

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. M. Bohnert

STR-Typisierung
an degradierten Minimalspuren
am Beispiel telogener Haare

Inaugural – Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Anna-Katharina Kleinfeld
aus Münster

Würzburg, August 2021



Referent: Prof. Dr. med. Michael Bohnert
Korreferent: Prof. Dr. med. Carsten Scheller
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:
02.12.2021

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Für
meine Eltern.

1. EINLEITUNG	- 1 -
1.1 Stand der Wissenschaft	- 2 -
1.2 Das menschliche Haar	- 3 -
1.2.1 Morphologie	- 3 -
1.2.2 Haararten	- 5 -
1.2.3 Wachstumszyklus	- 6 -
1.2.4 Biochemie des Haares	- 7 -
1.2.5 Haare als forensische Spur	- 8 -
1.3 Histologische Haaruntersuchung	- 9 -
1.3.1 Prinzip der histologischen Färbungen	- 10 -
1.3.2 DAPI-Prinzip	- 10 -
1.3.3 Harris-Hämatoxylin-Färbung	- 11 -
1.4 DNA-Typisierung	- 11 -
1.4.1 Genetische Individualität	- 12 -
1.4.2 DNA-Polymorphismen	- 12 -
1.4.2.1 Satelliten-DNA	- 13 -
1.4.2.2 Minisatelliten-DNA	- 13 -
1.4.2.3 Mikrosatelliten-DNA (=STR, short tandem repeats)	- 13 -
1.4.3 DNA-Typisierung in der forensischen Genetik	- 14 -
1.4.4 Multiplex-PCR	- 14 -
1.4.5 Kapillargelelektrophorese	- 15 -
1.5 Aufgaben- und Fragestellung	- 15 -
2. MATERIAL	- 17 -
2.1 Herkunft des Untersuchungsmaterials	- 17 -
2.2 Chemikalien und Geräte	- 17 -

3. METHODEN	- 22 -
3.1 Morphologische Untersuchung der Haare	- 22 -
3.2 Färbungen	- 22 -
3.2.1 DAPI-Färbung	- 23 -
3.2.2 Harris Hämatoxylin Färbung	- 23 -
3.3 Extraktionsmethoden	- 23 -
3.3.1 Chelex-100-Methode	- 23 -
3.3.2 Direkt-PCR	- 24 -
3.3.3 modifizierte TNCa-Extraktion nach Hellmann et al.....	- 25 -
3.3.4 QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit	- 27 -
3.3.5 NucleoSpin® Tissue XS.....	- 27 -
3.3.6 NucleoSpin® gDNA Clean-up.....	- 28 -
3.3.7 Li-Puffer	- 28 -
3.3.7.1 modifizierte Methoden	- 29 -
3.3.7.2 5-minütige Inkubation	- 30 -
3.3.7.3 6-stündige Inkubation.....	- 30 -
3.3.7.4 15-stündige Inkubation.....	- 30 -
3.3.7.5 + Triton X-100, 30-minütige Inkubation	- 30 -
3.3.7.6 + Triton X-100, 15-stündige Inkubation	- 30 -
3.3.8 DNA-Extraktion der Vergleichsspeichelproben.....	- 30 -
3.4 Nachweis und Quantifizierung humaner DNA mittels Quantifiler®	- 31 -
3.5 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR)	- 32 -
3.6 Kapillargelelektrophorese	- 34 -
4. ERGEBNISSE	- 37 -
4.1 Morphologische Begutachtung der Haare	- 37 -
4.1.1 Haarfarbe	- 37 -

4.1.2	Bestimmung der Haarlänge	- 38 -
4.2	Histologische Darstellung von Zellkernen	- 38 -
4.3	DNA-Profile der Vergleichsspeichelproben	- 41 -
4.4	DNA-Ausbeute der telogenen Haare	- 43 -
4.4.1	Chelex-100-Methode	- 44 -
4.4.2	Direkt-PCR	- 44 -
4.4.2.1	Direkt-PCR, komplettes Haar	- 44 -
4.4.2.2	Direkt-PCR, Schaft.....	- 45 -
4.4.2.3	Direkt-PCR, Wurzel	- 45 -
4.4.3	modifizierte TNCA-Methode nach Hellmann et al.	- 45 -
4.4.4	NucleoSpin® Tissue XS und NucleoSpin® Clean up	- 46 -
4.4.5	QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit	- 46 -
4.4.6	Li-Puffer, 30-minütige Inkubation	- 46 -
4.4.6.1	5-minütige Inkubation	- 47 -
4.4.6.2	6-stündige Inkubation.....	- 47 -
4.4.6.3	15-stündige Inkubation.....	- 48 -
4.4.6.4	+ Triton, 30-minütige Inkubation.....	- 48 -
4.4.6.5	+ Triton, 15-stündige Inkubation	- 49 -
4.5	Vergleich der einzelnen Extraktionsmethoden untereinander.....	- 53 -
4.6	Korrelation Zellkernanzahl und DNA-Ausbeute	- 54 -
4.6.1	Chelex-100-Methode nach Walsh et al.	- 55 -
4.6.2	Direkt-PCR	- 55 -
4.6.3	modifizierte TNCA-Methode	- 56 -
4.6.4	QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit	- 56 -
4.6.5	NucleoSpin® XS und NucleoSpin® Clean up.....	- 57 -
4.6.6	Li-Puffer nach Li et al.	- 57 -

4.6.6.1	5-minütige Inkubation	- 58 -
4.6.6.2	6-stündige Inkubation.....	- 58 -
4.6.6.3	15-stündige Inkubation.....	- 59 -
4.6.6.4	+Triton, 30-minütige Inkubation.....	- 59 -
4.6.6.5	+ Triton, 15-stündige Inkubation	- 60 -
4.7 Korrelation Haarfarbe und DNA-Ausbeute.....		- 61 -
5. DISKUSSION		- 63 -
5.1 Hintergrund der Untersuchung.....		- 63 -
5.2 Haarfarbe		- 64 -
5.3 Haarlänge		- 64 -
5.4 DAPI-Fluoreszenzfärbung als zuverlässige Screeningmethode		- 65 -
5.5 DNA-Ausbeute der telogenen Haare.....		- 65 -
5.6 Mögliche morphologische Lokalisation der degradierten DNA-Reste im Haar		- 67 -
6. ZUSAMMENFASSUNG.....		- 69 -
7. LITERATURVERZEICHNIS		- 71 -
8. ANHANG		- 77 -
8.1 Abkürzungsverzeichnis		- 77 -
8.2 Abbildungsverzeichnis		- 80 -
8.3 Tabellenverzeichnis		- 82 -

Danksagung

Lebenslauf

1. EINLEITUNG

Der Schwerpunkt der forensisch-medizinischen Haaranalyse liegt, neben der Speziesidentifizierung, in der Opfer- und / oder Täteridentitätsbestimmung im Rahmen einer kriminalpolizeilichen Ermittlung. Oftmals sind die erreichten Ergebnisse der forensisch-medizinischen Haaranalysen nicht zufriedenstellend, sodass neben der Möglichkeit der mikroskopischen Untersuchung der Fokus der forensischen Spurenkunde in den letzten Jahrzehnten immer mehr auf die molekulargenetischen Untersuchungsmethoden gelegt wurde.

Die ersten mikroskopischen Haaruntersuchungen wurden bereits im späten 19. Jahrhundert dokumentiert. Eine alleinige morphologische Analyse war jedoch nicht aussagekräftig genug, um gesicherte Angaben über eine Personenidentifizierung zu machen. Dies ist bis heute unverändert.

Durch die Entwicklung von molekulargenetischen Untersuchungsmethoden, veränderten sich die Möglichkeiten der forensischen Haaranalytik. So war es, im Rahmen der Analyse polymorpher Proteinsysteme, möglich, verlässlichere Angaben über Identitäten zu machen. Die ersten molekulargenetischen Untersuchungsmethoden waren allerdings nicht sensitiv genug, um mit dem geringen DNA-Gehalt von Einzelhaaren ausreichende Ergebnisse erzielen zu können.

Erst mit Einzug der Polymerasekettenreaktion (PCR), die eine Vervielfältigung einzelner, Individuen-spezifischer DNA-Abschnitte ermöglicht, und der Untersuchung von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP) gelang ein eindeutiger Identitätsnachweis, der ausreichend Beweiskraft besitzt, um von Strafverteidigungsbehörden und Gerichten verwertbar zu sein.

Heutzutage ist eine molekularbiologische Untersuchung für die Analyse human-biologischer, forensischer Spuren, wie etwa Blut, Sperma oder Speichel, Standard.

1.1 Stand der Wissenschaft

Bis Anfang des frühen 20. Jahrhunderts beschränkte sich die forensische Haaruntersuchung im Rahmen der damaligen Möglichkeiten lediglich auf die Begutachtung morphologischer Kriterien. Die wahrscheinlich ersten forensischen Untersuchungen des Haares gehen nach BISPING [8] auf Rudolf Virchow 1861 zurück. 1873 widmete der britische Toxikologe TAYLOR [57] in seinem Buch „The Principles and Practice of Medical Jurisprudence“ ein ganzes Kapitel der forensischen Haaruntersuchung. Es enthält Zeichnungen menschlicher Haare unter mikroskopischer Vergrößerung und verweist auf britische Ermittlungen, in denen seinerzeit Haare als Beweismittel genutzt wurden. 1874 erschien in Tübingen unter OESTERLEN [41] das erste Buch über die Bedeutung des menschlichen Haares in der Gerichtsmedizin. Es beschäftigt sich hauptsächlich mit morphologischen Kriterien und der Differenzierung menschlicher und tierischer Haare. 1910 veröffentlichte der französische forensische Wissenschaftler BALTHAZARD [5] „Le poil de l'homme et des animaux“, eine vergleichende Studie, die zahlreiche mikroskopische Untersuchungen nahezu aller Tierhaare enthält und somit eine Hilfestellung zur morphologischen Diskrimination menschlicher und tierischer Haare bietet.

Einen enormen Entwicklungsschritt in der forensischen Haaranalytik ermöglichte LANDSTEINER [2] mit seiner Entdeckung der Blutgruppen. YADA et al. [64] wiesen die Merkmale des AB0-Systems 1966 erfolgreich in Haaren nach. Darüber hinaus wurden in den späten 1970er Jahren weitere Blutgruppensysteme, wie etwa das Phosphoglucomutase₁-(PGM₁-)System an Wurzeln herausgerissener Haare von TWIBELL [58] oder aber die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (PGD) in Haarwurzeln durch OYA [44] nachgewiesen. 1983 gelang es GERTLER [18] die Enzyme Esterase D (EsD) und Glyocalase I (GLO) an humanen Haarwurzeln nachzuweisen. Eine Geschlechtsdifferenzierung konnte, nach der Entdeckung des inaktiven X-Chromosoms von BARR [7] und des Akridin-positiven Y-Chromosoms durch SCHWINGER [52] erfolgen. 1978 widmete sich NAGAMORI [37] dem spezifischen X-Chromosom-Nachweises aus dem reinen Haarschaft. Eine Revolution in der forensischen Spurenkunde gelang JEFFREYS 1985 [24, 25] durch die Etablierung des „genetischen Fingerabdrucks“ und SAIKI [49, 50] durch die Entwicklung und Einführung der PCR. Die PCR fand, wie in vielen anderen wissenschaftlichen Bereichen, auch in der

Rechtsmedizin enormen Zuspruch, sodass sich auf dieser Basis die bis heute genutzte STR-Analytik entwickelte. HUKKELHOVEN [22] gelang 1981 erstmals der DNA-Nachweis in Haaren; VON BEROLDINGEN [59] quantifizierte erstmals extrahierte DNA aus Haaren. Seit 1988 wird die DNA-Typisierung von einzelnen Haaren mittels PCR, erstmals von HIGUCHI [21] durchgeführt, eine gängige Untersuchungsmethode in der forensischen Medizin.

1.2 Das menschliche Haar

Evolutionsgeschichtlich ist das menschliche Haar als eine Weiterentwicklung der Fisch- und Reptilienschuppe zu sehen. Die ursprünglichen Funktionen des Haarkleides, wie z.B. der Kälteschutz, haben keine Bedeutung mehr für den neuzeitlichen Homo sapiens. Die wesentliche Funktion der Kopf- und Sexualbehaarung ist sozialer Natur [34].

1.2.1 Morphologie

Das Haar ist ein strangförmiges Hautanhangsgebilde, das über einen Follikel in der Epidermis verankert ist. Die Follikel sind zylindrische Einstülpungen der Epidermis, die bis zur Dermis oder Subkutis reichen. Jedem Follikel sind eine Talgdrüse und ein glatter Muskel, der *Musculus arrector pili*, angegliedert. Die Follikelzahl ist festgelegt und nimmt postnatal nicht mehr zu.

Man unterscheidet zwei Abschnitte des Haares, den vollständig keratinisierten *Haarschaft* und die nicht verhornte *Haarwurzel*. Der Schaft ist zu einem kleinen Anteil subdermal im Follikel verankert, der größere Anteil des Schaftes überragt jedoch die Hautoberfläche und endet in der Haarspitze.

Lange, kompakt liegende Hornzellen bilden die Hauptmasse des Schaftes, die *Rinde*. In ihr liegen die *Melanosomen*, die für die individuelle Haarfarbe verantwortlich sind. Die *Cuticula*, aufgebaut aus flachen, schuppenförmig angeordneten Hornzellen, umgibt die Rinde von außen. Streichrichtung ist zur Haarspitze. Das *Mark* ist ein mit lufthaltigen Hohlräumen gefüllter, diskontinuierlicher Strang aus Hornzellen und lediglich im Terminalhaar zu finden.

Ort der Verhornung ist die *keratogene Zone*. Sie liegt am Übergang von Haarwurzel zu Haarschaft.

Die *Haarwurzel* endet als trichterförmig aufgetriebener *Bulbus* am Boden des Follikels. Ihre Zellen sind unverhornt. Der Bulbus enthält die teilungsaktiven *Matrixzellen*, die für das Haarwachstum verantwortlich sind. Die Nachfolger der Matrixzellen steigen vom Bulbus her auf und differenzieren sich zu Cuticula, Mark, Rinde oder inneren Wurzelscheide. Zwischen den Matrixzellen sind die *Melanocyten* zu finden. Die späteren Rindenzellen nehmen von hier aus Melanosomen mit zu ihrem Bestimmungsort.

Die *Haarpapille* reicht von proximal in den Bulbus hinein. Sie besteht aus zellreichem Bindegewebe und enthält zur Versorgung des Haares eine Kapillarschlinge. Ohne die ernährende Funktion der Papille wäre kein Haarwachstum möglich.

Der Übergang des Follikels in die Hautoberfläche ist der *Haartrichter* oder *Infundibulum*. Am Follikelboden mündet der Talgdrüsenausführungsgang und – falls vorhanden – kurz darüber ein apokriner Schweißdrüsenausführungsgang.

Innerhalb des Follikels liegen symmetrisch Wurzel und Schaft umgebend die *epithelialen Wurzelscheiden*. Hoch bis zum Infundibulum bildet die innere Scheide eine feste Einheit mit Wurzel und Schaft. Sie besteht aus früh keratinisierten Zellen, die noch vor den Haarzellen verhornen. Die äußere Scheide verbindet sich nahtlos mit der Epidermis. Sie besteht aus vielen Schichten heller, unverhornter Zellen und enthält unterhalb des Infundibulums den sogenannten *Wulst*, eine Kumulation von Stammzellen, die sich zu Matrixzellen differenzieren, um so, nach Beendigung eines Wachstumszyklus, mit der Bildung eines neuen Haares, den nächsten Zyklus beginnen.

Von außen wird der Follikel von der *bindegewebigen Wurzelscheide* umhüllt. Zwischen ihr und der äußeren epithelialen Wurzelscheide liegt die *Basalmembran* oder *Glasmembran*.

Aufgabe des *M. arrector pili* ist die Aufrichtung des Haares („Gänsehaut“). Der Muskel inseriert unterhalb der Talgdrüse an der Wurzelscheide an der windabgewandten Seite des Follikels [31, 34, 42].

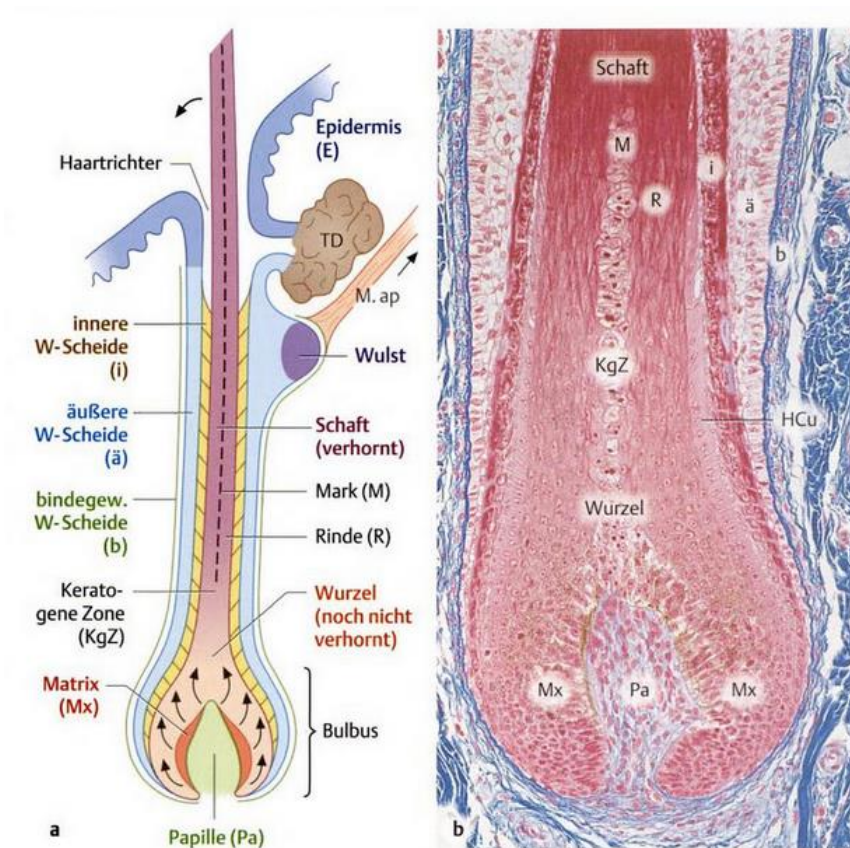


Abb. 1.2.1 Histologischer Aufbau des Haares, Haarfollikel (Längsschnitt) aus LÜLLMANN-RAUCH, R. [31]

1.2.2 Haararten

Es werden drei Arten des menschlichen Haares unterschieden [31, 40].

- Das fetale *Lanugohaar* wird durch seinen dünnen Querschnitt und seine Hypo-, bzw. Depigmentierung charakterisiert. Postnatal ersetzen sie die Flaum- oder Terminalhaare.
- Das *Flaumhaar*, auch *Vellushaar* genannt, welches als weiches (bis 20µm im Querschnitt), hypopigmentiertes und kurzes Haar die Körperoberfläche bedeckt. Der Follikel des Flaumhaares reicht lediglich bis in die Dermis.
- Das *Terminalhaar*, zu dem die langen, derben (bis 100 µm im Querschnitt) und pigmentierten Haare des Kopfes, der Brauen, der Wimpern und der sich im Laufe der Pubertät entwickelnden Haare der Achseln, Genitalregion, Umgebungsregion

von Körperöffnungen und das Barthaar des Mannes zählen. Hier reicht der Follikel bis in die Subkutis.

1.2.3 Wachstumszyklus

Der Wachstumszyklus des menschlichen Haares wird in drei Phasen unterschieden. Er beginnt immer mit der *anagenen Phase*, der eigentlichen Wachstumsphase. Sie dauert für das Kopfhaar bis zu 8 Jahre, für die Augenbraue nur einige Monate an. In dieser Phase ist der Follikel tief in der Epidermis verankert; die in dem Bulbus befindlichen Matrixzellen sind mitotisch aktiv und produzieren sämtliche Zellen des Haares [17, 31]. Wird das Haar in diesem Stadium durch extern wirkende Kräfte aus der Papille gerissen, ist die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass an dem herausgerissenen Haar Zellbestandteile zu finden sind.

Auf die anagene Wachstumsphase folgt die etwa dreiwöchige *Rückbildungs-* oder *katagene Phase*. Sie ist definiert als eine kurze Übergangsphase, in der der mitotisch aktive Follikel in die Ruhephase, die Telogenphase, übergeht. In dieser Rückbildungsphase reduziert sich der Follikel um zwei Drittel seiner ursprünglichen Größe. Die mitotische Aktivität wird eingeschränkt, die ernährende Versorgung der Kapillarschlingen wird verringert, die ersten Zellen des Bulbus verhornen. Mikroskopisch lässt sich als typisches Merkmal der Katagenphase die Vorstufe der „club-root“ darstellen, ein pinselartig, gebogenes Follikelende [45].

Die etwa dreimonatige Ruhe- oder Telogenphase endet mit dem Ausfall des Haares. In dieser Phase ist der Follikel endgültig auf ca. ein Drittel seiner ursprünglichen Größe geschrumpft; die Papille ist zu einem Zellhaufen kondensiert, der wenig an die originären Fibroblasten der anagenen Papille erinnert. Es sind keine Matrix, innere-, äußere Wurzelscheide oder Cuticula nachzuweisen. Die Verankerung des Haares erfolgt allein über das kolbenartig veränderte Follikelende. Das Haar fällt durch mechanische Beanspruchung oder durch ein neu nachwachsendes Haar aus [45].

Die Wachstumszyklen der menschlichen Follikel sind, im Gegensatz zu vielen anderen Säugetieren, nicht synchronisiert. So befinden sich ca. 90% der Kopfhaare in der Anagenphase, die übrigen 10% verteilen sich auf die Rückbildungs- bzw. Ruhephase. Bei physiologischen Verhältnissen verliert der Mensch ca. 100 Haare pro Tag [31].

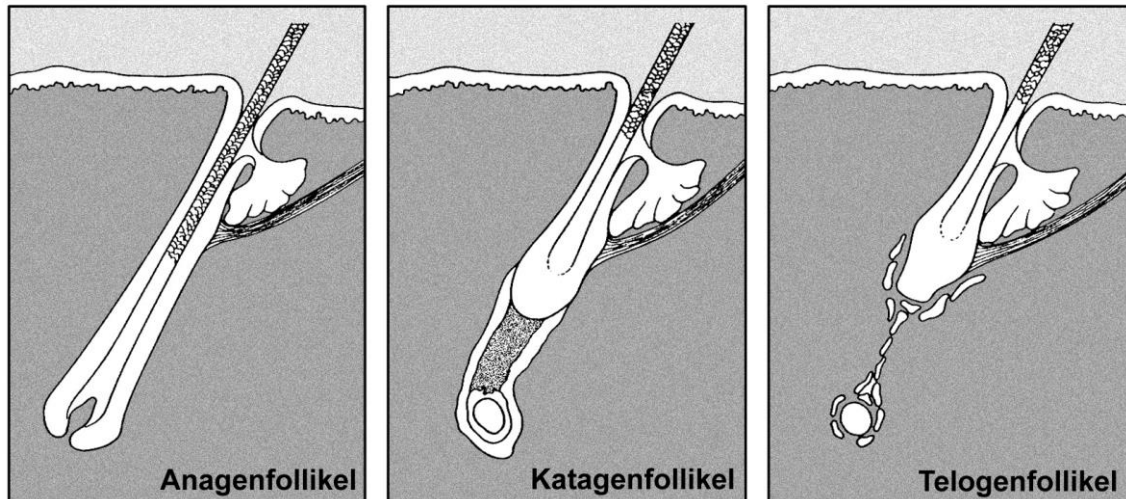


Abb. 1.2.3 Wachstumsphasen des Haares (aus ORFANOS, C.F. [42])

1.2.4 Biochemie des Haares

Das menschliche Haar ist ein komplexes Gewebe, aufgebaut aus verschiedenen differenzierten Zelltypen und einer Anzahl chemischer Komponenten. Der wichtige Grundbaustein des Haares ist das Keratin. Es wird zwischen weichem und hartem Keratin unterschieden. Diese beiden Typen differenzieren sich wesentlich in chemischem und strukturellem Aufbau. Das weiche Keratin entspricht der *Stratum corneum* der Epidermis. Die Berührungssensibilität des Gewebes ist hier der Ausgangspunkt des Terminus.

