



# Masterarbeit

## **Effizienz und Validität (semi-)automatisierter sowie nuklease-basierter DNA-Extraktionsverfahren:**

Ein kritischer Vergleich zur konventionellen differentiellen Lyse bei herausfordernden Sexualdeliktsspuren

eingereicht von

**BSc Hofer Eva-Maria Veronika**

zur Erlangung des akademischen Grades  
**Master of Science (Continuing Education)**  
**MSc (CE)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**  
ausgeführt im  
**Universitätslehrgang Medizinische Genetik**

unter der Anleitung von Betreuerin  
a.Univ.Prof. Dr. Hatzler-Grubwieser Petra

# **1. Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass, sofern bei der Erstellung dieser Arbeit Künstliche Intelligenz (KI) Werkzeuge zur Generierung und/oder Korrektur bestimmter Textpassagen verwendet wurden, dieser Einsatz unter Einhaltung ethischer Grundsätze, akademischer Integrität und den Vorgaben meiner Universität erfolgte, sowie in Folge dies transparent gemacht und in angemessener Weise gekennzeichnet wurde.

Innsbruck, am 06.01.2026

Hofer Eva-Maria Veronika, BSc

## **2. Danksagung**

Mit dieser Seite möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die auf vielfältige Art und Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben. Ein großer Dank gilt an a. Univ. Prof. Dr. Hatzler-Grubwieser Petra und a. Univ. Prof. Dr. Steinlechner Martin für die investierte Zeit und die wertvolle Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich meiner Familie und insbesondere meiner Mama danken, die mich mit ihrem unerschütterlichen Optimismus und ihrer Resilienz täglich inspiriert. Besonders danken möchte ich Pamela, für ihre Geduld und die beständige Unterstützung.

### 3. Zusammenfassung

Eine weit verbreitete und etablierte Methode zur forensischen DNA-Analyse von Beweismitteln aus Sexualstraftaten ist die differentielle DNA-Extraktion (DE). Die vorliegende Arbeit untersucht das am hiesigen Institut verwendete konventionelle manuelle DE-Protokoll, als semi-automatisierte Verfahren den EZ2 DNA Investigator Sep & Prep Kit (Qiagen) und den Maxwell DE Casework Kit (Promega) sowie als alternative Methode den Erase Sperm Isolation Kit (PTC Laboratories) und evaluiert die Belastbarkeit dieser Systeme bei herausfordernden forensischen Mischspuren mit ungünstigen Täter-Opfer-Verhältnissen. Hierzu wurden simulierte Beweismittel in Form von Vaginalabstrichen mit Samenflüssigkeits-Verdünnungen von 1:100 bis 1:800 erstellt und mittels rt-PCR sowie STR-Analyse analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die konventionelle DE insbesondere bei hohen Samenflüssigkeits-Verdünnungen die stabilsten Resultate erbrachte. Der EZ2 DNA Investigator Sep & Prep Kit lieferte im Vergleich die stabilste Performance der semi-automatisierten Systeme und zeigte Ergebnisse, die weitgehend mit der konventionellen DE vergleichbar sind. Er stellt somit eine zeiteffiziente Alternative für Labore mit hohem Probenaufkommen dar, sofern keine extremen Minimalspuren vorliegen. Im Gegensatz dazu wies der Maxwell DE Casework Kit in seiner jetzigen Form ein unzureichendes Trennpotential auf, was zu einer Verschleppung weiblicher Opfer-DNA in die Pelletfraktion und einer Maskierung der männlichen STR-Merkmale führte. Der nuklease-basierte Erase Sperm Isolation Kit hingegen erzielte zwar eine hohe Reinheit der männlichen Profile, war jedoch durch einen signifikanten Verlust an Spermien-DNA gekennzeichnet, was die Sensitivität insbesondere bei Minimalspuren stark einschränkt. Vielversprechend wären technologische Weiterentwicklungen von Zellseparations-Ansätzen, die zukünftig in forensischen Routinelaboren hilfreich sein könnten, insbesondere für Proben, bei denen auch die konventionelle DE an ihre Grenzen stößt.

## 4. Abstract

A widely used and established method for forensic DNA analysis of evidence from sexual assault cases is differential DNA extraction (DE). This study examines the conventional manual DE protocol used at our institute, the EZ2 DNA Investigator Sep & Prep Kit (Qiagen) and the Maxwell DE Casework Kit (Promega) as semi-automated methods, and the Erase Sperm Isolation Kit (PTC Laboratories) as an alternative method, and evaluates the reliability of these systems in challenging forensic mixed traces with unfavorable offender-victim ratios. Mock casework samples in form of vaginal swabs with semen dilutions of 1:100 to 1:800 were created and analyzed using rt-PCR and STR-Typing. The results show that conventional DE provides the most stable results, especially with high sperm dilutions. In comparison, the EZ2 DNA Investigator Sep & Prep Kit delivered the most stable performance of the semi-automated systems and showed results that were largely comparable to conventional DE. It therefore represents a time-efficient alternative for laboratories with high sample throughput, provided that there are no extreme minimal traces. In contrast, the Maxwell DE Casework Kit in its current form showed insufficient separation potential, which led to female victim DNA being carried over into the pellet fraction and masking the male STR markers. The nuclease-based Erase Sperm Isolation Kit, on the other hand, achieved a high purity of male profiles, but was characterized by a significant loss of sperm DNA, which severely limits sensitivity, especially in cases of minimal traces. Technological advances in cell separation approaches could be promising and may prove helpful in routine forensic laboratories in the future, especially for samples where conventional DE reaches its limits.

## 5. Inhaltsverzeichnis

<b>1. Eidesstattliche Erklärung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Danksagung</b> .....	<b>2</b>
<b>3. Zusammenfassung</b> .....	<b>3</b>
<b>4. Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>5. Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>6. Abkürzungen und deren Erklärung</b> .....	<b>7</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>10</b>
<b>9. Einleitung</b> .....	<b>11</b>
9.1 Herausforderungen bei der Analyse von Sexualdelikten in der forensischen Praxis .....	12
9.2 Separation von Zellen in der Probenvorbereitung vor der DNA-Extraktion .....	15
9.3 Differentielle DNA-Extraktion.....	18
9.3.1 Konventionelle differentielle Extraktion .....	19
9.3.2 Semi-automatisierter Ansatz .....	24
9.3.3 Nuklease-basierter Ansatz .....	26
9.4 STR-Analyse .....	27
9.5 Y-chromosomale STR-Analyse .....	28
9.6 Auswertung von STR-Profilen .....	29
9.7 Formulierung der Forschungsfrage .....	30
<b>10. Material und Methoden</b> .....	<b>31</b>
10.1 Auswahl und Vorbereitung der simulierten Beweismittel .....	31
10.4 Konventionelle Differentielle Extraktion.....	35
10.5 EZ2 DNA Investigator Sep&Prep Kit.....	37
10.6 Maxwell DE Casework Kit .....	38
10.7 Erase Sperm Isolation Kit.....	40

10.8	rt-qPCR.....	41
10.9	Autosomale STR-Analyse .....	43
10.10	Y-chromosomale STR-Analyse .....	45
10.11	Kapillarelektrophorese.....	46
10.12	Kriterien zur Effizienzbewertung.....	48
10.13	Datenaufbereitung und statistische Auswertung.....	48
<b>11.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
11.1	Quantifizierungs- und Y-STR Ergebnisse .....	49
11.2	Mittlere männliche und weibliche DNA-Konzentration .....	52
11.3	Konventionelle Differentielle Extraktion.....	54
11.4	EZ2 DNA Investigator Sep&Prep Kit.....	54
11.5	Maxwell DE Casework Kit .....	56
11.6	Erase Sperm Isolation Kit.....	57
11.7	STR Ergebnisse .....	58
<b>12.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>62</b>
<b>13.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>68</b>

## 6. Abkürzungen und deren Erklärung

Abkürzung	Erklärung
A. bidest	Aqua bidest
Abb.	Abbildung
ABI	Applied Biosystems
AK	Antikörper
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
Ca	Calcium
CCD-Kamera	Charge Coupled Device – Bildsensor
CE	Kapillarelektrophorese
Ct	cycle threshold/Schwellenzyklus
DE	Differentielle Extraktion
DEP	Dielektrophorese
DL	Differentielle Lyse
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DTT	Dithiothreitol
EDNAP	European DNA Profiling Arbeitsgruppe
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Erase	Erase Sperm Isolation
f	forward strand / Sense-Strang
FACS	fluoreszenzaktivierte Zellanalyse
h	Stunde(n)
Hi-Di-Formamid	Hochdeionisiertes – Formamid
HP	Hauptprofil
ILS	Interner Längenstandard
IPK	Interne-Positiv – Kontrolle
ISFG	Internationale Gesellschaft für Forensische Genetik
k.DE	konventionelle Differentielle Extraktion
kV	Kilovolt
LCM	Laser-Capture – Mikrodisektion
M	Molar
M.DE	Maxwell DE Casework
MACprep	Magnetische Zellseparation
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
MGB	Minor Groove Binder
MGBNFQ	Minor Groove Binder Non-Fluorescent Quencher
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mn	Mangan
M <sub>r</sub>	Mischungs – Ratio
MS	Mischspur
M <sub>x</sub>	Mischungs – Proportion
n.v.	nicht verwertbar
NaCl	Natriumchlorid
NETs	Neutrophile extrazelluläre Fallen
ng	Nanogramm
P	Profil
P	Pelletfraktion
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	potentia hydrogenii / Potential des Wasserstoffs
QG	Qiagen
qPCR	Quantitative Polymerase Kettenreaktion
r	reverse strand / Antisense-Strang

rcf	Relative Zentrifugalkraft
RFLP	Restriktions – Fragment – Längen – Polymorphismus
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit
rpm	Umdrehungen pro Minute
rt-PCR	real time (Echtzeit) – Polymerase Kettenreaktion
rt-qPCR	real time (Echtzeit) – Quantitative Polymerase Kettenreaktion
S&P	EZ2 DNA Investigator Sep & Prep
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek./s	Sekunde(n)
STR	Short Tandem Repeat
T:O	Täterschaft – Opfer – Mischungsverhältnis
Tab.	Tabelle
TCEP	Tris(2carboxyethyl)phosphin
TE	Tris – EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Ü	Überstandsfraktion
µl	Mikroliter

## 7. **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Herausforderungen in der PCR-Analyse bei Mischspuren in Beweismitteln aus Sexualstraftaten.....	14
Abbildung 2: Vorteile der Y-chromosomalen STR-Analyse bei Mischspuren in Beweismitteln aus Sexualstraftaten.....	15
Abbildung 3: Kryoschnitt von Spermienchromatin eines Hengstes nach partieller Dekondensation mit 10mM DTT (28). ....	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung von Protamin-DNA-Filamenten (28). ....	21
Abbildung 5: Vorbereitung der simulierten Beweismittel und Versuchsablauf. ....	33
Abbildung 6: Workflow der konventionellen differentiellen Extraktion.....	36
Abbildung 7: Workflow des EZ2 DNA Investigator Sep & Prep Kit. ....	38
Abbildung 8: Workflow des Maxwell DE Casework Kit. ....	39
Abbildung 9: Workflow des Erase Sperm Isolation Kit.....	41
Abbildung 10: Diagramme 1-10 der STR-Ergebnisse der Pelletfraktionen (P).....	61

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vorbereitung der simulierten Beweismittel.....	34
Tabelle 2: Sequenzen der Primer und Sonden für die rt-qPCR.....	42
Tabelle 3: Herstellung eines Prä-Mastermix für die rt-qPCR.....	43
Tabelle 4: Herstellung eines 10µl rt-qPCR-Mastermix.....	43
Tabelle 5: Einstellungen am QuantStudio™ 5Real-Time PCR Instrument .....	43
Tabelle 6: Herstellung eines 25 µl PCR-Mastermix für die autosomale STR- Analyse .....	44
Tabelle 7: DNA-Einsatzmenge in 25 µl PCR-Ansatz nach DNA-Konzentration ...	44
Tabelle 8: PowerPlex ESX 17 System Thermocycler Protokoll mit 30 Zyklen.....	44
Tabelle 9: STR-Marker PowerPlex ESX 17 System .....	45
Tabelle 10: Herstellung eines 25 µl PCR-Mastermix für die Y-chromosomale STR Analyse .....	45
Tabelle 11: PowerPlex Y23 System Thermocycler Protokoll mit 30 Zyklen .....	46
Tabelle 12: Y-chromosomale-STR-Marker PowerPlex Y23 System.....	46
Tabelle 13: Herstellung eines 11,3µl CE-Ansatz .....	47
Tabelle 14: Ergebnisse der DNA-Konzentration der Pelletfraktionen sowie der mittleren RFU Höhe der Y-STRs .....	50
Tabelle 15: Ergebnisse der DNA-Konzentration der Überstandsfraktionen.....	51
Tabelle 16: Ergebnisse der mittleren männlichen und weiblichen DNA- Konzentration sowie der mittleren RFU Höhe der Y-STRs.....	53
Tabelle 17: Übersicht STR Untersuchungen Konventionelle DE Methode.....	54
Tabelle 18: Übersicht STR Untersuchungen EZ2 DNA Investigator Sep&Prep Methode .....	55
Tabelle 19: Übersicht STR Untersuchungen Maxwell DE Casework Methode.....	56
Tabelle 20: Übersicht STR Untersuchungen Erase Sperm Isolation Methode .....	57
Tabelle 21: Vergleich der DE-Methoden hinsichtlich Sensitivität, Reinheit und Zeitaufwand.....	67

## 9. Einleitung

Die Beweissicherung von forensischen Spuren und DNA-Proben bei Sexualstraftaten und die Identifizierung einer Täterschaft spielen in der Strafverfolgung eine zentrale Rolle. Die Statistik Austria berichtet im Jahr 2024 in Österreich insgesamt 1.443 strafbare Handlungen nach dem Strafgesetzbuch gegen die sexuelle Integrität und Selbstbestimmung (§§ 201-220b), davon gab es nach dem jeweiligen Strafsatz 710 Verurteilungen (ca. 50%), dabei waren 97% der Verurteilten Männer (1).

