

Aus dem Institut für Rechtsmedizin

der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Herr Prof. Dr. med. Matthias Graw

Der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit als Screeningtest in der
forensischen Molekularbiologie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Anna Julia Schlender

aus

München

Jahr 2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstattein: Priv. Doz. Dr. Katja Anslinger

Mitberichterstattein: Prof. Dr. Oliver Gives

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. Katja Anslinger

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2014

1	EINLEITUNG.....	4
1.1	HISTORISCHE ENTWICKLUNG DER FORENSISCHEN MOLEKULARBIOLOGIE.....	4
1.1.1	<i>Southern Blot.....</i>	6
1.1.2	<i>RFLP Technologie.....</i>	6
1.1.3	<i>PCR.....</i>	8
1.2	SPURENSICHERUNG.....	13
1.3	KONTAKTSPUREN	15
1.4	MÖGLICHKEITEN DER DNA QUANTIFIZIERUNG.....	16
1.4.1	<i>Photometrie und Fluorimetrische Photometrie</i>	17
1.4.2	<i>Slot-Blot Methode.....</i>	18
1.4.3	<i>Real-Time PCR.....</i>	18
2	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	23
3	MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	MATERIAL	24
3.1.1	<i>Geräte.....</i>	24
3.1.2	<i>Software.....</i>	24
3.1.3	<i>Chemikalien und Kits</i>	25
3.2	TECHNISCHE AUFARBEITUNG	25
3.2.1	<i>Probenmaterial und Entnahme</i>	25
3.2.2	<i>DNA Extraktion und Reinigung.....</i>	26
3.2.3	<i>DNA-Quantifizierung</i>	31
3.2.4	<i>DNA-Typisierung</i>	43
3.2.5	<i>Qualitätssicherung, Auswertung und biostatistische Beurteilung</i>	50
3.3	STATISTISCHE AUFARBEITUNG	53
3.3.1	<i>Statistische Datensammlung.....</i>	53
3.3.2	<i>Detaillierte Auswertung nach TaqMan</i>	54
3.3.3	<i>Allgemeine Gültigkeit der Aussagen - Signifikanz</i>	54
3.3.4	<i>Technisches zur Bearbeitung:</i>	56
3.3.5	<i>Nachuntersuchung einiger Werte.....</i>	57
4	ERGEBNISSE.....	58
4.1	BETRACHTUNG DER ERGEBNISSE.....	58
4.1.1	<i>Einteilung in „verwertbar“ oder „nicht verwertbar“</i>	58
4.1.2	<i>Deskriptive Auswertung nach TaqMan</i>	60
4.2	BETRACHTUNG DER GRUPPE 1	65
4.3	SIGNIFIKANZ.....	67
4.4	ZUSATZBETRACHTUNG BEI TAQMAN MIN. GLEICH NULL	68
4.5	NACHUNTERSUCHUNG IN GRUPPE 1.....	69
5	DISKUSSION	72
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	81
7	ANHANG	83
7.1	SAS PROGRAMM:	83
7.2	EXCEL FORMEL FÜR SIGNIFIKANZBERECHNUNG:.....	84
7.3	QUELLENVERZEICHNIS.....	85
7.4	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	92
7.5	TABELLENVERZEICHNIS.....	93
7.6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
8	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	96
9	DANKSAGUNG:	97

1 Einleitung

An jedem Tatort hinterlässt der Täter seine Spur. Auf dieser Annahme entwickelte sich in vielen Schritten die forensische Kriminaltechnik. Die Spur ist ein weitreichender Begriff, sie umfasst einen menschlichen Fingerabdruck und reicht bis zum genetischen Fingerabdruck. Durch sorgfältige Aufnahmen aller Spuren hofft man einen Hinweis auf den Täter zu entdecken. Wenige kernhaltige Zellen, enthalten in einer einzelnen Hautschuppe, und damit eine geringe Menge Desoxyribonukleinsäure (DNA) reichen zur Erstellung eines sogenannten Identifizierungsmusters aus. Hierauf basiert die forensische Molekularbiologie. Durch immense Forschung in diesem Gebiet kam es zu einem großen Fortschritt. Das hat zur Folge, dass immer geringere Mengen an DNA ausreichen, um ein Identifizierungsmuster zu erstellen. Während man für den genetischen Fingerabdruck von Jeffreys beschrieben 1-2µg DNA benötigte, reichen heutzutage weniger als 100pg DNA für die Erstellung eines Identifizierungsmusters aus.

Um den enormen Fortschritt der DNA-Analyse zu verstehen, ist hier ein kurzer Abriss der Historie der forensischen Molekularbiologie aufgeführt.

1.1 Historische Entwicklung der forensischen Molekularbiologie

Schon im 19. Jahrhundert beschäftigte sich die Kriminalistik mit der Idee, anhand von Spuren eindeutig auf einen Täter schließen zu können. So beschrieb Sir Francis Galton 1892 die charakteristischen Muster von Fingerabdrücken, die sich bei allen Menschen unterscheiden (Stigler, 1995). Diese Vergleiche waren noch nicht standardisiert und die Ergebnisse noch sehr von dem jeweiligem Betrachter abhängig.

Anfang des 20. Jahrhunderts machte man eine weitere Entdeckung: das AB0-System. Das AB0-System ist ein vererbbarer Polymorphismus. Karl Landstein entdeckte Antikörper auf den Erythrozyten und diese Antikörper, oder auch Polymorphismen, sind mit dem Agglutinations-Test nachweisbar. Die Vererbung dieser Polymorphismen verlaufen nach den Mendelschen Gesetzen. Man hat Genprodukte, die verglichen werden können und muss nicht mehr auf die subjektive Betrachtung von Fingerabdrücken zurückgreifen. Dieses Prinzip kann man auch bei einer Abstammungsuntersuchung anwenden, indem hier die als Väter infrage kommenden Männer ein oder ausgeschlossen werden können. Dieser Fortschritt in der Wissenschaft führte dazu, dass man nach immer mehr Proteinpolymorphismen suchte und viele davon beschrieb. Mit Hilfe der unterschiedlichen Epitopen für die verschiedenen Proteinpolymorphismen versuchte man Spuren eindeutig

Personen zuzuordnen. Die Untersuchung mit Hilfe der Epitope ist stark abhängig vom Zustand der Probe. Das biologische Material kann schnell degradieren und die erfolgreiche Untersuchung hängt stark von der Lagerung und dem Alter, also der Qualität einer Probe, ab.

1953 wurde von Watson und Crick der Aufbau von DNA auf molekularer Ebene beschrieben und man begann sich mehr und mehr mit dem Träger der Erbinformation zu beschäftigen. Mitte der 80er Jahre beschäftigte man sich nicht mit den Unterschieden der Genprodukte, sondern den Unterschieden der Gene, also auf DNA-Ebene.

Unsere Erbinformation ist in der DNA gespeichert. Sie ist der genetische Code. Jeweils eine Gruppe von drei Basen (Basentriplet) codiert eine Aminosäure. Im Jahr 2001 wurde die gesamte Sequenz der menschlichen DNA erstmals durch die Human Genom Organisation veröffentlicht. Seit 2003 gilt das menschliche Genom zu 99,9% als entschlüsselt, das bedeutet man kennt die genaue Abfolge der Basen, aber noch nicht die Funktion von allen Bereichen (Lander et al., 2001). Das menschliche Genom besteht aus 3,3 Milliarden Basenpaaren, aber nur ein kleiner Teil davon, circa 2%, sind codierende Bereiche. Das bedeutet, nur die Information aus diesen zwei Prozent können in ein Genprodukt, etwa ein Protein, umgesetzt werden. Die gesamte Information die nötig ist, um ein Protein zu bauen, wird Gen genannt. Ein Gen besteht aus Exons und Introns. Während die Exons den Bauplan des Genprodukts enthalten, sind Introns zwischengeschaltete, nicht codierende Bereiche. Ein Mensch besitzt circa 30.000 bis 40.000 dieser Gene.

Von diesen 3,3 Milliarden Basenpaaren sind bei allen Menschen 99,9 % identisch. Es bleiben noch ca. 3 Millionen Basenpaare übrig, durch die sich die einzelnen Menschen unterscheiden. Diese Unterschiede sind für die Forensik wichtig, um eine Spur einer bestimmten Person zuzuordnen. Unterschiede können durch Mutationen entstehen. Mutationen sind Veränderungen in der Basenabfolge. Das reicht vom Austausch einzelner Basen über das Wegfallen bis zum Hinzufügen von einzelnen oder mehreren Basen. Entstehen kann diese Mutation durch fehlerhafte Vervielfältigung beziehungsweise fehlende Reparaturmechanismen. Dies kann sowohl in codierenden Bereichen, als auch in nicht codierenden Bereichen der DNA auftreten. Im codierten Bereich kann es zu einer Veränderung des Genprodukts kommen, allerdings nicht zwingend. Diese Veränderung kann negativ sein und zu einer Erbkrankheit führen oder auch positiv die Grundlage der Evolution bilden. Auf der Untersuchung dieser Unterschiede der DNA basiert die weitere Forschung in der Spurenuntersuchung. Da die DNA als Untersuchungsmaterial im Vergleich zu den Protein und Enzym polymorphismen wesentlich robuster ist, degradiert sie nicht so schnell und ist für forensische Zwecke als Spur besser geeignet.

1.1.1 Southern Blot

1975 beschrieb Southern eine Methode mit der man bestimmte DNA Abschnitte markieren konnte, der Southern Blot (Southern, 1975). Hierbei können ausgewählte DNA Abschnitte aus einem Gengemisch mit Hilfe von Gelelektrophorese und markierten Gensonden sichtbar gemacht werden. Dazu wird vorab mittels Restriktionsenzymen die gesamte DNA in Bruchstücke zerschnitten und diese mit Hilfe der Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die Doppelstränge der DNA werden gespalten und auf einer bestimmten Membran dauerhaft fixiert. Mit Hybridisierungssonden, meist radioaktiv oder chemisch markierte einzelsträngige DNA-Sonden, die komplementär zur gesuchten DNA sind, kann der bestimmte DNA Abschnitt sichtbar gemacht werden. Nun kann man feststellen, ob ein Mensch ein Träger eines bestimmten DNA-Abschnitts ist oder nicht. Dies wurde dann vor allem in der Humangenetik genutzt, um zu erkennen, ob Menschen Träger einer bestimmten Krankheit sind, auch wenn sie noch nicht ausgebrochen ist, wie zum Beispiel Morbus Huntington. Hierfür wird eine große Menge an DNA benötigt um eindeutige Ergebnisse erhalten zu können.

1.1.2 RFLP Technologie

Im forensischen Bereich entwickelte man darauf basierend die sogenannte Restriktions-Fragment- Längen-Polymorphie Technologie (RFLP) (Jeffreys et al., 1985b). Sir Alec Jeffreys beschrieb 1985 den „genetischen Fingerabdruck“ (Gill et al., 1985; Jeffreys et al., 1985 a). Er stellte heraus, dass man die DNA mittels Enzymen an definierten Stellen spalten kann. Diese Schnittstellen variieren bei jedem Individuum. Durch Auftrennung der DNA erhält man Muster, die bei jedem Individuum einzigartig und unterschiedlich sind. Hierfür verwendete er den Namen "genetischen Fingerabdruck". Grundlage sind unter anderem die Längenpolymorphismen oder Mutationen an den Schnittstellen. Man legt sein Augenmerk auf nicht codierende Abschnitte der DNA. Von großer Bedeutung sind Bereiche mit Wiederholungen von Basenabfolgen. Diese Basenabfolgen können unterschiedlich lang sein und unterschiedlich oft wiederholt werden. Bei jedem Menschen kann eine andere Anzahl von Wiederholungen vorliegen. Man spricht von Allelen, welche im Laufe der Evolution durch Mutation entstanden sind. Hier liegt eine Einteilung in Satelliten-DNA und „variable number of tandem repeats“ (VNTRs) vor. Bei Satelliten-DNA handelt es sich um Sequenzen zwischen 5 Basenpaaren (bp) und 171bp. Diese können so oft wiederholt werden, dass die

Gesamtlänge des Bereiches zwischen 100 Kilobasenpaaren bis zu einigen Megabasenpaaren betragen kann. Zur Spurenanalyse sind Satelliten-DNAs nicht geeignet, da die Bereiche viel zu groß sind. Im Gegensatz dazu sind VNTRs wesentlich kürzer. Ihre Wiederholungssequenz umfasst maximal 15bp und zusätzlich werden diese nur um die 50 mal wiederholt. Diese Bereiche sind hoch variabel und so wesentlich besser zur Spurenanalyse geeignet.

Für die enzymatische Spaltung verwendet man Restriktionsendonukleasen aus Bakterien. Diese spalten die DNA immer an denselben, spezifischen Stellen (an bestimmten Basenabfolgen). Dabei entstehen bei jedem Individuum unterschiedlich lange DNA-Bruchstücke abhängig von gegebenenfalls den zwischen den Schnittstellen liegenden unterschiedlichen VNTRs. Durch die Fragmentation entstehen sehr viele unterschiedliche Stücke, die mittels Sonden nach Auftrennung in der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden können. Das Ergebnis wird demnach Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus genannt.

Auch hier gab es unterschiedliche Entwicklungsstufen. Für die ersten Systeme wurden Multi-Locus-Sonden (MLS) benutzt. Diese Sonde erkennt Sequenzen, die aus 1.000bp bis 20.000bp bestehen. Die Sequenzen bestehen aus bis zu tausendmal wiederholten Motiven, während die Motive bis zu 100bp umfassen können. Die Sonden sind relativ unspezifisch und binden an mehrere unterschiedliche VNTRs. Mit Hilfe der MLS erhält man ein komplexes und hochspezifisches DNA Profil, so dass man gegebenenfalls eine Spur wesentlich eindeutiger einer einzigen Person zuordnen kann. Das ist ein enormer Fortschritt in der Forensik gewesen. Aber es gibt einige Nachteile der MLS. Man benötigt große Mengen an DNA und vor allem hochmolekulare DNA, da die Sonden eine gewisse Größe haben. Die DNA der Spuren ist jedoch oft durch Feuchtigkeit oder Bakterien schon geschädigt und somit kann gegebenenfalls kein Profil erstellt werden. Ist zu wenig DNA in einer Probe enthalten, kann dies auf die Aussagekraft der Banden einen Einfluss haben, zum Beispiel könne einige Banden bei zu wenig DNA verloren gehen. Ein weiterer nachteiliger Aspekt ist, dass eine Überlagerung von verschiedenen DNAs eine Interpretation kaum möglich macht, dies aber bei Tatortspuren sehr häufig auftritt.

Da die MLS statistisch kaum zu beurteilen sind, haben sich nach einiger Zeit Singel-Locus-Sonden (SLS) durchgesetzt. Dabei ähnelt der Aufbau der Sonden dem der MLS, aber es wird nur noch ein repetitiver Bereich an einem bestimmten Locus erkannt (Jeffrey et al., 1988; Wong et al., 1986). Das Bandenmuster beschränkt sich nun auf maximal zwei Banden, je nachdem, ob das Allel homo- oder heterozygot vorliegt, und wird dadurch besser interpretierbar. Im Vergleich zu Enzym und Proteinpolymorphismen hat die DNA als

Untersuchungsmaterial viele Vorteile, da sie durch ihren Aufbau weniger schnell degradiert. Für die Forensik ist diese Untersuchungsmethode noch nicht optimal, da immer noch relativ große Mengen an hochmolekularer DNA benötigt werden, die in Spurenmaterial oft nicht zur Verfügung stehen. Zusätzlich können Probleme bei der Auftrennung auftreten, wodurch das Ergebnis nicht sicher beurteilt werden kann.

1.1.3 PCR

Ein weiterer Fortschritt ist die Erfindung der Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) 1986 durch Mullis gewesen. Hiermit können bestimmte DNA Abschnitte kopiert und vervielfältigt werden. Man benötigt nun keine Restriktionsenzyme mehr, die an bestimmten Stellen schneiden, sondern der gesuchte DNA-Abschnitt wird mit Hilfe der PCR vervielfältigt. Jetzt können auch sehr kleine Mengen untersucht werden und durch die Vermehrung einer gewünschten DNA-Sequenz erhöht man die Sensitivität (Kimpton et al., 1996). Durch die Suche nach möglichst kurzen PCR Produkten kann man auch bei degradierter DNA Ergebnisse erhalten (Butler et al., 2003). Außerdem macht man eine simultane Amplifikation von mehreren Loci, dies wird dann Multiplex PCR genannt. Hiermit spart man DNA gegenüber mehreren Einzelreaktionen (Skolnick und Wallace, 1988).

Heutzutage untersucht man vor allem Längenpolymorphismen, die aus DNA-Blöcken aus zwei bis fünf/sieben Basen bestehen. Die Anzahl der Wiederholungen eines Blocks variiert von Individuum zu Individuum, aber nicht innerhalb eines Individuums. Dort ist sie in allen Zellen identisch. Diese besondere Art der Längenpolymorphismen wird Short Tandem Repeats (STR) genannt.

Die VNTRs werden nochmals in Minisatelliten und Mikrosatelliten (auch STRs genannt) unterteilt. Minisatelliten besitzen eine Länge von 10-100bp, die theoretisch bis tausendmal wiederholt werden können. Die Lokalisation im Chromosom ist im Telomorbereich.

Ist der Repeat zwischen 1 bis 7bp lang, spricht man von Mikrosatellit oder auch Short Tandem-Repeat. STRs weisen eine maximale Repeat-Häufigkeit von 100 auf. Schon 1989 beschrieb Tautz das Vorkommen von kurzen repetitiven Einheiten in der DNA, die in Ihrer Länge variieren (Tautz 1989; Weber und May, 1989). Als STRs wurden diese Bereiche dann 1991 von Edwards beschrieben (Edwards et al., 1991). Bald darauf wurde von Kimpton 1993 der Gebrauch von STRs in der Forensik aufgezeigt, um einzelne Individuen sicher voneinander zu unterscheiden. Dieses Prinzip wurde nun immer weiter verfolgt und etablierte sich in der molekularbiologischen Forensik als Methode der ersten Wahl, um

Identifizierungsmuster zu erstellen. Es stellte sich als zuverlässig, robust und für forensische Zwecke gut brauchbar heraus (Andersen et al., 1996). Bis heute hat man dieses Prinzip weiterentwickelt und schon 2001 hatte man über eine Million beschriebene STR-Marker (Lander et al., 2001). Diese unterscheiden sich in ihrer Güte. Als besonders für forensische Zwecke geeignet Marker werden diese erachtet, die eine hohe Diskriminierungskraft haben. Das bedeutet, sie besitzen möglichst viele verschiedene Merkmale, die in der Bevölkerung möglichst gleich verteilt vorliegen. Außerdem werden Marker mit einem kurzen Amplifikat verwendet, um auch degradierte DNA zu erfassen. Um eine internationale Vergleichbarkeit der Daten zu ermöglichen wurde schnell klar, dass man international zusammen arbeiten muss (Martin et al., 2001). Die schon 1988 gegründete European DNA Profiling Group entwickelte eine internationale, vereinheitlichte Untersuchungsstrategie (Gill et al., 1994). So arbeitete man auch an einer Vereinheitlichung der Nomenklatur (Gill et al., 1997, Tully G. et al., 2001). Heute finden hauptsächlich STRs Verwendung, die aus vier Basen (Tetranukleotid- Repeats) bestehen. Alle liegen im nicht codierenden Bereich der DNA. Für die Erstellung eines Identifizierungsmusters wurden in Deutschland standardmäßig im Jahr 1998 fünf Marker, 2001 acht Marker, dann 11 Marker und ab 2011 16 Marker untersucht. Für unsere Versuche wurden folgende acht Marker verwendet: D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA (FIBRA), SE33 (ACTBP2), TH01 (TC11) und vWA.

Am Beispiel von dem Marker TH01 (TC11) wird der Aufbau der STRs nun exemplarisch erklärt (Abbildung 1). Der STR Marker TH01 ist auf Chromosom 11p15-15,5 lokalisiert. Die vorkommende repetitive Einheit ist das Tetranukleotid TCAT (Günther und Patzelt, 1996). Die Anzahl der Wiederholungen des Tetranukleotids wird Merkmal oder Allel bezeichnet. In der europäischen Population findet man für TH01 zwischen fünf und maximal zehn Repeats. Bei den Wiederholungen kann es auch zu einem inkompletten Repeat kommen, hier zum Beispiel bei dem Allel 9.3. Jedes Allel liegt in einer normalen menschlichen Zelle immer doppelt vor und man spricht von einem diploiden Chromosomensatz. Man unterscheidet einen homozygot Genotypen, das bedeutet beide vorkommende Allele sind identisch, oder einen heterozygot Genotypen, das bedeutet die beiden Allele sind nicht identisch.

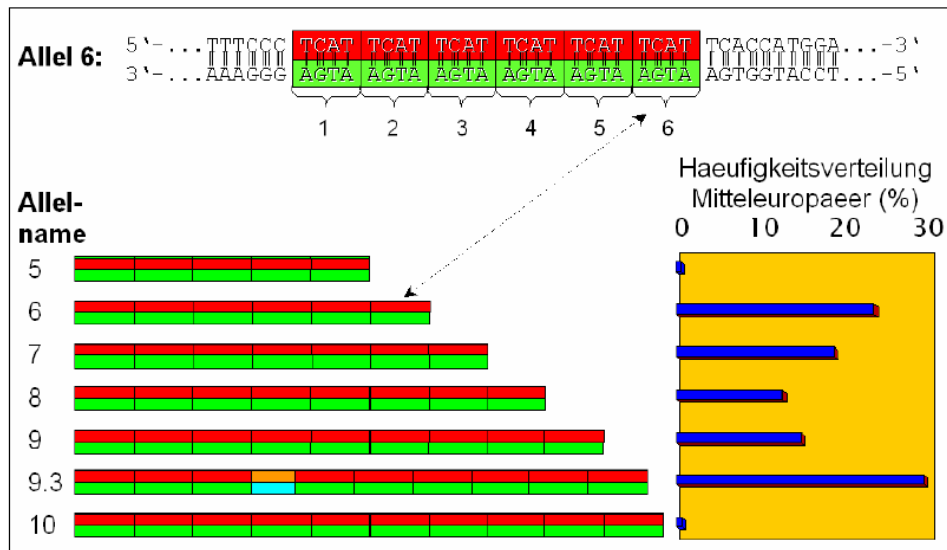


Abbildung 1: Beispielhafter Aufbau eines STR Locus: Am Beispiel TH01 zeigt sich die Wiederholung des Tetranukleotids, die unterschiedlichen Allele werden aufgezeigt und die Häufigkeitsverteilung in Mitteleuropa. Eine Besonderheit ist Allel 9,3, hier liegt ein inkomplettes Motiv in dem Allel 9

In Tabelle 1 werden die Eigenschaften der acht verwendeten STR Marker zusammengefasst.

STR	Lage	Tetranukleotid	Allel
TH01 (TC11)	Chromosom 11p15-5,5	TCAT	5-10
D18S51	Chromosom 18q21,3	GAAA	10-23
D3S1358	Chromosom 3p	TCTA	13-19
D8S1179	Chromosom 8	TATC	8-18
D21S11	Chromosom 21	TCTA	27-34,2
		TCTG	
FGA (FIBRA)	Chromosom 4q28	CTTT	18-28
SE33(ACTBP2)	Chromosom 5pter-5qter	AAAG	13-34
vWA (vWF)	Chromosom 12p12	TCTA	14-21

Tabelle 1: Zusammenfassung der verwendeten STRs: Die chromosomalen Lokalisation, hier als Lage bezeichnet, die jeweilige repetitiven Einheit des Tetranukleotids und dem Allel. Das Allel entspricht den möglichen vorliegenden Wiederholungen

Mit Hilfe dieser STR Systeme kann man eine Spur eindeutig einer Person zuordnen. Um die Aussagekraft einer Übereinstimmung zu bewerten, erfolgt eine biostatistische Beurteilung. Jedes Allel tritt mit einer bestimmten Häufigkeit in einer Bevölkerungsgruppe auf. Diese wird durch Populations-Studien an diversen Stichproben ermittelt und entspricht häufig der

Gaußschen' Verteilung. In Abbildung 2 sieht man die Häufigkeitsverteilung der Allele des STR Systems D3S1358 in Mitteleuropa. Hier treten die Allele in der Mitte häufiger auf als die Grenzwerte. Heute liegen für alle forensisch relevanten STR's ausreichend große Populationsstudien für zahlreiche Populationen weltweit vor (Welch et al., 2012). Auf diese Daten kann für die Berechnung der Genotyphäufigkeiten zurückgegriffen werden.

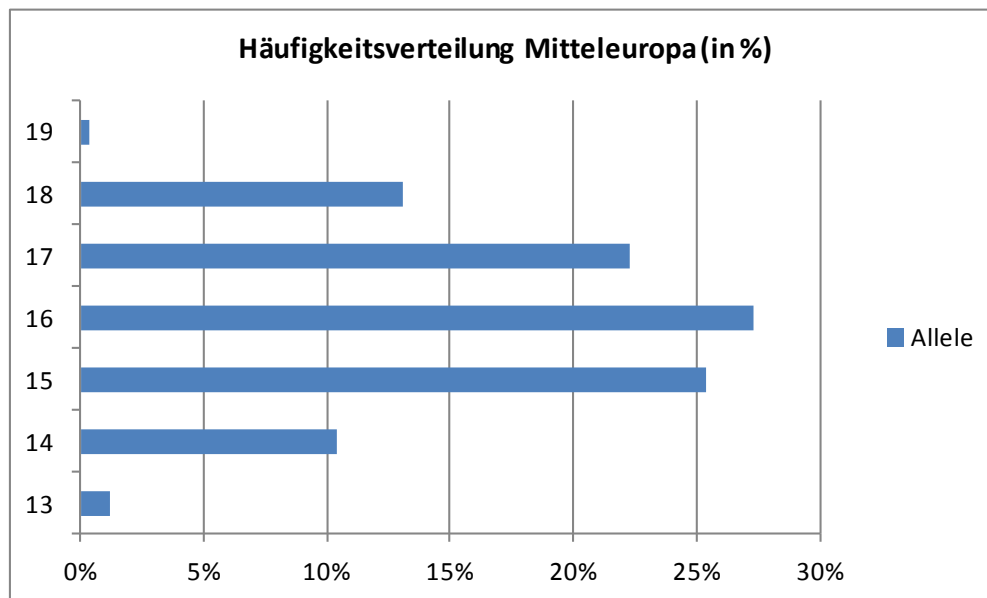


Abbildung 2: Frequenzhäufigkeit der Allele 13,14,15,16,17,18,19 am Beispiel des STR- Markers D3S1358 für Mitteleuropäer

Die Mathematiker Hardy und Weinberg konnten beweisen, dass die Häufigkeit eines Merkmals in einer Population unter den Bedingungen, dass eine Population sehr groß ist, die Individuen sich uneingeschränkt paaren können und es keine Selektion auf Grund einer Genveränderung gibt, über die Zeit konstant bleibt. Das bedeutet, dass die erfassten Häufigkeiten über einen langen Zeitraum in einer Population gleich bleiben und so für Berechnungen herangezogen werden können. Für eine Bevölkerung kann folgende Formel aufgestellt werden:

$$1 = a^2 + 2ab + b^2$$

Hierbei ist a oder b die Häufigkeit des Auftretens des Allels A oder B in der Bevölkerung. Für einen Genotyp, ist er heterozygot (TYP AB), gilt die Häufigkeit 2ab. Für einen homozygoten Genotyp (TYP AA) gilt die Häufigkeit a^2 . Um die Häufigkeit des gesamten Identifizierungsmusters zu erhalten, kann man die einzelnen Genotyphäufigkeiten (GH)

multiplizieren, da die einzelnen Loci unabhängig voneinander vererbt werden, sie liegen auf unterschiedlichen Chromosomen (Mayo O., 2008). Bei den hier verwendeten acht Systemen folgt:

$$\text{Person } X = GH\ D3S1358 \times GH\ D8S1179 \times GH\ D18S51 \times GH\ D21S11 \times GH\ FGA \times GH\ SE33 \\ \times GH\ TH01 \times GH\ vWA$$

Hier folgt noch eine Verdeutlichung anhand eines Beispiels mit fünf unabhängigen Systemen (Tabelle 2):

STR	Alleltyp	Frequenzhäufigkeiten	Genotyphäufigkeiten
D8S1132	18/18	$H(18/18)=0,015^2$	0,000225
SE33	15/22	$H(15/22)=2 \times 0,04 \times 0,009$	0,00072
TH01	9/10	$H(9/10)=2 \times 0,02 \times 0,002$	0,00008
FGA	23/24	$H(23/24)=2 \times 0,015 \times 0,013$	0,00039
VWA	16/16	$H(16/16)=0,18^2$	0,0324
Gesamthäufigkeit			0,00000000000000016

Tabelle 2: Beispiel der Genotyphäufigkeiten und der Häufigkeit des Identifizierungsmuster mit fünf Systemen

Somit werden die Häufigkeiten sehr klein. Würde man von einer Genotyphäufigkeit von 2% in jedem STR System ausgehen, ist die Frequenz des Identifizierungsmusters bei den hier verwendeten acht Systemen insgesamt $0,02^8 = 2,56 \times 10^{-14}$. Mittlerweile werden noch mehr Systeme zum Erstellen eines Identifizierungsmusters routinemäßig untersucht. Die Häufigkeit des Auftretens eines Identifizierungsmusters liegt in jedem Fall weit unter 1 zu einer Billion. Bei einer Erdbevölkerung von ca. 7 Milliarden, kann man somit davon ausgehen, dass ein erstelltes Profil „einzigartig“ ist. Die einzige Ausnahme bilden hier eineiige Zwillinge. Eineiige Zwillinge unterscheiden sich nur sehr gering durch einzelne Basenpaaraustausche in ihrer genetischen Information. Diese Bereiche werden in der Regel nicht von den STR Systemen erfasst.

Zum Zeitpunkt der Arbeit wurden acht STRs, basierend auf den derzeitigen Daten der Deutschen DNA Analyse Datei (DAD), untersucht. Mittlerweile sind deutschlandweit routinemäßig 16 STRs vorgeschrieben.

Die DAD wurde 1998 beim Bundeskriminalamt gegründet, nachdem es zur Gesetzesänderung kam, DNA Analysen als strafprozessuale Maßnahme möglich wurden

und eine Speicherung von personenbezogenen Daten in Form von Identifizierungsmustern erlaubt wurde (§ 81 StPO). In der DAD werden Datensätze von bislang nicht zugeordneten Tatortspuren und von Personen gespeichert. Zu diesen Personen zählen Verurteilte und Beschuldigte, die wegen einer Straftat mit erheblicher Bedeutung, mehreren Straftaten, die in ihrer Summe schwerwiegend sind oder wegen Straftaten gegen die sexuelle Selbstbestimmung überführt sind oder bereits verurteilt wurden. Grundsätzlich können alle tatrelevanten Spuren, die bislang keiner Person zuzuordnen waren, auf Veranlassung der ermittelnden Beamten unter dem Vorbehalt einer richterlichen Anordnung in der DAD gespeichert werden. Im ersten Quartal 2014 umfasst die DAD einen Bestand von 1.058.270 Datensätzen, aufgeteilt in 811.030 Personendaten und 247.240 Spurendatensätze. Monatlich werden ca. 8.500 Datensätze eingegeben. Seit Beginn der DAD kam es zu 171.619 Treffern (Stand vom 31.03.2014). Mit Treffern beschreibt man die Tatsache, dass ein Profil, das neu in DAD eingegeben wird, mit einem schon vorhandenen Profil übereinstimmt. Man unterscheidet 35.435 Spur-Spur-Treffer und 136.184 Spur-Person-Treffer. Im Idealfall bedeutet das, dass mit Hilfe der DAD eine Straftat geklärt werden kann oder zumindest Zusammenhänge zwischen verschiedenen Taten oder Tatorten erstellt werden können. Im Bereich der Diebstähle kam es zahlenmäßig zu den meisten Treffern. Hier gab es 106.679 Spur-Person-Treffer, das entspricht 78,3% der Spur-Person-Treffer.

