

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Würzburg
Vorstand : Prof. Dr. D. Patzelt

DNA-analytische Speziesdiagnostik

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Christoph Großmann
aus Würzburg

Würzburg, Januar 2007

Referent: Prof. Dr. med. Dieter Patzelt

Koreferent: Prof. Dr. med. Tiemo Grimm

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2007

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung	1
1.1	Methoden der Speziesdifferenzierung – Serologie vs. DNA-Analytik.....	1
1.2	RAPD-PCR – Prinzip und Anwendungsmöglichkeiten.....	6
1.2.1	Grundlagen : Prinzip der Polymerasekettenreaktion.....	6
1.2.2	Prinzip der RAPD-PCR.....	8
1.2.3	Anwendungsmöglichkeiten der RAPD-PCR.....	10
1.2.4	RAPD-PCR in der Rechtsmedizin.....	11
1.3	Aufgabenstellung.....	12
2.	Material und Methoden	14
2.1	Material.....	14
2.1.1	Verbrauchsmaterialien allgemein.....	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien Polymerasekettenreaktion (PCR).....	15
2.1.3	Geräte.....	16
2.1.4	Probenmaterial.....	17
2.2	Methoden.....	18
2.2.1	DNA-Isolierung aus Spurenmaterial mittels Chelex-100-Extraktion.....	18
2.2.2	DNA-Isolierung aus Vollblut.....	19
2.2.3	Phenol-Chloroform-Extraktion an Blutspuren.....	20
2.2.4	DNA-Isolierung und Aufreinigung mittels dem QIAamp Blood kit.....	22
2.2.5	Aufreinigung von DNA mittels Diatomeen.....	23
2.2.6	Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR).....	24
2.2.7	Gelelektrophorese.....	25

2.2.7.1	Prinzip der Gelelektrophorese.....	25
2.2.7.2	Horizontale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	25
2.2.7.3	Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	27
2.2.7.4	Silberimprägnierung.....	27
2.2.7.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.2.7.6	Hochauflösende Kapillarelektrophorese.....	29
3.	Ergebnisse	32
3.1	Isolierung und Aufreinigung von DNA-Material.....	32
3.2	Random amplified polymorphic DNA-PCR.....	33
3.3	Darstellung der Amplifizierungsprodukte.....	36
3.4	Untersuchung von Spuren menschlicher Herkunft.....	40
3.4.1	Primer I.....	40
3.4.2	Primer II.....	44
3.4.3	Primer III.....	48
3.5	Untersuchung von Spuren tierischer Herkunft.....	52
3.5.1	Speziesidentifikation – Hund.....	52
3.5.2	Speziesidentifikation – Rind.....	54
3.5.3	Speziesidentifikation – Hausschwein, Wildschwein.....	55
3.5.4	Speziesidentifikation – Katze.....	60
3.5.5	Speziesidentifikation – Pferd, Pony, Esel.....	61
3.5.6	Speziesidentifikation – sonstige heimische Tiere.....	65
3.5.6	Speziesidentifikation – exotische Tiere.....	71
3.6	Untersuchung von Pflanzengewebe.....	80

4.	Diskussion	83
4.1	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Spurenmaterial.....	83
4.2	RAPD-PCR.....	84
4.3	Darstellung der Amplifikationsprodukte.....	86
4.4	Abstammungsnachweis mittels RAPD-PCR ?.....	91
4.5	Ausblick.....	94
5.	Pferdeschändung – ein aktueller Fall	96
6.	Zusammenfassung	99
7.	Abkürzungsverzeichnis	100
8.	Literaturverzeichnis	102

Anhang

Danksagung

Lebenslauf

1. EINLEITUNG

1.1 Methoden der Speziesdifferenzierung – Serologie vs. DNA-Analytik

(Vollzug am Gen und am Genprodukt)

Der Herkunftsnachweis von biologischem Spurenmaterial stellte schon immer einen Kernpunkt in der Aufklärung von Straftaten dar. So auch die Unterscheidung ob z.B. eine Blutspur menschlichen oder tierischen Ursprungs ist.



Abb. 1.1:
Porträtfoto des
Bakteriologen
Paul Uhlenhuth

Dieser Fragestellung widmete sich der Freiburger Bakteriologe Paul Uhlenhuth (1870 – 1957).

Er veröffentlichte im Jahr 1901 ein Verfahren, das genau dieses Problem lösen sollte - die Immunpräzipitationsreaktion. Grundlage der Methodik ist eine Antigen–Antikörper–Reaktion. Zur Durchführung ist die Herstellung artspezifischer Antiseren notwendig. Hierzu wird ein sog. Mitteltier durch Gabe artfremder Serumproteine immunisiert. Das Tier bildet nun polyklonale IgG-Antikörper. Wird jetzt eine Antigenlösung mit passendem Antiserum überschichtet, kommt es an der Grenze zu einer Präzipitation über die Ausbildung von Immunkomplexen.

Es gelingt also nicht nur die Unterscheidung zwischen Mensch und Tier, sondern auch die Differenzierung verschiedener Tierarten mit Hilfe spezifischer Antiseren. Nachteil des Verfahrens ist der große Bedarf an Antiserum und die Einschränkung, dass der Nachweis von Immunkomplexen nur bei klarer Lösung gelingt. (zitiert nach Patzelt et al., 2003)

Der 1914 geborene Göteborger Bakteriologe Örjan Uchtermann verbesserte das Uhlenhuth'sche Verfahren und veröffentlichte den Doppeldiffusionstest im Agargel, der später seinen Namen erhält.

Grundlage dieser Blutartbestimmung ist wiederum eine Antigen-Antikörper-Reaktion, welche nun jedoch zweidimensional in einem Agargel abläuft. Ein Schema eines solchen Gels zeigt Abbildung 1.2.

Üblicherweise sind fünf Vertiefungen (Reservoire) in ein Gel eingestanzt. In die mittlere (1) wird ein artspezifisches Antiserum gegeben, das obere und untere Depot (2) wird mit der zu untersuchenden Probe befüllt. Die verbleibenden Depots enthalten einmal als Positiv-Probe dienendes Antigen (+) sowie NaCl als Negativ-Probe (-).

Die ablaufende radiale Immundiffusion führt beim Vorhandensein von homologem Antigen und Antiserum zur Ausbildung von unlöslichen Immunkomplexen. Es bilden sich Präzipitationslinien (Abb. 1.2, A)

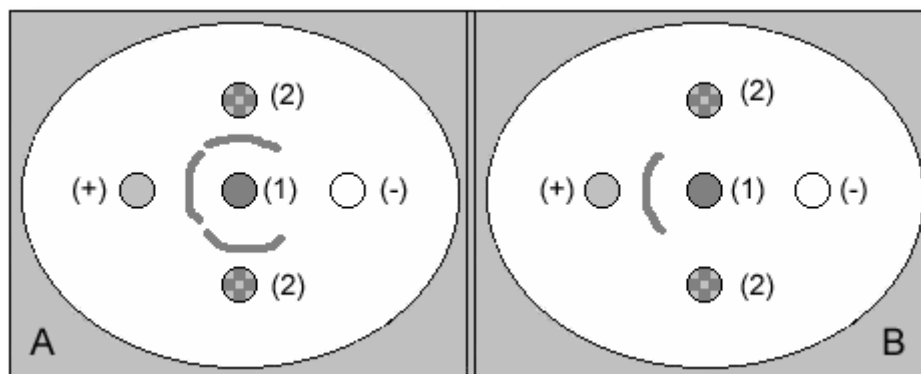


Abb. 1.2 : Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony; A unbekanntes Antigen (2) und Antiserum(1) sind homolog; B unbekanntes Antigen (2) und Antiserum (1) sind nicht homolog. (+) Positivprobe, (-) Negativprobe

Sind das Antiserum und die zu untersuchende Spur nicht homolog, bleibt die Bildung der Präzipitationslinien aus (Abb. 1.2, B). (zitiert nach Patzelt et al., 2003)

Der Verbrauch an Antiserum konnte bei diesem Verfahren im Vergleich zum Präzipitintest nach Uhlenhuth stark verringert werden. Nachteilig wirkt sich aber immer noch eine Reaktionszeit von 5 - 6 Stunden aus.

Ein Nachteil beider Verfahren gegenüber den sich später etablierenden DNA-analytischen Nachweismethoden ist eine geringere Spezifität aufgrund möglicher Kreuzreaktionen. Des Weiteren wirkt sich eine im Vergleich zur DNA schneller fortschreitende Proteindenaturierung ungünstig aus.

Eine weitere Möglichkeit zur Unterscheidung von Tier- und Menschenblut ist der von Robin R.C. Coombs, einem Cambridger Pathologen, entwickelte Antihumanglobulintest bzw. Coombs-Test. Hierbei handelt es sich um einen Hämagglutinationshemmtest.

Mit inkomplettem Anti-Rh (IgG-Antikörper) beladene Erythrozyten werden in einem Antihumanglobulin-Serum agglutiniert. Wird dem Antiserum vor Zugabe der Erythrozyten eine Blutspur menschlicher Herkunft zugesetzt, wird das Antihumanglobulin-Serum absorbiert. Nachträglich zugesetzte „beladene“ Erythrozyten werden nicht agglutiniert. Der positive Reaktionsausfall offenbart sich also über eine Agglutinationshemmung.

Ist kein humanes Protein in der zu untersuchenden Spur vorhanden, reagieren die Antihumanglobulin-Antikörper mit den hinzugegebenen Test-Erythrozyten und es kommt zur Agglutination. Der Test ist somit negativ, das Vorhandensein von Menschenblut ist ausgeschlossen. (zitiert nach Patzelt et al., 2003; Kaufmann, 1999)

Eine Übersicht beider möglicher Reaktionen zur Artidentifizierung von Blut zeigt Abbildung 1.3.

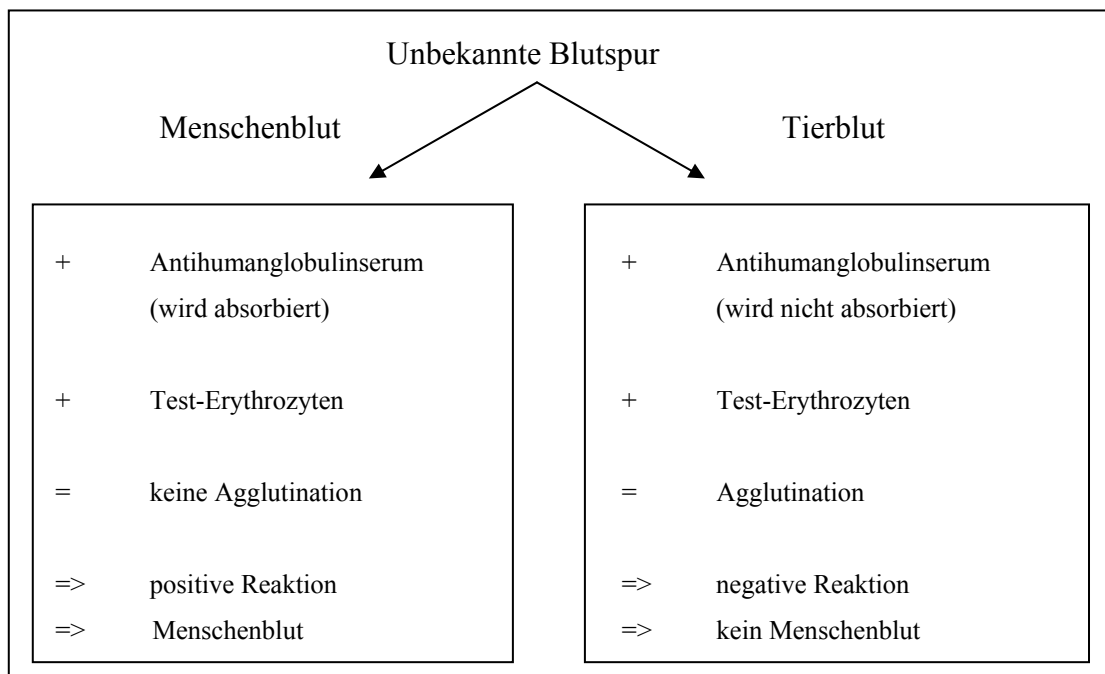


Abb. 1.3 : Antihumanglobulintest (Coombs-Test) – Übersicht der beiden Möglichkeiten zur Artidentifizierung von Blut

Bei der Durchführung eines Antihumanglobulintests werden zur Kontrolle immer noch weitere vier Ansätze untersucht:

- Eluat aus nicht-kontaminiertem Spurenlösungsmittel
- Tierblut
- NaCl
- Menschenblut bzw. Serum

Die Kontrollansätze 1 – 3 sollten negativ und Ansatz 4 positiv ausfallen.

Eine spezifischere aber aufwendigere Methode zum Herkunftsnachweis einer Blutspur ist die Untersuchung des Lactat-Dehydrogenase-Musters, welches mittels einer Cellulose-Acetatfolienelektrophorese dargestellt werden kann.

Das resultierende Bandenmuster ist artspezifisch. Weiterhin kann mit dieser Methode zwischen Menstruationsblut, frischem Venenblut und Leichenblut unterschieden werden. (zitiert nach Jung, 2002)

Mit dem Aufkommen DNA-analytischer Methoden wurden immunologische und serologische Nachweisverfahren immer weiter in den Hintergrund gedrängt. Es ergaben sich neue Möglichkeiten zur Untersuchung und Zuordnung von Spuren. Die Menge des benötigten Spurenmaterials wurde immer kleiner, die Ergebnisse immer zuverlässiger und schneller verfügbar.

Eine mögliche Verfahrensweise zur Analyse unbekannter Spuren bzw. deren Zuordnung zu einer bestimmten Spezies ist die Untersuchung mitochondrialer DNA (mtDNA). Diese liegt in zahlreicheren Kopien als chromosomale DNA vor, weshalb sie bei Fällen mit kleinsten Spuren, z.B. einem einzelnen Haar, besonders hilfreich sein kann. Der Speziesnachweis erfolgt hierbei mittels des Cytochrom b-Genes, welches mit Hilfe spezifischer Primer amplifiziert wird. Die vervielfältigten DNA-Abschnitte werden einem Restriktionsverdau mit speziellen Restriktionsendonukleasen unterzogen. Anschließend erfolgt die Darstellung des RFLP-Musters (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen) im Gel (z.B. Polyacrylamidgelelektrophorese). Das resultierende Bandenmuster ist artspezifisch.

Abbildung 1.4 zeigt das RFLP-Muster einiger Säugetierarten. Der Restriktionsverdau erfolgte bei dieser Untersuchung mit ALU I (Jung, 2002).

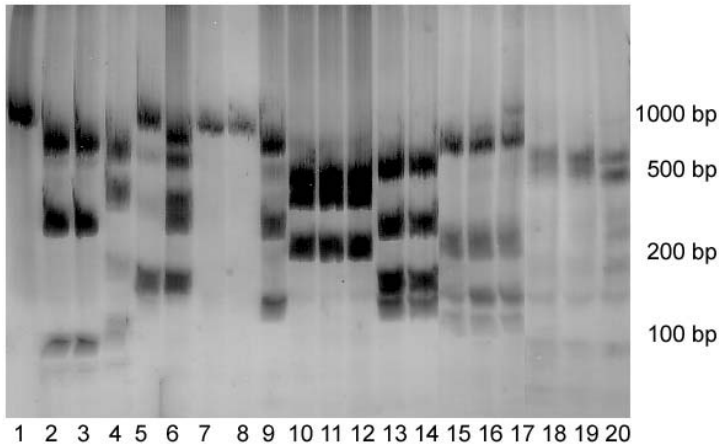


Abb.1.4: RFLP-Muster des Cytochrom b-Genes.

- 1 Mensch
- 2/3 Schimpanse
- 4 Kapuzineräffchen
- 5 Kaninchen
- 6 Pferd
- 7-8 Reh
- 9 Wildschwein
- 10-12 Rind
- 13/14 Schwein
- 15-17 Katze
- 18-20 Hund

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung unbekannter Spuren ist die Charakterisierung der im Blot-Verfahren immobilisierten DNA mittels Hybridisierung mit speziesspezifischen DNA-Sonden.

Bei dieser Methode wird die isolierte DNA zu Beginn einem hydrolytischen Verdau mit einer Restriktionsendonuklease unterzogen. Die entstehenden DNA-Fragmente werden mit Hilfe einer Gelelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt und so geordnet auf eine Membran transferiert (Southern-blot). Durch Hybridisierung mit spezifischen DNA-Sonden können nun speziesspezifische Bandenmuster dargestellt werden.

Eine schematische Übersicht der Arbeitsschritte dieser Nachweis- bzw. Identifizierungsmethode zeigt Abbildung 1.5.

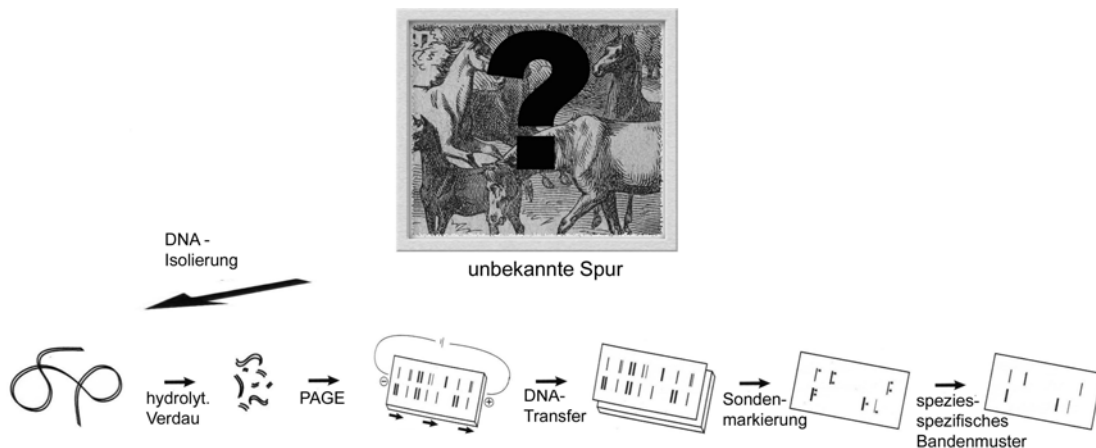


Abb. 1.5 : Speziesidentifizierung mittels speziesspezifischer DNA-Sonden – Übersicht

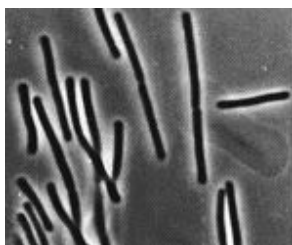
Eine weitere DNA-analytische Methode zur Speziesidentifizierung ist die RAPD-PCR, welche im folgenden Kapitel ausführlich beschrieben wird.

1.2 RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA-PCR) – Prinzip und Anwendungsmöglichkeiten

1.2.1 Grundlage : Prinzip der Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) ist eine von Kary Mullis 1985 entwickelte in-vitro Technik zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten. Die Amplifikation erfolgt temperaturgesteuert zyklisch nach Hinzugabe von Enzymen und DNA-Bausteinen. Ein einzelner Zyklus wird in drei Phasen unterteilt. Am Beginn steht die Denaturierung des DNA-Doppelstranges durch Hitze (94 °C), also das Lösen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen, wodurch diese als Einzelstränge vorliegen. Um nunmehr einen bestimmten Abschnitt amplifizieren zu können, werden kurze einzelsträngige DNA-Moleküle (Oligonukleotide), so genannte Primer benötigt. Deren Sequenz muss komplementär zu den Enden der zu vervielfältigenden DNA-Matrize sein. Die Anlagerung der Primer (primer-annealing) an die DNA-Einzelstränge findet bei einer Temperatur statt, die von der Schmelztemperatur (T_m) der Primer abhängig ist.

Anschließend kommt es in Gegenwart von Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTP's) mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase, deren Ansatzpunkt die gebundenen Primer darstellen, bei 72 °C zur DNA-Synthese in 3'-Richtung. Es entsteht eine Sequenz, die komplementär zur DNA-Matrize ist. Das eingesetzte Enzym, auch Taq-Polymerase genannt, wurde ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* (Abbildung 1.6) isoliert, einem Bewohner der heißen Quellen des Yellowstone Nationalparks. Die



Verwendung dieser hitzestabilen DNA-Polymerase ermöglicht die vollständige Automatisierung der PCR. Die vorher zur Anwendung gekommenen Enzyme mussten jeweils nach der Denaturierungsphase erneuert werden, was eine Unterbrechung des reibungslosen Ablaufes zur Folge hatte.

Abb.1.6: T. aquaticus Der beschriebene dreiphasige Ablauf (siehe Übersicht in Abbildung 1.7) wird nun mehrmals durchlaufen, wobei die neu synthetisierten DNA-Stränge ebenfalls als Matrize fungieren. Abschließend wird ein weiterer Extensionsschritt bei 72°C durchgeführt. Dieser dient dem Komplettieren von PCR-

Produkten der Länge n-1 auf die vollständige Länge des amplifizierten Fragments. Hierdurch wird die Ausbildung von Doppelpeaks, als möglichem Artefakt einer PCR, unterbunden.

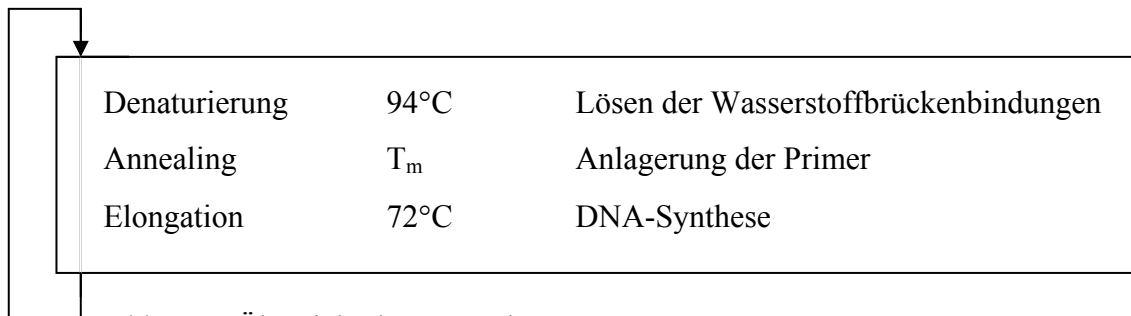


Abb. 1.7 : Übersicht der PCR-Phasen

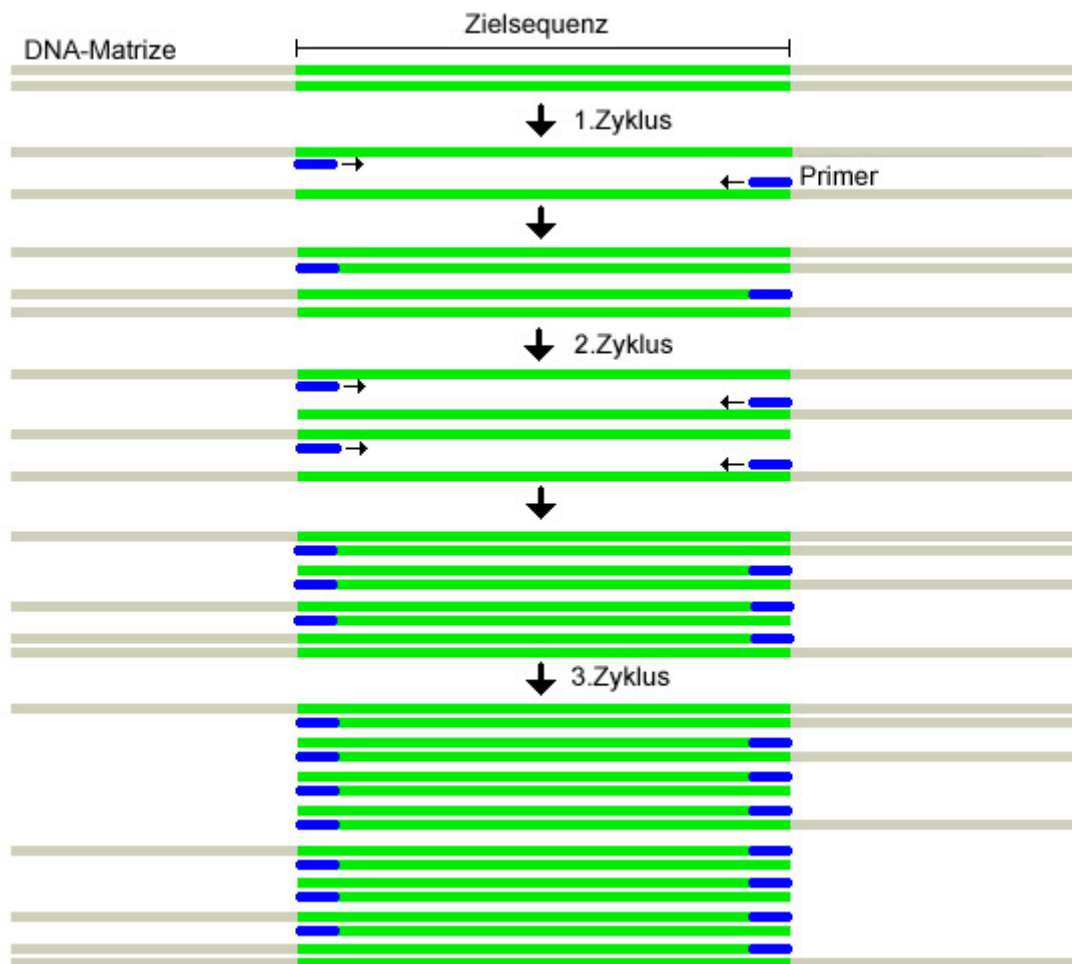


Abb. 1.8 : Schema der ersten drei Zyklen einer PCR

Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Zahl der Zielsequenzen. Abbildung 1.8 zeigt ein Schema der ersten drei Zyklen einer PCR. Dieses verdeutlicht, dass in den ersten Zyklen ein Teil der neu synthetisierten DNA-Stränge noch keine definierte Länge haben.

Die theoretische Anzahl der Zielsequenzen nach Abschluss der PCR lässt sich mit folgender Formel berechnen:

$$(2^n - 2n)x$$

- n = Anzahl der PCR-Zyklen
2n = Produkte des ersten und zweiten Zyklus, deren Länge nicht definiert ist
x = Anzahl der Ausgangsmoleküle der ursprünglichen Matrize

Bei 100%iger Ausbeute würde dies bedeuten, dass nach 30 Zyklen etwa 2^{30} Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize vorliegen würden. Dieses optimale Ergebnis ist jedoch nicht zu erreichen. Ursache hierfür sind verschiedenste Faktoren, wie zum Beispiel die Beschaffenheit der Matrize oder die Enzymaktivität, da es bei großer Hitze zur Denaturierung der DNA-Polymerase kommt. So hat z.B. die Taq-Polymerase bei 95 °C eine Halbwertszeit von ca. 40 Minuten. Des Weiteren kommt es im Verlauf einer PCR zum Verbrauch von Primern und Nukleotiden.

1.2.2 Prinzip der random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)

Die in dieser Arbeit eingesetzte RAPD-PCR (zufällig amplifizierte polymorphe DNA-PCR), auch arbitrarily primed PCR (willkürlich gestartete PCR) genannt, ist eine Sonderform der zuvor beschriebenen Standard-PCR. Veröffentlicht wurde diese Methode erstmals im Jahr 1990 von Williams et al.

Zum Einsatz kommt hierbei nur ein Primer, meist ein Dekanukleotid, dessen Sequenz willkürlich gewählt wird. Aufgrund der geringen Länge des Primers ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass komplementäre Sequenzen in der zu untersuchenden DNA vorhanden sind. Wenn es dann in ausreichend geringer Entfernung zur

Anlagerung zweier Primer in aufeinander zuweisender Richtung kommt, wird dieser DNA-Abschnitt vervielfältigt.

Es wird also nicht gezielt ein bestimmter DNA-Abschnitt amplifiziert, sondern die durch zufällige Anlagerung der Primer im Genom entstehenden Fragmente vervielfältigt und interpretiert.

Abbildung 1.9 zeigt schematisch den Vergleich zwischen Standard-PCR und RAPD-PCR. Teil A der Abbildung zeigt die Standard-PCR. Hierbei wird ein bekannter Bereich, in diesem Fall Gen B, bewusst gewählt und amplifiziert. Im Gegensatz dazu kommt es bei der RAPD-PCR (Teil B der Abbildung) zur mehrfachen Anlagerung der Primer. Wenn die Entfernung zwischen den Primern ausreichend gering ist, entstehen verschiedene, zufällige Produkte mit artspezifischem Peak- bzw. Bandenmuster

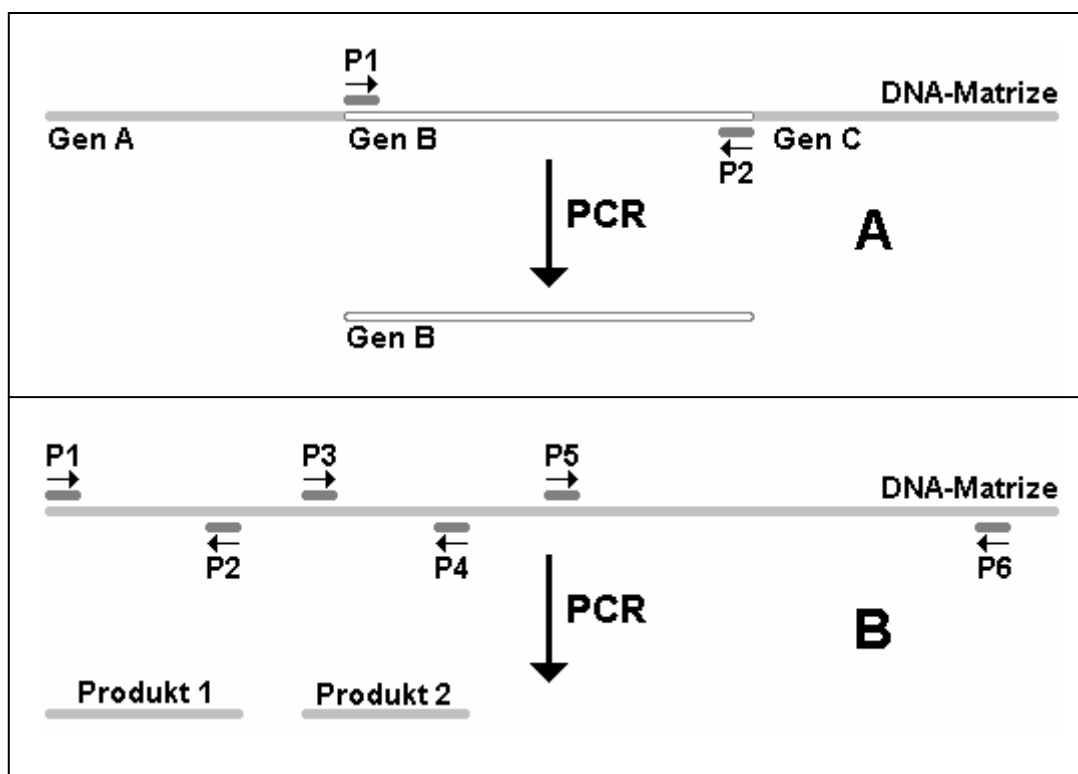


Abb. 1.9: Schematischer Vergleich von Standard-PCR (A) und RAPD-PCR (B)

1.2.3 Anwendungsmöglichkeiten der RAPD-PCR

Die RAPD-PCR zeichnet sich durch eine hohe Aussagekraft aus, weshalb sie in vielen verschiedenen Fachgebieten zum Einsatz kommt. Des Weiteren ist diese Technik einfach zu handhaben und wirtschaftlich. Um das große Potential der RAPD-PCR zu verdeutlichen, sollen im Folgenden einige mögliche Anwendungen vorgestellt werden.

In der Mikrobiologie wird die RAPD-PCR zur Typisierung von Bakterienstämmen (z.B. *Salmonella enterica* ssp. *enterica* [Chansiripornchai et al., 2000]) oder zur Identifizierung von in der Klinik isolierten Bakterien (z.B. *Helicobacter pylori*-Stämme [Akopyanz et al., 1992], *Salmonella enteritidis*-Stämme [Lin et al., 1996]) eingesetzt.

Im Bereich der Onkologie erfolgt der Nachweis von Mutationen bzw. polymorphen Regionen in Wilms-Tumorzellen, sowie in experimentell induzierten Nierenkrebszellen bei Hamstern in Form von Fragmentgrößenänderungen im Vergleich zu Kontrollgewebe [Singh et al., 1999]. Weiterhin gelingt eine Abschätzung genomischer Schäden bei Brustkrebs [Papadopoulos et al., 2001].

In der Landwirtschaft wird die RAPD-PCR zum Nachweis der genetischen Stabilität in-vitro vermehrter Pflanzen (z.B. *Annona muricata* (Stachel-Anemone) [Bridg et al., 2000]) eingesetzt.

Congiu et al. berichten 2000 von einem Fall der unerlaubten Vermarktung einer patentierten Erdbeersorte. Der unzweifelhafte Nachweis, dass es sich tatsächlich um die patentierte Sorte handelte, gelang mittels einer RAPD-PCR. Die Untersuchung wurde bei einem Rechtsstreit als Beweis anerkannt. Des weiteren wird die RAPD-PCR in diesem Zusammenhang als besonders geeignet zur Identifizierung von sich asexuell vermehrender Pflanzen beschrieben.

Auch im Bereich Lebensmittelkontrolle findet die RAPD-PCR Verwendung. So wurden verschiedene Hefe-Stämme aus Molkerei-Produkten identifiziert [Andrighetto et al., 2000], bzw. der Ursprung verschiedener tierischer Bestandteile in Geflügelpastete differenziert [Calvo et al., 2001].

In der Veterinärmedizin wurden RAPD-Marker identifiziert, die mit bestimmten Erkrankungen assoziiert sind (z.B. [Gu et al., 1998]).

Besonders häufig kommt die RAPD-PCR im Fachbereich Populationsgenetik zum Einsatz. Eine Anwendungsmöglichkeit ist die Identifizierung und Differenzierung

bestimmter Spezies und die Rekonstruktion der Abstammung (z.B. *Aedes aegypti* (Gelbfiebermücke) [Ballinger-Crabtree et al., 1992], *Aedes albopictus* (Tigermücke) [Kambhampti et al., 1992], Taihu-Schwein [Chang et al., 1999]).

Die Untersuchung der genetischen Diversität bzw. Evaluation genetischer Polymorphismen gelang z.B. bei *Panthera pardus orientalis* (Amurleopard) [Chelomina et al., 1999], einer fernöstlichen Raubtierart. Mittels der RAPD-PCR konnte im Rahmen dieser Studie sogar zwischen wildlebenden und im Zoo gehaltenen Tieren unterschieden werden.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Erhaltung der genetischen Vielfalt bei der kontrollierten Nachzucht bedrohter Tierarten (z.B. *Aquila adalberti* (Prinzenadler) [Padilla et al., 2000]).

Eine besonders interessante Möglichkeit der RAPD-PCR, die von vielen verschiedenen Fachrichtungen genutzt wird, ist die einfache und schnelle Speziesidentifizierung bzw. –differenzierung. Partis und Wells gelang 1996 z.B. die Unterscheidung von acht verschiedenen Fischarten, Glazko et al. die Differenzierung verschiedener Rinder-Subspezies.

Eine noch unbeantwortete Fragestellung ist, ob Paternitätsuntersuchungen mit Hilfe einer RAPD-PCR möglich sind. In der Literatur finden sich hierzu widersprüchliche Aussagen.

Bei der Untersuchung von Primatenkindern mit gesicherter Abstammung kam es zum Auftreten von nicht-elterlichen Banden [Riedy et al., 1992], was die RAPD-PCR als Werkzeug der Paternitätsbegutachtung ausschließen würde. Im Gegensatz dazu konnte bei der Untersuchung einer Libellenpopulation der Herkunftsnachweis geführt werden. [Hadrys et al., 1992].

1.2.4 RAPD-PCR in der Rechtsmedizin

Wie schon erwähnt, ist eine mögliche Anwendung der RAPD-PCR die Speziesidentifizierung bzw. –differenzierung. Mit diesem Merkmal stellt diese Methode ein adäquates Mittel zur Untersuchung und Zuordnung unbekannter Spuren dar.

Lee et al. veröffentlichten 1994 erstmals eine RAPD-PCR-Anwendung, mit der im Rahmen rechtsmedizinischer Untersuchungen eine eindeutige Zuordnung unbekannter Spuren gelang. Es konnten eindeutige Merkmale für insgesamt neun verschiedene Spezies dargestellt werden (Rind, Ziege, Schwein, Hund, Ratte, Hase, Huhn, Ente, Mensch).

Die Identifizierung der Herkunftsspezies stand auch bei der Untersuchung von Xenotransplantaten zur Sicherung des Transplantationsschutzgesetzes im Mittelpunkt [Dutta et al., 2001].

Benecke veröffentlichte 1998 eine RAPD-PCR-Anwendung, mit welcher die Untersuchung und Zuordnung von Insekten an Leichenfundorten vorgenommen wird. Mit dieser Methode ist eine verhältnismäßig genaue und schnelle Bestimmung der Leichenliegezeit möglich.

Die Frage, ob der Fundort einer Leiche auch dem Tatort entspricht oder ob der Körper erst kürzlich am Fundort abgelegt wurde, lässt sich ebenfalls mit Hilfe der Insekten in und um den Leichnam klären. Sind die Insekten innerhalb des Körpers einer anderen Subspezies zuzuordnen als jene im direkten Umfeld des Fundortes, so ist davon auszugehen, dass erst kürzlich eine Umlagerung stattgefunden hat.

Zwar ist die Anzahl bisheriger Veröffentlichungen im Bereich der forensischen Medizin eine RAPD-PCR-Anwendung betreffend relativ gering, das Vorhandensein von sinnvollen Einsatzmöglichkeiten jedoch nicht von der Hand zu weisen.

1.3 Aufgabenstellung

Die Aufgabe dieser Arbeit bestand in der Etablierung einer DNA-analytischen Technik zur Speziesidentifizierung aus Kleinstblutspuren und Gewebeteilen am Institut für Rechtsmedizin der Universität Würzburg.

Hierzu sollte die, in der Literatur bereits beschriebene, RAPD-PCR eingesetzt und optimiert werden. Als Kern der Arbeit sollte nachfolgend das PCR-Produkt im Rahmen einer hochauflösenden Kapillarelektrophorese aufgetrennt und das Ergebnis mittels der Software GeneScan dargestellt werden. Der Herkunftsnachweis der Spur sollte dann über den Vergleich der erstellten Diagramme erfolgen.

An die Untersuchungsmethoden wurden verschiedene Anforderungen gestellt. Neben der eindeutigen und zweifelsfreien Zuordnung der Herkunft einer Spur stand eine möglichst schnelle und einfache sowie kostengünstige Umsetzung bzw. Handhabung im Vordergrund.

Um die Technik der RAPD-PCR bei dieser Fragestellung einsetzen zu können, sollte ein Primer angegeben werden, der alle notwendigen Informationen liefert. Ebenso sollte das am sinnvollsten einzusetzende Verfahren zur DNA-Isolierung und Aufreinigung erarbeitet werden.

Zum Nachweis der Anwendbarkeit des Verfahrens in der Praxis sollte die Untersuchung von Blut- bzw. Gewebespuren regional häufig vorkommender Tierarten erfolgen.

Zur Frage der möglichen Paternitätsbegutachtung mittels einer RAPD-PCR-Anwendung sollten einige Familienuntersuchungen durchgeführt werden.

In Abbildung 1.10 ist der Weg einer unbekanntes Spur bis zum Herkunftsnachweis dargestellt.

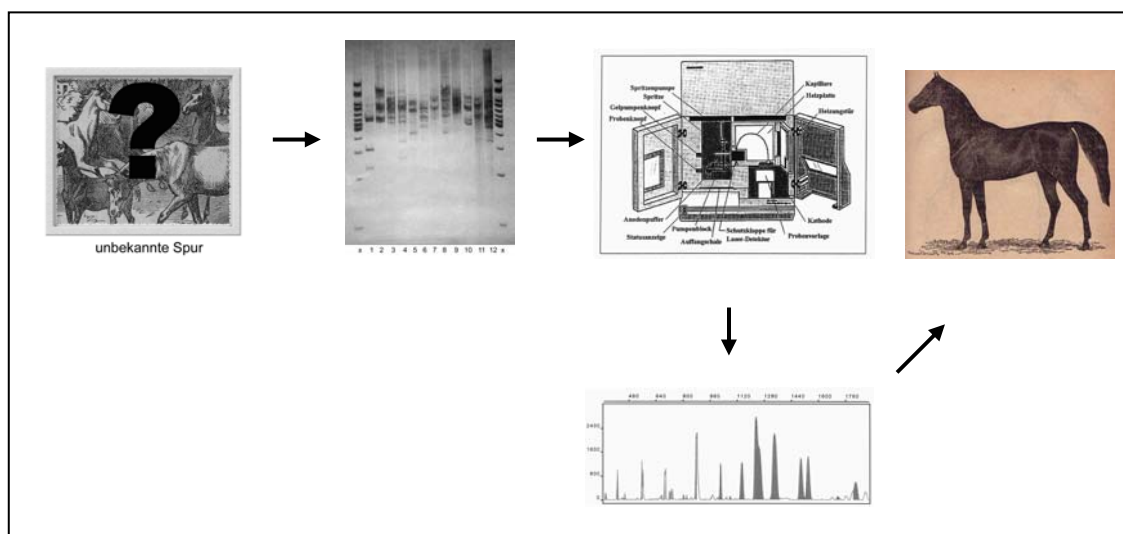


Abb. 1.10 : Übersicht – Weg einer unbekanntes Spur bis zum Herkunftsnachweis

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien allgemein

<u>Artikel</u>	<u>Typ-Bezeichnung</u>	<u>Hersteller (Vertreiber)</u>
Filterpipettenspitzen	Safeguard Filtertips 10, 30, 100, 200 u. 1000 μ l	Peqlab, Erlangen
Pipettenspitzen	Standardtips Precision Tips	Eppendorf, Hamburg Gilson (Noras)
Reaktionsgefäße	Standard und Safelock (1,2 und 5 ml) Mikroschraubröhrchen (1 und 5 ml)	Eppendorf, Hamburg Sarstedt, Nürnberg
Sofortbildfilme	667	Polaroid
Zentrifugenröhrchen	15 und 50 ml	Greiner (Noras)

Tab. 2.1 : Verbrauchsmaterialien allgemein

Spezielle Verbrauchsmaterialien und Reagenzien werden in Kapitel 2.2 bei den entsprechenden Methoden erwähnt.

