

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. D. Patzelt

**Morphologische und DNA-analytische
Untersuchungen
am Spurenmaterial Haar**

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Steffen Bergelt
aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2006

Referent: Prof. Dr. med Dieter Patzelt

Korreferent: Prof. Dr. med Tiemo Grimm

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06. Juni 2007

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Stand der Forschung	3
1.2 Das Haar des Menschen	3
1.2.1 Morphologie	4
1.2.2 Haarwachstum und Ersatz	7
1.2.3 Chemische Zusammensetzung und Haarfarbe	10
1.2.4 Asservierung sowie Untersuchungsmöglichkeiten an Haarspuren	11
1.3 Histologische Untersuchungstechniken	14
1.3.1 Fixierung histologischer Präparate	14
1.3.2 Färbung histologischer Präparate	15
1.3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	16
1.3.2.2 Methylgrün-Pyronin-Färbung	17
1.4 DNA-Typisierung	17
1.4.1 Tandem-Sequenzwiederholungen	19
1.4.2 Genetische Polymorphismen und genetische Individualität	20
1.4.3 Entwicklung der Methode	20
1.4.4 DNA-Typisierung	24
1.4.4.1 STR-Locus: HumACTBP2	26
1.4.4.2 STR-Locus: HumVWA	26
1.4.4.3 Geschlechtsbestimmungssystem: HumAMEL X/Y	27
1.4.5 Singleplex-PCR	27
1.4.6 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	29
1.4.7 Silberfärbung der Polyacrylamidgele	30
1.4.8 Hochauflösende Kapillarelektrophorese	30
1.5 Aufgaben- und Fragestellung	30
2. Material	32
2.1 Herkunft und Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials	32
2.2 Geräte und Chemikalien	32

3. Methoden	40
3.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate durch die Kopfhaut	41
3.1.1 Zuschnitt der Gewebeproben	41
3.1.2 Fixation	42
3.1.3 Entwässerung und Reinigung der Gewebeproben	44
3.1.3.1 Entwässerung der Gewebeprobe	44
3.1.3.2 Reinigung der Gewebeproben	43
3.1.4 Einbettung in Paraffin	44
3.1.5 Schneiden am Mikrotom	45
3.1.6 Färben der Gewebeschnitte	46
3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung	48
3.3 Methylgrün-Pyronin-Färbung	48
3.4. DNA Extraktion und Typisierung aus Haarwurzeln und Haarschäften	48
3.4.1 Morphologische Untersuchung der Haare	49
3.4.1.1 Haarlänge	49
3.4.1.2 Haarfarbe	50
3.4.2 DNA-Extraktion	50
3.4.2.1 Reinigung der Haare	50
3.4.2.2 DNA-Extraktion mittels Chelex-100-Methode	50
3.4.2.3 Reinigung der DNA mittels der Diatomeenerde	51
3.4.2.4 DNA-Extraktion mittels der Phenol-Chloroform-Methode	52
3.4.2.5 DNA-Extraktion aus Vollblut	53
3.4.3 Quantifizierung der extrahierten DNA-Menge aus Vollblut	54
3.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	54
3.4.5 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)	56
3.4.5.1 Silberfärbung der Polyacrylamidgele	57
3.4.5.2 Hochauflösende Kapillarelektrophorese	57
3.5 Berechnung der beobachteten Allelfrequenzen	58
4. Ergebnisse	59
4.1 Histologische Darstellung von Zellkern und Nukleinsäuren	59
4.2 Lichtmikroskopische Beobachtungen der Haarstruktur	59

4.2.1 Bestimmung der Haarlänge	68
4.2.2 Haarfarbe	68
4.3 DNA-Ausbeute aus telogenen Einzelhaaren	68
4.3.1 Merkmalsverteilung im STR-System HumVWA	69
4.3.2 Merkmalsverteilung im STR-System HumACTBP2	73
4.3.3 Merkmalsverteilung im Geschlechtsbestimmungssystem HumAMEL X/Y	77
5. Diskussion	81
5.1 Hintergrund der Untersuchung	81
5.2 Morphologische Lokalisation möglicher DNA-Reste im Haar sowie deren möglicher Einfluss auf ein Analyseergebnis	83
5.3 Bestimmung der Haarlänge und -dicke	85
5.4 Haarfarbe	86
5.5 DNA-Ausbeute aus telogenen Einzelhaaren	86
5.6 Analyse der extrahierten DNA	88
5.7 Genfrequenz-Vergleich mit einer deutschen Populationsstichprobe	92
6. Zusammenfassung	94
7. Literatur	96
8. Anhang	111
8.1 Abkürzungsverzeichnis	111
8.2 Abbildungsverzeichnis	113
8.3 Tabellenverzeichis	115

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

Ziel der forensischen Haaruntersuchung ist neben der Identifizierung der Spezies auch die Zuordnung von aufgefundenen Haarspuren zu einem bestimmten Individuum. Dabei können die Ergebnisse der ausgewerteten Haarspuren oftmals die Erwartungen der Untersuchungsstellen und Gerichte nicht hinreichend erfüllen. Folglich konzentriert sich die Aufmerksamkeit immer mehr auf neue molekularbiologische Ansätze mit dem Ziel der personenbezogenen Zuordnung des Spurenmaterials „Haar“, wie sie bei anderen Spuren menschlicher Herkunft in forensischen Labors heute selbstverständlich ist.

Gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurden erste mikroskopische Untersuchungen an Haaren unter forensischer Fragestellung durchgeführt. Zur Begutachtung wurden rein morphologische Kriterien herangezogen. Jedoch war die Gewährleistung einer Personenidentifizierung nicht hinreichend gesichert.

Mit Einführung der molekularbiologischen Methoden, wie z.B. mit der Bestimmung von polymorphen Proteinsystemen konnten zuverlässigere statistische Aussagen zur Identifizierung von Personen gewonnen werden. Limitierender Faktor der serologischen Haaranalyse war die niedrige Anzahl von Proteinpolymorphismen, die untersucht werden konnte. Außerdem steht in vielen Fällen nur ein einzelnes Haar zur Verfügung, sodass die Sensitivität der serologischen Methoden nicht ausreicht.

Mit der Modifizierung von DNA-Analysemethoden war ein Identitätsnachweis möglich geworden. Die Entwicklung vollzog sich über Untersuchungen von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) bis zur Vervielfältigung einzelner polymorpher DNA-Abschnitte mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR).

1.1 Stand der Forschung

Mit dem Beginn von Haaruntersuchungen in der forensischen Medizin konzentrieren sich alle Anstrengungen ausschließlich auf morphologische Kriterien. Die wohl erste

forensische Haaruntersuchung wurde nach BISBING [16] 1861 von Rudolf Virchow durchgeführt. Schnell folgten zahlreiche Veröffentlichungen, so erschien unter OESTERLEN [97] das erste Buch über die spurekundliche Haaruntersuchung. Ab Ende des 19. Jahrhunderts werden in den Lehrbüchern der gerichtlichen Medizin der Untersuchung von Haaren spezielle Kapitel gewidmet. BALTHAZARD et al. [8] führen 1910 erstmals eine methodische Beschreibung zur Unterscheidung von menschlichen und tierischen Haaren durch.

Im Jahre 1900 wurde mit der Entdeckung der Blutgruppen der Grundstein durch LANDSTEINER für die serologische Untersuchung an Haaren gelegt [120], die bald auch Einzug in die forensische Medizin gefunden hatte. KREFFT [78] konnte als erster Blutgruppensubstanzen an pulverisierten Kopfharen mittels Isoagglutinationstest nachweisen. 1966 beschrieb YADA [146] Merkmale des ABO-Systems an menschlichen Haarwurzeln. Weitere Blutgruppensysteme, wie zum Beispiel die des Phosphoglucomutase 1-Systems (PGM_1), wurde von TWIBELL [138] zur Überprüfung des Spurenalters benutzt. OYA [101] bestimmte außer den PGM-Merkmalen auch die der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGD) an Haarwurzeln. Die Merkmalsysteme Esterase D (EsD) und Glycolase I (GLY) überprüften GERTLER et al. [33] bezüglich ihrer Einsetzbarkeit in der Personenidentifizierung. Bis dato sind 13 serologische Systeme auf ihre Anwendbarkeit in der forensischen Haarspuranalyse überprüft worden [33], [48], [72], [78], [101], [138], [146].

Der Einsatz von physikalischen und chemischen Methoden in der Haaranalytik findet heute fast nur im toxikologischen Bereich der forensischen Medizin Anwendung. Hierbei ist der Nachweis von Drogenkonsum in Haarproben von besonderer Bedeutung [110].

Der Versuch, den Gehalt an Spurenelementen mittels der sogenannten Neutronenaktivierungsanalyse zur Individualdiagnose heranzuziehen, hat sich als nicht geeignet erwiesen. Zwar konnten geographische Unterschiede im Gehalt an Spurenelementen gefunden werden, zur Individualtypisierung reicht diese Differenzierung aber nicht aus [120].

Mit der Entdeckung des inaktiven X-Chromosoms durch BARR et al. [10] sowie der zytogenetischen Nachweismethode des Y-Chromosoms mittels Quinacrin [115] konnte

SCHMIDT [122] erstmals das Y-Chromosom in Haarwurzeln nachweisen. Weitere Untersuchungen wurden von ISHIZU [58] und KING [73] durchgeführt. NAGAMORI [96] entwickelte X-chromosomenspezifische Nachweismethoden für Zellen des Haarschaftes.

Mit der Entwicklung und Einführung des Begriffs „DNA-Fingerprinting“ durch JEFFREYS [61], [62] und der Etablierung der PCR durch MULLIS und SAIKI [117] auf der die moderne STR-Analytik basiert, setzte sich diese Methode auch rasch in der Haaranalytik durch. Da die DNA die alleinige materielle Grundlage genetischer Unterschiede zwischen verschiedenen Organismen darstellt, liefert das „DNA-Fingerprinting“ die bislang verlässlichste Methode zur biologischen Unterscheidung einzelner Individuen. HUKKELHOVEN [57] konnte als erster Autor DNA in Haaren nachweisen. 1989 quantifizierte VON BEROLDINGEN [140] die aus Wurzeln von Kopfharen extrahierte DNA. Während OHSHIMA [98] zur DNA-Typisierung an Haaren eine Restriktionsfragmentanalyse als Untersuchungsmethode einsetzte, bediente sich HIGUCHI [50] der Polymerasekettenreaktion (PCR). OHSHIMA [98] nutzte diese zur Geschlechtsbestimmung.

1.2 Das Haar des Menschen

Haare sind typische Hautanhangsgebilde der Säugerhaut. Aus der Sicht der Evolutionsgeschichte handelt es sich beim Haarkleid der Säugetiere um eine Weiterentwicklung der Fisch- und Reptilienschuppe. Völlige Haarlosigkeit beobachtet man nur bei ganz wenigen Meeressäugern [9]. Die Keratinfasern zählen zu den härtesten und beständigsten Strukturen der Biologie. Die meisten der unten aufgelisteten Haarfunktionen, die bei Tieren nach wie vor eine Rolle spielen, haben ihre Bedeutung für den neuzeitlichen Homo sapiens verloren.

Allgemeine Funktionen des Haares:

- Sensorische Funktionen
- Dispersion von Hautsekreten
- Soziale Kommunikation
- Schutz vor UV-Strahlung

- Mechanischer Hautschutz
- Sexuelle Signale
- Klima adaptierte Wärmeisolation
- Schutz vor Austrocknung
- Schutz vor Insekten / Filterfunktion
- Tarnung

Im wesentlichen dominieren beim Menschen die sozialen Funktionen der Kopf- und Sexualbehaarung. Daher können aus medizinischer Sicht harmlose Veränderungen des Haares oder Störungen des Haarwachstums für den Betroffenen sekundären Krankheitswert erlangen, da diese häufig als psychisch belastend empfunden werden und zur sozialen Isolation führen können [130].

Beim Menschen nehmen vor allem Geschlecht, Alter und Populationszugehörigkeit Einfluss auf die Behaarung. Die am stärksten behaarte Population sind die Eingeborenen Australiens, durch sehr schwache Behaarung zeichnen sich mongolische Völker aus. Haare fehlen nur an bestimmten Stellen des menschlichen Körpers wie z.B. Handteller und Fußsohlen sowie im Lippenrot und an Teilen der Genitalien.

In folgenden Kapiteln soll zunächst die Morphologie des Haares, das Haarwachstum sowie die chemische Zusammensetzung näher beschrieben werden.

1.2.1 Morphologie

Haare sind biegsame und zugfeste Hornfäden, die aus Einstülpungen der Epidermis (Epidermiszapfen) hervorgehen. Sie stecken in trichterförmigen Einsenkungen der Haut (Haartrichter). Makroskopisch gliedern sich Haare in zwei Abschnitte. Einen unter der Oberfläche der Epidermis gelegenen Teil, die sogenannte Haarwurzel, die mit der Haarzwiebel endet und den die Epidermis überragenden Teil, den Haarschaft, der in die Haarspitze ausläuft. Die Haarzwiebel umgreift eine bindegewebige Haarpapille, die als Organ der Ernährung dient. Geht dieser kapillarreiche Epidermiszapfen zugrunde, leidet die Vitalität des Haarfollikels und das Haar fällt aus.

Der größte Durchmesser des Haarfollikels wird durch die Auber'sche Linie beschrieben, welche den Bulbus in eine obere und eine untere Ebene aufteilt. In der oberen und der unteren Region liegen um die Haarpapille herum Epithelzellen, die sich

in Kutikula- Medulla- und Kortexzellen differenzieren. Diese Zellen sind mitotisch aktiv und dem Stratum basale der Haut äquivalent.

Der kraniale Anteil der Haarpapille wird von großen vakuolisierten und mäßig keratinisierten Zellen bedeckt. Diese bilden das Mark (Medulla) des Haares, sind schwach pigmentiert und enthalten azidophile Trichohyalin granula. Zur Haarspitze hin besteht das Mark aus abgeflachten, vielfach wie Geldstücke aufeinandergestapelten Zellen. Das Mark ist der variabelste Bestandteil des Haares, es kann fehlen (z.B. bei Lanugohaaren) oder ungleichmäßig stark entwickelt sein.

Die Epithelzellen differenzieren sich lateral der Haarpapille und bilden als Hauptmasse des Haares die Rinde (Kortex), die das Mark röhrenartig umgibt. Verhornte Tonofibrillen durchziehen die Kortexzellen und verleihen dem Haar seine außerordentliche mechanische Festigkeit. Hier werden auch Matrixzellen angetroffen, die Pigment an Nachbarzellen sezernieren und so für die Haarfarbe verantwortlich sind.

Die Kutikula bildet die letzte zum eigentlichen Haar gehörende Schicht und ist für ein charakteristisches Schuppenmuster verantwortlich. Schuppenmuster und Schuppenränder können in vielen Fällen Rückschlüsse auf die Artzugehörigkeit eines Haares geben und so zur morphologischen Begutachtung in der Spurenkunde herangezogen werden [82]. Die verhornten Kutikulazellen liegen dabei dachziegelartig übereinander. Daraus resultiert die rauhe und unregelmäßige Oberfläche des Haars.

Im ihrem Verlauf bildet die Epidermis um das Haar ein Epithelrohr, das sich aus mehreren Schichten zusammensetzt, nämlich die innere und äußere epitheliale Wurzelscheide.

Die innere Wurzelscheide umgibt das Haar unmittelbar, wächst aus dem Haarbulbus empor und endet unterhalb der Talgdrüsenmündung. Diese innere Wurzelscheide besteht aus drei in ihren oberen Abschnitten verhornenden Zellschichten:

Die Scheidenkutikula, die Huxley'sche Schicht sowie die Henle'sche Schicht. Letztendlich wandeln sich die drei einzelnen Lagen der inneren Wurzelscheide in eine einheitliche Hornschicht um, welche stückweise abbröckelt und mit dem Sekret der Talgdrüse nach außen gelangt.

Die äußere Wurzelscheide wird bis zur Talgdrüsenmündung von allen Schichten der Epidermis gebildet. Im weiteren Verlauf stellt die äußere Wurzelscheide eine von Stratum germinativum gebildete Röhre dar, die in die oberflächliche Schicht der Haarzwiebel übergeht. Am sogenannten Haarbeet, einer Verdickung der äußeren

Wurzelschicht, setzen die Mm. arrectores pilorum an. Bei der Kontraktion dieser Muskeln werden die Haare in eine annähernd senkrechte Stellung gebracht, d.h. sie „sträuben“ sich. Gleichzeitig wird die Haut durch die Kontraktion der in der Umgebung des Haartrichters liegenden Muskeln leicht eingezogen und es kommt zur „Gänsehaut“.

Zwischen den Mm. arrectores pilorum und der äußeren Wurzelscheide liegen Talgdrüsen, die bei Kontraktion „massiert“ werden und so zur Drüsenentleerung beitragen.

Beim Menschen lassen sich drei verschiedene Haararten unterscheiden. Ihre unterschiedliche Haarstruktur ist abhängig vom Alter des Menschen und dem Vorkommen am Körper. Im einzelnen sind dies:

- Das Lanugohaar kommt nur bei Feten und unreifen Neugeborenen vor. Es ist kurz, dünn, marklos und pigmentarm. Postnatal werden die Lanugohaare durch Flaum- oder Terminalhaare ersetzt.
- Das Flaumhaar ist das allgemeine Oberflächenhaar des menschlichen Körpers. Es ist weich, kurz und überwiegend farblos. Die Länge beträgt meistens nicht mehr als 2 cm.
- Das Terminalhaar (Langhaar) weist von der Struktur her Mark und Pigment auf. Das Gros der Langhaare stellen die Kopf- und Barthaare. Folglich können Terminalhaare längen mäßig variieren und sind meist sehr derb. Bei reifen Neugeborenen sind Terminalhaare bereits in Kopfhaut, Brauen und Wimpern vorhanden.

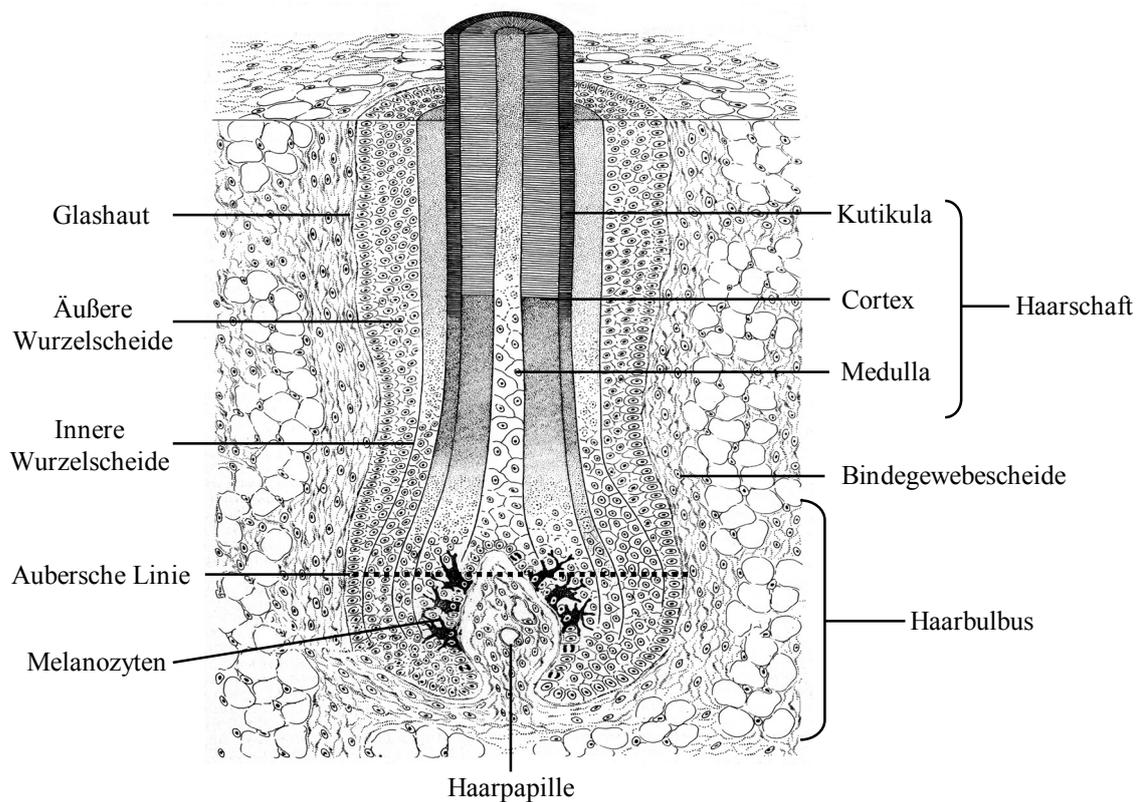


Abbildung 1.2.1: Schema einer Haarwurzel (aus JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. [64])

Unter Einwirkung von Sexualhormonen kann ein Haarfollikel zuerst Flaum- und später Terminalhaare hervorbringen. Dieses Verhalten ist z.B. bei Achselhaaren bei Kindern beiderlei Geschlechts und beim männlichen Barthaar zu beobachten. Im Zuge der männlichen Glatzenbildung kann sich der Terminalfollikel des Haupthaars auch wieder in einen Lanugofollikel umbilden.

1.2.2 Haarwachstum und Ersatz

Weder in allen Körperregionen noch im selben Gebiet erfolgt das Haarwachstum gleichzeitig statt. Verantwortlich dafür sind zahlreiche exogene (z.B. Temperatur) als auch endogene (z.B. hormonelle Sekretion der Keimdrüsen) Faktoren, die auch das Wachstum der Nägel an Fingern und Zehen beeinflussen. Am Scheitel und am Brustkorb beträgt die mittlere Wachstumsrate 0,44 mm/d, an der Schläfe 0,39 mm/d und am Kinn 0,27 mm/d [8], [87], [91], [117].

Generell werden drei Wachstumsphasen des Haares unterschieden:

Die eigentliche Wachstumsphase des Haarfollikels wird als *Anagenphase* bezeichnet. Ihre Dauer richtet sich vor allem nach der Haarlänge an den verschiedenen Körperstellen. In der menschlichen Kopfhaut können Haarfollikel bis zu acht Jahren in der Anagenphase verweilen [24]. Der tief in der Epidermis verankerte Follikel wird in seinem unteren zwiebelartig erweiterten Teil von pluripotenten und undifferenzierten Matrixzellen gebildet. Sämtliche Zellen des Haarschaftes (Mark, Rinde und Kutikula) sowie die drei Schichten der inneren Wurzelscheide (Kutikula, Huxley'sche und Henle'sche Schicht) werden von diesen mitotisch hoch aktiven Zellen gebildet. Zusätzlich zu ihrer Lokalisation im Follikel lassen sich die unterschiedlichen Zellen durch charakteristische Differenzierungsprodukte unterscheiden. Rindenzellen werden durch Filamentbündel, Matrix, Kutikula und innere Wurzelscheide durch Matrix-, Kutikula- und Trichohyalin granula gekennzeichnet. Das eigentliche Haar, das aus der Haut herauswächst, wird nach Abschluss der vollständigen Verhornung von Matrix-, Kutikula- und Rindenzellen gebildet. Zellen der inneren Wurzelscheide werden auf Höhe der Talgdrüsen in den Haarkanal abgestoßen. Die äußere Wurzelscheide wird von Zellen, die in der Follikelperipherie anzutreffen sind, gebildet. Während des Wachstums wandelt sich die mehrschichtige Breite am kranialen Follikelabschnitt in eine einzige Zelllage am unteren Bulbusende um. In dieser Region lassen sich auch Melanozyten nachweisen, die Pigmentgranula an Matrixzellen abgeben und so die Haarfarbe des jeweiligen Individuums bestimmen.

In der *Katagenphase*, die beim Menschen zirka zwei bis drei Wochen andauert [74], geht der Haarfollikel in die Ruhephase über. Der wachsende und tief in der Dermis liegende Follikel verkleinert sich auf etwa ein Drittel seiner Länge, um ein neues, pinselartiges und gebogenes Ende (sogenannter „club“) zu bilden. Von diesen Veränderungen sind sowohl die epithelialen als auch die bindegewebigen Follikelkomponenten betroffen.

Die *Telogenphase*, die auch als Ruhephase des Haarfollikels bezeichnet wird, dauert in den verschiedenen Bezirken des Körpers unterschiedlich lange. An den Augenbrauen umfasst die Telogenphase rund neun Monate, in der Kopfhaut zirka drei Monate.

Das Haarwachstum ist vollständig zum Erliegen gekommen. Die Haarfollikel erreichen ein ausgereiftes, stabiles Stadium, in dem die Haare mittels eines kolbenartigen Endes in den Follikeln verankert sind. Dem Ruhefollikel fehlen die meisten den wachsenden Follikel kennzeichnenden Strukturen und Zelllagen: Matrix, innere und äußere Wurzelscheide sowie die Haarkutikula. Die charakteristische Struktur der Ruhefollikel ist die in der Katagenperiode gebildete Keimschicht und der „club“ [116]. Danach fällt dieses Haar aus und ein neues bildet sich in demselben Follikel.

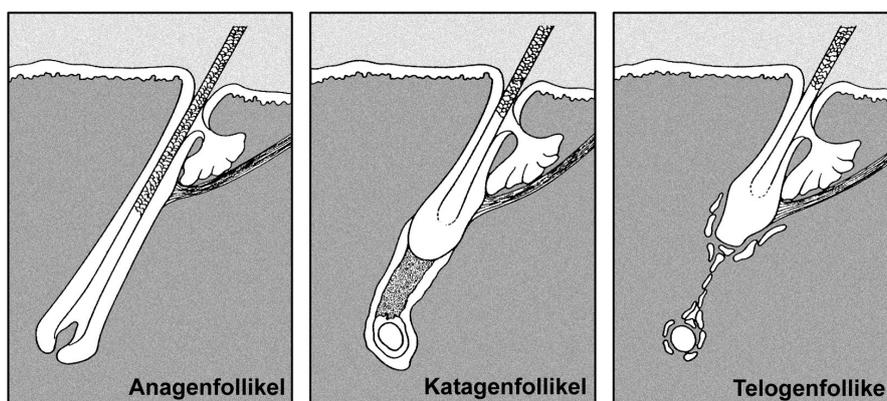


Abbildung 1.2.2: Wachstumsphasen des Haares (aus ORFANOS, C. [99])

Das Mengenverhältnis zwischen anagenen und telogenen Haaren ist beim gesunden Haarwuchs annähernd 4:1, im pathologischen Fall kann sich das Verhältnis umkehren. Die Gesamtheit der Haarfollikel beim erwachsenen Mann wird auf rund fünf Millionen geschätzt. Davon entfallen allein auf die Kopfhaut rund eine Million Haarfollikel. Die Haarfollikelzahl je cm^2 beträgt 880 ± 660 an der Wange, 770 ± 60 an der Stirn, 100 ± 50 am Unterarm und 40 ± 10 am Oberarm [133]. Untersuchungen an der Kopfhaut haben die allmähliche Abnahme der Haarfollikel mit fortschreitendem Alter bestätigt. Durch die Alterung der Haarfollikel kommt es zum charakteristischen Phänomen der Kahlheit [34].

1.2.3 Chemische Zusammensetzung und Haarfarbe

Das Haar stellt ein kompliziertes Gewebe dar, das sich aus mehreren differenzierten Zelltypen und einer Anzahl chemischer Komponenten zusammensetzt. Keratin besteht zum größten Teil aus Faser- und Matrixproteinen und bildet die Hauptstrukturkomponente des menschlichen Haares. Wesentliche chemische und strukturelle Verschiedenheiten lassen zwischen weichem und hartem Keratin unterscheiden.

Als weiches Keratin bezeichnet man das Stratum corneum der Epidermis, dessen Terminologie im wesentlichen von der Berührungssensibilität der Gewebe ausgeht [100].

Hartes Keratin bildet im charakteristischen Röntgendiffraktionsmuster das sogenannte α -Muster, das sich in allen Säugerkeratinen und der Epidermis aller Vertebraten wiederfinden lässt [6]. Wie sich zeigen ließ, sind es die Faserproteine dieses Gewebes, die das charakteristische Röntgendiffraktionsmuster bedingen.

Zusätzlich weisen diese unlöslichen Proteine in ihrer Aminosäurezusammensetzung und ihrem Molekulargewicht erhebliche Unterschiede auf [114]. Es ist seit längerem bekannt, dass einige Aminosäuren in einer konstanten Menge am Proteinaufbau des menschlichen Haares beteiligt sind. Zu den Aminosäuren gehört das schwefelhaltige Cystin, das zum hohen Gesamtschwefelgehalt von etwa 5 % des menschlichen Haares beiträgt. Zum Vergleich ist in der Epidermis ein Gesamtschwefelgehalt von 1,5 % zu messen. Da das Cystin am nativen Haar die wesentlichen Querbrücken zwischen den Peptidketten bildet, erklärt sich die viel größere Dehnungs- und Bruchresistenz des Haares gegenüber der Epidermis. Die Durchlässigkeit für Wasser ist allerdings viel geringer. Die Aufspaltung der Querbrücken bedeutet einen Verlust der mechanischen Stabilität des Haares. Im Rahmen molekularbiologischer Untersuchungen werden zur Aufspaltung des Disulfid Agenzien wie Thioglykolat, Mercaptoethanol und Dithiothreitol (DDT) verwendet.

