

**Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Dieter Patzelt**

**DNA-analytische Identifizierung
unter Verwendung von frischem und gelagertem Skelettmaterial**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Florian Goetz
aus Nandlstadt
Würzburg, Februar 2006**

Referent: Professor Dr. med. Dieter Patzelt

Koreferent: Professor Dr. med. Tiemo Grimm

Dekan: Professor Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2006

Der Promovend ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Molekularbiologische Grundlagen.....	3
1.1.1	DNA-Typisierung - der „genetische Fingerabdruck“.....	3
1.1.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	3
1.1.3	Variable number of tandem repeats (VNTR).....	4
1.1.3.1	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)	4
1.1.3.2	Short Tandem Repeats (STR).....	5
1.1.3.3	Very short STRs (vs-STR).....	5
1.1.4	Mitochondriale DNA (mtDNA).....	6
1.2	DNA-Analyse an Skelettmaterial.....	7
1.2.1	Aufbau und Eigenschaften von Knochengewebe.....	7
1.2.2	Lagerungsbedingungen und Knochendekomposition.....	9
1.2.3	Möglichkeiten der Liegezeitbestimmung an Knochenmaterial.	11
1.2.4	Vergleich der DNA-Analyse von Knochenmaterial gegenüber Weichgewebe bei längerer Leichenliegezeit.....	12
1.2.5	Historischer Abriss DNA-analytischer Untersuchungen an Knochenmaterial.....	13
1.3	Aufgabenstellung.....	15
2	Material und Methoden	16
2.1	Materialien.....	16
2.1.1	Instrumente und Reagenzien.....	16
2.1.2	Knochenproben und Lagerung.....	19
2.1.2.1	Knochenproben aus Sektionsgut.....	19
2.1.2.2	Knochenproben aus Skelett- bzw. Knochenfunden..	21

2.2	Methoden.....	22
2.2.1	Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung	22
2.2.2	Vorbereitung des Probenmaterials.....	23
2.2.3	Probenentnahme	23
2.2.4	DNA-Extraktion	24
2.2.5	DNA-Aufreinigung	26
2.2.6	Multiplex-STR mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit.....	26
2.2.7	vs-STR-Systeme.....	27
2.2.8	mtDNA	27
2.2.9	Durchführung der PCR.....	28
2.2.9.1	AmpFISTR Profiler Plus-Kit.....	28
2.2.9.2	vs-STR-Systeme	29
2.2.9.3	mtDNA	30
2.2.10	Gelelektrophorese.....	31
2.2.10.1	Niedrigauflösende horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE).....	31
2.2.10.2	Hochauflösende Kapillarelektrophorese.....	32
2.2.11	Sequenzierung der mtDNA Sequenz.....	33
3.	Ergebnisse	34
3.1	AmpFISTR Profiler Plus-Kit	34
3.1.1	Knochenproben aus Sektionsgut	34
3.1.2	Knochenproben aus Skelett- bzw. Knochenfunden.....	37
3.2	vs-STR-Systeme.....	38
3.2.1	Herstellung einer Allelleiter	38
3.2.2	Knochenproben aus Sektionsgut	38
3.2.3	Knochenproben aus Skelett- bzw. Knochenfunden.....	40
3.3	mtDNA.....	40

4.	Diskussion	42
4.1	Methoden.....	42
4.1.1	Probenbearbeitung.....	42
4.1.2	DNA-Extraktion	43
4.1.3	DNA-Aufreinigung	45
4.2	Ergebnisse	46
4.2.1	PCR-Artefakte und Interpretation der Ergebnisse.....	46
4.2.2	AmpFISTR Profiler Plus-Kit und vs-STR-Systeme	49
4.2.3	mtDNA.....	52
5.	Zusammenfassung.....	55
6.	Literaturverzeichnis.....	57

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Lamellenknochen, querschnitten, Vergrößerung 220-fach
(www.kgu.de/zmorph/Lehre/lern/histo3/data/gewebe/de/020_f.html)
- Abb. 2: Probenentnahme mit der Fräse
- Abb. 3: Längenfragmentanalyse der Allele für Probe 12 mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit
- Abb. 4: Allelleiter TH01vs
- Abb. 5: Längenfragmentanalyse der Allele für Probe 7 des vs-STR-Locus TPOXvs

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Vergleich von RFLP- und STR-Polymorphismen
- Tab. 2: Vergleich der Allelgröße der klassischen und vs-STR-Loci
- Tab. 3: Zusammensetzung menschlichen Knochengewebes
- Tab. 4: Morphologische Parameter zur Abschätzung der Liegezeit von Knochenfunden
- Tab. 5: Stadien der Leichenfäulnis (nach Wolff et al. 2001)
- Tab. 6: Übersicht über die aus Sektionsgut gewonnenen Knochenproben, nach Liegezeit geordnet
- Tab. 7: Übersicht über die Proben aus Skelett- bzw. Knochenfunden, nach Liegezeit geordnet
- Tab. 8: AmpFISTR Profiler Plus Systeme (www.appliedbiosystems.com), sortiert nach Allelgröße der Systeme
- Tab. 9: Primersequenzen der vs-STR-Systeme
- Tab. 10: PCR-Ansatz AmpFISTR Profiler Plus Kit
- Tab. 11: PCR-Bedingungen AmpFISTR Profiler Plus Kit
- Tab. 12: PCR-Ansatz vs-STR-Systeme
- Tab. 13: PCR-Bedingungen vs-STR-Systeme
- Tab. 14: PCR-Ansatz mtDNA
- Tab. 15: PCR-Bedingungen zur Amplifikation der mtDNA
- Tab. 16: Ansatz für ein 5 % Polyacrylamidgel
- Tab. 17: Ansatz zur Kapillarelektrophorese im Genetic Analyzer ABI 310

- Tab. 18: Ansatz zur mtDNA Sequenzierung
- Tab. 19: PCR-Bedingungen mtDNA Sequenzierung
- Tab. 20: Typisierungsergebnisse der aus Sektionsgut gewonnenen Knochenproben mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit
- Tab. 21: Allelprofile der zur Verfügung stehenden Referenzdaten
- Tab. 22: Typisierungsergebnisse der Knochenproben aus Skelett- bzw. Knochenfunden mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit
- Tab. 23: Typisierungsergebnisse der aus Sektionsgut gewonnenen Knochenproben in den vs-STR-Systemen
- Tab. 24: Typisierungsergebnisse der aus Skelett- bzw. Knochenfunden gewonnenen Knochenproben in den vs-STR-Systemen
- Tab. 25: Sequenzierungsergebnis der mtDNA-Sequenz des amplifizierten Segments der HV1-Region im Vergleich zur Anderson-Sequenz

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FAM	5-Carboxy-Fluorescein
HEX	4,7,2',4',5', 7'-Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein
MLS	Multi-Locus-Sonde
mt-DNA	mitochondriale DNA
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
SLS	Single-Locus-Sonde
STR	short tandem repeats
TAMRA	N,N,N',N'-Tetramethyl-6-Carboxyrhodamin
VNTR	variable number of tandem repeats

1. Einleitung

Die Identifizierung unbekannter Toter stellt einen wesentlichen Bestandteil des Aufgabengebiets der Rechtsmedizin dar. Ziel einer Identifizierung ist die möglichst genaue rekonstruktive Personenfeststellung durch Erhebung verschiedener Einzelmerkmale. Hierbei werden äußere Merkmale, wie z. B. Augen- und Haarfarbe, Narben, Muttermale oder Tätowierungen sowie anthropologische Daten, wie Geschlecht, Körpergröße, Lebensalter und Herkunft erhoben (Leopold 1998).

Die Obduktion dient neben der Feststellung der Todesursache auch der Gewinnung weiterer nützlicher Informationen. Aussagen über das Vorliegen von Krankheiten, Hinweise auf Operationen oder Verletzungen sowie die Erhebung des Zahnstatus können vor allem bei vorliegendem Vergleichsmaterial wichtige Hinweise auf die Identität geben.

Die Daktyloskopie, die Untersuchung des klassischen Fingerabdrucks, stellt wohl das am weitesten bekannte Mittel zur Personen- und Spurenidentifizierung dar. Sie umfasst die Gewinnung und Auswertung des Papillarlinienmusters der Fingerbeere zum Zwecke der Identifizierung. Voraussetzung für die Identifizierung von Leichen ist jedoch das Vorhandensein von Vergleichsmaterial (Blume 1998).

Bei Leichenteilen oder Leichen in fortgeschrittenen Verwesungsstadien können durch Untersuchung der Knochenmorphologie und Anwendung radiologischer Verfahren Rückschlüsse auf anthropologische Basisdaten gewonnen werden. Die Bestimmung der Körpergröße kann z. B. durch Vermessung definierter Knochenabschnitte anhand von Vergleichstabellen erfolgen. Zur Altersschätzung werden Knochenkerne, Wachstumsfugen und das Ausmaß degenerativer Skeletterscheinungen im Röntgenbild beurteilt.

Das Gebiet der forensischen Serologie befasst sich mit der Bestimmung von Blut-, Enzym- und Serumgruppen und hatte noch bis vor kurzem einen wichtigen Stellenwert bei der Identifizierung und Vaterschaftsbegutachtung. Hierbei werden aus einer Blutprobe konventionelle hämogenetische Merkmale wie die Blutgruppen (Erythrozytenmembran-Antigen-Systeme AB0, MNS, Rhesus), Enzymgruppen (Isoenzym-Polymorphismen saure Erythrozyten-Phosphatase ACP, Phosphoglukomutase PGM) und Serumgruppen (Plasmaproteinsysteme Haptoglobin HP, GC-System) bestimmt (Patzelt et al. 2003).

Die rasante Entwicklung DNA-analytischer Methoden der letzten Jahre hat der Rechtsmedizin ein neues Instrument zur Verfügung gestellt, welches auch in schwierigen Fällen eine Identifizierung ermöglichen kann, in denen konventionelle Methoden an ihre Grenzen stoßen. Hierbei wird aus Gewebeproben einer Leiche Erbmaterial extrahiert und ein individualtypisches DNA-Profil, der sogenannte „genetische Fingerabdruck“, erschlossen (Jeffreys et al. 1985). Durch vergleichende Untersuchung dieses DNA-Profiles mit biologischem Material eines Vermissten oder aber durch Einbeziehung direkter Verwandter eines mutmaßlich Verstorbenen in die Untersuchung können Rückschlüsse auf die Identität der Leiche gezogen werden.

Gerade bei Massenerdbeben kann die auf DNA-Analyse gestützte Identifizierung wertvolle Dienste leisten. So basierte beispielsweise die Identifizierung der Opfer des Terroranschlags vom 11. September 2001 in New York in mehr als der Hälfte der Fälle allein auf DNA-analytischen Untersuchungen (Oransky 2003).

Bei der Auswahl geeigneter Gewebeproben für die Erstellung eines solchen DNA-Profiles muss Rücksicht auf die nach dem Tode einsetzende Gewebezersetzung durch Autolyse und Fäulnis genommen werden. Die fortschreitende postmortale Zersetzung führt im Laufe der Zeit zur DNA-Degradation, das heißt zur Fragmentierung der DNA-Stränge. Dieser komplexe Prozess ist von vielen Faktoren abhängig. Ausgehend von einer proportional zur Lagerungszeit abnehmenden molekularen Integrität der DNA (Gaber 1998) zeigen sich in der Praxis verschiedene Gewebe unterschiedlich resistent gegenüber postmortalen Abbauprozessen (Burger et al. 1999).

Vergleicht man den Zustand der DNA in unterschiedlichen Geweben einer Leiche mit längerer Liegezeit und fortgeschrittener Fäulnis, so zeigt sich die in Hartgeweben wie Knochen- oder Zahnmaterial befindliche DNA, der aus Weichgewebe qualitativ und quantitativ überlegen (Hagelberg et al. 1991a, Lassen et al. 1994). Durch ihre außerordentlich hohe chemische Stabilität sind also gerade Hartgewebe hervorragend zur DNA-Untersuchung bei Leichen mit längerer Liegezeit geeignet.

1.1 Molekularbiologische Grundlagen

1.1.1 DNA-Typisierung - der „genetische Fingerabdruck“

Der Fingerabdruck ist das für jeden einzelnen Menschen charakteristische Hautleistenmuster der Fingerbeere. Er ist ein Stempelbild. Der Begriff „genetischer Fingerabdruck“ wird im übertragenen Sinne auf die DNA-analytische Charakterisierung eines Menschen angewandt (Krawczak und Schmidtke 1994). Er wurde 1985 von Jeffreys eingeführt und beschreibt den strichcodeähnlichen Charakter der DNA-Restriktionsfragmente nach elektrophoretischer Auftrennung und Hybridisierung mit markierten Sonden (siehe 1.1.3.1).

Die Erfassung eines „genetischen Fingerabdrucks“ stützt sich auf die Analyse nicht-kodierender Bereiche des menschlichen Erbmateri als, also Abschnitte, in denen keine phänotypisch relevanten Informationen gespeichert sind (Geserick und Roewer 1998). Diese nicht-kodierenden Abschnitte weisen eine sehr hohe Variabilität mit hohem Individualzuordnungspotential auf. Von besonderer Bedeutung sind hierbei repetitive Strukturelemente, die durch die unterschiedliche Anzahl der repetitiven Grundmuster eine extrem hohe allelische Variabilität aufweisen.

1.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von Kary B. Mullis 1985 entwickelte Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Technik zur enzymatischen DNA-Vervielfältigung. Hierbei wird der zu kopierende DNA-Abschnitt durch Anlagerung zweier kurzer, einsträngiger Oligonukleotide, der sogenannten Primer, definiert. Durch zyklische Wiederholung von Denaturierung der zu kopierenden DNA in zwei Einzelstränge, Hybridisierung der Primer an die Ziel-DNA und Verlängerung des Segments zwischen den Primern durch eine hitzestabile DNA-Polymerase, kommt es von Zyklus zu Zyklus zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA. Die Einführung dieser Technik stellte auf molekularbiologischem Gebiet einen Durchbruch dar, war es doch möglich geworden, auch geringste DNA-Mengen einer Analyse zugänglich zu machen (Gassen und Minol 1996).

1.1.3 Variable number of tandem repeats (VNTR)

Die bereits angesprochenen, zur DNA-Typisierung verwendeten, repetitiven DNA-Grundmuster werden als variable-number-of-tandem-repeats (VNTR) bezeichnet. Sie lassen sich anhand der repetitiven Einheiten in zwei Kategorien eingeteilt:

	<i>RFLP</i>	<i>STR</i>
Repetitive Sequenz	9 - 100 bp	2 - 6 bp
Allelgrößen	50 - 1.500 bp	50 - 350 bp
Loci	$10^3 - 10^4$ (vor allem Telomer-Region)	bis zu 10^5 (gesamtes Genom)
Polymorphie	+++	+
Analyse	Analyse mittels Southern Blot	PCR-Analyse
Beispiele	D12S11 (Chromosom 7, Sonde MS43a) D2S44 (Chromosom 2, Sonde YNH24)	Profiler Plus Kit (Neun STR-Systeme + Amelogenin-Locus, siehe Kap. 2.2.6)
Vorteile	<ul style="list-style-type: none"> • sehr hoher Informationswert durch ausgeprägte Polymorphie 	<ul style="list-style-type: none"> • durch PCR-Amplifikation hohe Sensitivität (Analyse von Mikrospuren und degradierter DNA möglich) • exakt definierte Allele ermöglichen Wahrscheinlichkeitsberechnung und Speicherung in Datenbanken
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • grosse Mengen hochmolekularer DNA nötig (für Mikrospuren und degradierte DNA ungeeignet) • keine exakte Berechnung der Allel-Häufigkeit möglich 	<ul style="list-style-type: none"> • relativ hohe Kontaminationsgefahr • interne und externe Qualitätskontrollen unerlässlich

Tab. 1: Vergleich von RFLP- und STR-Polymorphismen (nach Krawczak und Schmidtke sowie <http://www.med.uni-heidelberg.de/rechtmed/allg-hae.htm>)

1.1.3.1 Restriktionslängenpolymorphismen (RFLP)

Die Analyse der VNTRs beruht auf der Erfassung ihrer unterschiedlichen Fragmentlängen. Grundlage dieses Verfahrens bildet die Spaltung der DNA an spezifischen Erkennungssequenzen durch Restriktionsenzyme. Durch die wechselnde Anzahl von repetitiven Grundmustern innerhalb der geschnittenen DNA-Fragmente kommt es zur Entstehung von Restriktionsfragmenten unterschiedlicher Länge (RFLPs). Diese können nach elektrophoretischer Auftrennung durch Hybridisierung mit

markierten, komplementären, einsträngigen DNA-Molekülen, sogenannten Sonden, sichtbar gemacht werden. Durch dieses Verfahren entsteht ein für jeden Menschen individualspezifisches Hybridisierungsmuster, der „genetische Fingerabdruck“.

Der Vorteil dieser Methode besteht in dem hohen Individualzuordnungspotential aufgrund der hohen allelischen Variabilität, der bei Verwendung von nur vier nichtgekoppelten Systemen 4×10^{11} beträgt (Brinkmann et al. 1991). Der entscheidende Nachteil liegt in dem hohen Bedarf an hochmolekularer DNA, was den Einsatzbereich dieser Methode in der forensischen Spurenkunde stark einschränkt (Krawczak und Schmidtke 1994).

1.1.3.2 Short Tandem Repeats (STR)

Im Unterschied zu den RFLPs bestehen Short Tandem Repeats (STR) aus einem kürzeren Sequenzmotiv von 2-6 Basenpaaren, das sich tandemartig wiederholt (Edwards et al. 1991). Ihre geringere Allelgröße von etwa 50-350 bp ermöglicht die selektive Amplifikation im Rahmen der PCR, was im Gegensatz zur RFLP-Analyse eine enorme Erhöhung der Sensitivität mit sich bringt und damit auch geringste DNA-Mengen oder stark degradierte DNA grundsätzlich analysierbar macht (Hummel et al. 2001).

Ein weiterer Vorteil besteht in der exakten numerischen Definition der Allele. Damit ist einerseits die Möglichkeit einer Speicherung und Vergleichbarkeit der Daten, z. B. in Datenbanken gegeben, zum anderen lässt sich, bei bekannter Anzahl und Häufigkeitsverteilung der Allele innerhalb einer Population, eine statistische Ausschlusswahrscheinlichkeit (Diskriminationsindex) ermitteln (Geserick und Roewer 1998). Damit bilden die STRs die Grundlage der modernen forensischen DNA-Analyse.