Die 2011 veröffentlichte *Österreichische Prävalenzstudie zur Gewalt an Frauen und Männern* des Österreichischen Instituts Familienforschung (ÖIF) erhob, dass nahezu ein Drittel aller Frauen (29,5%) sexuelle Gewalt erfahren hat. Unter den Frauen, die eine Vergewaltigung (Definition laut Studie: „jemand ist gegen meinen Willen mit einem Penis oder etwas anderem in meinen Körper eingedrungen“) erlebt haben (7%, 91 Frauen), erstatteten nur 8,8% eine Anzeige. Die Dunkelziffer an Vergewaltigungen in Österreich liegt bei 1:11 (2).

Die 2022 veröffentlichte Studie *Geschlechtsspezifische Gewalt gegen Frauen in Österreich* erhob im Jahr 2021, dass nicht ganz ein Viertel der Frauen sexuelle Gewalt innerhalb oder außerhalb von intimen Beziehungen (ab dem Alter von 15 Jahren) (24%) erlebt haben (3). Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) schätzt, dass fast jede dritte Frau (35%) weltweit im Laufe ihres Lebens sexuelle Gewalt erlebt (4).

Eine weit verbreitete und etablierte Methode zur forensischen DNA-Analyse von Beweismitteln aus Sexualstraftaten ist die differentielle DNA-Extraktion (DE), auch als differentielle Lyse (DL) bezeichnet. Seit der erstmaligen Beschreibung der Methode im Jahr 1985 gab es einige Weiterentwicklungen und Modifizierungen einzelner Protokollschritte (5) (6). Dazu gehören beispielsweise unterschiedliche Konzentrationen der verwendeten Chemikalien oder Änderungen bei den Inkubationszeiten und -temperaturen. Durch die Vielzahl an Protokollen zur Durchführung einer differentiellen DNA-Extraktion ist eine allgemeine Vergleichbarkeit mit anderen Methoden nur schwer möglich, weshalb jedes Labor individuell sein verwendetes Protokoll mit aktuellen, neuen Ansätzen überprüfen und vergleichen sollte.

In der vorliegenden Masterarbeit wird die „konventionelle differentiellen DNA-Extraktion (DE)“ als die Methode beschrieben, welche auf manuellen Arbeitsschritten basiert und seit 1985 in Verwendung ist (5). Die Forschungsfrage der Arbeit evaluiert vergleichend, ausgewählte semi-automatisierte Ansätze und einen nuklease-basierten Ansatz mit der konventionellen DE hinsichtlich ihrer Effizienz bei der Analyse von Beweismitteln aus Sexualstraftaten. Ziel ist es herauszufinden, ob sich die am hiesigen Institut aktuell verwendete konventionelle DE in diesem Vergleich bewährt oder ob es Verbesserungsbedarf hinsichtlich der Methodik gibt.

Da es sich bei Beweismitteln aus Sexualstraftaten, insbesondere bei Vergewaltigungen, in erster Linie um Spermaspuren einer „männlichen“ Täterschaft handelt, wird in dieser Arbeit von einer „männlichen“ Täterschaft ausgegangen. In diesem Sinne sind auch jene Personen gemeint, die Sperma produzieren können, sich aber nicht als „männlich“ identifizieren. Als Opfer oder „geschädigte Personen“ sind alle Personen gemeint, unabhängig von ihrem biologischen Geschlecht oder ihrer geschlechtlichen Identität.

## **9.1 Herausforderungen bei der Analyse von Sexualdelikten in der forensischen Praxis**

Bei Beweismitteln aus Sexualstraftaten handelt es sich in erster Linie um Spermaspuren (vorausgesetzt es handelt sich um eine „männliche“ Täterschaft), wobei die Spur selten als Reinsperma vorliegt, sondern als Mischung aus unterschiedlichen Anteilen an Sperma und anderen Sekreten wie beispielsweise Vaginalsekret oder Speichel. Solche Sekretspuren haften z.B. an Originalspurenlägern wie Kleidung (z.B. Unterwäsche), Binden, Slipeinlagen, Tampons oder Gegenständen vom Tatort wie Bettwäsche, Autositzbezug, Decken, benutzte Kondome und anderen Objekten, welche laut Aussage der geschädigten Person eingeführt wurden. Überwiegend werden bei Sexualstraftaten im Rahmen einer möglichst zeitnah durchgeführten, körperlichen Untersuchung Abstriche von der geschädigten Person (z.B. Vaginal-, Anal- Penis- und Mundhöhlenabstriche, Körperabriebe) entnommen. Ist eine tatverdächtige Person bekannt, sollte diese ebenfalls sofort nach der Tat untersucht werden. Um eine Bakterienbildung und Degradierung der

gesicherten Spuren und der darin enthaltenen DNA zu vermeiden, sollten die feuchten Abstriche über mehrere Stunden an der Luft getrocknet oder in luftdurchlässigen Verpackungen wie Swab-Safe-Boxen (Kartonschachteln) oder Forensik-Röhren, die eine Belüftungsmembran oder Trockenmedium enthalten, verstaut werden (7).

Der Erfolg einer forensischen DNA-Analyse von Beweismitteln aus Sexualstraftaten hängt von zahlreichen Faktoren ab, wie beispielsweise die Anzahl der Täterschaft, die Zeitspanne zwischen Tatzeitpunkt und der Probenentnahme, die Qualität der Spermien und der Probe selbst, sowie auch deren Lagerungsbedingungen (8).

Die Forensik verwendet die Methode der autosomalen STR (Short Tandem Repeat) - Typisierung um einzigartige DNA-Profile von Personen zu erstellen, um diese voneinander unterscheiden und identifizieren zu können. Dazu werden Bereiche der Kern-DNA (nukleäre DNA) der nichtgeschlechtlichen Chromosomen (Autosomen) untersucht, vermessen und als DNA-Profil (bestehend aus STR-Merkmalen) dargestellt (9).

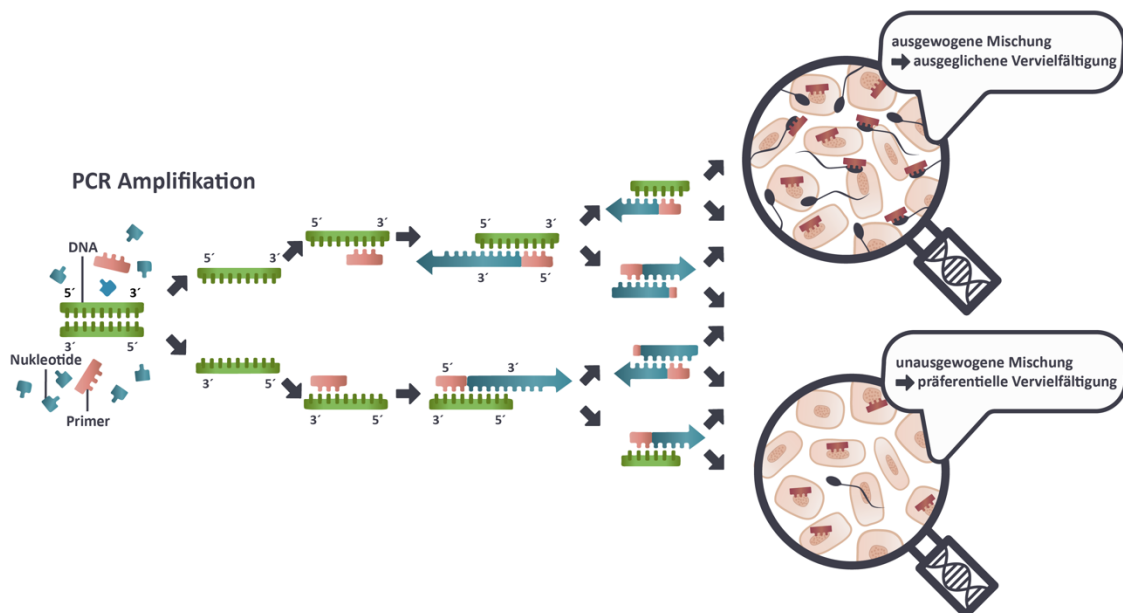
Eine der größten Herausforderungen bei Beweismitteln aus Sexualstraftaten kann das oft vorhandene ungünstige Mischungsverhältnis von hohen Opfer-DNA-Anteilen, beispielsweise durch Vaginalsekret, und geringen Täterschafts-DNA-Anteilen aus den Spermaspuren darstellen. Eine autosomale STR-Typisierung führt bei einem unausgewogenem Täterschaft-Opfer-Mischungsverhältnis (T:O-Ratio) aufgrund der präferentiellen PCR-Amplifikation oft nur zu einem reinen Opfer-Profil und das DNA-Profil der Täterschaft kann aufgrund des hohen Opfer-Anteils nicht oder nicht sicher abgeleitet werden (siehe Abb. 1). Bei einer niedrigen T:O-Ratio mit einem Überschuss an weiblicher DNA kann dann die Typisierung von Y-STRs nützlich sein. Hier werden STR-Marker typisiert, die auf dem Y-Chromosom liegen, das nur bei Männern vorkommt (siehe Abb. 2) (9).

Auch wenn sich die Zeitspanne zwischen Tatzeitpunkt und Probenentnahme verlängert, verschlechtert sich das Mischungsverhältnis zwischen Täterschafts-DNA- und Opfer-DNA-Anteilen. Fonneløp et al. zeigten in ihrer Studie, dass Spermien in Genitalabstrichen relativ lange erhalten bleiben und dort bei einer Ejakulation mit normaler Spermienqualität der potentiellen Täterschaft bis zu 72 Stunden nach Ejakulation (mit der höchsten Nachweisrate

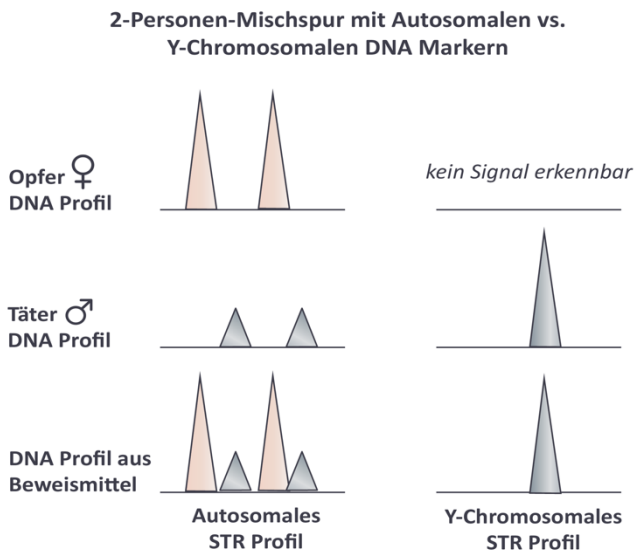
innerhalb der ersten 48 Stunden) und in Ausnahmefällen bis zu 6 Tagen nachweisbar sind (10).

Spermien müssen bei einer Ejakulation in die Vagina durch die Gebärmutter und die Eileiter wandern, ohne dabei eine Immunreaktion auszulösen weshalb jene Spermien, die keine Eizelle befruchten durch Apoptose und Phagozytose entfernt werden. Bei den meisten Spermien wird die Apoptose nicht induziert, sondern ist eine spontane Folge ihrer „anstrengenden“ Versuche, die Eizelle zu erreichen und zu befruchten. Die Apoptose kann die Identifizierung von Spermien beeinträchtigen, wenn das Zeitfenster zwischen Zeitpunkt der Tat und der Probenentnahme zu groß ist (11) (12).

Eine rasche und korrekte Probenentnahme nach der Tat ist essenziell, um die Nachweisrate von Täter-DNA zu maximieren (10) (13).



**Abbildung 1: Herausforderungen in der PCR-Analyse bei Mischspuren in Beweismitteln aus Sexualstraftaten.** Die PCR als semiquantitatives Verfahren mit präferentieller Amplifikation. Bei einer ausgewogenen Mischung binden die Primer mehr oder weniger zufällig an die DNA aller Zellen einer Mischung gleichermaßen und man erhält im optimalen Fall ein ausgewogenes DNA-Profil. Bei größeren, ungleichen T:O-Ratios haben die Primer kaum Chancen an die DNA der stark unterrepräsentierten Zellen zu binden und es wird nur die DNA der dominanten Teile der Mischung dargestellt.



## **Abbildung 2: Vorteile der Y-chromosomalen STR-Analyse bei Mischspuren in Beweismitteln aus Sexualstraftaten.**

Bei einer niedrigen T:O-Ratio kann die Typisierung von Y-STRs nützlich sein. Hier werden STR-Marker typisiert, die auf dem Y-Chromosom liegen, das nur bei Männern vorkommt.

