

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Rudolf Wegener

Vergleichende Untersuchung zur Extrahierbarkeit von DNA aus gelagerten humanen
Knochenproben

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Susanne Schuppan, geb. am 13. Januar 1980 in Weißwasser
aus Großbettlingen

Rostock, 7. Juli 2008

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Rudolf Wegener, Universität Rostock, Institut für Rechtsmedizin
2. Gutachter: PD Dr. med. Christoph Meißner, Universität Kiel, Institut für Rechtsmedizin
3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Reinhard Szibor, Universität Magdeburg, Institut für Rechtsmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2008

1	Abkürzungsverzeichnis.....	8
2	Einleitung	10
2.1	Vorbemerkungen	10
2.2	Die Zusammensetzung der Knochenmatrix	11
2.3	Die Extraktion	12
2.4	Die Polymerase-Kettenreaktion	13
2.5	Die Real Time PCR.....	14
2.6	Die Flächengelelektrophorese	18
2.7	Die Kapillarelektrophorese.....	18
2.8	Die Fragmentlängenanalyse der nukleären DNA anhand von STR.....	18
2.9	Die Sequenzierung der mitochondrialen DNA anhand der HV 1 Region.....	21
2.10	Ancient DNA.....	22
3	Fragestellung.....	23
4	Material	24
4.1	Knochenproben	24
4.2	Reagenzien	26
4.2.1	Kits zur DNA-Extraktion.....	26
4.2.2	Kit zur RTQ-PCR	26
4.2.3	Kit zur FLA	26
4.2.4	Kit zur Sequenzierung	26
4.2.5	weitere Reagenzien.....	26
4.3	Geräte	27

4.4	Verbrauchsmaterialien.....	28
4.5	Software.....	28
5	Methoden und Durchführung	29
5.1	Vorbemerkungen	29
5.2	Die Vorbereitung des Probenmaterials.....	30
5.2.1	Zuschneiden und Reinigen der Proben.....	30
5.2.2	Entkalkung der Proben	30
5.3	Die DNA-Extraktion	30
5.3.1	GEN-IAL, First DNA All-tissue DNA-Kit	31
5.3.2	QIAGEN, QIAamp DNA Mini Kit	31
5.3.3	Q·BIOgene, BIO 101 Systems, GENE CLEAN Kit for Ancient DNA.....	31
5.3.4	Promega, DNA IQ System, Tissue and Hair Extraction Kit	31
5.3.5	Organische Extraktion mit Phenol-Chloroform	31
5.3.6	MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin DNA Trace	32
5.4	Die Quantifizierung der DNA	33
5.5	Die DNA-Analysen	33
5.5.1	FLA-Analyse der STR.....	33
5.5.2	mtDNA-Sequenzierung	35
6	Ergebnisse	38
6.1	Zur Entkalkung.....	38
6.2	Zu den Scorekriterien der FLA	38
6.3	Zur ersten FLA	41
6.4	Zur RTQ-PCR	42

6.5	Zur zweiten FLA	46
6.6	Zur Sequenzierung	49
6.6.1	Flächengel.....	49
6.6.2	Sequenzierung	52
7	Diskussion.....	53
7.1	Vorbemerkungen	53
7.2	Zum Einfluss der Extraktionsmethoden auf die Ergebnisse	53
7.3	Zum Zustand des Ausgangsmaterials.....	55
7.3.1	Zustand des Knochens	55
7.3.2	Zustand der DNA.....	58
7.3.3	Inhibition und Kontamination	59
7.4	Zum Vorgehen mit den Knochenproben	59
7.4.1	Vorbehandlung	59
7.4.2	Extraktionsmethoden	60
7.4.2.1	Phenol-Chloroform	60
7.4.2.2	Silikate	61
7.4.2.3	GEN-IAL	62
7.4.2.4	Paramagnetische Partikel.....	62
7.4.3	Kits und Automatisierung gegenüber Handarbeit	63
7.4.4	Weitere Methoden	63
7.4.5	PCR.....	64
7.4.6	RTQ-PCR	64
7.4.7	FLA der nukleären DNA	65
7.4.8	Sequenzierung der mtDNA	70
7.4.9	Authentizität der Ergebnisse und Qualitätsmanagement.....	73

8	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	75
9	Literaturverzeichnis	77
10	Anhang	I
10.1	Protokolle	I
10.1.1	GEN-IAL, First DNA All-tissue DNA-Kit	I
10.1.1.1	DNA-Präparation aus Knochen und Zähnen	I
10.1.1.2	Grundprotokolls für kleine Mengen forensischer Materialien:	I
10.1.2	Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit	II
10.1.2.1	User-Developed Protocol: Isolation of genomic DNA from compact bone	II
10.1.2.2	Tissue Protocol.....	III
10.1.3	Q·BIOgene, BIO 101 Systems, GENE CLEAN Kit for Ancient DNA.....	IV
10.1.3.1	Protokoll eines Anwenders	IV
10.1.3.2	Manual Protocol.....	V
10.1.4	Promega, DNA IQ System, Tissue and Hair Extraction Kit	VI
10.1.4.1	Modified IQ procedure, November 2001 (Split lab)	VI
10.1.5	MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin DNA Trace	VI
10.1.5.1	Support protocol for the isolation of genomic DNA from human bones	VI
10.1.6	RTQ-PCR	VIII
10.1.7	FLA der nukleären DNA	IX
10.1.7.1	Biotype, Mentye Quadruplex DAA plus	IX
10.1.8	mtDNA-Sequenzierung	X
10.1.8.1	ABI PRISM BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit	X
10.2	Ergebnisse	XII
Thesen	XIX

INHALTSVERZEICHNIS

SelbständigkeitserklärungXX

Danksagung..... XXI

1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
A	Adenin, Ampère
Abb.	Abbildung
aDNA	ancient deoxyribonucleic acid
AFDIL	Armed Forces DNA Identification Laboratory
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CRS	Cambridge Referenz Sequenz
Ct	Zyklus, in dem die Treshold Line erreicht wird
DGRM	Deutsche Gesellschaft für Rechtsmedizin
D-Loop	displacement loop
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EEO	Elektroendosmose
Ethanol abs.	Ethanol absolut
Fpl.	Fundplatz
FRET	Fluorescent Resonance Energy Transfer
FLA	Fragmentlängenanalyse
g	Gramm, Gravitation
G	Guanin
GEDNAP	German DNA Profiling Group
H ₂ O _{dest.}	destilliertes Wasser
Hi-Di	highly deionized
H-Strang	heavy, schwerer Strang
hTERT	human telomerase reverse transcriptase
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HV 1	hypervariable Region 1
IPC	interne PCR-Kontrolle
ISFG	International Society for Forensic Genetics
KFGA	Kommission zur Feststellung der Qualifikation von Abstammungsgutachtern
L-Strang	light, leichter Strang
mtDNA	mitochondriale DNA
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PH	Peakhöhe
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
POP	Performance Optimized Polymer
rfu	relative fluorescent units
RNA	ribonucleic acid
RTQ-PCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
rpm	rounds per minute
SDS	Sequence Detection System oder Sodium Dodecyl Sulfate
STR	short tandem repeat
T	Thymin
Taq	DNA-Polymerase des Bakteriums <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris HCl pH 7,4 und 1mM EDTA pH 8,0
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
w/ v	weight per volume

2 Einleitung

2.1 Vorbemerkungen

Im Jahre 1866 publizierte Johann Gregor Mendel als erster mit der Aufstellung der Vererbungsregeln eine Arbeit im Wissenschaftszweig der Genetik [1]. Weitere wichtige Erkenntnisse, die zur Identifikation einer Person anhand ihrer DNA nötig sind, lieferten die Entwicklung des PCR-Verfahrens 1983 von Kary Mullis [2] und des „fingerprinting“ 1985 von Alec Jeffreys [3]. Die DNA-Analyse wurde dann erstmals 1986 vor Gericht in Großbritannien angewendet [4]. Mittlerweile findet der „genetische Fingerabdruck“ alltägliche Anwendung in der Abstammungsbegutachtung und Kriminalistik, der Paläontologie, Archäologie, Anthropologie, der Populationsbiologie und vielen anderen Bereichen [5,6]. In der Regel liegen gut typisierbare Proben von Körperflüssigkeiten oder Gewebe vor. Knochen und Zähne in der DNA-Analytik als Hartgewebe bezeichnet kommen dann zur Anwendung, wenn eine DNA-Typisierung der Überreste von Opfern nicht möglich ist. Katastrophen mit zahlreichen Opfern, wie der Anschlag auf das World Trade Center in New York [7] und der Tsunami in Südostasien, aber auch Flugzeugabstürze und Kriegshandlungen [8,9] sind Beispiele, wo durch Feuer oder sehr schnelle Verwesung meist nur noch Hartgewebe der Opfer zurückbleiben. Hartgewebe hat den Vorteil, dass DNA vor mikrobiologischen, physikalischen und chemischen Einflüssen lange Zeit weitestgehend geschützt werden kann. So enthält Knochengewebe gegenüber Gewebe z. B. von Mumien mehr hochmolekulare DNA und weniger inhibitorische Substanzen [10]. Außerdem weist Knochengewebe einen im Vergleich zu anderen Geweben geringen Wasser- und Enzymgehalt auf [11], wodurch DNA-Schäden ebenfalls geringer sind. Die Bindung der DNA an das Hydroxylapatit des Knochens trägt zusätzlich zur Stabilität dieser bei [12,13]. Der Prozess der Degradation der DNA kann dadurch nicht aufgehalten werden. Dadurch wurde die DNA-Typisierung von Überresten prominenter Nationalsozialisten wie Josef Mengele [14] und Martin Bormann [15], von Begleitern des Revolutionärs Che Guevara [16] oder der Romanovs, der letzten Zarenfamilie Russlands [17] bis hin zu Untersuchungen an „Ötzi“, der Eismumie aus Tirol [18] möglich.

2.2 Die Zusammensetzung der Knochenmatrix

Knochen sind von außen nach innen betrachtet, aus dem Periost, der Substantia corticalis, der Substantia spongiosa und dem Cavum medullare aufgebaut. Das Periost ist eine bindegewebige Knochenhaut. Die darunter liegende Substantia corticalis ist bei Röhrenknochen kräftiger ausgebildet und wird daher auch Substantia compacta genannt. Sie stellt die dichte und tragende Hartschicht dar. Die im Inneren befindliche Substantia spongiosa ist schwammartig aus feinen Knochenbälkchen aufgebaut, in dessen Netzwerk blutbildende Zellen liegen. Diese werden im Laufe des Lebens aber durch Fettgewebe ersetzt. Die für aDNA-Untersuchungen interessanten Osteozyten sind in die Knochenmatrix eingebettet, welche sich wie folgt zusammensetzt [19-21]:

anorganische Substanz:	60 - 70 %	Mineralien: Calciumsalze z. B. Hydroxylapatitkristalle $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, Phosphat, Carbonat, Nitrat, Natrium, Magnesium, Fluor
organische Substanz:	20 - 25 %	Kollagen Typ I, Proteoglykane, Proteine z. B. Osteonectin, Osteocalcin, Sialoprotein
Wasser:	10 - 15 %	

2.3 Die Extraktion

Bevor DNA-Merkmale typisiert werden können, müssen Zellen bzw. Zellfragmente aus dem Gewebe herausgelöst werden. Die Schwierigkeit der Extraktion liegt darin, die harte Substanz und etwaige Kontaminationen zu entfernen ohne dabei die Proben-DNA in Mitleidenschaft zu ziehen. Dies kann zuerst durch eine Reinigung der Knochenoberfläche geschehen mit anschließender mechanischer Zerkleinerung des Knochens und wahlweise einer Entkalkung. Die darauf folgende Isolation der DNA umfasste ursprünglich drei Schritte.

- Im ersten Schritt erfolgt die Lyse der Zell- und Kernmembran, welche durch EDTA und SDS erfolgen kann.
- Im zweiten Schritt wird die Lösung von Proteinen befreit und Nukleasen und DNA-bindende Proteine inaktiviert. Dies wird durch das Enzym Proteinase K unterstützt. Ein Phenol-Chloroform-Gemisch lässt Proteine ausfallen.
- Ziel des letzten Schritts ist die Konzentrierung der DNA durch Präzipitation [22-24]. Heutzutage bieten viele Unternehmen Kits an, deren Grundlage die Adsorption der DNA an verschiedene Partikel ist. Nach diversen Waschgängen wird diese schließlich wieder abgelöst und eluiert.

In dieser Arbeit wurde nach verschiedenen Protokollen gearbeitet mit den davor aufgeführten zugrunde liegenden Prinzipien:

1. Aussalzung - GEN-IAL, First DNA All-tissue DNA-Kit
2. Silicamembransäule - QIAGEN, QIAamp DNA Mini Kit
3. Glasmilch - Q-BIOgene, BIO 101 Systems, GENE CLEAN Kit For Ancient DNA
4. Paramagnetische Partikel - Promega, DNA IQ System, Tissue and Hair Extraction Kit
5. Phenol-Chloroform - Organische Extraktion nach dem Protokoll des Labors
6. Silicamembransäule - MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin DNA Trace

Anschließend wurden die STR-Loci D3S1358, D8S1179, D18S51 und SE33 und der mtDNA-Abschnitt HV 1 der Extrakte untersucht.

2.4 Die Polymerase-Kettenreaktion

Bevor die DNA untersucht werden kann, muss eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt werden [2]. Sie dient dazu, bestimmte Abschnitte der DNA zu vervielfältigen. Dazu sind Primer erforderlich, die an spezifische Stellen des Template-Strangs vor der Sequenz binden, die vervielfältigt werden soll. Die Primer dienen nun einer Polymerase als Startpunkt zur Synthese des neuen Strangs aus ebenfalls zugefügten Nukleotiden. Dies läuft in den meisten Fällen in 30 Zyklen hintereinander ab, wobei ein Zyklus in drei Phasen eingeteilt werden kann. Dabei handelt es sich um die Denaturierung, das Annealing und die Elongation. Dahinter verbirgt sich das Auftrennen des DNA-Doppelstrangs, das Anlagern der Primer und die Synthese des neuen Strangs. Die gesamte PCR läuft in einem Thermocycler unter optimalen Temperaturen und entsprechender Dauer automatisch ab [25]. Häufig findet dabei die Taq-Polymerase Anwendung. Sie stammt von einem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und hat den Vorteil, dass sie bei den für die Denaturierung der DNA nötigen hohen Temperaturen nicht zerstört wird.

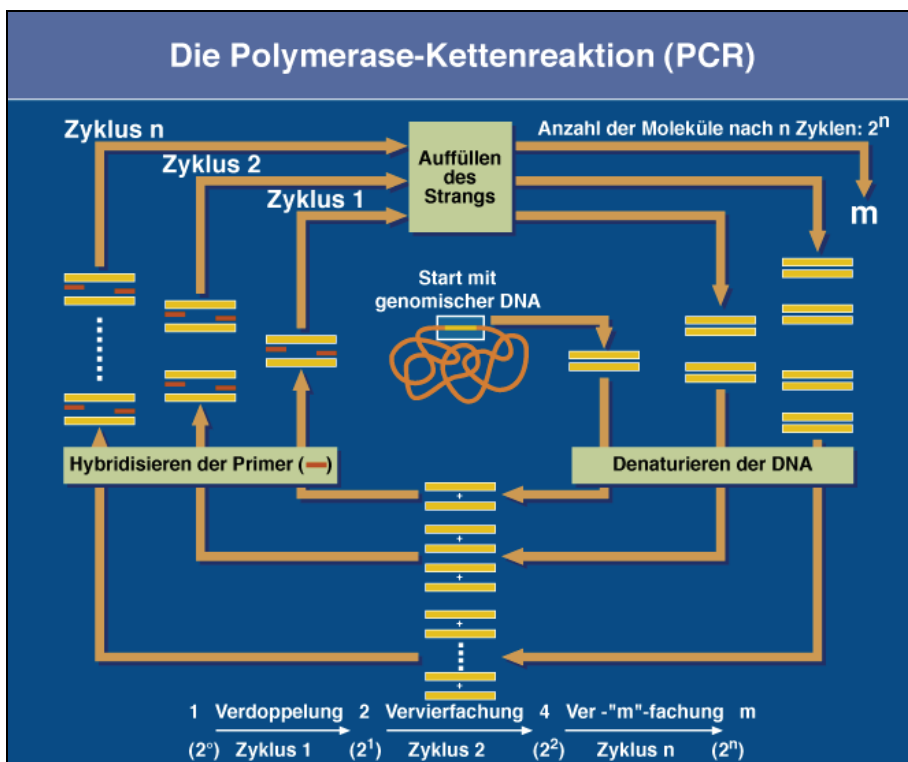


Abbildung 1: Schematischer Ablauf einer PCR [26]

2.5 Die Real Time PCR

In dieser Arbeit diente ein Sequence Detection System (SDS) - die Real Time PCR - zur Quantifizierung der extrahierten DNA. Cornel Mülhard empfiehlt die Abkürzung RTQ-PCR für Real Time quantitative PCR, um eine Abgrenzung zur rtPCR - PCR mit reverser Transkriptase - zu schaffen [27]. Eine Grundlage dieser Reaktion ist das von Livak eingeführte TaqMan-Prinzip [28]. Dem Reaktionsansatz werden dabei Sonden zugegeben, die aus einem hochenergetischen fluoreszierenden „Reporter“ und einem „Quencher“, der Licht bestimmter Wellenlänge absorbiert, bestehen. Wird diese Sonde nun durch eine Lichtquelle angeregt, wird die Emission des Reporters durch die örtliche Nähe des Quencher unterdrückt. Dieser Vorgang wird „Fluorescent Resonance Energy Transfer“ (FRET) genannt [29]. Erreicht die Polymerase die Sonde, spaltet sie aufgrund ihrer Exonucleaseaktivität den Reporter ab. Dadurch wird der Energietransfer zwischen diesen beiden gestoppt und es resultiert ein Anstieg der fluoreszierenden Emission, welche vom Sequence Detection Instrument registriert und durch Software graphisch dargestellt wird (siehe Abbildung 2).

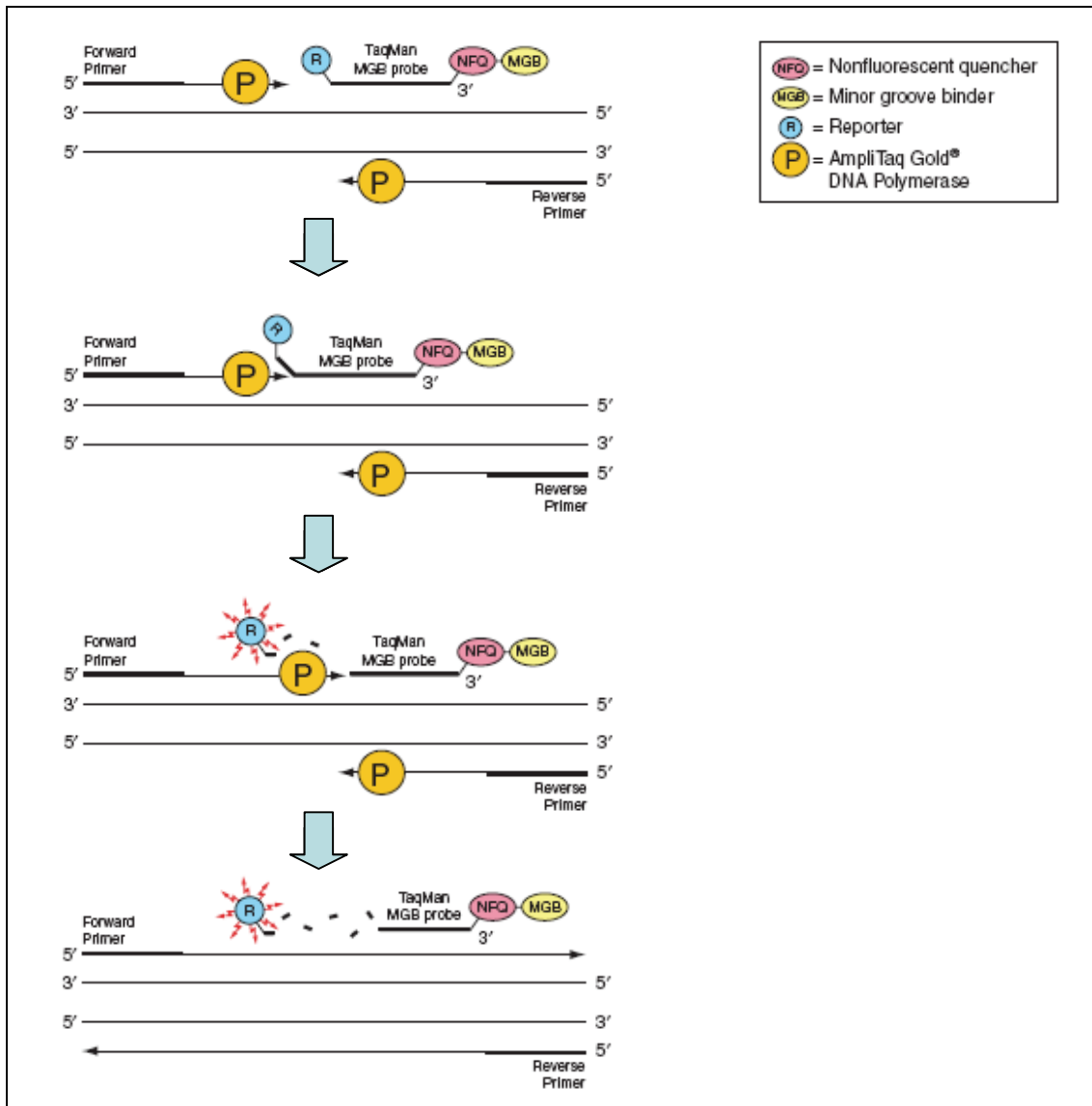


Abbildung 2: Die Nutzung des FRET in der RTQ-PCR [30]

* Von oben nach unten: Polymerisation und Binden der TaqMan MGB Sonde, Abspaltung des Reporters, Anstieg des Fluoreszenzsignals, Polymerisation des Amplicons.

Dabei werden die Signale genutzt, die während der Exponentialphase der PCR detektiert werden, da diese präziser sind als die der anderen Phasen [30]. Eine PCR läuft in der Praxis nicht rein exponentiell sondern in drei Phasen ab (siehe Abb. 4):

- Exponentialphase
- Linearphase
- Plateauphase

Während der Exponentialphase wird die Zielsequenz in jedem Zyklus verdoppelt. Anschließend folgt die Linearphase, in welcher die Reaktionen verlangsamt ablaufen, da ein oder mehrere Komponenten immer mehr aufgebraucht sind bzw. die Amplifikationsprodukte miteinander hybridisieren sowie Diphosphate und geschädigte Nucleotide die Reaktion hemmen [25,30]. Außerdem werden hier bereits einige Produkte degradiert. Schließlich erfolgt der Übergang in die Plateauphase. In dieser endet die PCR.

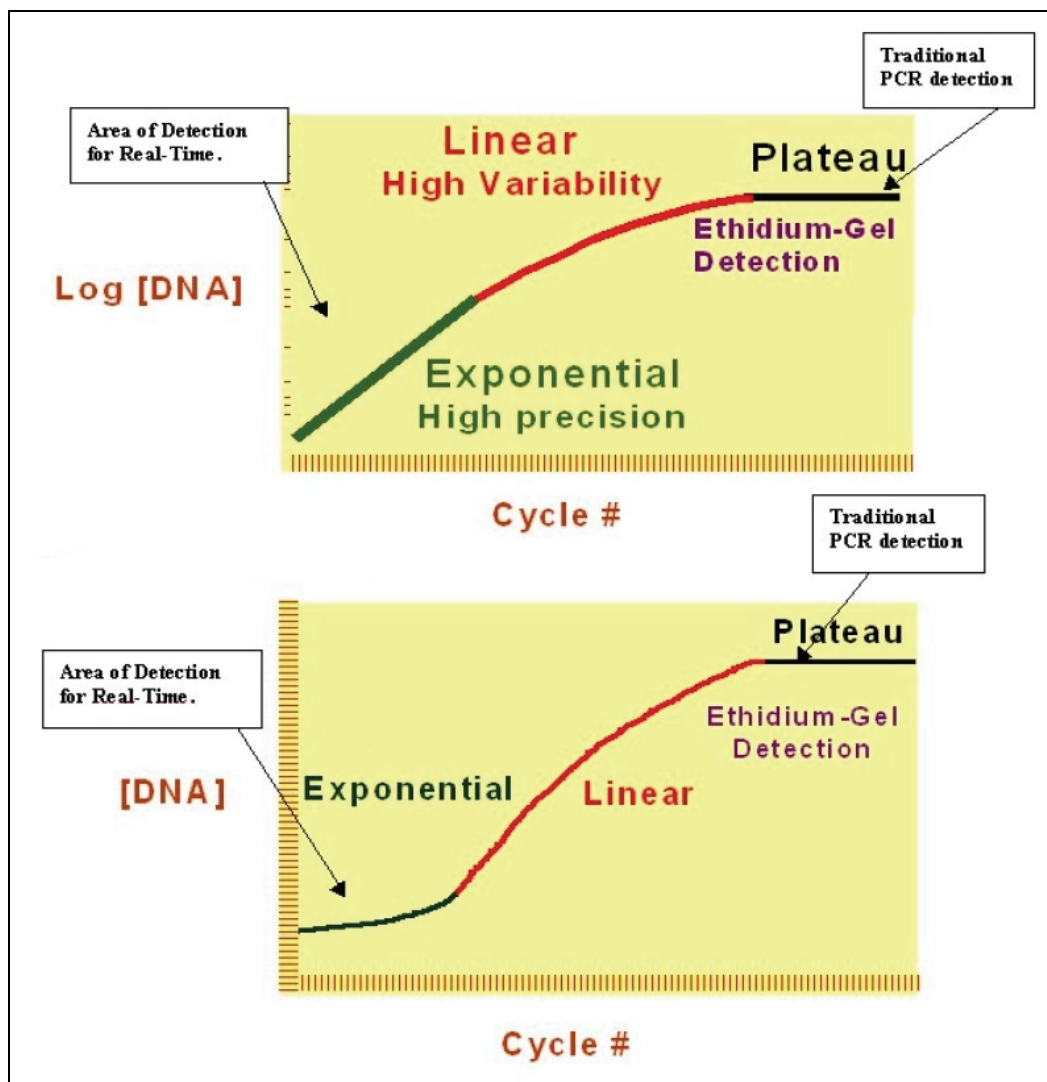


Abbildung 3: Phasen der Real Time PCR [30]

* *Abszisse:* *Zyklusanzahl der PCR*

Ordinate: *oben: DNA-Menge, logarithmische Maßeinteilung,*
 unten: DNA-Menge, lineare Maßeinteilung

Die logarithmische Einteilung ermöglicht die Darstellung der ersten Phase als Gerade und zeigt somit die gleichmäßige Potenzierung der Menge der DNA-Moleküle von Zyklus zu Zyklus.

