



BACHELORARBEIT

Frau
Jessica Klapper

**Bewertung des zeitabhängigen Ein-
flusses physikalischer Faktoren auf
den DNA-Degradationsgrad auf
Grundlage hochpolymorpher STR-
Systeme**

2017

BACHELORARBEIT

Bewertung des zeitabhängigen Einflusses physikalischer Fakto- ren auf den DNA-Degradations- grad auf Grundlage hochpolymor- pher STR-Systeme

Autor:
Frau Jessica Klapper

Studiengang:
Allgemeine und Digitale Forensik

Seminargruppe:
Fo14w2-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. Labudde

Zweitprüfer:
M.-Sc. Anne-Marie Pflugbeil

Einreichung:
Mittweida, 10.08.2017

BACHELOR THESIS

Assessment of time-dependent influences of physical factors on the degree of DNA degradation based on highly polymorphic STR systems

author:

Ms. Jessica Klapper

course of studies:

general and digital forensics

seminar group:

Fo14w2-B

first examiner:

Prof. Dr. rer. nat. Labudde

second examiner:

M.Sc. Anne-Marie Pflugbeil

submission:

Mittweida, 10.08.2017

Bibliografische Angaben:

Nachname, Vorname: Klapper, Jessica

Bewertung des zeitabhängigen Einflusses physikalischer Faktoren auf den DNA-Degradationsgrad auf Grundlage hochpolymorpher STR-Systeme

Assessment of time-dependent influences of physical factors on the degree of DNA degradation based on highly polymorphic STR systems

2017 - 107 Seiten

Mittweida, Hochschule Mittweida (FH), University of Applied Sciences,
Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2017

Abstract

In dieser Arbeit ging es hauptsächlich darum, zu untersuchen wie bestimmte, gewählte Degradationsparameter auf DNA Proben realer Personen einwirken und wie diese im Laufe der Zeit verändert werden. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf *dropout/dropin* Phänomenen. Dabei wurde zusätzlich die Verwendbarkeit des Chimera® Mentype® Kits in der forensischen Spurenanalytik überprüft.

Es wurden unterschiedliche Spurenmaterialien von fünf Probanden über einen Zeitraum von 4 h bis 14 Tagen, diversen Temperaturen und UVC-Bestrahlung ausgesetzt. Die Auswertung erfolgte mittels STR-Profilen sowie Fragment Analyzer™. Ebenfalls wurden Hautabriebsspuren gesichert, welche mittels NanoDrop™ und Fragment Analyzer™ analysiert wurden um eine Beurteilung über die Tauglichkeit dieser Tools vornehmen zu können.

Die Ergebnisse bestätigen, dass ein großer Unterschied zwischen Speichelproben und Mundschleimhautabstrichen besteht, was Degradationserscheinungen betrifft. Es konnte auch festgestellt werden, dass es signifikante Unterschiede bei den Probanden gibt. (*Shedderstatus*) Bei dem Vergleich von STR-Profilen mit den Fragment Analyzer™ Daten zeigt sich, dass eine Korrelation nicht möglich ist. Der angesetzten Toolvergleich brachte hervor, dass der Fragment Analyzer™ effizienter und präziser ist, womit der NanoDrop™ vorgezogen werden sollte.

Inhalt

Inhalt	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
2 Hypothesen	4
2.1 Fragment Analyzer™ Hypothesen.....	4
3 Theoretischer Hintergrund	6
3.1 Desoxyribonukleinsäure (DNS)	6
3.1.1 DNA Replikation	7
3.1.2 DNA Quantität, Qualität und Shedderstatus.....	8
3.1.3 DNA-Degradation	9
3.1.4 Phänomene der DNA-Degradation.....	11
3.2 Polymerase Kettenreaktion	12
3.3 Besonderheiten der verwendeten Spurenmaterialien	14
3.3.1 Mundschleimhaut	14
3.3.2 Speichel	14
3.4 Epithel und Epithelzellen	15
3.5 (Kapillar-) Elektrophorese, Elektropherogramm	17
3.5.1 Elektrophorese vs. Kapillarelektrophorese.....	17
3.5.2 Elektropherogramm.....	18
3.6 Chimäre, Chimärismus und Chimera Kit.....	20
3.6.1 Chimäre und Chimärismus	20
3.6.2 Bewertung des Mentype® Chimera® für die Spurenanalytik	21
3.7 Fragment Analyzer™ und ProSize 2.0	22
3.8 NanoDrop™	23
3.9 Sensitivitätsstudie.....	24
4 Aktueller Stand der Forschung	26
5 Material und Methoden	28
5.1 Material	28

5.2 Methoden Degradationsstudie.....	30
5.2.1 Methodik Speichelproben (Testreihe 1)	30
5.2.2 Methodik Mundschleimhautabstriche (Testreihe 2).....	32
5.2.3 Vergleiche von unterschiedlichem Spurenmaterial	32
5.2.4 Methodik der 14 Tage Testreihe (Testreihe 3)	33
5.2.5 Methodik Fragment Analyzer™ Daten	33
5.2.6 Vergleich Fragment Analyzer™ Daten mit STR-Profilen.....	34
5.2.7 Vergleich von NanoDrop™ und Fragment Analyzer™ anhand Hautabriebsspuren.....	34
6 Ergebnisse der Degradationsstudie	36
6.1 Degradationserscheinungen in den Speichelproben (Testreihe 1).....	36
6.1.1 Probandenbetrachtung	37
6.1.2 Zusammenfassende Aussagen zu den Speichelproben	45
6.2 Degradationserscheinungen der Mundschleimhautabstriche (Testreihe 2) ...	47
6.2.1 Probandenbetrachtung	48
6.2.2 Zusammenfassende Aussagen zu den Mundschleimhautabstrichen ..	53
6.3 Vergleiche der Tauglichkeit unterschiedlichen Spurenmaterials	55
6.4 Degradationserscheinungen der 14 Tage Testreihe (Testreihe 3)	58
6.5 Auswertung Fragment Analyzer™ Daten und Vergleich mit STR-Profilen ...	60
6.5.1 Probandenbetrachtungen	61
6.5.2 14 Tage Reihe.....	71
6.6 Toolvergleich von NanoDrop™ und Fragment Analyzer™ Daten anhand von Hautabriebsspuren	73
6.6.1 Unterarmabriebe.....	73
6.6.2 Handrückenabstriche.....	75
7 Diskussion der Ergebnisse.....	77
7.1 Degradationserscheinungen der Speichelproben (Testreihe 1)	78
7.2 Degradationserscheinungen der Mundschleimhautabstriche (Testreihe 2)...	80
7.3 Degradationserscheinungen in der 14 Tage Reihe (Testreihe 3).....	81
7.4 Fragment Analyzer™ Daten	81
7.5 Toolvergleiche mittels Hautabriebsspuren.....	83
Literatur	VII
Anlagen	XII
Selbstständigkeitserklärung	XIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DNA Strang mit komplementären Basen	6
Abbildung 2: DNA Aufbau.....	7
Abbildung 3: Ablauf PCR [13, modifiziert].....	13
Abbildung 4: Arten von Epithel, modifizierte Abbildung nach [21], [38]	17
Abbildung 5: Aufbau Kapillarelektrophoreseapparatur; nach Quelle [25]	18
Abbildung 6: Ausschnitt Vergleichsladder der Kontroll-DNA (DNA-5) des Chimera Mentype Kit	20
Abbildung 7: dropout Erscheinungen bei Proband 9.....	39
Abbildung 8: dropout Erscheinungen bei Proband 19	42
Abbildung 9: dropout Erscheinungen bei Proband 20.....	44
Abbildung 10: dropout Erscheinungen bei Proband A	51
Abbildung 11: dropout Erscheinungen bei Proband N	53
Abbildung 12: Unterschiede in den <i>dropout</i> Erscheinungen in unterschiedlichen Spurenmaterial unter Raumtemperatur	56
Abbildung 13: Unterschiede in den <i>dropout</i> Erscheinungen in unterschiedlichen Spurenmaterial nach UV-C Einfluss	57
Abbildung 14: beispielhafter Fragmentierungsverlauf Proband 9.....	61
Abbildung 15: beispielhafter Fragmentierungsverlauf Proband 19.....	63
Abbildung 16: beispielhafter Fragmentierungsverlauf Proband 20.....	65
Abbildung 17: Elektropherogramm P20 unter UV-C Einfluss	67
Abbildung 18: beispielhafter Fragmentierungsverlauf Proband A	67
Abbildung 19: beispielhafter Fragmentierungsverlauf Proband N	69

Abbildung 20: beispielhafter Fragmentierungsverlauf aller Probanden, 14 Tage71

Abbildung 21: Elektropherogramm aller Probanden, 14 Tage unter UV-C Einfluss.....72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Allele und Fragmentlängen der ausgewählten Speichelprobanden.....	45
Tabelle 2: Allele und Fragmentlängen der ausgewählten Mundschleimhautabstriche.	54
Tabelle 1: Vergleich ermittelter DNA-Mengen in NanoDrop und Fragment Analyzer Unterarm.....	74
Tabelle 4: Vergleich ermittelter DNA-Mengen in NanoDrop und Fragment Analyzer Handrücken.....	76

Abkürzungsverzeichnis

pg	... Pikogramm (1 Billionstel Gramm = 10 ⁻¹² g)
bp	... Basenpaare (Einheit der Fragmentlänge)
bp	... relative fluorescence units (Maßeinheit der Signalstärke in der Elektrophorese)
DNA / DNS	... Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
RNA	... Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
m-RNA	... Boten-RNA (messenger-RNA)
t-RNA	... transfer-RNA
PCR	... Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
EOF	... elektroosmotischer Strom (elektroosmotischer Flow)
Stabw.	... Standardabweichung
D7	... D7S1517
D3	... D3S1744
D12	... D12S391
D2	... D2S1360
D6	... D6S474
D4	... D4S2366
D8	... D8S1132
D5	... D5S2500
D18	... D18S51
D21	... D21S2055
D10	... D10S2325
P6	... Proband Nummer 6
P7	... Proband Nummer 7
P9	... Proband Nummer 9
P19	... Proband Nummer 19
P20	... Proband Nummer 20

°C	... Grad Celsius; Temperatureinheit
Zahl h	... Abkürzung für Stunden; Betrachtete Zeiten bei der Degradationsstudie
UVC	... Ultraviolettes Licht, Bereich C
Inj.	... Injektion
T1	... Testreihe 1
T2	... Testreihe 2
T3	... Testreihe 3
ng	... Nanogramm
ul	... Mikroliter
ng/μl	... Nanogramm pro Mikroliter (Einheit der DNA-Konzentration in Fragment Analyzer™ - Daten)
TIC	... Total Integrated Concentration (detektierter DNA-Anteil Fragment Analyzer™)
tot. Conc.	... total Concentration (Totale ermittelte Konzentration im Fragment Analyzer™)
LM	... Lower Marker (Untergrenze bzw. erster <i>Peak</i> im Fragment Analyzer™)
UM	... Upper Marker (Obergrenze bzw. letzter <i>Peak</i> im Fragment Analyzer™)
nm	... Nanometer, Maßeinheit Wellenlänge
STR	... <i>short tandem repeat</i> (Synonyme: <i>SSR: Simple Sequence Repeats</i> , Mikrosatelliten)

1 Einleitung

Im forensischen Bereich ist es möglich, anhand kleinster Spurenmengen DNA Profile zu erstellen, eine Täterschaft zu beweisen oder ganz allgemein, Personen in einem Tatzusammenhang zu identifizieren. Voraussetzung hierfür ist, dass DNA-Vergleichsproben von Tätern, Opfern oder Verdächtigen existieren. Jedoch kann bei biologischen Spuren, welche an Tatorten gefunden werden, keine direkte Aussage über die enthaltene DNA-Menge (Quantität) und den Zustand der DNA (Qualität) getroffen werden. In den überwiegenden Fällen bestimmt die DNA-Quantität die Weiterverwertbarkeit der Spur im Labor und schließlich bedingt diese die Qualität des Typisierungsergebnisses. So wird im Vorfeld eine Untersuchung angestellt, welche bestimmt, ob die Quantität ausreichend ist, um so weitere Tests zur DNA Bestimmung des Spurenmaterials vorzunehmen.

Die DNA-Qualität scheint gegenwärtig dabei noch eine untergeordnete Rolle, in der (Labor-) Praxis, zu spielen. Aussagen über die Zellzustände in Bezug zu Umwelteinflüssen und „Liegezeit“ bzw. Alter der Spur werden bisher nicht betrachtet.

Umwelteinflüsse können sich lediglich durch Tatzeit, Auffindzeit und -ort und aus eventuellen Wetterdaten schätzen lassen. Den Parameter Umwelt generell wirklich effizient einzubeziehen ist sehr schwierig, da bei ihm viele andere Faktoren beachtet werden müssen. Somit kommt es zu unvorhersagbarem Verhalten, welches die DNA einer Person verändert.

Ebenfalls werden aktuell auch keinerlei Aussagen getroffen, in wieweit die DNA-Quantität die Qualität beeinflusst oder umgekehrt. Somit erscheint es wichtig, eine Bestimmung im Vorfeld zu treffen, wie die Quantität Profile beeinflusst, da dies höchstwahrscheinlich Einfluss auf die Qualität nehmen wird.

Somit gilt es nun in diesem Projekt zu untersuchen, in welcher Weise die (simulierten) Umwelteinflüsse auf die DNA einwirken, diese verändern und in wieweit die Quantität Einfluss darauf nimmt. Untersucht werden sollen hierbei Einflüsse wie Temperaturen oder UV-Bestrahlung, zu bestimmten Zeitintervallen, von wenigen Stunden bis mehreren Tagen. Somit sollen, durch „zeitliche Veränderungen der Zellorganellen, bioinformatische und biometrische Methoden zum Abschätzen der Wahrscheinlichkeit des Auftretens von *allelic dropout*- und *dropout* Ereignissen entwickelt werden.“ [1]

Des Weiteren muss beachtet werden, dass sich die DNA jedes Menschen bei gegebenen Faktoren nicht gleich verhält. Hierbei muss eine Unterscheidung von „good-“ und „poor sheddern“ getroffen werden.

Anzunehmen ist, dass bei verdünnten DNA-Proben eher Degradationsphänomene zu beobachten sind. Auch sollten die Ausfallwahrscheinlichkeiten komplexerer Systeme zunehmen und simpel gebaute Systeme relativ beständig bleiben. Ebenfalls steht auch die Vermutung an, dass nicht nur komplexere Systeme, sondern auch längere Systeme, welche durch größere Fragmentlängen bestimmt sind, eher dazu neigen zu zerfallen. Zusätzlich wird davon ausgegangen, dass besonders bei UVC bestrahlten DNA-Proben ein vermehrtes Auftreten von *allelic* und *locus dropout* Erscheinungen zu beobachten ist. Wie allgemein bekannt ist, schädigt und zerstört UV-Strahlung Zellen bei ungeschützter Aussetzung über einen längeren Zeitraum. Somit wird auch die im Zellkern befindliche DNA zerstört. Bei einer Temperatur vom 40°C sollte es über einen längeren Zeitraum ebenfalls zu gehäufte Ausfällen kommen, da diese Temperatur ein Schwellenwert ist, bei welchem sich Eiweiße zu zersetzen beginnen.

Ebenso spielt der betrachtete Zeitraum auch eine große Rolle als Einflussfaktor, denn es wird hypothetisiert, dass Degradationsphänomene mit der Zeit zunehmen und dass mit zunehmender Zeit („Liegezeit“) mehr DNA zerstört bzw. verändert wird. Eine Betrachtung, dass Speichel (DNA) ohne Trocknung durch Bakterien oder Pilze zersetzt werden kann, wird nicht bedacht. [2]

Geprüft werden sollen diese Annahmen anhand Spurenmaterials freiwilliger Probanden und nicht durch in vitro (künstlich im Reagenzglas) hergestellte DNA. Ebenfalls werden Tests von unterschiedlichem Spurenmaterial angesetzt, welche für eine Identitätsfeststellung gesichert werden können, um zu sehen ob es hierbei Gemeinsamkeiten oder Unterschiede gibt. Dabei wird das Hauptaugenmerk auf Speichelproben und Mundschleimhautabstriche gelegt.

Es werden Tests mittels unterschiedlichen Prüfverfahren angesetzt, um sehen zu können welche Daten später geeigneter für eine Spurenanalyse sind. Verfahren hierbei sind eine klassische PCR zur Erstellung eines STR-Profilbildes und eine Analyse mittels Fragment Analyzer™ und PROSize Software, sowie eine DNA-Mengen und Qualitätsuntersuchung mittels NanoDrop™. Besonders in der Verwendung des Fragment Analyzer™ liegt ein großes Interesse, da hier festgestellt werden soll ob mittels dieses *Tools* eventuell schon eine qualitative Beurteilung der Proben möglich ist und nicht nur eine quantitative. Da dieses als Grundfunktion beide Betrachtungen zulässt, muss ermittelt

werden, ob zwischen den erscheinenden Elektropherogrammen und den PCR/Kapillarelektrophorese - STR-Bildern eine Korrelation gefunden werden kann.

Jedoch sollen hierbei die Erkenntnisse der im Vorfeld erstellten Sensitivitätsstudie, welche anhand von *in vitro* DNA durchgeführt wurde, einfließen und bei der Beurteilung der Ergebnisse helfen. Nach Abschluss dieser Arbeit sollen die erhaltenen Daten mit den Ergebnissen einer Mischspurenanalyse [b] korreliert werden.

Die Sensitivitätsstudie wurde zur Beurteilung des Zusammenhangs von Quantität und Qualität (und *dropout* Ereignissen) der DNA Profile, sowie eine Betrachtung der Qualitätsänderungen durchgeführt. Somit konnte festgestellt werden, ob unterhalb einer eigentlichen festgesetzten Grenze von 100 pg DNA doch noch aussagekräftige Profile erstellt werden können. [a]

Einen weiteren Unterschied zu bisherigen Forschungsarbeiten auf diesem Feld stellt das verwendete Kit dar. Dieses wurde eigentlich für den medizinischen Bereich zur Chimärismusanalyse und weniger für die forensische Spurenanalytik entwickelt. Im Zusammenhang mit einer anderen Arbeit zum Thema Mischspurenanalyse soll jedoch auch die Verwendbarkeit bei Einzelspuren untersucht werden. Ebenfalls kann durch eine Einzelspurenanalyse besser eine Validierung für den forensischen Bereich betrachtet werden.

2 Hypothesen

- 1) STR-Systeme und Allele mit hohen Fragmentlängen neigen eher zu Degradationsphänomenen.
- 2) Bei homozygoten STR-Systemen, mit Allelen großer Abstände, neigt das zweite Allel desselben *Locus* eher zu Ausfällen. Bei Allelen geringerer Distanzen ist diese Wahrscheinlichkeit geringer.
- 3) Besonders komplexe Systeme neigen unabhängig ihrer Fragmentlänge zu Degradationserscheinungen.
- 4) Parameterabhängige Hypothesen:
 - a) UVC Einfluss hinterlässt die meisten und deutlichsten Degradationsphänomene.
 - b) Der Parameter Raumtemperatur sollte die wenigsten Auswirkungen hervorrufen.
 - c) Es kommt vorwiegend zu *allelic* bzw. *locus dropouts* und eher weniger zu *allelic dropins*.
- 5) Nach einer 14 tägigen Lagerung unter einem bestimmten Parameter zeigen sich die signifikantesten Phänomene. Es wird mit einer sehr schlechten Profilqualität bis hin zu nicht vorhandenen Profilen gerechnet.
- 6) Aufgrund soliderer und mehr Zellen im Spurenmaterial sollten die Mundschleimhautabstriche deutlich stabilere Profile liefern als der Speichel.

2.1 Fragment Analyzer™ Hypothesen

- 7) Im zeitlichen Verlauf sinkt der (prozentuale) Anteil der detektierten DNA-Menge im Verhältnis zur gesamt enthaltenen DNA-Menge.
 - a) Ebenso sinkt generell die gesamt detektierbare DNA Menge.
- 8) Bei DNA ohne (stärkere) Degradation sollten der *Lower Marker (LM) Peak* vorliegen und ein *Peak* im Bereich von >2000 bp, da genügend lange Fragmente vorhanden sein sollten.
 - a) Mit zunehmender Zeit steigt die Fragmentierung der DNA. Es sind zunehmend mehr *Peaks* im Elektropherogramm zu erwarten.
 - b) Die Anteile der *Peaks* kurzer Fragmente wachsen mit der Zeit.

- 9) Es zeigen sich beständige *Peaks* im Bereich kurzer Fragmentlängen. Im zeitlichen Verlauf sinkt sowohl hier die Fragmentlänge und Signalstärke als auch der Anteil des *Peaks* an der detektierten DNA-Menge (prozentual gesehen).
- 10) Aufgrund eines anderen Verfahrens zur DNA Quantifizierung sind im Fragment Analyzer™ bessere Daten zu erwarten als bei NanoDrop™. Es wird davon ausgegangen, dass der Fragment Analyzer™ ausschließlich humane DNA detektiert
 - a) Die in NanoDrop™ ermittelten DNA-Mengen sollten deutlich höher liegen als jene vom Fragment Analyzer™, da NanoDrop™ auch bakterielle und virale DNA erfasst.

3 Theoretischer Hintergrund

Hier werden im Folgenden nun einige Begrifflichkeiten aus der Einleitung erläutert, fortführende Notwendigkeiten dargestellt und andere notwendige Hintergründe beleuchtet. Die hier aufgeführten Punkte stellen einen wichtigen Hintergrund für das Verständnis und die Auswertung der nachfolgenden Experimente dar.

3.1 Desoxyribonukleinsäure (DNS)

(engl.: *deoxyribonucleic acid* (DNA))

DNA ist ein hochmolekulares Makromolekül, bestehend aus vier organischen Basen (auch Nukleinbasen), einem Phosphatrest und einem Zuckerbaustein (Desoxyribose). Dieses Makromolekül ist ein doppelsträngiger Helix, welcher noch einmal in sich gewunden ist. Die DNA wird dabei auch als (gewundene) Leiter bezeichnet. Die vier organischen Basen, welche aus Kohlenstoffatomen bestehen, sind Adenin (A), Thymin (T), Cytosin (C) und Guanin (G). Dabei sind nur A-T und C-G zulässige komplementäre Basenpaare und bilden die Trittstufen der Leiter.



Abbildung 1: DNA Strang mit komplementären Basen

Dabei sind A-T über Wasserstoffbrücken und C-G über Schwefelbrücken miteinander verbunden.

Der Phosphatrest, welcher für die Bindung und Festigkeit wichtig ist, und der Zuckerbaustein bilden den Holm (äußeren Strang).

Eine Folge von drei Basenpaaren wird als Triplet bezeichnet und stellt eine Aminosäure dar. Aus 20 bis 22 dieser Aminosäuren werden, mittels RNA, Proteine (Eiweiße) aufgebaut.

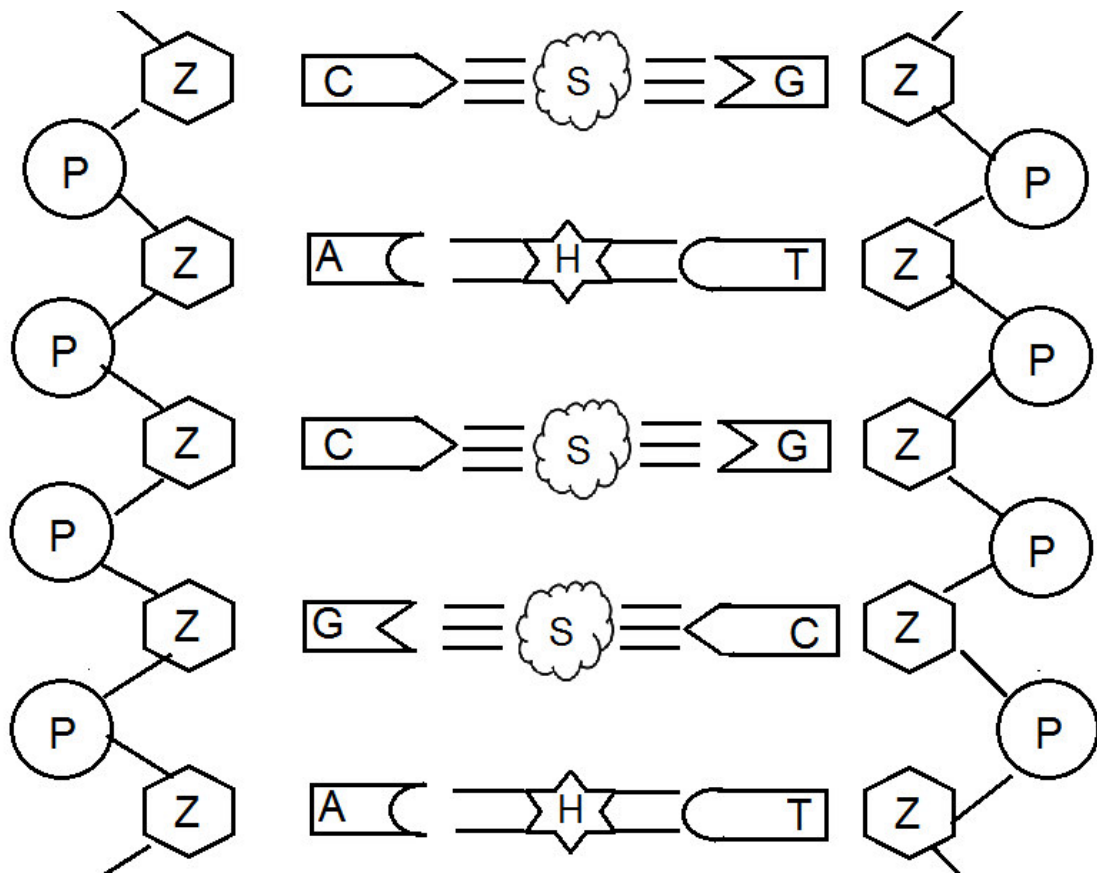


Abbildung 2: DNA Aufbau
 P = Phosphat, D = Desoxyribose, A/T/C/G = org. Basen,
 Drei-Strang-Verbindung = Schwefelbrücken, Zwei-Strang-Verbindung = Wasserstoffbrücken
 S=Schwefel, H=Wasserstoff

3.1.1 DNA Replikation

Die DNA-Replikation ist ein mehrstufiger Prozess, bei welchem zu Beginn die Doppelhelix mittels Topoisomerase entwunden wird. Die Helikase trennt folgend die Wasserstoffbrücken auf. An dieser Stelle entsteht nun eine Replikationsgabel. Diese nun entstandenen Einzelstränge werden für das Erstellen neuer DNA-Doppelhelices benötigt. Dabei muss jedoch zwischen Leitstrang und Folgestrang unterschieden werden. Der Leitstrang ist jener, welcher vom 3' zum 5' Ende verläuft. In diese Richtung verläuft auch die DNA-Spaltung und Neubildung der DNA. Diese Neubildung erfolgt mittels Polymerasen, welche die komplementären Basen (Nukleotide) aneinanderfügt. Für diesen Schritt werden *Primer* benötigt, welche aus RNA-Nukleotide bestehen. Diese *Primer* werden mittels Primase gebildet und verlaufen in genannte Richtung. (*Primerannealing*) Dabei ist eine *Primerbindung* jedoch nur an einem Strang möglich und nicht gleichzeitig an beiden Strängen. Die Ursache hierfür liegt an der vorgegebenen Richtung und daran, dass die Primase am 3' Ende beginnt, welches bei dem Folgestrang auf der anderen

Seite der DNA vorliegt. Somit wandert der Prozess erst an dem Leitstrang entlang bis zum Ende und von dort aus am Folgestrang wieder zurück. Die anzubindenden Nukleotide / komplementären Basen werden jedoch nicht erst hergestellt, sondern befinden sich schon im Zytoplasma und wandern durch die Zellkernporen in den Zellkern.

Die Auftrennung vom 3' in Richtung des 5' Endes bewirkt, dass eine Nukleotidbindung (Synthese) nur in entgegengesetzte Richtung möglich ist. Somit entstehen Tochterstränge immer vom 5' Ende her. Dies ist beim Leitstrang alles recht einfach und dieser kann, vom *Primer* beginnend, an einem Stück vervielfältigt werden. Beim Folgestrang jedoch, entstehen immer wieder kleine DNA-Fragmente (Okazaki-Fragmente). Diese bestehen aus *Primer* und einem kleinen Stück DNA-Tochterstrang unterschiedlicher Längen.

Diese *Primer* werden dann durch RNase H entfernt und entstandene Lücken werden mittels einer weiteren Polymerase mit Nukleotiden gefüllt. Durch Ligase findet nun eine Aneinanderbindung der hinzugefügten Nukleotide bzw. Okazaki-Stücke statt, sodass zwei identische DNA Stränge / Doppelhelices entstehen.

Fehlbildungen / Veränderungen im DNA Originalstrang werden somit mitkopiert, jedoch gibt es einen weiteren Folgeschritt, welcher eine Kontrollfunktion darstellt und diese Veränderungen überprüft. Dieser Schritt ist dahingehend wichtig, dass somit Mutationen und Krankheiten vermieden werden können.

3.1.2 DNA Quantität, Qualität und *Shedderstatus*

DNA Quantität ist hierbei sehr einfach zu beschreiben, da es wie der Name schon sagt um die DNA Menge geht. Eine festgelegte Nachweisgrenze scheint jedoch nicht zu existieren und eher Kit-spezifisch zu sein. In den meisten Fällen kommt es zu einem Test der erhaltenen Spur und erst im Ergebnis wird dann festgestellt, ob sie sich eignet oder zu wenig Vergleichsmaterial enthalten war. [3]

Laut „*Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*“ existieren auf Grundlage der DIN EN ISO 24276 Lebensmittel [4] folgende Definitionen für Nachweisgrenzen.

„Die absolute Nachweisgrenze ist die geringste Menge der Zielsequenz, die mit einem Nachweisverfahren in einer Untersuchungsprobe zuverlässig nachgewiesen werden kann. Die Angabe erfolgt als Kopienzahl.“ [5] [4]

„Die praktische Nachweisgrenze ist die geringste relative Menge der Zielsequenz, die

bei einer bekannten Anzahl von Kopien des Genoms der taxonomischen Zielgruppe in einer konkreten Probe nachgewiesen werden kann“ [5] [4, modifiziert]

Das hier verwendete Kit wirbt laut Gebrauchsanweisung [6] mit einer Grenze von 200 pg DNA. In einem telefonischen Gespräch mit FoSil wurde sogar eine Grenze von 100 pg genannt. Diese scheint auf Grundlage anderer Kits und der firmeneigenen (klinischen) Validierung so festgelegt.

Wie weit darunter einzelne Kits jedoch weiterhin problemlos ermitteln, wird eher selten erforscht.

DNA Qualität meint, wie Aussagekräftig ein DNA-Profil ist. Das heißt, wie viele STR-Systeme noch erfasst werden können. Die Qualität der DNA ist dabei von vielen Faktoren abhängig, diese werden im folgenden Abschnitt erläutert. Ebenso findet eine Beschreibung von Umwelt- und Zeitparametern statt, welche eine Degradation bewirken können und in welcher Weise sie auf die DNA einwirken.

Die Quantität kann ebenso durch den individuellen *Shedder*status beeinflusst werden. Dieser wiederum beeinflusst die Qualität der DNA-Profile. Dabei geht es darum, wieviel DNA ein Individuum bei einem einmaligen Kontakt hinterlässt. [36] Dabei wird eine Unterteilung in *good* und *poor shedder* vorgenommen. Als *good shedder* (guter DNA-Bereitsteller) werden Menschen bezeichnet, welche bei einem minimalsten Kontakt mit einem Objekt schon nach nur 10 Sekunden genügend DNA hinterlassen, um ein vollständiges Profil erstellen zu können. Bei *poor sheddern* ist unter diesen Bedingungen, wenn überhaupt, nur ein Teilprofil erstellbar. [43] [36]

3.1.3 DNA-Degradation

Degradation im weitesten biologischen und chemischen Sinne meint einen Abbau oder eine Zersetzung von chemischen Verbindungen. [40] Dies entspricht im eigentlichen Sinne aber nicht den Erscheinungen im Bereich von DNA-Degradation. Zwar ist es auch möglich, dass es durch gegebene Umwelteinflüsse zu einem DNA Abbau eines Spurenmaterials kommt, jedoch liegt der Hauptteil einer DNA-Degradation im Strangbruch bzw. Strangumbau der DNA oder in einem Basenaustausch. Dadurch wird in einigen Quellen auch von DNA-Fragmentierung gesprochen. [41] [42] Die Brüche, von DNA-Strängen, können chemische oder mechanische Ursachen besitzen. [7] [42] Es können starke Schäden im Gewebe oder den Zellen entstehen, was sich forensisch betrachtet im Profil niederschlägt und die Profilqualität herabsetzt. Da dies irreversibel ist, kann es zu einer

dauerhaften Veränderung (Mutationen) bzw. Modifikationen kommen. Somit ist es möglich, dass die originale DNA-Probe eines Verdächtigen / Opfers nicht zur gesicherten Spur passt und eine Identifizierung somit erschwert oder sogar unmöglich ist.

Mechanische Einflüsse stellen hier z.B. Beschallung, Nadeleinstiche, Vernebelung und Auswirkung von Druck, auf eine Zelle, dar. [7] Eine Auswirkung dieser, kann eine Apoptose (programmierter Zelltod) auslösen, da diese in der Regel durch starke Schädigung der Erbinformationen hervorgerufen wird.

Ein Strangbruch innerhalb der DNA wird meist durch das Brechen bzw. Wegfallen von Wasserstoff- oder Schwefelbrücken innerhalb der Stränge ausgelöst. Einige Wissenschaftler gehen ebenfalls davon aus, dass eine DNA-Sequenz vordefinierte Sollbruchstellen besitzt und diese unabhängig von anderen Faktoren brechen. Für die Stabilität der Doppelhelix sind hauptsächlich zwei Faktoren verantwortlich: die Basenpaarung zwischen komplementären Basen sowie Stapelwechselwirkungen (*stacking interactions*) zwischen aufeinanderfolgenden Basen. [8] Die Wasserstoffbrücken eines GC-Basenpaares tragen nur minimal zur Stabilität der Doppelhelix bei, während diejenigen eines AT-Basenpaares sogar destabilisierend wirken. [9] „Ionisierende Strahlung, wie zum Beispiel UV- oder γ -Strahlung, Alkylierung sowie Oxidation können die DNA-Basen chemisch verändern oder zum Strangbruch führen. Diese chemischen Änderungen beeinträchtigen unter Umständen die Paarungseigenschaften der betroffenen Basen. Viele der Mutationen während der Replikation kommen so zustande.“ [8]

Der Austausch von Basen kann Mutationen auslösen und ebenfalls Ursache für eine Nichterkennung eines Allels in einem Profil sein, da aufgrund dieses Transfers nun eine andere Sequenz vorliegt. Jedoch muss dieser sehr oft stattfinden und in allen Zellen, damit diese Nicht-Detektierbarkeit wirklich auftritt.

Chemischen Veränderungen, welche zum Teil eine starke Veränderung der Bauweise auslösen können, wären unter anderem Temperaturen, sowohl in der Luft als auch am Boden, Temperaturschwankungen und -extreme, Feuchtigkeit (ergo Trockenheit), der gegebene Untergrund, pH-Wert oder Sonnen- bzw. UV-Strahlung et cetera. Weiterhin ist die Dauer, wie lange eine DNA-Spur einem oder mehreren Umwelteinflüssen ausgesetzt ist, entscheidend. Auswirkungen des Ganzen können der Austausch von Basen, teilweisen Abschnitten der Basenfolge oder ein Brechen der DNA in kurze Fragmente sein. Es besteht hier die Annahme, dass mit zunehmender Zeit eine Probe mehr und mehr zerstört wird.