1.2 Spurensicherung

Die oben dargestellte historische Entwicklung in der forensischen Molekularbiologie zeigt deutlich, dass durch den Fortschritt immer kleinere Spuren verwendet werden können und immer weniger DNA ausreicht, um ein Identifizierungsmuster zu erstellen. Folglich finden sich an einem Tatort immer mehr Spuren, die als potentiell Untersuchungsmaterial in Frage kommen. Dies führt zu einer Flut von Proben. Im Gegenzug kommt es zu steigenden Personal- und Sachkosten. Allerdings enthält nicht jede asservierte Spur automatisch DNA und somit führt nicht jede Spur automatisch zu einem verwertbaren Ergebnis. Am Tatort kann man nicht sicher sagen, welche Spur genügend DNA enthält und welche nicht. Früher beschränkte man sich auf Blut, Speichel und Sperma- Spuren, da diese genügend DNA für die damaligen Testverfahren enthielten. Heutzutage reichen schon Hautschuppen aus, um ein DNA-Profil erstellen zu können. Diese geringe Menge an DNA könnte in jeder Antragung enthalten sein. Um sicher keine Spur zu übersehen, wird eine große Menge an Proben eingesammelt. Hier ist eine Optimierung notwendig, um einen kosteneffizienten und effektiven Ablauf zu gewährleisten. Diese Optimierungsmaßnahmen werden unten dargestellt.

Der Arbeitsprozess beginnt bei der Materialgewinnung. An jedem Tatort werden möglichst alle tatrelevanten Spuren, die DNA enthalten könnten, aufgesammelt. Gründliche und überlegte Spurensicherung ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche Analyse. Bond (Bond et al. 2008) stellte in seiner Studie fest, dass schon die Polizei eine wichtige Rolle bei der Probengewinnung übernimmt. Sie treffen eine Vorauswahl bei den Spuren. Somit ist die Erfahrung und Ausbildung der am Tatort befindlichen Polizisten Ausschlag gebend dafür, nicht nur Spuren mit viel DNA zu finden, sondern vor allem die Spur eines Täters zu entdecken.

Ein Problem bei der Probennahme besteht darin, dass Kontaktsuren meist mit dem bloßen Auge nicht sichtbar sind. Das bedeutet, die Spurensicherung muss sich überlegen, wo eine Spur sein könnte, um sie quasi „auf Verdacht“ zu asservieren. Es ergab sich die Notwendigkeit spezifischer kriminaltechnischer Methoden, um Spuren, die DNA enthalten können, sichtbar zu machen. Hier werden drei gängige Voruntersuchungstests beschrieben. So wird etwa Ninhydrin verwendet, um biologisches Material sichtbar zu machen. Anslinger et al. zeigt, dass Ninhydrin auf Grund seiner Bindungseigenschaften an Aminosäuren als Screeningmethode für biologisches Material verwendet werden kann. In 96% der Fälle war in Proben, die auf Ninhydrin reagiert haben, auch DNA enthalten, während nur in 9 % der Fälle in Proben, die Ninhydrin-negativ waren, DNA gefunden wurde. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem DNA Gehalt einer Probe und der Intensivität der Färbung mit Ninhydrin festgestellt werden. Als Schlussfolgerung kann diese Screeningmethode zur Voruntersuchung verwendet werden, allerdings sollten in sehr schweren Verbrechensfällen ggf. alle Spuren untersucht werden (Anslinger et al., 2004). Ninhydrin bindet an Aminosäuren und zeigt an, wenn Proteine in einer Probe enthalten sind. Das bedeutet aber nicht, dass humane DNA in der Probe enthalten ist. Weiterhin wird Licht in bestimmten Wellenlängen verwendet, etwa Superlite 400 der Lumatec GmbH, um latente Spuren sichtbar zu machen (Vogel, 2008). Bei weiterer Forschung fand man unterschiedliche Stoffe, die mit Hilfe des Lichts bei Vorhandensein von DNA zur Fluoreszenz gebracht werden. Schulz et al. veröffentlichte 2011 eine Studie zu 5-Methylthioninhydrin (5-MTN). In Zusammenhang mit Zinkchlorid entsteht eine starke Färbung, die fluoresziert. Es zeigt sich eine starke Verbesserung der Sichtbarkeit der Proben und es können wesentlich mehr Spuren entdeckt werden. Außerdem kann kein Einfluss auf die spätere Amplifizierung festgestellt werden (Schulz et al. 2011). Der Fortschritt an dieser Methode ist, dass in der Probe mit hoher Wahrscheinlichkeit DNA vorliegt, aber leider bedeutet das nicht, dass humane DNA in dieser Probe vorhanden ist. Es kann auch DNA vom Tier oder anderen Lebewesen vorliegen.

1.3 Kontaktsuren

Der Mensch hinterlässt immer wieder Hautschuppen, Haare oder Spuren von Speichel, zum Beispiel an Kaugummis oder Zigaretten. Das Ziel der Spurensicherung ist es, dieses Material zu asservieren. Durch Kontakt mit einem Gegenstand können Hautschüppchen übertragen werden. Wickenheiser et al. befasste sich 2002 mit der Theorie von „good shedder“ und „bad shedder“, um eine Erklärung für die unterschiedlichen Mengen an DNA, die von verschiedenen Personen auf einem Gegenstand übertragen werden, zu erklären. Durch Kontakt mit einem Gegenstand wird DNA auf diesem Gegenstand hinterlassen. Wie viel DNA übertragen wird, hängt zum Beispiel von der Länge der Berührung sowie der Oberfläche des Gegenstands ab (Wickenheiser, 2002). Neben diesen Gründen scheint es aber auch individuelle Eigenschaften zu geben, die noch nicht geklärt sind und die dazu führen, dass manche Personen besser Zellen abgeben als andere. Diese Personen werden als „good shedder“ bezeichnet (Wickenheiser, 2002).

Auch Lowe et al. beschäftigte sich mit diesem Thema und stellte in seiner Studie fest, dass die Übertragung von „bad shedder“ gesteigert werden kann, wenn sich die Personen für einen Zeitraum von 6h nicht die Hände waschen, während „good shedder“ schon kurz nach dem Händewaschen genügend DNA übertragen können. Gründe hierfür sind immer noch ungeklärt. Zusätzlich zeigte diese Studie, dass eine Zweitübertragung möglich ist: das bedeutet von einer Hand auf die nächste und auf einen Gegenstand. Unter idealen Laborbedingungen könnte hier sogar ein Profil einer Person erstellt werden, die den Gegenstand nicht berührt hat. Man spricht hier von Sekundärtransfer. Unter normalen Tatortbedingungen nimmt dies jedoch keine so große Relevanz ein, da es in der Regel zu Mischspuren kommt (Lowe et al., 2002). In seiner Versuchsreihe zum Transfer der DNA von Händen an Gegenstände, um Ursachen für „good shedder“ und „bad shedder“ zu erfahren, stellte Phipps et al. fest, dass diese Begriffe heutzutage überholt sind. In dieser neueren Studie zeigte sich, dass man davon ausgehen kann, dass man Personen nicht einfach in „good“ oder „bad shedder“ unterteilen kann, sondern dass eine Vielzahl von Faktoren Einfluss auf den Transfer von DNA hat. Die Einteilung von „good shedder“ und „bad shedder“ ist wesentlich komplizierter. Falls man von der Annahme „good shedder“ ausgeht, wird dies vermutlich meist von Umweltfaktoren überlagert und trifft wahrscheinlich nur auf wenige Individuen zu. Als wichtiger Einflussfaktor für den DNA Transfer wird von Lowe et al., das Händewaschen identifiziert, da sich, je länger der Proband die Hände nicht gewaschen hat, mehr DNA übertragen ließ. Es zeigt sich ebenfalls ein Zusammenhang mit der dominanten Hand, dass bedeutet, dass Personen mehr DNA von der rechten Hand abgeben, wenn sie Rechtshänder sind. Ursache hierfür ist vermutlich eine mechanische Abreibung. Wie auch bei Wickenheiser et al. vermutet, zeigte sich in der Studie, dass ein Sekundärtransfer

möglich aber sehr selten ist (Phipps und Petricevic, 2007). Kamphausen et al. nimmt an, dass die Menge und Qualität der DNA in einer Probe auch mit der Beschaffenheit der Haut zusammenhängen kann. Er hat in seiner Studie Hautproben untersucht, die von Menschen mit Hautkrankheiten stammen. Es wurde weiterhin unterschieden, ob die Hautkrankheit therapiert wurde oder nicht. Bei der Messung des DNA Gehalts in den Proben zeigt sich, dass Probanden mit chronischen Hautkrankheiten mehr Zellen verlieren und so mehr übertragen werden kann. In Europa sind bis zu 7% der Erwachsenen an diesen Hautkrankheiten erkrankt. Somit könnte das auch eine Erklärung für die unterschiedliche Quantität der DNA in unterschiedlichen Spuren sein (Kamphausen et al., 2012).

Dies zeigt, dass viele Faktoren einen Einfluss auf die Antragung von DNA haben können. Hinzu kommt, dass die Spur weiter unter Umwelteinflüssen steht, bevor sie asserviert wird und so gegebenenfalls die DNA weiter degradiert wird. Hierdurch wird die Qualität einer Spur stark beeinflusst und dies hat alles Auswirkungen darauf, ob man aus dem vorhandenem Material ein Profil erstellen kann oder nicht (Bond und Hammond, 2008).

1.4 Möglichkeiten der DNA Quantifizierung

Eine Vielzahl von am Tatort gewonnener Proben wird dem Labor zur Untersuchung übersandt. Man will wissen welche Probe genügend DNA in ausreichender Qualität enthält. Das Problem ist, dass einige Proben keine DNA enthalten oder nicht genügend, um ein Identitätsprofil zu erstellen. Ist es möglich, diese vorab, das heißt vor dem kostenintensiven Schritt der Profilerstellung, auszusortieren? Auch um ein optimales Amplifizieren der DNA gewährleisten zu können, muss man Informationen über die Probe in Erfahrung bringen. Ist die Probe optimal gereinigt und sind keine Hemmstoffe mehr enthalten? Ist die DNA von guter Qualität oder schon zu stark degradiert? Wie viel DNA enthält die Probe?

Vor der Amplifizierung wird die Probe also einer Quantifizierung unterzogen. In der forensischen Medizin ist diese Voruntersuchung der Proben nötig, um besser Aussagen über die Proben machen zu können und so bessere Ergebnisse bei der Amplifizierung zu erhalten. Da in forensischen Proben die in die nachfolgenden Untersuchungen eingesetzte DNA Menge entscheidend für das Ergebnis der Profilerstellung ist, hat man sich daher immer wieder mit der Quantifizierung der DNA beschäftigt. Über die Zeit entwickelten sich unterschiedlichste Methoden, von denen hier ein kurzer Abriss aufgezeigt wird.

1.4.1 Photometrie und Fluormetrische Photometrie

Bei der Photometrie wird die Fähigkeit der DNA, ultraviolettes Licht zu absorbieren, genutzt. Hierbei wird die DNA nicht verändert oder zerstört sondern mit UV-Licht bestrahlt und die Absorption gemessen. Dabei weiß man, dass die Purin- und Pyrimidinbasen Licht absorbieren, die Pentosephosphatgruppe hingegen nicht. Eine Extinktionsrate von 1 bei einer Wellenlänge von 260nm entspricht ca. einer DNA Konzentration von 50pg/µl. Je mehr DNA in einer Probe ist, desto mehr Licht wird absorbiert. Mit Hilfe dieser Information kann man den DNA Gehalt in der Probe berechnen. Eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen, Phenol oder anderem Material kann ebenfalls überprüft werden. Um diese Verunreinigung zu erkennen, misst man die Probe noch bei einer Wellenlänge von 280nm, dem Maximum der Absorption von Proteinen. Der Quotient dieser beiden Werte sollte optimaler Weise größer als 1,8 sein. Liegt dieser Wert vor, geht man davon aus, dass die Probe nicht verunreinigt ist. Diese Methode ist sehr schnell und hat geringe Kosten.

Nachteile der Photometrie sind, dass durch Bakterien oder Pilze verunreinigte DNA nicht bestimmt werden kann, da das Gemisch sehr trübe ist, und es kann dann keine Absorption gemessen werden. Ein weiterer Nachteil ist, dass die hier gemessene DNA nicht nur humane DNA umfasst. Da aber Proben mit DNA von anderen Lebewesen verunreinigt sein können, ist eine Aussage über den humanen DNA Gehalt nicht zwingend zu treffen. Für die Photometrie benötigt man große Mengen, die bei forensischen Proben oft nicht vorliegen. Dazu kommt noch, dass eine Verunreinigung mit Hemmstoffen sowie eine Degradierung der DNA nicht festgestellt werden kann. Zusätzlich muss die untersuchte Probe verworfen werden. Auf Grund einer möglichen Kontamination während des Versuches ist die Probe für eine weitere DNA-Analyse nicht brauchbar. So verliert man Untersuchungsmaterial, welches bei der Forensik nur in sehr geringem Masse zur Verfügung steht. Heutzutage wird die Photometrie in der Forensik in der Regel nicht mehr verwendet.

Die Quantifizierung durch Photometrie entwickelte sich weiter, indem man fluoreszierende Farbstoffe hinzufügt, die fluormetrische Photometrie. Diese Farbstoffe, zum Beispiel 4',6'-Diamindine-2-Phenylindole (DAPI) oder Picogreen, heften sich an die DNA und mit Hilfe von Licht einer bestimmten Wellenlänge leuchten sie. Je mehr DNA in einer Probe enthalten ist, desto stärker ist die Fluoreszenz. Mit Hilfe einer Kalibrierungskurve kann der DNA Gehalt bestimmt werden. Fortschritt dieser Methode ist, dass geringere Mengen an DNA gemessen werden können und vor allem nur die DNA gemessen wird. Nachteilig ist, dass die Methode nicht humanspezifisch ist, sondern der Farbstoff an jede DNA bindet und somit ebenso mit tierischer und bakterieller DNA interagiert (Nicklas und Buel, 2003).

1.4.2 Slot-Blot Methode

Ein weiterer Fortschritt in der Quantifizierung von DNA war die Slot-Blot Methode. Diese Methode basiert auf der Hybridisierung einer humanspezifischen Sonde an die DNA. Die DNA wird dazu vorab durch Gelelektrophorese aufgetrennt und dann werden spezifische Sonden hinzugefügt. Mit einem an die Sonde gekoppeltem Farbmolekül kann nun das DNA-Stück mit zur Sonde komplementärer Sequenz sichtbar gemacht werden. Durch Erstellen einer Standardkurve, die DNA Proben definierter Menge enthält, erfolgt ein Vergleich der Intensität der Banden mit der Farbeintensität der Probe, und es kann auf den DNA-Gehalt in der Probe geschlossen werden. Von Thermo Fisher wurde der QuantiBlot Human DNA entwickelt. Es wird eine Sonde aus einer bestimmten DNA-Sequenz mit Biotin gekoppelt, an das Biotin kann wiederum ein bestimmtes Konjugat binden, das mit Hilfe von Wasserstoffperoxid und einem Enhancer eine Lumineszenz entwickelt, die mit einem Röntgenfilm aufgenommen werden kann. Mit der Slot-Blot Methode kann man humane und primatenspezifische DNA quantifizieren. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass sie eine Sensitivitätsgrenze bei 0,15ng DNA hat, das bedeutet, dass Proben mit weniger als 0,15ng DNA nicht erkannt werden.

1.4.3 Real-Time PCR

Bei der Real-Time PCR wird das System der PCR genutzt und die Bildung der Amplifikate im Moment der Entstehung gemessen. Das Prinzip der Real-Time PCR ist, mit Hilfe von fluoreszierenden Farbstoffmolekülen die Menge an entstehenden PCR-Amplifikaten zu erfassen und daraus die Anfangskonzentration der DNA aus der eingesetzten Probe zu berechnen (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993). Hierbei werden spezifische Hybridisierungssonden verwendet, die sich an das zu amplifizierende Stück der DNA heften. Diese Sonden sind mit bestimmten Farbstoffen ausgestattet, die ein Signal abgeben, sobald das DNA Stück amplifiziert wurde. Bei jeder Verdopplung wird ein Farbstoffmolekül aktiviert. Erst wenn genügend Farbstoffmoleküle aktiviert sind, kann die Kamera ein Signal detektieren. Nun kann man durch die Anzahl der benötigten Zyklen bis zu einem eindeutig messbaren Signal die Anfangskonzentration der DNA in der Probe berechnen (genaue Ausführung siehe Kapitel 3.2.3.2).

Für forensische Zwecke hat diese Methode viele Vorteile. Bei der Real-Time PCR werden bestimmte Regionen der DNA amplifiziert, die nur auf der menschlichen DNA vorkommen.

So kann man mit Hilfe der Real-Time PCR gezielt humanspezifische DNA in einer Probe messen. Die Real-Time PCR ist ein sehr sensitives und spezifisches Verfahren, das kostengünstig und effizient die Menge an humaner DNA in einer Probe messen kann (Tringali et al., 2004). Die Methode kann auch geringe Mengen an DNA, wie sie in der Forensik oft vorliegen, nachweisen. In dieser Arbeit wird der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit verwendet. Green et al. zeigte in seiner Studie, dass der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit sehr spezifisch für menschliche DNA ist und bis zu 23pg in einer Probe zuverlässig detektieren kann (Green et al., 2005). Das Ergebnis des Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit wird im Folgendem als TaqMan-Wert, oder kurz TaqMan, bezeichnet.

Ein weiterer Fortschritt ist die Entwicklung der Multiplex Real-Time PCR. Grundlage hierfür ist, dass verschiedene Real-Time PCRs gleichzeitig in einem Reagenzgefäß ablaufen können. Hierbei werden nicht nur eine Region, sondern mehrere Regionen simultan in einem Reaktionsansatz amplifiziert. Man verwendet mehrere Primerpaare und mehrere unterschiedlich markierte Sonden. Ein Vorteil gegenüber mehreren Single-Plex-Ansätzen ist, dass man geringere Mengen an DNA für den Test benötigt, da mehrere Untersuchungen in einem Reaktionsansatz getestet werden können. Somit kann man mit Hilfe der Multiplex Real-Time PCR mehr Information aus einer Probe erhalten. Vor allem bei geringen Probenmengen, wie sie in der Forensik vorliegen, ist das von Vorteil (Bustin, 2000). Zusätzlich kommt es zu einer Kosten- und Zeitersparnis (Edwards und Gibbs, 1994).

Bei der internen Positiv Kontrolle (IPC) werden zwei Systeme gleichzeitig getestet, man kombiniert den Ansatz der Quantifizierung mit einer weiteren Hybridisierungssonde. Somit ist dies eine Form der Multiplex PCR.

Das Prinzip der IPC beruht darauf, dass man mit einer Sonde künstliche hergestellte DNA amplifiziert. Proben können mit PCR Inhibitoren verunreinigt sein. Dies führt dazu, dass man fälschlicherweise annimmt, eine zu geringe Menge an DNA sei in der Probe, da die Amplifikation durch die Hemmstoffe beeinträchtigt und die Anzahl neu synthetisierter Amplifikate reduziert wird. Um diese Hemmung aufzudecken läuft bei jeder Analyse eine IPC mit. Hierbei handelt es sich um eine konstante Menge synthetischer DNA, die in jede Probe dazu gegeben wird. Mit Hilfe einer spezifischen Sonde wird die synthetische DNA gleichzeitig amplifiziert und quantifiziert. Das Signal sollte immer nach einer bestimmten Anzahl der Zyklen detektiert werden. Man kann davon ausgehen, dass kein Hemmstoff in der Probe vorliegt, wenn die Anzahl der Zyklen immer konstant bleibt. Erfolgt diese Amplifizierung fehlerhaft oder verlangsamt, geht man davon aus, dass die Probe mit Hemmstoffen kontaminiert ist. Für die Forensik liegt der Vorteil darin, dass diese Proben

aufgereinigt werden können und so für die spätere Amplifizierung und für die eigentliche Genotypisierung optimal aufgereinigt und eingestellt zur Verfügung stehen.

Der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit wurde nach den Richtlinien der SWGDAM (Scientific Working Group DNA Analysis Methods) getestet (Green et al., 2005). Die SWGDAM ist eine Organisation unter der Leitung des FBI, die sich mit der Qualität von forensischen Laboren beschäftigt. Sie erarbeitet Empfehlungen für Forensische Labore, die sich mit Untersuchungsmethoden bis hin zu Sicherheitsmaßnahmen beschäftigen. Zur Validierung einer Untersuchungsmethode muss diese Methode folgende drei Eigenschaften erfüllen: Der Test muss robust sein und somit wenig fehler- und störanfällig. Der Test muss zuverlässig sein, das bedeutet, dass das Ergebnis des Tests die Menge in der Probe korrekt wiedergibt. Als Drittes muss der Test reproduzierbar sein. Hierbei muss bei mehrmaliger Untersuchung einer Probe immer ein vergleichbares Ergebnis entstehen.

Nielsen vergleicht 2008 fünf verschiedenen Methoden zur Quantifizierung. Hierfür verwendete er die UV Photometrie, die Fluorimetrische Photometrie mit SYBR-Green Farbstoff, die Slot blot Methode, den Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit und die RB1 rt-PCR (eine Real-Time PCR Methode, die die Region für das Retinoblastom 1 amplifiziert). Im Vergleich mit anderen Methoden zur Quantifizierung ist der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit sehr geeignet für die Anforderungen der modernen forensischen Molekularbiologie, da er sehr sensitiv und immer reproduzierbar ist (Nielsen et al., 2008). Als Nachteil stellt Nielson fest, dass im Vergleich von den fünf unterschiedlichen Methoden der Quantifizierung vor allem der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit den DNA Gehalt stark überschätzt. Ursache hierfür ist vermutlich eine zu niedrige Quantifizierung der Kontroll-DNA, die folglich zu höheren Werten bei der zu untersuchenden DNA führt. Die Überschätzung des DNA Gehalts mit dem Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit und seine Folgen werden noch genauer in der Diskussion betrachtet (Kapitel 0). Es soll sichergestellt werden, dass keine Spuren verloren gehen und somit auch Spuren mit sehr wenig DNA erkannt werden. Durch die Überschätzung kann davon ausgegangen werden, dass keine Proben aufgrund von geringen Werten fälschlicherweise ausgeschlossen werden.

Unabhängig von der Überschätzung des DNA Gehalts, ergibt sich ein weiteres Problem daraus, dass man nicht immer ein Profil bei der Genotypisierung erhält, obwohl laut Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit genügend DNA enthalten ist. Bei dem Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit wird ein sehr kurzes Stück von 62 Basen amplifiziert. Bei der nachfolgenden Profilerstellung werden unterschiedlich lange Regionen amplifiziert, diese Regionen können bis zu 400 Basen lang sein. Liegt die DNA nun sehr degradiert vor, ist es wahrscheinlicher, dass ein kurzes Stück von 62 Basen noch nicht

zerstört wurde, als dass eine Region von 400 Basen intakt geblieben ist. Somit wird von dem Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit auch sehr degradierte DNA erfasst, die bei der Genotypisierung, bei der DNA-Fragmente bis zu 400bp amplifiziert werden, nicht amplifiziert werden kann. Dies führt dazu, dass man beim Amplifizieren nur teilweise ein Profil oder gar kein Profil erhalten kann (Timken et al., 2005).

Neben dem Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit wurden noch andere Kits entwickelt, um zum Beispiel den Anteil an männlicher DNA in einer Probe zu bestimmen. Es gibt noch den Quantifiler™ Y DNA Quantification Kit. Dieser Kit erfasst eine Region auf dem Y-Chromosom und somit ist ein Rückschluss auf das Vorhandensein von männlicher DNA möglich (Walker et al., 2005). Bei Spuren, wie sie zum Beispiel bei einer Vergewaltigung vorliegen können, kann man so eine Abschätzung machen, ob männliche DNA in der Probe enthalten ist oder welches Verhältnis von männlicher und weiblicher DNA vorliegt. Dieser Kit kann mit dem Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit kombiniert werden und wird so zu einer Multiplex PCR, die Quantifiler Duo Quantification Kit genannt wird. Hierbei wird gleichzeitig zur allgemeinen Quantifizierung der Anteil an männlicher DNA mitbestimmt.

In der Studie von Bulander et al. wurden drei verschiedene Real-Time PCR Kits zur Quantifizierung humaner DNA verglichen. Diese waren Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit (ABI), Quantifiler™ Duo DNA Quantification Kit (ABI) und Plexor HY System (Promega). Der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit bestimmt nur die Gesamt-DNA mit einer Single Locus Sonde. Der Quantifiler™ Duo DNA Quantification Kit bestimmt sowohl die gesamte DNA als auch den Anteil männlicher DNA (ebenfalls SLS). Das Plexor HY System verwendet eine Multi-Copy Sonde. Eine Multi-Copy Sonde unterscheidet sich von der Single-Copy Sonde darin, dass sie an mehrere Bereiche der DNA binden kann und nicht nur an eine einzige Stelle. Darüber hinaus wurden auch zwei verschiedene Real-Time PCR Geräte verwendet: Roche LightCycler® 480 und der ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System. Es stellte sich heraus, dass grundsätzlich alle Kits und Untersuchungsgeräte für die forensische Medizin geeignet sind. Die Ergebnisse der einzelnen Kits können schlecht untereinander verglichen werden, da sie jeweils sehr unterschiedliche Werte aufweisen und Konzentrationen angeben. Deswegen sollte man bei einem Kit bleiben, der im Labor verwendet wird, da man sonst alle Standards reevaluieren muss. Es sollten also von jedem Labor für den verwendeten Kit eigene Ausscheidungskriterien erarbeitet werden (Bulander und Rolf, 2009).

Zur Verbesserung der Qualität und vor allem der Eichkurve empfiehlt sich der Einsatz von Pipettierrobotern, um manuelle Pipettierungenauigkeiten zu minimieren (Grgicak et al.,

2010). Neue Chargen von Standardreagenzien sollten vor Gebrauch regelmäßig evaluiert werden (Koukoulas et al., 2008)

Multiplex Real-Time PCR Ansätze werden auch noch in anderen Bereichen genutzt. Von Wurmb-Schwark et al. verwendete als Zielsequenz sowohl Bereiche auf der nuklearen DNA als auch auf der mitochondrialen DNA. Dies wird zum Beispiel bei sehr alten Proben verwendet. Mitochondriale DNA liegt in einer Zelle in viel höherer Kopienzahl vor als die nukleare DNA. In einer Zelle können bis zu mehreren 100 Mitochondrien vorliegen und jedes Mitochondrium enthält mehrere DNA Plasmide. Die nukleare DNA liegt in jeder Zelle nur einmal vor. Durch die Anzahl der Kopien von mitochondrialer DNA in einer Zelle ist die Wahrscheinlichkeit höher, dass mehr intakte mitochondriale DNA vorliegt, auch wenn die Probe schon sehr degradiert ist und nur noch wenig DNA enthält. Vor allem bei sehr alten Geweben, zum Beispiel alten Knochen ist dies von Vorteil (von Wurmb-Schwark et al., 2004). Eine weitere Entwicklung der Multiplex PCR ist, mit Hilfe von mehreren unterschiedlich großen zu amplifizierenden Bereichen der DNA Aussagen über die Degradierung der Probe zu machen. Können die großen Amplifikate, die bis zu 400 Basen umfassen, gebildet werden, ist die DNA gut erhalten, können nur kleine Sequenzen amplifiziert werden, liegt die DNA in einem degradierten Zustand vor (Schilz et al., 2004).

Die Real-Time PCR ist eine für die Forensik sehr wichtige Voruntersuchung. Mit ihrer Hilfe kann man Aussagen über die Qualität und Quantität der DNA in einer Probe machen. So erhält man eine Entscheidungshilfe ob Proben aussortiert werden können bevor sie amplifiziert werden.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die historische Entwicklung in der Forensik zeigt welchen enormen Fortschritt die Spurensuche in den letzten 100 Jahren gemacht hat. Durch die ständige Forschung reichen nur kleinste Mengen an DNA aus, um ein Identifizierungsmuster erstellen zu können. Während früher noch Blut und Spermaspuren aufgesucht werden mussten, reichen heute einzelne Hautschuppen, um ein Profil zu erstellen. Folglich kommt es zu einem immensen Zuwachs an potentiellem Spurenmaterial. Proben, die DNA enthalten könnten, werden zunächst asserviert und ins Labor gesandt. Das Problem hierbei ist, dass nicht jede dieser Proben, gerade im Bereich der Minimal- beziehungsweise Kontaktsuren, auch DNA in ausreichender Menge und Qualität enthalten muss. Bevor man die Probe amplifiziert, was sehr kosten- und zeitintensiv ist, will man dafür einige Informationen über die Probe gewinnen. Ist genug DNA in einer Probe enthalten für eine Amplifizierung? Ist die DNA nicht zu stark beschädigt oder verunreinigt? Mit dieser Information kann man entscheiden, ob eine Genotypisierung der Probe im Bereich des Möglichen liegt. Man will jede für eine Genotypisierung möglicherweise geeignete Spur detektieren und trotzdem möglichst kosten- und zeitoptimiert arbeiten. Deswegen wird vor der Amplifizierung eine Quantifizierung der DNA in der Probe durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit geht es um die Quantifizierung von DNA in einer Probe und die Aussagekraft in Bezug auf die Genotypisierung. Mit Hilfe des Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit kann die Menge der humanen DNA, die in einer Probe enthalten ist, bestimmt werden, bevor die Probe typisiert und die Profile ausgewertet werden. In dieser Studie geht es um die Ermittlung eines möglichen Grenzwerts, der es erlaubt, Proben mit einem DNA-Gehalt unter diesem Grenzwert auszuschließen, da aus ihnen mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit kein Profil mehr gewonnen werden kann.

