

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Würzburg
Vorstand: Prof. Dr. med. Christoph Meißner

DNA-analytische Untersuchungen an frischen und gelagerten Zähnen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Sebastian Gebhard
aus Schnaittach

Würzburg, Juli 2009

Referent: Prof. Dr. med. Dieter Patzelt

Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Dipl.-Ing. Ernst-Jürgen Richter

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11.03.2010

Der Promovend ist Zahnarzt.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Forensische Zahnmedizin	1
1.2 Molekularbiologische Grundlagen	3
1.2.1 Der genetische Fingerabdruck	3
1.2.2 Identifikationsmöglichkeiten mittels DNA-Analyse	3
1.2.2.1 Variable number of tandem repeats (VNTR)	4
1.2.2.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)	4
1.2.2.3 Short tandem repeats (STR)	4
1.2.2.4 Mitochondriale DNA (mtDNA)	5
1.2.2.5 Geschlechtsdifferenzierung mittels Amelogenin	6
1.3 Allgemeine zahnärztliche Grundlagen	6
1.4 Aufgabenstellung	9
2 Materialien und Methoden	10
2.1 Instrumente und Reagenzien	10
2.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte	10
2.1.2 Zahnreinigung und Probenentnahme	10
2.1.3 DNA-Extraktion	10
2.1.4 PCR	11
2.1.5 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	12
2.1.6 Hochauflösende Kapillarelektrophorese	13
2.2 Zahnproben und Lagerung	14
2.2.1 Zähne aus den Zahnarztpraxen Dr. Werner Gebhard und Dr. Lothar Gebhard	14
2.2.2 Zähne aus der Kieferchirurgiepraxis Dr. Dr. Hemmerich	15
2.2.3 Zähne der Naturhistorischen Gesellschaft Nürnberg	16
2.2.3.1 Zähne aus einer Ausgrabung in Katzwang	16
2.2.3.2 Zähne aus der Dietersberghöhle	17
2.2.4 Zähne aus Sektionsgut	18
2.3 Versuchsaufbauten	19
2.3.1 Frisch extrahierte Zähne	19
2.3.2 Im Erdboden vergrabene Zähne	19
2.3.3 In Wasser gelagerte Zähne	20
2.3.4 Der Sonnenstrahlung ausgesetzte Zähne	20
2.3.5 Zähne aus Sektionsgut	21
2.3.6 Starker Hitze ausgesetzte Zähne	21
2.3.7 Vor 28 bzw. 29 Jahren extrahierte Zähne	22
2.3.8 Zähne der Ausgrabung in Katzwang	22
2.3.9 Zähne aus der Dietersberghöhle	22
2.4 Methoden	23
2.4.1 Kontaminationsvermeidung	23
2.4.2 Probenentnahme	24
2.4.3 DNA-Extraktion	25
2.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
2.4.4.1 STR SE33	27

2.4.4.2 AmpFISTR® SGM Plus Kit.....	27
2.4.4.3 STR TPOX-vs.....	29
2.4.4.4 Menteype® NonaplexQS PCR Amplifikation Kit.....	30
2.4.5 Gelelektrophorese und Silberfärbung.....	31
2.4.6 Hochauflösende Kapillarelektrophorese.....	32
2.4.7 Quantifiler® Human DNA Quantification Kit.....	33
3 Ergebnisse.....	34
3.1 Frisch extrahierte Zähne.....	35
3.2 Im Erdboden vergrabene Zähne.....	37
3.3 In Wasser gelagerte Zähne.....	39
3.4 Der Sonnenstrahlung ausgesetzte Zähne.....	40
3.5 Zähne aus Sektionsgut.....	40
3.6 Starker Hitze ausgesetzte Zähne.....	41
3.7 Vor 28 bzw. 29 Jahren extrahierte Zähne.....	42
3.9 Zähne aus der Dietersberghöhle.....	43
4 Diskussion.....	45
4.1 Methoden.....	45
4.1.1 Probenentnahme.....	45
4.1.2 DNA-Extraktion.....	46
4.1.3 PCR.....	47
4.1.4 Real-Time-Quantitative-PCR (RTQ-PCR).....	49
4.2 Komplikationen und PCR-Artefakte.....	49
4.2.1 „allelic dropout“.....	50
4.2.2 Falsche Geschlechtsangabe.....	50
4.2.3 Stotterbanden.....	51
4.3 Ergebnisse.....	51
4.3.1 Frisch extrahierte Zähne.....	51
4.3.2 Im Erdboden vergrabene Zähne.....	53
4.3.3 In Wasser gelagerte Zähne.....	55
4.3.4 Der Sonnenstrahlung ausgesetzte Zähne.....	56
4.3.5 Zähne aus Sektionsgut.....	57
4.3.6 Starker Hitze ausgesetzte Zähne.....	57
4.3.7 Vor 28 bzw. 29 Jahren extrahierte Zähne.....	59
4.3.8 Zähne der Ausgrabung in Katzwang.....	59
4.3.9 Zähne aus der Dietersberghöhle.....	60
4.4 DNA-Analyse bei archäologischen Skelettfunden.....	60
5 Zusammenfassung.....	62
6 Literaturverzeichnis.....	64

Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Längen der Analyseprodukte in Beziehung zur Fragmentlänge der degradierten DNA (aus Hummel 2003, S. 28)
- Abb. 2: Apicales delta und Markkanal (Sicher et al. 1928, S. 128)
- Abb. 3: Der Eingang zur Dietersberghöhle
- Abb. 4: Standort der im Erdreich vergrabenen Zähne
- Abb. 5: Standort der in Wasser gelagerten Zähne
- Abb. 6: Standort der der Sonnenstrahlung ausgesetzten Zähne
- Abb. 7: Aufbewahrungsgefäß der fast 30 Jahre alten Zähne
- Abb. 8: Schädel mit Probenzahn Nr. 40 mit Trepanationsbohrung
- Abb. 9: Die drei Zähne aus der Dietersberghöhle (Proben 48-50)
- Abb. 10: Zahn mit zirkulärer Rille vor Öffnung der Pulpa
- Abb. 11: Probenentnahmeplatz
- Abb. 12: Probenzahn nach dem Aufbrechen
- Abb. 13: Polyacrylamidgel auf der Kühlplatte
- Abb. 14: Angefärbtes Vorgel der Proben 51 und 52; links: der SE33, rechts: SGM-Multiplex; beide mit Leiter, Neutralprobe, Positiv- und Negativkontrolle
- Abb. 15: Obere Grafik: Die Referenzalleleiter dieses Systems dient zum Abgleich mit den Probenergebnissen. Mittlere Grafik: Ein nicht eindeutig detektierbares Ergebnis. Die beiden Peaks der Probe 26 liegen zwar im Bereich der Allele 16 und 17, treten aber nur sehr schwach vom Hintergrundrauschen hervor und werden daher mit einem „?“ kenntlich gemacht. Untere Grafik: Bei Probe 47 ist eine eindeutige Allelzuordnung möglich.
- Abb. 16: Tief zerstörter Zahn der Probe Nr. 9
- Abb. 17: Beispiel für ein Elektropherogramm des Mentype® Nonaplex^{QS} analysiert am ABI PRISM® 310 Analyser mit rot markiertem DNA-Längensstandard 550 (ROX) (Biotype AG, Produktinformation Mentype® Nonaplex^{QS})
- Abb. 18: Stotterbanden bei di- und tetranukleotiden STR-Amplifikationsprodukten (aus Hummel 2003, S. 36)

Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Übersicht über das Ausgangsmaterial der Zahnarztpraxen Dr. Werner Gebhard und Dr. Lothar Gebhard
- Tab. 2: Übersicht über das Ausgangsmaterial der Kieferchirurgiepraxis Dr. Dr. Hemmerich
- Tab. 3: Übersicht über das Ausgangsmaterial der Ausgrabung bei Katzwang
- Tab. 4: Übersicht über das Ausgangsmaterial aus der Dietersberghöhle
- Tab. 5: Übersicht über das Ausgangsmaterial aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin Würzburg
- Tab. 6: PCR-Ansatz für SE33
- Tab. 7: PCR-Bedingungen für SE33
- Tab. 8: Systeme des AmpFISTR® SGM Plus® (nach Arbeitsanleitung AmpFISTR® SGM Plus®, Applied Biosystems)
- Tab. 9: PCR-Ansatz für AmpFISTR® SGM Plus® (nach Arbeitsanleitung AmpFISTR® SGM Plus®, Applied Biosystems)
- Tab. 10: PCR-Bedingungen für AmpFISTR® SGM Plus® (nach Arbeitsanleitung AmpFISTR® SGM Plus®, Applied Biosystems)
- Tab. 11: PCR-Ansatz für TPOX-vs (Hellmann et al. 2001)
- Tab. 12: PCR-Bedingungen für TPOX-vs (Hellmann et al. 2001)
- Tab. 13: Systeme des Mentype® Nonaplex^{QS} (nach Arbeitsanleitung für Mentype® Nonaplex^{QS}, Biotype® und Homepage Biotype AG)
- Tab. 14: PCR-Ansatz für Mentype® Nonaplex^{QS} (nach Arbeitsanleitung für Mentype® Nonaplex^{QS}, Biotype®)
- Tab. 15: PCR-Bedingungen für Mentype® Nonaplex^{QS} (nach Arbeitsanleitung für Mentype® Nonaplex^{QS}, Biotype®)
- Tab. 16: Ansatz für die Kapillarelektrophorese
- Tab. 17: Ansatz für Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (nach Arbeitsanleitung Quantifiler® Human DNA Quantification Kit, Applied Biosystems)
- Tab. 18(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der frisch extrahierten Zähne
- Tab. 18(b): TPOX-vs und Nonaplex der frisch extrahierten Zähne
- Tab. 19(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der vergrabenen Zähne
- Tab. 19(b): TPOX-vs und Nonaplex der vergrabenen Zähne

- Tab. 20(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der in Wasser gelagerten Zähne
- Tab. 20(b): TPOX-vs und Nonaplex der in Wasser gelagerten Zähne
- Tab. 21(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der Sonnenstrahlung ausgesetzten Zähne
- Tab. 21(b): TPOX-vs und Nonaplex der Sonnenstrahlung ausgesetzten Zähne
- Tab. 22(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der Zähne aus dem Sektionsgut
- Tab. 22(b): TPOX-vs und Nonaplex der Zähne aus dem Sektionsgut
- Tab. 23(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der starker Hitze ausgesetzten Zähne
- Tab. 23(b): TPOX-vs und Nonaplex der starker Hitze ausgesetzten Zähne
- Tab. 24: Quantifizierung, SE33 und SGM der vor 28 bzw. 29 Jahren extrahierten Zähne
- Tab. 25(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der Zähne der Ausgrabung in Katzwang
- Tab. 25(b): TPOX-vs und Nonaplex der Zähne der Ausgrabung in Katzwang
- Tab. 26: Quantifizierung, TPOX-vs und Nonaplex der Zähne aus der Dietersberghöhle

Abkürzungsverzeichnis

6-FAM:	6-Carboxy-Fluorescein
AKFOS:	Arbeitskreis Forensische Odonto-Stomatologie
bp:	Basenpaar
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
BSA:	Bovine serum albumin
dNTP:	Desoxynucleosidtriphosphat
HEX:	4,7,2',4',5',7'-Hexachloro-6-Carboxy-Fluorescein
NaOCl:	Natriumhypochlorit
NHG:	Naturhistorische Gesellschaft Nürnberg
OK:	Oberkiefer
PAGE:	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR:	Polymerasekettenreaktion
ROX:	6-Carboxy-X-Rodamin
RTQ-PCR:	Real-Time-Quantitative-PCR
STR:	short tandem repeats
UK:	Unterkiefer
VNTR:	variable number of tandem repeats
vs-STR:	very short STR
WF:	Wurzelkanalfüllung

1 Einleitung

1.1 Forensische Zahnmedizin

Die Mithilfe von Zahnärzten bei der Untersuchung von Zähnen zur Identifizierung ist in der Rechtsmedizin nicht unüblich. So wurde im Jahre 1976 während der 102. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde der Arbeitskreis Forensische Odonto-Stomatologie (AKFOS) gegründet, der es sich zur Aufgabe gemacht hat, „die forensischen Aspekte in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde zu sichten und die wissenschaftlichen Interessen dieses Gebietes [...] zu fördern“ (§3 der Satzung des AKFOS).

Ein forensisch tätiger Zahnarzt wird immer hinzugezogen, wenn andere Methoden zur Identifizierung einer unbekanntes Leiche nicht mehr realisiert werden können oder erfolglos blieben. Eine solche Identifizierung ist in der Regel durch eine Erhebung des Zahnstatus eines Toten oder durch einen Röntgenfilm und anschließendem Abgleich mit den zahnärztlichen Unterlagen der in Frage kommenden Person möglich. Nicht nur die Anzahl fehlender Zähne, gesetzter Implantate und Versorgung mit Wurzelkanalbehandlungen und Füllungen, sondern auch deren Position im Kiefer, deren Ausdehnung und die verwendeten Materialien machen ein menschliches Gebiss so gut wie unverwechselbar. Die Versorgung mit festsitzenden oder herausnehmbaren, prothetischen oder kieferorthopädischen Arbeiten (Kronen, Brücken, Teleskop-, Modellguß-, Klammer-, Coverdentureprothesen, totale Prothesen, Multibandapparaturen, Spangen, ...), chirurgische Eingriffe (Wurzelspitzenresektionen, Knochenaugmentationen, Sinuslifts, ...), das Vorhandensein von überzähligen oder verlagerten Zähnen und Veränderungen durch Alter oder pathologische Vorgänge (Zahnkippen, Atrophie der Kieferkämme, Zysten, ...) erweitern zudem die interindividuelle Variabilität (Wittacker et al. 1993, S. 9ff; Röttscher 2003, S. 1590ff).

Schwieriger wird es, wenn keine Restbezaehlung mehr vorhanden ist. In einigen Ländern ist es daher üblich, dass Prothesen mit Markierungen versehen werden, die eine Identifizierungshilfe geben (Röttscher 2000, S. 157f).

Aber nicht nur zur Identifizierung von Personen ist der forensisch tätige Zahnarzt in der Lage. Auch eine Lebensaltersschätzung ist mit Zähnen möglich. Anhand der

Chronologie der Zahnentwicklung und des Zahnwachstums kann bei Kindern unter 14 Jahren das Alter mit einer Zuverlässigkeit von +/- 2 Jahren bestimmt werden. Resorption der Milchzahnwurzeln, sowie Ausbildung und Verkalkung sind im Röntgenbild gut darstellbare Merkmale.

Der Razemisierungsgrad von Asparginsäure eignet sich für jedes Alter als eine präzise Möglichkeit der Altersschätzung. Wegen seines extrem bradytrophen Stoffwechsels ist Dentin ein optimales Gewebe zur biochemischen Lebensalterbestimmung. Asparginsäure tritt in zwei Formen auf: In einer L- sowie in einer D-Form. Bei der Biosynthese menschlicher Proteine werden ausschließlich L-Aminosäuren gebildet. Ab dem Zeitpunkt der Synthese kommt es zu spontanen, nicht enzymatischen Umwandlungen in die D-Form. Diese In-vivo-Razemisierung lässt sich im Zahndentin nach entsprechender Aufbereitung und Analyse nachweisen. Seit 1995 wird diese Methode in Deutschland auch bei lebenden Personen angewendet (Ritz-Timme et al. 2003).

Extrahierte Zähne erlauben eine Altersabschätzung auch durch Transluzenzbestimmung des Wurzeldentins (Bang et al. 1970).

Eine der bisher größten Herausforderungen für forensische Zahnärzte war sicherlich die Tsunami-Katastrophe im Indischen Ozean im Dezember 2004. Wie Petju, Schuller-Gotzburg oder Tan in ihren Studien darlegen, wurden alle deutschen Opfer in Thailand durch zahnärztliche Unterlagen identifiziert. Probleme durch mangelnde Unterlagen gab es jedoch bei der Identifizierung einheimischer Opfer (Petju et al. 2007; Schuller-Gotzburg et al. 2006; Tan 2005).

Aber nicht nur Naturkatastrophen wie Erdbeben, Überschwemmungen oder Vulkanausbrüche fordern immer wieder den Einsatz forensischer Zahnärzte. Auch Katastrophen wie das Zugunglück in Eschede, Schiffshavarien oder Flugzeugabstürze machen deren Einsatz ebenso nötig. Terrorangriffe wie im September 2001 in den USA, erweitern ebenfalls das Einsatzgebiet der forensischen Zahnmedizin (Glass 2005).

Das „Victorian Institute of Forensic Medicine“ im australischen Melbourne entwickelt seit 1997 eine computergestützte Software, die automatisiert den Zahnstatus vergleichen und auf Übereinstimmungen untersuchen kann. Dieses „Disaster And Victim IDentification“-Programm (DAVID) wird seit 2005 in ein Web-basierendes Programm umprogrammiert, welches dann schnell weltweit einsetzbar sein wird (Clement et al. 2006).

Besonders Zähne eignen sich oft sehr gut zur Erstellung des sogenannten genetischen Fingerabdrucks, da sie sehr widerstandsfähig gegen äußere Einflüsse sind. „Sie sind bei hochgradiger Gewebszerstörung wie bei Wasserlagerung, Fäulnis oder Leichenbrand eine relativ zuverlässige Quelle ausreichend hochmolekularer DNA. Die Zahnpulpa ist durch ihre Lokalisation gut vor Degradation und Kontamination geschützt“ (Patzelt et al. 2003, S. 1045).

1.2 Molekularbiologische Grundlagen

1.2.1 Der genetische Fingerabdruck

Zur Identifikation von Personen ist in Europa seit Anfang des 20. Jahrhunderts der „normale“ Fingerabdruck, das Daktylogramm, nicht mehr wegzudenken. Bei diesem Verfahren macht man sich das individuelle Hautleistenmuster der Fingerbeere zu Nutze (Siegmund-Schultze 2003).

1985 erkannte Jeffreys das Potential individualspezifischer repetitiver DNA als Grundlage zur Identifizierung. Durch die Analyse dieser nicht kodierenden DNA-Abschnitte ist es möglich jedes Individuum mit einem einzigartigen, strichcode-ähnlichen Muster in Verbindung zu bringen. Dieses Verfahren wird als „genetischer Fingerabdruck“ bezeichnet, da ähnlich wie beim Daktylogramm eine eindeutige Individualzuordnung möglich ist. Einzige Ausnahme bilden hierbei eineiige Zwillinge. Mit den damaligen Techniken war allerdings eine große Menge an hochmolekularer DNA nötig (Jeffreys et al. 1985).

1.2.2 Identifikationsmöglichkeiten mittels DNA-Analyse

Durch das „Human Genome Project“ wurde herausgefunden, dass nur ca. 5 % des menschlichen Genoms für die Codierung der Proteine verantwortlich sind. Die nicht codierenden Abschnitte sind für eine Identifizierung insofern interessant, weil sie eine interindividuelle Variabilität aufweisen. Verschiedene Arten von polymorphen DNA-

Strukturen sind mittlerweile bekannt, welche in der Spurensuche Anwendung finden (Hummel 2003, S. 26f).

1.2.2.1 Variable number of tandem repeats (VNTR)

Anfangs wurden längere, so genannte VNTRs (Variable number of tandem repeats) oder Minisatelliten für forensische Untersuchungen herangezogen. Diese repetitiven DNA-Sequenzen bestehen aus 5-50 Wiederholungen von 20-70 bp langen Segmenten. Folglich benötigt man hierfür hochmolekulare DNA. Spezielle Oligonukleotide, so genannte Primer, legen den Startpunkt der Amplifikation festlegen und definieren somit, welcher Locus auf der DNA in der PCR vervielfältigt wird (Horn et al. 1989).

1.2.2.2 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen (RFLP)

Bei der RFLP-Analyse (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen) von PCR-Produkten wird doppelsträngige DNA durch Restriktionsenzyme, so genannte Endonukleasen, verdaut und anschließend durch Elektrophorese aufgetrennt. Mit speziellen Sonden können nun die entstandenen Banden markiert und sichtbar gemacht werden. Dieses Bandenmuster ist bei jedem Individuum unterschiedlich und kann ebenso zur Identifizierung herangezogen werden. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass eine große Menge hochmolekularer DNA vorhanden sein muss, was die Verwendung in der Rechtsmedizin einschränkt (Hummel 2003, S. 126f).

1.2.2.3 Short tandem repeats (STR)

Ab dem Beginn der 90er Jahre lösten kürzere, polymorphe Strukturen die VNTRs ab. Zur Analyse dieser Mikrosatelliten oder STRs (Short Tandem Repeats) genügten nunmehr kürzere DNA-Fragmente und es konnte eine stärker degradierte DNA zur Individualzuordnung genutzt werden. Die sich dabei wiederholende Kernsequenz ist lediglich 2-6 bp groß, sodass die zu analysierenden Genorte nur 100-300 bp lang sind (Hammond et al. 1994; Urquhart et al. 1995).

Mit der Entwicklung von neuen Primern konnten noch kleinere Zielfragmente erfasst und somit noch stärker degradierte DNA verwendet werden. Dies war möglich, indem die Annealingposition der Primer näher an die repetitive Sequenz gelegt werden konnte. So gelang es bei den vs-STRs (very short STRs), die Allelgrößen auf unter 87 bp beim System TPOX, unter 86 bp beim System TH01 und unter 106 bp beim System FES zu senken. Beim Vergleich des klassischen Systems mit dem vs-System desselben Individuums ist eine Übereinstimmung der Allelnummern zu erwarten (Hellmann et al. 2001).

Das folgende Schema stellt die Länge der Analyseprodukte in Beziehung zur Fragmentlänge der degradierten DNA dar:

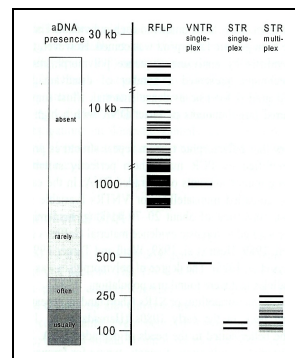


Abb. 1: Längen der Analyseprodukte in Beziehung zur Fragmentlänge der degradierten DNA (aus Hummel 2003, S. 28)

1.2.2.4 Mitochondriale DNA (mtDNA)

Im Gegensatz zu chromosomaler DNA, die zur einen Hälfte von der Mutter und zur anderen Hälfte vom Vater vererbt wird, wird die mitochondriale DNA ausschließlich in der maternalen Linie weitergegeben. Dies kommt daher, dass die Oozyte den kompletten Satz Mitochondrien bereits beinhaltet und vom Spermium bei der Befruchtung in der Regel keine weiteren hinzukommen. Alle Familienmitglieder der mütterlichen Linie besitzen folglich die gleiche mtDNA-Sequenz (Hühne et al. 1999). Innerhalb der ringförmigen mtDNA kommen die meisten Sequenzpolymorphismen in der „d-loop control region“ vor, die sich vor allem aus den Regionen HVR I und II (hypervariable region I und II) zusammensetzt. Mittels Sequenzanalyse von DNA dieser Regionen eines unbekanntes Menschen und Vergleich mit DNA von in Frage

kommenden Personen oder von deren mütterlichen Verwandten kann eine Identifikation durchgeführt werden (Bär et al. 2000).