Im Faktor Raumtemperatur liegt wohl das größte forensische Interesse, da davon auszugehen ist, dass die meisten Taten in Räumlichkeiten begangen werden. Somit sind die Spuren den dort vorherrschenden Umweltparametern ausgesetzt. Ebenfalls ist dies ein sehr variabler Faktor, welcher von Temperaturschwankungen, den Jahreszeiten, persönlichem Empfinden und dem „Lageort“ beeinflusst wird. Dabei wirken sich alle genannten Faktoren aufeinander aus und gehen ineinander über. Ebenfalls können das Vorhandensein von Heizung und / oder Klimaanlage, sowie die Entfernung einer Probe, von diesen, entscheidenden Einfluss nehmen.

Das Interesse an der Auswirkung von UVC-Bestrahlung ergibt sich aus folgendem Grund: wie allgemein bekannt ist, zerstört UV-Strahlung Zellen in hohem Maße. Auch neigt UV-Strahlung dazu, die DNA zu verändern, wodurch es zu unvorhersagbaren Modifikationen oder Mutationen kommen kann. Die Testreihe der 40° verdient besondere Beachtung, da dies ein Schwellwert ist, bei welchem Eiweiß beginnt zu denaturieren. Da DNA aus Eiweißen gebaut ist, sollte es somit dazu kommen, dass sie hier zerstört wird. [10] [11]

3.1.4 Phänomene der DNA-Degradation

Durch die sinkende DNA Konzentration einer Probe, sowie anderen beschriebenen Degradationsursachen, kommt es mutmaßlich eher zu *allelic* oder *locus dropouts*. Ein *allelic dropout* stellt einen Wegfall / Ausfall eines Allels dar. Ein *locus dropout* liegt vor, wenn ein ganzes STR-System entfällt. Bei homozygoten Systemen kann schon ein *allelic dropout* einen *locus dropout* bewirken.

Ein zweites Phänomen, welches durch DNA verändernde Parameter vorkommen kann, sind *allelic dropins*, was bedeutet, dass in DNA Profilen weitere oder andere Allele erscheinen. Es ist möglich, dass ein Ausfall eines eigentlichen Allels vorkommt und im Gegenzug ein anderes, in dem Sinne falsches, Allel detektiert wird. Diese können aus den erwähnten Einflussfaktoren resultieren. Mögliche Folgen hiervon wären, dass angenommen werden könnte, dass es sich um eine Mischspur handelt, wenn mehr als zwei echte Allele (in heterozygoten Systemen) vorliegen. In einem homozygotem STR-System können *dropins* zu der Annahme führen, dass eine Probe hier ein heterozygoten Profil zeigt. Somit bleiben eigentliche homozygote Systeme fälschlicherweise unerkannt.

Ein weiteres Phänomen stellen *Off Ladder (OL) Peaks* dar. Diese könnten wahre Allele darstellen, welche jedoch etwas verschoben wurden und nicht mehr genau auf der vorgegebenen Erkennungsmatrix liegen. Erkennbar, ob es sich um echte oder unechte *Peaks* handelt, ist dies anhand der Signalstärken. Diese sollten möglichst zu dem anderen *Peak* im selben *Locus* passen (bei heterozygoten Systemen). Signalstärken / *Peaks*, welche nur circa 15 % der Höhe anderer *Peaks* zeigen, werden als *Stutter-Peaks* bezeichnet. „Ein „*Stutter*“ ist ein um einen *Repeat* verschobener *Peak*. Dieser kann ein verlängertes oder verkürztes *Amplicon* sein“ [2] oder ein Durchschlag aus dem darunterliegenden Farbsystem. Ebenfalls sollte bei weiteren Unsicherheiten die Fragmentlänge betrachtet werden. Diese *OL-Peaks* sollten minimal vor oder nach der Erkennungsmatrix liegen, um sie eindeutig zuzuordnen. Liegen sie jedoch genau mittig und tendieren zu keinem Allel der Vergleichsmatrix, sollte keine Entscheidung getroffen werden, um welches Allel es sich handeln könnte.

3.2 Polymerase Kettenreaktion

[12] (engl. *polymerase chain reaction*, kurz PCR) Die PCR ist ein Vorgang, bei welchem DNA Sequenzen kopiert werden. Genutzt wird sie in vielen Bereichen, in welchen eine Erstellung eines DNA Profils notwendig ist. Die PCR benötigt dazu nicht vielmehr als die zu untersuchende DNA und einen *Primer*, welcher sich an die DNA bzw. bestimmte Sequenzen binden und diese somit vervielfältigen kann. Für Untersuchung von Spurenmaterial oder ähnlichem wird dieser Vorgang künstlich erzeugt, jedoch existiert er auch in natürlicher Form in unseren Körperzellen. (3.1.1 DNA-Replikation)

Die künstliche (oder auch *in vitro*) PCR existiert in verschiedenen Formen. Jedoch haben alle diese Arten einen ähnlichen Grundablauf in ihrem Verfahren. In den meisten Literaturquellen wird dieser Prozess dreistufig beschrieben. Bevor die eigentliche PCR angesetzt wird, muss zunächst die zu untersuchende Probe mit den Primern versetzt werden.

Den ersten Schritt stellt die Denaturierung (auch Initialisierung genannt) dar. Hier wird die DNA auf ca. 94- 96°C erhitzt. Dadurch kommt es zu einer Entwindung des Doppelhelix Stranges. Dies geschieht durch ein Aufbrechen der Wasserstoffbrücken. Ebenfalls werden auch hier die *Primer* getrennt, nicht nur die DNA. Somit liegen nun von *Primer* und DNA jeweils Einzelstränge vor, die sich aneinanderbinden können. Um eine Rückbildung der Doppelhelix zu verhindern wird die Probe sofort auf 55° - 65°C herunter gekühlt.

Außerdem ist diese Temperatur für den zweiten Schritt, das (*Primer-*) *Annealing* notwendig, denn die *Primer* arbeiten nur bei diesen Temperaturen am besten. Die genaue Temperatur ist *Primer-* und Literaturabhängig. Bei „Unterkühlung“ dieser Probe kann es zu Geisterbanden kommen, was bedeutet, dass die *Primer* unvollständige Bindungen mit der DNA eingegangen sind. Zu hohe Temperaturen können eine Bindung von DNA und *Primer* verhindern.

Den letzten Schritt stellt nun die Elongation (auch Polymerisation oder Amplifikation) dar. Hierbei werden freie Stränge der DNA-Polymerase mit freien Nucleotiden aufgefüllt. Begonnen wird am 3' - Ende des *Primers* und verläuft in Richtung des 5' – Endes. Für diesen Schritt wird die Probe wieder etwas weiter erwärmt, abhängig von der verwendeten Polymerase. Die hier verwendete Temperatur liegt zwischen 68° - 72°C.

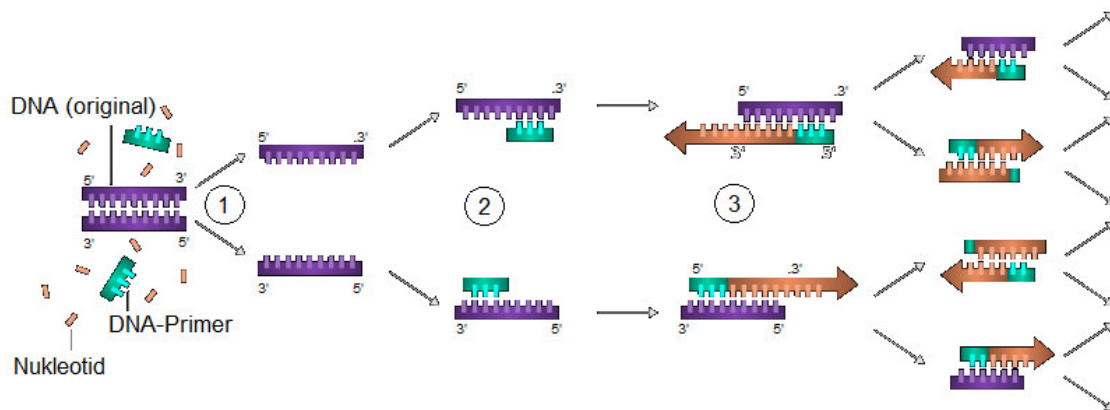


Abbildung 3: Ablauf PCR [13, modifiziert]
1= Schritt der Denaturierung; 2= Schritt des Annealings; 3= Schritt der Elongation

Insgesamt werden diese Schritte 20 – 50-mal wiederholt, abhängig von den gewählten *Primern* und der Polymerase. Auch müssen diese Schritte nicht manuell durchgeführt werden. In der Praxis wird meist eine *Thermocycler* verwendet, welcher sich auch dahingehend programmieren lässt und seine Arbeitsweise auf die vorliegenden Daten automatisiert anpasst. Insgesamt dauert ein solcher Durchlauf 2 – 4 Stunden. Wenn alle Zyklen beendet sind wird die DNA im Gerät auf ca. 4° - 8°C herabgekühlt. Je nachdem wie schnell ein Ergebnis gefordert ist, kann diese amplifizierte Probe schon nach etwa 30 Minuten direkt weiterverwendet werden. Dies ist davon abhängig, welche Elektrophoreseart genutzt wird. In der Spurenanalytik wird in der Regel eine Kapillarelektrophorese gewählt, da hier direkt Elektropherogramme erstellt werden können.

3.3 Besonderheiten der verwendeten Spurenmaterialien

Es wird vermutet, dass ein Unterschied zwischen den Auswirkungen gegebener Parameter auf Speichel und Mundschleimhaut besteht. Aus diesem Grund wird im Folgenden nun die Zusammensetzung beider Probenarten betrachtet. Ebenfalls werden andere forensisch relevante und wichtig erscheinende Tatsachen erfasst. Weiterführende Informationsquellen zu den Themen sind im Literaturverzeichnis vermerkt.

3.3.1 Mundschleimhaut

„Als Schleimhaut (Mukosa) wird die zarte, gefäßreiche Auskleidung der inneren Hohlräume und Hohlorganen vom Organismus bezeichnet, die im Normalfall unverhornt ist.“ [14] Ihre Oberfläche ist dabei mit einer Schleimschicht überzogen in welcher Muzine enthalten sind. [14] Die Mundschleimhaut stellt ein mehrschichtiges (Platten-) Epithel dar. (siehe 2.4) „Das Epithel ist größtenteils unverhornt, im Bereich des harten Gaumens, des Zungenrückens und des Zahnfleisches jedoch verhornt, da diese Bereiche beim Kauvorgang stark beansprucht werden.“ [15]

Die wichtigsten Funktionen der Schleimhaut (*Tunica Mucosa*) sind hierbei der Schutz vor Krankheitserregern, Resorption (Aufnahme) gelöster Stoffe oder Ausscheidung des Speichels für die Gleitfähigkeit. Dabei besitzt sie die Eigenschaft, Speichel mittels aktiven Transportmechanismen in eine bestimmte Richtung abzugeben, sowie zu transportieren und ermöglicht somit Sekretions- und Resorptionsprozesse. [14]

Trotz ihrer anscheinenden Zugehörigkeit zu den Schleimhäuten und der Tatsache, dass sie den gesamten Mundraum auskleidet, lässt sich die Mundschleimhaut in drei Arten einteilen: auskleidende Mundschleimhaut, mastikatorische Mundschleimhaut und spezialisierte Mundschleimhaut. Die auskleidende Mundschleimhaut stellt jedoch die forensisch relevante Art dar, da sie die Wangen auskleidet, von welchen im Regelfalle Abstriche genommen werden.

3.3.2 Speichel

Speichel als Sekret wird von den Speicheldrüsen gebildet und ausgeschieden. [18] Für vorliegende Experiment wurde muköser (muzinöser) Speichel verwendet, welcher

„durch Aktivität des sympathischen Nervensystems“ [16] zur Bildung angeregt wird. Seine Konsistenz ist eher zäh-schleimig und dickflüssig. Dabei ist Speichel „eine komplex zusammengesetzte Flüssigkeit, die neben dem Hauptbestandteil Wasser (99%) eine Vielzahl von organischen und anorganischen Verbindungen enthält. Als physiologische Speichelbestandteile finden sich u.a.:

Proteine: Mucin 1 (MG1), Mucin 2 (MG2), sIgA, Laktoferrin, Peroxidasen, Amylasen (Ptyalin), Carboanhydrasen, Prolin-reiche Proteine (PRPs), Lysozyme, Statherine, Histatine, Cystatine

[und] **Kleinmolekulare Bestandteile:** Elektrolyte [(„insbesondere Natrium (Na⁺), Kalium (K⁺), Chlor (Cl⁻) und Hydrogencarbonat (HCO₃⁻).“)], Ammoniak, Harnsäure, Harnstoff.“ [18] [17]

Nach Dr. N. Gumpert [19] sind ebenfalls wichtige Immunglobuline gegen, zum Teil enthaltene Keime, Blutgruppenbestandteile und abgestorbene Zellen der Mundschleimhaut enthalten. Diese Bestandteile können jedoch je nach Nahrung oder Gesundheitszustand variieren.

Eine weiterführende Erklärung der Bestandteile findet sich in genannten Quellen.

Durch seine besondere Zusammensetzung bietet der Speichel im Mundraum eine breite Palette unterschiedlichster Funktionen. Die zwei wichtigsten, für diese Arbeit am relevantesten erscheinenden, sind die Abwehr „Abwehr pathogener Erreger (Viren, Bakterien und Pilze)“, „Lubrikation (Befeuchtung) der Mundhöhle“ und der „Schutz und Reparatur der Mundschleimhaut“. [18] Das *Mucin* (oder Muzin) übernimmt hierbei speziell die Aufgabe des Schutzes vor äußeren Reizen mechanischen, chemischen oder physikalischen Ursprunges. [19] Somit ist Speichel ebenfalls ein Bestandteil bei Mundschleimhautabstrichen.

Der pH-Wert des Speichels liegt im sehr schwach säuerlichen bis neutralen Bereich, dieser wird ebenfalls wieder durch die Nahrungsaufnahme beeinflusst. Sein genauer Wert schwankt in einem Bereich von 6,0 – 7,2.

3.4 Epithel und Epithelzellen

„Als Epithel bezeichnet man das aus allen drei Keimblättern stammende Grenz- oder Deckgewebe, das die inneren und äußeren Oberflächen des Körpers auskleidet und zu ihrer Umgebung abgrenzt.“ [20]

Dabei bieten die Epithelien unseres Körpers eine breite Variabilität, welche jedoch Gemeinsamkeiten in Polarität, Zellkontakt, Basalmembran und Intermediärfilamente besitzen. Als forensisch Relevant wird hier die Basalmembran angesehen, da diese das Epithel am (subepithelialen) Bindegewebe befestigt. [20]

„Das subepitheliale Bindegewebe wird unter der Mucosa von Hohlorganen wie dem Respirations-, Verdauungs- oder Urogenitaltrakt als Lamina propria bezeichnet. Abgesehen von der Basalmembran enthalten Epithelien kaum Interzellularsubstanz, da die Zellen einen geschlossenen Verband bilden.“ [20]

Epithelien lassen sich auf unterschiedliche Weisen einteilen. Variante eins wäre eine Einteilung nach Drüsen- oder Oberflächenepithel. Die zweite wäre nach Anzahl der Zellschichten, Form der Zellen und Grad der Keratinisierung.

Dabei besteht ein Epithel nicht nur aus Epithelzellen, sondern auch aus Melanomzellen (Pigmentzellen), Merkel-Zellen und Langerhans'scher Zellen. Eine weiter entscheidende Tatsache ist, dass Epithelien keine Blutgefäße enthalten. „[...] [Die] Zellernährung erfolgt zwischen den einzelnen Epithelzellen über den Interzellularraum.“ [38] Eine Einteilung der Epithelarten wird anhand von Form, Anordnung und Zelloberfläche vorgenommen. [38] (siehe Abbildung 4)

Epithelarten

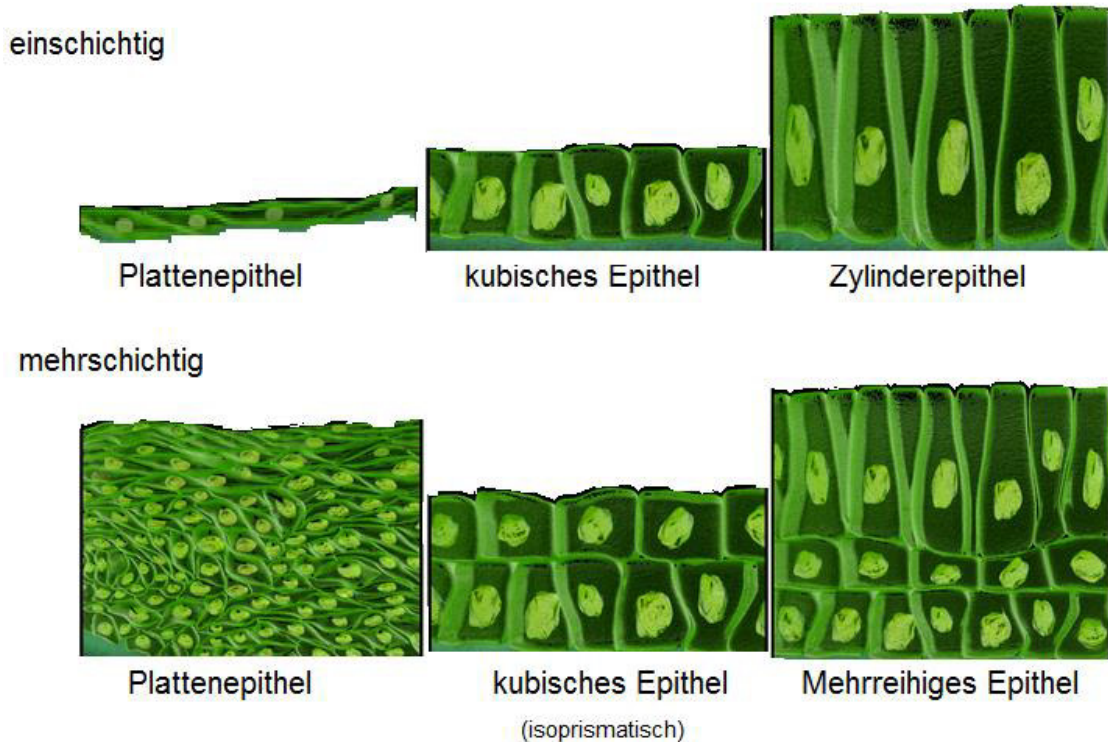


Abbildung 4: Arten von Epithel, modifizierte Abbildung nach [21], [38]

Allgemeine Funktionen des Epithelgewebes sind Barriere (Schutz), Sekretion (Stoffabgabe) und Resorption (Stoffaufnahme). Bei der Mundschleimhaut steht besonders die Speichelsekretion im Mittelpunkt.

Wie schon erwähnt bestehen Epithelien aus Epithelzellen. Dabei „handelt es sich um polare Zellen, die eine apikale und eine basale Seite aufweisen. Die apikale Seite zeigt in Richtung der Epitheloberfläche, die wiederum nach außen (z.B. bei der Haut) oder zum Lumen hinweist (z.B. beim Darm oder Drüsen). Die basale Seite verbindet die Epithelzellen über eine Basallamina mit dem darunterliegenden Gewebe.“ [22]

3.5 (Kapillar-) Elektrophorese, Elektropherogramm

3.5.1 Elektrophorese vs. Kapillarelektrophorese

Im Allgemeinen bezeichnet die Elektrophorese die „Wanderung elektrisch geladener Teilchen durch einen als Trägermaterial dienenden Stoff in einem elektrischen Feld“ [23] und „ist eine Untersuchungsmethode, die auf der räumlichen Trennung geladener Moleküle bzw. Molekülgruppen in einem elektrischen Feld basiert.“ [24] Bei einer Kapillarelektrophorese findet eine Separierung der Teilchen in einer dünnen Quarzglaskapillare,

welche mit Elektrolytflüssigkeit gefüllt ist, statt. Um mittels dieser Art ein DNA-Profil (Elektropherogramm) zu erhalten, wird das Elektrolytgefäß mit der Probe ausgetauscht. Die Injektion kann hierbei auf unterschiedliche Arten erfolgen. Entweder wird Druck, ein Vakuum oder Elektrokinetik angewandt. Für letzteres wird eine Spannung am Einlass angelegt. Dadurch werden die Ionen der Probe gelöst und durch den Elektroosmotischen Strom (EOF) ein gewisser Teil an und vor allem in die Kapillare gesogen. Damit eine vollständige Wanderung der Ionen innerhalb der Kapillare stattfinden kann, wird nach der Initialisierung wieder das Elektrolytgefäß angebracht und eine Spannungsquelle angelegt.

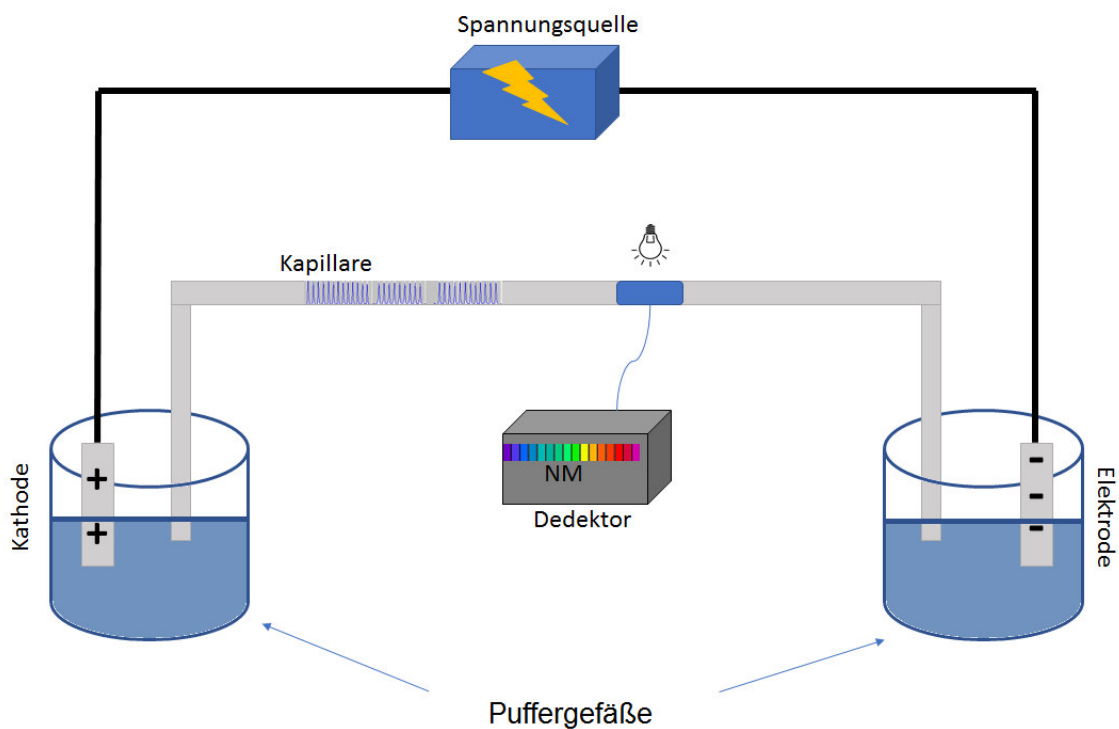


Abbildung 5: Aufbau Kapillarelektrophoreseapparatur; nach Quelle [25]

Eine tiefgehende Beschreibung findet sich unter „<http://www.chemie.de/lexikon/Kapillarelektrophorese.html>“ oder „Jandik, Petr und Günther Bonn: *Capillary Electrophoresis of Small Molecules and Ions* VCH, New York, Weinheim, Cambridge(UK), 1993“ oder „Camilleri, Patrick: *Capillary Electrophoresis -Theory and Practice 2nd ed.* CRC-Press BocaRaton, Boston, New York, Washington, D.C., London 1998.“

3.5.2 Elektropherogramm

In einem Elektropherogramm werden die ermittelten Daten aus der Elektrophorese dargestellt. Im Allgemeinen ist sein Einsatzgebiet im Bereich genetischer Fingerabdrücke

angesiedelt. Dabei bieten Elektropherogramme immer einen gleichen Aufbau. Im Gesamten sind untereinander alle Farbkanäle abgebildet. Diese belaufen sich hier auf das Blue-Green-Yellow (BGY) System. In jedem Farbkanal werden alle *Loci* und Allele angezeigt, welche unter diesem Farbspektrum ermittelt wurden. (Gelb wird aus Sichtbarkeitsgründen als schwarz erfasst.) Die *Loci* / Systeme, welche untersucht werden, sind in den breiten oberen Balken ersichtlich. Diese Balken können wiederum verschiedene Farben annehmen. Diese stehen in Zusammenhang mit der Signalstärke (rfu). Wenn die *Allelpeaks* die vordefinierte rfu erreichen oder überschreiten, erscheinen diese Balken grün, für „sehr geeignet“. Bei einer leichten Wertunterschreitung werden diese Balken gelb erfasst und liegen die ermittelten *Peaks* deutlich unter der gesetzten Stärke erscheinen die Balken rot, als Warnung für eine schlechte Qualität. (Standardmäßig werden 50 bp gewählt.)

Graue Banden welche in dem Diagramm unter jedem System erschienen sind vordefinierte Allele (*Ladder*) und deren Fragmentlängenbereich. Wenn ein detektiertes Allel auf dieser Bande liegt wird es in dem darunter stehenden Kasten angezeigt. Zusätzlich sind je nach Einstellung und Verwendungszweck Fragmentlänge und Signalstärke und einige andere Werte anzeigbar. Liegen mehrere Allel dicht beieinander, werden die Informationskästchen mit Linien an den jeweiligen Peak angebunden. Sollte einmal ein *Peak* nicht auf der vordefinierten *Ladder* liegen wird er als „*Off Ladder (OL)*“ erfasst. Dies geschieht, wenn die Fragmentlänge in dem Spurenmaterial zu lang oder zu kurz für die vordefinierten Bereiche ist. Jedoch kann durch genau Betrachtung der *Peaks* herausgefunden werden, zu welchem Allel er tendiert. Im Zweifelsfall sollte die PCR und Elektrophorese wiederholt werden.

Auch ist es Kit abhängig, welche Systeme untersucht werden und wie die Fragmentlängen aussehen. Somit ist jede *Vergleichsladder* unterschiedlich und kann nicht für andere Kits übernommen werden.

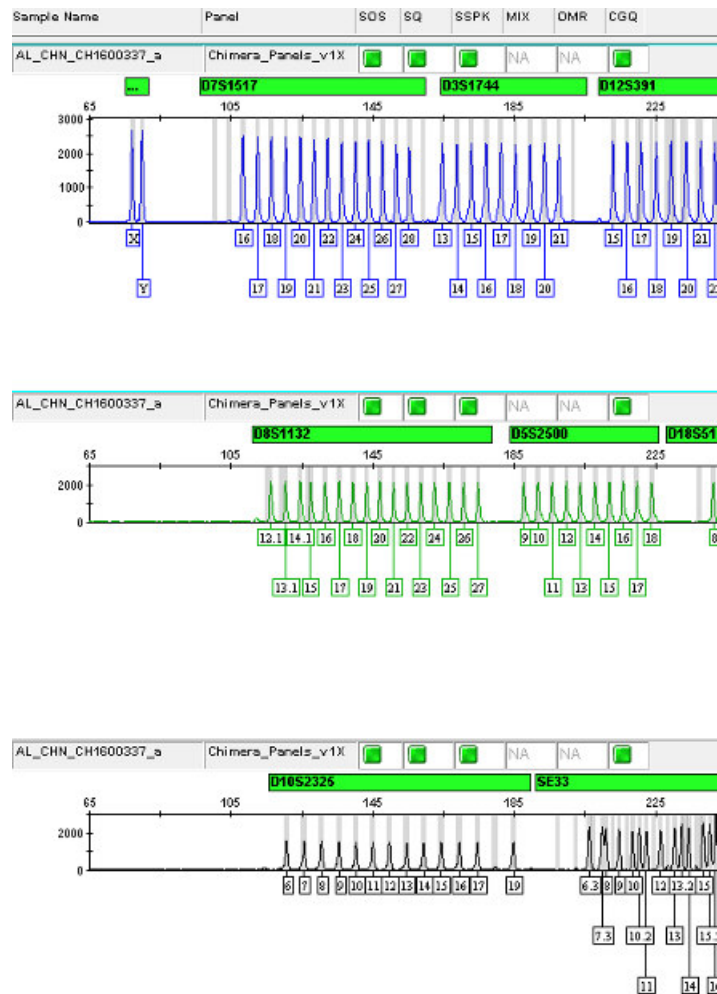


Abbildung 6: Ausschnitt der Vergleichsladder der Kontroll-DNA (DNA-5) des Chimera Mentype Kit; Biotype® Diagnostic GmbH Dresden; erste STR-Systeme der jeweiligen Farbkanäle (BGY) abgebildet

Weiterhin sollte angemerkt werden, dass solch ein Elektropherogramm nicht bei einer Gelelektrophorese erstellt werden kann. Jedoch lässt sich mit speziellen Programmen (z.B.: Fragment Analyzer™– ProSize) sowohl ein Elektropherogramm als auch ein digitales Gelabbild unter Verwendung einer Kapillarelektrophorese erstellen.

3.6 Chimäre, Chimärismus und Chimera Kit

3.6.1 Chimäre und Chimärismus

Für diesen Begriff muss eine klare Abgrenzung geschaffen werden, da er mehr als nur eine Bedeutung besitzt. Die wohl bekannteste Definition ist die des griechischen Mischwesens aus Löwe und Ziege. Wobei diesen Begriff wörtlich inkorrekt ist da es eigentlich Chimera hieß. Dieser Begriff wurde im Laufe der Zeit zu Chimäre und auf eine

Vielzahl von Mischgestalten umgelegt. Eine weitere Übersetzung des Wortes bedeutet noch Trugbild.

In der Genetik, Biologie oder Medizin steht dieser Begriff in einem ähnlichen Zusammenhang. Jedoch geht es hierbei eher um Lebewesen, welche „aus genetisch unterschiedlichen Zellen bzw. Geweben aufgebaut [sind] und dennoch ein einheitliches Individuum darstell[en].“ [26] Speziell beim Menschen lassen sich Blutchimären finden. Diese entstehen unter anderem durch Knochenmarkspenden, da das Knochenmark der Ort ist, an welchem Blutkörper gebildet werden. Somit werden nach einer Transplantation diese fremden Zellen zu Beginn reproduziert und ausgeschüttet. Dies normalisiert sich jedoch innerhalb einiger Monate wieder. Diese Tatsache wiederum wirkt sich nun auf den Genotyp eines Menschen aus. In diesem Zeitraum kann es bei DNA Untersuchungen dazu kommen, dass sich zwei Genotypen zeigen, welche voneinander separiert werden müssen. Medizinisch lassen sich so Spender und Empfänger voneinander trennen. Auch erscheint es von großem Interesse für einen forensischen Einsatz im Mischspurenbereich zu sein. (3.6.2 knüpft hier an)

3.6.2 Bewertung des Mentyte® Chimera® für die Spurenanalytik

Das hier eingesetzte Kit wurde von der Biotype® Diagnostic GmbH Dresden für die Chimärismusanalyse entwickelt und durch die Firma selbst medizinisch-klinisch geprüft und validiert. Die Validierung für die forensische Praxis soll anhand einer Sensitivitätsstudie (Praktikumsbericht [a]), der vorliegenden Arbeit, und einer anderen Arbeit zu Mischspuren vorgenommen werden, da sich gezeigt hat, dass es molekulargenetisch interessant und einsatzfähig ist.

Jedoch besteht zwischen dem eigentlichen Einsatzgebiet und dem vorgenommenen Test ein riesiger Unterschied. Die Chimärismusanalyse zielt darauf ab, zwei Genotypen welche bei einer Person mit Stammzellenspende kurzzeitig vorliegen, ordnungsgemäß voneinander zu trennen. Hierzu wurden „12 Chromosomen [gewählt, welche] hoch polymorphe Mikrosatelliten (STRs) mit einer hohen Heterozygotierrate und einer Ausgewogenen Allelverteilung [repräsentieren]. Diese Merkmale erhöhen die Chance informative *Loci* für die Spender-Empfänger Differenzierung zu finden und bieten somit Sicherheit und Robustheit für die Chimärismusanalyse.“ [6]

Im forensischen Bereich geht es jedoch darum, wie eingangs erwähnt, DNA-Profile zur Feststellung der Identität oder Verwandtschaft zu erstellen. Dazu werden nach neuestem deutschen Gesetz 15 Marker plus dem geschlechtsspezifischem Amelogenin betrachtet, welche dazu tendieren, hohe Gemeinsamkeiten mit Vergleichsproben zu zeigen. [2] [37]

Jedoch ist dieses Kit auf eine Separierung ausgelegt und verwendet hierbei andere STR-Systeme als die üblichen. Nichtsdestotrotz steht die Frage im Raum, ob dieses Kit nicht auch für die forensische Mischspurenanalyse in Betracht gezogen werden sollte, da es hier sehr sinnvoll erscheint. Doch darum soll es in der vorliegenden Arbeit nicht gehen.

3.7 Fragment Analyzer™ und ProSize 2.0

Der Fragment Analyzer™ der Firma „Advanced Analytical Technologies, Inc.“ ist ein hochtechnologischer und vielseitig einsetzbarer DNA oder RNA Sequenzierer. Mit ihm lassen sich verschiedenviele DNA-Proben auf einmal auswerten; von nur 1 bis hin zu 96 Stück auf einer Platte. Dabei können auch auf sechs Ebenen jeweils eine Platte platziert werden (576 Proben). Diese Daten werden jedoch nicht in einer Datei erfasst, sondern in sechs einzelnen abgelegt. Ebenfalls ist es möglich nur reihenweise Vergleiche durchzuführen (bis max. 12 Proben in einer Reihe).

Dabei arbeitet der Fragment Analyzer™ als paralleles Kapillarelektrophoresegerät. Dabei erfolgt hier die Trennung der Fragmente in einer sehr feinen (Quarzglas) Kapillare, welche als Trägerstoff verschiedenen Gelmatrizen enthalten kann. Diese Matrizen sind speziell für diese Aufgabe entwickelt und an spezifische Größenbereiche angepasst, wodurch sich eine breite Einsatz- und Analysemöglichkeit bietet. Durch das Anlegen einer Spannung beginnt die Probe bzw. vielmehr die Fragmente durch diese Gelmatrix zu wandern. Dabei brauchen kürzere Fragmente deutlich weniger Zeit als längere.

Das Sichtbarmachen der Fragmente erfolgt durch spezielle, interkalierende, fluoreszierende Farbstoffe, welche je nach Bedarf oder Auftrennungsgenauigkeit eingesetzt werden können. Diese Fluoreszenz kommt nur bei doppelsträngigen DNA-Molekülen zum Vorschein. Dabei wird eine sehr intensive LED eingesetzt, welche im Detektionsfenster ein Bild auf einen zweidimensionalen ladungsgekoppelten Detektor projiziert (Elektropherogramm).

Weiterführende Literatur hierzu wäre das „*Fragment Analyzer™ User Manual*“ [27] oder die Firmenwebsite [28].