Somit wurde die Fragestellung bearbeitet, ob und in welchem Maße der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit helfen kann, die Entscheidung zu treffen, ob eine Spur weiterverarbeitet werden sollte oder nicht. Zusätzlich wurde untersucht, ob man einen Grenzwert finden kann, ab dem diese Entscheidung zu treffen ist.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Modell	Hersteller
ABI Prism 7300 Sequence Detection System	Thermo Fisher ¹
ABI Prism® 3130 XL Genetic Analyzer	Thermo Fisher
Bio Robot 8000	Qiagen
Bio Robot EZ1	Qiagen
Gen Amp® PCR System (Thermocycler)	Qiagen
Thermoblock	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf
Vortex	Eppendorf
Zentrifuge	Eppendorf

Tabelle 3: Geräteübersicht

3.1.2 Software

Version	Hersteller
Genotyper	Thermo Fisher
GenScan® Software	Thermo Fisher
SDS Software v.1.0	Thermo Fisher
7300 Systemsoftware	Thermo Fisher

Tabelle 4: Software

¹ Thermo Fisher Scientific: der Konzern wechselte mehrmals seinen Namen: von Gründung als Grand Island Biological Company, über Applied Biosystems und Life Technology zu Thermo Fisher Scientific. Im weiteren wird er kurz als Thermo Fisher aufgeführt

3.1.3 Chemikalien und Kits

Chemikalie	Hersteller
Aqua ad injectabilia	Braun
HiDi Formamid	Thermo Fisher
10mM Tris-HCL (pH8.0), 0.1 mM Na ₂ EDTA	Thermo Fisher

Tabelle 5: Chemikalien

Kit	Hersteller
AmpF/STR® SEfiler Plus TM PCR	Thermo Fisher
EZ1 Dna Investigator Kit	Qiagen
10 X Genetic Analyzer Buffer with EDTA	Qiagen
GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard /ROX	Thermo Fisher
Jumpstart™ Taq DNA Polymerase	Thermo Fisher
Mentype® Nanoplex I PCR Amplification Kit	Thermo Fisher
POP4-TM Performance Optimized Polymer	Thermo Fisher
Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit	Thermo Fisher

Tabelle 6: Kits

3.2 Technische Aufarbeitung

3.2.1 Probenmaterial und Entnahme

Die eingesetzten Proben stammen alle von Spuren aus Routinefällen (Spuren aus dem minderschweren Deliktsbereich wie beispielsweise der Eigentumsdelikte, nicht jedoch im Bereich von Kapitaldelikten), die forensisch, genetisch analysiert werden sollen. Geeignet für diese Untersuchungen sind alle kernhaltigen Zellen, also Zellen, die DNA enthalten. Als Spurenmaterial sind somit Gewebe wie Knochen, Zähne, Haare und Fingernägel, sowie Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin zu verwenden. Außerdem treten viele kernhaltige Zellen in Körpersekreten (Speichel, Nasensekret und Schweiß), Ejakulat und Vaginalsekret (im Rahmen von Sexualsekreten) auf. Die Spuren selbst werden entweder von der Spurensicherung am Tatort asserviert oder später im Labor von den eingeschickten Asservaten abgenommen. Zur Abnahme des biologischen Materials von einem Spurenträger bedient man sich verschiedener Techniken. So fertigt man beispielsweise Abriebe, indem man ein mit DNA-freiem Wasser oder Puffer getränktem Wattetupfer mehrmals über die

Stelle reibt, an der biologisches Material vermutet wird. Dieser Tupfer wird an der Luft getrocknet, um eine Zersetzung der DNA durch Pilze oder Bakterien zu vermeiden. Um die Spur vor Zersetzung zu bewahren ist auch eine Lagerung in Alkohol möglich. Bei Folienabtastungen werden Regionen eines Gegenstands, auf dem sich Antragsungen befinden, mit einem forensischen Spurensicherungsband abgeklebt und diese später mit einem sterilen Skalpell wieder abgekratzt, weswegen diese Spuren auch Auskratzenungen genannt werden. Auch können Teile der Spur mit dem Spureenträger direkt der Untersuchung zugeführt werden, hier als Original bezeichnet. Die nachfolgende Tabelle (Tabelle 7) gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung der in dieser Arbeit untersuchten Spuren.

Spurenart	Anzahl
Abrieb	2609
Zigarette	327
Original	22
Sonst	21
Auskratzenung	20
Haar	14
Blut	12
Briefmarke	9
Kaugummi	9
Sekret	7
Etikett	5
Haut	5
Knebel	5
Joint	3

Tabelle 7: vorkommende Spurenarten und ihre Anzahl

3.2.2 DNA Extraktion und Reinigung

Aus den eingeschickten Spuren muss die DNA isoliert werden. Die Zellen müssen lysiert werden, damit man die im Zellkern befindliche DNA erhält. Hierfür werden abhängig von der Spur unterschiedliche Reagenzien verwendet. Dabei können aber auch Substanzen des Spureenträgers gelöst werden, zum Beispiel Farbstoffe aus Textilien oder Gerbstoffe im Leder, die die Probe verunreinigen. Diese können die DNA-Typisierung inhibieren und müssen deswegen bestmöglich entfernt werden. Deshalb müssen Proben oft zusätzlich gereinigt werden. Bei Extraktion und Aufreinigung soll möglichst viel DNA gewonnen werden und eine optimale Qualität erzielt werden. Mit den modernen Extraktionsmethoden können

beide Arbeitsschritte kombiniert werden. In dieser Arbeit wird der BioRobot EZ1 verwendet. Bei dem BioRobot EZ1 erfolgt eine semiautomatische DNA-Extraktion und Aufreinigung. Im ersten Schritt wird eine externe manuelle Lyse durchgeführt, im zweiten Schritt erfolgt die maschinelle Aufreinigung.

3.2.2.1 Aufbau des BioRobot EZ1 und Bestandteile des Reagenzienkits



Abbildung 3: Worktable des EZ1: 1. Elutionsröhrchen, 2. Tip Holders mit Tips, 3. Frei, 4. Probengefäß, 5. Reagenzienkartusche, 6. Heizblock

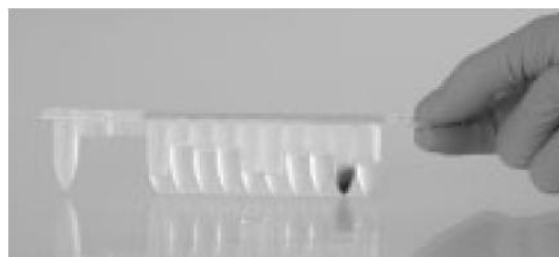


Abbildung 4: Reagenzienkartusche



Abbildung 5: Kartuschenhalter

EZ1 DNA Investigator Kit	(48)
Catalog no.	952034
Number of preps	48
Reagent Cartridge, DNA Investigator*	48
Disposable Tip Holders	50
Disposable Filter-Tips	50
Sample Tubes (2 ml)	50
Elution Tubes (1.5 ml)	50
Buffer G2	1 x 1 l ml
Proteinase K	2 x 250 µl
Carrier RNA [†]	1 x 310 µg
Q-Card [‡]	1
Handbook	1

Tabelle 8: Inhalt des BioRobot EZ1 Investigator Kit mit Chemikalien

3.2.2.2 Externe Lyse

Alle Proben, mit Ausnahme der Haare, werden gleichermaßen behandelt. Die Lyse der Haare wird getrennt in Kapitel 3.2.2.4. beschrieben. Zuerst erfolgt die manuelle Lyse gemäß Anslinger et al. 2005. Hierfür werden die Proben in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1ml Reinstwasser für 10min inkubiert. Das Gefäß wird für 5min bei 13.000U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zu der Probe wird nun 400µl G2-Puffer (Lysepuffer) und 10µl Proteinase-K aus dem Investigator Kit dazugegeben und durch den Vortexer gleichmäßig gemischt. Optional kann noch bei Spuren, in denen ein hoher Proteingehalt erwartet wird, 10µl Dithiotreitol (DTT) zugegeben werden. Bei 56°C wird die Probe nun im Thermoschüttler

für mindestens zwei Stunden oder maximal über Nacht inkubiert (Anslinger et al., 2005). Der Lysepuffer löst sämtliche Zellwände auf, um die DNA freizusetzen. Die Proteinase-K hilft Zellverbände und Zellkernmembranen aufzulösen und spaltet die freiwerdenden Enzyme. Hierdurch will man möglichst die gesamte DNA freisetzen. Danach wird das Gemisch für 4min auf 100°C erhitzt, um sicher zu gehen, dass Proteinase-K und die DNAsen denaturiert werden und die DNA nicht mehr beschädigt werden kann. Nach einer kurzen Zentrifugation können die Proben in den Bio Robot EZ1 zur Reinigung der DNA eingesetzt werden.

3.2.2.3 Prinzip des BioRobot EZ1:

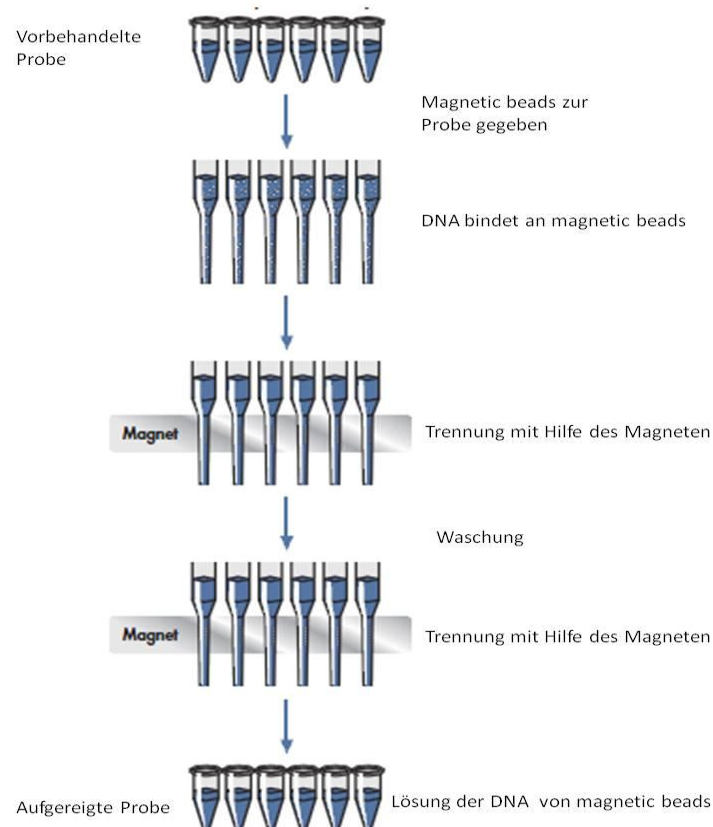


Abbildung 6: Prinzip der Reinigung des BioRobot EZ1: die vorbehandelten Proben werden mit den magnetic beads vermischt, die DNA bindet sich an die magnetic beads und kann so mit Hilfe von Magneten von der Flüssigkeit getrennt und gewaschen werden, bis am Ende die DNA wieder von den magnetic beads gelöst wird und als gereinigte Probe vorliegt

Im BioRobot EZ1 können bis zu sechs Proben gleichzeitig aufgereinigt werden. Die DNA wird von dem Lysat getrennt, indem man spezielle magnetische Kügelchen, sogenannte magnetic beads, benutzt. Diese magnetic beads sind mit einer Silikat-Membran beschichtet, die mit Hilfe von chaotropen Salzen DNA binden kann. Zuerst werden die mit definierten Chemikalien vorbefüllten Kartuschen (Investigator Kit) in den Kartuschenhalter des Biorobot EZ1 gegeben. Danach werden die Elutionsröhrchen, die Tipholder mit Tips und am Schluss die Probe in den Roboter an die vorgeschriebene Stelle eingesetzt. Der Ablauf ist in (Abbildung 6) dargestellt. Der Roboter pipettiert im ersten Schritt die beads zu der Probe und vermischt diese. Der pH und die restlichen Bedingungen sind so gewählt, dass die DNA an die beads bindet. Mit Hilfe von einem Magneten werden die beads mit der daran gebundenen DNA in die nächste Reinigungsflüssigkeit weitergegeben. Dieser Waschschrift wird mehrmals wiederholt, bis alle Zellreste eliminiert sind. In dieser Arbeit wird die DNA mit Hilfe von reinstem Wasser wieder von der Oberfläche der beads gelöst und liegt so als gereinigte DNA vor. Es ist auch möglich anstatt Reinstwasser Niedrigsalzpuffer zu verwenden. Bei allen Proben wird die DNA in 50µl gelöst.

3.2.2.4 Extraktion Haare

	Reagenzien	Abkürzung
	Chelex Suspension	
1M	Dithiotreitol Sigma	DTT
1M	Tris-hydroxymethylaminomethan	TRIS
5M	Natriumchlorid Lösung	NaCl
100mM	Calciumchlorid lösung	CaCl ₂
	SDS	SDS
70%	Ethanol	70%EtOH
100%	Ethanol	100%EtOH
3M	Natriumacetatlösung	NaAc
	GeneElute LPA 2,5%ig	
	Hellmann Puffer	
	Proteinnase K	ProtK

Tabelle 9: benötigte Reagenzien zur Extraktion von Haaren

Zur Extraktion von DNA aus Haaren wird ein Mastermix aus 95µl Hellman Puffer (Tabelle 10), 4 µl 1M DDT und 1 µl Proteinase K hergestellt. In diesen Mix werden die Haarwurzeln oder

Haarbruchstücke gegeben und mindestens 2 Stunden, maximal über Nacht inkubiert. In dem Hellmanpuffer befinden sich viele Ca^{++} -Ionen, die die Eigenschaft der Proteinase K verstärken und so zu einer besseren Lyse der Zellwände der Haarschäfte führen. Zur Isolierung der DNA wird eine Chelex-Gebrauchssuspension, ein ionenbindendes Kunstharz, verwendet. 200µl der Gebrauchssuspension werden mit der Probe für 10min auf 56°C inkubiert und danach auf 100°C erhitzt. Nach dem Zentrifugieren mit 13.000 U/min wird der Überstand abpipettiert und zu der Probe 3M NaAc-Lösung, 8µl Polyacrylamid und 680µl eiskaltes Reinstethanol gegeben. Die DNA wird nun mindestens 90min oder über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugieren und Abpipettieren des Überstandes wird das Pellet erst getrocknet und danach in 50µl Reinstwasser gelöst.

Stocklösung	Substanz	Menge
1M	TRIS pH=8,0	1ml
5M	NaCl	2ml
100mM	CaCl_2	1ml
10%	SDS	20ml

Tabelle 10: Hellmann Puffer

3.2.3 DNA-Quantifizierung

Dieser Schritt bestimmt die Menge an „humaner DNA“, die in einer Probe enthalten ist. Auf diesem Ergebnis basiert die weitere Untersuchung. Eine Probe muss nicht weiter getestet werden, wenn nicht genügend DNA enthalten ist, um die Erstellung eines Identifizierungsmusters zu gewährleisten. Die Quantifizierung gibt an, wie viel der Probe weiterverarbeitet werden muss, um eine optimale Konzentration der Template-DNA für die noch folgende PCR einsetzen zu können.

Es erfolgt immer eine Doppelbestimmung mit dem Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit, um stochastische Effekte beziehungsweise falsche negative Ergebnisse erkennen zu können. Mit Hilfe einer Software wird der Mittelwert berechnet.

3.2.3.1 Das Prinzip der PCR

Die Polymerase Ketten Reaktion ist eine Methode, um geringe Mengen DNA in vitro zu vervielfältigen (Mullis und Faloona, 1987; Saiki at al, 1988). Sie kann vielfältig verwendet

werden und ist hier sowohl für die Quantifizierung als auch die Typisierung notwendig. Das Grundprinzip ist folgendes (Abbildung 7): Die Vervielfältigung passiert, indem die drei Phasen der PCR beliebig oft wiederholt werden. In der ersten Phase, der „Denaturierungsphase“, wird die DNA durch Erhitzen aufgetrennt. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen getrennt und die DNA liegt in zwei Einzelsträngen vor. In der zweiten Phase, der Annealingphase, benötigt man Oligonukleotide (Primer), die komplementär zu bestimmten Abschnitten der DNA sind. Diese Primer binden an dem einzelnen DNA-Strang und flankieren das zu amplifizierende Stück auf der DNA. Mit Hilfe der DNA-Polymerase und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) kann in der letzten Phase ein neuer Strang synthetisiert werden. Dieser neu synthetisierte Strang wird nach Vorlage des zu amplifizierenden DNA-Stücks synthetisiert und ist zu diesem komplementär. Das Ausgangs-DNA-Stück wird als Templat bezeichnet. Diese Phase wird Elongation genannt.

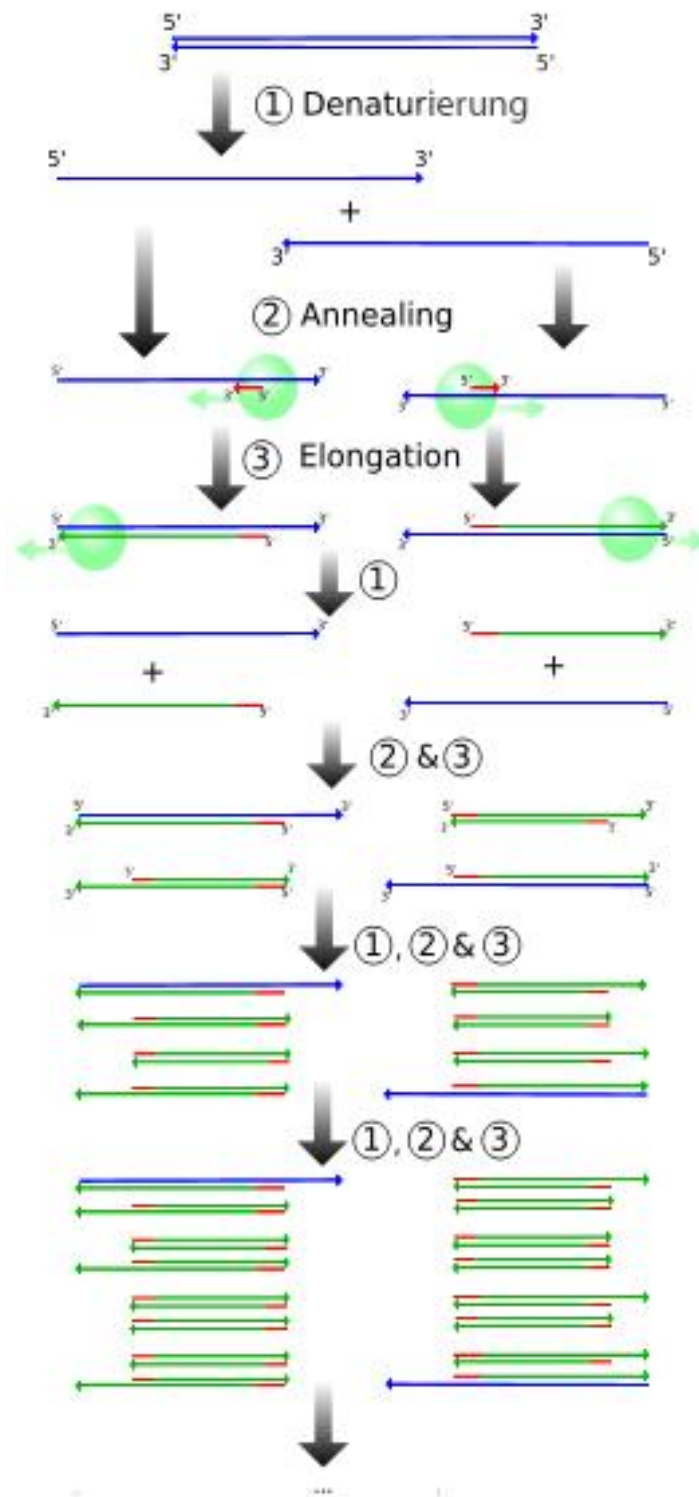


Abbildung 7: Darstellung des PCR Zyklus:1: Denaturierung , die Auftrennung der DNA in zwei Einzelstränge; 2: Annealing, Anheftung der Primer; 3: Elongation: Synthese des neuen Strangs mithilfe der Polymerase

Diese drei Schritte werden nun beliebig oft (bis zu 32-mal) wiederholt, um die Menge des zu amplifizierenden Stückes DNA zu vervielfältigen. Bei dem ersten Durchgang entstehen aus einem DNA Strang zwei Stränge. Bei jedem weiteren Schritt, wird diese Anzahl wieder verdoppelt. Unter optimalen Versuchsbedingungen würde man nach 30 Zyklen 2^{30} (ca. 1,08 Mrd.) DNA-Stränge erhalten.

3.2.3.2 Real-Time PCR

Bei der Real-Time PCR wird die Verdopplung der Amplifikate in Echtzeit dargestellt. Daher stammt der Name Real-Time PCR. Pro entstehendes Amplifikat wird ein fluoreszierendes Signal freigesetzt. Proportional zur Anzahl der PCR Produkte werden mehr und mehr fluoreszierende Farbstoffmoleküle freigesetzt. Ab einer bestimmten Menge von fluoreszierenden Farbstoffmolekülen können diese mit Hilfe einer Kamera detektiert werden. Nun kann man mit Hilfe der Anzahl der benötigten Zyklen bis zu einem Signal auf die Anfangskonzentration in dem Gemisch schließen. Somit werden die Proben quantifiziert.

Dies wird folgendermaßen erreicht:

Im Mastermix befinden sich die Primer, die sich in der Annealingphase an die Einzelstränge der DNA binden. Das Besondere an der Real-Time PCR ist die zusätzliche Verwendung von Hybridisierungssonden. Hybridisierungssonden sind einsträngige, künstlich hergestellte DNA Matrizen, die an bestimmte Stellen der DNA binden können und als Markierung genutzt werden. Diese Hybridisierungssonde bindet ebenfalls während der Annealingphase an eine bestimmte Stelle zwischen dem Vorwärts- und Revers-Primer (Abbildung 8).

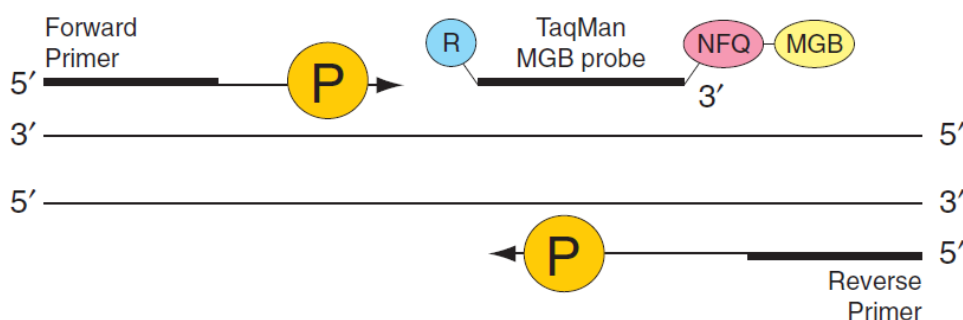


Abbildung 8: Anheftung der Hybridisierungssonde TaqMan® (MGB) in der Annealingphase

Die Hybridisierungssonden sind so verändert, dass an ihrem 5' Ende ein Reporterfarbstoff gekoppelt ist und an das 3' Ende ein Quencher. Der Reporterfarbstoff ist ein Fluoreszein-Derivat, der Quencher ist ein Rhodamin-Derivat. Eine Lichtquelle führt zur Fluoreszenz des Reporterfarbstoffs. Hier liegt die Besonderheit dieser Hybridisierungssonde. Durch die räumliche Nähe von Reporterfarbstoff und Quencher wird die Fluoreszenz unterdrückt, das wird auch Fluoreszenz-Energietransfer (FET) genannt (Förster, 1948; Lakowicz, 1983).

Während der Elongationsphase beginnt nun die DNA-Polymerase mit der Replikation am Primer. Dabei arbeitet sich die Polymerase immer weiter bis zur Hybridisierungssonde vor. Diese wird nach und nach hydrolisiert und es löst sich zuerst das am 5' Ende befindliche Reportersignal. Es ist jetzt nicht mehr in Räumlicher Nähe zu dem Quencher und kann nun fluoreszieren (Abbildung 9 und Abbildung 10).

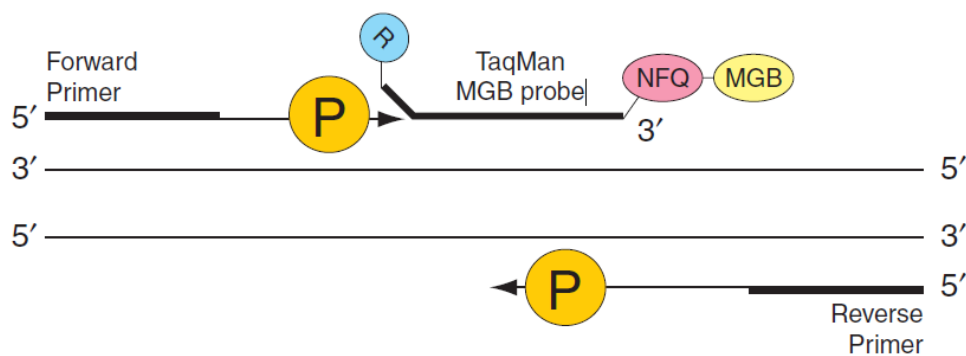


Abbildung 9: Lösung der TaqMan® MGB während der Elongationsphase

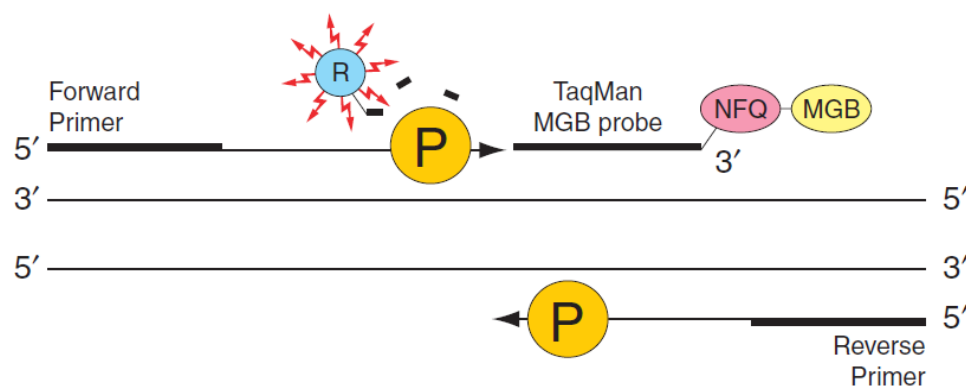


Abbildung 10: Hydrolisierung des Reporters von der TaqMan® MGB

Nur die freien Reporterfarbstoffe fluoreszieren, bei den gebundenen Reporterfarbstoffen wird die Fluoreszenz immer noch unterdrückt.

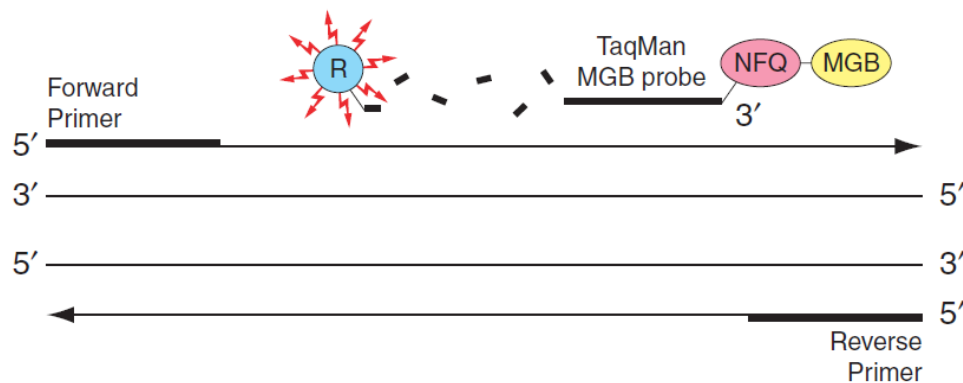


Abbildung 11: Abschluss der Elongationsphase, Reporter bleibt gelöst

In jedem Zyklus wird nun pro Strang, der amplifiziert wird, ein Farbstoffmolekül mehr zur Fluoreszenz angeregt. Deswegen spricht man von Echtzeit PCR, weil jedes neugebildete Amplifikat im Moment der Entstehung gemessen wird. Wenn genügend Reporterfarbstoffe fluoreszieren, kann dies mit einer Kamera gemessen werden. Diese Anzahl wird mit dem C_T -Wert (Threshold Cycle) beschrieben. Er ist die Nummer des Zyklus, bei dem der Schwellenwert für unspezifische Fluoreszenzemission überschritten und ein eindeutiges Fluoreszenzsignal detektiert wird. Mit Hilfe von diesen Daten sowie einer Eichkurve mit Standard-DNA in definierter Konzentration, die man parallel misst, und der Software wird die Konzentration der Probe in pg/ μ l berechnet.

3.2.3.2.1 Auswertung von Real-Time PCR-Daten

Die Fluoreszenz von jedem Zyklus wird mit der Kamera eingefangen und graphisch dargestellt. Es entsteht zum Beispiel folgendes Diagramm (Abbildung 12).

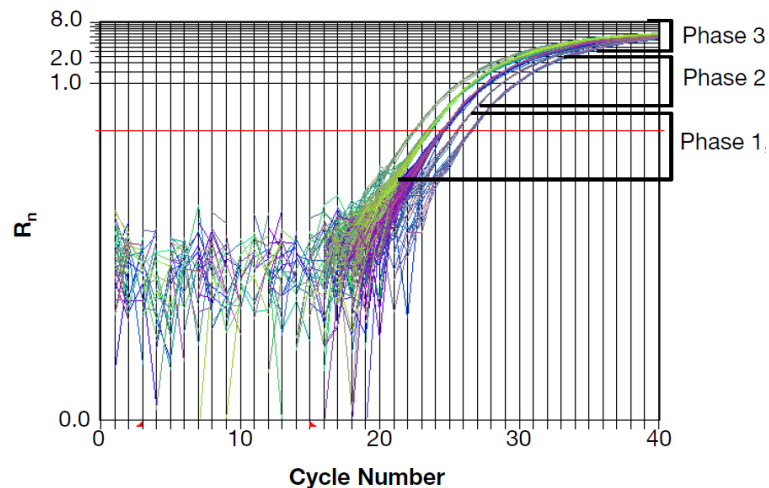


Abbildung 12: Darstellung der Fluoreszenz einer Real-Time PCR: Auf der X-Achse sind die Anzahl der Zyklen, auf der Y-Achse ist die Stärke des Fluoreszenzsignals R_n logarithmisch dargestellt; Phase 1 ist die exponentielle Phase, Phase 2 ist die lineare Phase und Phase 3 ist die Plateau Phase der Amplifikation.

Diesen Graph teilt man in drei Phasen ein. Die erste Phase wird exponentielle Phase genannt. Bei der logarithmischen Darstellung ist hier eine Gerade zu sehen. Bei guten PCR Bedingungen müssen mindestens 3 Zyklen in der exponentiellen Phase liegen. Das bedeutet, dass genügend Nukleotid Bausteine und Enzyme für eine gute PCR vorliegen. Erst wenn die Amplifikate eine Konzentration von $10^{-8}M$ erreichen, kann keine exponentielle Vermehrung mehr stattfinden. Hier beginnt die zweite Phase, die lineare Phase. Es liegt immer noch eine Vermehrung vor, die Kurve steigt immer noch, aber nicht mehr exponentiell. Ursache hierfür ist, dass mindestens eine der Komponenten, die für die PCR nötig ist, nicht mehr in ausreichendem Maß vorhanden ist. Die Amplifikation nimmt kontinuierlich ab. Man erreicht die dritte Phase, die Plateau Phase. Die Menge an entstehenden Amplifikaten nimmt ab, das Fluoreszenzsignal nimmt nicht mehr zu, die Konzentration der Template DNA ist bei ca. $10^{-7}M$.

