

## **VERGLEICH VERSCHIEDENER METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON LÄNGENHETEROPLASMIE INNERHALB DES HOMOPOLYMEREN C-STRETCH DER MITOCHONDRIALEN KONTROLLREGION**

S. Lutz-Bonengel<sup>1</sup>, T. Sänger<sup>1</sup>, S. Pollak<sup>1</sup> und R. Szibor<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Rechtsmedizin, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

<sup>2</sup>Institut für Rechtsmedizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Zwischen den Positionen 303-309 der mitochondrialen Kontrollregion befindet sich ein homopolymerer C-Stretch, an dem häufig das Vorkommen von Langenheteroplasmie beobachtet wird. Als Ursache werden Insertionen von einem oder mehreren Cytosin-Resten an der Position 309.x und ein „slippage“ der DNA-Polymerase während der Replikation angenommen.

Zur Untersuchung dieser Region wurden 120 DNA-Proben nicht verwandter Personen einerseits direkt sequenziert, andererseits mit dem Restriktionsenzym *MfeI* gespalten. Beim Vorliegen einer Langenheteroplasmie wird im Sequenzchromatogramm der Probanden gewöhnlich ein erhöhter Sequenzhintergrund bis hin zum Sequenzabbruch („out of phase“-Muster) beobachtet, wobei sich jedoch in der Regel ein dominanter Sequenztyp erkennen lässt. Die Methode der Restriktionsspaltung von fluoreszenzmarkierten Amplifikaten, die den entsprechenden homopolymeren Stretch enthalten, erwies sich dagegen nicht nur als rasch und kostengünstig, sondern im Vergleich zur direkten Sequenzierung auch als eine sehr exakte Methode. Zur genauen Bestimmung der Häufigkeiten der unterschiedlichen mitochondrialen Haplotypen innerhalb einer DNA-Probe wurden zudem 8 Proben kloniert.

Die Ergebnisse zeigen, dass Langenheteroplasmie viel häufiger vorkommt, als es die Methode der direkten Sequenzierung vermuten lässt. Proben, die zwischen den Positionen 303-309.x mehr als sieben Cytosin-Reste aufweisen, sind in der Regel heteroplasmatisch.

S. Lutz-Bonengel, Institut für Rechtsmedizin, Klinikum der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Albertstrasse 9, 79104 Freiburg, Germany. Tel.: 0049 (0) 761 2036829. Fax: 0049 (0) 761 2036858. e-Mail: lutz@sun11.ukl.uni-freiburg.de

---

## **SEQUENZIERUNGSERGEBNISSE DES LOCUS D5S818 – FOLGERUNG FÜR DIE STR-ANALYSE UND MUTATIONSAUFKLARUNG**

L. Henke<sup>1</sup>, M. Dulmer<sup>1</sup>, M. Baur<sup>2</sup>, R. Fimmers<sup>2</sup>, E. Pick<sup>1</sup>, C. Helmken<sup>1</sup> und J. Henke<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Blutgruppenforschung, Köln

<sup>2</sup>Institut für Medizinische Biometrie, Informatik und Epidemiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn

Der Locus D5S818 wurde bei über 2000 Personen untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Ergebnisse bei homozygoten Personen mit PowerPlex 16 (PP16) und Identifiler bzw. Profiler 1 beobachtet. In diesen Fällen konnte ein Allel \*10 mit PP16 nicht dargestellt werden. Die Häufigkeit der D5S818 \*10-Variante kann abgeschätzt werden. Die Sequenzierungen zeigten einen SNP im Bereich der PP16-Primerbindungsstelle. Zwei weitere SNPs ermöglichten zusätzlich die Differenzierung von Fragmenten gleicher Länge und konnten zur Aufklärung der Herkunft mutierter Allele beitragen.

Dr. L. Henke, Institut für Blutgruppenforschung, Köln, Hohenzollernring 57, Postfach 19 04 20, 50501 Köln, Germany, Tel: 0049 (0)221 253037, Fax: 0049 (0)221 251247. e-Mail: bgf.henke@t-online.de.

---

## **SPEZIESIDENTIFIZIERUNG MITTELS VERGLEICHENDER SEQUENZANALYSE DES MITOCHONDRIALEN 12S-RRNA-GENS**

B. Balitzki-Korte<sup>1</sup>, K. Anslinger<sup>2</sup>, B. Rolf<sup>2</sup> and W. Eisenmenger<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institut für Rechtsmedizin, Universität Giessen, Germany

<sup>2</sup>Institut für Rechtsmedizin, Universität München, Germany

Innerhalb der mitochondrialen DNA einer jeden Tierart befindet sich die genetische Information der ribosomalen RNA (rRNA), die eine wichtige, primär funktionale Rolle in der Zellphysiologie einnimmt. Die Gene dieser rRNA lassen sich in hochkonservierte und hochpolymorphe Bereiche unterscheiden. Während in den konservierten Regionen kaum Mutationen zu finden sind, werden in den polymorphen Abschnitten je nach Grad der Verwandtschaft große Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen Tierarten beobachtet. Individuen einer Art zeigen diese Unterschiede nicht. Somit können diese artspezifischen Abweichungen dazu genutzt werden, biologische Materialien unbekannter Herkunft einer bestimmten Tierart zuzuordnen. Mit der Amplifikation und anschließenden Sequenzierung eines Bereiches innerhalb des mitochondrialen 12S-Gens sowie der Auswertung bereits publizierter Sequenzen gelingt die Identifizierung

einer Spezies anhand von 20 – 25 Basen. Dazu kann neben der etablierten Methode der Sequenzierung nach Sanger auch die Technik der Pyrosequenzierung genutzt werden.