Mittels der ProSize® Software lassen sich diese ermittelten Daten ansehen, bearbeiten und nach notwendigen Kriterien analysieren. Dabei steht nicht nur eine Elektropherogramm zur Verfügung, sondern auch ein digitales Gelbild und eine *Peak*-tabelle. Diese lässt sich auf benötigte Daten ebenfalls individualisieren. Es kann somit die gesamte DNA-Menge der Probe oder der DNA-Anteil aller ermittelten Fragmentlängenbereiche (TIC = *Total Integrated Concentration*) ermittelt werden. Auch ist ersichtlich, welcher *Peak* (eine bestimmte Fragmentlänge) welchen genauen DNA-Anteil in ng/μl enthält.

Ebenfalls ist der Bereich, in welchem Fragmentlängen analysiert werden sollen, eingrenzbar. Dies geschieht mittels dem Setzen von *Lower Markern* (LM) und *Upper Markern* (UM). Standardmäßig ist der LM bei 1 gesetzt und kein UM.

Weitere Einstellungsmöglichkeiten und -erklärungen finden sich im „ProSize® 2.0 *User Manual*“ [29].

Ob jedoch der eingesetzte Farbstoff nur humane DNA oder auch virale oder bakterielle DNA erkennt, geht aus keiner Quelle hervor. Proteine werden scheinbar nicht erfasst, da, wie beschrieben, eine Fluoreszenz nur bei doppelsträngiger DNA vorliegt.

3.8 NanoDrop™

Die Analyse von DNA mittels „NanoDrop™“ der Firma „Thermo Scientific“ basiert auf einem anderem Analyseverfahren. Bei diesem Verfahren lässt sich ebenfalls eine DNA-Menge der Probe in ng/μl erfassen, jedoch umfasst dies nicht nur reine DNA, sondern auch Proteine und virale sowie bakterielle DNA. Anhand einer Wellenlängenmessung bzw. ihrer Absorption lässt sich ermitteln, ob die Probe reine DNA enthält oder ob sie verunreinigt ist und in welchem Grad. Dazu geht aus einer Notiz zum Technischen Report [30] hervor, dass Nukleinsäuren und Proteine ein Absorptionsmaximum bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Proteine) besitzen. Ein Verhältnis aus den gemessenen Werten beider (was das Programm schon übernimmt) sollte bei reiner DNA über 1,8 und bei RNA über 2,0 liegen.

Ebenfalls werden in einem Bereich von 230 nm andere Verunreinigungen gemessen und ein Verhältnis zur DNA (260 nm) gebildet. Für reine DNA / RNA sollte hier ein Wert von 2,0 - 2,3 ermittelt werden.

In beiden Fällen bedeutet ein geringes Verhältnis eine hohe Kontamination.

Kontamination können durch Kohlenhydrate, Phenol, Guanidin (Stickstoffverbindung) oder Glykogen (Stärke / Polysaccharid) entstehen.

Weiterführende Informationen sind aus der angehenden Notiz [30] oder „*Thermo Scientific NanoDrop™ Spectrophotometers*“ [31] zu entnehmen.

3.9 Sensitivitätsstudie

Im Allgemeinen wird eine Sensitivitätsstudie durchgeführt, um die Auswirkungen der Quantität auf die Qualität der DNA Spuren später besser beurteilen zu können. Diese fand im Rahmen des Bachelorpraktikums statt. Es wurde überprüft, inwieweit die DNA-Menge Einfluss auf die Qualität der erhaltenen Profile nimmt. Außerdem wurde hiermit ermittelt, ob bei diesem speziellen Kit ein forensisch brauchbarer Schwellwert tatsächlich eingehalten wird oder ob dieses Kit zu sensitiv für forensisches Spurenmaterial ist. Im medizinischen Einsatzbereich dieses Kits ist meist relativ genau bekannt, dass das entnommenen Probenmaterial genügend DNA zur Bestimmung enthält. Bei allen anderen Spuren ist dies immer ein ungewisser Faktor. Für diese Testreihe wurde die in vitro erzeugte Kontroll-DNA (DNA-5) in verschiedenen Verdünnungsstufen verwendet.

Dabei zeigte sich, dass *dropout* Ereignisse mit sinkender DNA-Menge zunehmen, wodurch es zu einer verschlechterten Profilqualität kommt und nur noch Teilprofile erstellbar sind. Bei einer zu geringen Menge (15,625 pg) enthaltener DNA neigte die Qualität schon dazu das kaum noch Profile erstellbar sind. Da jedoch keine Werte zwischen 31,25 pg (Teilprofile erhalten) und 15,625 pg DNA vorhanden waren, kann zu diesem Versuch keine genaue Aussage getroffen werden, ab welcher Menge das Kit keine ausreichenden Profile mehr liefert.

Ebenfalls konnte aus den Daten überprüft werden, ob der Kit-Schwellwert von 100 pg DNA, den Angaben entsprechend eingehalten wird oder ob er nach oben oder unten korrigiert werden muss. Um die Sensitivität korrekt beurteilen zu können wurden mehrere Testläufe mit dem Kit angesetzt. Dazu wurden zwei PCR's, in jeweils zwei Injektionen angesetzt und an unterschiedlichen Tagen unabhängig voneinander aufgetragen. Dadurch wurde ermittelt, dass keine PCR gleich verläuft und Gerätefehler, personenbezogene Faktoren und eventuelle Pipettierfehler Einfluss auf die Ergebnisse nehmen. Ebenso kann die Lagerung der Platten Auswirkungen im Wiederholungsversuch verursachen.

Ein weiterer Untersuchungspunkt fand sich darin, zu analysieren, inwieweit die Quantität (durch sinkende DNA-Konzentration) die Fragmentlänge und Signalstärke beeinflusst. Es wurde ermittelt, dass eine sinkende Konzentration eine Abnahme der Signalstärke

bewirkt. Weiterhin wurde bei der künstlichen DNA festgestellt, dass die Fragmentlänge nicht in Bezug zu *allelic* oder *locus dropouts* steht. Jedoch gilt es dies anhand realem Spurenmaterials noch einmal zu überprüfen, da sich künstliche / simulierte Spuren anders verhalten. Ebenfalls wurde aufgezeigt, dass *dropout* Ereignisse nicht konstant bzw. vermehrend mit sinkender Verdünnung auftreten, sondern eher willkürlich. Ebenso bedingen diese *dropouts* die ermittelte Standardabweichung, Mittelwerte und den Median von Fragmentlänge und Signalstärke. Es kommt zu einer Verschiebung in die Richtung des öfter vorhandenen Allels, welches nicht immer das kleinere sein muss, da ebenfalls bestätigt wurde, dass innerhalb eines STR-Systems die *Dropoutraten* von kurzen und langen Fragmenten gleich sind. Ebenso verhält es sich bei Betrachtung aller Fragmentlängen.

Als letzten Schwerpunkt galt es, anhand der Allel- / Systemkomplexitäten Aussagen über die Ausfallresistenz zu treffen. Die Beurteilung der Systemkomplexität fand anhand einer Tabelle der *Repeatmotive* statt, welche in der Mentype Chimera Gebrauchsanleitung [6] aufgeführt sind. Dabei kam es dazu, dass der D21 als komplexestes System gilt, gefolgt vom D3 und D12. Der D10 landete auf Platz 10, D5 auf Platz 11 und der D18 gilt als das simpelste System aller 12 *Loci*. Amelogenin wurde bei diesem Vergleich nicht mit einbezogen.

Es wurde analysiert und aufgezeigt, dass komplexere Systeme eher zu Ausfälle neigen.

Eine genaue Auflistung aller Vorgehensweisen und Ergebnisse kann im Praktikumsbericht nachgelesen werden. [a] Da es sich um eine nicht publizierte Arbeit handelt, kann eine Einsicht auf Wunsch bei der Autorin oder FoSil erfolgen.

4 Aktueller Stand der Forschung

Da dieses Gebiet in den letzten Jahren in Vergessenheit geriet, ist es schwierig, anderer Arbeiten zu finden. Jedoch wurden in den hier folgenden Arbeiten ähnliche Experimente angestellt oder, auf Basis anderen Spurenmaterials, ähnliche Fragestellungen thematisiert.

Eine relativ aktuelle Arbeit von Anna Schlender beschäftigt sich ebenfalls mit DNA und DNA-Degradation. [2] Jedoch befasst sich diese Arbeit wieder mit einer quantitativen Beurteilung von sichergestelltem Probenmaterial. Dies umfasst reale Spuren aus realen Strafdelikten gearbeitet.

Forschungsarbeiten zur qualitativen Beurteilung lassen sich eher weniger finden. Einige ältere Forschungsarbeiten auf diesem Gebiet gehen auch eher mit Populationsgenetik / -statistik einher.

Somit erscheint es äußerst sinnvoll, die hier angestellte Studie zu verfolgen bzw. auszuweiten.

Aus einer Studie von T. Tvedebrink et al. von 2009 geht hervor, dass längere Fragmente desselben *Locus* zu gleichen Ausfällen bzw. Ausfallwahrscheinlichkeiten neigen, wie kürzere. [32] Diese Tests wurden anhand von Mischspuren vorgenommen, welche zusätzlich verdünnt wurden oder sie erhielten verdünnte Proben der Probanden. Weitere Unterschiede bieten hierbei das Probenmaterial, da Blutproben von vier Personen entnommen und die Verwendung eines klassischen Kits, welches nicht so speziell ist, wie das Chimera Kit. Ebenfalls wird in dieser Arbeit bestätigt, dass die *dropouts* so willkürlich auftreten wie vermutet wurde. Weiterhin sollte eine größere Studie angestellt werden um zu sehen inwieweit Fragmentlängen eine Auswirkung auf *dropouts* haben und ob ein individueller Aspekt mit steigender Probenzahl sinkt.

Aus einer anderen Studie dieses Teams aus dem Jahr 2011 ist zu entnehmen, dass bei mehrfach angelegten Replikaten einer Probe für einen Degradationsparameter keine Schwankungen auftraten. [33] Somit kommen diese Wissenschaftler zu dem Schluss, dass kein Unterschied zwischen den Proben bestehen sollte, welche in einem Fall von einer Quelle genommen werden. Jedoch wurde festgestellt, dass in einigen wenigen Proben signifikante Unterschiede bestehen.

Des Weiteren zeigt eine Studie von Calacal G.C. et al. (2015), dass aus 0,1 g Knochenmaterial adäquate DNA zur Amplifizierung gewonnen werden kann. [34] Selbst bei *post mortem* Proben konnten hier fast vollständige Profile gewonnen werden. Vollständigkeit

meint hier, dass mehr als 60% der notwendigen Allele detektiert wurden. Bei Verwendung des Knochenmaterials konnten sogar Profile mit über 80% Vollständigkeit erstellt werden.

In einer Arbeit von J. S. Buckelton et al. wird gesagt, dass bei degradierten Proben die Signalstärken mit steigender Fragmentlänge abnimmt. [35] Die Ursache hierfür ist, dass die Wahrscheinlichkeit das Allele längerer Fragmentlängen ausfallen höher ist als die kürzerer Allele bzw. dass längere Fragmente anfälliger für Degradationserscheinungen sind.

Aus einer Arbeit von Goray M. et al. [36] geht hervor, dass bei einigen Probanden der *Shedder*status Tageszeit abhängig erscheint. Im Allgemeinen scheint ein erhöhter DNA-Ausstoß bei nachmittägigen Aktivitäten vorzuliegen. Getestet wurde dies anhand Handabstrichen beider Hände. Dabei wurde weiterhin festgestellt, dass es bei den meisten Probanden kein signifikanter Unterschied zwischen den Händen / Proben besteht. Bei einigen Probanden detektierte das Team deutlich höhere DNA Werte in den Proben, wodurch diese als wirkliche „*good shedder*“ beschrieben werden. Andere Probanden werden trotz allem auch als „*good shedder*“ bezeichnet, da sich DNA-Profile erstellen ließen. Anscheinend scheint auch ein gewisser Unterschied zwischen den Proben männlicher und weiblicher Personen zu bestehen.

Folglich zeigt sich, dass versucht wurde, Spurenmaterial aus diversen Quellen zu gewinnen, jedoch blieben Versuche anhand von Speichelproben oder Mundschleimhautabstrichen aus. Ebenfalls werden auch nur standardisierte Marker und Kits verwendet.

5 Material und Methoden

5.1 Material

Die komplette Spurensicherung und Experimentation oblag einer Mitarbeiterin der Forschungsgruppe FoSil der Hochschule Mittweida. Eine PCR-Durchführung wurde ebenfalls von besagter Mitarbeiterin in der Firma Biotype® Diagnostic GmbH in Dresden durchgeführt. Dabei wurde das Mentype® Chimera® Kit zur Untersuchung verwendet. Der Zeitraum der Experimentation lag im Winter (Dezember 2016 – März 2017).

Es wurden von 20 freiwilligen Teilnehmern sowohl Speichel- als auch Hautproben genommen. Die Verteilung der Probanden lag dabei bei 17 weiblichen und drei männlichen Personen. Abstammung spielte dabei keine Rolle, da es nicht um Populationsgenetik geht. Eine Speichelmenge von 5 ml wurde in Flacons gesichert. Von allen Probanden liegen Referenzprofile von unverdünnten Proben ohne Degradation vor. Aus diesen Proben wurde nur Probenmaterial der Probanden 9, 19 und 20 einer Degradation unterzogen und als Testreihe 1 erfasst. Verwendete Parameter waren hier Einfluss von Temperatur (5° Celsius, 40° Celsius und Raumtemperatur), sowie eine Lagerung auf dem Fensterbrett und Einwirkung von UV-C Strahlung. Diese wurde künstlich in einem DNA / RNA UV-Cleaner erzeugt. Dabei wurde die Veränderung über einen zeitlichen Verlauf von 24 h, 48 h, 72 h und 96 h betrachtet.

Die Degradation wurde auf unverdünnte und 1:10 verdünnte Spuren angewendet. Eine genaue Angabe der DNA-Menge kann im Vorfeld jedoch nicht vorgenommen werden, da es sich um reale Proben handelt und dazu keinerlei Aussagen getroffen werden können. Im Rahmen der Auswertung sollen hierzu Rückschlüsse erfolgen.

Hautabriebe wurden durch zwei unterschiedliche Verfahren mittels Tapes „DNA-Fast™“ der Firma *colorprint* gesichert. Verfahren eins: ein und dasselbe Tape auf dem Handrücken, auf zwei verschiedenen Stellen für jeweils 10 Sekunden andrücken. Dieses Verfahren dreimal auf den selben Stellen wiederholen, dabei fest andrücken und wieder abziehen.

Das zweite Verfahren lief wie das erste ab, mit dem Unterschied, dass die Proben vom Unterarm genommen wurden. Diese liegen ebenfalls wieder von den 20 vorher genannten Probanden vor und wurden im späteren Verlauf alle genutzt.

Von zwei anderen, weiblichen Probanden wurden Mundschleimhautabstriche mittels „*Samplotype i-sep® SQ*“ der Firma Biotype® genommen. Diese wurden als Testreihe 2

erfasst und den selbigen Parametern unterzogen wie Testreihe 1. Zeitlich wurde hier ein Verlauf von 4 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h und 96 h betrachtet.

Die dritte Testreihe besteht nur aus einer Betrachtung ausgewählter Speichel- und Mundschleimhautproben nach 14 Tagen unter den Bedingungen unverdünnt: 5°C, 40°C und UVC, sowie aus der Reihe 1:10 verdünnt bei 5°C und 40°C. Hierfür wurden von den Probanden 6, 7, 9, 19 und 20 die Speichelproben und die Mundschleimhautabstriche von A und N verwendet.

Im Anhang befindet sich eine Tabelle um sehen zu können, von welchen Probanden welche Parameter im zeitlichen Verlauf vorliegen und zu welchem keine Profile vorlagen (Anlage 1). Das Fehlen einiger Profile kann aus der Masse der Daten resultieren, wobei eine Überführung oder Speicherung der Profile in Excel, durch FoSil übersehen wurde.

Der Grund, weshalb nur bestimmte Proben betrachtet wurden liegt darin, dass diese Proben bei einer Mischspuranalyse eingesetzt wurden. Diese Ergebnisse sind in der Bachelorarbeit von C. Schulze [b] nachzulesen.

Des Weiteren wurden, mittels Fragment Analyzer™, alle vorhandenen Proben im unverdünnten Zustand untersucht, erfasst und bereitgestellt. Die vorhandenen Proben umfassen alle Zeitreihen der fünf untersuchten Parameter von den Speichelproben (9, 19, 20) und den Mundschleimhautabstrichen der zwei anderen Probanden. Beim Speichel liegt hier eine Zeitreihe von 24 h, 48 h, 72 h und 96 h vor und bei der Mundschleimhaut von 4 h, 24 h, 36 h, 48 h 72 h und 96 h. Ebenfalls existieren Datensets zu der 14 Tage Testreihe (T3).

Für einen noch angestellten Vergleich der genommenen Hautproben mittels unterschiedlichen Programmen stehen hier „Fragment Analyzer™“-Daten und Daten des Programms „NanoDrop™“ zur Verfügung.

Eine Auflistung aller Geräte und Chemikalien, welche für die gesamte Experimentation genutzt wurden, kann bei FoSil oder der Firma Biotype® Diagnostic Dresden erfragt werden. Diese hat aufgrund eines gewissen Eigeninteresses über die Verwendbarkeit und Einsatzfähigkeit ihres Kits alles zur Verfügung gestellt. Ebenfalls kann auch bei genannten Quellen ein Wetterdatenprofil für den Experimentationszeitraum angefragt werden.

5.2 Methoden der Degradationsstudie

Die Hauptaufgabe bei dieser Arbeit war eine Überarbeitung, Auswertung, Analyse und Interpretation der oben beschriebenen, bereitgestellten Daten. Zu Beginn wurden alle erhaltenen Profile bereinigt und nur jene betrachtet, welche für die Degradation als relevant angegeben wurden. Mittels der hier vorgenommenen Tests sollen qualitative Aussagen zur DNA getroffen werden. Dazu werden die Abhängigkeiten diverser Umwelteinflüsse in Bezug zur Zeit analysiert. Weiterhin wird ein Vergleich gezogen, wie sich die gegebenen Parameter auf unterschiedliches Spurenmaterial auswirken. (Parameter Umwelt und Zeit finden sich in Punkt 2 oder 4.1 wieder.) Ebenfalls sollen schon hier Aussagen getroffen werden, ob dieses Kit forensischen Nutzen besitzt und in welchem Rahmen es einsatzfähig ist. Des Weiteren können die Tests auch Auskunft über den *Shedder*-Status von einzelnen Probanden geben.

Auch flossen die Ergebnisse und Erkenntnisse aus einer vorher durchgeführten Sensitivitätsstudie hier mit ein. Diese wurde von der Autorin, im Rahmen des Bachelorpraktikums [a], ebenfalls selbst durchgeführt. (Nachzulesen unter 3.9) Im Allgemeinen wurde die Sensitivitätsstudie durchgeführt, um die Auswirkungen der Quantität auf die Qualität der DNA später besser beurteilen zu können.

Als letzten Schwerpunkt galt es, anhand der Allel/Systemkomplexitäten Aussagen über die Ausfallresistenz zu treffen.

5.2.1 Methodik Speichelproben (Testreihe 1)

Diese Testreihe umfasst Speichelproben, welche 1:10 verdünnt wurden. Durch fehlen einiger Profile wurde überlegt, ob diese Lücken nicht eventuell mit unverdünnten Profilen gefüllt werden könnten. Dies war jedoch nicht möglich, weil diese Profile sich nicht anpassten, da bei den unverdünnten Proben unter Degradation keinerlei Ausfälle ersichtlich waren. Aus diesem Grund wurde auch entschieden, dass die 1:10 Profile verwendet werden um Auswirkungen sichtbar darzustellen und daraufhin Rückschlüsse ziehen zu können.

Eine weitere Begründung ist der DNA Anteil, welcher bei unverdünnten Proben sehr hoch liegen sollte. Bei realen Proben ist jedoch auch in den seltensten Fällen bekannt wieviel DNA enthalten ist bzw. vermutlich liegt ein noch geringerer DNA-Anteil, als der hier verwendete, vor.

Ebenfalls wurde wieder die Fragmentlänge betrachtet und ein Vergleich zur Sensitivitätsstudie gezogen. In dieser wurde festgestellt, dass sie nicht im Zusammenhang mit *dropout* Ereignissen steht. Diese Annahme sollte hier nun noch einmal überprüft werden.

In erstellten Tabellen wurde nun zu Beginn der zeitliche Verlauf je Proband erfasst, wobei nur die Fragmentlängen extrahiert wurden. Diese wurde nun in eine binäre Erfassung überführt und für eine *dropout* Analyse verwendet. (1 = *dropout*, 0 = Allel vorhanden) Ebenfalls wurde eine Umsortierung nach Fragmentlänge vorgenommen. Dies war notwendig um über den zeitlichen Verlauf sehen zu können ob die Fragmentlänge hier eine Rolle spielt und ob bestimmte Fragmentlängen mit der Zeit zu konstanten oder vermehrten Ausfällen neigen. Anhand der ermittelten Längen ergab sich Folgende Anordnung der STR-Systeme (vom kürzesten zum längsten): Amelogenin, D7, D10, D8, D3, D5, D12, SE33, D18, D2, D6, D21 und D4.

Ebenfalls sollte auch anhand der aus der Sensitivitätsstudie betrachteten Systemkomplexitäten untersucht werden, ob bestimmte Parameter bestimmte Systeme / Basenfolgen beeinflussen und ob diese somit konstant über den Zeitraum ausfallen. Eine genaue Einteilung kann bei Bedarf nachgefragt oder im Praktikumsbericht [a] eingesehen werden. Ebenfalls konnten somit Rückschlüsse zu der DNA-Qualität und dem *Shedder*-Status der einzelnen Probanden geschaffen werden. Auch lässt sich hier die Annahme, ob es stabilere und schwächere DNA gibt, was probandenabhängig ist, examinieren. Weiterhin wurden bei *dropout* Ereignissen die Abstände zwischen den Allelen überprüft, ob sich dadurch *dropout* Erscheinung erklären lassen.

Ein weiterer Schritt war ein probandenweiser Vergleich, bei welchen innerhalb eines Parameters und einer Zeit analysiert wurde, ob sich ein Muster in der Degradation zeigt, oder ob bei den Probanden untereinander schon Unterschiede vorliegen. Dies gab ebenfalls Rückschlüsse über den *Shedder*-Status und auch darüber, ob Ausfälle aus zu geringen DNA-Anteilen resultieren. Es wurden hier im Vorfeld schon einmal die Ergebnisse der 14 Tage Reihe teilweise einbezogen.

Ein weiteres Vorgehen, welches besonders für den Vergleich von unterschiedlichem Spurenmaterial von Bedeutung ist, war die Zusammenführung von allen Proben innerhalb eines Parameters über den zeitlichen Verlauf. Es fand eine Zusammenführung der binären Tabellen statt, womit sich ergab, dass nun für jeden Zeitpunkt innerhalb des Parameters folgende Einteilung vorlag: 0 = alle Allele vorhanden, 1 = ein *dropout*, 2 = zwei *dropouts* und 3 = Ausfälle bei jedem Probanden in diesem Allel.

Zu jeder der vorher angegebenen *dropout* Analysen wurden prozentuale Berechnungen der *dropout* Erscheinungen angestellt. Bei den Probandenvergleichen kam es zu einer Berechnung der Ausfälle im gesamten Profil über den Zeitraum innerhalb eines Parameters. Dies sollte Erkenntnisse darüber liefern, ob die *dropout* Ereignisse im zeitlichen Verlauf zunehmen. Ebenfalls wurde dies im gesamten Speichelvergleich durchgeführt.

Anschließend wurden nur noch Fragmentlängen betrachtet. Dazu wurde der zeitliche Verlauf innerhalb eines Parameters erfasst. Für eine Visualisierung wurden diese ebenfalls nach ihrer Länge sortiert und in einem Vergleich dargestellt. Somit sind auch hier Ausfälle im Probandenvergleich ersichtlich. Eine Übersicht über den zeitlichen Verlauf wurde nicht angestellt, da es zu unübersichtlich erschien.

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse sollen standardisierte Aussagen entwickelt werden, wie sich die DNA unter den Parametern in Verbindung mit der Zeit verhält.

(siehe 6. Ergebnisse und 7. Diskussion)

5.2.2 Methodik Mundschleimhautabstriche (Testreihe 2)

Bei dieser Betrachtung wurden Profile der unverdünnten Proben verwendet, dass sich nur hier *allelic dropout* Erscheinungen zeigten. Weiterhin existierten hier nur zwei Proben wodurch es zu einem Unterschied in den ermittelten prozentualen Anteilen kommt.

Jedoch wurde hier die selbe Methodik verwendet wie bei Testreihe 1. (siehe Punkt 5.2.1)

5.2.3 Vergleiche von unterschiedlichem Spurenmaterial

Hierfür wurden die Visualisierungen aus den beiden vorhergehenden Methodiken verwendet und es wurde verglichen, bei welchen Parametern sich Unterschiede im Spurenmaterial zeigen. Dazu wurden Erkenntnisse der prozentualen *dropout* Erscheinungen von dem zusammengefassten Spurenmaterial, sowie die probandenweise erstellten zeitlichen Verläufe genutzt. Ebenfalls wurden für die Zeit - 48 h - eine Visualisierung der Fragmentlängen vorgenommen, da sich nur diese Zeit bei beiden Testreihen überschneidet. Anhand dieser Diagramme wurden *dropouts* in unterschiedlichem Spurenmaterial je Proband gegenübergestellt und ersichtlich gemacht. Ein zeitlicher Verlauf ist nicht erstellbar und nötig, da dies in vorhergehenden Schritten schon geschah.

5.2.4 Methodik der 14 Tage Testreihe (Testreihe 3)

Hierbei wurden wie eingangs erwähnt nur die Profile nach 14 Tagen Lagerung betrachtet. Durch eine vorherige Absprache wurde sich dazu entschieden diese Reihe gesondert zu betrachten und nicht in die vorherig genannten Zeitreihen einzubeziehen.

Da von dieser Zeit jeweils zwei Proben je Proband vorlagen, wurde im Vorfeld eine Sortierung vorgenommen und dass jeweils bessere Profil zur Weiterarbeit verwendet. Die verwendeten Proben und Parameter sind unter Punkt 5.1 nachzulesen. Dabei wurden wieder die verschiedenen Spurenmaterialien gegenübergestellt und ein Vergleich von verdünnten (1:10) und unverdünnten Proben angestellt. Ebenfalls wurde hier wie bei T1 und T2 eine prozentuale und totale Ausfallrate je Proband innerhalb eines Parameters erfasst. Anschließend kam es zu probanden- und spurmaterialweisen Vergleichen und Visualisierungen der Daten. Innerhalb eines Spurenmaterials wurde wieder untersucht, ob sich Allele oder Systeme zeigen, welche eher zu Ausfällen neigen. Weitere Untersuchungskriterien waren, wie vorhergehend auch, die Fragmentlänge und Systemkomplexität.

5.2.5 Methodik Fragment Analyzer™ Daten

In diesem Schritt wurden aus den erhalten Dateien des Fragment Analyzer™ Projekte zu den jeweiligen Probanden-Zeitreihen und zu dem unterschiedlichen Spurenmaterial erstellt und daraus Daten in Excel extrahiert. Ebenfalls wurden die erhaltenen Daten in „.pdf“ Dateien überführt. Dabei kam es in einigen Profilen zu einer manuellen Überarbeitung, da deutlich sichtbare *Peaks* im Elektropherogramm vorlagen, welche jedoch vom Programm nicht markiert wurden. Teilweise war es so möglich aus „nicht vorhandenen“ Profilen Werte zu extrahieren. Zu dem bisherigen Probenmaterial besteht jedoch ein Unterschied: für diesen Bereich wurden nur unverdünnte DNA-Proben verwendet. Somit kann zu den Speichel-STR-Profilen aus 5.2.1 kein Vergleich gezogen werden.

In der Bearbeitung der Daten ging es darum, prozentuale Anteile der ermittelten DNA-Menge TIC (*Total Integrated Concentration*) aus den *Peaks* des Elektropherogramms im Vergleich zu der tatsächlich ermittelten enthaltenen DNA-Menge (tot. Conc.) zu betrachten. Die Werte der Mengen liegen in ng/µl vor. Dabei wurde besonders der zeitliche Verlauf eines Parameters je Proband betrachtet, um eine Abnahme oder Zunahme des prozentualen Mengenanteils zu überprüfen. Ebenfalls fand eine Prüfung und Visualisierung statt, welche Fragmentlänge welchen Anteil an der TIC und ebenfalls an der totalen Konzentration besitzt. Dies gab ebenfalls Aufschluss darüber, in welchem Maß sich Anteile

über den Zeitraum eines Degradationsparameter veränderten. Somit wurde ersichtlich, ob es zu einer Fragmentierung der DNA kam, welche sich durch eine Zunahme von (kürzeren) *Peaks* zeigt. Von einer kaum auftretenden Fragmentierung bzw. Brechen von DNA kann hier gesprochen werden, wenn lediglich der Lower Marker (LM) und ein sehr großer *Peak* vorliegt, was bedeutet, dass sehr viele lange DNA Fragmente vorliegen.

Dabei wurden die zu Beginn genannten Hypothesen überprüft. Weiterhin soll anhand der Elektropherogramme ermittelt werden, ob es *Peaks* gibt welche innerhalb eines Parameters über dem gegebenen Zeitraum beständig bleiben und wie diese sich im zeitlichen Verlauf ändern (siehe Hypothesen Fragment Analyzer™). Hierfür wurden sowohl die *Peaks* (Fragmentlängen) als auch die prozentualen Anteile an der TIC und tot. Conc. überprüft. Wie schon vorhergehend wurde auch hier Unterschiede und Gemeinsamkeiten des verschiedenen Spurenmaterials analysiert.

5.2.6 Vergleich Fragment Analyzer™ Daten mit STR-Profilen

In diesem Schritt sollte es darum gehen, zu sehen, ob es schon möglich ist, Aussagen anhand der Fragment Analyzer™ Daten über die Profilqualität der DNA zu treffen. Dabei spielten *dropout* Ereignisse eine wichtige Rolle. Es wurde ein Vergleich von STR Profilen und den im Fragment Analyzer™ erhaltenen Elektropherogrammen angestellt. Untersucht wurde, ob bestimmte *Peaks* hier mit den Fragmentlängen übereinstimmen und inwieweit das Fehlen (oder Erscheinen) von *Peaks* mit *dropouts* bestimmter STR-Fragmentlängen in Verbindung steht. Angenommen wird, dass sich bei wenig degradierten Profilen im Fragment Analyzer™ hohe *Peaks* mit einem sehr hohen DNA-Anteil (TIC) detektieren lassen. Weiterhin sollte überprüft werden, ob bei Profilen, welche eine vermehrte *Peakanzahl* von unter <1500 bp zeigen, im zeitlichen Verlauf *dropout* Ereignisse auf das Verschwinden / Verändern von *Peaks* umgelegt werden können. Ebenfalls wurde analysiert, ob diese *dropout* Ereignisse bewirken, dass eine erhöhte TIC in den kleineren *Peaks* detektiert wurde.

5.2.7 Vergleich von NanoDrop™ und Fragment Analyzer™ anhand Hautabriebsspuren

Bei dem Vergleich von „NanoDrop™“- und Fragment Analyzer™-Daten ging es darum, herauszufinden, welches Programm bzw. Verfahren besser geeignet ist um DNA-Men-

gen zu erkennen. Dazu wurden die verschiedenen Hautabriebe aller Probanden betrachtet. Aus den erhaltenen Fragment Analyzer™ Daten wurden im Vorfeld durch die Bearbeiterin Wertetabellen und „pdf“-Dateien erstellt. Bei ungenauer maschineller Erstellung wurden, wenn möglich, *Peaks* manuell hinzugefügt. Da „NanoDrop™“ eine andere Arbeitsweise besitzt, ließ sich hier nur mit den erhaltenen Daten arbeiten und vergleichen. Es wurde eine Gegenüberstellung der ermittelten Daten angefertigt um zu sehen, welches Programm mehr DNA (in ng/μl) detektiert. Weiterführend wurde bei den NanoDrop™ Daten überprüft, bei welchem DNA-Proben wirklich von reiner DNA gesprochen werden kann, und somit direkt Werte mit dem Fragment Analyzer™ verglichen werden können. Unter Punkt 3.8 kann nachgelesen werden, wie sich reine DNA ergibt. Für die Vergleiche wurden sowohl Werte der TIC als auch der tot. Conc. verwendet.

6 Ergebnisse der Degradationsstudie

Unter diesem Abschnitt finden sich nun die ermittelten Ergebnisse der durchgeführten Experimente. Dabei wird wiederum eine probandenweise Erfassung erstellt um individuelle Aussagen treffen zu können. Dabei wird besonders der zeitliche Verlauf innerhalb eines Degradationsparameter betrachtet und *dropout* Ereignisse in Bezug zu Fragmentlänge und / oder Systemkomplexität beurteilt. Ebenfalls findet innerhalb eines Spurenmaterials ein Vergleich aller (verwendeten) Probanden statt, um Aussagen über die Tauglichkeit des Spurenmaterials, innerhalb eines Parameters, treffen zu können. zeitliche Verläufe spielen hierbei eine untergeordnete Rolle. Die letzten beiden Auswertungspunkte betreffen dann schließlich die ermittelten Fragment Analyzer™ Daten und den Hautspurenvergleich mittels verschiedener Geräte / Tools.

Bei einer Lagerung der Proben auf dem Fensterbrett können keinerlei Aussagen, inwieweit die Proben Sonneneinstrahlung ausgesetzt waren, getroffen werden, da es hierzu keinerlei Aufzeichnungen gibt. Zu den genauen Temperaturen lässt sich ebenfalls keine Aussage treffen, da ein Temperaturprofil nicht vorlag und durch Auskunft der Mitarbeiterin von FoSil irrelevant sei. Lediglich lässt sich durch den Experimentzeitraum von Dezember bis Januar annehmen, dass geringe Temperaturen vorherrschten.

Es wurde festgestellt, dass sich keine *dropins* zeigen. Zwar wurden Allelwerte bei der Elektrophorese erfasst, welche jedoch anhand von zu geringer Signalstärke und anderen Kriterien ausgeschlossen werden konnten.

6.1 Degradationserscheinungen in den Speichelproben (Testreihe 1)

Im Folgenden findet erst eine probandenweise Auswertung der einzelnen Profile je Parameter im zeitlichen Verlauf statt. Anschließend wird eine Zusammenfassung unter Einbezug aller drei Probanden getroffen. Aussagen über den *Shedder*status, einzelne Profilqualitäten und probandenbedingete Abhängigkeiten werden getroffen. Schließlich soll es zu generalisierten Aussagen zum Spurenmaterial - Speichel – kommen. Ein Vergleich mit den Proben der Mundschleimhaut wird im Punkt 6.3 ausgewertet. Was sich genau hinter der angesprochenen Systemkomplexität verbirgt und wie es zu solch einer Beurteilung kommt ist im Punkt 3.9 oder im Praktikumsbericht [a] nachzulesen. Zu einer genauen Auswertung der Fragmentlängen kommt es bei den Probandenbetrachtungen

nicht, da diese gerätebedingt jeweils um 1-2 bp schwanken können. Fragmentlängen werden lediglich im Bezug zu *dropout* Ereignissen als mögliche Begründung erfasst. In dem Punkt des Vergleichs aller Probanden untereinander (Punkt 6.1.2) kommt es dann zu einer genauen Betrachtung der Fragmentlängen, da diese eine entscheidende Rolle für Aussagen zur Profilqualität und oder *Shedder*status darstellen können.