Am Beginn des Graphen sieht man ein Rauschsignal, das nicht verwertet werden kann. Es entsteht dadurch, dass die Kamera Hintergrundrauschen detektiert. Man benötigt einen C_T Wert. Er ist der Wert, ab dem man ein eindeutiges Signal erfassen kann. Dieser Wert an eindeutig detektierbarer Fluoreszenz liegt nicht mehr im Bereich des Rauschens und somit in Phase 1. Je nachdem, wie viele Zyklen benötigt werden, um diesen Wert zu erreichen, liegt mehr oder weniger Template DNA zu Beginn vor.

Während der exponentiellen Phase, Phase 1, kann man auf die Menge der Template DNA am Beginn der PCR schließen. In dieser Phase steht jede Zunahme der Fluoreszenz linear für eine Zunahme der Amplifikate. Hieraus lässt sich folgende Gleichung ableiten:

$$N_c = N(1 + E)^c$$

Hierbei steht N_c für die Konzentration an amplifizierten Stücken zu einem bestimmten Zyklus. N ist die Anfangskonzentration der Template DNA, E steht für die Effizienz des PCR Ansatzes und c ist die Nummer des Zyklus.

3.2.3.3 Der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit

3.2.3.3.1 Bestandteile und Funktion:

Reagenzien	Inhalt
Quantifiler Human Primer Mix	Vorwärts- und Rückwärtsprimer
Quantifiler Human DNA	200ng/μl reiner DNA Standard
Quantifiler Human Reaction	AmpliTaQ Gold® DNA

Tabelle 11: Reagenzien im Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit

Der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit beruht auf dem Prinzip der Real-Time PCR. Ziel ist es mit Hilfe der PCR die Gesamtkonzentration an humaner DNA in der Probe zu erfassen. Der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit kombiniert zwei Probenansätze, den für humane DNA spezifischen Ansatz und die IPC. Der humanspezifische Ansatz beinhaltet zwei Primer zur Amplifikation der humanen DNA, sowie eine spezifische Hybridisierungssonde. Diese Hybridisierungssonde enthält an ihrem 5' Ende den Reporterfarbstoff FAM™. Am 3' Ende der Sonde befindet sich ein nichtfluoreszierender Quencher und ein Minor Groove Binder. Letzteres sind Moleküle, die von außen an die kleine Furche der DNA binden, um die Bindung der Sonde an die DNA zu verbessern. Die Zielsequenz, auch Target genannt, ist in diesem Kit ein Teil des Humane Telomerase Reverse Transcriptase Gen (hTERT). Es liegt auf dem Chromosom 5p15.33 und hat eine Länge von 62 Basen. Die Region liegt im nicht kodierenden Bereich der DNA. Innerhalb dieses Bereiches bindet auch die Sonde.

Für die interne Positivkontrolle wird eine definierte Menge synthetisch hergestellter DNA Fragmente in einer vorgegebenen Konzentration eingesetzt, die nicht in der Natur vorkommt. Zusätzlich sind zwei für das IPC Template spezifische Primer enthalten und eine

Hybridisierungssonde, die mit dem VIC® Reporterfarbstoff gekoppelt ist. In der Regel, wenn keine Hemmung vorliegt, sollte diese Positivkontrolle ab dem 25. PCR-Zyklus detektierbar sein. Das Signal sollte in allen Probengefäßen zur gleichen Zeit messbar sein. Ist dies nicht der Fall, spricht das Ergebnis dafür, dass in der Probe noch Hemmstoffe enthalten sind. Diese Probe muss noch einmal aufgereinigt werden, um bessere PCR-Bedingungen zu schaffen. Als Negativkontrolle wird nukleasefreies Wasser benutzt. Hier darf es zu keinem Signal kommen, da sonst unsauber gearbeitet wurde und DNA verschleppt wurde.

Um die Ergebnisse auswerten zu können, wird noch eine Standardverdünnungsreihe angelegt. Hierbei wird der im Kit mitgelieferte DNA Standard nach Herstellerangaben verdünnt. Man bildet eine Messreihe, die die Korrelation zwischen DNA-Konzentration und Zykluszahl, in diesem Zusammenhang auch Fluoreszenzsignal, wiedergibt. Dies kann man graphisch darstellen. Als Software wird Sequence Detection Systems (SDS) Software v1.0 verwendet. Die Interpretation wird in Kapitel 3.2.3.3.3 beschrieben.

3.2.3.3.2 Setup

Die gereinigten Proben werden zusammen mit dem Mastermix aus dem Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit in die 96-Well-Platte pipettiert. Bei dieser Platte sind Positionen für die Standardverdünnungsreihe, für die Positivkontrolle und für die Negativkontrolle, jeweils als Doppelbestimmung, reserviert. Der Mastermix wird aus Quantifiler Human Primer Mix und der Quantifiler PCR Reaction Mix nach Herstellerangaben (Tabelle 12) hergestellt. In 23µl dieser Mischung werden 2µl von der aufgereinigten Probe gegeben. Um die Proben auswerten zu können, muss man noch eine Standardreihe anlegen, die dann verglichen werden kann. Die Verdünnungsreihe für die Eichkurve wird gemäß Tabelle 13 aus einer Standard DNA mit der Anfangskonzentration 200pg/µl angesetzt. Auch von der Verdünnungsreihe werden 2µl entnommen und zum Mastermix pipettiert. Das gesamte Setup wird durch einen Roboter (Bio Robot 8000) pipettiert.

Die 96-Well-Platte wird mit einer durchsichtigen Klebefolie (optical adhesiv Cover) verschlossen und diese Reaktionsplatte mit Standardreihe, Proben und Kontrollen in das ABI Prism 7300 Sequence Detection System gegeben. Hier erfolgen die Thermocycler-Schritte. Zuerst wird alles für 2min auf 50°C, danach für 10sec auf 95°C erhitzt und für 1min auf 60°C abgekühlt. Diese PCR-Zyklen werden 40mal wiederholt.

Komponente	Volume pro Reaktion
Quantifiler Human Primer Mix	10,5
Quantifiler PCR Reaction Mix	12,5

Tabelle 12: Mischverhältnis Mastermix

Standard	Konzentration	Menge pro Probe	Mind. Menge	Verdünnung
Std. 1	50.000	50µl[200ng/µl stock]+ 150µl	10µl[200ng/µl stock]+ 30µl	4x
Std. 2	16.700	50µl[Std. 1]+ 100µl T ₁₀ E _{0,1} /glycogen	10µl[Std.1]+ 20µl T ₁₀ E _{0,1} buffer	3x
Std. 3	5.560	50µl[Std. 2]+ 100µl T ₁₀ E _{0,1} /glycogen	10µl[Std.2]+ 20µl T ₁₀ E _{0,1} buffer	3x
Std. 4	1.850	50µl[Std. 3]+ 100µl T ₁₀ E _{0,1} /glycogen	10µl[Std.3]+ 20µl T ₁₀ E _{0,1} buffer	3x
Std. 5	0.620	50µl[Std. 4]+ 100µl T ₁₀ E _{0,1} /glycogen	10µl[Std.4]+ 20µl T ₁₀ E _{0,1} buffer	3x
Std. 6	0.210	50µl[Std. 5]+ 100µl T ₁₀ E _{0,1} /glycogen	10µl[Std.5]+ 20µl T ₁₀ E _{0,1} buffer	3x
Std. 7	0.068	50µl[Std. 6]+ 100µl T ₁₀ E _{0,1} /glycogen	10µl[Std.6]+ 20µl T ₁₀ E _{0,1} buffer	3x
Std. 8	0.023	50µl[Std. 7]+ 100µl T ₁₀ E _{0,1} /glycogen	10µl[Std.7]+ 20µl T ₁₀ E _{0,1} buffer	3x

Tabelle 13: Ansatz Verdünnungsreihe

3.2.3.3.3 Beurteilung, Auswertung und Qualitätssicherung

Bevor man die Ergebnisse des Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit bewerten kann, muss eine Qualitätssicherung erfolgen. Hierfür wird unter anderem die Standardreihe so wie die IPC herangezogen.

Aus den Einzelkurven der Standardreihe wird nach jedem Real-Time PCR Run mit Hilfe des Programms SDS Software v1.0 eine Regressionsgerade berechnet. Es wird mit Hilfe der Proben der Standardreihe, deren Konzentration an DNA bekannt ist, der entsprechende C_T

wert bestimmt. Die Software legt nun durch diese gemessenen Punkte eine Regressionsgerade. Abbildung 13 zeigt Beispiele dieser Standardkurven.

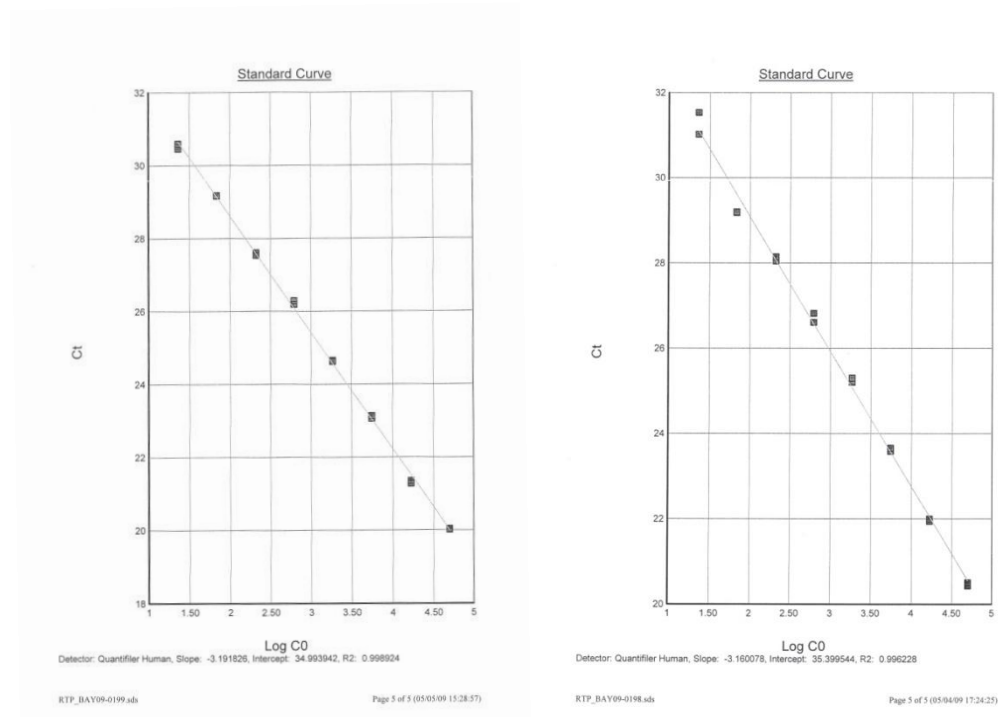


Abbildung 13: Standardverdünnungskurven: auf der X-Achse ist die Anfangskonzentration der Probe dargestellt, auf Y-Achse der CT Wert

Das Verhältnis von C_T Wert und der DNA Konzentration in der Probe lässt sich in folgender Gleichung ausdrücken:

$$C_T = m[\log Qty] + b$$

In dieser Gleichung steht m für die Steigung, Qty ist die Anfangskonzentration der DNA und b ist der Anfangswert. Nur wenn die Steigung dieser Regressionsgeraden zwischen -2,9 und -3,3 liegt, kann das Ergebnis weiterverarbeitet werden. Liegt die Steigung unter -3,3 werden die Daten eher überschätzt, liegt die Steigung über -2,9 (das bedeutet die Gerade verläuft flacher) werden die Ergebnisse unterschätzt. Um die Qualität der Standardkurve zu beurteilen wird noch der Wert R^2 betrachtet. Dieser Wert misst die Abweichung der einzelnen Messpunkte der Standardreihe und der berechneten Geraden, der Standardkurve. Optimal sollte dieser Wert 1 sein, das bedeutet es gibt keine Differenz, alle Punkte liegen genau auf der Geraden. Das ist im ersten Beispiel der Standardkurve zu sehen. Im zweiten Beispiel sieht man eine geringe Abweichung der ersten Werte, diese ist noch nicht von Bedeutung für

die Standardkurve. Erst wenn R^2 auf 0.98 zugeht, müssen die Ergebnisse überprüft werden. Mit Hilfe der so gewonnen und evaluierten Standardkurve kann man nun die Konzentrationen der unbekannten Proben bestimmen, indem man den entsprechenden X-Wert für den bekannten C_T -Wert abliest.

Die IPC ermöglicht die Unterscheidung von „richtig negativen“ Proben und durch PCR Inhibitoren verunreinigte Proben (zu geringe oder keine Amplifikation auf Grund von fehlenden Reagenzien oder fehlerhafter Messung). Man kann in Tabelle 14 mögliche Ergebnisse und deren Interpretationen ablesen.

Quantifiler Human	IPC (VIC Dye)	Interpretation
keine Amplifikation	Amplifikation	richtig negativ
keine Amplifikation	keine Amplifikation	ungültiges Ergebnis
Amplifikation (niedriges C_T und hohes ΔR_n)	keine Amplifikation	IPC Ergebnis ohne Bedeutung
Amplifikation (hohes C_T und niedriges ΔR_n)	keine Amplifikation	Partielle PCR Inhibition

Tabelle 14: Interpretation der IPC Ergebnisse: 1. Spalte gibt das Ergebnis der Amplifizierung an, 2. Spalte gibt das Ergebnis der IPC an. Amplifikation (niedriges C_T und hohes ΔR_n) bedeutet, dass sehr viel Anfangs-DNA Vorliegt. Der C_T wert ist niedrig, die Abweichung dieses C_T werts von der Standardkurve ist gering. Umgekehrt bedeutet Hohes C_T und niedriges ΔR_n , dass wenig Anfangs-DNA vorliegt, und somit der C_T sehr hoch ist, aber auch eine große Abweichung vorliegen kann. In der 3. Spalte ist die Interpretation angegeben.

Die Probe ist tatsächlich negativ, wenn keine Amplifikation stattgefunden hat, aber die IPC ein korrektes Ergebnis geliefert hat.

Wenn beide Werte negativ sind, die der Amplifikation und die der IPC, ist keine Unterscheidung zwischen Mangel an DNA, Vorhandensein von Inhibitoren oder Fehlern der Reagenzien oder Geräten möglich. In der Realität tritt dieser Fall äußerst selten ein.

Wenn extrem große Mengen humaner DNA vorhanden sind, kann es zu einer kompetitiven Hemmung der IPC-PCR kommen. Wenn also sehr hohe Werte bei der Quantifizierung festgestellt werden, aber die IPC zu niedrig ist, ist von Hemmung durch zu große DNA Mengen auszugehen.

Wenn aber eine geringe Amplifikation und kein Ergebnis für die IPC erscheinen, geht man von einer partiellen Hemmung der Probe aus.

Aus dem Ergebnis der IPC kann man nun schließen, welcher Arbeitsschritt erfolgen muss. Die Probe kann entweder amplifiziert werden, nochmals auf gleiche Weise gereinigt werden oder mit zusätzlichen Reinigungsschritten bearbeitet werden.

Ist die Standardkurve im Normbereich ausgefallen und zusätzlich kann man mit Hilfe der IPC auch eine Hemmung der Probe ausschließen, wird davon ausgegangen, dass die Werte für die einzelnen Proben verlässlich bestimmt wurden. Das bedeutet, man kann die Werte „freigeben“ und beurteilen. Man erhält beispielsweise folgenden Ausdruck (Tabelle 15).

1 Well	2 Sample Name	3 Detector	4 Task	5 Ct	6 StdDev Ct	7 Qty	8 MeanQty	9 StdDev Qty
A3	Konrad-Celtis=2.1.03~12-10102a	IPC	Unknown	27.35	0.044			
A4	Konrad-Celtis=2.1.03~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	27.08	0.082	2068.31	1988.40	113.014
B3	Konrad-Celtis=2.1.04~12-10102a	IPC	Unknown	27.41	0.044			
B4	Konrad-Celtis=2.1.04~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	27.20	0.082	1908.49	1988.40	113.014
C3	Konrad-Celtis=2.1.05~12-10102a	IPC	Unknown	28.09	0.534			
C4	Konrad-Celtis=2.1.05~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	27.63	0.300	1416.62	1657.53	340.693
D3	Konrad-Celtis=2.1.06~12-10102a	IPC	Unknown	27.34	0.534			
D4	Konrad-Celtis=2.1.06~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	27.21	0.300	1898.44	1657.53	340.693
E3	Konrad-Celtis=2.1.05~12-10102a	IPC	Unknown	27.08	0.072			
E4	Konrad-Celtis=2.1.05~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	27.19	0.174	1925.91	1775.49	212.721
F3	Konrad-Celtis=2.1.06~12-10102a	IPC	Unknown	27.18	0.072			
F4	Konrad-Celtis=2.1.06~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	27.43	0.174	1625.07	1775.49	212.721
G3	Konrad-Celtis=2.1.06~12-10102a	IPC	Unknown	27.11	0.071			
G4	Konrad-Celtis=2.1.06~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	28.23	0.033	938.12	923.13	21.200
H3	Konrad-Celtis=2.1.06~12-10102a	IPC	Unknown	27.21	0.071			
H4	Konrad-Celtis=2.1.06~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	28.27	0.033	908.14	923.13	21.200
I3	11-041461-1~12-10102a	IPC	Unknown	27.03	0.125			
I4	11-041461-1~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	26.54	0.170	3000.93	2770.72	325.568
J3	11-041461-1~12-10102a	IPC	Unknown	27.21	0.125			
J4	11-041461-1~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	26.78	0.170	2540.51	2770.72	325.568
K3	11-041461-2~12-10102a	IPC	Unknown	27.37	0.022			
K4	11-041461-2~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	24.28	0.176	14364.58	13230.82	1603.388
L3	11-041461-2~12-10102a	IPC	Unknown	27.41	0.022			
L4	11-041461-2~12-10102a	Quantifiler Human	Unknown	24.53	0.176	12097.05	13230.82	1603.388

Tabelle 15: Ausdruck aus dem Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit: In Spalte 1 wird der jeweilige Platz auf der 96- Well Platte beschrieben; in der 2. Spalte wird der Fallname mit Probennummer und Fallnummer genannt; die 3. Spalte gibt die Untersuchung an, die durchgeführt wurde, in unserem Fall die Quantifizierung mittels Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit ; in der 4. Spalte steht die Aufgabe, „unknown“, das bedeutet eine normale Quantifizierung hat stattgefunden; in der 5. Spalte steht der CT-Wert; die 6. Spalte gibt die Standardabweichung des CT-Werts vom Kontrollwert an; in der 7. Spalte wird das Ergebnis der Quantifizierung festgehalten und somit die Aussage, wieviel DNA enthalten ist; in der 8. Spalte wird der Mittelwert aus den zwei Messungen einer Probe berechnet; die 9. Spalte gibt wiederum die Standardabweichung von Qty an

3.2.4 DNA-Typisierung

Die DNA-Typisierung kann in zwei Schritten unterteilt werden. Der erste Schritt ist die Amplifikation der längenvariablen Bereiche (STR's) durch die PCR. Der zweite Schritt ist die

Fragmentlängenbestimmung durch Gelelektrophorese. Die Proben werden gemäß ihrer TaqMan Ergebnisse (wenn möglich) eingestellt, so dass 300-400pg DNA pro PCR-Ansatz enthalten sind. Dies dient der Verbesserung der Amplifikation, da eine gegenseitige Inhibition bei zu hoher Konzentration der Template DNA vermieden werden kann. Bei den von uns zum Zeitpunkt der Arbeit ausgewählten Reagenzien werden acht spezielle STR und das geschlechtsbestimmende Amelogeninsystem amplifiziert. Zuerst erfolgt die PCR Amplifikation durch das Mentyp® Nanoplex^{QS} (Biotype). Erhält man hier ein Profil, erfolgt die Doppelbestimmung mit Hilfe eines anderen Multiplex PCR Kits, in diesem Fall dem AmpF/STR® SEfiler plus (Thermo Fisher). Die Doppelbestimmung ist nötig um eine Reproduzierbarkeit des Ergebnisses sicher zu stellen.

3.2.4.1 Amplification

Bei der Amplifikation werden mit Hilfe der Multiplex PCR neun Regionen auf der DNA gleichzeitig vervielfältigt. Beide Kits amplifizieren die gleichen neun STRs, der AmpF/STR® SEfiler plus (Thermo Fisher) amplifiziert zusätzlich noch drei weitere STRs, die aber im Rahmen dieser Arbeit nicht ausgewertet wurden. Der Unterschied der beiden Kits liegt darin, dass sie unterschiedliche Primer verwenden und somit eine unterschiedliche Anordnung der STRs, basierend auf einer unterschiedlichen Länge der Amplikate, erreichen. Primer für die einzelnen Loci sind mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert.

3.2.4.1.1 STR Typisierung mit Mentyp® Nanoplex^{QS}

Inhalt Mentype® Nanoplex^{QS} PCR Amplification	
Nukleasefreies Wasser	3,0ml
Reaktionsgemisch A	500µl
Primergemisch	250µl
Kontroll DNA XY1	10µl
DNA Längenstandard 550	50µl
Allelleiter	10µl

Tabelle 16: Inhalt des Mentype® Nanoplex^{QS} PCR Amplifikation Kit

JumpStart™ Taq DNA Polymerase	Hot start, 2,3U/μl, 50U
Hi-Di™ Formamide	25ml
Matrix Standards DS-30 für ABI PRISM®	

Tabelle 17: zusätzliche Reagenzien

Mit dem Mentyp Nanoplex PCR Amplification Kit werden folgende acht polymorphe STR-Loci typisiert: D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA (FIBRA), SE33 (ACTBP2), TH01 (TC11), vWA und Amelogenin. (siehe Tabelle 18).

Locus	GenBank® Accession	Repeatmotiv des Referenz Allels	Referenz Allel	Allel- Bereich
Amelogenin	M55418			
Amelogenin	M55419			
D3S1358	11449919	TCTA[TCTG] ₂ [TCTA] ₁₅	18	8-26
D8S1179	G08710	[TCTA] ₁₂	12	6-21.2
D18S51	L18333	[AGAA] ₁₃	13	5.3-42
D21S11	AP000433	[TCTA] ₄ [TCTG] ₅ [TCTA] ₃ TA[TCTA] ₃ TCA[TCTA] ₂ T CCATA[TCTA] ₁₁	29	12-46
FGA/FIBRA	M64982	[TTTC] ₃ TTTTTCT[CTT T] ₁₃ CTCC[TTCC] ₂	21	12.2- 51.2
SE33/ACTB P2	NG000840	[AAAG] ₉ AA[AAAG] ₁₆	25.2	3-50
TH01/TC11	D00269	[TCAT] ₉	9	3-14
vWA	M25858	TCTA[TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃	18	10-26

Tabelle 18: STR Locus-spezifische Information für Mentype® NanoplexQS

Der Mastermix wird nach Angaben des Herstellers aus 7,1μl nukleasefreiem Wasser, 5μl Reaktionsgemisch A, 2,5μl Primergemisch und 0.4 μl Taq DNA Polymerase pro Probe angefertigt (Tabelle 19). Nun wird 300-400pg zu amplifizierenden DNA zu dem Mastermix gegeben und mit Reinstwasser auf ein einheitliches Reaktionsvolumen von 25μl ergänzt. Für die Positivkontrolle wird die Kontroll-DNA XY1 verwendet und auf 0,5ng in den 25μl verdünnt. Als Negativkontrolle wird anstelle der Probe nukleasefreies Wasser verwendet. Dieser Arbeitsschritt kann mit Hilfe des Pipettierroboters durchgeführt werden. Zur

Aktivierung der Hot-Start-Taq-Polymerase werden zu Beginn alle Proben für 4min auf 94°C in dem Thermocycler erhitzt. Hierbei wird das Protein, das die Hot-Start-Taq-Polymerase inhibiert, durch Erhitzen denaturiert. Die Proben werden nun für 30s auf 94°C erhitzt, dann für 120s auf 60°C abgekühlt und nochmals für 75s auf 72°C erhitzt. Dieser Zyklus wird 30-mal wiederholt und am Ende wird die Probe für 60min auf 68°C abgekühlt und danach bis auf 10°C abgekühlt (Tabelle 20). In Ausnahmefällen, bei sehr wenig DNA Gehalt in einer Probe, können auch 34 Zyklen durchgeführt werden. Öfter kann der Zyklus nicht wiederholt werden, da es limitierende Faktoren für eine PCR gibt. Dies erklärt den nicht bis zum Ende exponentiellen Verlauf der PCR. Ursachen dafür sind: Primer und dNTPs werden verbraucht, die Polymerase wird durch ständiges Erhitzen und Abkühlen geschädigt und es können sich die einzelnen Stränge wieder aneinander lagern und so die PCR hemmen.

Komponente	Volumen pro Reaktion
Nukleases-freies Wasser	14,1
Reaktionsgemisch A *	5,0
Primergemisch	2,5
Taq DNA Polymerase (hot start 2,5 U/μl)	0,4

Tabelle 19: Mischung des Mastermix: *enthält Mg²⁺, dNTP Mix, BSA

Hot Start für Aktivierung der JumpSTART™Taq DNA Polymerase	Zyklen (30 Zyklen)			Bis zum Ende	
	Denature	Anneal	Extend		
94°C	94°C	60°C	72°C	68°C	10°C

Tabelle 20: Thermocyclerschritte

3.2.4.1.2 STR Typisierung mit AmpF/STR® SEfiler plus

AmpF/STR® SEfiler plus	
AmpF/STR® SEfiler Plus™ Primer Set	Forward und Revers primer
AmpF/STR® SEfiler Plus™ Master Mix	Enzyme, Salze, dNTPs, Carrier Proteine, 0,05% ige Salzsäure
AmpF/STR® SEfiler Plus™ Allelic Ladder	
AmpF/STR® Control DNA 007	0,1 ng/µl humane männliche DNA in 0,2% Salzsäure und puffer

Tabelle 21: Inhalt des AmpF/STR®SEfiler plus Amplifikation Kit

Unter Verwendung der AmpF/STR SEfiler Plus™ werden folgende 11 polymorphe STR-Loci typisiert: D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA (FIBRA), SE33 (ACTBP2), TH01 (TC11), vWA, D2S1338, D16S539, D19S433 und das geschlechtsspezifische Amelogenin. Nachdem die Proben eingestellt und gegebenenfalls verdünnt wurden, wird ein Mastermix nach Herstellerangaben hergestellt (Tabelle 22). In 15µl des Mastermixes wird die zu amplifizierende DNA gegeben, so dass 25µl Gesamtvolumen vorhanden sind, falls nötig mit Reinstwasser auf 25 µl aufgefüllt. Als Positivkontrolle läuft die Kontroll-DNA „007“ mit, als Negativkontrolle wird Reinstwasser verwendet. Auch diese Arbeitsschritte können von dem Biorobot 8000 übernommen werden. Der darauffolgende PCR-Zyklus beginnt mit einer Erhitzung auf 95°C für 11min. 30 Zyklen lang wird die DNA bei 94°C für 20s denaturiert, für 2min auf 59°C abgekühlt und zur Anheftung wieder für 1min auf 72°C erwärmt. Am Ende wird alles für 60min auf 60°C gehalten, um es dann auf 4°C abzukühlen (Tabelle 23).

Komponente	Volume pro Reaktion (µl)
AmpFISTR® SEfiler Plus™ Master Mix	10.0
AmpFISTR® SEfiler Plus™ Primer Set	5.0

Tabelle 22: Mastermix

Anfangs Aktivierung	Zyklen (30 Zyklen)			Finale Extension	Finales Ende
	Denature	Anneal	Extend		
HOLD	CYCLE			HOLD	HOLD
95°C	94°C	59°C	72°C	60°C	4°C

Tabelle 23: Thermocyclerschritte

3.2.4.2 Elektrophorese

Nach der Amplifizierung der STRs folgt die Fragmentlängenbestimmung mit Hilfe der Elektrophorese. Das Prinzip der Elektrophorese ist, mittels Spannung die DNA Fragmente der Größe nach aufzutrennen. Hierfür benötigt man ein gelartiges Leitmedium. An dieses gelartige Medium legt man zwei Elektroden an, so dass ein Spannungsfeld entsteht. Die DNA Moleküle besitzen eine eigene Ladung, sie sind negativ geladen, das bedeutet, sie wandern auf die Anode zu. Hierbei wandern die kleinen Moleküle schneller, da sie sich schneller durch die Gelmaschen bewegen können und es kommt zu einer Auftrennung der DNA-Fragmente der Größe nach. Der ABI Prism 3130X ist ein Kapillargelelektrophoresegerät. Im Unterschied zu den früher verwendeten Gelplatten läuft hier jede Probe einzeln durch eine Kapillare, die mit gelartiger Substanz gefüllt ist und dann unter Spannung steht. Hierbei wird jede Probe einzeln in ihrer Kapillare gemessen. Vorteile zu einer Gelplatte sind, dass diese nicht erst gegossen werden muss und die Proben nicht einzeln in die Gelblocktaschen pipettiert werden müssen. Das Beladen der Kapillare und somit das Abarbeiten der Proben kann automatisiert werden.

Um die genaue Länge der einzelnen Amplifikate zu bestimmen, benötigt man noch einen Längenstandard, der alle Peaks zwischen 60 und 500 bp darstellt und so eine Zuordnung von Peak zu einer bestimmten Basenpaarlänge möglich macht.

Bevor man die Proben in den ABI Prism 3130X geben kann, müssen sie bei 95°C für 2min und 30s denaturiert werden. Bei der Kapillarelektrophorese gibt man 2µl des Amplifikats zu 20µl Gemisch, bestehend aus Hi-Di-Formamide und DNA-Längenstandard (Matrixvorbereitung in Tabelle 24 und Tabelle 25).

Komponente	Volumen pro Reaktion (µl)
Hi-Di™ Formamide	12,0
DNA Längenstandard 550 (ROX)	0,5

Tabelle 24: Gemischvorbereitung Mentyp® NanoplexQS

Komponente	Volumen pro Reaktion (µl)
GeneScan™ 600 LIZ® Size	0,6
Hi-DI™ Formamide	8,4

Tabelle 25: Gemischvorbereitung AmpF/STR® SEfiler plus

Maximal 96 Proben können auf einer Well-Platte in den ABI PRISM 3130X Genetic Analyzer eingesetzt werden. Es erfolgt eine automatisierte Beladung der Kapillaren aus der Well-Platte. Pro Lauf werden zusätzlich jeweils zwei allelische Leitern dazu gegeben. Allelische Leitern sind ein Mix aus allen Allelen eines STR Systems, die in einer Population üblicherweise vorkommen (Abbildung 14). Hiermit wird die Zuordnung von einem Peak zu einem STR System und somit die genaue Bestimmung der einzelnen Merkmale möglich. Auf diese Weise kann man die exakte Länge der Amplifikate bestimmen.