Verbrauchskemikalien wurden, soweit im Text nicht anders erwähnt, über Sigma (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck eurolab (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Verbrauchsmaterialien Polymerasekettenreaktion (PCR)

Artikel	Typ-Bezeichnung	Hersteller (Vertreiber)
Nucleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP)		MBI Fermentas, Wilna – Litauen
Taq-Polymerase	AmpliTaq Gold™	Applied Biosystems, Weiterstadt
MgCl ₂	MgCl ₂ -solution 25 mM	dto.
Puffer	10x PCR Buffer II	dto.
Mineralöl		Sigma, Steinheim
PCR-Reaktionsgefäße	0,2 / 0,6 ml, dünnwandig	Hartenstein

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterialien Polymerasekettenreaktion

Oligonukleotide (Primer) :

I.	RAPD-A	5' – ACG ACC CAC G – 3'	Lee et al. 1994
II.	RAPD-(A-1)	5' – ACG ACC CAC – 3'	modifiziert nach Lee 1994
III.	RAPD	5' – ACC TGA GAC C – 3'	Günther 1997
IV.	PRIMER6	5' – AAC GCG CAA C – 3'	Benecke 1998

Tab. 2.3: Oligonukleotide (Primer)

Alle Primer standen auch in einer farbmarkierten Version (5'-FAM) zur Verfügung. Die Primer I, II und III wurden von MWG Biotech synthetisiert, Primer IV von GeneScan BigBiotech, Freiburg.

2.1.3 Geräte

Geräteart	Typ-Bezeichnung	Hersteller (Vertreiber)
Ableitgerät	E 122	Consort (Peqlab, Erlangen)
Autoklav	Typ 23	MELAG (Hartenstein)
Bunsenbrenner		Hartenstein, Würzburg
Exsikator		Hartenstein, Würzburg
Gefrierschrank	Premium	Liebherr
Glaswaren	Bechergläser, Platten, etc.	Hartenstein, Noras oder Glas-Keil (alle Würzburg)
Kühlschrank		Bosch, Siemens
Laufkammer	Renner-Mini-Gel- Apparatus (horizontal)	Renner, Darmstadt
Leuchtkasten		Biotec Fisher
Magnetrührer	M21	GLW (Hartenstein)
Mikrowelle		Siemens
PAG-Elektrophoresegeräte	Multiphor II	
	Electrophoresis Unit	LKB/Pharmacia, Freiburg
	Macrodrive 5	
	Constant Power Supply	LKB/Pharmacia, Freiburg
	Multitemp II	
	Thermostatic Circulator	LKB/Pharmacia, Freiburg
pH-Meter	pH 526	WTW (Hartenstein)
Photometer	Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	verschiedene Größen	Abimed, Langenfeld
Schüttler	Vortex Genie 2	Bender+Hobein, Zürich
	Reamix 2789	Hartenstein
Sequenzierer	310 Genetic Analyzer	ABI, Weiterstadt
Sofortbildkamera	CRT / TA 40, mit	ORMAF / Padua-Italien
	Polaroidaufsatz und Electrophoresis hood GH10	
Taumelrotator, horizontal	Polymax 2040	Heidolph (Hartenstein)

Geräteart	Typ-Bezeichnung	Hersteller (Vertreiber)
Taumelrotator, vertikal	RT 20	CAT (Klein)
Thermocycler	Personal cycler	Biometra, Göttingen
Tischwaage	basic	Sartorius (Hartenstein)
UV-Lampe	UV-Transilluminator	UVP Inc. (Hartenstein)
Wärmeschrank	B30	Memmert (Hartenstein)
Wasserbad, klein	B	LAUDA (Hartenstein)
Wasserbad, groß	1083	GFL (Hartenstein)
Zentrifuge, gekühlt	Biofuge 17RS	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Mikroliter	Hettich, Tuttlingen
	Mikro 24-48	Hettich, Tuttlingen

2.1.4 Probenmaterial

Die in der Arbeit verwendeten Blutspuren unterschiedlicher Tierarten wurden freundlicherweise von verschiedenen tierärztlichen Einrichtungen und Zoologischen Gärten zur Verfügung gestellt. Die Proben wurden auf Leinenlappchen gebracht, getrocknet und in dieser Form weiter verarbeitet bzw. gelagert.

Humane Blutproben wurden aus Institutsbeständen bzw. der laufenden Routinearbeit entnommen.

Mundschleimhautabstriche wurden von freiwilligen Probanden gewonnen.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion aus Spurenmaterial mittels Chelex-100

(Walsh et al. 1991)

Diese Extraktionsmethode eignet sich sowohl für Blutspuren als auch für Mundschleimhautabstriche, Spermaspuren und andere Gewebearten (Teile von Insekten, Pflanzen).

Die Chelex-Extraktion ist die am häufigsten verwendete Methode zur DNA-Isolierung im Bereich der Rechtsmedizin. Dies begründet sich in der besonders guten Praktikabilität, der hohen Effektivität und den niedrigen Kosten.

Chelex bindet bivalente Ionen (z.B. Ca^{2+} , Mg^{2+}), was zur Inaktivierung von Enzymen und Strukturkomponenten der Zelle führt. Diese wird dadurch destabilisiert. Der endgültige Abbau der Zellanteile wird durch Zugabe von Proteinase K (10 mg/ml) erreicht. Die Zelle wird lysiert und die DNA freigesetzt. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgt durch nachfolgendes Abkochen. Blicke das Enzym aktiv, hätte dies die Zerstörung der Taq-Polymerase während der PCR zur Folge.

Von den auf Leinenlappchen getrockneten Blutspuren wird ein etwa 0,2 x 0,4 cm großes Stück eingesetzt. Zur DNA-Isolierung aus Mundschleimhautabstrichen wird ein entsprechend großes Stück aus dem verwendeten Probenträger ausgeschnitten. Bei Einsatz von nativem Tier- und Pflanzengewebe wird die Isolierung mit einem Gewebeteil in ähnlicher Größe begonnen.

Nach mehrmaliger Zerteilung wird der Probenträger zur Entfernung von Verunreinigungen mit 1 ml sterilem Aqua bidest. in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß mit Schraubdeckel gegeben. Zur Untersuchung von Speicherspuren werden nur 50 µl steriles Aqua bidest. zugegeben, damit sich der Probenträger voll saugt und die Chelex-Reaktion später nicht beeinträchtigt wird.

Nach einer mindestens 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und mehrmaligem gründlichen Durchmischen wird 2-3 min zentrifugiert (10.000 – 15.000 g, RT). Der

Überstand wird bis auf ca. 50 µl vorsichtig abpipetiert und verworfen. Der Spureträger verbleibt im Sediment.

Nach Zugabe von 150 µl 5 % Chelex-100-Suspension und 10 µl Proteinase K (10 mg/ml) – bei Sperma zusätzlich 7 µl 1 M DTT - wird die Probe für 30 min bei 56 °C inkubiert. Bei alten Spuren findet die Inkubation bei 37 °C über Nacht statt.

Hiernach wird der Ansatz stark geschüttelt und anschließend 8 min im Wasserbad gekocht. Nach erneutem gründlichen Durchmischen und 2-3 min Zentrifugieren bei 10.000 – 15.000 g und Raumtemperatur kann der Überstand direkt zur Amplifikation eingesetzt oder weiter aufgereinigt werden.

Die Proben werden bei 4 °C oder tiefgefroren aufbewahrt.

2.2.2 DNA-Extraktion aus Vollblut (Miller et al. 1988)

Die Methode der DNA-Extraktion aus Vollblut von Miller et al. beruht auf dem Prinzip der Kältehämolysen kernfreier Erythrozyten und nachfolgender Salzfällung der DNA aus Leukozyten.

Puffer :	Erythrozyten - Lysepuffer	150 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 0,1 mM EDTA (pH 7,4)
	TEN-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA (pH 8,0) 150 mM NaCl
	PBS	2,7 mM KCl 137 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ PO ₄ (pH 7,4)
	TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA (pH 8,0)

1-5 ml einer EDTA-Vollblutprobe werden mit 4 °C kaltem Erythrozyten-Lysepuffer auf 40 ml aufgefüllt und für 15 min auf Eis gelegt. Ziel hierbei ist die Lyse der Erythrozytenmembran mit nachfolgender Auswaschung des Hämoglobins der Erythrozytenmembran, um eine Inhibition enzymatischer Reaktionen zu vermeiden. Anschließend werden die Leukozyten 10 min bei 4 °C und 1.000 g abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wird das Sediment mit 20 ml kaltem Lysepuffer resuspendiert. Die Suspension wird 10 min bei 4 °C gelagert und dann wiederum zentrifugiert (10 min, 4 °C, 1.000 g). Der Überstand wird erneut verworfen. Die Probe wird nun zweimal mit 4 °C kaltem PBS gewaschen. Nach 10 minütigem Zentrifugieren bei 4 °C und 1.000 g wird das Sediment mit 3 ml TEN-Puffer resuspendiert. Es werden 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 30 µl SDS 20 % hinzugegeben. Die Mischung wird über Nacht zur vollständigen Lyse der Zellen bei 37 °C inkubiert.

Am Folgetag werden 1,4 ml gesättigtes NaCl 6 M (steril) hinzugegeben. Nach 15 Sekunden kräftigen Schüttelns wird 20 min bei 4.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert.

Der Überstand wird in ein neues Röhrchen überführt. Es werden 2,5 Volumina Ethanol (100 %) hinzugegeben und per Hand leicht durchmischt bis die DNA fädig ausfällt. Das DNA-Gespinnst wird mittels eines Glashakens entnommen und in Ethanol (70 %) getaucht.

Die DNA wird luftgetrocknet und anschließend über Nacht bei 4 °C in TE-Puffer gelöst. Die Proben werden tiefgefroren oder bei 4 °C gelagert.

2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion an Blutspuren (Hoff-Olsen P. et al. 1999)

Grundlage der Phenol-Chloroform-Extraktion, die sich besonders bei problematischen Blutspuren, Knochen und anderen Geweben bewährt hat, ist die Unterteilung eines verunreinigten Gemisches in zwei Phasen, eine wässrige und eine lipophile.

Die wasserlösliche DNA reichert sich in der hydrophilen Phase an, während sich aliphatische Proteine in der Interphase und lipophile Störstoffe in der organischen Phenolphase sammeln.

Puffer:	Extraktionspuffer	10 mM Tris-HCl pH 7,6 10 mM EDTA 100 mM NaCl
	TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0

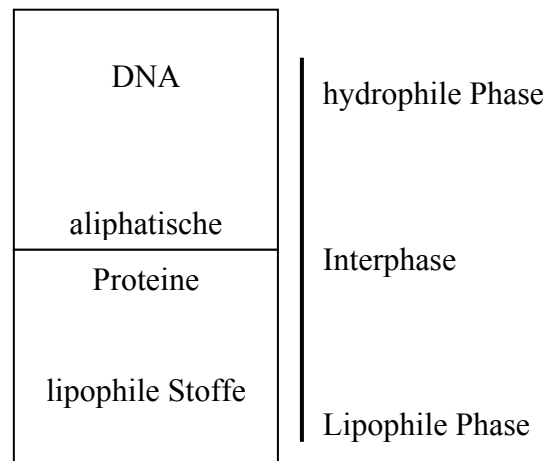


Abb. 2.1 : Grundlage der Phenol-Chloroform-Extraktion – Auftrennung einer Lösung in hydrophile und lipophile Phase

Eine etwa 1 cm² große Blutspur (bzw. 100 mg Gewebe) wird mehrmals zerteilt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben.

Hierzu werden

- 1) 500 µl Extraktionspuffer
- 2) 50 µl Proteinase K (10 mg/ml)
- 3) 20 µl 1 M DTT
- 4) 50 µl SDS 20 %

pipettiert. Der Ansatz wird nach kurzem Durchmischen über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Nach Zugabe von Phenol-Chloroform in etwa gleicher Menge wird 5 min per Hand geschüttelt und dann bei 12.000 g 7 min bei 15 – 18 °C zentrifugiert.

Die obere wässrige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals Phenol- Chloroform in gleicher Menge zugegeben. Abermals wird 5 min geschüttelt,

7 min abzentrifugiert und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Bestimmung des Volumens werden

- 1) $\frac{1}{10}$ Volumen 3 M Natriumacetat (4 °C)
- 2) 1 µl Glycogen (20 mg/ml) (4 °C)
- 3) 2 Volumen Ethanol abs.

hinzugegeben und der Ansatz manuell gemischt. Die DNA wird über Nacht bei -20 °C ausgefällt.

Nach 30minütigem Zentrifugieren bei 4 °C und 12.000 g wird vorsichtig dekantiert. Im Reaktionsgefäß befindet sich nun ein DNA-Pellet, welches mittels Zugabe von 500 µl eiskaltem 70 % Ethanol gewaschen wird. Die Proben werden 5 min bei 4 °C inkubiert und dann 10 min bei 4 °C abzentrifugiert.

Nach vorsichtigem Dekantieren wird das Pellet im Vakuum getrocknet und dann in 50 µl TE-Puffer über Nacht bei 4 °C gelöst.

2.2.4 DNA-Isolierung und Aufreinigung mittels dem QIAamp Blood kit

Die Isolierung und Aufreinigung wird nach den Protokollen für getrocknetes Blut und für Vollblut aus dem Handbuch des Herstellers für QIAamp Blood kits und QIAamp Tissue kits durchgeführt.

Ein etwa 0,5 x 0,5 cm großes Stück Leinen mit getrocknetem Blut wird mit 180 µl PBS in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Hiernach werden 25 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 200 µl Puffer (Buffer A1) hinzugegeben und der Ansatz sofort für ca. 15 Sekunden auf einem Vortex durchmischt bis eine homogene Lösung entsteht.

Diese wird für 10 min bei 70 °C im Brutschrank inkubiert, anschließend kurz abzentrifugiert und der Überstand verworfen.

Nach Zugabe von 210 µl 96-100 % Ethanol wird erneut maschinell durchmischt.

Die Lösung wird vorsichtig auf eine QIAamp-Spinsäule pipettiert, welche in einem 2 ml Auffanggefäß (Collection tube) steht. Nach 1minütiger Zentrifugation bei 6.000 g und

Raumtemperatur wird das Filtrat verworfen und die QIAamp-Spinsäule in ein neues Auffanggefäß gestellt.

500 µl Puffer (Buffer AW) werden hinzugegeben und wieder 1 min (6.000 g, RT) zentrifugiert. Das Filtrat wird erneut verworfen. Im folgenden Schritt werden nochmals 500 µl Puffer (Buffer AW) eingesetzt, diesmal aber 3 Minuten bei 12.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert, um letzte Ethanolreste aus der Säule zu entfernen. Nach Verwerfen des Auffanggefäßes mitsamt Filtrat wird ein neues Reaktionsgefäß verwendet, in welches die QIAamp-Spinsäule gesetzt wird.

Zur Elution der DNA werden 200 µl 70 °C heißer Puffer (Buffer AE) hinzugegeben und bei Raumtemperatur 1 min lang inkubiert. Nach 1 min Zentrifugation (6.000 g, RT) kann die Lösung direkt zur Amplifikation eingesetzt, oder bei 4 °C gelagert, werden.

2.2.5 Aufreinigung von DNA mittels Diatomeen

(Günther et al. 1995)

Wenn die DNA aus der Chelex- bzw. Phenol-Chloroform-Isolierung nicht direkt amplifizierbar ist, kann die Aufreinigung mittels Diatomeenerde nach Günther erfolgen. Bei der DNA-Isolierung verbleiben Abbauprodukte und PCR-Hemmstoffe (z.B. Hämoglobin) in der Probe, welche durch die Aufreinigung mittels Diatomeen entfernt werden können.

Lösungen :	Guanidinthiocyanat-Puffer (L6)	100 ml 0,1 M Tris-HCl (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 H ₂ O
	Diatomeen	200 g/l Diatomeenerde (Sigma)
		10 ml/l konz. HCl

Zur Aufreinigung werden 900 µl L6-Puffer, 50 µl Diatomeen-Lösung und 100 µl Chelex-Suspension bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert. Während dieser Zeit wird der Ansatz mehrmals per Hand geschüttelt.

Mittels einer 2 ml-Einwegspritze (Primo) wird der Ansatz durch eine Zentrifugenfritte (Wizard Minicolumns; Promega, Mannheim) in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß gedrückt. Die an der Diatomeenerde haftende DNA verbleibt im Filter, der zurückbleibende Ansatz wird verworfen.

Der Filter wird nun zweimal mit je 2 ml 80 % Isopropanol gewaschen. Hierzu wird ebenfalls eine 2 ml-Einwegspritze eingesetzt. Nach dem Waschvorgang wird jeweils 1 min bei 6.000 U/min und Raumtemperatur zentrifugiert, um den Filter vollständig vom Alkohol zu reinigen. Das Zentrifugat wird verworfen.

Die DNA wird durch Zugabe von 40 µl sterilem Aqua bidest. und 12minütiger Inkubation bei Raumtemperatur eluiert. Die daraus resultierende DNA-Lösung wird bei 6.000 U/min für zwei Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Hiernach können Filter und Diatomeenerde verworfen werden.

Die aufgereinigte Lösung kann direkt zur Amplifikation eingesetzt werden. Die Proben werden bei 4 °C oder tiefgefroren aufbewahrt.

2.2.6 Random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR)

Allgemeine Informationen und Erläuterungen zum Prinzip und dem grundlegenden Ablauf einer PCR bzw. RAPD-PCR sind in Kapitel 1.2 dargestellt.

Vor dem Start der PCR wird ein Reaktionsansatz hergestellt. Hierzu werden folgende Komponenten in ein dünnwandiges 0,6 ml PCR-Reaktionsgefäß pipettiert:

- 10x PCR Puffer II 5 µl
- MgCl₂ 25 mM 5 µl
- dNTPs 2 µl
- Primer 40 ng/µl 2 µl
- Taq-Polymerase 5 U/µl 0,4 µl
- DNA-Probe 1 – 5 µl

Der Reaktionsansatz wird bis auf 50 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt. Am Schluss wird dieser mit zwei Tropfen Mineralöl überschichtet, um eine Kondensation des Ansatzes

zu verhindern. Das Reaktionsgefäß wird in die dafür vorgesehene Vertiefung des Thermocyclers gesetzt und die PCR gestartet.

2.2.7 Gelelektrophorese

2.2.7.1 Prinzip der Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Amplifizierungsprodukte erfolgt mittels Gelelektrophorese. Elektrophorese ist die Wanderung geladener Partikel im elektrischen Feld.

Grundlage hierfür ist die negative Nettoladung von Nukleinsäuren, die in etwa proportional zur Molekülgröße ist. Diese kommt durch die zwischen den Nukleotiden befindlichen Phosphatbrücken (PO_4^-) zustande. Aufgrund der negativen Ladung wandern Nukleinsäuren im elektrischen Feld in Richtung des positiv geladenen Pols, der Anode.

Wird ein elektrisches Feld an ein Gel angelegt, wandern die aufgetragenen Moleküle durch das Gel hindurch in Richtung Anode. Da die hier verwendeten Polyacrylamidgele eine Art Molekülsieb mit definierter aber variierbarer Porengröße darstellen, trennen sich die Moleküle in Abhängigkeit von ihrer Größe auf. Kleine Moleküle wandern schneller durch die Poren des Gels und liegen nach Abschluss der Elektrophorese näher am positiv geladenen Pol als große Moleküle.

2.2.7.2 Horizontale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Diese niedrigauflösende Elektrophorese-Technik eignet sich besonders gut zur Erfolgskontrolle einer durchgeführten Amplifikation.

Für die Herstellung eines Polyacrylamid-Gels werden zwei 12,5 x 26 cm große, gründlich mit Wasser und Alkohol gereinigte Glasplatten bereitgelegt. Eine hiervon ist seitlich mit ca. 1 cm breiten Abstandshaltern beklebt. Auf die nicht beklebte, leicht mit Wasser benetzte Platte wird ein Gelfilm (GelBond PAG-Film, Amersham/Pharmacia, Freiburg) gelegt, wobei darauf zu achten ist, dass dessen hydrophile Seite nach oben

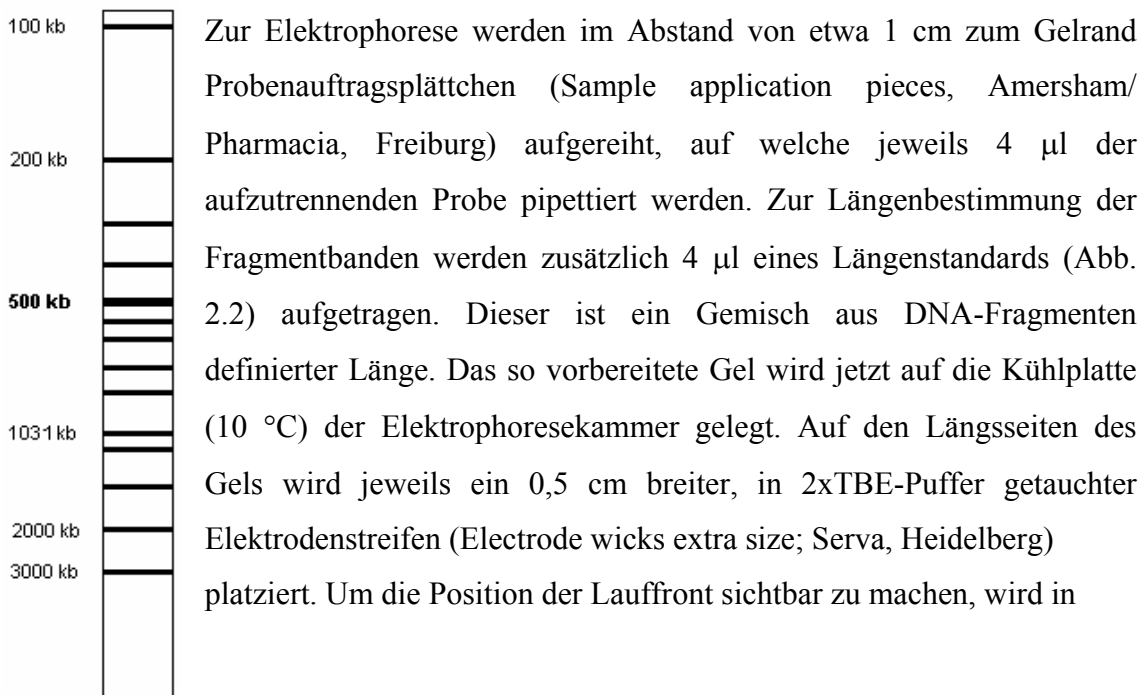
zeigt, also die hydrophobe Seite auf der Glasplatte zu liegen kommt. Die beklebte Platte wird jetzt auf den Gelfilm gesetzt. Der frisch vorbereitete Gelansatz wird mittels einer 50 ml-Spritze in den Raum zwischen den Platten gegeben.

Die Polymerisation des Gels ist nach etwa einer Stunde abgeschlossen, so dass dieses nach Entfernung der Glasplatten zur Elektrophorese eingesetzt werden kann. Die Lagerung der fertigen Gele erfolgt bei 4 °C.

Ansatz für ein 5%iges Polyacrylamid-Gel :

- 16 ml H₂O
- 2,1 ml 10x TBE-Puffer (890 mM Tris-Borat; 25 mM EDTA, pH 8,0)
- 2,7 ml Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 19:1 (Serva, Heidelberg)
- 200 µl APS (Amersham/Pharmacia, Freiburg)
- 1,5 µl TEMED (Serva, Heidelberg)

Der Vernetzungsgrad des Gels, also die Größe der Poren des Molekülsiebs, richtet sich nach dem Verhältnis Acrylamid/Bisacrylamid. Die Dichte des Gels ist abhängig von der Acrylamid-Konzentration. Beide Größen sind also variabel.



LD Abb. 2.2: Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus, MBI Fermentas

Höhe der Proben jeweils rechts und links ein Tropfen Agarosegel-Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylen Cyanol, 25 % Ficoll 400) aufgetragen. Die Platinelektroden werden nun so positioniert, dass sie genau auf den beiden Elektrodenstreifen zu liegen kommen. Die Elektrophorese wird mit 40 mA - bei kleineren Gelen proportional weniger - gestartet und so lange durchgeführt, bis die sichtbar gemachte Lauffront die Anode erreicht hat.

2.2.7.3 Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Reicht die niedrige Auflösung der PAGE nicht aus, kann die Harnstoff-PAGE eingesetzt werden, da hier eine weitaus bessere Längenzuordnung der Fragmentbanden möglich ist. Die bessere Auftrennung kommt durch den DNA-denaturierenden Effekt des Harnstoffs, sowie die verlängerte Laufstrecke zustande.

Die Methodik der Herstellung und Ausführung entspricht der der PAGE, jedoch werden jeweils 8 µl der aufzutrennenden Proben aufgetragen.

Ansatz für ein 6%iges Harnstoff-Polyacrylamid-Gel :

- 2,1 ml 10x TBE-Puffer
- 3,2 ml Acrylamid/Bisacrylamid im Verhältnis 19:1
- 8,8 g Harnstoff (Urea)
- 87 µl APS
- 8,7 µl TEMED
- ad 21 ml Aqua dest.

2.2.7.4 Silberimprägnierung (Allen et al. 1989)

Die Silberimprägnierung dient der Sichtbarmachung der aufgetrennten Amplifizierungsprodukte nach Abschluss der Elektrophorese.

Alle folgenden Arbeitsschritte werden bei kontinuierlichem Schütteln in einer Glas- oder Kunststoffschale auf einem horizontalen Taumelschüttler durchgeführt.

Nach Fixierung des Gels mittels 1 % Salpetersäure (HNO_3) für 5 min wird ca. 10 sec mit Aqua dest. gespült. Zur Imprägnierung wird die frisch angesetzte 12 mM Silbernitrat-Lösung (AgNO_3) hinzugegeben, in welcher das Gel für 12 min verbleibt. Hiernach wird wiederum mit Aqua dest. gespült. Die Reduktion erfolgt durch Zugabe der Entwicklerlösung (0,28 M NaH_2CO_3 (wasserfrei); 0,019 % Formalin), welche mehrmals gewechselt wird. Wenn sich die Banden deutlich darstellen, wird der Reduktionsprozess durch Zugabe von 10 % Essigsäure (CH_3COOH) abgestoppt. Zur dauerhaften Aufbewahrung wird das Gel nach gründlichem Spülen mit Aqua dest. für 5 min in 5 % Glycerol gegeben und dann über Nacht bei 80 °C im Wärmeschrank getrocknet. Harnstoff-Gele werden nur etwa eine halbe Stunde im Wärmeschrank gelagert und dann luftgetrocknet.

2.2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarosegele müssen vor Gebrauch frisch zubereitet werden. Für ein 1,5%iges Gel werden hierzu 675 mg Agarose NA (Amersham/Pharmacia, Freiburg) und 45 ml 1xTBE-Puffer (2 %: 900mg Agarose + 45 ml 1xTBE-Puffer) vermischt und dann mehrmals in der Mikrowelle aufgekocht, bis eine klare Lösung entsteht.

Nach kurzem Abkühlen der Lösung werden die randbegrenzenden Spacer des Gelträgers mittels einer Pasteurpipette abgedichtet. Der Agarose-Lösung werden 3 µl Ethidium-Bromid (10 mg/ml; Life Technologies) zugegeben und diese dann in den Gelträger eingegossen. Nach Einfügen eines 20 µl-Kammes zur Ausbildung der Probeneinsatztaschen wird das Gel zum Erhärten für 30 min bei 4 °C gelagert.

Zur Elektrophorese wird der Gelträger nach Entfernung der Spacer in die Laufkammer eingesetzt und 300 ml Ladepuffer hinzugefügt. Jetzt kann der Kamm einfach herausgezogen werden.

20 µl der aufzutrennenden Proben werden mit 4 µl Agarosegel-Probenpuffer (0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylen Cyanol, 25 % Ficoll 400) vermischt und dann 2 min bei Raumtemperatur und 12.000 g zentrifugiert. Hiervon werden jeweils 20 µl in die Geltaschen pipettiert.

Die Auftrennung erfolgt bei 80 V bis die farbige Bande des Probenpuffers, welche die Lauffront repräsentiert, die Hälfte der Strecke zurückgelegt hat.

Zur Darstellung der Banden wird das Gel aus dem Gelträger entfernt und auf eine UV-Lampe gelegt. Es kann zur Archivierung mit einer Sofortbildkamera fotografiert werden.

2.2.7.6 Hochauflösende Kapillarelektrophorese

Diese besonders sensitive Elektrophorese-Technik wird im automatischen Sequenzierer Genetic Analyzer ABI 310 von Applied Biosystems (siehe Abb. 2.3) durchgeführt.

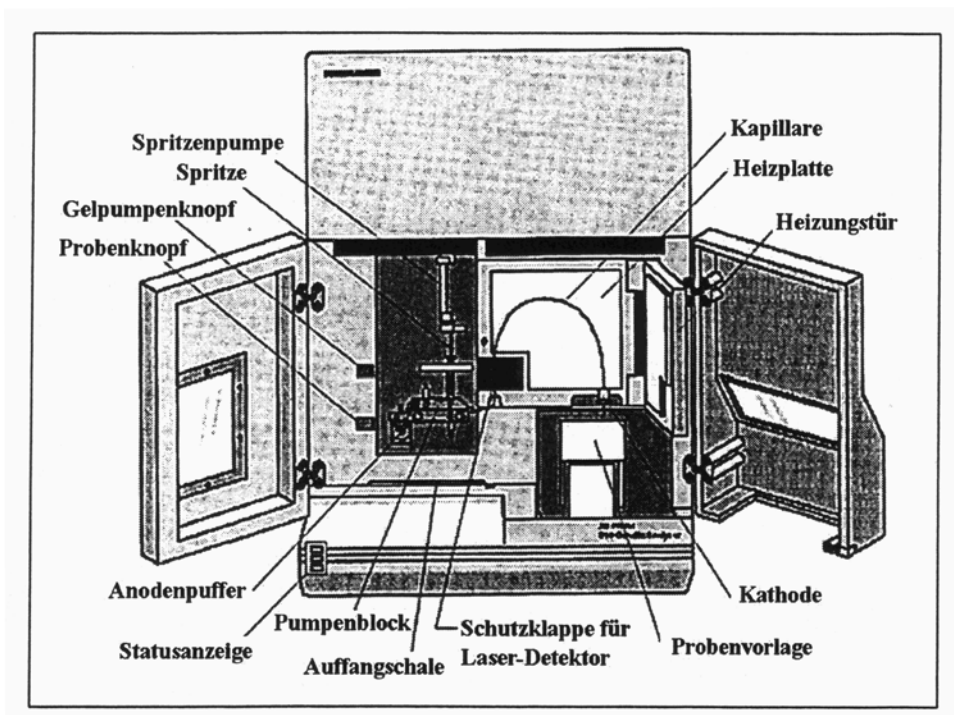


Abb. 2.3 : Schematische Darstellung des automatischen Sequenzierers (Jung, 2002)

Die DNA-Proben durchwandern hierbei eine polymergefüllte Kapillare ($\text{\O} 50 \mu\text{m}$, Trennstrecke 36 cm), in der die Fragmente der Größe nach aufgetrennt werden (siehe auch 2.2.7.1). Das hierfür verwendete Polymer wird für jede Analyse automatisch erneuert. Das Gerät führt die Kapillare unter Anlage einer Spannung kurz in das die DNA-Probe enthaltende Reaktionsgefäß ein. Hiernach wird diese gewaschen und in ein

Gefäß mit Kathodenpuffer getaucht. Die Dauer für die Auftrennung einer Probe wurde auf 45 Minuten eingestellt.

Am Ende dieser Kapillare befindet sich ein Quarz-Fenster. Hier werden die vorbeiwandernden Nukleinsäure-Fragmente von einem Laser angestrahlt. Fluoreszenzfarbstoffe, die über markierte Primer an der DNA gebunden sind, strahlen das Licht zurück, welches von Fotozellen absorbiert und in Datenmaterial umgewandelt wird. Diese Daten werden einem angeschlossenen Computer zur Auswertung übermittelt.

Bei der Fragmentlängenanalyse muss jeder Probe ein interner Längenstandard hinzugefügt werden, um eine Größenzuordnung der detektierten Fragmente zu ermöglichen.

Dieser Längenstandard muss für die Analyse anhand der vom Hersteller vorgegebenen Daten (siehe Abbildung 2.4) manuell definiert werden.

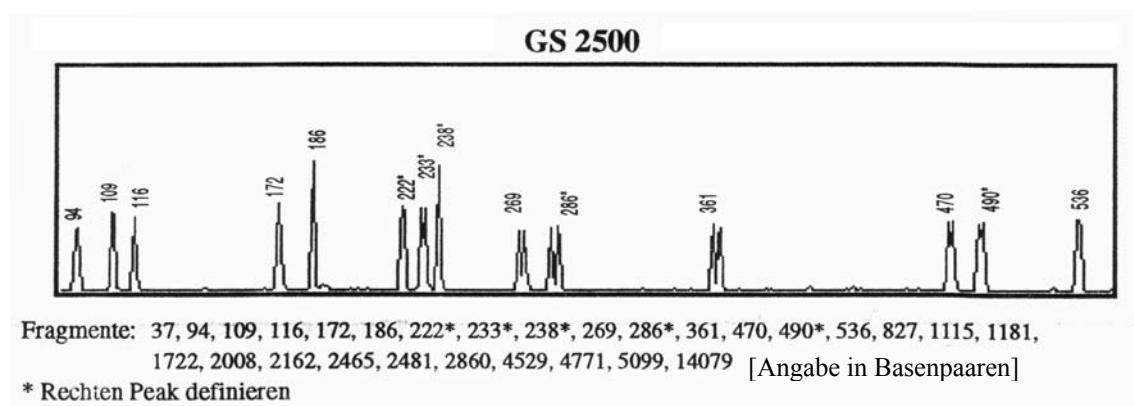


Abb. 2.4 : Definition des in dieser Arbeit verwendeten internen Längenstandards (GeneScan™-2500 Rox™ Size Standard; Applied Biosystems, Weiterstadt)

Vor dem Start einer Kapillarelektrophorese müssen die Proben speziell vorbereitet werden.

Um den DNA-Gehalt der Proben grob abschätzen zu können, wird eine horizontale PAGE (siehe 2.2.7.2) durchgeführt. In Abhängigkeit des DNA-Gehaltes, der sich in der Bandenstärke darstellt, werden 0,3 – 6 µl der Proben in ein Reaktionsgefäß (Genetic Analyser Probenröhrchen) pipettiert. Zusätzlich werden je Probe 12 µl deionisiertes Formamid (Sigma, Steinheim) und 0,5 µl interner Längenstandard zugegeben. Das Reaktionsgefäß wird anschließend mit einem Gummiseptum (Genetic Analyser Septa)

verschlossen. Zur Denaturierung werden die Proben bei 95 °C 2,5 min inkubiert. Nach Abschluss des Denaturierungsprozesses werden die Reaktionsgefäße in den Probenträger des automatischen Sequenzierers eingesetzt und die automatische Analyse gestartet.

Die Auswertung der vom automatischen Sequenzierer übermittelten Rohdaten erfolgt mit dem Programm GeneScan (Applied Biosystems, Weiterstadt). Dieses kann aus den eingehenden Daten Größe und Farbe der Fragmentbanden berechnen. Abbildung 2.5 zeigt beispielhaft eine mit GeneScan ausgewertete Blutspur (Mensch). Im Gegensatz zu den Gelbanden sind die Fragmente nun eindeutig in Qualität und Quantität zu bewerten.

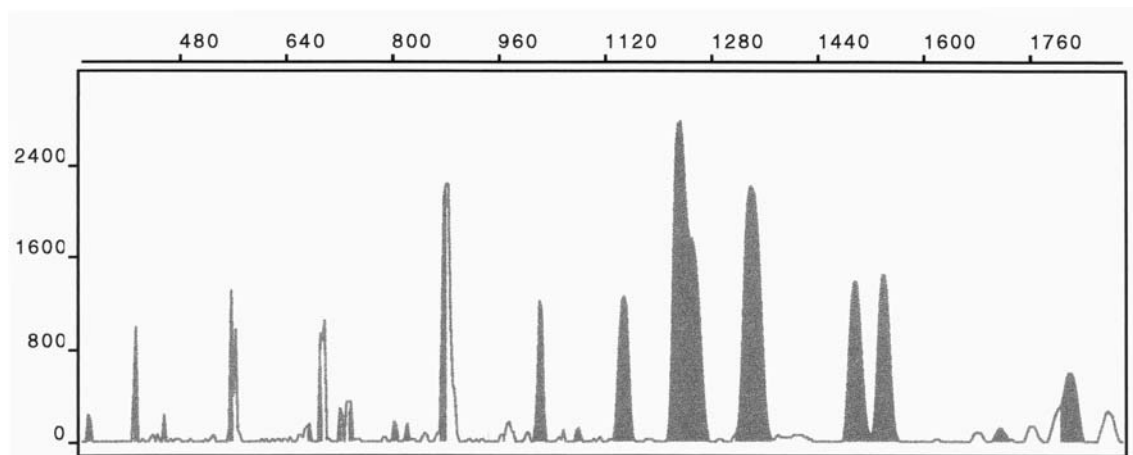


Abb. 2.5 : Beispielhafte Darstellung einer Probenauswertung mit dem Programm Gene Scan

Auf der y-Achse ist die Größe der Fragmentpeaks aufgetragen, welche die Signalstärke [rfu] der einzelnen Fragmente repräsentiert. Die x-Achse erlaubt die Zuordnung eines Fragmentes zu einem bp-Wert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA-Material

Die Aufgabe bestand zunächst in der Auswahl des sich für diese Arbeit am sinnvollsten darstellenden Verfahrens zur Isolierung und Aufreinigung von DNA. Hierbei musste neben der Effektivität im Erbringen von eindeutigen Ergebnissen auch auf ökonomisches Arbeiten geachtet werden.

Zur Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Spurenmaterial wurden vier Methoden getestet. Dies waren im Einzelnen:

- Chelex 100-Extraktion (Walsh et al. 1991)
- Phenol-Chloroform-Extraktion (Hoff-Olsen P. et al. 1999)
- Isolierung und Aufreinigung mittels dem QIAamp Blood kit (Qiagen)
- Aufreinigung mittels Diatomeen (Günther et al. 1995).

Am praktikabelsten stellte sich die Kombination aus Chelex 100-Extraktion (siehe Kapitel 2.2.1) und Aufreinigung mittels Diatomeen (siehe Kapitel 2.2.5) dar. Dies ist auch die Standardmethode am Institut für Rechtsmedizin in Würzburg bei Spurenfällen mit Blutantragungen vom Menschen. Die Ergebnisse waren größtenteils positiv, so konnte bei fast allen Blutspuren, Mundschleimhautabstrichen, Sperma und Haarwurzeln sowie Gewebeteilen von Tieren oder Pflanzen DNA isoliert werden. Des Weiteren zeichnet sich diese Methodik durch einfache Handhabung, niedrige Kosten und einen geringen Zeitaufwand aus.

Mittels der Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Kapitel 2.2.3) konnte ebenfalls DNA in ausreichender Menge isoliert werden. Es besteht jedoch ein erhöhter Zeitaufwand im Vergleich zur vorgenannten Chelex-100-Extraktion sowie eine gewisse Gesundheitsgefährdung durch giftige Inhaltsstoffe.

Die Isolierung und Aufreinigung mittels dem QIAamp Blood kit (siehe Kapitel 2.2.4) erbrachte vergleichbare Ergebnisse wie die beiden vorgenannten Extraktionsmethoden. Zwar besteht eine geringe Zeitersparnis gegenüber der Kombination Chelex100/Diatomeen, jedoch ergibt sich ein erheblich größerer Kostenaufwand.

