

Eine Strategie zur STR-Analyse telogener Einzelhaare in der forensischen Genetik



Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sarah Aurora Heß
aus Speyer

Köln 2022

Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Nürnberg
Prof. Dr. Michael Nothnagel

Tag der mündlichen Prüfung: 02. Februar 2022

*"Manchmal hat man eine sehr lange Straße vor sich. Man denkt,
die ist so schrecklich lang; das kann man niemals schaffen.*

*Dann fängt man an, sich zu beeilen. Und man eilt sich immer mehr. Jedes Mal, wenn
man aufblickt, sieht man, dass es gar nicht weniger wird, was noch vor einem liegt. Und
man kriegt es mit der Angst, und zum Schluss ist man ganz außer Puste und kann nicht
mehr. Und die Straße liegt immer noch vor einem. So darf man es nicht machen.*

*Man darf nie an die ganze Straße auf einmal denken. Man muss nur an den nächsten
Schritt denken, an den nächsten Atemzug, an den nächsten Besenstrich.
Und immer wieder nur an den nächsten.
Dann macht es Freude.*

*Auf einmal merkt man, dass man Schritt für Schritt die ganze Straße gemacht hat.
Man hat gar nicht gemerkt wie, und man ist nicht außer Puste.*

Das ist wichtig."

Frei nach Beppo Straßenkehrer, aus dem Buch *Momo*
von Michael Ende

ZUSAMMENFASSUNG

Telogene Einzelhaare sind häufig vorkommende Spurentypen an Tatorten. Derzeit werden sie zumeist von der STR-Typisierung ausgeschlossen, weil ihre STR-Profile aufgrund geringer DNA-Mengen und starker DNA-Degradierung in vielen Fällen unvollständig und schwierig zu interpretieren sind. In der vorliegenden Arbeit wurde eine systematische Vorgehensweise angewandt, um Korrelationen zwischen der DNA-Menge und DNA-Degradierung zu dem Erfolg der STR-Typisierung aufzuweisen und darauf basierend den Typisierungs-Erfolg von DNA aus Haaren vorhersagen zu können.

Zu diesem Zweck wurde ein human- (RiboD) und ein canin-spezifischer (RiboDog) qPCR-basierter Assay zur Messung der DNA-Menge und Bewertung der DNA-Integrität mittels eines Degradierungswerts (D-Wert) entwickelt. Aufgrund der Lage der genutzten Primer, welche auf ubiquitär vorkommende ribosomale DNA-Sequenzen abzielen, ist das Funktionsprinzip schnell und kostengünstig auf unterschiedliche Spezies anzuwenden. Die Funktionsweise der Assays wurde mittels seriell degradiertes DNA bestätigt und der humane Assay wurde im Vergleich zum kommerziellen Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit validiert. Schließlich wurde mit den Assays an DNA aus telogenen und katagenen Einzelhaaren von Menschen und Hunden der Zusammenhang zwischen DNA-Menge und DNA-Integrität zu der Vollständigkeit der STR-Allele (Allel Recovery) von DNA-Profilen untersucht, die mittels kapillarelektrophoretischer (CE) STR-Kits erhaltenen wurde. Es zeigte sich, dass bei humanen Einzelhaaren die Allel-Recovery sowohl von der DNA-Menge als auch der DNA-Integrität abhängt. Dagegen war die DNA-Degradierung bei einzelnen Hundehaaren durchweg geringer und die Allel-Recovery hing allein von der extrahierten DNA-Menge ab.

Um die STR-Analytik degradiertes humaner DNA-Proben weiter zu verbessern, wurde ein neuartiger NGS-basierter Assay (maSTR, Mini-Amplikon-STR) etabliert, der die 16 forensischen STR-Loci des *European Standard Sets* und Amelogenin als sehr kurze Amplikons (76-296 bp) parallel amplifiziert. Mit intakter DNA generierte der maSTR-Assay im Mengenbereich von 200 pg eingesetzter DNA reproduzierbare, vollständige Profile ohne Allelic Drop-ins. Bei niedrigeren DNA-Mengen traten vereinzelt Allelic Drop-ins auf, wobei unter Verwendung von mindestens 43 pg DNA vollständige Profile erhalten wurden.

Die kombinierte Strategie aus RiboD-Messungen der DNA-Menge und -Integrität und daraus resultierendem STR-Typisierungserfolg des maSTR-Assays wurde an degradiertes DNA validiert. Anschließend wurde die Strategie auf DNA aus telogenen und katagenen Einzelhaaren angewandt und mit den Ergebnissen des CE-basierten PowerPlex® ESX 17-Kits verglichen, das dasselbe STR-Marker-Set analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Erfolg der STR-Typisierung beider STR-Assays sowohl von der optimalen Menge der Template-DNA als auch von der DNA-Integrität abhängt. Mit dem maSTR-Assay wurden vollständige Profile mit ungefähr 50 pg Input-DNA für leicht degradiertes DNA aus Einzelhaaren nachgewiesen, sowie mit ungefähr 500 pg stark degradiertes DNA. Aufgrund der geringen DNA-Mengen von telogenen Einzelhaaren schwankte die Reproduzierbarkeit der maSTR-Ergebnisse, war jedoch stets dem PowerPlex® ESX 17-Kit in Bezug auf die Allel-Recovery überlegen.

Ein Vergleich mit zwei, hinsichtlich der Längenverteilung der Amplikons komplementären CE-basierten STR-Kits (PowerPlex® ESX 17 und ESI 17 Fast), sowie mit einem kommerziellen NGS-Kit (ForenSeq™ DNA Signature Prep) ergab, dass nicht die Technik der NGS, sondern die Kürze der Amplikons der wichtigste Faktor zur Typisierung degradiertes DNA ist. Der maSTR-Assay wies in allen Vergleichen mit den genutzten kommerziellen Kits jedoch eine höhere Anzahl an Allelic Drop-ins auf. Diese traten umso häufiger auf, je geringer die verwendete DNA-Menge und je stärker degradiert diese war.

Weil Profile mit Allelic Drop-ins Mischprofilen entsprechen, wurden die per maSTR-Assay generierten STR-Profile mit Verfahren zur Interpretation von Mischspuren untersucht. Bei der Composite-Interpretation werden alle vorkommenden Allele von Replikaten gezählt, bei der Consensus-Interpretation lediglich die reproduzierbaren Allele. Dabei stellte sich heraus, dass im Fall von wenigen Allelic Drop-ins (PowerPlex® ESX 17-generierte Profile) die Composite-Interpretation und bei Allelic Drop-in-haltigen Profilen (maSTR-generierte Profile) die Consensus-Interpretation am besten geeignet ist.

Schließlich wurde mittels der GenoProof Mixture 3-Software untersucht, inwieweit semi- und vollständig kontinuierliche probabilistische Verfahren bei der biostatistischen Bewertung der DNA-Profile aus Einzelhaaren geeignet sind. Dabei zeigte sich, dass der maSTR-Assay aufgrund der hohen Anzahl an Allelic Drop-ins den CE-basierten Methoden nur in Fällen von DNA leicht überlegen ist, die in ausreichender Menge und gering degradiert vorliegt. In diesem Bereich gelingt die Zuordnung des Profils aus Haaren zum Referenzprofil jedoch ebenfalls mittels CE-basierten Methoden.

Aus allen Ergebnissen wurde eine Empfehlung für die Handhabung von DNA aus ausgefallenen Einzelhaaren abgeleitet, die auf dem DNA-Degradierungsgrad in Kombination mit der DNA-Menge basiert. Die vorliegende Arbeit schafft somit eine Grundlage, um ausgefallene Einzelhaare in der Routine-Arbeit von kriminaltechnischen Ermittlungen nutzbar zu machen, sowie gegebenenfalls auf andere Spurentypen mit degradiertem DNA geringer Menge anzuwenden. Dadurch könnte die Nutzbarkeit solcher Spurentypen für die forensische Kriminalistik erhöht werden, insbesondere wenn die standardmäßig verwendeten CE-basierten Methoden versagen. Perspektivisch ist die Technik der NGS aufgrund der großen Multiplexierbarkeit uniformer, kurzer Marker generell der CE-basierten Technik bei der Typisierung degradiertem DNA überlegen.

ABSTRACT

Single telogen hairs are commonly occurring traces at crime scenes. Telogen hairs are usually excluded from STR typing because their STR profiles are in many cases incomplete and difficult to interpret due to low DNA amounts and strong DNA degradation. In this study, correlations between the quantity and degradation of DNA to the success of STR typing were systematically studied, aiming at predicting the STR typing success of DNA from hair based on such correlations.

For this purpose, a human-specific (RiboD) and a canine-specific (RiboDog) qPCR-based assay was developed to measure the DNA quantity and to evaluate DNA integrity by a degradation value (D-value). The location of the primers, that target ubiquitously occurring ribosomal DNA sequences, allows for a simple adaptation of the assay principle to different species. The functionality of the assays was confirmed using serially degraded DNA, and the human assay was validated in comparison to the commercial Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit. Finally, the assays were applied on DNA from telogen and catagen single hairs of humans and dogs to investigate the relationship between DNA quantity and integrity to the allele recovery of DNA profiles obtained using STR kits based on capillary electrophoresis (CE). For human single hairs, the allele recovery was found to depend on both DNA quantity and DNA integrity. In contrast, DNA degradation was consistently lower in single dog hairs and the allele recovery depended mainly on the amount of extracted DNA.

To further improve STR analysis of degraded human DNA samples, a novel NGS-based assay (maSTR, mini-amplicon STR) was established that amplified the 16 forensic STR loci of the European Standard Set and amelogenin as very short amplicons (76-296 bp) in parallel. The maSTR assay generated reproducible, complete profiles without allelic drop-ins with intact DNA of 200 pg. At lower DNA amounts, allelic drop-ins occurred, although complete profiles were obtained using at least 43 pg of DNA.

The combined strategy of measuring DNA quantity and integrity using the RiboD assay in conjunction with the improved STR typing success of the maSTR assay was first validated on degraded DNA and subsequently applied to DNA from telogen and catagen single hairs. Results were compared to those of the CE-based PowerPlex® ESX 17 kit that analyses the same STR marker set. For both types of assays, the STR typing success depended on both the optimal DNA input amount and DNA integrity. The maSTR assay detected complete profiles with approximately 50 pg of input DNA for slightly degraded DNA from single hairs, as well as with 500 pg of heavily degraded DNA. Due to the small amounts of DNA extracted from single telogen hairs, the reproducibility of maSTR results varied, but was always superior to the PowerPlex® ESX 17 kit in terms of allele recovery.

A comparison with two CE-based STR kits (PowerPlex® ESX 17 and ESI 17 Fast), which are complementary in terms of the size distribution of amplicon lengths, and with a commercial NGS kit (ForenSeq™ DNA Signature Prep) showed that the small amplicon lengths, rather than the NGS technique, is crucial for a successful STR typing of degraded DNA. The maSTR assay consistently showed a higher number of allelic drop-ins compared to the commercial kits. These allelic drop-ins occurred more frequently the smaller the amount of DNA and the more degraded it was.

Since profiles with allelic drop-ins resemble mixed profiles, strategies for the interpretation of DNA mixtures were applied on the STR profiles generated by the maSTR assay. With the composite interpretation, all alleles are counted that occur in replicates, whereas consensus interpretation counts only the reproducible alleles. It was found that in the case of few allelic drop-ins (PowerPlex® ESX 17-generated profiles) the composite

interpretation and in the case of allelic drop-in containing profiles (maSTR-generated profiles) the consensus interpretation is the most appropriate procedure.

Finally, GenoProof Mixture 3 software was used to investigate whether the semi- or fully continuous probabilistic methods are suitable for the biostatistical evaluation of DNA profiles from single hairs. This showed that the maSTR assay, due to its tendency to show more allelic drop-ins with low DNA amounts, is slightly superior to CE-based methods only for DNA that is present in sufficient quantity and low degradation. In this range of DNA amount and integrity, however, the assignment of profiles from hairs to reference profiles is already successful using CE-based methods.

From all results, a recommendation for the handling of DNA from shed single hairs was established that is based on the DNA degradation ratio in combination with the DNA quantity. Therefore, this study provides a basis for including shed single hairs in the routine work of forensic investigations. Furthermore, the recommendations and the combined strategy might be applicable to other trace types with degraded DNA of low quantity. This could increase the usability of such trace types for forensic criminology, in particular when standard CE-based methods remain inconclusive. In perspective, the technique of NGS turns out as generally superior to CE-based analysis in typing degraded DNA due to its potential for multiplex analysis of a large number of uniformly short markers.

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	IV
ABSTRACT	VI
INHALTSVERZEICHNIS	VIII
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	XI
TABELLENVERZEICHNIS	XI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Einzelhaare stellen herausfordernde Spurentypen für die DNA-basierte Humanidentifizierung dar	1
1.2 Die heutige Erstellung und Nutzung von DNA-Profilen zur Humanidentifizierung	2
1.2.1 STR-Marker sind wichtige Werkzeuge für die Humanidentifizierung	2
1.2.2 Schwellenwerte, biologische und technische Artefakte	5
1.2.3 Berechnungen von Ein- und Ausschlüssen, sowie Übereinstimmungen zwischen Spuren und weiteren Profilen	7
1.2.4 Probabilistische Genotypisierung	10
1.2.5 Weitere genetische Marker, die für die Humanidentifizierung von Bedeutung sind	12
1.3 Eignung und Nutzung von qPCR in der Forensik	13
1.4 Wachstumsphasen von Haaren beeinflussen den Erfolg der DNA-Analytik	15
1.4.1 Humanidentifizierung anhand der Morphologie	15
1.4.2 Morphologie und Wachstumsphasen von menschlichen Kopfharen	16
1.4.3 Humane und canine Haare sind anhand der Morphologie unterscheidbar	19
1.4.4 Die Untersuchung mitochondrialer DNA aus Haaren	21
1.4.5 Der Erfolg der Analytik nukleärer DNA aus Haaren hängt von mehreren Faktoren ab	21
1.4.6 Die Analytik von nukleärer DNA aus Hundehaaren	23
1.5 Herausforderungen für die STR-Profilierung von degradiertem DNA geringer Menge für die molekularbiologische Forensik	24
1.5.1 Degradierung und Menge der DNA in ausgefallenen Haaren	24
1.5.2 <i>Low Copy Number</i> -DNA	25
1.5.3 Bedeutung für die Analyse von DNA aus einzelnen, telogenen Haaren	26
1.5.4 Herangehensweise der Analyse von LT-DNA	26
1.6 Die Bedeutung von NGS-Techniken für die Forensik	29
1.6.1 Das Illumina-Verfahren	30
1.6.2 Vorteile von NGS-Methoden gegenüber kapillarelektrophoretischer Analyse forensischer STR-Amplikons	31
1.6.3 Forensische Assays, die auf NGS basieren	32
1.7 Zielsetzung	34
2. MATERIAL UND METHODEN	35
2.1 DAPI-Färbung von menschlichen Kopfharen	35
2.2 Proben und DNA-Extraktion	35
2.3 DNA-Extraktion von humanen Haaren	35
2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	36
2.5 Reinigung von PCR-Produkten mit AMPure XP Beads	36
2.6 Fluorometrische Quantifizierung mittels Quantus (Promega)	36
2.7 DNase-Verdau	36
2.8 Kommerzielle qPCR Kits	37
2.9 RiboD und RiboDog-Assays	37

2.10	Schmelzkurvenanalyse zur Analyse der Artenspezifität.....	39
2.11	STR-Analyse mittels Kapillarelektrophorese	39
2.12	maSTR-Assay	40
2.13	Bioinformatische Identifizierung von STR-Genotypen aus den maSTR-Rohdaten.....	41
2.14	Schwellenwert-Festlegung.....	43
2.14.1	Schwellenwert-Setzung für kapillarelektrophoretische Assays	43
2.14.2	Schwellenwert-Setzung des maSTR-Assays	43
2.14.3	Stotter-Schwellenwerte für probabilistische Verfahren.....	44
2.15	Komplementäre Auswertung kurzer Amplikons mittels PowerPlex® ESX/ESI 17 Fast	44
2.16	ForenSeq DNA Signature Prep Sequenzierung.....	45
2.17	Berechnung des Validitätsgrades von STR-Profilen mittels Composite- und Consensus-Interpretation	45
2.18	Probabilistisches Verfahren.....	46
3.	ERGEBNISSE	48
3.1	Übersicht über die angewandte Strategie der vorliegenden Studie.....	48
3.2	Entwicklung von zwei Protokollen zur Messung der Menge und Integrität von DNA bei Menschen und Hunden	49
3.2.1	Primerdesign	49
3.2.2	Bestimmung von DNA-Mengen und DNA-Degradierungswerten mit artifiziell degradiertes DNA	51
3.2.3	Validierung des humanen RiboD-Assays.....	52
3.2.4	Testung unterschiedlicher DNA zur Kalibrierung	54
3.2.5	Speziesspezifität des humanen RiboD-Assays	55
3.2.6	Voraussage der STR-Allel-Recovery unter Verwendung des RiboD-Assays von artifiziell verdauter humaner DNA	56
3.3	Zusammenhang zwischen DNA-Menge und Degradierung zur Allel-Recovery bei Einzelhaaren	57
3.4	Entwicklung des NGS-basierten maSTR-Assays.....	64
3.4.1	Design des maSTR-Assays	64
3.4.2	MiSeq FGx™ Qualitäts-Metriken	64
3.4.3	NGS-Charakteristiken: Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit, Konkordanz und Empfindlichkeit.....	66
3.5	Vergleich des NGS-basierten maSTR-Assays mit kapillarelektrophoretischen Kits	68
3.5.1	Vergleich der CE- und NGS-basierten STR-Typisierung mittels artifiziell degradiertes HeLa-DNA (<i>Proof of Concept</i>)	68
3.5.2	Anwendung des maSTR-Assays in einem forensischen Kontext mittels Analyse humaner Einzelhaare	71
3.5.3	Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit forensischer STR-Profile aus Haaren	73
3.5.4	Consensus und Composite-Interpretationen von kombinierten ESX/ESI- und maSTR-generierten STR-Profilen aus Einzelhaaren	77
3.5.5	Komplementäre Analyse kurzer Amplikons (<250 bp).....	79
3.5.6	Vergleich mit einem alternativen NGS-basierten Kit.....	81
3.5.7	Bewertung der DNA humaner Haare mittels probabilistischer Verfahren	86
4.	DISKUSSION	90
4.1	Die Quantität und Integrität von DNA aus Einzelhaaren korreliert mit der Allel-Recovery	92
4.1.1	Die Eignung ribosomaler Sequenzen für eine qPCR-basierte Analytik	92

4.1.2	Validität der qPCR-Ergebnisse.....	94
4.1.3	Vergleich der RiboD- und RiboDog-Assays mit kommerziellen Kits.....	97
4.1.4	Umgang mit PCR-Inhibition	97
4.1.5	Die Eignung von ausgefallenen humanen Haaren als Spurentyp in der Forensik	98
4.1.6	Fehlende Einheitlichkeit in der morphologischen Beschreibung von Haaren	100
4.1.7	Einfluss der Haarmorphologie bei Hunden auf den Typisierungserfolg ..	101
4.1.8	Optimierung der DNA-Extraktion aus Haaren	103
4.1.9	Repräsentiert der DNase-Verdau das DNA-Degradierungsmuster in Haaren?	103
4.1.10	Ergänzung zum Aufbau der Studie mit ausgefallenen Haaren	103
4.2	Entwicklung und Evaluierung des maSTR-Assays	104
4.2.1	Entwicklung des maSTR-Assays	104
4.2.2	NGS-Charakteristiken: Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit, Konkordanz, Empfindlichkeit und MiSeq FGx™ Qualitäts-Metriken.....	105
4.2.3	Indikatoren für Imbalancen und Diskordanzen des maSTR-Assays.....	106
4.2.4	Legung der Schwellenwerte für den maSTR-Assay.....	108
4.3	Einfluss von DNA-Menge und -Integrität artifiziell degradierter DNA auf die Konkordanz von maSTR und CE-generierten STR-Profilen	111
4.4	Vergleich zwischen maSTR und CE-generierten STR-Profilen von degradierter DNA aus Einzelhaaren	112
4.5	Vergleich unterschiedlicher Interpretations-Methoden der STR-Profile von DNA aus humanen Einzelhaaren	113
4.5.1	Composite-interpretierte STR-Profile aus Haaren erreichen höhere Validitätsgrade als Consensus-interpretierte STR-Profile.....	113
4.5.2	Die Composite-Ergebnisse mit hohen Validitätsgraden sind nicht vertrauenswürdig	114
4.6	Vergleich der STR-Profile von DNA aus humanen Einzelhaaren mittels alternativer Kits zum maSTR-Assay	115
4.6.1	Einfluss der Länge der Amplikons anhand des Vergleichs der ESX 17-/ ESI 17-Assays mit dem maSTR-Assay	116
4.6.2	NGS-basierte Methoden sind CE-basierten forensischen STR-Assays nicht generell überlegen	116
4.7	Bewertung der DNA humaner Haare mittels probabilistischer Verfahren	119
4.8	Derzeitige Schwächen des maSTR-Assays und Empfehlungen für mögliche Optimierungen	121
5.	SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK	125
5.1	Schlussfolgerung.....	125
5.2	Empfehlungen für die STR-Analyse menschlicher Einzelhaare	126
5.3	Empfehlungen zur Analyse caniner Einzelhaare	127
5.4	Ausblick.....	127
	ETHISCHE ASPEKTE	130
	LITERATURVERZEICHNIS	131
	ANHANG	145
	DANKSAGUNG	146
	ERKLÄRUNGEN	147
	LEBENS LAUF	149

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Darstellung von Haaren in unterschiedlichen Wachstumsphasen	17
Abbildung 2: Typisches Aussehen von Hunde- und Menschenhaaren	20
Abbildung 3: Übersicht über die Vorgehensweise der vorliegenden Studie	48
Abbildung 4: Schematische Darstellung der humanen rDNA-Organisation	50
Abbildung 5: Nachweis der PCR-Produkte der RiboD- und RiboDog-Assays	50
Abbildung 6: Serielle Degradierung genomischer DNA	51
Abbildung 7: Einfluss des DNase-Verdaus auf die DNA-Menge und -Integrität.....	52
Abbildung 8: Serielle Degradierung menschlicher HeLa-DNA	53
Abbildung 9: Vergleich des RiboD-Assays und des Quantifiler® Trio-Kits	54
Abbildung 10: Nachweis der Spezifität des humanen RiboD-Assays	55
Abbildung 11: Einfluss des DNase-Verdaus auf die Allel-Recovery	56
Abbildung 12: DAPI-gefärbte Haaren in unterschiedlichen Wachstumsphasen	58
Abbildung 13: Fotografien von menschlichen und caninen Einzelhaaren.....	59
Abbildung 14: Allel-Recovery der DNA aus humanen und caninen Haaren	60
Abbildung 15: Vergleich unterschiedlicher caniner STR-Profile.....	63
Abbildung 16: Größenverteilung der Amplikons des maSTR-Assays.....	64
Abbildung 17: Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit des maSTR-Assays	67
Abbildung 18: Vergleich maSTR- und ESX-basierter Recovery aus HeLa-DNA	69
Abbildung 19: Vergleich eines maSTR- und eines ESX-generierten STR-Profiles.....	70
Abbildung 20: maSTR- und ESX-generierte Allel-Recovery von DNA aus Haaren.....	72
Abbildung 21: Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit von STR-Profilen.....	74
Abbildung 22: Vergleich der STR-Profile einer replizierten Haar-Probe.....	75
Abbildung 23: Anzahl effektiver Reads von maSTR-generierten Replikaten	76
Abbildung 24: Vergleich unterschiedlicher Interpretationsmethoden	78
Abbildung 25: Validitätsgrade in Abhängigkeit der STR-Amplikonlänge.....	80
Abbildung 26: Größenbereiche aller ForenSeq™-Amplikons	83
Abbildung 27: Amplikonlängen verschiedener Assays von zwei Personen	84
Abbildung 28: Vergleich von NGS- und CE-basierten STR-Profilen aus Haaren.....	85
Abbildung 29: Validitätsgrade von CE- und NGS-generierten STR-Profilen.....	87
Abbildung 30: <i>Likelihood Ratios</i> bei verschiedenen Berechnungen	88

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Primer-Sequenzen der RiboD und RiboDog-Assays	38
Tabelle 2: Primersequenzen des maSTR-Assays.....	40
Tabelle 3: Verbale Prädikate der DNA-Degradierungsgrade von humaner DNA.....	57
Tabelle 4: Allel-Recoveries menschlicher Haare in Bezug auf DNA-Menge und D-Wert ..	61
Tabelle 5: Qualitäts-Parameter für die vier maSTR-Läufe in der vorliegenden Studie ...	65
Tabelle 6: Ergebnisse der Typisierung mittels des ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kits ..	82

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
ACR	Allel-Abdeckungs-Rate
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
CE	Kapillarelektrophorese (<i>capillary electrophoresis</i>)
CODIS	<i>Combined DNA Index System</i>
DAD	DNA-Analyse-Datei, Datenbank des Bundeskriminalamtes
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DoC	Abdeckungs-Tiefe (<i>depth of coverage</i>)
DOI	Digitaler Objektbezeichner (<i>Digital Object Identifier</i>)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESS	<i>European Standard Set</i>
et al.	et alii
FDP	forensische DNA-Phänotypisierung
G	Guanin
GPM3	GenoProofMixture (Software)
H _p	Hypothese der Anklage (<i>Hypothesis of Prosecution</i>)
H _d	Hypothese der Verteidigung (<i>Hypothesis of Defense</i>)
IGS	<i>intergenic spacer</i> (im Cluster von rDNA-Genen)
Indel	Insertion und Deletion
ISFG	Internationale Gesellschaft für Forensische Genetik (<i>International Society for Forensic Genetics</i>)
LOD	<i>Limit of Detection</i>
LR	<i>Likelihood Ratio</i>
maSTR	Mini-Amplikon-STR (Name eines in-house entwickelten Assays)
MCMC	Markov-Chain-Monte-Carlo-Verfahren
min	Minute(n)
Mio.	Millionen
mtDNA	mitochondriale DNA
NFI	<i>Netherlands Forensic Institute</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
nts	Nukleotide (<i>nucleotides</i>)
qRT-PCR	quantitative Real-Time-Polymerasekettenreaktion
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten (<i>relative fluorescence units</i>)
rRNA	ribosomale RNA
SCR	Sequenz-Abdeckungs-Rate
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
STR	<i>short tandem repeat</i>
T	Thymin
U	Unit
u. a.	unter anderem
URL	einheitlicher Quellenanzeiger (<i>Uniform Resource Locator</i>)
v. a.	vor allem

1. EINLEITUNG

1.1 Einzelhaare stellen herausfordernde Spurentypen für die DNA-basierte Humanidentifizierung dar

Mit der Erfindung der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR, (Mullis et al. 1986)) wurde der Grundstein in der Molekularbiologie gelegt, um genetische Analysen mit nur geringsten DNA-Mengen durchzuführen. Von dieser Steigerung der Sensitivität profitierte unter anderem die forensische Humanidentifizierung dadurch, dass neben Spurentypen, die typischerweise große DNA-Mengen aufweisen, wie beispielsweise Blut, auch Spuren minimalster DNA-Mengen in die Analysen miteinbezogen werden konnten.

Allerdings stellt die Analyse biologischer Spuren von Tatorten bis heute eine Herausforderung dar, da sich die Spurentypen stark in ihrer Eignung hierfür unterscheiden. Daher ist die heute gängige Erstellung eines DNA-Profiles mehreren Kriterien unterworfen: Erstens muss genügend DNA in genügender Quantität und Integrität vorhanden sein. DNA-Mengen unterhalb 100 pg gelten als herausfordernd, und obwohl eine schwache DNA-Degradierung im Normalfall kein Hindernis darstellt, gerät die auf PCR-basierende Humanidentifizierung bei DNA-Spuren geringer Menge und hoher DNA-Degradierung an ihre Grenzen. Zweitens sollte die DNA eines einzelnen Individuums kontaminationsfrei und weitestgehend frei von PCR-Inhibitoren sein. Bei forensischen Spuren ist im Grenzfall keins dieser Kriterien erfüllt. Beispielsweise können Inhibitoren wie das Häm des Blutes, Indigo als Bestandteil der Färbelösung bei Jeansgewebe und Melanin, das färbende Pigment in Haaren, die PCR-Bedingungen derart verschlechtern, dass die Amplifikation nicht valide ist (Schrader et al. 2012).

Blut und Speichel stellen grundsätzlich ideale Spurentypen dar, da sie oft DNA in ausreichender Menge in guter Qualität enthalten. Die Analysierbarkeit dieser Spurentypen kann jedoch dadurch erschwert werden, dass sie häufig als Mischspuren vorkommen. Diese können von mehreren, an der Tat beteiligten Personen stammen, von einem Gemisch aus Material der schädigenden und der geschädigten Person stammen und zusätzlich von völlig unbeteiligten Personen gebildet worden sein. Ein Ansatz für die Lösung dieses Problems besteht darin, Spurentypen zu untersuchen, die *eo ipso* nur von einer einzigen Person stammen können. Hierdurch werden Mischprofile im Vorhinein ausgeschlossen, so dass höchstempfindliche Analysemethoden zum Einsatz kommen können. Einen solchen Spurentyp stellt ein einzelnes Haar dar. Dieser Spurentyp kann als Einzelspur nur von einer Person stammen, die enthaltene DNA entspricht somit einem individuellen Genom. Kontaminationen und Mischprofile werden bei diesem Spurentyp von vorneherein vermieden, sofern sie nicht mit biologischem Material von anderen Personen, wie beispielsweise durch Anhaftungen von Blut, kontaminiert wurden. An Tatorten gefundene Einzelhaare können wichtige Asservate darstellen, vor allem wenn keine weitere, im Tatzusammenhang bestehende Spur gefunden wird, weshalb Einzelhaare oftmals asserviert werden. Analytisch gesehen sind sie jedoch auch eine der schwierigsten DNA-Spuren, da es sich dabei häufig um ausgefallene Haare in der telogenen oder exogenen Phase handelt, die auf natürliche Weise, also ohne grobe Gewalteinwirkung ausgefallen sind. Weil im Wurzelbereich in diesen Wachstumsphasen keine Zellteilungen mehr auftreten, weisen solche Haare meist nur noch Reste von Gewebe auf oder sind zellfrei. Aufgrund dessen enthalten solche Haare meist nur geringste DNA-Mengen und die DNA ist zum Teil sehr stark degradiert. Erschwerend kommt hinzu, dass durch Umwelteinflüsse, wie UV-Strahlung oder Feuchtigkeit, die DNA weiter beschädigt sein kann. Die Analyse von DNA aus telogenen

Einzelhaaren gestaltet sich daher als höchst anspruchsvoll, weshalb diese Haare gemeinhin als schlechte Spurentypen gelten. In der vorliegenden Arbeit wird es daher um die Möglichkeiten gehen, einzelne ausgefallene Haare für die forensische DNA-Analytik nutzbar zu machen. Zu diesem Zweck wird eine Strategie entwickelt, die es erlaubt einzelne Haare zu identifizieren, die für eine erfolgreiche DNA-Analytik selektiert und genutzt werden können.

1.2 Die heutige Erstellung und Nutzung von DNA-Profilen zur Humanidentifizierung

Der heute in der forensischen Genetik eingesetzte Abgleich von DNA-Markern beruht auf der wegberaubenden Arbeit des englischen Genetikers Alec Jeffreys. Dieser beschrieb 1985 die Erstellung eines Bandenmusters durch sogenannte *variable number of tandem repeat* (VNTR)-Sonden mittels der Technik der *restriction fragment length polymorphism* (RFLP)-Analyse (Jeffreys et al. 1985a; Jeffreys et al. 1985b, 1985c). Mit dieser Methode war es erstmals möglich, Personen auf Basis ihrer DNA zu unterscheiden. Die verwendeten Restriktionsfragmente sind aufgrund ihrer Größe anfällig für DNA-Degradierung und nicht für PCR-Anwendungen geeignet. Heutzutage werden für die Humanidentifizierung hochvariable Orte im Genom (Loci), sogenannte *short tandem repeats* (STR) genutzt. Die analysierten Bereiche sind im Gegensatz zu VNTRs sehr kurz (im Allgemeinen kürzer als 600 bp), wodurch sie für die Amplifikation per PCR geeignet sind und als Folge die STR-Analyse höhere Empfindlichkeiten erreicht als die Analyse per VNTR.

Heutzutage wird in kriminaltechnischen Instituten routinemäßig eine Reihe von ausgewählten STR-Loci, die als Marker dienen, per PCR amplifiziert und anschließend detektiert. Die dadurch generierten DNA-Profile (Edwards et al. 1991) werden beispielsweise dafür verwendet, Abgleiche zwischen DNA-Spuren aus Kriminalfällen mit Referenzprofilen zu erstellen, um eine Tatbeteiligung von bestimmten Personen zu untersuchen, oder um Verwandtschaften nachzuweisen.

1.2.1 STR-Marker sind wichtige Werkzeuge für die Humanidentifizierung

Die in der Forensik genutzten, unterschiedlichen STR-Marker befinden sich auf verschiedenen Chromosomen und bestehen aus Wiederholungen (*Repeats*) einer bestimmten Abfolge von meist vier Basen (Tetranukleotid-Repeats), wie beispielsweise die Basenabfolge Adenin Guanin Adenin Thymin [AGAT] des Markers D5S818. In der gesamten menschlichen Population gibt es zahlreiche Allele pro Marker, die sich in der Zahl der Repeats unterscheiden. Da die Anzahl der Wiederholungen eines STR-Locus auf dem jeweils paternal oder maternal vererbten Chromosom verschieden sein kann und sich häufig zwischen Individuen unterscheidet, resultiert aus unterschiedlichen Loci eine hohe Anzahl an individualspezifischen Kombinationsmöglichkeiten, so dass ein bestimmtes DNA-Profil rechnerisch einmalig in der gesamten Menschheit sein kann (Budowle et al. 2000).

Die unterschiedliche Anzahl an Wiederholungseinheiten bedingt Längenunterschiede zwischen den entsprechenden STR-Allelen, die sich wiederum in unterschiedlich großen PCR-Amplikons niederschlagen. Nach der PCR-Amplifikation werden die PCR-Produkte per Kapillarelektrophorese (englisch *capillary electrophoresis*, CE) entsprechend ihrer Länge aufgetrennt. Die Ergebnisse des Nachweises per Kapillarelektrophorese werden visuell in Elektropherogrammen (beispielsweise in **Abbildung 19 B**) dargestellt. Durch Vergleich mit bekannten Standards kann anhand der Größe der Amplikons auf die Anzahl

an Wiederholungseinheiten geschlossen werden. Die STR-Loci werden dabei entsprechend ihrer Wiederholungseinheiten benannt: Kommt eine Wiederholungseinheit in vierfacher Wiederholung vor (z.B. [AGAT] [AGAT] [AGAT] [AGAT]), wird diese als Allel 4 benannt (Bär et al. 1997).

Tetranukleotid-Repeats, die heutzutage bevorzugt und in größter Anzahl in STR-Kits verwendet werden, weisen vier Basen pro Wiederholungseinheit auf, wodurch sich theoretisch 256 mögliche Kombinationen des Motivs ergeben. Da STR-Wiederholungseinheiten tandemartig angeordnet sind und die Basen A mit T sowie C mit G komplementär sind, gleichen sich manche Motive, wodurch sich für Tetranukleotid-Repeats lediglich 33 mögliche Motive ergeben, wobei AGAT (beziehungsweise GATA) das häufigste Motiv für STR Loci ist, dass in den Loci der STR-Kits vorkommt (Jin et al. 1994). Diese Anzahl an Möglichkeiten wird durch Unregelmäßigkeiten innerhalb der Motive enorm vergrößert, wodurch sich die heute gängige Klassifizierung für STR-Marker ergibt. Geordnet von einfachen zu hochkomplexen Motiven werden die STR-Marker anhand der STR Nomenklatur aus den 1990er-Jahren eingeteilt in *simple* Repeats, *compound* Repeats (unterschiedliche *simple* Repeats, die aufeinander folgen) und *complex* Repeats, die sich durch unterschiedliche und teilweise inkomplette Wiederholungseinheiten auszeichnen. Daneben existieren STRs mit *complex hypervariablen* Repeats, zu denen beispielsweise der Marker SE33 (alternativer Name ACTBP2) zählt, deren Allele sich durch vielfältig angeordnete, teilweise inkomplette Wiederholungseinheiten unterscheiden und deren Allele schwierig zu klassifizieren sind (Urquhart et al. 1994; Gill et al. 1997; Rolf et al. 1997).

Weiterhin existieren Mikrovarianten, wenn Wiederholungseinheiten nicht vollständig sind. Ein Beispiel für eine Mikrovariante von Tetranukleotid-Repeats ist das in der Population häufigste Allel 9.3 von Marker TH01, das auch als *simple* Repeat „mit *nonconsensus* Allel“ (Gill et al. 1997) oder auch als Punktallel bezeichnet wird. Die Benennung der Punktallele setzt sich aus der Anzahl der Repeats, einem Punkt und der nachfolgenden Anzahl an Basen zusammen. Trägt beispielsweise ein STR-Locus die Wiederholungseinheit viermal plus zweier zusätzlicher Basen einer inkompletten Wiederholungseinheit, wird dieses Punktallel als Allel 4.2 bezeichnet.

Die analysierten STR-Bereiche sind relativ kurz und werden für gewöhnlich in Längen zwischen ungefähr 60 bis 550 bp Länge amplifiziert. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Längen können gemeinsam, in einer sogenannten Multiplex-PCR-Reaktion amplifizierte STR-Amplikons unterschiedlicher Marker entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und voneinander unterschieden werden. Heutzutage erfolgt die Auftrennung standardmäßig mittels Kapillarelektrophorese. Die Größenbereiche der Amplikons unterschiedlicher STR-Loci dürfen sich nicht gegenseitig überlappen, da sie in dem Fall nicht zu den korrekten Loci zugeordnet werden können. Um die Begrenzung der Anzahl der gleichzeitig aufzutrennenden Amplikons unterschiedlicher STR-Loci zu erhöhen, werden die Marker-spezifischen Primer der unterschiedlichen STR-Marker mit Fluorophoren markiert. Diese Markierung erlaubt neben der Zuordnung per Fragmentlänge ebenfalls die Zuordnung des Fragments anhand des spezifischen Fluorophors in sogenannte Kanäle. Die Stärke des Fluoreszenz-Signals wird in sogenannten relativen Fluoreszenz-Einheiten (englisch *relative fluorescence units*, RFU) gemessen. Die Kanäle werden häufig nach derjenigen Farbe benannt, die deren Fluorophore emittieren. Dadurch ist gewährleistet, dass diejenigen Fragmente unterschiedlicher STR-Marker überlappen dürfen, die mit unterschiedlichen Fluorophoren markiert sind, wodurch sich die Anzahl der multiplexierbaren STR-Marker erhöht. Aufgrund der Multiplexierbarkeit werden pro PCR-Ansatz sehr viele STR-Loci gemeinsam untersucht. STR-Profile eines einzigen Individuums erzeugen bi-allelische Muster - also zwei Peaks pro STR-Marker - im

Elektropherogramm, wenn sich die Allele der homologen Chromosomen unterscheiden (heterozygoter Genotyp), oder sie erzeugen im Fall homozygoter Genotypen lediglich ein Produkt pro Marker (**Abbildung 19 B**). In einem zusätzlichen Farbkanal wird mit jeder Probe ein Längenstandard mitlaufen gelassen, der im Abgleich mit den detektierten Peaks der anderen Kanäle zu einer groben Zuordnung der Allele zu den gemessenen Längen in Basenpaaren (bp) führt. Kommerzielle Kits enthalten zusätzlich eine Allelleiter, die als separate Probe ebenfalls kapillarelektrophoretisch aufgetrennt wird und die Amplifikationsprodukte der in der Population vorkommenden Allele der analysierten Marker enthält. Die Peak-Bereiche dieser Referenzallele werden im Elektropherogramm als sogenannte Bins dargestellt und dienen der Identifizierung der detektierten Allele entsprechend der korrekten Nomenklatur.

Als wichtige Kennzahl für die Abgleiche von STR-Profilen miteinander wird die sogenannte STR-Recovery genutzt, um die Ausbeute an STR-Allelen zu quantifizieren. Die Allel-Recovery gibt die Anzahl der Allele des untersuchten Profils (in Prozent) an, die mit dem jeweiligen Referenzprofil oder anderen Profilen übereinstimmen. Alternativ wird auch der Begriff der Konkordanz, also der Übereinstimmung, verwendet. Der Begriff der Recovery wird dafür genutzt, die Ausfälle von Allelen, sogenannten Allelic Drop-outs, zu detektieren, um beispielsweise den Erfolg unterschiedlicher STR-Methoden zu vergleichen. Im Gegensatz dazu liegt der Fokus der Konkordanz stärker auf der Korrektheit der Allele; es ist nicht nur das Ziel möglichst viele Allele durch die STR-Typisierung zu gewinnen, sondern korrekte Allele, die mit einem Referenzprofil übereinstimmen.

Für die Durchführung von STR-PCR-Reaktionen wird zumeist auf kommerziell erhältliche, vorkonfektionierte Reagenzien-Zusammenstellungen, sogenannte Kits, zurückgegriffen. Das X- und Y-chromosomal homologe Gen Amelogenin (Mannucci et al. 1994) stellt keinen STR-Marker dar, wird jedoch standardmäßig in allen gängigen STR-Kits genutzt, um das chromosomale Geschlecht der zu identifizierenden Person zu bestimmen. In den aktuell (Stand November 2021) auf dem Markt verbreiteten autosomalen STR-Kits variiert die Anzahl der analysierten STR-Marker pro Kit, die für die standardmäßige Humanidentifizierung eingesetzt werden, zwischen 16 und 26 Markern. Die STR-Kits PowerPlex® ESX 17, ESX 17 Fast und ESI 17 Fast (Promega), die in der vorliegenden Studie verwendet wurden, besitzen 16 STR-Marker und Amelogenin (Hill et al. 2011).

Für die Amplifikation degradierter DNA werden präferiert STR-Kits genutzt, die besonders kurze Mini-STR-Marker nutzen, wodurch Allelic Drop-outs reduziert werden können (Wiegand und Kleiber 2001; Wiegand et al. 2006; Butler et al. 2003; Tsukada et al. 2002; Grubwieser et al. 2006; Hellmann et al. 2001; Opel et al. 2007).

Die mit den Kits und der kapillarelektrophoretischen Analytik erhaltenen STR-Profile enthalten lediglich rein numerische Informationen über den jeweiligen STR-Marker, sowie über die Anzahl an Wiederholungseinheiten der Allele, eignen sich also sehr gut zum standardisierten Vergleich und zur Datenbanksuche. Es existieren derzeit global einige STR-Datenbanken, die auf unterschiedlichen, historisch gewachsenen STR-Sets beruhen, die in den verschiedenen Ländern untersucht werden. In den USA wurde das *Combined DNA Index System* (CODIS) entwickelt, aktuell bestehend aus 20 Markern, inklusive dem Kern (*Core STR markers*) und den restlichen Markern des erweiterten Markersets (Hares 2015). In der CODIS-Datenbank des FBI werden momentan ungefähr 20 Mio. STR-Profile gespeichert, die für Ermittlungen genutzt werden können (Federal Bureau of Investigation 2021). In Europa, unter anderem in Deutschland, sowie in der vorliegenden Arbeit, wird das erweiterte *European Standard Set* (ESS) genutzt (Welch et al. 2012), das aus den Markern des europäischen *Core Sets* und der Erweiterung besteht - eine Übersicht über die Marker liefert **Abbildung 16**. Für Ermittlungen in

Deutschland wird daher die auf dem ESS-basierende Datenbank, die DNA-Analyse-Datei (DAD, (Bundeskriminalamt 2021)) genutzt.

Daneben existieren Populationsdatenbanken, für die Institute und Forschungsgruppen Informationen zu STR-Markern, unter anderem Allelfrequenzen, global sammeln und veröffentlichen. Darunter zählen die zwei STRBase-Datenbanken des *National Institute of Standards and Technology* (NIST), zu finden auf (STRBase) und (STRBase 2.0), sowie (STRidER), der Datenbank des *European Network of Forensic Science Institutes* (ENFSI). Diese Datenbanken werden nicht zur Personenidentifizierung genutzt, sondern für biostatistische Berechnungen der Häufigkeit von STR-Profilen.

1.2.2 Schwellenwerte, biologische und technische Artefakte

Eine der mitunter größten Herausforderungen besteht in der forensischen Humanidentifizierung darin, STR-Profile zu interpretieren. Da die PCR-basierte Profilerstellung und kapillarelektrophoretische Auftrennung von Fragmenten sehr sensitive Methoden sind, können selbst kleinste DNA-Mengen gemessen werden. Diese müssen jedoch einerseits von Hintergrundrauschen abgetrennt werden und andererseits als Allele identifiziert werden, die von der Template-DNA stammen. Daher wurden Kriterien festgelegt, die hilfreich bei der Entscheidung sein können, ob es sich bei Peaks im Elektropherogramm um echte Allele handelt, oder ob sie auf Artefakte zurückzuführen sind. Um das Hintergrundrauschen der auf Floreszenzen beruhenden Analytik der Kapillarelektrophorese von Signalen zu trennen, die durch die Amplifikate verursacht werden, wird der analytische Schwellenwert genutzt. Ein analytischer Schwellenwert definiert die minimale Signalstärke, ab der Allele zuverlässig vom Hintergrundrauschen unterschieden werden können. Die Festlegung beruht daher häufig auf *signal-to-noise*-Analysen empirischer Daten (SWGDM 2010). Der analytische Schwellenwert, der dem Detektionslimit (englisch *Limit of Detection*, LOD) entspricht, wird hierbei häufig als dreifache Standardabweichung des Hintergrundrauschens definiert. In der forensischen DNA-Analytik wird aus Erfahrungsgründen der analytische Schwellenwert zumeist bei 50 RFU angegeben, was lediglich valide ist, sofern die Grundlinie rauscharm ist und die vom herstellende Unternehmen empfohlene Anzahl an Zyklen eingehalten wurde (Schneider et al. 2006). Die Zuweisung von analytischen Schwellenwerten kann durch Messen des Hintergrundrauschens von Negativkontrollen, also in Abwesenheit echter Signale, getroffen werden (SWGDM 2010). Das Hintergrundrauschen wird in diesem Fall nicht durch Fehler in der Amplifikation, sondern durch technische Schwankungen innerhalb des analytischen Systems verursacht, die nicht von Amplikons stammen. Die Intensität der vom Hintergrundrauschen verursachten Signale dient dabei als minimalster Wert, der nicht unterschritten werden sollte.

Ein zweiter Schwellenwert, der stochastische Schwellenwert, wird genutzt, um zufällige, stochastische Effekte der STR-Profile zu interpretieren. Diese können unter anderem Unterschiede in den Peak-Höhen verursachen. Die Peak-Höhen korrelieren mit der analysierten DNA-Menge und werden in RFU angegeben, welche im Elektropherogramm auf der Y-Achse aufgetragen sind (**Abbildung 19 B**). Bei Allelen eines heterozygoten STR-Locus sollten die Peak-Höhen der beiden Peaks daher ungefähr gleich hoch sein (Intralocus-Balance, auch als *peak height ratio* bezeichnet). Durch stochastische Effekte können die Peak-Höhen bei heterozygoten Genotypen variieren. Wenn eines der beiden Allele in der Höhe der RFU so stark vermindert ist, dass es den stochastischen Schwellenwert unterschreitet, wird dieses Ereignis als Allelic Drop-out bezeichnet, fallen beide Allele aus, als Locus Drop-out. Ein stochastischer Schwellenwert ist daher definiert als der Wert, oberhalb dessen davon ausgegangen werden kann, dass innerhalb einer

Ein-Personen-Probe kein Allelic Drop-out aufgrund von stochastischen Effekten aufgetreten ist (SWGDM 2010). Bei CE-basierten Assays wird eine *peak height ratio* von weniger als 60% als Richtwert für das Auftreten von Intralocus-Imbalancen betrachtet. Diese *peak height ratio* wird für einen STR-Locus berechnet, indem die Peak-Höhe des Allels mit dem niedrigeren RFU-Wert durch die Peak-Höhe des Allels mit dem höheren RFU-Wert geteilt und dieser Wert dann mit 100 multipliziert wird. Stochastische Effekte beschreiben also das Auftreten von intralocus auftretenden Unterschieden in der Peak-Höhe, die unter anderem zu Drop-outs führen können (SWGDM 2010).

Unterschiede in den Peak-Höhen von zwei Allelen an einem Locus können auf vielfältige Weise verursacht werden, beispielsweise auch durch präferentielle Amplifikation (die Bevorzugung der Amplifikation von Allelen aufgrund geringer Länge, (Walsh et al. 1992)), im Wesentlichen aber durch Stichprobeneffekte (stochastisches Sampling) bei sehr geringen DNA-Mengen. Verstärkt wird dieser Effekt bei degradiertem DNA, bei dem potentiell die Template-DNA der beiden Allele in unterschiedlicher Anzahl vorliegen könnte. Da die Vermehrung der Amplikons PCR-basiert und daher fast exponentiellem Wachstum unterliegt, fallen vor allem Unterschiede in der Amplifikation besonders ins Gewicht, die in einem frühen Zyklus der PCR geschehen. Daneben können die Peak-Höhen-Unterschiede nicht nur innerhalb der Loci variieren, sondern sich ebenfalls zwischen den unterschiedlichen Loci unterscheiden und beispielsweise durch PCR-Inhibitoren verursacht werden (Leclair et al. 2004; Debernardi et al. 2011; Buse et al. 2003). Der stochastische Schwellenwert wird daher als Hilfsmittel angewandt, um zu entscheiden, ob ein einzelnes Allel an einem Locus ein tatsächliches homozygotes Allel ist oder ob das heterozygote Allel als Drop-out ausgefallen ist.

In Anlehnung an die Bezeichnung des Allelic Drop-out existieren ebenfalls Allelic Drop-ins. Damit werden zusätzlich im Elektropherogramm auftretende Peaks bezeichnet, die jedoch nicht mit dem Referenzprofil übereinstimmen, also diskordant sind. Bei Ein-Personen-Spuren treten diese vor allem dann auf, wenn DNA in geringsten Mengen vorliegt. Mittlerweile ist es möglich, Drop-out und Drop-in-Wahrscheinlichkeiten durch Parameter zu berechnen, die aus den Elektropherogrammen stammen (Gill et al. 2012; Gill 2020). Die Höhe der Allelic Drop-ins kann aufgrund der unterschiedlichen Ursachen variieren. Sie können beispielsweise durch weitere Personen (als Teil eines Mischprofils) auftreten oder durch sehr hohe Stotter-Allele verursacht worden sein, vor allem in DNA-Profilen, die mit kleinsten DNA-Mengen erstellt wurden.

Im Elektropherogramm können verschiedene Artefakte auftreten, die unterschiedliche Ursachen haben. Dabei wird zwischen biologisch-verursachten Artefakten und Artefakten, die von dem Detektionsinstrument (der Kapillarelektrophorese) verursacht wurden, unterschieden (Butler 2009). Biologisch-verursachte Artefakt-Peaks werden durch die Template-DNA selbst oder durch Fehler während der PCR-Amplifikation verursacht. Dazu zählen sogenannte Stotter-Allele (englisch *stutter*), welche durch physisches Verrutschen (englisch *slippage*) zwischen Template-DNA-Strang und neu-synthetisiertem DNA-Strang im Zuge der Elongationsphase der PCR generiert werden. Dabei entstehen PCR-Produkte, die um eine Wiederholungseinheit kürzer (Rückwärts-Stotter; N-1 beziehungsweise N-4 im Fall von Tetranukleotid-Repeats) oder länger (Vorwärts-Stotter, N+1; N+4 im Fall von Tetranukleotid-Repeats) sind als die Haupt-Peaks, welche die genetische Ausstattung der spurenlegenden Person darstellt. Die verkürzten Stotter-Allele treten im Elektropherogramm vor dem Haupt-Peak auf, die verlängerten dahinter (Sparkes et al. 1996a; Schlötterer und Tautz 1992; Walsh et al. 1996). Dies tritt umso häufiger auf, je weniger Basenpaare pro Repeateinheit vorkommen, denn *Slippage*-Ereignisse von Repeats aus je drei Nukleotiden (Trinukleotid-Repeats, beispielsweise D22S1045) sind wahrscheinlicher als bei

Tetranukleotid-Repeats (Kruglyak et al. 1998). Die Höhe der Stotter-Peaks kann von den STR-Loci und den Amplifikationsbedingungen abhängig sein und kann bis zu 15% des Hauptpeaks betragen. Bei der Beurteilung des Vorliegens von Stotter-Peaks ist es entscheidend, nicht nur die relativen Stotter-Intensitäten innerhalb eines STR-Markers zu untersuchen, sondern zwischen verschiedenen STR-Markern in einer Multiplex-Amplifikation (Schneider et al. 2006).

Daneben können weitere biologische Artefakte wie beispielsweise Split-Peaks, Null-Allele und Off-Ladder-Allele auftreten. Split-Peaks werden durch inkomplette Adenylierung verursacht, wobei nicht alle Amplifikationsprodukte eine zusätzliche Adenin-Base an das 3'-Ende gehängt bekommen, da zu viel DNA-Template eingesetzt wurde oder das PCR-Programm die komplette Adenylierung nicht gewährleistet (Brownstein et al. 1996; Magnuson et al. 1996). Null-Allele können aus Variationen in oder um STR-Wiederholungsregionen resultieren, beispielsweise durch Mutationen in Primerbindestellen, wodurch die betroffenen Allele ausfallen. Null-Allele können durch eine weitere Amplifikation mit einem alternativen Kit behoben werden, das andere Primerbindestellen nutzt. Sie treten selten auf, da die flankierende Sequenz um STR-Wiederholungen relativ stabil und zwischen den Proben konsistent ist (Kline et al. 1998; Walsh 1998; Leibelt et al. 2003). Off-Ladder-Allele sind Mikrovarianten und treten um mindestens 0,5 bp zur Allelleiter verschoben oder außerhalb der Allelleiter auf.

Technologie-verursachte Artefakte werden durch das Detektionsinstrument verursacht und haben vielfältige Auswirkungen. Dazu zählen Durchschläge, die bei hohen Signalstärken auftreten und die Fähigkeit des Detektionsinstruments, den Farbstoff im richtigen Farbkanal zu detektieren, überfordern, wodurch Allel-Peaks in einem Kanal in andere Kanäle hineinstrahlen können, was auch als Durchbluten (englisch *Bleed-through*) oder *Pull-up* bezeichnet wird. Weiterhin können freie, nicht an Primer gebundene Fluoreszenzfarbstoffe als sogenannte *Dye blobs* detektiert werden. Nicht-reproduzierbare Artefakte werden weiterhin durch Luftblasen und Harnstoff-Kristalle in der Kapillare verursacht, die in allen Farbkanälen zu scharfen, gleichhohen "Spikes" führen (Sparkes et al. 1996a; Murphy et al. 2005; Butler 2009).

1.2.3 Berechnungen von Ein- und Ausschlüssen, sowie Übereinstimmungen zwischen Spuren und weiteren Profilen

Wurde eine DNA-Spur von einem Tatort für Amplifikationen benutzt, die generierten Elektropherogramme interpretiert und das STR-Profil (englisch *question sample* Q) notiert, wird dieses genutzt, um es mit anderen STR-Profilen abzugleichen. Darunter fallen beispielsweise lokale Abgleiche zu STR-Profilen tatverdächtiger Personen oder Abgleiche mit Datenbanken. In Deutschland wird dafür die DNA-Analyse-Datei (DAD) des Bundeskriminalamtes verwendet, die seit dem Jahr 1998 besteht. Die DAD wird genutzt, um Spuren zu Personen zuzuordnen und um Tatzusammenhänge zu ermitteln (Spur-Spur-Treffer, (Bundeskriminalamt 2021)). Diese Profile sind bereits bekannt (englisch *known* K). Für den Abgleich gibt es drei mögliche Resultate: Das unbekannte Profil Q kann mit dem bekannten Profil K übereinstimmen und dadurch einen Einschluss erzeugen, oder die Profile können sich gegenseitig ausschließen. Ein Ausschluss kommt zustande, wenn diskordante Allele vorliegen, die nicht in beiden Profilen zu finden sind oder Allele zur Übereinstimmung fehlen. Dabei können die Unterschiede zwischen den vergleichenden Profilen lediglich damit erklärt werden, dass sie von zwei unterschiedlichen Personen stammen. Weiterhin kann es vorkommen, dass die Profile weder komplett übereinstimmen, noch sich eindeutig voneinander ausschließen (*inconclusive*), da Informationen für einen Schlussfolgerung fehlen. Bei

übereinstimmenden Profilen müssen statistische Grundlagen von Populationsberechnungen beachtet werden, mit denen nachgewiesen werden kann, dass verglichene Profile nicht per Zufall übereinstimmen (Butler 2009).

Für die biostatistischen Berechnung der Schätzung einer zufälligen Übereinstimmung (englisch *Random match probability*, RMP) zwischen STR-Profilen nicht-verwandter Personen werden Allelfrequenzen derjenigen STR-Allele genutzt, die in den STR-Profilen vorkommen. Dafür werden die entsprechenden Informationen aus Populations-Datenbanken gezogen, die Auskunft geben über die Häufigkeiten der Allele innerhalb einer bestimmten Population (Allelfrequenz), die anhand realer STR-Profile untersuchter Individuen statistisch erhoben wurden. Mittels biostatistischer Analysen wird eine Schätzung vorgenommen, dass eine zufällige, nicht verwandte Person innerhalb der betrachteten Population das fragliche DNA-Profil beigetragen haben könnte. Bei der biostatistischen Berechnung der RMP werden die Genotypenfrequenzen aller STR-Marker des betrachteten STR-Profiles für alle Allele über deren Allelfrequenzen berechnet. Die berechnete zufällige Übereinstimmung (RMP) entspricht der relativen Häufigkeit des betrachteten STR-Profiles in der relevanten Population. Der RMP stellt daher keinen Abgleich mit einem anderen STR-Profil dar, sondern gibt lediglich Auskunft über die Seltenheit des betrachteten STR-Profiles in der betrachteten Population. Dabei gilt, dass Allele mit sehr niedrigen Allelfrequenzen eine hohe Diskriminierungskraft (englisch *power of discrimination*; PD) besitzen, wenn sie in einem Profil vorhanden sind, da eine zufällige Übereinstimmung umso seltener auftritt, je seltener das Allel vorkommt. Beispielsweise ist der Marker SE33 (ACTBP2) mit einem PD von 0,98 - 0,99 sehr informativ (Wiegand et al. 1993; Lászik et al. 2001), da er eine hochpolymorphe Struktur besitzt und sehr niedrige Allelfrequenzen aufweist. Dadurch besitzt er eine hohe Heterozygotenrate (englisch *heterozygosity*; H; (Weir 1996).

Bei der Berechnung von Allelfrequenzen muss getestet werden, ob bestimmte mathematische Gleichgewichte eingehalten werden. Dabei wird untersucht, ob eine unabhängige Vererbung zwischen den Allelen innerhalb eines genetischen Locus (Hardy-Weinberg-Gleichgewicht) und zwischen den unterschiedlichen Loci (Kopplungs-Gleichgewicht, englisch *Linkage equilibrium*) vorliegt (Balding und Nichols 1994). Wenn eine Population im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist, bleiben die Genotyp-Häufigkeiten an jedem einzelnen genetischen Locus konstant innerhalb einer sich zufällig paarenden Population (Hardy 1908; Stern 1943). In dem Fall können die Genotypfrequenzen aus den Allelfrequenzen berechnet werden (Goodwin et al. 2008). Das Kopplungs-Gleichgewicht muss erfüllt sein, um die Produktregel, die Multiplikation aller berechneten Genotypfrequenzen aller untersuchter Loci, anwenden zu können.

Die biostatistische Schätzung einer zufälligen Übereinstimmung (RMP) ist Teil von Fachgutachten, die bei Strafprozessen der tatverdächtigen Personen von den beiden Positionen der Anklage und der Verteidigung unterschiedlich ausgelegt werden können. Um jedoch unterschiedliche STR-Profile miteinander abzugleichen, werden biostatistische Berechnung des Wahrscheinlichkeitsverhältnisses (englisch *Likelihood Ratio*, LR) vorgenommen. Die Berechnung des LR beruht auf dem Verhältnis von zwei Wahrscheinlichkeiten desselben Beweises unter zwei alternativen, sich gegenseitig ausschließenden Hypothesen: Die Hypothese der Anklage (englisch *Hypothesis of Prosecution*; H_p) besagt, dass die DNA am Tatort von der tatverdächtigen Person stammt. Im Gegensatz dazu besagt die Hypothese der Verteidigung (englisch *Hypothesis of Defense*; H_d), dass die DNA zufällig mit der tatverdächtigen Person übereinstimmt und stattdessen von einer unbekannt Person aus der Bevölkerung stammt. Je seltener die untersuchten Allele sind, desto kleiner ist die RMP, umso größer wird der LR-Wert sein und umso stärker wird die Hypothese der Anklage (H_p) unterstützt (Evetts et al. 2000).

Bei Mischspuren und alternativen Szenarien für den Nachweis des Profils (zum Beispiel mit Berücksichtigung der errechneten Wahrscheinlichkeiten von Allelic Drop-outs oder Drop-ins) ist die Berechnung des LR-Werts wesentlich komplexer. Auf das Vorliegen von Mischprofilen weisen Profile hin, die mehr als zwei Allele in mindestens zwei genetischen Loci aufweisen, extreme Peak-Höhen-Imbalancen oder auffällig hohe Stotter aufweisen. Diese könnten durch mehr als nur eine Person verursacht worden sein (Gill et al. 2012). Beispielsweise sollte bei Vorlage von sechs Allelen (die über dem stochastischen Schwellenwert liegen) pro Locus auf eine Mindestanzahl von drei Spurengabern geschlossen werden. Das bedeutet, dass von drei Spurengabern oder mehr ausgegangen werden kann (Schneider et al. 2006; Clayton et al. 1998). Gemäß der Richtlinie von Clayton et al. (Clayton et al. 1998) sollte anschließend das ungefähre Verhältnis beziehungsweise der Anteil der Komponenten in der Mischung zueinander bestimmt werden. Dadurch kann auf den unterschiedlichen Anteil der DNA bzw. Peaks der jeweiligen Spurenverursacher in der Mischung geschlossen werden und bei großen Unterschieden eine Dekonvolution, also Auftrennung der Peak-Informationen in die einzelnen Profile der an der Spurenlegung beteiligten Personen erfolgen. Dafür wurde bereits nachgewiesen, dass der Anteil der DNA, die in ein Mischungsverhältnis als Template in eine PCR-Reaktion hineingeht, sich nach der Amplifikation in der Peak-Höhe der Intralocus-Verhältnis (innerhalb der Marker, jedoch nicht zwischen verschiedenen Markern) ungefähr widerspiegelt (Lygo et al. 1994; Sparkes et al. 1996b).

Wenn Mischprofile beobachtet werden, eignet sich neben der Berechnung des LR auch die Berechnung der Einschluss-Chance $P(I)$ (englisch *probability of inclusion*), vor allem, wenn die Anzahl der Personen im Profil nicht abgeschätzt werden kann. Die Einschluss-Chance wird ebenfalls als *Random-man-not-excluded* (RMNE) bezeichnet und ist ein biostatistisches Maß für die Wahrscheinlichkeit für alle Genotypen-Kombinationen, die nicht von der Beteiligung an der Spur ausgeschlossen werden können. Da die Einschluss-Chance über die relative Häufigkeit der Genotypen in der Population anhand der Allelfrequenzen berechnet wird, entspricht die Einschluss-Chance der Random Match Probability (RMP) im Fall von Einzelpersonenspuren (Schneider et al. 2006).

Die deutsche Spurenkommission hat im Jahr 2009 Richtlinien für die Interpretation von Mischspuren veröffentlicht, in denen Mischspuren in drei Kategorien (A, B, C) eingeteilt werden (Schneider et al. 2006, 2009). Mischspuren der Kategorie A zeichnen sich durch hohe Peaks oberhalb des stochastischen Schwellenwertes aus, die jedoch keine signifikanten Unterschiede der Höhe aufweisen, so dass nicht auf ein Mischungsverhältnis geschlossen werden kann und keine Zuordnung zu bestimmten Einzelpersonen möglich ist. Diese Profile benötigen eine biostatistische Analyse mittels der LR oder des RMNE. Mischspuren der Kategorie B zeigen keine stochastischen Effekte und weisen für alle heterozygoten Loci ein konsistentes Verhältnis der Peak-Höhen von mindestens 4:1 von Haupt- zu Nebenkomponeute aus, wodurch die Peak-Informationen in die einzelnen Profile der Personen, welche an der Spur beteiligt sind, im Groben aufgetrennt werden können. Die Ableitung eines konkreten Profils zum Zweck von biostatistischen Berechnungen auf Grundlage einer Einzelpersonenspur ist jedoch lediglich für die Hauptkomponente zulässig. Im Gegensatz dazu liegen die Ergebnisse der Mischspuren der Kategorie C aufgrund von niedriger DNA-Qualität oder/und -Quantität im stochastischen Bereich, weshalb nicht auf eindeutige Hauptverursacher geschlossen werden kann (Schneider et al. 2006). Allelic Drop-outs und Drop-ins, Stotter, weitere biologisch-verursachte und technische Artefakte erschweren die Auswertung der Profile von Kategorie C. Biostatistische Berechnungen von Loci in Mischproben dieser Kategorie, welche in der Nähe des Hintergrundrauschens liegen, sind nicht sinnvoll und daher nicht zulässig (Gill et al. 2006).

1.2.4 Probabilistische Genotypisierung

Mittlerweile stehen Software-Lösungen zur Verfügung, die auf probabilistischen Verfahren basieren, um die Übereinstimmung von STR-Profilen von tatverdächtigen Personen mit Profilen von Spuren, bevorzugt bei Mischspuren, zu berechnen. Dafür werden Mischungskomponenten identifiziert, Mischungsverhältnisse bestimmt und diese Informationen für biostatistische Berechnungen verwendet. Diese Software-Programme basieren teilweise auf unterschiedlichen Algorithmen von semi- oder vollständig kontinuierlichen Modellen, haben jedoch gemeinsam, dass diejenigen Genotypen-Konstellationen an jedem Locus berechnet werden, welche das Zustandekommen des vorliegenden Elektropherogramms am besten erklären (Kelly et al. 2014). Bei einer Mischspur, an der drei Personen oder mehr beteiligt sind, ist die eindeutige Zuordnung der beteiligten Personen allerdings schwierig bis unmöglich (Bright et al. 2016; Schneider et al. 2006).

Das Zustandekommen von Elektropherogrammen kann auf unterschiedliche Weise erklärt werden, wobei sich die Ergebnisse je nach dem dafür verwendeten Modell sehr stark unterscheiden können. Enthält beispielsweise ein Spurenprofil an einem heterozygoten Locus die Allele p und q, jedoch das Referenzprofil der tatverdächtigen Person lediglich das Allel p, kann dies unterschiedlich interpretiert werden. Nach den bereits erläuterten Regeln (binäres Modell) würde diese Nicht-Übereinstimmung zu einem Ausschluss führen. Dadurch würde die Hypothese der Verteidigung (das Spurenprofil stammt von einer unbekanntem, mit der tatverdächtigen Person nicht verwandten Person aus derselben Population) unterstützt werden. Anhand kontinuierlicher Modelle, wie dem semi-kontinuierlichen und dem vollständig kontinuierlichen Ansatz, kann diese Nicht-Übereinstimmung alternativ erklärt werden. Das Genotypen-Profil könnte durch Allelic Drop-outs und Drop-ins (die im binären Modell nicht berücksichtigt werden) zustande gekommen sein. Dadurch kann die Nicht-Übereinstimmung durch einen Verlust des Allels q (Allelic Drop-out) begründet werden, wodurch die Hypothese der Anklage (das Spurenprofil stammt von der tatverdächtigen Person) unterstützt wird. Eine wichtige Grundregel zur Schätzung von Drop-out-Wahrscheinlichkeiten betrifft die Korrelation zwischen Peak-Höhe des Haupt-Allels und des Allelic Drop-outs. Diese besagt, dass bei Vorlage eines heterozygoten Genotyps, die Wahrscheinlichkeit, dass ein Allel aufgrund stochastischer Effekte nicht amplifiziert wird (und daher ausfällt) mit abnehmender Peak-Höhe des vorhandenen Allels steigt. Um zu überprüfen, ob an einem Locus ein Allelic Drop-out aufgetreten ist, wird daher in biostatistischen Berechnungen die Drop-out Wahrscheinlichkeit (englisch *Drop-out probability*) genutzt. Dafür wird die Peak-Höhe des vorhandenen Allels zur Drop-out Wahrscheinlichkeit mittels einer Regressionskurve pro Locus aufgetragen (Gill et al. 2009; Tvedebrink et al. 2009).

Um zu überprüfen, ob Allelic Drop-ins und Drop-outs tatsächlich aufgetreten sind oder die STR-Profile in den Loci homozygot vorliegen, können Wiederholungen der PCR-Reaktionen sinnvoll sein. Anhand der Consensus-Interpretation (es werden lediglich reproduzierbare Allele gezählt) und der Composite-Interpretation (es werden alle Allele gezählt) kann das Auftreten bestimmter Allele bewertet werden (Pfeifer et al. 2012). Manche Software-Programme sind in der Lage diese Methoden in den Berechnungen zu berücksichtigen, beispielsweise GenoProof Mixture3 (GPM3, qualitytype GmbH, (Götz et al. 2017)), das für die vorliegende Studie genutzt wurde.

Der vollständig kontinuierliche Ansatz basiert, zusätzlich zu der Miteinbeziehung der Drop-out und Drop-in-Wahrscheinlichkeiten, auf der Berücksichtigung weiterer Parameter auf Basis der Peak-Informationen der untersuchten Elektropherogramme. Diese umfassen Peak-Höhen innerhalb der STR-Loci und zwischen allen Loci des

Multiplex-Assays, sowie die Höhen und Verhältnisse von Stotter-Allelen (Taylor et al. 2013). Als Grundlage der in dieser Studie genutzten semi- und vollständig kontinuierlichen probabilistische Genotypisierung per GPM3-Software diene das biologische Modell von Taylor, Brighth und Buckleton (Taylor et al. 2013). Zu Beginn müssen daher die Hypothese und Gegenhypothese eindeutig festgelegt werden, die zur Berechnung des LR genutzt werden. Beispielsweise wird vorgegeben, dass die Generierung der Mischspur durch zwei nicht verwandte Personen berechnet werden soll, wobei die eine Person das Opfer sei und die zweite Person die tatverdächtige Person sei (Hypothese der Anklage). Die Hypothese der Verteidigung wäre demnach definiert als Spurenverursachung durch zwei Personen, das Opfer und einer unbekannt Person, welche nicht mit der tatverdächtigen Person verwandt ist und aus der untersuchten Population stammt. Das von der GPM3-Software genutzte mathematische Verfahren ist das Markov-Chain-Monte-Carlo-Verfahren (MCMC), basierend auf dem Metropolis-Hastings-Algorithmus, das Markov-Ketten generiert, also zufällige Stichproben aus Wahrscheinlichkeitsverteilungen zieht. Das geschieht folgendermaßen: Nachdem alle möglichen Genotypkonstellationen aufgelistet wurden, welche zur Erklärung der Mischspur in Erwägung gezogen werden könnten, startet die Berechnung an einer zufälligen Stelle und nähert sich dann schrittweise dem *best fit*, also des am besten passenden Lösungsraumes an. Dafür wird in mehreren tausenden MCMC-Iterationen nach den Parametern und derjenigen Genotypkonstellation gesucht, welche die Zusammensetzung des Mischprofils im untersuchten Elektropherogramm am besten erklärt (Kelly et al. 2014). In der *Burn in*-Phase werden mehrere Parameter und Genotypkonstellationen simuliert und dadurch das sogenannte *Total Allelic Product* (T_{anr}^l) modelliert. Dieses entspricht der Peak-Höhe eines Allels (a) an einem Marker (l) einer Person (n) im Replikate (r) gemäß der Formel

$$T_{anr}^l = A^l \cdot R_r \cdot t_n \cdot e^{d_n \cdot m_a^l} \cdot X_{an}^l$$

für das biologische Modell (Taylor et al. 2013). Dabei steht der Ausdruck $A^l R_r$ für die simulierte PCR-bedingte Amplifikationseffizienz in Abhängigkeit von einem Replikate-Multiplier (R), der eingestellt werden kann. Die Amplifikationseffizienz stellt den Einfluss der PCR-Reaktion auf jeden STR-Marker dar, da die verschiedenen STR-Marker innerhalb des Multiplex-Kits unterschiedlich effizient DNA amplifizieren. Die Template-DNA-Menge (t_n) wird abhängig von der RFU im Elektropherogramm simuliert, da nicht nur die tatsächlich in die PCR eingesetzte Menge unbekannt ist, sondern auch der Anteil der DNA-Mengen der jeweiligen Personen in der Mischspur unbekannt ist, welche die Mischspur verursacht haben. Die DNA-Degradierung (d_{nr}) ist abhängig von der Fragmentlänge (m_{ar}^l) des Allels (auch als Molekulargewicht des Allels bezeichnet), da lange PCR-Zielregionen weniger häufig amplifiziert wurden, je stärker die DNA degradiert ist. Die Fragmentlänge wird dem vorliegenden Elektropherogramm des STR-Profiles entnommen und wird daher nicht simuliert. Durch die Merkmalsausprägung (X_{an}^l) wird berücksichtigt, ob das Allel in einem homo- oder heterozygot ausgeprägten Marker vorkommt. Wenn beispielsweise eine homozygote Ausprägung für das Allel angenommen wird, sollte das Allel doppelt so hoch sein (=2) wie die heterozygoten Allele, die im selben Farbkanal neben dem betrachteten Allel liegen. Ob 1 (heterozygot) oder 2 (homozygot) eingesetzt wird, ist also abhängig von der Genotypkonstellation. Die Parameter bedingen sich gegenseitig. So können beispielsweise Allele mit hoher RFU u.a. zustande kommen, wenn das DNA-Template nicht degradiert war, das Allel homozygot vorkommt oder mehrere an der Mischspur beteiligten Personen dasselbe Allel tragen. Parameter, die keinen Sinn ergeben, werden durch heuristische Methoden

bereits am Startpunkt herausgefiltert, um Rechenarbeit für Genotypkonstellationen zu vermeiden, durch die das Zustandekommen des tatsächlich vorliegenden Profils im Elektropherogramm nicht erklärt werden kann.

Da das *Total Allelic Product* die Gesamtmasse des betrachteten Allels unter Berücksichtigung der Umgebung erklärt, werden Phänomene wie N+1/N-1-Stotter mit eingerechnet, um das Zustandekommen des Allels zu erklären. Zu diesem Zweck werden die erwarteten maximalen Peak-Höhen der N+1 und N-1-Stotter aus den Stotterschwelldaten (die dem Manual des genutzten STR-Kits entnommen werden) berechnet. Das ist notwendig, um zwischen Artefakten, Stottern und tatsächlichen Allelen einer weiteren Person zu unterscheiden. Im Anschluss wird der Anteil der Stotter-Allele aus dem eigentlichen Allel herausgerechnet, wodurch die erwartete Peak-Höhe des Allels erhalten wird. Diese wird mit der tatsächlichen Peak-Höhe aus dem Elektropherogramm verglichen, indem die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung der erwarteten mit der beobachteten Peak-Höhe über den Logarithmus der Normalverteilung berechnet wird. Über die Multiplikation der Wahrscheinlichkeiten aller Allele und Stotter-Allele über alle Marker für alle Spurenverursacher wird die Wahrscheinlichkeit für die jeweils modellierte Genotypkonstellation für das komplette STR-Profil ausgerechnet. Dadurch wird die Dekonvolution erreicht, also die Zerlegung der Mischspur in die einzelnen Komponenten mit Zuordnung der Allele zu den entsprechenden Personen, die an der Spurenlegung beteiligt waren. Im nächsten Schritt werden die Wahrscheinlichkeiten für simulierte Parameter und Genotypkonstellationen geprüft und entweder akzeptiert oder abgelehnt. Akzeptanz geschieht, wenn die Wahrscheinlichkeit höher ist als vorherigen Schritt oder sie innerhalb einer Toleranz liegt, welche zufällig von der Software generiert wird und zwischen eins und null liegt. Indem die Anzahl jeder akzeptierten Genotypkonstellation gezählt wird, wird eine Wichtung vorgenommen. Genotypkonstellationen, die besonders häufig akzeptiert wurden, sind daher höher gewichtet als weniger häufig akzeptierte Genotypkonstellationen und können daher im besten Falle als die beste Erklärung angesehen werden, wie die Mischspur entstanden sein könnte. Die Wichtungen für die akzeptierten Genotypkonstellationen, die per MCMC-Verfahren gefunden wurden, gehen mit in die Berechnung des LR ein, welche die Allelfrequenzen miteinbezieht.

1.2.5 Weitere genetische Marker, die für die Humanidentifizierung von Bedeutung sind

Neben den autosomalen STR-Kits existieren Kits, die zusätzlich genutzt werden können, beispielsweise um die Diskriminierungsrate zu erhöhen oder um für Vortests zu nutzen. So gibt es beispielsweise STR-Panel, die sich auf die Amplifikation paternaler oder maternaler Marker beziehen, also die Humanidentifizierung über gonosomale, X- oder Y-chromosomale STR-Marker beruhen, beispielsweise um Verwandtschaftsverhältnisse aufzuzeigen oder zur Spezialanwendung in Sexualdelikt-Fällen, in denen meist Mischproben mehrerer Personen unterschiedlichen chromosomalen Geschlechts vorliegt. Weitere spezielle Marker zur Humanidentifizierung sind Insertions-Deletions-Polymorphismen (Indels) oder *rapidly mutating* Y-chromosomale STRs.

Neben STRs werden ebenfalls SNPs (englisch *single nucleotide polymorphisms*; Einzelnukleotidpolymorphismen) forensisch analysiert. Heutzutage werden SNPs in der forensischen Genetik vor allem zu Phänotypisierung und zur Bestimmung der biogeografischen Herkunft (ebenfalls als *Ancestry* bezeichnet) und zur Klärung von Verwandtschaftsverhältnissen (*Kinship* SNPs und Y-SNPs) eingesetzt. Allerdings eignen sie sich ebenfalls zur Humanidentifizierung, die jeweiligen SNPs werden als sogenannte

identity SNPs bezeichnet. Gegenüber STRs sind sie vorteilhaft, da sie potentiell mittels kürzerer Amplikons amplifiziert werden können, weshalb sie sich vor allem für die Analyse degradierter DNA eignen. Weiterhin weisen SNPs geringere Mutationsraten im Vergleich zu STRs auf, wodurch sie sich besser für die Identifizierung von tatverdächtigen Personen über deren Verwandtschaft (Genealogie) und für Abstammungsuntersuchungen eignen. Im Vergleich zu STRs nachteilig erweisen sich SNPs unter anderem durch die geringe polymorphe Ausprägung, da überwiegend lediglich zwei (oder drei bzw. vier in sehr seltenen tri- oder tetra-allelischen Fällen) Allele vorkommen, während die forensischen STR-Marker mindestens sechs Allele und mehr aufweisen. SNPs sind daher geringer polymorph als STRs und aufgrund dessen weniger informativ. Die dadurch bedingte geringere Diskriminierungsrate der SNPs erfordert eine höhere Anzahl an SNPs als es bei STRs der Fall ist, um in Kombination mehrerer SNPs ausreichend hohe Diskriminierungsraten für die Humanidentifizierung zu erreichen. Daher eignet sich der Einsatz von SNPs vor allem, wenn sie hochparallel analysiert werden können, wie es mittels der Technik der *Next Generation* Sequenzierung ermöglicht wurde. Für die Analyse von Mischspuren eignen sich SNP-Marker nicht beziehungsweise nur begrenzt (Amorim und Pereira 2005; Gill 2001a). Ein weiterer Nachteil der SNPs besteht darin, dass sie in kriminalistischen DNA-Datenbanken nicht repräsentiert sind und daher für Datenbank-Suchen nicht genutzt werden können.

1.3 Eignung und Nutzung von qPCR in der Forensik

Eine spezielle Anwendung zur Amplifikation von DNA, entsprechend der Methode der Polymerasekettenreaktion, stellt die quantitative PCR (qPCR) dar, die eine Quantifizierung der eingesetzten (Template) DNA mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen in Echtzeit ermöglicht. In der Forensik dient die qPCR-Methode dazu, die DNA-Menge für den optimalen Einsatz der DNA in die nachfolgende STR-Reaktion zu ermitteln. Da die CE-basierte STR-Detektion auf Fluoreszenz beruht, wird für viele STR-Kits eine DNA-Menge bis zu 500 pg oder 1 ng empfohlen, um auf negative Effekte wie beispielsweise dem Durchbluten im Elektropherogramm zu umgehen. Daneben wird die qPCR dafür benutzt, um die Integrität – den Grad der DNA-Degradierung – zu bestimmen, die Auskunft geben kann über den nachfolgenden Typisierungserfolg der STR-Profilierstellung. Dadurch wird die Grundlage geschaffen, um auf Basis der gemessenen Integritäts-Werte bestimmte Strategien anzuwenden, die für die STR-Analyse von degradierter DNA geeignet sind, wie beispielsweise die Verwendung von Mini-STR-Kits. Ein weiterer Vorteil der vorhergehenden qPCR-Analyse ist es, dass viele qPCR-Assays die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren durch eine interne Kontrolle feststellen können (Morrison et al. 2020; Zupanič Pajnič et al. 2017; Thomas et al. 2013).

Die Detektion der amplifizierten DNA basiert auf der Technik des Fluoreszenz- (oder Förster) Resonanz-Energie-Transfers (fluorescence resonance energy transfer, FRET) (Cardullo et al. 1988), sowie auf der fluorometrischen Emission von Fluorophoren wie beispielsweise SYBR Green, dass sich durch die spezifische Bindung in doppelsträngige DNA für den Einsatz in der qPCR eignet (Wittwer et al. 1997). Im Zuge des Elongations-Zyklus der PCR nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. In der exponentiellen Phase der qPCR steht die gebildete DNA-Menge in einem exponentiellen Zusammenhang mit der Ausgangsmenge und kann daher zur Quantifizierung der letzteren herangezogen werden. Überschreitet die Intensität der Fluoreszenz einen Schwellenwert in der exponentiellen Phase, wird die erforderliche PCR-Zyklenzahl (C_q -Wert, *quantification cycle* (Bustin et al. 2009)) erfasst. Durch die Auftragung der C_q -Werte gegen den Logarithmus der ursprünglich eingesetzten bekannten DNA-Menge wird mittels einer erstellten Standardkurve eine Kalibrierung

ermöglicht, anhand deren die jeweils ursprünglich vorhandene DNA-Menge der gemessenen Proben ermittelt wird (Quantifizierung).

Im Vergleich zu photometrischen oder fluorometrischen Methoden ist die Technik der qPCR besonders gut für den Einsatz in der genetischen Forensik geeignet, da sie hochspezifisch und sehr sensitiv ist und daher bis in den Pikogrammbereich valide Ergebnisse der korrekten Targetregionen liefern kann. Weiterhin ist die qPCR-Technik multiplexierbar, was die simultane Analyse mehrerer Target-DNA-Bereiche bedeutet, so dass neben der DNA-Quantifizierung ebenfalls die DNA-Integrität und die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren erfasst werden kann.

Die Erfassung der DNA-Integrität wird ermöglicht durch Amplifikation von mindestens zwei Target-DNA-Bereichen, die sich in der Länge unterscheiden. Dieses Prinzip basiert auf der Idee, dass ein längeres Amplikon anfälliger für die Degradierung ist, während kurze Amplikons nur wenig von DNA-Degradierung betroffen sind. Indem die jeweiligen Mengen dieser Amplikons mittels qPCR bestimmt werden, wird die DNA-Degradierung anhand des Verhältnisses bestimmt (**Kapitel 2.9**) und die DNA-Menge wird anhand der Menge des kurzen Amplikons bestimmt. In ersten Arbeiten hierzu wurden in der Vergangenheit Amplikons ausgewählt, die im Genom nur in zwei Kopien vorliegen (*single copy*), was die analytische Empfindlichkeit einschränkt (Swango et al. 2006; Hudlow et al. 2008). Die derzeitigen Systeme basieren auf Genloci mit mehreren Kopien (englisch *multi-copy gene loci*) und sind daher in der Lage, kleinste Mengen von Template-DNA zu analysieren (Nicklas und Buel 2003; Kitayama et al. 2013; Thomas et al. 2013; Pineda et al. 2014; Holt et al. 2016; Ewing et al. 2016; Vraneš et al. 2017). Dieses Prinzip für die Bestimmung der DNA-Degradierung, wurde in der vorliegenden Studie zur Entwicklung eines in-house qPCR-Assays genutzt (**Kapitel 3.2**).

Seit einigen Jahren werden die gebräuchlichsten kommerziellen Multiplex-Kits zur parallelen Messung der DNA-Quantität und Integrität von humaner DNA in der genetischen Forensik mit paralleler Amplifikation einer internen PCR-Kontrolle (IPC) von dem Investigator® Quantiplex® Pro (RGQ) Kit (QIAGEN, (Morrison et al. 2020; Vraneš et al. 2017)), dem PowerQuant® Kit (Promega, (Ewing et al. 2016)) und dem Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit (Thermo Fisher Scientific, (Vernarecci et al. 2015; Holt et al. 2016)) gestellt. Diese Kits sind in der Lage autosomale und Y-chromosomale DNA-Mengen von weniger als 1 pg zu quantifizieren.

Die Validierung von Techniken zur Quantifizierung wird häufig entsprechend definierter analytischer Parameter und Richtlinien durchgeführt, wie den Guidelines der SWGDAM-Arbeitsgruppe (SWGDAM 2016) und den MIQE-Guidelines (Bustin et al. 2009). Dabei spielen vor allem die Präzision der experimentell gemessenen Werte, die sich durch möglichst geringe Streuung der Messwerte von Replikaten (angegeben durch die Standardabweichung) auszeichnet, eine wichtige Rolle (Bustin et al. 2009; SWGDAM 2016). Die wahre Menge (die sogenannte Richtigkeit) hochkomplexer genomischer DNA kann prinzipiell nicht exakt ermittelt werden, da alle Messtechniken zur Quantifizierung von Nukleinsäuren unterschiedliche Schwächen aufweisen (Fluorophore, Amplikonlängen) und eine gewisse Anzahl an Replikaten notwendig ist, statistisch signifikante Werte zu ermitteln. Weiterhin treten im Pikogrammbereich Stichprobenfehler, die auf der zufälligen Entnahme eines Probenteils beruhen. Diese variieren besonders stark, zeigen also eine geringe Präzision, wenn sehr kleine DNA-Mengen den Stichprobenumfang bilden, beispielsweise wenn bei DNA-Mengen unterhalb 6,6 pg weniger DNA vorliegt als in einer diploiden menschlichen Zelle vorhanden ist. Da die Messungen auf spezifischen Zielbereichen der jeweiligen Chromosomen des Genoms basieren, werden erst in dem Fall positive Messwerte erhalten, wenn diese Bereiche in der gemessenen Stichprobe vorhanden und amplifizierbar sind. Negative Messwerte

weisen daher prinzipiell nicht auf die Abwesenheit von DNA hin, sondern lediglich auf eine Nicht-Amplifizierbarkeit oder Nichtvorhandensein der spezifischen Zielbereiche in der gemessenen Probe. Die Anfälligkeit gegenüber Stichprobenfehlern wird durch Nutzung von *multi-copy*-Loci reduziert, die in hoher Anzahl im Idealfall auf mehreren unterschiedlichen Chromosomen des Genoms vorkommen. Die Empfindlichkeits-, oder Empfindlichkeitsschwelle wird häufig über das *Limit of detection* (LOD) getestet, der geringsten DNA-Konzentration, an der 95% der positiven Proben detektiert werden: Innerhalb einer Gruppe an Replikaten, die Target-DNA in der Konzentration der LOD enthalten, dürfen lediglich fünf Prozent der Reaktionen vom tatsächlichen Wert abweichen (Bustin et al. 2009).