Im Anhang 1 befindet sich eine Tabelle mit einer Übersicht, welche Profile vorhanden waren und für die Auswertung genutzt wurden. Betrachtet wurden nur 1:10 verdünnte Speichelprofile.

6.1.1 Probandenbetrachtung

Proband 9

In der ersten Betrachtung ist hier schon auffällig, dass dieser Proband im System D3 ein homozygotes Merkmal aufweist.

Beginnend mit der Lagerung unter **Raumtemperatur** zeigen sich vereinzelte Allelausfälle bei 24 Stunden (D18 I, D21 II). Bei allen anderen Zeiten liegen komplette Profile vor. Lediglich ein Profil nach einer Zeit von 72 h existiert nicht. Somit lässt sich Hypothese 4 b) bestätigen, was in diesem Punkt bedeutet, dass die Hypothesen 1-3 angezweifelt werden könnten, da es zu keinem (weiteren) Auftreten von *dropout* Erscheinungen kommt. (Abbildung 7)

Unter einer Lagerung von **5° Celsius** liegen im zeitlichen Verlauf der Verdünnungsreihe keine Ausfälle vor. Selbst unter Einbezug der 14 Tage Reihe erschienen keine Ausfälle. Ebenfalls könnten hier die Hypothesen 1-3 angezweifelt werden, jedoch kann auch diese Temperatur nicht sehr Zellschädlich sein, oder der Proband zu den „*good sheddern*“ zählen und eine stabile DNA besitzen. (Abbildung 7)

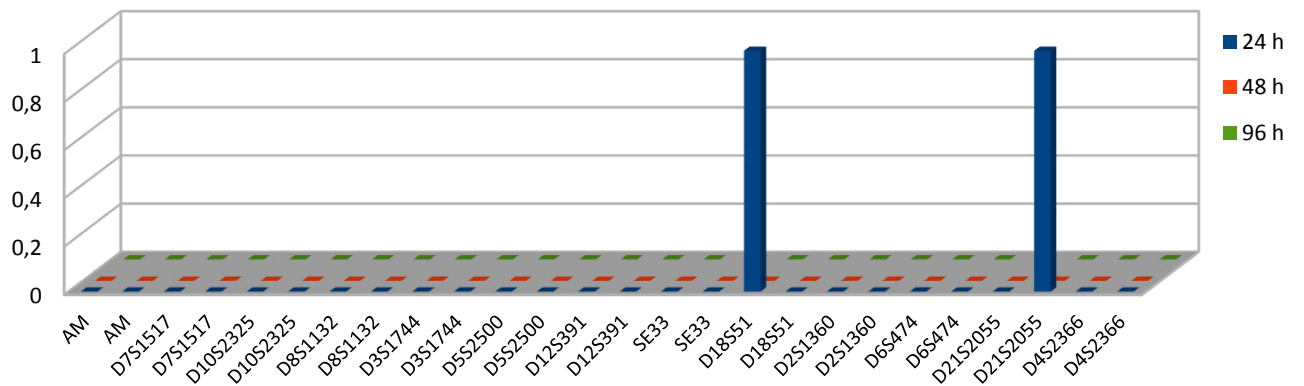
Bei **40° Celsius** zeigt sich bei 24 Stunden Ausfälle im D12 II und vom D8 bis D21. Diese tauchen jedoch in den anderen Zeiten nicht noch einmal auf. Ausnahme ist der D21 I welcher bei 48 h erneut ausfällt. Ansonsten liegen hier komplette Profile aller Zeiten vor. Unter Einbezug der Fragmentlänge ergeben sich hier Ausfälle im mittleren Fragmentlängenbereich. Dies kann zu der Annahme führen, dass *allelic dropouts* willkürlich auftreten und somit lässt sich Hypothese 1 hier falsifizieren. Der Ausfall des D21 kann auf seine hohe Systemkomplexität zurückgeführt werden, womit sich Hypothese 3 bestätigen lässt. Hypothese 2 ist wiederum anzweifelbar. (Abbildung 7)

Im zeitlichen Verlauf einer Lagerung der DNA auf dem **Fensterbrett** wurde durchgängig der D21 I nicht detektiert. Der Grund hierfür sollte eine hohe Fragmentlänge von ca. 363 bp und eine hohe Systemkomplexität sein, jedoch stellt die Tatsache, dass sich hier im zweiten Allel keinerlei Ausfälle zeigen und auch nicht in den anderen noch längeren Fragmenten (D4) eine etwas rätselhafte Erscheinung dar. Aus diesem Grund findet Hypothese 3 Bestätigung, Hypothese 2 gilt als falsifiziert und Hypothese 1 als zweifelhaft. (Abbildung 7)

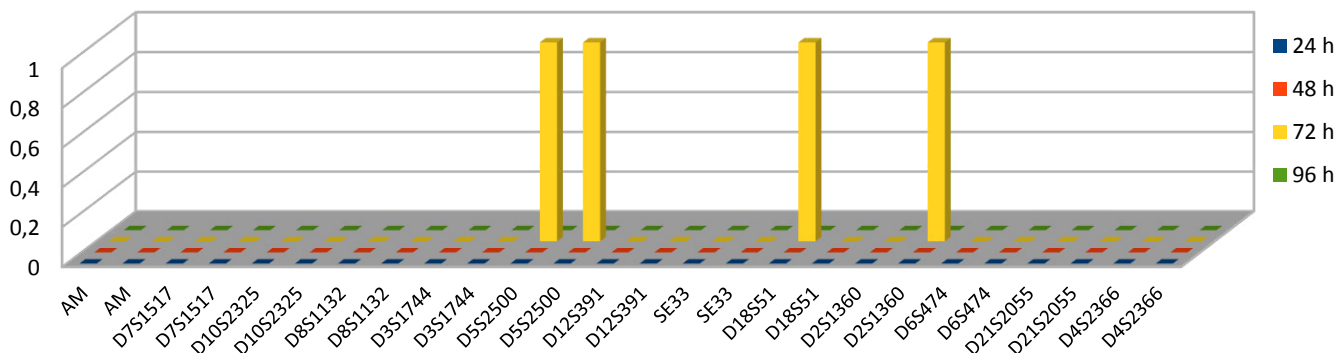
Die **UVC** Auswirkung scheint generell etwas zu fluktuieren. Festzustellen ist das D21 durchgängig bei allen Zeiten ausfällt, ebenso der D4 und er D6 I ab 48 Stunden. Ebenfalls lässt sich sehr deutlich erkennen, dass mit steigender Zeit, unter welcher UVC auf die DNA einstrahlt, die Anzahl der *allelic dropouts* in größeren Fragmentlängen zunimmt. Leider fehlt hier ein Profil von 96 h, jedoch ist zu vermuten, dass hier die *dropout* Anzahl weiter steigt. Somit gilt Hypothese 4 a) als bestätigt. Ebenso Hypothese 1 und 3. Hypothese 2 kann aufgrund der kompletten Ausfälle nicht genau beurteilt werden, jedoch könnte man durch den Ausfall des D6 I eine Anzweiflung bzw. Falsifizierung vornehmen. (Abbildung 7)

Für alle Parameter lässt sich Hypothese 4 c) bestätigen.

Raumtemperatur, Proband 9



5° Celsius, Proband 9



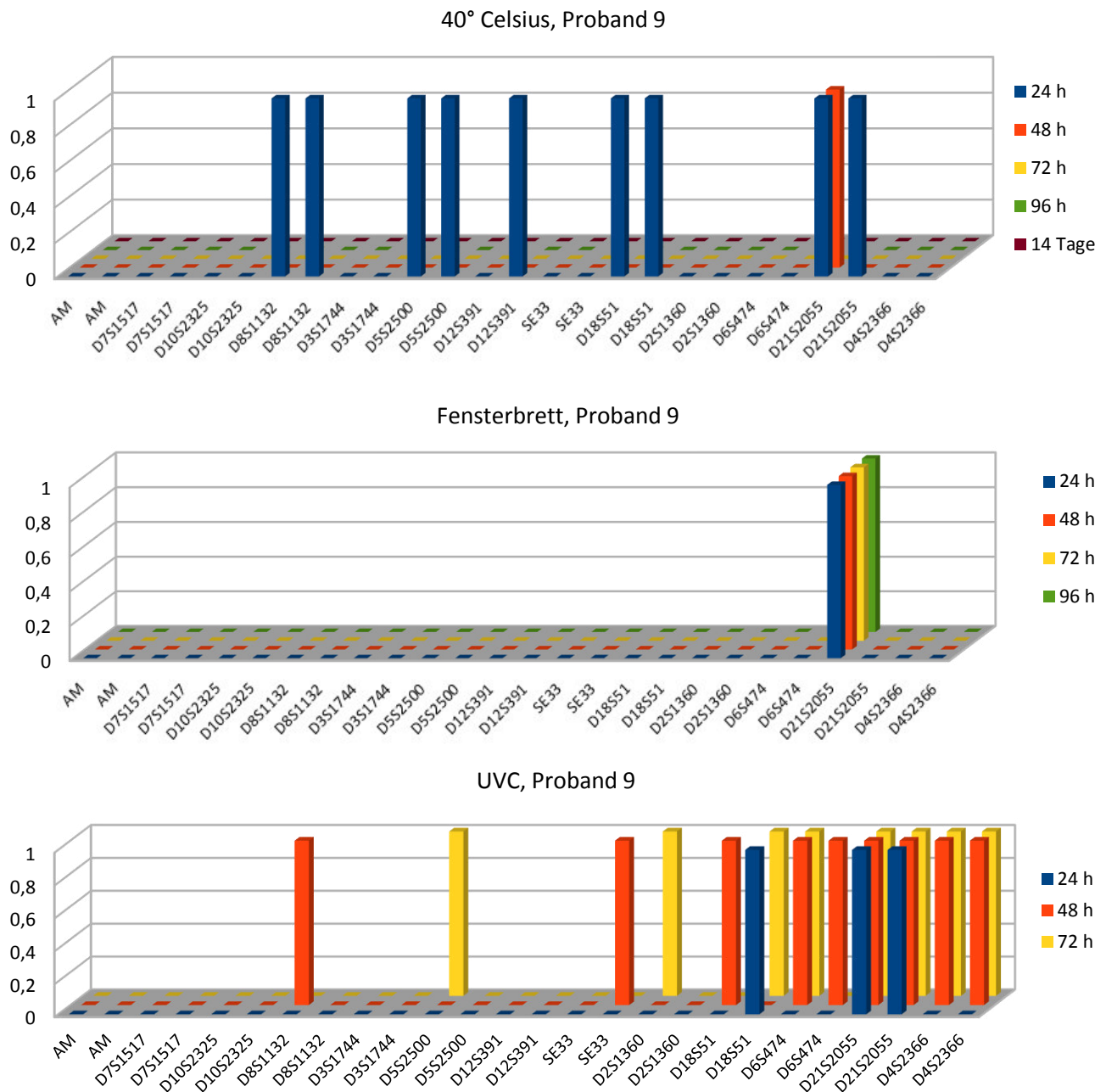


Abbildung 7: dropout Erscheinungen bei Proband 9 (1=dropout; 0=Allel vorhanden)

Proband 19

Bei diesem Probanden liegt eine Homozygotie im *Locus D7* vor.

Im zeitlichen Verlauf der **Raumtemperatur** zeigen sich keinerlei Ausfälle. Somit lässt sich Hypothese 4 b) bestätigen, was in diesem Punkt bedeutet, dass die Hypothesen 1-3 angezweifelt werden könnten, da es zu keinem Auftreten von *dropout* Erscheinungen kommt. (Abbildung 8)

Selbiges ist über den Verlauf von **5° Celsius** zu sagen, mit der Ausnahme eines einzelnen *allelic dropouts* bei 48 h im D21 II. Dies würde gegeben Falls für eine Bestätigung von Hypothese 3 sprechen sowie Hypothese 2. Jedoch können diese Hypothesen durch einmaliges Auftreten und Inkonsistenz angezweifelt werden, sowie auch Hypothese 1. Ebenfalls kann auch diese Temperatur nicht sehr Zellschädlich sein, oder der Proband zu den „*good sheddern*“ zählen und eine stabile DNA besitzen. (Abbildung 8)

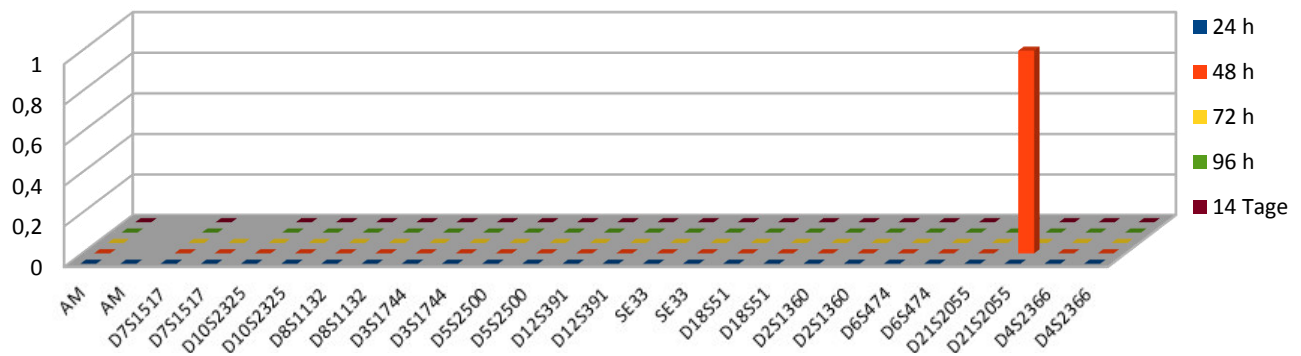
Bei den Profilen von **40° Celsius** zeigt sich, dass im Amelogenin und im D7 *allelic dropouts* erscheinen. Diese *allelic dropouts* bewirken jedoch in beiden Fällen einen *locus dropout*, da es sich um einen Probanden handelt, welcher weiblich ist und im D7 homozygot. Beide Systeme besitzen jedoch die kürzesten Fragmentlängen, womit diese als Ursache nicht in Erwägung gezogen werden kann. Falsifizierung Hypothese 1. Ebenfalls treten diese Ausfälle auch nur in diesem Profil dieser Zeit auf. Ein weiterer *dropout* taucht nach 96 h im D3 II auf. Bei diesem handelt es sich um Fragmentlängen im mittleren Drittel. Bei dem D3 handelt es sich zudem um ein System von höherer Komplexität. Eventuelle Bestätigung Hypothese 3 sowie Hypothese 2. (Abbildung 8)

Bei der **Fensterbrett**lagerung kommt es ebenfalls nur zu einem einzigen *allelic dropout* nach 72 Stunden im D10 I. Alle anderen Profile sind vollständig. Dies liegt scheinbar nicht an der Komplexität, da es eines der simpelsten Systeme ist. Ebenfalls kann auch die Fragmentlänge nicht als Begründung dienen. Somit kann eine Falsifizierung der Hypothesen 1-3 angenommen werden, jedoch erscheint der Werteumfang zu gering. (Abbildung 8)

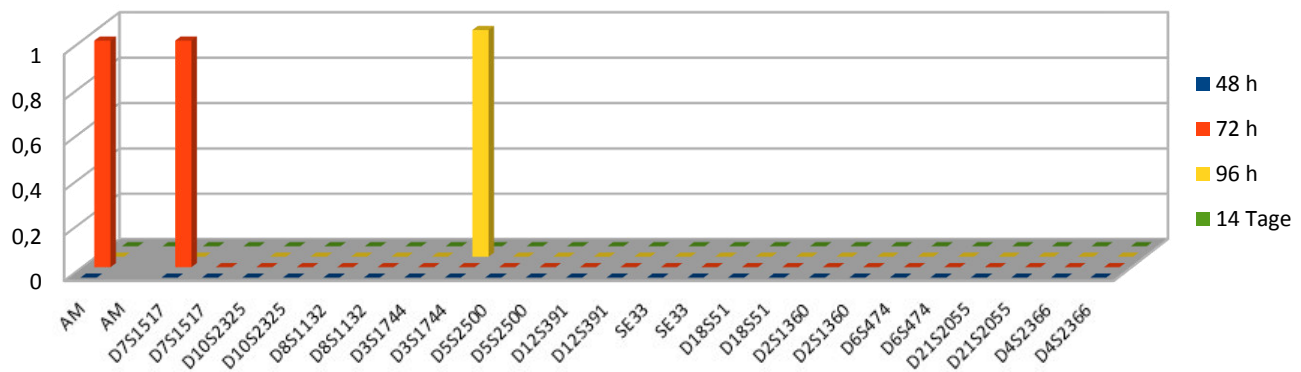
In den Profilen der **UVC**-Bestrahlung treten wieder starke Fluktuationen auf. Einzige Gemeinsamkeit ist der Ausfall des D21 II über alle Zeiten hinweg. Auch zeigt sich bei allen Zeiten, außer bei 72 h, dass der D21 komplett ausfällt. Eine Schwierigkeit stellt das Profil nach 48 Stunden dar, da dieses sehr viele Ausfälle ausweist, welche jedoch bei zunehmender Zeit nicht erneut erscheinen. Es ist eher so, dass bei 72 h ein fast vollständiges Profil vorliegt. Ebenfalls erscheinen die Ausfälle bei 48 h bei mittelmäßigen und sehr hohen Fragmentlängen, wodurch es wiederum keine Bestätigung der Fragmentlänge als Einflussfaktor gibt. Da jedoch der D21 das komplexeste System darstellt, kann hierin eine Begründung gefunden werden. Somit lassen sich auf die Ergebnisse jeweils einzeln betrachtet jeweils eine der Hypothesen 1-3 bestätigen. Ebenfalls sind diese auch Profilabhängig zu treffen. Aufgrund zu starker Schwankungen und Inkonsistent wird es schwierig allgemeine Aussagen zu treffen. Jedoch gilt Hypothese 4 a). (Abbildung 8)

Alles in Allem erscheint die DNA dieses Probanden als relativ resistent gegenüber den gewählten Degradationsparametern. Auch hier lässt sich Hypothese 4 c) bestätigen.

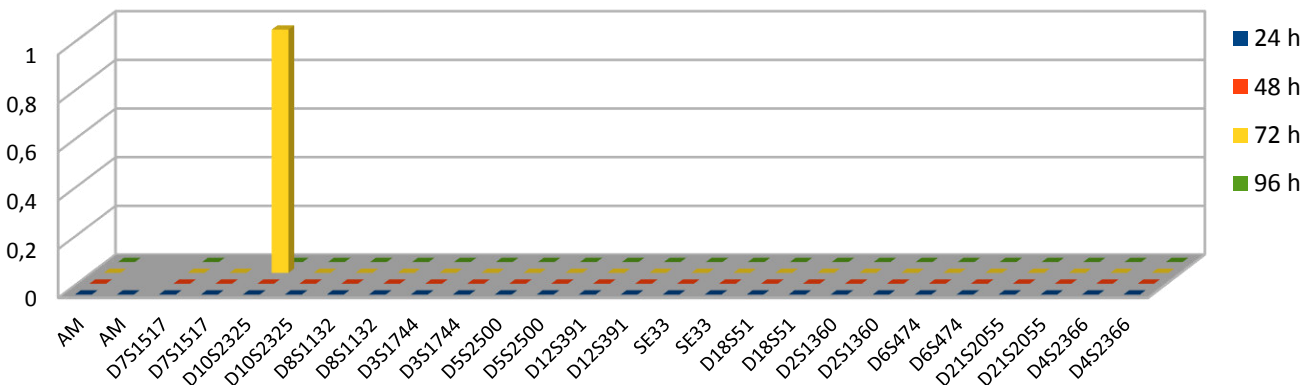
5° Celsius, Proband 19



40° Celsius, Proband 19



Fensterbrett, Proband 19



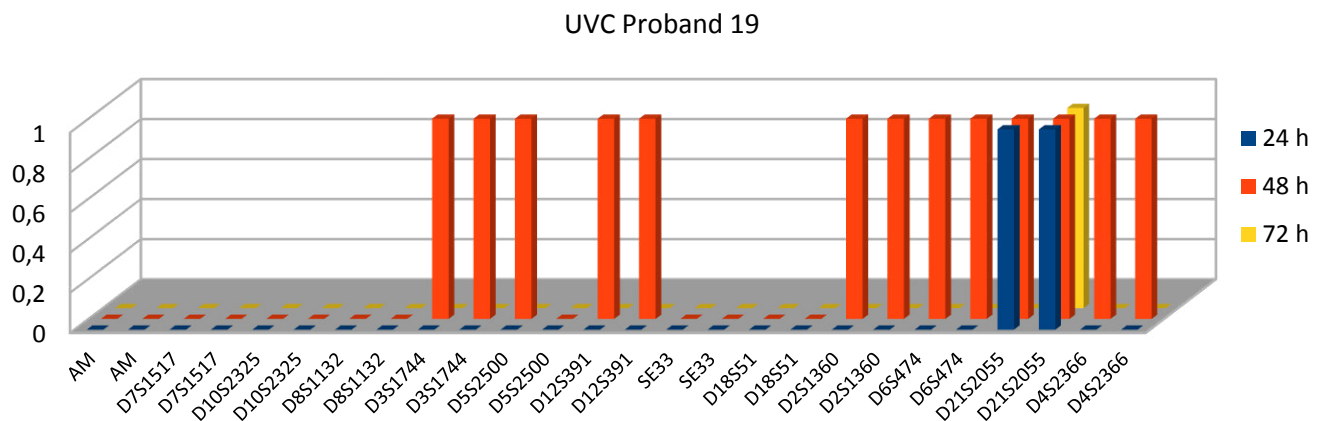


Abbildung 8: dropout Erscheinungen bei Proband 19
(1=dropout; 0=Allel vorhanden)

Proband 20

Dieser Proband ist in allen *Loci* heterozygot, womit er bei einer Betrachtung aller Speichelproben der einzige ist.

Bei dem Einfluss von **Raumtemperatur** fehlt das Profil nach 72 h, jedoch zeigen alle andern, vorhandenen Profile Vollständigkeit. Somit lässt sich Hypothese 4 b) bestätigen, was in diesem Punkt bedeutet, dass die Hypothesen 1-3 angezweifelt werden könnten, da es zu keinem Auftreten von *dropout* Erscheinungen kommt. (Abbildung 9)

Bei **5° Celsius** erscheint ein vereinzelter *allelic dropout* im D21 I nach 48 Stunden. Dieser spricht für die Korrektheit von Hypothese 1 und 3 und die Falschheit von Hypothese 2. Jedoch liegen hier zu wenige Phänomene vor um diese Aussagen für den Parameter geltend zu machen. (Abbildung 9)

Nach 24 h unter **40° Celsius** liegt ein Ausfall des D21 vor, welcher jedoch bei steigenden Zeiten nicht wieder auftaucht. Ursachen könnten die Systemkomplexität und die hohe Fragmentlänge sein. Jedoch ist dies nicht sehr aussagekräftig, da diese *dropouts* nicht erneut erscheinen. Somit können die Hypothesen 1-3 angezweifelt werden. (Abbildung 9)

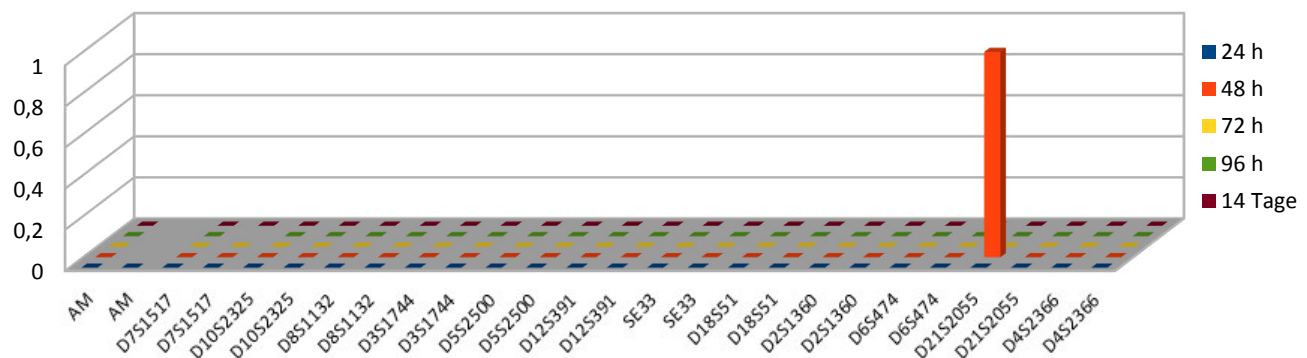
Bei der **Fensterbrett**lagerung treten wieder starke Unterschiede in den erhaltenen Profilen auf. Während bei 24 h einige Ausfälle vorliegen, treten diese bei 48 und 72 Stunden nicht wieder auf. Hier liegen vollständige Profile vor. Sowohl lassen sich die Ausfälle auch weniger auf Fragmentlänge oder Systemkomplexität zurückführen. Mögliche Ursachen werden unter Punkt 7.1 diskutiert. Somit findet eine Anzweiflung der Hypothesen 1-3 statt. (Abbildung 9)

Bei diesem Probanden zeigen sich unter **UVC** sehr viele Ausfälle, welche jedoch teilweise sehr unterschiedlich sind. Gemeinsamkeiten liegen in den Ausfällen des D12 II, D2 I, D6, D4, D5 (bei 24 und 72 h), D18 II und D21. Ebenfalls bietet sich im SE33 I nach 24 Stunden eine Ausfallerscheinung. Im Großen und Ganzen liegen hier, bezogen auf die Fragmentlänge, bei 24 h und 72 h die *allelic* und *locus dropouts* in den beiden oberen Dritteln. Bei 48 h liegen diese nur im oberen Drittel. Ein Profil von 96 h liegt nicht vor. Jedoch kann gesagt werden, dass mit steigender Zeit die *dropout* Rate zunehmen sollte und Fragmentlängen welche *dropouts* zeigen immer weiter sinken. Mutmaßlich kann hier angenommen werden, dass sich bei Proband 20 nach 96 h schon kein Profil mehr ergeben könnte.

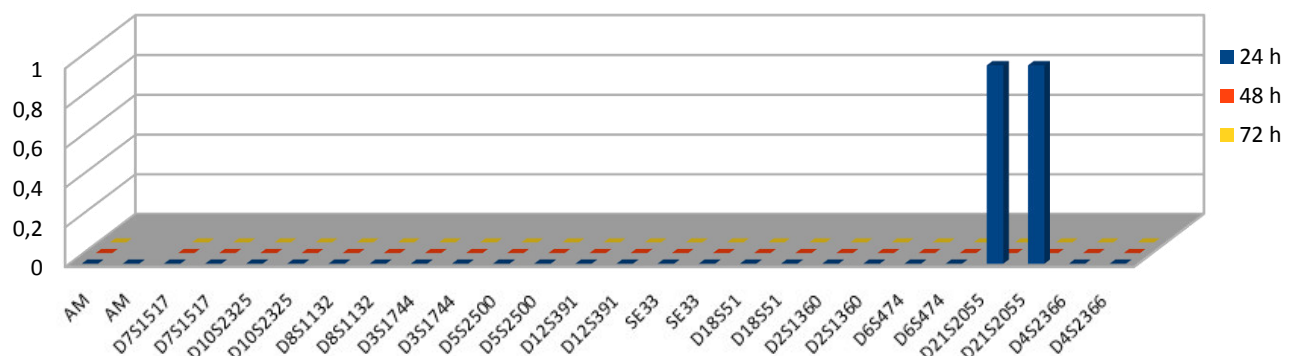
Somit lässt sich bei diesem Probanden eindeutig die Hypothese 1 bestätigen, sowie 4 a). Aufgrund der Ausfälle von simplen und hochkomplexen Systemen scheint sich Hypothese 3 falsifizieren zu lassen. Eine genaue Einschätzung von Hypothese 2 ist nicht möglich, da vorwiegend komplette *Loci* wegfallen. (Abbildung 9)

Allgemein findet sich auch in diesem Profilen eine Bestätigung von Hypothese 4 c).

5° Celsius, Proband 20



40° Celsius, Proband 20



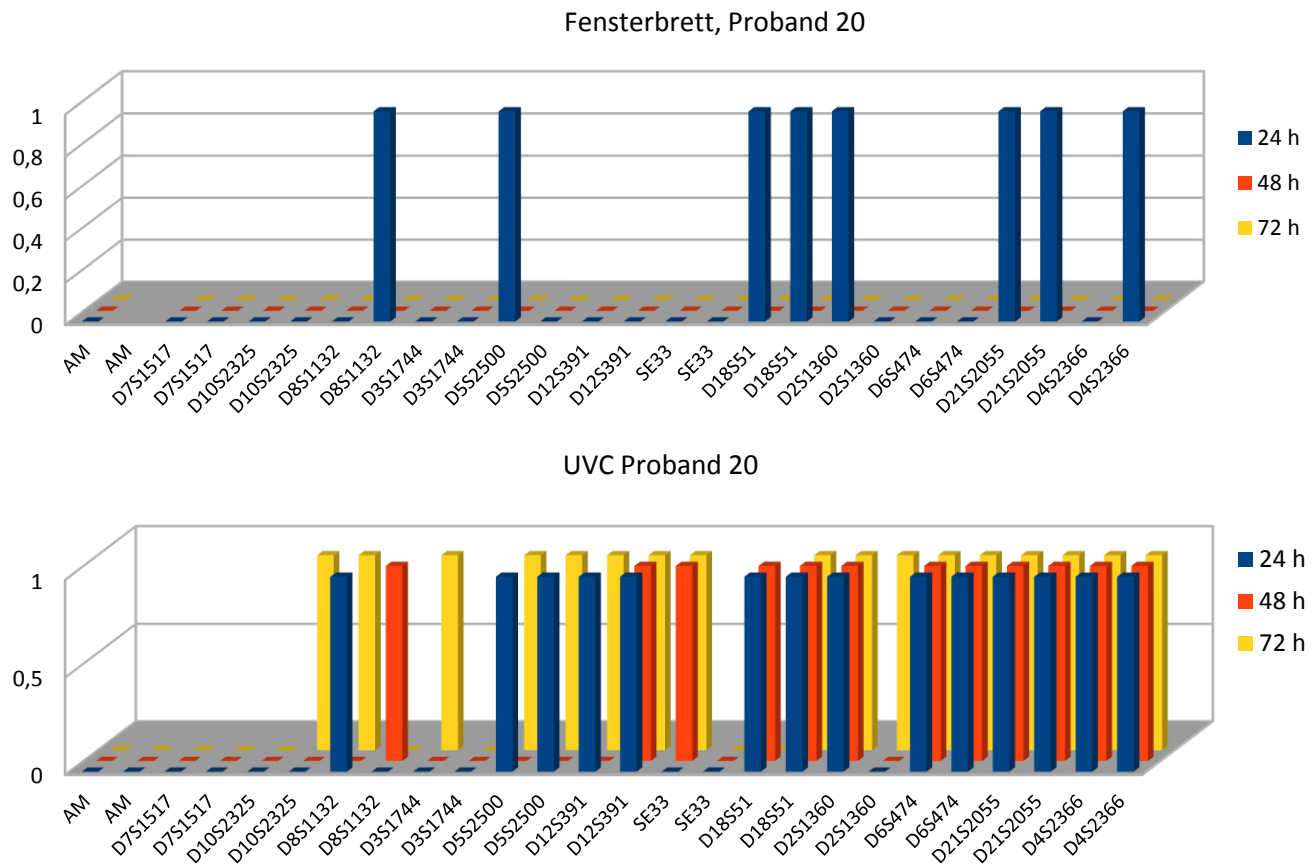


Abbildung 9: dropout Erscheinungen bei Proband 20
(1=dropout; 0=Allel vorhanden)

6.1.2 Zusammenfassende Aussagen zu den Speichelproben

Eine weitere interessante Tatsache, welche sofort auffällt, ist, dass alle Probanden im System D21 I und D10 II jeweils dasselbe Allel (19,1 ; 7) aufweisen. Ebenfalls liegen alle Allele der Probanden relativ nah beieinander, mit Ausnahme des SE33 bei P19. Weitere Allele, welche gleich sind, sind D7 II, D6 I, D4 I, D5 II, D21 I und D10 I und II. Des Weiteren lässt sich feststellen, dass der D2 I von P20 dasselbe Allel besitzt wie D2 II von P9. Selbiges lässt sich auch auf einen Vergleich von P9 mit P19 umlegen. Hier treten Gemeinsamkeiten in den Allelen D8 II, D5 I, D21 I, D10 II auf. Jedoch besitzen sie keine gleichen Allele an unterschiedlichen Stellen. Auch im Vergleich von P19 und P20 bieten sich gleiche Allele im D7I (jedoch vorsichtig zu betrachten durch Homogenität bei P19), D3 I, D4 II, D21 I und D10 II. Hier zeigt sich, dass es mehr zusätzliche Allele gibt welche jedoch an anderen Stelle stehen: D6 I = D6 II, D5 II = D5 I und D18 I = D18 II (geordnet: P19 = P20). (Tabelle 1)

Maker	Proband 9		Proband 19		Proband 20	
	Allele	Size (bp)	Allele	Size (bp)	Allele	Size (bp)
AM	X	76,93	X	76,95	X	76,92
AM	Y	79,79	X	76,95	X	76,92
D7S1517	18	116,17	21	128,1	21	128,37
D7S1517	24	140,14	h	169,32	24	140,41
D3S1744	18	185,86	14		14	169,36
D3S1744	h		19	189,97	20	194,12
D12S391	18	225,89	16	217,52	21	238,44
D12S391	23	246,33	19	230	22	242,55
D2S1360	20	285,65	25	305,96	22	293,78
D2S1360	22	293,64	26	310,16	24	301,88
D6S474	13	353,92	15	361,96	13	353,89
D6S474	14	357,86	16	365,97	15	361,98
D4S2366	10	433,56	9	429,67	10	433,66
D4S2366	12	441,75	14	450,18	14	450,26
D8S1132	18	140,28	19	127,96	20	147,8
D8S1132	21	151,54	21	151,47	22	155,49
D5S2500	11	196,08	11	196,27	15	212,16
D5S2500	17	220,08	15	212,21	17	220,15
D18S51	13	260,91	17	276,24	12	256,69
D18S51	23	299,14	20	287,67	17	275,86
D21S2055	19,1	363,28	19,1	363,3	19,1	363,36
D21S2055	20,1	367,36	31	411,22	26	390,96
D10S2325	7	125,68	10	140,21	7	125,92
D10S2325	12	149,86	12	150,04	12	150,24
SE33	25,2	278,44	14	234,39	17	245,25
SE33	27,2	286,1	15	238,24	20,2	259,54

Tabelle 2: Allele und Fragmentlängen (Size) der ausgewählten Speichelprobanden;
h=homozygotes Merkmal

Im Folgenden wird nun die Auswertung der einzelnen Zeitschritte je Parameter der drei Probanden untereinander dargestellt. Es werden lediglich Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Ausfallereignisse erfasst, womit es zum Fehlen einiger Zeiten und oder Parameter kommen kann. Anschließend folgen Aussagen zu den Profilqualitäten, *Shedder*-status und DNA Ausfallresistenzen der Probanden im Vergleich. Weiterführend sollen hier generalisierte Aussagen zum Spurenmaterial getroffen werden, welche für den Punkt 5.3 weiterverwendet werden sollen. Aussagen welche die einzelnen Probanden konkret betreffen sind in dem Punkt 6.1.1 nachzulesen.