Die Isolierung von DNA aus Vollblut wurde erfolgreich im Rahmen der Routinearbeit des Instituts nach der Methode von Miller et al. 1988 (siehe Kapitel 2.2.2) durchgeführt.

Nach Vergleich aller Variablen stellte sich die Kombination aus Chelex-100-Extraktion und DNA-Aufreinigung mittels Diatomeen als besonders effektiv und ökonomisch dar, weshalb diese Verfahren im weiteren Verlauf der Arbeit zur DNA-Extraktion aus Spurenmaterial eingesetzt wurden.

3.2 Random amplified polymorphic DNA-PCR

Die Aufgabe bestand in der Überführung der von Günther im Rahmen seiner Dissertation 1995 eingesetzten RAPD-PCR in die Routinearbeit des Instituts für Rechtsmedizin. Dies umfasste die Anpassung von Reaktionsbedingungen sowie die Austestung verschiedener Primer, wobei der am besten geeignete zur Anwendung kommen sollte.

Die Amplifikation wurde in Anlehnung an Günther nach Optimierung wie folgt durchgeführt:

- Initiale Denaturierung 10 min, 94 °C
- 40 Zyklen
 - (1) Denaturierung 1 min, 94 °C
 - (2) Primer-Anlagerung 1 min, 30 °C
 - (3) Extension 2 min, 72 °C
- Terminale Extension 45 min, 72 °C

Im Vergleich zur Vorlage wurde die initiale Denaturierung von 3 auf 10 Minuten verlängert. Die Zyklenanzahl wurde von 35 auf 40 erhöht und die terminale Extension von 10 auf 45 Minuten ausgedehnt.

Die optimale Konzentration der Komponenten des Reaktionsansatzes wurde durch Verdünnungsreihen ermittelt. Die bestmöglichen Ergebnisse wurden mit dem in Kapitel 2.2.6 angegebenen Ansatz erzielt.

Der Zusatz von Rinderserum (BSA, 160 ng/ μ l) erbrachte keinen messbaren Erfolg.

Die Einsatzmenge der Proben variierte je nach Beschaffenheit der Ausgangsspur.

Bei Mundschleimhautabstrichen und kräftigen bzw. materialstarken Blutspuren reichte der Einsatz von 1 μ l aufgereinigter DNA-Lösung, bei schwachen Blutspuren war der Einsatz von 5 μ l notwendig.

In Abbildung 3.2 ist eine PAGE dargestellt, welche das Amplifizierungsergebnis in Abhängigkeit vom in die PCR eingesetzten DNA-Material zeigt. Es wird deutlich, dass bei der hier zugrunde liegenden Blutspur eines Menschen der Einsatz von 1 μ l ausreichend ist.

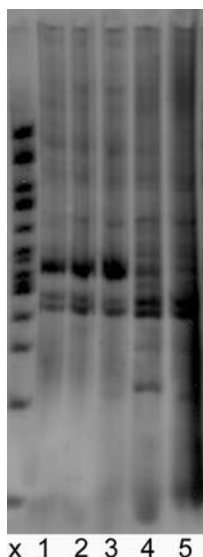


Abb. 3.1: PAGE nach Amplifikation nativer Blutspuren (x – 100 bp Leiter, 1-5 – Hundespuren)

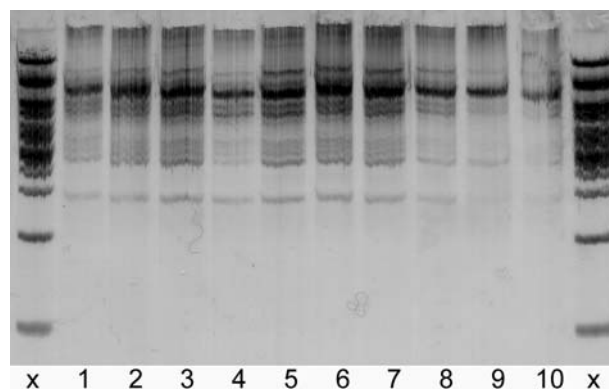


Abb. 3.2: PAGE, Einsatz verschiedener Mengen DNA-Material zur Amplifikation der Blutspur eines Menschen (x – 100 bp Leiter, 1 – 1 μ l, 2 – 2 μ l, ..., 10 – 10 μ l)

Der native Einsatz von Blutspuren in Form eines wenige Millimeter langen Fadens, welcher aus dem die Probe tragenden Leinenläppchen entnommen und direkt zur Amplifikation eingesetzt wurde, erbrachte nur in Einzelfällen (5 von insgesamt 50 getesteten Spuren) ein verwertbares Ergebnis (siehe Abb. 3.1). Diese Technik wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

Zu Anfang der Arbeit kamen vier Primer (siehe auch Kapitel 2.1.2) zum Einsatz. Die Primer I-III erbrachten bei Spuren menschlicher Herkunft alle ein sehr gutes Ergebnis. Die eindeutige Darstellung und Zuordnung von Spuren verschiedener Tiere gelang nur mit Primer I. Die unterscheidbare Darstellung von Pflanzenspuren war nur mit Primer II möglich.

Primer IV wurde aufgrund schwacher Ergebnisse in allen Bereichen außer Acht gelassen.

Abbildung 3.6 in Kapitel 3.4 zeigt vergleichend das aus der Amplifikation menschlicher Blutspuren resultierende Fragmentmuster der Primer I-III.

Primer I	Menschen (Blut, Mundschleimhautabstriche), Tiere (Blut, Mundschleimhautabstriche, Gewebe)
Primer II	Menschen (Blut, Mundschleimhautabstriche), Pflanzen
Primer III	Menschen (Blut, Mundschleimhautabstriche)
Primer IV	-

Tab. 3.1: Übersicht der erfolgreich getesteten Spurenarten in Zuordnung zu den entsprechenden Primern

Allgemein ist festzustellen, dass die Menge der entstandenen PCR-Produkte bei Einsatz unmarkierter Primer weitaus höher ist als bei Einsatz farbmarkierter Primer. Dies zeigte sich in der primär nach der PCR durchgeführten horizontalen Polyacrylamidgelelektrophorese. Stärke und Anzahl der Banden sind deutlich ausgeprägter (siehe Abb. 3.3).

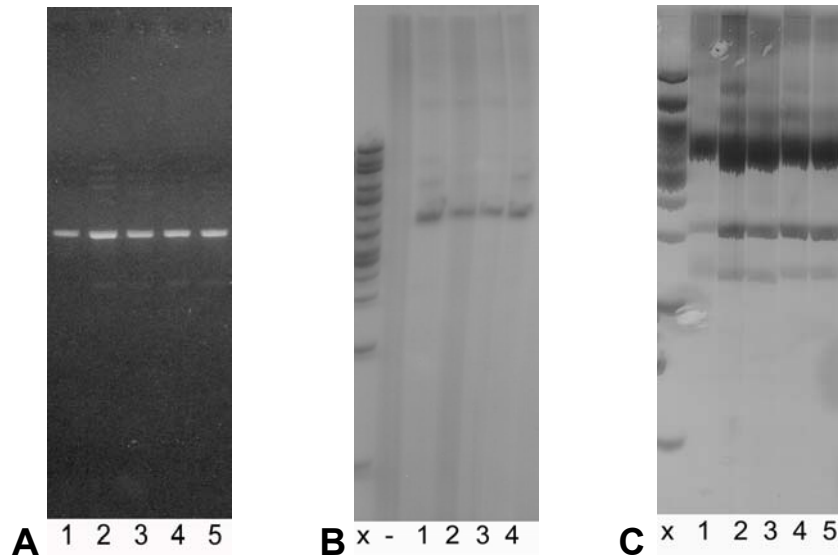


Abb. 3.3: Darstellung der Diskrepanz des Fragmentmusters bzw. der Menge der PCR-Produkte nach nicht markierter (C) und nach FAM-markierter (A, B) Amplifikation
A: Agarosegel, 1-5 - Hundespuren, Primer FAM-markiert;
B: PAGE, x – 100 bp Leiter, 1-4 – Hundespuren, Primer FAM-markiert;
C: PAGE, x – 100 bp Leiter, 1-5 – Hundespuren, Primer nicht markiert

3.3 Darstellung der Amplifizierungsprodukte

Die Produkte aus der PCR wurden primär mittels der horizontalen Polyacrylamid-gelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.7.2) dargestellt.

Im Rahmen der Routinearbeit wird die horizontale PAGE normalerweise zur Erfolgskontrolle einer PCR sowie zur Abschätzung der DNA-Menge im PCR-Produkt eingesetzt. Sofern eine Vergleichsprobe vorhanden ist, besteht jedoch die Möglichkeit der direkten Spezieszuordnung mittels der PAGE. Abbildung 3.4 zeigt einen Vergleich verschiedener Tierarten. Alle hier dargestellten spurenverursachenden Spezies zeigen ein unterschiedliches Bandenmuster. Abbildung 3.41 (Kapitel 3.5.7) zeigt eine horizontale PAGE mit paarweisem Auftrag einiger Spezies, welche die Umsetzbarkeit der direkten Speziesidentifikation ebenfalls veranschaulicht.



Abb. 3.4: horizontale PAGE,
Übersicht verschiedener
Spezies

- | | |
|----|-----------------------|
| x | 100 bp-Leiter |
| 1 | Hund |
| 2 | Katze |
| 3 | Schwein |
| 4 | Schwarzwild |
| 5 | Rind |
| 6 | Reh |
| 7 | Pferd |
| 8 | Pony |
| 9 | Esel |
| 10 | Weißschulterkapuziner |
| 11 | Sumatra Orang-Utan |
| 12 | Mensch |

In gleicher Weise ist die Speziesbestimmung auch mittels Harnstoff-PAGE (siehe Kapitel 2.2.7.3) und Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.2.7.5) möglich.

Die Harnstoff-PAGE zeigt aufgrund der längeren Laufstrecke im Bereich größerer DNA-Fragmente eine bessere Auftrennung als die PAGE, weshalb eine genauere Zuordnung der Fragmentgrößen möglich ist (siehe Kapitel 3.4.1, Abb. 3.8).

Gleiches gilt für die Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 3.5.2, Abb. 3.18). Hier ist die Trennung der einzelnen Fragmentbanden besonders deutlich, was ebenfalls zu einer Vereinfachung der Bandenzuordnung führt.

Die Auswertung und Darstellung der untersuchten Spuren mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese im automatischen Sequenzierer (siehe Kapitel 2.2.7.6) stellt den Kern der Arbeit dar.

Die mit der Software GeneScan erstellten Fragmentmuster wurden interpretiert und die gemessenen Daten in vergleichende Tabellen und Diagramme eingefügt.

Bei der Darstellung von GeneScan-Diagrammen wurde auf die Beschriftung der y-Achse, also die Signalstärke repräsentierende Größe [rfu] der Fragmente, verzichtet. Dies begründet sich in der Erkenntnis, dass bei mehrfacher Untersuchung ein und derselben Probe zum Teil erhebliche Unterschiede in der Signalstärke einzelner Banden festzustellen sind. Abbildung 3.5 verdeutlicht dies.

Bei Betrachtung des Diagramms fällt auf, dass die sich entsprechenden Fragmente zwar unterschiedliche Signalstärken aufweisen, die Relation der verschiedenen Fragmente zueinander jedoch sehr ähnlich ist. Aus diesem Grund ist ein direkter Vergleich einzelner Diagramme ohne Berücksichtigung der Fragmenthäufigkeit bzw. Signalstärke möglich.

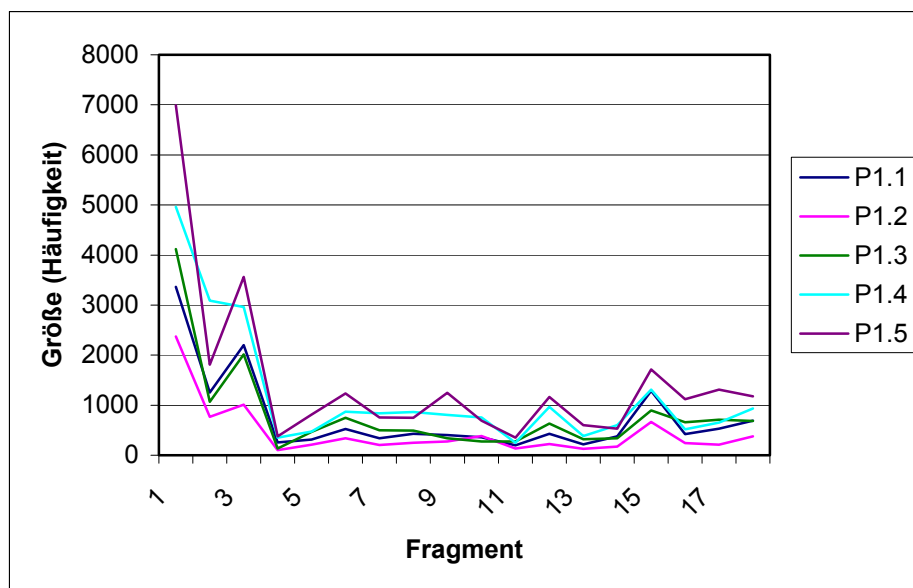


Abb. 3.5: Fünfmalige Untersuchung einer identischen Blutspur (siehe Kapitel 3.4.2, Tabelle 3.8 Primer II 1.1 – 1.5) Vergleich der Signalstärke identischer Fragmente

Fragmente mit nur geringer Signalstärke werden durch die Software nicht erkannt. Diese werden im weiteren Verlauf, sofern sie relevant sind, als nicht definierte Fragmente bezeichnet.

Bei Auswertung der Tierblutspuren fällt auf, dass nicht bei jeder Spur alle zu erwartenden Fragmente vorhanden sind. Hier zeigt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Signalstärke eines Fragmentes innerhalb einer Probe und der Häufigkeit dieses Fragmentes innerhalb aller untersuchten Proben der entsprechenden Tierart.

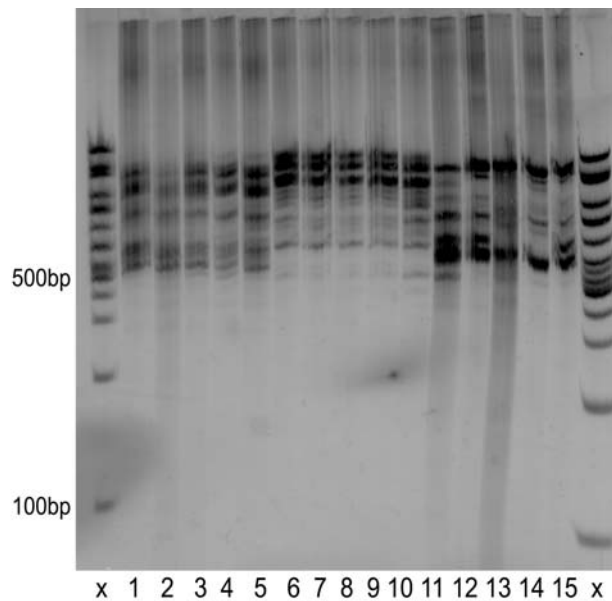
Wie in Kapitel 2.2.7.6 dargestellt, werden die Fragmentgrößen nach manueller Definition eines internen Standards automatisch zugeordnet. Dieser Vorgang erwies sich als problematisch und fehlerbehaftet. So war die manuelle Zuordnung der Standardpeaks vor allem im Bereich > 1.000 bp nicht immer eindeutig möglich. Hieraus resultierte in Einzelfällen eine Längenabweichung eigentlich gleich großer Fragmente. Ab einer Länge von etwa 1.700 bp mussten vorhandene Fragmente bei der Datenerfassung außer Acht gelassen werden, da neben dem gehäuften Auftreten von Artefakten die Längenzuordnung in diesem Bereich besonders fehlerhaft war.

3.4 Untersuchung von Spuren menschlicher Herkunft

Die wichtigsten Spezies im Rahmen rechtsmedizinischer Untersuchungen ist der Mensch, weshalb primär ein für den Mensch repräsentatives Fragmentmuster herausgearbeitet werden sollte.

Die DNA aller untersuchter Spuren menschlicher Herkunft wurde mittels Chelex-100 extrahiert (siehe Kap. 2.2.1). Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung mittels Diatomeen (siehe Kap. 2.2.5).

Bei Einsatz von Vollblut erfolgte die DNA-Isolierung nach der Methode von Miller et al. (siehe Kap. 2.2.2). Zur Amplifikation wurden für die Darstellung im Gel unmarkierte Primer, für die Darstellung mit Hilfe der Kapillarelektrophorese FAM-markierte Primer eingesetzt.



A

Abb. 3.6: PAGE – Gegenüberstellung der Amplifizierungsergebnisse von Primer I-III (Blutspuren verschiedener Menschen)
x – 100 bp-Leiter, 1-5 – Primer II,
6-10 – Primer III, 11-15 – Primer I

Zur Untersuchung von Spuren menschlicher Herkunft kamen drei Primer zum Einsatz (siehe auch Kapitel 2.1.2 und 3.2). Eine vergleichende Übersicht der Amplifizierungsergebnisse von Primer I, II und III zeigt die in Abbildung 3.6 dargestellte Polyacrylamidgelelektrophorese.

3.4.1 Primer I

Bei Amplifizierung von Spuren menschlicher Herkunft mit dem FAM-markierten Primer I und nachfolgender Kapillarelektrophorese ergibt sich das in Abbildung 3.9

oder 3.10 dargestellte Fragmentmuster. Hierbei stellen sich Fragmente mit einer Größe von 494 bp (1), 558 bp (2), 587 bp (3), 710 bp (4), 727 bp (5), 810 bp (6), 863 bp (7), 1068 bp (8) und 1.593 bp (9) dar. Das Ergebnis ist unabhängig von der Art der Spur (Blut, Mundschleimhautabstrich, Sperma, Haarwurzel) immer gleich. Es fällt jedoch auf, dass die mit (4) und (5) bezeichneten Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von 711 bp und 727 bp (bei Einbeziehung aller untersuchter Spuren) nicht immer vorhanden sind. 47,5 % der untersuchten Blutspuren bzw. 60 % der Mundschleimhautabstriche weisen die Fragmente bei 711 und 727 bp auf.

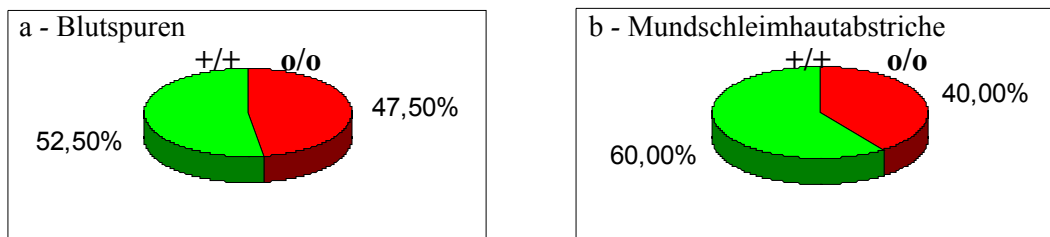


Abb. 3.7: Häufigkeitsverteilung der Fragmente 711 und 727 bp unter Einbeziehung aller untersuchter Spuren (a Blutspuren; b Mundschleimhautabstriche)
o/o Fragmente 711/727 nicht vorhanden, +/+ Fragmente 711/727 vorhanden

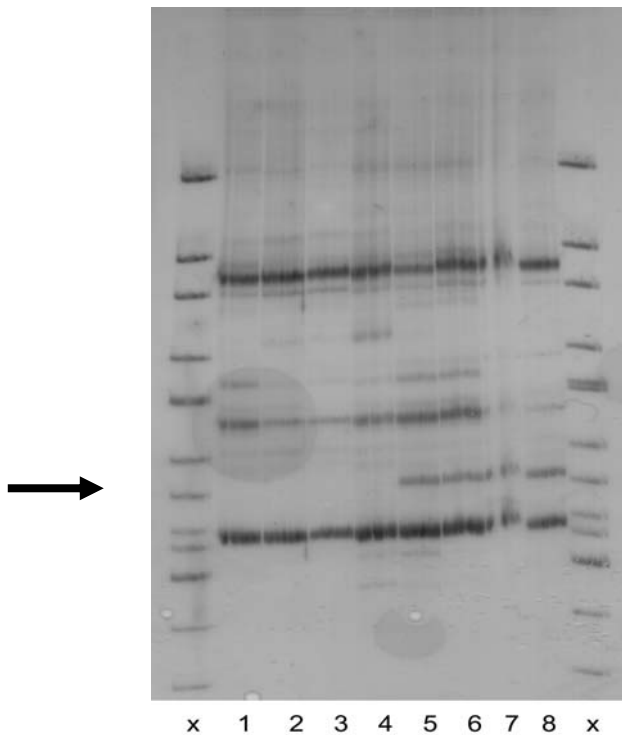


Abbildung 3.8 zeigt eine Harnstoff-PAGE. Zum direkten Vergleich sind jeweils vier Spuren aufgetragen, bei denen die Fragmente 711/727 bp vorhanden bzw. nicht vorhanden sind.

Abb. 3.8:
Harnstoff-PAGE – Gegenüberstellung von Blutspuren verschiedener Menschen
X – 100 bp-Leiter
1-4 – Fragmente 711/727 bp nicht vorhanden
5-8 – Fragmente 711/727 bp vorhanden
→ – Fragmentbande 711/727 bp

Bei insgesamt zwei der untersuchten Spuren fehlt das Fragment (9) mit einer Größe von 1.595 bp (Probe 31 Blut und Probe 7 Mundschleimhautabstrich stammen vom gleichen Probanden). Alle weiteren markierten Fragmente sind regelmäßig vorhanden.

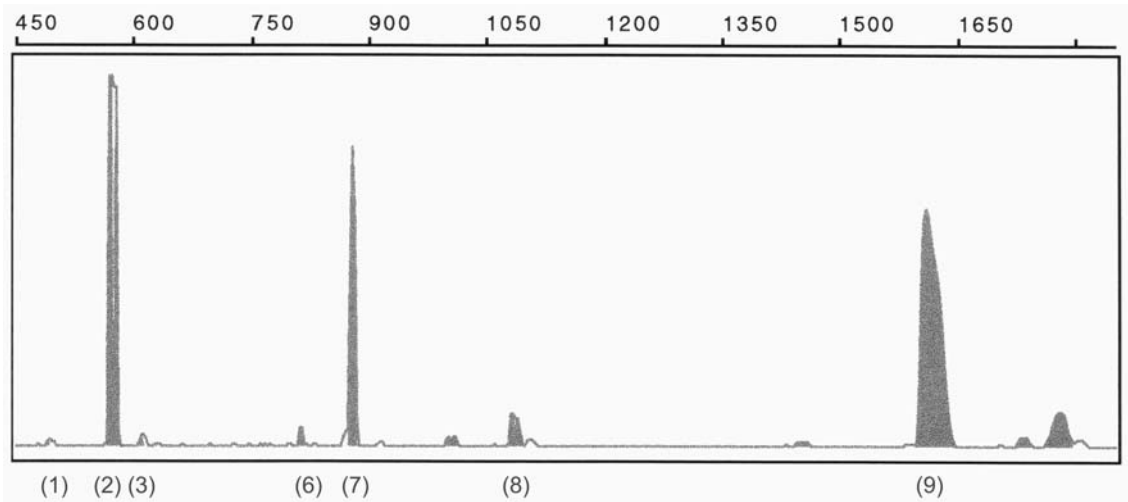


Abb. 3.9: Fragmentanalyse der Blutspur eines Menschen, amplifiziert mit Primer I (Fragmente (4) 711 bp und (5) 727 bp fehlen)

Insgesamt wurden 40 verschiedene Blutspuren sowie 20 Mundschleimhautabstriche untersucht. Die ausführlichen Ergebnisse sind in Tabelle A1 und A2 (siehe Anhang) dargestellt. Die statistische Zusammenfassung beider Untersuchungsreihen zeigen Tabelle 3.2 und 3.3.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mittelwert [bp]	494,16	557,92	587,65	710,61	727,01	809,62	862,39	1067,93	1593,34
Standardabw.	1,48	0,72	2,55	1,18	0,83	0,64	1,09	1,32	7,10
Varianz	2,19	0,52	6,51	1,39	0,70	0,41	1,19	1,74	50,40

Tab. 3.2: Untersuchungsreihe 40 Blutspuren verschiedener Menschen (Primer I)

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mittelwert [bp]	497,08	558,13	588,12	711,28	727,10	810,53	861,96	1068,76	1601,37
Standardabw.	0,90	0,81	1,27	2,19	1,35	1,65	1,41	2,37	7,83
Varianz	0,82	0,66	1,62	4,80	1,83	2,72	1,99	5,62	61,31

Tab. 3.3: Untersuchungsreihe 20 versch. Mundschleimhautabstriche (Primer I)

Bezüglich einer möglichen intrafamiliären Weitergabe der nicht regelmäßig vorhandenen Fragmente 711 bp, 727 bp und 1.596 bp wurden insgesamt fünf Familienuntersuchungen durchgeführt. Die untersuchten Familien bestanden aus vier bis sieben Mitgliedern.

Bei allen untersuchten Familien zeigte das Fragmentpaar 711 bp/727 bp ein regelmäßiges Auftreten. Das Fragment mit einer Länge von 1.596 bp trat einmal bei einem gesicherten Nachkommen eines fragmentpositiven Elternpaares nicht auf (siehe hierzu auch Kapitel 4.4).

Um die Wiederholbarkeit des Verfahrens, die Konstanz der Ergebnisse und die schon angesprochene Definitionsproblematik des internen Standards (siehe Kapitel 3.3) aufzuzeigen, wurden vier Blutspuren jeweils fünfmal an verschiedenen Tagen amplifiziert und ausgewertet. Hierbei zeigt sich, dass sowohl die Fragmentlängen [bp] als auch die Signalstärke der einzelnen Fragmente leicht differieren, was der Probenbeschaffenheit (Signalstärke der einzelnen Fragmente) bzw. der problematischen Standarddefinition (Fragmentlänge) zugesprochen werden kann.

Die Ergebniskonstanz und die Wiederholbarkeit des Verfahrens sind hiermit eindeutig nachgewiesen. Tabelle 3.4 zeigt beispielhaft eine dieser Untersuchungsreihen. Die Ergebnisse der Untersuchungsreihen 1,2 und 4 sind in Tab A3 (siehe Anhang) dargestellt.

In Abbildung 3.10 ist der Vergleich der Fragmentmuster einer im Abstand von zehn Wochen wiederholt untersuchten Blutspur aufgezeigt. Die Unterschiede zwischen beiden Fragmentmustern können als marginal (maximal 0,86 %) bezeichnet werden.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
3.1	n.def.	557,99	n.def.	711,25	727,52	810,25	863,53	1068,68	1594,53
3.2	n.def.	558,28	n.def.	710,91	727,44	809,55	859,46	1070,39	1600,91
3.3	498,18	557,45	584,82	709,86	726,21	809,14	862,01	n.def.	1590,28
3.4	n.def.	557,23	n.def.	709,82	726,27	809,09	863,56	1069,48	1591,55
3.5	497,88	560,25	586,91	714,89	729,32	813,18	862,37	1073,69	1603,92
Mittelwert	498,03	558,24	585,87	711,35	727,35	810,24	862,19	1070,56	1596,24
Standardabw.	0,21	1,20	1,48	2,08	1,26	1,71	1,67	2,20	5,94
Varianz	0,05	1,44	2,18	4,32	1,60	2,91	2,80	4,84	35,31

Tab. 3.4 : Fünfmalige Untersuchung einer identischen Blutspur (Mensch) an verschiedenen Tagen mit Primer I

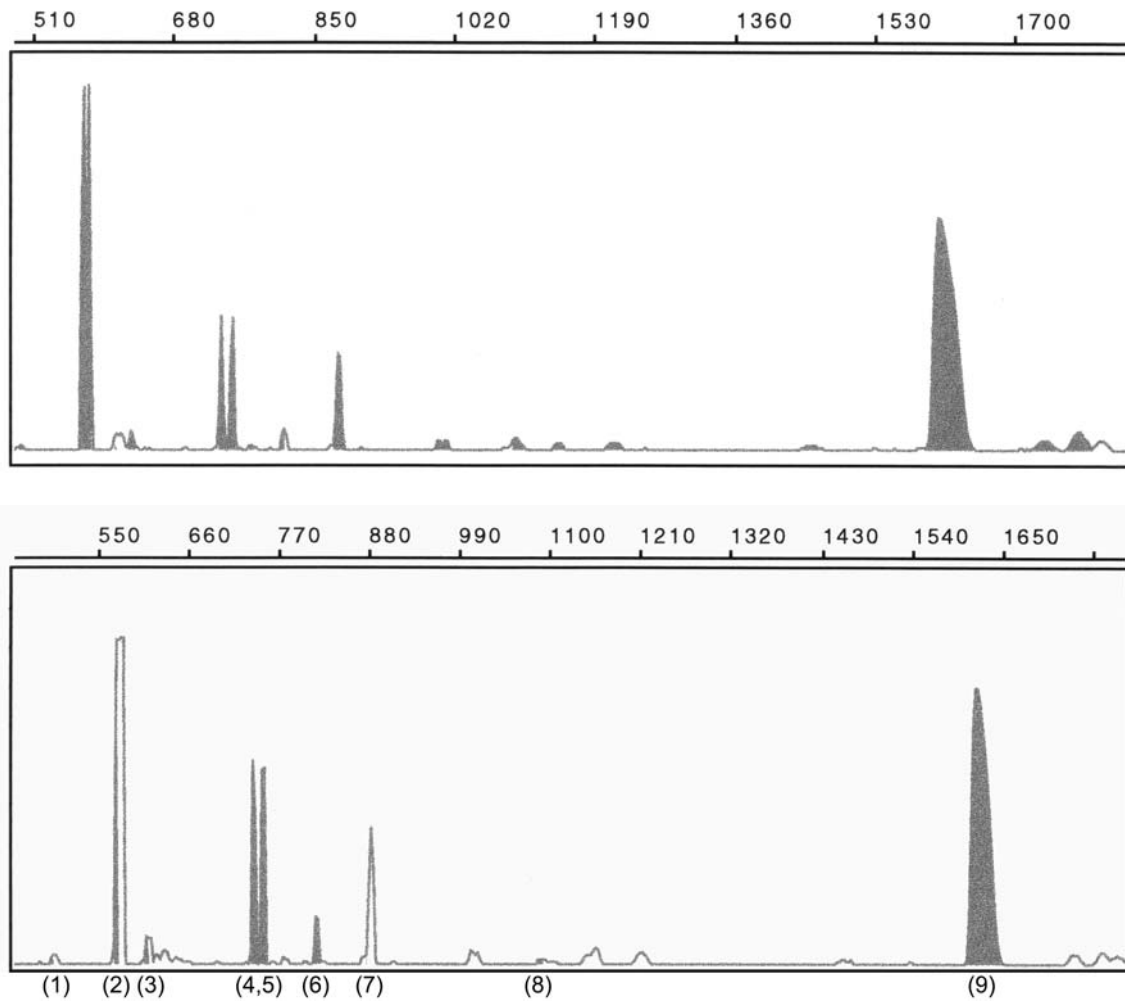


Abb. 3.10: Fragmentmuster einer identischen Blutspur, wiederholt untersucht im Abstand von zehn Wochen (siehe auch Tabelle 3.5, Probe 3.3 und 3.5)

3.4.2 Primer II

Es wurden insgesamt 20 verschiedene Mundschleimhautabstriche und 25 verschiedene Blutspuren untersucht. Eine statistische Übersicht beider Untersuchungsreihen zeigen die Tabellen 3.5 und 3.6. Die ausführliche Dokumentation ist im Anhang Tabelle A4 und A5 dargestellt.

Bei Auswertung der Blutspuren wurden die 18 häufigsten Fragmente berücksichtigt. Die Auswertung der Mundschleimhautabstriche beschränkt sich auf die neun signalstärksten Fragmente, da sich die Amplifizierungsergebnisse aufgrund des geringeren DNA-Gehaltes der Mundschleimhautabstriche gegenüber den Blutspuren schwächer darstellen.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mittelwert [bp]	500,95	508,34	597,28	673,64	706,10	717,90	729,27	750,67	778,70
Standardabw.	0,72	0,70	1,13	1,32	0,95	0,88	1,48	0,86	0,79
Varianz	0,51	0,49	1,28	1,73	0,90	0,78	2,10	0,74	0,63
Fragment	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Mittelwert [bp]	823,91	880,23	933,86	946,59	1003,14	1075,41	1130,43	1206,81	1376,90
Standardabw.	0,60	2,18	3,19	3,40	4,30	2,45	1,53	1,99	2,86
Varianz	0,36	4,76	10,18	10,86	18,45	6,02	2,35	3,95	8,19

Tab. 3.5: Untersuchungsreihe 25 verschiedene Blutspuren (Primer II)

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mittelwert [bp]	500,91	507,70	595,93	716,21	727,94	1002,99	1074,68	1203,57	1373,49
Standardabw.	0,69	1,55	1,03	1,94	1,50	2,51	2,51	4,65	3,80
Varianz	0,48	2,42	1,05	3,78	2,26	6,28	6,29	21,60	14,46

Tab. 3.6: Untersuchungsreihe 20 verschiedene Mundschleimhautabstriche (Primer II)

Zur Darstellung der Ergebniskonstanz wurden zwei verschiedene Blutspuren an fünf unterschiedlichen Tagen je einmal mittels eines immer neu gefertigten Reaktionsansatzes amplifiziert. Die Ergebnisse dieser beiden Untersuchungsreihen sind in Tab 3.7 aufgezeigt. Hierbei zeigen sich nur marginale Abweichungen im Bereich der Fragmentlängen mit einer maximalen Standardabweichung von 5,69 und einer durchschnittlichen Standardabweichung von 1,58 bp. Alle zum Speziesnachweis notwendigen Fragmente sind regelmäßig vorhanden.

Das typische Fragmentmuster einer mit Primer II untersuchten menschlichen Spur ist in Abbildung 3.11 wiedergegeben.

Hierbei zeigen sich Fragmente mit einer Größe von 501 bp (1), 508 bp (2), 597 bp (3), 674 bp (4), 706 bp (5), 718 bp (6), 729 bp (7), 751 bp (8), 779 bp (9), 824 bp (10), 880 bp (11), 934 bp (12), 947 bp (13), 1.003 bp (14), 1.075 bp (15), 1.130 bp (16), 1.207 bp (17) und 1.377 bp.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Probe																		
1.1	501,92	509,44	598,80	676,18	708,39	720,18	732,86	752,47	780,79	825,37	881,65	934,29	946,91	1007,40	1077,32	1132,09	n.def.	n.def.
1.2	499,66	506,95	596,57	672,39	705,04	717,00	728,62	749,88	777,70	823,40	879,31	933,79	946,78	1006,50	1074,57	1130,11	1202,74	1375,78
1.3	499,75	507,71	596,42	672,53	705,28	716,99	729,47	749,82	778,00	823,21	880,86	935,10	947,81	1007,98	1075,99	1130,04	1204,79	1375,82
1.4	500,71	508,08	596,27	672,63	705,45	717,16	727,39	750,20	778,30	824,04	882,09	936,86	949,46	1009,19	1078,08	1131,23	1206,52	1366,87
1.5	501,62	509,10	597,95	674,90	707,36	719,06	731,47	751,61	779,63	824,12	879,67	932,03	944,50	1004,08	1073,90	1130,59	1206,90	1380,47
Mittelwert[bp]	500,73	508,26	597,20	673,73	706,30	718,08	729,96	750,80	778,88	824,03	880,72	934,41	947,09	1007,03	1075,97	1130,81	1205,24	1374,74
Standardabw.	1,04	1,02	1,12	1,72	1,49	1,46	2,20	1,18	1,30	0,85	1,21	1,77	1,80	1,92	1,77	0,86	1,90	5,69
Varianz	1,08	1,04	1,25	2,95	2,21	2,14	4,83	1,40	1,68	0,72	1,46	3,14	3,24	3,67	3,13	0,74	3,62	32,34
2.1	501,53	509,00	598,99	675,69	708,29	719,71	730,99	752,42	780,45	824,86	877,87	929,98	941,82	993,05	1073,12	1129,88	n.def.	n.def.
2.2	501,24	508,53	596,58	675,59	704,86	716,84	729,37	749,86	778,52	823,30	881,77	937,17	949,83	1000,58	1077,38	1132,93	n.def.	n.def.
2.3	499,69	507,03	596,70	672,38	704,82	716,55	728,62	749,73	777,53	823,19	881,26	935,70	948,20	999,29	1076,42	1130,94	1206,67	1375,00
2.4	500,94	508,31	596,40	672,37	705,01	716,94	729,43	749,98	778,08	823,51	880,99	935,23	947,45	998,41	1075,67	1130,74	1208,53	1377,54
2.5	500,22	507,68	597,66	673,84	706,07	717,98	728,46	750,59	778,82	823,58	882,09	936,40	948,43	1000,02	1077,13	1132,13	n.def.	n.def.
Mittelwert[bp]	500,72	508,27	597,24	673,97	705,81	717,60	729,37	750,52	778,68	823,69	880,79	934,89	947,15	998,27	1075,94	1131,32	1207,60	1376,27
Standardabw.	0,76	0,77	1,08	1,63	1,48	1,29	1,00	1,11	1,10	0,67	1,69	2,84	3,10	3,03	1,71	1,20	0,86	1,27
Varianz	0,57	0,59	1,17	2,67	2,19	1,68	1,00	1,24	1,21	0,45	2,86	8,09	9,61	9,61	2,94	1,45	0,75	1,61

Tab.3.7 : Fünfmalige Amplifikation zweier Blutspuren (Mensch) an unterschiedlichen Tagen mit FAM-markiertem Primer II

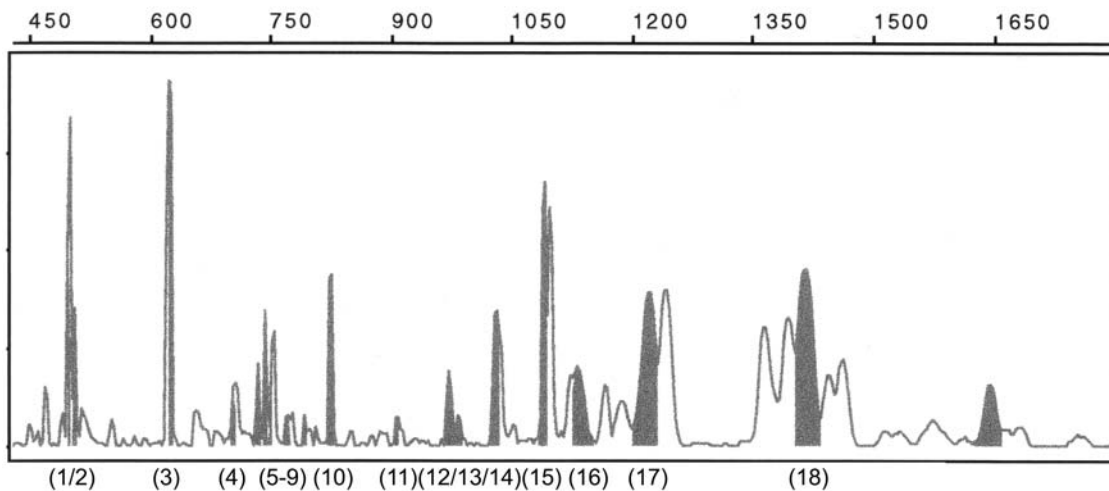


Abb. 3.11: Fragmentanalyse der Blutspur eines Menschen, amplifiziert mit Primer II

Um die Spezifität des Verfahrens zu untersuchen, wurde ein Mix aus DNA-Lösungen von fünf verschiedenen Blutspuren hergestellt. Tabelle 3.8 zeigt die Ergebnisse der fünf Einzelspuren sowie des Spuren-Mixes nach Amplifizierung und Fragmentanalyse.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
M.1	501,34	509,61	597,61	674,72	707,71	718,72	729,32	752,37	780,49
M.2	501,23	509,03	598,13	674,87	707,65	718,71	729,61	752,12	780,66
M.3	501,41	508,95	597,57	674,28	707,31	718,19	729,33	752,13	780,76
M.4	501,58	508,99	597,06	674,24	707,54	718,22	731,36	752,41	780,08
M.5	501,71	509,34	597,58	674,28	707,48	718,34	729,01	n.def.	780,48
Mittelwert [bp]	501,45	509,18	597,59	674,48	707,54	718,44	729,73	752,26	780,49
Mix 1-5	501,33	509,46	597,97	674,86	707,80	718,78	731,33	752,58	780,39
Fragment	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Probe									
M.1	825,46	882,57	937,56	n.def.	1002,73	1079,99	1132,31	1212,30	1384,08
M.2	825,45	882,66	937,56	949,63	1002,82	1079,53	1137,76	1211,59	1381,76
M.3	825,44	883,23	938,92	950,48	1000,90	1079,99	1131,84	1210,23	1379,82
M.4	825,44	882,72	937,16	949,47	1005,76	1079,35	1132,43	1209,09	1378,55
M.5	n.def.	883,96	937,35	949,34	1004,81	1079,35	1133,31	1209,58	1381,34
Mittelwert [bp]	825,45	883,03	937,71	949,73	1003,40	1079,64	1133,53	1210,56	1381,11
Mix 1-5	825,72	883,77	939,27	946,00	1004,76	1080,66	1131,93	1210,12	1380,48

Tab. 3.8 : Untersuchungsreihe - Mix verschiedener Blutspuren zum Nachweis der Spezifität des angewendeten Verfahrens (Fragmentmuster der fünf Einzelspuren im Vergleich zum Fragmentmuster des Spurenmixes) – Primer II

Bei Betrachtung der einzelnen Fragmentanalysen fällt auf, dass zwar immer die gleichen Fragmente vorhanden sind, die Spezifität des Verfahrens also nachgewiesen ist, diese jedoch in der Signalstärke zum Teil deutlich variieren. Die Werte für die Signalstärke bzw. Häufigkeit innerhalb der einzelnen Spur wurden mit der Formel $[Y=X*100/\text{häufigstes Fragment}]$ indexiert und zum direkten Vergleich graphisch aufbereitet (siehe Abbildung 3.12). Es zeigt sich ein teilweise eklatanter Unterschied in der Signalstärke der einzelnen Fragmente, welcher sich aber durch den unterschiedlichen DNA-Gehalt der untersuchten Proben erklärt.