Die analytische Spezifität bezieht sich auf die Eigenschaft des qPCR-Assays die spezifische Zielsequenz im Genom nachzuweisen, anstatt unspezifische Bereiche zu amplifizieren. Die Wiederholbarkeit (Kurzzeit-Präzision oder Intra-Assay Varianz, englisch *Repeatability*) bezieht sich auf die Präzision und Robustheit des Assays, mit dem die gleichen Proben innerhalb desselben Assay-Laufes wiederholt analysiert werden und kann durch die Standardabweichung der C_q -Werte der technischen Replikate dargestellt werden. Die Reproduzierbarkeit (Langzeit-Präzision oder Inter-Assay Varianz, englisch *Reproducibility*) bezieht sich auf die Variation der Ergebnisse zwischen unterschiedlichen Assay-Läufen oder zwischen verschiedenen Laboren und wird typischerweise als Standardabweichung der DNA-Konzentrationen dargestellt. Im Gegensatz dazu ist die Darstellung der Reproduzierbarkeit über die Standardabweichung der C_q -Werte kein geeignetes Mittel, da die Standardkurven zwischen den verschiedenen Assay-Läufen variieren (Bustin et al. 2009).

1.4 Wachstumsphasen von Haaren beeinflussen den Erfolg der DNA-Analytik

Ausgefallene einzelne Kopfhaare stellen den Großteil der an Tatorten gefundenen Haare dar (DiZinno et al. 1999). Allerdings werden diese nicht in jedem Fall für die Analyse der DNA genutzt, da sich ausgefallene Haare meist im telogenen oder exogenen Wachstumsstadium befinden und daher geringe DNA-Mengen und einen hohen Grad an DNA-Degradierung aufweisen. Die STR-Analyse ihrer nukleären DNA ist aufgrund dessen selten erfolgreich (Opel et al. 2008; Brandhagen et al. 2018), insbesondere weil häufig keine anhaftenden Zellen, wie Haarwurzelscheidezellen (englisch *hair root sheath cells*) vorhanden sind (Hochmeister et al. 1996; Pfeiffer et al. 2004).

1.4.1 Humanidentifizierung anhand der Morphologie

Der Gebrauch von Haaren in der Forensik kann zur Aufklärung von Straftaten eine sinnvolle Maßnahme sein. Im Gegensatz zu einigen Spurentypen, beispielsweise zu Spermien zum Nachweis von Sexualdelikten, kann es schwierig sein, Haare mit der Straftat in Zusammenhang zu bringen oder den Tathergang zu erklären, da Haare von einem Ort zu einem anderen transferiert werden können. Haare können jedoch bei erfolgreicher Analyse zusätzliche Evidenz erbringen, entweder als Hinweis oder in Zusammenhang mit anderen Beweismitteln.

Der mikroskopische, morphologische Abgleich von Haaren zwischen tatverdächtigen Personen und als Beweismittel genutzten Haaren gehörte bis in die 1990er-Jahre zur Routinearbeit der Identifizierung von Personen. Dieser morphologische Abgleich stellte sich später als ungenaue, subjektive und unwissenschaftliche Methode heraus, indem in einigen der von dem „Innocence Project“ aufgerollten Altfällen (*cold cases*) in den USA

mittels neuester DNA-analytischer Methoden nachgewiesen wurde, dass Haare, die ursprünglich als Beweismaterial gegen tatverdächtige Personen genutzt wurde, ein anderes STR-Profil als das der tatverdächtigen Personen aufwies, zum Teil sogar von Tieren stammte. Es wurde nachgewiesen, dass in mindestens 90% von 268 Fällen zwischen den Jahren 1970-1999, die zur Verurteilungen führten, die Gutachten von Haaranalysen fehlerhaft oder wissenschaftlich invalide sind (Geddes 2015; Federal Bureau of Investigation 2015). Die Problematik liegt vor allem darin, dass es keine systematischen wissenschaftlichen Studien gibt, in denen Ähnlichkeiten von morphologischen Merkmalen von Haaren und deren Häufigkeit untersucht wurde. Infolgedessen ist es völlig unklar, wie viele Individuen weltweit Haare tragen, die eine identische Morphologie aufweisen, weshalb die Diskriminierungskraft der Morphologie von Haaren nicht eingeschätzt werden kann. Dieser Fakt wurde ignoriert, wodurch die tatsächliche Beweiskraft morphologischer Untersuchungen aufgrund von subjektiven Beurteilungen falsch eingeschätzt wurde (Bowers und Koen 2017; Geddes 2015). Infolge der Arbeit des „Innocence Project“ stellte das FBI ab 1996 die Erstellung von Gutachten ein, die alleinig auf der Grundlage visueller Vergleiche beruhten und verpflichtete sich zur ergänzenden Untersuchung der mitochondrialen DNA, sofern ein Haar als Beweismaterial in Betracht kommt (Bowers und Koen 2017; Federal Bureau of Investigation 2015).

Heutzutage wird davon ausgegangen, dass die Untersuchung morphologischer Unterschiede eine Unterscheidung zwischen Menschenhaaren und unterschiedlichen Haaren verschiedener Tierarten zulässt, sofern mehrere Parameter untersucht werden. Beispielsweise werden dafür die Haarwurzelform herangezogen, sowie die Schuppenstruktur, die Färbung, die Beschaffenheit der Medulla und des Cortexes, sowie die Dicke der Haare, insbesondere des Haarschaftes (Bowers und Koen 2017; Ogle und Fox 1999; Robertson 1999). Jedoch wird heutzutage davon ausgegangen, dass es nicht möglich ist, Haare anhand morphologischer Unterschiede individuellen Menschen zuzuordnen. Dafür ist die Nutzung der Bestandteile der Haare unabdingbar, wie nukleäre DNA oder Proteine. Die proteomische Genotypisierung stellt momentan noch eine sehr junge Wissenschaft dar, wurde jedoch bereits erfolgreich an Menschenhaaren angewandt (Parker et al. 2019; Goecker et al. 2020). Aufgrund der etablierten Strukturen wird in der forensischen Humanidentifizierung von Haaren jedoch weiterhin die nukleäre DNA genutzt. Hierfür ist jedoch eine erfolgreiche DNA-Analytik vonnöten.

1.4.2 Morphologie und Wachstumsphasen von menschlichen Kopfharen

Zum Verständnis der DNA-Analytik von Haaren ist die Kenntnis des Entwicklungszyklus und der Morphologie von Haaren von besonderer Bedeutung, da diese im Zusammenhang mit der Herausforderung der DNA-Analytik von Haaren stehen.

Haare werden in Haarfollikeln gebildet, die gut durchblutet und in der Haut versenkte Strukturen darstellen. Der Haarschaft kann in drei Bereiche untergliedert werden (von innen nach außen), die Medulla, den Cortex und die Cuticula (**Abbildung 1**). Anhand morphologischer Eigenschaften wie Dicke, Pigmentierung und Form der Medulla (beispielsweise durchgehend oder unterbrochen) und der Art der Beschuppung der Cuticula, können Haare grob miteinander abgeglichen und unterschieden werden (Deedrick D. W. 2000; Ogle und Fox 1999; Robertson 1999). An der Basis des Haarfollikels, am sogenannten Haarbulbus, auch Haarzwiebel genannt, sitzt die Dermalpapille, ein eiförmiges Gewebe, das aus mesenchymalen Stammzellen besteht und von proliferierenden Haar-Keimzellen (englisch *germinal cells*, nicht zu verwechseln mit den Keimzellen, Gameten der Fortpflanzungsorgane) der anagenen Haarwurzel

umgeben ist. Die Dermalpapille ist essentiell für das Haarwachstum und für die Steuerung des Haarzyklus (Taylor et al. 2000; Jahoda et al. 1984; Harding und Rogers 1999). Der Haarschaft wird umgeben von einem umhüllenden Kanal, der inneren Wurzelscheide (englisch *inner root sheath*). Die sogenannte äußeren Wurzelscheide (englisch *outer root sheath*) entspricht der äußersten Epithelschicht, die um den proximalen Teil des Haars herum liegt.

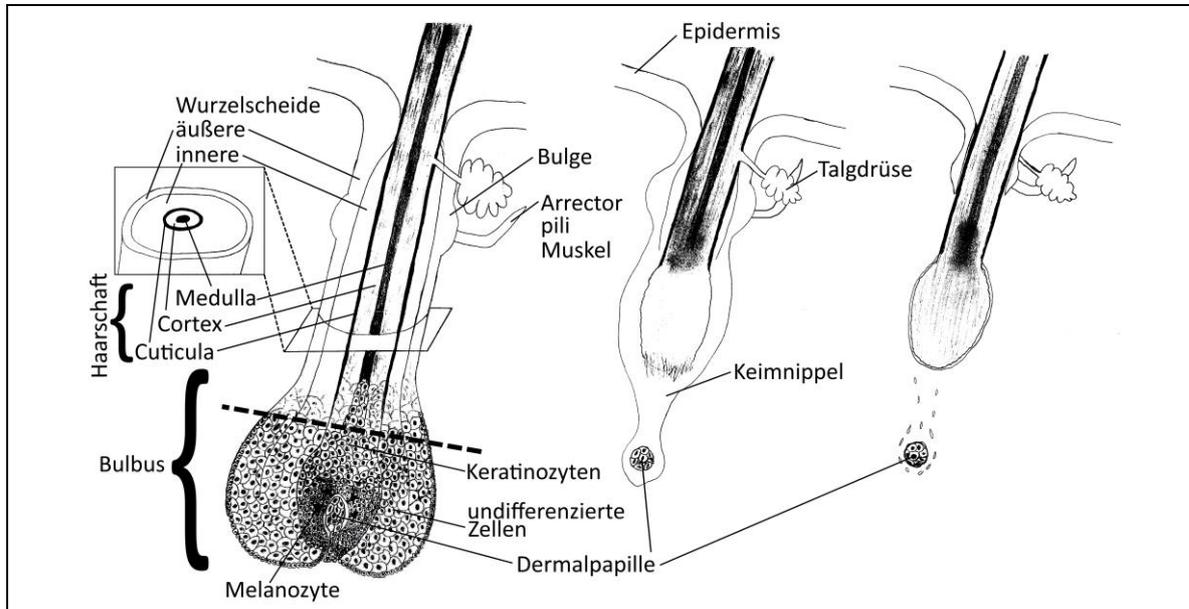


Abbildung 1: Darstellung von Haaren in unterschiedlichen Wachstumsphasen

Schematische Darstellung eines longitudinalen Schnittes durch Haare unterschiedlicher Wachstumsphasen (von links nach rechts anagene, katagene, telogene Wachstumsphase). Aufgrund der schematischen Darstellung wurde auf die Einzeichnung der Zellen, die sich bis zur Epidermis fortsetzen, in den beiden Wurzelscheiden verzichtet. Auf die Eintragung der Blutversorgung in die Dermalpapille wurde im Sinne der Übersichtlichkeit verzichtet. Die gestrichelte Linie des anagenen Haarfollikels stellt die Aubersche Linie dar. Gezeichnet und verändert nach (Junqueira und Carneiro 1991; Bengtsson et al. 2012; Lindner et al. 1997).

Der Wachstumszyklus des Haares wird in unterschiedliche Phasen eingeteilt. In der metabolisch hoch aktiven anagene Phase, der Wachstumsphase der Zellproliferation und Differenzierung, wachsen die Haare, indem die Haarschäfte von differenzierenden Zellen aus dem basalen Teil des Follikels herausgeschoben werden. Die Verweildauer von menschlichen Kopfharen in der anagenen Phase korreliert mit der Haarlänge, wird jedoch mit zwei bis sieben Jahren angegeben und stellt damit den Großteil des Wachstumszyklus dar (Dry 1926; Linch et al. 2001; Alonso und Fuchs 2006). Die anagene Phase ist von einer hohen metabolischen und mitotischen Aktivität geprägt. Ausgehend von der Dermalpapille werden noch undifferenzierte Zellen in Richtung der Epidermis geschoben und differenzieren sich anschließend in Zellen der einzelnen Bestandteile des Haares. Ein Teil der Zellen entwickelt sich zu Keratinozyten, die das Protein Keratin produzieren, wodurch der Haarschaft gebildet wird. Andere Zellen entwickeln sich zu Melanozyten, welche durch die Produktion von Melanin für die Pigmentierung des Haarschaftes verantwortlich sind. Die Epithelschichten der inneren und äußeren Wurzelschicht umgeben den Haarschaft und sind Teil des Haarfollikels. Durch die ständige Proliferation werden neue Zellen nachgeschoben, wodurch der bereits keratinisierte Teil des Haarschafts auf der Haut herausgeschoben wird (Harding und Rogers 1999; Bengtsson et al. 2012). Die Aubersche Linie ist eine fiktive Trennung und teilt den Haarbulbus in oben und unten, in bereits differenzierte Zellen und noch

proliferierende Zellen ein. Der Bereich herum wird auch als Aushärtungszone – bezogen auf die Verhornung durch die Keratinisierung – beschrieben (Madea 2004).

Mit Eintritt in die katagene Phase endet das in der anagenen Phase beobachtete Wachstum und die Wurzelscheiden werden größtenteils zurückgebildet. Die katagene Phase dauert mehrere Wochen (Linch et al. 2001). Die Teilung und Differenzierung der Zellen stoppt in der katagenen Phase und der Boden des Haarschafts löst sich zum Teil vom Follikel ab und schließt sich zu einer abgerundeten Struktur, die als Kolbenwurzel (Madea 2004) (englisch *club hair*) bezeichnet wird, die aus Cortex-Zellen besteht und während der telogenen Phase dort verankert bleibt (Higgins et al. 2009; van Neste et al. 2007; Harding und Rogers 1999). Während der katagenen Phase unterliegen die Epithelzellen in Bulbus und Wurzelscheide dem Prozess der Apoptose (Lindner et al. 1997) und der Keratinisierung (van Neste et al. 2007). Keratinozyten der Haare sterben während der Keratinisierung, wobei der Zellkern fragmentiert wird und die nukleäre DNA durch die Keratinozyten-spezifischen DNase1-like 2 (DNase1L2) degradiert wird (Harding und Rogers 1999; Linch 2009). Die Folge des DNase-Verdaus ist eine erhebliche Reduzierung der DNA-Menge in keratinisierten Haaren, im Gegensatz zu haarbildenden Zellen DNase1L2-defizienter transgener Mäuse, die im Mausmodell eine Ablation von DNase1L2 aufweisen (Fischer et al. 2011).

Die Verankerung des Kolbenhaars in der Haut führt von den Cortex-Zellen zu umgebenden Haar-Keimzellen, die als sogenannter Epithelsack (englisch *epithelial sac*) bezeichnet wird (Bourguignon et al. 2008). Der Follikel selbst verkürzt sich stark, wodurch der Epithel-Strang (englisch *epithelial strand*) ausgebildet wird (Alonso und Fuchs 2006; Harding und Rogers 1999), der sich zwischen der Dermalpapille und dem oberen Part des Follikels befindet. Anhaftendes Gewebe, das zum Teil an der Kolbenwurzel hängend aus der Haut herausgezogen werden kann, wird als sogenannter Keimnippel (englisch *germinal nipple*) bezeichnet (Linch et al. 1998). Als Folge der Veränderungen in der katagenen Phase liegt die Kolbenwurzel getrennt von der Dermalpapille vor, die tiefer im Gewebe liegt als die Kolbenwurzel.

Es folgt die telogene, die sogenannte Ruhephase des Haarwachstumszyklus, in der die Follikel weitestgehend inaktiv bleiben und in der keine Proliferation, Differenzierung oder Apoptose messbar ist (Alonso und Fuchs 2006). Aufgrund der Verkürzung des Follikels besitzt dieser nur noch etwa ein Drittel seiner ursprünglichen Länge und liegt dadurch näher an der Hautoberfläche (Linch et al. 2001). Die telogene Phase der Haare in der menschlichen Kopfhaut dauert ungefähr drei bis vier Monate und somit länger als die katagene Phase (Kligman 1961). Telogene Haare fallen – entgegen landläufiger Meinung - normalerweise nicht aus, sondern sie werden durch leichte mechanische Einwirkungen wie beispielsweise dem Bürsten des Kopfhaares herausgezogen (Harding und Rogers 1999). Am Ende der telogenen Phase haben die Haare den Zellwachstumszyklus (Robertson 1999; Linch 2008; Müntener et al. 2011; Edson et al. 2013) und die nachfolgende Kernfragmentierung während der Keratinisierung (McNevin et al. 2005) abgeschlossen.

Die nachfolgende Phase, die sogenannte exogene Phase, ist eine vor kurzem vorgeschlagene vierte Phase des Haarwachstumszyklus und ist die am wenigsten untersuchte Phase (Milner et al. 2002; van Neste et al. 2007). Die exogene Phase zeichnet sich dadurch aus, dass das Haar nicht mehr in der Haut verankert ist und daher ausfällt (Milner et al. 2002). Es existieren zwei unterschiedliche Theorien, die den Prozess der Ablösung auf verschiedene Weisen erklären. Der Prozess könnte ein passiver Vorgang sein, wodurch das exogene Haar durch ein neu entstehendes Haar im selben Follikel aus diesem herausgedrückt wird. Die alternative Theorie besagt, dass die exogene Phase aktiv durch spezifischen Signale ausgelöst wird, wodurch die

Verankerung des Haars im Follikel aufgelöst wird (Higgins et al. 2009). Dass exogene Haare, im Gegensatz zu telogenen Haaren, keine Reste der inneren und äußeren Wurzelscheide aufweisen, konnte mittels bestimmter Färbungen nachgewiesen werden, mit denen unterschiedliche Wachstumsphasen der Haare voneinander unterschieden werden können (van Neste et al. 2007). Da die menschliche Kopfhaut etwa 100.000 bis 150.000 Haarfollikel enthält, die sich in unterschiedlichen Wachstumsphasen befinden, wobei ungefähr 10% dieser Haare in der telogenen (oder exogenen) Phase verweilen, wird der tägliche Verlust auf etwa 150 Kopfhare geschätzt (Linch et al. 2001).

Als Folge der morphologischen Veränderungen während den verschiedenen Wachstumsphasen, liegt DNA, die für die Humanidentifizierung genutzt wird, in ausgefallenen Haaren in unterschiedlichen Mengen und Degradierungsgraden vor: Reste von Gewebe der Wurzelscheidezellen können vor allem im Bereich der Kolbenwurzel anhaften und eine Vielzahl an nutzbaren Zellkernen aufweisen (Ottens et al. 2013; Haines und Linacre 2016). Im Gegensatz dazu liegt die DNA der Haarschäfte stark degradiert vor (Brandhagen et al. 2018).

Ziel aktueller Forschung ist die Klärung der Frage, welche Mechanismen an der Aktivierung und Einleitung eines neuen Wachstumszyklus beteiligt sind, die von der Dermalpapille und multipotenten Stammzellen in einer Ausbuchtung, dem sogenannten *Bulge*, ausgehen und zur Bildung eines neuen Haarschaftes führen (Blanpain et al. 2004; Panteleyev et al. 2001; Taylor et al. 2000).

1.4.3 Humane und canine Haare sind anhand der Morphologie unterscheidbar

Einzelne Haare von Menschen und Tieren sind eine häufig vorkommende Spur an Tatorten, wobei Haare in der telogenen Wachstumsphase die Mehrheit dieser Haare darstellen (Hellmann et al. 2001) In den letzten Jahren hat die Untersuchung von Wild- und Haustieren in der forensischen Genetik zunehmend an Bedeutung gewonnen. Im Jahr 2020 lebten 10,7 Mio. Hunde in privaten Haushalten in Deutschland. Hunde sind daher direkt nach Katzen die zweitbeliebtesten Haustiere in Deutschland (Statista 2021). Aufgrund dieses hohen Kontaktniveaus sind ausgefallene Hundehaare häufig an Tatorten zu finden und können einen Menschen mit einem Tatort in Verbindung bringen, wenn die Haare von einem einzelnen Hund stammen (Ganço et al. 2009; Blackie et al. 2015). Hundehaare bleiben an Kleidung, Teppichen und anderen Oberflächen haften (Blackie et al. 2015). Da Hundehaare sehr einfach durch Sekundärübertragung (englisch *secondary transfer*) weiter verteilt werden können, kann die DNA-Profilierung von Hunden keinen kategorischen Beweis dafür liefern, dass sich ein Mensch am Tatort befand, aber sie kann sehr starke Hinweise für die weitere Untersuchung von Straftaten liefern (Deedrick D. W. 2000). Weitere Gründe zur Identifizierung eines bestimmten Tieres sind unter anderem die Klärung von Bissspuren (Eichmann et al. 2004; Dobosz et al. 2009; Fonseca et al. 2015), der Artenschutz, die Bestimmung des Geschlechts sowie die Rekonstruktion ungeklärter Todesfälle, Morde und anderer Straftaten. Es können an einem Tatort Tiere selbst Opfer von Gewalt werden (zum Beispiel durch Tiermissbrauch) oder sogar als "Mordwaffe" eingesetzt werden (Modrow et al. 2016). Die DNA-analytische Untersuchung biologischer Spuren tierischen Ursprungs wird unter anderem im Auftrag des Zoll, der Polizei, von Umweltschutzbehörden und von Gerichten angeordnet. Eine genetische Analyse caniner Genome ist ebenfalls für Züchtungen von Interesse, wobei in diesem Bereich vor allem die Mischlings- und Abstammungsanalysen von Bedeutung sind (Modrow et al. 2016). Das Thema der forensischen STR-Typisierung bei Hunden ist im Vergleich zur STR-Typisierung beim Menschen relativ neu, während die Arbeit mit mitochondrialer DNA bei Hunden häufiger vorkommt.

Es ist mittels mikroskopischer Untersuchung für geschulte Fachkräfte relativ einfach, Hundehaare von menschlichem Haar anhand morphologischer Eigenschaften zu unterscheiden (**Abbildung 2**), wobei die Wurzelform, die Färbung (gebändert oder uniform), die Pigmentierung des Cortex, die Struktur der Medulla und die Schuppen-Formation der Cuticula berücksichtigt werden, während sich die Bestimmung der genauen Tierart über die Morphologie der Haare als sehr schwierig gestalten kann (Tridico et al. 2014; Teerink Cambridge University Press, New York, NY, 1991p. 221.; Bowers und Koen 2017; Moore 1988; Sato et al. 2006). Hundehaare weisen eine typische Grannenform auf (Madea 2004), sind spitz zulaufend und speerförmig. Im Gegensatz dazu erinnert die Kolbenwurzel telogener Menschenhaare an die typische Form von handelsüblichen Wattestäbchen.



Abbildung 2: Typisches Aussehen von Hunde- und Menschenhaaren

Dargestellt sind die morphologischen Unterschiede zwischen telogenen Haaren von Hunden und Menschen anhand von Fotografien. Gezeigt ist ein canines Deckhaar und ein humanes Kopfhaar.

Hunde besitzen zwei unterschiedliche Haartypen, das Deckhaar (Grannenhaare, Primärhaar, Schutzhaar, englisch *guard hairs*) und die Unterwolle (Wollhaare, Sekundärhaar). Die Behaarung der Hunde besteht entweder aus einer einlagigen Behaarung oder aus zwei verschiedenen Haartypen (Deckhaar und Unterwolle), die büschelweise aus demselben Haarfollikel entspringen und daher mehrschichtig sind (Müntener et al. 2011). Die umgangssprachliche Bezeichnung „Fell“ kann entweder bedeuten, dass mehrere Haare aus demselben Follikel entspringen oder dass eine doppelte Behaarung in Deckhaar und Unterwolle vorliegt. Die Deckhaare sind dicker und sorgen für mechanischen Schutz, Farbe und Textur, während die weichen und sehr feinen Haare der Unterwolle für die Temperaturisolierung von Bedeutung sind (Whitaker und Ostrander 2019). Im Gegensatz dazu wachsen Menschenhaare als Einzelhaare aus den Follikeln heraus. Während menschliche Haare in der Regel einfarbig sind, können vor allem die Deckhaare der Hundehaare in verschiedenen Farben gebändert sein (agouti (Bannasch et al. 2021)), während die Unterwolle in der Regel einfarbig ist. Deckhaare sind dick und borstig, wohingegen die Haare der Unterwolle wesentlich feiner, dünner und weicher sind. Einige Hunderasen (zum Beispiel der Pudeln) besitzen nur das Deckhaar. In diesem Fall fehlt die Unterwolle und die gesamte Behaarung wird nicht als Fell bezeichnet, sondern als Haarmantel. Taktile Haare (Schnurrhaare) und Spezialhaare (Haare des Schwanzes und der Mähne) gehören nicht zum Fell und werden in der Regel nicht in forensischen Untersuchungen untersucht.

1.4.4 Die Untersuchung mitochondrialer DNA aus Haaren

Es ist bereits bekannt, dass die mitochondriale DNA (mtDNA)-Analyse neben dem Einsatz in taxonomischen Studien (Pfeiffer et al. 2004; Wetton et al. 2003) in einigen Fällen einen starken Hinweis auf einen Tatzusammenhang in der forensischen Molekulargenetik darstellen kann (Halverson und Basten 2005; Schneider et al. 1999). Vor allem bei Spurentypen wie ausgefallenen Einzelhaaren, von denen die nukleäre DNA aufgrund von extremer DNA-Degradierung häufig nicht für die Identifizierung von Personen genutzt werden kann, wird die mtDNA genutzt. Bisher wurde gezeigt, dass die mtDNA-Menge und Integrität mit der Länge des Haarschafts abnimmt und im Haarschaft in geringeren Mengen vorkommt als die extrem degradierte nukleäre DNA (Brandhagen et al. 2018). Neben der nukleären DNA wird die mtDNA während der apoptotischen Prozesse und der Keratinisierung während der katagenen Wachstumsphase von Haaren ebenfalls degradiert. Allerdings weist mtDNA gegenüber nukleärer DNA den Vorteil auf, dass sie in ungefähr tausendfacher Kopien-Anzahl pro Zelle vorliegen kann (Linch et al. 2001; Bengtsson et al. 2012), während die humanen Chromosomen lediglich zweifach vorkommen und beide chromosomale Loci für eine korrekte STR-Profilierung vorhanden sein müssen. Die zirkuläre Form könnte zudem stabiler gegen DNA-Degradierung schützen als die lineare Form der Chromosomen (Thiriveedhi V.K. 2019). Mittlerweile wurde bereits gezeigt, dass mtDNA in den Haarschaften ausgefallener Haare in ausreichender Kopien-Zahl vorhanden ist und trotz DNA-Degradierung erfolgreich per PCR amplifiziert werden kann (Grisedale et al. 2018). Allerdings bieten mtDNA-Profile nicht die Unterscheidungskraft von nukleären DNA-Profilen, da mtDNA-Profile Haplotypen darstellen und zudem die mtDNA ausschließlich maternal vererbt wird. Dadurch kann nicht zwischen mütterlich verwandten Genotypen unterschieden werden, wodurch die Identifizierung eines Individuums nicht möglich ist (Grisedale et al. 2018; Sullivan et al. 1992; Levin et al. 1999; Bender et al. 2000).

1.4.5 Der Erfolg der Analytik nukleärer DNA aus Haaren hängt von mehreren Faktoren ab

In einigen Publikationen wurde davon berichtet, dass der Erfolg der nukleären DNA-Amplifikation von menschlichen Einzelhaaren von der Anwesenheit kernhaltiger Zellen abhängt (Ottens et al. 2013; Haines et al. 2015; Haines und Linacre 2016). Dabei wurden ebenfalls die Erfolge durch "direkte" PCR-Amplifikationen (ohne separaten DNA-Extraktionsschritt) und der Nutzen der Färbungen von vorhandenen Zellkernen in Korrelation zu Allel-Ausbeuten der STR-Marker untersucht.

Da kernhaltige Zellen vor allem in der Wachstumsphase und daher am anagenen menschlichen Haar aufzufinden sind, erzeugen anagene Haare in der Regel zumindest weitestgehend vollständige STR-Profile, vor allem wenn auf die separate DNA-Extraktion verzichtet wird (Ottens et al. 2013). Es wird daher davon ausgegangen, dass vor allem anhaftende Zellen der Wurzelscheide genügend intakte DNA bereitstellen (Ottens et al. 2013). Ottens et al. stellten daraufhin die Hypothese auf, dass telogene und ausgefallene menschliche Haare für die STR-Typisierung genutzt werden können, sofern diese Haare ausreichend Reste des Haarwurzelmaterials aufweisen. Mittels "direkter" Amplifikation ohne vorhergehende DNA-Extraktion wiesen Ottens et al. partielle oder vollständige STR-Profile von telogenen Einzelhaaren nach.

Um kernhaltige Zellen an menschlichen Haaren sichtbar zu machen, identifizierten Haines et al. unterschiedliche Farbstoffe (unter anderem Diamond™ Nucleic Acid Dye, EvaGreen™), welche Zellkerne histologisch anfärben und die nachfolgende "direkte" PCR-Amplifikation und die Kapillarelektrophorese nicht inhibieren (Haines et al. 2015).

In einer nachfolgenden Studie zeigten Haines et al., dass der Erfolg der STR-Typisierung von der Anzahl der kernhaltigen Zellen beeinflusst wird: 55% der elf untersuchten, aus der Kopfhaut herausgezupften Haare mit mehr als 100 Kernen erzeugten vollständige Profile. Im Gegensatz dazu wiesen ausgefallene Haare – die vermutlich überwiegend im telogenen und exogenen Stadium vorlagen – keine Zellkerne oder maximal 20 Zellkerne auf und wiesen, unabhängig von der Anzahl der Zellkerne, lediglich maximal 40% der STR-Allele der Referenzprofile auf. Damit stimmten die Ergebnisse von Haines et al. mit alternativen Studienergebnissen überein, die ebenfalls nachgewiesen haben, dass Haare mit einer geringen Anzahl an Zellkernen keine ausreichenden STR-Profile generieren können (Edson et al. 2013; Lepez et al. 2014). Haines zeigte jedoch zum ersten Mal, dass diese schlechte Ausgangssituation von ausgefallenen Haaren nicht wesentlich durch die Technik der "direkten" PCR-Amplifikation – mit der DNA-Extraktions-bedingter DNA-Verlust reduziert wird – verbessert werden kann, die zumindest bei anagenen Haaren von Vorteil sein kann.

Edson et al. zeigten, dass 35% der telogenen menschlichen Haare Zellkerne besaßen und von den insgesamt 998 Haaren, die mikroskopisch nach einer Haematoxylin-Färbung analysiert wurden, 6% der Haare mehr als 100 Zellkerne aufwiesen, wobei die Anzahl der Zellkerne in einer Korrelation mit dem Erfolg der STR-Typisierung zu stehen schien. Erst ab einer Anzahl von mehr als 20 Zellkernen wurden Teilprofile in der STR-Typisierung erzielt. Im Bereich zwischen 20 und 100 Zellkernen variierte die Anzahl der STR-Allele sehr stark. Dies kann dem geschuldet sein, dass einzelne Zellkerne im Zuge der mikroskopischen Fokussierung übersehen wurden. Insgesamt fiel der Erfolg der STR-Typisierung bei Haaren mit einer hohen Anzahl an Zellkernen größer aus als bei geringer Anzahl an Zellkernen oder ohne Zellkerne. Diese Zellkerne befanden sich zum Teil im anhaftenden Gewebe der Haare, das zum Teil in großer Menge vertreten und eindeutig unter dem Mikroskop sichtbar war. Zellkerne konnten von Edson et al. durch die Haematoxylin-Färbung (sowie in Lepez et al. mittels der DAPI-Färbung) jedoch auch an Stellen von telogenen Haaren nachgewiesen werden, die kein sichtbares Gewebe aufwiesen (Edson et al. 2013; Lepez et al. 2014). Aufgrund dessen könnten die Studien von Edson et al. und Lepez et al. dahingehend kritisiert werden, dass diejenigen Haare, die aufgrund von anhaftendem Gewebe, gute Erfolge der STR-Typisierung erzielten, keine frühen telogenen Haare (an denen noch Reste der Verankerung auftreten können, (Linch et al. 2001)) sein können, sondern einer der Endphasen der katagenen Wachstumsphase zuzuordnen seien (Edson et al. 2013).

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass Zellen des Epithelsacks (Harding und Rogers 1999; Bourguignon et al. 2008), der in der katagenen Phase ausgebildet wird, beziehungsweise Reste von anhaftenden Wurzelscheidezellen (Alonso und Fuchs 2006) der Grund sind für das Auffinden von Geweberesten an telogenen Haaren, die zum Teil die STR-Typisierung ermöglichen (Linch et al. 2001). Der Haarschaft und die Kolbenwurzel sind komplett keratinisiert, wodurch eine erfolgreiche Analyse der nukleären DNA des Haarschaftes aufgrund der enormen Degradierung und der geringen verbliebenen Menge der nukleären DNA selbst als sehr herausfordernd angesehen wird, während die Analyse von mtDNA möglich ist (Robertson et al. 2007). Einige Arbeitsgruppen empfehlen daher eine Färbung der Zellkerne, die Voraussagen über den Erfolg der nachfolgenden Profil-Erstellung von einzelnen Haarwurzeln in einem gewissen Rahmen erlauben (Lee et al. 2017; Edson et al. 2013; Lepez et al. 2014; Haines und Linacre 2016; Szabo et al. 2012). Allerdings stießen diese Methoden im Fall der telogenen Einzelhaare mit einer geringen Anzahl an Zellkernen an ihre Grenzen, denn je stärker die DNA degradiert vorliegt, desto häufiger scheitert indessen die STR-Analyse (Opel et al. 2008). Vollständige STR-Profile können von diesen Haaren daher generell nicht erwartet werden (Edson et al. 2013; Lepez et al. 2014).

Neben dem Nachweis von Zellkernen in Resten von Gewebearhängen an telogenen Haaren, wurde in der Vergangenheit ebenfalls per qPCR-basierter Analyse der DNA-Menge und -Integrität aus Haaren die generelle Eignung der vorkommenden DNA untersucht, die DNA zur Identifizierung zu nutzen. Der hohe Degradierungsgrad und die geringe DNA-Menge ist bezeichnend für DNA aus telogenen Einzelhaaren (Opel et al. 2008; Bourguignon et al. 2008; Edson et al. 2013; Lepez et al. 2014; Haines und Linacre 2016; Lee et al. 2017; Szabo et al. 2012). Die DNA-Integrität, gepaart mit der DNA-Menge, eignet sich prinzipiell dazu, den Erfolg der STR-Typisierung vorauszusagen. Zupanič Pajnič et al. haben die Nützlichkeit quantitativer PCR-Assays zur Beurteilung der DNA-Integrität gezeigt, um eine erfolgreiche STR-Analyse aus Skelettresten vorauszusagen (Zupanič Pajnič et al. 2017). In ähnlicher Weise wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob die DNA-Integrität als Metrik für die Voraussage der STR-Typisierbarkeit der DNA telogener Einzelhaare dienen kann.

1.4.6 Die Analytik von nukleärer DNA aus Hundehaaren

Es wurden einige STR-Typisierungskits entwickelt, um Hunderassen und einzelne Hunde zu identifizieren (van Asch und Pereira 2010; Berger et al. 2014; Linacre et al. 2011; Wictum et al. 2013; Kun et al. 2013; Ogden et al. 2012; Kanthaswamy 2015), die auch in der Bestimmung von individuellen Tieren durch den Spurentyp des Hundehaars eingesetzt werden können.

Es wird angenommen, dass ausgefallene Haare von Hunden, insbesondere die kurzen, permanent ausfallenden Wollhaare, für eine konventionelle STR-Analyse schlecht geeignet sind, weil sie zu wenig DNA aufweisen (Budowle et al. 2005). Bei der DNA-Analyse von Hundehaaren wird daher häufig zuerst morphologisch zwischen Deckhaaren und Unterwolle unterschieden und die nachfolgende Strategie auf den Spurentyp angepasst. Für die Untersuchung der Unterwolle ist es üblich, Hundehaare zu poolen, um die DNA-Menge zu erhöhen und den Allelic Drop-out zu reduzieren, der bei der Analyse von Haaren üblich ist (McNevin et al. 2005; Bengtsson et al. 2012). Bisher wird behauptet, dass die STR-Typisierung von genomischer DNA aus Proben von bis zu zehn Hundehaaren in der Forensik häufig problematisch ist. In früheren Studien konnten vollständige oder nahezu vollständige DNA-Profile von Hundehaaren erhalten werden, wenn mehr als zwei Haare zusammengefasst wurden (Pfeiffer et al. 2004; Ganço et al. 2009; Dobosz et al. 2009). Im Gegensatz dazu zeigten einzelne telogene Hundehaare einen sehr geringen DNA-Gehalt und fast nie vollständige Profile (Pádár et al. 2002; Dayton et al. 2009). Blackie et al. erhielten jedoch einige fast vollständige Profile, wenn einzelne Hundehaare des Deckhaares analysiert wurden, wobei keine Haare der Unterwolle untersucht wurde. Permanent ausfallende Wollhaare des Hundes sind wie menschliche telogene Haaren offensichtlich für eine konventionelle STR-Analyse schlecht geeignet, da sie zu wenig DNA enthalten (Blackie et al. 2015). Daher werden meist lediglich die Deckhaare verwendet, die zwar auch telogen sind, aber mehr Erfolg versprechen. Blackie et al. führten die hohe Rückgewinnung von Allelen aus einzelnen Deckhaaren auf die "direkte" PCR-Amplifikation ohne separate DNA-Extraktion zurück.

Es existieren eine Reihe von STR-Kits, die gezielt hundespezifische STR-Marker amplifizieren, deren Allelfrequenzen bekannt sind. STR-Panels für die Individualidentifizierung von Hunden und der Untersuchung von rassenspezifischen Unterschieden werden vor allem von der (Canine DNA Profiling (CaDNAP)) Gruppe der Internationalen Gesellschaft für Forensische Genetik (ISFG) und der Internationalen Gesellschaft für Tier-Genetik (ISAG) entwickelt und untersucht (Berger et al. 2014; Linacre et al. 2011). Dabei liegt ein Schwerpunkt der Forschung neben der Bestimmung

des individuelle Tiers auf der Eingrenzung der in Betracht kommender Hunderassen (Budowle et al. 2005; Zenke et al. 2015). Für die gezielte Amplifikation degradierter DNA sind vor allem STR-Kits geeignet, die besonders kurze STR-Marker nutzen, wie beispielsweise das Mini-DogFiler Kit (Kun et al. 2013).

Für eine STR-Analyse einzelner ausgefallener Hundehaare wäre eine vorgeschaltete Bestimmung der DNA-Menge und -Integrität möglicherweise vorteilhaft. Diese könnte als Voraussage über den Erfolg der nachfolgenden Typisierung genutzt werden. Bisher wurde jedoch der Zusammenhang zwischen der DNA-Menge und -Integrität zum Erfolg der STR-Typisierung für die DNA aus Hundehaaren noch nicht systematisch untersucht. Dementsprechend wurden häufig photometrische Methoden (Pfeiffer et al. 2004; Ganço et al. 2009; Eichmann et al. 2004; Berger et al. 2014; Dayton et al. 2009; Berger et al. 2018; Clements et al. 2008) zur Quantifizierung verwendet, oder es wird auf das Quantifizieren verzichtet, obwohl qPCR-Methoden zur Quantifizierung genomischer caniner DNA bereits verfügbar sind (Evans et al. 2007; Walker et al. 2004; Kanthaswamy et al. 2012; Clements et al. 2006).

1.5 Herausforderungen für die STR-Profilierstellung von degradierter DNA geringer Menge für die molekularbiologische Forensik

1.5.1 Degradierung und Menge der DNA in ausgefallenen Haaren

Die Analyse von DNA aus telogenen Einzelhaaren ist sehr anspruchsvoll, da die DNA aus keratinisierten Zellen nicht nur quantitativ sehr gering, sondern auch stark degradiert vorliegt (Linch et al. 2001; Bengtsson et al. 2012). Bei menschlichen Haaren führen die Prozesse der Beendigung der Wachstumsphase, wie apoptotische Prozesse und Keratinisierung von Haarbestandteilen, sowie der Wegfall Zellkern-haltiger Gewebe wie den Wurzelscheiden, zu DNA-Fragmenten mit einer Länge von etwa 100 bp (Matsuda et al. 1997) bis etwa 200 bp (Teraki und Shiohara 1999). Diese Länge stellt die Obergrenze für Allele dar, die aus vollständig keratinisierten telogenen Einzelhaaren gewonnen werden können. Darüber hinaus können exogene Faktoren, die nach dem Ausfall des Haares auf dieses einwirken, die DNA beschädigen. Beispiele für diese Faktoren sind Umweltbedingungen wie Temperatur, UV-Strahlung, Feuchtigkeit, niedriger pH-Wert und der Befall von Bakterien und Pilzen (Kun et al. 2013; Bengtsson et al. 2012).

Es wird zugleich vermutet, dass die keratinisierte Struktur der Haare, die unter günstigen Umweltbedingungen lagern, die DNA gegen weitere Degradierung schützt und dadurch konserviert. DNA-Degradierung von ancient DNA (aDNA) wurde in der Vergangenheit in der Verbindung mit Wasser beobachtet, was die hydrolytische DNA-Degradierung betreffen könnte (Pääbo et al. 1989; Bengtsson et al. 2012). Da die Keratinisierung mit Wasserverlust einhergeht, mithin eine natürliche Trocknung darstellt, wäre es möglich, dass DNA-Fragmente, die durch Apoptose und Keratinisierung verblieben sind, konserviert in den Haaren vorliegen und durch weitere Degradierung geschützt sind (Bengtsson et al. 2012).

Die entstehenden sehr kurzen DNA-Fragmente, die möglicherweise vollständig amplifizierbare STR-Loci enthalten, könnten um Histonproteine gewickelt sein und wären dann von der Degradierung weniger betroffen. Das Vorhandensein solcher sogenannter „nukleosom-geschützter STRs“ wurde 2016 postuliert (Dong et al. 2016), aber noch nicht experimentell bestätigt.

Für die Analyse von nukleärer DNA aus Haaren wird meist die Kolbenwurzel des Haares verwendet, da DNA aus der Kolbenwurzel höhere DNA-Mengen aufweist als aus dem

Haarschaft (McNevin et al. 2005; Opel et al. 2008; Higuchi et al. 1988). Im Vergleich dazu weisen anagene Haare aufgrund der anhaftenden Zellen DNA-Ausbeuten im Bereich von einigen Nanogramm DNA auf (Higuchi et al. 1988; Haines und Linacre 2016). In der Praxis werden daher katagene und ausgefallene Haare lediglich in den Fällen in die DNA-Analytik eingeschlossen, wenn keine anderen Spuren vorliegen, die erfolgsversprechender sind. Die DNA-Menge aus ausgefallenen Haaren bewegt sich in einem Bereich von wenigen hunderten Pikogramm DNA oder weniger, zum Teil wurden DNA-Konzentrationen von nur wenigen Pikogramm DNA pro μL erhalten (Edson et al. 2013; Haines und Linacre 2016). Durch die geringe DNA-Menge ausgefallener Einzelhaare weist die DNA dieses Spurentyps Effekte auf, die typisch sind für *Low Copy Number-DNA*.

1.5.2 Low Copy Number-DNA

Schwierige Spurentypen, dessen DNA unterhalb der empfohlenen Einsätze für Amplifikations-Reaktionen fallen, werden häufig als sogenannte *Low Copy Number-DNA* (LCN-DNA) bezeichnet.

Typisch für die STR-Analytik von LCN-DNA ist das Vorkommen stochastischer Effekte wie ungewöhnlich hohe Stotter-Allele, sowie Intralocus-Imbalancen (Imbalancen der Peak-Höhen der Allele innerhalb des STR-Markers, siehe **Kapitel 1.2.2**) und Interlocus-Imbalancen (Imbalancen der Peak-Höhen der Allele, die sich zwischen den STR-Markern im gesamten Multiplex unterscheiden), bis zum Ausfallen der Allele (Gill 2001b; Gill et al. 2012; Budowle et al. 2009; van Oorschot et al. 2010; Benschop et al. 2013). Weiterhin sind diese Spurentypen besonders gefährdet durch die Kontamination von Fremd-DNA, da lediglich wenige fremde DNA-Moleküle ausreichen, um die unterschiedlichen verursachenden Personen im resultierenden Mischprofil aufgrund der Peak-Höhen nicht unterscheiden zu können (Gill 2001b; Gill et al. 2012). Aufgrund der vielfältigen Effekte im stochastischen Bereich zeichnet sich LCN-DNA durch inkonsistente Ergebnisse und daher durch eine besonders schlechte Reproduzierbarkeit der STR-Ergebnisse aus, die folglich schwierig zu interpretieren sind (van Oorschot et al. 2010; Balding und Buckleton 2009), vor allem wenn mehrere Personen an der Legung von Mischspuren bestehend aus LCN-DNA beteiligt waren (Pfeifer et al. 2012).

Die DNA-Menge typischer LCN-DNA bewegt sich in dem Mengenbereich, der bei Einsatz in STR-Assays zu vereinzelt Peak-Höhen führt, die unterhalb des stochastischen Schwellenwerts liegen (McNevin et al. 2015). Aufgrund hochsensitiver STR-Assays wurde die entsprechende Menge mit weniger als 200 pg (Budowle et al. 2009) beziehungsweise weniger als 100 pg (Gill et al. 2000b) angegeben. Moderne CE-basierte STR-Kits wie der PowerPlex® ESX 17-Kit, der in der vorliegenden Studie verwendet wurden, weisen keine Drop-outs oder Drop-ins im Bereich bis 62,5 pg intakter DNA auf (Tucker et al. 2012).

Zuweilen wird der Begriff LCN zur Kennzeichnung dezidierter Protokolle verwendet, mit denen DNA mit wenigen Ausgangsmolekülen höhere STR-Peaks als mit dem Standard-Vorgehen erreichen können. Neben einer verlängerten Dauer der DNA-Injektion zu Beginn der kapillarelektrophoretischen Fragmentlängenauftrennung zählt dazu die Erhöhung der PCR-Zykluszahl auf 34 Zyklen oder mehr, die normalerweise zwischen 28-30 Zyklen liegt, häufig gepaart mit einer nachträglichen Aufreinigung der PCR-Amplifikate (McNevin et al. 2015; Gill 2001b; Forster et al. 2008; Budowle et al. 2009; Smith und Ballantyne 2007). Die Erhöhung der Zykluszahl zielt auf höhere Fluoreszenzwerte, also Peak-Höhen in RFU, hat jedoch zur Folge, dass stochastische Effekte, beispielsweise Intralocus-Imbalancen, sowie Stotter-Allele und Drop-in- sowie

Drop-out-Ereignisse ebenfalls in der Intensität zunehmen, da sie exponentiell vermehrt werden. Dadurch besteht die Gefahr, dass sie gegebenenfalls über den analytischen beziehungsweise stochastischen Schwellenwert gelangen (Gill 2001b; Gill et al. 2000b; Balding und Buckleton 2009). Manche Arbeitsgruppen raten daher von der LCN-Methode für die Analyse von DNA aus telogenen Haaren ab (Edson et al. 2013). Ein neuerer Ansatz für den Umgang mit LCN-DNA ist die PCR-Amplifikation in reduziertem PCR-Volumen, die sogenannte *low volume-PCR*, wobei die Sensitivität aufgrund höherer DNA-Konzentration, erhöht wird (McNevin et al. 2015; Schmidt et al. 2006).

Da Allelic Drop-outs typischerweise bei niedrigen Template-DNA-Mengen auftreten, werden Berechnungen von Drop-in- und Drop-out-Wahrscheinlichkeiten vor allem in Literatur beschrieben, die von *Low Copy Number*-DNA handelt (Gill et al. 2000b; Gill et al. 2012), meist in Kombination der Mischspuren-Problematik. Die Handhabung von Berechnungen von Drop-in- und Drop-out-Wahrscheinlichkeiten sind häufig Teil von Software, die probabilistische Genotypisierung vornimmt (Taylor et al. 2013).

1.5.3 Bedeutung für die Analyse von DNA aus einzelnen, telogenen Haaren

Im Gegensatz zur *Low Copy Number*-DNA beschreibt der Begriff der *Low Template*-DNA (LT-DNA) solche Spurentypen, die - zusätzlich zur geringen DNA-Ausgangsmenge oder als Alleinstellungsmerkmal - eine problematische DNA-Integrität aufweisen. LT-DNA zeigt daher die in den **Kapiteln 1.2.2** und **1.5.2** beschriebenen Effekte und ist zusätzlich von der DNA-Degradierung betroffen (Gill 2001b; Balding und Buckleton 2009; McNevin et al. 2015).

LT-DNA weist aufgrund der Degradierung kurze DNA-Fragmente auf, die prinzipiell zum Teil oder vollständig amplifizierbare STR-Loci enthalten können. Je kürzer die DNA-Fragmente sind, desto wahrscheinlicher ist es, dass bevorzugt lange STR-Amplikons ausfallen, wodurch sich der Skipisten-Effekt (englisch *ski slope effect*, **Abbildung 19 B**) ergibt, der ein typisches Zeichen für degradierte und DNA und/oder Inhibition ist (Solomon et al. 2018; Zhong et al. 2019). Der Skipisten-Effekt beschreibt Elektropherogramme, deren Peaks umso geringere RFU-Werte aufweisen, je länger die Amplikons innerhalb des CE-Kanals sind (Peak-Höhen daher typischerweise von links nach rechts abnehmend).

STR-Profile degradiert DNA telogener und exogener Einzelhaare zeigen daher häufig Intralocus-Imbalancen, hohe Stotter-Allele, inkonsistenten Ergebnissen beziehungsweise schlechte Reproduzierbarkeit, sowie Allel- und Locus-Drop-out in hohem Maße (Bengtsson et al. 2012; McNevin et al. 2005; Edson et al. 2013). Daher zeigte die STR-Typisierung von telogenen Einzelhaaren eine relativ geringe Erfolgsrate, was zu unvollständigen DNA-Profilen führte (Opel et al. 2008; Hellmann et al. 2001).

1.5.4 Herangehensweise der Analyse von LT-DNA

Die Interpretation von STR-Profilen von LT-DNA gestaltet sich vor allem dann besonders schwierig, wenn Drop-ins und Drop-outs zu Nichtübereinstimmung, sogenannter Diskordanz, zu den Vergleichsprofilen führen, da sie Ausschlüsse erzeugen. Aufgrund dessen wurden Modelle für LT-DNA erstellt, welche die Wahrscheinlichkeiten von Drop-outs und Drop-ins mit in die Berechnungen zum wahrscheinlichsten Zustandekommen der Spur über die *Likelihood Ratio* (LR) mit einbeziehen (Balding und Buckleton 2009).

Aufgrund des Zusammenhangs von Amplikonlänge und Nachweisbarkeit bei degradiert DNA (Hara et al. 2015) ist die Reduzierung der Amplikon-Längen, durch Analyse

sogenannter Mini-STRs, ein effektives und häufig verwendetes Werkzeug, um STR-Loci selbst von degradiertem DNA erfolgreich zu amplifizieren und Drop-outs zu reduzieren (Wiegand und Kleiber 2001; Wiegand et al. 2006; Butler et al. 2003; Tsukada et al. 2002; Grubwieser et al. 2006; Hellmann et al. 2001; Opel et al. 2007), die typischerweise bevorzugt durch lange PCR-Zielregionen verursacht werden (Skipisten-Effekt (Solomon et al. 2018)). Als Folge wurde bereits in älteren Studien von erhöhten Erfolgsraten bei der STR-Typisierung von telogenen Einzelhaaren durch reduzierte Amplikonlängen berichtet (Hellmann et al. 2001).

Um Allelic Drop-ins und Drop-outs zu reduzieren, die in eingeschränkter Reproduzierbarkeit vorkommen, wird für die Analyse von LT-DNA die Analyse mehrerer Replikate der STR-PCR empfohlen (Gill et al. 2000b; Pfeifer et al. 2012). Für die Interpretation der Replikate der generierten STR-Profile existieren unterschiedliche Herangehensweisen, die sogenannten Consensus- und Composite-Interpretationsmethoden, wobei hier vor allem die Untersuchungen von Pfeifer et al. an Mischspuren aus LT-DNA erwähnenswert ist. Per Consensus-Strategie werden alle reproduzierbaren Allele gezählt, die in den Replikaten mindestens zweimal vorkommen, während bei der Composite-Interpretation alle Allele gezählt werden, selbst wenn diese nicht reproduzierbar sind (Pfeifer et al. 2012; Benschop et al. 2011; Bright et al. 2012).

Da stochastische Effekte wie Drop-outs und erhöhte Stotter-Allele, sowie Drop-ins häufig nicht reproduzierbar sind, stellt die Consensus-Interpretation eine effektive konservative Vorgehensweise dar, um den Einfluss stochastischer Effekte zu reduzieren, die vor allem bei komplexen Mischspuren von LT-DNA angewandt wird. Durch die Consensus-Interpretation fallen viele Drop-ins und erhöhte Stotter-Allele weg, wodurch die Menge der diskordanten (nicht mit dem Referenzprofil übereinstimmenden) Allele wegfällt. Jedoch fallen durch die Consensus-Methode ebenfalls viele Allele weg, die zum Referenzprofil konkordant sind, jedoch in den Replikaten nicht reproduzierbar aufgetreten sind. Für LT-DNA bleiben daher in Fällen starker DNA-Degradierung und geringer DNA-Menge zu wenige Allele übrig, um aussagekräftige Profile zu bilden (Benschop et al. 2011; Pfeifer et al. 2012; Benschop et al. 2013). Pfeifer et al. merkten bereits an, dass der Consensus-Ansatz als die etablierte Standard-Methode bei DNA großer Menge gilt, jedoch bei LT-DNA aufgrund der geringen Reproduzierbarkeit nur geringere Ausbeuten als der Composite-Ansatz hervorbringt (Pfeifer et al. 2012). Da Drop-ins weniger häufig auftreten als Drop-outs, wird daher in manchen Fällen die Composite-Methode genutzt. Composite-interpretierte STR-Profile weisen in den meisten Fällen höhere Grade der Übereinstimmung auf als mittels der Consensus-Strategie erreicht wurden, da nicht-reproduzierbare Allele nicht wegfielen (Pfeifer et al. 2012; Bright et al. 2012). Pfeifer et al. empfehlen daher bei per Composite-Methode interpretierten Profilen besonders vorsichtig umzugehen, da Drop-ins zu Ausschlüssen führen können. Es wird weiterhin empfohlen die Daten nicht zu überinterpretieren und die Anzahl der Replikate und Wahl der Kits sorgsam zu erwägen, da vor allem Amplikons kurzer Länge bei degradiertem DNA von Vorteil sind (Pfeifer et al. 2012). Bei ausreichender DNA-Menge sei die Consensus-Methode zu bevorzugen (Pfeifer et al. 2012). Dabei wurde nie Kit-abhängig definiert, welche DNA-Menge einer bestimmten Degradierung als „ausreichend“ angesehen ist – ein fixer Wert existiert daher nicht.

Die Anzahl der Replikate ist dabei eine weitere wichtige Fragestellung: Pfeifer et al. zeigten, dass die Consensus-Methode bei der Analyse von zwei Replikaten große Verluste an Informationen durch Drop-outs im Vergleich zur Composite-Methode aufweist, die sich bei einer Steigerung auf drei Replikate verringern. Dies könnte dadurch begründet werden, dass tatsächlich vorliegende Allele mit höherer Wahrscheinlichkeit mindestens zweimal nachgewiesen werden, wenn die Anzahl der Replikate erhöht wird. Pfeifer et al.

folgerten daraus, dass die Consensus-Methode mit drei Replikaten besser für die Analyse von LT-DNA geeignet ist als die Consensus-Methode mit zwei Replikaten (Pfeifer et al. 2012). Benschop et al. schlagen für die Consensus-Methode eine mindeste Übereinstimmung der Allele von zwei in vier Replikaten vor, was in Routine-Laboren aufgrund des erhöhten Arbeitsaufwands als nicht praktikabel angesehen wird (Benschop et al. 2011; Pfeifer et al. 2012; Budowle et al. 2009; McNevin et al. 2015). Pfeifer et al. stellten zudem fest, dass der Unterschied zwischen Composite- und Consensus-Interpretation umso größer ist, je geringer die analysierte DNA-Menge ist, da bei sinkender Menge die Anzahl der Drop-outs ansteigt.

McNevin hat typische LCN-Methoden angewandt, um den Erfolg der Typisierung von LT-DNA aus telogenen Einzelhaaren zu verbessern (McNevin et al. 2015). Dabei erwies sich die „klassische“ LCN-Methode (34 PCR-Zyklen) aufgrund vermehrter Drop-ins als kontraproduktiv, während ein reduziertes Reaktionsvolumen mit erhöhter-Polymerase-Menge mehr konkordante Allele generierte. Da die Consensus-Methode in einem Wegfall an Allelen resultiert, die nicht reproduzierbar sind, wurde von McNevin zusammengefasst, dass diese Vorgehensweise der reduzierten Reaktionsvolumina mit erhöhter Polymerase-Menge eine Consensus-Interpretation überflüssig mache. Wesentlich bei der DNA-Extraktion aus Einzelhaaren ist es, dass die DNA der Haare durch die Extraktionsmethode nicht noch weiter degradiert wird, da umso weniger STR-Allele nachgewiesen werden können, je stärker die DNA degradiert ist (Opel et al. 2008; Hara et al. 2015).

Um die Übereinstimmung des Spurenprofils mit einem bekannten STR-Profil zu vergleichen, entwickelten Pfeifer et al. den Validitätsgrad (Pfeifer et al. 2012). Dieser berücksichtigt im Gegensatz zur klassischen Definition der Konkordanz neben den Drop-out-Ereignissen ebenfalls die Drop-ins-Ereignisse (Berechnung siehe **Kapitel 2.17**) und gewichtet diese ungefähr gleich. Pfeifer et al. betonten, dass Drop-ins als problematischer zu bewerten sind als Drop-outs, da sich durch Drop-ins Übereinstimmungen zu den Profilen von nicht an der Spur beteiligten Personen ergeben könnten. Da jedoch Drop-ins wesentlich weniger häufig auftreten als Drop-outs, wird die Gewichtung als berechtigt angesehen (Pfeifer et al. 2012).

Neben den Methoden der Composite/Consensus-Interpretation existieren weitere Herangehensweisen wie die semi- oder vollständig kontinuierlichen probabilistischen Modelle oder das Bayessche Modell. Die genutzte Methode zur Interpretation von STR-Profilen, ist wohl zu definieren, da sonst der Vorwurf der Befangenheit beispielsweise durch *replicate shopping* aufgeworfen werden könnte, also der gezielten Auswahl eines Profils, das zur zu vertretenden Hypothese passt (Bright et al. 2012).

Weitere Möglichkeiten, die durch die DNA-Degradierung auferlegten Einschränkungen zu überwinden, basieren auf kürzeren STR-Amplifikaten, sogenannten Mini-STRs, die sowohl für menschliche DNA (Hellmann et al. 2001; Opel et al. 2007; Mulero et al. 2008; Wiegand und Kleiber 2001; Wiegand et al. 2006; Butler et al. 2003) als auch für canine DNA entwickelt wurden (Kun et al. 2013). Beispielsweise weist das AmpFLSTR MiniFiler-Kit (Thermo Fisher Scientific) lediglich Amplikon-Längen von unterhalb 270 bp auf (Mulero et al. 2008).

Daneben eignen sich auch komplementäre STR-Kits, welche dieselben Marker amplifizieren und in zwei Läufen die Ergebnisse der kurzen Amplikons beider Kits vereinigt werden können, wie es beispielsweise mit dem PowerPlex® ESX 17, ESI 17-Kits möglich ist (Hill et al. 2011). Die Humanidentifizierung mittels kurzer Amplikons ist jedoch nicht auf STR-Marker beschränkt. Assays, die auf SNPs und auf Insertionen/Deletionen (InDels) basieren, wie beispielsweise das InnoTyper® 21-Kit

(Grisedale et al. 2018) eignen sich aufgrund der kurzen Zielbereiche für die Amplifikation mittels sehr kurzer Amplikons. Das InnoTyper® 21-Kit nutzt neben einem Amelogenin-Marker 20 human-spezifische Alu-Retrotransposon-Marker sehr kurzer Länge (bis 125 bp), die aufgrund dessen für stark degradierte DNA aus Haarschäften geeignet sind und bisher vielversprechende Ergebnisse zeigten (Grisedale et al. 2018).

Herkömmliche STR-Kits weisen typische Nachteile auf, die auf der Technik der Kapillarelektrophorese beruhen, wodurch sie für die Anwendung mit degradierter DNA geringster Menge nicht ideal sind. Aufgrund der technisch-bedingten Einschränkungen von kapillarelektrophoretischen Auftrennungen der STR-Amplikons, weisen diese unterschiedlichen Längen auf, wodurch präferentielle Amplifikation stattfindet (Walsh et al. 1992): Je kürzer die Amplikons, desto besser werden sie amplifiziert, kommen in größerer Menge vor und dienen in größerer Menge als Template für den nächste PCR-Zyklus. Neben den typischen Effekten der LT-DNA wie Imbalancen und dem Skipisten-Effekt, kann präferentielle Amplifikation mit dazu beitragen, dass die Analyse degradiertes DNA aus telogenen Einzelhaaren selten erfolgreich ist. Neben der Verwendung von Mini-STRs weisen auch SNP-Assays einen Vorteil für die Analyse von degradiertes DNA aus, da SNP-Marker wesentlich kürzer sein können als STR-Marker und daher in den kurzen DNA-Fragmenten amplifiziert werden können (Hughes-Stamm et al. 2011).

Eine weitere Möglichkeit zur Analyse degradiertes DNA stellt daher die Humanidentifizierung durch *die Next Generation-Sequenzierung* (NGS) dar, wodurch die hochparallele Analyse einer Vielzahl von Amplikons uniformer Länge ermöglicht wird, wodurch präferentielle Amplifikation stark reduziert wird. Durch die Sequenzierung besonders kurzer STR-Amplikons hat sich NGS bereits als gut geeignet für die STR-Typisierung von degradierten DNA-Proben erwiesen (Kim et al. 2016) und könnte auch die STR-Typisierung telogener Einzelhaare verbessern.

1.6 Die Bedeutung von NGS-Techniken für die Forensik

Neben dem Nachweis der in der Forensik genutzten STR-Loci mittels der etablierten kapillarelektrophoretischen Analytik, existiert seit etwas mehr als 10 Jahren eine weitere Methode, die momentan als sinnvolle Ergänzung eingesetzt wird (Ballard et al. 2020). Dabei handelt es sich um Sequenzier-Techniken der *Next Generation Sequencing*, die auch als *Massively Parallel Sequencing* (MPS) oder *High Throughput Sequencing* (HTS) bezeichnet wird (Ng et al. 2018). Diese Begriffe sollten ursprünglich den enorme Vorteil durch eine innovative, neue Technik verdeutlichen. Nachträglich wurde sie auch als Sequenzierung der zweiten Generation bezeichnet, als Abgrenzung zu früheren, nicht parallelisierten Verfahren. Damit ist es möglich, nicht nur die Länge von DNA-Stücken zu bestimmen, sondern ihre Basenabfolge zu entschlüsseln.

Über 20 Jahre lang bestimmte die Sanger-Sequenzierung, welche nach dem Prinzip des Kettenabbruchs funktioniert, die molekularbiologische DNA-Sequenzierung (Sanger et al. 1977). Diese bietet den Vorteil hoher Genauigkeit und langer Leseweiten von ungefähr 1.000 Basenpaaren pro erzeugter Sequenz, allerdings unter der Beschränkung des Probendurchsatzes. Die Möglichkeit zum Multiplexen, der parallelen Analyse von unterschiedlichen Amplikons, besteht nicht. Dadurch ist die Technik sehr arbeitsintensiv und eignet sich nicht für den Einsatz in der Humanidentifizierung. Im Gegensatz dazu zeichnen sich verschiedene Techniken der Next-Generation-Sequenzierung durch ihre hohe Multiplexierbarkeit aus, wodurch eine hohe Parallelisierung, also Generierung gleicher und unterschiedlicher Sequenzen, sogenannter *Reads*, im selben Arbeitsschritt und daher in Relation sehr zeit- und kostengünstig erreicht wird. Den verschiedenen

Techniken ist gemein, dass zuerst einzelne Template-Moleküle erzeugt werden, entweder durch Fragmentierung hochmolekularer DNA, deren Fragmente sonach räumlich separiert einzeln amplifiziert werden, oder durch die gezielte Amplifikation bestimmter Loci per Multiplex-PCR. Anschließend wird jedes Amplifikationsprodukt separat als einzelnen Molekül sequenziert. Die Sequenzierung aller Fragmente erfolgt dabei parallel. Die Sequenzinformationen werden anschließend mittels bioinformatischer Werkzeuge wieder vereinigt, wobei die Informationen der unterschiedlichen, ursprünglich eingesetzten DNA-Proben voneinander unterscheidbar sind (Metzker 2010). Die gezielte Amplifikation, das sogenannte *Amplikon sequencing* wird unter anderem im diagnostischen Bereich und der Humanidentifizierung verwendet.

1.6.1 Das Illumina-Verfahren

Das NGS-Verfahren der Illumina-Sequenzierung existiert seit dem Jahr 2006 (Ansorge 2009) und funktioniert für alle Anwendungen nach dem gleichen Prinzip: Zur Erstellung einer Sequenzier-Bibliothek (englisch *library*) wird DNA mit Adaptern ligiert oder diese werden mittels Amplifikation an die Fragmente verankert. Dies geschieht für die forensischen Kits mittels mehrerer PCR-Amplifikationen, zwischen denen die PCR-Produkte gereinigt werden. In diesem Verfahren tragen die Amplikons vor den Adaptersequenzen sogenannte Indices, die in ihrer Kombination pro Bibliothek, also pro DNA-Probe, einzigartig in dem Gesamtansatz vorkommen. Einige forensische Kits, die auf dem Illumina-Verfahren basieren, können bis zu 96 Bibliotheken pro Ansatz parallel sequenzieren. Nach einer Quantifizierung werden die einzelnen Bibliotheken normalisiert und vereinigt (gepoolt). Durch die Normalisierung wird sichergestellt, dass keine der Bibliotheken im Gesamtansatz überwiegt.

Anschließend wird die gepoolte, finale Bibliothek denaturiert, und die einzelsträngigen Fragmente werden über komplementäre Adapter über eine Seite der Fragmente an einen Träger innerhalb eines mikrofluidischen Systems, der sogenannten *Flowcell*, gebunden. Die lokale Amplifikation der Fragmente zu Clustern geschieht dann über die isothermale Brücken-Amplifikation (englisch *bridge amplification* (Morozova und Marra 2008)). Dabei werden die Fragmente vermehrt, bis die *Flowcell* im Idealfall eine optimale Clustergröße der Amplikate erreicht. Die anschließende Sequenzierung basiert auf dem Prinzip des *sequencing by synthesis* (Shendure und Ji 2008), bei dem DNA-Polymerase, Sequenzierprimer und fluoreszenzmarkierte Nukleotide simultan der *Flowcell* zugegeben werden und pro Zyklus jeder Strang um ein Nukleotid verlängert wird, das am 3'-Ende durch einen Blocker vor weiterer Verlängerung geschützt ist. Nach jedem Zyklus werden die Fluorophore angeregt und die Reaktion wird als digitales Bild von einer hochauflösenden Kamera detektiert. Anschließend werden Blocker und Fluorophor abgespalten und der nächste Zyklus wird initiiert. Da alle DNA-Stränge auf der *Flowcell* von diesem Verfahren betroffen sind, werden alle Stränge parallel sequenziert (Mardis 2008). Anschließend gehen die Rohdaten, die während der Sequenzierung erzeugt wurden, in die Datenanalyse ein. Dabei werden die Bild-Dateien und Berechnungen zu Wahrscheinlichkeiten von bestimmten Basen an jeweiligen Positionen zusammengefügt, wodurch fastq-Dateien erzeugt werden, die während der Sequenzierung durch die Detektion jeder eingebauten Base generiert wurden und sowohl Basensequenz- als auch Qualitätsinformationen beinhalten (*base calling*). Dabei wird die Qualität der Sequenzen in der 7-Bit-Zeichenkodierung ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*) kodiert, welche sich in einen dezimalen Zahlenwert (Phred-Wert) umrechnen lässt. Der Phred-Wert gibt die Wahrscheinlichkeit des Einbaus einer inkorrekten Base (inkorrekte *base call*) an einer bestimmten Position innerhalb der Sequenzen an (Voelkerding et al. 2009). Um die Qualität aller Basen aller Sequenzen

des gesamten NGS-Laufs anzugeben, nutzt die Illumina-Software den prozentualen Anteil der Basen, die mindestens einen Phred-Wert von 30 aufweisen als Qualitätswert (Q30). Dies entspricht dem prozentualen Anteil aller Basen im gesamten NGS-Lauf, für die eine Wahrscheinlichkeit für einen inkorrekten *base call* von eins in 1000 angegeben wird, was einer Genauigkeit für einen korrekten *base call* von 99,9% entspricht.

Da die beidseitigen Illumina-Indices der Amplifikate in die Sequenzierung eingeschlossen sind, gewährleisten diese eine Zuordnung der Amplifikate zu der ursprünglichen, spezifischen DNA-Bibliothek.

1.6.2 Vorteile von NGS-Methoden gegenüber kapillarelektrophoretischer Analyse forensischer STR-Amplikons

Für Bereiche mit sich oft wiederholenden Sequenzen (*Repeats*) stellen kurze Sequenzen, die zur Sequenzierung genutzt werden, einen Nachteil dar, da diese nicht eindeutig an das Referenz-Genom kartiert werden können und repetitive Bereiche nicht überspannen können (Voelkerding et al. 2009). Dies gilt neben Genom-Kartierungen auch für die forensischen STR-Loci. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Illumina MiSeq FGx™-Gerät ist in der Lage bis zu $0,6 \times 10^{12}$ Basen (600 Gigabasen) bei einem Lauf zu generieren, mit Leseweiten bis zu 300 bp pro Read, die mittels *paired-end*-Technik zu 600 bp zusammengefügt werden können. Aufgrund der repetitiven Sequenzen der STR-Loci stellt diese vergleichsweise enorme Leseweite dieser Methode einen großen Vorteil dar, um den jeweiligen STR-Marker zu überspannen. Daher ist die NGS-Methode von 600 bp-langen Leseweiten neben der Technik der Kapillarelektrophorese für die Analyse von STR-Loci geeignet.

Im Gegensatz zur Sequenzierung kompletter Genome gewinnt die hochparallelisierte Sequenzierung von STR-Loci in der forensischen Genetik erst seit wenigen Jahren an Bedeutung. Für die routinemäßige Analyse von gewöhnlichen Spuren reicht die CE-Methode meist aus, ist in den kriminaltechnischen Instituten etabliert und validiert, ist vergleichsweise kostengünstig und fordert wenig Ressourcen. Da die Kapillarelektrophorese vor den Gerichten als valide Methode anerkannt ist, wird diese Methode bedenkenlos verwendet. Die NGS-basierte STR-Analyse wird daher heutzutage immer noch primär in Ausnahmefällen eingesetzt, wo die konventionelle Analyse der STR-Loci per CE erfolglos bleibt. Die alternative Technologie der NGS kann vor allem bei schwierigen DNA-Spuren wie degradierter DNA und der Mischspuranalyse bessere Erfolgchancen bieten sowie einen enormen Informationsgewinn und stellt für diese Spuren daher einen Fortschritt gegenüber der Kapillarelektrophorese dar.

Die per NGS sequenzierten STR-Loci enthalten neben den Informationen über die Länge der Amplikons auch die Information über die Basenabfolge. Dadurch ist es möglich, zusätzliche Sequenzvarianten, sogenannte Isoallele, zu finden, die mittels der Kapillarelektrophorese nicht erfasst werden können (Kim et al. 2016; Gettings et al. 2015). Diese Isoallele zeichnen sich durch dieselben Längen der Amplikons, aber durch Varianten innerhalb der Sequenzen aus. Solche Sequenzvarianten treten, zumeist als SNPs, sowohl innerhalb der STR-Wiederholungseinheiten, als auch innerhalb der flankierenden Sequenzen auf. Indem diese Sequenzvariationen zusätzlich zur Längeninformaton genutzt werden, wird die Diskriminationskraft beträchtlich erhöht (van der Gaag et al. 2016; Revoir et al. 2019; Silva et al. 2020; Benschop et al. 2021; Ballard et al. 2020; Kim et al. 2016; Gettings et al. 2015). Dies hat den Vorteil einer verbesserten Interpretation der Profile und kann zur Dekonvolution separater Profile individueller Personen bei Mischspuren beitragen (Benschop et al. 2021; Ballard et al.

2020; van der Gaag et al. 2016; Hoogenboom et al. 2017). Indem Sequenzvarianten sowohl in den Allelen als auch in vermeintlichen und tatsächlichen Stotter-Allelen aufgewiesen werden, stellen die Isoallele ein nützliches Werkzeug für die Analyse forensischer Spuren dar. Vor allem bei LT-DNA kann der Informationsgewinn durch die Sequenzvariationen von entscheidendem Vorteil sein. Die Technik der NGS könnte daher für die Analyse degradierter DNA geringer Mengen aus ausgefallenen Einzelhaaren gut geeignet sein. Da mittels NGS viele Allele in mehrere unterscheidbare Varianten aufgespalten werden, wird es notwendig, die momentane STR-Nomenklatur zur Benennung von Allelen anzupassen, was in der globalen forensischen Gemeinschaft diskutiert wird. Dabei ist es wichtig, dass eine neue Nomenklatur für NGS-erzeugte Daten kompatibel ist mit der herkömmlichen, auf CE-generierten Daten basierenden Nomenklatur (Phillips et al. 2018; Gettings et al. 2017; Parson et al. 2016; Gettings et al. 2019; Hoogenboom et al. 2021).

Daneben ist die Möglichkeit, eine sehr hohe Anzahl an Markern simultan in einer Reaktion zu analysieren (Multiplexen) und sehr viele Proben parallel zu bearbeiten, ein wichtiger technischer Vorteil der NGS-Technik gegenüber dem gegenwärtigen Standardverfahren der kapillarelektrophoretischen Fragmentanalyse (Churchill et al. 2016). Diese in Relation zu CE-basierten Assays stark erhöhte Anzahl an STR-Markern ist möglich, da die Technik der NGS die nicht durch die Anzahl der Kapillaren (im Vergleich zur Kapillarelektrophorese) begrenzt ist und Überlappungen der Größenbereiche der Amplikons (siehe **Kapitel 1.2.1**) in der NGS kein Problem darstellen (Ballard et al. 2020). Deshalb ermöglicht NGS die parallele Amplifikation von sehr kurzen Amplikons (Mini-STRs) für alle Marker, die im ähnlichen Längenbereich liegen. Durch die parallele Nutzung einer Vielzahl von Mini-Amplikons ist die NGS-Technik ideal für die Typisierung degradierter DNA geeignet. Da alle NGS-analysierten Amplikons theoretisch homogene Längen aufweisen können, wird auch der möglichen präferentiellen Amplifikation kurzer Amplikons begegnet.

1.6.3 Forensische Assays, die auf NGS basieren

Die unterschiedlichen NGS-Verfahren, die sich in der forensischen Genetik durchgesetzt haben, unterscheiden sich in der Funktionsweise zwischen den jeweiligen Herstellern. Es existieren zur Zeit zwei populäre Systeme, die forensisch validiert worden sind und sich in der verwendeten Technik unterscheiden, die Illumina-Sequenzierung auf dem MiSeq FGx™ Forensic Genomics System und das Ion Torrent-Verfahren (Thermo Fisher Scientific). Einige Kits und Panels gewährleisten neben der reinen, klassischen STR-Analytik der autosomalen und gonosomalen Marker auch oder ausschließlich die Analyse von Verwandtschaftsbeziehungen, Abstammungen und bestimmter Marker des Phänotyps. Diese Analysen gehen über die klassische forensische Anwendung für die Verfolgung von Straftaten hinaus, werden zum Teil jedoch auch dafür genutzt.

Verogen bietet neben dem von Illumina entwickelten ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit (230 STR- und SNP-Marker (Churchill et al. 2016; Xavier und Parson 2017)) das ForenSeq™ MainstAY-Kit (52 STR-Marker, die ESSL, CODIS und den minimalen Y-Haplotyp-Standards umfassen) an, das speziell für die Routine entwickelt und im Jahr 2021 veröffentlicht wurde, sowie das ForenSeq™ Kintelligence Kit, um genetische Verwandtschaftsbeziehungen (*kinship*) inklusive forensischer Genealogie nachzuvollziehen. Im Kintelligence Kit sind dafür 10.230 SNP-Marker enthalten, und der Abgleich mit genetischen Daten anderer Personen ist für die Verogen-eigene GEDmatch Datenbank optimiert. Thermo Fisher Scientific bietet für die forensische Humanidentifizierung per NGS unterschiedliche Panels der Precision ID NGS-

Produktreihe an. Das Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel v2 nutzt Amplikons bis 303 bp Länge für den gemeinsamen Nachweis von 31 autosomalen STRs und 4 Loci zur Bestimmung des biologischen Geschlechts (Tao et al. 2019). Daneben werden die Precision ID Identity Panel (124 SNPs; (Meiklejohn und Robertson 2017) und Precision ID Ancestry Panel (165 autosomale SNPs (Pereira et al. 2017)) von Thermo Fisher Scientific angeboten. Das PowerSeq Auto/Y System (46GY) von Promega sequenziert simultan Amelogenin und 45 autosomale, sowie Y-STR-Amplikons bis zu einer Länge von 303 bp (Montano et al. 2018). Den STR-Kits von Verogen, Thermo Fisher Scientific und Promega ist gemeinsam, dass sie meist einen Einsatz von mindestens 100 pg beziehungsweise 125 pg genomische DNA empfehlen, um volle Konkordanz zu erreichen. Die Sensitivität der NGS-basierten Kits ähnelt daher den modernen CE-basierten STR-Kits, in denen zwar routinemäßig 0,5 bis 1 ng eingesetzt wird, die jedoch meist selbst bei 100 pg keine Ausfälle zeigen.

Eine weitere Anwendung der forensischen *Next Generation*-Sequenzierungen ist die SNP-basierte Bestimmung der äußeren Merkmale einer Person durch DNA-Analyse, die sogenannte forensische DNA-Phänotypisierung (FDP). Die FDP nahm ihren Anfang durch die Analyse eines Panels von SNPs, die häufig mit der Ausprägung einer bestimmten Haar- oder Augenfarbe korrelieren, was später um die Hautfarbe erweitert worden ist (IrisPlex-Assay; HIrisPlex-S-Assays (Walsh et al. 2011; Walsh et al. 2013)). Um die Vielzahl der Marker parallel zu analysieren, basieren kommerzielle Kits zur FDP zumeist auf der Methode der NGS, wie beispielsweise das für die vorliegende Studie benutzte ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit (Verogen) oder das Precision ID Ancestry Panel (Thermo Fisher Scientific).

Die Technik der NGS wurde in der Vergangenheit bereits erfolgreich vor Gericht dafür genutzt, monozygote Zwillinge im Rahmen eines Kriminalfalls genetisch zu unterscheiden (Weber-Lehmann et al. 2014), wobei in diesem Fall die Identifizierung nicht auf der Analyse von STR-Markern beruhte.

Neuere Verfahren, wie die Technik von PacBio und der Sequenzierung durch Nanoporen (durch die Firma Oxford Nanopore kommerzialisiert) werden als Sequenzierung der dritten Generation bezeichnet. Diese Techniken haben gemein, dass sie die Sequenzierung enorm langer DNA-Stränge ermöglichen und keine vorherige PCR-Amplifikation erfordern (Metzker 2010) .

1.7 Zielsetzung

Der Erfolg der STR-Typisierung von ausgefallenen Einzelhaaren scheint zu einem gewissen Teil mit dem Vorhandensein und der Anzahl von Zellkernen im Gewebe zu korrelieren. Es ist bisher allerdings nicht gelungen, bestimmte Grenzwerte zu ziehen, oberhalb deren eine STR-Typisierung von telogenen Einzelhaaren empfehlenswert ist. Weiterhin ist die Färbung von Einzelhaaren und die mikroskopische Untersuchung, um Zellkerne zu zählen, eine aufwendige und umständliche Methode. Aufgrund der niedrigen Erfolgsrate der STR-Typisierungen von DNA aus ausgefallenen Haaren, besteht daher die Notwendigkeit eine Methode zu entwickeln, mit der erfolgsversprechende Haare von solchen Haaren selektiert werden können, die nicht typisierbar sind. Weiterhin sollten die analytischen Methoden weiter verbessert werden, um den Typisierungserfolg bei einzelnen Haaren zu steigern. Die vorliegende Studie verfolgt diese übergeordnete Zielsetzung in zwei Teilzielen.

Das erste Teilziel ist die Entwicklung einer einfachen und kostengünstigen Vorgehensweise, mit der auf Basis der DNA-Menge und -Integrität solche Einzelhaare identifiziert werden können, bei denen eine STR-Typisierung erfolgsversprechend ist. Zu diesem Zweck sollte eine hochsensitive, für die Analyse von Einzelhaaren geeignete qPCR-Methode entwickelt werden, mit der es möglich ist, sowohl die DNA-Menge als auch die DNA-Degradierung zu bestimmen. Diese Methode sollte zudem auf einfache Weise an weitere Spezies adaptierbar sein, deren Haare in Kriminalfällen zuweilen eine Rolle spielen, insbesondere Hundehaare.

Das zweite Teilziel besteht in der Verbesserung der STR-Analytik degradierter DNA aus Einzelhaaren. Hierfür sollte ein in-house entwickelter NGS-basierter STR-Assay (maSTR-Assay) validiert und hinsichtlich seiner Eignung für menschliche Einzelhaare getestet werden, der aufgrund besonders kurzer STR-Amplikons für die STR-Typisierung von degradierter DNA besonders geeignet sein sollte.

Schließlich sollte durch die Kombination beider Methoden – der qPCR zur Bestimmung der DNA-Menge und Degradierung, sowie dem NGS-basierten Assay zur STR-Typisierung – eine Strategie erarbeitet werden, mit der in Zukunft telogene Einzelhaare standardmäßig für die forensische STR-Analyse genutzt werden können.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 DAPI-Färbung von menschlichen Kopfhaaren

DAPI-Färbung erfolgte gemäß (Bourguignon et al. 2008) mittels einer Färbelösung aus 160 µg DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol), 224 mg DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan; beides Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1 mL 200mM Tris-HCl, pH 7,4 und 9 mL Glycerol, die bei -20°C gelagert wurde. Haarwurzeln wurden bei Raumtemperatur über Nacht in 100-200 µL Färbelösung inkubiert und anschließend in der Färbelösung mikroskopisch (Leica DM5000 B) untersucht und durch das Okular fotografiert (Digitalkamera Canon Ixus 125HS).

2.2 Proben und DNA-Extraktion

DNA von humanen und caninen Mundschleimhaut-Abstrichen diente als Referenzproben für die STR-Typisierung der jeweiligen Individuen. Diese Proben sowie Gewebe von Ausstanzungen von Ohren von Mäusen und eine caninen Nieren-Zelllinie (MDCK-Zelllinie) wurden mit dem QIAamp® DNA Mini beziehungsweise mit dem Blood Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) gemäß den Empfehlungen des Herstellers behandelt (QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook). Die für diese Studie involvierten menschlichen Spenderinnen (zwei nicht verwandte weibliche Mitglieder des Forschungsteams) unterzeichneten vor Abgabe der Proben eine informierte Einverständniserklärung. Die drei nicht verwandten Hunde (zwei Rüden, eine Hündin) wurden während ihrer Teilnahme an der Studie nicht geschädigt.

2.3 DNA-Extraktion von humanen Haaren

Die menschlichen Haare wurden nach dem Waschen der Haare mit einem Kamm, der zuvor durch mit Bleiche von Nukleinsäuren befreit wurde, durch den Vorgang des Kämmens entnommen und an der Luft getrocknet. Hundehaare wurden durch Streicheln gesammelt. Beim Sammeln der Hundehaare bzw. Menschenhaare wurde darauf geachtet, nicht an den Haaren zu ziehen. Die Haare wurden bis zu einem Jahr in einer dunklen Box bei Raumtemperatur und normaler Raumluftfeuchtigkeit aufbewahrt. Einzelne Haare wurden mit einem von zwei Mikroskopen (Leica DM1000 in Verbindung mit der Digitalkamera Canon Ixus 125HS; Leica DM5000 B inklusive automatischer Bildaufnahme) unter einer Vergrößerung von 40x bis 100x fotografiert. Um eine mögliche PCR-Inhibition durch das Pigment Melanin zu minimieren (Yoshii et al. 1993; Eckhart et al. 2000), wurden nur 1-2 mm des basalen Haarsegments einschließlich der telogenen Kolbenwurzel mit Schere und Pinzette (mit Ethanol und Bleichmittel gereinigt) abgeschnitten und in ein 1,5 ml-Röhrchen überführt.

Die DNA wurde mit einem optimierten Puffer nach Hellmann et al. (Hellmann et al. 2001) extrahiert, der wie folgt modifiziert wurde: Die Haarwurzeln wurden in einem Volumen von 40 µL Extraktionspuffer lysiert, der 1 x TNCA-Puffer mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, 39 mM DTT (Dithiothreitol) und 250 µg/mL Proteinase K enthielt. Um Inhibitionen der nachfolgenden PCR-Analysen zu vermeiden, wurde auf Natriumdodecylsulfat verzichtet. Die Ansätze wurden bei 56°C in einem Thermoschüttler (300 U/min) für 2 h inkubiert. Waren nach 90 min noch ungelöste Haarfragmente sichtbar, wurden weitere Proteinase K und DTT bis zu einer Endkonzentration von 500 µg/mL beziehungsweise 117 mM zugegeben und die Lyse für maximal 4 h verlängert. Zur Enzym-Deaktivierung wurden die Proben bei 75°C für 30 min inkubiert. Die DNA wurde mit Natriumacetat (0,3 M Endkonzentration), 2 µL

linearem Polyacrylamid (LPA, als Fällungszusatz) und dem 0,8-fachen Volumen Isopropanol gefällt. Die Proben wurden bei 4°C für 20 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (30 min, 14000 x g). Das Pellet wurde mit 200 µL 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (10 min, 14000 x g). Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet wurde mindestens 20 min bei offenem Deckel getrocknet und danach in 10-40 µL vorgewärmtem (37°C) Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Für jede Analysemethode (qPCR, CE, NGS) wurde 1 µL gereinigte DNA verwendet. DNA-Mengen und Integrität wurden mit dem RiboD-Assay (humane DNA) beziehungsweise dem RiboDog-Assay (canine DNA) bestimmt.