Der Lipidgehalt des Haares beträgt 1-2 %, der Epidermis über 10 %.

Kohlenhydrate spielen als Energiequelle und als Brennstoff für die Oxidierung eine eher untergeordnete Rolle.

Verantwortlich für die Produktion von Melaninpigment und damit letztlich für die Haarfarbe sind Matrixzellen, die der Papille kappenförmig aufsitzen. In der Anagenphase nehmen die Melanozyten an Größe zu und enthalten in ihrem Zytoplasma reichlich Pigmentkörnchen. Die Melaninbildung beginnt damit, dass in den Praemelanosomen die aromatische Aminosäure L-Thyrosin aus der Zellumgebung aufgenommen wird. Daraus wird unter Mitwirkung von Thyrosinase 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA). Dieses wird weiter in Dopachinon überführt. Über zusätzliche Syntheseschritte entsteht schließlich Melanin.

Vom Haarpigment Melanin sind drei Melaninklassen bekannt: Eumelanine, Phäomelanine und Neuromelanine. Melanine sind in fast allen Lösungsmitteln unlöslich. Weiterhin können freigesetzte Melanine die PCR-Reaktion inhibieren [147].

Die einzelnen Haarfarben sind durch folgende Charakteristika gekennzeichnet [99]:

- Weiße Haare haben kein Pigment in der Rinde und nur sehr wenig im Mark
- Blonde Haare sind dünn, enthalten wenig Pigment und so gut wie kein Mark.
- Rote Haare enthalten rotes Melanin.
- Schwarze Haare enthalten sehr große Melanosomen, die über Mark und Rinde verteilt sind.

An Leichen, die bereits Verwesungs- und Fäulniserscheinungen zeigen, können auffallend fuchsigrote Färbungen an den Haaren beobachtet werden. Oxidative Vorgänge am Pigment sowie Nitrierungs- und Alkalisierungreaktionen am Keratin, insbesondere an dem als Keratinbaustein vorliegenden Tyrosin, führen zu solchen Farbveränderungen.

1.2.4 Asservierung sowie Untersuchungsmöglichkeiten an Haarspuren

Anlässe für rechtsmedizinische Haaruntersuchungen können u. a. tätliche Auseinandersetzungen und Unfälle sein. Dabei können am Tatort, an der Kleidung einer betroffenen oder vermutlich beteiligten Person oder an Tatwerkzeugen Haare gefunden werden. Auch ohne äußere Gewalteinwirkung verliert eine gesunde Person ständig Haare. Nimmt man an, dass auf der menschliche Kopfhaut 10^6 Haare vorkommen und

die Anagendauer 1.000 Tage lang andauert, so verliert der Mensch pro Tag zirka 100 Haare [128]. Statistisch gesehen bedeutet das den Verlust eines Haares pro 15 Minuten. Die Sicherung einer Haarspur sollte mit Lupe und Pinzette erfolgen. Als weitere Methode steht das Klebeband als Mittel zur Verfügung [76]. Jedes aufgefundene Haar sollte separat asserviert und beschriftet werden. Eine Sicherung von Vergleichsspuren sollte sehr umfangreich erfolgen.

Bei menschlichen Haaren müssen an vier verschiedenen Stellen des Kopfes Haarproben entnommen werden und zwar direkt an der Haut. Damit die Haarwurzel in eine Untersuchung mit einbezogen werden kann, müssen Haare eventuell ausgerupft oder ausgekämmt werden. Bei Sexualdelikten müssen auch Schamhaare in das Vergleichsmaterial mit einbezogen werden [40].

Im Rahmen von Vergleichsuntersuchungen gestaltet sich die Entnahme von Tierhaaren oft problematisch oder ist z.T. nicht möglich. Die meisten Untersuchungsstellen halten deshalb eine Sammlung von Tierhaaren bzw. Fotografien mikroskopischer Präparate bereit [47], [136].

Die spurenanalytische Aufarbeitung von Haaren beginnt mit einer äußeren Besichtigung. Hier erfolgt eine detaillierte Betrachtung und morphologische Beschreibung des Spurenmaterials. Eventuell vorhandene Schmutzanlagerungen können vor der Reinigung der Haare mit Seife, Alkohol oder Äther selbst als wichtiges Indiz zur Identifikation von Personen dienen. Durch Bakterien oder Pilze kann auf bestehende Krankheiten zurückgeschlossen werden.

Der Untersuchung nach morphologischen Kriterien folgt die Beurteilung der metrischen Verhältnisse (Anzahl, Länge und Form). Die Breite der Haare wird mit einem Okularmeter gemessen. Hierbei muss bedacht werden, dass die Schaftbreite bei verschiedenen Kopfhaaren derselben Person von 0,02 bis 0,14 mm variieren kann [136]. Pigmentierung, Pigmentverteilung sowie Pigmentfärbung können ebenfalls festgestellt werden.

An Körperhaaren sind zusätzlich durch mechanische Gewalt- oder Schweißeinwirkungen verursachte Schäden an der Kutikula zu erkennen. Zur Untersuchung der Kutikulazeichnung verwendet SCHRÖDER [126] eine erweichte Gelatineschicht fotografischer Platten, in die das Haar eingepresst wird. Stumpfe Gewalteinwirkungen stellen sich als Quetschungen, Auflösungen oder als splitterartige

Bruchstellen dar. Bei scharfen Werkzeugen reichen die Befunde von glattrandig queren oder schrägen Durchtrennungsstellen bis zu gequetschten Haarenden bei einer weniger scharfer Schneide. Grundsätzlich führt eine mechanische Belastung des Haares besonders bei langen Haaren zur Aufsplitterung der Haarenden (sogenanntes Pinselhaar) [83]. Außerdem ermöglicht dieses Verfahren auch die Unterscheidung zwischen Tier- und Menschenhaar, da bei Tieren speziesgebundene Kutikulazeichnungen zu erkennen sind [47], [82].

Eine spezielle molekularbiologische Methode zur Untersuchung von Einzelhaaren stellt die Erfassung von Isoenzym-Polymorphismen an Haarwurzeln und Haarwurzelscheiden dar. Durch Stärkegel- oder Zelluloseacetatelektrophorese und isoelektrische Fokussierung in Polyacrylamidgelen konnten folgende Isoenzymtypisierungen erfolgreich durchgeführt werden: Phosphoglukomutase (PGM_1), Adenylatkinase (AK), 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGD), Phosphohexose-Isomerase (PHI) von TWIBELL et al. [138]. Phosphoglukomutase₁-Subtypen von TRÖGER et al. [137], Esterase D (EsD) und Glyoxalase I (GLO) von GERTLER et al. [33]. α -L-Fucosidase (FUCA) von KIDO et al. [68] und Diaphorase₃ (DIA_3) ebenfalls von KIDO et al. [69].

Durch die Entdeckung der repetitiven Sequenzen im Genom (sog. „genetischen Fingerabdruckes“) durch JEFFREYS [61] hielt die Spurenkunde auf DNA-Ebene Einzug in die Haaranalytik. OHSHIMA [98] verwendete als Untersuchungsmethode eine Restriktionsenzymfragmentanalyse, HIGUCHI [50] eine Individualtypisierung mittels Polymerasekettenreaktion (PCR). Eine weitere wichtige Identifikationsmethode in der forensischen Medizin ist die Untersuchung mitochondrialer Sequenzen. Die hohe Anzahl der Kopien pro Zelle (ca. 1.000 - 10.000 Kopien/Zelle) [22] ermöglicht an Spurenmaterial eine sensitive Nachweismethoden zur Identifizierung von Personen. Diese Möglichkeit besteht selbst dann, wenn nur eine geringe Menge an Spurenmaterial vorhanden ist. Zu beachten ist hierbei, dass sich die meisten als Spurenmaterial vorkommenden Haare im telogenen Stadium befinden und somit die DNA-Ausbeute sehr gering ausfällt. Kosmetische Haarfärbungen können molekularbiologische Untersuchungen erheblich beeinträchtigen. Meist handelt es sich um Bleichmittel (z.B. H_2O_2), die bei Bearbeitung des Haares ebenfalls in Lyse gehen und somit die DNA-Typisierung erschweren können.

1.3 Histologische Untersuchungstechniken

Im 17. Jahrhundert begann mit der Entdeckung des Lichtmikroskops die Ära der wissenschaftlichen Haarforschung. Bereits im Jahre 1665 wurden Unterschiede von Menschen- und Tierhaaren in ihrer Oberflächenbeschaffenheit und in ihrem Querschnitt beschrieben. Später fanden sich detaillierte Abbildungen menschlicher Haare mit der Einteilungen in Haarwurzel, Kutikula, Rinde und Mark [9].

1884 wurde ein erster differenzierter Haaraufbau vorgestellt, der erst ab 1960 durch den Einsatz neuer Methoden mit hohem Auflösungsvermögen wie Rasterelektronenmikroskopie (REM), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und durch Röntgenbeugung ergänzt und erweitert wurde.

1.3.1 Fixierung histologischer Präparate

In der Histologie bezeichnet man mit „Fixierung“ eine Methode zur Vorbereitung von biologischem Untersuchungsmaterial für die mikroskopische Analyse. Die Fixierung dient dazu, die enzymatische Autolyse (Auflösung durch gewebeeigene Enzyme) sowie die bakterielle Zersetzung (Fäulnis) zu verhindern, um aussagekräftige histologische Schnitte zu fertigen. Weiterhin werden die im Gewebe enthaltenen Eiweiße dauerhaft denaturiert, sind lagerbar und können auch mit erheblichen Zeitversatz noch untersucht werden. Dabei sollen die Substanzen der Fixationslösung das Gewebe schnell fixieren oder denaturieren. Des weiteren bleibt die Gewebestruktur im Augenblick des Fixationsvorgangs erhalten und wird für die weiteren Arbeitsschritte resistent gemacht. Gewebe sollten deshalb ein günstiges Verhältnis von Oberfläche zu Volumen aufweisen.

Der menschliche Organismus besteht aus ca. 80 % Wasser, 12 % Proteinen und 7 % Fett. Somit ist klar, dass der größte Anteil dieser Trockensubstanzen zur Zeit des Lebens im gelösten Zustand vorliegt. Der Vorgang der Fixierung muss daher darauf abzielen, die Löslichkeit der wesentlichen organischen Komponenten (Eiweiß, Fett und Kohlenhydrate) herabzusetzen oder das Lösungsmittel zu entfernen.

Zusammenfassend müssen durch eine Fixationslösung folgende Punkte gewährleistet werden:

- Verhinderung von Schrumpfung, Schwellung oder Verzerrung des Gewebes.
- Inaktivierung gewebeeigener Enzyme.
- Abtöten von Mikroorganismen.
- Gewährleistung einer Gewebebeschaffenheit, die eine Weiterbearbeitung des Gewebes durch Entwässerung, Reinigung, Einbettung, Schneiden und Färbung zulässt.

Die Wahl einer Fixationslösung wird durch die Gewebestrukturen und -veränderungen bestimmt, welche später durch eine spezifische Färbung dargestellt werden soll. In dieser Arbeit wurde zum einen Formalin, zum anderen ein Fixiergemisch, die sogenannte Carnoysche Flüssigkeit, verwendet.

1.3.2 Färbung histologischer Präparate

Ziel von histologischen Färbungen ist es, sowohl lebende als auch fixierte Gewebe, die eigentlich für das menschliche Auge transparent erscheinen, sichtbar zu machen. Dabei wird ein Farbstoff, der in Lösung angeboten wird, an definierte Gewebestrukturen gebunden.

Die Farbstoffe können grob in zwei Gruppen aufgeteilt werden:

1. Natürliche Farbstoffe, wie z.B. Hämatoxylin, Indigo, Koschenille und seine Derivate, sowie Orcein und Brazilin.
2. Artifizielle Farbstoffe. Diese werden durch chemische Reaktion von Substanzen, die in Kohleteer enthalten sind, synthetisiert [102], [106], [134].

Färbungen werden in der Regel am fixierten Gewebe durchgeführt. Es werden vier Hauptvorgänge für das Entstehen von histologischen Gewebepreparaten verantwortlich gemacht:

1. Die Oberflächenabsorption wird durch eine physikalische Reaktion hervorgerufen. Der ionisierte Farbstoff bindet an der Gewebefläche, die eine bestimmte elektrische Ladung trägt.

2. Die direkte Färbung beruht auf unterschiedlichen Absorptionspotentialen der verschiedenen Gewebestrukturen mit einer schwachen Lösung eines Färbemittels. Besonders die Gewebedichte dient hier als kontrollierender Faktor.
3. Die indirekte Färbung bedient sich einer starken Lösung des Färbemittels. Nachfolgend wird der Farbstoff von unrelevanten angefärbten Gewebestrukturen entweder ausgewaschen oder von chemischen Reagenzien zersetzt.
4. Beizen sind Salze oder Hydroxide von bi- oder trivalenten Metallen, die bestimmte Gewebestrukturen vor Bindung mit Farbstoffen bewahren.

Weitere Faktoren, die Einfluss auf eine Färbung nehmen, sind die Stärke der Ladung der Färbelösung, ihre Konzentration, die Fixation und die Temperatur. In den folgenden zwei Kapiteln werden die beiden verwendeten Färbemethoden näher besprochen.

1.3.2.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Nach einer Formalinfixierung lassen sich histologische Schnitte sehr gut mit Hämalaun färben. Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung handelt es sich um eine Doppelfärbung, die schnell und einfach auszuführen ist und oft als Übersichtsfärbung in der Routine von histologischen Laboratorien verwendet wird. Hämalaun ist ein Hämatoxylinlack des Aluminiums, das mit gewöhnlichem Alaun (Kalialaun $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{K}_2(\text{SO}_4) \cdot 24\text{H}_2\text{O}$) oder Ammoniumalaun ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) gebildet wird. Als positiv geladener Farbstoff ist Hämalaun dazu geeignet, ganz allgemein Basophilie einer Struktur anzuzeigen.

Das in dieser Arbeit verwendete saure Hämalaun nach Mayers liefert sehr selektive, starke, blaue Kernfärbungen. Eine Überfärbung der Präparate ist praktisch nicht möglich. Außerdem zeichnet sich der Farbstoff durch seine Stabilität aus und der daraus resultierenden langen Haltbarkeit.

Im Anschluss wurde die Kernfärbung nach Mayer mit einer sogenannten Gegenfärbung ergänzt. Verwendet wurde hierfür der synthetische Anilinfarbstoff Eosin Y, der chemisch dem Tetrabrom-Fluorescein entspricht. Die gleichzeitige Löslichkeit in Wasser wie in Alkohol macht Eosin Y zum Präparat der Wahl bei Doppel- oder Dreifachfärbungen. Als saurer Plasmafärbstoff enthält Eosin Y Sulfonyl- und

Carbonsäure, die bevorzugt Bindungen mit Gewebeproteinen ausbilden, die einen Überschuss an basischen Aminosäuren, wie z.B. Arginin, Lysin, Hydroxylysin und Histidin besitzen.

Das Ergebnis der Färbung sind verschiedene rötliche Tonabstufungen des angefärbten Zytoplasmas und der meisten Interzellulärsubstanz.

1.3.2.2 Methylgrün-Pyronin-Färbung

Die von PAPPENHEIM [103] eingeführte Ein-Schritt-Methode mit Methylgrün-Pyronin dient der gleichzeitigen Darstellung von DNA und RNA in Gewebeschnitten. DNA färbt mit Methylgrün, RNA bildet mit Pyronin einen roten Farbniederschlag. Aufgrund der uneinheitlichen Verwendung von Farbstoffen und des pH-Wertes der Färbelösung galt diese Färbung lange als schlecht reproduzierbar. Ihre letzte Vervollkommnung erfuhr die Methylgrün-Pyronin-Färbung durch KURNICK [79]. Er erkannte, dass die elektrostatische Bindung basischer Farbstoffe abhängig vom isoelektrischen Punkt der zu färbenden Struktur ist. Der gewünschte pH-Wert konnte durch die Modifikation des Pappenheimschen Farbgemisches mit Zugabe von Phenol erreicht werden. In modernen Ansätzen arbeitet man mit Pufferlösungen, die den pH-Wert von 4,8 zuverlässig einstellen. Methylgrün bindet nämlich dann mit der höher polymerisierten DNA, wohingegen das niedrigere Polymer RNA mit Pyronin bindet. Wird die DNA durch Säuren oder UV-Licht depolymerisiert, verliert Methylgrün die Fähigkeit zur Anfärbung des Chromatins.

1.4 DNA-Typisierung

Unterschiede zwischen einzelnen Individuen sind in der Sequenz ihrer jeweiligen Desoxyribonukleinsäure (DNS oder engl.: DNA) niedergelegt. In der forensischen Spurenkunde bedient man sich sowohl der im Zellkern gelegenen genomischen DNA als auch der in den Mitochondrien gelegenen mitochondrialen DNA. Die DNA ist ein Makromolekül, welches aus vielen Nucleotiden besteht, die über eine 3',5'-Phosphodiesterbindung zu einer langen Kette verknüpft sind. Die genetische

Information ist in der DNA durch die Sequenz der Basen codiert. In der DNA sind die vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin enthalten. Eine Folge von drei Basen (Triplet) codiert jeweils auf dem Genom für eine Aminosäure. Die gesamte haploide DNA des Menschen ist ca. 990 mm/Zelle lang und enthält $3,9 \times 10^9$ Basenpaare auf 23 Chromosomen.

Die DNA liegt im Zellkern als gegenläufige (plectonemische) rechtsgewundene α -Doppelhelix vor, die in einer kompletten Windung zehn Basenpaare enthält und eine Windungshöhe von 3,4 nm aufweist. Jede Base im Doppelstrang bestimmt eindeutig ihre gegenüberliegende (komplementäre) Base (Prinzip der Basenpaarung). Dadurch ist eine exakte Weitergabe der genetischen Information möglich (identische Replikation).

Das humane mitochondriale Genom (mtDNA) besteht aus einer zirkulären doppelsträngigen DNA mit einer Länge von 16.569 Kilobasen (kb), dessen Basenfolge erstmals von ANDERSON et al. [4] sequenziert werden konnte. Im Vergleich zu der genomischen DNA besitzt die mitochondriale DNA eine kompaktere Struktur und verfügt über keine Introns oder Startboxen (TATA-Boxen) [5]. Jedes Mitochondrium besitzt mehrere Kopien des mitochondrialen Genoms, so dass von einer sehr hohen Kopienzahl pro Zelle ausgegangen werden kann. Entgegen den Mendel'schen Regeln unterliegt die mtDNA einem maternalen Vererbungsmodus. Insgesamt existieren nur drei nicht kodierende Bereiche der Kontrollregion, die im sog. Displacement (D)-Loop lokalisiert sind. Es liegen zwei Bereiche mit einer großen Sequenzvariabilität vor: die hypervariable Region 1 (HV1) zwischen den Positionen 16.024 und 16.356 und die hypervariable Region 2 (HV2) zwischen den Positionen 73 und 240. Eine dritte Region (HV3) mit geringerer Variabilität stellt sich im Bereich 438 - 574 dar [17], [104].

Häufig steht jedoch die Untersuchung der genomischen DNA im Mittelpunkt, da sie durch die Tatsache der Rekombination über eine wesentlich größere Heterogenität verfügt [28], [29], [77], [104]. Darüber hinaus können elektrophoretisch quantifizierbare Fragmentgrößen der genomischen DNA als Ausdruck der Heterogenität direkt verglichen werden, während zur Darstellung der mitochondrialen Heterogenität eine Sequenzierung mit anschließendem Vergleich einer Bezugsgröße, der sog. Anderson-Sequenz, erforderlich wird [104].

1.4.1 Tandem-Sequenzwiederholungen

Gegenstand der Untersuchungen in dieser Arbeit sind repetitive Sequenzen, die in den nichtcodierenden DNA-Abschnitten (Introns) entweder verstreut zwischen anderen DNA-Sequenzen liegen oder als hintereinandergeschaltete Tandemwiederholungen auftreten. Je nach Länge der Tandemwiederholungen unterscheidet man zwischen:

1. Satelliten-DNA
2. Variable number of tandem repeats (VNTRs)
 - Minisatelliten-DNA
 - Mikrosatelliten-DNA

Satelliten-DNA:

Satelliten-DNA ist im Chromosom im Centromerbereich lokalisiert und besteht aus hochrepetitive Sequenzen, deren Länge von 5 bp bis maximal 171 bp beschrieben wird [20]. Die Gesamtlänge des Bereiches, in der die Wiederholungseinheiten auftreten, kann von 100 Kilobasen bis zu einigen Megabasen variieren. Ihre Allele sind für die Spurenanalyse nicht nur zu groß, sie sind sogar ungeeignet, da ihre einzelnen Repeats nicht identisch, sondern nur zu 95 % homolog sind.

Variable number of tandem repeats (VNTRs):

Im Gegensatz zur Satelliten-DNA sind die Anzahlen der Wiederholungen wesentlich kürzer, sie bestehen in der Regel aus bis zu 50 Wiederholungen. Diese Wiederholungen sind außerdem hochvariabel. Durch falsche Zusammenlagerung beim Crossover während der meiotischen Rekombination haben sich im Verlauf der Evolution viele verschiedene Allele gebildet, die aus jeweils einer anderen Zahl von Wiederholungen bestehen.

Minisatelliten-DNA:

Als Minisatelliten-DNA werden DNA-Bereiche bezeichnet, bei denen Kernsequenzen von 9 – 100 bp hintereinander geschaltet sind und die theoretisch mehrere tausend Wiederholungen bilden können. Die Lokalisation im Chromosom liegt im Telomerbereich [59], [62], [104].

Mikrosatelliten-DNA:

Einen besonderen Anteil nicht-kodierender DNA-Abschnitte stellen Mikrosatelliten dar, die in Form von kurzen Sequenzen mit einer Länge von 2 bis 7 bp vorkommen. Diese kurzen Wiederholungseinheiten sind über das gesamte Genom verteilt und weisen eine maximale Repeathäufigkeit von ca. 100 auf. Aus diesem Grund werden sie auch als „short tandem repeats“ (STR) bezeichnet. Sie treten auf bestimmten Chromosomen an einer genau definierten Stelle (locus) in einer variablen Anzahl auf. Die Untersuchung der STR-Systeme umfasst verschiedene Chromosomen und Chromosomenbereiche.

1.4.2 Genetische Polymorphismen und genetische Individualität

Die genetische Heterogenität ist die Grundvoraussetzung der forensischen Serologie. Nur, wenn sich Individuen voneinander unterscheiden, können Zuordnungen von Spuren zu Personen und umgekehrt erfolgen [104]. Die heutigen DNA-Untersuchungen unter forensischem Aspekt bedienen sich bestimmter Genomregionen, von denen bekannt ist, dass sie bei verschiedenen Individuen häufig differieren. Man bezeichnet solche Genomabschnitte als polymorphe Regionen, wenn in einer menschlichen Population verschiedene Varianten (Allele) von mehr als einem Prozent an demselben Locus vorkommen. Bei dieser Häufigkeit ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass die Variante nur zufällig mehrmals auftritt. Eine hohe Heterozygotenrate von z.B. polymorphen STR-Regionen ermöglicht eine gute Differenzierung von Individuen, falls sich diese in den untersuchten STR-Systemen unterscheiden.

1.4.3 Entwicklung der Methoden

Seit der Entdeckung der DNA als Träger der genetischen Information durch AVERY [120] hat sich die Molekulargenetik mit bemerkenswerter Geschwindigkeit entwickelt. Mit den Entdeckungen von JEFFREYS [62] und MULLIS [117] hat die DNA-Technologie Einzug in die forensische Medizin gefunden. Durch die Entwicklung des sogenannten „DNA-Fingerprinting“ war es nun möglich geworden, die Beweiskraft bei

der Aufklärung von Straftaten und Paternitätsbestimmungen erheblich zu steigern. Mit folgenden Methoden werden unterschiedliche repetitive Sequenzen in der forensischen Spurenkunde untersucht:

RFLP-Analyse der Minisatelliten-DNA mittels Multi-Locus-Sonden (MLS)

JEFFREYS [62] fragmentierte nukleäre menschliche DNA mittels Restriktionsenzymen in unterschiedliche große Bruchstücke und trennte diese elektrophoretisch auf. Danach transferierte er sie auf eine Membran und hybridisierte sie mit einer MLS (Multi-Locus-Sonde), sodass sich Varianten repetitiver Sequenzen an vielen verschiedenen DNA-Loci gleichzeitig nachweisen lassen. Als Endergebnisse zeigen sich komplexe, multiallelische Bandenmuster, die mittels der Southern-Blot-Technik als diskrete, strichcodeartige Banden auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden („DNA-Fingerprinting“).

Der Nachweis dieser polymorphen Regionen mit Restriktionsenzymen und einer Sonde wird als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) bezeichnet. Das Individualzuordnungspotenz ist, verglichen mit anderen Merkmalssystemen (z.B. Blutgruppenserologie, HLA-Typisierung) ungleich höher.

Für die Anwendbarkeit in der forensischen Medizin besitzt die DNA-Typisierung mittels MLS zur RFLP-Bestimmung aber mehrere Schwächen:

1. Aufgrund der relativ geringen Empfindlichkeit der RFLP-Analyse werden im Vergleich zur Polymerasekettenreaktion (PCR) mindestens 500 ng DNA (entspricht 500.000 bis 1 Million Spermien) benötigt.
2. Für die Auswertung werden üblicherweise nur Banden mit einer Größe von >4.000 bp verwendet. Da Banden >4.000 bp sehr dicht nebeneinander zur Darstellung kommen, sind sie kaum identifizierbar. Aus diesem Grund benötigt man für die RFLP-Analyse hochmolekulare DNA. Im forensischen Spurenmaterial trägt die häufige Präsenz z.B. von Bakterien oder UV-Licht zur Degradierung der DNA bei. Diese „unkontrollierte“ Fragmentierung der DNA produziert ein fehlerhaftes oder negatives Ergebnis.
3. Die häufig in der forensischen Spurenkunde vorkommenden Überlagerungen zweier DNA-Muster, wie z.B. in Sperma- und Vaginalzellen, machen eine Interpretation mittels MLS nahezu unmöglich.

4. Die detektierten Banden weisen oft eine unterschiedliche Intensität auf, da die Kernsequenz pro Restriktionsenzymfragment in unterschiedlicher Anzahl vorliegt (je mehr Sonden an ein DNA-Fragment hybridisiert werden, desto intensiver erscheint das Markierungssignal). Der Verlust von schwachen Banden im Spurenmaterial ist so oft unvermeidbar.
5. Ergebnisse des „DNA-Fingerprinting“ sind statistisch nicht analysierbar. Es liegen keine Kenntnisse vor, welche Banden zu einem Locus zuzuordnen sind [113].

RFLP-Analyse der Minisatelliten-DNA mittels Single-Locus-Sonden (SLS)

Durch die Einführung von Single-Locus-Sonden (SLS) konnten nach Restriktionsenzymverdau repetitive Sequenzen der Minisatelliten-DNA von bestimmten Genorten erfasst werden. Sogenannte VNTRs (engl.: variable number of tandem repeats) treten als Tandemwiederholungen auf den verschiedenen Chromosomen in unterschiedlicher Anzahl, Größe und Sequenzen auf. Mit der RFLP-Analyse mittels Single-Locus-Sonde (z.B. MS1, MS8, MS31, g3, TBQ7) können pro Individuum maximal zwei Fragmente nachgewiesen werden.

Neben der Möglichkeit der Bestimmung von geschlechtsspezifischen X- und Y-Sonden [98] besteht der Fortschritt gegenüber der DNA-Typisierung mittels MLS-Sonden darin, dass durch Hybridisierung mit verschiedenen SLS-Sonden die Übereinstimmung mehrerer DNA-Muster verschiedener Personen voneinander einfacher zu differenzieren ist. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, mehrere Personen voneinander einfach zu unterscheiden, was als Diskriminationsstärke bezeichnet wird. Jedoch schränken auch einige Nachteile die Anwendung der RFLP-Analyse mittels SLS in der forensischen Praxis ein:

1. Auch bei diesem Nachweis ist hochmolekulare DNA erforderlich, da aufgrund der geringen Empfindlichkeit etwa 20 ng DNA benötigt werden. Zahlreiche in der SLS-Analyse verwendeten Systeme kommen zwischen 2 – 20 kb zur Darstellung, sodass bei degradiertem DNA ein negatives oder fehlerhaftes Ergebnis produziert wird.
2. Die Ergebnisse eines einzelnen Merkmalsystems erreichen nicht die Aussagekraft einer MLS-Analyse.