Neben der hohen Variabilität bietet die mtDNA Vorteile wie das Analysieren von Verwandtschaftsbeziehungen der mütterlichen Linie und das Vorkommen einer hohen Anzahl an Kopien von 10^3 - 10^4 pro Zelle (Geserick et al. 1998).

1.2.2.5 Geschlechtsdifferenzierung mittels Amelogenin

Das Amelogenin ist ein Protein, das bei der Schmelzbildung der Zähne eine Rolle spielt. Es wird auf den beiden gonosomalen Chromosomen X und Y an den Stellen Xp22.31-p22.1 und Yp11.2 codiert. Anfang der 90er Jahre wurde entdeckt, dass das erste Intron dieses Gens auf dem X-Chromosom 6 bp kürzer ist und statt 112 bp nur 106 bp aufweist. Somit deutet eine Bande (106 bp) bei der Analyse auf ein weibliches Geschlecht, zwei Banden (106 bp und 112 bp) auf ein männliches Geschlecht hin (Mannucci et al. 1994).

1.3 Allgemeine zahnärztliche Grundlagen

Ein Mensch hat mit Weisheitszähnen insgesamt 32 bleibende Zähne, davon pro Kieferquadrant zwei Schneidezähne (Inzisivi), einen Eckzahn (Caninus), zwei kleine Backenzähne (Prämolaren) und drei große Mahlzähne (Molaren). Der grundlegende anatomische Aufbau ist bei allen Zähnen gleich (Fischer 1935, S. 2).

Die Bezifferung der Zähne wurde bei dieser Arbeit nach dem von der Federation Dentaire Internationale 1970 eingeführten, so genannten FDI-Schema durchgeführt. Dieses Zahnschema mit zwei Ziffern setzt sich aus der Nummer des Quadranten und dem von der Mitte aus fortlaufend nummerierten Zahn zusammen (Lehmann et al. 2002, S. 9).

Ein Zahn besteht aus drei Hartgeweben, dem Zahnbein (Dentium), dem Zahnschmelz (Enamelum) und dem Zahnzement (Cementum).

Das Dentin besteht aus einer organischen, kollagenreichen Grundsubstanz (etwa 70 %) und zur Härtung aus anorganischen Hydroxylapatitkristallen $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ (etwa 30 %). Anders als bei der Knochenbildung, bei der sich die Osteoblasten in

den Knochen einmauern, bleiben die Dentin bildenden Zellen, die Odontoblasten, am Rand des Zahnbeines liegen und entsenden lediglich 1-3 µm dicke Fortsätze („Tomes-Fasern“) in die Zahnbeinröhrchen (Tubuli dentales).

Zum Schutz vor Abnutzung wird das Dentin vom härtesten menschlichen Gewebe, dem Zahnschmelz, überzogen. Dieser besteht, ähnlich wie Knochen oder Dentin, aus Hydroxylapatitkristallen, die in eine organische Grundsubstanz eingelagert sind. Der organische Anteil beträgt weniger als 1 %. Die Schmelz bildenden Zellen, die Ameloblasten, liegen dem Zahnschmelz außen auf und werden nach dem Zahndurchbruch rasch abgekaut. Zahnschmelzdefekte sind daher nicht regenerationsfähig.

Der im Knochen eingebettete Anteil ist von einem dünnen Überzug aus knochenähnlichem Zahnzement umgeben. Kräftige Bandzüge ziehen von ihm aus in den Kieferknochen und verankern somit den Zahn in der Zahnhöhle, der Alveole (Lippert 2003, S. 601).

Im Zahninneren, dem Pulpenkavum, befindet sich ein nerven- und gefäßreiches Gewebe, welches unter anderem aus undifferenzierten Zellen, Fibroblasten und Odontoblasten besteht (Hellwig et al. 2003, S. 248).

Schon 1928 war bekannt, dass sich der Wurzelkanal nicht nur verjüngt, um schließlich in der Wurzelspitze im Foramen apicale auszumünden, sondern sich in der Regel kurz vor dem Ausgang in mehrere Äste aufteilt und damit ein apikales Delta bildet (siehe Abb. 2). Eine weitere Form der Nebenäste stellen Markkanäle dar, die eine Seitenwand der Wurzel perforieren können und an der Außenseite münden (Sicher et al. 1928, S. 128f).

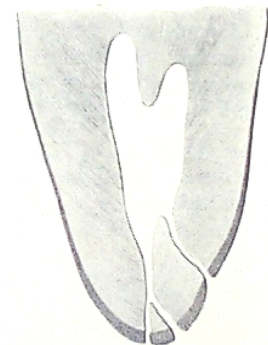


Abb. 2: Apicales delta und Markkanal (Sicher et al. 1928, S. 128)

Jeder Zahn im Gebiss ist durch sein Wurzelmerkmal, Massenmerkmal, Winkelmerkmal und andere Zahnmerkmale eindeutig seiner Position im Zahnbogen zuortbar. Das Wurzelmerkmal ist definiert als die Abweichung der Wurzel nach distal im Bezug zur Zahnachse. Das Massenmerkmal bedeutet, dass die Zähne mesial massiger sind als distal. Das Winkelmerkmal sagt aus, dass von vestibulär gesehen der Winkel der Schneidekante mit der Approximalfläche mesial spitzer ist als distal (Lehmann et al. 2002, S. 13).

In dieser Arbeit wurde Gewebe der Zahnpulpa untersucht. Das Zahnmarkgewebe ist allerdings nicht immer gesund. In Folge von Karies entwickelt sich oftmals eine Pulpitis. Dieses so veränderte Pulpengewebe unterliegt den für Entzündungen üblichen Kardinalsymptomen Rubor, Tumor, Kalor, Dolor und Functio laesa. Allerdings verursacht die besondere Topografie charakteristische Verlaufsformen. Durch einen Reiz ausgelöste Hyperämie führt zu einer Erhöhung des Gewebedrucks. Daraufhin wandern Leukozyten durch chemokinetische und chemotaktische Faktoren aus den Gefäßen an den Reaktionsort; eine reversible Pulpitis entsteht. Kann der Reiz entfernt werden, kommt es zur Ausheilung. Bei weiterem Bestehen des Reizes wandern kurzlebige neutrophile Granulozyten ein, welche beim Absterben zelltoxische Komponenten und proteolytische Enzyme freisetzen, die bei entsprechender Konzentration unweigerlich zur Pulpanekrose führen.

Neben der aseptischen, entzündungsbedingten Nekrose kann auch eine Kolliquationsnekrose durch in die Pulpa eindringende Bakterien entstehen. Dabei kann der bakterielle Befall entweder durch eine kariöse Läsion des Zahnhartgewebes stattfinden oder die Bakterien gelangen retrograd durch eine Entzündung des Zahnhalteapparates (Parodontitis) über das Foramen apicale in das Endodont (Paro-Endo-Läsion) (Hellwig et al. 2003, S. 254ff).

Die Therapie einer Pulpitis besteht in einer Wurzelkanalbehandlung. Hierbei wird die pulpitische oder gangränöse Kronen- und Wurzelpulpa entfernt, das Kanallumen mit endodontischen Instrumenten aufbereitet und anschließend der Wurzelkanal mit Spüllösungen und medizinischen Einlagen desinfiziert. Wenn die Kanäle (teils erst nach mehreren Sitzungen) beschwerdefrei sind und trocken gelegt werden können, werden die Wurzelkanäle mit Guttaperchastiften und einer Wurzelkanalfüllpaste verschlossen (Weber 2003, S. 298ff).

Wegen der üblich verwendeten desinfizierenden Wurzelkanaleinlagen ist fraglich, ob aus wurzelgefüllten Zähnen für die Analyse verwertbare DNA gewonnen werden kann. Besonders durchgeführte Spülungen mit Natriumhypochlorit zur Reinigung der Wurzelkanäle zerstören vorhandene DNA.

1.4 Aufgabenstellung

Zielsetzung dieser Doktorarbeit war zu überprüfen, inwieweit die Fortentwicklung molekularer Nachweisverfahren der letzten Jahre neue Möglichkeiten zur Typisierung von STR-Systemen an Zähnen bietet. Dabei wurde im Besonderen der Frage nachgegangen, wie sich verschiedene Lagerungsbedingungen auf die Degradation von pulpaler DNA auswirken. Hierzu wurden einige zum Zeitpunkt der Zahnextraktion vitale Zähne im Erdreich vergraben, in Wasser gelagert, der Sonneneinstrahlung ausgesetzt und im Wärmeschrank erhitzt. Zwei Zähne aus dem Sektionsgut des Institutes für Rechtsmedizin der Universität Würzburg wurden ohne spezielle Lagerung in dieser Arbeit verwendet. Zähne mit vorhandenen Wurzelkanalfüllungen wurden auf verwertbare Ergebnisse hin analysiert. Zusätzlich standen vor 28 bzw. 29 Jahren extrahierte Zähne sowie 380-550 Jahre und 2.300-2.800 Jahre alte Zähne zur Untersuchung zur Verfügung.

2 Materialien und Methoden

2.1 Instrumente und Reagenzien

2.1.1 Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

Gefrierschrank Premium	Liebherr, Biberach
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Safeguard-Filtertips 10, 30, 100, 200 und 1000 µl	PeqLab, Erlangen
Vortex-Gerät Genie 2	Bender & Hobein, Zürich
Wärmeschrank Modell 600	Memmert, Schwabach

2.1.2 Zahnreinigung und Probenentnahme

K-Feile Colorinox® der Größen 20 - 55	Dentsply, Konstanz
Petrischale, steril	Hartenstein, Würzburg
NaOCl	Roth, Karlsruhe
Hebel nach Bein	Aesculap, Tuttlingen
Prämolarenzange	Aesculap, Tuttlingen
Diamantbohrer	Komet, Lemgo
Turbine	Kavo, Biberach
Einschweißfolien	Hawo, Obringheim
Pinzette	Carl Martin, Solingen

2.1.3 DNA-Extraktion

E.Z.N.A.® Tissue DNA Mini Kit	PeqLab, Erlangen
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Wasserbad Modell B	Lauda, Königshofen

Zentrifuge Microliter
Brutschrank B 30

Hettich, Tuttlingen
Memmert, Schwabach

2.1.4 PCR

Microcon YM-30

Millipore, Eschborn

PCR-Wasser LiChrosolv®

Merck, Darmstadt

Mineralöl

Sigma, Steinheim

Thermocycler ABI Gene Amp PCR System 2400

Applied Biosystems, Weiterstadt

Thermocycler „Personal Cycler“

Biometra, Göttingen

Amplifikation mit dem „AmpFI STR® SGM Plus“-Kit:

AmpliTaq Gold® (5 U/μl)

Applied Biosystems, Weiterstadt

AmpF1STR® PCR Reaction Mix

Applied Biosystems, Weiterstadt

AmpF1STR® Profiler Plus Primer Set

Applied Biosystems, Weiterstadt

Amplifikation des SE33-Systems:

10x Taq Buffer

Eppendorf, Hamburg

Nucleotide-Triphosphat (5 mM)

Pharmacia, Freiburg

MgCl Soluion (2 mM)

Applied Biosystems, Weiterstadt

Taq DNA Polymerase (5 U/μl)

Eppendorf, Hamburg

Primer 1 und 2 (SE33)

Applied Biosystems, Weiterstadt

Amplifikation mit dem Mentype® Nonaplex^{QS} PCR Amplifikation Kit:

JumpStart™ Taq DNA Polymerase

Sigma-Aldrich, Steinheim

Reaction Mix A

Biotype, Dresden

Primer Mix

Biotype, Dresden

Amplifikation des TPOX-vs-Systems:

wie SE33-System

Primer 1 und 2

MWG-Biotech, Ebersdorf

Quantifiler® Human DNA Quantification Kit

Quantifiler® PCR Reaction Mix

Applied Biosystems, Weiterstadt

Quantifiler® Human Primer Mix

Applied Biosystems, Weiterstadt

T₁₀E_{0.1} (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.1 mM Na₂EDTA)

Applied Biosystems, Weiterstadt

PRISM® 7000 Sequence Detection System

Applied Biosystems, Weiterstadt

2.1.5 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Niedrigauflösende horizontale Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE):

Ansatz für ein 5 % Polyacrylamidgel:

16 ml H₂O

2,1 ml 10 x TBE-Puffer

2,7 ml Acrylamid/Bisacrylamidlösung

(Acrylamide-Bis 19:1)

Serva, Heidelberg

200 µl APS

Serva, Heidelberg

1,5 µl TEMED

Serva, Heidelberg

Glasplatten 124 x 258 mm

Glas Keil, Würzburg

Probenpuffer:

0,25 % Bromphenol Blau

Roth, Karlsruhe

0,25 % Xylen Cyanol

Roth, Karlsruhe

25 % Ficoll 400

Roth, Karlsruhe

10 x TBE-Puffer:

890 mM Tris-Borat	Roth, Karlsruhe
25 mM EDTA (pH 8,0)	Roth, Karlsruhe

Probenauftragsplättchen

Serva, Heidelberg

Gene Ruler 100 bp Ladder Plus MBI

Fermentas, Litauen

Salpetersäure 1 %

Roth, Karlsruhe

Silbernitratlösung:

0,4 g AgNO ₃	Roth, Karlsruhe
200 ml Aqua dest.	

Entwicklerlösung:

0,28 M NaH ₂ CO ₃	Roth, Karlsruhe
0,019 % Formalin	Roth, Karlsruhe

Essigsäure 10 %

Roth, Karlsruhe

Glycerol

Roth, Karlsruhe

Elektrodenstreifen

Serva, Heidelberg

Elektrophoresekammer LKB 2117 Multiphor II

LKB/Pharmacia, Freiburg

Elektrophoresekühlgerät LKB 2219 Multitemp II

LKB/Pharmacia, Freiburg

GelBond PAG-Film

Pharmacia, Freiburg

Spannungsgerät LKB 2297 Macrodrive 5

LKB/Pharmacia, Freiburg

Taumelschüttler Polymax 2040

Heidolph, Schwabach

Folie für Gel

Pharmacia, Freiburg

2.1.6 Hochauflösende Kapillarelektrophorese:

GeneScan 500 ROX Size Standard

Applied Biosystems, Weiterstadt

Formamid

Sigma, Steinheim

Genetic Analyzer ABI 310

Applied Biosystems, Weiterstadt

2.2 Zahnproben und Lagerung

Das Untersuchungsmaterial dieser Arbeit umfasst insgesamt 50 Zähne und zwei Mulltupfer, die nach der Zahnextraktion zur Blutstillung verwendet wurden (Nr. 46 und 47). Zum größten Teil (39 Zähne) stammen diese Zähne aus den Zahnarztpraxen von Dr. Werner Gebhard, Schnaittach, und Dr. Lothar Gebhard, Nürnberg. Die Zähne Nr. 21 bis 23 stammen aus der Kieferchirurgiepraxis Dr. Dr. Hemmerich, München. Die Zähne Nr. 38 bis 40 wurden von der Naturhistorischen Gesellschaft Nürnberg (NHG) aus der Abteilung für Vorgeschichte von Dr. Mühldorfer aus einer Ausgrabung in Katzwang bei Nürnberg für die Untersuchungen überlassen. Bei einer Grabung in der Dietersberghöhle wurden die Zähne der Proben Nr. 48, 49 und 50 gefunden und ebenfalls von der NHG Nürnberg für diese Arbeit bereitgestellt. Aus dem Sektionsgut des Institutes für Rechtsmedizin Würzburg wurden die Zähne Nr. 33 und 34 entnommen.

Nach Beendigung des jeweiligen Versuches wurden die Zähne im Institut bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung eingefroren. Die dabei stattfindende DNA-Degradation wurde als vernachlässigbar eingestuft.

2.2.1 Zähne aus den Zahnarztpraxen Dr. Werner Gebhard und Dr. Lothar Gebhard

Von extrahierten Zähnen wurde Granulations- und Wurzelhautgewebe entfernt. Nach Trocknung wurden diese in Einschweißfolie versiegelt und dem Verfasser übergeben. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie für kurze Zeit dunkel, trocken und kühl gelagert.

Die Patienten wurden über die geplante Arbeit informiert und gaben dazu ihr Einverständnis. Zeitpunkt der Extraktion, Alter und Geschlecht wurden anonym erfasst und für die Arbeit verwendet.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über das Ausgangsmaterial von diesen beiden Praxen wieder:

Probennr.	Alter des Patienten	Genus	Zahn	Extraktionstag	Bemerkung
1	19	m	18	20.05.2005	
2	84	m	42	30.05.2005	Zahn vital
3	54	m	12	03.06.2005	Zahn vital
4	69	m	31	02.06.2005	Zahn vital
5	69	m	42	02.06.2005	Zahn vital
6	80	w	23	06.06.2005	Zahn avital
7	74	w	26	05.07.2005	tief zerstört
8	51	m	23	17.05.2005	tief zerstört
9	51	m	25	17.05.2005	tief zerstört
10	64	w	36	15.06.2005	
11	51	m	24	17.05.2005	tief zerstört
12	21	m	28	08.06.2005	
13	21	m	38	08.06.2005	
14	87	w	24	19.08.2005	stark sklerosiert
15	18	w	28	28.10.2003	weit offenes Foramn apicale
16	48	m	23	04.08.2005	Tupfer Nr. 47
17	79	w	42	06.06.2005	
18	18	m	28	02.06.2005	
19	83	w	13	15.06.2005	
20	69	m	46	04.07.2005	Zahn vital
24	35	m	26	18.08.2005	WF am 02.08.04
25	57	m	26	19.05.2005	WF seit ~6 a
26	58	w	37	07.07.2005	Tupfer Nr. 46
27	51	m	18	30.07.2005	
28	59	m	12	02.08.2005	
29	57	w	38	22.07.2005	Zahn vital
30	55	m	34	02.08.2005	
31	69	m	38	07.07.2005	
32	49	m	38	08.07.2005	Zahn vital
35	38	m	28	25.08.2005	
36	19	m	38	16.06.2005	Zahn vital
37	59	m	11	13.10.2005	
41	53	w	41	22.09.2005	Zahn vital
42	44	w	17	04.10.2005	Zahn vital
43	44	w	48	17.06.2005	Zahn vital
44	19	m	28	16.06.2005	Zahn vital
45	69	m	36	07.07.2005	Zahn vital
51	23	w	38	06.11.2006	Zahn vital
52	45	w	48	27.12.2006	

Tab. 1: Übersicht über das Ausgangsmaterial der Zahnarztpraxen Dr. Werner Gebhard und Dr. Lothar Gebhard

2.2.2 Zähne aus der Kieferchirurgiepraxis Dr. Dr. Hemmerich

Die Zähne aus der Kieferchirurgiepraxis Dr. Dr. Hemmerich, München, stammen aus einer Sammlung von Zähnen mit anormalen Wurzelverhältnissen, die Dr. Werner Gebhard in den Jahren 1977/78 während seiner Assistenzzeit entfernt hat. Sie sind folglich vor 28 bzw. 29 Jahren gezogen worden. Nach der Zahnextraktion wurden sie

gereinigt und mit H₂O₂ gebleicht. Anschließend lagerten sie bei Raumtemperatur trocken in einem gläsernen Behältnis (siehe Abb. 7, S. 22). Das Alter und Geschlecht der Patienten konnte nach einer so langen Zeitspanne nicht mehr festgestellt werden. Die Stellung im Zahnbogen wurde anhand von Kronenform, Kronenflucht, Krümmungsmerkmal und Winkelmerkmal (siehe Kapitel 1.3, S. 7) zugeordnet. Die Zähne waren vollständig erhalten und ohne kariöse Läsionen (siehe Tab. 2).

Probennr.	Alter des Patienten	Genus	Zahn	Extraktionsjahr	Bemerkung
21	?	?	23	1976/77	
22	?	?	48	1976/77	
23	?	?	23	1976/77	

Tab. 2: Übersicht über das Ausgangsmaterial der Kieferchirurgiepraxis Dr. Dr. Hemmerich

2.2.3 Zähne der Naturhistorischen Gesellschaft Nürnberg

Insgesamt sechs Zähne aus zwei Zeitepochen wurden von der Naturhistorischen Gesellschaft Nürnberg (NHG) für Untersuchungszwecke zur Verfügung gestellt. Diese waren im Rahmen von zwei archäologischen Grabungen geborgen und von der NHG bereits wissenschaftlich bearbeitet worden.

Zwei Zähne waren noch im Kieferknochen verankert und ihre Stellung im Zahnbogen konnte so eindeutig identifiziert werden. Die anderen vier Zähne lagen als Einzelzähne vor und konnten anhand von typischen Zahnmerkmalen, wie bereits in Kapitel 1.3, S. 7 beschrieben, der Stellung im Zahnbogen zugeordnet werden.

2.2.3.1 Zähne aus einer Ausgrabung in Katzwang

Drei Zähne stammen aus einer Ausgrabung des Jahres 2004 an der Friedhofs- und Wehrmauer der Kirche „Unserer Lieben Frauen“ in Katzwang im Süden Nürnbergs. Die dazugehörigen Skelette wurden außerhalb der Friedhofsmauer etwa 70 cm unterhalb der jetzigen Grasoberfläche entdeckt. Insgesamt wurden Skeletteile von 13 Individuen gefunden, wobei davon auszugehen ist, dass es sich hierbei um eine größere Grablege handeln muss. Die menschlichen Leichname wurden nach christlicher Sitte in Ost-West-Richtung und mit gekreuzten Armen beigesetzt. An diversen Knochen konnten Verletzungen durch Hieb- und Stichwaffen nachgewiesen

werden. Derzeit wird angenommen, dass die Knochen aus einem der folgenden drei Kriege stammen müssten:

- 1. Markgrafenkrieg (1449/50)
- 2. Markgrafenkrieg (1552-54)
- Dreißigjähriger Krieg (besonders 1631/32).