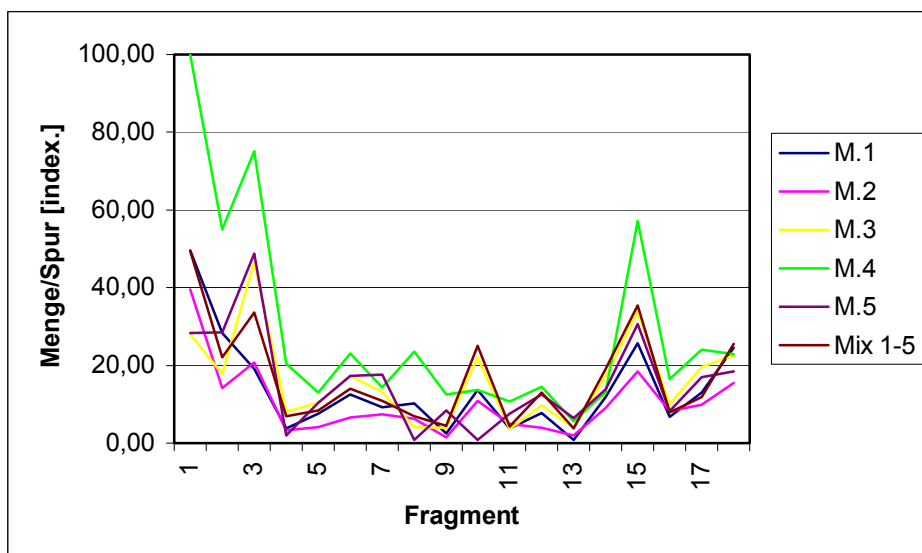


Abb. 3.12 : Vergleich der Signalstärken einzelner Fragmente von fünf verschiedenen Blutspuren (Mensch), amplifiziert mit Primer I (Diagramm zu Tabelle 3.9)

3.4.3 Primer III

Mit Primer III wurden 20 verschiedene Mundschleimhautabstriche und 25 verschiedene Blutspuren untersucht. Eine statistische Übersicht dieser beiden Untersuchungsreihen ist in Tabelle 3.9 und 3.10 dargestellt. Die ausführlichen Ergebnisse aller Einzelproben sind im Anhang Tabelle A6 und A7 zu finden.

Bei Auswertung der Blutspuren wurden die 18 häufigsten Fragmente berücksichtigt. Die Auswertung der Mundschleimhautabstriche umfasst die neun prägnantesten

Fragmente, da sich die Amplifizierungsergebnisse aufgrund des geringeren DNA-Gehaltes der Mundschleimhautabstriche gegenüber den Blutspuren schwächer darstellen.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mittelwert [bp]	346,79	412,44	457,37	549,98	641,96	661,58	693,53	823,53	862,56
Standardabw.	0,75	0,64	0,47	0,58	1,01	1,45	1,86	1,02	1,51
Varianz	0,56	0,42	0,22	0,34	1,02	2,11	2,27	1,05	2,28

Fragment	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Mittelwert [bp]	938,05	990,40	1063,53	1148,87	1229,55	1311,97	1468,55	1513,51	1715,30
Standardabw.	2,69	2,99	1,45	1,97	6,38	3,08	3,86	2,40	2,92
Varianz	7,26	8,95	2,11	3,87	40,69	9,49	12,58	5,75	8,51

Tab. 3.9 : Untersuchungsreihe 25 verschiedene Blutspuren (Primer III)

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mittelwert [bp]	412,03	549,53	660,40	862,38	990,98	1227,62	1306,19	1463,61	1512,69
Standardabw.	0,66	0,34	1,66	1,39	2,16	6,45	4,16	3,07	1,85
Varianz	0,44	0,11	2,76	1,94	4,66	41,57	17,30	9,40	3,41

Tab. 3.10 : Untersuchungsreihe 20 Mundschleimhautabstriche (Primer III)

Zur Darstellung der Ergebniskonstanz wurden zwei verschiedene Blutspuren an unterschiedlichen Tagen mit einem jeweils neu gefertigten Reaktionsansatz insgesamt fünfmal amplifiziert und die Ergebnisse tabellarisch verglichen (siehe Tabelle 3.11). Hierbei zeigen sich nur marginale Abweichungen im Bereich der Fragmentlängen mit einer maximalen Standardabweichung von 5,36 bzw. einer durchschnittlichen Standardabweichung von 1,88.

Abbildung 3.13 zeigt das typische Fragmentmuster einer mit Primer III untersuchten Spur eines Menschen. Es stellen sich Fragmente mit einer Größe von 347 bp (1), 412 bp (2), 457 bp (3), 550 bp (4), 642 bp (5), 662 bp (6), 694 bp (7), 824 bp (8), 863 bp (9), 938 bp (10), 990 bp (11), 1.064 bp (12), 1.149 bp (13), 1.230 bp (14), 1.312 bp (15), 1.469 bp (16), 1.514 bp (17) und 1.715 bp (18) dar.

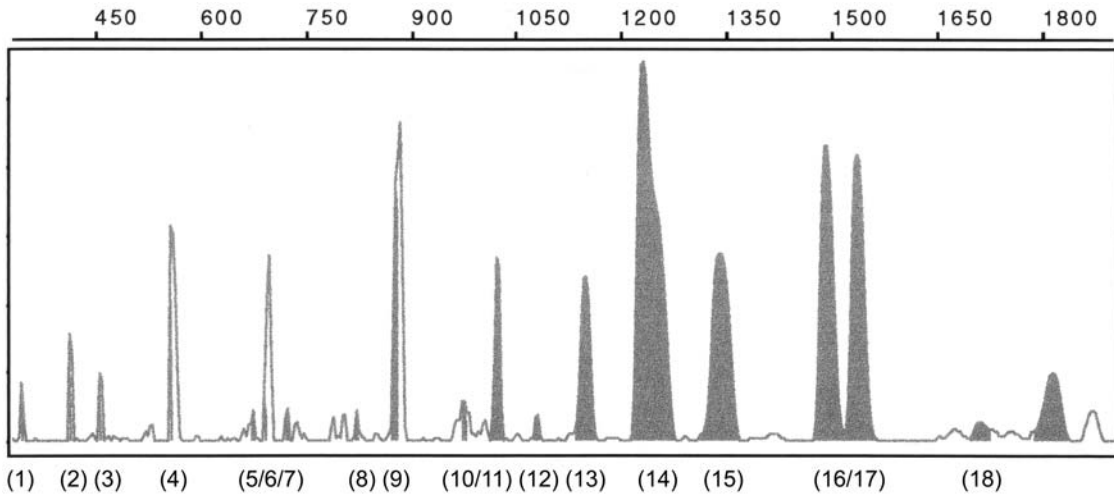


Abb.3.13: Fragmentanalyse der Blutspur eines Menschen, amplifiziert mit Primer III

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Probe																		
1.1	346,69	412,51	457,50	549,78	642,04	661,24	693,19	823,43	863,58	935,65	992,53	1064,56	1148,83	1232,70	1311,62	1468,38	1513,86	1716,31
1.2	346,08	411,57	456,69	549,61	641,20	660,47	692,49	823,21	862,83	935,40	991,73	1064,17	1147,83	n.def.	1309,43	1467,15	1512,99	1714,34
1.3	n.def.	411,86	n.def.	548,98	n.def.	659,62	n.def.	n.def.	864,72	n.def.	993,40	n.def.	1148,09	1219,89	1310,23	1465,80	1515,86	n.def.
1.4	346,10	412,85	458,51	551,52	644,06	665,36	697,95	826,33	865,31	n.def.	995,63	n.def.	1154,67	1228,72	1317,91	1475,90	1512,54	n.def.
1.5	347,16	412,77	457,76	551,40	641,00	665,07	697,74	825,85	864,53	n.def.	993,90	1064,67	1153,22	1226,59	1318,89	1475,07	1511,99	n.def.
Mittelwert[bp]	346,51	412,31	457,62	550,26	642,08	662,35	695,34	824,71	864,19	935,53	993,44	1064,47	1150,53	1226,98	1313,62	1470,46	1513,45	1715,33
Standardabw.	0,52	0,57	0,75	1,14	1,40	2,68	2,91	1,61	0,98	0,18	1,48	0,26	3,18	5,36	4,45	4,69	1,51	1,39
Varianz	0,27	0,32	0,56	1,29	1,95	7,17	8,44	2,60	0,97	0,03	2,19	0,07	10,13	28,72	19,81	21,96	2,29	1,94
2.1	346,41	411,83	457,05	549,80	641,89	660,95	693,20	823,43	862,42	938,24	989,69	1061,91	1148,03	1235,64	1314,36	1469,71	1514,44	1716,30
2.2	n.def.	412,27	457,14	549,71	641,68	661,00	n.def.	822,80	863,10	938,54	990,15	n.def.	1148,16	1234,63	1311,35	1468,42	1512,70	1716,57
2.3	345,73	411,62	456,70	549,45	641,14	660,27	692,82	822,81	865,48	941,15	991,94	1064,05	1147,43	1231,99	1310,67	1469,57	1516,82	1722,00
2.4	n.def.	n.def.	n.def.	549,46	n.def.	659,82	n.def.	n.def.	864,12	n.def.	992,71	n.def.	1145,49	1232,55	1310,63	1464,03	1510,80	1712,01
2.5	348,67	412,60	457,82	551,29	643,73	664,84	n.def.	825,62	865,20	943,87	995,45	1065,54	1153,53	n.def.	1318,03	n.def.	1513,40	1719,23
Mittelwert[bp]	346,94	412,08	457,18	549,94	642,11	661,38	693,01	823,67	864,06	940,45	991,99	1063,83	1148,53	1233,70	1313,01	1467,93	1513,63	1717,22
Standardabw.	1,54	0,44	0,47	0,77	1,13	2,00	0,27	1,34	1,32	2,63	2,30	1,82	2,99	1,72	3,20	2,67	2,22	3,72
Varianz	2,37	0,19	0,22	0,59	1,27	3,99	0,07	1,79	1,73	6,91	5,29	3,33	8,96	2,96	10,23	7,10	4,94	13,83

Tab. 3.11 : Fünfmalige Amplifikation zweier Blutspuren verschiedener Menschen an unterschiedlichen Tagen mit Primer III

3.5 Untersuchung von Spuren tierischer Herkunft

Zur Darstellung der Möglichkeit einer Speziesidentifizierung mittels der angewendeten Technik wurden Spuren von insgesamt 25 verschiedenen Tierarten untersucht.

Die DNA aller untersuchten tierischen Spuren wurde mittels Chelex-100 extrahiert und im Anschluss mittels Diatomeen aufgereinigt. Zur Amplifikation wurden für die Darstellung im Gel unmarkierte Primer, für die Darstellung mit Hilfe der Kapillarelektrophorese FAM-markierte Primer eingesetzt.

Alle in Kapitel 3.5 untersuchten Proben wurden mit Primer I (siehe Kapitel 2.1.2 und 3.2) amplifiziert. Die Amplifikation von Spuren tierischer Herkunft mit Primer II und III erbrachte kein verwertbares Ergebnis.

3.5.1 Speziesidentifikation – Hund

Es wurde eine Stichprobe von 19 Blutspuren verschiedener Hunde sowie ein Mundschleimhautabstrich untersucht. Abbildung 3.14 zeigt das typische Fragmentmuster einer mit GeneScan ausgewerteten Hundebloodspur. Es kommt zur Darstellung von Fragmenten mit einer Länge von 501 bp (1), 561 bp (2), 564 bp (3), 867 bp (4), 911 bp (5), 1.000 bp (6), 1.009 bp (7), 1.151 bp (8) und 1.399 bp (9). Das Fragmentpaar (2)/(3) stellt sich besonders signalstark dar.

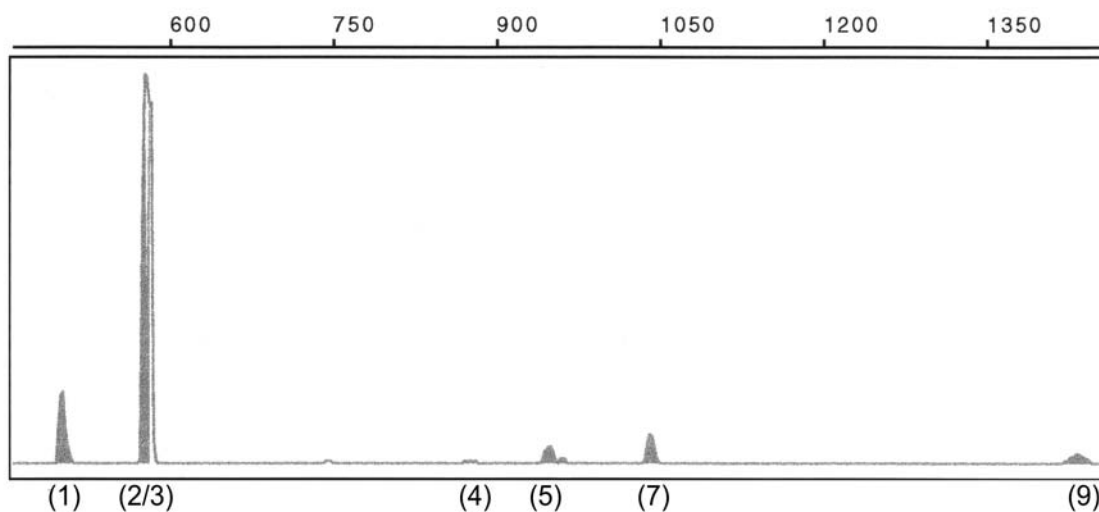


Abb. 3.14 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Hundes (Tabelle A8 im Anhang, Spur 11), amplifiziert mit Primer I

In Tabelle 3.12 ist die statistische Übersicht der ausgewerteten Spuren dargestellt. Die komplette Ergebnistabelle ist im Anhang (Tabelle A8) aufgeführt.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mittelwert [bp]	501,40	560,81	563,54	866,90	911,37	999,80	1009,36	1151,45	1399,12
Standardabw.	1,97	0,91	0,81	2,76	2,34	2,18	2,39	1,06	1,99
Varianz	3,86	0,83	0,65	7,64	5,48	4,76	5,71	1,13	3,95
A (rel.)	0,45	1	1	0,2	0,45	0,15	0,25	0,1	0,1
B (index.)	3,65	99,19	94,74	2,17	2,21	1,88	2,67	1,39	1,41

Tab. 3.1: Untersuchungsreihe 20 Spuren verschiedener Hunde, amplifiziert mit Primer I; A : relative Häufigkeit des Fragmentes in der Stichprobe; B: Signalstärke des Fragmentes innerhalb einer Probe ($y=x*100/\text{größte Signalstärke}$)

Der Vergleich zwischen dem Vorhandensein eines Fragmentes in der Stichprobe (A, [%]) und der Häufigkeit des einzelnen Fragments innerhalb einer Probe, repräsentiert durch die Signalstärke [rfu] (B, nach der Formel $y=(x*100/\text{größte Signalstärke})$ indexiert) ist graphisch aufbereitet in Abbildung 3.15 dargestellt.

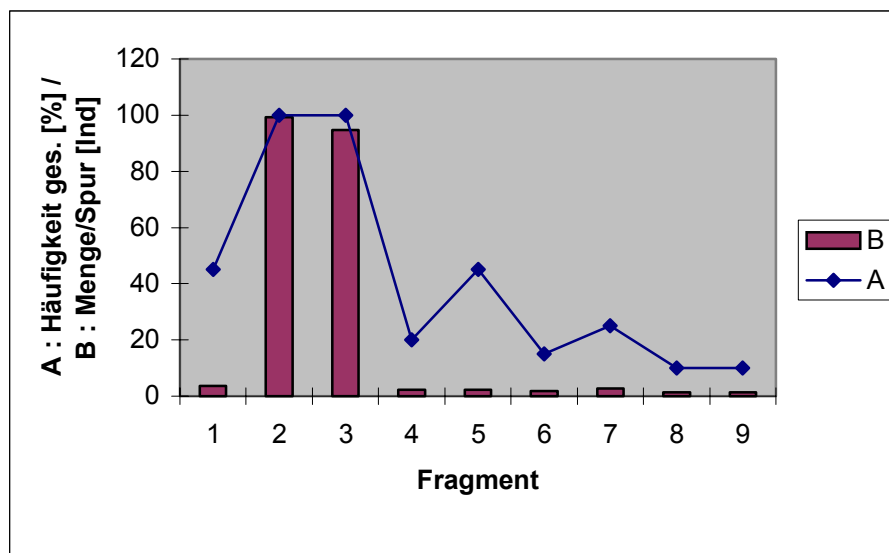


Abb. 3.15 : Vergleich von Häufigkeit eines Fragmentes in der Stichprobe A und Signalstärke/Spur B (Grafik zu Tab. 3.13, Untersuchungsreihe 20 Spuren verschiedener Hunde)

Es zeigt sich, dass nur zwei Fragmente (Fragment 2 mit einer Länge von 560 bp und Fragment 3 mit einer Länge von 563 bp) in allen untersuchten Spuren vorhanden sind. Diese zeigen auch innerhalb einer Spur eindeutig die größte Signalstärke. Alle anderen Fragmente mit einer Häufigkeit von höchstens 45 % in der Stichprobe sind auch innerhalb einer einzelnen Spur vergleichsweise signalarm.

Innerhalb aller untersuchter Arten ist das alleinige Vorhandensein der Fragmente (2) und (3) spezifisch für die Spezies Hund.

3.5.2 Speziesidentifikation – Rind

Es wurden 10 Blutspuren von verschiedenen Rindern untersucht. Tabelle 3.13 zeigt die Ergebnisübersicht der im Rahmen der Kapillarelektrophorese detektierten Fragmente, Abbildung 3.16 das repräsentative Fragmentmuster einer mit GeneScan ausgewerteten Rinderblutspur. Es stellen sich Fragmente mit einer Länge von 493 bp (1), 557 bp (2), 875 bp (3), 1.118 bp (4), 1.143 bp (5), 1.224 bp (6), 1.250 bp (7), 1.348 bp (8) und 1.400 bp (9) dar. Das Fragmentpaar (4)/(5) ist besonders signalstark.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Probe										
1	874,28 1118,38 1143,14									
2	874,39 1118,79 1143,45									
3	494,28	876,23 1119,81 1143,36 1224,90 1251,32								
4	493,82	876,99 1119,75 1142,09 1226,14 1251,70 1347,73 1393,17								
5	492,55	557,62	874,13 1120,36 1142,34							
6	1118,77 1144,21									
7	557,74		1119,93 1142,68 1226,82 1248,45							
8	491,35	872,04 1111,58 1140,92 1218,81 1250,69 1346,56 1404,26								
9	492,94	556,84	1114,48 1141,54 1222,71 1249,39 1348,49 1401,56							
10	1115,97 1144,35									
Mittelwert [bp]	492,99	557,40	874,68	1117,78	1142,81	1223,88	1250,31	1347,59	1399,66	
Standardabw.	1,14	0,49	1,75	2,87	1,11	3,24	1,36	0,97	5,78	
Varianz	1,31	0,24	3,05	8,25	1,23	10,47	1,85	0,95	33,45	

Tab. 3.13: Untersuchungsreihe 10 Spuren verschiedener Rinder (Primer I)

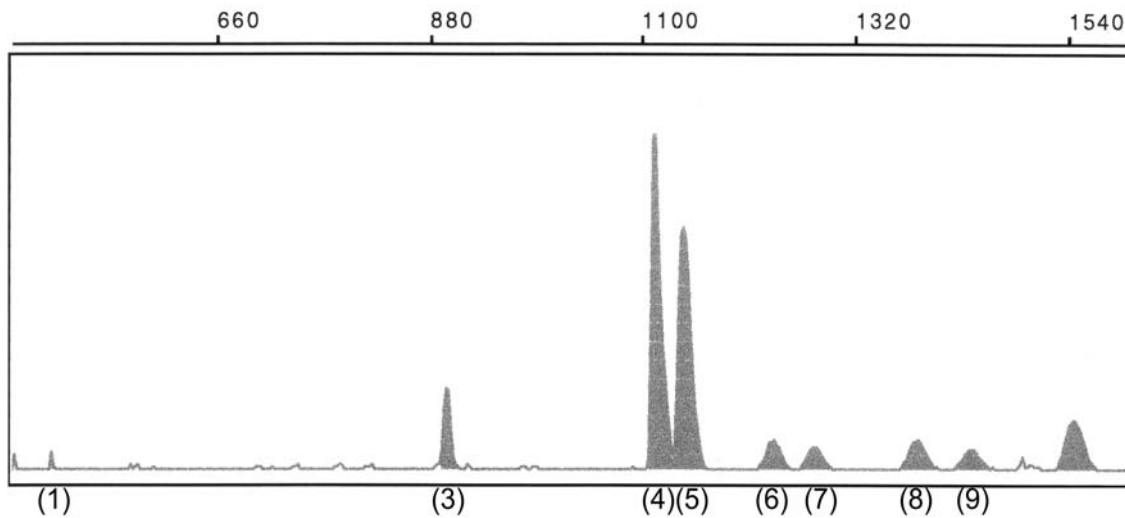


Abb. 3.16: Fragmentanalyse der Blutspur eines Rindes (Tabelle 3.13, Spur 8), amplifiziert mit Primer I

3.5.3 Speziesidentifikation – Hausschwein, Wildschwein

Zum direkten Vergleich werden die Ergebnisse von Hausschwein und Wildschwein in einem Kapitel vorgestellt.

Es wurde eine Stichprobe von 20 Spuren verschiedener Hausschweine und zehn Spuren verschiedener Wildschweine untersucht. In Tabelle 3.14 ist die statistische Übersicht der ausgewerteten Hausschweinspuren dargestellt. Tabelle 3.15 zeigt die Ergebnisse der untersuchten Wildschweinspuren. Die vollständigen Tabellen sind im Anhang (Tabelle A9 und A10) zu finden.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert [bp]	642,31	841,60	933,75	1083,83	1097,76	1334,47	1692,85
Standardabw.	1,04	1,22	1,38	2,53	2,00	2,41	2,71
Varianz	1,08	1,48	1,90	6,38	3,99	5,81	7,37
A (rel.)	0,80	1,00	0,50	1,00	1,00	0,25	0,35
B (index.)	70,50	84,85	25,60	31,40	30,70	8,60	48,70

Tab. 3.14 : Untersuchungsreihe 20 Spuren verschiedener Hausschweine

A : relative Häufigkeit des Fragmentes in der Stichprobe;

B : Häufigkeit des Fragmentes innerhalb einer Probe

($y=x*100/\text{größte Häufigkeit}$), repräsentiert durch die Signalstärke

Fragment	1	2	3	4	5	6	7
Mittelwert [bp]	643,08	841,98	935,38	1085,46	1099,21	1340,34	1701,96
Standardabw.	0,63	0,85	1,81	2,29	1,94	0,60	3,98
Varianz	0,39	0,72	3,28	5,22	3,77	0,36	15,85
A (rel.)	0,9	1,0	0,2	0,7	1,0	0,2	0,2
B (index.)	74,2	87,2	8,5	23,7	21,6	3,0	1,5

Tab. 3.15 : Untersuchungsreihe 10 Spuren verschiedener Wildschweine
A : relative Häufigkeit des Fragmentes in der Stichprobe;
B : Häufigkeit des Fragmentes innerhalb einer Probe
($y=x*100/\text{größte Häufigkeit}$), repräsentiert durch die
Signalstärke

Es wurde nun versucht, mittels der Häufigkeitsverteilung der einzelnen Fragmente eine Unterscheidung zwischen Hausschwein und Wildschwein zu ermöglichen. Hierzu wurde jeweils der Vergleich von Häufigkeit eines Fragmentes in der Stichprobe (A, [%]) und Häufigkeit eines Fragmentes in der einzelnen Probe, repräsentiert durch die Signalstärke (B, indexiert nach der Formel $Y=X*100/\text{größte Häufigkeit}$) graphisch aufbereitet (siehe Abbildung 3.17 und 3.28).

Die mit B bezeichnete Datenreihe für die Häufigkeit eines Fragmentes innerhalb einer Spur wurde dann für Hausschwein und Wildschwein in einem Diagramm gegenübergestellt (siehe Abbildung 3.19).

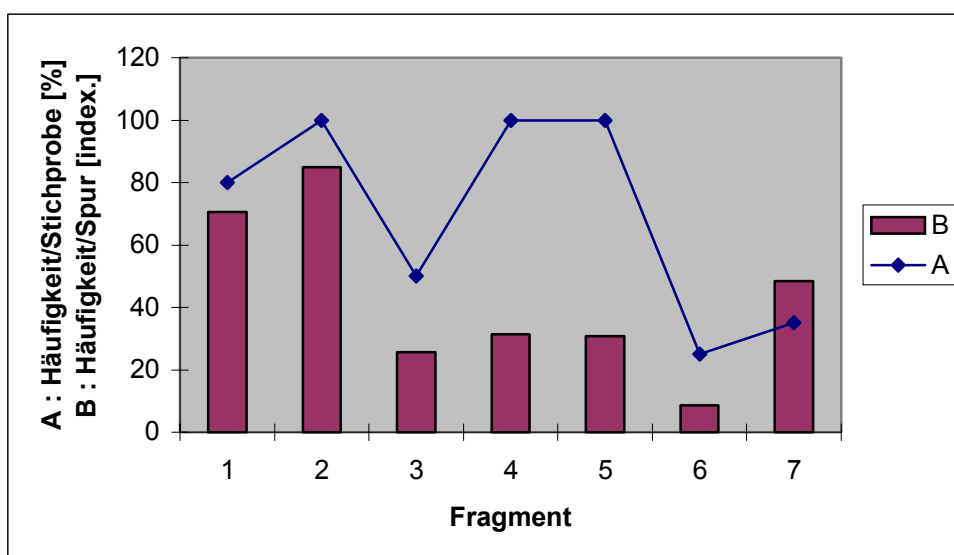


Abb. 3.17: Vergleich von Häufigkeit eines Fragmentes in der Stichprobe (A) und Häufigkeit/Spur, repräsentiert durch die Signalstärke (B) - Hausschweine

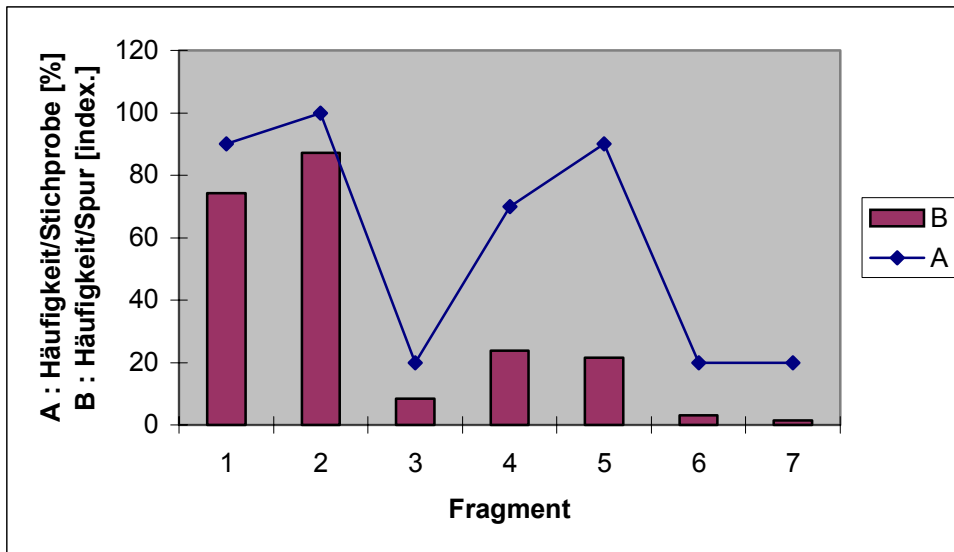


Abb. 3.18: Vergleich von Häufigkeit eines Fragmentes in der Stichprobe (A) und Häufigkeit/Spur, repräsentiert durch die Signalstärke (B) – Wildschweine

Bei Betrachtung von Abbildung 3.19 fällt auf, dass der einzige signifikante Unterschied in der Häufigkeitsverteilung bzw. Signalstärke von Fragment 7 besteht.

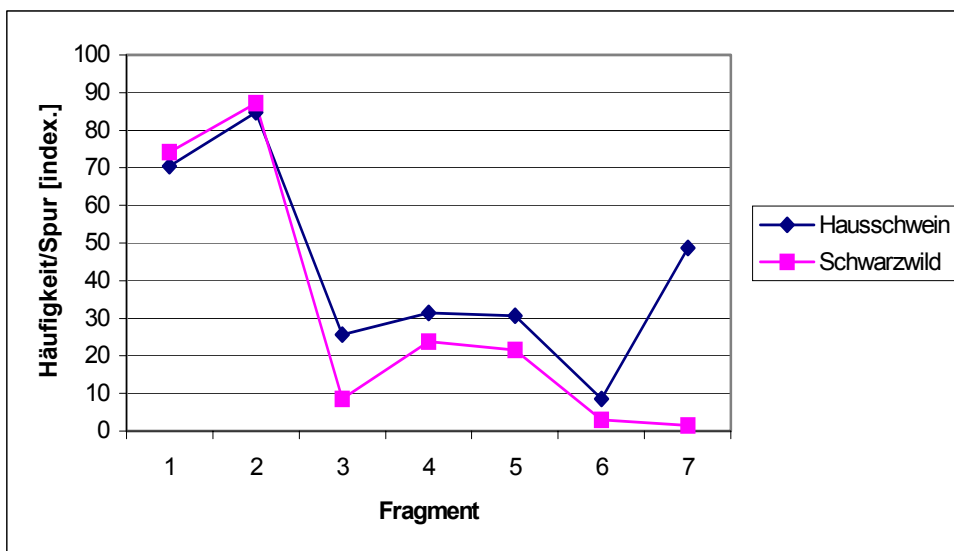


Abb. 3.19 : Vergleich der Fragmenthäufigkeiten bzw. Signalstärke innerhalb einer Spur (Gegenüberstellung Hausschwein - Wildschwein)

Das repräsentative Ergebnis der hochauflösenden Kapillarelektrophorese von Hausschwein und Wildschwein ist in Abbildung 3.21 und 3.22 aufgezeigt. Es treten

Fragmente mit einer Länge von 643 bp (1), 842 bp (2), 935 bp (3), 1.084 bp (4), 1.098 bp (5), 1.334 bp (6) und 1.692 bp (7) auf. Das bei 35 % der untersuchten Hausschweinspuren vorhandene Fragment 7 (1.692 bp) tritt immer in Kombination mit einer veränderten Häufigkeitsverteilung weiterer Fragmente auf. Fragment 2 (841 bp) ist in diesen Fällen immer das signalstärkste, wogegen Fragment 1 (642 bp) kaum noch messbar ist. In Abbildung 3.20 ist das Fragmentmuster einer solchen Spur dargestellt. Spuren, bei denen das Fragment 7 nicht detektiert werden konnte, weisen bei den Fragmenten 1 und 2 eine nahezu gleiche Signalstärke auf.

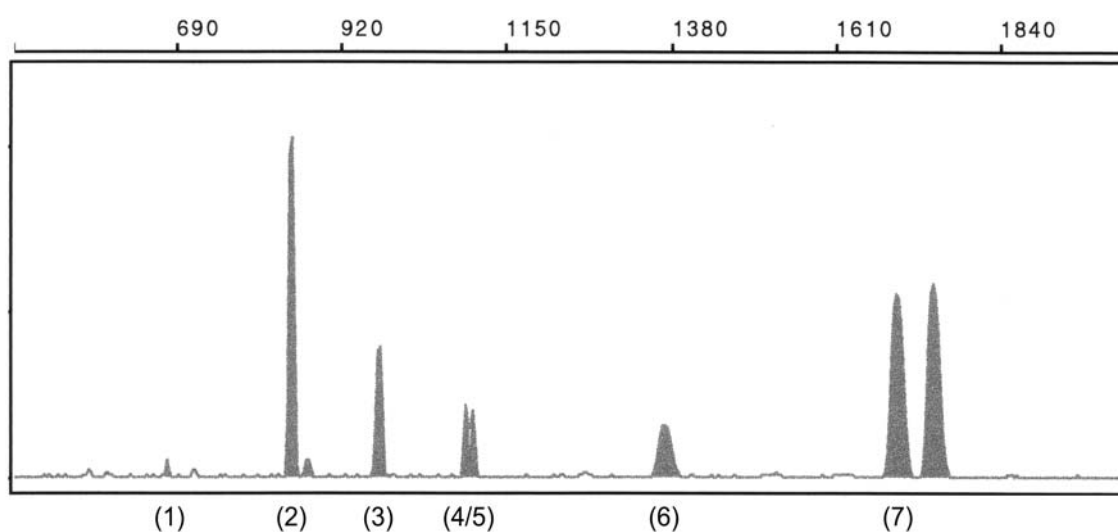


Abb. 3.20 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Hausschweins (Tabelle A9 im Anhang, Spur 12)

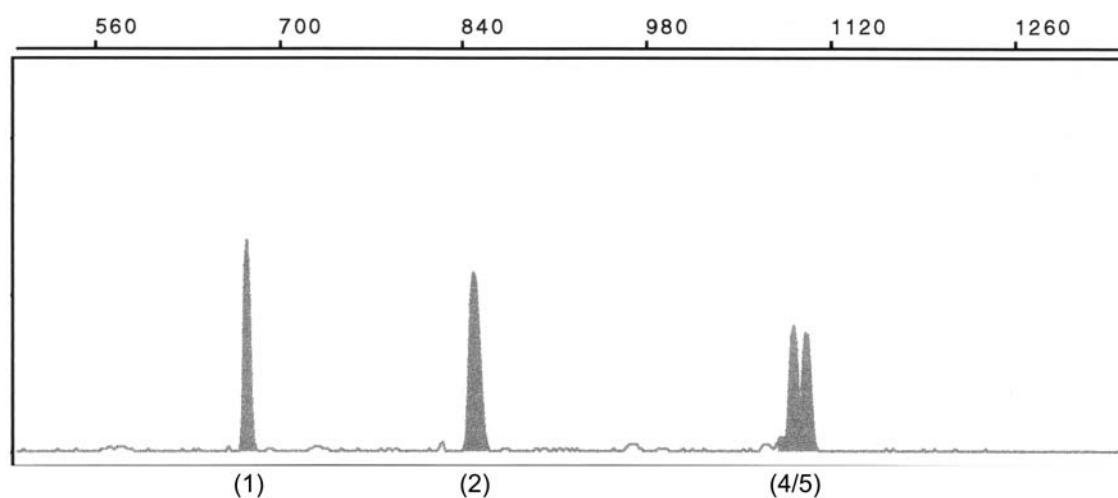


Abb. 3.21 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Hausschweins; (Tabelle A9 im Anhang, Spur 6)

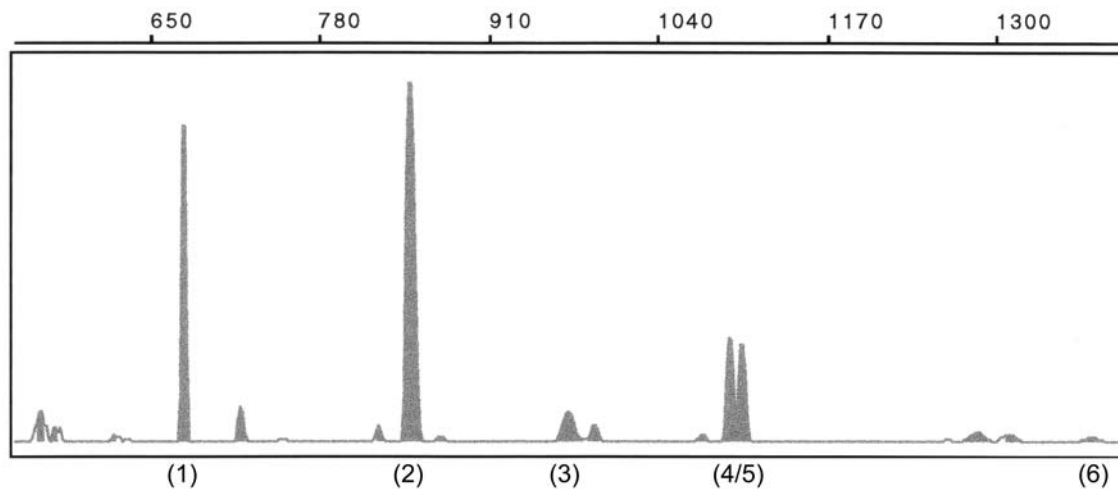


Abb. 3.22 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Wildschweins; (Tabelle A10 im Anhang, Spur 4)

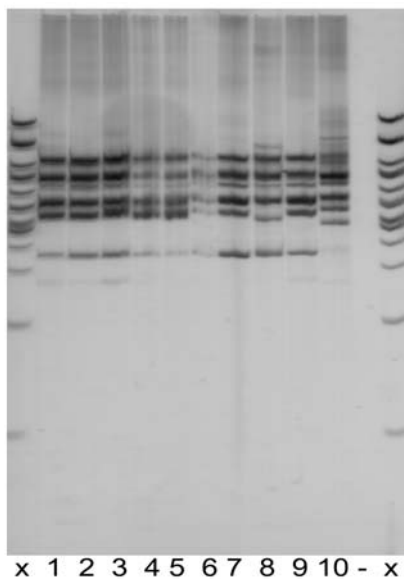


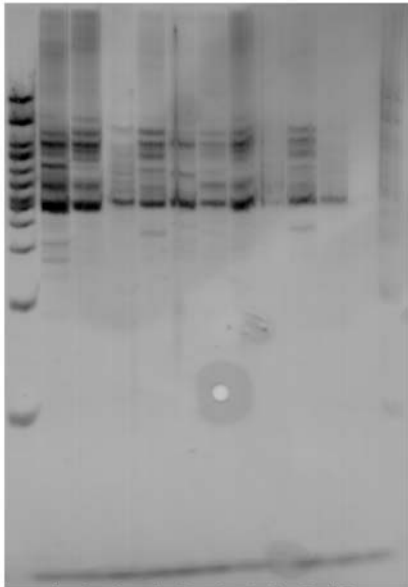
Abbildung 3.23 zeigt eine Polyacrylamidgелеlektrophorese. Zum Vergleich sind fünf verschiedene Hausschwein- und fünf verschiedene Wildschweinspuren nebeneinander aufgezeigt.

Abb. 3.23 : Polyacrylamidgелеlektrophorese – Vergleich Hausschwein/Wildschwein

- x – 100bp-Leiter
- 1-5 – verschiedene Hausschweine
- 6-10 – verschiedene Wildschweine
- – Negativprobe

3.5.4 Speziesidentifikation – Katze

Es wurde eine Stichprobe von 40 Spuren verschiedener Katzen untersucht. Abbildung



x 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 - x

Abb. 3.24 : PAGE; 10 Spuren verschiedener Katzen

3.24 zeigt eine niedrigauflösende Polyacrylamidgелеlektrophorese. Verglichen werden zehn Blutspuren verschiedener Katzen. Die Amplifizierung erfolgte mit einem nicht-markierten Primer. Das Gel zeigt bei allen Spuren das gleiche Bandenmuster.

Im Anschluss wurden die Spuren mit einem farbmarkierten Primer amplifiziert, um nachfolgend eine hochauflösende Kapillarelektrophorese durchführen zu können. Die Ergebnisse dieser und aller folgenden

Untersuchungen mit farbmarkiertem Primer erbrachten kein verwertbares Ergebnis. Die Blutspuren, bei denen eine ausreichende Menge an DNA-Material vervielfältigt werden konnte, zeigten

in der Fragmentanalyse keine Gemeinsamkeiten. Beispielhaft zeigt Abbildung 3.25 die Gegenüberstellung von zwei Fragmentanalysen, welche nach Amplifikation zweier unterschiedlicher Katzenblutspuren mit FAM-markiertem Primer erfolgten.