Trägt man in einem Diagramm die Zyklusanzahl gegen die DNA-Menge auf, ergibt sich folgendes Bild:

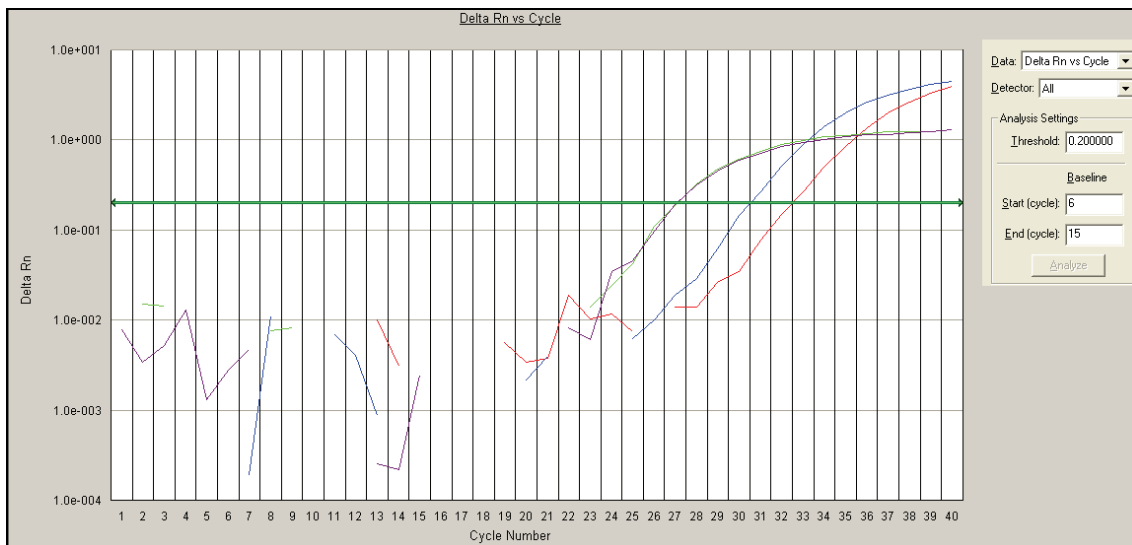


Abbildung 4: Detektion der Probe K 5

Legende:

rot	nach QIAGEN Extraktion	Abszisse	Anzahl der Zyklen
grün	dazugehörige IPC	Ordinate	Delta Rn als Maß für die Fluoreszenzstärke
blau	nach Phenol Extraktion	grüne Gerade	Treshold Line, alle darüber liegenden Signale
lila	dazugehörige IPC		heben sich vom Hintergrundrauschen ab

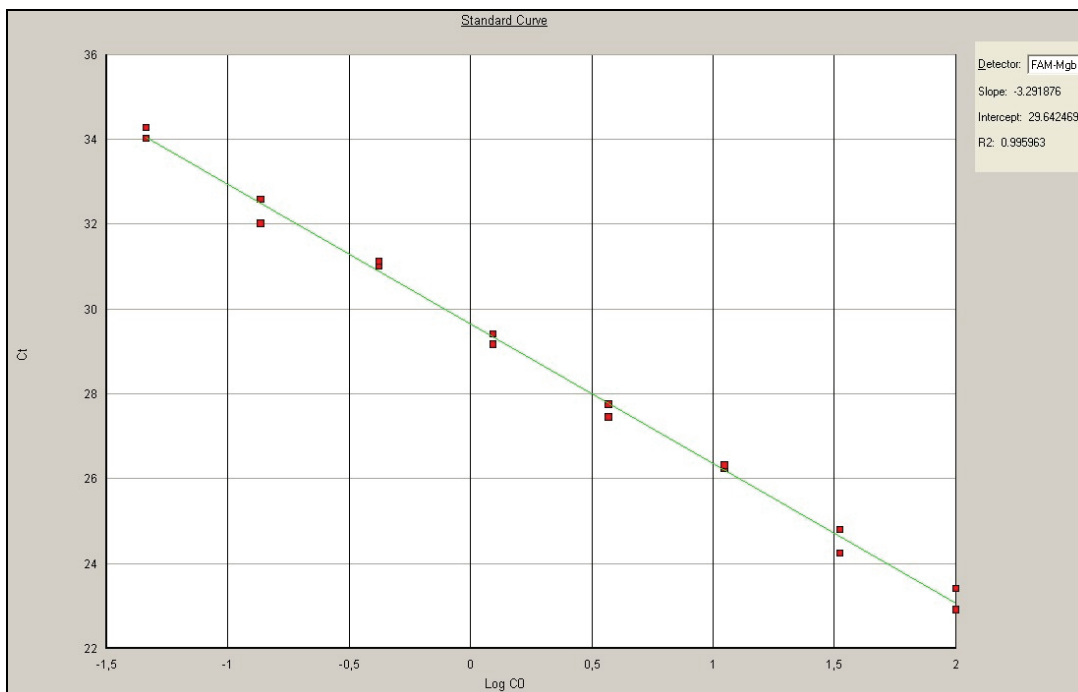


Abbildung 5: Standardkurve aus acht Verdünnungsstufen

* Abszisse: logarithmische Darstellung der anfänglichen DNA-Kopie-Menge, Ordinate: Ct - Zyklus, in dem die Treshold Line erreicht wird

2.6 Die Flächengelelektrophorese

Zum Trennen der DNA nach Molekülgröße wird die Elektrophorese genutzt. Grundprinzip der Elektrophorese ist, dass elektrisch geladene Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine poröse Matrix wandern, wobei ihre Geschwindigkeit von ihrer Molekülgröße und Struktur abhängig ist. Nukleinsäuren sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen. Entsprechend wandern sie von der Katode zur Anode. Die dafür notwendige Matrix ist typischerweise Agarose oder Acrylamid in Elektrophoresepuffer gelöst [23]. Um die Auftrennung als Banden sichtbar zu machen, wird meist ein interkalierender Farbstoff zugegeben, der in UV-Licht fluoresziert. Beispiele sind Ethidiumbromid und SYBR-Green. Die Größe der aufgetrennten Fragmente bestimmt man durch Vergleich mit Größenmarkern oder DNA-Leitern, deren DNA-Fragmentgrößen bekannt sind und die bei jeder Elektrophorese mitlaufen [25]. In dieser Arbeit wurde die Flächengelelektrophorese als Nachweis einer erfolgreichen PCR für die mtDNA genutzt. Für die Fragmentlängenanalyse der STR diente eine Kapillarelektrophorese.

2.7 Die Kapillarelektrophorese

Bei der Kapillarelektrophorese entspricht die mit einem Polymer gefüllte Kapillare der Laufstrecke einer Tasche eines Flächengels. Die zu untersuchenden DNA-Abschnitte sind durch verschiedene mit fluoreszierendem Farbstoff gebundenen Primern markiert. Diese durchlaufen der Größe nach Richtung Anode die Kapillare und werden durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Deren Wellenlänge, Signalstärke und zeitliches Auftreten werden registriert, mit einer Leiter und einem internen Längenstandard verglichen und schließlich von einer Software in einem Elektropherogramm als Peak graphisch dargestellt [31].

2.8 Die Fragmentlängenanalyse der nukleären DNA anhand von STR

Nicht-codierende Bereiche der nukleären DNA weisen u. a. sogenannte Mikrosatelliten oder STR „short tandem repeats“ auf. Dabei handelt es sich um kurze, sich mehrfach wiederholende Basenabfolgen, die über das gesamte Euchromatin verstreut sind [32]. Ihre Grundeinheit besteht aus einem bis fünf Nukleotiden, die zehn- bis einige hundertmal hintereinander liegen [32]. Die Anzahl der Wiederholungen beschreibt das Allel [33].

Die Nomenklatur erfolgt nach der „International Society for Forensic Genetics“ (ISFG).

Danach bedeutet der Locus D18S51 folgendes:

- D DNA
- 18 Chromosom 18
- S singularär, nur an dieser Stelle zu finden
- 51 Position nach der „World Health Organisation“, chronologische Nummer

Allele werden in der Literatur beschrieben als paarweise einander zugeordnete Gene auf homologen Chromosomen, die sich hinsichtlich ihrer räumlichen Anordnung und Funktion gleichen. Durch Mutation eines oder mehrerer Nucleotide geht ein Allel in ein anderes über [34,35]. Der Begriff des Allels wird bei der FLA auf nicht codierende Bereiche der DNA erweitert. Die STR werden hochkonserviert und stabil von einer Generation zur nächsten weitergegeben und codominant vererbt [32]. Für ein Individuum sind pro Locus maximal zwei verschiedene Allele, ein mütterliches und ein väterliches, möglich. Dann besteht Heterozygotie. Liegt von beiden Elternteilen jeweils das gleiche Allel vor, handelt es sich um Homozygotie. Die Analyse der Allele erfolgt mittels Kapillarelektrophorese. Die Peaks können mit Hilfe der Allel-Leiter und des internen Längenstandards einem Allel zugeordnet werden.

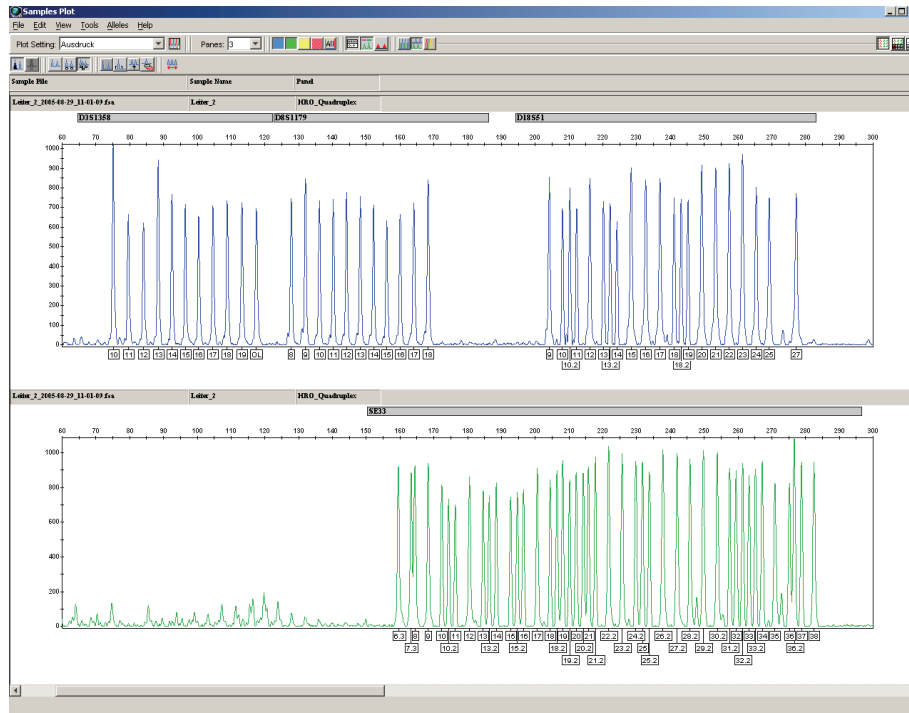


Abbildung 6: Beispiel für eine Allel-Leiter.

* Die Abszisse gibt die Allele und die Ordinate die Intensität der Peaks in rfu an.

Diese Zuordnung kann durch Artefakte erschwert werden, die vor allem bei der Analyse von degradierter und low copy number DNA auftreten. Dabei handelt es sich um Stutterbanden, Allel dropout, Locus dropout und Formabweichungen der Peaks. Sogenannte Stutterbanden sind um eine Repeateinheit kürzere Peaks, die vor dem Hauptpeak liegen und eine geringere Peakhöhe aufweisen. Sie entstehen vermutlich durch Fehler der Taq-Polymerase, wenn sie sich vorübergehend vom Template-Strang ablöst. Der Template-Strang kann nun denaturieren und Loops bilden und somit eine gewisse Anzahl der Repeateinheiten „überbrücken“, die in der anschließenden Elongation nicht mit beachtet werden. Dieser Vorgang wird „slippage“ oder „slipped-strand mispairing“ genannt [36,37]. Beim Allel dropout wird nur ein Allel detektiert, obwohl zwei vorhanden sind. Beim Locus dropout dagegen kann ein ganzer Locus größerer Allele nicht nachgewiesen werden. Beides tritt durch stochastische Effekte bei geringer Ausgangsmenge der DNA während der PCR auf bzw. bei DNA von geringer Molekülgröße [38,39]. D. h. der Zufall entscheidet, wann alle benötigten Komponenten zusammentreffen und welcher Template-Strang bzw. Allel vervielfältigt wird. Aufgrund der Potenzierung der Anzahl der Moleküle pro Zyklus können die Moleküle eines Allels

so sehr schnell eine viel höhere Konzentration erreichen als die des anderen. Formabweichungen der Peaks und solche Peaks, die keinem Allel zugeordnet werden können, entstehen durch nicht spezifisches Priming, Fehler der Taq-Polymerase und unzureichend denaturierte DNA [40,41]. Schließlich kann sich auch eine Kontamination durch Peaks in Stutterposition zeigen, die höher als typische Stutter sind oder kann durch mehr als zwei Peaks an einem Locus gekennzeichnet sein. In diesem Fall wäre auch eine Heterozygotenimbalance möglich [42].

2.9 Die Sequenzierung der mitochondrialen DNA anhand der HV 1 Region

Neben der im Zellkern befindlichen DNA existiert in den Mitochondrien ebenfalls eine DNA, die mtDNA. Das ringförmige Molekül besteht aus einem leichten L-Strang, und einem schweren H-Strang aufgrund einer asymmetrischen G/ C-Verteilung und umfasst etwa 16 569 Basenpaare [43]. Des Weiteren kann es in einen kodierenden und einen nicht kodierenden Bereich eingeteilt werden. Den größten nicht kodierenden Teil stellt die Kontrollregion, auch D-Loop genannt, dar, die sich über eine Länge von 1121 Basenpaaren erstreckt. Sie weist unter anderem drei hypervariable Regionen HV 1, HV 2 und HV 3 auf [44], deren Sequenzierung zur Personenidentifikation genutzt werden, da sie die meisten Sequenzvariationen aufweisen [43,45,46]. Die gesamte mtDNA-Sequenz wurde 1981 von Anderson veröffentlicht und nach ihm benannt [47]. Sie ist aber auch als Cambridge Reference Sequence CRS bekannt und dient als Vergleichsgrundlage und zur Nomenklatur. So besagt T16362C, dass sich an Position 16362 der durchnummerierten Basen des L-Strangs statt dem Thymin wie in der CRS die Base Cytosin befindet [43]. Die mtDNA wird rein maternal vererbt und weist eine fünf- bis zehnmal höhere Mutationsrate auf aber keine Rekombination [43]. Die Sequenzierung der mtDNA kann nach einer Methode nach Sanger erfolgen [48]. Zu einem standardmäßigen PCR-Ansatz wird nur ein Primer und zusätzlich zu den dNTP auch fluoreszenzmarkierte ddNTP gegeben. Die ddNTP werden zwar wie dNTP von der Polymerase eingebaut, da ihnen aber eine weitere Hydroxylgruppe fehlt, kommt es zu einem Kettenabbruch. Durch die überschüssige Anwesenheit der dNTP, einer kleineren Menge ddNTP und einem gleichmäßigen Verhältnis der vier Basen erhält man Fragmente, die sich jeweils nur um eine Basenlänge unterscheiden. Diese werden anschließend wieder elektrophoretisch aufgetrennt und zum Fluoreszieren angeregt. Da jede der vier Basen

mit einem anderen Farbstoff markiert ist, kann aus der Wellenlänge und dem zeitlichen Erscheinen bzw. der Fragmentlänge die jeweilige Base ermittelt werden.



Abbildung 7: Ausschnitt aus der Sequenz der Probe K 5

* Die obere Balkenreihe ist eine Zusammenfassung der darunter befindlichen Sequenzierergebnisse. Die Basenposition ist anhand der Nummerierung der oberen Balkenreihe erkennbar. Schwarze Punkte geben die Positionen an, die sich von der CRS unterscheiden. Die Software beurteilt die Qualität der Peaks durch blaue, gelbe und rote Balken.

2.10 Ancient DNA

Pääbo definiert aDNA als sämtliche DNA, die von Proben aus Museen, archäologischen Funden, Fossilien und anderen ungewöhnlichen Quellen stammen [49]. Sie ist zumeist autolytischen oder diagenetischen Prozessen oder jeglicher Art von Fixation ausgesetzt gewesen [50]. Somit ist davon auszugehen, dass diese DNA immer Degradation aufweist und in geringen Mengen vorliegt. Außerdem weist sie chemische Veränderungen auf und liegt oft mit DNA von Mikroorganismen vermischt vor. Die erste schriftliche Veröffentlichung zur Untersuchung von aDNA erschien 1984 [51].

3 Fragestellung

Diese Arbeit widmet sich der Untersuchung der DNA-Extraktion aus Hartgewebe. Dabei sollen sechs verschiedene Methoden der DNA-Isolierung auf ihre Anwendbarkeit in der forensisch-genetischen Untersuchungspraxis miteinander verglichen werden. Die nachfolgenden Schritte bis hin zur DNA-Typisierung erfolgen deshalb nach dem identischen Prozedere. Dazu soll sowohl genomische als auch mtDNA vergleichend untersucht werden. Mit der Real Time PCR sollen die Ergebnisse der DNA-Extraktion quantifiziert werden. Die Untersuchung mit ihrem grob orientierenden Charakter soll ein Einstieg in weiterführende systematische DNA-Extraktionsstudien aus Hartgewebe sein. Deshalb werden zunächst Knochenproben mit stark divergierenden Liegezeiten ausgewählt. Ziel der Untersuchung ist es letztendlich, den erfolgreichsten Ansatz herauszufinden.

4 Material

4.1 Knochenproben

Die untersuchten Knochenproben N 1, N 2 und K 1 bis K 10 wurden vom Institut für Rechtsmedizin der Universität Rostock und die Proben A 1 bis A 7 vom Archäologischen Landesmuseum, Landesamt für Bodendenkmalpflege in Schwerin zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um anonymisierte humane Knochenproben aus dem Raum Mecklenburg. Die Proben N 1 und N 2 wurden im Rahmen von gerichtlichen Obduktionen gemäß § 87 StPO entnommen. Nähere Angaben können Tabelle 1 entnommen werden.

Tabelle 1: Bezeichnung der Knochenproben und deren Eigenschaften

Bezeichnung der Proben	Liegezeit in Jahren	Fundort	Zustand	Knochenart
N 1	0		umgeben von Blut und Knochenmark	Röhrenknochen
N 2	0		umgeben von Blut und Knochenmark	Röhrenknochen
K 1	19	Schlammteich	mazeriert, fortgeschrittene Leichenveränderungen,	Humerus
K 2	19	Wohnung	unauffällig	unbekannt
K 3	unbekannt	Straßenrand, vorherige Lagerung unklar	bräunlich verfärbt, Liegezeit unklar	Schädel
K 4	6	Ostseestrand	umgeben von Wurzelwerk, Sand, tonigem Schlamm; längere Zeit im Wasser, entfettet, dunkelbraun, gelblich verfärbt	unbekannt
K 5	6	Ostseestrand	umgeben von Wurzelwerk, Sand, tonigem Schlamm; längere Zeit im Wasser, entfettet, dunkelbraun, gelblich verfärbt	Humerus
K 6	6	Ostseestrand	umgeben von Wurzelwerk, Sand, tonigem Schlamm; längere Zeit im Wasser, entfettet, dunkelbraun, gelblich verfärbt	Schädel
K 7	61	Binnensee	verfärbt, entfettet, brüchig	Schädeldach
K 8	3	an Bahnstrecke	Tierfraß	ev. Tibia
K 9	unbekannt	unbekannt	brüchig, dunkelbraun	Wirbelkörper
K 10	unbekannt	unbekannt	unauffällig	Schädeldach
A 1	200	Sand, Kies	Oberfläche hart, gelb-braun	Röhrenknochen
A 2	1200	Sand, Lehm	Oberfläche gelb-braun, sehr brüchig, leicht	Femur
A 3	1700	Sand	Oberfläche gelb-braun	Tibia
A 4	3000	Sand, Lehm	Oberfläche braun, brüchig, leicht, viel Sand in Markhöhle, fragliche Brandspuren	fraglich Tibia
A 5	3500	Kies	Oberfläche gelb-braun, leicht	Unterkiefer
A 6	4000	Kies	ev. Brandspuren, Oberfläche gelb-braun, sehr leicht, 2 mm dünne Kompakta	Tibiakopf
A 7	5000	auf Lehm, schwach lehmhaltiger Sand	Oberfläche hart, leicht	Becken

4.2 Reagenzien

Von den aufgelisteten Firmen wurden folgende Geräte und Materialien verwendet: Alle unten genannten Produkte sind Trademarks der jeweiligen Firmen und werden im Folgenden nicht mit den üblichen Zeichen gekennzeichnet.

4.2.1 Kits zur DNA-Extraktion

<i>First DNA All-tissue DNA-Kit</i>	GEN-IAL GmbH, Troisdorf
<i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	QIAGEN GmbH, Hilden
<i>GENECLEAN Kit For Ancient DNA</i>	Q·BIOgene, BIO 101 Systems, Vista CA, USA
<i>DNA IQ System, Tissue and Hair Extraction Kit</i>	Promega Corporation, Madison, USA
<i>NucleoSpin DNA Trace</i>	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren

4.2.2 Kit zur RTQ-PCR

<i>Quantifiler Human DNA Quantification Kit</i>	Applied Biosystems, Foster City; USA
---	--------------------------------------

4.2.3 Kit zur FLA

<i>Mentype Quadruplex DAA plus</i>	Biotype AG, Dresden
------------------------------------	---------------------

4.2.4 Kit zur Sequenzierung

<i>ABI PRISM BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
---	--------------------------------------

4.2.5 weitere Reagenzien

<i>Agarose standard EEO</i>	SERVA Heidelberg/ New York
<i>Chelaplex III</i>	Merck, Darmstadt

<i>DTT</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>dNTP mixture</i>	MBI Fermentas, Burlington, Kanada
<i>EDTA, Titriplex® III</i>	Merck, Darmstadt
<i>Ethanol 100 %</i>	
<i>Ethanol 70 %</i>	
<i>Hi-Di Formamid</i>	Applied Biosystems, Foster City; USA
<i>Isopropanol Isopropylalkohol</i>	
<i>Na₂HPO₄</i>	VEB Laborchemie Apolda, ehem. DDR
<i>NaCl</i>	Riedel-de Haën AG, Seelze
<i>NaOH-Salz</i>	Merck, Darmstadt
<i>n-Butyl-Alkohol, wassergesättigt</i>	J. T. Baker, Holland
<i>PBS</i>	
<i>Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol</i>	Roth, Karlsruhe
<i>Platinum Taq DNA Polymerase</i>	Biotype AG, Dresden für STR bzw. Invitrogen, Karlsruhe für mtDNA
<i>POP-4 Polymer</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>PCR-Primer mtDNA</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Proteinase K</i>	MACHEREY-NAGEL, Düren
<i>Reinstwasser LiChrosolv</i>	Merck, Darmstadt
<i>SDS</i>	
<i>SYBR Green I Dye Nucleic Acid Gel Stain</i>	Molecular Probes, Eugene, USA
<i>10.000 x</i>	
<i>Tris HCl</i>	Merck, Darmstadt

4.3 Geräte

<i>Trockenschrank</i>	MELAG, Berlin
<i>Waage MC1 Laboratory LC 620 S</i>	Sartorius, Göttingen
<i>MagneSphere Magnetic Technology Stand (für 1,5 ml Tubes)</i>	Promega Corporation, Madison, USA
<i>ABI PRISM 7000 Sequence Detection System</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Thermocycler Primus 25</i>	MWG-BIOTECH, Ebersberg (mtDNA)

<i>Mastercycler personal</i>	EPPENDORF, Hamburg Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg (STR)
<i>3100 Avant Genetic Analyzer</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Minigelelektrophorese</i>	Renner GmbH, Darmstadt

4.4 Verbrauchsmaterialien

<i>Genetic Analyzer Septa</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>96-Well Reaktionsplatte</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Optical Adhesive Cover</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Compression pad</i>	Applied Biosystems, Foster City, USA
<i>Centricon Centrifugal Filter Devices</i>	Amicon Bioseparations & Millipore Corporation, USA
<i>YM-100 Säulen</i>	Princeton Separations Inc., Adelphia, USA
<i>Centri-Sep Säulen</i>	Princeton Separations Inc., Adelphia, USA

4.5 Software

<i>PCR</i>	Eppendorf Mastercycler personal Software
<i>FLA</i>	ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer Data Collection Software, Version 2.0 GeneMapper ID Software v3.1
<i>Real Time PCR</i>	ABI PRISM 7000 SDS Software, Version 1.0
<i>Sequenzierung</i>	Sequencing Analysis 2.1.1 Software SeqScape

5 Methoden und Durchführung

5.1 Vorbemerkungen

Während jedes Arbeitsschritts wurden Einmal-Untersuchungshandschuhe und ein Laborkittel getragen. Auf die Verwendung von Mund- und Haarschutz konnte verzichtet werden, weil die DNA-Profile aller Mitarbeiter vorlagen und in die Auswertungen der Ergebnisse mit einbezogen wurden. Das Vorbereiten zur Entkalkung, die Entkalkung, Extraktion, PCR, FLA, Real Time PCR und mtDNA-Sequenzierung wurde jeweils in separaten Räumen vorgenommen. Sämtliche Werkzeuge wurden mit vergälltem 70-prozentigem Ethanol gereinigt. Die Knochenproben des Instituts für Rechtsmedizin wurden in sterilen Urinbechern, die des Archäologischen Landesmuseum Schwerin in Plastiktüten und Pappkartons aufbewahrt. Alle Tubes und Pipettenspitzen wurden vor ihrem Gebrauch autoklaviert.

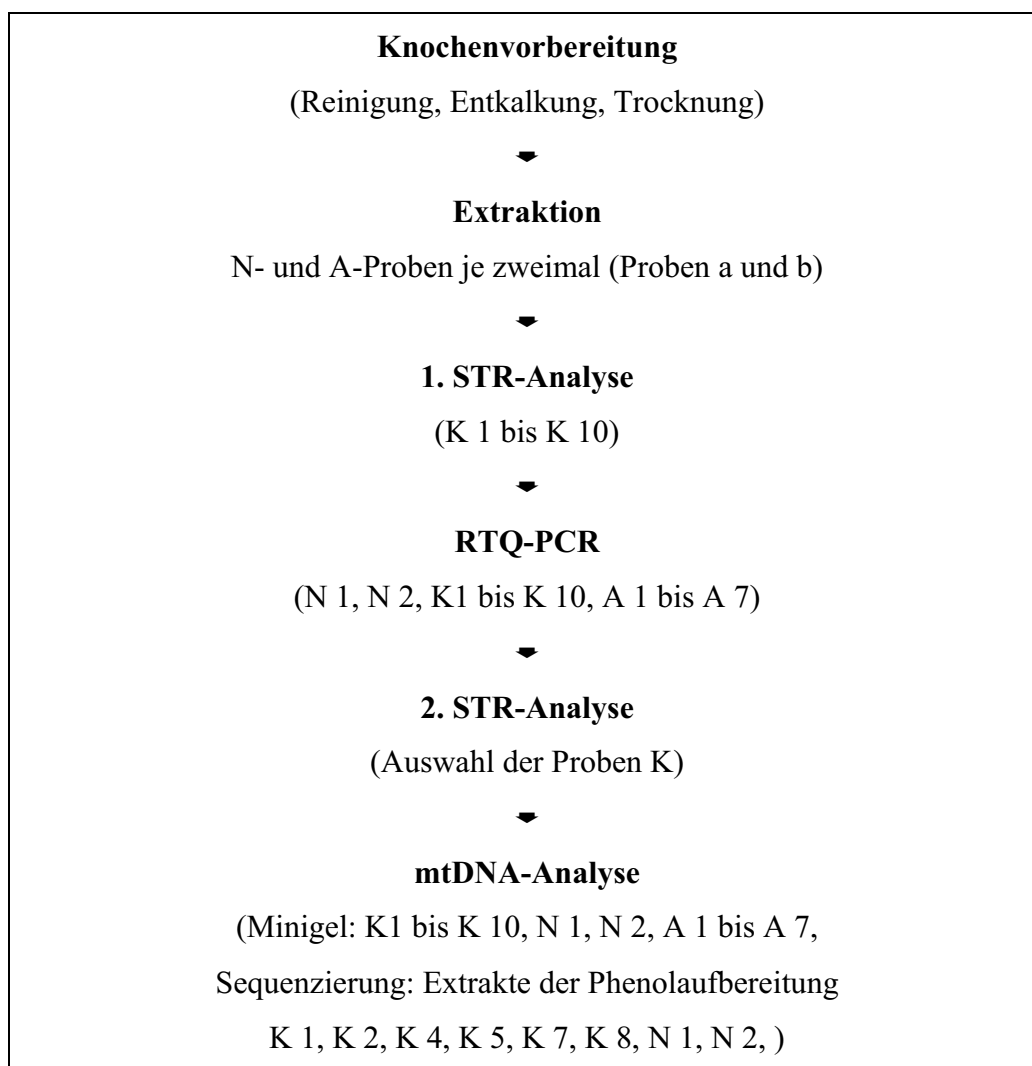


Abbildung 8: Vorgehensweise während dieser Arbeit

5.2 Die Vorbereitung des Probenmaterials

5.2.1 Zuschneiden und Reinigen der Proben

Die Knochen wurden mit Hilfe einer oszillierenden Säge in ca. 3 mm dicke Scheiben geschnitten. Im nächsten Schritt erfolgte die mechanische Reinigung der Oberflächen der Knochenscheiben mit einem Skalpell oder der Säge. Vor der Entkalkung fand eine Spülung mit destilliertem Wasser statt. N 1 und N 2 wurden grob von Weichgewebe befreit und sieben Tage bei 37 °C im Trockenschrank getrocknet.

5.2.2 Entkalkung der Proben

Je Probe wurden 0,9 g bis 3,6 g Ausgangsmaterial und 30 ml bis 55 ml einer EDTA-haltigen Lösung in Falcontubes gegeben. Die Proben standen für sieben Tage auf einem Schüttler bei Zimmertemperatur. Währenddessen wurde die Lösung zweimal gewechselt.

Entkalkerlösung:

Chelaplex III	250 g
(Dinatriumdihydrogenethylendiamintetraacetat)	
40-prozentige Natriumhydroxidlösung	bis ein pH-Wert von 7,0 bis 7,4 erreicht wurde
destilliertes Wasser	ad 1000 ml

Unter Zuhilfenahme steriler Kanülen wurden die Proben anschließend auf ihre Festigkeit geprüft. Danach sind sie mit einem Skalpell in ca. 5 mm kleine Stücken geschnitten und bei 37 °C über Nacht getrocknet worden.

5.3 Die DNA-Extraktion

Von den Knochenproben K 1 bis K 10 wurde jeweils nur eine Extraktion je Methode durchgeführt. Die Proben A 1 bis A 7 und N 1 und N 2 wurden jeweils zweimal mit der Phenol-Chloroform-Methode extrahiert.

Die Aufbereitung der Knochen mit Hilfe der Kits erfolgte gemäß den zugehörigen Protokollen der Firmen. Auf Abweichungen von diesen Protokollen wird hingewiesen. So verlangen einige Protokolle eine Zerkleinerung des Knochens zu Knochenmehl oder -späne. Dies wurde übergangen, um bei allen Kits gleiche Voraussetzungen zu schaffen.

5.3.1 GEN-IAL, First DNA All-tissue DNA-Kit

Bis auf folgende Einschränkungen ist den Anweisungen des Herstellers „DNA-Präparation aus Knochen und Zähnen“ des „Grundprotokolls für kleine Mengen forensischer Materialien“ entsprochen worden: Es wurde nicht mit Knochenspänen gearbeitet. Ebenfalls ist die beschriebene Entkalkung in Schritt 1 bis 7 entfallen.

