

Verbesserte DNA-Analyse von humanen Blut- und Urinproben
unter rechtsmedizinischen Aspekten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität, Kiel

vorgelegt von

Antje Milde

Mai 2000

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angeführten Quellen und Hilfsmitteln verwendet habe.

Kiel, Juni 2000

Danksagung

Ich danke Herrn PD Dr. rer. nat. Guido Krupp und Herrn Prof. Dr. rer. nat. M. Thomm für die Unterstützung, durch die diese Dissertation ermöglicht wurde.

Herrn PD Dr. med. Dr. jur. H.-J. Kaatsch und Herrn Prof. Dr. med. M. Oehmichen danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat. Matthias Menzel, Frau Dr. rer. nat. Telse Roggentin und Herrn PD Dr. rer. nat. Peter Roggentin für das ehrliche Interesse und die konstruktive Kritik.

Für den reibungslosen Computereinsatz danke ich meinem Lebensgefährten Herrn Dipl.-Phys. Joachim Kellers.

Mein Dank gilt außerdem Nicole und Thorsten Zwick sowie Dr. med. Andreas Dabelstein für Korrekturarbeiten und meinen Eltern Anneliese und Werner Milde.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	4
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Untersuchung der Urinproben.....	10
2.1.1 Probenmaterial für die Urin-Analyse	10
2.1.2 Probenmaterial für die Untersuchung der Chimären-Drillinge.....	10
2.1.3 pH-Messung des Urins	10
2.1.4 Mikroskopische Untersuchung des Urins	10
2.1.5 Hämatoxylin-Färbung (HE-Färbung).....	11
2.1.6 DNA-Extraktion	11
2.1.6.1 Chelex-Methode.....	11
2.1.6.2 Phenol-Chloroform-Extraktion	12
2.1.7 Lagerungsbedingungen.....	13
2.2 Quantifizierung und Qualitätsüberprüfung der DNA.....	13
2.2.1 Transfer der Nukleinsäuren auf Nylonmembranen.....	13
2.2.2 Hybridisierung von Nukleinsäuren	14
2.2.3 Statistische Auswertung der Abweichung von DNA-Mengen nach Applikation im Slot-Blot ...	15
2.3 Amplifikation der einzelnen STR-Regionen	15
2.3.1 Qualitätskontrolle	18
2.4 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese	20
2.4.1 Horizontale Elektrophorese	20
2.4.2 ABI Prism 377 Sequenzierautomat.....	21
2.4.3 Detektion der DNA-Fragmente	22
2.4.3.1 Horizontale Elektrophorese	22
2.4.3.2 ABI PRISM 377 Sequenzierautomat.....	22
2.5 Datenanalyse	23
3. ERGEBNISSE.....	24
3.1 Urinuntersuchungen	24
3.1.1 pH-Werte der Probanden	24
3.1.2 Zelluläre Zusammensetzung des Urins.....	24
3.1.3 Zellzahlen der frischen Urinproben.....	26
3.2 Mengenbestimmung von DNA aus Urin	26
3.2.1 Einfluß der Extraktionsmethode.....	29

3.2.2 Einfluß des Tagesverlaufs.....	29
3.2.3 Einfluß der Lagerungstemperatur und Chelatbildner.....	31
3.3 Typisierbarkeit der DNA aus gelagerten Urinproben	35
3.3.1 Ergebnisse mit dem STR-System HumTH01	39
3.3.2 Ergebnisse des AmpFLP D1S80.....	40
3.3.3 Einfluß der DNA-Konzentration im PCR-Ansatz.....	42
3.3.4 Darstellung der PCR-Systeme ACTBP2 und D21S11.....	43
3.4 Typisierungsergebnisse der Blutchimären	45
3.4.1 STR-System HUMvWFA31	45
3.4.2 Geschlechtsbestimmungssystem HUMAMELX/Y	47
4. DISKUSSION.....	48
4.1 Optimierung der DNA-Ausbeute	48
4.2 Lagerungstemperatur und Chelatbildner.....	51
4.3 Amplifizierbarkeit der DNA.....	53
4.4 Statistische Datenauswertung.....	55
4.4.1 STR-System HUMTH01	55
4.4.2 AmpFLP D1S80.....	56
4.5 DNA-Typisierung der Blutchimären.....	57
5. ZUSAMMENFASSUNG	59
6. LITERATUR	61
7. ANHANG.....	72
ABKÜRZUNGEN.....	79

1. Einleitung

Die Rechtsmedizin ist ein Fachgebiet der Medizin, das sich mit der Aufklärung von Straftatbeständen unter Einsatz naturwissenschaftlicher Methoden beschäftigt. Gegenstand der Untersuchungen zur Erbringung gerichtsverwertbarer (forensischer) Beweise sind häufig die Körperflüssigkeiten Blut und Urin. Bei der Untersuchung bzw. Zuordnung von Probenmaterial, das im Zusammenhang mit Drogenmißbrauch, Einbruchsdelikten, Sexualstraftaten oder zur Abklärung der Identität gesichert wurde, werden diese Körperflüssigkeiten bevorzugt toxikologischen und DNA-analytischen Methoden unterzogen.

Blut, die im Herzkreislaufsystem zirkulierende und dem Gastransport dienende Körperflüssigkeit, kann aufgrund seiner komplexen Zusammensetzung (Leukozyten, Erythrozyten, Thrombozyten, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide, anorganische Verbindungen, eventuell Medikamente) mit unterschiedlichen Methoden identifiziert und analysiert werden. Die DNA-Untersuchung des Blutes bedient sich dabei der Leukozyten, da nur die DNA dieses Zelltyps die für die Individualisierung notwendigen Längenpolymorphismen enthält. Etwa 4000-9000 Leukozyten/ μ l befinden sich normalerweise im Blut gesunder Erwachsener.

Urin, das Ausscheidungsprodukt der Nieren, enthält organische und anorganische Verbindungen, Gallenfarbstoffe und, als zelluläre Bestandteile, neben Epithelzellen und Leukozyten gelegentlich auch Spermien und ggf. Bakterien. Im Gegensatz zum Blut sind die für eine DNA-Untersuchung relevanten kernhaltigen Zellen im Urin in nur geringer Anzahl vorhanden. So können maximal bis zu 5 Leukozyten/ μ l Harn bei gesunden Erwachsenen gezählt werden. Werden in der Urinprobe eines weiblichen Spenders Spermien gefunden, so liegen kernhaltige Zellen von zwei verschiedenen Personen vor - es handelt sich um eine sogenannte Mischspur.

Mit der Möglichkeit zur Isolierung von DNA-Molekülen wurde die Untersuchung von Polymorphismen (s. S. 4) im menschlichen Genom möglich. Die DNA-Analyse wurde anfangs unter Einsatz von Restriktionsenzymen und Multi-Locus-Sonden (MLS) durchgeführt. Gegenstand der Untersuchung waren dabei die stark variablen repetitiven Sequenzen der Minisatelliten, die durch Jeffreys *et al.* (1985) Zugang zur forensischen Spurenanalytik fanden. Für die Untersuchung wird die DNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit einer Multi-Locus-Sonde hybridisiert. Diese Sonde bindet an komplementäre Sequenzen unterschiedlicher Minisatelliten-Regionen. Das Ergebnis auf dem Röntgenfilm ist ein DNA-Profil aus einer Vielzahl diskreter Banden, das individualspezifisch ist und von Jeffreys als

genetischer Fingerprint beschrieben wurde. Der Nachweis dieser polymorphen Regionen mit Restriktionsenzymen und einer Sonde wird als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) bezeichnet.

Eine Weiterentwicklung bedeutete die RFLP-Analyse von Minisatelliten-DNA durch Einsatz der Single-Locus-Sonden (SLS). Gegenstand der Untersuchung sind dabei Tandemwiederholungen, die in unterschiedlicher Anzahl vorliegen, die sogenannten VNTRs (engl.: variable number of tandem repeats, s. S. 4). Nach der Behandlung der DNA mit einem Restriktionsenzym und der Hybridisierung mit einer SLS können so pro Individuum maximal 2 Fragmente nachgewiesen werden.

Beide Methoden haben in der forensischen Anwendbarkeit u. a. den Nachteil, daß chromosomale DNA in großer Menge (1-2 µg) erforderlich ist. In der forensischen Praxis steht aber normalerweise nur wenig Untersuchungsmaterial für eine DNA-Analyse zur Verfügung. Dabei kann es sich beispielsweise um einen am Tatort gesicherten Blutstropfen oder Anhaftungen an Wäschestücken handeln. Mit der Einführung der PCR-Methode durch Mullis (1987) und der hierdurch ermöglichten Vervielfältigung (Amplifikation) kurzer, variabler DNA-Abschnitte mit den entsprechenden Startermolekülen (Primern), konnte die für Untersuchungen einzusetzende Probenmenge erheblich reduziert werden. In Einzelfällen gelangen zuverlässige DNA-Untersuchungen mit einer Einsatzmenge von 0,05 ng DNA Ausgangsmaterial, was der Menge von etwa 10 somatischen Zellen entspricht (Brinkmann *et al.*, 1993; Minnasch *et al.*, 1998). Handelt es sich bei dem zu untersuchenden Spurenmaterial um Blut, so kann aus einem Volumen von 3 µl bzw. 3 mm² Spurenlagerer eine DNA-Menge extrahiert werden, die eine eindeutige Identifikation des Spurenlegers aufgrund einer Vergleichsprobe ermöglicht (Walsh *et al.*, 1991).

Beim Urin variieren die Volumina, die für eine erfolgreiche DNA- oder serologische Analyse eingesetzt werden müssen, je nach eingesetzter Methode zwischen 0,1 ml und 200 ml. Früher wurden die im Urin vorkommenden polymorphen Proteine bzw. die klassischen ABO-Blutgruppen zur Individualisierung mit serologischen Methoden untersucht. Dieser Teilbereich der rechtsmedizinischen Spurenkunde beschäftigt sich ausschließlich mit den Eigenschaften des Blutserums (Mills *et al.*, 1989; Chase, 1985; Roy, 1990).

Die Entwicklung und Fortschritte von DNA-Techniken in der Spurenkunde wurden dann auf die forensische Urinanalyse übertragen. Die frühen Untersuchungsmethoden unter Einsatz von SLS-Sonden benötigten große Probenvolumina (bis zu 200 ml), eine Schwachstelle in der Spurenkunde (Röwer *et al.* 1990; Brinkmann *et al.* 1992). Erst mit der Einführung der PCR-Methode konnten auch geringe Volumina (0,1 ml) zuverlässig untersucht werden (Gasparini *et al.*, 1989; Brinkmann *et al.*, 1992 und Brinkmann, 1993).

Individuell-konstitutionelle Faktoren wie Geschlecht, Ernährungsgewohnheiten oder aktueller Immunstatus haben normalerweise eine größere Auswirkung auf die absolute Zellzahl im

Urin und somit auf die extrahierbare DNA-Menge als bei Blut (Sarree, 1976; Karcher, 1982; Rathert, 1991). Auch Lagerungs- und Extraktionsbedingungen können zu einer Abnahme der extrahierbaren Gesamt-DNA aus einer Urinprobe führen. Für weitergehende Untersuchungen werden Urinproben in der Regel bei -20 °C eingefroren bzw. bei +4 °C im Kühlschrank aufgehoben. Der Versand der Proben mit der Post zu einem rechtsmedizinischen Labor wird normalerweise ohne Kühlung durchgeführt. Bei dieser Praxis kommt es zu einer DNA-Degradierung, die auf enzymatische Aktivität (durch DNasen) zurückzuführen ist. Eine eindeutige Interpretation der Ergebnisse und die Zuordnung der Probe zu einer Person wird durch diese Umstände erschwert (Tsongalis *et al.*, 1996; Medintz *et al.*, 1994; Linfert *et al.*, 1998; Pötsch *et al.*, 1992).

Über mehrere Jahre bei +4°C gelagerte Proben zeigten ein starkes mikrobielles Wachstum. Die dadurch mitextrahierte Fremd-DNA störte die Amplifikation. Für die Entfernung der störenden Mikroorganismen wurde der Urin deshalb durch die mit einer Gaze bestimmter Porengröße verschlossene Öffnung eines Reaktionsgefäßes in ein zweites Gefäß zentrifugiert. Die Amplifikationsrate der DNA aus Epithelzellen nahm daraufhin deutlich zu. Diese Methode ist jedoch sehr umständlich und erhöht das Kontaminationsrisiko (Prinz *et al.*, 1993).

Untersuchungsmaterial, das bei Verstößen gegen die sexuelle Selbstbestimmung (z. B. nach einer Vergewaltigung oder sexuellem Mißbrauch von Kindern), bei Strangulation (Epithelzellen des Täters am Hals des Opfer) oder bei Bißwunden (Mißhandlung) am Opfer gesichert wurde, enthält in der Regel zellhaltiges Material von mindestens zwei verschiedenen Individuen. Naturgemäß variiert bei diesem Untersuchungsmaterial der Zellanteil der beteiligten Spurenleger (Opfer und Täter), und folglich werden bei einer solchen DNA-Analyse Merkmale mit unterschiedlicher Intensität detektiert (Gyllenstein *et al.*, 1992, Wiegand *et al.*, 1997 und 1998). Erschwert wird die Interpretation der Mischspurenergebnisse außerdem durch Überlagerungen des Bandenmusters. Bei Vorliegen von verschiedenen Zelltypen, wie z. B. Spermien und Epithelzellen im Urin ist eine getrennte Analyse durch differenzierende Extraktionsschritte möglich (Walsh *et al.*, 1991). Bei der Untersuchung einer Mischung gleicher Zelltypen unterschiedlicher Herkunft wie z. B. Blut von verschiedenen Personen oder Epithelzellen kann eine eindeutige Zuordnung nur mit Vergleichsproben der Beteiligten erfolgen. Problematisch wird die Interpretation, wenn eine vorliegende Einzelprobe aufgrund einer genetischen Besonderheit zunächst unberechtigterweise als Mischspur erscheint. Am Beispiel der DNA-Analyse von sogenannten Blutchimären wird dies in dieser Arbeit verdeutlicht.

Bei Blutchimären sind zwei unterschiedliche Blutzellpopulationen in einem Individuum nachweisbar. Aufgrund von Blutgefäßverwachsungen (Anastomosen) zwischen zweieiigen Zwillingen im Uterus kann es zu einem Austausch roter und weißer Blutstammzellen von einem Individuum zum anderen kommen. Einige transfundierte Blutstammzellen etablieren sich im Knochenmark des Empfängers, der als Folge Zellpopulationen mit unterschiedlichen genetischen Merkmalen ausbildet (Dunsford *et al.*, 1953 und 1957; Booth *et al.*, 1957; Gill, 1977; Ling *et al.*, 1988; Tippet, 1983; Farber *et al.*, 1993; Milde *et al.*, 1999).

Für die DNA-Analyse zur Zuordnung von Blut- und Urinproben zu einem Individuum werden repetitive DNA-Abschnitte im nichtcodierenden Bereich des Genoms mit Hilfe der PCR vervielfältigt. Diese sogenannten Mini- und Mikrosatelliten variieren in ihrer Gesamtlänge (Allele) und in der Länge der Wiederholungseinheiten (Brutlag, 1980). Diese Variabilität der Wiederholungseinheiten an einem speziellen Ort des Genoms bezeichnet man als Polymorphismus (Litt *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1992).

Die Einheiten von Minisatelliten-Regionen können 15 bis 64 bp lang sein und werden auch VNTR ("variable number of tandem repeats") genannt (Jeffreys *et al.*, 1985a und 1985b; Jarman *et al.*, 1986; Tautz, 1989). Bei der Etablierung der Polymerasekettenreaktion wurden in der Rechtsmedizin zunächst VNTR-Regionen mit den entsprechenden Primern amplifiziert (Boerwinkel *et al.*, 1989; Horn *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 1989).

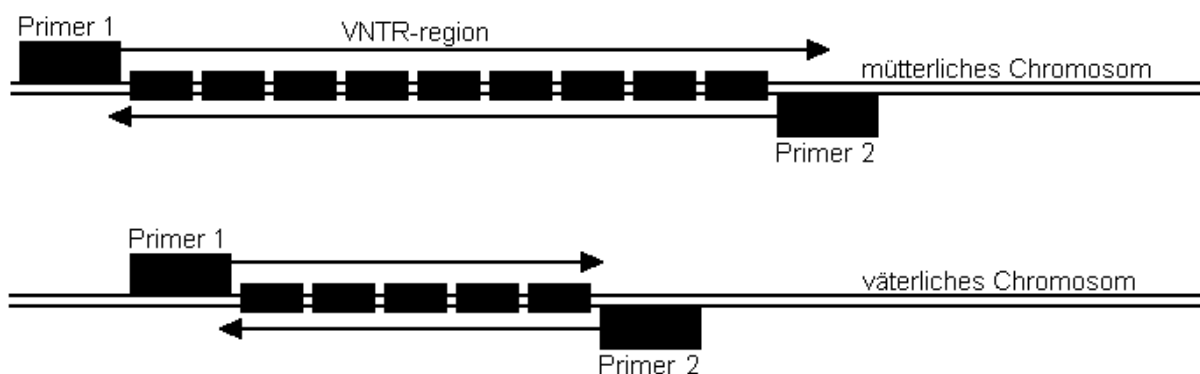


Abb.1: Schema einer VNTR-Region (aus Hochmeister, 1995)

Es können Fragment-Längen-Polymorphismen (AmpFLPs) bis 1 kb vervielfältigt werden (Brinkmann *et al.*, 1993). Durch den Einsatz eines DNA-Standards (Allelleiter, die sich aus allen bekannten Allelen zusammensetzt) ist eine klare Zuordnung der Banden gewährleistet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der AmpFLP D1S80 eingesetzt (Nakamura *et al.*, 1988; Budowle *et al.*, 1991; Skowatsch *et al.*, 1992; Baechtel *et al.*, 1993; Cosso *et al.*, 1995). Die Wiederholungseinheiten dieses Systems bestehen aus 16 bp großen Fragmenten. Bislang wurden 28 Allele detektiert (Kasai *et al.*, 1990; Sajantila *et al.*, 1992 und Kloostermann *et al.*, 1993). Für den Polymorphismus sind auch Mikrovariationen (Basenaustausch innerhalb der Allele) verantwortlich (Duncan *et al.*, 1997).

Die Mikrosatelliten umfassen Wiederholungseinheiten von 2 bis 6 bp Länge. Diese sogenannten STRs ("short tandem repeats") sind über das gesamte menschliche Genom verteilt (Saiki *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 1991; Beckmann *et al.*, 1992; Puers *et al.*, 1993). Am zuverlässigsten lassen sich tetramere Wiederholungseinheiten amplifizieren (Litt *et al.*, 1989; Weber *et al.*, 1989; Edwards *et al.*, 1991; Kimpton *et al.*, 1992; Lygo *et al.*, 1994; Walsh *et al.*, 1996). Die STR-Regionen sind wesentlich kürzer (100 - 300 bp) und dadurch zuverlässiger zu amplifizieren als die AmpFLPs (Rand *et al.*, 1992; Sajantila *et al.*, 1994; Lassen *et al.*, 1994).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die tetrameren STR-Systeme HUMTH01 und HUMvWFA31 eingesetzt (Hammond *et al.*, 1994; Lorente *et al.*, 1994; Evett *et al.*, 1996). HUMTH01 besitzt 8 häufig vorkommende Allele (Polymeropoulos *et al.*, 1991; Edwards *et al.*, 1991; Puers *et al.*, 1993; Urquhart *et al.*, 1994). Die Nomenklatur der Allele ergibt sich aus der Anzahl der Wiederholungseinheiten. So besitzt das kleinste Allel (Nr. 5) 5 und das größte (Nr. 11) 11 Wiederholungseinheiten (DNA-Kommission der International Society for Forensic Haemogenetics = ISFH).

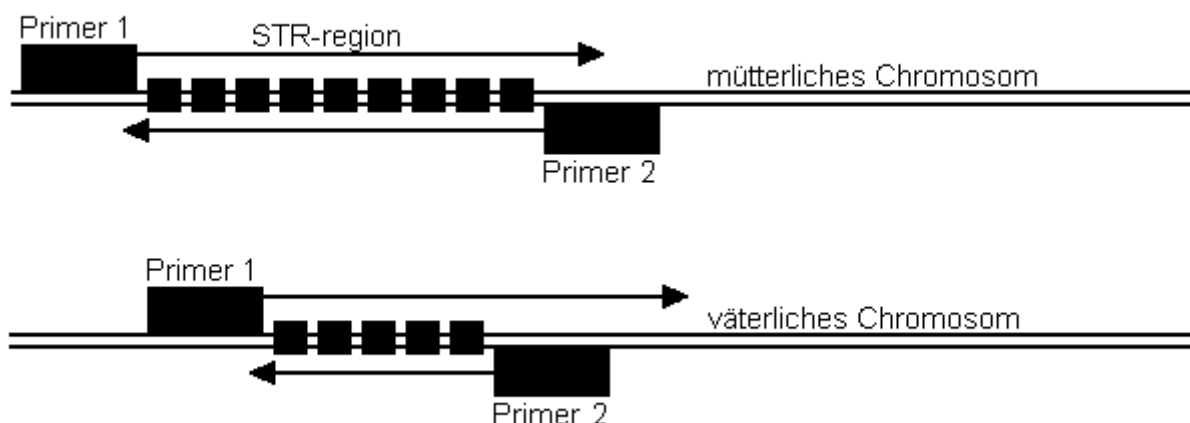


Abb. 2: Schema einer STR-Region (aus Hochmeister, 1995)

HUMvWFA31 besitzt 9 häufig vorkommende Allele, die sich aus zwei einfachen, jedoch in der Basenabfolge unterschiedlichen Sequenzmotiven zusammensetzen (Kimpton *et al.*, 1992; Sajantila *et al.*, 1994; Urquhart *et al.*, 1994).

Mit Hilfe der PCR-Methode können ferner spezifische Sequenzen auf den Geschlechtschromosomen amplifiziert werden (Gill, 1987; Akane *et al.*, 1992; Roewer *et al.*, 1992; Fattorini *et al.*, 1993; Mannucci *et al.*, 1994; Gaensslen *et al.*, 1992; Santos *et al.*, 1996). Mikrosatelliten auf dem Y-Chromosom werden nur uniparental vererbt, sind haploid und können nicht rekombinieren. Polymorphismen können auf dem Y-Chromosom lediglich durch Mutationen entstehen (Jobling *et al.*, 1997; Roewer *et al.*, 1992; Kayser *et al.*, 1997).

Für die Geschlechtsbestimmung im Rahmen dieser Arbeit wurden die Primer für das Amelogeningeschlechtsbestimmungssystem eingesetzt. Der Amelogenin-Genort auf dem X-Chromosom weist eine 6 bp große Deletion im Intron 1 des Gens auf (Nakahori *et al.*, 1991; Pfitzinger *et al.*, 1993). Für das X-Chromosom resultiert daraus eine Länge des Amplifikates von 106 bp, für das Y-Chromosom eine Länge von 112 bp. Aufgrund der zu amplifizierenden Fragmente ist dieses System sehr sensitiv und kann Y-Chromosomen noch in einem 100-fachen Überschuß von X-Chromosomen detektieren (Mannucci *et al.*, 1994).

Aufgabenstellung

Eine optimale Lagerung von Urinproben zur Beweissicherung ist Voraussetzung für ein eindeutiges, reproduzierbares Analyse-Ergebnis. Für die rechtsmedizinische Routine ist es deshalb erstrebenswert, Asservierungsbedingungen für Urinproben zu ermitteln, die die DNA langfristig (über mehrere Jahre) stabilisieren und gleichzeitig eine Analyse nicht stören.

Die im Rahmen der Urinanalyse ermittelten Genotyp- und Allelfrequenzen von 50 nicht-verwandten Individuen aus Schleswig-Holstein wurden auf ihre Einsetzbarkeit für die biostatistische Auswertung an diesem Institut überprüft. Mit Hilfe dieser Berechnung wird die Wahrscheinlichkeit ausgedrückt, mit der ein biologisches Untersuchungsmaterial einem Individuum zuzuordnen ist. Dafür wurden die beobachteten Populationsdaten auf Erfüllung der Kriterien für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht überprüft.

Die forensischen Konsequenzen einer genetischen Besonderheit, die das DNA-Profil eines betroffenen Individuums unberechtigt wie eine Mischspur erscheinen läßt und deshalb eine "Fallgrube" in der forensischen Ergebnisinterpretation darstellt, wird am Beispiel von sogenannten Blutchimären diskutiert.

2. Material und Methoden

2.1 Untersuchung der Urinproben

2.1.1 Probenmaterial für die Urin-Analyse

Von 25 männlichen und 25 weiblichen nicht-verwandten Probanden aus Schleswig-Holstein wurden jeweils an einem Tag morgens, mittags und abends etwa 100 ml Urin gesammelt. Jeder Person wurden sterile Bechergläser für die Probennahme und sterile 50 ml Falcon-Röhrchen zur Lagerung des zu untersuchenden Urins überlassen. Die Proben wurden sofort aufgearbeitet.

2.1.2 Probenmaterial für die Untersuchung der Chimären-Drillinge

Für diese Untersuchungen wurden natives Blut, Urin und Abstriche der Mundschleimhaut eingesetzt. Die DNA-Extraktion erfolgte nach der Chelex-Methode.

2.1.3 pH-Messung des Urins

Der pH-Wert des Morgenurins wurde mittels pH-Teststreifen (Fa. Merck) für jeden Probanden ermittelt.