2.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Zur Auftrennung der erhaltenen PCR-Produkte wurden 1-2% Agarose-Gele in 1x TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA-Na₂, pH 8,0), welcher auch als Laufpuffer diente, in horizontalen Elektrophorese-Kassetten verwendet. Als Ladepuffer und DNA-Farbstoff diente Midori Green Direct (Nippon Genetics, Tokyo, Japan, #MG06), Als Molekulargewichtsstandard diente der GeneRuler 50bp DNA Ladder ready-to-use (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, #SM0373), der mi-100 bp+ DNA Marker Go (Metabion, Planegg, Deutschland, #mi-M8200), sowie der λDNA/HindIII-Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, #SM0101). Die DNA-Fragmente wurden für 30 bis 45 min bei 100 bis 130 V aufgetrennt und nachfolgend auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 312 nm betrachtet und mit der Digitalkamera Canon Ixus 125HS dokumentiert.

2.5 Reinigung von PCR-Produkten mit AMPure XP Beads

Mit Hilfe der magnetischen AMPure XP Beads wurden PCR-Produkte, die länger als 100 bp sind, von Enzymen, Primern, Nukleotiden und Pufferkomponenten gereinigt. Die Reinigung der PCR-Produkte (30 µL) mittels AMPure XP Beads (Beckman Coulter, Brea, USA, #A63881) erfolgte nach Angaben des Herstellers. Dafür wurden AMPure XP Beads und der Gesamtansatz der PCR-Produkte in einer PCR-Platte (Fassungsvermögen 300 µL) gemischt, auf einem magnetischen Ständer zweimal mit 80% Ethanol (je 200 µL) gewaschen und nach Lufttrocknen in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,5) resuspendiert.

2.6 Fluorometrische Quantifizierung mittels Quantus (Promega)

Zur Quantifizierung von doppelsträngiger DNA wurde je 1 µL Probe mit 199 µL QuantiFluor™ ONE dsDNA (Promega, Madison, USA) unter Lichtabschluss gemischt und auf dem Quantus-Gerät (Promega, Madison, USA) gemessen.

2.7 DNase-Verdau

HeLa genomische DNA (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts) wurde schrittweise mit DNase I (Invitrogen, Waltham, USA) verdaut. Die DNase wurde in DNase-Puffer, der 100 mM Tris, 5 mM CaCl₂ und 2,5 mM MgCl₂ enthielt, auf eine Konzentration von 0,0025 U/µL verdünnt. Jedes DNase-Verdauungsgemisch enthielt 25,6 µL DNase-Puffer, 89,6 µL nukleasefreies Wasser (#129114, QIAGEN, Hilden, Deutschland), 128 µL HeLa-DNA (insgesamt 12,8 µg DNA) und 12,8 µL DNase I in DNase-Puffergemisch (0,005 U/µL). Das DNase-Verdauungsgemisch wurde bei 24 °C im Veriti 96 Well-Cycler (Applied Biosystems, Waltham, USA) inkubiert, wobei der Deckel auf 70 °C erhitzt wurde. Jedes DNase-Verdauungsgemisch umfasste ein Endvolumen von 124 µL, das 12,2 µL DNase-Puffer, 42,7 µL nukleasefreies Wasser (QIAGEN, Hilden,

Deutschland), 6,1 µg HeLa-DNA und 0,02025 U DNase I im DNase-Puffergemisch enthielt. Zu bestimmten Zeitpunkten (5, 30, 120, 240, 480, 720 min) wurde dasselbe Volumen entfernt (entspricht jeweils dem ursprünglichen Einsatz von 45,5 ng DNA/µL) und die jeweilige Verdauung durch Zugabe von 5 µL 25 mM EDTA gestoppt und 15 min bei 65°C inkubiert, danach auf Eis gestellt. Die DNA-Konzentrationen wurden vor der Analyse eingestellt (1-1000 pg/µL) und 1 µL jeder Probe wurde mit dem RiboD-Assay gemessen. Die entsprechenden Proben wurden genutzt für die in **Kapitel 3.2.2 (Abbildung 6 und Abbildung 7)** beschriebenen Experimente. Diese DNase-verdauten Proben für **Kapitel 3.2.3 (Abbildung 9)**, **3.2.6 (Abbildung 11)** und **3.5.1 (Abbildung 18)** wurden nach einem modifizierten Protokoll durchgeführt. Es wurde eine DNase I-Konzentration von 0,005 U/µL und ein DNase-Verdauungspuffer mit 100 mM Tris, 5 mM CaCl₂ und 0,25 mM MgCl₂ verwendet. Zu bestimmten Zeitpunkten wurde dasselbe Volumen entfernt (entspricht jeweils dem ursprünglichen Einsatz von 45,5 ng DNA/µL) der DNase-Verdauungsmischung in ein neues Röhrchen überführt und die Reaktion mit 5 µL 25 mM EDTA gestoppt und 15 min bei 65 °C inkubiert, danach auf Eis gestellt. Die folgenden Proben wurden in zwei verschiedenen Ansätzen verdaut. Folgende Dauern des DNase-Verdauens wurden durchgeführt: 5, 15, 25, 35, 45 min (erster Ansatz), sowie 50, 90, 150, 195 und 255 min (zweiter Ansatz). DNase-Verdau von caniner MDCK-DNA wurde unter Verwendung einer DNase I-Konzentration von 0,0075 U/µL und eines DNase-Puffers, der 100 mM Tris, 5 mM CaCl₂ und 2,5 mM MgCl₂ enthielt, durchgeführt. Jede Reaktion umfasste ein Endvolumen von 102 µL mit 10,2 µL DNase-Puffer, 76,2 µL nukleasefreiem Wasser (QIAGEN, Hilden, Deutschland), 800 ng Hunde-DNA und 0,03825 U DNase I. Zu bestimmten Zeitpunkten (0, 15, 90, 180 und 300 min; **Kapitel 3.2.2, Abbildung 6 und Abbildung 7**) wurden 20 µL der Reaktion in ein neues Röhrchen überführt und die Reaktion durch Zugabe von 2 µL 25 mM EDTA gestoppt. Die DNA-Konzentrationen wurden vor der Analyse eingestellt (10-1000 pg/µL) und 1 µL jeder Probe wurde mit dem RiboDog-Assay gemessen. Alle degradierten Proben, sowie die intakte Kontrolle wurden vor dem Einsatz in die qPCR durch eine gelelektrophoretische Austrennung der DNA auf die Degradierung überprüft.

2.8 Kommerzielle qPCR Kits

Der Ansatz des qPCR-basierten Quantifiler® Trio DNA Quantification Kits, die Durchführung auf dem 7500 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und die Analyse der Ergebnisse erfolgte nach Angaben des Herstellers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Ebenso wurde mit den PowerPlex® Kits ESX 17, ESX 17 Fast und ESI 17 Fast (Promega, Madison, USA) entsprechend der Angaben des Herstellers verfahren.

2.9 RiboD und RiboDog-Assays

Alle Primersequenzen (**Tabelle 1**) wurden mit der Software Geneious R8 (Biomatters Ltd, Auckland, Neuseeland) bestimmt, indem das menschliche Genom GRCh38 (heruntergeladen von der FTP-Site des NCBI (Human genome version GRCh38)) mit den ribosomalen Sequenzen verschiedener Tierarten verglichen wurde, u.a. mit Anwendung von BLAST. Diese Abgleiche wurden mit Hilfe von globalen (Needleman-Wunsch-Algorithmus) und lokalen Alignments (Smith-Waterman-Algorithmus) vorgenommen (Needleman und Wunsch 1970; Smith und Waterman 1981). Das Primerdesign basiert auf der Sequenz [NC_000021.9](#) des „Homo sapiens chromosome 21, GRCh38.p12 Primary Assembly“. Das menschliche lange Amplikon entspricht der chromosomalen Range 8249466 bis 8249827, das kurze Amplikon der Range 8205910 bis 8205976. Für die Reproduzierbarkeitsstudie wurden Singleplex-RiboD-qPCR-Läufe auf einem

LightCycler II-System (Roche, Basel), einem qTower3-Cycler (Analytik Jena, Jena) oder einem 7500 Fast Instrument (RiboD im Vergleich zum Quantifiler® Trio Kit, Applied Biosystems, Waltham, USA) durchgeführt. Jede RiboD-Mischung umfasste ein 20 µL Endvolumen, das 10 µL Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X, #K0221, life technologies, Carlsbad, USA), 1 µM Primer (entsalzt, Metabion, Planegg), nukleasefreies Wasser (QIAGEN, Hilden, Deutschland) und 1 µL Template-DNA (1 pg-100 ng) enthielt. Die Reaktionsbedingungen waren 10 min bei 95°C und 40 Zyklen von 15 s bei 95°C, 30 s bei 65°C und 30 s bei 72°C. Die Spezifitäten der Primer wurden durch Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte bestätigt.

Tabelle 1: Primer-Sequenzen der RiboD und RiboDog-Assays

Primer	Amplikonlänge	Richtung	Primersequenz (5'-3')
Mensch – kurzes Amplikon	67 bp	fwd	5'-GGT CGG TGA CGC GAC C-3'
		rev	5'-GGC CCA AAA TGC CGA CTC-3'
Mensch – langes Amplikon	362 bp	fwd	5'-ACA GCT CTG GCG TGC AG-3'
		rev	5'-GCT CTC CGA CTC CGC AC-3'
Hund – kurzes Amplikon	87 bp	fwd	5'-GCG GTG ACC TGT GGC T-3'
		rev	5'-GTC AGC ACC TAC CTG GCA-3'
Hund – langes Amplikon	313 bp	fwd	5'-GGA CCT CCG GAG CTG C-3'
		rev	5'-GGG TGG CGC GAC AGA-3'

Der C_q -Wert ist umgekehrt proportional zur ursprünglich in die PCR eingesetzte DNA-Menge. Durch die Auftragung der C_q -Werte gegen den Logarithmus der ursprünglich eingesetzten, bekannten DNA-Mengen, wurde eine Kalibrierung erstellt entsprechend der Formel:

$$y = a \cdot \ln(x) + b$$

Anhand der Standardkurve der Kalibrierung wurde durch Auflösen nach x die jeweils ursprünglich vorhandene DNA-Menge der gemessenen Proben ermitteln (Quantifizierung). Die Degradierungsverhältnisse (D-Werte) wurden für jede Probe als Verhältnis zwischen den DNA-Mengen, berechnet über das lange Amplikon, geteilt durch die DNA-Mengen, berechnet über das kurze Amplikon, erhalten.

Die PCR-Effizienz wurde für jeden Lauf unter Verwendung seriell verdünnter Standard-DNA mit bekannter DNA-Menge bestimmt (für genaue Werte siehe Anhang 1).

Falls nicht anders erwähnt, wurden serielle Verdünnungen von HeLa-DNA (#N4006 S, New England Biolabs, Ipswich, USA) als Kalibratoren verwendet. In späteren Experimenten erwies sich die Promega 2800M-DNA (#DD7101, Promega, Madison, USA) als eine zuverlässigere und präzisere DNA für die Kalibrierung (siehe Anhang 1, S4). Daher wurden einige Proben unter Verwendung von 2800M als Standard requantifiziert. Für RiboDog-Assays diente die aus der Hundezelllinie (MDCK) extrahierte DNA als Kalibrierstandard. Diese DNA wurde fluorometrisch auf Quantus (Promega, Madison, USA) quantitativ bestimmt und dann seriell auf 3,2 ng, 320 pg, 32 pg, 3,2 pg DNA verdünnt.

Die qPCR-basierten RiboD- und RiboDog-Assays wurden hinsichtlich Empfindlichkeit, Präzision, Genauigkeit, Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit (gemäß den Richtlinien "SWGDM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods", 2016, (SWGDM 2016)) und gemäß den MIQE-Richtlinien (Bustin et al. 2009) mit intakter DNA und artifiziell degradiertes DNA validiert.

Zur Validierung des humanen RiboD-Assays wurde der Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit ((Vernarecci et al. 2015), Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf

dem 7500 Fast Instrument (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die in dieser Studie aufgezeigten D-Werte sind die reziproken Werte der Degradierungs-Indizes, die mit der HID-Real-Time PCR-Analysesoftware (Quantifiler® Trio Kit) ermittelt wurden. Um die DNA-Degradierungswerte zwischen dem RiboD-Assay und dem Quantifiler® Trio Kit zu vergleichen, wurden also für beide Assays die DNA-Degradierungen berechnet, indem die DNA-Menge, die über das jeweilige lange Amplikon bestimmt wurde, durch die DNA-Menge geteilt wurde, die über das jeweilige kurze Amplikon bestimmt wurde.

2.10 Schmelzkurvenanalyse zur Analyse der Artenspezifität

Die Arten der Homininae Unterfamilie (Goodman et al. 1990) wurden durch humane genomische HeLa-DNA (#N4006S, New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts) und DNA von Gorilla (*Gorilla gorilla*) und Schimpanse (*Pan troglodytes*) repräsentiert, die aus Kot extrahiert worden war. Die Hunde-DNA (*Canis lupus familiaris*) wurde aus einem Wagenschleimhaut-Abstrich (Mischrasse aus Pointer/Retriever) und aus MDCK-kultivierten Zellen gewonnen. Maus-DNA (*Mus musculus*) mit C57BL6-Hintergrund wurde aus einer Ohrstanze extrahiert. Fliegen der Ordnung Diptera (*Ceratitis capitata*, *Aedes aegypti*, *Drosophila suzukii*) wurden als DNA-Extrakte von ganzen Fliegen zur Verfügung gestellt. Es wurden etwa 1 bis 10 ng DNA verwendet, gemessen mit einem Nanophotometer (Implen, München, Deutschland). Nach der Amplifikation per Realtime-PCR auf dem Roche LightCycler II (Roche, Basel, Schweiz) beziehungsweise dem Analytik Jena qTower (Analytik Jena, Jena, Deutschland) wurde die Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, indem 50°C für 5 min gehalten wurde, gefolgt von einer Erwärmung von 50 auf 95°C mit einer Geschwindigkeit von 1 °C/s und einer Haltezeit von 15 s.

2.11 STR-Analyse mittels Kapillarelektrophorese

Im Anschluss an die PCR-Amplifikation der STR-Assays mittels Fluoreszenz-markierter Primer wurde die kapillarelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte genutzt, um diese aufzutrennen und nachzuweisen. Die STR-Typisierung von menschlichen Proben wurde mit dem PowerPlex® ESX 17 System (#DC6721, Promega, Madison, USA) auf einem 9700 Thermocycler (Applied Biosystems, Waltham, USA) gemäß den Anweisungen des Herstellers mit den folgenden Modifikationen durchgeführt: Jede Reaktionsmischung bestand aus einem 5 µL Endvolumen, das 1 µL Reaktionsmischung, 0,5 µL Primermischung, nukleasefreies Wasser und 1-2 µL Template-DNA enthielt. Die Reaktionsbedingungen waren 2 min bei 96°C, gefolgt von 30 Zyklen von 30 s bei 94°C, 2 min bei 59°C und 90 s bei 72°C, und einem zusätzlichen Schritt bei 60°C für 45 min und einem abschließenden Halt bei 4°C. Die STR-Analyse von Hunde-DNA wurde von Eurofins Medigenomix Forensik GmbH (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Für die STR-Analyse von Hunde-DNA wurden zwei kommerzielle Multiplex-PCR-Kits gemäß den Herstelleranleitungen angefertigt: Das Canine Panel 1.1 (#F860S) und der Canine ISAG STR Parentage Kit (# A36138), die beide von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) bezogen wurden. Ein (Humanproben) oder zwei (Hundeproben) Mikroliter jedes PCR-Produkts wurden mit Formamid und Größenstandard gemischt und während der Kapillarelektrophorese auf einem ABI 310 Genetic Analyzer (Humanproben) oder 3130 XL Genetic Analyzer (Hundeproben; beide Geräte von Applied Biosystems, Waltham, USA) mit Standardparametern getrennt. Für Hunde-DNA wurde eine Injektionszeit von 15 Sekunden verwendet. Die Profile wurden mit der GeneMapperID v.3.2.1 Analysis Software Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) analysiert. Ein analytischer Schwellenwert von 50 relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) (für menschliche Proben)

oder 100 RFU (für Hundeproben) wurde verwendet, um Allelic Drop-outs zu identifizieren. Die Auswertung und Interpretation der STR-Daten wurde manuell vorgenommen, beruhend auf den Elektropherogrammen. Dafür wurden die Informationen über Allel-Nummer und Peak-Höhen (RFU) für weitere Untersuchungen manuell in Excel-Tabellen übertragen.

2.12 maSTR-Assay

Zum Zweck einer verbesserten Analyse degradiert DNA wurde der maSTR-Assays (Mini-Amplikon-STR) zur STR-Typisierung entwickelt. Dafür wurden die Zielregionen für die Amplifikationen von Mini-Amplikons (Butler et al. 2003; Kim et al. 2016) auf eine Weise festgelegt, sodass die repetitiven Regionen der europäischen Kern-STR loci (EU-Core-STR) sowie möglicherweise informative SNPs in den flankierenden Regionen enthalten sind und keine SNPs innerhalb der Primerbindungsstellen vorhanden sind.

Tabelle 2: Primersequenzen des maSTR-Assays

Locus		Primer Sequenzen inklusive Illumina Überhang (5'-3')	Herkunft
D2S1338	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGAAACAGAAATGGCTTGG	(Kim et al. 2016)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGTTATTCAGTAAGTTAAAGGATTGC	(Kim et al. 2016)
D8S1179	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTTTTGTATTTTCATGTGTACATTCGT	(Kim et al. 2016)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTAGATTATTTTCACTGTGGGGAA	(Kim et al. 2016)
D18S51	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTGAGTGACAAATTGAGACCTTG	(Kim et al. 2016)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGTTGCTACTATTTCTTTTCTTTTCTC	(Kim et al. 2016)
FGA	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAATAAAATTAGGCATATTTACAAGC	(Kim et al. 2016)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCCAGCAAAAAGAAAGGAA	(Kim et al. 2016)
TH01	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGATCCCATTTGGCCTGTTCT	(Kim et al. 2016)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAGGTCACAGGGAACACAGA	(Kim et al. 2016)
vWA	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAATAATCAGTATGTGACTTGGATTG	(Kim et al. 2016)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGATAAATACATAGGATGGATGG	(Kim et al. 2016)
D21S11	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAATCCCAAGTGAATTGCC	(Kim et al. 2016)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGTAGATAGACTGGATAGATAGACGA	(Kim et al. 2016)
D10S1248	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTAATGAATTGAACAAATGAGTGAG	(Coble und Butler 2005)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAACTCTGGTTGTATTGTCTTCAT	(Coble und Butler 2005)
D1S1656	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGTTGCTCAAGGGTCAACT	(Lareu et al. 1998)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAGAAATAGAATCACTAGGGAACC	(Lareu et al. 1998)
D2S441	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCTACAGGAATCATGAGCCA	*
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGAGCTAAGTGGCTGTGGTGT	*
D12S391	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCAACAGGATCAATGGATGCA	*
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTGTCATGAGATTTTTCAGCCT	*
D22S1045	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGCTGCTATGGGGGCTAGAT	*
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCGAATGTATGATTGGCAATATTTTT	(Coble und Butler 2005)
SE33	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAAAGAGACAAAGAGAGTTAG	(Müller et al. 2007)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACATCTCCCCTACCGCTATAG	(Müller et al. 2007)
Amel.	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTGGGCTCTGTAAGAA	(Sullivan et al. 1993)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATCAGAGCTTAACTGGGAAGCTG	(Sullivan et al. 1993)
D19S433	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCAAAAAGCTATAATTGTACCAC	(Kim et al. 2016)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAAAATCTTCTCTTTCTTCTCTC	(Kim et al. 2016)
D16S539	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGGAGCAAAACAAAGGCAGA	*
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGCATGTATCTATCATCCATCTCTG	(Kim et al. 2016)
D3S1358	fwd	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCAGTCCAATCTGGGTGACAG	(Kim et al. 2016)
	rev	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATCAACAGAGGCTTGCATGT	(Kim et al. 2016)

*: Vorliegende Studie.

Die verwendeten Primersequenzen wurden unter Verwendung der Software Geneious R8 (Biomatters Ltd, Auckland, Neuseeland) entwickelt oder aus früheren Veröffentlichungen (**Tabelle 2**) adaptiert.

Erstellt und getestet wurden die Primer und die Mastermix-Reaktion von der damaligen Mitarbeiterin im Projekt „FunForGen“ am Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften an der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg, Dr. Trine Riemer. Weitere Anpassungen zur Weiterentwicklung (beispielsweise Kontrollen über Non-template-Proben, Anpassungen der Primerkonzentrationen und Austesten unterschiedlicher PhiX-Gehälter) wurden von der Autorin im Zuge der Arbeiten vorgenommen (Daten nicht gezeigt), sowie die Validierung des maSTR-Assays und die Anwendung auf HeLa-DNA und DNA aus Einzelhaaren.

Jede Amplikon-Multiplex-Reaktion umfasste 25 µL Endvolumen, bestehend aus 12,5 µL Multiplex PCR Plus Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland), 1,25 µL Primer-Mix (0,1 µM jedes der 34 Primer), nukleasefreies Wasser (QIAGEN, Hilden, Deutschland) und Template-DNA (1 pg-10 ng). Die Reaktionsbedingungen waren 5 min bei 95°C und 35 Zyklen von 30 s bei 95°C, 3 min bei 60°C und 3 min bei 72°C sowie weitere 10 min bei 68°C und Halten bei 4°C. Die PCR-Indizes (Nextera XT Index Kit, Nr. FC-131-1001, Illumina, San Diego, USA) wurden in einer zweiten PCR gemäß den Empfehlungen des Herstellers (16s Metagenomic Library Prep Guide) angehängt, die aus einem 50 µL Endvolumen mit 25 µL HiFi HotStart ReadyMix bestand (KAPA/ Roche, Basel, Schweiz), 10 µL DEPC-Wasser, jeweils 5 µL Index 1 und 2 und 5 µL gereinigtes PCR-Produkt der vorherigen Amplikon-PCR. Die Reaktionsbedingungen waren 3 min 95°C und 8 Zyklen von 30 s bei 95°C, 30 s bei 55°C und 30 s bei 72°C. Nach 5 min bei 72°C wurde die Reaktion bei 4°C gestoppt. Die Reinigung der PCR-Produkte wurde unter Verwendung von Agencourt Ampure XP Beads (Beckman Coulter, Brea, Kalifornien) gemäß den Empfehlungen des Herstellers mit Modifikationen durchgeführt: 52,5 µL (27,5 µL) 10 mM Tris-HCl und 20 µL (56 µL) AMPure XP-magnetischen Beads für die erste (zweite) Reinigung. Nach der Quantifizierung unter Verwendung des QuantiFluor® ONE dsDNA-Systems (Promega, Madison, USA) und des Library Quantification Kit für Illumina Platforms (KAPA/ Roche, Basel, Schweiz) wurden die Proben normalisiert und auf 4 nM gepoolt und auf 4 bis 12 pM Konzentrationen verdünnt. Nach dem Einbringen von PhiX-Reaktionen (15% bis 50%, PhiX Control Kit v3, Illumina, San Diego, USA) wurden die Reaktionen auf das Illumina MiSeq FGx™-Gerät gemäß den Empfehlungen des Herstellers geladen (MiSeq FGx Instrument Reference Guide Part # 15050524 Rev. C) und auf einer Standard-v3-Flowcell auf dem MiSeq FGx™-Gerät (Illumina, San Diego, USA) unter Verwendung von paired-end Sequenzierungen mit Dual-Index-Reads mit dem Reagent Kit v3 (600 Zyklen, Illumina, San Diego, USA) sequenziert.

2.13 Bioinformatische Identifizierung von STR-Genotypen aus den maSTR-Rohdaten

Um die im maSTR-Assay amplifizierten und auf der MiSeq FGx™-Gerät sequenzierten PCR-Produkte zu nutzen, um STR-Loci zu detektieren, Allellängen und repetitive Sequenzen zu bestimmen und ein Alignment, sowie ein Variant-Calling für nicht-repetitive Regionen durchzuführen, wurde die folgende Analysepipeline verwendet.

Das Demultiplexen wurde mit der Illumina bcl2fastq-Konvertierungssoftware mit Standardparametern durchgeführt (Illumina bcl2fastq Conversion Software v1.8.4). Das Qualitäts-Trimmen wurde mit Trimmomatic (Bolger et al. 2014) durchgeführt (Parameter MINLEN: 25 SLIDINGWINDOW: 4: 25 LEADING: 20 TRAILING: 20). Nur Read-Paare, welche die Parameter des Qualitäts-Trimmen erfüllt haben, wurden

weiterverarbeitet. Das Merging, der Prozess des Zusammensetzens eines Read-Paares durch Bilden einer Konsensussequenz der überlappenden 3'-Enden, wurde unter Verwendung von Fastq-Join mit Standardparametern durchgeführt (Aronesty 2013). Auch hier wurden nur erfolgreich zusammengeführte (*merged*) Read-Paare weiterverarbeitet. Allele-Calling wurde mit einem in-house Tool namens SNiPSTR durchgeführt. Es führt mit AGREP (*tre-agrep*) eine Fuzzy-Suche für alle Reads durch und ergibt einen Read-Call, wenn dieser mit ungefähr zwei Erkennungselementen (REs) übereinstimmt. Die REs sowie die anschließend verwendeten Umwandlungen von der Information der Länge zum spezifischen Allel wurden aus STRaitRazor v2s (King et al. 2017) entnommen. REs sind kurze Oligonukleotidsequenzen, die 12 bis 18 Nukleotide stromaufwärts und stromabwärts der Repeats umfassen und als Identifikator für die Loci und als Grenze zur Unterscheidung zwischen der repetitiven und der flankierenden Region dienen. Die Fuzzy-Suche wird von AGREP mit einer erlaubten Substitution und keiner erlaubten Insertion oder Deletion durchgeführt (maximale Fehler: 1, Kosten für Substitutionen: 1, Kosten pro Insertion und für Deletion: jeweils 2) (= max-errors: 1, substitute-cost: 1, insert-cost: 2, delete-cost: 2). Die Zuweisung/Assignment eines Reads zu einem Locus erfordert eine ausreichende Länge des Reads, um den gesamten repetitiven Bereich plus die zwei REs zu überspannen. Nach der Suche werden Reads mit identischer Sequenz zusammengefasst und mit einer Häufigkeit versehen. Die Sequenzlänge zwischen den REs für jeden Read wird bestimmt und in eine Allellänge übersetzt. Die Reads werden dann zur weiteren Verarbeitung in repetitive und nicht-repetitive Bereiche aufgeteilt. Repetitive Bereiche werden automatisch in die *core repeat notation* übersetzt, d. H. Kern-Repeats in Klammern und eine Zahl, welche die Anzahl der Repeat-Einheiten angibt. Die nicht-repetitiven flankierenden Sequenzen werden unter Verwendung des Smith-Waterman-Algorithmus auf das Referenzgenom aligniert.

Die Ergebnisse wurden unter Verwendung von benutzerdefinierten R-Skripten verarbeitet, um die wahrscheinlichsten Allele und Artefakte pro Probe zunächst unter Verwendung einer statischen Stotterschwelle von 15% zu berechnen und die Ergebnisse in klassischen Kapillarelektrophorese-Histogrammen darzustellen.

In verschiedenen Schritten der Pipeline wurden Reads gezählt und die durchschnittlichen Read-Längen bestimmt. Da das letzte Allele-Calling auf zusammengeführte (engl. *Merged*) Reads durchgeführt wurde, beziehen sich die Frequenzen immer auf die Anzahl der Read-Paare:

1. Lesepaare mit Durchlassfilter (englisch *Passing filter* (PF) *read pairs*): Anzahl der Read-Paare pro Lauf, die den *Chastity*-Filter bestanden haben und nach dem Demultiplexen in die FASTQ-Datei geschrieben werden. Bei diesem Schritt werden keine Qualitätswerte berücksichtigt.
2. Getrimmte Read-Paare (engl. *Trimmed read pairs*): Anzahl der Read-Paare pro Lauf, die das Qualitäts-Trimmen bestanden haben. Es wurden nur Paare gezählt, bei denen beide Reads das Trimmen überstanden haben.
3. Zusammengeführte (engl. *Merged*) Read-Paare: Anzahl der getrimmten Read-Paare, die erfolgreich zusammengeführt wurden, also Read-Paare, die durch Bildung einer Konsensus-Sequenz des überlappenden 3'-Endes zusammengesetzt wurden.
4. Effektive Reads (engl. *Effective reads*): Anzahl der zusammengeführten Reads, die erfolgreich einem Locus zugewiesen (*assigned*) wurden. Zu diesem Zeitpunkt wurde kein analytischer Schwellenwert berücksichtigt. Jeder einem Locus zugewiesene Read wurde ebenfalls auf eine Allelfrequenz gezählt.

Diese Analysepipeline ermöglicht es nicht nur, die Längeninformationen zur Bestimmung der Allele zu verwenden, sondern auch die repetitive Sequenz anzuzeigen und die Durchführung von Varianten-*Calls* in den nicht-repetitiven Regionen durchzuführen. Die NGS STR-Nomenklatur bezog sich in dieser Studie auf die Empfehlungen der Internationalen Gesellschaft für Forensische Genetik (ISFG) (Parson et al. 2016).

2.14 Schwellenwert-Festlegung

2.14.1 Schwellenwert-Setzung für kapillarelektrophoretische Assays

Bei der CE-basierten STR-Analyse der PowerPlex® ESX 17, ESX 17 Fast und ESI 17 Fast-Kits mittels der GeneMapperID v.3.2.1 Analysis Software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurde ein analytischer Schwellenwert von mindestens 50 RFU (Schneider et al. 2006) verwendet, um die Anzahl der Allelic Drop-outs und Drop-ins zu bestimmen. Stotter wurden ab mindestens 15% des Haupt-Peaks detektiert beziehungsweise gemäß den Angaben des Herstellers der entsprechenden STR-Assays. Bei Minimal Spuren wurde der stochastische Schwellenwert mit dem analytischen Schwellenwert gleichgesetzt, da die Peaks sehr niedrige RFU aufwiesen.

2.14.2 Schwellenwert-Setzung des maSTR-Assays

Das *Allel-Calling* aller durchgeführten maSTR-Läufe resultierte in mehreren einzelnen Excel-Tabellen pro Probe. Die Informationen über Allel-Nummer und Anzahl der Reads von allen auszuwertenden Profilen wurden manuell in eine Excel-Tabellen übertragen. Es wurden nur diejenigen Allele als tatsächliche ein (homozygot) bzw. zwei (heterozygot) Allele detektiert, die den am häufigsten vorkommenden Allelen im jeweiligen Marker entsprechen und alle voreingestellten Schwellenwerte überstiegen. Die analytischen, stochastischen und Stotter-Schwellenwerte wurden über die Profile manuell ausgetestet und auf alle Profile angewandt. Um die CE- und NGS-basierten Analysemethoden zu vergleichen, wurden nur die Fragmentlängen (keine Sequenzen) verwendet, um die Konkordanz der Allele zu ermitteln.

Um Herausforderungen des maSTR-Assays zu identifizieren, die zu Null-Allelen, Allelic Drop-outs oder Drop-ins führen, wurde die Konkordanz zwischen CE- und NGS-generierten DNA-Profilen (Hill, C. R. et al. 2010) anhand intakter DNA untersucht und zur Legung entsprechender Schwellenwerte genutzt. Die Festlegung der analytischen, stochastischen und Stotter-Schwellenwerte war ein wichtiger Bestandteil der Entwicklung des maSTR-Assays und wird in **Kapitel 4.2.4** beschrieben. Der analytische Schwellenwert von 6 Reads und der stochastische Schwellenwert von 2% der Reads wurden für die STR-Interpretation aller maSTR-Assay-generierten Daten angewandt. Die Entscheidung zwischen homo- und heterozygoten Markern hängt von der Readzahl des Allels ab, das in geringerer Anzahl als das Allel vorkommt, das die meisten Reads in dem entsprechenden Marker aufweist: Beträgt die Readzahl mehr als 15%, wird es als tatsächliches Allele gezählt und der Marker als heterozygot bewertet. Die N-1 und N+1-Stotter-Schwellenwerte wurden für die meisten Loci auf 15% des Haupt-Allels festgelegt, mit Ausnahme der Marker D8S1179 (20%), D18S51 (20%), D22S1045 (22%), D2S1338 (18%), D10S1248 (20%) und SE33 (ACTBP2, 21%). Wurde dieser prozentuale Anteil überschritten, wurde das Allel nicht als Stotter-Allel gezählt, sondern als tatsächliches Allel. Um die Stotter-Schwellenwerte festzulegen, wurden alle Stotter-Allele von Referenzprofilen untersucht, die mit intakter DNA von mindestens 300 pg generiert wurden. Allelic Drop-ins, die im selben Marker mit nur einem Unterschied einer Repeat-Länge auftraten, wurden separat gezählt, unabhängig davon, ob die Marker-typischen

Schwellenwerte für Stotter überschritten wurden. Beispielsweise wurden im Profil J318 im Marker D2S1338 sowohl Allel 20 als auch 19 als Drop-ins gewertet, ebenso im Profil J198 im Marker D8S1179 die beiden Allele 9 und 10. Für Allele, deren Länge sich um eine Wiederholungseinheit unterschied, galt, dass das Allel geringerer Read-Anzahl mehr als 15 % der gesamten Read-Anzahl des Haupt-Allels aufweisen musste, um als heterozygoten Allel und nicht als Stotter-Allel interpretiert zu werden.

Nach der Festlegung und Anwendung der Schwellenwerte wurden Signale gemäß (Ganschow et al. 2018a) unterschieden in Allele (korrekt amplifizierte und sequenzierte DNA-Templates von biologischem Ursprung), Artefakte, sowie Stotter-Allele; die restlichen Signale werden als Rauschen gewertet. Artefakte können Sequenzfehler und - zu einem geringen Teil - somatische Mutationen sein. Artefakte sind Signale, die über dem analytischen, aber unterhalb des stochastischen Schwellenwerts liegen.

Die STR-Profile, die mit dem maSTR-Assay erstellt wurden, wurden manuell mit den jeweiligen Referenzprofilen und den CE-generierten Profilen manuell auf Konkordanz überprüft.

2.14.3 Stotter-Schwellenwerte für probabilistische Verfahren

Für die Auswertung der maSTR-Assay-generierten Daten zur Nutzung in Software, die auf probabilistischen Berechnungen beruht, wurden die Profile konservativer in Bezug auf die Stotter-Schwellenwerte ausgewertet als dies bei den restlichen Auswertungen der Fall war. Die N-1 und N+1-Stotter-Schwellen wurden festgelegt auf einen Marker-spezifischen Prozentsatz des Marker-Allels. Wird dieser überschritten, wurde das Allel nicht als Stotter-Allel gezählt, sondern als tatsächliches Allel: TH01 (15%), D8S1179 (23%), vWA (22%), D18S51 (26%), D12S391 (29%), D22S1045 (22%), D2S441 (25%), D2S1338 (18%), D10S1248 (20%), D19S433 (17%), D21S11 (21%), D2S1338 (30%), D1S1656 (20%), FGA (24%), D3S1358 (29%), D10S1248 (25%), D16S539 (16%) und SE33 (ACTBP2, 29%).

2.15 Komplementäre Auswertung kurzer Amplikons mittels PowerPlex® ESX/ESI 17 Fast

Vergleichende Untersuchungen zur Performance verschiedener STR-Assays wurden mittels der PowerPlex® ESX 17 und PowerPlex® ESI 17 Fast Systeme (Promega, Madison, USA) durchgeführt mit 5 sec Injektionen auf dem ABI 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Waltham, USA) mit je 1 µL DNA-Einsatz. Die Amplifikation und Analyse eines Teils der Proben wurden in der Rechtsmedizin Bonn durchgeführt mit den komplementären PowerPlex® ESX 17 und ESI 17 Fast-Kits, die dieselben 16 STR-Loci nutzen, jedoch unterschiedlich lange PCR-Produkte amplifizieren. Für die komplementäre Auswertung wurden lediglich PCR-Produkte verwendet, die kürzer als 250 bp waren. Dafür wurden die STR-Marker D10S1248, D1S1656, D22S1045, D2S441, D12S391 von dem ESX 17 Fast-Kit genutzt, sowie die STR-Marker D19S433, D16S539, D18S51, TH01, D3S1358, vWA, D8S1179, FGA von dem ESI 17 Fast-Kit (Promega - PowerPlexESI 17 Fast 2021; Promega - PowerPlex ESX 17 Fast 2021; Hill et al. 2011). Es wurde die Reduzierung der Amplikonlänge auf die Allel-Recovery bzw. auf den Validitätsgrad untersucht, indem lediglich Amplikons mit weniger als 250 bp der komplementären PowerPlex® ESX 17 und ESI 17 Fast im Vergleich zu denselben Amplikons, die per maSTR-Assay analysiert wurden, zu Typisierung genutzt wurden. Dafür wurden jeweils die Promega-Kits mit denjenigen Markern genutzt, die am besten mit der Länge der Amplikons des maSTR Kits übereingestimmt haben. Beispielsweise ist TH01 in beiden

Promega-Kits ein kurzes Amplikon, im ESI Fast Kit jedoch noch kürzer als im ESX Fast Kit. Die Länge des Amplikons beträgt bei beiden Personen im maSTR-Assay 92 bp (Allel 7) bzw. 100 bp (Allel 9) und 103 bp (Allel 9.3), daher wurde für den Vergleich der TH01 Marker aus dem ESI Fast-Kit genutzt. Bei Fällen, in denen die ESX-typisierten Profile in Duplikaten durchgeführt wurden, wurden immer diejenigen Profile genutzt, welche die größte Recovery aufwiesen.

Die durch die ESX 17 und ESI 17 Fast-Kits generierten Profile wurden mit den jeweiligen Referenzprofilen verglichen, um die Allel-Recovery beziehungsweise Validitätsgrade (**Kapitel 2.17**) berechnen. Beim Vorliegen von mehreren Replikaten wurden jeweils diejenigen ESX 17 und ESI 17 Fast-Profilen für die komplementäre Zusammenstellung der kurzen STR-Marker genutzt, welche die höchsten Validitätsgrade aufwiesen.

2.16 ForenSeq DNA Signature Prep Sequenzierung

Das ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit (Illumina, San Diego, USA) wurde entsprechend den Angaben des Herstellers angewandt, beschrieben in (Illumina - ForenSeq™ DNA Signature Prep 2015). Zur Auswertung wurde die Illumina-eigene UAS-Software genutzt. Der genutzte Primermix des ForenSeq DNA Signature and Prep Kits umfasste 58 STRs (einschließlich 27 autosomaler STRs, 7 X- und 24 Y-Haplotyp-Marker), 94 identitätsinformativen SNPs (iSNPs), 56 abstammungsinformativen SNPs (ancestry SNPs, aSNPs) und 22 phänotypisch-informativen SNPs (pSNPs).

Zum Zeitpunkt der Sequenzierung war das von Illumina entwickelte ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit ebenfalls Teil des Illumina-Portfolios. Daher wurden die Angaben zur Länge der verwendeten Amplikons aus dem entsprechenden PDF des Reference Guides "forenseq-dna-signature-prep-guide-15049528-01_Sept2015", Table 2 (autosomale STRs) des Herstellers in der Version von September 2015 entnommen. Mittlerweile gehört das Kit nicht mehr zu Illumina, sondern ist Teil des Verogen-Portfolios (VeroGen, San Diego, USA). In dem PDF "ForenSeq-DNA-Prep-Guide-VD2018005-A" von Verogen in Table 2 (autosomale STRs) in der aktuellen Version von Juni 2018 werden Amplikonlängen angegeben, die sich um wenige Basenpaare von den Amplikonlängen unterscheiden, die im Reference Guide von Illumina angegeben wurden (für beide PDFs siehe Anhang). Für die Erstellung der Abbildung der Amplikonlängen wurden die Angaben des Illumina-vertriebenen Kits genutzt. Da der Zusammenhang zwischen der Anzahl der STR-Repeats und der tatsächlichen Länge der jeweiligen Amplikons in Abhängigkeit von der Repeat-Anzahl lediglich im Verogen-Reference Guide angegeben wurde, wurden diese Werte in Kombination mit den Amplikonlängen des Illumina-PDFs genutzt, um die tatsächlichen Amplikonlängen für die in dieser Studie genutzten DNA (von Person B und Person C) zu berechnen. Dafür wurde die minimale Amplikonlänge des Illumina-PDFs genutzt, um die Amplikonlänge des kleinsten im Verogen-PDF angegebenen Amplikons zu berechnen.

2.17 Berechnung des Validitätsgrades von STR-Profilen mittels Composite- und Consensus-Interpretation

Um die bestmögliche Interpretations-Strategie für STR-Profilen aus telogenen Haaren zu untersuchen, wurde DNA aus telogenen Haaren mittels der komplementären Multiplex-STR-Typisierungskits (PowerPlex® ESX 17, PowerPlex® ESI 17, Promega, Madison, USA) amplifiziert und per CE aufgetrennt. Alle Proben wurden ein oder zweimal mit dem ESX-Kit amplifiziert und einmal mit dem ESI-Kit. Der Interpretation der STR-Profilen mittels Composite- und Consensus-Methode lagen mindestens eine ESX-Analyse und genau eine ESI-Analyse zugrunde. Per Consensus-Strategie wurden alle Allele gezählt, die in den

zwei beziehungsweise drei Replikaten mindestens zweimal vorkommen, indem sie über dem AT von 50 RFU liegen (Benschop et al. 2011). Die Composite-Strategie zählt hingegen alle Allele, selbst wenn diese nicht reproduzierbar sind. Die Injektionszeiten der DNA-Proben aus telogenen Haaren lag bei 5 sec mit jeweils 1µL DNA.

Um Übereinstimmungen des Spurenprofils mit bekannten STR-Profilen zu vergleichen, wurde der Validitätsgrad gemäß Pfeifer et al. (Pfeifer et al. 2012) verwendet:

Validitätsgrad in % = $\frac{[\text{Anzahl der Allele im Referenzprofil} - \text{Anzahl der Drop-outs}]}{[\text{Anzahl der Allele im Referenzprofil} + \text{Anzahl der Drop-ins}]}$

Werte unterhalb 100% zeigen das Auftreten stochastischer Effekte an. Mit dieser Methode können unterschiedliche Interpretationsmethoden zur Bewertung von STR-Profilen miteinander verglichen werden, indem die Methode nicht nur Drop-out-Ereignisse bewertet, sondern zusätzlich der Einfluss der Allelic Drop-ins in die Berechnung eingeht.

2.18 Probabilistisches Verfahren

Für die Auswertung der maSTR-Assay-generierten Daten zur Nutzung in Software, die auf probabilistischen Berechnungen beruht, wurden die Profile konservativer in Bezug auf die Stotter-Schwellenwerte ausgewertet als dies bei den restlichen Auswertungen der Fall war (**Kapitel 2.14**). Die maSTR-generierten STR-Profile von DNA aus Haaren wurden entsprechend der Angabe der Read-Anzahl pro Allel per Composite und Consensus-Interpretation ausgewertet. Die daraus resultierenden Allel-Nummern, Readzahlen und anhand der Primer-Positionen berechneten Fragmentlängen der maSTR-generierten STR-Profile von DNA aus Haaren wurden in die GenoProof Mixture 3 Software (qualitytype GmbH, Dresden, Deutschland, (Götz et al. 2017)) eingeladen und die Readzahl im Folgenden als RFU-Werte behandelt. Zum Abgleich mit CE-erzeugten STR-Profilen (PowerPlex® ESX 17-Kit, Promega, Madison, USA) von DNA aus Haaren wurden diese als fsa-Dateien eingeladen. Mittels der GenoProof Mixture 3-Software wurden die semi- und vollständig kontinuierlichen Berechnungen des LR-Werts auf Basis der beiden fsa-Duplikate vorgenommen, die von der Software per Composite-Methode interpretiert wurde. Als Referenzprofile dienten Promega ESX-Profile, die aus Mundschleimhautabstrichen erzeugt wurden und die ebenfalls als fsa-Dateien eingeladen.

Die Software GenoProof Mixture 3 wurde genutzt, um mittels semi- und vollständig kontinuierlicher Verfahren die Zusammensetzung von gemischten STR-Profilen zu bewerten bzw. STR-Profile, die aufgrund von Drop-in-Ereignissen Ähnlichkeiten mit echten Mischprofilen aus Mischspuren aufwiesen (Götz et al. 2017). Für die Berechnung der Genotypen wurden die Allelfrequenzen der FBI-Datenbank aus dem Jahr 2016 der kaukasischen Population genutzt („Caucasian (FBI_2016)“, siehe Anhang). Für die vollständig kontinuierliche Berechnung wurden die folgenden Parameter genutzt: Als Ersatzfrequenzen wurde 0,001 genutzt und restlichen Allelfrequenzen wurden aufgefüllt, wenn die Summe geringer war als 1, ansonsten wurde normalisiert. Subpopulationen (Theta) und Verwandtschaften wurden nicht berücksichtigt. Schrittzahlen der Einschwingphase waren standardmäßig auf 100.000 und bei der Messung auf 500.000 gesetzt, Random-Walk-Standardabweichung auf 0,05. Es wurden immer vier Markov-Ketten parallel berechnet. Die Detektionsgrenze lag bei sechs und die Linearitätsgrenze bei 20.000 und die maximale Degradierung lag bei 0,02. Die Varianz der Amplifikationseffizienz lag bei 0,05, maximales N-1-Stotter-Verhältnis 0,3 bzw. für N+1-Stotter 0,1, die maximale Drop-in-Peak-Höhe lag bei 400, Drop-in-Alpha-Wert bei 0,005 bzw. Beta-Wert bei 0,05 und die Drop-in-Frequenz bei 0,001. Die minimale Allel-

Varianzkonstante wurde auf null gesetzt und die maximale auf 30. Bei den semikontinuierlichen Berechnungen werden die Drop-out- und Drop-in-Wahrscheinlichkeiten ebenfalls mit in die Berechnung einbezogen. Allerdings wird die Drop-out-Wahrscheinlichkeit nicht wie beim vollständig kontinuierlichen Modell berechnet, sondern vorgegeben (Standardeinstellung: heterozygot = 0,1 und homozygot = 0,005). Die Drop-in-Wahrscheinlichkeit ist mit 0,05 voreingestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Übersicht über die angewandte Strategie der vorliegenden Studie

Abbildung 3 bietet eine Übersicht über die angewandte Strategie der vorliegenden Arbeit. Der Gebrauch von Haaren in der Forensik kann in der Strafverfolgung eine sinnvolle und hilfreiche Methode darstellen. Die Herausforderung bei der Untersuchung von DNA aus Haaren besteht vor allem in der starken Degradierung der DNA, die häufig in sehr geringen Mengen im Pikogrammbereich vorkommt. In der vorliegenden Studie wurden Korrelationen zwischen dem Schweregrad der DNA-Degradierung und der DNA-Menge zu der Anzahl an erfolgreich detektierten STR-Allelen beschrieben (**Kapitel 3.2.6**). Dadurch wurde eine Methode etabliert, die es in der Zukunft ermöglichen soll, anhand des DNA-Degradierungsgrades (D-Wert) und der DNA-Menge Voraussagen über die potentielle Ausbeute an STR-Allelen (Allel-Recovery, **Kapitel 1.2.1**) zu treffen. Dafür wurde ein neuer qPCR-basierter Assay entwickelt (RiboD), der sowohl die DNA-Menge als auch den DNA-Degradierungswert bestimmt (**Kapitel 3.2.1**). Die Funktionsweise des Assays wurde anhand artifiziell degradiertes DNA nachgewiesen (**Kapitel 3.2.2**). Die Validierung des Assays wurde durch Abgleich der Ergebnisse mit einem kommerziell erhältlichen Kit durchgeführt (Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit, Thermo Fisher Scientific, **Kapitel 3.2.3**). Das Funktionsprinzip des RiboD-Assays wurde auf canine DNA übertragen und an DNA von Hunden getestet.

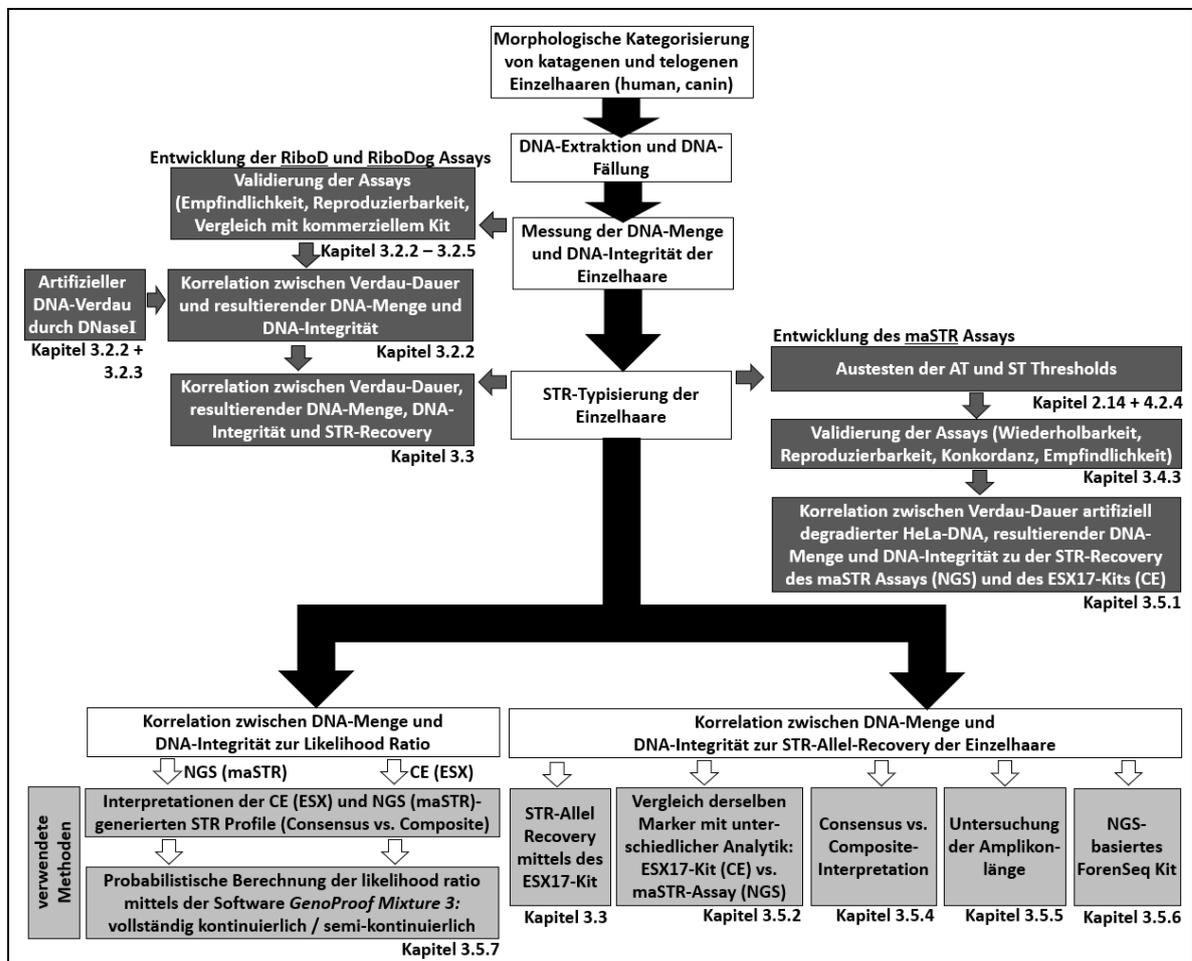


Abbildung 3: Übersicht über die Vorgehensweise der vorliegenden Studie

Übersicht über die angewandte Strategie der vorliegenden Studie inklusive Verweis auf die jeweiligen Kapitel.

Anschließend wurde der jeweilige spezifische Assay zur Bestimmung der DNA-Menge und Integrität von DNA aus ausgefallenen Haaren von Menschen und Hunden angewandt, um die Korrelation zur Allel-Recovery bei realen Spurentypen zu untersuchen (**Kapitel 3.3**). Die STR-Typisierung wurde mit dem kommerziellen PowerPlex® ESX 17-Kit (Promega, Madison, USA) durchgeführt, das auf der Technik der Kapillarelektrophorese (CE) beruhen. Diese Technik erlaubt keine überlappenden Fragmentlängen, wodurch lediglich eine begrenzte Anzahl an STR-Markern ähnlicher Fragmentlänge parallel amplifiziert und detektiert werden. Aufgrund der Beschaffenheit der DNA aus ausgefallenen Haaren, die sich durch hohe DNA-Degradierung auszeichnet, sind vor allem sehr kurze STR-Marker (Mini-STRs) für deren Typisierung geeignet. Die Technik der *Next Generation Sequenzierung* (NGS) ermöglicht die parallele Analyse kurzer STR-Marker ähnlicher Fragmentlänge, weswegen ein neues NGS-Kit von der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg entwickelt wurde, das ausschließlich Mini-Amplikon-STRs nutzt (maSTR-Assay). Dieser Assay wurde in der vorliegenden Studie in Bezug auf die Empfindlichkeitsgrenze, die Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit untersucht (**Kapitel 3.4.3**) und sowohl auf artifiziell degradierte DNA (**Kapitel 3.5.1**) als auch auf DNA aus ausgefallenen humanen Haaren angewendet (**Kapitel 3.5.2**). Der NGS-basierte maSTR-Assay analysiert dieselben STR-Marker wie das PowerPlex® ESX 17-Kit (Promega, Madison, USA), wodurch die Performance beider Assays miteinander verglichen werden konnten (**Kapitel 3.5**). Um den Einfluss der Marker-Länge auf den Erfolg der STR-Typisierung zu untersuchen, wurden die bisherigen Ergebnisse mit weiteren CE-basierten Kits (PowerPlex® ESX 17 und ESI 17 Fast-Kits, **Kapitel 3.5.5**) und einem kommerziellen NGS-basierten Kit (ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit, Illumina, **Kapitel 3.5.5**) verglichen. Um eine für ausgefallene Haare geeignete Strategie zu finden, wurde die Interpretation mittels der Consensus- und der Composite-Methode untersucht (**Kapitel 3.5.4** und **3.5.7**). Interpretierte Profile wurden ebenfalls für biostatistische Berechnungen mittels semi- und vollständig kontinuierlichen probabilistischen Verfahren (**Kapitel 3.5.7**) genutzt.

3.2 Entwicklung von zwei Protokollen zur Messung der Menge und Integrität von DNA bei Menschen und Hunden

In dieser Studie wurden SYBR Green-basierte Singleplex-qPCR-Assays etabliert, die auf rDNA-Sequenzen von Mensch (RiboD-Assay) bzw. Hund (RiboDog-Assay) abzielen, um die Menge und Integrität von DNA aus ausgefallenen Einzelhaaren zu bestimmen.

3.2.1 Primerdesign

Um eine ausreichende Empfindlichkeit sicherzustellen, basiert das Verfahren auf einer qPCR, die spezifisch auf eine Sequenz abzielt, die in mehreren Kopien pro Genom vorhanden ist. Es wurden dafür Sequenzen der ribosomalen DNA (rDNA) genutzt, da diese in tandemartig-repetitiv angeordneten Clustern von etwa 400 Kopien pro diploider Zelle auf den menschlichen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 verteilt sind (Henderson et al. 1972; Long und Dawid 1980; Veiko et al. 2003). Es besteht eine beträchtliche Sequenzdiversität in den regulatorischen Regionen, was eine Anpassung an menschliche DNA oder nicht-menschliche Spezies ermöglicht (Srivastava und Schlessinger 1991; Agrawal und Ganley 2018). Die menschengespezifischen Primer zielen auf eine Region des rDNA-Promotors innerhalb des *intergenic spacer* (IGS) ab, die im Gegensatz zu der 5S, 5,8S und 28S-rDNA zwischen verschiedenen Spezies nur wenig konserviert ist (Srivastava und Schlessinger 1991; Agrawal und Ganley 2018; Symonová 2019). Zur Quantifizierung wird ein kurzes Amplikon (67 bp, **Abbildung 4**) verwendet, von dem

erwartet wird, dass es nur wenig von der DNA-Degradierung beeinflusst wird, während ein langes Amplikon (362 bp), das anfälliger für DNA-Degradierung ist, zur Beurteilung der Stärke der DNA-Degradierung dient. Wie in **Abbildung 4** dargestellt, sind beide Amplikons innerhalb einer 720 bp langen Zielsequenz (8249466-8250185 bp, Contigs NT_187317, NT_187318 und 8432491-8433210 von NC_000021.9, Homo sapiens Chromosom 21, GRCh38.p12) durch 291 bp getrennt. Die Zielsequenz des kurzen Amplikons befindet sich 11 bp stromaufwärts der + 1-Stelle der 45S-Prä-rDNA. Die 720 bp lange Sequenz befindet sich auch auf Chromosom 22 (NT_187388.1) und auf einem unplatzierten genomischen Gerüst (*unplaced genomic scaffold*, NT_167214.1).

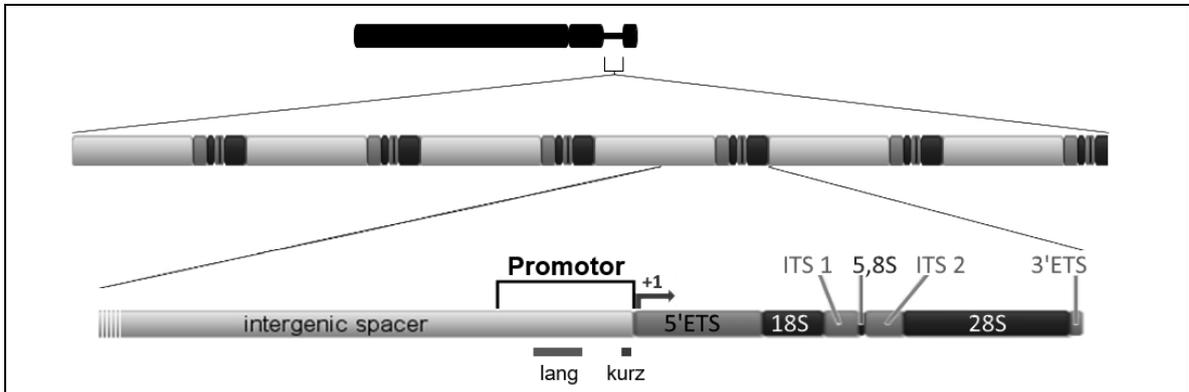


Abbildung 4: Schematische Darstellung der humanen rDNA-Organisation

Schema der humanen genomischen Zielsequenzen innerhalb der rDNA-Sequenzen der Nucleolus-Organisatorregion eines akrozentrischen Chromosoms, die für den RiboD-Assay innerhalb der rDNA-Sequenzen von Chromosom 13, 14, 14, 21 und 22 in der Nucleolus-Organisatorregion verwendet wurden. Die für die qPCR genutzten Sequenzen liegen im Promotor-Bereich, der dem transkribierten Bereich vorgeschaltet ist. Dieser Bereich besteht aus der 18S, 5,8S und 28S-rDNA inklusiver der *external transcribed sequences* (ETS) und *internal transcribed sequences* (ITS). +1 markiert den Transkriptionsstart. Modifiziert nach (Miller und Beatty 1969).

Amplikons für den RiboDog-Assay wurden analog zum menschlichen System entwickelt. Zur Quantifizierung wird ein kurzes (87 bp) Amplikon verwendet, während die Integrität der DNA unter Verwendung eines langen Amplikons (313 bp) bestimmt wird. Beide Primerpaare amplifizieren PCR-Produkte der erwarteten Länge (**Abbildung 5**).

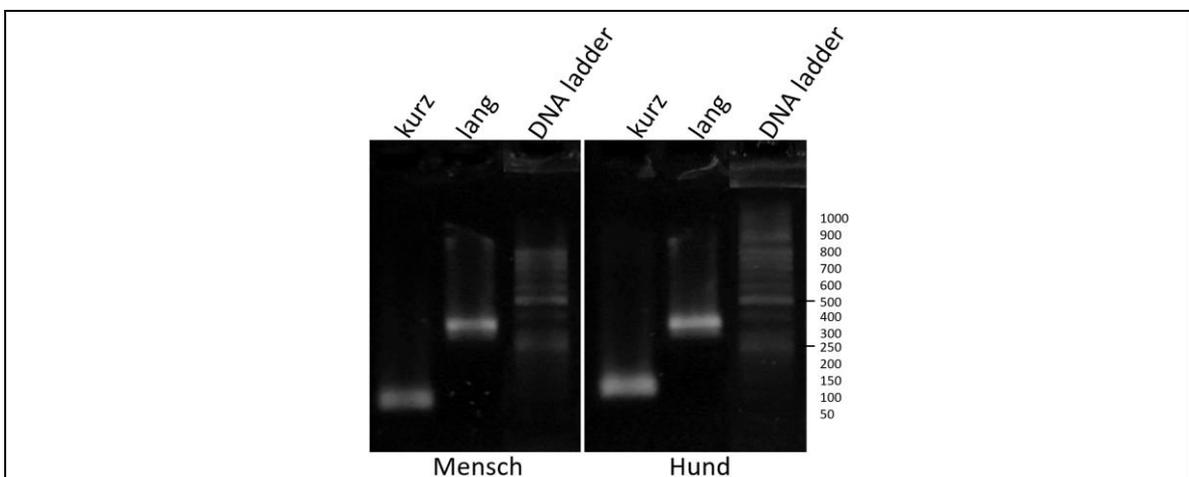


Abbildung 5: Nachweis der PCR-Produkte der RiboD- und RiboDog-Assays

Die PCR-Produkte des humanen RiboD-Assays (67 bp und 362 bp) und des caninen RiboDog-Assays (87 bp und 313 bp) wurden mit der jeweilig passenden Template-DNA (Mensch bzw. Hund) erstellt und auf einem zweiprozentigen Agarosegel aufgetragen. Längenstandard: GeneRuler 50bp DNA Ladder ready-to-use. Alle gezeigten Wells befanden sich auf demselben Gel und wurden nachträglich für die Abbildung nebeneinander dargestellt.

3.2.2 Bestimmung von DNA-Mengen und DNA-Degradierungswerten mit artifiziell degradiertes DNA

Menschliche (HeLa) und canine (MDCK) DNA wurde durch DNase I-Verdau für verschiedene Zeiträume schrittweise artifiziell degradiert und zur Validierung der beiden qPCR-Assays hinsichtlich DNA-Menge und -Integrität verwendet (**Abbildung 6** und **Abbildung 7**). Im repräsentativen Gelbild (**Abbildung 6**) zeigt sich, dass die verdaute DNA einen Schmier auf einem Agarosegel erzeugt, der umso weiter in den Bereich mit niedrigem Molekulargewicht reicht, je länger die DNA verdaut wurde.

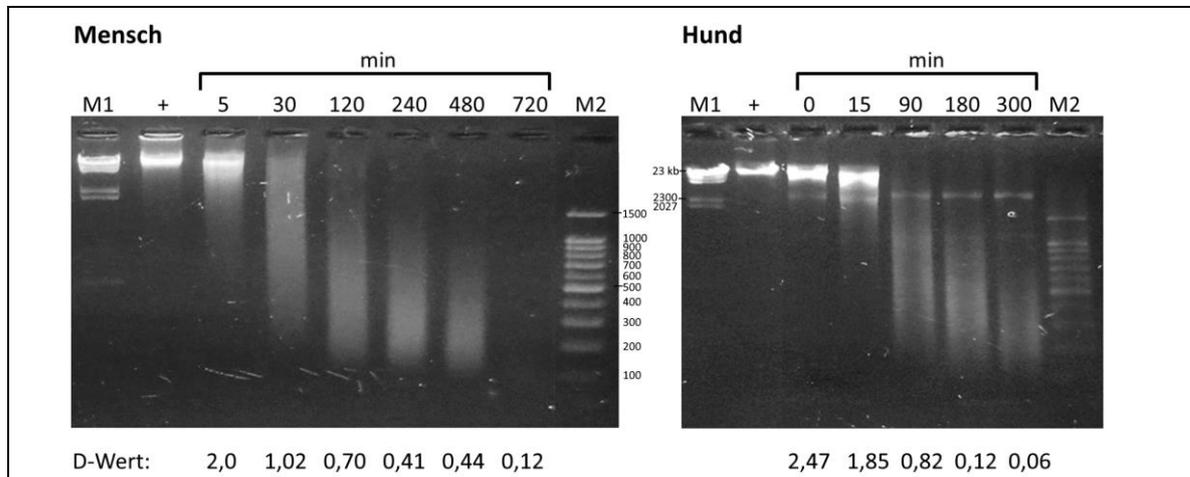


Abbildung 6: Serielle Degradierung genomischer DNA

Serieller DNase I-Verdau, visualisiert auf einem zwei Prozentigem Agarosegel. Die Dauer gibt die Länge der DNase I-Behandlung an (in Minuten). Mensch: DNase I-Verdau von HeLa-DNA. Hund: DNase I-Verdau von caniner DNA aus MDCK-Zellen. M1-Marker: λ DNA/HindIII, M2-Marker: mi-100 bp+ DNA Marker Go (Angaben in Basenpaaren). +: Unverdaute Positivkontrolle (HeLa-DNA bzw. DNA aus MDCK-Zellen). D-Wert: DNA-Degradierungswert, berechnet mit dem jeweiligen qPCR-Assay (RiboD für humane DNA; RiboDog für canine DNA). Die hier gezeigten D-Werte stimmen mit den für 1000 pg DNA berechneten D-Werten in **Abbildung 7** B und D überein.

Die unterschiedlich lange verdaute DNA-Proben wurden in den entsprechenden humanen RiboD-Assays und caninen RiboDog-Assays gemessen. Dabei wurde die DNA-Menge und der DNA-Degradierungsgrad bestimmt. Der als D-Wert bezeichnete DNA-Degradierungsgrad ist das Verhältnis der berechneten DNA-Mengen an langem und kurzem Amplikon des qPCR-Assays (**Kapitel 2.9**). Je niedriger die D-Werte sind, desto ausgeprägter ist die DNA-Degradierung. Die Messungen wurden in 22 (Mensch) und einem (Hund) qPCR-Ansatz an den qPCR-Geräten Roche LightCyclerII (Mensch) und qTower3 (Hund) durchgeführt. Alle Daten, einschließlich der PCR-Effizienz, sind in den Zusatzdaten aufgeführt (siehe Anhang 1, S1, S2, S4, S7). Die Anzahl der Replikate wird in **Abbildung 7** A und C aufgeführt.

Wie in **Abbildung 7** gezeigt, korrelieren abnehmende DNA-Mengen (sowohl für kurze als auch lange Amplikons; A, C) und abnehmende D-Werte (B, D) mit der Degradierungsdauer für alle initial eingesetzten DNA-Mengen (1 bis 1000 pg für menschliche DNA, 10 bis 1000 pg für canine DNA; die DNA-Mengen beziehen sich auf gemessene DNA-Mengen vor dem DNase-Verdau). Die DNA-Menge des kurzen Amplikons wurde zu Beginn der DNase-Verdau nur geringfügig beeinflusst und kann somit unabhängig vom Verdau Informationen über die DNA-Konzentration liefern. Das lange Amplikon wurde durch den Verdau stärker beeinflusst als das kurze Amplikon, so dass die D-Werte sowohl für den menschlichen als auch für den caninen Assay mit zunehmender DNA-Degradierung abnahmen. Vor allem bei intakter oder nur mäßig

degradiertes DNA wurden die D-Werte deutlich durch die Menge der eingegebenen DNA beeinflusst. Serielle Verdünnungen von DNA-Proben, deren DNA-Mengen und DNA-Degradierungen bekannt sind, zeigen umso geringere D-Werte, je stärker die Proben verdünnt sind.

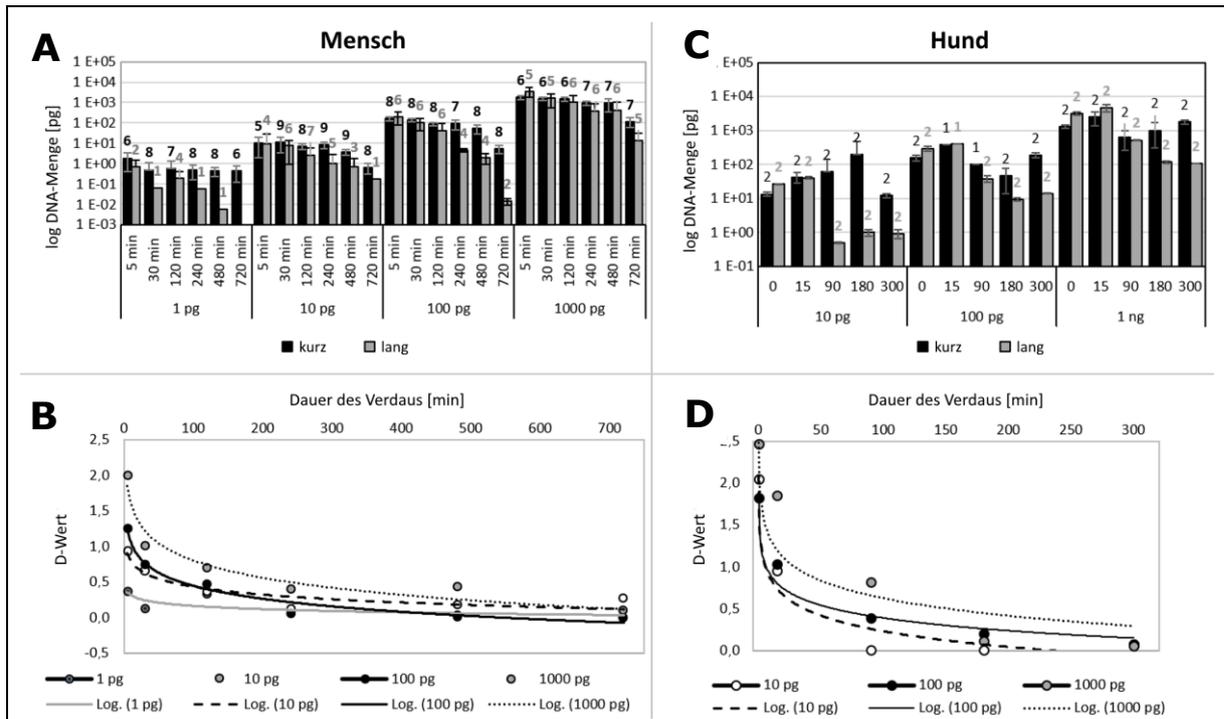


Abbildung 7: Einfluss des DNase-Verdau auf die DNA-Menge und -Integrität

Auswirkung des artifiziellen DNase-Verdau auf die beiden qPCR-Assays in Abhängigkeit von der Verdauungsdauer und der ursprünglich verwendeten DNA-Menge. A, B: Mensch. C, D: Hund. A, C: Durchschnittliche, gemessene DNA-Mengen, sortiert nach der ursprünglich eingesetzten DNA-Menge (1, 10, 100, 1000 pg). Schwarze Balken stehen für kurze Amplikons, während graue Balken lange Amplikons repräsentieren. Die DNA-Mengen wurden anhand der C_q -Werte berechnet, die D-Werte aus dem Quotienten der jeweils berechneten DNA-Mengen der beiden Amplikons. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung (\pm SD) dar; Anzahl der gemessenen Proben (n) oberhalb jedes Balkens. B, D: Korrelation des D-Werts (y-Achse) und der Degradierungsdauer (x-Achse) für die verschiedenen angegebenen Mengen an eingesetzter DNA.

Mit dem RiboD-Assay wurde eine ausreichende Präzision über 1 pg für intakte DNA und 10 pg degradierte DNA erreicht. Degradierete DNA mit Mengen von weniger als 10 pg zeigte eine inkonsistente Amplifikation des langen Amplikons. Die Empfindlichkeitsgrenze für den RiboD-Assay für intakte DNA befindet sich daher bei 1 pg und für degradierte DNA bei 10 pg. Für Hunde-DNA zeigte degradierte DNA von 10 pg starke Variationen. Im Allgemeinen schienen die Hunde-qPCR-Assays weniger präzise zu sein als die humanen qPCR-Assays, was mit der geringeren Anzahl analysierter Replikate zusammenhängen könnte (**Abbildung 7 A und C**).

3.2.3 Validierung des humanen RiboD-Assays

Der zuvor beschriebene artifizielle DNase-Verdau von HeLa-DNA mit DNase I wurde mit einer höheren Anzahl an Verdau-Dauern unter leicht veränderten Bedingungen wiederholt, um die Aktivität der DNase leicht zu erhöhen und dadurch dieselbe Bandbreite des vorherigen Verdau in kürzerer Dauer zu erreichen. Die erhaltenen Proben bestätigten die vorherigen Ergebnisse, da mit der Verdau-Dauer der Schmier auf

einem Agarosegel in Richtung des geringeren Molekulargewichtes wanderte und die D-Werte abnahmen (**Abbildung 8**).

Der D-Wert und die DNA-Menge zweier auf die Einsatzmenge von 10 ng (vor dem Verdau) und 333 pg (nach dem Verdau) normalisierten Probensätze wurden sowohl mit dem Quantifiler® Trio-Kit als auch mit dem RiboD-Assay gemessen, um letzteren zu validieren (**Abbildung 9**). Die Probensätze beinhalteten sowohl intakte DNA als auch artifiziell degradierte DNA, so dass die beiden unterschiedlichen Assays in Bezug auf die Empfindlichkeit bei Einsatz von degradierter DNA verglichen wurden.

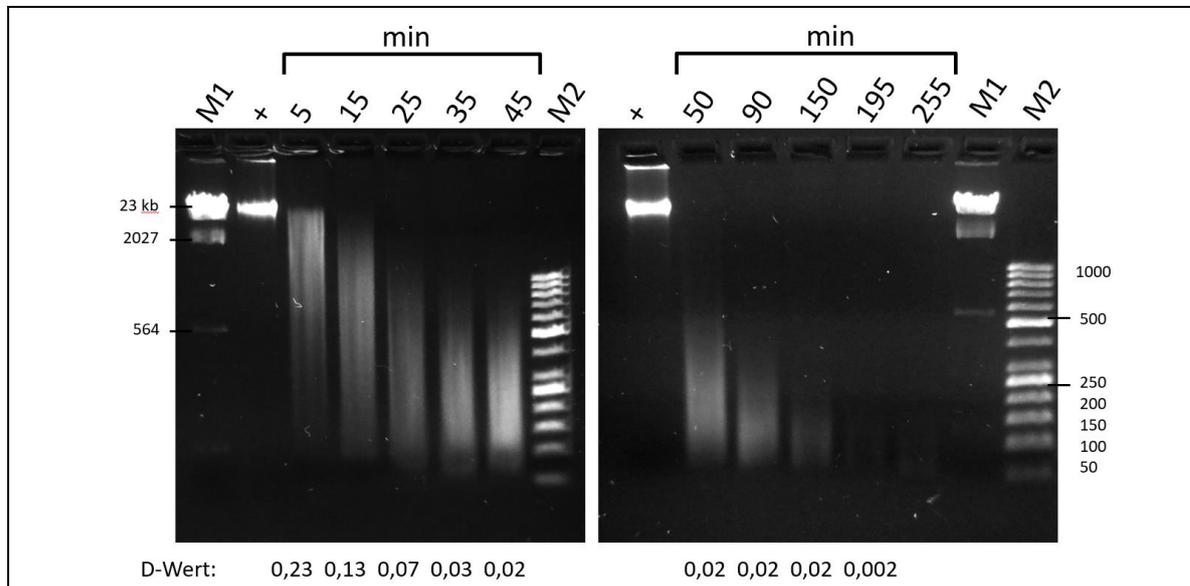


Abbildung 8: Serielle Degradierung menschlicher HeLa-DNA

Serieller DNase I-Verdau von HeLa-DNA, visualisiert auf einem zwei Prozentigen Agarosegel. Die Dauer gibt die Länge der DNase I-Behandlung an (in Minuten). M1-Marker: λ DNA/HindIII, M2-Marker: GeneRuler 50 bp DNA Ladder, ready-to-use (Angaben in Basenpaaren). +: Unverdaute Positivkontrolle (HeLa-DNA). D-Wert: Degradierungswertwert, berechnet mit dem RiboD qPCR-Assay. Die hier gezeigten D-Werte stimmen mit den für 333 pg DNA berechneten D-Werten in **Abbildung 9** und **Abbildung 11** überein. Die 255 min verdauten Probe wurde nicht quantifiziert und wurde fortan von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Die verdauten Proben wurden in zwei identischen Ansätzen erzeugt und auf zwei unterschiedliche Agarosegele geladen.

Die Ergebnisse zeigen, dass der RiboD-Assay und das Quantifiler® Trio-Kit Assays im Bereich von 10.000 pg bis ungefähr 100 pg DNA-Mengen und Integrität zu quantifizieren vermögen. Beide Assays zeigen den Trend, dass mit zunehmender DNA-Degradierung der D-Wert und die DNA-Menge abnimmt (**Abbildung 9**). Es wurde jedoch eine geringere PCR-Effizienz des RiboD-Assays im Vergleich zum Quantifiler® Trio Kit nachgewiesen (siehe Anhang 1, S2).

Da sich die Normalisierung der DNA-Proben der Einsatzmenge von 10 ng für den DNA-Degradierungswert vor dem DNase-Verdau bezieht, die Normalisierung des 333 pg-Datensatzes mit den Proben nach dem DNase-Verdau geschah, nehmen die DNA-Mengen des „10 ng“-Datensatzes bei beiden Quantifizierungs-Assays entsprechend der Dauer des DNase-Verdau ab, während der „333 pg“-Datensatz relativ stabil bleibt (**Abbildung 9 A**).

Mit 10 ng eingesetzter DNA zeigen beide qPCR-Assays eine Korrelation zwischen zunehmender Verdau-Dauer und abnehmenden DNA-Mengen (10 ng Proben, **Abbildung 9 A**) und sinkenden D-Werten (**Abbildung 9 B**). Die D-Werte des Quantifiler® Trio-Kits

decken jedoch einen größeren Bereich für DNA ab, die zwischen 5 und 25 Minuten verdaut wurde (schwach degradierte DNA).

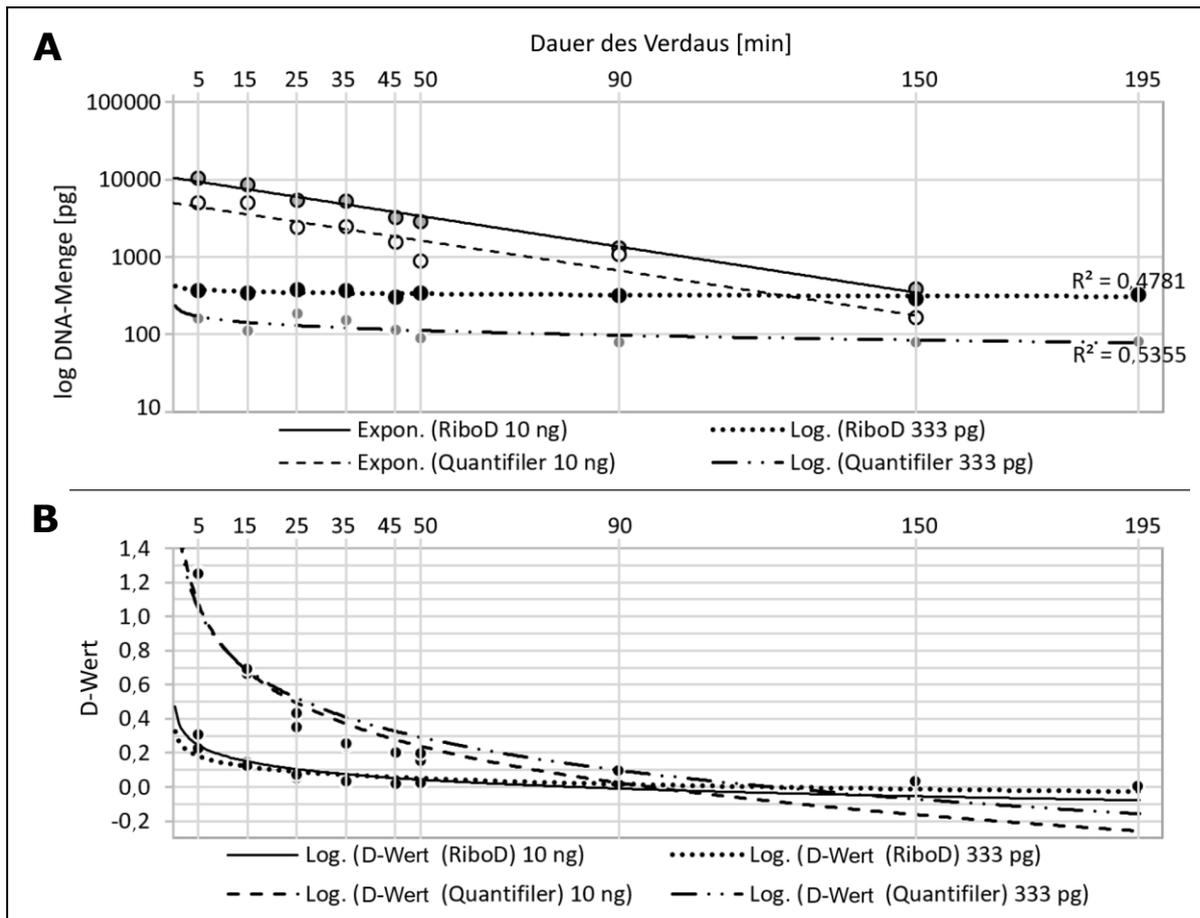


Abbildung 9: Vergleich des RiboD-Assays und des Quantifiler® Trio-Kits

A: Gemessene DNA-Menge nach dem DNase I-Verdau für die jeweils eingesetzten DNA-Mengen. B: D-Werte der eingesetzten DNA für die DNA-Mengen von 10 ng und 333 pg. Die degradierten DNA-Proben wurden auf 10 ng (vor dem Verdau) und 333 pg (nach dem Verdau) normalisiert. Die x-Achse in den Abbildungsteilen A und B repräsentiert die Dauer, für die die DNA mittels DNaseI verdaut wurde (5, 15, 25, 35, 45, 50, 90, 150, 195 min). Für den RiboD-Assay wurden Messungen mit einem qTower3-Thermocycler (Analytik Jena) durchgeführt, während das Quantifiler®-Kit mit einem 7500 Fast Instrument (Applied Biosystems) durchgeführt wurde. Um die DNA-Degradierungswerte zwischen dem RiboD-Assay und dem Quantifiler® Trio Kit zu vergleichen, wurden die reziproken Werte für das Quantifiler® Trio Kit angegeben.

3.2.4 Testung unterschiedlicher DNA zur Kalibrierung

Für alle bisherigen, in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen, wurden serielle Verdünnungen von HeLa-DNA als Kalibratoren für die qPCR-Kalibrierungskurve des RiboD-Assays verwendet. Aufgrund möglicher Aneuploidien bei HeLa-DNA, einer Tumorzelllinie, wurde die Promega 2800M-DNA als potenzieller Ersatz für die Erstellung der Kalibrierungskurve getestet. Im Durchschnitt führte die 2800M-DNA als Kalibrierstandard zu DNA-Mengen von etwas weniger als einem Drittel geringerer Menge als bei Messungen mit HeLa-DNA als Kalibrierstandard, während die D-Werte nur geringfügig beeinflusst wurden (siehe Anhang 1, S4).

3.2.5 Speziespezifität des humanen RiboD-Assays

Der RiboD-Assay sollte spezifisch Menge und Integrität humaner DNA in forensischen Proben bestimmen, um über einzusetzende Mengen in nachfolgenden STR-Analysen zu informieren. Weiterhin ist die Speziespezifität von PCR-basierten Quantifizierungsmethoden ein wichtiger Maßstab, um die Möglichkeiten von Kontaminationen durch nicht-menschliche DNA einzuschätzen. Daher wurde die Speziespezifität des RiboD-Assays unter Verwendung von DNA von Menschen und verschiedenen Tieren getestet, einschließlich Individuen der Homininae-Unterfamilie (Mensch, Gorilla, Schimpanse), Hund und Maus sowie verschiedener Fliegenarten der Ordnung Diptera (Ceratitis capitata, Aedes aegypti, Drosophila suzukii). Obwohl der RiboD-Assay zu Amplifikationsprodukten mit DNA der getesteten, nicht-menschlichen Spezies führte, konnten insbesondere Amplifikationsprodukte des Assays von anderen Säugetier-Spezies (Maus, Hund) unter Verwendung des langen Amplikons mittels Schmelzkurvenanalyse und Agarose-Gelelektrophorese klar von menschlicher DNA unterschieden werden. Eine Ausnahme bildete die DNA von Gorilla und Schimpanse, die zu sehr ähnlichen PCR-Produkten wie beim Menschen führte, was auf eine hohe Konservierung der ribosomalen DNA-Sequenzen zwischen Mitgliedern der Homininae-Unterfamilie hinweist (**Abbildung 10**).

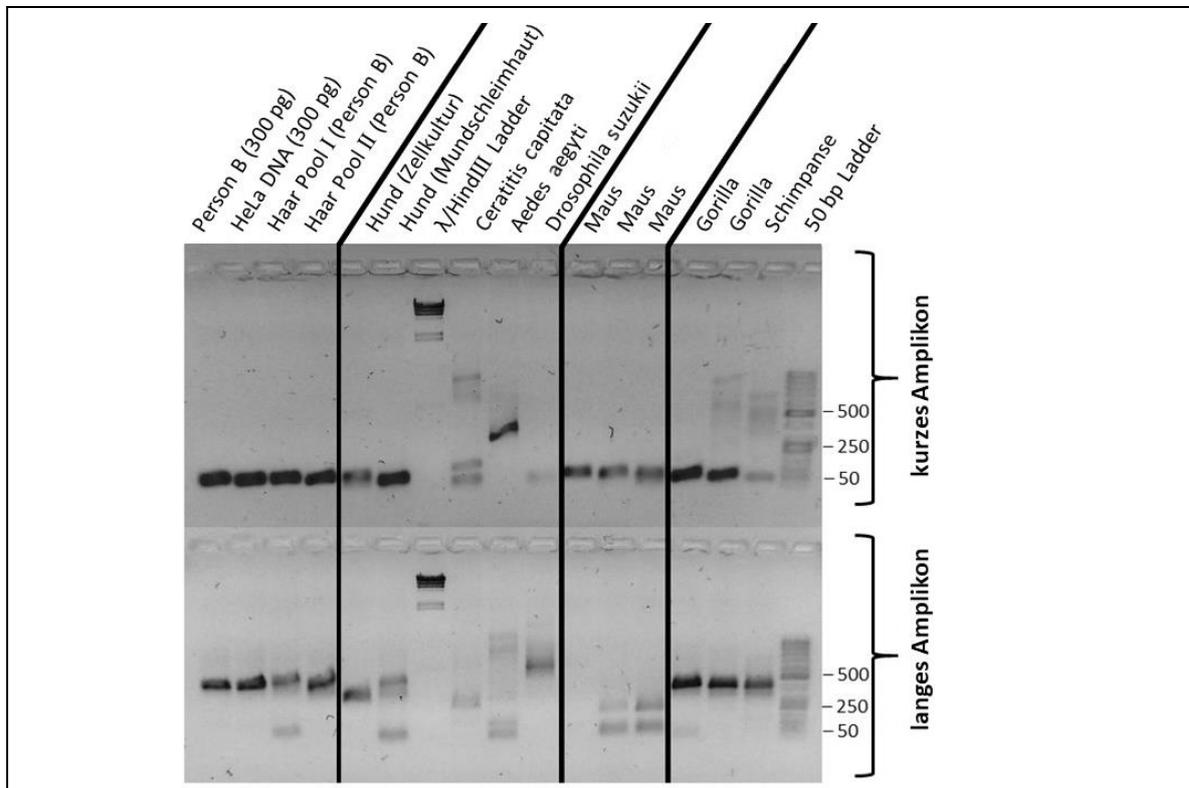


Abbildung 10: Nachweis der Speziespezifität des humanen RiboD-Assays

Der qPCR-Assay wurde mittels unterschiedlicher DNA aus unterschiedlichen Tierarten und Mensch durchgeführt und die entstandenen PCR-Produkte nach Abschluss der qPCR auf einem zweiprozentigen Agarosegel aufgetrennt. Längenstandard: GeneRuler 50bp DNA Ladder ready-to-use (Angaben in Basenpaaren).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass der RiboD-Assay sowie der RiboDog-Assay sicher verwendet werden können, wenn die Spezies der Probe anderweitig bestätigt werden kann, beispielsweise durch mikroskopische Morphologie bei Haaren und taxonomische Untersuchungen mittels der nukleären DNA oder mtDNA.