5.3.2 QIAGEN, QIAamp DNA Mini Kit

Die Firma bietet zu Ihrem „Tissue Protocol“ ein „User-Developed protocol: Isolation of genomic DNA from compact bone using the QIAamp DNA Mini Kit“ an. Die Zerkleinerung und die Entkalkung erfolgte wie unter 5.1.1 und 5.1.2 beschrieben, die nachfolgenden Arbeitsschritte entsprechen den beiden o. g. Protokollen.

5.3.3 Q·BIOgene, BIO 101 Systems, GENE CLEAN Kit for Ancient DNA

Bei diesem Kit empfiehlt der Hersteller ebenfalls eine Vorinkubation der Probe mit Proteinase K. Das Protokoll eines Anwenders des Kits liegt bei und wurde für unsere vergleichende Untersuchung angewandt. Anschließend wurde das Manual Protocol ab Schritt sechs befolgt. Außerdem stehen drei verschiedene „Dehybernation solutions“ zur Verfügung. Der Hersteller stellt es dem Anwender frei, welche zum Einsatz gebracht wird. Während dieser Arbeit wurde nur die „Dehybernation solution A“ verwendet, da auf die Giftigkeit der anderen beiden im Herstellerprotokoll hingewiesen wird.

5.3.4 Promega, DNA IQ System, Tissue and Hair Extraction Kit

Zum „Bone Extraction Protocol“ zu diesem Kit ist zusätzlich ein „Modified IQ procedure, November 2001 (Split lab)“-Protokoll beigefügt. Es beschreibt unter anderem die Zusammensetzung eines „Bone Incubation buffer“ zur Selbstherstellung. Diese Zusammensetzung wurde auch während dieser Arbeit genutzt. Da der Hersteller von einer eingesetzten Knochenmenge von bis zu 2 g ausgeht und dazu 3 ml der Proteinase K Digestion Solution gibt, wurde in dieser Anwendung nur 1 ml hinzugegeben.

5.3.5 Organische Extraktion mit Phenol-Chloroform

Diese Methode basiert auf Joseph Sambrook und wurde der Aufgabenstellung der Arbeit entsprechend modifiziert [24]. Nach der Extraktion erfolgte eine Aufreinigung unter Zuhilfenahme von Centricon Centrifugal Filter Devices 100, die auf einer Ultrafiltrierung durch eine anisotrope Membran basieren. D. h. diese Membran besteht aus einer sehr dünnen Oberschicht, die nur kleine Poren aufweist, und einer dickeren, großporigen Unterschicht.

Die obere Schicht hält die gewünschten Moleküle zurück, die anschließend wieder von ihr gelöst werden können.

Lyse

Der Knochenprobe wurden 500 µl DNA-Lysepuffer (enthält 0,01 M Tris-HCl, pH 7,6, 0,01 M EDTA, 0,1 M NaCl, pH 8, 2 % SDS, 0,04 M DTT, H₂O_{bidest}) und 20 µl Proteinase K (20 mg/ ml) zugefügt. Danach erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 56 °C. Verbliebenes Substrat wurde am nächsten Tag kurz abzentrifugiert (5 min., 11 000 rpm) und anschließend mit dem flüssigen Überstand (Lysat) weitergearbeitet.

Proteinfällung

Nun wurden 700 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 : 24 : 1, pH 6,8 – 8,0) (Extrakt : Phenolgemisch ~ 1 : 1) zugegeben, gemischt und drei Minuten schwenkend inkubiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1000 g bildeten sich drei Phasen im Reaktionsgefäß. Die obere DNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Der gesamte Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt. Im Folgenden ist 700 µl wassergesättigtes N-Butanol zugefügt worden. Die Probe wurde geschüttelt und für zwei Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Anschließend ist das Butanol wieder abgenommen worden, welches nun die obere Phase bildete, während sich die DNA in der unteren Phase befand.

Konzentrierung der DNA

Auf die Mikrokonzentratoren Centricon 100 wurde ein Milliliter Reinstwasser und die DNA-haltige Lösung gegeben. Dies ist 25 Minuten in einer Festwinkelzentrifuge bei 2000 g zentrifugiert worden.

Danach wurde noch zweimal mit einem Milliliter Reinstwasser aufgefüllt und jeweils 15 Minuten zentrifugiert. Die DNA-Lösung konnte dann durch Zentrifugation für zwei Minuten bei 2000 g der umgedrehten Mikrokonzentratoren zurückgewonnen werden.

5.3.6 MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin DNA Trace

Es wurde das „Support protocol for the isolation of genomic DNA from human bones“ angewandt. Auch dieses sieht Knochenmehl vor, was ebenfalls übergangen wurde.

Alle Extrakte wurden nach der Gewinnung bei -20 °C gelagert.

5.4 Die Quantifizierung der DNA

Das gene target dieses Kits ist die human telomerase reverse transcriptase (hTERT). Die amplifizierte Region befindet sich in einem nicht codierenden Bereich des Chromosoms 5 (5p15.33) und das Amplicon hat eine Länge von 62 Basen. Die Aufarbeitung der Proben erfolgte nach dem Protokoll des Kits.

Tabelle 2: Konzentrationen der Verdünnungsreihe des Standards

Standard 1	50,000 ng/ µl
Standard 2	16,700 ng/ µl
Standard 3	5,560 ng/ µl
Standard 4	1,850 ng/ µl
Standard 5	0,620 ng/ µl
Standard 6	0,210 ng/ µl
Standard 7	0,068 ng/ µl
Standard 8	0,023 ng/ µl

Die Real Time PCR lief entsprechend den Angaben des Herstellers unter folgenden Bedingungen ab :

Initiale Denaturierung	95 °C	10 min
40 Zyklen je:		
Denaturierung	95 °C	15 s
Annealing	60 °C	1 min

5.5 Die DNA-Analysen

5.5.1 FLA-Analyse der STR

Alle STR-Loci wurden gleichzeitig, d. h. in einer Multiplex PCR nach dem Protokoll des Kits „Mentype Quadruplex DAA plus“ amplifiziert. Es wurden 5,0 µl des jeweiligen DNA-Extraktes eingesetzt.

Tabelle 3: Charakterisierung der untersuchten Loci

Locus	Repeatmotiv	Allel	Größe in bp: ABI 3100-Avant
D3S1358	TCTA (TCTG) ₂ (TCTA) ₁₅	10 - 20	76,60 - 118,00
D8S1179	(TCTA) ₁₂	8 - 18	128,10 - 169,00
D18S51	(AGAA) ₁₃	9 - 27	204,75 - 278,00
SE33/ ACTBP2	(AAAG) ₉ AA (AAAG) ₁₆	6,3 - 38	158,80 - 281,80

Die PCR lief entsprechend den Angaben des Herstellers unter folgendem Cyclerprofil ab:

Initiale Denaturierung	hot start 94 °C	4 min
30 Zyklen je:		
Denaturierung	94 °C	30 s
Annealing	58 °C	120 s
Ramping	1 °C/ s	
Elongation	72 °C	75 s
Finale Elongation	68 °C	60 min
Abkühlung	10 °C bis zur Beendung	

Die Kapillarelektrophorese wurde unter folgenden Bedingungen entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt:

Kapillare	36 cm Array
Polymer	POP-4
Module File	HIDFragmentAnalysis36_POP4
Injektionsdauer	5 s
Injektionsspannung	5 kV
Run Dauer	24 min
Run Spannung	15,0 kV
Run Temperatur	60 °C

5.5.2 mtDNA-Sequenzierung

Während dieser Arbeit wurde die Region HV 1, welche von Position 16024 bis 16383 der CRS reicht, mit Hilfe der Primer F15971 und R16410 vervielfältigt und sequenziert. Die dabei entstehende Ampliconlänge beträgt 440 Basenpaare.

Tabelle 4: Charakterisierung der Primer

Primer	Sequenz
F15971	5' - TTA ACT CCA CCA TTA GCA CC - 3'
R16410	5' - GAG GAT GGT GGT CAA GGG AC - 3'

Die Schmelztemperaturen T_m der Primer wurden anhand der Formel von Chester und Marshak ermittelt [52]. **GC %** stellt den gemeinsamen Anteil Guanin und Cytosin an der Primersequenz in Prozent dar. **L** steht für die Anzahl der Nucleotide.

$$T_m = 69,3 \text{ °C} + 0,41 \times \text{GC \%} - 650 / L$$

Der PCR-Ansatz ist folgendermaßen zusammengesetzt [53]:

10x PCR-Reactionbuffer	2,5 µl
dNTP-Mix	200 µM
MgCl ₂	2 mM
forward Primer	10 pmol
reverse Primer	10 pmol
Platinum <i>Taq</i>	1 U
DNA K 1 bis K 10, A 1 bis A 7	8 µl
N 1a, 1b, 2a, 2b	4 µl
H ₂ O _{dest}	ad 25 µl

Die Amplifizierungs-PCR lief entsprechend den Angaben des Herstellers unter den folgenden Bedingungen ab:

Initiale Denaturierung	94 °C	1 min
32 Zyklen je:		
Denaturierung	94 °C	20 s
Annealing	50 °C	10 s
Ramping		1 °C/ s
Elongation	72 °C	30 s
Abkühlung	10 °C bis zur Beendung	

Die Erfolgskontrolle der Amplifikation erfolgte mittels einer Gelelektrophorese. Das zwei-prozentige Agarose-Minigel wurde aus 0,8 g Agarose und 40 ml einfach TBE bereitet.

10x TBE-Puffer:

Tris (0,89M)	108,00 g
Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O (0,025M)	9,30 g
Borsäure	55,00 g
H ₂ O _{dest.}	ad 1000 ml
pH 8,0	

Ladepuffer:

Bromphenolblau	0,25 % (w/ v)
Xylen Cyanol FF	0,25 % (w/ v)
Ficoll (Typ 400)	15 % (w/ v)

Die Beladung der Taschen erfolgte mit 4 µl DNA und 2 µl Ladepuffer-SYBR Green-Gemisch (2 µl SYBR Green I Dye auf 498 µl Ladepuffer). Die erfolgreich amplifizierten Proben wurden mit Hilfe von Centricon YM-100 Säulen nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Danach erfolgte der Ansatz der Sequenzier-PCR mit 4 µl DNA und nach den Angaben des Herstellers mit folgendem Programm:

Initiale Denaturierung	96 °C	1 min
25 Zyklen je:		
Denaturierung	96 °C	10 s
Annealing	50 °C	5 s
Ramping		1 °C/ s
Elongation	60 °C	2 min
Abkühlung	8 - 10 °C bis zur Beendung	

Daran schloss sich eine Präzipitation der DNA mit Ethanol an. Die DNA wurde mit 2 μ l 125 mM EDTA, 2 μ l 3 M Natriumacetat und 50 μ l eiskaltem Ethanol abs. versetzt. Nach 15-minütigem Mischen und Inkubieren bei Raumtemperatur ist die Lösung 30 Minuten bei 13 000 rpm zentrifugiert worden. Der Überstand wurde entfernt und 70 μ l eiskaltes 70-prozentiges Ethanol zugegeben. Nach erneutem Zentrifugieren für 25 Minuten bei 13 000 rpm und Entfernen des Überstandes, fand das Trocknen der DNA bei 56 °C für 20 Minuten statt. Die DNA ist schließlich wieder in 18 μ l Reinstwasser gelöst worden. Folgend wurden 7 μ l dieser DNA-Lösungen mit je 10 μ l Hi-Di Formamid versetzt und nach den Angaben des Herstellers sequenziert:

Kapillare	36 cm Array
Polymer	POP-4
Instrument Protocol	Seq_POP4_36 cm_7s_2kV
Injektionsdauer	7 s
Injektionsspannung	2 kV
Run Temperatur	55 °C

6 Ergebnisse

6.1 Zur Entkalkung

Nach der einwöchigen Entkalkung ergab die Prüfung der Härte der Proben unter Zuhilfenahme steriler Kanülen folgende Ergebnisse:

Tabelle 5: Knochenhärte nach der Entkalkung

Knochenprobe	Konsistenz nach
N 1	+
N 2	+
K 1	0
K 2	++
K 3	0
K 4	+
K 5	0
K 6	0
K 7	0
K 8	+
K 9	--
K 10	+
A 1	++
A 2	--
A 3	--
A 4	-
A 5	--
A 6	--
A 7	--

Legende:

++	insgesamt noch hart, die Kanüle kann nicht in die Probe eindringen
+	harter Kern, die Kanüle kann die Probe nicht perforieren
0	optimal, die Kanüle kann die Probe bei geringem Widerstand perforieren
-	weich, die Kanüle kann die Probe ohne Widerstand perforieren
--	schwammig, zerfallend, die Knochenstruktur ist zerstört

6.2 Zu den Scorekriterien der FLA

Nach der Fragmentlängenanalyse wurden alle Methoden mit Hilfe eines ergebnisbasierten Scoresystem bewertet, das sich allein auf die Auswertbarkeit der erzielten Elektropherogramme bezieht. Dabei wurde jeder Locus einzeln betrachtet. Atypische Peakformen wurden von vornherein ausgeschlossen. Zuerst sollen Typisierungen mit mehr als zwei möglichen Allelen ausgeschlossen werden bzw. eine Entscheidung zwischen homo- und heterozygot gefällt werden. Dies geschieht indem in absteigender Reihenfolge der Peakhöhen

Vergleiche angestellt werden. Nachfolgend wurde eine farbliche Kennzeichnung genutzt, die die Sicherheit der Peaks anhand ihrer Reproduzierbarkeit widerspiegelt. So werden die absoluten Peakhöhen angelehnt an die Kriterien der GeneMapper ID Software v3.1 beurteilt. Bei heterozygoten Typisierungen wurden zusätzlich die Peakhöhenverhältnisse der Allele betrachtet. Ideal wäre ein Verhältnis von 100 Prozent. Aufgrund der Fehleranfälligkeit wurden Verhältnisse von 50 Prozent akzeptiert [54]. Anschließend wurde das Verhältnis des höchsten Stutter zum nachfolgenden Allelpeak beurteilt. Dabei wurden für heterozygote Typisierungen höhere Werte akzeptiert, da theoretisch jedes heterozygote Allel in der Hälfte der Intensität eines homozygoten Locus voliegt. Peaks, die nicht als Stutter oder Allel bezeichnet werden können und somit Artefakte darstellen, wurden schließlich mit ihrer Peakhöhe ins Verhältnis zur Peakhöhe des kleinsten Allels gesetzt.

ERGEBNISSE

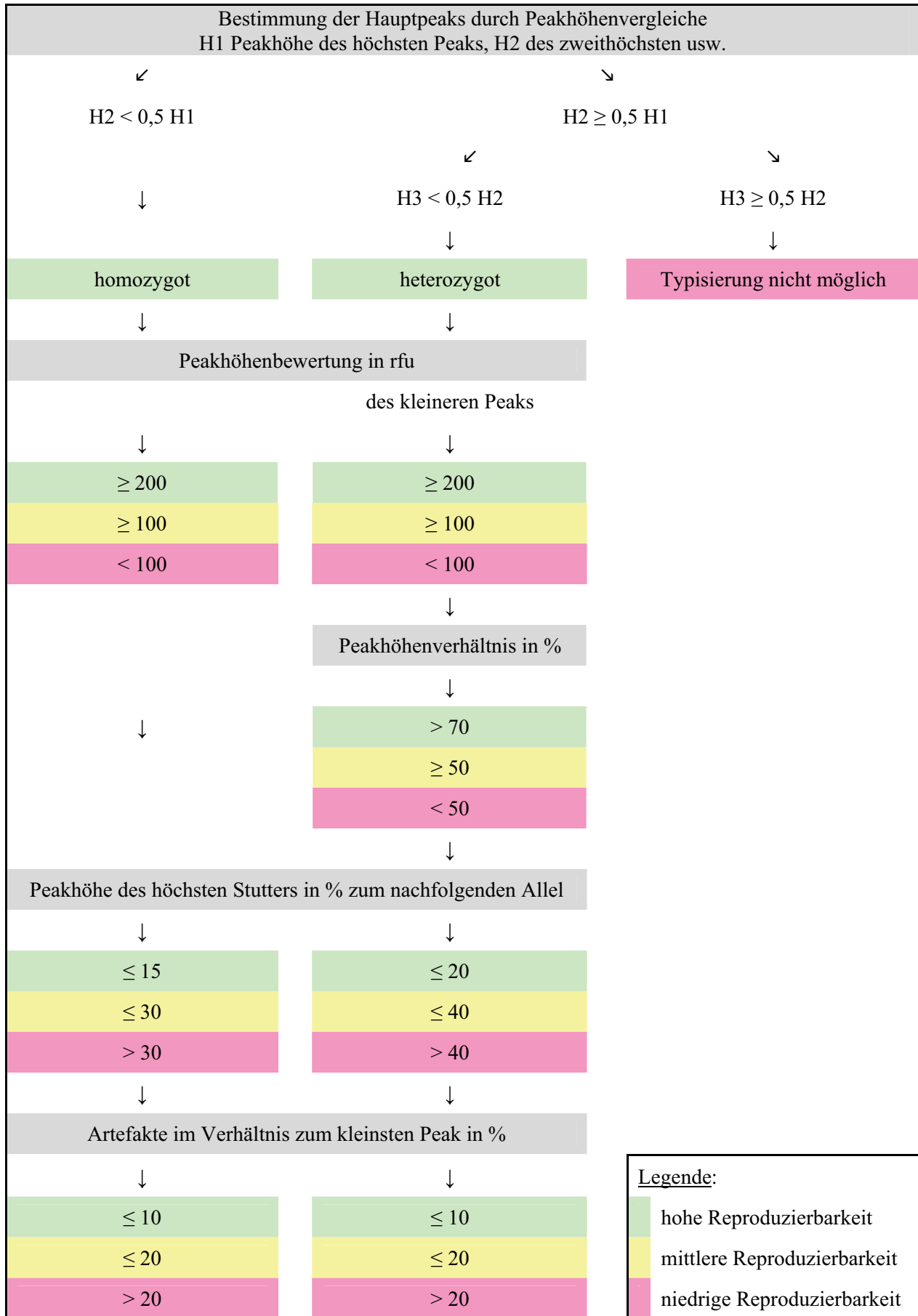


Abbildung 9: Scorekriterien

6.3 Zur ersten FLA

Mit Hilfe des Scores wurde ermittelt, wie viele Loci je Probe und Methode als gültig, d. h. als homo- oder heterozygot, bestimmt werden konnten. Die durch uns ausgewählten Verfahren wurden jeweils an zehn Knochenproben des Instituts für Rechtsmedizin überprüft. Pro Knochenprobe sind die dem Quadruplex entsprechenden Loci betrachtet und dabei pro detektiertem Locus ein Punkt vergeben worden. Folglich ergibt sich für jede Methode eine mögliche Gesamtpunktzahl von 40.

In den DNA-Extrakten, die mit dem Kit der Firma GEN-IAL und Phenol-Chloroform gewonnen wurden, konnten nach der ersten PCR keine Allele nachgewiesen werden. Die Methode nach Q BIOgene erbrachte zwei Punkte, Promega fünf Punkte, MACHEREY-NAGEL sechs Punkte und QIAGEN 13 von 40 Punkten. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 9. Die vollständigen Ergebnisprotokolle sind im Anhang aufgelistet (Tabelle 17).

6.4 Zur RTQ-PCR

Die Real Time PCR diente zur Konzentrationsbestimmung der DNA und zum indirekten Nachweis von Inhibitoren.

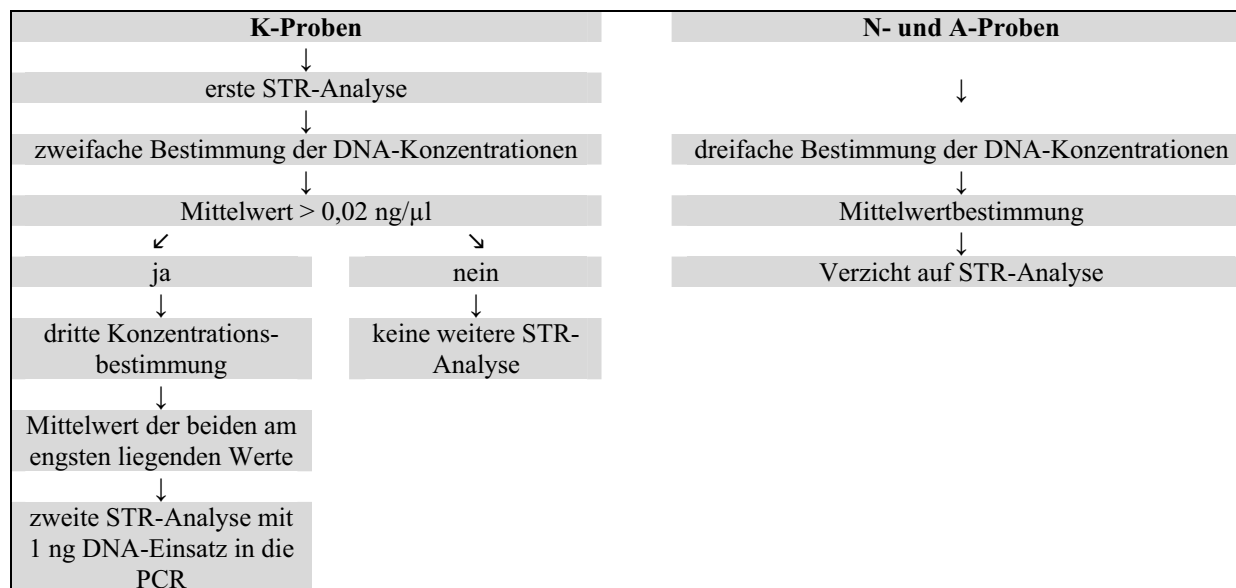


Abbildung 10: Vorgehensweise zur RTQ-PCR

* Proben deren Konzentrationen unter 0,02 ng/μl lagen, wurden ausgeschlossen, da aus ihnen eine nicht realisierbar hohe Einsatzmenge für eine optimierte Fragmentlängenanalyse folgt.

Die ermittelten DNA-Konzentrationen zeigten Schwankungen von bis zu fünf Zehnerpotenzen zwischen den rezenten Knochen und den historischen Knochenproben des Landesmuseums. Der indirekte Nachweis von Inhibitoren trat in allen Lösungen der GEN-IAL-Aufarbeitung auf.

Tabelle 6: Hemmung der Amplifikation der IPC- und Proben-DNA

Methoden Proben	GEN-IAL	QIAGEN	Q·BIOgene	Promega	Phenol- Chloroform	MACHEREY NAGEL
N 1a						
N 1b						
N 2a						
N 2b						
K 1	++					
K 2	++					
K 3	++				++	
K 4	++					
K 5	++					
K 6	++					
K 7	++					
K 8	++					
K 9	++	+			+	++
K 10	++					
A 1a						
A 1b						
A 2a						
A 2b						
A 3a					+++	
A 3b					+++	
A 4a						
A 4b						
A 5a						
A 5b						
A 6a					+++	
A 6b					+++	
A 7a						
A 7b					+	

* Zu den dunkelgrau hinterlegten Flächen erfolgte keine Untersuchung. Die Aufarbeitung der N- und A-Proben erfolgte nur mit Phenol. Die Kennzeichnung mit „+“ entspricht der Anzahl der gehemmten Amplifikationen. War die IPC der K-Proben zweimal negativ, wurde keine dritte RTQ-PCR durchgeführt.

Tabelle 7: Mittelwerte der beiden Werte mit der geringsten Abweichung der ermittelten DNA-Konzentrationen

Methoden Proben	GEN-IAL	QIAGEN	Q-BIOgene	Promega	Phenol- Chloroform	MACHEREY NAGEL
N 1a					483,68000	
N 1b					276,01000	
N 2a					339,46500	
N 2b					350,39750	
K 1					0,03130	
K 2			0,11275		0,06400	
K 3						
K 4			0,06525		0,02615	
K 5		0,08725	0,22125		0,68500	0,17850
K 6					0,02230	
K 7						
K 8		0,13550	0,23375		0,46450	
K 9						
K 10						
A 1a					0,22200	
A 1b					0,22850	
A 2a					0,00230	
A 2b					0	
A 3a					0	
A 3b					0	
A 4a					0	
A 4b					0	
A 5a					0,00787	
A 5b					0,00073	
A 6a					0	
A 6b					0	
A 7a					0,01430	
A 7b					0,01101	

* Zu den dunkelgrau hinterlegten Flächen erfolgte keine Untersuchung. Angaben in ng/µl, bei den K-Proben sind nur Werte > 0,02 ng/ µl aufgeführt

Zusammengefasst wurde mit der Phenol-Chloroform-Methode die durchschnittlich höchste DNA-Konzentration erzielt. Bei den Knochen fiel vor allem die Probe A1 mit einer hohen DNA-Konzentration neben den wenig erfolgreichen anderen A-Proben auf.

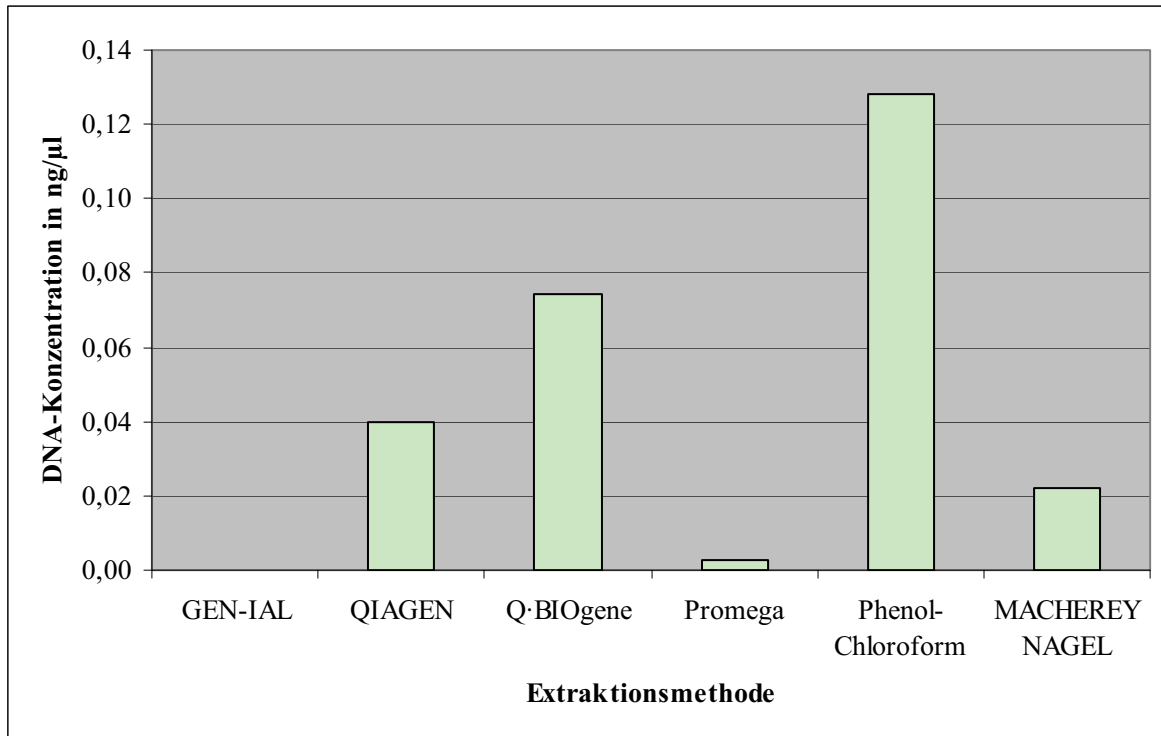


Abbildung 11: Durchschnittliche DNA-Konzentrationen der Extrakte in Abhängigkeit von der Methode.

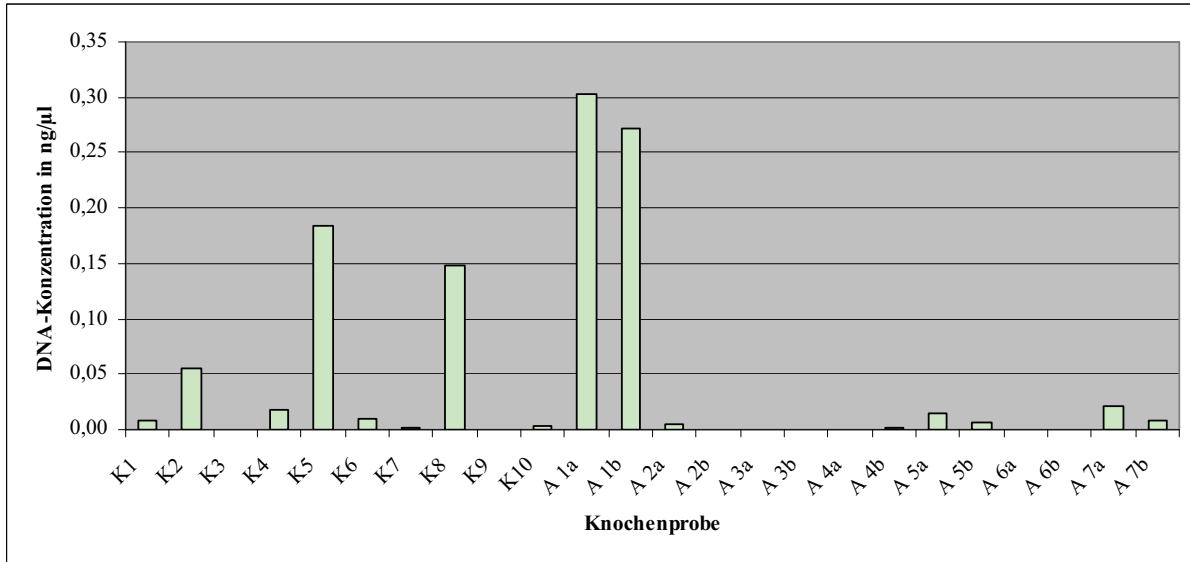


Abbildung 12: Durchschnittliche DNA-Konzentrationen der Extrakte in Abhängigkeit von der Probe.