Die Ergebnisse zeigen die Möglichkeit der Identifizierung verschiedener Arten durch die Analyse kurzer Fragmente ihrer 12S-Gen-Sequenz. Dazu reicht die Amplifikation des gewünschten Fragmentes mit Hilfe eines Primerpaares. Für degradierte DNA wurde ein alternativer Rückprimer getestet, der die Amplifikation eines kürzeren Sequenzabschnittes ermöglicht. Es wurden insgesamt 91 Proben verschiedener Tiere analysiert, die sich aus 8 Säugetier-Arten, 2 Fisch-Arten und 3 Vogel-Arten zusammensetzen.

Zudem kann und wird die Methode bereits bei Fragestellungen in der forensischen Routine angewendet.

Beate Balitzki-Korte, Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen, Frankfurter Str. 58, 35392 Gießen, Germany, Tel.: 0049 (0) 641 9941413. Fax 0049 (0) 641 9941419 e-Mail: [beate.balitzki-korte@forens.med.uni-giessen.de](mailto:beate.balitzki-korte@forens.med.uni-giessen.de)

---

## **DNA-EXTRAKTION AUS FORENSISCHEM PROBENMATERIAL - EIN METHODENVERGLEICH**

F. SCHILZ, J. LUKER, D. SCHMIDT und S. HUMMEL

Institut für Zoologie und Anthropologie,

Abteilung Historische Anthropologie und Humanökologie, Universität Göttingen

### Einleitung

Für die Erstellung genetischer Fingerabdrücke aus forensischem Probenmaterial ist die Qualität der DNA-Extrakte von besonderem Interesse. Da sich die DNA aus diesem Probenmaterial dadurch auszeichnet, dass sie nur in kleinen Mengen und degradiert vorliegt, sollte für den Erfolg einer PCR-Amplifikation ein möglichst effizientes Extraktionsverfahren gewählt werden. In der Rechtsmedizin ist das Chelex<sup>®</sup>-Protokoll (Walsh et al. 1991) als schnelles und effektives Verfahren bekannt. In einer Vergleichsstudie wurde DNA, die mit Hilfe des Chelex<sup>®</sup>-Verfahrens aus Spurenmaterial extrahiert wurde mit solcher aus einem automatisierten DNA-Extraktionsverfahren (Biorobot EZ1, Qiagen) verglichen.

### Material und Methoden

Als Ausgangsmaterial für diesen Methodenvergleich dienten Proben des GEDNAP-Ringversuches 26/27, außerdem rezentes und forensisches Skelettmaterial, sowie menschliche Kotproben. Für die DNA-Extraktion wurden zwei Verfahren angewendet. Zum einen wurde die DNA nach dem Chelex<sup>®</sup>-Protokoll und zum anderen mit einer automatisierten DNA-Extraktion mit dem Forensic-Card-Reference-Protokoll des Biorobot EZ1 (Qiagen) extrahiert. Die Qualität der DNA-Extrakte aus beiden Verfahren wurde an Hand ihrer Amplifikationsergebnisse und ihrer Elektropherogramme verglichen. Dafür wurden von jeder Probe gleiche Volumina aus jeweils beiden DNA-Extrakten zur autosomalen STR-Typisierung in eine standardisierte Profiler Plus<sup>™</sup>-PCR (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) eingesetzt. Nach der Amplifikation wurden jeweils gleiche Mengen PCR-Produkt zur Fragmentlängenanalyse auf einen Sequenzer Modell 373 stretch (Applied Biosystems) aufgebracht.

### Ergebnisse und Schlussfolgerungen

Die Amplifikationsergebnisse, die mit DNA-Extrakten aus dem Biorobot EZ1 erzielt wurden, waren besser als die mit DNA-Extrakten aus dem Chelex<sup>®</sup>-Verfahren. Während es bei der Profiler Plus<sup>™</sup>-PCR mit Extrakten aus dem Chelex<sup>®</sup>-Verfahren häufiger zu *allelic dropout*-Phänomenen gekommen ist, konnten mit den DNA-Extrakten aus der automatisierten DNA-Extraktion in der Regel vollständige genetische Fingerabdrücke generiert werden. Des Weiteren weisen die DNA-Extrakte aus dem Biorobot EZ1 (Qiagen) im Gegensatz zu solchen aus Chelex<sup>®</sup>-Extraktion praktisch keine PCR-Inhibitoren auf. Das Verfahren der automatisierten DNA-Extraktion mit Hilfe des Biorobot EZ1 (Qiagen) ist demnach besonders für die Bearbeitung von degradierten Probenmaterial geeignet.