1.1.3.3 Very Short STRs (vs-STRs)

Hellmann et al. konnten 2001 durch Einsatz neu entwickelter STR-Primer die Erfolgsrate der DNA-Analyse aus degradiertem DNA, z. B. aus telogenen Haaren, erheblich verbessern. Telogenes Haar material besteht aus ausgefallenen Haaren ohne zelluläre Bestandteile der Haarwurzel. Die vorhandene DNA sitzt hierbei in den Resten keratinisierter Haarzellen und ist hochgradig degradiert, generell nur etwa 100 bp lang (Matsuda et al. 1997). Hellmann et al. gelang es durch Modifikation der Primer das

PCR-Produkt und die daraus resultierende Allelgröße in drei STR-Systemen (TPOX_{vs}, TH01_{vs}, FES_{vs}) erheblich zu reduzieren. Durch Verkleinerung, über nahezu vollständige Ausschaltung der flankierenden Region zwischen Primerbindungsstelle und repetitiver STR-Sequenz, konnte der zu amplifizierende DNA-Abschnitt beträchtlich vermindert werden (Tab. 2). Bei Untersuchung eines Individuums in einem vs- und dem jeweils korrespondierenden klassischen System, sind bei entsprechender Nummerierung die gleichen Allele zu erwarten, bei stark verkürzter Allelgröße der vs-Systeme.

<i>klassisches System</i>	<i>Allelgröße [bp]</i>	<i>very short System</i>	<i>Allelgröße [bp]</i>
TPOX	218-246	TPOX_{vs}	58-86
TH01	169-193	TH01_{vs}	61-85
FES	213-237	FES_{vs}	81-105

Tab. 2: Vergleich der Allelgröße der klassischen und vs-STR-Loci (nach Hellmann et al. 2001)

Medienwirksame Anwendung fand dieses Verfahren im Rahmen einer nachträglichen Untersuchung eines Mordfalles im Jahre 1991. Im Zuge der damaligen Ermittlungen wurde in einem 60 Meter vom Haus des Opfers entfernten Schrebergarten, dem mutmaßlichen Standort des Todesschützen, ein Handtuch mit neun telogenen Haaren gefunden. Bei der nachträglichen DNA-analytischen Untersuchung dieser Haare mit Hilfe der vs-Primer, konnte ein DNA-Profil erschlossen werden, mit dessen Hilfe der Täter gefasst werden konnte.

1.1.4 Mitochondriale DNA (mtDNA)

Das mitochondriale Genom besteht aus einem kurzen, ringförmigen DNA-Molekül mit einer Länge von 16.569 bp, dessen Sequenz 1981 von Anderson et al. entschlüsselt werden konnte. Es setzt sich aus einer kodierenden und einer nicht-kodierenden, hypervariablen Kontrollregion zusammen. Die kodierende Region enthält einige Gene für Enzyme der Atmungskette.

Die Kontrollregion umfasst mehr als 1100 Basenpaare und ist aus verschiedenen Gründen für Identifizierungszwecke interessant:

- Innerhalb der Kontrollregion existieren zwei hypervariable Segmente mit einer sehr hohen Polymorphie, die etwa 5-10 mal höher ist als bei genomischer DNA (Holland et al. 1993).
- Das mitochondriale Genom wird auf der mütterlichen Linie vererbt, so dass Verwandtschaftsbeziehungen über die mütterliche Linie auch über mehrere Generationen hinweg nachgewiesen werden können (Koolmann 1994).
- Aufgrund der hohen Kopienzahl von etwa 10^3 - 10^4 pro Zelle (Hagelberg und Clegg 1991b) ist die mtDNA-Analyse das mit Abstand sensitivste Verfahren der forensischen DNA-Analytik (Geserick und Roewer 1998).

In der Regel konzentriert sich die Analyse mitochondrialer DNA auf zwei ca. 400 bp lange DNA-Abschnitte innerhalb derer die höchste Sequenzvariabilität auftritt, den sog. hypervariablen Regionen HV-1 und HV-2. Durch Sequenzanalyse dieser hypervariablen Bereiche kann, bei Vergleich mit biologischem Material eines Vermissten oder eines auf der mütterlichen Linie Verwandten, eine Identifikation erfolgen.

1.2. DNA-Analyse von Skelettmaterial

1.2.1 Aufbau und Eigenschaften von Knochengewebe

Der Aufbau von Knochen stellt einen Kompromiss zwischen möglichst hoher Stabilität und möglichst geringem Gewicht dar. Dies wird durch einen zweischichtigen Aufbau mit einer außenliegenden Substantia compacta und einer im Knocheninneren liegenden Substantia spongiosa erreicht (Faller 1995).

Die Substantia compacta, kurz „Kompakta“ genannt, bildet eine äußere, dichte Knochenschicht, deren Dicke je nach Höhe der mechanischen Belastung schwankt. Sie ist vor allem im Schaftbereich langer Röhrenknochen sehr gut ausgeprägt und kann hier mehrere Millimeter dick sein. Die Substantia spongiosa, kurz „Spongiosa“, ist ein im Inneren des Knochens befindliches Netzwerk von Knochenbälkchen. Dieses Netzwerk ist ständigen Umbauprozessen ausgesetzt, so richten sich die Spongiosabälkchen nach der Belastungssituation im jeweiligen Knochenbereich aus (Lippert 1993).

Die mikroskopische Anatomie des Knochengewebes ist durch Lamellensysteme oder Osteone charakterisiert, die durch Osteozyten mit der zwischen ihnen liegenden Inter-

zellulärschubstanz (Knochenmatrix) gebildet wird.

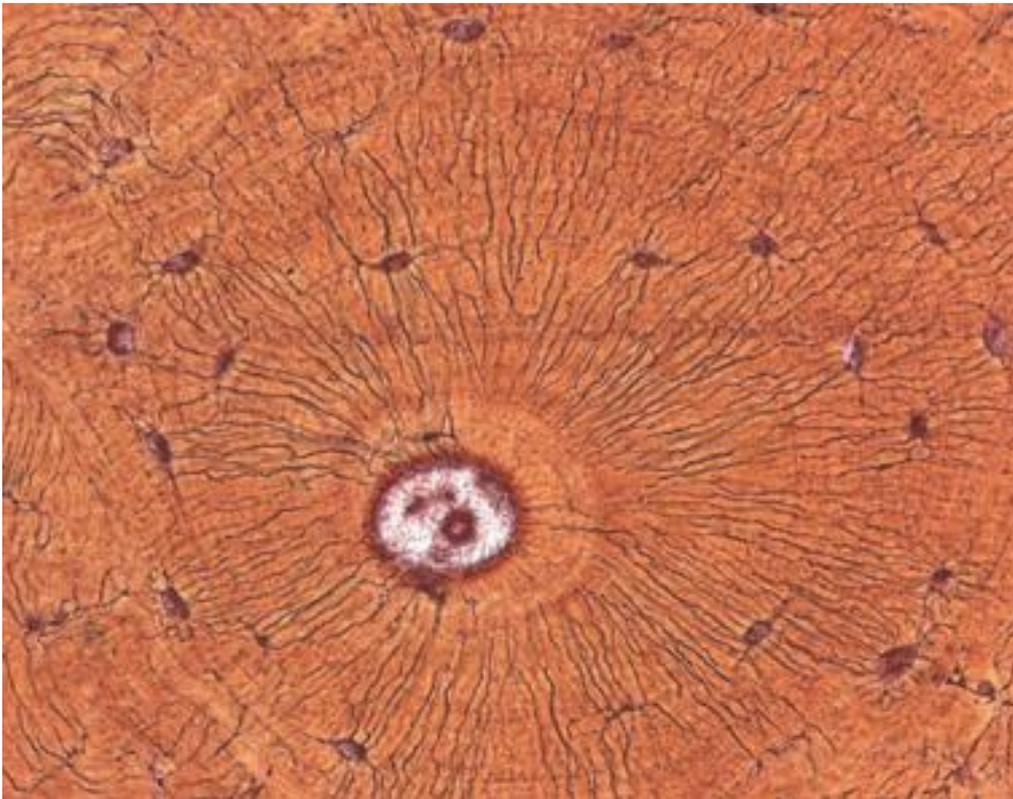


Abb. 1: Lamellenknochen, querschnitt, Vergrößerung 220-fach
(www.kgu.de/zmorph/Lehre/lern/histo3/data/gewebe/de/020_f.html)

Um das zentral gelegene Blutgefäß (Haversscher-Kanal), das der Ernährung des Osteons dient, liegen ringförmig die Osteozyten. Diese sind untereinander durch lange Zytoplasmafortsätze verbunden und werden von der umliegenden Knochengrundsubstanz (Extrazellulärmatrix) regelrecht eingemauert.

Das Knochengewebe befindet sich in einem steten Umbauprozess. Zum einen erfolgt eine funktionelle Anpassung der Knochenbälkchen an veränderte Belastungen, zum anderen kommt es zum Dickenwachstum des Knochens. Durch Osteoblasten wird Knochengewebe an der Außenseite des Knochens angebaut, Osteoklasten bauen an der Innenseite Knochen ab.

Nach dem Zahnmaterial ist ausdifferenziertes Knochengewebe die härteste Substanz des menschlichen Körpers. Die physikalische Härte des Knochens beruht auf dem

Zusammenspiel von organischen und anorganischen Bestandteilen, insbesondere auf der Einlagerung von Kalksalzen in die fibrillenreiche Grundsubstanz (Lippert 1993). Die Kalksalze liegen überwiegend als Hydroxylapatit, d.h. als kristallines Kalziumphosphat vor. Entkalkt man im Experiment einen Knochen, z.B. durch kalziumbindende Chelatoren, so wird er gummiartig biegsam (Leonhardt 1990).

organisch 30%	anorganisch 70%
Grundsubstanz - Matrix 98% (Kollagen 95%, andere Proteine 5%)	Hydroxylapatit 95% andere Mineralien 5%
Zellen 2% (Osteozyten, Osteoblasten, Osteoklasten)	

Tab. 3: Zusammensetzung menschlichen Knochengewebes (nach Niethard und Pfeil 1992)

Die enge Verwebung anorganischer und organischer Substanzen im Knochen sowie die besondere Architektur von Knochenmatrix und Osteozyten resultieren also aus einer relativ hohen Stabilität gegenüber Einflüssen von außen (Burger et al. 1999).

1.2.2 Lagerungsbedingungen und Knochendekomposition

Der postmortale Zerfall des menschlichen Körpers ist ein sehr komplexer Prozess. Er beginnt mit der Autolyse und Zersetzung des Gewebes durch Fäulnis (Zeller 2000). Unter Autolyse versteht man den nicht-bakteriellen Abbau organischer Substanzen durch die nach dem Tode frei werdenden bzw. aktivierten Proteasen. Fäulnis wird durch Bakterien, sowohl Eigen- als auch Fremdkeime, hervorgerufen. Es kommt hierbei im feuchten Milieu zu einem teils reduktiven teils oxidativen Gewebeabbau (Madea et al. 2003). Durch den enzymatischen Einfluss dieser beiden Mechanismen kommt es zum Eiweiß-, Kohlenhydrat- und Fettabbau (Daldrup 1979). Mit der Zeit führen diese und andere Vorgänge, z. B. Tierfraß, zu einer völligen Skelettierung der Leiche. Auch die DNA ist von diesen Abbauprozessen betroffen. Durch bakterielle Enzymgruppen, den Nukleasen, kommt es zur zunehmenden Fragmentierung der DNA und Verkleinerung

der DNA-Stränge; die DNA wird degradiert. Zerfällt die DNA infolge enzymatischer, mikrobieller oder mechanischer Einflüsse, so bleiben die Bruchstücke dennoch Informationsträger und grundsätzlich einer Typisierung zugänglich. Wird die DNA im Verlauf dieses Prozesses jedoch unter 150 Basenpaare fragmentiert, so gelingt die Amplifizierung konventioneller STR-Loci nicht mehr. Durch Analyse der vs-STR-Systeme oder mitochondrieller DNA kann dieses diagnostische Fenster vergrößert werden (Geserick und Roewer 1998).

Im Knochen selbst kommt es auch zu einem mikrobiellen Abbau der Kollagenfibrillen. Dieser Prozess ist abhängig vom umgebenden pH-Wert. In saurem Milieu werden die protektiv wirkenden Hydroxylapatit-Kristalle vermehrt aus der Knochenmatrix gewaschen, was den Kollagenabbau beschleunigt. In alkalischem Milieu kommt es dagegen durch eine Substitution von H^+ -Ionen des Hydroxylapatits durch Ca^{2+} -Ionen zu einer Stabilisierung des Mineralanteils und so zu einem langsamerem Fortschreiten des Abbaus (Stephan 1992). Wird das Zusammenspiel von anorganischen und organischen Substanzen im Knochen durch zunehmenden Kollagenabbau und Auswaschung des Hydroxylapatits zerstört, beginnt der enzymatische Abbau der dadurch aufgebrochenen Knochensubstanz und damit auch der DNA. Der Erhaltungszustand des Knochengewebes und der darin enthaltenen DNA ist also von vielen Faktoren abhängig:

- **Temperatur:** Niedrige Temperaturen führen durch Verlangsamung chemischer Prozesse und Hemmung mikrobiellen Wachstums allgemein zur Verlangsamung von DNA-Abbauprozessen.
- **Mikroorganismen:** Die Abwesenheit mikrobieller Einflüsse verringert die enzymatische DNA-Degradation durch bakterielle Enzyme.
- **Feuchtigkeit:** Unter trockenen Bedingungen können hydrolytische und oxidative Beschädigungen der DNA vermindert werden.
- **pH-Wert:** Ein hoher pH-Wert stabilisiert die anorganische Knochensubstanz und ist somit ein protektiver Faktor hinsichtlich weiterer DNA- Zerstörung.
- **UV-Strahlung:** Bei oberflächlich gelagertem Knochenmaterial kommt es durch Einwirkung von UV-Strahlen zu Strangbrüchen der DNA, wenn auch zunächst nur in oberflächlichen Gewebeanteilen.

Von allen genannten Faktoren scheinen hierbei niedrige Temperaturen und/oder trockenes Milieu die wichtigsten protektiven Faktoren für die Gewebeerhaltung und damit auch für die DNA-Konservierung zu sein. Aufgrund der komplexen Vorgänge und vielfältigen Faktoren, die zur Degradation der DNA führen, gilt jedoch, dass eine eindeutige Korrelation zwischen (Liege-)Zeit einerseits und Qualität der extrahierten DNA andererseits nicht hergestellt werden kann. Auf diese Tatsache haben bereits mehrere Autoren hingewiesen (Burger et al. 1999; Poinar et al. 1996; Höss et al. 1996; Geserick und Roewer 1998).

1.2.3 Möglichkeiten der Liegezeitbestimmung an Knochenmaterial

Bei Funden skelettierter Leichenüberreste oder sonstiger Knochenfunde stehen verschiedene Methoden zur Einschätzung der Liegezeit bzw. zur Datierung des Knochenalters zur Verfügung. Bei der Liegezeitbestimmung von Knochenmaterial werden morphologische, chemische und radiometrische Methoden verwendet.

Morphologische und chemische Methoden sind aufgrund der vielfältigen Faktoren, welche die Knochendekomposition beeinflussen, nur im Rahmen relativ hoher, schwankender Ungenauigkeiten zu verwenden. Radiometrische Methoden wie die Radiokarbonmethode kommen vor allem auf anthropologischem und archäologischem Gebiet zum Einsatz. Sie dienen der Datierung von Knochenmaterialien mit Liegezeiten von mehreren Jahrhunderten und darüber (Berg und Protsch von Zieten 1998).

Unter mitteleuropäischen Normalbedingungen kann es bei oberflächlicher Lagerung einer Leiche im Freien bereits nach wenigen Monaten zu einer vollständigen Skelettierung kommen. Im Erdgrab ist unter Normalbedingungen für dieselben Vorgänge von einer Zeitspanne von etwa sieben Jahren auszugehen (Sadler 1995, Berg und Protsch von Zieten 1998), wobei von allen Autoren die starken Schwankungen in Abhängigkeit von den äußeren Einflussfaktoren betont werden (Berg und Protsch von Zieten 1998, Burger et al. 1999).

Betrachtet man die Morphologie des längs aufgeschnittenen Röhrenknochens an skelettierter Leichenüberresten, so spricht eine Fettwachsfüllung der Markhöhle für eine Liegezeit unter 30 Jahren, wobei diese vor allem bei oberflächlicher Lagerung nicht regelmäßig vorhanden ist. Nach etwa 30 bis 40 Jahren finden sich Usuren der

Knochenoberfläche vor allem im Bereich der Gelenkenden (Berg und Protsch von Zieten 1998).

Im Laufe der Zeit kommt es durch progressiven Abbau der organischen Matrix zu einer Verminderung der Knochenfestigkeit. Diese ist stark abhängig von Bodenbeschaffenheit und pH-Wert, so dass die Zeitangaben hierfür stark schwanken. Nach Forster ist bei leichtem und brüchigem Knochen mit einer Liegezeit von mehr als 300 Jahren auszugehen, Berg und Protsch von Zieten geben bei verminderter Knochenfestigkeit Werte von 2 bis 3 Jahrtausenden an (Forster 1986, Berg und Protsch von Zieten 1998).