Das harte Keratin zeigt ein charakteristisches α -Röntgendiffraktionsmuster, für welches die Faserproteine des Haares verantwortlich sind. Dieses spezifische Muster lässt sich in allen Säugerkeratinen und der Epidermis aller Vertebraten nachweisen [3].

Die Aminosäure Cystein ist für den relativ hohen Gesamtschwefelgehalt von 5% des Haares verantwortlich. Im direkten Vergleich dazu liegt der der Epidermis bei nur etwa 1,5%. Das Cystein bildet die Quervernetzung zwischen den Peptidketten, welche sich durch ein Reduktionsmittel, wie etwa Dithiothreitol (DTT), im Rahmen von molekularbiologischen Untersuchungen aufbrechen lassen [36].

Der Lipidgehalt des Haares beträgt 1-2%; der der Epidermis etwa 10%. Daraus ergeben sich, im Unterschied zur Epidermis, eine größere Dehnungs- und Bruchresistenz und eine geringere Wasserdurchlässigkeit des Haares [42].

Für die charakteristischen Farben des Haares sind die Melanozyten bzw. das von ihnen synthetisierte Melanin verantwortlich.

Die Melaninsynthese erfolgt aus der Aminosäure Tyrosin, welches über das Enzym Tyrosinase über 3,4-Hydroxyphenylalanin (DOPA) und weiter in Dopachinon gespalten wird. Über eine Reihe weiterer Syntheseschritte erfolgt letztlich das Endprodukt Melanin [56].

Die Melanozyten umstülpen die dermale Papille. Während in der Anagenphase die Melanozyten groß und reich an Pigmentkörnchen sind, endet die Pigmentgranulasynthese in der Katagenphase. Damit endet auch der Einbau der Pigmentgranula in die Rindenzellen.

Es werden drei Arten von Melaninen unterschieden: *Eumelanin*, *Phäomelanin* und *Neuromelanin*. Die eigentliche Haarfarbe eines Menschen hängt sowohl von Qualität und Quantität des synthetisierten Melanins, als auch von der Haardicke ab. So enthalten schwarze Haare die größte Anzahl an weit über das Mark und Rinde verteilten Melanosomen. Blonde Haare sind hypopigmentiert, dünn und enthalten sehr wenig Mark. Weiße Haare hingegen sind in der Rinde depigmentiert, im Mark stark hypopigmentiert. Rote Haare enthalten rotes Melanin [14].

1.2.5 Haare als forensische Spur

Neben der toxikologischen Haaruntersuchung auf Drogen, Medikamentenbestandteile oder andere toxische Substanzen, wie sie in der forensischen Toxikologie üblich ist, stehen die Untersuchungen in Hinblick auf Individualmerkmale und Spurenuordnung im Fokus der forensisch-medizinischen Haaranalytik [33, 40]. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung von Individualmerkmalen und der sich damit ergebenden Spurenuordnung.

Spuren sind per definitionem Materialablagerungen auf Personen oder sachgegenständlichen Oberflächen, die nach Sicherung und Auswertung einen möglichen Rückschluss auf eventuell stattgefundene Straftaten zulassen. So werden etwa nach Einbrüchen, Gewalt- bzw. Sexualdelikten oder Verkehrsunfällen verschiedenste Spuren gesichert. Mögliche Spuren können unter anderem Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel, Sperma oder Vaginalsekrete, aber auch Gewebeteile oder Hautanhangsgebilde

wie Haare oder Nägel sein. Nicht selten ist die Menge der vorhandenen Spuren sehr gering.

Aufgrund des bekannten Wachstumszyklus verliert ein gesunder Mensch auf ganz natürliche Weise bis zu 100 Haare am Tag. Dies macht eine mögliche Sicherung an Tatorten sehr wahrscheinlich. Die Sicherung sollte mittels Lupe und Pinzette oder aber mit einem Klebeband erfolgen. Prinzipiell sollte jedes Haar einzeln asserviert und beschriftet werden.

Die Untersuchung des gesicherten Haares ist aus mehreren Untersuchungsschritten aufgebaut. Primär erfolgt die morphologische Begutachtung. So werden etwaig vorhandene Anhaftungen erkannt und ggfs. weiter untersucht. Nach Reinigung des Haares mittels Alkohol, Seife oder Ether werden die Haarlänge und –farbe bestimmt. Darauf folgen die Breitenvermessung des Haares sowie die Beurteilung der Pigmentierung.

Seit 1984 ist durch JEFFREYS‘ [24, 25] Entdeckung der Minisatelliten im menschlichen Genom, also der hypervariablen DNA-Bereiche, die spurenkundliche Untersuchung auf DNA-Ebene ausgeweitet. Dies betrifft auch die Haaranalytik. Die STR-Typisierung ist, neben der Untersuchung der mitochondrialen Sequenzen, eine wichtige Erhebung in Richtung Individual-Zuordnung.

1.3 Histologische Haaruntersuchung

Bis zu der Erfindung des Lichtmikroskops im späten 17. Jahrhundert durch den Niederländer van Leeuwenhoek, beschränkte sich die maximale Vergrößerung von Objekten durch sogenannte „Flohgläser“ auf das etwa 9-fache. Der erste wissenschaftliche Bericht über mikroskopische Haaruntersuchungen wurde im Jahr 1857 von LASSAIGNE [28] verfasst. 1869 erschien eine Arbeit von PFAFF [46], die unter anderem die Diskriminierung menschlicher und tierischer Haare erlaubt. WALDEYER [60] veröffentlichte 25 Jahre später einen Atlas menschlicher und tierischer Haare mit hervorragenden mikrofotografischen Abbildungen. KÖHLER [27] revolutionierte 1893 mit seiner Arbeit an Ultraviolettmikroskopen die Lichtmikroskopie. Ab diesem Zeitpunkt entwickelte sich die Fluoreszenzmikroskopie rasant. Lange Zeit beschränkte sich die Haaruntersuchung auf die Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskopie bis

die Haaranalytik mit Einzug der Röntgendiffraktionsanalyse, sowie Raster- und Transmissionselektronenmikroskope auf eine neue Ebene gehoben wurde.

1.3.1 Prinzip der histologischen Färbungen

Durch die mikroskopische Begutachtung von gefärbtem histologischen Material ist es möglich, die mit dem bloßen Auge nicht erkennbaren Strukturen, wie z.B. Zellkerne oder Zytoplasma, sichtbar zu machen und voneinander zu unterscheiden. Man unterscheidet mehrere Arten von Farbstoffen. Die den Standardfärbungen entsprechenden Farbstoffe sind:

Kationische = basische Farbstoffe

binden an anionische Strukturen, wie z.B. DNA oder RNA, die aufgrund ihres Färbeverhaltens auch als basophile Strukturen bezeichnet werden. Ein Vertreter dieser Klasse ist das Hämatoxylin.

Anionische = saure Farbstoffe

binden an kationische Strukturen, wie z.B. Plasmaproteine, Mitochondrien oder Hämoglobin, die aufgrund ihres Färbeverhaltens auch als eosinophile Strukturen bezeichnet werden. Ein Vertreter dieser Klasse ist das Eosin.

Neben den Standardfärbungen bietet die moderne Histologie eine breite Auswahl an weiteren möglichen Färbungen, wie etwa die Immun-, Substrat- oder die Emzymhistochemie [32].

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit mittels *Fluoreszenzfarbstoffen*, wie z.B. dem 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), die DNA anzufärben.

1.3.2 DAPI-Prinzip

Der Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) bindet an A-T-reiche Sequenzen doppelsträngiger DNA. Durch die Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert DAPI in sichtbarem Blau.

Um ein rasches Verblässen der Fluoreszenz zu verhindern, kann dem Färbeansatz das bicyclische, tertiäre Amin 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO) als Stabilisator beigefügt werden.

Mittels Fluoreszenzmikroskop ist es möglich, die angefärbten, also DNA-haltigen, Strukturen zu erkennen und eine Aussage über die Quantität der vorhandenen Zellkerne, bzw. nukleinsäurehaltigen Strukturen zu machen [10].

1.3.3 Harris-Hämatoxylin-Färbung

Der basische Farbstoff Hämatoxylin kann auf zweierlei Wegen gewonnen werden; auf natürlichem Wege durch Extraktion des Kernholzes der Haematoxylin-Arten oder aber auf synthetische Weise. Die Nomenklatur ist historisch bedingt, korrekterweise müsste das Oxidationprodukt *Hämatein* genannt werden. Es existieren über 100 verschiedene Rezepte zur Farbstoffgewinnung. Die gängigsten Rezepturen sind die nach Mayer, Harris und Weigert. Das in dieser Arbeit verwendete Harris-Hämatoxylin ist ein Hämatein, welches als leicht saurer Farbstoff vorliegt. Erst durch die Verbindung mit einem Aluminiumkation (Al^{3+}) wird die gewünschte Färbewirkung erreicht. Der basische Farblack liegt in einer Lösung mit leicht saurem Milieu (pH 3-4) vor. Über eine Chelatbildung an mehrwertigen Kationen mit anionischen Strukturen bindet der Farblack an das Substrat. Diese Bindung ist so stabil, dass folgende Spülschritte in Wasser und Alkohol sie nicht wieder lösen. Durch die Spülung mit destilliertem Wasser (pH 4,8-5,0) entsteht die rötlich-braune Farbe der gefärbten Strukturen. Nach der eigentlichen Kernfärbung schließt sich meist eine Gegenfärbung der übrigen histologischen Strukturen an. Diese erfolgt oftmals mit dem sauren Farbstoff Eosin. Auf die Gegenfärbung wurde in dieser Arbeit aufgrund mangelnden Nutzens verzichtet [1, 32].

1.4 DNA-Typisierung

Die humane DNA ist aus vier unterschiedlichen Bausteinen zusammengesetzt: den Nukleotiden. Die Nukleotide wiederum setzen sich aus einer Desoxyribose, einem Phosphat und entweder einer organischen Purin- (Adenin und Guanin) oder einer Pyrimidinbase (Cytosin und Thymin) zusammen. Sie weisen ein 5'-Phosphat- und ein 3'-Hydroxyl-Ende auf, worüber sie mit weiteren Nukleotiden über ein Zucker-Phosphat-„Rückgrat“ zu einem Makromolekül verknüpft sind. Das fadenförmige Makromolekül ist aus zwei Polynukleotidsträngen aufgebaut, die über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft sind. Nach der Chargaff-Regel lässt sich die Basenzusammensetzung der DNA analysieren. Sie besagt, dass die Anzahl der Adenine

immer der der Thyminen und die der Guanine der der Cytosine entspricht. Daraus ergibt sich, dass die Anzahl der Pyrimidine gleich der Anzahl der Purine ist. Watson und Crick entwickelten im Jahr 1953 das Modell der DNA-Doppelhelix. Dieses zeigt, dass die beiden Einzelstränge der DNA antiparallel verlaufen, also das 5'-Ende des einen Strangs dem 3'-Ende des komplementären Strangs gegenüberliegt und umgekehrt. Man spricht von Polaritäten. Die beiden Einzelstränge liegen ineinander verdrillt in Form einer Doppelhelix vor. Die hydrophoben Basen nach innen, das negativ geladene Zuckerphosphatrückgrat außen. 1952 gelang es Alfred Hershey und Martha Chase basierend auf den Erkenntnissen von Oswald T. Avery, die DNA als genetischen Informationsträger zu identifizieren. Sie ist in Form von Nukleotidsequenzen verschlüsselt. Man unterscheidet zwischen einmalig vorkommender single-copy DNA, die in der Regel zu den proteinkodierenden Bereichen gehört und der repetitiven DNA, die nahezu ausschließlich zu den nicht-kodierenden Bereichen gezählt wird. 1968 konnten Marshall Nirenberg und Gobind Khorana beweisen, dass die lineare Abfolge der Basen über die Abfolge der Aminosäure in den Proteinen entscheidet. Das gesamte humane Genom ist 111 cm lang; enthält etwa 3253×10^6 Basenpaare (bp) und ist auf 23 Chromosomen verteilt [23, 47].

1.4.1 Genetische Individualität

Für die Individualität eines Menschen ist sowohl die Heterogenität der genomischen als auch der mitochondrialen Desoxyribonukleinsäure (DNS oder engl.: DNA) verantwortlich. Durch sie ist eine Unterscheidung zwischen zwei Individuen möglich. Für die größere Heterogenität der genomischen DNA der kodierenden und der nicht-kodierenden Bereiche ist die Rekombination verantwortlich [23]. Der Untersuchungsschwerpunkt der genetischen forensischen Spurenkunde liegt in den nicht-kodierenden Bereichen.

1.4.2 DNA-Polymorphismen

DNA-Abschnitte, die innerhalb verschiedener Individuen derselben Spezies neutrale Variationen aufweisen, werden als DNA-Polymorphismen bezeichnet, der variable DNA-Bereich als polymorphe Region. Neutral bedeutet, dass die betroffenen Sequenzen in nicht-kodierenden Bereichen liegen und somit eine Mutation in diesem Bereich stumm,

also ohne Genproduktveränderung, verläuft. Man unterscheidet zwischen molekularen Sequenz- und Längenmarkern. In den Sequenzmarkern unterscheidet sich die Basenabfolge, während bei den Längenmarkern die Häufigkeit einer sich wiederholenden, repetitiven Sequenz variiert.

Der genetische Fingerabdruck, also die eindeutige Identifizierung eines menschlichen Individuums, fußt auf der hohen Variabilität der DNA-Polymorphismen. Diese Polymorphismen können, genau wie Gene, homo- oder heterozygot auf den beiden homologen Chromosomen vorkommen. Man spricht demnach auch von homo- oder heterozygoten Allelen. Der Vererbungslehre entsprechend werden die Allele an die nachfolgenden Generationen vererbt. Das beinahe komplette menschliche Genom weist diese kurzen, sich tandemartig hintereinander wiederholenden Sequenzen auf. Man unterscheidet je nach Anzahl der repetitiven Einheiten zwischen Satelliten-Minisatelliten- und Mikrosatelliten-Sequenzen [23, 47].

1.4.2.1 Satelliten-DNA

Mit einem Wiederholungsgrad von 103-107 mal pro Locus, welcher nur etwa 1-2 Mal pro Chromosom vorliegt und einer Länge von bis zu mehreren hunderttausend sich wiederholenden Basenpaaren zählt die Satelliten-DNA zu den größten DNA-Tandemwiederholungsabschnitten.

1.4.2.2 Minisatelliten-DNA

Das Sequenzmotiv ist 9-100 bp; der gesamte sich wiederholende Abschnitt ist nicht länger als 15000 bp. Minisatelliten-DNA können bis zu mehrere tausend Mal im Genom vorkommen und bilden Polymorphismen (Variable Number of Short Tandem Repeats, VNTR).

1.4.2.3 Mikrosatelliten-DNA (=STR, short tandem repeats)

Das Sequenzmotiv der Mikrosatelliten-DNA ist mit 2-6 bp noch kürzer als das der Minisatelliten. Der Gesamt-Tandem-Repeat erreicht eine Maximallänge von etwa 400 bp. Sie kommen über das komplette Genom verteilt vor. Die STRs machen etwa 0,5% des Gesamtgenoms aus. Durch einen leichten Versatz der Einzelstränge während der DNA-Replikation kann es zu einer Veränderung der Anzahl der Motivwiederholungen kommen. Daraus ergibt sich eine sehr hohe Polymorphie. Die kurzen Fragmentlängen

und die damit verbundene hohe Resistenz gegenüber nukleasenvermitteltem Abbau macht sie für die Forensik zu einem der wichtigsten Marker.

Nahezu alle Individuen einer Spezies weisen eine Heterozygotie der Mini- und Mikrosatelliten auf [23, 47].

1.4.3 DNA-Typisierung in der forensischen Genetik

Für die forensische Genetik spielen im Sinne der Kriminalistik bzw. der Abstammungsanalyse die STR die wichtigste Rolle. Die tandemartigen Wiederholungen kurzer Nukleotidsequenzen weisen eine sehr hohe Variabilität am Locus der Mikrosatelliten auf. Es wird darüber spekuliert, ob diese Mutationen aufgrund ihrer genetischen Unerheblichkeit unverändert verbleiben. Von den bis heute beschriebenen vielen Tausend STRs sind letztendlich nur etwa 50 STRs gründlich erforscht, d.h. die Allelfrequenz und Sequenzstruktur (repeats) ist bekannt [23].

Das European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) empfiehlt die Untersuchung von 16 STR-Merkmalssystemen und dem geschlechtsspezifischen System Amelogenin. Alle 16 Systeme entstammen den nichtkodierenden Bereichen der DNA, lokalisiert auf verschiedenen Chromosomen [54].

1.4.4 Multiplex-PCR

Die Multiplex-PCR ermöglicht die gleichzeitige Amplifikation mehrerer STR-Systeme. Sie ist in der Regel industriell hergestellten Multiplex-Kits erhältlich. Sie bieten eine enorme Zeitersparnis gegenüber der Singleplex-PCR, bei der jedes STR-System einzeln amplifiziert werden muss, was einen vermehrten Probenverbrauch mit sich zieht. Allerdings sind die Multiplex- gegenüber den Singleplex-PCRs in ihrer Sensitivität geringer, wie CHAMBERLAIN [15] in seiner Arbeit feststellte. Die in dieser Arbeit untersuchten STR-Systeme entsprechen den von der European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI) und European DNA profiling Group (EDNAP) deklarierten europäischen Standard Sets (ESS) und damit der entsprechenden Standardarbeitsanweisung des Instituts für Forensische Genetik Münster, DN_SA_110.

Folgende 17 Systeme wurden typisiert: D18S51, D21S11, TH01, D3S1358, D16S539, D2S1338, D1S1656, D10S1248, FGA, D8S1179, vWA, D22S1045, SE33, D19S433, D12S391, D2S441 und das geschlechtsindizierende System Amelogenin.

1.4.5 Kapillargelelektrophorese

Ziel der Kapillargelelektrophorese ist die Auftrennung und Detektion von fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten. Die Elektrophorese ist als Wanderung von sich in Lösung befindlicher Ionen oder geladenen Moleküle durch ein Medium bei angelegter Spannung definiert. Die PCR-Produkte werden vor der eigentlichen Elektrophorese mit Formamid versetzt. Das Reagenz ist in der Lage die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Strängen der PCR-Amplifikate aufzubrechen und die Salzkonzentration zu vermindern. Die Kapillare wird mit einer Gelmatrix (Polymer) gefüllt und Probenmaterial elektrokinetisch in die Kapillare injiziert. Die angelegte Spannung bewirkt, dass sich die verschieden großen DNA-Amplikone ihrer Länge nach auftrennen und sich in Richtung der Anode, an einem Argon-Ionen-Laser vorbei bewegen. Dieser regt die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe zur spontanen Lichtemission an. Das emittierte Licht wird mittels Prisma seiner Wellenlänge nach zerlegt und von einer Detektionseinheit (CCD-Kamera) registriert. Jeder Probe ist ein ebenfalls fluoreszenzmarkierter Längenstandard (CC5) zugesetzt, der Fragmente mit bekannter Länge enthält. Anhand dieser Fragmentlängen erfolgt die Längenberechnung der unbekanntem Amplikone. Die CCD-Kamera setzt die Fluoreszenzintensität in Daten um, die dann an die Datenerfassungssoftware übertragen werden.

Die Kapillargelelektrophorese erfolgte in dieser Arbeit mithilfe des ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystems unter der entsprechenden Standardarbeitsanweisung des Instituts für Forensische Genetik Münster, DN_SA_102.

1.5 Aufgaben- und Fragestellung

Edmond Locard formulierte 1910 den Grundsatz der heutigen, modernen forensischen Wissenschaft, dass jeder Kontakt eine Spur hinterlasse. Diese Spur kann zum Beispiel in Form von Körperflüssigkeiten wie Blut, Speichel oder Sperma oder aber Hautschuppen, Kleidungsfasern oder Haaren vorliegen. Diese Arbeit befasst sich ausschließlich mit der Untersuchung des Spurenträgers „Haar“. Haare können im Rahmen unterschiedlicher

Verbrechen, wie etwa Einbrüchen, Verkehrsunfällen, Gewalt-, Sexual- oder Kapitaldelikten gesichert werden. Aufgrund des Wachstumszyklus des Haares liegen die meisten gesicherten Haare in ihrer telogenen Form vor. Das heißt, das Wachstum ist abgeschlossen; das Haar persistiert ischämisch und unter Ablösung vom umgebenden Bindegewebe bis zum natürlichen Ausfall in seinem Follikel. Basierend auf diesem biologischen Prozess liegt die DNA in sehr geringer Konzentration deutlich degradiert vor. Um eine realistische Routinesituation nachzuahmen, werden in dieser Arbeit lediglich telogene Kopfhaare von sieben unverwandten Probanden untersucht. Diese Anforderungen werden mikroskopisch überprüft. Im Rahmen einer möglichen Screeningmethodenentwicklung werden die Haare vor der Extraktion mit DAPI, einem DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoff, gefärbt und fluoreszenzmikroskopiert. Zudem wird die Möglichkeit einer Harris-Hämatoxylinfärbung als Alternative zur Fluoreszenzfärbung untersucht. Es werden sechs etablierte und eine bislang nicht weiter erforschte Extraktionsmethode für telogene Haare vergleichend angewendet. Die bis dato unzureichend untersuchte Extraktionsmethode wird durch fünf Parameteränderungen modifiziert. Die zu erwartenden, geringen DNA-Mengen aus den telogenen Kopfhaaren werden mit einer Multiplex-PCR auf die dem europäischen Standard entsprechenden 16 STR-Systeme und dem geschlechtsindizierenden System Amelogenin amplifiziert und anschließend mittels hochsensitiver Kapillargelelektrophorese typisiert. Als Vergleich dienen die DNA-Profile, die aus den Speichelproben der Probanden gewonnen werden. Die unterschiedlichen Extraktionsmethoden werden auf ihre Effizienz hinsichtlich der DNA-Ausbeute verglichen. Zusätzlich wird der Zusammenhang zwischen der mikroskopisch sichtbaren, angefärbten DNA und dem Typisierungsergebnis untersucht.

2. MATERIAL

2.1 Herkunft des Untersuchungsmaterials

Die 257, in dieser Arbeit untersuchten Haare wurden von insgesamt sieben Probanden, sechs Studentinnen und einem Studenten der Universität Würzburg, gespendet. Sechs Probanden sind Nordwesteuropäer, eine Probandin ist eine Vorderasiatin.

Die Spender sammelten ihre natürlich ausgefallenen Haare, meist von der Kleidung oder aber nach dem Föhnen, über einen Zeitraum von etwa 12 Wochen in Pergamintüten. Die Tüten wurden bis zu Beginn der Forschungsarbeiten für einen Zeitraum von etwa 18 Monaten an einem dunklen Ort bei Zimmertemperatur gelagert.