### Literatur

**WALSH PS, METZGER DA, HIGUCHI R (1991) CHELEX 100 AS A MEDIUM FOR SIMPLE EXTRACTION OF DNA FOR PCR-BASED TYPING FROM FORENSIC MATERIAL. BIOTECHNIQUES 10: 506-513**

Felix Schilz, Institut für Zoologie und Anthropologie, Historische Anthropologie und Humanökologie, Bürgerstr. 50, 37073 Göttingen, Germany. Tel.: 0049 (0) 551-393699, e-mail: [fschilz@gwdg.de](mailto:fschilz@gwdg.de)

---

## **"BASELINE WINDOW SIZE" - AUSWIRKUNGEN AUF DIE AUTOMATISIERTE GENOTYPISIERUNG**

Sabine Quast, Angelika Lösch, Kirsten Thelen  
ID-Labor GmbH, Wiesbaden

Die Erstellung von genetischen Fingerabdrücken auf Basis von STR-Analysen hat in den vergangenen Jahren einen hohen Grad an Automatisierung erfahren. Durch die Nutzung des ABI3100-Analyzers der Firma Applied Biosystems können routinemäßig Analysen im 96er-Format durchgeführt werden. Die automatische Auswertung der Analysedaten durch GeneScan und die anschließende Fragmenterkennung mittels Genotyper liefern dazu die Voraussetzungen. Zum Beginn des Jahres 2003 wurden Änderungen in den Standardanalyseparametern der GeneScan-Software durch Applied Biosystems vorgenommen. Eine Sensibilisierung der Nutzer in Bezug auf die Änderungen erfolgte jedoch nicht. Effekte der betroffenen Analyseparameter auf die richtige Fragmenterkennung im Genotyper und auf die Analyse von Spurenmaterialien werden am Beispiel des Identifiler<sup>®</sup>-Kits dargestellt und die daraus resultierenden Konsequenzen für die Automatisierung von DNA-Analysen gezogen.

Dr. Kirsten Thelen, ID-Labor GmbH, Rheingaustraße 190-196, Postfach 3540, D-65025 Wiesbaden. Tel.:0049 (0) 611 6098335. Fax: 0049 (0)611 6098336. e-Mail: info@ID-Labor.de.

---

## **UNERWARTET LANGE STR-ALLELE UND IHRE DARSTELLUNG MIT VERSCHIEDENEN FORENSISCHEN KITS**

P. Grubwieser, R. Mühlmann, M. Pavlic und W. Parson  
Institut für Gerichtliche Medizin, Medizinische Universität Innsbruck

Bei der Typisierung von Spuren und Mundhöhlenabstrichen treten immer wieder unüblich lange oder auch kurze STR-Allele auf, die nicht in den gewohnten Kategoriebereich des Markers fallen. Bei der Verwendung von STR-Multiplexen kann es deshalb dazu kommen, dass derartige Allele in eine andere Marker-Kategorie verschoben und in der Folge falsch zugeordnet werden. Wir zeigen zwei Beispiele ungewöhnlich langer Allele in den STR-Systemen D3S1358 and D21S11 und vergleichen die Darstellung dieser Allele anhand dreier unterschiedlicher kommerziell erhältlicher Multiplex-Kits, SGMplus (ABI), Powerplex 16 (Promega) und genRES MPX 2 (Serac). Die Elektrophorese und Detektion der Allele erfolgte auf der CE 3100 (ABI). Die langen Allele wurden kloniert und sequenziert, die Inserts der Plasmide wiederum mittels PCR und nachfolgender Elektrophorese längenverifiziert und bestätigt. Die dargestellten Beispiele zeigen, wie wichtig eine vorsichtige und konservative Interpretation der Ergebnisse bzw. eine genaue Kontrolle der Auswertung sind. Aufgrund der hier beschriebenen Phänomene ist es angezeigt, im Zweifelsfall zwei verschiedene STR-Multiplexen – in denen der betroffene Marker in jeweils unterschiedlicher Nachbarschaft zu anderen STR-Loci steht - für eine Probe anzusetzen, um die Ergebnisse der Allele zu bestätigen.

Ao. Univ.Prof. Mag. Dr. W. Parson, Institut für Gerichtliche Medizin, Medizinische Universität Innsbruck, Müllerstr. 44, 6020 Innsbruck, Österreich. Tel.: 0043 (0) 512 507 3303. Fax: 0043 (0) 512 507 2764. e-Mail: [walther.parson@uibk.ac.at](mailto:walther.parson@uibk.ac.at).

---

## **REAL-TIME PCR FÜR DIE DNA-QUANTIFIZIERUNG VON BIOLOGISCHEN SPUREN**

S. Köchl, H. Niederstätter und W. Parson  
Institut für Gerichtliche Medizin, Medizinische Universität Innsbruck

Die erfolgreiche Typisierung einer biologischen Spur hängt stark sowohl von der Menge als auch von der Qualität der extrahierten DNA ab. Eine der Grundvoraussetzungen für ein optimales Resultat – im Idealfall ein ausgewogenes und vollständiges STR-Profil - ist der relativ genaue Einsatz der empfohlenen DNA-Menge in die Amplifikationsreaktion. Zu viel bzw. zu wenig DNA führt zu Phänomenen wie Artefaktbanden, Allel- oder Locus-dropout, n sowie n-1 Banden, oder auch zu besonders hohen Stotterbanden und andere mehr. Wir stellen hier ein sehr sensitives DNA-Quantifizierungssystem vor, welches auf der Methode der Real-Time PCR basiert und mit welchem der Gehalt an amplifizierbarer DNA sehr akkurat und reproduzierbar festgestellt werden kann.