Folglich kommt ein Alter der Knochenfunde von etwa 380-550 Jahren in Betracht. Eine Radiocarbonuntersuchung zur genaueren Datierung steht noch aus, ist aber nach einer geplanten anthropologischen Untersuchung vorgesehen (Zeitler 2005). In der folgenden Tabelle ist eine Übersicht über dieses Ausgangsmaterial aufgelistet:

Probennr.	Alter des Leichnams	Genus	Zahn	Grabungsjahr	Bemerkung
38	?	?	18	2004	Einzelzahn
39	?	?	17 oder 18	2004	Einzelzahn
40	?	?	16	2004	Zahn im Kiefer

Tab. 3: Übersicht über das Ausgangsmaterial der Ausgrabung bei Katzwang

2.2.3.2 Zähne aus der Dietersberghöhle

Drei weitere untersuchte Einzelzähne, ebenfalls aus dem Bestand der NHG Nürnberg, stammen aus einer Grabung des Archäologen J. R. Erl in der Dietersberghöhle bei Egloffstein. Neben zahlreichen Schädel- und Skelettfragmenten von erwachsenen Personen, Kleinkindern und Föten befanden sich auch 44 lose Zähne (Erl 1953, S. 238).

Die Höhle ist eine 11 m tiefe Schachtspalte mit einem etwa 1,5 m x 1,0 m großen Einstiegsloch (siehe Abb. 3). Der Schuttkegel am Boden der Höhle bestand aus humosem Sediment, welches bei Regen stark durchnässt wurde.

Diese Höhle diente wahrscheinlich als Begräbnisstätte eines Familienverbandes (epigenetische Merkmale weisen auf familiäre Verhältnisse hin) von Wald und



Abb. 3: Der Eingang zur Dietersberghöhle

Wildimkern aus der späten Hallstattzeit (HaC und HaD) und der frühen La-Tène-Zeit, beides Epochen der Eisenzeit. Dies konnte aus Grabbeigaben und Schmuckstücken geschlossen werden. Das Alter der Zähne beträgt somit 2.300-2.800 Jahre.

Forensisch-anthropologische Untersuchungen haben ergeben, dass sich Reste von mindestens 46 Individuen in der Höhle befunden haben. Unter der Hauptinventarnummer 8289 werden sie in der Sammlung der NHG aufbewahrt (Baum 1999).

Die genauen Lagerbedingungen der Ausgrabungsreste können nicht mehr ermittelt werden, da während der Kriegsjahre die Sammlungsstücke zum Schutz vor Plünderungen mehrmals ausgelagert wurden. Bis zum Umzug der NHG im Jahre 2000 lagerten die Präparate schließlich auf dem Dachboden und waren dort ständig wechselnder Temperatur und Luftfeuchtigkeit ausgesetzt. Erst danach konnten die Kellerräume der Norishalle zum Aufbewahren herangezogen werden (Mühldorfer).

Da sehr viele der ausgegrabenen Zähne tiefe kariöse Läsionen aufwiesen (der Kariesbefall lag bei 33,5 %), wurden drei äußerlich unversehrte Zähne für diese Untersuchung herangezogen. Bei erfolgreichem Erstellen eines genetischen Fingerabdruckes wären verwandtschaftliche Beziehungen und das Geschlecht der Individuen von großer archäologischer Bedeutung. Die NHG wäre dann an weiteren Untersuchungen interessiert gewesen.

In der nachfolgenden Tabelle sind Informationen über die Zähne aus der Dietersberghöhle zusammengefasst:

Probennr.	Alter des Leichnams	Genus	Zahn	Grabungsjahr	Bemerkung
48	?	?	11	1928	Einzelzahn
49	?	?	23	1928	Einzelzahn
50	?	?	18	1928	Einzelzahn

Tab. 4: Übersicht über das Ausgangsmaterial aus der Dietersberghöhle

2.2.4 Zähne aus Sektionsgut

In zwei Fällen konnten Zähne von Leichen mit Liegezeiten von 14 bis 17 Tagen aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin Würzburg zur Untersuchung herangezogen werden.

Probenzahl Nr. 33 wurde am 30.08.05, Probenzahl Nr. 34 am 31.08.05 aus den Leichnamen extrahiert. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Zähne in sterilen Röhrchen bei -20 °C im institutseigenen Gefrierschrank aufbewahrt.

Tabelle 5 gibt Auskunft über dieses Ausgangsmaterial:

Probennr.	Alter des Verstorbenen	Genus	Zahn	Liegezeit	Obduktionstag	Bemerkung
33	36	m	33	~17d	25.08.2005	
34	59	m	33	~14d	31.08.2005	

Tab. 5: Übersicht über das Ausgangsmaterial aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin Würzburg

2.3 Versuchsaufbauten

2.3.1 Frisch extrahierte Zähne

Um mit den Gerätschaften und den Reagenzien vertraut zu werden und um zu überprüfen, ob das E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Mini Kit für diese Analyseaufgabe geeignet ist, wurden einige Zähne ohne Lagerung DNA-analytisch untersucht. Weiterhin wurden asensible Zähne, Zähne mit obliteriertem Pulpenkavum, Weisheitszähne mit weit offenem Foramen apicale und Zähne mit großen kariösen Läsionen oder Wurzelkanalbehandlungen analysiert.

Diese Zähne wurden keiner gesonderten Lagerung unterzogen, sondern direkt ausgewertet. Bis zur Auswertung wurden sie, wie auch alle anderen Zähne, bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.3.2 Im Erdboden vergrabene Zähne

Bei dieser Versuchsanordnung wurden Einmalplastikbecher am Boden mit Löchern versehen und mit Folienstift beschriftet. Diese Becher wurden verwendet, um die Zähne wieder finden und identifizieren zu können. Die Löcher dienten dazu, dass sich nach Regenfällen kein Wasser in den Becher stauen konnte. Jeder Becher wurde zu einem Drittel mit Erde gefüllt, dann ein Zahn platziert und darauf wiederum Erde bis zum Becherrand aufge-

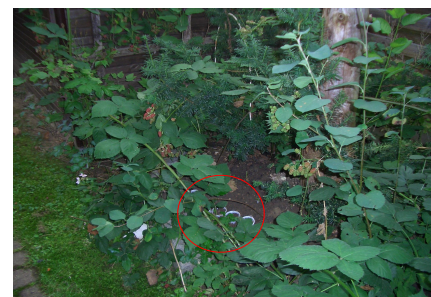


Abb. 4: Standort der im Erdreich vergrabenen Zähne

schüttet. Anschließend wurden die Becher an einer relativ feuchten und schattigen Stelle unter Büschen bis zur Oberkante vergraben. Die Zähne lagen somit etwa 4 cm unter der Erde und waren den Witterungsbedingungen ausgesetzt (siehe Abb. 4, S. 19).

Für die Untersuchungen wurden Zähne nach etwa vier Wochen (Zahn 10), etwa vier Monaten (Zahn 26), etwa einem halben Jahr (Zähne 31 und 32) und etwa einem Jahr (Zähne 43, 44 und 45) Liegezeit entnommen.

2.3.3 In Wasser gelagerte Zähne

Die fünf in Wasser gelagerten Zähne (Nr. 35, 41, 42, 36 und 37) wurden in kleine, mit Leitungswasser gefüllte Glasgefäße gegeben. Die Deckel wurden nicht verschraubt, sondern nur aufgelegt, um einen Gasaustausch zu ermöglichen (siehe Abb. 5). Regelmäßig wurde der Wasserstand überprüft und bei Bedarf Wasser nachgefüllt. Diese Versuchsreihe lagerte im Heizungskeller bei Temperaturen um die 20 °C.



Abb. 5: Standort der in Wasser gelagerten Zähne

Entnommen wurden Zähne nach etwa einem Vierteljahr (Zahn 35), einem halben Jahr (Zähne 41 und 42) und einem Jahr (Zähne 36 und 37).

2.3.4 Der Sonnenstrahlung ausgesetzte Zähne

Um den Einfluss der Sonnenstrahlung auf die DNA in Zähnen zu bewerten, wurden die Probenzähne 51, 52, 27, 28, 29 und 30 der Sonnenstrahlung ausgesetzt. Hierzu wurden wieder Einmalplastikbecher am Boden mit Löchern versehen, um Regenwasser eine Abflussmöglichkeit zu bieten. Damit die Zähne möglichst ohne Schatten der Sonne ausgesetzt waren und um die Becher stabil zu verankern,



Abb. 6: Standort der der Sonnenstrahlung ausgesetzten Zähne

wurden sie etwa zu zwei Drittel mit kleinen Kieselsteinen aufgefüllt und obenauf die

Probenzähne gelegt. Anschließend wurden die Becher auf einem Garagendach bis zum Becherrand in ein Kiesbett versenkt. Somit konnten die Zähne nicht vom Wind weggeblasen werden und sie waren den Witterungsbedingungen, insbesondere der UV-Strahlung der Sonne, ausgesetzt (Abb. 6, S. 20).

Entnommen wurden Zähne nach etwa vier Wochen (Zähne 51 und 52), vier Monaten (27 und 28) und einem halben Jahr (Zähne 29 und 30) Liegezeit.

2.3.5 Zähne aus Sektionsgut

Wie schon in Kapitel 2.2.4, S. 18 beschrieben, stammen zwei Zähne (Nr. 33 und 34) von Sektionen im Institut für Rechtsmedizin Würzburg.

Dabei wurde der Zahn der Probe 33 einer stark verwesenen Leiche eines 36-jährigen Mannes entnommen, bei der laut Obduktionsbericht eine Liegezeit von etwa 17 Tagen angenommen wird. Es waren bereits schwärzlich-grüne Verfärbungen der Haut festzustellen. Kopf- und Gesichtsteile fehlten vollständig. Ausgedehnter Madenbefall war bereits zu erkennen.

Die Probe 34 stammt vom Leichnam eines 59-jährigen Mannes mit höchstgradiger Fäulnis und teilweise beginnender Mumifizierung. Die Haut war schwärzlich verfärbt. Im Bereich des Mittelgesichts lag das Knochengestüt vollständig frei und massiver Madenbefall war feststellbar. Die Liegezeit betrug laut Obduktionsbericht etwa 14 Tage.

2.3.6 Starker Hitze ausgesetzte Zähne

Dieser Versuch diente dazu zu erforschen, wie stark DNA im Zahn unter sehr heißen Bedingungen, wie sie beispielsweise bei Bränden entstehen können, degradiert. Hierzu wurden die Zähne Nr. 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19 und 20 in einem feuerfesten Glasbehälter in einen auf 200 °C vorgeheizten Ofen im Institut für Rechtsmedizin gegeben.

Nach 30 min (Zähne 11 und 12), 60 min (Zähne 13 und 16), 90 min (Zähne 17 und 18) und 120 min (Zähne 19 und 20) wurden die Zähne wieder entnommen und auf Raumtemperatur abgekühlt.

2.3.7 Vor 28 bzw. 29 Jahren extrahierte Zähne

Die Zähne, welche aus der Kieferchirurgiepraxis Dr. Dr. Hemmerich aus München stammen, waren vor 28 bzw. 29 Jahren entfernt worden. Die Lagerung der mit H₂O₂ gereinigten Zähne erfolgte trocken in einem Glasbehältnis bei Raumtemperatur und ohne direkte Sonneneinstrahlung (siehe Abb. 7).



Abb. 7: Aufbewahrungsgefäß der fast 30 Jahre alten Zähne

2.3.8 Zähne der Ausgrabung in Katzwang

Wie bereits in Kapitel 2.2.3.1, S. 16 beschrieben, stammen diese Zähne von einer Ausgrabung in Katzwang. Um so viel Zahnschubstanz wie möglich zu erhalten, wurden diese Zähne entgegen dem üblichen Prozedere nicht zirkulär geschwächt und aufgebrochen, sondern von okklusal trepaniert. Um auch diese Bohrung möglichst klein zu halten, wurde nur die große palatinale Wurzel (alle diese Zähne waren OK Molaren) zugänglich gemacht und für die Untersuchung genutzt (siehe Abb. 8).



Abb. 8: Schädel mit Probenzahn Nr. 40 mit Trepanationsbohrung

2.3.9 Zähne aus der Dietersberghöhle

Die Einzelzähne der Ausgrabung „Dietersberghöhle“ (siehe Abb. 9) wurden nur mit dem System TPOX-vs und dem Nonaplex-Multiplex analysiert, da auf Grund ihres Alters wenig DNA zu erwarten war. Auch hier wurde kein Zahn zirkulär geschwächt und durchgebrochen, sondern wie bei den Zähnen der Ausgrabung in Katzwang durch Bohrungen von palatinal (Probenzähne 48 und 49) bzw. okklusal (Probenzahn 50) eröffnet.

2.4 Methoden

2.4.1 Kontaminationsvermeidung

Eine Kontamination der Zähne, wie auch der entnommenen Proben, mit Fremdmaterial muss vermieden werden, um eine erfolgreiche DNA-Analyse zu erhalten. Zum einen kann dadurch Fremd-DNA in die Versuchsreihen gelangen und falsche Resultate liefern, zum anderen kann das Verunreinigen der Proben mit Bakterien oder DNA-abbauenden Enzymen zur Degradation der DNA und somit zu falsch-negativen



Abb. 9: Die drei Zähne aus der Dietersberhöhle (Proben 48-50)

Ergebnissen führen. Während der gesamten Aufbereitung und Verarbeitung ist eine Kontamination mit fremdem Material möglich. Besonders zu erwähnende Kontaminationsquellen sind neben der Methode zur Entnahme der Probe, die Labormitarbeiter, die Laborausstattung, die Pipetten, die Pipettenspitzen, die Reaktionsgefäße, die Reagenzien, die Zentrifugenröhrchen, der Thermocycler und die Elektrophoresekammer, um nur einige Beispiele zu nennen (Newton et al. 1994, S. 53ff).

Zur Vermeidung einer Kontamination wurden diverse Vorkehrungen getroffen. Damit nur Material aus dem Inneren des Zahns in den Versuch gelangte, wurden die Zähne sowohl vor Anlage einer zirkulären Rille mit einer Zahnarzt-turbine (siehe Abb. 10), als auch vor dem Aufbrechen im Labor von außen sorgfältig mit einem in NaOCl-getränkten Tuch gereinigt. NaOCl bewirkt hierbei eine Oxidation der außen noch anhaftenden DNA-Überreste, wodurch diese denaturiert und somit zerstört werden. Um eine Kreuz-



Abb. 10: Zahn mit zirkulärer Rille vor Öffnung der Pulpa

kontamination mit der vorherigen Probe zu unterbinden, wurden sämtliche Instrumente wie der Hebel nach Bein, Zange, Pinzette und Endo-feilen nach jedem Gebrauch in NaOCl eingelegt und anschließend mit einem neuen Stück Papierrolle getrocknet (Gilbert et al. 2005; Yang et al. 2003).

Des Weiteren wurde als Unterlage im Labor bei jeder Probe ein frisches Stück Papiertuch ausgebreitet. Dieses musste nicht steril sein, da das Probenmaterial damit nicht direkt in Kontakt kam. Die Proben wurden ausschließlich über einer sterilen

Petrischale aus dem Zahn entnommen. Dies fand bei jeder Probe mit neuen Latexhandschuhen statt.

Sämtliche Pipettenspitzen, welche nicht vom Hersteller steril verpackt angeliefert werden, wurden vor Benutzung im Autoklaven sterilisiert.

Zur Überprüfung auf das Vorhandensein von kontaminierten Reagenzien lief von Beginn an bei jeder Versuchsreihe eine Neutralprobe mit. Zusätzlich diente eine Negativkontrolle bei der PCR zur weiteren Sicherheit.

Im Rahmen der Vorbereitung der PCR wurden weitere Vorsichtsmaßnahmen getroffen. So wurde der Platz zum Herstellen des Mastermix und zum Verteilen auf die PCR-Röhrchen strikt von dem Platz der Zugabe der DNA getrennt, um eine „carry over“-Kontamination zu unterbinden.

Ständiges Tragen von frischen Einmalhandschuhen beim Pipettieren der Reagenzien war obligat.

Nachdem das Ergebnis der Proben vorlag, konnte auch durch Vergleich mit den bekannten genetischen Fingerabdrücken des Verfassers und der übrigen Labormitarbeiter eine weitere Kontaminationsquelle ausgeschlossen werden.

2.4.2 Probenentnahme

Die Zähne wurden vor der Bearbeitung zunächst, wie in Kapitel 2.4.1, S. 23 beschrieben, mit einem NaOCl getränktem Lappen abgerieben, um eventuell anhaftende DNA-Reste zu entfernen. Anschließend wurden die Zähne in der Zahnarztpraxis Dr. Gebhard, Schnaittach, mit einem Diamantbohrer und einer Zahnarztmaschine auf Höhe der Schmelz-Zement-Grenze durch das Anlegen einer Rille zirkulär geschwächt, in Einschweißfolie versiegelt und erst im Institut unter Laborbedingungen aufgebrochen, sodass nun die eröffnete Pulpa und die Wurzelkanäle zugänglich waren. So wurde eine Kontamination während des Transports ausgeschlossen.



Abb. 11: Probenentnahmeplatz

Die Abbildung 11 zeigt den Arbeitsplatz im Institut für Rechtsmedizin, an dem die Probeentnahme aus den eröffneten Zähnen stattfand.

Mit einer Zahnextraktionszange und einem Bein'schen Hebel wurden die Zähne an den vorher angelegten Sollbruchstellen aufgebrochen (siehe Abb. 12). Falls noch intaktes Pulpagewebe vorhanden war, wurde dieses mit einer feinen Pinzette entnommen und in ein beschriftetes Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurden die Wurzelkanäle mit Endofeilen aufsteigender Größe aufbereitet und die dabei gewonnenen Dentinspäne in einer Petrischale gesammelt.



Abb. 12: Probenzahn nach dem Aufbrechen

2.4.3 DNA-Extraktion

Aus den so gewonnen Proben erfolgte die DNA-Gewinnung mittels „E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Mini Kit“ der Firma PeqLab. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die DNA selektiv und reversibel an eine Silikamembran gebunden wird.

Das Vorgehen entspricht der dem Kit beiliegenden Arbeitsanleitung. Hierzu werden mit Hilfe von 200 µl TL-Puffer die Späne aus der Petrischale in ein steriles, 1,5 ml fassendes Zentrifugenröhrchen gegeben, mit 25 µl OBTM-Proteinase versetzt, durch Vortexen sorgfältig gemischt und für drei Stunden in 55 °C warmes Wasser gegeben. Da kein Schüttelwasserbad zur Verfügung stand, wurden, wie ebenfalls laut Anleitung möglich, die Proben alle 30 min durch Vortexen gemischt, um eine Sedimentierung zu verhindern. Bei den Proben 1, 2, 7 bis 10 und 26 bis 35 wurde die Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37 °C durchgeführt, was im Isolierungsprotokoll ebenso angegeben ist. Dieser Schritt dient dem Aufschließen der Zelle und dem Abbau von Proteinen.

Anschließend wird dem Lysat 220 µl BL-Puffer hinzupipettiert, durch Vortexen gemischt und bei 70 °C im Wasserbad zehn Minuten inkubiert.

Nach Zugabe von 220 µl absolutem Ethanol und Vortexen wird der gesamte Ansatz auf eine HiBind[®]-DNA-Säule geladen und bei 8.000 g für eine Minute abzentrifugiert. Dabei binden die Nukleinsäuren reversibel an der Silikamembran der HiBind[®]- Säule. Der Durchfluss wird verworfen.

Durch zweimaliges Waschen mit jeweils 600 µl DNA-Waschpuffer, welcher bereits mit dem 1,5-fachen Volumen mit absoluten Ethanol ergänzt worden war, und

Abzentrifugieren für eine Minute bei 8.000 g werden störende PCR-Hemmstoffe entfernt. Das Zentrifugat wird jeweils verworfen.

Nun wird die Membran bei maximaler Geschwindigkeit der Zentrifuge (ca. 12.000 g) für zwei Minuten vollständig getrocknet.

Bei der folgenden Elution werden 200 µl auf 70 °C vorgewärmter Elutionspuffer auf die in ein frisches Zentrifugenröhrchen gesteckte Säulenmatrix pipettiert, bei Raumtemperatur drei Minuten inkubiert und bei 8.000 g für eine Minute abzentrifugiert. Um eine höhere DNA-Konzentration zu erlangen, wurde für die zweite Elution das erste ebenfalls auf 70 °C vorgewärmte Eluat verwendet (Arbeitsanleitung PeqLab).

2.4.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR stellt eine in vitro-Technik dar, mit der man DNA-Abschnitte vervielfältigen kann. Dazu muss lediglich die Anfangs- und Endsequenz dieses Abschnittes bekannt sein. Die doppelsträngige DNA wird bei 94 °C aufgeschmolzen (Denaturierung), damit sie einzelsträngig vorliegt. Oligonucleotidprimer, die zu den Anfangs- und Endabschnitten komplementär sind, lagern sich an die DNA Matrize (template) an. Dieser Vorgang wird als Annealing bezeichnet und benötigt eine Temperatur zwischen 50 °C und 65 °C je nach Primer. Die DNA-Polymerase lagert vom Primer in 5'-Richtung Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) entsprechend der einzelsträngigen DNA-Matrize an. Diese Synthese der neuen DNA-Stränge wird Extension genannt und findet polymeraseabhängig zwischen 68 °C und 72 °C statt. MgCl₂ und ein zugesetzter Puffer sind ebenfalls für die PCR essentiell. MgCl₂ fördert in einer Konzentration zwischen 1,0 mM und 1,5 mM die Polymeraseaktivität, kann aber bei zu hoher Konzentration inhibierend wirken. Der Puffer schafft das richtige pH-Milieu für die Reaktionen. Mit der nun folgenden erneuten Denaturierung beginnt der zweite Zyklus. Dies führt zu einem exponentiellen Anstieg der Zielsequenz. Die Zyklusanzahl ist je nach verwendetem PCR-Kit unterschiedlich. Sind alle Zyklen durchlaufen, schließt sich ein abschließender 45-minütiger Extensionsschritt an, bei dem unvollständig amplifizierte DNA-Stränge noch aufgefüllt werden. Schließlich kühlt der Thermocycler die Proben auf 4 °C herab (Newton et al. 1994, S. 19ff).

Von jeder Probe wurde eine PCR-Reaktion mit 1 µl, 5 µl bzw. 10 µl DNA angesetzt und mit sterilem Aqua dest. auf ein Volumen von 25 µl ergänzt. Die PCR wurde in

den automatischen Thermocyclern ABI Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems) und Personal Cycler (Biometra) durchgeführt. Zur Aktivierung der DNA-Polymerase wurden die Proben vor dem ersten PCR-Zyklus auf 94 °C erhitzt.