2.2 Chemikalien und Geräte

Alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte, Chemikalien und Materialien sind nachfolgend gelistet.

Histologische Färbungen

Objektträger	26 x 76mm	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Reaktionsgefäß	1,5ml	Diagonal, Münster
Ethanol	≥99,8%	Roth, Karlsruhe
Harris Haematoxylin		Sigma-Aldrich, München
Aqua dest. entmineralisiert	nach DIN 43530	Chemica, Sarstedt
Glycerin		Sigma-Aldrich, München
Deckgläschen	24 x 50mm	R. Langenbrinck, Emmerdingen
Mikroskop	Olympus KL1500 compact	Olympus SZ, Tokio

DAPI-Färbeansatz:

DAPI	Sigma-Aldrich, München
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Tris-HCl 0,2M; pH 7,4	Roth Karlsruhe
Fluoreszenz-Mikroskop	Prof. Dr. Göhde, Münster

DNA-Extraktion nach Chelex 100

Chelex ® - 100 - Suspension 5% in HPLC-H ₂ O	BIO RAD, München
Proteinase K (10 mg/ml)	Macherey-Nagel, Düren
Vortexer VTX-3000L	LMS Tokyo, Japan
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Blockthermostat	Eppendorf, Hamburg

Li-Puffer:

Tris-HCl (pH 8,0)	Roth, Karlsruhe
EDTA (pH 8,0)	Roth, Karlsruhe
0,2 mol NaCl	Merck, Darmstadt
Proteinase K (200 µg/ml)	Macherey-Nagel, Düren
Triton X-100	Roth, Karlsruhe

Direct PCR

Reaktionsgefäß 0,2 ml	Diagonal, Münster
PowerPlex® ESX 17 System	Promega, Mannheim
Thermocycler GeneAmp 9700	Applied Biosystems, Darmstadt

Modifizierte TNCA – Extraktion

Lysepuffer:

Tris-HCl, pH 8,0

100 mM NaCl

1 mM CaCl₂

2% SDS (w/v)

39 mM DTT

250 µg/ml Proteinase K

Roth, Karlsruhe

Merck, Darmstadt

Sigma-Aldrich, München

Roth, Karlsruhe

omnilab, Bremen

Macherey & Nagel, Düren

NucleoSpin®Tissue XS

NucleoSpin® Tissue XS Kit

Macherey-Nagel, Düren

NucleoSpin® gDNA Clean-up

NucleoSpin® gDNA Clean-up Kit

Macherey-Nagel, Düren

Quantifiler:

HPLC-Wasser

J.T. Baker, Griesheim

Quantifiler® Human DNA

Applied Biosystems,

Quantification Kit

Darmstadt

Quali-PCR-Platten 96-well

Kisker, Steinfurt

PCR-Folie

Kisker, Steinfurt

1 M Tris pH 8,0

Thermo Fisher Scientific,

Waltham

0,5 M EDTA pH 8,0

Thermo Fisher Scientific,

Waltham

Glycogen

Roth, Karlsruhe

9947A, DNA Standard

Promega, Mannheim

TaqMan® RNase

Applied Biosystems,

Darmstadt

7500 Real Time PCR System,
Spectral Calibration Kit

Applied Biosystems,
Darmstadt

Amplifikation:

PowerPlex ® ESX 17 System

Promega, Mannheim

9947A, DNA Standard

Promega, Mannheim

ThermoTube PCR Tubes 0,2 ml

Kisker, Steinfurt

Reaktionsgefäß 1,5 ml aus PP

Sarstedt AG & Co,

Nümbrecht

Vortex-Mixer VTX-3000L

LMS, Tokyo

Tischzentrifuge mini spin

Eppendorf, Hamburg

Thermocycler GeneAmp 9700

Applied Biosystems,

Darmstadt

Amplikonanalyse, Kapillarelektrophorese:

3130 Running Buffer 10x

Applied Biosystems,

Darmstadt

POP-4 TM Polymer for

Applied Biosystems,

3130 Genetic Analyzers

Darmstadt

HPLC-Wasser

J.T. Baker, Griesheim

3130 Capillary Array 36 cm

Applied Biosystems,

Darmstadt

3130 Genetic Analyzer Capillary Array

Applied Biosystems,

Darmstadt

Gene Mapper ID v3.2.1

Applied Biosystems,

Darmstadt

HiDi-Formamid

Applied Biosystems,

Darmstadt

CC5-Längenstandard

Promega, Mannheim

Allgemein verwendete Geräte und Materialien:

Pipetten (verschiedene Volumina)

Eppendorf, Hamburg

Filterpipettenspitzen (verschiedene Volumina)

Sarstedt AG & Co.,
Nümbrecht

Schraubröhrchen mit Deckel

Sarstedt AG & Co.,
Nümbrecht

Sezierscheren

Plano GmbH, Wetzlar

Kühlschrank

Liebherr, Biberach an der Riß

Gefrierschrank

Liebherr, Biberach an der Riß

Glaswaren

Hirschmann, Eberstadt

Tischwaage

Sartorius, Göttingen

3. METHODEN

Dieses Kapitel widmet sich der Erläuterung der einzelnen experimentellen Untersuchungen. Es unterteilt sich in die Beschreibung der Anfertigung der histologischen Färbungen und der Erklärung der unterschiedlichen DNA-Extraktionsmethoden. Abschließend geht es auf die DNA-Typisierung der telogenen Haare ein.

3.1 Morphologische Untersuchung der Haare

Als erster Untersuchungsschritt wurden alle Haare der sieben Probanden mit einem Stereomikroskop (SZX7, Firma Olympus) unter 12,5-facher Vergrößerung begutachtet und die Wurzelqualität nach telogen, katagen bzw. anagen beurteilt. Lediglich die telogenen Haare wurden für die weiteren Untersuchungsschritte katalogisiert und die Haarfarbe (blond, braun, rot, schwarz) und –länge bestimmt. Die Haarfarben der Probanden und die Durchschnittslänge ihrer Haare sind in den **Abbildungen 4.1.1a-g** bzw. der **Tabelle 4.1.2** angegeben. Anschließend wurden die Haare mit einem Skalpell auf eine Länge von 1cm distal der Wurzel gekürzt. Das Skalpell wurde nach jeder Nutzung mittels Wischdesinfektion mit einem 70%igen Alkohol getränkten Einmalzellstofftuch gereinigt. Nach der mikroskopischen Untersuchung wurden die Haare je nach Extraktionsmethode in 1,5 ml bzw. 0,2 ml Reaktionsgefäße (Firma Diagonal) überführt, wonach sich die weiteren Untersuchungsschritte direkt anschlossen.

3.2 Färbungen

Um im Rahmen einer Screening-Untersuchung im Vorfeld eine Aussage über den Nutzen eines telogenen Haares in Bezug auf den Nutzen einer genetischen STR-Typisierung treffen zu können, wurde in dieser Arbeit der Möglichkeit, Färbungen als Voruntersuchung zu nutzen, nachgegangen.

Durch die mikroskopische Begutachtung von gefärbtem, histologischen Material, ist es möglich, die mit dem bloßen Auge nicht erkennbaren Strukturen, wie z.B. Zellkerne, sichtbar zu machen.

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Färbungen als potentielle Screening-Methoden verglichen.

3.2.1 DAPI-Färbung

Nach Protokoll von Lepez et al. [29]

Ansatz DAPI/DABCO-Färbelösung

1,6 mg DAPI, 2,24 g DABCO, 10 ml Tris-HCl 0,2 M; pH 7,4

1. Das auf 1cm gekürzte, telogene Haar auf einen sauberen Objektträger platzieren
2. 20 µl der DAPI/DABCO-Lösung direkt auf das Haar pipettieren
3. Haar mit einem Deckgläschen bedecken
4. Direkte Fluoreszenzmikroskopie

3.2.2 Harris Hämatoxylin Färbung

Nach Protokoll von Brooks et al. [12]

1. Das auf 1 cm gekürzte, telogene Haar mit der Wurzel voran in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß geben
2. 0,5 ml 100% Ethanol auf das Haar pipettieren und für 30 min bei Raumtemperatur inkubieren
3. Ethanol entfernen
4. 0,5 ml Harris Hämatoxylin auf das Haar pipettieren und für 2 ½ min bei Raumtemperatur inkubieren
5. Harris Hämatoxylin entfernen
6. 0,5 ml destilliertes Wasser auf das Haar pipettieren und entfernen
7. 1-2 Tropfen Glycerin auf einen sauberen Objektträger geben und mit der Pinzette das gefärbte Haar aus dem Eppendorf Reaktionsgefäß auf dem Objektträger platzieren und mit einem Deckgläschen bedecken
8. Bei 40-facher Vergrößerung mikroskopieren

3.3 Extraktionsmethoden

3.3.1 Chelex-100-Methode

Ziel der Extraktion ist die Sicherung des Erbguts aus den eventuell vorhandenen Zellen der telogenen Haare.

Die in dieser Arbeit angewandte Technik beruht auf dem von WALSH [61] beschriebenen und vom Institut für Forensische Genetik Münster GmbH modifizierten und in der zu dem Zeitpunkt geltenden Standardarbeitsanweisung DN_SA_001. Durch gepaarte Iminodiacetatgruppen ist das Styrodivinylbenzolcopolymer Chelex®100 in der Lage, mehrwertige Metallionen (z.B. Cu^{2+} oder Fe^{2+}) zu chelatisieren. Die DNA-Isolierung erfolgt mittels Kochen bei 100°C , wodurch die Komplexbildung der o.g. Ionen eine katalytische DNA-Fragmentierung durch z.B. Desoxyribonukleasen (DNAsen) verhindert. Darüber hinaus bindet das Chelex-Harz hydrophobe Zellbestandteile und trägt damit zur Aufreinigung des Untersuchungsmaterials bei. Falls notwendig, kann die Lyseeffektivität durch Zugabe von Proteinase K (Pro K) erhöht werden. Durch hydrolytische Inaktivierung von DNAsen bzw. anderen (Membran-)Proteinen führt das Enzym zusätzlich zur DNA-Freisetzung aus den Zellen. Da die in der PCR eingesetzte Taq-DNA-Polymerase Protease-empfindlich ist, muss diese durch Denaturierung vor der Amplifikation inaktiviert werden.

Die DNA aus den Speichelproben der Probanden wurde nach folgendem Protokoll extrahiert:

1. Ein kleines Stück des Wattestielstopfers mit einer Sezierschere abschneiden und in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß geben
2. Hinzufügen von $30\ \mu\text{l}$ Chelex® (5% in HPLC- H_2O) + $1\ \mu\text{l}$ ProK (10 mg/ml)
3. Ansatz für 10 sec maschinell mischen (Vortexer)
4. Ansatz bei 56°C für 30 min im schwenkenden Wasserbad inkubieren
5. Ansatz für 10 s maschinell mischen (Vortexer)
6. Ansatz bei 100°C für 8 min im Blockthermostat inkubieren
7. Ansatz für 10 sec maschinell mischen (Vortexer)
8. Probe bei $14.000 \times g$ 3 min zentrifugieren
9. gewonnenen Überstand für die Amplifikation verwenden

3.3.2 Direkt-PCR

Während bei der klassischen DNA-Amplifikation von forensischen Spuren immer ein Extraktionsschritt voraus geht, wird bei der direkten PCR auf diesen verzichtet. Dies birgt den großen Vorteil, dass ein DNA-Verlust, der durch das Wegfallen von Waschschr

oder Reaktionsgefäßwechsel entstehen kann, reduziert wird. Zusätzlich werden einerseits mögliche Kontaminationen verhindert, andererseits Zeit und Kosten gespart [9, 43].

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden sehr sensible und möglichen Inhibitoren gegenüber äußerst unempfindliche PCR-Kits entwickelt. Sie erlauben eine Amplifikation ohne einen vorherigen Extraktionsschritt. Trotz der Sensibilitätszunahme der Kits ist nach wie vor der Anfangs-DNA-Gehalt einer Probe über den Erfolg einer PCR entscheidend. Für die direkte PCR spricht also die originäre Anfangs-DNA-Menge einer Probe, die ohne vorherige Aufbereitungsschritte direkt amplifiziert wird.

In dieser Arbeit wurden die Haare auf dreierlei Weise untersucht. Es wurde zwischen einer direkten Amplifikation der Wurzel (2 mm distal der Wurzel geschnitten), des Schaftes (5 mm reiner Schaft) sowie der Wurzel zusammen mit dem Schaft (7 mm distal der Wurzel) unterschieden.

Der jeweilige Abschnitt des Haares wurde direkt in einem PCR-Reaktionsgefäß platziert und im 12,5 µl Ansatz (PowerPlex® ESX 17 System) amplifiziert. Anschließend wurden die Amplifikate mittels Kapillarelektrophorese ausgewertet.

3.3.3 modifizierte TNCA-Extraktion nach Hellmann et al.

Ziel der TNCA-Extraktion nach Hellmann et al. ist die Isolierung von Zellkern-DNA aus Haarschäften bzw. – wurzeln. Das Prinzip beruht auf einer Lyse der Keratinmatrix mit anschließender Aufreinigung und Konzentration [20].

Der Lysepuffer setzt sich wie folgt zusammen:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 2% SDS (w/v), 39 mM DTT und 250 µg/ml Proteinase K

Anstelle der organischen Extraktion mittels Phenol-Chloroform, wird in dieser Arbeit mit dem Harz Chelex gearbeitet.

In dieser Arbeit wurde nach folgendem Extraktionsprotokoll gearbeitet:

1. Das auf 1 cm gekürzte, telogene Haar mit der Wurzel voran in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß geben
2. 200 µl der Extraktionslösung auf das Haar pipettieren
3. Bei 56°C über Nacht inkubieren

4. Sollte das Haar über Nacht makroskopisch noch nicht lysiert sein, werden 16 µl Proteinase K und 20 µl TNCA zugegeben und erneut für 60 min bei 56°C im Wasserbad inkubiert (ggfs. wiederholen)
5. Nach vollständiger Lyse 200 µl 5%iges Chelex (in HPLC-H₂O) auf den Ansatz pipettieren
6. Ansatz für 5-10 sec maschinell mischen (Vortexer)
7. 60 min Inkubation bei 56°C im Wasserbad / Thermoblock
8. 8 min Inkubation im kochenden Wasserbad
9. Proben 5-10 sec vortexen
10. 3 min Zentrifugation bei 13.000 U/min
11. Aufkonzentrierung des Überstandes mittels Microcon®YM-30 auf 50 µl
12. Aufreinigung mittels QIAquick®-Säulen (Elution mit 50 µl Puffer)

Entsalzung und Konzentrierung mittels Microcon® YM-30 Centrifugal Filter Devices

Ziel der Entsalzung ist die Konzentrierung von DNA-Extrakten, die einerseits nach erfolgter PCR kein verwertbares Ergebnis liefern, und andererseits von DNA-Extrakten, die sehr geringe DNA-Mengen, Verunreinigungen und / oder PCR-Inhibitoren enthalten. Der Extrakt wird über eine regenerierte Zellulosemembran mit spezifischer Porengröße (30.000 NMWL) zentrifugiert. Während der Zentrifugation passieren Salze und andere Bestandteile die Membran. Die DNA kann aufgrund ihrer Größe die Membran nicht passieren. Durch die Zugabe von HPLC-Wasser, die Kippung des Eppendorf-Reaktionsgefäßes um 180° und die erneute Zentrifugation des Ansatzes, kann der aufkonzentrierte Extrakt mit dem Endvolumen von 50 µl in einem neuen Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen werden. Das Vorgehen entspricht der zu dem Zeitpunkt geltenden Standardarbeitsanweisung DN_SA_006_08 des Instituts für Forensische Genetik Münster.

Aufreinigung mittels QIAquick®-Säulen

Ziel ist die Herstellung eines aufgereinigten DNA-Extraktes zur weiteren Verwendung in PCR-Reaktionen. Die Aufreinigung dient dazu, den vorliegenden DNA-Extrakt von, die PCR störenden, Substanzen, z.B. Salzen, zu befreien. Die DNA wird unter Hochsalzbedingungen an eine Silicamembran gebunden, gewaschen und anschließend mit einem Nidrigsalzpuffer wieder eluiert. Die maximale Bindungskapazität der

QIAquick®-Säulen beträgt 10 µg DNA. Der Bindungspuffer der QIAquick® Spin Kits bietet eine optimale Salzkonzentration und pH-Wert, um die DNA an die Silicamembran zu adsorbieren. Unerwünschte Verunreinigungen wie Salze o.ä. binden nicht an die Silicamembran, sondern werden im weiteren Verlauf heraus gewaschen. Die Elution der DNA erfolgt durch die Zugabe eines Elutionspuffers, wobei der pH-Wert zwischen pH 7,0 und 8,5 liegen sollte, um eine möglichst effiziente Elution zu erzielen.

Nach TNCa-Extraktion, Konzentrierung und Aufreinigung erhält man einen DNA-Extrakt von 50 µl, der für die anschließende Amplifikation genutzt wird. Das Vorgehen entspricht der zu dem Zeitpunkt geltenden Standardarbeitsanweisung DN_SA_007_07 des Instituts für Forensische Genetik Münster.

3.3.4 QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit

Der Extraktionsautomat ermöglicht nach einer manuellen Probenvorbehandlung (Lyse) die anschließende automatische DNA-Aufreinigung von Spurenproben zur weiteren Verwendung in PCR- oder Sequenzierreaktionen. Das Prinzip des QIASymphony® beruht auf einer Silica-basierten DNA-Aufreinigung in Kombination mit magnetischen Partikeln. Die Reinigungsmethode besteht aus vier Schritten: Lyse, Bindung, Waschung und abschließende Elution.

Die DNA-Extraktion wurde nach der zu dem Zeitpunkt geltenden Standardarbeitsanweisung DN_SA_208_02 des Instituts für Forensische Genetik Münster durchgeführt.

Das Protokoll für die DNA-Extraktion aus Haaren erfordert eine Probenaufbereitung unter Zugabe von 40 µl DTT (1,0 M).

3.3.5 NucleoSpin® Tissue XS

Der NucleoSpin® Tissue XS Kit ist für die effiziente Isolation genomischer DNA aus u.a. forensischen Spuren ausgelegt. Durch einen speziell entwickelten Trichter werden hoch-konzentrierte DNA-haltige Eluate von 5-30 µl gewonnen. Die Lyse wird über eine Probeninkubation in einem Proteinase K-haltigen Lysepuffer erzielt. Durch die Zugabe von Ethanol werden optimale Voraussetzungen für die DNA-Bindung an eine Silica-Membran geschaffen. Der Ansatz wird auf die NucleoSpin® Tissue XS Säule pipettiert,

daraufhin bindet die vorhandene DNA direkt an die Silica-Membran. Zwei darauffolgende Waschgänge mit Waschpuffer entfernen mögliche Kontaminationen erfolgreich. Das Endprodukt ist die reine DNA, gelöst in einem 5-30 µl großen, leicht alkalischen, schwach ionischen Puffer (5 mM Tris-HCl, pH 8,5).

Es wurde nach Herstellerangabe gearbeitet (Mai 2014 / Rev. 06 User manual): Das telogene Haar wird mittels der von HELLMANN [20] beschriebenen Methode vorbereitet. Daraufhin wird mit Schritt 3 des geltenden Standardprotokolls von Macherey-Nagel fortgefahren.

3.3.6 NucleoSpin® gDNA Clean-up

Der NucleoSpin® gDNA Clean-up Kit ist für die schnelle Aufreinigung von im Vorfeld isolierter hochmolekularer genomischer DNA konzipiert. Er wird vor allem für die Aufreinigung und Konzentration nach groben Extraktionsmethoden, wie zum Beispiel mittels Trizol, oder anderen enzymatischen oder chemischen Reaktionen genutzt. Er besitzt unter anderem die Fähigkeit, den PCR-Inhibitor Melanin zu eliminieren.

Es wurde nach Herstellerangabe gearbeitet (Juli 2014 / Rev. 02 User manual).

3.3.7 Li-Puffer

Die Arbeitsgruppe rund um LI [30] hat im Jahr 2010 eine simple und kostengünstige Methode der direkten PCR-Amplifikation entwickelt. Sie optimierte die unterschiedlichen Komponenten und deren Konzentrationen in Lysepuffern. Dabei wurde ihr Augenmerk auf die Einzelkomponenten und ihre Funktion im Rahmen der Lyse gelegt.

Proteinase K hydrolysiert Zellproteine in Gegenwart von Tris-HCl (pH 8,0), bei einer optimalen Temperatur von 55°C; EDTA verhindert die DNA-Fragmentierung durch Bindung von bivalenten Kationen, die ihrerseits endogene Nukleasen aktivieren; das Tensid SDS, Natriumlaurylsulfat, setzt chromatingebundene DNA frei und NaCl neutralisiert die negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und lässt damit eine räumliche Annäherung der DNA-Moleküle zu.

Ergebnis war ein optimierter Lysepuffer mit folgender Zusammensetzung:

10mmM (Tris)-HCl (pH 8,0), 2 mM EDTA (pH 8,0), 0,2 mol/l NaCl und 200 µg/ml Proteinase K.

Auf das Natriumlaurylsulfat wurde verzichtet, da es die Taq-DNA-Polymerase bei einer Konzentration von 0,01% inhibiert und somit eine Amplifikation unmöglich macht. Ursprünglich wurde diese Methode lediglich für die Amplifikation tierischer Gewebe konzipiert. Interessanterweise konnte sie aber auch für menschliche Proben, wie etwa Blut, Wangenschleimhautzellen und Haare, erfolgreich eingesetzt werden. Die direkte Amplifikation erfordert weniger Reagenzien (Tris-HCl, EDTA, Protease K und NaCl) und eine geringere Inkubationszeit von nur 35 Minuten. Die Kosten pro Probe belaufen sich auf weniger als 0,02€ und alle Schritte können in einem 96-well Thermo-Cycler durchgeführt werden.

In dieser Arbeit wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet:

1. Das auf 1cm gekürzte, telogene Haar mit der Wurzel voran in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß geben
2. 6 µl des Lysepuffers auf das Haar pipettieren
3. Inkubation bei 55°C für 30 min
4. Bei 95°C für 5 min kochen

Für die Amplifikation wurden 2 µl des Extraktionsansatzes eingesetzt.

3.3.7.1 modifizierte Methoden

Im Folgenden wird die ursprüngliche Extraktionsmethode, wie sie von Li et al. [30] entwickelt wurde, modifiziert. Zum einen wurden die Inkubationszeiten experimentell verändert, zum anderen wurde dem Ansatz das nicht-ionische Tensid Triton X-100 zugefügt. Das Tensid Triton-X-100 denaturiert keine Proteine. Dadurch ist eine Lösung nativer Membranproteine möglich, ohne sie in ihrer Konformation zu verändern. Durch die Zugabe des Tensids zu dem eigentlichen Li-Puffer wird eine größere DNA-Ausbeute erwartet.

Die Zusammensetzung des originalen Lysepuffers blieb unverändert. Die Modifikationen sind nachfolgend gelistet.

3.3.7.2 5-minütige Inkubation

Anstelle der dem Original entsprechenden 30-minütigen Inkubationszeit bei 55°C wird das Haar im Extraktionsansatz für fünf Minuten bei 55°C inkubiert.

3.3.7.3 6-stündige Inkubation

Anstelle der dem Original entsprechenden 30-minütigen Inkubationszeit bei 55°C wird das Haar im Extraktionsansatz für sechs Stunden bei 55°C inkubiert.