3.2.6 Voraussage der STR-Allel-Recovery unter Verwendung des RiboD-Assays von artifiziell verdauter humaner DNA

Der RiboD-Assay soll zur Voraussage des Typisierungserfolges bei forensischen DNA-Proben verwendet werden. Daher wurde im Folgenden getestet, ob DNA-Menge und D-Wert über die Anzahl der erhaltenen STR-Allele der artifiziell degradierten DNA (**Kapitel 3.2.3**) Auskunft geben kann. Dafür wurden die DNA-Mengen und D-Werte der verdauten Proben in Korrelation gesetzt zu der Anzahl der erhaltenen, konkordanten STR-Allele (Allel-Recovery, **Kapitel 1.2.1**) nach erfolgter STR-Typisierung unter Verwendung des PowerPlex® ESX 17-Kits (Promega, **Abbildung 11**). Zur Berechnung der Allel-Recovery wurden die Allele der Referenzprobe (intakte HeLa-DNA) mit den STR-Profilen der artifiziell verdauten HeLa-D verglichen: Die Allel-Recovery gibt die Anzahl der Allele des untersuchten Profils an, die mit dem jeweiligen Referenzprofil übereinstimmen. Da die Allel-Recovery sowohl von der eingesetzten DNA-Menge als auch von dem Grad der DNA-Degradierung abhängt, wurden konstante DNA-Mengen eingesetzt, um den Einfluss der DNA-Degradierung gezielt zu untersuchen. Durch den Einsatz von jeder DNA-Probe in drei unterschiedlichen Verdünnungen (333 pg, 33pg und 3,3 pg) wurde eine Normalisierung erreicht, bei der sich die Allel-Recovery innerhalb der Verdünnungsstufe lediglich durch die D-Werte der eingesetzten DNA unterscheidet. Die Verdünnung auf 333 pg wurde als der Realität angemessen erachtet, da einzelne telogene Kolbenwurzeln gewöhnlich nicht mehr als 300 pg DNA ergaben (**Kapitel 3.3**).

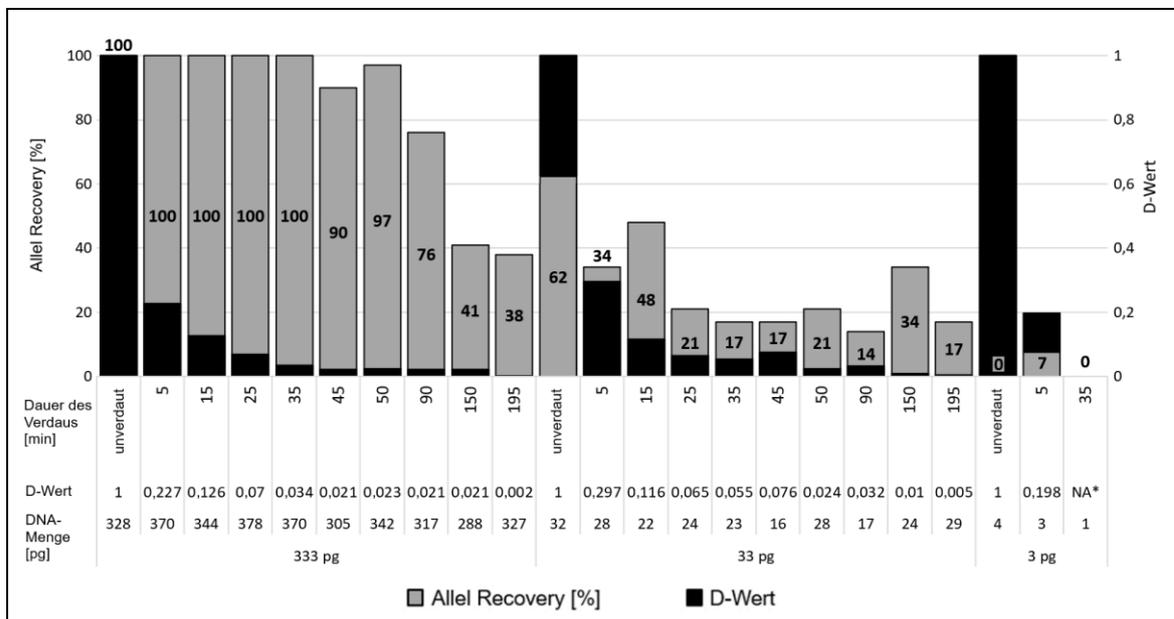


Abbildung 11: Einfluss des DNase-Verdau auf die Allel-Recovery

Ergebnisse der STR-Typisierung von artifiziell verdauter und intakter HeLa-DNA, typisiert mittels des PowerPlex® ESX 17-Kits (Promega). Die seriellen Verdünnungen von intakter und verdauter (neun Stufen des schrittweisen DNase-Verdau von 5 bis 195 min) HeLa-DNA sind geordnet nach der DNA-Menge (333 pg, 33 pg und 3 pg) aufgetragen. Gestapelte Balken repräsentieren die Allel-Recovery und den D-Wert jeder Probe: Schwarze Balken zeigen den D-Wert (Werte zwischen 0 und 1, rechte y-Achse). Graue Balken geben die Allel-Recovery in Prozent an (innerhalb und über den Balken). Zwei Proben mit einer DNA-Menge von vier beziehungsweise einem Pikogramm DNA (intakt und Verdau-Dauer 35 min) ergaben keine Allele. Die letztere Probe erzeugte keinen C_q -Wert durch Messen des langen Amplikons, daher war ein D-Wert nicht anwendbar (NA*). Es wurden keine Replikate durchgeführt.

Um die beobachteten Korrelationen zwischen der DNA-Degradierung und den Allel-Recoveries der STR-Typisierungen zu formulieren, wurden die in **Tabelle 3** aufgeführten verbalen Prädikate für die Beschreibung der D-Werte genutzt. Diese wurden mit dem

RiboD-Assay berechnet, weshalb die D-Werte nicht auf andere qPCR-Assays übertragen werden können. Die D-Werte stehen in Relation zu geringen DNA-Mengen (weniger als 2 ng DNA). Eine genauere Zuordnung zu bestimmten DNA-Mengen ist für diese D-Werte nicht anwendbar, da der D-Wert umso geringer ausfällt, je niedriger die eingesetzte DNA-Menge ist (**Abbildung 7 B**). Die Bereiche der D-Werte orientieren sich an dem Gelbild von **Abbildung 8**: Leicht degradierte DNA zeigt bereits einen deutlichen Schmier, der sich weiter verkürzt und umso weiter in den Bereich der niedrigeren Molekulargewichte wandert, je länger verdaut wurde. Ab einer Verdau-Dauer von 35 min ist die DNA stark degradiert und ab einem Verdau-Dauer von 195 min ist die extrem verdaute DNA auf dem Gelbild fast nicht mehr erkennbar.

Tabelle 3: Verbale Prädikate der DNA-Degradierungsgrade von humaner DNA

Degradierung	leicht	mäßig	ausgeprägt	stark	extrem
D-Wert	< 1-0,2	< 0,2-0,1	< 0,1-0,05	< 0,05-0,01	< 0,01

Wie in **Abbildung 11** dargestellt, nahm die Allel-Recovery mit zunehmender DNA-Verdau-Dauer (und dadurch zunehmendem Grad der DNA-Degradierung, gemessen anhand des D-Werts) und abnehmender DNA-Menge ab: Je länger der DNase I-Verdau dauerte, desto weniger Allele wurden gewonnen. Zusätzlich zeigt **Abbildung 11** anhand der drei Verdünnungs-Stufen (333 pg, 33 pg, 3,3 pg), dass umso weniger Allele erhalten wurden, je weniger DNA in die STR-Typisierung eingesetzt wurde. Intakte und leicht, mäßig, sowie ausgeprägt und stark degradierte DNA (entsprechend Verdau-Dauern von 5, 15, 25 und 35 min) mit einer Menge von etwa 333 pg zeigten keine Allelic Drop-outs. Bei noch längerem DNase-Verdau, resultierend in D-Werten unterhalb 0,023, war die Allel-Recovery jedoch stark beeinträchtigt. Bei der Analyse von DNA-Mengen im Bereich von 33 pg nahm die Allel-Recovery stark ab, sodass selbst für intakte DNA lediglich 62% der Allele detektiert werden konnten. Dieselben Proben degradiert DNA wiesen daher in der 1:10-Verdünnung im Bereich von 30 pg eingesetzter DNA wesentlich mehr Drop-outs auf als beim Einsatz der zehnfachen DNA-Menge. Auf 3 pg normalisierte Proben haben die Empfindlichkeitsgrenze des PowerPlex® ESX 17-Kits erreicht: Es werden keine oder nur sehr wenige Allele nachgewiesen. In keinem Fall wurden mit beiden Methoden andere Allele als die erwarteten gefunden.

Die vorliegenden Ergebnisse rechtfertigen die Annahme, dass die zu erwartende STR-Recovery für DNA geringer Menge vorausgesagt werden kann, wenn lediglich die beiden per RiboD-Assay gemessenen Faktoren der DNA-Menge und der DNA-Integrität vorliegen. Diese Annahme wird in den weiteren Kapiteln weiter untersucht.

3.3 Zusammenhang zwischen DNA-Menge und Degradierung zur Allel-Recovery bei Einzelhaaren

Der Ribo-Assay ermöglicht aufgrund seiner hohen Empfindlichkeit die Analyse der DNA aus einzelnen telogenen Haaren. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob für diesen Spurentyp eine ähnliche Korrelation zwischen der DNA-Menge und DNA-Degradierung zu der Allel-Recovery besteht, wie in **Kapitel 3.2.6** bereits gezeigt wurde. Dadurch könnte eine Voraussage der Allel-Recovery für DNA aus Einzelhaaren ermöglicht werden, die auf den qPCR-Ergebnissen der DNA-Menge und -Integrität basiert.

Um dies zu untersuchen, wurde DNA aus einzelnen Haaren aus einem Kollektiv von Menschen- bzw. Hundehaaren extrahiert, DNA-Menge und DNA-Degradierungsgrad mittels der RiboD- bzw. RiboDog-Assays bestimmt und einer speziesspezifischen STR-

Analyse unterzogen. Als Referenzprofile dienten Mundschleimhaut-Abstriche der drei Hunde und zwei menschlichen Individuen, von denen die untersuchten Haare stammten. Aufgrund der geringen Menge an extrahierter DNA, wurden DNA-Proben von einzelnen Haaren nur ein einziges Mal analysiert. In keinem Fall wurden mit den humanen und caninen STR-Kits andere Allele als die erwarteten gefunden (keine Drop-ins). Die nachfolgend dargelegten Ergebnisse sollen dazu dienen, die zu erwartende Allel-Recovery von STR-Markern abschätzen zu können beim Einsatz von Einzelhaaren, von denen lediglich die Menge der einsetzbaren DNA und der Degradierungsgrad bekannt ist.

Menschenhaare

Um die Relevanz einer qPCR-basierten Methode zur Voraussage des STR-Erfolgs von telogenen Einzelhaaren zu untersuchen, wurden die Zellkerne menschlicher Kopfhare über eine DAPI-Färbung nachgewiesen. Zellkerne wurden lediglich im Gewebe der Haarwurzelscheiden (anagen) und des Keimnippels (katagen) beobachtet. Diese Ergebnisse stimmen mit bereits veröffentlichten Ergebnissen anderer Forschungsgruppen überein, in denen mittels histologischer Färbungen gezeigt wurde, dass menschliche Einzelhaare in der ruhenden Wachstumsphase keine oder nur wenige Zellkerne aufweisen (Edson et al. 2013; Lepez et al. 2014; Haines et al. 2015; Haines und Linacre 2016). Eine diffuse DAPI-induzierte Blaufärbung der Kolbenwurzel katagener und telogener Haare weist darauf hin, dass sich freie DNA in den keratinisierten Zellen des Cortex befinden könnte (**Abbildung 12**).

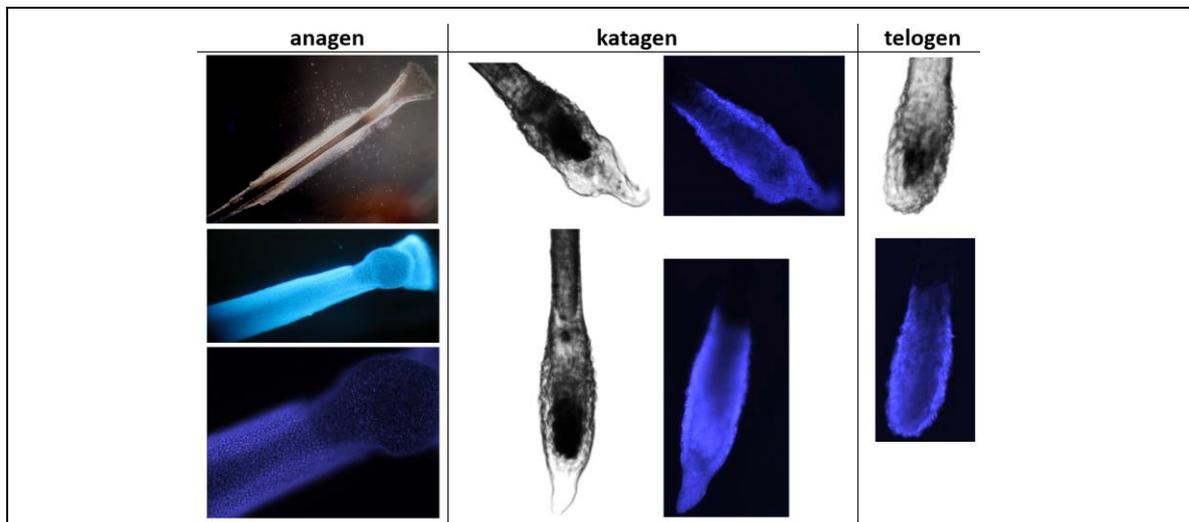


Abbildung 12: DAPI-gefärbte Haaren in unterschiedlichen Wachstumsphasen

Darstellung von humanen ungefärbten und mit DAPI gefärbten Kopfharen unterschiedlicher Wachstumsphasen anhand repräsentativer Fotografien. Die Vergrößerung erfolgte mittels des Fluoreszenzmikroskops Leica DM5000, die Aufnahmen wurden mittels der Digitalkamera Canon Ixus 125HS durch das Okular getätigt. Die Fotografien der einzelnen Haare wurden mit unterschiedlichen Einstellungen vorgenommen: Die obere Abbildung eines anagenen Haares wurde mittels Auflichtes erzeugt, die anderen Haare mittels Hellfeld, während die Aufnahmen der bläulich DAPI-gefärbten Haare unter Fluoreszenz (DAPI-Filter) erfolgten.

Abbildung 13 zeigt repräsentative Beispiele der Morphologie der Wurzelbereiche der analysierten Einzelhaare sowie die per RiboD-Assay ermittelten Mengen und D-Werte der daraus extrahierten DNA. Der Übergang (katagene Phase) vom wachsenden Haar (anagene Phase) zu inaktiven, toten Haaren (telogene Phase) ist gekennzeichnet durch vollständige Keratinisierung (Verhornung) des Haares und Ablösung des Haarfollikels von der Papille, wobei die Wurzelscheide auf einen als Keimnippel bezeichneten Zellrest

reduziert ist (Haare 9 und 28, (Linch et al. 1998)). Typisch für telogene Haare ist die Reduktion auf ein Drittel der ursprünglichen Gesamtwurzellänge und die typische Kolbenwurzels-Morphologie, die nahezu oder vollständig zellfrei sein kann (Haare 27 und 29 (Linch et al. 1998; Linch 2008), siehe **Kapitel 1.4.2**).

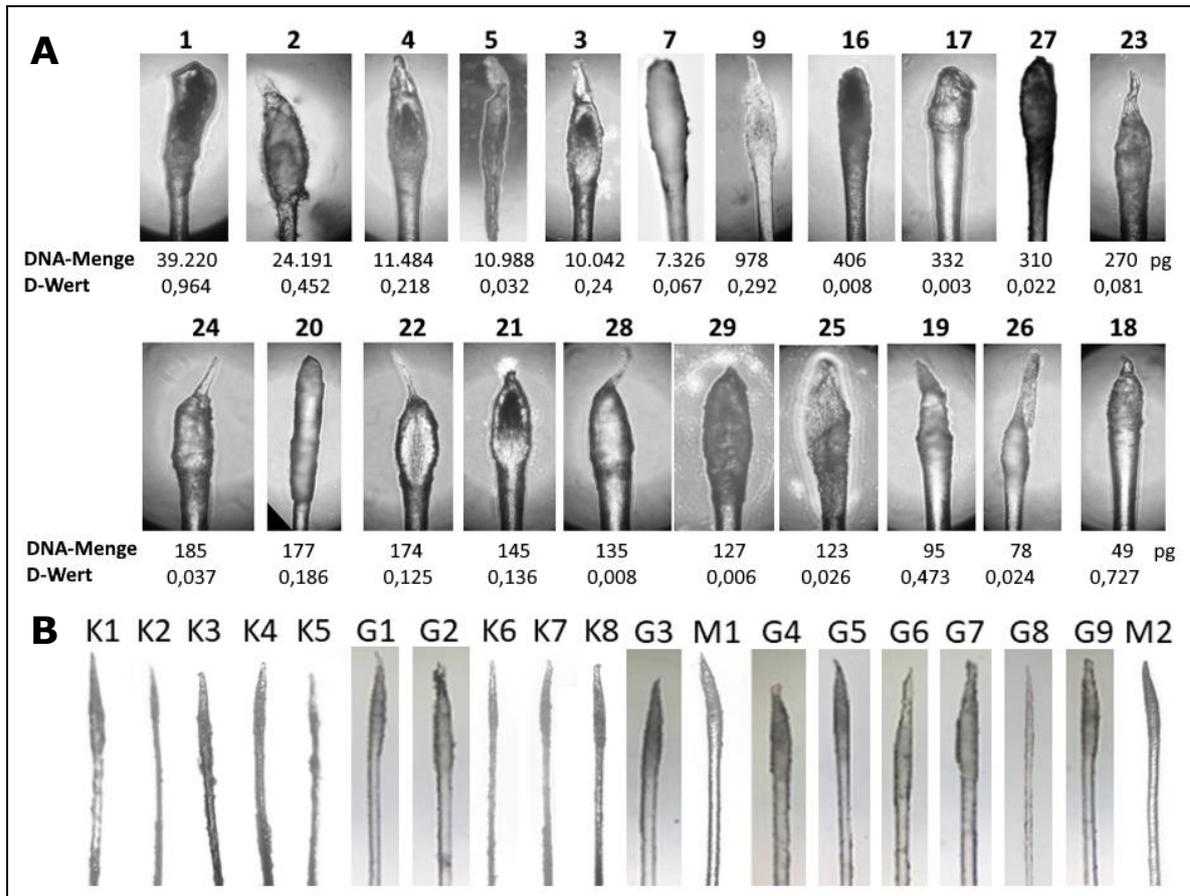


Abbildung 13: Fotografien von menschlichen und caninen Einzelhaaren

Einzelhaare von zwei Menschen (A) und drei Hunden (B), die in der Studie verwendet wurden. A: Menschliche Haare, angeordnet nach der DNA-Menge [pg] und dem entsprechenden D-Wert. Die DNA-Menge bezieht sich auf die komplette DNA-Menge der gesamten Haarwurzel. B: Hundehaare, mit Haaren G4, G8 und M2, die für die Haarpoools repräsentativ sind, die für die DNA-Extraktion verwendet wurden. Die Buchstaben K, G, M bezeichnen die drei Hunde, von denen die Haare stammen. Fotos von Haar 7 und 27 stammen von dem Mikroskop Leica DM5000 B. Folgende Fotos wurden mittels der Fotokamera Canon Ixus 125HS durch das Okular des Leica DM1000- Mikroskops in der Hellfeld-Einstellung aufgenommen: Haar 1, 2, 4, 5, 3, 9, 16, 17, 23, 24, 20, 22, 21, 28, 29, 25, 19, 26, 18, sowie alle Hundehaare. Aufgrund der Hellfeldmikroskopie erscheinen die Haare durchscheinender im Vergleich zu Bildern, die mit der Leica DM5000 B aufgenommen wurden. Die Haare 1-5 befanden sich nicht im telogenen Wachstumsstadium, sondern im anagenen (Haar 1) beziehungsweise katagenen (Haare 2-5) Stadium und dienten als Positivkontrolle zu den telogenen Haaren, um den Einfluss der DNA-Menge und Integrität auf die konkordanten Allele zu untersuchen.

Da Einzelhaare im telogenen Stadium nur sehr wenig DNA beinhalten, konnte pro Ansatz jeweils nur ein Mikroliter eingesetzt werden, um genügend Probe für den Einsatz in unterschiedliche Analysetechniken (PowerPlex® ESX 17 und ESI 17 Fast STR-Kits, maSTR-Assay, ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit) zu gewährleisten. Der Einsatz von größeren Volumina war somit ausgeschlossen, weshalb Gruppen von ähnlichen eingesetzten DNA-Mengen gebildet wurden.

Die Haare 1-5 befanden sich nicht im telogenen Wachstumsstadium, sondern im anagenen (Haar 1) beziehungsweise katagenen (Haare 2-5) Stadium und dienten als

Positivkontrolle zu den telogenen Haaren, um den Einfluss der DNA-Menge und Integrität auf die konkordanten Allele zu untersuchen. Die Haare 1-4, 6-16, 21-23, 25, 27, 29, sowie Pool 1-3 stammen von der weiblichen Person B, während die Haare 5, 17-20, 24, 26 und 28 von der weiblichen Person C stammen.

Die empirisch ermittelten Schwellenwerte, die für die Erstellung verbaler Prädikate (**Tabelle 3**) an artifiziiell degradiertes DNA (**Kapitel 3.2.3**) ermittelt wurden, wurden in der vorliegenden Studie mit Einzelhaaren bestätigt.

Um die Auswirkung der DNA-Degradierung in Hinblick auf die beiden Faktoren der eingesetzten DNA-Menge und des DNA-Degradierungsgrads zu untersuchen, wurden diese Parameter separat analysiert. Dafür wurden die Proben entsprechend ihrer eingesetzten DNA-Menge in sechs Gruppen für Einzelhaare eingeteilt (**Abbildung 14** und **Tabelle 4**). Innerhalb der Gruppen wurden die Proben entsprechend ihrer D-Werte angeordnet.

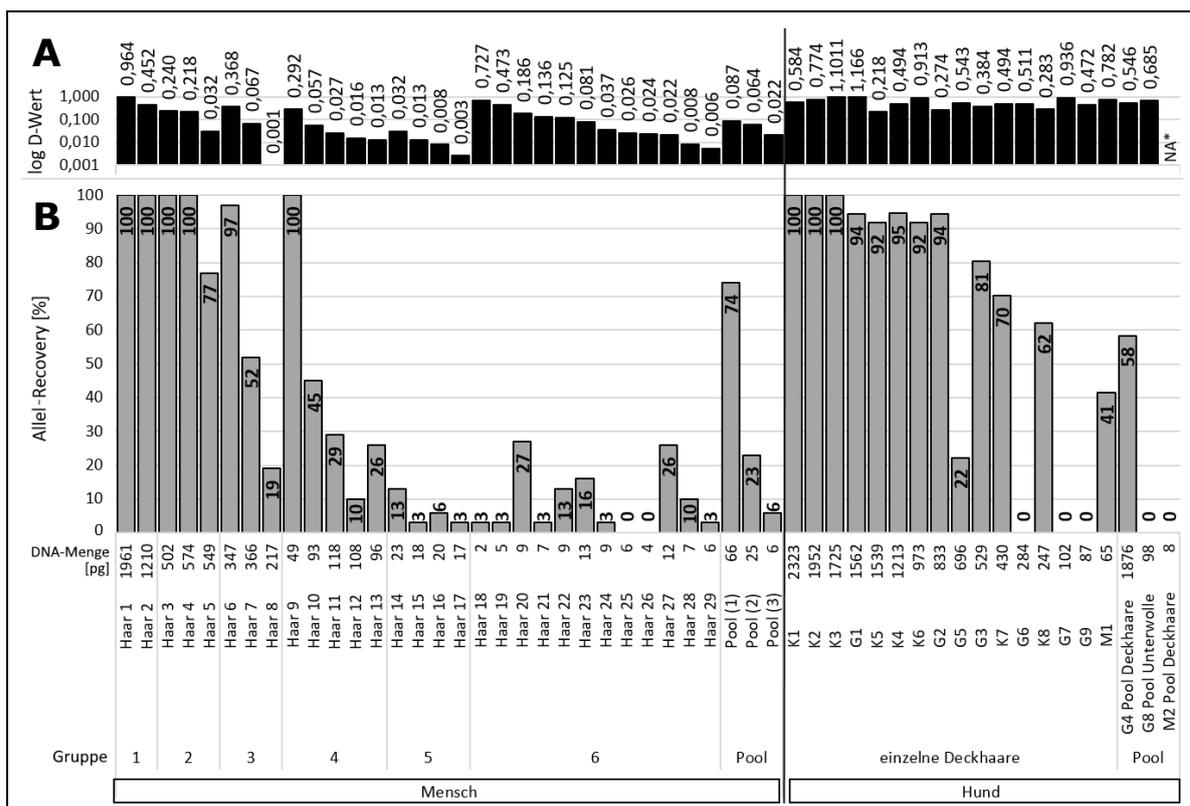


Abbildung 14: Allel-Recovery der DNA aus humanen und caninen Haaren

Ergebnisse der STR-Typisierung von menschlicher (links) und Hunde-DNA (rechts) unter Verwendung des PowerPlex® ESX 17-Kits (Mensch) und zwei unterschiedlicher STR-Kits für Hunde-DNA. Jede DNA-Probe wurde einmal analysiert. A: Histogramm der logarithmischen D-Werte, bestimmt mittels des RiboD- bzw. RiboDog-Assays. B: Die Balkenhöhen (einschließlich der Anzahl innerhalb des Balkens) repräsentieren die Übereinstimmung (in Prozent) der gewonnenen STR-Allele, die mit den jeweiligen Referenzprofilen übereinstimmen (Recovery). Für die Analyse der menschlichen Haare wurden die Proben entsprechend ihrer DNA-Menge [pg] in sechs Gruppen (und einer zusätzlichen Gruppe für gepoolte Proben) geordnet. Innerhalb der Gruppen wurden die Proben entsprechend ihrer D-Werte angeordnet. Die DNA-Menge [pg] bezieht sich auf das eingesetzte Volumen von je 1 µL DNA, die für die Analyse verwendet wurde. Die humanen Haare 1-5 befanden sich nicht im telogenen Wachstumsstadium, sondern im anagenen (Haar 1) beziehungsweise katagenen (Haare 2-5) Stadium und dienten als Positivkontrolle zu den telogenen Haaren, um den Einfluss der DNA-Menge und Integrität auf die konkordanten Allele zu untersuchen. Die humanen Haare 1-4, 6-16, 21-23, 25, 27, 29, sowie Pool 1-3 stammen von der weiblichen Person B, während die humanen Haare 5, 17-20, 24, 26 und 28 von der weiblichen Person C stammen. Der Pool der Hundehaare M2 erzeugte keinen C_q-Wert für das lange Amplikon, daher war ein D-Wert nicht anwendbar (NA*).

Abbildung 14 zeigt, dass die Beziehung zwischen D-Werten und Allel-Recoveries der einzelnen Haare ebenfalls vom DNA-Gehalt abhängig war. Bei der gleichzeitigen Betrachtung der DNA-Menge und des Degradierungswertes (D-Wert) muss daher beachtet werden, dass die berechneten D-Werte von der eingesetzten DNA-Menge abhängig sind: Je geringer die eingesetzte DNA-Menge ist, desto kleiner sind die berechneten D-Werte (**Abbildung 7**). Daher müssen beide Parameter betrachtet werden, wenn Rückschlüsse auf die Allel-Recovery gezogen werden. Da DNA aus Einzelhaaren der natürlichen DNA-Degradierung unterworfen ist, wird davon ausgegangen, dass stark degradierte DNA keine hohe DNA-Menge aufweisen kann, da diese stark degradiert wurde.

Tabelle 4: Allel-Recoveries menschlicher Haare in Bezug auf DNA-Menge und D-Wert

Kategorie		1	2	3	4	5	6	
DNA-Menge [ng]		2-1	0,5	0,2-0,3	0,05-0,1	0,02	< 0,01	
D-Wert	< 1-0,2	leicht	2 x (++)*	2 x (++)	1 x (++)		2 x (-)	
	< 0,2-0,1	mäßig			1 x (++)			
	< 0,1-0,05	ausgeprägt			1 x (-)	1 x (-)	3 x (-)	
	< 0,05	stark/extrem		1 x (+)	1 x (-)	3 x (-)	4 x (-)	6 x (-)
<i>Gesamtanzahl der Haare</i>			2	3	3	5	4	12

* Anzahl individueller Haare mit Allel-Recoveries von >90% (++); 60–90% (+); weniger als 60% (-)

Zur leichteren Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sind die D-Werte in **Tabelle 4** in vier Gruppen eingeteilt, die von leichter (D-Werte zwischen 1 und 0,2) über mäßige (D-Werte 0,2-0,1), ausgeprägte (D-Werte zwischen 0,1 und 0,05) bis zu starker und extremer (D-Werte unter 0,05) Degradierung reichen. Dieses Klassifikationsschema zeigt, dass ein hoher DNA-Gehalt der einzelnen Haare typischerweise zu Allel-Recoveries von über 90% führte, selbst wenn die DNA mäßig degradiert ist (Gruppen 1 und 2). Mit moderatem DNA-Degradierung und Mengen zwischen 2 ng und 500 pg ergab das PowerPlex® ESX 17-Kit (fast) vollständige Profile. Wenn die DNA-Mengen dagegen unter 20 pg lagen, führte selbst eine leichte Degradierung dazu, dass weniger als 60% der Allele detektiert wurden.

Bei einem maximalen DNA-Einsatz von etwa 350 pg oder weniger wurde die Allel-Recovery hauptsächlich durch den Grad der DNA-Degradierung bestimmt (Gruppe 3), gemessen anhand des D-Werts. Beispielsweise ergab leicht degradierte DNA von Haar 6 (346,7 pg; D-Wert 0,368) ein nahezu vollständiges Profil. Im Gegensatz dazu lieferte die ausgeprägt degradierte DNA von Haar 7 (366,2 pg; D-Wert 0,067) nur 52% der Allele. DNA aus Haaren, bei denen weniger als 50 pg DNA eingesetzt wurde, war häufig extrem degradiert (D-Werte unter 0,01) und zeigt im Allgemeinen sehr schlechte Allel-Recovery, was wahrscheinlich auf stochastische Effekte zurückzuführen ist.

Wie aus **Abbildung 13** hervorgeht, wurden aus Haaren mit reichlich vorhandenem Gewebe, wie dies typischerweise in der anagenen und katagenen Übergangsphase (Haare 1-5) der Fall ist, DNA-Mengen > 1 ng (pro µL eingesetzte Probe) und D-Werte > 0,1 gewonnen, die ohne oder mit sehr wenigen Allelic Drop-outs analysiert werden konnten (**Abbildung 14**). Dies ist konsistent mit Befunden von (Linch et al. 1998) die berichteten, dass die Menge des am Kolbenhaar anhaftenden Gewebes maßgeblich den Erfolg der nukleären DNA-Analyse für diesen Haartyp bestimmt. Daher besteht unbestreitbar eine Korrelation zwischen der Morphologie der Kolbenwurzel und der Typisierbarkeit ebendieser Wurzel, wenn eine große Menge anhaftendes Wurzelscheidengewebe (engl. *hair root sheath tissue*) vorhanden ist.

Bei vollständig telogenen und auch einigen katagenen Kolbenwurzeln, wie solchen mit wenig anhaftendem Wurzelscheidengewebe, variierten die DNA-Mengen oder D-Werte stark, so dass die STR-Typisierbarkeit nicht aus der Morphologie abgeleitet werden konnte: Die telogenen Haare 16 und 27 hatten (fast) kein anhaftendes Gewebe, aber zeigten vergleichbare D-Werte (weniger als 0,06) und höhere DNA-Mengen als die Haare 28 und 26, die mehr anhaftendes Gewebe aufwiesen, weshalb diese eher dem Übergang katagen-telogen zuzuordnen wären. Gemäß der vorliegenden Studie weist anhaftendes Gewebe mit der spezifischen Morphologie eines Keimnippels daher nicht zwingend auf eine erfolgreiche Typisierbarkeit hin.

Zusammenfassend gilt, dass die Schwellenwerte des D-Werts, die für künstlich degradierte DNA charakterisiert wurden (siehe **Kapitel 3.2.6**), auch für DNA-Proben gelten, die aus menschliche Einzelhaaren extrahiert wurden. Zusätzlich beeinflusst die eingesetzte DNA-Menge den Einfluss des D-Werts auf die Allel-Recovery: Je geringer die eingesetzte DNA-Menge ist, desto stärker hängt die Allel-Recovery vom D-Wert ab; je weniger Input-DNA verwendet wird und je stärker sie degradiert wird, desto geringer ist die Allel-Recovery. Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, den RiboD-Assay zur Voraussage des Erfolgs der nachfolgenden STR-Typisierung einzusetzen.

Hundehaare

In dieser Studie wurden Fellhaare von drei Hunden verwendet, die verschiedene Mischlinge unterschiedlicher Rassen waren (siehe Anhang 1, S5). **Abbildung 13** zeigt die Morphologie von getesteten Hundehaaren. Typisch für Hundehaare sind die speerförmigen Haarwurzeln (Tridico et al. 2014), wodurch sie im Normalfall leicht von menschlichen, wattestäbchen-förmigen Haarwurzeln unterschieden werden können.

Da einzelne Haare der Unterwolle in Vorversuchen sehr geringe Mengen an DNA ergaben, wurden zehn Haare der Unterwolle (G8, **Abbildung 13**) gepoolt, quantifiziert und mit einem Pool von zehn ebenso extrahierten Deckhaaren (G4) desselben Hundes verglichen. Deutlich erkennbar ist die feinere Struktur der Haare der Unterwolle (G8), bei der die Haarwurzel weniger dick ist als bei Deckhaaren. Im Gegensatz zu Deckhaaren konnten aus den gepoolten Haaren der Unterwolle keine STR-Allele amplifiziert werden.

Hundehaare, die hohe DNA-Ausbeuten ergaben, zeigten eine höhere Allel-Recovery als Haare mit einer geringen DNA-Menge, während die DNA-Degradierung nur einen geringen Einfluss auf die STR-Typisierbarkeit hatte. Zum Beispiel ergab Haar G1 94,4% der Allele, wenn mehr als 1,5 ng DNA verwendet wurden, während die gleichermaßen degradierte DNA von Haar G7 ein leeres Profil ergab, wenn 102 pg verwendet wurden (**Abbildung 14**). Beim Vergleich von Hundehaaren mit ähnlichen DNA-Mengen zeigte keines der Haare D-Werte von weniger als 0,2. DNA aus Hundehaaren scheint daher im Vergleich zu menschlichen Haaren nur geringfügig oder mäßig degradiert zu sein. Darüber hinaus wurde ebenfalls beobachtet, dass bei einigen Proben die Anzahl der Allelic Drop-outs nicht von den D-Werten abzuhängen scheint. Beispielsweise wurden für die Probe Haar G3 (D-Wert 0,38) mehr Allele detektiert als bei dem Haar G5, dessen D-Wert mit 0,54 größer war als vom Haar G3 (**Abbildung 14**). Beide Proben wiesen hohe DNA-Mengen auf (Bereich zwischen 500-700 pg DNA), in dem die STR-Typisierung erfolgreich sein sollte. Die Morphologie der Hundehaare des Deckhaars gibt daher keine Information über die mögliche Allel-Recovery der nachfolgenden STR-Typisierung. Beispielsweise sehen die Haare G2, G3 und G6 vom selben Hund ähnlich aus und ergeben relativ hohe DNA-Mengen und hohe D-Werte. Im Gegensatz zu den beiden anderen Haaren konnte bei der STR-Typisierung von Haar G6 jedoch kein einziges STR-Allel detektiert werden (**Abbildung 14** und **Abbildung 15**).

Überraschenderweise ergab das Haar G1 kein vollständiges Profil, obwohl sein D-Wert nur eine geringe DNA-Degradierung zeigte und die eingesetzte DNA-Menge mit etwa 1,5 ng sehr hoch war. In den STR-Profilen dieses Haares sowie in anderen Haaren und einer Speichelprobe von Hund G zeigte den Marker AHTk253 einen Allelic Drop-out. Die beiden Allele von AHTk253 konnten nur in einer anderen Speichelprobe identifiziert werden, in der mehr DNA in der STR-PCR verwendet wurde. AHTk253 ist der längste Marker im grünen CE-Kanal und daher anfällig für Allel- und Locus-Drop-out.

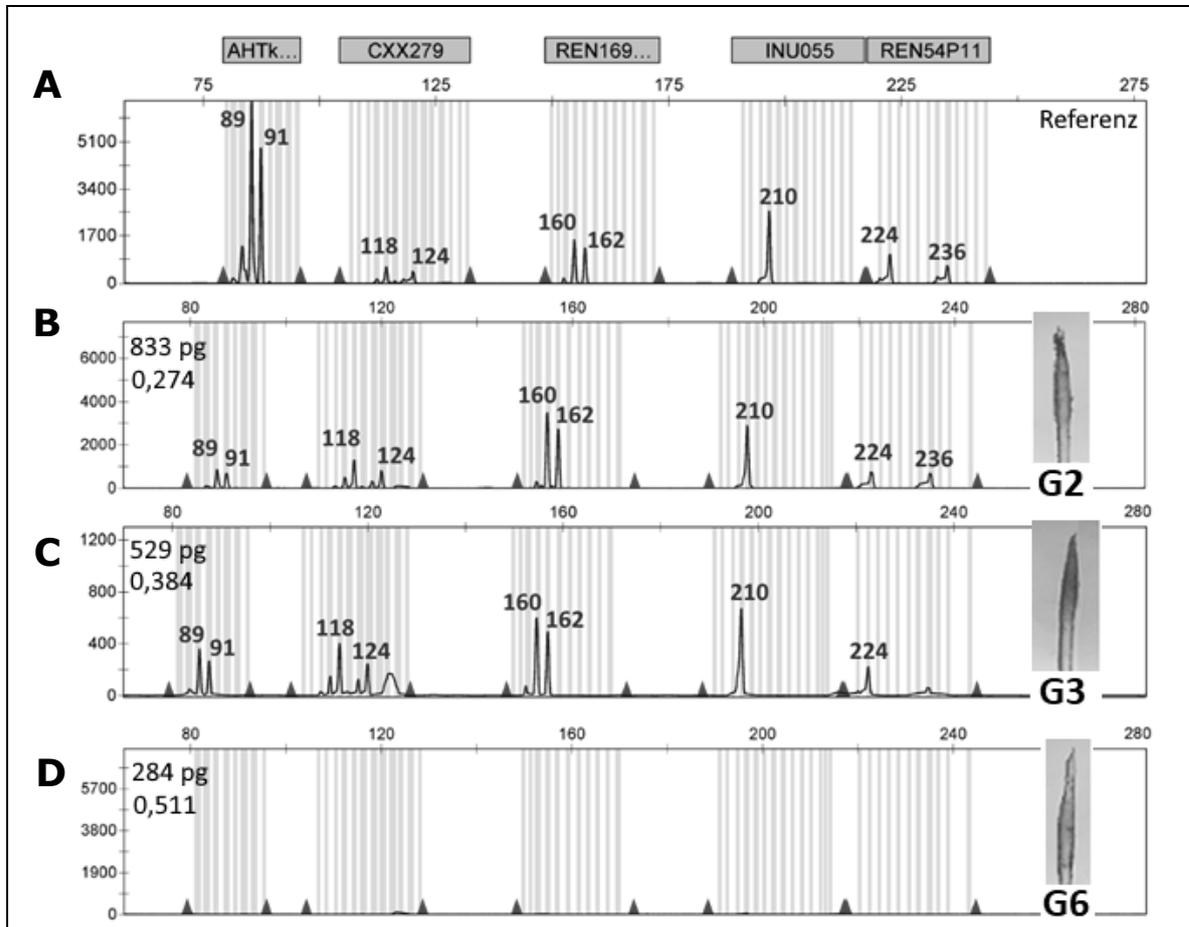


Abbildung 15: Vergleich unterschiedlicher caniner STR-Profile

Ausschnitte exemplarischer Elektropherogramme der STR-Profile von DNA aus Hundehaaren. A: Referenzprofil von DNA aus einem Mundschleimhautabstrich. B: Haar G2, C: Haar G3, D: Haar G6, inklusive der eingesetzten DNA-Mengen (obere Zahl) und des D-Werts der eingesetzten DNA (untere Zahl, jeweils linker Rand). Bei den caninen STR-Assays wird anstelle einer Allelnummer die Fragmentlänge in Basen angegeben (Zahlen oberhalb der Peaks).

Bei der Bewertung der STR-Profile von Hundehaaren ist anzumerken, dass die Länge der PCR-Amplifikate anstelle einer Allelzahl angegeben ist. Darüber hinaus können Stotter-Allele oft halb so hoch sein wie die echten Peaks. Dies liegt daran, dass Hunde-STR-Marker häufig Dinukleotid-Wiederholungen sind, die stärker zum Stottern neigen als Marker mit mehr Basen pro Wiederholungseinheit (Dayton et al. 2009). Besonders Marker mit vielen sich wiederholenden Einheiten (wie AHTk130) sind davon betroffen. Ein weiterer Faktor für die hohen Stotter-Allele könnte die Injektionszeit von 15 Sekunden im Vergleich zu menschlichen Kits sein.

3.4 Entwicklung des NGS-basierten maSTR-Assays

Der maSTR-Assay (Mini-Amplikon-STR) wurde im Zuge dieser Arbeit entwickelt, mit dem Ziel, von degradierter DNA mittels NGS STR-Profile zu erstellen, die das EU-Core-STR-Set (ESS) abdecken und somit DAD-kompatibel sind.

3.4.1 Design des maSTR-Assays

Der PCR-Assay ermöglicht die parallele Amplifikation von 16 EU-Core-STR-Loci und Amelogenin unter Verwendung kurzer Amplikons (76-296 bp), sogenannten Mini-Amplikons (Butler et al. 2003; Kim et al. 2016) mit überlappenden Größenbereichen in einer Multiplexreaktion (**Abbildung 16**). Die amplifizierte DNA wurde verwendet, um eine gepoolte NGS-Bibliothek zu konstruieren, die anschließend mit einem Illumina MiSeq FGx™-Gerät für Paired-End-Reads in 2 × 300 bp-Zyklen analysiert wurde. Die Reads wurden unter Verwendung einer eigens entwickelten bioinformatischen Pipeline den entsprechenden STR-Loci und Allelen zugewiesen. Anpassungen der von dieser Pipeline gelieferten Längen-Allel-Übersetzungen führten zur korrekten STR-Typisierung des SE33-Locus, was zum Zeitpunkt der Entwicklung des Assays mit anderen NGS-Tools noch nicht möglich war. Damit amplifiziert der maSTR-Assay exakt dieselben Marker wie die PowerPlex® ESX 17 und ESI 17 Kits (Promega). Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf der Studie der maSTR-Assay mit ebendiesen Kits verglichen, um die Allel-Recovery zu untersuchen.

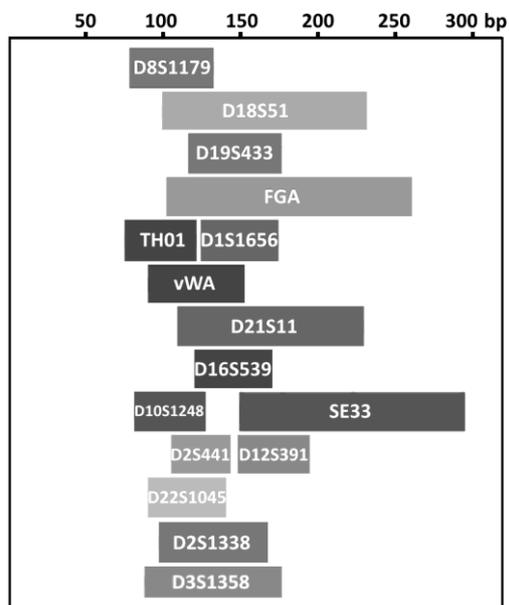


Abbildung 16: Größenverteilung der Amplikons des maSTR-Assays

Minimale (76 bp) und maximale (296 bp) Fragmentlängen aller möglichen Amplikons des maSTR-Assays.

3.4.2 MiSeq FGx™ Qualitäts-Metriken

Die Parameter für die Qualitäts- und Performance-Metriken der unterschiedlichen maSTR-Assay-Durchläufe (im Folgenden als "Läufe" bezeichnet) wurden gemäß (Guo et al. 2017) analysiert. Die Clusterdichte (K/mm^2) ist ein Maß für die Anzahl der Cluster pro Quadratmillimeter pro Lauf. Cluster-Passing-Filter (PF-Cluster) ist die Anzahl der Cluster, die den Qualitätsfilter überstanden haben. Die Qualitätsmetrik $\% \geq Q30$ ist ein Prozentsatz der Nukleotide der Reads mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von weniger als 1 in 1000 (0,1%) für den *base call* einer inkorrekten Base (**Kapitel 1.6.1**). Effektive Reads werden gezählt als Anzahl der Reads pro Probe nach dem Qualitäts-Trimmen, dem

Zusammenführen der Read-Paare (*merging*) und der erfolgreichen Bestimmung der STR-Allele. Effektive Reads sind daher Reads, die tatsächlich für die STR-Typisierung verwendet wurden. „Effektive Reads [%] der gefilterten Reads“ wird als Prozentsatz der gefilterten Reads berechnet, die als effektive Reads für die STR-Typisierung verwendet wurden.

Der Parameter „Effektive Reads [%] der gefilterten Reads“ zeigt, dass ein großer Teil der gefilterten Reads nicht für die STR-Typisierung qualifiziert ist, da nur 1/3 (Lauf 1 und 2) bis die Hälfte (Lauf 4) der gefilterten Reads als effektiv verwendet wurden. Im Allgemeinen gehen beim Trimmen und Zusammenführen wesentlich weniger Reads verloren als bei der Bestimmung der STR-Allele selbst, da die Parameter "gefilterte Read-Paare", "getrimmte Read-Paare" und "erfolgreich zusammengeführte Read-Paare" im Vergleich signifikant höhere Zahlen aufweisen als die Anzahl der „effektiven Read-Paare“. Daher scheint die Qualität von zusammengeführten Read-Paaren, die als effektive Reads verwendet werden, der entscheidende Faktor für den Erfolg der STR-Typisierung zu sein.

Tabelle 5: Qualitäts-Parameter für die vier maSTR-Läufe in der vorliegenden Studie

	Guideline	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 3	Lauf 4
Anzahl der Proben degradierter DNA		78	78	50	38
PhiX [%]		15	50	15	15
Finale, gepoolte Bibliothek [pM] ¹		~12 ⁷	12,2	5,8	19,3
Dichte [K/mm ²]	800-1000	1200	1300	730	1240
Cluster [Mio.] ²		28,7	31,8	18,3	28,6
PF Cluster [Mio.]	22-25	24,6	27,8	17,6	23,1
Ausbeute [GB] ³	13-15	14,7	16,7	10,6	13,9
% ≥ Q30	>70	47	60	56	50
Nukleotide vor Trimmen [Mrd.] ⁴		3,5	2,1	2,4	4,2
Nukleotide nach Trimmen mit <i>Singletons</i> [Mrd.]		2,6	1,6	2,2	3,4
Nukleotide nach Trimmen ohne <i>Singletons</i> [Mrd.]		2,4	1,5	2,1	3,2
Gefilterte Read-Paare [Mio.]		19,8	12,2	14	18,7
Getrimmte Read-Paare [Mio.]		16,4	10,2	12,8	16,5
Erfolgreich zusammengeführte Read-Paare [Mio.]		15,2	9,4	12,4	15,6
Effektive Read-Paare [Mio.]		5,7	3,5	5,5	9,8
Effektive Reads [%] der gefilterten Reads ⁵		31	31	40	52
Gefilterte durchschnittliche Read-Länge [nts] ⁶		88	87	87	112
Getrimmte durchschnittliche Read-Länge [nts]		74	73	82	98
Zusammengeführte durchschnittliche Read-Länge [nts]		80	80	85	103

¹ pM: pikoMol (1E-12 Mol), berechnet anhand der DNA-Quantifizierung (KAPA Bibliothek quantification kit) und dem Verdünnungsfaktor; ² Mio.: Million (1E+06); ³ GB: Gigabasen (1E+09 Basen); ⁴ Mrd.: Milliarde [1E+09]; ⁵ Effektive Reads [%] der gefilterten Reads: Division der Anzahl der effektiven Reads durch die Anzahl der gefilterten Reads; ⁶ nts: Nukleotide; ⁷ wurde nicht mit dem KAPA Library Quantification Kit gemessen.

In den maSTR-Läufen 1 und 2 wurden dieselben Proben derselben Amplikon-PCR für beide gepoolten Bibliotheken verwendet, mit Ausnahme einer Probe aus Lauf 1, die nicht in Lauf 2 enthalten war. In Lauf 1 wurden 96 DNA-Proben sequenziert, in Lauf 2 daher nur 95. Im Gegensatz dazu wurden in den Läufe 3 und 4 zwei unterschiedliche Bibliotheken verwendet, indem dieselbe DNA mancher Proben für zwei unabhängige Amplikons-PCRs eingesetzt wurde. In Lauf 3 wurden 87 DNA-Proben sequenziert, in Lauf 4 nur 63.

Lauf 1 und 2 führten zu ähnlichen Qualitätswerten, da dieselben Proben derselben Amplikon-PCR für beide Bibliotheken verwendet wurden (mit Ausnahme einer Probe). Eine erhöhte PhiX-Menge in Lauf 2 (50% PhiX) hat möglicherweise zu etwas höheren

Qualitätswerten als in Lauf 1 (15% PhiX) geführt, lieferte jedoch insgesamt weniger gefilterte und effektive Reads als Lauf 1. Der Wert $\% \geq Q30$ in allen Läufen lag nicht innerhalb des empfohlenen Bereichs für Amplikon-Sequenzierungen (> 70). Dies könnte auf Überclustering und geringe Komplexität der Proben zurückzuführen sein: In allen Läufen diente die DNA von nur fünf bis zehn Individuen als Template. Alle Läufe ergaben zusammengeführte Read-Paare mit kurzen Längen (kürzer als 110 nt), möglicherweise aufgrund von Überclustering (Daten nicht gezeigt).

Die Läufe 1, 2 und 4 beinhalteten hohe DNA-Mengen, was zu höheren Werten der Dichte führte als in Lauf 3, der eine geringere DNA-Menge aufwies. Eine hohe eingesetzte DNA-Menge führte zu Merkmalen, die für Überclustering typisch sind, wie niedrige Qualitätswerte ($\% \geq Q30$; mit Ausnahme von Lauf 2) im Vergleich zu Lauf 3 und ein höherer Verlust von Clustern, welche den Filter nicht passierten (Anzahl der „PF-Cluster“ im Vergleich zu „Cluster“), sowie ein höherer Verlust von Reads, welche nicht die Anforderung für eine erfolgreiche Zusammenführung erfüllten (Anzahl der „getrimmten Read-Paare im Vergleich zu „erfolgreich zusammengeführten Read-Paare“), was zu einem höheren Verlust von Reads führte als in Lauf 3 (Manual "Cluster Density" (Illumina)).

3.4.3 NGS-Charakteristiken: Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit, Konkordanz und Empfindlichkeit

Der NGS-basierte maSTR-Assay wurde hinsichtlich Empfindlichkeit, Präzision, Genauigkeit, Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit validiert (gemäß den Richtlinien „SWGDM-Validierungsrichtlinien für DNA-Analysemethoden“, (SWGDM 2016)). Um den NGS-basierten maSTR-Assay auf Konkordanz (Hill, C. R. et al. 2010) zu prüfen, wurde die Information über die Fragmentlänge der NGS-generierten Reads mit CE-generierten STR-Profilen des PowerPlex® ESX 17-Assays (**Kapitel 2.11**) verglichen. Die Reproduzierbarkeit wurde bewertet, indem zuverlässige und korrekte Genotypen mehrfach von derselben Template-DNA generiert und analysiert wurden, die von derselben Person angesetzt und demselben Detektionsinstrument (PCR-Cycler, sowie MiSeq FGx™-Gerät) erhalten wurden, gemäß der Vorgabe von Guo et al. (Guo et al. 2017). Die Wiederholbarkeit wurde untersucht, indem zweimal dieselben PCR-Produkte sequenziert wurden (in Lauf 1 und 2). Um die Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit und die Empfindlichkeitsgrenze des entwickelten maSTR-Assays zu testen, wurden verschiedene DNA-Verdünnungen intakter DNA in unterschiedlichen maSTR-Läufen sequenziert. Die DNA stammt aus kultivierten HeLa-Zellen (Person A), sowie von Person B aus Mundschleimhautzellen, welche durch einen Abstrich gesammelt wurden. Die Empfindlichkeit, definiert als die Fähigkeit zur reproduzierbaren Erstellung vollständiger Profile aus einer Reihe von Eingangs-DNA-Mengen mit Messwerten über dem analytischen Schwellenwert auf einem NGS-Gerät (Guo et al. 2017), wurde unter Verwendung unterschiedlicher DNA-Mengen aus zwei verschiedenen Verdünnungsreihen ausgewertet. Aufgrund der Durchführung der PCRs und der Detektion der STR-Fragmente auf dem MiSeq FGx™-Gerät in mehreren Replikaten, zeigen die vorliegenden Ergebnisse Varianzen, die sowohl auf Effekte während der Amplifikation der Erstellung der Bibliothek beruhen können, als auch auf Unterschieden während der Clusterbildung und Sequenzierung mit dem MiSeq FGx™-Gerät.

DNA-Mengen zwischen 1 ng und 100 pg HeLa-DNA ergaben vollständige Profile. Allerdings konnten Allelic Drop-ins nicht reproduzierbar vermieden werden: In Lauf 2 trat beim Einsatz von 211 pg DNA ein Drop-in-Ereignis im Marker D22S1045 auf, das ein Stotter-Allel sein könnte, aber oberhalb des Stotter-Schwellenwertes von 22% lag.

Dieser Marker besteht im Gegensatz zu den übrigen Markern, die aus Tetranukleotid-Wiederholungseinheiten bestehen, aus Trinukleotid-Wiederholungseinheiten, die zu höheren Stottern neigen, als es bei Tetranukleotid-Markern der Fall ist (Schlötterer und Tautz 1992; Kruglyak et al. 1998). Daher wird in diesem Fall angenommen, dass es sich hierbei nicht um eine Kontamination handelt, sondern um ein ungewöhnlich hohes Stotter-Allel (**Abbildung 17**). Vollständige, zuverlässige, genaue und übereinstimmende STR-Profile mit 100% Recovery wurden reproduzierbar aus 200 pg DNA erhalten und in der Einzeltestung ebenso aus mindestens 112 pg DNA. In einigen Fällen traten bei DNA-Mengen unterhalb 100 pg trotz eines vollständigen Profils (43 pg HeLa-DNA) einzelne Allelic Drop-in-Ereignisse (3%) auf. DNA-Mengen unter 40 pg führen zu einem starken Anstieg von Allelic Drop-outs sowie Drop-ins (insbesondere bei Mengen unter 10 pg).

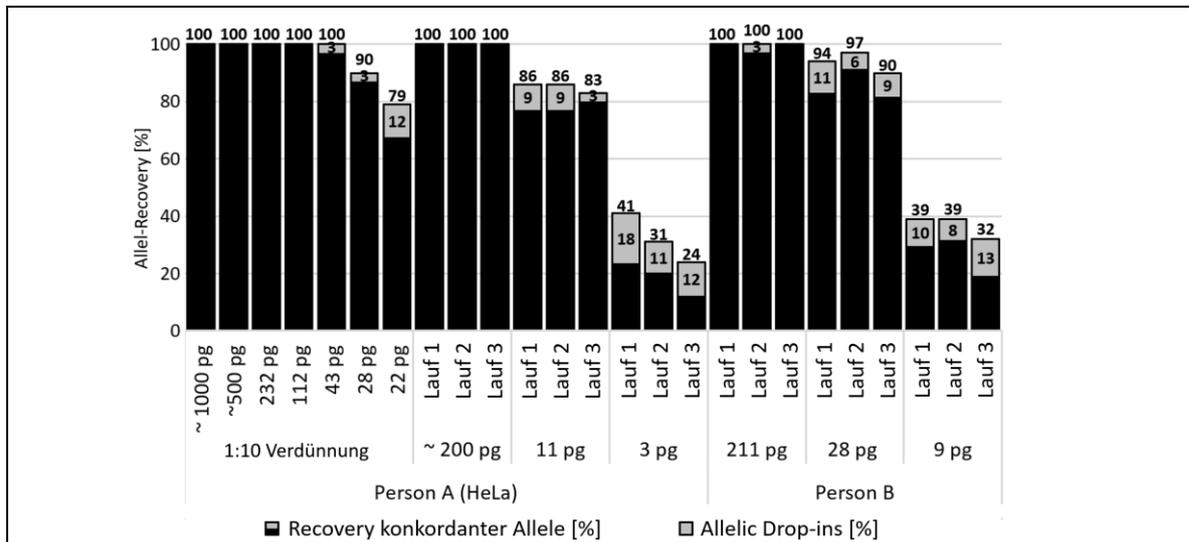


Abbildung 17: Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit des maSTR-Assays

Die Reproduzierbarkeits- und Empfindlichkeitsstudie des maSTR-Assays wurde mittels intakter DNA durchgeführt. Das Histogramm zeigt die Allel-Recovery [%] aufgetragen gegen DNA-Verdünnungen von zwei Personen (Person A, Person B) mit spezifischen Mengen, berechnet aus verschiedenen NGS-Läufen (Lauf 1, 2, 3 und 4). Die Höhe ganzer Balken (grau und schwarz) stellt die Recovery korrekt typisierter Allele dar (Zahlen oberhalb der Balken), während graue Felder Allelic Drop-ins als Prozentsatz aller detektierten Allele darstellen. Die DNA-Mengen wurden unter Verwendung des RiboD-Assays mit 2800M-DNA (Promega) als Kalibrator (Standardreihe) berechnet. Die Proben der 1:10 Verdünnungsreihe wurden in Lauf 4 analysiert.

Bei Einsatz von minimalsten DNA-Mengen liefert die Methode keine verlässlichen STR-Profile, weil stochastische Effekte gehäuft auftreten. Der Anteil der Allelic Drop-ins wird in **Abbildung 17** als Anteil am tatsächlich vorkommenden Profil (aller vorkommenden Allele, sowohl korrekter/konkordanter und fremder/diskordanter Allele) dargestellt. Das bedeutet beispielsweise, dass bei Einsatz von 3 pg DNA von Person A 76% der Allele nicht nachweisbar sind (Lauf 3) im Vergleich zum Referenzprofil, da lediglich sieben korrekte Allele (24% des Referenzprofils) detektiert wurden. Weitere sieben Allele wurden als Drop-ins detektiert, diese stellen daher die Hälfte der tatsächlich detektierten Allele des Profils dar und werden daher als Anteil von 12% dargestellt.

Das Auftreten von mehr als zwei Allelic Drop-ins an mehr als zwei Loci innerhalb eines STR-Profils führt zu seiner Bewertung als Mischprofil (Gill et al. 2012). Daher muss die Empfindlichkeitsgrenze als diejenige DNA-Menge definiert werden, mit der in empirischen Studien keine oder nur wenige und nicht-reproduzierbare Drop-ins auftreten. Werden geringere DNA-Mengen unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze eingesetzt, kann anhand des STR-Profils nicht auf die Herkunft der Drop-ins geschlossen werden, die sowohl durch die schlechte DNA-Integrität und geringe DNA-Quantität, als

auch durch Assay-bedingte Fehler bedingt sein können. Aufgrund der vorliegenden Daten kann nicht davon ausgegangen werden, dass der maSTR-Assay unterhalb der Empfindlichkeitsgrenze von 40 pg die Anforderungen für reproduzierbare Daten mit zufriedenstellender Genauigkeit und Präzision erfüllt.

3.5 Vergleich des NGS-basierten maSTR-Assays mit kapillarelektrophoretischen Kits

Nach der Entwicklung und Validierung des maSTR-Assays wurde der Assay genutzt, um STR-Profile mittels degradierter DNA geringer Menge zu erstellen, und um diese Profile mit denjenigen Profilen zu vergleichen, die mit kommerziellen, CE-basierten STR-Kits erstellt wurden, indem dieselbe DNA eingesetzt wurde.

3.5.1 Vergleich der CE- und NGS-basierten STR-Typisierung mittels artifiziell degradierter HeLa-DNA (*Proof of Concept*)

Um die Eignung (*Proof of Concept*) des maSTR-Assays für degradierte DNA-Proben zu belegen, wurde der maSTR-Assay mit dem CE-basierten PowerPlex® ESX 17 STR Assay hinsichtlich der Allel-Recovery verglichen. Hierzu wurde die analysierte DNA-Menge auf etwa 333 pg artifiziell degradierte DNA normalisiert (sowie weiter seriell verdünnt auf 33 pg und 3,3 pg; quantifiziert mit dem RiboD-Assay mit HeLa-DNA als Kalibrierung). 333 pg wurden als angemessen erachtet, da aus einzelnen Kolbenwurzeln telogener Haare häufig nicht mehr als 300 pg DNA gewonnen werden. Die Konkordanz (Hill, C. R. et al. 2010) der per maSTR-Assay erstellten STR-Profile wurde durch den Vergleich mit STR-Profilen ermittelt, welche unter Verwendung des Promega PowerPlex® ESX 17 (CE)-Kits an intakter und degradierter HeLa-DNA erstellt wurden. Die per PowerPlex® ESX 17 generierten Ergebnisse wurden in **Kapitel 3.2.6** gezeigt.

Wie in **Abbildung 18** gezeigt wird, nahm die Allel-Recovery beider Analysemethoden mit zunehmender DNA-Degradierung (angezeigt durch den D-Wert) und abnehmender DNA-Menge ab: Je länger der DNase I-Verdau andauerte, desto weniger DNA wurde gemessen, welche umso stärker degradiert wurde, was in einer rückläufigen Anzahl von detektierten Allelen resultierte. Intakte und degradierte DNA mit einer Menge von etwa 333 pg bei D-Werten von $\geq 0,023$ zeigte sowohl bei CE- als auch bei NGS-basierten Assays nur wenige Allelic Drop-outs. Bei D-Werten unter 0,023 war die Allel-Recovery mit dem PowerPlex® ESX 17-Kit jedoch stärker betroffen als mit dem maSTR-Assay, der in den meisten Proben von 333 pg DNA immer noch (fast) vollständige Profile ergab.

Bei der Analyse von DNA-Mengen im Bereich von 33 pg nahm die Allel-Recovery der CE-basierten Methode stark ab. Die Performance der NGS-Methode wurde auch durch Allel- und Locus Drop-outs beeinflusst, jedoch in geringerem Maße als bei der CE-basierten Methode. Auf 3 pg normalisierte Proben scheinen die Empfindlichkeitsgrenze sowohl der CE- als auch der NGS-basierten Methode erreicht zu haben. Die NGS-Methode ergab immer noch eine höhere Anzahl von Allelen, es gab jedoch keine klare Korrelation zwischen dem Degradierungswert und der Allel-Recovery.

In keinem Fall wurden mit dem PowerPlex® ESX 17 Kit in Kombination der CE-basierten Detektionsmethode andere Allele oberhalb des Schwellenwertes von 50 RFU als die erwarteten Allele gefunden, was zu einer Übereinstimmung von 100% führte. Im Gegensatz dazu wurden Allele, die nicht mit dem Referenzprofil übereinstimmten (Allelic Drop-ins), unter Nutzung des maSTR-Assays in Kombination mit der NGS-basierten Detektionsmethode detektiert. Die Anzahl dieser Allelic Drop-ins stieg mit der absteigenden Integrität und Quantität der Template-DNA an (**Abbildung 18**).

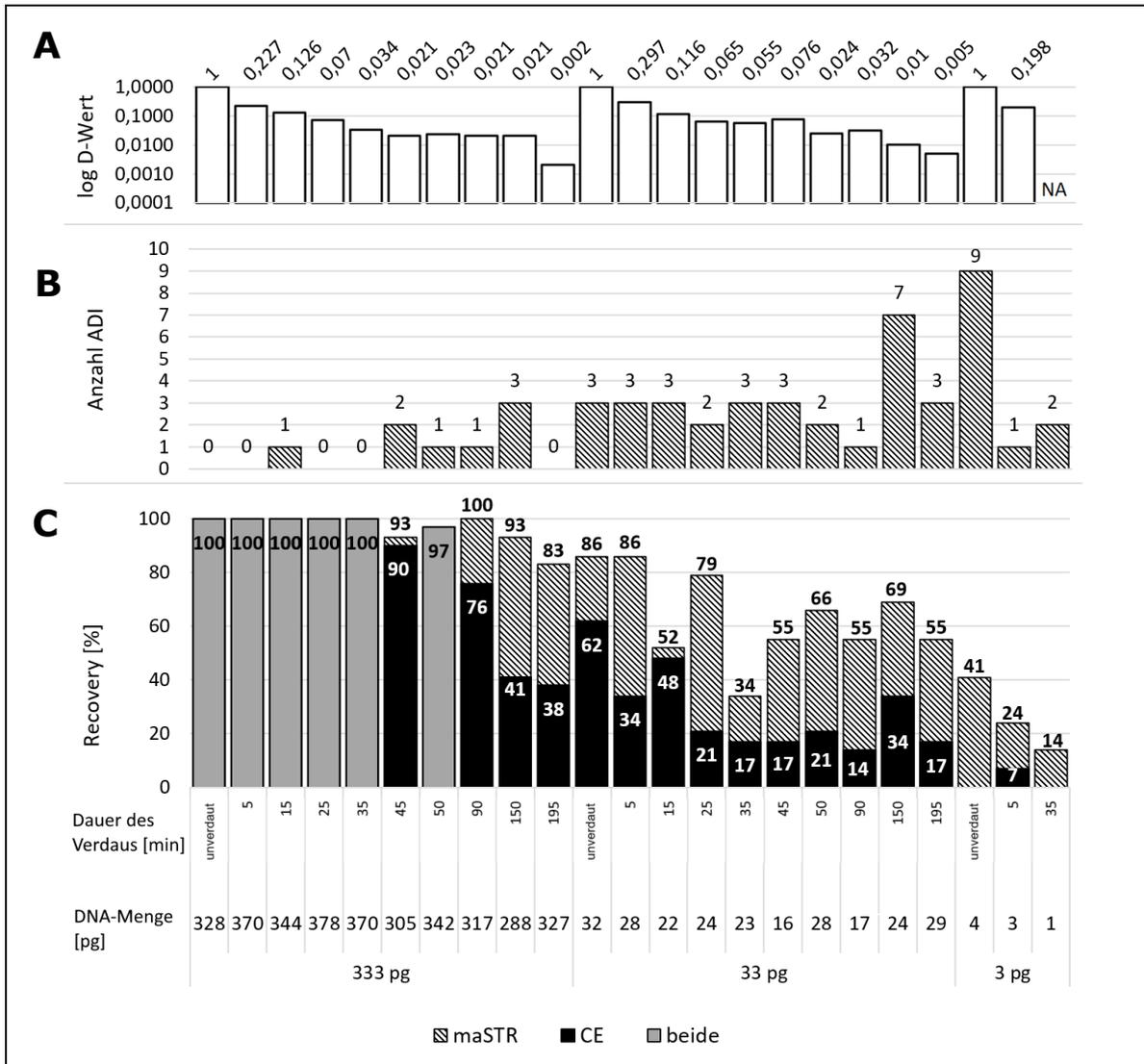


Abbildung 18: Vergleich maSTR- und ESX-basierter Recovery aus HeLa-DNA

Vergleich der maSTR-basierten und PowerPlex® ESX 17-basierten (CE) STR-Typisierung von artifiziiell degradiierter und intakter HeLa-DNA. Die Histogramme sind gegen serielle Verdünnungen von intakter und degradiierter HeLa-DNA (neun Stufen des schrittweisen DNase-Verdauus von 5 bis 195 min, siehe **Kapitel 3.2.3**) mit Mengen von etwa 333 pg, 33 pg und 3 pg aufgetragen. A: Histogramm der logarithmischen D-Werte. B: Histogramm der Anzahl der detektierten Allelic Drop-ins (ADI) des maSTR und des CE-basierten STR-Assays. C: Histogramm, welches die Allel-Recovery des maSTR-Assays und des CE-Assays mit den angegebenen DNA-Mengen darstellt. Gestrichelte Balken repräsentieren den prozentualen Anteil an Allelen, die mittels des maSTR-Assays erhalten wurden, während schwarze Balken die Allel-Recovery des CE-Assays zeigen (Anzahl innerhalb der Balken). Graue Balken repräsentieren identische Allel-Recovery von CE- und maSTR-Assays. Zwei Proben mit einer DNA-Menge von vier beziehungsweise einem Pikogramm DNA (intakt und Verdau-Dauer 35 min) ergaben unter Verwendung von CE-basierter Analytik keine Allele. Die letztere Probe erzeugte keinen C_q-Wert durch Messen des langen Amplikons, daher war ein D-Wert nicht anwendbar (NA).

Bei stark degradiierter DNA, die in großer Menge eingesetzt wurde, wurden stochastische Effekte detektiert, wie Drop-outs aber auch Drop-ins. Dabei handelt es sich vor allem um ungewöhnlich hohe Stotter-Werte. Beispielsweise weist die Probe „Verdau-Dauer von 90 min, 333 pg“ (**Abbildung 18**), die per maSTR-Assay analysiert wurde, ein Allelic Drop-in auf, wobei es sich um ein Stotter-Allel der Repeat-Anzahl 19 im Marker SE33 (ACTBP2) handelt, das mit 26% um 4% oberhalb des akzeptierten Stotter-Schwellenwerts von 22% des Haupt-Allels 20 vorkommt (**Abbildung 19 B**).

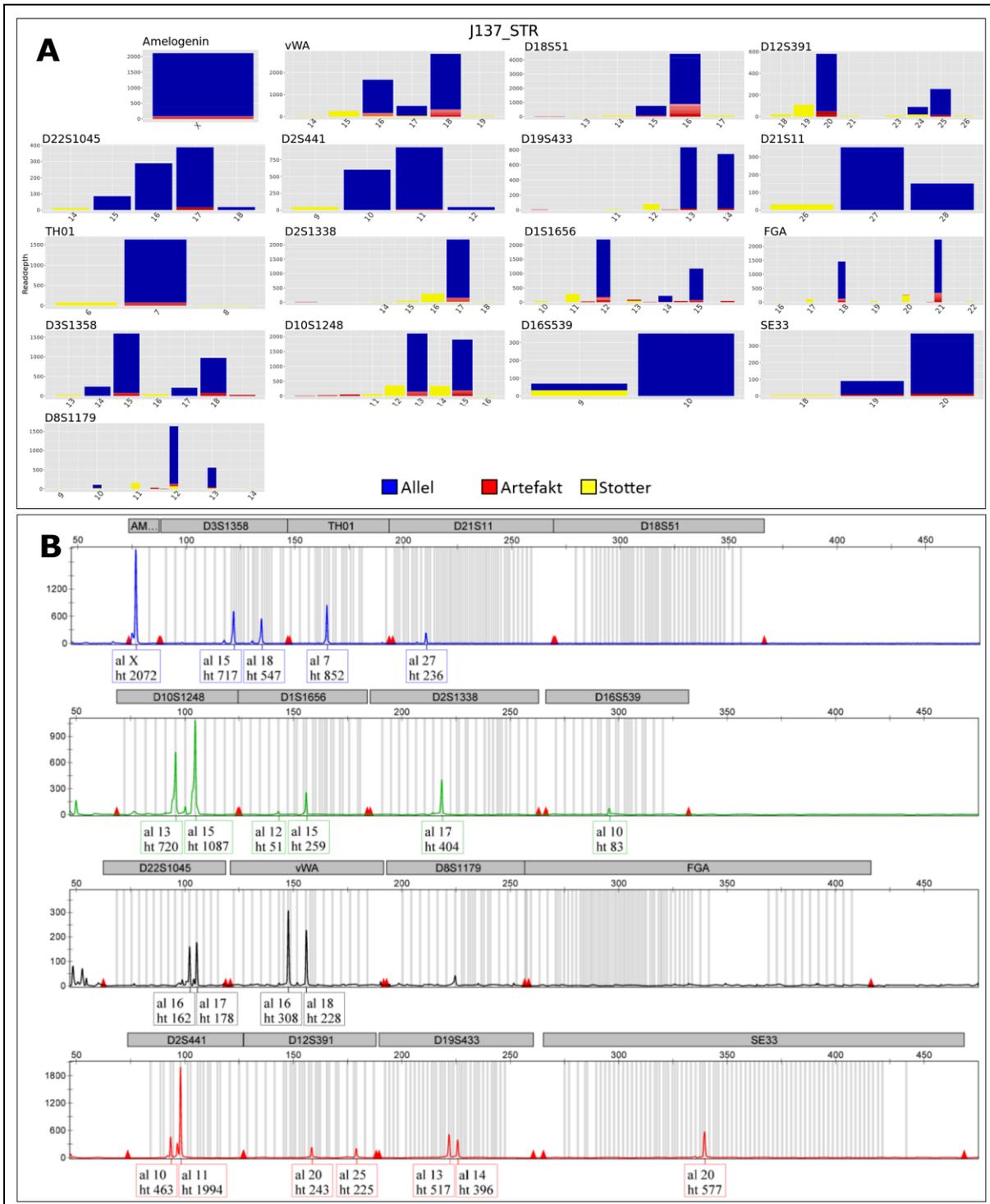


Abbildung 19: Vergleich eines maSTR- und eines ESX-generierten STR-Profiles

Vergleich der STR-Profile derselben DNA-Probe (Verdau-Dauer 90 min, 333 pg), die artifiziel degradiert wurde. Das STR-Profil zeigt die Allele 16 verschiedener forensischer STR-Loci und Amelogenin einer einzigen individuellen Person. A: Histogramm, das durch die Amplifikation per maSTR-Assay und Analyse mittels MiSeq FGx™-Sequenziergerät und einer bioinformatischen Pipeline erstellt wurde. Die Signalstärke der Allele wird über die Anzahl der Reads (Y-Achse) dargestellt, die amplifiziert wurden. Die Größe der Fragmente wird nicht explizit angegeben. Die Allele sind entsprechend ihrer Fragmentlänge von kurz (links) nach lang (rechts) innerhalb des grau-hinterlegten Bereichs (entspricht einem STR-Marker) geordnet. Signale, die als Allele gewertet wurden, sind blau dargestellt, Artefakte rot und Stotter-Allele gelb. B: Elektropherogramm, das durch die Amplifikation mittels PowerPlex® ESX 17-Kit (Promega) und Längenauftrennung auf dem ABI 310 Genetic Analyzer erstellt wurde. Die Peaks stellen die Amplikons der amplifizierten Allele dar. Die Allele wurden kapillarelektrophoretisch entsprechend ihrer Länge aufgetrennt und anhand Fluoreszenzmarkierungen in vier Farbkanälen getrennt

dargestellt. Graue Streifen repräsentieren die sogenannten Allel-Bins, welche die Zuordnung der gemessenen Allel-Nummern zu real existierenden Allelen gewährleisten. Die Signalstärke der Allele wird über die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU, Y-Achse) dargestellt, sowie im Kästchen unter der Allel-Nummer (abgekürzt als „a“) angegeben als Höhe (englisch *height*, abgekürzt „ht“). Die Größe der Fragmente wird in Basenpaaren (bp) durch die X-Achse dargestellt und reicht von kurz (links) nach lang (rechts). Aufgrund dessen wird der Skipisten-Effekt der degradierten DNA, die in die Multiplex-PCR eingesetzt wurde, visuell erkennbar: Die kurzen, sich im Elektropherogramm links befindlichen Allele weisen signifikant höhere Signalstärken auf als Amplikons von STR-Loci, die durch längere Fragmente (rechts) amplifiziert wurden. Zum Teil fielen die langen Allele komplett aus.

3.5.2 Anwendung des maSTR-Assays in einem forensischen Kontext mittels Analyse humaner Einzelhaare

Die Fähigkeit des NGS-basierten maSTR-Assays, zuverlässige und genaue STR-Profile zu erhalten, wurde unter Verwendung von DNA aus humanen Einzelhaaren bewertet, die bereits für Untersuchungen der CE-basierten STR-Allel-Recovery (mittels des PowerPlex® ESX 17-Kits, **Kapitel 3.3**) verwendet und in **Abbildung 13** dargestellt wurden.

Die mit den STR-Typisierungsmethoden des NGS-basierten maSTR-Assays und des PowerPlex® ESX 17-Assays erzielten Allel-Recoveries sind in **Abbildung 20** zusammengefasst. Wie bereits bei artifiziell degradierter DNA zu sehen war, hing der Prozentsatz der detektierten Allele sowohl von der DNA-Menge, als auch vom Schweregrad der Degradierung ab. Um die Wirkung der DNA-Degradierung isoliert zu untersuchen, wurden die Proben entsprechend ihrer DNA-Mengen in sechs Gruppen eingeteilt. Innerhalb der Gruppen wurden die Proben nach dem Schweregrad der DNA-Degradierung – dargestellt mittels des D-Werts - sortiert.

Anagene (Haar 1) und katagene Haare mit reichlich anhaftendem Wurzelgewebe (Haare 2-4, **Abbildung 13**), die bereits mit dem PowerPlex® ESX 17-Kit (fast) vollständige Profile lieferten, lieferten mit dem maSTR-Assay ebenfalls gute Ergebnisse (**Abbildung 20**). Im Gegensatz dazu bestand keine Korrelation zwischen der Morphologie und der DNA-Menge, sowie dem D-Wert und damit der Typisierbarkeit bei vollständig telogenen Kolbenwurzeln ohne Zellanhaftungen und solchen mit wenig anhaftendem Wurzelscheidengewebe: Die telogenen Haare 16 und 27 hatten (fast) kein anhaftendes Gewebe, zeigte jedoch vergleichbare D-Werte (weniger als 0,06) und eine größere Menge an DNA als die Haare 28 und 26, die mehr anhaftendes Gewebe hatten. Beim Vergleich dieser Haare mit und ohne Gewebe konnte eine etwas erhöhte Recovery für die maSTR-generierten im Vergleich zu CE-generierten Profilen nachgewiesen werden (**Abbildung 20**).

Um die Stärke der DNA-Degradierung von humaner DNA aus Haaren zu beschreiben, wurden die in **Tabelle 3** aufgelisteten verbalen Prädikate genutzt. Wie in **Abbildung 20** gezeigt, wurden mit einer hohen Menge an eingesetzter DNA hohe Allel-Recoveries, sowohl der CE-, als auch der NGS-basierten STR-Typisierung erreicht, selbst wenn die DNA leicht bis mäßig degradiert wurde (Gruppen 1 und 2). Bei leichter bis mäßiger DNA-Degradierung und Mengen zwischen 2 ng und 500 pg, ergaben beide Analysemethoden (fast) vollständige Profile. Bei einem maximalen DNA-Input von etwa 350 pg DNA oder weniger wurde die Allel-Recovery vom Schweregrad der DNA-Degradierung abhängig (Gruppe 3). Beispielsweise ergab leicht degradierte DNA von Haar 6 (346,7 pg, D-Wert 0,368) ein fast vollständiges Profil mit CE und NGS. Im Gegensatz dazu enthält ausgeprägt degradierte DNA von Haar 7 (366,2 pg, D-Wert 0,067) eine ähnliche DNA-Menge und lieferte durch CE-Analyse etwa 50% der Allele, während der maSTR-Assay ein nahezu vollständiges Profil ergab.

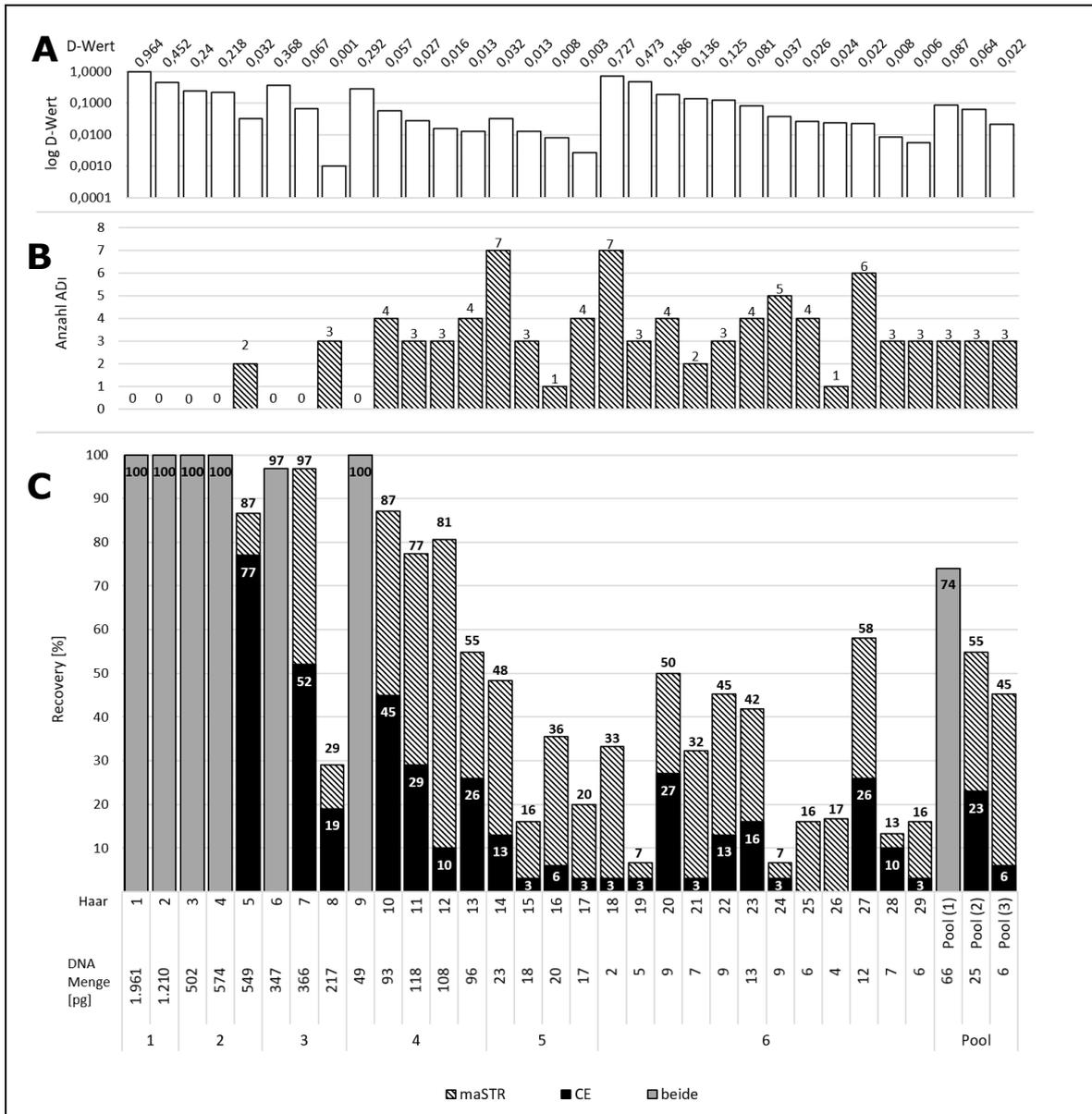


Abbildung 20: maSTR- und ESX-generierte Allel-Recovery von DNA aus Haaren

Korrelation des DNA-Degradierungswerts und dem Auftreten stochastischer Effekte für repräsentative 29 menschliche Einzelhaare und drei gepoolte DNA-Proben von telogenen Haaren unter Verwendung des PowerPlex® ESX 17-Kits (CE) und des maSTR-Assays. A: Histogramm der logarithmierten D-Werte. B: Histogramm der Anzahl der Allelic Drop-ins (ADI). C: Histogramm der Allel-Recovery des maSTR-Assays und des CE-Assays für alle Haare. Gestrichelte Balken zeigen den prozentualen Anteil von Allelic Drop-ins an, welche vom maSTR-Assay erhalten wurden. Schwarze Balken zeigen die Allel-Recovery des CE-Assays an. Graue Balken repräsentieren identische Allel-Recoveries für die CE- und maSTR-basierte Analytik. Die Werte der einzelnen Proben sind in unterschiedliche Blöcke ähnlicher DNA-Mengen [pg] geordnet. Die DNA-Mengen [pg] beziehen sich auf jeweils 1 µL DNA pro Probe, die für die Analyse verwendet wurde. Die Haare 1-5 befanden sich nicht im telogenen Wachstumsstadium, sondern im anagenen (Haar 1) beziehungsweise katagenen (Haare 2-5) Stadium und dienten als Positivkontrolle zu den telogenen Haaren, um den Einfluss der DNA-Menge und Integrität auf die konkordanten Allele zu untersuchen. Die Haare 1-4, 6-16, 21-23, 25, 27, 29, sowie Pool 1-3 stammen von der weiblichen Person B, während die Haare 5, 17-20, 24, 26 und 28 von der weiblichen Person C stammen.

DNA aus Haaren, die weniger als 50 pg DNA ergab, weist zugleich eine extreme DNA-Degradierung auf (D-Werte von $\leq 0,01$). Solche DNA-Proben zeigten bei der CE-Analyse eine schlechte Allel-Recovery, wahrscheinlich aufgrund stochastischer Effekte, konnten jedoch mit dem maSTR-Assay obzwar unvollständig, dennoch zum Teil aufschlussreich typisiert werden. Beispielsweise konnte die stark degradierte DNA des Haars 27 (D-Wert

0,022) mit dem maSTR-Assay über die Hälfte der Allele detektieren, während die herkömmliche CE-basierte STR-Typisierung nur etwa die Hälfte dieser Recovery erreichte. Diesem Vorteil steht jedoch entgegen, dass ebendiese Haare, welche per maSTR-Assay eine erhöhte Recovery gegenüber dem PowerPlex®-Kit aufweisen, ebenso eine erhöhte Anzahl an Allelic Drop-ins zeigen. Bei der CE-basierte Methode wurden keine Drop-ins detektiert. Beispielsweise sind in Probe 27 sechs Allelic Drop-ins im maSTR-generierten Profil enthalten, während die CE-basierte Methode lediglich konkordante Allele zeigt (**Abbildung 20**). Diese Anfälligkeit des maSTR-Assays für Drop-ins kann unterschiedliche Ursachen haben.