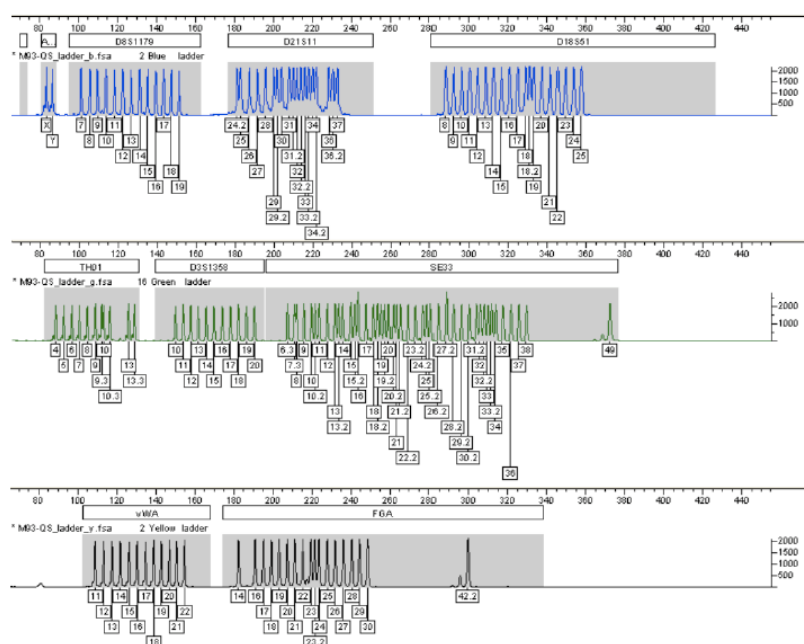


Abbildung 14: vollständige Fragmentübersicht der allelischen Leiter des Mentyp® Nanoplex Kits

Die Amplifikate werden mittels einer Fluoreszenzmarkierung, die sich auf dem Primer befindet, sichtbar gemacht. Dafür benötigt man ein Laser-Detektor-System. Der Laser bestrahlt die Kapillare. Bewegt sich nun ein fluoreszenzmarkiertes Molekül vor diesem Laser, wird das Molekül angeregt, emittiert eine Fluoreszenz und diese wird vom Detektor erfasst. In den hier verwendeten Kits werden die vier Fluoreszenzstoffe, 6 FAM, HEX, NED und ROX verwendet. Durch die unterschiedlich markierten Amplifikate kann eine gleichzeitige Amplifikation von verschiedenen STR-Regionen bewerkstelligt werden. STR-Regionen, die eine ähnliche Länge der Amplifikate umfassen, können nicht mit dem gleichen Farbstoff markiert werden, da man sie sonst nicht unterscheiden kann. Es können nur STR-Regionen, deren Amplifikate eine unterschiedliche Länge aufweisen, mit dem gleichen Farbstoff markiert werden. So ist es möglich, alle Amplifikate einer Multiplex in einem Lauf gleichzeitig zu erfassen.

3.2.5 Qualitätssicherung, Auswertung und biostatistische Beurteilung

Auch bei der DNA-Typisierung muss eine Qualitätssicherung erfolgen. Jeder Peak muss eindeutig einem Merkmal eines STR-Systems zugeordnet werden können. Peaks über 50 Relative-Fluoreszenz-Unit (RFU) werden als echt gewertet. Hierfür wird zuerst der Längenstandard (Size Standard) geprüft. Alle Fragmente zwischen 75bp und 400bp sollten bei den Ergebnissen sichtbar sein und die Peaks müssen korrekt zugeordnet sein. Als nächster Schritt wird die Allelische Leiter (Allelic Ladder) überprüft und hierzu wird die gemessene Allelische Leiter mit den von der Firma erstellten Vorgaben verglichen. Hierdurch wird die korrekte Benennung der Leiterallele überprüft, sowie die entsprechende 1bp-Auftrennung. Zusätzlich führt man bei jeder Messung eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mit. Bei der Negativkontrolle, in dieser Arbeit nukleasefreiem Reinstwasser, darf es zu keinem Ergebnis kommen, da sonst eine Kontamination der Reagenzien vorliegt. Als Positivkontrolle wird Kontroll-DNA verwendet, die auf jeden Fall amplifiziert werden muss, da sonst ein Fehler im Reaktionsablauf vorliegen kann.

Erst nach der Überprüfung des Laufs und korrekter Benennung kann eine Auswertung der Proben durch einen Sachverständigen erfolgen. Dieser entscheidet, ob die Ergebnisse eines Laufs freigegeben werden. In dieser Arbeit werden die Proben doppelbestimmt, indem man zwei unterschiedliche Amplifizierungs-Kits verwendet, um eine Reproduzierbarkeit des Ergebnisses zu überprüfen. Diese Doppelbestimmung erfolgt nur, wenn im ersten Lauf Allele

detektiert worden sind. Erhält man hier kein Ergebnis, wird auf die Doppelbestimmung verzichtet.

Im Idealfall erhält man ein eindeutiges Profil, bei dem jedes der neun Systeme maximal zwei Allele zeigt. Hier spricht man von einem Vollprofil einer Person, siehe Beispielprofil (

Abbildung 15):

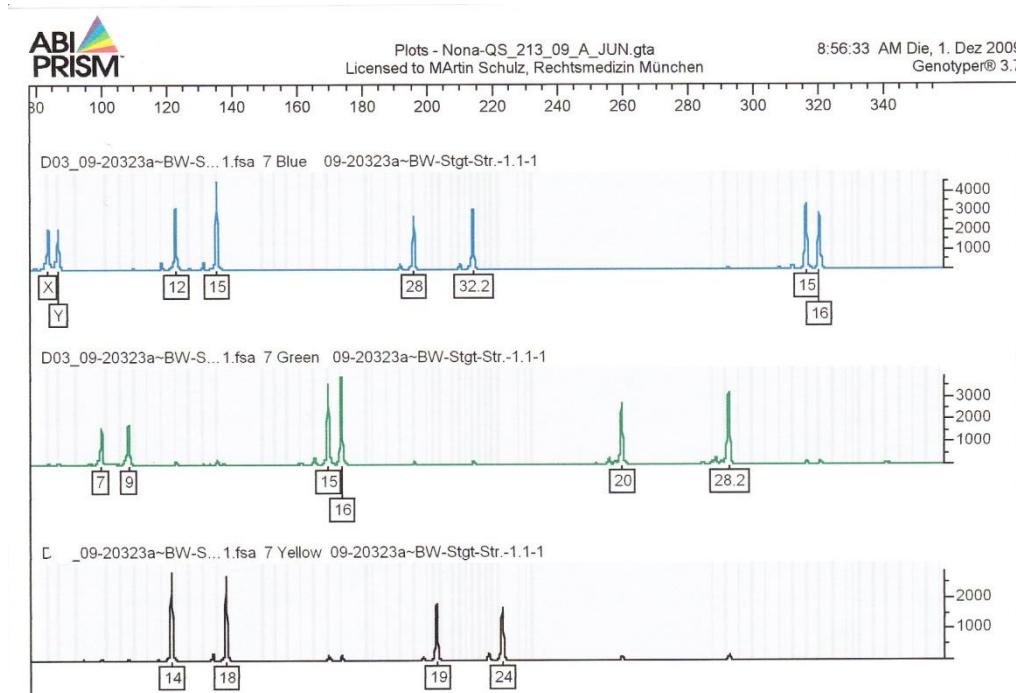


Abbildung 15: DNA Profil

Ein Teilprofil liegt vor, wenn nicht in allen 9 Systemen jeweils zwei Merkmale darstellbar sind. Hier werden die Merkmale, die vollständig erkannt werden, benannt, zum Beispiel 8 Merkmale von 9 Systemen. Ein Sonderfall liegt vor, wenn der Spurverursacher homozygot ist, hierbei kann nur 1 Merkmal anstatt der sonst zwei dargestellt werden.

Neben dem Einzelmuster kann auch eine Mischung von mehreren Personen vorliegen. Von einer Mischspur spricht man, wenn man bei mindestens zwei Systemen mehr als zwei Allele findet. Von der Anzahl der Allele in einem System kann man auf die Anzahl der Spurenverursacher rückschließen. Liegen vier Allele in einem System vor, geht man von mindestens zwei Spurenverursachern aus. Liegen sechs Allele vor geht man von mindestens drei Spurenverursachern aus. Liegen mehr als sechs Allele vor, ist die Einschränkung auf eine bestimmte Personenanzahl fast nicht mehr möglich beziehungsweise sinnvoll. Eine Besonderheit ist das Vorliegen von drei Allelen in nur einem System, hier muss es sich nicht

unbedingt um eine Mischung von Personen handeln, sondern es kann die genetische Besonderheit einer Trisomie vorliegen.

Hat man die Mindestanzahl der Spurverursacher festgestellt, kann man gegebenenfalls noch zwischen Hauptverursachern und Nebenspur unterscheiden. Hierbei werden die Peakhöhe und das Verhältnis der Peaks zueinander zur Hilfe gezogen.

Besonderheiten bei der Auswertung sind „allelic drop out“, „allelic drop in“, „Zusatzbanden“, „Stutter“ und „multiple Bandenmuster“.

„Allelic drop out“ oder „Allelic drop in“ können bei einer Einzelmessung festgestellt werden. Bei „allelic drop out“ werden auf Grund der geringen Mengen an DNA oder der schlechten Qualität der DNA bestimmte Allele von der PCR nicht erfasst und können so nicht amplifiziert werden (Beispiel in Abbildung 16). Als „Allelic drop in“ wird es bezeichnet, wenn ein zusätzliches Merkmal, welches nicht zum eigentlichen Genotyp des Spurenverursachers gehört, in der Amplifizierung sichtbar ist. Dies kann durch Artefactbanden passieren, oder, wie in den meisten Fällen, durch Kontamination. Die Probe wurde dann nicht mit einem kompletten Profil verunreinigt, sondern nur mit kleinen Bruchstücken.

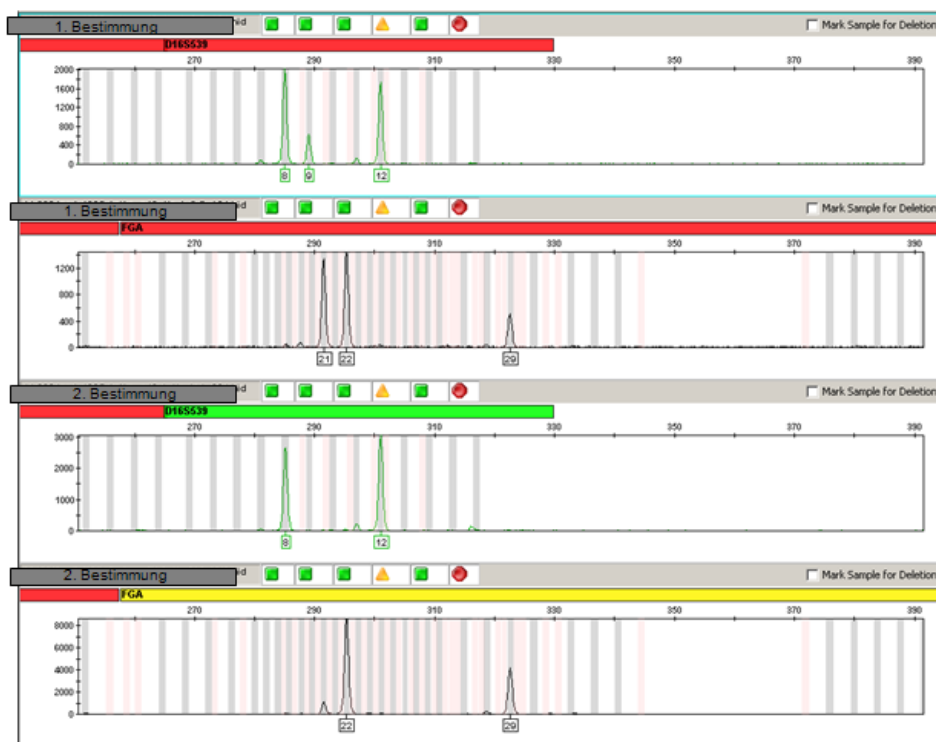


Abbildung 16: Beispiel für „Allelic drop out“: im ersten Lauf in zwei STR Systemen wurden die Banden 8, 9, 12, 21, 22, und 29 dargestellt. Im zweiten Lauf konnten nur die Banden 8, 12, 22 und 29 dargestellt werden. Es kam zum Drop out für Bande 9 und 21

„Zusatzbanden“ kann man nur bei der Doppelbestimmung feststellen, wenn ein Vergleich zweier Läufe möglich ist. Hierbei handelt es sich um eine Bande, die in einem Lauf sichtbar ist und in einem anderen Lauf nicht sichtbar ist, zum Beispiel ein drop out im 1. Lauf.

Ein „Stutter“ ist ein um einen Repeat verschobener Peak, dieser kann ein verlängertes oder verkürztes Amplicon sein. Es handelt sich um einen Artefakt bei der PCR, der fast immer vor einem Hauptpeak sichtbar ist und dessen Höhe bis zu 15% des Hauptpeaks ausmachen kann.

Bei sehr degradierter DNA erhält man zwar ein Signal, es stellt sich aber bei der weiteren Untersuchung heraus, dass es sich um ein multiples Bandenmuster von degradierter DNA handelt. Bei beiden Läufen entsteht ein völlig unterschiedliches Muster. Hierbei handelt es sich um nicht reproduzierbare Bandenmuster, die nicht realistisch sind und somit nicht aussagekräftig.

3.3 Statistische Aufarbeitung

3.3.1 Statistische Datensammlung

Die hierfür verwendeten Daten stammen aus Routinefällen (Spuren aus dem minderschweren Deliktsbereich wie beispielsweise Eigentumsdelikte) aus den Jahren 2007 bis 2009. Hierbei werden insgesamt 3100 Proben aus 734 Fällen begutachtet. 32 Proben wurden nicht in die weitere Auswertung einbezogen, da es sich hier um Vergleichsproben handelte. Für die restlichen 3068 Proben werden zur Auswertung in einer Tabelle neben Fallnummer, Probennummer und Probenart, die Güte des erhaltenen Profils sowie die beiden Ergebnisse der Quantifizierung (im Folgendem als TaqMan bezeichnet) und der sich daraus errechnete Mittelwert erfasst (Tabelle 26). Hinzu kommen 97 Proben in der Nachuntersuchung.

2					TaqMan			Identifikationsprofil		
3	Gutachtennummer	Probenart	Probennummer		Qty Wert1	Qty Wert 2	Mean Qty	Ergebniss	Personen Profil	Systeme
4	2009-22-000535	Abri	Abrieb 2 Blutspur	G	674	693	683,5	positiv	1 Person	9 Systeme
5	2009-22-000535	Abri	Abrieb 3 Blutspur	G	384	374	379	positiv	1 Person	9 Systeme
6	2009-22-000535	Abri	Abrieb 4 Blutspur	G	1736	1816	1776	positiv	1 Person	9 Systeme
7	2009-22-000541	Abri	Abrieb 1.1	S	9	7	8	positiv	Mischung von mind.	28 Systeme
8	2009-22-000541	Abri	Abrieb 1.2	S	95	97	96	positiv	Mischung von mind.	39 Systeme
9	2009-22-000541	Abri	Abrieb 2.1	S	4	6	5	positiv	Mischung von mind.	49 Systeme
10	2009-22-000541	Abri	Abrieb 2.2	S	7	20	13,5	positiv	multiple Bandenmuster	degradierte DNS
11	2009-22-000541	Abri	Abrieb 2.3	S	94	191	142,5	positiv	Mischung von mind.	39 Systeme
12	2009-22-000542	Abri	Abrieb 5	S	0	9	4,5	negativ		
13	2009-22-000542	Abri	Abrieb 6	S	30	42	36	positiv	Mischung von mind.	39 Systeme
14	2009-22-000542	Abri	Abrieb 7	S	4	5	4,5	negativ		
15	2009-22-000544	Abri	Abrieb 7	S	0	0	0	negativ		
16	2009-22-000544	Abri	Abrieb 8	S	0	4	2	negativ		
17	2009-22-000543	Abri	Abrieb 1	S	0	0	0	negativ		
18	2009-22-000543	Abri	Abrieb 2	S	0	0	0	negativ		
19	2009-22-000543	Abri	Abrieb 3	S	0	0	0	negativ		
20	2009-22-000543	Abri	Abrieb 4	S	1	2	1,5	positiv	Mischung von mind.	29 Systeme
21	2009-22-000501	Abri	Abrieb	G	0	2	1	negativ		
22	2009-22-000500	Abri	Abrieb	G	36368	37918	37143	positiv	1 Person	9 Systeme
23	2009-22-000499	Abri	Abrieb	G	1	7	4	negativ		

Tabelle 26: Auszug aus der RohdatenTabelle

3.3.2 Detaillierte Auswertung nach TaqMan

In dieser Arbeit geht es darum, ob es möglich ist, einen Grenzwert zu finden, der eine verlässliche Aussage darüber zulässt, ab welchem TaqMan-Wert eine Probe weiterverarbeitet werden sollte oder verworfen werden kann. Hierbei sollen einerseits möglichst wenige Ergebnisse falsch negativ aussortiert werden und andererseits Proben nicht unnötig der Genotypisierung zugeführt werden. Für diese Grenze wählen wir den Wert 2%. Das bedeutet, wenn die Wahrscheinlichkeit für ein verwertbares Ergebnis über 2% liegt, sollte die Probe auf alle Fälle weiteruntersucht werden. Die 2%-Hürde wurde in Absprache mit den auftraggebenden Polizeidienststellen des Instituts für Rechtsmedizin festgelegt.

In der Auswertung wird zuerst festgelegt, welche Ergebnisse verwertbar sind und welche nicht. Im nächsten Schritt werden die Daten deskriptiv betrachtet und dann mit Hilfe des Programms SAS ausgewertet.

3.3.3 Allgemeine Gültigkeit der Aussagen - Signifikanz

Nachdem die Ergebnisse deskriptiv betrachtet worden sind, folgt die Überprüfung der TaqMan-Ergebnisse auf ihre allgemeine Gültigkeit und somit, ob sie auf zukünftige Analysen übertragbar sind. Die Ergebnisse werden als signifikant bezeichnet, wenn die der Hypothese

widersprechenden Ergebnisse nicht durch Zufall erklärt werden können. Es liegt somit ein überzufälliger Zusammenhang vor.

Hierfür wird mit einem Signifikanztest gezeigt, ob die Wahrscheinlichkeit für ein verwertbares Ergebnis signifikant kleiner der von uns gesetzten Grenze, nämlich den 2%, ist.

Für jeden statistischen Test wird die zu „beweisende Aussage“ als Gegenhypothese H_1 formuliert. In dieser Arbeit lautet sie: die Wahrscheinlichkeit, dass ein verwertbares Ergebnis eintritt, die Verwertbarquote, ist kleiner als 0,02. Die Nullhypothese H_0 ist das Gegenteil davon und lautet: Die Wahrscheinlichkeit, dass ein verwertbares Ergebnis eintritt ist größer oder gleich 0,02.

Ziel des Tests ist es, die Nullhypothese signifikant zu einem festgelegten Signifikanzniveau α zu verwerfen. Bei den Werten handelt es sich um Zufallsbetrachtungen. Man kann eine falsche Entscheidung nicht sicher ausschließen, deswegen will man die Wahrscheinlichkeiten für falsche Entscheidungen sehr gering halten. Das Signifikanzniveau bestimmt eine Grenze für die Wahrscheinlichkeit eines Fehlers erster Art bei statistischen Tests. Ein Fehler erster Art besagt, die Nullhypothese H_0 wird abgelehnt, obwohl sie zutrifft. Hier bedeutet das, die Wahrscheinlichkeit dass der Test sich für eine Verwertbarquote $< 0,02$ entscheidet, obwohl in Wirklichkeit die Verwertbarquote mindestens 0,02 beträgt, ist höchstens das vorgegebene Signifikanzniveau α . Übliche Werte für α sind 0,05, 0,01 oder 0,005 – je kleiner der gewählte Wert ist, desto geringer muss die Fehlerwahrscheinlichkeit und desto sicherer soll die Aussage sein. Wir wählen α ist 0,01.

Eine Signifikanz kann nur erreicht werden, wenn das beobachtete Ergebnis erheblich unter dem vorgelegten Wert ist, das ist eine Art Sicherheitsabstand.

Als statistischer Test wird der Binomialtest verwendet. Hier ist die Testgröße binomial verteilt: das bedeutet, man zählt bei n-facher, unabhängiger Durchführung eines Experimentes mit Ausgängen „verwertbar“ und „nicht verwertbar“ die Anzahl verwertbarer Versuchsausgänge. Der Ausgang „verwertbar“ tritt mit der unbekannten Wahrscheinlichkeit P auf. Die Wahrscheinlichkeit P soll in diesem Fall mit P gleich 0,02 laut Nullhypothese berechnet werden.

Zu Zeiten leistungsschwacher Rechner und bei großen n-Werten war die exakte Verteilung schwer zu berechnen und man wählte daher oft eine Annäherung an die Normalverteilung. Diese Annäherung ist hier nicht gut durchzuführen, weil die Anzahl der Fälle und auch der Anteil klein sind. Heutzutage ist es relativ einfach möglich, an Stelle der schlechten Annäherung die exakte Verteilung zu berechnen. Die Formel lautet:

$$P(X = i) = b(i|p_0, n) = \binom{n}{i} p_0^i (1 - p_0)^{n-i}$$

P ist die Wahrscheinlichkeit, i ist die Anzahl der verwertbaren Ergebnisse, p_0 ist die Wahrscheinlichkeit von 0,02 und n ist die Anzahl der wiederholten Versuche. In Excel wird dies mit der rekursiven Formel berechnet, dass bedeutet es wird immer das Ergebnis des vorherigen Schrittes verwendet um das neue Ergebnis zu berechnen. Die Formel lautet:

$$P(X = i) = b(i|p_0, n) = b(i - 1|p_0, n)(n - (i - 1)) \frac{p_0}{i(1 - p_0)}$$

Das Ergebnis des Signifikanztestes für die vorliegenden Daten wird in Kapitel 4.3 dargestellt. Im Anhang ist die Berechnung ausgeführt.

Aus diesen Wahrscheinlichkeiten wird durch Summation der Wahrscheinlichkeit berechnet, dass höchstens k positive Ergebnisse auftreten

$$P(X \leq k) = \sum_{i=0}^k P(X = i) = \sum_{i=0}^k b(i|p_0, n)$$

Beim Signifikanztest entscheidet man sich gegen H_0 und für die Signifikanz von H_1 , wenn die beobachteten Werte kleiner gleich einem theoretischen Wert k sind, der von α , n und p_0 abhängt. Dieser Wert k heißt kritischer Wert. Für ihn muss $P(X \leq k) \leq \alpha$ sein, weil damit die Wahrscheinlichkeit für einen Fehler 1. Art (Entscheidung für H_1 obwohl H_0 gilt) kleiner gleich α bleibt. Man braucht dann nur zu schauen, ob der beobachtete Wert kleiner gleich diesem theoretischen „kritischen“ Wert ist. In der Tabelle 31 sind die Wahrscheinlichkeiten $P(X = i)$, $P(X \leq i)$ für $\alpha=0,01$ und $p_0=0,02$ und $n=1071$ (diese Anzahl ist im Verlauf die Entscheidende) dargestellt und der kritische Wert markiert.

3.3.4 Technisches zur Bearbeitung:

Programm zur Übernahme und Aufarbeitung der Daten, sowie zur Erstellung von Grafiken zur Veranschaulichung und Berechnung der Binomialverteilung ist Microsoft Office Excel 2007.

Das Programm zur Bearbeitung und Auswertung der Daten ist SAS. Das Programm ist im Anhang abgebildet.

3.3.5 Nachuntersuchung einiger Werte

Nachdem wir anhand unserer Daten eine signifikante Grenze festgelegt haben, wird diese Aussage nochmals an einer getrennten Stichprobe überprüft. Hierfür werden 97 Proben durch Zufall ausgewählt, deren Mittelwert zwischen 0-5pg/ μ l DNA liegt. Unter denselben Messbedingungen werden auch an diesen Proben sämtliche Tests durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 *Betrachtung der Ergebnisse*

4.1.1 Einteilung in „verwertbar“ oder „nicht verwertbar“

In den Rohdaten (Tabelle 26) wird im ersten Schritt in der Spalte „Ergebnisse“ erfasst, ob grundsätzlich Allele detektiert worden sind oder nicht. Dies wird als positiv oder negativ festgehalten und wird nur für eine laborinterne Entscheidung verwendet. Wenn keine Allele auftreten, also hier negativ steht, wird auf die zweite Amplifizierung verzichtet. Erst durch die Ergebnisse aus beiden Amplifizierungen kann eine Aussage zu einem Identifikationsprofil getroffen werden. In den nächsten Spalten wird nun erfasst, in wie vielen Systemen Merkmale nachgewiesen werden konnten. Folgende Spannbreite der Ergebnisse wird diskutiert: Merkmale in 9 von 9 Systemen, Merkmale in 8 von 9 Systemen, Merkmale in 7 von 9 Systemen, Merkmale in 6 von 9 Systemen, Merkmale in 0 oder 1 von 9 Systemen, multiple Bandenmuster und kein Ergebnis. Merkmale in 5, 4, 3 und 2 von 9 Systemen treten als Ergebnis bei unseren Proben nicht auf. Darauf folgt die Einteilung, ob das Profil aussagekräftig ist oder nicht. Das Profil ist aussagekräftig wenn in mehr als 6 Systemen Merkmale erkannt werden. Anhand der Merkmale in den Systemen erfolgt die Einteilung in Vollprofil und Teilprofil. Wenn alle Merkmale des Systems vollständig darstellbar sind, also in 9 Systemen alle Merkmale (einmal oder zweimal entspricht entweder homozygoter oder heterozygoter Konstellation) auftreten, spricht man von Vollprofil. Sind nur in 8, 7 oder 6 Systemen die Merkmale vollständig, spricht man von Teilprofil. Merkmale in nur einem System oder überhaupt keine Merkmale, sowie multiple Bandenmuster werden als nicht verwertbare Ergebnisse zusammengefasst.

Hieraus folgt die Einteilung in verwertbare und nicht verwertbare Ergebnisse, die in Tabelle 27 dargestellt ist.

		Anzahl gesamt	3068
		Nicht verwertbar	1800
		verwertbar	1268
verwertbar	Vollprofil	gesamt	1183
		1 Person	792
		Mischung mit Hauptkomponente	191
		Mischung	200
	Teilprofil	gesamt	85
		1 Person	24
		Mischung mit Hauptkomponente	9
		Mischung	52
nicht verwertbar	nicht verwertbar	gesamt	211
		multiple Bandenmuster	160
		1-0 Systeme	51
	kein Profil	gesamt	1589

Tabelle 27: Aufteilung der Rohdaten in verwertbare und nicht verwertbare Ergebnisse: Die Anzahl der verwertbaren Ergebnisse setzt sich aus Vollprofil und Teilprofil zusammen, diese werden noch mal unterteilt in 1 Person und Mischung mit oder ohne Hauptkomponenten. Die nicht verwertbaren Ergebnisse teilen sich auf in nicht verwendbare Ergebnisse, bestehend aus 1 und 0 Systeme, multiple Bandenmuster und kein Profil.

Verwertbar sind alle Ergebnisse, die ein aussagekräftiges Profil erhalten. Diese Gruppe besteht aus Vollprofilen und Teilprofilen und beinhaltet 1.268 Proben. Nicht verwertbar bleiben alle Ergebnisse, die von Anfang an kein Signal ergaben, also negativ waren. Zusätzlich kommen alle Proben hinzu, deren Ergebnis nicht verwertbar ist (mbm). Insgesamt beinhaltet diese Gruppe 1.800 Proben.

In Tabelle 27 ist bei Voll- und Teilprofilen darüber hinaus festgehalten worden, ob es sich um eine Einzelspur, also DNA von einer Person handelt, oder Mischspuren. Bei Mischspuren wurde auch die Mindestanzahl der Personen, die zur Mischung beigetragen haben, festgehalten und ob gegebenenfalls eine Hauptkomponente abzuleiten war. Diese Information muss hier nicht weiter betrachtet werden, da es sich hier um eine inhaltliche Information handelt, die unabhängig von der technischen Bearbeitung ist.

4.1.2 Deskriptive Auswertung nach TaqMan

Um einen Überblick über die Daten zu gewinnen werden die Proben in Gruppen mit Hilfe des TaqMan-Mittelwerts eingeteilt. Es werden folgende vier Gruppen erstellt: Mittelwert von 0-5pg/μl, >5-10pg/μl, >10-30pg/μl und >30pg/μl. In jeder Gruppe werden die verwertbare oder nicht verwertbare Ergebnisse aufgezählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 graphisch dargestellt

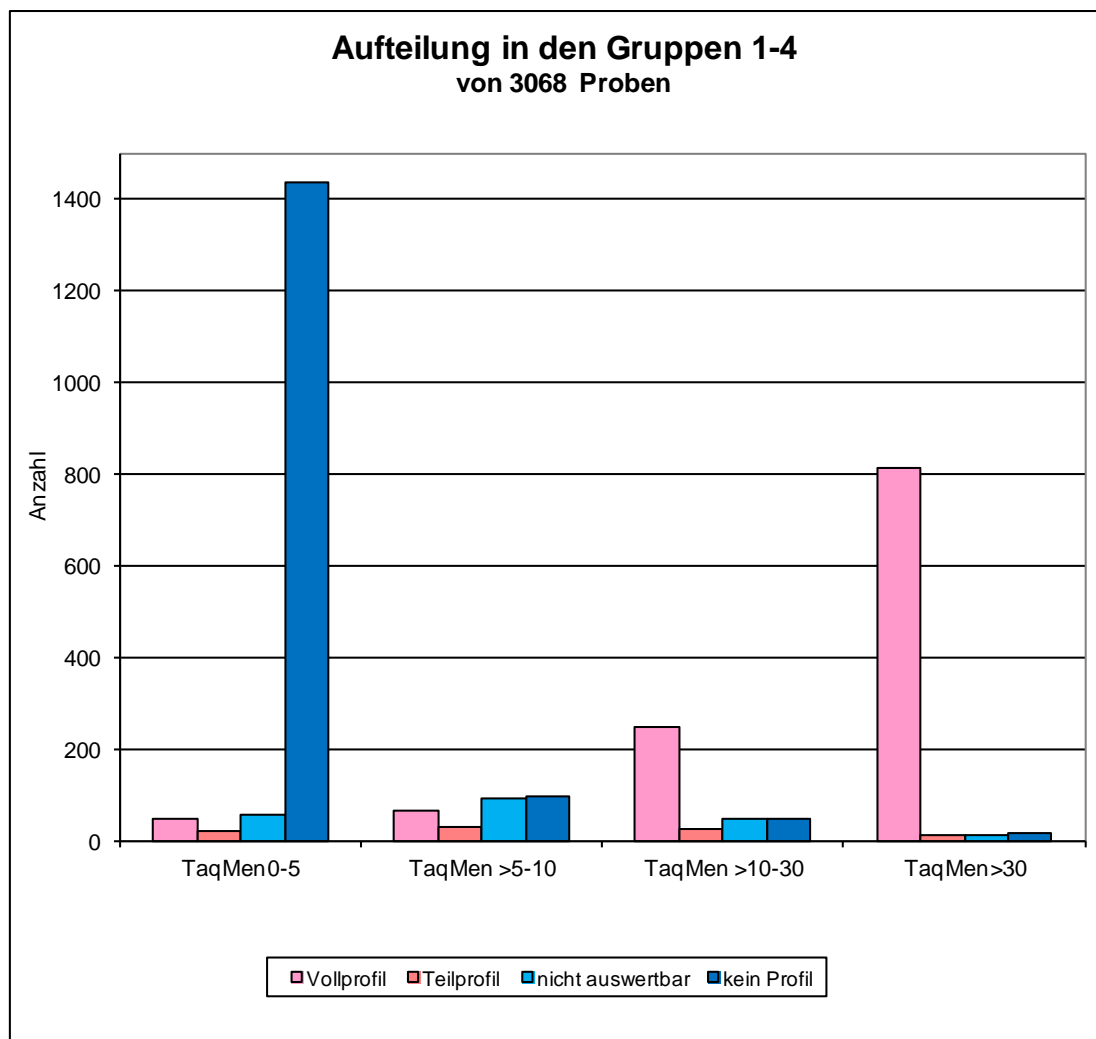


Abbildung 17: Aufteilung in den einzelnen TaqMan Gruppen: auf der X-Achse werden die vier Gruppen dargestellt, auf der Y-Achse werden die Anzahl der Proben dargestellt. Jede der vier Gruppen besteht aus vier Blöcken. Jeder Block gibt die Anzahl der Proben mit Vollprofil, Teilprofil, keinem Profil oder nicht verwertbarem Profil wieder.