2.1.4 Mikroskopische Untersuchung des Urins

Mittels mikroskopischer Begutachtung wurde der Zellstatus des zu untersuchenden Urins bestimmt, um Aufschluß über Art, Menge und Beschaffenheit der zellulären Zusammensetzung (kernhaltige Zellen, mikrobielle Zellen, Spermien) und somit über zu erwartende DNA-Menge zu erhalten.

Ein 500 µl Aliquot des frischen Urins wurde in einem Reaktionsgefäß für 5 min bei Höchststufe (14000 x g) in einer Eppendorffzentrifuge zentrifugiert, der Überstand bis auf etwa 50 µl abgenommen und das Sediment mit einer Eppendorfpipette vorsichtig homogenisiert. Anschließend wurde 1 µl der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer überführt und mikroskopisch im Hellfeld untersucht (10 x Okular, 40 x Vergrößerung, Fa. Zeiss).

Aliquots der gelagerten Urinansätze wurden wie oben beschrieben behandelt und 5 µl der Suspension auf einen einfachen Objektträger überführt, getrocknet und einer anschließenden Hämatoxylin-Färbung zur Sichtbarmachung der Zellkerne unterzogen.

Die mikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axioskop-Mikroskop durchgeführt.

2.1.5 Hämatoxylin-Färbung (HE-Färbung)

Für die HE-Färbung wurden 3 Lösungen benötigt:

Lösung 1. Die Hämatoxylin-Lösung nach Ehrlich besteht aus 2 g Hämatoxylin, 100 ml 96 % igem Alkohol, 100 ml *aqua bidest.*, 100 ml Glycerin, 3 g Kalialaun, 0.1 g Natriumjodat und 10 ml Eisessig. Die Lösung muß mindestens 2 Wochen abgedeckt reifen.

Lösung 2. Für die Differenzierung wurde eine HCl-Alkohol-Lösung hergestellt. Sie enthielt 50 ml absoluten Alkohol, 50 ml *aqua bidest.* und 1 ml rauchende (36 %) Salzsäure.

Lösung 3. Für die Plasmafärbung (oder Gegenfärbung) wurde eine 1 %ige wässrige Eosinlösung hergestellt.

Die Urinsuspension wurde mittels Eppendorfpipette auf einen Objektträger überführt und getrocknet. Die Objektträger wurden 12 min in Lösung 1 inkubiert und anschließend mit Leitungswasser abgespült. Für die Differenzierung schloß sich ein Inkubationsschritt in Lösung 2 an, dem ein 5-10minütiger Spülschritt mit Leitungswasser folgte. Danach wurden die Objektträger für etwa 12-15 s in Lösung 3 getaucht, wieder mit Wasser abgespült und getrocknet. Durch diese Färbung wurden die Zellkerne blau gefärbt. Andere Bestandteile färbten sich in verschiedenen Abstufungen rot (Romeis Mikroskopische Technik, 1989).

2.1.6 DNA-Extraktion

Zum Vergleich der DNA-Ausbeute aus Urin wurden zwei unterschiedliche Methoden zur DNA-Extraktion eingesetzt. Dabei handelte es sich um a) die Chelex- und b) die organische Extraktionsmethode mittels Phenol und Chloroform.

2.1.6.1 Chelex-Methode

Chelex (Fa. Biorad) ist ein Harz, das als chelatkomplexbildende Gruppe das Iminodiacetat enthält. Diese Gruppen binden Metallionen und verhindern hierdurch eine Degradierung der DNA. Chelex verändert den pH-Wert des Reaktionsansatzes und führt nach Erhitzen des Ansatzes auf 100 °C zu einer Zerstörung der Zellmembran. (Walsh *et al.*, 1991).

Für die Urin-Extraktion wurden pro Person 4 ml des Urins 10 min bei maximaler Umdrehung (14000 x g) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand entfernt. Das Sediment wurde in 1 ml sterilem *aqua bidest.* aufgenommen, vorsichtig auf einem Vortex-Gerät homogenisiert und für 45 min bei R.T. inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 4 min bei maximaler Umdrehung sedimentiert und der Überstand bis auf 50 µl abgenommen. Der Ansatz wurde mit 150 µl 5 %igen Chelex, 2 Units Proteinase K und 7 µl (1 M) Dithiothreitol-Lösung (DTT) versetzt. Die Ansätze wurden anschließend für 45 min bei 56 °C

in einem Thermomixer (Fa. Eppendorf) lysiert, dann für einige Sekunden homogenisiert und im Wasserbad für 8 min auf 100 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben wieder homogenisiert und zentrifugiert, um das Harz zu sedimentieren. Der Überstand enthielt die DNA.

2.1.6.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die organische Extraktion wird meistens mit den organischen Lösungsmitteln Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol durchgeführt. Phenol und Chloroform führen zu einer Denaturierung von Proteinen, die sich nach einem Zentrifugationsschritt in der Interphase ansammeln. Isoamylalkohol verhindert das Schäumen.

Die Lyse des Urinsediments wurde in einem Puffer (10 mmol Tris-HCl, 100 mmol NaCl, 1 mmol EDTA, pH = 8,0, 2 % SDS, 6 Units Proteinase K, 30 µl (1 M) DTT) durchgeführt.

Pro Person wurden nacheinander 4 ml Urin 10 min bei maximaler Umdrehung (14000 x g) in einer Eppendorf-Tischzentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu dem Sediment wurden 400 µl Lysepuffer gegeben. Der Ansatz wurde kurz homogenisiert und über Nacht bei 56 °C in einem Thermomixer-Gerät (FA. Eppendorf) inkubiert.

Die organische DNA-Extraktion wurde durch aufeinanderfolgendes Ausschütteln der Zellysate mit jeweils den gleichen Volumina an 1. Phenol, 2. Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (Volumenverhältnis 25:24:1) und 3. Chloroform/Isoamylalkohol (Volumenverhältnis 24:1) vorgenommen. Zur Trennung der beiden Phasen wurden die Proben für 3 min mit maximaler Umdrehung (14000 x g) in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert und jeweils die DNA-haltige, wäßrige Phase nach jedem Zentrifugationsschritt in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Zu der DNA-haltigen, wässrigen Phase wurde nach dem letzten Extraktionsschritt ein 1/10 Volumen 4 mol LiCl, 20 µg Glykogen zur quantitativen Ausfällung der DNA und ein einfaches Volumen Isopropanol pipettiert. Die Fällung der DNA wurde durch Lagerung der Proben bei -20 °C für mindestens 1,5 h unterstützt. Nach Zentrifugieren für 25 min bei maximaler Umdrehung wurde der Überstand dekantiert und das DNA-haltige Pellet für 30 min bei 56 °C in einem Thermomixer bei geöffnetem Reaktionsdeckel getrocknet. Danach wurden die Sedimente in 200 µl TE-Puffer (10 mmol Tris-HCl, 1 mmol EDTA, pH = 8,0) aufgenommen. Das Lösen der DNA erfolgte für mindestens 30 min bei 56 °C in dem Thermomixer (Sambrook *et al.*, 1989).

2.1.7 Lagerungsbedingungen

Unter forensischen Aspekten ist es notwendig, die kernhaltigen Zellen vor Lyse und der damit verbundenen Freisetzung der DNA zu schützen. In Gegenwart von zweiwertigen Metallkationen degradieren die ubiquitär vorkommenden Nukleasen die freigesetzte DNA. Durch Zusatz von Chelatbildnern wie EDTA und Natriumcitrat werden die evtl. vorkommenden Metallkationen komplex gebunden und die Wirkung der Nukleasen aufgehoben.

Für die Lagerungsexperimente wurde der Morgenurin der Probanden in ein steriles Becherglas überführt, vorsichtig geschwenkt und auf 9 sterile Falcon-Röhrchen verteilt, von denen drei Gefäße den Chelatbildner Natriumcitrat und drei Gefäße EDTA jeweils in einer Endkonzentration von 40 mM enthielten. Die restlichen Falcon-Röhrchen enthielten nur Urin. Das Urin-Volumen pro Röhrchen betrug jeweils 10 ml. Jeweils ein Röhrchen der unterschiedlichen Ansätze wurde bei R.T., bei +4 °C und bei -20 °C für 14 Tage gelagert. Zur Bestimmung des DNA-Status wurden 2 x 4 ml des frischen Urins pro Person einer DNA-Extraktion unterzogen.

2.2 Quantifizierung und Qualitätsüberprüfung der DNA

Zur Bestimmung der DNA-Menge wurde die Slot-Blot-Methode eingesetzt. Unter den herkömmlichen Quantifizierungsmethoden (Spektralphotometrie, Agaroseminigelelektrophorese und Dot- oder Slot-Blot-Methode) liefert diese den sensitivsten Nachweis. Diese Methode ermöglicht die Quantifizierung bis zu einer Detektionsgrenze von etwa 200 pg DNA (spektralphotometrische Meßung: etwa 100 ng, Agaroseminigel und Ethidiumbromidfärbung: etwa 20 ng, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten). Der Vorteil dieser Methode ist zusätzlich eine Qualitätsüberprüfung hinsichtlich humaner DNA-Sequenzen, auch in Gegenwart von DNA tierischer oder bakterieller Herkunft. Die vorhandene Menge der zu untersuchenden DNA wird anhand eines aufgetragenen DNA-Standards durch direkten Vergleich abgeschätzt. Der Nachteil ist, daß durch einen direkten Vergleich der zu untersuchenden Probe mit dem aufgetragenen Standard nur ein ungefährender Wert ermittelt wird.

2.2.1 Transfer der Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Die in dieser Arbeit verwendete Slot-Blot-Apparatur (Typ: Manifold der Firma Gibco BRL) wurde nach den Herstellerangaben verwendet. Für die Durchführung der DNA-

Quantifizierung wurde das ACES™2.0 Human DNA Quantitation System der Firma Gibco BRL nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

10 µl der DNA-haltigen Lösung wurden mit 100 µl Denaturierungs-Lösung (0,5 M NaCl und 0,5 M NaOH) denaturiert und auf einer ungeladenen Nylonmembran (Nytran N der Firma Schleicher-Schüll) mittels eines angelegten Vakuums immobilisiert. Anschließend wurden die Taschen mit 400 µl Denaturierungs-Lösung ausgespült.

Als Quantifizierungsstandard diente die DNA einer Zelllinie (K562-DNA, Firma Gibco BRL), die in definierten Konzentrationen eingesetzt wurde. Diese aus einer menschlichen Leukämie-Zelllinie stammende DNA wird in der Rechtsmedizin als Kontroll-DNA standardmäßig eingesetzt.

Zur Fixierung der DNA wurde die Membran für 30 min im Trockenschrank bei 80 °C getrocknet.

2.2.2 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Die Prähybridisierung der Nylonmembranen, die der Glättung der Membranoberfläche und der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen dient, wurde bei 50 °C für 20 min in etwa 30 ml Prähybridisierungslösung (0,5 M Natriumphosphat, pH = 7,2, 0,5 % (v/v) Tween 20, 1 % (w/v) Hammerstein Kasein und 0,02 % (w/v) Natriumazid) durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte nach Abgießen der Prähybridisierungslösung durch Zugabe von Hybridisierungslösung, die die menschengespezifische Sonde D17Z1 enthält, bei 50 °C für 20 min (Waye *et al.*, 1989 und 1991). Die Sonde wurde als ein mit alkalischer Phosphatase markiertes Oligonukleotid eingesetzt. Sie ist komplementär zu einer primatenspezifischen α -Satelliten-Sequenz auf dem Chromosom Nr. 17 und ist Bestandteil des Human Quantitation Systems der Firma Gibco BRL (Willard, 1985; Waye *et al.*, 1986).

Die Sondenlösung wurde abgegossen und die Membran im Wasserbad bei 50 °C 2 x 10 min mit je 25 ml Waschpuffer (0,5 Mol Natriumphosphat, pH = 7,2, 5 % (w/v) Tween 20) geschwenkt, um überschüssige und unspezifisch gebundene Sonde abzuwaschen. Danach wurde die Membran 2 x 5 min auf dem Schüttler bei R.T. in 1 x Finalwaschpuffer (0,01 Mol Tris-HCl, pH = 8,6 und 0,15 M NaCl) gewaschen.

Die Membran wurde 5 min in etwa 10 ml Chemilumineszenzfarbstoff Lumi-Phos Plus (Firma Gibco BRL) geschwenkt. Der Farbstoff wurde abgegossen, die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und für 10-30 min in einer Filmkassette mit einem Röntgenfilm (Kodak XAR) bei R.T. inkubiert. Eine Schwärzung des Films erfolgte an den Stellen, an denen die Sonde an die immobilisierten, komplementären Sequenzen gebunden hatte (Walsh *et al.*, 1992). Die Entwicklung des Röntgenfilmes fand in einem Entwicklungsgerät (Typ Kodak, RR-Xomat Processor Model M7B) statt.

2.2.3 Statistische Auswertung der Abweichung von DNA-Mengen nach Applikation im Slot-Blot

Für die Erfassung von Mittelwert, Standardabweichung sowie Variationskoeffizient zur Beurteilung der Reproduzierbarkeit wurden DNA-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen in einem Modellversuch nach dem Slot-Blot-Verfahren auf Membranen appliziert. Die Banden auf dem Röntgenfilm wurden anschließend mit Hilfe eines Densitometers (Fa. Biometra) ausgewertet.

2.3 Amplifikation der einzelnen STR-Regionen

Die DNA, extrahiert aus den unterschiedlich gelagerten Urinproben, wurde mit den Primern für das STR-System HumTH01 sowie dem AmpFLP-System D1S80 typisiert.

Die DNA-Proben der Familie mit den Chimären-Drillingen wurden mit dem STR-System HUMvWFA31 und dem Geschlechtsbestimmungssystem HUMAMELX/Y typisiert.

Bei allen PCR-Zyklen finden 3 Schritte statt: 1. die Denaturierung, bei der die DNA in Einzelstränge gespalten wird, 2. das Annealing (deutsch: Anlagerung), bei dem die Primer an die zu ihnen komplementären Sequenzen der Ziel-DNA binden und 3. die Extension, bei der die Taq-Polymerase das Primer-DNA-Hybridisierungsprodukt verlängert, indem sie entsprechend den komplementären Sequenzen die einzelnen dNTPs einbaut.

Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Personalcyler, Biometra) in 500 µl Eppendorfcaps durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde in einem Reaktionsvolumen von 50 µl standardmäßig durchgeführt. Die Standard-Ansätze sowie Primersequenzen können den aufgeführten Tabellen entnommen werden. Die Taq-Polymerase wurde von der Firma Promega bezogen.

Tab. 1 : Sequenzen der im PCR-Experiment verwendeten Primer

Locus	Primersequenz	Quelle
D1S80, 5'Strang	5'GAAACTGGCCTCCAAACA CTGCCCGCCG3'	Budowle <i>et al.</i> , 1991
D1S80, 3'Strang	5'GTCTTGTTGGAGATGCAC GTGCCCTTGC3'	Budowle <i>et al.</i> , 1991
HUMTH01, 5'Strang	5'GTGGGCTGAAAAGCTCC CGATTAT3'	Edwards <i>et al.</i> , 1992
HUMTH01, 3'Strang	5'ATTCAAAGGGTATCTGGG CTCTGG3'	Edwards <i>et al.</i> , 1992
HUMvWFA31, 5'Strang	5'CCCTAGTGGATGATAAGA ATAATC3'	Kimpton <i>et al.</i> , 1992
HUMvWFA31, 3'Strang	5'GGACAGATGATAAATACA TAGGATGGATGG3'	Kimpton <i>et al.</i> , 1992
HUMAMELX/Y, 5'Strang	5'CCCTGGGCTCTGTAAAG AATAGTG3'	Nakahori <i>et al.</i> , 1991
HUMAMELX/Y, 3'Strang	5'ATCAGAGCTTAACTGGG AAGCTG3'	Nakahori <i>et al.</i> , 1991
ACTBP2, 5'Strang *	5'AATCTGGGCGACAAGAG TGA3'	Möller <i>et al.</i> , 1994
ACTBP2, 3'Strang	5'ACATCTCCCCTACCGCTA TA3'	Möller <i>et al.</i> , 1994
D21S11, 5'Strang *	5'TGTATTAGTCAATGTTCT CCCCAAG3'	Urquhart <i>et al.</i> , 1994
D21S11, 3'Strang	5'TGTATTAGTCAATGTTCT CCAG3'	Urquhart <i>et al.</i> , 1994

*Primer wurden FAM-markiert von der Fa. Perkin Elmer synthetisiert

Tab. 2: PCR-Ansatz für die STR-Region HUMTH01 und das Geschlechtsbestimmungssystem HUMAMELX/Y

Substanz	Endkonzentration im Ansatz
Oligonukleotidprimer	10 pmol
PCR-Puffer	10 x
dNTP-Gemisch	2 mM
Template	2-3 ng DNA
Taq-Polymerase	5 U/µl
BSA (bovine serum albumin)	20 µg
<i>aqua bidest.</i>	ad 50 µl

Tab. 3: PCR-Ansatz für die STR-Region HUMWFA31 und den AmpFLP D1S80

Substanz	Endkonzentration im Ansatz
Oligonukleotidprimer	12.5 pmol
PCR-Puffer	10 x
dNTP-Gemisch	2 mM
Template	2-3 ng DNA
Taq-Polymerase	5 U/μl
BSA (bovine serum albumin)	20 μg
<i>aqua bidest.</i>	ad 50 μl

Tab. 4: Temperaturprofil der PCR für die STR-Region HUMTH01

Vorgang	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94 °C	20 s
Annealing	64 °C	20 s
Extension	70 °C	1 min
Zyklenzahl	30	

Tab. 5: Temperaturprofil der PCR für das Geschlechtsbestimmungssystem HUMAMELX/Y

Vorgang	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	60 °C	1 min
Extension	72 °C	1 min
Zyklenzahl	30	

Tab. 6: Temperaturprofil der PCR für die STR-Region HUMWFA31

Vorgang	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94 °C	45 s
Annealing	50 °C	30 s
Extension	72 °C	30 s
Zyklenzahl	30	

Tab. 7: Temperaturprofil der PCR für den AmpFLP D1S80

Vorgang	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94 °C	1 min
Annealing	65 °C	1 min
Extension	72 °C	1 min
Zyklenzahl	27	

Tab. 8: Temperaturprofil der PCR für das STR-System ACTBP2 und D21S11

Vorgang	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94 °C	45 s
Annealing	60 °C	55 s
Extension	72 °C	45 s
Zyklenzahl	30	

2.3.1 Qualitätskontrolle

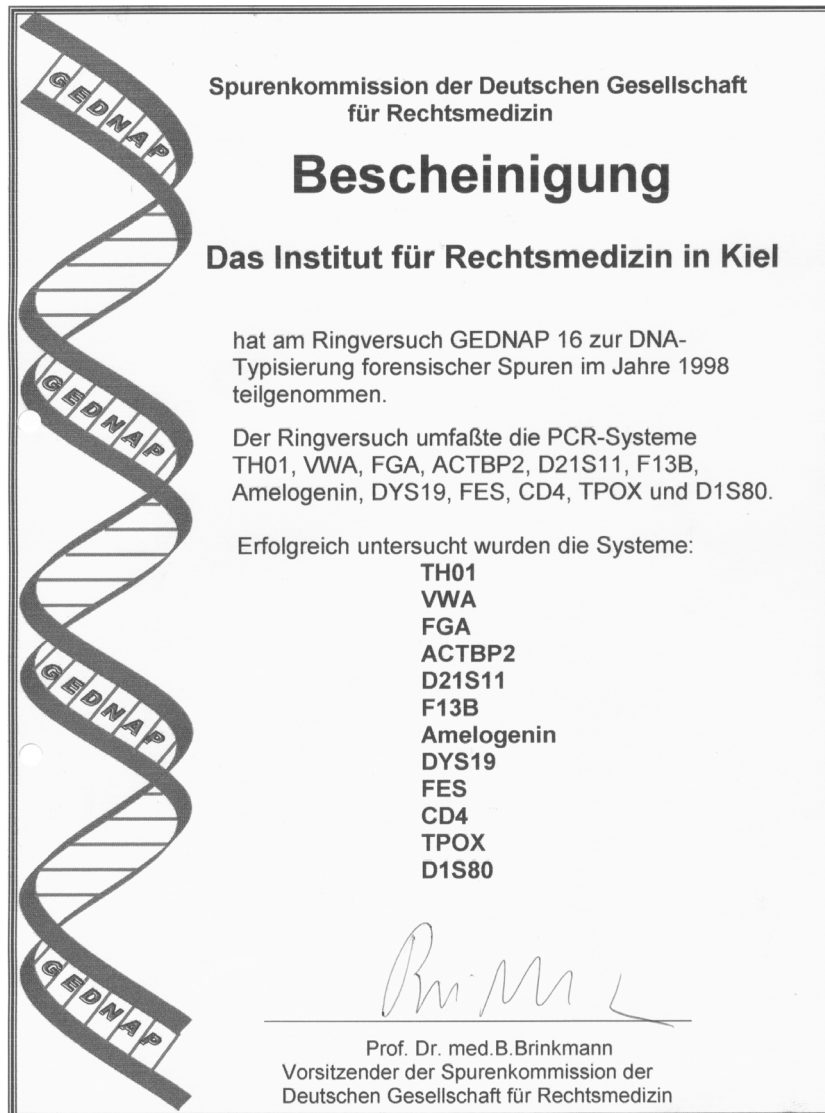
Die Qualitätssicherung erfolgt durch laborinterne und externe Kontrollmaßnahmen.

Die Qualitätskontrollen eines etablierten PCR-Systems erfordert intern die Untersuchung der DNA einer Zelllinie, wie z. B. K562 und einer Person aus dem Labor außerdem die Kennzeichnung der Primer, des Amplifikationsprofils, der systemspezifischen allelischen Leiter und der Elektrophoreseparameter.

Extern muß die gesetzlich vorgeschriebene Qualitätskontrolle durch Teilnahme an jährlich mindestens zwei zeitlich getrennten Spurenringversuchen (GEDNAP = German DNA Profiling Group) erfolgen, die von der Spuren- und Qualitätssicherungskommission der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin durchgeführt wird.

Mit dem Gesetz zur Änderung der Strafprozeßordnung (DNA-Identitätsfeststellungsgesetz) vom 24. Juni 1998 können DNA-Merkmale von Tatverdächtigen in einer vom Bundeskriminalamt Wiesbaden eingerichteten DNA-Analyse-Datei gespeichert werden. Die für diese Datei relevanten PCR-Systeme umfassen HumTH01, HumvWFA31, HumFGA, D21S11 und ACTBP2. Die Spurenuntersuchung können von den rechtsmedizinischen Instituten (oder Landeskriminalämtern oder Laboreinrichtungen) durchgeführt werden, deren erfolgreiche Teilnahme an einem entsprechenden Ringversuch zertifiziert wurde.

Abb. 3: Bescheinigung über die erfolgreiche Teilnahme an einem Spurenringversuch in den aufgeführten PCR-Systemen.



2.4 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

2.4.1 Horizontale Elektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Amplifikate wurde die hochauflösende, horizontale, native Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) mit ultradünnen Gelen eingesetzt (Allen *et al.*, 1989; Haas *et al.*, 1994).

Zur Gelherstellung wurden 2 Glasplatten gleicher Größe (24 cm x 12 cm x 0,5 cm) verwendet. Ihre Reinigung erfolgte mit *aqua bidest* und anschließend mit 95 %igem Ethanol. Dann wurde auf eine Glasplatte eine GelBondPAG-Folie (Firma Biozym), mit der hydrophoben Seite der Glasplatte zugewandt, aufgelegt. Die Geldicke wurde mit 0,4 mm breiten Abstandhaltern bestimmt. Die gereinigte Glasplatte wurde dagegen gelehnt, mit Metallklammern an drei Seiten befestigt und die Gellösung durch eine Öffnung in dem Gummiraahmen luftblasenfrei hineinpipettiert. Anschließend auch diese Seite mit Metallklammern verschlossen.

Die Polymerisation erfolgte für mindestens eine halbe Stunde bei R.T. Für die Elektrophorese des Gels wurden die Metallklammern entfernt, die Glasscheiben auseinandergenommen, der Gummiraahmen entfernt und die Gelbondfolie zusammen mit dem Gel auf die Kühlplatte der Elektrophoresekammer aufgelegt. Die DNA-haltige Lösung wurde in die Taschen eines Applikationsstreifen (Fa. Serva), der 1 cm von der Anode entfernt aufgelegt wurde, hineinpipettiert. Als Laufpuffer diente ein Tris-Borat-Puffer (1 M Tris-HCl, 0,28 M Borsäure, pH = 9,0).

Zur Bestimmung der Allelkonstitution der verschiedenen Personen wurden Allelleitern eingesetzt. Diese bestanden aus den für jeden STR-Locus möglichen Allelkonstellationen. Die Allelbezeichnung erfolgte in Anlehnung an die Empfehlungen der DNA-Kommission der International Society of Forensic Haemogenetics (ISFH). Als Positiv-Kontrolle diente die Zelllinie K562, die im HUMTH01 die Allelkonstellation 9.3/9.3 besitzt, im HUMvWFA31 16/16, im HUMAMELX/Y-System X-X-Merkmale und im AmpFLP-System die Allelkonstellation 18/29.

Die Elektrophorese erfolgte unter folgenden Maximalwerten: 1000 Volt (V), 35 Watt (W) und 15 Milliampere (mA) und dauerte zwischen 2 und 3 h. Die Temperatur während der Elektrophorese betrug 10 °C.