Die Allel-Recovery des maSTR-Assays hängt, wie schon beim ESX 17-Kit gezeigt, neben der DNA-Integrität der eingesetzten DNA auch von den DNA-Mengen ab: Je geringer die eingegebene DNA-Menge ist, desto stärker hängt die Allel-Recovery von der Schweregrad der DNA-Degradierung (dargestellt über den D-Wert) ab. Je weniger Input-DNA verwendet wird und je stärker sie degradiert ist, desto geringer ist die Allel-Recovery, sowohl in CE- als auch in NGS-basierter Analytik (siehe Blöcke 4, 5 und 6, **Abbildung 20**). In den meisten Fällen (mit Ausnahme von Haar 3) ergab degradierte DNA unter Verwendung des maSTR-Assays eine höhere Allel-Recovery als die CE-Analyse unter Verwendung von PowerPlex® ESX 17. Zusammengenommen legen diese Ergebnisse nahe, dass der RiboD-Assay eine Voraussage des nachfolgenden STR-Typisierungserfolgs unter Verwendung einer herkömmlichen CE-basierten und NGS-(maSTR-) basierten STR-Analyse ermöglicht.

3.5.3 Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit forensischer STR-Profile aus Haaren

Die bereits in **Abbildung 20** aufgeführten Proben wurden in Bezug auf die Reproduzierbarkeit der STR-Ergebnisse anhand des maSTR-Assays in Duplikaten analysiert, sowie für das CE-basierte ESX 17-Kit als einzelne Analyse. Für die maSTR-generierten Daten bedeutet das, dass ungefähr die Hälfte der hier gezeigten Profile in maSTR-Lauf 1 und 2 sequenziert wurden, wobei dieselben PCR-Produkte in beiden Läufen verwendet wurden (**Abbildung 21**), weswegen mit diesen Proben die Wiederholbarkeit untersucht wurde. Im Gegensatz dazu wurde die andere Hälfte der Profile in den Läufen 3 und 4 basierend auf separaten PCR-Amplifikationen sequenziert. Dabei wurden identische Vorgehensweisen angewandt beim Ansetzen der PCRs, mit der Ausnahme, dass im maSTR-Lauf 4 die finale Bibliothek in der Menge von 8pM anstatt 4pM eingesetzt wurde. Dies könnte einen Einfluss auf die daraus resultierende Datenmenge haben, würde wahrscheinlich jedoch nicht die Drop-in-Raten beeinflussen, weil diese bereits während der vorgeschalteten Multiplex-PCR entstehen.

Wie **Abbildung 21** zeigt, variiert die Anzahl der Drop-ins und der Recoveries zwischen den unterschiedlichen maSTR-generierten Profilen. Diese Variation korreliert sowohl mit der Quantität und Integrität der eingesetzten DNA als auch mit der Zugehörigkeit zu den jeweiligen maSTR-Assay-Läufe. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nimmt mit abnehmender Quantität und Integrität der Template-DNA ab: Sowohl die Recoveries als auch die Anzahl der Drop-ins sind nicht reproduzierbar bei Profilen geringer DNA-Quantität und -Integrität.

Die Tatsache, dass Minimal Spuren, vor allem solche, deren DNA degradiert vorliegt, schlechte Reproduzierbarkeiten aufweisen, ist für CE-Analysen bekannt. Allerdings weisen Profile, die mit CE-basierten Kits generiert werden, eine wesentlich geringere Häufigkeit von Allelic Drop-ins auf als mittels des maSTR-Assays detektiert wurden. Die in **Abbildung 20** und **Abbildung 21** dargestellten CE-generierten Profile weisen keine

Drop-ins auf. Neben der bekannten Problematik der stochastischen Effekte muss daher für maSTR-generierte Profile noch mindestens eine andere Ursache für die hohe Anzahl an Drop-ins vorliegen, die vermehrt stochastische Fehler bedingt und/oder durch tatsächliche Kontaminationen sowie systematische Fehler hervorgerufen werden könnten. Den nicht vorhandenen Allelic Drop-ins steht gegenüber, dass die CE-basierten Profile wesentlich niedrigere Recoveries aufweisen, als es beim maSTR-Assay der Fall ist. Vor allem bei DNA-Proben aus telogenen Haaren, die in geringen DNA-Mengen und/oder eine hohe DNA-Degradierung aufweisen, fallen eine Vielzahl von Allelen aus, die jedoch mit dem maSTR-Assay detektiert werden konnten.

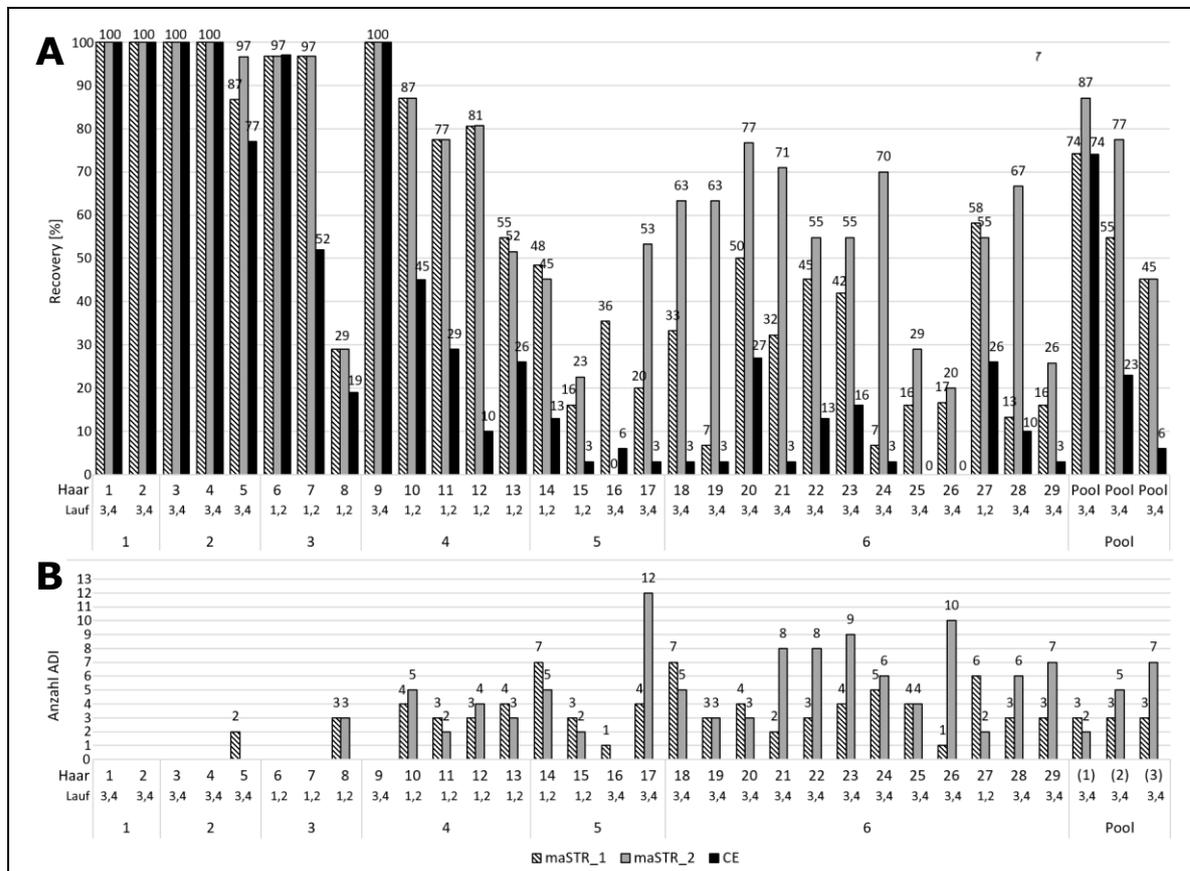


Abbildung 21: Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit von STR-Profilen

Der Vergleich zur Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit der maSTR-Ergebnisse im Vergleich zum PowerPlex® ESX 17-Assay wurde mit DNA aus Haaren durchgeführt. Ein Teil der Proben, die unter „maSTR_1“ gelistet sind, wurden in Lauf 1 des maSTR-Assays sequenziert, der andere Teil der Proben von „maSTR_1“ wurde in Lauf 3 sequenziert. Ein Teil der Proben, die unter „maSTR_2“ gelistet sind, wurden in Lauf 2 des maSTR-Assays sequenziert, der andere Teil der Proben von „maSTR_2“ wurde in Lauf 4 sequenziert. Dieselben Proben wurden als Duplikate analysiert in Lauf 1 und 2, ein anderer Teil der Proben wurden als Duplikate in Lauf 3 und 4 analysiert. Die folgenden Profile wurden zur Überprüfung der Wiederholbarkeit in Lauf 1 und Lauf 2 auf Basis derselben Amplikon-PCRs sequenziert: Einzelhaar 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 27. Alle restlichen Profile wurden in Lauf 3 und Lauf 4 sequenziert und stammen aus zwei getrennten PCR-Ansätzen. Die Wiederholbarkeits-Studien der Profile zielen bei Profilen, welche in Lauf 1 und 2 generiert wurden, lediglich auf die Sequenzierung ab, da in beiden Läufen dieselben Bibliotheken verwendet wurden und daher dieselben PCR-Amplikons in zwei Replikaten sequenziert wurden. Im Gegensatz dazu zielen die Reproduzierbarkeits-Studien der Profile, die in Lauf 3 und 4 generiert wurden, auf die Amplifikation per PCR und die Sequenzierung ab, da unterschiedliche Bibliotheken verwendet wurden, indem dieselbe DNA für zwei unabhängige Amplikons-PCR-Läufe eingesetzt wurde.

In **Abbildung 21** ist auffällig, dass die Unterschiede in der Recovery und der Anzahl der Allelic Drop-ins von den Proben derjenigen Haare, die in Lauf 1 und 2 sequenziert wurden, weniger gravierend sind, als dies bei den Proben von Lauf 3 und 4 der Fall ist

(**Abbildung 21**). Das könnte einerseits durch die identischen PCR-Produkte verursacht worden sein, die in Lauf 1 und 2 doppelt sequenziert wurden, während in Lauf 3 und 4 die Amplikon-PCRs unabhängig voneinander liefen. Andererseits zählen die meisten Proben, die in Lauf 1 und 2 liefen, zu denjenigen Proben (Einzelhaare 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 27), die weniger stark degradierte DNA und/oder DNA größerer Menge aufwiesen als die Proben, die in Lauf 3 und 4 sequenziert wurden. Daher werden im Folgenden einzelne repräsentative Beispiele herausgegriffen, um zu erläutern, wie die Wiederholbarkeits- und Reproduzierbarkeitsstudie genutzt wurde, um Hinweise auf die Ursprünge der Allelic Drop-ins zu erlangen.

Einige Proben weisen Allelic Drop-ins auf, die eine sehr hohe Readanzahl zeigen und nicht reproduzierbar sind: Bei Profilen, die separate Amplikon-PCRs durchlaufen haben (Lauf 3 und 4), treten zum Teil Drop-ins sehr hoher Readzahlen auf, die nicht reproduzierbar sind, jedoch zu hohe Readzahlen aufweisen, um als Hintergrundrauschen zu zählen. Eine Hochsetzung des analytischen Schwellenwertes kann diese daher nicht unterbinden: Bei der Haar 21 treten im Profil J357 (siehe Anhang 2) in Lauf 3 in Marker D8S1179 die fremden Allele 9 und 11 mit einer hohen Readzahl auf (je mehr als 2000 Reads) und das fremde Allel 10 mit einer etwas niedrigeren, jedoch recht hohen Readzahl für DNA geringer Menge (**Abbildung 22**). Das homozygote Allel 13 des Referenzprofils konnte nicht detektiert werden. Bei der Wiederholung sowohl der Amplifikation der Probe als auch der Sequenzierung in Lauf 4 (J434) wurden Drop-in-Allele 9 und 11 nicht als prominenteste Allele detektiert, allerdings wurden diese Allele in niedriger Readzahl nachgewiesen und es traten in diesem Profil neben Allel 13 auch das fremde Allel 10 in höherer Readzahl auf. In der entsprechenden Probe, die per PowerPlex®-Assay und CE analysiert wurde, konnten keine Drop-ins festgestellt werden, allerdings konnte in dem Marker kein einziges Allel detektiert werden.

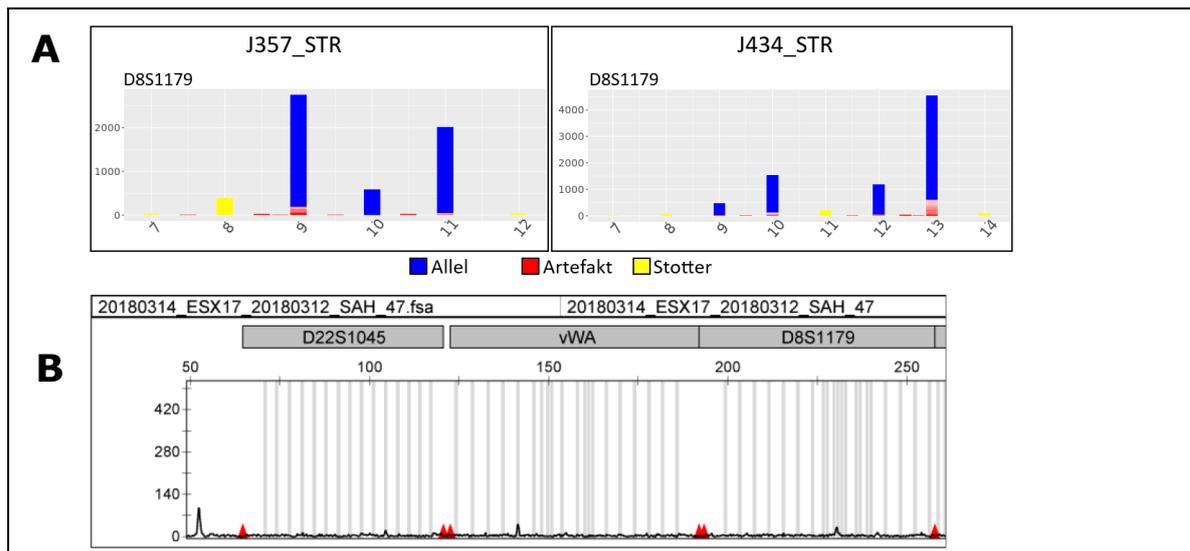


Abbildung 22: Vergleich der STR-Profile einer replizierten Haar-Probe

Reproduzierbarkeit der maSTR-Ergebnisse im Vergleich zum CE-basierten PowerPlex®-Assay anhand des repräsentativen Beispiels von der Probe „Haar 21“. A: Amplifikation und Sequenzierung der DNA per maSTR-Assay in zwei Replikaten. B: Amplifikation und Fragmentlängen-Auftrennung per CE-basiertem PowerPlex® ESX 17-Assay (Promega).

Bei Haar 27 tritt im Profil J198 (siehe Anhang 2) in Lauf 1 in Marker D12S391 das fremde Allel 22 mit 66 Reads auf, statt dem heterozygoten Allel 21 (das zusammen mit Allel 23 dem Referenzprofil entsprechen würde). Dasselbe Phänomen für Marker D12S391 tritt auch im Profil J189 bei Haar 10 derselben Spenderin auf (siehe Anhang 2): Allel 22 wird hier mit 65 Reads gezählt, wobei Allel 23 vorhanden ist und Allel 21 fehlt. Allel 22, das

in beiden Profilen bei Marker D12S391 diskordant ist, aber als Allel gezählt wird, könnte ein ungewöhnlich hohes Stotter-Allel von Allel 23 sein oder es könnten systematische Fehler in der Auswertung vorliegen, die zu einem Zählen von Allel 22 anstatt Allel 21 geführt haben.

Weiterhin wurde beobachtet, dass mit abnehmender Zahl der effektive Reads in Korrelation die Anzahl der Allelic Drop-ins zunehmen und die Recoveries abnehmen (vgl. **Abbildung 21** und **Abbildung 23**). Dabei ist auffällig, dass die Zahl der effektiven Reads in den Läufen 1 und 2 niedriger sind als in den Läufen 3 und 4.

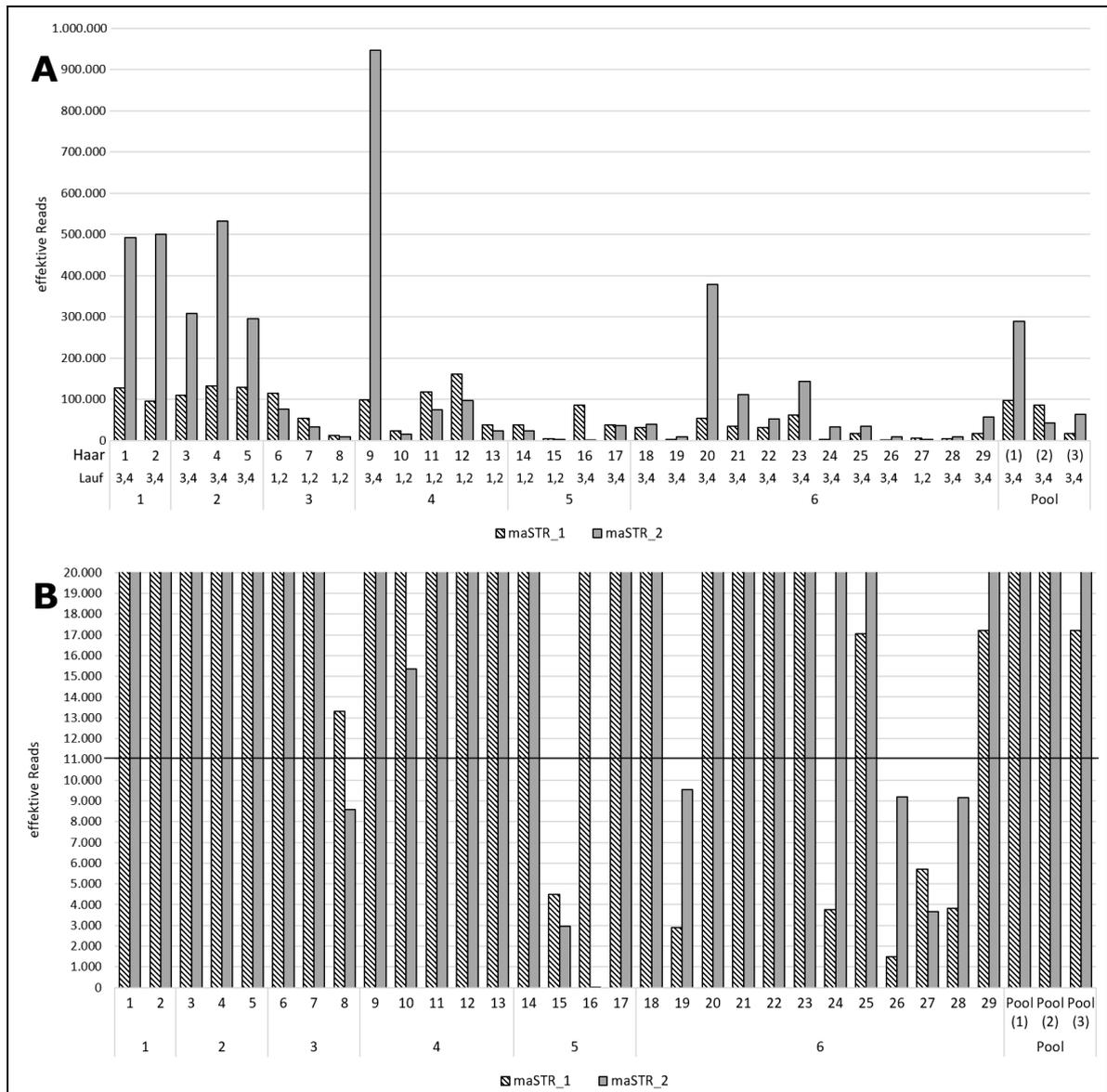


Abbildung 23: Anzahl effektiver Reads von maSTR-generierten Replikaten

Effektive Reads der jeweiligen STR-Profile von DNA aus Haaren für unterschiedliche maSTR-Läufe. A: Die folgenden Profile wurden zur Überprüfung der Wiederholbarkeit in Lauf 1 und Lauf 2 auf Basis derselben Amplikon-Bibliothek sequenziert: Einzelhaar 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 27. Alle restlichen Profile wurden in Lauf 3 und Lauf 4 sequenziert und stammen aus zwei getrennten PCR-Ansätzen. Die Wiederholbarkeits-Studien der Profile zielen bei Profilen, welche in Lauf 1 und 2 generiert wurden, auf die Sequenzierung ab, da in beiden Läufen dieselbe Bibliothek verwendet wurde und daher dieselben PCR-Amplikons in zwei Replikaten sequenziert wurden. Im Gegensatz dazu zielen die Reproduzierbarkeits-Studien, der Profile, die in Lauf 3 und 4 generiert wurden, auf die Amplifikation per PCR und die Sequenzierung ab, da zwei unterschiedliche Bibliotheken verwendet wurden, indem dieselbe DNA für zwei unabhängige Amplikons-PCR-Läufe eingesetzt wurde. B: Vergrößerte Darstellung von A mit Markierung der 11.000 Reads-Grenze.

Einige Proben weisen Allelic Drop-ins auf, die eine sehr hohe Readanzahl zeigen und reproduzierbar sind: Bei der Probe Haar 15 tritt im maSTR-Profil J195 (siehe Anhang 2) in Lauf 1 in Marker D8S1179 das fremde Allel 10 neben dem Allel 13 auf, das im Referenzprofil homozygot vorkommt. Dabei zählt das fremde Allel mehr Reads als das Allel des Referenzprofils. Dieses Verhältnis trat nach erneuter Sequenzierung in Lauf 2 erneut auf (J291). Ebenso verhält es sich bei Haar 14 im Profil J199 (siehe Anhang 2) in Lauf 1 in Marker D8S1179. Hier tritt das fremde Allel 10 neben dem Allel 13 auf, das im Referenzprofil homozygot vorkommt, auf und zählt dabei mehr Reads als das Allel des Referenzprofils. Dieses Verhältnis ist ebenfalls reproduzierbar (J295 in Lauf 2). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Sequenzierung und Sequenz-Analyse nicht die Ursache des Drop-ins sein kann, da in Lauf 1 dieselben PCR-Produkte genutzt wurde wie in der Wiederholung (Lauf 2).

Bei Haar 25 tritt im Profil J353 (siehe Anhang 2) in Lauf 3 in Marker D19S433 das fremde Allel 14 neben dem Allel 13 auf; das Referenzprofil zeigt die Marker 12 und 13. Dabei zählt das fremde Allel 14 mehr Reads als das Allel 13 des Referenzprofils. Bei der Wiederholung der PCR und erneuter Sequenzierung in Lauf 4 (J437) fällt der Marker komplett aus. Das Mischungsverhältnis des Allels 14 mit hoher Readzahl und des Allels 13 in niedriger Readzahl, sowie der gleichzeitige Allel-Ausfall von Allel 12 und Drop-in des Allels 14 könnte ein Hinweis darauf sein, dass die korrekten Allele vorhanden sind und amplifiziert wurden, jedoch die bioinformatische Auswertung um ein Repeat „verrutscht“ ist. Alternativ könnte aufgrund stochastischer Effekte Allel 14 ein sehr hoher Stotter von Allel 13 sein, der in höherer Readzahl als Allel 13 vorkommt.

3.5.4 Consensus und Composite-Interpretationen von kombinierten ESX/ESI- und maSTR-generierten STR-Profilen aus Einzelhaaren

Um die bestmögliche Interpretations-Strategie für STR-Profile aus ausgefallenen Haaren zu untersuchen, wurde STR-Profile von DNA aus Haaren hinsichtlich der Größenverteilung der Loci von komplementären Multiplex-STR-Typisierungskits (PowerPlex® ESX 17, PowerPlex® ESI 17, Promega, **Kapitel 2.15**) untersucht. Diese Kits amplifizieren dieselben STR-Marker, jedoch in unterschiedlichen Größenverteilungen. Es wurden die gleichen Marker unterschiedlicher Länge von beiden Kits für die Analyse der Replikate verwendet. Die Ergebnisse der Replikate der ESX 17/ESI 17-Typisierungen wurden mit denjenigen der maSTR-basierten Typisierung verglichen. Dafür wurden die STR-Profile mittels zweier Interpretations-Strategien ausgewertet und miteinander verglichen: Mittels der Consensus-Interpretation der Profile werden lediglich reproduzierbare Allele gezählt, während in der Composite-Interpretation alle vorkommenden Allele aller Replikate gezählt werden (**Kapitel 1.2.4**). Statt der Allel-Recovery wird der Erfolg der Typisierung im Validitätsgrad angegeben (**Kapitel 2.17**, (Pfeifer et al. 2012)), da in dessen Berechnung neben der Anzahl der Allelic Drop-outs auch die Anzahl der Allelic Drop-ins eingeht. Aufgrund der zuvor beobachteten hohen Anzahl an Drop-ins im maSTR-Assay, erscheint dieser Wert zur Beurteilung der Qualität der STR-Profile als besser geeignet als die Allel-Recovery.

Mit abnehmender DNA-Menge und DNA-Integrität steigt die Anzahl der Allelic Drop-outs der ESX-, ESI- und maSTR-Assays, wodurch der Validitätsgrad abnimmt. Allelic Drop-ins werden unter Anwendung der ESX und ESI-Kits nur in wenigen Fällen detektiert, kommen im maSTR-Assay dagegen vermehrt vor (**Abbildung 24**).

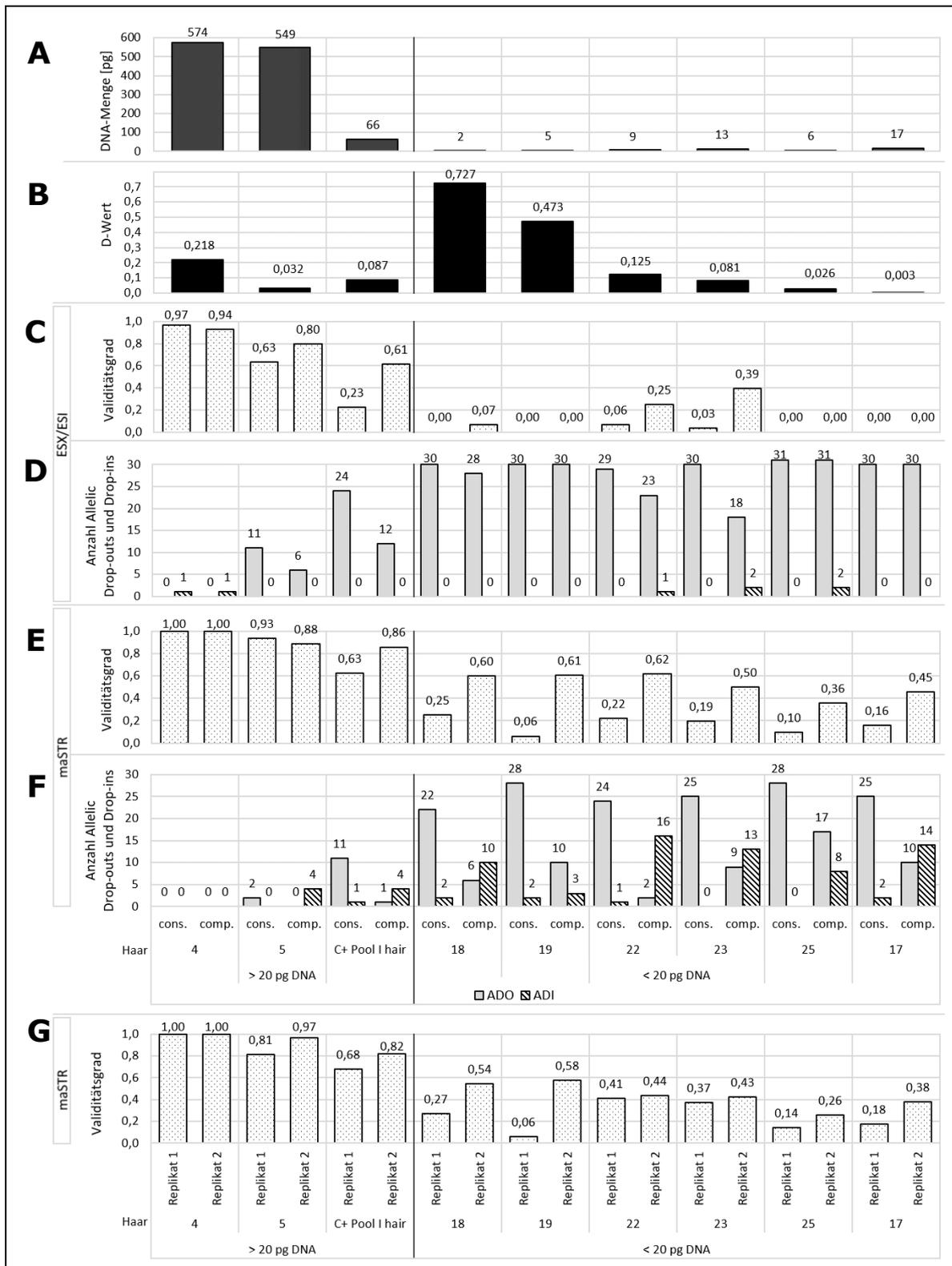


Abbildung 24: Vergleich unterschiedlicher Interpretationsmethoden

Die Ergebnisse der STR-Interpretationsmethoden „Consensus“ (cons.) und „Composite“ (comp.) von STR-Profilen wurden anhand der DNA unterschiedlicher Haare verglichen. Die Proben wurden gemäß der in die PCR eingesetzte DNA-Menge in zwei Kategorien sortiert (mehr und weniger als 20 pg DNA-Einsatz). Innerhalb der Kategorien wurden die DNA anhand ihres DNA-Degradierungswerts sortiert. DNA-Proben, zu denen die in die PCR eingesetzte DNA-Menge und der Degradierungswert vorliegen (A und B), wurden mit den komplementären Kits PowerPlex® ESX 17 und ESI 17 Fast (Promega) amplifiziert und per CE analysiert. Bei der Consensus-Strategie werden Allele oberhalb des Schwellenwerts von 50 RFU gezählt, die in den zwei beziehungsweise drei Replikaten mindestens zweimal vorkommen. Mittels der Composite-Strategie werden alle Allele gezählt, die mindestens einmal vorkommen und den Schwellenwert von 50 RFU

überschritten haben. Der Validitätsgrad (C, E) wird anhand der Anzahl der Allelic Drop-outs (hellgrau) und Allelic Drop-ins (schwarz-weiß gestreift; D, F) berechnet. Der Validitätsgrad und die Anzahl der Allelic Drop-ins und Drop-outs der Consensus- beziehungsweise Composite-interpretierten Profile ist sowohl für die kombinierte Auswertung der komplementären PowerPlex® ESX 17 und ESI 17 Fast-Kits (C, D) gezeigt, als auch für den maSTR-Assay (E, F). Der Validitätsgrad des maSTR-Assays (G) wurde nicht über die beiden Interpretationsstrategien berechnet, sondern stellt die miteinander verrechneten Allelic Drop-ins und Drop-outs für die STR-Profile der einzelnen Replikate dar. Es wurden dieselben DNA-Proben verwendet wie in **Abbildung 20**, **Abbildung 21** und **Abbildung 23**. Die kombinierte ESX/ESI 17-Methode wurde per Consensus beziehungsweise Composite-Interpretation analysiert, anhand je einem ESI 17 Fast-erzeugtem Profil und zwei ESX 17-Profilen (Haar 22, 4, 25, 5 und 19) beziehungsweise einem ESX 17-Profil (Haar 23, 17, 18 und Pool). Die maSTR-Profile wurden immer in Duplikaten ausgewertet. Die Haare 4 und 5 befanden sich nicht im telogenen Wachstumsstadium, sondern im katagenen Stadium und dienten als Positivkontrolle zu den telogenen Haaren, um den Einfluss der DNA-Menge und Integrität auf die konkordanten Allele zu untersuchen. Die Haare 4, 22, 23, 25 und Pool I stammen von der weiblichen Person B, während die Haare 5, 17-19 von der weiblichen Person C stammen.

Wie zuvor (**Kapitel 3.4.3**) schon gezeigt, ist DNA aus Haaren nicht auswertbar, wenn die eingesetzte DNA-Menge zu gering ist, auch wenn die DNA nur wenig degradiert ist (**Abbildung 24**, Haar 18). Der umgekehrte Fall mit einer hohen Menge an eingesetzter DNA, aber starker DNA-Degradierung, resultiert ebenfalls in einer Vielzahl an Allelic Drop-outs (**Abbildung 24**, Haar 5 und C+ Pool I).

Bei fast allen Proben wurden per Composite-Strategie höhere Validitätsgrade als mit der Consensus-Strategie erreicht. STR-Profile, die mittels des maSTR-Assays generiert wurden, weisen höhere Validitätsgrade auf als ESX/ESI-generierte STR-Profile. Die Validitätsgrade der einzelnen maSTR-Replikate wurden ebenfalls in **Abbildung 24** dargestellt, weil diese auf unterschiedlichen PCR-Assays beruhen und daher verglichen werden kann, ob durch die Consensus- oder Composite-Strategie der Duplikate eine Verbesserung in Relation zu den einzelnen Replikaten erreicht werden konnte. Dies konnte lediglich für die maSTR-generierten Daten durchgeführt werden, nicht für die ESX/ESI-Daten, weil diese keine Duplikate darstellen, da unterschiedliche Amplikons erzeugt wurden. Die maSTR-generierten Daten zeigen, dass DNA, die in ausreichender Menge und Integrität vorliegt, sowohl mittels separater als auch Composite oder Consensus-kombinierter Auswertung zu guten Validitätsgraden führt (Haar 4 und Haar 5). Aufgrund der ungewöhnlich hohen Anzahl der Allelic Drop-ins des maSTR-Assays zeigen vor allem die per Composite-Methode ausgewerteten Proben (weil hier alle detektierten Allele gewertet wurden) lediglich eine geringe Verbesserung des Validitätsgrades in Relation zu den Validitätsgraden der separat ausgewerteten Proben.

DNA-Proben von Mengen unterhalb 20 pg konnten mit keiner der beiden Strategien zu auswertbaren STR-Profilen führen, da die Anzahl der Allelic Drop-outs selbst mit der Composite-Strategie zu hoch war.

3.5.5 Komplementäre Analyse kurzer Amplikons (<250 bp)

Um den Grund für die in Relation zu CE-basierten STR-Typisierungskits erhöhten Validitätsgrade (Pfeifer et al. 2012) der maSTR-generierten STR-Profile zu untersuchen, wurden lediglich diejenigen Marker der komplementären Promega Kits PowerPlex® ESX 17 und ESI 17 ausgewertet, die kürzer als 250 bp sind (**Kapitel 2.15**). Diese Kits amplifizieren dieselben Marker, jedoch unterscheiden sich die Primer-Bindestellen der beiden Kits, sodass PCR-Amplikons, die in einem Kit eine hohe Anzahl an Basenpaaren aufweisen, im anderen Kit kürzere Amplikons generieren (Hill et al. 2011). Die gemeinsame Analyse beider Kits soll dazu führen, dass mit degradiertem DNA mehr STR-Allele erhalten werden sollen als mit einem Standard-Kit, da insgesamt 13 der 17 STR-

Marker durch die komplementäre Anwendung über sehr kurze Amplikons (< 250 bp) abgedeckt werden. Die entsprechenden Marker von maSTR-generierten Profilen wurden zum Vergleich herangezogen (**Abbildung 25**).

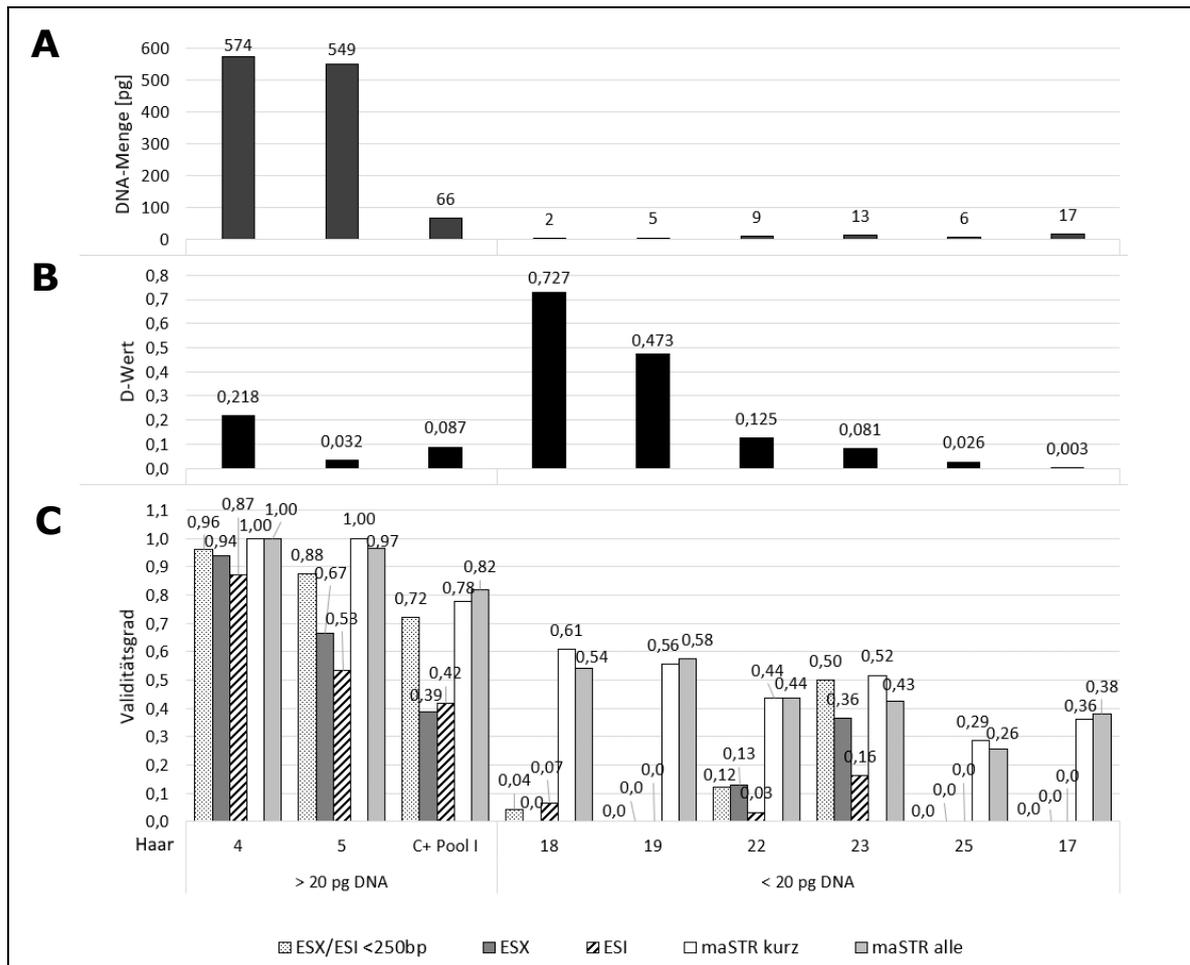


Abbildung 25: Validitätsgrade in Abhängigkeit der STR-Amplikonlänge

Vergleich unterschiedlicher STR-Interpretationsmethoden (C) zu der DNA-Menge (A) und -Integrität (angegeben anhand des DNA-Degradierungsgrads, D-Wert, B) mittels DNA aus telogenen Haaren. Die STR-Interpretationsmethoden (C) umfassen die komplementäre, CE-basierten Auswertung der PowerPlex® ESX 17 und ESI 17 Fast-Kits („ESX/ESI <250bp“) zur separaten Auswertung der einzelnen CE-basierten Kits („ESX“, „ESI“) und dem NGS-basierten maSTR-Assay, von dem lediglich diejenigen Marker ausgewertet wurden, die in „ESX/ESI <250bp“ genutzt wurden („maSTR kurz“) und von allen Markern („maSTR alle“). Anordnung in zwei Kategorien (mehr und weniger als 20 pg eingesetzte DNA-Menge) und innerhalb der Kategorie entsprechend der DNA-Degradierung in absteigender Reihenfolge. Für die Erstellung der Profile der komplementäre ESX/ESI-Amplikons unterhalb 250 bp Länge wurde jeweils dasjenige ESX 17-beziehungsweise ESI 17 Fast-Profil genutzt, das den höchsten Validitätsgrad aufwies. Die Haare 4 und 5 befanden sich nicht im telogenen Wachstumsstadium, sondern im katagenen Stadium und dienen als Positivkontrolle zu den telogenen Haaren, um den Einfluss der DNA-Menge und Integrität auf die konkordanten Allele zu untersuchen. Die Haare 4, 22, 23, 25 und Pool I stammen von der weiblichen Person B, während die Haare 5, 17-19 von der weiblichen Person C stammen.

Durch die komplementäre ESX/ESI-Auswertung der Amplikons, die kürzer als 250 bp sind, wurden die Validitätsgrade bei manchen Haaren erkennbar verbessert im Vergleich zu den separaten Auswertungen anhand der ESX 17- beziehungsweise ESI 17-Kits. Dazu zählen Haare, die mehr als 100 pg DNA aufwiesen oder leicht bis ausgeprägt degradierte DNA (Proben Haar 4, Haar 5, C+ Pool I, Haar 23). In Fällen, in denen per ESX- oder ESI-Kit kaum oder keine Allele gefunden werden konnten (stark bis extrem degradierte DNA geringer Menge), konnte durch die komplementäre Auswertung keine Verbesserung

erzielt werden. Im Fall extrem degradiertes DNA geringer Menge (13 pg) von Haar 23 wurde aufgrund der komplementären Auswertung ein Validitätsgrad von 0,5 und eine Allel-Recovery von 52% erreicht, während die separaten Auswertungen lediglich Validitätsgrade von 0,36 (ESX) und 0,16 (ESI) aufwiesen. In keinem der untersuchten Fälle überstiegen die Validitätsgrade der komplementären ESX/ESI-Auswertung diejenigen des maSTR-Assays. Ergebnisse des NGS-basierten Assays („maSTR kurz“), von dem lediglich diejenigen Marker ausgewertet wurden, die auch in der komplementären ESX/ESI-Auswertung genutzt wurden, unterschieden sich kaum von den Ergebnissen, in denen alle Marker genutzt wurden („maSTR alle“, **Abbildung 25**).

3.5.6 Vergleich mit einem alternativen NGS-basierten Kit

Um zu überprüfen, ob die verbesserten Validitätsgrade des maSTR-Assays im Vergleich zu den Validitätsgraden der CE-basierten Kits auf den jeweiligen instrumentellen analytischen Verfahren (CE bzw. NGS) selbst beruhen, wurden einige DNA-Proben aus Einzelhaaren zusätzlich einer NGS-basierten Sequenzierung mittels des ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kits (Verogen, bzw. Illumina, siehe **Kapitel 2.16**) unterzogen. Dieses Kit nutzt neben Amelogenin sowohl 27 autosomale STR-Marker (aSTRs), als auch 94 identitätsinformativ SNP-Marker (iSNPs) zur Identifizierung von Personen, sowie 31 gonosomale STR-Marker zur Klärung von Verwandtschaftsverhältnissen (X-, Y-STRs). Weitere Marker zur Bestimmung des Phänotyps (22 phänotypisch-informative SNPs, pSNPs) und der Bestimmung der biogeografischen Herkunft (56 abstammungsinformative SNPs, ancestry SNPs, aSNPs) sind ebenfalls enthalten. Als Kontrolle wurde von jeder Person, die Einzelhaare spendete, ein zusätzlicher Mundschleimhautabstrich genommen, die DNA extrahiert und per ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit sequenziert und unter den Standard-Einstellungen der Schwellenwerte ausgewertet. Die Ergebnisse der STR-Marker und Amelogenin dieser Kontrollen waren zu 100% konkordant mit den Referenzprofilen der CE-Analytik. Gonosomale STRs wurden in der vorliegenden Studie nicht betrachtet. Die SNPs, welche zur Voraussage der Phänotypen (Augen- und Haarfarbe), sowie der biogeografischen Herkunft verwendet werden, gingen in die Analyse mit ein. Auf die Voraussagen wird aufgrund der Anonymisierung in der vorliegenden Studie verzichtet.

Alle Qualitätswerte der Sequenzierung mit dem ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit lagen im akzeptablen Bereich. Die durchschnittliche Qualität für die erhaltenen Reads lag innerhalb des empfohlenen Bereichs: Die Cluster-Dichte lag bei 479 k/mm², und sehr viele Cluster haben die Qualitätsprüfung bestanden (*Clusters passing filter* lag bei 98,35%). Die Phasierung lag mit 0,208% unterhalb des von Illumina empfohlenen Schwellenwertes von ≤ 0,25% und das *Prephasing* lag unterhalb des Schwellenwertes von ≤ 0,15% (0,002%).

In **Tabelle 6** werden die marker-spezifischen Ergebnisse gezeigt. Die Summe der Reads wird lediglich angegeben für die Allele, die typisiert werden konnten. Die Recovery wird angegeben als die relative Recovery der typisierten Allele [%] zum Referenzprofil (C+).

Die sehr niedrigen Recoveries der STR- und SNP-Marker der Sequenzierungen zeigen, dass die Haare 22, 23 und Haar 25 nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen der ForenSeq™-Sequenzierungen führen (**Tabelle 6**). Diese Proben weisen sehr wenige beziehungsweise keine Reads auf, die in der Sequenzierungs-Reaktion erstellt wurden und den Proben zugeordnet wurden. Die auf SNP-basierte Phänotypisierung war von diesen Proben ebenfalls nicht erfolgreich. DNA aus Haaren, die in relativ hoher Menge eingesetzt wurde (Haar 2 und 5), zeigte hohe Recoveries und konnte erfolgreich für die

SNP-Phänotypisierung verwendet werden, die ebenfalls für die Kontrollproben aus Mundschleimhautabstrichen erfolgreich war.

Tabelle 6: Ergebnisse der Typisierung mittels des ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kits

	Probe	Person B					Person C	
		Kontrolle	Einzelhaar				Kontrolle	Einzelhaar
		C+_buccal	2	23	25	22	C+_buccal	5
Autosomale STRs + Amel	Typisierte Loci	28 / 28	28 / 28	4 / 28	0 / 28	0 / 28	28 / 28	17 / 28
	Recovery [%]	NA	100	8,0	0	0	NA	52,2
	Summe der Reads	50621	27840	240	0	0	67903	2661
X-STR	Typisierte Loci	7 / 7	6 / 7	1 / 7	0 / 7	1 / 7	7 / 7	4 / 7
	Recovery [%]	NA	90,9	9,1	0,0	9,1	NA	58,3
	Summe der Reads	30109	13279	49	0	54	31031	514
iSNP	Typisierte Loci	90 / 94	82 / 94	3 / 94	0 / 94	1 / 94	93 / 94	30 / 94
	Recovery [%]	NA	90,6	3,4	0,0	0,9	NA	25,2
	Summe der Reads	27224	18292	142	0	45	42073	2736
SNPs: Phänotypisierung	Haar- und Augenfarbe	22 / 22	22 / 22	0	0	0	22 / 22	12 / 22
	Biogeografische Herkunft	53 / 54	50 / 54	4 / 54	0	0	53 / 54	26 / 54

NA: Nicht anwendbar

In allen untersuchten Assays und Kits sind unterschiedliche Amplikonlängen pro Marker enthalten, da die Primer-Bindestellen zwischen den PCR-Assays variieren. Um die Ergebnisse der ForenSeq™-Sequenzierung bewerten zu können, wurden die Bandbreiten der möglichen Amplikonlängen aller untersuchten Marker gegeneinander aufgetragen (**Abbildung 26**).

Die durchschnittliche Amplikonlänge (Mittelwert) der autosomalen STRs des ForenSeq™-Kits liegt für die minimalen Amplikonlängen bei 143 bp und für die maximalen Amplikonlängen bei 201 bp. Die Mediane der Datensätze liegen bei weniger Basenpaaren, sowohl für die minimale (135 bp) als auch maximale (182 bp) Amplikonlängen. Mit Ausnahme der aSNPs sind die Mittelwerte der Amplikonlängen größer als die Mediane der jeweiligen Datensätze. Der Großteil aller Amplikons aller STR- und SNP-Marker im ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit sind daher kürzer als der Mittelwert. Das wird dadurch verursacht, dass wenige Amplikons existieren, die wesentlich länger sind als der Median. Für aSTRs gilt dies vor allem aufgrund der Amplikonlängen von Penta E, Penta D, FGA, D12S391, D22S1045 und D21S11 (**Abbildung 26**).

Insgesamt sind im ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit 172 SNP-Marker enthalten (vor allem iSNPs und aSNPs, **Abbildung 26**), die in wesentlich kürzeren Amplikons (116 bp im Median) amplifiziert werden als es für STR-Marker des ForenSeq™-Kits und STR-Markers der CE-basierten ESX und ESI 17-Kits (**Abbildung 27**) der Fall ist. Daher wurde erwartet, dass beim Einsatz degradiert DNA vor allem die SNP-Marker der ForenSeq™-Methode gegenüber den STR-Markern des ForenSeq™-Kits und STR-Markern der CE-basierten Kits in großen Mengen korrekt amplifiziert werden sollten. Allerdings sind die Ausbeuten dieser zusätzlichen Informationen sehr gering (**Tabelle 6**): Bei Haar 5 (stark degradierte DNA großer Menge, siehe **Abbildung 28**) konnten lediglich 26,2% aller in der Vergleichsprobe (Mundschleimhautabstrich, C+) identifizierten iSNPs gefunden werden, sowie nur ungefähr die Hälfte aller pSNPs, die jedoch ebenfalls eine ausgeprägte Länge aufweisen können und dadurch stärker von Drop-outs betroffen sein können. Auch

bei stark degradiertem DNA, die in geringen DNA-Mengen (< 20 pg, Haar 22, 23, 25) vorlagen, konnten im Durchschnitt nur weniger als 10% aller SNPs identifiziert werden. Selbst bei lediglich gering degradiertem DNA (Haar 2), von dieser vergleichsweise viel DNA in die initiale PCR eingesetzt wurde (1,2 ng, **Abbildung 28**), konnten nicht alle analysierbaren SNPs gefunden werden.

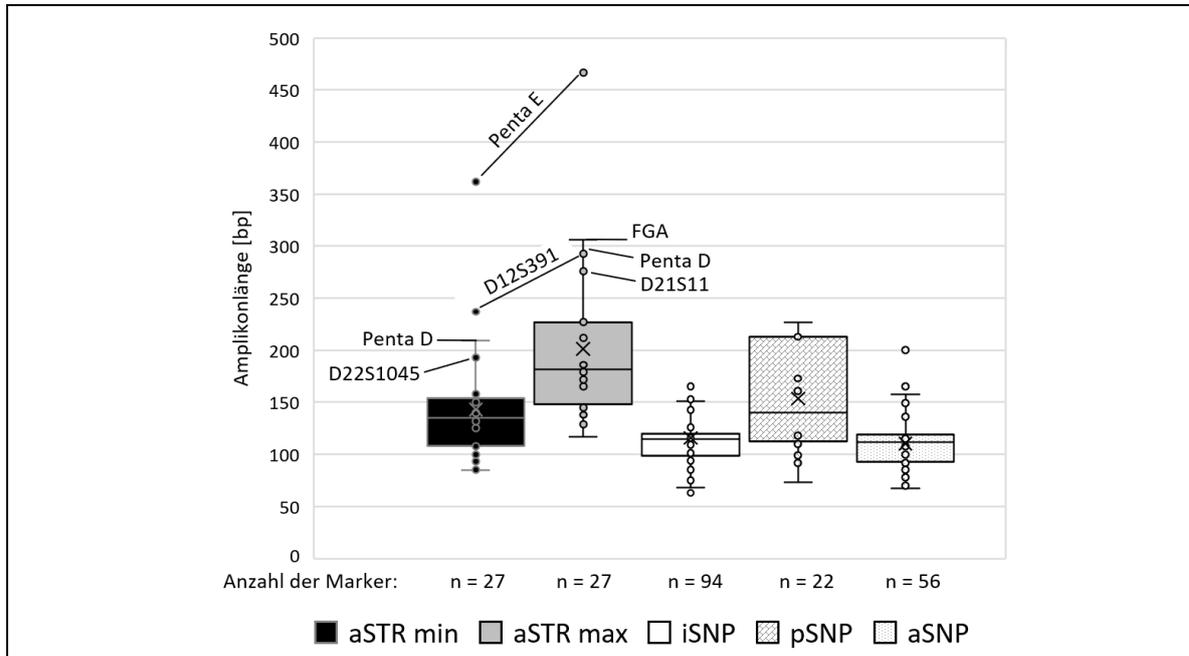


Abbildung 26: Größenbereiche aller ForenSeq™-Amplikons

Längenbereiche und Anzahl der Amplikons des ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kits (Illumina), in dem die minimalen und maximalen möglichen Amplikonlängen in Basenpaaren pro autosomalem STR-Marker (aSTR) und SNP-Marker (iSNP, pSNP und aSNP) als Boxplots aufgetragen sind. Diese Auftragung gibt keinen Aufschluss über die tatsächlichen Amplikonlängen der Allele der untersuchten Testpersonen. Die Punkte repräsentieren die Datenpunkte (den Längen der Amplikons in bp) und die Kreuze zeigen die Mittelwerte der Amplikonlängen an. Die zentrale Linie der Boxplots stellt den Medianwert dar, der die Hälfte aller Datenwerte repräsentiert und welcher die Datenwerte in zwei Hälften teilt: Die eine Hälfte der Daten ist höchstens so groß wie der Median, die andere Hälfte ist mindestens so groß. Der Interquartilsabstand (25-75%), in dem 50% der Datenwerte liegen, wird von der jeweiligen Box repräsentiert (exklusive Median). Die von der Box ausgehenden Striche (*Whiskers*) zeigen den Abstand zu den Maximal- beziehungsweise Minimalwerten an (wenn keine Ausreißer vorhanden sind), oder den nächstgrößeren (beziehungsweise nächstkleineren) Datenpunkt, wenn Ausreißer vorhanden sind. Ausreißer sind definiert als Datenpunkte, die eine zu große Distanz von der Box (1,5-facher Interquartilsabstand) haben, um von den *Whiskers* eingefasst zu werden.

Um die Auswirkungen der unterschiedlichen Amplikonlängen der verschiedenen Assays auf die Recovery der STR-Marker unter Einsatz degradiertem DNA vergleichen zu können, wurden alle amplifizierbaren Allele der zwei an dieser Studie teilnehmenden Personen (B und C) gegeneinander aufgetragen (**Abbildung 27**). Dadurch wurde gewährleistet, dass Aussagen über den Zusammenhang der Amplikonlänge der Allele und der Recovery getroffen werden können, die nicht auf der Amplikon-Bandbreite (**Abbildung 26**) basieren, sondern auf der tatsächlichen Amplikonlänge der untersuchten Proben. Die durchschnittliche Amplikonlänge (Mittelwert) der autosomalen STRs aller Kits und Assays der untersuchten Amplikons der beiden Personen liegt sehr nah an den jeweiligen Medianen der Amplikonlängen (**Abbildung 27**). Es liegen lediglich wenige Amplikons hoher Länge vor, die den Mittelwert in den Bereich einer hohen Basenpaar-Anzahl verschieben. Diese Amplikons großer Länge sind im maSTR-Assay sowie in den ESX und ESI Kits die langen Amplikons des Markers SE33 (ACTBP2), die im ForenSeq™-Kit durch die beiden Penta-Marker ersetzt wurden (**Abbildung 27**).

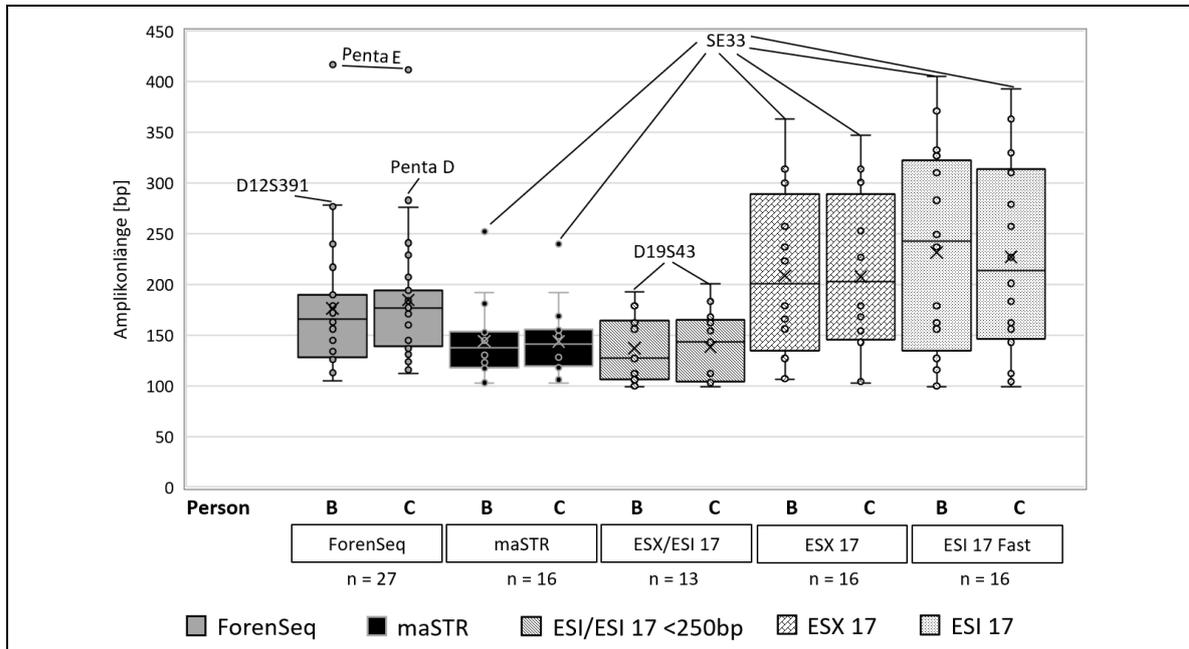


Abbildung 27: Amplikonlängen verschiedener Assays von zwei Personen

Aufgetragene Längenbereiche der autosomalen STR-Amplikons des ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kits (Illumina), des maSTR-Assays und der PowerPlex® ESX 17 und ESI 17-Kits (Promega) für die jeweilige DNA der untersuchten Personen (B und C). Diese Auftragung als Boxplots erlaubt keinen Rückschluss über die Bandbreite der Amplikons der verwendeten Assays, sondern zeigt die Amplikonlängen in Basenpaaren der tatsächlich amplifizierten Allele pro Marker. n = Anzahl der Datenpunkte (STR-Marker) pro Datensatz. Die verwendeten Parameter der Boxplots sind identisch zu **Abbildung 26**.

Die eingesetzte DNA-Menge und der Degradierungsgrad bedingt maßgeblich die Menge an Amplikons, die mittels der unterschiedlichen PCR-basierten Assays erstellt werden konnten: Während wenig bis ausgeprägt und stark degradierte DNA in relativ großer Menge (mehr als 20 pg DNA) gute Ergebnisse der CE-basierten Typisierung ergeben (Haar 2, 5 und C+ Pool I, **Abbildung 28**), kann stark degradierte DNA in geringer Menge (Haar 22, 23 und 25) weder in CE- noch in NGS-basierten Methoden erfolgreich typisiert werden.

Trotz der im Vergleich zu den CE-basierten ESX 17 und ESI 17-Kits relativ kurzen Amplikonlängen der autosomalen STR-Marker des ForenSeq™-Kits und der hohen Anzahl der autosomalen STR-Marker im ForenSeq™-Kit (**Abbildung 27**), wurden vergleichsweise wenige Allele durch das ForenSeq™-Kit amplifiziert: Die Recoveries der STR-Marker des ForenSeq™-Kits und die absolute Anzahl an amplifizierten Allelen fallen sehr niedrig aus (**Abbildung 28**, C und E, siehe Anhang 2, *ForenSeq Results 1*). Vor allem die Recoveries der ForenSeq-Auswertung für Haare, die sich durch besonders starke Degradierung und geringste DNA-Menge auszeichnen, sind niedriger als die maSTR-erzeugten Ergebnisse und die Ergebnisse der komplementären ESX/ESI-Kits. Beispielsweise zeigt das telogene Haar 23 mit bis zu 17 Allele (von 30 Allelen für Person B) ungefähr die Hälfte der Allele des Profils für die komplementäre ESX/ESI-Methode und der maSTR-Assay, während das ForenSeq™-Kit lediglich vier Allele (von 50 Allelen für Person B) typisiert (**Abbildung 28**, C und E). Vor allem Proben starker DNA-Degradierung und geringste DNA-Menge zeigen im Vergleich zum maSTR-Assay und den CE-basierten Methoden eine geringere Anzahl an korrekt amplifizierten STR-Allelen beim ForenSeq™-Kit, obwohl dieses mehr amplifizierbare Marker zur Verfügung stellt als die CE-basierten Kits und der maSTR-Assay. Es wurde angenommen, dass dies hauptsächlich durch die geringe Recovery bedingt wurde und die geringe Recovery durch

sehr stringente Schwellenwerte in der ForenSeq™-spezifischen UAS-Software verursacht wurde. Daher wurden die Schwellenwerte nachträglich herabgesetzt für eine erneute Analyse der Ergebnisse.

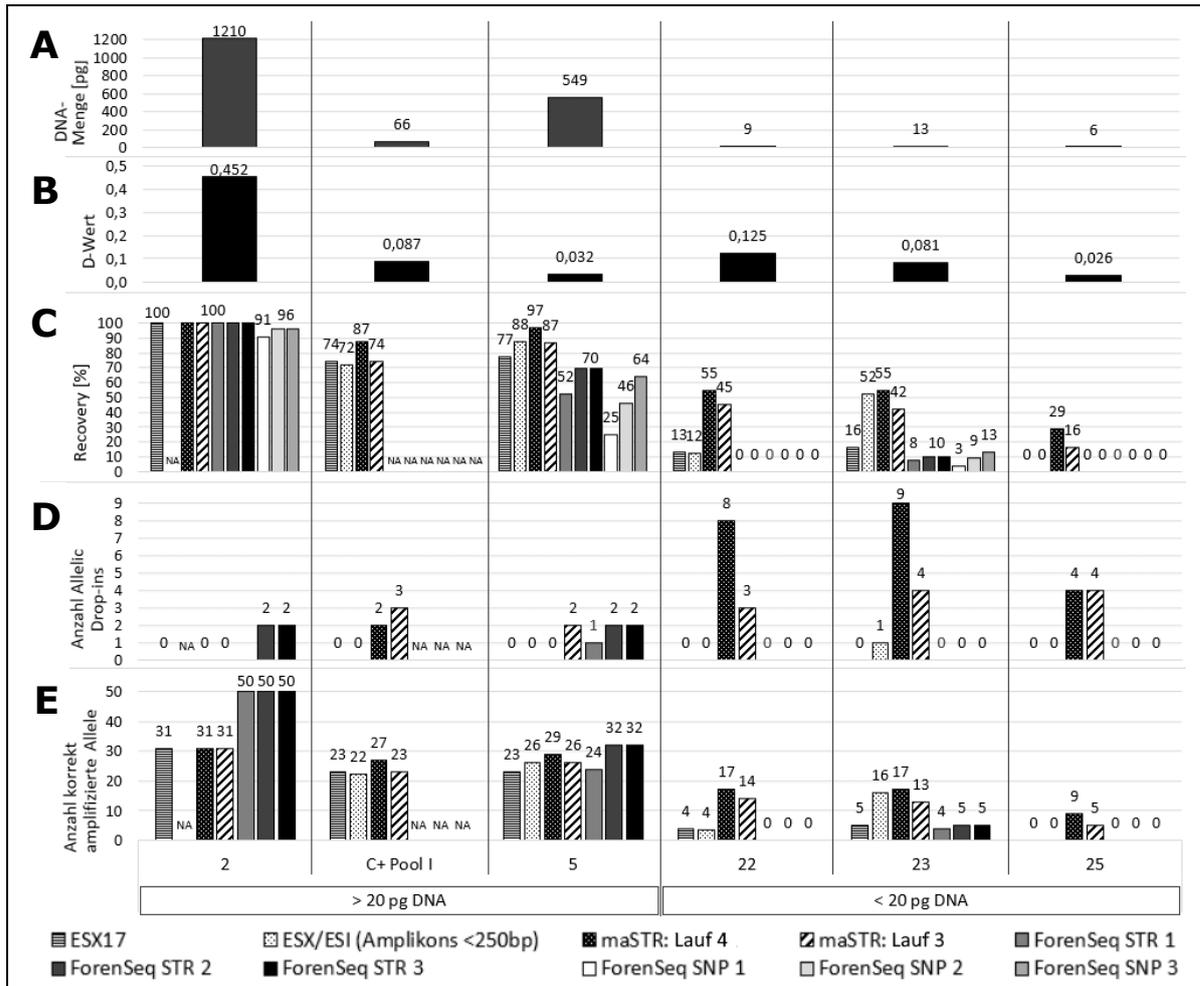


Abbildung 28: Vergleich von NGS- und CE-basierten STR-Profilen aus Haaren

Gegenüberstellung NGS- und CE-basierter STR-Assays zur Profilerstellung anhand repräsentativer DNA aus Haaren variabler DNA-Menge (A) und Integrität (angegeben anhand des DNA-Degradierungsgrads, D-Wert, B). Die relative Allel-Recovery [%] zum Referenzprofil, sowie die Anzahl der Allelic Drop-ins und die absolute Anzahl korrekt amplifizierter Allele des PowerPlex® ESX 17-Kits (Promega), der komplementären Auswertung der Allele geringer Amplikonlänge der PowerPlex® ESX 17- und ESI 17 Fast-Kits (Promega), des in-house entwickelten maSTR-Assays (in zwei Replikaten, Lauf 3 und Lauf 4), sowie der ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kits (Illumina) werden miteinander dargestellt. Die Auswertung der "ForenSeq STR" und "ForenSeq SNP" wurde mit drei unterschiedlichen Schwellenwerten durchgeführt. Auswertungen, die mit dem Zusatz "1" gekennzeichnet sind, wurden mit den voreingestellten Schwellenwerten der UAS Software ausgewertet (analytischer Schwellenwert von 1,5% und Interpretations-Schwellenwert von 4,5%). Auswertungen, die mit dem Zusatz "2" bzw. "3" gekennzeichnet sind, wurden mit dem analytischen Schwellenwerte von 1% und den Interpretations-Schwellenwerten von 2% ("2") beziehungsweise 1% ("3") ausgewertet. Alle Daten sind geordnet in zwei Kategorien (mehr und weniger als 20 pg eingesetzte DNA-Menge) und innerhalb der Kategorie entsprechend der DNA-Degradierung in absteigender Reihenfolge geordnet. Die Haare 4 und 5 befanden sich nicht im telogenen Wachstumsstadium, sondern im katagenen Stadium und dienten als Positivkontrolle zu den telogenen Haaren, um den Einfluss der DNA-Menge und Integrität auf die konkordanten Allele zu untersuchen. Die Haare 2, 22, 23, 25 und Pool I stammen von der weiblichen Person B, während das Haar 5 von der weiblichen Person C stammt. Die Anzahl der autosomalen STR-Allele ohne Amelogenin beläuft sich für Person B (beziehungsweise C) auf 30 (29) für die Kits ESX 17 und ESI 17, sowie für den maSTR-Assay, während sich die Zahl in der komplementären ESX/ESI-Auswertung für Allele unter 250 bp auf 25 (24) beläuft und für das ForenSeq™-Kit 50 (46) Allele zählt. NA: Nicht anwendbar (wurde nicht getestet). Die Daten der ESX 17- und der maSTR-Assays entsprechen Kapitel 3.5.3, **Abbildung 21** und Kapitel 3.5.5, **Abbildung 25**.

Durch die Herabsetzung der Schwellenwerte sollte untersucht werden, ob dies eine Erhöhung der Recovery und einen Anstieg der absoluten Anzahl der amplifizierten Allele bedingt. Durch Herabsetzung des analytischen Schwellenwertes werden weniger Reads benötigt, um als Signal wahrgenommen zu werden. Durch Herabsetzung des Interpretations-Schwellenwertes werden Signale bei weniger Reads als Allel typisiert. Die Herabsetzung der analytischen und des Interpretations-Schwellenwerts ergab entgegen der Erwartungen lediglich einen geringfügigen Anstieg der Readanzahl pro Profil (**Abbildung 28**). Beispielsweise stieg die Anzahl der Reads von Haar 5 von 2661 Reads pro STR-Profil (herkömmliche Schwellenwerte) bis auf 2888 Reads (analytischer Schwellenwert 1% und Interpretationsschwellenwert 1%) an (siehe Anhang 2, *ForenSeq Results 1*). Haare, die sich durch besonders starke Degradierung und geringste DNA-Menge auszeichnen, konnten eine geringfügige Steigerung der Readanzahl verzeichnen (von 240 Reads pro STR-Profil bis zu 255 Reads, Haar 23, **Abbildung 28**, siehe Anhang 2, *ForenSeq Results 2 und 3*) oder keine Reads dazugewinnen und zeigten dadurch auch bei einer Herabsetzung der Schwellenwerte keine auswertbaren Reads (Haar 22 und 25, siehe Anhang 2, *ForenSeq Results 1*).

Die Herabsetzung der Schwellenwerte bedingte zugleich eine geringfügige Verbesserung der Recoveries der STR- und SNP-Marker, beispielsweise stieg für die Probe von Haar 23 die Recovery der STR-Allele von acht auf zehn Prozent an durch Herabsetzung der Schwellenwertes, zugleich stieg die Recovery der SNP-Marker von drei auf 13% an (**Abbildung 28**). Der Zugewinn der STR-Allele bestand durchgehend aus korrekten Allelen, die konkordant zu den verwendeten Referenzprofilen waren (siehe Anhang 2, *ForenSeq Results 3*), mit zwei Ausnahmen: Die Proben Haar 2 und 5 zeigten durch die Herabsetzung wenige Allelic Drop-ins (**Abbildung 28**), die in jedem Fall als Stotter-Allele mit hoher Readzahl identifiziert wurden. Haare, die sich durch besonders starke Degradierung und geringste DNA-Menge auszeichnen, konnten daher durch keine der Methoden vollständig typisiert werden. Die besten Recoveries wurden durch die komplementäre Auswertung der ESX/ESI 17-Kits erreicht und durch der maSTR-Assay (**Abbildung 28**, Haar 23), wobei letzterer viele Drop-ins bei Haaren geringer DNA-Menge aufweist (**Abbildung 28 D**).

Trotz der hohen Anzahl an STR- und SNP-Markern scheint das ForenSeq™-Kit gegenüber der herkömmlichen Typisierung mittels STR-Assay per Kapillarelektrophorese für den Einsatz geringster Mengen von degradierter DNA keinen signifikanten Vorteil zu haben, da die relative Allel-Recovery des ForenSeq™-Kits geringer ausfiel als mit dem ESX 17-Kit (CE). Dies gilt neben Haaren, die sich durch besonders starke Degradierung und geringste DNA-Menge auszeichnen, auch für ausgeprägt und stark degradierte DNA, die in größerer DNA-Menge eingesetzt werden konnten: Bei dem Haar 5 lag die Recovery bei 76,7% der STR-Marker, während die ForenSeq™ lediglich 52,2% erreichte. Obwohl das ForenSeq™-Kit mit 27 autosomalen STR-Markern mehr Marker enthält als das ESX 17-Kit, wurden aufgrund der vergleichsweise schlechten Recovery lediglich 24 der 46 möglichen Allele amplifiziert (**Abbildung 28**, C und E).

3.5.7 Bewertung der DNA humaner Haare mittels probabilistischer Verfahren

Um zu testen, inwieweit probabilistische Ansätze dabei unterstützen können, anhand von STR-Profilen von DNA aus Haaren die bekannten Referenzprofile zu ermitteln, wurden die CE- und NGS-basierten STR-Profile auf Basis eines vollständig kontinuierlichen und eines semikontinuierlichen probabilistischen Modells ausgewertet. Dafür wurde die DNA von sieben ausgewählten Einzelhaaren und die Probe Pool (I) aus

telogenen Haaren per CE-basierten PowerPlex® ESX 17 Kit (Promega) und dem maSTR-Assay analysiert.

Die DNA-Proben wurden erneut sequenziert (maSTR-Lauf 5, Daten nicht gezeigt) in Duplikaten, wobei die Multiplex-PCRs separat angesetzt wurden. Die Daten des maSTR-Assays wurden unter modifizierten Schwellenwerten für Stotter-Allele erneut ausgewertet (**Kapitel 2.14.3**), da die aufgetretenen Allelic Drop-ins bei manchen Profilen, die unter den herkömmlichen Schwellenwerten ausgewertet wurden, per Consensus-Interpretation nicht wegfielen. Da sich die Schwellenwerte der STR-Analyse der in diesem Kapitel vorliegenden Daten zu den bisher in den vorherigen Kapiteln präsentierten Daten unterscheiden, wurde die Anzahl der Allelic Drop-outs und Drop-ins erneut dargestellt (**Abbildung 29**). Die Übereinstimmung der STR-Profile mit den Spenderprofilen wurde durch die Berechnung eines Validitätsgrades (Pfeifer et al. 2012) durch den Vergleich der Consensus- und der Composite-Interpretation der STR-Profile bestimmt.

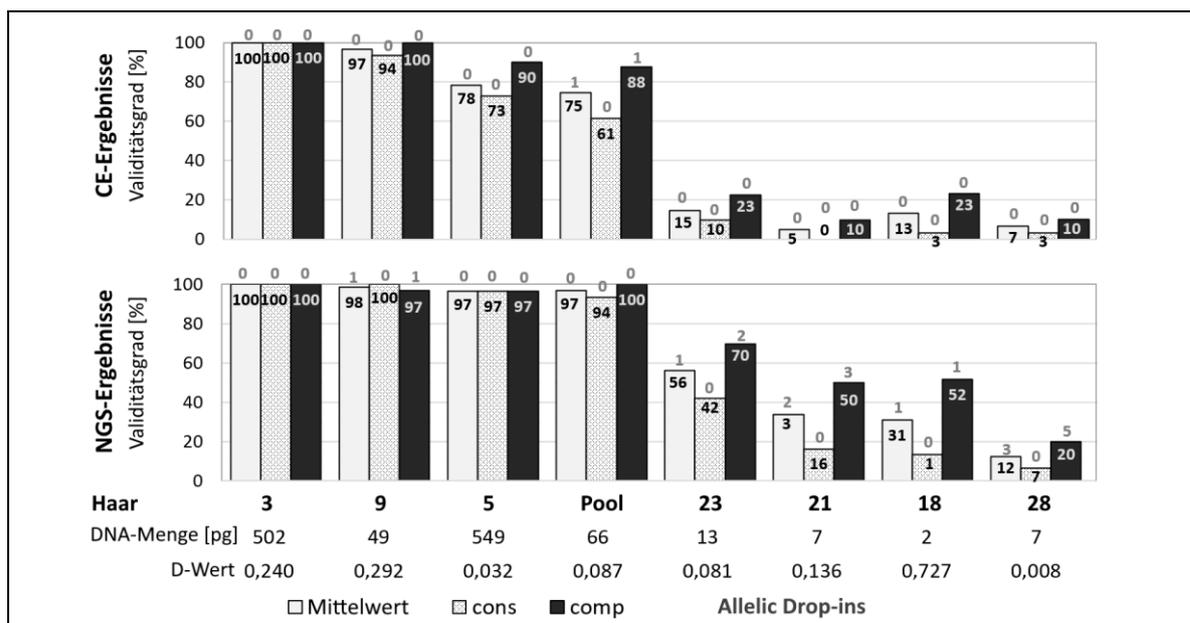


Abbildung 29: Validitätsgrade von CE- und NGS-generierten STR-Profilen

Auswirkung der CE- und NGS-basierten Methoden und der Consensus- („cons“) und Composite- („comp“) Interpretationsmethoden auf den Validitätsgrad. Der Validitätsgrad in % wurde aus zwei unabhängige Amplifikationen pro Probe berechnet gemäß Pfeifer et al. (Pfeifer et al. 2012). Ein Wert von 100% zeigt ein korrektes Ergebnis ohne Drop-out oder Drop-in-Ereignisse an, während Werte <100% auf stochastische Effekte hinweisen. Die Berechnungen basierten auf per Consensus (schraffierte Balken) oder Composite (schwarze Balken) interpretierten Profilen. Weiße Balken: Mittelwerte. Grau Zahlen über Balken: Anzahl der Allelic Drop-ins. Degradierungs-Werte (D-Werte) wurden unter Verwendung des RiboD Assays bestimmt. Die STR-Profile wurden mit dem PowerPlex® ESX 17-Kit (Promega) und dem in-house-entwickelten NGS-basierten maSTR-Assay erstellt. Die Haare 3 und 5 befanden sich nicht im telogenen Wachstumsstadium, sondern im katagenen Stadium und dienten als Positivkontrolle zu den telogenen Haaren, um den Einfluss der DNA-Menge und Integrität auf die konkordanten Allele zu untersuchen. Die Haare 3, 9, 21, 23 und der Pool (I) stammen von der weiblichen Person B, während die Haare 5, 18 und 28 von der weiblichen Person C stammen.

Die Ergebnisse aus **Kapitel 3.5.2** und **3.5.4** konnten auch hier bestätigt werden: Allelic Drop-ins treten vor allem beim maSTR-Assay auf, wobei die Anzahl der Drop-ins in Relation zu der bisherigen Auswertung durch Modifizierung der Schwellenwerte gesunken ist. Degradierete DNA geringster Menge erreicht durch die maSTR-Typisierung höhere Validitätsgrade als die CE-basierte Typisierung. Weiterhin erreicht die Composite-Interpretationsmethode höhere Validitätsgrade als die Consensus-Methode, während

diese eine geringere Anzahl an Allelic Drop-ins aufweist. Aufgrund der hohen Anzahl der Allelic Drop-ins des maSTR-Assays wurden diese STR-Profile für die Anwendung der probabilistischen Methoden per Consensus-Methode interpretiert. Da die per PowerPlex® ESX 17-erzeugten STR-Profile lediglich in einem der acht Profile Drop-ins zeigten, dieses Assay jedoch mehr Allelic Drop-outs als die NGS-Methode zeigte, wurden die CE-basierten Daten per Composite-Methode interpretiert. Diese Methode zeichnet sich dadurch aus, dass die Anzahl der Drop-outs in Relation zur Consensus-Methode reduziert werden. Aufgrund dessen weisen die NGS-basierten STR-Profile keine Allelic Drop-ins auf und CE-basierte STR-Profile weisen lediglich einen Allelic Drop-in auf in der gepoolten Probe.

Im Folgenden wurde die Wahrscheinlichkeit (basierend auf der *Likelihood Ratio*) berechnet werden, dass die STR-Profile der DNA aus Einzelhaaren mit den Profilen der Referenzproben übereinstimmen. Dafür wurden die Consensus-interpretierten CE-Profile und die Composite-interpretierten NGS-basierten STR-Profile auf der Basis einer vollständig kontinuierlichen und einer semikontinuierlichen probabilistischen Modellierung mittels der Software GenoProof Mixture 3 (qualitytype GmbH (Götz et al. 2017)) bewertet (siehe **Kapitel 1.2.4**). Als Hypothese der Anklage wurde angenommen, dass die DNA der Haare von derjenigen Person stammt, von der die Referenzprobe (Mundschleimhautabstrich) genommen wurde (**Abbildung 30**). Die Hypothese der Verteidigung geht davon aus, dass das Haar von einer mit der Spenderin nicht verwandten Person stammt. Es wurden jeweils Duplikate der Profile eingesetzt, die per maSTR-Assay beziehungsweise per CE (PowerPlex® ESX 17 Kit) analysiert wurden.

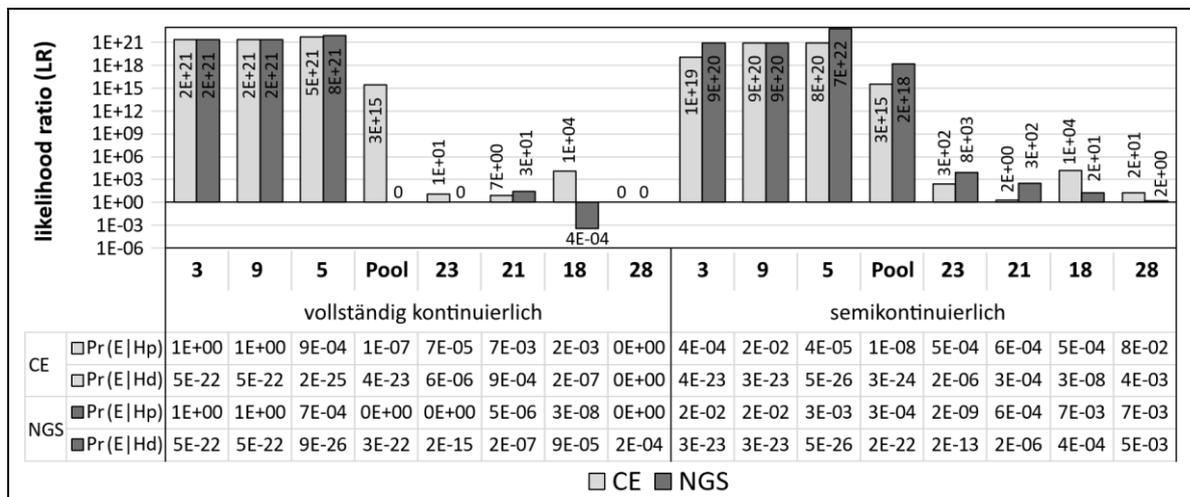


Abbildung 30: Likelihood Ratios bei verschiedenen Berechnungen

Die *Likelihood Ratios* wurden mit vollständig kontinuierlichen und semikontinuierlichen probabilistischen Methoden der GenoProof Mixture 3 Software (qualitytype GmbH) berechnet für per Composite- bzw. Consensus-Interpretation analysierte Profile aus CE- und NGS-basierter STR-Typisierung mit. H_p : Hypothese der Anklage; H_d : Hypothese der Verteidigung.

Der Vergleich der pro DNA-Probe eingesetzten DNA-Menge und des Degradierungsgrades (**Abbildung 29**) mit den Ergebnissen der probabilistischen Berechnungen (**Abbildung 30**) bestätigte die bisherigen Beobachtungen: Leicht degradierte DNA von mindestens 40 pg Menge sind gut typisierbar mit keinen oder wenigen Allelic Drop-outs und Allelic Drop-ins (Haare 3 und 9), wodurch mittels semi- und vollständig kontinuierlichen Berechnungen sehr hohe Wahrscheinlichkeiten (LR von mindestens 1E+19) für eine Übereinstimmung von Probe und Referenzprofil erreicht werden. Stark degradierte DNA relativ hoher Menge (Haar 5) erreicht vergleichbare Ergebnisse. Für ausgeprägt degradierte DNA über 40 pg Menge (Pool I) wurden etwas

geringere *Likelihood Ratios* für die semi- und vollständig kontinuierliche Berechnung erreicht von maximal $1E+15$. Gemäß den verbalen Prädikaten, die vom *Netherlands Forensic Institute* (NFI) empfohlen werden (*Likelihood ratios in practice*), ist dieser Wert eine extrem starke Unterstützung für den Fall, dass die genannten Profile zu beobachten sind, wenn die Hypothese der Anklage wahr ist („das Haar stammt von der Spenderin“), wohingegen die Hypothese der Verteidigung („das Haar stammt von einer mit der Spenderin nicht verwandten Person“) weniger unterstützt wird. Die binäre Berechnung des LR ergab für die maSTR-generierten Profile von Haar 3 und Haar 9 gleich hohe Werte ($2E+21$) wie für die vollständig kontinuierliche Berechnung. Die restlichen maSTR-Profilen ergaben LR-Werte von Null für die binäre Berechnung. Die binär berechneten CE-Daten ergaben für Haar 9 ebenfalls denselben Wert wie für die vollständig kontinuierliche Berechnung ($2E+21$), alle LR-Werte der restlichen Haare ergaben Null (Daten nicht gezeigt).

Die bisherigen Ergebnisse, dass DNA aus Haaren (Haare 23, 21, 18 und 28), die in Mengen unterhalb 20 pg eingesetzt wird, unabhängig von den Degradierungswerten keine ausreichenden STR-Typisierungen ergeben, wurde bestätigt. Gemäß den SWGDAM-Guidelines läge für alle Proben – mit Ausnahme der vollständig kontinuierlich berechneten, NGS-analysierten Probe von Haar 18 – ein Einschluss vor (Übereinstimmung mit der Referenzprobe). Da jedoch keine dieser Proben den LR-Wert von $1E+04$ überstieg, wird gemäß den Prädikaten, die vom NFI empfohlen werden, angenommen, dass es zwar wesentlich wahrscheinlicher ist, die genannten Profile zu beobachten, wenn die Hypothese der Anklage wahr ist („das Haar stammt von der Spenderin“), als wenn die Hypothese der Verteidigung („das Haar stammt von einer mit der Spenderin nicht verwandten Person“) wahr ist. Als verbales Prädikat empfiehlt das NFI den Ausdruck „moderat starke Unterstützung“. Gemäß den SWGDAM-Guidelines zählt jeder LR-Wert als Inklusion, jedoch erlaubt lediglich die Höhe des LR eine ungefähre Einschätzung der tatsächlichen Übereinstimmung. Zum Vergleich lohnt es sich, sich am Wert von $3E+10$ zu orientieren; dies ist die ungefähre Anzahl an Menschen, die je auf der Erde gelebt haben. Aufgrund dessen wird der Wert von $E+04$ als nicht ausreichend gewertet. Von der Autorin der vorliegenden Studie wird angenommen, dass ein solch niedriger LR-Wert nicht als statistisch ausreichend bewertet werden kann, um in einem Gutachten die Übereinstimmung der Proben-DNA mit den Referenzprofilen bedenkenlos zu empfehlen, da die Übereinstimmung des Haar-Profiles mit dem Profil einer Person, die mit der Spenderin der Referenzprobe nicht verwandt ist, nicht mit höchster Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann. Als Folge dessen ist die Zuordnung der Profile aus den Haaren 23, 21, 18 und 28 zu ihren Referenzproben statistisch nicht ausreichend zu rechtfertigen und daher nicht beweiskräftig (englisch *inconclusive*).

Für NGS-erzeugte Daten, bei denen nur ein Allel eines heterozygoten Locus nachgewiesen werden konnte, wobei das eine Allel eine hohe Readzahl zeigte, erzeugten die vollständig kontinuierlich berechneten *Likelihood Ratios* einen Ausschluss (Haare 28, 23 und Pool, **Abbildung 30**).

Die Ergebnisse wurden bereits publiziert in (Heß et al. 2019).

4. DISKUSSION

Degradierete DNA aus ausgefallenen Einzelhaaren ist ein schwieriger Spurentyp der forensischen Molekulargenetik. Die Erfolge der STR-Typisierung dieses Spurentyps hängen maßgeblich von der verwendbaren DNA-Menge und dem Ausmaß der DNA-Degradierung ab. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig systematisch die Korrelation zwischen DNA-Menge und DNA-Degradierung zum Erfolg der STR-Typisierung untersucht. Darauf basierend wurden Schlussfolgerungen über den Typisierungserfolg von DNA aus einzelnen ausgefallenen Haaren gezogen, die mittels moderner forensischer STR-Kits oder neuen NGS-Methoden analysiert wurden.