3.3.7.4 15-stündige Inkubation

Anstelle der dem Original entsprechenden 30-minütigen Inkubationszeit bei 55°C wird das Haar im Extraktionsansatz für 15 Stunden bei 55°C inkubiert.

3.3.7.5 + Triton X-100, 30-minütige Inkubation

Anstelle der dem Original entsprechenden 30-minütigen Inkubationszeit bei 55°C wird das Haar im Extraktionsansatz für 30 Minuten bei 55°C inkubiert. Zusätzlich wird dem Ansatz 3% Triton X-100 zugesetzt.

3.3.7.6 + Triton X-100, 15-stündige Inkubation

Anstelle der dem Original entsprechenden 30-minütigen Inkubationszeit bei 55°C wird das Haar im Extraktionsansatz für 15 Stunden bei 55°C inkubiert. Zusätzlich wird dem Ansatz 3% Triton X-100 zugesetzt.

3.3.8 DNA-Extraktion der Vergleichsspeichelproben

Ziel der Extraktion ist die DNA-Isolierung aus den Zellen von Mundschleimhautabrieben. Die Speichelproben werden durch einen Wangenschleimhautabrieb mittels Wattestiel tupfer gewonnen.

Das Prinzip dieser Extraktionsmethode ist die dieselbe, wie in **3.3.1** bereits erläutert.

Die DNA aus den Speichelproben der Probanden wurde nach folgendem Protokoll extrahiert:

1. Ein ca. 4 mm³ großes Stück des getrockneten Watteträgers in ein beschriftetes Eppendorfgefäß geben
2. Hinzufügen von 400 µl Chelex[®] (5% in HPLC-H₂O) + 10 µl ProK (10 mg/ml)

3. Ansatz maschinell mischen (Vortexer)
4. Ansatz bei 56°C für 30 min im schwenkenden Wasserbad inkubieren
5. Ansatz maschinell mischen (Vortexer)
6. Ansatz bei 100°C für 8 min im Blockthermostat inkubieren
7. Ansatz maschinell mischen (Vortexer)
8. Probe bei 14.000 x g 3 min zentrifugieren
9. Gewonnenen Überstand für die Amplifikation verwenden

3.4 Nachweis und Quantifizierung humaner DNA mittels Quantifiler®

Ziel ist die Quantifizierung von DNA-Extrakten mittels der real-time PCR-Technik.

Die real-time PCR ist eine Methode, bei der die Bildung von Amplifikaten während der PCR kontinuierlich verfolgt werden kann. Sie wird in dieser Arbeit zur Quantifizierung von DNA eingesetzt. Das Prinzip des Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) beruht auf der spezifischen Detektion von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden - sogenannten Sonden. Aufgrund ihrer zur Targetsequenz komplementärer DNA ermöglichen sie einen spezifischen Nachweis der Amplikone. Über eine dem Matrizen-DNA-Strang komplementärer und mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markierte TaqMan-Sonde wird die Detektion des PCR-Produktes gewährleistet. Darüber hinaus enthält der Quantifiler eine IPC (internal PCR control) Template-DNA – eine synthetische, natürlich nicht vorkommende Sequenz, die dazugehörigen Primer und eine VIC-markierte TaqMan MGB-Sonde (MGB= minor groove binder). Zusätzlich beinhaltet der Mastermix alle für eine erfolgreiche PCR notwendigen Reagenzien, wie MgCl₂, dNTPs, AmpliTaqGold DNA-Polymerase und den Fluorophor ROX als passive Referenz. Die IPC dient der internen Qualitätskontrolle – also der Funktionalitätsüberprüfung einzelner Systembestandteile.

ROX normiert Schwankungen der Fluoreszenz, die z.B. durch Pipettierunterschiede von Vertiefung zu Vertiefung auftreten können. Die Fluoreszenz kann in einem Thermocycler mit entsprechender Detektionsoptik nach jedem PCR-Zyklus gemessen werden. Der Quantifiler® Human DNA Quantification Kit arbeitet mit der absoluten Quantifizierung. Hierbei wird eine Verdünnungsreihe eines Standards mit bekannter Konzentration erstellt. Die gemessenen Fluoreszenzen der unbekannt konzentrierten Proben können mit der Standard-Fluoreszenz verglichen und somit quantifiziert werden.

Anhand der mit dem Human Quantifiler bestimmten, DNA-Mengen eines Probenextraktes, wird entschieden, wieviel Volumen des Extrakts für die sich anschließende Amplifikation eingesetzt wird. Es gilt die zu dem Zeitpunkt geltende Standardarbeitsanweisung DN_SA_008_08 des Instituts für Forensische Genetik Münster.

3.5 Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR)

Mit der Polymerasekettenreaktion ist es möglich geringste Mengen von DNA-Molekülen zu vervielfältigen und so nachweisbare und analysierbare Quantitäten zu erhalten. Die dafür genutzte Methode wurde von SAIKI [50] beschrieben.

Für eine erfolgreiche Amplifikation werden bestimmte Reaktionsteilnehmer benötigt:

- Primer
bestimmte Oligonukleotide markieren das zu vervielfältigende Fragment von beiden Enden. Sie dienen der DNA-Polymerase als Ansatzpunkt für die darauffolgende Synthese
- DNA-Polymerase
ein thermostabiles Enzym, welches ursprünglich aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium *Thermus aquaticus* stammt und isoliert wurde. Hieraus leitet sich der Name „*Taq-DNA-Polymerase*“ ab. Diese Thermostabilität ist für den Amplifikationsablauf von besonderem Vorteil, da sie die unumgänglichen Denaturierungsschritten während der PCR ohne Schaden übersteht. Heutzutage wird das Enzym eher durch rekombinante Expression in *E. coli* Bakterien gewonnen
- Nukleotide
Bausteine der DNA, zusammengesetzt aus einem Monosaccharid (Pentose), einem Phosphorsäurerest und einer der vier Nucleobasen (Adenin, Cytosin, Thymin oder Guanin)
- Magnesiumchloridlösung ($MgCl_2$) und Reaktionspuffer
bieten optimale Milieubedingungen für eine erfolgreiche Amplifikation

Die letztendliche Replikation des zu vervielfältigenden DNA-Fragments erfolgt unter sich wiederholenden Schritten zyklisch.

Grundsätzlich differenziert man 3 Amplifikationsphasen: Die *Denaturierung* bei 94°C, in der die doppelsträngige DNA durch Hitzedenaturierung in Einzelstränge zerfällt; das *Primer-Annealing* bei einer, für das Primerpaar spezifischen Temperatur, in der sich der Primer an die ihm entsprechende komplementäre DNA-Sequenz anlagert; und die *Extension* bei 72°C, in der die eigentliche Vervielfältigung des Matrizenstrangs durch die Taq-DNA-Polymerase stattfindet. Dieser Zyklus wird bis zu 40 Mal wiederholt, sodass es in jedem Zyklus zu einer Verdopplung der gewünschten DNA-Sequenz kommt. Somit ist theoretisch eine Vermehrung der Ausgangs-DNA um das $(2^n)^a$ -fache (n = Anzahl der Zyklen; a = Anzahl der Ausgangsmoleküle) möglich [33]. In dieser Arbeit wurden sämtliche PCRs mit dem Promega PowerPlex ESX 17 (ESX= European Standard Extended) Kit durchgeführt. Ziel ist die Amplifikation von 16 autosomalen STR-Systemen plus Geschlechtsbestimmung in einer Multiplex-Reaktion mittels PCR-Technik. Durch die Reaktion von fluoreszenzmarkierten Primerpaaren, einem Reaktionsmix (inkl. DNA-Polymerase), DNA-Extrakt und HPLC-H₂O in 30 sich wiederholenden Zyklen aus Denaturierung, Annealing und Extension im Thermocycler, resultieren fluorochromierte PCR-Produkte. Die Untersuchungsmethode entspricht gültigen Standardarbeitsanweisung DN_SA_010_07 des Instituts für Forensische Genetik Münster.

Die Abbildung 3.5 zeigt die fluorochromierten PCR-Produkte schematisch.

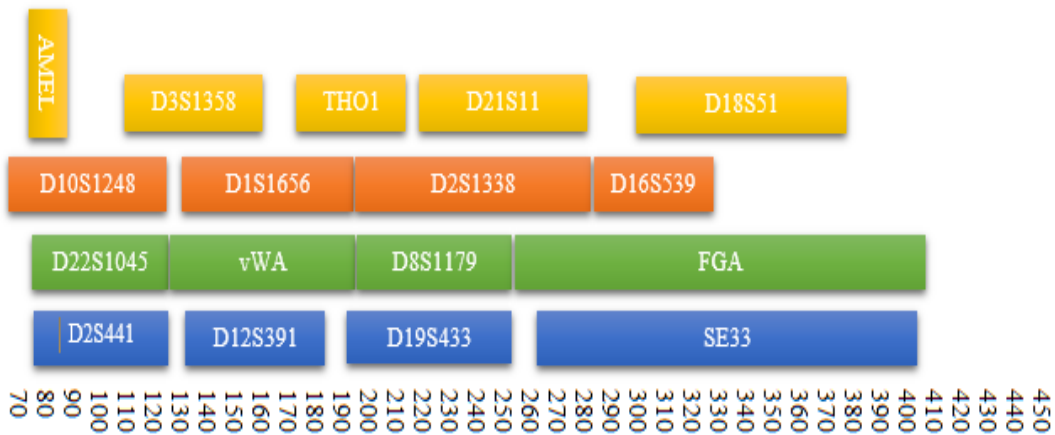


Abb. 3.5: schematische Darstellung der fluorochromierten PCR-Produkte (PowerPlex ESX-17 Kit)

Die PCR wurde in einem 12,5µl Reaktionsansatz durchgeführt.

Protokoll PowerPlex ESX17

Anfangsdenaturierung:	96°C – 2 min	
Denaturierung:	94°C – 20 sec	} 30 Zyklen
Annealing:	59°C – 120 sec	
Extension:	72°C – 30 sec	
Schluss-Extension:	72°C – 5 min, 60°C – 10 min	
Ende:	4°C - ∞	

3.6 Kapillargelelektrophorese

Ziel der Kapillargelelektrophorese ist die Auftrennung und Detektion von fluoreszenzmarkierten PCR-Produkten. Die Elektrophorese ist als Wanderung von sich in Lösung befindlicher Ionen oder geladenen Moleküle durch ein Medium bei angelegter Spannung definiert. Die PCR-Produkte werden vor der eigentlichen Elektrophorese mit Formamid versetzt. Das Reagenz ist in der Lage, die Wasserstoffbrückenbindungen

zwischen den komplementären Strängen der PCR-Amplifikate aufzubrechen und die Salzkonzentration zu vermindern. Es werden zeitgleich vier Kapillaren mit einer Gelmatrix (Polymer) gefüllt und Probenmaterial in die jeweilige Kapillare elektrokinetisch injiziert. Die angelegte Spannung bewirkt, dass sich die verschieden großen DNA-Amplikone ihrer Länge nach auftrennen und sich in Richtung der Anode, da negativ geladen, an einem Argon-Ionen-Laser vorbei bewegen. Dieser regt die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe zur Lichtemission an. Das emittierte Licht wird mittels Prisma seiner Wellenlänge nach zerlegt und von einer Detektionseinheit (CCD-Kamera) registriert. Jeder Probe ist ein ebenfalls fluoreszenzmarkierter Längenstandard (CC5, Promega) zugesetzt, der Fragmente mit bekannter Länge enthält. Anhand dieser Fragmentlängen erfolgt die Längenberechnung der unbekanntenen Amplikone. Die CCD-Kamera setzt die Fluoreszenzintensität in Daten um, die dann an die Datenerfassungssoftware übertragen werden.

Die Kapillargelelektrophorese erfolgte in dieser Arbeit mithilfe des ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer von Applied Biosystems nach folgendem, den zu dem Zeitpunkt geltenden Standardarbeitsanweisungen DN_SA_102 und _110 des Instituts für Forensische Genetik entsprechenden Protokoll:

Speichelproben:

1. Amplifikate mit jeweils 100 µl HPLC-H₂O verdünnen
2. Jeweils 12 µl Formamid (mit internem Längenstandard) in jede Vertiefung der Mikrotiter-Platte vorlegen
3. 1 µl des verdünnten Amplifikats in die Vertiefung pipettieren
4. 0,5 µl der Ladder in die Vertiefung pipettieren
5. Bei 14.000 x g 1 min zentrifugieren
6. Bei 96°C 3 min denaturieren
7. Ansätze für mindestens 3 min bei -15°C bis -25°C in einem Kühlblock im Tiefkühlschrank lagern

Haare:

1. Jeweils 12 μ l Formamid-CC5 in jede Vertiefung der Mikrotiter-Platte vorlegen
2. 4 μ l des unverdünnten Amplifikats in die Vertiefung pipettieren
3. 0,5 μ l der Ladder in die Vertiefung pipettieren
4. Bei 14.000 x g 1 min zentrifugieren
5. Bei 96°C 3 min denaturieren
6. Ansätze für mindestens 3 min bei -15°C bis -25°C in einem Kühlblock im Tiefkühlschrank lagern

4. ERGEBNISSE

4.1 Morphologische Begutachtung der Haare

Bevor die Haare der Probanden für die weiteren forensischen Analyseschritte (Färbung, Extraktion, Amplifikation und Typisierung) genutzt werden konnten, wurden sie makroskopisch in Hinblick auf ihre Farbe begutachtet, vermessen und schließlich ihre Wurzelqualität bewertet. Ausschließlich telogene Haare wurden für die weiteren Untersuchungsschritte genutzt.

4.1.1 Haarfarbe

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Haarfarbe und DNA-Ausbeute zu untersuchen, wurden die Haarfarben der Probanden bestimmt. Von den sieben Probanden konnten drei als blond-, einer als rot-, zwei als braun- und einer als schwarzhaarig typisiert werden. Die folgenden Abbildungen zeigen die Haarfarben der einzelnen Probanden.



Abb. 4.1.1a A.D., blond



Abb. 4.1.1b E.K., rot

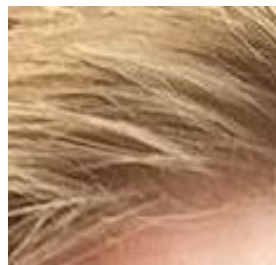


Abb. 4.1.1c, G.E., blond



Abb. 4.1.1d, J.B., blond



Abb. 4.1.1e, R.R., schwarz



Abb. 4.1.1f T.M., braun



Abb. 4.1.1g, S.G., braun

4.1.2 Bestimmung der Haarlänge

Jedes telogene Haar wurde einzeln vermessen. Die Haarlänge der Probanden reichte von 4,2 bis 45 cm. Daraus ergibt sich eine durchschnittliche Länge der untersuchten Haare von ca. 35,6 cm.

Proband	mittlere Haarlänge (cm)
A.D.	41
E.K.	42
G.E.	4,2
J.B.	33
R.R.	45
S.G.	29
T.M.	34

Tab. 4.1.2: Durchschnittliche Haarlänge der untersuchten Probanden

4.2 Histologische Darstellung von Zellkernen

Dieser Abschnitt stellt die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Beobachtungen der gefärbten Haare dar. Die Beobachtung von Zellkernen oder anderen Zellorganellen kann ein Hinweis auf die Gegenwart von DNA sein, die im späteren Extraktionsschritt isoliert werden kann. Grundsätzlich ist die Darstellung von degradierter DNA mit den gängigen histologischen Färbungen äußerst diffizil. Die vorhandenen nukleinsäurehaltigen Strukturen der telogenen Haare wurden mithilfe der klassischen histologischen Harris Hämatoxylin-Färbung und der fluoreszenzhistologischen DAPI-Färbung dargestellt. Während sich die Nukleinsäuren in der Harris Hämatoxylin-Färbung rot-braun darstellten, fluoreszierten sie in der DAPI-Färbung leuchtend blau.

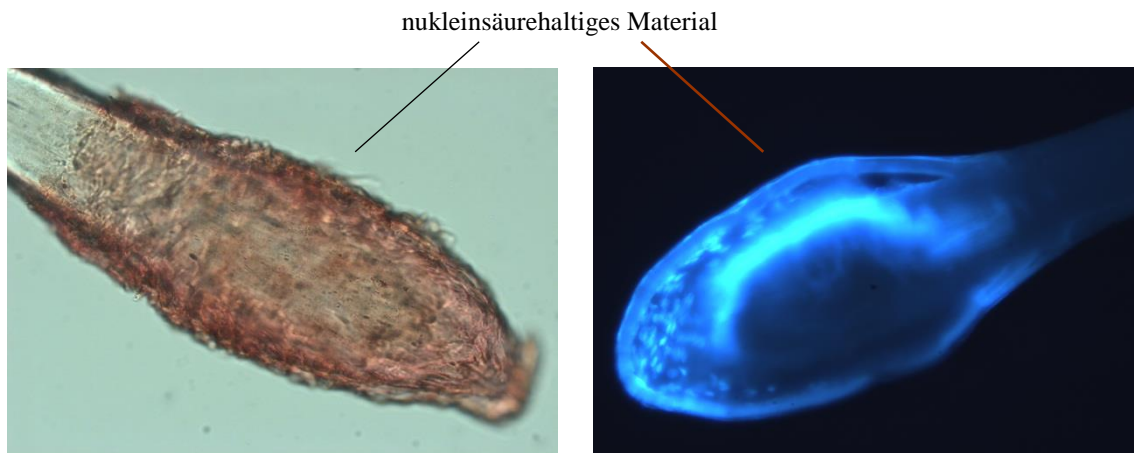


Abb. 4.2a: HE-Färbung, 40X

Abb. 4.2b: DAPI-Färbung, 40X

telogene Wurzel mit nukleinsäurehaltigen Substanzen

Vorab wurde sowohl die Fluoreszenz- als auch die Standard-Hämatoxylin-Färbung auf Durchführbarkeit und Validität untersucht. Die Vorversuche zu der Hämatoxylin-Färbung ergaben keinerlei reproduzierbare Ergebnisse, sodass sie nicht weiter in den Untersuchungsablauf mit einbezogen wurde. Die Screeningmethode, die initial der Extraktion durchgeführt wurde, beschränkte sich also auf die DAPI-Fluoreszenzfärbung. Alle 257 in dieser Arbeit untersuchten telogenen Haare wurden vor Extraktion mittels dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt und mikroskopiert. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Anzahl fluoreszenzmikroskopisch darstellbarer nukleinsäurehaltiger Zellkerne und einer erfolgreichen Typisierung zu ziehen, wurden die sichtbaren Zellkerne gezählt und notiert.

Es folgte eine Aufgliederung in fünf Kategorien: keine sichtbaren Zellkerne; kleiner zwanzig sichtbare Zellkerne; zwanzig bis fünfzig sichtbare Zellkerne; größer fünfzig sichtbare Zellkerne und das Vorhandensein eines keratinisierten warzenförmigen Fortsatzes; einem angehängten zellkernlosen, keratinisierten Gewebe.

Die folgenden Abbildungen geben beispielhaft Vertreter der einzelnen Kategorien wieder:

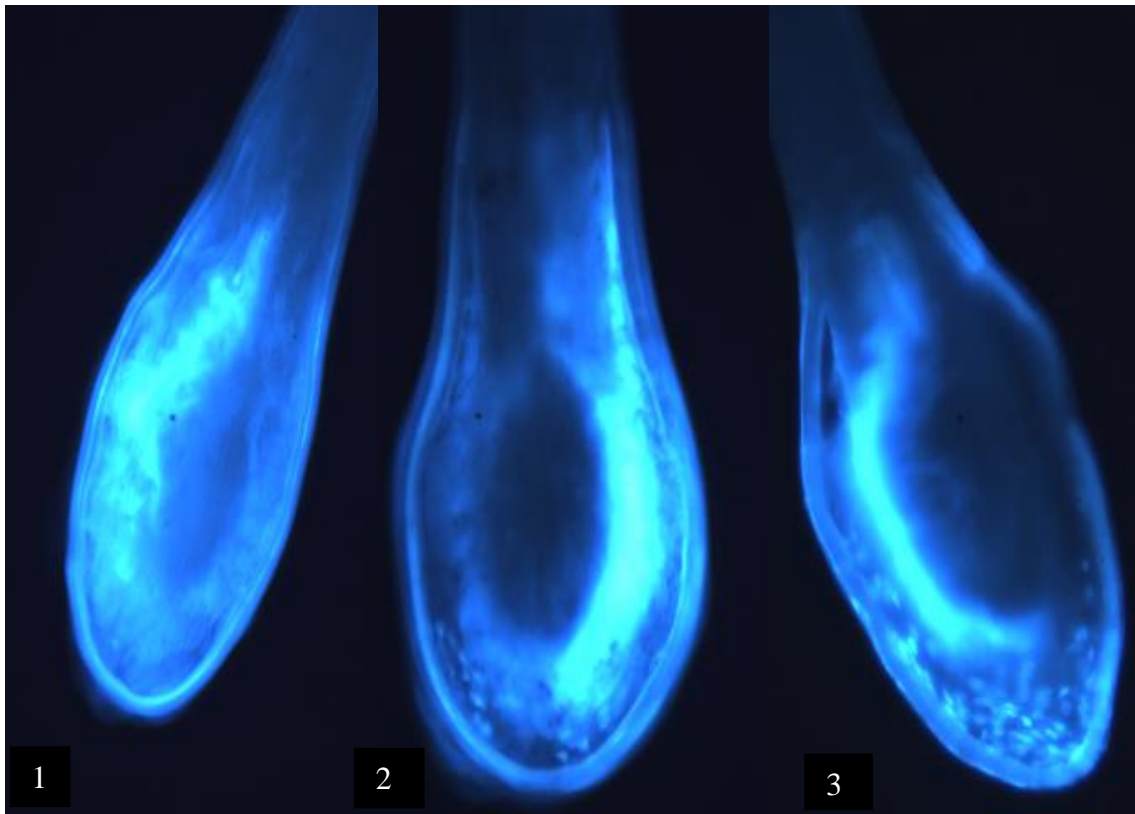


Abb.4.2 1-3, DAPI-Färbung, 40X
beispielhafte Vertreter der einzelnen DAPI-Kategorien: 1.= keine sichtbaren Zellkerne, 2.= <20 sichtbare Zellkerne, 3.= 20-50 sichtbare Zellkerne

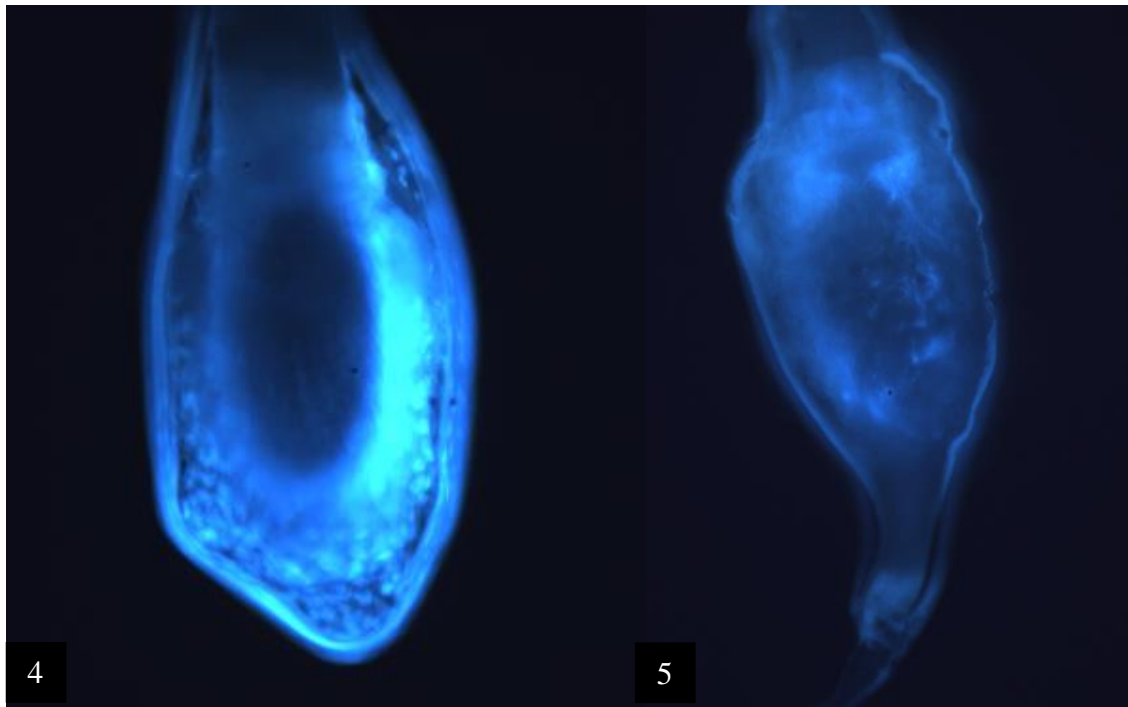


Abb. 4.2. 4-5, DAPI-Färbung, 40X beispielhafte Vertreter der einzelnen DAPI-Kategorien 4.= >50 sichtbare Zellkerne, 5.= Vorhandenseins eines keratinisierten warzenförmigen Fortsatzes (im Folgenden als kern. Ni bezeichnet)

Anmerkung: Diese Abbildung besteht aus fünf Einzelbildern, die unabhängig voneinander aufgenommen wurden. Fluoreszenzintensitätsunterschiede zwischen den fünf Bildern können nicht interpretiert werden.