	<i>Liegezeit in Jahren</i>							
	0-2	2-7	10-20	20-30	30-40	50-100	100-200	> 200
Weichteilreste (Oberfläche)	+	-	-	-	-	-	-	-
Weichteilreste (Erdgrab)	+	+	-	-	-	-	-	-
Fettwachs (Markhöhle)	+	+	+	(+)	-	-	-	-
Usuren (Knochenoberfläche)	-	-	-	(+)	+	+	+	+
Festigkeitsverlust	-	-	-	-	-	-	-	(+)

Tab. 4: Morphologische Parameter zur Abschätzung der Liegezeit von Knochenfunden (durchschnittliche Befunde unter mitteleuropäischen Normalbedingungen, nach Leopold 1998)

1.2.4 Vergleich der DNA-Analyse von Knochenmaterial gegenüber Weichgewebe bei längerer Leichenliegezeit

Im Rahmen einer DNA-analytischen Identifizierung wird man im Regelfall zunächst vorhandenes Weichteilgewebe zur Untersuchung heranziehen. Der Vorteil liegt in einer im Vergleich zu DNA aus Hartgeweben ungleich schnelleren und einfacheren Extraktion. In Fällen in denen jedoch ein fortgeschrittenes Dekompositionsstadium des Untersuchungsmaterials vorliegt besteht eine quantitative und qualitative Überlegenheit der aus Hartgewebe gewonnenen DNA gegenüber der aus Weichgewebe. Hierauf

weisen Lassen et al. (1994) und Hagelberg et al. (1991b) in ihren Untersuchungen zum DNA-Gehalt verschiedener Gewebe in fortgeschrittenen Dekompositionsstadium hin. Die Gründe für die bessere Konservierung der DNA liegen zum einen an der schon angesprochenen physikalischen Härte des Knochengewebes, resultierend aus der engen Verflechtung organischer und anorganischer Bestandteile. Die im Zellkern der Osteozyten befindliche DNA wird durch die umgebende dichte Knochenmatrix, also den chemisch sehr stabilen Kollagenfibrillen und Hydroxylapatit-Kristallen vor postmortalem enzymatischem Abbau geschützt. Zum anderen nimmt man an, dass die Fähigkeit des Hydroxylapatits, freigesetzte doppelsträngige DNA zu binden, einen zusätzlichen protektiven Effekt auszuüben vermag (Zeller 2000). Sämtliche Prozesse im Rahmen einer postmortalen Dekomposition, aber auch einer möglichen Kontamination betreffen zunächst die Knochenoberfläche und dringen von hier im Laufe der Zeit in die Tiefe vor. Bei Verwendung von Knochenmaterial mit dicker Kompaktaschicht, wie z. B. an langen Röhrenknochen, können durch entsprechende Bearbeitung des Knochens Bereiche mit bereits degradiert oder kontaminierter DNA entfernt werden. Zur Analyse sollte also nur aus der Tiefe der Kompakta stammendes Knochenmaterial kommen, bei dem eine Degradierung oder Kontamination weitgehend ausgeschlossen ist.

1.2.5 Historischer Abriss DNA-analytischer Untersuchungen an Knochenmaterial

Die in archäologischen und forensischen Knochenfunden enthaltene DNA birgt einen enormen Fundus an Informationen, den zu lesen erst mit Einführung der PCR möglich wurde. Sowohl der Rechtsmediziner als auch der Anthropologe, Archäologe und Evolutionsbiologe kann für sein jeweiliges Forschungsgebiet wichtige Schlüsse aus der Analyse von Knochen-DNA erhalten.

Die erste, erfolgreiche Amplifikation mitochondrialer DNA aus mehrere Jahrhunderte altem, menschlichen Knochenmaterial wurde 1989 von Hagelberg et al. beschrieben. In der Folge wurden die von ihnen angewandten Methoden verfeinert, ausgeweitet und insbesondere im Rahmen anthropologischer Fragestellungen (Horai et al. 1989, Hänni et al. 1990), jedoch auch bald unter forensischen Gesichtspunkten angewandt (Honda et al. 1990). Zunehmend wurde versucht DNA-analytische Untersuchungen an

Skelettresten und Knochenfunden in der forensischen Laborroutine anzuwenden. Die hierbei auftauchenden methodischen und analytischen Schwierigkeiten, wie zum Beispiel eine Probenkontamination mit rezenter DNA, unzureichende DNA-Extraktions- und Aufreinigungsverfahren, sowie eine Inhibierung der PCR durch bestimmte Substanzen, konnten bis heute nur teilweise gelöst werden (Hagelberg et al. 1991a; Hummel et al. 1992; Schmerer et al. 1999).

Die erste erfolgreiche Identifikation knöcherner Überreste durch Analyse nukleärer Knochen-DNA wurde 1991 durch Hagelberg et al. veröffentlicht. Durch PCR-Analyse von sechs Mikrosatelliten-Loci konnten die knöchernen Überreste eines Mordopfers acht Jahre nach der Tat identifiziert werden (Hagelberg et al. 1991c). In der Folge wurden viele bisher ungeklärte Fälle unter Verwendung dieser neuen analytischen Möglichkeiten nochmals aufgerollt.

Einer größeren Öffentlichkeit zugänglich gemacht wurden z. B. die Ergebnisse der Untersuchungen der Skelettreste von Josef Mengele (Jeffreys et al. 1992). 13 Jahre nach seinem Tod in Brasilien wurde der mutmaßliche Leichnam des KZ-Arztes exhumiert und aus einem Stück Oberschenkelknochen ein genetischer Fingerabdruck gewonnen. Durch Einbeziehung von Mengeles Frau und des gemeinsamen Sohnes in die Untersuchung konnte der zuvor durch konventionelle Identifizierungsmethoden geäußerte Verdacht auf molekularbiologischer Ebene bestätigt werden.

Im Jahre 1994 berichteten Gill et al. über die Identifizierung der nach 73 Jahren aufgefundenen Skelettüberreste der russischen Zarenfamilie durch STR-Analyse und Teilen des mitochondrialen Genoms. Hierbei konnte für alle neun Skelettüberreste eine vollständige Typisierung in fünf STR-Systemen durchgeführt werden, zusätzlich in allen Fällen zwei jeweils 360 und 380 bp lange mtDNA-Sequenzen erfolgreich amplifiziert und typisiert werden. Die Leichenüberreste der Zarenfamilie waren mit Schwefelsäure übergossen und anschließend verbrannt worden; der dennoch gute Erhaltungszustand der DNA ist hierbei trotz der langen Liegezeit der Überreste auf das kalte Klima des Fundorts Jekaterinenburg zurückzuführen.

Holland et al veröffentlichten 1993 die Ergebnisse einer DNA-analytischen Identifizierung der 24 Jahre alten Überreste eines im Vietnamkrieg gefallenen US-Soldaten. Die Skelettüberreste waren dabei mehr als 17 Jahre tropischen Bedingungen

mit hohen Temperaturen und Luftfeuchtigkeit ausgesetzt. Die Amplifikation nukleärer DNA scheiterte auf Grund des hohen Grades der DNA-Degradation; in vier von sieben Knochen-DNA-Extrakten konnte zumindest eines von zwei Segmenten des mitochondrialen Genoms mit einer maximalen Länge von 210 bp amplifiziert werden. Durch mtDNA Vergleich mit mutmaßlichen Angehörigen der mütterlichen Linie konnte eine Identifizierung mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,58 % durchgeführt werden.

1.3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, ein Protokoll zur DNA-Extraktion aus frischem und gelagertem Skelettmaterial zu erarbeiten sowie dessen Eignung für den Einsatz in der Individualtypisierung unterschiedlicher, im Laboralltag anfallender forensischer Knochenproben zu untersuchen.

Im Rahmen eines Erfahrungsaustausches, verbunden mit einem zweiwöchigen Aufenthalt am Institut für Rechtsmedizin der Universität Münster, sollte das dort praktizierte DNA-Extraktionsverfahren für Knochen erlernt und auf seine Tauglichkeit für den Einsatz am Institut für Rechtsmedizin in Würzburg geprüft werden.

Die Qualität der aus Knochen verschiedenen Alters und unterschiedlicher Lagerungsbedingungen extrahierten DNA sollte durch verschiedene Typisierungsverfahren untersucht werden. Neben der Analyse verschiedener STR-Loci unterschiedlicher Größe mittels eines Multiplex-PCR-Kits sollte auch ein Analyseverfahren speziell für stark degradierte DNA mit sogenannten very short Primern (vs-Primer) in die Untersuchung einbezogen werden. Dieses Verfahren sollte inklusive der Erstellung einer Allelleiter etabliert werden.

Anhand zweier, ausgewählter, stark degradiertes Proben, bei denen eine Analyse genomischer DNA erfolglos blieb, sollte exemplarisch eine Individualtypisierung mittels Analyse der mitochondrialen DNA erstellt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Instrumente und Reagenzien

Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

Automatische Pipetten	Roth, Karlsruhe
Gefrierschrank Premium	Liebherr, Biberach
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart
pH-Meter WTW	WTW, Weilheim
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Safeguard-Filtertips 10, 30, 100, 200 und 1000 µl	Peqlab, Erlangen
Vortex-Gerät Genie 2	Bender & Hobein, Zürich
Zentrifuge Biofuge 17 RS	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Mikroliter	Hettich, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Klein, Würzburg

Knochenreinigung und Probenentnahme

Alufolie	Hartenstein, Würzburg
Bunsenbrenner	Hartenstein, Würzburg
Einmalskalpell, steril	Megro, Wesel
Ethanol 70%	Roth, Karlsruhe
Multifräse FBS 12/E mit flexibler Welle	Proxxon, Niersbach
Petrischale, steril	Hartenstein, Würzburg
Probenlöffelchen	Hartenstein, Würzburg
Tischwaage Basic	Sartorius, Göttingen

DNA-Extraktion

EDTA-Phosphat-Puffer (pH 8,0):	
0,5 M EDTA	Roth, Karlsruhe
0,25 M Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
Ethanol 100%	Roth, Karlsruhe
NucleoSpin® Funnel Column	Macherey-Nagel, Düren
Proteinase K (20 mg/ml)	Roche, Mannheim

Puffer B3	Macherey-Nagel, Düren
Puffer B5	Macherey-Nagel, Düren
Puffer BW	Macherey-Nagel, Düren
Puffer T1	Macherey-Nagel, Düren
Schüttelwasserbad GFL 1003	GFL, Burgwedel
Tris-HCl-Puffer (pH 8,5)	
5 mM Tris	Roth, Karlsruhe
HCl	Roth, Karlsruhe
Überkopfschüttler Cat RT 20	Hartenstein, Würzburg
<u>DNA-Aufreinigung</u>	
Microcon YM-30	Millipore, Eschborn
<u>Amplifikation mit dem PE-ABI „AmpF1STR Profiler Plus“-Kit:</u>	
Ampli Taq Gold (5U/μl)	Roche, Mannheim
ABI AmpF1STR PCR Reaction Mix	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABI AmpF1STR Profiler Plus Primer Set	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler ABI Gene Amp PCR System 2400	Applied Biosystems, Weiterstadt
<u>Amplifikation der vs-STR-Systeme:</u>	
10x Taq Buffer	Eppendorf, Hamburg
Mineralöl	Sigma, Steinheim
Nucleotide-Triphosphat (5mM)	Pharmacia, Freiburg
Primer I und II (je 40ng/μl)	MWG-Biotech, Ebersdorf
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler „Personal Cycler“	Biometra, Göttingen
<u>Amplifikation der mtDNA:</u>	
Primer 1 und 2 (HV-1)	MWG-Biotech, Ebersdorf
Nucleotide-Triphosphat (5mM)	Pharmacia, Freiburg
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	Eppendorf, Hamburg
10x Taq Buffer	Eppendorf, Hamburg
MgCl ₂	Eppendorf, Hamburg

Niedrigauflösende horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE):

10 x TBE-Puffer:	890 mM Tris-Borat	Roth, Karlsruhe
	25 mM EDTA (pH 8,0)	Roth, Karlsruhe

Agarosegel-Probenpuffer:

0,25 % Bromphenol Blau	Roth, Karlsruhe
0,25 % Xylen Cyanol	Roth, Karlsruhe
25 % Ficoll 400	Roth, Karlsruhe

Ansatz für ein 5% Polyacrylamidgel:

16 ml H ₂ O	
2,1 ml 10 x TBE-Puffer	
2,7 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung (Acrylamide-Bis 19:1)	Serva, Heidelberg
200 µl APS	Serva, Heidelberg
1,5 µl TEMED	Serva, Heidelberg

Elektrodenstreifen Serva, Heidelberg

Elektrophoresekammer LKB 2117 Multiphor II LKB/Pharmacia, Freiburg

Elektrophoresekühlgerät LKB 2219 Multitemp II LKB/Pharmacia, Freiburg

Entwicklerlösung:

0,28 M NaH ₂ CO ₃	Roth, Karlsruhe
0,019 % Formalin	Roth, Karlsruhe

Essigsäure 10% Roth, Karlsruhe

GelBond PAG-film Pharmacia, Freiburg

Gene Ruler 100 bp Ladder Plus MBI Fermentas, Litauen

Glasplatten 124 x 258 mm Glas Keil, Würzburg

Probenauftragsplättchen Serva, Heidelberg

Salpetersäure 1% Roth, Karlsruhe

Silbernitratlösung:

0,4 g AgNO ₃	Roth, Karlsruhe
200 ml Aqua dest.	

Spannungsgerät LKB 2297 Macrodrive 5 LKB/Pharmacia, Freiburg

Taumelschüttler Polymax 2040 Heidolph, Schwabach

Hochauflösende Kapillarelektrophorese:

GeneScan 500 ROX Size Standard Applied Biosystems, Weiterstadt

Genetic Analyzer ABI 310 Applied Biosystems, Weiterstadt

Sequenzierung der mtDNA:

BigDye-Kit Applied Biosystems, Weiterstadt

2.1.2 Knochenproben und Lagerung

Untersuchungsmaterial dieser Arbeit bildeten 21 Knochenproben verschiedener Individuen, die zum einen dem Sektionsgut des Instituts entnommen wurden, zum anderen aus Skelett- bzw. Knochenfunden stammten.

2.1.2.1 Knochenproben aus Sektionsgut

Aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Würzburg wurde mit Einverständnis des Auftraggebers in 14 geeigneten Fällen, bei Leichen mit unterschiedlicher Liegezeit, Knochenmaterial entnommen. Nach Möglichkeit wurde hierbei Material aus großen Röhrenknochen entnommen. In Fällen, wo dies aus sektionstechnischen Gründen nicht möglich war, wurde ein mehrere Zentimeter großes Rippenstück asserviert. In neun Fällen wurde ein Stück Rippe, in vier Fällen ein Femur und in einem Fall ein Tibiastück als Knochenprobe entnommen. Diese wurden in sterilen Röhrchen bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

<i>Stadium</i>	<i>Leichenveränderungen</i>
1	keine Zeichen der Leichenfäulnis
2	beginnende Zeichen der Leichenfäulnis (Durchschlagen des Venennetzes, Aufblähung, Ablösen der Oberhaut)
3	fortgeschrittene Zeichen der Leichenfäulnis (Grünfäule, Madenbefall mit / ohne Puppenbildung, faulige Erweichung der Organe)
4	Spätstadium mit (Teil-)Skelettierung

Tab. 5: Stadien der Leichenfäulnis (nach Wolff et al. 2001)

Die Liegezeit wurde als Zeitintervall zwischen mutmaßlichem Todeszeitpunkt und Verbringung der Leiche bzw. der Knochenproben in die Kühlung definiert. Es sollte hierbei also nur die Zeit der effektiv stattfindenden DNA-Degradierung durch Umwelteinflüsse gerechnet werden; die DNA-Degradation nach Einlagerung der Proben bei -20°C wurde vernachlässigt.

Die Liegezeit der Leichen, aus denen Knochenmaterial entnommen wurde, lag zwischen einer Stunde und 41 Wochen, mit einer durchschnittlichen Liegezeit von etwa 50 Tagen. Die Einteilung des Fortschritts der Leichenfäulnis erfolgte in vier Stadien in Anlehnung an Wolff et al. (2001). Zu Grunde gelegt wurden hierbei die im Sektionsprotokoll beschriebenen liegezeitbedingten Veränderungen.

<i>Probennummer</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Material</i>	<i>Liegezeit</i>	<i>Fundort - Jahreszeit</i>	<i>Stadium der Leichenfäulnis</i>
1	w	Rippe	1 Stunde	Wasser – Sommer	1
2	m	Femur	3-4 Tage	Wohnung – Sommer	2
3	m	Rippe	6 Tage	Wohnung – Frühling	3
4	m	Rippe	9 Tage	Wasser – Sommer	2-3
5	m	Rippe	10 Tage	Wohnung – Sommer	3
6	m	Rippe	14 Tage	Wohnung – Sommer	3
7	w	Rippe	15 Tage	Wohnung – Frühling	3
8	m	Rippe	15 Tage	Wohnung – Sommer	3
9	m	Femur	20 Tage	Wohnung – Sommer	3-4
10	w	Rippe	39 Tage	Wasser – Winter	1
11	m	Rippe	> 8 Wo.	Wasser – Winter	2-3
12	w	Tibia	16 Wo.	Container – Winter	3-4
13	m	Femur	17 Wo.	Wohnung – Sommer	3-4
14	m	Femur	41 Wo.	Wald - Frühling	4

Tab. 6: Übersicht über die aus Sektionsgut gewonnenen Knochenproben, nach Liegezeit geordnet

2.1.2.2 Knochenproben aus Skelett- bzw. Knochenfunden

In sieben Fällen dienten Skelett-, bzw. Knochenfunde als Untersuchungsmaterial, die dem Institut zur Begutachtung überlassen wurden. Diese wurden unter trockenen Bedingungen bei Raumtemperatur gelagert. Die grobe Einschätzung der Liegezeit erfolgte an Hand morphologischer Kriterien, analog der in Kapitel 1.2.3 beschriebenen Parameter.

Lediglich im Fall des in Probe 20 verarbeiteten Knochenfundes waren zusätzliche Informationen vorhanden, die eine weitere Eingrenzung der Liegezeit ermöglichten. Hierbei handelte es sich um einen Schädelknochen, der in der Nähe eines aus der Zeit der napoleonischen Koalitionskriege stammenden Soldatenfriedhofs bei Obernburg am Main gefunden wurde. Die auch das Gebiet um Obernburg erfassenden Koalitionskriege fanden um 1806 statt, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit von einer Liegezeit von etwa 200 Jahren für diesen Knochenfund auszugehen ist.

<i>Probennummer</i>	<i>Material</i>	<i>Weichteilreste</i>	<i>Fettwachs</i>	<i>Usuren</i>	<i>Festigkeitsverlust</i>	<i>geschätzte Liegezeit</i>
15	Femur	-	-	(+)	-	10-50 J.
16	Femur	-	-	(+)	-	10-50 J.
17	Schädel	-	-	+	-	10-50 J.
18	Kalottenstück	-	-	(+)	-	10-50 J.
19	Schädel	-	-	+	-	> 50 J.
20	Schädel	-	-	+	-	~ 200 J.
21	Femur	-	-	+	(+)	> 200 J.

Tab. 7: Übersicht über die Proben aus Skelett- bzw. Knochenfunden, nach Liegezeit geordnet

2.2 Methoden

2.2.1 Maßnahmen zur Kontaminationsvermeidung

Beim Umgang und der Analyse stark fragmentierter DNA sind Maßnahmen zur strikten Vermeidung einer Kontamination unabdingbar. Den verschiedenen Kontaminationsmöglichkeiten wurde durch entsprechende Maßnahmen begegnet (Hummel et al. 1995). Die Möglichkeit einer Kontamination durch rezente DNA ist im Verlauf des gesamten Probenbearbeitungs- und DNA-Extraktionsprozesses gegeben. Einerseits kann ein Eintrag rezenter DNA durch den Untersucher bzw. das Laborpersonal erfolgen, zum anderen durch kontaminierte Laborgegenstände oder Arbeitsflächen.