Zu diesem Zweck wurden qPCR-basierte Methoden zur Messung der DNA-Menge und Bewertung der DNA-Integrität von humaner (RiboD-Assay) und caniner (RiboDog-Assay) DNA entwickelt, die über den DNA-Degradierungswert (D-Wert) abgebildet wird. Mittels dieser Assays wurde anhand einer schrittweisen, über die Verdau-Dauer induzierten DNA-Degradierung eine Verringerung der DNA-Menge und DNA-Integrität festgestellt (**Kapitel 3.2.2**). Die Allel-Recovery der STR-Marker dieser artifiziell verdauten DNA nahm mit zunehmender DNA-Degradierung und abnehmender DNA-Menge ab, wobei die Anzahl der Allelic Drop-outs sowohl von der eingesetzten DNA-Menge, als auch von der DNA-Integrität (gemessen mittels des D-Werts) abhing (**Kapitel 3.2.6**). Der Einfluss der DNA-Degradierung auf die Allel-Recovery konnte besonders gut für die auf 333 pg-normalisierten Proben festgestellt werden. Bei der Analyse von 1:10-verdünnten DNA-Mengen im Bereich von 33 pg nahm die Allel-Recovery stark ab und selbst für intakte DNA konnten lediglich 62% der Allele detektiert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der Empfindlichkeits-Studien des PowerPlex® ESX 17-Kits überein, das bis zu minimalen DNA-Mengen von 62,5 pg keine Drop-outs oder Drop-ins aufweist (Tucker et al. 2012). Unterhalb dieser DNA-Menge führt neben der DNA-Degradierung auch die geringe DNA-Menge zum Auftreten stochastischer Effekte.

Diese Beobachtungen anhand artifiziell degradierte DNA wurden an STR-Typisierungen von DNA aus humanen telogenen Einzelhaaren bestätigt (**Kapitel 3.3**). Leicht und mäßig degradierte DNA (definiert gemäß den verbalen Prädikaten in **Tabelle 3**) aus Einzelhaaren ist in größeren Mengen im Einzelhaar vorhanden als ausgeprägt, stark und extrem degradierte DNA, weshalb mit leicht und mäßig degradierte DNA größerer Menge mehr Allele typisiert werden können als bei stärker degradierte DNA geringerer Menge (**Kapitel 3.3**). Bei Hundehaaren scheint die Allel-Recovery lediglich von der eingesetzten DNA-Menge abzuhängen, da die DNA aus telogenen Deckhaaren im Vergleich zu repräsentativen Menschenhaaren wenig degradiert ist. Die erhaltenen STR-Typisierungsergebnisse standen in keiner Abhängigkeit zu morphologischen Merkmalen der Einzelhaare, sofern wenig oder kein anhaftendes Gewebe vorhanden war.

Eine Zielsetzung der Entwicklung des RiboD-Assays war es, einen DNA-Locus zu verwenden, der zwischen Spezies konserviert genug ist, um den Assay an verschiedenen Spezies adaptieren zu können; zugleich sollte eine Diskriminierung zwischen den Spezies möglich sein. Die Umsetzung dieses Ziels wurde gezeigt durch Anpassung des humanspezifischen Assays an Hunde-DNA (RiboDog-Assay). Die prinzipielle Eignung beider Assays für die Bewertung degradierte DNA aus Minimal Spuren wurde schließlich durch die Analyse von Einzelhaaren von Menschen und Hunden gezeigt. Die entsprechenden Ergebnisse der RiboD und RiboDog-Assays wurden bereits publiziert in (Heß et al. 2021).

Um die STR-Typisierung für degradierte DNA geringer Menge aus Einzelhaaren zu verbessern, wurde der maSTR-Assay entwickelt. Dieser Assay typisiert 16 EU-Core-STR-Loci und Amelogenin simultan. In dem maSTR-Assay werden besonders kurze und daher

für die Anwendung an degradiertem DNA geeignete Amplikons (76-296 bp) verwendet. Der Assay amplifiziert verlässliche und reproduzierbare STR-Profile mit einer Mindestmenge von 200 pg eingesetzter DNA (**Kapitel 3.4.3**). Unterhalb 100 pg DNA häufen sich Allelic Drop-outs und Drop-ins. Im Vergleich zum kommerziellen, Kapillarelektrophorese-basierten PowerPlex® ESX 17-Kit (Promega), in dem die gleichen STR-Marker wie im maSTR-Assay genutzt werden, ist der maSTR-Assay in der Lage, mehr konkordante Allele zu typisieren. Allerdings generiert der maSTR-Assay zugleich mehr Allelic Drop-ins. Dieser Unterschied wurde vor allem bei stark degradiertem DNA geringer DNA-Menge deutlich (**Kapitel 3.5.1** und **3.5.2**). Aufgrund der geringen Mengen eingesetzter DNA von telogenen Einzelhaaren schwankte die Reproduzierbarkeit der maSTR-Ergebnisse, war jedoch dem PowerPlex® ESX 17-Kit in Bezug auf die Allel-Recovery überlegen, zum Preis einer höheren Anzahl an Allelic Drop-ins (**Kapitel 3.5.3**).

Um den maSTR-Assay mit einer CE-basierten Methode zu vergleichen, die dieselben Marker nutzt, wurden Duplikate von maSTR-erzeugten und einer Kombination aus PowerPlex® ESX 17- und ESI 17-Kit-generierte STR-Profilen per Consensus- und Composite-Methode interpretiert (**Kapitel 3.5.4**). Obwohl das Beurteilungssystem dieses Vergleichs, der Validitätsgrad (Pfeifer et al. 2012), neben der Anzahl der Allelic Drop-outs ebenfalls Drop-ins miteinbezieht, erreichten maSTR-generierte Profile höhere Validitätsgrade als ESX/ESI 17-generierte Profile, trotz der im Vergleich wesentlich höheren Anzahl an Allelic Drop-ins des maSTR-Assays. Die schlechteren Validitätsgrade werden mit der im Vergleich zum maSTR-Assay wesentlich längeren Amplikons der ESX 17 und ESX 17 Fast-Kits begründet. Der Validitätsgrad scheint als Bewertungssystem für Assays mit einer hohen Anzahl an Drop-ins der Bewertung per Allel-Recovery nicht überlegen zu sein, da Drop-ins für die Interpretation von STR-Profilen eine größere Herausforderung darstellen als Drop-outs, da die Verlässlichkeit des Profils nicht gegeben ist. Ausgrundessen wird postuliert, dass sich die Consensus-Methode besser eignet, um STR-Profile stark degradiertem DNA geringer Menge zu beurteilen, als es die Composite Interpretationsstrategie vermag. Die Anzahl der Allelic Drop-ins sollte daher in jedem Fall im Bericht beziehungsweise im forensischen Gutachten mit angegeben werden, um den Einfluss auf das STR-Profil einschätzen zu können.

Um gezielt den Einfluss der Amplikonlängen auf die STR-Typisierungserfolge von degradiertem DNA zu untersuchen, wurde der maSTR-Assay mit einer CE-basierten Methode zu verglichen, die ebenfalls ausschließlich kurze Amplikons nutzt: Die komplementäre Auswertung der ESX 17 und ESI 17 Fast-Kits, in der lediglich Amplikons mit einer Maximallänge bis 250 bp genutzt wurden. Diese komplementäre ESX/ESI 17-Auswertung der PowerPlex®-Profile zeigte ähnliche Validitätsgrade wie der maSTR-Assay (**Kapitel 3.5.5**) und lag hinsichtlich der Allel-Recovery lediglich geringfügig hinter dem maSTR-Assays zurück (**Kapitel 3.5.5**). Jedoch wies die komplementäre ESX/ESI-Methode von Amplikonlängen unterhalb 250 bp weniger Allelic Drop-ins auf als die maSTR-Methode. Das ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit (Illumina), ein ähnlich wie der maSTR-Assay NGS-basiertes Assay, nutzt ebenfalls kurze Amplikons, scheint jedoch sehr konservative Schwellenwerte zu benutzen und war dem maSTR-Assay bei der Allel-Recovery unterlegen, erzeugte jedoch weniger Drop-ins. Untersuchungen der CE- und NGS-generierten STR-Profile mittels probabilistischer Verfahren bestätigten, dass der maSTR-Assay aufgrund der hohen Anzahl an Allelic Drop-ins den CE-basierten Methoden nur in Fällen von DNA überlegen ist, die in ausreichender Menge und gering degradiert eingesetzt wird.

Somit konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden, dass die Amplifikation kurzer Marker der entscheidende Vorteil bei der Amplifikation degradiertem DNA ist und dass die Bewertung von geringsten DNA-Mengen sehr komplex ist, da im Bereich der

Empfindlichkeitsgrenzen der Assays gearbeitet wird, an dem sich stochastische Fehler häufen und die Reproduzierbarkeit nicht gegeben ist. Es konnte ebenfalls festgestellt werden, dass NGS-basierte Methoden potentiell einen Vorteil gegenüber CE-basierten Methoden aufweisen, indem simultan eine Vielzahl sehr kurzer Amplikons in Multiplex-Assays generiert werden können. Eine gegenüber CE erhöhte Sensitivität der NGS-Technik konnte nicht festgestellt werden.

Nachfolgend werden die unterschiedlichen Themenbereiche vorerst getrennt voneinander diskutiert und anschließend auf die Gesamtstrategie eingegangen. Dabei wird zuerst auf die Korrelation zwischen der DNA-Menge und dem DNA-Degradierungswert zu der Allel-Recovery artifiziell degradiertes DNA und DNA aus Einzelhaaren eingegangen mittels des in-house entwickelten RiboD-Assays (**Kapitel 4.1**). In den **Kapiteln 4.2 bis 4.8** wird auf die alternativen STR-basierten Assays, vor allem auf den maSTR-Assay, zur Typisierung der genutzten DNA-Proben eingegangen. Eine Schlussfolgerung und ein Ausblick umschreibt die aus den gewonnenen Daten resultierenden Erkenntnisse und gibt Empfehlungen für die Arbeitsweise beim Vorliegen degradiertes DNA aus Haaren.

4.1 Die Quantität und Integrität von DNA aus Einzelhaaren korreliert mit der Allel-Recovery

4.1.1 Die Eignung ribosomaler Sequenzen für eine qPCR-basierte Analytik

In dieser Studie wird die Entwicklung eines zuverlässigen, empfindlichen und kostengünstigen Assays zur gleichzeitigen Bestimmung der Quantität und Integrität von degradiertes DNA auf humanen Einzelhaaren beschrieben. Aufgrund der erforderlichen Empfindlichkeit für diese Anwendung eignet sich hierfür eine quantitative PCR-Methode in Echtzeit (qPCR) besonders gut (Higuchi et al. 1993). Die in dieser Studie entwickelten qPCR-Assays generieren kurze und lange Amplikons, wobei die kurzen Amplikons gegenüber DNA-Degradierung resistenter sind als die langen Amplikons. Über dieses Prinzip war es möglich, die DNA-Menge und den Degradierungswert (D-Wert) zu bestimmen. Um die erforderliche Empfindlichkeit zu gewährleisten, nutzen die qPCR-Assays einen *Muti-Copy-Locus*, wodurch sie in der Lage sind, kleinste Mengen von Template-DNA zu analysieren (Nicklas und Buel 2003; Kitayama et al. 2013; Thomas et al. 2013; Pineda et al. 2014; Holt et al. 2016; Ewing et al. 2016). In der vorliegenden Studie wurden zum ersten Mal die *multi-copy*-vorliegenden ribosomalen DNA-Sequenzen genutzt. Beim Menschen sind sie in Clustern von insgesamt mehreren hundert Kopien pro Genom vorhanden. Diese rDNA-Cluster befinden sich an den Nukleolus-Organisator-Regionen der humanen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 (Srivastava und Schlessinger 1991; Henderson et al. 1972; Long und Dawid 1980; Veiko et al. 2003). Die Verteilung über mehrere Chromosomen senkt die Wahrscheinlichkeit stochastischer Sampling-Effekte bei der Analyse von DNA mit niedriger Kopienzahl, wie sie beim Verlust eines bestimmten Chromosoms oder Chromosomenteils auftreten können. Die prinzipielle Organisation der rDNA-Einheiten in den Clustern ist bei allen Spezies ähnlich, und bei den meisten nicht-humanen Spezies befinden sich rDNA-Cluster ebenfalls auf mehreren Chromosomen. Die Genome vieler Eukaryoten enthalten sogar eine noch höhere Anzahl von rDNA-Einheiten als das menschliche Genom (Long und Dawid 1980).

Der RiboD-Assay basiert auf einer humanspezifischen 720 bp-Zielsequenz, die sich in der Promotorregion – einem Teil des *intergenic spacers* (IGS) – des prä-45S rDNA-Gens befindet. Während die transkribierten Bereiche der rDNA unter den Spezies evolutionär hoch konserviert sind und ubiquitär vorkommen, sind die IGS-Sequenzen variabler, da

sie weniger konserviert sind (Srivastava und Schlessinger 1991; Agrawal und Ganley 2018; Symonová 2019; Mayer et al. 2008; Mayer et al. 2006; Paalman et al. 1995), so dass es möglich ist, artspezifische Assays zu etablieren.

Die vorliegende Studie der Speziespezifität zeigt, dass Primer-Bindestellen vorliegen, die zwischen den Spezies sehr ähnlich sind, da der humane RiboD-Assay auch aus DNA nicht-humaner Spezies Amplifikations-Produkte generierte (**Abbildung 10**). Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Region von etwa -80 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle trotz ihrer speziespezifischen Sequenz (Mayer et al. 2008) für die PCR-Amplifikation nicht spezifisch genug ist. Weiterhin könnten verschiedene Polymorphismen innerhalb einer Spezies vorliegen oder möglicherweise polymorphe rDNA-Wiederholungseinheiten in diesen Regionen vorliegen. In der Tat wurde mittlerweile gezeigt, dass sowohl intra- als auch interindividuelle Sequenzvariationen, sowie Variationen der Kopien-Anzahl innerhalb der rDNA-Sequenzen vorkommen (Malinovskaya et al. 2018; Parks et al. 2018) und dass der IGS der variabelste Teil der rDNA-Einheiten ist (Agrawal und Ganley 2018). Dies könnte auch eine Erklärung für die etwas unsauberen Banden der Gelbilder (**Abbildung 5** und **Abbildung 10**) liefern und könnte die etwas geringer als erwartete Empfindlichkeit von lediglich einem Pikogramm erklären. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde nicht getestet, inwieweit solche Variationen den RiboD-Assay beeinflussen könnten. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte Variationen die Bindung von PCR-Primern und damit die gemessenen DNA-Mengen oder D-Werte beeinflussen können. Die geringfügigen Unterschiede in den Ergebnissen, die bei Verwendung von HeLa-DNA oder Promega 2800M-DNA als Kalibrierstandards beobachtet wurden (siehe Anhang 1, S4, sowie **Kapitel 3.2.4**), können auf solche rDNA-Sequenz- oder Kopien-Anzahl-Variationen (*copy number variations*) in den jeweiligen Kalibratoren hinweisen. Diese Unterschiede wurden beim Vergleich des RiboD-Assays mit dem Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit ermittelt (**Kapitel 3.2.3**). Diese Unterschiede zwischen den beiden Methoden hinsichtlich der ermittelten DNA-Mengen und DNA-Degradierungswerte könnten auf inhärente Eigenschaften der verschiedenen Ziel-DNA-Loci zurückzuführen sein. Zum Beispiel ist es möglich, dass HeLa-DNA, die als Standard für RiboD-Tests dient, aufgrund von Aneuploidie und Chromosomenaberrationen eine unterschiedliche Anzahl von Ziel-DNA-Loci aufweist, im Vergleich zu DNA aus menschlichen diploiden Zellen. Einige künstlich degradierte Proben wurden unter Verwendung von Promega 2800M-DNA als Standardkalibrierung für den RiboD-Assay neu quantifiziert, was tatsächlich zu ähnlicheren Ergebnissen zwischen dem RiboD- und dem Quantifiler®-Assay (Vergleich Anhang 1, S4 und **Abbildung 9**) führte. Im Durchschnitt führte die 2800M-DNA als Kalibrierstandard zu DNA-Mengen von etwa 29% weniger DNA-Menge als bei Messungen mit HeLa-DNA als Kalibrierstandard, wohingegen die D-Werte nur geringfügig beeinflusst wurden (siehe Anhang 1, S4).

Vor allem durch die Gelbilder, die mit den langen Amplikons erzeugt wurden (**Abbildung 10**), und durch die Schmelzkurvenanalyse (siehe Anhang 1, S3) konnten die PCR-Produkte der Nicht-Homininae-Spezies von den menschlichen PCR-Produkten unterschieden werden; innerhalb der Unterfamilie der Homininae (Mensch, Gorilla, Schimpanse (Goodman et al. 1990)) war dies jedoch nicht möglich. Während bestimmte forensische Szenarien denkbar sind, in denen Mischungen aus Affen- und menschlicher DNA auftreten könnten, sind solche Szenarien bei der Fallarbeit eher unwahrscheinlich. In solchen seltenen Fällen wäre die auf RiboD basierende Analyse der DNA-Menge und -Integrität irreführend. Bei anderen Säugetieren, die potenziell zu positiven RiboD-Testergebnissen führen könnten, wie beispielsweise die in dieser Studie untersuchte DNA von Hunden und Mäusen, müssen aufgrund der Ähnlichkeiten der Gelbilder und

Schmelzkurven-Analysen die Schlussfolgerungen mit Vorsicht gezogen werden. Im Gegensatz dazu können sowohl der RiboD-Assay als auch der RiboDog-Assay mit Sicherheit auf Spuren unzweifelhafter Speziesherkunft angewendet werden, wie z.B. kultivierte Zellen, Gewebebiopsien oder telogener Haare wie in der aktuellen Studie. Allerdings muss die Fachkraft zur korrekten Begutachtung der Haare in der Lage sein, Einzelhaare aufgrund speziesspezifischer Morphologie der korrekten Spezies zuzuordnen. Im Zweifelsfall können taxonomische Studien (beispielsweise anhand der Gens der Cytochrom-c-oxidase I der mtDNA (Cortellini et al. 2019)) genutzt werden, um die Herkunft der Haare zu bestimmen.

Die hier entwickelte qPCR-Methode bietet somit den Vorteil, dass sie schnell und einfach auf andere Arten übertragen werden kann, da die Zielregionen (Promotorregionen der rRNA-Gene) ubiquitär sind, auch wenn sie sich in der exakten Sequenz unterscheiden. Diese Regionen sind bei vielen Tierarten bereits bekannt und sequenziert. Dies erlaubt die Bestimmung der Mengen und der Integrität der DNA verschiedener Spezies in wenigen einfachen Arbeitsschritten.

4.1.2 Validität der qPCR-Ergebnisse

Die Validierung des RiboD-Assays erfolgte durch den Vergleich mit dem kommerziellen Quantifiler® Trio DNA Quantification-Kit (Thermo Fisher Scientific). Dieses zeigte denselben Trend zwischen der Dauer des DNase-Verdaus zu den erhaltenen DNA-Mengen und Degradierungswerten, wie es beim RiboD-Assay der Fall war (**Kapitel 3.2.3**). Es wurde jedoch eine geringere PCR-Effizienz des RiboD-Assays im Vergleich zum Quantifiler® Trio Kit nachgewiesen (siehe Anhang 1, S2). Grund dafür könnte beispielsweise eine noch nicht optimale Zusammensetzung des Reaktionsmixes sein oder eine nicht optimale Primerbindung, beispielsweise aufgrund polymorpher Targetsequenzen. Die Höhe der D-Werte des Quantifiler® Trio -Kits zeigen zwar denselben Trend wie der RiboD-Assay, weisen jedoch bei intakter und gering degradiert DNA einen höheren Anfangswert auf, wodurch im Verlauf der Degradierung ein größerer Wertebereich abgedeckt wird (**Abbildung 9**). Dies kann auf Unterschiede in der Länge der benutzten Amplikons (vor allem der langen Amplikons: 362 bp für RiboD, 214 bp für das Quantifiler® Trio-Kit) oder der genomischen Verteilung der Amplikons zwischen den beiden Assays zurückzuführen sein. Aufgrund der geringen Fragmentlänge der langen Amplikons des Quantifiler® Trio Kits (214 bp) könnte diese theoretisch selbst bei extrem stark degradiert DNA die Degradierung präzise messen, während die Amplifikation über die langen RiboD-Amplikons bereits von der Degradierung der Targetsequenzen beeinflusst wäre. Das RiboD-Assay wurde mit der Intention entwickelt, DNA-Degradierung zu messen, um Auswirkungen auf die STR-Profile von CE und NGS-basierten Typisierungskits voraussagen. Daher ist die Länge der langen RiboD-Amplikons mit 362 bp im Vergleich zum Quantifiler® Trio Kit besser geeignet, mögliche Drop-outs von STR-Allelen voraussagen, die länger als 214 bp sind. Darüber hinaus wurde der RiboD-Assay nicht als Multiplex-Assay ausgeführt und ist daher anfälliger für Variabilität zwischen der Amplifikation eines langen und eines kurzen Fragments derselben DNA-Probe.

Aufgrund einer Proben-Normalisierung unter Verwendung des RiboD-Assays lagen die mit der RiboD-Methode bestimmten DNA-Mengen näher an den erwarteten Werten als die mit dem Quantifiler® Trio -Assay bestimmten Mengen.

Um die RiboD- und RiboDog-Assays noch weiter zu validieren, wurde auf die jeweiligen Empfehlungen der MIQE-Guidelines (Bustin et al. 2009) und die "SWGDM Validation Guidelines for DNA Analysis Methods" (SWGDM 2016) zurückgegriffen. Die qPCR-

basierten RiboD- und RiboDog-Assays wurden auf Reproduzierbarkeit untersucht, also auf die Variationen zwischen unterschiedlichen Läufen, in Kombination mit der Wiederholbarkeit innerhalb der Läufe (**Abbildung 7**). Aufgrund stark beschränkter Anzahl an parallel amplifizierbaren Proben wurden alle quantifizierten Proben gemeinsam aufgetragen, also nicht zwischen Reproduzierbarkeit und Wiederholbarkeit unterschieden. Da lediglich die an den jeweiligen Standardkurven desselben Laufs interpolierten Werte (DNA-Menge) für den Vergleich verschiedener Läufe genutzt wurden, nicht jedoch die C_q -Werte, ist der Vergleich der Werte miteinander konform mit den MIQE-Guidelines (Bustin et al. 2009) und ist daher valide und zulässig.

Bei der Validierung der Assays fiel auf, dass die PCR-Effizienz und die Standardabweichungen der Einzelwerte schwankten (siehe Anhang 1, S1 für RiboD und S7 für RiboDog). Es kommen an dieser Stelle zwei Faktoren zusammen: Die generelle Herausforderung einer guten Präzision (geringe Streuung der Messwerte) und die Herausforderung der präzisen DNA-Quantifizierung bei geringsten DNA-Mengen (SWGDM 2016).

Zum einen ist die Präzision (angegeben durch die Standardabweichung) eine Herausforderung, da es dadurch erschwert wird, den „wahren Wert“ zu finden. Die Standardabweichungen der berechneten DNA-Mengen waren innerhalb der Testläufe (Wiederholbarkeit) geringer als zwischen den Testläufen (Reproduzierbarkeit; siehe Anhang 1, S1 und S7). Diese Variationen in der PCR-Effizienz und den Einzelwerten der Replikate aller qPCR-Läufe, die über den Grad der Präzision informieren, sind möglicherweise auf das verwendete qPCR-Cycler-Modell (Roche LightCyclerII) zurückzuführen, das nur eine parallele Bearbeitung von 32 Proben ermöglicht. Daher wurden DNA-Standards für die Kalibrierung lediglich in Duplikaten im Bereich geringer Mengen (1 pg bis 1 ng) gemessen, was zu geringen Variationen innerhalb der Läufe, aber höheren Variationen zwischen den Läufen führte. Weiterhin wurde eine Vielzahl an qPCR-Läufen benötigt, um eine hohe Anzahl an Replikaten zu erhalten. In jedem Lauf sind Standards für die Erstellung der Kalibrierungskurve mitgelaufen, wodurch die Anzahl der tatsächlich nutzbaren Proben weiter reduziert wurde und von jedem Lauf die Effizienz und die akzeptable Abweichung von der Standardkurve separat festgestellt werden musste.

Zum anderen streuen Messwerte umso breiter, je geringer die eingesetzte DNA-Menge ist, da stochastische Effekte auftreten. Da die Messungen auf spezifischen Zielbereichen der jeweiligen Chromosomen des Genoms basieren, werden erst in dem Fall positive Messwerte erhalten, wenn diese Bereiche in der gemessenen Stichprobe vorhanden und amplifizierbar sind. Bei geringen DNA-Mengen ist es wahrscheinlicher als bei hohen DNA-Mengen, dass diese Bereiche zufällig nicht in der Stichprobe enthalten sind. Diese Möglichkeit wurde zwar durch die Nutzung von *multi-copy*-Loci in den RiboD- und RiboDog-Assays reduziert, kann jedoch trotzdem auftreten.

Aufgrund dieser beider Faktoren sind die Standardabweichungen der geringen DNA-Mengen, die über mehrere Läufe bestimmt wurden, zum Teil recht hoch. Die Empfindlichkeitsgrenzen der Assays, die anhand der Präzision der gemessenen Werte für geringe DNA-Mengen festgelegt wurden, wurden davon beeinflusst. Dabei wurde zwischen dem kurzen und dem langen Amplikon unterschieden. Für das humane und canine qPCR-Assay galt gleichermaßen, dass die Amplifikation eines kurzen Amplikons der zuverlässigen Bestimmung der DNA-Menge bei geringen DNA-Mengen diene. Eine zufriedenstellende Präzision (im Sinne von Standardabweichungen, die im akzeptablen Bereich lagen) wurde bis zu 1 pg für das kurze Amplikon und 10 pg für das lange Amplikon im Fall von menschlicher DNA erreicht. Degradierete DNA mit kleineren Mengen als 10 pg zeigte aufgrund der inkonsistenten Amplifikation des langen Amplikons keine

zuverlässigen Werte. Daher wurde die Empfindlichkeitsgrenze für den RiboD-Assay für intakte DNA auf 1 pg und für degradierte DNA auf 10 pg festgelegt.

Für den RiboDog-Assay wurde die Untergrenze der Empfindlichkeit von 10 pg DNA für das kurze und das lange Amplikon ermittelt. Der canine qPCR-Assay zeigt allerdings generell mehr Variationen als der humane qPCR-Assay, möglicherweise aufgrund der geringen Replikanzahl: Die canine DNA wurde bis zu zweimal gemessen, wobei die humane DNA bis zu neunmal gemessen wurde. Weiterhin wurde für den humanen Assay gekaufte DNA (HeLa-DNA beziehungsweise 2800M-DNA) verwendet, während für die Kalibrierung des RiboDog-Assays eigens extrahierte canine DNA aus kultivierten Zellen verwendet wurde, die lediglich fluorometrisch auf dem Quantus-Gerät (Promega, **Kapitel 2.9**) quantifiziert wurde. Diese Methode misst neben der caninen DNA ebenfalls andere doppelsträngige DNA-Moleküle anderer Spezies wie beispielsweise die DNA von Bakterien. Daher wird davon ausgegangen, dass die tatsächlich vorhandene Menge an hundeeigener DNA geringer war als die mit der fluorometrischen Methode gemessene. Um die tatsächlich vorhandene DNA-Menge zu messen, könnten künstlich erzeugte DNA-Templates als Kalibrierung in der qPCR, deren Molekülanzahl bekannt ist, verwendet werden. Es wird jedoch vermutet, dass die RiboDog-qPCR bei Hunden etwas weniger empfindlich sein könnte wie es beim humanen RiboD-Assay erwiesen wurde. Diese Erklärungen könnten möglicherweise die starke Streuung der Messwerte begründen, aufgrund dessen verdünnte DNA-Proben von Hunden unterhalb 320 pg für die Erstellung der Standardkurve nicht verwendet wurden. Daher konnte mit den beiden Messergebnissen von 3200 und 320 pg die tatsächliche DNA-Menge der Hunde-DNA weniger genau bestimmt werden, als dies bei menschlicher DNA der Fall war. Dies galt vor allem für Messwerte, die unterhalb 320 pg und damit außerhalb der Standardkurve lagen.

Aufgrund des qPCR-Programms mit 40 Amplifikationszyklen trat in wenigen qPCR-Läufen ein positiver NTC (*no template control*) auf, wobei das Signal von den tatsächlichen Proben unterscheidbar war.

Ein weiterer Faktor, der zu Messungenauigkeiten beitrug, könnte das geringe Volumen der eingesetzten DNA sein. Dadurch bezieht sich die DNA-Menge in Pikogramm [pg] in **Abbildung 14** auf das eingesetzte Volumen von je 1 µL DNA. In den meisten kommerziellen qPCR-Assays werden jedoch mindestens 2 µL Probe eingesetzt, um Pipettierfehler zu reduzieren, die vor allem bei minimalen Volumina auftreten. Eine solche Vorgehensweise war in dieser Studie nicht möglich, da das DNA-Volumen der Lysate begrenzt war und die DNA für mehrere Ansätze in unterschiedlichen Methoden (Quantifizierung, unterschiedliche STR-Assays) ausreichen musste.

Die qPCR-Effizienzen des RiboD Assays lag bei 97% (kurzes Amplikon) und 90% (langes Amplikon), wenn HeLa-DNA für die Erstellung der Kalibrierungskurve genutzt wurde, sowie 95% (kurzes Amplikon) und 90% (langes Amplikon), wenn die Kalibrierung auf 2800M-DNA (Promega) beruhte (siehe Anhang 1, S4). Die qPCR-Effizienzen des RiboDog-Assays wurden mit seriell verdünnter Hunde-DNA aus MDCK-Zellen bestimmt und ergaben 94% für das kurze Amplikon und 90% für das lange Amplikon (siehe Anhang S7) womit sie unterhalb der optimalen PCR-Effizienz (95–105%) lagen, obwohl lediglich sehr wenige Messpunkte genutzt wurden. In den meisten Fällen waren die qPCR-Effizienzen beider Assays unter Verwendung des kurzen Amplikons höher als die Assays unter Verwendung des langen Amplikons, selbst bei intakter DNA mit einer hohen Menge (siehe Anhang 1, S1), was bedeuten könnte, dass die langen Amplikons weniger gut amplifiziert werden als die kurzen Amplikons. Diese niedrigen Effizienzen der Assays können auf suboptimales Primerdesign oder suboptimalen Reaktionsbedingungen hinweisen. Sofern, selbst nach einer künftigen Optimierung der Primer, das Problem

bestehen bleibt, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die Target-Regionen im Genom polymorph gestaltet sind, so dass nicht davon ausgegangen werden könnte, dass die Empfindlichkeit und Effizienz verbessert werden kann. Für eine schnelle und kostengünstige Amplifikation zur groben Bestimmung der DNA-Menge und Degradierung ist das RiboD/RiboDog-Prinzip jedoch geeignet. Für diese Assays wird nicht der Anspruch erhoben, DNA-Mengen im einstelligen Pikogrammbereich zu messen. Für solch kleine DNA-Mengen können ohnehin keine vollständigen STR-Profile erstellt werden. Das RiboD/RiboDog-Prinzip reicht jedoch dafür aus, den Erfolg der STR-Typisierung aus ausgefallenen Haaren von Menschen und Hunden abzuschätzen.

4.1.3 Vergleich der RiboD- und RiboDog-Assays mit kommerziellen Kits

Aufgrund der Versuchsergebnisse wird angenommen, dass der RiboD-Assay ebenso zuverlässig wie andere kommerziell erhältliche Kits auf dem Markt, wie der Quantifiler® Trio DNA Quantification Kit (Vernarecci et al. 2015; Holt et al. 2016), das PowerQuant® System von Promega (Ewing et al. 2016) und der Investigator® Quantiplex® Pro Kit von QIAGEN (Vraneš et al. 2017) ist. Diese Kits weisen zwar niedrigere Empfindlichkeitsgrenzen auf, wurden jedoch (noch) nicht im Zusammenhang mit der systematischen Austestung des Degradierungswertes in Korrelation zum Erfolg der STR-Typisierungen von DNA aus ausgefallenen Einzelhaaren beschrieben.

Im Gegensatz zu diesen kommerziellen Multiplex-Kits, basiert die Amplifikation der Amplikons der RiboD und RiboDog-Assays auf einfachen Singleplex-Reaktionen unter Verwendung von SYBR Green als Farbstoff. Die RiboD und RiboDog-Assays wurden zum Zweck einer schnellen und kostengünstigen Möglichkeit entwickelt, um Haare von Menschen und Hunden zu quantifizieren und die DNA-Integrität zu bestimmen. Die Assays basieren auf einer genetischen Region, die ubiquitär in Tieren vorkommt, jedoch speziesspezifische Promotorregion besitzt. Basierend auf dieser Promotorregion wird eine schnelle Anwendung auf weitere Tierarten ermöglicht. Die Vorteile des RiboD-Assays gegenüber kommerziellen Lösungen bestehen daher in der nicht-proprietären genetischen Locus-Information, die die Etablierung von qPCR-Assays zu geringen Kosten ermöglicht. Darüber hinaus könnte sich die mögliche Anpassung des RiboD-Prinzips an nicht-menschliche Spezies in der Wildtierforensik als nützlich erweisen, insbesondere in Ländern, in denen die Budgets für die DNA-Analyse begrenzt sind. Das RiboD-Assay-Prinzip kann sich daher besonders in Kriminalfällen mit Tieren als nützlich erweisen. Tierhaare sind häufig gefundene Spuren, die bei der Klärung von Tatumständen helfen können, beispielsweise wenn eine der an der Straftat beteiligten Personen Hunde besitzt oder Tatorte von bestimmten Hunden bewohnt waren. Aus diesem Grunde wäre eine weitere Anpassung des RiboD/RiboDog-Prinzips an Katzenhaare eine künftige sinnvolle Aufgabenstellung. In der Wildtier-Forensik können Tierhaare morphologisch entsprechend ihrer Arten identifiziert (Tridico 2005; Tridico et al. 2014) und anschließend aufgrund der STR-Analyse mit bestimmten Individuen oder Populationen in Verbindung gebracht werden. Hierbei wäre dann die möglicherweise geringe Speziesspezifität des qPCR-Assays nicht von Nachteil.

4.1.4 Umgang mit PCR-Inhibition

Interne PCR-Kontrollen (IPC) zur Unterscheidung zwischen DNA-Degradierung und PCR-Inhibition, die häufig in kommerziellen Kits enthalten sind, waren in den Reaktionen der RiboD und RiboDog-Assays nicht enthalten. Bei diesen Kontrollen ist die Template-DNA bereits im PCR-Mix enthalten und die Amplifikation wird lediglich in dem Fall inhibiert,

wenn PCR-Inhibitoren vorliegen. Eine analoge Möglichkeit zur IPC stellen die Qualitätssensoren in STR-Kits dar. Diese bestehen aus einem kurzen und einem langen Locus, dessen Template-DNA im Assay enthalten ist. Bei gleichzeitiger Detektion des kurzen Sensors in voller Signalstärke, zeigt die Reduzierung der Signalstärke des langen Sensors eine PCR-Inhibition an; bei starker PCR-Inhibition fallen beide Sensoren aus (Zgonjanin et al. 2017).

Der RiboD- und RiboDog-Assay (ebenso wie der maSTR-Assay) enthalten keine IPCs (beziehungsweise Qualitätssensoren) und wurden nicht auf Inhibitoren (üblicherweise unter anderem bestehend aus Huminsäure, Hematin, Calciumhydrogenphosphat, Tanninsäure, Ethanol (Schrader et al. 2012)) getestet, da im Mittelpunkt dieser Arbeit die forensische Anwendung auf DNA aus Einzelhaaren stand. Aus Einzelhaaren extrahierte DNA kann als PCR-Inhibitor insbesondere Melanin enthalten (Yoshii et al. 1993; Eckhart et al. 2000). Da nukleäre DNA in Haarschäften sehr stark degradiert vorliegt (Brandhagen et al. 2018), wurde in dieser Studie lediglich die Kolbenwurzel und ein kurzes Stück vom Übergang zum Haarschaft pro Probe verwendet. Dadurch wurde einer starken Belastung mit Melanin vorgebeugt. Weiterhin könnten Inhibitoren wie Huminsäuren vorhanden sein, wenn die Haare am oder im Boden gelagert wurden, wie beispielsweise im Falle von Leichenfunden. In der vorliegenden Studie wurden Einzelhaare unter kontrollierten Bedingungen gesammelt (Kämmen mit einem gereinigten Kamm, Streicheln der Hunde mittels eines Handschuhs). Es wird angenommen, dass diese Spurentypen nicht vergleichbar sein könnten mit Haaren, die für unbestimmte Zeit an Tatorten lagen, eventuell durch sekundären Transfer transportiert wurden, sowie bestimmten Umweltbedingungen aufgesetzt waren. Anhaftungen und Kontaminationen sowie exogen induzierte DNA-Degradierung könnten bei realen *Casework*-Proben die Folge sein, die in dieser Studie nicht untersucht wurden. In der vorliegenden Studie wurde darauf verzichtet, da diese Variable die Ergebnisse verändern könnte und lediglich die interne DNA der Haare und deren Eignung zur DNA-Quantifizierung und -Typisierung untersucht werden sollte.

Grundsätzlich kann die DNA im Falle von Inhibitoren weiter aufgereinigt werden. Jedoch erscheint dies bei Einzelhaaren wenig sinnvoll, weil hierbei weiterer Verlust an DNA aufträte. Auch wird bei Anwesenheit von Inhibitoren empfohlen, die Probe zu verdünnen, da damit gleichzeitig die Inhibitor-Konzentration verringert wird (Schrader et al. 2012). Bei DNA aus ausgefallenen Einzelhaaren bietet sich diese Vorgehensweise jedoch nicht an, da die ohnehin schon geringe DNA-Konzentration dadurch weiter verringert werden würde. Somit erscheint die Information über das Vorliegen von PCR-Inhibition gerade bei Einzelhaaren wenig sinnvoll.

4.1.5 Die Eignung von ausgefallenen humanen Haaren als Spurentyp in der Forensik

Telogene Einzelhaare sind ein häufig anzutreffender Spurentyp, der aufgrund der zu erwartenden geringen Erfolgsraten bisher nur selten einer STR-Analyse unterzogen wurde. Vielmehr wird mitochondriale DNA analysiert, die jedoch aufgrund ihrer mütterlichen Vererbung eine wesentlich geringere Trennschärfe aufweist (Buckleton et al. 2011; Verscheure et al. 2013). Die Analyse von Menge und Integrität der nukleären DNA mittels qPCR ist daher eine Strategie zur Identifizierung derjenigen Haare, die erfolgreich STR-typisiert werden können (Lin et al. 2018; Thomas et al. 2013; Holmes et al. 2018; Martins et al. 2019). Wenn sie auf einzelne Haare angewandt wird, besteht ein Vorteil der anschließenden Analyse darin, dass die DNA von einem einzelnen Individuum stammt. Dadurch können Methoden mit höchster Empfindlichkeit angewandt

werden, da das Risiko der Erstellung gemischter Profile minimiert wird (Martins et al. 2019). In dieser Studie wurde zum ersten Mal an Einzelhaaren der Zusammenhang zwischen DNA-Integrität und STR-Typisierbarkeit systematisch untersucht.

Die Nützlichkeit des humanen RiboD-Assays für die Voraussage des Erfolgs der STR-Typisierung in Fällen von degradierter DNA wurde in den **Kapiteln 3.2.2** und **3.2.6** untersucht. Bei Verwendung von artifiziell degradierter HeLa-DNA war die Allel-Recovery sowohl von der DNA-Menge als auch vom D-Wert abhängig, wobei niedrige DNA-Mengen und/oder niedrige D-Werte mit niedrigen Allel-Recoveries korrelierten. Dieser Befund wurde bei der Anwendung des RiboD-Assays auf einzelne Haare bestätigt (**Kapitel 3.3**). Dabei ist auffällig, dass vollständige Profile lediglich für diejenigen humanen Einzelhaare erzeugt wurden, die nicht dem telogenen Wachstumsstadium, sondern dem anagenen (Haar 1) beziehungsweise dem katagenen Stadium zuzuordnen sind (Haare 2-5; **Abbildung 13**). Durch diese Studie wurde zum ersten Mal der Zusammenhang zwischen DNA-Integrität und STR-Typisierbarkeit systematisch untersucht, indem degradierte DNA aus Einzelhaaren analysiert wurde. In dieser Studie waren hohe DNA-Mengen prädiktiv für vollständige STR-Profile, wenn die D-Werte über 0,03 lagen. Weiterhin wurden vollständige Profile mit weniger als 100 pg Input-DNA für leicht degradierte DNA (D-Wert von 1 - 0,2) erhalten. Bei DNA-Mengen zwischen 50 und 100 pg korrelierte der Erfolg der STR-Typisierung hauptsächlich mit den D-Werten. Als Faustregel hat sich in der Studie bewiesen, dass der Einsatz von weniger als 100 pg DNA, welche ausgeprägt bis extrem degradiert ist (D-Wert von $\leq 0,1$), zu weniger als 50% Konkordanz zum Referenzprofil führte. Weiterhin schienen bei DNA-Mengen unter 20 pg stochastische Effekte zu überwiegen, da die Profile unabhängig von den D-Werten unvollständig waren.

Bemerkenswert ist, dass die D-Werte (und der Erfolg der DNA-Typisierung) nicht mit der Morphologie des Haares korrelierten, wenn kein oder wenig Gewebe anhaftet. In früheren Studien wurden fluoreszierende DNA-Färbungen verwendet, um den Erfolg der STR-Typisierung auf der Grundlage des Vorhandenseins von Zellkernen oder von mutmaßlichen Zellkernresten innerhalb der Wurzel oder des Haarschafts vorauszusagen (Bourguignon et al. 2008; Edson et al. 2013; Lepez et al. 2014; Haines und Linacre 2016; Lee et al. 2017; Szabo et al. 2012). Die hier vorliegende Studie bestätigt eine frühere Studie von (Opel et al. 2008), die DNA-Degradierung einzelner Haare durch qPCR an menschlichen Alu-Sequenzen untersuchte. Sie fanden eine ähnliche Diversität der DNA-Mengen pro Haar und eine ausgeprägte und variable DNA-Degradierung und konnten diese Ergebnisse mit dem Erfolg der STR-Typisierung in Beziehung setzen (Opel et al. 2008). In der Studie von Opel et al. wurde jedoch ein STR-Multiplex von lediglich zwölf STR-Markern untersucht und keines der aktuellen Standard-Kits wie in der vorliegenden Arbeit. Zudem sind die Alu-Elemente auf Primaten-Arten beschränkt (Batzler und Deininger 2002), so dass der Assay nicht an andere Arten angepasst werden kann.

Bei menschlichen telogenen Einzelhaaren zeigt die vorliegende Studie nur in dem Fall eine Korrelation zwischen der Morphologie und dem Erfolg der STR-Typisierung, wenn sehr viel anhaftendes Gewebe wie Haarwurzelscheidezellen vorhanden ist. Im Gegensatz dazu kann der STR-Typisierungserfolg von telogenen Haaren nicht basierend auf der Morphologie des Haares geschätzt werden, wenn lediglich wenig oder kein anhaftendes Gewebe vorhanden ist. Der Grund hierfür könnte eine starke DNA-Degradierung des anhaftenden Gewebes sein (die durch den D-Wert nachgewiesen wurde), welche eine inhärente Eigenschaft sein oder aus ungünstigen Umgebungsbedingungen resultieren kann. Diese Erkenntnis steht im Widerspruch zur aktuell bestehenden pauschalen Annahme, dass Haare mit viel anhaftendem Gewebe (neben anagenen auch katagene Haare) bessere STR-Profile liefern als vollständig telogene Einzelhaare ohne oder mit

wenig anhaftendem Gewebe. Daher wird hier postuliert, dass es sinnvoll ist, nicht mehr von der Annahme auszugehen, dass eine Korrelation zwischen Morphologie und Typisierbarkeit vorliegt. Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass der D-Wert eine geeignete Messgröße für die Entscheidung darstellt, ob eine STR-Typisierung an Einzelhaaren durchgeführt werden soll, als die bloße Untersuchung der Morphologie eines Haares. Insbesondere wurde nachgewiesen, dass STR-Profile von humanen Haaren gewonnen werden können, die aufgrund ihrer schlechten morphologischen Eigenschaften im Routinelaborbetrieb für die Analyse verworfen und lediglich als Rückstellprobe gelagert worden wären. Somit kann es vorkommen, dass wertvolle Informationen nicht genutzt werden, die zur Klärung von Kriminalfällen beitragen könnten. Darüber hinaus kann eine qPCR-Messung vor der STR-Typisierung helfen, humane Haare von der Analyse auszuschließen, die trotz vielversprechender morphologischer Eigenschaften keine brauchbaren DNA-Profile liefern würden. Da zumindest in europäischen und amerikanischen Kriminallaboren eine DNA-Quantifizierung vorgenommen wird, um das optimale Volumen der vorliegenden DNA für den Einsatz in der STR-PCR zu ermitteln, bietet sich eine simultane Bestimmung der DNA-Integrität an. Diese beiden Eigenschaften der DNA, die Menge und die Integrität, könnten somit künftig in Kombination genutzt werden, um den STR-Erfolg vorauszusagen.

4.1.6 Fehlende Einheitlichkeit in der morphologischen Beschreibung von Haaren

Über die fragwürdige Beziehung zwischen Morphologie und STR-Typisierungserfolg hinausgehend, ist die Beschreibung von Haar-Morphologie in der Forensik oft wenig konsistent. In der vorliegenden Studie wurden Haare genutzt, die sowohl reine Kolbenwurzeln aufwiesen, als auch Haare mit anhaftendem Gewebe. Diese Haare wurden daher als telogen und zum Teil auch als katagen beschrieben, wenn ein beträchtlicher Teil der Kolbenwurzel von Gewebe bedeckt war. In älteren Publikationen werden Haare jedoch zum Teil auch als telogen beschrieben, die viel Gewebe aufwiesen. Zum Teil werden die Begriffe „telogen“ und „katagen“ in Publikationen genutzt, ohne dass repräsentative Fotografien beiliegen, beispielsweise in (Ottens et al. 2013). Dadurch kann es passieren, dass selbst sachverständige Personen nur schwer einschätzen können, ob ein vorliegendes Haar eher als telogen oder katagen einzuordnen ist. Beispielsweise wurden Kolbenwurzeln, die eine relativ große Menge anhaftendes Gewebe aufweisen, das sich vor allem an der Spitze der Kolbenwurzel findet, als telogen (Edson et al. 2013) bezeichnet und das anhaftende Gewebe als Keimnippel (Linch et al. 1998). Dabei handelte es sich zum Teil um ähnliche Haare wie in **Abbildung 13**, die in der vorliegenden Studie zum Teil als katagen bezeichnet wurden. Der Übergang zwischen dem katagenen und telogenen Wachstumsstadium ist schwierig exakt zu bestimmen, wenn sich telogene Haare durch den großteiligen Verlust anhaftender Zellen auszeichnen, jedoch nicht festgelegt ist, wieviel Gewebe tatsächlich anhaften darf, um als telogen und nicht als katagen zu gelten. In einigen Studien wird deshalb ausdrücklich darauf hingewiesen, dass lediglich telogene Kolbenwurzeln verwendet wurden, die keinen Keimnippel aufwiesen (Hellmann et al. 2001). Die unterschiedlichen Formen des Gewebeanhangs werden nicht einheitlich unter anderem in den Publikation von (Bourguignon et al. 2008) und (Linch et al. 1998) beschrieben. Die Problematik der Vergleichbarkeit von Typisierungsergebnissen von Haaren bestimmter Morphologie spielt hierbei zusätzlich hinein: Jedes Haar kann nur ein einziges Mal zur DNA-Extrahierung genutzt werden.

Die in der vorliegenden Studie vorgestellte Strategie stellt eine Möglichkeit dar, dieses Problem der inkonsistenten Benennung zu lösen, da sich die Morphologie für die Voraussage des Typisierungserfolgs als irrelevant herausgestellt hat. Die DNA-Menge und DNA-Degradierung stellen geeignetere und aussagekräftigere prädiktive Metriken dar, die in einer engeren Korrelation zum Erfolg der STR-Typisierung stehen, als das Zählen von Zellkernen (beispielsweise genutzt von (Edson et al. 2013)) oder der Betrachtung der morphologischen Merkmale bei Haaren. Die in dieser Studie vorgeschlagene Strategie zur STR-Analyse von Einzelhaaren in der forensischen Genetik ist daher auf Haare in allen Wachstumsphasen anwendbar und nicht nur auf die telogene Wachstumsphase.

4.1.7 Einfluss der Haarmorphologie bei Hunden auf den Typisierungserfolg

In der Vergangenheit wurden vollständige Profile in der Regel nicht mit einzelnen telogenen Hundehaaren erzeugt. Um vollständige Profile zu erhalten, mussten Pools von mindestens fünf bis zehn Haaren verwendet werden (Pfeiffer et al. 2004). Im Gegensatz dazu zeigt die hier vorliegende Studie, dass vollständige oder fast vollständige Profile (genügend STR-Marker für eine hohe Trennschärfe, in der Regel 15 Loci) aus einzelnen Deckhaaren von Hunden gewonnen werden können.

Bei Deckhaaren von Hunden nimmt die Morphologie der Einzelhaare noch weniger Einfluss auf den Erfolg der STR-Typisierung als bei menschlichen Haaren: Die Morphologie der Deckhaare gibt weder Auskunft über die Menge der DNA oder die Integrität, noch über den Erfolg der STR-Typisierung. Dies zeigt sich daran, dass kein Haar erkennbare Zelladhäsionen trug (**Abbildung 13**), die DNA-Mengen der einzelnen Haare jedoch sehr unterschiedliche Typisierungs-Erfolge erzielten. Die RiboDog-Ergebnisse zeigten, dass die D-Werte aller DNA aus caninen Deckhaaren im Vergleich zu D-Werten telogener Menschenhaare relativ groß sind und nie kleinere Werte als 0,2 ergaben (**Abbildung 14**). Verglichen mit den Degradierungswerten von künstlich verdauter Hunde-DNA scheint ein D-Wert von 0,2 einer nicht maximal degradierten DNA zu entsprechen. Im Gegensatz dazu ist die DNA aus telogenen Menschenhaaren stärker degradiert als die DNA der Deckhaare von Hunden: Die meisten der hier getesteten menschlichen telogenen Einzelhaare hatten D-Werte von weniger als 0,1 (**Abbildung 14**). Alle untersuchten Deckhaare wiesen daher D-Werte auf, die im Vergleich zu künstlich verdauter Hunde-DNA oder im Vergleich zu menschlichen telogenen Einzelhaaren als leicht verdaute DNA ($< 1-0,2$) eingestuft wurden. Bisher ist die DNA-Integrität von Hundehaaren nicht systematisch untersucht worden. Die vorliegende Studie zeigt zum ersten Mal, dass die DNA einiger Deckhaare weniger stark degradiert ist als menschliche Kopfhare. Der Befund wurde an drei Hunden erzielt. Es sollte daher in weiteren Studien untersucht werden, ob dieser Befund generell für Hunde repräsentativ ist. Da die DNA von caninen Deckhaaren nur geringfügig degradiert ist, scheint der Grad der DNA-Degradierung wenig oder keinen Einfluss auf den Erfolg der STR-Profilierung zu haben. Daher wird der Schluss gezogen, dass Allel-Ausfälle in STR-Profilen bei caninen Deckhaaren hauptsächlich oder ausschließlich auf kleine DNA-Mengen zurückzuführen sind, jedoch nicht in Abhängigkeit zur DNA-Degradierung stehen. Dies steht im Gegensatz zu früheren Studien, die von geringen Erfolgsraten bei der STR-Typisierung einzelner oder gepoolter telogener Hundehaare berichteten (Pfeiffer et al. 2004). In Übereinstimmung mit unserer Studie wurde jedoch kürzlich über eine erfolgreiche STR-Analyse von einzelnen Deckhaaren von Hunden unter Verwendung „direkter“ PCR-Ansätze berichtet (Blackie et al. 2015). In dieser Studie war die DNA-Integrität einzelner Haare jedoch nicht bewertet worden. Es scheint also in Bezug auf die DNA-Integrität einen prinzipiellen Unterschied zwischen Hunde- und

Menschenhaaren zu geben, und es könnte interessant sein, dies auch bei anderen Säugetieren zu untersuchen.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Integrität von menschlichem Haar und Hundehaar wäre, dass Hundehaare im Vergleich zu menschlichem Haar eine kürzere Lebensdauer haben, so dass zur DNA-Degradierung weniger Zeit zur Verfügung stünde. Es wäre ebenfalls denkbar, dass bestimmte Prozesse, die zur DNA-Degradierung im menschlichen Haar führen, im Hundehaar anders ablaufen oder dass einige Prozesse ganz fehlen. Daher wäre es interessant, die möglichen individuellen und rassenspezifischen Unterschiede der Hundehaare hinsichtlich der DNA-Integrität zu untersuchen, da solche Unterschiede den Erfolg der STR-Typisierung beeinflussen könnten. Beispielsweise ergaben Einzelhaare des Hundes K in der hier vorliegenden Studie höhere Allel-Recoveries als Einzelhaare der anderen zwei getesteten Hunde (**Abbildung 14**). Dabei ist nicht klar, ob dies durch einen geringen Stichprobenumfang, oder einen hunderassenspezifischen Unterschied bedingt wurde. Unterschiede zwischen kurzhaarigen und langhaarigen Rassen wären denkbar, insbesondere, weil bekannt ist, dass der Haarwechsel rassenspezifisch ist: Gewöhnlich befinden sich einige Hundehaarfollikel im Anagen-, andere im Katagen- und einige im Telogen-Stadium. Die Rate, mit der Hunde ihre Haare verlieren, und die Anzahl der ausfallenden Haare unterliegt rassespezifischen Wachstumszyklen, da insbesondere Hunde im Freien in der Regel zweimal im Jahr einen Fellwechsel von Sommer- auf Winterfell durchlaufen, wodurch die DNA-Menge und -Integrität der Haare beeinflusst werden könnte (Al-Bagdadi et al. 1977). So gelten beispielsweise kurzhaarige Hunde wie Pudel als für allergiegeplagte Menschen geeignet, da sie kein Unterfell haben, ihre Haarfollikel in der Regel in der anagenen Wachstumsphase bleiben und daher weniger Haare ausfallen als bei anderen Hunderassen (Verma und Joshi 2012). Im Gegensatz dazu wächst menschliches Kopfhhaar etwa 5 Jahre lang aus der Kopfhaut, bevor es ausfällt. In einer Studie von Blackie et al. konnten jedoch keine rassenbedingten Unterschiede festgestellt werden, weder für den Erfolg der STR-Typisierung noch für die DNA-Menge (Blackie et al. 2015). Um diese Hypothese zu untersuchen müssten wesentlich mehr Hunde untersucht werden, um signifikante Ergebnisse zu erhalten. Gleichwohl wäre es interessant, rassenspezifische Unterschiede zu untersuchen in Bezug auf DNA-Menge und -Integrität aus Deckhaaren.

Das Fell vieler Hunderassen weist neben dem Deckhaar eine zusätzliche Art der Haare, die feinere Unterwolle auf. Es besteht sowohl ein morphologischer als auch ein DNA-analytischer Unterschied zwischen Deckhaaren und Haaren der Unterwolle bei Hunden. Bei Hundehaaren sehen die Haare der Unterwolle (G8, **Abbildung 13** und **Abbildung 14**) nicht nur feiner und dünner aus, sondern enthalten auch viel weniger DNA als Deckhaare (G4). Der Grad der DNA-Degradierung ist jedoch bei den Deckhaaren und dem einen Pool an Haaren der Unterwolle ähnlich. Hier vorliegende Untersuchungen bestätigten die Ergebnisse von (Blackie et al. 2015): Die Unterwolle weist in der Regel keine oder nur wenige Allele auf, während die Erfolgsrate bei den Deckhaaren bis zu vollständigen Profilen deutlich höher war (**Abbildung 14**). Die Einzelhaare der Unterwolle sind daher für forensische DNA-Analysenmethoden nicht geeignet. Für die Untersuchung der Unterwolle ist daher eine Zusammenlegung (Pooling) mehrerer Haare erforderlich (Blackie et al. 2015). Haare der Unterwolle sind jedoch häufiger zu finden als Deckhaare, da sie bei vielen Rassen in höherer Anzahl vorkommen und insbesondere beim Fellwechsel zwischen der kalten und warmen Jahreszeit verstärkt ausfallen.

4.1.8 Optimierung der DNA-Extraktion aus Haaren

In dieser Studie wurde der Extraktionspuffer nach (Hellmann et al. 2001) weiter optimiert, insbesondere um mögliche PCR-Inhibition durch die Reagenzien zu vermeiden. Dies erschien insbesondere deswegen wichtig, weil auf Silica-basierte Methoden zur DNA-Aufreinigung verzichtet wurde, da diese immer einen gewissen Verlust an DNA aufgrund unvollständiger Bindung und/oder Elution implizieren, wodurch die Minimalspuren noch weiter an DNA verlieren könnten. Beim Puffer nach Hellmann et al. wird auf EDTA als Komplexbildner für zweiwertige Kationen verzichtet, um eine erhöhte Proteinase K-Aktivität zu erzielen. EDTA wird normalerweise eingesetzt, um Calcium- und Magnesiumionen zu komplexieren, wodurch in Zellen enthaltene DNasen inaktiviert werden (Grahn 2013; Amory et al. 2007; Guérout et al. 2010). Vermutlich ist es bei dem Spurentyp des ausgefallenen Haares ohne Zellanhänge nicht notwendig, DNasen zu inaktivieren, da diese Haare hauptsächlich aus getrocknetem Keratingerüsten bestehen, die keine aktiven DNasen beinhalten. Für die DNA-Extraktion scheint bei diesem Spurentyp vor allem eine effiziente Proteinase K und ein Reduktionsmittel (im verwendeten Protokoll Dithiothreitol, DTT) von Bedeutung zu sein, das die Disulfidbrücken des Keratingerüsts aufbricht. Durch den Verzicht des Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), das im Puffer nach Hellmann et al. enthalten ist, wurde vermieden, dass potentielle SDS-Reste nach der DNA-Fällung vorliegen könnten. Dies war von Bedeutung, da bereits geringe SDS-Reste zu PCR-Inhibition führen (TIJSSEN 1993). Wie die erhaltenen Ergebnisse zeigen, erwies sich der Extraktionspuffer als gut geeignet, um DNA aus Haaren zu extrahieren und effizient mittels PCR zu analysieren.

4.1.9 Repräsentiert der DNase-Verdau das DNA-Degradierungsmuster in Haaren?

In der vorliegenden Studie wurden die Ergebnisse mit artifiziell verdauter humaner HeLa- und caniner MDCK-DNA durch Untersuchungen an Einzelhaaren von Menschen und Hunden bestätigt. Bemerkenswert ist dabei, dass artifiziell verdaute DNA aus kultivierten Zellen durch vorhergehende DNA-Extraktion ohne DNA-verpackende Proteine wie Histone vorliegt. Im Gegensatz dazu liegt die nukleäre DNA der Haare im Zuge der DNA-Degradierung im Chromatin vor, also gebunden in Nukleosomen. Innerhalb der Nukleosomen könnte die DNA für Endonukleasen weniger zugänglich sein und es gibt Hinweise darauf, dass die Positionierung der Nukleosomen gewebeabhängig ist (Dong et al. 2016). Für Haare wurde gezeigt, dass das Enzym DNase1L2 die DNA-Degradierung vermittelt (Fischer et al. 2011). Daher spiegelt der artifizielle DNase I-Verdau von nackter HeLa- oder MDCK-DNA möglicherweise nicht das DNA-Degradierungsmuster natürlicher Haare wider, und daher sind die aus Zellen oder Geweben oder sogar zwischen verschiedenen Geweben erhaltenen D-Werte möglicherweise nicht exakt vergleichbar. Weiterhin könnte sich auch die Zugänglichkeit der STR-Loci für DNasen (beziehungsweise der Grad ihrer Degradierung) zwischen DNA aus Haaren und gereinigter genomischer DNA unterscheiden.

4.1.10 Ergänzung zum Aufbau der Studie mit ausgefallenen Haaren

Aus den hier präsentierten Ergebnissen von menschlichen Haaren und Hundehaaren kann nicht geschlossen werden, in wie viel Prozent der Fälle von vorhandenen Haaren diese für die STR-Typisierung erfolversprechend sind, da hauptsächlich diejenigen Haare für die Typisierungsstudien ausgewählt wurden, die quantifizierbare DNA-Mengen aufwiesen. Die hier vorliegenden Ergebnisse sind daher als Teil einer qualitativen, jedoch nicht als quantitativen Studie zu interpretieren. Von mehreren hunderten untersuchten

menschlichen Kopfharen befand sich der Großteil in der katagenen Wachstumsphase, beziehungsweise dem Übergang zwischen katagener und telogener Phase, erkennbar durch eine große Menge anhaftenden Gewebes an der Wurzel. Dies kann durch die Art der Probenahme bedingt worden sein, da durch das Kämmen der Kopfhare eine gewisse Kraft ausgeübt wurde. Es wurden lediglich solche Haare in die qPCR-basierte Bestimmung der DNA-Menge und Degradierung eingeschlossen, die nur geringe Zellanhaftungen oder reine Kolbenwurzeln aufwiesen (**Abbildung 13**). Ausnahme davon waren ein paar wenige Haare der anagenen (Haar 1) und katagenen Wachstumsphase (Haare 4-5), die als Vergleichsproben genutzt wurden. Von allen untersuchten Haaren wurden lediglich solche Haare für weitere Studien genutzt, die C_q -Werte erzeugten. Bei zu geringen DNA-Mengen oder zu hoher Degradierung konnten keine C_q -Werte erhalten werden, wodurch die Haare von weiterer Nutzung ausgeschlossen wurden.

4.2 Entwicklung und Evaluierung des maSTR-Assays

Die NGS-Technik stellt ein vielversprechendes Werkzeug dar, um degradierte DNA zu typisieren (Müller et al. 2019), vor allem wenn sehr kurze Marker genutzt werden (Kim et al. 2016). Um gezielt die Humanidentifizierung mittels degradiertes DNA zu verbessern, wurde der maSTR-Assay entwickelt, eine NGS-basierte Methode zur STR-Amplifikation mit – im Vergleich zur kapillarelektrophoretischen Methode – relativ kurzen Amplikons. Die Validierung des maSTR-Assays in Bezug auf Konkordanz, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit erfolgte mittels intakter HeLa-DNA in unterschiedlichen Verdünnungen (**Kapitel 3.4.3**). Als *Proof of Concept* wurde die verbesserte STR-Typisierung degradiertes DNA mit dem maSTR-Assay im Vergleich zur CE-Methode anhand schrittweise degradiertes HeLa-DNA nachgewiesen (**Kapitel 3.5.1**). Der maSTR-Assay wurde anschließend mit unterschiedlichen CE- und NGS-basierten forensischen Assays und unterschiedlichen STR-Interpretation-Methoden verglichen, um eine optimierte Strategie für die Analyse menschlicher telogener Einzelhaare in der Humanidentifizierung abzuleiten.

4.2.1 Entwicklung des maSTR-Assays

Kim et al. (Kim et al. 2016) entwickelten einen NGS-Assay mit Mini-STRs zur erfolgreichen STR-Typisierung degradiertes DNA unter Verwendung von 13 CODIS STR-Markern, vier zusätzlichen Markern und Amelogenin. Für die Entwicklung des maSTR-Assays wurde der Assay nach Kim et al. um die restlichen Marker der EU-Core-STR-Loci einschließlich SE33 (ACTBP2) erweitert. Der maSTR-Assay umfasst mit 16 EU-Core-STR-Loci und Amelogenin dieselben Loci wie die CE-basierten PowerPlex® ESX 17- und ESI 17-Kits (Promega). Damit wird sowohl gewährleistet, dass die Performance der Assays vergleichbar ist (wobei Variationen durch die verwendete Technik und die unterschiedliche Länge der Amplikons generiert werden), als auch, dass Kompatibilität zur DAD-Datenbank gegeben ist. Die Designs der Primer wurden maßgeblich unter der Vorgabe durchgeführt, möglichst kurze Amplikons zu generieren, damit der Assay verglichen mit anderen CE- und NGS-basierten Assays besser in der Lage ist, stark degradierte DNA zu analysieren. Die gewählten Amplikonlängen variieren zwischen minimal 76 bp bis maximal 296 bp. Zudem wurde darauf geachtet, dass keine bekannten SNPs auf den Primerbindestellen liegen.

4.2.2 NGS-Charakteristiken: Wiederholbarkeit, Reproduzierbarkeit, Konkordanz, Empfindlichkeit und MiSeq FGx™ Qualitäts-Metriken

Nach dem Design und den ersten Läufen des maSTR-Assays erfolgte die Validierung des Assays in Bezug auf Konkordanz, Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit mittels intakter HeLa-DNA in unterschiedlichen Verdünnungen (**Kapitel 3.4.3**). Die Reproduzierbarkeit des maSTR-Assays wurde anhand dreier maSTR-Läufe untersucht **Abbildung 17**. Mit Bezug auf die Definition von Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit (**Kapitel 1.3**) werden in Lauf 1 und Lauf 2 die Wiederholbarkeit untersucht, da in Lauf 1 und Lauf 2 dieselben Proben derselben Amplikon-PCR für beide gepoolten Bibliotheken verwendet wurden, mit Ausnahme einer Probe aus Lauf 1, die nicht in Lauf 2 enthalten war. Da angenommen wurde, dass die Erstellung der Bibliotheken per PCR mehr Variation erzeugt als die nachfolgenden Schritte der Sequenzierung, wurden die in Lauf 1 und Lauf 2 genutzten Proben als technische Replikate angesehen, obwohl sie in zwei unterschiedlichen Läufen analysiert wurden. Sofern die Mindestmenge von 200 pg DNA eingesetzt wurde, werden in der Regel 100% konkordante, wiederholbare und reproduzierbare Allele erhalten in den Vergleichen der Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit (Lauf 3 im Vergleich zu Lauf 1 beziehungsweise Lauf 2, **Abbildung 17**). Für Variationen der Ergebnisse wie der Read-Zahl zwischen den Läufen 1 und 2 trugen möglicherweise Ungenauigkeiten beim Pipettieren bei, da die bereits amplifizierte PCR-Bibliothek einzelner Proben (ein individuelles STR-Profil entspricht einer Probe) jeder Probe für die beiden Läufe 1 und 2 separat zur gepoolten Bibliothek von Lauf 1 und Lauf 2 pipettiert wurden, wodurch sich die entstehenden gepoolten PCR-Bibliotheken leicht unterschieden haben könnten.

Der Vergleich der Rohdaten aller maSTR-Läufe (**Tabelle 5**) zeigt, dass der geringe Anteil effektiver Reads im Vergleich zu der Anzahl der gefilterten Reads hauptsächlich auf Schwierigkeiten bei der Bestimmung von STR-Allelen zurückzuführen ist, die wahrscheinlich auf reduzierte Read-Längen zurückzuführen sind. Als Ursache der reduzierten Readlängen wird das Überclustering vermutet, das zu Reads von geringer oder unzureichender Qualität führen kann, je mehr Zyklen ausgeführt wurden (Daten nicht gezeigt), was zu kurzen Reads mit lediglich akzeptabler Qualität führt. Dieser Effekt könnte hauptsächlich dazu geführt haben, dass die Read-Länge von etwa 206 Nukleotiden der ursprünglichen Amplikons auf (weniger als) etwa 100 Nukleotide gefilterter Reads („gefilterte durchschnittliche Reads“) reduziert wurde. Überclustering (englisch *overclustering*) geschieht, wenn zu viel DNA auf die Flowcell geladen wird (im Falle der Standard-v3-Flowcell normalerweise bei mehr als 20 pM) oder die Library nicht sauber genug von Verunreinigungen gewaschen wurde. Daraus resultierend liegen die gebildeten Cluster zu nah beieinander, was sich in unpräzisen Bildaufnahmen niederschlägt (Manual "Cluster Density" (Illumina)), wodurch die Qualität eingeschränkt wird. Das Trimmen von Nukleotid-Informationen niedriger Qualität, sowie das Verwerfen einzelner Reads (*Singletons*), wenn der komplementäre Read des Paares nicht den Qualitäts-Anforderungen entsprach, führte zu einem großen Verlust an Nukleotiden (Lauf 1 verlor aufgrund dieser Ursache mehr als eine Milliarde Nukleotide), wodurch die Read-Längen noch stärker verringert wurden. Dies wirkte sich jedoch nur geringfügig auf die Read-Länge aus, da die Anzahl der "gefilterten durchschnittlichen Read-Länge" mit der Anzahl der "getrimmten durchschnittlichen Read-Längen" vergleichbar ist. Der Zusammenführungsprozess (*Merging*) führte aufgrund überlappender Effekte lediglich zu leicht verlängerten Read-Paaren.

Infolge reduzierter Read-Längen wurden die repetitiven Regionen der STR-Loci nur teilweise abgedeckt, so dass in diesen Fällen keine Allelbestimmung möglich war.

Weiterhin scheint die Anzahl der Proben, die degradierte DNA enthalten, mit der durchschnittlichen Read-Länge pro maSTR-Lauf zu korrelieren. In Läufen, die hauptsächlich degradierte DNA enthalten, ist ein hoher Anteil an kurzen Amplifikationsprodukten zu erwarten, da die größeren Amplikons nicht mehr als Zielsequenzen für die Amplifikation dienen konnte. Infolgedessen wird der Anteil der kurzen Reads erhöht. Dies würde die Korrelation längerer Read-Längen von Lauf 4 mit der geringeren Anzahl von Proben degradierter DNA (im Vergleich zu den Läufen 1, 2 und 3) erklären, was zu einer höheren Anzahl effektiver Read-Paare und einem höheren Anteil gefilterter Reads zu effektiven Reads führt. Es wird angenommen, dass Lauf 4 aus diesem Grund bessere Ergebnisse als die anderen Läufe zeigt, selbst wenn Lauf 4 aufgrund einer hohen Menge an Input-DNA überclustert war. Aufgrund all dieser Erkenntnisse wird empfohlen, dass der maximale DNA-Input nicht mehr als 4 bis 8 pM DNA betragen sollte, wenn eine große Anzahl von Proben mit stark degradierter DNA aus Einzelhaaren eingesetzt wird.

Im Vergleich der Läufe 3 und 4 wies Lauf 4 (entspricht den Proben von „maSTR_2“ in **Abbildung 21**) eine höhere Recovery als Lauf 3 auf (entspricht den Proben von „maSTR_1“). Dies könnte durch die längere durchschnittliche Länge der zusammengeführten Reads (**Tabelle 5**) in Lauf 4 (103 nts) als in Lauf 3 (85 nts) bedingt worden sein.

4.2.3 Indikatoren für Imbalancen und Diskordanzen des maSTR-Assays

Die Read-Zahl von Signalen und die Anzahl an Allelic Drop-ins dient im Folgenden als Indikator, um die Validität des maSTR-Assays zu beurteilen. Allelic Drop-ins traten sowohl in Verdünnungsreihen bis zum Minimal-Wert von 3 pg in den Studien zur Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit mittels intakter HeLa-DNA (**Abbildung 17**) auf, als auch in den Untersuchungen von Verdünnungsreihen von unterschiedlich stark degradierter artifizieller DNA (**Abbildung 18**). Ebenso traten Allelic Drop-ins in der Analyse humaner telogener Einzelhaare (**Abbildung 20**) auf. Im Gegensatz dazu traten in allen verglichenen NGS- und CE-basierten STR-Kits signifikant weniger Allelic Drop-ins auf als im maSTR-Assay und wurden nur in Einzelfällen beobachtet. Daher wird vermutet, dass der maSTR-Assay eine besondere Fehlerquelle aufweist, die zu einer Häufung von Allelic Drop-ins führt. Dabei zog sich eine Auffälligkeit durch alle mit dem maSTR-Assay generierten Daten: Die Anzahl der Drop-ins und Drop-outs von mittels des maSTR-Assays erzeugten STR-Profilen von artifiziell degradierter DNA und DNA aus telogenen Einzelhaaren nimmt mit abnehmender DNA-Menge und ansteigender DNA-Degradierung zu (**Abbildung 18** und **Abbildung 20**).

Ursprung der Problematik der Allelic Drop-ins könnten starke Interlocus-Imbalancen (siehe **Kapitel 1.5.2**) sein, die stichprobenartig im maSTR-Assay nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt). Interlocus-Imbalancen werden beispielsweise bedingt durch ineffiziente PCR-Effizienzen oder zu geringem/zu hohem Anteil der marker-spezifischen Primer in der Primer-Abmischung der Multiplex-Reaktion. Dadurch können Allele ausfallen, obwohl sie in ausreichender Start-Menge auf der Template-DNA vorlagen. Hierbei fallen – typisch für LT-DNA (**Kapitel 1.5.2** und **1.5.3**) – umso mehr Allele aus, je stärker degradiert die eingesetzte DNA und je geringer die DNA-Menge war (Gill 2001b; Gill et al. 2012; Budowle et al. 2009; van Oorschot et al. 2010; Benschop et al. 2013). Diese Anfälligkeit für stochastische Effekte, spiegelt sich typischerweise auch im Auftreten von Imbalancen wider (Whitaker et al. 2001).

Vor allem zufällige Amplifikationsfehler könnten eine Ursache für einen Teil derjenigen Drop-ins sein, die nicht reproduzierbar sind. Aus den Untersuchungen von Replikaten

der maSTR-Sequenzierung (**Abbildung 21**) und von Composite/Consensusinterpretierten Profilen (**Abbildung 24**) wird geschlossen, dass viele Allelic Drop-ins nicht reproduzierbar sind, da die Anzahl der Allelic Drop-ins in den Replikaten variiert. Beispielsweise weisen die DNA-Proben aus telogenen Einzelhaaren in Lauf 4 mehr Allelic Drop-ins auf als in Lauf 3 (**Abbildung 21**), daher kann zumindest aus den Daten abgeleitet werden, dass die Differenz zwischen der Anzahl der Allelic Drop-ins von Lauf 4 und Lauf 3 denjenigen Allelic Drop-ins entspricht, die nicht reproduzierbar detektiert wurden. Die Anzahl nicht-reproduzierbarer Allelic Drop-ins scheint mit abnehmender DNA-Menge und DNA-Integrität anzusteigen. Dies wird daraus ersichtlich, dass die Differenz der Anzahl der Allelic Drop-ins zwischen Lauf 3 und Lauf 4 größer ist als zwischen Lauf 1 und Lauf 2 (**Abbildung 21**). Da in den Läufen 1 und 2 vor allem DNA-Proben höherer DNA-Menge und -Integrität analysiert wurden, konnte diese Annahme jedoch nicht weiter erhärtet werden.

Bei stark degradiertem DNA, die in großer Menge eingesetzt wurde, handelt es sich bei einem Teil der Drop-ins wahrscheinlich um ungewöhnlich hohe Stotter-Allele (dargelegt in **Kapitel 3.5**). Ein Beispiel dafür ist das diskordante Allel 22 des Markers D12S391, auf das in **Kapitel 3.5.3** eingegangen wurde. Die Möglichkeit, dass Allele innerhalb eines unbalancierten Markersystems ausfallen, im Vergleich zu Markersystemen, die innerhalb und außerhalb in Relation zum Gesamt-Assay ähnlich hohe Read-Zahlen aufweisen, ist umso größer, je unbalancierter die Markersysteme sind und je geringer die Menge und Integrität der eingesetzten DNA ist. Hohe Stotter-Allele sind daher ein bereits bekanntes stochastisches Phänomen. Allerdings traten in den maSTR-Profilen ebenfalls Drop-ins an Positionen auf, die keinen Stottern entsprechen können.

Da durchaus ebenfalls Drop-ins auftraten, die reproduzierbar sind, kann ein systematischer Fehler der initialen Multiplex-PCR oder eine fehlerbehaftete Auswertung/Analyse für einen Teil der Allelic Drop-ins nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise wurden manche Drop-ins durch Fehler im Primer-Assay (Primerdesign, Primer-Abmischungen, Kreuzreaktionen) oder eine fehlerbehaftete Auswertung/Analyse des *Allel-Callings* hervorgerufen. Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass für einige Allele die Readzahlen zu hoch sind, sodass sie zum Teil in höherer Read-Zahl als die konkordanten Allele auftraten. Beispielsweise traten in Stichproben aus Lauf 1 und Lauf 2 dieselben Allelic Drop-ins reproduzierbar auf, die unabhängig von dem Auftreten des konkordanten Allels auftraten (STR-Marker D8S1179, **Kapitel 3.5.3**, **Abbildung 22**). Weiterhin sollte die Problematik des Primer-Designs einzelne Marker mehr betreffen als andere, was im Falle von D8S1179 ebenfalls zutreffen könnte, da dieser Locus besonders anfällig für Drop-ins zu sein schien. Abhilfe könnte ein künftiges Neudesign der entsprechenden Marker schaffen.

Eine alternative Erklärung für das Auftreten von Allelic Drop-ins (vor allem für das Auftreten reproduzierbarer Allelic Drop-ins) würde das Vorkommen von kontaminierender Fremd-DNA bieten, welche umso stärker beobachtet wurde, je geringer die gezielt eingesetzte DNA-Menge ist. Durch die geringe Menge der Template-DNA könnten aufgrund präferentieller Amplifikationen (Walsh et al. 1992) in den ersten Zyklen der PCR zufällig selbst die geringsten Spuren kontaminierender Fremd-DNA zu Signalen in einer höheren Anzahl führen, als die eigentliche DNA-Probe erreicht. Reale Kontaminationen aus fremder DNA erscheint jedoch unplausibel, da Drop-ins in allen maSTR-Läufen detektiert wurden, in einer Vielzahl an Läufen der PowerPlex®-Kits mit geringsten DNA-Mengen jedoch lediglich vereinzelte Drop-ins detektiert wurden. Gäbe es im genutzten Labor Probleme mit Kontaminationen, müssten diese ebenfalls bei den PowerPlex®-Kits aufgetreten sein. Kontaminationen von Komponenten des maSTR-Assays werden als Hauptursache ausgeschlossen, da durch stichprobenartige

Untersuchungen keine reproduzierbar auftretenden Fremd-Allele in allen Proben mit geringer DNA-Menge detektiert wurden. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden spezielle Maßnahmen beim Ansatz aller Assays ergriffen, wie dem Ansatz der initialen PCR unter einer UV-Hood, der Verwendung von ISO18385-konformer Plastik und der Trennung der Ansatzräume in prä- und post-PCR-Anwendungen.

4.2.4 Legung der Schwellenwerte für den maSTR-Assay

Eine maßgebliche Aufgabe in der Entwicklung des maSTR-Assays war die Festlegung der analytischen und stochastischen Schwellenwerte. Da der maSTR-Assay in-house entwickelt wurde, mussten sowohl die Stotter-Schwellenwerte als auch der analytische und stochastische Schwellenwerte empirisch bestimmt werden. Da die NGS-Technik in der Forensik noch relativ neu ist, existiert keine Guideline zur Legung der Schwellenwerte. Anbei wird beschrieben, welche Methoden – neben den Empfehlungen für CE-basierte Systeme (siehe **Kapitel 1.2.2**) - bereits existieren und auf welche Weise die Schwellenwerte im maSTR-Assay festgelegt wurden, inklusive der möglichen Folgen für die Allel-Recovery des maSTR-Assays, sowie Empfehlungen für künftige Optimierungen des maSTR-Assays in Bezug auf die Schwellenwerte.

Die Beobachtung, dass die absolute Anzahl von per NGS-erzeugten Reads für die Legung der analytischen und stochastischen Schwellenwerte von Bedeutung ist (Bregu et al. 2013; Young et al. 2017), wird in einigen Publikationen aufgegriffen und war ausschlaggebend für die Festlegung auf bestimmte Schwellenwerte im maSTR-Assay. Als Beispiel zur genauen Berechnung des analytischen und stochastischen Schwellenwertes dient die Publikation von Guo et al. (Guo et al. 2017) anhand des ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit auf dem MiSeqFGx™-System. Diese basiert auf dem Minimum von 650 effektiven Reads pro Locus, der als minimale *Depth of Coverage* (DoC) festgelegt wurde. Dieser Begriff beschreibt die Abdeckung (englisch *coverage*) am jeweiligen Locus. Der analytische Schwellenwert wurde definiert als 1,5% dieses Werts ($1,5\% \times 650$ effektive Reads = 10 effektive Reads). Der stochastische, auch als *calling* oder Interpretations-Schwellenwert bezeichnete Wert, wurde bei 4,5% dieses Werts (30 effektive Reads) gelegt. Aufgrund dieser Read-Zahlen sollte ein mit dem ForenSeq™ erzeugtes Profil eine Mindestzahl von 85.000 effektiven Reads aufweisen (Guo et al. 2017). Bei einer optimalen Anzahl von 650 effektiven Reads pro Marker müsste der maSTR-Assay aufgrund der 17 enthaltenen Marker mindestens 11.050 Reads pro STR-Profil aufweisen. Diese Grenze wurde von manchen Haar-Proben (Haar 8, 15, 16, 19, 24, 26, 27 und 28) in mindestens einem der beiden Replikate nicht erreicht (**Abbildung 23 B**).

Für das Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel für die Sequenzierung auf dem Ion S5 von Thermo Fisher Scientific wurde ähnlich vorgegangen. Dieses Kit nutzt einen analytischen Schwellenwert von 2% und einen stochastischen Schwellenwert von 5% einer festgesetzten Abdeckung (Müller et al. 2018).

Während der NGS-basierte maSTR-Assay entwickelt wurde, standen keine etablierten Methoden zur Verfügung, um die analytischen Schwellenwertes der forensischen Methode von PCR-basierten NGS-Assays basierend auf Hintergrundrauschen festzulegen. Die Intensität der Signale wurde zwar mittels der Anzahl der sequenzierten Reads pro Locus (entspricht der Abdeckung) bestimmt (Warshauer et al. 2013), jedoch existierte keine validierte Methode, um falsch positive Signale zu bewerten, die vom Hintergrundrauschen verursacht werden (Young et al. 2017). Young et al. beschrieben einen Ansatz zur Festlegung analytischer Schwellenwerte, der für NGS-basierte Multiplex-Assays geeignet ist und auf dem Hintergrundrauschen basiert. Dies wurde

durchgeführt mit der Argumentation, dass positive Kontrollen besser als negative Kontrollen dazu geeignet sein sollten, einen analytischen Schwellenwert festzulegen, da neben dem instrumentellen Rauschen ebenfalls das PCR-verursachte Rauschen berücksichtigt werden sollte, das im Idealfall das alleinige Rauschen darstelle und lediglich bei positiven Kontrollen untersucht werden könne (Bregu et al. 2013; Young et al. 2017).

Young et al. postulierten die Hypothese, dass ein analytischer Schwellenwert von 10 Reads als allgemein ausreichend für Profile mit einer Abdeckung von unter 5.000 Reads angesehen werden kann (Young et al. 2017). Sie haben ebenfalls festgestellt, dass analytische Schwellenwerte, „die auf Hintergrundrauschen basieren und als das Signal zählen, das nach Abzug von Allelen und N-1 Stotter-Artefakten verbleiben, mit zunehmender Locus Abdeckung nach oben tendieren.“ Ein in Relation zur eingesetzten DNA-Menge erhöhtes Hintergrundrauschen wurde ebenfalls von der Arbeitsgruppe um Bregu et al. festgestellt, indem gezeigt wurde, dass das Hintergrundrauschen mit einem DNA-Input von mehr als 1 ng DNA zunimmt (Bregu et al. 2013). Aufgrund dieser Tatsache empfiehlt sich die Festlegung des analytischen Schwellenwertes auf Basis von Negativkontrollen daher nicht. Daraus ergibt sich, dass der analytische Wert von 10 Reads daher angepasst werden kann, wenn wesentlich mehr (Schwellenwert sollte hochgesetzt werden) oder weniger (Schwellenwert könnte herabgesetzt werden) als 5.000 Reads pro Locus vorhanden sind.

Aufgrund dessen zielte die empirische Bestimmung des analytischen Schwellenwertes des in-house entwickelten maSTR-Assays auf einen Wert zwischen 1 und 10 Reads. Zur Festlegung des analytischen Schwellenwertes wurden Profile ausgetestet mit unterschiedlichen Schwellenwerten unterhalb 10 Reads pro Allel. Diese Testung geschah an STR-Profilen von intakter DNA mit Verdünnungen von bis zu 300 pg/Profil und wurde durch einen Vergleich der Konkordanz zwischen den mittels CE bestimmten Referenzprofilen und den NGS-generierten DNA-Profilen unterschiedlicher analytischer Schwellenwerte vorgenommen, mit dem Ziel Null-Allele und Allelic Drop-outs zu identifizieren. Dabei wurde festgestellt, dass bei einem analytischen Schwellenwert von sechs Reads keine unbekannt Signale detektierbar waren, sowie keine Allelic Drop-out und Drop-in-Ereignisse auftraten. Das Hintergrundrauschen setzte sich daher zusammen aus sogenannten Sequenzierfehlern und technisch-bedingten Artefakten. Aufgrund dessen wurde dieser analytische Schwellenwert auf alle erstellten STR-Profile angewandt als reguläre Qualitätskontrolle aller Profile. Dass es eine sinnvolle Maßnahme war den AT herunterzusetzen, zeigt sich darin, dass STR-Profile von DNA aus telogenen Haaren durchaus weniger als 5.000 Reads pro Locus aufweisen können (**Abbildung 23**). Damit wurde die Empfehlung von Young et al. um vier Reads unterschritten. Durch die Festlegung des analytischen Schwellenwertes auf sechs Reads wurde ein Wert gewählt, der übermäßiges Allelic Drop-out konkordanter Allele verhinderte.

Die Festlegung des analytischen Schwellenwertes des maSTR-Assays wurde zusammenfassend nicht an einem prozentualen Wert der minimalen *Depth of Coverage* festgesetzt, sondern an einem festen Wert von sechs Reads pro Allel. Das lässt sich vor allem darüber rechtfertigen, dass in der Testung an verdünnter, intakter DNA keine fremden Allele gefunden wurden und es zu dem Zeitpunkt der Entwicklung nicht möglich war den analytischen Schwellenwert prozentual zu definieren. Es wird daher empfohlen nach einer künftigen Optimierung der Primer-Designs und Primer-Abmischungen der im maSTR-Assay verwendeten Primer, die minimale *Depth of Coverage* auszutesten, die für diesen Assay sinnvoll wäre und anhand dessen den analytischen (und stochastischen) Schwellenwert zu bestimmen. Dafür wäre es sinnvoll, DNA-Verdünnungsreihen in drei bis fünf Replikaten in die Bibliothek-PCR einzusetzen, wobei vor allem geringe DNA-

Mengen eingesetzt werden müssen, zumindest jedoch die DNA-Menge von 100 pg/Profil. Anhand dieser Profile wird empfohlen die minimale *Depth of Coverage* zu bestimmen, also die minimale Anzahl an Reads pro Locus, in denen keine Drop-outs vorkommen. In diesem Ansatz wird empfohlen den analytischen Schwellenwert auf 1,5% der *Depth of Coverage* festzulegen und den stochastischen Schwellenwert bei 4,5%. In diesem Ansatz wird empfohlen vor Festlegung der Schwellenwerte die Interlocus- und Intralocus-Balance zu bestimmen.