In Abbildung 17 ist das Vorkommen von verwertbaren Ergebnissen (Vollprofil, Teilprofil) und nicht verwertbaren Ergebnissen (mbm, kein Profil) für vier Kategorien dargestellt, die sich

anhand der TaqMan Mittelwerte ergeben. Die Gruppe, die von 0-5pg/μl DNA erfasst, wird von 68 verwertbaren und 1.496 nicht verwertbaren Fälle gebildet. In der Gruppe, die >5-10pg/μl DNA umfasst, kommen 93 verwertbare und 186 nicht verwertbare Ergebnisse vor. 275 Fälle in der Gruppe, die >10-30pg/μl DNA umfasst, sind verwertbar, 96 Proben sind nicht verwertbar. In der letzten Gruppe sind 827 Fälle verwertbar und nur noch 27 sind nicht verwertbar.

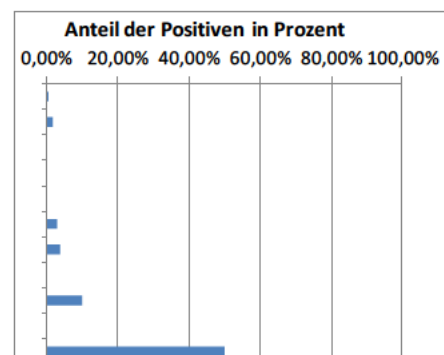
Gruppe 1 ist der Anzahl nach die größte Gruppe und für die Findung des Grenzwerts die entscheidende Gruppe. Je höher die TaqMan Ergebnisse werden, desto öfter erhält man ein verwertbares Ergebnis. Diese Gruppen sind nicht von Interesse für die weitere Betrachtung, da hier auf alle Fälle eine weitere Amplifizierung zur Profilerstellung erfolgen muss.

Um einen Grenzwert zu finden, müssen die TaqMan-Werte im niedrigen Bereich (bis zu 5pg/μl DNA als Mittelwert) wesentlich genauer betrachtet werden. Hier reicht nicht mehr ein Mittelwert aus, sondern die TaqMan-Werte sollten einzeln betrachtet werden. Der größere von beiden Werten wird als maximaler Wert (TaqMan max.) definiert und der kleinere Wert als minimal (TaqMan min.) erfasst. Danach erfolgt die Sortierung in verwertbare und nicht verwertbare Ergebnisse. Zuletzt wird der Anteil an verwertbaren Ergebnissen angegeben. Die Daten werden mit dem Programm SAS erfasst. Das Programm ist im Anhang 7.1 abgebildet.

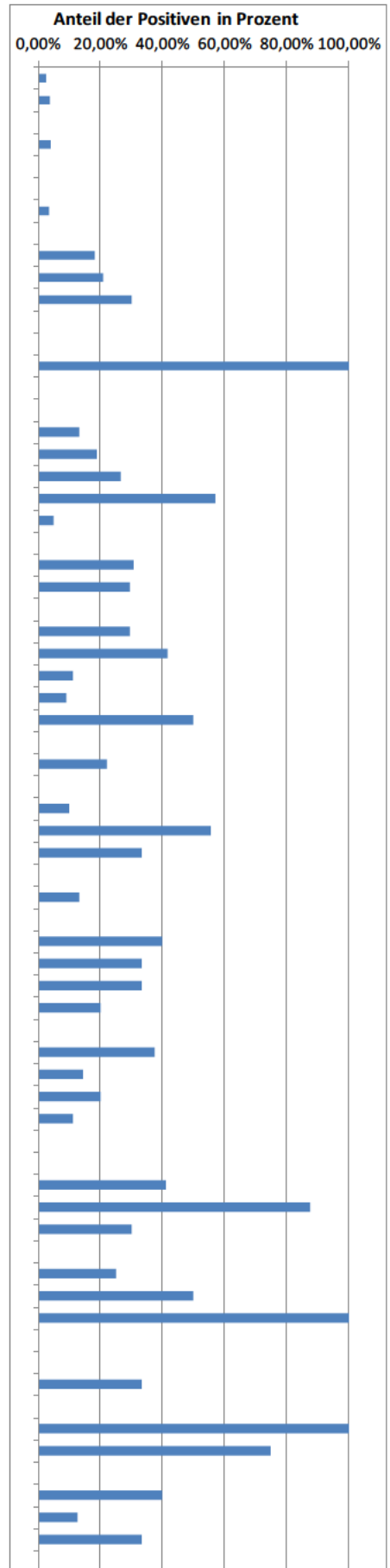
Sobald TaqMan-Max größer als 10pg/μl ist, werden Gruppen gebildet. Die Gruppen werden wie folgt gebildet: TaqMan max. 11-30pg/μl, von TaqMan max. 31-100pg/μl, von TaqMan max. 101-1000pg/μl, von TaqMan max. 1001-10000pg/μl und von TaqMan max. 10001-15000pg/μl. Gleichmaßen müsse auch die Minimalwerte zusammengefasst werden.

Man erhält folgende Tabelle 28:

		Anzahl	Mittelwert	Ergebnis		Anteil positiv
		N	N	negativ	positiv	
Alle		3068	627 63	1800	1268	41 33%
TaqMan max.	TaqMan min.					
0	0	750	0	748	2	0 27%
1	0	116	0,5	114	2	1,72%
	1	12	1	12	0	0,00%
1,5	0	2	0 75	2	0	0 00%
	1	1	1,25	1	0	0,00%
2	0	139	1	135	4	2,88%
	1	27	1 5	26	1	3 70%
	1,5	1	1,75	1	0	0,00%
	2	20	2	18	2	10,00%
2,5	0	3	1,25	3	0	0,00%
	2	2	2,25	1	1	50,00%



		Anzahl	Mittelwert	Ergebnis		Anteil positiv
		N	N	negativ	positiv	
Alle		3068	627,63	1800	1268	41,33%
TaqMan max.	TaqMan min.					
3	0	81	1,5	79	2	2,47%
	1	26	2	25	1	3,85%
	1,5	1	2,25	1	0	0,00%
	2	25	2,5	24	1	4,00%
	3	8	3	8	0	0,00%
3,5	2	2	2,75	2	0	0,00%
4	0	58	2	56	2	3,45%
	1	17	2,5	17	0	0,00%
	2	22	3	18	4	18,18%
	3	24	3,5	19	5	20,83%
4,5	4	10	4	7	3	30,00%
	0	1	2,25	1	0	0,00%
	2	1	3,25	1	0	0,00%
	4	1	4,25	0	1	100,00%
5	0	20	2,5	20	0	0,00%
	1	6	3	6	0	0,00%
	2	15	3,5	13	2	13,33%
	3	16	4	13	3	18,75%
	4	15	4,5	11	4	26,67%
6	5	7	5	3	4	57,14%
	0	20	3	19	1	5,00%
	1	5	3,5	5	0	0,00%
	2	13	4	9	4	30,77%
	3	17	4,5	12	5	29,41%
	3,5	1	4,75	1	0	0,00%
	4	17	5	12	5	29,41%
	5	12	5,5	7	5	41,67%
7	6	9	6	8	1	11,11%
	0	11	3,5	10	1	9,09%
	1	2	4	1	1	50,00%
	1,5	1	4,25	1	0	0,00%
	2	9	4,5	7	2	22,22%
	3	5	5	5	0	0,00%
	4	10	5,5	9	1	10,00%
	5	9	6	4	5	55,56%
8	6	9	6,5	6	3	33,33%
	7	3	7	3	0	0,00%
	0	15	4	13	2	13,33%
	1	2	4,5	2	0	0,00%
	2	5	5	3	2	40,00%
	3	6	5,5	4	2	33,33%
	4	12	6	8	4	33,33%
	5	5	6,5	4	1	20,00%
9	5,5	1	6,75	1	0	0,00%
	6	8	7	5	3	37,50%
	7	7	7,5	6	1	14,29%
	8	5	8	4	1	20,00%
	0	9	4,5	8	1	11,11%
	2	4	5,5	4	0	0,00%
	2,5	1	5,75	1	0	0,00%
	3	17	6	10	7	41,18%
10	4	8	6,5	1	7	87,50%
	5	10	7	7	3	30,00%
	6	7	7,5	7	0	0,00%
	7	4	8	3	1	25,00%
	8	6	8,5	3	3	50,00%
	9	3	9	3	0	0,00%
	0	3	5	3	0	0,00%
	1	1	5,5	1	0	0,00%
	2	3	6	2	1	33,33%
	3	1	6,5	1	0	0,00%
	4	2	7	2	0	0,00%
	5	4	7,5	1	3	75,00%
	6	2	8	2	0	0,00%
	7	5	8,5	3	2	40,00%
	8	8	9	7	1	12,50%
	9	3	9,5	2	1	33,33%
	10	2	10	2	0	0,00%



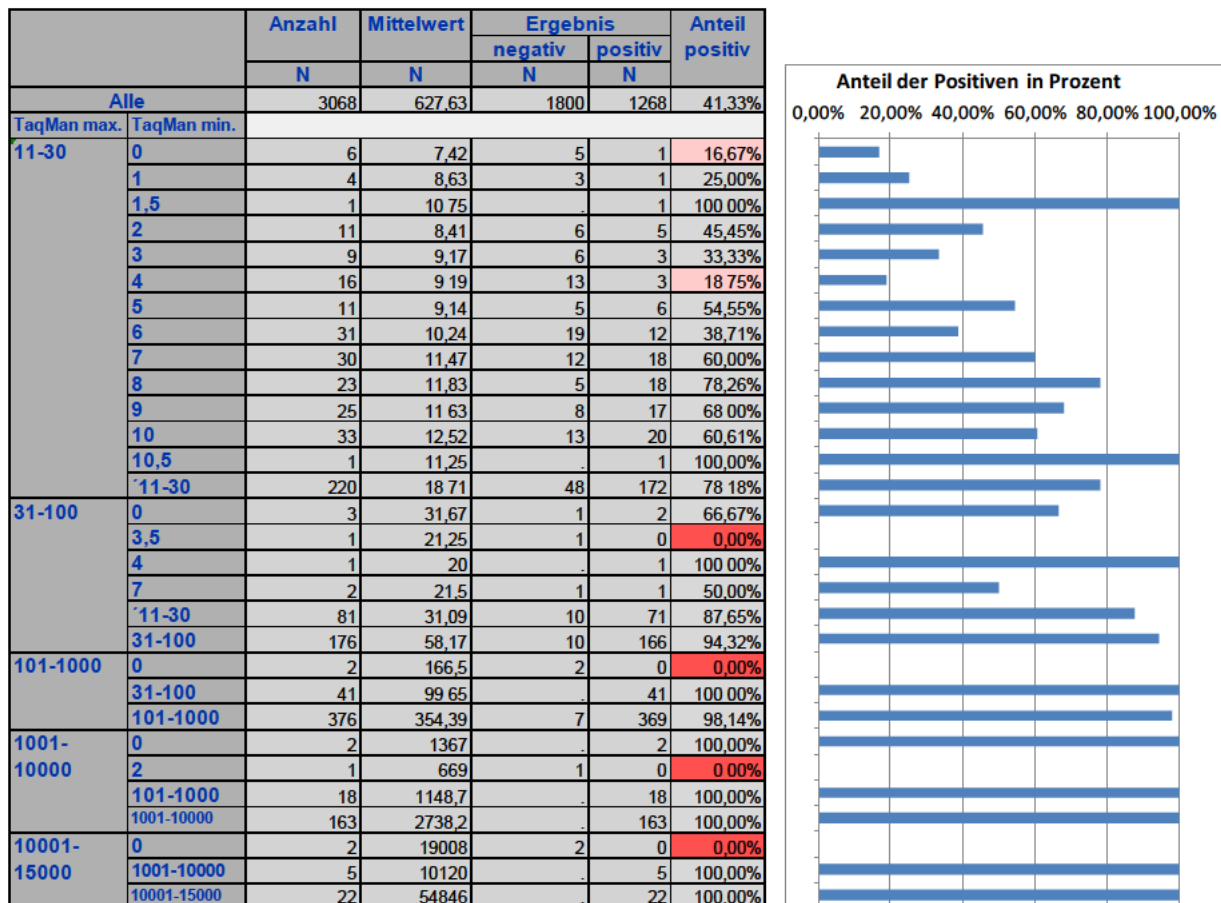


Tabelle 28: Alle Ergebnisse der Untersuchung: Spalte 1 zeigt den maximalen TaqMan-Wert, Spalte 2 den dazugehörigen minimalen TaqMan-Wert, Spalte 3 zeigt die Anzahl der Proben dieser Kategorie, Spalte 4 zeigt den Mittelwert aller Proben einer Kategorie, Spalte 5 zeigt die Anzahl der nicht verwertbaren Ergebnisse, Spalte 6 zeigt die Anzahl der verwertbaren Ergebnisse und Spalte 7 zeigt den Anteil an Verwertbaren zur Gesamtanzahl einer Kategorie. Hierbei enthalten die grauen Felder Werte größer 20%, die hellrosa Felder enthalten Werte größer 10 %-20%, die rosaroten Felder enthalten Werte größer 2% bis 10% und die roten Felder enthalten Werte kleiner gleich 2%. In der Grafik ist der Anteil der Verwertbaren als Balkendiagramm dargestellt.

In der Grafik zu Tabelle 28, wird der Anteil an verwertbaren Ergebnissen dargestellt. Hier zeigt sich eine eindeutige Tendenz. Wenn beide TaqMan-Werte 0pg/µl sind, ist die Wahrscheinlichkeit bei 0,267% ein verwertbares Ergebnis zu erhalten, mit anderen Worten, nur bei 1 von ungefähr 375 Fällen ist ein verwertbares Ergebnis zu erwarten. Man sieht in der Grafik, dass je höher die TaqMan-Werte sind, desto höher wird die Wahrscheinlichkeit eines verwertbaren Ergebnisses. Wenn der TaqMan max. Wert größer als 10pg/µl ist, kommt es, von wenigen Ausnahmen abgesehen, mit mehr als 20% zu einem verwertbaren Ergebnis. Das ist einerseits in der Balkengrafik dargestellt und andererseits in der Tabelle grau unterlegt. Je geringer die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines verwertbaren Ergebnisses ist, desto intensiver ist die Rotfärbung im Feld. Angefangen mit einer hellrosa Markierung bei Feldern mit Werten zwischen 10% und 20 %, rosarot bei Feldern mit Werten zwischen 2% und 10% bis zu rot bei Feldern mit Werten unter 2%. Bei 2% liegt die von uns inhaltlich gewählte Grenze, da bei dieser Wahrscheinlichkeit für ein verwertbares Ergebnis

der Kostenaufwand zu hoch ist und der Verlust von diesen Ergebnissen auch beim Auftraggeber bei diesen Delikten als tragbar angesehen wird.

Betrachtet man nun diese Tendenzen, zeigt sich, dass alle Ergebnisse über TaqMan max. 10 nicht weiter betrachten müssen, da sie mit viel zu hoher Wahrscheinlichkeit ein verwertbares Ergebnis liefern werden und deswegen nicht von Bedeutung für die Grenzwertfindung sind. Hier gibt es noch zwei Ausnahmen. Die erste Ausnahme ist bei den Werten 11-30pg/µl und 0pg/µl mit einer Wahrscheinlichkeit für ein verwertbares Ergebnis von 16,67%. Die zweite Ausnahme ist bei 11-30pg/µl und 4pg/µl mit einer Wahrscheinlichkeit von 18,75% für ein verwertbares Ergebnis. Auch diese Wahrscheinlichkeit ist hoch genug um diese Proben sicher weiterbearbeiten zu müssen. Zusätzliche Ausnahmen treten bei folgenden Werten auf: TaqMan max. 31-100 und TaqMan min. 0, TaqMan max. 101-1000 und TaqMan min. 0, TaqMan max. 1001 -10000 und TaqMan min. 0 sowie TaqMan max. 10001- 15000 und TaqMan min. 0 auf. Dies sind spezielle Fälle, auf die noch einmal in Kapitell.4.4. eingegangen wird.

Grundsätzlich kann man die Ergebnisse in zwei Gruppen einteilen. Die Grenze liegt dann bei den Werten TaqMan max. 10 und TaqMan min. 4. In der Gruppe 1 sind alle Werte enthalten, bei denen der höhere der beiden Taqman-Werte kleiner 10 ist und der niedrigere der beiden TaqMan-Werte kleiner 4 ist. Diese Werte werden einzeln betrachtet. Sie sind für das Finden eines Grenzwerts sehr interessant. In der Gruppe 2 werden alle anderen Ergebnisse erfasst, hier kommt es von wenigen Ausnahmen abgesehen immer mit mehr als 20% zu einem verwertbaren Ergebnis. Wenn die Ergebnisse immer über 20% liegen, sind die Proben für uns eindeutig weiter zu untersuchen und somit für das finden einer Grenze uninteressant. Diese Gruppe wird im unteren Teil von Tabelle 29 zusammengefasst. Man erhält folgende zwei Gruppen:

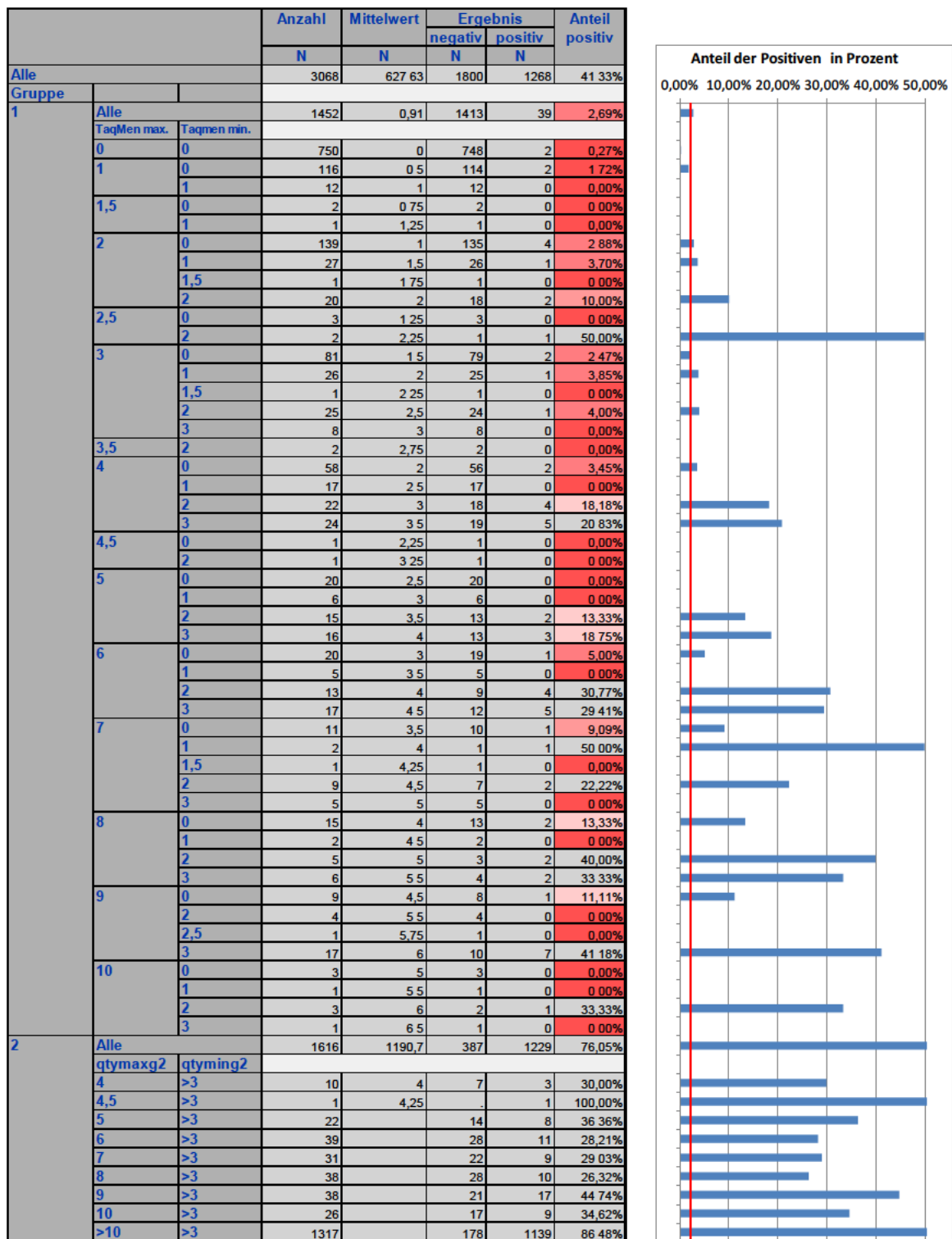


Tabelle 29: Einteilung der Ergebnisse in zwei Gruppen: Gruppe 1 umfasst alle Wert TaqMan max. <10 und TaqMan min.<3; Gruppe 2 umfasst alle Werte TaqMan max. > 10 oder und TaqMan min. >3

4.2 Betrachtung der Gruppe 1

Wir betrachten Gruppe 1 aus Tabelle 29. Hier wurde bei 2 % in der Grafik eine rote Linie gezogen, um zu verdeutlichen, wo unsere inhaltlich gewählte Grenze liegt.

Insgesamt werden hier 1.452 Proben betrachtet, von denen 1.413 nicht verwertbar und 39 verwertbar sind. Wenn beide TaqMan Werte 0 sind, kommt es in nur 0,267% der Fälle zu einem verwertbaren Ergebnis. Bei den folgenden Werten ist die Wahrscheinlichkeit für ein verwertbares Ergebnis tendenziell immer ansteigend. Bei TaqMan 2 und 0 kommt es bei 139 Fällen schon mit Wahrscheinlichkeit von 2,88% zu einem verwertbaren Ergebnis. Der Ausschlag bei TaqMan 2,5 und 2 kann nicht verwertet werden, da hier nur zwei Fälle vorliegen, wovon einer verwertbar und der andere nicht verwertbar ist. Die 50% geben kein reelles Bild wieder auf Grund der zu kleinen Stichprobemenge. Trotzdem sieht man hier die Tendenz, je höher die Werte werden, desto wahrscheinlicher tritt ein verwertbares Ergebnis auf.

Zur Grenzwertfindung werden, basierend auf den Daten, verschiedene Alternativen in Tabelle 30 berechnet. Es werden alle Werte bis zu den verschiedenen TaqMan max. zu einer Gruppe zusammengefasst, dies soll unseren möglichen Grenzwert darstellen. Die Idee dabei ist, dass man immer unter der inhaltlichen gewählten Erfolgsgrenze von 2% bleibt. Man wählt aus Tabelle 28 die Werte aus und fasst sie zu einer Gruppe zusammen, somit addiert man alle einzelnen Werte bis dahin. Hierbei sieht man, dass bei TaqMan min größer 1 die Wahrscheinlichkeit schon über 2% steigt, so dass man für TaqMan min Obergrenze bei 1 setzen muss.

		Anzahl Proben	Ergebnis		Anteil Positiv
			negativ	positiv	
Alle		3068	1591	1477	41,33%
TaqMan max.	TaqMan min.				
0	0	750	748	2	0.27%
bis 1,5	bis 1	881	877	4	0,45%
bis 2,5	bis 1	1071	1060	11	1,03%
bis 4	bis 1	1291	1273	18	1,39%
bis 4,5	bis 1	1348	1318	30	2,23%
bis 5	bis 1	1376	1345	31	2,25%

Tabelle 30: Ermitteln eines Grenzwerts

Im Einzelnen sieht das so aus: In der ersten Reihe werden alle Werte zusammengefasst, die TaqMan max. und min. gleich 0pg/µl sind. In der zweiten Reihe werden zu diesen Werten noch die Werte bis TaqMan max. 1,5pg/µl und TaqMan min. 1pg/µl dazu addiert. Dadurch erhält man für die Wahrscheinlichkeit eines verwertbaren Ergebnisses den Wert 0,45%. So fährt man fort, in der nächsten Reihe werden dann alle Werte bis TaqMan max. 2,5pg/µl und

TaqMan min. 1pg/µl addiert. Es zeigt sich, dass man bis zu TaqMan max. 4,5pg/µl und TaqMan min. 1pg/µl, mit der Wahrscheinlichkeit für ein verwertbares Ergebnis unter der Grenze von 2% liegt. Im Kapitel 4.3 wird gezeigt ob diese Grenzen signifikant sind oder nicht.

4.3 Signifikanz

Der Signifikanztest soll beweisen, dass eine Aussage nicht nur für die beobachteten Werte gilt, sondern auch auf alle gleichartigen Fälle verallgemeinert werden kann. Die beobachteten Werte werden als Zufallsstichproben aus allen möglichen gleichartigen Meßreihen aufgefasst. Hier wird zum Beispiel untersucht, bis zu welcher TaqMan max. TaqMan min. Kombination man zum Niveau α gleich 0,01 signifikant weniger als 2% positive Ergebnisse erhält. Zur Berechnung der Signifikanz bzw. der kritischen Werte wird die in Kapitel 3.3.3 beschriebene Formel und Tabelle der Binomialverteilung verwendet. Wenn der beobachtete Wert kleiner oder gleich als der kritische Wert ist, ist die Wahrscheinlichkeit für positive Ergebnisse zum Niveau α von 0,01 signifikant kleiner als 2%. Daraus ergibt sich folgende Tabelle 31:

		Alle	Ergebnis		Anteil	K-	Signifi
			Neg.	Pos.			
		N	N	N	Pos.	Wert	kanz
		N	N	N	N	N	Ja/Nein
Alle		3068	1591	1477	41,33%		
TaqMan max.	TaqMan min.						
0	0	750	748	2	0.27%	6	Ja
bis 1,5	bis 1	881	877	4	0,45%	8	Ja
bis 2,5	bis 1	1071	1060	11	1,03%	11	Ja
bis 4	bis 1	1291	1273	18	1,39%	14	Nein
bis 4,5	bis 1	1348	1318	30	2,23%	15	Nein
bis 5	bis 1	1376	1345	31	2,25%	15	Nein

Tabelle 31: Überprüfen der Signifikanz

Anhand dieser Tabelle sieht man, dass unser Ergebnis nur Signifikant bis zu TaqMan max. 2,5pg/µl und TaqMan min. 1pg/µl ist. Das bedeutet, hier können wir unsere Grenze legen. Wenn unser TaqMan Ergebnis unter diesen Werten ist, muss die Probe nicht weiter untersucht werden, dass es signifikant unter 2% zu einem positiven Ergebnis kommt. Der kritische Wert liegt bei 11, das bedeutet, es dürften bei einer Stichprobenzahl von 1.071

Fällen zu 11 positiven Ergebnissen kommen, bei uns liegen genau 11 vor. Dies zeigt, dass unser Ergebnis signifikant ist.

4.4 Zusatzbetrachtung bei TaqMan min. gleich Null

Durch das Betrachten der Tabelle 28 fällt eine Unregelmäßigkeit schnell ins Auge. Wenn der TaqMan min. gleich 0 ist, hat man oft viele nicht verwertbare Ergebnisse. Diese Besonderheit wäre nicht entdeckt worden, wenn man nur die Mittelwerte betrachtet hätte. Durch das Betrachten von TaqMan max. und TaqMan min. getrennt erhält man wesentlich mehr Informationen. Deswegen wird nochmal im Speziellen betrachtet, was es mit den TaqMan min. gleich 0 Werten auf sich hat. Hierfür werden nun vier Gruppen gebildet 0, 1-10, 11-100 und 101- 15000 (Tabelle 32). Jede Gruppe wird aufgeteilt in TaqMan min. gleich 0 oder TaqMan min. nicht gleich 0.

		Anzahl Proben	Ergebnis		Anteil Positiv
			Negativ	Positiv	
Alle TaqMan min. =0		1243	1221	22	1,77%
Alle TaqMan min ≠0		1825	579	1246	68,27%
TaqMan max.	TaqMan min.				
0	0	750	748	2	0,27%
1-10	0	478	463	15	3,14%
	nicht 0	523	411	112	21,41%
11-100	0	9	6	3	33,33%
	nicht 0	676	160	516	76,33%
101-15000	0	6	4	2	33,33%
	nicht 0	626	8	618	98,72%

Tabelle 32: Ergebnisse sortiert nach Min. gleich Null

Wenn der TaqMan min. 0 ist, unabhängig von TaqMan max. Wert, ist die Wahrscheinlichkeit eines verwertbaren Ergebnisses bei 1,77%. Bei TaqMan min. nicht gleich 0 liegt die Wahrscheinlichkeit für ein verwertbares Ergebnis bei 68,27%. Das bedeutet, wenn TaqMan min. 0 ist, kommt es relativ häufiger zu einem nicht verwertbaren Ergebnis als wenn TaqMan min. nicht 0 ist. Hierfür werden nun die Ergebnisse in jeder Gruppe verglichen und die Wahrscheinlichkeit eines verwertbaren Ergebnisses bei TaqMan min. gleich 0 oder TaqMan min. nicht gleich 0 ermittelt. Es ist immer wahrscheinlicher ein verwertbares Ergebnis zu erhalten, wenn Min. nicht gleich 0 ist. So kommt es in der Gruppe 1-10 für TaqMan min.

gleich 0 in 3,14 % zu einem verwertbaren Ergebnis und für TaqMan min. nicht gleich 0 in 21,41 %. Bei den Gruppen 11-100 und 101 bis 15000 kann es bei TaqMan min. gleich 0 in 33,33% zu einem verwertbaren Ergebnis kommen. Die Wahrscheinlichkeit für TaqMan min. ungleich 0 ist in diesen Gruppen „ungleich höher“ bei 76,33% oder bei sogar 98,72 Prozent. Ein Sonderfall liegt vor, wenn TaqMan max. sehr hoch ist und TaqMan min. gleich 0. Das Besondere ist die niedrige Fallzahl und die weit auseinander liegenden Werte. Bei den Werten 31-100 und 0, 101-1000 und 0, 1001-10000 und 0 oder 10001-15000 und 0 ist die Stückzahl zu gering um eine valide Aussage machen zu können, aber trotzdem kann man die Tendenz erkennen, dass die Wahrscheinlichkeit eines verwertbaren Ergebnisses wesentlich geringer ist wenn TaqMan min. gleich 0 ist. Auf diese Gruppe wird noch mal in der Diskussion eingegangen und Gründe für die verwertbaren Ergebnisse erörtert.