Ein weiteres Kontaminationsrisiko besteht in einer Kreuzkontamination durch Übertragung von DNA-Spuren zwischen den Proben. Eine Kontamination durch Übertragung von Amplifikationsprodukten zwischen verschiedenen Proben stellt die sogenannte "*carry-over*"-Kontamination dar.

Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos durch rezente DNA wurden während jedes Arbeitsschrittes Schutzbekleidung und Einmalhandschuhe getragen. Laborräumlichkeiten zur Aufbereitung der Proben, DNA-Extraktion und -Amplifikation der Proben wurden strikt voneinander getrennt. Jeder Arbeitsplatz wurde vor und nach Gebrauch sorgfältig mit 70 % Ethanol gereinigt. Zur Knochenaufbereitung und Gewinnung des Probenmaterials wurde ein eigener Arbeitsplatz unter einem Abzug mit laminarem Flow eingerichtet, an dem ausschließlich Knochen-DNA verarbeitet wurde. Die Arbeitsfläche dieses Arbeitsplatzes wurde zur Vermeidung einer Kreuzkontamination vor Bearbeitung jeder neuen Probe mit Aluminiumfolie ausgelegt und diese mittels eines Bunsenbrenners thermisch von eventuell kontaminierender DNA gereinigt. Sämtliche metallische Gerätschaften zur Knochenbearbeitung wurden vor Kontakt mit Knochen mit 70 % Ethanol gereinigt und anschließend in einer Bunsenbrennerflamme dekontaminiert.

Zum Ausschluss einer Kreuz- oder „carry over“-Kontamination wurden Negativkontrollen parallel zu jeder Extraktion bearbeitet, um eine eventuelle Kontamination der Extraktionspuffer bzw. der Amplifikationsprodukte aufzudecken. Jegliches Laborpersonal mit Zugang zum Probenmaterial, bzw. den Arbeitsräumen wurde als mögliche Kontaminationsquelle im PCR-Ergebnis ausgeschlossen. Es wurde darauf

Wert gelegt, nur Ergebnisse zu verwerten, bei denen sich die entsprechende Negativkontrolle als sauber erwies. Ein weiteres Risiko ergibt sich aus einer möglichen Kontamination der Probenoberfläche. Hierzu wurde die oberflächliche Knochenschicht nach vorhergehender Säuberung ca. 1 mm abgetragen (s. 2.2.2).

2.2.2 Vorbereitung des Probenmaterials

Im Falle der aus Sektionsgut stammenden Proben wurde evtl. anhaftendes Weichteilgewebe mit einem sterilen Einmalskalpell entfernt. In zwei Arbeitsschritten wurde die Knochenoberfläche mit destilliertem Wasser und 70% Ethanol gesäubert. Das Knochenmaterial wurde zum Trocknen für 1-2 Stunden unter dem Abzug belassen.

An dem trockenen Knochenmaterial wurde am Ort der geplanten Probenentnahme die oberflächliche Schicht in einer Dicke von etwa einem Millimeter mittels einer handelsüblichen Multifräse abgetragen. Vor der endgültigen Materialgewinnung wurde die Knochenoberfläche durch kurzes Schwenken in der Bunsenbrennerflamme dekontaminiert. Der Fräskopf wurde ebenfalls nach jedem Arbeitsschritt zunächst mit destilliertem Wasser, dann mit 70 % Ethanol gereinigt und vor jedem neuen Arbeitsschritt in der Flamme dekontaminiert.

2.2.3 Probenentnahme

Das endgültige Probenmaterial für die spätere DNA-Extraktion wurde mittels der Fräse in Form eines feinen Pulvers aus den tieferen Anteilen der Knochenkompakta gewonnen. Bei der Entnahme des Knochenpulvers wurde zur Vermeidung von thermischen Schäden der DNA am -21°C vorgekühlten Knochen mit niedrigen Drehzahlen der Fräse gearbeitet. Es wurde strikt darauf geachtet, ein Vordringen des Fräskopfes in den potentiell kontaminierten Markraum des Knochens zu vermeiden. Das Knochenpulver wurde in einer sterilen Petrischale aufgefangen, in 15 ml Zentrifugenröhrchen abgefüllt und gewogen.



Abb. 2: Probenentnahme mit der Fräse

2.2.4 DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus den Knochenproben erfolgte in Anlehnung an das von Toprak (persönliche Mitteilung) am Institut für Rechtsmedizin der Universität Münster entwickelte Protokoll mit EDTA-/Proteinase K-Verdau und reversibler Bindung der DNA an eine Silica-Membran (NucleoSpin Funnel Column, Macherey-Nagel).

1g Knochenpulver wurde in 100 μ l Proteinase K (20 mg/ml), 2 ml 0,5 M EDTA + 0,25 M Natriumphosphat (pH 8,0) und 7 ml Puffer T1 (Macherey-Nagel) über Nacht im Wasserbad bei 56°C inkubiert.

Durch den Extraktionspuffer mit EDTA, Proteinase K und Natriumphosphat wird die DNA aus den in der anorganischen Knochenmatrix liegenden Zellen herausgelöst. Der Chelator EDTA bewirkt durch Bindung von Kalzium-Ionen eine Dekalzifizierung des Hydroxylapatits. EDTA entfernt außerdem die für die Aufrechterhaltung der Gesamtstruktur der Zellhülle unentbehrlichen Magnesiumionen und hemmt DNA-abbauende Enzyme. Unter der fortschreitenden Dekalzifizierung des Knochenmaterials kann die im Puffer enthaltene Proteinase K die freiwerdenden Proteine spalten. Durch

die zusätzliche Zerstörung von DNAsen kommt es zu einer höheren DNA-Ausbeute im Extrakt. Das zugegebene Phosphat stabilisiert durch den schwach alkalischen pH die aus dem Hydroxylapatit-Knochenmatrix-Verbund herausgelösten DNA-Moleküle. Diese Prozesse sind durch die Pulverisierung der Probe und der damit verbundenen Oberflächenvergrößerung stark beschleunigt.

Entsprechend dem Temperaturoptimum der Proteinase wurden die Proben über Nacht bei 56°C im Wasserbad inkubiert, anschließend für 48 h bei 4°C im Überkopfschüttler belassen. Durch die Lagerung der Proben im Überkopfschüttler wird eine Sedimentierung des Knochenpulvers verhindert und den Puffersubstanzen ständig neue Angriffsfläche geboten. Dieser Vorgang wurde bei 4° C durchgeführt, um ein weiteres Degradieren der DNA zu verhindern.

Nach Zentrifugation für 3 min bei 1800 g wurde der Überstand mit 8 ml Puffer B3 (Macherey-Nagel) für 10 min bei 70°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 3 min bei 1800 g wurden dem Überstand 8,4 ml 100 % Ethanol zugefügt und nach kurzem Durchmischen für 2 min bei 1800 g zentrifugiert.

Nach Aufschließen der DNA aus den Zellen erfolgte die Bindung an eine Silica-Membran (NucleoSpin Funnel Column, Macherey-Nagel). An der Silica-Membran erfolgt eine spezifische, reversible Bindung der Nukleinsäuren. Dies ermöglicht ein effektives Waschen der DNA und somit weitestgehende Entfernung störender PCR-Hemmstoffe. Bei dem verwendeten System der Firma Macherey-Nagel sind die Silica-Partikel an eine Membran gebunden, so dass im Unterschied zum Protokoll von Höss und Pääbo (1993) ein Silica-freies Extrakt sichergestellt werden kann, welches nach Abschluss des Waschvorganges von der Membran eluiert wird.

Hierfür wurde eine Silica-Membran (NucleoSpin Funnel Column, Macherey-Nagel) in jeweils 10 ml Schritten mit der extrahierten DNA beladen und für 3 min bei 1500 g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und der Vorgang bis zum Aufbrauch des gesamten Probenansatzes wiederholt. Die an die Silica-Membran gebundene DNA wurde mit 3 ml Puffer BW (Macherey-Nagel) und zweimal mit 3 ml Puffer B5 (Macherey-Nagel) gewaschen. Die Elution der DNA von der Silica-Membran erfolgte durch Zugabe von 80 µl Tris/HCl (5 mM, pH 8,5, 70° C), Inkubation bei Raumtemperatur für 3 min und anschließendes Zentrifugieren für 3 min bei 1000 g.

2.2.5 DNA-Aufreinigung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Aufreinigung mittels Microcon YM-30 Filtereinheiten (Millipore, Eschborn) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wird ein Filter definierter Porengröße eingesetzt, nur Substanzen oberhalb eines bestimmten cut-off-Molekulargewichts werden in den Poren zurückgehalten. Für die Filtergröße ergibt sich bei dem verwendeten Produkt eine untere nominale Molekulargewichtsgrenze von 30.000 Dalton (ca. 45 bp).

2.2.6 Multiplex-STR mit dem AmpFISTR Profiler Plus Kit

Der AmpFISTR Profiler Plus Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) ist ein PCR-Multiplex-Kit zur Co-Amplifikation von neun STR-Loci (D3S1358, vWA, FGA, D8S1179, D21S11, D18S51, D5S818, D13S317, D7S820). Zusätzlich wird ein Segment des X-Y homologen Amelogenin-Gens amplifiziert, welches aufgrund der unterschiedlichen Länge auf X- und Y-Chromosom zur Geschlechtszuordnung verwendet werden kann (Sullivan et al. 1993).

<i>Locus</i>	<i>Allelgröße [bp]</i>	<i>Chromosom</i>	<i>Allelzahl</i>	<i>Markierung</i>
Amelogenin	107, 113	X, Y	2	JOE
D3S1358	114 -142	3	8	5-FAM
D8S1179	128 - 168	8	12	JOE
D5S818	135 - 171	5	10	NED
vWA	157 - 197	12	11	5-FAM
D21S11	189 - 243	21	22	JOE
D13S317	206 - 234	13	8	NED
FGA	219 - 267	4	14	5-FAM
D7S820	258 - 294	7	10	NED
D18S51	273 - 341	18	21	JOE

Tab. 8: AmpFISTR Profiler Plus Systeme (www.appliedbiosystems.com),
sortiert nach Allelgröße der Systeme.

Ein Primer jedes STR-Locus ist mit einem von drei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (5-FAM - blau, JOE - grün, NED - gelb). Dadurch können, nach gelelektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte, sich gegenseitig überlappende Allele anhand der Farbmarkierung einem STR-System zugeordnet werden.

2.2.7 vs-STR-Systeme

Bei den drei vs-STR-Systemen (TPOXvs, TH01vs, FESvs) handelt es sich um verkürzte STR-Systeme, bei denen es Hellmann et. al 2001 gelang, durch Einsatz neu entwickelter Primer, die flankierende Region zwischen Primerbindungsstelle und repetitiver STR-Sequenz und somit auch das Amplifikationsprodukt und damit die Allelgröße zu verkürzen (vgl. 1.1.3.3).

	<i>Primersequenz 5'-3'</i>	<i>Markierung</i>	<i>Literatur</i>
FESvs	P 1: GTTTAGGAGACAAGGATAGCAGT P 2: GCGAAAGAATGAGACTACAT	FAM	Hellmann et al. (2001)
TH01vs	P 1: CCTGTTCCCTCCCTTATTTCC P 2: GAACACAGACTCCATGGTG	HEX	Umetsu et al. (1997)
TPOXvs	P 1: GGGAACCCTCACTGAATG P 2: CAGCGTTTATTTGCCCAA	TAMRA	Hellmann et al. (2001)

Tab. 9: Primersequenzen der vs-STR-Systeme

Die Primer sind zur späteren Analyse im automatischen Sequencer fluoreszenzmarkiert (Tab. 9) und wurden von der Fa. MWG-Biotech, Ebersdorf, bezogen.

2.2.8 Mitochondriale DNA

Zwei ausgewählte Proben (17 und 20), bei denen die Analyse nukleärer DNA erfolglos blieb, wurden zur exemplarischen Analyse der mtDNA ausgewählt. Hierbei wurde ein 400 bp langes Segment (Primer 1: L 15997; Primer 2: H 16395) der hypervariablen Kontrollregion HV-1 des mitochondrialen Genoms amplifiziert.

2.2.9 Durchführung der PCR

Die PCR wurde in automatischen Thermocyclern (PE Gene Amp PCR System 2400 und Biometra „Personal Cycler“) durchgeführt. Für den Standard-Reaktionsansatz wurden 5 µl DNA verwendet. Stellten sich bei der Auftrennung und Visualisierung der PCR-Produkte in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Silbernitratfärbung die Banden nicht in gewünschter Weise dar, wurde in einem erneuten PCR-Ansatz die Menge der verwendeten DNA zwischen 0,5 und 9,5 µl variiert, die Zugabe von sterilem Aqua dest. entsprechend angepasst.

Um das Auftreten sogenannter n-1-Produkte zu verhindern, wurde nach Beendigung der zyklischen DNA-Amplifikation ein abschließender Extensionsschritt durchgeführt. n-1-Produkte entstehen während der PCR-Reaktion durch unvollständig amplifizierte DNA-Stränge. Der Extensionsschritt bewirkt ein abschließendes Auffüllen der nicht vollständig amplifizierten DNA-Stränge durch die DNA-Polymerase.

2.2.9.1 AmpFISTR Profiler Plus Kit

Die Amplifikation des AmpFISTR Profiler Plus Kits wurde im Thermocycler PE Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Jeder Reaktionsansatz bestand aus 25 µl. Zunächst wurde ein Amplifikationsmix angesetzt, der die entsprechende Menge an Primern, PCR-Puffer und Taq-Polymerase für die benötigte Probenanzahl, incl. einer Negativ- und Positiv-Kontrolle enthielt.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
AmpFISTR PCR Reaction Mix	10 µl
AmpFISTR Profiler Plus Primer Set	5 µl
Ampli Taq Gold (5 U/µl)	0,5 µl
DNA	5 µl
Aqua dest.	4,5 µl

Tab. 10: PCR-Ansatz AmpFISTR Profiler Plus Kit

Nach Verteilung auf die PCR-Gefäße wurden je Probe 5 µl des DNA-Extraktes zugegeben und der Reaktionsansatz mit Aqua dest. auf 25 µl je Probe aufgefüllt. Die

Proben wurden verschlossen, durchmischt, kurz abzentrifugiert und abschließend in den Thermocycler gegeben.

	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
initiale Denaturierung	95°C	11 min
28 Zyklen	94°C	1 min
	59°C	1 min
	72°C	1 min
abschließende Extension	60°C	45 min
Kühlung	4°C	unendlich

Tab. 11: PCR-Bedingungen AmpFISTR Profiler Plus Kit

2.2.9.2 vs-STR-Systeme

Die Amplifikation der vs-STR-Loci erfolgte im Thermocycler „Personal Cycler“ (Biometra, Göttingen). Jeder Reaktionsansatz bestand aus 25 µl. Als Verdunstungsschutz während der Amplifikation wurden zu jedem Ansatz zwei Tropfen Mineralöl zugegeben.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
10x Taq Buffer	2,5 µl
Primer I	0,75 µl
Primer II	0,75 µl
Nucleotide-Triphosphat (5 mM)	1 µl
Taq DNA Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
DNA	5 µl
Aqua dest.	14,8 µl

Tab. 12: PCR-Ansatz vs-STR-Systeme

	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
initiale Denaturierung	94°C	1 min
28 Zyklen	94°C	1 min
	54°C	1 min
	72°C	1 min
abschließende Extension	72°C	10 min
Kühlung	4°C	unendlich

Tab. 13: PCR-Bedingungen zur Amplifikation der vs-STR

2.2.9.3 mtDNA

Die Amplifikation der hypervariablen Region 1 wurde im Thermocycler PE Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
10x Taq Buffer	5 µl
Primer I	1,5 µl
Primer II	1,5 µl
Nucleotide-Triphosphat (5 mM)	2 µl
Ampli Taq Gold (5 U/µl)	0,4 µl
DNA	5 µl
Aqua dest.	34,6 µl

Tab. 14 : PCR-Ansatz mtDNA

	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
initiale Denaturierung	94°C	1 min
30 Zyklen	94°C	1 min
	56°C	1 min
	72°C	1 min
abschließende Extension	72°C	10 min
Kühlung	4°C	unendlich

Tab. 15: PCR-Bedingungen zur Amplifikation der mtDNA

2.2.10 Gelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese macht man sich die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld, das an ein synthetisches Gel angelegt wird, zunutze. Durch die negative Netto-Ladung der DNA kommt es im elektrischen Feld zu einer zur Anode gerichteten Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe, erkannt durch ihre unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit im komplexen Porennetzwerk des Gels. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt hierbei von der Nettoladung, der Molekülgröße und -form, sowie der angelegten Spannung ab (Koolmann 1994).

Durch parallele Elektrophorese eines definierten Längenstandards können Aussagen über die Größe der aufgetrennten Fragmente getroffen werden.

2.2.10.1 Niedrigauflösende horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Zur Überprüfung des Amplifikationserfolges wurden die PCR-Produkte in einem 5 % Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Silbernitratfärbung wurde die Größenabschätzung der Fragmente anhand einer 100 bp-Leiter vorgenommen.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Aqua dest.	16 ml
10x TBE-Puffer	2,1 ml
Acrylamid/Bisacrylamidlösung 19:1	2,7 ml
APS	200 µl
TEMED	1,5 µl

Tab. 16: Ansatz für ein 5 % Polyacrylamidgel

Herstellung des 5 % Polyacrylamidgels

Nach Ansatz der Gellösung (Tab. 16) wurde diese zwischen zwei Glasplatten auf einen GelBond PAG-film (Pharmacia, Freiburg) gegossen. Die Geldicke wurde mit 0,75 mm dicken Abstandshaltern vorgegeben.

Beschicken des Gels

Nach Auspolymerisierung wurde das Gel entnommen und je 4 µl der PCR-Produkte mittels Probenauftragsplättchen auf das Gel gegeben. Eine zusätzlich aufgebrauchte 100

bp-Leiter diente der Abschätzung der Größe der Amplifikate. An die Enden des Gels wurde ein in 1x TBE getränkter Filterpapierstreifen zur Elektrodenapplikation gelegt, die Lauffront wurde mittels Bromphenolblau sichtbar gemacht. Die Auftrennung erfolgte in der Elektrophoresekammer LKB 2117 Multiphor II (LKB/Pharmacia, Freiburg) bei 1000 V, 40 mA und 5 W.