Unter der Bedingung **Raumtemperatur** lässt sich nach 24 h feststellen, dass nur bei P9 zwei Allele (D18 I und D21 II) ausgefallen sind. Ansonsten treten bei diesem Parameter keinerlei Ausfälle im zeitlichen Verlauf auf. Somit bestehen keine Unterschiede zwischen den Probanden und die Probenart – Speichel - scheint bei Raumtemperatur keine Veränderungen im genetischen Profil hervorzurufen. Somit könnte hier angenommen werden, dass von allen Probanden genügend DNA in der Probe vorhanden war, es keinen „*poor shedder*“ gibt und alle Probanden gute Profile liefern sollten. Somit lässt sich Hypothese 4 b) bestätigen, was in diesem Punkt bedeutet, dass die Hypothesen 1-3 angezweifelt werden könnten, da es zu keinem Auftreten von *dropout* Erscheinungen kommt.

In dem zweiten temperaturabhängigen Parameter - Lagerung bei **5° Celsius** - zeigt sich bei P19 und P20 jeweils ein Allelausfall. Bei P19 im D21 II und bei P20 im D21 I. (Bei Betrachtung dieser Ausnahmen kann man von einer Bestätigung von Hypothese 1 und 3 sprechen.) Diese Ausfälle wiederholen sich jedoch im zeitlichen Verlauf nicht erneut. Somit scheint Speichel unter diesen Temperaturen beständig gute Profile zu liefern. Ein Unterschied zwischen den Probanden scheint auch hier nicht zu existieren. In der Gesamtbetrachtung lässt sich sagen, dass durch fehlende *dropout* Erscheinungen im zeitlichen Verlauf die Hypothesen 1-3 nicht ausgewertet werden können und somit anzweifelbar sind. Ebenfalls kann auch die Temperatur nicht sehr schädlich auf Speichelproben einwirken.

Bei einer Lagerung von **40° Celsius** ergibt sich nach 24 h eine Gemeinsamkeit von P9 und P20; es erscheint ein *locus dropout* im D21. Ein Vergleich mit P19 ist nicht möglich, da hier ein 24 h Zeitprofil fehlt. Die einmalig schlechte Profilqualität von P9 bei 24 h sollte nicht in eine Beurteilung des Spurenmaterials einfließen, das es hierfür eine Vielzahl an Gründen gibt. Es zeigt sich ebenfalls, dass unter hohen Temperaturen kaum eine Beeinträchtigung der Verwertbarkeit von gefundenen Speichelproben vorliegt. Die DNA aller Probanden besitzen ein näherungsweise gleiches Verhalten. In der Gesamtbetrachtung lässt sich sagen, dass durch fehlende *dropout* Erscheinungen im zeitlichen Verlauf

die Hypothesen 1-3 nicht ausgewertet werden können und somit anzweifelbar sind. Ebenfalls kann auch die Temperatur nicht sehr schädlich auf Speichelproben einwirken.

Eine **Fensterbrett**lagerung bietet wieder sehr unterschiedliche Ergebnisse. Gemeinsamkeiten der Ausfälle scheint es nicht zu geben. Unter Vernachlässigung des schlechten 24 h Profils von P20 zeigt sich, dass die Speichelproben Temperaturschwankungen und eventueller Sonneneinstrahlung gut widerstehen. Somit lässt sich durch fehlende *dropout* Erscheinungen im zeitlichen Verlauf sagen, dass Hypothesen 1-3 nicht ausgewertet werden können und somit anzweifelbar sind.

Die Auswirkungen der **UVC** Bestrahlung bewirken bei allen Probanden erhebliche Ausfälle. Somit scheint Speichel bei dieser Bedingung ein sehr instabiles Spurenmaterial zu sein. Es zeigt sich, dass die Profile von Proband 19 noch die besten sind und dieser die stabilste DNA zu besitzen scheint. Bei P20 treten die meisten Ausfälle auf. Somit scheint dieser Teilnehmer eine sehr instabile bzw. schwache DNA zu besitzen, welche unter UV Einstrahlung zu einem hohen Degradationsgrad neigt. Ebenso kann hier die Annahme geltend gemacht werden, dass es sich um einen „*poor shedder*“ handelt. Begründungen für einige *allelic dropouts* können hierbei nicht durch die individuellen Fragmentlängen oder Allelabstände innerhalb eines Systems gefunden werden, da sich auch bei einem Vergleich ergab, dass diese sich ähneln. In einigen Fällen zeigt sich sogar, dass bei Probanden größerer Fragmentlängen und Allelabstände keinerlei Ausfälle erscheinen, bei kleinen Allelabständen schon. Durch genannte Tatsachen ist hier eine Generalisierung über die Hypothesen schwierig. Jedoch scheint es so als könnte hier in den Hypothesen 1 und 3 Bestätigung gefunden und Hypothese 2 angezweifelt bzw. falsifiziert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Hypothesen 4 a) – c) zutreffend sind.

6.2 Degradationserscheinungen der Mundschleimhaut-abstriche (Testreihe 2)

Im Folgenden findet erst eine probandenweise Auswertung der einzelnen Profile je Parameter im zeitlichen Verlauf statt. Anschließend wird eine Zusammenfassung unter Einbezug beider Probanden getroffen. Aussagen erfolgen über den *Shedder*status, einzelne Profilqualitäten und probandenbedingete Abhängigkeiten, woraus schließlich generalisierte Aussagen zu dem Spurenmaterial - Mundschleimhaut – getroffen werden. Ein Vergleich mit den Speichelproben wird im Punkt 6.3 ausgewertet. Was sich genau

hinter der angesprochenen Systemkomplexität verbirgt und wie es zu solch einer Beurteilung kommt ist im Praktikumsbericht [a] nachzulesen. Zu einer genauen Auswertung der Fragmentlängen kommt es bei den Probandenbetrachtungen nicht, da diese gerätebedingt jeweils um 1-2 bp schwanken können. Fragmentlängen werden lediglich im Bezug zu *dropout* Ereignissen als mögliche Begründung erfasst. In dem Punkt des Vergleichs beider Probanden untereinander (Punkt 6.2.2) kommt es dann zu einer genauen Betrachtung der Fragmentlängen, da diese eine entscheidende Rolle für Aussagen zur Profilqualität und oder *Shedder*status darstellen könnten.

Im Anhang befindet sich eine Tabelle mit einer Übersicht, welche Profile vorhanden waren und für die Auswertung genutzt wurden. Betrachtet wurden nur unverdünnte Mundschleimhautprofile. Die verdünnten Testreihen wurden nicht untersucht, da sich hier im Vergleich keine Ausfälle zeigten, was eine verwunderliche Tatsache darstellt. Bei einigen Proben ergab sich während der Aufarbeitung, dass Probenamen vertauscht wurden. Somit wurden aus anfänglich existenten Profilen Fehlende. Festgestellt wurde dies anhand der ermittelten Allele, da diese keinerlei Übereinstimmung mit dem Referenzprofil des im Probenname angegebenen Probanden fanden.

6.2.1 Probandenbetrachtung

Proband A

Bei diesem weiblichen Probanden erscheint ein homozygotes Merkmal im *Locus* D12.

Bei Betrachtung der Probe im zeitlichen Verlauf unter dem Einfluss von **Raumtemperatur** zeigt sich nach 36 h ein Ausfall des D10. Der D10 II sowie D3 II, SE33 II und D18 II fallen nach 48 h aus. Auskunft über einen weiteren Verlauf bietet diese Testreihe nicht, da hierfür keinerlei Profile bzw. Testreihen existieren. Was hier sehr auffällig ist, ist die Tatsache, dass scheinbar vermehrt die zweiten Allel ausfallen. Dies spricht für die Bestätigung der Hypothese 2. Diese sind jedoch nicht durch die Fragmentlängen bedingt, da die genannten Systeme alle im mittigen Fragmentlängenbereich liegen. Falsifizierung Hypothese 1. Bei einer Überprüfung der Allelabstände ergab sich, dass bei allen vier Systemen Allelabstände von über 10 Basenpaaren (bp) vorliegen, welche die Ausfälle begünstigen. Jedoch sind davon nicht alle STR-Systeme mit dieser Eigenschaft betroffen. Nach diesem Kriterium jedoch müssten sich auch im D7 und D4 solche *allelic dropout* Ereignisse zeigen. Jedoch kann sich eine gewisse Bestätigung von Hypothese 2 hier finden lassen. Aufgrund niedriger Systemkomplexitäten kommt es zur Falsifizierung von

Hypothese 3. Ebenfalls ergibt sich im Gesamten die Widerlegung von 4 b). (Abbildung 10)

Bei **5° Celsius** treten nach 36 schon Ausfälle des D10, SE33 II, D2 II und D4 II auf. Lediglich der Ausfall des D10 wiederholt sich nach 48 h. Es kann eine Zustimmung für Hypothese 2 und eine Ablehnung der Hypothese 3 gefunden werden. Hypothese 1 trifft nur bedingt zu und ist somit fraglich. (Abbildung 10)

Ebenfalls zeigt sich der Wegfall des kompletten D10 *Locus* bei Lagerung von **40° Celsius** sogar bis in die 14 Tage Reihe. Dies spricht für eine Ablehnung der 3. Hypothese, da es sich nach hier geltender Beurteilung um ein simples System handelt. Weitere Ausfälle nach 36 h sind im D6 und D4 II zu verzeichnen. Beides sind Systeme mit einer sehr hohen Fragmentlänge; der D4 sogar zusätzlich noch mit einem Allelabstand von 21 bp. Somit kommt es zur Anerkennung der Hypothesen 1 und 2. Diese *dropout* Ereignisse wiederholen sich nach 48 nicht, jedoch gibt es *allelic dropouts* bei D5 II und D18 II. Der D18 hier wieder mit einem Allelabstand von 35 bp und der D5 mit nur vier Basenpaaren (bp). Ebenfalls findet sich hier die Ablehnung der Hypothese 3. (Abbildung 10)

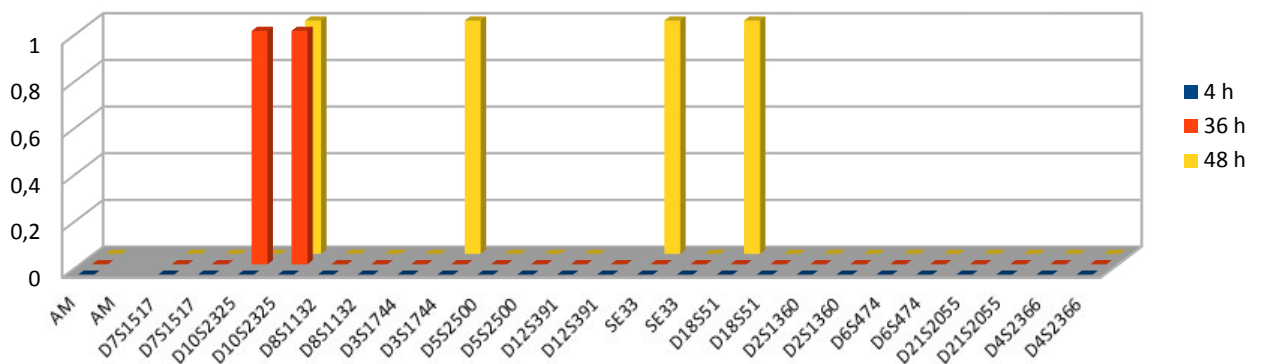
Von der Lagerungsbedingung **Fensterbrett** existieren von Proband A nur die Profile von 4 h und 36 h Stunden. Dabei zeigen sich nur bei 36 h Ausfälle im D10, D5 II, SE33 II, D2 II und D4 II. Diese Ausfälle können sich durch größere Allelabstände und zum Teil durch Fragmentlängen begründen lassen (ausgenommen D10). Somit bleibt Hypothese 1 hier anzweifelbar. Hypothese 2 findet Zustimmung und Hypothese 3 gilt als falsifiziert. Anzunehmen hierbei ist, dass diese *dropout* Phänomene durch die niedrigen Temperaturen oder -schwankungen bedingt sein könnten. Aufgrund des fehlenden Temperaturprofils ist jedoch keine genauere Aussage möglich. (Abbildung 10)

UV-Einfluss (in Form von Sonneneinstrahlung) und seine Auswirkungen, kann hierbei ausgeschlossen werden, da in dieser speziellen Testreihe (Mundschleimhaut) keinerlei *dropout* Ereignisse auftreten. Selbst bei einer Überprüfung der verdünnten Profile nicht. Dies bedeutet, dass Hypothese 4 a) falsifiziert wurde. Aus somit nicht gegebenen Werten bleiben die Hypothesen 1-3 fragwürdig. (Abbildung 10)

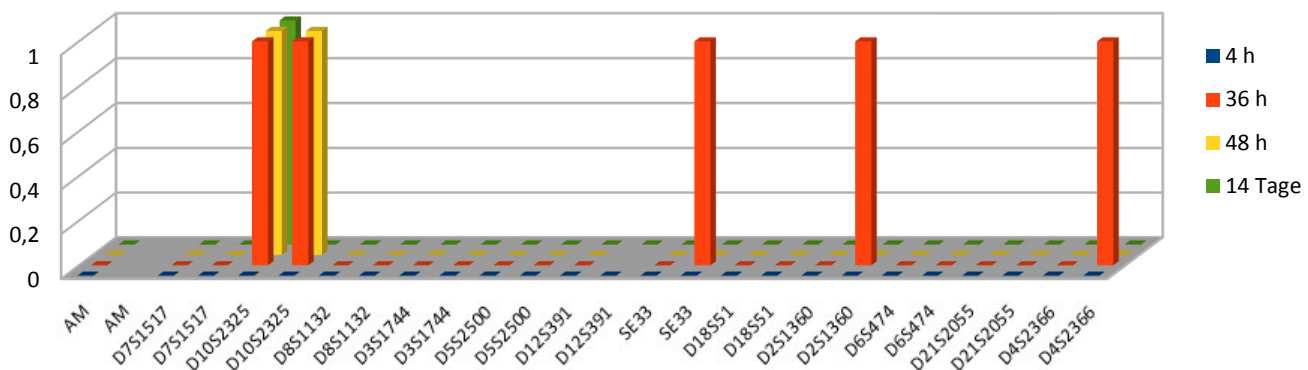
Zusammenfassend kann hier festgestellt werden, dass bei diesem Profil, und dieser Probenart, Temperaturen sehr starken Einfluss auf die STR-Systeme nehmen. Weiterhin ist festzustellen, dass meist das zweite Allele eines *locus dropout* Erscheinungen aufweist, welche bei dem überwiegenden Teil durch hohe Allelabstände bedingt sind. Somit können im Vorfeld gesetzte Hypothesen bestätigt (2 u. 4 c)) und andere (1 u. 3) abgelehnt werden. (Abbildung 10)

Weiterhin ist besonders der immer wieder auftretende *dropout* des D10 unter den Temperaturen auffällig. Aufgrund seiner geringen Fragmentlänge kann eine im Vorfeld gestellte Hypothese (1) nicht angenommen werden, jedoch lässt sich eine Aussage *Tvedebrink's et al* [32] bestätigen. Mit Fragmentlängen von 125/150 bp zählt dieses System zu einem der kürzesten. Da auch beide Allele jeweils ausfallen und nicht nur das zweite, spielen Allelabstände somit eine untergeordnete Rolle. Ebenfalls kann sich aufgrund der Systemkomplexität auch keine Begründung hierfür finden lassen, da der D10 von allen 12 Systemen (ohne Amelogenin) auf Platz 10 steht, was bedeutet, dass er eine sehr geringe Systemkomplexität besitzt. Hypothese 3 ist somit falsifiziert. Einzige Auffälligkeit hier war, dass sich sein Sequenzmuster aus fünf, sich wiederholenden Basen zusammensetzt. Bei allen anderen Systemen ist es zumeist eine Wiederholung von vier Basen. (Quelle zu den Sequenzmustern: Praktikumsbericht [a] und Chimera Mentype Gebrauchsanleitung [6])

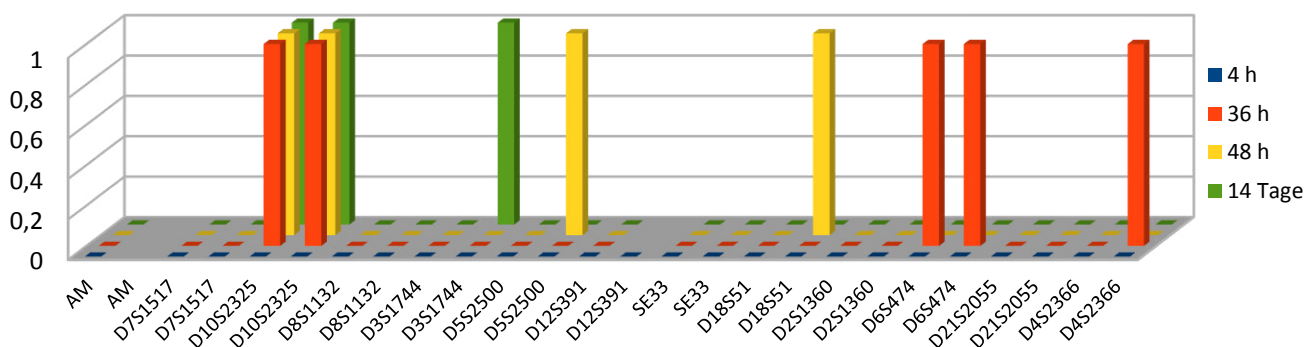
Raumtemperatur, Proband A



5° Celsius Proband A



40°C Proband A



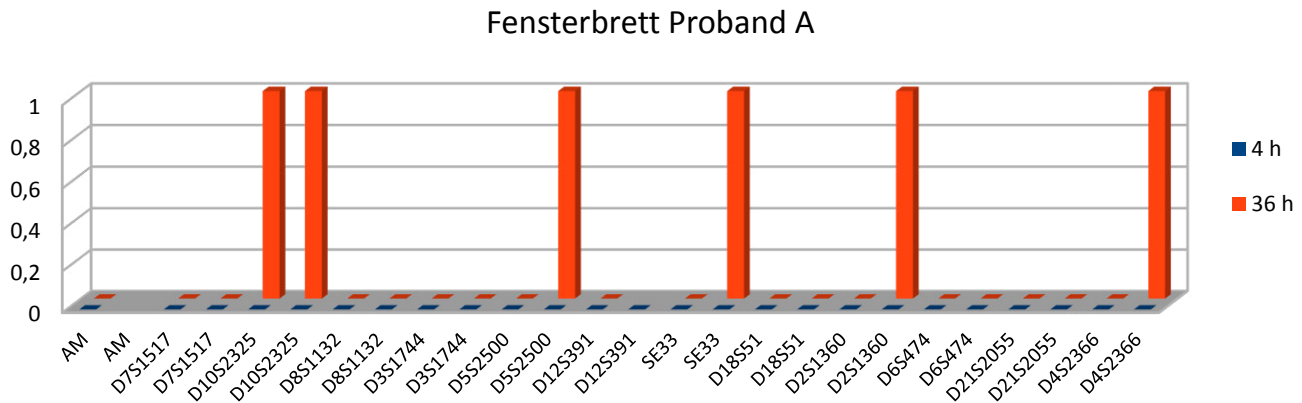


Abbildung 10: dropout Erscheinungen bei Proband A
(1=dropout; 0=Allel vorhanden)

Proband N

Auch bei diesem weiblichen Probanden erscheint ein homozygoten Merkmal im *Locus* D12.

Bei dem Parameter **Raumtemperatur** zeigen sich nach 24 h Ausfälle im D7 II, D10 II, D18 (beide Allele) und D6 I. Nach 48 h liegen *dropout* Ereignisse im D10 (komplett), D8 II, SE33 I und D18 (komplett). Somit liegt ein beständiger Ausfall des D10 und D18 vor. Eine Erhöhung der *dropout* Ereignisanzahl um eins, liegt vor. Evidentlicherweise jedoch in anderen Systemen. Der Komplettausfall beider STR-*Loci* sind nicht durch die Fragmentlänge bedingt, ebenso nicht durch eine Systemkomplexität, da beide Systeme zu den Simpelsten gehören. [a] Falsifizierung Hypothesen 1 und 3. Hypothese 2 anzweifelbar bzw. Tendenz zur Falsifizierung. Ebenfalls Hypothese 4 b). (Abbildung 11)

Bei der Lagerung dieser Proben bei **5° Celsius** liegen nur Profile von 4 h und 48 h vor. Dabei zeigt sich ein einzelner *allelic dropout* im D18 I. Somit scheint diese geringe Temperatur kaum Auswirkungen auf die DNA von Proband N zu haben. Somit lassen sich eher schlechte Aussagen zu den Hypothesen treffen. Der Ausfall im D18 wäre eine Falsifizierung von Hypothese 3 und 2. Eine Bestätigung für 1 kann hier auch eher bedingt getroffen werden, da es System höherer Fragmentlängen gibt. (Abbildung 11)

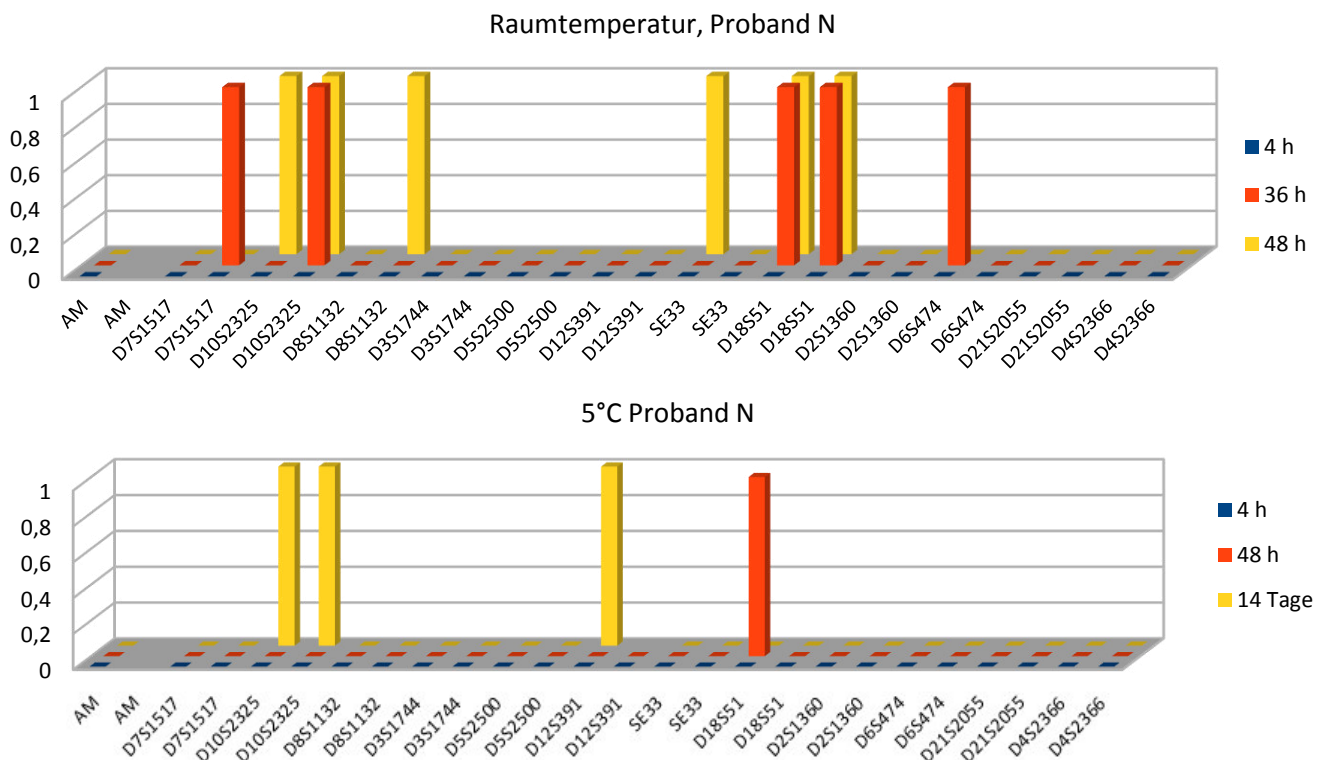
Bei **40° Celsius** werden wiederum gehäufte Ausfälle detektiert. Dabei ist lediglich der *locus dropout* des SE33 konsistent. Ebenfalls liegen nach 36 h mehr *dropout* Ereignisse vor. Ausfälle sind: D10 I, SE33 und D18 komplett. Nach 48 h: D8 I und SE33. Somit lassen sich alle Hypothesen von 1 bis 3 als nicht zutreffend betrachten. (Abbildung 11)

Bei einer **Fensterbrett**lagerung kann ebenfalls nur eine Zeit von 4 und 36 Stunden betrachtet werden. Ausfälle zeigen sich wiederum erst bei 36 h im D7 I, D8 II und

SE33 I. Somit gelten die Hypothesen 1-3 als widerlegt. Ob Temperaturen bzw. Temperaturschwankungen diese *dropout* Phänomene hervorrufen, kann nicht genau bestimmt werden, da dieses Profil, wie vorher erwähnt, scheinbar weniger temperaturanfällig (für niedrige Temperaturen) ist. Aufgrund des fehlenden Temperaturprofils ist jedoch keine genauere Aussage möglich. (Abbildung 11)

UV-Einfluss (in Form von Sonneneinstrahlung) und seine Auswirkungen, kann hierbei ausgeschlossen werden, da in dieser speziellen Testreihe (Mundschleimhaut) keinerlei *dropout* Ereignisse auftreten. Selbst bei einer Überprüfung der verdünnten Profile nicht. Dies bedeutet, dass Hypothese 4 a) falsifiziert wurde. Aus somit nicht gegebenen Werten bleiben die Hypothesen 1-3 fragwürdig. (Abbildung 11)

Zusammenfassend ist auffällig, dass D10 und D18 vermehrt *allelic* oder *locus dropouts* aufweisen. Jedoch kann keine Abhängigkeit der STR-Systemkomplexität festgestellt werden, da beide sehr simpel sind. Falsifizierung Hypothese 3. Bei dem D10 spielt auch die Fragmentlänge keine Rolle, da dieser mit 145/159 Basenpaaren (bp) zu den sehr kurzen Systemen zählt. Der D18 wiederum liegt mit 264/276 bp im oberen zweiten Drittel aller Fragmentlängen. Trotz allem kann hier die Fragmentlänge eher weniger als Faktor gezählt werden. Falsifizierung Hypothese 1. Im gesamten kann auch die 2. Hypothese eher abgelehnt werden. Hypothese 4 c) gilt als angenommen.



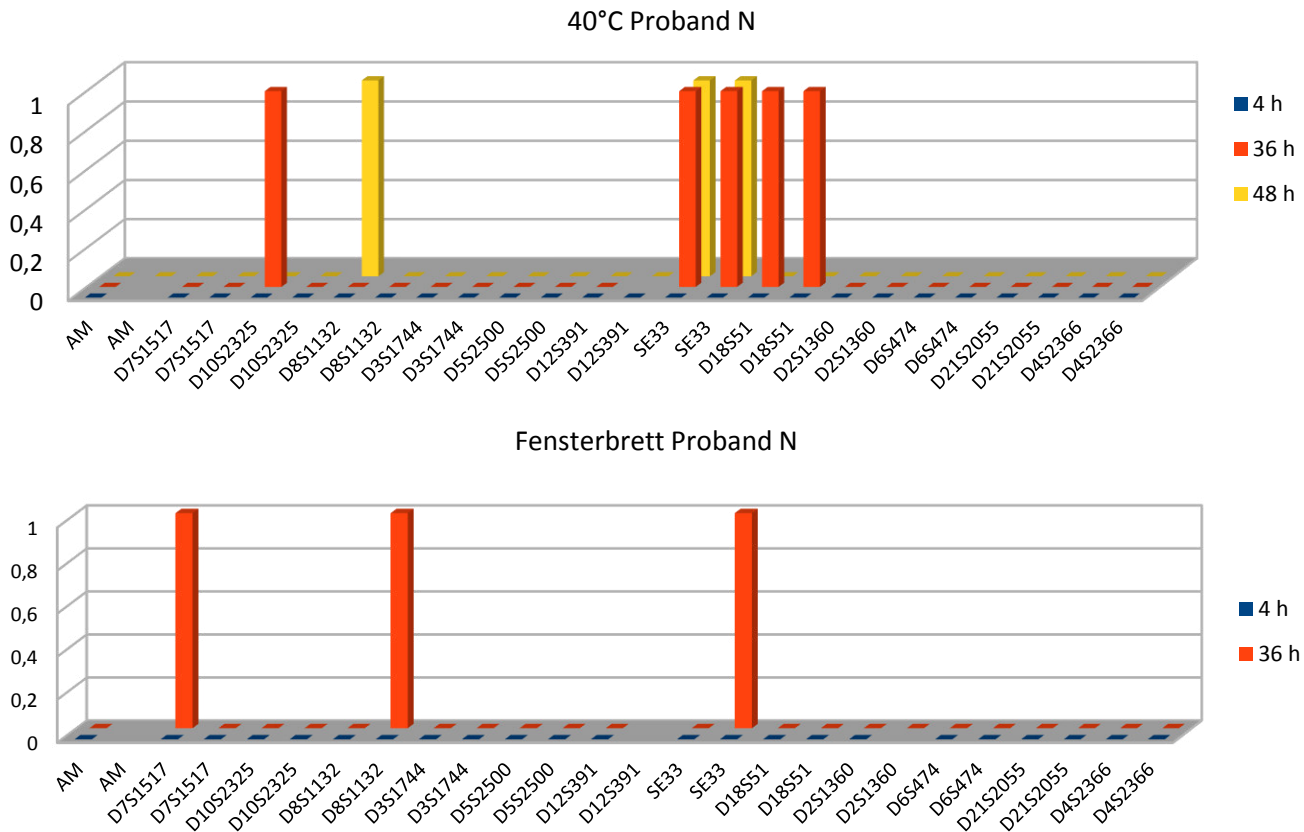


Abbildung 11: dropout Erscheinungen bei Proband N
(1=dropout; 0=Allel vorhanden)

6.2.2 Zusammenfassende Aussagen zu den Mundschleimhautabstrichen

Eine weitere Tatsache neben der Homogenität im gleichen System ist, dass D2 I = D2 II, D8 II bei beiden Proben dasselbe Allel und D5 I = D5 II ist. (Tabelle 2) Weiterhin ist auffällig, dass Mundschleimhautabstriche bei UVC Bestrahlung scheinbar unbeeinflusst bleiben. Jedoch scheinen Temperaturen über einen längeren Zeitraum erhebliche Auswirkungen auf dieses Probenmaterial zu haben. Dabei ist zu beachten, dass das Profil bzw. die DNA von Probandin A deutlich anfälliger erscheint. Eine mögliche Ursache hierfür könnten die deutlich größeren Fragmentlängen und Allelabstände sein. Hypothese 4 a) falsifiziert.

Maker	Proband A		Proband N	
	Allele	Size (bp)	Allele	Size (bp)
AM	X	76,96	X	76,92
AM	X	76,96	X	76,92
D7S1517	17	112,26	22	132,53
D7S1517	21	128,53	25	144,13
D3S1744	18	185,98	17	181,92
D3S1744	21	198,36	20	194,17
D12S391	18	225,85	20	234,46
D12S391	h		h	
D2S1360	22	293,76	21	289,72
D2S1360	24	301,84	22	293,8
D6S474	13	353,85	15	361,99
D6S474	14	357,92	16	366,07
D4S2366	9	429,71	11	437,82
D4S2366	14	450,26	13	446,07
D8S1132	21	151,62	18	140,14
D8S1132	22	155,49	22	155,49
D5S2500	11	196,42	10	192,13
D5S2500	12	200,07	11	196,07
D18S51	13	260,67	14	264,75
D18S51	22	295,05	17	276,05
D21S2055	25	387,03	16,1	351,22
D21S2055	26	391,14	20,1	367,45
D10S2325	7	125,92	11	144,94
D10S2325	12	150,17	14	159,32
SE33	21	261,49	17	245,5
SE33	26,2	282,09	29,2	293,66

Unter **Raumtemperatur** ergeben sich bei 36 h Gemeinsamkeiten im Ausfall des D10 II, welche auch bei 48 h konstant bleibt. Ebenfalls zeigen der SE33 I und D18 I bei dieser Zeit gemeinsame Ausfälle im Probenmaterial. Alle anderen *allelic dropout* erschienen jeweils nur in einer von beiden Proben. Somit gilt hier generalisiert, dass Hypothese 3 falsifiziert ist, sowie Hypothese 1. Hypothese 2 gilt individuell und ist somit anzweifelbar.

Bei einer Lagerung von **5° Celsius** zeigen sich innerhalb beider Probanden keinerlei Gemeinsamkeiten. Proband A scheint hier eine anfälliger DNA zu besitzen als N. Die detektierten Allelausfälle treten hierbei auch nicht in den selben Systemen oder *Loci* auf. Eine generelle Beurteilung der Anwendbarkeit der Hypothesen ist hier somit erschwert.

Auch ist mit zwei Probanden ein zu geringer Testumfang vorhanden um klare Entscheidungen treffen zu können.

Die Bedingung von **40° Celsius** bewirkt im D10 I Ausfälle in den Mundschleimhautprofilen. Andere Gemeinsamkeiten lassen sich nicht finden. Im Gesamten gilt Hypothese 3 als falsifiziert, Hypothese 1 als zweifelhaft mit der Tendenz zur Falsifizierung. Ebenso Hypothese 2.

Der Ausfall des SE33 II nach 36 h stellt hier die einzige Gemeinsamkeit im Spurenmaterial bei der Lagerung auf dem **Fensterbrett** dar. Eine klare Beurteilung der Hypothesen ist auch hier wieder nicht möglich. Jedoch zeigt sich aus dem vorhergehenden Individualbetrachtungen, dass alle Hypothesen die Tendenz zur Falsifizierung aufweisen.

Da sich unter **UVC** bei beiden Probanden keine *dropout* Ereignisse zeigen, kann eine DNA-Profilbeständigkeit bei diesem Probenmaterial als Gemeinsamkeit der Probanden betrachtet werden. Hypothese 4 a) falsifiziert. Zu allen anderen ist keine Aussagen möglich, aufgrund keinerlei *dropout* Phänomene, Somit anzweifelbar oder sogar falsifizierbar.

In allen gemeinsam erstellten Diagrammen eines Spurenmaterial aus allen Probanden steigt insgesamt eine *allelic dropout* Anzahl. Bestätigung Hypothese 4 c).

6.3 Vergleiche der Tauglichkeit unterschiedlichen Spurenmaterials

Schon im Vorfeld sollte erwähnt werden, dass bei einem Allelvergleich der Profile deutlich ersichtlich ist, dass es zwischen den Speichelproben und Mundschleimhautabstrichen der Probanden weniger Gemeinsamkeiten der Allele gibt. Ebenfalls sollten alle hier ermittelten Ergebnisse kritisch betrachtet werden, da es sich um einen Vergleich von verdünnten und unverdünnten Proben handelt. Wie erwähnt sind dies alle Profile, in welchen Degradationserscheinungen zu verzeichnen waren. Abbildungen werden nur von den signifikantesten Unterschieden dargestellt.

Bei den Profilen unter **Raumtemperatur** ist deutlich zu erkennen, dass Speichel hier sehr wenige Ausfälle zeigt und wenn, dass diese nur bei vereinzelt Proben auftreten.