Spuren können generell Substanzen enthalten, die bei der Extraktion in der DNA-hältigen Phase bleiben und die PCR inhibieren. Mit traditionellen DNA-Quantifizierungsmethoden können diese Inhibitoren nicht detektiert werden, sondern müssen über eine DNA-Konzentrationsreihe ausverdünnung werden. Die Real-Time PCR Methode bietet über eine interne PCR Kontrolle (IPC) die Möglichkeit, Inhibition schon bei der Quantifizierung zu detektieren, um das DNA-Menge für die Amplifikationsreaktion entsprechend einzustellen, bzw. eine zusätzliche Aufreinigung einer DNA-Probe durchzuführen. Das vorgestellte Quantifizierungssystem ist modular aufgebaut. Nukleare und mtDNA können simultan quantifiziert werden, bzw. eine der beiden als IPC für das andere Quantifizierungssystem dienen. Mittels alternativer

Primerkombinationen, die zu unterschiedlichen Amplikonlängen führen, kann schließlich der Degradierungsgrad einer DNA-Probe bestimmt werden.

Ao. Univ.Prof. Mag. Dr. W. Parson, Institut für Gerichtliche Medizin, Medizinische Universität Innsbruck, Müllerstr. 44, 6020 Innsbruck, Österreich. Tel.: 0043 (0) 512 507 3303. Fax: 0043 (0) 512 507 2764. e-Mail: [walther.parson@uibk.ac.at](mailto:walther.parson@uibk.ac.at).

---

## **SCHNELLES SCREENING VON SNPS AUS DEM KODIERENDEN BEREICH DER MTDNA ZUR IDENTIFIKATION VON EUROPÄISCHEN MITOCHONDRIALEN HAPLOGRUPPEN**

A. Brandstätter<sup>1</sup>, T.J. Parsons<sup>2</sup> und W. Parson<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Gerichtliche Medizin, Medizinische Universität Innsbruck, Österreich

<sup>2</sup>Armed Forces DNA Identification Laboratory, Rockville, MD, USA

Diese Arbeit präsentiert eine Auswahl von 16 SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) aus dem kodierenden Bereich der humanen mitochondrialen DNA. Die gewählten Marker wurden für die Zuordnung von Individuen zu einer der neun europäischen mitochondrialen Makro-Haplogruppen verwendet. Die ausgewählten SNPs wurden in zwei Multiplex-Systemen mit dem SNaPshot Verfahren, das auf dem Prinzip des „Minisequencings“ beruht, dargestellt. Die Methode wurde als schnelle Screening-Methode entwickelt, um in einem Ausleseverfahren unterschiedliche Haplogruppen voneinander zu differenzieren, was in Spurenfällen mit einer großen Probenzahl entscheidende Vorteile bringt. Darüber hinaus bringt diese Bestimmung Information über die haplogruppen-spezifische Variabilität einer zunächst unbekannt Probe und gibt damit Hinweise für eine gezielte weiterführende Untersuchung der hochvariablen Bereiche der mitochondrialen Kontrollregion im Sinne der Sequenzierung. Die Haplogruppe U kann so beispielsweise durch Sequenzierung von HV3 weiter differenziert werden, da U2 durch die Präsenz von 340T und 508G, U4 jedoch durch die Präsenz von 499A charakterisiert sind bzw. können Individuen jener Gruppen in diesem Fragment voneinander differenziert werden. Die Analysemethoden erwies sich als sehr sensitiv, 1 pg genomische DNA reichten für eine vollständige Typisierung aus. 277 unverwandte Personen wurden typisiert, und die Verteilung der resultierenden Haplogruppen wurde mit jenen aus der vollständigen Sequenzierung der Kontrollregion und der Literatur verglichen. Die „Power of Discrimination“ liegt bei 0,88, die Wahrscheinlichkeit für einen zufälligen Treffer zwischen 2 unverwandten Personen beträgt 11,4%. Dieses neue Multiplex-System für mitochondriale SNPs ist eine viel versprechende, innovative DNA-Typisierungsmethode für Forensik und Evolutionsforschung.

Ao. Univ.Prof. Mag. Dr. W. Parson, Institut für Gerichtliche Medizin, Medizinische Universität Innsbruck, Müllerstr. 44, 6020 Innsbruck, Österreich. Tel.: 0043 (0) 512 507 3303. Fax: 0043 (0) 512 507 2764. e-Mail: [walther.parson@uibk.ac.at](mailto:walther.parson@uibk.ac.at).