VNTR-Typisierung der Minisatelliten-DNA mittels PCR

Nach Entwicklung der PCR-Methode (Polymerase-Ketten-Reaktion) verloren die Restriktionsenzyme für die DNA-Analyse für die Spurenkunde an Bedeutung. Durch Einsatz hitzestabiler DNA-Polymerasen, wie z.B. die Taq-DNA-Polymerase, konnten bestimmte Genomabschnitte gentechnologisch um etwa den Faktor 10^8 vervielfältigt werden. Mittels PCR wurden zunächst verschiedene Bereiche der Minisatelliten-DNA untersucht, später hochpolymorphe VNTR-Regionen mittels PCR amplifiziert. Diese nachgewiesenen VNTR-Polymorphismen werden als amplifizierbare Fragmentlängenpolymorphismen (AmpFLP) bezeichnet. Folgende VNTR-Regionen werden in der rechtsmedizinischen Praxis eingesetzt:

- das System D1S80 auf Chromosom Nr.1 [21], [66], [75]
- das System YNZ22 auf Chromosom Nr.17 [56], [112]
- die hypervariable Region 3` Apo B auf Chromosom Nr. 2 [84], [112]
- Col2A [112]

Der Einsatz der PCR zur Untersuchung von VNTR-Regionen weist gegenüber der Untersuchung mittels Restriktionsenzymen und Single-Locus-Sonden mehrere Vorteile auf:

1. Heraufsetzen der Nachweisempfindlichkeit durch die PCR auf Größenordnungen von ca. 5 ng DNA.
2. Möglichkeit der Typisierung von degradiertem DNA [7], [31], [38], [144].

STR-Typisierung der Mikrosatelliten-DNA mittels PCR

Mit TAUTZ et al. [135] im Jahre 1994 hält die Mikrosatelliten-DNA Einzug in die DNA-Typisierung. Dimerische STRs der Sequenz AC stellen sich als zu kurz heraus, da die Taq-Polymerase häufig an diesen vorbeigeleitet wird und somit eine genaue Amplifikation nicht möglich ist. Dieses Vorbeigleiten, das sogenannte „artefact stutter banding“, ist bei tri-, tetra- und pentameren STR-Loci seltener zu beobachten [28], [29], [32], [143]. Tri- und tetramere STR-Loci wurden durch EDWARDS [28], [29]

erfolgreich in die forensische DNA-Typisierung eingeführt. Im Vergleich zu der oben aufgeführten DNA-Typisierung weist diese mehrere Vorteile auf:

1. Die DNA-Typisierung eines STR-Systems setzt den Einsatz von 0,5 - 1 ng DNA voraus, ist also in der Nachweisempfindlichkeit der Amplifikate sensitiver als die der AmpFLPs [28], [29].
2. Mit STRs kann degradierte DNA typisiert werden [35], [37], [46].
3. Tri- und tetramere STR-Regionen kommen im nukleären Genom sehr häufig vor. Im menschlichen Genom sind solche STR-Loci mit einer Häufigkeit von ca. 400 Millionen verteilt. Da es sich zusätzlich um hochpolymorphe Regionen handelt, ist der Einsatz zur Personenidentifizierung besonders geeignet [1], [28], [29], [71].
4. Die Kürze der Fragmente vermindert eine ungleiche Amplifikation unter Allelen sowie den Ausfall von großen Allelen, wie es z.B. bei der Amplifikation von VNTR-Regionen zu beobachten ist.
5. Die Amplifikationsprodukte liegen in einem Größenbereich von 120 bis 350 bp, der eine präzise Allelbestimmung erlaubt. Die Allellängen können mittels PAGE oder Kapillarelektrophorese aufgelöst werden [21].

Somit stellt die molekularbiologische Untersuchung von STR-Regionen ein wichtiges und aussagekräftiges Instrument der forensischen DNA-Typisierung dar. In der forensischen Medizin ist der Einsatz von STR-Systemen an verschiedene Anforderungen gebunden. Diese Bedingungen werden in folgenden Kapiteln beschrieben.

1.4.4 DNA-Typisierung

In dieser Arbeit werden zwei STR-Systeme und ein Geschlechtsbestimmungssystem zur Untersuchung eingesetzt. Die Auswahl der Systeme erfolgt im Hinblick auf die im Spurenmaterial „Haar“ oft nur gering und degradiert vorkommenden DNA sowie deren Etablierung in der forensischen Praxis. Die Anforderungen für die DNA-Typisierung einzelner STR-Systeme (Singleplex-PCR) lassen sich wie folgt beschreiben:

- Effizienz:

Um eine hohe statistische Aussage zu erhalten, sollte die Heterozygotenrate möglichst hoch sein. Es sollten zahlreiche Allele mit gleichmäßiger Häufigkeit verfügbar sein.

- Sensitivität:

Die Sensitivität bezieht sich auf die Größe des zu amplifizierenden Fragmentbereichs des STR-Systems. Kleine Fragmentgrößen eines STR-Systems sind bei der Amplifikation von geringen oder stark degradierten DNA-Mengen sensitiver.

- Reproduzierbarkeit:

Eine standardisierte Nomenklatur muss zu jedem STR-System vorhanden sein. Dies beinhaltet die Existenz einer Alleleiter, welche durch die Häufigkeit von Allelen in einer bestimmten Population konstruiert wird. Zur Unterscheidung der Allele wird zusätzlich eine standardisierte elektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate vorausgesetzt. Die Qualitätskontrolle eines etablierten STR-Systems erfordert intern die Untersuchung der DNA einer Vergleichsprobe bekannter Gruppenzugehörigkeit. Weiterhin ist die erfolgreiche Teilnahme an Ringversuchen, die von der Spuren- und Qualitätssicherungskommission der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin durchgeführt werden, notwendig (externe Qualitätskontrolle).

- Populationsgenetische Aspekte:

Die Populationsdaten der STR-Systeme müssen zum Einsatz für die statistische Auswertung bekannt sein. Diese umfassen die DNA-Typisierung einzelner STR-Systeme von einer großen Anzahl unverwandten Individuen in mehreren Populationen.

Die untersuchten Loci tetramerer STR-System werden in folgenden Kapiteln vorgestellt. Die Bezeichnung der Loci erfolgt nach Angaben der Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

1.4.4.1 STR-Locus: HumACTBP2

Der Locus HumACTBP2 (SE33) wird von MOOS [92] mit einem Fragmentgrößenbereich von 223 bis 309 bp angegeben. Dieser wird von der Genbank als „human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2“ definiert und weist die Genbank-Nr. V00482 auf. Die tetramere, polymorphe Sequenz besitzt die chromosomale Lokalisation 5pter-5qter und liegt im Bereich des β -Aktin Pseudogen 2. Die polymorphe Struktur wurde erstmals von MOOS et al. [92] untersucht. Weitere Autoren beschrieben die Region hinsichtlich der Einsatzmöglichkeit in der forensischen Medizin [93], [95], [108], [123], [124], [139]. HumACTBP2 weist einen komplexen STR-Locus mit Tetranukleotidstruktur auf, der mehr als 32 Allele im Bereich von 202 bis 323 bp beinhaltet. Dabei wiederholt sich die hochrepetitive Sequenz 5'-CAAA-3' bis maximal vierzig mal. Im Bereich zwischen 233 bis 273 bp wurden zusätzlich hexamere Abschnitte mit der Sequenz 5'-AAAAAG-3' oder 5'-AGAAAG-3' entdeckt. Aufgrund der hohen Anzahl von Längen- und Sequenzvarianten stellt HumACTBP2 einen hoch informativen STR-Locus dar.

1.4.4.2 STR-Locus: HumVWA

Der Locus HumVWA wird in der Genbank als „human von Willebrand factor gene, exon 39, 40, 41 and 42, and the repetitive element“ definiert und von MANUSCO [88] mit einer Größe von 5.285 bp angegeben. Die tetramere polymorphe Sequenz ist auf dem Chromosom 12p12-pter lokalisiert.

Erstmalig wurde diese polymorphe Struktur von KIMPTON [71] untersucht. Weitere Autoren überprüften die Einsatzmöglichkeit in der forensischen Praxis [52], [70], [85], [94], [119]. Das Intron 40 des HumVWA-Gens enthält drei TCTA tandem-repeat-Regionen. PEAKE [105] untersuchte die Region zwischen den Nukleotiden 1.900 bis 2.000, DE VETTEN [25] zwischen 2.200 bis 2.350. KIMPTON [71] amplifizierte die polymorphe Region TCTA mit zwei Oligonukleotidprimern zwischen den Nukleotiden 1.640 bis 1.794, der amplifizierte Fragmentgrößenbereich erstreckt sich über 154 bp.

1.4.4.3 Geschlechtsbestimmungssystem: HumAMEL X/Y

Zur Geschlechtsbestimmung mittels PCR-Methode werden einfache homologe Sequenzen mit nur einigen Basenpaaren Unterschied auf dem X- und Y-Chromosom benötigt. Nach Empfehlung der ISFH [26] sollten sowohl X- als auch Y-chromosomal-spezifische Kopienbereiche amplifiziert werden, wobei diese PCR parallel oder simultan durchgeführt werden kann.

Das Amelogenin-Gen liegt auf dem DYZ1-Locus (AMGY) des Y-Chromosoms und homolog auf dem X-Chromosom (AMGX) in dem Bereich, in dem beide Geschlechtschromosomen nicht rekombinieren [104]. Die Vervielfältigung geschlechtschromosomaler Bereiche erfolgt mit nur einem einzigen Primerpaar, dabei sind die PCR-Produkte Fragmente mit unterschiedlicher Größe. Die Primer des Amelogenin-Systems werden von einer 6 bp-Deletion innerhalb des Intron 1 des X-homologen Bereichs flankiert. Die X-chromosomalen Fragmente sind 103 bp, die Y-chromosomalen Fragmente sind 109 bp groß.

Bei Männern treten zwei Fragmente auf. Das eine Fragment misst 103 bp, das andere 109 bp. Bei Frauen dagegen treten zwei gleichgroße 106 bp große Fragmente auf, die nach elektrophoretischer Auftrennung als eine einzelne Banden, zu erkennen sind.

Der Erfolg der Amplifikation wird durch die Anwesenheit der X-spezifischen Bande kontrolliert. Das Geschlechtsbestimmung wird durch die An- oder Abwesenheit der Y-spezifischen Bande bestimmt.

1.4.5 Singleplex-PCR

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion beruht auf einer zuverlässigen in vitro Methode, um bestimmte DNA-Zielsequenzen zu vervielfältigen. Für die DNA-Replikation müssen folgende Reaktionsteilnehmer zur Verfügung gestellt werden:

- Primer (Startersequenz)
- Taq-Polymerase
- Nukleotide und Energie (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- Reaktionspuffer und Magnesiumchloridlösung ($MgCl_2$)

Der PCR-Zyklus beginnt mit der Denaturierung durch Hitze der DNA in ihre Einzelstränge. Oligonukleotid-Primer, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize (engl.: template) sind, flankieren die gewünschte Sequenz (engl.: primer annealing). So kann die Taq-Polymerase mit der schrittweisen Addition von Desoxyribonukleotideinheiten an das 3'-Ende der DNA-Kette beginnen. Bei jedem durchgeführten Zyklus von Denaturierung, Primer Hybridisierung und Neusynthese (engl.: primer-extension) oder Elongation wird die Zahl der Kopien verdoppelt. Unter optimalen Bedingungen bezüglich der Zusammensetzung des Reaktionsgemisches sowie des Zeitprofils und der wechselnden Temperaturbedingungen der Zyklen gelang es, nach insgesamt 35 durchlaufenen Zyklen millionenfache Kopien der DNA-Zielsequenz im Thermocycler herzustellen. Dabei sollten folgende grundsätzliche Überlegungen und Auswahlkriterien an die verschiedenen PCR-Komponenten gestellt werden:

- Primerauswahl:

Die Primersequenzen der einzelnen Systeme sollten so beschaffen sein, dass die einzelnen Sequenzen weder inter- noch intramolekular komplementär sind. Somit wird eine Hybridisierungsreaktion, wie z.B. in Form von Primerdimerprodukten vermieden. Außerdem sollten die Oligonukleotide möglichst gleiche Schmelztemperaturen zum Anlagern an die Ziel-DNA (engl.: template-DNA) aufweisen. Dies kann dadurch erreicht werden, dass Primer mit gleicher Länge, ähnlichen GC-Gehalt sowie einer gleichmäßigen Verteilung von G und C innerhalb der Primersequenz selbst verwendet werden.

- Zyklusparameter:

Jeder Synthesezyklus einer PCR-Reaktion besteht aus drei Schritten:

1. Denaturierung der Matrizen-DNA bei einer Temperatur von 95 °C.
2. Anbindung des Primer an die Ziel-DNA (template-DNA) bei 50 – 60 °C (Annealing).
3. Bindung der Nukleotide an die gebundenen Primer bei 72 °C (Extension). Die Annealingtemperatur soll so hoch wie möglich, die Anzahl der Zyklen so gering wie möglich gehalten werden, damit keine unspezifischen Amplifikationsprodukte auftreten.

- Enzymkonzentration

Die typische PCR-Reaktion gilt als äußerst effektiv, doch vermehren sich die gesuchten Sequenzen nicht beliebig lange exponentiell. Mit zunehmender Konzentration der Amplikons vermindern sich deren Hybridisierungen untereinander durch Konkurrenz in der Anlagerung der Primer. Zusätzlich nimmt die Aktivität des Enzyms durch Hitzedenaturierung ab.

- Pufferkonzentration:

Für die meisten PCR-Reaktionen werden Standardpuffer eingesetzt, die aus 10 mmol/l Trishydroxymethylaminomethan (Tris), 50 mmol/l KCl und 1,5 mmol/l $MgCl_2$ bestehen. Zu beachten ist, dass die Mg^{2+} -Ionen mit den dNTPs einen löslichen Komplex bilden und so für den dNTP-Einbau ausschlaggebend sein können. Außerdem kann die $MgCl_2$ -Konzentration die Ausbeute einer PCR wesentlich beeinflussen.

Im allgemeinen verringert eine ungenügende Mg^{2+} -Konzentration die Anzahl der Amplifikate, überschüssige Mg^{2+} -Ionen fördert die Bildung unspezifischer Produkte.

Die in diesem Kapitel vorgestellten STR-Systeme HumACTBP2, HumVWA sowie dem Amelogenin-System HumAMEL X/Y stellen einzelne DNA-Systeme dar, mit denen eine Individualtypisierung inklusive einer Geschlechtsbestimmung in der forensischen Praxis möglich ist. Durch zwei bereits etablierte Methoden wird aus Haarwurzeln und Haarschäften DNA extrahiert. Die Amplifikate werden mittels hoch sensitiver Polyacrylamidgelelektrophorese und Silberfärbung nachgewiesen und sollen so zur Individualtypisierung dienen.

1.4.6 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten bis 1.000 bp wird die Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) eingesetzt [45]. Der Einsatz dieser Elektrophoresetechnik ermöglichte die Auftrennung von DNA-Fragmenten in einem spezifischen Größenbereich und diente somit zur Überprüfung des PCR-Erfolges. Die negative Ladung der DNA-Moleküle verursacht im alkalischen Milieu eine Wanderung im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Da das Polyacrylamidgel ein komplexes

Netzwerk mit definierter Porengröße darstellt, wandern besonders kleine Moleküle (mit wenigen Basenpaaren) relativ schnell durch das Gel. Große Moleküle gelangen mit entsprechend verlangsamter Geschwindigkeit durch die Gelporen. Auf diese Weise wurden die DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt.

1.4.7 Silberfärbung der Polyacrylamidgele

Zur Detektion der mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Amplifikate wurden die Gele aus Kapitel 1.4.6 mit Silbernitrat gefärbt [45]. Bei diesem sensitiven Detektionsverfahren wird ionisches Silber (Silbernitrat) an die DNA gebunden und durch eine Reduktionsreaktion in sichtbares metallisches Silber umgewandelt.

1.4.8 Hochauflösende Kapillarelektrophorese

Unter dem Begriff Kapillarelektrophorese wird eine analytische Technik zusammen gefasst, bei der in einer Kapillare die unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten geladener Teilchen in einem elektrischen Feld zur Trennung ausgenutzt wird.

Die DNA der zur analysierende Probe wird durch Hitze denaturiert und in ihre beiden Einzelstränge zerlegt. Anschließend erfolgt die elektrophoretische Auftrennung in einer Glaskapillare, die mit einem Gel angefüllt ist. Zur Detektion der DNA-Fragmente wird ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, der durch einen Argonlaser angeregt wird. Von einer sog. CCD (charge couple device)-Kamera wird die erzeugte Fluoreszenz erfasst und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Ein angeschlossener Computer wertet die Signale mittels spezieller Software aus.

1.5 Aufgaben- und Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit werden Haarspuren in ihrer Funktion als Beweismaterial untersucht. Anlässe für eine spurenkundliche Untersuchung von Haaren waren

vorwiegend Gewaltdelikte, Einbrüche oder Verkehrsunfälle. Haare konnten dann an Kleidungsstücken, Tatwerkzeugen oder Personen gesichert werden. Die Entnahme des Vergleichsmaterials erfolgte an 30 unverwandten Probanden.

Mit einer makroskopischen und mikroskopischen Beurteilung der Einzelhaare wird die Eignung als forensisches Untersuchungsmaterial überprüft. Meistens treten telogene Haare als Spurenmaterial auf. Aufgrund des zum Stillstand gekommenen Wachstums sowie der vollständigen Lösung des Haarfollikels vom Blutsystem und Bindegewebe, besitzen diese Haare den niedrigsten Gehalt an DNA. Aus diesem Grund erfolgte die DNA-Extraktion ausschließlich an telogenen Haaren sowie Haarschäften.

Die isolierte Gesamt-DNA aus telogenen Haaren und Haarschäften wird zur Bestimmung der Allelkonstellationen der polymorphen, tetrameren STR-Regionen ACTBP2, HumVWA sowie einem Geschlechtsbestimmungssystem HumAMEL X/Y in die PCR eingesetzt. Zum Vergleich wird die DNA der entsprechenden Person auch aus Blut isoliert.

Die zu erwartenden geringen DNA-Mengen aus telogenen Kopfharen und Haarschäften wird im Hinblick auf den Einsatz in der forensischen Praxis untersucht und beurteilt. Weiterhin werden anhand von histologischen Längs- und Querschnitten durch die Kopfhaut Haare in ihrer Gesamtstruktur untersucht. Mit der histologischen Hämatoxylin-Eosin- sowie der Methylgrün-Pyronin-Färbung soll geprüft werden, ob sich morphologische Hinweise auf die Existenz möglicher Strukturen in Zellen des keratinisierten Haares finden lassen, mit denen hochmolekulare DNA assoziiert sein kann. Die morphologischen Untersuchungen fanden primär unter dem Aspekt der Korrelation zwischen DNA-Ausbeute und der Haarfarbe und Haarlänge statt.

2 Material

2.1 Herkunft und Beschaffenheit des Untersuchungsmaterials

Sämtliches Untersuchungsmaterial entstammt dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Würzburg aus dem Jahre 1998-1999. Die Materialentnahme erfolgte an 30 unverwandten Leichen, deren Obduktionen gerichtlich angeordnet waren. Für die Herstellung histologischer Schnitte wurde Kopfhaut verwendet. Das Material wurde aus dem Rand des bogenförmigen Hautweichteilschnittes vom rechten Processus mastoideus über das Hinterhaupt zum linken Processus mastoideus entnommen. Die entnommene Kopfhaut wurde bis zur Fixierung bei – 20 °C tiefgefroren.

Für die DNA-analytischen Untersuchungen erfolgte zusätzlich eine Entnahme von 10 Kopfhaaren am Hinterkopf (occipital) mit einer Pinzette sowie 5 ml Vollblut. Sowohl die Einzelhaare als auch die Blutprobe wurden jeweils in 5 ml Reaktionsgefäße (Firma Falcon) überführt und bis zur weiteren Untersuchung bei – 20 °C aufbewahrt.

2.2 Geräte und Chemikalien

Nachfolgend sind alle in dieser Arbeit verwendeten Instrumente, Materialien und Chemikalien aufgeführt. Die verwendeten Reagenzien ohne Bezugsquelle wurden von den Firmen Sigma (München), Roth (Karlsruhe) und Merck eurolab (Darmstadt) bezogen.

Fixationslösungen:

10 % Formalin

Fa. Straub, Nürnberg

Carnoy'sche Flüssigkeit: 10 ml Eisessig

Fa. Merck eurolab

30 ml Chloroform	Fa. Merck eurolab
60 ml 100 % Ethanol	Fa. Merck eurolab

Entwässerung, Reinigung und Einbettung:

Autotechnicon-Mono-Gerät

Chloroform Fa. Merck eurolab

Ethanol 80-100% Fa. Merck eurolab

Gewebekassetten Fa. Medin, Giessen

Paraffin Histosec Fa. Merck eurolab

Paraffinspender Fa. Reichert

Schneiden am Mikrotom:

Ethanol 100 % Fa. Merck eurolab

Objektträger (76 : 26 mm) Fa. Langenbrinck

Schlittenmikrotom Fa. Leica

Wasserbad Fa. Medax

Xylol Fa. Roth, Karlsruhe

Färben der Schnitte:

Acetatpuffer :	0,1 N Natriumacetat	Fa. Merck eurolab
	0,1 N Essigsäure	Fa. Merck eurolab

Deckglas (50 : 24 mm)		Fa. Diatec, Hallstadt
Eindeckmittel Pertex		Fa. Medite
Eosinlösung:	25 mg Eosin	Fa. Sigma, München
	3 ml 100 % Essigsäure	Fa. Merck eurolab
Filterpapier		
Hämateinlösung:	1.000 ml Aqua dest.	
	1 g Hämatoxylin	Fa. Sigma, München
	200 mg Natriumjodat	Fa. Merck eurolab
	50 g Kalialaun	Fa. Merck eurolab
	50 g Chloralhydrat	Fa. Merck eurolab
	1 g Zitronensäure	Fa. Roth, Karlsruhe
Methylgrün-Pyroninlösung:	1 g Methylgrün	Fa. Sigma, München
	50 µl Aqua dest.	
	5 g Pyronin Y	
Mikroskop		Fa. Zeiss, Jena
Xylol		
<i><u>Reinigung der Haare:</u></i>		
100 % Ethanol		
Aqua bidest		
Brutschrank		Fa. Memmert

DNA-Extraktion mittels Chelex 100:

Chelex-100 Suspension 5 % (gelöst in Aqua bidest.)

DTT (1M)

Proteinase K (10 mg/ml)

Fa. Merck eurolab

Wasserbad, groß

GFL

Reinigung der DNA mittels Diatomeenerde:

80 % Isopropanol

Diatomeenerdesuspension: 200 g/l Diatomeenerde

Fa. Sigma, München

gelöst in 10 ml/l konz. HCl

Fa. Merck eurolab

Guanidinthiocyanat

-Puffer (L6): 100 ml 0,1 M Tris-HCl Puffer (pH 6,4)

8,8 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

2,6 ml Triton-X 100

120 g Guanidinthiocyanat ad 250 ml H₂O

Zentrifugenfritte

Fa. Promega

Phenol-Chloroform-Extraktion:

20 % SDS (in H₂O)

100 % Ethanol

3 M Natriumacetat

DTT (60 mg/ml)

Extraktionspuffer: 0,01 M Tris-HCl (pH 7,6)
0,01 M EDTA
0,1 M NaCl

Flüssiger Stickstoff

Glycogen

Homogenisator Fa. Hartenstein

Phenol/Chloroform Fa. Roth, Karlsruhe

Proteinase K (10 mg/ml) Fa. Merck eurolab

DNA Extraktion aus Vollblut:

20 % SDS

Erythrozyten-Lysepuffer: 150 mM NH₄Cl
10 mM KHCO₃
0,1 mM EDTA (pH 7,4)

PBS: 2,7 mM Kaliumchlorid (KCl)
137 mM Natriumchlorid (NaCl)
1,5 mM Kalium-di-hydrogenphosphat (KH₂PO₄)
7,75 mM Di-Natrium-hydrogenphosphat (Na₂HPO₄), pH
7,4

Proteinase K (10 mg/ml) Fa. Merck eurolab

TE-Puffer. 10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA, pH 8,0

TEN-Puffer: 10 mM Tris-HCl
 10 mM EDTA, pH 8,0
 150 mM NaCl

Quantifizierung der extrahierten DNA-Menge aus Vollblut:

Biophotometer

Fa. Eppendorf

Amplifikation:

Allel-Leitern VWA, ACTBP2, AMELX/Y

Entwicklung des
 Instituts

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus

MBI Fermentas

Oligonukleotidprimer für die PCR:

MWG-Biotech

Reagenzien für den

Amplifikationsmix:

Aqua dest.

Primer I und II

Nukleotide-Triphosphat

MBI Fermentas

10x PCR-Puffer

Taq-Polymerase

Fa. Eppendorf

	Primersequenz 5'-3'	repetitive Sequenz	Literatur
VWA Primer 1	5'- CCC TAG TGG ATG ATAAGAATAATC	TCTA	MOOS [92]
VWA Primer 2	5'- GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TGG	TCTA	MOOS [92]
ACTBP2 Primer 1	5'- AAT CTG GGC GAC AAG AGT GA	CAAA	MANUSCO [88]
ACTBP2 Primer 2	5'- ACA TCT CCC CTA CCG CTA TA	CAAA	MANUSCO [88]

Kühlschrank		Fa. Bosch
Magnetrührer M 21		GLW
Mikroschraubröhrchen		Fa. Sarstedt
PAG-Elektrophoresegeräte	Multiphor II Electrophoresis Unit	Fa. Pharmacia, Freiburg
	Macrodrive 5 Power Supply	Fa. Pharmacia, Freiburg
	Multitemp Thermostatic Circulator	Fa. Pharmacia, Freiburg
pH Meter pH256		WTW
Photometer		Fa. Eppendorf
Pipettenspitzen (verschiedene Volumina)		Fa. Eppendorf
Reaktionsgefäße	Standard und Safelock	Fa. Eppendorf
Schüttler Vortex Genie 2		Fa. Bender & Hobein
Taumelrotator, horizontal		Fa. Heidolph
Tischwaage		Fa. Sartorius
Zentrifuge Mikroliter		Fa. Hettich, Tuttlingen
Zentrifugenröhrchen		Fa. Greiner

3 Methoden

In diesem Kapitel wird das Untersuchungsmaterial sowie die experimentelle Vorgehensweise bei den Untersuchungen beschrieben. Im ersten Teil wird die Verfahrensweise zur Herstellung von histologischen Schnitten durch die Kopfhaut erläutert. Im zweiten Teil wird die Methode der DNA-Extraktion und Typisierung aus Haarschäften und -wurzeln vorgestellt.

Das Verfahren zur statistischen Analyse des aus den DNA-Profilen gewonnenen Datenmaterials der untersuchten Stichproben wird im Kapitel 3.5 erläutert.

3.1 Herstellung histologischer Schnittpräparate durch die Kopfhaut

In der folgenden Arbeit wird mit ausgewählten Fixationen und Färbemöglichkeiten der Versuch unternommen, in histologischen Schnitten durch die Kopfhaut Haare auf intakte Zellkerne und darin enthaltene DNA zu untersuchen. Dafür wurden sowohl Längs- als auch Querschnitte durch die Haarstrukturen angefertigt, die mit der Hämatoxylin-Eosin- und der Methylgrün-Pyronin-Methode angefärbt wurden. Vorher mussten die Präparate in speziellen Fixierungslösungen wie z.B. Formalin und der Carnoyschen Flüssigkeit, vorbehandelt werden.

3.1.1 Zuschnitt der Gewebeproben

Kopfhaut lässt sich am besten im gefrorenen und unfixierten Zustand z. B. mit einem Rasiermesser zuschneiden. Um exakte Querschnitte durch die Haare zu erhalten darf die Schnittführung mit dem Mikrotom nicht einfach parallel zur Haaroberfläche erfolgen, denn dies würde Schrägschnitte ergeben. Vielmehr muss mit der Lupe der Haarverlauf an der Schnittfläche kleiner quadratischer Kopfhautstücke (1,5 x 1,5 cm) festgestellt werden. Nun wurde einseitig die Kopfschwarte so weit abgetragen, dass in den Gewebestücken die Haare senkrecht stehen. Ein solcher Flachschnitt ergab Querschnitte durch die Haare in den verschiedenen Höhen ihrer Einpflanzung in der Kopfhaut.

Längsschnitte durch die Kopfhaut sind sehr schwer zu realisieren, vor allem wenn das Haar von der Haarzwiebel bis zum Austritt aus der Kopfhaut getroffen werden soll. Die Seitenfläche der Gewebestücke muss exakt mit dem Verlauf des Haares identisch sein. Beim Schneiden orientiert man den Block so, dass zuerst der Bulbus und zuletzt der Haarschaft vom Messer getroffen wird. Dazu wurde die Kopfhaut in 1,5 x 0,5 cm große rechteckige Stücke zugeschnitten. Noch vor der Färbung konnte unter dem Mikroskop das Ergebnis der Schnitfführung begutachtet werden.

3.1.2 Fixation

Folgende Fixationslösungen wurden verwendet:

- 10 %-ige Formalinlösung → Hämatoxylin-Eosin-Färbung
- Carnoysche Flüssigkeit → Methylgrün-Pyronin-Färbung

Die verwendete 10 %-ige Formalinlösung (100 ml 10 % Formalinlösung + 900 ml destilliertes Wasser) benötigte zur vollständigen Fixation der 1,5 x 1,5 cm und 1,5 x 0,5 cm großen Gewebestücke ca. 48 Stunden. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur (21 °C). Die besten Fixationsergebnisse wurden bei einem pH-Wert von 7,0 erreicht. Formalinpigment bildete sich bei einem pH-Wert unter 5,6. Ein alkalisches Hämatin wird bei einem pH-Wert von über 8,0 gebildet.