Tab. 9: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese für die Untersuchung der PCR-Systeme

Genort	Acrylamid-Stammlösung 30 %T/0,9 %C	Tris-Formiat-Puffer 0,5 M	CHES 0,28 M	<i>aqua bidest.</i>	APS/TEMED 10 %/100 %ig
HUMTH01	7 ml	4,88 ml	2,96 ml	15 ml	200 µl/11 µl
HUMvWFA31	7 ml	4,88 ml	2,96 ml	15 ml	200 µl/11 µl
HUMAMELX/Y	8 ml	4,88 ml	2,96 ml	14 ml	200 µl/11 µl

Genort	Acrylamid-Stammlösung 30 %T/0,9 %C	Tris-Formiat-Puffer 0,5M	Glycerin 87 %	<i>aqua bidest.</i>	APS/TEMED 10 %/100 %ig
D1S80	5,5 ml	4,88 ml	2,2 ml	17,2 ml	200 µl/11 µl

2.4.2 ABI Prism 377 Sequenzierautomat

Die elektrophoretische Auftrennung der Amplifikate für die STR-Systeme D21S11 und ACTBP erfolgte mit dem ABI PRISM 377 Sequenzierautomaten und denaturierendem Polyacrylamidgel. Die Datenerfassung erfolgt über Fluoreszenzdetektion. Zur Gelherstellung wurden die Glasscheiben mit Bindsilan (einer Lösung aus 40 ml absoluten Ethanol, 10 ml 10% iger Essigsäure und 1,3 ml Bindsilan) silanisiert. Die untere Scheibe wurde dann in das Gestell eingelegt, die Abstandshalter eingebracht und die obere Glasscheibe paßgenau eingeführt. Die Gellösung wurde luftblasenfrei einpipettiert und der Probenkamm eingedrückt. Nach der Auspolymerisation (2 h) wurde der Kamm entfernt und das Gestell in den Sequenzierautomaten eingesetzt. Dann folgte der "plate-check", bei dem der Laser den Lesebereich überprüft. In die obere und untere Pufferkammer wurde 1 x TBE-Puffer (10 x Stammlösung: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA, ad 1 l) eingefüllt und die Heizplatte angelegt, sowie die Kathoden und Anoden. Es folgte der Vorlauf bei 51 °C. Der Vorlaufpuffer (Bestandteil des Genescan-500 TAMRA-Kits der Fa. Perkin Elmer) wurde an der oberen Gelkante aufgetragen. Durch den darin enthaltenen Farbstoff (Blau-Dextran) werden die Geltaschen blau gerahmt und dadurch sichtbar gemacht.

Die PCR-Produkte wurden wie folgt behandelt: 1,5 µl Amplifikat wurden mit 2,5 µl Formamid, 0,5 µl Ladepuffer und 0,5 µl interner Standard gemischt und für 4 m bei 96 °C im Thermo-Cykler denaturiert. Jeweils 2,3 µl des Ansatzes wurden dann in die Taschen appliziert.

Tab. 10: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese für die Untersuchung der PCR-Systeme

Genort	Amberlite	Acrylamid-Stammlösung 40 % T/1 %C	TBE-Puffer(10x)	Harnstoff	<i>aqua bidest.</i>	APS/TEMED 10%/100%ig
ACTBP2	Spatel-Spitze	5 ml	5 ml	18 g	28 ml	250 µl/35 µl
D21S11	Spatel-spitze	5 ml	5 ml	18 g	28 ml	250 µl/35µl

2.4.3 Detektion der DNA-Fragmente

2.4.3.1 Horizontale Elektrophorese

Die Detektion der Fragmente erfolgte durch Silberfärbung. Die Gele wurden für 10 min in einer 1 %igen HNO₃-Lösung fixiert, mit *aqua bidest.* abgespült und für 20 min in einer 0,2 %igen Silbernitratlösung inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in *aqua bidest.* wurden die Gele in 0,28 M Na₂CO₃ mit Formaldehyd (1 ml einer 37 %igen Formaldehydlösung pro 500 ml Na₂CO₃-Lösung) entwickelt, bis die Fragmente sichtbar wurden. Das Abstoppen der Entwicklung der Gele erfolgte für 5 min mit 10 %igem Eisessig. Anschließend wurden die Gele für 5 min in 1 %igem Glycerol fixiert. Das Trocknen der Gele fand über Nacht statt (Bassam *et al.*,1991).

2.4.3.2 ABI PRISM 377 Sequenzierautomat

Nach etwa 1,5 -2 h konnten die Fragmente computergestützt ausgewertet werden.

Das fluoreszierende Licht der FAM-markierten DNA-Fragmente wurde dafür vom Argon Laser verstärkt, über mehrere Linsen gesammelt und im Spektrographen fokussiert. Nach spektrographischer Aufspaltung des Lichtes wurde dieses über eine CCD-Kamera (charge coupled device) im Sequenzierautomaten erfaßt. Die Rohdaten wurden zum angeschlossenen Computer (Power Macintosh 7200/90) transferiert und dort mit der GENESCAN-Software: 377 Collection, Version 1.1, Gene Scan Analysis 2.02 von Perkin Elmer bearbeitet.

2.5 Datenanalyse

In einer Bevölkerung mit einem gleichbleibenden Genbestand findet eine ständige Rekombination der Gene statt, aber normalerweise keine Veränderung der Genfrequenz. Wenn zudem die Genotypen in einem ganz bestimmten Verhältnis zueinander stehen, das sich aus den Genfrequenzen ergibt, spricht man von einem stabilen populationsgenetischen Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht wird durch das Hardy-Weinberg-Gesetz beschrieben. Bei bekannter Häufigkeit der Homo- und Heterozygoten einer Stichprobe kann man das HWG zur Abschätzung, ob sich die Stichprobe bezüglich des betreffenden Merkmals im populationsgenetischen Gleichgewicht befindet, einsetzen (Buselmaier *et al.*, 1999; Knußmann, 1996).

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht gilt unter folgenden Voraussetzungen:

1. jedes Individuum in einer Population hat die gleiche Chance, sich mit jedem Individuum des anderen Geschlechts mit gleicher Fruchtbarkeit zu paaren
2. es dürfen keine Mutationen erfolgen;
3. Genimport oder -export darf nicht stattfinden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob die Annahmen des Hardy-Weinberg-Gesetz bei den verwendeten Stichproben erfüllt sind. Dies geschah unter Anwendung des χ^2 -Tests (Futuyma, 1990, Wricke, 1972, Weir, 1992).

Für die Beurteilung der Versuchsergebnisse wurden außerdem die Hetero- und Homozygotenrate sowie der Diskriminationsindex (DI) und die Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (P_m) berechnet. Der Diskriminationsindex bezeichnet die Wahrscheinlichkeit, daß zwei zufällig ausgewählte, nicht verwandte Personen verschiedene Genotypen aufweisen.

Die Übereinstimmungswahrscheinlichkeit hingegen gibt an, wie hoch die Wahrscheinlichkeit für zwei zufällig ausgewählte Individuen ist, die gleiche Allelkonstellation für einen Locus zu besitzen. Der Wert variiert zwischen 0 und 1. Je kleiner der Wert ist, desto geringer die Wahrscheinlichkeit. Beträgt der Wert z. B. 0,1, so bedeutet dies, daß diese Allelkonstellation statistisch bei einer von 10 nicht verwandten Personen anzutreffen ist.

Die für die Berechnung notwendigen Formeln sind im Anhang unter 7.8 aufgeführt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die statistische Auswertung computergestützt durch das Institut für Medizinische Statistik in Bonn sowie das Institut für Rechtsmedizin der Universität Eppendorf, Hamburg mit Hilfe des Computerprogramms HWEANA17 (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht-Analyse).

3. Ergebnisse

3.1 Urinuntersuchungen

3.1.1 pH-Werte der Probanden

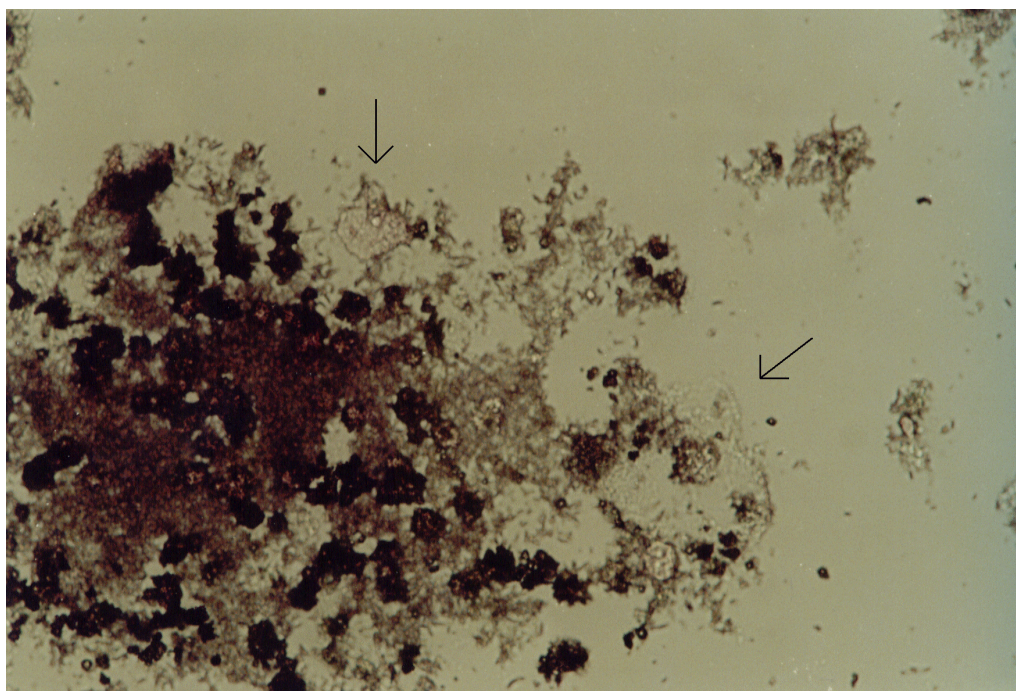
Der pH-Wert im Urin verändert sich mit zunehmender Lagerungsdauer und fördert die Zellyse. Deshalb wurde von jeder frischen Urinprobe der pH-Wert gemessen. Der pH-Wert gesunder Individuen ist leicht sauer bis neutral in Abhängigkeit von den Ernährungsgewohnheiten. Die in dieser Arbeit ermittelten Werte liegen in dem Normbereich gesunder Erwachsener zwischen $\text{pH} = 5$ und $\text{pH} = 7$.

3.1.2 Zelluläre Zusammensetzung des Urins

Im Rahmen der Lagerungsexperimente wurden 450 Urinproben sedimentiert, auf Objektträger überführt und gefärbt. Die mikroskopische Auszählung ergab einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Verteilung kernhaltiger Zellen. Das Harnsediment weiblicher Individuen wies höhere Anteile an exfoliierten Epithelzellen verschiedener Morphotypen (rundliche, birnenförmige und geschwänzte) auf, die aus unterschiedlichen Bereichen der ableitenden Harnwege stammten. Außerdem wurden großflächige Epithelzellen, Leukozyten und Zylinder (zusammengepreßte Epithelzellen in einer Matrix aus Protein) gesichtet. Der Anteil an Epithelzellen überwog alle anderen Zelltypen. Als nichtzelluläre Bestandteile wurden Calciumoxalat und Urate beobachtet.

Die bei R.T. gelagerten, gefärbten Proben ohne Zusatz enthielten flockiges Sediment, Schleimfäden, Streptokokken und Hyphen (Abb. 4). Neben degradierten konnten auch noch intakte Epithelzellen beobachtet werden. Dagegen waren die mit EDTA versetzten Urinproben sedimentarm und ohne mikrobiellen Bewuchs (Abb.5). Bei 2 männlichen Probanden konnten Spermien z. T. in nicht auszählbarer Anzahl nachgewiesen werden (Abb. 6). Die mit Natriumcitrat versetzten Proben wiesen ebenfalls eine starke Sedimentbildung auf.

Die bei $+4\text{ °C}$ und ohne Zusatz gelagerten Urinproben waren nach 14 Tagen makroskopisch klar. Auch mikroskopisch wurden keine Bakterien beobachtet, da mikrobielles Wachstum bei $+4\text{ °C}$ mit nur geringen Teilungsraten stattfindet.



Pfeile zeigen auf intakte Epithelzellen

Abb. 4: Mikroskopische Aufnahme (10 x Vergrößerung, 10 x Okular, Zeiss Axioskop-Mikroskop) der Urinprobe von Proband 16, gelagert für 14 Tage bei Raumtemperatur ohne Zusatz, nach HE-Färbung.

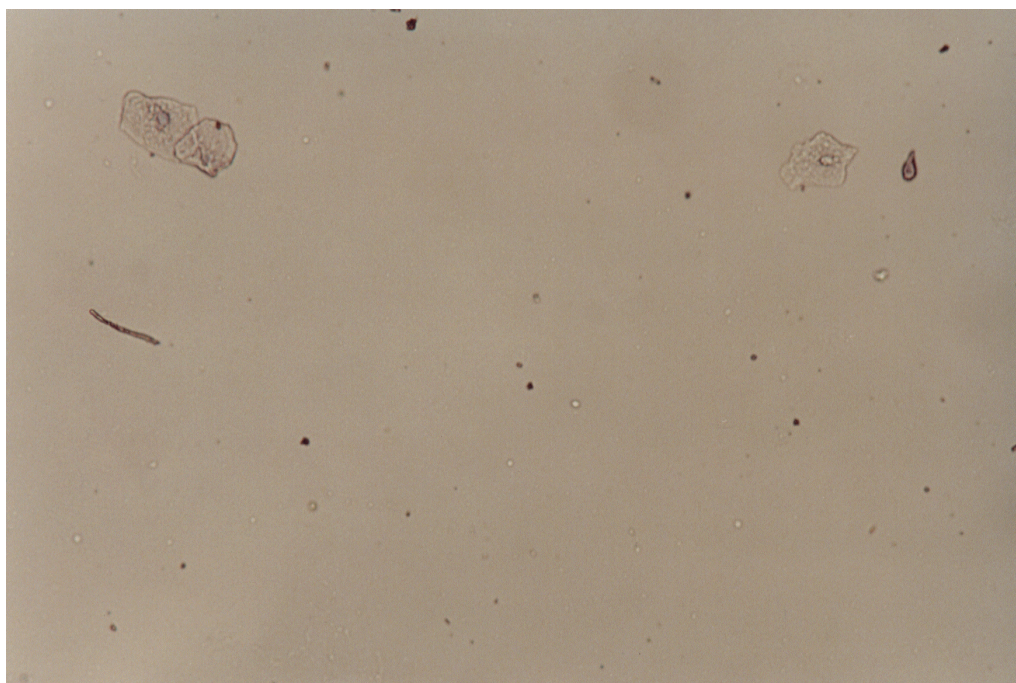


Abb. 5: Mikroskopische Aufnahme (10 x Vergrößerung, 10 x Okular, Zeiss Axioskop-Mikroskop) der Urinprobe von Proband 16, gelagert für 14 Tage mit Zusatz von EDTA nach HE-Färbung. Bei den Zellen handelt es sich um Epithelzellen.

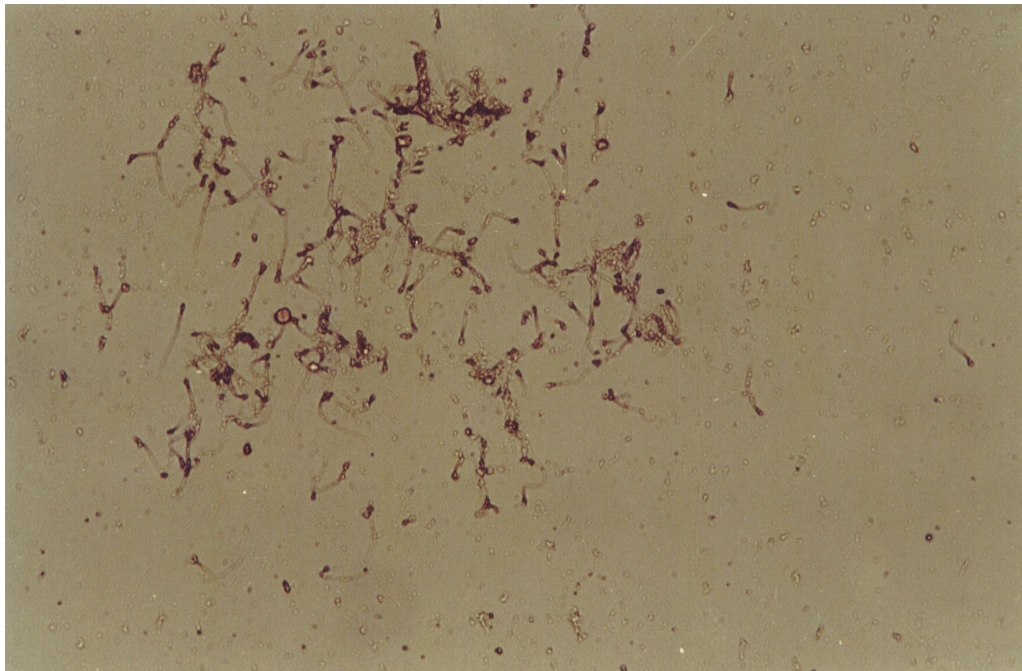


Abb. 6: Mikroskopische Aufnahme (20 x Vergrößerung, 10 x Okular mit dem Zeiss Axioskop-Mikroskop) der frischen Urinprobe von Proband 32, nach HE-Färbung. Gut sichtbar sind Spermien.

3.1.3 Zellzahlen der frischen Urinproben

Bei der Auszählung der Zellzahlen wurden Leukozyten und Epithelzellen berücksichtigt. Durchschnittlich konnten 5280 Zellen/ml Urin bei weiblichen Probanden und 238 Zellen/ml Urin bei männlichen Probanden ermittelt werden. Bei 12 männlichen Individuen waren die Urinproben nicht auswertbar, d.h. es konnte weniger als 1 Zelle/ μ l Urin gezählt werden.

3.2 Mengenbestimmung von DNA aus Urin

Für die Ermittlung der extrahierten DNA-Menge wurde die DNA von 25 männlichen und 25 weiblichen freiwilligen Probanden aus Urin (frisch und gelagert) isoliert und mittels Slot-Blot und einer humanspezifischen Sonde quantifiziert (Abb. 7 und 8).

Die DNA-Menge der zu untersuchenden Probe wurde im direkten Vergleich mit einem aufgetragenen Standard ermittelt.

Abb. 7: Slot-Blot zur Quantifizierung der Gesamt-DNA-Mengen der Personen 7, 9, 16 und 42 aus jeweils 0,2 ml Urin in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Probennahme und der DNA-Extraktionsmethode.

Auftragsschema des unten dargestellten Slot-Blot mit entsprechenden Erklärungen

	1 Standard	2	3	4
A	0 ng	Morgenurin, Proband 7	Mittagsurin, Proband 7	Abendurin, Proband 7
B	0,2 ng	Morgenurin, Proband 7	Mittagsurin, Proband 7	Abendurin, Proband 7
C	1,0 ng	Morgenurin, Proband 9	Mittagsurin, Proband 9	Abendurin, Proband 9
D	2,0 ng	Morgenurin, Proband 9	Mittagsurin, Proband 9	Abendurin, Proband 9
E	4,0 ng	Morgenurin, Proband 16	Mittagsurin, Proband 16	Abendurin, Proband 16
F	10 ng	Morgenurin, Proband 16	Mittagsurin, Proband 16	Abendurin, Proband 16
G	20 ng	Morgenurin, Proband 42	Mittagsurin, Proband 42	Abendurin, Proband 42
H	30 ng	Morgenurin, Proband 42	Mittagsurin, Proband 42	Abendurin, Proband 42

■ = Chelex-Extraktion □ = Phenol-Extraktion

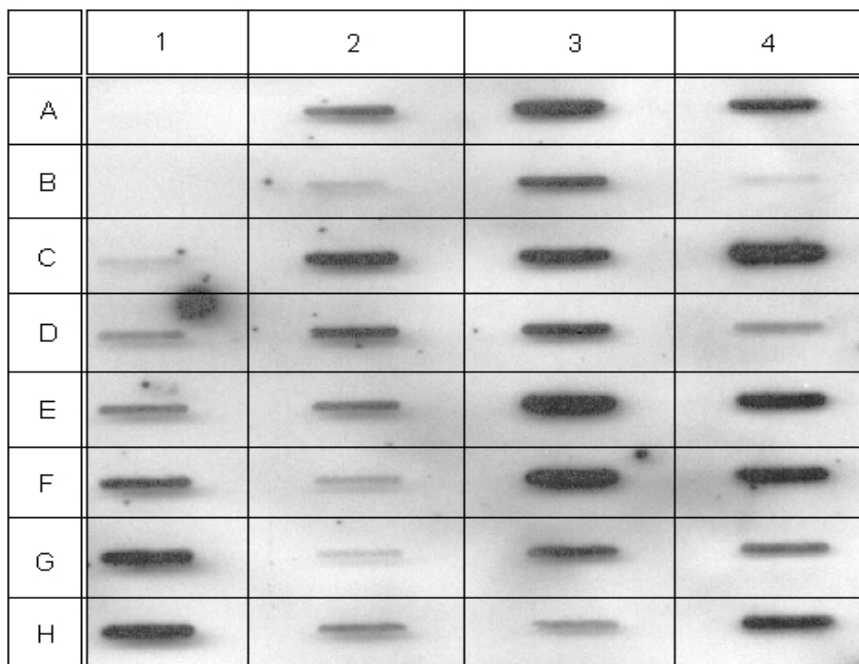
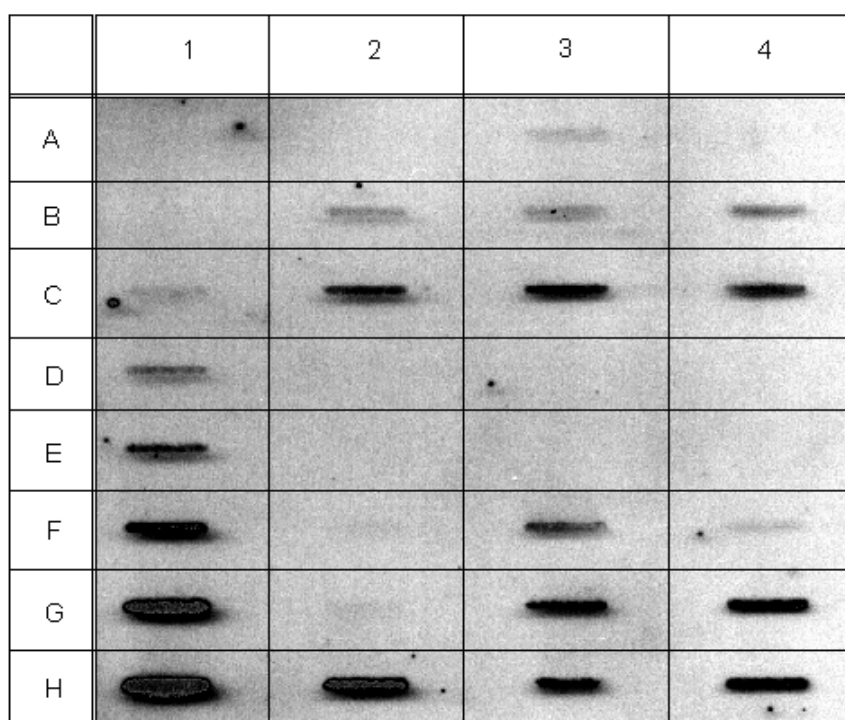


Abb. 8: Slot-Blot zur Quantifizierung der Gesamt-DNA-Mengen aus jeweils 0,2 ml Urin der Personen 11 und 16 nach 14 Tagen Lagerungszeit, mit und ohne Zusatz von Natriumcitrat (40 mmol Endkonzentration) und EDTA (40 mmol Endkonzentration).

Auftragsschema des unten dargestellten Slot-Blot mit Erklärung

	1	2	3	4
	Standard			
A	0 ng	11, o.Zusatz	11, o.Zusatz	11, o. Zusatz
B	0,2 ng	11, Citrat	11, Citrat	11, Citrat
C	1,0 ng	11, EDTA	11, EDTA	11, EDTA
D	2,0 ng	leer	leer	leer
E	4,0 ng	leer	leer	leer
F	10 ng	16, o.Zusatz	16, o.Zusatz	16, o.Zusatz
G	20 ng	16, Citrat	16, Citrat	16, Citrat
H	40 ng	16, EDTA	16, EDTA	16, EDTA

= R.T.
 = +4° C
 = - 20° C



In der weiblichen Gruppe betrug die höchste extrahierte DNA-Menge 100 ng/ml Morgenurin, in der männlichen Gruppe hingegen 50 ng/ml Urin. Von 25 untersuchten männlichen Probanden konnte bei 5 Personen keine DNA nachgewiesen werden, d. h. die DNA-Menge lag unterhalb von 20 ng/ml aufgetragener DNA-Probe. Dies wurde bei keinem weiblichen Individuum beobachtet.

3.2.1 Einfluß der Extraktionsmethode

Die DNA der Probanden wurde mit zwei verschiedenen Extraktionsmethoden (Chelex-Methode und Phenol/Chloroform-Methode) isoliert. Im Vergleich zeigt sich, daß in der Regel eine höhere DNA-Ausbeute mit der Chelex-Methode erzielt wurde.