4.5 Nachuntersuchung in Gruppe 1

Eine Grenze wurde bestimmt bei TaqMan max. kleiner 2,5pg/µl und TaqMan min. kleiner 1pg/µl. An einer unabhängigen Stichprobe wird nun nochmals überprüft, ob auch hier diese Aussage zutrifft.

Es werden 97 Proben durch Zufall ausgewählt und unter gleichen Messbedingungen sämtliche Tests durchgeführt. 77 befinden sich wieder im Mittelwert zwischen 0-5pg/µl, in 20 Fällen kommt es bei einer der beiden Messung zu einem extrem hohen Wert, der nicht dargestellt werden kann, und vermutlich auf die Eigenfluoreszenz des Plastikmaterials zurückzuführen ist. Die Daten werden in Tabelle 33 dargestellt.

		TaqMan 0-5	TaqMan >30	Gesamt
Verwertbar	Anzahl	77	20	97
	Nicht verwertbar	70	19	89
	Verwertbar	7	1	8
	9 Systeme gesamt	5	0	5
	Teilprofil gesamt	2	1	3
	multiple Bandenmuster	10	4	14
Nicht verwertbar	negativ	60	15	75

Tabelle 33: Aufteilung der 97 Proben der Nachuntersuchung: In den Spalten wird die Aufteilung in die TaqMan Gruppen dargestellt, in den Zeilen sieht man die Unterteilung in verwertbar und nicht verwertbar, so wie ihre Untergruppen

Auch in dieser Stichprobe werden noch einmal die TaqMan max. und TaqMan min. Werte betrachtet und tabellarisch dargestellt. Es wird überprüft ob unsere Aussage auch auf diese Stichprobengruppe zutrifft.

Die Daten werden in Tabelle 34 dargestellt.

		Anzahl	Ergebnis		Anteil
		Proben	negativ	positiv	Positiv
Alle		97	89	8	8%
TaqMan max.	TaqMan min.				
0	0	39	39	0	0%
1	0	1	1	0	0%
2	0	2	2	0	0%
	1	3	3	0	0%
	2	1	1	0	0%
3	1	2	2	0	0%
	2	3	2	1	33%
	3	2	1	1	50%
4	0	1	1	0	0%
	1	1	1	0	0%
	2	2	1	1	50%
	3	1	1	0	0%
	4	4	3	1	25%
4,5	2	1	1	0	0%
5	1	1	1	0	0%
	2	2	2	0	0%
	3	4	3	1	25%
	4	1	1	0	0%
6	1	1	1	0	0%
	3	1	0	1	100%
7	1	1	1	0	0%
	2	1	1	0	0%
	3	1	1	0	0%
8	2	1	0	1	100%
15000	0	4	4	0	0%
	1	3	2	1	33%
	2	7	7	0	0%
	3	3	3	0	0%
	15000	3	3	0	0%

Tabelle 34: Auszählung der 97 nachuntersuchten Proben

In dieser Nachuntersuchung zeigen sich die Ergebnisse wesentlich eindeutiger. Bis zur Grenze von TaqMan max. 2,5pg/µl und TaqMan min 1pg/µl kommt es in 0% der Fälle zu einem verwertbaren Ergebnis. Die von uns gewählte Grenze kann durch die neu untersuchten Daten eindeutig bestätigt werden, auch wenn die Stückzahl für weitere Signifikanztests zu klein ist. Dennoch sehen wir, dass unsere Grenze auch auf diese Stichprobe zutrifft und können sie als aussagekräftig betrachten.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit geht es um die Quantifizierung von DNA in einer Probe und der daraus resultierenden, möglichen Konsequenz für weitere Untersuchungen. Mit Hilfe des Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit wird die Menge der DNA, die in einer Probe enthalten ist, bestimmt. Die Frage in dieser Arbeit lautet, ob man durch diese Quantifizierung bestimmen kann, welche Proben in der weiteren Untersuchung typisiert werden sollen und welche nicht. Das Ziel ist es, mit Hilfe des Ergebnisses des Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit Proben eindeutig aussortieren zu können, die nicht weiter untersucht werden müssen. Hierbei müssen falsch negative Ergebnisse auf ein Minimum reduziert werden. Darunter versteht man alle Proben, die nach Aussage des TaqMan kein Ergebnis liefern dürften, bei denen aber doch ein Profil erstellt werden kann. Durch die Einführung eines Grenzwerts können die Ressourcen im Labor optimal genutzt und somit kosteneffizient gearbeitet werden.

Durch ein Aussortieren von Proben ist mit einem Verlust von Daten zu rechnen, auch wenn dieser noch so gering ist. Bei Kapitaldelikten muss jede Spur typisiert werden, auch wenn nach Aussage der Quantifizierung die Erfolgchance für den Erhalt eines Profils gegen null geht. Der Verlust von einer möglichen Information wird im Bereich von Kapitaldelikten als zu riskant angesehen. Ein geringer Verlust von möglichen Informationen ist bei Delikten aus dem minderschweren Deliktsbereich gegebenenfalls noch tragbar. Um nun einen Grenzwert für den Bereich der Massenkriminalität einführen zu können, musste zuerst in Zusammenarbeit mit unseren Auftraggebern erörtert werden, welche Menge an falsch negativen Ergebnissen tragbar wäre. Hier wurde mit Polizeidienststellen des Instituts für Rechtsmedizin festgelegt, dass bei einer Wahrscheinlichkeit für ein positives Ergebnis unter 2% die Probe nicht weiter typisiert werden muss.

Die Wahrscheinlichkeit für ein positives Ergebnis liegt nur bei den Proben mit einem sehr geringen DNA Gehalt unter 2%. Deswegen werden in der vorliegenden Arbeit vor allem die Proben mit einem geringen DNA Gehalt betrachtet. Dies entspricht Proben mit nur wenig pg DNA pro µl Extrakt als Ergebnis des Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit. Je größer der DNA Gehalt in einer Probe ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für ein positives Ergebnis, somit sind die großen TaqMan Werte für die Findung eines Grenzwerts uninteressant. Laut Herstellerangaben kann der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit Werte zwischen dem Referenzbereich von 23- 50.000pg/µl valide messen. Green et al. bestätigen in einer Studie, dass der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit ab 23pg valide Ergebnisse liefert (Green et al., 2005). Hierbei wurden unterschiedlichste Proben

verwendet: DNA von unterschiedlichen ethnischen Gruppen, DNA –Mischungen, degradierte DNA, aus Fallproben gewonnene DNA, synthetische DNA von verschiedenen Herstellern und sogar nicht humane DNA. In der Studie von Green et al. war der niedrigste vorkommende DNA Gehalt 16pg/µl. Die Ergebnisse des Quantifiler™ Human DNA Quantification Kits wurden genauestens überprüft und dabei die Ergebnisse mit anderen Quantifizierungsmethoden verglichen. Die Reproduzierbarkeit des Ergebnisses wurde eingeschätzt, sowie die Sensitivität für humane DNA und die Spezifität wurden untersucht. Green et al. untersuchte den Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit aber nur im Bereich des vom Hersteller angegebenen Referenzbereichs. Wenn Messungen unter diesem Bereich vorkommen, wurden sie aufgrund des stochastischen Effekts von der Studie ausgeschlossen.

Das Problem ist, dass die Werte, die hauptsächlich in der vorliegenden Arbeit betrachtet werden, weit unter diesen Referenzwerten bei ca.5pg/µl liegen. Der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit liefert auch ein Ergebnis, wenn weniger als 23pg/µl DNA in Proben enthalten sind. Wenn man eine Probe von 2µl verwendet, entspricht dies ungefähr 10 Kopien einer DNA in der Probe (Green et al., 2005). Bei so wenig DNA in einer Probe kann es zu stochastischen Effekten bei der Bestimmung kommen. Anschaulich bedeutet das, dass in einem Probengefäß von 50µl sehr wenig DNA vorliegt und diese nicht homogen verteilt sein muss. Pipettiert man nun aus diesem Gemisch 2µl heraus, können durch Zufall entweder zwei DNA Stränge aufgenommen werden, ein DNA Strang oder auch kein DNA Strang (Abbildung 18).

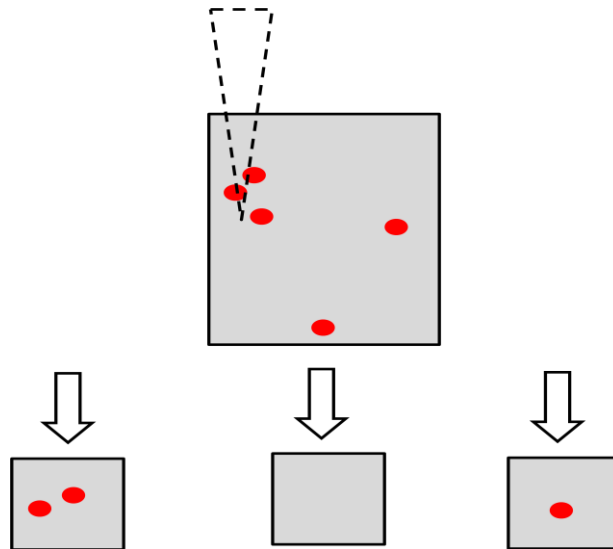


Abbildung 18: Stochastischer Effekt: Probengefäß mit Pipettenspitze, DNA als rote Kreise dargestellt, durch wenig DNA kommt es zu einer inhomogenen Verteilung der DNA, bei Pipettierung können unterschiedliche Mengen an DNA entnommen werden.

Dieser geringe DNA Gehalt in einer Probe liegt weit unter der vom Hersteller angegebenen Eichkurve. Das kann dazu führen, dass die Einzelwerte der TaqMan Ergebnisse sehr unterschiedlich ausfallen. Grund hierfür ist der Aufbau des Tests mit einer Single Locus Sonde. Trotz der geringen Menge an DNA in einer Probe kann genügend DNA für eine Amplifizierung vorhanden sein. Der Hersteller rät deshalb, bei einem Ergebnis unter 23pg DNA entweder eine weitere Quantifizierung durchzuführen oder die Probe zu konzentrieren.

Schon andere Studien haben sich mit dem Problem der Grenzwertfindung beschäftigt. Cupples et al. will in seiner Studie einen Mindestwert finden, unter welchem man auf keinen Fall ein Profil aus der Probe erstellen kann. Hierfür verwendete er Abstriche aus Wangenschleimhaut. Die DNA wird quantifiziert und Verdünnungsreihen werden hergestellt mit Proben, die von 2 bis 250pg/μl DNA enthalten. Es konnte kein eindeutiger Grenzwert festgelegt werden, ab wann man kein Profil mehr erhält. Als Ergebnis wurde „Vollprofil“, „Teilprofil“ und „nicht auffindbar“ erfasst. In 27% der Fälle konnte ein Profil amplifiziert werden, obwohl der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit kein Ergebnis zeigte. Von diesen 33 Fällen kam es einmal zu einem Vollprofil, einmal zu einem verwertbaren Teilprofil und 7 mal zu einem nicht verwertbaren Ergebnis. Wir haben in unserer eigenen Studie eine andere Einteilung gewählt. Nur Voll- und Teilprofile werden als verwertbar, alles andere als nicht verwertbar deklariert. Bezogen auf die Einteilung in unserer vorliegenden Studie würde das für eine Wahrscheinlichkeit von 6% für ein falsch negatives Ergebnis sprechen. Dieses Ergebnis weicht sehr stark von unserem Ergebnis ab, bei dem es in 0,27% zu falsch negativen Ergebnissen kam.

In beiden Arbeiten zur Quantifizierung von DNA wurde der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit nach Herstellerangaben verwendet. Unterschiede zu der Versuchsanordnung in der hier betrachteten Arbeit von Cupples et al. waren, dass jede Probe nur einmal quantifiziert wurde. Geht man bei unseren Daten von einer einmaligen Quantifizierung aus und nimmt nur den jeweils ersten Wert der Quantifizierung, erhält man bei 1.012 Proben mit TaqMan null in 24 Fällen ein positives Ergebnis, das entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 2,4% für ein falsch negatives Ergebnis. Dieser Wert ist zwar nicht so hoch, wie die 6% aus der Studie von Cupples et al., aber auch wesentlich höher als unsere 0,27%. Die besonders hohen Werte bei Cupples et al. könnten auch an der geringen Fallzahl und somit an einem stochastischen Effekt liegen. Auch in der Studie von Cupples et al. wird diskutiert, dass eine einmalige Quantifizierung nicht ausreicht um aus den erhaltenen Werten eine Schlussfolgerung ziehen zu können (Cupples et al., 2009). In unserer Versuchsanordnung wurden alle Proben doppelt bestimmt und danach der Mittelwert aus beiden TaqMan-Werten gebildet. Damit kann sichergestellt werden, dass falsch negative Proben erkannt werden. Das bedeutet, Proben die einmal keinen Wert gezeigt haben, werden nicht sofort ausgeschlossen. Gründe hierfür sind unter anderem menschliches Versagen, Pipettierungsungenauigkeiten aber auch die stochastische Prävalenz.

Köhnemann et al. stellte fest, dass man mit Hilfe der qPCR relativ gut nachweisen kann, ob mitochondriale DNA in Haarschäften vorhanden ist oder nicht. Da auf dem Markt kein Kit für die Quantifizierung von mt-DNA vorhanden ist, wurden hierfür zwei bestimmte Primer verwendet (F16328 und R16440), eine Untersuchungsmethode entwickelt und überprüft. Bei den Primern handelt es sich um Single Locus Sonden (SNPs). Erhält man ein Ergebnis bei der Quantifizierung, ist im Nachhinein auch immer eine Amplifizierung der mt-DNA möglich. Die Ergebnisse wurden entsprechend zu unserer Studie in verwertbare und nicht verwertbare Ergebnisse eingeteilt. Bei 110 Proben mit einem positiven qPCR Ergebnis, kam es immer zu einem verwertbaren Ergebnis bei der weiteren Analyse (Köhnemann et al., 2010). In unserer vorliegenden Arbeit ist so ein eindeutiger Schluss nicht möglich. Auch wenn bei der qPCR DNA nachgewiesen wird, kommt es nicht unbedingt zu einem verwertbaren Profil. In beiden Fällen werden Single Locus Sonden verwendet. Aber in der Studie von Köhnemann et al. wird mitochondriale DNA und nicht Kern DNA untersucht. Der Grund für diese Abweichung liegt wahrscheinlich in der mitochondrialen DNA. Köhnemann et al. erwähnt, dass mt-DNA aufgrund des zahlreichen Vorkommens in einer Zelle viel einfacher detektiert werden kann. In der von uns vorgelegten Studie kann kein so eindeutiges Ergebnis geliefert werden, deshalb muss man sich intensiver mit einer Grenzwertfindung beschäftigen.

Aber auch bei der Studie von Köhneman et al. kommt es zu falsch negativen Ergebnissen bei der Quantifizierung von mitochondrialer DNA. Hier kam es bei 135 Proben in 27 Fällen zu keinem Ergebnis bei der Quantifizierung, in 4 Fällen konnte dennoch ein Teilprofil erstellt werden. Das entspricht einer Wahrscheinlichkeit von 15% für falsch negative Ergebnisse (Köhneman et al., 2010). Das zeigt, dass eine gewisse Anzahl an falsch negativen Ergebnissen in unterschiedlichen Studien nicht vermieden werden konnte.

Auch bei Doppelbestimmung kommen in der vorliegenden Arbeit falsch negative Ergebnisse vor. Bei TaqMan 0pg/µl in der Doppelbestimmung kommt es in 0,27% zu einem positiven Ergebnis. Diese Wahrscheinlichkeit ist sehr gering. Dies lässt sich vermutlich durch den bereits erläuterten stochastischen Effekt im Bereich unterhalb der Eichkurve erklären. Um das Auftreten von falsch negativen Ergebnissen zu minimieren, wurde die Doppelbestimmung in die Routine eingeführt. Eine weitere Minimierung ist kaum möglich und im Bereich Einbruch/Diebstahl oder geringere Deliktsbereiche ist dieser Fehler tragbar.

Neben den falsch negativen Ergebnissen fallen noch andere Phänomene bei Betrachtung der Daten auf. Einige TaqMan Kombinationen treten sehr selten auf und haben dadurch eine geringe Fallzahl, wie zum Beispiel die Kombination TaqMan max. 2,5pg/µl und TaqMan min. 2pg/µl. In der graphischen Darstellung springen diese Kombinationen durch sehr hohe oder sehr niedrige Wahrscheinlichkeiten ins Auge und erscheinen wegen der geringer Fallzahl wie Ausreißer. Diese vermeintlichen Ausreißer muss man nicht weiter betrachten und durch die Bildung von größere Gruppen entfallen sie ganz.

Manchmal kommt es vor, dass bei der Doppelbestimmung ein Wert extrem hoch (101-15000) und der andere Wert Null ist. Diese Ergebnisse sind im Allgemeinen nicht reproduzierbar. Hier handelt es sich höchstwahrscheinlich um Eigenfluoreszenz des Plastikmaterials. Dies tritt hier in 6 Fällen auf, wobei zwei davon ein positives Ergebnis liefern. Da hier gegebenenfalls eine fehlerhafte Bestimmung vorliegt, sollten die Proben entweder erneut quantifiziert werden oder zur Sicherheit einfach weiteruntersucht werden. Über den DNA Gehalt in diesen Proben kann nach der 1. Quantifizierung keine eindeutige Aussage gemacht werden.

Nach Diskussion der auffälligen Werte muss nun noch die Theorie der stochastischen Untersuchung im Allgemeinen betrachtet werden. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass anfangs bis zu einem TaqMan von 4,5pg/µl die Wahrscheinlichkeit für ein positives Ergebnis unter 2% bleibt. Um eine Grenze festlegen zu können muss diese Beobachtung verallgemeinerbar sein. Mit Hilfe von Signifikanztests versucht man die hier erhaltenen Ergebnisse auf alle möglichen, gleichartigen Fälle zu übertragen. Bei dem hier

verwendeten Signifikanztest kam man zu dem Ergebnis, dass alle Ergebnisse mit TaqMan max. kleiner 2,5pg/µl und TaqMan min. kleiner 1pg/µl eindeutig unter 2% Wahrscheinlichkeit für ein positives Ergebnis liegen. Dieses Ergebnis ist sogar hoch signifikant, das bedeutet das Signifikanzniveau von 0,01 konnte eingehalten werden. In der Theorie für einen statistischen Test darf immer nur eine Hypothese aufgestellt werden und diese muss einzeln überprüft werden. Unsere Hypothese lautet, dass bis zu einem TaqMan max. Wert kleiner 2,5pg/µl und TaqMan min kleiner 1pg/µl signifikant weniger als 2% positive Ergebnisse vorliegen. Hier wurden ergänzend weitere Hypothesen mit jeweils einem anderen Wert überprüft. Dabei wurde für die jeweilige Hypothese ein anderer Grenzwert gewählt, diese waren 0pg/µl, 1,5pg/µl sowie 4pg/µl; 4,5pg/µl und 5pg/µl. Bei den Werten größer 2,5pg/µl konnte aber kein signifikantes Ergebnis mehr erreicht werden. Dieses Prozedere war nötig und ist in der Praxis durchaus gängig, da man aufgrund der Materialknappheit nicht für jeden möglichen Grenzbereich noch einmal so viele Daten erheben kann.

Um die Richtigkeit unserer Ergebnisse zu überprüfen, wurde zusätzlich eine Cross-Validierung durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein statistisches Verfahren bei dem das errechnete Ergebnis an einem unabhängigen Datensatz überprüft wird. In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten anhand der Nachuntersuchung kontrolliert. Durch die 97 unabhängigen Proben der Nachuntersuchung konnten somit die erhaltenen Ergebnisse bekräftigt werden.

Eine sehr ähnliche Fragestellung wird in einer Studie von Anslinger et al. 2011 behandelt. Anslinger et al. überprüft, wie man aus Proben, die man bei Sexualdelikten erhält und die meist eine Mischung von weiblicher und männlicher DNA enthalten, am besten diese Spuren heraus filtern kann, die genügend männliche DNA enthalten, um den männlichen Anteil der Spur noch darstellen zu können. Die Studie beschäftigt sich mit dem Problem, ob man mit Hilfe des Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit Proben finden kann, die keine männliche DNA enthalten, um diese Proben vor der weiteren Untersuchung auszusortieren. Hierfür wurden 508 Proben zuerst mit Hilfe des Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit quantifiziert und die Menge an männlicher DNA erfasst. Es erfolgte eine Doppelbestimmung. Im Anschluss wurden alle Proben entweder mit autosomalen und Y-chromosomalen STRs oder nur Y-chromosomalen STRs typisiert. Liegt viel männliche DNA in einer Probe vor, kann neben den Y-chromosomalen STRs auch noch die autosomalen STRs mitamplifiziert werden. Liegt aber sehr viel weibliche DNA in einer Probe vor und nur wenig männliche, kann es zu Problemen bei der Typisierung kommen. Bei den autosomalen STRs wird vermehrt die weibliche DNA amplifiziert, dadurch wird die männliche DNA in der Probe nicht erkannt. In solchen Fällen muss nur eine Y-chromosomale STR Typisierung erfolgen, um nicht die männliche Information zu verlieren.

In der Studie von Anslinger et al. wurde die Effektivität des Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit im Bezug auf das Finden von männlicher DNA untersucht. Der Aufbau dieser Studie ist ähnlich dem Aufbau der hier vorliegenden Studie, nur das Augenmerk liegt auf der männlichen DNA. Auch die Ergebnisse wurden ähnlich eingeteilt, man unterschied zwischen „Vollprofil“, „Teilprofil“ und „nicht verwertbare“ oder „nicht reproduzierbare“ Ergebnisse. In 311 Fällen fand der Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit in beiden Fällen keine männliche DNA, trotzdem konnte hier in 8 Fällen mit Hilfe der Y-chromosomalen Typisierung ein Profil erstellt werden. Das entspricht einer Wahrscheinlichkeit für ein falsch negatives Ergebnis von 2,57%. In 73 Fällen fand der Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit einmal männliche DNA in der Probe und einmal keine, hier kam es in 18 Fällen zu einem positiven Ergebnis. Die Schlussfolgerung dieser Studie zeigt, dass man mit Hilfe des Quantifiler® Duo DNA Quantification Kit keine sichere Aussage machen kann. Es gibt zu viele falsch negative Aussagen. Im Gegensatz zu unserer durchgeführten Studie wäre der Verlust dieser Daten im Zusammenhang mit Sexualstraftaten nicht tragbar. Dennoch ist es wichtig die Quantifizierung zu machen, um entscheiden zu können, ob so wenig männliche DNA vorliegt, dass man nur eine Y-chromosomale Typisierung durchführen kann oder auch eine autosomale Typisierung gegebenenfalls erfolgsversprechend verlaufen könnte (Anslinger et al., 2011). Dieses Ergebnis zeigt Ähnlichkeit zu der von uns vorgelegten Studie. Auch hier kommt es zu falsch negativen Ergebnissen, allerdings ist die Wahrscheinlichkeit hierfür wesentlich geringer, und das Ausmaß ist für minderschwere Delikte, wie Eigentum- und Raubdelikte eher tragbar.

Auf Grund der von uns durchgeführten und hier vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen konnte nach einer Besprechung mit den Auftraggebern die Untersuchungsstrategie im Jahr 2009 im Labor geändert werden. Es wurden nicht mehr alle Proben nach der Quantifizierung typisiert, sondern nur Proben, die mehr als 2,5pg/µl DNA bei Quantifizierung durch den Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit erfasst haben. Genauer bedeutet das, dass alle Proben mit beiden TaqMan Werten null (dies umfasst den Großteil mit 750 Proben), ausgeschlossen werden, sowie 131 Proben, bei denen TaqMan min. 0pg/µl oder 1pg/µl und TaqMan max. 1pg/µl oder 1,5pg/µl, sowie 190 Proben bei denen TaqMan min. 0pg/µl oder 1pg/µl und TaqMan max. 2pg/µl oder 2,5pg/µl ist. Von unseren 3.068 Proben können somit 1.071 Proben ausgeschlossen werden, die nicht weiter getestet werden müssen. Daraus kann man schließen, dass ca. 35% der Proben in Zukunft nicht weiter getestet werden müssen. Es kann eine kosten- und zeiteffizientere Arbeit erreicht werden.

Werden im Labor neue Kits verwendet, kann diese Grenze nicht automatisch übernommen werden. Für jeden Kit ist eine individuelle Validierung mit Grenzwertfindung, entsprechend dieser Studie, erforderlich. Dies ist ein dynamischer Prozess. Durch die Verbesserung der

Quantifizierungs Kits, oder auch durch das Einführen von zum Beispiel STR Multiplex Systeme, kann diese Grenze auch weiter nach unten sinken.

Eine andere Möglichkeit der Kostenersparnis wird in der Studie von Westring et al. gezeigt. Hierbei werden weniger Reagenzien als vom Hersteller angegebenen für die Quantifizierung verwendet und überprüft, ob man bei der Quantifizierung übereinstimmende Ergebnisse erhält. Es wurden Proben mit unterschiedlichem DNA Gehalt, Proben mit Verunreinigung oder degradierter DNA gemessen. Der Bereich variierte von 0 bis 2,9ng/µl DNA. Mit Hilfe des Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit wurden die Proben quantifiziert, wobei eine Testreihe mit der vom Hersteller angegebenen Reagenzienmenge pipettiert wurde (entspricht 10,5µl Primer Mix, 12,5µl PCR Reaction Mix und 2µl DNA) und eine Testreihe mit reduziertem Reagenzienmaterial (entspricht 4,2µl Primer Mix, 5µl PCR Reaction Mix und 0,8µl DNA) angestezt wurde. Es kam jeweils zu reproduzierbaren und sehr ähnlichen Ergebnissen ohne starke Abweichung bei den Testreihen. Als Schlussfolgerung konnte kein Unterschied bei der Testreihe mit verminderter Reagenzienmenge gefunden werden. Bei Proben mit sehr degradierter DNA, kam es in dieser Testreihe sogar zu weniger stochastischen Effekten (Westring et al., 2007). Die Behauptung, dass es bei geringerer Reagenzienmenge zu weniger stochastischen Effekten kommt, konnte in unserem Labor nicht bestätigt werden und müsste noch an einem großen Datensatz überprüft werden. Es könnte aber als Möglichkeit zur Optimierung unseres Grenzwerts in Betracht gezogen werden.

Eine Idee zur Weiterführung dieser Studie wäre die Verwendung von Multi Copy Sonde Anstelle einer Single Copy Sonde. So wurde in der Studie von Thomas et al. 2013 überprüft, ob sich Multi Copy Test Kits besser zum Erheben eines Grenzwerts eignen. Es wurde der Qiagen Investigator™ Quantiplex Kit zur Quantifizierung der DNA verwendet. Im Kit wird zur Amplifizierung ein Multi Copy Gen mit 146 Basenpaaren verwendet. Das bedeutet, dieser Kit unterscheidet sich völlig von dem von uns verwendeten Kit. Bei uns liegt eine wesentlich kürzere Single Copy Sonde vor. In der Studie von Thomas et al. wurden 55 Proben aus Wangenabstrichen gewonnen und verdünnt, so dass die Konzentrationen von 300pg/µl bis 0,078pg/µl variierten. Man teilte die Ergebnisse der Quantifizierung in vier Gruppen ein, von „keine DNA enthalten“ bis „mehr als 100pg/µl DNA“ und verglich die dazu erhaltenen STR-Profile. Auch hier kam es vor, dass bei Proben detektierbare Allele gefunden wurden, obwohl bei der Quantifizierung keine DNA gemessen wurde. So konnte bei 27 Proben mit negativer Quantifizierung ein Teilprofil gewonnen werden. Auch bei Proben mit einem sehr geringen DNA Gehalt (bis 8,9pg/µl DNA) kam es bei 7 Ergebnissen sogar zu 2 Vollprofilen. Allerdings kam es auch in sechs Fällen vor, dass man ein verwertbares Ergebnis auf Grund der Quantifizierung erwartet hätte und man trotzdem kein Profil erstellen konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Qiagen Investigator™ Quantiplex Kit

wesentlich geringere Mengen an DNA als der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit messen kann. Der niedrigste auf der Eichkurve erfassbare Wert ist beim Qiagen Investigator™ Quantiplex Kit 4,8pg/µl im Vergleich zu dem bei uns empfohlenen Wert von 23pg/µl. Auch wenn der Qiagen Investigator™ Quantiplex Kit wesentlich sensitiver bei sehr niedrigen Ergebnissen ist, kann man mit diesem Test trotzdem noch nicht die Vorhersage über das zu erwartende Ergebnis verbessern (Thomas et al., 2013).

6 Zusammenfassung

In der Forensik geht es darum, aus allen am Tatort asservierten Spuren möglichst viele Informationen über den Täter zu erhalten. Auf Grund der enormen Fortschritte in der forensischen Molekularbiologie reichen mittlerweile einige Zellen aus, um ein DNA Profil erstellen zu können. Die kommerziell erhältlichen Kits und Untersuchungsmethoden werden immer weiter entwickelt und somit auch sensitiver.

Dies führt zu einer Herausforderung und zu der in dieser Arbeit behandelten Fragestellung. Da man möglichst viel Information am Tatort gewinnen will, wird eine Fülle von Proben eingeschickt, um diese zu untersuchen. Man hofft daraus ein DNA Profil erstellen zu können. Aber nicht jede asservierte Spur enthält DNA. Da die Untersuchungsmethoden sehr kosten- und zeitaufwendig sind, will man die Proben ohne DNA weitestgehend aussortieren und nicht aufwendig austypisieren. Hierbei spielt die Quantifizierung von humaner DNA in einer Probe eine wichtige Rolle.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Menge an humaner DNA zu bestimmen, die in einer Probe enthalten sein muss, um ein eindeutiges Profil aus einer Spur gewinnen zu können. Hierbei soll ein Grenzwert gebildet werden, ab dem es sich lohnt eine Probe weiter zu untersuchen oder diese zu verwerfen, da man mit großer Wahrscheinlichkeit kein Profil erhalten wird.

Insgesamt wurden 3.068 Proben untersucht. In einer unabhängigen Nachuntersuchung wurden nochmals 97 Proben auf gleiche Weise untersucht. Alle Proben wurden nach Extraktion und Aufreinigung durch den Bio Robot EZ1 mittels Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit von der Firma Thermo Fisher quantifiziert. Der Kit enthält für die Amplifikation eine Single Copy Sonde aus 62 Basenpaaren. Diese Quantifizierung erfolgte doppelt, um das Problem des stochastischen Effekts zu minimieren. Die eigentliche Genotypisierung, beziehungsweise STR-Profilerstellung erfolgte einmal mit Mentyp® Nanoplex QS von der Firma Biotype, und einmal mit AmpF/STR® SEfiler plus von der Firma Thermo Fisher.

