay und die direkte Genotypisierung der *real-time* PCR-Produkte zum jetzigen Zeitpunkt den Quantifiler® Human DNA Quantification Kit und die ACTBP2-Monoplex noch nicht ersetzen.

2. Etablierung und Anwendung eines *real-time* PCR-Assays zur Quantifizierung von mtDNA

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit ein *real-time* PCR-Assay zur Quantifizierung von mtDNA etabliert werden, das eine ca. 96,7%ige Amplifizierungseffizienz aufwies.

Im ersten Teilprojekt wurden die PCR-Produkte dieses Assays für eine Sequenzierung verwendet, die bei 15 der 35 Proben erfolgreich verlief. D.h. diese Sequenzen waren im mtDNA-Abschnitt 16262 bis 16410 identisch zu denen, die mittels der konventionellen Sequenzierung erhalten wurden. Der Bereich 16411 bis 16439 wurde erstmals in dieser Arbeit untersucht. An der Position 16412 fiel bei 11 Proben erstmalig eine A/G-Heteroplasmie auf. Ob die Position 16412 zu den sogenannten heteroplasmatischen Hotspots gehört, muss noch durch Sequenzierungen weiterer Proben mit alternativen Primern geklärt werden.

Das zweite Teilprojekt bestand aus der Anwendung des entwickelten Assays zur Quantifizierung von mtDNA aus Zahndentin. Außerdem sollte untersucht werden, ob eine Abnahme der mtDNA-Konzentration mit steigendem Alter des Zahndonors vorliegt, so wie es Mörnstad et al. (1999) beobachtet hatten. Diese führten für die Quantifizierung der mtDNA eine semi-quantitative PCR mit anschließender Endpunktbestimmung durch, die in diesem Fall jedoch kein adäquates Mittel zur DNA-Quantifizierung darstellt.

Im Ergebnis wurde tendenziell eher eine Zunahme als eine Abnahme der mtDNA-Konzentration mit steigendem Lebensalter beobachtet. Es konnte allerdings kein linearer Zusammenhang zwischen dem Alter des Zahnspenders und der mtDNA-Menge erkannt werden.

10. Literaturverzeichnis

- Adams,K.M., Lambert,N.C., Heimfeld,S., Tylee,T.S., Pang,J.M., Erickson,T.D., und Nelson,J.L. (2003). Male DNA in female donor apheresis and CD34-enriched products. *Blood*.
- Anderson,S., Bankier,A.T., Barrell,B.G., de Bruijn,M.H., Coulson,A.R., Drouin,J., Eperon,I.C., Nierlich,D.P., Roe,B.A., Sanger,F., Schreier,P.H., Smith,A.J., Staden,R., und Young,I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465.
- Ascioglu,F., Oguz-Savran,F., und Ozbek,U. (2004). Mutation rate at commonly used forensic STR loci: paternity testing experience. *Dis. Markers*, **20**, 313-315.
- Ayub,Q., Mohyuddin,A., Qamar,R., Mazhar,K., Zerjal,T., Mehdi,S.Q., und Tyler-Smith,C. (2000). Identification and characterisation of novel human Y-chromosomal microsatellites from sequence database information. *Nucleic Acids Res.*, **28**, e8.
- Bacher,J. und Schumm, J.W. (1998). Development of Highly Polymorphic Pentanucleotide Tandem Repeat Loci with Low Stutter. *Profiles in DNA*, Vol.2, No.2
- Bar,W., Brinkmann,B., Budowle,B., Carracedo,A., Gill,P., Lincoln,P., Mayr,W., und 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**, 175-176.
- Becker,A., Bender,K., Edelmann,J., Götz,F., Henke,L., Hering,S., Hohoff,C., Hoppe,K., Klintschar,M., Muche,M., Rolf,B., Szibor,R., Weirich,V., Jung,M., Brabetz,W. (2007). New alleles and mutational events at 14 STR loci from different German populations. *Forensic Science International: Genetics*, 1/3-4 232-237
- Bhoopat,T., Hohoff,C., und Steger,H.F. (2003). Identification of DYS385 allele variants by using shorter amplicons and Northern Thai haplotype data. *J. Forensic Sci.*, **48**, 1108-1112.
- Bhoopat,T., Sriduangkaew,S., und Steger,H.F. (2006). STR loci D10S2325, D16S539 and D19S253: Northern Thai population data. *Leg. Med. (Tokyo)*, **8**, 306-307.
- Bosch,E., Lee,A.C., Calafell,F., Arroyo,E., Henneman,P., de Knijff,P., und Jobling,M.A. (2002). High resolution Y chromosome typing: 19 STRs amplified in three multiplex reactions. *Forensic Sci. Int.*, **125**, 42-51.
- Brandstatter,A. und Parson,W. (2003). Mitochondrial DNA heteroplasmy or artefacts-a matter of the amplification strategy? *Int. J. Legal Med.*, **117**, 180-184.
- Brinkmann,B., Klintschar,M., Neuhuber,F., Huhne,J., und Rolf,B. (1998). Mutation rate in human microsatellites: influence of the structure and length of the tandem repeat. *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 1408-1415.
- Butler J.M. (2005). Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers. Second Edition, Elsevier Academic Press Inc. Ltd., London.

- Cardullo,R.A., Agrawal,S., Flores,C., Zamecnik,P.C., und Wolf,D.E. (1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **85**, 8790-8794.
- Cavalli-Sforza,L.L. und Edwards,A.W. (1967). Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Genet.*, **19**, 233-257.
- Chen,X., Prosser,R., Simonetti,S., Sadlock,J., Jagiello,G., und Schon,E.A. (1995). Rearranged mitochondrial genomes are present in human oocytes. *Am. J. Hum. Genet.*, **57**, 239-247.
- Dupuy,B.M., Stenersen,M., Egeland,T., und Olaisen,B. (2004). Y-chromosomal microsatellite mutation rates: differences in mutation rate between and within loci. *Hum. Mutat.*, **23**, 117-124.
- Filosto,M., Mancuso,M., Vives-Bauza,C., Vila,M.R., Shanske,S., Hirano,M., Andreu,A.L., und DiMauro,S. (2003). Lack of paternal inheritance of muscle mitochondrial DNA in sporadic mitochondrial myopathies. *Ann. Neurol.*, **54**, 524-526.
- Gahan,M.E., Miller,F., Lewin,S.R., Cherry,C.L., Hoy,J.F., Mijch,A., Rosenfeldt,F., und Wesselingh,S.L. (2001). Quantification of mitochondrial DNA in peripheral blood mononuclear cells and subcutaneous fat using real-time polymerase chain reaction. *J. Clin. Virol.*, **22**, 241-247.
- Gill,P., Ivanov,P.L., Kimpton,C., Piercy,R., Benson,N., Tully,G., Evett,I., Hagelberg,E., und Sullivan,K. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat. Genet.*, **6**, 130-135.
- Gusmao,L., Butler,J.M., Carracedo,A., Gill,P., Kayser,M., Mayr,W.R., Morling,N., Prinz,M., Roewer,L., Tyler-Smith,C., und Schneider,P.M. (2006). DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics (ISFG): an update of the recommendations on the use of Y-STRs in forensic analysis. *Forensic Sci. Int.*, **157**, 187-197.
- Gyllensten,U., Wharton,D., Josefsson,A., und Wilson,A.C. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*, **352**, 255-257.
- Hahnemann,J.M., Nir,M., Friberg,M., Engel,U., und Bugge,M. (2005). Trisomy 10 mosaicism and maternal uniparental disomy 10 in a liveborn infant with severe congenital malformations. *Am. J. Med. Genet. A*, **138**, 150-154.
- Henke,J. und Henke,L. (1999). Mutation rate in human microsatellites. *Am. J. Hum. Genet.*, **64**, 1473-1474.
- Hering,S. und Muller,E. (2001). New alleles and mutational events in D12S391 and D8S1132: sequence data from an eastern German population. *Forensic Sci. Int.*, **124**, 187-191.
- Higuchi,R., Fockler,C., Dollinger,G., und Watson,R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N. Y.)*, **11**, 1026-1030.