3.2.2 Einfluß des Tagesverlaufs

Der Vergleich von männlichen und weiblichen Probanden zeigt, daß die DNA-Ausbeute im weiblichen Kollektiv zu allen Tageszeitpunkten höher war als im männlichen. Die größte Differenz ergab sich bei der Mittagsanalyse, bei der die Ausbeute hier mit beiden Extraktionsmethoden etwa fünfmal so hoch war wie bei den männlichen Probanden. Zu den anderen Tageszeitpunkten war die DNA-Ausbeute in der weiblichen Kontrollgruppe etwa 2 bis 3 x höher (Abb. 9 und 10).

Die DNA-Ausbeute bei den weiblichen Individuen war im Tagesverlauf mittags mit einem Mittelwert von 55 ng/ml Urin (Chelex) am höchsten. Bei den männlichen Personen wurde abends der höchste Wert ermittelt: 15,8 ng/ml Urin (Chelex). Die niedrigste DNA-Ausbeute wurde bei den weiblichen und männlichen Probanden morgens mit 30 ng/ml bzw. 5,8 ng/ml Urin (Chelex) beobachtet.

Die DNA-Ausbeute mit der Phenolmethode war im weiblichen Kollektiv mittags am höchsten (31 ng/ml) und abends am niedrigsten (15 ng/ml). In der männlichen Gruppe wurde abends die höchste DNA-Ausbeute (8,2 ng/ml) erzielt und mittags die niedrigste (5,4 ng/ml).

Unter Berücksichtigung der beiden Proben, die Spermien in hoher Konzentration enthielten, wurde in der Gruppe männlicher Probanden morgens der höchste Durchschnittswert (16 ng/ml, Chelex) und mittags der niedrigste Wert ermittelt (11 ng/ml, Chelex).

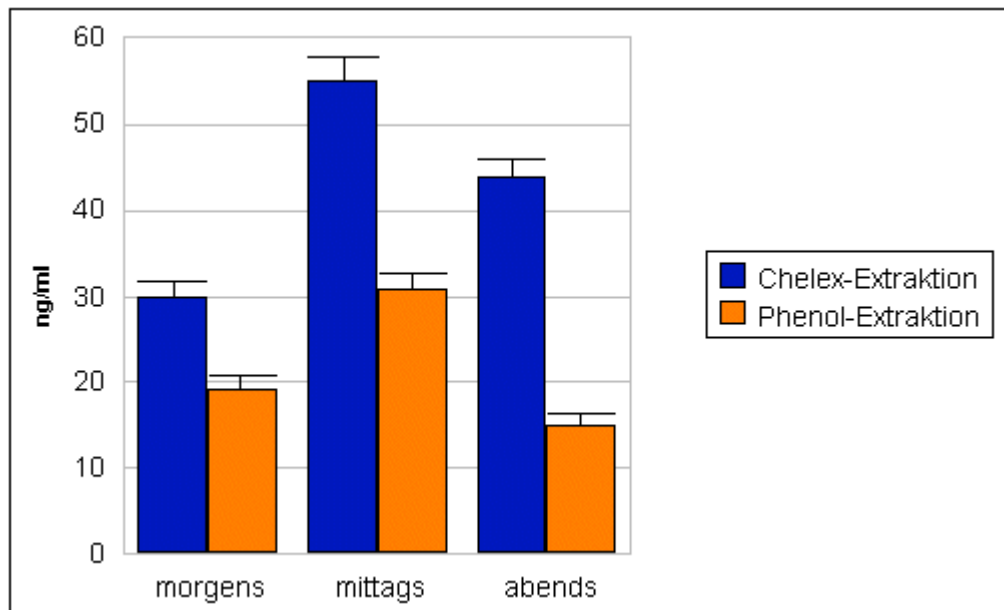


Abb. 9: Durchschnittliche DNA-Menge aus 1 ml Urin weiblicher Probanden in Abhängigkeit von der Tageszeit der Urinabgabe und den verschiedenen Extraktionsmethoden.

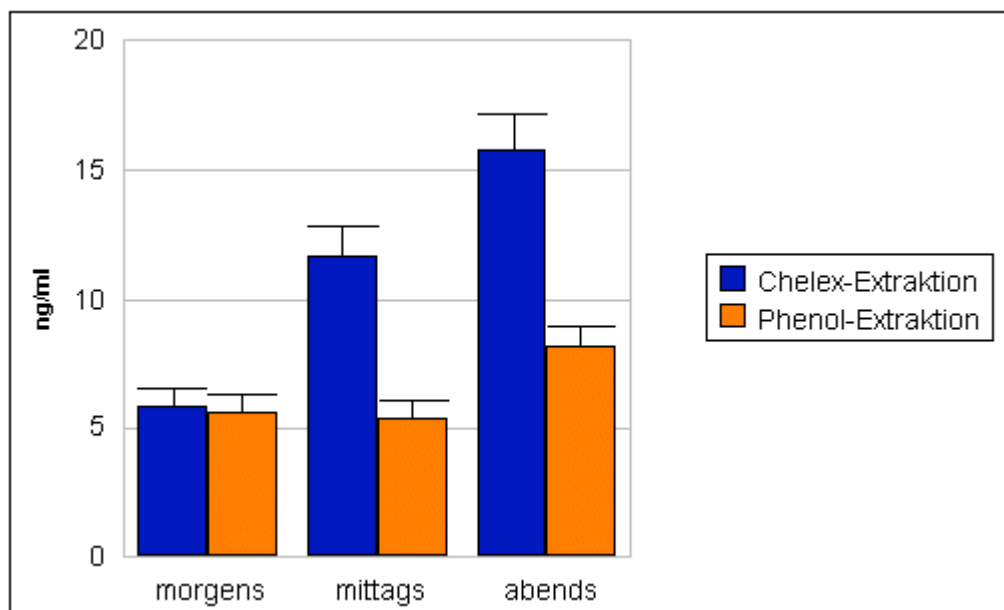


Abb. 10: Durchschnittliche DNA-Menge aus 1 ml Urin männlicher Probanden in Abhängigkeit von dem Tageszeitpunkt der Urinabgabe und den verschiedenen Extraktionsmethoden.

3.2.3 Einfluß der Lagerungstemperatur und Chelatbildner

Die Auswirkung von Chelatbildnern wie EDTA und Natriumcitrat auf den DNA-Gehalt im gelagerten Urin wurde in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Als Kontrolle diente die extrahierte DNA-Menge aus frischem Morgenurin.

Lagerung bei R.T.:

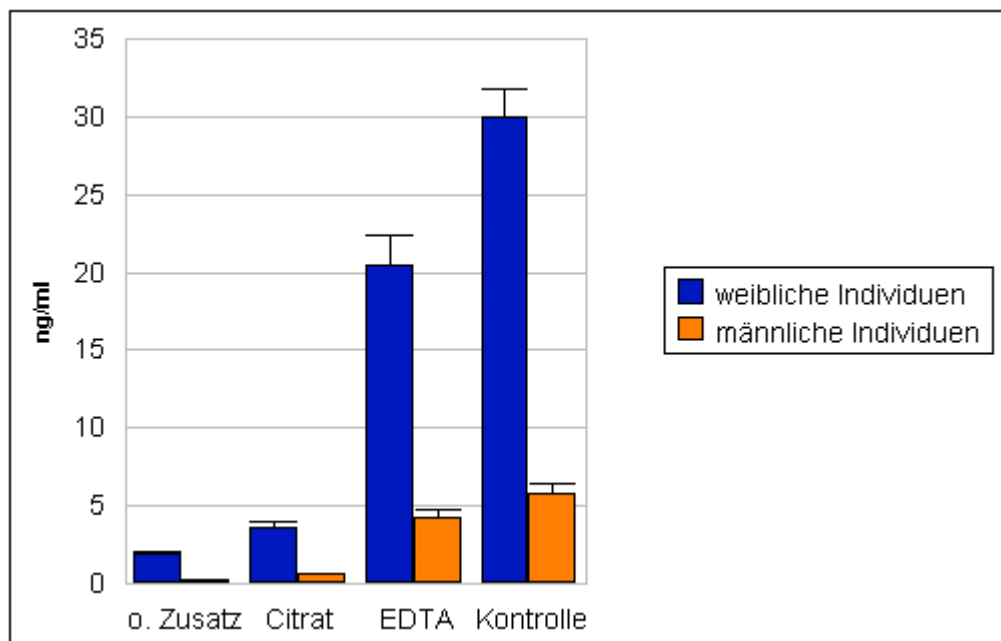


Abb. 11: Durchschnittliche DNA-Ausbeute mit der Chelex-Methode aus 1 ml Urin nach 14-tägiger Lagerung bei Raumtemperatur, mit und ohne Zusatz von Natriumcitrat (40 mmol Endkonzentration) bzw. EDTA (40 mmol Endkonzentration). Kontrolle: DNA-Menge aus dem gleichen Volumen frischen Urins. Im Vergleich zum frischen Urin sank die nachweisbare durchschnittliche DNA-Menge (mit Chelex extrahiert) nach 14-tägiger Lagerungszeit. Aus Urin ohne Zusatz wurden in der weiblichen Gruppe 6,7 % bzw. 5 % in der männlichen Gruppe, mit Natriumcitrat 12 % bzw. 12 % und mit EDTA 69 % bzw. 74 % der ursprünglichen DNA-Menge festgestellt.

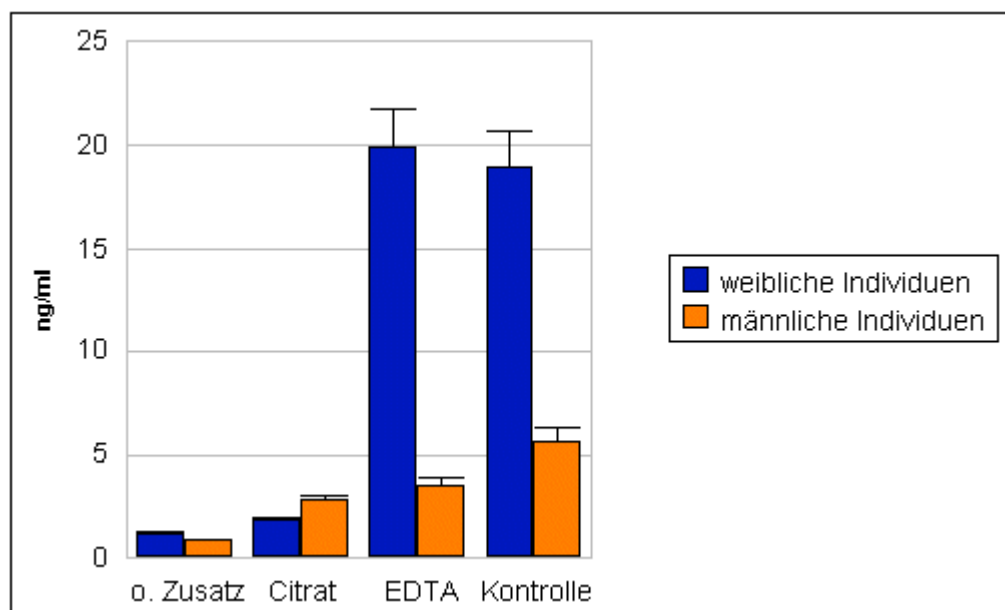


Abb. 12: Durchschnittliche DNA-Ausbeute mit der Phenol-Methode aus 1 ml Urin nach 14-tägiger Lagerung bei Raumtemperatur, mit und ohne Zusatz von Natriumcitrat (40 mmol Endkonzentration) bzw. EDTA (40 mmol Endkonzentration). Kontrolle: DNA-Menge aus dem gleichen Volumen frischen Urins.

Lagerung bei +4°C:

Die ermittelte durchschnittliche DNA-Menge (mit der Chelex-Methode extrahiert) aus Urin ohne Zusatz sank in der weiblichen Gruppe auf 33 % bzw. 26 % in der männlichen Gruppe, mit Natriumcitrat auf 64 % bzw. überstieg die DNA-Menge der Kontrolle um 15 %. Mit EDTA-Zugabe wurde im weiblichen Kollektiv 73 % der ursprünglichen Menge nachgewiesen, während bei den Männern um 28 % mehr DNA nachgewiesen wurde als in der Kontrolle.

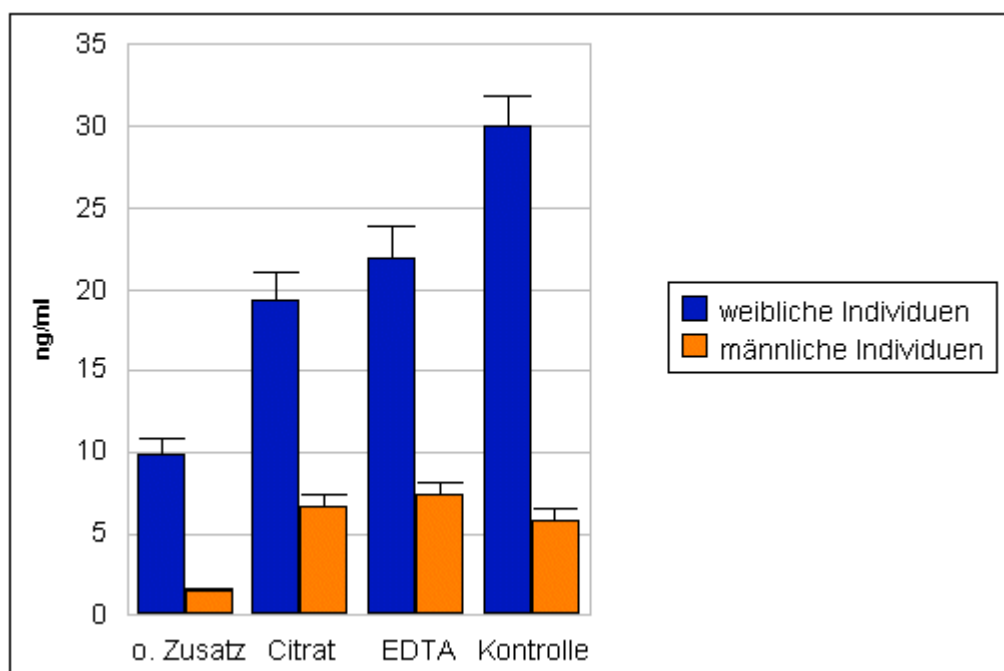


Abb. 13: Durchschnittliche DNA-Ausbeute mit der Chelex-Methode aus 1 ml Urin nach 14-tägiger Lagerung bei +4 °C, mit und ohne Zusatz von Natriumcitrat (40 mmol Endkonzentration) bzw. EDTA (40 mmol Endkonzentration). Kontrolle: DNA-Menge aus dem gleichen Volumen frischen Urins.

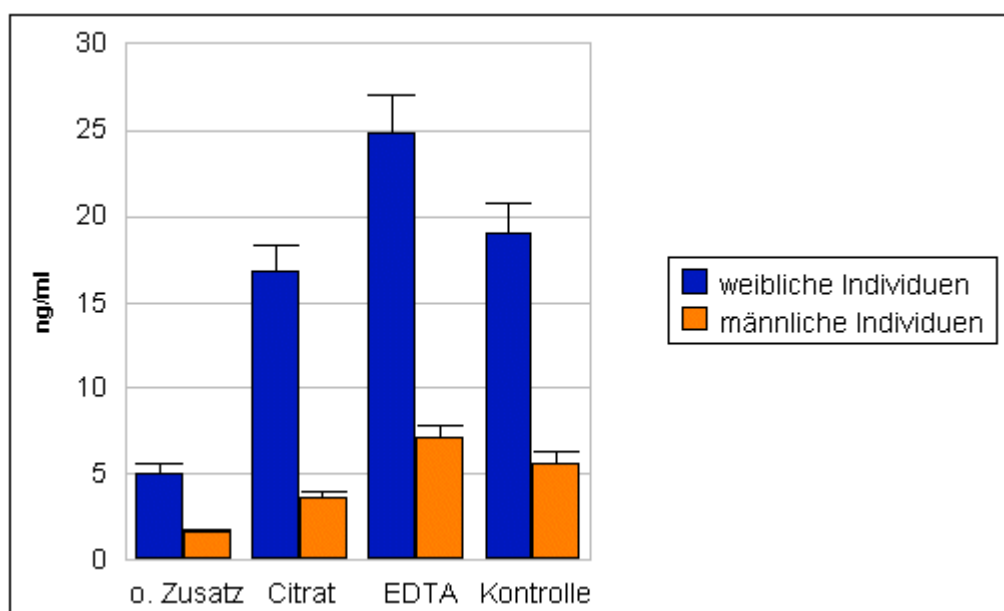


Abb. 14: Durchschnittliche DNA-Ausbeute mit der Phenol-Methode aus 1 ml Urin nach 14-tägiger Lagerung bei +4 °C, mit und ohne Zusatz von Natriumcitrat (40 mmol Endkonzentration) bzw. EDTA (40 mmol Endkonzentration). Kontrolle: DNA-Menge aus dem gleichen Volumen frischen Urins.

Lagerung bei -20°C:

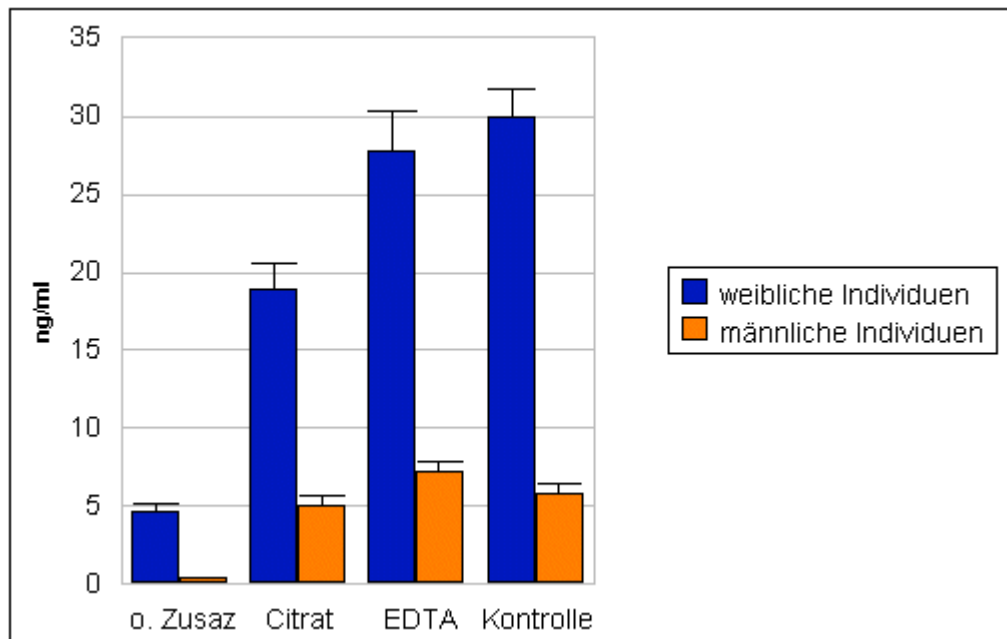


Abb. 15: Durchschnittliche DNA-Ausbeute mit der Chelex-Methode aus 1 ml Urin nach 14-tägiger Lagerung bei -20°C, mit und ohne Zusatz von Natriumcitrat (40 mmol Endkonzentration) bzw. EDTA (40 mmol Endkonzentration). Kontrolle: DNA-Menge aus dem gleichen Volumen frischen Urins. Die ermittelte durchschnittliche DNA-Menge (mit der Chelex-Methode extrahiert) aus Urin ohne Zusatz lag in der weiblichen Gruppe bei 16% bzw. 8,6 % in der männlichen Gruppe, mit Natriumcitrat bei 63% bzw. 88 % und mit EDTA bei 92 % der ursprünglichen Menge bzw. überstieg in der männlichen Gruppe die DNA-Menge der Kontrolle um 25 %.

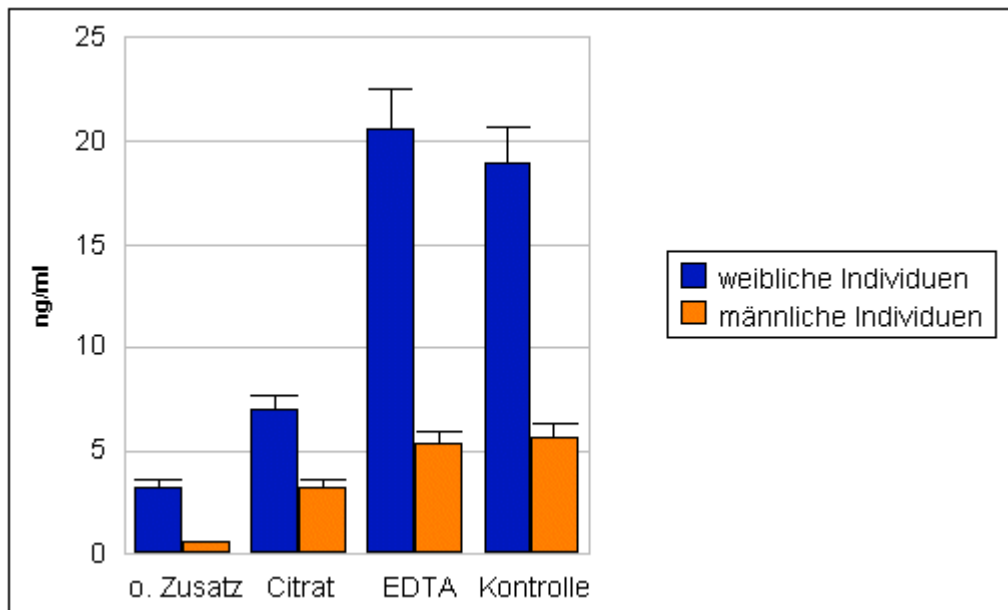


Abb. 16: Durchschnittliche DNA-Ausbeute mit der Phenol-Methode nach 14-tägiger Lagerung bei -20°C , mit und ohne Zusatz von Natriumcitrat (40 mmol Endkonzentration) bzw. EDTA (40 mmol Endkonzentration). Kontrolle: DNA-Menge aus gleichem Volumen frischen Urins.

3.3 Typisierbarkeit der DNA aus gelagerten Urinproben

Die Amplifizierbarkeit der isolierten DNA-Proben wurde mittels PCR-Reaktion mit den Primern für das STR-System HUMTH01 und für den AmpFLP D1S80 überprüft. Die Abbildungen 17 und 18 zeigen eine Auswahl von Amplifikaten nach Auftrennung in einem nativen Polyacrylamidgel mit anschließender Silberfärbung. Eingesetzt wurde mit der Chelex-Methode isolierte DNA. Zusammengefaßt sind die Ergebnisse in der Tab. 11. Pro System wurden 450 Einzelproben untersucht. Die Tabelle verdeutlicht, daß mit abnehmender Temperatur bei Einsatz von Chelatbildnern die Quote erfolgreicher Amplifikationen zunimmt. Im Vergleich beider Geschlechter konnten mit den beiden Systemen im weiblichen Kollektiv etwa doppelt so viele Proben erfolgreich typisiert werden wie im männlichen.

Die Tabelle zeigt außerdem, daß im Vergleich beider Systeme mit HUMTH01 deutlich mehr Proben amplifiziert werden konnten als mit D1S80.