2.4.4.1 STR SE33

Zur Amplifizierung des STR-Einzelsystems SE33 werden zwei Primersequenzen benötigt, die sich wie folgt zusammensetzten:

Primer 1: 5'-AATCTGGGCGACAAGAGTGA-3'

Primer 2: 5'-ACATCTCCCCTACCGCTATA-3'

(Möller et al. 1994)

Die nachfolgenden Tabellen 6 und 7 geben die Zusammensetzung des Mastermix und die Bedingungen der PCR wieder:

Reagens	Menge
Primer 1:	0,75 µl/Ansatz
Primer 2:	0,75 µl/Ansatz
dNTP:	1,00 µl/Ansatz
10 x Puffer:	2,50 µl/Ansatz
MgCl ₂	2,00 µl/Ansatz
Taq DNA Polymerase:	0,20 µl/Ansatz
Gesamt:	7,20 µl/Ansatz

Tab. 6: PCR-Ansatz für SE33

Phase	Temperatur	Dauer	35 Zyklen
Aktivierung der Taq DNA Polymerase :	94 °C	10 min	
Denaturierung:	94 °C	1 min	
Annealing:	60 °C	1 min	
Extension:	72 °C	1 min	
abschließende Extension:	60 °C	45 min	
Kühlung:	4 °C	∞	

Tab. 7: PCR-Bedingungen für SE33

2.4.4.2 AmpFISTR® SGM Plus Kit

Der Multiplex AmpFISTR® SGM Plus beinhaltet 11 x 2 fluoreszenzmarkierte Primer, durch welche die STR-Loci D3S1358, vWA, D19S539, D2S1338, D8S1179, D21S11,

D18S51, D19S433, THO1 und FGA, sowie die erste Intronsequenz des Amelogenin-Gens amplifiziert werden. Mit Hilfe dieses Segments des Amelogenin-Gens ist eine Geschlechtsdifferenzierung möglich (siehe Kapitel 1.2.2.5, S. 6).

In Tabelle 8 sind die Systeme des AmpFISTR® SGM Plus Kits aufgelistet:

Locus	Chromosomaler Ort	Repetitives Motiv	Größe in bp	Fluoreszenzmarkierung
D3S1358	3p	TCTA [TCTG] ₁₋₂ [TCTA] _n	114-142	5-FAM
vWA	12p12-pter	TCTA [TCTG] ₃₋₄ [TCTA] _n	157-209	5-FAM
D16S539	16q24-qter	[AGAT] _n	234-274	5-FAM
D2S1338	2q35-37.1	[TGCC] _n [TTCC] _n	289-341	5-FAM
Amelogenin	X p22.1-22.3		107	JOE
Amelogenin	Y: p11.2		113	JOE
D8S1179	8	[TATR] _n ; R kann A oder C sein	128-172	JOE
D21S11	21q11.2-q21	[TCTA] _n [TCTG] _n [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCATA [TCTA] _n	187-243	JOE
D18S51	18q21.3	[AGAA] _n	26-345	JOE
D19S433	19q12-13.1	[AAGG] [AAAG] [AAGG] [TAGG] [AAGG] _n	106-140	NED
THO1	11p15.5	[TCAT] _n	165-204	NED
FGA	4q28	[TTTC] ₃ TTTTCT [CTTT] _n CTCC [TTCC] ₂	215-353	NED

Tab. 8: Systeme des AmpFISTR® SGM Plus® (nach Arbeitsanleitung AmpFISTR® SGM Plus®, Applied Biosystems)

Das AmpFISTR® SGM Plus Kit beinhaltet bereits den AmpFISTR® PCR Reaction Mix, das AmpFISTR® Profiler Plus Primer Set und die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5 U/µl). Der AmpFISTR® PCR Reaction Mix ist ein Gemisch aus einem dNTP-Mix, Mg²⁺ und BSA (Bovine serum albumin). Das beigesetzte BSA kann PCR-inhibierende Einflüsse minimieren, indem es die Inhibitoren bindet (Comey et al. 1994).

Die beiden folgenden Tabellen 9 und 10 geben die Zusammensetzung des Mastermix und die bei der PCR herrschenden Bedingungen wieder:

Reagens	Menge
ABI AmpFISTR® Profiler Plus Primer Set:	2,50 µl/Ansatz
ABI AmpFISTR® PCR Reaction Mix:	5,00 µl/Ansatz
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase:	0,50 µl/Ansatz
Gesamt:	7,50 µl/Ansatz

Tab. 9: PCR-Ansatz für AmpFISTR® SGM Plus® (nach Arbeitsanleitung AmpFISTR® SGM Plus®, Applied Biosystems)

Phase	Temperatur	Dauer
Aktivierung der AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase:	94 °C	1 min
Denaturierung:	94 °C	1 min
Annealing:	59 °C	1 min
Extension:	72 °C	1 min
abschließende Extension:	60 °C	45 min
Kühlung:	4 °C	∞

28 Zyklen

Tab. 10: PCR-Bedingungen für AmpFISTR® SGM Plus® (nach Arbeitsanleitung AmpFISTR® SGM Plus®, Applied Biosystems)

2.4.4.3 STR TPOX-vs

Wie das STR-System SE33 (siehe Kapitel 2.4.4.1; S. 27) ist das STR-System TPOX-vs ein einzelnes System, das durch die beiden folgenden Primersequenzen bestimmt wird:

Primer 1: 5'-CCTGTTCCCTCCCTTATTTCC-3'

Primer 2: 5'-GAACACAGACTCCATGGTG-3'

Durch neue Primer verkürzt sich der zu amplifizierende Abschnitt von 218-246 bp (TPOX) auf 58-86 bp (TPOX-vs) (Hellmann et al. 2001).

Der Mastermix für die PCR-Ansätze setzt sich wie in Tabelle 11 aufgelistet zusammen. In Tabelle 12 ist das Programm zur Amplifizierung im Thermocycler aufgeführt:

Reagens	Menge
Primer 1:	0,75 µl/Ansatz
Primer 2:	0,75 µl/Ansatz
dNTP:	1,00 µl/Ansatz
10 x Puffer:	2,50 µl/Ansatz
MgCl ₂	2,00 µl/Ansatz
Taq DNA Polymerase:	0,20 µl/Ansatz
Gesamt:	7,20 µl/Ansatz

Tab. 11: PCR-Ansatz für TPOX-vs (Hellmann et al. 2001)

Phase	Temperatur	Dauer	35 Zyklen
Aktivierung der Taq DNA Polymerase:	94 °C	10 min	
Denaturierung:	94 °C	1 min	
Annealing:	55 °C	1 min	
Extension:	72 °C	1 min	
abschließende Extension:	60 °C	45 min	
Kühlung:	4 °C	∞	

Tab. 12: PCR-Bedingungen für TPOX-vs (Hellmann et al. 2001)

2.4.4.4 Mentype® Nonaplex^{QS} PCR Amplifikation Kit

Das Mentype® Nonaplex^{QS} PCR Amplifikation Kit beinhaltet die Loci D3S1358, D8S1179, D18S51, D21S11, FGA, SE33, THO1 und vWA. Zusätzlich wird wiederum die erste Intronsequenz des Amelogenin amplifiziert.

Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die im Mentype® Nonaplex^{QS} verwendeten Systeme:

Locus	Chromosomaler Ort	Repetitives Motiv	Referenz-allele	Größe in bp	Fluoreszenzmarkierung
Amelogenin	Xp22.1-22.3			83	6-FAM
Amelogenin	Yp11.2			87	6-FAM
D8S1179	8q23.1-23.2	[TATC] ₁₂	12	95-163	6-FAM
D21S11	21q21.1	[TCTA] ₄ [TCTG] ₆ [TCTA] ₃ TA [TCTA] ₃ TCA [TCTA] ₂ TCCATA [TCTA] ₁₁	29	177-252	6-FAM
D18S51	18q11.1	[AGAA] ₁₃	13	281-427	6-FAM
THO1	11p15.5	[TCAT] ₉	9	82-131	HEX
D3S1358	3p25.3	TCTA [TCTG] ₂ [TCTA] ₁₅	18	139-195.5	HEX
SE33	6q14.2	[AAAG] ₉ AA [AAAG] ₁₆	25.2	196-377	HEX
vWA	12p13.31	TCTA [TCTG] ₄ [TCTA] ₁₃	18	102-168	NED
FGA	4q28.2	[TTTC] ₃ TTTTTTCT [CTTT] ₁₃ CTCC [TTCC] ₂	21	174-338	NED

Tab. 13: Systeme des Mentype® Nonaplex^{QS} (nach Arbeitsanleitung für Mentype® Nonaplex^{QS}, Biotype® und Homepage Biotype AG)

Der Lieferumfang dieses Kits beinhaltet ein Reaktionsgemisch (Reactions Mix A), welches Mg²⁺, dNTP-Mix und BSA bereits enthält, und ein Primergemisch (Primer Mix). Zusätzlich wird noch die JumpStart™ Taq DNA Polymerase (Sigma; 2,5 U/μl) benötigt, welche vor der PCR bei 94 °C für eine Minute aktiviert werden muss.

Die beiden folgenden Tabellen zeigen die Zusammensetzung des Mastermix für den PCR-Ansatz, sowie den PCR-Ablauf:

Reagens	Menge
Primer Mix:	2,50 µl/Ansatz
Reaction Mix A:	5,00 µl/Ansatz
JumpStart™ Taq DNA Polymerase:	0,40 µl/Ansatz
Gesamt:	7,40 µl/Ansatz

Tab. 14: PCR-Ansatz für Mentype® Nonaplex^{QS} (nach Arbeitsanleitung für Mentype® Nonaplex^{QS}, Biotype®)

Phase	Temperatur	Dauer	
Aktivierung der JumpStart™ Taq DNA Polymerase:	94 °C	1 min	35 Zyklen
Denaturierung:	94 °C	1 min	
Annealing:	60 °C	1 min	
Extension:	72 °C	1 min	
abschließende Extension:	68 °C	45 min	
Kühlung:	4 °C	∞	

Tab. 15: PCR-Bedingungen für Mentype® Nonaplex^{QS} (nach Arbeitsanleitung für Mentype® Nonaplex^{QS}, Biotype®)

2.4.5 Gelelektrophorese und Silberfärbung

Bei der Gelelektrophorese lassen sich Proteine, Nukleinsäuren oder andere geladene Makromoleküle im elektrischen Feld nach ihrer Größe, Form und Nettoladung trennen. Zur Auftrennung von DNA-Molekülen kleiner 500 Nukleotide eignet sich besonders die PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese), weil sie entgegen dem Agarosegel sehr kleine Poren aufweist. Da die DNA negative Ladung trägt, wandert sie in einem elektrischen Feld zur Anode. Als Ergebnis entstehen Banden von gleich weit gewanderten Molekülen (siehe Abb. 13) (Kreutzig 2002, S. 117).

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Elektrodenstreifen entfernt und das Gel in eine Glasschale gegeben. Zur Äquilibration wurde dem Gel 1%-ige Salpetersäure (HNO₃) zugegeben und es wurde für fünf Minuten auf einen Taumelschüttler gestellt. Anschließend wurde das Gel etwa zehn



Abb. 13: Polyacrylamidgel auf der Kühlplatte

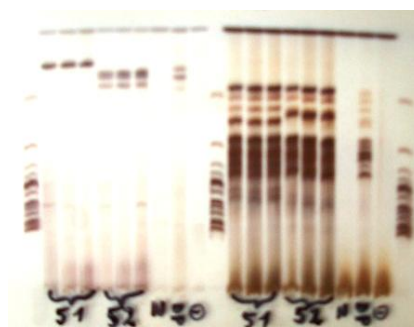


Abb. 14: Angefärbtes Vorgel der Proben 51 und 52; links: der SE33, rechts: SGM-Multiplex; beide mit Leiter, Neutralprobe, Positiv- und Negativkontrolle

Sekunden mit Aqua dest. abgespült und mit frisch angesetzter Silbernitrat-Lösung für zwölf Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem gründlichem Spülen mit Aqua dest. wurde die Entwicklerlösung zugegeben und bis zum Sichtbarwerden der PCR-Banden abgewartet. Zum Stoppen des Entwicklerprozesses diente eine 10%-ige Essiglösung, welche mindestens zwei Minuten einwirken musste. Um die Gele lagerfähig zu machen, wurden sie mit Aqua dest. gründlich gespült, für fünf Minuten in 5%-iges Glycerol eingelegt und schließlich nach einer Nacht bei 80 °C im Wärmeschrank mit Folie bedeckt (siehe Abb. 14, S. 31) (Allen et al. 1989).

2.4.6 Hochauflösende Kapillarelektrophorese

Mit Hilfe kapillarelektrophoretischer Auftrennung (GeneScan) im automatischen Sequenzierautomaten Genetic Analyzer ABI 310 (Applied Biosystems) ist es möglich, die STR-Systeme zu analysieren. In einer mit Polymer gefüllten Kapillare erfolgt hierbei die Elektrophorese (Ziegle et al. 1992).

Dabei ist es möglich, die Fragmentlänge bis auf ein Basenpaar genau zu bestimmen. Dies wird nach lasergestützter Fragmentlängenmessung durch einen Vergleich mit einem internen Längenstandard (GeneScan 500 ROX Size Standard, Applied Biosystems) ermöglicht. Die fluoreszierenden Marker dienen der Differenzierung überlappender Systeme (Kimpton et al. 1993). Eine parallel aufgetrennte Allelleiter dient der Zuordnung der Fragmentlängen zu einem definierten Allel.

In der folgenden Tabelle finden sich die entsprechenden Mengen der Reagenzien wieder:

Reagens	Menge
Formamid:	12,00 µl/Ansatz
GeneScan 500 ROX Size Standard:	0,50 µl/Ansatz
Gesamt:	12,50 µl/Ansatz

Tab. 16: Ansatz für die Kapillarelektrophorese

Nachdem der Mastermix auf die Probengefäße verteilt worden war, wurde das zu analysierende PCR-Produkt in Abhängigkeit von der Intensität der Banden dem PAGE-Gel (zwischen 0,5 und 3,0 µl) hinzu gegeben. Zur Linearisierung der DNA

wurden die Ansätze bei 95 °C für 150 Sekunden im Heizblock inkubiert und anschließend im Sequenzierautomaten analysiert.

2.4.7 Quantifiler® Human DNA Quantification Kit

Mittels des Quantifiler® Human DNA Quantification Kit und dem PRISM® 7000 Sequence Detection System ist es möglich DNA-Konzentrationen zu bestimmen. Dabei wird mit einer Real-Time-Quantitative-PCR (RTQ-PCR) ein 62 bp langes Intron des Human telomerase reverse transcriptase Gens (hTERT) amplifiziert. Diese Zielsequenz befindet sich bei 5p15.33. Der Quantifiler® Human Primer Mix besteht aus den beiden Primern mit Fluoreszenzmarkierung (FAM). Im Quantifiler® PCR Reaction Mix sind bereits die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, dNTPs und ein Puffer enthalten. Zusätzlich muss noch eine Verdünnungsreihe aus acht Standards angefertigt werden, die zum späteren Vergleichen dient. Hierzu werden 10 µl des Quantifiler Human DNA Standards (200 ng/µl) mit 30 µl T₁₀E_{0.1} (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 0.1 mM Na₂EDTA) verdünnt. Vom Standard 1 (50 ng/µl) werden wiederum 10 µl mit 30 µl T₁₀E_{0.1} vermischt bis bei Standard 8 eine Konzentration von 0,023 ng/µl vorliegt.

Die Tabelle zeigt die Zusammensetzung des Mastermix, der zu den 2 µl DNA zugegeben werden muss.

Reagens	Menge
Quantifiler® Human Primer Mix:	10,50 µl/Ansatz
Quantifiler® PCR Reaction Mix:	12,50 µl/Ansatz
Gesamt:	23,00 µl/Ansatz

Tab. 17: Ansatz für Quantifiler® Human DNA Quantification Kit (nach Arbeitsanleitung Quantifiler® Human DNA Quantification Kit, Applied Biosystems)

Bei der RTQ-PCR werden die Proben durch Fluoreszenz-Messungen im Bereich von 500-660 nm analysiert und durch einen Vergleich mit den Standards ausgewertet (Arbeitsanleitung Quantifiler® Human DNA Quantification Kit, Applied Biosystems).

Durch die mitlaufende Neutralprobe kann überprüft werden, ob Geräte und Reagenzien DNA-frei waren.

3 Ergebnisse

Das Probengut umfasste 50 Zähne. Diese wurden verschiedenen Lagerbedingungen ausgesetzt und überprüft, ob daraufhin noch eine DNA-Analyse durchgeführt werden konnte oder ob schon zu stark degradierende Einflüsse eingewirkt haben.

Nach der DNA-Extraktion wurden die Ansätze zunächst mit Hilfe des Systems SE33 und des SGM-Multiplex-Kits amplifiziert und ausgewertet. Konnte bei der Auswertung keine eindeutige Typisierung vorgenommen werden, wurden die Proben mit weiteren Kits amplifiziert. In Fällen, in denen das STR-System SE33 nicht detektierbar war, wurde versucht, mit Hilfe des STR TPOX-vs, welcher nur sehr kurze DNA-Fragmente zur Analyse benötigt, eine Typisierung zu erlangen. So sollte festgestellt werden, ob überhaupt amplifizierbare DNA vorhanden ist. Falls die Typisierung mit dem STR-System SE33 erfolgreich war, aber mit dem SGM das Ergebnis nicht zufriedenstellend ausfiel, wurde versucht, mit dem sensitiveren Nonaplex doch noch DNA-analytische Untersuchungen zu bekommen. Ebenso wurde bei detektierbarem TPOX-vs die DNA anschließend mit dem Nonaplex-Kit amplifiziert.

Zum Schluss wurden sämtliche DNA-Proben mit Hilfe des Quantifiler® Human DNA Quantification Kits (Applied Biosystems) einer Quantifizierung unterzogen.

Das Ergebnis wurde als erfolgreich typisierbar angenommen, wenn sich der Peak bei der GeneScan-Auswertung hinreichend groß (größer als 30 rfu [relative fluorescent units]) auf einem Allelbereich dargestellt hat. Alle anderen Peaks, welche sich nur schwach aus dem Rauschen erhoben haben (kleiner als 30 rfu), aber dennoch deutlich auf einem Allelbereich lagen, wurden durch ein Fragezeichen „(?)“ kenntlich gemacht (siehe Abb. 15, S. 35). Konnte kein Allel bestimmt werden, wurde dies durch „***“ markiert.

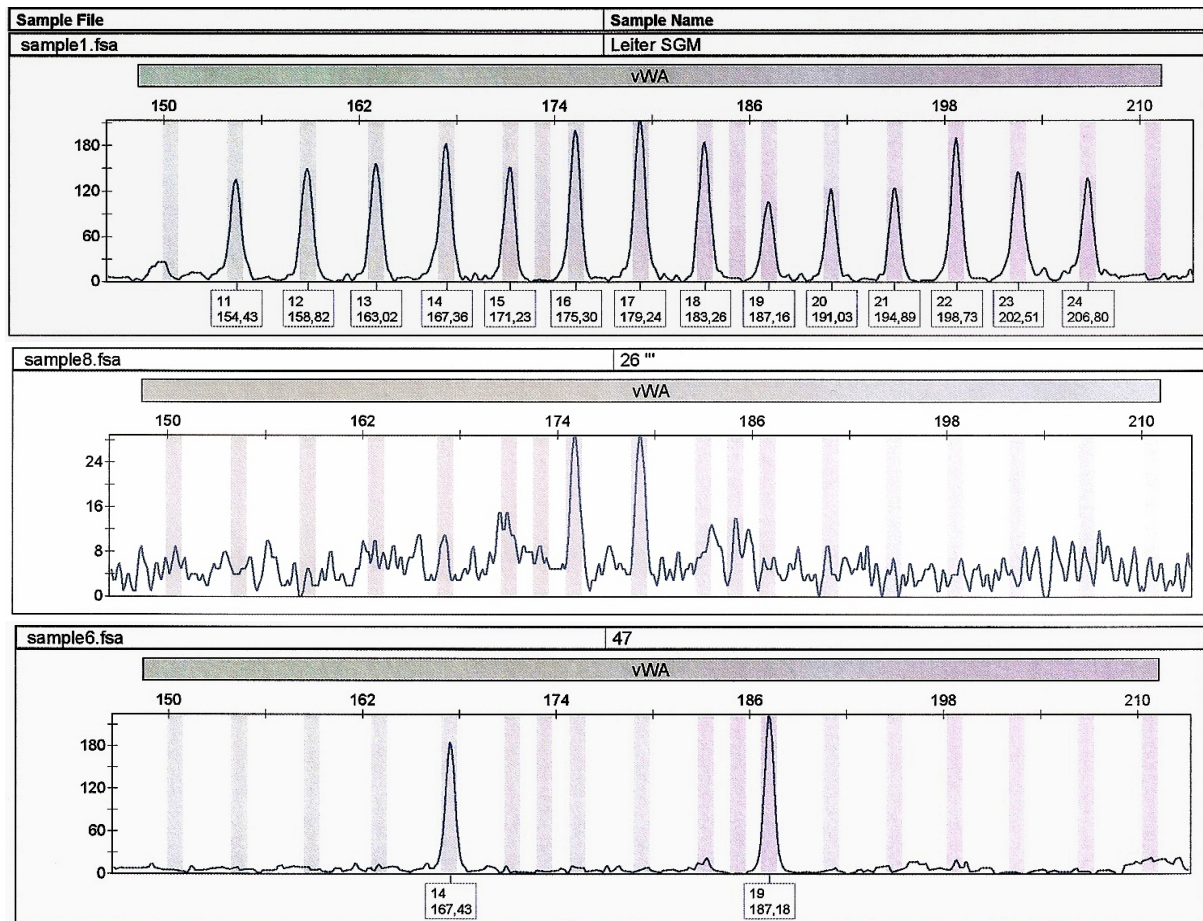


Abb. 15: Obere Grafik: Die Referenzalleleleiter dieses Systems dient zum Abgleich mit den Probenergebnissen. Mittlere Grafik: Ein nicht eindeutig detektierbares Ergebnis. Die beiden Peaks der Probe 26 liegen zwar im Bereich der Allele 16 und 17, treten aber nur sehr schwach vom Hintergrundrauschen hervor und werden daher mit einem „?“ kenntlich gemacht. Untere Grafik: Bei Probe 47 ist eine eindeutige Allelzuordnung möglich.

Die Probennummer wurde nach der Reihenfolge der bearbeiteten Zähne vergeben.

3.1 Frisch extrahierte Zähne

Die Proben 1 bis 5 stammen von Zähnen, welche vor der Zahnextraktion noch sensibel auf einen Kältetest reagiert hatten. Ihre Zahnpulpen waren somit zum Zeitpunkt der Entfernung noch vital. Mit den Systemen SE33 und SGM-Multiplex waren diese Zähne erfolgreich detektierbar. Die gewonnenen DNA-Konzentrationen lagen dabei zwischen 0,374 und 15,4 ng/µl.