Die Profile des Speichels liegen selbst im verdünnten Zustand zumeist komplett vor. (Abbildung 12)

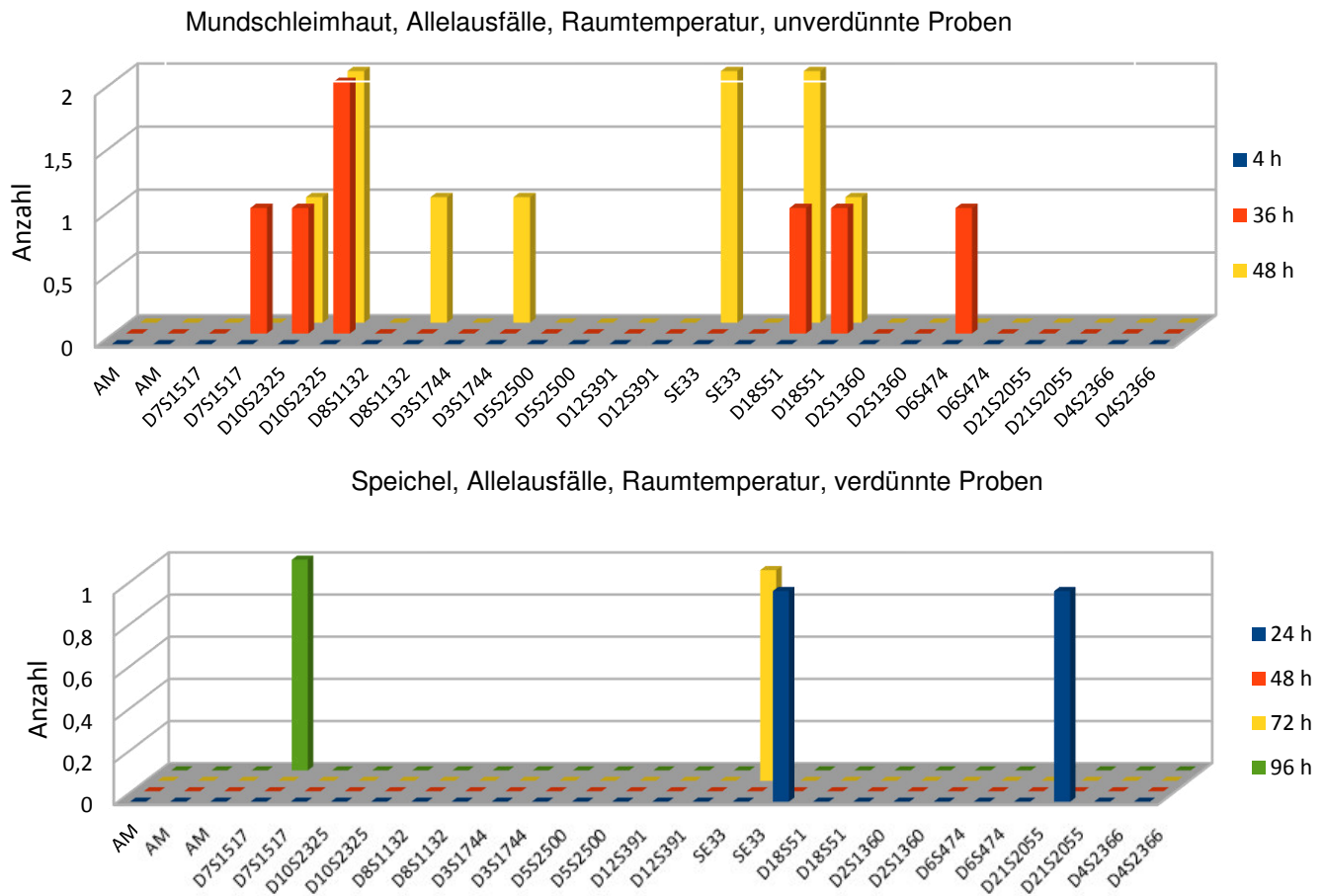


Abbildung 12: deutlich erkennbare Unterschiede in den *dropout* Erscheinungen in dem unterschiedlichen Spurenmaterial unter Raumtemperatur, dargestellt über den Zeitlichen Verlauf, sortiert nach Fragmentlänge; beispielhaft für andere Temperaturparameter
(1= Ausfall bei einem Probanden; 2= bei 2 Probanden; 3= bei 3 Probanden)

Ebenfalls spiegelt sich auch in den andern beiden **Temperaturparametern** wieder, dass hier die Mundschleimhautabstriche deutlich mehr *dropout* Ereignisse zeigen. Einzige Auffälligkeit bieten die 24 Stunden bei Speichel. Die scheint jedoch andere Gründe zu haben und ist nur durch einen Probanden bedingt. Diese Auffälligkeit wird an anderer Stelle thematisiert.

Bei genauerer Betrachtung der **Fensterbrettlagerung** belegt sich ebenfalls schon der bereits erwähnte Unterschied. In den Speichelprofilen gibt es nach 24 h Ausfälle, welche jedoch nicht erneut erschienen. Da von den Mundschleimhautabstrichen hier nur Profile der 4 und 36 Stunden Reihe vorliegen zeigen sich nur nach 36 h Ausfälle. Ob diese jedoch beständig bleiben kann nicht gesagt werden. Was zu erkennen ist, ist das *dropout* Phänomene bei beiden Probenarten meist nur in einem Profil vorkommen und nicht bei

allen. Somit stellt dies ebenfalls eine Beeinträchtigung der Vergleichbarkeit dar. Ebenfalls wird angenommen, dass *dropout* Ereignisse der Speichelproben durch Sonneneinstrahlung (UV) entstanden sein könnten, wohingegen die Ausfälle bei Mundschleimhaut vermutlich von geringen Temperaturen rühren.

Offensichtlich ist, dass die Profile der Mundschleimhaut unter **UVC** Einwirkung deutlich beständiger sind bzw. nicht zu Ausfällen neigen. Die Speichelproben jedoch zeigen deutliche Ausfälle, welche bei allen Probanden auftreten. UVC scheint auch die einzige Bedingung zu sein, bei welcher *allelic* und *locus dropout* Ereignisse Fragmentlängen bedingt zu sein scheinen. (Abbildung 13)

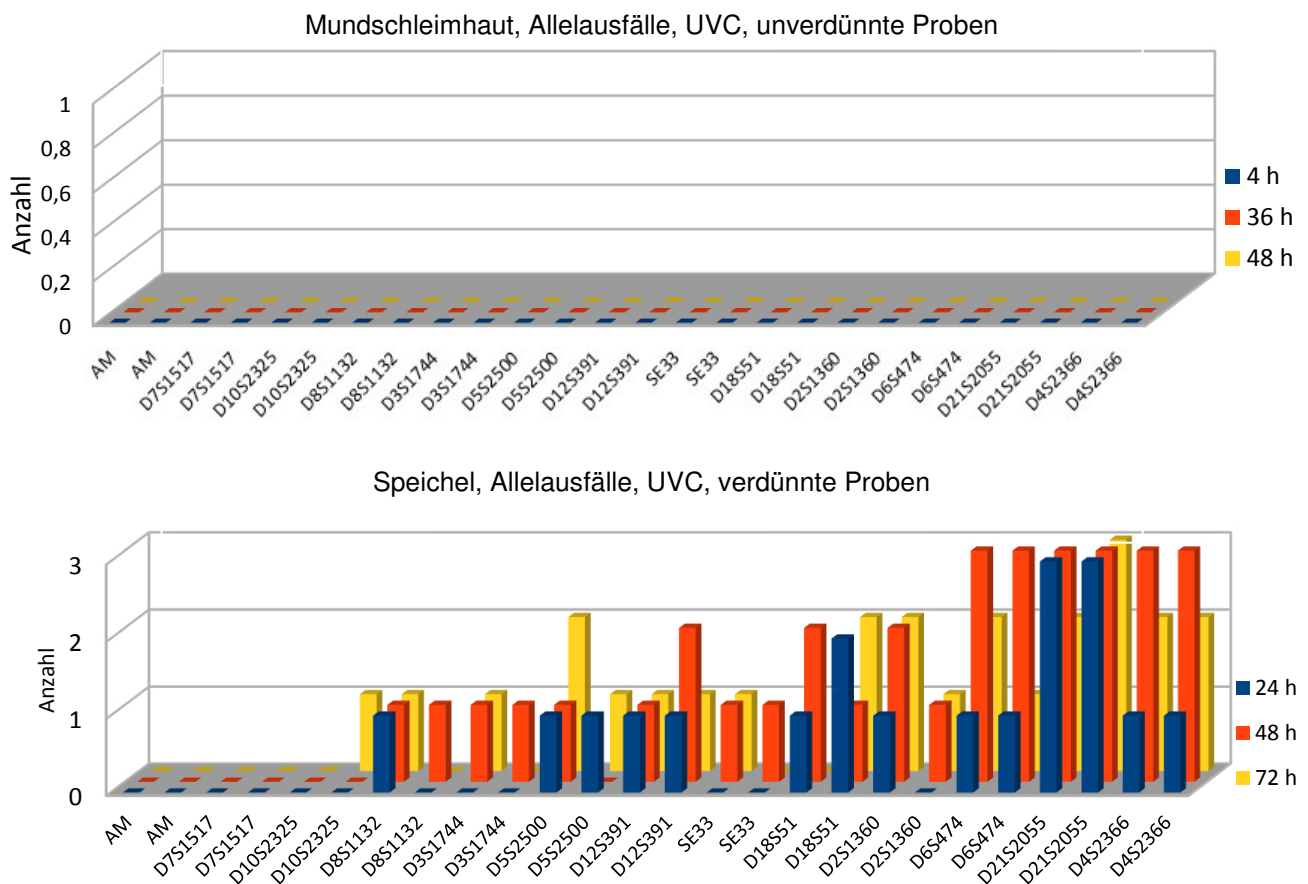


Abbildung 13: deutlich erkennbare Unterschiede in den dropout Erscheinungen in dem unterschiedlichen Spurenmaterial nach UV-C Einfluss, dargestellt über den zeitlichen Verlauf, sortiert nach Fragmentlänge; (1= Ausfall bei einem Probanden; 2= bei 2 Probanden; 3= bei 3 Probanden)

Anhand aller gesammelten Daten und Ergebnisse lässt sich für die Temperaturparameter, sowie der Fensterbrettlagerung die 6. Hypothese falsifizieren. Hier liegt die Vermutung nahe, dass Speichel, durch die Tatsache der Nahrungsaufnahme, temperaturbe-

ständig sein könnte. Lediglich unter UVC lässt sich Hypothese 6 bestätigen. Die Vermutung geht hierbei in die Richtung, dass die in der Mundschleimhaut deutlich erhöhte Epithelanzahl hier eine Rolle spielt.

6.4 Degradationserscheinungen der 14 Tage Testreihe (Testreihe 3)

Bei einem Vergleich zeigt sich hier wieder, dass in den Reihen der unverdünnten DNA deutlich mehr Ausfälle auftreten, als in den verdünnt angesetzten Reihen. Im Allgemeinen ordnen sich diese Profile eher weniger in den vorherigen zeitlichen Probandenverlauf ein. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei den vorhandenen 14 Tage Profilen weniger Ausfälle auftreten, als zuvor. Ebenfalls ist zu sehen, dass schon innerhalb eines Probenmaterials deutliche Unterschiede bestehen, welche auf enthaltene DNA-Menge einer Probe oder den *Shedder*status zurückzuführen sein können.

Es zeigt sich, dass hier nach einer 14 tägigen Lagerung bei **5° Celsius** in den **1:10** verdünnten Proben keinerlei Ausfälle zu verzeichnen sind. Dies ist jedoch ein Widerspruch zu den ermittelten Profilen des Speichels. (siehe 6.1.1)

Bei den **unverdünnt** vorliegenden Profilen ergeben sich wiederum in beiden Profilen der Mundschleimhaut *dropout* Ereignisse, sowie in den Speichelprofile von P9 und P19. Bei den Mundschleimhautproben zeigen sich vermehrt Ausfälle bei PN. Dies könnte als Widerspruch zu den vorherigen Ergebnissen gesehen werden, da PA sehr viele Ausfälle unter dieser Temperaturbedingung bot, welche nun wegfallen. Anhand bisheriger Ergebnisse könnte das nun erhaltene 14 Tage Profil von N jedoch einen vermutlichen, oder so zu erwarteten Verlauf widerspiegeln. (siehe 6.2.1) Die Phänomene bei P9 und P19 liegen im minimalsten Bereich und könnten somit eine normale Degradation darstellen. Bei P20, P6 und P7 sind keine Ausfälle zu verzeichnen. Für P6 und P7 können jedoch keinen genauen Aussagen getroffen werden, da für beide Probanden keine Degradationsexperimente angesetzt waren. Besonders Auffällig hierbei ist wieder der Ausfall des D10 in den Proben A, N und 9.

Bei der Bedingung **40° Celsius** ließen sich ebenfalls wieder in den unverdünnten Profilen keine Ausfälle detektieren, außer bei PA. Da bei den 1:10 Profilen der Mundschleimhaut immer eine Vollständigkeit vorlag (bis 96 h), ist dieser eine Ausfall nach 14 Tagen nicht verwunderlich, da schon viel früher in dieser Testreihe Ausfallerscheinungen er-

wartet wurden. Bei der unverdünnten Testreihe zeigen sich bei allen Profilen starke *dropout* Ereignisse. Dabei sind in den Speichelproben deutlich mehr Ausfälle zu verzeichnen als in den Mundschleimhautabstrichen. Aus vorhergehenden Erkenntnissen sollten jedoch in der Mundschleimhaut mehr *dropouts* zu verzeichnen sein, als bei den Speichelproben. Ebenso sollte hier generell eine erhöhte *dropout* Zahl hier vorliegen, da schon nach wenigen Stunden mehr *allelic dropouts* in den Mundschleimhautprofilen zu verzeichnen waren. Die hier detektierte Anzahl würde jedoch eine Abnahme der Phänomene bedeuten. Die *dropout* Ereignisse der Speichelproben sollten jedoch nicht in der unverdünnten Reihe so häufig erscheinen. Nach bisherigen Ergebnissen wären diese in der 1:10 Reihe zu erwarten. Das Nichtauftauchen der *dropout* Ereignisse in dieser würde wie eine Abnahme der Phänomene bedeuten und keine Konstante oder Zunahme darstellen, wie es eigentlich zu erwarten ist.

Im Allgemein ist hier auffällig, dass bei den Temperaturparametern besonders der D10 zu *dropout* Ereignissen neigt. Von der Systemkomplexität gehört dieser aber scheinbar zu den simpelsten Systemen und auch die Fragmetlänge ist eine der kürzesten. Einzige Auffälligkeit bietet jedoch das Wiederholen von fünf Basen im *Repeat*motiv statt nur vier.

Von den Proben der **UVC**-Bestrahlung wurden nur unverdünnte Proben verwendet. Diese zeigen, dass außer bei PA in jedem Profil *allelic* oder *locus dropouts* zu verzeichnen sind. Der Großteil hier liegt wieder auf Seiten der Speichelproben, was zu den bisherigen Ergebnissen passt. Dabei wurden jedoch bei P6 und P7 jeweils nur ein *allelic dropout* erfasst, bei Proband P9 und P20 sind es drei und bei P19 sechs. Anhand der vorhergehenden Auswertung (5.1 ff) wäre jedoch zu erwarten, dass P20 die meisten Ausfälle vorweist, da dieses Profil sehr instabil war. Eine mögliche Begründung hierfür wäre das Vorhandensein von genügend DNA, da keine Verdünnung vorliegt. Da generell unter UVC-Bestrahlung eine erhöhte *dropout* Rate erwartet wurde, passen die ermittelten Profile gut und bestätigen diese Annahme.

Bei einer Betrachtung aller Parameter und der festgestellten Tatsache, dass weniger *dropout* Phänomene zu verzeichnen sind, lässt sich für alle Hypothese 5 falsifizieren. Die Systemkomplexität scheint bei allen Proben wiederum eine untergeordnete Rolle zu spielen, womit Hypothese 3 falsifiziert wurde. Hypothese 1 lässt sich in einigen Speichelproben Bestätigen, jedoch nicht bei der Mundschleimhaut. Zu Hypothese 2 sind keine genauen Aussagen möglich, da zumeist *locus dropouts* vorliegen.

6.5 Auswertung Fragment Analyzer™ Daten und Vergleich mit STR-Profilen

Hierbei zeigen sich jeweils schon zwischen den Probanden starke Unterschiede der Profilqualitäten und den erhaltenen Elektropherogrammen. Aus diesem Grund wurde der angesetzte Punkt eines gemeinsamen Anlegens von zeitlichen Verläufen innerhalb einer Probenart nicht vorgenommen. Im Folgenden werden nun probandenweise Auswertungen erfasst und gleichzeitig kommt es zu den Vergleichen mit den STR-Profilen. Dabei wird versucht schon hier generalisierte Aussagen zu treffen, ob anhand der ermittelten Daten Rückschlüsse auf die STR-Profile bzw. die Profilqualität möglich sind. Zudem ist es auch nur begrenzt möglich, anhand der Fragment Analyzer™ Daten Aussagen zu beständigen *Peaks* zu treffen. Der Grund hierfür liegt in der stark variierenden ermittelten DNA-Konzentration sowie einem unterschiedlichem Fragmentierungsgrad der Proben. Anhand der ermittelten prozentualen Anteile der *Peaks*, sowohl an der TIC als auch der gesamten DNA-Menge sollen näherungsweise Rückschlüsse gezogen werden.

Eine weitere Auffälligkeit bei allen Profilen zeigt der prozentuale TIC Anteil an der gesamt ermittelten DNA-Konzentration. Dieser fluktuiert innerhalb einer Zeitreihe sehr stark. Eine Abnahme der TIC ist nicht zu beobachten. In einigen Fällen kommt es sogar zu einer Zunahme der ermittelten TIC Anteile an der gesamten DNA. (Anlage 2 Falsifizierung Hypothese 7 und 7 a).

Ein weiterer Rückschluss hierfür wäre, dass, wenn im zeitlichen Verlauf die *Peak*höhen abnehmen, dies für eine Abnahme der Fragmentierung spricht. Wenn kleinere *Peaks* ebenfalls abnehmen oder verschwinden, bedeutet dies umgekehrt, dass längere Fragmente vorliegen. Steigt jedoch im zeitlichen Verlauf die *Peak*höhe, ohne dass kleinere *Peaks* verschwinden, bedeutet dies, dass in diesem Fragmentlängenbereich eine größere Fragmentierung vorliegt, welche die TIC ansteigen lassen könnte. Zu beachten ist, dass ein großer *Peak* über 2000 bp jedoch im zeitlichen Verlauf abnehmen sollte, da anzunehmen ist, dass eine Fragmentierung zunimmt.

6.5.1 Probandenbetrachtungen

Proband 9

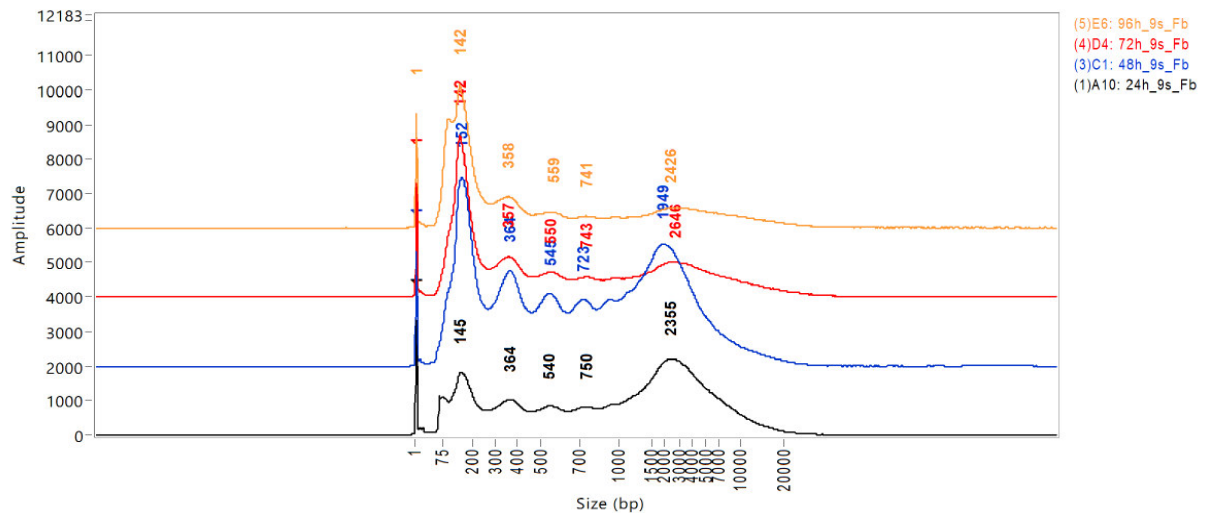


Abbildung 14: beispielhafter Fragmentierungsverlauf Proband 9; hier Parameter Fensterbrett; Elektropherogramme aller Parameter auf Anfrage erhältlich

Im Elektropherogramm (vgl. Abbildung 14) zeigen sich bei jeder Zeitreihe eine Vielzahl von *Peaks*. Diese könnte zum einen für eine fragmentierte DNA sprechen, bei welcher ein gehäufter DNA Bruch vorliegt, zum andern könnte es jedoch auch eine normale DNA Erfassung darstellen, bei welcher bestimmte *Peaks* im Elektropherogramm des Fragment Analyzer™s einem bestimmten Fragmentlängenbereich des STR-Profiles darstellen.

Im ersten Fall kommt es zu einer ausführlichen Betrachtung der **5° Celsius** Lagerung. Wenn nun hier die erste Aussage angenommen würde, müssten sich im STR-Profil *allelic dropouts* zeigen, was jedoch nicht der Fall ist. Jedoch bieten sich im ermittelten STR-Elektropherogramm sehr viele *Off Ladder Peaks*, was für eine hohe Fragmentierung sprechen könnte. Ebenfalls ist der gesetzte Signalstärkenbereich von 50 rfu bei diesem nicht erreicht. (vgl. Abbildung 14)

Bei Annahme der zweiten Aussage würde das Fehlen einiger *Peaks* im Fragment Analyzer™ bedeuten, dass hier *dropout* Ereignisse in bestimmten Fragmentlängenbereichen erschienen. Werden nun einmal die Ergebnisse der 72 h Reihe betrachtet, ist auffällig, dass es nur einen *Peak* bei ca. 140 bp und einen bei >2000 gibt. Unter der gegebenen Annahme kommt es zu dem Schluss, dass hier Fragmentlängen im mittleren Bereich ausgefallen sein müssten. Bei Hinzuziehen des STR Profils zeigt sich hier jedoch

Vollständigkeit. Ebenfalls wurden im STR-Elektropherogramm kaum *OL-Peaks* oder andere großartige Ausschläge ermittelt. Lediglich der gesetzte rfu Bereich wurde nicht eingehalten.

Aufgrund dieser Feststellung kann gesagt werden, dass die erste Annahme „Eine Vielzahl von *Peaks* spricht für eine fragmentierte DNA“ geltend gemacht wird. Somit wird im Folgenden nur noch mit dieser weitergearbeitet. Es zeigt sich, dass in jedem Profil, welches im Elektropherogramm mehrere *Peaks* aufweist, *OL-Peaks* im STR-Bild erscheinen. Somit scheint hier schon mal ein Zusammenhang zur Profilqualität zu bestehen. Weiterhin ist ersichtlich, dass der Fragmentierungsgrad im zeitlichen Verlauf sinkt.

Bei der Analyse über die Veränderung von *Peaks* innerhalb der Fragment Analyzer™ Daten zeigt sich, dass der Anteil langer Fragmente (>2000 bp) im zeitlichen Verlauf steigt, obwohl in den Profilen jeweils eine erhöhte Fragmentierung ersichtlich ist. Wie jedoch erwähnt sinkt diese mit zunehmender Zeit, was durch eine Abnahme von kleinen *Peaks* verdeutlicht wird. Ein Wegfall einiger *Peaks* bedeutet somit bei diesem Versuch, dass die Profilqualität steigt und lange Fragmente vorliegen.

Unter der Bedingung von **40° Celsius** zeigt sich im Fragment Analyzer™, dass eine zunehmende Fragmentierung der Profile stattfindet. Wie zuvor gesagt, wird dies durch ein steigendes auftreten kürzerer Fragmentlängen verursacht, sowie einer Abnahme des *Peaks* über 2000 bp (in diesem Falle von ursprünglich über 6000 bp). In STR-Profilen spiegelt sich ebendas durch nicht Erreichen der minimalen rfu und einem vermehrten Auftreten von *OL-Peaks* im zeitlichen Verlauf wieder. (vgl. Abbildung 14) Bestätigung der Hypothesen 8 a) und b).

Eine Lagerung auf dem **Fensterbrett** zeigt, dass im zeitlichen Verlauf alle Proben stark fragmentiert sind. Ebenfalls bieten die STR-Profile eine schlechte Qualität. Zwar gibt es hier eher weniger erfasste *OL-Peaks*, jedoch sind bei allen vorhandenen *Peaks* die Höhen unterhalb der gesetzten rfu. Ebenfalls ergibt sich im Fragment Analyzer™, dass bei einer größeren Fragmentlänge eines kleineren *Peaks* der Konzentrationsanteil eines größeren deutlich geringer ausfällt. Dies entspricht einem stärkeren Fragmentierungsgrad und den eingangs erwähnten Vermutungen. (Abbildung 14) Bestätigung der Hypothesen 8 a) und b).

Die Bedingung **Raumtemperatur** zeigt eine zunehmende Fragmentierung der DNA. Dies spiegelt auch das STR-Profil wieder. Jedoch ist ein Erfassen von *dropout* Ereignissen wiederum nicht möglich. (vgl. Abbildung 14) Bestätigung der Hypothesen 8 a) und b).

Durch **UVC** Einfluss war die höchste Fragmentierung zu erwarten, was sich jedoch nicht in den Daten widerspiegelt. Zwar steigt ersichtlicher Weise die Fragmentierung, aber dennoch besteht keine Steigerung zwischen 48 h und 96 h. Ebenfalls bleiben die ermittelten Fragmentlängen *Peaks* hier relativ beständig. Diese Tatsache lässt sich im STR Profil jedoch nicht wiederfinden, da hier in allen Zeiten sehr gut Profile vorliegen. Es sind keine *OL-Peaks* zu verzeichnen. Ebenso ist auch bis auf vereinzelte Systeme ein angegebener *rfu*-Schwellwert erreicht worden. Einen Anstieg der Systeme, welche diesen Schwellwert nicht erreichen, ist auch nicht zu verzeichnen. Somit liefert das UV-STR-Profil deutlich bessere Werte als der Fragment Analyzer™. (vgl. Abbildung 14) Die Hypothesen 8 a) und b) sind anzweifelbar.

Im Allgemeinen ist das STR-Bild des UVC von allen Bedingungen das Beste, obwohl hier zu erwarten war, dass es sehr schlecht ausfallen sollte.

Proband 19

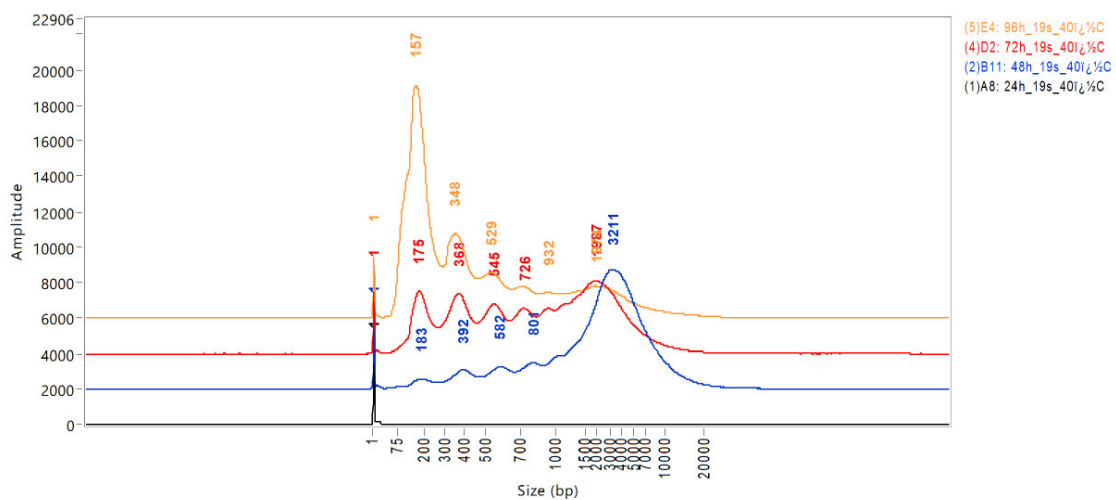


Abbildung 15: beispielhafter Fragmentierungsverlauf Proband 19; hier Parameter 40°C; Elektropherogramme aller Parameter auf Anfrage erhältlich

Beginnend mit der Lagerung bei **5° Celsius**, zeigt sich bei diesem Probanden, eine starke Fragmentierung, welche jedoch mit steigender Zeit abzunehmen scheint. In den STR-Profilen spiegelt sich diese Tatsache teilweise wieder. Bei der Veränderung von 72 h auf 96 h nehmen die ermittelten *OL-Peaks* im STR-Bild ab und somit liegt eine weniger fragmentierte DNA vor. Das 48 h Profil erscheint als das beste Bild. Im Fragment Analyzer™ spiegelt sich dies auch wieder, da trotz Fragmentierung jedoch die längsten Fragmentstücke im Vergleich vorliegen. (vgl. Abbildung 15) Falsifizierung der Hypothesen 8 a) und b).

Ebenfalls ist eine starke Fragmentierung aller Proben bei **40° Celsius ersichtlich**. Eine Umlage auf die STR-Profile ist nicht möglich, da nur verwertbare Bilder von 48 h und 72 h vorhanden sind. Jedoch liegt hier nur ein unwesentlicher Anstieg von *OL-Peaks* vor. Allgemein ist bei den Profil-Screenshots zu sehen, dass alle Signalstärken unterhalb der rfu von 50 liegen. (Abbildung 15) Bestätigung der Hypothesen 8 a) und b).

Bei der **Fensterbrett**lagerung zeigen sich deutlich verschiedenen DNA-Profile. Im Elektropherogramm ist schon ersichtlich, dass hier eine besonders große Schwankung der enthaltenen DNA-Mengen vorliegt. Jedoch bietet sich als Gemeinsamkeit auch hier wieder eine starke Fragmentierung. Weiterhin verdeutlicht sich, dass mit der Zeit diese Fragmentierung zunimmt. Dies wird durch die Abnahme der Fragmentlängen*peaks* und dem Wegfall einiger *Peaks* deutlich. In den STR-Bildern äußert sich die Fragmentierung durch ein gehäuftes Erscheinen von *OL-Peaks*. Der Wegfall einiger *Peaks* kann jedoch nicht mit *dropout* Ereignissen in Verbindung gebracht werden. Ebenso wenig mit der Signalstärke, welche in allen Profilbildern zwar unterhalb der gesetzten rfu, jedoch bei allen Profilen im selben Bereich liegt. (vgl. Abbildung 15) Bestätigung der Hypothesen 8 a) und b).

Unter **Raumtemperatur**, welche eine relativ häufige Lagerungsbedingung von Speichelproben darstellen sollte, ist ebenfalls eine starke Fragmentierung ersichtlich, welche sich auch in den STR-Profilen wiederfinden lässt. Weiterhin ergab sich im Fragment Analyzer™, dass bei der 48 h Probe eine hohe DNA-Konzentration vorhanden war. Es manifestiert sich zudem eine Zunahme kleinerer Fragmentlängen*peaks*, als Folge der Abnahme größerer *Peaks*. In den STR-Bildern wird diese Fragmentierung der DNA durch ein vermehrtes detektieren von *OL-Peaks* dargestellt. Ebenfalls zeigt sich hier, dass die Signalstärken über den zeitlichen Verlauf annähernd gleich bleiben, jedoch zeugen die Profile von einer schlechten Qualität, da sie die minimal festgesetzte rfu nicht erreichen. (vgl. Abbildung 15) Bestätigung der Hypothesen 8 a) und b).

Die Lagerung der Probe unter **UVC** belegt, dass eine erhöhte Fragmentierung hier stattgefunden hat, welche mit der Zeit zunimmt. Bei der 96 h Probe erscheinen lediglich zwei kurze *Peaks*. Diese würden, nach jetziger Annahme, für vermehrte *dropout* Ereignisse sprechen, welche sich jedoch bei der STR-Profilbetrachtung nicht wiederfindet. Zwar erscheinen im Bild die drei längsten Fragmente als nicht erfasst bzw. nicht vorhanden, aber in dem dazugehörigen Werteprofil wurden diese erfasst. Somit ist eine Umlage der Phänomene nicht möglich. Ebenfalls zeigen die UVC-STR-Profile eine sehr gute Qualität mit einer gut erfassten Signalstärke über dem Schwellwert. Wiederholend ist auch hier ersichtlich, dass die ermittelten Profile von deutlich besserer Qualität zeugen, als die

Profile der Temperaturparameter. Auch bieten diese STR-Profile kaum *OL-Peaks*, womit sich die im Fragment Analyzer™ erfasste Fragmentierung nicht widerspiegelt oder erklären lässt. (vgl. Abbildung 15) Bestätigung Hypothesen 8 a) und b).

Auch bei den Proben dieses Probanden scheinen Temperaturen einen erhöhten Einfluss auf den Fragmentierungsgrad zu haben, welche jedoch keinen Einfluss auf *dropout* Ereignisse im STR-Profil besitzen.

Proband 20

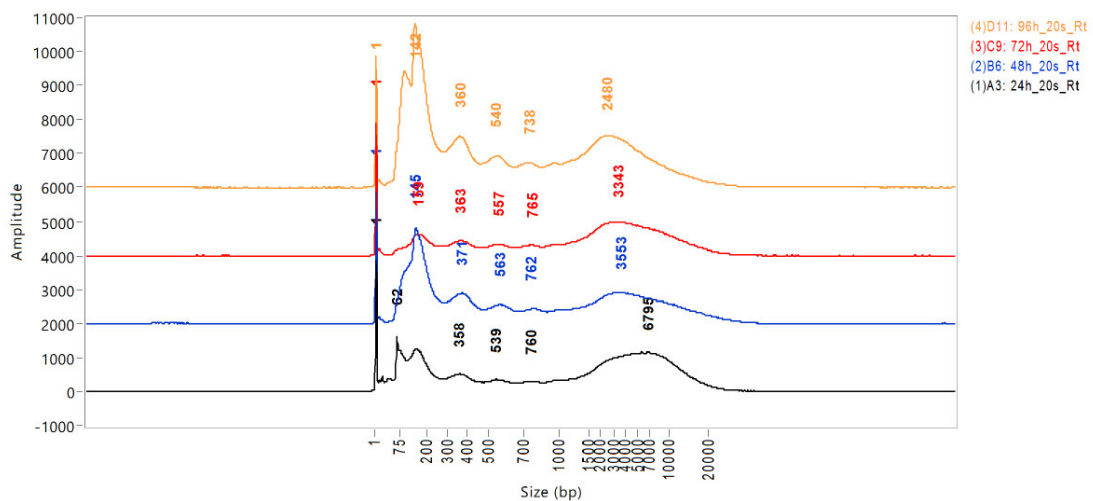


Abbildung 16: beispielhafter Fragmentierungsverlauf Proband 20; hier Parameter Raumtemperatur; Elektropherogramme aller Parameter auf Anfrage erhältlich

Hier zeigt sich im Elektropherogramm von **5° Celsius**, dass nur die Zeiten 24 h und 72 h ausgewertet werden können. Bei 48 h war zu wenig DNA enthalten, wodurch kein Profil erstellt werden konnte. Was bei 96 h schiefgelaufen ist, kann ebenfalls nicht gesagt werden, vermutlich wurde vergessen eine Probe einzupipettieren. Der Verlauf der verwertbaren Profile verdeutlicht eine gewisse Abnahme der Fragmentierung der *Peaks* <700bp. Das Absinken des *Peaks* >2000 bp hat zur Folge, dass ein *Peak* einer Fragmentlänge von größer 70bp detektiert werden kann. Somit steigt in diesem Bereich die Fragmentierung. In den STR-Profilen spiegelt sie sich nicht wieder. Bei beiden ist eine schlechtere Qualität vorhanden, jedoch werden bei 72 h weniger *OL-Peaks* detektiert als bei 24 h. (vgl. Abbildung 16) Bestätigung der Hypothese 8 b), jedoch Falsifizierung Hypothese 8 a).