- Hohoff,C., Dewa,K., Sibbing,U., Hoppe,K., Forster,P., und Brinkmann,B. (2007). Y-chromosomal microsatellite mutation rates in a population sample from northwestern Germany. *Int. J. Legal Med.*, **121**, 359-363.
- Hohoff,C., Schurenkamp,M., Borchers,T., Eppink,M., und 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**, 300-302.
- Hou,Y.P., Tang,J.P., Dong,J.G., Ji,Q., Li,Y.B., Wu,J., Zhang,S.Z., Zhang,J., Yan,J., Walter,H., und Prinz,M. (2001). Further characterization and population data for the pentanucleotide STR polymorphism D10S2325. *Forensic Sci. Int.*, **123**, 107-110.
- Jeffreys,A.J., Wilson,V., und Thein,S.L. (1985). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature*, **316**, 76-79.
- Jobling,M.A., Bouzekri,N., und Taylor,P.G. (1998). Hypervariable digital DNA codes for human paternal lineages: MVR-PCR at the Y-specific minisatellite, MSY1 (DYF155S1). *Hum. Mol. Genet.*, **7**, 643-653.
- Jobling,M.A., Pandya,A., und Tyler-Smith,C. (1997). The Y chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int. J. Legal Med.*, **110**, 118-124.
- Jobling,M.A. und Tyler-Smith,C. (2003). The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nat. Rev. Genet.*, **4**, 598-612.
- Kayser,M., Caglia,A., Corach,D., Fretwell,N., Gehrig,C., Graziosi,G., Heidorn,F., Herrmann,S., Herzog,B., Hidding,M., Honda,K., Jobling,M., Krawczak,M., Leim,K., Meuser,S., Meyer,E., Oesterreich,W., Pandya,A., Parson,W., Penacino,G., Perez-Lezaun,A., Piccinini,A., Prinz,M., Schmitt,C., Roewer,L. (1997). Evaluation of Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int. J. Legal Med.*, **110**, 125-129.
- Kayser,M., Kittler,R., Erler,A., Hedman,M., Lee,A.C., Mohyuddin,A., Mehdi,S.Q., Rosser,Z., Stoneking,M., Jobling,M.A., Sajantila,A., und Tyler-Smith,C. (2004). A comprehensive survey of human Y-chromosomal microsatellites. *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 1183-1197.
- Kayser,M., Roewer,L., Hedman,M., Henke,L., Henke,J., Brauer,S., Kruger,C., Krawczak,M., Nagy,M., Dobosz,T., Szibor,R., de Knijff,P., Stoneking,M., und Sajantila,A. (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**, 1580-1588.
- Kittler,R., Erler,A., Brauer,S., Stoneking,M., und Kayser,M. (2003). Apparent intrachromosomal exchange on the human Y chromosome explained by population history. *Eur. J. Hum. Genet.*, **11**, 304-314.
- Klein,R., Braunschweiger,G., Junge,A., und Wiegand,P. (2003). A very long ACTBP2 (SE33) allele. *Int. J. Legal Med.*, **117**, 235-236.
- Klitschar,M., Dauber,E.M., Ricci,U., Cerri,N., Immel,U.D., Kleiber,M., und Mayr,W.R. (2004). Haplotype studies support slippage as the mechanism of germline mutations in short tandem repeats. *Electrophoresis*, **25**, 3344-3348.

- Krings,M., Stone,A., Schmitz,R.W., Krainitzki,H., Stoneking,M., und Paabo,S. (1997). Neandertal DNA sequences and the origin of modern humans. *Cell*, **90**, 19-30.
- Kuzniar,P., Jastrzebska,E., und Ploski,R. (2006). Validation of nine non-CODIS STR loci for forensic use in a population from Central Poland. *Forensic Sci. Int.*, **159**, 258-260.
- Lambert,N.C., Lo,Y.M., Erickson,T.D., Tylee,T.S., Guthrie,K.A., Furst,D.E., und Nelson,J.L. (2002). Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood*, **100**, 2845-2851.
- Lee,D.H., Han,J.S., Lee,W.G., Lee,S.W., und Rho,H.M. (1998). Quadruplex amplification of polymorphic STR loci in a Korean population. *Int. J. Legal Med.*, **111**, 320-322.
- Lessig,R. und Edelmann,J. (1998). Y chromosome polymorphisms and haplotypes in west Saxony (Germany). *Int. J. Legal Med.*, **111**, 215-218.
- Livak,K.J., Flood,S.J., Marmaro,J., Giusti,W., und Deetz,K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.*, **4**, 357-362.
- Lui,Y.Y., Chik,K.W., Chiu,R.W., Ho,C.Y., Lam,C.W., und Lo,Y.M. (2002). Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin. Chem.*, **48**, 421-427.
- Mannucci,A., Sullivan,K.M., Ivanov,P.L., und 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**, 190-193.
- Messing,J., Crea,R., und Seeburg,P.H. (1981). A system for shotgun DNA sequencing. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 309-321.
- Mornstad,H., Pfeiffer,H., Yoon,C., und Teivens,A. (1999). Demonstration and semi-quantification of mtDNA from human dentine and its relation to age. *Int. J. Legal Med.*, **112**, 98-100.
- Mullokanov,M., Cass,I., Achary,P.M., und 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**, 46-47.
- Nei,M. und Chesser,R.K. (1983). Estimation of fixation indices and gene diversities. *Ann. Hum. Genet.*, **47**, 253-259.
- Niederstätter H, Berger B, Oberacher H, Brandstätter A, Huber CG, Parson W. (2005). Separate analysis of DYS385a and b versus conventional DYS385 typing: is there forensic relevance? *Int J Legal Med.* Jan;119(1):1-9.
- Pfeiffer,H., Brinkmann,B., Huhne,J., Rolf,B., Morris,A.A., Steighner,R., Holland,M.M., und Forster,P. (1999). Expanding the forensic German mitochondrial DNA control region database: genetic diversity as a function of sample size and microgeography. *Int. J. Legal Med.*, **112**, 291-298.