Aus dieser Untersuchung ergaben sich folgende Ergebnisse für die 257 untersuchten Haare:

sichtbare Zellkerne	Anzahl der telogenen Haare
0	203
≤ 20	34
>20 – 50	12
>50	10

Tab. 4.2: Verteilung der unter DAPI-Färbung sichtbaren Zellkerne aller 257 untersuchten Haare

4.3 DNA-Profile der Vergleichsspeichelproben

Um einen verifizierten Rückschluss auf die, in den unterschiedlichen Extraktionsmethoden, ermittelten Allele ziehen zu können, wurden als Referenz Speichelproben der Probanden mittels der Chelex-100-Methode (s. 3.3.1) extrahiert,

amplifiziert (3.5) und anschließend typisiert (3.6). Die Ergebnisse dieser Untersuchung werden in folgenden Tabellen dargestellt:

Proband	Amelogenin	D3S1358	TH01	D21S11	D18S51	D10S1248
A.D.	X	15/18	6	28/30.2	14/16	14/16
E.K.	X	16/17	7/9.3	30/31.2	13/14	14
G.E.	X/Y	16/17	6/8	28	13/15	14/15
J.B.	X	17	9.3	28/29	13/14	14
R.R.	X	15/16	6/7	29/32.2	12/17	13/14
S.G.	X	16/17	8/9.3	30.2/31.2	14/16	13/14
T.M.	X	14/18	9/9.3	29	12	14/16

Tab. 4.3.a: Genotypen der Vergleichsspeichelproben mittels ESX-17

Proband	D1S1656	D2S1338	D16S539	D22S1045	VWA	D8S1179
A.D.	17.3/18.3	17/24	12/13	16	14/17	12/13
E.K.	11/15	20/24	9/14	14/16	16/17	14
G.E.	12/15	18/19	12/14	15/16	17	13/15
J.B.	17/17.3	17/22	11/12	15/17	16/17	13/15
R.R.	13/16	21/24	12	14/15	17	12/13
S.G.	11/13	18/20	12	15/17	14/16	13
T.M.	14/16.3	23/25	11/12	15/16	14/16	12/15

Tab. 4.3.b: Genotypen der Vergleichsspeichelproben mittels ESX-17

Proband	FGA	D2S441	D12S391	D19S433	ACTBP2
A.D.	19/22	10/11	21	13/14	16/17
E.K.	22/23	11/15	22/23	13/14.2	27.2/28.2
G.E.	25/26	11/14	22/23	15/16	27.2/32.2
J.B.	22	10	18/23	14	18/28.2
R.R.	20/21	14/15	18/20	14/16	15
S.G.	23.2/24	11.3/14	20/21	14/15.2	15/29.2
T.M.	23/24	11	21/22	12/16.2	19/23.2

Tab. 4.3c: Genotypen der Vergleichsspeichelproben mittels ESX-17

4.4 DNA-Ausbeute der telogenen Haare

Die 257 telogenen Einzelhaare von den insgesamt sieben Probanden wurden mithilfe sechs unterschiedlicher Extraktionsmethoden (Chelex-100-Methode, directPCR, TNCa-Puffer, QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit, NucleoSpin® Tissue XS, NucleoSpin® gDNA Clean up, Li-Puffer) untersucht. Als Referenz diente das aus Speichelproben typisierte DNA-Profil der Probanden (**Vgl Tab 4.3a-c**). Die extrahierte DNA wurde mittels Kapillargelelektrophorese typisiert und für weitere Beurteilungen hinsichtlich einer möglichen Korrelation zu morphologischen und histologischen Kriterien herangezogen. Die folgenden Tabellen geben die Mittelwerte der erfolgreich typisierten Allele im Vergleich zu den eigentlich zu erzielenden Allelen, einem vollständigen DNA-Profil entsprechend, der einzelnen Probanden an.

4.4.1 Chelex-100-Methode

Proband	zu erzielende Allele	\bar{x} erzielte Allele
A.D.	29	0
E.K.	30	5
G.E.	30	1
J.B.	26	2
R.R.	29	1,5
S.G.	30	1
T.M.	29	0

Tab. 4.4.1: Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Chelex-100-Methode, n=14

4.4.2 Direkt-PCR

Die Ergebnisse werden, den Untersuchungen entsprechend, aufgeteilt in: komplettes Haar, reine Untersuchung des Schaftes und der reinen Untersuchung der Wurzel.

4.4.2.1 Direkt-PCR, komplettes Haar

Proband	zu erzielende Allele	\bar{x} erzielte Allele
A.D.	29	0
E.K.	30	5
G.E.	30	5
J.B.	26	0
R.R.	29	1
S.G.	30	1
T.M.	29	0

Tab. 4.4.2.1: Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Direkt-PCR, komplettes Haar, n=7

4.4.2.2 Direkt-PCR, Schaft

Proband	zu erzielende Allele	\bar{x} erzielte Allele
A.D.	29	0
E.K.	30	3
G.E.	30	0
J.B.	26	0
R.R.	29	1
S.G.	30	0
T.M.	29	1

Tab. 4.4.2.2: Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Direkt-PCR, Schaft, n=7

4.4.2.3 Direkt-PCR, Wurzel

Proband	zu erzielende Allele	\bar{x} erzielte Allele
A.D.	29	0
E.K.	30	6
G.E.	30	20
J.B.	26	0
R.R.	29	0
S.G.	30	6
T.M.	29	3

Tab. 4.4.2.3: Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Direkt-PCR, Wurzel, n=7

4.4.3 modifizierte TNCa-Methode nach Hellmann et al.

Die Haare wurden nach Extraktion mittels HumanQuantifiler®, eine real-time quantitative PCR, quantifiziert. Da alle Extrakte negativ waren, wurde auf eine Typisierung verzichtet.

4.4.4 NucleoSpin® Tissue XS und NucleoSpin® Clean up

Mit den beiden Aufbereitungsmethoden von Macherey-Nagel konnten keinerlei Allele aus den telogenen Haaren typisiert werden.

4.4.5 QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit

Proband	zu erzielende Allele	\bar{x} erzielte Allele
A.D.	29	0
E.K.	30	1
G.E.	30	1
J.B.	26	0
R.R.	29	1
S.G.	30	3
T.M.	29	0

Tab. 4.4.5: Durchschnittlich erzielte Allelanzahl pro Proband mittels QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit, n=7

4.4.6 Li-Puffer, 30-minütige Inkubation

Proband	zu erzielende Allele	\bar{x} erzielte Allele
A.D.	29	1
E.K.	30	0
G.E.	30	15
J.B.	26	8
R.R.	29	12
S.G.	30	0
T.M.	29	8

Tab. 4.4.6: Durchschnittlich erzielte Allelanzahl pro Proband mittels Li-Puffer, n=28

4.4.6.1 5-minütige Inkubation

Proband	zu erzielende Allele	\bar{x} erzielte Allele
A.D.	29	1
E.K.	30	1
G.E.	30	12
J.B.	26	3
R.R.	29	0
S.G.	30	1
T.M.	29	0

Tab. 4.4.6.1: Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Li-Puffer, 5-minütige Inkubation, n=21

4.4.6.2 6-stündige Inkubation

Proband	zu erzielende Allele	\bar{x} erzielte Allele
A.D.	29	0
E.K.	30	6
G.E.	30	0
J.B.	26	2
R.R.	29	10
S.G.	30	20
T.M.	29	2

Tab. 4.4.6.2: Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Li-Puffer, 6-stündige Inkubation, n=21

4.4.6.3 15-stündige Inkubation

Proband	zu erzielende Allele	\bar{x} erzielte Allele
A.D.	29	1
E.K.	30	1
G.E.	30	7
J.B.	26	10
R.R.	29	3
S.G.	30	10
T.M.	29	10

Tab. 4.4.6.3: Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Li-Puffer, 15-stündige Inkubation, n=21

4.4.6.4 + Triton, 30-minütige Inkubation

Proband	zu erzielende Allele	\bar{x} erzielte Allele
A.D.	29	0
E.K.	30	2
G.E.	30	0
J.B.	26	7
R.R.	29	12
S.G.	30	10
T.M.	29	0

Tab. 4.4.6.4: Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Li-Puffer unter Zugabe von Triton, 30-minütige Inkubation, n=21

4.4.6.5 + Triton, 15-stündige Inkubation

Proband	zu erzielende Allele	\bar{x} erzielte Allele
A.D.	29	6
E.K.	30	3
G.E.	30	8
J.B.	26	5
R.R.	29	10
S.G.	30	7
T.M.	29	3

Tab. 4.4.6.5: Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Li-Puffer unter Zugabe von Triton, 15-stündige Inkubation, n=105

Folgende Elektropherogramme zeigen ein Teilprofil und ein volles DNA-Profil eines telogenen Haares und die *positiv Kontrolle* eines anagenen Haares unter Li-Puffer + Triton, nach 15-stündiger Inkubation.

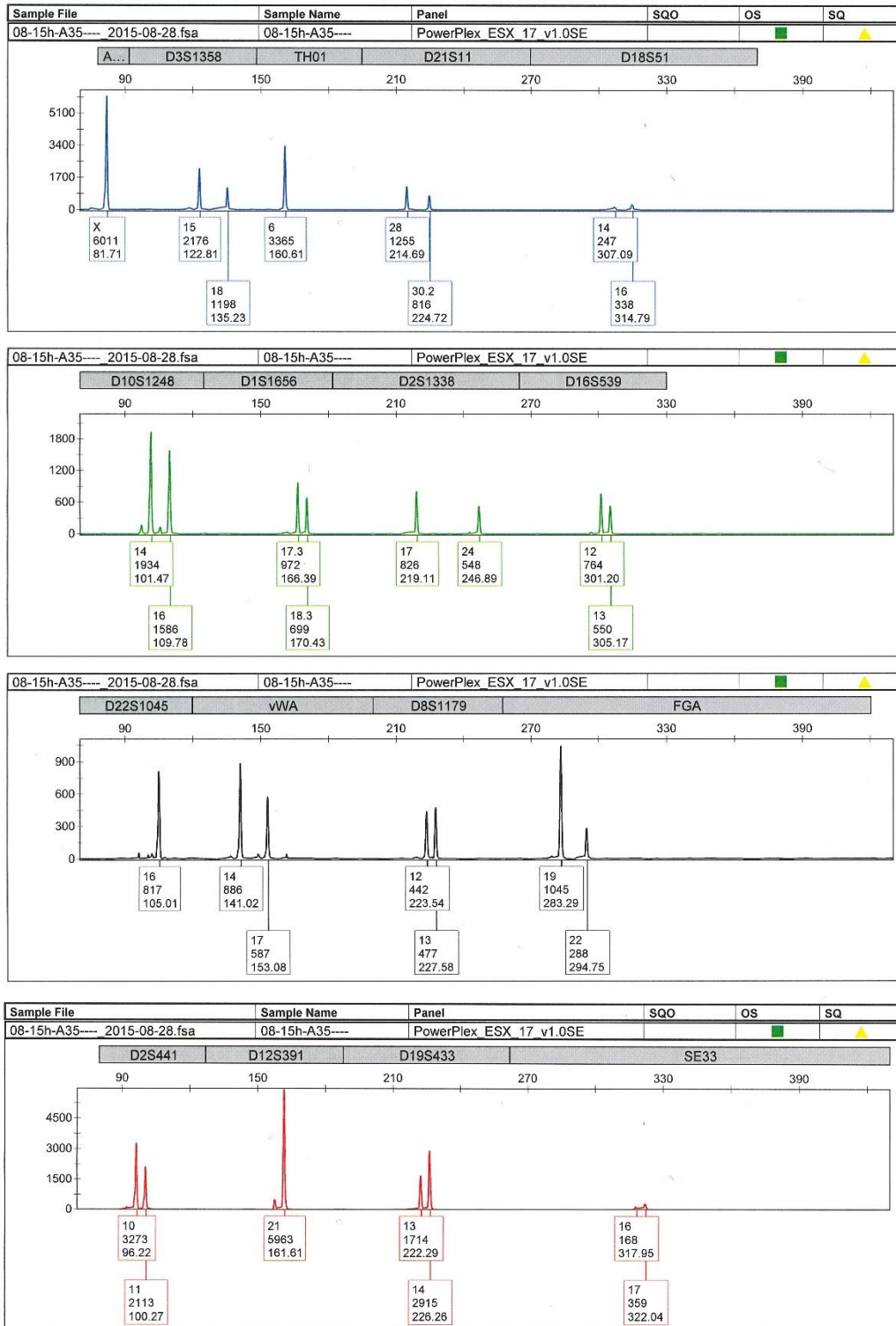


Abb. 4.4.6a beispielhaftes Elektropherogramm eines kompletten DNA-Profiles eines telogenen Haares

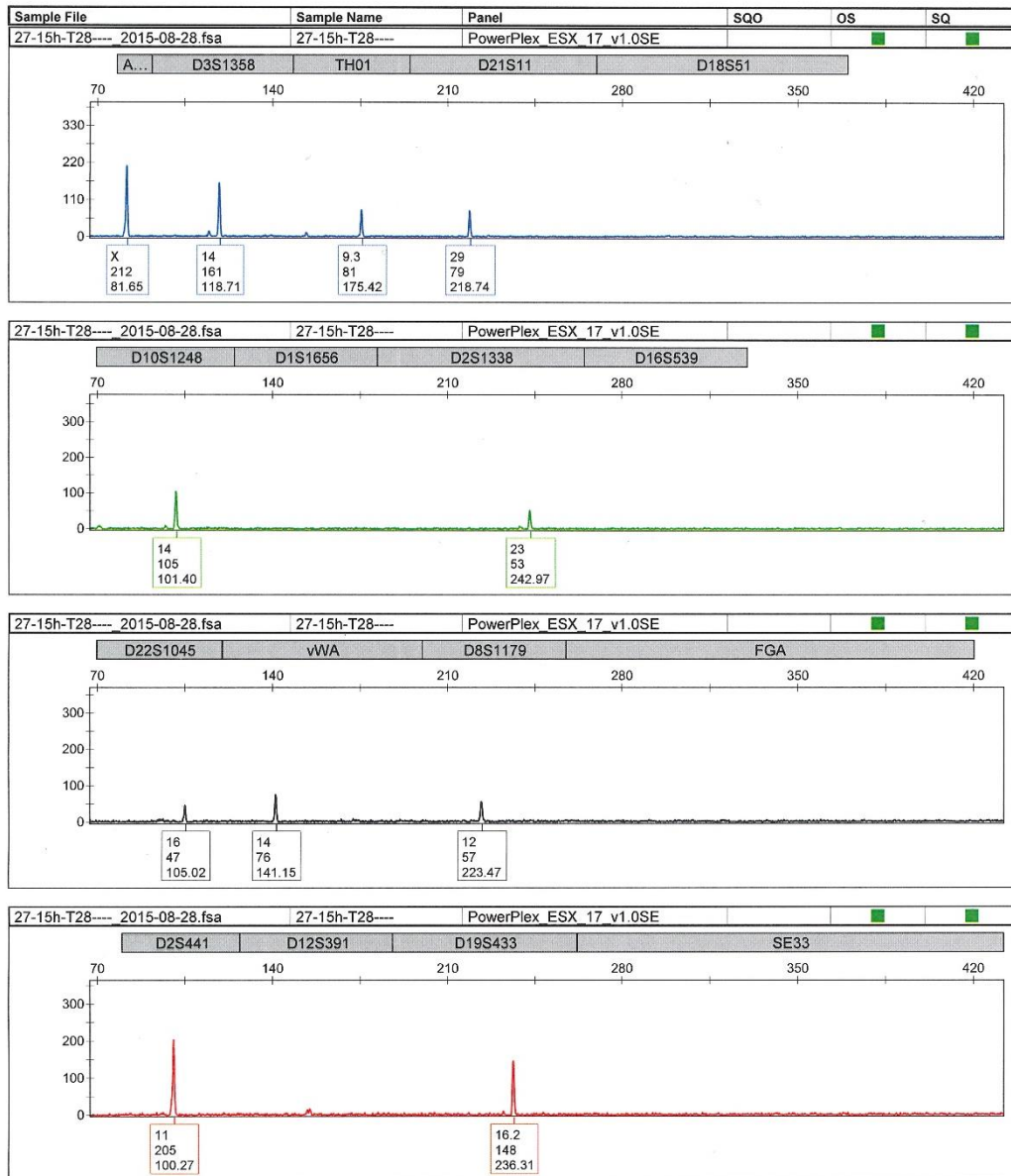


Abb. 4.4.6b beispielhaftes Elektropherogramm eines partiellen DNA-Profiles eines telogenen Haares

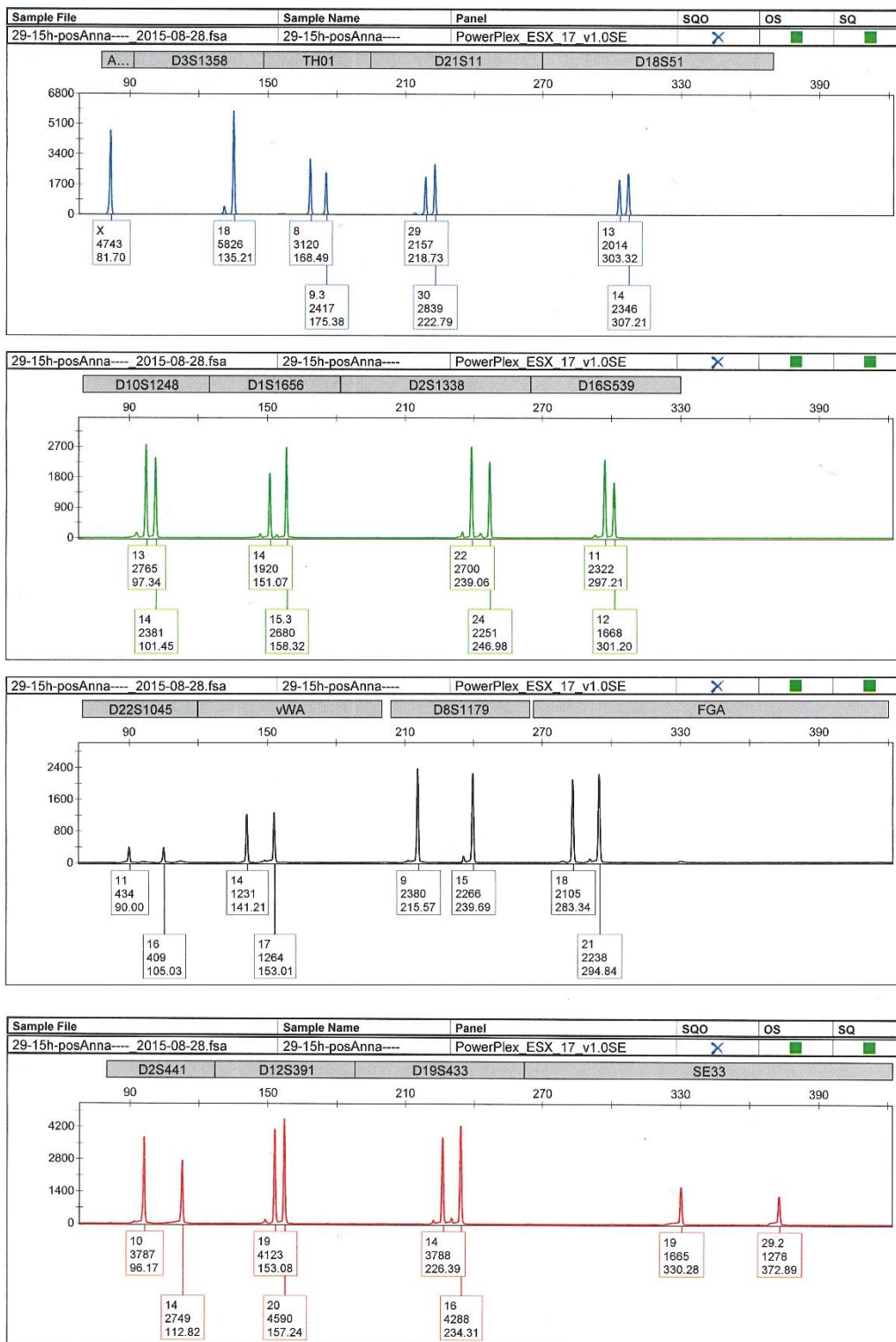


Abb 4.4.6c.: Beispielhaftes Elektropherogramm einer Positiv Kontrolle eines anagenen Haares

4.5 Vergleich der einzelnen Extraktionsmethoden untereinander

Die Extraktionserfolge der Li-Untersuchungsreihe ähneln und pendeln sich bei durchschnittlich 5,7 Allelen / Experiment ein. Der schlechteste Typisierungserfolg der Reihe (\bar{x} erzielte Allele / Experiment = 2,8) ist bei einer Inkubationszeit von 5 Minuten, ohne Zugabe des Oberflächentensids Triton X-100, zu verzeichnen. Die direkte PCR der reinen telogenen Wurzel erzielt im Schnitt 5 Allele / Experiment. Dahinter folgen mit unter zwei erzielten Allelen pro Experiment die Chelex-100-Methode nach Walsh et al., die direkte PCR des reinen Schafts und des kompletten Haars und die QIASymphony® mit „DNA Investigator“ Kit. Die mit Abstand schlechtesten Ergebnisse, da komplett negativ, wurden bei der modifizierten TNCA-Extraktion nach Hellmann und den NucleoSpin® Aufbereitungsmethoden beobachtet. Die nachfolgende Grafik gibt eine Übersicht der Ergebnisse der einzelnen Extraktionsmethoden.