---

## **Wunder oder Fälschung? Untersuchungen am Blut der stigmatisierten Therese Neumann von Konnersreuth**

PD Dr. Burkhard Rolf, Institut für Rechtsmedizin  
Ludwigs-Maximilians-Universität München  
Frauenlobstr. 7a, 80337 München  
Tel.: 089-51605183, Fax: 089-51605144  
e-mail: [burkhard.rolf@rechts.med.uni-muenchen.de](mailto:burkhard.rolf@rechts.med.uni-muenchen.de)

Therese Neumann (geboren am 08.04.1898 in Konnersreuth, einem Dorf in der Oberpfalz, verstorben am 18.09.1962) wurde mehrfach von schweren Erkrankungen geheilt, obwohl bei einem Teil der Erkrankungen eine Gesundung medizinisch unmöglich erschienen war. Weitere Phänomene in ihrem Leben waren das Erleben von geschichtlich-religiösen Ereignissen in Visionen, die Wiedergabe des in der Vision Gehörten in der Originalsprache, das Auftreten der Wundmale Christi (Stigmata), und die Tatsache dass sie über Jahrzehnte hinweg ausschließlich vom regelmäßigen Empfang der heiligen Kommunion lebte (Nahrunglosigkeit). In der Fastenzeit 1926 stellten sich bei Therese Neumann zum erstenmal die Visionen vom Leiden Christi und die Wundmale des Gekreuzigten ein. Diese Erscheinungen wiederholten sich seitdem vor allem in den Karwochen. Im Auftrag des Bistums Regensburg haben wir Verbandsmaterial mit Blutantragungen von den Wundmalen untersucht. Als Vergleichsmaterial hatten wir Proben von noch lebenden Angehörigen und Briefe mit Briefmarken, die Therese Neumann zu Lebzeiten verschickt haben soll. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Vortrag vorgestellt.

---

## mtDNA-Analysen aus DNA-Extrakten nach differentieller Lyse

Katja Anslinger, Birgit Bayer

Im Rahmen von Untersuchungen in einem sexuell motivierten Tötungsdelikt wurden Spermien im Scheidenabstrich der Getöteten nachgewiesen. Es handelte sich hierbei um die einzige tatrelevante Fremdspur, die nach den Ermittlungen der Polizei vom (bislang unbekanntem) Täter stammen mußte. Ein Auftrag zur Bestimmung der ethnischen Zugehörigkeit des mutmaßlichen Täters wurde erteilt. Nach differentieller Lyse wurden getrennt die DNA-Identifizierungsmuster von Scheidenzellen und Spermien dargestellt. Von den Spermien wurde der Y-Haplotyp bestimmt. Eine darüber hinaus durchgeführte mtDNA-Analyse (HVR 1 und 2) ergab eine identische Sequenz für beide Zellfraktionen, die mit der Sequenz der Getöteten vollständig übereinstimmte. Zufall oder technisch bedingter Artefakt? Im Rahmen des Vortrages sollen systematische Austestungen bzgl. dieser Fragestellung vorgestellt werden.

---

## ZUR ALTERSBESTIMMUNG UND ABSTAMMUNGSDIAGNOSTIK AN EMBRYONALEM ABRASIONSMATERIAL

U. Hanisch, S. Hering und J. Dreßler

Institut für Rechtsmedizin, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden

In Verdachtsfällen der Vergewaltigung oder sexuellen Nötigung gelangt nach Schwangerschaftsunterbrechung aus kriminologischer Indikation mitunter Abrasionsmaterial zur rechtsmedizinischen Begutachtung. Die juristischen Fragestellungen konzentrieren sich dabei auf das Schwangerschaftsalter sowie die Abstammung zum Tatverdächtigen.

Neben der Größe des Embryos und des Fruchtsackes lassen sich auch durch histologische und immunhistologische Untersuchungen des plazentaren Gewebes Rückschlüsse auf das Schwangerschaftsalter ziehen. Für die molekulargenetische Analyse sind sowohl embryonale als auch trophoblastäre Anteile des Schwangerschaftsmaterials geeignet.

Kasuistisch vorgestellt wird das methodische Vorgehen bei makroskopisch nicht sicher identifizierbaren Anteilen bzw. vollständigem Fehlen des Keimlings.

Im vorliegenden Fall gab die 31 jährige Betroffene an vergewaltigt worden zu sein. Aus der Tat sei eine Schwangerschaft hervorgegangen, die 21 Tage später durch eine Abrasio unterbrochen wurde.

Vom Frischmaterial wurden unter sterilen Bedingungen drei Proben entnommen, die in der DNA-Analyse nur wenige Hinweise für Zellen kindlichen Ursprungs ergaben. Daraufhin wurde das restliche Gewebe vollständig in Paraffin eingebettet und jeweils in mehreren Schnittstufen histologisch untersucht. Feingeweblich bestand das Untersuchungsmaterial zu etwa 80 % aus schwangerschaftstypisch transformiertem Endometrium und zu etwa 20 % aus plazentarem Zottenwerk, Anteile des Embryos waren nicht vorhanden. Der histologische Reifegrad der plazentaren Zotten entsprach der 7. bis 8. Schwangerschaftswoche post menstruationem. Dabei waren zur Einschätzung der Zottenvaskularisation immunhistochemische Untersuchungen hilfreich (anti CD 31 – Reaktion). Eine primäre Störung der Fruchtanlage oder extrauterine Gravidität konnte ausgeschlossen werden.