Eines der Hauptziele bei der Analyse von Beweismitteln aus Sexualstraftaten ist die Entmischung der Opfer-DNA von der Täterschafts-DNA, insbesondere bei einer ungünstigen T:O-Ratio. Dies lässt sich in den folgenden Analyseschritten erreichen:

- in der Probenvorbereitung durch Zelltrennung von Zellpopulationen (z.B. Spermien und Epithelzellen)
- in der DNA-Extraktion (z.B. durch eine differentielle Zelllyse/-Extraktion)
- in der PCR (z.B. durch eine Y-STR-Analyse)
- in der Auswertung von STR-Profilen (z.B. durch eine Mischspuren-Dekonvolution)

## **9.2 Separation von Zellen in der Probenvorbereitung vor der DNA-Extraktion**

Mehrere akademische Forschungsgruppen und Unternehmen haben in der forensischen DNA-Analyse Ansätze entwickelt, um in der Probenvorbereitung vor der DNA-Extraktion Zellen voneinander zu trennen. Unter den Methoden finden sich unter anderem die Separation einzelner Hautschuppen (Partikel), die Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM), mehrere Antikörper-basierte Ansätze und mehrere Mikrofluidik-Technologien, wie beispielsweise das Dielektrophorese (DEP)-Array und die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS).

Die mikroskopische Separation einzelner Hautschuppen (Partikel) auf Abklebungen von beispielsweise Textilien oder der Opferhaut ist bei der Identifizierung einzelner Spurenverursacher in komplexen Mischspuren besonders nützlich und erhöht die Wahrscheinlichkeit DNA-Profile von Opfer und Täterschaft getrennt zu erhalten. Hautschuppen (Partikel) können dabei je nach Größe und Herkunft eine bis viele Zellen enthalten, sind jedoch in der Regel mikroskopisch klein. Da die Methode zeitintensiv ist und analytisches Know-How erfordert, wird sie vorwiegend in der Aufarbeitung von Cold-Case-Fällen oder bei Kapitaldelikten eingesetzt (14). Eine Hautschuppenanalyse kann auch bei Sexualdelikten eingesetzt werden. Abhängig von den Fallumständen können für die Entscheidung die erwartete Erfolgsquote, die anfallenden Kosten und Laborkapazitäten von Bedeutung sein.

Die Laser-Capture-Mikrodissektion (LCM) kombiniert das Lichtmikroskop mit einer Lasertechnologie, welche auf bestimmte Zellen z.B. Spermien gerichtet ist, um diese mit einer optischen Pinzette hochpräzise zu isolieren. Die LCM ist insbesondere bei forensischen Proben mit einer geringen Spermienanzahl sowie degradierten Proben nützlich. Ein Einsatz der LCM in der forensischen Routinediagnostik ist durch die hohen Kosten (Spezialgerät), sowie dem zeitintensiven Arbeitsaufwand und dem umfangreichen erforderlichen Fachwissen allerdings derzeit kaum umsetzbar (15).

In der forensischen DNA-Analyse gibt es Antikörper (AK) basierte Ansätze, um spezifisch Spermien aus Mischspuren zu trennen. Dabei binden spermaspezifische Proteine an AK, welche an magnetischen Beads (Partikel) gebunden sind und somit anschließend extrahiert werden können. Allerdings kann bei älteren Proben mit langen Lagerungsbedingungen die Bindungseffizienz der AK aufgrund der Degradierung der Spermienstruktur (Abbau des Spermienhalses und Geißel/Flagellum) abnehmen oder es kann zu einer unspezifischen AK-Bindung der Nicht-Spermienzellen kommen (16).

Zhao et al. konnten zeigen, dass ein AK-basierter Ansatz, der auf die auf den Spermienköpfen lokalisierte PH-20-Hyaluronidase abzielt, sowohl intakte als auch beschädigte Spermien ohne Flagellum erfolgreich binden konnte. Die Studie zeigt auch, dass AK-basierte Ansätze von einer DNase-Behandlung zur Entfernung der Epithelzell-DNA profitieren. Dieser vielversprechende Ansatz war auch in Proben mit einem ungünstigen Spermien-Epithelzell-

Mischungsverhältnis erfolgreich und die Ergebnisse der Studie zeigten eine höhere Sensitivität im Vergleich zur DE. Weitere Untersuchungen dieses Ansatzes sind notwendig und noch ausständig (17).

Grosjean et al. testeten und verglichen den Erase Sperm Isolation Kit (PTC Laboratories) als nuklease-basierter DE Ansatz mit dem bereits kommerziell erhältlichen MACSprep Forensic Sperm MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) als AK-basierter Ansatz. Die Studie ergab, dass der Erase Sperm Isolation Kit hinsichtlich der Effizienz der Spermien-DNA-Ausbeute für Proben mit geringer Spermienanzahl in Gegenwart einer hohen Epithelzellanzahl dem MACSprep Kit überlegener war. Wenn aber die Reinheit der Spermienfraktionen berücksichtigt wurde, stellte sich das anders dar. So erreichte der MACprep Kit bei den 1:200 Samenverdünnungen etwa zehnmal reinere Ergebnisse im Vergleich zum Erase Sperm Isolation Kit. Somit müsste die derzeitige Spermien-DNA-Ausbeute für stark verdünnte Spermaproben mit dem MACSprep-Kit erhöht werden, damit dieser Kit aufgrund der höheren Reinheit zumindest als Alternative in Betracht gezogen werden könnte. Zusätzlich anzumerken ist auch, dass beide dieser Kits hinsichtlich der Kosten kaum mit den, meist selbst hergestellten DE-Lösungen mithalten können (18).

Das DEPArray-System (Menarini Silicon Biosystems) nutzt die Dielektrophorese (DEP), um einzelne Spermienzellen mit hoher Sensitivität und Selektivität aus Mischspuren zu isolieren. Ursprünglich wurde die Technik zum Nachweis zirkulierender Tumorzellen entwickelt und ermöglicht eine präzise Einzelzell-Erfassung und -Bildgebung. Laut Williamson et al. erhöhte die DEPArray-Analyse im Vergleich zur differentiellen DNA-Extraktion die Wahrscheinlichkeit ein Single-Source-Profil zu erhalten von 32,1% auf 96,2% (19).

Die Durchflusszytometrie (fluoreszenzaktivierte Zellanalyse, FACS) wird in der Forensik ebenfalls als vielversprechende Analysemethode zur Spermienzelltrennung aus Mischspuren herangezogen. Dabei werden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, die spezifisch an Spermienproteine oder Zytokeratine binden, um Spermien von anderen Zellen zu unterscheiden. Fokias et al. trennten mittels FACS-Analyse erfolgreich Spermien und Nicht-Spermien-Zellen im Verhältnis von 1:500 (20).

Obwohl Mikrofluidik-Technologien wie das DEPArray oder die FACS Analyse in der Forensik für die Spermienzelltrennung aus Mischspuren

vielversprechend sind, limitieren die derzeit hohen Kosten sowie der komplexe und zeitintensive Arbeitsaufwand einen Einsatz für die Routinediagnostik. Einschränkend ist auch die Bedingung einer qualitativen Zell-Membranstruktur, da die Probenqualität durch bspw. die Probenentnahme- und Lagerungsbedingungen (z.B. Trocknung) beeinflusst wird. Schließlich stellen forensische Proben eine zusätzliche Herausforderung für die Mikrofluidik-Technologien durch das Probenvolumen bzw. Makro-Mikro-Schnittstellenproblem dar. Mikrofluidik-Systeme akzeptieren routinemäßig Probenvolumina in der Größenordnung von einigen zehn Mikrolitern, was für einige forensische Szenarien ausreichend sein mag, für zahlreiche Fallkonstellationen jedoch nicht (19) (21) (22).

Moderne Zellseparations-Ansätze bieten somit zwar grundsätzlich mehrere Vorteile wie eine verbesserte Spezifität und ein Automatisierungspotential, eine breite Implementierung dieser Methoden in forensischen Routinelaboren ist jedoch sehr kostenintensiv und erfordert spezielle Infrastrukturen. In Zukunft wird sich zeigen, ob diese innovativen Ansätze ihr großes Potenzial durch weitere Forschungsarbeiten und technologische Weiterentwicklungen in die Routinediagnostik bringen können (21) (22).

### **9.3 Differentielle DNA-Extraktion**

Das Ziel einer erfolgreichen differentiellen DNA-Extraktion (DE) besteht darin, ein DNA-Profil einer Spermaspur aus einer zuvor gemischten Probe zu erhalten. In vielen Fallkonstellationen leistet das Opfer einen höheren Beitrag zur ungetrennten Mischung, weshalb ohne eine Zelltrennung zur Isolierung der Spermien die DNA der Täterschaft im Vergleich zur Opfer-DNA zu niedrig und daher nur schwer zu interpretieren sein kann (22).

Die differentielle Lyse (DL) bzw. differentielle DNA-Extraktion (DE) ist in der forensischen DNA Analyse eine etablierte Methode für Beweismittel aus Sexualstraftaten und wurde erstmals 1985 von Gill et al. beschrieben (5). Gill et al. stützen sich dabei auf die 1971 veröffentlichte Arbeit von Calvin und Bedford, die nachwies, dass bei Einwirkung von Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT) eine Dekondensation der Spermienkerne stattfindet (23). Im Laufe der Jahre gab es viele Weiterentwicklungen des DE-Verfahrens. Die

meisten Methoden verwenden jedoch dieselben grundlegenden Schritte wie von Gill et al. beschrieben (6).

Nach Durchführung der DE erfolgt in der Regel eine DNA-Quantifizierung, um die Menge an zu „amplifizierbarer“ DNA und die daraus bestimmte DNA-Einsatzmenge für die STR-Typisierung zu ermitteln. Derzeit sind verschiedene rt-qPCR-Assays (real time quantitative Polymerase-Kettenreaktionsverfahren) und Kits für den Nachweis humanspezifischer DNA kommerziell erhältlich. Einige dieser Kits, wie beispielsweise von der Firma Promega, beinhalten die Möglichkeit in einer Probe gleichzeitig die humane DNA-Konzentration sowie die humane Y-chromosomale DNA-Konzentration zu bestimmen, um die Downstream-Analyse dementsprechend anpassen zu können (9).

### **9.3.1 Konventionelle differentielle Extraktion**

Bei dieser Methode der „differentiellen chemischen Lyse“ liegt die Eleganz in ihrer Einfachheit: Sie lysiert mithilfe einer SDS/Proteinase-K-Lösung effektiv alle Zellen mit Ausnahme der Spermienkerne und setzt das Lysat anschließend der Zentrifugalkraft aus, wobei die verbleibenden Komponenten mit der höchsten Dichte (idealerweise Spermienkerne) durch Pelletieren vom Lysat getrennt werden. Anschließend werden die Spermienkerne mit einer SDS/Proteinase-K/DTT-Lösung lysiert. DTT besitzt dabei die Fähigkeit Disulfidbrücken in den Proteinen des Spermienkerns und dessen Membran zu reduzieren, was zu einem Aufbrechen des Spermienkerns und in weiterer Folge zu einer Chromatin-Dekondensation führt (9).

Detergenzien (z.B. SDS), Proteinase K und DTT sind die drei entscheidenden Komponenten für die Freisetzung der DNA. SDS zerstört die Zell- und Kernmembranen und ermöglicht somit den weiteren enzymatischen Verdau von Proteinen, welche u.a. mit der DNA in Form von Chromosomen liegen. SDS ist ein anionisches Tensid und bindet bzw. denaturiert Proteine, wodurch zelluläre Enzyme inaktiviert werden. Dabei werden nichtkovalente Bindungen der Proteine unterbrochen und so deren Quartär- und Tertiärstrukturen zerlegt. Die Serinprotease Proteinase K verfügt über eine endo- und exoproteolytische Aktivität und wird ebenfalls für den Proteinabbau

in Zelllysaten eingesetzt. Sie ist hier besonders wirksam, da sie bei erhöhten Inkubationstemperaturen und in Gegenwart von SDS wirken kann (11) (9) (7).

Unterschiedliche Konzentrationen dieser drei Komponenten sowie auch unterschiedliche Inkubationszeiten und -temperaturen haben einen Einfluss auf die DE. Für jede Komponente, Inkubationszeit bzw. -temperatur gibt es jedoch einen gewissen Spielraum, in dem im Allgemeinen gleichwertige Ergebnisse zu erwarten sind. So wurde beispielsweise von Hennekens et al. beobachtet, dass die Zelltrocknung bei Raumtemperatur in den Proben einen größeren Einfluss auf die vorzeitige Lyse der Spermien in die Nicht-Sperma-Fraktion hat, als unterschiedliche Lysebedingungen (24).