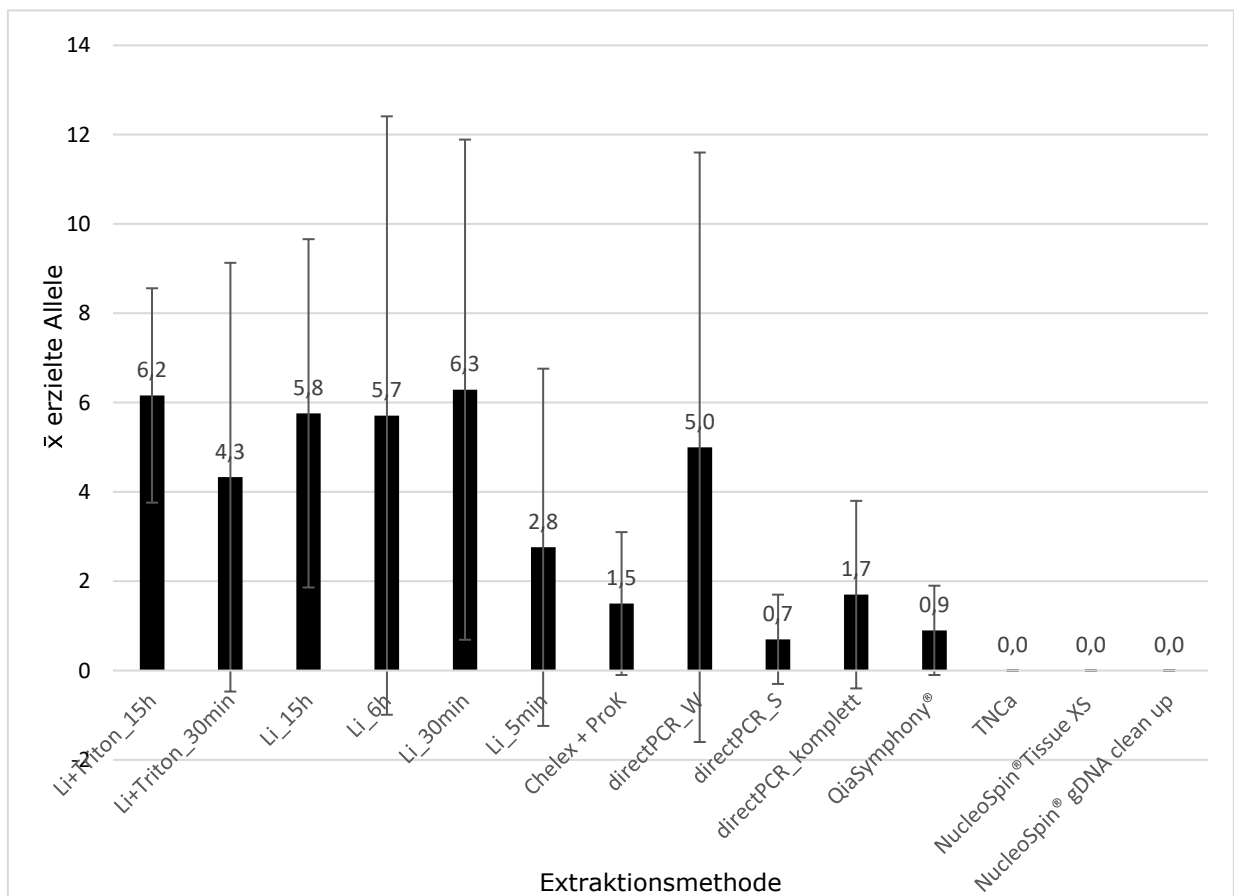


Abb. 4.5: Durchschnittlich erfolgreich typisierte Allele der einzelnen Extraktionsmethoden

Die Typisierungserfolge mit dem modifizierten Li-Puffer unter Zugabe von 3% Triton und einer Inkubationszeit von 15 Stunden sind signifikant besser als drei der bekannten Standard-Extraktionsmethoden. Folgende Tabelle gibt die p-Werte zu den vergleichenden Extraktionsmethoden wieder:

Extraktionsmethode^a	p-Wert
Chelex-100 nach Walsh et al.	0,003006
directPCR nach Ottens et al.	
- komplettes Haar	0,006619
- Schaft	0,001028
QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit	0,001242

Tab. 4.5: Signifikanz der modifizierten Methode (+3% Triton, Inkubationszeit 15 Stunden) im Vergleich zu den anderen angewandten Extraktionsmethoden

Im Vergleich zu der originären Extraktionsmethode nach Li et al. und den untersuchten vier Modifikationen konnten keine signifikant besseren Ergebnisse erzielt werden. Die folgenden Extraktionsmethoden ergaben keine Ergebnisse: modifizierte TNCA-Extraktion nach Hellmann et al., NucleoSpin® MACHEREY-NAGEL®, Clean up gDNA ® MACHEREY-NAGEL®.

4.6 Korrelation Zellkernanzahl und DNA-Ausbeute

Die nachfolgenden Tabellen geben Auskunft über den Zusammenhang zwischen der Anzahl der mittels DAPI-Färbung sichtbar gemachten Zellkerne der telogenen Haare und der Anzahl der jeweils durchschnittlich erfolgreich typisierten Allele. Die Anzahl der Zellkerne wurde in die fünf unter **4.2** beschriebenen Kategorien unterteilt.

4.6.1 Chelex-100-Methode nach Walsh et al.

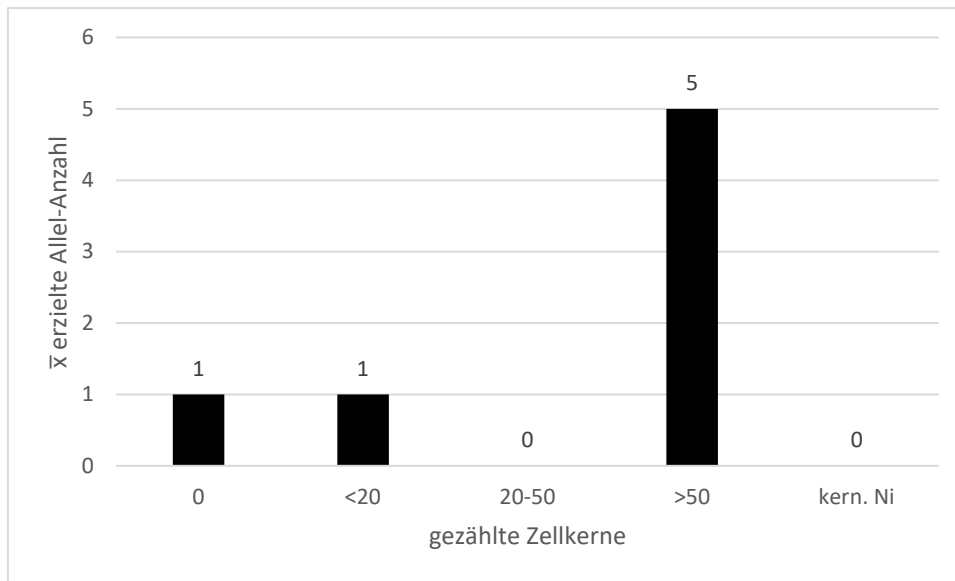


Abb. 4.6.1: Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels Chelex-100-Methode im Verhältnis zu gezählten Zellkernen

4.6.2 Direkt-PCR

Hier wurden die Methoden Direkt-PCR komplett und Direkt-PCR Wurzel zusammengefasst. Eine Angabe über Direkt-PCR Schaft entfällt.

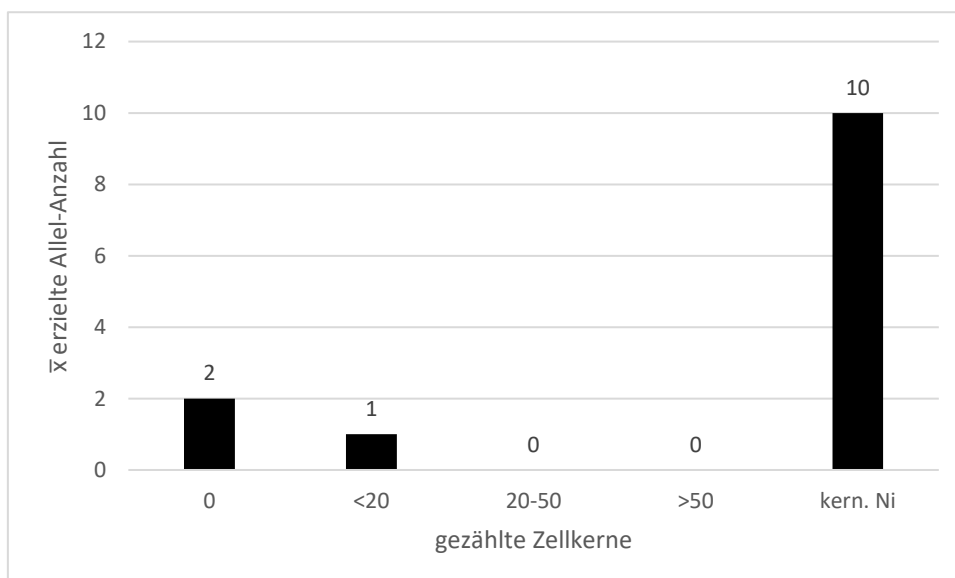


Abb. 4.6.2: Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels Direkt-PCR im Verhältnis zu gezählten Zellkernen

4.6.3 modifizierte TNCa-Methode

Der von HELLMANN et al. [20] vorgestellte Typisierungserfolg konnte in dieser Arbeit mit der modifizierten Methode nicht reproduziert werden. Alle mit dem modifizierten TNCa-Puffer extrahierten Haare enthielten keine nachweisbare Menge an humaner Zellkern DNA. Somit entfiel eine Typisierung.

Aufgrund der negativen Ergebnisse wurde auf die grafische Darstellung verzichtet.

Anzahl Zellkerne	\bar{x} erzielte Allele
0	0
<20	0
20-50	0
>50	0
keratinisierter warzenförmiger Fortsatz (ker. Ni)	0

Tab. 4.6.3: Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels modifizierter TNCa-Methode nach Hellmann et al. im Verhältnis zu gezählten Zellkernen

4.6.4 QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit

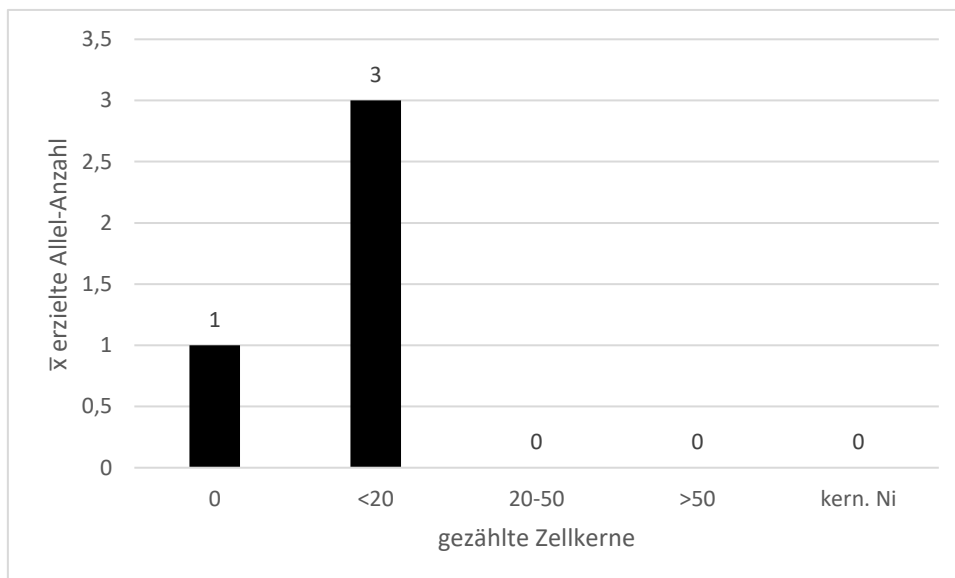


Abb. 4.6.4: Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit im Verhältnis zu gezählten Zellkernen

4.6.5 NucleoSpin® XS und NucleoSpin® Clean up

Mit den von Macherey-Nagel® angebotenen Kits zur Extraktion telogener Haare konnten keine Typisierungserfolge erzielt werden.

Aufgrund des negativen Ergebnisses wurde auf eine graphische Darstellung verzichtet.

Anzahl Zellkerne	\bar{x} erzielte Allele
0	0
<20	0
20-50	0
>50	0
keratinisierter warzenförmiger Fortsatz (ker. Ni)	0

Tab. 4.6.5: Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels der Macherey-Nagel®-Aufbereitungsmethoden im Verhältnis zu gezählten Zellkernen

4.6.6 Li-Puffer nach Li et al.

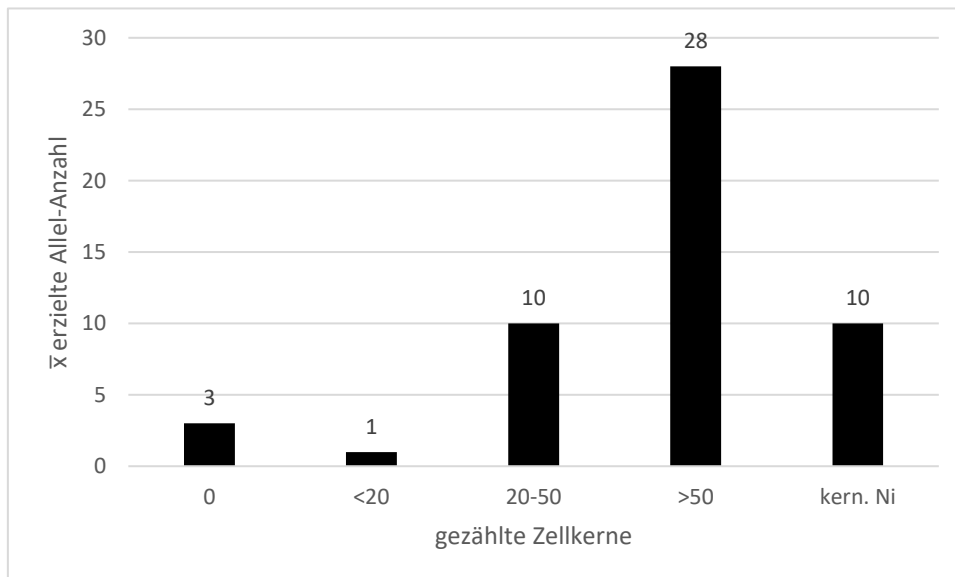


Abb. 4.6.6: Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels Li-Puffers im Verhältnis zu gezählten Zellkernen

4.6.6.1 5-minütige Inkubation

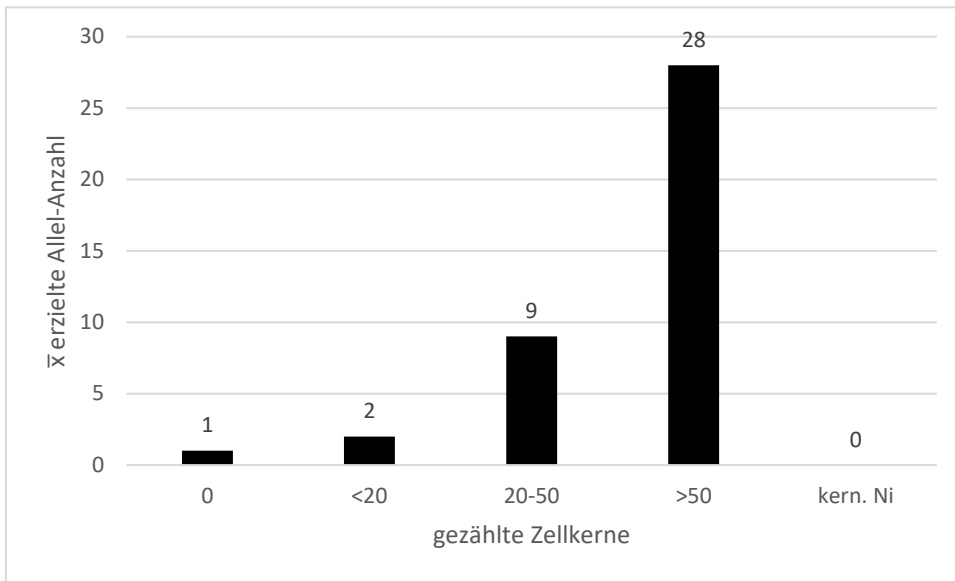


Abb. 4.6.6.1: Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels Li-Puffers 5-minütige Inkubation im Verhältnis zu gezählten Zellkernen; es konnten keine Haare mit einem keratinisierten warzenförmigen Fortsatz nachgewiesen werden

4.6.6.2 6-stündige Inkubation

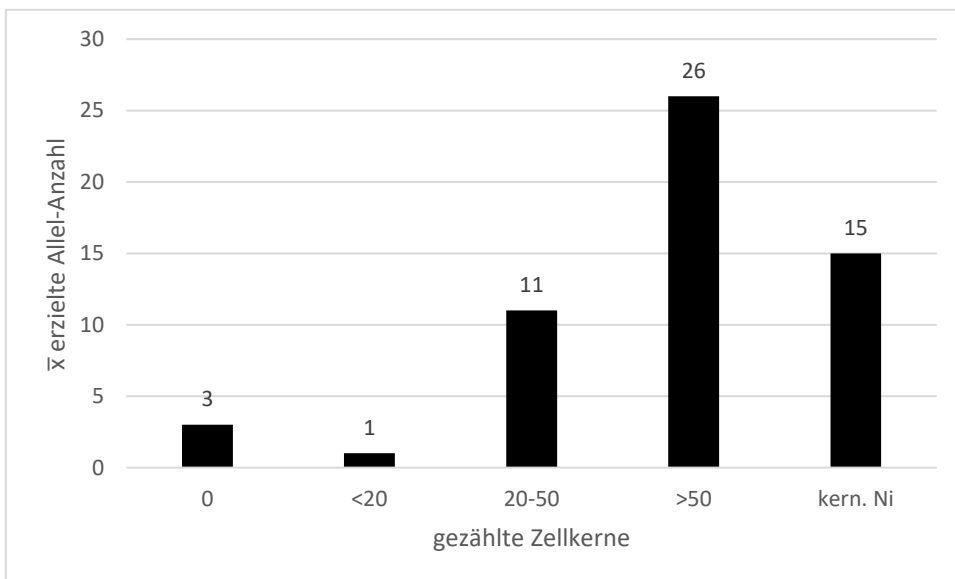


Abb. 4.6.6.2: Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels Li-Puffers 6-stündige Inkubation im Verhältnis zu gezählten Zellkernen

4.6.6.3 15-stündige Inkubation

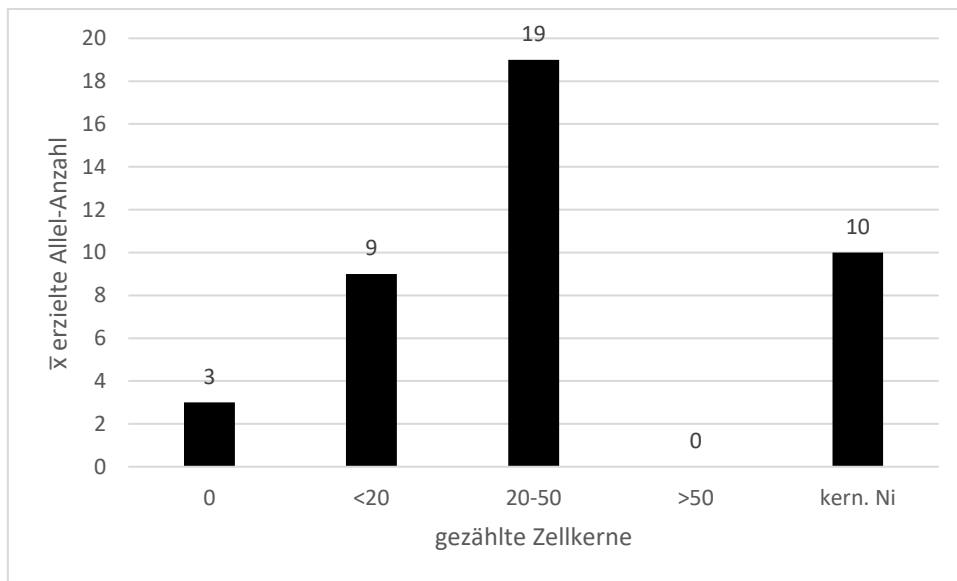


Abb. 4.6.6.3: Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels Li-Puffers 15-stündige Inkubation im Verhältnis zu gezählten Zellkernen; es konnten keine Haare mit >50 Zellkerne nachgewiesen werden

4.6.6.4 +Triton, 30-minütige Inkubation

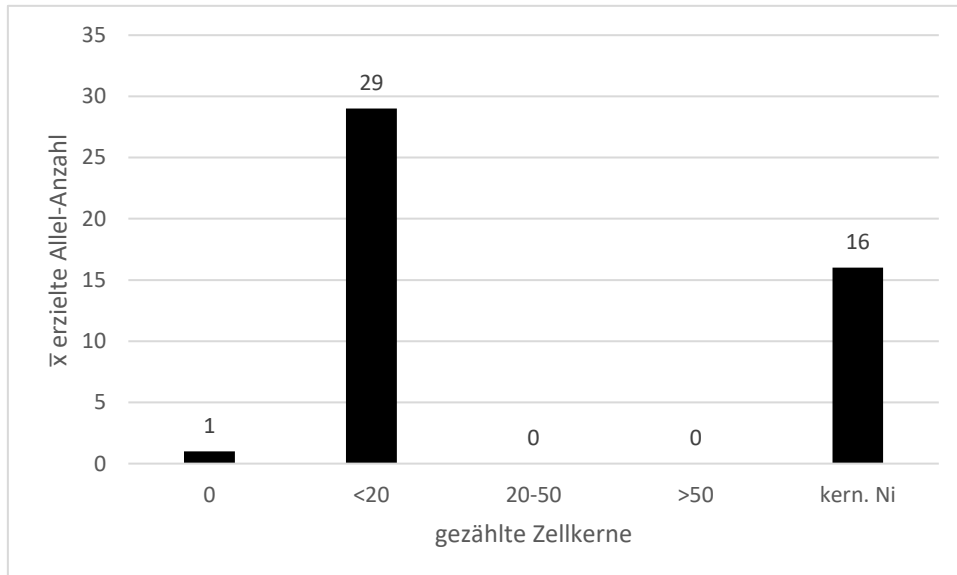


Abb. 4.6.6.4: Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels Li-Puffers + Triton 30-minütige Inkubation im Verhältnis zu gezählten Zellkernen; es konnten keine Haare mit 20-50, >50 Zellkerne nachgewiesen werden

4.6.6.5 + Triton, 15-stündige Inkubation

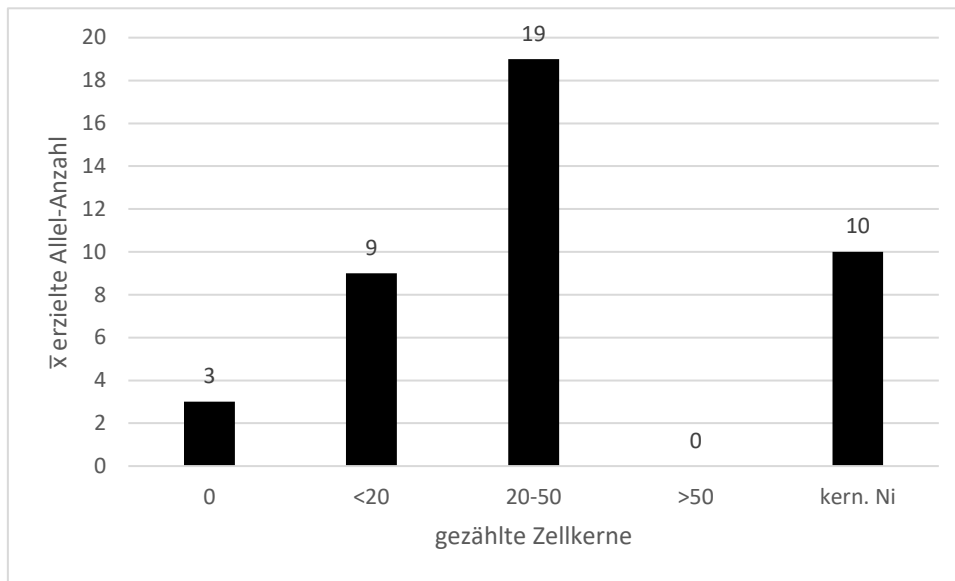


Abb. 4.6.6.5: Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels Li-Puffers + Triton 15-stündige Inkubation im Verhältnis zu gezählten Zellkernen; es konnten keine Haare mit >50ZK nachgewiesen werden

Der Typisierungserfolg korreliert mit der Anzahl der darstellbaren Zellkerne. Grundsätzlich wurden bessere Typisierungserfolge erzielt, wenn bei der DAPI-Färbung mehr als zwanzig Zellkerne sichtbar waren. Die mit Abstand meisten Allele, zum Teil sogar volle DNA-Profile, wurden bei telogenen Haaren, die in der DAPI-Färbung 50 oder mehr Zellkerne zeigten, typisiert. Nichts desto trotz konnten telogene Haare, die als DAPI-negativ gewertet wurden, mit durchschnittlich zwei richtigen Allelen typisiert werden. Bei drei von 180 DAPI-negativen Haaren konnte ein volles DNA-Profil nachgewiesen werden. Telogene Haare, die einen keratinisierten warzenförmigen Fortsatz aufwiesen, weisen im Schnitt mit 12 Allelen auf.