Für die Festlegung des stochastischen Schwellenwertes des maSTR-Assays wurde anders als beim analytischen Schwellenwert vorgegangen. Ein stochastischer Schwellenwert von 2% der Reads des jeweiligen Locus ist ein akzeptierter Ansatz bei der Analyse forensischer NGS-Daten (Ganschow et al. 2018b) und wurde dementsprechend für den maSTR-Assay angewandt und stichprobenartig an STR-Profilen überprüft, die mit mindestens 300 pg intakter DNA generiert wurden. Da jedoch einige Allelic Drop-outs und Drop-ins in den in der vorliegenden Arbeit generierten Daten festgestellt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass der stochastische Schwellenwert höher angesetzt werden muss, um eine valide Möglichkeit darzustellen auf stochastische Effekte hinweisen zu können. Vermutlich tragen Imbalancen des maSTR-Assays zur Beobachtung bei, dass der stochastische Schwellenwert zu niedrig gelegt wurde. Allerdings wäre es ebenfalls denkbar, dass der stochastische Schwellenwert für Profile mit einer geringen Anzahl an Reads weniger verlässlich sein könnte als bei Profilen aus intakter DNA ausreichender Menge. Da *Low Copy Number*-DNA vermehrte stochastische Effekte aufweist, könnte es in diesen Fällen sinnvoll sein, den stochastischen Schwellenwert anzuheben.

In stichprobenartigen Untersuchungen der maSTR-erzeugten STR-Profile wurde beobachtet, dass manche Allele um einen Repeat verrutscht sein könnten oder die Typisierung korrekter Allele fehlerbehaftet sein könnte, da sehr hohe Allelic Drop-ins eintraten, während die konkordanten Allele fehlten oder nur in niedriger Read-Zahl vorhanden waren. Manche dieser speziellen Beobachtungen waren reproduzierbar, andere nicht (**Kapitel 3.5.3**). Manche solcher Phänomene könnten durch sehr hohes Hintergrundrauschen erzeugt worden sein. Daher könnte es sinnvoll sein, die Read-Zahl für den analytischen Schwellenwert nicht für alle STR-Marker gemeinsam zu bestimmen, sondern für alle Marker separat.

Der maSTR-Assay weist im Gegensatz zu dem PowerPlex® ESX 17-Kit eine hohe Anzahl an Allelic Drop-ins auf, vor allem beim Einsatz von geringen DNA-Mengen intakter (**Abbildung 17**) und degradiertter DNA (**Abbildung 18** und **Abbildung 20**), die zum Teil eine hohe Readzahl besitzen (Daten nicht gezeigt, lediglich Stichproben wurden ausgewertet). Daher wird – neben den bereits besprochenen möglichen Ursachen für das Auftreten der Drop-ins – vermutet, dass die niedrigen analytischen und stochastischen Schwellenwerte, die für den maSTR-Assay genutzt wurden, für die hohe Anzahl an Drop-ins und zugleich für die – in Relation zu den PowerPlex® Kits – relativ niedrige Anzahl der Drop-outs verantwortlich sein könnte. Bei einem zu niedrig gesetzten analytischen Schwellenwert wird nicht ausreichend sicher zwischen dem Hintergrundrauschen und realen Signalen unterschieden (SWGDM 2010), wodurch sehr niedrige, konkordante Allele gezählt werden (die Allel-Recovery folglich hoch ist), jedoch auch diskordante Signale des Hintergrundrauschens als Allele gewertet werden, die als Allelic Drop-ins gezählt werden. Bei einem zu niedrig gesetzten stochastischen Schwellenwert kann das Auftreten stochastischer Effekte nicht ausgeschlossen werden. Durch Hochsetzen des stochastischen Schwellenwerts können zumindest diejenigen Signale ausgeschlossen werden, die stochastischen Ursprungs sind (SWGDM 2010). Es wird angenommen, dass diejenigen diskordanten Allele, die trotz hochgesetzten

Schwellenwerten auftreten würden, nicht stochastischen Ursprungs sind. Mögliche Ursprünge wurden bereits in **Kapitel 4.2.3** diskutiert. Es wird angenommen, dass durch das Hochsetzen der Schwellenwerte die Anzahl der Drop-outs ansteigen würde.

Neben der Festlegung des analytischen und stochastischen Schwellenwertes war ebenfalls die Festlegung des Schwellenwertes für Stotter-Allele (**Kapitel 1.2.2** und **2.14.22.14**) ein wichtiger Bestandteil der Entwicklung des maSTR-Assays. Die Unterscheidung zwischen wahren Allelen und Artefakten wird an den sogenannten Stotter-Positionen dadurch erschwert, dass die DNA-Polymerase fehleranfällig ist. Durch „Verrutschen“ der DNA-Polymerase werden Amplikons erstellt, die um eine Wiederholungseinheit kürzer oder länger sind als die Haupt-Allele, welche die genetische Ausstattung der spurenlegenden Person darstellen (Schlötterer und Tautz 1992; Walsh et al. 1996). Die Bezeichnung der Artefakte beschreibt daher durch die jeweilige Analyse-Methode erzeugte Allele, die von wahren Allelen zum Teil lediglich durch Erfahrungswerte unterscheidbar sind, die in dem Fall von Stotter-Allelen als Schwellenwerte angegeben werden. Die relativen Intensitäten der Stotter-Allele (RFU in CE-Analysen, Anzahl der Reads in NGS-Analysen) sind abhängig von den jeweiligen STR-Loci, können zwischen verschiedenen STR-Loci innerhalb der Multiplex-Amplifikation unterschiedlich sein und hängen von den Amplifikationsbedingungen ab (Schneider et al. 2006). Für die Schwellenwerte der Stotter-Allele wird historisch die 15%-Faustregel angewandt: Beträgt ein Allel an einer Stotter-Position maximal 15% der RFU des Haupt-Allels, wird es als Stotter-Allel kategorisiert. Für gewöhnlich werden in den Handbüchern der Kits spezifische Stotter-Schwellenwerte für alle im Kit vorkommenden Marker angegeben, da die Wahrscheinlichkeiten des Auftretens von Stotter-Allelen und die Höhe der Stotter-Allele (in RFU) zwischen den Markern variieren. Vor allem Marker, die aus kurzen Wiederholungseinheiten bestehen, wie beispielsweise die Trinukleotid-Repeats des Markers D22S1045 (Kruglyak et al. 1998), sowie Allele, die eine hohe Anzahl an Repeats tragen, weisen in der Regel stark ausgeprägte Stotter-Allele auf. Die Unterscheidung zwischen wahren Allelen und Stotter-Allelen gestaltet sich vor allem bei der Analyse von Mischspuren als schwierig.

Aufgrund dessen wurden bei der oben genannten Austestung der analytischen Schwellenwerte mit Profilen aus mindestens 300 bp intakter DNA alle Stotter der getesteten Profile begutachtet (**Kapitel 2.14.2**). Die im maSTR-Assay angewandten Stotter-Schwellenwerte ergaben in diesen Profilen keine Stotter-Allele, die eine Zuordnung der Allele als weiteres (diskordantes) oder heterozygotes Allel zuließen und besitzen lediglich für die genutzten Amplifikationsbedingungen des maSTR-Assays Gültigkeit.

4.3 Einfluss von DNA-Menge und -Integrität artifiziell degradierter DNA auf die Konkordanz von maSTR und CE-generierten STR-Profilen

In den Versuchen zum *Proof of Concept* (**Kapitel 3.5.1**) wurde nachgewiesen, dass der Erfolg der STR-Typisierung des maSTR-Assays in Bezug auf die Allel-Recovery maßgeblich von der optimalen eingesetzten DNA-Menge und der DNA-Integrität abhängt. Mit dem maSTR-Assay wurden in der Regel 100% mit dem CE-generierten Referenzprofil übereinstimmende Allele gefunden, sofern mindestens 200 pg intakte DNA eingesetzt wurde (**Abbildung 17**, **Abbildung 18**). In einem Einzelfall mit intakter DNA von 211 pg eingesetzter DNA trat ein Allelic Drop-in auf (**Abbildung 17**). Allelic Drop-outs und Allelic Drop-ins traten vermehrt bei DNA mit absteigender Menge unterhalb 100 pg auf, sowie bei Einsatz von degradierter DNA.

Bei Einsatz von vergleichsweise großen DNA-Mengen (ungefähr 300 pg) traten im maSTR-Assay viele Allelic Drop-ins und Drop-outs auf, wenn die DNA stark degradiert war (**Abbildung 18**, Verdau-Dauern von 45 min bis 195 min). Diese Abhängigkeit von dem D-Wert, wenn die DNA in ausreichender Menge vorliegt, wurde zuvor bereits mit dem PowerPlex® ESX 17-Kit beobachtet.

Verbale Prädikate wie „stark degradierte DNA“ beschreiben den Ausprägungsgrad der DNA-Degradierung sowohl für artifiziell verdaute DNA als auch DNA aus telogenen Haaren. Da diese verbalen Prädikate anhand der RiboD-Messwerte definiert wurden und die Höhe des D-Werts mit der DNA-Menge der eingesetzten DNA korreliert (**Abbildung 7** und **Abbildung 9**), sind diese verbalen Prädikate lediglich für mit RiboD-gemessenen Werte geringer DNA-Mengen von 300 pg und geringer anwendbar. Für artifiziell degradierte DNA sind die verbalen Prädikate sowohl für auf 300 pg als auch auf 30 pg normalisierten DNA-Mengen anwendbar.

In Proben mit DNA-Mengen von weniger als 300 pg DNA und degradierter DNA korrelieren die beobachteten stochastischen Effekte des maSTR-Assays und des PowerPlex® ESX 17-Kits sowohl mit dem Schweregrad der DNA-Degradierung, als auch mit der eingesetzten DNA-Menge. In diesen Fällen war die mit dem PowerPlex® ESX 17-Kit erzielte Allel-Recovery geringer als mit dem maSTR-Assay. Der maSTR-Assay wies in dem DNA-Mengenbereich allerdings Allelic Drop-ins aus, während das PowerPlex® ESX 17-Kit lediglich konkordante Allele aufwies.

Extrem degradierte DNA (D-Wert kleiner als 0,01) unterhalb 333 pg zeigte weder in den maSTR- noch CE-basierten Daten vollständige Profile (**Abbildung 18**).

4.4 Vergleich zwischen maSTR und CE-generierten STR-Profilen von degradierter DNA aus Einzelhaaren

Die aus den Untersuchungen mit artifiziell degradierter DNA gefundene Korrelation zwischen DNA-Menge und Integrität zur Anzahl an Drop-outs und Drop-ins wurde ebenfalls in den Untersuchungen mit degradierter DNA aus Einzelhaaren nachgewiesen. Der maSTR-Assay und das CE-basierte PowerPlex® ESX 17-Kit lieferten vollständige Profile, wenn große Mengen (bis zu 500 pg) leicht degradierter DNA aus Haaren eingesetzt wurde, wobei diese Haare nicht dem telogenen Wachstumsstadium, sondern dem anagenen (Haar 1) beziehungsweise dem katagenen Stadium zuzuordnen sind (Haare 2-5; **Abbildung 13**).

Die Menge von 500 pg intakter DNA wird üblicherweise für CE-basierte Kits empfohlen, um vollständige Profile zu erhalten und zugleich das Überladen der Kapillare zu verhindern. Mit dem maSTR-Assay und dem PowerPlex® ESX 17 wurden vollständige Profile mit weniger als 100 pg Eingangs-DNA für leicht degradierte DNA (D-Wert bis 0,2) bis zu einer eingesetzten DNA-Menge von 49 pg gefunden. Die Recovery von mehr als $\frac{3}{4}$ aller Allele der Referenzprofile kann mit dem maSTR erreicht werden, wenn leicht bis stark degradierte DNA-Mengen im Bereich zwischen ungefähr 350 bis 550 pg eingesetzt werden und wenn ausgeprägt bis stark degradierte DNA im Bereich von ungefähr 100 pg DNA eingesetzt wird. Im Gegensatz dazu waren die Recoveries derselben Proben in den meisten Fällen wesentlich reduziert, wenn die STR-Profile mit dem PowerPlex® ESX 17-Kit erstellt wurden. Dieses Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von (Kim et al. 2016) überein, in denen ebenfalls eine erhöhte Recovery von per NGS-sequenzierten Mini-STRs für degradierter DNA festgestellt wurde. In ebendiesen Proben traten in PowerPlex® ESX-erzeugten Profilen allerdings keine Allelic Drop-ins auf, während der maSTR-Assay bei den beschriebenen Proben bis zu maximal vier Allelic Drop-ins zeigte

(**Abbildung 20**). Geringere DNA-Mengen als 100 pg führten unabhängig vom DNA-Degradierungswert zu stochastischen Effekten, wie für den maSTR-Assay in **Abbildung 17** anhand intakter DNA bereits gezeigt wurde.

Degradierete DNA aus Einzelhaaren, die eine noch stärkere DNA-Degradierung als „ausgeprägt bis stark degradierte DNA“ (**Tabelle 3**) und/oder eine geringere eingesetzte DNA-Menge als 100 pg aufweisen, zeigten konsistent eine geringere Recovery als 75% der Referenzallele. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von artifiziell degradierte DNA zeigte extrem degradierte DNA (D-Wert kleiner als 0,01) aus telogenen Einzelhaaren unterhalb 300 pg weder in den maSTR- noch CE-basierten Daten vollständige Profile (**Abbildung 20**). Auch bei diesen Proben verzeichnete der maSTR-Assay mehr konkordante Allele als die CE-basierte Methode, unterlag dieser jedoch in Bezug auf die Anzahl der Allelic Drop-ins, die vor allem bei extrem niedrigen DNA-Mengen und hohen Degradierungswerten in großer Zahl auftraten, während die CE-erzeugten Daten keine Drop-ins aufwiesen (beziehungsweise ein Drop-in, siehe **Kapitel 3.5.7**).

4.5 Vergleich unterschiedlicher Interpretations-Methoden der STR-Profile von DNA aus humanen Einzelhaaren

4.5.1 Composite-interpretierte STR-Profile aus Haaren erreichen höhere Validitätsgrade als Consensus-interpretierte STR-Profile

Der maSTR-Assay zeigte bei degradierte DNA geringer Menge neben den Allelic Drop-outs auch einige Allelic Drop-ins. Diese diskordanten Allele führen dazu, dass die STR-Profile als Mischprofile interpretiert werden könnten. Dabei weisen die Signale zum Teil geringe Read-Zahlen auf und eine Abtrennung zwischen verschiedenen Personen aufgrund unterschiedlicher, konstanter Peak-Höhen, ist nicht möglich, weshalb nicht auf eindeutige Haupt- und Nebenkomponten geschlossen werden kann. Diese Profile entsprechen der Kategorie C in der Klassifizierung der Mischspuren der Spurenkommission (**Kapitel 1.2.3**, (Schneider et al. 2006)). Gemäß dieser ist die biostatistische Berechnungen von Loci in Mischproben dieser Kategorie, welche in der Nähe des Hintergrundrauschens liegen, nicht sinnvoll und daher nicht zulässig (Gill et al. 2006). Teilweise wurden in maSTR-generierten Profilen ebenfalls Drop-ins hoher Read-Zahl detektiert, die jedoch nicht anhand der der Read-Zahlen von konkordanten Allelen unterschieden werden konnten (entspricht Kategorie A, (Schneider et al. 2006)). Das Auftreten von Drop-ins, die in diese beiden Kategorien fallen, legte die Anwendung von Ansätzen nahe, die üblicherweise für die Analyse von LT-DNA angewendet werden (häufig bei der Analyse von Spuren- und *touch*-DNA (Pfeifer et al. 2012)), wie wiederholte STR-Analyse und eine geeignete Interpretationsstrategie (Composite oder Consensus). Für die Bewertung der Composite- und Consensus-Interpretation wurde der Validitätsgrad verwendet (**Kapitel 2.17**, (Pfeifer et al. 2012)), da in dessen Berechnung neben der Anzahl der Allelic Drop-outs auch die Anzahl der Allelic Drop-ins eingeht. Aufgrund der beobachteten hohen Anzahl an Drop-ins im maSTR-Assay wurde angenommen, dass dieser Wert zur Beurteilung der Qualität der STR-Profile besser geeignet sei als die Allel-Recovery.

Der Validitätsgrad nimmt mit abnehmender DNA-Menge und abnehmender DNA-Integrität der DNA aus Haaren ab (**Abbildung 24**). Diese Abnahme des Validitätsgrades wird im Fall der komplementären CE-Kits ESX 17/ESI 17 maßgeblich durch den Ausfall von Allelen und Markern verursacht, jedoch nur zum kleinen Teil durch Allelic Drop-ins. Diese Allelic Drop-ins werden nur in wenigen Fällen detektiert und sind meistens nicht

reproduzierbar. Im Gegensatz dazu weisen die maSTR-basierten Ergebnisse einen höheren Anteil an Allelic Drop-ins auf und liefern trotzdem höhere Validitätsgrade als die CE-basierten Ergebnisse, da die CE-basierten Kits meist mehr Drop-outs aufweisen als die Summe aller stochastischer Effekte (Drop-outs und Drop-ins) der maSTR-Daten. Außerdem fallen in der Formel zur Berechnung des Validitätsgrades (**Kapitel 2.17**) die Anzahl der Allelic Drop-outs etwas mehr ins Gewicht als die Anzahl der Drop-ins.

Sowohl die Ergebnisse der maSTR- als auch der ESX/ESI-generierten Daten zeigen, dass mittels der Consensus-Strategie im Vergleich zur Composite-Strategie die Allelic Drop-ins reduziert werden, jedoch zugleich die Anzahl der ausgefallenen Allele erhöht wird (beispielsweise anhand Haar 23, **Abbildung 24**). Composite-interpretierte STR-Profile weisen in den meisten Fällen höhere Validitätsgrade auf als mittels der Consensus-Strategie erreicht wurde – dies wurde gleichermaßen für maSTR und ESX/ESI-Ergebnisse nachgewiesen. Diese Ergebnisse bestätigen die Befunde von Pfeifer et al. (Pfeifer et al. 2012) und Bright et al. (Bright et al. 2012). Pfeifer et al. merkten bereits an, dass der Consensus-Ansatz als die etablierte Standard-Methode bei DNA großer Menge gilt (Budowle et al. 2009), jedoch bei LT-DNA aufgrund der geringen Reproduzierbarkeit nur geringere Validitätsgrade als der Composite-Ansatz hervorbringt (Pfeifer et al. 2012). Im Gegensatz zu dieser Studie wurden in der vorliegenden Studie nicht die ESX beziehungsweise die ESI-Amplifikationen mehrmals durchgeführt (ESX mit ESX vergleichen und ESI mit ESI vergleichen), sondern die ESX-generierten Profile und die ESI-generierten Profile wurden als Replikate behandelt. Dies ist gerechtfertigt, weil die beiden ESX und ESI-Kits als komplementäre Kits für genau diese Anwendung entwickelt wurden und aufeinander abgestimmt sind (Hill et al. 2011).

4.5.2 Die Composite-Ergebnisse mit hohen Validitätsgraden sind nicht vertrauenswürdig

Trotz der höheren Validitätsgrade von Composite-interpretierten Profilen im Vergleich zu Consensus-interpretierten Profilen, sind in Composite-interpretierten Profilen mehr Allelic Drop-ins enthalten als bei den Consensus-interpretierten Profilen, da einige Drop-ins nicht reproduzierbar waren. Dies gilt gleichermaßen für CE- und NGS-generierte Daten, wobei letztere deutlich mehr Drop-ins aufwiesen als die CE-generierten Daten. Daher unterstützen die Ergebnisse die Empfehlung von Bright et al. (Bright et al. 2012), dass Composite-Interpretationen lediglich in Fällen angewandt werden sollte, in denen die Drop-in-Rate gering ist. Es wäre daher ein Trugschluss, aufgrund des höheren Validitätsgrades bei der Interpretation von STR-Profilen aus DNA telogener Einzelhaare die Composite-Strategie zu bevorzugen, da Composite-ausgewertete Profile mehr Drop-ins aufweisen als es bei Consensus-ausgewerteten Profilen der Fall ist.

Beim Einsatz von hohen Mengen intakter DNA sind Allelic Drop-ins relativ einfach zu erkennen, beispielsweise wenn drei statt maximal zwei Allele in einem heterozygoten Marker generiert werden. In der vorliegenden Studie sind diese Drop-ins jedoch viel schwieriger zu erkennen als in diesem Beispiel-Szenario, da bei degradiertem DNA geringer Menge sowohl Drop-outs als auch Drop-ins im selben Marker in Kombination auftreten können. Bei einem heterozygoten Marker, der zwei Allele zeigt, stellt sich daher die Frage, ob beide Allele konkordant sind oder ein (oder beide) Allel(e) ausgefallen und durch ein (oder zwei) Drop-in(s) ersetzt wurden. Daher verfälschen Drop-ins die STR-Profile wesentlich stärker als es Drop-outs allein vermögen, denn Drop-ins können nicht von realen Allelen unterschieden werden, die tatsächlich im Genom der Person vorkommen, die die untersuchte Spur verursacht hat. In der vorliegenden Studie wurde vor allem die Situation beobachtet, dass Allele in Marker eingesprungen sind, die

ebenfalls Drop-outs aufweisen. Dadurch wird die Nutzbarkeit des gesamten STR-Profiles in Frage gestellt. Die Consensus-Methode scheint in dieser Studie die am besten passende Methode zu sein, um vertrauenswürdige Profile zu generieren, da lediglich reproduzierbare Allele in die Analyse miteingehen.

Zur Verbesserung der Interpretation könnte es sinnvoll sein, mehr als zwei Replikate zur Consensus-Methode zu nutzen, wie von Pfeifer et al. empfohlen wurde. In der Studie von Pfeifer et al. wurde eine Verbesserung der Consensus-Ergebnisse erreicht, wenn die Anzahl der Replikate von zwei auf drei Amplifikationen erhöht wurde, da die Erhöhung der Replikat-Anzahl die Möglichkeit erhöht, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (Pfeifer et al. 2012). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, könnte jedoch mit dem maSTR-Assay künftig getestet werden. Brisant ist dabei jedoch die Frage der Durchführbarkeit: LT-DNA sollte in möglichst hohen DNA-Konzentrationen vorliegen und während der DNA-Extraktion nicht verdünnt werden. Eine möglichst hohe DNA-Konzentration ist für LT-DNA von Bedeutung, da dadurch stochastischen Effekte reduziert werden, die aufgrund zu geringer DNA-Menge verursacht werden. Das Vermindern stochastischer Effekte ist wichtig, da dadurch reproduzierbare Allele gewonnen werden können, was per Consensus-Interpretation analysierten Profilen zugutekommt. Diesen Vorteilen für geringe Elutions-Volumina steht entgegen, dass die Anzahl der möglichen Anwendungen maßgeblich durch das Elutions-Volumen begrenzt wird.

Es wird für die künftige Forschung in diesem Gebiet empfohlen, die Vor- und Nachteile von reduzierten Extraktionsvolumina systematisch zu untersuchen, um in Zukunft Empfehlungen für die beste Probenextraktion und Amplifikation für telogene Einzelhaare verfassen zu können.

4.6 Vergleich der STR-Profile von DNA aus humanen Einzelhaaren mittels alternativer Kits zum maSTR-Assay

Im Fall von minimalen Mengen degradiertes DNA (**Abbildung 18**, **Abbildung 20** und **Abbildung 24**) zeigte der maSTR-Assay wesentlich höhere Allel-Recoveries bzw. Validitätsgrade als die herkömmliche STR-Typisierung durch CE-basierte Kits (PowerPlex® ESX 17 und ESI 17) und war diesen dadurch überlegen. Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Längen der STR-Amplikons der Assays einen entscheidenden Faktor für die höheren Recovery-Werte und Validitätsgrade des maSTR-Assays darstellen, wurden bestimmte DNA-Proben von DNA aus humanen Einzelhaaren zusätzlich mit den komplementären PowerPlex® ESI 17 Fast- und ESX 17 Fast-Kits (Promega) untersucht, sowie mit dem NGS-basierten ForenSeq™ DNA Signature Prep kit (Illumina). Diese Vorgehensweise wurde gewählt, da die Reduzierung der Allel-Längen bekanntermaßen ein effektives Mittel ist, um degradierte DNA zu typisieren, da vor allem lange Amplikons sehr häufig bei der Amplifikation degradiertes DNA ausfallen (Wiegand und Kleiber 2001; Wiegand et al. 2006; Butler et al. 2003; Tsukada et al. 2002; Grubwieser et al. 2006; Hellmann et al. 2001; Opel et al. 2007). Die ESX 17 Fast- und ESI 17 Fast-Kits komplementieren sich gegenseitig, indem in beiden Kits Amplikons verkürzter Längen amplifiziert werden, die in dem jeweils anderen Kit in der längeren Variante generiert werden. Durch den komplementären Ansatz wurden die Amplikate der komplementären ESX/ESI-Kits verglichen, die nicht nur dieselben Marker wie im maSTR-Assay amplifizieren, sondern in Kombination auch ähnliche Längen wie im maSTR-Assay aufweisen (**Abbildung 27**, Boxen „maSTR“ und „ESX/ESI 17 <250bp“) und kürzer als 250 bp sind (**Kapitel 3.5.5**, (Hill et al. 2011)).

4.6.1 Einfluss der Länge der Amplikons anhand des Vergleichs der ESX 17-/ESI 17-Assays mit dem maSTR-Assay

Die komplementäre ESX/ESI-Auswertung von kurzen Amplikons führte zu höheren Validitätsgraden im Vergleich zur separaten ESX beziehungsweise ESI-Auswertung mit Markern, die auch Amplikons umfassen, die größer als 250 bp sind (**Abbildung 25**). Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Beobachtungen von (Pfeifer et al. 2012). Die Längenbereiche der längsten Amplikons der ESX und ESI-Kits reichen von 275 bp bis 475 bp und umfassen die Marker D18S51, D16S539, FGA und SE33 (ACTBP2) (ESI 17 Kit) beziehungsweise D22S1045, D10S1248, D2S441, D12S391 und SE33 (ACTBP2) im ESI 17 Kit. Da degradierte DNA besonders anfällig für Allelic Drop-outs der langen Amplikons ist, fielen vor allem die längeren Amplikons bei Amplifikation der Proben der telogenen Einzelhaare aus, was geringere Validitätsgrade für die separaten ESX und ESI-Auswertungen bedingte in Relation zur komplementären Auswertung der kurzen Amplikons der komplementären ESX/ESI-Marker und der Auswertung der sehr kurzen maSTR-Amplikons (**Abbildung 16**).

Ergebnisse des NGS-basierten Assays, von dem lediglich diejenigen Marker ausgewertet wurden, die in „ESX/ESI“ genutzt wurden („maSTR kurz“; **Abbildung 25**) unterschieden sich kaum von den Ergebnissen, in denen alle Marker genutzt wurden („maSTR alle“), da lediglich drei Marker nicht genutzt wurden, die wie alle Marker im maSTR-Assays sehr kurz sind und daher weniger anfällig für DNA-Degradierung sind als es bei CE-basierten Kits der Fall ist. Das längste in dieser Studie genutzte Allel des maSTR-Assays ist das Allel 28.2 des Markers SE33 (ACTBP2) mit einer geringen Länge von 252 bp.

Zusammenfassend legen Untersuchungen nahe, dass die Länge der Amplikons einen entscheidenden Faktor darstellt, um die erhöhten Validitätsgrade und Recovery-Werte des maSTR-Assays zu erklären.

4.6.2 NGS-basierte Methoden sind CE-basierten forensischen STR-Assays nicht generell überlegen

In keinem der untersuchten Fälle überstiegen die Validitätsgrade der komplementären ESX/ESI-Auswertung diejenigen des maSTR-Assays (**Abbildung 25**). Diese Beobachtung scheint die Hypothese zu unterstützen, dass die NGS-Methode sensitiver ist als die CE-basierte Methode für die Analyse degradiert DNA geringer Menge. Neben dem niedrig gelegten analytischen Schwellenwert des maSTR-Assays, der für diese hohe Sensitivität mit verantwortlich ist, spricht ein weiterer Punkt gegen eine solche generalisierte Aussage: Die Analysemethoden unterscheiden sich sehr stark voneinander, da die kapillarelektrophoretische Unterscheidung der Fragmentlängen nach anderen Prinzipien erfolgt als die NGS-basierte Methode.

Der Frage, ob die NGS-Methode sensitiver ist als die CE-basierte Methode für die Analyse degradiert DNA geringer Menge, wurde durch den Vergleich mit einem kommerziellen NGS-basierten Kit nachgegangen. Gleichzeitig soll untersucht werden, ob sich die hohe Anzahl an Markern des ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kits in einer höheren Anzahl an konkordanten Allelen niederschlägt, im Vergleich zu CE-Kits und dem maSTR-Assay.

Dafür wurden bestimmte Proben von DNA aus humanen Einzelhaaren mit dem ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit (Illumina) sequenziert und mit den maSTR-Daten verglichen. Der Vergleich zwischen NGS-basierten und CE-basierten Methoden ist vor allem deswegen sinnvoll, weil in jüngeren Studien gezeigt werden konnte, dass NGS ein geeignetes Mittel zur Analyse degradiert DNA darstellen könnte (Müller et al. 2019; Kim et al. 2016) – obwohl degradierte DNA vermehrt stochastischen Fehlern unterworfen

ist. Der Vergleich des maSTR-Assays mit dem ForenSeq™-Kit ist insbesondere deswegen sinnvoll, weil das ForenSeq™-Kit auf der gleichen analytischen Plattform (Illumina Miseq FGx™) beruht wie der maSTR-Assay.

Trotz der hohen Anzahl an kurzen Amplikons fallen einige Amplikons des ForenSeq™-Kits in Längenbereiche, wie sie auch in den ESX 17- und ESI 17-Kits vorkommen (**Abbildung 27**) und sind dadurch wesentlich länger als die im maSTR-Assay verwendeten Amplikons. Die aSTRs des ForenSeq™ DNA Signature prep-Kit (Illumina) reichen bis zu 237 bp (Marker D12S391). Die einzige Ausnahme bildet der aSTR-Marker Penta E, dessen Amplikons bis zu über 362 bp reichen können.

Das ForenSeq™ DNA Signature prep-Kit weist eine hohe Anzahl an STR-Markern auf, da die maximale Anzahl an Multiplex-Markern nicht durch technische Vorgaben begrenzt ist, wie es bei der Kapillarelektrophorese der Fall ist. Daher muss für einen Vergleich zwischen unterschiedlichen Assays neben den Unterschieden in den Amplikon-Fragmentlängen auch die Gesamtzahl der Amplikons Assay betrachtet werden. Im Gegensatz zum Vergleich des maSTR-Assays zu den ESX 17 beziehungsweise ESI 17 Fast-Kits werden im Vergleich zum ForenSeq™-Kit nicht exakt dieselben Marker untersucht. Im ForenSeq™-Kit sind alle Marker des maSTR-Assays enthalten mit Ausnahme von SE33. Zusätzlich sind im ForenSeq™-Kit zwölf weitere Marker enthalten.

Diese hohe Multiplexierung und die Nutzung langer Amplikons (in Relation zum maSTR-Assay und der komplementären ESX/ESI-Auswertung) könnte erklären, dass der ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit im Vergleich mit den EX17 und ESI 17 Fast-Kits und dem in-house entwickelten maSTR-Assay geringere Allel-Recoveries, aber eine hohe absolute Anzahl an korrekt typisierten Allelen (**Abbildung 28**) für geringfügig degradierte Haare aufwies in DNA-Mengen oberhalb 20 pg. Die hohe Multiplexierung des ForenSeq™-Kits erfüllte bei diesen Proben den Zweck, durch eine hohe absolute Anzahl an amplifizierten Markern, nutzbare Teilprofile zu erzeugen, selbst wenn prozentual weniger Allele in Relation zu den verglichenen Assays amplifiziert wurden.

Bei stark degradierter DNA geringer Menge unter 20 pg führte die geringere Recovery des ForenSeq™-Kits dazu, dass eine geringere Anzahl an Allelen gewonnen wurden, als es mit den CE-basierten ESX 17 und ESI 17 Fast-Kits, sowie dem maSTR-Assay der Fall war. In diesen Fällen scheinen die CE-basierten Kits den anderen Assays überlegen, da selbst in diesem Mengenbereich keine (mit einer Ausnahme) Drop-ins auftraten, während der maSTR-Assay viele Drop-ins verzeichnete. Die hohe Anzahl der Marker des ForenSeq™-Kits ist daher nicht von Vorteil, wenn die prozentuale Recovery sehr gering ist. Dies könnte ein Hinweis auf sehr stringente Schwellenwerte sein oder ein Hinweis auf eine geringe Empfindlichkeit des ForenSeq™-Kits gegenüber den anderen Methoden. Mit dem ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit können bis zu 96 Proben/Amplikon-Bibliotheken erstellt und zusammen sequenziert werden. Geringe Empfindlichkeit könnte durch präferentielles Beladen (aufgrund unzureichender Normalisierung) der *Flowcell* mit Proben bedingt worden sein, die in zu großer DNA-Menge eingesetzt wurden, wodurch der Großteil der Adapter auf der *Flowcell* mit derjenigen DNA besetzt wurde, die in hoher Menge vorhanden ist. Die Auswertung der Rohdaten mittels der Illumina Universal Analysis Software (UAS) ergab, dass lediglich die Referenzprofile und das Haar 2 die Minimalmenge von 85.000 absoluten Reads pro Profil überschritten, die von Illumina als Maßstab angegeben werden. Das per ForenSeq™-Kit sequenzierte Haar 5 erreichte 10.000 Reads und alle restlichen Proben wiesen weniger als 2.000 Reads pro Profil auf. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der Beobachtung, dass umso weniger effektive Reads im maSTR-Assay generiert werden, je stärker die DNA degradiert ist und je weniger DNA-Menge eingesetzt wurde. Für die maSTR-Analyse wurde die Marke von mindestens 11.050 effektiven Reads pro STR-Profil von besonders stark degradierter DNA geringer

Menge zum Teil nicht erreicht (**Abbildung 23 B**). Die geringen Readzahlen könnten eventuell durch dadurch verursacht worden sein, dass degradierte DNA in der initialen PCR ineffizient amplifiziert wurde und die geringe Template-Menge nicht ausreichte, um in der PCR ausreichende PCR-Produkte zu erzeugen, die auf die *Flowcell* geladen wurden. Deswegen könnte in die Sequenzierung zu wenig DNA eingesetzt worden sein, die erfolgreich sequenziert werden kann.

Die mittels des ForenSeq™-Kits sequenzierten Marker resultierten in Read-Mengen pro Proben für aSTR und Amelogenin, die der DNA-Menge und DNA-Integrität der jeweiligen Proben entsprachen und sich mit der Anzahl an absoluten Reads pro Profil deckten (**Tabelle 6**): DNA aus Haaren, die in ausreichender Menge und Integrität eingesetzt wurde, konnte korrekt typisiert werden und entsprach dem Referenzprofil, das bereits über CE-Analytik und dem maSTR-Profil bestimmt werden konnte. DNA aus Haaren, die in minimalen Mengen und stark degradiert vorlag, konnte weder mittels der STR-Marker, noch der SNP-Marker amplifiziert werden. Es wird ausgeschlossen, dass Fehler in der Sequenzier-Reaktion oder der nachträglichen Analytik der Software für diese geringe Anzahl der Reads dieser Proben vorhanden sind, da die Qualitätswerte aller Sequenzen innerhalb der Grenzwerte lagen und die Referenzprofile mit den STR-Profilen übereinstimmten, die mit der herkömmlichen Methode (CE-Analytik in Kombination des PowerPlex® ESX 17-Kits) erstellt wurden. Obwohl SNP-Marker durchschnittlich etwas kürzere Amplikons aufweisen als STR-Marker, zeigten die SNP-Marker keine erhöhte Typisierbarkeit. Dies könnte dem Umstand geschuldet sein, dass die STR-Marker nur geringfügig länger sind als die SNP-Marker, der Unterschied daher nicht wesentlich ins Gewicht fällt.

Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten und wenig Hintergrundrauschen zu generieren, nutzt das ForenSeq™-Kit und die zugehörige UAS Software stringente Schwellenwerte, die im Fall der nicht typisierbaren Einzelhaare die geringe Anzahl an Reads bedingen könnten. Es wird daher angenommen, dass zwar PCR-Produkte erzeugt wurden, die Sequenzdaten jedoch nicht den analytischen Schwellenwert überschritten haben. Um die Auswirkungen der Schwellenwerte auf die Empfindlichkeit zu testen, wurde der analytische und Interpretations-Schwellenwert für die ForenSeq™-Ergebnisse nachträglich manuell herabgesetzt. Dadurch verbesserte sich die Allel Recovery nur geringfügig (**Abbildung 28**), die Anzahl der Drop-ins stieg jedoch an. Proben, die mit den voreingestellten Schwellenwerten nicht typisiert werden konnten, konnten auch mit den niedrigeren Schwellenwerten keine Recoveries erreichen, die für typisierbare Profile ausreichend wären, um Personen eindeutig zu identifizieren. Da die Standardeinstellung der ForenSeq™-Schwellenwerte zu keinen Drop-ins führte, scheinen die von Illumina gesetzten Schwellenwerte maximal empfindlich gesetzt zu sein, um verlässliche Profile zu liefern, sofern die DNA-Menge und Integrität ausreichend sind. Eine generell erhöhte Empfindlichkeit des ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kits gegenüber den anderen Assay konnte daher nicht festgestellt werden.

Das ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit scheint also nicht für den Einsatz mit DNA aus telogenen Einzelhaaren geeignet zu sein, da trotz der hohen Anzahl an Markern mit sehr kurzen Amplikonlängen in Relation zu den alternativen Assays lediglich eine sehr geringe Anzahl an Allelen amplifiziert wurde. Dies bestätigt die Ergebnisse aus Evaluierungsstudien zu diesem Kit, in denen der Kit vollständige, reproduzierbare und konkordante Ergebnisse lieferte, sofern mindestens 500 pg DNA eingesetzt wurde, wobei der Großteil der Allele bereits mit 100 pg detektiert werden kann (Churchill et al. 2016; Xavier und Parson 2017). Der maSTR-Assay ist daher dem ForenSeq™ leicht überlegen, da er etwas sensitiver ist. Für den DNA-Mengenbereich unterhalb 62,5 pg wurden diskordante Allelen bei der Analyse mittels ForenSeq™-Kit festgestellt, die in der Anzahl

zunahmen, je weniger DNA verwendet wurde (Jäger et al. 2017). Der maSTR-Assay zeigt diskordante Allele bereits in höheren Mengenbereichen (**Abbildung 17**). Für moderne CE-Kits werden etwas niedrigere Empfindlichkeitsgrenzen festgestellt, weswegen sie für DNA aus telogenen Haaren besser geeignet sind als das ForenSeq™ DNA Signature Prep-Kit. Beispielsweise wurden für den ESX 17-Kit vollständige Profile mit einer Peak Height Ratio (PHR) von mehr als 60% bei Einsatz von 62,5 pg intakter DNA festgestellt (Tucker et al. 2012), während die Grenzen für die Empfindlichkeit für vollständige Profile bei den ESX 17 Fast- und ESI 17Fast-Kits bei mindestens 125 pg liegen (McLaren et al. 2014).

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass die reduzierten Recoveries des ForenSeq™-Kits im Vergleich zu der herkömmlichen Methode der Kapillarelektrophorese und des NGS-basierten maSTR-Assays keine konkreten Schlussfolgerungen auf die Empfindlichkeit der NGS-Analytik im Vergleich zur CE-basierten Analytik erlauben.

Aufgrund des geringen Umfangs des Probenkollektivs von **Abbildung 28** (sechs Haare) wird empfohlen den Vergleich der ForenSeq™-Methode mit dem maSTR-Assay und den CE-basierten ESX 17 und ESI 17 Fast-Kits mit mehr Proben zu wiederholen und in großer Replikanzahl zu testen. Dadurch soll gewährleistet werden, dass statistisch signifikante Ergebnisse über die Reproduzierbarkeit und Robustheit der untersuchten Methoden gewonnen werden, sowie ein Trend zu der Eignung der verschiedenen Analyse-Methoden abgeleitet werden kann. Im besten Fall könnte dies dazu beitragen die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen.

4.7 Bewertung der DNA humaner Haare mittels probabilistischer Verfahren

Die STR-Profile von acht ausgewählten DNA-Proben aus menschlichen Einzelhaaren wurden mit der Software GenoProof Mixture 3 (qualitytype GmbH (Götz et al. 2017)) erneut ausgewertet, mit der die Likelihood-Quotienten von NGS-basierten und CE-basierten STR-Profilen mit probabilistischen Methoden in einer semi- und vollständig kontinuierlichen Weise berechnet wurden. In vollständig kontinuierlichen Modellen sorgt eine Reihe von Simulationen für die statistische Gewichtung aller möglichen Genotypkonstellationen und die Auflösung von Haupt- und Nebenkomponten (Taylor et al. 2013). Dies erhöht die Aussagekraft des Likelihood-Quotienten im Vergleich zu semikontinuierlichen Modellen, bei denen nur Wahrscheinlichkeiten von Drop-Ins und Drop-Outs betrachtet werden. Probabilistische Berechnungen werden daher häufig für die Analyse von Mischspuren angewandt. Im Fall von STR-Profilen aus degradierten DNA-Spuren geringer Menge sollte damit untersucht werden, ob sich probabilistische Methoden zur Analyse von Proben eignen, die keine Mischproben darstellen, aber sehr viele stochastische Effekte und eine geringe Reproduzierbarkeit aufweisen, was typisch ist für LT-DNA. Aufgrund von übermäßigen Drop-out- und Drop-in-Ereignissen, hohen Stotter-Allelen und insgesamt inkonsistente Wiederholbarkeit, die typisch sind für degradierte DNA geringster Menge (Gill et al. 2012), wichen die bereits diskutierten STR-Profile der DNA-Proben zum Teil erheblich vom korrekten Profil des Spenders ab.

Um die Auswirkungen der Allelic Drop-ins einzuschätzen, wurden daher Ansätze angewandt, die üblicherweise für die Analyse von DNA mit LT-DNA genutzt werden (häufig bei der Analyse von Spuren- und touch-DNA (Pfeifer et al. 2012)), wie wiederholte STR-Analyse und die Bestimmung einer Interpretationsstrategie (Composite oder Consensus, siehe **Kapitel 3.5.4**).

Weiterhin können ebenfalls probabilistische Ansätze von Vorteil sein, wenn mehr als zwei Drop-ins an mehr als zwei Loci in einem LT-DNA-Profil auftreten und ein gemischtes STR-Profil vortäuschen (Gill et al. 2012) und stochastische Effekte auftreten, die typisch für LT-DNA sind (Edson et al. 2013). Aufgrund dessen wurden die Consensus- und Composite-interpretierten Ergebnisse miteinander verglichen (**Abbildung 29**) und die interpretierten STR-Profile mit per semi- und vollständig kontinuierlichen Berechnung per GenoProof Software (qualitytype GmbH) angewandt (**Abbildung 30**). Aufgrund der Vielzahl an Allelic Drop-ins wurden die NGS-erzeugten Profile nicht per Composite- sondern per Consensus-Methode interpretiert. Im Gegensatz dazu wurden die CE-generierten STR-Profile per Composite-Methode interpretiert, da die Daten nur wenige Allelic Drop-ins, jedoch eine Vielzahl an Drop-outs aufwiesen, im Vergleich zu den NGS-generierten Profilen.

Da die maSTR-generierten Profile eine schlechte Reproduzierbarkeit aufwiesen, führte die Consensus-Auswertung zu einem großen Verlust von Allelen, wodurch die vollständig kontinuierliche probabilistische Berechnung der maSTR-generierten STR-Profile keinen bedeutenden Vorteil gegenüber CE-basierten Profilen erbrachte. Degradierete DNA aus Haaren, die mit weniger als 20 pg pro Reaktion eingesetzt wurden (Haar 23, 21, 18, 28) wies viele stochastische Effekte auf und ergaben daher sehr niedrige Validitätsgrade. Diese Proben erreichten mittels probabilistischer Berechnungen lediglich sehr niedrige *Likelihood Ratios*, wodurch die Herkunft der DNA von Personen, die mit der Person, von der das Haar stammt, nicht verwandt sind, statistisch nicht widerlegt werden konnte. Da jedoch diese STR-Profile Drop-outs und Drop-ins zeigten, die nicht unterschiedlichen Komponenten zugeordnet werden können und zum Teil im stochastischen Bereich lagen, können diese zu Mischspuren der Kategorie C (Schneider et al. 2006) gezählt werden. Biostatistische Berechnungen von Loci in Mischproben dieser Kategorie, welche in der Nähe des Hintergrundrauschens liegen, sind nicht sinnvoll und daher nicht zulässig (Gill et al. 2006). Daher wurde in Kauf genommen, dass durch die Consensus-Interpretation Allele verloren gehen, sofern die Drop-ins reduziert wurden, wodurch die biostatistische Berechnung ermöglicht wurde.

Die genutzte Vorgehensweise führte zu manchen Auffälligkeiten: Für NGS-erzeugte Daten, bei denen nur ein Allel eines heterozygoten Locus nachgewiesen werden konnte, wobei das eine Allel eine hohe Readzahl zeigte, waren die vollständig kontinuierlich berechneten *Likelihood Ratios* gleich Null und erzeugte dadurch einen Ausschluss (Haare 28, 23 und Pool, **Abbildung 30**). Das wurde dadurch verursacht, dass die Software aufgrund des hohen Allels von einem homozygoten Marker ausging und daher nicht mit dem heterozygoten Referenzprofil an diesem Marker übereinstimmen kann. Wären die Rohdaten des NGS-erzeugten Profils eingelesen worden, wäre dieses Problem eventuell nicht aufgetreten. Diese vermeintliche Homozygotie ist – zumindest für die NGS-erzeugten Profile – vermutlich auf die ausgeprägten Allel-Imbalancen zurückzuführen, die mit dem maSTR-Assays verursacht wurden. Im Gegensatz dazu kam es bei CE-basierten Profilen nur bei einem Haar (28) zu einem falschen Ausschluss, der aufgrund sehr geringer DNA und starker Degradierung ohnehin nicht ausreichend typisiert werden konnte. Die vollständig kontinuierliche Methode eignet sich vor allem für CE-erzeugte Profile.

Die binäre Berechnung des LR mit maSTR-generierten Profilen war lediglich für Haare erfolgreich, die den maximalen Validitätsgrad von 100% erreichten (Haar 3 und 9). Für CE-generierte Profile gelang die binäre LR-Berechnung lediglich für Haar 9. Die LR-Werte lagen dabei auf einem gleich hohen Wert ($2E+21$) wie für die vollständig kontinuierliche Berechnung. Aufgrund des Auftretens von Drop-outs und Drop-ins wurden in den restlichen Proben Ausschlüsse erzeugt, weshalb der LR mit Null angegeben wurde.

Diejenigen Marker, welche diese Effekte zeigten, hätten aus der Berechnung ausgeschlossen werden können, um Ausschlüsse zu umgehen. Dadurch wäre es möglich gewesen LR-Werte zu berechnen, die jedoch aufgrund der geringen Anzahl an genutzten Markern vermutlich sehr kleine Werte ergeben hätten und daher nicht aussagekräftig gewesen wären. Daher wurde auf diese Vorgehensweise verzichtet.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass lediglich DNA aus Haaren, die wenige stochastische Effekte aufwies, per semi- und vollständig kontinuierlicher probabilistischer Berechnung hohe *Likelihood Ratios* erzeugten. NGS-generierte Profile wiesen gegenüber CE-generierten Profilen keinen signifikanten Vorteil auf. Es wird angenommen, dass dies vor allem dem Umstand geschuldet ist, dass lediglich numerische Informationen der maSTR-generierten Profile in die GenoProof Software eingeladen wurden (**Kapitel 2.18**). Dies hatte zur Folge, dass die vollständig kontinuierliche Berechnung lediglich für die CE-basierten Profile aus Haaren und die Referenzprofile sinngemäß genutzt wurde, da die Elektropherogramme in die GPM3 Software eingeladen wurden und die Berechnung auf Basis der Elektropherogramme erfolgen konnte. Im Gegensatz dazu wurden lediglich die zwei Allele der NGS-generierten maSTR-Profilen für die Berechnung genutzt, welche in größter Anzahl vorhanden waren und welche die Schwellenwerte (analytisch, stochastisch, Stotter) überstiegen und manuell per Consensus-Interpretation ausgewertet. Dadurch wurden lediglich die reproduzierbaren, rein numerischen Informationen über Allel-Nummern, Anzahl der Reads und Fragmentlängen der maSTR-generierten STR-Profilen für die Berechnung genutzt. Das biologische Modell, das auf dem komplexen Zusammenhang von DNA-Menge und -Degradierung, Amplifikationseffizienz, Fragmentlänge und Hetero- bzw. Homozygotie basiert (**Kapitel 1.2.4**), konnte daher nicht sinngemäß auf die maSTR-generierten Daten angewandt werden. NGS-basierte Daten sind generell nicht mit der Software kompatibel, da das biologische Modell u.a. in Bezug von DNA-Degradierung keine Anwendung findet: Da alle Marker in NGS-Assays in etwa uniforme Längen besitzen sollten, um Imbalancen zu vermeiden, werden alle Marker ähnlich gut bzw. ähnlich schlecht amplifiziert, weshalb kein Skipisten-Effekt im Profil auftritt. Dadurch wird davon ausgegangen, dass die Berechnung des LR-Werts auf Basis der maSTR-Profilen vor allem auf den Allelfrequenzen basiert. Dies könnte erklären, dass sich die Ergebnisse der semikontinuierlichen Methode nur unwesentlich von den Ergebnissen der vollständig kontinuierlichen Methode unterscheiden.

4.8 Derzeitige Schwächen des maSTR-Assays und Empfehlungen für mögliche Optimierungen

Im Zuge der Analysen wurden einige Schwächen des maSTR-Assays erkennbar, die zum Teil bereits in den thematisch passenden Kapiteln diskutiert wurden (**Kapitel 4.2.3** und **4.2.4**). Auf weitere Schwächen wird im Folgenden eingegangen, und es werden Möglichkeiten genannt, wie diese künftig adressiert werden könnten.

Das Auftreten von Allelic Drop-ins des maSTR-Assays, die sowohl in niedriger als auch höherer Read-Zahl auftreten als die konkordanten Allele, können durch unterschiedliche Ursachen hervorgerufen worden sein (siehe **Kapitel 4.2.3** und **4.2.4**). Es stellte sich heraus, dass neben der Behebung der Ursachen, die zum Auftreten von Allelic Drop-ins führen, ebenfalls die Vorgehensweise angepasst werden sollte, mit der Allelic Drop-ins gezählt werden. Gemäß der maSTR-Pipeline wurden nur diejenigen Allele als tatsächliche Allele detektiert, die den am häufigsten vorkommenden Allelen im jeweiligen Marker entsprechen und alle Schwellenwerte überstiegen. Fielen jedoch beide Allele beziehungsweise das homozygote Allel des Markers aus, wurden die Drop-ins detektiert

und als Allele gezählt, sofern sie den analytischen, stochastischen und gegebenenfalls den Stotter-Schwellenwert überstiegen (siehe **Kapitel 3.5.3** und **Abbildung 22**). Hieraus folgt, dass – zumindest in einem Teil der Proben – das Auftreten von Drop-outs und Drop-ins in Kombination zu hoher Anzahl an Drop-ins führten, da der Ausfall eines oder beider konkordanten Allele das Einspringen eines oder zweier anderer, diskordanter Allele ermöglichte. Dieser Zusammenhang zwischen Allelic Drop-outs und Drop-ins könnte den Grund für nicht-vorhandene Allelic Drop-ins in STR-Profilen hoher Allel-Recovery darstellen. Diese Behauptung wird dadurch gestützt, dass Drop-ins der maSTR-generierten Profile in umso höherer Anzahl auftraten, je stärker die DNA degradiert war (**Abbildung 18**) und je geringer die eingesetzte DNA-Menge (**Abbildung 17**) war, wodurch mehr Drop-outs auftraten. Die Zunahme von Drop-outs ist typisch für LT-DNA (siehe **Kapitel 1.5.2** und **1.5.3**), wodurch das Einspringen diskordanter Allele (Drop-in) in das STR-Profil ermöglicht werden konnte. In künftigen Optimierungen des maSTR-Assays sollte überprüft werden, ob sich neben den konkordanten Allelen in jedem Marker weitere Signale oberhalb der Schwellenwerte befinden, um mögliche Drop-ins besser zu identifizieren und zu zählen, sodass diese mit in die Statistik eingehen. Höher gelegte Schwellenwerte könnten hierbei zumindest für Drop-ins niedriger Readzahlen Abhilfe schaffen (**Kapitel 4.2.4**).

Um das Ausmaß und die Ursache von aufgetretenen Imbalancen und Allelic Drop-ins zu untersuchen, wird empfohlen die bisherigen Ergebnisse des maSTR-Assays explizit mittels bestimmter Kennzahlen wie der Interlocus- und Intralocus-Balance und der gesamten Abdeckung (englisch *coverage*) zu analysieren, damit mögliche Ursachen gezielt untersucht werden können und der maSTR-Assay in Folge gezielt angepasst werden kann. Diese Kennzahlen könnten als *Quality gates* dienen, um den Fortschritt der Optimierung des maSTR-Assays zu bewerten.

Die Evaluierung von NGS-basierten forensischen Assays erfolgt häufig durch die Untersuchung der Zuverlässigkeit, Empfindlichkeit und Konkordanz durchgeführt, sowohl von Ein-Personen-DNA als auch mittels Mischspuranalysen, sowie herausfordernden Proben wie degradierter DNA geringer Menge. Dies wurde für den maSTR-Assay bereits durchgeführt. Die Genauigkeit, die Abdeckung (*depth of coverage*, DoC, in der forensischen Molekulargenetik üblicherweise angegeben als angegeben als die Anzahl der Reads pro Locus) und Balance der Allel werden in vielen Veröffentlichungen als informative Metrics für die Qualität der Daten angegeben (Churchill et al. 2016; Xavier und Parson 2017) und sollten daher ebenfalls für den maSTR-Assay genutzt werden. Weiterhin wird empfohlen die Allel-Abdeckungs-Rate (ACR) und die Sequenz-Abdeckungs-Rate (SCR) der Daten pro Lauf automatisiert zu berechnen und zu vergleichen.

Die sogenannte Sequenz-Abdeckungs-Rate (*sequence coverage ratios*, SCRs) verwendet die Basenpaar-Sequenz der STR-Allele gegenüber der Wiederholungsstruktur der Allele. SCRs werden in der Regel berechnet, indem die Anzahl der Reads, die verwendet wurden, um Allel-Calls mit nominaler Wiederholungslänge durchzuführen, und die Anzahl der Reads, die PCR-Artefakten zugeschrieben wurden, durch die Gesamtzahl der Reads bei diesem Marker dividiert werden (Churchill et al. 2016). Beispielsweise unterscheidet die prozentuale Aufteilung des SCRs in Studien von (Guo et al. 2017) in wahre Allele, Sequenz-basiertes Rauschen (englisch *noise*; SN) und Längen-basiertes Rauschen (LN) an jedem Marker.

Die Intralocus-Balance wird häufig angegeben als das Verhältnis der Read-Anzahl der einzelnen Allele zueinander, innerhalb eines Markers (oder gemittelt über alle Markers des Assays). Als Metric für die Intralocus-Balance wird häufig die Allel-Abdeckungs-Rate (*Allele Coverage Ratio*, ACR) verwendet. Diese wird berechnet, indem das Allel mit der

niedrigeren Abdeckung (Anzahl der Reads pro Allel) durch das Allel mit der höheren Abdeckung an diesem Locus dividiert wurde (z. B. $400X/450X = 0,89$; 1,0 bedeutet gleiche Abdeckung) (Churchill et al. 2016; Gill et al. 2000a). Aufgrund ihrer Definition ist die Berechnung identisch mit der klassischen Berechnung des *peak height ratios* (SWGDM 2010) für die Analyse der Interlocus-Balance von CE-generierten Profilen, der für die Beurteilung des stochastischen Schwellenwertes verwendet wird, und hat dieselbe Aussagekraft (siehe **Kapitel 4.2.4**): Bei Werten oberhalb 60% gelten Allele des Markers als balanciert. Gut balancierte Allele reduzieren dabei das Auftreten von Allelic Drop-outs. Aufgrund der Anfälligkeit degradierter DNA geringer Menge für das Auftreten stochastischer Effekte, empfiehlt sich die Darstellungsweise der ACR in Korrelation zur DNA-Menge als Heat Map wie in (Silvery et al. 2020).

Weiterhin sollte die Interlocus-Balance (die Marker Abdeckung, englisch *Coverage* in %) untersucht werden. Durch diese Analyse der Abdeckungs-Verteilung (englisch *Distribution*) der Marker soll sichergestellt werden, dass die pro Profil erzeugten Reads nicht in über- oder unterproportionaler Weise auf bestimmte Marker fallen, die besonders gut beziehungsweise besonders schlecht performen, woraus Drop-outs resultieren können. Die Interlocus-Balance wird häufig dargestellt als Read-Anzahl pro Marker in mehreren Replikaten im Vergleich zu allen Markern innerhalb des Assays, in absoluten Zahlen (dargestellt als die Depth of Coverage, DoC (Guo et al. 2017)) oder relativen (Montano et al. 2018) Angaben. Im Idealfall sind alle Marker gleich gut abgedeckt innerhalb des Assays, wodurch die Anzahl der Reads pro Marker genau dem Prozentsatz entsprechen würde, zu dem der Marker im Assay vertreten ist (beispielsweise 5% bei einem Assay, der aus 20 Markern bestehend). Je balancierter die Read-Anzahl aller Amplikons ist, desto besser werden Allelic Drop-outs reduziert.

Im Fall von Imbalancen ist von einer präferentiellen Amplifikation auszugehen, die durch unterschiedliche Performance der Marker oder Allele verursacht wird, da diejenigen Reads am häufigsten amplifiziert wurden, die in der ersten Amplifikation (PCR) bevorzugt wurden. Diese nehmen in der nachfolgenden Sequenzierung einen größeren Teil der *Flowcell* ein im Vergleich zu Amplikons, die nicht übermäßig amplifiziert oder im geringeren Maß amplifiziert wurden, als es im Optimalfall geschehen sollte. Aufgrund dessen ist es möglich, dass bei komplett aufgelasteter *Flowcell* die unteramplifizierten Amplikons nicht sequenziert wurden, da der Großteil der Adapter auf diejenigen Amplikons gefallen ist, die im Übermaß vorhanden waren. Da die nachfolgenden PCRs nach der initialen Multiplex-PCR zur Erstellung der Bibliotheken von Illumina entwickelt und validiert wurden, wird angenommen, dass die Ursprünge für die Imbalancen bei der initialen Multiplex-PCR geschehen und anschließend durch die weiteren Schritte vermehrt werden.

Um die Interlocus-Balancen zu verbessern, könnte künftig beispielsweise die Primer-Abmischung angepasst werden, die in den bisherigen maSTR-Läufen in äquimolaren Konzentrationen angesetzt wurde. Die Amplifikation bisher unterrepräsentierter Marker könnte abgehoben und die Amplifikation überrepräsentierter Marker herabgesetzt werden und die Erfolge dieser Vorgehensweisen könnten mit den genannten Kennzahlen validiert werden. Es wird empfohlen diese Kennzahlen genauestens für die Analysen des maSTR-Assays zu untersuchen, da jüngere Studien bereits zeigen, dass NGS-basierte Sequenzierung im Gegensatz zu CE-basierten Methoden selbst bei degradierter DNA vielversprechend ist – trotz der vermehrten stochastischen Fehler (Müller et al. 2019; Kim et al. 2016). Neben den Primer-Abmischungen wird empfohlen, die Parameter der initialen Multiplex-PCR systematisch zu untersuchen, wie es beispielsweise von (Ganschow et al. 2018b) bereits im *Design of Experiments* durchgeführt wurde, mit dem Ziel, die optimale Kombination der Amplifikationsbedingungen zu finden. Neben der

Anzahl der PCR-Zyklen und der Elongations-Dauer stellten sich vor allem die Annealing-Temperatur und -Dauer als besonders einflussreich heraus. Weitere Faktoren wären die Zusammensetzung des Mastermixes, wie beispielsweise die Menge und Aktivität, sowie die *Proofreading*-Aktivität der Polymerase, sowie Zusätze, welche die Robustheit verbessern.

Weiterhin wurde beobachtet, dass mit abnehmender Zahl der effektive Reads in Korrelation die Anzahl der Allelic Drop-ins zunehmen und die Recoveries abnehmen (**Abbildung 21** und **Abbildung 23**) und einige Haare wiesen weniger als 11.050 effektiven Reads pro Profil auf (**Abbildung 23 B**, **Kapitel 4.2.4**). Der maSTR-Assay sollte daher künftig dahingehend verbessert werden, dass vor allem der Parameter „Effektive Reads [%] der gefilterten Reads“ erhöht wird. Dieser Parameter zeigt, dass ein großer Teil der Sequenzdaten zwischen dem Filtern und der Bestimmung der STR-Allele verloren gehen (**Tabelle 5**). Daran könnte von der Sequenzqualität und einem Überclustering geschuldet sein (**Kapitel 4.2.2**). In der künftigen Optimierung des maSTR-Workflows sollte daher das Problem eines möglichen Überclustering behoben werden, indem beispielsweise weniger DNA der gepoolten Bibliothek eingesetzt wird, die Diversität angehoben wird und die PCR-Produkte eventuell besser gereinigt werden (Manual "Cluster Density" (Illumina)).

5. SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

5.1 Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Vorgehensweise zu entwickeln, mit der Einzelhaare selektiert werden können, die erfolgsversprechende Eigenschaften für eine nachfolgende STR-Typisierung aufweisen. Zu diesem Zweck wurde eine hochsensitive, für die Analyse von Einzelhaaren geeignete qPCR-Methode entwickelt, mit der es möglich ist, sowohl die DNA-Menge als auch die DNA-Degradierung zu bestimmen. Die dafür genutzten Zielsequenzen der ribosomalen DNA sind für diesen Zweck geeignet, da sie als *multi-copy-Locus* vielfach in der menschlichen DNA vertreten sind, wodurch der qPCR-Assay hochsensitiv ist. Da ribosomale DNA evolutionär konserviert und ubiquitär vertreten ist, ist das qPCR-Prinzip einfach und kostengünstig auf andere Spezies übertragbar. Um eine gewissen Spezies-Spezifität zu gewährleisten, werden Zielsequenzen in der Promotor-Region genutzt, die nur wenig konserviert sind. Die mit dem qPCR-Assay gemessenen DNA-Mengen und -Integritäten sind zur Bewertung des Erfolges der STR-Typisierung von degradierter DNA im Allgemeinen und von DNA aus ausgefallenen Einzelhaaren im Speziellen gut geeignet. Im Gegensatz dazu stellt die Morphologie der ausgefallenen Haare kein gutes Bewertungssystem für den Erfolg der Typisierung dar, sofern kein oder wenig anhaftendes Gewebe am Haar vorhanden ist. Durch Adaptation des qPCR-Prinzips an canine DNA wurde festgestellt, dass der DNA-Degradierungsgrad von DNA aus ausgefallenen Hundehaaren einen geringen oder keinen Einfluss auf den Erfolg der STR-Typisierung mit caninen STR-Kits hat.

Ein weiteres Ziel der Arbeit bestand in der Verbesserung der STR-Analytik degradierter DNA aus Einzelhaaren. Hierfür wurde ein in-house entwickelter NGS-basierter STR-Assay (maSTR-Assay) validiert und hinsichtlich seiner Eignung für menschliche Einzelhaare getestet. Aufgrund kurzer STR-Amplikons erwies sich der maSTR-Assay für die STR-Typisierung von degradierter DNA als besonders gut geeignet. Der maSTR-Assay erbrachte konsistent höhere Allel-Recoveries als alternative Kits. Dabei scheint nicht die andere Detektionstechnik der NGS der CE-Technik generell überlegen zu sein. Es wird davon ausgegangen, dass die in NGS-Methoden gegenüber CE massiv erhöhte parallel analysierte Anzahl an STR-Markern nur in dem Fall vorteilhaft gegenüber CE ist für die Anwendung an degradierter DNA, wenn die Amplikons sehr kurz sind. NGS-Methoden sind für diese Anwendungen an degradierter DNA besonders geeignet, da die parallele Analyse einer Vielzahl von uniformen Amplikonlängen im Multiplexverfahren ermöglicht wird, da gegenüber der CE-Technik keine Beschränkung auf der parallelen Analyse von Fragmenten entsprechend der Länge besteht.

Der maSTR-Assay zeigte im Vergleich zu kommerziellen Assays eine ungewöhnlich hohe Anzahl an Allelic Drop-ins, die mit reduzierter DNA-Menge und zunehmender Stärke der DNA-Degradierung anstieg. Diese Drop-ins waren zum Teil nicht reproduzierbar und können durch unterschiedliche Faktoren verursacht worden sein. Es wird davon ausgegangen, dass ein Teil der Drop-ins durch zu niedrige Schwellenwerte und starke Imbalancen verursacht wurden, weswegen der maSTR-Assay weiterer Optimierung bedarf. Allelic Drop-ins in STR-Profilen aus degradierter DNA geringer Menge verursachen eine geringe Verlässlichkeit des Profils, vor allem wenn sie zusammen mit Drop-outs auftreten, da nicht abgeschätzt werden kann, ob die detektierten Allele durch die genetische Ausstattung oder durch stochastische Effekte oder andere Fehlerquellen verursacht wurden. Um dieser Schwierigkeit zu begegnen, wurden Methoden der Analyse von Mischspuren angewandt. Dabei eignet sich sowohl die Allel-Recovery, der Validitätsgrad und der biostatistisch errechnete *Likelihood Ratio*, um die Übereinstimmung der Profile aus Haaren mit den Referenzprofilen zu bewerten. Der

Validitätsgrad bildet im Gegensatz zur Allel-Recovery neben den Allelic Drop-outs ebenfalls die Drop-ins ab. Jedoch erwies sich der Validitätsgrad der Allel-Recovery als Bewertungssystem nicht als überlegen, weil er nicht den Einfluss der aufgetretenen Drop-ins auf die forensische Identifizierung bewertet.

Für STR-Profile in Replikaten, die keine Allelic Drop-ins aufweisen, sind Composite-Interpretationen von Vorteil, da die Anzahl der Drop-outs reduziert wird. Im Gegensatz dazu eignet sich für die Interpretation Drop-in-haltiger STR-Profile – wie die Replikate der maSTR-generierten STR-Profile – lediglich die Consensus-Methode. Dadurch wurden Drop-ins reduziert, wodurch zugleich einige, nicht reproduzierbare konkordante Allele verloren gingen. Eine Optimierung des maSTR-Assays mit dem Ziel einer Reduzierung der Allelic Drop-ins würde gegebenenfalls die Anwendung der Composite-Interpretation erlauben, wodurch sich der Informationsgewinn stark erhöhen und in den biostatistischen Berechnungen zusätzliche Sicherheiten liefern würde.

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Studie eine Strategie entwickelt, die qPCR-basierte Quantifizierung und Integritätsbestimmung mit einer Voraussage des Erfolgs der STR-Typisierung kombiniert, um erfolgsversprechende Haare für die Analyse per STR-Typisierung zu selektieren. Durch die vorliegende Studie wurde die Grundlage geschaffen, um mithilfe der NGS-Technik die Humanidentifizierung der degradierten DNA aus ausgefallenen Einzelhaaren zu optimieren und gegebenenfalls auf ähnliche Spurentypen mit degradierter DNA geringer Menge anzuwenden, bei denen die standardmäßig verwendeten CE-basierten Kits versagen.

5.2 Empfehlungen für die STR-Analyse menschlicher Einzelhaare

Es wird empfohlen alle verwendeten Haare vor der DNA-Extraktion morphologisch zu untersuchen, um Informationen über den Spurentyp zu erhalten und die Spezies einzugrenzen. Dadurch eignet sich eine Fotografie durch das Okular des Binokulars oder Mikroskops. Für die DNA-Extraktion wird empfohlen, den in dieser Studie beschriebenen modifizierten Puffer nach (Hellmann et al. 2001) zu verwenden. In diesem wurde auf die Zugabe PCR-inhibierender Detergenzien verzichtet und durch die DNA-Fällung werden prinzipiell größere DNA-Verluste vermieden. Es wird empfohlen die Konzentration von DTT und Proteinase K zu erhöhen, falls die Haare in einer angemessenen Lyse-Dauer nicht in Lösung gehen sollten. Für die Extraktion sollte lediglich die Kolbenwurzel und eventuell anhaftendes Gewebe genutzt werden, um das Einbringen des PCR-Inhibitors Melanin zu reduzieren. Ein reduziertes Volumen zur Rücklösung der DNA nach der Fällung ist möglich, um die DNA aufzukonzentrieren. Es wird empfohlen die kombinierte Strategie aus einer qPCR-basierter Bewertung und der STR-Typisierung anzuwenden, um Informationsverlust zu vermeiden, sowie Kosten und Ressourcen zu schonen. Um den Erfolg der STR-Typisierung vorauszusagen, kann entweder der in dieser Studie beschriebene RiboD-Assay angewandt werden oder jedes andere herkömmliche qPCR-Kit, das neben der DNA-Menge ebenfalls die DNA-Integrität bestimmt. Dafür müssen zuvor die Schwellenwerte der DNA-Menge und -Integrität ausgetestet werden, an welchen der Einsatz der DNA in die STR-Typisierung zu rechtfertigen sind. Um Pipettierfehler zu reduzieren, sollten alle Assays mit einem Volumen von mindestens 2 µL pro DNA angesetzt werden. Für die STR-Typisierung eignen sich vor allem Assays, welche eine Vielzahl an sehr kurzen Amplikons in Multiplex nutzen. Wenn möglich, sollten mindestens zwei, besser drei Replikate der STR-Typisierung erstellt werden, um verlässliche Profile nach der Interpretation per Composite- oder Consensus-Methode zu erhalten. Für degradierte DNA geringer Menge wird empfohlen die Consensus-

Interpretation anzuwenden, sofern Auffälligkeiten im Profil auf das Vorkommen von Allelic Drop-ins oder auf ein Mischprofil schließen lassen.

5.3 Empfehlungen zur Analyse caniner Einzelhaare

Als Ergänzung zu den grundsätzlichen Empfehlungen für die Analyse von menschlichen Haaren, wird an dieser Stelle auf die Empfehlungen zur Analyse caniner Einzelhaare eingegangen. Für die Analyse von Hundehaaren ist es zu empfehlen, diese zunächst makroskopisch in Unterwolle und Deckhaare zu unterteilen, letztere für die DNA-Extraktion zu verwenden und die DNA zunächst zu quantifizieren, bevor sie für die STR-Typisierung verwendet wird. Wenn die in diesen Versuchsansätzen gewonnenen empirischen Ergebnisse für alle Hunde repräsentativ sind, kann auf die Bestimmung des Grades der DNA-Degradierung verzichtet werden. Dies liegt daran, dass der D-Wert einen geringeren Einfluss auf den Erfolg der STR-Typisierung zu haben scheint als die Menge der DNA. Wie beim humanen RiboD-Assay kann die hundespezifische qPCR-Analyse (RiboDog) helfen zu bestimmen, welche Haare weiter analysiert werden sollten, da die Morphologie keine Voraussage über den STR-Erfolg zulässt. Das Poolen von Deckhaaren sollte umgangen werden, um Mischprofile zu vermeiden, da die rein morphologische Analyse der Haare keinen Rückschluss über die Herkunft der Haare rechtfertigt. Sollte kein Deckhaar vorhanden sein, wird die Analyse von Haaren der Unterwolle empfohlen. Wenn die Haare der Unterwolle makroskopisch ähnlich sind, könnten die DNA-Proben der einzelnen Haare gepoolt, das Volumen reduziert und die konzentrierte Probe für die STR-Analyse verwendet werden. Dies wird als sinnvoll angesehen, da bereits bekannt ist, dass die STR-Analyse einzelner Haare der Unterwolle keine vollständigen STR-Profile generiert.

5.4 Ausblick

Die Optimierung der RiboD- und RiboD-Assays könnte einige Vorteile mit sich bringen. Diese Assays könnten perspektivisch weiter optimiert werden, indem die Zusammensetzung des Puffers verbessert wird, um die PCR-Effizienz zu erhöhen. Weiterhin würde es Sinn ergeben die Assays zur Messung der kurzen und langen Amplikons zu multiplexen, um das Volumen des DNA-Inputs zu reduzieren. Dadurch würde es möglich werden, dass das DNA-Volumen erhöht werden könnte von 1 auf 2 μL , wodurch Pipettierfehler verringert werden. Durch die geschickte Wahl von zusätzlichen TaqMan-Sonden/Zielsequenzen könnte die Spezifität weiter erhöht werden. Außerdem gestattet die Multiplexierung ebenfalls die parallele Amplifikation von internen PCR-Kontrollen zur Überprüfung der Probe auf PCR-Inhibitoren.

Durch die Sequenzierung der PCR-Produkte der RiboD- und RiboDog-Läufen, welche DNA unterschiedlicher Individuen nutzt, könnten eventuell auftretende Sequenzunterschiede festgestellt werden und der Grad der Konservierung der Zielsequenzen untersucht werden. Polymorphismen könnten eventuell nicht nur zwischen verschiedenen Spezies, sondern auch verschiedenen Individuen vorherrschen, beziehungsweise könnten eventuell Einzelpersonen mehrere Varianten derselben Zielsequenz aufweisen. Letzteres würde die „Verschwommenheit“ der Banden der PCR-Produkte eventuell erklären. Da Katzen neben Hunden sehr beliebte Haustiere sind, würde die Adaptation des RiboD-Prinzips auf Katzen Sinn ergeben. Damit könnten die DNA-Mengen und -Integritäten von Katzenhaaren untersucht und eventuell Voraussagen über den Erfolg der STR-Typisierungen ermöglicht werden.

Künftig sollte der maSTR-Assay optimiert werden, damit die Ursachen der Imbalancen und Allelic Drop-ins behoben werden. Die derzeitige Problematik und Optionen zur Optimierung des maSTR-Assays wurden bereits in den **Kapiteln 4.2.3** und **4.8** diskutiert. Auf Möglichkeiten zur verbesserten Legung der analytischen, stochastischen und Stotter-Schwellenwerte der maSTR-Assays wurde in **Kapitel 4.2.4** eingegangen, wodurch das Auftreten stochastischer Effekte reduziert werden sollte.

Möglichkeiten den maSTR-Assay von Grund auf zu verbessern, wären die Erweiterung des in Multiplex amplifizierten Markersets durch weitere sehr kurze Amplikons, um zu gewährleisten, dass selbst beim Ausfall eines Teils der Marker genügend Informationen erhalten werden, um sinnvolle Abgleiche mit Referenzprofilen erstellen zu können. Um die Diskriminierungskraft weiter zu erhöhen, sollte neben der Information über die Fragmentlängen ebenfalls die Sequenz der maSTR-generierten PCR-Produkte in die Analyse mit einbezogen werden. Die Sequenzunterschiede zwischen den Isoallelen können sowohl innerhalb der Wiederholungseinheiten auftreten, als auch in den flankierenden Sequenzen und könnten daher einen wertvollen Zugewinn an Informationen gegenüber der CE bedeuten, um die Diskriminationskraft zu erhöhen (van der Gaag et al. 2016; Revoir et al. 2019; Silva et al. 2020; Benschop et al. 2021; Ballard et al. 2020; Kim et al. 2016; Gettings et al. 2015). Vor allem die DNA aus degradierten Haaren, die sich durch Reduktion des Informationsgehalts aufgrund von Drop-outs auszeichnet, wäre diese Vorgehensweise von bedeutendem Vorteil gegenüber CE-basierten Assays. Diese Vorgehensweise könnte ebenfalls genutzt werden, um den möglichen Ursprung eventuell auftretender Allelic Drop-ins hoher Read-Zahl zu untersuchen. Mit der vorliegenden Studie über den maSTR-Assay wurde die Grundlage geschaffen, um darauf aufbauend ein Assay zu entwickeln und zu validieren, das vor allem für die Anwendung an degradierter DNA geringer Menge den standardmäßigen CE-Kits weit überlegen sein könnte. Durch die Nutzung der Sequenz-Informationen wird es ermöglicht, die PCR-Multiplexe um *unique molecular identifiers* (UMI) zu erweitern. Durch den Gebrauch von UMIs soll das Hintergrundrauschen und das Auftreten von Stotter-Allelen reduziert werden, da alle Amplikons zu ihrer Template-DNA zurückverfolgt werden können (Woerner et al. 2021). Das könnte vor allem bei per NGS-analyzierter degradierter DNA geringer Menge von enormem Vorteil sein.

Weiterhin könnte die DNA-Extraktion von Kolbenwurzeln in „Direkt“-Lysepuffern, die keine DNA-Reinigung benötigen, einigen Mehrwerte mit sich bringen. Da davon ausgegangen wird, dass DNA im Keratin-Gerüst vorliegt, hängt die Lyse-Effizienz maßgeblich von der Zerstörung des Keratins ab. Reduktionsmittel zum Brechen von Disulfidbrücken und Proteinasen zum Abbau der Protein-Reste, könnten daher der limitierende Faktor sein, um die DNA freizulegen. Sofern diese in Maßen eingesetzt werden, die kompatibel mit nachfolgenden PCR-Systemen sind, würde der Einsatz von „Direkt“-Lysepuffern die DNA-Reinigung überflüssig machen und dadurch potentiellen DNA-Verlust vermeiden. Ein limitierender Faktor ist das Volumen des Lysepuffers, um die DNA in ausreichenden Konzentrationen in die nachfolgenden Assays einsetzen zu können.

Es wäre erstrebenswert, dass die in der vorliegenden Studie entwickelte Strategie, die qPCR-basierte Quantifizierung und Integritätsbestimmung mit einer Voraussage des Erfolgs der STR-Typisierung kombiniert, in der kriminaltechnischen Routinearbeit etabliert wird. Somit könnte Informationsverlust reduziert und Ressourcen und Gelder für diejenigen Spuren eingesetzt werden, die erfolgsversprechend sind. Durch Austesten der Schwellenwerte für die DNA-Menge und -Integrität an intakter und degradierter DNA sollte dieses Prinzip ebenfalls auf alternative Quantifizierung-Kits übertragbar sein.

Dadurch könnte die kombinierte Strategie ebenfalls mit bereits für die jeweiligen Laboratorien validierten Kits genutzt werden.

ETHISCHE ASPEKTE

Einverständniserklärung von humanen Individuen

Ein Ethikvotum wurde für dieses Projekt nicht eingeholt. Alle DNA-Proben wurden freiwillig zur Verfügung gestellt und anonymisiert. Alle Personen, die biologisches Material zur Verfügung gestellt haben, haben eine „Einverständniserklärung zur genetischen Analyse und Aufbewahrung von Untersuchungsmaterial“ freiwillig unterschrieben und dadurch ihre Zustimmung gegeben.

Der Wortlaut der „Einverständniserklärung zur genetischen Analyse und Aufbewahrung von Untersuchungsmaterial“ ist wie folgt:

„Ich erkläre mich einverstanden, dass von mir entnommene Haare und/oder von mir aufbewahrtes Gewebe im Rahmen des unten genannten Untersuchungsgrundes auf die Zusammensetzung genetischer STR-Marker untersucht wird. Ich stimme außerdem zu, dass ein Teil des Untersuchungsmaterials aufbewahrt wird, um die entsprechenden Ergebnisse überprüfen zu können.

Hiermit erkläre ich gleichzeitig, dass ich über die Möglichkeiten und Grenzen der angeforderten genetischen Untersuchung aufgeklärt worden bin. Die sich für mich aus den Ergebnissen dieser Untersuchung persönlich ergebenden Konsequenzen wurden ausführlich erörtert.

Alle Ergebnisse der Untersuchung dürfen lediglich anonymisiert an Dritte weitergegeben und publiziert werden.

Untersuchungsgrund: Forensische Genotypisierung von STR-Markern

Der anonymisierten Verwendung von Untersuchungsmaterial und die Veröffentlichung der Ergebnisse für wissenschaftliche Zwecke stimme ich zu.“

Gewebeproben und Ursprung der verwendeten DNA von Tieren

Die tierischen Spuren (DNA aus Hundehaaren und Mundspeichel) wurden vom Hundebesitzer artgerecht gesammelt (unter anderem durch Streicheln des Hundes), weshalb kein Tierversuchsantrag für dieses Projekt benötigt wurde. DNA und Gewebe anderer Tierarten wurde aus anderen Instituten im Zuge von Arbeiten extrahiert, die durch entsprechende Anträge abgedeckt sind.

Gesellschaftlicher Nutzen des Projekts

Die Ergebnisse dieses Promotionsprojekts werden dazu beitragen, den in der Praxis selten genutzten Spurentyp des telogenen Einzelhaars von Menschen und Hunden zur Identifizierung tatverdächtiger Personen nutzbarer zu machen. Da diese neue Verfahrensweise global in den kriminaltechnischen Laboren angewandt werden kann, soll dieses Promotionsvorhaben zur verbesserten Aufklärung von Straftaten beitragen.

LITERATURVERZEICHNIS

- 16s Metagenomic Library Prep Guide: Part # 15044223 Rev. B, Illumina. Illumina
http://emea.support.illumina.com/downloads/16s_metagenomic_sequencing_library_preparation.html?langsel=/de/.
- Agrawal, Saumya; Ganley, Austen R. D. (2018): The conservation landscape of the human ribosomal RNA gene repeats. In: *PLoS one* 13 (12), e0207531. DOI: 10.1371/journal.pone.0207531.
- Al-Bagdadi, F. A.; Titkemeyer, C. W.; Lovell, J. E. (1977): Hair follicle cycle and shedding in male beagle dogs. In: *American journal of veterinary research* 38 (5), S. 611–616.
- Alonso, Laura; Fuchs, Elaine (2006): The hair cycle. In: *Journal of Cell Science* 119 (Pt 3), S. 391–393. DOI: 10.1242/jcs02793.
- Amorim, António; Pereira, Luísa (2005): Pros and cons in the use of SNPs in forensic kinship investigation: a comparative analysis with STRs. In: *Forensic science international* 150 (1), S. 17–21. DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.06.018.
- Amory, S.; Keyser, C.; Crubézy, E.; Ludes, B. (2007): STR typing of ancient DNA extracted from hair shafts of Siberian mummies. In: *Forensic science international* 166 (2-3), S. 218–229. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.05.042.
- Ansorge, Wilhelm J. (2009): Next-generation DNA sequencing techniques. In: *New biotechnology* 25 (4), S. 195–203. DOI: 10.1016/j.nbt.2008.12.009.
- Aronesty, Erik (2013): Comparison of Sequencing Utility Programs. In: *Open Bioinforma. J.* 7 (1), S. 1–8. DOI: 10.2174/1875036201307010001.
- Balding, David J.; Buckleton, John (2009): Interpreting low template DNA profiles. In: *Forensic science international. Genetics* 4 (1), S. 1–10. DOI: 10.1016/j.fsigen.2009.03.003.
- Balding, David J.; Nichols, Richard A. (1994): DNA profile match probability calculation: how to allow for population stratification, relatedness, database selection and single bands. In: *Forensic science international* 64 (2-3), S. 125–140. DOI: 10.1016/0379-0738(94)90222-4.
- Ballantyne, Kaye N.; Goedbloed, Miriam; Fang, Rixun; Schaap, Onno; Lao, Oscar; Wollstein, Andreas et al. (2010): Mutability of Y-chromosomal microsatellites: rates, characteristics, molecular bases, and forensic implications. In: *American journal of human genetics* 87 (3), S. 341–353. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.08.006.
- Ballard, David; Winkler-Galicki, Jakub; Wesoly, Joanna (2020): Massive parallel sequencing in forensics: advantages, issues, technicalities, and prospects. In: *Int J Leg Med* 134 (4), S. 1291–1303. DOI: 10.1007/s00414-020-02294-0.
- Bannasch, Danika L.; Kaelin, Christopher B.; Letko, Anna; Loechel, Robert; Hug, Petra; Jagannathan, Vidhya et al. (2021): Dog colour patterns explained by modular promoters of ancient canid origin. In: *Nature ecology & evolution* 5 (10), S. 1415–1423. DOI: 10.1038/s41559-021-01524-x.
- Bär, W.; Brinkmann, B.; Budowle, B.; Carracedo, A.; Gill, P.; Lincoln, P. et al. (1997): DNA recommendations. Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. International Society for Forensic Haemogenetics. In: *Int J Leg Med* 110 (4), S. 175–176. DOI: 10.1007/s004140050061.
- Batzer, Mark A.; Deininger, Prescott L. (2002): Alu repeats and human genomic diversity. In: *Nat Rev Genet* 3 (5), S. 370–379. DOI: 10.1038/nrg798.
- Bender, Klaus; Schneider, Peter M.; Rittner, Christian (2000): Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. In: *Forensic science international* 113 (1-3), S. 103–107. DOI: 10.1016/S0379-0738(00)00223-1.
- Bengtsson, Camilla Friis; Olsen, Maia E.; Brandt, Luise Ørsted; Bertelsen, Mads F.; Willerslev, Eske; Tobin, Desmond J. et al. (2012): DNA from keratinous tissue. Part I: hair and nail. In: *Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger : official organ of the Anatomische Gesellschaft* 194 (1), S. 17–25. DOI: 10.1016/j.aanat.2011.03.013.
- Benschop, Corina; Haned, Hinda; Sijen, Titia (2013): Consensus and pool profiles to assist in the analysis and interpretation of complex low template DNA mixtures. In: *International Journal of Legal Medicine* 127 (1), S. 11–23. DOI: 10.1007/s00414-011-0647-5.
- Benschop, Corina C. G.; van der Beek, Cornelis P.; Meiland, Hugo C.; van Gorp, Ankie G. M.; Westen, Antoinette A.; Sijen, Titia (2011): Low template STR typing: effect of replicate number and consensus method on genotyping reliability and DNA database search results. In: *Forensic Science International: Genetics* 5 (4), S. 316–328. DOI: 10.1016/j.fsigen.2010.06.006.
- Benschop, Corina C. G.; van der Gaag, Kristiaan J.; Vreede, Jennifer de; Backx, Anouk J.; Leeuw, Rick H. de; Zuñiga, Sofia et al. (2021): Application of a probabilistic genotyping software to MPS mixture STR data is supported by similar trends in LR compared with CE data. In: *Forensic Science International: Genetics* 52, S. 102489. DOI: 10.1016/j.fsigen.2021.102489.
- Berger, B.; Berger, C.; Hecht, W.; Hellmann, A.; Rohleder, U.; Schleenbecker, U.; Parson, W. (2014): Validation of two canine STR multiplex-assays following the ISFG recommendations for non-human DNA analysis. In: *Forensic science international. Genetics* 8 (1), S. 90–100. DOI: 10.1016/j.fsigen.2013.07.002.