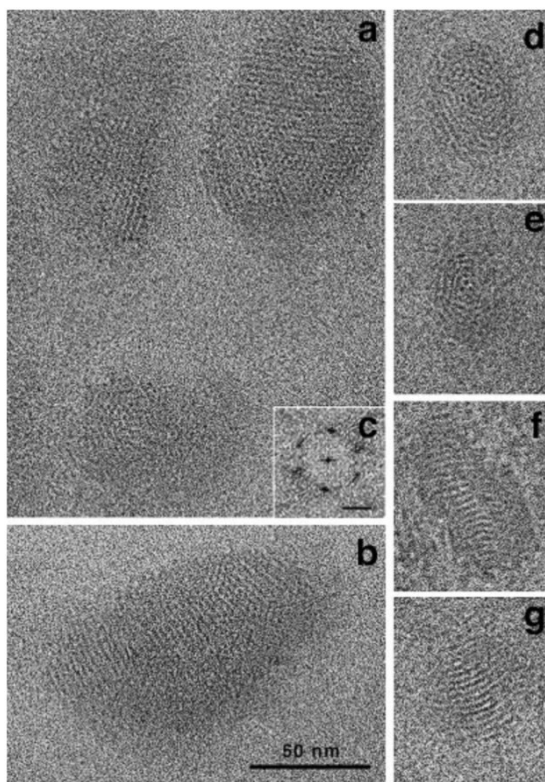
Lounsbury et al. konnten in ihrer Studie durch eine pH-Wert Erhöhung des Lysepuffers (10mM MES/Tris pH 8.5, 1% SDS, 20mg/mL Proteinase K) der Nicht-Spermienzellen auf 8,5 und Inkubationsbedingungen von 42°C für 30 Minuten eine 200 bis 300%ige Steigerung der Spermien-Rückgewinnung aus gealterten Proben zeigen (25).

Die Spermienkerne lysieren aufgrund vernetzter, thiol-reicher Proteine in der Spermienkernmembran im ersten Lyseschritt mithilfe von SDS und Proteinase K nicht. Thiol-reiche Proteine enthalten einen hohen Anteil der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein. Die Thiol- oder Sulfhydrylgruppe des Cysteins ist dabei entscheidend für ihre Struktur und Funktion. Während der Spermatogenese, im Stadium der Spermienzellreifung im Nebenhoden, kommt es durch die Bildung von Disulfidbrücken in den Thiolgruppen der Spermienproteine Protamine zu einer Vernetzung zwischen und innerhalb dieser Protamine. Dies macht die Spermienkernmembran so stabil und widerstandsfähig (26).

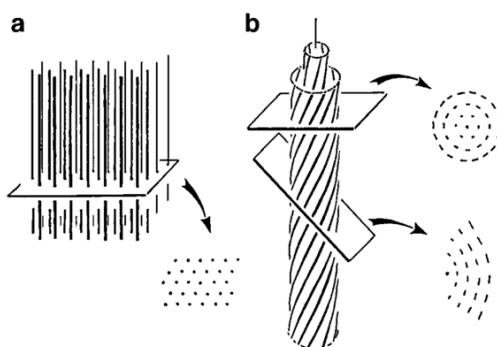
In reifen Spermienkernen ist das Chromatin zudem extrem dicht gepackt. Möglich machen dies unter anderem wiederum die Spermienproteine Protamine, die anstelle von Histonen eine enge Bindung mit der DNA im Spermienkern eingehen und dabei einen Protamin-DNA-Komplex bilden. Dieser Komplex wird unter anderem durch Disulfidbrücken stabilisiert. Im Gegensatz zu Histonen sind Protamine evolutionär nicht stark konserviert. Der Wechsel von Histon zu Protamin verändert die DNA-Verpackung und führt zu einer Reduktion des Spermienkernvolumens im Vergleich zu einem somatischen Zellkern von

etwa 1/20. Für eine erfolgreiche DNA-Extraktion muss dieser Protamin-DNA-Komplex im DNA-Extraktionsverfahren aufgebrochen werden (11) (27).

Sartori et al. verbildlichten eine hexagonale Protamin-DNA-Struktur mithilfe von Elektronenmikroskopie und Röntgendiffraktometrie von mit DTT behandeltem Spermienchromatin (von Hengsten). Das DTT wurde eingesetzt, um die kompakte DNA-Struktur zu lockern und partiell dekondensierte Protamin-DNA-Filamente abzubilden (siehe Abb. 3 und Abb. 4) (28).



**Abbildung 3: Kryoschnitt von Spermienchromatin eines Hengstes nach partieller Dekondensation mit 10mM DTT (28).** Es sind Bündel mit hexagonaler, dicht gepackter Anordnung der DNA-Filamente erkennbar (a, b), welche durch die Beugung im Röntgendiffraktogramm (c) bestätigt wird. Die Filamente befinden sich 2,7nm voneinander entfernt. In d bis g sind Doppel-Dreh-Bündel der Filamente erkennbar (28).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung von Protamin-DNA-Filamenten (28).** Eine hexagonal, dicht gepackten Anordnung (a) und eine Doppel-Dreh-Konfiguration (b), jeweils mit der entsprechenden Beugung im Röntgendiffraktogramm (28).

DTT wird in der Laborroutine standardmäßig zur Lyse von Spermienköpfen verwendet. Es gibt aber auch Studien, die über eine mangelnde Wirksamkeit von DTT berichten. So zeigten Roszkowski et al. auf, dass die Zugabe von DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol nicht ausreichte, um die Spermien von Mäusen erfolgreich zu lysieren. Trizol, ergänzt mit Tris(2carboxyethyl)phosphin (TCEP), bewirkte hingegen eine vollständige, effiziente und schnelle (Maus-)Spermienzellyse. Diese Chemie könnte als eine Alternative zur Spermienzellyse für forensische Proben in Betracht gezogen werden (29) (21).

Welche wesentlichen Voraussetzungen müssen nun aber erfüllt sein, damit eine DE erfolgreich ist? Zwei grundsätzliche Faktoren entscheiden bei der DE über den Erfolg der Trennung: die Gewinnung der Spermien-DNA (DNA-Ausbeute) und die Veränderung des Verhältnisses von Opfer-DNA zu Spermien-DNA, ausgehend von der „gemischten“ Ausgangsprobe (Effizienz der Trennung). Eine ideale DE erzeugt eine Lösung aus Spermien-DNA, frei von Zellmaterial bzw. DNA des Opfers. Diese wird als „Pelletfraktion“ (P) oder „spermienangereicherte Fraktion“ bezeichnet und stammt bei effizienter Entfernung der gesamten Opfer-DNA idealerweise nur aus einer einzigen Spermien Quelle (vorausgesetzt es gibt nur einen mitwirkenden Täter). Eine ideale DE erzeugt weiters eine „Überstandsfraktion“ (Ü) bzw. „Nicht-Spermien-Zellfraktion“ oder „spermienarme Fraktion“, die sowohl DNA des Opfers als auch DNA aus den Nicht-Spermienzellen der „männlichen“ Täterschaft enthält. Das Vorhandensein männlicher DNA in der Opfer-Fraktion ist nicht ungewöhnlich, da im Sperma vorhandene Nicht-Spermienzellen wie Leukozyten, Makrophagen oder Spermatozyten ebenso wie die Opfer-Zellen einer Lyse mit Detergenz und Proteinase K unterzogen werden. Es kann unter Umständen auch schon zu einer vorzeitigen Lyse von Spermien kommen, wenn die Spermienzellwand oder die Spermien-DNA geschädigt ist. Solche Schäden können bei langen Zeitfenstern zwischen Zeitpunkt der Tat und der Probenentnahme oder auch bei nicht optimalen Bedingungen in der Probenlagerung auftreten. Ein Verlust von Spermien-DNA an die Nicht-Spermien-Zellfraktion ist ungünstig, da die verfügbare DNA-Menge für die Analyse in der Pellet- bzw. Spermienfraktion dadurch verringert wird. Die Spermien-DNA-Ausbeute wird durch viele Faktoren, wie die partielle oder

vollständige Spermienfreisetzung aus der Probe, den Spermienverlust im Prozess der differentiellen Zelltrennung (z.B. Zentrifugation, Reinigungsschritte ect.) und der DNA-Aufreinigung bei der Extraktion, beeinflusst (22).

Seit der Einführung von sensitiven PCR-basierten Typisierungsmethoden anstelle von RFLP in den 1990er Jahren wurde erkannt wie wichtig es ist, die DE durch eine Reduzierung der Nicht-Sperma-DNA-Verschleppung zu verbessern. Zu den Reduktionsstrategien gehören das Waschen des Spermienpellets, eine erhöhte Effizienz bei der Nicht-Spermienzell-Lyse und das Hinzufügen eines zweiten Nicht-Spermienzell-Lyseschritts (30). Gleichzeitig wurde befürchtet, dass diese Strategien die Spermien-DNA-Ausbeute beeinträchtigen können, da strengere Lysebedingungen oder zusätzliche Lyseschritte auch einen Spermien-DNA-Verlust verursachen könnten (31) (32). Hennekens et al. konnten nicht feststellen, ob verschiedene Lyse- und Inkubationsbedingungen mit einer ungünstigen vorzeitigen Spermien-Lysierung zusammenhängen (24). Klein et al. zeigten hingegen, dass die Effizienz der konventionellen Standard-DE durch das Hinzufügen eines zweiten Nicht-Spermienzell-Lyseschritts erheblich verbessert werden konnte, wodurch die Nicht-Sperma-DNA-Verschleppung reduziert wurde, ohne dass es zu einer Reduktion der Spermien-DNA-Gewinnung kam (33).

Auch das Alter und der Zustand der Beweisproben haben einen großen Einfluss auf die Qualität einer DE. Unabhängig vom Probenmaterial variiert der Erfolg und die Qualität der Zelltrennung in der DE zwischen verschiedenen Laboren und kann zudem auch zwischen einzelnen Labormitarbeiterinnen und -mitarbeitern variieren (8).

Die konventionelle DE ist in der Laborroutine vieler forensischer Labore etabliert. Sie ist eine effektive Methode zur Auftrennung der Pellet- (P) bzw. Spermienfraktion von der Überstands- (Ü) bzw. Nicht-Spermien-Zellfraktion und gut geeignet für eine forensische Downstream-Analyse. Einschränkend kann hier aber angeführt werden, dass sich DNA-Verluste bei den Zellseparationsschritten oder im DNA-Extraktionsprozess nicht vermeiden lassen und dass durch die vielen unterschiedlichen Schritte beim Probenumgang (z.B. Flüssigkeitstransfer, Zentrifugation) eine Automatisierung nicht möglich ist (22).

### 9.3.2 Semi-automatisierter Ansatz

Die differentielle DE lässt sich aufgrund der vielen unterschiedlichen Schritte beim Probenumgang (z.B. Flüssigkeitstransfer, Zentrifugation) nur schwer vollständig automatisieren, so erfüllt bisher kein automatisierter Ansatz alle Anforderungen an Geschwindigkeit, Durchsatz und effizienter Zelltrennung. Es gibt aber einige (semi-) automatisierte Ansätze, welche teilweise bereits kommerziell erhältlich sind. Der QIAcube (Qiagen) sowie die AutoLys STAR (Hamilton) Liquid-Handling Workstation können eine Probeninkubation, -schüttelung und -zentrifugation durchführen, wodurch eine DE mit einigen zusätzlichen Handgriffen semi-automatisiert durchführbar ist. Eine weitere Technik ist das Differex-System (Promega). Dieser Ansatz kombiniert differentielle Zentrifugation mit Phasentrennung und nutzt dabei weiterhin die differentiellen Lyse- und Waschschriffe einer herkömmlichen DE. Differex ist mit einer Reihe von Roboter-Workstations (Biomek 3000, Freedom EVO usw.) kompatibel, was eine automatisierte Probenverarbeitung ermöglicht. Die Isolierung der Spermien erfolgt mithilfe einer Trennlösung, deren Dichte größer als die von Wasser, aber geringer als die der Spermien ist. Dadurch entsteht eine Barriere zwischen dem Spermienpellet und der wässrigen Lösung freier DNA, die für die Nicht-Spermien-Zellfraktion leicht entfernt werden kann. Für die Lyse der Spermienzellen und die Isolierung männlicher DNA wird der Spermienfraktion DNA IQ Resin (Promega) zugesetzt, das das Spermienpellet „verschließt“ und eine zusätzliche Zentrifugation nach den Waschschriffen überflüssig macht (22).

Das EZ2 DNA Investigator Sep & Prep Kit (Qiagen) ist seit dem Jahr 2025 kommerziell erhältlich und (semi-)automatisiert die Aufreinigung von genomischer DNA von Proben aus Sexualstraftaten. Dabei werden die Proben mit einem Protokoll manuell vorbehandelt und anschließend am Biorobot EZ2 Connex Fx (Qiagen) in einem ca. 70-minütigen Lauf automatisiert verarbeitet. In diesem Lauf wird die Nicht-Spermien-Zellfraktion abgehoben und an der Pelletfraktion mehrere Wasch-, Bead-Binding und Elutionsschriffe durchgeführt. Durch die magnetische Bead-Technologie werden Zentrifugationsschriffe im automatisierten Lauf umgangen (34).