* Die Proben N 1 und N 2 wurden aufgrund ihrer tausendfach höheren Werte nicht in die Abbildung mit einbezogen. Nähere Angaben befinden sich in Tabelle 19 im Anhang.

6.5 Zur zweiten FLA

Anhand der nun bekannten DNA-Konzentration konnte gezielt eine DNA-Menge von 1 ng in einem PCR-Ansatz von 25 µl eingesetzt werden. Da der Ansatz maximal 17,1 µl DNA-Lösung zuließ, begrenzte sich die Typisierung auf die unten genannten Proben. Folglich wurden nur 13 Proben einer erneuten PCR und Fragmentlängenanalyse unterzogen und deren Scorepunkte erneut bestimmt.

Tabelle 8: Resultierende Einsatzmengen des DNA-Extrakts in eine erneute FLA

Methoden Proben	GEN IAL	QIAGEN	Q·BIOgene	Promega	Phenol Chloroform	MACHEREY NAGEL
K 1					17,1	
K 2			6,4		15,6	
K 3						
K 4			15,3		17,1	
K 5		9,0	5,7		1,5	5,6
K 6					17,1	
K 7						
K 8		7,4	5,0		2,2	
K 9						
K 10						

* *Es waren maximal 17,1 µl der DNA-Lösung für ein 25 µl-Ansatz möglich. Angaben in µl*

ERGEBNISSE

Tabelle 9: Scorewerte nach der ersten STR-Analyse

Methoden Proben	GEN IAL	QIAGEN	Q·BIOgene	Promega	Phenol Chloroform	MACHEREY NAGEL
K 1	0	0	1 (1)	2	0	0
K 2	0	0	0	0	0	0
K 3	0	0	0	2 (2)	0	0
K 4	0	0	0	0	0	0
K 5	0	3	0	0	0	3
K 6	0	0	0	1	0	0
K 7	0	3 (1)	0	0	0	0
K 8	0	4	1	0	0	0
K 9	0	0	0	0	0	0
K 10	0	3 (3)	0	0	0	3 (1)
Σ	0	13	2	5	0	6
von 40 in %	0	32,5	5,0	12,5	0	15,0
PH < 100 rfu	0	4	1	2	0	1

* Die Angaben in Klammern beziehen sich auf Peaks < 100 rfu, PH: Peakhöhe

Tabelle 10: Scorewerte nach der zweiten STR-Analyse

Methoden Proben	GEN IAL	QIAGEN	Q·BIOgene	Promega	Phenol Chloroform	MACHEREY NAGEL
K 1	0	0	1 (1)	2	0	0
K 2	0	0	0	0	4	0
K 3	0	0	0	2 (2)	0	0
K 4	0	0	0	0	1	0
K 5	0	4	0	0	4 (1)	4 (1)
K 6	0	0	0	1	2 (1)	0
K 7	0	3 (1)	0	0	0	0
K 8	0	4	3	0	4	0
K 9	0	0	0	0	0	0
K 10	0	3 (3)	0	0	0	3 (1)
Σ	0	14	4	5	15	7
von 40 in %	0	35,0	10,0	12,5	37,5	17,5
PH < 100 rfu	0	4	1	2	2	2

* Die Angaben in Klammern beziehen sich auf Peaks < 100 rfu, PH: Peakhöhe

Legende:

Die optimierten Proben sind grün markiert und ersetzen die Werte gemäß Tabelle 9 der ersten Durchführung.

Tabelle 11: Übersicht der Punkteverteilung zu den optimierbaren DNA-Extrakten

Methode	erste FLA		PH < 100 rfu von den gültigen	zweite FLA		PH < 100 rfu von den gültigen
QIAGEN	7/ 8	87,5 %	0	8/ 8	100 %	0
Q·BIOgene	1/ 16	6,3 %	0	3/ 16	18,8 %	0
Phenol-Chloroform	0/ 24	0 %		15/ 24	62,1 %	2/ 24
MACHEREY-NAGEL	3/ 4	75,0 %	0	4/ 4	100 %	1/ 4

* Die Zahl vor dem Bruchstrich gibt die Anzahl der detektierten Loci an, der Wert dahinter die maximal mögliche Anzahl. PH: Peakhöhe

Folgende Typisierungen ergeben sich durch Zusammenfassen der STR-Muster pro Methode und Knochen, die gemäß dem Score für gültig befunden wurden.

Tabelle 12: Übersicht der aus dem Score resultierenden Typisierungsergebnisse der Proben

Probe	D3S1358	D8S1179	D18S51	SE33
K 1	15-17	14		
K 2	17-18	9-10	12-14	17-21,2
K 3		15		22,2
K 4	14-15			
K 5	17	10-15	14-15	24,2-27,2
K 6		10-15		14-30,2
K 7	16	14		26,2
K 8	15-17	12-13	16-17	23,2
K 9				
K 10	15-16	8-15		21-30,2

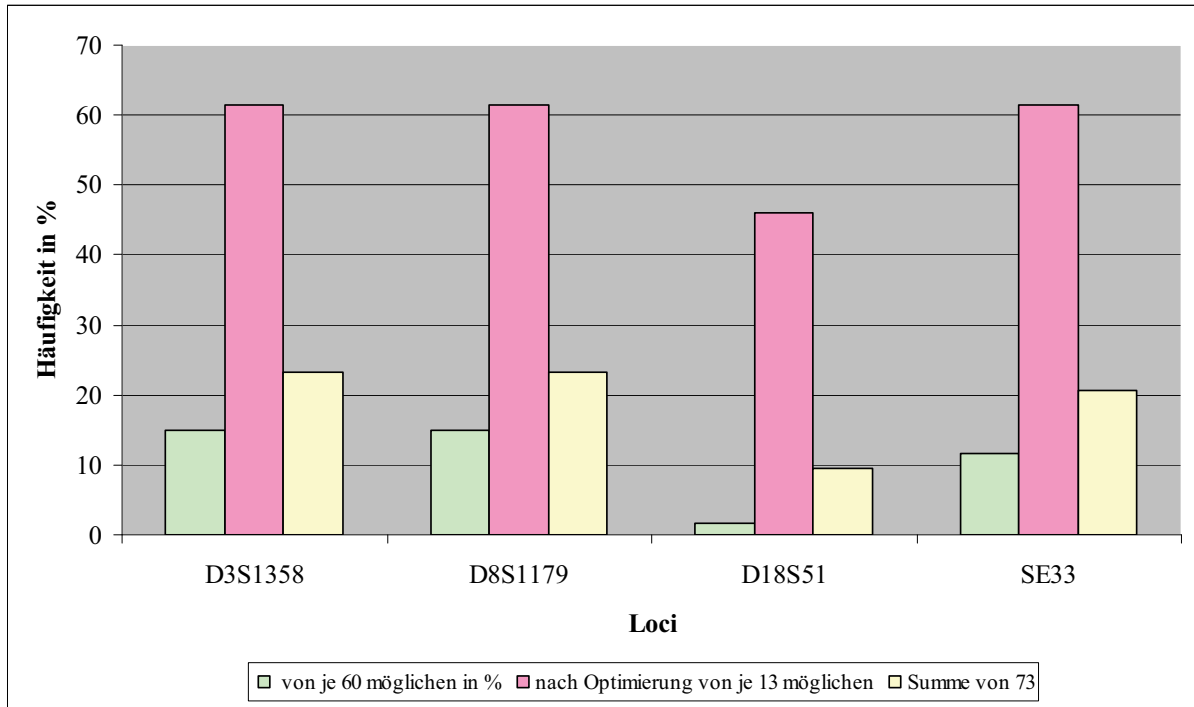


Abbildung 13: Häufigkeiten der Detektion der Loci

* Dabei gingen nur die gemäß dem Score für eindeutig befundenen Detektionen ein.

6.6 Zur Sequenzierung

6.6.1 Flächengel

Mit allen Proben wurde eine Flächengelelektrophorese zur Überprüfung des Amplifizierungserfolgs der PCR durchgeführt. Die mit dem interkalierenden Farbstoff Sybr-Green versetzten Proben der Phenol-Extraktion ergaben die in Abbildung 14 bis 17 dargestellten Banden im UV-Licht. In Tabelle 13 wurde die Qualität der Banden beurteilt.

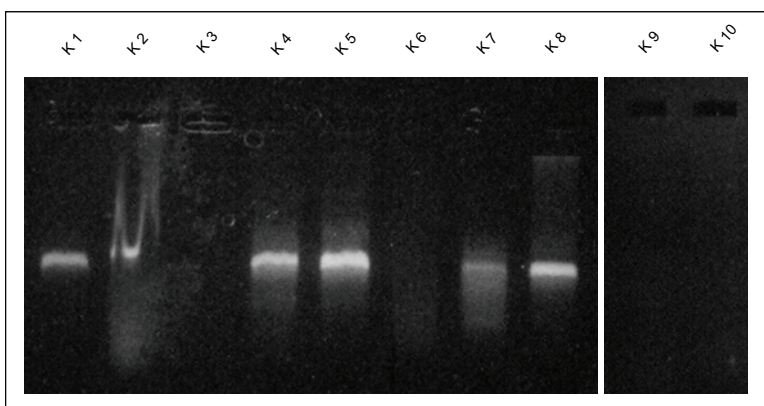


Abbildung 14: Einsatz von 5 µl DNA-Lösung in die PCR

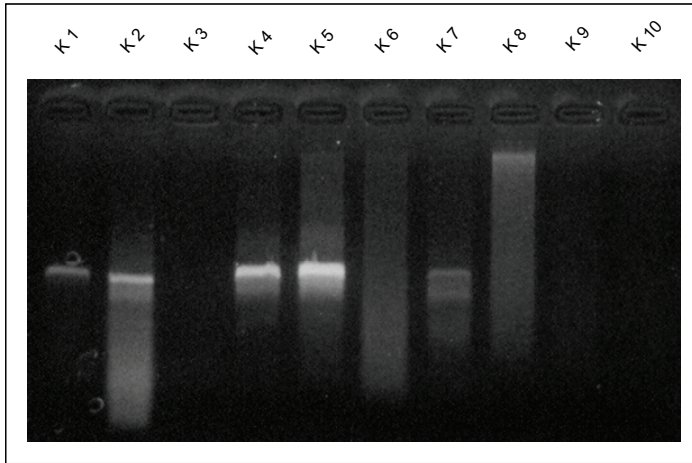


Abbildung 15: Einsatz von 8 μ l DNA-Lösung in die PCR

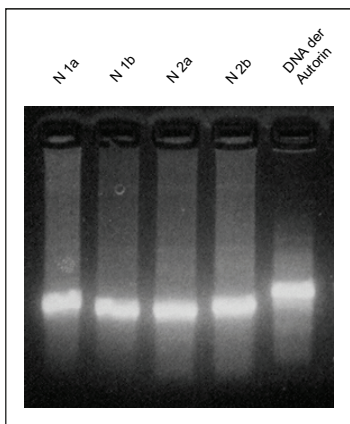


Abbildung 16: Einsatz von 4 μ l DNA-Lösung in die PCR

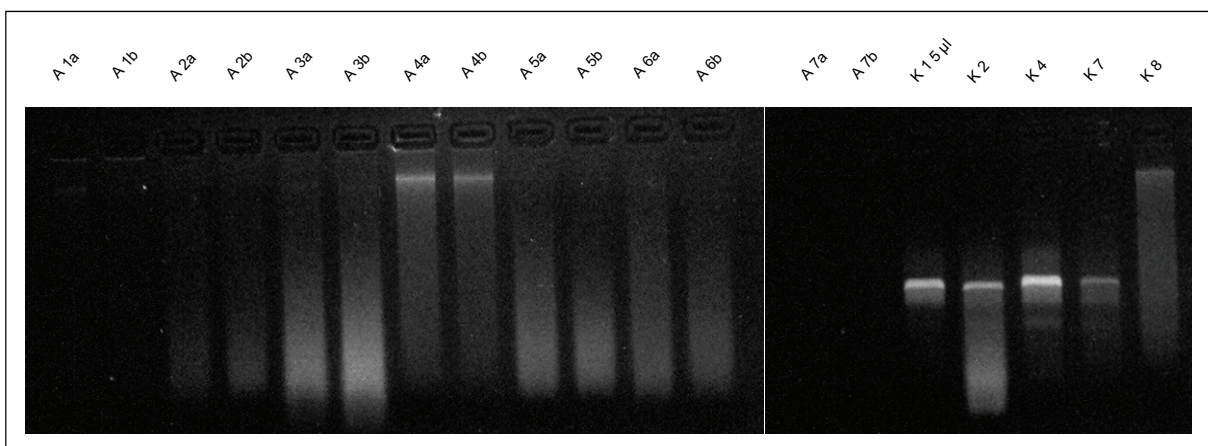


Abbildung 17: Einsatz von 8 μ l DNA-Lösung in die PCR

* Für K 1 erfolgte ein Einsatz von nur 5 μ l.

ERGEBNISSE

Tabelle 13: Beurteilung der Banden

Methoden Proben	GEN IAL	QIAGEN	Q·BIOgene	Promega	Phenol Chloroform	MACHEREY NAGEL
N 1a						
N 1b						
N 2a						
N 2b						
K 1						
K 2						
K 3						
K 4						
K 5						
K 6						
K 7						
K 8						
K 9						
K 10						
A 1a						
A 1b						
A 2a						
A 2b						
A 3a						
A 3b						
A 4a						
A 4b						
A 5a						
A 5b						
A 6a						
A 6b						
A 7a						
A 7b						
Σ gelb und grün	0	7	7	6	6	2

Legende:

	keine, unerwartete oder mehrere Banden
	schwache erwartete Bande
	deutliche erwartete Bande
	hier erfolgte keine Untersuchung.

6.6.2 Sequenzierung

Die Proben, die nach der Phenol-Chloroform-Aufarbeitung eine sichere Bande aufwiesen, wurden jeweils zwei- bis dreimal sequenziert und mit der CRS verglichen. In Tabelle 14 werden die Einzelheiten dazu aufgezeigt.

Tabelle 14: mtDNA-Analyse der mit Phenol aufbereiteten Proben

Probe	Sequenzabweichung von CRS	Qualität
K 1	T16362C	
K 2	C16069T, T16126C, T16189C, G16213A, C16223T	
K 3	fehlende Bande	
K 4	T16126C, A16163G, C16186T, T16189C, C16294T	
K 5	C16069T, T16126C, G16145A, T16172C, C16222T, C16261T	
K 6	fehlende Bande	
K 7	nur streckenweise sequenziert	
K 8	CRS	
K 9	fehlende Bande	
K 10	fehlende Bande	
N 1a	C16111T, T16298C	
N 1b	C16111T, T16298C	
N 2a	C-Stretch, T16189C	
N 2b	C-Stretch, T16189C	
SS	CRS	

* In die Beurteilung der Qualität fielen die Vollständigkeit der Sequenzierung des HV 1 Bereiches und technisches Hintergrundrauschen ein. Bei der Probe SS handelt es sich um eine aus Blut gewonnene DNA-Lösung der Verfasserin

Legende:

	vollständig und eindeutig typisierbar
	nur unvollständig typisierbar oder Signalrauschverhältnis über 3 : 1

7 Diskussion

7.1 Vorbemerkungen

Es finden sich im Schrifttum keine allgemein gültigen Aussagen zu einer erfolgversprechenden DNA-Extraktion aus Knochen. Die Ursachen sind in der Verschiedenheit des Ausgangsmaterials und der davon abhängigen Extraktionsverfahren zu sehen. Darüber hinaus sind vielfach die Bestandteile der Kits nicht bekannt. Auch ist die Aufarbeitung von Knochen aufwendiger als von besser zugänglichen und zellreicheren Geweben oder Flüssigkeiten wie z. B. Blut [55-57]. Knochen bzw. Hartgewebe kommen für die Bestimmung von Individualmerkmalen erst dann in Betracht, wenn die anderen Gewebsreste wegen starker Kontamination oder Degradation nicht mehr geeignet sind. Wichtige Ursachen für die Unwägbarkeit der Analyse sind die harte Knochensubstanz, die eigentlich die Degradation der DNA verlangsamen kann, die geringe Anzahl noch intakter Zellen, die sich darin befinden und ggf. chemische Substanzen mit inhibitorischen Effekten [57,58].

Die Auswertbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit ist stark beeinflusst durch die unterschiedliche Quantität und Qualität der gewonnenen DNA [59]. Die Extraktion muss so optimiert sein, dass möglichst viel amplifizierbare DNA gewonnen werden kann. Es hat sich gezeigt, dass die verfügbaren Methoden je nach Beschaffenheit des Ausgangsmaterials nur eingeschränkt geeignet sind. Folglich sind noch aufwändige systematische Untersuchungen erforderlich, um das vorhandene Methodenspektrum grundlegend weiter zu entwickeln.

7.2 Zum Einfluss der Extraktionsmethoden auf die Ergebnisse

Sechs verschiedene Methoden sind in dieser Arbeit untersucht worden. Dabei handelt es sich um eine organische Methode mit Phenol, drei Methoden mit Silikaten, eine Methode mit paramagnetischen Beads und eine Aussalzmethode.

Während die Extraktion und Untersuchung von DNA heute zur Routine in vielen wissenschaftlichen Bereichen gehören [60] und dafür immer wieder neue Techniken auf den Markt gebracht werden, ist die Anwendung von Phenol und Chloroform zur DNA-Extraktion aus Knochen die wohl älteste Methode [24]. Darüber hinaus scheint es auch, die meist bevorzugte Methode zu sein, wofür die breite Anwendung trotz ihrer Toxizität spricht [38,56,58,61]. Häufig werden auch Silikapartikel verwendet, was wohl ihrer einfachen Handhabung und ähnlich guter Resultate zuzuschreiben ist [7,62-64]. Paramagnetische Partikel können eine

elegante Alternative dazu darstellen. Hierzu gibt es aber kaum Erfahrungsberichte über systematische wissenschaftliche Untersuchungen [65,66].

Zur Beurteilung der DNA-Qualität diente die Fragmentlängenanalyse der STR. Die Typisierung von allelischen short tandem repeats ist weltweit Goldstandard der Individualisierung von DNA-Proben geworden. Insofern sind die kommerziell etablierten DNA-Kits zur Beurteilung der Qualität extrahierter DNA besonders geeignet. Der Vergleich der STR-Analysen mit Hilfe des Scores erbrachte an erster Stelle 15 von 40 Punkten für die Phenol-Methode, dicht gefolgt mit 14 Punkten von QIAGEN. Die anderen Methoden erzielten dagegen nur maximal sieben Punkte. Beim zusätzlichen Betrachten der Peakhöhen, liegt QIAGEN wiederum hinter der Phenol-Methode mit vier Peaks unter 100 rfu gegenüber zwei der Phenol-Methode und zwei Peaks zwischen 100 und 200 rfu bei beiden Methoden. Die Extrakte der Phenol-Methode wurden nach einem ersten Durchgang ohne verwertbare Ergebnisse, ein zweites Mal, dann erfolgreich, typisiert. Eine Möglichkeit der Erklärung ist, dass durch die Quantifizierung der DNA und der dadurch optimierten DNA-Einsatzmenge, eine Überladung der PCR oder ein zu geringes DNA-Angebot im zweiten Durchgang vermieden werden konnte. Überdies sind subjektive Fehler trotz sorgfältigem Arbeiten nie ganz ausgeschlossen.

Mit Hilfe der Real Time PCR wurde von allen Extrakten mindestens zweimal die DNA-Konzentration ermittelt. Zusammengefasst konnten in den ersten beiden Analysen in 75 Prozent der mit Phenol aufgearbeiteten Lösungen DNA nachgewiesen werden. Die gleiche Anzahl findet sich für die Anwendung mit Q·BIOgene. Die QIAGEN-Lösungen waren nur in 55 Prozent der Analysen erfolgreich, Promega in 45 Prozent, MACHEREY-NAGEL in 30 Prozent und GEN-IAL in keiner der Lösungen. Weit vorne liegt ebenfalls die organische Methode mit den durchschnittlich detektierten DNA-Konzentrationen von 0,128 ng/μl, mit fast nur der Hälfte dieser Menge steht Q·BIOgene mit 0,075 ng/μl an zweiter Stelle. In den QIAGEN-Extrakten konnte wiederum davon fast nur die Hälfte mit 0,040 ng/μl detektiert werden, gefolgt von MACHEREY-NAGEL mit 0,022 ng/μl und mit viel Abstand Promega mit 0,003 ng/μl und GEN-IAL mit keiner DNA-Detektion. Nach diesen beiden Untersuchungen lieferte die Phenol-Methode die besten Resultate. Die Ergebnisse der Vorgehensweisen nach QIAGEN und Q·BIOgene verhalten sich dabei gegensinnig. Obwohl die Q·BIOgene-Extrakte mehr DNA enthalten, waren sie doch weniger erfolgreich in der STR-Analyse. Eine mögliche Erklärung findet sich in der Größe der extrahierten DNA. Die Amplicons der RTQ-PCR haben eine Länge von 62 Basenpaaren, während das kürzeste Amplicon der STR-Analyse 77 bp lang ist. Es wäre eine Schädigung der DNA während der Q·BIOgene-Extraktion vorstellbar.

Aus dem Ergebnis der IPC der RTQ-PCR kann geschlussfolgert werden, ob durch die Extraktion Inhibitoren entfernt worden sind. Besonders auffällig ist dabei die vollständige Hemmung der PCR in allen Extrakten der GEN-IAL-Methode. Während die organische Methode in den zwei Extrakten der Probe K 3 eine Hemmung anzeigte, konnte mit Hilfe der QIAGEN-Methode zwar die IPC amplifiziert werden, aber auch keine DNA nachgewiesen werden. Bei beiden Methoden konnte in je einer Lösung der Probe K 9 eine Inhibition nachgewiesen werden, so auch in beiden Lösungen der MACHEREY-NAGEL-Anwendung. In Zusammenschau der erzielten DNA-Konzentrationen und der Inhibition im Fall des Knochens K 3 könnte geschlussfolgert werden, dass die Anwendung mit Silikaten mehr DNA-Verluste erbringt, aber Inhibitoren gut entfernt werden. Während die Phenol-Anwendung ungenügend Inhibitoren entfernt, dafür aber eine höhere DNA-Konzentration erzielt. Dies könnte sich auch aus dem Mechanismus der Methoden erklären lassen. Grundprinzip der Phenol-Anwendung ist das Entfernen von Inhibitoren aus der DNA-Lösung mit dem Problem, nicht alle Inhibitoren dabei spezifisch erfassen zu können. Die Silikate hingegen binden die DNA und entfernen sie aus der ursprünglichen Lösung mit der Schwierigkeit, einer ungenügenden Bindung, was vor allem bei wenig vorhandener DNA von Bedeutung ist [58,67,68].

Die Durchführung einer mtDNA-Analyse zeigte, dass mit der organischen Methode auch diese erfolgreich extrahiert werden kann.

Zur weiteren Beurteilung sind differenziertere Aussagen hinsichtlich der Knocheneigenschaften, der Anwendung im Alltag und der Ausstattung der Labore notwendig.

7.3 Zum Zustand des Ausgangsmaterials

7.3.1 Zustand des Knochens

Knochen und degradierte Materialien erbringen häufig nicht zufrieden stellende Ergebnisse [57]. Der Extraktions- und Analyseerfolg ist wesentlich vom Zustand des Knochens, der Quantität und Qualität der DNA, Verunreinigungen und Kontamination abhängig. Die Liegezeit des Knochens und das Ergebnis der Extraktion müssen dabei nicht miteinander korrelieren [56,68-70]. Laut Cattaneo ist ab einer Liegezeit von 10 Jahren ein Plateau erreicht, ab dem sich z. B. alle mtDNA-Analysen sehr ähnlich verhalten [67]. Die Knochenproben in dieser Arbeit wiesen eine Liegezeit von unbekannt, wenige Tage, drei, sechs, 19, 61 und 200 bis 5000 Jahren auf. Dabei erbrachten die unter einem Monat alten Proben N 1 und N 2, der dreijährige K 8 und ein Teil der sechsjährigen Knochen nämlich K 5 die besten Ergebnisse. Die Knochen ab einer Liegezeit von 200 Jahren erzielten keine verwertbaren Ergebnisse. Hiernach könnte also festgestellt werden: Je älter der Knochen ist, umso schlechter ist das

Ergebnis. Zusätzlich ist jedoch erkennbar, dass die Proben K 4, K 5 und K 6 gleichen Ausgangssituationen unterworfen waren, aber nur die Probe K 5 gute Werte erbrachte.

Nach Eintritt des Todes ist der Körper verschiedenen Abbauprozessen unterworfen. Dies sind die nach wenigen Stunden einsetzende Autolyse, welche durch körpereigene Enzyme bedingt ist [69], und die später auftretende Fäulnis, welche durch Bakterien verursacht wird. Die Geschwindigkeit und Dauer dieser Prozesse ist von den umgebenden Umweltfaktoren abhängig [71]. Casper stellte 1858 eine Regel zum Verhältnis des Fäulniseintritts an der Luft, in Wasser und im Erdboden auf [72]:

Luft : Wasser : Erde 1 : 2 : 8 Wochen

Diese und weitere Vorgänge wie z. B. Tierfraß führen schließlich zur Skelettierung. Die folgende Dekomposition der Knochen verläuft langsamer und umfasst auch die Zerstörung des Hydroxylapatits in Abhängigkeit vom pH-Wert, Sekundärmineralisation, Bodenart, Temperatur, Feuchtigkeit, mikrobiologischer Besiedelung und mechanischem Druck [19,69]. Dabei können aber Knochen vom selben Friedhof und ähnlichen Alters immer noch völlig unterschiedlich qualitative Ergebnisse erbringen [60,73]. Weiterhin haben zahlreiche Autoren festgestellt, dass die Röhrenknochen, die eine dicke Substantia compacta bzw. eine dichte Konsistenz besitzen, größte Aussicht auf noch amplifizierbare DNA bieten [38,63,74-76]. Andere Autoren können dies allerdings nicht bestätigen [77]. Fisher fand zwischen corticaler, spongiöser oder subchondraler Knochenmasse keine Unterschiede [8]. Allgemein kann jedoch behauptet werden, dass Knochen, die eine dichte, spröde und unbeschädigte Oberfläche aufweisen, eher gut erhaltene DNA beinhalten, als wenn sie hingegen feucht oder porös sind, Beschädigungen zeigen oder sich leicht abreiben lassen [70]. Der Knochenhalt steht in guter Übereinstimmung mit einer erfolgreichen Amplifizierung [62]. Dabei spielt die Färbung wohl eine untergeordnete Rolle [70], obwohl sie von Inhibitoren wie Huminsäuren, Eisen und Maillard-Produkten erzeugt wird [60,78]. Bei den Maillard-Produkten handelt es sich um zyklische Verbindungen, die nicht-enzymatisch durch Hitzeeinwirkung aus reduzierenden Zuckern und Aminosäuren entstehen. Huminsäuren sind hochmolekulare Verbindungen, die während des Abbaus von biologischem Material entstehen.

Unsere gut typisierten Knochen N 1 und N 2 wurden sofort nach Entnahme vom Leichnam steril verpackt und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Die Knochenproben K 4, K 5 und K 6 wurden am Strand nach längerem Aufenthalt im Wasser gefunden. Diese Knochen erschienen entfettet, dunkelbraun und gelblich verfärbt. Die Bedingungen zum DNA-Erhalt waren somit nicht optimal. Letztendlich ließ nur K 5 eine Typisierung zu. Der ebenfalls gut analysierbare Knochen K 8 wies laut Protokoll Tierfraßspuren auf und wurde ein Jahr nach Todeseintritt an

7.3.2 Zustand der DNA

Je weiter die Knochensubstanz zerstört wird, umso stärker ist auch die DNA den Umweltfaktoren ausgesetzt. Die Degradation beschreibt das Zerbrechen des DNA-Moleküls in kleinere Stücken aufgrund von chemischen und physikalischen Einflüssen, wie UV-Strahlung, Temperatur, Feuchtigkeit, pH-Wert, Oxidantien, mechanischer Stress, Nucleasen, Metallionen, Mikroorganismen, Harnsäure u. a. [69,81,82]. Die Veränderungen der DNA umfassen Basenmodifikationen und -verluste, Crosslinks und Aufspalten der Phosphatverbindungen [6,83]. Nach Iwamura spielen Mikroorganismen und Feuchtigkeit eine größere Rolle als hohe Temperaturen und UV-Strahlen [61]. Günstige Bedingungen für den DNA-Erhalt sind [12,69,83,84]:

- ein schnelles Austrocknen postmortal, welches eine Hydrolyse verringert
- niedrige Temperaturen bzw. das Fehlen großer Schwankungen dieser, da sie chemische Reaktionen verlangsamen
- ein hoher Salzgehalt, da dieser die Nucleasen hemmt
- eine möglichst geringe Besiedelung von Mikroorganismen
- ein neutraler oder leicht alkalischer pH-Wert, der eine gewisse Stabilität der Knochenmatrix als auch der DNA gewährleistet
- fehlende UV-Strahlung, die sonst zu Strukturveränderungen der DNA führen kann

Beispiele für besonders gut erhaltene Gewebe stellen Moorleichen dar, bei denen sich die Huminsäuren und der Sauerstoffabschluss günstig auswirken, da sie DNA-abbauende Enzyme hemmen [11]. Allerdings wirkt sich das saure Liegemilieu negativ auf die DNA aus. Bei Eisfunden, wie der Gletschermumie aus den Ötztaler Alpen, ist die geringe Temperatur der entscheidende Parameter [18]. Das heiße Klima bei ägyptischen Mumien ist zwar eher schädlich, aber aufgrund der gleichzeitigen Trockenheit der DNA-Erhalt möglich. Einige Autoren haben sich mit dem Schädigungspotential dieser Faktoren näher befasst [79,85]. MacHugh konnte anhand seiner Untersuchungen nachweisen, dass eine kalte und trockene Witterung und stabile Umweltbedingungen sich besonders günstig auf den Erhalt der DNA auswirken [86]. Einerseits können die Veränderungen der DNA den Ablauf der Extraktion stören, andererseits die Amplifizierung beeinflussen und somit eine Typisierung oder Sequenzierung verfälschen oder unmöglich machen [83]. Aus diesen Gründen gehen einige Autoren davon aus, dass unter ungünstigen Lagerungsbedingungen Amplicons länger als 200 bp kaum angetroffen werden und somit kontaminationsverdächtig sind [18,69,87].