Der Zahn der Probe 6 reagierte vor der Zahnextraktion nicht mehr sensibel DNA war mit dem Quantifiler nicht mehr nachweisbar. Die Systeme SE33 und der SGM-Multiplex ergab kein amplifizierbares Ergebnis. Das System TPOX-vs lieferte

ebenso wie der Nonaplex-Multiplex ein vollständiges, eindeutig detektierbares Merkmalsmuster, lediglich der Locus D8S1179 wurde als fraglich eingestuft.

Bei den Proben 7 bis 9 handelt es sich um Material von tief kariösen Zähnen (siehe Abb. 16). Die Karies war bereits soweit fortgeschritten, dass große Teile der Krone fehlten. Mit einer Sonde konnte noch keine direkte Verbindung zur Pulpa festgestellt werden, da sich die Zahnpulpa an dieser Stelle bereits zurückgezogen und Reizdentin gebildet hatte. Damit versucht



Abb. 16: Tief zerstörter Zahn der Probe Nr. 9

sich der Körper gegen die eindringenden Mikroorganismen zur Wehr zu setzen. Im Zahn wird dabei lediglich eine reversible Pulpitis erzeugt, welche keine degradierenden Eigenschaften aufweist. Die Systeme SE33 und der Nonaplex-Multiplex konnten in allen Loci typisiert werden. Die DNA-Konzentrationen lagen zwischen 0,092 und 0,335 ng/ μ l.

Die Probe 14 wurde aus einem Zahn entnommen, bei dem das Pulpenkavum stark obliteriert war und die Kanäle nur mit Mühe gefunden und aufbereitet werden konnten. Mit sehr feinen Endonadeln der ISO-Größe 10 (0,1 mm Durchmesser an der Spitze) war es möglich, den Kanal zu finden und schließlich bis ISO-Größe 30 aufzubereiten. Hierbei konnten nur das STR-System SE33 und der Locus TH01 des Nonaplex-Multiplex ein Ergebnis aufzeigen. Die SGM-Multiplex-Analyse war, wie die Konzentrationsbestimmung, erfolglos.

Bei Probe 15, die aus einem Weisheitszahn gewonnen wurde, war das Wurzelwachstum noch nicht vollständig abgeschlossen. Trotz weit offener apikaler Foramina konnte problemlos eine DNA-Analyse mittels SGM und SE33 gewonnen werden. Die DNA-Konzentration betrug 11,42 ng/ μ l.

Zusätzlich konnten noch zwei Zähne mit Wurzelkanalfüllungen (Proben 24 und 25) untersucht werden (siehe Kapitel 1.3, S. 8). Die DNA-Menge lag zwar mit < 5 pg/ μ l unter der Nachweisgrenze, aber dennoch konnten bei Probe 24 (mit einer ein Jahr alten Wurzelkanalfüllung) das System SE33 und fünf Loci des Nonaplex-Multiplex (FGA, TH01, D3S1358, vWA und AMEL) erfolgreich amplifiziert werden. Die Analyse des Multiplex SGM war in keinem System erfolgreich. Der Zahn der Probe 25 hatte eine sechs Jahre alte Wurzelkanalfüllung. Das System SE33 zeigte keinen Erfolg, wohingegen das System TPOX-vs und ein Locus des Nonaplex-Multiplex (TH01) Erfolg brachten. Bei zwei Loci des SGM (D18S51 und vWA) und einem Locus des

Nonaplex-Multiplex (D18S51) konnten Allele vermutet werden. Allerdings war der Locus D18S51 bei den beiden Kits, AmpFI STR® SGM Plus und Nonaplex^{QS} PCR Amplifikation, nicht übereinstimmend. Das Quantifiler® Human DNA Quantification Kit konnte keine DNA nachweisen (siehe Tab. 18(a) und 18(b)).

Proben-nr.	Menge in ng/µl	SE33	SGM										
			FGA	D19S433	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	D16S539	D2S1338	AMEL
1	15,4	26,2/27,2	21/22	13/14	15/17	7/9	15/16	28/29	16	17/18	11	24/25	XY
2	0,374	25,2/26,2	21/23	14/15,2	14/20	5/9,3	10/16	28/30	16/18	14/17	12/13	22/24	XY
3	5,21	14/21,2	19/25	15/15,2	14	7/9,3	12/13	29/31,2	16/18	14/16	11/12	17/19	XY
4	7,26	15/17	21	13	15/17	6/7	14/15	27/33,2	17	17	11/12	20/23	XY
5	7,11	15/17	21	13	15/17	6/7	14/15	27/33,2	17	17	11/12	20/23	XY
6	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	X
7	0,126	20/20,2	20/22	14/15	14/17	9,3	13/14	30/31,2	15/16	14/17	9/11	21/24	X
8	0,335	19/29,2	20/27	13/14	16/19	8/9,3	14	30/31,2	14/15	17/18	9/12	23/24	XY
9	0,092	19/29,2	20/27	13/14	16/19	8/9,3	14	30/31,2	14/15	17/18	9/12	23/24	XY
14	< 5pg	17,2	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
15	11,42	28,2/29,2	19/21	13/15	12/17	6/9	13/14	28/30	14/16	16/18	12	18/24	X
24	< 5pg	16/23,2	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
25	< 5pg	***	***	***	10,2 (?)	***	***	***	***	15,2 (?)	***	***	***

Tab. 18(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der frisch extrahierten Zähne

Proben-nr.	TPOX-vs	Nonaplex									Kommentar
		SE33	FGA	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	AMEL	
1											frisch
2											frisch; vital
3											frisch; vital
4											frisch; vital
5											frisch; vital
6	8/9	15/28,2	20/25	12/20	9,3	12/14(?)	28/31,2	16	16/17	X	frisch; avital
7											frisch; tief zerstört
8											frisch, tief zerstört
9											frisch, tief zerstört
14	SE33 erfolgreich	***	***	***	9	***	***	***	***	***	frisch; 83J; stark sklerosiert
15											frisch; weit offenes F.a.
24	SE33 erfolgreich	***	20	***	8/10	***	***	17	16	XY	frisch; 1 Jahre alte WF
25	8	***	***	13 (?)	8/9,3	***	***	***	***	***	frisch; 6 Jahre alte WF

Tab. 18(b): TPOX-vs und Nonaplex der frisch extrahierten Zähne

3.2 Im Erdboden vergrabene Zähne

Die vier Wochen im Erdreich vergrabene Probe 10 erbrachte ein vollständiges Merkmalsmuster bei dem STR-System SE33 und dem SGM-Multiplex. Die Menge an DNA von 0,019 ng/µl war hierfür ausreichend.

Nach drei Monaten (Probe 26) war schon eine leichte Degradation der DNA eingetreten. Im Gegensatz zum System SE33 lieferte der SGM-Multiplex ein unvollständiges Merkmalsmuster. Die Systeme D19S433, D3S1358 und AMEL konnten eindeutig typisiert werden, bei den Loci FGA, TH01, D8S1179, D21S11, vWA, D16S539 und D2S1338 waren die Peaks nur sehr schwach ausgeprägt. Der Locus D18S51 ergab kein verwertbares Ergebnis. Die beim SGM-Multiplex potenziell erkennbaren Loci konnten im Nonaplex-Multiplex komplett bestätigt werden.

Lediglich beim Locus FGA wurde im SGM-Multiplex nur ein Allel vermutet und im Nonaplex-Multiplex wurden zwei Allele nachgewiesen. Die vorhandene DNA-Konzentration betrug 0,042 ng/µl.

Proben 31 und 32 stammen von Zähnen, welche etwa ein halbes Jahr vergraben waren. Bei beiden war der STR SE33 erfolgreich, jedoch war der SGM-Multiplex-Ansatz nicht mehr für ein vollständiges Merkmalsmuster ausreichend. Lediglich bei der Probe 31 konnten vier Loci (D19S433, D21S11, D16S539 und AMEL) bzw. bei der Probe 32 acht Loci (FGA, D18S51, D8S1179, D21S11, D3S1358, vWA, D16S539 und AMEL) des SGM-Multiplex teilweise detektiert werden. Die DNA-analytischen Untersuchungen ergaben bei Probe 31 beim SGM-Multiplexlocus D21S11 ein Allelmuster mit zwei Peaks, von denen im Nonaplex nur eines bestätigt werden konnte. Ebenso ergab sich bei Probe 31 beim SGM-Multiplex ein falsches Geschlecht; das Allel für „Y“ wurde nicht amplifiziert. Locus D8S1179 der Probe 31 konnte auch mittels Nonaplex-Multiplex nicht ermittelt werden.

Nach etwa einem Jahr wurden die Probenzähne 43, 44 und 45 aus dem Erdreich entnommen. Bei diesen Proben konnten nur noch vereinzelt Allele identifiziert werden. Lediglich der sehr kurze TPOX-vs und der Locus AMEL des Nonaplex konnten noch bei allen dreien erfolgreich amplifiziert werden. Bei Probe 43 war daneben noch Locus TH01 des Nonaplex-Multiplex erfolgreich, bei Probe 44 der Locus SE33 des Nonaplex-Multiplex und bei Probe 45 die Loci TH01 und D8S1179 des Nonaplex-Multiplex. Die Menge an DNA lag bei allen unter der Nachweisgrenze von 5 pg/µl.

Proben-nr.	Menge in ng/µl	SE33	SGM										
			FGA	D19S433	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	D16S539	D2S1338	AMEL
10	0,019	15/30,2	23/25	13/15	12/19	7/9,3	10/13	28/30	18	14/16	11	18/23	X
26	0,042	20/30,2	22 (?)	13/15,2	***	7/9 (?)	11/13 (?)	28/32,2 (?)	17/18	16/17 (?)	12/13 (?)	23 (?)	X
31	< 5pg	19	***	14 (?)	***	***	***	19/34,2 (?)	***	***	9	***	X
32	0,051	14/19	25(?)	***	14	***	14	29	15/16	16/17	11/12(?)	***	XY
43	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
44	< 5pg	17	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
45	< 10pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Tab. 19(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der vergrabenen Zähne

Proben-nr.	TPOX-vs	Nonaplex									Kommentar
		SE33	FGA	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	AMEL	
10		kein Nonaplex und TPOX-vs, da SGM erfolgreich war									Erde: 09.07.-15.08.05
26	SE33 erfolgreich	20/30,2	18/22	15/17	7/9	11/13	28/32,2	17/18	16/17	X	Erde: 09.07.-15.10.05
31	SE33 erfolgreich	19	19	19	6	***	34,2	15/17	***	XY	Erde: 09.07.05-03.03.06
32	SE33 erfolgreich	14/19	25	14	7/10	14	29	15/16	16/17	XY	Erde: 09.07.05-03.01.06; vital
43	8/11	***	***	***	6	***	***	***	***	X	Erde: 09.07.05-24.07.06; vital
44	11	***	***	***	***	***	***	***	***	X	Erde: 09.07.05-24.07.06; vital
45	8/11	***	***	***	6	13/14	***	***	15	XY	Erde: 09.07.05-24.07.06; vital

Tab. 19(b): TPOX-vs und Nonaplex der vergrabenen Zähne

3.3 In Wasser gelagerte Zähne

Bei der Analyse konnte aus der vier Wochen im Wasser gelagerten Probe 35 nur 0,078 ng/µl DNA gewonnen werden. Zwar reichte dies aus, um mittels des Systems SE33 und dem Nonaplex-Multiplex eine DNA-Analyse zu erreichen, allerdings konnte der SGM-Multiplex nicht an allen Loci eindeutig typisiert werden. Die fünf erfolgreich amplifizierten und die drei vermuteten Loci des SGM-Multiplex stimmten zwar mit denen des Nonaplex-Multiplex überein, jedoch konnten die Loci D8S1179, D16S539 und D2S1338 im SGM-Multiplex nicht wiedergegeben werden.

Die ein halbes Jahr in Wasser gelegenen Proben 42 (0,511 ng/µl DNA) und 43 (0,666 ng/µl DNA) waren mit dem Einzelsystem SE33 und dem SGM-Multiplex typisierbar, sodass die PCR weder mit dem System TPOX-vs noch mit dem Nonaplex-Multiplex durchgeführt werden musste.

Nach einem Jahr waren die Ergebnisse weniger erfolgreich. Das Quantifizierungskit konnte keine DNA mehr nachweisen. Bei Probe 36 waren die Systeme SE33 und TPOX-vs erfolgreich, aber sowohl beim SGM-Multiplex, wie auch beim Nonaplex-Multiplex traten nur etwa die Hälfte der Systeme zum Vorschein. Erfolgreich waren beim SGM-Multiplex die Loci FGA, TH01, D8S1179, D21S11, D3S1358, vWA und AMEL, beim Nonaplex-Multiplex die Loci D18S51, TH01, D21S11, D3S1358, vWA und AMEL. Bei Probe 37 war weder mit dem System SE33 noch dem SGM-Multiplex eine Typisierung möglich, jedoch lieferte das System TPOX-vs ein erfolgreich typisiertes Ergebnis. Auch der Nonaplex-Multiplex ergab an den Loci TH01, D21S11, D3S1358, vWA und AMEL einen verwertbaren Erfolg.

Proben-nr.	Menge in ng/µl	SE33	SGM										
			FGA	D19S433	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	D16S539	D2S1338	AMEL
35	0,078	23,2/26,2	20/22	15(?)	12/16	7/9	***	28/30(?)	15/16(?)	15/17	***	***	XY
41	0,511	13/32,2	24/25	13/14	12/15	7/9,3	13/14	30/31	16/17	15/18	11/12	18	X
42	0,666	18/30,2	21/26	13/15	12	6/10	13	27/30	15/17	14	13	20	X
36	< 5pg	17/29,2	17/18/19/24	***	***	6/9	14	32,2/34,2	15	15	***	***	XY
37	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Tab. 20(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der in Wasser gelagerten Zähne

Proben-nr.	TPOX-vs	Nonaplex									Kommentar
		SE33	FGA	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	AMEL	
35	SE33 erfolgreich	23,2/26,2	20/22	12/16	7/9	12/15	28/30	15/16	15/17	XY	H ₂ O: 23.09.05-03.01.06
41		kein Nonaplex und TPOX-vs, da SGM erfolgreich war									H ₂ O: 23.09.05-03.03.06; vital
42		kein Nonaplex und TPOX-vs, da SGM erfolgreich war									H ₂ O: 23.09.05-03.03.06; vital
36	8	***	***	15 (?)	6/9	***	31	16/18	14/15	XY	H ₂ O: 23.09.05-24.09.06; vital
37	9	***	***	***	9(?)	***	29	14(?)	15/16	X	H ₂ O: 23.09.05-24.09.06

Tab. 20(b): TPOX-vs und Nonaplex der in Wasser gelagerten Zähne

3.4 Der Sonnenstrahlung ausgesetzte Zähne

Proben Nr. 51 und 52 ergaben nach vier Wochen unter Sonneneinstrahlung bei dem System TPOX-vs und bei dem Nonaplex-Multiplex eine eindeutige Typisierung. Die DNA-Konzentration von 0,823 und 0,947 ng/µl war hierfür ausreichend.

Bereits nach einem Vierteljahr konnte bei den Proben 27 und 28 keine DNA mehr quantifiziert werden. Ebenso erfolglos blieb die PCR mittels des STR-Systems SE33 und des SGM-Multiplex. Nur das System TPOX-vs konnte typisiert werden. Der Nonaplex-Multiplex erbrachte bei Probe 27 drei typisierbare Loci (TH01, D3S1358 und AMEL) und bei Probe 28 lediglich einen typisierbaren Locus (TH01) hervor.

Nach einem halben Jahr zeigte die Probe des Zahns Nr. 29 mit keinem Kit eine Typisierung. Auch die Quantifizierung konnte keine DNA nachweisen. Die Probe 30 war nur im System TPOX-vs typisierbar. Die zwei Loci im Nonaplex-Multiplex, welche nur sehr schwache Peaks zeigten, können nicht zur eindeutigen Identifizierung herangezogen werden.

Proben-nr.	Menge in ng/µl	SE33	SGM										
			FGA	D19S433	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	D16S539	D2S1338	AMEL
51	0,823		kein SE33 und SGM, da TPOX-vs und Nonaplex gemacht wurde										
52	0,947		kein SE33 und SGM, da TPOX-vs und Nonaplex gemacht wurde										
27	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
28	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
29	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
30	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Tab. 21(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der Sonnenstrahlung ausgesetzten Zähne

Proben-nr.	TPOX-vs	Nonaplex									Kommentar
		SE33	FGA	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	AMEL	
51	8	14/19	20/24	17	6/9,3	12/13	28/31,2	16/17	17	X	UV: 27.12.06-01.02.06
52	10/11	18/30,2	21/26	12	6/10	13	27/30	15/17	14	X	UV: 27.12.06-01.02.06
27	9	***	***	***	9,3	***	***	17	***	XY	UV: 04.08.-05.11.05; vital
28	8/9	***	***	***	9,3	***	***	***	***	***	UV: 04.08.-05.11.05
29	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	UV: 04.08.05-03.03.06; vital
30	8/11	***	***	***	6	***	***	***	***	X(?)	UV: 04.08.05-03.03.06

Tab. 21(b): TPOX-vs und Nonaplex der Sonnenstrahlung ausgesetzten Zähne

3.5 Zähne aus Sektionsgut

Bei Probe 33 (etwa 17 Tage Liegezeit) konnte 0,091 ng/µl DNA gewonnen werden. Eine DNA-analytische Untersuchung mittels des Systems SE33 und des SGM-Multiplex war in allen Systemen möglich.

Probe 34 (etwa 14 Tage Liegezeit) lieferte keine quantifizierbare DNA mehr. Das Untersuchungsergebnis mit dem STR-System SE33 war erfolgreich, mit dem SGM-Multiplex konnten drei Loci nicht (D18S51, TH01 und D2S1338) und fünf weitere nur unsicher (FGA, D19S433, D21S11, vWA und D16S539) identifiziert werden. Lediglich bei den Loci D8S1179, D3S1358 und AMEL konnten die Allele eindeutig ermittelt werden.

Proben- nr	Menge in ng/µl	SE33	SGM										
			FGA	D19S433	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	D16S539	D2S1338	AMEL
33	0,091	27,2/33,2	20/23	15,2	13/14	7/8	11/13	29/30	14	17	11/12	18/25	XY
34	< 5pg	18	21/22 (?)	16 (?)	***	***	11/14	28 (?)	17	19 (?)	12 (?)	***	XY

Tab. 22(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der Zähne aus dem Sektionsgut

Proben- nr	TPOX-vs	Nonaplex									Kommentar
		SE33	FGA	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	AMEL	
33	SE33 erfolgreich	27,2/26,2	20/23	13/14	7/8	11/13	29/30	14	17	XY	verweste Leiche ~17d
34	SE33 erfolgreich	***	***	***	7/9	***	***	***	***	***	verweste Leiche ~14d

Tab. 22(b): TPOX-vs und Nonaplex der Zähne aus dem Sektionsgut

3.6 Starker Hitze ausgesetzte Zähne

Die DNA-Konzentration nahm bei zunehmender Hitzeexposition kontinuierlich ab. Waren nach 30 min noch Konzentrationen von 0,154 ng/µl (Probe 11) und 1,79 ng/µl (Probe 12) festzustellen, konnten nach 60 min nur noch Werte von <10 pg/µl (Probe 13) und 0,034 ng/µl (Probe 16) ermittelt werden. Alle Werte späterer Proben (Nr. 17 - 20) lagen unter der Nachweisgrenze.

Korrespondierend dazu verhält sich auch der Nachweis der verschiedenen Allele. Bei den ersten Proben (Nr. 11 und 12) konnte das System SE33 verlässlich nachgewiesen werden und auch beim SGM-Multiplex zeigten sich noch vier (Probe 11: die Loci FGA, D19S433, D21S11 und AMEL) bzw. fünf (Probe 12: die Loci D19S433, D8S1179, D21S11, vWA und AMEL) amplifizierbare Loci. Der Nonaplex-Multiplex ergab nur bei Probe 11 im System D21S11 kein Ergebnis.

Proben 13 und 16, die nach 60 min entnommen wurden, brachten ebenfalls beim STR-System SE33 ein Ergebnis. Mit dem SGM-Multiplex konnte jedoch nur noch bei Probe 16 der Locus AMEL wiedergegeben werden, der allerdings nicht mit dem Genus des Patienten übereinstimmte. Mit dem Nonaplex-Multiplex konnten zwar mehr Loci typisiert werden (Probe 13: SE33, TH01, und AMEL; Probe 16: FGA,

TH01, D21S11, vWA und AMEL), dies reicht aber für eine zufriedenstellende Identifizierung nicht aus.

90 min nach Versuchsbeginn wurden Proben Nr. 17 und 18 dem Wärmeschrank entnommen. Probe 17 konnte noch beim System SE33 typisiert werden. Dies gelang bei Probe 18 nicht mehr. Das SGM-Multiplex-Kit ermöglichte bei beiden Proben keine Typisierung. Eine weitere Untersuchung der Probe 18 mit dem System TPOX-vs konnte Allele darstellen. Die Untersuchung mit dem Nonaplex-Kit gestattete bei beiden Proben eine Typisierung des AMEL-Locus und zusätzlich bei Probe 18 die Loci TH01 und D3S1358.

Die Zähne Nr. 19 und 20 wurden 120 min der Hitze ausgesetzt. Probe 19 konnte beim System SE33 noch typisiert werden, Probe 20 ergab hierbei kein Ergebnis. Erst unter Zuhilfenahme des Systems TPOX-vs gelang eine Typisierung. Der SGM-Multiplex konnte bei beiden keine Allele liefern. Der Nonaplex-Multiplex lieferte bei beiden am Locus D21S11 verwertbare Allele, zusätzlich stellte sich am Locus TH01 bei Probe 20 ein Allel dar.