Tab. 11: DNA-Typisierung mit den Systemen HUMTH01 und D1S80 in Abhängigkeit der verschiedenen Lagerungsbedingungen.

a) weibliche Gruppe

	Anzahl der zu untersuchenden Proben, N = 25					
	Anzahl der nicht nachweisbar war (<0.2 ng)	Proben, in denen DNA		Untersuchung der gesamten Proben		
		davon typisierbar mit TH01	davon typisierbar mit D1S80	davon typisierbar mit TH01	davon typisierbar mit D1S80	typisierbar mit TH01 und D1S80
R.T., o. Zusatz	17 (68 %)	5 (29 %)	2 (12 %)	8 (32 %)	3 * (13 %)	2 (8 %)
R.T., Citrat	11 (44 %)	4 (36 %)	2 (18 %)	9 (36 %)	5 (20 %)	2 (8 %)
R.T., EDTA	3 (12 %)	1 (33 %)	-	17 (68 %)	8 (33 %)	8 (32 %)
+4 °C, o. Zusatz	7 (28 %)	5 (71 %)	2 (29 %)	15 (60 %)	10 (42 %)	7 (28 %)
+4 °C, Citrat	4 (16%)	1 (25 %)	1 (25 %)	14 (56 %)	9 *,** (38 %)	8 (32 %)
+4 °C, EDTA	2 (8 %)	1 (50 %)	1 (50 %)	20 (80 %)	15 (63 %)	14 (56 %)
-20 °C, o. Zusatz	12 (48 %)	4 (33 %)	4 (33 %)	10 (40 %)	7 (29 %)	5 (20 %)
-20 °C, Citrat	4 (16 %)	2 (50 %)	1 (25 %)	16 (64 %)	15 ** (63 %)	13 (52 %)
-20 °C, EDTA	-	-	-	21 (84 %)	13 (54 %)	12 (48 %)

* =Allel-drop-out beobachtet

** =Zusatzbande detektiert

- = keine erfolgreiche Amplifikation

b) männliche Gruppe

	Anzahl der zu untersuchenden Proben, N = 25					
	Anzahl der nicht nachweisbar war (<0.2 ng)	Proben, in denen DNA		Untersuchung der gesamten Proben		
		davon typisierbar mit TH01	davon typisierbar mit D1S80	davon typisierbar mit TH01	davon typisierbar mit D1S80	typisierbar mit TH01 und D1S80
R.T., o. Zusatz	22 (88 %)	1 (5 %)	-	2 (8%)	-	-
R.T., Citrat	20 (80 %)	-	-	-	2 * (8%)	-
R.T., EDTA	12 (48 %)	1 (8 %)	3 (25 %)	5 (20%)	6 25%)	2 (8 %)
+4 °C, o. Zusatz	18 (72 %)	4 (22 %)	2 (11 %)	8 (32%)	4 (17%)	1 (4 %)
+4 °C, Citrat	11 (44 %)	2 (18 %)	3 (27 %)	6 (24%)	4 (17%)	3 (12 %)
+4 °C, EDTA	10 (40 %)	3 (30 %)	1 (10 %)	8 (32%)	6 (25%)	3 (12 %)
-20 °C, o. Zusatz	18 (72 %)	1 (6 %)	-	6 (24%)	3 (13%)	1 (4 %)
-20 °C, Citrat	11 (44 %)	-	-	6 (24%)	3 (13%)	1 (4 %)
-20 °C, EDTA	7 (28 %)	-	2 (29 %)	12 (48%)	10 (42%)	6 (24 %)

* = Allel-drop-out beobachtet

- = keine erfolgreiche Amplifikation

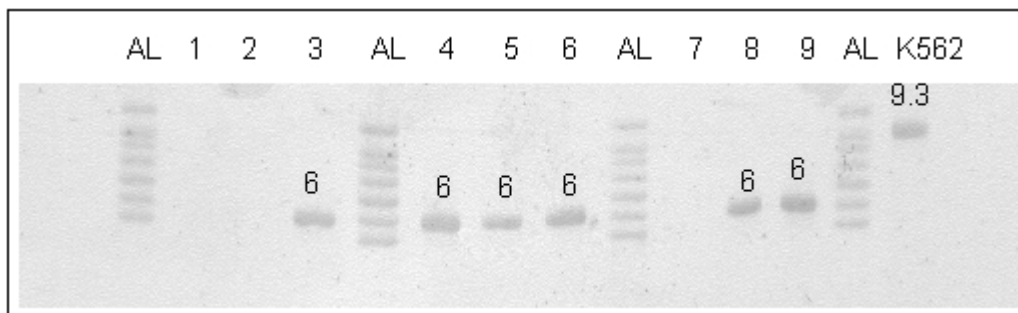


Abb. 17: Ausschnitt eines PAGE-Gels von DNA-Amplifikaten der STR-Region **HUMTH01** der Person Nr. 16 in Abhängigkeit von verschiedenen Lagerungsbedingungen. Bahn 1: R.T. ohne Zusatz, Bahn 2: R.T. mit Citrat, Bahn 3: R.T. mit EDTA, Bahn 4: + 4 °C ohne Zusatz, Bahn 5: + 4 °C mit Citrat, Bahn 6: + 4 °C mit EDTA, Bahn 7: - 20 °C ohne Zusatz, Bahn 8: - 20 °C mit Citrat und Bahn 9: - 20 °C mit EDTA. AL = Allelleiter, K562 = Positiv-Kontrolle. Die Zahlen 6 und 9.3 bezeichnen die Allele.

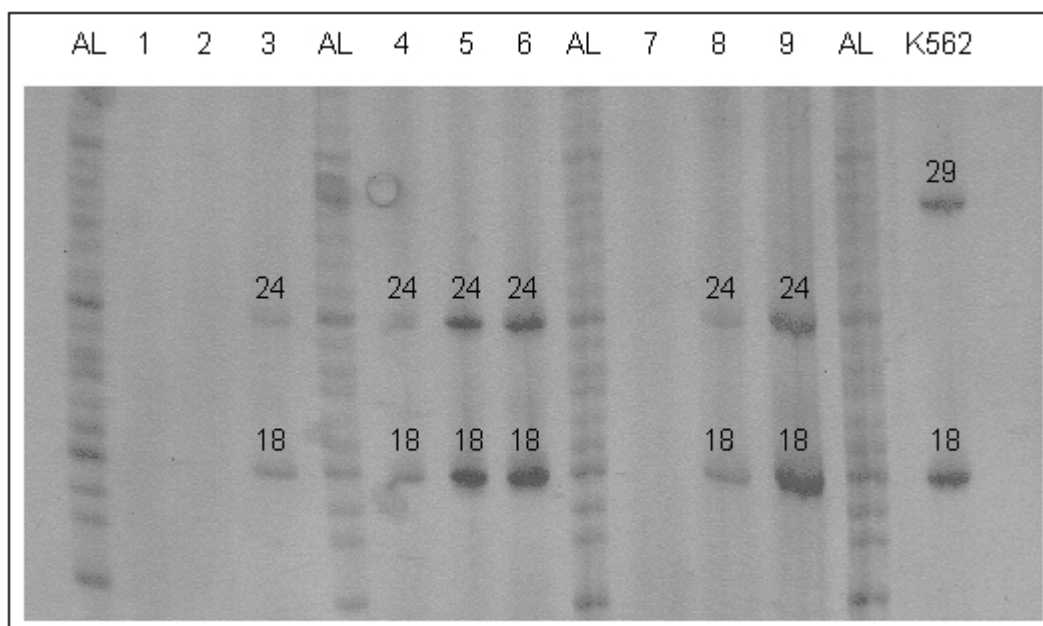


Abb. 18: Ausschnitt eines PAGE-Gels von DNA-Amplifikaten der AmpFLP-Region **D1S80** der Person Nr. 16 in Abhängigkeit von verschiedenen Lagerungsbedingungen. Bahn 1: R.T. ohne Zusatz, Bahn 2: R.T. mit Citrat, Bahn 3: R.T. mit EDTA, Bahn 4: + 4 °C ohne Zusatz, Bahn 5: + 4 °C mit Citrat, Bahn 6: + 4 °C mit EDTA, Bahn 7: - 20 °C ohne Zusatz, Bahn 8: - 20 °C mit Citrat, Bahn 9: - 20 °C mit EDTA. = Allelleiter, K562 = Positiv-Kontrolle. Die Zahlen 18, 24 und 29 bezeichnen die Allele.

3.3.1 Ergebnisse mit dem STR-System HumTH01

Die Tabelle 12 stellt die ermittelten Allelkonstellationen der untersuchten Probanden dar. Sie umfaßt für den Genort HUMTH01 15 unterschiedliche Genotypen. Bei 8 bisher detektierten Allelen ergeben sich für diesen Genort 36 mögliche Genotypen. Die heterozygoten Allelkonstellationen 6/9.3 wurden bei 8 Personen (16 %) am häufigsten ermittelt, gefolgt von 8/9.3 bei 5 Personen (10 %). Zwei Genotypen (6/7, 6/9) konnten jeweils bei vier Personen ermittelt werden. Bei 8 möglichen homozygoten Allelkonstellationen wurde am häufigsten 9.3/9.3 bei 6 Personen (12 %) beobachtet, gefolgt von 6/6 bei 4 Personen.

Tab. 12 : Beobachtete Genotypen der 50 Individuen für HUMTH01 und D1S80

Anzahl	HUMTH01 Genotyp	Anzahl	HUMTH01 Genotyp	Anzahl	D1S80 Genotyp	Anzahl	D1S80 Genotyp
1	5/9.3	2	9/9	1	16/28	2	23/24
4	6/6	5	9/9.3	1	18/21	1	23/36
4	6/7	6	9.3/9.3	1	18/23	11	24/24
3	6/8			9	18/24	1	24/25
4	6/9			1	18/28	1	24/27
8	6/9.3			1	18/31	3	24/28
1	7/7			1	20/24	4	24/29
2	7/8			1	21/24	2	24/31
2	7/9			1	22/24	1	24/37
2	7/9.3			1	22/27	1	26/28
1	8/8			1	22/29	1	28/28
5	8/9.3			1	22/31	2	31/31

Die Häufigkeiten der verschiedenen Allele des HUMTH01-Systems von 50 nicht-verwandten Personen sind in Abb. 19 wiedergegeben. Der Abbildung ist zu entnehmen, daß 6 der 8 bisher beschriebenen Allele für das STR-System HUMTH01 bei diesen Untersuchungen gefunden wurden. Die einzigen Allele, die in dieser Population nicht beobachtet werden konnten, waren Allel 10 und 11. Als häufigstes Allel war 9.3 mit 33 % vertreten. Es folgte Allel 6 mit 27 %, Allel 9 mit 14 % und Allele 8 und 7 mit je 2 %. Allel 5 konnte nur zu 1 % beobachtet werden.

Der ermittelte χ^2 -Wert ergab für HUMTH01 6,67. Als DI-Wert (die Wahrscheinlichkeit, mit der 2 zufällig aus einer Population ausgewählte Individuen verschiedene Genotypen aufweisen) wurde mit 0,92 berechnet.

Die zu diesem Wert komplementäre Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (P_m = die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung zweier zufällig ausgewählter Individuen für eine STR-Region) wurde mit 0,08 berechnet.

Die Heterozygotenrate betrug 78 %. Der Test auf HWG ergab 86, 33 (s. Anhang).

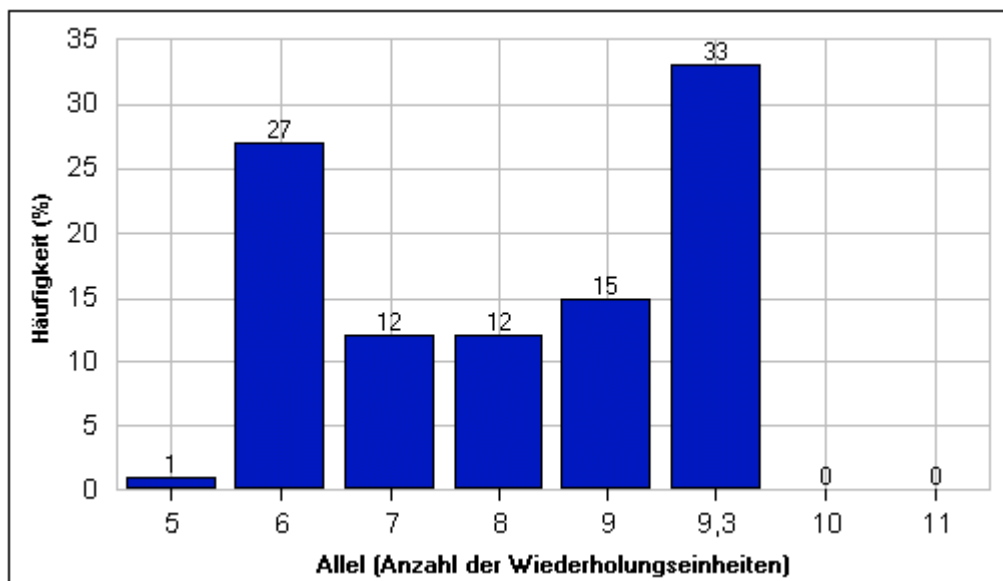


Abb. 19: Verteilung der detektierten Allele von 50 Personen für den STR-Locus HUMTH01

3.3.2 Ergebnisse des AmpFLP D1S80

Von den insgesamt 351 möglichen Genotypen (Minnasch *et al.*, 1998) konnten in dieser Population 7,1 % (25 Genotypen) ermittelt werden (Tab. 12). Die Anzahl der heterozygoten Individuen betrug 36, die der homozygoten 14. Unter den Heterozygoten konnte am häufigsten die Konstellation 18/24 mit 14 % (7 Individuen) beobachtet werden, gefolgt von 24/29 mit 8 % (4 Individuen) und 24/28 mit 6 % (3 Individuen). Die Konstellationen 18/21, 23/24 und 24/31 wurden bei je 2 Personen (4 %) beobachtet. Unter den Homozygoten wurde die Konstellation 24/24 mit 20 % (10 Personen), gefolgt von 18/18 und 31/31 mit je 4 % (jeweils 2 Personen) am häufigsten beobachtet.

Die Häufigkeiten der verschiedenen Allele des D1S80-Systems der 50 nicht-verwandten Personen ist der Abb. 20 zu entnehmen.

Die Abbildung verdeutlicht, daß 15 von 41 möglichen Allelen für den AmpFLP D1S80 detektiert wurden. Als häufigstes Allel war 24 mit 44 % vertreten, gefolgt von Allel 18 mit 16 %.

Nachgewiesen wurden Allel 28 (mit 8 %), Allel 31 (mit 7 %), Allel 29 (mit 5 %), Allele 22 und 23 (mit 4 %), Allel 21 (mit 3 %) , Allele 20 und 27 (2 %) und die Allele 25, 26, 32, 36 und 37 mit jeweils 1 %. Die Allele 14, 16, 38, 39, 40, 41 konnten im Rahmen dieser Untersuchung nicht detektiert werden.

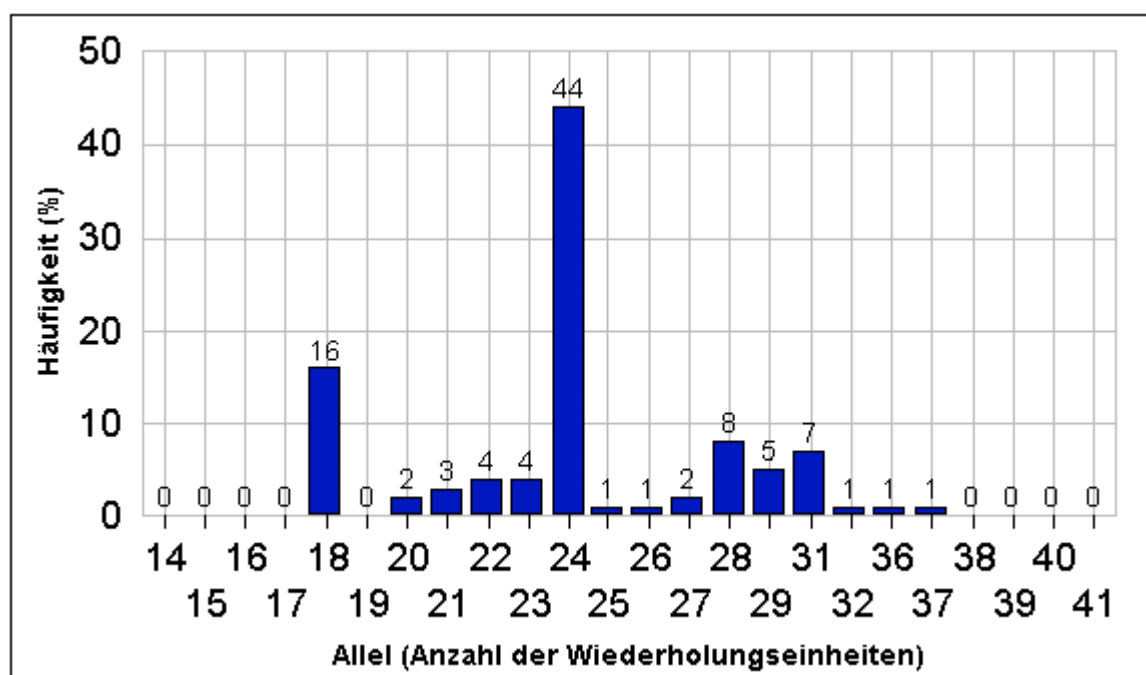


Abb. 20: Verteilung der detektierten Allele des Locus D1S80 für 50 Personen.

Als χ^2 -Wert wurde für D1S80 60.88 berechnet. Für den Diskriminationsindex (DI) wurde 0,95 und für die Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (Pm) 0,05 ermittelt. Die Heterozygotenrate wurde mit 77 % ermittelt. Der Test auf HWG ergab einen Wert von 33,66 (s. Anhang).

3.3.3 Einfluß der DNA-Konzentration im PCR-Ansatz

Die für eine PCR-Reaktion einzusetzende DNA-Menge sollte optimal sein, um spezifische Amplifikationsprodukte zu erhalten. Bei einer zu hohen DNA-Template-Menge in dem Reaktionsansatz können Verfälschungen durch sogenannte Extra- oder Zusatzbanden entstehen. Dies könnte als gemischte DNA-Probe falsch interpretiert werden.

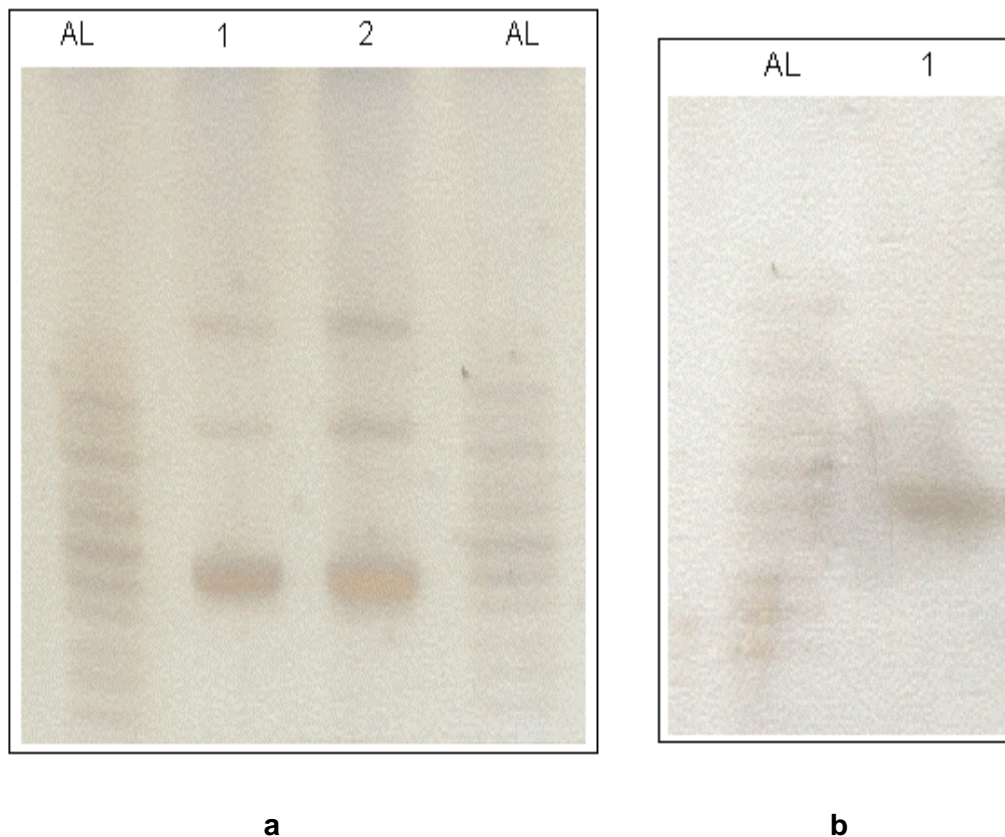


Abb. 21: Ausschnitt eines PAGE-Gels mit DNA-Amplifikaten der STR-Region HUMFGA

a) AL = Allelleiter, Spur 1 und 2: PCR-Produkte eines Individuums mit Zusatzbanden

b) AL = Allelleiter, Spur 1 PCR-Produkte des gleichen Individuums ohne Zusatzbanden

a) PCR-Amplifikate ohne vorherige Quantifizierung der DNA durch Slot-Blot. Gut sichtbar sind in den Bahnen 1 und 2 die kurzen individualspezifischen Allele (untere intensive Bande). Die beiden längeren Fragmente, die im oberen Bereich der Allelleiter verlaufen, sind unspezifische Zusatzbanden (schwache Banden). **b)** In der Bahn 1 wurde ein 1:10 verdünnter DNA-Ansatz in die PCR-Reaktion eingesetzt. Je 5 µl PCR-Amplifikat wurde aufgetragen und mit Silberfärbung sichtbar gemacht. Unter diesen Bedingungen wurde ausschließlich das individuelle Merkmal amplifiziert.

3.3.4 Darstellung der PCR-Systeme ACTBP2 und D21S11

Diese STR-Systeme gehören zu den Kern-Systemen der jährlichen Qualitätskontrollen. Zur eindeutigen Beurteilung der meisten Fragestellungen ist eine PAGE-Analyse der PCR-Systeme TH01, VWA, FGA, F13B, Amelogenin, DYS19, FES, CD4, TPOX und D1S80 völlig ausreichend.

Die Auftrennung der Allele des Genortes ACTBP2 und D21S11 jedoch können aufgrund der Vielzahl bzw. der Variationen nur an einem Sequenzierautomaten präzise durchgeführt werden.

a) Genort ACTBP2

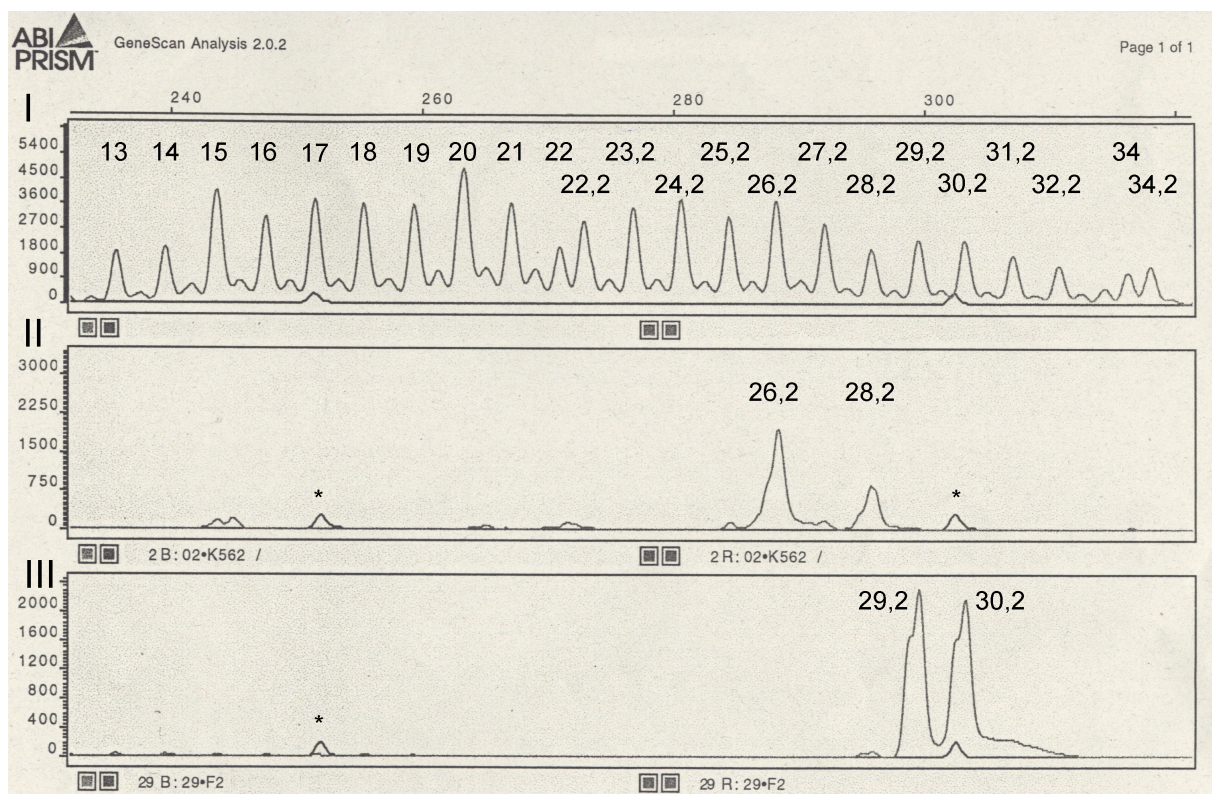


Abb. 22: Elektropherogramm von DNA-Amplifikaten des Genortes ACTBP2. Bahn I: Alleleiter, Bahn II: K562, Positiv-Kontrolle, Bahn III. Amplifikate eines Individuums. * = interner Längenstandard TAMRA-markiert. Der Primer ist 5'-FAM-markiert.

b) Genort D21S11

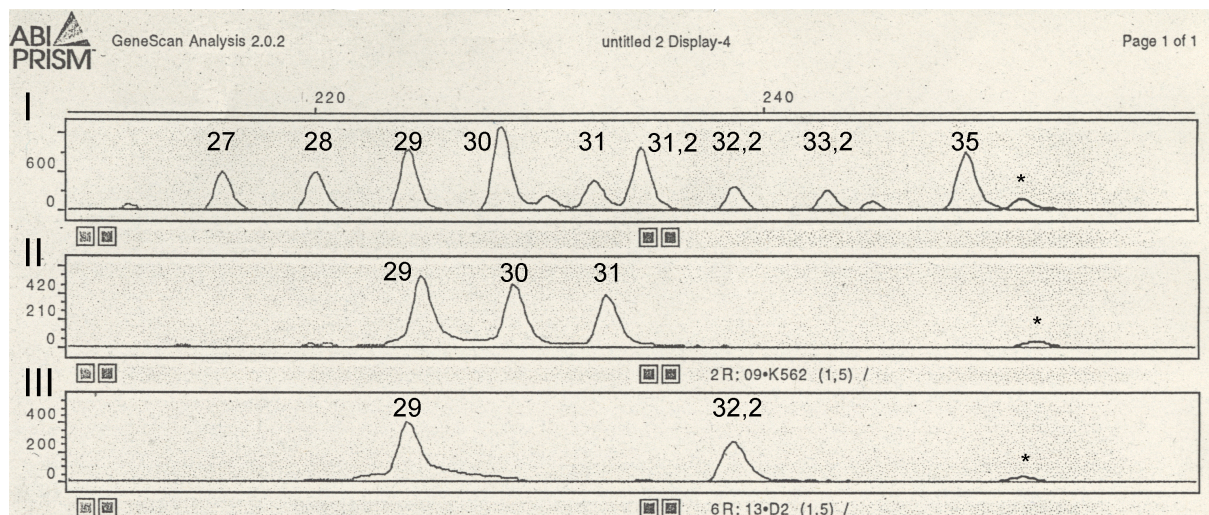


Abb. 23: Elektropherogramm von PCR-Amplifikaten des Genortes D21S11. In Bahn I: Alleleiter, Bahn II: K562, Positiv-Kontrolle, Bahn III: Amplifikates eines Individuums, * = interner Längenstandard TAMRA-markiert. Der Primer ist 5'-FAM-markiert.