7.3.3 Inhibition und Kontamination

Inhibition und Kontamination spielen vor allem bei der Arbeit mit Knochen eine wesentliche Rolle, da ohnehin nur sehr wenig DNA im Ausgangsmaterial verfügbar ist und sie u. a. deren Amplifizierung hemmen [60]. Zu den Inhibitoren gehören völlig verschiedene Substanzgruppen wie Huminsäuren [11], Metallionen [7], Fremd-DNA/ Nontemplate-DNA [10] und hohe Salzkonzentrationen [11], außerdem Kollagen I [38,88], Maillard Produkte [10], Fulvinsäuren [69], der Knochenbestandteil Hydroxylapatit [89], und der Gerbstoff Tannin [88,90]. Ihre unterschiedlichsten Eigenschaften machen es so schwierig, sie zu identifizieren und schließlich aus dem Extrakt zu entfernen. Aber auch Reste von Phenol, Silikaten, SDS, Proteinase K, EDTA und Proteinresten während der Extraktion können zur Hemmung der Amplifikation insbesondere der Taq-Polymerase führen [11,91,92]. Kontamination mit fremder DNA kann, außer der hemmenden Wirkung, auch eine falsche Typisierung hervorbringen [10,11]. Weiterhin bedeutet Kontamination mit rezenten Zellen nicht nur das Vorhandensein von Fremd-DNA, sondern bringt auch Nucleasen mit ein, die wiederum die DNA zerstören können. Somit ist im Umgang mit DNA, besonders mit aDNA, Sorgsamkeit hinsichtlich der Vermeidung von Kontamination und weiterer Schädigung der DNA geboten, aber auch ein ausreichend energisches Vorgehen, um Inhibitoren zu entfernen [11].

7.4 Zum Vorgehen mit den Knochenproben

7.4.1 Vorbehandlung

Abhängig von der Qualität der Knochen und ihrer vorliegenden Menge sind verschiedene Methoden zur Dekontamination der Oberfläche von Fremd-DNA und Umweltresten oder zur Beseitigung dieser denkbar [8,10,11,60,61,77].

Der nächste Schritt umfasst eine Entkalkung und ein eventuelles Zermahlen des Knochens, um die darin befindlichen Zellen der Lyse zugänglich zu machen. Die Dekalzifizierung sollte so lange erfolgen, bis der Knochen keinen harten Kern mehr aufweist. Das Zermahlen des Knochens kann diesen Vorgang verkürzen. Allerdings konnte Primorac zeigen, dass eine komplette Dekalzifizierung nicht unbedingt nötig ist, um geeignete DNA zu extrahieren [93]. Einige Autoren stellten sogar fest, dass die Wahrscheinlichkeit sogar reduziert ist [8,60,93]. Jedoch konnte Hochmeister an drei Monate bis elf Jahre alten Knochen nach der Entkalkung immer mehr DNA-Mengen gewinnen als ohne Entkalkung. Bei frischen Knochen sei dies allerdings nicht nötig [56]. Andelinovic setzt diesen Schritt erst ein, wenn eine Extraktion mit Phenol-Chloroform bereits zweimal fehlgeschlagen ist [63]. Denn zu bedenken ist, dass mit zunehmender mechanischer und chemischer Beeinflussung des Knochens auch die Zerstörung

der Zielmoleküle zunimmt. Folglich muss durchaus zielorientiert aber auch schonend extrahiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden beim Zersägen der Knochen Pausen eingelegt, um eine zu starke Hitzeentwicklung und somit Schädigung der DNA zu vermeiden. Danach wurden sie mit einem Skalpell gereinigt und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Nach einer Woche Entkalkung wiesen sie teilweise noch harte Stellen auf, die Proben A 1 bis A 7 und K 9 hingegen erschienen schon schwammig. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurde trotz Kenntnis der zuvor genannten kontroversen Ansichten das Risiko der Entkalkung über eine Woche hinweg in Kauf genommen. Allerdings ist es möglich, dass unter diesen Umständen sehr viel DNA der alten Proben verloren ging.

Erschwert wird der Vergleich der Methoden durch die unterschiedlichen Empfehlungen der Hersteller zu den Einsatzmengen der Knochen. Um diesen Empfehlungen etwas zu entsprechen, wurden unterschiedliche Knochenmengen pro Methode eingesetzt. Dabei wurde pro Knochen immer die gleiche Menge verwendet. Bei den in Tabelle 16 des Anhangs aufgeführten Werten handelt es sich um bereits entkalkte Proben. Während der Entkalkung verloren die Knochenstücke bis zu zwei Drittel ihrer Masse. Somit ergaben sich für die Q-BIOgene-Methode die optimalsten Einsatzmengen. Das schien aber aufgrund der besseren Ergebnisse für Phenol-Chloroform und QIAGEN kaum ausschlaggebend zu sein. Von den Proben K 3, K 8 und K 9 wurden mit ca. 200 mg bis 250 mg die größten Mengen Knochenmaterial eingesetzt. Letztendlich fielen aber K 5 und K 8 mit ihren positiven Resultaten auf. Dabei enthielten die Ansätze des Knochens K 5 mit 100 mg nur die Hälfte der Menge von K 8. Ebenfalls Mengen um 100 mg wurden von den Knochen K 1, K 4, K 6 und K 7 verwendet. Diese konnten aber keine so guten Ergebnisse wie K 5 und K 8 erbringen. Von den sehr alten Knochen A 1 bis A 7 und den Rezenten wurden die Mengen an die Phenol-Methode angepasst.

7.4.2 Extraktionsmethoden

7.4.2.1 *Phenol-Chloroform*

Um DNA mit Hilfe von Phenol-Chloroform zu extrahieren [24], sind mehrfaches Überführen der Lösung in neue Tubes und häufiges Zentrifugieren nötig (siehe auch S. 7). In dem hier verwendeten Protokoll erfolgte es neun Mal. Dadurch besteht die erhöhte Gefahr einer Kontamination. Des Weiteren kann es zu DNA-Verlusten durch Tubewechsel kommen. Schließlich können die Scherkräfte der Zentrifugation Schäden an der DNA verursachen [11,58]. Weiterhin ist auf die toxische und ätzende Wirkung von Phenol und Chloroform hinzuweisen, wodurch ein Arbeitsplatz mit Abzug und eine gesonderte Entsorgung notwendig

sind. Die oben erwähnte inhibitorische Wirkung des Phenols auf die PCR verlangt zusätzlich präzises Arbeiten. Trotz dieser Nachteile hat sich diese Methode durchgesetzt [58,60,61,64,93,94]. Selbst große Laboratorien arbeiten mit Phenol, wie z. B. das AFDIL bei Opfern des 11. September 2004 [80]. Das Protokoll in dieser Arbeit ist nahezu mit dem des AFDIL identisch. In der Literatur ist diese Methode immer wieder Gegenstand von Vergleichen [58,75,88]. So sind Goodyear und Willard der Meinung, dass die organische Extraktion und Ethanolpräzipitation nur ungenügend PCR-Inhibitoren beseitigt [78,82]. Andere Autoren versuchen durch geringfügige Modifikationen die Methode weiter zu optimieren [5,59,95,96]. Konomi verweist sogar auf Qualitätsunterschiede der Phenol-Chloroform-Lösungen verschiedener Anbieter. So sei die Lösung der Firma Sigma besser als die des Herstellers Boehringer [95]. Maniatis beschreibt als letzten Schritt eine Präzipitation der DNA mit Ethanol. Viele Autoren ersetzen diese durch eine einfach zu handhabende Aufreinigung mit Centricon 100 Säulen [82,92], was auch in dieser Arbeit Anwendung fand. Centricon erziele dabei sogar bessere Ergebnisse als die Ethanolpräzipitation, da weniger DNA-Verlust entsteht [82] und sei v. a. nützlich, wenn die DNA sehr degradiert ist [93]. Diese Mikrokonzentratoren enthalten eine anisotrope Membran, die große Moleküle wie DNA, aber auch einige Inhibitoren zurückhält [92]. Somit wird die Lösung von Salzen befreit und zusätzlich konzentriert.

7.4.2.2 Silikate

Silikate sind Anionenaustauscher und werden in den Kits von QIAGEN und MACHEREY-NAGEL als Säulenmembran und von Q-BIOgene als Glasmilch verwendet [92,97,98]. Silikate binden DNA. Eine Voraussetzung dafür ist, dass auch chaotrope Salze, wie Natriumjodid, Guanidinisothiocyanat und Natriumperchlorat, vorhanden sind. Sie stören hydrophobe Interaktionen von Proteinen und denaturieren sie dadurch, was einer Aussalzung entspricht. Außerdem neutralisieren die Kationen der Salze die negative Ladung der Silicaoberfläche und laden sie positiv. Danach kann die negativ geladene DNA erst gebunden werden [25,99]. Anschließend mit einem Salz-Ethanol-Puffer gewaschen, kann die DNA mit Wasser oder TE-Puffer wieder gelöst werden [25,91]. Vorteile dieser Vorgehensweise sind die Ungiftigkeit, eine einfachere Handhabung, gute Inhibitorenentfernung und in der Anwendung weniger nötige Zentrifugationsschritte, als die Phenol-Anwendung verlangt [67,91]. Nachteil sind ein DNA-Verlust aufgrund ungenügender Bindung der DNA und ein Mindestelutionsvolumen [58,67,68]. Cattaneo empfiehlt glass milk daher eher für Untersuchungen von mtDNA, aufgrund ihrer höheren Kopienanzahl [67]. Des Weiteren ist auf ein Hemmen der PCR durch Silikapartikel hinzuweisen und somit eine vollständige Entfernung nach Benutzen von Glas-

milch notwendig [91,92]. Trotzdem finden Silikate ebenfalls eine breite Anwendung [7,62-64]. Prado konnte keinen Unterschied zwischen Silicaresin und Säulen feststellen [5]. Lassen kombinierte erfolgreich eine Phenol-Anwendung mit Silicapowder an Mumien-gewebe [10]. Auch Yang erhielt gute Resultate mit einer ähnlichen Kombination [92]. Uneinigkeit besteht auch bei den Silikatmethoden gegenüber der Erfolgsrate und möglichen Verbesserungen [63,68,87,91]. Die Vorgehensweisen nach MACHEREY-NAGEL und QIAGEN beruhen beide auf Säulen. Trotzdem konnten mit QIAGEN bessere Resultate erzielt werden. Ein Grund könnte sein, dass die MACHEREY-NAGEL-Methode mit größeren Lösungsvolumina arbeitet und dabei DNA verloren geht.

7.4.2.3 GEN-IAL

Die Anwendung nach GEN-IAL verzichtet ebenfalls auf toxische Lösungen und Säulen-systeme, was DNA-Verluste reduziert. Nähere Angaben zu den Bestandteilen des Kits sind leider nicht ausfindig zu machen. Das Extraktionsprinzip beruht laut Becker auf das Aus-salzen [58]. Zellreste, Proteine und mögliche PCR-Inhibitoren besitzen eine lockere Hydrat-hülle und sollen präzipitiert werden. Kommen nun Salzionen höherer Konzentration ohne Hydrathülle dazu, z. B. Lithiumchlorid, entziehen diese den Vorhergenannten die Hydrathül-len. Die Zellreste, Proteine und PCR-Inhibitoren sind somit unlöslich und fallen aus. Diese Vorgehensweise kann ebenfalls auf Tubewechsel und Zentrifugieren nicht verzichten. Nach Becker ist diese Aussalzmethode noch erfolgreicher, als die organische Extraktion und die organische besser als eine Silikatanwendung. Seine Angaben zu den verschiedenen Aus-gangsmaterialien und auch der Knochen sind allerdings nur ungenügend beschrieben [58]. Cattaneo beschreibt ebenfalls einen höheren DNA-Ertrag als mit Silikaten, verweist aber auch auf ein zu geringes Entfernen von Inhibitoren mittels Aussalzen. Das konnte auch in dieser Arbeit mit Hilfe der Real Time PCR durch fehlenden Nachweis der IPC bestätigt wer-den.[67]. Des Weiteren waren die meisten Extrakte der GEN-IAL-Methode aufgrund ihrer offensichtlichen Gelb- bis Braunfärbung auffällig. Denkbar wäre somit eine Aufreinigung der DNA nach der Extraktion, wobei der Mehraufwand nur durch eine deutlich bessere Ausbeute vertretbar wäre.

7.4.2.4 Paramagnetische Partikel

Je nach Oberflächeneigenschaft, können paramagnetische Partikel z. B. DNA binden. Werden sie einem äußeren Magnetfeld ausgesetzt, weisen sie eine in Feldrichtung zeigende Magneti-sierung auf [100]. Somit sammeln sich die Partikel am Magnet, so dass die verbleibende

Lösung entfernt werden kann. Folglich benötigt diese Methode keinen Zentrifugationsschritt. Jedoch ist zu beachten, dass die Beadmenge die DNA-Ausbeute begrenzt und somit genaues Pipettieren und ständiges Eluieren der Beads notwendig ist. Cattaneo verglich eine Anwendung mit Paramagnetischen Beads mit einer Aussalzmethode mit Hilfe von Natriumazetat und einer Glasmilch-Anwendung, wobei die letztere am erfolgreichsten war [67]. Die Methode mit paramagnetischen Partikeln habe dabei noch schlechter abgeschnitten als die Aussalzmethode. Mit Paramagnetischen Partikeln wurde zwar weniger DNA extrahiert, die Methode soll aber Inhibitoren immer noch besser als mit der Aussalzung beseitigen. Staiti verglich Phenol-Chloroform mit Promega IQ mit abgewandeltem Inkubationspuffer und geringerer Resinmengen und empfand die Promega Methode als schneller und sicherer in Bezug auf die Reinheit und erzielte Menge der DNA [57].

7.4.3 Kits und Automatisierung gegenüber Handarbeit

Die heute auf dem Markt erhältlichen Kits zur DNA-Extraktion erlauben eine einfachere und standardisiertere Handhabung. So sind bei industriell gefertigten und abgefüllten Lösungen der pH-Wert, die Mengen und Konzentrationen genauer und die Kontaminationsgefahr geringer. Außerdem werden Methoden bevorzugt weiterentwickelt, die ohne giftige Zusatzstoffe auskommen. Weiterhin kann unter speziell optimierten Kits für Knochen, Haare, Blut, Speichel, Sperma, Weichgewebe und anderen gewählt werden. Mittlerweile ersetzen Homogenisatoren oder vollautomatisierte Vorgehensweisen die mühsame und fehleranfällige Handarbeit [10,65]. Allerdings ist dies nach Auffassung Rechsteiners für Knochen wenig geeignet [101]. So ist bei allen Knochenproben, gerade bei sehr alten Knochen, eine speziell angepasste Behandlung angebracht. Aufgrund der häufig unbekanntem Zusammensetzung der Kitlösungen ist individuelles Arbeiten jedoch kaum möglich. Auch kann auf die variable, aber meist begrenzte Menge der Knochenprobe nur unzureichend eingegangen werden. DNA-Untersuchungen an Knochenproben sollten nur durch erfahrene Untersucher vorgenommen werden.

7.4.4 Weitere Methoden

Neben den in dieser Arbeit verwendeten Methoden finden sich in der Literatur auch Anwendungen mit Chelex, Dextran Blue, Ultraschall und zusätzliche Aufreinigungsmethoden, die hier der Vollständigkeit halber erwähnt werden sollen. Sie werden aber für die DNA-Typisierung von Knochen kaum angewendet. Im Vergleich Chelex mit der organischen Extraktion sei Ersteres nicht bei Knochen aber bei Blut empfehlenswert, da es vor allem Metall-

ionen entferne [93,102]. Chelex sei zudem einfach und schnell zu handhaben, aber entferne andere Inhibitoren in den meisten Fällen nicht [82]. Dextran Blue ist ein Carrier zur Entfernung von PCR-Inhibitoren mit selektiver Ethanol Präzipitation. Kalmar empfiehlt eine Anwendung nur, wenn andere Methoden versagt haben [88]. Die Anwendung von Ultraschall zum Zellmembranaufbruch hat aber zu einer auffällig geringeren DNA-Ausbeute geführt, womöglich aufgrund einer zusätzlichen Fragmentation der DNA [5].

7.4.5 PCR

Dem Hauptaugenmerk dieser Arbeit entsprechend wurden - wo immer möglich - alle PCR-Durchgänge unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Sämtliche Parameter wie Konzentrationen, Primerart, Taq-Polymerase-Art, Dauer, Zyklenanzahl, Temperatur könnten an den Extrakt angepasst werden. Um Zeit und Ausgangsmaterial zu sparen, wurde eine Quadruplex-PCR gewählt. Ein Nachteil dabei ist allerdings ein Verlust der Effizienz der PCR, da nicht für alle Komponenten ideale Konditionen bestehen [103]. In der Literatur wird ein DNA-Einsatz von 0,3 ng bis 2,0 ng empfohlen, um für die STR-Analyse balancierte Peaks zu erhalten [41,42,54,104,105]. Unter bestimmten Veränderungen der PCR und ihrer Komponenten sind wohl auch Mengen zwischen 10 pg bis 1000 pg oder gar einer einzigen Zelle erfolgreich einsetzbar [7,106,107]. Dabei steigt allerdings die Gefahr von Kontamination und Fehltypisierungen.

Für degradierte DNA kann die Anwendung von Miniprimern hilfreich sein [7,18,108]. Diese erzielen kürzere Amplicons, indem sie so nahe wie möglich vor der Repeat-Region binden. Konventionelle STR-Typisierung verlangt dagegen eine DNA-Molekül-Größe von 100 bis 350 bp. Stark degradierte DNA kann jedoch unter 150 bp liegen [109]. Die Miniplexe arbeiten sogar erfolgreich mit noch geringeren DNA-Einsätzen [110]. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer der mtDNA-Analyse empfiehlt Edson für hochqualitative DNA, da ihre Ampliconlänge 440 bp beträgt [80]. Seine Miniprimere erzeugen hingegen ein Amplicon von nur 150 bp. Die hier verwendeten Primer konnten aber auch bei der endgültigen Identifikation des Hitler-Vertrauten Martin Bormann, der 1945 starb, erfolgreich angewandt werden [64].

7.4.6 RTQ-PCR

Vor Einsatz des DNA-Extrakts in die Amplifizierung ist es vorteilhaft, die DNA-Konzentration zu ermitteln. Somit kann ein wesentlicher Störfaktor der PCR ausgeschlossen werden, indem optimale DNA-Mengen eingesetzt werden. Das wiederum spart Zeit und Material. Es lässt sich jedoch damit keine Aussage zur Amplifizierbarkeit der DNA treffen

[111]. Allerdings ist die optimale DNA-Menge bei nicht degradiertem DNA, wie sie z. B. aus frischem Gewebe gewonnen wird, nicht entscheidend.

Eine Möglichkeit der Quantifizierung ist die photometrische Messung, die allerdings auch sehr fehleranfällig ist. Aufgrund ähnlicher Absorptionseigenschaften bei Wellenlängen von 260 und 280 nm werden nicht nur DNA, sondern auch Proteine, PCR-Inhibitoren, Fremd-DNA und RNA detektiert [67,105]. Außerdem sind zumeist größere Ausgangsvolumina erforderlich [105].

Mehrere Vorteile bringt hingegen eine Real Time PCR. Sie detektiert einerseits spezifisch die Ziel-DNA und andererseits können Inhibitoren indirekt durch eine interne PCR-Kontrolle in jeder Probe nachgewiesen werden. Weiterhin werden kleinere Mengen der DNA-Lösung eingesetzt und es können ebenfalls geringere Mengen Template-DNA detektiert werden. Die Nachweisgrenze der hier angewandten Methode liegt unter 0,023 ng/ µl und entspricht weniger als 13 Kopien der Quantifiler Human target DNA in 2 µl. Einziger Nachteil ist der hohe Anschaffungspreis. Inzwischen sind die meisten forensischen Laboratorien mit entsprechendem Equipment ausgestattet. Inhibitoren konnten vier Mal bei dem Knochen K 9 und zwei Mal bei dem Knochen K 3 mit Hilfe der IPC nachgewiesen werden. Vor allem bei der Probe K 9 war die starke Braunfärbung des Knochens schon im Voraus auffällig. Somit könnte der Versuch einer weiteren Aufreinigung erfolgen.

Bei den untersuchten Knochen war die Probe K 5 am erfolgreichsten, dicht gefolgt von K 8, wie auch in den STR-Profilen. K 3 und K 9 fielen wiederholt mit kaum detektierbarer DNA auf. Die in Tabelle 8 aufgeführten DNA-Mengen liegen pro Knochen betrachtet recht weit auseinander. Eine Möglichkeit der Erklärung ist die stochastische Wirkung der geringen Mengen während der PCR. Schließlich erschienen die STR-Analyseergebnisse, nach Optimierung der DNA-Einsatzmenge in die PCR, besser. Somit ist die Anwendung einer RTQ-PCR bei ungewissem Extraktionserfolg und ungewissem Zustand der DNA zu empfehlen.

7.4.7 FLA der nukleären DNA

Die Durchführung der STR-Typisierung wurde gewählt, um aus deren Auswertbarkeit Rückschlüsse auf die Qualität und Quantität der DNA und somit der Extraktionsfähigkeit der Methoden zu ziehen [67,112]. Richtungsweisend kann das anhand der Artefakte und der erzielten Peakhöhen beurteilt werden [42,54]. Mit Hilfe des Scores wurden mögliche Peaks gegenüber Artefakten definiert. Entscheidend für die Punktevergabe war die Anzahl der detektierten STR-Marker. Die Bedingungen waren für alle Proben wieder gleich. Ziel der Arbeit war es nicht, die Läufe je Probe zu optimieren. Dem Score zufolge lässt sich feststellen, dass

die Phenol-Methode mit 15 Punkten ein Punkt vor der QIAGEN-Anwendung liegt. Werden zusätzlich die Peakhöhen betrachtet, liegt QIAGEN wiederum hinter der Phenol-Methode mit vier Peaks unter 100 rfu gegenüber zwei der Phenol-Methode und zwei zwischen 100 und 200 rfu bei beiden Methoden. Die Peakhöhenverhältnisse sind wie die Peakhöhen ebenfalls von der Menge der vorliegenden DNA abhängig, da es durch stochastische Effekte zu einer stärkeren Amplifizierung eines Allels kommen kann und somit ein eigentlich heterozygoter Genotyp als homozygot fehlbestimmt wird [54]. Die höchsten Stutter wurden insgesamt nur viermal über 30 Prozent bzw. bei heterozygoten Proben über 40 Prozent der Höhe der Hauptpeaks gefunden.

Es wurden vier Loci unterschiedlicher Länge untersucht, die auf autosomalen Chromosomen liegen. Da bei den vorliegenden Proben von degradierter DNA ausgegangen werden kann, war zu erwarten, dass die kürzeren Allele vermehrt nachgewiesen werden können und höhere Peaks aufweisen als die längeren Allele [40,42,110,113]. Entsprechend waren von allen 73 STR-Analysen nach Beurteilung mittels des Scores 17-mal D3S1358, ebenfalls 17-mal D8S1179, aber nur 7-mal D18S51 und 15-mal SE33 erfolgreich zu detektieren. Das nach dem Score beurteilte längste nachgewiesene Allel ist 30,2 von SE33 von K 10 mit einer Länge von 253,00 bp, das zweitgrößte von K 8 von D18S51 Allel 17 mit einer Länge von 237,60 bp. Eine vollständige Typisierung der Proben ist nicht immer gelungen. Viele mögliche Allelpeaks wurden außerdem, aufgrund der getroffenen Definitionen durch den Score, nicht anerkannt. Dennoch sollte der Blick auf das Elektropherogramm nicht durch einen Scorewert oder durch eine Computereinstellung ersetzt werden. Im Zweifelsfall haben Mehrfachbestimmungen immer das Primat.

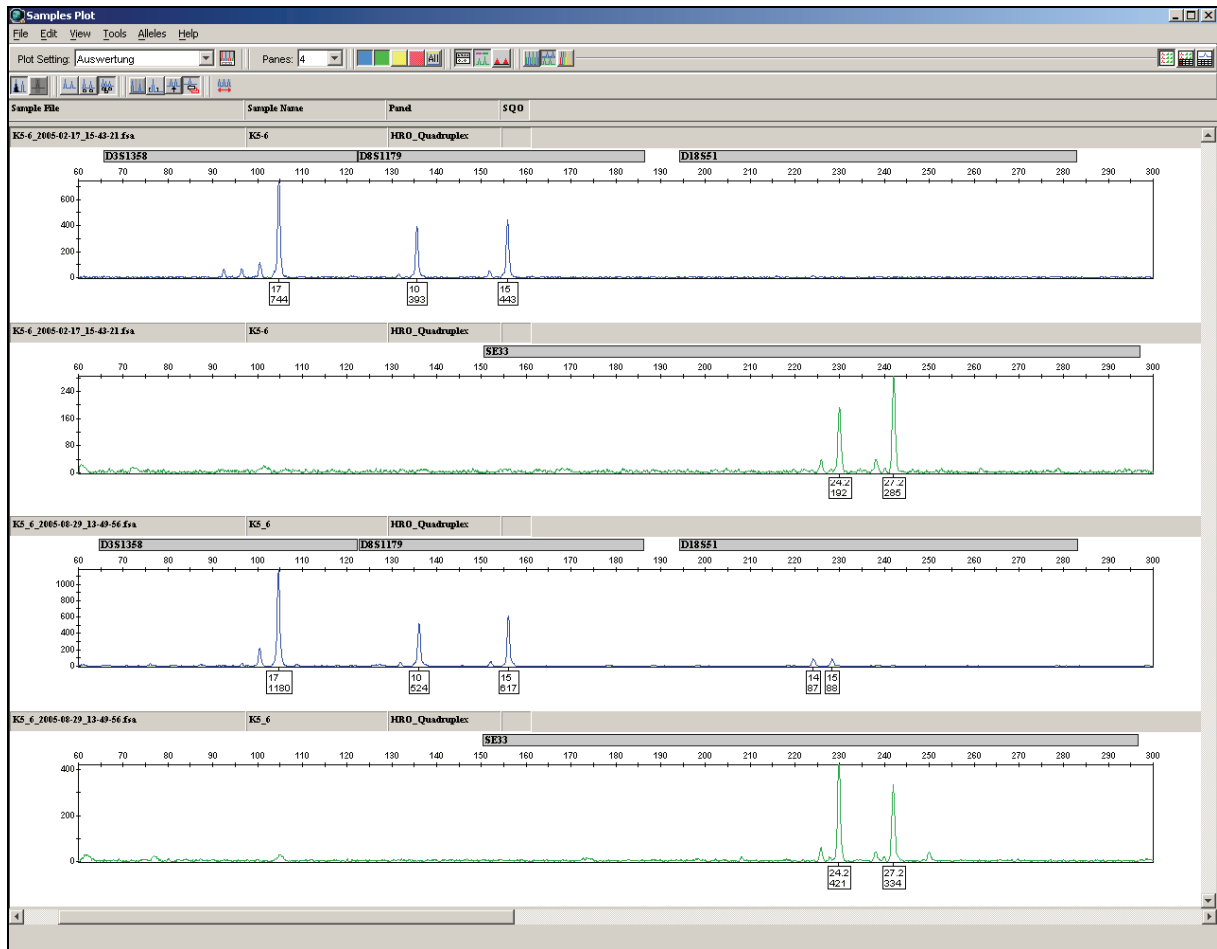


Abbildung 19: Zunahme der Peakhöhen am Beispiel K 5 (MACHEREY-NAGEL)

* vor (oben) und nach (unten) Optimierung der DNA-Einsatzmenge

Des Weiteren fallen im oberen Elektropherogramm typische Stutter auf sowie ein Dropout des Locus D18S51.