Proben-nr.	Menge in ng/µl	SE33	SGM											
			FGA	D19S433	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	D16S539	D2S1338	AMEL	
11	0,154	19/27,2	18,3	13/14	***	***	***	32,2	***	***	***	***	***	Y
12	1,79	18/20	***	14	***	***	11/12	29/30	17/18	16/18	***	***	***	XY
13	< 10pg	18	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
16	0,034	27,2	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	X
17	< 5pg	32	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
18	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
19	< 5pg	20/28,2	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
20	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Tab. 23(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der starker Hitze ausgesetzten Zähne

Proben-nr.	TPOX-vs	Nonaplex									Kommentar
		SE33	FGA	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	AMEL	
11	SE33 erfolgreich	27.2/29.2	16/21	17	8/9.3	14	***	14/17	16/17	XY	Ofen: 30min/200°C; tief zerstört
12	SE33 erfolgreich	18/20	20/25	16	8/9.3	11/12	29/30	17/18	16/18	XY	Ofen: 30min/200°C
13	SE33 erfolgreich	28,2	***	***	6/8	***	***	***	***	XY	Ofen: 60min/200°C
16	SE33 erfolgreich	***	18	***	7	***	27/36.2	***	14	XY	Ofen: 60min/200°C
17	SE33 erfolgreich	***	***	***	***	***	***	***	***	XY(?)	Ofen: 90min/200°C
18	8/11	***	***	***	9	***	***	17/18	***	XY	Ofen: 90min/200°C
19	SE33 erfolgreich	***	***	***	***	***	34	***	***	***	Ofen: 120min/200°C
20	8/9	***	***	***	6	***	27/32.2	***	***	***	Ofen: 120min/200°C

Tab. 23(b): TPOX-vs und Nonaplex der starker Hitze ausgesetzten Zähne

3.7 Vor 28 bzw. 29 Jahren extrahierte Zähne

Die Quantifizierung mit den Quantifer Kit lieferte eine Menge von 4,25 bis 28,44 ng/µl. Eine Typisierung konnte in allen Systemen des SGM-Multiplex und im Einzel-

system SE33 erfolgen. Weitere Untersuchungen mit dem Nonaplex-Multiplex und dem TPOX-vs brauchten daher nicht durchgeführt werden.

Proben-nr.	Menge in ng/µl	SE33	SGM										
			FGA	D19S433	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	D16S539	D2S1338	AMEL
21	4,25	17/33,2	21/25	15/15,2	12	8	13/14	28/30	14/17	17	10/12	25/26	XY
22	27,98	16/28,2	18/21	15/16	14	7/9,2	12/14	30,2/31,2	15/16	16/19	11/13	16/17	XY
23	28,44	19	21/23	12/14	14/18	6/7	12/14	28/31	14/17	17	11/13	17/25	XY

Tab. 24: Quantifizierung, SE33 und SGM der vor 28 bzw. 29 Jahren extrahierten Zähne

3.8 Zähne der Ausgrabung in Katzwang

Die gewonnenen Dentinspäne erbrachten keinen Nachweis von DNA mittels Quantifizierung.

Keine der Proben konnte beim System SE33 oder dem SGM-Multiplex eine Typisierung liefern. Bei Probe 38 konnte als einziges ein Allel beim System TPOX-vs vermutet werden. Eine weitere Untersuchung mit dem Nonaplex-Multiplex ergab ebenso keine Typisierung.

Proben-nr.	Menge in ng/µl	SE33	SGM										
			FGA	D19S433	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	D16S539	D2S1338	AMEL
38	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
39	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
40	< 5pg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***

Tab. 25(a): Quantifizierung, SE33 und SGM der Zähne der Ausgrabung in Katzwang

Proben-nr.	TPOX-vs	Nonaplex									Kommentar
		SE33	FGA	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA	AMEL	
38	9(?)	***	***	***	***	***	***	***	***	***	Katzwang
39	***	kein Nonaplex, da bereits TPOX-vs nicht erfolgreich war									Katzwang
40	***	kein Nonaplex, da bereits TPOX-vs nicht erfolgreich war									Katzwang

Tab. 25(b): TPOX-vs und Nonaplex der Zähne der Ausgrabung in Katzwang

3.9 Zähne aus der Dietersberghöhle

Das Quantifiler® Human DNA Quantification Kit ergab auch hierbei keinen DNA-Nachweis. Beim System TPOX-vs gelang bei Probe 48 als einzige eine Typisierung, welche jedoch mit dem Nonaplex-Multiplex nicht weiter typisiert werden konnte.

Proben- nr.	Menge in ng/μl	TPOX-vs	Nonaplex								Kommentar	
			SE33	FGA	D18S51	TH01	D8S1179	D21S11	D3S1358	vWA		AMEL
48	< 5pg	10(?)/11	***	***	***	***	***	***	***	***	***	Dietersbergerhöhle
49	< 5pg	***			kein Nonaplex, da TPOX-vs nicht erfolgreich war						Dietersbergerhöhle	
50	< 5pg	***			kein Nonaplex, da TPOX-vs nicht erfolgreich war						Dietersbergerhöhle	

Tab. 26: Quantifizierung, TPOX-vs und Nonaplex der Zähne aus der Dietersberghöhle

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob sich aus Zähnen genügend brauchbare DNA zur Gewinnung eines „genetischen Fingerabdrucks“ gewinnen lässt.

Die Analyse der in der Zahnpulpa gegen äußere Einflüsse gut geschützten DNA nach unterschiedlich langen Liegezeiten, Hitzeeinwirkung, Sonnenbestrahlung mit Einwirkung durch UV-Licht, Lagerung in Wasser oder Erde ließen unterschiedliche Ergebnisse erwarten.

4.1 Methoden

4.1.1 Probenentnahme

Um eine Inhibition der PCR durch Hemmstoffe zu verhindern, müssen diese nach Möglichkeit entfernt werden. Stoffe, die in diesem Fall in Erwägung gezogen werden müssen, sind Huminsäure und Fulvinsäure, welche durch Abbauprozesse organischen Materials entstehen. Der Einsatz moderner hoch entwickelter DNA-Kits, wie das hier verwendete E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Mini Kit, dienen der Abtrennung dieser Stoffe (Burger et al. 1999).

Weiter ist darauf zu achten, dass an dem Zahn haftende Stoffe zu entfernen sind bzw. mit NaOCl eventuell vorhandene DNA zerstört werden muss. Um auch an den Gerätschaften befindliche DNA unbrauchbar zu machen, wurden sämtliche zur DNA-Extraktion verwendeten Geräte vor Gebrauch mit NaOCl abgewischt (Gilbert et al. 2005; Yang et al. 2003).

Auf eine Dekalzifizierung des Dentinpulvers wurde verzichtet, da sich im Dentin keine Zellkerne befinden und somit keine DNA vorhanden ist. Studien bei der Aufarbeitung von Kochenpulver belegen, dass dabei eine Dekalzifizierung nicht nötig ist, dass sogar der Ertrag von DNA bei nicht dekalzifiziertem Knochenpulver doppelt so hoch ist wie bei dekalzifiziertem Pulver, da jede zusätzliche Reinigung zu DNA-Verlust führt. (Fisher et al. 1993).

Das Trepanieren von Zähnen nach entsprechender Reinigung und die Gewinnung von Pulparesten mit einer feinen Pinzette oder mit Endonadeln war daher die Methode mit den größten Erfolgsaussichten.

4.1.2 DNA-Extraktion

Das E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Mini Kit basiert auf der Grundlage einer Silikamembran. Das reversible Binden der DNA an Silikapartikel ist ein Standardverfahren, um die DNA von nieder- und hochmolekularen Substanzen wie zellulärer Debris und Proteinen zu trennen, welche die PCR inhibieren können. Nach mehrmaligem Waschen kann dann die DNA mittels Puffer wieder in Lösung überführt werden. Allerdings sind die Silikapartikel selbst PCR-Inhibitoren, sodass diese vor der PCR entfernt werden müssen (Höss et al. 1993; Günther et al. 1995). Durch Auftragen der Silikapartikel auf eine Membran wie im E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Mini Kit kann auf diesen letzten Reinigungsschritt verzichtet werden.

Eine weitere Methode zur DNA-Gewinnung stellt das Phenol-Chloroform-Protokoll dar. Dabei wird nach der Proteinase K-Verdauung eine Phenol-Chloroform-Fällung durchgeführt. Der Nachteil dieser Methode ist, dass durch die Verwendung eines organischen Lösungsmittels zwar störende Komponenten entfernt, aber bei alten und bodengelagerten Proben auch Huminstoffe mit extrahiert werden. Diese Huminstoffe können oftmals nicht komplett eliminiert werden, was bei der PCR zu Problemen führen kann. Diese Methode ist sehr fehleranfällig und stellt eine hohe fachliche Anforderung an den Labormitarbeiter da, wodurch es für den routinemäßigen schnellen Einsatz ungeeignet ist. Daneben ist zu bemerken, dass ein Teil der DNA bei der Fällung verloren geht (Baron et al. 1996). Durch diese Umstände ist dieses Protokoll für diese Arbeit unzweckmäßig.

Andere DNA-Extraktionsprotokolle wie „Chelex“ oder „Boil“ scheiden ebenfalls für die Verwendung in dieser Arbeit aus, da diesen ein stark denaturierendes Reagens fehlt, welches Histone zerstören kann, die die DNA vor Verfall schützen (Hummel 2003, S.61ff).

4.1.3 PCR

Das AmpFISTR® SGM Plus Kit bietet die Möglichkeit zur Amplifizierung von zehn tetranukleotiden STRs und Amelogenin. Dabei sind die STRs so gewählt, dass sich überlappende Systeme durch drei Farbmarkierungen unterscheiden lassen.

Neben den sieben europäischen Datenbanksystemen (European Standard Set = ESS: TH01, vWA, D21S11, FGA, D3S1358, D8S1179 und D18S51) und vier weiteren Systemen (D16S539, D2S1358, AMEL und D19S433) fehlt in diesem Set das in der deutschen DAD (DNA-Analyse-Datei) vorhandene System SE33 (Patzelt et al. 2007, S. 513ff).

Dieses SE33 wurde als Einzelsystem ebenfalls in einer weiteren PCR eingesetzt. Da bei einem Einzelsystem sowohl die Reagenzien, wie auch die Temperaturen während der PCR besser an das System angepasst werden können, bietet dieses eine sensiblere Typisierungsmöglichkeit als ein Multiplex-Ansatz.

Um zumindest einen Nachweis von vorhandener DNA zu erbringen, wurde versucht, mit dem TPOX-vs eine Typisierung durchzuführen. Dieses verkürzte System (siehe Kapitel 1.2.2.3, S. 4) gestattet auf DNA-Fragmente zurückzugreifen, die im Bereich von 100 bp liegen. Hellmann et al. zeigten in ihrer Studie von 2001, bei der sie bei telogenen Haaren eine Typisierung versuchten, wie viel sensibler die vs-STR-Systeme im Gegensatz zu den konventionellen Systemen sind. Den Einsatz einer neuen short pentaplex (ShoP) PCR bei der Analyse stark degradierter DNA bezeichneten Meißner et al. 2007 als sehr wirkungsvoll. Die Anwendung solcher Multiplex-Kits kann bei stark zerstörter DNA eine Typisierung ermöglichen.

Mit dem Mentype® Nonaplex^{QS} PCR Amplifikation Kit ist es möglich die acht für die DAD geforderten STR-Systeme (ESS: TH01, vWA, D21S11, FGA, D3S1358, D8S1179 und D18S51 + SE33) und Amelogenin zu amplifizieren. Dieses Kit bietet höhere Sensibilität als das AmpFISTR® SGM Plus Kit, da ähnlich wie bei den vs-STRs die Primerbindungsstellen näher an die repetitive Sequenz gelegt werden konnten und daher kürzere DNA-Fragmente zur Amplifizierung ausreichen. Des Weiteren lassen sich laut Herstellerangaben Nullallele (siehe Kapitel 4.2.1, S. 50) vermeiden, da bekannte Mutationen in der Primerbindungsstelle des SE33 kompensiert werden. Durch eine höhere Zyklenanzahl (35 Zyklen gegenüber 28 Zyklen beim SGM Multiplex) können auch noch schwache Allele erkennbar werden. Wie beim AmpFISTR® SGM Plus Kit werden auch hier Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung sich überlappenden Systeme verwendet.

Abb. 17 zeigt ein Beispiel, wie ein Elektropherogramm des Mentype® Nonaplex^{QS} mit den vier Farbmarkierungen aussieht:

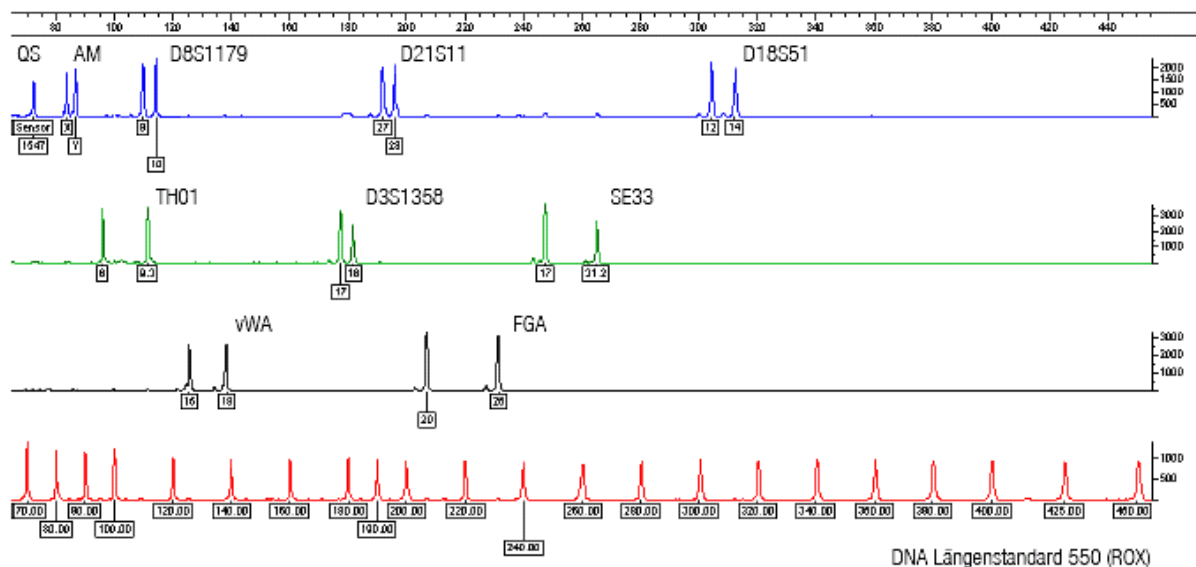


Abb. 17: Beispiel für ein Elektropherogramm des Mentype® Nonaplex^{QS} analysiert am ABI PRISM® 310 Analyser mit rot markiertem DNA-Längenstandard 550 (ROX) (Biotype AG, Produktinformation Mentype® Nonaplex^{QS})

Um das Optimum von 1,0-2,5 ng DNA im PCR-Ansatz zu erzielen, wurden je Probe drei Ansätze mit unterschiedlicher Menge DNA angesetzt. Es wurde jeweils eine Probe mit 1 µl, eine mit 5 µl und eine mit 10 µl DNA angesetzt. Bei zu geringer Menge DNA kann eventuell keine Amplifikation stattfinden. Wenn zu viel DNA in den PCR-Ansatz gegeben wird, kann es dazu kommen, dass die Reaktion aus Mangel an Primern die exponentielle Phase der PCR nicht erreicht, in der die Zielfragmente sehr effizient amplifiziert werden (Hummel 2003, S. 105f). Da viele DNA-Polymerasen beim abschließenden Extensionsschritt ein A-Nukleotid an das 3'-Ende der Einzelstränge anfügen, wodurch -A zu +A Fragmenten werden, entstehen durch einen Mangel an A-Nukleotiden zwei Peaks bei der Analyse mit der hochauflösenden Kapillarelektrophorese. Daneben kann es bei der Analyse im GeneScan zu so genannten „off-scale data“ führen (Wallin et al. 1998). Sutlovic et al. legten in einer Studie 2005 dar, dass ab einer Menge von 100 ng Huminsäure pro 25 µl PCR-Ansatz die Polymerase komplett inhibiert wird, die PCR scheitert und zu falsch-negativen Ergebnissen führt. Die in die PCR eingesetzte Menge DNA muss daher so gering wie möglich gehalten werden, um auch die Menge an Huminsäure so gering wie möglich zu halten. Humin- und Fulvinsäuren werden im Boden aus organischem Material gebildet und bezeichnen hochmolekulare chemische Verbindungen (Yeates

et al. 1997). Um eine Kontamination durch anhaftende Erde und damit Humin- und Fulvinsäure zu vermeiden, wurden vorsorglich alle äußeren Zahnoberflächen gründlich gereinigt.

4.1.4 Real-Time-Quantitative-PCR (RTQ-PCR)

Die Real-Time-Quantitative-PCR (RTQ-PCR) mittels Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich die Möglichkeit einer Quantifizierung bietet. Dabei wird während der PCR-Zyklen die Zunahme der Fluoreszenz und damit korrespondierend die Zunahme der DNA-Menge gemessen. Eine Auftrennung mittels Gelelektrophorese ist dabei nicht nötig. Allerdings ist diese Methode den gleichen Problemen wie die herkömmliche PCR unterworfen. PCR-inhibierende Stoffe können auch bei der RTQ-PCR zum Scheitern führen, weswegen dem Kit BSA zugegeben ist. Des Weiteren ist eine gewisse Grundlänge der DNA-Fragmente nötig, da eine 62 bp lange Struktur zu analysieren ist. Das Quantifiler[®] Human DNA Quantification Kit gibt somit die Menge an amplifizierbarer DNA wieder. Die Menge an stärker degradiertem DNA ist damit nicht nachweisbar. Aus stochastischen Gründen ist es dennoch möglich, dass vereinzelt STR-Systeme typisiert werden können, wie beispielsweise die Proben 25 und 26 zeigen (Applied Biosystems, Quantifiler[™] Kits - User's Manual).

4.2 Komplikationen und PCR-Artefakte

Die meisten Artefakte ergeben sich bei einer Erhöhung der Zyklenzahl bei der PCR. Zwar steigt dadurch auch die Detektionswahrscheinlichkeit von sonst nicht erkannten Allelen, aber auch die Anzahl von falsch-positiven Ergebnissen erhöht sich (Bower et al. 2005). Das Hauptaugenmerk bei dieser Arbeit war nicht eine Erhöhung der Zyklenzahl sondern eine Verminderung der Artefaktbildung.

Hierbei stellt wohl der „allelic dropout“ das größte Problem dar. Dass ein Geschlecht falsch wiedergegeben wurde, konnte im Fall der Probe 31 belegt werden. Stotter-

banden konnten dank ihrer einfachen Identifizierung zwar beobachtet werden, spielten aber bei der Analyse nur eine untergeordnete Rolle.

4.2.1 „allelic dropout“

Der Ausfall eines der beiden Allele eines heterozygoten Systems führt zur falschen Annahme eines homozygoten Systems. Man spricht von einem „allelic dropout“. Dies kann beispielsweise passieren, wenn sich durch Mutationen die Hybridisationssequenz für die Primer so verändert hat, dass diese sich nicht mehr anlagern können. Ein so verändertes Allel wird Nullallel genannt und wird in der PCR nicht amplifiziert (Butler 2001).

Bei sehr wenig degradierter Ausgangs-DNA kann es ebenso durch Strangbrüche zum Ausfall eines Allels kommen. Dabei ist die Wahrscheinlichkeit größer, dass zuerst Allele der großen Systeme wie D18S51, D2S1338, D16S539 oder FGA ausfallen, bevor kleinere Systeme wie D19S433, AMEL, D3S1358 oder D8S1179 betroffen sind (Schmerer et al. 1999).

4.2.2 Falsche Geschlechtsangabe

Bei der Feststellung des Geschlechts einer Person, von der eine Probe stammt, kann es passieren, dass eines der beiden Allele durch Degradation bereits zerstört worden ist. Bei diesem „allelic dropout“ kann unter Umständen dennoch eine Geschlechtsbestimmung möglich sein. Wenn das X-chromosomale Allel ausfällt und nur das Y-chromosomale Allel amplifiziert wird, ist die Probe korrekt als männlich zu identifizieren (siehe Probe 11, Kapitel 3.6, S. 42). Fällt hingegen das Y-chromosomale Allel aus, wird die Probe als falsch-weiblich erkannt. Ein Indiz auf den Ausfall des Y-chromosomalen Allels gibt bei Multiplexsystemen der Ausfall anderer Systeme (Hummel 2003, S. 29f).

Da das Geschlecht der Personen, von denen die Proben stammten, bekannt war, konnten durch einen Abgleich nur eine falsche Geschlechtszuordnung ermittelt werden. Probe 31 brachte bei der Analyse ein falsch-weibliches Ergebnis.

4.2.3 Stotterbanden

Stotterbanden oder Schattenbanden entstehen durch das Verrutschen der Polymerase („slippage“) um eine repetitive Einheit während der Neusynthetisierung. Dabei kann das Verrutschen als „forward-slippage“ geschehen, wobei eine repetitive Einheit übersprungen wird und der neue Strang kürzer wird, oder es kann als „backward-slippage“ passieren, bei dem eine repetitive Einheit doppelt amplifiziert wird und somit ein zu langer Strang entsteht. Je kleiner die repetitive Einheit ist, desto ausgeprägter sind die Stotterbanden (siehe Abb. 18). Ebenso sind Systeme, bei denen die repetitive Einheit die gleiche Kernsequenz vorweist, häufiger betroffen als Systeme wie D21S11 oder FGA, die unterschiedliche Kernsequenzen enthalten. Die Ausprägung der Stotterbanden ist bei größeren Allelen durch die höhere Wahrscheinlichkeit von „slippages“ intensiver als bei kleinen Allelen (Walsh et al. 1996).

Durch den bei tetranukleotiden STR-Amplifikationsprodukten wesentlich geringer ausgeprägten Peak vor bzw. nach einem Allel (siehe Abb. 18) sind die Stotterbanden leicht identifizierbar. Regelmäßig konnten diese bei der Auswertung beobachtet und berücksichtigt werden.

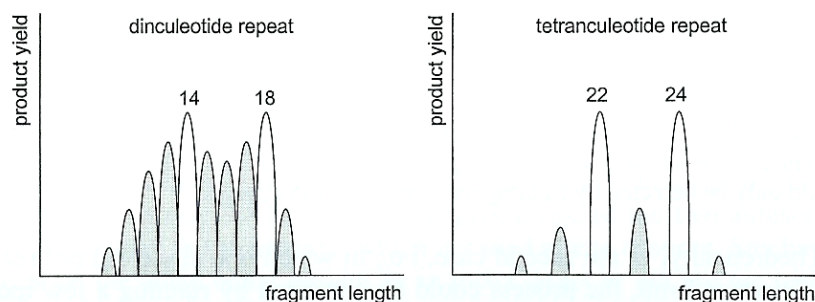


Abb. 18: Stotterbanden bei di- und tetranukleotiden STR-Amplifikationsprodukten (aus Hummel 2003, S. 36)

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Frisch extrahierte Zähne

Die vor kurzer Zeit extrahierten Zähne dienten bei den ersten Untersuchungen dazu, die Methode zu testen und zu überprüfen, ob sie für diese Zwecke geeignet ist. Bei

den Proben 1 bis 5 (alle Zähne waren vor der Zahnextraktion sensibel, was ein Hinweis auf die Vitalität der Zähne ist; Weber 2003, S. 296) konnte eine DNA-analytische Untersuchung mit dem System SE33 und dem SGM-Multiplex erfolgreich verifiziert werden. Somit zeigte sich, dass die angewandten Kits, insbesondere das E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Mini Kit zur Isolierung der DNA, für diese Arbeit gut geeignet waren.