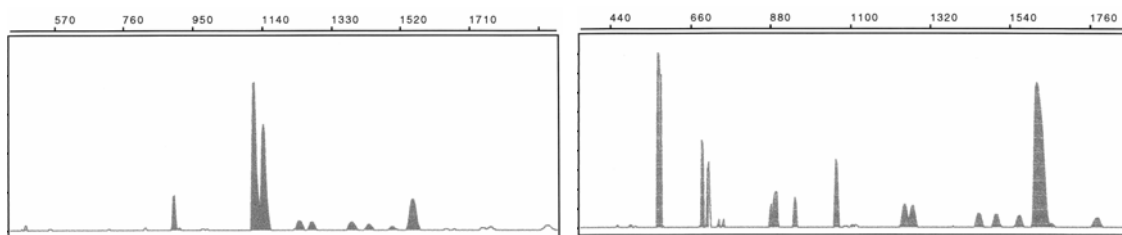


Abb.3.25: Fragmentanalyse zweier unterschiedlicher Katzenblutspuren, amplifiziert mit FAM-markiertem Primer I

Die Speziesidentifikation nach Amplifizierung mit einem nicht-markierten Primer I und Vergleich mittels PAGE ist möglich, die Fragmentanalyse mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese führt in diesem Fall aber zu keinem Ergebnis.

3.5.5 Speziesidentifikation – Pferd, Pony, Esel

Es wurde eine Stichprobe von 15 verschiedenen Pferden (*Equus caballus*), zwei Eseln (*Equus asinus asinus*) und zwei Ponys (*Equus islandicus*) untersucht. Aus dem Bereich exotischer Arten wurde ein Prozewalski-Wildpferd (*Equus przewalskii*, mongolisches Wildpferd) zum Vergleich mit einbezogen.

Tabelle 3.16 zeigt die Auswertung der hochauflösenden Kapillarelektrophorese. Aufgezeigt sind alle Fragmente mit einer Häufigkeit in der Stichprobe von > 50 %. Bei allen amplifizierten Spuren zeigen sich Fragmente mit einer Länge von 400 bp (1), 494 bp (2), 556 bp (3), 690 bp (5), 724 bp (7), 835 bp (8), 875 bp (9) und 1.050 bp (11). Bei den untersuchten Spuren von Ponys treten weiterhin Fragmente mit einer Länge von 1.012 bp (10), 1.380 bp (13) und 1.428bp (15) auf. Bei den untersuchten Spuren von Eseln kommt es dagegen zum Auftreten von Fragmenten mit einer Länge von 1.076 bp (12) und 1.399 bp (14). Beide untersuchten Arten zeigen weiterhin ein Fragment mit 604 bp (4).

Die Fragmente 3 (555 bp), 5 (690 bp) und 8 (835 bp) weisen bei den untersuchten Pferdespuren eine Häufigkeit von 100 % auf. Diese drei Fragmente sind auch jeweils in der einzelnen Spur am signalstärksten. Abbildung 3.26 zeigt den Vergleich von Fragmentenhäufigkeit in der Stichprobe (A, [%]) und Fragmentenhäufigkeit bzw. Signalstärke in der einzelnen Spur (B, indexiert nach der Formel $Y=X*100/\text{größte Häufigkeit}$).

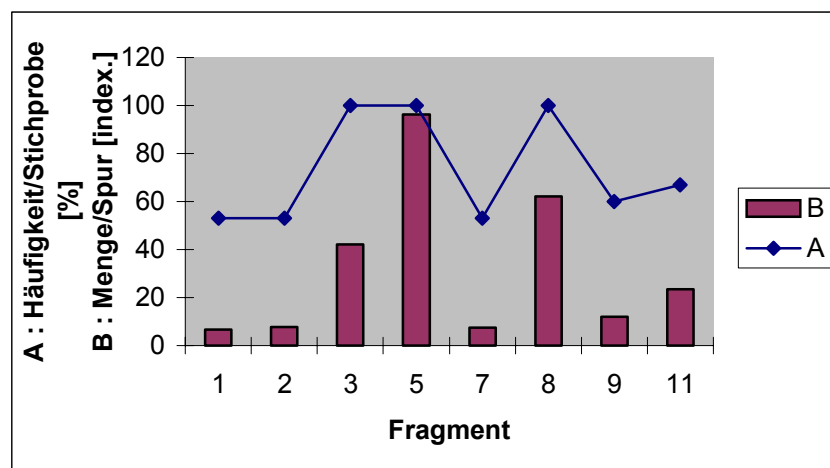


Abb. 3.26 : Vergleich von Häufigkeit eines Fragmentes in der Stichprobe (15 Pferde, A) und innerhalb der einzelnen Spur [Signalstärke, rfu] (B)

Innerhalb aller untersuchter Arten ist die Kombination der Fragmente 3 (555 bp), 5 (690 bp) und 8 (835 bp) zum Speziesnachweis -Pferd, Pony, Esel- ausreichend.

Von Interesse war nun die Fragestellung, ob die nahverwandten Esel und Ponys von den Pferden abzugrenzen sind.

Bei Betrachtung von Tabelle 3.16 zeigt sich, dass sowohl bei den untersuchten Spuren von Eseln als auch von Ponys jeweils drei spezifische Fragmente auftreten. Bei Eseln sind dies die Fragmente 6 (710 bp), 12 (1.075 bp) und 14 (1.399 bp), bei Ponys die Fragmente 10 (1.012 bp), 13 (1.380 bp) und 15 (1.427 bp).

In Abbildung 3.27 ist ein Vergleich der Fragmenthäufigkeiten innerhalb der einzelnen Spuren zwischen Pferd, Pony und Esel dargestellt. Es zeigt sich, dass die jeweils spezifischen Fragmente auch vergleichsweise signalstark in den einzelnen Spuren vorliegen.

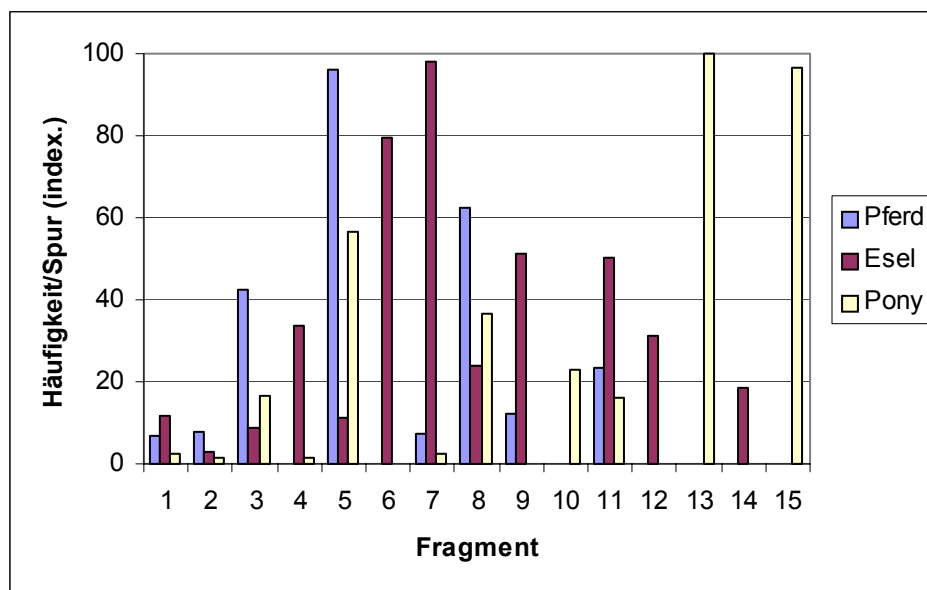


Abb. 3.27 : Vergleich der Fragmenthäufigkeiten innerhalb der einzelnen Spuren von Pferd, Esel und Pony (verglichen mittels der Signalstärke [rfu])

Das Prozewalski-Wildpferd zeigt im Rahmen der durchgeführten Fragmentanalyse keine spezifischen Merkmale gegenüber dem domestizierten Pferd. In den folgenden Abbildungen 3.28 – 3.30 sind die jeweils repräsentativen Fragmentmuster einer mit GeneScan ausgewerteten Blutspur von Pferd, Pony und Esel dargestellt.

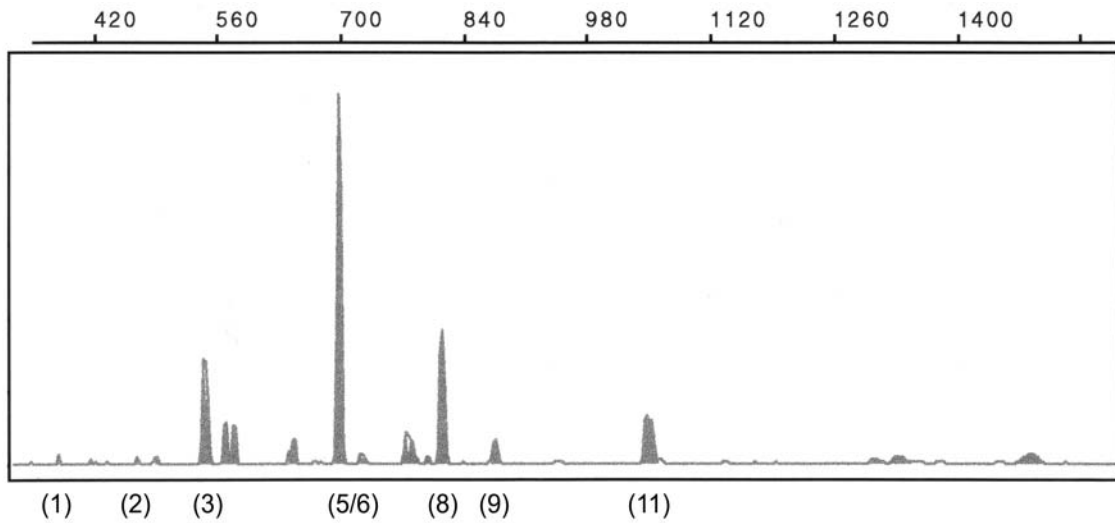


Abb. 3.28 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Pferdes (Tabelle 3.16, Spur 6)

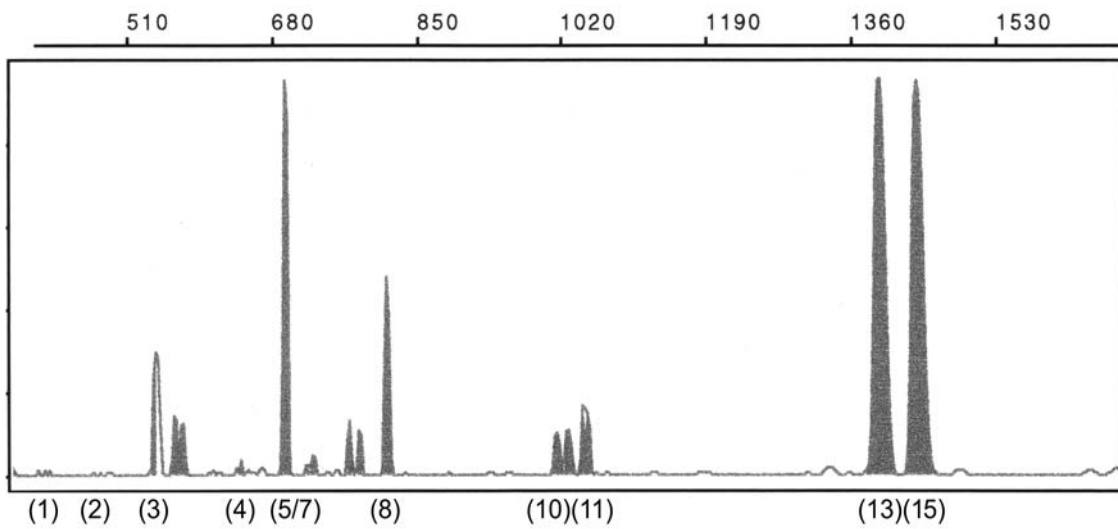


Abb. 3.29 : Fragmentanalyse einer Pony-Blutspur (Tabelle 3.6, Spur Pony 1)

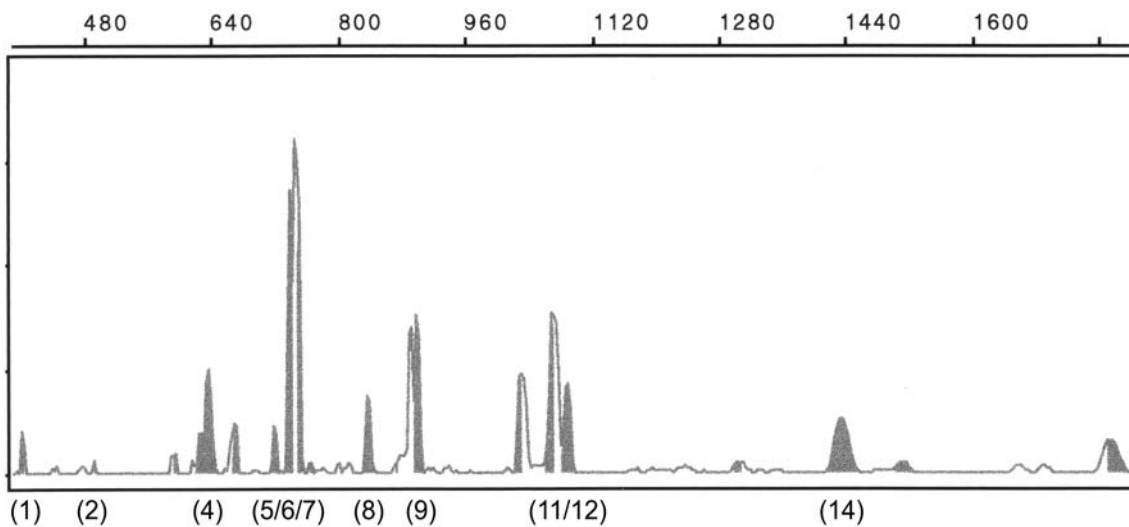


Abb. 3.30 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Esels (Tabelle 3.16, Spur Esel 1)

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Probe															
Pferd 1	400,73	492,75	555,47		690,94		719,02	835,27	874,57		1048,75				
2	400,19	493,68	555,43		690,47		724,36	834,61			1046,51				
3	399,37		554,51		690,43		723,78	836,00	877,13		1052,11				
4	399,40	494,35	554,62		689,95		722,75	835,47	874,82		1049,76				
5			555,87		690,90			835,13			1051,00				
6	400,48	493,02	555,49		690,39		723,53	834,12	874,73		1050,26				
7	399,75	493,91	555,04		690,52		722,78	834,79	874,23		1047,56				
8	399,32	493,79	554,92		689,67		723,30	835,55	876,83		1052,10				
9			554,61		690,10			834,91	873,39						
10			555,50		691,33			835,57	873,38						
11		493,12	554,97		689,09			834,19							
12			554,73		688,82			834,48							
13			554,59		689,09			834,58							
14			557,18		696,00			837,21			1051,84				
15	400,71	493,01	555,53		689,93		723,55	833,81	873,38		1045,86				
Prozewalski	399,05		556,33		693,80		722,47	836,86	876,74		1052,70				
Pony 1	399,47	496,68	556,34	603,42	692,90		724,51	836,02		1011,62	1052,19		1384,63		1430,32
Pony 2	400,31	493,48			690,03		725,23	835,27		1012,71	1048,47		1375,55		1425,47
Esel 1	398,66	494,12		604,44	687,30	710,90	723,44	833,73	875,36		1049,33	1075,39		1398,76	
Esel 2	399,33		558,54	603,73	687,67	710,43	728,88	833,99	875,21		1050,93	1075,69		1399,55	
Mittelwert [bp]	399,75	493,81	555,54	603,86	690,47	710,67	723,66	835,08	874,98	1012,17	1049,96	1075,54	1380,09	1399,16	1427,90
Standardabw.	0,67	1,08	1,04	0,52	1,98	0,33	2,15	0,96	1,34	0,77	2,17	0,21	6,42	0,56	3,43
Varianz	0,44	1,16	1,08	0,27	3,93	0,11	4,64	0,92	1,80	0,59	4,71	0,05	41,22	0,31	11,76

Tab. 3.16: Untersuchungsreihe 20 Spuren verschiedener Pferde (inkl. Prozewalski-Wildpferd, Pony und Esel)

3.5.6 Speziesidentifikation – sonstige heimische Tiere

Das Kapitel sonstige heimische Tiere umfasst im Einzelnen die Amplifizierungsergebnisse von folgenden Spurenverursachern:

- Schalenwild (Rehwild) - 6 Spuren
- Rotwild - 2 Spuren
- Huhn - 4 Spuren
- Zwergkaninchen - 2 Spuren
- Schaf - 1 Spur
- Stubenfliege u. Kleidermotte - 3 Spuren

Von der Gattung Rehwild wurden Blutspuren sechs verschiedener Tiere untersucht. In Tabelle 3.17 ist das Ergebnis der Fragmentanalyse dargestellt, Abbildung 3.31 zeigt beispielhaft das Fragmentmuster einer mit GeneScan ausgewerteten Rehblutspur. Es kommt zum Auftreten von Fragmenten mit einer Länge von 495 bp (1), 563 bp (2), 580 bp (3), 643 bp (4), 802 bp (5), 826 bp (6), 836 bp (7) und 954 bp (8).

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8
Probe								
Rehwild 1	492,99	562,86				826,26	837,47	953,39
2		563,63	580,29	643,61	801,32	825,50	835,84	954,80
3				643,85	801,99	826,26		953,73
4	493,82	561,47	576,63	641,84			834,47	
5	497,59		581,62		802,53	827,20	836,49	953,50
6	496,78		580,59		802,20	825,76	835,91	954,46
Mittelwert [bp]	495,30	562,65	579,78	643,10	802,01	826,20	836,04	953,98
Standardabw.	2,23	1,09	2,18	1,10	0,51	0,65	1,09	0,62
Varianz	4,99	1,20	4,74	1,21	0,26	0,42	1,19	0,39

Tab. 3.17 : Untersuchungsreihe Schalenwild (Rehwild), 6 verschiedene Blutspuren

Bei Betrachtung von Tabelle 3.18 fällt auf, dass kein Fragment bei allen untersuchten Proben vorhanden ist, weshalb keine eindeutige Fragmentkombination für die Gattung Rehwild definiert werden kann.

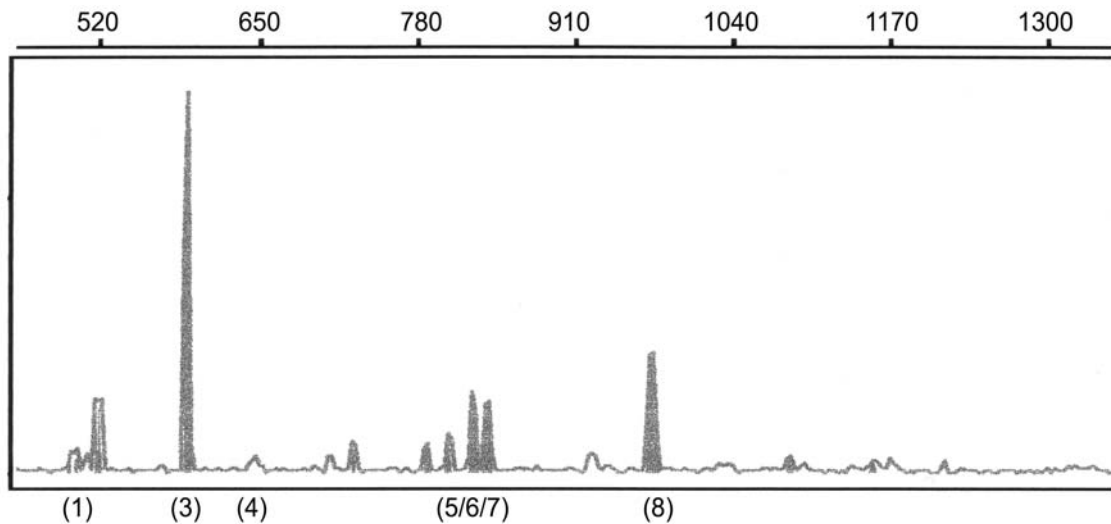


Abb. 3.31 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Rehs (Tabelle 3.17, Spur 5)

Die Untersuchung der Blutspuren von zwei verschiedenen Tieren der Gattung Rotwild erbrachte ebenfalls kein eindeutiges Ergebnis. Beiden Spuren gemeinsam ist ein Fragmentpaar mit einer Länge von 1.131 bp und 1.143 bp. Die weiteren, mit nur sehr geringer Signalstärke auftretenden Fragmente sind jedoch unterschiedlich. Aufgrund der geringen Spurenanzahl ist eine eindeutige Zuordnung repräsentativer Fragmente nicht möglich.

Es wurden insgesamt vier Spuren unterschiedlicher Hühnerküken untersucht. Die Ergebnisse der Fragmentanalyse sind in Tabelle 3.18 dargestellt. Abbildung 3.32 zeigt das typische Fragmentmuster einer mit GeneScan ausgewerteten Hühnerkükenblutspur. Hierbei zeigen sich Fragmente mit einer Länge von 394 bp (1), 768 bp (2), 929 bp (3), 937 bp (4), 1.094 bp (5), 1.268 bp (6), 1.299 bp (7), 1.479 bp (8) und 1.697 bp (9).

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Küken 1	394,55	767,95	929,19	937,20		1267,97	1298,70	1482,30	1696,94
2	394,23	767,96	929,13	937,64	1095,30	1267,04	1297,17	1478,90	1696,15
3	393,38	767,60	929,81	937,53		1269,75	1299,70		1696,69
4	394,04		926,50		1092,47			1475,54	
Mittelwert [bp]	394,05	767,84	928,66	937,46	1093,89	1268,25	1298,52	1478,91	1696,59
Standardabw.	0,49	0,21	1,47	0,23	2,00	1,38	1,27	3,38	0,40
Varianz	0,24	0,04	2,16	0,05	4,00	1,90	1,62	11,42	0,16

Tab. 3.18 : Untersuchungsreihe Hühnerküken, 4 verschiedene Blutspuren

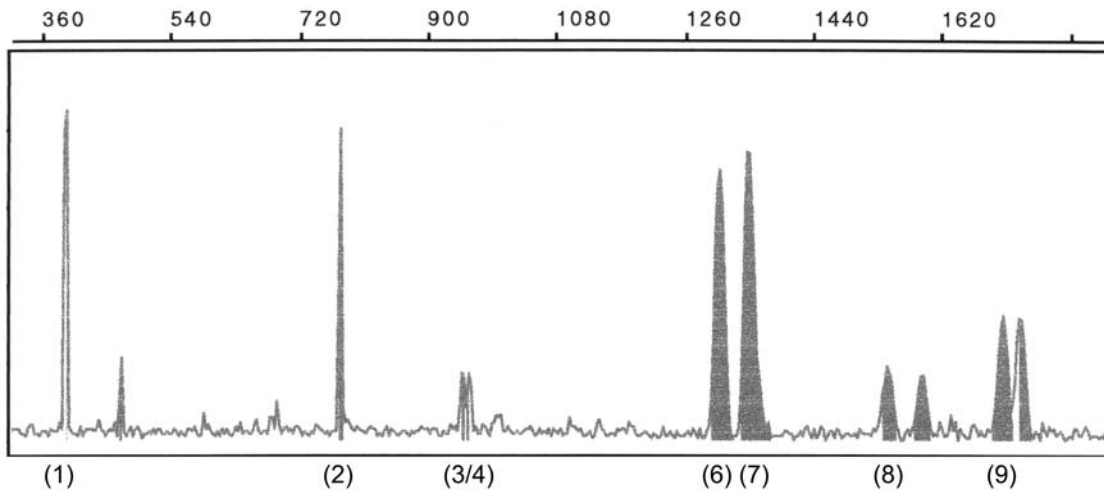


Abb. 3.32 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Kükens (Tabelle 3.18, Spur 1)

Zur Untersuchung von Zwergkaninchen standen zwei verschiedene Blutspuren zur Verfügung. Tabelle 3.19 zeigt die Ergebnisse der Fragmentanalyse, Abbildung 3.33 das typische Fragmentmuster. Es kommt zum Auftreten von Fragmenten mit einer Länge von 403 bp (1), 495 bp (2), 563 bp (3), 703 bp (4), 733 bp (5), 839 bp (6), 885 bp (7), 1.060 bp (8) und 1.455 bp (9).

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Kaninchen 1	402,53	495,28	563,23	702,91	732,59	838,36	884,64	1060,13	1454,52
2	402,65	494,91	563,03	702,52	734,91	839,14	885,16	1061,02	1455,07

Tab. 3.19 : Untersuchungsreihe Zwergkaninchen, 2 verschiedene Blutspuren

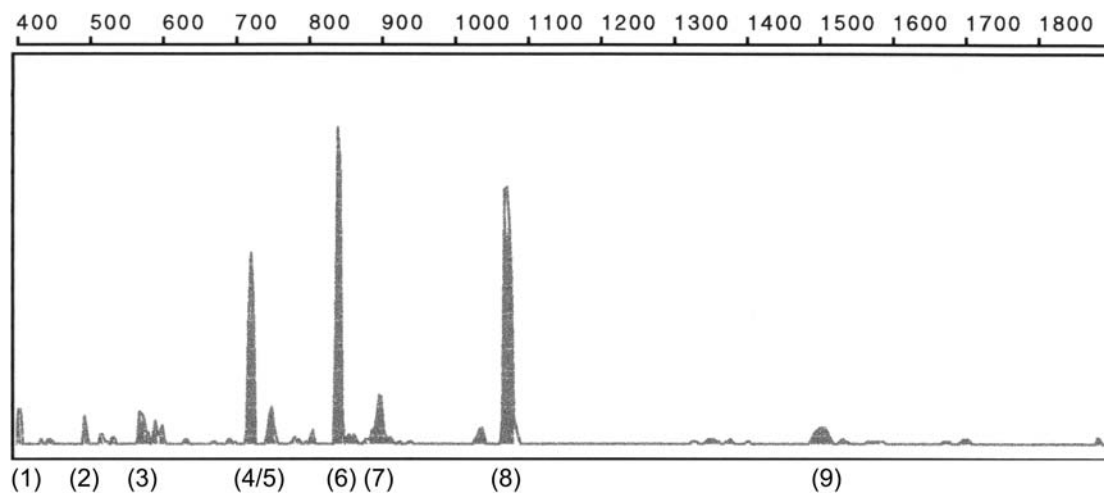


Abb. 3.33: Fragmentanalyse der Blutspur eines Kaninchens (Tabelle 3.19, Spur 1)

Weiterhin wurde die Blutspur eines Schafes untersucht. In Tabelle 3.20 ist das Ergebnis der Fragmentanalyse dargestellt, Abbildung 3.34 zeigt das Fragmentmuster der untersuchten Spur. Hierbei zeigen sich Fragmente mit einer Länge von 354 bp (1), 527 bp (2), 859 bp (3), 642 bp (4) 847 bp (5) und 1.017 bp (6).

Fragment	1	2	3	4	5	6
Probe						
Schaf	353,52	526,93	858,86	641,94	847,41	1016,80

Tab. 3.20 : Untersuchung einer Schafblutspur

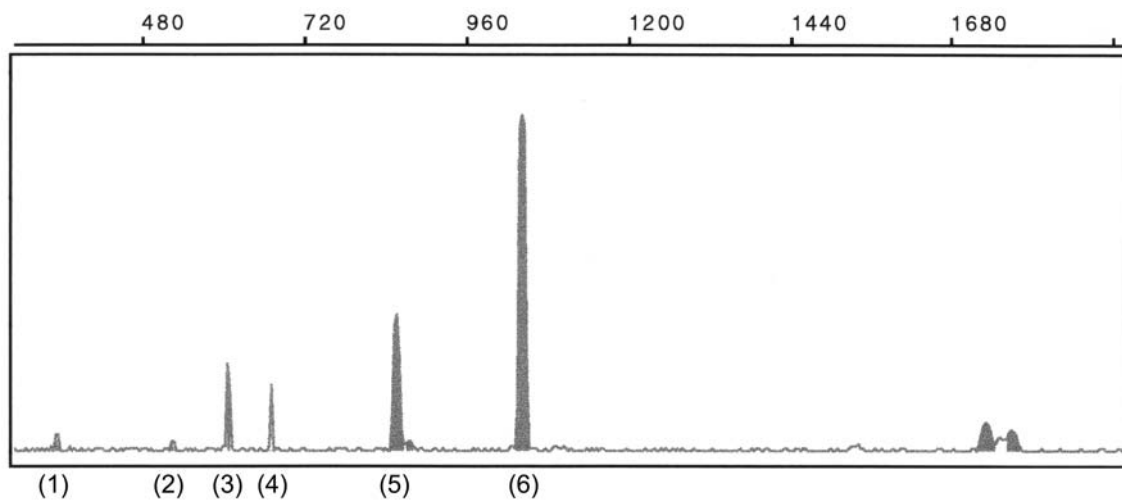


Abb. 3.34 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Schafes (Tab. 3.20)

Die Amplifizierung von Insekten beschränkt sich auf den Nachweis, dass mit der verwendeten Untersuchungstechnik ein verwertbares Ergebnis herbeizuführen ist.

Hierzu wurde Gewebe einer Stubenfliege (*Musca domestica*) sowie zweier Kleidermotten (*Tineola bisselliella*) untersucht. Das Ergebnis der Fragmentanalyse der beiden Gewebesuren von Motten ist in Tabelle 3.21 dargestellt. Es stellen sich Fragmente mit einer Länge von 576 bp (1), 582 bp (2), 588 bp (3), 611 bp (4), 618 bp (5), 706 bp (6), 710 bp (7), 919 bp (8) und 1.237 bp (9). Bei wiederholter Untersuchung der Gewebespur Motte 1 kam es, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, zu einer Verschiebung der bp-Skala. Tabelle 3.22 zeigt, dass die detektierten Fragmente der Spur Motte 1* eigentlich nicht zum Ergebnis Motte passen.

Zur Verdeutlichung, dass trotz Verschiebung der bp-Skala eine Spezieszuordnung möglich ist, wird das Fragmentmuster dieser Spur dem ursprünglichen Ergebnis zum Vergleich gegenübergestellt (siehe Abb. 3.35). Beide Fragmentmuster erscheinen deckungsgleich.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Motte 1	575,99	582,36	587,98	610,79	619,92	706,05	710,41	918,60	1236,82
2	576,08	583,34	588,71	610,77	617,04	705,76	710,01	918,81	1237,84
Motte 1*	566,10	571,59	576,62	597,11	605,75	694,04	698,46	904,56	1235,40

Tab. 3.21 : Untersuchungsreihe Motten, 2 verschiedene Gewebesuren

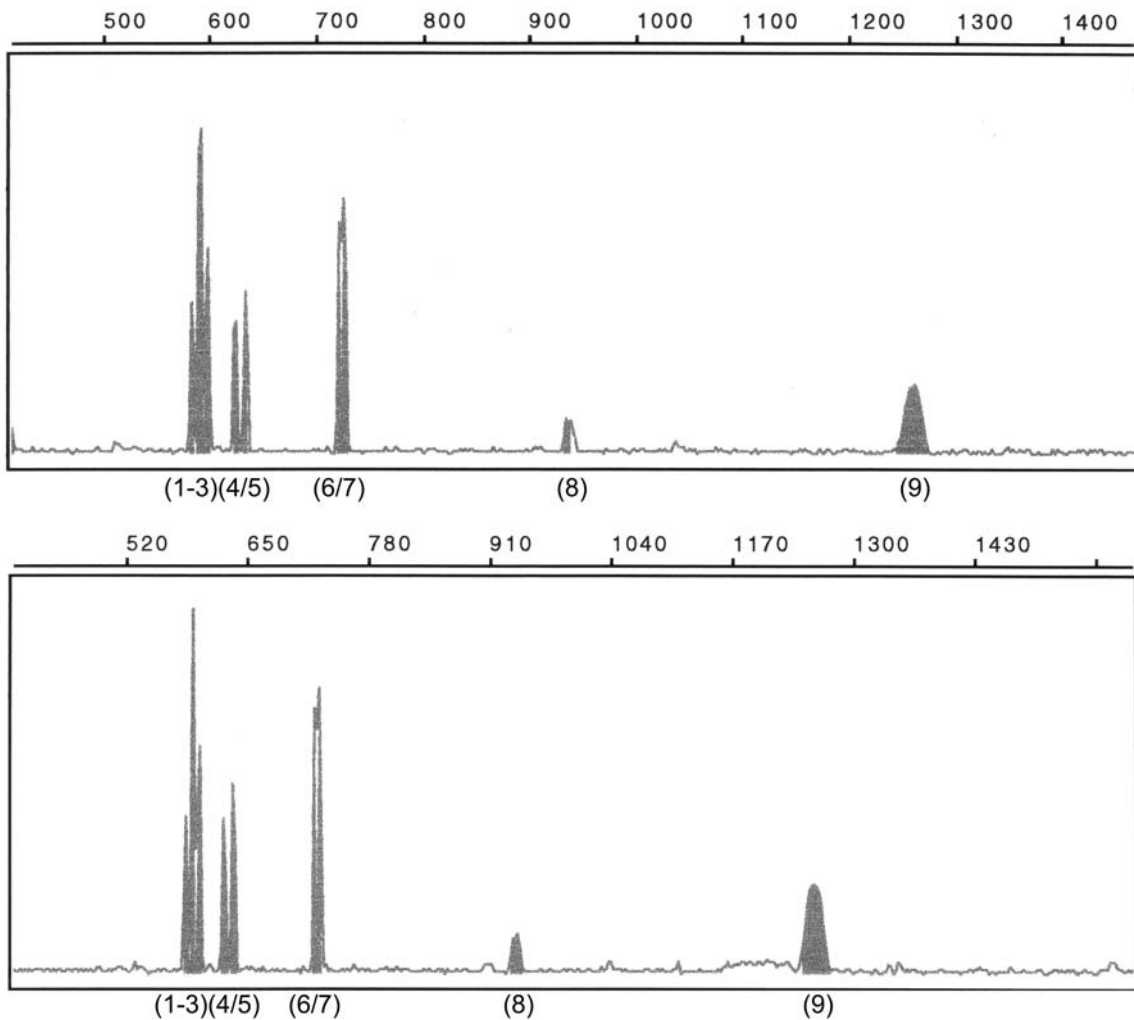


Abb. 3.35 : Fragmentanalyse der Gewebespur einer Motte (Tab. 3.21, Motte 1 und 1*)

Das Ergebnis der Fragmentanalyse des Fliegengewebes ist in Tabelle 3.22 dargestellt, das resultierende Fragmentmuster zeigt Abbildung 3.36. Es resultieren Fragmente mit einer Länge von 499 bp (1), 534 bp (2), 547 bp (3), 718 bp (4), 904 bp (5), 947 bp (6), 1.115 bp (7), 1.190 bp (8) und 1.434 bp (9).

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Fliege	499,37	533,97	546,52	717,86	904,40	947,00	1114,59	1189,56	1434,44

Tab. 3.22 : Untersuchung von Fliegengewebe

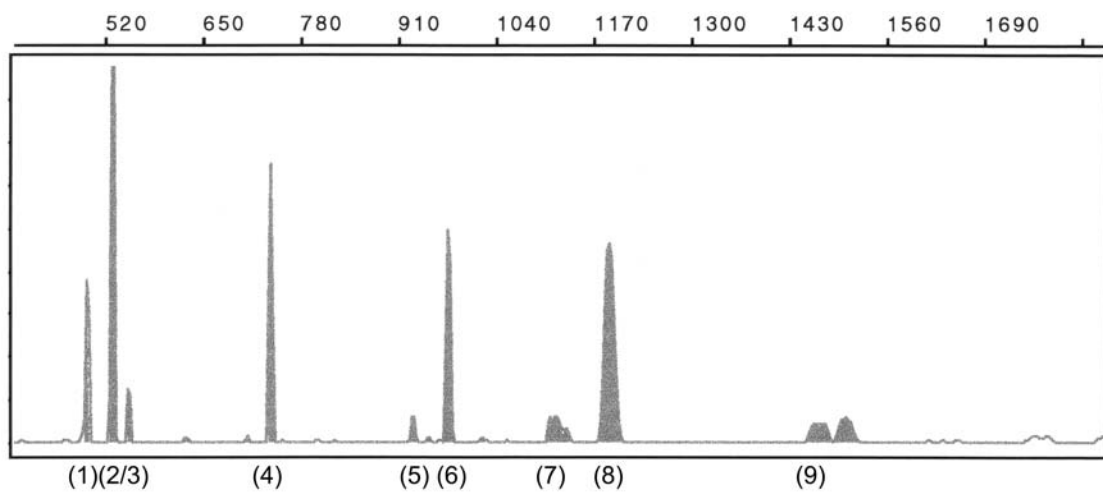


Abb. 3.36 : Fragmentanalyse der Gewebespur einer Fliege (Tab. 3.22)

3.5.7 Speziesidentifikation – exotische Tiere

Das Kapitel exotische Tiere umfasst im Einzelnen die Amplifizierungsergebnisse von Spuren folgender Tiere:

- Afrikanischer Krallenfrosch - 6 Spuren
- Südafrikanischer Seebär - 2 Spuren
- Hausyak - 2 Spuren
- Trampeltier - 2 Spuren
- Bartaffe - 2 Spuren
- Sumatra Orang-Utan - 2 Spuren
- Weißschulterkapuzineräffchen - 3 Spuren
- Damagazelle - 2 Spuren
- Afrikanischer Elefant - 1 Spur
- Amurtiger - 1 Spur

Es wurden insgesamt sechs Spuren unterschiedlicher Krallenfrösche (Xenopus laevis) untersucht. Die Ergebnisse der Fragmentanalyse sind in Tabelle 3.23 dargestellt. Abbildung 3.37 zeigt das typische Fragmentmuster einer mit GeneScan ausgewerteten Blutspur. Es kommt zum Auftreten von Fragmenten mit einer Länge von 501 bp (1), 586 bp (2), 605 bp (3), 660 bp (4), 885 bp (5), 931 bp (6), 1.174 bp (7), 1.215 bp (8) und 1.294 bp (9), wobei Fragment (1) besonders signalstark ist.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Xenopus l. 1	500,02				885,52		1172,85	1216,28	1293,03
2	500,74	586,79	604,59	659,53	885,11	931,48		1213,99	1292,07
3	500,62	586,84	604,38	659,72	884,48	931,09	1174,92	1215,06	1295,04
4	500,22	583,69	604,23	659,56	885,46	932,13	1172,64	1214,36	1291,89
5	501,54		604,92	659,62	886,27		1173,64	1216,15	1294,51
6	501,51	587,03		659,85		931,16	1173,78	1217,08	1295,82
Mittelwert [bp]	500,78	586,09	604,53	659,66	885,37	931,47	1173,57	1215,49	1293,73
Standardabw.	0,64	1,60	0,30	0,13	0,65	0,47	0,90	1,21	1,63
Varianz	0,41	2,57	0,09	0,02	0,43	0,23	0,81	1,46	2,66

Tab. 3.23 : Untersuchungsreihe Krallenfrosch, 6 verschiedene Blutspuren

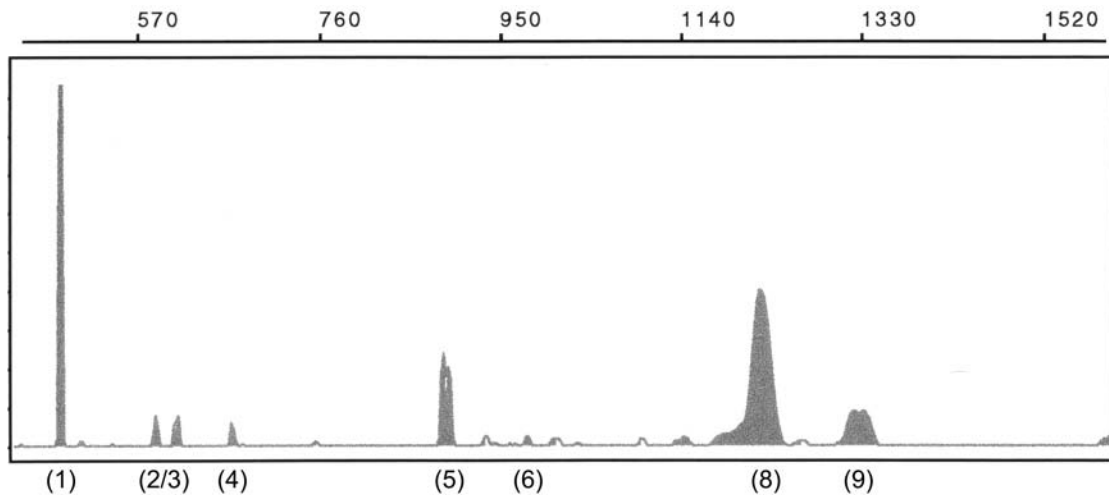


Abb. 3.37 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Krallenfrosches (Tabelle 3.23, Spur 2)

Zur Untersuchung afrikanischer Seebären standen zwei Spuren zur Verfügung. Tabelle 3.24 zeigt das Ergebnis der Fragmentanalyse, in Abbildung 3.38 ist das Fragmentmuster einer mit GeneScan ausgewerteten Blutspur dargestellt. Es resultieren Fragmente mit einer Länge von 491 bp (1), 548 bp (2), 554 bp (3), 660 bp (4), 680 bp (5), 874 bp (6), 1.166 bp (7), 1.205 bp (8) und 1.323 bp (9). Besonders signalstark stellt sich das Fragmentpaar (2)/(3) dar.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Seebär 1	492,25	548,25	554,13	660,67	680,12	873,65			1322,52
2	490,47	548,50	554,07	660,03	680,03	873,69	1166,24	1205,47	