Die nachfolgende Grafik gibt eine Übersicht der durchschnittlich erfolgreich typisierten Allele der einzelnen Extraktionsmethoden im Verhältnis zu der Zellkern-Anzahl.

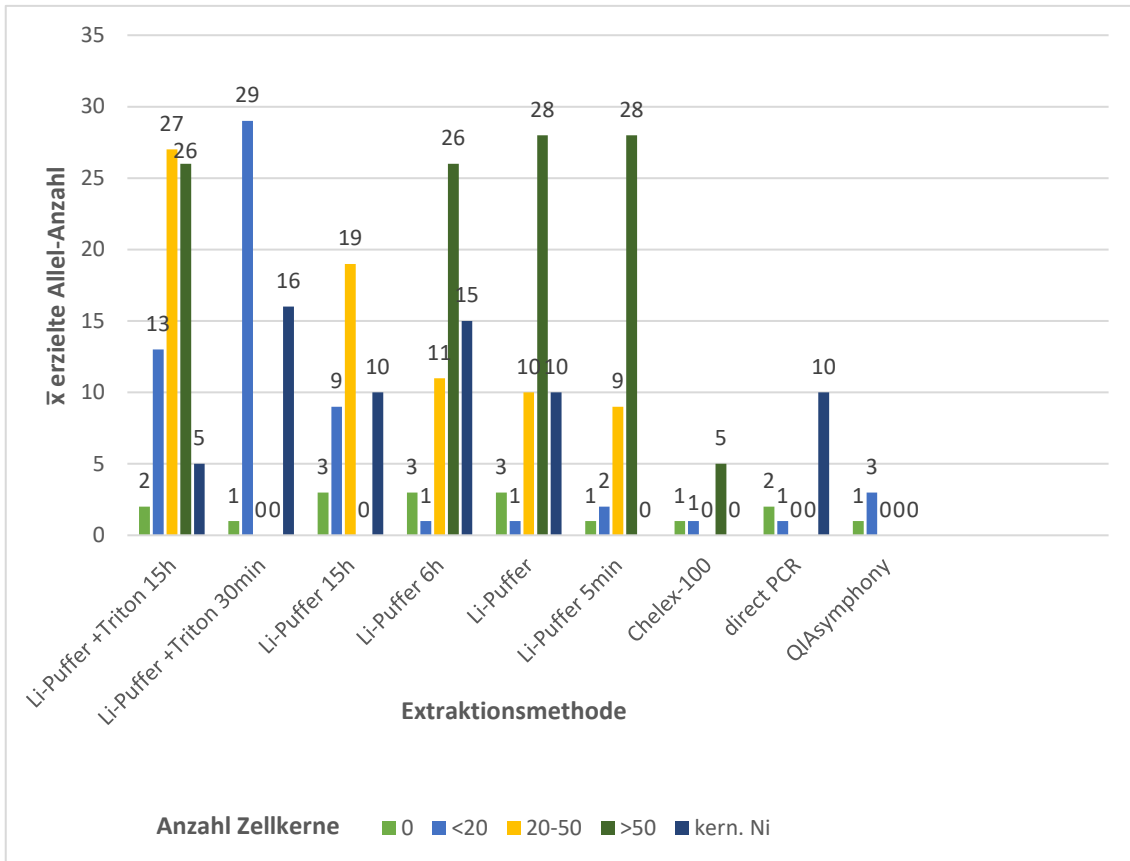


Abb. 4.6: Übersicht der durchschnittlich erfolgreich typisierten Allele aller Extraktionsmethoden im Verhältnis zu den im Vorfeld mit DAPI-Färbung gezählter Zellkerne

4.7 Korrelation Haarfarbe und DNA-Ausbeute

Von insgesamt 257 untersuchten telogenen Haaren konnte bei 147 Haaren, also in 57%, ein oder mehrere Allele typisiert werden. Die Korrelation zwischen Haarfarbe und der DNA-Ausbeute zeigt, dass im Durchschnitt vor allem die schwarzen Haare erfolgreicher typisiert werden konnten. Im Vergleich zu blonden und roten Haaren ist die durchschnittliche Allel-Ausbeute doppelt so hoch. Im Vergleich zu braunen Haaren ist die Allel-Ausbeute 1,5-fach höher. Vergleicht man die durchschnittliche Allel-Ausbeute aller Extraktionsmethoden, so erzielen blonde und rote Haare die Hälfte der durchschnittlichen Allele der schwarzen und eine ca. 1,4-fach geringere durchschnittliche Allel-Anzahl als braune Haare.

Die nachfolgende Grafik gibt die Korrelation zwischen Haarfarbe und der durchschnittlichen Allel-Anzahl wieder.

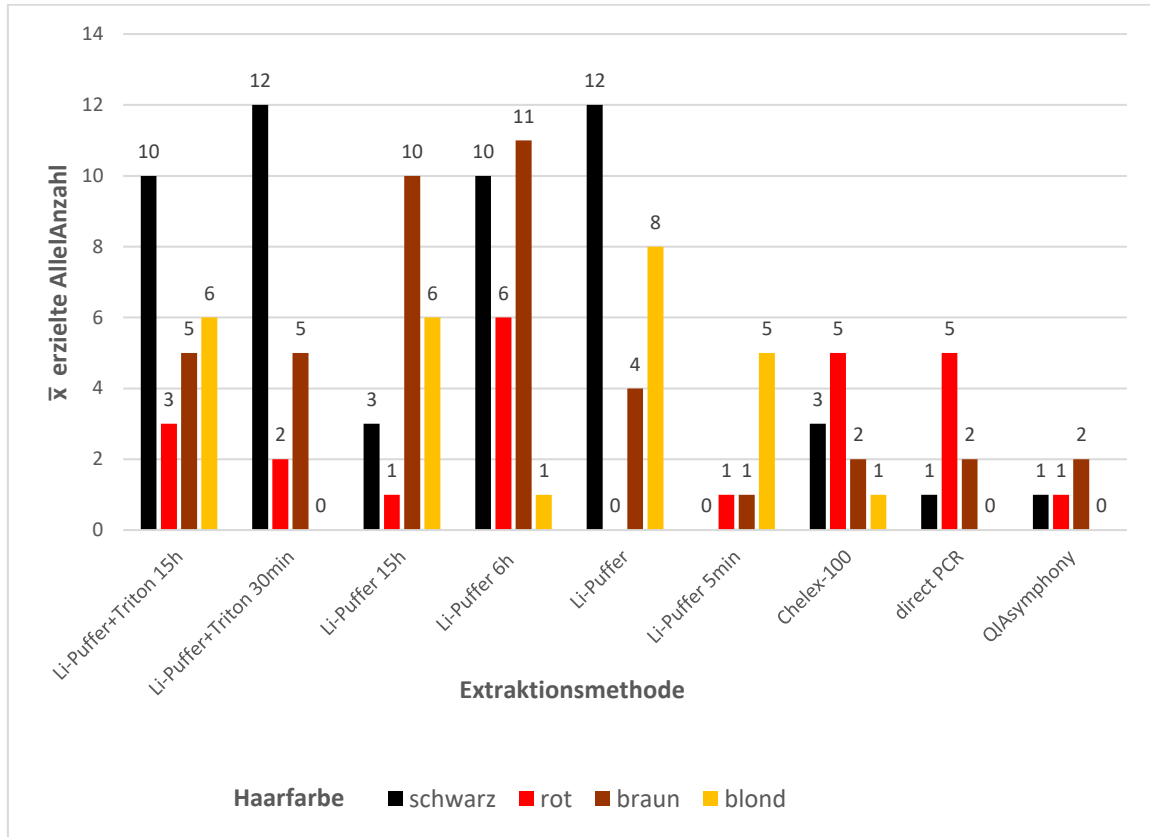


Abb. 4.7: Korrelation Haarfarbe und durchschnittliche Allel-Anzahl

5. DISKUSSION

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche die effizienteste Extraktionsmethode telogener Haare ist. Es wurden sowohl gängige Standardextraktionsmethoden, als auch bislang nicht etablierte Extraktionsmethoden betrachtet und im Rahmen derer eine Weiterentwicklung der vielversprechendsten Methode untersucht. Darüber hinaus wurde versucht, mittels mikroskopischer Voruntersuchungen, eine valide Aussage über den Typisierungserfolg eines einzelnen telogenen Haares geben zu können.

5.1 Hintergrund der Untersuchung

Das Haar als Spurenlagerer zeichnet sich gegenüber anderen menschlich-biologischen Spuren durch eine lange Lagerungsstabilität und hohe Autolyseresistenz aus. Damit ist es auf den ersten Blick ein wertvolles Untersuchungsmaterial. So ist es nachvollziehbar, dass diese Vorteile durch viele unterschiedliche Herangehensweisen in den letzten Jahrzehnten zu nutzen probiert wurden. Leider waren die Ergebnisse von Blutgruppenbestimmungen [11, 38, 64] oder die Geschlechtsdifferenzierungen über den Nachweis eines Y-Chromosoms [53], sowie mikroskopische Untersuchungen histologischer und elektronenmikroskopischer Art für die Individualitätsbestimmung nicht ausreichend zufriedenstellend. Dies änderte sich mit dem Einzug der molekularbiologischen Untersuchungsmethodik [49, 50].

Durch den natürlichen Wachstumszyklus des Haares ist es erklärlich, wieso vor allem telogene Haare oftmals an Tatorten gesichert werden können. So fallen jedem Menschen durchschnittlich bis zu 100 Haare pro Tag auf ganz natürliche Art und Weise aus [40]. Bis ein Haar der Kopfhaut entfällt, durchläuft es komplexe Keratinisierungsprozesse. Während die Entwicklung der Haarproteine ausgiebig erforscht ist, ist über die Veränderung der im Haar enthaltenen Nukleinsäuren wenig bekannt [3, 16, 55]. Man geht davon aus, dass die DNA im Laufe der Keratinisierungsprozesse [13, 20, 36] degradiert und somit denkbar ungünstige Voraussetzungen für eine STR-Typisierung bietet. Doch sind es gerade diese molekularbiologischen Untersuchungen, die von besonders diskriminativer Aussagekraft sind. Erschwerend kommt hinzu, dass oftmals Einzelhaare als Spur an Tatorten gesichert werden, sodass der DNA-Gehalt eines einzelnen telogenen

Haares für eine molekularbiologische Untersuchung ausreichend sein muss. So sind konsequenterweise vor allem Haare mit anheftenden Hautepithelien oder aber mit Bestandteilen der Haarwurzelscheiden erfolgreich typisierbar.

Darüber hinaus wird in der Literatur immer wieder das in den Haaren enthaltene Melanin als potentieller PCR-Inhibitor diskutiert und damit als ein möglicher Grund der raren Typisierungserfolge gesehen [4, 19, 36, 39].

Heutzutage sind STR-Typisierungen an telogenen Haaren und dementsprechend deutlich degradierter DNA, von meist kaum mehr als 110 bp großen DNA-Fragmenten durch die Entwicklung modifizierter, höchst sensitiver STR-Primer möglich, wenn auch immer noch nicht zufriedenstellend [6, 20, 36].

Einen alternativen Ansatzpunkt der Haaruntersuchung bietet die Isolierung der menschlichen, mitochondrialen DNA (mtDNA), Amplifikation der 228 bp Region des D-Loops und anschließender Sequenzierung [62, 63]. Diese Untersuchung ist nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

5.2 Haarfarbe

Über die Verteilung der Haarfarbe der Erdbevölkerung macht die Literatur nur wenige Angaben. CÉSARINI [14] stellt ein Vorherrschen des schwarzen Haares weltweit fest. In der nordwesteuropäischen Bevölkerung ist vor allem blondes und rotes Haar verbreitet. Diese Literaturangaben entsprechen den Beobachtungen dieser Arbeit. So sind vier nordwesteuropäische Probanden rothaarig bzw. blond, während zwei nordwesteuropäische Probanden braunhaarig sind und eine vorderasiatische Probandin eine schwarze Haarfarbe aufweist (vgl. Tab. 4.1.1).

5.3 Haarlänge

Auch zur durchschnittlichen Haarlänge der Erdbevölkerung gibt die Literatur nur ungenaue Angaben. Die durchschnittliche Haarlänge eines Individuums ist vermutlich eher durch modische statt durch genetische Faktoren bestimmt.

5.4 DAPI-Fluoreszenzfärbung als zuverlässige Screeningmethode

Basierend auf der Färbemethodik nach LEPEZ et al. [29] wurden alle telogenen Haaren mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI gefärbt, ehe sie typisiert wurden. Die Wurzelqualität wurde bestimmt und die sichtbaren Kerne wurden gezählt (vgl. **Tab 4.2**). Im Vergleich zu der belgischen Arbeitsgruppe, die ihren Schwellenwert für eine erfolgreiche STR-Typisierung bei einem Minimum von 20 gezählten Zellkernen für mindestens ein Teilprofil legten, konnte in dieser Arbeit in vier von fünf Fällen mit der modifizierten Li-Extraktionsmethode bereits mit zehn sichtbaren Zellkernen ein Teilprofil (mehr als 65% richtige Allele) detektiert werden.

Die Konsequenz einer Voruntersuchung mittels DAPI-Fluoreszenz-Färbung ist für den Routinefall aus unterschiedlichen Gesichtspunkten zu betrachten. Die Untersuchungen zeigten einen klaren Zusammenhang zwischen einer vermehrten Menge mikroskopisch nachweisbarer DNA und einer erfolgreichen Typisierung: Der Typisierungserfolg steigt proportional zu der im Vorfeld mikroskopisch nachgewiesenen Zellkernanzahl. Das entspricht erwartungsgemäß der Literatur. Dies gibt in der Routine die Möglichkeit, in einem Fall, der mehrere Haare als Beweismittel beinhaltet, die Haare mit der besten Typisierungsprognose herauszufiltern und zu untersuchen. Andererseits zeigte diese Arbeit, dass, wenn auch nur zu 3,5% (3/85 Haaren) die Möglichkeit gegeben ist, ein telogenes Haar, bei dem sich im Rahmen der Screeninguntersuchung im Vorfeld histologisch keine DNA nachweisen ließ, ein volles Profil nachweisen lässt. So kann in der Routinesituation auch ein DAPI-negatives Haar ein durchaus verwertbares Ergebnis erzielen. Sollte ein Fall also nur wenige telogene, DAPI-negative Haare enthalten, wird geraten, auch diese zu typisieren.

5.5 DNA-Ausbeute der telogenen Haare

Wie bereits erwähnt, weisen telogene Einzelhaare nur eine geringe Menge degradierter DNA auf. Um eine erfolgreiche DNA-Typisierung durchzuführen, ist es von besonderer Bedeutung, sich einer maximal effizienten DNA-Extraktionsmethode zu bedienen, die die Grundlage für eine erfolgreiche PCR und gelungene Typisierung bietet. Einen alternativen Ansatz bietet der Verzicht auf eine Extraktion, wie sie im Rahmen von direkt-PCRs angewandt wird [43]. Grundgedanke dieser Methodik ist die Minimierung von

eventuellen Kontaminationen und Ablauffehlern, die durch den Einsatz vieler unterschiedlicher Gefäße oder aber auch transferbedingt auftreten können; die Maximierung der Sensitivität ist – nicht zuletzt – eine Kosten- und Zeitersparnis. Da die Ergebnisse der direkten Amplifikation im Rahmen dieser Arbeit als nicht erfolversprechend zu werten waren, wurde von einer weiteren Untersuchung in diese Richtung abgesehen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fallen entsprechend der bekannten und im Vorfeld geschilderten Problematik aus. Die durchschnittlich korrekt typisierte Allelzahl ist in keiner der untersuchten Extraktionsmethoden zufriedenstellend. So werden im Schnitt 5,7 Allele pro Experiment der Li-Untersuchungsreihe richtig typisiert, unabhängig der Zugabe von Triton X-100. Eine Inkubationszeit von mindestens 30 Minuten scheint einen positiven Effekt auf den Extraktionsvorgang zu haben; die Ergebnisse einer 5-minütigen Inkubationszeit sind 2,25-fach schlechter als die derselben Extraktionsmethode mit 30-minütiger Inkubationszeit. Durch die Zugabe des Oberflächentensids Triton X-100 wurde eine größere DNA-Ausbeute erwartet. Mit der entsprechend modifizierten Extraktionsmethode wurden allerdings 1,5-fach schlechtere Ergebnisse erzielt als mit der äquivalenten Extraktionsmethode ohne das Oberflächentensid. Auch eine längere Inkubationszeit von 15 Stunden hat keinen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse (**Abb. 4.5**).

Die Typisierungserfolge der unter **3.3.7.4** beschriebenen Extraktionsmodifikation der chinesischen Forschungsgruppe rund um Li et al. [30] sind signifikant effizienter als drei der gängigen Extraktionsmethoden (Chelex-100 nach Walsh et al., direkte PCR des kompletten Haares, bzw. des reinen Schafts nach Ottens et al. und des QIA-symphony® mit "DNA Investigator"-Kit). Diese Signifikanz muss jedoch im Verhältnis zu den noch schlechteren DNA-Ausbeuten dieser drei Extraktionsmethoden relativiert werden.

Von den insgesamt 257 untersuchten telogenen Haaren, konnten lediglich, verteilt auf alle in **3.3** angeführten Extraktionsmethoden, aus 22 Haaren ein volles Profil und von 19 weiteren Haaren mehr als zehn richtige Allele detektiert werden. 105 Haare erbrachten weniger als 10 Allele, aus 111 Haaren konnte kein Allel abgeleitet werden.

Diese schlechte DNA-Ausbeute aus telogenen Haaren ist ein in der Literatur bekanntes Problem. Als mögliche Ursache dafür ist einerseits die schlechte DNA-Qualität zu werten: Wie unter **5.1** beschrieben, sind komplexe Keratinisierungsprozesse für die

Degradation der DNA verantwortlich, so dass davon auszugehen ist, dass die in geringen Mengen in telogenen Haaren enthaltene DNA in einem Größenbereich von kaum mehr als 110 bp für eine effiziente Amplifikation nicht ausreichend ist [6, 20 36].

Darüber hinaus wird in der Literatur immer wieder das Melanin als PCR-Inhibitor diskutiert [4, 19, 36, 39]. Als logische Konsequenz daraus geht hervor, dass bei dunklen Haaren besonders schlechte Typisierungserfolge zu erwarten wären. Diese Hypothese ist nicht mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbar. So konnte bei schwarzen Haaren eine durchschnittlich doppelt so hohe Allel-Ausbeute wie bei den blonden und roten Haaren und immerhin eine 1,5-fach höhere Allel-Ausbeute als bei braunen Haaren erzielt werden (vgl. 4.7). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen bieten die mittlerweile stabilen und Inhibitor-resistenten Amplifikationskits, sodass das Melanin als PCR-Inhibitor möglicherweise keine allzu große Rolle mehr spielt.

5.6 Mögliche morphologische Lokalisation der degradierten DNA-Reste im Haar

Die komplexen Zellkeratinisierungsvorgänge und der damit verbundene Verbleib der DNA im Haar sind in der Literatur relativ wenig beschrieben. Es gilt die allgemeine Meinung, dass die Nukleinsäuren der Zellen während dieses Prozesses zu Grunde gehen [51]. Mc NEVIN et al. [35] konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass eine Extraktion einer telogenen Haarwurzel nicht erfolgreicher ist als die eines telogenen Haarschaftes. Sie schlussfolgern daraus, dass die telogene Haarwurzel im gleichen Maß keratinisiert wie der Haarschaft und die Wurzel somit nicht mehr DNA enthält wie es bis dahin allgemeine Lehrmeinung war.

Im Rahmen der Etablierung einer Screeningmethode in Form einer Fluoreszenzfärbung mittels DAPI konnte diese Erkenntnis nicht bestätigt werden. Nukleinsäurehaltige Strukturen konnten, wenn überhaupt, nur im Wurzelbereich nachgewiesen werden. DNA im Bereich des Schaftes konnte in keinem Fall dargestellt werden. Darüber hinaus wurde, wie unter 4.4.2 beschrieben, mittels direkter Amplifikation der Vergleich zwischen der Untersuchung von telogenen Wurzeln und telogenen Schäften untersucht. Im Schnitt wurden von 203 Allelen 5 Allele durch eine Untersuchung des Schaftes richtig typisiert, während sich bei der Untersuchung der telogenen Wurzel immerhin 35 von 203 Allelen darstellen ließen (vgl. Tab. 4.4.2.1 und 4.4.2.2). Um eine valide Aussage über die

morphologische Lokalisation der DNA im telogenen Haar treffen zu können, wären weitere Untersuchungen, vor allem histologischer Art, notwendig gewesen. Dies war jedoch nicht Ziel der vorliegenden Arbeit.

Eine alternative Untersuchung der telogenen Haare bietet die mtDNA-Analytik. Der große Vorteil der mtDNA ist, dass sie im Vergleich zur chromosomalen DNA in hundert- bis tausendfacher Kopie vorliegt und damit einen quantitativen Vorteil gegenüber dem diploiden Satz der chromosomalen DNA bietet, der in lediglich zwei verschiedenen Kopien vorliegt. Andererseits lässt eine mtDNA-Analytik nur eine schlechtere Diskrimination gegenüber der nukleären DNA-Typisierung zu. Ein weiterer Nachteil der mtDNA-Analytik ist, dass weibliche Verwandte nicht klar voneinander zu unterscheiden, bzw. auszuschließen sind. Das heißt, eine weibliche Linie kann durchaus bestimmt werden, eine weibliche Einzelperson zu identifizieren ist aber nicht möglich. Ob eine mtDNA-Analytik sinnvoll ist, sollte individuell und fallabhängig entschieden werden.