Silbernitratfärbung

Zur Visualisierung der Banden erfolgte die Silbernitratfärbung nach Budowle et al. (1991). Hierzu wurde das Gel in 1 % Salpetersäure fünf Minuten fixiert. Nach Waschen mit destilliertem Wasser wurde frisch angesetzte Silbernitratlösung für 12 Minuten zugegeben. Die Anfärbung der Banden in der Entwicklerlösung wurde mit 10 % Essigsäure gestoppt, sobald die Banden die gewünschte Färbung erreicht hatten.

2.2.10.2 Hochauflösende Kapillarelektrophorese

Die Analyse der STR-Systeme erfolgte durch kapillarelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate im Sequenzierautomaten Genetic Analyzer ABI 310 (Applied Biosystems). Die Elektrophorese erfolgt hierbei in einer mit Polymer gefüllten Kapillare (Ziegler et al. 1992). Mit Hilfe lasergestützter Fragmentlängendetektion der fluoreszenzmarkierten DNA-Einzelstrangfragmente kann durch Zuordnung zu einem internen Längenstandard (GeneScan 500 ROX Size Standard, Applied Biosystems) die Längenbestimmung bis zu einem Basenpaar genau durchgeführt werden (Kimpton et al. 1993).

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
Formamid	12 µl
GeneScan 500 ROX Size Standard	0,5 µl
PCR-Produkt	0,5 - 3 µl

Tab. 17: Ansatz zur Kapillarelektrophorese im Genetic Analyzer ABI 310

Durch Vergleich mit einer parallel aufgetrennten Allelleiter werden die Allele der jeweiligen Systeme bestimmt. Zunächst wurde ein Mix angesetzt, der die entsprechende Menge an Formamid und Längenstandard für die benötigte Probenanzahl, incl. der jeweiligen Allelleitern und einer Negativ-Kontrolle enthält.

Nach Verteilung auf die Probengefäße wurde in Abhängigkeit der Bandenstärke in der niedrigauflösenden horizontalen PAGE 0,5 bis 3 µl des jeweiligen PCR-Produkts zugegeben. Vor dem Beladen des Sequenzierautomaten wurden die Proben zur Strangtrennung für 150 Sekunden bei 95° C im Heizblock inkubiert.

2.2.11 Sequenzierung der mtDNA Sequenz

Die Sequenzierung der mtDNA wurde nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977) durchgeführt. Diese Methode beruht auf der enzymatischen Kopierung des zu sequenzierenden DNA-Stranges unter Einbau zufällig verteilter fluoreszenzmarkierter Nukleotide, die nach erfolgtem Einbau zum DNA-Kettenabbruch führen. So entstehen während der Reaktion unterschiedlich lange DNA-Strangkopien, die jeweils mit einem der vier farbmarkierten Nukleotide enden. Die so markierten DNA-Fragmente wurden im Sequenzierautomaten Genetic Analyzer ABI 310 kapillarelektrophoretisch aufgetrennt, die endständigen fluoreszenzmarkierten Nukleotide von einem Laser detektiert. Zur Sequenzierung wurde für diese Arbeit der Bigdye-Kit von Applied Biosystems eingesetzt. Die Amplifikation unter Einbau der fluoreszenzmarkierten Nukleotide wurde im Thermocycler PE Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

<i>Reagenz</i>	<i>Menge</i>
TRR (Terminator-Ready-Reaction Mix)	2 µl
Primer	0,7 µl
DNA	20 ng
Aqua dest.	ad 10 µl

Tab. 18: Ansatz zur mtDNA Sequenzierung

	<i>Temperatur</i>	<i>Dauer</i>
30 Zyklen	96°C	1 min
	54°C	1 min
	60°C	1 min

Tab. 19: PCR-Bedingungen mtDNA Sequenzierung

3. Ergebnisse

3.1 AmpFISTR Profiler Plus Kit

Zur Erstellung eines autosomalen STR-Fingerprints und zur molekularen Geschlechtszuordnung wurden die DNA-Extrakte aller Proben einer Multiplex-Amplifikation mit dem AmpFISTR Profiler Plus Kit unterzogen. Aus jedem der 21 zur Verfügung stehenden Knochenmaterialien wurden zwei getrennte Proben entnommen, diese unabhängig voneinander extrahiert und amplifiziert. Die Beurteilung des Amplifikationserfolges bzw. -misserfolges erfolgte anhand der aus beiden Amplifikationen gewonnenen Ergebnisse. Proben, bei denen sich das Ergebnis der ersten Amplifikation im Rahmen der zweiten Amplifikation bestätigte, wurden als erfolgreich typisierbar klassifiziert.

Die Ergebnisse derjenigen Proben, bei denen sich nur in einer Amplifikation ein Ergebnis erzielen ließ bzw. bei denen sich in beiden Amplifikaten jeweils verschiedene Ergebnisse zeigten, wurden nicht gewertet. In den Tabellen sind diese Ergebnisse in Klammern gesetzt, die Ergebnisse beider Amplifikationen der Übersichtlichkeit halber als a und b getrennt voneinander aufgeführt. Proben, bei denen in beiden Fällen keine Amplifikate nachweisbar waren, wurden als nicht typisierbar bezeichnet und mit einem Minuszeichen gekennzeichnet. Bei der Analyse der Negativ-Kontrollen konnte in keinem Fall eine Verunreinigung nachgewiesen werden. Eine mögliche Kontamination durch Laborpersonal mit Zugang zum Probenmaterial bzw. den Arbeitsräumen konnte durch Vergleich der PCR-Ergebnisse mit den bekannten Fingerprints des Personals ausgeschlossen werden.

3.1.1 Knochenproben aus Sektionsgut

Bei der Amplifikation der autosomalen STRs mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit ließ sich für 13 der 14 aus Sektionsgut gewonnenen Knochenmaterialien (93 %) ein reproduzierbares Allelprofil gewinnen. Diese 13 Proben waren in allen amplifizierten Systemen typisierbar, so dass ein durchgängiges Allelprofil angefertigt werden konnte. Stellvertretend sei das Elektropherogramm der Allelverteilung für Probe 13 dargestellt (Abb. 3).

Zu erkennen ist hierbei die für degradierte DNA charakteristische, abnehmende Peakhöhe, entsprechend geringeren Amplifikationsprodukten, mit steigender Größe des STR-Systems.

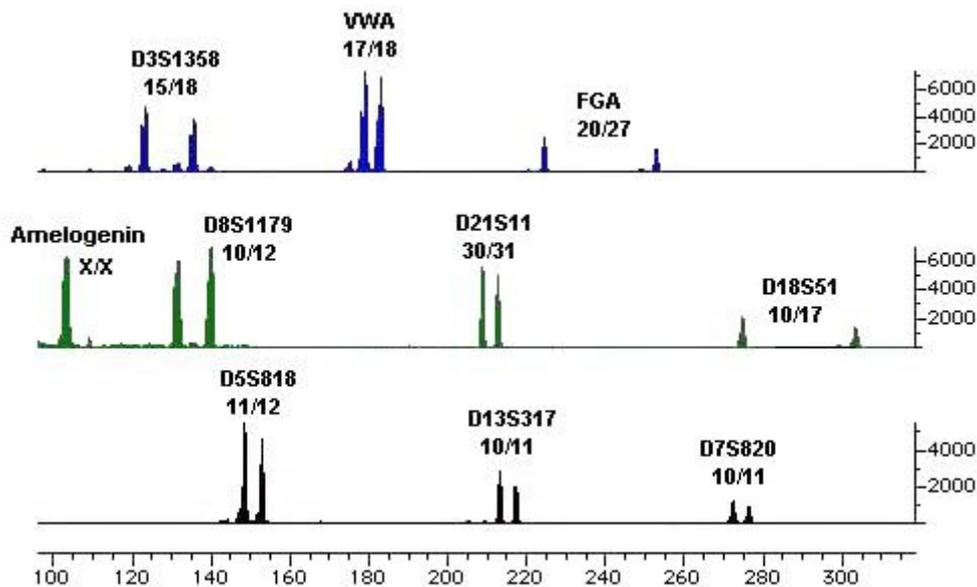


Abb. 3: Längenfragmentanalyse der Allele für Probe 12 mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit (X-Achse: Länge der Amplifikationsprodukte in Basenpaaren; Y-Achse: Peakhöhe in dimensionslosen Fluoreszenzeinheiten); charakteristische abnehmende Peakhöhe mit zunehmender Länge der STR-Systeme.

Für eine Probe (14) konnte mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit lediglich in einem System ein reproduzierbares Ergebnis amplifiziert werden. Diese Probe war im Amelogenin-Locus typisierbar, so dass eine molekulare Geschlechtszuordnung durchgeführt werden konnte. In den anderen getesteten Systemen konnte kein reproduzierbares Amplifikationsergebniss gewonnen werden. Festzustellen ist, dass es sich bei dieser Knochenprobe, mit einer Liegezeit von 41 Wochen, um die älteste, aus Sektionsgut gewonnene Probe handelte.

	Amelo. 102/110	D3S1358 110-140	D8S1179 120-170	D5S818 130-170	VWA 155-195	D21S11 185-240	D13S317 205-235	FGA 215-265	D7S820 255-295	D18S51 270-340
1	X/X	16/17	12/13	12/12	18/19	28/30	12/14	22/24	9/11	15/17
2	X/Y	15/18	10/14	12/12	16/18	30/31	12/12	21/22	9/10	16/17
3	X/Y	15/16	15/16	10/10	16/18	28/30	8/8	18/20	8/8	15/16
4	X/Y	17/17	12/15	9/10	18/19	29/30	12/12	20/20	12/12	14/14
5	X/Y	15/16	10/13	11/12	16/16	31,2/32	11/13	22/24	8/10	15/19
6	X/Y	15/17	13/13	11/11	14/18	29/32,2	11/14	20/21	9/9	13/22
7	X/X	18/18	13/14	11/12	16/17	30/32,2	9/11	19/20	12/12	17/17
8	X/Y	17/18	10/13	11/12	16/20	31/33,2	9/12	20/22	8/9	11/14
9	X/Y	17/19	13/15	10/12	16/18	30/31	8/12	19/21	12/12	12/13
10	X/X	16/18	13/14	12/13	17/21	28/29	11/12	20/23	8/11	13/17
11	X/Y	14/17	12/13	11/11	16/16	28/31	8/11	20/23	10/10	13/14
12	X/X	15/18	10/12	11/12	17/18	30/31	10/11	20/27	10/11	10/17
13	X/Y	17/18	11/13	11/13	14/15	29/31,2	10/11	20/23	9/10	13/15
14a	X/Y	(17/17)	-	(12/12)	(17/17)	-	-	(20/20)	-	-
14b	X/Y	(17/19)	(13/14)	(13/13)	(18/18)	-	-	(22/22)	-	-

Tab. 20: Typisierungsergebnisse der aus Sektionsgut gewonnenen Knochenproben mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit (Systeme [bp] und Proben nach Allelgröße, bzw. Liegezeit geordnet)

Für fünf Proben waren Referenzergebnisse vorhanden (Tab. 21). In vier Fällen (Proben 5, 9, 11, 12) war ein Allelprofil durch Typisierung von Spuren-, bzw. Vergleichs-DNA des mutmaßlich Verstorbenen bereits bekannt. In diesen vier Fällen zeigte der direkte Vergleich der gewonnenen Typisierungsergebnisse mit den Referenzdaten eine vollständige Übereinstimmung.

	Amelo. 102/110	D3S1358 110-140	D8S1179 120-170	D5S818 130-170	VWA 155-195	D21S11 185-240	D13S317 205-235	FGA 215-265	D7S820 255-295	D18S51 270-340
5 R	X/Y	15/16	10/13	11/12	16/16	31,2/32	11/13	22/24	8/10	15/19
9 R	X/Y	17/19	13/15	10/12	16/18	30/31	8/12	19/21	12/12	12/13
11 R	X/Y	14/17	12/13	-	16/16	28/31	-	20/23	-	13/14
12 R	X/X	15/18	10/12	-	17/18	30/31	-	20/27	-	10/17
13 R	X/Y	17/17	13/13	11/13	14/15	29/31,2	9/10	19/23	10/13	12/12

Tab. 21: Allelprofile der zur Verfügung stehenden Referenzdaten (mit - bezeichnete Systeme wurden für Proben 11 R und 12 R nicht bestimmt)

In einem Fall (Probe 13) lag das Allelprofil eines Geschwisters als Vergleichsmaterial vor. Der Versuch der Erstellung eines DNA-Profiles aus Muskelgewebe, das der Leiche im Rahmen der Sektion nach einer Liegezeit von 17 Wochen entnommen wurde, war gescheitert. Beim Vergleich der Ergebnisse konnte die geschwisterliche Verwandtschaft in keinem System ausgeschlossen werden. Die Berechnung ergab unter Berücksichtigung europäischer Verteilungsdaten eine Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer Vollgeschwisterschaft von 99,73 %.

3.1.2 Knochenproben aus Skelett- bzw. Knochenfunden

Bei der Bewertung der Typisierungsergebnisse wurde analog dem in 3.1 beschriebenen Procedere vorgegangen. Bei der Amplifikation der autosomalen STRs mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit ließ sich für keine der sieben Proben aus Skelett- bzw. Knochenfunden ein reproduzierbares Allelprofil gewinnen.

Bei zwei Proben (17 und 20) konnte in jeweils einer der unabhängig voneinander durchgeführten Typisierungen ein Ergebnis erzielt werden, welches jedoch nicht reproduzierbar war. Im Fall der Probe 17 konnten hierbei neun Systeme bestimmt werden. Bei Probe 20 konnten Ergebnisse in sieben Systemen gefunden werden, wovon jedoch in zwei Fällen drei Allele auftraten.

	<i>Amelo.</i>	<i>D3S1358</i>	<i>D8S1179</i>	<i>D5S818</i>	<i>VWA</i>	<i>D21S11</i>	<i>D13S317</i>	<i>FGA</i>	<i>D7S820</i>	<i>D18S51</i>
	102-110	110-140	120-170	130-170	155-195	185-240	205-235	215-265	255-295	270-340
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17a	(X/Y)	(16/17)	(12/12)	(9/12)	(15/16)	(29/30)	(10/11)	(20/21)	(8/10)	-
17b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20a	(X/Y)	(15/16/19)	(8/12/13)	(11/11)	(16/17)	(29/32,3)	-	(22/23)	-	-
20b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 22: Typisierungsergebnisse der Knochenproben aus Skelett- bzw. Knochenfunden mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit

3.2 vs-STR-Systeme

3.2.1 Herstellung einer Allelleiter

Für jedes der drei vs-STR-Systeme wurde eine Allelleiter zusammengestellt, anhand derer die Allele der späteren Amplifikate ermittelt werden konnten. Hierzu wurde zunächst für jeden Labormitarbeiter ein Allelprofil in den konventionellen STR-Systemen FES, TH01 und TPOX bestimmt. Durch geeignete Kombination der unterschiedlichen Allele verschiedener DNA-Extrakte wurde für jedes System eine Allelleiter gebildet. Die jeweilige DNA-Kombination wurde nun im entsprechenden vs-System amplifiziert, anschließend im Sequencer typisiert. Anhand der Allelleiter als Referenz konnten die Allele entsprechend ihrer Größe definiert werden.

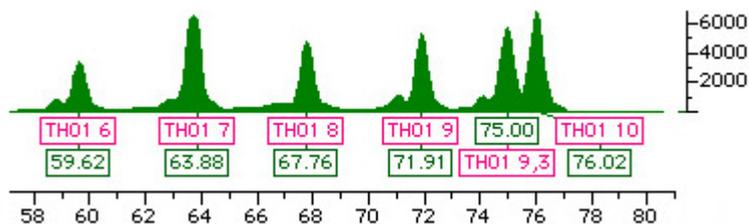


Abb. 4: Allelleiter TH01vs

3.2.2 Knochenproben aus Sektionsgut

Bei der Amplifikation der vs-STRs konnte für 13 der 14 aus Sektionsgut gewonnenen Knochenmaterialien (93 %) in allen drei Systemen ein reproduzierbares Ergebnis gewonnen werden. Die älteste, aus Sektionsgut gewonnene Probe (14), konnte nur im System TPOXvs reproduzierbar typisiert werden. In den anderen beiden Systemen konnte jeweils nur in einem der Typisierungsgänge ein Ergebnis erzielt werden, wobei im System TH01vs drei Allele auftraten.

	<i>TPOXvs</i> 58-86	<i>TH01vs</i> 61-85	<i>FESvs</i> 81-105
1	8/11	6/7	10/10
2	10/11	9,3/9,3	12/12
3	8/10	9,3/10	11/12
4	8/11	6/9	10/12
5	8/8	9/9,3	10/11
6	8/8	9,3/9,3	11/11
7	8/11	9/9	11/11
8	11/11	7/9,3	10/12
9	8/8	6/9	11/11
10	8/8	9,3/9,3	10/12
11	8/11	7/9,3	11/11
12	8/11	7/9,3	10/11
13	8/11	6/6	11/11
14a	8/10	(7/8/9)	-
14b	8/10	-	(10/10)

Tab. 23: Typisierungsergebnisse der aus Sektionsgut gewonnenen Knochenproben in den vs-STR-Systemen

Stellvertretend sei das Elektropherogramm der Allelverteilung für Probe 7 dargestellt (Abb. 5).

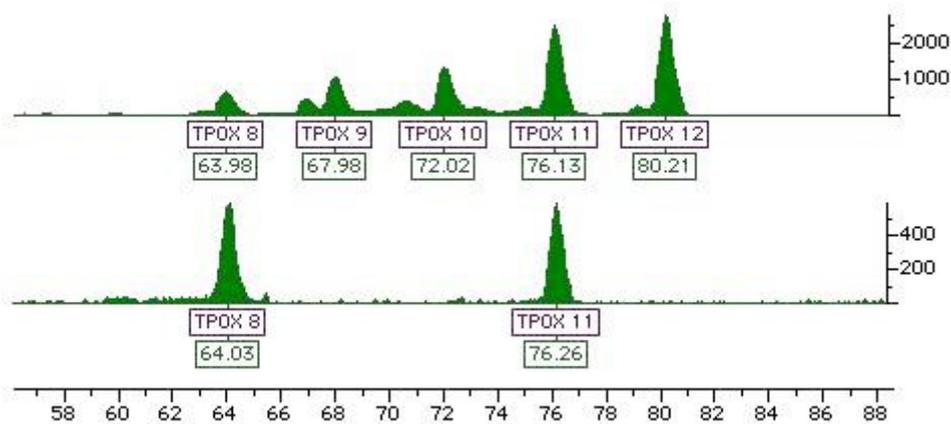


Abb. 5: Längenfragmentanalyse der Allele für Probe 7 des vs-STR-Locus TPOXvs (X-Achse: Länge der Amplifikationsprodukte in Basenpaaren; Y-Achse: Peakhöhe in dimensionslosen Fluoreszenzeinheiten)

3.2.3 Knochenproben aus Skelett- bzw. Knochenfunden

Bei der Bestimmung der vs-STRs ließ sich für die Proben aus Skelett- bzw. Knochenfunden bei keiner der sieben Proben ein reproduzierbares Allelprofil gewinnen.