Das Verhalten der Fragmentierung bei **40° Celsius** verläuft nach der gestellten Annahme (8 a) und b)): im zeitlichen Verlauf steigt die Fragmentierung. Dabei bietet das

24 h Profil eine kaum vorhandene Fragmentierung. Ebenfalls erscheinen mit der Zeit neue kleinere *Peaks* und der *Peak* >2000 Basenpaaren wird verringert. Im STR-Profil kann dies durch Auftauchen von *OL-Peaks* und einer geringen Signalstärke bestätigt werden. (vgl. Abbildung 16)

Die Testreihe der Probenlagerung auf dem **Fensterbrett** zeigt ab 48 h eine ähnliche Fragmentierung. Einzige Auffälligkeit bietet der *Peak* >2000 bp, da dieser mit der Zeit zunimmt, anstatt sinkt. Eine Erklärung hierfür gibt es nicht, da ein Anstieg der anderen *Peaks* bemerkbar ist, was jedoch für eine steigende Fragmentierung spricht. Das Profil von 24 h kann nicht zur Bewertung hinzugezogen werden, da es keinerlei Ausschläge besitzt. Im STR-Bild zeigt sich jedoch ein gut detektierbares Profil mit einer geeigneten Signalstärke. Ebenfalls kann die steigende Fragmentierung, anhand von steigendem Auftauchen der *OL-Peaks*, bestätigt werden. (vgl. Abbildung 16) Bestätigung der Hypothesen 8 a) und b).

Die Elektropherogramme der **Raumtemperatur** bieten wieder eine sehr offensichtliche Fragmentierung, bei welcher der Anteil kurzer Fragmente zunehmend ist und der Anteil sehr langer Fragmente mit der Zeit deutlich abnimmt. Ebenfalls kann dies durch die STR-Profilqualität bestätigt werden. (Abbildung 16) Bestätigung der Hypothesen 8 a) und b).

Im letzten verwendeten Parameter **UVC**-Einstrahlung zeigen sich sehr schlechte Elektropherogrammbilder. Eine Fragmentierung ist kaum zu erkennen, da generell kaum *Peakausschläge* auftreten. Begründung hierfür könnte ein sehr geringer DNA-Anteil oder eine hochgradige Zerstörung der DNA sein bzw. beide Tatsachen im Zusammenspiel. Bei 24 h spiegelt sich diese Tatsache im STR-Bild wieder, da hier keine erfassten *Peaks* angezeigt werden. Von 48 h ist kein Bild vorhanden. Bei 72 h ist ein sehr gutes STR-Bild vorhanden und somit kann die Fragmentierung bzw. das nicht Vorhandensein von DNA nicht bestätigt werden. Ebenso bei 96 h. (siehe Abbildung 17)

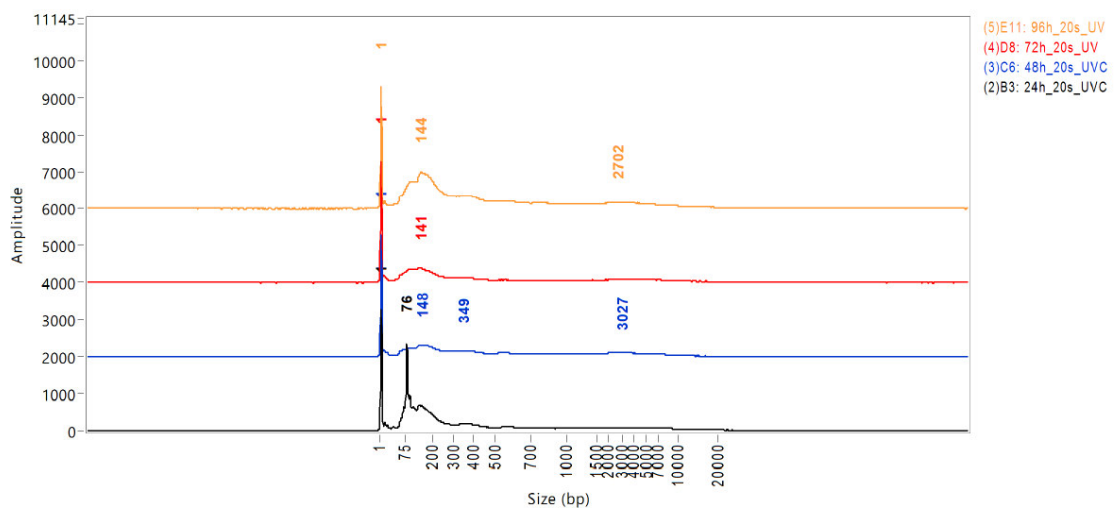


Abbildung 17: Elektropherogramm P20 unter UV-C Einfluss; Besonderheit einer geringen Fragmentierung ersichtlich

Wie schon im Vorfeld wirkt sich auch hier die Temperatur sehr auf die ermittelten Daten aus, was jedoch nur im Fragment Analyzer™ ersichtlich ist. Im STR-Bild kommt es zu keinerlei Auffälligkeiten oder Beeinträchtigungen. Es können keine Rückschlüsse auf *dropout*-Verhaltens anhand der Fragment Analyzer™ Daten getroffen werden. Im allgemeinen Vergleich zeigt sich, dass die STR-Profile dieses Probanden am besten aussahen und die benötigte rfu in fast allen Parametern erreicht wurde.

Proband A

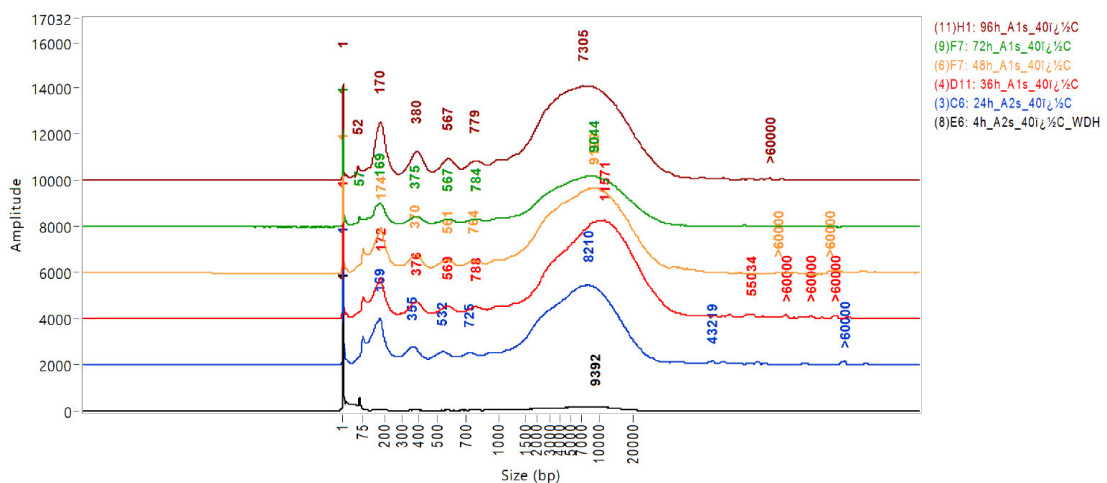


Abbildung 18: beispielhafter Fragmentierungsverlauf Proband A; hier Parameter 40° Celsius; Elektropherogramme aller Parameter auf Anfrage erhältlich

Bei diesem Probanden, sowie Proband N, kann ein direkter Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen gezogen werden, da hier unverdünnten Profile bei den Degradations-STR-

Profilen (6.2) verwendet wurden. Bei diesen Proben lagen jeweils auch doppelte Fragment Analyzer™ Analysen vor. Eine im Vorfeld vollzogene Sortierung zielte darauf ab, Profile zu verwenden, welche sehr viele *Peaks* zeigten. Jenes resultiert aus einer im Vorfeld falsch gesteckten Annahme. Auswirkungen auf die Ergebnisse finden hierdurch nicht statt, da alle Profile sehr ähnlich waren und ein vermehrtes *Peak*auffreten in einem Bereich von >10.000 bp entstand. Eine Auflistung aller verwendeten Profile und Fragment Analyzer™ Daten kann im Nachhinein bei der Autorin oder FoSil erfragt werden.

Unter der Bedingung **5° Celsius** zeigt sich bei allen Zeiten eine stärkere Fragmentierung. Der *Peak* über 2000 bp ist jedoch im zeitlichen Verlauf zunehmend, was bedeutet, dass mehr lange Fragmente detektiert werden können. Durch einen Vergleich der DNA-Mengen ergibt sich, dass diese Ansteigend sind, wodurch dieses Phänomen Erklärung findet. (mehr DNA = höhere Wahrscheinlichkeit längere Fragmente zu detektieren) Zu- und Abnahmen einiger *Peaks* lassen sich mit *dropout* Ereignissen erklären, da das Fehlen größerer Fragmentlängen diese *Peaks* abnehmen lässt, wodurch andere *Peak*-bereiche zunehmen oder unverändert bleiben. Das schlecht erfasste STR-Bild spiegelt die Fragmentierung wieder. Selbst bei 4 h treffen diese Aussagen schon zu. (vgl. Abbildung 18) Die Hypothesen 8 a) und b) sind anzweifelbar.

Über die Profile der Lagerung bei **40° Celsius** lassen sich selbige Aussagen treffen. Einzige Ausnahme hier ist die 4 h Zeit, da sich kaum *Peaks* zeigen. (Hypothese 8) Somit scheint bei dieser Zeit Degradations- und Fragmentierungsauswirkungen gering zu sein. Die Erhaltenen STR-Bilder finden mit den eben getroffenen Aussagen Übereinstimmung. Das Bild der 4 h und ebenfalls der 24 h zeugt von einer guten Signalstärkenerfassung. Alle andern jedoch zeigen weniger gute Profile. Unterschiedliche *dropout* Ereignisse und DNA-Konzentrationen tragen ihren Teil zu Schwankungen der Fragmentlängen*peaks* bei. (Abbildung 18)

Bei der Lagerung der Proben auf dem **Fensterbrett** tritt ebenfalls erst eine starke Fragmentierung ab 24 Stunden auf. Auch korrelieren die STR-Profile mit diesen Aussagen.

Bei **Raumtemperatur** liegt schon wieder eine etwas stärkere Fragmentierung nach 4 h vor, welche sich im zeitlichen Verlauf steigert. Ebenfalls lässt sich dies wieder in den STR-Profilen wiederfinden. (vgl. Abbildung 18) Bestätigung der Hypothesen 8 a) und b).

Im letzten Parameter, **UVC**-Bestrahlung, zeigen sich im STR-Profil keine *dropouts*. Bis auf einige wenige Ausnahmen zeugen die STR-Bilder von guter Qualität, ohne *OL-Peaks* und mit erreichter Mindestsignalstärke. Die erhaltenen Elektropherogramme spiegeln ebenso größtenteils eine geringere Fragmentierung der Proben wieder. Dabei liegt der

vermehrt *OL-Peaks* und eine geringere Signalstärke als der gesetzte Wert. Bei den vorgehenden Profilen bestand ein Zusammenhang zwischen dem Detektieren von *OL-Peaks* und dem Fragmentierungsgrad, wodurch den erwähnte Rückschluss gründet. (vgl. Abbildung 19) Bestätigung der Hypothesen 8, a) und b).

Bisherige Aussagen zu den Fragment Analyzer™ Daten können auch auf die **Fensterbrett**lagerung umgelegt werden. Die hier vorhandenen STR-Bilder von 4 h und 36 h zeugen wiederum von einer schlechten Qualität, welche geprägt ist, von sehr breiten Allelbanden und einem nicht-Erreichen der Mindest-rfu. (vgl. Abbildung 19)

Die STR-Bilder der **Raumtemperatur** zeigen wieder eine zu niedrige Signalstärke an und mit zunehmender Zeit eine steigende *OL-Peak*anzahl. Somit kann durch fehlende Fragmentierung der Fragment Analyzer™ Daten keine Korrelation gefunden werden. (vgl. Abbildung 19) Bestätigung Hypothese 8.

Bei den Elektropherogrammen der **UVC**-Bestrahlung ist ab 48 Stunden eine steigende Fragmentierung ersichtlich. Dies entspricht den eigentlichen Erwartungen. Die STR-Profile weisen jedoch keine *dropout* Erscheinungen auf. Die STR-Bilder geben dabei lediglich wieder, dass die Signalstärke sehr gering ist. Es sind eindeutige STR-Profile ohne *OL-Peaks* ermittelbar. (vgl. Abbildung 19) Bestätigung der Hypothesen 8 a) und b).

Bei diesem Probanden lassen sich die im Vorfeld (6.2.1) ermittelten Ergebnisse schlecht auf die Fragment Analyzer™ Daten umlegen, da *dropout* Phänomene der Temperaturparameter nicht wiedergespiegelt werden. Im Allgemeinen zeigt dieser Proband eine eigentlich erwarteter Fragmentierung, welche erst mit der Zeit einsetzt und nicht von Beginn ab vorherrschend ist.

6.5.2 14 Tage Reihe

Für diese Vergleiche liegen ebenfalls nur Fragment Analyzer™ Daten der unverdünnten Reihen der Parameter 5°C, 40°C und UVC-Einfluss vor.

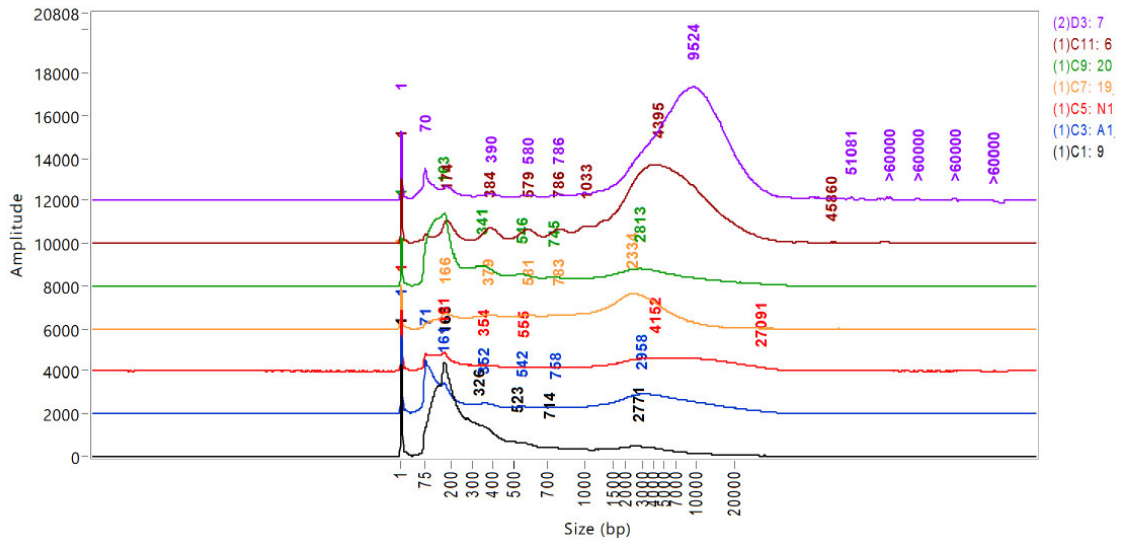


Abbildung 20: beispielhafter Fragmentierungsverlauf aller Probanden nach 14 Tagen, hier unter Einfluss von 5° Celsius

Bei **5° Celsius** zeigt sich bei allen Probanden eine Fragmentierung. Dabei ist besonders auffällig, dass bei P9, P20 und PA ein besonders hoher Anteil kurzer Fragmente im Bereich von 70-160 Basenpaaren vorliegt. Dies wirkt sich auf alle nachfolgenden *Peaks* aus, welche einen geringen Anteil an Fragmenten besitzen. Die Proben von P6, P7 und PN scheinen besonders lange Fragmente zu besitzen, da hier *Peakausschläge* von über 4000 bp detektiert werden konnten und sich später noch signifikante *Peaks* bei über 20.000 bp offenbaren. Einige STR-Bilder ergeben, dass die Aussagen umlegbar sind, andere hingegen, dass dies nicht vorgenommen werden kann. Die Unterschiede jedoch bestehen in den doppelt angesetzten Proben, welche ein abweichendes Verhalten von einander aufweisen und in der falschen Vorauswahl der Elektropherogramme. Für diese wurde die Auswahl anhand der aufgetretenen *Fragmentpeaks* getroffen, welche nach dem nun erlangten Erkenntnisstand scheinbar die schlechteren waren und nicht wie angenommen die Besseren. (Abbildung 20)

Bei **40° Celsius** zeigt sich, dass ebenfalls das Elektropherogramm von P7 und P9 einen deutlich erhöhten Anteil an sehr langen Fragmenten aufweist. Von Proband A sind zwei Profile vorhanden, welche sehr unterschiedlich sind. Das eine, weist einen deutlich erhöhten Anteil kurzer Fragmente auf, wohingegen in dem zweiten kaum Fragmentlänge detektiert werden können. Die wenigen detektierten bilden jedoch auch nur kleinere *Peaks*. Ebenfalls liegen von P19 zwei Profile vor. Bei einem erscheint eine weniger

starke Fragmentierung, jedoch ist der *Peak* der langen Fragmente auch sehr klein. In dem zweiten jedoch ist der *Peak* langer Fragmente doppelt so groß, trotz starker Fragmentierung. Die Kurve des P20 weist keinerlei Fragmentierung auf, es gibt lediglich einen größeren Ausschlag langer Fragmente. Auch hier zeugen einige STR-Bilder von schlechterer Qualität und entsprechen den gewählten Fragment Analyzer™ Daten. Andere Profile wiederum passen nicht zu den Ergebnissen, was dafürsprechen sollte, dass die nicht verwendeten Fragment Analyzer™ Daten hier korrelieren könnten. (vgl. Abbildung 20)

Bei der Lagerung unter **UVC-Bestrahlung** ergibt, dass bei den Probanden 19, 6 und 9 lediglich nur sehr kurze Fragmente detektiert werden können. Weitere *Peaks* erscheinen nicht und lassen sich auch nicht manuell ergänzen. Somit scheinen diese Proben besonders geschädigt worden zu sein. Im Vergleich mit dem STR-Profil zeigt sich zumindest bei P19 ein erhöhtes *dropout* Vorkommen. Das Profil des Probanden A besitzt eine starke Fragmentierung, durch eine Vielzahl von *Peaks*, jedoch gibt es auch noch sehr lange Fragmente. Das Elektropherogramm von P20 bietet einen sehr kleinen Peak und ein *Peak* welcher sehr große Fragmente (>8000 bp) enthält, die längsten von allen Proben im Vergleich. Das Profil von PN besitzt einen deutlich hohen Anteil kurzer, sowie sehr langer Fragmente. Die STR-Bilder von 19, 6 und 9 liegen hier in beiden Ausführungen in einer guten Qualität vor, was die oben beschriebenen Elektropherogramme nicht wiedergeben. Die Profile von A und N jedoch bieten eine eher schlechtere Qualität und lassen sich somit ebenfalls schlecht korrelieren. (siehe Abbildung 21)

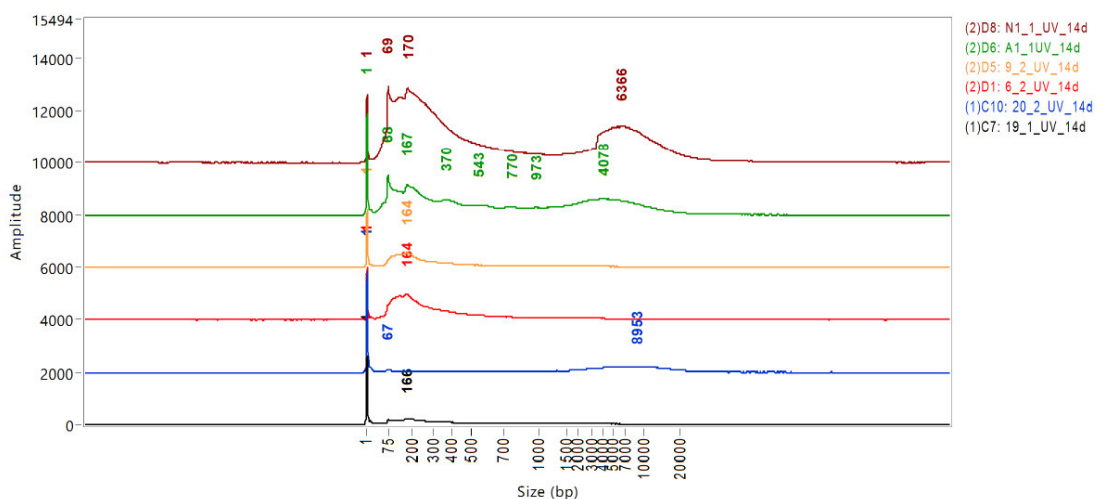


Abbildung 21: Elektropherogramm aller Probanden nach 14 Tagen unter UV-C Einfluss

6.6 *Tool*vergleich von NanoDrop™ und Fragment Analyzer™ Daten anhand von Hautabriebsspuren

Bei diesem Vergleich soll es nun darum gehen, herauszufinden, welches der beiden genannten Quantifizierungstools das bessere ist. Gemeint ist, dass herausgefunden werden soll, welches Tool bessere bzw. genauere Werte zu den enthaltenen DNA-Mengen liefert. Eine Untersuchung der Profilqualität bzw. ein Vergleich kann hier nicht vorgenommen werden, da NanoDrop™ reine Quantifizierungswerte liefert. Unter den Punkten 3.7 und 3.8 kann die Funktionsweise beider Tools noch einmal genau nachgelesen werden.

Die Bearbeitung dieses Punktes erfolgt nun anhand von Hand- und Unterarmabriebsspuren. Von beiden liegen sowohl NanoDrop™ als auch Fragment Analyzer™ Daten vor. Ebenfalls gibt es eine NanoDrop™ Analyse von allen Speichelprobanden, welche jedoch nicht im Fragment Analyzer™ durchgeführt wurde. Somit kann hier kein Vergleich geschaffen werden. Ein Versuch, Daten aus Degradationsprofilen zurückzurechnen kann ebenfalls nicht vorgenommen werden, da diese nur von 5 Probanden vorliegen und ebenso, wie bereits unter 6.5 erwähnt, zu starke Schwankungen aufweisen.

Bei den Hand-, sowie Unterarmabrieben zeigt sich schon auf den ersten Blick, dass die NanoDrop™ Quantifizierung einen deutlich höheren DNA Anteil in allen Proben angibt. Dies jedoch ist keine genaue Auskunft, da Proteine und virale oder bakterielle DNA hier mit detektiert werden.

6.6.1 Unterarmabriebe

Bei einer Analyse zur reinen DNA (Verhältnis 260/280nm) ergab sich bei Proband 13, 18 und 19 ein Verhältnis von ~1,8, womit hier von reiner DNA gesprochen werden kann. Bei Proband 19 ergab sich sogar ein Verhältnis von ~2,0, was laut *Manual* [30] für reine RNA sprechen würde. (Tabelle 3)

Bei einer Untersuchung der Kontamination ergab sich in allen Proben, dass diese erhöht vorliegt, bei 230 nm oder weniger. Gründe werden unter 6.5 anhand des *Manuals* erörtert. Ausreißer zeigen sich keine, jedoch liegen alle Werte deutlich unterhalb des Bereiches für reine Nukleinsäure. Der höchste Wert liegt bei nur 0,6 (Probanden 6 und 7), welcher jedoch schon für eine hohe Kontamination spricht. Der Minimalwert liegt bei 0,19 (P13). Somit ist ebenfalls ersichtlich, dass alle Werte nicht sehr weit auseinander liegen und nur in einem minimalen Bereich schwanken.

Im Vergleich zu den Fragment Analyzer™ Daten ist der ermittelte DNA-Anteil im Schnitt 10-40-mal so hoch (bis auf wenige Ausnahmen). Bei Proband 1 konnte im Vergleich über die 260-fache Menge an Probenmaterial gemessen werden. Aufgrund der sehr niedrigen DNA-Mengen in den Fragment Analyzer™ Ergebnissen, ist hier anzunehmen, dass nur humane DNA wirklich detektiert wird. Im Fragment Analyzer™ können nur DNA-Mengen in einem Bereich von 0,01 bis 0,6 ng/µl detektiert werden.

Ebenfalls bieten sich auch in den wenigsten Elektropherogrammen signifikante *Peaks*. Dies ist auch schon in den Gelbildern ersichtlich. Bei P2 lässt sich einmal Fragmentlängen über 60.000 bp detektieren. P3 zeigt einen *Peak* bei >400 bp, P7 bei >4500 bp, P11 zwei *Peaks* bei ca. 400 bp und >3000 bp und P17 in einem Bereich von 300-700 bp.

Eine Korrelation von Fragment Analyzer™ mit den STR-Profilen wie in 5.5 kann hier nicht gefunden werden. Die Probanden 5, 7, 20 liefern ein vollständiges Profil. Von den Proben 2, 4, 6 und 15 kann noch ein Teilprofil erstellt werden. Alle anderen Proben zeigen ein sehr schlechtes oder gar kein Profil an. Auch ist ersichtlich, dass die Proben, welche bei NanoDrop™ als reine DNA markiert wurden nicht jene waren, welche auch STR-Profile lieferten. Die Qualität der STR-Bilder ist einstimmig mit den STR-Profilen. Somit können keine zusätzlichen oder anderen Informationen hieraus gewonnen werden.

Probe	NanoDrop Daten			Fragment Analyzer Daten	
	260/280	260/230	ng/ul	Total Conc. (ng/ul)	Verhältnis
1U	1,1	0,58	3,61	0,0138	261,594203
2U	1,15	0,26	3,68	0,0473	77,8012685
3U	1,23	0,47	3,38	0,2489	13,5797509
4U	1,12	0,57	3,46	0,09	38,4444444
5U	1,46	0,25	3,56	0,062	57,4193548
6U	1,01	0,61	4,19	0,1209	34,6567411
7U	1,18	0,6	4,69	0,2265	20,7064018
8U	1,01	0,38	2,61	0,1228	21,2540717
9U	1,05	0,24	2,67	0,1986	13,4441088
10U	1,46	0,19	2,46	0,1915	12,845953
11U	1,53	0,54	2,08	0,5599	3,7149491
12U	1,06	0,35	2,48	0,1169	21,2147134
13U	1,85	0,19	2,71	0,1566	17,3052363
14U	1,01	0,47	2,48	0,0644	38,5093168
15U	2,4	0,2	2,03	0,0341	59,5307918
16U	1,1	0,4	4,37	0,0568	76,9366197
17U	1,58	0,36	2,93	0,2498	11,7293835
18U	1,31	0,23	2,22	0,1518	14,6245059
18U	1,87	0,35	2,83		18,6429513
19U	2,06	0,33	2,71	0,3496	7,75171625
20U	0,96	0,25	3,85	0,2263	17,0128148

Tabelle 4: Vergleich ermittelter DNA-Mengen in NanoDrop und Fragment Analyzer Unterarm
grün markierte Zellen entsprechen reiner DNA bei NanoDrop; 260/280 = NanoDrop-Verhältnis von gemessenen Proteinen zu DNA; 260/230 = Verhältnis der Kontamination einer Probe in NanoDrop; Spalte Verhältnis spiegelt den Unterschied der gemessenen Verhältnisse der Tools wieder

6.6.2 Handrückenabstriche

Bei der Auswertung mittels NanoDrop™ ergibt sich hier, dass die Probanden 5, 7, 8 und 10 ein Verhältnis von ~1,8 bei 260/280 nm besitzen. Somit liegt hier nur reine DNA vor. Bei Proband 5 wäre wieder ein Verhältnis von 2,0 erreicht und Proband 10 zeigt sogar ein Verhältnis von ≈3,0 an. Laut *Manual* [30] würden diese Ergebnisse beider Proben auch für das detektieren reiner RNA zu nutzen sein. Ebenfalls sagt das *Manual* [30], dass ein hohes Verhältnis unbedenklich ist und nur bei sehr kleinen Verhältnissen sollte Ursachenforschung betrieben werden. Probanden, welche ein signifikant kleines Verhältnis unter 1 aufweisen sind die Proben von P11 (hier doppelt angesetzt) und P20. Die Kontaminationsanalyse (Verhältnis 260/230 nm) ergab, dass die Probe von P12 mit einem Wert von 2,3 relativ nah an den Vorgaben für reine Nukleinsäure liegt, obwohl es sich nicht um reine DNA / RNA handelt. Weiterhin ist auffällig, dass die Abriebe von P4 und P6 sehr hohe Verhältnisse (10,63 | 5,65) aufweisen. Somit scheinen bei diesen Proben Fehler vorgelegen zu haben. Anhand der Angaben des *Manual* [30] liegt nur bei einem geringen Verhältnis eine Kontamination vor. Ebenfalls bietet sich bei P13 eine Besonderheit, da dieses Verhältnis in den negativen Bereich geht. Aufgrund der nicht aufgeführten Spalte der 230nm Werte kann nicht nachvollzogen werden, ob es sich um einen Mess- oder Rechenfehler handelt. Somit bleibt hier nur anzunehmen, dass es sich um eine sehr starke Kontamination handelt.

Bei Betrachtung und Vergleich der Fragment Analyzer™ Daten zeigt sich, dass NanoDrop™ zumeist die 20-60-fache Menge detektiert. Jedoch gibt es 4 Proben bei welchen sogar über die 100-fache bzw. 200-fache bzw. 300-fache Menge an Probenmaterial besitzen. Jedoch ist eben die Qualität der Proben fraglich, da nicht nur humane DNA erfasst wird. Hier lassen sich mittels Fragment Analyzer™ nur Werte von 0,01 bis 0,2 ng/μl detektieren, mit Ausnahme von P16, bei welchem ein Wert von 1,4 ng/μl vorliegt.

In den Elektropherogrammen, sowie Gelbildern zeigen sich wie zuvor kaum Ausschläge für signifikante Fragmentlängen. P1 weist einen leichten Ausschlag im Bereich von 700-200 bp auf, P11 einen sehr kleinen um die 75 bp und P14 im Bereich von 60-400 bp und bei 500 bp. P16 besitzt einen sehr deutlichen Ausschlag von 31 bis 527 bp und selbst nachfolgend bis 10.000 bp sind vorhandene Fragmente erkennbar.

Die STR-Profile der meisten Probanden erschienen hier von guter Qualität. Lediglich bei den Probanden 1-3, 9, 12, 18 und 19 lassen sich weder Teil- noch vollständige Profile ermitteln. Somit ist wieder eine Korrelation mit den Elektropherogrammen nicht möglich. Jedoch hat NanoDrop™ einige Proben als reine DNA erkannt, welche auch wirklich ein

Profil abliefern. Die Qualität der STR-Bilder ist einstimmig mit den STR-Profilen. Somit können keine zusätzlichen oder anderen Informationen hieraus gewonnen werden.

Probe	NanoDrop Daten			Fragment Analyzer Daten	
	260/280	260/230	ng/ul	Total Conc. (ng/ul)	Verhältnis
1h	1,43	0,46	10,86	0,1871	58,0438268
2h	3,24	0,58	2,1	0,084	25
3h	1,12	1,38	3,75	0,0577	64,9913345
4h	1,09	10,63	4,36	0,0664	65,6626506
5h	2,01	0,63	4,26	0,0548	77,7372263
6h	1,14	5,65	4,27	0,0682	62,6099707
7h	1,8	0,93	2,92	0,0703	41,5362731
8h	1,7	0,43	2,33	0,0656	35,5182927
9h	1,51	0,52	3,57	0,0418	85,4066986
10h	2,99	0,38	1,9	0,0517	36,7504836
11h	0,82	0,57	3,31	0,0657	50,3805175
11h	1,54	1,21	2,08		31,6590563
12h	1,19	2,32	3,85	0,0177	217,514124
13h	0,95	-3,22	3,28	0,0287	114,285714
14h	0,92	0,25	2,73	0,2243	12,1711993
15h	1,32	1,23	5,4	0,0155	348,387097
16h	1,26	0,7	4,43	1,4441	3,06765459
17h	1,42	0,76	3,75	0,1541	24,3348475
18h	1,11	0,99	4,76	0,0166	286,746988
19h	1,52	0,2	4,21	0,1195	35,2301255
20h	0,82	1,59	4,28	0,0761	56,2417871

*Tabelle 4: Vergleich ermittelter DNA-Mengen in NanoDrop und Fragment Analyzer Handrücken
grün markierte Zellen entsprechen reiner DNA bei NanoDrop; 260/280 = NanoDrop-Verhältnis von gemessenen Proteinen zu DNA; 260/230 = Verhältnis der Kontamination einer Probe in NanoDrop;
Spalte Verhältnis spiegelt den Unterschied der gemessenen Verhältnisse der Tools wieder*

7 Diskussion der Ergebnisse

Wie eingangs erwähnt, gibt es viele Umwelteinflüsse welche bedacht werden müssen. Diese wirken dabei mehr oder minder schwer auf den DNA Strangbau ein. Ebenfalls zeigen sich signifikante Unterschiede bei den Spurenmaterialien. Jedoch sollte hierbei auch bedacht werden, dass Spurenmaterial durch Unachtsamkeiten oder durch seine lange Lagerungszeit mit Pilzen und Bakterien in Kontakt gekommen sein könnte. Solch ein Einfluss sollte eventuell noch einmal überdacht und untersucht werden. Weiterhin wurden einige andere Faktoren, welche an Tatorten vorherrschen könnten nicht bedacht. Dies wären zum Beispiel Umwelteinflüsse, wie Untergrund (z.B.: Teppichboden, Laminat, Erde etc.) oder Lichtmenge (hell, dunkel). Solch eine Testreihe sollte jedoch gegebenenfalls einmal in Betracht gezogen werden. Da es zu diesem Gebiet auch weniger Forschungen gibt erscheint es als sinnvoll. Besonders der Aspekt Licht könnte eine Kontroverse bieten, da Helligkeit bzw. Dunkelheit vermutlich keinen Einfluss nimmt, jedoch wurde dies noch nicht überprüft. Könnte es somit einen Faktor darstellen? Das Interesse an den Beschaffenheiten des Untergrundes, auf welchem sich die Spur eine Weile befindet, liegt darin, dass Teppichböden Speichel, somit DNA, gut aufsaugen. Demzufolge sollte dort eine schnelle Trocknung des Probenmaterials stattfinden und dieses somit weniger von Bakterien und Pilzen befallen werden. Außerdem könnte untersucht werden, inwieweit das wieder Löslich machen der getrockneten DNA Einfluss nimmt, bzw. ob es durch die Austrocknung zu erheblichen Strangbrüchen kommt. Bei den Beschaffenheiten von Erde und Laminat kann eine Zerstörung durch Pilze und Bakterien untersucht werden, da Erde ein guter Nährboden hierfür ist (wobei auch hier wieder unterschieden werden könnte zwischen trockener und feuchtem Erdboden). Laminat bietet sich als Nährboden an, da auf ihm die Probe lange feucht bleibt und nicht einzieht und somit nur sehr langsam trocknet, bzw. eine Trocknung auch von Luftfeuchtigkeit und Temperaturen abhängt. Somit bietet sich Luftfeuchtigkeit schon wieder als ein neuer Faktor an. Vermutlich wird auch diese langsam trocknende DNA-Spur besonders von Pilzen und Bakterien befallen.