- Polymeropoulos,M.H., Rath,D.S., Xiao,H., und Merrill,C.R. (1992). Tetranucleotide repeat polymorphism at the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2). *Nucleic Acids Res.*, **20**, 1432.
- Prinz,M., Boll,K., Baum,H., und Shaler,B. (1997). Multiplexing of Y chromosome specific STRs and performance for mixed samples. *Forensic Sci. Int.*, **85**, 209-218.
- Rolf,B., Wiegand,P., und Brinkmann,B. (2002). Somatic mutations at STR loci--a reason for three-allele pattern and mosaicism. *Forensic Sci. Int.*, **126**, 200-202.
- Rozen,S., Skaletsky,H., Marszalek,J.D., Minx,P.J., Cordum,H.S., Waterston,R.H., Wilson,R.K., und Page,D.C. (2003). Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. *Nature*, **423**, 873-876.
- Ruiz-Ponte,C., Loidi,L., Vega,A., Carracedo,A., und Barros,F. (2000). Rapid real-time fluorescent PCR gene dosage test for the diagnosis of DNA duplications and deletions. *Clin. Chem.*, **46**, 1574-1582.
- Saiki,R.K., Gelfand,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., und Erlich,H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Sajantila,A. (1999). [Molecular genetics revolutionized forensic medicine]. *Duodecim*, **115**, 1545-1551.
- Satoh,M. und Kuroiwa,T. (1991). Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. *Exp. Cell Res.*, **196**, 137-140.
- Schneider,P.M., Meuser,S., Waiyawuth,W., Seo,Y., und Rittner,C. (1998). Tandem repeat structure of the duplicated Y-chromosomal STR locus DYS385 and frequency studies in the German and three Asian populations. *Forensic Sci. Int.*, **97**, 61-70.
- Schwartz,M. und Vissing,J. (2002). Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.*, **347**, 576-580.
- Schwartz,M. und Vissing,J. (2004). No evidence for paternal inheritance of mtDNA in patients with sporadic mtDNA mutations. *J. Neurol. Sci.*, **218**, 99-101.
- Skaletsky,H., Kuroda-Kawaguchi,T., Minx,P.J., Cordum,H.S., Hillier,L., Brown,L.G., Repping,S., Pyntikova,T., Ali,J., Bieri,T., Chinwalla,A., Delehaunty,A., Delehaunty,K., Du,H., Fewell,G., Fulton,L., Fulton,R., Graves,T., Hou,S.F., Latrielle,P., Leonard,S., Mardis,E., Maupin,R., McPherson,J., Miner,T., Nash,W., Nguyen,C., Ozersky,P., Pepin,K., Rock,S., Rohlfing,T., Scott,K., Schultz,B., Strong,C., Tin-Wollam,A., Yang,S.P., Waterston,R.H., Wilson,R.K., Rozen,S., und Page,D.C. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, **423**, 825-837.
- Souza Goes,A.C., de Carvalho,E.F., Gomes,I., da Silva,D.A., Gil,E.H., Amorim,A., und Gusmao,L. (2005). Population and mutation analysis of 17 Y-STR loci from Rio de Janeiro (Brazil). *Int. J. Legal Med.*, **119**, 70-76.
- Strachan,T. und Read,A.P. (1996). *Molekulare Humangenetik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

Sutovsky,P., Moreno,R.D., Ramalho-Santos,J., Dominko,T., Simerly,C., und Schatten,G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, **402**, 371-372.

Taylor,R.W., McDonnell,M.T., Blakely,E.L., Chinnery,P.F., Taylor,G.A., Howell,N., Zeviani,M., Briem,E., Carrara,F., und Turnbull,D.M. (2003). Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Ann. Neurol.*, **54**, 521-524.

Timken,M.D., Swango,K.L., Orrego,C., und Buoncristiani,M.R. (2005). A duplex real-time qPCR assay for the quantification of human nuclear and mitochondrial DNA in forensic samples: implications for quantifying DNA in degraded samples. *J. Forensic Sci.*, **50**, 1044-1060.

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

Wiegand,P., Budowle,B., Rand,S. und Brinkmann,B., (1993). Forensic validation of the STR systems SE33 and TC11. *Int. J. Leg. Med.* 105, pp. 315–320.)

Wiegand,P., Lareu,M.V., Schurenkamp,M., Kleiber,M., und Brinkmann,B. (1999). D18S535, D1S1656 and D10S2325: three efficient short tandem repeats for forensic genetics. *Int. J. Legal Med.*, **112**, 360-363.

Wiegand,P., Meyer,E., und Brinkmann,B. (2000). Microsatellite structures in the context of human evolution. *Electrophoresis*, **21**, 889-895.

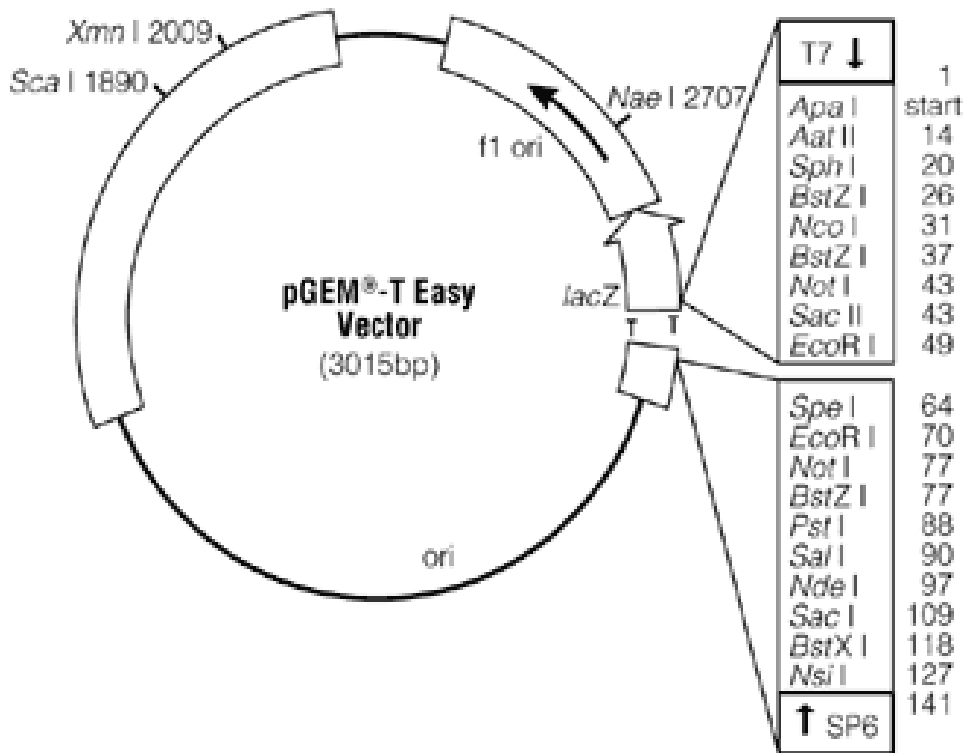
Willuweit S, Roewer L, on behalf of the International Forensic Y Chromosome User Group (2007) Y chromosome haplotype reference database (YHRD): Update, Forensic Science International: Genetics 1(2) 83-87

Yuasa,I., Umetsu,K., Harihara,S., Kido,A., Miyoshi,A., Saitou,N., Dashnyam,B., Jin,F., Lucotte,G., Chattopadhyay,P.K., Henke,L., und Henke,J. (2006). Distribution of the F374 allele of the SLC45A2 (MATP) gene and founder-haplotype analysis. *Ann. Hum. Genet.*, **70**, 802-811.

Zarrabeitia,M.T., Riancho,J.A., Gusmao,L., Lareu,M.V., Sanudo,C., Amorim,A., und Carracedo,A. (2003). Spanish population data and forensic usefulness of a novel Y-STR set (DYS437, DYS438, DYS439, DYS460, DYS461, GATA A10, GATA C4, GATA H4). *Int. J. Legal Med.*.