3.4 Typisierungsergebnisse der Blutchimären

3.4.1 STR-System HUMvWFA31

Die Analyse der Speichel- und Urinproben zeigte die individuelle Allelkonstellation für jedes Mitglied der Familie. Danach konnte für das Mädchen die Allelkonstellation 16/19 und für die beiden Brüder die Allele 15/16 detektiert werden (Tab. 13 und Abb. 24).

Die Ergebnisse der Blutuntersuchung zeigten ein Mischbild aus individuellen Allelen und den Allelen der Geschwister. Das Mädchen erhielt von beiden Brüdern je einen Anteil von hämopoetischen Stammzellen (Allel 15) und transfundierte je einen Anteil Stammzellen (Allel 19) zu den Brüdern (Tab. 14 und Abb. 25).

Tab. 13: Allelkonstellationen der Familie nach DNA-Analyse der Speichel- und Urinproben.

Individuen	HUMvWFA31 Allelkonstellationen	HUMAMELX/Y
Mutter	15/19	X-X
Kind 1 (Tochter)	16/19	X-X
Kind 2 (Sohn)	15/16	X-Y
Kind 3 (Sohn)	15/16	X-Y
Vater	16/19	X-Y

Tab. 14: Allelkonstellationen der Familie nach DNA-Analyse der Blutproben.

Individuen	HUMvWFA31 Allelkonstellationen	HUMAMELX/Y
Mutter	15/19	X-X
Kind 1 (Tochter)	15/16/19	X-Y
Kind 2 (Sohn)	15/16/19	X-Y
Kind 3 (Sohn)	15/16/19	X-Y
Vater	16/19	X-Y

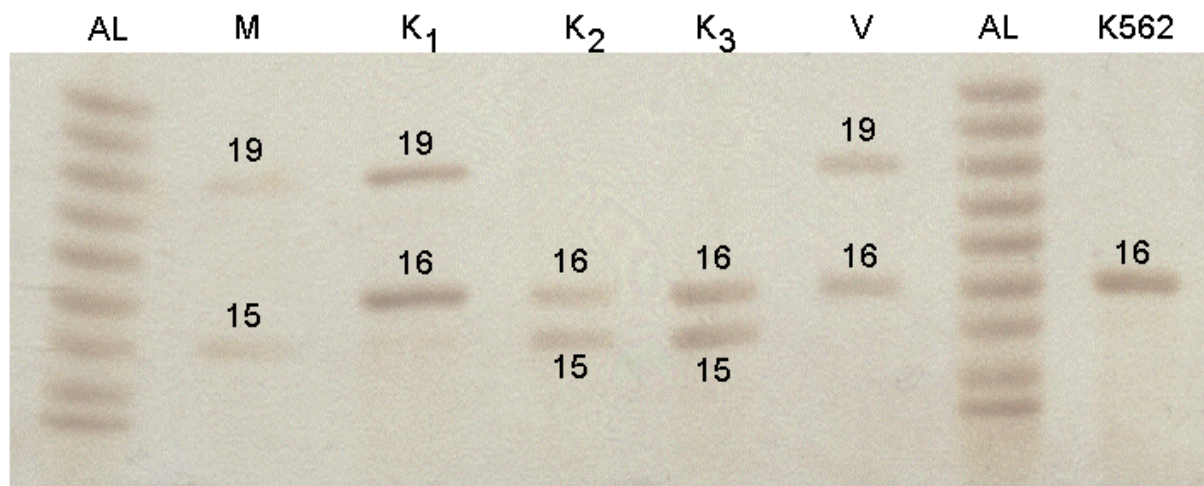


Abb. 24: PAGE-Gel mit dem DNA-Profil der Speichelproben der Chimären-Drillinge. Untersucht wurde das STR-System HUMWFA31. M = Mutter, K1 = Tochter, K2, K3 = Zwillingssöhne, V = Vater. Die Ziffern 15, 16 und 19 bezeichnen die Allele.

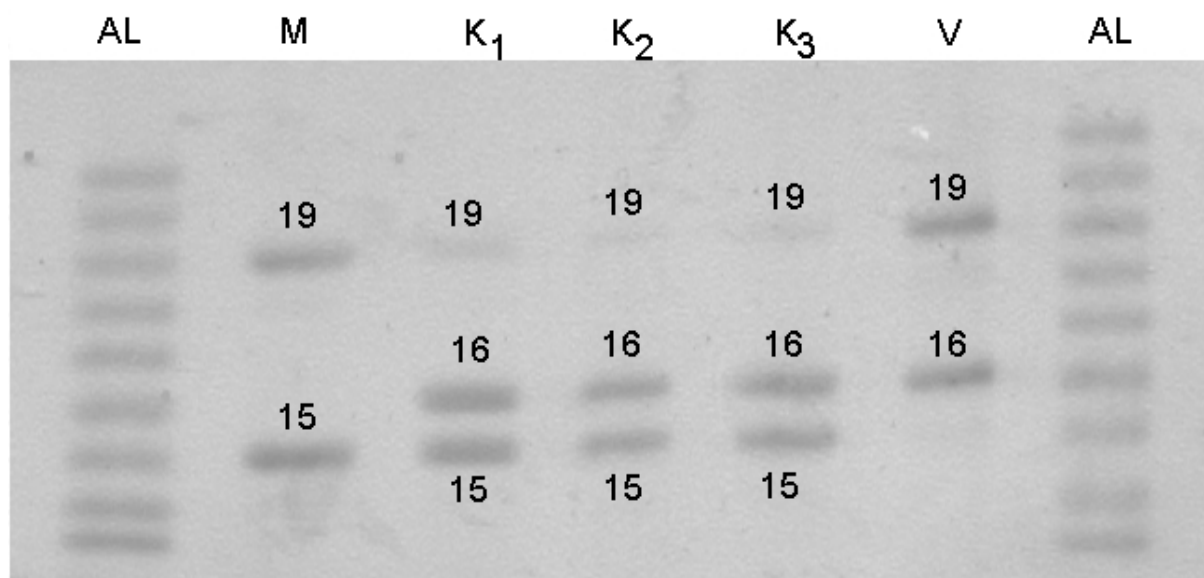


Abb. 25: PAGE-Gel mit dem DNA-Profil der Blutproben der Chimären-Drillinge. Untersucht wurde das STR-System HUMWFA31. M = Mutter, K1 = Tochter, K2, K3 = Zwillingssöhne, V = Vater. Die Ziffern 15, 16 und 19 bezeichnen die Allele.

3.4.2 Geschlechtsbestimmungssystem HUMAMELX/Y

Die Analyse der Speichelproben ergab das geschlechtsspezifische X-X-Muster für die Tochter und X-Y-Merkmale für die beiden Zwillingsöhne (Tab. 13 und Abb. 26).

Die Analyse der Blutproben jedoch ergab für die Tochter wie auch für die Söhne ein X-Y-Muster (Tab. 14 und Abb. 27).

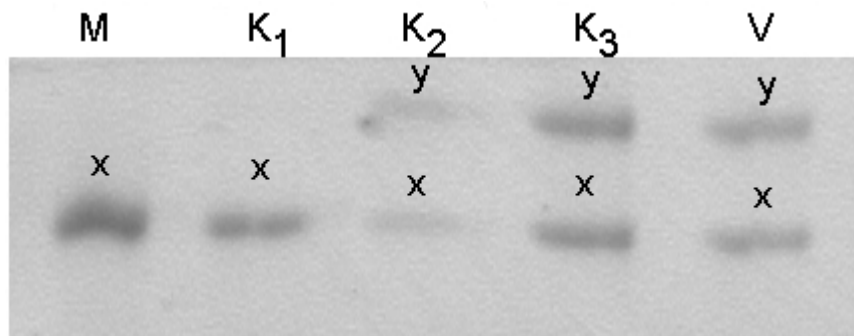


Abb. 26: PAGE-Gel mit dem DNA-Profil der Speichelproben der Chimären-Drillinge. Untersucht wurde das System HUMAMELX/Y. M = Mutter, K1 = Tochter, K2, K3 = Zwillingsöhne, V = Vater.

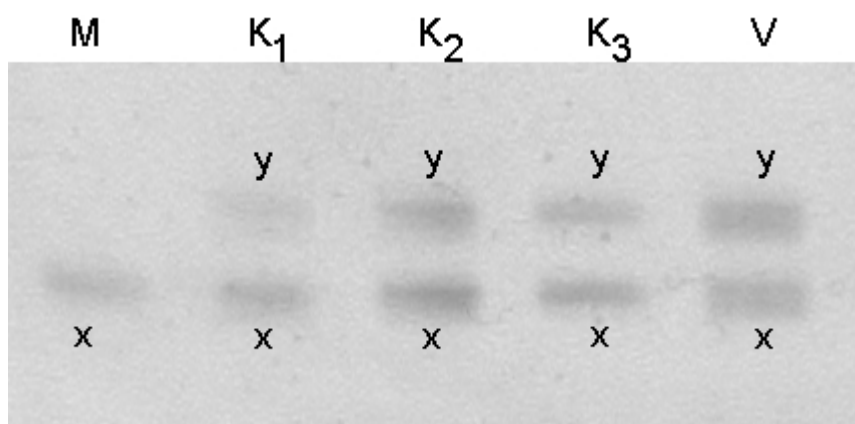


Abb. 27: PAGE-Gel mit dem DNA-Profil der Blutproben der Chimären-Drillinge. Untersucht wurde das System HUMAMELX/Y. M = Mutter, K1 = Tochter, K2, K3 = Zwillingsöhne, V = Vater.

4. Diskussion

4.1 Optimierung der DNA-Ausbeute

Eine optimale DNA-Extraktionsmethode ist Voraussetzung, um zum einen die Ausbeute zu maximieren und zum anderen die die PCR störenden Komponenten (Inhibitoren) zu entfernen. Die Wahl der Extraktionsmethode richtet sich nach der Beschaffenheit des biologischen Materials, nach der Menge des Spurenmaterials und nach dem vorliegenden Zelltyp (Sweet *et al.*, 1996). Nach der erfolgreichen Standardisierung der Verfahren wurden am Institut für Rechtsmedizin in Kiel in den Jahren 1997-1999 bis zu 30 gerichtsverwertbare Befunde pro Jahr erhoben. Einige dabei gelöste technische Probleme sollen anhand von Beispielen im Rahmen dieser Arbeit diskutiert werden.

Urin enthält normalerweise nur eine relativ geringe Anzahl kernhaltiger Zellen (ca. 5 Leukozyten/ μ l). In der Praxis kann es vorkommen, daß trotz Einsatzes größerer Volumina Urin (10 ml) die DNA-Menge unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Um Verluste durch nicht optimale Extraktionsprotokolle möglichst niedrig zu halten, wurden zwei unterschiedliche Methoden parallel durchgeführt.

Der Vergleich zweier Extraktionsmethoden (Phenol-Chloroform-Methode und Chelex-Methode) im Rahmen dieser Arbeit zeigte, daß eine höhere DNA-Ausbeute aus Urinproben mit dem Chelex-Protokoll erzielt werden konnte. Bei dieser schnelleren und einfacheren Aufbereitung werden keine die nachfolgende PCR-Reaktion störenden Lösungsmittel eingesetzt. Die Methode eignet sich gut für Spurenmaterial mit geringen Zellzahlen, wie z. B. Urin. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Autoren gemacht (Singer-Sam *et al.* 1989; Walsh *et al.*, 1991).

Die klassische Phenol-Chloroform-Extraktion lysiert die Zellen und trennt die DNA von störenden Komponenten durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln. Neben den methodischen Nachteilen der Phenol-Extraktion (Spuren von Lösungsmitteln verbleiben in der wässrigen, die DNA enthaltenden Phase und behindern möglicherweise die nachfolgende PCR-Reaktion) ergeben sich gegenüber der Chelex-Methode durch Pipettiervorgänge ein höheres Kontaminationsrisiko sowie ein höherer Zeitaufwand.

Ein weiterer Nachteil dieser Methode ist, daß Anteile der DNA während des Transfers in ein frisches Reaktionsgefäß mit der Interphase verworfen werden. Dies wäre eine Erklärung dafür, daß in einigen gelagerten Urinproben der DNA-Gehalt höher war als in der Kontrolle, die die DNA aus der frischen Urinprobe enthielt. Andere Ursachen könnten in einer nicht

ausreichenden Homogenisierung der Urinproben bzw. Pipettiergenauigkeiten zu finden sein.

Von Jung *et al.* (1991) wurden beide Extraktionsmethoden an Blutproben auf Baumwollträgern verglichen. Bei der Anwendung der Chelex-Methode wurde hierbei eine bis zu 6fach höhere Ausbeute beobachtet. Vandenberg *et al.* (1997) verglichen die Effizienz unterschiedlicher DNA-Extraktionsmethoden an Blutproben und erzielten mittels Chelex-Methode die besten Ergebnisse. Sweet *et al.* (1996) erhielten bei der Untersuchung von Speichelproben mittels Chelex die höchsten Ausbeuten. Bei Vergleichsuntersuchungen zwischen verschiedenen Methoden konnte mit Chelex eine größere Probenzahl erfolgreich typisiert werden. Mit guten Ergebnissen konnte die Chelex-Methode auch bei problematischen Spureträgern eingesetzt werden, z. B. indigogefärbten Hosen. PCR-Inhibitoren wie z. B. Indigo-Farbstoffe und Detergenzien wurden von dem Chelex besser gebunden (Del Rio *et al.*, 1996).

In der forensischen Praxis zeigt sich jedoch, daß nicht alle in Textilfarbstoffen enthaltenen Inhibitoren von Chelex gebunden werden. Bei einem intensiv roten Spureträger konnten die mitextrahierten störenden Komponenten erst nach der Behandlung mit Lösungsmitteln entfernt werden.

Die Phenol-Chloroform-Methode eignet sich besser für Spurenmaterial, bei dem die DNA aus einer harten Matrix, wie z. B. aus Zähnen und Knochen herausgelöst werden muß (Pfeiffer *et al.*, 1999). Dies zeigte sich bei der Identifikation eines Zahnes, der in einem Brötchen in einem Schnellrestaurant in Spanien gesichert und in dieses Institut zur Begutachtung eingeschickt wurde. Dabei handelte es sich um ein Zahnfragment ohne Wurzelbereich, das einer intensiven Mikrowellenbestrahlung (1400 W) ausgesetzt gewesen war. Mittels DNA-Sondentechnik konnte u. a. die Humanspezifität bestätigt werden.

Für ein eindeutiges PCR-Ergebnis ist eine optimale DNA-Konzentration im Reaktionsansatz besonders wichtig. Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, daß zu große DNA-Einsatzmengen zu sogenannten Extrabanden führen. (s. Punkt 3.3.3). Das sind Banden, die neben den individuellen Allelen auftreten. Diese DNA-Fragmente sind in der Größe variabel und können sowohl außerhalb als auch im Bereich des Standards liegen. Eine sichere Interpretation wird dadurch erschwert.

Die Abschätzung der DNA-Konzentration nach dem Slot-Blot-Verfahren erfolgte in dieser Arbeit durch Vergleich mit den Signalintensitäten aufgetragener Standardproben in definierter Konzentration ("side-to-side-Vergleich"). Durch die Konzentrationssprünge kann es bei der Abschätzung zu Unschärfen kommen. Eine größere Fehlerquelle können Verunreinigungen in den DNA-Extrakten, wie z. B. Zelltrümmer, Fasern oder unvollständig lysierte Haare bilden, die durch die angewandte Extraktionsmethode nicht entfernt wurden

und die die Fixierung auf der Membran behinderten. Der Vorteil der Slot-Blot-Methode für die forensische Praxis ist, daß die eingesetzte Sonde D17Z1 in einem DNA-Gemisch unterschiedlicher Herkunft spezifisch nur an humane Sequenzen bindet. Spurenmaterial wie z. B. gelagerter Urin ist in der Regel mit Mikroorganismen kontaminiert. Auch Pflanzen- oder Tierzellen, deren DNA bei der Extraktion mit in die DNA-Probe gelangt, können sich am Spurenträger befinden.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die zelluläre Zusammensetzung und daher die extrahierbaren DNA-Mengen aus dem Urin der Probanden sehr variabel sind. Die im Urin weiblicher Probanden häufiger anzutreffenden kernhaltigen Zellen (Epithelzellen und Leukozyten) haben ihren Ursprung wahrscheinlich im Genitalbereich. Nach Prescott (1966) sind kernhaltige Zellen häufiger bei Männern anzutreffen, jedoch liegt die Ursache dieser Feststellung wohl eher in der bei Prescotts Untersuchung verwendeten Probennahme begründet. Bei Männern untersuchte er Spontanurin, bei Frauen gewann er die Harnprobe durch eine Art Katheterisierung, bei der der Harn nicht mit dem Genitalbereich in Berührung kam. In der Regel enthält der Urin männlicher Probanden nur sehr geringe Zahlen kernhaltiger Zelltypen. Dies zeigte sich auch in der Praxis wenn zu toxikologischen Untersuchungen nachträglich Urinprobe mittels DNA-Analyse zu Identitätszwecken typisiert werden müssen.

Auch Spermien konnten im Rahmen dieser Arbeit in zwei Proben von männlichen Probanden beobachtet werden. Bei Männern gelangen Spermien aufgrund des anatomischen Aufbaus des Urogenitaltraktes in den Urin, bei Frauen hingegen können Spermien postcoital im Urin zu finden sein. In der forensischen Praxis sollte daher eine mikroskopische Untersuchung der Urinproben nicht nur zur Erfassung kernhaltiger Zelltypen zur Abschätzung der zu erwartenden DNA-Menge durchgeführt werden, sondern auch im Hinblick auf das Vorliegen von Mischtypen (z. B. Spermien in weiblichen Urinproben). Im Rahmen von Sexualstraftaten kann das ein weiteres Beweismittel sein. Normalerweise wird bei Verdacht des Verstoßes gegen die sexuelle Selbstbestimmung von Frauen und Kindern das zu untersuchende Material zunächst einem Vortest auf Saure Phosphatase unterzogen, einem Enzym, das im Ejakulat des Mannes vorkommt. Bei positiver Reaktion werden dann kleine Bereiche mikroskopisch begutachtet. In der Regel sind intakte Spermien sehr selten nachzuweisen. Deshalb schließt sich eine molekulargenetische Untersuchung im Amelogenin-Geschlechtsbestimmungssystem zum Nachweis männlicher Merkmale an. Diese Untersuchung ist in der Praxis der sicherste Nachweis, auch dann, wenn das Ejakulat aus medizinischen Gründen keine Spermien enthält (Scott *et al.* 1963; Prescott, 1965; Prinz *et al.*, 1993; Pötsch *et al.*, 1992; Milde *et al.*, 1999).

4.2 Lagerungstemperatur und Chelatbildner

Für weiterführende Untersuchungen muß biologisches Spurenmaterial über einen langen Zeitraum (für mindestens 2 Jahre) verfügbar sein. In der Praxis hat sich gezeigt, daß die Lagerung von Spurenmaterial bei ungeklärten Straftatbeständen für Jahrzehnte sinnvoll ist. Durch verbesserte Analyse-Techniken können diese Asservate an der Aufklärung von Straftaten, die vor langer Zeit begangen wurden, beitragen. Zu diesen Spuren gehören Körperflüssigkeiten, Epithelzellen an Abklebefolie gesichert, Körperteile, Zähne und Knochen. Optimale Lagerungsbedingungen sind daher Voraussetzung, um auch nach Jahren noch reproduzierbare und vor Gericht verwertbare Ergebnisse zu erhalten.

Speichel-, Blut-, und Spermaspuren werden auf dem Spurenlagerer getrocknet und sind bei dieser Vorgehensweise auch nach Jahrzehnten typisierbar. Gewebeasservate werden bei -20°C eingefroren und können je nach Zustand zum Zeitpunkt der Entnahme noch typisiert werden. Dies zeigte sich bei mehreren Fällen zur Aufklärung von biologischen Verwandtschaftsverhältnissen. Im Rahmen dieser konnten auf der Grundlage von z. T. hochgradig degradierten Gewebeasservaten der verstorbenen Putativväter bzw. Putativmutter mittels STR-Systemen und PCR-Technik die Vaterschaft bzw. Mutterschaft nachträglich aufgeklärt werden.

Problematisch war die Lagerung beim Urin. Urin enthält nur geringe Zahlen kernhaltiger Zellen und kann deshalb nicht auf einem Watteträger asserviert werden, sondern nur in größeren Volumina. In der toxikologischen Abteilung werden Urinproben deshalb langfristig bei -20°C aufgehoben. Wie in anderen Experimenten beschrieben wurde, führt dies jedoch beim Auftauvorgang zu DNA-Verlust durch Degradierung. Um für diese Körperflüssigkeit eine nachträgliche Typisierung auch nach Jahren zu gewährleisten, wurden Lagerungsexperimente mit Komplexbildnern durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß durch die Zugabe von EDTA zu Urinproben die DNA-Ausbeute bei allen untersuchten Lagerungstemperaturen erheblich gesteigert werden konnte (Milde *et al.*, 1999).

Bei Raumtemperatur und ohne Zusatz gelagert, konnte in den Urinproben mikroskopisch ein Bewuchs der Proben durch Bakterien und Hefen beobachtet werden. Der gemessene pH-Wert war zu diesem Zeitpunkt stark alkalisch ($\text{pH} = 10$). Die Veränderung des pH-Wertes ist wahrscheinlich auf bakterielle Aktivität zurückzuführen und möglicherweise für den Zellverlust durch Zellyse verantwortlich. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit den Beobachtungen anderer Autoren. Nach deren Beschreibungen setzt der Abbauprozess schon unmittelbar nach dem Harnlassen ein (Pötsch *et al.*, 1992; Medintz *et al.*, 1994). Durch EDTA wurde das mikrobielle Wachstum in den Urinproben gehemmt. Bei Gram-negativen

Bakterien hat Calcium eine die Lipopolysaccharidschicht stabilisierende Funktion. Durch die Zugabe von EDTA zum Nährmedium stehen diese Metallkationen für den Zellwandaufbau der Bakterien nicht mehr zur Verfügung. Die Bakterienzellen werden lysiert (Schlegel, 1985). Auch Enzyme benötigen für ihre Aktivität Metallkationen. Durch EDTA werden diese Kationen gebunden und der bakterielle Stoffwechsel gehemmt.

Bei +4 °C sind Bakterienwachstum und enzymatische Aktivitäten in Urinproben auch ohne Zusatz von konservierenden Mitteln herabgesetzt. Es können deshalb nach langer Lagerungszeit noch intakte Zellen nachgewiesen werden. Die DNA-Ausbeute war ohne konservierende Mittel im Vergleich mit den anderen untersuchten Temperaturen bei +4 °C am höchsten (Brinkmann *et al.*, 1992; Prinz *et al.*, 1993).

Bei -20 °C und ohne Zusatz gelagerte Proben zeigten eine deutliche Abnahme des extrahierbaren DNA-Gehaltes. Eine Ursache ist wahrscheinlich in Eiskristallen zu finden, die beim Auftauvorgang die Zellmembran zerstören und die freiliegende DNA Nukleasen zugänglich machen. Eine Möglichkeit, diesen Vorgang zu verhindern, die aber hier nicht untersucht wurde, wäre auch die Zugabe von Glycerin zu den Urinproben vor dem Einfrieren. Nach Pötsch (1992) wird jedoch eine verbesserte Zellyse gerade schwer lysierbarer, keratinisierter Übergangsepithelien der ableitenden Harnwege durch mehrmaliges Auftauen und Einfrieren der Urinproben beobachtet. Diese Vorgehensweise ist jedoch nicht unproblematisch, da gerade bei dieser Praxis nach Tsongalis *et al.* (1996) starke Degradierungsprozesse beobachtet werden können. Die nachfolgende Amplifikation wird dadurch erschwert.

Eleganter ist es, diese die Zellyse erschwerende Membranstruktur - wie in dieser Arbeit durchgeführt - durch Dithiothreitol (DTT) und längere Inkubationzeit aufzulösen. Bewährt hat sich dieses Reduktionsmittel in Kombination mit einer optimalen Lysetemperatur auch bei der Auflösung von den in Spermien vorkommenden schwefelhaltigen Proteinen.

Die Zugabe von EDTA zum Urin bindet zweiwertige Metallkationen. Nukleasen benötigen jedoch diese Kationen, um aktiv zu sein. Durch die Zugabe von EDTA wird die Degradierung der während des Auftauprozesses freigesetzten DNA durch ubiquitär vorkommende DNasen verzögert. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren, die den Einfluß von EDTA bei der Lagerung von Blut beschrieben (Gustafson *et al.*, 1987; Lahiri *et al.*, 1993; Bomjen *et al.*, 1996).