Da dieser Kit neu am Markt ist, gibt es bislang noch keine unabhängig publizierte Studien, welche den EZ2 DNA Investigator Sep & Prep Kit mit anderen Methoden einer DE vergleichen oder tiefere Einblicke in den automatisierten Protokollablauf gewähren. Im Kontext der automatisierten Bead-Extraktions-Technologie lässt sich Folgendes feststellen:

Beim EZ2 DNA Investigator System bindet bei der DNA-Extraktion die isolierte DNA aus den Zellen an die Silika-Oberfläche von magnetischen Partikeln in Anwesenheit eines chaotropen Salzes. Das chaotrope Salz stört die Wasserstoffbrückenbindungen in flüssigem Wasser, was dazu führt, dass denaturierte Proteine und Nukleinsäuren thermodynamisch stabiler sind als ihre nativ gefalteten bzw. strukturierten Gegenstücke. Bei einem pH-Wert von mehr als 7,5 beträgt die DNA-Adsorptionswahrscheinlichkeit an die Silika-Oberfläche etwa 95%. Die so an die magnetischen Partikel gebundene DNA wird dann gewaschen und es werden unerwünschte Verunreinigungen wie z.B. Proteine oder Zelltrümmer entfernt. Anschließend wird die DNA unter alkalischen Bedingungen effizient in TE-Puffer eluiert (9).

Das Maxwell DNA IQ-System (Promega) nutzt dieselbe DNA-Bindungs- und Elutionstechnik wie das EZ2 DNA Investigator System, wobei das DNA IQ-System als Bindematrix mit einem proprietären paramagnetischen Resin (Harz) arbeitet, welches sich von klassischen silikabeschichteten Partikeln in der chemischen Oberfläche und Selektivität unterscheidet. Anschließend wird mit einem Magneten die, an die Oberfläche der Harz-Partikel gebundene DNA festgehalten und in mehrere Reaktionsgefäße überführt (9).

Die paramagnetischen Beads im DNA IQ-System haben einen durchschnittlichen Durchmesser von etwa 12µm und bestehen aus einem Magnetit-Nanopartikel, welcher mit einer Siliziumdioxid-Schicht umgeben ist (Siliziumdioxid-Magnetit-Komposit). Das reduzierte Verhältnis an Siliziumdioxid-Magnetit und die geringe Makroporosität verringert die Bindung von unerwünschten Proteinen an die Beads. Unter günstigen Bedingungen können Proteine mit der DNA um die Bindestellen auf den Silika-Oberflächen der magnetischen Beads konkurrieren (35).

Duchamp et al. verglichen in einer von Qiagen initiierten Studie den EZ2 Connect Fx und Maxwell FSC bei der Analyse von unterschiedlichen forensischen Proben (z.B. Blut, Speichel, Hautkontaktspuren). In dieser Studie

erzielte das EZ2 Connect Fx-System in der Regel höhere DNA-Ausbeuten und vollständigere STR-Profile (68% vollständige Profile im Vergleich zu 52% bei Maxwell FSC) (36).

Davis et al. analysierten in einer vergleichenden Studie simulierte forensische Proben (getestet wurden Sperma, Blut, Speichel, Epithelien, Haarwurzeln, Zähne und Knochen) mit den verschiedenen Extraktionsmethoden. Sie zeigten, dass der EZ1 (Qiagen, Vorläufermodell des EZ2) bei vielen Probenarten die höchste DNA-Ausbeute erreicht, bei Spermaspuren auf Stoff jedoch der Automate Express (Thermo Fisher Scientific) und der Maxwell (Promega) bessere Ergebnisse erzielten. Diesen Unterschied erklärten die Studienautoren damit, dass es zum Zeitpunkt der Studie keine optimierten EZ1-Protokolle für reine Spermaspuren gab, weshalb auf einen Protokollabschnitt aus dem differentiellen Extraktionsprotokoll zurückgegriffen werden musste (37).

### **9.3.3 Nuklease-basierter Ansatz**

Während die konventionelle DE auf einer rein physikalischen Trennung von Sperma- und Epithelzellen durch Zentrifugation und anschließenden Waschschritten beruht, basiert der Erase Sperm Isolation Kit auf einem „Nuklease-only“ Ansatz. Dabei wird nach dem Epithelzellverdau ein einziger Zentrifugationsschritt zur Pelletierung der Spermien durchgeführt. Die anschließend abgehobene Nicht-Spermien-Zellfraktion enthält weibliche und männliche DNA aus Nicht-Spermazellen (z.B. Epithelzellen, Leukozyten, Makrophagen). Anschließend erfolgt ein selektiver Verdau der freiliegenden Nicht-Sperma-DNA in der Spermienfraktion unter Verwendung des Enzyms Desoxyribonuklease I (DNase I). Dadurch entfallen die Wasch- und Pelletierungsschritte einer konventionellen DE. DNase I baut hochselektiv solubilisierte Nicht-Spermien-DNA ab, wohingegen Spermien-DNA in intakten Spermienköpfen nicht abgebaut wird. Da SDS im Lysepuffer die Nuklease (DNase I) Aktivität hemmt, wird DNase I in einem modifizierten Detergens-Proteinase K-Puffer verwendet, der ebenfalls Zellen aus den Abstrichen löst und weshalb kein Pufferwechsel nach der Lyse und dem Nicht-Spermien-Zellverdau erforderlich ist. Die Spermienfraktion wird durch die Inaktivierung der Nuklease

mit EDTA und gleichzeitiger Lysierung der Spermien mit Dithiothreitol (DTT) gewonnen (38) (39) (40) (41).

Desoxyribonuklease I (DNase I) ist eine Endonuklease die normalerweise sekretiert wird, um einzel- und doppelsträngige DNA im extrazellulären Raum auf Oligonukleotide zu spalten. Sie ist somit größtenteils für den Abbau der zirkulierenden DNA verantwortlich, welche aus dem apoptotischen und nekrotischen Zelltod sowie neutrophilen extrazellulären Fallen (NETs) stammt. Die DNase I ist eines der am besten erforschten Enzyme, es wirkt ideal unter neutralen pH-Bedingungen mit einer niedrigen Konzentration an gelösten Ionen und benötigt zweiwertige Metallionen wie  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$  für seine katalytische Aktivität. DNase I zeigt keine Präferenz für bestimmte Nukleotidsequenzen, reagiert jedoch empfindlich auf die Konformationen und die Struktur der DNA-Doppelhelix (42) (43).

In einer groß angelegten Studie von Garvin et al. verglichen fünf kriminaltechnische Labore ihre DE mit dem Erase Sperm Isolation Kit. Im Vergleich zur konventionellen DE wurde bei den mit dem Erase Sperm Isolation Kit extrahierten Pelletfraktionen (Spermienfraktionen) ein signifikanter Anstieg der DNA-Menge beobachtet (39). Es gibt bereits Bestrebungen den „Nuklease-only“ Ansatz zu automatisieren (41) (44). Die hohe Effektivität dieser selektiven Abbaumethode der Nicht-Spermien-DNA (manuell oder automatisiert) macht diese Methode zu einer interessanten Alternative zur konventionellen DE.

## **9.4 STR-Analyse**

Die analysierten Short-Tandem-Repeat (STR)-Marker für den genetischen Fingerabdruck eines Individuums liegen in den intronischen Bereichen des Genoms und sind informationsneutral bezüglich genetischer Eigenschaften wie z.B. Ethnie, Aussehen oder Prädisposition gegenüber bestimmten Krankheiten. Die STR-Marker sind kurze, tandemartig wiederholte Basenabfolgen und unterscheiden sich je nach Individuum in ihrer absoluten Länge. Dieser Längenpolymorphismus der STR-Marker wird analysiert und ist entscheidend für die Merkmalsausprägungen (Allele) bei der Erstellung eines DNA-Profiles im Sinne des genetischen Fingerabdrucks eines Individuums. In der

Forensik können beispielsweise Bereiche der Kern-DNA (nukleäre DNA) der nicht-geschlechtlichen Chromosomen (Autosomen) untersucht werden (7).

## 9.5 Y-chromosomale STR-Analyse

Auch auf dem Y-Chromosom befinden sich STRs, die eine ähnliche Struktur und Längenpolymorphismus wie autosomale STRs besitzen. Eine wichtige Anwendung von Y-chromosomalen STRs ist bei Sexualstraftaten gegeben, wenn die Spuren ein sehr ungünstiges Mischungsverhältnis von sehr hohen „weiblichen“ und sehr geringen „männlichen“ DNA-Anteilen aufweisen (siehe Abb. 2). In solchen Fällen sind Y-chromosomale STR Analysen die einzige Möglichkeit, DNA-Merkmale des „männlichen“ Anteils zu typisieren, da hier der „weibliche“ Anteil in der Y-STR-PCR-Analyse kein konkurrierendes Substrat darstellt. Die Analyse von Y-STRs kann auch bei Fallkonstellationen in denen im Spurenmaterial keine Spermien vorhanden sind hilfreich sein, z.B. wenn es zu keiner Ejakulation gekommen ist oder bei der Täterschaft eine Azoospermie oder Vasektomie vorliegt, ebenso wenn die Untersuchung des Opfers und Sicherung der Genitalabstriche nicht sofort nach der Tat sondern erst Tage später stattgefunden hat. Y-STRs werden paternal vererbt und alle Nachkommen einer Patriline weisen das gleiche Y-chromosomale Merkmalmuster, auch Haplotyp genannt, auf. Aus diesem Grund ist im Gegensatz zu den autosomalen STR-Markern mit Y-chromosomalen STR-Markern keine Individualisierung einer („männlichen“) Person möglich und somit auch die biostatistische Aussagekraft der Y-STRs niedriger. Ist das Y-chromosomale Merkmalmuster einer tatverdächtigen Person bekannt, kann diese im Direktvergleich mit einer analysierten Spur bei Nichtübereinstimmung ausgeschlossen werden. Eine Übereinstimmung zwischen den Y-chromosomalen Merkmalmustern bedeutet, dass diese Person der Spurenverursacher sein könnte, ebenso aber eine andere Person derselben Patriline oder ein Träger des gleichen Y-chromosomalen Merkmalusters. Eine Typisierung von Y-STRs bietet bei einer Mann-Mann Opfer-Täter Konstellation keinen Mehrwert (7) (9) (45).

Sween et al. untersuchten den Nachweis männlicher DNA in Vaginalabstrichen nach 5-minütiger digitaler Penetration (Eindringen mit den

Fingern) mithilfe von Y-STRs. Die Nachweisrate nimmt auch hier mit einer vergrößerten Zeitspanne zwischen Probenentnahme und digitaler Penetration ab und ist von verschiedenen Faktoren abhängig, unter anderem auch davon wie gut („bereitwillig“) die Epithelzellen eines Mannes abgegeben werden. Bei einer Probenentnahme nach einer Stunde konnten durchschnittlich 85%, nach sechs Stunden 77% und nach zwölf Stunden 73% der Y-STR-Allele nachgewiesen werden. Nach 24 Stunden sank die Nachweisrate weiter ab, nach 72 Stunden konnte nur mehr ein vollständiges Y-STR-Profil nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass in Ausnahmefällen „männliche“ DNA-Spuren bis zu 3 Tage nach einer digitalen Penetration nachweisbar sein können (13).

## **9.6 Auswertung von STR-Profilen**

Ein forensisches DNA-Labor verwendet STR-Interpretationsrichtlinien, die auf Grundlage eigener Validierungsstudien basieren. Diese Validierungsstudien definieren beispielsweise die beobachteten Stutter-Ratios für jeden Locus, legen Mindestschwellenwerte für Peakhöhen fest und definieren die erwarteten Peak Ratios der Heterozygoten-Peaks innerhalb eines Locus. Bei der Amplifikation von STRs werden reproduzierbare Fragmente gebildet, deren Länge um eine Repeateinheit kürzer sind als die eigentlichen Allele. Da die Repeateinheit der meisten verwendeten STR-Marker 4 Basen beträgt, werden diese sogenannten Stutter auch „n-4 Peaks“ genannt. Wesentlich seltener treten so genannte „Back-Stutter“ auf, also Peaks, die einen Repeat länger sind als das eigentliche Allel („n+4 Peaks“). Die durchschnittliche Höhe der Stutter-Peaks ist vom jeweiligen STR-Marker abhängig. Es ist darauf zu achten, dass in Mischspuren Allele an Stutter-Positionen maskiert sein können. Bei der Auswertung von STR-Profilen muss entschieden werden, ob die DNA in der Probe von einer einzelnen Person oder von mehreren Personen stammt. STR-Profile können grob in Profilen (P) eines einzelnen Spurenverursachers, Hauptprofilen (HP) in der sich eine Hauptkomponente als Spurenverursacher durchsetzt und Mischspuren (MS) unterteilt werden. Mischspuren enthalten Merkmale von mehr als einem Spurenverursacher und stellen sich durch ein STR-Profil von meist mehr als zwei Allelen (Merkmalen) pro System dar. Das

Mischungsverhältnis (Mischungs-Ratio  $M_r$ ) beschreibt den relativen Anteil der Komponenten in einer Mischspur. Mischspuren können von gleichen Anteilen jeder Komponente (1:1) bis hin zu einem deutlich überwiegenden Anteil (z.B. 1:5) einer Komponente reichen. Anhand von Mischproben mit bekannter DNA-Menge wurde gezeigt, dass das Mischungsverhältnis während der PCR-Amplifikation annähernd gleich amplifiziert wird. Dadurch können die im Elektropherogramm beobachteten Peaks Aufschluss auf die in der Probe enthaltenen Komponenten geben. Die  $M_r$  kann am einfachsten in einem STR-Lokus bestimmt werden, in dem beide Komponenten keine geteilten heterozygoten Allele aufweisen (insgesamt 4 Allele). Für die Berechnung der  $M_r$  werden die beiden Allele der bspw. „männlichen“ Komponente (A+B) durch die Allele der „weiblichen“ Komponente (C+D) geteilt  $(A+B)/(C+D) = 0,5$  bzw. 1:2. Das Amelogenin-System als Marker zur Geschlechtsbestimmung kann beispielsweise bei zwei Personen-Mischspuren von einem unbekanntem „weiblichen“ und einem unbekanntem „männlichen“ Merkmalmuster dabei helfen, einen „männlichen“ und einen „weiblichen“ Anteil in einem Mischungsverhältnis zu beurteilen. Die  $M_x$  (Mischungs-Proportion) im Amelogenin-System wird mit  $M_x = (2Y)/(X+Y)$  berechnet. Dieser Wert kann vergleichend dazu verwendet werden, die  $M_r$  zu überprüfen (9) (46) (47).