Zur statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse der Quantifizierung mit den Ergebnissen der Genotypisierung verglichen. Erhaltene Profile unterschied man in zwei Gruppen, „Verwertbar“ und „Nicht Verwertbar“. Unter „Verwertbar“ wurden Voll- und Teilprofile erfasst, nicht verwertbar umfasst die negativen Ergebnissen sowie nicht interpretierbare, beziehungsweise reproduzierbare Profile. Mit Hilfe des Programms SAS wurden die Daten betrachtet und eine eindeutige Tendenz wurde sichtbar. Es war zu erwarten, dass je mehr DNA in einer Probe enthalten ist, desto höher ist die

Wahrscheinlichkeit für ein positives Ergebnis. Die Frage ist nun, ab welchem Wert die Wahrscheinlichkeit groß genug ist. Die Grenze muss bei Proben mit einem sehr geringen Gehalt an DNA gefunden werden. Obwohl diese Werte außerhalb des vom Hersteller empfohlenen Bereichs zur Quantifizierung liegen, gibt der QuantifilerTM Human DNA Quantification Kit auch für den Bereich unter 23pg/μl verwertbare Ergebnisse (TaqMan-Werte) an. Zur genaueren Bestimmung wird ein Grenzwert berechnet und dessen Signifikanz überprüft. Hierzu muss mit den auftraggebenden Polizeidienststellen festgelegt werden, wie hoch die Wahrscheinlichkeit für falsch negative Ergebnisse sein darf. Da für Spuren aus dem minderschweren Deliktsbereich wie beispielsweise der Eigentumsdelikte, anders als bei Kapitaldelikten, ein gewisser Verlust an Informationen tragbar ist, wurde ein maximaler Wert von 2% für falsch negative Ergebnisse vereinbart. Somit kann eine hoch signifikante Grenze mit einem Signifikanzniveau α von 0,01 bei einem TaqMan max. kleiner als 2,5pg/μl und TaqMan min. kleiner 1pg/μl gezogen werden. Das bedeutet, dass alle Proben, deren Ergebnis bei der Quantifizierung unter diesen TaqMan Werten liegt, nicht weiter amplifiziert werden müssen. Diese Untersuchungsstrategie wurde 2009 realisiert.

Für jeden neuen Kit muss aber immer in ähnlicher Verfahrensweise ein neuer Grenzwert erstellt werden, da die Ergebnisse unserer Studie nicht auf andere Kits übertragbar sind. Eine Weiterführung dieser Studie wäre zum Beispiel die Festlegung eines Grenzwerts unter Verwendung von Multi-Copy-Sonden anstatt Single-Copy-Sonden. Diese erhöhen die Sensitivität der Quantifizierung.

7 Anhang

7.1 SAS Programm:

```
data anna.datenber;                                /* Bestimmung der Positiven
set anna.datenber(drop=ergebniss personen_profil);
positiv=0;
if ergebnis="positiv" then positiv=1;
if Systeme="0 von 9 Systeme" then positiv=0;
if personenProfil="multiple Bandenmuster" then positiv=0;
qtypmax=max(qtywert1,qtywert2);                    /* Berechnunh von TaqMan max.
qtypmin=min(qtywert1,qtywert2);                    und TaqMan min.

select ;                                           /* Gruppenbildung
when (qtypmax<11) qtypmaxg=qtypmax;
when (qtypmax<31) qtypmaxg=20;
when (qtypmax<101) qtypmaxg=65;
when (qtypmax<1001) qtypmaxg=550;
when (qtypmax<10001) qtypmaxg=5500;
otherwise qtypmaxg=15000;end;
select ;
when (qtypmin<11) qtypming=qtypmin;
when (qtypmin<31) qtypming=20;
when (qtypmin<101) qtypming=65;
when (qtypmin<1001) qtypming=550;
when (qtypmin<10001) qtypming=5500;
otherwise qtypming=15000;end;
run;
data anna.datenber;
set anna.datenber;
select ;
when (qtypmax<11) qtypmaxg2=qtypmax;
otherwise qtypmaxg2=1000;end;
select ;
when (qtypmin<3) qtypming2=qtypmin;
otherwise qtypming2=1000;end;
run;
data anna.datenber;
set anna.datenber;
if qtypmax<11 and qtypmin<3 then gruppe=1;
else gruppe=2;
run;
```

Tabelle 35: SAS Programm zur Erhebung der Daten: Im ersten Absatz wird die Definition von Positiv und Negativ festgelegt, wobei Positiv ein verwertbares Ergebnis bedeutet und negativ kein verwertbares Ergebnis. Im nächsten Schritt erfolgt die Aufteilung in TaqMan max. und TaqMan min, entspricht hier den qtypmax und qtypmin Werten. Im letzten Schritt erfolgt die Zusammenfassung in Gruppen ab Werten größer 10.

7.2 Excel Formel für Signifikanzberechnung:

Input	p=	0,02	n=	1071
	p/(1-p)=	0,020408163	Summe=	1,000
k	P(X=k)	P(X<=k)	Koeffizient(Zwischenrech	
0	4,00984E-10	4,00984E-10		
1	8,76437E-09	9,16535E-09	1071	
2	9,56926E-08	1,04858E-07	535	
3	6,95887E-07	8,00745E-07	356,333333	
4	3,79187E-06	4,59262E-06	267	
5	1,6514E-05	2,11066E-05	213,4	
6	5,98773E-05	8,09839E-05	177,666667	
7	0,000185916	0,0002669	152,142857	
8	0,00050463	0,00077153	133	
9	0,001216375	0,001987905	118,111111	
10	0,002636308	0,004624213	106,2	
11	0,005189466	0,009813679	96,4545455	
12	0,00935516	0,01916884	88,3333333	
13	0,015552771	0,03472161	81,4615385	
14	0,023986635	0,058708245	75,5714286	
15	0,034495065	0,09320331	70,4666667	
16	0,046462741	0,13966605	66	
17	0,058845368	0,198511418	62,0588235	
18	0,070320882	0,2688323	58,5555556	
19	0,079535863	0,348368162	55,4210526	
20	0,085379314	0,433747476	52,6	

Tabelle 36: Berechnung mit Excel der Formel: $P(X=i) = b(i | p_0, n) = \binom{n-i-1}{i} p_0^i (1-p_0)^{n-i-1}$. In diesem Fall wurde der kritische Wert zur Signifikanzbestimmung berechnet für 1071 Fälle, die für TaqMan max<2,5 und TaqMan min.< 1 auftreten, unter der Bedingung, dass die falsch negativen Werte mit einer Wahrscheinlichkeit von = 0,02 auftreten. Das Ergebnis kann man in der Zeile ablesen, in der P(X<=k) unter dem Signifikanzniveau α liegt, dass bedeutet die 0,01 gerade noch nicht übersteigt. In diesem Fall ist das Zeile 11 mit 0,0098. Folglich liegt der kritische Wert hierfür bei 11.

7.3 Quellenverzeichnis

Andersen JF, Greenhalgh MJ, Butler HR, Kilpatrick SR, Piercy RC, Way KA, Myhill HS, Wright JC, Hallet R, Parkin BH (1996). Further validation of a multiplex STR system for use in routine forensic identity testing. *Forensic Sci Int.* 1996 Mar 5;78(1):47-64

Anslinger K, Bayer B (2011). The effect of increased cycle numbers using the Quantifiler Duo DNA Quantification Kit (AB) on the detection of minute amounts of male DNA in mixtures and its application in routine casework. *Forensic Sci Int. Genetics Supplement Series* 2011 Dec;3(1): e277-278

Anslinger K, Bayer B, Rolf B., Kail W, Eisenmenger W (2005). Application of Biorobot EZ1 in a forensic laboratory. *Leg Med (Tokyo).* 2005 May;7(3):164-8

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

Applied Biosystems(2001).ABI PRISM® 310 - Instrument DNA Analyzer Diagnostics System. User Manual. 2012

Applied Biosystems(2007). AmpFISTR®SEfiler SEfiler Plus™ - PCR Amplifikation Kit. User Guide. 2007

Applied Biosystems(2012). Quantifiler® Kits - Quantifiler®Human DNA Quantification Kit and Quantifiler®Y Human Male DNA Quantification Kit. User Manual. 2012

Bäßler G, Förster R, Eberspächer B, Karl C, Kugler M, Pflug W (1999). Frequency data for the STR loci HumFibra (FGA) and Hum ACTBP2 (SE33) in a population of Germans and Turks from South-West Germany. *Int J Legal Med.* 1999;112(2):136-8.

Bond JW, Hammond C (2008). The Value of DNA Material Recovered from Crime Scenes. *J Forensic Sci.* 2008 Jul;53(4):797-801

Biotype AG (2008). Mentype® Nonaplex^{QS} PCR Amplifikation Kit –Gebrauchsanleitung. Dez. 2008

Brodersen K, Anslinger K, Rolf B (2003). DNA Analyse und Strafverfahren. Rechtliche und biologische Grundlagen der DNA Analyse. München. Verlag C.H.Beck

Bulander N, Rolf B (2009). Comparison of the Plexor1 HY System, Quantifiler1 and Quantifiler Duo1 kits using the Roche LightCycler 480 System and the ABI 7900 Real-Time PCR instrument. Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2 (2009) 104–105

Butler JM, Shen Y, McCord BR (2003). The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. J Forensic Sci. 2003 Sep;48(5):1054-64

Bustin SA (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J Mol Endocrinol. 2000 Oct;25(2):169-93.

Cupples CM, Champagne JR, Lewis KE, Cruz TD (2009). STR profiles from DNA samples with "undetected" or low quantifiler results. J Forensic Sci. 2009 Jan;54(1):103-7

Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. Am J Hum Genet. 1991 Oct;49(4):746-56

Edwards MC, Gibbs RA (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. PCR Methods Appl. 1994 Feb;3(4):S65-75.

Förster VT (1948). Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Ann. of Phys. (Leipzig)* 2:55–75.

Gill P, Brinkmann B, D'Aloja E, Andersen J, Bar W, Carracedo A, Dupuy B, Eriksen B, Jangblad M, Johnsson V, Kloosterman AD, Lincoln P, Morling N, Rand S, Sabatier M, Scheithauer R, Schneider P, Vide MC (1997). Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature. Forensic Sci Int. 1997 Jun 23; 87(3):185-92.

Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ (1985). Forensic application of DNA 'fingerprints'. Nature. 1985 Dec 12-18;318(6046):577-9.

Gill P, Kimpton C, D'Aloja E, Andersen JF, Bar W, Brinkmann B, Holgersson S, Johnsson V, Kloosterman AD, Lareu MV (1994). Report of the European DNA profiling group (EDNAP)--

towards standardisation of short tandem repeat (STR) loci. *Forensic Sci Int.* 1994 Mar; 65(1):51-9

Green RL, Roinestad IC, Boland C, Hennessy LK (2005). Developmental validation of the quantifiler real-time PCR kits for the quantification of human nuclear DNA samples. *J Forensic Sci.* 2005 Jul;50(4):809-25.

Grgicak CM, Urban ZM, Cotton RW (2010). Investigation of reproducibility and error associated with qPCR methods using Quantifiler® Duo DNA quantification kit. *J Forensic Sci.* 2010 Sep; 55(5):1331-9.

Günther S, Patzelt D (1996). Population data for the STR systems HumTH01, HumVWA and FES/FPS in a population sample from Lower Franconia. *Int J Legal Med.* 1996;109(2):102-3.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y).* 1992 Apr;10(4):413-7.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y).* 1993 Sep;11(9):1026-30.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985 b). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature.* 1985 Mar 7-13;314(6006):67-73.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985 a). Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature.* 1985 Jul 4-10;316(6023):76-9.

Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, Keyte J (1988). Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res.* 1988 Dec 9;16(23):10953-71.

Kamphausen T, Schadendorf D, von Wurmb-Schwark N, Bajanowski T, Poetsch M (2012). Good shedder or bad shedder-the influence of skin diseases on forensic DNA analysis from epithelial abrasions. *Int J Legal Med.* 2012 Jan;126(1):179-83.

Kimpton CP, Oldroyd NJ, Watson SK, Frazier RR, Johnson PE, Millican ES, Urquhart A, Sparkes BL, Gill P (1996). Validation of highly discriminating multiplex short tandem repeat amplification systems for individual identification. *Electrophoresis* 1996 Aug;17(8):1283-93.

Köhnemann S, Pennekamp P, Schmidt PF, Pfeiffer H (2010). qPCR and mtDNA SNP analysis of experimentally degraded hair samples and its application in forensic casework. *Int J Legal Med.* 2010 Jul;124(4):337-42.

Koukoulas I, O'Toole FE, Stringer P, van Oorschot RA (2008). Quantifiler observations of relevance to forensic casework. *J Forensic Sci.* 2008 Jan; 53(1):135-41

Lakowicz JR (1983). Energy Transfer. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York: Plenum Press 1983; 303–339.

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Raymond C, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N,

Blöcker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglu S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ; International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409(6822):860-921.

LaSalle HE, Duncan G, McCord B (2011). An analysis of single and multi-copy methods for DNA quantitation by real-time polymerase chain reaction. *Forensic Sci Int Genet*. 2011 Jun;5(3):185-93. doi: 10.1016/j.fsigen.2010.03.002.

Laurin N, Frégeau C (2012). Optimization and validation of a fast amplification protocol for AmpFISTR(®) Profiler Plus(®) for rapid forensic human identification. *Forensic Sci Int Genet*. 2012 Jan;6(1):47-57.

Lowe A, Murray C, Whitaker J, Tully G, Gill P (2002). The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. *Forensic Sci Int*. 2002 Sep 10;129(1):25-34.

Martin PD, Schmitter H, Schneider PM (2001). A brief history of the formation of DNA databases in forensic science within Europe. *Forensic Sci Int*. 2001 Jun 15;119(2):225-31.

Mayo O (2008). A century of Hardy-Weinberg equilibrium. *Twin Res Hum Genet*. 2008 Jun;11(3):249-56

Mullis KB, Faloona F (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol*. 1987;155:335-50.

Nicklas JA, Buel E (2003). Quantification of DNA in forensic samples; *Anal Bioanal Chem*. 2003 Aug; 376(8):1160-7.

Nielsen K, Mogensen HS, Hedman J, Niederstätter H, Parson W, Morling N (2008). Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Sci. Int. Genet.* 2008 Jun; 2(3):226-30.

Phipps M, Petricevic S (2007). The *tendency* of *individuals* to transfer DNA to handled items. *Forensic Sci Int.* 2007 May 24;168(2-3):162-8.

Qiagen (2009).EZ1® DNA Investigator Handbook, For automated purification of DNA from forensic and biosecurity samples using EZ1 instruments. 2009

Ruitberg CM, Reeder DJ, Butler JM (2001). STRBase: a short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Res.* 2001 Jan 1; 29:320-322.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* 1988 Jan 29;239(4839):487-91.

Schilz F, Hummel S, Herrmann B (2004). Design of a multiplex PCR for genotyping 16 short tandem repeats in degraded DNA samples. *Anthropol Anz.* 2004 Dec;62(4):369-78.

Schulz MM, Brune V, Maiertaler M, Graw M (2011). Visualization of latent biological traces via 5-methylthioninhydrin (5-MTN) staining for forensic DNA typing. *Forensic Sci Int. Genetics Supplement Series* 2011 Dez;3(1):e530–e531

Skolnick MH, Wallace RB (1988). Simultaneous analysis of multiple polymorphic loci using amplified sequence polymorphisms (ASPs). *Genomics* 1988 May; 2(4):273-9.

Southern EM (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.* 1975 Nov 5;98(3):503-17

Stiegler SM (1995). Galton and identification by fingerprints. *Genetics* 1995 Jul; 140(3):857-60

Tautz D (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 1989 Aug 25;17(16):6463-71.

Thiemann F, Cullen PM, Klein H (2006). Leitfaden Molekulare Diagnostik: Grundlagen, Gesetze, Tipps und Tricks. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co.KGaA

Thomas JT, Berlin RM, Barker JM, Dawson Cruz T (2013). Qiagen's Investigator™ Quantiplex Kit as a Predictor of STR Amplification Success from Low-Yield DNA Samples. *J Forensic Sci.* 2013 Sep;58(5):1306-9.

Timken MD, Swango KL, Orrego C, Buoncristiani MR (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.* 2005 Sep;50(5):1044-60.

Tringali G, Barbaro A, Insirello E, Cormaci P, Roccazzello AM (2004). Rapid and efficacious real-time quantitative PCR assay for quantitation of human DNA in forensic samples; *Forensic Sci Int.* 2004 Dec 2;146 Suppl:S177-81.

Tully G, Bär W, Brinkmann B, Carracedo A, Gill P, Morling N, Parson W, Schneider P (2001). Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int.* 2001 Dec 15;124(1):83-91.

Vogel P (2008). Nachweis forensisch relevanter Spuren mit Hilfe der Lichtquelle Superlite 400. *Unv. Dissertation, LMU medizinische Fakultät* 2008.

von Wurmb-Schwark N, Schwark T, Harbeck M, Oehmichen M (2004). A simple Duplex-PCR to evaluate the DNA quality of anthropological and forensic samples prior short tandem repeat typing. *Leg Med (Tokyo).* 2004 Apr; 6(2):80-8.

Walker JA, Hedges DJ, Perodeau BP, Landry KE, Stoilova N, Laborde ME, Shewale J, Sinha SK, Batzer MA (2005). Multiplex polymerase chain reaction for simultaneous quantitation of human nuclear, mitochondrial, and male Y-chromosome DNA: application in human identification. *Anal Biochem.* 2005 Feb 1;337(1):89-97.

Weber JL, May PE (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet.* 1989 Mar;44(3):388-96.

Welch LA, Gill P, Phillips C, Ansell R, Morling N, Parson W, Palo JU, Bastisch I (2012). European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial

STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers. Forensic Sci Int Genet. 2012 Dec;6(6):819-26.

Westring CG, Kristinsson R, Gilbert DM, Danielson PB (2007). Validation of reduced-scale reactions for the Quantifiler Human DNA kit. J Forensic Sci. 2007 Sep;52(5):1035-43.

Wickenheiser RA (2002). *Trace DNA*: a review, discussion of theory, and application of the transfer of *trace* quantities of *DNA* through skin contact. J Forensic Sci. 2002 May;47(3):442-50.

Wong Z, Wilson V, Jeffreys AJ, Thein SL (1986). Cloning a selected fragment from a human DNA 'fingerprint': isolation of an extremely polymorphic minisatellite. Nucleic Acids Res. 1986 Jun 11; 14(11):4605-16.

7.4 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: BEISPIELHAFTER AUFBAU EINES STR LOCUS (HTTP://WWW.UNI-TUEBINGEN.DE/ABOT/LIFE/KRIMINALTECHNIK.PDF VOM 26.05.2009).....	10
ABBILDUNG 2: FREQUENZHÄUFIGKEIT DER ALLELE 13,14,15,16,17,18,19 AM BEISPIEL DES STR- MARKERS D3S1358 FÜR MITTELEUROPÄER	11
ABBILDUNG 3: WORKTABEL DES EZ1: (QIAGEN (2009).EZ1® DNA INVESTIGATOR HANDBOOK, FOR AUTOMATED PURIFICATION OF DNA FROM FORENSIC AND BIOSECURITY SAMPLES USING EZ1 INSTRUMENTS. 2009).....	27
ABBILDUNG 4: REAGENZIENKARTUSCHE (QIAGEN (2009).EZ1® DNA INVESTIGATOR HANDBOOK, FOR AUTOMATED PURIFICATION OF DNA FROM FORENSIC AND BIOSECURITY SAMPLES USING EZ1 INSTRUMENTS. 2009).....	27
ABBILDUNG 5: KARTUSCHENHALTER (QIAGEN (2009).EZ1® DNA INVESTIGATOR HANDBOOK, FOR AUTOMATED PURIFICATION OF DNA FROM FORENSIC AND BIOSECURITY SAMPLES USING EZ1 INSTRUMENTS. 2009).....	28
ABBILDUNG 6: PRINZIP DER REINIGUNG DES BIOBOT EZ1 (QIAGEN (2009).EZ1® DNA INVESTIGATOR HANDBOOK, FOR AUTOMATED PURIFICATION OF DNA FROM FORENSIC AND BIOSECURITY SAMPLES USING EZ1 INSTRUMENTS. 2009)	29
ABBILDUNG 7: DARSTELLUNG DES PCR ZYKLUS	33
ABBILDUNG 8: ANHEFTUNG DER HYBRIDISIERUNGSONDE TAQMAN® (MGB) IN DER ANNEALINGPHASE (APPLIED BIOYSTEMS(2012). QUANTIFILER® KITS - QUANTIFILER®HUMAN DNA QUANTIFICATION KIT AND QUANTIFILER®Y HUMAN MALE DNA QUANTIFICATION KIT. USER MANUAL. 2012)	34
ABBILDUNG 9: LÖSUNG DER TAQMAN® MGB WÄHREND DER ELONGATIONSPHASE (APPLIED BIOYSTEMS(2012). QUANTIFILER® KITS - QUANTIFILER®HUMAN DNA QUANTIFICATION KIT AND QUANTIFILER®Y HUMAN MALE DNA QUANTIFICATION KIT. USER MANUAL. 2012)	35
ABBILDUNG 10: HYDROLISIERUNG DES REPORTERS VON DER TAQMAN® MGB (APPLIED BIOYSTEMS(2012). QUANTIFILER® KITS - QUANTIFILER®HUMAN DNA QUANTIFICATION KIT AND QUANTIFILER®Y HUMAN MALE DNA QUANTIFICATION KIT. USER MANUAL. 2012)	35
ABBILDUNG 11: ABSCHLUSS DER ELONGATIONSPHASE, REPORTER BLEIBT GELÖST (APPLIED BIOYSTEMS(2012). QUANTIFILER® KITS - QUANTIFILER®HUMAN DNA QUANTIFICATION KIT AND QUANTIFILER®Y HUMAN MALE DNA QUANTIFICATION KIT. USER MANUAL. 2012)	36
ABBILDUNG 12: DARSTELLUNG DER FLUORESCENZ EINER REAL-TIME PCR (APPLIED BIOYSTEMS(2012). QUANTIFILER® KITS - QUANTIFILER®HUMAN DNA QUANTIFICATION KIT AND QUANTIFILER®Y HUMAN MALE DNA QUANTIFICATION KIT. USER MANUAL. 2012).	37
ABBILDUNG 13: STANDARDVERDÜNNUNGSKURVEN.....	41

ABBILDUNG 14: VOLLSTÄNDIGE FRAGMENTÜBERSICHT DER ALLELISCHEN LEITER DES MENTYPE® NANOPLEX KITS (APPLIED BIOYSYSTEMS(2012). QUANTIFILER® KITS - QUANTIFILER®HUMAN DNA QUANTIFICATION KIT AND QUANTIFILER®Y HUMAN MALE DNA QUANTIFICATION KIT. USER MANUAL. 2012)	49
ABBILDUNG 15: DNA PROFIL	51
ABBILDUNG 16: BEISPIEL FÜR „ALLELIC DROP OUT“	52
ABBILDUNG 17: AUFTEILUNG IN DEN EINZELNEN TAQMAN GRUPPEN	60
ABBILDUNG 18: STOCHASTISCHER EFFEKT	74

7.5 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ZUSAMMENFASSUNG DER VERWENDETEN STRS	10
TABELLE 2: BEISPIEL DER GENOTYPHÄUFIGKEITEN UND DER HÄUFIGKEIT DES IDENTIFIZIERUNGSMUSTER MIT FÜNF SYSTEMEN	12
TABELLE 3: GERÄTEÜBERSICHT	24
TABELLE 4: SOFTWARE	24
TABELLE 5: CHEMIKALIEN	25
TABELLE 6: KITS	25
TABELLE 7: VORKOMMENDE SPURENARTEN UND IHRE ANZAHL	26
TABELLE 8: INHALT DES BIOROBOT EZ1 INVESTIGATOR KIT MIT CHEMIKALIEN (QIAGEN (2009).EZ1® DNA INVESTIGATOR HANDBOOK, FOR AUTOMATED PURIFICATION OF DNA FROM FORENSIC AND BIOSECURITY SAMPLES USING EZ1 INSTRUMENTS. 2009)	28
TABELLE 9: BENÖTIGTE REAGENZIEN ZUR EXTRAKTION VON HAAREN	30
TABELLE 10: HELLMANN PUFFER	31
TABELLE 11: REAGENZIEN IM QUANTIFILER™ HUMAN DNA QUANTIFICATION KIT	38
TABELLE 12: MISCHVERHÄLTNIS MASTERMIX (APPLIED BIOYSYSTEMS(2012). QUANTIFILER® KITS - QUANTIFILER®HUMAN DNA QUANTIFICATION KIT AND QUANTIFILER®Y HUMAN MALE DNA QUANTIFICATION KIT. USER MANUAL. 2012)	40
TABELLE 13: ANSATZ VERDÜNNUNGSREIHE (APPLIED BIOYSYSTEMS(2012). QUANTIFILER® KITS - QUANTIFILER®HUMAN DNA QUANTIFICATION KIT AND QUANTIFILER®Y HUMAN MALE DNA QUANTIFICATION KIT. USER MANUAL. 2012)	40
TABELLE 14: INTERPRETATION DER IPC ERGEBNISSE (APPLIED BIOYSYSTEMS(2012). QUANTIFILER® KITS - QUANTIFILER®HUMAN DNA QUANTIFICATION KIT AND QUANTIFILER®Y HUMAN MALE DNA QUANTIFICATION KIT. USER MANUAL. 2012).	42
TABELLE 15: AUSDRUCK AUS DEM QUANTIFILER™ HUMAN DNA QUANTIFICATION KIT	43
TABELLE 16: INHALT DES MENTYPE® NANOPLEXQS PCR AMPLIFIKATION KIT	44
TABELLE 17: ZUSÄTZLICHE REAGENZIEN	45
TABELLE 18: STR LOCUS-SPEZIFISCHE INFORMATION FÜR MENTYPE® NANOPLEXQS (BIOTYPE AG (2008). MENTYPE® NONAPLEXQS PCR AMPLIFICATION KIT –GEBRAUCHSANLEITUNG. DEZ. 2008)	45
TABELLE 19: MISCHUNG DES MASTERMIX (BIOTYPE AG (2008). MENTYPE® NONAPLEXQS PCR AMPLIFICATION KIT – GEBRAUCHSANLEITUNG. DEZ. 2008)	46
TABELLE 20: THERMOCYCLERSCHRITTE (BIOTYPE AG (2008). MENTYPE® NONAPLEXQS PCR AMPLIFICATION KIT – GEBRAUCHSANLEITUNG. DEZ. 2008)	46
TABELLE 21: INHALT DES AMPF/STR®SEFILER PLUS AMPLIFIKATION KIT	47
TABELLE 22: MASTERMIX (APPLIED BIOYSYSTEMS(2007). AMPFLSTR®SEFILER SEFILER PLUS™ - PCR AMPLIFIKATION KIT. USER GUIDE. 2007)	47
TABELLE 23: THERMOCYCLERSCHRITTE (APPLIED BIOYSYSTEMS(2007). AMPFLSTR®SEFILER SEFILER PLUS™ - PCR AMPLIFIKATION KIT. USER GUIDE. 2007)	48
TABELLE 24: GEMISCHVORBEREITUNG MENTYP® NANOPLEXQS (BIOTYPE AG (2008). MENTYPE® NONAPLEX ^{QS} PCR AMPLIFICATION KIT –GEBRAUCHSANLEITUNG. DEZ. 2008)	49
TABELLE 25: GEMISCHVORBEREITUNG AMPF/STR® SEFILER PLUS (APPLIED BIOYSYSTEMS(2007). AMPFLSTR®SEFILER SEFILER PLUS™ - PCR AMPLIFIKATION KIT. USER GUIDE. 2007)	49
TABELLE 26: AUSZUG AUS DER ROHDATENTABELLE	54
TABELLE 27: AUFTEILUNG DER ROHDATEN IN VERWERTBARE UND NICHT VERWERTBARE ERGEBNISSE:	59
TABELLE 28: ALLE ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG	63
TABELLE 29: EINTEILUNG DER ERGEBNISSE IN ZWEI GRUPPEN	65
TABELLE 30: ERMITTELN EINES GRENZWERTS	66
TABELLE 31: ÜBERPRÜFEN DER SIGNIFIKANZ	67
TABELLE 32: ERGEBNISSE SORTIERT NACH MIN. GLEICH NULL	68
TABELLE 33: AUFTEILUNG DER 97 PROBEN DER NACHUNTERSUCHUNG	69

TABELLE 34: AUSZÄHLUNG DER 97 NACHUNTERSUCHTEN PROBEN	70
TABELLE 35: SAS PROGRAMM ZUR ERHEBUNG DER DATEN:	83
TABELLE 36: BERECHNUNG MIT EXCEL DER FORMEL	84

7.6 Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaar
C _T -Wert	Threshold Cycle
DAD	Deutsche DNA Analyse Datei
DAPI	4',6'-Diamindine-2-Phenylindole
DNA	desoxyribonuklein acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
6-FAM	6- Carboxyfluorescein
FET	Fluoreszenz-Energietransfer
GH	Genotyphäufigkeit
H ₀	Nullhypothese
H ₁	Gegenhypothese
HEX	Hexachloro-Fluoresceine
hTERT	Humane Telomerase Reverse Transcriptase Gen
IPC	interne Positivkontrolle
MGB	TaqMan® minor groove binder
MLS	Multi-Loci-Sonde
NED	fluoreszierender Farbstoff der Firma Applied Biosystems
P	Wahrscheinlichkeit
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

RFLP	Restriktions Fragment Längen Polymorphismus
RFU	relative Fluoreszenz Unit
RNA	ribonuklein acid (Ribonukleinsäure)
ROX	Carboxy X Rhodamin
rt-PCR	real time Polymerase Chain Reaction
SDS	Sequenz Detection System
SLS	Single-Locus-Sonde
STR	Short Tandem Repeat
SWGDM	Scientific Working Group DNA Analyse Methods
Taq	Thermus aquatius
UV	Ultra violett
VIC	fluoreszierender Farbstoff der Firma Applied Biosystems
VNTRs	variable number of Tandem repeats

8 Eidesstattliche Versicherung

Schlender, Anna Julia

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Der Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit als Screeningtest in der forensischen
Molekularbiologie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und
alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als
solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Anna Julia Schlender

9 Danksagung:

Herrn Prof. Dr. med M. Graw, dem Leiter des Instituts für Rechtsmedizin in München, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit anzufertigen.

Frau PD Dr. K. Anslinger danke ich für die Betreuung meiner Arbeit, die wertvollen Tipps und die viele Geduld beim langen Werdeprozess.

Frau B. Bayer danke ich für das Quantifizieren der Proben und Erstellen der DNA Profile.

Herrn Dr. Peter Kremser, meinem Vater, danke ich für die hilfreiche statistische Beratung und dem zur Verfügung Stellen der statistischen Programme.

Dem Rest meiner Familie danke ich für die liebevolle Unterstützung.