DISKUSSION

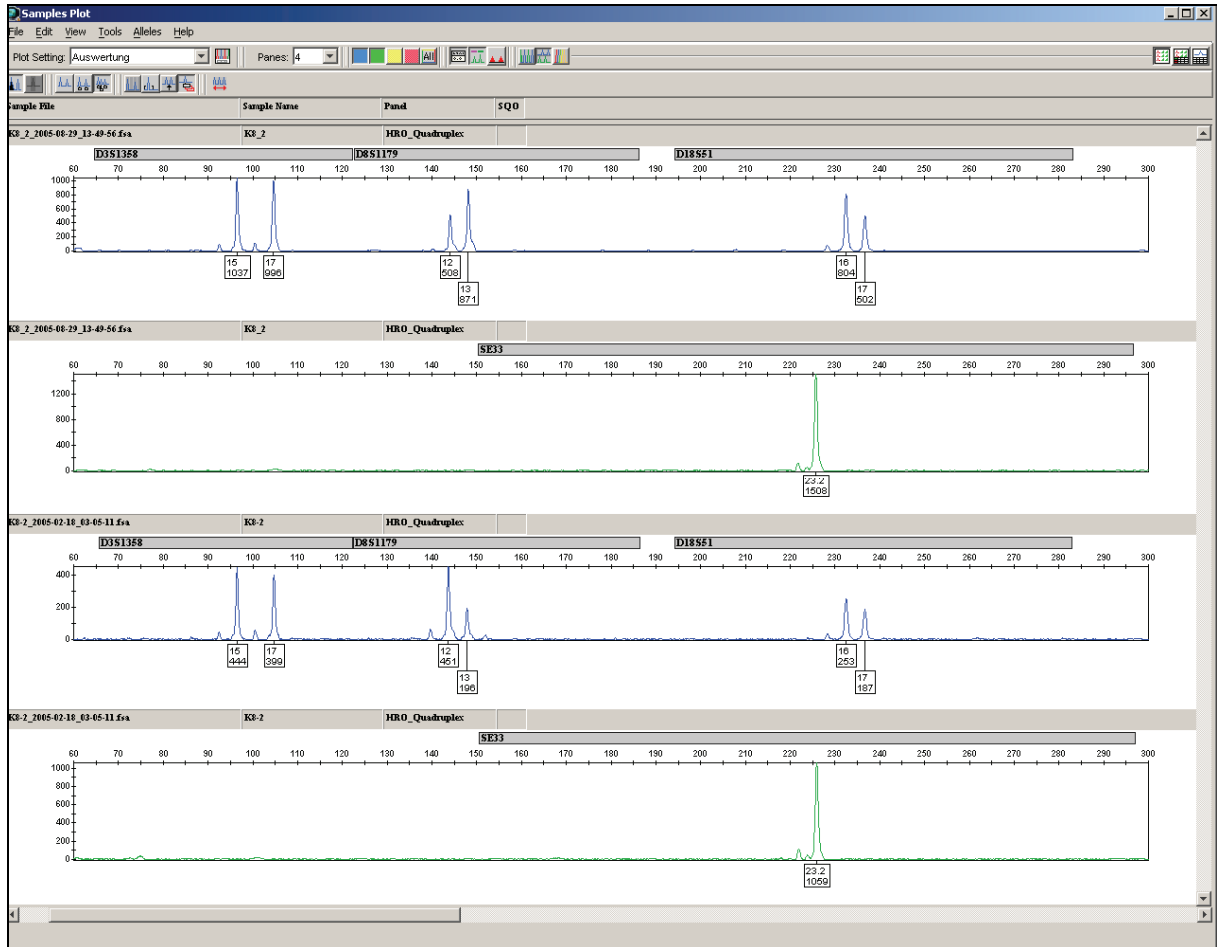


Abbildung 20: Ergebnis der Knochenprobe K 8 nach der QIAGEN-Extraktion

* Im Locus *D8S1179* wurde im unteren Elektropherogramm das Allel 13 nach den Scorekriterien nicht gewertet.

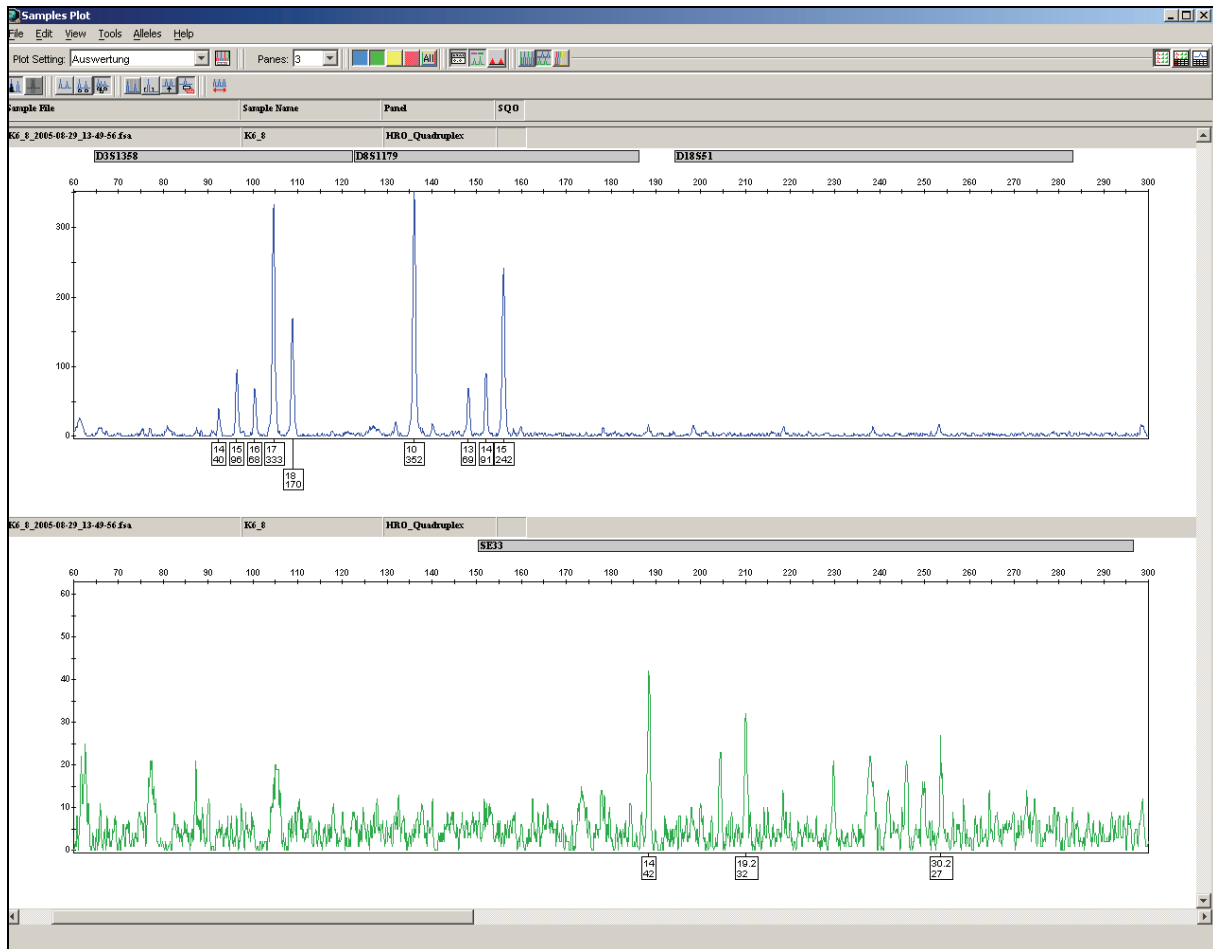


Abbildung 21: Ergebnis der Knochenprobe K 6 nach der Phenol-Extraktion

* *In diesem Fall der Typisierung von K 6 sind die Peaks zu niedrig, um sie von Stuttern und Hintergrundrauschen eindeutig zu trennen.*

Eine weitere Möglichkeit, die man in den Score einfließen lassen könnte, wäre die Peakarea. Diese stellt nach Clayton einen besseren Indikator für die DNA-Menge dar, weil so die Peakform mit einbezogen würde [40].

In der zweiten Typisierung der Phenol-Extrakte konnten plötzlich auffällig gute Peaks beobachtet werden, die nicht allein durch die Optimierung der eingesetzten DNA-Menge zu erklären sind. Somit ist ein Pipettierfehler oder ähnliches im ersten Durchgang denkbar. Die Probe K 2 erbrachte nur eine Typisierung in einer Phenol-Aufarbeitung, die mit optimierter DNA-Menge lief. Darin konnten eindeutige Peaks dargestellt werden, die aufgrund der Einmaligkeit auf eine Kontamination hinweisen können. Anhand der Muster der Labormitarbeiter konnte keine Quelle gefunden werden. Die am meisten erfolgversprechenden Knochen waren K 5 und K 8. Die Probe K 9 erbrachte gar keine Typisierung. Bei der Arbeit mit alter

DNA treten immer wieder typische Artefakte auf. Während dieser Arbeit fanden sich vor allem Stutter Banden und Allel dropout bzw. Locus dropout.

7.4.8 Sequenzierung der mtDNA

Mit der Durchführung einer mtDNA-Sequenzierung sollte gezeigt werden, ob die Phenol-Methode auch diese ausreichend ermöglicht. Daher wurde die Analyse auf die HV 1-Region begrenzt. Holland empfiehlt ab einem Knochenliegealter von 30 Jahren nur noch mtDNA zu nutzen [7].

Vor der eigentlichen Sequenzierung erlaubten die Banden der Flächengelelektrophorese eine Beurteilung von Qualität und Quantität der Ziel-DNA. Entsprechend den Ergebnissen der STR-Analysen konnten mit den GEN-IAL-Proben keine Banden erzeugt werden. Proben, die eine STR-Typisierung zuließen, zeigten auch Banden. Wie zu erwarten war, fiel insgesamt die Ausprägung der Banden besser aus, als die STR-Analyse. Grund dafür ist die höhere Anzahl der mtDNA-Moleküle gegenüber der nukleären DNA pro Zelle. Im Gegensatz zur nukleären DNA, die in zweifacher Ausführung pro Zelle vorliegt, kann die mitochondriale DNA gewebe- und artenabhängig über 1000 Kopien je Zelle aufweisen [43].

Die Proben des Landesmuseums und K 3, K 6, K 9 und K 10, die nach der Phenol-Methode extrahiert wurden, ließen im Minigel keine Bande erkennen und enthielten somit keine relevanten Mengen geeigneter mtDNA. Die Proben K 1, K 2, K 4, K 5, K 7 und K 8 sowie die frischeren N1a, 1b, 2a und 2b konnten sequenziert werden, wobei einige ein paar Besonderheiten aufwiesen:

K 2: In den drei Ansätzen zur Sequenzierung fielen fünf Positionen auf, die nicht eindeutig einer Base zugeordnet werden konnten. Darunter befindet sich auch die Möglichkeit einer CRS, so dass eine Kontamination anzunehmen ist. Da sich diese Abweichung in allen Durchläufen widerspiegelt, ist von einer Kontamination des Extrakts auszugehen, was sich auch in der STR-Analyse zeigt. Alternativ wäre auch eine Sequenzheteroplasmie denkbar. Dass heißt, ein Individuum hätte zwei verschiedene durch Mutation entstandene mtDNA-Moleküle, die sich in einer Base unterscheiden [43]. Da es sich hier aber um gleich fünf Basenpositionen handelt, ist diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich.



Abbildung 22: Ausschnitt aus der Sequenz der Probe K 2

* Die Kontamination zeigt sich durch zwei Peaks fast gleicher Höhe z. B. an der Position 16223 in allen drei Sequenzierdurchgängen. Y steht für Cytosin und Thymin, R steht für Guanin und Adenin.

K 4: In einem Ansatz der mtDNA-Sequenzierung sind ebenfalls Basen vorhanden, die nicht eindeutig zugeordnet werden können, mit Unauffälligkeiten in den anderen beiden Ansätzen. Diese weisen auf eine Kontamination während dieses einen Durchgangs hin.

K 7: Es konnte nur streckenweise eine DNA-Sequenz bestimmt werden, da stärkeres Hintergrundrauschen und unvollständige primernahe Bereiche vorlagen. Bei dieser Probe war bereits im Minigel eine nur schwache Bande erkennbar. Ursache könnte eine zu geringe DNA-Menge sein.

K 8: Der erste Analysedurchlauf ergab ein komplettes Sequenzmuster, wogegen in zwei weiteren Versuchen der Optimierung keine Bande mehr im Minigel erreicht werden konnte. Es kann davon ausgegangen werden, dass durch Kontamination mit DNasen oder häufiges Auftauen starke Schäden der DNA aufgetreten sind.

N 2: Aufgrund des C-Stretch und undeutlicher primernaher Bereiche, ist eine Sequenzbestimmung sowohl im Extrakt a als auch b schwierig. Durch Hintereinanderliegen mehrerer

Cytosinmoleküle, so genannte Polycytosinstränge, im Templatemolekül überlagern sich die Sequenzierprodukte und führen zu einer Phasenverschiebung. Das heißt, die danach folgenden Basen werden an falschen und unterschiedlichen Positionen detektiert und erbringen ein nicht definierbares Muster. Häufig ist dies wohl der Fall bei Haplotypen mit einem Cytosin an Position 16189, was auch auf diese Probe zutrifft [114]. Ein bekanntes Problem sind die primernahen Bereiche der DNA. Hier arbeitet die Polymerase sehr fehlerhaft, was zu uneindeutigen Sequenzabschnitten führt. Es wäre ein zusätzlicher neuer Ansatz mit Primern denkbar, die ein längeres DNA-Stück begrenzen, um diesen Bereich sicher zu sequenzieren. Je länger dieses Fragment allerdings ist, umso unwahrscheinlicher wird der Amplifizierungserfolg bzw. die Ausbeute gerade bei alter DNA.

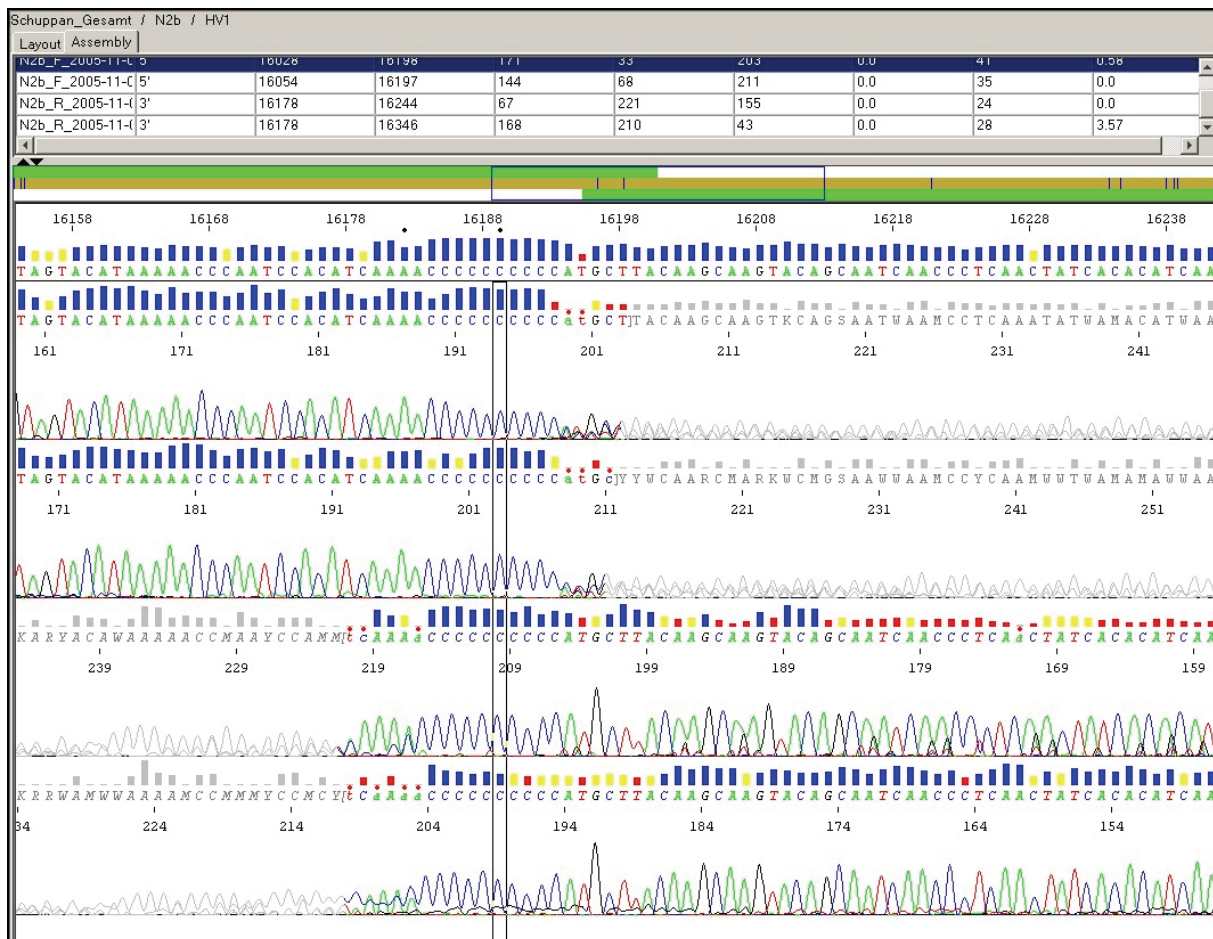


Abbildung 23: Ausschnitt aus der Sequenz der Probe N 2a.

* Erkennbar ist der C-Stretch, bestehend aus 10 hintereinander liegenden Cytosinbasen an Position 16184 bis 16193 und die folgende Schwierigkeit der Basenzuordnung.

Erwartungsgemäß wurden von den frischen Knochen N 1 und N 2 sehr gute Ergebnisse erhalten. Von den zehn Knochen höheren Alters K 1 bis K 10 waren sechs erfolgreich. Aufgeschlüsselt nach dem Alter lässt sich feststellen, dass die etwa 20 Jahre alten Knochen ebenfalls gute Resultate erbrachten. Während die ca. 50 Jahre alten Knochen unter Schwierigkeiten zu typisieren waren und die über 50 Jahre alten sogar keine Sequenzierungen zuließen.

Die Phenol-Methode ermöglicht somit auch mtDNA-Analysen.

Die verschiedenen Eigenschaften der STR der nucleären DNA und der HV-Regionen der mtDNA bieten unterschiedliche Einsatzmöglichkeiten.

So kann der Nachweis von STR vor allem dann eingesetzt werden, wenn mit fragmentierter DNA zu rechnen ist, da sie besonders kurze DNA-Abschnitte von 80 bp bis 400 bp darstellen [12]. Daher wird sie zur Personenidentifikation, in der Populationsgenetik, zur Aufstellung von Stammbäumen und als Krankheitsmarker genutzt [115]. Des Weiteren sind die STR-Polymorphismen die Methode der Wahl bei der Interpretation von Mischspuren und Vaterschaftstests. Mischspuren können eindeutiger durch Anzahlhäufung der Allele der STR dargestellt werden, als durch verschiedene Möglichkeiten von Basensequenzen der mtDNA. Dafür ist die mtDNA sehr gut charakterisiert, weist keine Rekombination und eine höhere Evolutionsrate auf und wird nur maternal vererbt, was in der Erforschung von Populationswanderungen sehr nützlich ist. Gerne wird sie auch bei Untersuchungen von Material mit langer Liegezeit, telogenen Haaren, zur ethnischen Herkunft und mütterlichen Verwandtschaftsbeziehungen eingesetzt [45].

7.4.9 Authentizität der Ergebnisse und Qualitätsmanagement

Das Qualitätsmanagementsystem des Labors für forensische Genetik der Universität Rostock wurde 2005 durch die KFGA nach einem Prüfverfahren akzeptiert. Eine weitere externe Qualitätskontrolle stellen die 2x jährlich stattfindenden GEDNAP-Ringversuche der DGRM dar. Zusätzlich wurden die unter 5.1 genannten Vorsichtsmaßnahmen wie das Arbeiten mit Handschuhen und Kittel, der räumlichen Trennung der einzelnen Untersuchungsphasen etc. entsprechend den Richtlinien der ISFG eingehalten [114]. Bedeutsam ist auch die EDV-basierte Prüfung der Ergebnisse durch die Software SeqScape und GeneMapper. Die Knochenproben dieser Arbeit wurden zwar nur je einmal pro Methode extrahiert, aber insgesamt lagen aufgrund der sechs Methoden gleich sechs Muster zum Vergleich vor. Daneben ergab die zweite optimierte STR-Analyse sich entsprechende Muster. Zusätzlich wurden die

STR-Typen aller Labormitarbeiter mit den Proben verglichen; andere Kontaminationsquellen wurden ausgeschlossen. Die Untersuchung der K 8-Probe, im Vorhinein von einer Medizinisch Technischen Assistentin des Labors durchgeführt, ergab das gleiche Typisierungsergebnis wie von diesem Durchlauf. Negativkontrollen und Längenstandards wurden ebenfalls grundsätzlich mitgeführt. Durch die mehrmalige Untersuchung sowohl der F- als auch R-Sequenz des HV 1-Abschnitts der mtDNA ist auch hier eine Reproduzierbarkeit gewährleistet. So konnte mit Hilfe der DNA-Sequenzierung im Extrakt der Probe K 2 und in einem PCR-Ansatz der Probe K 4 Fremd-DNA festgestellt werden. Aufgrund der höheren Kopienanzahl der mtDNA tritt Kontamination durch plasmatische DNA auch eher ein als bei nucleärer DNA. In dieser Untersuchung ist es nicht gelungen, mit Phenol extrahierte aDNA der Proben A 1 bis A 7 im Gel sichtbar darzustellen, aber es wurde auch keine Kontamination nachgewiesen. Die Frage der Authentizität stellt sich vor allem bei der Arbeit mit aDNA aufgrund ihrer geringen Molekülanzahl als auch ihrer chemischen Veränderungen. Empfehlenswert für die Arbeit mit aDNA wäre eine mehrfache Extrahierung und Analyse in einem Labor, welches sonst nicht mit entsprechender, in diesem Fall humaner DNA arbeitet und zusätzlich eine weitere unabhängige Aufarbeitung in einem anderen Labor. Ständig mitgeführte Negativkontrollen sind unabdingbar. Einige Autoren zogen die Molekülgröße der analysierten DNA-Stücke heran. Alte DNA weist meist eine Länge von 100 bp auf. Handelt es sich bei den untersuchten DNA-Molekülen um längere Exemplare, ist die Authentizität in Frage gestellt. Aber auch 100 bp bis 600 bp konnten bei aDNA-Proben nachgewiesen werden [60,73]. Somit erweist sich die Fragmentlänge als alleiniges Kriterium nicht als aussagekräftig. Bei den vorliegenden Proben konnten in der STR-Analyse Amplicons mit einer Maximallänge von 253,0 bp nachgewiesen werden. Die erfolgreichere mtDNA-Analyse erbrachte Amplicons mit einer Länge von 440 bp. Die RTQ-PCR ergab Amplicons von sogar nur 62 bp. Eine weitere Möglichkeit zur Einschätzung der Authentizität ist das gleichzeitige Typisieren von Tierknochen gleichen Ursprungs und Nachweis artspezifischer Marker [6,60]. Schließlich stellt sich bei der Untersuchung von alter mtDNA die Frage nach der postmortalen Modifikation der Sequenz. Zur Einschätzung kann die Untersuchung des Erhaltungszustands vorhandener Aminosäuren dienen [83]. Auf weitere Methoden und Reparaturmechanismen verweist Cipollaro [6].

8 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

- 1) In der vorliegenden Arbeit wurde an 17 Knochen unterschiedlichen Alters und Herkunft die Anwendbarkeit von sechs DNA-Extraktionsmethoden getestet und anhand einer STR-Typisierung beurteilt.
- 2) Mit der Phenol-Aufarbeitung konnte nucleäre und mtDNA extrahiert werden.
- 3) Es wurde ein Scoresystem entwickelt, das die Peaks der FLA definiert und deren Höhe, Peakhöhenverhältnisse, Stutter und Artefakte mit einbezieht.
- 4) Unter Berücksichtigung der erzielten Analysenergebnisse ist die organische Extraktion mit Phenol und der anschließenden Aufreinigung mit Centricon die erfolgreichste Methode. Sie erzielte 15 von 40 möglichen Punkten.
- 5) Allerdings ist der Unterschied zur QIAGEN-Methode mit der Anwendung von Silikamembransäulen sehr gering. Sie erreichte 14 von 40 Punkten.
- 6) Erfolglos blieb die Aussalzmethode nach GEN-IAL.
- 7) Nur wenige Knochenproben waren typisierbar. Aus älteren Knochen mit einer geringen Menge degradierter DNA bei zusätzlicher Kontamination und Inhibition konnte auch mittels Phenol-Extraktion keine DNA extrahiert werden.
- 8) Nach unseren Erfahrungen der DNA-Quantifizierung mittels Real Time PCR lässt sich mit ihr durch eine Optimierung der DNA-Einsatzmenge in die PCR die Chance auf eine erfolgreiche DNA-Typisierung erhöhen. So erreichten die QIAGEN- und MACHEREY-NAGEL-Extraktionen nach der Optimierung je einen Punkt mehr in der Scorewertung. Bei der Q·BIOgene-Methode konnten sogar zwei Punkte mehr registriert werden und bei der Phenol-Aufarbeitung 15 Punkte.
- 9) Speziell für die hier aufgezeigten Methoden sollten zusätzlich die Auswirkungen größerer Einsatzmengen der Knochen, der Einsatz von Knochenmehl, einer individuellen Entkalkungs- und Lysedauer und schließlich weiterer Aufreinigungsschritte vor allem für die GEN-IAL-Extrakte untersucht werden.
- 10) Zusätzlich zur Änderung der verwendeten PCR-Konzentrationen, Zyklen und Zeiten könnte sich der Versuch des Einsatzes von BSA und Miniprimern bezahlt machen [7,18,80,99,108]. Dabei ist aber immer eine erhöhte Kontaminationsgefahr gegeben.
- 11) Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse empfiehlt es sich, die QIAGEN-Methode zuerst in Betracht zu ziehen. Sie ist weniger umständlich zu handhaben als die Phenol-Extraktion. Erst, wenn die Analysenergebnisse nicht zufriedenstellend sind bzw. sich das Ausgangsmaterial von vornherein als schwierig darstellt oder in geringer Menge

vorliegt, sollte die Phenol-Methode herangezogen werden. Zudem muss zwischen zusätzlichen Aufreinigungsschritten gegenüber Kontamination, DNA-Schädigung und Verlust abgewogen werden.