## 9.7 Formulierung der Forschungsfrage

Diese Masterarbeit beschäftigt sich mit der Forschungsfrage, inwieweit sich ausgewählte semi-automatisierte Ansätze und ein nuklease-basierter Ansatz von der konventionellen DE hinsichtlich ihrer Effizienz bei der Analyse von Beweismitteln aus Sexualstraftaten unterscheiden. Die vorliegende Arbeit evaluiert, inwieweit Automatisierungsstrategien die Effizienz der Auftrennung von Spermien von anderen Körperzellen bei einer DE steigern können, ohne die kritische Sensitivität bei Proben mit geringer Spermienanzahl zu kompromittieren. Ziel ist es herauszufinden, ob die Wirksamkeit der aktuell am hiesigen Institut verwendeten DE verbessert werden kann. Die Heterogenität bestehender Protokolle der verschiedenen Publikationen und Laborroutinen, die in Verwendung sind, erfordert eine systematische Validierung gegenüber neuen methodischen Ansätzen, um die Robustheit der Ergebnisse sicherzustellen. Für

den semi-automatisierten Ansatz werden der EZ2 DNA Investigator Sep&Prep (Qiagen) und der Maxwell DE Casework Kit (Promega) sowie als nuklease-basierter Ansatz der Erase Sperm Isolation Kit (PTC Laboratories) untersucht.

Für die Herstellung der simulierten Beweismittel wurden Vaginalabstriche von weiblichen Spenderinnen und Sperma von männlichen Spendern verwendet. Die Forschungsfrage beschäftigt sich mit Beweismitteln aus Sexualstraftaten, die für alle Geschlechter gleichermaßen von Bedeutung sind. Personen aller Geschlechter können Opfer von Sexualdelikten sein und eine DE der forensischen Spuren kann zur Tataufklärung beitragen. Als Opfer oder „geschädigte Person“ sind alle Personen gemeint, unabhängig von ihrem biologischen Geschlecht oder ihrer geschlechtlichen Identität.

## **10. Material und Methoden**

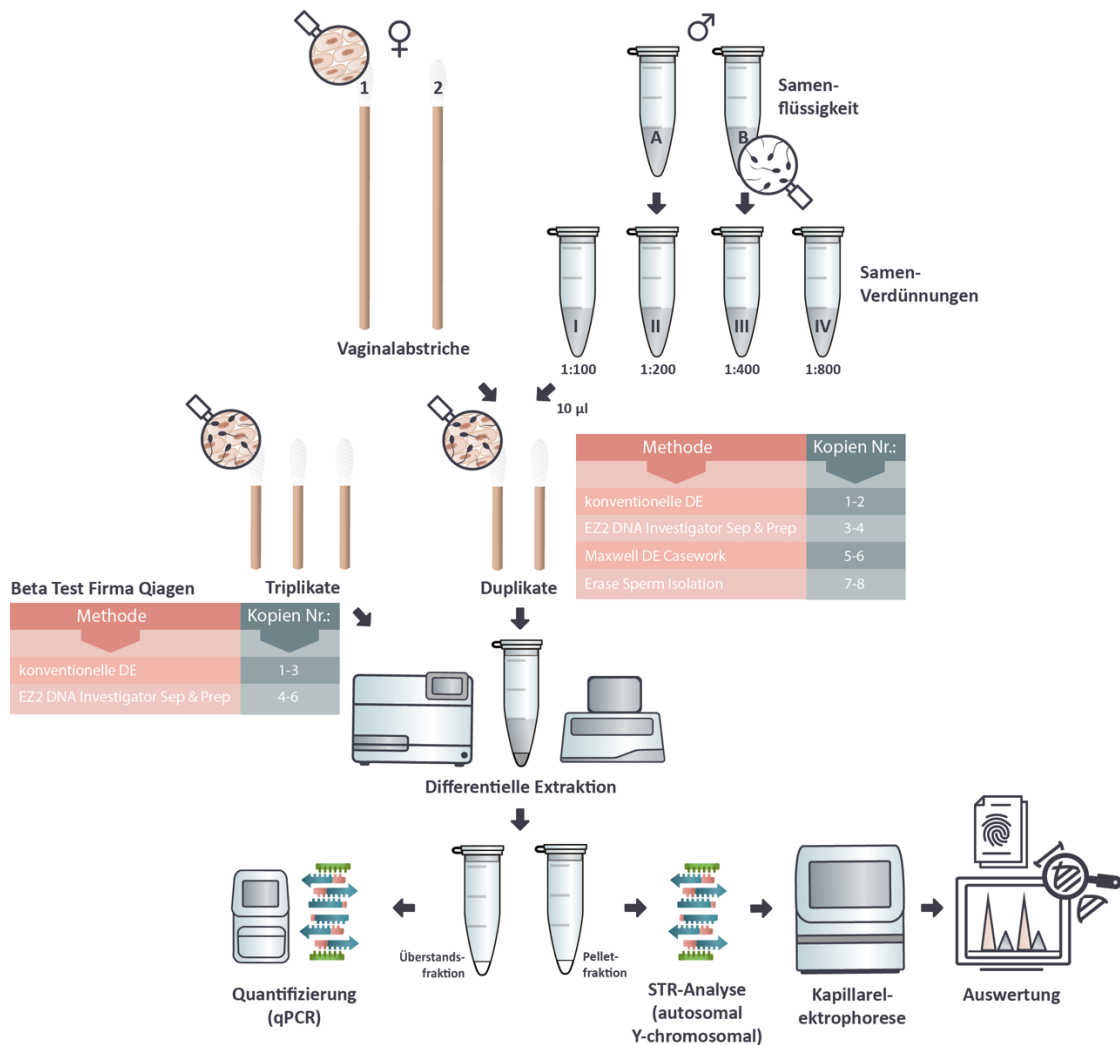
### **10.1 Auswahl und Vorbereitung der simulierten Beweismittel**

36 Vaginalabstriche werden jeweils von zwei weiblichen freiwilligen Probandinnen (Probe 1 & 2) an mehreren Tagen entnommen. Um eine mögliche Kontamination zu vermeiden, wurden die Abstriche in menstruationsfreien Tagen entnommen und es fand in den Tagen davor kein Geschlechtsverkehr statt. Die Samenflüssigkeit wird von zwei freiwilligen Spendern (Probe A & B) bereitgestellt. Das unverdünnte Ejakulat wird jeweils in vier Verdünnungen (1:100 = I/1:200 = II/1:400 = III/1:800 = IV) mit A. bidest angereichert. Die DNA-Konzentration aus den Samen-Verdünnungen wird mittels rt-qPCR bestimmt und jeweils 10µl der jeweiligen Verdünnung im Duplikat zu den Vaginalabstrichen zugegeben. Die Vaginalabstriche der Probandin 1 werden jeweils mit den Samen-Verdünnungen des Probanden A (1+A) und die Vaginalabstriche der Probandin 2 mit den Samen-Verdünnungen des Probanden B (2+B) versetzt (siehe Tab. 1 bzw. Abb. 5). Die simulierten Beweismittel werden mit der jeweiligen DE-Methode im Duplikat (n= 2, Nr.: 1-2, 3-4, 5-6, 7-8) verarbeitet und die DNA-Konzentration mittels rt-qPCR ermittelt. Alle Pelletfraktionen (P) und ausgewählte Überstandsfraktionen (Ü) der unterschiedlichen Methoden werden mittels PowerPlex ESX 17 System PCR Kit (Promega) amplifiziert und mittels Kapillarelektrophorese analysiert. Um den

männlichen Anteil in ausgewählten Pelletfraktionen (P) mit einem rein weiblichen STR-Profil zu bestimmen, werden Y-chromosomale STRs in der extrahierten DNA mit dem PowerPlex Y23 System Kit (Promega) amplifiziert.

Weiters wird im Rahmen der Masterarbeit an einem Beta-Test der Firma Qiagen (QG) teilgenommen. In diesem Beta-Test werden zwei externe Proben der Firma jeweils im Triplikot (n=3, Nr.: 1-3, 4-6) mit der konventionellen DE und dem Sep & Prep Kit untersucht. Der EZ2 DNA Investigator Sep & Prep Kit (Qiagen) kann 12 Proben verarbeiten, weshalb bei dieser Methode von den eigens hergestellten Proben nur die 1:200 Verdünnungen beider Probandenpaare und die 1:400 Verdünnung des Probandenpärchens 1+A (jeweils im Duplikot) ausgewählt wurden und mit den beiden firmeneigenen Proben im Triplikot untersucht werden.

Die Herstellung der simulierten Beweismittel wird in zwei Probenchargen durchgeführt. Die erste Probencharge wird für die konventionelle DE und die EZ2 DNA Investigator Sep & Prep Methode verwendet. Die Herstellung der zweiten Probencharge für den Maxwell DE Casework Kit und den Erase Sperm Isolation Kit erfolgt einige Monate später aus den bei -20°C gelagerten Samen-Verdünnungen (einmaliges Auftauen der Verdünnungen nach ca. einem halben Jahr).



**Abbildung 5: Vorbereitung der simulierten Beweismittel und Versuchsablauf.** Vaginalabstriche werden von zwei Probandinnen (Probe 1 & 2) und die Samenflüssigkeit von zwei Spendern (Probe A & B) bereitgestellt. Das Ejakulat wird jeweils in vier Verdünnungen (1:100 = I/1:200 = II/1:400 = III/1:800 = IV) mit A. bidest angereichert und 10µl im Duplikat zu den Vaginalabstrichen zugegeben (1+A/2+B). Die simulierten Beweismittel werden mit der jeweiligen DE-Methode im Duplikat bzw. Triplikate (Beta Test der Firma Qiagen) verarbeitet und die DNA-Konzentration mittels rt-qPCR ermittelt. Im Anschluss erfolgt die Amplifikation von autosomalen bzw. Y-chromosomalen STRs und die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Kapillarelektrophorese.

Ausgangs- probe	Zusatz- probe	Kombination	Verdünnung	Kopien Nr.	Methoden
1	A	1+AI	1:100	1/5/7	k.DE/M.DE/Erase
1	A	1+AI	1:100	2/6/8	k.DE/M.DE/Erase
1	A	1+AII	1:200	1/3/5/7	k.DE/S&P/M.DE/Erase
1	A	1+AII	1:200	2/4/6/8	k.DE/S&P/M.DE/Erase
1	A	1+AIII	1:400	1/3/5/7	k.DE/S&P/M.DE/Erase
1	A	1+AIII	1:400	2/4/6/8	k.DE/S&P/M.DE/Erase
1	A	1+AIV	1:800	1/5/7	k.DE/M.DE/Erase
1	A	1+AIV	1:800	2/6/8	k.DE/M.DE/Erase
2	B	1+BI	1:100	1/5/7	k.DE/M.DE/Erase
2	B	1+BI	1:100	2/6/8	k.DE/M.DE/Erase
2	B	1+BII	1:200	1/3/5/7	k.DE/S&P/M.DE/Erase
2	B	1+BII	1:200	2/4/6/8	k.DE/S&P/M.DE/Erase
2	B	1+BIII	1:400	1/5/7	k.DE/M.DE/Erase
2	B	1+BIII	1:400	2/6/8	k.DE/M.DE/Erase
2	B	1+BIV	1:800	1/5/7	k.DE/M.DE/Erase
2	B	1+BIV	1:800	2/6/8	k.DE/M.DE/Erase
/	/	QG	1:200	1/4	k.DE/S&P
/	/	QG	1:200	2/5	k.DE/S&P
/	/	QG	1:200	3/6	k.DE/S&P
/	/	QG	1:800	1/4	k.DE/S&P
/	/	QG	1:800	2/5	k.DE/S&P
/	/	QG	1:800	3/6	k.DE/S&P

**Tabelle 1: Vorbereitung der simulierten Beweismittel**

## 10.2 Ermittlung der mittleren männlichen DNA-Konzentration mittels rt-qPCR

Um die mittlere männliche DNA-Konzentration der Samen-Verdünnungen zu bestimmen werden 10µl der Verdünnungen auf jeweils vier sterile Stieltupfer aufgetragen. Die Abstriche werden unter Zusatz von 480µl Extraktionsgemisch (genaue Beschreibung unter Punkt 11.4), 20µl Proteinase K und 20µl DTT bei 56 °C über Nacht auf einem Schüttelinkubator (~700rpm) inkubiert. Im Anschluss werden 350µl des jeweiligen Lysats mit dem EZ1 & EZ2 DNA Investigator Kit (Qiagen) mit dem EZ2 DNA Investigator Large Volume RT Protokoll extrahiert und mittels rt-qPCR quantifiziert.