11. ANHANG

11.1: Vektorkarte des pGEM[®]-T Easy Vectors



11.2: Ergebnistabellen zum STR-System D10S2325

Familien, bei denen eine Mutation auftrat und Personen, die lange Allele aufweisen sind grau markiert.

Deutsche Population				
Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2
1	1	PV	7	11
2	2	PV	8	11
3	3	KM	13	15
4		PV	10	12
5	4	KM	9	12
6		PV	9	15
7	5	KM	7	14
8	6	KM	7	14
9		PV	10	10
10	7	KM	10	14
11		PV	9	12
12	8	KM	12	13
13		PV	12	13
14	9	KM	10	10
15		PV	11	12
16	10	KM	11	13
17		PV	9	13
18	11	KM	12	14
19		PV	9	14
20	12	KM	10	12
21		PV	12	15
22	13	KM	7	9
23		PV	12	12
24	14	KM	7	11
25		PV	10	11
26	15	KM	7	7
27		PV	7	7
28	16	PV	9	14
29	17	KM	13	13
30		PV	7	7
31	18	Kd	12	14
32		KM	13	14
33		PV	9	12
34	19	KM	7	7
35		PV	8	10
36	20	Kd	8	10
37		KM	7	10
38		PV	8	13
39	21	Kd	12	14
40		KM	7	14
41		PV	10	12
42	22	Kd	10	12
43		KM	10	12
44		PV	10	10
45	23	Kd	10	12
46		KM	9	12
47		PV	9	10

Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2
48	24	Kd	7	13
49		KM	8	13
50		PV	7	14
51	25	Kd	7	12
52		KM	11	12
53		PV	12	12
54	26	Kd	7	12
55		KM	7	11
56		PV	8	12
57	27	Kd	9	14
58		KM	11	14
59		PV	9	9
60	28	Kd	9	12
61		KM	10	12
62		PV	9	14
63	29	Kd	11	12
64		KM	12	12
65		PV	8	11
66	30	Kd	7	11
67		KM	11	12
68		PV	7	12
69	31	Kd	7	13
70		KM	9	13
71		PV	7	9
72	32	Kd	9	10
73		KM	9	11
74	33	Kd	10	12
75		KM	12	12
76		PV	7	10
77	34	Kd	13	13
78	35	KM	12	13
79		PV	10	14
80	36	Kd	7	11
81		KM	11	16
82		PV	7	12
83	37	Kd	8	9
84		KM	9	13
85		PV	7	8
86	38	Kd	9	9
87		KM	7	9
88	39	Kd	7	7
89		KM	7	9
90		PV	7	7
91	40	Kd	7	13
92		KM	12	13
93		PV	7	7
94	41	Kd	11	12
95		PV	7	12
96	42	Kd	13	15
97		KM	7	15

Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2
98	42	PV	7	13
99	43	Kd	10	12
100		KM	10	12
101		PV	10	13
102	44	Kd	7	13
103		KM	7	12
104		PV	9	13
105	45	Kd	10	13
106		KM	12	13
107		PV	7	10
108	46	Kd	7	12
109		KM	9	12
110		PV	7	11
111	47	Kd	12	12
112		KM	7	12
113		PV	11	12
114	48	Kd	7	11
115		KM	7	12
116		PV	9	11
117	49	Kd	9	14
118		KM	9	9
119		PV	12	14
120	50	Kd	9	11
121		KM	11	14
122		PV	9	12
123	51	Kd	8	9
124		KM	9	12
125		PV	8	11
126	52	Kd	13	14
127		KM	14	14
128		PV	7	13
129	53	KM	12	12
130		PV	11	11
131	54	Kd	8	10
132		KM	8	12
133		PV	9	10
134	55	Kd	7	10
135		KM	10	11
136		PV	7	13
137	56	Kd	10	10
138		KM	10	12
139		PV	10	14
140	57	Kd	9	14
141		KM	11	14
142		PV	9	12
143	58	Kd	7	13
144		KM	10	13
145		PV	7	14
146	59	Kd	11	12
147		KM	12	14

Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2
148	59	PV	11	13
149	60	Kd	10	11
150		KM	10	13
151		PV	11	11
152	61	Kd	13	15
153		KM	12	13
154		PV	13	15
155	62	Kd	11	14
156		KM	8	11
157		PV	12	14
158	63	Kd	12	15
159		KM	12	13
160		PV	7	15
161	64	Kd	7	11
162		KM	7	9
163		PV	11	11
164	65	KM	7	12
165		PV	10	15
166	66	Kd	10	14
167		KM	9	14
168		PV	7	10
169	67	Kd	10	13
170		KM	10	14
171		PV	12	13
172	68	Kd	7	7
173		KM	7	11
174		PV	7	12
175	69	Kd	7	7
176		KM	7	14
177		PV	7	12
178	70	KM	8	9
179		PV	11	14
180	71	Kd	7	10
181		KM	7	12
182		PV	10	13
183	72	Kd	8	13
184		KM	10	13
185		PV	8	12
186	73	Kd	11	15
187		KM	11	12
188		PV	10	15
189	74	Kd	13	15
190		KM	13	15
191		PV	13	13
192	75	Kd	10	14
193		KM	10	12
194		PV	11	14
195	76	Kd	12	16
196		KM	14	16
197		PV	7	12

Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2
198	77	Kd	7	11
199		KM	10	11
200		PV	7	8
201	78	Kd	9	11
202		KM	9	15
203		PV	11	14
204	79	Kd	10	15
205		KM	10	15
206		PV	9	10
207	80	Kd	10	13
208		KM	10	13
209		PV	10	11
210	81	Kd	8	11
211		KM	8	12
212		PV	11	13
213	82	Kd	9	12
214		KM	9	10
215		PV	10	12
216	83	Kd	10	12
217		KM	11	12
218		PV	10	12
219	84	Kd	12	13
220		KM	10	12
221		PV	11	14
222	85	Kd	10	10
223		KM	10	12
224		PV	7	10
225	86	Kd	7	10
226		KM	7	8
227		PV	10	10
228	87	Kd	7	15
229		KM	7	11
230		PV	9	15
231	88	Kd	10	12
232		KM	10	13
233		PV	7	12
234	89	Kd	7	9
235		KM	7	13
236		PV	9	10
237	90	Kd	11	11
238		KM	11	13
239		PV	7	11
240	91	Kd	7	14
241		KM	7	11
242		PV	14	15
243	92	Kd	9	13
244		KM	9	13
245		PV	7	9
246	93	Kd	7	14
247		KM	12	14

Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2
248	93	PV	7	12
249	94	Kd	7	9
250		KM	9	12
251		PV	7	10
252	95	Kd	10	11
253		KM	11	11
254		PV	10	11
255	96	Kd	10	11
256		KM	10	12
257		PV	11	13
258	97	Kd	7	10
259		KM	10	12
260		PV	7	7
261	98	Kd	7	12
262		KM	12	12
263		PV	7	11
264	99	Kd	10	12
265		KM	12	15
266		PV	7	10
267	100	Kd	9	13
268		KM	7	13
269		PV	9	11
270	101	Kd	9	13
271		KM	9	10
272		PV	11	13
273	102	KM	8	8
274		PV	7	8
275		Kd	12	13
276	103	KM	12	13
277		PV	13	14
278	104	Kd	10	13
279		KM	7	10
280		PV	10	13
281	105	Kd	9	15
282		KM	9	9
283		PV	11	15
284	106	Kd	7	13
285		KM	7	14
286		PV	13	13
287	107	Kd	7	13
288		KM	7	11
289		PV	13	13
290	108	Kd	10	11
291		KM	7	10
292		PV	11	13
293	109	Kd	8	15
294		KM	12	15
295		PV	7	10
296	110	Kd	13	13
297		KM	12	13

Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2
298	110	PV	11	13
299	111	Kd	7	8
300		KM	7	8
301		PV	7	12
302	112	Kd	10	12
303		KM	10	11
304		PV	10	12
305	113	Kd	12	13
306		KM	13	13
307		PV	7	12
308	114	Kd	12	13
309		KM	12	13
310	115	Kd	10	11
311		KM	7	10
312		PV	10	11
313	116	Kd	8	11
314		KM	8	13
315		PV	10	11
316	117	Kd	9	10
317		PV	10	12
318	118	Kd	8	13
319		KM	9	13
320		PV	8	9
321	119	Kd	11	14
322		KM	9	11
323	120	Kd	9	11
324		KM	9	13
325		PV	9	11
326	121	Kd	9	14
327		KM	9	14
328		PV	7	9
329	122	Kd	7	7
330		KM	7	14
331		PV	7	13
332	123	Kd	10	13
333		KM	10	15
334		PV	8	13
335	124	Kd	7	10
336		KM	7	10
337		PV	7	13
338	125	Kd	8	14
339		KM	8	11
340		PV	12	14
341	126	Kd	7	9
342		KM	7	11
343		PV	7	9
344	127	Kd	7	13
345		KM	7	9
346		PV	12	13
347	128	Kd	8	13

Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2
348	128	KM	13	15
349		PV	8	12
350	129	Kd	9	10
351		KM	9	12
352		PV	9	10
353	130	Kd	12	12
354		KM	7	12
355		PV	12	13
356	131	Kd	11	12
357		KM	12	12
358		PV	9	11
359	132	Kd	11	14
360		KM	14	17
361		PV	10	11
362	133	Kd	9	10
363		KM	9	10
364		PV	9	9
365	134	Kd	9	12
366		KM	11	12
367		PV	9	9
368	135	Kd	13	13
369		KM	7	13
370		PV	12	13
371	136	Kd	11	12
372		KM	11	11
373		PV	10	12
374	137	Kd	7	13
375		KM	7	12
376		PV	12	13
377	138	Kd	7	7
378		KM	7	10
379		PV	7	13
380	139	Kd	13	13
381		KM	10	13
382		PV	9	13
383	140	Kd	9	11
384		KM	9	10
385		PV	7	11
386	141	Kd	7	11
387		KM	11	12
388		PV	7	7
389	142	KM	11	12
390		PV	7	12
391	143	Kd	11	13
392		KM	9	13
393		PV	11	14
394	144	Kd	7	10
395		KM	10	11
396		PV	7	9
397	145	Kd	8	14

Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2
398	145	KM	8	11
399		PV	10	14
400	146	Kd	10	11
401		KM	9	10
402		PV	11	12
403	147	Kd	7	15
404		KM	12	15
405		PV	7	10
406	148	Kd	11	12
407		KM	11	12
408		PV	10	11
409	149	Kd	7	15
410		KM	7	15
411		PV	12	15
412	150	Kd	8	13
413		KM	10	13
414		PV	8	12
415	151	Kd	12	13
416		KM	13	15
417		PV	10	12
418	152	Kd	7	15
419		KM	7	12
420		PV	13	15
421	153	Kd	9	12
422		KM	9	10
423		PV	12	12
424	154	Kd	9	14
425		KM	11	14
426		PV	9	11
427	155	Kd	13	13
428		KM	13	14
429		PV	11	13
430	156	Kd	7	12
431		KM	7	10
432		PV	12	23
433	157	Kd	11	13
434		KM	11	13
435		PV	11	12
436	158	Kd	7	10
437		KM	7	14
438		PV	10	12
439	159	Kd	7	10
440		KM	10	11
441		PV	7	11
442	160	Kd	7	12
443		KM	9	12
444		PV	7	14

Kurdische Population					
Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2	D10S2325 Allel 3
1	1	Kd 1	9	11	
2		Kd 2	11	12	
3		Kd 3	9	13	
4		Kd 4	9	11	
5		Kd 5	9	13	
6		Kd 7	9	11	
7		KM	11	13	
8		PV	9	12	
9		2	KM	7	11
10	PV		7	9	
11	3	Kd 1	7	11	
12		Kd 2	9	11	
13		Kd 3	7	11	
14		Kd 4	7	11	
15		Kd 5	7	10	
16		Kd 6	7	10	
17		Kd 7	7	11	
18		Kd 8	7	10	
19		PV	10	11	
20	4	Kd1	11	13	
21		Kd2	9	10	
22		Kd3	10	13	
23		Kd4	9	10	
24		Kd5	9	11	
25		Kd6	10	13	
26		Kd7	11	13	
27		KM	9	13	
28		PV	10	11	
29	5	Kd 1	9	12	
30		Kd 2	9	12	
31		Kd 3	11	12	
32		Kd 4	9	11	
33		KM	11	12	
34	6	Kd1	9	10	
35		Kd2	9	11	
36		Kd3	7	11	
37		Kd4	9	10	
38		KM	10	11	
39		PV	7	9	
40	7	Kd 1	11	12	
41		Kd 2	10	12	
42		Kd 3	10	12	
43		Kd 4	10	12	
44		KM	12	12	
45	8	Kd1	7	13	
46		Kd2	12	12	
47		Kd3	12	12	
48		KM	12	13	
49		PV	7	12	

Person	Familie	Familien- mitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2	D10S2325 Allel 3
50	9	Kd 2	13	13	
51		Kd 4	13	13	
52		Kd 5	9	13	
53		Kd 6	9	12	
54		KM	12	13	
55	10	Kd1	12	13	
56		Kd2	12	13	
57		Kd3	10	13	
58		Kd4	10	13	
59		Kd5	10	13	
60		PV	13	13	
61	11	Kd 1	7	7	
62		Kd 2	7	8	
63		Kd 3	7	16	
64		Kd 4	7	16	
65		KM	7	8	
66		PV	7	16	
67	12	Kd2	9	14	
68		Kd6	9	14	
69		KM	9	9	
70		PV	11	14	
71	13	Kd1	11	12	
72		Kd2	12	13	
73		Kd3	11	13	
74		Kd4	13	13	
75		KM	12	13	
76		PV	11	13	
77	14	Kd1	9	15	
78		KM	9	10	
79		PV	7	15	
80	15	Kd 1	7	11	
81		KM	7	11	
82		PV	7	10	
83	16	Kd 2	10	22	(23)
84		KM	10	11	
85		PV	12	22	23
86	17	Kd 1	8	11	
87		KM	9	11	
88		PV	7	8	
89	18	Kd1	10	11	
90		Kd2	10	10	
91		Kd3	11	14	
92		KM	10	11	
93		PV	10	14	
94	19	Kd 1	10	12	
95		Kd 2	10	12	
96		KM	10	12	
97		PV	10	12	
98	20	Kd1	7	11	
99		KM	7	9	

Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2	D10S2325 Allel 3
100	20	PV	7	11	
101	21	Kd 1	12	15	
102		PV	8	15	
103	22	Kd1	7	10	
104		KM	7	7	
105		PV	7	10	
106	23	Kd1	11	13	
107		Kd2	7	13	
108		Kd3	11	13	
109		Kd4	7	13	
110	24	PV	7	11	
111		Kd 1	7	9	
112		Kd 2	7	11	
113		KM	7	10	
114	25	PV	9	11	
115		Kd1	10	11	
116		Kd3	10	11	
117	26	PV	8	12	
118		Kd1	12	13	
119		Kd2	12	13	
120		Kd3	8	11	
121	27	KM	11	13	
122		Kd 2	10	11	
123		Kd 3	10	11	
124		KM	10	12	
125	28	PV	10	11	
126		Kd1	9	12	
127		Kd2	8	12	
128		KM	10	12	
129	29	PV	8	9	
130		Kd 1	11	11	
131		Kd 4	11	12	
132		Kd 7	11	12	
133		KM	11	12	
134	30	PV	11	11	
135		Kd1	10	12	
136		KM	7	12	
137	31	PV	10	14	
138		Kd 1	10	14	
139		Kd 2	10	14	
140		Kd 3	10	14	
141		KM	10	14	
142	32	PV	10	10	
143		Kd2	7	8	
144	33	KM	8	10	
145		Kd 1	9	13	
146		KM	10	13	
147	34	PV	9	12	
148		Kd1	9	10	
149	34	Kd2	9	10	

Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2	D10S2325 Allel 3
150	34	PV	9	9	
151	35	Kd 1	8	13	
152	36	Kd1	9	15	
153		Kd3	14	15	
154		Kd4	9	12	
155		Kd6	14	15	
156		Kd8	9	12	
157		Kd9	9	15	
158		KM	12	15	
159	37	Kd 2	9	14	
160		KM	7	9	
161	38	Kd2	12	13	
162		Kd3	13	13	
163		KM	9	13	
164		PV	12	13	
165	39	Kd 1	9	14	
166		KM	9	12	
167		PV	8	14	
168	40	Kd 1	13	14	
169		KM	7	13	
170		PV	12	14	
171	41	Kd1	9	12	
172		Kd2	7	9	
173		Kd3	9	12	
174		KM	7	12	
175		PV	9	9	
176	42	Kd 1	10	11	
177		Kd 3	7	10	
178		Kd 4	7	13	
179		Kd 5	7	10	
180		kd 6	10	11	
181		kd 7	7	13	
182		kd 8	7	13	
183		KM	10	13	
184		PV	7	11	
185	43	Kd1	7	13	
186		Kd2	12	13	
187		Kd3	7	13	
188		KM	7	12	
189		PV	10	13	
190	44	kd 1	10	13	
191		Kd 2	11	13	
192		PV	10	11	
193	45	Kd 1	12	13	
194		Kd 2	12	13	
195		KM	12	12	
196		PV	9	13	
197	46	Kd1	10	21	
198		Kd2	10	22	23
199		Kd3	10	22	

Person	Familie	Familien- mitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2	D10S2325 Allel 3
200	46	Kd4	7	10	
201		Kd5	7	10	
202		Kd7	7	10	
203		Kd8	10	23	
204		KM	10	10	
205		PV	7	22	23
206	47	Kd 1	7	12	
207		Kd 2	7	12	
208		KM	12	13	
209		PV	7	12	
210	48	Kd1	9	13	
211		Kd2	9	10	
212		Kd3	9	13	
213		Kd4	9	13	
214		KM	9	9	
215		49	Kd1	7	10
216	KM		7	8	
217	PV		9	10	
218	50	Kd 1	11	15	
219		Kd 2	11	15	
220		Kd 3	11	15	
221		Kd 4	11	15	
222		KM	11	11	
223		PV	12	15	
224	51	Kd4	10	15	
225		Kd5	11	14	
226		KM	10	11	
227		PV	14	15	
228	52	Kd2	10	12	
229		Kd3	10	12	
230	53	Kd 1	7	10	
231		Kd 2	7	10	
232		Kd 3	7	10	
233		KM	7	7	
234		PV	10	10	
235	54	Kd	9	14	
236		KM	9	14	
237	55	Kd 1	11	13	
238		Kd 2	11	13	
239		KM	11	11	
240		PV	11	13	
241	56	Kd	12	15	
242		KM	7	12	
243		PV	9	15	
244	57	Kd 1	10	12	
245		Kd 2	9	14	
246		KM	9	10	
247		PV	12	14	
248	58	Kd 1	8	10	
249		Kd 2	8	10	

Person	Familie	Familien- mitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2	D10S2325 Allel 3
250	58	PV	9	10	
251	59	Kd 1	10	10	
252		Kd 2	10	11	
253		Kd 3	10	11	
254		KM	10	11	
255		PV	10	11	
256	60	Kd 1	7	8	
257		Kd 2	7	11	
258		Kd 3	8	13	
259		Km	7	13	
260		PV	8	11	
261	61	Kd 3	10	14	
262		Kd 1	9	10	
263		Kd 2	9	10	
264		PV	9	14	
265	62	Kd 1	7	11	
266		Kd 2	7	11	
267		Kd 3	7	11	
268		PV	7	11	
269	63	Kd 2	11	11	
270		Kd 3	11	11	
271		KM	7	11	
272		PV	11	11	
273	64	Kd 1	9	11	
274		Kd 2	9	10	
275		KM	10	11	
276		PV	9	9	
277	65	Kd 1	9	11	
278		Kd 2	10	11	
279		Kd 3	10	11	
280		Kd 4	9	10	
281		Kd 5	9	10	
282		Kd 6	11	11	
283		KM	10	11	
284		PV	9	11	
285	66	Kd 1	7	10	
286		Kd 2	7	7	
287		Kd 3	7	7	
288		KM	7	11	
289		PV	7	10	
290	67	Kd	9	9	
291		KM	9	11	
292		PV	9	11	
293	68	Kd 1	7	10	
294		Kd 2	7	10	
295		KM	10	10	
296		PV	7	11	
297	69	Kd 1	7	14	
298		Kd 4	7	14	
299		Kd 5	7	14	

Person	Familie	Familienmitglied	D10S2325 Allel 1	D10S2325 Allel 2	D10S2325 Allel 3
300	69	KM	7	14	
301		PV	7	14	
302	70	Kd	7	7	
303		KM	7	9	
304		PV	7	7	
305	71	Kd 1	9	15	
306		Kd 2	15	16	
307		Kd 3	15	16	
308		KM	15	15	
309		PV	9	16	
310	72	Kd 1	14	14	
311		Kd 2	14	14	
312		PV	12	14	
313	73	Kd 1	10	13	
314		Kd 2	10	13	
315		Kd 3	10	13	
316		Kd 4	10	13	
317		Kd 5	10	10	
318		Kd 6	10	11	
319		KM	10	13	
320		PV	10	11	
321	74	Kd 1	10	13	
322		Kd 2	10	13	
323		Kd 3	10	15	
324		Kd 4	10	13	
325		KM	10	12	
326		PV	13	15	
327	75	Kd 1	8	11	
328		Kd 3	9	11	
329		Kd 4	9	11	
330		Kd 5	7	8	
331		Kd 6	8	11	
332		Kd	12	15	
333		PV	7	15	
334	76	Kd 1	8	9	
335		Kd 2	8	9	
336		KM	7	8	
337		PV	9	12	

11.3: Ergebnisse des Quantifiler® Human DNA Quantification Kits, der ACTBP2-Monoplex und des ACTBP2-Assay (inkl. Genotypisierung der PCR-Produkte)