	<i>TPOXvs</i> 58-86	<i>TH01vs</i> 61-85	<i>FESvs</i> 81-105
15a	(10/10)	(9,3/9,3)	-
15b	-	-	-
16a	(8/9)	(6/6)	-
16b	(11/11)	-	-
17a	(9/10)	(6/9)	-
17b	-	-	-
18a	-	-	-
18b	-	-	-
19a	(8/8)	(9,3/9,3)	-
19b	(8/9/11)	(8/9/9,3)	-
20a	(8/8)	-	(10/10)
20b	-	-	-
21a	8/11	(6/9)	-
21b	8/11	-	-

Tab. 24: Typisierungsergebnisse der aus Skelett- bzw. Knochenfunden gewonnenen Knochenproben in den vs-STR-Systemen

Lediglich Probe 21 konnte in einem der Systeme (TPOXvs) erfolgreich typisiert werden. Im Falle der Proben 15, 16, 17, 19 und 20 wurden zwar Ergebnisse erzielt, die jedoch in der Kontrolle nicht reproduzierbar waren. Für Probe 18 konnte kein Ergebnis gewonnen werden.

3.3 mtDNA

Exemplarisch wurde für zwei Proben aus der Gruppe der Skelett- bzw. Knochenfunde, welche im Rahmen der nukleären DNA-Analyse kein reproduzierbares Ergebnis gebracht hatten, eine Analyse mitochondrialer DNA vorgenommen. Es wurde ein Fragment der HV1-Region des mitochondrialen Genoms amplifiziert.

	15990	16000	16010	16020	16030
Anderson					
Probe 17	C CAAAGCTAAG	ATTCTAATTT	AAACTATTCT	CTGTTCTTTC	ATGGGGAAG
Probe 20		AG ATTCTAATTT	AAACTATTCT	CTGTTCTTTC	ATGGGGAAG
	16040	16050	16060	16070	16080
Anderson					
Probe 17	C AGATTTGGGT	ACCACCCAAG	TATTGACTCA	CCCATCAACA	ACCGCTATG
Probe 20	C AGATTTGGGT	ACCACCCAAG	TATTGACTCA	CCCATCAACA	ACCGCTATG
	16090	16100	16110	16120	16130
Anderson					
Probe 17	T ATTTTCGTACA	TTACTGCCAG	CCACCATGAA	TATTGTACGG	TACCATAAA
Probe 20	T ATTTTCGTACA	TTACTGCCAG	CCACCATGAA	TATTGTACGG	TACCATAAA
	16140	16150	16160	16170	16180
Anderson					
Probe 17	T ACTTGACCAC	CTGTAGTACA	TAAAAACCCA	ATCCACATCA	AAACCCCCT
Probe 20	T ACTTGACCAC	CTGTAGTACA	TAAAAACCCA	ATCCACATCA	AAACCCCCT
	16190	16200	16210	16220	16230
Anderson					
Probe 17	C CCCATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCCTCAACTA	TCACACATC
Probe 20	C CT CATGCTTA	CAAGCAAGTA	CAGCAATCAA	CCCTCAACTA	TCA
	C CCCATGCTT				

Tab. 25: Sequenzierungsergebnis der mtDNA-Sequenz des amplifizierten Segments der HV1-Region im Vergleich zur Anderson-Sequenz

Im Falle der Probe 17 konnte ein 234 Nukleotide langes Segment (15 999 – 16 233), für Probe 20 ein 194 Nukleotide umfassendes Segment (15 999 – 16193) sequenziert werden. Probe 17 zeigt im Vergleich zur Referenz-Sequenz von Anderson an Position 16192 eine Sequenzänderung, Probe 20 zeigte für den sequenzierten Bereich Übereinstimmung mit der Referenz-Sequenz.

4. Diskussion

4.1 Methoden

4.1.1 Probenbearbeitung

Die Maßnahmen zur strikten Kontaminationsvermeidung bei der Bearbeitung und Analyse stark fragmentierter DNA wurden bereits in Kap. 2.2.1 angesprochen. Dies betrifft bei der Bearbeitung vor allem die Knochenoberfläche, von der ein Eintrag kontaminierender DNA stattfinden kann. Folglich muss vor Entnahme der Proben zur Extraktion eine Oberflächenbearbeitung durchgeführt werden. Neben oberflächlich vorhandenen Fremd-DNA-Eintragungen werden Verunreinigungen des Knochens, die sich aus den Lagerungsbedingungen ergeben, entfernt. Dies ist vor allem bei erd- oder bodengelagerten Knochen wichtig, da Verschmutzungen der Knochenoberfläche mit Humin- und Fulvinsäuren aus dem umgebenden Erdreich zu einer Inhibition der späteren PCR führen können (Burger et al. 1999).

Viele unterschiedliche Verfahren werden in der Literatur angegeben, wobei überwiegend abrasive Techniken Anwendung finden: Sandstrahlen der Knochenoberfläche mit Aluminium-Oxid-Sand (Hagelberg et al. 1991a), Bearbeitung mit Schleifpapier oder einem Bohrschleifer (Höss und Pääbo 1993; Yang et al. 1998). Andere Autoren vertrauen auf die Zerstörung kontaminierender DNA durch eine UV-Bestrahlung der Oberfläche zur Bildung von Pyrimidin-Dimeren innerhalb des DNA-Strangs (Lassen et al. 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls ein abrasives Verfahren eingesetzt. Nach entsprechender Reinigung der Knochenoberfläche erfolgte die Entfernung der oberflächlichen Knochenschicht um ca. 1 mm mit einer Fräse. Das Verfahren wurde wegen der Möglichkeit zur einfachen Reinigung und thermischen Dekontamination des Fräskopfes in der Bunsenbrennerflamme gewählt.

Die endgültige Probenentnahme wurde ebenfalls mit Hilfe des Fräskopfes durchgeführt. Dieses Verfahren bietet einige Vorteile. Durch den kleinen Fräskopf (ca. 5 mm Durchmesser) ist eine gezielte Materialentnahme aus dem mittleren Kompaktbereich möglich. Ausgehend von einer Verunreinigung des Knochens nicht nur an der Außenseite, sondern auch im Bereich der Markhöhle wurde versucht, möglichst nur Material aus dem mittleren Drittel der Kompakta zu gewinnen. Dieser Ansatz beruht auf histologischen Untersuchungen archäologischen Knochenmaterials (Hagelberg und

Clegg 1991b), bei denen eine zumindest teilweise erhaltene Mikromorphologie des Knochengewebes im mittleren Kompaktadrittel, bei weitgehender diagenetischer Zerstörung des äußeren und inneren, an die Markhöhle grenzenden Kompaktaanteils, gezeigt werden konnte. Aus den genannten Gründen ist gerade bei Knochenproben mit degradierter DNA eine Entnahme möglichst aus Material mit dicker Kompakta zu fordern; dies ließ sich jedoch im Rahmen dieser Arbeit auf Grund fehlenden Untersuchungsmaterials leider nicht für alle Proben realisieren.

Die Entnahme des Knochenpulvers mittels Fräse bietet im Unterschied zur Verwendung einer elektrischen Mühle zwei Vorteile. Zum einen ist eine gezielte Probenentnahme aus der mittleren Kompaktaschicht möglich. Zum anderen kann bei Verwendung der Fräse das Risiko einer Kontamination durch die einfache Säuberung und Dekontaminierung des Fräskopfes minimiert werden. Darüberhinaus ist das gewonnene Knochenpulver nach eigenen Erfahrungen deutlich feiner als vergleichbares Material aus einer elektrischen Mühle und bietet somit den Extraktionspuffern größtmögliche Angriffsfläche um ein Aufschließen der Zellen zu erleichtern.

4.1.2 DNA-Extraktion

DNA-Extraktion und Aufreinigung können als die kritischen Schritte im gesamten Ablauf der Analyse degradierter DNA angesehen werden (Cattaneo et al. 1997; Geserick und Roewer 1998).

Da DNA nur innerhalb zellulärer Knochenstrukturen vorliegt, in der Regel also in Osteozyten, welche von der anorganischen Matrix förmlich eingemauert sind, ist die Effizienz des Aufschlusses dieser Zellen im Rahmen der Extraktion von entscheidender Bedeutung. In den gewonnenen DNA-Extrakten finden sich darüberhinaus häufig co-extrahierte Inhibitoren der Taq-Polymerase. Deshalb hängt der Erfolg der Extraktion ausreichender, sauberer DNA für die spätere PCR größtenteils von der Effizienz und Sauberkeit dieser beiden Schritte ab (Prado et al. 1997).

Bei der Quantifizierung der aus gelagertem Knochenmaterial extrahierten DNA mit fortgeschrittener Degradation liegt der Anteil menschlicher DNA im Extrakt unter 1 %. Auf diese Tatsache, welche für die spätere Amplifikation wichtig ist, weisen mehrere Autoren hin (Alonso et al. 2001, Holland et al. 1993). Hohe Konzentrationen

mikrobieller DNA können bei der PCR, zusätzlich zur Wirkung von co-extrahierten Huminstoffen, die Aktivität der Taq-Polymerase weiter reduzieren (Hummel et al. 2001, Jeffreys et al. 1992, Lassen et al. 1994).

Viele verschiedene Extraktionsprotokolle sind in der Literatur veröffentlicht. Dies mag als Beleg dafür gelten, dass ein verlässliches Standardverfahren zur DNA-Extraktion aus Knochen mit längerer Liegezeit sich bisher noch nicht durchgesetzt hat. Zwei Verfahren sind jedoch weit verbreitet und sollen kurz dargestellt werden:

Hagelberg und Clegg veröffentlichten 1991 ein Verfahren basierend auf EDTA/Proteinase K-Verdau, Phenol-Chloroform-Fällung und anschließender Passage des Extraktes durch einen Centricon Mikrokonzentrador. Als problematischer Punkt dieser Methode gilt die Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierbei werden nach entsprechendem Auslösen aus der Matrix die Osteozyten lysiert, die DNA von störenden Komponenten durch Ausschütteln mit organischen Lösungsmitteln getrennt. Bei der Bearbeitung von altem, bodengelagertem Knochenmaterial ergibt sich durch die co-extrahierten Huminstoffe regelmäßig eine deutliche Braunfärbung des Extraktes. Diese PCR-inhibierenden Huminstoffe werden im Laufe der kontaminationsträchtigen Phenol/Chloroform-Extraktion jedoch meist nicht vollständig entfernt. Zusätzlich tritt bei jeder Fällung ein Verlust eines Teils der DNA ein. Gerade bei den in altem Knochengewebe enthaltenen, geringen Mengen fragmentierter DNA ist dies nicht erwünscht. Zusätzlich müssen in einem anschließenden Schritt alle Spuren von Lösungsmitteln ausgewaschen werden, da diese die nachfolgende PCR-Reaktion behindern. Im Rahmen der DNA-Konzentrierung mittels Centricon-Röhrchen werden alle Stoffe ab einer definierten Größe an einer anisotropischen Membran zurückgehalten. Hierbei werden jedoch neben der DNA auch hochmolekulare PCR-Inhibitoren mitkonzentriert (Prado et al. 1997).

Ein anderes verbreitetes Verfahren (Höss und Pääbo 1993, Günther et al. 1995) beinhaltet eine reversible Bindung der aus den Zellen ausgelösten DNA an Silica-Partikel, von welchen die DNA nach diversen Waschvorgängen wieder freigesetzt und gewonnen wird. Vorteilhaft ist die spezifische, reversible Bindung von Nukleinsäuren an die Partikel. Mögliche nieder- oder hochmolekulare PCR-Inhibitoren im Extrakt können so effektiv ausgewaschen werden. Da die Silica-Partikel selbst jedoch

Hemmstoffe der PCR darstellen, muss auf ein Silica-Partikel-freies DNA-Eluat geachtet werden.

Veröffentlichungen über die Effizienz verschiedener Extraktionsmethoden durch vergleichende Studien sind selten. In einer der wenigen verglichen Cattaneo et al. die DNA-Extraktion mittels Chelex, Phenol/Chloroform und Silica (Cattaneo et al. 1995 und 1997). Im Rahmen der Chelex-Extraktion konnten keine befriedigenden Ergebnisse gewonnen werden, da bei diesem Verfahren inhibitorische Substanzen nicht ausreichend eliminiert wurden. Die Phenol/Chloroform-Extraktion zeigte sich kontaminations-trächtig und hinsichtlich der Ergebnisse der Silica-Extraktion unterlegen.

In der hier dargestellten Arbeit wurde eine von Toprak (persönliche Mitteilung) am Institut für Rechtsmedizin der Universität Münster weiterentwickelte Extraktionsmethode zur Bearbeitung von Knochenproben längerer Liegezeit angewandt, welche Elemente verschiedener Verfahren vorteilhaft verbindet (Kap. 2.2.4). Hierzu wurde ein optimierter Extraktionspuffer entwickelt, dieser Ansatz mit einer reversiblen Bindung der DNA an eine Silica-Membran (NucleoSpin Funnel Column, Macherey-Nagel) kombiniert. Der Ablauf der Extraktion wurde entsprechend den Eigenschaften der Puffersubstanzen und zur Vermeidung einer weiteren DNA-Degradation optimiert. Das Verfahren der DNA-Bindung an eine Silica-Membran wurde der kontaminationsanfälligen Phenol-Chloroform-Fällung vorgezogen. Im Unterschied zum Protokoll von Höss und Pääbo (1993) wurde zur Gewährleistung eines Silica-freien Extraktes ein System verwendet, bei dem die Silica-Partikel an eine Membran gebunden sind, von welcher die DNA nach Abschluss des Waschvorganges eluiert wird.

4.1.3 DNA-Aufreinigung

Von vielen Autoren wird auf die enorme inhibitorische Potenz organischer Erdschubstanzen im Rahmen der PCR-Amplifikation hingewiesen (Burger et al. 1999; Cattaneo et al. 1997; Hummel et al. 1995; Prado et al. 1997; Tuross 1994). Diese dunklen organischen Geopolymere ohne reproduzierbare chemische Struktur werden als Humin- oder Fulvinsäuren bezeichnet (Zeller 2000). Diese Huminstoffe zeichnen für eine Inhibition der Taq-Polymerase verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von nur geringen Mengen eines nicht aufgereinigten DNA-Extraktes aus

erdgelagertem Knochen, die Amplifikation einer rezenten DNA-Positiv-Kontrolle wirksam verhindert wird (Holland et al. 1993). Vor allem der Faktor Luft- bzw. Bodenfeuchtigkeit zeigt eine positive Korrelation mit dem Huminsäuregehalt in gelagertem Knochenmaterial. Der unterschiedliche Huminsäuregehalt in verschiedenen Knochenmaterialien scheint einer der Gründe für deren stark unterschiedliche Amplifizierbarkeit zu sein.

Eine ausreichende Elimination dieser Substanzen aus dem Extrakt und der Überwindung der von ihnen hervorgerufenen PCR-Inhibition gilt als eine der Herausforderungen bei der Analyse von alten, bodengelagerten Knochenmaterialien. Ein effektives Reinigungsverfahren der DNA im Anschluss an die Extraktion scheint also eine der Voraussetzungen für eine erfolgreiche Amplifikation zu sein. Zu bedenken ist jedoch, dass jegliche DNA-Aufreinigungsmethode neben dem gewünschten Effekt einer Eliminierung bzw. Reduktion von Inhibitoren auch einen gewissen DNA-Verlust mit sich bringt. Aufgrund der großen Bedeutung dieser inhibitorischen Substanzen wurde dieser Nachteil jedoch in Kauf genommen.

4.2 Ergebnisse

4.2.1 PCR-Artefakte und Interpretation der Ergebnisse

Bei der Analyse degradierter DNA kommt es im Rahmen der PCR häufig zu Artefaktbildungen. Die Kenntnis dieser Vorgänge spielt bei der Bewertung der PCR-Ergebnisse, insbesondere der Unterscheidung zwischen authentischen Ergebnissen und Artefakten, eine entscheidende Rolle:

- „allelic dropout“:

Wird die PCR mit sehr wenigen DNA-Strängen als Bindungspartner der STR-Primer gestartet, so kann es hierbei zum Ausfall eines Allels kommen, d.h. es wird lediglich ein Allel eines heterozygoten Individuums amplifiziert. Somit resultiert ein fälschlicherweise homozygotes Ergebnis für ein eigentlich heterozygotes Individuum (Schmerer et al. 1999).

- Stotterbanden („stutter bands“ oder „shadow bands“):

Stotterbanden resultieren durch ein sogenanntes Verrutschen der Taq-Polymerase („Taq-polymerase slippage“) innerhalb der ersten PCR-Zyklen (Schultes et al. 1999). Hierbei wird von einer vermehrten Bildung von Sekundärstrukturen der repetitiven DNA während der PCR ausgegangen, welche die Polymerase im Rahmen der Neusynthese des DNA-Doppelstrangs nicht erkennt und somit in der Regel eine Repeateinheit auslöst. Findet dieser Ablesefehler in den frühen Zyklen statt, so wird das so synthetisierte Artefakt zum Competitor für authentische DNA-Stränge (Burger 2000). Da diese bei degradiertem DNA ohnehin in geringer Kopienzahl vorliegen, stellen Stotterbanden ein ernstzunehmendes Problem dar. Es werden also Amplifikationsprodukte gebildet, die eine Repeateinheit kürzer als das eigentliche authentische Allel sind. In der Regel weisen Stotterbanden eine deutlich schwächere Signalintensität auf als die Produkte der Originalallele, so dass sie durch den durch sie hervorgerufenen, deutlich kleineren Vor-Peak leicht zu identifizieren sind.