Für die Extraktionskontrolle werden eine Positivkontrolle (Blutstanze), eine Negativkontrolle (Extraktionschemikalien ohne Zugabe von DNA-haltigem Material) und ein steriler Stieltupfer als Leerwert mitgeführt.

### **10.3 Ermittlung der mittleren weiblichen DNA-Konzentration mittels rt-qPCR**

Um die mittlere weibliche DNA-Konzentration der Vaginalabstriche zu bestimmen, werden jeweils vier Vaginalabstriche der Probandin 1 und 2 unter Zusatz von 480µl Extraktionsgemisch (genaue Beschreibung unter Punkt 11.4) und 20µl Proteinase K bei 56°C über Nacht auf einem Schüttelinkubator (~700rpm) inkubiert. Im Anschluss werden 350µl des Lysats mit dem EZ1 & EZ2 DNA Investiagor Kit (Qiagen) mit dem EZ2 DNA Investigator Large Volume RT Protokoll extrahiert und mittels rt-qPCR quantifiziert.

### **10.4 Konventionelle Differentielle Extraktion**

In einem ersten Schritt wird der Spureträger (z.B. Abstrich) unter Zusatz von 480µl Extraktionsgemisch und 20µl Proteinase K bei 37°C für 30 Minuten auf einem Schüttelinkubator (~700rpm) inkubiert. In dieser ersten Lyse wird idealerweise nur die DNA von den Nicht-Spermien-Zellen (bspw. Epithel- oder Blutzellen) in Lösung gebracht. Der Spureträger wird mit einer Kolbenhubpipette ausgedrückt und die gesamte Lösung in ein zweites Reaktionsgefäß überführt. Durch eine anschließende Zentrifugation für 5 Minuten bei 16.320rcf werden die Spermien pelletiert. Der Überstand mit der isolierten DNA wird auf ca. 20 bis 50µl Restflüssigkeit abpipettiert (= spermienarme Fraktion/Überstandsfraktion). Das idealerweise aus den Spermien bestehende Pellet wird mit A. bidest zweimal gewaschen (Zugabe von 1ml A. bidest, vortexen, Zentrifugation für 5 Minuten bei 16.320rcf und Überstand bis auf ca. 20-50µl Restflüssigkeit abpipettieren). Anschließend werden die Spermien in einem zweiten Verdau unter Zugabe von 400µl Extraktionsgemisch, 16µl Proteinase K und 16µl DTT aufgeschlossen (= spermienangereicherte Fraktion/Pelletfraktion).

Beide Fraktionen (Pellet und Überstand) werden bei 56°C für mindestens eine Stunde oder über Nacht auf einem Schüttelinkubator (~700rpm) weiter lysiert. Die Extraktion erfolgt automatisiert mit dem Biorobot EZ2 Connex Fx (Qiagen). 350µl des Lysats der jeweiligen Fraktion werden mit dem EZ1 & EZ2 DNA Investiagor Kit (Qiagen) mit dem EZ2 DNA Investigator Large Volume RT Protokoll extrahiert und in 50µl TE-Puffer eluiert.

Für die Extraktionskontrolle werden eine Positivkontrolle (Blutstanze), eine Negativkontrolle (Extraktionschemikalien ohne Zugabe von DNA-haltigem Material) und ein steriler Stieltupfer als Leerwert mitgeführt.

### Extraktionspuffer

10mM Tris, pH 8.0; 10mM EDTA, pH 8.0; 100mM NaCl

exemplarisch für 200ml:

- 190ml A.bidest
- 2ml 1M Tris-Lösung pH 8.0
- 4ml 5M NaCl-Lösung
- 4ml 0,5M EDTA-Lösung pH 8.0

### Extraktionsgemisch

exemplarisch für 30ml:

- 24ml Extraktionspuffer
- 6ml 10% SDS-Lösung

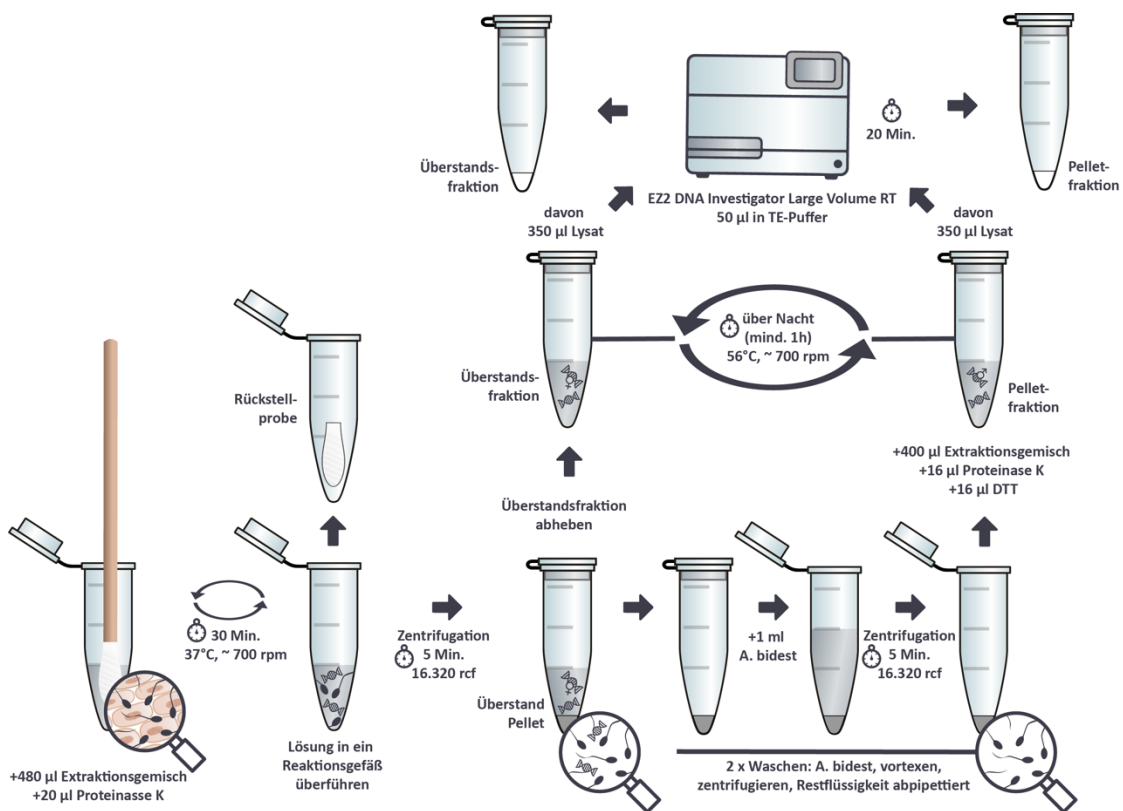
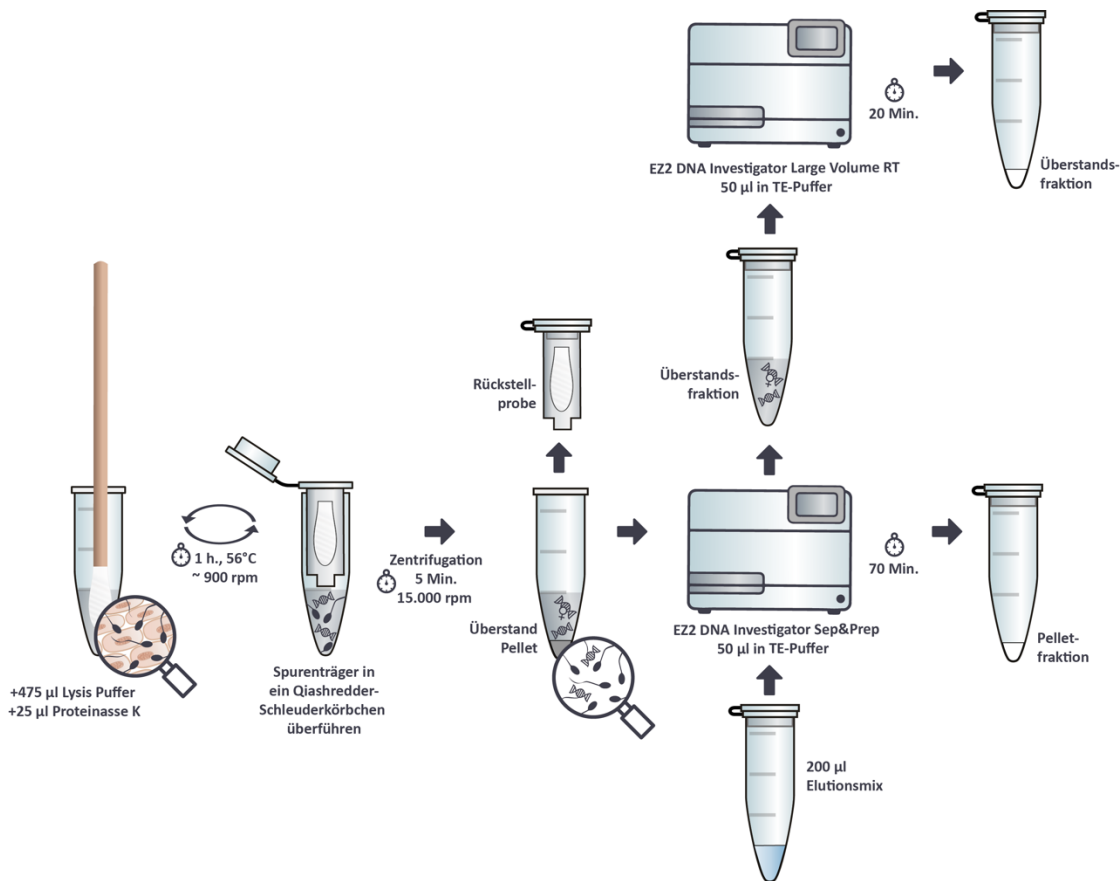


Abbildung 6: Workflow der konventionellen differentiellen Extraktion.

## 10.5 EZ2 DNA Investigator Sep&Prep Kit

In einem ersten Schritt wird der Spureträger (z.B. Abstrich) unter Zusatz von 475µl firmeneigenen Lysis Puffer und 25 µl Proteinase K bei 56°C für eine Stunde auf einem Schüttelinkubator (~900rpm) inkubiert. Dadurch wird idealerweise nur die DNA von den Nicht-Spermien-Zellen in Lösung gebracht. Der Spureträger wird in ein Qiasredder-Schleuderkörbchen (Spin-Basket) überführt und mit dem Lysat für 5 Minuten bei 15.000rpm zentrifugiert. Für die automatisierte Extraktion der spermienangereicherten Fraktion wird ein Elutionsmix hergestellt. Das bereits pelletierte Lysat (ohne Spin-Basket) wird mit dem EZ2 Sep&Prep Protokoll am EZ2 Connex Fx verarbeitet. Die spermienarme Fraktion (Überstandsfraktion) wird während des ca. 70-minütigen Laufs in ein Reaktionsgefäß pipettiert. An der spermienangereicherten Fraktion (Pelletraktion) werden eine Reihe von Reinigungsschritten durchgeführt, die DNA in Lösung gebracht und extrahiert. Die spermienarme Fraktion (Überstandsfraktion) muss anschließend mit dem EZ2 DNA Investigator Large Volume RT Protokoll in einem zweiten ca. 20-minütigen Lauf separat extrahiert werden. Beide Fraktionen werden jeweils in 50µl TE-Puffer eluiert.

Aufgrund der Limitation der Probenanzahl des Beta-Tests werden bei dieser Methode keine Extraktionskontrollen mitgeführt.



**Abbildung 7: Workflow des EZ2 DNA Investigator Sep&Prep Kit.**

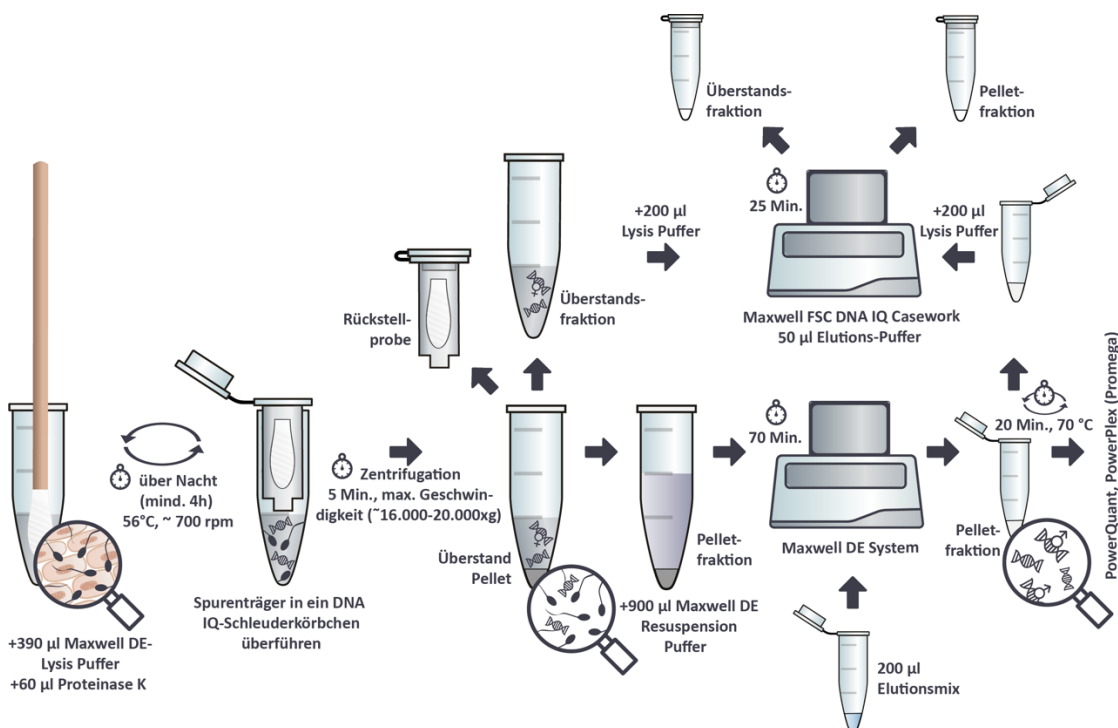
## 10.6 Maxwell DE Casework Kit

Der Maxwell DE Casework Kit ist mit Stand Dezember 2025 nicht erwerbbar und wird uns von der Firma Promega als Testversion zur Verfügung gestellt. Das Maxwell DE System (Promega) (semi-)automatisiert die Aufreinigung von genomischer DNA von Proben aus Sexualstraftaten. Dabei werden die Proben mit einem Protokoll manuell vorbehandelt und anschließend am Maxwell RSC (Promega) in einem ca. 70-minütigen Lauf automatisiert verarbeitet.