Für die molekulargenetische Analyse wurde nach mikroskopischer Markierung gezielt trophoblastäres Gewebe aus dem Paraffinblock disseziert. Um den Anteil mütterlicher DNA abzuschätzen, erfolgte vorerst eine Single-PCR. In einer der Materialproben dominierten die kindlichen Allele, der Anteil der mütterlichen Allele lag unter 10%. Dieses Untersuchungsmaterial konnte in der nachfolgenden Multiplex-PCR wie ein normaler Abstammungsfall bearbeitet werden. Die Kasuistik veranschaulicht, dass die spurenanalytische Bearbeitung von Abrasionsmaterial nur unter Einbeziehung embryonalpathologischer Kenntnisse erfolgreich sein kann.

U. Hanisch, Institut für Rechtsmedizin, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden, Fetscherstraße 74, 01307 Dresden, Germany. Tel.: +493514583363. Fax.: +493514584375. e-mail: [irm@rcs.urz.tu-dresden.de](mailto:irm@rcs.urz.tu-dresden.de) .

---

## ZUR ALTERSBESTIMMUNG UND ABSTAMMUNGSDIAGNOSTIK AN EMBRYONALEM ABRASIONSMATERIAL

U. Hanisch, S. Hering und J. Dreßler

Institut für Rechtsmedizin, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden

In Verdachtsfällen der Vergewaltigung oder sexuellen Nötigung gelangt nach Schwangerschaftsunterbrechung aus kriminologischer Indikation mitunter Abrasionsmaterial zur rechtsmedizinischen Begutachtung. Die juristischen Fragestellungen konzentrieren sich dabei auf das Schwangerschaftsalter sowie die Abstammung zum Tatverdächtigen.

Neben der Größe des Embryos und des Fruchtsackes lassen sich auch durch histologische und immunhistologische Untersuchungen des plazentaren Gewebes Rückschlüsse auf das Schwangerschaftsalter ziehen. Für die molekulargenetische Analyse sind sowohl embryonale als auch trophoblastäre Anteile des Schwangerschaftsmaterials geeignet.

Kasuistisch vorgestellt wird das methodische Vorgehen bei makroskopisch nicht sicher identifizierbaren Anteilen bzw. vollständigem Fehlen des Keimlings.

Im vorliegenden Fall gab die 31 jährige Betroffene an vergewaltigt worden zu sein. Aus der Tat sei eine Schwangerschaft hervorgegangen, die 21 Tage später durch eine Abrasio unterbrochen wurde.

Vom Frischmaterial wurden unter sterilen Bedingungen drei Proben entnommen, die in der DNA-Analyse nur wenige Hinweise für Zellen kindlichen Ursprungs ergaben. Daraufhin wurde das restliche Gewebe vollständig in Paraffin gebettet und jeweils in mehreren Schnittstufen histologisch untersucht. Feingeweblich bestand das Untersuchungsmaterial zu etwa 80 % aus schwangerschaftstypisch transformiertem Endometrium und zu etwa 20 % aus plazentarem Zottenwerk, Anteile des Embryos waren nicht vorhanden. Der histologische Reifegrad der plazentaren Zotten entsprach der 7. bis 8. Schwangerschaftswoche post menstruationem. Dabei waren zur Einschätzung der Zottenvaskularisation immunhistochemische Untersuchungen hilfreich (anti CD 31 – Reaktion). Eine primäre Störung der Fruchtanlage oder extrauterine Gravidität konnte ausgeschlossen werden.

Für die molekulargenetische Analyse wurde nach mikroskopischer Markierung gezielt trophoblastäres Gewebe aus dem Paraffinblock disseziert. Um den Anteil mütterlicher DNA abzuschätzen, erfolgte vorerst eine Single-PCR. In einer der Materialproben dominierten die kindlichen Allele, der Anteil der mütterlichen Allele lag unter 10%. Dieses Untersuchungsmaterial konnte in der nachfolgenden Multiplex-PCR wie ein normaler Abstammungsfall bearbeitet werden. Die Kasuistik veranschaulicht, dass die spurenanalytische Bearbeitung von Abrasionsmaterial nur unter Einbeziehung embryonalpathologischer Kenntnisse erfolgreich sein kann.

U. Hanisch, Institut für Rechtsmedizin, Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden, Fetscherstraße 74, 01307 Dresden, Germany. Tel.: +493514583363. Fax.: +493514584375. e-mail: [irm@rcs.urz.tu-dresden.de](mailto:irm@rcs.urz.tu-dresden.de) .

---

## **Chromosom X      Typisierung:      Validierung      und      Anwendung      des Mentype® Argus X-UL**

H.-D. Grimmecke und M. Föhlisch

Die forensische Spurenkunde und Abstammungsbegutachtung nutzt im wesentlichen die Short Tandem Repeat (STR) Loci der 22 Autosomen, die im weiblichen und männlichen Geschlecht gleich sind. Es gibt jedoch Fragestellungen, die nach Alternativen und Ergänzungen durch Untersuchung von STRs der Geschlechtschromosomen (Gonosomen) verlangen. Besonders die Lösung sogenannter Defizienzgutachten, also der Nachweis der Verwandtschaft über Generationen hinweg bei Defizienz einzelner oder mehrere Personen des Stammbaumes, lassen sich durch Einbeziehung der gonosomalen STRs mit hoher Zuverlässigkeit lösen. Auch die Spurenkunde nutzt im steigenden Maße gonosomale STRs.