Probe 6 stammte von einem asensiblen Zahn. Die Asensibilität von Zähnen kann verschiedene Ursachen haben. Beispielsweise kann eine aggressive Karies bis zum Pulpenkavum durchgebrochen sein und eine Pulpitis, also eine bakterielle Entzündung des Zahnmarks, erzeugt haben, welche dabei das Gewebe irreversibel degradiert. Weitere Ursachen für asensible Zähne können Traumata, Kronen oder ein obliteriertes Pulpenkavum sein. Nach dem Ergebnis der Probe 6 hatte der Zahn vermutlich eine irreversible Pulpitis, da eine tiefreichende kariöse Stelle vorhanden war. Bei der Typisierung lieferte das System TPOX-vs ein eindeutiges Ergebnis, der Nonaplex-Multiplex konnte nicht bei allen Loci ein vollständig detektierbares Merkmalsmuster liefern. Dies lässt den Rückschluss zu, dass bereits degradierende Vorgänge im Zahninneren eingesetzt hatten.

Das Ausgangsmaterial der Proben 7 bis 9 bestand aus drei tief zerstörten Zähnen. Dennoch konnte noch keine direkte Verbindung zur Pulpa festgestellt werden, da der Zahn bereits Tertiärdentin gebildet hatte. Da die dabei entstehende reversible Pulpitis keine DNA-abbauenden Eigenschaften aufweist, konnten die Loci mittels SGM-Multiplex eindeutig identifiziert werden.

Beim Probenzahn Nr. 14 konnte der Wurzelkanal kaum aufbereitet werden, weil das Pulpenkavum nahezu vollständig obliteriert war. Obwohl die DNA-Konzentration unter der Nachweisgrenze von 5 pg/µl lag, konnte hierbei noch das System TPOX-vs und das kleine System TH01 des Nonaplex-Multiplex eine Typisierung liefern. Zur Identifizierung sind diese beiden Systeme nicht mehr ausreichend, aber dennoch belegt dies, dass sehr stark degradierte DNA noch vorhanden ist.

Beim Probenzahn Nr. 15 konnte trotz weit offener apikaler Foramina problemlos eine DNA-Analyse mittels SGM-Multiplex und des Systems SE33 durchgeführt werden. Bei der Aufbereitung konnte das eingetrocknete Nervengewebe im Ganzen entnommen werden, was die hohe DNA-Ausbeute von 11,42 ng/µl erklärt. Dies lässt den Schluss zu, dass weit offene Foramina bei frisch extrahierten Zähnen mit noch nicht abgeschlossenem Wurzelwachstum die DNA-Typisierung nicht einschränken.

Die Zähne der Proben 24 und 25 waren mit Wurzelkanalfüllungen versorgt worden. Dabei wurde entzündetes oder gangränöses Pulpengewebe herausgenommen und der Wurzelkanal mit Endofeilen aufbereitet. Da es im Dentin kleine Ausbuchtungen gibt und das apikale Delta nicht vollständig entfernt werden kann (siehe Kapitel 1.3, S. 7), sind potentiell verwertbare, übrig gebliebene Zellen denkbar. Obwohl die DNA-Menge unter der Nachweisgrenze lag, konnte dennoch bei Probe 24, welche mit einer ein Jahr alten Wurzelkanalfüllung versehen war, das System SE33 und die meisten kleinen Systeme des Nonaplex-Multiplex erfolgreich typisiert werden. Folglich war die gewonnene DNA zwar stark degradiert, aber dennoch nicht komplett zerstört. Bei Probe 25, der Zahn hatte eine sechs Jahre alte Wurzelfüllung, war das STR-System SE33 nicht erfolgreich. Allerdings zeigten das System TPOX-vs und vereinzelte Loci der Multiplexe SGM und Nonaplex eine erfolgreiche Typisierung. Der Locus D18S51 lieferte bei den beiden Kits SGM- und Nonaplex-Multiplex unterschiedliche Allele, was den Schluss zulässt, dass entweder das Hintergrundrauschen einen Peak vorgetäuscht hat oder bei den beiden Kits jeweils nur eines der beiden Allele amplifiziert wurde. Die degradierenden Eigenschaften des oftmals bei der Wurzelkanalaufbereitung eingesetzten NaOCl wirken nicht in voller Konzentration in allen Seitenkanälen, sodass einige Systeme mit kurzen Amplifikationsprodukten noch detektierbar bleiben. Eine Untersuchung von Zähnen mit Wurzelkanalbehandlung bringt nicht immer gute Ergebnisse, kann aber auch Erfolge erzielen.

4.3.2 Im Erdboden vergrabene Zähne

Vergrabene Zähne wurden nach etwa vier Wochen (Zahn 10), vier Monaten (Zahn 26), einem halben Jahr (Zähne 31 und 32) und einem Jahr (Zähne 43, 44 und 45) entnommen und analysiert.

Probe 10 konnte eine komplette Typisierung hervorbringen, kein Locus ist im SGM-Multiplex ausgefallen.

Nach drei Monaten (Probe 26) konnte schon eine leichte Degradation der DNA nachgewiesen werden. Auch wenn das Einzelsystem SE33 noch typisiert werden konnte, kann man sich bei fast allen Systemen des SGM-Multiplex nur auf Vermutungen über die Allelzusammensetzung stützen. Das im SGM-Multiplex vermutete Allel des Locus

FGA wurde im Nonaplex-Multiplex um ein zweites Allel erweitert. Der Nonaplex konnte komplett typisiert werden.

Ein halbes Jahr vergraben waren die Zähne der Proben 31 und 32. Bei beiden war das System SE33 erfolgreich, jedoch sind beim SGM-Multiplex weitere Systeme komplett ausgefallen und nur etwa die Hälfte der Loci wurde fraglich typisiert. Probe 31 ergab beim SGM-Multiplexlocus D21S11 ein Allelmuster von zwei Peaks, von denen im Nonaplex nur eines typisiert werden konnte. Ebenso wurde bei Probe 31 mit dem SGM-Multiplex das Allel für „Y“ nicht amplifiziert. Der Nonaplex-Multiplex brachte fast keinen Allelausfall.

Die Probenzähne 43, 44 und 45 wurden nach etwa einem Jahr aus dem Erdreich entnommen. Bei diesen Proben konnten nur noch sehr vereinzelt Allele typisiert werden. Der sehr kurze TPOX-vs und der Locus AMEL des Nonaplex konnten noch bei allen drei Spuren erfolgreich amplifiziert werden.

Probe 26 und 31 zeigen, dass vermutete Allele des SGM-Multiplex nicht unbedingt dem tatsächlichen Allelbestand entsprechen müssen, sondern nur Hinweise auf mögliche Allele geben. Die meisten der im SGM-Multiplex vermuteten Allele konnten allerdings mit Hilfe des Nonaplex-Multiplex verifiziert werden.

In den ersten vier Wochen war die gewonnene DNA soweit intakt, dass eine Typisierung erfolgreich verlief. Erste Degradationserscheinungen lassen sich nach vier Monaten feststellen und nehmen kontinuierlich zu, bis nach einem Jahr fast keine verwertbare DNA mehr vorhanden ist.

In der Studie von Pfeiffer et al. aus dem Jahr 1999 konnte gezeigt werden, dass bei bodengelagerten Zähnen bereits nach sechs Wochen Systeme, die Fragmente länger als 500 bp benötigen (in diesem Fall das System D1S80), nicht mehr erfolgreich amplifizierbar waren. Selbst nach 18 Wochen konnte das System vWA in nur vier von zwölf Fällen und das System TH01 in lediglich zwei von zwölf Fällen detektiert werden. Auch ein rapider Abfall der DNA-Konzentration konnte zwischen der 6. und 18. Woche beobachtet werden.

Murakami et al. konnten im Jahr 2000 bei ihren Untersuchungen zur Geschlechtsbestimmung von Zahnproben mittels PCR zeigen, dass diese bei bis zu acht Wochen im Erdreich gelagerten Zähnen kein Problem darstellte.

Die Ergebnisse der aufgeführten Studien werden durch diese Arbeit bestätigt.

4.3.3 In Wasser gelagerte Zähne

Nach etwa drei Monaten (Zahn 35), sechs Monaten (Zähne 41 und 42) und zwölf Monaten (Zähne 36 und 37) wurden die in Wasser gelagerten Zähne entnommen und bis zur Verarbeitung eingefroren.

Bei Probe 35 gelang bei dem Systems SE33 und dem Nonaplex-Multiplex in allen Systemen eine Typisierung, allerdings konnte der SGM-Multiplex nicht an allen Loci eindeutig bestimmt werden. Drei Systeme dieses Multiplex fielen aus. Die vermutlich typisierten Systeme des SGM-Multiplex stimmten mit denen des Nonaplex-Multiplex überein.

Die ein halbes Jahr in Wasser gelegenen Proben 42 und 43 konnten bei dem System SE33 und dem SGM-Multiplex typisiert werden, sodass weder der TPOX-vs, noch der Nonaplex herangezogen werden musste.

Nach einem Jahr konnte mit dem Quantifizierungskit keine DNA mehr nachgewiesen werden. Die Systeme SE33 und TPOX-vs waren bei Probe 36 erfolgreich, aber sowohl beim SGM-Multiplex, als auch beim Nonaplex-Multiplex konnte nur etwa die Hälfte der Loci amplifiziert werden. Bei Probe 37 konnte weder mit dem System SE33 noch mit dem SGM-Multiplex eine Typisierung erbracht werden. Das System TPOX-vs konnte ein erfolgreich typisiertes Ergebnis liefern und auch der Nonaplex-Multiplex konnte in der Hälfte der Systeme typisiert werden.

Degradationserscheinungen traten bei den in Wasser gelagerten Zähnen erst zwischen einem halben bis einem Jahr in Erscheinung. Diese späte Degradation lässt sich besonders auf das Fehlen von UV-Strahlung und die moderate Temperatur im Heizungskeller (~20 °C) zurückführen.

Dass bei Probe 35 bereits nach wenigen Monaten der SGM-Multiplex erfolglos blieb, könnte daran liegen, dass bereits DNA-degradierende Vorgänge zum Zeitpunkt der Zahnextraktion vorhanden waren, wie sie auch bei äußerlich unversehrten Zähnen durch eine Paro-Endo-Läsion (siehe Kapitel 1.3, S. 8) vorkommen können. Nicht nur die DNA-Qualität, sondern auch deren Quantität könnte in diesem Fall eine erfolgreiche DNA-Analyse mittels SGM verhindert haben.

Alvarez Garcia et al. konnten in ihrer Studie 1996 nach drei Monaten das System TH01 bei vier von sechs Proben und nach sechs Monaten bei zwei von sechs Proben typisieren. Das Amelogeninsystem konnte nach beiden Zeitspannen bei allen

Proben typisiert werden. In diesem Bereich decken sich die Ergebnisse von Alvarez Garcia et al. größtenteils mit dieser Arbeit.

4.3.4 Der Sonnenstrahlung ausgesetzte Zähne

Nach etwa einmonatigem (Zähne 51 und 52), dreimonatigem (Zähne 27 und 28) und sechsmonatigem (Zähne 29 und 30) Aussetzen der Sonnenstrahlung wurden diese Zähne der Analyse zugeführt.

Vier Wochen unter Sonneneinstrahlung ergab bei den Proben Nr. 51 und 52 im System TPOX-vs und im Nonaplex-Multiplex bei einer DNA-Konzentration von 0,823 und 0,947 ng/µl eine eindeutige Typisierung.

Nach einem Vierteljahr konnte bei den Proben 27 und 28 keine DNA mehr quantifiziert werden. Ebenso erfolglos blieb die PCR mit dem Einzelsystem SE33 und dem SGM-Multiplex. Das System TPOX-vs konnte typisiert werden. Mittels Nonaplex-Multiplex konnten Systeme mit sehr kurzen Amplifikationsprodukten vereinzelt dargestellt werden.

Die Probe des Zahns Nr. 29 zeigte nach einem halben Jahr mit keinem Kit eine Typisierung. Auch die Quantifizierung konnte keine DNA nachweisen. Die Probe 30 lieferte nur im System TPOX-vs eine Typisierung. Die zwei Loci im Nonaplex-Multiplex, welche man vermuten kann, können nicht zu einer eindeutigen Identifizierung heran gezogen werden.

Schon seit langem werden UV-Strahlen zur Sterilisation von Luft, Wasser und Oberflächen eingesetzt. Speziell die Lichtwellenlänge der UV-C-Strahlung von 200 bis 300 nm wird von der DNA absorbiert und zerstört somit deren Struktur. Daher ist es nicht verwunderlich, dass ein Zahn, der in gewissem Maße transluzent ist, das Pulpengewebe im Inneren nur eingeschränkt vor der Strahlung schützen kann und es nach wenigen Monaten zu Degradationerscheinungen der DNA kommen konnte. Weitere Umweltfaktoren wie Hitze und Feuchtigkeit, denen die Zähne im Versuchszeitraum ausgesetzt waren, haben ebenfalls zum weiteren Zerfall der DNA beigetragen.

Bei den erfolgreich typisierten Proben 51 und 52 muss darauf hingewiesen werden, dass diese zu einer kühleren Jahreszeit der Sonnenstrahlung ausgesetzt waren.

Sowohl der flachere Einfallswinkel der Sonnenstrahlung, als auch die winterlichen Temperaturen müssen bei der Betrachtung berücksichtigt werden.

4.3.5 Zähne aus Sektionsgut

Die zwei Zähne aus der alltäglichen Sektionsarbeit (Zähne Nr. 33 und 34) ergaben zwei sehr unterschiedliche Ergebnisse. Während bei Probe 33 (etwa 14 Tage Liegezeit bis zum Auffinden) mit 0,091 ng/µl zwar relativ wenig DNA gewonnen werden konnte, aber dennoch eine Analyse mittels SE33 und SGM möglich war, war bei Probe 34 (etwa 17 Tage Liegezeit bis zum Auffinden) keine DNA mehr quantifizierbar. Das Einzelsystem SE33 war erfolgreich. Mit dem SGM-Multiplex konnten drei Systeme nicht und fünf nur vermutlich detektiert werden. Lediglich bei den drei kleinsten Systemen waren die Allele eindeutig ermittelbar.

Probe 34 war die einzige Probe, bei der im Nonaplex-Multiplex weniger Loci erkannt wurden als im SGM-Multiplex.

Vielfältige Gründe können hierzu beigetragen haben. Dazu tragen unter anderem Mikroorganismen bei, die für die Verwesung gestorbener Lebewesen verantwortlich sind. DNA-Untersuchungen an Zähnen aus Massengräbern in Kroatien, Bosnien und Herzegowina von Alonso et al. aus dem Jahre 2001 haben hierbei 32 Bakterienarten identifizieren können, die teilweise auch Bestandteil der physiologischen Keimflora der Mundhöhle sind. Beispiele hierfür sind verschiedene Arten von Laktobazillen, Pseudomonas, Staphylokokken und Streptokokken.

4.3.6 Starker Hitze ausgesetzte Zähne

Vier Mal wurden je zwei Zähne aus dem auf 200 °C vorgeheizten Wärmeschrank entnommen, nach 30 min (Zähne Nr. 11 und 12), nach 60 min (Zähne Nr. 13 und 16), nach 90 min (Zähne Nr. 17 und 18) und nach 120 min (Zähne Nr. 19 und 20).

Die DNA-Konzentration nahm dabei kontinuierlich ab. Nach 90 min lagen alle Werte unter der Nachweisgrenze.

Korrespondierend dazu verhält sich auch der Nachweis der verschiedenen Allele. Bei den ersten Proben (Nr. 11 und 12) konnte das System SE33 verlässlich nach-

gewiesen werden und auch beim SGM-Multiplex zeigten sich noch vier (Probe Nr. 11) bzw. fünf (Probe Nr. 12) amplifizierbare Systeme. Der Nonaplex-Multiplex lieferte bei beiden Proben eine eindeutige Identifizierung.

Proben 13 und 16, die nach 60 min entnommen wurden, ergaben ebenfalls beim Einzelsystem SE33 eine Typisierung. Mit dem SGM-Multiplex konnte jedoch nur noch bei Probe 16 der Locus AMEL wiedergegeben werden, der allerdings nicht mit dem Genus des Patienten übereinstimmte. Mit dem Nonaplex-Multiplex konnten zwar bei beiden Proben mehr Loci typisiert werden, dies reicht aber für eine vollständige Identifizierung nicht aus.

90 min nach Versuchsbeginn wurden Proben Nr. 17 und 18 dem Wärmeschrank entnommen. Probe 17 konnte noch beim System SE33 typisiert werden. Dies gelang bei Probe 18 nicht mehr. Der SGM-Multiplex lieferte bei beiden Proben keine Typisierung mehr. Eine weitere Untersuchung der Probe 18 mit dem System TPOX-vs konnte Allele darstellen. Die Untersuchung mit dem Nonaplex-Multiplex ergab bei beiden Proben eine Typisierung des AMEL-Locus und zusätzlich bei Probe 18 die Loci TH01 und D3S1358.

Die Zähne Nr. 19 und 20 wurden 120 min der Hitze ausgesetzt. Probe 19 konnte beim STR-System SE33 noch typisiert werden, Probe 20 brachte hierbei kein Ergebnis. Erst unter Zuhilfenahme des Systems TPOX-vs gelang eine Typisierung. Der SGM-Multiplex konnte bei beiden keine Allele hervorbringen. Der Nonaplex-Multiplex lieferte bei beiden am Locus D21S11 verwertbare Allele, zusätzlich zeigte sich bei Probe 20 am Locus TH01 ein Allel.

Bei einigen Studien wurden Zähne zwei Minuten bei verschiedenen Temperaturen gelagert und anschließend versucht, eine Geschlechtsbestimmung durchzuführen. Dies stellte bis 200 °C kein Problem dar. Erst bei 250 °C gelang es vereinzelt nicht mehr und bei 300 °C war dies nur noch in wenigen Fällen möglich (Tsuchimochi et al. 2002; Murakami et al. 2000).

Williams et al. verlängerten bei ihrer Studie die Zeit auf 15 min und untersuchten die Lagerung der Zähne zwischen 100 bis 500 °C mit anschließender Amplifizierung des Amelogeninsystems. Als Ergebnis stellen sie ebenfalls fest, dass bis 200 °C eine Typisierung des Geschlechts möglich ist. Darüber hinaus konnten auch sie bis höchstens 400 °C vereinzelte Erfolge darlegen (Williams et al. 2004).

Bei Hitzeeinwirkung ergaben sich auch dieser Arbeit je nach Temperatur und Einwirkzeit nicht immer brauchbare Ergebnisse. Eine Auswertung sollte trotzdem regelmäßig versucht werden.

4.3.7 Vor 28 bzw. 29 Jahren extrahierte Zähne

Die Typisierung der Proben 21, 22 und 23 konnte in allen Systemen des SGM-Multiplex, wie auch im STR-System SE33 erfolgreich durchgeführt werden.

Da bei trockenen Bedingungen hydrolytische und oxidative Beschädigungen der DNA vermindert werden, wurden diese trocken aufbewahrten Zähne erfolgreich typisiert. Die Aufbewahrung in einem Schrank hat die Zähne vor der Einwirkung von UV-Strahlen geschützt, sodass die DNA in keinem nennenswerten Maße zerstört wurde.

Eine Studie von Alvarez Garcia et al. aus dem Jahre 1996 zeigte ebenfalls, dass bei DNA-Material von 10 bis 30 Jahre alten Zähnen die Typisierung des Systems Amelogenin problemlos möglich war.

4.3.8 Zähne der Ausgrabung in Katzwang

Bei allen drei Zähnen aus Katzwang (Nr. 38, 39 und 40), die archäologisch auf ein Alter von 380 – 550 Jahre datiert worden waren, konnte mit keinem Kit ein Ergebnis amplifiziert werden. Der TPOX-vs der Probe 38 ergab einen sehr schwachen Peak im GeneScan, der sich kaum vom Hintergrundrauschen abhob und deshalb nicht als Typisierung in Erwägung gezogen werden kann.

Der genaue Grund für den Ausfall lässt sich schwer nachvollziehen. Vermutlich haben Mikroorganismen in der Zeit vor der Ausgrabung bereits zu massiver Degradation der DNA beigetragen. Die genauen geologischen Verhältnisse am Fundort in 70 cm Tiefe sind nicht bekannt. Die zweijährige Lagerung im Keller der NHG fand unter trockenen und kühlen Bedingungen statt, sodass diese Zeitspanne keinen großen Einfluss mehr ausgeübt haben dürfte.

4.3.9 Zähne aus der Dietersberghöhle

Die Proben 48, 49 und 50 (drei Zähne aus der Dietersberghöhle) wurden ausschließlich dem TPOX-vs unterzogen, da es hier auf Grund der langen Liegedauer von etwa 2300-2800 Jahren in erster Linie darum ging, überhaupt DNA nachzuweisen. So war es auch nicht verwunderlich, dass die Quantifizierung keinen DNA-Nachweis ergab. Umso erstaunlicher ist, dass bei der Probe 48 beim System TPOX-vs Allele vermutet werden konnten. Der anschließend durchgeführte Nonaplex blieb jedoch erfolglos.

Wie bereits bei den von der Ausgrabung in Katzwang stammenden Zähnen (Kapitel 4.3.8, S. 59) ist die lange Lagerung in der Erde sicherlich ein Teilaspekt für die schlecht ausgefallene Typisierung. Ebenso sind die wechselnden Lagerbedingungen in der NHG für die DNA-Konservierung nicht günstig gewesen. Dabei fallen die sechs Jahre Lagerung im relativ konstant kühlen und trockenen Keller der NHG (2000 bis 2006) gegenüber den 72 Jahren (1928 bis 2000), in denen die Zähne am Dachboden ständigen Temperaturschwankungen ausgesetzt waren und in denen kriegsbedingt verschiedene Umzüge stattgefunden haben, nicht sehr ins Gewicht. Burger et al. legten in ihrer Studie von 1999 bereits dar, dass eine lange Lagerung außerhalb eines Gefrierschranks die DNA-Ausbeute erheblich mindert.

4.4 DNA-Analyse bei archäologischen Skelettfunden

Es gelang Wissenschaftlern, erfolgreiche DNA-Extraktionen bei einem 2.000 Jahre alten, mumifizierten Leichnam aus China durchzuführen (Hummel 2003, S. 2).