Tab.3.24: Untersuchungsreihe afrikanischer Seebär, 2 versch. Blutspuren

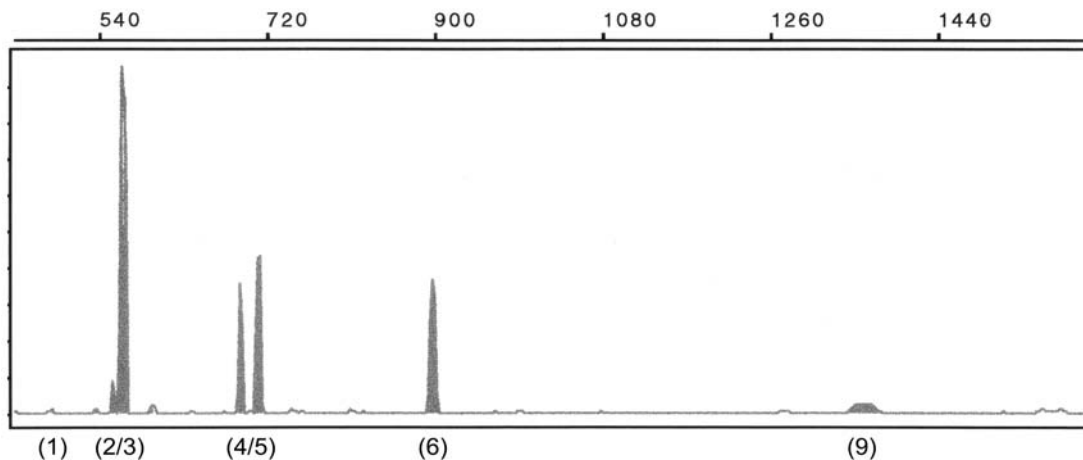


Abb. 3.38 : Fragmentanalyse der Blutspur eines afrikanischen Seebären (Tabelle 3.24, Spur 1)

Von der Gattung Hausyak wurden ebenfalls zwei Blutspuren untersucht. Das Ergebnis der Fragmentanalyse ist in Tabelle 3.25 zu sehen, Abbildung 3.39 zeigt das Fragmentmuster der hochauflösenden Kapillarelektrophorese. Hierbei zeigen sich Fragmente mit einer Länge von 494 bp (1), 879 bp (2), 960 bp (3), 968 bp (4), 1.125 bp (5), 1.147 bp (6) und 1.179 bp (7). Die Fragmente (3), (4) und (7) stellen sich nur bei einer von zwei Spuren dar. Das bei beiden Spuren auftretende Fragment (2) stellt sich besonders signalstark dar.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7
Probe							
Hausyak 1	494,86	883,70	960,34	968,76	1128,52	1149,49	1179,22
2	494,72	875,86			1122,70	1145,14	

Tab. 3.25 : Untersuchungsreihe Hausyak, 2 verschiedene Blutspuren

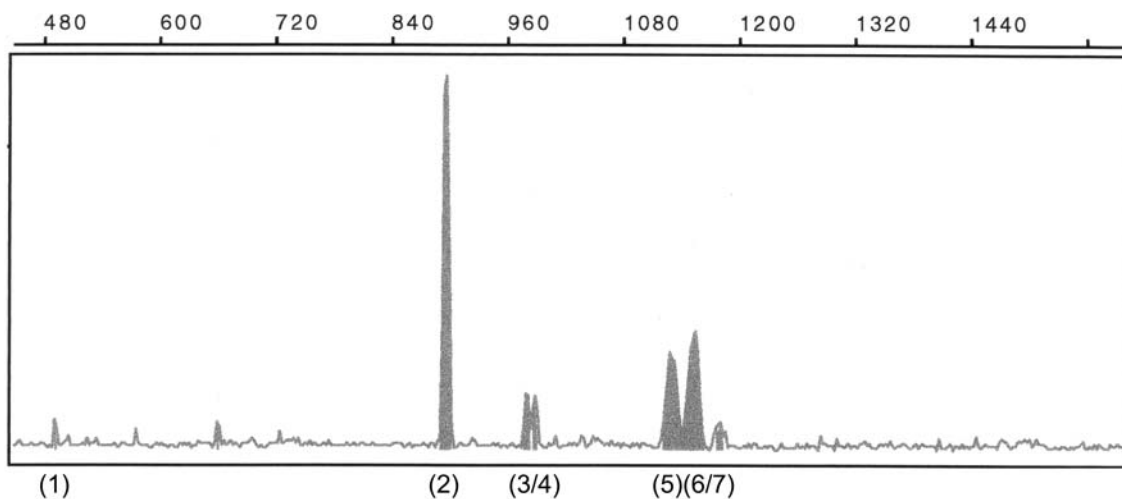


Abb.3.39 : Fragmentanalyse einer Hausyakblutspur (Tab. 3.25, Spur 1)

Zur Untersuchung der Gattung Trampeltier kamen zwei verschiedene Blutspuren zum Einsatz. Tabelle 3.26 zeigt das Ergebnis der Fragmentanalyse, Abbildung 3.40 das Fragmentmuster einer mit GeneScan ausgewerteten Blutspur. Es stellen sich Fragmente mit einer Länge von 774 bp (1), 859 bp (2), 863 bp (3), 946 bp (4), 954 bp (5), 1.147 bp (6) und 1.332 bp (7) dar.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7
Probe							
Trampeltier 1	773,94	858,93	862,91	946,11	954,37	1148,21	1332,99
2	774,19	859,72	863,06	946,90	954,42	1147,02	1331,98

Tab. 3.26 : Untersuchungsreihe Trampeltier, 2 verschiedene Blutspuren

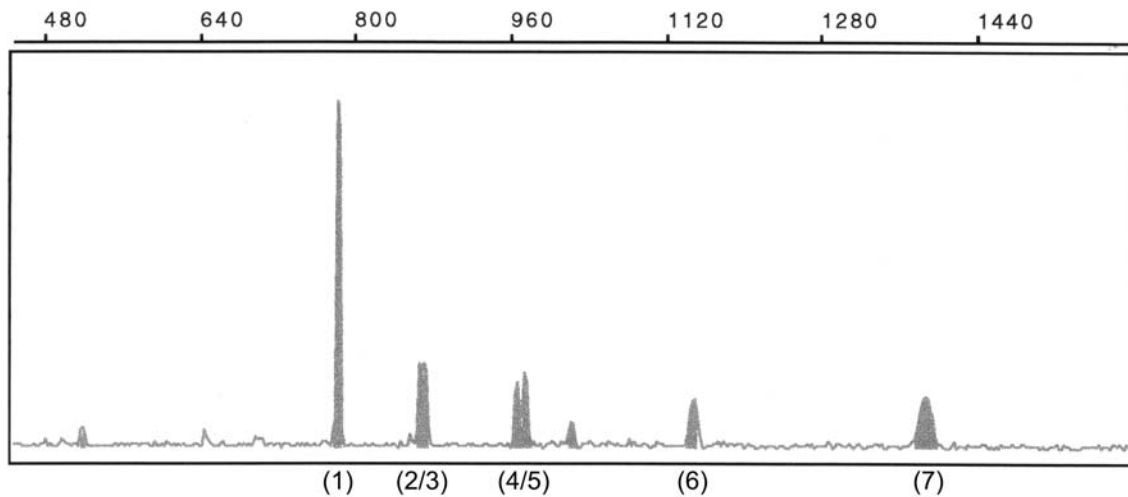


Abb. 3.40 : Fragmentanalyse einer Trampeltierblutspur (Tab. 3.26, Spur 1)

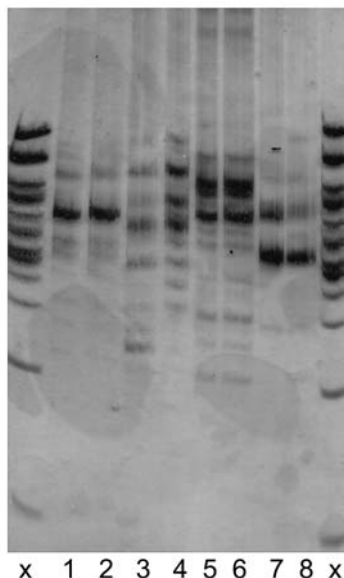


Abbildung 3.41 zeigt eine Polyacrylamidgелеlektrophorese. Zum Vergleich sind vier verschiedene exotische Arten nebeneinander aufgetragen.

Abb. 3.41 : PAGE – Vergleich verschiedener exotischer Tierarten

- X – 100bp-Leiter
- 1,2 – Damagazelle
- 3,4 – Trampeltier
- 5,6 – Hausyak
- 7,8 – südafrikanischer Seebär

Weiterhin wurden zwei Blutspuren unterschiedlicher Bartaffen untersucht. Das Ergebnis der Fragmentanalyse ist in Tabelle 3.27 dargestellt, Abbildung 3.42 zeigt das aus der hochauflösenden Kapillarelektrophorese resultierende Fragmentmuster. Es

resultieren Fragmente mit einer Länge von 558 bp (1), 562 bp (2), 647 bp (3), 649 bp (4), 1.307 bp (5), 1.581 bp (6), und 1.592 bp (7).

Fragment	1	2	3	4	5	6	7
Probe							
Bartaffe 1	558,35	562,35	647,07	649,41		1583,57	1594,63
2	558,33	562,46	646,88	649,61	1306,51	1579,28	1590,27

Tab. 3.27 : Untersuchungsreihe Bartaffe, 2 verschiedene Blutspuren

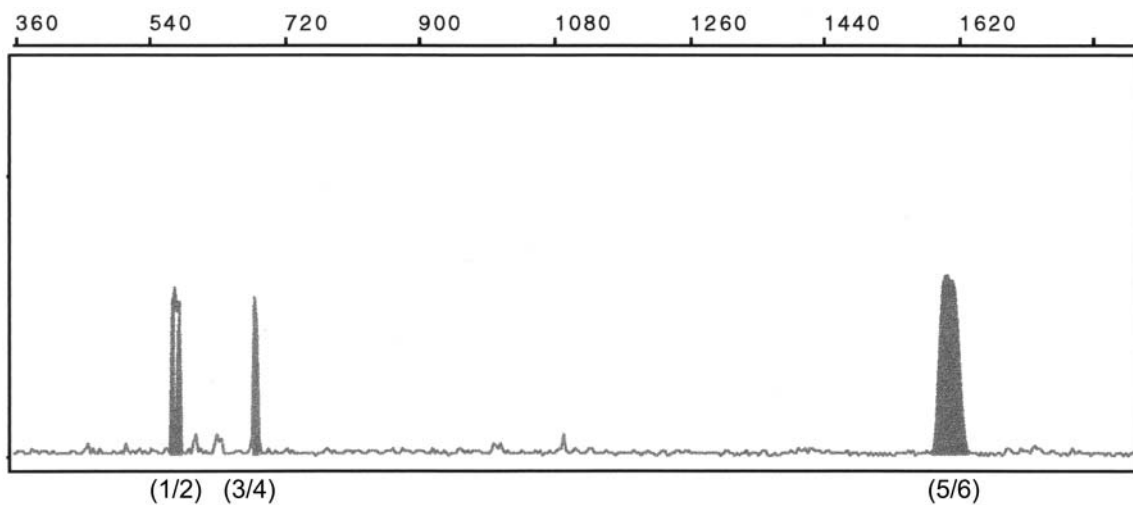


Abb. 3.42 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Bartaffen (Tab. 3.27, Spur 1)

Zur Untersuchung der Sumatra Orang-Utans standen zwei Blutspuren zur Verfügung. Tabelle 3.28 zeigt das Ergebnis der Fragmentanalyse, Abbildung 3.43 das Fragmentmuster einer mit GeneScan ausgewerteten Blutspur. Hierbei zeigen sich Fragmente mit einer Länge von 557 bp (1), 561 bp (2), 744 bp (3), 873 bp (4), 893 bp (5), 900 bp (6), 1.149 bp (7), 1.180 bp (8) und 1.214 bp (9).

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Orang-Utan 1	557,78	560,41		872,80	894,50	900,79	1149,99	1182,14	1214,08
2	557,60	561,21	744,18	872,27	892,20	899,62	1149,05	1177,56	

Tab. 3.28: Untersuchungsreihe Sumatra Orang-Utan, 2 versch. Blutspuren

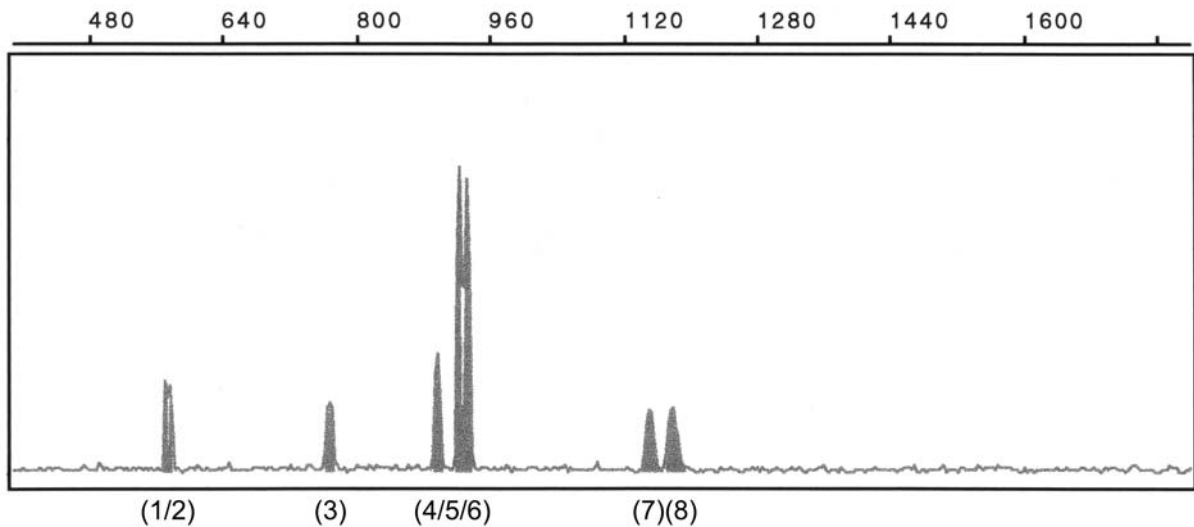


Abb. 3.43 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Sumatra Orang-Utans
(Tab. 3.28, Spur 2)

Von der Spezies Weißschulterkapuziner wurden drei Blutspuren untersucht. In Tabelle 3.29 ist das Ergebnis der Fragmentanalyse dargestellt, Abbildung 3.44 zeigt das aus der hochauflösenden Kapillarelektrophorese resultierende Fragmentmuster. Es zeigen sich Fragmente mit einer Länge von 460 bp (1), 472 bp (2), 575 bp (3), 605 bp (4), 699 bp (5), 721 bp (6), 874 bp (7), 888 bp (8) und 933 bp (9).

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Kapuziner 1		473,29	573,99			720,65	874,80	891,85	
2	460,49	472,75	575,52	605,56	699,20	721,91	875,68	886,17	936,29
3	460,10	472,44	575,98	605,45	699,13	722,10	872,01	886,66	929,11

Tab. 3.29: Untersuchungsreihe Weißschulterkapuziner, 3 verschiedene Blutspuren

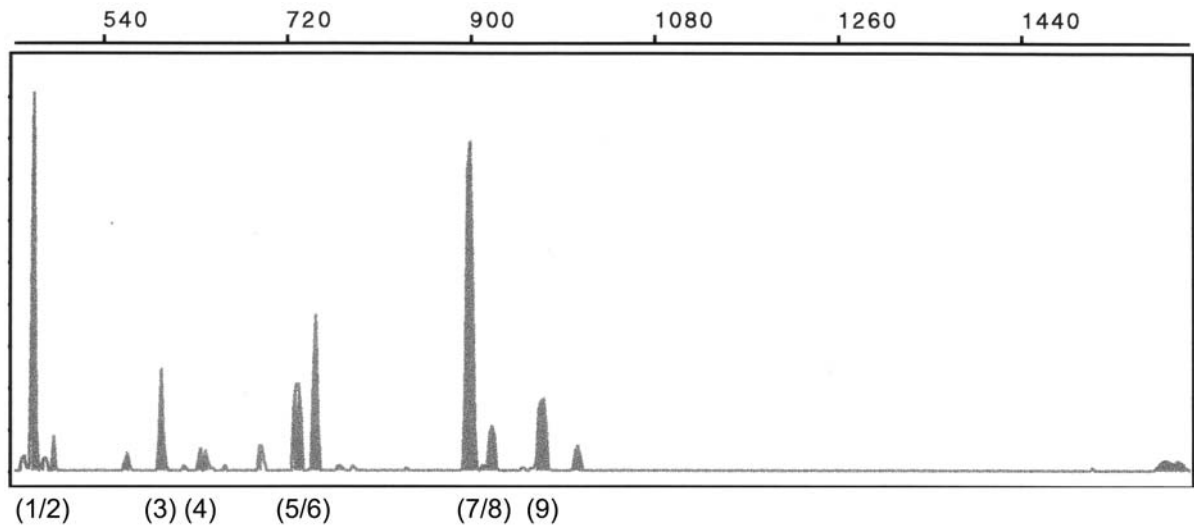


Abb. 3.44 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Weißschulterkapuziners (Tab. 3.29, Spur 2)

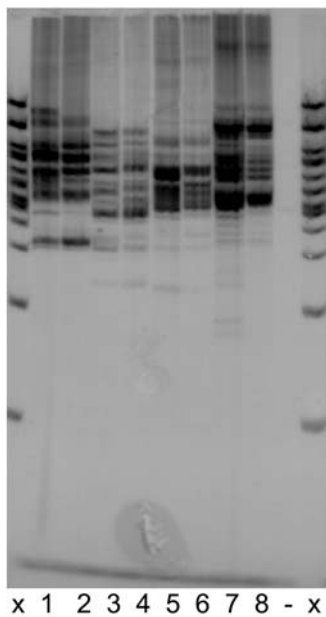


Abbildung 3.45 zeigt ein Polyacrylamidgel. Dargestellt ist die Übersicht der drei untersuchten Affenarten sowie zum direkten Vergleich zwei menschliche Spuren.

Abb.3.45: PAGE –Vergleich des Fragmentmuster verschiedener Affenarten und des Menschen
 X – 100bp-Leiter
 1,2 – Sumatra Orang-Utan
 3,4 – Bartaffe
 5,6 – Weißschulterkapuziner
 7,8 – Mensch
 - Negativprobe

Zur Untersuchung von Damagazellen standen zwei Blutspuren zur Verfügung. Tabelle 3.30 zeigt das Ergebnis der Fragmentanalyse, Abbildung 3.46 das Fragmentmuster einer mit GeneScan ausgewerteten Blutspur. Es stellen sich Fragmente mit einer Länge von 492 bp (1), 561 bp (2), 599 bp (3), 877 bp (4), 1.134 bp (5), 1.155 bp (6), 1.233 bp (7), 1.292 bp (8) und 1.430 bp (9) dar. Hierbei zeigt sich Fragment (4) besonders signalstark.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Damagazelle 1	491,65	561,81	599,66	876,49	1135,06	1155,31	1235,85	1293,55	
2	492,13	560,91	598,56	876,61	1132,77	1154,44	1231,04	1291,76	1429,99

Tab. 3.30 : Untersuchungsreihe Damagazelle, 2 verschiedene Blutspuren

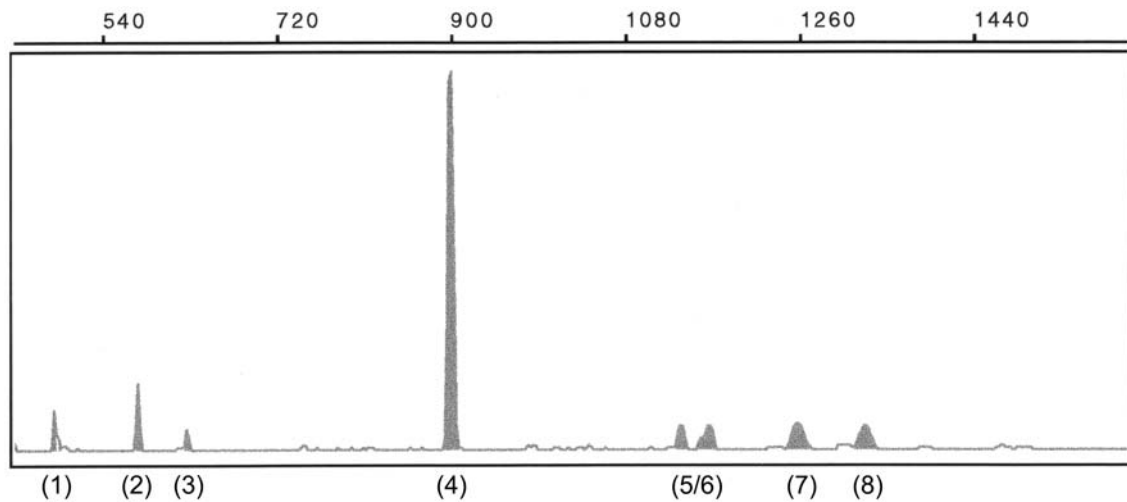


Abb. 3.46 : Fragmentanalyse der Blutspur einer Damagazelle (Tab. 3.30, Spur 1)

Von den Gattungen afrikanischer Elefant und Amurtiger stand jeweils nur eine Blutspur zur Verfügung. In Tabelle 3.31 ist das Ergebnis der Fragmentanalyse der Elefantenblutspur dargestellt, Tabelle 3.32 zeigt das Ergebnis der Tigerblutspur. Die jeweiligen Fragmentmuster sind in Abbildung 3.47 und 3.48 zu sehen. Aus der Fragmentanalyse des afrikanischen Elefanten resultieren Fragmente mit einer Länge von 556 bp (1), 643 bp (2), 843 bp (3), 875 bp (4), 935 bp (5), 1.073 bp (6), 1.087 bp (7), 1.100 bp (8) und 1.216 bp (9). Bei der Amplifikation des Amurtigers zeigen sich Fragmente mit einer Länge von 554 bp (1), 632 bp (2), 677 bp (3), 778 bp (4), 788 bp (5), 880 bp (6), 1.085 bp (7), 1.139 bp (8) und 1.259 bp (9).

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Afrik. Elefant	555,84	642,78	842,96	875,36	934,83	1073,19	1087,79	1100,44	1215,89

Tab. 3.31 : Untersuchung der Blutspur eines afrikanischen Elefanten

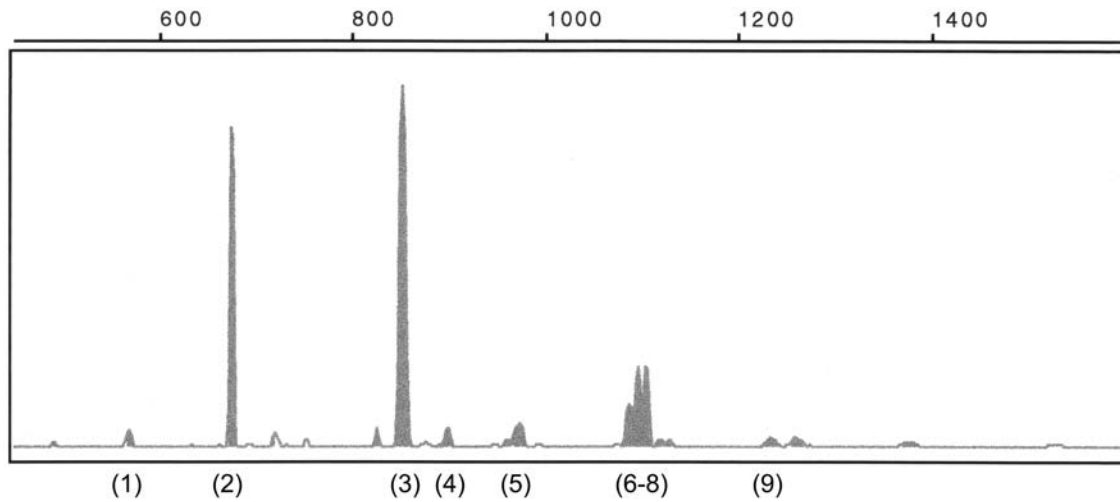


Abb. 3.47 : Fragmentanalyse der Blutspur eines afrik. Elefanten (Tab. 3.31)

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Amurtiger	554,44	632,33	677,09	777,73	787,73	880,03	1085,20	1138,60	1258,97

Tab. 3.32 : Untersuchung der Blutspur eines Amurtigers

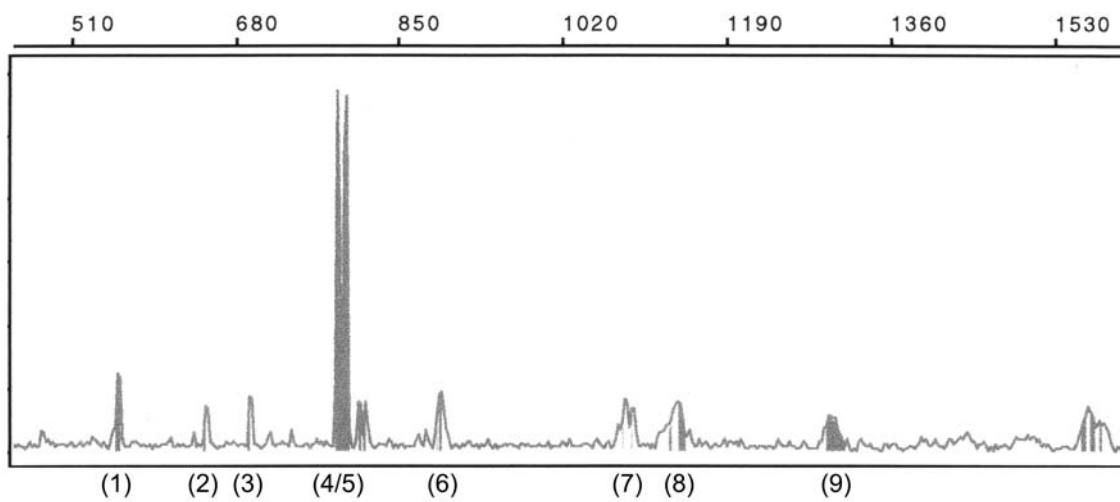


Abb. 3.48 : Fragmentanalyse der Blutspur eines Amurtigers (Tab. 3.32)

3.6 Untersuchung von Pflanzengewebe

Dieses Kapitel beschränkt sich auf den Nachweis, dass mittels der verwendeten Untersuchungsmethode auch die Unterscheidung verschiedener Pflanzen gelingt.

Hierzu wurden Pflanzenteile zerkleinert und der Chelex-100-Extraktion unterzogen (siehe Kapitel 2.2.1). Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung mittels Diatomeen (siehe Kapitel 2.2.5). Zur Amplifikation wurden für die Darstellung mittels Kapillarelektrophorese FAM-markierte Primer eingesetzt. Ein verwertbares Ergebnis konnte nur bei Einsatz von Primer II erzielt werden. Primer I und III erzeugten keine ausreichende DNA-Menge (siehe Kapitel 3.2).

Von drei verschiedenen Gartenkräuterarten (Schnittlauch, Basilikum, Petersilie) wurden jeweils zwei unterschiedliche Proben untersucht und ausgewertet. Die Ergebnisse der Fragmentanalyse sowie die Fragmentmuster sind in Tabelle 3.33 und Abbildung 3.49 – 3.51 dargestellt.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Schnittlauch 1	473,27	537,48	562,58	701,81	797,47	840,08	1066,20	1255,02	1272,76
2	472,48	537,22	562,43	700,68	797,37	837,21	1063,25	1253,58	1273,07
Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Basilikum 1	606,75	609,44	756,34	800,83	994,26	1013,02	1259,01	1276,04	1378,51
2	606,93	609,76	756,02	800,49					1388,24
Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
Petersilie 1	374,13	586,12	622,49	665,81	738,43	810,01	1052,01	1096,43	1330,74
2	374,00	586,45	622,64	666,78	738,25	808,71	1050,66	1095,16	1330,32

Tab. 3.33 : Untersuchungsreihe verschiedene Gartenkräuter

Bei der Fragmentanalyse von Schnittlauchgewebe stellen sich Fragmente mit einer Länge von 473 bp (1), 537 bp (2), 562 bp (3), 701 bp (4), 797 bp (5), 839 bp (6), 1.064 bp (7), 1.254 bp (8) und 1.273 bp (9) dar. Aus der Amplifikation von Basilikum

resultieren Fragmente der Länge 607 bp (1), 609 bp (2), 756 bp (3), 800 bp (4), 994 bp (5), 1.013 bp (6), 1.259 bp (7), 1.276 bp (8) und 1.383 bp (9). Das Fragmentmuster von Petersilie zeigt Fragmente mit einer Länge von 374 bp (1), 586 bp (2), 622 bp (3), 666 bp (4), 738 bp (5), 809 bp (6), 1.051 bp (7), 1.096 bp (8) und 1.330 bp (9).

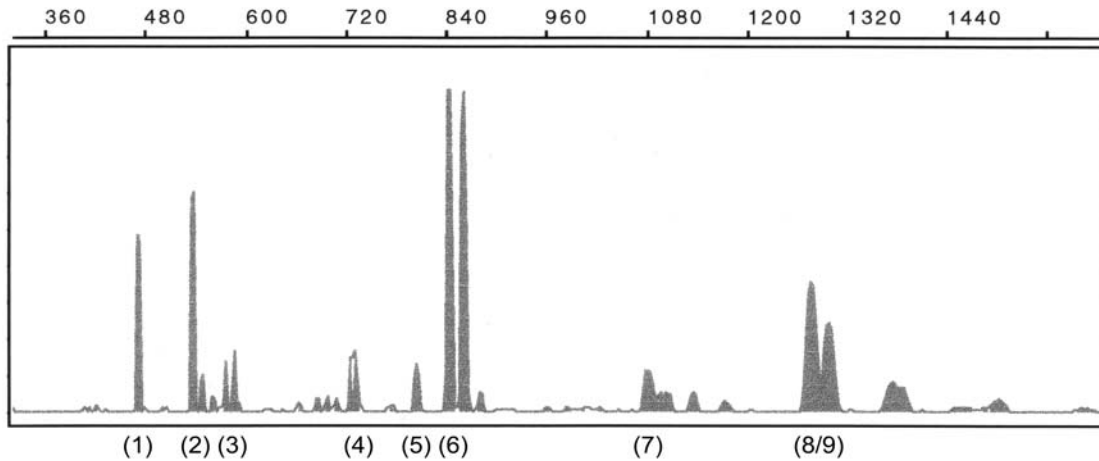


Abb. 3.49 : Fragmentanalyse von Schnittlauchgewebe (Tab 3.34, Spur Schnittlauch 1)

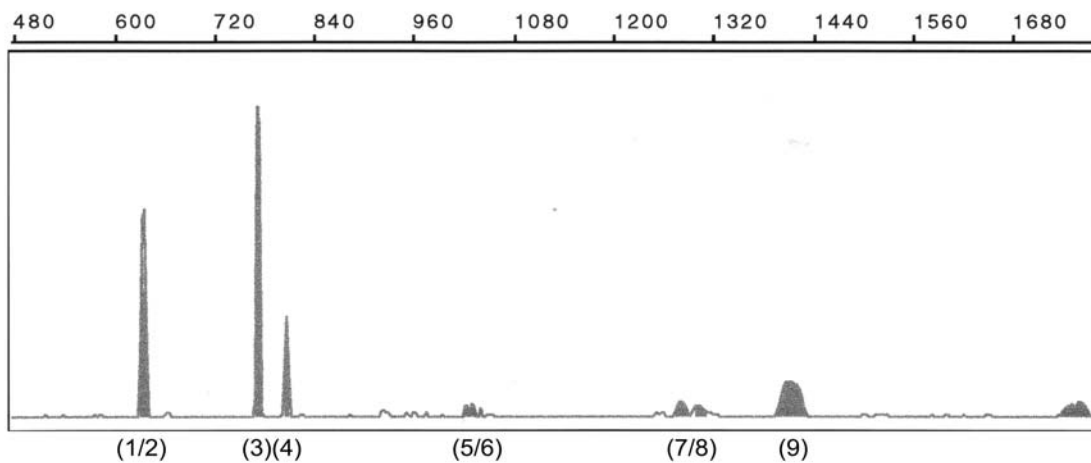


Abb. 3.50 : Fragmentanalyse von Basilikumgewebe (Tab. 3.34, Spur Basilikum 1)

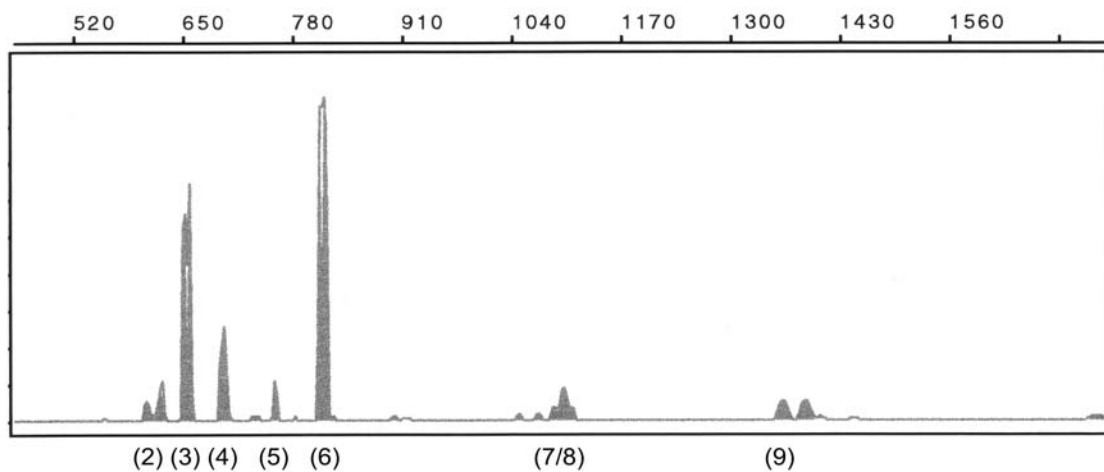


Abb. 3.51 : Fragmentanalyse von Petersiliegewebe (Tab. 3.34, Spur Petersilie 1)

4. DISKUSSION

4.1 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Spurenmaterial

Alle getesteten Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von DNA-Material aus Blut oder Gewebeteilen lieferten eine ausreichende Menge an DNA, um einen Speziesnachweis zu führen.

Aus diesem Grund fiel die Entscheidung für oder gegen ein bestimmtes Verfahren weniger in Abhängigkeit von der erzielbaren DNA-Menge, sondern aufgrund von ebenfalls als sehr relevant eingestuften Randfaktoren. Hierzu zählten eine einfache Handhabung, Wirtschaftlichkeit, eine potentielle Gesundheitsgefährdung sowie Schnelligkeit in der Erzielung von verwertbaren bzw. eindeutigen Ergebnissen.

Unter Hinzuziehung all dieser Faktoren stellte sich die Kombination aus DNA-Extraktion mittels Chelex-100 (siehe Kap. 2.2.1) und Aufreinigung mittels Diatomeen (siehe Kap. 2.2.5) als die sinnvollste dar.

Die Durchführung der Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Kap. 2.2.3) ist sehr zeitaufwendig und setzt den Einsatz von schädlichen Stoffen voraus, was in diesem Fall in keinem Verhältnis zum erzielten Ergebnis steht.

Die kombinierte Isolierung und Aufreinigung mittels dem QIAamp Blood kit (siehe Kap. 2.2.4) erbringt zwar eine geringe Zeitersparnis gegenüber der Kombination aus Chelex-100-Extraktion und Aufreinigung mittels Diatomeen, jedoch auch höhere Kosten.

Eine potentiell aussichtsreiche Technik stellt der Einsatz von Nativmaterial dar. Hierbei wurde aus dem die Spur tragenden Leinenläppchen ein wenige Millimeter langer Faden direkt zur Amplifikation eingesetzt. Zwar konnten in der vorliegenden Arbeit nur einmal eindeutige Ergebnisse erzielt werden (siehe Kapitel 3.2), die mögliche Zeit- und Kostenersparnis macht diese Untersuchungsmethode jedoch interessant für weitere Versuche, z. B. durch die Hinzugabe von Detergentien o. ä., eine Ergebniskonstanz zu erlangen.

4.2 RAPD-PCR

Der Einsatz der random amplified polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR) weist eine Reihe von Vorteilen im Vergleich zu anderen Untersuchungen auf, die ebenfalls zum Speziesnachweis eingesetzt werden können. So ist vor allem die sehr schnelle, einfache und kostengünstige Handhabung zu nennen. Des Weiteren unterliegt DNA-Material einem deutlich langsameren Degradationsprozess als Proteine.

Neben nicht von der Hand zu weisender Vorteile zeigt der Einsatz einer RAPD-PCR auch eine Reihe von Nachteilen. So zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit des Ergebnisses von verschiedensten äußeren Faktoren. Zu berücksichtigen sind die Umgebungstemperatur, der Thermocycler (Gerätetyp), die eingesetzte Polymerase, die Menge an eingesetzter DNA, das Auftreten von PCR-Artefakten (Tab.4.1) sowie die Notwendigkeit des Mitführens von Vergleichsproben.

Umgebungstemperatur
Thermocycler (Gerätetyp)
Polymerase
PCR-Artefakte
Einsatzmenge der DNA

Tab.4.1: Übersicht der Faktoren, welche das Ergebnis einer RAPD-PCR beeinflussen können

Von entscheidender Bedeutung ist die Wahl des Primers. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, können kleinste Unterschiede in der Basenfolge über Erfolg oder Misserfolg einer Amplifikation bzw. Speziesidentifikation entscheiden.

Der zur Anwendung gekommene Primer II (5'-ACG ACC CAC-3') unterscheidet sich nur in einer einzelnen Base von Primer I (5'-ACG ACC CAC G-3'), hat jedoch im Gegensatz zu diesem im Rahmen der Spezieszuordnung zu keinem reproduzierbaren Ergebnis geführt.

Vor Einsatz des Verfahrens in der Laborroutine ist, in Abhängigkeit von der Zielsetzung, die Festlegung auf einen Primer zwingend erforderlich. So konnte mit den

Primern I und III keine Differenzierung verschiedener Pflanzengattungen erfolgen. Dies wurde jedoch durch Einsatz von Primer II möglich.

Daraus ergibt sich die absolute Notwendigkeit einer Standardisierung des Verfahrens und einer Konstanz der Umgebungsfaktoren. Nur bei konstanten Bedingungen ist ein vergleichbares und reproduzierbares Ergebnis erreichbar.

Diese grundlegende Notwendigkeit bestätigen verschiedene in der Literatur zu findende Untersuchungen.

Quishui et al. untersuchten 1994 bei Einsatz von vier verschiedenen Primern den Effekt, der durch den Gebrauch dreier unterschiedlicher Thermocycler entsteht. Bei einem von vier Primern zeigten sich deutliche Ergebnisvariationen. Eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei wiederholtem Einsatz ein und desselben Thermocyclers konnte mit diesem Primer nur bei Einsatz des modernsten Gerätes erreicht werden. Es wird geschlussfolgert, dass nur der Einsatz von Primern sinnvoll erscheint, die bei Nutzung verschiedener Thermocycler konstante Ergebnisse liefern, da nur dann bei standardisierten Abläufen ein interlaboratorielle Vergleich gelingen kann.

Eine Studie von Saunders et al. (2001) untersuchte den Einsatz von 33 verschiedenen Thermocyclern in insgesamt 18 verschiedenen Labors. Auch hier zeigten sich deutliche Ergebnisvariationen bei Nutzung unterschiedlicher Geräte. Die Reproduzierbarkeit eines Ergebnisses im gleichen Thermocycler wird mit 88% angegeben.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle wird von Olivier et al. (1999) genannt. Bei der Untersuchung von Kaninchen-DNA konnte festgestellt werden, dass gleich große Fragmente nicht immer die gleiche DNA-Sequenz haben. Bei der Darstellung im Gel zeigt sich zwar nur eine Bande, diese kann aber Fragmente darstellen, die alle die gleiche bp-Länge aufweisen, aber potentiell multiple DNA-Sequenzen repräsentieren.

Zum gleichen Ergebnis kommt Black (1993), in dessen Studie ebenfalls die These unterstützt wird, dass gleich lange DNA-Fragmente nicht die gleiche Frequenz haben

müssen. Auch beim Ergebnisvergleich zwischen verschiedenen Labors rät er zur Vorsicht, vor allem dann, wenn unterschiedliche Thermocycler eingesetzt werden.

Da die bp-Frequenz der Fragmente zur Speziesdifferenzierung im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen bei Einsatz denaturierender Gele nicht von Relevanz ist, kann die vorgenannte Problematik außer Acht gelassen werden.

Alle vorgenannten Studien zeigen, dass eine Standardisierung der Technik notwendig ist, um reproduzierbare und zwischen verschiedenen Labors vergleichbare Ergebnisse zu erzielen.