Eine mtDNA-Sequenzierung des keratinisierten Materials *telogene Haare* stellt also in einigen Fällen durchaus eine Alternative zur nukleären DNA-Typisierung dar, ist jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem telogenen Haar als forensische Spur. Ziel dieser Arbeit war es, eine geeignete Untersuchungsmethodik zu ermitteln und damit eine erfolgreiche Typisierung zu sichern. Darüber hinaus wurde im Rahmen einer initialen Screeninguntersuchung versucht, eine möglichst verlässliche Aussage über den Typisierungserfolg eines einzelnen telogenen Haars zu geben.

Insgesamt wurden 257 telogene Haare von sechs Probanden mittels DAPI (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan) fluoreszenzgefärbt, mikroskopiert, extrahiert, amplifiziert und anschließend typisiert.

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet an die A-T-reichen Regionen doppelsträngiger DNA. Eine Anregung mit ultraviolettem Licht lässt den Farbstoff in sichtbarem Blau fluoreszieren und markiert somit DNA-haltige Bereiche. Die Untersuchungen der fluoreszenzgefärbten, telogenen Haare ergaben eine Korrelation zwischen der Menge der sichtbaren Zellkerne und dem Typisierungserfolg. Entgegen der Erwartungen konnte, wenn auch nur zu 3,5%, aus DAPI-negativen Haaren ein volles DNA-Profil detektiert werden. Dies hat zur Konsequenz, dass ein DAPI-negatives Haar in einem forensischen Spurenfall ein durchaus verwertbares Ergebnis erzielen kann und nicht im Vorfeld der Untersuchungen ausgeschlossen werden sollte. In Spurenfällen mit mehreren Haaren kann über die DAPI-Screeningmethode das Haar mit der besten Typisierungsprognose gewählt werden.

Es wurden sieben unterschiedliche Extraktionsmethoden verglichen und im Rahmen dessen die erfolgversprechendste Methode optimiert. Der originäre, chinesische Lysepuffer setzt sich aus einer optimalen Kombination und Konzentration folgender Einzelkomponenten zusammen: 10mmol (Tris)-HCl (Tris(hydroxymethyl)aminomethan) (pH 8,0), 2mmol EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) (pH 8,0), 0,2mol NaCl und 200µg/ml Proteinase K.

Dem Ansatz wurde hoc loco das nicht-ionische Tensid Triton X-100 in einer 3%-igen Konzentration zugefügt. Durch mehrere Versuchsreihen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede durch den Zusatz des Oberflächentensids, noch durch eine Verlängerung der originären 30-minütigen Inkubationszeit. Im Durchschnitt wurden in den Experimenten rund um die Li-Untersuchungsreihe 5,7 Allele erfolgreich typisiert. Im

Vergleich zu den drei Extraktionsmethoden (Chelex-100 nach Walsh et al., direkte PCR des kompletten Haares, bzw. des reinen Schafts nach Ottens et al. und des QIASymphony® mit “DNA Investigator”-Kit) konnten signifikant bessere Ergebnisse erzielt werden. Diese Signifikanz muss jedoch im Verhältnis zu den noch schlechteren DNA-Ausbeuten dieser drei Extraktionsmethoden relativiert werden.

Es ist allgemein bekannt, dass ein telogenes Haar als forensische Spur einen äußerst diffizilen Spureträger darstellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen dies. Die Optimierung und Weiterentwicklung eines erfolgversprechenden Lysepuffers lässt auf eine zukünftig erfolgreichere Typisierung und dementsprechend bessere Verwertbarkeit der forensischen Spur *telogenes Haar* hoffen.

Da bis dato die Keratinisierungsprozesse im Haar und der damit verbundene Verbleib der Zellkerne bzw. der Degradation der DNA nur wenig erforscht sind, sollten sich zukünftige Untersuchungen unter anderem auch diesem Thema widmen, um die erfolgreiche STR-Typisierung der degradierten Minimalspuren weiter zu verbessern.

Darüber hinaus birgt die Weiterentwicklung der Sequenzer in Bezug auf die Optimierung und Erweiterung ihrer Farbkanäle und die daraus resultierende Möglichkeit auch kürzere STRs zu detektieren, eine große Chance die Wertigkeit des *telogenen Haars* als forensische Spur weiter zu steigern.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. AVWIORO. "Histological Uses of Haematoxylin - A Review." *JPCS* 2011: 24-34.
2. AYMARD, J.P. "Karl Landsteiner (1868-1943) and the discovery of blood groups." *Transfus Clin Biol* 19 2012: 244-248.
3. BADEN, H.P., MADERSON, P.F.A. "The occurrence and evolution of fibrous proteins in the amniote epidermis." *Am. Zool.* 8 1968: 813.
4. BAKER, L.E., MC CORMICK, W.F., MATTESON, K.J. "A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth." *J Forensic Sci* Jan 2001: 126-130.
5. BALTHAZARD, V., LAMBERT, M. *Le poil de l'homme et des animaux*. Paris: Steinheil, 1910.
6. BÄR, W., BRINKMANN, B., BUDOWLE, B., CARRACEDO, A., GILL, P., LINCOLN, P., MAYR, W., OLAISEN, B. "DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. International Society for Forensic Haemogenetics." *Int J Legal Med* 1997: 175-176.
7. BARR, M.C., BERTRA, E.G. "A morphological distinction between neurones of the male and female, and the behavior of the nuclear satellite during accelerated nucleoprotein synthesis." *Nature* 166 1949: 676-677.
8. BISBING, R. E. "The forensic identification and association of human hair." *Forensic Handbook*. Eaglewood Cliffs: Prentice Hall Inc., 1982. 184-221.
9. BLACKIE, R., TAYLOR, D., LINACRE, A. "DNA profiles from clothing fibres using direct PCR." *Forensic Sci Med Pathol.* 12 2013: 331-335.
10. BOURGUIGNON, L., HOSTE, B., BOONEN, T., VITS, K., HUBRECHT, F. "A fluorescent microscopy-screening test for efficient STR-typing of telogen hair roots." *Forensic Sci Int Genet* 3 2008: 27-31.
11. BRINKMANN, B., LEMKE, J., LENGFELD R. "Reliability of ABO blood group determinations from hair." *Arch Kriminol* Nov-Dec 1979: 167-171.

12. BROOKS, E., CULLEN, M., SZTYDNA, T., WALSH, S.J. "Nuclear staining of telogen hair roots contributes to successful forensic nDNA analysis." *Aust J Forensic Sci* 42 2010: 115-122.
13. BUTLER, J.M., SHEN, Y., MC CORD, B.R. "The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA." *J Forensic Sci* 2003: 1054-1064.
14. CÉSARINI, J.-P. "Haarmelanin und Haarfarbe." in: ORFANOS, C.E. *Haar und Haarkrankheiten*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1979. 137-164.
15. CHAMBERLAIN, J.S. "Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification." *Nucleic Acids Res.* 9 1988: 11141-11156.
16. CHAPMAN, R.E., DOWNES, A.M., WILSON, P.A. "Migration and keratinization of cells in wool follicles." *Aust J Biol Sci* Oct 1980: 587-603.
17. FORSLIND, B. "Die wachsende Anagenphase." ORFANOS, C.E. *Haar und Haarkrankheiten*. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1979. 51-74.
18. GERTLER, A., NAGAI, T. "Nachweis von Esterase D (EsD) und Glyoxalase I (GLO) an menschlichen Haarwurzeln mittels Agarosegel-Dünnschichtelektrophorese." *Z. Rechtsmed.* 90 1983: 15-18.
19. GIAMBERNARDI, T.A., RODECK, U., KLEBE, R.J. "Bovine serum albumin reverses inhibition of RT-PCR by melanin." *Biotechniques*. Oct 1998: 564-566.
20. HELLMANN, A., ROHLEDER, U., SCHMITTER, H., WITTIG, M. "STR typing of human telogen hairs - a new approach." *Int J Legal Med* 114 2001: 269-273.
21. HIGUCHI, R., VON BEROLDINGEN, C.H., SENSABAUGH, G.F., ERLICH, H.A. "DNA typing from single hairs." *Nature* 332 1988: 543-546.
22. HUKKELHOVEN, M.W, VROMANS, E., MARKSLAG, A.M., VERMORKEN, A.J. "A simple fluorometric microassay for DNA in hair follicles or fractions of hair follicles." *Anticancer Res.* 1 1981: 341-344.
23. JANNING, W., KNUST, E. "Molekulare Humangenetik." *Genetik. Allgemeine Genetik - Molekulare Genetik - Entwicklungsgenetik*. Stuttgart: Thieme, 2008. 300-340.

24. JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L. "Hypervariable "minisatellite" regions in human DNA." *Nature* 31 1985: 67-73.
25. JEFFREYS, A.J., WILSON, V., THEIN, S.L. "Individual specific "fingerprints" of human DNA." *Nature* 316 1985: 76-79.
26. KALBE, J., KUROPKA, R., MEYER-STORK, L.S., SAUTER, S.L., LOSS, P., HENCO, K., RIESNER, D., HÖCKER, H., BERNDT, H. "Isolation and characterization of high-molecular mass DNA from hair shafts." *Biol Chem Hoppe Seyler* May 1988: 413-416.
27. KÖHLER, A. "Ein neues Beleuchtungsverfahren für mikrophotographische Zwecke." *Z. wiss. Mikrosk.* 10 1893: 433-440.
28. LASSAIGNE, J.L. "De l'examen physique des poils et des cheveux." *Annales d'hygiene publique* 8. Paris: Baillière et Fils, 1857. 226.
29. LEPEZ, T., VANDEWOESTYNE, M, VAN HOOFFSTAT, D., DEFORCE, D. "Fast nuclear staining of hair roots as a screening method for successful STR analysis in forensics." *Forensic Sci Int Genet* 13 2014: 191-194.
30. LI, H., XU, H., ZHAO, C., SULAIMAN, Y., WU, C. "A PCR amplification without DNA extraction." *Electrophoresis* 32 2011: 394-397.
31. LÜLLMANN-RAUCH, R. "Histologie." Stuttgart: Thieme, 2009. 536-541.
32. LÜLLMANN-RAUCH, R. "Methoden." *Histologie.* Stuttgart: Thieme, 2009. 599-604.
33. MADEA, B., BRINKMANN, B. "Forensische Spurenkunde." MADEA, B., BRINKMANN, B. *Handbuch der gerichtlichen Medizin.* Berlin: Springer, 2003. 1003-1106.
34. MADEA, B., MUßHOFF, F. "Haaranalytik, Technik und Interpretation in Medizin und Recht." Köln: Deutscher Ärzte-Verlag GmbH, 2004. 37.
35. MC NEVIN, D., WILSON-WILDE, L., ROBERTSON, J., KYD, J., LENNARD, C. "Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair. Part 2. An optimised genomic DNA extraction procedure reveals donor dependence of STR profiles." *Forensic Sci Int* 153 2005: 247-259.
36. MC NEVIN, D., WILSON-WILDE, L., ROBERTSONS, J., KYD, J., LENNARD, C. "Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair. Part

1. Review of current status and knowledge gaps." *Forensic Sci Int.* 153 2005: 237-246.
37. NAGAMORI, H. "Sex determination from plucked hairs without epithelial root sheath." *Forensic Sci Int.* 12 1978: 167-173.
38. NISHI, K., ANNUSS, B., RAND, S., BRINKMANN, B. "ABO blood grouping of hairs using an avidin-biotin-peroxidase complex technique." *Z Rechtsmed* 102(4) 1989: 247-254.
39. NOZAWA, H., YAMAMOTO, T., UCHICHI, R., YOSHIMOTO, T., TAMAKI, K., HAYASHI, K., KATSUMATA, Y. "Purification of nuclear DNA from single hair shafts for DNA analysis in forensic sciences." *Leg Med (Tokyo)* Apr 1999: 61-67.
40. OEPEN, I. "Biologische (menschliche) Spuren." FORSTER, B. *Praxis der Rechtsmedizin.* Stuttgart: Thieme, 1986. 258-272.
41. OESTERLEN, O. *Das menschliche Haar und seine gerichtsärztliche Bedeutung.* Tübingen, 1874.
42. ORFANOS, C., RUSKA, H. "Die Keratine der Haut und des Haares." *Hautarzt* 21 1970: 343-351.
43. OTTENS, R., TAYLOR, D., LINACRE, A. "Successful direct amplification of nuclear markers from a single hair follicle." *Forensic Sci Med Pathol.* 9 2013: 238-243.
44. OYA, M., ITO, H., KIDO, A., SUZUKI, O., KATSUMATA, Y., YADA, S. "Phosphoglucomutase 1 (PGM1) and 6-Phosphogluconat-Dehydrase (PGD) types in human hairbulb." *Forens. Sci.* 11 1978: 135-138.
45. PARAKKAL, P.F. "Katagen- und Telogenphase." ORFANOS, C.E. *Haar und Haarkrankheiten.* Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1979. 78-92.
46. PFAFF, E.R. *Das menschliche Haar in seiner physiologischen, pathologischen und forensischen Bedeutung.* Leipzig: Wigand, 1869.
47. RASSOW, J., HAUSER, K., NETZKER, R., DEUTZMANN, R. "Molekulare Genetik." *Duale Reihe, Biochemie.* Stuttgart: Thieme, 2006. 412-509.
48. ROTH, S.I. "The cytology of the murine resting (telogen) hair follicle." Sydney: Angus Robertson, 1968. 233-250.

49. SAIKI R.K., SCHARF, S., FALOONA, F.A., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A., ARNHEIM, N. "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anaemia." *Science* 230 1985: 1350-1354.
50. SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A. "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* 239 1988: 487-491.
51. SCHWARZ, E. "Untersuchungen zum Schicksal der aus Nukleinsäuren beim Zellabbau während der epidermalen Keratinisation freier Purine." *Arch Klin Exp Derm* 216 1963: 427-445.
52. SCHWINGER, E. *Bedeutung und gerichtsmedizinische Anwendung der DNS Fluorochromierung von Chromosomen und Zellkernen*. Lübeck: Schmidt-Römhild, 1975.
53. SCHWINGER, E., TRÖGER, H. "Wie sicher ist die Geschlechtsbestimmung in Blutspuren?" *Beitr. gerichtl. Med* 1977: 267-271.
54. SPRECHER, C. "The PowerPlex®ESX and ESI Systems: Meeting the New European Standard." *Promega Corporation* (2009).
55. SUZUKI, H., FUKUYAMA, K., EPSTEIN, W.L. "Changes in nuclear DNA and RNA during epidermal keratinization." *Cell Tissue Res* Oct 1977: 155-167.
56. SWAN, G.A. "Some studies on the formation and structure of melanin." *Rend. Accad. Sci. Fis. Mat. (Soc. Naz. Sci. Napoli)* 1964: 1-17.
57. TAYLOR and A. S. *The principles and practice of medical jurisprudence*. Philadelphia: Henry C. Lea, 1873.
58. TWIBELL, J., WHITEHEAD, P.H. "Enzyme typing of human hair roots." *J Forensic Sci.* 23 1978: 356-360.
59. VON BEROLDINGEN, C.H., ROBY, R.K., SENSABAUGH, G.F., WALSH, S. "DNA in hair." *Proceedings of the International Symposium of the Forensic Aspects of DNA Analysis*. Quantico: FBI Academy, 1989. 265-266.

60. WALDEYER, W. *Atlas der menschlichen und tierischen Haare sowie der ähnlichen Fasergebilde, Für Bedürfnisse der Staatsarzneikunde, des Handels, der Technik und der Landwirtschaft.* Lahr: Schauenburg, 1884.
61. WALSH, P.S., MATZGER, D.A., HIGUCHI, R. "Chelex as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material." *Biotechniques* 19 1991: 506-513.
62. WILSON, M.R., DIZINNO, J.A., POLANESKY, D., REPLOGLE, J. "Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic case work analysis." *Int J Legal Med.* 108 1995: 68-75.
63. WILSON, M.R., DIZONNO, J.A., POLANSKEY, D., REPLOGLE, J., BUDOWLE, B. "Validation of mitochondrial DNA sequencing for forensic casework analysis." *Int J Legal Med* 1995: 68-74.
64. YADA, S., OKANE, M., SANO, Y.: "Blood grouping of a single human hair by means of elution technique." *Act Crim Japon* 32 1966: 7.

8. ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaCl_2	Calciumchlorid
Cu^{2+}	Kupferion
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	et alii
Fe^{2+}	Ferrum (Eisen)
g	G-Zahl
ggfs.	gegebenenfalls
HiDi-Formamid	reines Formamid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

H ₂ O	Dihydrogenmonoxid (Wasser)
inkl.	inklusive
kbp	Kilobasenpaare
ker ni	keratinisierter, warzenförmiger Fortsatz (keratinised nipple)
M.	Musculus
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minute
μ	mikro
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mol/l	mol pro Liter
mRNA	<i>messenger Ribonucleinacid</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NMWL	Nominal Molecular Weight Limit
o. g.	oben genannten
o.ä.	oder ähnliches
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PP	Polypropylen
Pro K	Proteinase K
rfu	<i>relative fluorescence units</i>
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

s.	siehe
sec	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
STR	<i>short tandem repeat</i>
T	Thymin
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethan-Hydrochlorid
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
vgl.	vergleiche
VNTR	<i>variable number of tandem repeats</i>
\bar{x}	arithmetisches Mittel
z.B.	zum Beispiel

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.2.1	histologischer Aufbau des Haares, Haarfollikel (Längsschnitt).....	5 -
Abb. 1.2.3	Wachstumsphasen des Haares.....	7 -
Abb. 3.5	Schematische Darstellung der fluorochromierten PCR-Produkte (Power Plex ESX-17 Kit).....	34 -
Abb. 4.1.1a	A.D., blond.....	37 -
Abb. 4.1.1b	E.K., rot.....	37 -
Abb. 4.1.1c	G.E., blond.....	37 -
Abb. 4.1.1d	J.B., blond.....	37 -
Abb. 4.1.1e	R.R., schwarz.....	37 -
Abb. 4.1.1f	T.M., braun.....	37 -
Abb. 4.1.1g	S.G., braun.....	37 -
Abb. 4.2a	HE-Färbung, 40X, telogene Wurzel mit nukleinsäurehaltigen Substanzen.....	39 -
Abb. 4.2b	DAPI-Färbung, 40X, telogene Wurzel mit nukleinsäurehaltigen Substanzen.....	39 -
Abb. 4.2.1-3	DAPI-Färbung, 40X beispielhafte Vertreter der einzelnen DAPI-Kategorien.....	40 -
Abb. 4.2.4-5	DAPI-Färbung, 40X beispielhafte Vertreter der einzelnen DAPI-Kategorien.....	41 -
Abb. 4.4.6a	beispielhaftes Elektropherogramm eines kompletten DNA-Profiles eines telogenen Haares.....	50 -
Abb. 4.4.6b	beispielhaftes Elektropherogramm eines partiellen DNA-Profiles eines telogenen Haares.....	51 -
Abb. 4.4.6c	beispielhaftes Elektropherogramm einer Positiv Kontrolle eines anagenen Haares.....	52 -
Abb. 4.5	Durchschnittlich erfolgreich typisierte Allele der einzelnen Extraktionsmethoden.....	53 -
Abb. 4.6.1	Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels Chelex-100-Methode im Verhältnis zu gezählten Zellkernen.....	55 -

Abb. 4.6.2	Durchschnittlich erzielte Allelanzahl mittels Direkt PCR im Verhältnis zu gezählten Zellkernen.....	- 55 -
Abb. 4.6.4	Durchschnittlich erzielte Allelanzahl mittels QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit im Verhältnis zu gezählten Zellkernen.....	- 56 -
Abb. 4.6.6	Durchschnittlich erzielte Allelanzahl mittels Li-Puffers im Verhältnis zu gezählten Zellkernen.....	- 57 -
Abb. 4.6.6.1	Durchschnittlich erzielte Allelanzahl mittels Li-Puffers, 5-minütige Inkubation im Verhältnis zu gezählten Zellkernen.....	- 58 -
Abb. 4.6.6.2	Durchschnittlich erzielte Allelanzahl mittels Li-Puffers, 6-stündige Inkubation im Verhältnis zu gezählten Zellkernen.....	- 58 -
Abb. 4.6.6.3	Durchschnittlich erzielte Allelanzahl mittels Li-Puffers, 15-stündige Inkubation im Verhältnis zu gezählten Zellkernen.....	- 59 -
Abb. 4.6.6.4	Durchschnittlich erzielte Allelanzahl mittels Li-Puffers, + Triton, 30-minütige Inkubation im Verhältnis zu gezählten Zellkernen.....	- 59 -
Abb. 4.6.6.5	Durchschnittlich erzielte Allelanzahl mittels Li-Puffers, + Triton, 15-stündige Inkubation im Verhältnis zu gezählten Zellkernen.....	- 60 -
Abb. 4.6	Übersicht der durchschnittlich erfolgreich typisierten Allele aller Extraktionsmethoden im Verhältnis zu den im Vorfeld mit DAPI-Färbung gezählter Zellkerne.....	- 61 -
Abb. 4.7	Korrelation Haarfarbe und durchschnittliche Allel-Anzahl.....	- 62 -

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1.2	Durchschnittliche Haarlänge der untersuchten Probanden.....	38 -
Tab. 4.2	Verteilung der unter DAPI-Färbung sichtbaren Zellkerne aller 257 untersuchten Haare.....	41 -
Tab. 4.3a	Typisierung der Vergleichsspeichelproben mittels ESX-17.....	42 -
Tab. 4.3b	Typisierung der Vergleichsspeichelproben mittels ESX-17.....	42 -
Tab. 4.3c	Typisierung der Vergleichsspeichelproben mittels ESX-17.....	43 -
Tab. 4.4.1	Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Chelex-100-Methode.....	44 -
Tab. 4.4.2.1	Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Direkt PCR, komplettes Haar.....	44 -
Tab. 4.4.2.2	Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Direkt PCR, Schaft.....	45 -
Tab. 4.4.2.3	Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Direkt PCR, Wurzel.....	45 -
Tab. 4.4.5	Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels QIASymphony® mit „DNA Investigator“-Kit.....	46 -
Tab. 4.4.6	Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Li-Puffer.....	46 -
Tab. 4.4.6.1	Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Li-Puffer, 5-minütige Inkubation.....	47 -
Tab. 4.4.6.2	Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Li-Puffer, 6-stündige Inkubation.....	47 -
Tab. 4.4.6.3	Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Li-Puffer, 15-stündige Inkubation.....	48 -
Tab. 4.4.6.4	Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Li-Puffer unter Zugabe von Triton, 30-minütige Inkubation.....	48 -
	-	
Tab. 4.4.6.5	Durchschnittlich erzielte Allelzahl pro Proband mittels Li-Puffer unter Zugabe von Triton, 15-stündige Inkubation.....	49 -

Tab. 4.5	Signifikanz der modifizierten Methode (+3% Triton, Inkubationszeit 15 Stunden) im Vergleich zu den anderen angewandten Extraktionsmethoden.....	- 54 -
Tab. 4.6.3	Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels modifizierter TNCa-Methode nach Hellmann et al. im Verhältnis zu gezählten Zellkernen.....	- 56 -
Tab. 4.6.5	Durchschnittlich erzielte Allelzahl mittels der Machery-Nagel®-Aufbereitungsmethoden im Verhältnis zu gezählten Zellkernen.....	- 57 -