Anhand der eigenen Proben ist bei der Analyse des STR-Systems D3S1358 der Knochenprobe 14 im Rahmen der ersten Bestimmung (14a, siehe Kap. 3.1.1) von einem „dropout“ des Allels 19 auszugehen. Im System VWA der gleichen Probe zeigt sich in beiden Analysen ein homozygot, jedoch differentes Ergebnis. Der wirkliche Genotyp könnte heterozygot 17/18 sein, dann wäre in jeder der Analysen das jeweils andere Allel im Sinne eines „allelic dropout“ ausgefallen.

Die Häufigkeit des Auftretens der beschriebenen Artefakte ist der PCR-Zykluszahl proportional. Zur Verminderung von möglichen Artefakten ist also einerseits eine möglichst niedrige Anzahl von PCR-Zyklen zu fordern (Hummel et al. 2001, Pancorbo et al. 1995). Andererseits ist gerade bei der Bearbeitung von gelagertem Knochenmaterial die verminderte Aktivität der Taq-Polymerase durch Huminstoffe zu berücksichtigen, welche manche Autoren durch eine erhöhte Zyklusanzahl auszugleichen versuchen. Die Durchführung von 50 und mehr PCR-Zyklen (60 Zyklen durch Schmerer et al. 1999 oder Schultes et al. 1997) mag bei der Beantwortung anthropologischer Fragestellungen, unter Inkaufnahme falsch positiver Ergebnisse, zu verantworten sein, verbietet sich jedoch im Rahmen rechtsmedizinischer Fragestellungen aufgrund des hohen Artefaktisikos.

In dieser Arbeit wurde der Artefaktvermeidung der höhere Stellenwert eingeräumt, die Zyklenzahl bei der Amplifikation nukleärer DNA auf 28, im Falle mitochondrialer DNA, auf 30 Zyklen begrenzt, widersprüchliche Ergebnisse nicht gewertet.

Bei der Interpretation der Analyseergebnisse werden in der Literatur unterschiedliche Maßstäbe angelegt. Je nach anthropologisch/archäologischer oder rechtsmedizinischer Fragestellung werden differente Analyseergebnisse einer Probe mit unterschiedlicher Restriktion behandelt.

Schultes et al. führten 1997 in einer archäologischen Untersuchung eine Zuordnung verschiedener, knapp 3000 Jahre alter Skelettteile eines Kollektivgrabes mittels nukleärer DNA-Typisierung durch. Hierbei wurden für jedes Skelettteil 8-12 getrennte Extraktions- und Amplifikationsgänge durchgeführt, die vermeintlichen Allele durch Zusammenfassung aller Analysen bestimmt, wobei bei Bestimmung von mehr als zwei Allelen in einer Probe, die zwei höchsten Peaks als Allele gewertet wurden. Eine Probe wurde als homozygot gewertet, wenn in der Mehrzahl der Bestimmungen das Ergebnis homozygot blieb, bzw. sich ein dominierender Peak zeigte. Eine ähnliche Interpretation der Amplifikate nach STR-Analyse findet sich bei Burger (Burger 2000).

Die Interpretation der Ergebnisse rechtsmedizinischer Untersuchungen hat ungleich zurückhaltender zu erfolgen. Gerade bei der Identifikation menschlicher Überreste und Verwertung von Ergebnissen im juristischem Umfeld, müssen Artefakte und Fehlbestimmungen mit hinreichender Sicherheit ausgeschlossen werden.

Zur Authentifizierung der Ergebnisse und weitgehendem Ausschluss einer fälschlichen Interpretation möglicher PCR-Artefakte, werden von allen Autoren mehrfache, getrennte Extraktions- und Amplifikationsgänge für jede Probe durchgeführt. In dieser Arbeit wurden analog Hummel et al. (1999) zwei getrennte Bestimmungen durchgeführt, die Ergebnisse nur dann als authentisch gewertet, wenn beide Analysen das gleiche Ergebnis zeigten und Artefakte, soweit möglich, ausgeschlossen wurden. Bei jedem Zweifel wurden die Ergebnisse nicht als korrekt und reproduzierbar gewertet (vgl. Hellmann et al. 2001).

4.2.2 AmpFISTR Profiler Plus-Kit und vs-STR-Systeme

Betrachtet man die Ergebnisse der Analysen der Knochenproben aus Sektionsgut mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit, so konnten hierbei in 93 % reproduzierbare Allelprofile gewonnen werden. Im Fall der Probe 13, mit einer Liegezeit von 17 Wochen, konnte noch ein komplettes, reproduzierbares Allelprofil erschlossen werden. Für Probe 14, mit einer Liegezeit von 41 Wochen die älteste der Proben aus Sektionsgut, konnte lediglich das Amelogenin-System verlässlich bestimmt werden.

Vergleicht man beide Proben, so ist festzustellen, dass einerseits das Zeitintervall der Liegedauer zwischen beiden Proben sehr lang ist. Gerade der analysetechnisch interessante, zeitliche Bereich zwischen beiden Proben, in dem offensichtlich die Analysierbarkeit der Proben deutlich absank, konnte aus Mangel an geeignetem Knochenmaterial nicht abgedeckt werden. Andererseits ist bedingt durch die unterschiedlichen Lagerungsbedingungen beider Proben, aufgrund der bei Probe 14 zusätzlichen Umwelteinflüsse, von einer deutlich höheren Degradation der DNA auszugehen. Charakteristisch dafür sind auch die bei dieser Probe beobachteten, und in Kap. 4.1.4 beschriebenen Artefaktbildungen.

Insgesamt ist bei allen Proben eine mit zunehmender, systemimmanenter Fragmentgröße progredient abnehmende Peakhöhe zu beobachten. Verantwortlich hierfür ist die statistisch höhere Degradationswahrscheinlichkeit längerer DNA-Matrizen. Den Primern dieser STR-Systeme stehen weniger intakte Matrizen zur Bindung zur Verfügung. Die intakten Amplifikationsprodukte nehmen entsprechend der Größe des STR-Systems ab (Hummel et al. 1999). Erwartungsgemäß sind bei der Analyse degradierter DNA mit einem Multiplex-Ansatz bevorzugt die Systeme mit kleineren Amplifikationsprodukten korrekt typisierbar. Dies ist z. B. an Hand der Probe 14 nachvollziehbar; der Amelogenin-Locus als kleinstes System des AmpFISTR Profiler Plus-Kits war bestimmbar, bei den anderen Systemen mit größeren Amplifikaten war ein reproduzierbares Allelprofil nicht zu erschließen.

Für die übrigen Proben aus Skelettfunden, welche in einen zeitlichen Bereich von ca. 10-200 Jahre datiert wurden, konnten mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit keine reproduzierbaren Ergebnisse gewonnen werden.

Durch Bestimmung der vs-STR-Systeme konnte die Analyserate nur gering verbessert werden. Bei den Knochenproben aus dem Sektionsgut konnte für Probe 14 das System TPOX_{vs} bestimmt werden; bei den älteren Proben aus Skelettfunden konnte interessanterweise für die älteste Knochenprobe (Probe 21), welche auf mehr als 200 Jahre Liegezeit geschätzt wurde, das System TPOX_{vs} reproduzierbar bestimmt werden. Diese Tatsache zeigt, dass die verlässliche Analyse einer Probe von vielen komplexen Faktoren abhängig ist, von denen der Zeitfaktor nur einer ist. Der unterschiedliche Huminsäuregehalt in verschiedenen gelagerten Knochenmaterialien scheint einer der Gründe für deren stark unterschiedliche Amplifizierbarkeit zu sein.

Die in dieser Untersuchung gewonnenen Ergebnisse für die Analysierbarkeit in Abhängigkeit des Liegealters einer Probe decken sich mit den für vergleichbares Knochenmaterial in der Literatur veröffentlichten Daten nur teilweise. Legt man allerdings die in Kapitel 4.1.4 angesprochenen Kriterien zur Interpretation der Ergebnisse als Maßstab an in der Literatur veröffentlichten Daten an, so sind die gewonnenen Ergebnisse durchaus vergleichbar.

Hummel et al. verglichen 1999 die Analysierbarkeit von bodengelagerten Knochen- und Skelettfunden unterschiedlichen Alters und verschiedener Lagerungsbedingungen. Hierbei wurden 10 STR-Systeme im Rahmen einer Multiplex-Analyse mit dem AmpFISTR Profiler Plus-Kit bestimmt. Erstaunlicherweise war die Rate der positiven Typisierungen eher von den Lagerungsbedingungen abhängig als vom Alter der Probe. Von den sechs analysierten, zwischen drei Monaten und 3000 Jahre alten Proben konnten nur zwei vollständig, reproduzierbar analysiert werden.

Eine drei Monate bei -20°C gelagerte Knochenprobe sowie eine 250 Jahre alte bodengelagerte Skelettprobe konnten in allen Systemen erfolgreich analysiert werden. Bei einer drei Monate alten bodengelagerten Probe konnten nur noch acht von zehn Allelen bestimmt werden; bei der mit ca. 3000 Jahren ältesten Probe konnten erstaunlicherweise noch sieben von zehn Allelen bestimmt werden. Die Analysierbarkeit dieser Probe ist durch die Lagerung in einer Höhle mit einer relativ konstanten Temperatur von $+6^{\circ}\text{C}$ und trockenem Milieu zu erklären. Durch die niedrige Temperatur sind DNA-Degradationsvorgänge, wie auch die Bildung von inhibierenden Substanzen bei dieser Probe weitestgehend gehemmt worden (Burger et al. 1999).

Charakteristischerweise ließen sich bevorzugt die kürzeren Systeme bestimmen, wie dies im Falle der Analyse degradierter DNA erwartungsgemäß der Fall ist.

Prado et al. berichteten 1997 über eine erfolgreiche Analysequote von 55 % bei der Analyse verschiedener STR-Loci (100-330 bp) von 18 Knochenproben mit einer Liegezeit von sechs Monaten bis 25 Jahren. Durch Erweiterung der Analyse auf die mitochondriale DNA konnte eine Quote von 100 % erreicht werden.

In der im Kap. 4.1.2 bereits angesprochenen Arbeit von Cattaneo et al. (1997) wurden unterschiedliche Extraktionsverfahren verglichen. Als Material diente frisches und gelagertes Skelettmaterial mit einem Alter von bis zu 43 Jahren. Analysiert wurde nukleäre DNA (HLA-DPB1-Locus: 327 bp; Amelogenin-System 106/112 bp), sowie ein Teil des mitochondrialen Genoms (Region V: 120 bp). Betrachtet man die Ergebnisse des im Vergleich überlegenen Glassmilk-Silica-Verfahrens, so findet sich eine positive Analysequote für den HLA-DPB1-Locus von 39 %, für den Amelogenin-Locus von 35 % und für mitochondriale DNA von 84 %.

Die Grenze der Analysierbarkeit nukleärer DNA findet sich bei den von Cattaneo et al. (1997) angegebenen Daten bei Proben mit einer Liegezeit zwischen einem Jahr und fünf Jahren. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen der eigenen Untersuchung. Für das interessante Zeitintervall zwischen beiden Proben waren auch bei Cattaneo et al. keine geeigneten Proben vorhanden. Die zwei ältesten Proben, für die eine Analyse des HLA-DPB1-Locus möglich war, hatten eine Liegezeit von 11 Jahren; erstaunlicherweise konnte für diese beiden Proben die Merkmalsausprägung im deutlich kleineren Amelogenin-Locus nicht bestimmt werden.

In der Literatur finden sich viele weitere Fallbeispiele von Identifizierungen von Skelettüberresten mittels DNA-analytischen Untersuchungen (siehe 1.2.5). Von allen Autoren wird die Tatsache betont, dass eine eindeutige Korrelation zwischen Alter und Analysierbarkeit einer Probe nicht hergestellt werden kann. Dies beruht auf den komplexen Faktoren, die bei der DNA-Degradation eine Rolle spielen. Diese Tatsache kann an Hand der eigenen Proben bestätigt werden.

4.2.3 mtDNA

Im Rahmen der Analyse mitochondrialer DNA wurden zwei Proben ausgewählt, bei denen eine Typisierung nukleärer DNA nicht möglich war und somit von einem hohen Maß an DNA-Degradation ausgegangen werden konnte. Hierbei konnte für die Proben 17 und 20 jeweils ein 194 und ein 234 bp langes Segment der hypervariablen Region I amplifiziert und sequenziert werden. An Hand von Vergleichsmaterial wäre also auch im Falle der Proben 17 und 20 theoretisch eine Identifizierung möglich, selbst wenn die Analyse nukleärer DNA bei fortgeschrittener DNA-Degradation erfolglos bleibt. Somit kann in diesen Fällen die diagnostische Lücke durch Analyse der mitochondrialen DNA geschlossen werden.

Diese Daten entsprechen weitestgehend den veröffentlichten Untersuchungen. Bei der schon angesprochenen Untersuchung eines 17 Jahre alten Skelettüberrestes mit fortgeschrittener DNA-Degradation (Holland et al. 1993) konnte eine erfolgreiche Identifizierung über Analyse eines 210 bp großen Segmentes der mtDNA durchgeführt werden (siehe 1.2.5). Interessanterweise zeigte die von Holland per slot-blot-Analyse durchgeführte Quantifizierung der DNA weniger als 1 % menschliche DNA. Die in den Extrakten vorhandene DNA bei Skelettproben mit längerer Liegezeit ist also überwiegend mikrobiellen Ursprungs.

Fisher et al. analysierten 1993 Teile des mitochondrialen Genoms von acht 130 Jahre gelagerten Skelettüberresten von gefallenem Soldaten des amerikanischen Bürgerkriegs (1861 – 65). Diese Knochenproben wurden noch während des Krieges 1862 gesammelt und im weiteren Verlauf bei Raumtemperatur in trockener Umgebung gelagert. Um eine Aussage über die DNA-Degradation machen zu können, wurden unterschiedlich lange Segmente des mitochondrialen Genoms amplifiziert, die Größe der Amplifikate gelelektrophoretisch kontrolliert. Eine Sequenzierung wurde nicht durchgeführt. Das längste Segment, welches bei einem Viertel der Proben amplifiziert werden konnte war 410 bp lang, mit abnehmender Länge des Segments stieg die Häufigkeit der positiven Amplifikation (410 bp-Segment in 25 %; 343 bp-Segment in 37 %; 210 bp-Segment in 50 %; 97 bp-Segment in 75 %).

In seiner vergleichenden Arbeit über Extraktionsverfahren konnten Cattaneo et al. (1997) in frischem und gelagertem Skelettmaterial mit einem Alter von bis zu 43 Jahren

in 84 % ein 120 bp langes Segment der Region V des mitochondrialen Genoms amplifizieren.

Auch Prado et al. konnten 1997 die erfolgreiche Analysequote bei der Analyse von 18 Knochenproben mit einer Liegezeit von sechs Monaten bis 25 Jahren von 55 % bei Analyse von STR-Loci auf 100 % bei Analyse von mitochondrialer DNA steigern. Für vergleichbares Material gehen die Autoren von einer Degradation der DNA mit Fragmenten von rund 400 bp Länge aus (Prado et al. 1997).

Auch auf archäologischem Gebiet wird über Amplifikationen von kürzeren mitochondrialen DNA-Sequenzen berichtet. Höss und Pääbo konnten 1993 ein 91 bp langes Segment aus Skelettfunden einer vor 25.000 Jahren ausgestorbenen Wildpferd-Gattung amplifizieren. Hagelberg et al. untersuchten 1993 die prähistorische Besiedlung der pazifischen Inseln an Hand menschlicher Knochenfunde, welche auf Zeiträume zwischen 300 – 2500 Jahre vor Christus datiert wurden. Für 55 % der Proben konnte erfolgreich ein 228 bp langes Segment der hypervariablen Region des mitochondrialen Genoms amplifiziert und sequenziert werden.

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen die Probleme bei der Analyse von Skelettproben mit längerer Liegezeit sowie die Grenzen des getesteten Extraktions- und Aufreinigungsverfahrens deutlich auf. Hinsichtlich der ungenügenden Typisierungsergebnisse der Proben mit längerer Liegezeit muss einerseits von einer ausgeprägten Degradation der vorliegenden DNA, andererseits von einer mangelnden Eliminierung von Inhibitoren der Taq Polymerase ausgegangen werden. Durch Analyse der vs-STR-Systeme konnte die Analyserate des Multiplex-Ansatzes nicht wesentlich verbessert werden. Die positive Sequenzierung von mtDNA-Segmenten mit bis zu 234 Nukleotiden Länge bei den ältesten Proben zeigt jedoch, dass längere DNA-Fragmente die stattfindenden Abbauprozesse gleichwohl überstanden haben können, und somit eine Typisierung bei vorliegenden Vergleichsproben durchaus möglich ist. Die Tatsache, dass bei Vorliegen solcher DNA-Fragmente eine Amplifikation kleinerer STR-Systeme oder auch der vs-STR-Systeme nicht möglich ist liegt an der ungleich höheren Sensitivität der Amplifikation mitochondrialer DNA durch die hohe Kopienzahl pro Zelle.

Insgesamt decken sich die Ergebnisse dieser Arbeit - eine entsprechend einheitliche Bewertung der Typisierungsergebnisse vorausgesetzt - mit den in der Literatur veröffentlichten Daten. Berichte über positive Typisierungen mehrerer STR-Loci aus über 3000 Jahre alten Skelettfunden basieren wohl auf einem ausgesprochen guten DNA-Erhaltungszustand bei entsprechend positiven Umweltbedingungen, können jedoch an Hand des eigenen Materials nicht nachvollzogen werden. Eine generelle Korrelation zwischen Liegezeit und Erhaltungszustand der DNA kann, wie bereits angesprochen, auch aus den eigenen Daten nicht abgeleitet werden.

Die Effizienz der Extraktion und Aufreinigung der DNA bei Analyse älteren Knochenmaterials ist von herausragender Bedeutung. Das auf Bindung der DNA an Silica-Partikel beruhende Verfahren dieser Arbeit bietet theoretisch gegenüber anderen veröffentlichten Verfahren, insbesondere der Phenol-Chloroform-Extraktion Vorteile. In der Praxis spiegeln sich, bei mangelnder Vergleichbarkeit der unterschiedlichen, in der Literatur vorhandenen Ergebnisse, diese Vorteile in den Typisierungsraten nicht wider. Es bedarf noch weiterer Entwicklung und Verbesserung der DNA-Aufreinigungsverfahren, um das Problem der Taq-Inhibierung durch mitextrahierte Huminstoffe, bzw. das durch hohe Konzentrationen an mikrobieller DNA in Zukunft zu lösen.