Reaktionsabläufe und Reaktionsbedingungen sollten einem immer gleichen Protokoll unterliegen, um vermeidbare Fehler auszuschließen.

Ein weiteres, aber eher untergeordnetes Problem stellt die Ergebnisabhängigkeit von der Einsatzmenge des DNA-Materials dar. Hierbei steht nicht das Auftreten unterschiedlich signalstarker aber gleich großer Fragmente in verschiedenen Untersuchungen im Vordergrund, sondern mögliche falsch-negative Ergebnisse bei Einsatz einer zu geringen DNA-Menge. Diese Fehlerquelle kann jedoch relativ einfach mittels Durchführung einer Konzentrationsreihe ausgeschaltet werden.

4.3 Darstellung der Amplifikationsprodukte zum Speziesnachweis

Zur Darstellung der PCR-Produkte stehen verschiedenste Möglichkeiten zur Auswahl. Es stellt sich die Frage, welche Darstellungsmöglichkeit zur Speziesidentifikation notwendig ist bzw. welche sich am praktikabelsten erweist.

Am Anfang steht immer die niedrigauflösende Polyacrylamidgelelektrophorese, welche primär zur Erfolgskontrolle einer durchgeführten PCR eingesetzt wird. Diese PAGE ist mit wenig Zeit- und Materialaufwand sehr ökonomisch.

Eine weitere, etwas detailgetreuere Möglichkeit der Darstellung ist die Harnstoff-Polyacrylamidgelelektrophorese. Aufgrund der längeren Laufstrecke kommt es zu einer deutlicheren Auftrennung der Fragmentbanden, was eine eindeutigere Längenzuordnung der Fragmente ermöglicht. Diese Technik ist jedoch aufgrund eines weitaus größeren Zeit- und Materialaufwandes im Vergleich zur niedrigauflösenden PAGE nicht rentabel.

Eine ebenfalls sehr deutliche Auftrennung der Fragmentbanden trotz kurzer Laufstrecke wird bei der Agarosegelelektrophorese erreicht. Hierbei ergibt sich jedoch die Problematik, dass ein entsprechendes Gel immer frisch zubereitet werden muss, was wiederum einen erhöhten Zeitaufwand mit sich bringt.

Im Rahmen der Arbeit hat sich gezeigt, dass eine Speziesidentifizierung schon mittels dieser Techniken möglich ist, sofern eine Vergleichsprobe der darzustellenden Spezies mit auf das Gel aufgetragen wird. Um also einen ersten Hinweis auf den Verursacher einer unbekanntem Spur zu erhalten, ist die niedrigauflösende PAGE, als am einfachsten zu handhabendes Verfahren, vollkommen in der Lage. Benötigt man ein zweifelsfreies Ergebnis ohne den Einsatz der hochauflösenden Kapillarelektrophorese, so sollte die Harnstoff-PAGE eingesetzt werden, da hier detailreichere Ergebnisse erzielt werden können.

Die hochauflösende Kapillarelektrophorese ist sicher die zeit- und kostenaufwendigste unter den genannten Techniken.

Die bei jeder Untersuchung primär notwendige manuelle Definierung des Standards gestaltet sich vor allem in Bereichen größerer Fragmente (>1.000 bp) teilweise schwierig, so dass hier eine potentielle Fehlerquelle verborgen ist. Aufgrund der aufgetretenen Fehler und sich zusätzlich darstellender Artefakte wurden im Rahmen dieser Arbeit alle Fragmente >1.700 bp außer Acht gelassen.

Wie in der Routine üblich, müssen auch bei dieser Form der Elektrophorese neben einer Positiv- und einer Negativkontrolle zum endgültigen Speziesnachweis bekannte Vergleichsproben mitgeführt werden. Dies begründet sich einerseits in der erläuterten

Problematik der Standarddefinition, andererseits in der in Einzelfällen eingetretenen kompletten Verschiebung der bp-Skala, wodurch es bei einem Fragmentlängenvergleich zu Fehlinterpretationen kommen kann.

Sind Ergebnisse bzw. Diagramme von vorhergehenden Auswertungen vorhanden, kann ein direkter Vergleich der Fragmentmuster zur Identifikation einer unbekanntes Spur herangezogen werden. Hierbei würde eine Verschiebung der bp-Skala nicht zum Tragen kommen, da über eine Deckungsgleichheit zweier Diagramme ebenfalls eine Spezieszuordnung erfolgen kann (siehe hierzu auch Kap. 3.5.6, Abb. 3.36, Tab. 3.22).

Der Speziesnachweis konnte mittels der hochauflösenden Kapillarelektrophorese für fast alle untersuchten Tierarten erbracht werden. Interessant war nun die Fragestellung, ob auch besonders nah verwandte Tierarten, so zum Beispiel Hausschwein und Wildschwein unterschieden werden können.

Der Vergleich der Fragmentmuster von Hausschwein und Wildschwein lässt mittels der hier eingesetzten Methoden keine Unterscheidung zu. Beide Arten zeigen ein nahezu identisches Fragmentmuster. Der Versuch, mit Hilfe der Häufigkeitsverteilung einzelner Fragmente bzw. durch Interpretation von Signalstärkedifferenzen eine Unterscheidung herbeizuführen, misslang ebenfalls. Alle vorhandenen Unterschiede zeigen keine ausreichende Signifikanz. Es bleibt zu resümieren, dass eine Differenzierung zwischen Haus- und Wildschwein mittels der vorgenommenen Fragmentanalyse nicht möglich ist. Die Identifizierung der Spezies Schwein innerhalb aller untersuchter Arten gelingt jedoch eindeutig (siehe auch Kap. 3.5.3).

Die überaus nahe Verwandtschaft zwischen Haus- und Wildschwein zeigt sich eindrucksvoll bei der Auswilderung ehemals domestizierter Tiere. Schon nach wenigen Generationen in freier Natur hat sich eine komplette Rückentwicklung zum Wildschwein vollzogen.

Eine weitere Gruppe nahverwandter Tierarten stellen Pferde, Esel, Ponys und Prozewalski-Wildpferde dar. Hier gelang schon mittels der Fragmentanalyse die eindeutige Unterscheidung von Pferd, Pony und Esel. Das Prozewalski-Wildpferd konnten von den anderen Pferden nicht abgegrenzt werden.

Es stellt sich die Frage, ob eine genauere Differenzierung nach Modifikation der angewendeten Methoden möglich ist. Eventuell ist der Einsatz bzw. die Austestung noch weiterer Primer Erfolg versprechend, vor allem, da mit den im Rahmen dieser Arbeit getesteten Primern eine Identifizierung aller Arten nicht gelang. So war es zum Beispiel nicht möglich, für die allgegenwärtige Hauskatze ein arttypisches Fragmentmuster auszuarbeiten.

Allgemein erscheint es sinnvoll, eine Datenbank mit den verschiedensten Spuren anzulegen, um in möglichst vielen Fällen einen zweifelsfreien Herkunftsnachweis einer unbekanntem Spur führen zu können.

Nach einer, schon mehrfach als absolut notwendig angesehenen, Standardisierung des Verfahrens, kann es gelingen, eine Übersicht der jeweils speziestypischen Fragmente auszuarbeiten. Eine solche Übersichtskarte könnte den Einsatz von Vergleichsproben unnötig machen bzw. ersetzen. Abbildung 4.1 zeigt eine Möglichkeit, wie eine solche Übersichtskarte aussehen kann. Dargestellt sind neben einer bp-Leiter die typischen Fragmente, die bei der Untersuchung von Menschen, Hunden, Rindern, Pferden, Ponys, Eseln und Schweinen aufgetreten sind.

[bp-Länge]	Mensch	Hund	Rind	Pferd	Pony	Esel	Schwein/ Wildschwein
300							
400				<u>399</u>	399	<u>399</u>	
500	<u>494</u> <u>557</u>		493	493	494	493	
		<u>560</u> <u>563</u>		<u>555</u>	555	555	
	<u>587</u>						
600					604	<u>604</u>	
				<u>689</u>	<u>689</u>	<u>689</u>	<u>642</u>
700	710			<u>723</u>	724	<u>710</u> <u>723</u>	
800	<u>809</u>			<u>834</u>	<u>834</u>	<u>834</u>	
	<u>862</u>						
900			874	<u>874</u>		<u>874</u>	<u>933</u>
1.000					<u>1.012</u>		
				<u>1.049</u>	<u>1.049</u>	<u>1.049</u>	
	<u>1.067</u>						
						<u>1.075</u>	
							<u>1.083</u> <u>1.099</u>
1.100			<u>1.117</u>				
			<u>1.142</u>				
1.200			1.223				
			1.250				
1.300							
					<u>1.380</u>		
1.400						<u>1.399</u>	
					<u>1.428</u>		
1.500							
1.600	<u>1.593</u>						
1.700							

Abb.4.1: Übersicht – Vergleich der detektierten Fragmente der am häufigsten getesteten heimischen Tierarten und des Menschen (unterstrichen dargestellte Fragmente sind in der einzelnen Spur besonders signalstark)

4.4 Abstammungsnachweis mittels RAPD-PCR ?

Wie in Kapitel 3.4.1 dargestellt, kam es bei der Fragmentanalyse von Spuren menschlicher Herkunft, welche mit Primer I amplifiziert wurden, zum unregelmäßigen Auftreten eines Fragmentpaares mit einer Größe von 711 bzw. 727 bp (in der dargestellten Fragmentanalyse mit (4) und (5) bezeichnet). Abbildung 4.3 zeigt jeweils eine entsprechende Fragmentanalyse.

Einmalig konnte ein Fehlen des Fragmentes (9) mit einer Größe von 1.596 bp festgestellt werden.

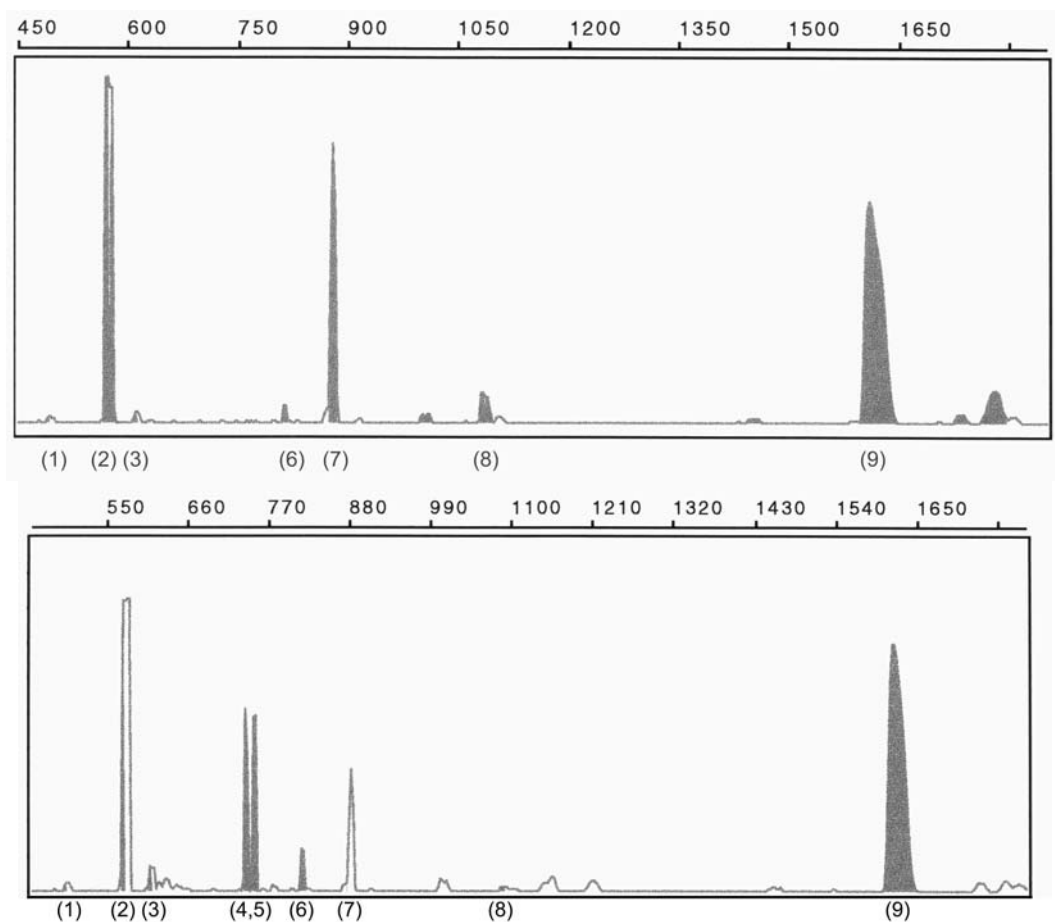


Abb.4.3: Vergleich der Fragmentanalysen zweier Blutspuren (Mensch), amplifiziert mit Primer I;
oben: Fragmente 711 bp und 727 bp nicht vorhanden
unten: Fragmente 711 bp (4) und 727 bp (5) vorhanden

Es stellte sich nun die Frage, ob eine intrafamiliäre Regelmäßigkeit im Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein der Fragmente besteht. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurden fünf Familienuntersuchungen durchgeführt.

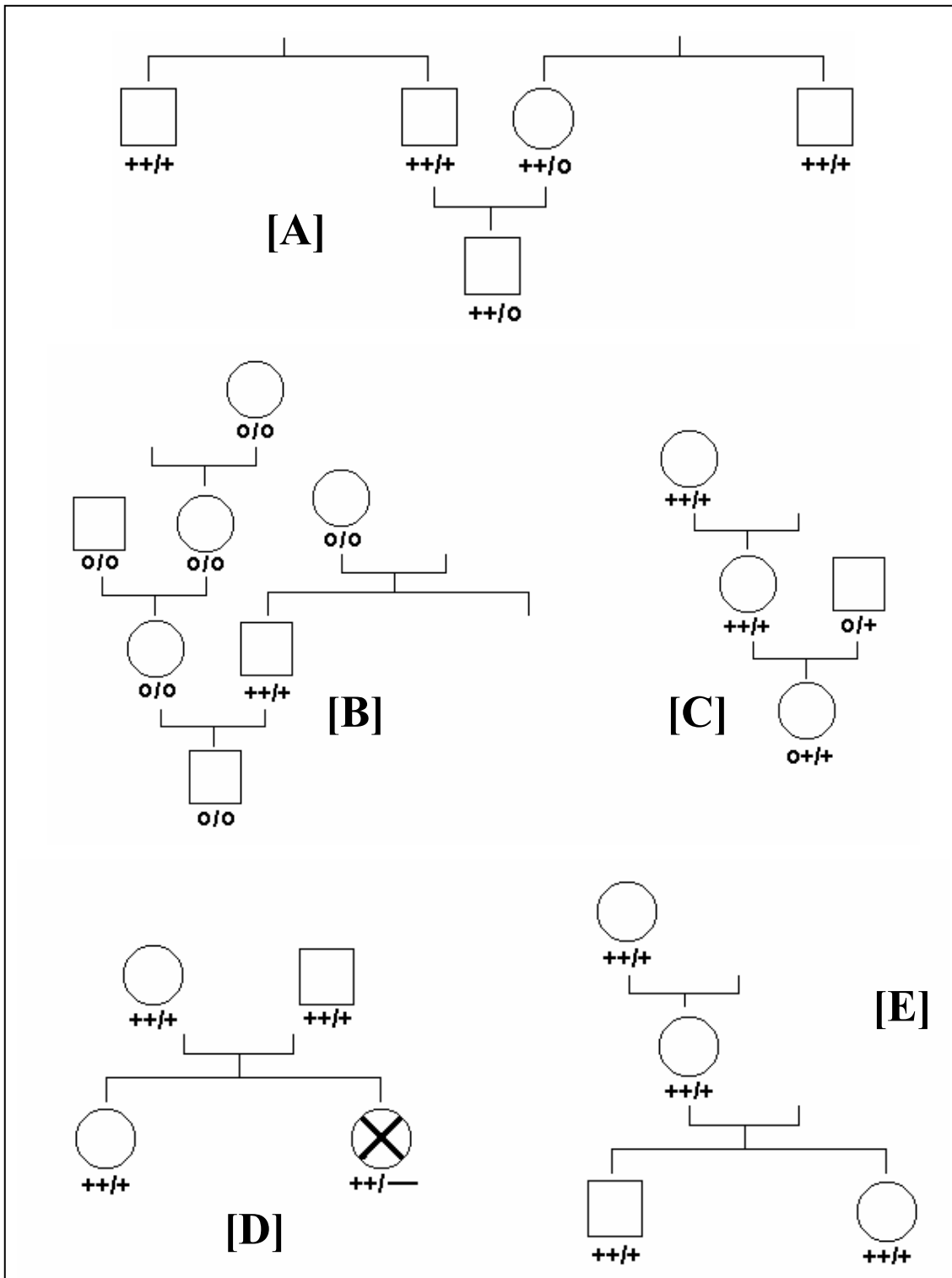


Abb. 4.4 : Stammbäume der durchgeführten Familienuntersuchungen zur Klärung, ob eine intrafamiliäre Konstanz im Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein der Fragmente 711/727 bp bzw. 1.596 bp besteht
 Kreis = weibliche Person, Quadrat = männliche Person, + = Fragment vorhanden, o = Fragment nicht vorhanden (Darstellung : 711,727/1.596)

In Abbildung 4.4 sind die Stammbäume der einzelnen Familienuntersuchungen dargestellt. Anhand des Stammbaumes von Familie [D] kann die grundsätzliche Aussage einer intrafamiliären Konstanz im Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein von Fragmenten widerlegt werden. Beide Elternteile haben das Fragment mit 1.596 bp, ein sicher aus diesem Verhältnis heraus entstandene Tochter weist dieses Fragment nicht auf.

Bezüglich des Fragmentpaares mit 711 bzw. 727 bp kann im Rahmen der durchgeführten Untersuchungen keine Aussage getroffen werden. In allen untersuchten Familien ist das Auftreten bzw. Nicht-Auftreten des Fragmentpaares regelmäßig. Um jedoch von einer gesicherten Regelmäßigkeit sprechen zu können, müsste eine weitaus größere Probandenzahl untersucht werden.

Sollte sich in einer größer angelegten Untersuchung bezüglich des Auftretens der Fragmente 711 bp/727 bp eine gesicherte intrafamiliäre Weitergabe bestätigen, könnte die Technik der RAPD-PCR theoretisch auch im Rahmen von Abstammungsuntersuchungen eingesetzt werden.

Einer entsprechenden Fragestellung widmeten sich Riedy et al. im Jahre 1992. Sie untersuchten mittels einer RAPD-PCR die intrafamiliäre Konstanz von auftretenden Banden in einer Pavian-Population, sowie zum Vergleich bei gesicherten Nachkommen der gleichen Spezies bzw. des Menschen. Im Rahmen dieser Untersuchung kam es zum Auftreten nicht-elterlicher Banden bei gesicherten Nachkommen, weshalb ernsthafte Zweifel geäußert wurden, dass mit der vorliegenden Technik ein Abstammungsnachweis bzw. –ausschluss erfolgen kann.

Hadrys et al. erbrachten 1992 den erfolgreichen Abstammungsnachweis in einer Libellenpopulation. Sie kamen zur Schlussfolgerung, dass besonders beim Auftreten von großen Nachkommenschaften ein Nachweis der Elternschaft mittels RAPD-PCR möglich ist.

Nach Kenntnisnahme der vorgenannten Untersuchungsergebnisse bleibt es zweifelhaft, ob mittels einer RAPD-PCR ein sicherer und eindeutiger Abstammungsnachweis bzw. –ausschluss erfolgen kann.

Sicherlich kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass nach Modifikationen der eingesetzten Technik, z.B. bei Einsatz anderer Primer oder dem sicheren Ausschluss

von PCR-Artefakten und nach Standardisierung der Reaktionsabläufe eine RAPD-PCR zum Zweck der Abstammungsuntersuchung eingesetzt werden kann.

4.5 Ausblick

Die Technik der RAPD-PCR zeigt eindeutig das Potential, sich in verschiedensten Fachgebieten der Medizin bzw. Naturwissenschaft zu etablieren.

Im Bereich der Rechtsmedizin finden sich zahlreiche Beispiele, in welchen sich Anwendungsmöglichkeiten ergeben.

Die RAPD-PCR könnte zu einem schnellen, einfach zu handhabenden und kostengünstigen Routineverfahren in der Speziesdiagnostik aus Blut- und Gewebespuren werden. Eine Eignung, gerade als Schnelltest in der Primärdiagnostik, ist nicht von der Hand zu weisen. Vor allem, wenn der Einsatz von nativem Probenmaterial erfolgreich durchgeführt werden kann, findet sich wohl kaum ein konkurrenzfähiges Verfahren.

Eine absolute Notwendigkeit stellt die Standardisierung des Verfahrens dar, da nur so ein inter- und intralaboratorieller Vergleich möglich ist. Dieser stellt eine Grundlage für den Routineeinsatz dar.

Eine weitere, sehr viel versprechende, Einsatzmöglichkeit ist die von Benecke 1998 beschriebene Diagnostik von Insektenmaterial an Leichenfundorten. Der erfolgreich durchgeführte Herkunftsnachweis von verschiedenen Insektenspezies kann wichtige Beweise zur Aufklärung von Gewaltverbrechen liefern. Neben dem Nachweis der Leichenliegezeit mittels einer RAPD-PCR-Anwendung, gelingt es zu bestimmen, ob ein Leichnam zuvor verlagert wurde oder nicht.

Wie schon in Kapitel 1.2.2 angesprochen, zeigt sich auch außerhalb der Rechtsmedizin das große Potential der RAPD-PCR.

Vor allem in der Mikrobiologie hat der Einsatz der RAPD-PCR inzwischen einen hohen Stellenwert erlangt. Unzählige Veröffentlichungen zeigen den hohen Nutzen dieser Technik.

Interessante Anwendungsmöglichkeiten ergeben sich auch in der Onkologie. Der Nachweis von Fragmentgrößenänderungen beim Auftreten bestimmter Tumore bzw. Erkrankungen könnte die RAPD-PCR zu einem diagnostischen Werkzeug werden lassen. Auch die Ursachenforschung bestimmter Erkrankungen könnte vorangetrieben werden.

Gleiche Erfolge können für den Einsatz der RAPD-PCR in der Veterinärmedizin erwartet werden.

Ob es in naher Zukunft eine RAPD-PCR-Anwendung geben wird, die sich zum Abstammungsnachweis eignet, ist fraglich. Was auf mikrobiologischer Ebene gelang, ist nach den vorliegenden Veröffentlichungen nicht notwendigerweise auf den Menschen bzw. komplexere Spezies übertragbar. Aber auch in diesem Feld sind Ansätze vorhanden.

Allgemein bleibt zu resümieren, dass mit der RAPD-PCR eine sehr interessante Untersuchungstechnik zur Verfügung steht, deren Einsatz in der Routinediagnostik aber noch weiterer Entwicklung bedarf.

Vor allem steht die Ausarbeitung eines standardisierten Verfahrens, um unnötige, durch beeinflussbare Umgebungsfaktoren ausgelöste, Fehler zu vermeiden. Die Anfälligkeit für entsprechende Faktoren stellt sicherlich auch einen der limitierenden Faktoren in der Anwendbarkeit des Verfahrens dar.

5. PFERDESCHÄNDUNG – EIN AKTUELLER FALL

Speziesidentifizierung mittels RAPD-PCR im Rahmen eines aktuellen Falles von Pferdeschändung

Die Möglichkeit, die angewendete Technik einem Praxistest zu unterziehen, ergab sich noch innerhalb der Bearbeitungszeit.

Das Institut für Rechtsmedizin in Würzburg wurde beauftragt, einen Fall von Pferdeschändung zu untersuchen. Als Beweismittel wurde ein Holzpfehl mit einer Blutantragung sichergestellt. Mit diesem sei einem Pferd eine genitale Pfählungsverletzung zugeführt worden. Die primäre Frage war nun, ob es sich bei der Blutantragung möglicherweise um Blut des Täters oder um Blut eines geschändeten Pferdes handelt, bzw. ob der Holzpfehl überhaupt dem Tatgeschehen zuzuordnen ist.

Aus der vorhandenen Blutspur wurde DNA isoliert und aufgereinigt (Kombination Chelex 100/Diatomeen). Nach Durchführung einer RAPD-PCR mit Primer I und einer hochauflösenden Kapillarelektrophorese erfolgte eine Analyse mittels GeneScan. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 5.1 dargestellt. Es zeigen sich Fragmente mit einer Länge von 557 bp (3), 695 bp (5), 723 bp (7), 836 bp (8), 1.050 bp (11), 1.389 bp (13) und 1.428 bp (14).

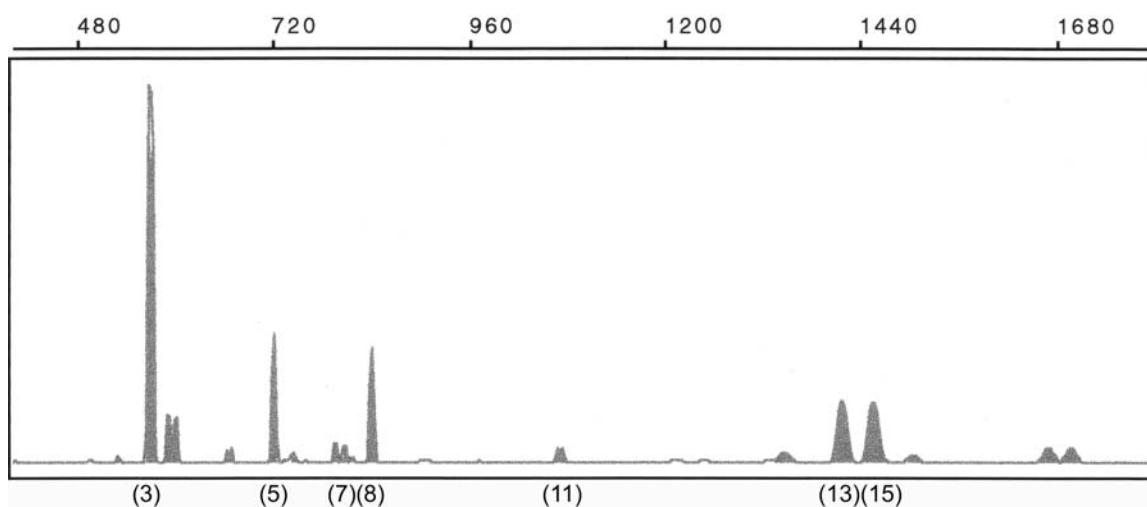


Abb. 5.1: Fragmentanalyse einer unbekanntes Blutspur im Rahmen der Untersuchung eines Falles von Pferdeschändung (Amplifikation mit Primer I)

Da die Spezies Pferd als wahrscheinlichster Verursacher der Blutantragung in Frage kam, wurden die ermittelten Daten primär mit den Fragmentanalysen von Pferd, Pony und Esel verglichen (siehe hierzu auch Kapitel 3.5.5). Abbildung 5.2 zeigt die Gegenüberstellung der Fragmentanalysen von Pferd, Pony und Esel sowie der unbekanntes Blutspur. Rein nach optischen Gesichtspunkten bewertet, zeigt sich eine deutliche Ähnlichkeit zwischen der Fragmentanalyse der unbekanntes Spur und der eines Ponys. Im weiteren Verlauf wurden nun die einzelnen detektierten Fragmente verglichen (siehe Tabelle 5.1).

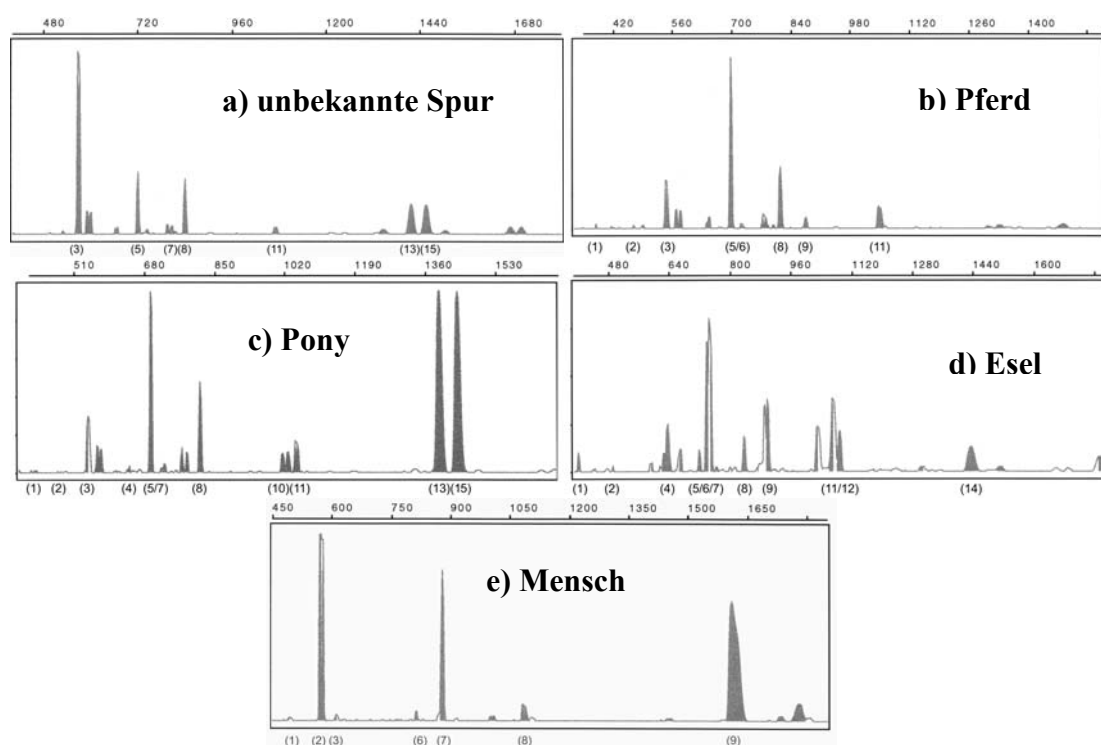


Abb.5.2: Gegenüberstellung der Fragmentanalysen von Mensch, Pferd, Pony und Esel sowie der unbekanntes Blutspur (Amplifikation mit Primer I)

Neben den für Pferd, Pony und Esel allgemein vorhandenen Fragmenten zeigen sich die, nur bei Ponys zur Darstellung gekommenen, Fragmente 13 und 15. Hiermit kann die Zuordnung der unbekanntes Blutspur zur Spezies Pony erfolgen.

Der Einsatz der RAPD-PCR mit nachfolgender hochauflösender Kapillarelektrophorese hat in diesem Fall einen eindeutigen Herkunftsnachweis der unbekanntes Blutspur vom

Pferd erbracht. Die Einsetzbarkeit der angewendeten Technik im Rahmen forensischer Fälle zum Herkunftsnachweis einer Blutspur hat sich somit bestätigt.

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8
Probe								
unbek. Spur			556,93		695,35		722,66	836,48
Pony 1	399,47	496,68	556,34	603,42	692,90		724,51	836,02
Pony 2	400,31	493,48			690,03		725,23	835,27

Fragment	9	10	11	12	13	14	15
Probe							
unbek. Spur			1050,19		1388,84		1427,80
Pony 1		1011,62	1052,19		1384,63		1430,32
Pony 2		1012,71	1048,47		1375,55		1425,47

Tab.5.1: Vergleich der mittels hochauflösender Kapillarelektrophorese detektierten Fragmente der unbekanntes Blutspur und der Fragmente der Pony-Blutspuren

6. ZUSAMMENFASSUNG

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Optimierung und Etablierung einer random amplified polymorphic DNA-PCR-Anwendung (RAPD-PCR) zum zweifelsfreien Nachweis der spurenverursachenden Spezies aus Blut- und Gewebespuren.

Hierzu wurden verschiedene Verfahren zur Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Spurenmaterial getestet. Die Kombination aus Chelex-100-Extraktion und DNA-Aufreinigung mittels Diatomeen erwies sich als besonders geeignet. Neben dem Hervorbringen einer ausreichend großen Menge an DNA-Material besticht diese Methodik durch einen sehr geringen Zeit- und Kostenaufwand, weshalb ein überaus ökonomisches Arbeiten gewährleistet werden kann.

Der Ablauf der eingesetzten RAPD-PCR wurde nach verschiedenen Vorlagen aus der Literatur modifiziert und optimiert, so dass schließlich nahezu jede Amplifikation erfolgreich verlief. Im Laufe der Arbeit kamen verschiedene Primer zum Einsatz, wovon Primer I bei allen Spuren menschlicher bzw. tierischer Herkunft ein eindeutiges Ergebnis zu Tage brachte. Primer II konnte erfolgreich zur Differenzierung von verschiedenen Pflanzengeweben eingesetzt werden.

Die Darstellung der Amplifizierungsprodukte erfolgte primär mittels einer horizontalen PAGE, woran sich eine hochauflösende Kapillarelektrophorese anschloss. In Einzelfällen kamen sowohl Agarosegelelektrophorese als auch Harnstoff-PAGE zum Einsatz.

Es wurden Spuren von insgesamt 25 verschiedenen Tierarten, des Menschen sowie Pflanzengewebe untersucht. 22 der 25 untersuchten Tierarten konnte mittels der hochauflösenden Kapillarelektrophorese ein artspezifisches Fragmentmuster zugeordnet werden, ebenso dem Menschen und den unterschiedlichen Pflanzengeweben. Alle Tierarten konnten im Rahmen einer, mit unmarkiertem Primer I durchgeführten PAGE mit Hilfe einer Vergleichsprobe zweifelsfrei identifiziert bzw. differenziert werden.

Im Rahmen eines aktuellen Falles von Pferdeschändung konnte die spurenverursachende Spezies mittels der angewendeten Methodik eindeutig als Pony identifiziert werden, womit die Anwendbarkeit des Verfahrens als erwiesen gilt.

7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin oder Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum
C	Cytosin
DNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
DTT	Dithiotretiol
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
G	Guanin
HCl	Salzsäure
KCl	Kalium-Chlorid
M	Mol
mA	Milliampere
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
mM	Millimol
NaCl	Natrium-Chlorid
µl	Mikroliter
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
rfu	relative fluorescence unit
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TEN-Puffer	Tris-EDTA-NaCl-Puffer
T _m	Schmelztemperatur der Primer

Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminoethan
V	Volt
Vol	Volumen

8. LITERATURVERZEICHNIS

Akopyanz N, Bukanov NO, Westblom TU, Kresovich S, Berg DE (1992) DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic acids Res* 20(19): 5137-42

Allen RC, Graces G, Budowle B (1989) Polymerase Chain Reaction Amplification Products separated on rehydratable Polyacrylamide Gels and stained with Silver. *Bio Techniques* 7(7): 736-742

Andrighetto C, Psomas E, Tzanetakis N, Suzzi G, Lombardi A (2000) Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from diary products. *Lett Appl Microbiol.* 30(1): 5-9

Baur C, Teifel-Greding J, Liebhardt E (1989) Species identification by fragmented DNA. *Beitr Gerichtl Med.* 47: 165-70

Ballinger-Crabtree ME, Black WC 4th, Miller BR (1992) Use of genetic polymorphisms detected by the random-amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) for differentiation and identification of *Aedes aegypti* subspecies and populations. *Am J Trop Med Hyg.* 47(6): 893-901

Benecke M (1997) DNA typing in forensic medicine and in criminal investigations: a current survey. *Naturwissenschaften* 84: 181-188

Benecke M (1998) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) typing of necrophageous insects (diptera, coleoptera) in criminal forensic studies: validation and use in practice. *Forensic Sci nt.* 98: 157-168

Black WC 4th (1993) PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Mol. Biol.* 2(1): 1-6

Bridg, H (2000) Micropropagation and determination of the in vitro stability of *Annona cherimola* Mill. and *Annona muricata* L. *Diss.*

Brinkmann B, Wiegand P (1993) DNA-Analysen – Neue Entwicklungen und Trends. *Kriminalistik* 3: 191-5

Calvo JH, Zaragoza P, Osta R (2001) Random amplified polymorphic DNA fingerprints for identification of species in poultry pate. *Poult Sci.* 80(4): 522-4

Chang Q, Zhou KY, Wang YQ, Zhang ZK, Cao X (1999) RAPD analysis of genetic diversity and phylogenetic relationship of the Taihu pigs. *I Chuan Hsueh Pao.* 26(5): 480-8

Chansiripornchai N, Ramasoota P, Bangtrakulnonth A, Sasipreeyajan J, Svenson SB (2000) Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis for typing avian *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29(3): 221-5

Chattopadhyay P (2003) RAPD markers system as a useful tool for rapid identification of the origin of lizard contaminants in food. *Food Chem Toxicol.* 41(12): 1719-25

Chelomina GN, Spiridonova LN, Kozyrenko MM, Artiukova EV, Chelomin lu V, Zhuravlev lu N (1999) Use of RAPD-PCR-analysis of cellular DNA for the evaluation of genetic polymorphism and subspecies diagnostic of the Far Eastern leopard *Panthera pardus orientalis*. *Genetika.* 35(5): 681-7

Congiu L, Chicca M, Cella R, Rossi R, Bernacchia G (2000) The use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers to identify strawberry varieties: a forensic application. *Mol Ecology* 9: 229-232

Dutta R, Kashyap VK (2001) Detection of species of graft in xenotransplants using arbitrary primed polymerase chain reaction. *Am J Forensic Med Pathol.* 22(4): 400-4

Glazko VI, Dyman TN, Tarasiuk SI, Dubin AV (1999) The polymorphism of proteins, RAPD-PCR and ISSR-PCR markers in European and American bison and cattle. *Tsitol Genet.* 33(6): 30-9

Glazko VI, Zelenaia LB (1998) Differentiation of domestic horse and Prozewalskis horse using various DNA sequences; *Genetika.* 34(7): 996-9

Gu W, Acland GM, Langston AA, Ostrander EA, Aguirre GD, Ray K (1998) Identification of a RAPD marker linked to progressive rod-cone degeneration in dogs. *Mamm Genome* 9(9): 740-4

Gu W, Post CM, Aguirre GD, Ray K (1999) Individual DNA bands obtained by RAPD analysis of canine genomic DNA often contain multiple DNA sequences. *J Hered.* 90(1): 96-8

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

Günther S (1997) DNA-Polymorphismen: Methodische, spurenkundliche und evolutions-genetische Betrachtungen unter besonderer Berücksichtigung y-chromosomaler STR-Systeme. *Naturwissenschaftliche Promotionsschrift, Würzburg*

Guglich EA, Wilson PJ, White BNN (1994) Forensic application of repetitive DNA markers to the species identification of animal tissues. *J Forensic Sci.* 39(2): 353-61

Hadrys H, Balick M, Schierwater B (1992) Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Mol Ecology.* 1: 55-63

Hadrys H, Schierwater B, Dellaporta SL, DeSalle R, Buss LW (1993) Determination of paternity in dragonflies by Random Amplified Polymorphic DNA fingerprinting. *Mol Ecol.* 2(2): 79-87

- Hoff-Olsen P, Mevag B, Staalstrom E, Hovde B, Egeland T, Olaisen B (1999) Extraction of DNA from decomposed human tissue. An evaluation of the extraction methods for short tandem repeat typing. *Forensic Sci Int.* 105(3): 171-83
- Jung S (2002) Forensische DNA-Analytik; *Naturwissenschaftliche Promotionsschrift, Würzburg*
- Kambhampati S, Black WC 4th, Rai KS (1992) Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae) : techniques, statistical analysis, and applications. *J Med Entomol.* 29(6): 939-45
- Kaufmann SHE (1999) Antigen-Antikörper-Reaktion: Grundlagen serologischer Methoden. In: Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann (Hrsg) *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie.* Springer-Verlag, 84-93
- Lahiri DK, Bye S, Nurnberger JI Jr, Hodes ME, Crisp M (1992) 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(4): 193-205
- Lambooy WF (1994) Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: correcting for the effects of PCR artifacts caused by variation in experimental conditions. *PCR Methods Appl.* 4(1): 38-43
- Lambooy WF (1994) Computing genetic similarity coefficients from RAPD data: the effects of PCR artifacts. *PCR Methods Appl.* 4(1): 31-37
- Lee James Chun-I, Jan-Growth Chang (1994) Random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD PCR) fingerprints in forensic species identification. *Forensic Sci Int.* 67: 103-107

- Lin AW, Usera MA, Barrett TJ, Goldsby RA (1996) Application of random amplified polymorphic DNA analysis to differentiate strains of *Salmonella enteritidis*. *J Clin Microbiol.* 34(4): 870-6
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16(3): 1215
- Mullis, Kary B (1990) Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. *Spektrum der Wissenschaft* 6: 60-67
- Newton CR, Graham A (1994) PCR. 2.Auflage. Spektrum Akademischer Verlag
- Nusser JA, Goto RM, Ledig DB, Fleischer RC, Miller MM (1996) RAPD analysis reveals low genetic variability in the endangered light-footed clapper rail. *Mol Ecol.* 5: 463-72
- Olivier M, Meehl MA, Lust G (1999) Random amplified polymorphic DNA (RAPD) sequences as markers for canine genetic studies. *J Hered.* 90(1): 78-82
- Padilla JA, Martinez-Trancon M, Rabasco A, Parejo JC, Sansinforiano ME, Guijo MI (2000) Genetic variability in the Iberian imperial eagle (*Aquila adalberti*) demonstrated by RAPD analysis. *J Hered.* 91(6): 495-9
- Papadopoulos, S (2001) Untersuchungen genomischer Veränderungen von Mammakarzinomzellen mittels Random Amplified Polymorphic DNA. *Dissertation*
- Partis L, Wells RJ (1996) Identification of fish species using random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Moll Cell Probes* 10(6): 435-41
- Patzelt D, Baur MP, Bertrams J (2003) Forensische Serologie/Hämatogenetik. In: Madea B, Brinkmann B (Hrsg) Handbuch gerichtliche Medizin, Band 2. *Springer-Verlag*, 991-1115