Die wissenschaftlichen Grundlagen zur Anwendung dieser Systeme sind erarbeitet und umfassend veröffentlicht worden. Mit der Entwicklung von Mentype® Argus X-UL und Argus Y-MH folgt die Biotype AG den neuen Erfordernissen und bietet validierte Tests für X- und Y-chromosomale STRs kommerziell an.

Es ist zu beachten, dass bei Nutzung der STRs des X Chromosoms für gekoppelte Loci besondere Regeln zu beachten sind, welche noch nicht hinreichend untersucht und validiert worden sind. Nur ungekoppelte Loci liefern in gewohnter Weise von einander unabhängige Informationen und lassen sich bereits heute für Spurenkunde und Abstammungsbegutachtung wie die STRs der Autosomen anwenden.

Vorgestellt wird insbesondere die Validierung eines Pentaplex für vier ungekoppelte STRs des X Chromosoms. Das Testsystem basiert auf den STR Loci DXS8378, DXS7132, HPRTB und DXS7423, die jeweils einer der vier Kopplungsgruppen des X Chromosoms zugeordnet sind, sowie Amelogenin als geschlechtsspezifische Amplifikationskontrolle.

---

### **STR-TYPISIERUNG VON TELOGENEN HAAREN - ERFAHRUNGEN IN DER FALLBEARBEITUNG**

H. Schmitter

Kriminaltechnisches Institut, Bundeskriminalamt, KT 31

Auf dem Spurenworkshop 2002 in Bonn hat Hellmann über ein Verfahren zur STR-Typisierung von telogenen Haaren berichtet. Erfahrungen mit dieser Untersuchungsmethode, die im Bundeskriminalamt seit etwa vier Jahren in der Fallbearbeitung eingesetzt wird, werden im vorliegenden Beitrag dargestellt. In einigen Fällen haben die Ergebnisse entscheidend zur Aufklärung bisher ungelöster Straftaten verholfen. Die Anträge auf Untersuchungen werden besonders häufig in Altfällen gestellt, in denen bisher nicht analysierte Haare als einzige noch verwertbar erscheinende Spuren vorliegen. Die Erfolgsquote der Untersuchungen liegt zwischen 30 und 60%, wobei Lagerungsbedingungen und Vorbehandlungen (etwa Präparation für mikroskopische Untersuchungen) erheblichen Einfluss auf den Untersuchungserfolg ausüben.

Dr. rer. nat H. Schmitter, Bundeskriminalamt, KT 31, Thaerstr. 11, 65193 Wiesbaden, Germany. Tel.: 0049 (0) 611 5512661. Fax: 0049 (0) 611 5545089. e-Mail: hermann.schmitter@bka.bund.de

---

### **Erstellung von STR Profilen von sehr niedrigen DNA Spuren mittels einer modifizierten Kapillarelektrophorese Methode. Eine Alternative zur LCN (Low Copy Number) Analyse?**

A. McDonald, L. Perrins, M. Greenhalgh und H. Solbrig-Lebuhn  
Orchid Biosciences Europe Ltd, Abingdon, United Kingdom

In 2003 hat Orchid Cellmark den ABI PRISM 3100 Genetic Analyser in die forensische Routineanalytik übernommen.

Während der anfänglichen Validierungsphase konnte beobachtet werden, daß der Analyser unter gleichen Versuchsbedingungen und unter Anwendung der empfohlenen Injektionsparameter leicht höhere SGMPlus Peaks lieferte, als das gleiche PCR Produkt unter Einsatz des ABI PRISM 377 DNA Sequencers.

Weitere Versuche durch Modifikation der Injektionsspannung und -zeit ergaben Möglichkeiten einer signifikanten Erhöhung der Signalstärke.

Die PCR Reaktion in unserem Labor hat ein Volumen von 25 µl, nur 1 µl davon kann auf ein 377 Gel zusammen mit dem internen Standard und Beladungspuffer gegeben werden.

Der Elektroinjektionsmodus des Kapillarelektrophorese Analysers macht es möglich das PCR Produkt auf der Kapillare zu konzentrieren, ohne signifikanten Verlust der Auflösung.

Wir haben gleichzeitig die Anzahl der anderen geladenen Komponenten der PCR Produkt Reaktion reduziert (Entsalzung).

Niedermolekulare, negativ geladene Komponenten, wie z. B. PCR Primer, konkurrieren mit den PCR Produkten bei Anlegen der Spannung, um die Kapillare zu beladen.

Reduzierung dieser Ionen durch Mikrofiltration oder Dialyse erhöht den Anteil des DNA PCR Produkts und stellt somit eine größere Portion zur Beladung der Kapillare bereit. Dies wiederum erhöht die Sensitivität des Systems.

Beispiele von verschiedenen Fällen demonstrieren diesen Effekt.

Die Blutanalyse von der Kleidung eines ermordeten Opfers ergab unter Einsatz des 377 Gel Sequencers nur ein eindeutiges DNA Profil des Opfers und vage Anzeichen für ein weiteres Profil eines anderen Individuums.