Beide Pigmente konnten entweder mit einer alkoholischen Picrin-Säure oder einer Lösung von 1% Kaliumhydroxyd in 80 % Alkohol gelöst werden (cave! Picrin-Säure nie im getrockneten Zustand lagern, da hoch explosiv!).

Die Carnoysche Flüssigkeit (60 ml 100 % Ethanol + 30 ml Chloroform + 10 ml Eisessig) dringt sehr rasch in das zu fixierende Gewebe ein (ca. 2,9 mm in vier Stunden), sodass für die 1,5 x 1,5 cm großen Gewebestücke eine Fixationszeit von acht Stunden und für die 1,5 x 0,5 cm großen Gewebestücke eine Fixationszeit von 3,5 Stunden veranschlagt wurde. Der Aufenthalt in der Lösung sollte nicht länger ausgedehnt werden als zur völligen Durchdringung notwendig. Bei zu langer Einwirkzeit verstärkten sich die Schrumpfungen und die Präparate werden zu hart. Zu beachten ist außerdem, dass Carnoysche Flüssigkeit Erythrozyten hämolysiert. Auch

säurelösliche Zellgranula und Pigmente gehen bei dieser Fixation in Lösung. Nach der Fixation sollte man sofort in absolutes Ethanol übertragen.

Für die weitere Bearbeitung werden die durchfixierten Gewebeproben in Kassetten (Firma Medin) verbracht.

3.1.3 Entwässerung und Reinigung der Gewebeproben

Unmittelbar nach der Fixierung besitzen Präparate noch nicht die richtige Beschaffenheit, um mit dem Mikrotom geschnitten werden zu können. Deshalb schloß sich eine Nachbehandlung an, die sich in eine Entwässerung, Reinigung sowie eine sogenannte Einbettung gliederte. Das zu untersuchende Objekt musste folglich mit einem Medium durchtränkt werden, sodass hinterher eine feste und gut schneidbare Masse entstand.

Entwässerung, Reinigung und Einbettung in Paraffin wurden mit einem Autotechnicon-Mono-Gerät durchgeführt. Mit Hilfe einer Zeitschaltuhr wurden Körbe mit den Gewebeproben im Rotationsverfahren in verschiedene Behälter (sogenanntes Einkammersystem) befördert, die die Entwässerungs- und Reinigungsflüssigkeiten sowie das Paraffin zur Einbettung enthielten.

Die Verweildauer der Körbe in den einzelnen Behältern kann individuell eingestellt werden. Ebenso verhielt es sich mit der Temperatur mit der das Paraffin erhitzt wurde. Für die zwölf vorhandenen Behälter wurden folgende Inhalte und Einwirkzeiten festgesetzt:

Behälter	1:	80 % Ethanol	1 1/2 Stunden
Behälter	2:	80 % Ethanol	2 Stunden
Behälter	3:	95 % Ethanol	1 Stunde
Behälter	4:	95 % Ethanol	1 Stunde
Behälter	5:	100 % Ethanol	1 Stunde
Behälter	6:	100 % Ethanol	1 Stunde
Behälter	7:	100 % Ethanol	1 Stunde
Behälter	8:	Chloroform	1 Stunde
Behälter	9:	Chloroform	1 Stunde

Behälter 10:	Paraffin 57 °C	2 Stunden
Behälter 11:	Paraffin 57 °C	2 Stunden
Behälter 12:	Paraffin 57 °C	2 Stunden

3.1.3.1 Entwässerung der Gewebeproben

Die Entwässerung musste grundsätzlich mit wasserlöslichen Flüssigkeiten durchgeführt werden. Im Autotechnicon-Mono-Gerät wurde hier Ethanol in der oben aufgeführten Konzentration und Zeitdauer verwendet (vgl. Kapitel 3.1.3). Der gesamte Vorgang musste in einer aufsteigenden Konzentration des Alkohols erfolgen, damit das Wasser langsam aber vollständig aus dem Gewebe entfernt werden konnte. Zu beachten war auch ein Verhärtungseffekt der Präparate, der durch die alkoholische Entwässerung hervorgerufen werden konnte.

3.1.3.2 Reinigung der Gewebeproben

Die Reinigungsflüssigkeit musste sowohl mit Ethanol (Entwässerungsmittel) als auch mit dem Paraffin (Einbettungsmittel) mischbar sein. Chloroform (Trichlormethan, CHCl_3) wird meist als sehr geeignetes Intermedium angegeben. Aus dem absoluten Alkohol wurden die Präparate in zwei Portionen Chloroform überführt. Wegen des hohen spezifischen Gewichtes von Chloroform sanken die Präparate im Chloroform nicht.

3.1.4 Einbettung in Paraffin

Paraffine bezeichnet ein Gemisch aus Alkanen (gesättigten Kohlenwasserstoffe) mit der allgemeinen Summenformel $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$. Für Routinearbeiten wurde sog. Hartparaffin mit der Summenformel $\text{C}_{>15}\text{H}_{>30+2}$ und einem Schmelzpunkt von 56 – 58 °C verwendet. Aus der Reinigungsflüssigkeit Chloroform wurden die Präparate in geschmolzenes

reines Paraffin übertragen. Die elektrisch beheizbaren Kammer-Systeme des Einbettautomaten gewährleisten eine konstante Temperatur und somit eine gute Durchtränkung der Gewebestücke. Die Dauer des Durchtränkens mit reinem Paraffin beträgt für 3 – 5 mm dicke Präparate zwei Stunden.

Im Anschluss wurden die Gewebestücke den Einbettkassetten entnommen und in der Einbettmulde so ausgerichtet, dass die Schnittführung mit dem Mikrotom korrekt ausgeführt werden konnte (vgl. Kapitel 3.1.5). Danach wurde das Präparat mit der Einbettkassette abgedeckt (spätere Einspannvorrichtung für das Mikrotom) und vollständig mit Paraffin, das aus einem Paraffinspender (Firma Reichert) stammte, aufgefüllt. Auf einer integrierten Kühlplatte härtete der Paraffinblock aus.

3.1.5 Schneiden am Mikrotom

Für die Herstellung der 5 – 6 µm dicken Schnitte wurde ein Schlittenmikrotom (Fa. Leica) verwendet. Zu beachten war dabei, dass der Paraffinblock exakt waagrecht zum Mikrotommesser ausgerichtet sein muss, sodass bei der Schnittführung alle Anteile des Blockes gleichzeitig angeschnitten und somit Verzerrungen im Schnittpräparat vermieden wurden. Oftmaliges Kontrollieren der Halterungs- und Justierschrauben verhinderte gewellte Schnitte. Das Mikrotommesser sollte stets scharf sein und einen keilförmigen, sogenannten biplanen Schliff besitzen [39].

Nach erfolgtem Schnitt mit dem Mikrotom wurden die Schnitte in ein Wasserbad (Fa. Medax) übertragen. Die Temperatur des Wasserbades sollte 5 – 10 °C unter dem Schmelzpunkt des Einbettmediums liegen, hier also 47 – 51 °C. Luftblasen zwischen Präparat und Wasseroberfläche mussten vermieden werden. Runzeln und Falze im Präparat konnten mit einem feinen Pinsel vorsichtig ausgestrichen werden.

Vom Wasser aus wurden die Präparate auf Objektträger (Fa. Langenbrinck) aufgezogen. Dabei sollten nur solche Objektträger Verwendung finden, die aus reinem Glas gefertigt waren und eine Dicke von 1 – 1,2 mm sowie eine Seitenlänge von 76 : 26 mm (englisches Format) aufwiesen.

Nach vollständigem Trocknen wurden die Schnitte zum Entfernen des Paraffins für vier Minuten in Xylol verbracht. Danach überführte man in eine absteigende Alkoholreihe sowie in Aqua dest.:

- 100 % Ethanol 2 Minuten
- 96 % Ethanol 2 Minuten
- 80 % Ethanol 2 Minuten
- 60 % Ethanol 2 Minuten
- Aqua dest. 2 Minuten

3.1.6 Färben der Gewebeschnitte

Herstellung von saurem Hämatoxylin nach MAYER [81]:

- 1 g Hämatoxylin in 1000 ml Aqua dest. lösen.
- 200 mg Natriumjodat (NaIO_3) und 50 g Kalialaun in der Hämatoxylinlösung unter Schütteln lösen; die entstehende Lösung soll eine blauviolette Farbe erhalten.
- 50 g Chloralhydrat und 1 g Zitronensäure zugeben. Die blauviolette Farbe der Lösung soll nun in einen rotvioletten Farbton umschlagen.

Herstellung einer 2 % Eosinlösung:

- 25 mg Eosin in 1250 ml Aqua dest. lösen
- 3 ml kalte Essigsäure zugeben

Anwendung der Färbelösungen:

Die entparaffinierten Schnitte wurden für 3 Minuten in die Hämatoxylinlösung zur Kernfärbung gegeben. Danach wurden die Schnitte mehrmalig in Aqua dest. gespült. Unter fließendem Leitungswasser erfolgte das sogenannte Bläuen der Zellkerne sowie das Auswaschen der Säurereste der Färbelösung. Die Einwirkung des Alkalis aus dem Leitungswasser verursachte den tief blauen Ton der Kernfärbung. Durch Kontrolle mit dem Lichtmikroskop konnte die Intensität der Kernfärbung optimal eingestellt werden (progressives Färben).

Anschließend wurde der Objektträger für 5 Minuten in die Eosinlösung übertragen. Eine mäßige Überfärbung ist erwünscht. Es folgt zuerst eine Spülung mit Aqua dest., danach eine mit Leitungswasser. Die Differenzierung erfolgte in 80 %, 96 % und 100 % Alkohol für jeweils 2 Minuten. Im letzten Schritt wurden die Präparate für 4 Minuten in Xylol eingestellt.

Herstellung der Färbelösung Methylgrün-Pyronin nach DRURY [27]:

- 1 g Methylgrün in 50 ml Aqua dest. unter Erwärmen lösen. Zur Entfernung von Verunreinigungen mit Methylgrün die abgekühlte Lösung mit Chloroform ausschütteln.
- 5 g Pyronin Y in 100 ml Aqua dest. lösen.
- Methylgrün-Pyronin-Stammlösung: 10 ml der Lösung von Methylgrün mit 17,5 ml Pyronin Y-Lösung mit 250 ml Aqua dest. mischen.
- Die Stammlösung 1:1 mit Azetatpuffer von pH 4,8 mischen.

Herstellung der Pufferlösung nach DRURY [27]:

- 0,1 N Natriumazetatlösung (8,204 g $C_2H_3O_2Na$ oder 13,61 g $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O/l$).
- 0,1 N Essigsäure (6,005 g/l).
- 56,6 ml Natriumazetatlösung und 43,4 ml Essigsäure mischen, pH 4,8 überprüfen.

Anwendung der Färbelösung:

Die entparaffinierten Schnitte wurden für 1 Minute in Aqua dest. überführt. Anschließend wurde mit Filterpapier der Objektträger abgepresst, sodass keine größeren Flüssigkeitsmengen mehr zurück bleiben. In der Methylgrün-Pyronin-Lösung wurden die Schnitte für 25 Minuten gefärbt, mit Azetatpuffer (pH 4,8) kurz abgespült und erneut mit Filterpapier unter leichtem Abpressen getrocknet. Zur Entwässerung wurde kurz in Azeton übertragen und anschließend für 2 Minuten in Xylol eingestellt.

Abschließend wurde auf die fertig gefärbten Präparate ein Tropfen Kunstharz aufgebracht und unter Vermeidung von Luftblasen ein Deckglas (Dicke von 0,17 mm) aufgelegt.

3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Hämalaun als positiv geladener Farbstoff wurde zur selektiven Kernfärbung verwendet. Nach Färben in einer sauren Lösung wurde durch Spülen mit Leitungswasser die typisch blaue Farbe der Zellkerne erzeugt. Zugleich bedeutet dieser Vorgang eine Fixierung der Färbung, da Hämalaun bei höherem pH-Wert schlechter löslich ist.

Der saure Plasmafarbstoff Eosin Y bindet durch elektrostatische Wechselwirkungen an Gewebe und färbt dieses in verschiedenen rötlichen Tonabstufungen. Zellkerne, Kalk, Schleim und grampositive Bakterien werden nicht dargestellt.

3.3 Methylgrün-Pyronin-Färbung

Die Kombinationstechnik der Methylgrün-Pyronin-Färbung wird zur parallelen Darstellung von DNA und RNA herangezogen. Durch elektrostatische Bindungen der basischen Farbstoffe wird das Chromatin (DNA) blaugrün, Nukleonen und Ergastoplasma (RNA) rot dargestellt. Der sogenannte Brachet-Test wurde zum Nachweis der Spezifität dieser Färbung durchgeführt. Nach Verdauung durch RNase und DNase unterbleibt die Anfärbung von DNA und RNA durch die beiden oben genannten Farbstoffe.

3.4 DNA-Extraktion und Typisierung aus Haarwurzeln und Haarschäften

Von 30 nichtverwandten Personen wurden Einzelkopfhaare und Nativblut entnommen. Nach der Selektion der telogenen Kopfhaare erfolgte die Extraktion der DNA. An den Haarwurzeln geschah dies mittels der Chelexextraktion, an den Haarschäften mit der Phenol-Chloroform-Extraktion. Zum Vergleich diente die aus dem Vollblut isolierte DNA. Mittels Singleplex-PCR wurde die Typisierung der zwei STR-Systeme ACTBP2 und HumVWA sowie die Geschlechtsbestimmung durch HumAMEL X/Y durchgeführt.

Die Detektion der Amplifikate erfolgte nach PAGE mit Silberfärbung sowie einer hochauflösenden Kapillarelektrophorese.

3.4.1 Morphologische Untersuchung der Haare

Mittels eines Lichtmikroskopes (Firma Zeiss) wurde die morphologische Untersuchung der Haare und die Selektion der telogenen Einzelhaare durchgeführt. Die äußere Inspektion beinhaltete eine Bestimmung der Haarlänge und der Haarfarbe. Haarlänge und Haarfarbe wurden bestimmt, um Korrelationen zwischen diesen Parametern und der DNA-Ausbeute herzustellen. Die Daten der morphologischen Untersuchungen sind den Tabellen 4.4.1.c, 4.4.2.c und 4.4.3.a zu entnehmen.

Haare, die zur DNA-Gewinnung eingesetzt werden sollten, wurden in destilliertem Wasser bei 40facher Vergrößerung mikroskopisch untersucht. Die Wachstumsphase der Haare wurde anhand der Haarwurzelform beurteilt. Nur Haare mit telogenem Abschluss wurden zur DNA-Extraktion eingesetzt.

Bis zur Aufarbeitung wurden die einzelnen Haare nach mikroskopischer Untersuchung bei -20 °C in 2 ml Reaktionsgefäßen (Firma Eppendorf) gelagert.

3.4.1.1 Haarlänge

Zur DNA-Typisierung wurden Abschnitte von Haaren mit einer Länge von 1 cm verwendet. Zur Messung wurden die Kopfhaare der Personen auf Papier mit Millimeterskalierung mit Klebestreifen befestigt. Vom Haarbulbus aus wurde eine Länge von 1 cm in Richtung Haarspitze abgemessen und das Haar mittels eines Skalpells durchtrennt. Der Rest des Haarschafts wurde vermessen und komplett zur DNA-Extraktion eingesetzt.

3.4.1.2 Haarfarbe

Zur korrekten Einteilung der Haarfarbe wurden insgesamt fünf Farbgruppen mit den Farben rot, braun, blond, schwarz und weiß eingeteilt. Bei Mischungen von Farbkomponenten wurde diejenige Farbe zuerst genannt, die am stärksten repräsentiert war. So bedeutet die Farbe weißschwarz, dass der weiße Anteil in dem Haar stärker vertreten ist. Die Haarfarben der einzelnen Personen sind in den Tabellen 4.4.1.c, 4.4.2.c und 4.4.3.a wiedergegeben.

3.4.2 DNA-Extraktion

Zur Vorbereitung der DNA-Extraktion mussten die Haare zunächst gereinigt und danach lysiert werden. Bei Blut entfiel der Reinigungsprozess. Die DNA wurde unter Anwendung der Chelex- und der organischen Phenol-Chloroform-Methode extrahiert und anschließend mittels Diatomeenerde aufgereinigt. Die Aufbewahrung der DNA erfolgte bei -4 °C bzw. -20 °C .

3.4.2.1 Reinigung der Haare

Äußere Verunreinigungen der Haare wurden vor der DNA-Extraktion mit Wasser und Alkohol beseitigt [36], [50]. Dabei wurde das Haar zuerst mit 1 ml Aqua bidest gewaschen. Nach dem Abpipettieren folgte ein Waschschrift mit 1 ml 100 % Ethanol. Nach Überführung in einen Brutschrank (Firma Memmert) konnte der restliche Alkohol bei 40 °C verdampfen.

3.4.2.2 DNA-Extraktion mittels Chelex-100-Methode

WALSH et al. [141] ermöglichten durch die Einführung der Chelex-100-Extraktion eine zuverlässige Methode, um aus organischen Spuren DNA zu gewinnen. Als

Chelatbildner mit besonders hoher Affinität für bivalente Metallionen wie z.B. Ca^{2+} und Mg^{2+} , verhindert Chelex-100 eine Degradation der DNA durch Inhibierung der DNA-abbauenden Ca^{2+} -abhängigen Enzyme.

Nach dem Reinigen (vgl. Kapitel 3.4.2.1) wurden die Haarbulbi in einem Eppendorfreaktionsgefäß mit 1 ml Aqua bidest. für 15-30 Minuten inkubiert. Unter wiederholtem Mischen erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Ansatz für 2-3 Minuten bei 10.000-15.000g und 21 °C zentrifugiert, der Überstand bis auf 20-30 µl abpipettiert und verworfen. Nach der Zugabe von 150 µl Chelex 5 % (in Aqua bidest) und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) wurde der Ansatz maschinell geschüttelt und über Nacht (12-14 Stunden) bei 56 °C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz wiederum für 10 Sekunden geschüttelt und für 8 Minuten im Wasserbad gekocht, um die Proteinase K zu inaktivieren. Nach erneutem Vortexen für 10 Sekunden folgte eine Zentrifugation bei 10.000-15.000g und 21 °C für 2-3 Minuten.

Der DNA-Extrakt wurde in Anlehnung an die von GÜNTHER et al. [42] beschriebene Methode zur Reinigung von DNA mittels Diatomeenerde aufbereitet (vgl. Kapitel 3.4.2.3).

3.4.2.3 Reinigung der DNA mittels der Diatomeenerde

Nach Extraktion der DNA mittels der Chelex-100-Methode wurden 70 µl jedes Extraktes mit 900 µl Guanidinthiocyanat-Puffer (L6) versetzt und nach Zugabe von 50 µl Diatomeen-Suspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde mit einer Einwegspritze durch eine Zentrifugen-Fritte gedrückt. Auf die gleiche Weise wurde mit 2 ml 80 % Isopropanol gewaschen. Anschließend wurde die Fritte in ein leeres Eppendorfreaktionsgefäß überführt und bei 12.000g und 21 °C für 20 Sekunden zentrifugiert. Das Eppendorfreaktionsgefäß mit dem abzentrifugierten Isopropanol wurde verworfen. Durch Zugabe von 50 µl Aqua dest. und 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die Elution.

Die Abtrennung der DNA von der Diatomeenerde geschah durch Zentrifugieren bei 12.000g und 21 °C für 20 Sekunden. Die Fritte mit der zurückgehaltenen Diatomeenerde konnte verworfen werden. Die Proben wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

3.4.2.4 DNA-Extraktion mittels der Phenol-Chloroform-Methode

Die von HOFF-OLSEN et al. [54] etablierte DNA-Extraktionsmethode bedient sich der unterschiedlichen Löslichkeit von DNA und den übrigen Zellbestandteilen in einem Phenol/Chloroform-Gemisch. Die hydrophile DNA verbleibt dabei im wässrigem Milieu und wird mit Ethanol präzipitiert.

Nach dem Reinigen (vgl. Kapitel 3.4.2.1) wurden die Haarschäfte mit flüssigem Stickstoff gefroren und mittels eines Mörsers zermahlen. In einem Reaktionsgefäß wurden zu den Fragmenten des Haarschafes 500 µl Extraktionspuffer, 50 µl Proteinase K (10 mg/ml), 50 µl DTT (60 mg/ml) und 20 µl 20 % SDS hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht (ca. 12-14 Stunden) bei 37 °C. Anschließend wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform zugegeben und für 5 Minuten maschinell gerüttelt. Der Extraktionsansatz wurde bei 12.000g und 21 °C für 7 Minuten zentrifugiert und die obere wässrige Phase in eine neues Reaktionsgefäß überführt. Das entsprechende Volumen Phenol/Chloroform wurde erneut zugegeben und abermals nach 5 minütigem Vortexen für 7 Minuten bei 12.000g und 21 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde sorgfältig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (4 °C), 1 µl Glycogen (20 mg/ml) und 2 Volumen 100 % Ethanol (4 °C) zugegeben und der Ansatz per Hand vorsichtig geschüttelt.

Die Präzipitation der DNA erfolgte über Nacht (ca. 12-14 Stunden) und wurde durch Lagerung der Proben bei - 20 °C unterstützt. Nach Zentrifugation bei 21 °C für 30 Minuten bei 12.000g wurde der Überstand dekantiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol (- 4 °C) versetzt und für 5 Minuten bei - 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde das Pellet bei 4 °C, 12.000g und 21° C für 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde erneut abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde nun im Vakuum getrocknet und in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zuletzt erfolgte die Lösung der DNA im Kühlschrank. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

3.4.2.5 DNA-Extraktion aus Vollblut

Als effektive und zuverlässige Methode zur DNA-Extraktion aus Vollblut hat sich die sogenannte Kältehämolysenach LAHIRI [80] bewährt. Das Prinzip beruht auf der unterschiedlichen Stabilität der roten und weißen Blutkörperchen. Die Kältehämolysen der kernfreien Erythrozyten bei 0 °C wurde durch die Salzfällung der DNA aus Leukozyten ergänzt.

5 ml Vollblut wurden mit 45 ml Erythrozyten-Lysepuffer gemischt und für 5 Minuten auf Eis gebracht. Nach dem Zentrifugieren bei 4 °C und 1.000g für 5 Minuten konnte der Überstand verworfen werden. Dieser Schritt wurde wiederholt bis das Pellet weiß erschien und somit alle Erythrozytenschatten entfernt waren. Das Sediment wurde erneut mit 20 ml eiskaltem PBS resuspendiert und erneut bei 4 °C und 1.000g für 10 Minuten abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment in 3 ml eiskaltem TEN-Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde für eine Minute auf 37 °C erwärmt und nach Zugabe von 20 % SDS und 60 µl Proteinase K (Konz. 10 mg/ml) über Nacht (ca. 12 - 14 Stunden) bei 37 °C inkubiert.

Nachdem die Lyse aller erythrozytenfreien und kernhaltigen Zellen stattgefunden hat, schließt sich die sogenannte Salzextraktion an. Der klaren Suspension wurde 1,2 ml NaCl zugeführt und für 15 Sekunden kräftig geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 5.000g und 21 °C für 15 Minuten. Der Überstand wurde abgenommen und mit 2 Volumina 100 % Ethanol versetzt. Durch vorsichtiges Durchmischen fiel die DNA nach ca. 1 Minute fädig aus. Mit Hilfe eines Glashakens wurde die DNA entnommen und in 1 ml 70 % Ethanol gereinigt. Die DNA wurde an der Luft getrocknet und in TE-Puffer (10mM Tris-HCl; 1mM EDTA, pH 8,0) gelöst. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

3.4.3 Quantifizierung der extrahierten DNA-Menge aus Vollblut

Für die exakte Messung der Konzentration der Nukleinsäurelösung aus dem Vollblut wurde ein Spektralphotometer (Fa. Eppendorf) mit einer Wellenlänge von 230, 260, 280 und 320 nm verwendet. Das Absorptionsmaximum von DNA befindet sich bei der Wellenlänge 260 nm. Das Verhältnis (Ratio) der Absorptionen von 260 und 280 nm zeigt die Anwesenheit von Salzen und/oder Proteinen an. Die Ratio sollte im Idealfall zwischen 1,9 und 2,0 liegen. Eine Absorption von 320 nm lässt auf eine Verunreinigung schließen. Diese Werte sowie die aus der Absorption bei 260 nm festgestellte DNA-Konzentration wird vom Photometer berechnet und von einem angeschlossenen Drucker ausgegeben. Vor jeder Messreihe musste das Photometer mit H₂O kalibriert werden. Weiterhin durfte das Probenvolumen nicht kleiner als 50 µl betragen, da ansonsten das Licht nicht vollständig durch die DNA-Lösung geleitet werden konnte.

3.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde für alle verwendeten Systeme mit demselben Reaktionsansatz (25 µl) durchgeführt:

- 67 mM Tris/HCl, pH 8,8
- 2 mM MgCl₂
- 1 mM DTT
- 160 µg/ml BSA
- 250 µM von jedem NTP
- 2 U Taq Polymerase
- sowie jeweils 20 pmol der Primer für die 3` und 5`-Richtung.

Die Amplifikation der einzelnen Proben erfolgte unter Einsatz von 1 µg DNA, 0,75 µl von jedem Primer I und II, 1 µl Nukleotidgemisch, 2,5 µl 10xPCR-Puffer und 0,2 µl Gesamtvolumen ergänzt.

Die Denaturierung erfolgte bei einer Temperatur von 94 °C. Insgesamt folgten 35 Zyklen mit einer Dauer zwischen drei und vier Minuten. Den von System zu System unterschiedlichen Primeranlagerungsschritten von jeweils einer Minute, folgten die

Extensionsschritte bei 72 °C für einer Minute. Gemäß dem Gesetz der Basenpaarung wurde entlang der einzelsträngigen DNA-Matrize ein komplementärer DNA-Strang synthetisiert. Nach 35 Zyklen wurde ein abschließender Extensionsschritt bei 72 °C für 45 Minuten durchgeführt. Die Temperaturprofile für die jeweilig verwendeten STR-Regionen sind in Tabelle 3.4.5 angegeben. Die Annealing-Temperatur wird anhand des GC-Gehalts der Primer berechnet.

Als Verdunstungsschutz während der Amplifikation wurden noch 10 µl Mineralöl je Reaktionsansatz zugegeben. Vor dem Starten der PCR in einem Thermocycler (Perkin Elmer TC 480) wurden die Caps kurz abzentrifugiert.

Tabellen 3.4.4: Temperaturprofile der Singleplex-PCR:

Art	Temperatur	Dauer
Denatuierung	94 °C	60 sec
Annealing	60 °C	60 sec
Extension	72 °C	60 sec
Zyklendauer	35	---

STR-Region HumACTBP2 (SE 33)

Art	Temperatur	Dauer
Denatuierung	94 °C	60 sec
Annealing	49 °C	60 sec
Extension	72 °C	60 sec
Zyklendauer	35	---

STR-Region HumVWA

Art	Temperatur	Dauer
Denaturierung	94 °C	60 sec
Annealing	60 °C	60 sec
Extension	72 °C	60 sec
Zyklendauer	35	---

Geschlechtsbestimmungssystem HumAMEL X/Y

3.4.5 Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE)

Die PCR-Produkte aus Kapitel 3.4.4 wurden direkt in die niedrigauflösende horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt. Die Größe der Amplifikate wurde anhand einer 100 bp-Leiter abgeschätzt. Für die 21 ml Gel-Lösung wurden in 16 ml Aqua dest. 2,7 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung, 2,1 ml 10xTris-Borat-Puffer, 200 µl APS (Ammoniumperoxidsulfat) und 1,5 µl TEMED pipettiert. Bevor die Gellösung mit einer 50 ml Spritze zwischen zwei Glasplatten der Größe 124 x 258 mm gegossen werden konnte, musste zwischen beiden Platten ein Gel-Bond-Film (GelBond PAG-film, Amersham/Pharmacia, Freiburg) aufgebracht werden. Nach etwa einer Stunde war die Gelpolymerisation abgeschlossen und die Glasplatten konnten entfernt werden. Die PCR-Produkte wurden in der Menge von 5 µl auf die dafür vorgesehenen Auftragsplättchen pipettiert. Flankierend wurden 5 µl der 100 bp-Vergleichsleiter aufgetragen. Sowohl am anodischen als auch am kathodischen Gelände wurden 0,5 cm breite Filterpapierstreifen aufgelegt, die zuvor in 2 x TBE mit 0,01 % Bromphenolblau getränkt worden waren. Die Elektrophorese erfolgte auf einer Kühlplatte der Elektrophoresekammer bei einer konstanten Temperatur von 15 °C. Die Laufbedingungen betragen 1.000 V, 20-30 mA, 10 W bei einer Dauer von 30 Minuten. Zum Sichtbarmachen der Banden wurde das Gel mit Silbernitrat gefärbt (vgl. Kapitel 3.4.5.1).