Zusätzlich zu EDTA wurde Natriumcitrat untersucht. Beide Komplexbildner bilden mit Erdalkalimetalle z.T. sehr stabile wasserlösliche Chelatkomplexe. Der Vergleich beider Komplexbildner zeigte, daß Natriumcitrat im Vergleich mit EDTA weniger gut als Stabilisator

geeignet ist. Die DNA-Ausbeute war deutlich niedriger. Eine der wichtigsten Ursachen ist wahrscheinlich in dem durch diese Verbindung geförderten bakteriellen Wachstum zu sehen. In den Proben bildet dieser Chelatbildner offensichtlich eine zusätzliche Kohlenstoffquelle für die vorhandenen Bakterien.

4.3 Amplifizierbarkeit der DNA

Die DNA-Proben, die aus Urin mittels Chelex extrahiert worden waren, wurden auf ihre Amplifizierbarkeit überprüft.

Die Typisierungsergebnisse zeigen, daß trotz einer ausreichenden "Template"-Konzentration gelegentlich ein Ausbleiben der DNA-Amplifikation beobachtet werden konnte (Tab. 11). In Veröffentlichungen anderer Autoren wurden ähnliche Beobachtungen beschrieben (Pötsch *et al.*, 1992; Prinz *et al.*, 1993). Die genaue Ursache der Polymerase-Hemmung im Reaktionsansatz konnte hier nicht geklärt werden. Naturgemäß ist die Zusammensetzung des Urins sehr variabel. Es können unterschiedliche Stoffwechselprodukte, nukleosidanalogue Verbindungen als Metabolite der Nahrung, Reste von Medikamenten und Drogen nachgewiesen werden, die bei der DNA-Extraktion nicht entfernt wurden. Durch die Zugabe von BSA (bovine serum albumin) zum Reaktionsansatz konnten bei einigen Proben Amplifikationen erzielt werden, bei denen zuvor - ohne BSA - ein Ausbleiben der PCR-Reaktion beobachtet worden war. BSA hat nach Akane *et al.* (1994) die Funktion, Inhibitoren zu binden.

Der mikrobielle Bewuchs in den Urinproben und deren mitextrahierte Fremd-DNA hat nach Prinz *et al.* (1993) einen hemmenden Einfluß auf die PCR-Reaktion. In systematischen Versuchen konnte mit zunehmender Konzentration von Fremd-DNA im Reaktionsansatz ein Ausbleiben der PCR-Reaktion beobachtet werden. Um die störenden mikrobiellen Kontaminanten von den humanen Zellen vor der DNA-Extraktion zu entfernen, wurde in dem Versuch von Prinz der Urin durch eine Siebvorrichtung aus Gaze (53 µm Porengröße) zwischen zwei ineinander gestellten Zentrifugengefäßen gefiltert. Die Rate der typisierbaren Proben nahm daraufhin deutlich zu.

Dieser Ansatz ist jedoch sehr umständlich und führt unter Umständen zu Materialverlust und Kontaminationen durch die zusätzlichen Arbeitsschritte. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Zugabe von EDTA das Wachstum der Mikroorganismen gehemmt.

Die Gegenwart einer optimalen Magnesiumkonzentration in dem PCR-Reaktionsansatz ist eine Voraussetzung für eine einwandfreie Funktionsweise der Taq-Polymerase (Kloosterman *et al.*, 1993). Zusammen mit den Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) bilden sie einen löslichen Komplex, der für den Einbau der dNTPs ausschlaggebend ist. Ausserdem stimuliert Magnesium die Polymeraseaktivität. Im allgemeinen verringert eine ungenügende Magnesium-Konzentration die Bildung der Amplifikate. Nicht ausreichend entfernte EDTA-Anteile in den Urinproben stören daher die Taq-Polymerase. Die DNA-Extraktion mit der Chelex-Methode führt jedoch zu einer deutlichen Verdünnung des EDTA-enthaltenden Urinsediments. Die Typisierungsergebnisse zeigen, daß in der Regel die DNA aus Urinproben, die mit EDTA gelagert worden waren, häufiger amplifiziert werden konnten als DNA aus Urinproben ohne EDTA.

Die Ergebnisse in dieser Untersuchung verdeutlichen, daß die Typisierungsquote für das STR-System HUMTH01 höher war als für D1S80. Dies ließ sich bei allen untersuchten Parametern beobachten. Die Amplifikation kurzer DNA-Abschnitte ist vor allem bei hochgradig verfaultem und altem Spurenmaterial mit HUMTH01 noch erfolgreich. Dies zeigte sich auch bei der Identifizierung eines Schädels nach etwa 10jähriger Liegezeit in einem Erdgrab. Nach der Extraktion der DNA aus dem Wurzelbereich (Pulpakanal und umgebendes Dentin) eines Backenzahnes konnten ausschließlich kurze Zielsequenzen erfolgreich vervielfältigt werden.

Bei dem AmpFLP D1S80 fiel das Phänomen auf, daß bei heterozygoter Allelkonstellation das größere Allel nicht immer zuverlässig mitamplifiziert wurde, das sogenannte "Allel-drop-out". Die Ursache hierfür ist nicht vollständig bekannt, jedoch wurde es ausschließlich bei gelagerten Urinproben beobachtet und ist möglicherweise auf zunehmende Degradierung der DNA zurückzuführen. Dieses Ereignis kann zu Fehlinterpretationen führen.

Auch konnte das Auftreten von Extrabanden beobachtet werden (s. Punkt 3.3.3). Neben dem Einsatz einer nicht optimalen Template-Konzentration im Reaktionsansatz können diese Extrabanden auch auf eine zu hohen Anzahl von PCR-Zyklen zurückzuführen sein (Kloosterman *et al.*, 1993; Cosso *et al.*, 1995).

Die in der Literatur beschriebenen Zwischenallele, die aufgrund von Variationen innerhalb der Sequenzen entstehen und eine anodale oder kathodale Verschiebung der Allele verursachen, konnten in dieser Arbeit nicht detektiert werden (Duncan *et al.*, 1997).

4.4 Statistische Datenauswertung

4.4.1 STR-System HUMTH01

Der jeweilige Anteil verschiedener Allele in einer Populationsstichprobe wird als relative Häufigkeit (Genfrequenz) angegeben. Die Frequenzangabe eines Allels bildet die Grundlage der biostatistischen Berechnung der Wahrscheinlichkeit für die Täterschaft eines Beschuldigten. Als Richtlinie wird für jedes rechtsmedizinische Institut ein Stichprobenumfang von 200 nicht-verwandten Personen als Populationsstudien empfohlen. Im Vergleich mit umfangreicheren Populationsstichproben in Deutschland wurde bei den Untersuchungen dieser Arbeit eine nahezu übereinstimmende Anordnung der Allele nach Häufigkeit festgestellt.

Am häufigsten wurde jeweils das Allel 9.3 nachgewiesen. Die relative Häufigkeit betrug 27 % bei 183 nicht-verwandten Personen in Süddeutschland (Günther *et al.*, 1996) und 36 % bei 232 nicht-verwandten Personen in Norddeutschland (Minnasch *et al.*, 1998). Im Rahmen der verhältnismäßig kleinen Stichprobe dieser Arbeit wurde das Allel 9.3 mit 33 % nachgewiesen.

Es folgten mit abnehmender Häufigkeit die Allele 6 und 9. Diese wurden in der süddeutschen Populationsstichprobe zu 23 % bzw. 9 % beobachtet und in der norddeutschen zu 20 % bzw. 15 %. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Allelfrequenz von 27 % bzw. 15 % ermittelt. Es folgten in der Rangfolge die Allele 7 und 8. Die Allele 10 und 5 wurden nur in der süddeutschen Untersuchung detektiert, jedoch nicht in der norddeutschen oder im Rahmen dieser Arbeit. Die Häufigkeitsverteilung macht deutlich, daß hinsichtlich des Auftretens bestimmter Allele ein Nord-Südgefälle zu beobachten ist.

Die populationsgenetischen Untersuchungen im außereuropäischen Raum zeigen, daß teilweise große Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens einzelner Allele zwischen Europiden, Negriden und Mongoliden bestehen (Van Oorschot, 1994; Budowle *et al.*, 1997). Dies konnte auch bei der Aufklärung einer Todesermittlungssache an diesem Institut beobachtet werden. Die DNA-Analyse des Spurenmaterials offenbarte ein Allel, das typisch ist für die Gruppe der Bantus in Afrika. In den deutschen Populationsuntersuchungen wird es aufgrund des äußerst seltenen Auftretens jedoch nicht berücksichtigt. In diesem Falle konnte eine statistische Auswertung aufgrund fehlenden Datenmaterials nicht durchgeführt werden.

Wie die obigen Ausführungen zeigen, können durch den Einsatz überregionaler Datenbanken Fehler in der Abschätzung der Aussagekraft auftreten. Im Gerichtsverfahren wird dadurch möglicherweise eine Person zu Unrecht entlastet oder belastet.

Anhand der für diese Stichprobe ermittelten Daten wurden verschiedene Kriterien hinsichtlich der Einsetzbarkeit des HUMTH01-Systems für die Routine diskutiert.

Eine hohe Heterozygotenrate bedeutet eine intensive Durchmischung unterschiedlicher Allele. Die Aussagekraft eines PCR-Systems wird dadurch erhöht, daß mehrere Variationen zur Differenzierung von Individuen zur Verfügung stehen. In dem HUMTH01-System konnte in dieser Arbeit eine Heterozygotenrate von 72 % beobachtet werden. Dieser Wert deckt sich mit der norddeutschen Untersuchung, die 232 Personen umfaßte. Die in Süddeutschland durchgeführte Populationsuntersuchung mit 183 Probanden ergab eine wesentlich höhere Heterozygotenrate (83 %).

Die Unterscheidungsmöglichkeit von Personen wird durch den Diskriminationsindex angegeben. Je höher der DI-Wert, desto besser sind zwei Personen voneinander unterscheidbar. Der in dieser Arbeit berechnete Index betrug 0,92 und deckte sich mit vergleichbaren Populationsstudien (Haas *et al.*, 1996). In umfangreicheren Populationsstudien wurden niedrigere (norddeutsche Stichprobe) oder gleiche (süddeutsche Stichprobe) Werte ermittelt.

Zusammenfassend kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß repräsentative und für die Praxis einsetzbare Ergebnisse für dieses System auch mit wesentlich kleineren Stichproben erzielt werden können.

4.4.2 AmpFLP D1S80

Für dieses PCR-System wurde im Vergleich der ermittelten Ergebnisse dieser Studie mit anderen Populationsuntersuchungen eine abweichende Allelanordnung und -verteilung beobachtet.

Das Allel 24 wurde in der vorliegenden Untersuchung sowie bei den anderen Statistiken am häufigsten ermittelt. Bei der Auswertung von 218 nicht-verwandten Personen in Nordrhein-Westfalen wurde es zu 37 % (Skowatsch *et al.*, 1992) und in Norddeutschland unter 232 nicht-verwandten Personen zu 36 % (Minnasch *et al.*, 1998) nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine relative Häufigkeit von 44 % ermittelt.

In der Reihenfolge der Frequenzen folgte das Allel 18 zu 25 % (Skowatsch), zu 23 % (Norddeutschland) und 16 % im Rahmen dieser Untersuchung. Allel 28 wurde zu 7 % (Norddeutschland) und zu 8 % in dieser Arbeit beobachtet. In der nordrhein-westfälischen Untersuchung schloß sich Allel 31 zu 5 % an.

Ein Kriterium für den Einsatz eines PCR-Systems in der forensischen Spurenanalyse ist eine möglichst gleichmäßige Verteilung der bei einer populationsgenetischen Untersuchung beobachteten DNA-Fragmente auf alle bekannten Allele dieses Systems. Die Aussagekraft dieses System wird dadurch erhöht.

In der vorliegenden Arbeit konnten von 29 möglichen Allelen neben den 3 erwähnten noch 12 weitere mit einer geringen Häufigkeit nachgewiesen werden. Trotz des ausgeprägten Polymorphismus wurden am häufigsten die Allelkonstellationen 24/24 (11 Personen) und 18/24 (9 Proben) detektiert. Diese Beobachtung stimmt mit den anderen Statistiken überein. Entsprechend niedrig fiel die Heterozygotenrate mit 0,7 aus (0,84 und 0,81 bei den anderen Untersuchungen). Der Diskriminationsindex wurde mit 0,93 ermittelt und ist identisch mit der norddeutschen Studie. Die Übereinstimmungswahrscheinlichkeit bei beiden Untersuchungen betrug 0,07.

Bei der DNA-Analyse unter Einsatz dieses Systems ist daher die Wahrscheinlichkeit höher, daß zufällig identische Allelkonstellationen nachgewiesen werden. Für eine gerichtsverwertbare Bestimmung müssen in solchen Fällen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Liegt Untersuchungsmaterial mit geringem DNA-Gehalt und begrenzter Ausgangsmenge (z. B. Urinanhaftungen an Kleidungsstücken des Opfers) vor, ist der Einsatz anderer PCR-Systeme diesem in jedem Fall vorzuziehen.

Die Ergebnisse, die für den Genort D1S80 ermittelt wurden, lassen die Schlußfolgerung zu, daß dieses PCR-System für die DNA-Analyse von Spurenmaterial nur bedingt einsetzbar ist.

4.5 DNA-Typisierung der Blutchimären

Die DNA-Analyse der Blutproben der Drillinge mit Blutchimärismus ergab mit beiden eingesetzten PCR-Systeme (HUMvWFA31 und HUMAMELX/Y) ein "Pseudo-Mischbild".

Die typisch männlichen X-Y-Merkmale im Geschlechtsbestimmungssystem wurden auch bei dem weiblichen Drilling nachgewiesen. Die beiden Banden lagen in etwa der gleichen Intensität vor. Schlußfolgernd wäre ein weiblicher Straftäter bei der Aufklärung eines Straftatbestandes irrtümlicherweise ausgeschlossen worden.

Nach ihrer Entstehungsform können zwei Gruppen von Blutchimärismus unterschieden werden. Die hier vorgestellte Form gehört zu dem spontanen, der durch Gefäßanastomosen der Plazenten und anschließender Transfusion von Blutstammzellen entsteht. Die variablen

Blutzellanteile führen bei einer DNA-Analyse zu einer unterschiedlich intensiven Vervielfältigung der Allele. Dies zeigt sich besonders in dem HUMvWFA31-System. Hier ergab sich für die Drillinge ein Muster aus drei unterschiedlich intensiv vervielfältigten Allel-Abschnitten (Abb. 25). Anhand der Bandenkonstellationen der Blutuntersuchung zeigte sich im Vergleich mit der Urin-/Speichelanalyse, daß das Merkmal, das der weibliche Drilling von den beiden Zwillingsbrüdern empfangen hatte, häufiger (stärker) amplifiziert wurde. Im Unterschied dazu ließ sich das Allel, das die Brüder von der Schwester erhalten hatten nur sehr schwach darstellen. Vermutlich beeinflußt nicht nur die Länge der Transfusionszeit, sondern auch die Zahl der Spender (Zwillings-Geschwister) die Menge der Stammzellen, die auf den Empfänger übertragen werden (Hosoi, 1977; Hansen *et al.*, 1978; 1984 und 1993). Der spontane Blutchimärismus bleibt lebenslang in einem Individuum etabliert. Im Gegensatz dazu sind der künstliche, der nach einer Bluttransfusion sowie der Blutchimärismus, der nach einer allogenen (griech. = fremd) Knochenmarktransplantation entsteht, nur vorübergehend nachzuweisen (Tippet, 1983; Farber *et al.*, 1989; Gill, 1977).

Bei der Beurteilung einer "Pseudo-Mischspur" wäre deshalb irrtümlich von der Beteiligung mehrerer Personen als Spurenverursacher ausgegangen worden. Um diese Fehlerquelle bei der Interpretation von Mischspuren zu vermeiden, sollte zum einen das Auftreten dieser genetischen Besonderheit bei der DNA-Analyse berücksichtigt werden und zum anderen bevorzugt Urin- bzw. Speichelproben untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Die Körperflüssigkeiten Urin und Blut sind häufig Grundlage DNA-analytischer Methoden in der Rechtsmedizin. Der aus Urin naturgemäß nur geringe extrahierbare DNA-Gehalt kann langfristig durch nicht optimale Lagerungs- und Extraktionsbedingungen so stark abnehmen, daß eine eindeutige Zuordnung der Probe zu einer Person nicht mehr möglich ist. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, Asservierungsbedingungen für Urinproben zu ermitteln, die die DNA langfristig stabilisieren und gleichzeitig eine Analyse nicht stören.

Werden in der Urinprobe eines weiblichen Spenders Spermien gefunden, so liegen kernhaltige Zellen von zwei verschiedenen Personen vor - eine sogenannte Mischspur. Bei Vorliegen unterschiedlicher Zelltypen ist eine getrennte DNA-Analyse durch differenzierende Zellyse möglich. Erschwert wird eine Zuordnung durch Vorliegen von Probenmaterial, das sich aus kernhaltigen Zellen eines Typs - z. B. Blut - verschiedener Individuen zusammensetzt. Problematisch wird die Interpretation, wenn das Blut einer Person aufgrund einer genetischen Besonderheit irrtümlich als Mischspur interpretiert werden könnte.

In dieser Arbeit wurden deshalb die rechtsmedizinischen Konsequenzen eines sogenannten Blutchimärismus diskutiert.

Für die Bestimmung der extrahierbaren DNA-Gesamtmenge wurde die DNA aus frischen Urinproben von 50 nicht-verwandten Probanden aus Schleswig-Holstein (je 25 männliche und 25 weibliche) mit zwei unterschiedlichen Extraktionsmethoden (Chelex- und Phenol-Chloroform-Methode) isoliert. Es zeigte sich, daß in der Regel eine höhere DNA-Menge aus dem Urin weiblicher Probanden extrahiert werden konnte. In Parallelversuchen mit beiden Extraktionsmethoden wurde eine höhere DNA-Ausbeute mit der Chelex-Methode erzielt.

Für die Ermittlung der optimalen Lagerungsbedingungen wurden Urinproben entweder ohne Zusatz oder unter Zugabe der Chelatbildner Natriumcitrat oder EDTA für 14 Tage bei unterschiedlichen Temperaturen (Raumtemperatur, +4 °C und -20 °C) inkubiert.

Es zeigte sich, daß die extrahierten DNA-Gesamtmengen unabhängig von der Temperatur am niedrigsten in Urinproben ohne Zusatz waren und am höchsten in den Proben, die mit EDTA versetzt worden waren. Der Vergleich der Lagerungstemperaturen ergab, daß bei -20 °C und Zusatz von EDTA in der Regel die höchste DNA-Gesamtmenge extrahiert werden konnte.

Die Amplifizierbarkeit der nach der Chelex-Methode isolierten DNA wurde mit Primern zweier verschiedener PCR-Systeme (HUMTH01 und AmpFLP D1S80) überprüft. Generell konnte die DNA aus den Urinproben, die mit EDTA versetzt worden waren, am erfolgreichsten

amplifiziert werden. Der Vergleich der beiden PCR-Systeme zeigte, daß sich HUMTH01 aufgrund der kürzeren Amplifikate leichter vervielfältigen ließ als D1S80.

Die ermittelten Allelfrequenzen der PCR-Systeme wurden auf Einsetzbarkeit für die biostatistische Wahrscheinlichkeitsberechnung überprüft. Diese Berechnung drückt aus, mit welcher Wahrscheinlichkeit ein im Rahmen eines Straftatbestandes gesichertes Beweisstück einem Beschuldigten zuzuordnen ist. Dazu wurden verschiedene Kriterien (Hardy-Weinberg-Gesetz) überprüft und die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse mit anderen, umfangreicheren Stichproben verglichen. Es konnte gezeigt werden, daß sich die Populationsstichprobe für die untersuchten Merkmale in einem populationsgenetischen Gleichgewicht befindet und für die biostatistischen Berechnungen eingesetzt werden darf.

Am Beispiel der DNA-Analyse von Blutchimären wird auf eine "Fallgrube" bei der forensischen Interpretation von Spuren hingewiesen. Die Analyse von Blutproben von Drillingen mit Blutchimärismus (zwei Brüder, eine Schwester) führte zu irreführenden Ergebnissen. Aufgrund von zwei genetisch unterschiedlichen Blutzellpopulationen, die in einem Individuum nachweisbar waren, ergaben die DNA-Typisierungen eine "Pseudo-Mischspur". Als Konsequenz mußte der weibliche Drilling als männlich interpretiert werden, da im Geschlechtsbestimmungssystem männliche Erbmerkmale detektiert wurden. Die DNA-Analyse von Speichel- bzw. Urinproben dagegen ergab eindeutige individuelle Ergebnisse der Drillinge, so daß diesen Untersuchungsmaterialien für eine eindeutige Typisierung der Vorzug zu geben ist.

6. Literatur

Akane A., Seki S., Shiono H., Nakamura H., Hasegawa M., Kagawa M., Matsubara K., Nakahori Y., Nagafuchi S., Nakagome Y.: Sex determination of forensic samples by dual PCR amplification of an X-Y homologous gene. *Forensic Sci Int* 52 (1992):143-148.

Akane A., Matsubara K., Nakamura H., Takahashi S., Kimura K.: Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci* 39 (1994): 362-72.

Allen R.C., Graves G., Budowle B.: Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *BioTechniques* 7 (1989): 736-744.

Bassam B.J., Caetano-Anolles G., Gresshoff P.M. : Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 196 (1991): 80-83.

Baechtel S., Smerick J.B., Presley K.W., Budowle B.: Multigenerational amplification of a reference ladder for alleles at locus D1S80. *J Forensic Sci* 38 (1993):1176-1182.

Beckmann J.S., Weber J.L.: Survey of human and rat microsatellites. *Genomics* 12 (1992): 627-631.

Boerwinkel W., Fourest E., Chan L.: Rapid typing of tandemly repeated hypervariable loci by the polymerase chain reaction: application to the apolipoprotein B`3 hypervariable region. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 (1989): 212-216.

Bomjen G., Raina A., Sulaiman I.M., Hasnain S.E., Dogra T.D.: Effect of storage of blood samples on DNA yield, quality and fingerprinting: a forensic approach. *Indian J Exp Biol* 34 (1996) 384-386.

Booth P.B., Plaut G., James J.D., Ikin E.W., Moores P., Sanger R., Race R.R.: Blood chimerism in a pair of twins. *Brit Med J* (1957): 1456-1458.

Brinkmann B., Rand St., Bajanowski T.: Forensic identification of urine samples. *Int J Legal Med* 105 (1992): 59-61.

Brinkmann B.: The use of STR`s in stain analysis. P Int Sym Hum Ident 3 (1993): 357-365.

Brinkmann B., Wiegand P.: DNA-Analysen. Kriminalistik 3 (1993): 191-195.

Brutlag D.L.: Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA. Annu Rev Genet 14 (1980): 121-144

Budowle B., Chakraborty R., Giusti A.M., Eisenberg A.J., Allen R.C.: Analysis of the VNTR locus D1S80 by the PCR followed by high-resolution PAGE. Am J Hum Genet 48 (1991): 137-144.

Budowle B., Baechtel F.S., Smerick J.B., Presley K.W., Giusti A. M., Parsons G., Alevy M.C., Chakraborty R.: D1S80 Population data in african americans, caucasians, southeastern hispanics, southwestern hispanics and orientals. J Forensic Sci 40 (1995): 38-44.

Budowle B., Smerick J. B., Keys K.M., Moretti T.R.: United States population data on the multiplex short tandem repeat loci - HUMTH01, TPOX, and CSF1PO - and the variable number tandem repeat locus D1S80. J Forensic Sci 42 (1997): 846-849.

Buselmaier W., Tariverdian G.: Humangenetik. Springer Verlag: Berlin (1999).

Chase M.G.: ABO typing studies on liquid urines. J Forensic Sci 31 (1986):881-885.

Cosso S., Reynolds R.: Validation of the AmpFLP D1S80 PCR amplification kit for forensic casework analysis according to TWGDAM guidelines. J Forensic Sci 40 (1995): 424-434.

Del Rio S.A., Marino M.A., Belgrader P.: PCR-based human leukocyte antigen (HLA) DQ α typing of blood stained light and dark blue denim fabric. J Forensic Sci 41 (1996): 490-492.

Duncan G.T., Balamurugan K., Budowle B., Smerick J., Tracey M.L.: Microvariation at the human D1S80 locus. Int J Legal Med 110 (1997): 150-154.

Dunsford I., Bowley C.C., Hutchinson A.A., Thompson J.S., Sanger R., Race R.R.: A human blood-group chimera. Brit Med J (1953): 81.

Dunsford I., Stacey S.M.: Partial breakdown of acquired tolerance to the A antigen. *Vox Sang* 2 (1957): 414-417.

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

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

Evetts I.W., Gill P.D., Scrannage J.K., Weir B.S.: Establishing the robustness of short-tandem-repeat statistics for forensic applications. *Am J Hum Genet* 58 (1996): 398-407.

Farber C.M., DeBock G., Verhest A., Simon P., Verschraegen-Spae M., Vassat G.: Demonstration of spontaneous XX/XY chimerism by DNA fingerprinting. *Hum Genet* 82: (1989):1997-1998.

Fattorini P., Caccio S., Gustincih S., Florian F., Altamura B., Graziosi G.: Sex identification by polymerase chain reaction of Y-DNA -satellite in aged tissue samples. *Electrophoresis* 14 (1993): 23-26.

Futuyma D.J.: *Evolutionsbiologie*. Birkhäuser: Basel (1990).