Die erneut durchgeführte optimierte Kapillarelektrophorese Analyse machte es möglich ein klares DNA Profil eines anderen Individuums in der Mixtur zu bestimmen.

Der Einsatz dieser Methode wurde aktiv untersucht und kann als Alternative zur LCN Analytik angesehen werden.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß die Anzahl der PCR Zyklen nicht erhöht werden muß und somit das Risiko irritierende Ergebnisse durch externe Kontaminationen zu erhalten, reduziert ist.

Dr. Heike Solbrig-Lebuhn, Orchid BioSciences Europe Ltd, Büro Deutschland, 47803 Krefeld, Kempener Allee 112 c, Tel: 02151-976656, Fax: 02151-976657, e-mail: [hsolbrig@orchid-deutschland.de](mailto:hsolbrig@orchid-deutschland.de)

---

### **Erstellung von STR Profilen von sehr niedrigen DNA Spuren mittels einer modifizierten Kapillarelektrophorese Methode. Eine Alternative zur LCN (Low Copy Number) Analyse?**

A. McDonald, L. Perrins, M. Greenhalgh und H. Solbrig-Lebuhn  
Orchid Biosciences Europe Ltd, Abingdon, United Kingdom

In 2003 hat Orchid Cellmark den ABI PRISM 3100 Genetic Analyser in die forensische Routineanalytik übernommen.

Während der anfänglichen Validierungsphase konnte beobachtet werden, daß der Analyser unter gleichen Versuchsbedingungen und unter Anwendung der empfohlenen Injektionsparameter leicht höhere SGMPlus Peaks lieferte, als das gleiche PCR Produkt unter Einsatz des ABI PRISM 377 DNA Sequencers.

Weitere Versuche durch Modifikation der Injektionsspannung und -zeit ergaben Möglichkeiten einer signifikanten Erhöhung der Signalstärke.

Die PCR Reaktion in unserem Labor hat ein Volumen von 25 µl, nur 1 µl davon kann auf ein 377 Gel zusammen mit dem internen Standard und Beladungspuffer gegeben werden.

Der Elektroinjektionsmodus des Kapillarelektrophorese Analysers macht es möglich das PCR Produkt auf der Kapillare zu konzentrieren, ohne signifikanten Verlust der Auflösung.

Wir haben gleichzeitig die Anzahl der anderen geladenen Komponenten der PCR Produkt Reaktion reduziert (Entsalzung).

Niedermolekulare, negativ geladene Komponenten, wie z. B. PCR Primer, konkurrieren mit den PCR Produkten bei Anlegen der Spannung, um die Kapillare zu beladen.

Reduzierung dieser Ionen durch Mikrofiltration oder Dialyse erhöht den Anteil des DNA PCR Produkts und stellt somit eine größere Portion zur Beladung der Kapillare bereit. Dies wiederum erhöht die Sensitivität des Systems.

Beispiele von verschiedenen Fällen demonstrieren diesen Effekt.

Die Blutanalyse von der Kleidung eines ermordeten Opfers ergab unter Einsatz des 377 Gel Sequencers nur ein eindeutiges DNA Profil des Opfers und vage Anzeichen für ein weiteres Profil eines anderen Individuums.

Die erneut durchgeführte optimierte Kapillarelektrophorese Analyse machte es möglich ein klares DNA Profil eines anderen Individuums in der Mixtur zu bestimmen.

Der Einsatz dieser Methode wurde aktiv untersucht und kann als Alternative zur LCN Analytik angesehen werden.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß die Anzahl der PCR Zyklen nicht erhöht werden muß und somit das Risiko irritierende Ergebnisse durch externe Kontaminationen zu erhalten, reduziert ist.

Dr. Heike Solbrig-Lebuhn, Orchid BioSciences Europe Ltd, Büro Deutschland, 47803 Krefeld, Kempener Allee 112 c, Tel: 02151-976656, Fax: 02151-976657, e-mail: [hsolbrig@orchid-deutschland.de](mailto:hsolbrig@orchid-deutschland.de)

---

### **Obduktion einer forensischen mtDNA Datenbank**

H.-J. Bandelt



Auf dem 21. Spurenworkshop München (09.- 10.02.2001) der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin wurde das Projekt „D-Loop-Base“ einer zentraleuropäischen Datenbank für nicht codierende mitochondriale Sequenzen vorgestellt („D-Loop-BASE im Internet - Eine neue Qualität der forensischen mtDNA-Datenbank“; siehe <http://rechts.web.med.uni-muenchen.de/workshop/programm.pdf>). Seit dem Onlinegang im August 2001 hat sich nichts an Form und Inhalt dieser Datenbank geändert (<http://www.d-loop-base.de/index1.htm>). Ein Vorfall (Testanfrage an D-Loop-BASE) zieht jedoch in Zweifel, ob die Datenbank jemals intakt war. Der äußere Befund offenbart letale Konzeptions- und Programmierfehler. Der innere Befund, bei dem verstümmelte publizierte wie fehlerhafte unpublizierte Sequenzen aus D-Loop-BASE heraussezierbar sind, bestätigt die schlimmsten Befürchtungen, was den Datenbestand betrifft. Ein zügiger Offlinegang ist zur Schadensbegrenzung dringend geboten.