2008 haben Forscher aus einer Darmprobe die mt-DNA der etwa 5.300 Jahre alten Gletschermumie „Ötzi“ erstmals komplett entziffert (Madersbacher 2008).

Bei noch vorhandenen Weichgewebe, zum Beispiel Mumien mit eingetrocknetem Gewebe und dem seltenen Fall einer Gletscherleiche, kann wegen der im Vergleich zum Hartgewebe schnelleren und einfacheren Extraktion im Regelfall dies zunächst zur Untersuchung herangezogen werden.

Bei älteren Skelettfunden ohne mumifizierte Weichgewebsreste sind mit Knochenpulver bessere Ergebnisse zu erwarten als aus Zähnen, da Zellen mit Zellkernen im Knochen eingeschlossen sind.

DNA lässt sich auch aus prähistorischem Knochenmaterial extrahieren (Patzelt et al. 2003, S. 1045).

Wegen seiner physikalischen Härte und der engen Verflechtung organischer und anorganischer Bestandteile resultiert eine gute Konservierung der DNA in der dichten äußeren Knochenschicht (Substantia compacta). Die im Zellkern der Osteoblasten befindliche DNA ist dort gut vor postmortalem enzymatischem Abbau geschützt (Goehz 2006).

Höss und Pääbo konnten 1993 noch DNA-Sequenzen aus Skelettfunden einer vor 25.000 Jahren ausgestorbenen Wildpferdart amplifizieren.

Zur Untersuchung von DNA aus Zähnen eignen sich besonders frische oder bis zu wenigen Jahrzehnten alte Zähne. In dieser Arbeit war bei trocken gelagerten 28 Jahre alten Zähnen DNA noch gut typisierbar.

Besonders der Einwirkung konzentrierter mineralischer Säuren widerstehen Zähne für längere Zeit und diese können noch untersucht werden, wenn die Knochen- substanz bereits zerstört ist (Röttscher 2003, S. 1650).

Bei Großkatastrophen oder in unzugänglichen Gebieten erhält man nach Entfernung eines Zahnes ein leicht zu handhabendes Körperteil mit geschützter und für eine Analyse gut brauchbarer DNA.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde überprüft, inwieweit sich verschiedene Lagerungsbedingungen von Zähnen auf die Verwertbarkeit von DNA im Zahninneren zur Gewinnung eines genetischen Fingerabdrucks auswirken.

Die Untersuchungen an frisch extrahierten Zähnen ließen erkennen, dass die in dieser Arbeit verwendeten Methoden und DNA-Kits für die weitere Analyse der den unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzten Zähne geeignet sind.

Asensible Zähne weisen bereits bei der Zahnextraktion Zeichen von Degradation auf. Dagegen ist der kariöse Zerstörungsgrad an sich noch kein Ausschlusskriterium.

Bei wurzelkanalbehandelten Zähnen konnten nur Systeme mit sehr kurzen Amplifikationsprodukten typisiert werden. Sie waren für eine genetische Identifizierung kaum geeignet.

Bei der Analyse im Erdreich vergrabener Zähne nahm die Anzahl der typisierbaren Systeme nach einem Vierteljahr Liegezeit kontinuierlich ab, bis schließlich nach einem Jahr nur noch vereinzelt kleine Systeme detektiert werden konnten.

Ein anderes Bild zeigte sich bei den in Wasser gelagerten Zähnen. Bis zu einem halben Jahr nach Versuchsbeginn konnte eine Typisierung aller Systeme durchgeführt werden. Erst nach einem Jahr war die Degradation so weit vorangeschritten, dass große Systeme keine Typisierung mehr erlaubten.

Bei Zähnen, die der Sonnenstrahlung einen Monat ausgesetzt waren, war es dagegen problemlos möglich, einen vollständigen genetischen Fingerabdruck zu erfassen. Nach drei Monaten konnten allerdings nur noch vereinzelt sehr kleine Systeme gewonnen werden. Nach einem halben Jahr ergab lediglich der TPOX-vs eine erfolgreiche Typisierung. UV-Strahlung kann Zahnschmelz und -dentin durchdringen und DNA in recht kurzer Zeit degradieren.

Die Zähne aus dem Sektionsgut des Instituts für Rechtsmedizin Würzburg lieferten unterschiedliche Ergebnisse, sodass hierzu keine generelle Aussage gemacht werden kann.

Bei der Behandlung der Zähne mit Hitze von 200 °C konnte die DNA nur begrenzte Zeit vor Degradation geschützt werden. Bereits nach einer halben Stunde waren große Teile der Multiplex-Kits nicht mehr für eine Typisierung verwertbar. Das STR-System SE33 konnte allerdings noch ermittelt werden. Die Entnahmen zu späteren

Zeitpunkten (60 min, 90 min und 120 min) lieferten fast nur noch einzelne STR-Systeme.

Eine knapp 30-jährige trockene Lagerung von Zähnen in einem Schrank mit Schutz vor Sonneneinstrahlung schadete der DNA-Analysierbarkeit kaum.

Ein vollständiger Ausfall aller Systeme musste bei den Zahnproben von der Ausgrabung in Katzwang verzeichnet werden. Die Zähne dieser 380 bis 550 Jahre alten Schädel lieferten kein auswertbares DNA-Material mehr.

Ebenso konnte mit diesen Untersuchungsmethoden aus den 2300 bis 2800 Jahre alten Zähnen aus der Dietersberghöhle kein analysierbares DNA-Material gewonnen werden.

Es zeigte sich, dass Lagerbedingungen einen entscheidenden Einfluss auf die DNA-Qualität ausüben. Als DNA-schädigende Einflüsse können neben Mikroorganismen und Feuchtigkeit insbesondere UV-Strahlung und Hitze gelten. Der Faktor Zeit spielt bei günstigen Lagerbedingungen eine untergeordnete Rolle.

Weitere Untersuchungen könnten noch versuchen, mitochondriale DNA zu amplifizieren, da von dieser 100-1000 Kopien pro Zelle vorliegen. So gelang es beispielsweise Pääbo et al. aus 7.000 Jahren alter mtDNA das Gen *cyt b₂* zu vervielfältigen. Lawlor et al. gelang dies bei einem Segment des HLA-Gens aus 7.500 Jahren alter mtDNA (Newton et al. 1994, S. 113).

6 Literaturverzeichnis

Allen RC, Graves C, Budowle B (1989) Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Biotechniques* 7(7): 736-744.

Alonso A, Andelinovic S, Martin P, Sutlovic D, Erceg I, Huffine E, Fernandez de Simon L, Albarran C, Definis-Gojanovic M, Fernandez-Rodrigues A, Garcia P, Drmic I, Rezic B, Kuret S, Sancho M, Primorac D (2001) DNA typing from skeletal remains: Evaluation of multiplex and megaplex STR systems on DNA isolated from bone and teeth samples. *Croat. Med. J.* 42(3): 260-266.

Alvarez Garcia A, Munoz I, Pestoni C, Lareu MV, Rodriguez-Calvo MS, Carracedo A (1996) Effect of environmental factors on PCR-DNA analysis from dental pulp. *Int. J. Legal Med.* 109(3): 125-129.

Applied Biosystems (2006) AmpFISTR® SGM Plus® PCR Amplification Kit – User's Manual, Weiterstadt.

Applied Biosystems (2006) Quantifiler™ Kits – Quantifiler™ Human DNA Quantification Kit and Quantifiler™ Y Human Male DNA Quantification Kit – User's Manual, Weiterstadt.

Bär W, Brinkmann B, Budowle W, Carracedo A, Gill P, Holland M, Lincoln PJ, Mayr W, Morling N, Olaisen B, Schneider PM, Tully G, Willson M (2000) DNA commission of the international society for forensic genetics: guidelines for mitochondrial DNA typing. *Int. J. Legal Med.* 113: 193-196.

Bang G, Ramm E (1970) Determination of age in humans from root dentin transparency. *Acta Odontol. Scand.* 28: 3–35.

Baron H, Hummel S, Herrmann B (1996) Mycobacterium tuberculosis complex DNA in ancient human bones. *J. Archaeol. Sci.* 23: 667-671.

Baum N (1999) Die Dietersberghöhle bei Egloffstein, Kr. Forchheim - von der Opferhöhle zum Bestattungsplatz. *Prähistorische Zeitschrift* 74(1): 79-121.

Bower MA, Spencer M, Matsumura S, Nisbet RER, Howe CJ (2005) How many clones need to be sequenced from a single forensic or ancient DNA sample in order to determine a reliable consensus sequence? *Nucleic Acids Res.* 33(8): 2549-2556.

Burger J, Hummel S, Herrmann B, Henke W (1999) DNA preservation: A microsatellite-DNA study on ancient remains. *Electrophoresis* 20(8): 1722-1728.

Biotype AG (2006) Mentype® Nonaplex^{QS} PCR Amplification Kit – Gebrauchsanleitung, Dresden.

Biotype AG: http://en.biotype.de/index.php?option=com_content&task=view&id=12&Itemid=23#download (aufgerufen am 03.04.07).

Biotype AG, Produktinformation Mentype® Nonaplex^{QS}: http://www.biotype.de/files/downloads/produkte/mentype/Produktinformation_Mentype_NonaplexQS.pdf (aufgerufen am 08.04.07).

Butler JM (2001) Forensic DNA typing - Biology and technology behind STR markers. Academic Press, San Diego.

Clement JG, Winship V, Ceddia J, Al-Amad S, Morales A, Hill AJ (2006) New software for computer-assisted dental-data matching in Disaster Victim Identification and long-term missing persons investigations: "DAVID Web". *Forensic Sci. Int.* 159(1): 24-29.

Comey CT, Koons BW, Presley KW, Smerick JB, Sobieralski CA, Stanley DM, Baechtel FS (1994) DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis. *J. Forensic Sci.* 39(5): 1254-1269.

Erl JR (1953) Abhandlungen der Naturhistorischen Gesellschaft zu Nürnberg XXXVI. Band, Heft 5 – Die Dietersberghöhle bei Egloffstein. Naturhistorische Gesellschaft Nürnberg, Nürnberg.

Fischer H (1935) Handbuch für Dentisten, Band II. Apollonia-Verlag Klaus Fürst, München.

Fisher DL, Holland MM, Mitchell L, Sledzik PS, Webb Wilcox A, Wadhams M, Weedn VW (1993) Extraction, evaluation and amplification of DNA from decalcified and undecalcified United States Civil War bone. *J. Forensic Sci.* 38(1): 60-68.

Geserick G, Roewer L (1998) Beiträge der modernen Hämogenetik zur Identifikation. In: Leopold D. (Hrsg.) Identifikation unbekannter Toter: interdisziplinäre Methodik, forensische Osteologie. Schmidt-Römhild, Lübek, 327-355.

Gilbert MTP, Rudbeck L, Willerslev E, Hansen AJ, Smith C, Penkman KEH, Prangenberg K, Nielsen-Marsh CM, Jans ME, Arthur P, Lynnerup N, Turner-Walker G, Bibble M, Kiolbye-Biddle B, Collins MJ (2005) Biochemical and physical correlates of DNA contamination in archaeological human bones and teeth excavated at Matera, Italy. *J. Archaeol. Sci.* 32: 785-793.

Glass RT (2005) Forensic dentistry in a terrorist world. *N. Y. State Dent. J.* 71(3): 21-25.

Goetz F (2006) DNA-analytische Identifizierung unter Verwendung von frischem und gelagertem Skelettmaterial. Inaugural – Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Günther S, Herold J, Patzelt D (1995) Extracting of high quality DNA from blood-stains using diatoms. *Int. J. Legal Med.* 108(3): 154-156.

Hammond HA, Jin L, Zhong Y, Caskey CT, Chakraborty R (1994) Evaluation of 13 short tandem repeats loci for use in personal identification applications. *Am. J. Hum. Genet.* 55: 175-189.

Hellmann A, Rohleder U, Schmitter H, Wittig M (2001) STR typing of human telogen hairs - a new approach. *Int. J. Legal Med.* 114(4-5): 269-273.

Hellwig E, Klimek J, Attin Th (2003) Einführung in die Zahnerhaltung. Urban & Fischer, München.

Höss M, Pääbo S (1993) DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res.* 21(16): 3913-3914.

Horn GT, Richards B, Klinger KW (1989) Amplification of a highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* 17: 2140.

Hühne J, Pfeiffer H, Brinkmann B (1999) Heteroplasmic substitution in the mitochondrial DNA control region in mother and child samples. *Int. J. Legal Med.* 112: 27-30.

Hummel S (2003) Ancient DNA typing: methods, strategies and applications. Springer, Berlin.

Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL (1985) Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. *Nature* 316: 76-79.

Kimpton CP, Gill P, Walten A, Urquhart A, Millican ES, Adams M (1993) Automated DNA profiling employing multiplex amplification of short tandem repeat loci. *PCR Methods Appl.* 3: 13-22.

Kreutzig Th (2002) Kurzlehrbuch Biochemie. Urban & Fischer, München.

Lehmann KM, Hellwig E (2002) Zahnärztliche Propädeutik. Urban & Fischer, München.

Lippert H (2003) Lehrbuch Anatomie. Urban & Fischer, München.

Madersbacher F (2008) Ötzi. *Curr. Biol.* 18(21): R990-R991.

Mannucci A, Sullivan KM, Ivanov PL, Gill P (1994) Forensic application of a rapid quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. *Int. J. Legal Med.* 106(4): 190-193.

Meißner C, Bruse P, Müller E, Öhmichen M (2007) A new sensitive short pentaplex (ShoP) PCR for typing of degraded DNA. *Forensic Sci. Int.* 166(2-3): 121-127.

Möller A, Brinkmann B (1994) Locus ACTBP2 (SE33) – Sequencing data reveal considerable polymorphism. *Int. J. Legal Med.* 106(5): 262-267.

Mühldorfer, B (persönliche Mitteilung).

Murakami H, Yamamoto Y, Yoshitome K, Ono T, Okamoto O, Shigeta Y, Doi Y, Miyaishi S, Ishizu H (2000) Forensic study of sex determination using PCR on teeth samples. *Acta Med. Okayama* 54(1): 21-32.

Newton CR, Graham A (1994) PCR. Spektrum, Berlin.

Patzelt D, Baur MP, Bertrams J (2003) Forensische Serologie/Hämogenetik. In: Madea B, Brinkmann B (Hrsg.) *Handbuch gerichtliche Medizin 2*. Springer-Verlag, Berlin, S. 991-1115.

Patzelt D, Schneider PM (2007) Forensische Serologie/Molekulare Genetik. In: Madea B (Hrsg.) *Praxis Rechtsmedizin – Befunderhebung, Rekonstruktion, Begutachtung*. Springer Medizin Verlag, Berlin, S. 495-537.

PeqLab Biotechnologie GmbH: E.Z.N.A.[®] Tissue DNA Mini Kit - Arbeitsanleitung. Erlangen.

Petju M, Suteerayongprasert A, Thongpud R, Hassiri K (2007) Importance of dental records for victim identification following the Indian Ocean tsunami disaster in Thailand. *Public Health* 121(4): 251-257.

Pfeiffer H Hühne J, Seitz B, Brinkmann B (1999) Influence of soil storage and exposure period on DNA recovery from teeth. *Int. J. Legal Med.* 112(2): 142-144.

Ritz-Timme S, Cattaneo C, Collins MJ, Waite ER, Schütz HW, Kaatsch HJ, Borrman HI (2000) Age estimation: the state of the art in relation to the specific demands of forensic practise. *Int. J. Legal Med.* 113(3): 129-136.

Rötzscher K (2000) *Forensische Zahnmedizin: Forensische Odonto-Stomatologie.* Springer, Berlin.

Rötzscher K (2003) Individuelle Merkmale. In: Madea B, Brinkmann B (Hrsg.) *Handbuch gerichtliche Medizin 2.* Springer-Verlag, Berlin, S. 1590-1598.

Satzung des Arbeitskreises Forensische Odonto-Stomatologie vom 14.05.1996; <http://www.akfos.org/satzung.html> (aufgerufen am 23.03.2007).

Schuller-Gotzburg P, Suchanek J (2006) Forensic odontologists successfully identify tsunami victims in Phuket, Thailand. *Forensic Sci. Int.* [Epub ahead of print; <http://www.pubmed.com>].

Schmerer W, Hummel S, Herrmann B (1999) Optimized DNA extraction to improve reproducibility of STR genotyping with highly degraded DNA as target. *Electrophoresis* 20(8): 1712-1716.

Sicher H, Tandler J (1928) *Anatomie für Zahnärzte.* Verlag von Julius Springer, Berlin.

Siegmund-Schultze N (2003) Seit 100 Jahren arbeiten deutsche Polizisten mit dem Fingerabdruck. *Ärzte Zeitung*, 14.05.2003.

Sutlovic D, Gojanovic MD, Andelinovic S, Gugic D, Primorac D (2005) Taq polymerase reverses inhibition of quantitative real time polymerase chain reaction by humic acid. *Croat. Med. J.* 46(4): 556-562.

Tan PH (2005) The killing field of Khao Lak: forensic odontology in Thailand tsunami victim identification. *Singapore Dent. J.* 27(1): 41-50.

Tsuchimoochi T, Iwasa M, Maeno Y, Koyama H, Inoue H, Isobe I, Matoba R, Yokoi M, Nagao M (2002) Chelating resin-based extraction of DNA from dental pulp and sex determination from incinerated teeth with Y-chromosomal alphoid repeat and short tandem repeats. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* 23(3): 268-271.

Urquhart A, Oldroyd NJ, Kimpton CP, Gill P (1995) Highly discriminating heptaplex short tandem repeat PCR system for forensic identification. *Biotechniques* 18: 116-121.

Wallin JM, Buoncristiani MR, Lazaruk KD, Fildes N, Holt CL, Walsh PS (1998) TWGDAM validation of the AmpFISTR™ blue PCR Amplification Kit for forensic casework analysis. *J. Forensic Sci.* 43(4): 854-870.

Walsh PS, Fildes NJ, Reynolds R (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.* 24(14): 2807-2812.

Weber Th (2003) *Memorix – Zahnmedizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Whittaker DK, MacDonald DG (1993) *Atlas der forensischen Zahnmedizin*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.

Williams D, Lewis M, Franzen T, Lissett V, Adams C, Whittaker D, Tysoe C, Butler R (2004) Sex determination by PCR analysis of DNA extracted from incinerated, deciduous teeth. *Science & justice – J. Forensic Sci. Soc.* 44(2): 89-94.

Yang DY, Eng B, Saunders SR (2003) Hypersensitive PCR, ancient human mtDNA, an contamination. *Hum. Biol.* 75(3): 355-364.

Yeates C, Gillings MR, Davison AD, Altavilla N, Veal DA (1997) PCR amplification of crude microbial DNA extracted from soil. *Lett. Appl. Microbiol.* 25(4): 303-307.

Zeitler JP (2005) Skelette erzählen - Sonderbestattung vor der Friedhofmauer in Katzwang. In: Stadt Nürnberg, Hochbauamt - Untere Denkmalschutzbehörde (Hrsg.) *Krieg und Frieden - Wehrbauten in und um Nürnberg. Kurzführer zum Tag des Offenen Denkmals 2005*, Nürnberg, S. 44-48.

Ziegle JS, Su Y, Kevin P, Corcoran LN Mayrand PE, Hoff LB, McBride LJ, Kronick MN, Diehl SR (1992) Application of automated DNA sizing technology for genotyping microsatellite loci. *Genomics* 14: 1026-1031.

Danksagung

Mein Dank gilt in besonderem Maß Herrn Prof. Dr. med. Dieter Patzelt für die Bereitstellung dieser Arbeit und eines Arbeitsplatzes in den Laboratorien des Instituts für Rechtsmedizin. Er ließ mir bei der Durchführung der Arbeiten jede nötige Hilfe zukommen und darüber hinaus bekam ich durch ihn interessante Einblicke in die Rechtsmedizin.

Ein großes Dankeschön gebührt auch meinem Betreuer Herrn Dr. Sven Jung, der mir bei allen Fragen, die sich ergaben, unterstützend und beratend zur Seite stand und mich in die Geräte und Untersuchungsmethoden unterwies.

Herrn Prof. Dr. med. dent. Dipl.-Ing. Ernst-Jürgen Richter danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Weiterhin danke ich Frau Hinkelmann, die ebenfalls immer ein offenes Ohr für mich hatte und die mich in ihrem Arbeitsbereich aufnahm.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich herzlich bedanken, vor allem bei Herrn Dr. Etzel, der mir einige Zähne überließ, sowie bei den Präparatoren, von denen ich Zähne aus dem Sektionsgut für diese Arbeit bekam.

Herrn Dr. Mühdorfer von der Naturhistorischen Gesellschaft Nürnberg danke ich für die Bereitstellung mehrerer sehr alter Zähne, die eine große Bereicherung für diese Arbeit waren.

Ein weiterer Dank gilt meinem Onkel Herrn Dr. Lothar Gebhard, der mir ebenfalls bei der Sammlung von Zähnen für diese Arbeit half.

Als letztes möchte ich meinen Eltern danken, die es erst ermöglicht haben, dass ich es so weit geschafft habe. Meinem Vater danke ich besonders für die Bereitstellung der meisten Zähne und für die Vorbereitungen sämtlicher Zähne in dessen Praxis.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation wurde weder vollständig, noch teilweise einer anderen Fakultät vorgelegt, mit dem Ziel, einen akademischen Grad zu erwerben.

Ich habe noch nie versucht einen akademischen Grad zu erwerben, es wurde mir auch kein solcher entzogen.

Gegen mich ist kein strafrechtliches Ermittlungsverfahren oder Disziplinarverfahren eingeleitet.

Schnaittach, den 01.07.2009

Sebastian Gebhard

Lebenslauf

Sebastian Gebhard

Kleiberweg 20
91220 Schnaittach
Tel.: 0176/20528369

Zur Person:

Sebastian Gebhard geboren am 10.03.1982 in Nürnberg, Zahnarzt, ledig,
deutsche Staatsangehörigkeit

Ausbildung:

Juni 2002 Allgemeine Hochschulreife am Paul-Pfinzing-Gymnasium
Hersbruck

WS 2002/03 Studium der Zahnmedizin an der TU Dresden
ab SS 2003 Studium der Zahnmedizin an der JMU Würzburg
November 2007 Zahnärztliches Staatsexamen an der JMU Würzburg

seit Dezember 2007 Assistenz Zahnarzt in den Praxen Dr. W. Gebhard
(Schnaittach) und Dr. F. Petschelt (Lauf a. d. Peg.)

Weitere Tätigkeiten:

11.01. - 16.03.2008 Famulatur in der Zahnklinik auf den Cook-Inseln

seit 01.07.2000 Ehrenamtliche Mitarbeit im Katastrophenschutz beim THW
Lauf a. d. Peg.