3.4.5.1 Silberfärbung der Polyacrylamidgele

Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten unter kontinuierlichem Schütteln in einer Glasschale. Nach der Entnahme aus der Elektrophoresekammer wurden die Gele in 1 % Salpetersäure für 5 Minuten fixiert. Anschließend wurde mit Aqua dest. für 10 Sekunden gespült. Danach wurde das Gel in einer 12 mM Silbernitratlösung für 12 Minuten gefärbt. Die Reduktion der Lösung geschah durch 0,28 M NaH_2CO_3 (wasserfrei) mit 0,019 % Formalin. Nach etwa 5 – 10 Minuten wurden die PCR-Banden sichtbar. Der Reduktionsprozess wurde mit 10 % Essigsäure gestoppt. Nach Spülung mit Aqua dest. wurde das Gel 5 Minuten in 5 % Glycerol inkubiert und bei 80 °C im Wärmeschrank getrocknet.

3.4.5.2 Hochauflösende Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese wurde mit dem Sequenzierungsautomaten (ABI-Prism 310 Genetic Analyser von Perkin Elmer) durchgeführt. Die elektrophoretische Trennung und Laserdetektion der mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten DNA-Fragmente des PCR-Amplifikates erfolgte bei 60 °C. Mit den Programmen Genescan und Genotyper berechnete der Computer aus den eingehenden Rohdaten die Größe und Farbe der detektierten Peaks und ordnete anhand eines mitgeführten fluoreszenzfarbmarkierten internen Längenstandards die errechneten Fragmentlängen eines Allels der allelischen Leiter des entsprechenden STR-Systems zu. Dabei entsprechen ganze Zahlenwerte den regulären Nukleotidrepeats. Die Stellen hinter dem Komma bezeichnen die Abweichung von ganzzahligen Repeats in Basenpaaren.

Das Vorbereiten der Proben begann mit einer Abschätzung der entsprechenden Bandenstärken in der niedrigauflösenden Polyacrylamidgel-Elektrophorese. Je nach Bandenstärke wurden zwischen 0,3 und 5 μl PCR-Produkt in ein Genetic Analyser Probenröhrchen gegeben. Weiterhin mussten 0,5 μl interner Längenstandard (GS ROX-500, Applied Biosystems) sowie 12 μl deionisiertes Formamid (Sigma) zupipettiert und das Röhrchen mit einem Gummi-Septum (Genetic Analyser Septa, Applied Biosystems)

geschlossen werden. Nach 2,5 Minuten Denaturierung bei 95 °C und sofortiger Abkühlung auf 0 °C konnte die elektrophoretische Fragmentanalyse erfolgen.

3.5 Berechnung der beobachteten Allelfrequenzen

Die Allelfrequenzen wurden aus den relativen Häufigkeiten der Genotypen hergeleitet.

Die Allelfrequenz ($f(x_i)$) eines bestimmten Alleles x_i berechnet sich aus der Formel:

$$f(x_i) = (2n_{ii} + \sum_j n_{ij}) / (2n)$$

(n = Anzahl der Probanden, n_{ij} = Anzahl der Probanden mit Genotyp A_iA_j ,

x = Allelfrequenz).

4. Ergebnisse

4.1 Histologische Darstellung von Zellkern und Nukleinsäuren

Die Darstellung von Zellkernen und Nukleinsäuren wurde mittels der histologischen Hämatoxylin-Eosin- und Methylgrün-Pyronin-Färbung durchgeführt. Dabei erschienen in beiden Färbungen nukleinsäurehaltige Strukturen dunkelblau bzw. dunkelgrün. Das überwiegend homogene Grundplasma der Zellen zeigte sich eosinophil und wurde stellenweise durch die Einlagerung von Zellorganellen und Sekretkörnern strukturiert. Sogenannte degradierte DNA war mit herkömmlichen histologischen Färbetechniken nur sehr eingeschränkt darstellbar.

4.2 Lichtmikroskopische Beobachtungen der Haarstruktur

In diesem Kapitel werden die lichtmikroskopischen Beobachtungen der Gesamtstruktur eines Haares vorgestellt. Besonderes Gewicht wird auf die Darstellung von Zellkernen oder Zellorganellen gelegt, die Hinweise auf das Vorhandensein von DNA geben können. Dabei erfolgt die Beschreibung der Ergebnisse vom Haarbulbus aus in Richtung Haarspitze sowie von zentral zu peripher gelegenen Haarstrukturen.

Der Haarbulbus setzt sich zunächst aus einer Masse von relativ großen, vakuolisierten und scheinbar nur gering keratinisierten sowie stark basophilen Epithelzellen zusammen, die die dermale Papille mantelförmig umhüllen. Vor allem die cranial gelegenen Zellen, die dem Stratum basale der Haut äquivalent sind, verfügen über synthetisierende Organellen und bilden im weiteren Wachstumsverlauf das Mark (Medulla) aus. Die charakteristische intensive Basophilie dieser Zellen beruht auf dem Vorkommen größerer Mengen ribosomaler RNA sowie Nukleinsäuren, die besonders gut mittels der Methylgrün-Pyronin-Färbung zur Darstellung kommen. Darüber hinaus ist die relativ hohe Zellteilungsaktivität histologisch anhand von Mitosefiguren gut nachvollziehbar. Der Haarbulbus wird von lockerem Faserbinde- und Fettgewebe der tiefen retikulären Dermis bzw. der Subcutis umgeben. Hier sind zahlreiche Blutgefäße vom kapillären Bautyp zur Versorgung des Haarfollikels nachweisbar (vgl. Abb. 4.2a).

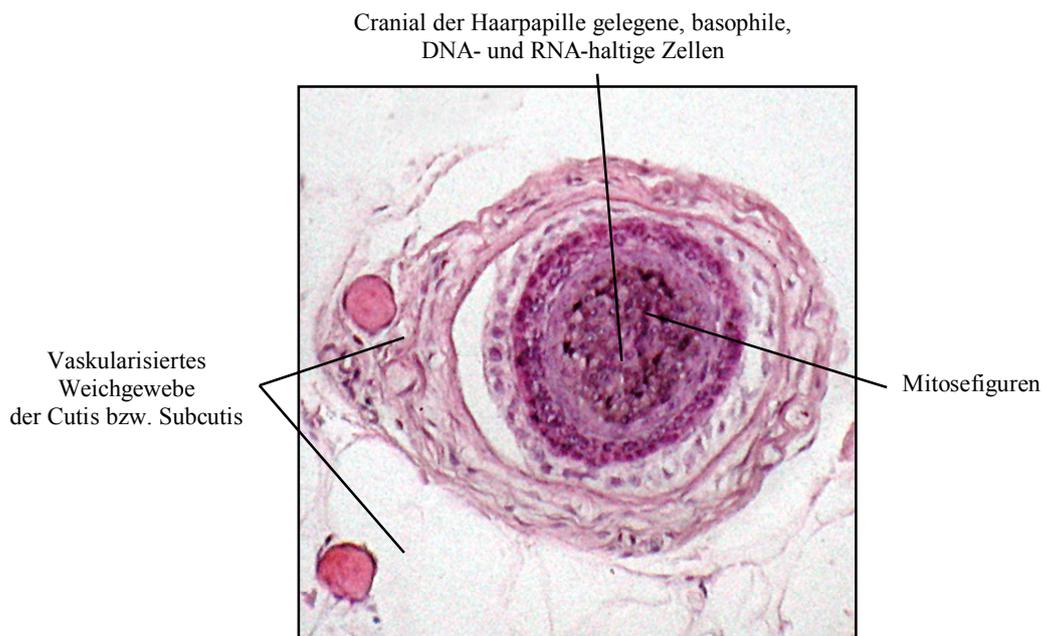


Abb. 4.2a: Querschnitt durch einen Anagenfollikel
unmittelbar cranial der Haarpapille.
Methylgrün-Pyronin-Färbung, 40X

Die im Haarbulbus lateral gelegenen langen, spindeligen und kernhaltigen Zellen bilden als Hauptmasse des Haares die Rindensubstanz. Bereits in der unmittelbaren Umgebung der Haarpapille verlieren diese Zellen schnell ihre Struktur und differenzieren sich zu dicht liegenden fusiformen Zellen aus. Diese färben sich teilweise mit einem kräftig eosinophilen Farbton an, was auf einen starken keratinisierten Zustand der Zellen schließen lässt. Der Zellkern und intrazytoplasmatische Zellorganellen sind hier aber lichtmikroskopisch über weite Abschnitte noch nachweisbar. Auf histologischen Präparaten dieser Region ist die eindeutige Abgrenzung zu Melanin, welches in Melanozyten synthetisiert und gespeichert wird, oftmals schwierig. Das eisenfreie, primär intrazelluläre Pigment ist von dunkelbrauner bis schwarzer Farbe und ist besonders in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung bei großer Vergrößerung als feingranuläre, intrazelluläre Ablagerungen erkennbar (vgl. Abb. 4.2b).

Nach außen hin wird das Haar durch eine kubische und kernhaltige Zellschicht der Kutikula abgeschlossen. Auch hier ist noch ein prominenter, zentralständiger Zellkern

Um die Henlesche- und Huxleysche Schicht anhand mikroskopischen Präparaten zu differenzieren, ist es notwendig, Querschnitte aus höheren Schichten des Haares zu betrachten.

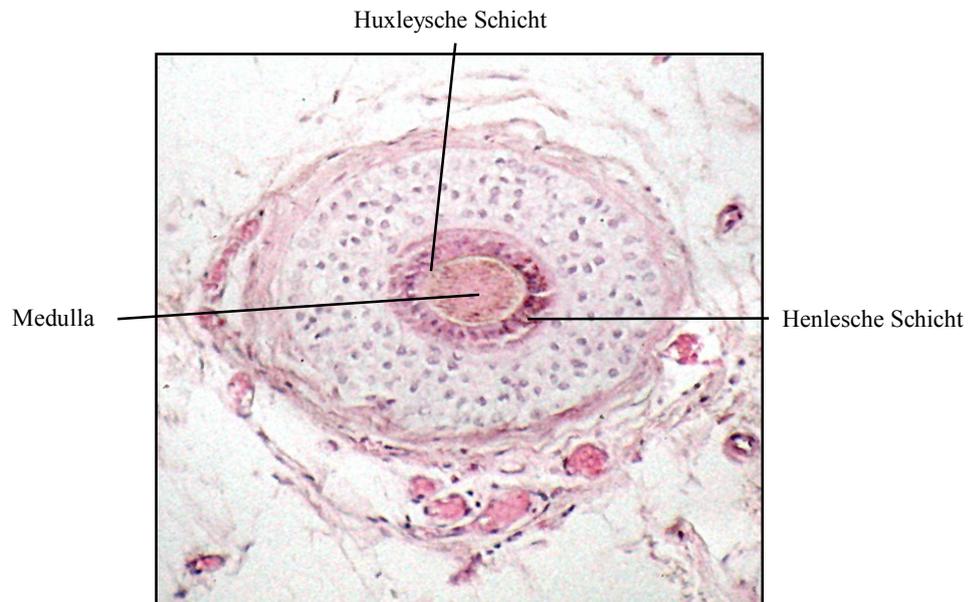


Abb. 4.2c: Querschnitt durch ein Kopfhaar zwischen Haarpapille und Keratinisierungszone.
Methylgrün-Pyronin-Färbung, 40 X

Der inneren folgt die äußere Wurzelscheide, die einen Mantel aus nach unten gewachsenen Epidermiszellen darstellt. Diese Schicht nimmt im Verlauf von der Hautoberfläche zur Haarzwiebel ständig an Stärke ab. Nahe der Hautoberfläche verfügt sie über alle Schichten der Epidermis, nahe der Haarpapille ist sie nur noch einschichtig und dem Startum basale der Haut äquivalent (vgl. Abb. 4.2f, 4.2g und 4.2h).

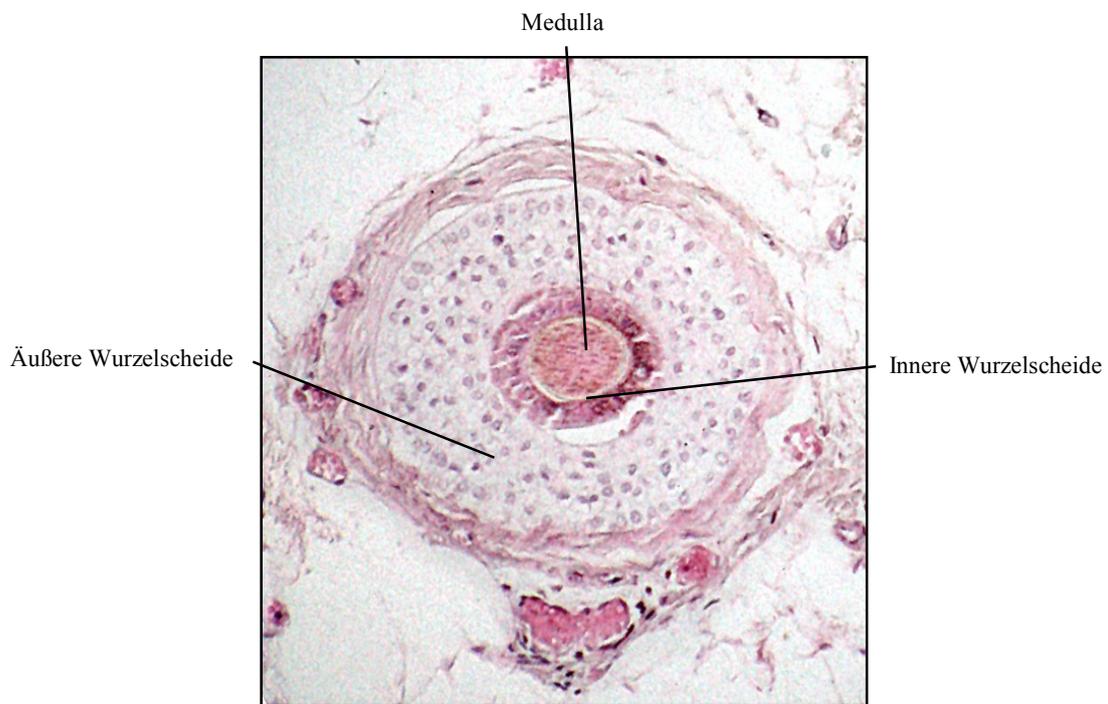


Abb. 4.2d: Querschnitt durch ein Kopfhaar zwischen Haarpapille und Keratinisierungszone. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40 X

Für die weiteren lichtmikroskopischen Beobachtungen spielt die sogenannte Keratinisierungszone eine entscheidende Rolle. Längsschnitte durch diesen Bereich haben bewiesen, dass im Laufe des Haarwachstums sämtliche basophil angefarbten Zellorganellen eine polymorphe Gestalt annehmen und mit dem allmählichen Einsetzen der Keratinisierung vollständig verschwinden (vgl. Abb. 4.2f, 4.2g und 4.2h). An stichpunktartig durchgeführten Messungen konnte gezeigt werden, dass die morphologische Entwicklung von der Bulbusbasis bis zur vollständig verhornten Haarfasern in einem Abstand zwischen 1.500 bis 2.200 μm vor sich geht. Die dabei beobachtete Variabilität der Werte ist offenbar auf die Tatsache zurückzuführen, dass die Zone der Keratinisierung im Stadium der Telogenphase in Richtung Bulbus verschoben ist (vgl. Abb.4.2e).

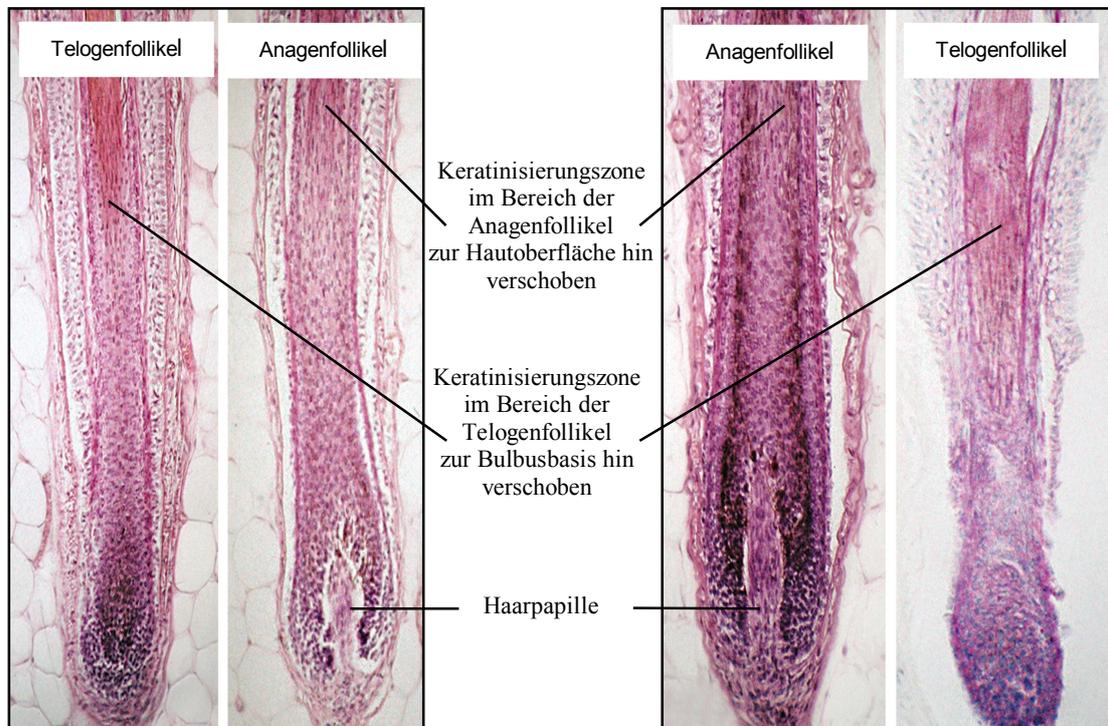


Abb. 4.2e: Längsschnitte durch einen Telogen- und Anagenfollikel. Darstellung der Differenzierungsprozesse eines Keratinozyten in eine vollständig verhornte Zelle.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung 20 X

Methylgrün-Pyronin-Färbung 20 X

In den Abbildungen kann außerdem gut zwischen einem ruhenden Follikel (Telogenfollikel) und einem wachsenden Follikel (Anagenfollikel) differenziert werden. Die dermale Papille ist beim Telogenfollikel lichtmikroskopisch nicht mehr zu erkennen und die Wachstumsprozesse sind zum Erliegen gekommen (vgl. Abb. 4.2e).

Nicht nur in den zentralen Abschnitten des Haares verlieren sich durch den einsetzenden Keratinisierungsprozess die darstellbaren basophilen Zellorganellen, auch im Bereich der inneren Wurzelschichten verschmelzen die Henlesche- und Huxleysche Schicht zu einem kräftig roten eosinophilen Streifen (vgl. Abb. 4.2f und 4.2g).

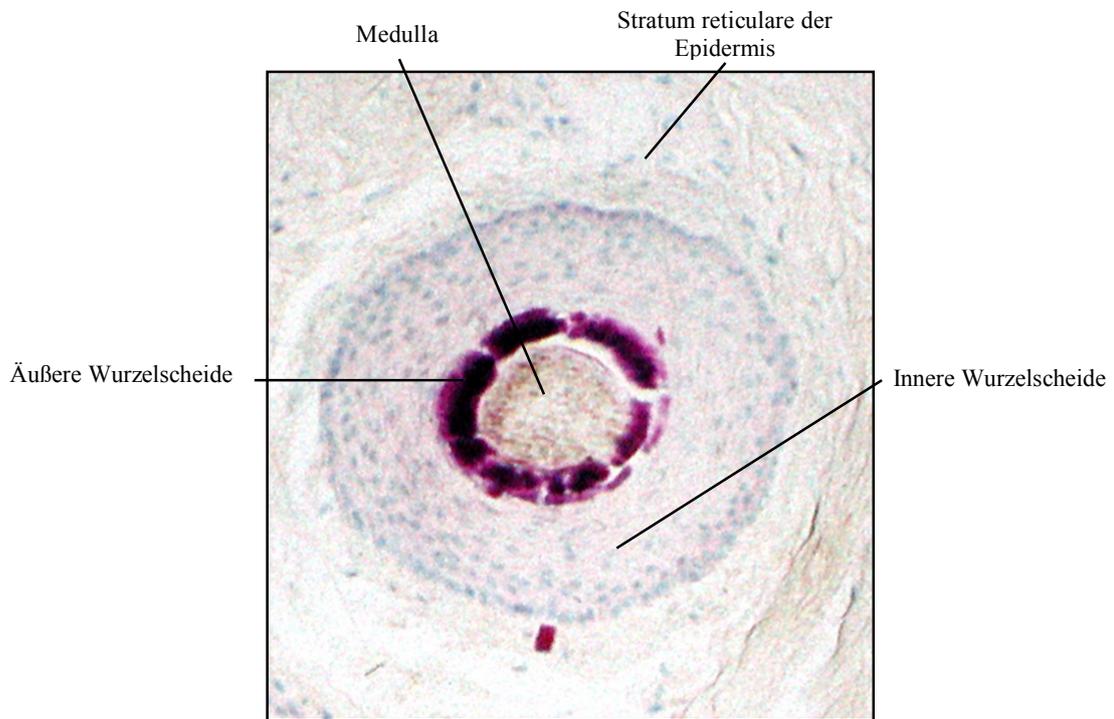


Abb. 4.2f: Querschnitte durch ein Kopfhaar
in Höhe des Stratum reticulare der Haut
Methylgrün-Pyronin-Färbung, 40 X

Die Schnittebenen in Höhe der Cutis des deckenden Integuments zeigen im Bereich des zentral gelegenen Haares (Medulla) keine Zellorganellen mehr, die feingranulären Ablagerungen innerhalb des Haares selbst werden durch Melanin hervorgerufen (vgl. Abb. 4.2f und 4.2g).

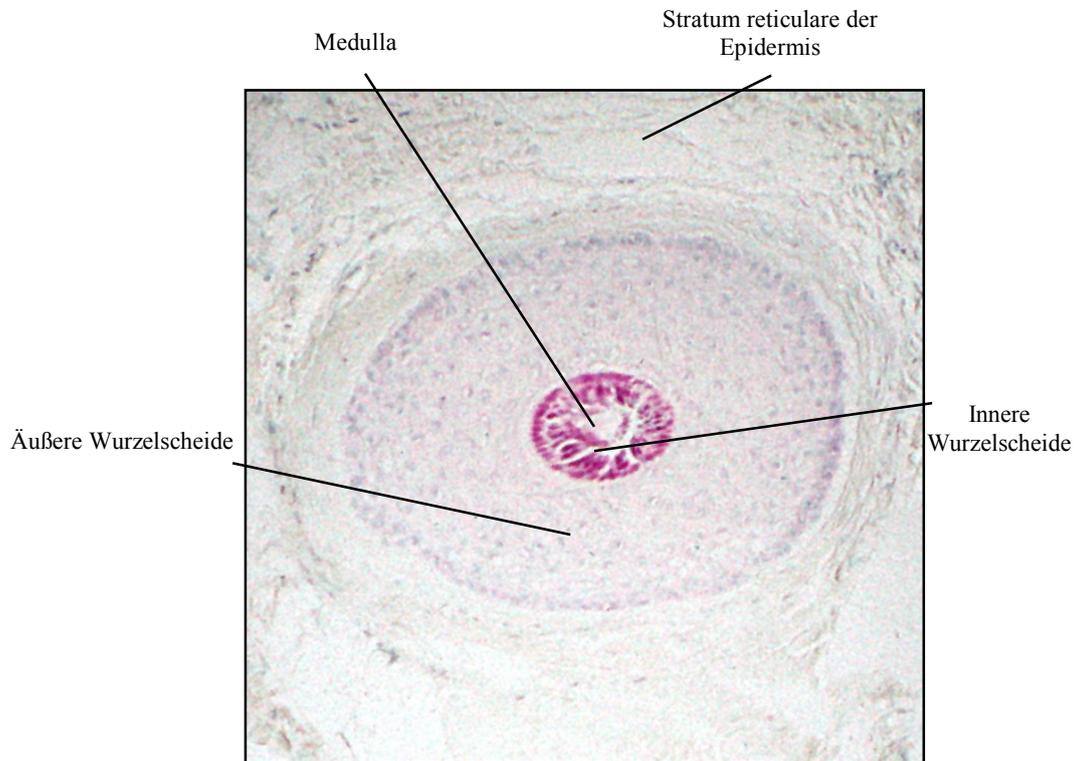


Abb. 4.2g: Querschnitte durch ein Kopfhaar
in Höhe des Stratum reticulare der Haut
Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40 X

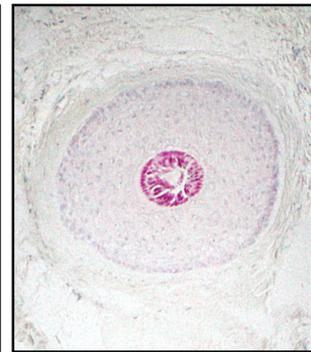
Zusammenfassend zeigen die Abbildungen 4.2h und 4.2i anhand eines Längsschnitts durch ein menschliches Haar (Telogenfollikel) die oben lichtmikroskopisch erhobenen Befunde mit Zuordnung der einzelnen Schnittebenen zu dem im Querschnitt dargestellten Präparat.



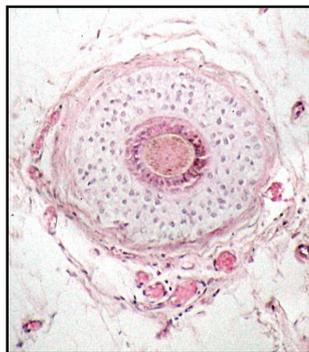
Abb. 4.2 h: Schema eines Haares.
Methylgrün-Pyronin-Färbung, 10 X



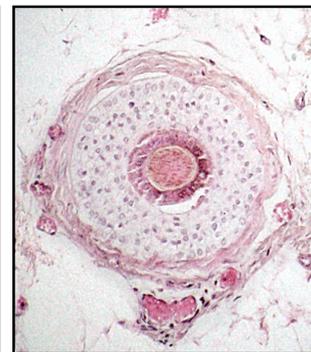
3: Methylgrün-Pyronin-Färbung
40 X



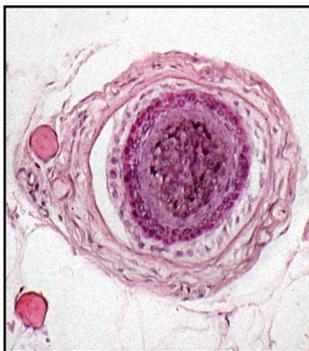
3: Hämatoxylin-Eosin-Färbung,
40 X



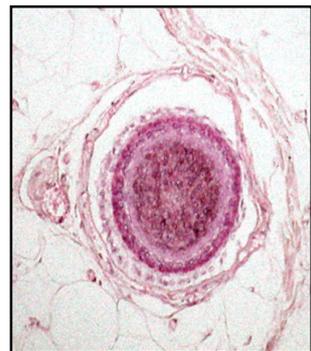
2: Methylgrün-Pyronin-Färbung
40 X



2: Hämatoxylin-Eosin-Färbung
40 X



1: Methylgrün-Pyronin-Färbung
40 X



1: Hämatoxylin-Eosin-Färbung
40 X

Abb. 4.2 i: Drei Querschnitte durch das Haar
Methylgrün-Pyronin- und Hämatoxylin-Eosin-Färbung

4.2.1 Bestimmung der Haarlänge

Die Vermessung erfolgte für die telogenen Einzelkopfhaare und variiert in einer Länge von 2,5 cm bis 26 cm. Dementsprechend lag die durchschnittliche Haarlänge der untersuchten Kopfhaare bei 10,7 cm \pm 5.

Des Weiteren wurde die Dicke der Haare geprüft. Es konnten Haardicken zwischen 58 μ m und 92 μ m nachgewiesen werden, der Mittelwert beträgt hier 75 μ m \pm 3,75 μ m.

4.2.2 Haarfarbe

Zur Klärung der Frage, ob eine bestimmte Haarfarbe mit der DNA-Ausbeute korreliert, wurden die fünf verschiedenen Farbkategorien rot, blond, braun, schwarz und weiß bestimmt. Unter den 30 Personen wiesen fünf eine rote, vier eine braune, vier eine blonde, acht eine schwarze und acht eine weiße Kopfhaarfarbe auf.

	rot	blond	braun	schwarz	weiß
Anzahl der Probanden $\Sigma=30$	5	4	4	8	8

Tabelle 4.2.2: Häufigkeit der Haarfarben der untersuchten Haarproben

4.3 DNA-Ausbeute aus telogenen Einzelhaaren

Aus den 30 verschiedenen Haarwurzeln und Haarschäften wurde versucht, mittels des Chelex-100-Verfahrens und der Phenol-Chloroform-Methode DNA zu isolieren. Zum Vergleich diente die aus Vollblut isolierte DNA. Durch den Einsatz von Einzelhaaren wurde die Präsenz von Mischspuren praktisch ausgeschlossen. Zur Beurteilung einer eventuellen Korrelation zwischen morphologischen Kriterien und DNA-Ausbeute, wurden die Ergebnisse der Fragmentanalyse herangezogen.