9 Literaturverzeichnis

1. Mendel, JG (1866) Versuche über Pflanzenhybriden. Verhandlungen des Naturforschenden Vereins in Brünn IV: 3-47
2. Mullis, K, Faloona, F, Scharf, S, Saiki, R, Horn, G, and Erlich, H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol. 51 Pt 1: 263-273
3. Jeffreys, AJ, Wilson, V, and Thein, SL (1985) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Nature 316 [6023]: 76-79
4. Lee, HC, Ladd, C, Bourke, MT, Pagliaro, E, and Tirnady, F (1994) DNA typing in forensic science. I. Theory and background. Am.J.Forensic Med.Pathol. 15 [4]: 269-282
5. Prado, M, Franco, CM, Fente, CA, Cepeda, A, Vazquez, BI, and Barros-Velazquez, J (2002) Comparison of extraction methods for the recovery, amplification and species-specific analysis of DNA from bone and bone meals. Electrophoresis 23 [7-8]: 1005-1012
6. Cipollaro, M, Galderisi, U, and Di Bernardo, G (2005) Ancient DNA as a multidisciplinary experience. J.Cell Physiol 202 [2]: 315-322
7. Holland, MM, Cave, CA, Holland, CA, and Bille, TW (2003) Development of a quality, high throughput DNA analysis procedure for skeletal samples to assist with the identification of victims from the World Trade Center attacks. Croat.Med.J. 44 [3]: 264-272
8. Fisher, DL, Holland, MM, Mitchell, L, Sledzik, PS, Wilcox, AW, Wadhams, M and others (1993) Extraction, evaluation, and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone. J.Forensic Sci. 38 [1]: 60-68
9. Holland, MM, Fisher, DL, Mitchell, LG, Rodriguez, WC, Canik, JJ, Merrill, CR and others (1993) Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. J.Forensic Sci. 38 [3]: 542-553
10. Lassen, C, Hummel, S, and Herrmann, B (1994) Comparison of DNA extraction and amplification from ancient human bone and mummified soft tissue. Int.J.Legal Med. 107 [3]: 152-155
11. Hummel, S and Herrmann, B (1994) General Aspects of Sample Preparation. 1 [4]: 59-68
12. Burger, J, Hummel, S, and Herrmann, B (1997) [Detection of DNA single-copy sequences of prehistoric teeth. Site milieu as a factor for preservation of DNA]. Anthropol.Anz. 55 [2]: 193-198
13. Lindahl, T (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. Nature 362 [6422]: 709-715
14. Jeffreys, AJ, Allen, MJ, Hagelberg, E, and Sonnberg, A (1992) Identification of the skeletal remains of Josef Mengele by DNA analysis. Forensic Sci.Int. 56 [1]: 65-76

15. Anslinger, K, Weichhold, G, Keil, W, Bayer, B, and Eisenmenger, W (2001) Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int.J.Legal Med.* 114 [3]: 194-196
16. Leonart, R, Riego, E, Sainz de la Pena MV, Bacallao, K, Amaro, F, Santiesteban, M and others (2000) Forensic identification of skeletal remains from members of Ernesto Che Guevara's guerrillas in Bolivia based on DNA typing. *Int.J.Legal Med.* 113 [2]: 98-101
17. Gill, P, Ivanov, PL, Kimpton, C, Piercy, R, Benson, N, Tully, G and others (1994) Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat.Genet.* 6 [2]: 130-135
18. Handt, O, Richards, M, Trommsdorff, M, Kilger, C, Simanainen, J, Georgiev, O and others (1994) Molecular genetic analyses of the Tyrolean Ice Man. *Science* 264 [5166]: 1775-1778
19. Herrmann, B and Newesely, H (1982) [Long-term decomposition of bones. 1. Mineral phase]. *Anthropol.Anz.* 40 [1]: 19-31
20. Löffler, G and Petrides, P (1998) *Biochemie und Pathobiochemie.* 6. Auflage: 749
21. Junqueira, L and Carneiro, J (1996) *Histologie.* 4. Auflage: 195-196
22. Brown, TA (1990) Die Reinigung von DNA aus lebenden Zellen. 1: 37-44
23. Walker, MR and Rapley, R (1997) *Route Maps in Gene Technology.* 1
24. Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989) Isolation of High-molecular-weight DNA from Mammalian Cells. 2: 9.14-9.19
25. Mülhardt, C (1999) *Der Experimentator: Molekularbiologie.* 1: 66-74
26. <http://www.pharmchem.tu-bs.de>.
27. Mülhardt, C (2003) *Der Experimentator: Molekularbiologie.* 4: 96
28. Livak, KJ, Flood, SJ, Marmaro, J, Giusti, W, and Deetz, K (1995) Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4 [6]: 357-362
29. Cardullo, RA, Agrawal, S, Flores, C, Zamecnik, PC, and Wolf, DE (1988) Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85 [23]: 8790-8794
30. Applied Biosystems. (2003) *Quantifiler Kit User's Manual* : 1-6
31. Butler, JM, Buel, E, Crivellente, F, and McCord, BR (2004) Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis. *Electrophoresis* 25 [10-11]: 1397-1412
32. Bennett, P (2000) Demystified ... microsatellites. *Mol.Pathol.* 53 [4]: 177-183
33. Wiegand, P and Rolf, B (2003) *Analyse biologischer Spuren Teil II: DNA-Typisierung.* *Rechtsmedizin* 13 [6]: 375-381

34. Hirsch-Kauffmann, M and Schweiger, M (2000) *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 4. Auflage: 139
35. Ford, EB (1957) Polymorphism in Plants, Animals and Men. *Nature* 180 [4598]: 1315-1319
36. Murray, V, Monchawin, C, and England, PR (1993) The determination of the sequences present in the shadow bands of a dinucleotide repeat PCR. *Nucleic Acids Res.* 21 [10]: 2395-2398
37. Levinson, G and Gutman, GA (1987) Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol.Biol.Evol.* 4 [3]: 203-221
38. Gonzalez-Andrade, F and Sanchez, D (2005) DNA typing from skeletal remains following an explosion in a military fort--first experience in Ecuador (South-America). *Leg.Med.(Tokyo)* 7 [5]: 314-318
39. Kimpton, C, Fisher, D, Watson, S, Adams, M, Urquhart, A, Lygo, J and others (1994) Evaluation of an automated DNA profiling system employing multiplex amplification of four tetrameric STR loci. *Int.J.Legal Med.* 106 [6]: 302-311
40. Clayton, TM, Whitaker, JP, Sparkes, R, and Gill, P (1998) Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. *Forensic Sci.Int.* 91 [1]: 55-70
41. Sparkes, R, Kimpton, C, Gilbard, S, Carne, P, Andersen, J, Oldroyd, N and others (1996) The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (II), Artefacts, casework studies and success rates. *Int.J.Legal Med.* 109 [4]: 195-204
42. LaFountain, MJ, Schwartz, MB, Svete, PA, Walkinshaw, MA, and Buel, E (2001) TWGDAM validation of the AmpFISTR Profiler Plus and AmpFISTR COfiler STR multiplex systems using capillary electrophoresis. *J.Forensic Sci.* 46 [5]: 1191-1198
43. Rolf, B and Wiegand, P (2004) *Analyse biologischer Spuren, Teil III: Mitochondriale DNA und Y-chromosomale STR*. *Rechtsmedizin* 14 [6]: 473-484
44. Lutz, S, Weisser, HJ, Heizmann, J, and Pollak, S (1997) A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. *Hum.Genet.* 101 [3]: 384
45. Pfeiffer, H and Brinkmann, B (2000) Sequenzanalyse mitochondrialer DNA in der Rechtsmedizin. *Rechtsmedizin* 10 [2]: 51-55
46. <http://www.EMPOP.org>
47. Anderson, S, Bankier, AT, Barrell, BG, de Bruijn, MH, Coulson, AR, Drouin, J and others (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 [5806]: 457-465
48. Sanger, F, Nicklen, S, and Coulson, AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74 [12]: 5463-5467
49. Pääbo, S, Poinar, H, Serre, D, Jaenicke-Despres, V, Hebler, J, Rohland, N and others (2004) Genetic analyses from ancient DNA. *Annu.Rev.Genet.* 38: 645-679

-
50. Herrmann, B and Hummel, S (1994) Ancient DNA: recovery and analysis of genetic material from paleontological, archaeological, museum, medical, and forensic specimens. 1
 51. Higuchi, R, Bowman, B, Freiberger, M, Ryder, OA, and Wilson, AC (1984) DNA sequences from the quagga, an extinct member of the horse family. *Nature* 312: 282-284
 52. Chester, N and Marshak, DR (1993) Dimethyl sulfoxide-mediated primer Tm reduction: a method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal.Biochem.* 209 [2]: 284-290
 53. Tetzlaff, S (2004) Vergleichende populationsgenetische Untersuchungen anhand ausgewählter humaner mitochondrialer DNA-Polymorphismen. Fachbereich Biologie, Universität Rostock: 14-15
 54. Krenke, BE, Tereba, A, Anderson, SJ, Buel, E, Culhane, S, Finis, CJ and others (2002) Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. *J.Forensic Sci.* 47 [4]: 773-785
 55. Hagelberg, E, Gray, IC, and Jeffreys, AJ (1991) Identification of the skeletal remains of a murder victim by DNA analysis. *Nature* 352 [6334]: 427-429
 56. Hochmeister, MN, Budowle, B, Borer, UV, Eggmann, U, Comey, CT, and Dirnhofer, R (1991) Typing of deoxyribonucleic acid (DNA) extracted from compact bone from human remains. *J.Forensic Sci.* 36 [6]: 1649-1661
 57. Staiti, N, Di Martino, D, and Saravo, L (2004) A novel approach in personal identification from tissue samples undergone different processes through STR typing. *Forensic Sci.Int.* 146 Suppl: S171-S173
 58. Becker, J, Baasner, A, Schäfer, C, and Madea, M (2001) Ein DNS-Extraktionskit "für alle Fälle"? *Rechtsmedizin* 11: 270-274
 59. Schmerer, WM (2003) Extraction of ancient DNA. *Methods Mol.Biol.* 226: 57-62
 60. Hagelberg, E and Clegg, JB (1991) Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 244 [1309]: 45-50
 61. Iwamura, ES, Oliveira, CR, Soares-Vieira, JA, Nascimento, SA, and Munoz, DR (2005) A qualitative study of compact bone microstructure and nuclear short tandem repeat obtained from femur of human remains found on the ground and exhumed 3 years after death. *Am.J.Forensic Med.Pathol.* 26 [1]: 33-44
 62. Cipollaro, M, Di Bernardo, G, Galano, G, Galderisi, U, Guarino, F, Angelini, F and others (1998) Ancient DNA in human bone remains from Pompeii archaeological site. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* 247 [3]: 901-904
 63. Andelinovic, S, Sutlovic, D, Erceg, I, I, Skaro, V, Ivkovic, A, Paic, F and others (2005) Twelve-year experience in identification of skeletal remains from mass graves. *Croat.Med.J.* 46 [4]: 530-539
 64. Anslinger, K, Weichhold, G, Keil, W, Bayer, B, and Eisenmenger, W (2001) Identification of the skeletal remains of Martin Bormann by mtDNA analysis. *Int.J.Legal Med.* 114 [3]: 194-196

65. Nagy, M, Otremba, P, Kruger, C, Bergner-Greiner, S, Anders, P, Henske, B and others (2005) Optimization and validation of a fully automated silica-coated magnetic beads purification technology in forensics. *Forensic Sci.Int.* 152 [1]: 13-22
66. Stemmer, C, Beau-Faller, M, Pencreac'h, E, Guerin, E, Schneider, A, Jaqmin, D and others (2003) Use of magnetic beads for plasma cell-free DNA extraction: toward automation of plasma DNA analysis for molecular diagnostics. *Clin.Chem.* 49 [11]: 1953-1955
67. Cattaneo, C, Craig, OE, James, NT, and Sokol, RJ (1997) Comparison of three DNA extraction methods on bone and blood stains up to 43 years old and amplification of three different gene sequences. *J.Forensic Sci.* 42 [6]: 1126-1135
68. Evison, MP, Smillie, DM, and Chamberlain, AT (1997) Extraction of single-copy nuclear DNA from forensic specimens with a variety of postmortem histories. *J.Forensic Sci.* 42 [6]: 1032-1038
69. Burger, J, Hummel, S, Hermann, B, and Henke, W (1999) DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains. *Electrophoresis* 20 [8]: 1722-1728
70. Hagelberg, E, Bell, LS, Allen, T, Boyde, A, Jones, SJ, and Clegg, JB (1991) Analysis of ancient bone DNA: techniques and applications. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 333 [1268]: 399-407
71. Madea, B, Krause, D, and Jachau, K (2003) *Praxis Rechtsmedizin. Leichenerscheinungen und supravitale Reaktionen - Todeszeitbestimmung.* 35-52
72. Casper, JL (1858) *Handbuch der gerichtlichen Medizin. Thanatologischer Teil.*
73. Tuross, N (1994) The biochemistry of ancient DNA in bone. *Experientia* 50 [6]: 530-535
74. Wiegand, P and Rolf, B (2003) *Analyse biologischer Spuren Teil II: DNA-Typisierung. Rechtsmedizin* 13 [6]: 375-381
75. Cattaneo, C, Smillie, DM, Gelsthorpe, K, Piccinini, A, Gelsthorpe, AR, and Sokol, RJ (1995) A simple method for extracting DNA from old skeletal material. *Forensic Sci.Int.* 74 [3]: 167-174
76. Alonso, A, Andelinovic, S, Martin, P, Sutlovic, D, Erceg, I, Huffine, E and others (2001) DNA typing from skeletal remains: evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat.Med.J.* 42 [3]: 260-266
77. Rennick, SL, Fenton, TW, and Foran, DR (2005) The effects of skeletal preparation techniques on DNA from human and non-human bone. *J.Forensic Sci.* 50 [5]: 1016-1019
78. Goodyear, PD, MacLaughlin-Black, S, and Mason, IJ (1994) A reliable method for the removal of co-purifying PCR inhibitors from ancient DNA. *Biotechniques* 16 [2]: 232-235
79. Rankin, DR, Narveson, SD, Birkby, WH, and Lai, J (1996) Restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis on DNA from human compact bone. *J.Forensic Sci.* 41 [1]: 40-46

-
80. Edson, SM, Ross, JP, Coble, MD, Parsons, TJ, and Barritt, SM (2004) Naming the Dead - Confronting the Realities of Rapid Identification of Degraded Skeletal Remains. *Forensic Science Review* 16 [1]: 63-90
 81. <http://forensidna.com/Bookstore/index.html>.
 82. Willard, JM, Lee, DA, and Holland, MM (1998) Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin. *Methods Mol.Biol.* 98: 9-18
 83. Hofreiter, M, Serre, D, Poinar, HN, Kuch, M, and Pääbo, S (2001) Ancient DNA. *Nat.Rev.Genet.* 2 [5]: 353-359
 84. Eglinton, G and Logan, GA (1991) Molecular preservation. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 333 [1268]: 315-327
 85. Perry, WL, III, Bass, WM, Riggsby, WS, and Sirotkin, K (1988) The autodegradation of deoxyribonucleic acid (DNA) in human rib bone and its relationship to the time interval since death. *J.Forensic Sci.* 33 [1]: 144-153
 86. MacHugh, DE, Edwards, CJ, Bailey, J, Bancroft, DR, and Bradley, DG (2000) The extraction and Analysis of Ancient DNA from Bone and Teeth: a Survey of Current Methodologies. *Ancient Biomolecules* 3: 81-102
 87. Meyer, E, Wiese, M, Bruchhaus, H, Claussen, M, and Klein, A (2000) Extraction and amplification of authentic DNA from ancient human remains. *Forensic Sci.Int.* 113 [1-3]: 87-90
 88. Kalmar, T, Bachrati, CZ, Marcsik, A, and Rasko, I (2000) A simple and efficient method for PCR amplifiable DNA extraction from ancient bones. *Nucleic Acids Res.* 28 [12]: E67
 89. Dugan, K, Lawrence, HS, Aagaard, PJ, Polanskey, D, and Fisher, CL (2008) Improvements in bone extraction for mtDNA analysis.
 90. Hummel, S, Nordsiek, G, and Herrmann, B (1992) Improved efficiency in amplification of ancient DNA and its sequence analysis. *Naturwissenschaften* 79 [8]: 359-360
 91. Hoss, M and Pääbo, S (1993) DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21 [16]: 3913-3914
 92. Yang, DY, Eng, B, Wayne, JS, Dudar, JC, and Saunders, SR (1998) Technical note: improved DNA extraction from ancient bones using silica-based spin columns. *Am.J.Phys.Anthropol.* 105 [4]: 539-543
 93. Primorac, D, Andelinovic, S, Definis-Gojanovic, M, Drmic, I, Rezic, B, Baden, MM and others (1996) Identification of war victims from mass graves in Croatia, Bosnia, and Herzegovina by use of standard forensic methods and DNA typing. *J.Forensic Sci.* 41 [5]: 891-894
 94. Hummel, S, Schultes, T, Bramanti, B, and Herrmann, B (1999) Ancient DNA profiling by megaplex amplications. *Electrophoresis* 20 [8]: 1717-1721
 95. Konomi, N, Lebwohl, E, and Zhang, D (2002) Comparison of DNA and RNA extraction methods for mummified tissues. *Mol.Cell Probes* 16 [6]: 445-451

96. Schmerer, WM, Hummel, S, and Herrmann, B (1999) Optimized DNA extraction to improve reproducibility of short tandem repeat genotyping with highly degraded DNA as target. *Electrophoresis* 20 [8]: 1712-1716
97. Baker, LE, McCormick, WF, and Matteson, KJ (2001) A silica-based mitochondrial DNA extraction method applied to forensic hair shafts and teeth. *J.Forensic Sci.* 46 [1]: 126-130
98. Vogelstein, B and Gillespie, D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 76 [2]: 615-619
99. Rohland, N and Hofreiter, M (2007) Comparison and optimization of ancient DNA extraction. *Biotechniques* 42 [3]: 343-352
100. Guesdon, J and Avrameas, S (1977) Magnetic solid phase enzyme-immunoassay. *Immunochimistry* 14: 443-447
101. Rechsteiner, M (2006) Applying Revolutionary Technologies to DNA Extraction for Forensic Studies.
102. Walsh, PS, Metzger, DA, and Higuchi, R (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *Biotechniques* 10 [4]: 506-513
103. Sparkes, R, Kimpton, C, Watson, S, Oldroyd, N, Clayton, T, Barnett, L and others (1996) The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (I). Mixtures, ageing, degradation and species studies. *Int.J.Legal Med.* 109 [4]: 186-194
104. Moretti, TR, Baumstark, AL, Defenbaugh, DA, Keys, KM, Smerick, JB, and Budowle, B (2001) Validation of short tandem repeats (STRs) for forensic usage: performance testing of fluorescent multiplex STR systems and analysis of authentic and simulated forensic samples. *J.Forensic Sci.* 46 [3]: 647-660
105. Nicklas, JA and Buel, E (2003) Quantification of DNA in forensic samples. *Anal.Bioanal.Chem.* 376 [8]: 1160-1167
106. Ruano, G, Fenton, W, and Kidd, KK (1989) Biphasic amplification of very dilute DNA samples via 'booster' PCR. *Nucleic Acids Res.* 17 [13]: 5407
107. Findlay, I, Taylor, A, Quirke, P, Frazier, R, and Urquhart, A (1997) DNA fingerprinting from single cells. *Nature* 389 [6651]: 555-556
108. Alonso, A, Martin, P, Albarran, C, Garcia, P, Fernandez, dS, Jesus, IM and others (2005) Challenges of DNA profiling in mass disaster investigations. *Croat.Med.J.* 46 [4]: 540-548
109. Butler, JM, Shen, Y, and McCord, BR (2003) The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. *J.Forensic Sci.* 48 [5]: 1054-1064
110. Chung, DT, Drabek, J, Opel, KL, Butler, JM, and McCord, BR (2004) A study on the effects of degradation and template concentration on the amplification efficiency of the STR Miniplex primer sets. *J.Forensic Sci.* 49 [4]: 733-740
111. Hohoff, C and Brinkmann, B (2005) Trends in der forensischen Molekulargenetik. *Rechtsmedizin* 13 [4]: 183-189

112. Schmerer, WM, Hummel, S, and Herrmann, B (2000) STR-genotyping of archaeological human bone: experimental design to improve reproducibility by optimisation of DNA extraction. *Anthropol.Anz.* 58 [1]: 29-35
113. Cooper, A and Poinar, HN (2000) Ancient DNA: do it right or not at all. *Science* 289 [5482]: 1139
114. Bär, W, Brinkmann, B, Budowle, B, Carracedo, A, Gill, P, Holland, M and others (2000) DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int.J.Legal Med.* 113 [4]: 193-196
115. Naidoo, R and Chetty, R (1998) The Application of Microsatellites in Molecular Pathology. *Pathology Oncology Research* 4 [4]: 310-315

10 Anhang

10.1 Protokolle

Schritte, die nicht befolgt wurden, wurden kursiv gedruckt und stehen in Klammern.

10.1.1 GEN-IAL, First DNA All-tissue DNA-Kit

10.1.1.1 DNA-Präparation aus Knochen und Zähnen

- (1. Knochenoberfläche mit Skalpell säubern.*
- 2. 1-5 g Knochen- bzw. Zahnspäne mit der Bohrmaschine ausbohren und in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführen.*
- 3. 40 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5) zugeben.*
- 4. Über Nacht im Überkopfschüttler bei 4 °C schütteln.*
- 5. Für 10 min. bei 4.000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen.*
Schritte 3-5 dreimal wiederholen.
- 6. Knochen- bzw. Zahnmehl mit ca. 30 ml sterilem ddH₂O waschen.*
- 7. Für 10 min. bei 4.000 rpm zentrifugieren und Überstand verwerfen.*
Schritte 6 und 7 zweimal wiederholen.)
- 8.** Zugabe von 550 µl Lyse 1 + Lyse 2 (vorher im Verhältnis 10 : 1 mischen), 12,5 µl DTT (0,8 M frisch angesetzt!) und 25 µl Enzym
- 9.** Inkubation im Schüttelwasserbad bei 56 °C bis zur vollständigen Auflösung (ü.N. oder länger).
- 10.** 375 µl Lyse 3 zugeben und 20 s leicht vortexen.

Weiter mit Schritt 4 des:

10.1.1.2 Grundprotokolls für kleine Mengen forensischer Materialien:

- (1. Material falls nötig zerkleinern und in einem Reaktionsgefäß mit 220 µl Lyse 1+2, und 5 µl Enzym versetzen.*

Hinweis: Das Material sollte vollständig von Lysepuffer bedeckt sein.

- 2. Für 10 - 60 min. bei 65 °C inkubieren oder je nach Material zur kompletten Lyse mehrere Tage bei 37 °C, gelegentlich schütteln und frisches Enzym zugeben.*
- 3. 150 µl Lyse 3 zugeben, 20 s leicht vortexen. Achtung: immer etwa ¾ des Lysat-Volumens an Lyse 3 nehmen.)*

4. 5 min. bei -20 °C kühlen.
5. Für 10 min. bei 13.000 rpm zentrifugieren und Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführen.
6. Zugabe von 300 µl Isopropanol, mischen.
7. Zur Pellettierung der DNA für 15 min. bei 13.000 rpm zentrifugieren.
8. Den Überstand vollständig entfernen, das Pellet mit 300 µl eiskaltem 70 % Ethanol waschen und anschließend für 5 min. bei 13.000 rpm zentrifugieren. Das Pellet trocknen lassen und in 10 - 100 µl TE⁴ oder ddH₂O lösen. Die Erwärmung auf 37 °C beschleunigt die DNA-Löslichkeit.

10.1.2 Qiagen, QIAamp DNA Mini Kit

10.1.2.1 User-Developed Protocol: Isolation of genomic DNA from compact bone

- (1. Completely remove bone marrow and soft tissues using razor blades and/or sandpaper.*
- 2. Crush the bone into small fragments. Grind to a fine powder using a metal blender half-filled with liquid nitrogen.*
- 3. Transfer 5 g of the powder into sterile 50 ml polypropylene tubes and add 40 ml of 0.5 M EDTA, pH 7.5, to decalcify the sample. Agitate the tubes on a rotator at 4 °C for 24 h.*
- 4. Centrifuge the sample at 2000 x g for 15 min. Discard the supernatant. Repeat the decalcification process several times.*

Note: Generally, decalcification takes 3 - 5 days. The decalcification process can be monitored by adding a saturated solution of ammonium oxalate, pH 3.0, to the decanted supernatant. If the solution remains clear, the decalcification process can be stopped.
- 5. Wash the pellet with 40 ml of sterile deionized water to remove ions that have accumulated during decalcification. Centrifuge the sample for 15 min at 2000 x g and discard the supernatant. Repeat this washing procedure 3 times.)*
6. To 50 mg of pellet, add 360 µl Buffer ATL.

Weiter mit Schritt 2 des:*10.1.2.2 Tissue Protocol*

- (1. Cut up to 25 mg of tissue (up to 10 mg spleen) into small pieces, place in a 1.5 ml microcentrifuge tube, and add 180 µl of Buffer ATL. It is important to cut the tissue into small pieces to decrease lysis time. The yield of DNA will depend on both the amount and the type of tissue processed. 1 mg of tissue will yield approximately 0.2–1.2 µg of DNA. 2 ml microcentrifuge tubes are better suited for lysis.)*
 2. Add 20 µl Proteinase K, mix by vortexing, and incubate at 56 °C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample, or place in a shaking water bath or on a rocking platform.
 3. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from the inside of the lid. Continue with step 3a, or if RNA-free genomic DNA is required, continue with step 3b. Transcriptionally active tissues, such as liver and kidney, contain high levels of RNA which will copurify with genomic DNA. RNA may inhibit some downstream enzymatic reactions, but will not inhibit PCR.
 - 3a. Add 200 µl Buffer AL to the sample, mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70 °C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid. It is essential that the sample and Buffer AL are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution. A white precipitate may form on addition of Buffer AL, which in most cases will dissolve during incubation at 70 °C. The precipitate does not interfere with the QIAamp procedure, or with any subsequent application.
- (OR*
- 3b. First add 4 µl RNase A (100 mg/ml), mix by pulse-vortexing for 15 s, and incubate for 2 min at room temperature. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid before adding 200 µl Buffer AL to the sample. Mix again by pulse-vortexing for 15 s, and incubate at 70 °C for 10 min. Briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.)*
4. Add 200 µl ethanol (96–100 %) to the sample, and mix by pulse-vortexing for 15 s. After mixing, briefly centrifuge the 1.5 ml microcentrifuge tube to remove drops from inside the lid.
 5. Carefully apply the mixture from step 4 (including the precipitate) to the QIAamp Spin Column (in a 2 ml collection tube) without wetting the rim. Close the cap, and centri-

- fuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Spin Column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the tube containing the filtrate.
6. Carefully open the QIAamp Spin Column and add 500 µl Buffer AW1 without wetting the rim. Close the cap, and centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min. Place the QIAamp Spin Column in a clean 2 ml collection tube (provided), and discard the collection tube containing the filtrate.
 7. Carefully open the QIAamp Spin Column and add 500 µl Buffer AW2 without wetting the rim. Close the cap and centrifuge at full speed (20,000 x g; 14,000 rpm) for 3 min. Continue directly with step 8, or to eliminate any chance of possible Buffer AW2 carryover, perform step 7a, and then continue with step 8.
- (7a. (Optional): Place the QIAamp Spin Column in a new 2 ml collection tube (not provided) and discard the collection tube containing the filtrate. Centrifuge at 20,000 x g (14,000 rpm) for 1 min.)*
8. Place the QIAamp Spin Column in a clean 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided), and discard the collection tube containing the filtrate. Carefully open the QIAamp Spin Column and add 200 µl Buffer AE or distilled water. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge at 6000 x g (8000 rpm) for 1 min.
 9. Repeat step 8.

10.1.3 Q·BIOgene, BIO 101 Systems, GENECLEAN Kit for Ancient DNA

10.1.3.1 Protokoll eines Anwenders

Overnight Soaking Solution:

- 5 ml 0.5 M EDTA

- 200 ml 10 % SDS

-200 ml 20 mg/ml Proteinase K

1. Samples were rotated and incubated at 37 °C for 12-15 hours.
2. 1 ml DeHybernation Solution A was added to each sample and rotated for 2-4 hours at 60 °C.
3. Samples were spun in centrifuge to pellet particulate.
4. Supernatant was transferred to clean tube and 1.2 ml Ancient DNA GLASSMILK and 3.0 ml DeHybernation Solution A were added.

5. Samples were rotated for 2 hours at 35-40 °C.
6. Samples were centrifuged at 4,000 rpm for 1 minute to pellet Ancient DNA GLASSMILK. Supernatant was discarded.
7. 0.5 ml Salton Wash #1 was added to resuspend pellet, which was then transferred to a SPIN Filter.
8. The protocol, starting with Step 6, was followed from this point forward.

10.1.3.2 Manual Protocol

- (1. Add 100-500 mg homogenized or powdered sample to 1 ml DeHybernation Solution in a nucleic acid-free microcentrifuge tube.*
- 2. Incubate at 45-60 °C between 2 and 12 hours with mixing (longer incubation times may be necessary).*
- 3. Centrifuge sample at high speed for 5 minutes to pellet particulate material. Transfer supernatant to a new nucleic acid-free microcentrifuge tube. Add 300 µl Ancient DNA GLASSMILK suspension. Incubate at room temperature for 10-30 minutes with mixing.*
- 4. Transfer suspension to a SPIN Filter and Catch Tube. Centrifuge at 14,000 x g in microcentrifuge for 1 minute or until liquid is transferred to Catch Tube. (Empty Catch Tube as needed).*
- 5. Add 0.5 ml Salton Wash #1 and centrifuge at 14,000 x g to clean GLASSMILK/ DNA complex.)*
- 6. Add 0.5 ml Salton Wash #2 and centrifuge at 14,000 x g to clean GLASSMILK/ DNA complex.*
- 7. Add 0.5 ml Ancient DNA Alcohol Wash and centrifuge to empty filter of Wash Solution. Repeat. [Important: Be sure to add alcohol prior to first use].*
- 8. Empty Catch Tube and centrifuge for 2 minutes to “dry” GLASSMILK in SPIN Filter.*
- 9. Place filter into a DNA-free Elution Catch Tube. Add 50-100 µl DNA-free Elution Solution. Resuspend pellet by hand or briefly vortex (1-2 seconds, any longer will result in damage to the filter). Centrifuge for 1 minute to transfer eluate to Catch Tube. Optional: Elute a second time.*
- 10. Remove SPIN Filter and discard. DNA is ready to use in amplification reaction without further manipulation.*

10.1.4 Promega, DNA IQ System, Tissue and Hair Extraction Kit

10.1.4.1 Modified IQ procedure, November 2001 (Split lab)

1. Put 2 g of pulverized bone in 15 or 50 ml tube. Add 3-5 ml of extraction buffer (5ml 100 mM TrisHCl pH 8.0, 5ml 1 M NaCl, 25ml 100 mM EDTA, 2.5 ml 10 % SDS, dd water ad 50 ml) or prepared Lysis buffer (DNA IQ kit) and 200 μ l of Protease K solution (20mg/ml). Leave 1 hour at 56 °C.
2. Centrifuge 4 minutes on 5000 rpm. Take clear supernatant.
3. Add two volumes (6 - 10ml) of prepared Lysis Buffer (DNA IQ kit) and 15 μ l of Resin (DNA IQ kit) to supernatant. Vortex Resin well.
4. Incubate 10 minutes at room temperature.
5. Place tube on Magnetic Stand. Separation will occur in a few seconds.
6. Carefully remove and dispose of all solution without disturbing the resin on the side of the tube (DNA is on resin now).
7. Add 100 μ l of prepared Lysis Buffer to resin and transfer everything in 1.5 (or 2) ml tube. Vortex briefly.
8. Put tube on Magnetic Stand and remove and dispose of all Lysis buffer.
9. Add 100 μ l of prepared Wash Buffer (DNA IQ kit) to resin. Vortex briefly.
10. Return tube on Magnetic Stand. Dispose of all Wash Buffer.
11. Repeat steps 9 and 10 two more times for a total of 3 washes, making sure all of the solution has been removed after last wash.
12. Air-dry resin on Magnetic Stand for 5-15 minutes.
13. Add 30 μ l of nuclease free water.
14. Close lid, vortex tube and place it at 65 °C for 5 minutes.
15. Remove tube from 65 °C and vortex briefly. Immediately place on Magnetic Stand (DNA is in solution now).
16. Transfer solution to a container of choice.