Ebenfalls zeigt sich anhand aller erhaltenen Daten, dass die verwendeten Proben realer Personen alle stark unterschiedliche Ergebnisse liefern, und somit schlechte generalisierte Aussagen liefern. Es wird empfohlen noch einmal mit einer Experimentation von künstlicher Seite her zu beginnen, und mit einer künstlichen DNA zu arbeiten, bei welcher die Menge genau beurteilt werden kann. Bei Anlegen mehrerer Replikate können Mehrfachproben simuliert werden oder es kommt zur Verwendung verschiedener künstlicher DNA, um das Vorhandensein von mehreren Probanden zu simulieren. Ebenfalls

kann hier eine bessere Einteilung der Verdünnungsstufen geschaffen werden, ähnlich einer Sensitivitätsstudie. Die damit ermittelten Ergebnisse können dann mit dieser Arbeit korreliert werden.

7.1 Degradationserscheinungen der Speichelproben

(Testreihe 1)

Anhand aller betrachteten Proben kann gesagt werden, dass die Fragmentlänge keinen Einfluss auf die *dropout* Ereignisse hat. Weiterhin kann eine von *Tvedebrink et al* [32] angebrachte Aussage bestätigt werden, nach welcher kurze und lange Allele dieselbe Ausfallwahrscheinlichkeit besitzen. Ebenso ergibt sich, dass ein Abstand der Allele ebenso wenig Auswirkungen besitzt. Mit der Tatsache, dass zumeist die ersten Allele eines Systems *dropout* Ereignisse zeigten, kann auch hier die Hypothese falsifiziert werden.

Die Komplexität der STR-*Loci* könnte jedoch einen gewissen Einfluss haben, da besonders häufig das D21, als sehr komplexes System, ausfiel. Es besitzt eine große Vielzahl an *Repeat*sequenzen, welche jedoch einzeln nur sehr wenig wiederholt werden. Weiterhin wird dies durch eine hohe Fragmentlänge etwas begünstigt. Jedoch zeigte der D10 des Öfteren Ausfälle, wobei es eines der simpelsten Systeme zu sein scheint. Besonderheit an diesem sind jedoch seine fünf sich wiederholenden Basenfolgen. Diese könnten somit eine erhebliche Auswirkung auf anfällige Strangveränderungen darstellen.

Die hier festgestellten Gemeinsamkeiten einiger Allele der Probanden könnten für die Mischspur eine Problematik ergeben. Es kann bei einer Mischung dieser Profile nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich um zwei Profile mit heterozygoten Merkmalen handelt, oder um ein heterozygoten und ein homozygoten. Ebenfalls kann auch hier die Vermutung anstehen, dass es sich um einen *dropout* in einem Profil handeln könnte. Jedoch, wird nicht anhand dieser einzelnen Marker, mit nur drei *Allelpeaks* darüber entschieden, um wie viele Mischspuren es sich handelt, sondern anhand des gesamten Profils. Auch könnten die erwähnten Allelüberschneidungen in den verschiedenen *Loci* wiederholt zu denselben Problemen führen. Jedoch ist dies nicht Teil dieser Arbeit.

Eine weitere Schlussfolgerung oder Vermutung, welche aus den eben gefundenen Allelgemeinsamkeiten angestellt werden könnte, wäre, dass scheinbar in der Population diese Allele in den gegebenen Systemen häufig vertreten sind. Der Probenumfang ist jedoch viel zu gering um dies wirklich als Behauptung aufzustellen. Auch liegen keine

Angaben vor, aus welchen Populationsgruppen die Probanden stammen, somit ist dies schwer zu beweisen. Aber die Vermutung, dass es sich um die europäische Population handelt liegt sehr nahe. Es sollte ein erneutes Experiment, mit einem anderen Proben-satz angestellt werden, um eine Vergleichsbasis zu schaffen.

Weiterhin ist bei den Zeitreihen der Probanden zu sehen, dass wie vermutet unter UVC Einfluss sehr viele Ausfälle auftreten und diese im Zeitverlauf zunehmen. Es ist erkennbar, dass bei diesem Parameter die Fragmentlänge doch eine übergeordnete Rolle spielt. Im Vergleich aller Probanden wurde festgestellt, dass die Proben von P20 besonders unter dem UVC litten. Jedoch zeigt sich hier, dass es nicht an der allgemeinen Fragmentlänge liegt, da P19 insgesamt die längsten Fragmente besitzt, aber die wenigsten Ausfälle auftreten. Somit scheint die DNA von P20 weniger resistent bzw. anfälliger für Degradation zu sein. Ebenfalls könnte es sich bei diesem Teilnehmer um einen „*poor shedder*“ handeln. Im Vergleich (aller Parameter) lässt sich P 19 als „*good shedder*“ einstufen. Aus welchem Grund jedoch die Profile von P19 unter UVC solche Fluktuationen der Qualität zeigen, ist rätselhaft. Begründung könnte man wieder an der ungleichen Lagerposition finden, daran, dass nicht jede Probe gleich degradiert, den zu unterschiedlichen DNA-Konzentrationen oder in einer unachtsam verdünnten Probe.

Bei Betrachtung der anderen Umweltparameter zeigen sich wie erwähnt fast vollständige Profile bei allen Speichel-Probanden. Somit scheinen diese wenigen Einflüsse auf die DNA zu haben. Lediglich können für die Fensterbrettlagerung nur Mutmaßungen angestellt werden, da hier keine Wetterdaten vorliegen. Da diese Tests im Winter durchgeführt wurden, war die Sonneneinstrahlung nicht so lange und so intensiv. Somit trifft weniger UVC-Strahlung auf die Proben. Im Sommer ist mit intensiverer und längerer Sonneneinstrahlung und deutlich höheren Temperaturen zu rechnen. Diese können diese Profile anders aussehen lassen. Somit sollte eine erneute Testreihe angestrebt werden. Auch kann eine Platzierung einen Einfluss auf die Profile haben. Eine Lagerung im Schatten bewirkt niedrigere Temperaturen und geringeren UV Einfluss. Eine Lagerung bei direkter Sonne wurde im vorhergehenden Satz schon einmal beschrieben.

Die angesetzten 40°C scheinen auch noch zu niedrig zu sein um Schaden in den Zellen anzurichten. Zwar ist diese Temperatur nicht gut für die Zellen, jedoch beginnt erst hier der anfängliche Denaturierungsprozess. Allgemein ist bekannt, das Fieber erst ab 42°C erheblich schädlich für den Körper ist. Können diese 2°C Temperaturunterschied wirklich von Bedeutung sein? Somit sollte hier ebenfalls erwogen werden, eine etwas höhere Temperatur zu nutzen.

Eine weitere Vermutung könnte auch dahingehen, dass selbst in den verdünnten Proben dennoch viel DNA enthalten war und diese somit weniger zerstört wird, da sich alles in allem zeigte, dass die Qualität der Profile auch stark vom enthaltenen DNA-Anteil abhängig ist. Echtes Spurenmaterial aus realen Fällen enthält meist weniger DNA und somit könnten diese Profile doch stärker zerstört werden. Weiterhin wird an dieser Stelle mitgegeben, dass *dropouts* in homozygoten Profilen bei einer Mischspur auch wieder zu Fehler führen können, da somit ganze Systeme ausfallen und zu wenig *Peaks* angezeigt werden. Dadurch stellt sich wieder die Frage, homozygote Spuren, heterozygote welche gleiche Allele haben oder doch *dropouts*, jedoch wo und in welcher Weise.

7.2 Degradationserscheinungen der Mundschleimhautabstriche (Testreihe 2)

Die getroffenen Aussagen zur Beurteilung der Hypothesen können in diesem Punkt für die Mundschleimhaut übernommen werden. Jedoch gelten für die Degradationsparameter andere Aussagen.

Hier zeigt sich, dass bei beiden Proben die Ausfälle bei unverdünnter DNA im zeitlichen Verlauf bei Raumtemperatur, 5°C und 40°C zunehmen. In den verdünnten Reihen ist dies nicht der Fall, was eine etwas seltsame Tatsache darstellt, da hier etwas weniger Material enthalten ist und somit eigentlich etwas mehr Ausfälle auftreten sollten. Bei der Fensterbrettlagerung liegen zu wenige unverdünnte Profile vor, um eindeutige Schlüsse zu ziehen. In den verdünnten Proben liegen immer vollständige Profile vor, wodurch zu vermuten ist, dass eine DNA freundliche Temperatur herrschte und auch die Sonnen-, und damit verbundenen UV-Einstrahlung, nicht sonderlich groß war.

Fast vollständige Profile tauchen trotz UVC-Einfluss in den Proben auf. Entweder war sehr viel DNA enthalten, sodass nicht sehr viel zerstört wurde oder die Mundschleimhautabstriche und die darin enthaltenen Zellen sind resistenter gegenüber diesem Parameter. Der Unterschied zum Speichel besteht dabei darin, dass bei den Mundschleimhautabstrichen, wie es der Name schon sagt, sehr viele Hautzellen enthalten sind. Diese Zellen können somit deutlich stabiler unter UVC bestehen. Weitere Unterschiede sind unter Punkt 2.3 nachzulesen. Der *allelic dropout* bei PN kann auf Degradation oder PCR bzw. Gerätefehler zurückzuführen sein.

Ebenfalls ist der hier angesetzte Probenumfang von nur zwei Probanden zu gering gewählt und es sollte noch einmal eine erneute Testreihe angesetzt werden. Diese sollte

jedoch nicht von fremden Personen genommen werden. Vielmehr sollten von den gleichen Personen beide Spurenmaterialarten stammen. Dadurch ist eine eindeutigere Korrelation möglich und es können genauere Aussagen getroffen werden.

7.3 Degradationserscheinungen in der 14 Tage Reihe

(Testreihe 3)

Warum hier die ermittelten Profile nicht zu den bisherigen Ergebnissen passen lässt sich schlecht erörtern. Es könnte an den unterschiedlichen DNA Mengen jeder einzelnen Probe liegen, daran, dass nicht alle Proben gleich degradieren (auch resultierend aus dem enthaltenen Probenmenge) oder an einem Unterschied zwischen intensiver und nicht so intensiver Beeinflussung der Umweltfaktoren.

Diese Reihen sollten sich auch eigentlich in den bisherigen zeitlichen Verlauf einordnen und nicht plötzlich vollständig bzw. komplett anders sein. Hier sollte überdacht werden, ob nicht eventuell noch einmal eine neue Testreihe angesetzt werden sollte. Aus dem vorherigen Gespräch mit der Mitarbeiterin von FoSil ergab sich, dass bewusst keine hohen Verdünnungen gewählt wurden, da aufgrund von Testreihe 1 und 2 die Vermutung anlag, dass zu wenig DNA enthalten ist um aussagekräftige Profile zu erhalten. Dies kann jedoch nun anhand der erhaltenen Werte widerlegt werden. Ebenso zeigt sich, dass der Punkt Verdünnung bei den Mundschleimhautabstrichen keinerlei Einfluss besitzt.

7.4 Fragment Analyzer™ Daten

Da die erhaltenen Daten hier höchst unterschiedliche Ergebnisse liefern und die DNA-Mengen schon innerhalb einer Probenart über die Zeit sehr stark variieren gilt besonders hier eine erneute Versuchsreihe anzusetzen mit kontrollierten, gleichen DNA-Konzentrationen. Damit könnte festgestellt werden ob sich ein gewisses konstantes Verhalten zeigt und in welchem Maß die Fragmentierung zunimmt. Alle jetzt erhaltenen Daten treten zu wahllos auf, um Einstimmigkeiten oder Konstanten zu finden. Auch verändert sich der Fragmentierungsgrad zum Teil so stark, dass er nicht wie erwartet verläuft und somit weitere Schwierigkeiten bereitet.

Auch zeigt sich bei diesen Daten eine geringe Auswirkung der UVC-Bestrahlung und eine hohe Auswirkung in den Temperaturparametern. Durch klar definierte DNA-Mengen

kann hier eine Überprüfung stattfinden ob dies wirklich der Fall ist oder ob bei den verwendeten realen Proben bestimmte Faktoren für dieses Phänomen sorgten. Eine Korrelation der Ergebnisse sollte wieder durchgeführt werden um dann schlussendlich generalisierte Aussagen für die forensische Spurenermittlung treffen zu können.

Weiterhin ist es mittels Fragment Analyzer™ und den erhaltenen Daten hier nur möglich, Aussagen zur Profilqualität zu treffen, jedoch nicht zu *dropout* oder *dropin* Phänomenen, sowie zum Ausfall bestimmter Fragmentlängenbereiche. Beim Ansetzen einer oben erwähnten neuen Versuchsreihe sollte eine bessere Überprüfung getroffen werden, ob *dropout* Ereignisse in bestimmten Fragmentlängenbereich zum Auftreten oder Ausfallen bestimmter *Peaks* im Elektropherogramm führen. Die Profilqualität kann auch nur in begrenztem Rahmen bestimmt werden, da sich in diesem Test verdeutlicht, dass sich bei einer erhöhten Fragmentierung in den Profilen *Off Ladder Peaks*, falsch erkannte Allele und Signalstärken, welche eine angegebene Minimal-rfu nicht erreichen konnten, zeigten. Mehr jedoch lässt sich bisher nicht herausfiltern. Auch scheint eine Fragmentierung bisher nicht im Zusammenhang zu *dropout* Ereignissen zu stehen. Steigende Fragmentierung, der DNA, bedeutet jedoch nicht, dass es zu vermehrten Allelausfällen kommt, da die unverdünnten Profile bis auf wenige *dropout* Ereignisse vollständig sind.

Ebenfalls sollten auch mittels Fragment Analyzer™ die verdünnten Proben analysiert werden, um so eine wirkliche Vergleichbarkeit zu schaffen. In diese Arbeit war dies etwas schwer, da im Vorfeld die 1:10 angesetzten Profile der Speichelproben, aufgrund ihrer erscheinenden Degradationsphänomene, eingehend betrachtet wurden, welche in den unverdünnten Proben nicht vorhanden waren.

Zudem stellen sich nun im Nachhinein einige Fragen. Wären die ermittelten Fragment Analyzer™ Daten nicht eher so bei den 1:10 zu erwarten? Inwieweit hat die Fragmentierung Einfluss auf *dropout* Ereignisse, da in jedem Profil *Peaks* >2000 bp vorhanden sind und reicht das somit eben für vollständige STR-Profile? Stehen bestimmte *Peaks* des Elektropherogramms doch für gewisse Fragmentlängenbereiche der STR-Profile und bedeutet dann eine Veränderung der *Peakgröße* oder ein Wegfall, dass *dropout* Ereignisse auftauchen? Mit einer optimierten Versuchsreihe sollten sich diese Fragen jedoch klären lassen.

Es wurde mit einer vorgegebenen Annahme gearbeitet und ausgewertet, welche besagt, dass bei Proben ohne bzw. mit wenig Degradationsauswirkung nur der LM und der >2000 bp vorhanden ist. Würde jedoch nach einer anfänglich anderen Annahme vorgegangen werden, dass ein *Peak* im Fragment Analyzer™ für eine bestimmte Fragmentlänge im STR-Bild steht, kann durch eine Betrachtung sogar in einigen Profilen eine

Korrelation gefunden werden. Jedoch geht dies nicht bei allen Profilen. Gründe liegen in der unterschiedlichen DNA-Menge; Lagerung in Randbereichen (bei bestimmten Parametern), wodurch diese eine abgeschwächtere Intensität haben; einer unterschiedlichen Lagerung auf dem Fensterbrett, wodurch es zu unterschiedlichen Auswirkungen der natürlichen Parameter kommt und der Tatsache, dass nicht jede Probe unter denselben Bedingungen gleich degradiert. Würde man nun jedoch diese Annahme betrachten lässt sich folgendes finden: *dropout* Erscheinungen bei ca. 100-200 bp in den STR-Profilen können im Fragment Analyzer™ den *Peak* um 140-160 bp beeinflussen bzw. zu dessen Wegfall führen. Fragmentlängen von ca. 200-300 bp beeinflussen den Fragment Analyzer™-*Peak* >300. Die STR-Fragmentlängen 300- 400 bp sollten den *Peak* >500 beeinflussen und alle noch größeren STR-Fragmentlängen sollten sich auf den >700 bp *Peak* auswirken. Will man nun diese Tatsachen von diesem Standpunkt aus betrachten, müsste der Punkt 5.5 ff noch einmal neu ausgewertet werden.

Einen weiteren Punkt bieten die Fragmentlängen der Mundschleimhaut. Diese weisen deutlich größere / längere Fragmente auf. Somit stellt sich hier die Frage, ob sie bessere DNA-Qualität besitzt, da sie direkt mit einem Tupfer abgerieben wird und somit ein geringer Speichenanteil und ein hoher Epithelanteil vorhanden ist oder liegt es an der frische des Probenmaterials? Diese Abstriche wurden bei Biotype® frisch genommen und nicht vorher gesichert. Kann dies dazu beitragen, dass schon die vorherige Sicherung des Speichels eine Degradation auslöst, anders als bei direkt frischen Proben, da es zu keiner umgehenden Verarbeitung der Proben kam? Oder ist eine gewisse Fragmentierung des Speichels durch pH-Wert und seine Eigenschaften doch normal?

7.5 *Tool*vergleiche mittels Hautabriebsspuren

Auf den ersten Blick wirkt NanoDrop™ nach wie vor, durch seinen hohen ermittelten DNA Anteil einer Probe, als das bessere *Tool* zur Auswertung. Bestätigung Hypothese 10 a). Jedoch sollte weiterhin bedacht werden, dass dieses Programm alle DNA einer Probe bestimmt, somit auch virale und bakterielle. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich jedoch, dass nur in den wenigsten Fällen wirklich reine DNA ermittelt werden kann. Der Großteil aller Proben ist mittel bis stark verunreinigt. Dies ist schon allein durch das Probenmaterial bedingt. Die Hauptproben, welche mittels Tapes gesichert wurden enthalten hierbei nicht nur Epithelzellen, sondern auch andere auf der Haut befindliche Stoffe wie z.B.: Schweiß. Dieser wiederum enthält Harnstoff, welcher eine Stickstoffverbindung ist und für eine Kontamination der Probe sorgt. Ebenfalls werden Mineralstoffe und ebenfalls Proteinreste ausgeschieden welche zu einer Verunreinigung der Probe

führen und das Verhältnis zwischen den Wellenlängenbereichen herabsetzen und somit eindeutig angeben, dass zu wenig DNA enthalten ist.

Ein weiterer Aspekt für die niedrige Erkennungsrate von DNA in NanoDrop™ besteht laut *Manual* [30] darin, dass weniger als 10 ng/μl der Nukleinsäure enthalten war. Was sowohl aus den NanoDrop™ sowie den Fragment Analyzer™ Daten ersichtlich ist. Die totale Konzentration des im Fragment Analyzer™ ermittelten DNA-Anteils spiegelt die zu geringe Konzentration sogar besser wieder, da hier scheinbar nur humane DNA detektiert wird. Bis auf eine Ausnahme liegt hier die DNA-Menge jeder Probe <1 ng/μl. Anhand der enthaltenen Aussagen zu den Speichelproben muss dies jedoch keine Auswirkung auf die STR-Profilqualität haben, da bei dieser Versuchsreihe zum Teil auch nur so wenig DNA enthalten war. Bestätigung Hypothese 10.

Jedoch zeigen die STR-Profile bis auf wenige Ausnahmen, dass nur sehr schlechte oder keine Profile ermittelbar sind. Dies liegt jedoch auch an dem Sicherungsverfahren des Spurenmaterials. Anhand der erhaltenen Daten sollte überdacht werden ob eine andere Sicherung, z.B.: Abrieb mittels Tupfern oder andern Abriebsmethoden verwendet werden sollte. Ebenfalls kann das Anheften der Tapes auf einem Untergrund, bzw. Trägermaterial zu Verlusten von Probenmaterial führen. Diese Testreihe sollte definitiv noch einmal in einer besseren Methodik und Qualität wiederholt werden, da bekannt ist, dass sich aus kleinsten Hautschuppenmengen STR-Profile erstellen lassen. Bei der Spurensicherung sollte auf die Beschaffenheit der Hautoberfläche geachtet werden und eventuell Notizen angefertigt werden, da sich laut Goray et al [36] und Bright et al [39] der *Shedder*status daran beurteil lässt und eventuell anhand dieser Quelle ein besserer Zeitpunkt zur Spurensicherung gewählt werden könnte.

Literatur

- [1] vgl. inoffizielle Quelle; Auszug aus dem Lastenheft; von FoSil; 2016; liegt der Firma Biotype vor
- [2] SCHELNDER, Anna Julia, Dissertation: Der Quantifiler Human DNA Quantification Kit als Screentest in der forensischen Molekularbiologie; München; 2014
- [3] INTERVIEW mit SCHNEIDER P., Professor am Institut für Rechtsmedizin der Universitätsklinik Köln. „Nachweisgrenzen der DNA-Analyse“; DNA-Analyse in der Kriminalistik GID: 191,12/2008 S. 24 – 27; Autor: *Susanne Schultz*; online: <https://www.genethisches-netzwerk.de/gid/191/nachweisgrenzen-dna-analyse>
- [4] DIN EN ISO 24276 Lebensmittel – Verfahren zum Nachweis von gentechnisch modifizierten Organismen und ihren Produkten – Allgemeine Anforderungen und Definitionen
- [5] Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Extraktion von DNA für die Untersuchung gentechnischer Veränderungen mittels PCR: Leitfaden zur Einzellabor- und Ringversuchsvalidierung von Verfahren sowie der Qualitätskontrolle von extrahierter DNA; online: http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/09_Untersuchungen/AG_GVO_DNA_Extraktion_Validierung.pdf?__blob=publicationFile&v=2
- [6] BIOTYPE® Diagnostic GmbH: Mentype® Chimera® Gebrauchsanweisung. Dresden, Version Dezember2014
- [7] QUAIL M.A.: "DNA: Mechanical Breakage". Wellcome Trust Sanger Institute, Cambridge, UK , Published online: November 2010: <http://www.els.net/WileyCDA/ElsArticle/refId-a0005333.html>
- [8] Autorenkollektiv: <https://de.wikipedia.org/wiki/Desoxyribonukleinsäure>; Aufruf: 25.05.2017
- [9] YAKOVCHUK P. et al: *Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix*. In: *Nucleic Acids Research*. Band 34, Nr. 2, 2006
- [10] Vgl. [http://www.chemie.de/lexikon/Denaturierung_\(Biochemie\).html](http://www.chemie.de/lexikon/Denaturierung_(Biochemie).html);
- [11] Vgl. Autorenkollektiv: <https://de.wikipedia.org/wiki/Protein#Denaturierung>; Aufruf: 07.06.2017

- [12] vgl. Autorenkollektiv: https://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion#Theoretischer_Ablauf; 08.06.2017
- [13] Bildquelle: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4a/Polymerasekettenreaktion.svg/842px-Polymerasekettenreaktion.svg.png>; Aufruf: 08.06.2017
- [14] OPTI-DENT GmbH: <https://www.optimale-zahnbehandlung.ch/index.php/mund/mundschleimhaut?start=1>; Aufruf: 12.06.2017
- [15] Autorenkollektiv: <https://de.wikipedia.org/wiki/Mundschleimhaut#Aufbau>; Aufruf: 18.06.2017
- [16] OPTI-DENT GmbH: <https://www.optimale-zahnbehandlung.ch/mund/speichel?showall=1>; Aufruf: 18.06.2017
- [17] OPTI-DENT GmbH: <https://www.optimale-zahnbehandlung.ch/index.php/mund?showall=&start=11>; Aufruf: 19.06.2017
- [18] Autorenkollektiv: <http://flexikon.doccheck.com/de/Speichel>; Aufruf: 20.06.2017
- [19] Dr. GUMPERT, Nicolas: <https://www.dr-gumpert.de/html/speichel.html>; Aufruf: 20.06.2017
- [20] Autorenkollektiv: <http://flexikon.doccheck.com/de/Epithel>; Aufruf: 25.06.2017
- [21] Bildquelle: "Classification of Epithelium." von BruceBlaus. https://blog.lecturio.de/wp-content/uploads/2015/07/Epithelium_Classification.png; Aufruf: 25.06.2017
- [22] Autorenkollektiv: <http://flexikon.doccheck.com/de/Epithelzelle>; Aufruf: 25.06.2017
- [23] Autorenkollektiv: <http://www.chemie.de/lexikon/Elektrophorese.html>; Aufruf: 05.07.2017
- [24] Autorenkollektiv: <http://flexikon.doccheck.com/de/Elektrophorese>; Aufruf: 05.07.2017
- [25] Bildquelle: http://www.pharmchem.tu-bs.de/images/waetzig_kpep_ce-geraet.jpg
Aufruf: 05.07.2017
- [26] SCHOPFER, Peter; BRENNICKE, Axel: Pflanzenphysiologie. Elsevier, München 2006, S. 546 f.

- [27] ADVANCED ANALYTICAL TECHNOLOGIES, Inc. (AATI): Fragment Analyzer™ User Manual. IA 50021 USA, 2015.
- [28] AATI: <https://www.aati-us.com/instruments/fragment-analyzer/>; Aufruf 20. 07.2017
- [29] AATI: PROSize® User Manual. IA 50021 USA, 11.09.2015
- [30] THERMO SCIENTIFIC: Assessment of Nucleic Acid Purity, Technical Note 52646. Thermo Fisher Scientific Inc., 2015
- [31] THERMO SCIENTIFIC: Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. Thermo Fisher Scientific Inc., 11/2010
- [32] TVEDEBRINK T. et al.: Estimating the probability of allelic drop-out of STR alleles in forensic genetics. Elsevier Ireland Ltd.; 2009
- [33] TVEDEBRINK T. et al.: Statistical model for degraded DNA samples and adjusted probabilities for allelic drop-out. Elsevier Ireland Ltd.; 2011
- [34] CALACAL G. C. et al.: Comparing different post-mortem human samples as DNA sources for downstream genotyping and identification. Elsevier Ireland Ltd.; 2015
- [35] BUCKLETON J. S. et al.: Forensic DNA Evidence Interpretation. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2005
- [36] GORAY M. et al.: Shedder status – An analysis of self and non-self DNA in multiple handprints deposited by the same individuals over time. Elsevier Ireland Ltd.; 2016
- [37] GEKO: Richtlinie der Gendiagnostik-Kommission für die Anforderungen an die Durchführung genetischer Analysen zur Klärung der Abstammung und an die Qualifikation von ärztlichen und nichtärztlichen Sachverständigen gemäß § 23 Abs. 2 Nr. 4 und Nr. 2b GenDG; Fassung vom 17.07.2012; veröffentlicht und in Kraft getreten am 26.07.2012; III. Anforderungen Punkt 7.2.1.
- [38] Autorenkollektiv (u.a. JÄHNE, Maria; GEORGI, Tobias): <https://www.lecturio.de/magazin/histologie-epithelien/>; Aufruf: 25.06.2017
- [39] BRIGHT J.A., Petricevic S.F. et al: Recovery of the trace DNA and its application to DNA profiling of shoe insoles. Forensic Sci. Int. 145 (1) 7-12. 2004

[40] Autorenkollektiv: [https://de.wikipedia.org/wiki/Zersetzung_\(Chemie\)](https://de.wikipedia.org/wiki/Zersetzung_(Chemie)); letzter Aufruf: 06.08.2017

[41] online: Institut Marquès: <http://institutomarques.com/de/kinderwunsch/maennliche-unfruchtbarkeit/dna-fragmentierung-in-spermien/>; Barcelona, Spanien. letzter Aufruf 06.08.2017

[42] Autorenkollektiv: https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_fragmentation; letzter Aufruf: 06.08.2017

[43] LOWE, A., MURRAY, C. et al: The propensity of individuals to deposit DNA and secondary transfer of low level DNA from individuals to inert surfaces. Forensic SCI. Int. 29 (1), 2002. Seite 25-34

weiterführende Quellen:

[a] KLAPPER Jessica: Praktikumsbericht – Evaluierung und Validierung eines neuartigen STR Kits für die Spurenanalytik anhand einer Sensitivitätsstudie. Hochschule Mittweida; 2017; nicht publiziert

[b] SCHULTZE Constanze: Bachelorarbeit – Thema Mischspuren. Hochschule Mittweida; nicht publiziert

KAMPHAUSEN T., SCHADENDORF D. et al: Good shedder or bad shedder – the influence of skin diseases on forensic DNA analysis from epithelial abrasions. Germany; 2011. Springer-Verlag 2011. Online: https://www.researchgate.net/publication/51128367_Good_shedder_or_bad_shedder-The_influence_of_skin_diseases_on_forensic_DNA_analysis_from_epithelial_abrasions; letzter Aufruf 07.08.2017

Anlagen

Anlage 1: Tabelle vorhandener Degradationsphänomene.....	A-I
Anlage 2: Konzentrationsschwankungen der Fragment Analyzer™ Daten (je Parameter pro Proband).....	A-III

Anlage 1: Tabelle vorhandener Degradationsprofile

Probe	4h	24h	36h	48h	72h	96h	14d	4h	24h	36h	48h	72h	96h	14d	4h	24h	36h	48h	72h	96h	14d
	RT							5 °C							40 °C						
9		x		x	x						x	x	X 2		x			x		x	X 2
19		x				x					x	x	X 2							x	X 2
20		x				x			x		(19)		X 2	x						x	X 2
6													X 2								X 2
7													X 2								X 2
A1	x		x	x			x	x	x	x			X 2	x	x	x	x				x2
A2	x		x	x			x	fn	x				X 2	x	x	x	x				
N1	x			x			x	x	x				X 2	x	x	x	x				X 2
N2	x			x			x	x					X 2	x	x	x	x				
1:10 PCR																					
9		x		x		x		X 2		x		x	X 2	x	x		x	x	x		X 2
19		x		x	x	x		x2		x	X 2	x	X 2				x	x			X 2
20		x		x		x		x2		x	x	x	X 2	x	x		x	x			X 2
6													X 2								X 2
7													X 2								X 2
A1	x3				x		x				x		x2	X 2					x		x2
A2	x2				x		fn				x		X 2	x							
N1	fn				x		x2				x		x2	x							x2
N2	fn				x		x				x	x	X 2	x							
1:20 PCR	h; laut Tabelle unverdünnt fehlt bisher (Standard zu neiderig); nicht zur Auswertung zu verwend																				
9																					
19																					
20																					
6																					
7																					
A1		x				x		x					x	x		x					x
A2		x				x		x					x	x		x					x
N1		x				x		x					x	x		x					x
N2		x				x		x					X 2	x		x					x
1:50 PCR	Von 9, 19, 20, 6, 7 vorhanden; ATA																				
9																					
19																					
20																					
6																					
7																					
A																					
N																					
2 PCR v.																					
9				x							x							x			
19				x							x							x			
20				x							x							x			
6																					
7																					
A																					
N																					

Anlagen 2: Konzentrationsschwankungen der Fragment Analyser™ Daten (je Parameter pro Proband)

5° Celsius						
	Proband 9		Proband 19		Proband 20	
	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.
24h	4,349	4,3976	11,5177	11,6263	2,2834	2,5558
48h	14,6672	14,6696	5,3849	5,3886	fehlerhafte Probe	
72h	6,0603	6,1448	17,2904	17,3072	4,5052	4,6639
96h	8,8757	10,9864	17,1995	17,2345	fehlerhafte Probe	
40° Celsius						
	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.
24h	0,5977	0,8128	0,0019	0,015	1,1647	1,4207
48h	9,5254	9,608	17,4778	17,4799	6,006	6,0121
72h	4,8623	4,8815	21,1618	21,1886	4,8167	5,5902
96h	7,9847	8,0992	36,5691	36,6041	4,0505	4,0663
Fensterbrett						
	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.
24h	10,7593	10,7877	2,8494	2,8569	0,6244	1,1085
48h	21,3432	21,37	58,5196	58,4579	4,5109	4,5697
72h	9,8515	9,9471	36,5949	37,1703	6,6803	6,7469
96h	10,7197	10,8261	0,6261	0,812	6,4884	6,5808
Raumtemperatur						
	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.
24h	1,5617	1,8221	3,219	3,3021	6,2173	6,2139
48h	11,1313	11,1581	36,8239	36,8507	7,2592	7,2909
72h	3,9026	3,9162	16,1677	16,1713	4,1474	4,1902
96h	10,0383	10,115	24,9432	24,97	11,3926	11,3858
UVC						
	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.
24h	3,1812	3,3959	8,4256	8,5812	1,6046	1,8792
48h	1,4729	1,6047	1,4821	1,5497	1,05	1,2828
72h	nicht vorhanden		5,4527	5,5502	1,0694	1,2131
96h	8,6674	9,6129	1,3061	2,0748	3,6356	3,8856

5 ° Celsius				
	Proband A		Proband N	
	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.
4h	5,203	5,2776	1,1663	1,929
24h	18,6629	18,8169	12,595	12,6294
36h	46,3293	46,3637	14,4447	14,4791
48h	18,8944	18,9288	17,971	18,5293
72h	15,485	15,5118	21,1871	21,2139
96h	17,1266	17,1534	40,5718	40,5986
40° Celsius				
	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.
4h	0,73	0,8427	1,9115	2,0874
24h	15,1931	15,2275	22,0725	22,1069
36h	20,016	20,0504	31,3848	31,6082
48h	17,6509	17,6744	34,7325	34,9174
72h	7,5887	7,6105	12,5393	12,5661
96h	15,5351	15,5619	75,7988	75,8256
Fensterbrett				
	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.
4h	1,4572	1,7959	3,4669	3,5013
24h	10,5745	10,5853	9,8822	9,956
36h	49,9533	49,9877	12,4784	12,4971
48h	13,4759	13,5103	8,7356	8,7937
72h	10,9034	16,4235	7,6021	7,6091
96h	19,5517	19,5785	17,0034	17,0302
Raumtemperatur				
	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.
4h	6,5986	8,0084	1,4059	1,4579
24h	41,4312	41,4656	18,0473	18,0817
36h	51,0199	51,0543	nicht vorhanden	
48h	15,5931	15,6275	13,898	13,9324
72h	10,729	10,7558	13,6499	13,6767
96h	14,8962	14,923	38,5945	38,6213
UVC				
	TIC (ng/ul)	Total Conc.	TIC (ng/ul)	Total Conc.
4h	2,0756	2,7641	3,5987	3,6086
24h	7,6787	7,7197	60,9564	60,9908
36h	15,2746	15,5915	20,2754	20,3098
48h	1,4877	1,6733	19,8484	19,8828
72h	1,2163	1,5725	8,0746	8,7948

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 10. August 2017

Jessica Klapper

Jessica Klapper