Probe	Spurenart	Quantifiler			ACTBP2-Assay			Eingruppierung
		CT	[ng/µl]	ACTBP2-Befund	CT	[ng/µl]	ACTBP2-Befund	
007 (1)	Zelllinie	32.51	5,31e-002		37.93	2,80e-002		
007 (1)	Zelllinie	31.80	8,91e-002		38.25	2,22e-002		
007 (2)	Zelllinie	32.35	5,54e-002		36.48	1,40e-001		
007 (2)	Zelllinie	31.72	8,77e-002		36.42	1,46e-001		
0,62 ng/µl	Standard	30.05	0,62	19	30.34	0,62	19	1
1	Blut	28.14	1,27	20	33.90	5,12e-001	20	1
2	Blut	30.94	1,66e-001	18/25.2	39.00	1,29e-002	18/(25.2)	1
3	Blut	29.25	5,66e-001	15 / 29.2	neg.		neg.	4
4	Blut	30.29	2,65e-001	19/23.2	38.56	1,78e-002	19/23.2	1
5	Blut	29.22	5,79e-001	17/30.2	36.00	1,13e-001	17/((30.2))	1
6	Blut	29.80	3,79e-001	18/25.2	39.48	9,17e-003	18/(25.2)	1
7	Blut	28.14	1,27	16/18	neg.		16/(18)	1
8	Blut	29.50	4,71e-001	19/29.2	36.75	6,54e-002	19/((29.2))	1
9	Blut	28.19	1,22	16/21.2	35.84	1,27e-001	16/(21.2)	1
10	Blut	26.97	2,95	18/29.2	33.54	6,63e-001	18/((29.2))	1
11	Blut	29.36	5,22e-001	13	neg.		neg.	4
12	Blut	31.82	8,77e-002	20/30.2	neg.		neg.	4
13	Blut	31.73	9,40e-002	26.2/31.2	neg.		26.2/((31.2))	1
14	Blut	32.80	4,30e-002	26.2/31.2	neg.		26.2	2
15	Blut	27.82	1,59	26.2/31.2	neg.		26.2/((31.2))	1
16	Blut	31.21	1,36e-001	26.2/31.2	39.78	7,35e-003	26.2/((31.2))	1
17	Blut	36.98	2,08e-003	15/22.2	neg.		neg.	4
18	Blut	28.24	1,18	19/23.2	38.21	2,28e-002	19/23.2	1
19	Blut	28.28	1,14	17/30.2	36.22	9,56e-002	17/((30.2))	1
20	Blut	27.93	1,47	16/18	neg.		16/(18)	1
21	Blut	30.06	3,15e-001	19/29.2	neg.		19/((29.2))	1
22	Blut	30.70	1,98e-001	13	neg.		13	1

Probe	Spurenart	Quantifiler			ACTBP2-Assay			Eingruppierung
		CT	[ng/µl]	ACTBP2-Befund	CT	[ng/µl]	ACTBP2-Befund	
23	Blut	29.55	4,56e-001	26.2/31.2	neg.		26.2/((31.2))	1
24	Blut	30.18	2,89e-001	26.2/31.2	neg.		26.2/((31.2))	1
25	Blut	30.48	2,32e-001	26.2/31.2	39.96	6,48e-003	neg.	4
26	Blut	29.48	4,80e-001	18/25.2	37.18	4,80e-002	18/(25.2)	1
27	Blut	30.47	2,33e-001	14	35.74	1,35e-001	14	1
28	Blut	24.58	15,92	19/28.2	neg.		neg.	4
29	Blut	27.97	1,35	17/28.2	neg.		neg.	4
30	Blut	26.60	3,65	27.2/30.2	neg.		neg.	4
31	Blut	neg.		neg.	neg.		neg.	1
32	Blut	27.75	1,59	26.2/27.2	39.97	1,28e-002	26.2/27.2	1
33	Blut	28.67	8,12e-001	18	neg.		neg.	4
34	Blut	27.93	1,39	16	34.21	6,66e-001	16	1
35	Blut	32.73	4,20e-002	neg.	neg.		neg.	1
36	Blut	26.81	3,14	17/28.2	neg.		neg.	4
37	Blut	27.39	2,06	20/21	37.10	9,21e-002	20/(21)	1
38	Blut	28.11	1,22	17/28.2	36.82	1,11e-001	17/((28.2))	1
39	Blut	28.43	9,66e-001	20/21	38.00	4,95e-002	20/(21)	1
40	Blut	30.54	2,07e-001	21/22.2/26.2/27.2	neg.		21/22.2	2
41	Blut	30.67	1,89e-001	26.2/27.2	neg.		neg.	4
42	Blut	28.81	7,32e-001	25.2/29.2	39.81	1,43e-002	25.2/((29.2))	1
43	Blut	33.27	3,24e-001	20/28.2	37.12	9,04e-002	20/(28.2)	1
44	Blut+Schimmel	neg.		neg.	neg.		neg.	1
45	Blut+Schimmel	neg.		neg.	neg.		neg.	1
46	Zigarettenrest	29.70	4,07e-001	19/20	36.20	9,71e-002	19/20	1
47	Zigarettenrest	27.31	2,31	15/29.2	36.34	8,77e-002	15	2
48	Zigarettenrest	38.05	9,52e-004	neg.	neg.		neg.	1
49	Zigarettenrest	26.95	3,00	18/28.2	33.50	6,80e-001	18/((28.2))	1
50	Zigarettenrest	neg.		neg.	neg.		neg.	1
51	Zigarettenrest	29.68	4,15e-001	13/22	36.55	7,57e-002	13/((22))	1
52	Zigarettenrest	32.18	6,73e-002	21/24.2	37.70	3,30e-002	(15/21/22.2/23.2)/24.2	2
53	Zigarettenrest	28.05	1,35	15/(29.2)	33.83	5,37e-001	15	2