4.3.1 Merkmalsverteilung im STR-System HumVWA

Zunächst wurde die extrahierte DNA im STR-System HumVWA typisiert. Es konnten insgesamt sieben Allele gefunden werden (14 bis 20). Aufgelistet nach den Allelen ergibt sich folgende Tabelle:

Allel(e)	Anzahl	%
	$\Sigma=30$	
14-17	2	6,6 %
14-19	1	3,3 %
15-16	1	3,3 %
15-17	4	13,3 %
15-18	3	10 %
16	1	3,3 %
16-17	4	13,3 %
16-18	3	10 %
17-18	3	10 %
17-19	4	13,3 %
17-20	1	3,3 %
18	1	3,3 %
19-20	2	6,6 %

Tabelle 4.3.1a: Allele im System HumVWA

Die beobachteten Allelfrequenzen des Systems HumVWA betragen:

Allel	Anzahl	Frequenz
	$\Sigma=58$	
14	3	5,2 %
15	8	13,8 %
16	9	15,5 %
17	18	31,0 %
18	10	17,2 %
19	7	12,1 %
20	3	5,2 %

Tabelle 4.3.1b: Beobachtete Allelfrequenzen im System HumVWA

28 der Probanden sind heterozygote Merkmalsträger, das entspricht 93,3 %, 2 Probanden (6,7 %) sind homozygote Merkmalsträger in diesem STR-System.

Die Ergebnisse der Typisierung aller untersuchter Proben im System HumVWA zeigt in der Reihenfolge der Probennummer folgende Tabelle:

Nummer Proband	Blut VWA	Wurzel VWA	Schaft VWA	Haarfarbe	Haarlänge (cm)
1	15-17	15-17	---	braun	8
2	16-17	16-17	16-17	schwarz	5
3	19-20	---	---	blond	11
4	16-18	16-18	---	rot	7
5	16-17	---	---	weiß	17
6	16	16	16	schwarz	21
7	15-17	---	---	schwarz	10
8	17-19	17-19	---	braun	6
9	17-18	---	---	rot	18
10	14-19	14-19	---	weißbraun	7
11	17-18	17-18	---	blond	9
12	15-17	---	---	weißschwarz	4
13	17-20	17-20	17-20	schwarz	12
14	18	18	---	weiß	6
15	17-19	17-19	17-19	blond	7
16	14-17	14-17	---	schwarz	17
17	19-20	---	---	blond	7
18	15-18	---	---	rot	7
19	17-19	17-19	---	weiß	26
20	15-17	---	---	braun	6
21	17-19	17-19	---	schwarz	6
22	16-18	---	---	weiß	9
23	14-17	14-17	---	weiß	22
24	15-18	---	---	weißschwarz	8
25	17-18	17-18	---	rot	7
26	16-18	16-18	---	blond	15
27	15-16	---	---	schwarz	11
28	15-18	15-18	---	rot	6
29	16-17	---	---	schwarz	22
30	16-17	16-17	---	braun	5

Tabelle 4.3.1c: Übersicht der morphologischen Kennzeichen sowie der Allelfrequenzen im System HumVWA

Bei 18 von 30 untersuchten Haarwurzeln konnten im System HumVWA eine erfolgreiche Typisierung (60 %) durchgeführt werden. Die Untersuchung der aus den Haarschäften extrahierten DNA ergab im System HumVWA nur bei vier Personen (13,3 %) ein verwertbares Ergebnis.

Die Überprüfung einer Korrelation zwischen Haarfarbe und DNA-Ausbeute an Haarschäften zeigt, dass schwarze Haare in diesem STR-System auffallend häufig mit

einer erfolgreichen Typisierung vergesellschaftet sind. Drei Personen hatten die Haarfarbe schwarz, eine Person die Haarfarbe blond.

Dagegen hatte die Haarlänge einen geringeren Einfluss auf die extrahierbare nukleäre DNA-Menge, da sowohl die Haarschäftlänge von 5 cm als auch von 21 cm verwertbare Ergebnisse ergab.

Ein Beispiel für die Auftrennung der im HumVWA amplifizierten DNA-Produkte zeigt die folgende Abbildung eines Elektrophorese-Geles nach Silbernitratfärbung.

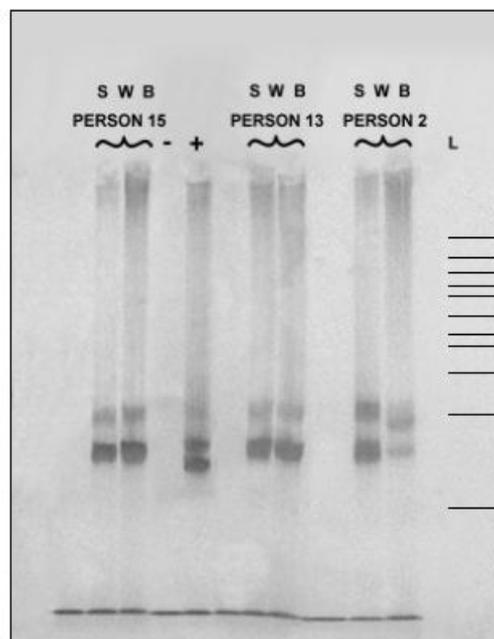


Abbildung 4.3.1d: Auftrennung ausgewählter HumVWA-Amplifikate in einem Polyacrylamid-Horizontal-Gel. Mit „L“ ist in dieser Abbildung die Allelleiter bezeichnet. „+“ steht für positiv-, „-“ für die negativ Kontrolle. „B“ steht für Blut, „W“ für Haarwurzel und „S“ für Haarschaft. Mit den Zahlen 2, 13 und 15 sind die verschiedenen Proben durchnummeriert. Die unterschiedliche Intensität der Banden ist bedingt durch die unterschiedliche PCR-Ausbeute

Abbildung 4.3.1e zeigt die Allelleiter des STR-Systems HumVWA. Bei der untersuchten Person besteht kein Unterschied zwischen den Allelen aus den Spuren Haarschaft, Blut und Haarwurzel.

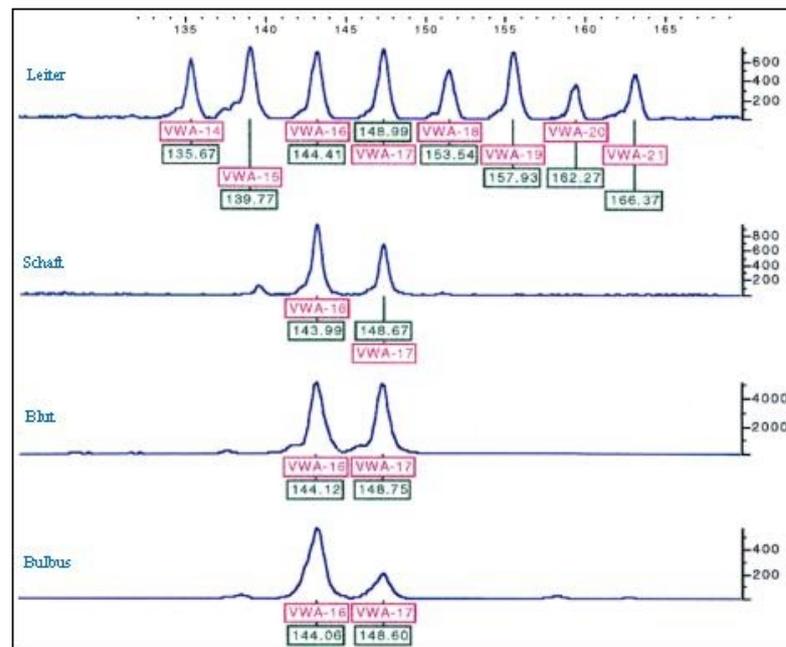


Abbildung 4.3.1e: Computergestützte Auswertung bei der Kapillarelektrophorese im STR-System HumVWA

4.3.2 Merkmalsverteilung im STR-System HumACTBP2

Auch hier wurde zunächst die extrahierte DNA im STR-System HumACTBP2 (SE 33) typisiert. Insgesamt konnten 18 Allele beobachtet werden (12 bis 31,2, 33-34). Aufgelistet nach den Allelen ergibt sich folgende Tabelle:

Allel(e)	Anzahl $\Sigma=30$	%
12-19	1	3,3 %
13	1	3,3 %
14-28,2	1	3,3 %
15-28,2	1	3,3 %
16-20	1	3,3 %
16-21,2	2	6,7 %
16-28,2	1	3,3 %
17-27,2	1	3,3 %
18	1	3,3 %
18-24,2	1	3,3 %
19-20	2	6,7 %
19-29,2	1	3,3 %
20-21,2	1	3,3 %
20-27,2	1	3,3 %
20-31,2	1	3,3 %
21,2-30,2	2	6,7 %
22,2-28,2	1	3,3 %
23,2-27,2	2	6,7 %
23,2-29,2	1	3,3 %
24,2-26,2	1	3,3 %
25,2-29,2	1	3,3 %
26,2-29,2	1	3,3 %
27,2-29,2	1	3,3 %
28,2-31,2	1	3,3 %
30,2-31,2	1	3,3 %
33-34	1	3,3 %

Tabelle 4.3.2a: Beobachtete Allele im System HumACTBP2

Die beobachteten Allelfrequenzen des Systems HumACTBP2 betragen:

Allel	Anzahl $\Sigma=58$	Frequenz
12	1	1,7 %
13	1	1,7 %
14	1	1,7 %
15	1	1,7 %
16	4	6,9 %
17	1	1,7 %
18	2	3,4 %
19	4	6,9 %
20	6	10,3 %
21,2	5	8,6 %
22,2	1	1,7 %
23,2	3	5,2 %
24,2	2	3,4 %
25,2	1	1,7 %
26,2	2	3,4 %
27,2	5	8,6 %
28,2	5	8,6 %
29,2	5	8,6 %
30,2	3	5,2 %
31,2	3	5,2 %
33	1	1,7 %
34	1	1,7 %

Tabelle 4.3.2b: Beobachtete Allelfrequenzen im System HumACTBP2

Auch in diesem STR-System waren 28 der Probanden heterozygote Merkmalsträger, das entspricht 93,3 %, und 2 Probanden (6,7 %) homozygote Merkmalsträger.

Die Ergebnisse der Typisierung aller untersuchter Proben im System HumACTPB2 zeigt in der Reihenfolge der Probennummer folgende Tabelle:

Nummer Proband	Blut SE 33	Wurzel SE 33	Schaft SE 33	Haarfarbe	Haarlänge (cm)
1	18-24,2	---	---	braun	8
2	16-28,2	16-28,2	16-28,2	schwarz	5
3	12-19	---	---	blond	11
4	25,2-29,2	25,2-29,2	25,2-29,2	rot	7
5	22,2-28,2	22,2-28,2	---	weiß	17
6	23,2-27,2	23,2-27,2	23,2-27,2	schwarz	21
7	16-20	---	---	schwarz	10
8	20-21,2	20-21,2	---	braun	6
9	18	18	18	rot	18
10	13	13	---	weißbraun	7
11	23,2-27,2	---	---	blond	9
12	17-27,2	17-27,2	---	weißschwarz	4
13	20-27,2	20-27,2	20-27,2	schwarz	12
14	19-20	19-20	---	weiß	6
15	24,2-26,2	---	---	blond	7
16	15-28,2	15-28,2	---	schwarz	17
17	30,2-31,2	---	---	blond	7
18	26,2-29,2	26,2-29,2	---	rot	7
19	16-21,2	---	---	weiß	26
20	23,2-29,2	---	---	braun	6
21	16-21,2	16-21,2	16-21,2	schwarz	6
22	14-28,2	14-28,2	---	weiß	9
23	21,2-30,2	---	---	weiß	22
24	33-34	33-34	33-34	weißschwarz	8
25	19-29,2	---	---	rot	7
26	27,2-29,2	---	---	blond	15
27	21,2-30,2	---	---	schwarz	11
28	19-20	---	---	rot	6
29	20-31,2	---	---	schwarz	22
30	28,2-31,2	---	---	braun	5

Tabelle 4.3.2c: Übersicht der morphologischen Kennzeichen sowie der Allelfrequenzen im System HumACTBP2

Auch in diesem STR-System konnte die DNA-Extraktion aus Haarwurzeln mit anschließender Typisierung bei 15 Personen erfolgreich durchgeführt werden (50 %). Die Untersuchung der Haarschäfte ergab bei sieben Probanden (23,3 %) eine ausreichende DNA-Menge, um eine anschließende Individualtypisierung durchzuführen.

Auch in diesem STR-System wurde eine computergestützte Kapillarelektrophorese durchgeführt. Folgende Abbildungen zeigen die Allelleiter des STR-Systems HumACTBP2, darunter die identischen Allele der Person 2 aus den Spuren Blut, Haarwurzel und Haarschaft.

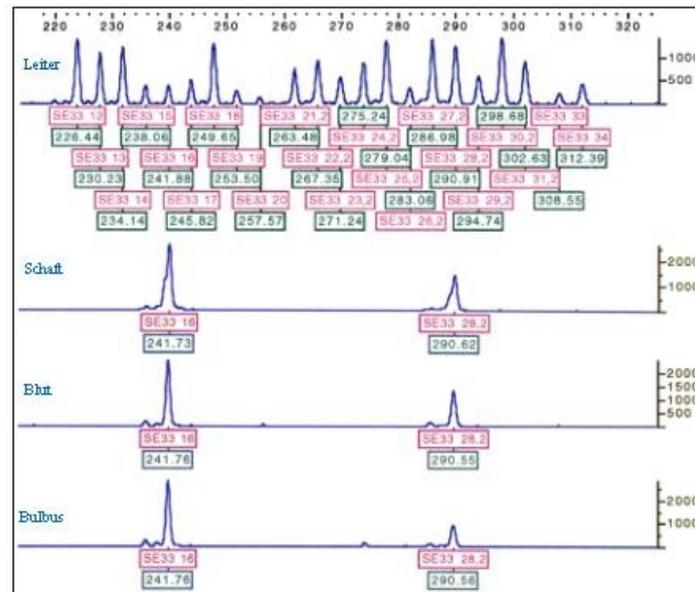


Abbildung 4.3.2e: Computergestützte Auswertung bei der Kapillarelektrophorese im STR-System HumACTBP2

4.3.3 Merkmalsverteilung im Geschlechtsbestimmungssystem HumAMEL X/Y

Mit dem Locus HumAMEL X/Y kann unter Einsatz eines Primerpaares das Geschlecht in einem PCR-Ansatz typisiert werden. Dieser Geschlechtstest basiert auf der gleichzeitigen Amplifikation einer einzelnen X- und Y-homologen Kopiensequenz (single copy sequence). Die produzierten Amplifikate liefern bei weiblichen Individuen ein 103 bp großes Fragment und bei männlichen Individuen zwei Fragmente mit der Größe 103 bp und 109 bp.

Nummer Proband	Blut Amelogenin	Wurzel Amelogenin	Schaft Amelogenin	Haarfarbe	Haarlänge (cm)
1	XX	---	---	braun	8
2	XX	XX	XX	schwarz	5
3	XY	---	---	blond	11
4	XX	---	---	rot	7
5	XY	XY	---	weiß	17
6	XX	---	---	schwarz	21
7	XY	---	---	schwarz	10
8	XY	---	---	braun	6
9	XY	XY	---	rot	18
10	XX	---	---	weißbraun	7
11	XY	---	---	blond	9
12	XY	---	---	weißschwarz	4
13	XX	XX	---	schwarz	12
14	XX	---	---	weiß	6
15	XX	---	---	blond	7
16	XX	XX	---	schwarz	17
17	XY	---	---	blond	7
18	XY	XY	---	rot	7
19	XX	---	---	weiß	26
20	XY	XY	XY	schwarz	6
21	XY	---	---	braun	6
22	XX	XX	---	weiß	9
23	XX	---	---	weiß	22
24	XY	---	---	weißschwarz	8
25	XY	XY	---	rot	7
26	XX	---	---	blond	15
27	XX	---	---	schwarz	11
28	XY	---	---	rot	6
29	XX	XX	---	schwarz	22
30	XY	XY	---	braun	5

Tabelle 4.3.3a: Übersicht der morphologischen Kennzeichen sowie der Geschlechtsbestimmung im System HumAMEL X/Y.

Mit dem Geschlechterkennungs-System HumAMEL X/Y wurden mit Abstand die schlechtesten Ergebnisse bei der Durchführung der Typisierung erreicht. Bei 11 Probanden war die Extraktion von DNA aus den Haarwurzeln (36,6 %) erfolgreich. Bei zwei Personen gelang die Typisierung aus dem Haarschäften (6,6 %). Eine Person war weiblich, die andere männlich. Beide Individuen waren schwarzhaarig. Die Länge der Einzelhaare betrug 5 cm bzw. 6 cm.

Die folgende Abbildung eines Elektrophoresegel nach Silberfärbung zeigt die Allelkonstellation einer weiblichen (2) und einer männlichen Person (20)

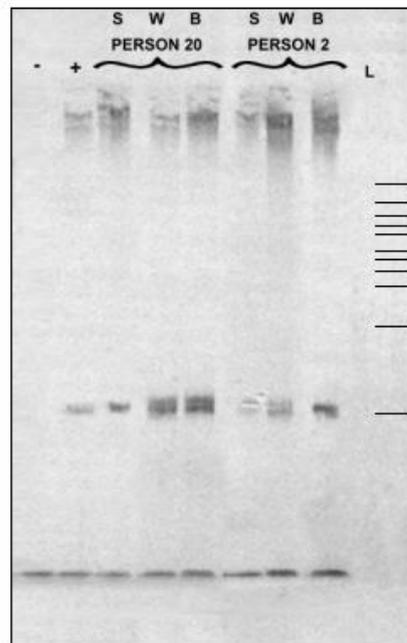


Abbildung 4.3.3b: Auftrennung ausgewählter HumAMEL X/Y-Amplifikate in einem Polyacrylamid-Horizontal-Gel. „L“ bezeichnet die Alleleiter, die positiv- und negativ-Kontrollen sind mit „+“ und „-“ dargestellt. „B“ steht für Blut, „W“ für Wurzel und „S“ für Schaft. Mit den Zahlen 2 und 20 sind die verschiedenen Personen durchnummeriert. Die unterschiedliche Intensität der Banden liegt an dem teilweise unterschiedlichen PCR-Ertrag

Folgende Abbildungen zeigen die Resultate der Kapillarelektrophorese im STR-System HumAMEL X/Y. Da die Ergebnisse der Spureträger Blut, Haarwurzel und Haarschaft identisch sind, wird hier nur die Spur Haarschaft aufgeführt.

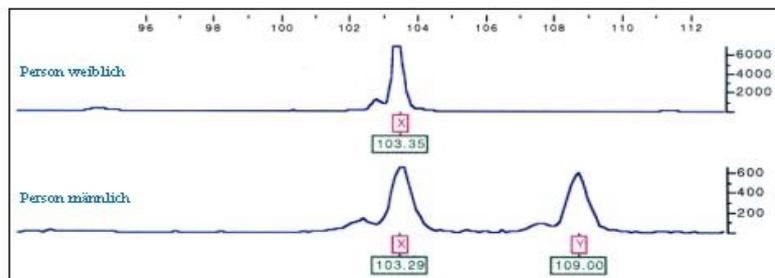


Abbildung 4.3.3c: Computergestützte Auswertung bei der Kapillarelektrophorese im STR-System HumAMEL X/Y

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob aus Anteilen des Haares mit oder ohne Haarwurzeln genügend DNA gewonnen werden kann, um daraus Individualmerkmale der betreffenden Person festzustellen. Darüber hinaus wurde mit histologischen Längs- und Querschnitten durch die menschliche Kopfhaut versucht, in den Haarstrukturen intakte Zellkerne und darin enthaltene DNA mit spezifischen Färbemethoden nachzuweisen.

5.1 Hintergrund der Untersuchung

In der rechtsmedizinischen Praxis waren Haare als Untersuchungsmaterial schon immer von Interesse, da sie sich, im Gegensatz zu anderen Spurenmaterialien, wie z.B. Blut oder Sperma, durch die Vorteile einer Langzeitinformation, Autolyseresistenz und Lagerungsstabilität auszeichnen.

Im Mittelpunkt der forensischen Untersuchungen stehen die Feststellungen von Individualmerkmalen an Haaren und die Spurenuordnung zu einer Person oder deren Ausschluss als Spurenleger. Weiterhin kann an Haaren der Nachweis von chronischen Belastungen mit toxischen Substanzen, Drogen oder Medikamenten erbracht werden. Letzteres war nicht das Ziel dieser Arbeit.

Durch die rasche Weiterentwicklung der instrumentellen Analytik befindet sich die forensische Haarkunde seit einigen Jahren in einer dynamischen Entwicklung. Das Methodenspektrum der Haaruntersuchungen reicht von morphologischen und serologischen Untersuchungsverfahren über die Anwendung der Atom-Absorptionsspektroskopie und Massenspektrometrie bis zu molekularbiologischen Techniken. Bei der Expansion der forensischen Haaruntersuchungen wird zunehmend übersehen, dass viele Zusammenhänge bis heute weitgehend ungeklärt sind und in der praktischen rechtsmedizinischen Tätigkeit umfangreiche Kenntnisse dieses speziellen

Untersuchungsmaterials für eine personenbezogene, ausgewogene gutachtliche Bewertung eine wesentliche Voraussetzung darstellen.

Im Gegensatz zu Haarproteinen, ihrer Chemie und Biochemie, ist über den Verbleib der Nukleinsäuren während der Keratinisierungsprozesse wenig bekannt. Allgemein wird bis jetzt angenommen, dass DNA und RNA in der Initialphase der Keratinisierung in den Haarfollikeln zugrunde gehen [23], [60], [65], [131]. Grundsätzlich waren die Untersuchungen auf DNA-Ebene beim Vorliegen mehrerer Haarwurzeln möglich, bei Einzelhaarasservaten und an ausgefallenen Haaren gelang eine Merkmalsbestimmung nach PCR nicht immer. Als Ursache wurde die geringe Ausbeute an chromosomaler DNA sowie eine Hemmung der PCR-Reaktion durch Haarkomponenten wie Melanine diskutiert [148].

Eine erfolgreiche Typisierung auf DNA-Ebene ist bisher nur an Haarasservaten gelungen, bei denen Bestandteile der Haarwurzelscheiden vorhanden waren oder denen abgeschilferten Hautepithelien anhafteten. Aus Haarwurzeln konnte mitochondriale DNA (mtDNA) isoliert werden und nach DNA-Amplifikation der 228 bp Region des D-Loops menschlicher mt-DNA die Sequenzierung erfolgen. WILSON et al. [145] konnten an Haarschaftmaterial mitochondriale DNA-Sequenzen mit guten Erfolgsraten amplifizieren.

Mittels neu entwickelter STR-Primer (FESvs, TH01vs und TPOXvs) konnten HELLMANN et al. [49] erfolgreiche DNA-Analysen an stark degradierter DNA aus telogenen Einzelhaaren durchführen. Die in keratinisierten Haarzellen vorkommenden, meistens nur bis 110 bp großen DNA-Fragmente [89] konnten mittels Modifikation der Primer zur erfolgreichen Individualtypisierung herangezogen werden. Durch die Verkleinerung bzw. vollständige Abspaltung der flankierenden Region zwischen Primerbindungsstelle und repetitiver STR-Sequenz, konnte der zu amplifizierende DNA-Abschnitt deutlich verkürzt werden (vgl. Tab. 5.1). Bei entsprechender Nummerierung der internationalen anerkannten Nomenklatur sind bei gleichzeitiger Untersuchungen eines Individuums in einem klassischen STR- und dem vs-System die gleichen Allele zu erwarten [11].

Klassisches STR-System	Allelgröße (bp)	vs-System	Allelgröße (bp)
FES	213 - 237	FESvs	81 - 105
TPOX	218 - 246	TPOXvs	58 - 86
TH01	169 - 193	TH01vs	61 - 85

Tabelle 5.1: Vergleich der Allelgrößen zwischen klassischen und vs-STR-System [89].

Vor diesem Hintergrund bestanden die Hauptziele der vorliegenden Arbeit in der Herausarbeitung des Stellenwertes des Spurenmaterials „Haar“ in den molekularbiologischen Untersuchungen. Außerdem sollte mit Hilfe von histologischen Schnitten und spezifischen Färbemethoden die morphologische Lokalisation der Zielsubstanz DNA im Haar gefunden werden.

5.2 Morphologische Lokalisation möglicher DNA-Reste im Haar sowie deren möglicher Einfluss auf ein Analyseergebnis

Über das Verbleiben des Zellkerns und der darin enthaltenen DNA bei Einwirkung von starken biomechanischen Kräften, wie sie z.B. während des Verlaufs von Keratinisierungsprozessen auftreten, liegt keine Information vor. Bisher ging man davon aus, dass die Nukleinsäuren während der Keratinisierung zu Grunde gehen [53], [127]. Das Verständnis des Prozesses, durch den die undifferenzierte Epidermiszelle zu einer vollständig verhornten Zelle transformiert, begründet sich teilweise auf der Kenntnis der Proteinsynthese in diesen Zellen. Längsschnitte durch Anagen- und vor allem Telogenfollikel zeigen, dass die Zellkerne der Keratozyten im unteren Bulbusteil fast das gesamte Zellvolumen einnehmen (vgl. Abb. 4.2a, 4.2b, 4.2e). Hier besteht eine hohe Mitoserate, DNA und RNA sind offensichtlich reichlich vorhanden. Im weiteren Wachstumsverlauf Richtung Haarspitze nehmen die Keratozyten eine spindelförmige Gestalt an. Neben einem erniedrigten Kern/Zytoplasma-Verhältnis können auch weniger zytoplasmatische Zellorganellen, wie z.B. Mitochondrien, beobachtet werden. Die Basophilie der Zellen nimmt ab (vgl. 4.2e). Dem gegenüber stehen die

Beobachtungen im Bereich der Kutikula. Während mit zunehmendem Abstand vom Haarbulbus aus Keratinfilamente im Zytoplasma zunehmen und die Haastrukturen im histologischen Bild eosinophil erscheinen sind innerhalb der Kutikula lichtmikroskopisch basophile, oftmals als Nukleoli imponierende Strukturen, zu beobachten (vgl. Abb. 4.2e, 4.2f, 4.2g und 4.2h).

Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen einzelner Forscher überein, die bereits im Jahre 1953 Anhaltspunkte für das Vorliegen von Zellkernresten in der Kutikula des Haares [15], [67], [109] gefunden hatten. BAUER et al. [13] konnte erstmals DNA in keratinisierten Zellen nachweisen. Als Untersuchungsmaterial dienten hyperkeratotische Hautschuppen. PÖTSCH-SCHNEIDER [111] dehnte die Untersuchungen auf die ultrastrukturelle Ebene aus. Betrachtungen mit Hilfe des Differenz-Interferenz-Phasenkontrast Mikroskops ergaben innerhalb der Kernregion befindliche, rundlich oder oval konfigurierte optisch dichte Zonen. Besondere Bedeutung kommt hier den Kutikulazellen zu, da an Haaren mit einer hohen Wachstumsgeschwindigkeit eine größere Anzahl an Nukleoli beobachtet werden konnte als an Haaren mit einer durchschnittlichen Wachstumsgeschwindigkeit [111]. Diese Nukleoli sind in einem größeren Umfang in Zellen mit einer hohen Proteinsynthese vorhanden und stellen die Lokalisation der Genorte der ribosomalen DNA dar. Im Gegensatz zur Medulla konnten lichtmikroskopisch zudem in den eigenen Untersuchungen morphologische Kriterien einer Keratinisierung in den oberen Haarfollikelabschnitten zu einem späteren Zeitpunkt als in den übrigen Strukturen des Haares beobachtet werden (vgl. 4.2a, 4.2b, 4.2e und 4.2 h), [15], [109]. Deshalb ist anzunehmen, dass die späteren Kutikulazellen im Zuge von Keratinisierungsprozessen relativ schnell vom unteren Haarfollikel aus Richtung Haarspitze wandern und so eine vollständige Fragmentierung von chromosomaler DNA vermieden wird. Zudem können chemische Veränderungen, spezielle Bindungsverhältnisse oder Lokalisation der Nukleinsäuren zu der beobachteten Diskrepanz zwischen mikroskopischen Befunden und der geringen DNA-Ausbeute herkömmlicher Extraktionen sowie einer mangelnden Amplifikation durch die Polymerasen-Kettenreaktion erklären.

Ergänzend muß hier darauf hingewiesen werden, dass bei Untersuchungen am keratinisierten Material auch mitochondriale DNA im spurenkundlichem Interesse steht. Während die chromosomale DNA im diploiden Satz nur in 2 unterschiedlichen Kopien vorliegt, gibt es pro Zelle einige hundert oder sogar tausend Kopien identischer

mitochondrialer DNA [145]. Alle Transformationsprozesse der Zelle benötigen aktive Energie. Somit müssen die Mitochondrien bis zu einer sehr späten Phase der Keratinisierung intakt bleiben. Transmissionsmikroskopische Untersuchungen weisen darauf hin, dass die mtDNA möglicherweise in einer stark degradierten oder zumindest in einer stark veränderten Form im Haar vorliegt [111]. Dies könnte auch hier der Grund für die häufig nur im geringen Maße erfolgreiche Darstellung der mtDNA mittels molekularbiologischen Methoden sein.