Gaensslen R.E., Berka K.M., Grosso D.A., Ruano G., Pagliaro E.M., Messina D., Lee H.C.: A polymerase chain reaction (PCR) method for sex and species determination with novel controls for deoxyribonucleic acid (DNA) template length. *J Forensic Sci* 37 (1992): 6-20.

Gasparini P., Savoia A., Pignatti P.F.: Amplification of DNA from epithelial cells in urine. *New Engl J Med* 320 (1989): 809.

Gill T.J.: Chimerism in humans. *Transplant P* 9 (1977):1423-1431.

Gill P.: A new method for sex determination of the donor of forensic samples using a recombinant DNA probe. *Electrophoresis* 8 (1987): 35-38.

Günther St., Patzelt D.: Population data for the STR systems HUMTH01, HUMvWA and FES/FPS in a population sample from lower Franconia. *Int J Legal Med* 109 (1996):102-103.

Gustafson S., Proper J.A., Bowie E.J.W., Sommer St.S.: Parameters affecting the Yield of DNA from human blood. *Anal Biochem* 165 (1987): 294-299.

Gyllenstein U.B., Josefsson A., Schemschat K., Saldeen T., Petterson U.: DNA typing of forensic material with mixed genotypes using allele-specific enzymatic amplification (Polymerase Chain Reaction). *Forensic Sci Int* 52 (1992): 149-160.

Haas H., Budowle B., Weiler G.: Horizontal polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *Electrophoresis* 15 (1994): 153-158.

Haas H., Weiler G.: Entwicklung eines Quadruplex-PCR-Systems mit den Loci HUMFES, HUMTH01, HUMVWFA31 und HUMAMELX/Y zur Detektion der Amplifikate nach Polyacrylamidgelelektrophorese mittels Silberfärbung. *Rechtsmedizin* 6 (1996):114-119.

Hansen H.E., Eriksen B., Niebuhr E., Dabelsteen E.: Serologic markers and chromosome variants in a pair of chimeric twins. *Hum Heredity* 28 (1978): 411-420.

Hansen H.E., Niebuhr E., Lomas C.: Chimeric twins. *Hum Heredity* 34 (1984): 127-130.

Hansen E.H., Sondervang A.: DNA profiles of chimeric twins, TS and MR using the single-locus-probe technique. *Hum Hereditiy* 43 (1993): 98-102.

Hammond H.A., Jin L., Zhong Y., Caskey C. T., Chakraborty R.: Evaluation of 13 short tandem repeat loci for use in personal identification applications. *Am J Hum Genet* 55 (1994): 175-189.

Hochmeister M.N.: Molecular aspects of medicine. Elsevier Science Ltd.:Oxford GB (1995).

Horn G.T., Richards B., Klinger K.W.: Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 17 (1989): 2140.

Hosoi T., Yahara S., Kunitomo K., Saji J., Ohtsuki Y.: Blood chimeric Twins. *Vox Sang.* 32 (1977): 339-341.

International Society for Forensic Haemogenetics. DNA recommendations-1992 report concerning recommendations of the DNA commission of the International Society for

Forensic Haemogenetics relating to the use of PCR-based polymorphisms. *Int J Legal Med* 105 (1992):63-64.

Jarmann A.P., Nicholls R.D., Weatherall D.J., Clegg J.B., Hicks D.R.: Molecular characterization of a hypervariable region downstream of the human alpha-globin gene complex. *EMBO J* 5 (1986): 1857-1863.

Jeffreys A.J., Wilson V., Thein S.L.: Hypervariable minisatellite regions in human DNA. *Nature* 314 (1985a): 67-73.

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

Jobling M.A., Pandya A., Tyler-Smith C.: The Y-chromosome in forensic analysis and paternity testing. *Int J Legal Med* 110 (1997): 118-124.

Jung J.M., Comey C.T., Baer D.B., Budowle B.: Extraction strategy for obtaining DNA from bloodstains for PCR amplification and typing of the HLA-DQ β gene. *Int J Legal Med* 104 (1991): 145-148.

Karcher G.: *Kurzlehrbuch der Urologie*. Schattauer Verlag: Stuttgart/New York (1982).

Kasai K., Nakamura Y., White R.: Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) Locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *J Forensic Sci* 35 (1990): 1196-1200.

Kayser M., Caglia D., Fretwell N., Gehring C., Graziosi G. et al.: Evaluation of Y-chromosomal STR`s: a multicenter study. *Int J Legal Med* 110 (1997): 125-133.

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

Kloostermann D., Budowle B., Daselaar P.: PCR-amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus. *Int J Legal Med* 105 (1993): 257-264.

Knußmann R.: *Vergleichende Biologie des Menschen*. Gustav Fischer Verlag: Stuttgart (1996).

Lahiri D.K., Schnabel B.: DNA isolation by a rapid method from human blood samples: effects of MgCl₂, EDTA, Storage Time, and Temperature on DNA Yield and Quality. *Biochem Genet* 31 (1993): 321-328.

Lorente J.A., Lorente M., Budowle B., Wilson M.R., Villanueva E.: Analysis of short tandem repeat (STR) HUMvWA in the spanish population. *Forensic Sci Int* 65 (1994): 169-175.

Lassen C., Hummel S., Herrmann B.: Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and mummified soft tissue. *Int J Legal Med* 107 (1994): 152-155.

Linfert D. R., Wu A.H.B., Tsongalis G.J.: The effect of pathologic substances and adulterants on the DNA typing of urine. *J Forensic Sci* 43 (1998): 1041-1045.

Ling M.G., Hibbin J., Arthur C., Apperley A., Keffreys A., Goldman J.: Use of minisatellite DNA probes for recognition and characterization of relapse after allogenic bone marrow transplantation. *Brit J Haematol* 68 (1988): 195-201.

Litt M., Luty J.A.: A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44 (1989): 397-401.

Lygo J.E., Johnson P.E., Holdaway D.J. Woodroffe S., Whitaker J.P., Clyton T.M., Kimpton C.P., Gill P.: The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. *Int J Legal Med* 107 (1994): 77-89.

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

Medintz I., Chiriboga L., McCurdy L., Kobilinsky L.: Restriction fragment length polymorphism and polymerase chain reaction-HLA DQ α analysis of casework urine specimens. *J Forensic Sci* 39 (1994): 1372-1380.

Milde A., Haas-Rochholz H., Kaatsch H.-J.: Improved DNA typing of human urine by adding EDTA. *Int J Legal Med* 112 (1999): 209-210.

Milde A., Kühl-Burmeister R., Ritz-Timme St., Kaatsch H.-J.: DNA-typing in cases of blood chimerism. *Int J Legal Med* 112 (1999): 333-335.

Mills P.R., Chase M.G.: The detection of group specific component from urine samples. *Forensic Sci Int* 43 (1989):215-221.

Minnasch P., Meißner Ch., von Wurmb N., Gerling I., Oehmichen M.: Fortschritte in der forensischen Spurenanalytik durch Einsatz moderner molekulargenetischer Verfahren: Populationsdaten dreier ausgesuchter Genorte. *Focus Mul* 15 (1998): 15-19.

Möller A., Brinkmann B.: Locus ACTBP2 (SE33). *Int J Legal Med* 106 (1994): 262-267.

Mullis K.B., Faloona F.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Method Enzymol* 155 (1987): 335-350.

Nakahori Y., Hamano K., Iwaya M., Nakagome Y.: Sex identification by polymerase chain reaction using X-Y homologous primer. *Am J Med Genet* 39 (1991): 472-473.

Nakamura Y., Carlson M., Krapcho K., White R.: Isolation and mapping of a polymorphic DNA sequence (pMCT118) on chromosome 1p (D1S80). *Nucleic Acids Res* 16 (1988): 9364.

Oorschot van R.A.H., Gutowski St.J., Robinson S.L.: HUMTH01: Amplification, species specificity, population genetics and forensic applications. *Int J Legal Med* 107 (1994): 121-126.

Pfeiffer H., Hühne J., Seitz B., Brinkmann B.: Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int J Legal Med* 112(1999):192-144.

Pfizinger H., Ludes B., Mangin P.: Sex determination of forensic samples: co-amplification and simultaneous detection of a Y-specific and an X-specific DNA sequence. *Int J Legal Med* 105 (1993): 213-216.

Pötsch L., Prager-Eberle M., Penzes L., Schneider P.M., Rittner Ch.: Zum Identitätsnachweis an Urinproben mit PCR. *Rechtsmedizin* 3 (1992): 128-133.

Polymeropoulos M., Xiao H., Rath D.S., Merrill C.R.: Tetranucleotide repeat polymorphism at the human tyrosine hydroxylase gene (TH01). *Nucleic Acids Res* 19 (1991): 3753.

Prescott L.F.: Effects of acetylsalicylic acid, phenacetin, paracetamol and coffee on renal tubular epithelium. *Lancet* ii (1965): 91-96.

Prescott L.F.: The normal urinary excretion rates of renal tubular cells, leucocytes and red blood cells. *Clin Sci* 31(1966): 425-435.

Prinz M., Grellner W., Schmitt C.: DNA typing of urine samples following several years of storage. *Int J Legal Med* 106 (1993): 75-79.

Puers C., Hammond H.A., Jin L., Caskey C.T., Schumm J. W.: Identification of repeat sequence heterogeneity at the polymorphic short tandem repeat locus HUMTH01 (AATG)_n and reassignment of alleles in population analysis by using a locus-specific allelic ladder. *Am J Hum Genet* 53 (1993): 593-958.

Rand St., Puers C., Skowasch K., Wiegand P., Budowle B., Brinkmann B.: Population genetics and forensic efficiency data of 4 AmpFLPs. *Int J Legal Med.* 104 (1992): 329-333.

Rathert P., Roth St.: *Urinzytologie.* Springer Verlag: Berlin (1991).

Roewer L., Nürnberg P., Fuhrman E., Rose M., Prokop O., Epplen J.T.: Stain analysis using oligo nucleotide probes specific for simple repetitive DNA Sequences. *Forensic Sci Int* 47 (1990): 59-70.

Roewer L., Arnemann J., Spurr N.K., Grzeschik K.-H., Epplen T.J.: Simple repeat sequences on the human Y- chromosome are equally polymorphic as their autosomal counterparts. *Hum Genet* 89 (1992): 389-394.

Romeis: *Mikroskopische Technik* Urban & Schwarzenberg: München (1989).

Roy R.: Concentration of urine samples by three different procedures: ABO typing from concentrated urine samples. *J Forensic Sci* 35 (1990):1133-1137.

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

Sajantila A., Budowle B., Ström M., Johnsson V., Lukka M., Peltonen L., Ehnholm C.: PCR amplification of alleles at the D1S80 locus: comparison of a Finnish and a North American Caucasian population sample, and forensic casework evaluation. *Am J Hum Genet* 50 (1992): 816-825.

Sajantila A., Pacek P., Lukka M., Syvänen A.-C., Nokelainen P., Sistonen P., Peltonen L., Budowle B.: A microsatellite polymorphism in the von Willebrand factor gene: comparison of allele frequencies in different population samples and evaluation for forensic medicine. *Forensic Sci Int* 68 (1994): 91-102.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T.: *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press: New York (1989).

Santos F.R., Gerelaikhan T., Munkhtuja B., Oyunsuren T., Epplen J.T., Pena S.D.J.: Geographic differences in the allele frequencies of the human Y-linked tetranucleotide polymorphism DYS 19. *Hum Genet* 97 (1996): 309-313.

Sarre H.: *Nierenkrankheiten*. Thieme Verlag: Stuttgart (1976).

Schlegel H.G.: *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme Verlag: Stuttgart (1985).

Scott J.T., Denman A.M., Dorling J.: Renal irritation caused by salicylates. *Lancet* i, (1963): 344-348.

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

Skowatsch K., Wiegand P., Brinkmann B.: pMCT 118 (D1S80): A new allelic ladder and an improved electrophoretic separation lead to the demonstration of 28 alleles. *Int J Legal Med* 105 (1992): 165-168.

Southern E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98 (1975): 503.

Sweet D., Lorente M., Valenzuela A., Lorente J.A., Alvarez J.C.: Increasing DNA extraction yield from saliva stains with a modified Chelex method. *Forensic Sci Int* 83 (1996): 167-177.

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

Tippet P.: Blood group chimeras. *Vox Sang* 44 (1983): 333-359.

Tsongalis G.J., Anamani D.E., Wu A.H.B.: Identification of urine specimen donors by the PM and DQA1 amplification and typing kit. *J Forensic Sci* 41 (1996): 1031-1034.

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

Vandenberg N., v. Oorschot R.A.H., Mitchell R.J.: An evaluation of selected DNA extraction strategies for short tandem repeat typing. *Electrophoresis* 18 (1997): 1624-1626.

Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R.: Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10 (1991): 506-509.

Walsh P.S., Varlaro J., Reynolds R.: A rapid chemiluminescent method for quantitation of human DNA. *Nucleic Acids Res* 20 (1992):5061-5065.

Walsh P.S., Fildes N., Reynolds R.: Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res* 24 (1996): 2807-2812.

Waye J.S., Willard H.F.: Structure, organisation and sequence of alpha satellite DNA from human chromosome 17: evidence for evolution by unequal crossing-over and an ancestral pentamer repeat shared with the human x chromosome. *Mol Cell Biol* (1986):3156-3165.

Waye J.S., Presley L.A., Budowle B., Shutler G.G., Fourney R.: A simple and sensitive method for quantifying human genomic DNA in forensic specimen extracts. *BioTechniques* 7 (1989): 852-855.

Waye J.S., Michaud D., Bowen J.H., Fourney R.M.: Sensitive and specific quantification of human genomic deoxyribonucleic acid (DNA) in forensic science specimens: casework examples. *J Forensic Sci* 36 (1991): 1198-1203.

Weber J.L., May P.E.: Abundant class of human polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44 (1989): 388-396.

Weir B.S: Independence of VNTR alleles defined as fixed bins. *Genetics* 130 (1992): 873-887.

Wiegand P., Kleiber M.: DNA typing of epithelial cells after strangulation. *Int J Legal Med* 110 (1997): 181-183.

Wiegand P., Heide S., Stiller D., Kleiber M.: DNA-Untersuchung von Hautepithelzellen asserviert am Rollkragenpullover und am Hals des Opfers. *Rechtsmedizin* 8 (1998): 226-228.

Willard H.F.: Chromosome-specific organization of human alpha satellite DNA. *Am J Hum Genet* 37 (1985): 524-532.

Wricke G.: Populationsgenetik. Walter de Gruyter: Berlin (1972).

7. Anhang

Tabelle 7.1: Tagesverlauf der DNA-Gesamtmenge aus 1 ml frischen Urin, isoliert mit 2 verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden (Chelex. = E.1, Phenol. = E.2).

Klassenintervall [ng/ml]	Morgens, E.1 a_k	Morgens, E.2 a_k	Mittags, E.1 a_k	Mittags, E.2 a_k	Abends, E.1 a_k	Abends, E.2 a_k
n. n. - 30	17 (24)	18 (24)	13 (22)	16 (25)	15 (22)	21 (21)
31 - 60	6 (1)	7 (1)	5 (2)	5 (-)	5 (1)	4 (3)
61 - 90	- (-)	- (-)	1 (1)	1 (-)	- (-)	- (-)
91 - 120	2 (-)	- (-)	3 (-)	1 (-)	3 (2)	- (-)
121 - 150	- (-)	- (-)	- (-)	1 (-)	- (-)	- (-)
151 - 180	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
181 - 210	- (-)	- (-)	3 (-)	- (-)	2 (-)	- (-)
>210	- (-)	- (-)	- (-)	1 (-)	- (-)	- (-)

() = männliche Probanden, ausserhalb der Klammer = weibliche Probanden

n. n. = nicht nachweisbar, a_k = Anzahl der Probanden, deren DNA-Gesamtmenge in dem Klassenintervall liegen

Tabelle 7.2: Detektierte DNA-Menge [ng/ml] aus Urin, 14 Tage bei Raumtemperatur gelagert, mit und ohne Zusatz von Natriumcitrat (40 mmol Endkonzentration) bzw. EDTA (40 mmol Endkonzentration). DNA wurde mit 2 Extraktionsmethoden isoliert (Chelex. = E.1, Phenol. = E.2).

Klassenintervall [ng/ml]	o. Zusatz, E.1 a_k	o. Zusatz, E.2 a_k	Citrat, E.1 a_k	Citrat, E.2 a_k	EDTA, E.1 a_k	EDTA, E.2 a_k
n. n. - 30	25 (25)	25 (25)	25 (25)	25 (24)	19 (23)	19 (24)
31 - 60	- (-)	- (-)	- (-)	- (1)	6 (1)	5 (1)
61 - 90	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	1 (-)
91 - 120	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
121 - 150	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (1)	- (-)
151 - 180	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
181 - 210	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
> 211	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)

() = männliche Probanden, ausserhalb der Klammer = weibliche Probanden

n. n. = nicht nachweisbar, a_k = Anzahl der Probanden, deren DNA-Gesamtmenge in dem Klassenintervall liegen

Tabelle 7.3: Detektierte DNA-Menge [ng/ml] aus 1 ml Urin, 14 Tage bei +4 °C gelagert, mit und ohne Zusatz von Natriumcitrat (40 mmol Endkonzentration) bzw. EDTA (40 mmol Endkonzentration). DNA wurde mit 2 Extraktionsmethoden isoliert (Chelex. = E.1, Phenol. = E.2)

Klasseneinteilung [ng/ml]	o. Zusatz, E.1 a _k	o. Zusatz, E.2 a _k	Citrat, E.1 a _k	Citrat, E.2 a _k	EDTA, E.1 a _k	EDTA, E.2 a _k
n. n. - 30	24 (24)	25 (24)	20 (22)	22 (23)	19 (22)	19 (23)
31 - 60	1 (-)	- (-)	3 (1)	2 (1)	5 (1)	3 (1)
61 - 90	- (-)	- (-)	2 (1)	1 (-)	1 (1)	2 (1)
91 - 120	- (-)	- (1)	- (-)	- (1)	- (-)	1 (-)
121 - 150	- (1)	- (-)	- (1)	- (-)	- (1)	- (-)
151 - 180	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
181 - 210	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
> 211	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)

() = männliche Probanden, ausserhalb der Klammer = weibliche Probanden
n. n. = nicht nachweisbar, a_k = Anzahl der Probanden, deren DNA-Gesamtmenge in dem Klassenintervall liegen

Tabelle 7.4: Detektierte DNA-Mengen [ng/ml] aus 1 ml Urin, 14 Tage bei -20 °C gelagert, mit und ohne Zusatz von Natriumcitrat (40 mmol Endkonzentration) bzw EDTA (40 mmol Endkonzentration). DNA mit 2 Extraktionsmethoden isoliert (Chelex. = E.1, Phenol. = E.2)

Klassen-Intervall [ng/ml]	o. Zusatz, E.1 a _k	o. Zusatz, E.2 a _k	Citrat, E.1 a _k	Citrat, E.2 a _k	EDTA, E.1 a _k	EDTA, E.2 a _k
n. n. - 30	25 (24)	25 (25)	20 (23)	23 (23)	17 (22)	20 (23)
31 - 60	- (-)	- (-)	4 (1)	1 (1)	5 (1)	4 (1)
61 - 90	- (-)	- (-)	1 (-)	- (-)	3 (1)	- (-)
91 - 120	- (1)	- (1)	- (-)	1 (1)	- (-)	1 (1)
121 - 150	- (1)	- (-)	- (1)	- (-)	- (1)	- (-)
151 - 180	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
181 - 210	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)
> 211	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)	- (-)

() = männliche Probanden, ausserhalb der Klammer = weibliche Probanden
n. n. = nicht nachweisbar, a_k = Anzahl der Probanden, deren DNA-Gesamtmenge in dem Klassenintervall liegen

Tabelle 7.5: Informationen zu den untersuchten Genloci

Genort	Chromosomen-lokalisierung	Repeatsequenz	Größenbereich (bp)
D1S80	1	(GAGGACCACC AGGAG*)14-41**	430-814
HUMTH01	11	(TCAT)5-11**	179-202
HUMVWA	12	(ATCT)2** (GTCT)3-4** (ATCT)9-13**	135-167
HUMAMELY	Y	--	112
HUMAMELX	X	--	106

*häufiges Wiederholungsmotiv

** = Ziffern geben die Anzahl der Wiederholungen innerhalb eines Allels an

Tabelle 7.6: Allelverteilung des Locus HUMTH01. Die Spalte "Anzahl" gibt an, wie häufig dieses Allel bei den 50 untersuchten Personen auftrat. Die Frequenz ergibt sich aus der Anzahl dividiert durch 100 (50 Personen x 2 Allele)

Allele	Anzahl	Frequenz
5	1	0.01
6	27	0.27
7	12	0.12
8	12	0.12
9	15	0.15
9.3	33	0.33
10	0	0
11	0	0
Summe	100 (50 x 2)	1

Tabelle 7.7: Allelverteilung des Locus D1S80 Locus. Die Spalte "Anzahl" gibt an wie häufig dieses Allel bei den 50 untersuchten Personen auftrat. Die Frequenz ergibt sich aus der Anzahl dividiert durch 100 (50 Personen x 2 Allele).

Allele	Anzahl	Frequenz
14	0	0
15	0	0
16	0	0
17	0	0
18	16	0.16
19	0	0
20	2	0.02
21	3	0.03
22	4	0.04
23	4	0.04
24	44	0.44
25	1	0.01
26	1	0.01
27	2	0.02
28	8	0.08
29	5	0.05
31	7	0.07
32	1	0.01
36	1	0.01
37	1	0.01
38	0	0
39	0	0
40	0	0
41	0	0
Summe	100	1

7.8 Formeln der Datenanalyse

Beobachtete Genotyp- und Allelfrequenzen

Die Allelfrequenzen (p_i) werden nach folgender Formel berechnet :

$$p_i = \frac{2 \times oP_{i,i} + \sum oP_{i,j}}{2 \times N}$$

$oP_{i,i}$ = Anzahl der beobachteten Homozygoten

$oP_{i,j}$ = Anzahl der beobachteten heterozygoten Genotypen

N = Probenanzahl

Die erwarteten Genotypen werden wie folgt ermittelt:

$$eP_{i,j} = N \times p_i^2 \text{ bzw. } eP_{i,j} = N \times 2p_i p_j$$

$eP_{i,i}$ = erwartete homozygote Genotypen

$eP_{i,j}$ = erwartete heterozygote Genotypen

N = Probenanzahl

Berechnung des χ^2 -Wertes :

$$\chi^2 = \sum_{i,j=1}^k \frac{(oP_{i,j} - eP_{i,j})^2}{eP_{i,j}}$$

Die Absicherung des Ergebnisses erfolgt über Signifikanzgrenzen, die für Populationsstudien nach Weir (1992) zu 5% gewählt wurden. Diese geben das Ausmaß an, mit dem das Ergebnis als statistisch signifikant gelten kann und somit interpretierbar ist.

Hetero- und Homozygotenrate ($H_{i,j}$ bzw $H_{i,i}$)

$$oH = 1 - \sum_{i=1}^I p_i$$

Homozygotenrate

$$H_{i,j} = 1 - H_{i,j}$$

Die erwartete Heterozygotenrate wird nach der Formel von Edwards *et al.* (1992) berechnet:

$$eH = \frac{N}{N-1} \cdot \left[1 - \sum_{k=1}^K \left(\frac{n_k}{n} \right)^2 \right]$$

n = die beobachteten Allelhäufigkeiten von K -Allelen eines Locus

Diskriminationsindex (DI) und Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (P_m)

$$DI = 1 - \sum_{k=1}^K oP_k^2$$

oP_k = beobachtete Frequenz eines jeden Genotyps

$$P_m = \sum_{k=1}^m oP_k^2$$

P_k = Frequenz von jedem bestimmten Phänotyp

m = Anzahl der bestimmten Phänotypen

Tabelle 7.9: Übersicht der statistischen Datenauswertung der beiden Genorte

Beurteilungskriterium	HUMTH01	D1S80
Beobachtete Genotypen (${}_oP_{i,i}, {}_oP_{i,j}$)	15	25
Beobachtete Allele (${}_o p_i$)	6	15
Mögliche Genotypen	36	351
Mögliche Genotypen (%)	41.67 %	7.12 %
$\frac{2}{-}$	6.66	60.88
Beob. Heterozygotität (${}_o H_{i,j}$)	0.72	0.7
Beob. Homozygotität	0.28	0.3
Erw. Heterozygotität (${}_e H_{i,j}$)	0.78	0.77
Diskriminationsindex (DI)	0.92	0.93
Übereinstimmungswahrscheinlichkeit (P_m)	0.08	0.07
Test HWG	0.8633	0.3366

Abkürzungen

AmpFLP	Amplifizierbarer Fragmentlängenpolymorphismus
AP	Alkalische Phosphatase
BIS	N,N'-Methylen-Bis-Acrylamid
bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin (engl.:bovine serum albumin)
CHES	2-(Cyclohexylamino-)-ethansulfonsäure
%CPDA	Konzentration des Quervernetzers PDA, (w/v)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
GEDNAP	German DNA Profiling Group
h	Stunde (engl.: hour)
kb	Kilobasen
min	Minuten
mol	Molekulargewicht in Gramm in 1 Liter Lösung
ng	Nanogramm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	Piperazindiacrylamid
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
R.T.	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
STR	Kurze Wiederholungseinheiten (engl.: short tandem repeats)
%T	Totale Monomerkonzentration, (w/v)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

VNTR Variable Zahl von Wiederholungseinheiten (engl.: variable number of tandem repeats)

VWA STR-System, auch vWFA31 genannt