Probe	Spurenart	Quantifiler			ACTBP2-Assay			Eingruppierung
		CT	[ng/µl]	ACTBP2-Befund	CT	[ng/µl]	ACTBP2-Befund	
54	Zigarettenrest	neg.		neg.	neg.		neg.	1
55	Zigarettenrest	28.58	9,22e-001	21/29.2	neg.		21	2
56	Zigarettenrest	28.20	1,21	neg.	neg.		15/((29.2))	4
57	Zigarettenrest	33.67	2,29e-002	23.2/24.2	neg.		23.2	2
58	Zigarettenrest	27.26	2,4	17/33.2	34.74	2,80e-001	17	2
59	Zigarettenrest	29.73	3,98e-001	23.2/24.2	37.83	3,01e-002	23.2/24.2	1
60	Zigarettenrest	30.62	2,09e-001	23.2/24.2	38.72	1,58e-002	23.2/24.2	1
61	Zigarettenrest	35.13	7,95e-003	neg.	neg.		neg.	1
62	Zigarettenrest	32.35	5,98e-002	neg.	neg.		neg.	1
63	Zigarettenrest	28.88	6,94e-001	18/20.2	36.91	1,05e-001	18/20.2	1
64	Zigarettenrest	29.12	5,83e-001	19/34.2	35.26	3,24e-001	14	3
65	Zigarettenrest	29.95	3,19e-001	29.2/32	neg.		neg.	4
66	Zigarettenrest	26.75	3,28	15/20	32.53	2,11	15/(20)	1
67	Zigarettenrest	27.79	1,54	12/20	32.54	2,1	12/(20)	1
68	Zigarettenrest	neg.		neg.	neg.		neg.	1
69	Zigarettenrest	30.23	2,60e-001	15/(29.2)	35.69	2,41e-001	15/(29.2)	1
70	Zigarettenrest	neg.		(18)	neg.		neg.	4
71	Abrieb Armabdruck	36.10	3,62e-003	neg.	neg.		neg.	1
72	Abrieb Auto	neg.		neg.	neg.		neg.	1
73	Abrieb Auto	neg.		neg.	neg.		neg.	1
74	Abrieb Bobbles	34.39	1,25e-002	20.2/25.2/28.2	neg.		neg.	4
75	Abrieb Bobbles	35.07	7,63e-003	11/20/22.2	neg.		neg.	4
76	Abrieb Bobbles	34.92	8,55e-003	14	neg.		((25.2))	3
77	Abrieb Bobbles	35.22	6,87e-003	17/20.2/25.2/27.2/30.3	neg.		neg.	4
78	Abrieb Bohrloch	37.72	1,11e-003	neg.	neg.		13.2/27.2	4
79	Abrieb Brecheisen	34.47	1,19e-002	12/18/(19/23.2/28.2)	neg.		neg.	4
80	Abrieb Eisenbügelsäge	neg.		neg.	neg.		neg.	1
81	Abrieb Eisenbügelsäge	37.10	1,74e-003	neg.	neg.		neg.	1
82	Abrieb Fensterscheibe	32.55	4,78e-002	18/19	neg.		18/19	1
83	Abrieb Feuerzeug	33.19	3,25e-002	12/(22.2)	neg.		neg.	4
84	Abrieb Flasche	30.26	2,73e-001	18/(25.2)/(28.2)	neg.		((18.1))	3
85	Abrieb Flasche	neg.		neg.	neg.		((18.1))	4

Probe	Spurentyp	Quantifiler			ACTBP2-Assay			Eingruppierung
		CT	[ng/µl]	ACTBP2-Befund	CT	[ng/µl]	ACTBP2-Befund	
86	Abrieb Flasche	neg.		neg.	neg.		neg.	1
87	Abrieb Flasche	36.46	3,04e-003	(12/15)	neg.		neg.	4
88	Abrieb Flasche	31.36	1,14e-001	18/20.2	neg.		18/20.2	1
89	Abrieb Flasche	31.49	1,04e-001	26.2/30.3/(27.2/29.2)	neg.		neg.	4
90	Abrieb Flasche	33.65	2,15e-002	16	neg.		neg.	4
91	Abrieb Flasche	neg.		neg.	neg.		neg.	1
92	Abrieb Flasche	neg.		neg.	neg.		neg.	1
93	Abrieb Flasche	28.42	9,74e-001	17/28.2	39.68	1,57e-002	17/((28.2))	1
94	Abrieb Flasche	neg.		(29.2)	neg.		neg.	4
95	Abrieb Flasche	33.07	3,28e-002	24.2/25.2	neg.		24.2/25.2	1
96	Abrieb Flasche	33.37	2,63e-002	19/31.2	neg.		19	2
97	Abrieb Flasche	neg.		neg.	neg.		neg.	1
98	Abrieb Flasche	neg.		neg.	neg.		neg.	1
99	Abrieb Flasche	neg.		neg.	neg.		neg.	1
100	Abrieb Flasche	36.53	2,63e-003	neg.	neg.		neg.	1
101	Abrieb Flasche	neg.		neg.	neg.		neg.	1
102	Abrieb Flasche	neg.		neg.	neg.		neg.	1
103	Abrieb Flasche	36.41	2,88e-003	neg.	neg.		neg.	1
104	Abrieb Glas	31.95	7,45e-002	19/20/22/29.2	neg.		19/20/22	2
105	Abrieb Handflächenabdruck	neg.		neg.	neg.		neg.	1
106	Abrieb Handgriff	neg.		(28.2)	neg.		neg.	4
107	Abrieb Radiostecker	35.15	7,21e-003	16	neg.		neg.	4
108	Abrieb Radiostecker	34.51	1,15e-002	(16/17)	neg.		neg.	4
109	Abrieb Scheibe	36.76	2,43e-003	neg.	neg.		neg.	1
110	Abrieb Schlauchenden	neg.		neg.	neg.		neg.	1
111	Abrieb Schraubendreher	38.06	8,66e-004	17/29.2	neg.		neg.	4
112	Abrieb Schraubendrehergriff	35.26	7,22e-003	neg.	neg.		neg.	1
113	Abrieb Schraubendrehergriff	32.26	6,39e-002	19/21	neg.		neg.	4
114	Abrieb Sekret	neg.		neg.	neg.		neg.	1
115	Abrieb Spitzhacke	neg.		neg.	neg.		neg.	1

Probe	Spurenart	Quantifiler			ACTBP2-Assay			Eingruppierung
		CT	[ng/µl]	ACTBP2-Befund	CT	[ng/µl]	ACTBP2-Befund	
116	Abrieb Taschenlampe	neg.		neg.	neg.		neg.	1
117	Abrieb Taschenlampe	neg.		neg.	neg.		neg.	1
118	Abrieb Taschenmesser	33.42	2,76e-002	neg.	neg.		neg.	1
119	Abrieb Werkzeug	35.99	3,91e-003	neg.	neg.		neg.	1
120	Abrieb Werkzeug	38.08	8,50e-004	neg.	neg.		neg.	1
121	Abrieb Werkzeug	38.26	7,47e-004	neg.	neg.		neg.	1
122	Abrieb Werkzeug	37.32	1,48e-003	neg.	neg.		neg.	1
123	Abrieb Werkzeug	37.66	1,16e-003	neg.	neg.		neg.	1
124	Abriebe Zange	33.88	1,96e-002	((18/26.2))	neg.		((18))	2
125	Baseballkappe	neg.		neg.	neg.		neg.	1
126	Baseballkappe	32.73	4,54e-002	20 / 26.2	neg.		neg.	4
127	Baseballkappe	34.51	1,25e-002	neg.	neg.		neg.	1
128	Borsten einer elektr. Zahnbürste	33.91	2,03e-001	20/28.2	38.66	3,15e-002	20/(28.2)	1
129	Einweghandschuh Fingerkuppe	31.39	1,20e-001	18/20.2/22.2/28.2	neg.		neg.	4
130	Einweghandschuh Fingerkuppe	32.25	6,43e-002	18/28.2	neg.		neg.	4
131	Handschuh Fingerkuppe	32.56	5,13e-002	(16)/17/(25.2)	neg.		neg.	4
132	Handschuh gelbe Antragung	neg.		neg.	neg.		neg.	1
133	Handschuh Handgelenk	neg.		neg.	neg.		neg.	1
134	Handschuh Handinnenfläche und Handrücken	34.11	1,66e-002	17/27.2/28.2	neg.		neg.	4
135	Leinenhose	32.78	4,37e-002	(16)/26.2/31.2/(32.2)	neg.		neg.	4
136	Papiertaschentuch	20.69	281,18	15/(31.2)	neg.		neg.	4
137	Schlauchenden	35.10	7,48e-003	30.2/31.2	neg.		neg.	4
138	Schraubendreher	33.32	2,95e-002	19	neg.		((19))	1
139	Sportschuh	neg.		neg.	neg.		neg.	1
140	Sportschuh	33.31	2,97e-002	neg.	neg.		neg.	1