5.3 Bestimmung der Haarlänge und -dicke

Erwartungsgemäß konnten in der Literatur nur ungefähre Angaben zur durchschnittlichen Haarlänge gefunden werden, da für die Kopfhärlänge weniger biologische sondern eher modische Aspekte eine Rolle spielen. Auf „Langhaar-Wettbewerben“ konnten des öfteren Haarlängen von über 150 cm beobachtet werden. Den Weltrekord hält zur Zeit die Amerikanerin Dianne Witt aus Massachusetts mit mehr als 300 cm. ROBBINS [114] fasst die Daten bezüglich der Haarlänge in unten aufgeführter Tabelle zusammen. Die hier genannten Zahlen stellen Durchschnittswerte dar.

Haartyp	Alter (a)	Länge max (cm)
Lanugo	<1	15
Kind	1-12	60
Erwachsener	>13	100
Vellus	>30	0,1

Tabelle 5.3a: Kopfbehaarung und Alter, durchschnittliche maximale Länge

Aus der Literatur ist bekannt, dass innerhalb verschiedener Populationen sowie im Bereich der Kopfbehaarung einer Person unter Umständen eine erhebliche Variation der Haardicke zu beobachten ist. Als Faustregel gilt, dass der Durchmesser der Haare bei einer Person um mehr als den Faktor zwei variiert [114]. Der in dieser Arbeit errechnete

Mittelwert von 75 μm stimmt mit den Ergebnissen von BERG [14], HAAS [44], OESTERLEN [97], ROBBINS [114] und SWIFT [132] gut überein.

	\varnothing max μm	\varnothing min μm	\varnothing max/ \varnothing min
West Europäer	81,94	56,74	1,44
Chinesen	94,28	76,79	1,23
Inder	92,94	66,49	1,40
Afrikaner	98,23	58,52	1,68
Kaukasier	63,93	47,28	1,35
Mongolen	79,53	61,96	1,28
Äthiopier	90,62	51,70	1,75

Tabelle 5.3b: Größter und kleinster durchschnittlicher Durchmesser bei Haaren unterschiedlicher Populationen [132]

5.4 Haarfarbe

Für die Verteilung der Haarfarbe in der Bevölkerung konnten keine statistischen Daten gefunden werden. ORFANOS [99] beschreibt ein Vorherrschen der schwarzen Haarfarbe unter der gesamten Erdbevölkerung, während blondes und rotes Haar in Nordwesteuropa vorherrscht.

5.5 DNA-Ausbeute aus telogenen Einzelhaaren

Beim Vorliegen von geringen DNA Mengen oder degradierter DNA wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als Methode der Wahl angesehen. Diese moderne Technik zur Individualtypisierung von biologischen Materialien auf DNA-Ebene hat die klassischen proteinanalytischen Untersuchungsmethoden zur Feststellung von Merkmalen, die sich für einen Ausschluss oder eine Zuordnung einer Spur zu einer bestimmten Person eignen, abgelöst. Haare zählen zu den wenigen Asservaten in der

forensischen Spurenkunde, bei denen die molekularbiologischen Untersuchungsmethoden bisher nur mit mäßigem Erfolg angewendet werden konnten. Das spezielle Problem war bei dieser Untersuchung, dass es sich bei dem hier verwendeten Material um telogene Haare handelte. Da zu erwarten war, dass nur eine relativ geringe Menge an DNA in diesen Haaren vorhanden ist, musste besonderer Wert auf eine effektive DNA-Extraktionsmethode gelegt werden.

Die Phenolextraktion stellt eine Standardmethode zur DNA-Extraktion in der forensischen Praxis dar, die auf die besonderen Bedingungen der Spurenkunde angepasst wurden [36]. In dieser Arbeit ließ sich mit dieser Methode nur aus wenigen Haarschäften DNA gewinnen, die sich in der anschließenden PCR auch erfolgreich amplifizieren ließ. Einige Faktoren grenzen die Tauglichkeit der Methode für die Spurenkunde ein. Bei der Verwendung von Haarschäften traten Probleme bei der Abtrennung von inhibitorischen Stoffen auf. Zudem wurde die PCR-Reaktion möglicherweise durch die fehlende Abtrennung von DNA-Bruchstücken gehemmt [3]. Ein weiterer Nachteil dieser Methode besteht in einem hohen Zeit- und Materialaufwand sowie im Einsatz toxischer Reagenzien und deren Entsorgungsproblemen. Außerdem wurde die Phenol/Chloroform-Extraktion in der forensischen Praxis hauptsächlich für die RFLP-Analyse optimiert, für die eine verhältnismäßig große DNA-Menge benötigt wird. Für sehr geringe Spuren scheint diese Methode allerdings nur begrenzt geeignet zu sein, da es hier schwierig ist, die Interphase zwischen der wässrigen und organischen Phase sauber abzutrennen [86] und so ein großer Teil der DNA verloren gehen kann.

Auf der Suche nach einer für die Spurenkunde bezüglich der Effektivität günstigeren Extraktionsmethode, hat sich die von WALSH et al. [141] vorgeschlagene Extraktion mittels des Chelatbildners Chelex-100 besonders bewährt. Im Vergleich zu der Phenol/Chloroform-Methode konnte mit der Chelex-100-Extraktion im Verhältnis zur Spurengröße etwa die 20fache DNA-Menge extrahiert werden [141]. Allerdings ist bei der Verwendung von schwierigen Spurenrägern auch diese Methode umstritten [142]. Als mögliche Ursache der schlechten DNA-Qualität sind zum einen inhibitorische Stoffe, zum anderen ein hoher Anteil von degradierter DNA im Größenbereich von <100 bp zu nennen. Diese DNA-Bruchstücke können durch die Konkurrenz um die

Primer zu einer Verschlechterung der Ausbeute der PCR-Produkte führen und so letztendlich eine Spurenanalyse unmöglich machen [2]. Außerdem werden bei der Extraktion denaturierte Enzyme nicht abgetrennt, was zu einer Maskierung der DNA führen kann, die ebenfalls die Amplifikation verhindert. Daher wurde auf eine modifizierte Methode der Reinigung der mit Chelex-100 extrahierten DNA zurückgegriffen [41], die auf eine von BOOM [18] vorgeschlagene DNA-Extraktionsmethode mit Diatomeenerde aufbaut.

Mit der kombinierten Extraktionsmethode Chelex-100 und anschließender Reinigung mittels Diatomeenerde war die Amplifikation an der Mehrzahl der Haarwurzeln möglich. Es zeigten sich nach Auftragung der Amplifikate auf einem Polyacrylamidgel zwar Unterschiede in der Intensität der Banden, diese beruhten jedoch auf dem quantitativen DNA-Unterschied in der aufgetragenen Eluat-Menge. Anhand dieser erfolgreichen Amplifikate konnte gezeigt werden, dass die Feststellung von Individualmerkmalen an Haarwurzeln durch die Kombination der Chelex-100-Extraktionsmethode und der Diatomeen-Reinigung deutlich gesteigert werden konnte.

5.6 Analyse der extrahierten DNA

Die Einführung der DNA-Technologie, hier vor allem die Polymerasen-Kettenreaktion (PCR), revolutionierte die forensische Spurenkunde und die Paternitätsbestimmung, so dass die Beweiskraft bei der Aufklärung von Straftaten und Vaterschaften erheblich gesteigert werden konnte. Neben verschiedenen Extraktionsmethoden zur Gewinnung von DNA aus Haarwurzeln und -schäften war für diese Arbeit auch die Quantität und Qualität der gewonnen DNA von Bedeutung.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten PCR-Systeme wurden an hiesigem Institut hinsichtlich der $MgCl_2$ -Konzentration und der Hybridisierungstemperatur optimiert [41].

Für die Individualzuordnung von Spurenmaterial wurden die Tetranukleotidrepeats HumVWA und HumACTBP2 ausgewählt, die auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind. Des weiteren wurde der Locus HumAMEL X/Y in die Amplifikation mit einbezogen, um das Geschlecht der Person zu erkennen.

Wichtig für die forensische Spurenkunde ist die Diskriminationskraft („power of discrimination“, pD). Diese gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der zwei zufällig aus einer Population ausgewählte Individuen verschiedene Genotypen aufweisen. Sie liefert somit einen wichtigen Hinweis zur potentiellen Anwendung eines Polymorphismus in der forensischen Analyse [63]. GÜNTHER untersuchte auf autosomalen Chromosomen liegende STR-Systeme, die für eine Stichprobe pD -Werte je nach System zwischen 0,84 und 0,94 ergaben [41]. Das bedeutet, dass man mit einer Wahrscheinlichkeit von 94 % eine Spur der verursachenden Person zuordnen kann. Im Rahmen dieser Untersuchungen stellte sich zusätzlich der Locus HumACTBP2 als sehr zuverlässiges STR-System mit hohem Informationsgehalt heraus. Folglich wurde er in dieser Arbeit verwendet.

Durch die unterschiedliche Größe der zwei Tetranukleotidrepeats HumVWA und HumACTBP2 sowie dem Geschlechtsbestimmungssystem HumAMEL X/Y konnte zusätzlich der Degradationsgrad der untersuchten DNA (sog. Maß der Degradation) mit in die Untersuchungen einfließen. Wie in dieser Arbeit festgestellt werden konnte, war eine erfolgreiche Individualzuordnung der Proben mit deutlich geringerem und vor allem qualitativ niedrigerem DNA-Gehalt (Haarschaft) mittels HumACTBP2 häufiger zu beobachten, als mittels HumVWA. Als Erklärung kann hier die unterschiedliche Länge (bp) der beiden verwendeten Systeme nicht dienen, da kürzere STR-Loci bezüglich Degradation der DNA weniger anfällig sind als längere Genomabschnitte.

Mit Hilfe eines hochauflösenden Polyacrylamidgels erfolgte in einer Horizontalgel-Elektrophorese die Darstellung der Amplifikate. Schwierigkeiten bei der Bestimmung einer Bande können durch elektrophoretische Probleme wie z.B. den „smile“-Effekt am Rand des Geles durch die Eigenschaft des elektrischen Feldes auftreten. Im Seit-zu-Seit-Vergleich ist somit eine klare Zuordnung der Banden zu einem Allel oft nicht möglich. Eine zuverlässige Alternative zur Darstellung der Individualmerkmale stellte die computergestützte Auswertung mittels Kapillar-Elektrophorese dar.

Anfängliche Probleme aufgrund der PCR-Reaktionsbedingungen, wie ein Allelic-Drop-out, d.h. allgemein der Verlust höhermolekularer Allele bzw. eine bevorzugte Amplifikation bestimmter Allele, konnten durch technische Verbesserungen behoben werden [51]. Ursache eines Allelic-Drop-out ist zum einen der oft zu niedrige DNA-Gehalt des untersuchten Spurenmaterials, zum anderen die ungenügende Denaturierungstemperatur bei signifikanten Differenzen im Gehalt der Basen Guanin

und Cytosin zwischen den zu amplifizierenden Allelen, bei stark degradiertem Ziel-DNA und/oder bei limitierten Konzentrationen der Taq-Polymerase.

Das von SCHLÖTTERER [121] aufgestellte „strand slippage“-Modell war häufig in den eigenen Untersuchungen zu beobachten (vgl. Abbildung 4.3.2e), bei dem ab einer bestimmten Wiederholungshäufigkeit der Repeats bei der Replikation, Rekombination oder Reparatur der DNA-Einzelstrang-Schleifen (loops) durch ein Abspringen der Polymerase entstehen können. So kann es durch falsche Zusammenlagerung der kurzzeitig ungepaarten Strangenden der DNA bei der anschließenden Kettenverlängerung zu einer Verkürzung des Repeatbereiches im neusynthetisierten Strang kommen. Jedoch konnten alle in dieser Arbeit beobachteten Allele der Systeme HumVWA und HumACTBP2 in den zitierten Veröffentlichungen [12], [124] wieder gefunden werden.

Durch Untersuchungen konnte außerdem belegt werden, dass eine sorgfältige morphologische Untersuchung eines Haarasservates, die Feststellung des vorliegenden Haarstatus, ein Nachweis von anhaftenden Zellen der inneren und äußeren Haarwurzelscheide oder von Hautschuppenmaterial, einen sicheren Anhaltspunkt für die Einschätzung der Erfolgsaussichten einer Individualisierung der jeweiligen Spur auf DNA-Ebene darstellt [111]. Unter Berücksichtigung dieses Entscheidungskriteriums können Haarspuren bei Verdacht auf eine Mischspur aufgrund der Vorgeschichte oder anhand morphologischer Befunde einzeln untersucht werden. Im Gegensatz zu häufigen „natürlichen Kontaminationen“ bei Vaginalabstrichen oder Blutspuren, ist allerdings das gleichzeitige Vorliegen von Haaren verschiedener Personen in einer authentischen Spur höchst selten. Gelegentlich kommen Beimischungen von Tierhaaren in menschlichen Haarspurasservaten vor. Diese sind jedoch mit mikroskopischen Methoden leicht zu identifizieren. Unter Beachtung der notwendigen Sicherheitsstandards treten selten inkongruente Resultate bei Typisierungen von Haarspuren auf, zumal eine Kontamination von Haarasservaten erfahrungsgemäß selten beobachtet wird [111]. Vielmehr stellt die ungenügende DNA-Ausgangsmenge ein Problem dar. Als Nachweisgrenze für die gängigen durchgeführten PCR-Verfahren gilt ca. 50 pg DNA [50].

Des Weiteren konnte durch eine erfolglose DNA-Amplifikation an weißen Haarproben belegt werden, dass die Haarfarbe und somit Melanin als potentieller Taq-Polymerase Inhibitor [148], keinen Einfluss auf das Ergebnis nimmt. Durch eigene Untersuchungen

wird diese Feststellung auch durch die Tatsache gestützt, dass die Haarfarbe „schwarz“ sowohl im STR-System HumVWA als auch im STR-System HumACTBP2 auffallend häufig mit einer erfolgreichen DNA-Amplifikation vergesellschaftet war.

Die minimale Anzahl vorliegender positiver Ergebnisse über die Extraktion hochmolekularer DNA und die anschließende Amplifikation aus wurzellosen Haaren stehen im Widerspruch zu zahlreichen Veröffentlichungen, in denen über eine durchwegs erfolgreiche PCR-Typisierung in diesen Systemen berichtet wurde [65], [125]. Allerdings schlossen manche Autoren selbst nicht völlig aus, dass ihre Resultate auf anhaftende Epithelzellen zurückzuführen sind. Zudem ist die Information über das Ausgangsmaterial, wie morphologische Parameter, an dem die positiven PCR-Typisierungen gelangen, beschränkt. Häufig wird nur auf wenig definierte Bezeichnungen wie „wurzellose Haare“ oder „Haarschaftmaterial“ zurückgegriffen. Somit sind in diesen Fällen leider keine Rückschlüsse auf Zusammenhänge zwischen erfolgreicher DNA-Extraktion und eventuellen Besonderheiten des eingesetzten Haarmaterials möglich.

Als alternativer Ansatzpunkt zur DNA-Typisierung chromosomaler DNA-Loci führten WILSON et al. [145] die Amplifikation und anschließende Sequenzierung mitochondrialer (mt) DNA als Methode der Wahl an. Die Kontrollregion (D-Loop) menschlicher mtDNA besitzt ein hohes Diskriminierungspotential und eignet sich für die Individualisierung von Haarspuren im Rahmen kriminaltechnischer Untersuchungen [4], [55], [102], [107], [130]. Die hohe Kopienzahl pro Zelle erlaubt an Spurenmaterial, das in geringer Menge vorhanden ist oder teilweise degradierte DNA enthält, einen sensitiven Nachweis zur Identifizierung von Personen. Es muss jedoch bedacht werden, dass die Mutationsrate mitochondrialer DNA etwa 5 bis 10fach höher ist als bei chromosomaler DNA [19], [90], [129]. Der Haarfollikel als Organ mit hoher zyklischer Aktivität, hoher Proliferationsrate und einer der höchsten Mitoseraten menschlichen Gewebes [30], [86] sollte unter diesem Blickwinkel auf die Zuverlässigkeit einer mtDNA-Typisierung weiter untersucht werden.

5.7 Genfrequenz-Vergleich mit einer deutschen Populationsstichprobe

Die relativ geringe Anzahl von 30 untersuchten Haarwurzeln und Haarschäften erlaubt nur eine eingeschränkte statistische Beurteilung. Das gesamte Probenmaterial stammt aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Würzburg. Diese Tatsache schließt aber den Einfluss verschiedener ethnischer Gruppen aus anderen Ländern der Erde nicht aus. Die Häufigkeit der beobachteten Genfrequenzen ist in folgenden Tabellen aufgeführt.

Allel	Frequenz in D* %	Genfrequenzen in dieser Studie (%)	n ($\Sigma=58$)
14	9,4	5,2	3
15	12,7	13,8	8
16	18,0	15,5	9
17	30,2	31,0	18
18	19,3	17,2	10
19	7,6	12,1	7
20	2,5	5,2	3

Tabelle 5.7a: Vergleich mit deutscher Population im System HumVWA
n = Anzahl der jeweils beobachteten Allele [43]

Die beobachteten Allelfrequenzen im System HumVWA korrelieren relativ gut mit den Daten aus der Populationsstichprobe.

Allel	Frequenz in D* %	Genfrequenzen in dieser Studie (%)	n ($\Sigma=58$)
12	0,26	1,7	1
14	3,33	1,7	1
15	4,07	1,7	1
16	3,74	6,9	4
17	6,88	1,7	1
18	7,17	3,4	2
19	7,47	6,9	4
20	5,64	10,3	6
21,2	2,47	8,6	5
22,2	3,14	1,7	1
23,2	3,36	5,2	3
24,2	3,06	3,4	2
25,2	3,51	1,7	1
26,2	5,61	3,4	2
27,2	8,67	8,6	5
28,2	6,65	8,6	5
29,2	5,68	8,6	5
30,2	5,31	5,2	3
31,2	3,14	5,2	3
33	0,41	1,7	1
34	0,37	1,7	1

Tabelle 5.7b: Vergleich mit deutscher Population im System HumACTBP2
n = Anzahl der jeweils beobachteten Allele [12]

Die beobachteten Allelfrequenzen im System HumACTBP2 variieren mehr oder weniger stark. Als Erklärung dient die geringe Probenzahl.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, eine Korrelation zwischen der Morphologie des Spurenmaterials Haar und der molekularbiologischen Untersuchung herzustellen.

In der Rechtsmedizin waren Haare lange Zeit wegen der technisch schwierigen und zeitintensiven Untersuchungsmethoden eher von untergeordneter Bedeutung. Erst in den letzten Jahren wurden ausreichende wissenschaftliche Grundlagen geschaffen, um im Rahmen der forensischen Spurenkunde spezielle Fragestellungen anhand von molekularbiologischen Haaranalyseergebnissen mit größter Sicherheit zu beantworten.

Humane Kopfhaut wurde aus der occipitalen Region entnommen und in 5 μm starke histologische Längs- und Querschnitte aufgearbeitet. Dabei musste die Schnittführung bei Längsschnitten so ausgeführt werden, dass das Haar von der Haarzwiebel bis zum Austritt aus der Kopfhaut getroffen wurde. Auf Querschnitten mussten die Haare exakt tangential angeschnitten werden, Schrägschnitte waren zu vermeiden.

Nach ausgewählten Fixationen wurden die Gewebeschnitte mit der Hämatoxylin-Eosin- sowie der Methylgrün-Pyronin-Färbung behandelt. Morphologische Hinweise auf die Existenz von Cytoplasmastrukturen, die mit Nukleinsäuren assoziiert sein könnten, fanden sich nach abgeschlossener Keratinisierung ausschließlich im Bereich der Kutikula. Diese lichtmikroskopischen Ergebnisse stehen mit bereits veröffentlichten ultrastrukturellen Untersuchungen im Einklang [79]. Im Bereich des Markstranges oder anderen Abschnitten des Haares konnten nach den abgeschlossenen Keratinisierungsprozessen keine Strukturen gefunden werden, die auf das Vorhandensein von Nukleinsäuren schließen lassen.

Des Weiteren wurden mit geeigneten Verfahren die Extraktion von DNA aus telogenen Haarwurzeln und Haarschäften durchgeführt. Mit der auf WALSH et al. [141] zurückgehenden Chelex-100-Extraktionsmethode und der von GÜNTHER et al. [42] beschriebenen Kombination der anschließenden Reinigung der Extrakte mit

Diatomeenerde, war der DNA-Nachweis in mehr als die Hälfte der untersuchten Haarwurzeln möglich.

Die Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode nach HOFF-OLSEN [54] erlaubte einen erfolgreichen DNA-Nachweis in durchschnittlich 14,3 % der Fälle.

Zur Typisierung der genomischen DNA wurde die Polymerasen-Ketten-Reaktion (PCR) angewandt. Untersucht wurde dabei zwei in der forensischen Praxis gängige STR-Systeme, zum einen das auf Chromosom 5 lokalisierte System HumACTBP2 (SE33) zum anderen das auf Chromosom 12 gelegene System HumVWA. Zusätzlich wurde das Geschlechtsbestimmungssystem HumAMEL X/Y in die Untersuchung mit einbezogen.

Die Ergebnisse lassen zukünftig auf ein gezieltes Vorgehen und die Anwendung spezieller Methoden für die Individualtypisierung am Spurenmaterial Haar hoffen.

Da Keratinisierungsprozesse im wachsendem Haar wohl eine Schlüsselrolle über das Schicksal der Zellkerne und der darin enthaltenen Degenerationsgrad der DNA spielen, sollten sich zukünftige Untersuchungen in der Rechtsmedizin verstärkt dieser Thematik widmen.

7 Literatur

- 1 ADAMS, M., URQUHART, A., KIMPTON, C.P., GILL, P.:
The human D11S554 locus: four distinct families of repeat patterns at one locus.
Hum Mol Genet. 2 (1993), 1373-1376.
- 2 AKANE, A., SHIONO, H., MATSUBARA, K., NAKAMURA, H.,
HASEGAWA, M., KAGAWA, M.:
Purification of forensic specimens for the polymerase chain reaction (PCR)
analysis.
J Forensic Sci Soc. 38 (1993), 691-701.
- 3 AKANE, A., MATSUBARA, K., NAKAMURA, H., TAKAHASHI, S.,
KIMURA, K.:
Purification of highly degraded DNA by gel filtration for PCR.
Biotechniques. 16 (1994), 235-238.
- 4 ANDERSON, S., BANKIER, A.T., BARRELL, B.G., de BRUIJN, M.H.L.,
COULSON, A.R., DROUIN, J., EPERON, I.C., NIERLICH, D.P., ROE, B.A.,
SANGER, F., SCHREIER, P.H., SMITH, A.J., STADON, R., YOUNG, I.G.:
Sequence and organization of the mitochondrial genome.
Nature 290 (1981), 457-465.
- 5 ATTARDI, G., CHOMY, A., MONTOYA, J., OYALA, D.:
Identification and mapping of human mitochondrial genes.
Cytogenet Cell Genet. 32 (1982), 85-98.
- 6 BADEN, H.P., MADERSON, P.F.A.:
The occurrence and evolution of fibrous proteins in the amniote epidermis.
Am. Zool. 8 (1968), 813.
- 7 BALASZ, I., BAIRD, M., CLYNE, M., MEADE, E.:
Human population genetic studies of five hypervariable DNA loci.
Am J Hum Genet. 44 (1989), 182-190.
- 8 BALTHAZARD, V., LAMBERT, M.:
Le Poil de le homme et des animaux.
Steinheil: Paris (1910).
- 9 BARGMANN, W.:
Histologische und mikroskopische Anatomie des Menschen.
6. Aufl., Thieme: Stuttgart (1967).
- 10 BARR, M.C., BERTRAM, E.G.:
A morphological distinction between neurones of the male and female, and the
behavior of the nuclear satellite during accelerated nucleoprotein synthesis.
Nature 166 (1949), 676-677.

- 11 BÄR, W., BRINKMANN, B., BUDOWLE, B., CARRACEDO, A., GILL, P., LINCOLN, P., MAYR, W., OLAISEN, B.:
DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems.
Int J Legal Med. 110 (1997), 175-176.
- 12 BÄSSLER, G., FÖRSTER, R., EBERSPÄCHER, B., KARL, C., KUGLER, M., PFLUG, W.:
Frequency data for the STR loci HumFibra (FGA) and Hum ACTPB2 (SE33) in a population of Germans and Turks from South-West Germany.
Int J Legal Med. 112 (1999), 136-138.
- 13 BAUER, W., BOENZEMANN, J.B.M., de GROOD, R.M., KOOPMANN, R.J.:
Flow cytometric investigations of corneocytes from psoriatic scales and the effect of Ingram therapy.
J Dermatol. 13 (1986), 175-178.
- 14 BERG, S.:
Haare.
In: Ponsold, A.: Lehrbuch der gerichtlichen Medizin.
3. Aufl., Thieme: Stuttgart (1967).
- 15 BIRBECK, M.S.C., MERCER, E.:
The electrons microscopy of the human hair follicle. The hair cuticle.
J Biophys Biochem Cytol. 3 (1957), 215-222.
- 16 BISBING, R.E.:
The forensic identification and association of human hair.
In: Forensic Science Handbook.
Prentice Hall Inc.: Englewood Cliffs (1982), 184-221.
- 17 BODENTEICH, A., MERRIL, C.R., POLYMEROPOULOS, M.H., MITCHELL, L.G.:
Dinucleotid repeat in the human mitochondrial D-loop.
Hum Mol Genet. 1 (1992), 140.
- 18 BOOM, R., SOL, C.J., SALISMAN, M.M., JANSEN, C.L., WERTHEIM-van DILLEN, P.M., van der NOORDAA, J.:
Rapid and simple method for purification of nucleic acids.
J Clin Microbiol. 28 (1990), 495-203.
- 19 BROWN, W.M., GEORGE, M., WILSON, A.C.:
Rapid evolution of animal mitochondrial DNA.
Proc Natl Acad Sci USA 76 (1979), 1967-1971.
- 20 BRUTLAG, D.L.:
Molecular arrangement and evolution of heterochromatic DNA.
Annu Rev Genet. 14 (1980), 121-144.

- 21 BUDOWLE, B., GIUSTI, A.M., WAYE, J.S., BAECHEL, F.S., FOURNEY, R.M., ADAMS, D.E., PRESLEY, L.A., DEADMAN, H.A., MONSON, K.L.: Fixed bin analysis for statistical evaluation of continuous distributions of allelic data from VNTR loci for use in forensic comparisons. *Am J Hum Genet.* 48 (1991), 841-855.
- 22 CANN, R.L., STONEKING, M., WILSON, A.C.: Mitochondrial DNA and human evolution. *Nature* 325 (1987), 31-36.
- 23 CHAPMAN, R.E., DOWNES, A.M., WILSON, P.A.: Migration and keratinization of cells in wool follicles. *Aust J Biol Sci.* 33 (1980), 587-603.
- 24 CHASE, H.B.: Physical factors which influence the growing hair. In: *The biology of hair growth.* Academic Press: New York (1958), 435-440.
- 25 DE VETTEN, M., PLOOS VAN AMSTEL, H.K., REITSMA, P.H.: RFLP for the human prothrombin (F2) gene. *Nucleic Acids Res.* 18 (1990), 5917.
- 26 DNA COMMISSION OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR FORENSIC HAEMOGENETICS: DNA recommendations – 1994 report concerning further recommendations of the DNA Commission of the ISFH regrading PCR-based polymorphisms in STR (short tandem repeat) systems. *Vox Sang.* 69 (1995), 70-71.
- 27 DRURY, R.A.B., WALLINGTON, E.A.: *Carleton's Histological Technique.* 5th Ed., Oxford University Press: Oxford (1980).
- 28 EDWARDS, A., CIVITELLO, A., HAMMOND, H.A., CASKEY, T.: DNA typing with trimeric and tetrameric tandem repeats: Polymorphic loci, detection systems and population genetics. In: *The Second International Symposium of Human Identification.* Promega Corporation: Madison (1991) 31-45.
- 29 EDWARDS, A., CIVITELLO, A., HAMMOND, H.A., CASKEY, T.: DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am J Hum Genet.* 49 (1991), 746-756.
- 30 EPSTEIN, W.L., MAIBACH, H.I.: Cell proliferation and movement in human hair bulbus. In: *Hair growth.* Pergamon Press (1969), 83-97.

- 31 EVETT, I.W., GILL, P.:
A discussion of robustness of methods for assessing the evidential value of DNA single locus profiles in crime investigations.
Electrophoresis 12 (1991), 226-230.
- 32 FREGEAU, C.J., FOURNEY, R.M.:
DNA typing with fluorescently tagged short tandem repeats: a sensitive and accurate approach to human identification.
Biotechniques 15 (1993), 100-119.
- 33 GERTLER, A., NAGAI, T.:
Nachweis von Esterase D (EsD) und Glyoxalase I (GLO) an menschlichen Haarwurzeln mittels Agarosegel-Dünnschichtelektrophorese.
Z Rechtsmed. 90 (1983), 15-18.
- 34 GIACOMETTI, L.:
The anatomy of the human scalp.
In: Aging.
Pergamon Press: London (1965), 97-120.
- 35 GILL, P., IVANOV, P.L., KIMPTON, C., PIERCY, R., BENSON, N., TULLY, G., EVETT, I., HAGELBERG, E., SULLIVAN, K.M.:
Identification of the Romanov family by DNA analysis.
Nat Genet. 6 (1994), 130-135.
- 36 GILL, P., JEFFREYS, A.J., WERRETT, D.J.:
Forensic application of DNA fingerprints.
Nature 318 (1985), 577-579.
- 37 GILL, P., KIMPTON, C.P., SULLIVAN, K.:
A rapid polymerase chain reaction method for identifying fixed specimens.
Electrophoresis 13 (1992), 173-175.
- 38 GILL, P., SULLIVAN, K.M., WERRETT, D.J.:
The analysis of the hypervariable DNA profiles: Problems associated with the objective determination of the probability of a match.
Hum Genet. 85 (1990), 75-79.
- 39 GRAY, P.:
The microtome formulary and guide.
Mc. Graw-Hill Book Co.: New York (1954).
- 40 GRIFFIN, R.M.E., CRAWFORD, C.:
An improved method for the preparation of combs for use in hair combing kits.
Sci & Justice 37 (1997), 109-111.