10.1.5 MACHEREY-NAGEL, NucleoSpin DNA Trace

10.1.5.1 Support protocol for the isolation of genomic DNA from human bones

- (1 *Prepare sample*
Mill 1 g bone to a fine powder.)

-
- 2 **Pre-Lysis**
Add 2 ml buffer (0.5M EDTA/0.25 M PO₄³⁻, pH 8) and 7 ml buffer T1 and 100 µl proteinase K solution. Vortex to mix. Be sure that the samples are completely covered with lysis solution.
Incubate at 56 °C overnight.
Afterwards incubate sample for 48 h at 4 °C on a shaking incubator.
 - 3 **Lysis**
Vortex the samples. Add 8 ml buffer B3, vortex vigorously and incubate at 70 °C for 10 min. Vortex briefly. Centrifuge for 10 min at 5,000 x g and transfer the supernatant to a new microcentrifuge tube.
 - 4 **Adjust DNA binding conditions**
Add 8.4 ml ethanol (96 - 100 %) to the sample and vortex vigorously.
 - 5 **Bind DNA**
For each sample, place one NucleoSpin DNA Funnel column into a 50 ml collecting tube. Apply the sample successively to the column. Centrifuge for 3 min at 3,000 × g. Discard the flow-through and place the column back into the collecting tube.
 - 6 **Wash silica membrane**
1st wash: Add 3 ml buffer BW. Centrifuge for 3 min at 3,000 × g. Discard the flow-through and place the column back into the collecting tube.
2nd wash: Add 3 ml buffer B5 to the column and centrifuge for 3 min at 3,000 × g. Discard the flow-through and place the column back into the collecting tube.
3rd wash: Add 3 ml buffer B5 to the column and centrifuge for 3 min at 3,000 × g. Discard the flow-through and place the column back into the collecting tube.
 - 7 **Dry silica membrane**
Centrifuge the column for 10 min at 3,000 x g. Residual ethanol is removed during this step.
 - 8 **Elute highly pure DNA**
Place the NucleoSpin DNA Funnel column into a 50 ml microcentrifuge tube and add 60 µl prewarmed elution buffer BE (70 °C). Incubate at room temperature for 2 min. Centrifuge for 3 min at 3,000 x g.

10.1.6 RTQ-PCR

1. Standardreihe:

Standard	Konzentration in ng/ μl	Menge je 2 μl in ng	minimale Men- ge	Verdünnungsfaktor
Std. 1	50,000	100,000	10 μ l Standard + 30 μ l buffer	4x
Std. 2	16,700	33,400	10 μ l Std. 1 + 20 μ l buffer	3x
Std. 3	5,560	11,120	10 μ l Std. 2 + 20 μ l buffer	3x
Std. 4	1,850	3,700	10 μ l Std. 3 + 20 μ l buffer	3x
Std. 5	0,620	1,240	10 μ l Std. 4 + 20 μ l buffer	3x
Std. 6	0,210	0,420	10 μ l Std. 5 + 20 μ l buffer	3x
Std. 7	0,068	0,136	10 μ l Std. 6 + 20 μ l buffer	3x
Std. 8	0,023	0,046	10 μ l Std. 7 + 20 μ l buffer	3x

2. Prepare the reagents:

Thaw the primer mix completely, then vortex 3 to 5 seconds and centrifuge briefly before opening the tube. Swirl the Quantifiler PCR Reaction Mix gently before using. Do not vortex it.

3. Pipette the required volumes of components into an appropriately sized polypropylene tube.
4. Vortex the PCR mix 3 to 5 seconds, then centrifuge briefly.
5. Dispense 23 μ L of the PCR mix into each reaction well.
6. Add 2 μ L of sample, standard, or control to the appropriate wells.
7. Seal the reaction plate with the Optical Adhesive Cover.
8. Centrifuge the plate at 3000 rpm for about 20 seconds in a tabletop centrifuge with plate holders to remove any bubbles.
9. Place the compression pad over the Optical Adhesive Cover with the gray side down and the brown side up and with the holes positioned directly over the reaction wells.

10.1.7 FLA der nukleären DNA

10.1.7.1 Biotype, Mentype Quadruplex DAA plus

1. Master Mix Zusammensetzung:

Reaction Mix D	5,0 µl
Primer Mix	2,5 µl
Taq	0,4 µl

2. Beladung der Tubes für die PCR:

	Reinstwasser	Master Mix	DNA-Lösung
DNA-Probe	12,1 µl	7,9 µl	5,0 µl Proben-DNA
Positivkontrolle	16,1 µl	7,9 µl	1,0 µl Kontroll-DNA
Negativkontrolle	17,1 µl	7,9 µl	0

3. Denaturierung der DNA

Formamid Hi-Di	12 µl
ROX 400 HD	0,5 µl
DNA Längenstandard	
DNA-Lösung bzw.	1 µl
Allel.Leiter	1 µl

- Lösungen 3 min. bei 95 °C inkubieren, danach sofort in einen Eisständer stellen.
- In eine 96-well-Platte je 13 µl der Proben geben.

10.1.8 mtDNA-Sequenzierung

10.1.8.1 ABI PRISM BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit

1. Ansatz für die 1. PCR:

Master Mix Zusammensetzung:

H ₂ O _{HPLC}	11,5 µl
10xPCR-Puffer/ Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTP Mix 200 µmol	2,5 µl
Mg ²⁺ 1,5 mmol	1,0 µl
Primer Mix HV 1	2,0 µl (je 1,0 µl F+R)
Platinum Taq DNA-Polymerase 1-2 U/ µl	0,5 µl

Beladung der Tubes für die 1. PCR:

	Master Mix	DNA-Lösung	H ₂ O _{HPLC}
DNA-Probe	20,0 µl	5,0 µl	0
Negativkontrolle	20,0 µl	0	5,0 µl

2. Aufreinigung der DNA-Proben über Centricon YM-100:

- Vorladen von 2 ml H₂O_{HPLC} auf die Säule
- gesamte vorbereitete DNA-Probe hinzufügen
- Zentrifugation 10 min bei 3000 x g
- Rückgewinnung der DNA durch Umdrehen der Säule,
Zentrifugation 2 min bei 270 x g

3. Ansatz für die 2. PCR:

Master Mix Zusammensetzung:

Ready Reaction Premix	4 µl
5x Big Dye Sequenzierpuffer	2 µl
Primer (10 pmol)	je 1,0 µl F und R
Positivkontrolle: Primer M13(-21)	1 µl

Beladung der Tubes für die 2. PCR:

	Master Mix	DNA-Lösung	H ₂ O _{HPLC}
DNA-Probe	7,0 µl	4,0 5,0 µl	8,0 9,0 µl
Negativkontrolle	7,0 µl	0	13 µl
Positivkontrolle	7,0 µl	4,0 µl pGEM [®] 3Zf(+)	9,0 µl

10.2 Ergebnisse

Tabelle 15: Eigenschaften der verwendeten Knochenproben

Bezeichnung der Proben	Funddatum	verm. Todeszeitpunkt/ Alter in Jahren	Fundort	Zustand	Knochenart
N 1	Aug. 2005	0		umgeben von Blut und Knochenmark	Röhrenknochen
N 2	Sept. 2005	0		umgeben von Blut und Knochenmark	Röhrenknochen
K 1	1987	1987 ein Monat zuvor/ 19	in Schlammteich	maziert, fortgeschrittene Leichenveränderungen, Alkohol 2,1 mg/ g	Humerus
K 2	1987	1987 einige Tage zuvor/ 19	Wohnung	unauffällig	unbekannt
K 3	2000	unbekannt	Straßenrand, vorherige Lage rung unklar	bräunlich verfärbt, Liegezeit unklar	Schädel
K 4	2002	2000/ 6	Strand	umgeben von Wurzelwerk, Sand, tonigem Schlamm; längere Zeit im Wasser, entfettet, dunkelbraun, gelblich verfärbt	
K 5	2002	2000/ 6	Strand	umgeben von Wurzelwerk, Sand, tonigem Schlamm; längere Zeit im Wasser, entfettet, dunkelbraun, gelblich verfärbt	Humerus
K 6	2002	2000/ 6	Strand	umgeben von Wurzelwerk, Sand, tonigem Schlamm; längere Zeit im Wasser, entfettet, dunkelbraun, gelblich verfärbt	Schädel
K 7	2003	verm. 1945/ 61	in See	verfärbt, entfettet, brüchig	Schädeldach
K 8	2004	2003/ 3	an Bahnstrecke	Tierfraß..	ev. Tibia
K 9	keine Angaben bekannt			brüchig, dunkelbraun	Wirbelkörper
K 10	keine Angaben bekannt				Schädeldach
A 1	2001	200	Sand, Kies, in ca. 2 m Tiefe	Oberfläche hart, gelb braun	Röhrenknochen
A 2	1995 1999	1200	Sand, Lehm, in ca. 70 cm Tiefe	Oberfläche gelb braun, sehr brüchig, leicht	Femur
A 3	1863 1875 u. 1967	1700	Sand, in 1,5 b 2 m Tiefe	Oberfläche gelb braun	Tibia
A 4	2003	3000	Sand, Lehm, in ca. 40 cm Tiefe	Oberfläche braun, brüchig, leicht, viel Sand in Markhöhle, Brand?	ev. Tibia
A 5	1900	3500	Kies, in ca. 60 cm Tiefe	Oberfläche gelb braun, leicht	Unterkiefer
A 6		4000	Kies, in ca. 75 cm Tiefe	Brandspuren?, Oberfläche gelb braun, sehr leicht, 2 mm dünne Kompakta	Tibiakopf
A 7	1969	5000	auf Lehm, schwach lehmhaltiger Sand	Oberfläche hart, leicht	Becken

Tabelle 16: Knocheinsatzmengen entkalkt

Knochen	Knochenmengen in g					
	I	II	III	IV	V	VI
	GEN-IAL	QIAGEN	Q·BIOgene	Promega	Phenol/ Chloroform	MACHEREY- NAGEL
N 1a				0,503		
N 1b				0,502		
N 2a				0,495		
N 2b				0,501		
K 1	0,080	0,089	0,084	0,093	0,092	0,090
K 2	0,270	0,256	0,256	0,267	0,272	0,269
K 3	0,247	0,219	0,203	0,232	0,227	0,230
K 4	0,141	0,169	0,172	0,173	0,168	0,170
K 5	0,099	0,081	0,109	0,103	0,103	0,102
K 6	0,118	0,120	0,112	0,123	0,122	0,122
K 7	0,070	0,065	0,064	0,067	0,070	0,068
K 8	0,192	0,243	0,220	0,211	0,208	0,211
K 9	0,200	0,201	0,204	0,203	0,203	0,202
K 10	0,181	0,189	0,167	0,170	0,184	0,182
A 1a				0,493		
A 1b				0,490		
A 2a				0,490		
A 2b				0,497		
A 3a				0,493		
A 3b				0,502		
A 4a				0,499		
A 4b				0,504		
A 5a				0,505		
A 5b				0,502		
A 6a				0,500		
A 6b				0,502		
A 7a				0,498		
A 7b				0,504		

ANHANG

Tabelle 17: Scorebewertung

Probe	Anzahl der höchsten Peaks		Peakhöhe		Peakhöhenverhältnis		Peakhöhe des höchsten Stutter		Artefakte im Verhältnis zum kleinsten Peak in %
			in rfu		in %		in %		
	H2 < 0,5 H1	1	homozygot	≥ 200	homozygot	entfällt	homozygot	≤ 15	≤ 10
	H2 ≥ 0,5 H1	H3 < 0,5 H2	2	≥ 100				≤ 30	≤ 20
	H2 ≥ 0,5 H1	H3 ≥ 0,5 H2		< 100				> 30	> 20
			heterozygot (kleinster der Allelpeaks)	≥ 200	heterozygot	> 70	heterozygot	≤ 20	
				≥ 100		≥ 50		≤ 40	
				< 100				> 40	
<i>GEN-IAL</i>									
K1 I									
K2 I									
K3 I									
K4 I									
K5 I									
K6 I									
K7 I									
K8 I									
K9 I									
K10 I									
<i>QIAGEN</i>									
K1 II									
K2 II									
K3 II									
K4 II									
K5 II	D3S1358	1		≥ 100		entfällt		≤ 30	≤ 10
	D8S1179	2		≥ 100		> 50		≤ 20	≤ 10
	D18S51								
	SE33	1		≥ 200		entfällt		≤ 15	> 20
K6 II	D3S1358	1		≥ 200		entfällt		> 30	≤ 20
	D8S1179	1		≥ 100		entfällt		≤ 15	≤ 10
	D18S51								
	SE33	1		< 100		entfällt		≤ 15	≤ 10
K7 II	D3S1358	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10
	D8S1179	1		≥ 200		entfällt		> 30	> 20
	D18S51	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10
	SE33	1		≥ 200		entfällt		≤ 15	≤ 10
K8 II	D3S1358	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10
	D8S1179	1		≥ 200		entfällt		> 30	> 20
	D18S51	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10
	SE33	1		≥ 200		entfällt		≤ 15	≤ 10
K9 II	D3S1358	2		< 100		> 50		≤ 20	≤ 10
	D8S1179	2		< 100		> 70		≤ 20	≤ 10
	D18S51								
	SE33	1		< 100		entfällt		≤ 15	≤ 10
K10 II	D3S1358	1		≥ 200		entfällt		≤ 30	≤ 10
	D8S1179	1		≥ 200		entfällt		≤ 15	> 20
	D18S51	1		≥ 200		entfällt		> 30	≤ 10
	SE33	2		≥ 100		> 70		≤ 20	≤ 10
K5 II	D3S1358	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10
	D8S1179	2		≥ 200		> 50		≤ 20	≤ 10
	D18S51	2		≥ 200		> 50		≤ 20	≤ 10
	SE33	1		≥ 200		entfällt		≤ 15	≤ 10
K8 II	D3S1358	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10
	D8S1179	2		≥ 200		> 50		≤ 20	≤ 10
	D18S51	2		≥ 200		> 50		≤ 20	≤ 10
	SE33	1		≥ 200		entfällt		≤ 15	≤ 10
<i>Q-BIOgene</i>									
K1 III	D3S1358	2		< 100		> 50		≤ 20	≤ 10
K2 III									
K3 III									
K4 III									
K5 III									
K6 III									
K7 III									
K8 III	D3S1358	2		≥ 100		> 70		≤ 40	≤ 10
	D8S1179								
	D18S51								
	SE33								
K9 III									
K10 III									
K2 III									
K4 III									
K5 III									

ANHANG

Tabelle 17: Fortsetzung Scorebewertung

Probe	Anzahl der höchsten Peaks		Peakhöhe		Peakhöhenverhältnis		Peakhöhe des höchsten Stutter		Artefakte im Verhältnis zum kleinsten Peak in %
			in rfu		in %		in %		
	H2 < 0,5 H1	1	homozygot	≥ 200	homozygot	entfällt	homozygot	≤ 15	≤ 10
	H2 ≥ 0,5 H1 H3 < 0,5 H2	2		≥ 100				≤ 30	≤ 20
	H2 ≥ 0,5 H1 H3 ≥ 0,5 H2			< 100				> 30	> 20
			heterozygot (kleinster der Allelpeaks)	≥ 200	heterozygot	> 70	heterozygot	≤ 20	
				≥ 100		≥ 50		≤ 40	
				< 100				> 40	
K8 III	D3S1358	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10
	D8S1179	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10
	D18S51								
	SE33	1		≥ 200		entfällt		≤ 15	≤ 10
<i>Promega</i>									
K1 IV	D3S1358	2		≥ 200		> 70		> 40	≤ 10
	D8S1179	1		≥ 200		entfällt		≤ 15	> 20
	D18S51								
	SE33								
K2 IV									
K3 IV	D3S1358								
	D8S1179	1		< 100		entfällt		≤ 15	≤ 10
	D18S51								
	SE33	1		< 100		entfällt		≤ 15	≤ 10
K4 IV									
K5 IV									
K6 IV	D3S1358								
	D8S1179	1		≥ 100		entfällt		≤ 30	> 20
	D18S51								
	SE33								
K7 IV									
K8 IV									
K9 IV									
K10 IV									
<i>Phenol/ Chloroform</i>									
K1 V									
K2 V									
K3 V									
K4 V									
K5 V									
K6 V									
K7 V									
K8 V									
K9 V									
K10 V									
K1 V	D3S1358								
K2 V	D3S1358	2		≥ 200		> 70		≤ 40	> 20
	D8S1179	2		≥ 200		> 70		≤ 40	≤ 10
	D18S51	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10
	SE33	2		≥ 200		> 70		≤ 40	> 20
K4 V	D3S1358	2		≥ 200		> 70		≤ 20	> 20
	D8S1179								
	D18S51								
	SE33								
K5 V	D3S1358	1		≥ 200		entfällt		≤ 30	≤ 10
	D8S1179	2		≥ 200		> 50		≤ 20	≤ 10
	D18S51	2		≥ 100		> 70		≤ 20	≤ 10
	SE33	2		< 100		> 50		≤ 20	≤ 10
K6 V	D3S1358								
	D8S1179	2		≥ 200		> 70		≤ 40	> 20
	D18S51								
	SE33	2		< 100		> 70		> 40	> 20
K8 V	D3S1358	2		≥ 200		> 70		≤ 40	≤ 10
	D8S1179	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10
	D18S51	2		≥ 100		> 70		≤ 20	≤ 10
	SE33	1		≥ 200		entfällt		≤ 15	≤ 10

Tabelle 17: Fortsetzung Scorebewertung

Probe	Anzahl der höchsten Peaks		Peakhöhe		Peakhöhenverhältnis		Peakhöhe des höchsten Stutter		Artefakte im Verhältnis zum kleinsten Peak in %	
			in rfu		in %		in %			
	H2 < 0,5 H1	1	homozygot	≥ 200	homozygot	entfällt	homozygot	≤ 15	≤ 10	
	H2 ≥ 0,5 H1	H3 < 0,5 H2	2	≥ 100				≤ 30	≤ 20	
	H2 ≥ 0,5 H1	H3 ≥ 0,5 H2		< 100				> 30	> 20	
			heterozygot (kleinster der Allelpeaks)	≥ 200	heterozygot	> 70	heterozygot	≤ 20		
				≥ 100		≥ 50		≤ 40		
				< 100				> 40		
<i>MN</i>										
K1 VI										
K2 VI										
K3 VI										
K4 VI										
K5 VI	D3S1358	1		≥ 200		entfällt		≤ 30	≤ 10	
	D8S1179	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10	
	D18S51									
	SE33	2		≥ 200		> 70		≤ 40	≤ 10	
K6 VI										
K7 VI										
K8 VI										
K9 VI										
K10 VI	D3S1358	2		≥ 200		> 50		≤ 20	> 20	
	D8S1179	2		≥ 200		> 70		≤ 40	> 20	
	D18S51									
	SE33	2		< 100		> 50		≤ 20	≤ 10	
K5 VI	D3S1358	1		≥ 200		entfällt		≤ 30	≤ 10	
	D8S1179	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 10	
	D18S51	2		< 100		> 70		≤ 20	≤ 10	
	SE33	2		≥ 200		> 70		≤ 20	≤ 20	

Legende:

	optimierte PCR
	ungültig
1	homozygot
2	heterozygot
H1	Höhe des höchsten Peaks
H2	Höhe des zweithöchsten Peaks
H3	Höhe des dritthöchsten Peaks

Tabelle 18: DNA-Quantifizierung der RTQ-PCR der K- Proben

Kit	Knochen	RTQ-PCR 1	RTQ-PCR 2	RTQ-PCR 3	Mittelwert der beiden engsten	result. in µl der engsten	Abw. zu Mittelw in % der engsten
GEN-IAL	K 1						
	K 2						
	K 3						
	K 4						
	K 5						
	K 6						
	K 7						
	K 8						
	K 9						
	K 10						
QIAGEN	K 1	0,00565	0,00500				
	K 2	0,01695	0,01095				
	K 3	0	0				
	K 4	0	0				
	K 5	0,07050	0,10400	0,15850	0,08725	11,46	19,20
	K 6	0	0,00353				
	K 7	0	0				
	K 8	0,12850	0,21950	0,14250	0,13550	7,38	5,17
	K 9		0				
	K 10	0,00226	0,00575				
Q-BIOgene	K 1	0,00476	0,00985				
	K 2	0,06900	0,15650	0,24500	0,11275	8,87	38,80
	K 3	0	0,00465				
	K 4	0,02060	0,06900	0,06150	0,06525	15,33	5,75
	K 5	0,08400	0,18750	0,25500	0,22125	4,52	15,25
	K 6	0,00132	0				
	K 7	0	0				
	K 8	0,13800	0,26500	0,20250	0,23375	4,28	13,37
	K 9	0	0,00535				
	K 10	0,00190	0,00620				
Promega	K 1	0,00239	0				
	K 2	0	0,00925				
	K 3	0	0				
	K 4	0	0,01100				
	K 5	0,00433	0				
	K 6	0,00900	0				
	K 7	0	0,00580				
	K 8	0,00248	0,01035				
	K 9	0	0				
	K 10	0	0,00690				
Ph/ Ch	K 1	0,01700	0,02730	0,03530	0,03130	31,95	12,78
	K 2	0,05950	0,06850	0,13850	0,06400	15,63	7,03
	K 3						
	K 4	0,02485	0,04655	0,02745	0,02615	38,24	4,97
	K 5	0,28500	0,63000	0,74000	0,68500	1,46	8,03
	K 6	0,01970	0,02490	0,07000	0,02230	44,84	11,66
	K 7	0	0,01135				
	K 8	0,16200	0,54000	0,38900	0,46450	2,15	16,25
	K 9	0					
	K 10	0,01540	0,00570				

* Angaben in ng/ µl, Ph/ Ch für Phenol-Chloroform

Tabelle 18: Fortsetzung DNA-Quantifizierung der RTQ-PCR der K- Proben

Kit	Knochen	RTQ-PCR 1	RTQ-PCR 2	RTQ-PCR 3	Mittelwert der beiden engsten	result. in μ l der engsten	Abw. zu Mittelw in % der engsten
MN	K 1	0	0				
	K 2	0	0				
	K 3	0	0				
	K 4	0	0				
	K 5	0,07200	0,17200	0,18500	0,17850	5,60	3,64
	K 6	0,00154	0				
	K 7	0	0,01045				
	K 8	0,00750	0,01735				
	K 9						
	K 10	0	0				

* Angaben in ng/ μ l, MN für MACHEREY-NAGEL

Legende zu Tabelle 18 und 19:

	IPC und Knochen-DNA wurden nicht amplifiziert
	die beiden am engsten liegenden Werte
0	Knochen-DNA wurde nicht amplifiziert

Tabelle 19: DNA-Quantifizierung der RTQ-PCR der N- und A- Proben

Knochen	RTQ-PCR 1	RTQ-PCR 2	RTQ-PCR 3	Mittelwert der beiden engsten	result. in μ l der engsten	Abw. zu Mittelw in % der engsten
N 1a	255,17000	500,72500	466,63500	483,68000		3,52
N 1b	197,05500	299,07000	252,95000	276,01000		8,35
N 2a	347,46500	232,68000	331,46500	339,46500		2,36
N 2b	188,75500	345,74500	355,05000	350,39750		1,33
A 1a	0,46400	0,26800	0,17600	0,22200	5,68	20,72
A 1b	0,35850	0,20700	0,25000	0,22850	4,00	9,41
A 2a	0,00000	0,01210	0,00459	0,00230	217,86	100,00
A 2b	0,00000	0,00000	0,00000			0,00
A 3a		0,00000	0,00000			0,00
A 3b		0,00000	0,00000			0,00
A 4a	0,00000	0,00000	0,00000			0,00
A 4b	0,00411	0,00000	0,00000	0,00000		0,00
A 5a	0,00480	0,01095	0,02620	0,00787	38,17	39,09
A 5b	0,01745	0,00000	0,00145	0,00073	692,04	99,31
A 6a		0,00000	0,00000			0,00
A 6b		0,00000	0,00000			0,00
A 7a	0,01370	0,01490	0,03470	0,01430	28,82	4,20
A 7b		0,00486	0,01715	0,01101		133,76

* Angaben in ng/ μ l

Thesen

1. Der Erfolg von DNA-Typisierungen aus Hartgewebe ist häufig nicht vorhersehbar. Das gilt sowohl für die genomische als auch für die - gegenüber Umwelteinflüssen resistere - mtDNA.
2. Die Extrahierbarkeit von DNA aus Knochengewebe korreliert sowohl mit der Liegezeit als auch mit den Expositionsbedingungen.
3. Die in der rechtsmedizinischen Praxis erworbenen Kenntnisse über postmortale Dekompositionsprozesse können allerdings im Einzelfall eine Entscheidungshilfe sein.
4. Für alle Extraktionsmethoden finden sich im Schrifttum sehr widersprüchliche Angaben. Bereits daraus ist herzuleiten, dass noch keine Untersuchungsstandards existieren. Offenbar sind Untersuchungsergebnisse an Proben, die nicht unter identischen Laborbedingungen gelagert sind, nicht vergleichbar.
5. Selbst die Knochenmatrix ist nach Lebensalter und medizinischer Vorgeschichte sehr variabel. Allgemein gültige Schlussfolgerungen zu Extraktionsverfahren sind nach derzeitiger Kenntnis nicht möglich.
6. Die Quantifizierung extrahierter DNA durch die Real Time PCR ist - über den DNA-Nachweis im Minigel hinaus - ein wichtiges Kriterium für nachfolgende Arbeitsschritte.
7. Da bereits geringfügige Modifikationen im Extraktionsprotokoll zahlreiche Auswirkungen auf das Extraktionsverfahren haben können, sind auch aus methodischen Gründen DNA-Extraktionen in ihrer Komplexität schwer reproduzierbar.
8. Nach dem derzeitigen Erkenntnisstand sind die Qiagen-Extraktion und das „klassische“ Phenol-Extraktions-Verfahren die Methoden der Wahl zur DNA-Isolierung aus Knochengewebe.
9. Für die Zukunft wäre es vorteilhaft, einen Weg zu finden, Inhibitoren spezifisch nachweisen, entfernen oder unwirksam machen zu können, ohne die DNA dabei zu beeinflussen.
10. Dennoch sind noch keine Ansätze für eine grundlegende Verbesserung der derzeit insgesamt unbefriedigenden Situation erkennbar.

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die eingereichte Inauguraldissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Großbettlingen, 7. Juli 2008

Susanne Schuppan

Danksagung

Diese Arbeit entstand am Institut für Rechtsmedizin der Universität Rostock, dessen Mitarbeiter ich herzlich danken möchte für die Freundlichkeit, das große Vertrauen und die Überlassung des Arbeitsplatzes.

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. med. Rudolf Wegener für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, seine sehr hilfreichen Ideen und Kritik, die gemeinsame Fahrt zum Archäologischen Landesmuseum in Schwerin und das Treffen in Zürich.

Daneben stand mir vor allem Dr. med. Volker Weirich hilfreich zur Seite. Ihm danke ich besonders für die gegebene Freizügigkeit bei der Methodensuche, seine Offenheit gegenüber meinen Ideen, seine ständige Gesprächs- und Hilfsbereitschaft, das Vertrauen sowie die immer voranbringenden Ratschläge.

Zugleich sei Diane Meißner, für ihr ständiges Interesse, Ihre große Unterstützung und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft ganz herzlich gedankt.

Darüber hinaus habe ich auch Unterstützung durch Angelika Düwel, Dirk Kühnel und Wolf-Dietmar Müller, sowie Claudia Richter und Sylvio Tetzlaff erhalten und danke ihnen sehr dafür.

Dem Toxikologischen Labor des Instituts für Rechtsmedizin und vor allem Elke Riedel, gilt mein Dank für die freundliche Bereitstellung der Zentrifuge, der Entkalkerlösung und den Arbeitsplatz im Labor.

Ebenso bedanke ich mich bei Dr. rer. nat. Ulrike Bulnheim und dem Experimentellen Forschungszentrum der Universität Rostock für die Einführung sowie das Vertrauen und die Bereitstellung des SDS.

Ich bedanke mich auch bei PD Dr. rer. nat. habil. Dipl.-Prähist. Hauke Jöns und den Mitarbeitern des Archäologischen Landesmuseums Mecklenburg-Vorpommern, Abteilung für Bodendenkmalpflege, für den freundlichen Kontakt und die vertrauensvolle Überlassung der Knochen für meine Untersuchungen.

Großen Dank möchte ich schließlich auch meinem Lebensgefährten Martin Mehrländer, meiner Schwester Sylvia Schuppan und meinen Eltern für ihre Unterstützung, ihr Interesse und das Korrekturlesen entgegenbringen.

Zurückblickend hat mich diese Arbeit um vertiefte Erkenntnisse auf dem Gebiet der forensischen Genetik bereichert. Mein Ziel, Einblicke in ein Labor und allgegenwärtige Vorgänge und Standards zu erhalten, habe ich durch die freundliche Hilfe aller Beteiligten erreicht. Die Faszination an der Sensibilität der aDNA und ihre Aussagekraft, sowie die Bewunderung für die Beständigkeit der bis zu 5000 Jahre alten menschlichen Überreste werden mich weiterhin begleiten.

Vielen herzlichen Dank

Susanne Schuppan