Neben der Verwendung von Skelettmaterial stellt im Zuge der Identitätsfeststellung auch die DNA-Extraktion aus Zähnen eine Alternative dar. Insbesondere für die DNA-Extraktion aus Zahnwurzeln postulieren Hummel et al. (2001) eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse als bei Knochenmaterial, was auf eine niedrigere Huminstoff-Konzentration in den Proben zurückgeführt wird. Alonso et al. (2001) verweisen auf die höhere DNA-Qualität aus Zähnen im Vergleich zu der aus Knochenmaterial. In der Praxis wird man bei entsprechend vorhandenem Untersuchungsmaterial mehrere parallele Analysen aus unterschiedlichen Materialien zur späteren Vergleichbarkeit der Untersuchungen durchführen.

5. Zusammenfassung

Der DNA-analytischen Untersuchung von frischem und gelagertem Skelettmaterial kommt bei der Identifikation unbekannter Toter zunehmende Bedeutung zu. In Fällen, in denen auf Grund fortgeschrittener Fäulnis- und Verwesungsprozesse, bei Brandzehrung und Tierfraßdefekten nur Skelettüberreste einer DNA-Analyse zur Verfügung stehen, können dank des besonderen anatomischen und biochemischen Aufbaus des Knochengewebes in der Regel noch ausreichende DNA-Mengen zur Typisierung gewonnen werden.

Die genetische Charakterisierung von insgesamt 21 Knochenproben unterschiedlicher Liegezeit sollte zur Aufklärung der praktischen Durchführbarkeit von Knochen-DNA-Typisierungen im rechtmedizinischen Laboralltag beitragen. 14 Knochenproben stammten aus Sektionsgut (Liegezeit von einer Stunde bis 41 Wochen), 7 Proben aus Skelett- bzw. Knochenfunden (geschätzte Liegezeit zwischen 10 und über 200 Jahren).

Im Vordergrund stand dabei die Erprobung eines auf reversibler DNA-Bindung an eine Silica-Membran (NucleoSpin Funnel Column, Macherey-Nagel) beruhenden Extraktionsverfahrens. Im Rahmen eines Multiplex-PCR-Ansatzes (AmpFISTR Profiler Plus Kit, Applied Biosystems) wurde eine molekulare Geschlechtsbestimmung durchgeführt und neun verschiedene STR-Loci bestimmt. Zusätzlich wurden drei besonders kurze, sog. vs-STRs bestimmt und exemplarisch für zwei Proben Bereiche des mt-Genoms sequenziert.

Bei der Multiplex-Analyse ließ sich für 13 der 14 aus Sektionsgut gewonnenen Proben (93 %) ein komplettes, reproduzierbares Allelprofil gewinnen, lediglich an der mit 41 Wochen älteste Probe aus dem Sektionsgut (Probe 14) konnte nur eine molekulare Geschlechtszuordnung durchgeführt werden. Ebenso konnten alle drei vs-STR-Loci für 13 der 14 Proben reproduzierbar bestimmt werden; Probe 14 war in einem der drei vs-STR-Loci typisierbar.

Die sieben Proben aus Skelett- bzw. Knochenfunden waren bei der Multiplex-Analyse nicht reproduzierbar typisierbar, die Bestimmung der vs-STR-Loci führte im Fall der ältesten Probe (Probe 21) zur Typisierung eines der drei Loci (TPOXvs).

An Hand zweier Proben aus der Gruppe der Skelett- bzw. Knochenfunde, welche im Rahmen der nukleären DNA-Analyse kein reproduzierbares Ergebnis gebracht hatten, erfolgte die exemplarische mt-DNA-Sequenzierung. Es wurde ein jeweils 234, bzw. 194 Nukleotide langes Segment (Probe 17, bzw. 20) der HV1-Region des mitochondrialen Genoms amplifiziert. Probe 17 zeigte hierbei an Position 16.192 eine Abweichung im Vergleich zur Referenz-Sequenz von Anderson.

Jüngere Untersuchungen wie auch diese Arbeit zeigen, dass Umwelteinflüsse und Lagerungsbedingungen mehr Einfluss auf den Erhaltungszustand der DNA haben, als der Faktor Zeit. Die Analyse und Typisierung von Knochen-DNA hat sich als wichtiges Verfahren zur Identifizierung im rechtsmedizinischen Alltag etabliert. Die unverändert unbefriedigenden Typisierungsergebnisse bei der Analyse älteren Knochenmaterials unterstreichen jedoch die Notwendigkeit der Weiterentwicklung zuverlässiger und effektiver Extraktions- und Aufreinigungsverfahren.

6. Literaturverzeichnis

Alonso A, Andelinovic S, Martin P, Sutlovic D, Erceg I, Huffine E (2001) DNA typing from skeletal remains: Evaluation of Multiplex and Megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croatian Medical Journal* 42(3): 260-6

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG (1981) Sequence organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465

Anslinger K, Weichhold G, Keil W, Bayer B, Eisenmenger W (2001) Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int J Legal Med* 114(3):194-6

Berg S, Protsch von Zieten R (1998) Datierung von Skelettfunden. In: Leopold D (Hrsg) Identifikation unbekannter Toter: interdisziplinäre Methodik, forensische Osteologie. Schmidt-Römhild, Lübeck, 107-162

Blume HJ (1998) Erkennungsdienstliche Maßnahmen als Grundlage der Identifizierung unbekannter Lebender und Toter. In: Leopold D (Hrsg) Identifikation unbekannter Toter: interdisziplinäre Methodik, forensische Osteologie. Schmidt-Römhild, Lübeck, 37-52

Brinkmann B, Rand S, Wiegand P (1991) Population and family data of RFLP's using selected single- and multi-locus-systems. *Int J Leg Med* 104: 81-86

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

Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W (1999) DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient remains. *Electrophoresis* 20: 1722-1728

Burger J (2000) Sequenzierung, RFLP-Analyse und STR-Genotypisierung alter DNA aus archäologischen Funden und historischen Werkstoffen. Dissertation, Göttingen

Cattaneo C, Smillie DM, Gelsthorpe K, Piccinini A, Gelsthorpe AR, Sokol RJ (1995) A simple method for extracting DNA from old skeletal material. *Forensic Sci Int* 74: 167-174

Cattaneo C, Craig OE, James NT, Sokol RJ (1997) Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *J Forensic Sci* 42(6): 1126-1135

Corach D, Sala A, Penancino G, Sotelo A (1995) Mass disasters: Rapid molecular screening of human remains by means of STR typing. *Electrophoresis* 16: 1617-1623

Daldrup T (1979) Postmortaler Eiweißzerfall in menschlichen Organen - Reaktionen und zeitliche Zusammenhänge. *Triltsch*, Düsseldorf

Debrauwere H, Gendrel CG, Lechat S, Dutreix M (1997) Differences and similarities between various tandem repeat sequences: Minisatellites and microsatellites. *Biochemie* 79: 577-86

Edwards A, Civitello A, Hammond HA, Caskey CT (1991) DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Amer J Hum Gent* 49: 746-756

Faller A (1995) *Der Körper des Menschen*. Thieme, Stuttgart

Fisher DL, Holland MM, Mitchell L, Sledzik PS, Wilcox AW, Wadhams M, Weedn VW (1993) Extraction, evaluation and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States civil war bone. *J Forensic Sci* 38: 60-68

Forster B (1986) *Praxis der Rechtsmedizin für Mediziner und Juristen*. Thieme, München

Gaber O (1998) Altersabhängige anatomische Veränderungen an Humerus, Femur und Tibia. In: Leopold D (Hrsg) *Identifikation unbekannter Toter: interdisziplinäre Methodik, forensische Osteologie*. Schmidt-Römhild, Lübeck, 163-185

Gassen G, Minol K (1996) *Gentechnik: Einführung in Prinzipien und Methoden*. Fischer, Stuttgart

Gerstenberger J (2002) *Analyse alter DNA zur Ermittlung von Heiratsmustern in einer frühmittelalterlichen Bevölkerung*. Dissertation, Göttingen

Geserick G, Roewer L (1998) Beiträge der modernen Hämogenetik zur Identifikation. In: Leopold D (Hrsg) *Identifikation unbekannter Toter: interdisziplinäre Methodik, forensische Osteologie*. Schmidt-Römhild, Lübeck, 327-355

Gill P, Ivanov PL, Kimpton C, Piercy R, Benson N, Tully G, Evett I, Hagelberg E, Sullivan K (1994) Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nature Genetics* 6: 130-135

Günther S, Herold J, Patzelt D (1995) Extraction of high quality DNA from bloodstains using diatoms. *Int J Legal Med* 108: 154-156

Hänni C, Laudet V, Sakka M, Begue A, Stehelin D (1990) Amplification of mitochondrial DNA fragments of ancient human teeth and bones. *Acad Sci Paris* 310: 365-370

Hagelberg E, Sykes B, Hedges R (1989) Ancient bone DNA amplified. *Nature* 342: 485

Hagelberg E, Bell LS, Allen T, Boyde A, Jones SJ, Clegg JB (1991a) Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. *Phil Trans R Soc Lond* 333: 399-407

Hagelberg E, Clegg JB (1991b) Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc R Soc Lond B* 244: 45-50

Hagelberg E, Gray IC, Jeffreys AJ (1991c) Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352: 427-429

Hagelberg E, Clegg JB (1993) DNA polymorphisms in prehistoric Pacific islanders. *Proc R Soc Lond B* 252: 163-170

Hammelev D, Madden D, Norby S, Turner J (2000) DNA-Profilanalyse. European initiative for biotechnology education (EIBE), Unit 2, Kiel

Hellmann A, Rohleder U, Schmitter H, Wittig M (2001) STR typing of human telogen hairs - a new approach. *Int J Legal Med* 114:269-273

Hochmeister MN, Budowle B, Borer UV, Eggmann U, Comey CT, Dirnhofer R (1991) Typing of desoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J Forensic Sci* 36: 1649-1661

Höss M, Pääbo S (1993) DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res* 21:3913-3914

Höss M, Jaruga P, Zastwany TH, Dizdaroglu M, Pääbo S (1996) DNA damage and DNA sequence retrieval from ancient tissues. *Nucleic Acids Res* 24: 1304-7

Hoff-Olson P, Jacobson S, Mevag B, Olaisen B (2001) Microsatellite stability in human post-mortem tissues. *Forensic Sci Int* 119: 273-8

Holland MM, Fisher DL, Mitchell LG, Rodriguez WC, Canik JJ, Merrill CR, Weedn VW (1993) Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: Identification of remains from the Vietnam war. *J Forensic Sci* 38: 542-553

Honda K, Harihara S, Nakamura T, Hirai M, Misawa S (1990): Sex identification by analysis of DNA extracted from hard tissues. *Nippon Hoigaku Zasshi* 44: 293-301

Horai S, Hayasaka K, Murayama K, Wate N, Koike H, Nakai N (1989) DNA amplification from ancient human skeletal remains and their sequence analysis. *Proc Japan Acad* 65: 229-233

Hummel S, Herrmann B (1991) Y-chromosome-specific DNA amplified in ancient human bone. *Naturwissenschaften* 78: 266-7

Hummel S, Nordsiek G, Herrmann B (1992) Improved efficiency in amplification of aDNA and its sequence analysis. *Naturwissenschaften* 79: 359-360

Hummel S, Nordsiek G, Rameckers J, Lassen C, Zierdt H, Baron H, Herrmann B (1995) aDNA - Ein neuer Zugang zu alten Fragen. *Z Morph Anthropol* 81: 41-65

Hummel S, Schultes T, Bramanti B, Herrmann B (1999) Ancient DNA profiling by megaplex amplifications. *Electrophoresis* 20: 1717-1721

Hummel S, Schultes T, Gerstenberger J (2001) DNA-Analysen an Skelettfunden - Von der DNA-Extraktion zum genetischen Fingerabdruck. *Research in Legal Medicine* 26, Schmidt-Römhild, Lübeck

Hunger H, Leopold D (1978) Identifikation. Barth, Leipzig

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Individual specific „fingerprints“ of human DNA. Nature 316: 76-79

Jeffreys AJ, Allen MJ, Hagelberg E, Sonnberg A (1992) Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. For Sci Int 56: 65-76

Kimpton CP, Gill P, Walton A, Urquhart A, Millican ES, Adams M (1993) Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. PCR Methods and Applications 3: 13-22

Koolman J (1994) Taschenatlas der Biochemie. Thieme, Stuttgart

Krawczak M, Schmidtke J (1994) DNA-Fingerprinting. Spektrum, Berlin

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

Lee HC, Pagliaro EM, Gaensslen RE, Berka KM, Keith TP, Keith GN, Garner DD (1991) DNA analysis in human bone tissue: RFLP typing. Journal For Sci 31(2): 209-212

Leonhardt H (1990) Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen. Thieme, Stuttgart

Leopold D (1998) Identifikation durch äußere körperliche Merkmale. In: Leopold D (Hrsg) Identifikation unbekannter Toter: interdisziplinäre Methodik, forensische Osteologie. Schmidt-Römhild, Lübeck, 85-102

Lippert H (1993) Lehrbuch Anatomie. Urban & Schwarzenberg, München

Madea B, Krause D, Jachau K (2003) Leichenerscheinungen und supravitale Reaktionen - Todeszeitbestimmung. In: Madea B (Hrsg) Praxis Rechtsmedizin. Springer, Berlin, 35-52

Matsuda H, Imaizumi K, Kubota S, Miyasaka S, Yoshino M, Seta S (1997) Technical investigation of DNA extraction from single hair shaft. Rep Nat Res Inst Police Sci 50: 23-28

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. Meth Enzymol 155: 335-350

Niethard F, Pfeil J (1992) Orthopädie. Hippokrates, Stuttgart

Notz A, Ehrlich P (2001) Heiße Spur im Mordfall Rohwedder führt zu Grams. Financial Times Deutschland

Oransky I (2003) DNA identification of Sept. 11 victims continues: Techniques developed after attacks detailed at American Chemical Society meeting. The Scientist September 9, 2003

Pancorbo MM, Azucena C, Santos A, Barbero C (1995) Genetic typing with HUMTH01, HUMVWA31A and HUMFES/FPS STR loci, D1S80 VNTR locus and HLA-DQ alpha of recent and from XII-XIII spongy bone. Electrophoresis 16: 1612-1616

Pate DF, Hutton JT (1988) The use of soil chemistry data to address post-mortem diagenesis in bone mineral. J.A.S. 15: 729

Patzelt D, Baur MP, Bertrams J (2003) Forensische Serologie/Hämogenetik. In: Madea B, Brinkmann B (Hrsg) Handbuch gerichtliche Medizin, Band 2. Springer, Berlin, 991-1115

Perry WL, Bass WM, Riggsby WM, Sirotkin K (1988) The autodegradation of desoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. *J Forensic Sci* 33: 144-153

Poinar HN, Höss M, Bada JL, Pääbo S (1996) Amino acid racemization and the preservation of ancient DNA. *Science* 272: 864-6

Prado VF, Castro AKF, Oliveira CL, Souza KT, Pena SDJ (1997) Extraction of DNA from human skeletal remains: practical applications in forensic sciences. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering* 14: 41-44

Rankin DR, Narveson SD, Birkby WH, Lai J(1996) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) analysis on DNA from human compact bone. *J Forensic Sci* 41: 40-46

Sadler DW (1995) Identification. www.dundee.ac.uk/forensicmedicine/llb

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463

Schmerer W, Hummel S, Herrmann B (1999) Optimized DNA extraction to improve reproducibility of STR genotyping with highly degraded DNA as target. *Electrophoresis* 20: 1712-1716

Schultes T, Hummel S, Herrmann B (1997) Zuordnung isolierter Skelettelemente mittels aDNA-typing. *Anthrop Anz* 55: 207-216

Stephan E (1992) Die chemische Analyse von prähistorischen Knochen und Sedimenten aus vier zeitlich und regional unterschiedlichen Fundorten. Magisterarbeit, Tübingen

Sullivan KM, Mannucci A, Kimpton CP, Gill P (1993) A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. *Biotechniques* 15: 636-641

Toprak K (persönliche Mitteilung)

Tuross N (1994) The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia* 50: 530-535

Umetsu K, Suzuki T (1997) A simple technique for the genotyping of TH01 locus. *Nippon Hoigaku Zasshi* 51: 433-437

Wolff M, Uribe A, Ortiz A, Duque (2001) A preliminary study of forensic entomology in Medellin, Colombia. *For Sci Int* 120: 53-59

Yang D, Eng B, Wayne JS, Dudar JC, Saunders SR (1998) Technical Note: Improved extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am J Phys Anthr* 105: 539-543

Zeller M (2000) Molekularbiologische Geschlechts- und Verwandtschaftsbestimmung in historischen Skelettresten. Dissertation, Tübingen

Ziegle JS, Su Y, Kevin P, Corcoran LN, Mayrand PE, Hoff LB, McBride LJ, Kronick MN, Diehl SR (1992) Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* 14: 1026-31

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. D. Patzelt für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes, sowie für die geduldige Begleitung und konstruktive Kritik im gesamten Verlauf der Arbeit.

Besonderer Dank gebührt Herrn Dr. rer. nat. S. Jung für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit. Ohne seine beständige Hilfsbereitschaft, Unterstützung, Geduld und Kritik wäre die Fertigstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Würzburg für das gute und angenehme Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt Frau Hinkelmann, Frau Laudenbacher, Frau Schantura und Frau Schuldenzucker, die durch ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft maßgeblich zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Lebenslauf

Name: Florian Goetz
Geburtsdatum: 02.07.1973
Geburtsort: Landshut
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1979 - 1983 Grundschohle in Abensberg
1983 - 1992 Johannes-Nepomuk Gymnasium in Rohr/Ndb.
Juli 1992 Abitur

1992 - 1993 Zivildienst im Cabriniheim, Offenstetten
(Schule und Heim für geistig und körperlich behinderte Kinder)

Studium

1993 - 2000 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
November 2000 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

September 2001 – Arzt im Praktikum, Abteilung für Unfall- und Wiederher-
Februar 2003 stellungschirurgie Klinikum Freising, Prof. Dr. W. Holzmüller
März 2003 Approbation als Arzt
seit März 2003 Weiterbildungsassistent zum Facharzt für Allgemeinohirurgie,
Abteilung für Allgemein-, Thorax- und Gefäßchirurgie
Klinikum Freising, Dr. F. Zeller

Nandlstadt, Februar 2006