- 41 GÜNTHER, S.:
DNA-Polymorphismen: Methodische, spurenkundliche und
evolutionsgenetische Betrachtungen unter besonderer Berücksichtigung Y-
chromosomaler STR-Systeme.
Dissertation, Universität Würzburg (1997).
- 42 GÜNTHER, S., HEROLD, J., PATZELT, D.:
Extraction of high quality DNA from bloodstainings using diatoms.
Int J Legal Med. 108 (1995), 154-156.
- 43 GÜNTHER, S., PATZELT, D.:
Population data for the STR systems HumTH01, HumVWA and FES/FPS in a
population sample from lower franconia.
Int J Legal Med. 109 (1996), 102-103.
- 44 HAAS, H.:
Untersuchungen an menschlichen Haaren mittels Multiplex-PCR unter
forensischen Aspekten.
Dissertation, Universität Gießen (1995).
- 45 HAAS, H., BUDOWLE, B., WEILWE, G.:
Horizontal polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of DNA
fragments.
Electrophoresis 15 (1994), 153-158.
- 46 HAGELBERG, E., GRAY, I.C., JEFFREYS, A.J.:
Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis.
Nature 352 (1991), 427-429.
- 47 HALLER, B.:
Ein Bestimmungsschlüssel für Tierhaare.
Arch Kriminol. 169 (1982), 45.
- 48 HEIFER, U.:
Zum Beweiswert von ABO-Bestimmungen an Einzelhaaren.
Arch Kriminol. 142 (1968), 78-84.
- 49 HELLMANN, A., ROHLEDER, U., SCHMITTER, H., WITTIG, M.:
STR typing of human telogen hairs – a new approach.
Int J Legal Med. 114 (2001), 269-273.
- 50 HIGUCHI, R., VON BEROLDINGEN, C.H., SENSABAUGH, G.F., ERLICH,
H.A.:
DNA typing from single hairs.
Nature 332 (1988), 543-546.

- 51 HOCHMEISTER, M.N., BUDOWLE, B., BORER, U.V., DIRNHOFER, R.:
A method for the purification and recovery of genomic DNA from the HLA-DQA1 amplification product and its subsequent amplification and typing with the AmpliType® PM PCR Amplification and Typing Kit.
J Forensic Sci Soc. 40 (1995), 649-653.
- 52 HOCHMEISTER, M.N., JUNG, J.M., BUDOWLE, B., BORER, U.V., DIRNHOFER, R.:
Swiss population data on three tetrameric short tandem repeat loci – vWA, HumTH01 and F13A01 – derived using multiplex PCR and laser fluorescence detection.
Int J Legal Med. 107 (1994), 34-36.
- 53 HODGSON, C.:
Nucleic acids and their decomposition products in normal and pathological horny layers.
J Invest Dermatol. 39 (1962), 69-78.
- 54 HOFF-OLSEN, P., MEVAG, B., STAALSTROM, E., HOVDE, B., EGELAND, T., OLAISEN, B.:
Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of five extraction methods for short tandem repeat typing.
Forensic Sci Int. 105 (1999), 171-183.
- 55 HOLLAND, M.M., FISHER, D.L., MITCHELL, L.G., RODRIQUEZ, W.C., CANIK, J.J., MERRIL, C.R., WEEDN, V.W.:
Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War.
J Forensic Sci Soc. 38 (1993), 542-553.
- 56 HORN, G.T., RICHARDS, B., KLINGER, K.W.:
Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction.
Nucleic Acids Res. 17 (1989), 2140.
- 57 HUKKELHOVEN, M.W., VROMANS, E., MARKSLAG, A.M., VERMORKEN, A.J.:
A simple fluorometric microassay for DNA in hair follicles or fractions of hair follicles.
Anticancer Res. 1 (1981), 341-344.
- 58 ISHIZU, H.:
Sex identification of hairs by Y-chromosome.
Nippon Hoigaku Zasshi 26 (1972), 403-406.

- 59 JARMANN, A.P., NICHOLLS, R.D., WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B., HICKS, D.R.:
Molecular characterization of a hypervariable region downstream of the human alpha-globin gene complex.
The EMBO Journal 5 (1986), 1857-1863.
- 60 JARRET, A.:
The physiology and pathophysiology of the skin.
Academic Press: London (1973).
- 61 JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L.:
Individual specific "fingerprints" of human DNA.
Nature 316 (1985b), 76-79.
- 62 JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.C.:
Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA.
Nature 314 (1985), 67-73.
- 63 JONES, A.D.:
Blood samples: probabilities of discriminations.
J Forensic Sci Soc. 12 (1972), 355-359.
- 64 JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J.:
Histologie.
3. Aufl., Springer: Berlin (1991).
- 65 KALBE, J., KUROPKA, R., MEYER-STORK L.S., SAUTER, S.L., LOOS, P., RIESNER, D. :
Isolation and characterization of high molecular mass DNA from hair shafts.
Biol Chem Hoppe Seyler 369 (1988), 413-416.
- 66 KASAI, K., NAKAMURA, Y., WHITE, R.:
Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application for forensic science.
J Forensic Sci. 35 (1990), 1196-1200.
- 67 KASSENBECK, P.:
Das Haar und seine Struktur.
Wella: Darmstadt (1984).
- 68 KIDO, A., KOMATSU, N., OSE, Y., OYA, M.:
 α -L-Fucosidase phenotyping in human tissues, dental pulp and hair roots.
Forensic Sci Int. 33 (1987), 53-59.
- 69 KIDO, A., KOMATSU, N., OYA, M., SEKIYAMA, S.:
DIA₃ phenotyping in human tissues, dental pulps and hair roots by isoelectric focusing.
Z Rechtsmed. 100 (1988), 133-137.

- 70 KIMPTON, C., FISHER, D., WATSON, S., ADAMS, M., URQUHART, A., LYGO, J., GILL, P.:
Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci.
Int J Legal Med. 106 (1994), 302-311.
- 71 KIMPTON, C., WALTON, A., GILL, P.:
A further tetranucleotide repeat polymorphism in the vWF gene.
Hum Mol Genet. 1 (1992), 287.
- 72 KIRST, R.:
Neuere Studien zur ABO-Blutgruppenprägung des menschlichen Haares.
Math Naturwiss Reihe Wiss., Z. Martin-Luther-Universität: Halle (1968), 17.
- 73 KING, L.A., WIGMORE, R.:
Sexing of hair sheath cells using Y-chromosome fluorescence.
J Forensic Sci Soc. 20 (1980), 263-265.
- 74 KLIGMAN, A.M.:
The human hair cycle.
J Invest Dermatol. 33 (1959), 307-316.
- 75 KLOOSTERMAN, A.D., BUDOWLE, B., DASELAAR, P.:
PCR amplification and detection of the human D1S80 VNTR locus.
Amplification conditions, population genetics and application in forensic analysis.
Int J Legal Med. 105 (1993), 257-264.
- 76 KOLÁR, P.:
Estimation of fibres recovery methods efficiency.
Institute of Criminalistics Prague, Odborna Sdeleni 3 (1995), 3-5.
- 77 KORNBERG, R.D.:
Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA.
Science 184 (1974), 868-871.
- 78 KREFFT, S.:
Über das Vorkommen von Gruppensubstanzen in menschlichen Haaren.
Dtsch Z ges gerichtl Med. 42 (1953), 395-408.
- 79 KURNICK, N.B.:
Pyronin Y in the methylgreen-pyronin histological stain.
Stain Technol. 30 (1955), 213-230.
- 80 LAHIRI, D.K., BYE, S., NURNBERGER, J.I. Jr., HODES, M.E., CRISP, M.:
A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested.
J Biochem Biophys Methods. 25 (1992), 193-205.

- 81 LILLE, R.D.:
Histopathologic technique and practical histochemistry.
Mc. Graw-Hill Book Co.: New York (1965).
- 82 LOCHTE, T.:
Tafeln der Haarkunde.
Geest & Partig: Leipzig (1954).
- 83 LOCHTE, T.:
Stichwort: Haare.
In: Handwörterbuch der gerichtlichen Medizin.
Springer: Berlin (1940).
- 84 LUDWIG, E.H., FRIEDL, W., Mc CARTHY, B.J.:
High resolution analysis of a hypervariable region in the human apolipoprotein B gene.
Am J Hum Genet. 45 (1989), 458-464.
- 85 LYGO, J.E., JOHNSON, P.E., HOLDAWAY, D.J., WOODROFFE, S., WHITAKER, J.P., CLAYTON, T.M., KIMPTON, C.P., GILL, P.:
The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework.
Int J Legal Med. 107 (1994), 77-89.
- 86 MALKINSON, F.D., KEANE, J.T.:
Hair matrix cell kinetics: a selective review.
Int J Dermatol. 17 (1978), 536-551.
- 87 MANNUCCI, A., SULLIVAN, K., IVANOV, P.L., GILL, P.:
Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin.
In: BÄR, W., FIORI, A., ROSSI, U.: Advances in Forensic Haemogenetics 5.
Springer: Berlin (1993), 329-332.
- 88 MANUSCO, D.J., TULEY, E.A., WESTFIELD, L.A., WORRAL, N., SHELTON INLOES, B.B., SORAGE, J.M., ALEVY, Y.G., SADLER, J.E.:
Structure of the gene for human Willebrand factor.
J Biol Chem. 264 (1989), 19514-19527.
- 89 MATSUDA, H., IMAIZUMI, K., KUBOTA, S., MIYASAKA, S., YOSHINO, M., SETA, S.:
Technical investigation of DNA extraction from single hair shaft.
Rep Nat Res Inst Police Sci. 50 (1997), 23-28.
- 90 MONNAT, R.J., REAY, D.T.:
Nucleotide sequence identity of mitochondrial DNA from different human tissues.
Gene 43 (1986), 205-211.

- 91 MONROE, D.D.:
Hair growth measurements using intradermal sulphur-35-cystine.
Arch Derm. 93 (1966), 119-122.
- 92 MOOS, M., GALLWITZ, D.:
Structure of two human beta-actin related processed genes one of which is
located next to a simple repetitive sequence.
EMBO J. 2 (1983), 757-761.
- 93 MÖLLER, A., BRINKMANN, B.:
Locus ACTBP2 (SE33). Sequencing data reveals considerable polymorphism.
Int J Legal Med. 106 (1994), 262-267.
- 94 MÖLLER, A., MEYER, E., BRINKMANN, B.:
Different types of structural variation in STRs: Hum FES/FPS, HumVWA and
HumD21S11.
Int J Legal Med. 106 (1994), 319-323.
- 95 MÖLLER, A., SCHÜRENKAMP, M., BRINKMANN, B.:
Evaluation of an ACTBP2 ladder composed of 26 sequenced alleles.
Int J Legal Med. 108 (1995), 75-78.
- 96 NAGAMORI, H.:
Sex determination from plucked hairs without epithelial root sheath.
Forensic Sci Int. 12 (1978), 167-173.
- 97 OESTERLEN, O.:
Das menschliche Haar und seine gerichtsärztliche Bedeutung.
Tübingen (1874).
- 98 OHSHIMA, T., HAAS, H., PRINZ, M., STAAK, M., BERGHAUS, G.:
Possibilities of DNA sex determination in hair roots.
Arch Kriminol. 185 (1990), 163-171.
- 99 ORFANOS, C.:
Haar und Haarkrankheiten.
Gustav Fischer: Stuttgart (1991).
- 100 ORFANOS, C., RUSKA, H.:
Die Keratine der Haut und des Haares.
Hautarzt 21 (1970), 343-351.
- 101 OYA, M., ITO, H., KIDO, A., SUZUKI, O., KATSUMATA, Y., YADA, S.:
Phosphoglucomutase 1 (PGM1) and 6-phosphogluconate dehydrogenase (PDG)
types in human hairbulb.
Forensic Sci. 11 (1978), 135-138.
- 102 PAABO, S., GIFFORD, J.A., WILSON, A.C.:
Mitochondrial DNA sequences from a 7000-year-old brain.
Nucleic Acids Res. 16 (1988), 9775-9778.

- 103 PAPPENHEIM, A.:
Zur Kenntnis und Würdigung der Methylgrün-Pyronin-Reaktion.
Folio Haematol. (1908), 51-56.
- 104 PATZELT, D., BAUR, M.P., BERTRAMS, J.:
Forensische Serologie/Hämogenetik
In: Madea, B., Brinkmann, B.(Hrsg.): Handbuch gerichtliche Medizin.
1. Aufl., Band 2. Springer: Berlin (2003).
- 105 PEAKE, I.R., BOWEN, D., BIGELL, P., LIDDELL, M.B., SADLER, J.E.,
STANDEN, G., BLOMM, A.L.:
Family studies and prenatal diagnosis in severe von Willebrand disease by
polymerase chain reaction amplification of a variable number tandem repeat
region of the Willebrand factor gene.
Blood 76 (1990), 555-561.
- 106 PEARSE, A.G.E.:
Histochemistry, theoretical and applied.
Vol. 2, Churchill Livingstone: Edinburgh (1972).
- 107 PIERCY, R., SULLIVAN, K.M., BENSON, N., GILL, P.:
The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian
genetic identification.
Int J Legal Med. 106 (1993), 85-90.
- 108 POLYMEROPOULOS, M.H., DENISE, S.R., HONG, X., MERRIL, C.R.:
Tetranucleotide repeat polymorphism of the human beta-actin related
pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBPS).
Nucleic Acids Res. 20 (1992), 1432.
- 109 PUCCINELLI, V.A., CAPUTO, R., CECARELLI, B.:
The structure of human hair follicle and hair shaft: an electron microscope study.
G Ital Dermatol. 108 (1967), 453-498.
- 110 PÜSCHEL, K., TOMASCH, P., ARNOLD, W.:
Opiate levels in hair.
Forensic Sci Int. 21 (1983), 181-186.
- 111 PÖTSCH-SCHNEIDER, L.E.:
Zu Möglichkeiten und Grenzen von Haaruntersuchungen in der Rechtsmedizin.
Habilitation, Universität Mainz (1998).
- 112 RAND, S., PUERS, C., SKOWASCH, K., WIEGAND, P., BUDOWLE, B.,
BRINKMANN, B.:
Population genetics and forensic efficiency data of 4 AMPFLP's.
Int J Legal Med. 104 (1992), 329-333.

- 113 RITTER, H.:
On the statistics of the genetic fingerprint.
Int J Legal Med 104 (1991), 307-308.
- 114 ROBBINS, C.R.:
Chemical and physical behaviour of human hair.
Van Nostriand Reinhold Comp.: New York (1979).
- 115 ROBERTS, A.M., GOODALL, H.:
Y chromosome visibility in quinacrine-stained human spermatozoa.
Nature 262 (1976), 493-494.
- 116 ROTH, S.I.:
The cytology of the murine resting (telogen) hair follicle.
In: Biology of the skin and the hair growth.
Angus Robertson: Sydney (1968), 233-250.
- 117 SAIKI R.K., SCHARF, S., FALOONA, F.A., MULLIS, K.B., HORN, G.T.,
ERLICH, H.A., ARNHEIM, N.:
Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site
analysis for diagnostic of sickle cell anaemia.
Science 230 (1985), 1350-1354.
- 118 SAITOH, M., UZUKA, M., SAKAMOTO, M., KOBORI, T.:
Rate of the Hair Growth.
In: Hair growth.
Pergamon Press (1969), 161-168.
- 119 SAJANTILA, A., PACEK, P., LUKKA, M., SYVÄNEN, A.C.,
NOKELAINEN, P., SISTONEN, P., PELTONEN, L., BUDOWLE, B.:
A microsatellite polymorphism in the Willebrand factor gene: comparison of
allele frequencies in different population samples and evaluation of forensic
medicine.
Forensic Sci Int. 68 (1994), 91-102.
- 120 SCHAIDT, G.:
Haare.
In: Müller, G. (Hrsg.): Gerichtliche Medizin.
2. Aufl., Teil 1. Springer: Berlin (1975).
- 121 SCHLÖTTERER, C., TAUTZ, D.:
Slippage synthesis of simple sequence DNA.
Nucleic Acids Res. 20 (1992), 211-215.
- 122 SCHMIDT, W.:
Sex chromatin in hair.
Cytogenet. 6 (1967), 342-349.

- 123 SCHMITTER, H., SONNTAG, M.L.:
Proposal for general rules for the denominations of alleles of STR-loci based on the electrophoretic mobilities of their fragments.
Klin Lab. 41 (1995), 173-176.
- 124 SCHNEIDER, H.R., RAND, S., SCHMITTER, H., WEICHHOLD, G.:
ACTBP2-nomenclature recommendations of GEDNAP.
Int J Legal Med. 111 (1998), 97-100.
- 125 SCHREIBER, A., AMTMANN, E., STORCH, V., SAUER, G.:
The extraction of high-molecular-mass DNA from hair shafts.
FEBS LETT. 230 (1988), 209-211.
- 126 SCHRÖDER, A.:
Ist die Unterscheidung von Menschen- und Tierhaaren durch Untersuchung der Kutiukula möglich?
Dtsch Z ges gerichtl Med. 15 (1930), 127.
- 127 SCHWARZ, E.:
Untersuchungen zum Schicksal der aus Nukleinsäuren beim Zellabbau während der epidermalen Keratinisation freiwerdenden Purine.
Arch Klin Exp Derm. 216 (1963), 427-445.
- 128 SERRI, F., D., CERIMELE, D.:
Embryologie und Entwicklung des Haarfollikels.
In: Haar- und Haarkrankheiten.
Gustav Fischer: Stuttgart (1997).
- 129 SIMONETTI, S., CHEN, X., DiMAURO, S., SCHON E.A.:
Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: analysis by quantitative PCR.
Biochim Biophys Acta. 1180 (1992), 113-122.
- 130 SULLIVAN, K.M., HOPGOOD, R., GILL, P.:
Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA.
Int J Legal Med. 105 (1992), 83-86.
- 131 SUZUKI, H., FUKUYAMA, K., EPSTEIN, W.L.:
Changes in nuclear DNA and RNA during epidermal keratinization.
Cell Tissue Res. 184 (1977), 155-167.
- 132 SWIFT, J.A.:
Some theoretical considerations on the bending stiffness of human hair.
International Journal of Cosmetic Science 17 (1995), 245-253.

- 133 SZABO, G.:
The regional frequency and distribution of hair follicles in human skin.
In: The biology of hair growth.
Academic Press: New York (1958), 33-38.
- 134 THOMPSON, S.W., LUNA, L.G.:
An atlas of artifacts.
Charles C. Thomas: Springfield (1978).
- 135 TAUTZ, D., SCHLOTTERER, C.:
Simple sequences.
Curr Opin Genet Dev. 6 (1994), 832-837.
- 136 TRÖGER, H., D., SCHNEEWEIS, R.-P., WINDUS, G.:
Beweiswert mikromorphologischer Haaruntersuchungen.
Beitr Gerichtl Med. 46 (1988), 227-231.
- 137 TRÖGER, H., D., TUTSCH-BAUER, E., URBAN, R.:
PGM₁-Subtypisierung am Einzelhaar mit isoelektrischer Fokussierung im
Polyacrylamidgel.
Beitr Gerichtl Med. 42 (1984), 241-244.
- 138 TWIBELL, J., WHITEHEAD, P.H.:
Enzym typing of human hair roots.
J Forensic Sci. 23 (1978), 356-360.
- 139 URQUHART, A., KIMPTON, C.P., GILL, P.:
Sequence variability of the tetranucleotide repeat of the human beta-actin related
pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ATBP2) locus.
Hum Genet. 92 (1993), 637-638.
- 140 VON BEROLDINGEN, C.H., ROBY, R.K., SENSABAUGH, G.F., WALSH,
S.:
DNA in Hair.
In: Proceedings of the International Symposium of the Forensic Aspects of DNA
Analysis.
FBI Academy: Quantico (1989), 265-266.
- 141 WALSH, P.S., METZGER, D.A., HIGUCHI, R.:
Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing
from forensic material.
Biotechniques 10 (1991), 506-513.
- 142 WIEGAND, P., BAJANOWSKI, T., BRINKMANN, B.:
DNA typing of debris from fingernails.
Int J Legal Med. 106 (1993), 81-83.

- 143 WIEGAND, P., BUDOWLE, B., RAND, S., BRINKMANN, B.:
Forensic validation of the STR systems SE33 and TC11.
Int J Legal Med. 105 (1993), 315-320.
- 144 WIEGAND, P., RAND, S., BAJANOWSKI, T.:
Möglichkeiten der DNA-Typisierung an exhumierten Leichengeweben.
Rechtsmedizin 3 (1992), 10-13.
- 145 WILSON, M.R., DIZINNO, J.A., POLANESKY, D., REPLOGLE, J.,
BUDOWLE, B.:
Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic case work analysis.
Int J Legal Med. 108 (1995), 68-74.
- 146 YADA, S., OKANE, M., SANO, Y.:
Blood grouping of a single human hair by means of elution technique.
Act Crim Japon. 32 (1966), 7.
- 147 YOSHII, T., TAMURA, K., ISHIYAMA, I.:
Presence of a PCR-inhibitor in hairs.
Nippon Hoigaku Zasshi 46 (1992), 313-316.
- 148 YOSHII, T., TANIGUCHI, T., AKIYAMA, K., TAMURA, K., ISHIYAMA, I.:
PCR inhibitor: Water-soluble eumelanin, as a PCR-inhibitor and a simple
method for its removal.
Jap J Legal Med. 47 (1993), 393-396.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen:

A	Adenin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar
C	Cytosin
DDT	Dithiothreitol
dest.	destilliert
D-Loop	Displacement-Loop
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et altera (lat. und andere)
G	Guanin
g	Fallbeschleunigung
IFSH	The International Society For Forensic Haemogenetic
KB	Kilobasen
MLS	Multi-Locus-Sonde
mt	mitochondrial
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RFLP	Restriktionsenzymfragmentlängenpolymorphismus
SLS	Single-Locus-Sonde
STR	Kurze Wiederholungseinheiten (engl.: short tandem repeats)
T	Thymin

TE	Tris-EDTA-Puffer
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tris	Tris-/Hydroxymethyl-Aminomethan
VNTR	Variable Zahl von Wiederholungseinheiten (engl.: variable number of tandem repeats)
vs	very small

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.2.1	Schema einer Haarwurzel	7
Abb. 1.2.2	Wachstumsphasen des Haares	9
Abb. 4.2a	Querschnitte durch einen Anagenfollikel unmittelbar cranial der Haarpapille. Methylgrün-Pyronin-Färbung, 40X	60
Abb. 4.2b	Querschnitte durch einen Anagenfollikel unmittelbar cranial der Haarpapille. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40X	61
Abb. 4.2c	Querschnitte durch ein Kopfhaar zwischen Haarpapille und Keratinisierungszone. Methylgrün-Pyronin-Färbung, 40X	62
Abb. 4.2d	Querschnitte durch ein Kopfhaar zwischen Haarpapille und Keratinisierungszone. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40X	63
Abb. 4.2e	Längsschnitt durch ein Telogen- und Anagenfollikel. Darstellung der Differenzierungsprozesse eines Keratinozyten in eine vollständig verhornte Zelle	64
Abb. 4.2f	Querschnitte durch ein Kopfhaar in Höhe des Stratum reticulare der Haut. Methylgrün-Pyronin-Färbung, 40X	65
Abb. 4.2g	Querschnitte durch ein Kopfhaar in Höhe des Stratum reticulare der Haut. Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40X	66
Abb. 4.2h	Schema eines Haares. Methylgrün-Pyronin-Färbung, 10X	67
Abb. 4.2i	Drei Querschnitte durch das Haar. Methylgrün-Pyronin-Färbung und Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 40X	67

- Abb. 4.3.1d** Auftrennung ausgewählter HumVWA-Amplifikate in einem Polyacrylamid-Horizontal-Gel 71
- Abb. 4.3.1e** Computergestützte Auswertung bei der Kapillarelektrophorese im STR-System HumVWA 72
- Abb. 4.3.2d** Auftrennung ausgewählter HumACTPB2-Amplifikate in einem Polyacrylamid-Horizontal-Gel 76
- Abb. 4.3.2e** Computergestützte Auswertung bei der Kapillarelektrophorese im STR-System HumACTPB2 77
- Abb. 4.3.3b** Auftrennung ausgewählter HumAMEL X/Y-Amplifikate in einem Polyacrylamid-Horizontal-Gel 79
- Abb. 4.3.3c** Computergestützte Auswertung bei der Kapillarelektrophorese im STR-System HumAMEL X/Y 80

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.4.4	Temperaturprofile der Singleplex-PCR der STR-Regionen HumACTBP2 (SE 33), HumVWA und dem Geschlechtsbestimmungssystem HumAMEL X/Y	55
Tab. 4.2.2	Häufigkeit der Haarfarben der untersuchten Haarproben	68
Tab. 4.3.1a	Beobachtete Allele im System HumVWA	69
Tab. 4.3.1b	Beobachtete Allelfrequenzen im System HumVWA	69
Tab. 4.3.1c	Übersicht der morphologischen Kennzeichen sowie der Allelfrequenzen HumVWA	70
Tab. 4.3.2a	Beobachtete Allele im System HumACTBP2	73
Tab. 4.3.2b	Beobachtete Allelfrequenzen im System HumACTBP2	74
Tab. 4.3.2c	Übersicht der morphologischen Kennzeichen sowie der Allelfrequenzen im System HumACTBP2	75
Tab. 4.3.3a	Übersicht der morphologischen Kennzeichen sowie der Geschlechtsbestimmung im System HumAMEL X/Y	78
Tab.: 5.1	Vergleich der Allelgrößen zwischen klassischen und vs-STR-System	83
Tab. 5.3a	Kopfbehaarung und Alter, durchschnittliche maximale Länge	85
Tab. 5.3b	Größter und kleinster Durchmesser bei Haaren unterschiedlicher Rasse	86

Tab. 5.7a Vergleich mit deutscher Population im System HumVWA 92

Tab. 5.7b Vergleich mit deutscher Population im System HumACTPB2 93

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med D. Patzelt für die Überlassung des Themas, für die Erlaubnis zur Benutzung aller Einrichtungen am Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg, die für die Durchführung der Versuche zur Verfügung standen sowie für seine stete Unterstützung und Bereitschaft, auftretende Probleme zu diskutieren.

Herrn Dr. rer. nat. S. Jung danke ich für seine geduldige Anleitung, seine wertvollen Ratschläge, seine Hinweise und Anregungen bei der Organisation und der Durchführung der experimentellen Arbeiten.

Danken möchte ich auch Frau G. Hinkelmann, C. Laudenschlager, Frau T. Schantura, Frau C. Schuldensucker für die qualifizierte technische Hilfe, die freundliche Aufnahme und das gute Arbeitsklima, ohne die das Projekt nicht hätte gedeihen können.

Für den Erfahrungsaustausch auf dem Gebiet der forensischen Spurenkunde bin ich Frau R. Henkel, Institut für Rechtsmedizin der Medizinischen Hochschule Hannover dankbar.

Herrn Schmidt, Institut für Pathologie der Universität Würzburg, gebührt Dank für die photographischen Arbeiten.

Allen nicht namentlich genannten Kollegen, Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Institute für Rechtsmedizin und Pathologie der Universität Würzburg sei die mannigfaltige Unterstützung im Verlauf der letzten Jahre nicht vergessen und für die vielen kritischen Diskussionen und die stete Hilfsbereitschaft gedankt.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name	Steffen Bergelt
Geburtsdatum/-ort	18.06.1971 in Münchberg
Familienstand	ledig

Schulbildung

1977 –1981	Grundschule Sparneck-Weißdorf
1981 –1991	Gymnasium, Kolleg St. Blasien
	Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1992 (WS)	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg
1995 (SS)	Prüfung zum Physikum
1996 (SS)	Studienortwechsel an die Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
1996 (SS)	Prüfung zum Ersten Staatsexamen
1999 (WS)	Prüfung zum Zweiten Staatsexamen
1999 (SS)	Beginn der Absolvierung des Praktischen Jahres
1999 (SS)-2000 (WS)	Praktisches Jahr mit den Fächern:
2000 (SS)	Prüfung zum Dritten Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

06/2000-11/2001	Arzt im Praktikum am Institut für Pathologie der Universität Würzburg
12/2001-05/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pathologie der Universität Würzburg
seit 06/2005	Assistenzarzt am Pathologischen Institut Aalen

Würzburg, im Juni 2006