- Berger, Burkhard; Berger, Cordula; Heinrich, Josephin; Niederstätter, Harald; Hecht, Werner; Hellmann, Andreas et al. (2018): Dog breed affiliation with a forensically validated canine STR set. In: *Forensic science international. Genetics* 37, S. 126–134. DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.08.005.
- Blackie, Renée; Taylor, Duncan; Linacre, Adrian (2015): Successful direct amplification of nuclear markers from single dog hairs using DogFiler multiplex. In: *Electrophoresis* 36 (17), S. 2082–2085. DOI: 10.1002/elps.201400560.
- Blanpain, Cedric; Lowry, William E.; Geoghegan, Andrea; Polak, Lisa; Fuchs, Elaine (2004): Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. In: *Cell* 118 (5), S. 635–648. DOI: 10.1016/j.cell.2004.08.012.
- Bolger, Anthony M.; Lohse, Marc; Usadel, Bjoern (2014): Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (15), S. 2114–2120. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bourguignon, Luc; Hoste, Bernadette; Boonen, Tom; Vits, Kathy; Hubrecht, Françoise (2008): A fluorescent microscopy-screening test for efficient STR-typing of telogen hair roots. In: *Forensic science international. Genetics* 3 (1), S. 27–31. DOI: 10.1016/j.fsigen.2008.08.006.
- Bowers, C. Michael; Koen, Wendy J. (Hg.) (2017): Forensic science reform. Protecting the innocent. London: Academic Press.
- Brandhagen, Michael D.; Loreille, Odile; Irwin, Jodi A. (2018): Fragmented Nuclear DNA is the Predominant Genetic Material in Human Hair Shafts. In: *Genes* 9 (12). DOI: 10.3390/genes9120640.
- Bregu, Joli; Conklin, Danielle; Coronado, Elisse; Terrill, Margaret; Cotton, Robin W.; Grgicak, Catherine M. (2013): Analytical thresholds and sensitivity: establishing RFU thresholds for forensic DNA analysis. In: *Journal of forensic sciences* 58 (1), S. 120–129. DOI: 10.1111/1556-4029.12008.
- Bright, Jo-Anne; Gill, Peter; Buckleton, John (2012): Composite profiles in DNA analysis. In: *Forensic Science International: Genetics* 6 (3), S. 317–321. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.07.001.
- Bright, Jo-Anne; Taylor, Duncan; McGovern, Catherine; Cooper, Stuart; Russell, Laura; Abarno, Damien; Buckleton, John (2016): Developmental validation of STRmix, expert software for the interpretation of forensic DNA profiles. In: *Forensic science international. Genetics* 23, S. 226–239. DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.05.007.
- Brownstein, M. J.; Carpten, J. D.; Smith, J. R. (1996): Modulation of non-templated nucleotide addition by Taq DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. In: *BioTechniques* 20 (6), 1004-6, 1008-10. DOI: 10.2144/96206st01.
- Buckleton, J. S.; Krawczak, M.; Weir, B. S. (2011): The interpretation of lineage markers in forensic DNA testing. In: *Forensic science international. Genetics* 5 (2), S. 78–83. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.01.010.
- Budowle, Bruce; Chakraborty, Ranajit; Carmody, George; Monson, Keith L. (2000): Source Attribution of a Forensic DNA Profile (Forensic Science Communications July 2000) 2 (3). Online verfügbar unter https://www.researchgate.net/profile/keith-monson/publication/267683506_source_attribution_of_a_forensic_dna_profile_forensic_science_communications_july_2000.
- Budowle, Bruce; Eisenberg, Arthur J.; van Daal, Angela (2009): Validity of Low Copy Number Typing and Applications to Forensic Science. In: *Croat Med J* 50 (3), S. 207–217. DOI: 10.3325/cmj.2009.50.207.
- Budowle, Bruce; Garofano, Paolo; Hellman, Andreas; Ketchum, Melba; Kanthaswamy, Sree; Parson, Walther et al. (2005): Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. In: *Int J Leg Med* 119 (5), S. 295–302. DOI: 10.1007/s00414-005-0545-9.
- Bundeskriminalamt (2021): Erkennungsdienst. Online verfügbar unter https://www.bka.de/DE/UnsereAufgaben/Ermittlungsunterstuetzung/Erkennungsdienst/erkennungsdienst_node.html, zuletzt aktualisiert am 2021, zuletzt geprüft am 19.10.2021.
- Buse, Edward L.; Putinier, Jeanne C.; Hong, Mary M.; Yap, Aimee E.; Hartmann, John M. (2003): Performance evaluation of two multiplexes used in fluorescent short tandem repeat DNA analysis. In: *J. Forensic Sci.* 48 (2), S. 348–357.
- Bustin, Stephen A.; Benes, Vladimir; Garson, Jeremy A.; Hellems, Jan; Huggett, Jim; Kubista, Mikael et al. (2009): The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. In: *Clinical Chemistry* 55 (4), S. 611–622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.
- Butler, John M. (2009): Fundamentals of Forensic DNA Typing. 1. Aufl. s.l.: Elsevier textbooks. Online verfügbar unter <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=631904>.
- Butler, John M.; Shen, Yin; McCord, Bruce R. (2003): The development of reduced size STR amplicons as tools for analysis of degraded DNA. In: *J. Forensic Sci.* 48 (5), S. 1054–1064.
- Canine DNA Profiling (CaDNAP): Gruppe der ISFG. Online verfügbar unter <https://www.isfg.org/Working%20Groups/CaDNAP>, zuletzt geprüft am 19.06.2021.
- Cardullo, R. A.; Agrawal, S.; Flores, C.; Zamecnik, P. C.; Wolf, D. E. (1988): Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85 (23), S. 8790–8794. DOI: 10.1073/pnas.85.23.8790.
- Churchill, Jennifer D.; Schmedes, Sarah E.; King, Jonathan L.; Budowle, Bruce (2016): Evaluation of the Illumina(®) Beta Version ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit for use in genetic profiling. In: *Forensic Science International: Genetics* 20, S. 20–29. DOI: 10.1016/j.fsigen.2015.09.009.

- Clayton, T.M; Whitaker, J.P; Sparkes, R.; Gill, P. (1998): Analysis and interpretation of mixed forensic stains using DNA STR profiling. In: *Forensic science international* 91 (1), S. 55–70. DOI: 10.1016/S0379-0738(97)00175-8.
- Clements, Dylan N.; Carter, Stuart D.; Innes, John F.; Ollier, William E. R.; Day, Philip J. R. (2006): Analysis of normal and osteoarthritic canine cartilage mRNA expression by quantitative polymerase chain reaction. In: *Arthritis research & therapy* 8 (6), R158. DOI: 10.1186/ar2053.
- Clements, Dylan N.; Wood, Shona; Carter, Stuart D.; Ollier, William E. R. (2008): Assessment of the quality and quantity of genomic DNA recovered from canine blood samples by three different extraction methods. In: *Research in veterinary science* 85 (1), S. 74–79. DOI: 10.1016/j.rvsc.2007.09.009.
- Coble, Michael D.; Butler, John M. (2005): Characterization of New MiniSTR Loci to Aid Analysis of Degraded DNA. In: *J. Forensic Sci.* 50 (1), S. 1–11. DOI: 10.1520/JFS2004216.
- Cortellini, Venusia; Carobbio, Anna; Brescia, Gloria; Cerri, Nicoletta; Verzeletti, Andrea (2019): A comparative study of human and animal hairs: Microscopic hair comparison and cytochrome c oxidase I species identification. In: *J Forensic Sci Med* 5 (1), S. 20. DOI: 10.4103/jfsm.jfsm_49_18.
- Dayton, Melody; Koskinen, Mikko T.; Tom, Bradley K.; Mattila, Anna-Maria; Johnston, Eric; Halverson, Joy et al. (2009): Developmental validation of short tandem repeat reagent kit for forensic DNA profiling of canine biological material. In: *Croat Med J* 50 (3), S. 268–285. DOI: 10.3325/cmj.2009.50.268.
- Debernardi, A.; Suzanne, E.; Formant, A.; Pène, L.; Dufour, A. B.; Lobry, J. R. (2011): One year variability of peak heights, heterozygous balance and inter-locus balance for the DNA positive control of AmpF Φ STR Φ Identifier Φ STR kit. In: *Forensic Science International: Genetics* 5 (1), S. 43–49. DOI: 10.1016/j.fsigen.2010.01.020.
- Deedrick D. W. (2000): Part 1: Hair Evidence. Hg. v. Federal Bureau of Investigation (Vol 2, 3). Online verfügbar unter <https://archives.fbi.gov/archives/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/july2000/deedric1.htm>, zuletzt geprüft am 18.09.2021.
- DiZinno et al. 1999: Typing of DNA derived from hairs. In: J Robertson, editor. *Forensic examination of hair*. London: Taylor and Francis; 1999. Unter Mitarbeit von DiZinno JA, Wilson MR, Budowle B. In: S. 155–173.
- Dobosz, Marina; Lancia, Massimo; Coletti, Alessio; Grasso, Cinzia; Panarese, Fernando; Iulii, Paolo de (2009): Genetic typing of dogs' traces in biological samples. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2* (1), S. 283–285. DOI: 10.1016/j.fsigss.2009.07.004.
- Dong, Chun-Nan; Yang, Ya-Dong; Li, Shu-Jin; Yang, Ya-Ran; Zhang, Xiao-Jing; Fang, Xiang-Dong et al. (2016): Whole genome nucleosome sequencing identifies novel types of forensic markers in degraded DNA samples. In: *Scientific reports* 6, S. 26101. DOI: 10.1038/srep26101.
- Dry, F. W. (1926): The coat of the mouse (*Mus musculus*). In: *Journ. of Gen.* 16 (3), S. 287–340. DOI: 10.1007/BF02983004.
- Eckhart, L.; Bach, J.; Ban, J.; Tschachler, E. (2000): Melanin binds reversibly to thermostable DNA polymerase and inhibits its activity. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 271 (3), S. 726–730. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2716.
- Edson, Janette; Brooks, Elizabeth M.; McLaren, Carolyn; Robertson, James; McNevin, Dennis; Cooper, Alan; Austin, Jeremy J. (2013): A quantitative assessment of a reliable screening technique for the STR analysis of telogen hair roots. In: *Forensic science international. Genetics* 7 (1), S. 180–188. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.10.001.
- Edwards, A.; Civitello, A.; Hammond, H. A.; Caskey, C. T. (1991): DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. In: *American journal of human genetics* 49 (4), S. 746–756.
- Eichmann, Cordula; Berger, Burkhard; Reinhold, Maximilian; Lutz, Martin; Parson, Walther (2004): Canine-specific STR typing of saliva traces on dog bite wounds. In: *Int J Leg Med* 118 (6), S. 337–342. DOI: 10.1007/s00414-004-0479-7.
- Evans, Jeffrey J.; Wictum, Elizabeth J.; Penedo, M. Cecilia T.; Kanthaswamy, Sreetharan (2007): Real-time polymerase chain reaction quantification of canine DNA. In: *J. Forensic Sci.* 52 (1), S. 93–96. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2006.00305.x.
- Evet, I.w.; Jackson, G.; Lambert, J. A.; McCrossan, S. (2000): The impact of the principles of evidence interpretation on the structure and content of statements. In: *Science & Justice* 40 (4), S. 233–239. DOI: 10.1016/S1355-0306(00)71993-9.
- Ewing, Margaret M.; Thompson, Jonelle M.; McLaren, Robert S.; Purpero, Vincent M.; Thomas, Kelli J.; Dobrowski, Patricia A. et al. (2016): Human DNA quantification and sample quality assessment: Developmental validation of the PowerQuant Φ system. In: *Forensic science international. Genetics* 23, S. 166–177. DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.04.007.
- Federal Bureau of Investigation (2015): FBI Testimony on Microscopic Hair Analysis Contained Errors in at Least 90 Percent of Cases in Ongoing Review. Hg. v. Press Release ((202) 324-3691). Online verfügbar unter <https://www.fbi.gov/news/pressrel/press-releases/department-of-justice-and-fbi-joint-statement-on-microscopic-hair-analysis>, zuletzt geprüft am 19.10.2021.
- Federal Bureau of Investigation (2021): The FBI's Combined DNA Index System (CODIS) Hits Major Milestone. Hg. v. Press Release ((202) 324-3691). Online verfügbar unter <https://www.fbi.gov/news/pressrel/press-releases/the-fbis-combined-dna-index-system-codis-hits-major-milestone>, zuletzt geprüft am 19.10.2021.

- Fischer, Heinz; Szabo, Sandra; Scherz, Jennifer; Jaeger, Karin; Rossiter, Heidemarie; Buchberger, Maria et al. (2011): Essential role of the keratinocyte-specific endonuclease DNase1L2 in the removal of nuclear DNA from hair and nails. In: *The Journal of investigative dermatology* 131 (6), S. 1208–1215. DOI: 10.1038/jid.2011.13.
- Fonseca, Gabriel; Mora, Esther; Lucena, Joaquín; Cantín, Mario (2015): Forensic studies of dog attacks on humans: a focus on bite mark analysis. In: *RRFMS*, S. 39. DOI: 10.2147/RRFMS.S92068.
- Forster, Luke; Thomson, Jim; Kutranov, Stefan (2008): Direct comparison of post-28-cycle PCR purification and modified capillary electrophoresis methods with the 34-cycle "low copy number" (LCN) method for analysis of trace forensic DNA samples. In: *Forensic science international. Genetics* 2 (4), S. 318–328. DOI: 10.1016/j.fsigen.2008.04.005.
- Ganço, L.; Carvalho, M.; Serra, A.; Balsa, F.; Bento, A. M.; Anjos, M. J. et al. (2009): Genetic diversity analysis of 10 STR's loci used for forensic identification in canine hair samples. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 2 (1), S. 288–289. DOI: 10.1016/j.fsigs.2009.08.068.
- Ganschow, Sebastian; Silvery, Janine; Kalinowski, Jörn; Tiemann, Carsten (2018a): toaSTR: A web application for forensic STR genotyping by massively parallel sequencing. In: *Forensic science international. Genetics* 37, S. 21–28. DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.07.006.
- Ganschow, Sebastian; Silvery, Janine; Tiemann, Carsten (2018b): Development of a multiplex forensic identity panel for massively parallel sequencing and its systematic optimization using design of experiments. In: *Forensic science international. Genetics* 39, S. 32–43. DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.11.023.
- Geddes, Linda (2015): Hanging by a thread. In: *New Scientist* 226 (3019), S. 27. DOI: 10.1016/S0262-4079(15)30257-8.
- Gettings, Katherine Butler; Aponte, Rachel A.; Vallone, Peter M.; Butler, John M. (2015): STR allele sequence variation: Current knowledge and future issues. In: *Forensic science international. Genetics* 18, S. 118–130. DOI: 10.1016/j.fsigen.2015.06.005.
- Gettings, Katherine Butler; Ballard, David; Bodner, Martin; Borsuk, Lisa A.; King, Jonathan L.; Parson, Walther; Phillips, Christopher (2019): Report from the STRAND Working Group on the 2019 STR sequence nomenclature meeting. In: *Forensic Science International: Genetics* 43, S. 102165. DOI: 10.1016/j.fsigen.2019.102165.
- Gettings, Katherine Butler; Borsuk, Lisa A.; Ballard, David; Bodner, Martin; Budowle, Bruce; Devesse, Laurence et al. (2017): STRSeq: A catalog of sequence diversity at human identification Short Tandem Repeat loci. In: *Forensic Science International: Genetics* 31, S. 111–117. DOI: 10.1016/j.fsigen.2017.08.017.
- Gill, P. (2001a): An assessment of the utility of single nucleotide polymorphisms (SNPs) for forensic purposes. In: *Int J Leg Med* 114 (4-5), S. 204–210. DOI: 10.1007/s004149900117.
- Gill, P. (2001b): Application of low copy number DNA profiling. In: *Croat Med J* 42 (3), S. 229–232.
- Gill, P.; Brenner, C. H.; Buckleton, J. S.; Carracedo, A.; Krawczak, M.; Mayr, W. R. et al. (2006): DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the interpretation of mixtures. In: *Forensic science international* 160 (2-3), S. 90–101. DOI: 10.1016/j.forsciint.2006.04.009.
- Gill, P.; Gusmão, L.; Haned, H.; Mayr, W. R.; Morling, N.; Parson, W. et al. (2012): DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: Recommendations on the evaluation of STR typing results that may include drop-out and/or drop-in using probabilistic methods. In: *Forensic science international. Genetics* 6 (6), S. 679–688. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.06.002.
- Gill, Peter (2020): *Forensic Practitioner's Guide to the Interpretation of Complex DNA Profiles*. Unter Mitarbeit von Corina Benschop, Øyvind Bleka, Hinda Haned und Oskar Hansson. San Diego: Elsevier Science & Technology. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/book/9780128205624>.
- Gill, Peter; Brinkmann, B.; d'Aloja, E.; Andersen, J.; Bar, W.; Carracedo, A. et al. (1997): Considerations from the European DNA profiling group (EDNAP) concerning STR nomenclature. In: *Forensic science international* 87 (3), S. 185–192. DOI: 10.1016/S0379-0738(97)00111-4.
- Gill, Peter; Puch-Solis, Roberto; Curran, James (2009): The low-template-DNA (stochastic) threshold--its determination relative to risk analysis for national DNA databases. In: *Forensic Science International: Genetics* 3 (2), S. 104–111. DOI: 10.1016/j.fsigen.2008.11.009.
- Gill, Peter; Sparkes, Rebecca; Fereday, Lyn; Werrett, David J. (2000a): Report of the European Network of Forensic Science Institutes (ENSFI): formulation and testing of principles to evaluate STR multiplexes. In: *Forensic science international* 108 (1), S. 1–29. DOI: 10.1016/S0379-0738(99)00186-3.
- Gill, Peter; Whitaker, Jonathan; Flaxman, Christine; Brown, Nick; Buckleton, John (2000b): An investigation of the rigor of interpretation rules for STRs derived from less than 100 pg of DNA. In: *Forensic science international* 112 (1), S. 17–40. DOI: 10.1016/S0379-0738(00)00158-4.
- Goecker, Zachary C.; Salemi, Michelle R.; Karim, Noreen; Phinney, Brett S.; Rice, Robert H.; Parker, Glendon J. (2020): Optimal processing for proteomic genotyping of single human hairs. In: *Forensic Science International: Genetics* 47, S. 102314. DOI: 10.1016/j.fsigen.2020.102314.
- Goodman, Morris; Tagle, Danilo A.; Fitch, David H. A.; Bailey, Wendy; Czelusniak, John; Koop, Ben F. et al. (1990): Primate evolution at the DNA level and a classification of hominoids. In: *Journal of Molecular Evolution* 30 (3), S. 260–266. DOI: 10.1007/BF02099995.
- Goodwin, William; Linacre, Adrian; Hadi, Sibte (2008): *An introduction to forensic genetics*. Reprinted. Chichester: Wiley.

- Götz, Frank M.; Schönborn, Holger; Borsdorf, Viktoria; Pflugbeil, Anne-Marie; Labudde, Dirk (2017): GenoProof Mixture 3—New software and process to resolve complex DNA mixtures. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 6, e549-e551. DOI: 10.1016/j.fsigss.2017.09.212.
- Grahn, Robert A. (2013): Impact of Allogrooming in Domestic Cats (*Felis silvestris catus*) on Mitochondrial DNA Profiling of Shed Hairs. In: *TOFORSJ* 6 (1), S. 12–19. DOI: 10.2174/1874402801306010012.
- Grisedale, Kelly S.; Murphy, Gina M.; Brown, Hiromi; Wilson, Mark R.; Sinha, Sudhir K. (2018): Successful nuclear DNA profiling of rootless hair shafts: a novel approach. In: *International Journal of Legal Medicine* 132 (1), S. 107–115. DOI: 10.1007/s00414-017-1698-z.
- Grubwieser, P.; Mühlmann, R.; Berger, B.; Niederstätter, H.; Pavlic, M.; Parson, W. (2006): A new "miniSTR-multiplex" displaying reduced amplicon lengths for the analysis of degraded DNA. In: *Int J Leg Med* 120 (2), S. 115–120. DOI: 10.1007/s00414-005-0013-6.
- Guérout, Marc; Picot, Daniel; Abi-Ghanem, Joséphine; Hartmann, Brigitte; Baaden, Marc (2010): How cations can assist DNase I in DNA binding and hydrolysis. In: *PLoS Comput Biol* 6 (11), e1001000. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1001000.
- Guo, Fei; Yu, Jiao; Zhang, Lu; Li, Jun (2017): Massively parallel sequencing of forensic STRs and SNPs using the Illumina® ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit on the MiSeq FGx™ Forensic Genomics System. In: *Forensic science international. Genetics* 31, S. 135–148. DOI: 10.1016/j.fsigen.2017.09.003.
- Haines, Alicia M.; Linacre, Adrian (2016): A rapid screening method using DNA binding dyes to determine whether hair follicles have sufficient DNA for successful profiling. In: *Forensic science international* 262, S. 190–195. DOI: 10.1016/j.forsciint.2016.03.026.
- Haines, Alicia M.; Tobe, Shanan S.; Kobus, Hilton; Linacre, Adrian (2015): Successful direct STR amplification of hair follicles after nuclear staining. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 5, e65-e66. DOI: 10.1016/j.fsigss.2015.09.026.
- Halverson, Joy L.; Basten, Christopher (2005): Forensic DNA identification of animal-derived trace evidence: tools for linking victims and suspects. In: *Croat Med J* 46 (4), S. 598–605.
- Hara, M.; Nakanishi, H.; Takahashi, S.; Nagai, A.; Yamamoto, T.; Yoneyama, K. et al. (2015): Relationship between DNA degradation ratios and the number of loci detectable by STR kits in extremely old seminal stain samples. In: *Legal medicine (Tokyo, Japan)* 17 (5), S. 391–393. DOI: 10.1016/j.legalmed.2015.05.008.
- Harding und Rogers 1999: Physiology and Growth of Human Hair. In: J Robertson, editor. Forensic examination of hair. London: Taylor and Francis; 1999. Unter Mitarbeit von Harding, H. und Rogers, G. In: S. 1–90.
- Hardy, G. H. (1908): MENDELIAN PROPORTIONS IN A MIXED POPULATION. In: *Science (New York, N. Y.)* 28 (706), S. 49–50. DOI: 10.1126/science.28.706.49.
- Hares, Douglas R. (2015): Selection and implementation of expanded CODIS core loci in the United States. In: *Forensic Science International: Genetics* 17, S. 33–34. DOI: 10.1016/j.fsigen.2015.03.006.
- Hellmann, A.; Rohleder, U.; Schmitter, H.; Wittig, M. (2001): STR typing of human telogen hairs - a new approach. In: *International Journal of Legal Medicine* 114 (4-5), S. 269–273. DOI: 10.1007/s004140000175.
- Henderson, A. S.; Warburton, D.; Atwood, K. C. (1972): Location of Ribosomal DNA in the Human Chromosome Complement. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 69 (11), S. 3394–3398. DOI: 10.1073/pnas.69.11.3394.
- Heß, Sarah Aurora; Biermann, Jan-Philip; Grabmüller, Melanie; Madea, Burkhard; Thiele, Ralf; Jäger, Richard (2019): Evaluation of STR profiles of single telogen hairs using probabilistic methods. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. Online verfügbar unter [https://www.fsigenicssup.com/article/S1875-1768\(19\)30209-4/fulltext](https://www.fsigenicssup.com/article/S1875-1768(19)30209-4/fulltext).
- Heß, Sarah Aurora; Trapani, Salvatore; Boronat, Maria Del Mar; Theunissen, Glenn M.G.; Rolf, Burkhard; Jäger, Richard (2021): Ribosomal DNA as target for the assessment of DNA degradation of human and canine DNA. In: *Legal Medicine* 48, S. 101819. DOI: 10.1016/j.legalmed.2020.101819.
- Higgins, Claire A.; Westgate, Gillian E.; Jahoda, Colin A. B. (2009): From telogen to exogen: mechanisms underlying formation and subsequent loss of the hair club fiber. In: *The Journal of investigative dermatology* 129 (9), S. 2100–2108. DOI: 10.1038/jid.2009.66.
- Higuchi, R.; Beroldingen, C. H. von; Sensabaugh, G. F.; Erlich, H. A. (1988): DNA typing from single hairs. In: *Nature* 332 (6164), S. 543–546. DOI: 10.1038/332543a0.
- Higuchi, Russell; Fockler, Carita; Dollinger, Gavin; Watson, Robert (1993): Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. In: *Nat Biotechnol* 11 (9), S. 1026–1030. DOI: 10.1038/nbt0993-1026.
- Hill, Carolyn R.; Duewer, David L.; Kline, Margaret C.; Sprecher, Cynthia J.; McLaren, Robert S.; Rabbach, Dawn R. et al. (2011): Concordance and population studies along with stutter and peak height ratio analysis for the PowerPlex® ESX 17 and ESI 17 Systems. In: *Forensic Science International: Genetics* 5 (4), S. 269–275. DOI: 10.1016/j.fsigen.2010.03.014.
- Hill, C. R. et al. (2010): Strategies for concordance testing. Profiles in DNA (Promega), 13(1). Online verfügbar unter <https://www.promega.de/resources/profiles-in-dna/2010/strategies-for-concordance-testing/>.
- Hochmeister, M. N.; Budowle, B.; Eisenberg, A.; Borer, U. V.; Dirnhofer, R. (1996): Using multiplex PCR amplification and typing kits for the analysis of DNA evidence in a serial killer case. In: *J. Forensic Sci.* 41 (1), S. 155–162.

- Holmes, Amy S.; Houston, Rachel; Elwick, Kyleen; Gangitano, David; Hughes-Stamm, Sheree (2018): Evaluation of four commercial quantitative real-time PCR kits with inhibited and degraded samples. In: *International Journal of Legal Medicine* 132 (3), S. 691–701. DOI: 10.1007/s00414-017-1745-9.
- Holt, Allison; Wootton, Sharon Chao; Mulero, Julio J.; Brzoska, Pius M.; Langit, Emanuel; Green, Robert L. (2016): Developmental validation of the Quantifiler® HP and Trio Kits for human DNA quantification in forensic samples. In: *Forensic science international. Genetics* 21, S. 145–157. DOI: 10.1016/j.fsigen.2015.12.007.
- Hoogenboom, Jerry; Sijen, Titia; van der Gaag, Kristiaan J. (2021): STRNaming: Generating simple, informative names for sequenced STR alleles in a standardised and automated manner. In: *Forensic Science International: Genetics* 52, S. 102473. DOI: 10.1016/j.fsigen.2021.102473.
- Hoogenboom, Jerry; van der Gaag, Kristiaan J.; Leeuw, Rick H. de; Sijen, Titia; Knijff, Peter de; Laros, Jeroen F. J. (2017): FDSTools: A software package for analysis of massively parallel sequencing data with the ability to recognise and correct STR stutter and other PCR or sequencing noise. In: *Forensic Science International: Genetics* 27, S. 27–40. DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.11.007.
- Hudlow, William R.; Chong, Mavis Date; Swango, Katie L.; Timken, Mark D.; Buoncristiani, Martin R. (2008): A quadruplex real-time qPCR assay for the simultaneous assessment of total human DNA, human male DNA, DNA degradation and the presence of PCR inhibitors in forensic samples: a diagnostic tool for STR typing. In: *Forensic science international. Genetics* 2 (2), S. 108–125. DOI: 10.1016/j.fsigen.2007.09.001.
- Hughes-Stamm, Sheree R.; Ashton, Kevin J.; van Daal, Angela (2011): Assessment of DNA degradation and the genotyping success of highly degraded samples. In: *International Journal of Legal Medicine* 125 (3), S. 341–348. DOI: 10.1007/s00414-010-0455-3.
- Human genome version GRCh38: NCBI FTP Homepage, ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/Homo_sapiens.
- Illumina - ForenSeq™ DNA Signature Prep (2015): Reference Guide. forenseq-dna-signature-prep-guide-15049528-01_Sept2015.pdf. Catalog # TG-450-9001DOC (Document # 15049528 v01).
- Illumina bcl2fastq Conversion Software v1.8.4:
https://support.illumina.com/downloads/bcl2fastq_conversion_software_184.html.
- ISAG: International Society for Animal Genetics. Online verfügbar unter www.isag.us, zuletzt geprüft am 21.09.2021.
- ISFG: International Society for Forensic Genetics. Online verfügbar unter <https://www.isfg.org/>, zuletzt geprüft am 10.11.2021.
- Jäger, Anne C.; Alvarez, Michelle L.; Davis, Carey P.; Guzmán, Ernesto; Han, Yonmee; Way, Lisa et al. (2017): Developmental validation of the MiSeq FGx Forensic Genomics System for Targeted Next Generation Sequencing in Forensic DNA Casework and Database Laboratories. In: *Forensic Science International: Genetics* 28, S. 52–70. DOI: 10.1016/j.fsigen.2017.01.011.
- Jahoda, C. A.; Horne, K. A.; Oliver, R. F. (1984): Induction of hair growth by implantation of cultured dermal papilla cells. In: *Nature* 311 (5986), S. 560–562. DOI: 10.1038/311560a0.
- Jeffreys, A. J.; Brookfield, J. F.; Semeonoff, R. (1985a): Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. In: *Nature* 317 (6040), S. 818–819. DOI: 10.1038/317818a0.
- Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S. L. (1985b): Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. In: *Nature* 314 (6006), S. 67–73. DOI: 10.1038/314067a0.
- Jeffreys, A. J.; Wilson, V.; Thein, S. L. (1985c): Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. In: *Nature* 316 (6023), S. 76–79. DOI: 10.1038/316076a0.
- Jin, L.; Zhong, Y.; Chakraborty, R. (1994): The exact numbers of possible microsatellite motifs. In: *American journal of human genetics* 55 (3), S. 582–583.
- Junqueira, L. C.; Carneiro, J. (1991): Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen Unter Berücksichtigung der Histophysiologie. Dritte, erweiterte und völlig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg (Springer-Lehrbuch).
- Kanthaswamy, S. (2015): Review: domestic animal forensic genetics - biological evidence, genetic markers, analytical approaches and challenges. In: *Animal genetics* 46 (5), S. 473–484. DOI: 10.1111/age.12335.
- Kanthaswamy, S.; Premasuthan, A.; Ng, J.; Satkoski, J.; Goyal, V. (2012): Quantitative real-time PCR (qPCR) assay for human-dog-cat species identification and nuclear DNA quantification. In: *Forensic science international. Genetics* 6 (2), S. 290–295. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.06.005.
- Kelly, Hannah; Bright, Jo-Anne; Buckleton, John S.; Curran, James M. (2014): A comparison of statistical models for the analysis of complex forensic DNA profiles. In: *Science & Justice* 54 (1), S. 66–70. DOI: 10.1016/j.scijus.2013.07.003.
- Kim, Eun Hye; Lee, Hwan Young; Yang, In Seok; Jung, Sang-Eun; Yang, Woo Ick; Shin, Kyoung-Jin (2016): Massively parallel sequencing of 17 commonly used forensic autosomal STRs and amelogenin with small amplicons. In: *Forensic science international. Genetics* 22, S. 1–7. DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.01.001.
- King, Jonathan L.; Wendt, Frank R.; Sun, Jie; Budowle, Bruce (2017): STRait Razor v2s: Advancing sequence-based STR allele reporting and beyond to other marker systems. In: *Forensic science international. Genetics* 29, S. 21–28. DOI: 10.1016/j.fsigen.2017.03.013.
- Kitayama, Tetsushi; Fujii, Koji; Nakahara, Hiroaki; Mizuno, Natsuko; Kasai, Kentaro; Yonezawa, Naoto; Sekiguchi, Kazumasa (2013): Estimation of the detection rate in STR analysis by determining the DNA degradation ratio

- using quantitative PCR. In: *Legal medicine (Tokyo, Japan)* 15 (1), S. 1–6. DOI: 10.1016/j.legalmed.2012.07.003.
- Kligman, A. M. (1961): Pathologic dynamics of human hair loss. I. Telogen effluvium. In: *Arch Dermatol* 83 (2), S. 175–198. DOI: 10.1001/archderm.1961.01580080005001.
- Kline, M. C.; Jenkins B.; Rogers, S. (1998): Non-amplification of a vWA allele. In: *Journal of forensic sciences* (43(1)), S. 250.
- Kruglyak, Semyon; Durrett, Richard T.; Schug, Malcolm D.; Aquadro, Charles F. (1998): Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (18), S. 10774–10778.
- Kun, Teri; Lyons, Leslie A.; Sacks, Benjamin N.; Ballard, Ruth E.; Lindquist, Christina; Wictum, Elizabeth J. (2013): Developmental validation of Mini-DogFiler for degraded canine DNA. In: *Forensic science international. Genetics* 7 (1), S. 151–158. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.09.002.
- Lareu, M. V.; Barral, S.; Salas, A.; Pestoni, C.; Carracedo, A. (1998): Sequence variation of a hypervariable short tandem repeat at the D1S1656 locus. In: *International Journal of Legal Medicine* 111 (5), S. 244–247. DOI: 10.1007/s004140050161.
- Lászik, A.; Sótónyi, P.; Rand, S.; Hohoff, C. (2001): Frequency data for the STR locus ACTBP2 (SE33) in eight populations. In: *Int J Leg Med* 115 (2), S. 94–96. DOI: 10.1007/s004140100209.
- Leclair, Benoît; Frégeau, Chantal J.; Bowen, Kathy L.; Fournay, Ron M. (2004): Systematic Analysis of Stutter Percentages and Allele Peak Height and Peak Area Ratios at Heterozygous STR Loci for Forensic Casework and Database Samples. In: *J. Forensic Sci.* 49 (5), S. 1–13. DOI: 10.1520/JFS2003312.
- Lee, So-Yeon; Ha, Eun-Ju; Woo, Seung-Kyun; Lee, So-Min; Lim, Kyung-Hee; Eom, Yong-Bin (2017): A rapid nuclear staining test using cationic dyes contributes to efficient STR analysis of telogen hair roots. In: *Electrophoresis* 38 (13-14), S. 1771–1779. DOI: 10.1002/elps.201700024.
- Leibelt, Craig; Budowle, Bruce; Collins, Patrick; Daoudi, Yasser; Moretti, Tamyra; Nunn, Gary et al. (2003): Identification of a D8S1179 primer binding site mutation and the validation of a primer designed to recover null alleles. In: *Forensic science international* 133 (3), S. 220–227. DOI: 10.1016/S0379-0738(03)00035-5.
- Lepez, Trees; Vandewoestyne, Mado; van Hoofstat, David; Deforce, Dieter (2014): Fast nuclear staining of head hair roots as a screening method for successful STR analysis in forensics. In: *Forensic science international. Genetics* 13, S. 191–194. DOI: 10.1016/j.fsigen.2014.08.003.
- Levin, B. C.; Cheng, H.; Reeder, D. J. (1999): A human mitochondrial DNA standard reference material for quality control in forensic identification, medical diagnosis, and mutation detection. In: *Genomics* 55 (2), S. 135–146. DOI: 10.1006/geno.1998.5513.
- Likelihood ratios in practice: Hinda Haned (Netherlands Forensic Institute, NFI). Online verfügbar unter http://forensim.r-forge.r-project.org/misc/3_NFI_experience.pdf, zuletzt geprüft am 12.11.2021.
- Lin, Sze-Wah; Li, Christina; Ip, Stephen C. Y. (2018): A performance study on three qPCR quantification kits and their compatibilities with the 6-dye DNA profiling systems. In: *Forensic science international. Genetics* 33, S. 72–83. DOI: 10.1016/j.fsigen.2017.11.016.
- Linacre, A.; Gusmão, L.; Hecht, W.; Hellmann, A. P.; Mayr, W. R.; Parson, W. et al. (2011): ISFG: recommendations regarding the use of non-human (animal) DNA in forensic genetic investigations. In: *Forensic science international. Genetics* 5 (5), S. 501–505. DOI: 10.1016/j.fsigen.2010.10.017.
- Linch, C. A.; Whiting, D. A.; Holland, M. M. (2001): Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist. In: *J. Forensic Sci.* 46 (4), S. 844–853.
- Linch, Charles A. (2008): The ultrastructure of tissue attached to telogen hair roots. In: *J. Forensic Sci.* 53 (6), S. 1363–1366. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2008.00868.x.
- Linch, Charles A. (2009): Degeneration of nuclei and mitochondria in human hairs. In: *J. Forensic Sci.* 54 (2), S. 346–349. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2008.00972.x.
- Linch, Charles A.; Smith, Stephanie L.; Prahlow, Joseph A. (1998): Evaluation of the Human Hair Root for DNA Typing Subsequent to Microscopic Comparison. In: *J. Forensic Sci.* 43 (2), 16137J. DOI: 10.1520/JFS16137J.
- Lindner, G.; Botchkarev, V. A.; Botchkareva, N. V.; Ling, G.; van der Veen, C.; Paus, R. (1997): Analysis of apoptosis during hair follicle regression (catagen). In: *The American Journal of Pathology* 151 (6), S. 1601–1617.
- Long, E. O.; Dawid, I. B. (1980): Repeated genes in eukaryotes. In: *Annual review of biochemistry* 49, S. 727–764. DOI: 10.1146/annurev.bi.49.070180.003455.
- Lygo, J. E.; Johnson, P. E.; Holdaway, D. J.; Woodroffe, S.; Whitaker, J. P.; Clayton, T. M. et al. (1994): The validation of short tandem repeat (STR) loci for use in forensic casework. In: *Int J Leg Med* 107 (2), S. 77–89. DOI: 10.1007/BF01225493.
- Madea, Burkhard (2004): *Haaranalytik. Technik und Interpretation in Medizin und Recht.* Cologne: Verlag Deutscher Ärzte.
- Magnuson, V. L.; Ally, D. S.; Nylund, S. J.; Karanjawala, Z. E.; Rayman, J. B.; Knapp, J. I. et al. (1996): Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by Taq DNA polymerase: implications for PCR-based genotyping and cloning. In: *BioTechniques* 21 (4), S. 700–709. DOI: 10.2144/96214rr03.

- Malinovskaya, Elena M.; Ershova, Elizaveta S.; Golimbet, Vera E.; Porokhovnik, Lev N.; Lyapunova, Nataliya A.; Kutsev, Serguey I. et al. (2018): Copy Number of Human Ribosomal Genes With Aging: Unchanged Mean, but Narrowed Range and Decreased Variance in Elderly Group. In: *Frontiers in genetics* 9, S. 306. DOI: 10.3389/fgene.2018.00306.
- Mannucci, A.; Sullivan, K. M.; Ivanov, P. L.; Gill, P. (1994): Forensic application of a rapid and quantitative DNA sex test by amplification of the X-Y homologous gene amelogenin. In: *Int J Leg Med* 106 (4), S. 190–193. DOI: 10.1007/BF01371335.
- Manual "Cluster Density" (Illumina): Optimizing Cluster Density on Illumina Sequencing Systems. 11 April 2016. Hg. v. Illumina. Online verfügbar unter <https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/other/miseq-overclustering-primer-770-2014-038.pdf>, zuletzt geprüft am 11.11.2021.
- Mardis, Elaine R. (2008): The impact of next-generation sequencing technology on genetics. In: *Trends in genetics* : *TIG* 24 (3), S. 133–141. DOI: 10.1016/j.tig.2007.12.007.
- Martins, Cátia; Ferreira, Paulo Miguel; Carvalho, Raquel; Costa, Sandra Cristina; Farinha, Carlos; Azevedo, Luísa et al. (2019): Evaluation of InnoQuant® HY and InnoTyper® 21 kits in the DNA analysis of rootless hair samples. In: *Forensic science international. Genetics* 39, S. 61–65. DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.12.005.
- Matsuda et al. (1997): Technical Investigation of DNA Extraction from Single Hair Shaft. In: *Rep Nat Res Inst Police Sci* 50, 23-28.
- Mayer, Christine; Neubert, Melanie; Grummt, Ingrid (2008): The structure of NoRC-associated RNA is crucial for targeting the chromatin remodelling complex NoRC to the nucleolus. In: *EMBO reports* 9 (8), S. 774–780. DOI: 10.1038/embor.2008.109.
- Mayer, Christine; Schmitz, Kerstin-Maike; Li, Junwei; Grummt, Ingrid; Santoro, Raffaella (2006): Intergenic transcripts regulate the epigenetic state of rRNA genes. In: *Molecular cell* 22 (3), S. 351–361. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.03.028.
- McLaren, Robert S.; Bourdeau-Heller, Jeanne; Patel, Jaynish; Thompson, Jonelle M.; Pagram, Jenny; Loake, Thomas et al. (2014): Developmental validation of the PowerPlex® ESI 16/17 Fast and PowerPlex® ESX 16/17 Fast Systems. In: *Forensic Science International: Genetics* 13, S. 195–205. DOI: 10.1016/j.fsigen.2014.08.004.
- McNevin, Dennis; Edson, Janette; Robertson, James; Austin, Jeremy J. (2015): Reduced reaction volumes and increased Taq DNA polymerase concentration improve STR profiling outcomes from a real-world low template DNA source: telogen hairs. In: *Forensic Sci Med Pathol* 11 (3), S. 326–338. DOI: 10.1007/s12024-015-9679-3.
- McNevin, Dennis; Wilson-Wilde, Linzi; Robertson, James; Kyd, Jennelle; Lennard, Chris (2005): Short tandem repeat (STR) genotyping of keratinised hair. Part 1. Review of current status and knowledge gaps. In: *Forensic science international* 153 (2-3), S. 237–246. DOI: 10.1016/j.forsciint.2005.05.006.
- Meiklejohn, Kelly A.; Robertson, James M. (2017): Evaluation of the Precision ID Identity Panel for the Ion Torrent™ PGM™ sequencer. In: *Forensic Science International: Genetics* 31, S. 48–56. DOI: 10.1016/j.fsigen.2017.08.009.
- Metzker, Michael L. (2010): Sequencing technologies - the next generation. In: *Nat Rev Genet* 11 (1), S. 31–46. DOI: 10.1038/nrg2626.
- Miller, O. L.; Beatty, B. R. (1969): Visualization of nucleolar genes. In: *Science (New York, N.Y.)* 164 (3882), S. 955–957. DOI: 10.1126/science.164.3882.955.
- Milner, Yoram; Sudnik, James; Filippi, Mario; Kizoulis, Menas; Kashgarian, Michael; Stenn, Kurt (2002): Exogen, shedding phase of the hair growth cycle: characterization of a mouse model. In: *Journal of Investigative Dermatology* 119 (3), S. 639–644. DOI: 10.1046/j.1523-1747.2002.01842.x.
- MiSeq FGx Instrument Reference Guide Part # 15050524 Rev. C: Illumina, <http://emea.support.illumina.com/downloads/miseq-fgx-instrument-reference-guide-15050524.html?langsel=/de/>.
- Modrow, J.-H.; Revyakina, O.; Reder, H.; Hasse, J.; Wurmb-Schwark, N. von; Schwark, T. (2016): Molekulargenetische Identifikation von Canidae in der forensischen Praxis. In: *Rechtsmedizin* 26 (1), S. 42–46. DOI: 10.1007/s00194-015-0036-3.
- Montano, E. A.; Bush, J. M.; Garver, A. M.; Larijani, M. M.; Wiechman, S. M.; Baker, C. H. et al. (2018): Optimization of the Promega PowerSeq™ Auto/Y system for efficient integration within a forensic DNA laboratory. In: *Forensic Science International: Genetics* 32, S. 26–32. DOI: 10.1016/j.fsigen.2017.10.002.
- Moore, J. E. (1988): A key for the identification of animal hairs. In: *Journal of the Forensic Science Society* 28 (5-6), S. 335–339. DOI: 10.1016/S0015-7368(88)72862-5.
- Morozova, Olena; Marra, Marco A. (2008): Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. In: *Genomics* 92 (5), S. 255–264. DOI: 10.1016/j.ygeno.2008.07.001.
- Morrison, Jack; McColl, Suzanne; Louhelainen, Jari; Sheppard, Kayleigh; May, Ashley; Girdland-Flink, Linus et al. (2020): Assessing the performance of quantity and quality metrics using the QIAGEN Investigator® Quantiplex® pro RGQ kit. In: *Science & justice : journal of the Forensic Science Society* 60 (4), S. 388–397. DOI: 10.1016/j.scijus.2020.03.002.
- Mulero, Julio J.; Chang, Chien Wei; Lagacé, Robert E.; Wang, Dennis Y.; Bas, Jennifer L.; McMahon, Timothy P.; Hennessy, Lori K. (2008): Development and validation of the AmpFISTR MiniFiler PCR Amplification Kit: a

- MiniSTR multiplex for the analysis of degraded and/or PCR inhibited DNA. In: *J. Forensic Sci.* 53 (4), S. 838–852. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2008.00760.x.
- Müller, Kathrin; Klein, Rachel; Miltner, Erich; Wiegand, Peter (2007): Improved STR typing of telogen hair root and hair shaft DNA. In: *Electrophoresis* 28 (16), S. 2835–2842. DOI: 10.1002/elps.200600669.
- Müller, Petra; Alonso, Antonio; Barrio, Pedro A.; Berger, Burkhard; Bodner, Martin; Martin, Pablo; Parson, Walther (2018): Systematic evaluation of the early access applied biosystems precision ID Globalfiler mixture ID and Globalfiler NGS STR panels for the ion S5 system. In: *Forensic Science International: Genetics* 36, S. 95–103. DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.06.016.
- Müller, Petra; Sell, Christian; Hadrys, Thorsten; Hedman, Johannes; Bredemeyer, Steffi; Laurent, Francois-Xavier et al. (2019): Inter-laboratory study on standardized MPS libraries: evaluation of performance, concordance, and sensitivity using mixtures and degraded DNA. In: *International Journal of Legal Medicine*. DOI: 10.1007/s00414-019-02201-2.
- Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, S. 263–273. DOI: 10.1101/SQB.1986.051.01.032.
- Müntener, Tabitha; Doherr, Marcus G.; Guscetti, Franco; Suter, Maja M.; Welle, Monika M. (2011): The canine hair cycle - a guide for the assessment of morphological and immunohistochemical criteria. In: *Veterinary dermatology* 22 (5), S. 383–395. DOI: 10.1111/j.1365-3164.2011.00963.x.
- Murphy, Kathleen M.; Berg, Karin D.; Geiger, Tanya; Hafez, Michael; Flickinger, Katie A.; Cooper, Lisa et al. (2005): Capillary Electrophoresis Artifact Due to Eosin. In: *The Journal of Molecular Diagnostics* 7 (1), S. 143–148. DOI: 10.1016/S1525-1578(10)60021-9.
- National Research Council. The evaluation of forensic DNA evidence. National Academies Press, 1996.
- Needleman, Saul B.; Wunsch, Christian D. (1970): A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. In: *Journal of Molecular Biology* 48 (3), S. 443–453. DOI: 10.1016/0022-2836(70)90057-4.
- Ng, Siemon H.; Braxton, Cassandra; Eloit, Marc; Feng, Szi Fei; Fragnoud, Romain; Mallet, Laurent et al. (2018): Current Perspectives on High-Throughput Sequencing (HTS) for Adventitious Virus Detection: Upstream Sample Processing and Library Preparation. In: *Viruses* 10 (10), S. 566. DOI: 10.3390/v10100566.
- Nicklas, Janice A.; Buel, Eric (2003): Development of an Alu-based, real-time PCR method for quantitation of human DNA in forensic samples. In: *J. Forensic Sci.* 48 (5), S. 936–944.
- Novroski, Nicole M. M. (2021): Exploring new short tandem repeat markers for DNA mixture deconvolution. In: *WIREs Forensic Sci* 3 (1). DOI: 10.1002/wfs2.1390.
- Ogden, Rob; Mellanby, Richard J.; Clements, Dylan; Gow, Adam G.; Powell, Roger; McEwing, Ross (2012): Genetic data from 15 STR loci for forensic individual identification and parentage analyses in UK domestic dogs (*Canis lupus familiaris*). In: *Forensic science international. Genetics* 6 (2), e63-5. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.04.015.
- Ogle, Robert R.; Fox, Michelle J. (1999): Atlas of human hair microscopic characteristics. Boca Raton: CRC Press. Online verfügbar unter <http://www.loc.gov/catdir/enhancements/fy0646/98034752-d.html>.
- Opel, Kerry L.; Chung, Denise T.; Drábek, Jirí; Butler, John M.; McCord, Bruce R. (2007): Developmental validation of reduced-size STR Miniplex primer sets. In: *Journal of forensic sciences* 52 (6), S. 1263–1271. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2007.00584.x.
- Opel, Kerry L.; Fleishaker, Erica L.; Nicklas, Janice A.; Buel, Eric; McCord, Bruce R. (2008): Evaluation and quantification of nuclear DNA from human telogen hairs. In: *Journal of forensic sciences* 53 (4), S. 853–857. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2008.00777.x.
- Ottens, Renée; Taylor, Duncan; Abarno, Damien; Linacre, Adrian (2013): Successful direct amplification of nuclear markers from a single hair follicle. In: *Forensic Sci Med Pathol* 9 (2), S. 238–243. DOI: 10.1007/s12024-012-9402-6.
- Pääbo, S.; Higuchi, R. G.; Wilson, A. C. (1989): Ancient DNA and the polymerase chain reaction. The emerging field of molecular archaeology. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (17), S. 9709–9712.
- Paalman, M. H.; Henderson, S. L.; Sollner-Webb, B. (1995): Stimulation of the mouse rRNA gene promoter by a distal spacer promoter. In: *Mol. Cell. Biol.* 15 (8), S. 4648–4656. DOI: 10.1128/MCB.15.8.4648.
- Pádár, Z.; Egyed, B.; Kontadakis, K.; Füredi, S.; Woller, J.; Zöldág, L.; Fekete, S. (2002): Canine STR analyses in forensic practice. Observation of a possible mutation in a dog hair. In: *Int J Leg Med* 116 (5), S. 286–288. DOI: 10.1007/s00414-002-0302-2.
- Panteleyev, A. A.; Jahoda, C. A.; Christiano, A. M. (2001): Hair follicle predetermination. In: *Journal of Cell Science* 114 (Pt 19), S. 3419–3431.
- Parker, Glendon; Goecker, Zachary; Franklin, Rachel; Durbin-Johnson, Blythe; Milan, Jennifer; Karim, Noreen et al. (2019): Proteomic genotyping: Using mass spectrometry to infer SNP genotypes in a forensic context. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 7 (1), S. 664–666. DOI: 10.1016/j.fsigs.2019.10.130.
- Parks, Matthew M.; Kurylo, Chad M.; Dass, Randall A.; Bojmar, Linda; Lyden, David; Vincent, C. Theresa; Blanchard, Scott C. (2018): Variant ribosomal RNA alleles are conserved and exhibit tissue-specific expression. In: *Science advances* 4 (2), eaao0665. DOI: 10.1126/sciadv.aao0665.

- Parson, Walther; Ballard, David; Budowle, Bruce; Butler, John M.; Gettings, Katherine B.; Gill, Peter et al. (2016): Massively parallel sequencing of forensic STRs: Considerations of the DNA commission of the International Society for Forensic Genetics (ISFG) on minimal nomenclature requirements. In: *Forensic science international. Genetics* 22, S. 54–63. DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.01.009.
- Pereira, Vania; Mogensen, Helle S.; Børsting, Claus; Morling, Niels (2017): Evaluation of the Precision ID Ancestry Panel for crime case work: A SNP typing assay developed for typing of 165 ancestral informative markers. In: *Forensic Science International: Genetics* 28, S. 138–145. DOI: 10.1016/j.fsigen.2017.02.013.
- Pfeifer, Céline M.; Klein-Unseld, Rachel; Klintschar, Michael; Wiegand, Peter (2012): Comparison of different interpretation strategies for low template DNA mixtures. In: *Forensic science international. Genetics* 6 (6), S. 716–722. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.06.006.
- Pfeiffer, I.; Völkel, I.; Täubert, H.; Brenig, B. (2004): Forensic DNA-typing of dog hair: DNA-extraction and PCR amplification. In: *Forensic science international* 141 (2-3), S. 149–151. DOI: 10.1016/j.forsciint.2004.01.016.
- Phillips, C.; Gettings, K. Butler; King, J. L.; Ballard, D.; Bodner, M.; Borsuk, L.; Parson, W. (2018): "The devil's in the detail": Release of an expanded, enhanced and dynamically revised forensic STR Sequence Guide. In: *Forensic Science International: Genetics* 34, S. 162–169. DOI: 10.1016/j.fsigen.2018.02.017.
- Pineda, Gina M.; Montgomery, Anne H.; Thompson, Robyn; Indest, Brooke; Carroll, Marion; Sinha, Sudhir K. (2014): Development and validation of InnoQuant™, a sensitive human DNA quantitation and degradation assessment method for forensic samples using high copy number mobile elements Alu and SVA. In: *Forensic science international. Genetics* 13, S. 224–235. DOI: 10.1016/j.fsigen.2014.08.007.
- Promega - PowerPlex ESX 17 Fast (2021): PowerPlex® ESX 17 Fast System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers. Technical Manual. Instructions for Use of Products DC1710 and DC1711 (TMD040). Online verfügbar unter https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-esx-17-fast-system-protocol.pdf?rev=494b148d65344970b04abd887e1f6028&sc_lang=en, zuletzt aktualisiert am 2021, zuletzt geprüft am 19.10.2021.
- Promega - PowerPlex ESI 17 Fast (2021): PowerPlex® ESI 17 Fast System for Use on the Applied Biosystems® Genetic Analyzers. Technical Manual. Instructions for Use of Products DC1720 and DC1721 (TMD041). Online verfügbar unter https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/powerplex-esi-17-fast-system-protocol.pdf?rev=b47e75913bdb4b788dd8e4d3bc00d9fb&sc_lang=en, zuletzt aktualisiert am 2021, zuletzt geprüft am 19.10.2021.
- QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook: QIAGEN. HB-0329-004-1102728-HB-QIAamp-DNA-Mini-Blood-Mini-0516-WW, Jahr 2016 (05/2016). Online verfügbar unter <https://www.qiagen.com/kr/resources/download.aspx?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en>, zuletzt geprüft am 19.10.2021.
- Revoir, A. P.; Lancaster, H.; Ames, C. (2019): Initial assessment of NGS as a tool to augment routine CE analysis of STRs. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 7 (1), S. 747–749. DOI: 10.1016/j.fsigss.2019.10.162.
- Robertson, James R. (1999): *Forensic Examination of Hair*. 1st ed. ISBN: 0-7484-0567-4. London: CRC Press (International Forensic Science and Investigation).
- Robertson, Kate S.; McNevin, Dennis; Robertson, James (2007): STR genotyping of exogenous hair shaft DNA. In: *Australian Journal of Forensic Sciences* 39 (2), S. 107–122. DOI: 10.1080/00450610701650096.
- Rolf, B.; Schürenkamp, M.; Junge, A.; Brinkmann, B. (1997): Sequence polymorphism at the tetranucleotide repeat of the human beta-actin related pseudogene H-beta-Ac-psi-2 (ACTBP2) locus. In: *Int J Leg Med* 110 (2), S. 69–72. DOI: 10.1007/s004140050033.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74 (12), S. 5463–5467. DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.
- Sato, Hajime; Matsuda, Hideaki; Kubota, Satoshi; Kawano, Koichi (2006): Statistical comparison of dog and cat guard hairs using numerical morphology. In: *Forensic science international* 158 (2-3), S. 94–103. DOI: 10.1016/j.forsciint.2005.04.041.
- Schlötterer, C.; Tautz, D. (1992): Slippage synthesis of simple sequence DNA. In: *Nucleic acids research* 20 (2), S. 211–215. DOI: 10.1093/nar/20.2.211.
- Schmidt, Ulrike; Lutz-Bonengel, Sabine; Weisser, Hans-Joachim; Sänger, Timo; Pollak, Stefan; Schön, Ulrike et al. (2006): Low-volume amplification on chemically structured chips using the PowerPlex16 DNA amplification kit. In: *Int J Leg Med* 120 (1), S. 42–48. DOI: 10.1007/s00414-005-0041-2.
- Schneider, P. M.; Fimmers, R.; Keil, W.; Molsberger, G.; Patzelt, D.; Pflug, W. et al. (2006): Allgemeine Empfehlungen der Spurenkommission zur Bewertung von DNA-Mischspuren. In: *Rechtsmedizin* 16 (6), S. 401–404. DOI: 10.1007/s00194-006-0411-1.
- Schneider, P. M.; Fimmers, R.; Keil, W.; Molsberger, G.; Patzelt, D.; Pflug, W. et al. (2009): The German Stain Commission: recommendations for the interpretation of mixed stains. In: *International Journal of Legal Medicine* 123 (1), S. 1–5. DOI: 10.1007/s00414-008-0244-4.
- Schneider, P. M.; Seo, Y.; Rittner, C. (1999): Forensic mtDNA hair analysis excludes a dog from having caused a traffic accident. In: *Int J Leg Med* 112 (5), S. 315–316. DOI: 10.1007/s004140050257.
- Schneider, Peter (2013): Vortrag: Die neuen Empfehlungen der ISFG DNA-Kommission zur Bewertung von STR-Befunden unter Berücksichtigung von möglichen Drop-out und Drop-in Ereignissen.

- Schrader, C.; Schielke, A.; Ellerbroek, L.; Johne, R. (2012): PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. In: *J Appl Microbiol* 113 (5), S. 1014–1026. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- Shendure, Jay; Ji, Hanlee (2008): Next-generation DNA sequencing. In: *Nat Biotechnol* 26 (10), S. 1135–1145. DOI: 10.1038/nbt1486.
- Silva, Deborah S. B. S.; Scheible, Melissa K.; Bailey, Sarah F.; Williams, Christopher L.; Allwood, Julia S.; Just, Rebecca S. et al. (2020): Sequence-based autosomal STR characterization in four US populations using PowerSeq™ Auto/Y system. In: *Forensic Science International: Genetics* 48, S. 102311. DOI: 10.1016/j.fsigen.2020.102311.
- Silvery, Janine; Ganschow, Sebastian; Wiegand, Peter; Tiemann, Carsten (2020): Developmental validation of the monSTR identity panel, a forensic STR multiplex assay for massively parallel sequencing. In: *Forensic Science International: Genetics* 46, S. 102236. DOI: 10.1016/j.fsigen.2020.102236.
- Smith, Pamela J.; Ballantyne, Jack (2007): Simplified low-copy-number DNA analysis by post-PCR purification. In: *Journal of forensic sciences* 52 (4), S. 820–829. DOI: 10.1111/j.1556-4029.2007.00470.x.
- Smith, T. F.; Waterman, M. S. (1981): Identification of common molecular subsequences. In: *Journal of Molecular Biology* 147 (1), S. 195–197. DOI: 10.1016/0022-2836(81)90087-5.
- Solomon, April D.; Hytinen, Madison E.; McClain, Aryn M.; Miller, Marilyn T.; Dawson Cruz, Tracey (2018): An Optimized DNA Analysis Workflow for the Sampling, Extraction, and Concentration of DNA obtained from Archived Latent Fingerprints. In: *Journal of forensic sciences* 63 (1), S. 47–57. DOI: 10.1111/1556-4029.13504.
- Sparkes, R.; Kimpton, C.; Gilbard, S.; Carne, P.; Anderson, J.; Oldroyd, N. et al. (1996a): The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. In: *International Journal of Legal Medicine* 109 (4), S. 195–204. DOI: 10.1007/BF01225518.
- Sparkes, R.; Kimpton, C.; Watson, S.; Oldroyd, N.; Clayton, T.; Barnett, L. et al. (1996b): The validation of a 7-locus multiplex STR test for use in forensic casework. (I). Mixtures, ageing, degradation and species studies. In: *Int J Leg Med* 109 (4), S. 186–194. DOI: 10.1007/BF01225517.
- Srivastava, A. K.; Schlessinger, D. (1991): Structure and organization of ribosomal DNA. In: *Biochimie* 73 (6), S. 631–638. DOI: 10.1016/0300-9084(91)90042-Y.
- Statista (2021): Anzahl der Haustiere in privaten Haushalten in Deutschland in den Jahren 2016 bis 2020 (in Millionen). Hg. v. statista.com. Online verfügbar unter <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/156836/umfrage/anzahl-der-haushalte-mit-haustieren-in-deutschland-2010/>, zuletzt geprüft am 11.09.2021.
- Stern, C. (1943): THE HARDY-WEINBERG LAW. In: *Science (New York, N.Y.)* 97 (2510), S. 137–138. DOI: 10.1126/science.97.2510.137.
- STRBase: National Institute of Standards and Technology. Unter Mitarbeit von John M. Butler und Dennis J. Reeder. Online verfügbar unter <https://strbase.nist.gov/>, zuletzt geprüft am 09.11.2021.
- STRBase 2.0: National Institute of Standards and Technology. Online verfügbar unter <https://strbase-b.nist.gov/>, zuletzt geprüft am 09.11.2021.
- STRidER: European Network of Forensic Science Institutes. Online verfügbar unter <https://strider.online/>, zuletzt geprüft am 09.11.2021.
- Sullivan, K. M.; Hopgood, R.; Gill, P. (1992): Identification of human remains by amplification and automated sequencing of mitochondrial DNA. In: *Int J Leg Med* 105 (2), S. 83–86. DOI: 10.1007/BF02340829.
- Sullivan, K. M.; Mannucci, A.; Kimpton, C. P.; Gill, P. (1993): A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. In: *BioTechniques* 15 (4), 636-8, 640-1.
- Swango, Katie L.; Timken, Mark D.; Chong, Mavis Date; Buoncristiani, Martin R. (2006): A quantitative PCR assay for the assessment of DNA degradation in forensic samples. In: *Forensic science international* 158 (1), S. 14–26. DOI: 10.1016/j.forsciint.2005.04.034.
- SWGDM (2010): Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing. Wurde mittlerweile überarbeitet und im Jahr 2017 veröffentlicht unter dem Titel "Interpretation Guidelines for Autosomal STR Typing by Forensic DNA Testing Laboratories". Online verfügbar unter <https://www.swgdam.org/publications>.
- SWGDM (2016): Validation Guidelines for DNA Analysis Methods. Online verfügbar unter <https://www.swgdam.org/publications>.
- Symonová, Radka (2019): Integrative rDNAomics-Importance of the Oldest Repetitive Fraction of the Eukaryote Genome. In: *Genes* 10 (5). DOI: 10.3390/genes10050345.
- Szabo, Sandra; Jaeger, Karin; Fischer, Heinz; Tschachler, Erwin; Parson, Walther; Eckhart, Leopold (2012): In situ labeling of DNA reveals interindividual variation in nuclear DNA breakdown in hair and may be useful to predict success of forensic genotyping of hair. In: *International Journal of Legal Medicine* 126 (1), S. 63–70. DOI: 10.1007/s00414-011-0566-5.
- Tao, Ruiyang; Qi, Wenjie; Chen, Chong; Zhang, Jingyi; Yang, Zihao; Song, Wei et al. (2019): Pilot study for forensic evaluations of the Precision ID GlobalFiler™ NGS STR Panel v2 with the Ion S5™ system. In: *Forensic Science International: Genetics* 43, S. 102147. DOI: 10.1016/j.fsigen.2019.102147.
- Taylor, Duncan; Bright, Jo-Anne; Buckleton, John (2013): The interpretation of single source and mixed DNA profiles. In: *Forensic Science International: Genetics* 7 (5), S. 516–528. DOI: 10.1016/j.fsigen.2013.05.011.

- Taylor, Gina; Lehrer, Michael S.; Jensen, Pamela J.; Sun, Tung-Tien; Lavker, Robert M. (2000): Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. In: *Cell* 102 (4), S. 451–461. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00050-7.
- Teerink, B. J. (Cambridge University Press, New York, NY, 1991p. 221.): Hair of west European Mammals: Atlas and Identification Key.
- Teraki, Y.; Shiohara, T. (1999): Apoptosis and the skin. In: *European journal of dermatology : EJD* 9 (5), 413-25; quiz 426.
- Thiriveedhi V.K. (2019): Direct PCR amplification of nuclear DNA from shed dog hair using DogFile. Online verfügbar unter <https://search.proquest.com/openview/aca0275d074732fe3d9177b23dea3a13/1?pq-origsite=gscholar&cbl=51922&diss=y>.
- Thomas, Jacqueline T.; Berlin, Rebecca M.; Barker, Jessica M.; Dawson Cruz, Tracey (2013): Qiagen's Investigator™ Quantiplex Kit as a predictor of STR amplification success from low-yield DNA samples. In: *J. Forensic Sci.* 58 (5), S. 1306–1309. DOI: 10.1111/1556-4029.12171.
- TIJSSSEN, P. (1993): Hybridization with nucleic acid probes. In: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (24), S. 191–195.
- tre-agrep: <https://laurikari.net/tre/about/>.
- Tridico, S. (2005): Examination, Analysis, and Application of Hair in Forensic Science - Animal Hair. In: *Forensic science review* 17 (1), S. 17–28.
- Tridico, S. R.; Houck, M. M.; Kirkbride, K. Paul; Smith, M. E.; Yates, B. C. (2014): Morphological identification of animal hairs: Myths and misconceptions, possibilities and pitfalls. In: *Forensic science international* 238, S. 101–107. DOI: 10.1016/j.forsciint.2014.02.023.
- Tsukada, Kazuhiko; Takayanagi, Kayoko; Asamura, Hideki; Ota, Masao; Fukushima, Hirofumi (2002): Multiplex short tandem repeat typing in degraded samples using newly designed primers for the TH01, TPOX, CSF1PO, and vWA loci. In: *Legal Medicine* 4 (4), S. 239–245. DOI: 10.1016/S1344-6223(02)00049-4.
- Tucker, Valerie C.; Hopwood, Andrew J.; Sprecher, Cynthia J.; McLaren, Robert S.; Rabbach, Dawn R.; Ensenberger, Martin G. et al. (2012): Developmental validation of the PowerPlex® ESX 16 and PowerPlex® ESX 17 Systems. In: *Forensic Science International: Genetics* 6 (1), S. 124–131. DOI: 10.1016/j.fsigen.2011.03.009.
- Tvedebrink, Torben; Eriksen, Poul Svante; Mogensen, Helle Smidt; Morling, Niels (2009): Estimating the probability of allelic drop-out of STR alleles in forensic genetics. In: *Forensic Science International: Genetics* 3 (4), S. 222–226. DOI: 10.1016/j.fsigen.2009.02.002.
- Urquhart, A.; Kimpton, C. P.; Downes, T. J.; Gill, P. (1994): Variation in short tandem repeat sequences--a survey of twelve microsatellite loci for use as forensic identification markers. In: *Int J Leg Med* 107 (1), S. 13–20. DOI: 10.1007/BF01247268.
- van Asch, Barbara; Pereira, Filipe (2010): State-of-the-Art and Future Prospects of Canine STR-Based Genotyping~!2010-01-07~!2010-04-02~!2010-05-17~! In: *TOFORSJ* 3 (2), S. 45–52. DOI: 10.2174/1874402801003020045.
- van der Gaag, Kristiaan J.; Leeuw, Rick H. de; Hoogenboom, Jerry; Patel, Jaynish; Storts, Douglas R.; Laros, Jeroen F. J.; Knijff, Peter de (2016): Massively parallel sequencing of short tandem repeats-Population data and mixture analysis results for the PowerSeq™ system. In: *Forensic Science International: Genetics* 24, S. 86–96. DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.05.016.
- van Neste, Dominique; Leroy, Thérèse; Conil, Séverine (2007): Exogen hair characterization in human scalp. In: *Skin Res Technol* 13 (4), S. 436–443. DOI: 10.1111/j.1600-0846.2007.00248.x.
- van Oorschot, Roland Ah; Ballantyne, Kaye N.; Mitchell, R. John (2010): Forensic trace DNA: a review. In: *Investigative genetics* 1 (1), S. 14. DOI: 10.1186/2041-2223-1-14.
- Veiko, N. N.; Egolina, N. A.; Radzivil, G. G.; Nurbaev, S. D.; Kosyakova, N. V.; Shubaeva, N. O.; Lyapunova, N. A. (2003): Quantitation of Repetitive Sequences in Human Genomic DNA and Detection of an Elevated Ribosomal Repeat Copy Number in Schizophrenia: The Results of Molecular and Cytogenetic Analyses. In: *Molecular Biology* 37 (3), S. 349–357. DOI: 10.1023/A:1024274924381.
- Verma, K.; Joshi, B. (2012): Different Animal Species Hairs as Biological Tool for the Forensic Assessment of Individual Identification Characteristics from Animals of Zoological Park, Pragti Maidan, New Delhi, India. In: *J Forensic Res* 3:160. DOI: 10.4172/2157-7145.1000160.
- Vernarecci, Stefano; Ottaviani, Enrica; Agostino, Alessandro; Mei, Elisabetta; Calandro, Lisa; Montagna, Paola (2015): Quantifiler® Trio Kit and forensic samples management: a matter of degradation. In: *Forensic science international. Genetics* 16, S. 77–85. DOI: 10.1016/j.fsigen.2014.12.005.
- Verscheure, Sophie; Backeljau, Thierry; Desmyter, Stijn (2013): Reviewing population studies for forensic purposes: Dog mitochondrial DNA. In: *ZooKeys* (365), S. 381–411. DOI: 10.3897/zookeys.365.5859.
- Voelkerding, Karl V.; Dames, Shale A.; Durtschi, Jacob D. (2009): Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. In: *Clinical Chemistry* 55 (4), S. 641–658. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112789.
- Vraneš, Miroslav; Scherer, Mario; Elliott, Keith (2017): Development and validation of the Investigator® Quantiplex Pro Kit for qPCR-based examination of the quantity and quality of human DNA in forensic samples. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 6, e518-e519. DOI: 10.1016/j.fsigs.2017.09.207.

- Walker, Jerilyn A.; Hughes, David A.; Hedges, Dale J.; Anders, Bridget A.; Laborde, Meredith E.; Shewale, Jaiprakash et al. (2004): Quantitative PCR for DNA identification based on genome-specific interspersed repetitive elements. In: *Genomics* 83 (3), S. 518–527. DOI: 10.1016/j.ygeno.2003.09.003.
- Walsh, P. S.; Erlich, H. A.; Higuchi, R. (1992): Preferential PCR amplification of alleles: mechanisms and solutions. In: *PCR methods and applications* 1 (4), S. 241–250. DOI: 10.1101/gr.1.4.241.
- Walsh, P. S.; Fildes, N. J.; Reynolds, R. (1996): Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. In: *Nucleic acids research* 24 (14), S. 2807–2812. DOI: 10.1093/nar/24.14.2807.
- Walsh, Sean (1998): Commentary on Kline MC, Jenkins B, Rogers S. Non-amplification of a vWA allele. In: *Journal of forensic sciences* (43(1)), S. 1103–1104.
- Walsh, Susan; Lindenbergh, Alexander; Zuniga, Sofia B.; Sijen, Titia; Knijff, Peter de; Kayser, Manfred; Ballantyne, Kaye N. (2011): Developmental validation of the IrisPlex system: determination of blue and brown iris colour for forensic intelligence. In: *Forensic Science International: Genetics* 5 (5), S. 464–471. DOI: 10.1016/j.fsigen.2010.09.008.
- Walsh, Susan; Liu, Fan; Wollstein, Andreas; Kovatsi, Leda; Ralf, Arwin; Kosiniak-Kamysz, Agnieszka et al. (2013): The HlrisPlex system for simultaneous prediction of hair and eye colour from DNA. In: *Forensic Science International: Genetics* 7 (1), S. 98–115. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.07.005.
- Warshauer, David H.; Lin, David; Hari, Kumar; Jain, Ravi; Davis, Carey; Larue, Bobby et al. (2013): STRait Razor: a length-based forensic STR allele-calling tool for use with second generation sequencing data. In: *Forensic Science International: Genetics* 7 (4), S. 409–417. DOI: 10.1016/j.fsigen.2013.04.005.
- Weber-Lehmann, Jacqueline; Schilling, Elmar; Gradl, Georg; Richter, Daniel C.; Wiehler, Jens; Rolf, Burkhard (2014): Finding the needle in the haystack: differentiating "identical" twins in paternity testing and forensics by ultra-deep next generation sequencing. In: *Forensic Science International: Genetics* 9, S. 42–46. DOI: 10.1016/j.fsigen.2013.10.015.
- Weir, Bruce S. (1996): Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data. 2. ed., [rev. and expanded]. Sunderland, Mass.: Sinauer.
- Welch, L. A.; Gill, P.; Phillips, C.; Ansell, R.; Morling, N.; Parson, W. et al. (2012): European Network of Forensic Science Institutes (ENFSI): Evaluation of new commercial STR multiplexes that include the European Standard Set (ESS) of markers. In: *Forensic Science International: Genetics* 6 (6), S. 819–826. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.03.005.
- Wetton, Jon H.; Higgs, Jenny E.; Spriggs, Adrian C.; Roney, Chris A.; Tsang, Carol S.F.; Foster, Aiden P. (2003): Mitochondrial profiling of dog hairs. In: *Forensic science international* 133 (3), S. 235–241. DOI: 10.1016/S0379-0738(03)00076-8.
- Whitaker, D. Thad; Ostrander, Elaine A. (2019): Hair of the Dog: Identification of a Cis-Regulatory Module Predicted to Influence Canine Coat Composition. In: *Genes* 10 (5). DOI: 10.3390/genes10050323.
- Whitaker, J.P.; Cotton, E.A.; Gill, P. (2001): A comparison of the characteristics of profiles produced with the AMPFISTR® SGM Plus™ multiplex system for both standard and low copy number (LCN) STR DNA analysis. In: *Forensic science international* 123 (2-3), S. 215–223. DOI: 10.1016/S0379-0738(01)00557-6.
- Wictim, Elizabeth; Kun, Teri; Lindquist, Christina; Malvick, Julia; Vankan, Dianne; Sacks, Benjamin (2013): Developmental validation of DogFiler, a novel multiplex for canine DNA profiling in forensic casework. In: *Forensic science international. Genetics* 7 (1), S. 82–91. DOI: 10.1016/j.fsigen.2012.07.001.
- Wiegand, P.; Budowle, B.; Rand, S.; Brinkmann, B. (1993): Forensic validation of the STR systems SE 33 and TC 11. In: *Int J Leg Med* 105 (6), S. 315–320. DOI: 10.1007/BF01222114.
- Wiegand, P.; Kleiber, M. (2001): Less is more--length reduction of STR amplicons using redesigned primers. In: *Int J Leg Med* 114 (4-5), S. 285–287. DOI: 10.1007/s004140000162.
- Wiegand, P.; Klein, R.; Braunschweiger, G.; Hohoff, C.; Brinkmann, B. (2006): Short amplicon STR multiplex for stain typing. In: *Int J Leg Med* 120 (3), S. 160–164. DOI: 10.1007/s00414-005-0048-8.
- Wittwer, C. T.; Ririe, K. M.; Andrew, R. V.; David, D. A.; Gundry, R. A.; Balis, U. J. (1997): The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. In: *BioTechniques* 22 (1), S. 176–181. DOI: 10.2144/97221pf02.
- Woerner, August E.; Mandape, Sammed; King, Jonathan L.; Muenzler, Melissa; Crysop, Benjamin; Budowle, Bruce (2021): Reducing noise and stutter in short tandem repeat loci with unique molecular identifiers. In: *Forensic Science International: Genetics* 51, S. 102459. DOI: 10.1016/j.fsigen.2020.102459.
- Xavier, Catarina; Parson, Walther (2017): Evaluation of the Illumina ForenSeq™ DNA Signature Prep Kit - MPS forensic application for the MiSeq FGx™ benchtop sequencer. In: *Forensic Science International: Genetics* 28, S. 188–194. DOI: 10.1016/j.fsigen.2017.02.018.
- Yoshii, T.; Tamura, K.; Taniguchi, T.; Akiyama, K.; Ishiyama, I. (1993): Water-soluble eumelanin as a PCR-inhibitor and a simple method for its removal. In: *Nihon hoigaku zasshi = The Japanese journal of legal medicine* 47 (4), S. 323–329.
- Young, Brian; King, Jonathan L.; Budowle, Bruce; Armogida, Luigi (2017): A technique for setting analytical thresholds in massively parallel sequencing-based forensic DNA analysis. In: *PloS one* 12 (5), e0178005. DOI: 10.1371/journal.pone.0178005.

- Zenke, Petra; Egyed, Balázs; Pádár, Zsolt; Kovács, Gábor (2015): Increasing relevance of non-human genetics in Hungarian forensic practice. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 5, e250-e252. DOI: 10.1016/j.fsigss.2015.09.100.
- Zgonjanin, Dragana; Soler, Mirella Perruccio; Antov, Mirjana; Redhead, Paul; Stojiljković, Goran; Milić, Aleksandra (2017): Validation and implementation of the Investigator® 24plex QS kit for forensic casework. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 6, e77-e79. DOI: 10.1016/j.fsigss.2017.09.051.
- Zhong, Chang; Green, Robert; Norona, Wilma; Mulero, Julio; Eardley, Rob; Ge, Jianye; Lackey, Angie (2019): Applied Biosystems VeriFiler Plus PCR Amplification Kit with internal quality control system provides confident answers with challenging forensic samples. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 7 (1), S. 441–443. DOI: 10.1016/j.fsigss.2019.10.044.
- Zupanič Pajnič, Irena; Zupanc, Tomaž; Balažic, Jože; Geršak, Živa Miriam; Stojković, Oliver; Skadrić, Ivan; Črešnar, Matija (2017): Prediction of autosomal STR typing success in ancient and Second World War bone samples. In: *Forensic science international. Genetics* 27, S. 17–26. DOI: 10.1016/j.fsigen.2016.11.004.

ANHANG

Folgende Dateien befinden sich als *Supporting Information* im elektronischen Anhang:

- Anhang 1: qPCR-basierte Daten
- Anhang 2: NGS und CE-basierte Daten
- Caucasian (FBI_2016)
- forenseq-dna-signature-prep-guide-15049528-01_Sept2015.pdf
- ForenSeq-DNA-Prep-Guide-VD2018005-A.pdf

Der elektronische Anhang befindet sich im DocFile Ordner von Sarah Aurora Heß:

DocFile-Nummer: 8876D1

Der elektronische Anhang wurde Prof. Dr. Peter Nürnberg und Prof. Dr. Michael Nothnagel zur Verfügung gestellt.

Die originalen STR-Profile, die Auskunft über personenbezogene genetische Profile geben, sind vertrauliche Informationen, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Richard Jäger, Fachbereich Angewandte Naturwissenschaften, Hochschule Bonn-Rhein-Sieg vorgehalten werden. Spezifische Anfragen sind gegebenenfalls an ihn zu richten (richard.jaeger@h-brs.de).

DANKSAGUNG

An erster Stelle danke ich Professor Dr. Nürnberg für die Möglichkeit der externen Betreuung an der Universität zu Köln. Professor Dr. Nürnberg und Professor Dr. Nothnagel danke ich insbesondere für ihre Unterstützung und die Erstellung der Gutachten. Professor Dr. Jäger danke ich für die Möglichkeit an diesem interessanten und finanziell aufwändigen Themengebiet zu forschen und für die Betreuung auf Seiten der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg.

Dem Graduierteninstitut der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg möchte ich ebenfalls danken für die organisatorische und finanzielle Unterstützung, sowie für die hilfreichen Fortbildungen. Der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg danke ich insbesondere für die finanzielle Unterstützung in Form des Stipendiums des Fachbereichs Angewandte Naturwissenschaften.

Professor Dr. Schneider möchte ich danken für die Beratung meines Promotionsprojektes und die Möglichkeit in seinem Labor Messungen durchzuführen.

Besonders danke ich der Rechtsmedizin Bonn für die fachliche Kompetenz und Hilfsbereitschaft, sowie der Möglichkeit Messungen in der Rechtsmedizin durchzuführen.

Weiterhin danke ich der qualitytype GmbH für die Bereitstellung der GenoProof Mixture3-Testsoftware, die fachkundige Beratung und die hilfreichen Seminare.

Mein Dank gilt ebenfalls Nicole, Sonja, Trine, Jan, Mona und Julia der Hochschule Bonn-Rhein-Sieg für eure persönliche und fachliche Unterstützung und Hilfe.

Ebenso danken möchte ich Laura, Sabine und Michael für die Bereitstellung der DNA von Primaten, Insekten und Hunden, sowie Steffi und Mogli, Mona und Motte für die tierisch gute Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinen Freundinnen und Freunden, meiner Familie und meinem Partner für eure Freundschaft und Liebe. Hanna und Micha, danke, dass ihr immer für mich da seid. Thomas, danke, dass du mich erdest.

ERKLÄRUNGEN**Erklärung zum Promotionsverfahren**

gemäß der Promotionsordnung vom 02. Februar 2006 mit den Änderungsordnungen vom 10. Mai 2012, 16. Januar 2013 und 21. Februar 2014

(Nichtzutreffendes bitte streichen; ggf. näher erläutern und entsprechende Unterlagen beifügen!)

1. Frühere Promotionsverfahren

~~1.1 Ich habe bereits einen Dokortitel erworben oder ehrenhalber verliehen bekommen.~~

~~(nähere Angaben)~~

~~1.2 Für mich ist an einer anderen Fakultät / Universität ein Promotionsverfahren eröffnet worden, aber noch nicht abgeschlossen.~~

~~(nähere Angaben)~~

~~1.3 Ich bin in einem Promotionsverfahren gescheitert.~~

~~(nähere Angaben)~~

~~2. Ich bin wegen einer vorsätzlichen **Straftat** zu einer Freiheitsstrafe von mindestens einem Jahr ohne Bewährung rechtskräftig verurteilt worden bzw. es läuft ein Strafverfahren gegen mich.~~

~~(nähere Angaben)~~

Ich versichere, alle Angaben wahrheitsgemäß gemacht zu haben.

Hess _____
Nachname in Druckbuchstaben

15.11.2021
Datum



Unterschrift

Erklärung zur Dissertation

gemäß der Promotionsordnung vom 02. Februar 2006 mit den Änderungsordnungen vom 10. Mai 2012, 16. Januar 2013 und 21. Februar 2014

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. rer. nat. Peter Nürnberg betreut worden.

Teilpublikationen:

Heß, Sarah Aurora; Biermann, Jan-Philip; Grabmüller, Melanie; Madea, Burkhard; Thiele, Ralf; Jäger, Richard (2019): Evaluation of STR profiles of single telogen hairs using probabilistic methods. In: *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*.

DOI: [10.1016/j.fsigss.2019.10.049](https://doi.org/10.1016/j.fsigss.2019.10.049). Online verfügbar unter:

[https://www.fsigeneticssup.com/article/S1875-1768\(19\)30209-4/fulltext](https://www.fsigeneticssup.com/article/S1875-1768(19)30209-4/fulltext)

Heß, Sarah Aurora; Trapani, Salvatore; Boronat, Maria Del Mar; Theunissen, Glenn M.G.; Rolf, Burkhard; Jäger, Richard (2021): Ribosomal DNA as target for the assessment of DNA degradation of human and canine DNA. In: *Legal Medicine* 48, S. 101819. DOI:

[10.1016/j.legalmed.2020.101819](https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2020.101819).

Langenfeld, der 15.11.2021



Sarah Aurora Heß

LEBENS LAUF

Sarah Aurora Heß

Biologin

Persönliche Daten

Geboren: 22.08.1985 in Speyer, Deutschland
Nationalität: Deutsch
E-Mail: sarahaurohess@gmail.com

Akademische Ausbildung

Seit Mai 2021 Promotionsstudium an der Universität zu Köln, Deutschland
10/2005 – 05/2012 Biologiestudium an der Johannes Gutenberg-Universität (JGU) Mainz, Deutschland
05/2012 Erreichter Abschluss: **Diplom-Biologin**
Abschlussnote 1,0 (Diplom mit Auszeichnung)
Diplomarbeit: *Analyse des Transkriptoms mutanter Drosophila Stämme mit Allelen des Gens DmX*; angefertigt am Institut für Molekulargenetik, gentechnologische Sicherheitsforschung und Beratung, JGU Mainz (Betreuer: E.R. Schmidt)
03/2011 Diplomprüfungen: Molekulargenetik (1,0); Immunologie (1,0); Anthropologie (1,0); Biochemie (freiwilliges Zusatzfach: 1,7)
09/2009 Vordiplom: Abschlussnote 1,7
09/2009 – 03/2010 Erasmus Auslandsstudium an der University of Malta, Malta
1996 – 2005 Hans Purrmann-Gymnasium Speyer (Abitur: 03/2005, NC: 1,7)

Beruflicher Werdegang

Seit 08/2019 **Wissenschaftlerin**
QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Projektmanagement und Produktentwicklung in der Forschung & Entwicklung

02/2015 – 02/2019 **Wissenschaftliche Angestellte**
Hochschule Bonn-Rhein-Sieg (H-BRS), Rheinbach, Deutschland (Betreuer: R. Jäger)

- Praktische Durchführung der Experimente für das Promotionsvorhaben
- Entwicklung und Validierung artspezifischer qRT-PCR-Methoden
- Verbesserung der DNA-Extraktion, Reinigung und Anreicherung von degradierter DNA telogener Einzelhaare
- Validierung einer in-house entwickelten MiSeq FGx™-Sequenzierungsmethode, optimiert für degradierte DNA, die auf Mini-STRs abzielt

- 06/2012 – 02/2015 mit Unterbrechung 02/2013 – 06/2013 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin** der AG Nitsch am Institut für Anatomie & Neurobiologie (IMAN), Universitätsmedizin Mainz
- Pflege, Haltung und Zucht muriner Versuchstiere, inklusive Markierung (Ohr, Tattoo), Entnahme von Gewebeproben (Schwanzspitzenbiopsie)
 - Genotypisierung transgener Mauslinien
- 02/2013 – 04/2013 **Praktikantin** am Institut „Plant & Food Research“, Auckland, Neuseeland: *Charakterisierung transgener Apfelinien* (Betreuer: R. Espley)
- Analyse der Transkriptionsrate von MdMYB10 mit Hilfe von qPCR
 - Analyse der genomischen DNA auf Integrationsstellen transgener Linien von *Malus domestica* anhand der *PCR-based Genome Walking*-Methode
- 2008 – 2011 **Studentische Hilfskraft** am Institut für Molekulargenetik, JGU Mainz
- Laborarbeit, v.a. Genexpression
 - Betreuung verschiedener Praktika zur klassischen und molekularen Genetik

Ehrenamt

- 10/2016 – 02/2019 Gewähltes Mitglied als Promovierendenvertretung des Institutsrats des Graduierteninstituts der H-BRS, Rheinbach, Deutschland
- SS 2008 – WS 2012 Gewähltes Mitglied des Fachschaftsrats Biologie, JGU Mainz

Stipendien und Förderungen

- 03/2018-02/2019 PhD-Stipendium des Fachbereichs Angewandte Naturwissenschaften der H-BRS, Rheinbach, Deutschland
- 06/2018 Reisekostenzuschuss für den Kongress der *Deutschen Gesellschaft für Abstammungsbegutachtung 2018* (Deutschland)
- 07/2011 – 12/2011 Förderungsstipendium der Stipendienstiftung Rheinland-Pfalz für Abschlussarbeiten
- 09/2009 – 03/2010 Erasmusstipendium zum Auslandsaufenthalt auf Malta

Vorstellungen der Forschungsergebnisse

- Vortrag auf dem *Spurenworkshop 2017, 2018 und 2019* und dem Kongress der *Deutschen Gesellschaft für Abstammungsbegutachtung 2018* (Deutschland und Schweiz)
- Poster-Präsentationen auf dem *Genetics in Forensics Kongress 2017* (UK) und dem *International Society for Forensic Genetics Kongress 2019* (Tschechien)

Sprachkenntnisse Deutsch (Muttersprache)
Englisch (verhandlungssicher)

Organisationen Internationale Gesellschaft für Forensische Genetik (*International Society for Forensic Genetics*)

Langenfeld, 15.11.2021