Patzelt D (1984) Anwendung der isoelektrischen Fokussierung in der gerichtlichen Medizin; *Habilitationsschrift*

Quishui He, Matti K. Viljanen, Jussi Mertsola (1994) Effects of thermocyclers and primers on the reproducibility of banding patterns in randomly amplified polymorphic DNA analysis. *Molecular and Cellular Probes*. 8(2): 155-160

Riedy MF, Hamilton WJ, Aquadro CF (1992) Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acids Res*. 20(4): 198

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

Saunders GC, Dukes J, Parkes HC, Cornett JH (2001) Interlaboratory study on thermal cycler performance in controlled PCR and random amplified polymorphic DNA analyses. *Clin. Chem*. 47(1): 47-55

Singh KP, Roy D (1999) Detection of Mutation(s) or polymorphic loci in the genome of experimental animal and human cancer tissues by RAPD/AP-PCR depend on DNA polymerase. *Int J Oncol*. 14(4): 753-8

Uhlenhuth P (1901) Eine Methode zur Unterscheidung der verschiedenen Blutarten, im Besonderen zum differentialdiagnostischen Nachweise des Menschenblutes. *Dtsch Med Wochenschrift* 6: 82-3

Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10(4): 506-13

Weedn VW (1996) Forensic DNA tests. *DNA Technology* 16(1): 187-196

Welsh J, McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18(24): 7213-18

Werner (1992) Biomathematik und Medizinische Statistik. 2.Auflage. Verlag Urban & Schwarzenberg

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18(22): 6531-5

Zehner R, Zimmermann S, Mebs D (1998) Rflp and sequence analysis of the cytochrome b gene of selected animals and man : methodology and forensic application. *Int J Legal Med.* 111: 323-7

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
1	n.def.	557,79	n.def.			809,84	864,23	1070,94	1592,57
2	n.def.	558,04	n.def.			809,69	862,26	1066,93	1594,40
3	n.def.	558,45	n.def.	711,35	727,75	809,23	859,08	1070,26	n.def,
4	n.def.	557,30	n.def.	709,47	726,22	809,29	862,26	1066,49	1597,46
5	n.def.	557,34	n.def.			809,22	861,61	1065,69	1591,08
6	493,78	559,05	589,15	711,70	727,65	810,01	864,16	1070,07	1591,95
7	n.def.	558,25	585,78	711,99	728,08	810,22	863,15	1069,78	n.def,
8	n.def.	557,45	585,07	709,86	726,55	809,27	862,94	1067,35	1587,64
9	n.def.	556,96	586,13			809,03	862,60	1068,17	1588,33
10	494,33	558,91	586,13			810,48	862,58	1068,26	1591,98
11	494,66	558,19	588,13			809,61	863,77	1069,79	1587,90
12	493,23	559,00	586,18	711,61	727,60	810,21	862,87	1067,25	1593,34
13	495,30	558,43	588,27			810,21	862,87	1067,25	1593,34
14	494,36	557,45	n.def.			809,57	863,33	1068,57	1598,94
15	494,18	557,50	584,70			809,77	862,99	1068,68	1595,03
16	493,06	558,33	591,15			809,80	862,01	1067,27	1596,13
17	493,08	558,07	588,66	710,38	726,50	809,46	862,77	1068,35	1588,60
18	492,76	558,16	n.def.			809,52	863,25	1068,67	1600,38
19	493,04	558,76	586,12	711,10	727,14	809,59	862,49	1068,24	1559,88
20	493,20	558,74	n.def.			809,61	862,61	1068,24	1593,78
21	494,33	557,61	n.def.			809,09	860,68	1065,72	1595,87
22	493,32	558,79	591,52	711,63	727,53	809,82	862,84	1068,63	1599,01
23	493,60	558,91	591,54	711,52	727,60	810,15	862,20	1067,67	1594,63
24	492,99	558,58	591,63	711,66	727,64	810,23	862,25	1067,73	1594,15
25	493,27	558,62	591,75	711,72	727,66	810,01	863,16	1069,51	1598,91
26	494,29	557,77	583,27			809,93	862,33	1068,06	1598,82
27	493,27	558,45	n.def.	708,46	727,55	809,90	862,56	1067,84	1602,67
28	493,15	558,69	591,25	711,93	727,90	809,50	862,40	1067,62	1599,75
29	494,76	558,12	n.def.			809,82	862,58	1068,37	1590,79
30	n.def.	556,17	585,41			807,73	859,31	1067,41	1586,26
31	n.def.	557,02	586,71	709,00	725,64	808,70	861,39	n.def.	
32	n.def.	557,23	587,90			809,13	861,26	1065,78	1593,34
33	498,63	557,65	584,12	709,13	725,56	809,47	861,13	1067,21	1602,53
34	497,97	557,71	584,45	709,23	725,66	811,89	860,78	1065,65	1594,97
35	495,32	556,48	587,02			809,01	862,59	1066,65	1599,78
36	n.def.	557,83	588,63			809,98	862,94	1066,12	1594,13
37	n.def.	557,54	587,95			808,93	862,63	1067,85	1590,11
38	n.def.	556,91	587,93	709,84	726,46	809,12	861,79	1066,93	1591,79
39	n.def.	557,19	n.def.			808,78	863,65	1069,65	1595,66
40	n.def.	557,52	n.def.	709,95	726,41	809,79	863,20	1068,77	1587,72
Mittelwert [bp]	494,16	557,92	587,65	710,61	727,01	809,62	862,39	1067,93	1593,34
Standardabw.	1,48	0,72	2,55	1,18	0,83	0,64	1,09	1,32	7,10
Varianz	2,19	0,52	6,51	1,39	0,70	0,41	1,19	1,74	50,40

Tab. A1 Untersuchungsreihe 40 versch. Blutspuren (Mensch), amplifiziert mit Primer I

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
1	497,95	557,88	n.def.	710,84	726,63	809,24	861,17	1066,04	1598,68
2	497,09	558,08	587,68	710,50	726,33	809,15	860,63	1065,46	1604,54
3	498,20	558,00	n.def.	710,25	726,57	809,94	861,68	1066,90	1593,99
4	n.def.	558,41	n.def.			809,16	862,62	1068,59	1601,68
5	498,49	558,55	n.def.	711,26	727,47	n.def.	860,18	n.def.	n.def.
6	495,72	558,23	589,74	710,36	726,88	n.def.	863,34	n.def.	1609,51
7	n.def.	557,63	n.def.	710,49	726,84	809,52	861,47	n.def.	
8	n.def.	557,02	586,71	709,00	725,64	808,70	861,39	n.def.	
9	n.def.	557,10	n.def.	707,15	724,45	n.def.	861,40	1065,11	1590,90
10	n.def.	557,25	n.def.			n.def.	860,08	1070,59	1592,70
11	496,09	557,43	n.def.			n.def.	860,30	1071,99	1592,15
12	n.def.	557,24	n.def.			n.def.	860,60	n.def.	1593,09
13	n.def.	558,86	n.def.			n.def.	862,97	1067,94	1602,59
14	n.def.	557,58	n.def.			n.def.	n.def.	n.def.	1593,04
15	n.def.	557,46	n.def.			n.def.	861,21	n.def.	1598,78
16	n.def.	558,91	n.def.	713,57	728,29	n.def.	863,64	1070,39	1608,90
17	497,10	559,30	n.def.	713,59	728,17	812,11	864,70	1071,83	1607,39
18	496,42	559,33	588,36	714,05	728,57	812,30	864,18	1071,15	1614,31
19	496,81	559,72	n.def.	714,27	729,32	812,98	862,29	1068,72	1610,77
20	496,95	558,67	n.def.			812,16	863,33	1069,13	1610,21
Mittelwert [bp]	497,08	558,13	588,12	711,28	727,10	810,53	861,96	1068,76	1601,37
Standardabw.	0,90	0,81	1,27	2,19	1,35	1,65	1,41	2,37	7,83
Varianz	0,82	0,66	1,62	4,80	1,83	2,72	1,99	5,62	61,31

Tab. A2 : Untersuchungsreihe 20 verschiedene Mundschleimhautabstriche (Mensch), amplifiziert mit Primer I

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
1.1	n.def.	558,13	n.def.			n.def.	863,45	1068,67	1603,41
1.2	n.def.	557,38	n.def.			809,67	862,37	1067,27	1594,18
1.3	494,98	557,51	586,71			809,38	867,10	n.def.	1584,91
1.4	n.def.	557,31	n.def.			809,60	862,15	1064,38	1591,36
1.5	496,77	558,18	585,20			809,30	863,43	1068,27	1589,41
Mittelwert [bp]	495,88	557,70	585,96			809,49	863,70	1067,15	1592,65
Standardabw.	1,27	0,42	1,07			0,18	1,99	1,94	6,90
Varianz	1,60	0,18	1,14			0,03	3,97	3,75	47,55
2.1	n.def.	557,84	n.def.			809,77	861,94	1066,57	1599,62
2.2	497,54	558,02	n.def.			809,11	862,20	1067,37	1598,40
2.3	n.def.	557,40	584,54			809,58	861,82	1066,25	1596,55
2.4	n.def.	557,41	n.def.			809,35	861,71	1065,45	1589,37
2.5	498,17	560,69	587,42			813,06	861,31	1072,89	1602,29
Mittelwert [bp]	497,86	558,27	585,98			810,17	861,80	1067,71	1597,25
Standardabw.	0,45	1,38	2,04			1,63	0,33	2,98	4,87
Varianz	0,20	1,90	4,15			2,66	0,11	8,87	23,73
3.1	n.def.	557,99	n.def.	711,25	727,52	810,25	863,53	1068,68	1594,53
3.2	n.def.	558,28	n.def.	710,91	727,44	809,55	859,46	1070,39	1600,91
3.3	498,18	557,45	584,82	709,86	726,21	809,14	862,01	n.def.	1590,28
3.4	n.def.	557,23	n.def.	709,82	726,27	809,09	863,56	1069,48	1591,55
3.5	497,88	560,25	586,91	714,89	729,32	813,18	862,37	1073,69	1603,92
Mittelwert [bp]	498,03	558,24	585,87	711,35	727,35	810,24	862,19	1070,56	1596,24
Standardabw.	0,21	1,20	1,48	2,08	1,26	1,71	1,67	2,20	5,94
Varianz	0,05	1,44	2,18	4,32	1,60	2,91	2,80	4,84	35,31
4.1	493,50	557,68	588,95	710,17	726,57	n.def.	866,68	1076,20	1591,64
4.2	497,73	558,16	585,31	709,64	725,85	809,34	862,06	1069,03	n.def.
4.3	n.def.	557,31	n.def.	709,43	726,27	n.def.	862,72	1067,24	1594,65
4.4	n.def.	559,33	n.def.	714,05	729,11	n.def.	865,27	n.def.	1601,26
4.5	n.def.	559,43	n.def.	714,56	729,18	811,54	865,66	n.def.	n.def.
Mittelwert [bp]	495,62	558,38	587,13	711,57	727,40	810,44	864,48	1070,82	1595,85
Standardabw.	2,99	0,96	2,57	2,52	1,62	1,56	1,99	4,74	4,92
Varianz	8,95	0,92	6,62	6,34	2,62	2,42	3,95	22,48	24,22

Tab. A3 : Fünfmalige Untersuchung einer identischen Blutspur (Mensch) an verschiedenen Tagen mit Primer I (Untersuchungsreihen 1-4)

Probe/Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.1	501,92	509,44	598,80	676,18	708,39	720,18	732,86	752,47	780,79
1.2	499,66	506,95	596,57	672,39	705,04	717,00	728,62	749,88	777,70
1.3	499,75	507,71	596,42	672,53	705,28	716,99	729,47	749,82	778,00
1.4	500,71	508,08	596,27	672,63	705,45	717,16	727,39	750,20	778,30
1.5	501,62	509,10	597,95	674,90	707,36	719,06	731,47	751,61	779,63
Mittelwert [bp]	500,73	508,26	597,20	673,73	706,30	718,08	729,96	750,80	778,88
Standardabw.	1,04	1,02	1,12	1,72	1,49	1,46	2,20	1,18	1,30
Varianz	1,08	1,04	1,25	2,95	2,21	2,14	4,83	1,40	1,68
2.1	501,53	509,00	598,99	675,69	708,29	719,71	730,99	752,42	780,45
2.2	501,24	508,53	596,58	675,59	704,86	716,84	729,37	749,86	778,52
2.3	499,69	507,03	596,70	672,38	704,82	716,55	728,62	749,73	777,53
2.4	500,94	508,31	596,40	672,37	705,01	716,94	729,43	749,98	778,08
2.5	500,22	507,68	597,66	673,84	706,07	717,98	728,46	750,59	778,82
Mittelwert [bp]	500,72	508,27	597,24	673,97	705,81	717,60	729,37	750,52	778,68
Standardabw.	0,76	0,77	1,08	1,63	1,48	1,29	1,00	1,11	1,10
Varianz	0,57	0,59	1,17	2,67	2,19	1,68	1,00	1,24	1,21
3	501,75	509,11	598,27	674,70	707,15	719,07	730,88	751,69	779,16
4	501,70	509,12	598,36	672,96	707,56	718,99	731,54	751,93	780,11
5	501,33	508,77	598,15	674,58	707,01	718,67	729,98	751,86	n.def.
6	500,98	508,46	597,78	674,44	706,80	717,88	730,12	750,99	778,66
7	500,92	508,45	597,55	676,67	705,64	717,82	729,90	750,18	n.def.
8	499,83	507,22	597,43	673,09	705,80	717,19	727,32	750,39	778,29
9	499,92	507,37	597,28	672,95	705,57	717,28	729,31	750,17	778,03
10	499,83	507,27	597,65	n.def.	705,95	717,62	729,39	750,17	778,42
11	501,50	508,70	597,69	673,83	706,62	718,35	728,29	751,00	779,09
12	501,58	509,06	598,62	674,87	707,40	719,34	731,17	751,79	777,89
13	501,06	508,35	597,19	n.def.	706,08	718,10	727,99	750,50	778,90
14	500,84	508,14	596,37	672,32	705,44	716,82	727,15	750,18	778,32
15	501,23	508,45	596,67	672,92	705,65	717,31	728,16	n.def.	778,52
16	501,10	508,51	596,85	671,18	705,86	717,45	727,33	749,82	777,94
17	500,27	507,79	597,75	673,47	705,57	717,70	727,36	749,99	n.def.
18	499,99	507,58	597,26	673,13	705,18	717,61	727,35	749,19	n.def.
19	499,99	507,57	597,19	n.def.	705,21	717,72	729,64	749,49	n.def.
20	501,14	508,61	597,04	673,57	705,81	717,70	728,39	750,73	779,03
21	501,14	509,02	592,48	672,09	705,95	718,01	730,40	750,92	778,61
22	501,53	508,87	596,39	672,69	705,39	717,53	728,56	751,14	778,62
23	501,43	508,87	597,54	673,33	706,22	717,64	730,22	750,72	778,15
24	501,58	508,93	597,57	673,61	706,34	718,13	728,51	750,62	779,08
25	501,54	509,02	597,90	674,37	706,53	718,49	730,34	751,40	779,02
Mittelwert [bp]	500,95	508,34	597,28	673,64	706,10	717,90	729,27	750,67	778,70
Standardabw.	0,72	0,70	1,13	1,32	0,95	0,88	1,48	0,86	0,79
Varianz	0,51	0,49	1,28	1,73	0,90	0,78	2,10	0,74	0,63

Probe/Fragment	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1.1	825,37	881,65	934,29	946,91	1007,40	1077,32	1132,09	n.def.	n.def.
1.2	823,40	879,31	933,79	946,78	1006,50	1074,57	1130,11	1202,74	1375,78
1.3	823,21	880,86	935,10	947,81	1007,98	1075,99	1130,04	1204,79	1375,82
1.4	824,04	882,09	936,86	949,46	1009,19	1078,08	1131,23	1206,52	1366,87
1.5	824,12	879,67	932,03	944,50	1004,08	1073,90	1130,59	1206,90	1380,47
Mittelwert [bp]	824,03	880,72	934,41	947,09	1007,03	1075,97	1130,81	1205,24	1374,74
Standardabw.	0,85	1,21	1,77	1,80	1,92	1,77	0,86	1,90	5,69
Varianz	0,72	1,46	3,14	3,24	3,67	3,13	0,74	3,62	32,34
2.1	824,86	877,87	929,98	941,82	993,05	1073,12	1129,88	n.def.	n.def.
2.2	823,30	881,77	937,17	949,83	1000,58	1077,38	1132,93	n.def.	n.def.
2.3	823,19	881,26	935,70	948,20	999,29	1076,42	1130,94	1206,67	1375,00
2.4	823,51	880,99	935,23	947,45	998,41	1075,67	1130,74	1208,53	1377,54
2.5	823,58	882,09	936,40	948,43	1000,02	1077,13	1132,13	n.def.	n.def.
Mittelwert [bp]	823,69	880,79	934,89	947,15	998,27	1075,94	1131,32	1207,60	1376,27
Standardabw.	0,67	1,69	2,84	3,10	3,03	1,71	1,20	0,86	1,27
Varianz	0,45	2,86	8,09	9,61	9,61	2,94	1,45	0,75	1,61
3	824,34	883,13	937,97	950,47	1004,90	1079,49	1131,92	n.def.	n.def.
4	825,05	878,10	930,26	942,66	997,27	1073,52	1129,31	n.def.	n.def.
5	824,26	875,73	927,37	938,98	999,30	1070,84	1129,67	n.def.	n.def.
6	824,43	886,44	937,96	950,52	1005,07	1078,82	1132,64	n.def.	n.def.
7	823,13	879,99	932,77	947,73	1008,13	1075,31	1132,00	n.def.	n.def.
8	823,52	880,28	935,59	947,58	1009,30	1075,66	1130,25	1207,48	1377,33
9	823,82	880,50	934,56	947,52	999,80	1075,93	1131,08	1207,68	1376,89
10	n.def.	880,88	936,46	949,17	1004,13	1077,30	1130,40	1209,09	1376,70
11	824,02	n.def.	937,06	949,68	1004,79	1078,17	1132,16	n.def.	n.def.
12	824,83	879,81	933,28	944,82	1006,25	1075,84	1131,41	1208,47	1382,05
13	n.def.	874,77	926,41	939,28	999,49	1069,76	1126,19	1209,35	1380,27
14	823,74	881,12	935,65	948,64	1003,96	1076,26	1130,39	1207,00	1374,62
15	823,28	879,00	930,10	942,59	994,32	1072,36	1129,47	1207,65	1377,61
16	n.def.	877,61	926,95	938,97	1000,54	1069,65	1126,58	1210,33	1378,29
17	823,94	877,92	931,40	n.def.	1005,28	1072,61	1129,07	1205,69	1378,96
18	823,34	878,69	931,11	945,38	1005,20	1073,68	1128,67	1203,48	1375,06
19	823,32	880,20	935,33	n.def.	1009,14	1076,20	1128,62	1203,17	1375,35
20	823,42	881,29	934,80	947,76	1001,49	1076,49	1130,37	1204,92	1376,98
21	823,95	879,88	933,34	946,41	1006,09	1075,02	1130,09	1207,68	1377,60
22	823,92	881,03	934,87	948,15	1008,31	1076,24	1131,25	1207,25	1376,57
23	823,69	879,76	934,05	946,62	998,72	1074,60	1130,09	1207,14	1378,58
24	824,47	882,61	938,75	951,65	1003,22	1078,54	1132,02	1205,66	1376,41
25	824,28	880,98	934,65	948,67	1002,48	1076,76	1129,79	1208,54	1377,92
Mittelwert [bp]	823,91	880,23	933,86	946,59	1003,14	1075,41	1130,43	1206,81	1376,90
Standardabw.	0,60	2,18	3,19	3,40	4,30	2,45	1,53	1,99	2,86
Varianz	0,36	4,76	10,18	10,86	18,45	6,02	2,35	3,95	8,19

Tab. A4: Untersuchungsreihe – 25 versch. Blutspuren (Mensch), amplifiziert mit Primer II; Spur 1 + 2 wurden jeweils 5x an versch. Tagen amplifiziert und ausgewertet

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
1	501,53	507,03	597,40	n.def.	n.def.	1002,95	1074,90	n.def.	n.def.
2	501,24	508,61	596,70	717,11	728,01	n.def.	n.def.	n.def.	n.def.
3	500,83	508,99	596,02	716,57	729,29	1002,20	1076,09	1203,22	1377,84
4	501,94	509,45	595,97	719,78	730,55	1000,20	1079,29	1204,00	1379,21
5	501,36	508,85	596,77	717,04	726,93	1005,87	1074,58	n.def.	n.def.
6	501,66	507,39	597,78	717,79	729,59	n.def.	1076,48	n.def.	1378,06
7	501,23	508,81	596,17	n.def.	n.def.	n.def.	1077,57	n.def.	n.def.
8	501,40	507,55	597,50	717,38	n.def.	n.def.	n.def.	n.def.	n.def.
9	501,01	508,32	595,03	716,21	728,15	1000,11	1075,32	1204,59	1373,69
10	500,98	506,10	595,24	714,41	726,55	1006,14	1072,21	1194,96	1368,25
11	500,68	506,26	594,36	714,25	726,53	1006,29	1072,53	1199,38	1371,01
12	500,26	509,66	594,41	713,94	726,01	1000,34	1073,03	1204,66	1370,44
13	500,19	505,94	595,46	714,49	726,93	1000,25	1073,52	n.def.	1370,98
14	500,14	509,88	594,84	714,88	727,09	1000,74	1073,20	1199,92	1369,62
15	499,88	505,54	595,85	714,49	727,06	1005,56	1071,83	1203,42	1370,14
16	500,33	505,79	595,47	n.def.	729,43	n.def.	n.def.	1204,91	1373,01
17	501,38	508,72	596,95	n.def.	n.def.	n.def.	1075,55	1213,34	n.def.
18	500,35	505,70	595,59	714,95	726,76	n.def.	1073,03	n.def.	1374,80
19	499,67	505,81	n.def.	n.def.	n.def.	1003,45	1070,96	n.def.	n.def.
20	502,08	509,60	595,10	719,84	730,28	1004,77	1079,47	1206,92	1378,35
Mittelwert [bp]	500,91	507,70	595,93	716,21	727,94	1002,99	1074,68	1203,57	1373,49
Standardabw.	0,69	1,55	1,03	1,94	1,50	2,51	2,51	4,65	3,80
Varianz	0,48	2,42	1,05	3,78	2,26	6,28	6,29	21,60	14,46

Tab. A5 : Untersuchungsreihe – 20 verschiedene Mundschleimhautabstriche (Mensch), amplifiziert mit Primer II

Probe/Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1.1	346,69	412,51	457,50	549,78	642,04	661,24	693,19	823,43	863,58
1.2	346,08	411,57	456,69	549,61	641,20	660,47	692,49	823,21	862,83
1.3	n.def.	411,86	n.def.	548,98	n.def.	659,62	n.def.	n.def.	864,72
1.4	346,10	412,85	458,51	551,52	644,06	665,36	697,95	826,33	865,31
1.5	347,16	412,77	457,76	551,40	641,00	665,07	697,74	825,85	864,53
Mittelwert [bp]	346,51	412,31	457,62	550,26	642,08	662,35	695,34	824,71	864,19
Standardabw.	0,52	0,57	0,75	1,14	1,40	2,68	2,91	1,61	0,98
Varianz	0,27	0,32	0,56	1,29	1,95	7,17	8,44	2,60	0,97
2.1	346,41	411,83	457,05	549,80	641,89	660,95	693,20	823,43	862,42
2.2	n.def.	412,27	457,14	549,71	641,68	661,00	n.def.	822,80	863,10
2.3	345,73	411,62	456,70	549,45	641,14	660,27	692,82	822,81	865,48
2.4	n.def.	n.def.	n.def.	549,46	n.def.	659,82	n.def.	n.def.	864,12
2.5	348,67	412,60	457,82	551,29	643,73	664,84	n.def.	825,62	865,20
Mittelwert [bp]	346,94	412,08	457,18	549,94	642,11	661,38	693,01	823,67	864,06
Standardabw.	1,54	0,44	0,47	0,77	1,13	2,00	0,27	1,34	1,32
Varianz	2,37	0,19	0,22	0,59	1,27	3,99	0,07	1,79	1,73

Probe/Fragment	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1.1	935,65	992,53	1064,56	1148,83	1232,70	1311,62	1468,38	1513,86	1716,31
1.2	935,40	991,73	1064,17	1147,83	n.def.	1309,43	1467,15	1512,99	1714,34
1.3	n.def.	993,40	n.def.	1148,09	1219,89	1310,23	1465,80	1515,86	n.def.
1.4	n.def.	995,63	n.def.	1154,67	1228,72	1317,91	1475,90	1512,54	n.def.
1.5	n.def.	993,90	1064,67	1153,22	1226,59	1318,89	1475,07	1511,99	n.def.
Mittelwert [bp]	935,53	993,44	1064,47	1150,53	1226,98	1313,62	1470,46	1513,45	1715,33
Standardabw.	0,18	1,48	0,26	3,18	5,36	4,45	4,69	1,51	1,39
Varianz	0,03	2,19	0,07	10,13	28,72	19,81	21,96	2,29	1,94
2.1	938,24	989,69	1061,91	1148,03	1235,64	1314,36	1469,71	1514,44	1716,30
2.2	938,54	990,15	n.def.	1148,16	1234,63	1311,35	1468,42	1512,70	1716,57
2.3	941,15	991,94	1064,05	1147,43	1231,99	1310,67	1469,57	1516,82	1722,00
2.4	n.def.	992,71	n.def.	1145,49	1232,55	1310,63	1464,03	1510,80	1712,01
2.5	943,87	995,45	1065,54	1153,53	n.def.	1318,03	n.def.	1513,40	1719,23
Mittelwert [bp]	940,45	991,99	1063,83	1148,53	1233,70	1313,01	1467,93	1513,63	1717,22
Standardabw.	2,63	2,30	1,82	2,99	1,72	3,20	2,67	2,22	3,72
Varianz	6,91	5,29	3,33	8,96	2,96	10,23	7,10	4,94	13,83

Probe/Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
3	347,23	413,14	457,48	550,08	641,69	661,12	693,17	823,03	862,02
4	n.def.	412,81	457,72	550,01	n.def.	661,67	n.def.	n.def.	n.def.
5	n.def.	412,81	n.def.	550,10	n.def.	662,21	n.def.	n.def.	860,20
6	346,70	412,11	457,26	549,84	642,22	661,64	692,46	823,75	860,81
7	346,89	412,32	457,50	550,04	642,25	661,64	694,17	823,40	861,78
8	347,98	412,05	457,31	549,73	641,93	661,44	693,53	823,32	861,82
9	346,90	413,37	458,03	550,49	642,88	662,41	694,07	823,13	863,63
10	346,67	412,02	457,25	549,80	642,44	660,73	693,57	823,04	861,49
11	346,68	413,74	457,97	550,39	643,20	662,59	694,71	823,89	862,55
12	346,12	413,47	457,89	550,09	642,39	662,00	693,88	823,72	862,43
13	n.def.	412,16	n.def.	549,88	n.def.	661,23	692,98	n.def.	862,34
14	346,15	411,73	456,94	549,49	641,43	660,59	692,78	n.def.	864,25
15	346,75	413,18	457,65	550,61	642,54	661,71	693,55	823,64	863,18
16	347,81	412,18	457,63	550,00	642,71	662,08	694,08	823,96	861,05
17	n.def.	412,72	457,43	550,18	n.def.	662,17	694,26	n.def.	862,28
18	n.def.	411,92	456,85	549,69	n.def.	661,27	692,57	n.def.	862,62
19	n.def.	411,89	n.def.	549,80	n.def.	661,44	n.def.	n.def.	862,52
20	345,64	412,05	457,07	549,17	640,19	663,58	691,51	822,61	861,40
21	347,24	413,06	457,62	549,95	642,14	661,20	693,19	822,79	861,06
22	345,57	411,26	456,64	549,24	640,15	659,21	691,75	822,39	860,91
23	347,22	413,37	457,56	550,14	642,17	661,44	693,30	822,77	859,88
24	347,21	411,80	456,59	549,42	639,99	659,71	691,52	822,94	860,79
25	347,13	413,17	457,56	550,09	641,86	660,40	693,28	822,74	861,73
Mittelwert [bp]	346,79	412,44	457,37	549,98	641,96	661,58	693,53	823,53	862,56
Standardabw.	0,75	0,64	0,47	0,58	1,01	1,45	1,86	1,02	1,51
Varianz	0,56	0,42	0,22	0,34	1,02	2,11	2,27	1,05	2,28

Probe/Fragment	10	11	12	13	14	15	16	17	18
3	934,63	991,53	1064,02	1148,79	1233,79	1307,24	1464,19	1511,54	1709,85
4	n.def.	984,33	n.def.	1146,71	1237,70	1310,04	1474,13	1518,52	1714,49
5	935,09	981,52	n.def.	1148,15	1240,04	1317,51	1474,28	1518,77	1717,40
6	935,77	985,49	1059,47	1147,72	1235,30	1314,66	1472,39	1515,78	1713,74
7	938,77	989,52	1062,90	1150,13	1231,76	1311,56	1468,05	1510,45	1717,84
8	939,58	990,49	1063,48	1149,91	1233,35	1310,78	1467,90	1510,37	1715,93
9	943,29	994,15	1062,12	1150,50	1233,36	1311,44	1466,50	1509,50	n.def.
10	939,73	989,93	1062,61	1150,10	1220,03	1311,42	1467,97	1511,93	1717,68
11	942,02	992,64	1065,47	1149,46	1235,64	1313,55	1468,69	1512,50	1718,55
12	934,94	991,17	1064,22	1149,65	1231,38	1308,18	1466,44	1510,54	1714,49
13	939,51	989,73	n.def.	1149,30	1234,11	1313,51	1468,87	1514,90	1717,39
14	n.def.	992,79	1063,93	1146,60	1233,79	1309,76	1468,29	1513,43	1714,46
15	941,23	991,56	1064,27	1149,25	1230,89	1308,73	1468,14	1512,77	1718,35
16	936,96	987,38	n.def.	1148,99	1223,08	1315,65	1471,52	1516,19	n.def.
17	935,66	988,62	n.def.	1148,70	1220,07	1312,97	1471,63	1514,91	1714,96
18	938,22	989,08	n.def.	1146,13	1233,72	1312,78	1470,01	1515,67	1714,96
19	935,96	988,09	n.def.	1148,03	1222,81	1312,20	1472,37	1515,90	n.def.
20	939,83	990,54	1063,62	1147,32	1231,76	1306,13	1461,90	1511,73	1710,96
21	938,98	989,69	1063,69	1148,63	1220,11	1309,16	1465,34	1512,35	1710,88
22	938,54	989,73	1062,29	1147,55	1231,96	1311,88	1466,15	1514,67	1716,04
23	936,71	987,64	1061,81	1148,00	1220,80	1311,96	1465,92	1513,35	1712,66
24	938,84	989,73	1063,14	1148,64	1217,82	1309,53	1461,48	1509,59	1710,38
25	933,79	990,81	1065,75	1149,29	1220,13	1311,22	1467,55	1514,98	1715,34
Mittelwert [bp]	938,05	990,40	1063,53	1148,87	1229,55	1311,97	1468,55	1513,51	1715,30
Standardabw.	2,69	2,99	1,45	1,97	6,38	3,08	3,86	2,40	2,92
Varianz	7,26	8,95	2,11	3,87	40,69	9,49	12,58	5,75	8,51

Tab. A6: Untersuchungsreihe – 25 verschiedene menschliche Blutspuren, amplifiziert mit Primer III; Spur 1 und 2 wurden jeweils fünfmal an verschiedenen Tagen amplifiziert und ausgewertet

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
1	410,89	549,16	659,43	862,85	992,53	1218,77	1305,93	1464,42	1512,65
2	n.def.	549,71	660,74	861,98	n.def.	1229,07	1314,34	1463,75	1507,83
3	412,76	549,97	661,02	861,74	990,41	1231,36	1311,15	1468,40	1514,55
4	412,98	550,15	661,61	861,64	991,01	1229,16	1310,34	1463,58	1513,13
5	411,62	549,29	659,70	n.def.	993,42	1233,86	1307,53	1467,47	1512,84
6	413,28	549,90	661,17	863,00	988,59	1237,26	1310,41	1467,31	1514,15
7	411,19	549,35	659,90	n.def.	994,58	1217,38	1308,72	n.def.	n.def.
8	412,23	549,60	659,63	864,47	992,13	1229,59	1302,91	1461,54	1511,08
9	412,00	549,26	659,35	863,14	988,44	1231,56	1304,44	1464,67	1513,94
10	411,91	549,33	663,18	861,39	992,12	1228,38	1302,01	1458,41	1509,86
11	412,26	549,57	658,83	n.def.	992,17	1232,17	1311,36	1463,88	1513,26
12	412,20	549,44	659,28	861,99	988,40	1231,49	1302,40	1463,00	1514,37
13	412,21	549,21	663,84	863,27	989,11	1230,39	1303,02	1460,93	1513,13
14	412,24	549,25	659,14	863,48	988,79	1234,40	1306,22	1464,02	1514,98
15	412,52	549,38	659,54	863,75	989,66	1231,09	1302,25	1459,68	1511,15
16	412,18	549,35	658,52	863,31	987,49	1216,98	1303,00	1463,96	1514,50
17	412,13	549,28	663,72	860,89	992,52	1225,64	1302,55	1460,75	1510,66
18	411,75	549,20	658,31	860,03	990,90	1214,12	1299,54	1460,09	1513,83
19	411,52	550,08	661,48	864,00	994,76	1221,67	1309,58	1469,19	1512,44
20	410,67	550,11	659,54	859,54	991,66	1228,01	n.def.	n.def.	1512,73
Mittelwert [bp]	412,03	549,53	660,40	862,38	990,98	1227,62	1306,19	1463,61	1512,69
Standardabw.	0,66	0,34	1,66	1,39	2,16	6,45	4,16	3,07	1,85
Varianz	0,44	0,11	2,76	1,94	4,66	41,57	17,30	9,40	3,41

Tab. A7 : Untersuchungsreihe – 20 verschiedene Mundschleimhautabstriche (Mensch), amplifiziert mit Primer III

Fragment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe									
1		561,17	563,82			997,30			
2		561,11	563,75	865,99		1001,32			
3		560,65	563,25		911,92				
4	498,67	560,15	562,86		911,14		1011,22		
5		560,92	563,86						
6	499,35	561,11	563,81						
7	499,44	561,03	563,62				1012,20		
8		557,86	561,69	868,02					
9		561,13	563,80						
10	502,38	560,46	562,84	870,01	908,18		1006,32	1150,70	
11	500,69	560,81	562,23		909,41		1007,95		1397,71
12	502,02	560,86	564,10		908,21	1000,78		1152,20	
13	502,66	559,85	562,80		911,99		1009,10		1400,52
14		560,58	563,37						
15		560,52	563,43						
16		560,70	563,52						
17		561,20	563,85						
18	502,81	561,62	564,33		913,18				
19		561,82	564,40		914,57				
20	504,56	562,57	565,42	863,56	913,73				
Mittelwert [bp]	501,40	560,81	563,54	866,90	911,37	999,80	1009,36	1151,45	1399,12
Standardabw.	1,97	0,91	0,81	2,76	2,34	2,18	2,39	1,06	1,99
Varianz	3,86	0,83	0,65	7,64	5,48	4,76	5,71	1,13	3,95
Häufigkeit(rel.)	0,45	1	1	0,2	0,45	0,15	0,25	0,1	0,1
Größe (index.)	3,65	99,19	94,74	2,17	2,21	1,88	2,67	1,39	1,41

Tab.A8: Untersuchungsreihe – 20 Spuren verschiedener Hunde

Fragment	1	2	3	4	5	6	7
Probe							
1	642,79	842,40		1087,73	1100,46		
2	642,34	841,67		1084,89	1098,01		
3	643,17	840,76		1079,19	1094,32		
4	643,58	840,68		1081,36	1095,37		
5	642,65	842,48		1085,13	1099,33		
6	643,15	840,57	931,53	1082,62	1096,91		
7	643,15	840,15		1078,51	1093,00		
8	641,73	842,36		1085,68	1099,87		
9	642,97	842,90		1085,64	1099,19		
10		841,04	933,62	1083,26	1098,00	1331,37	1690,73
11	640,54	841,18	935,23	1083,78	1098,84	1333,95	1689,31
12	640,66	840,92	932,25	1081,90	1097,28	1334,77	1690,78
13	640,18	841,29	935,78	1084,84	1098,84	1334,15	1692,34
14		841,19	934,12	1084,53	1096,36		1695,77
15	643,01	840,96	932,21	1082,17	1096,19		
16	642,47	841,92	934,08	1084,37	1098,52		
17		840,69	933,97	1084,31	1097,74		1695,67
18	642,76	845,75		1089,23	1100,92		
19	641,85	841,49		1084,47	1098,72	1338,10	
20		841,59	934,71	1083,02	1097,40		1695,33
Mittelwert [bp]	642,31	841,60	933,75	1083,83	1097,76	1334,47	1692,85
Standardabw.	1,04	1,22	1,38	2,53	2,00	2,41	2,71
Varianz	1,08	1,48	1,90	6,38	3,99	5,81	7,37
A (rel.)	0,80	1,00	0,50	1,00	1,00	0,25	0,35
B (index.)	70,50	84,85	25,60	31,40	30,70	8,60	48,70

Tab. A9 : Untersuchungsreihe – 20 Spuren verschiedener Hausschweine

Fragment	1	2	3	4	5	6	7
Probe							
1	643,24	841,88		1084,42	1098,49		
2	643,34	841,24					
3	643,46	840,59		1081,58	1095,72		
4	643,26	841,22	934,10	1084,52	1098,64	1340,76	1704,77
5	643,25	843,25		1085,84	1099,59		
6	643,64	842,87		1087,01	1100,99		
7	643,31	842,12		1085,98	1099,78		
8		841,61			1099,84		
9	642,63	842,90		1088,85	1102,39		
10	641,57	842,14	936,66		1097,49	1339,91	1699,14
Mittelwert [bp]	643,08	841,98	935,38	1085,46	1099,21	1340,34	1701,96
Standardabw.	0,63	0,85	1,81	2,29	1,94	0,60	3,98
Varianz	0,39	0,72	3,28	5,22	3,77	0,36	15,85
A (rel.)	0,9	1,0	0,2	0,7	1,0	0,2	0,2
B (index.)	74,2	87,2	8,5	23,7	21,6	3,0	1,5

Tab. A10 : Untersuchungsreihe – 10 Spuren verschiedener Wildschweine

DANKSAGUNG

Zu Beginn möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. D. Patzelt für die Bereitstellung des Themas sowie die wissenschaftliche Betreuung und Beratung bedanken.

Des Weiteren gebührt besonderer Dank meinem Betreuer Herrn Dr. rer. nat. S. Jung sowie dem gesamten Team des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Würzburg für die uneingeschränkte Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die hervorragende Zusammenarbeit.

Ich danke außerdem den zahlreichen tierärztlichen Einrichtungen und Zoologischen Gärten für die Bereitstellung der Proben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern sowie meiner Frau, denn ohne ihre ausdauernde Hilfe und Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Christoph Dirk Großmann
An den Röthen 10
97080 Würzburg
Telefon 0931 – 72192

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Vor- u. Familienname: Christoph Dirk Großmann
Geburtsdatum: 03.09.1976
Geburtsort: Würzburg
Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1983 – 1987 Besuch der „Spielmann“-Grundschule in Weilburg
1987 – 1996 Besuch des Gymnasiums „Philippinum“ in Weilburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

Juli 96 – April 97 Grundwehrdienst

Hochschulbildung

April 1997	Beginn des Medizinstudiums an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
September 1999	Ärztliche Vorprüfung mit der Note „gut“
September 2000	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note „gut“
März 2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note „gut“
Praktisches Jahr	28.04.2003 – 17.08.2003 Prof. Dr. med. D. Kranzfelder, Missionsärztliche Klinik, Abteilung Gynäkologie 18.08.2003 – 07.12.2003 Prof. Dr. med. B. Jany, Missionsärztliche Klinik, Abteilung Innere Medizin 08.12.2003 – 28.03.2004 Prof. Dr. med. A. Thiede, Chirurgische Universitätsklinik Würzburg
Mai 2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung mit der Note „sehr gut“ und damit Abschluss des Medizinstudiums mit der Gesamtnote „gut“ (1,66)

Beruflicher Werdegang

Seit Juni 2004	Assistenzarzt in der Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe Prof. Dr. med. D. Kranzfelder, Missionsärztliche Klinik, Würzburg
----------------	--