In einem ersten Schritt wird der Spurenräger (z.B. Abstrich) unter Zusatz von 390µl Maxwell DE Lysis Puffer und 60µl Proteinase K bei 56°C für mindestens vier Stunden oder über Nacht auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Dadurch wird idealerweise nur die DNA von den Nicht-Spermien-Zellen in Lösung gebracht. Der Spurenräger wird in ein DNA IQ-Schleuderkörbchen (Spin-Basket) überführt und mit dem Lysat für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand mit der isolierten DNA wird auf ca.

50µl Restflüssigkeit abpipettiert (= spermienarme Fraktion/Überstandsfraktion). Für die automatisierte Extraktion der spermienangereicherten Fraktion (Pelletfraktion) wird ein Elutionsmix hergestellt. Die Pelletfraktion wird mit 900µl Maxwell DE Resuspension Puffer gemischt und mit dem Maxwell DE System am Maxwell RSC verarbeitet. Am Ende des Laufs wird die Pelletfraktion für 20 Minuten bei 70°C inkubiert. Sowohl die Pelletfraktion, als auch die Überstandsfraktion werden im Anschluss mit dem Maxwell FSC DNA IQ Casework Kit weiterverarbeitet. Dabei werden beide Fraktionen mit 200µl Lysis Puffer versetzt und mit dem ca. 25-minütigen DNA IQ Casework Protokoll am Maxwell RSC extrahiert und in 50µl Elutions-Puffer eluiert.

Anzumerken ist, dass die spermienangereicherte Fraktion (Pelletfraktion) im Anschluss an den Maxwell DE System Lauf mit PowerQuant und PowerPlex (Promega) kompatibel ist und somit in der Promega Downstreamanalyse direkt weiterverarbeitet werden kann. Ein zweiter DNA IQ Casework Lauf wäre nicht notwendig. Aufgrund der Limitation der Probenanzahl werden bei dieser Methode keine Extraktionskontrollen mitgeführt.



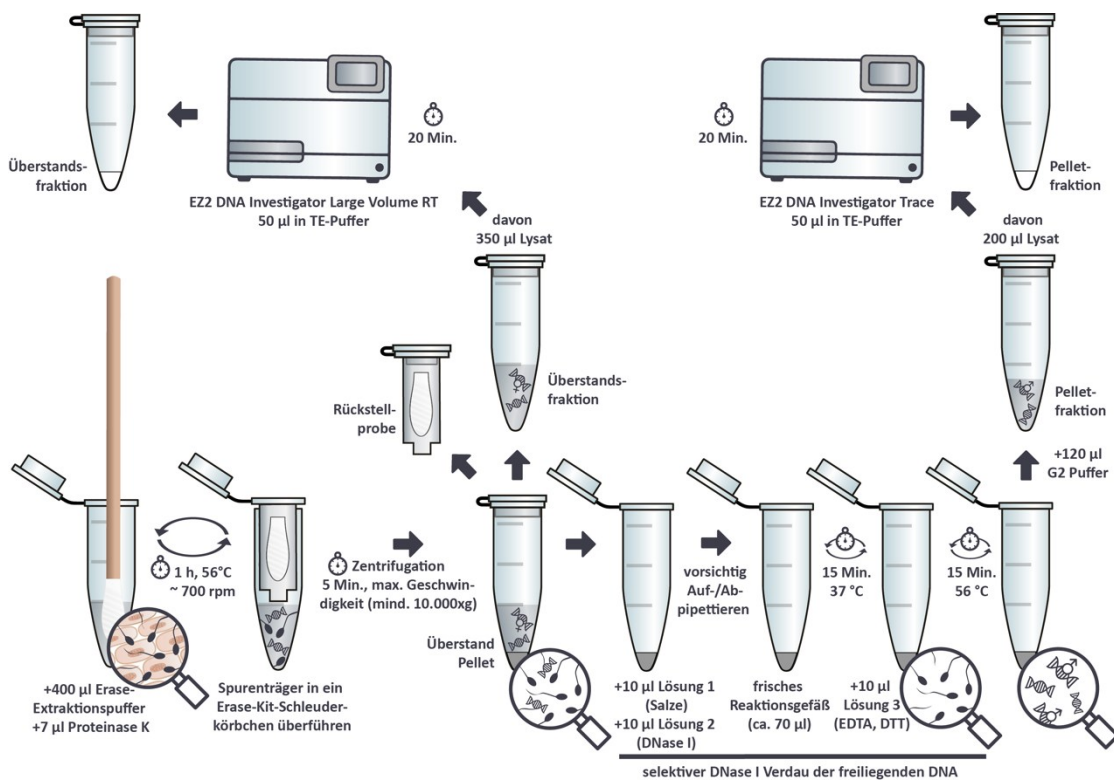
**Abbildung 8: Workflow des Maxwell DE Casework Kit.**

## 10.7 Erase Sperm Isolation Kit

Das Erase Sperm Isolation Kit (PTC Laboratories) enthält Transferröhrchen und Reagenzien zur Durchführung von 50 differentiellen Extraktionen. In einem ersten Schritt wird der Spureträger (z.B. Abstrich) unter Zusatz von 400µl des firmeneigenen Erase-Extraktionspuffers und 7µl Proteinase K bei 56°C für eine Stunde auf einem Schüttelinkubator inkubiert. Dadurch wird idealerweise nur die DNA von den Nicht-Spermien-Zellen in Lösung gebracht. Der Spureträger wird in ein Erase-Kit-Schleuderkörbchen (Spin-Basket) überführt und mit dem Lysat für 5 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand mit der isolierten DNA wird auf ca. 50µl Restflüssigkeit abpipettiert (= spermienarme Fraktion/Überstandsfraktion). Anschließend erfolgt ein selektiver Verdau der freiliegenden Nicht-Sperma-DNA in der spermienangereicherten Fraktion (Pelletfraktion) unter Verwendung des Enzyms DNase I. Dabei werden 10µl der Lösung 1 (Salze) und 10µl der Lösung 2 (DNase I) zur Pelletfraktion zugegeben und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt. Die 70µl werden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden 10µl der Lösung 3 (EDTA, DTT) hinzugefügt und für 15 Minuten bei 56°C inkubiert. Die spermienangereicherte Fraktion wird dabei durch die Inaktivierung der Nuklease mit EDTA und gleichzeitiger Lysierung der Spermien mit Dithiothreitol (DTT) gewonnen.

Die Extraktion beider Fraktionen erfolgt automatisiert mit dem Biorobot EZ2 Connex Fx (Qiagen) mit dem EZ1 & EZ2 DNA Investigator Kit. Die Überstandsfraktion (~350µl) wird mit dem EZ2 DNA Investigator Large Volume RT Protokoll extrahiert. Die Pelletfraktion (~80µl) wird mit 120µl G2 Puffer versetzt und mit dem EZ2 DNA Trace Protokoll extrahiert. Beide Fraktionen werden in 50µl TE-Puffer eluiert.

Für die Extraktionskontrolle werden eine Positivkontrolle (Blutstanze) und eine Negativkontrolle (Extraktionschemikalien ohne Zugabe von DNA-haltigem Material) mitgeführt.



**Abbildung 9: Workflow des Erase Sperm Isolation Kit.**

## 10.8 rt-qPCR

Die DNA-Quantifizierung mittels real-time (rt) - qPCR (TaqMan-assay) ist eine Methode zur semiquantitativen Messung der humanen DNA-Konzentration in DNA-Extrakten für die nachfolgende PCR-Untersuchung. Beim sogenannten TaqMan- oder 5' – Nuclease-Assay entsteht das Fluoreszenzsignal durch Anregung eines Reporter-Fluoreszenzfarbstoffs, welcher an ein Oligonukleotid gekoppelt ist (= fluoreszenzmarkierte Sonde), das spezifisch an eine Ziel-DNA bindet (siehe Tab. 2). Der Quantifizierungs-Reaktionsmix (siehe Tab. 3 und 4) enthält als zusätzliche Komponente für den Nachweis von PCR-Hemmung ein Internes Positiv-Kontroll-Plasmid als Interne-Positiv-Kontrolle (IPK). Diese amplifiziert während der rt-qPCR unabhängig davon, ob in der Probe DNA vorhanden ist oder nicht. Zudem ergibt sich ein Hinweis auf Inhibition durch einen erhöhten Ct-Wert der IPK. Es wird ein DNA-Standard für die Qualitätskontrolle mit einer Konzentration von 5ng/µl mitgeführt.

Der rt-qPCR Ansatz (siehe Tab. 4) wird im Doppelansatz mit dem Pipettierroboter Tecan Freedom Evo 100 automatisiert pipettiert. Die Durchführung der rt-qPCR erfolgt auf dem QuantStudio™ 5Real-Time PCR

Instrument (Thermofisher) (siehe Tab. 5). Mittels der Ct-Werte einer Verdünnungsreihe eines DNA-Standards bekannter Konzentrationen lässt sich eine Eichkurve erstellen. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration werden die Ct-Werte aus den jeweiligen Doppelansätzen gemittelt. Die Quantifizierung einer unbekanntem DNA-Ausgangsmenge erfolgt durch einen Vergleich des Ct-Werts dieser Probe mit jenen der Eichkurve.

### **BSA 2,5mg/ml**

exemplarisch für 24ml:

- 3ml BSA-Lösung 20mg/ml
- 21ml A.bidest

in 1ml Aliquoten für 30 Minuten bei 95°C auf einem Thermomixer inkubieren

### **10mM Tris/0,1mM EDTA pH 8.0**

exemplarisch für 50ml:

- 0,5ml 1M Tris-Lösung pH 8.0
- 10µl 0,5M EDTA-Lösung pH 8.0
- 49,5ml A.bidest

### **10mM Tris/0,1mM EDTA pH 8.0, 20µl/ml Glycogen**

exemplarisch für 25ml:

- 100µl Glycogen (Konzentration 5mg/ml)
- 24,9ml 10mM Tris/0,1mM EDTA pH 8.0

### **Interne Positiv Kontrolle (pmtIPC)**

Stammlösung (1 Milliarde Kopien/µl) auf eine Konzentration von 1 Million Kopien/µl mit 10mM Tris 0,1mM EDTA verdünnen (1:1000).

#### **Primer für die nukleäre Ziel-Sequenz (94bp Fragment)**

AluYb8 f 5' – CTTGCAGTGAGCCGAGATT – 3'

AluYb8 r 5' – GAGACGGAGTCTCGCTCTGTC – 3'

#### **Sonde für die nukleäre Ziel-Sequenz (TaqMan MGB-Sonde, Applied Biosystems)**

AluYb8 MGB 5' – FAM – ACTGCAGTCCGCAGTCCGGCCT – MGBNFQ – 3'

#### **Primer für die interne Positiv Kontrolle**

RB1 ex25 157 f 5' – CCAGAAAATAAATCAGATGGTATGTAACA – 3'

RB1 ex25 IPC r235 5' – TCGTTTTCGGAGCGTTGGTTAG – 3'

#### **Sonde für die interne Positiv Kontrolle (TaqMan MGB-Sonde, Applied Biosystems)**

RB1 2727 MGB 5' – VIC – CAGCACTTCTTTTGAGCAC – MGBNFQ – 3'

### **Tabelle 2: Sequenzen der Primer und Sonden für die rt-qPCR.**

Die Verdünnung der Primer und Sonden erfolgt mit sterilem Tris-EDTA-Puffer (10mM Tris/0,1mM EDTA pH 8.0, 20µl/ml Glycogen).

Bestandteile	Konzentration Stammlösung	Endkonzentration in 10µl	µl für eine Reaktion
10x BSA	2,5mg/ml	0,25mg/ml	1
AluYb8 f	100µM	400nM	0,04
AluYb8 r	100µM	400nM	0,04
AluYb8 MGB (FAM)	100µM	200nM	0,02
RB1 Ex25 157f	100µM	900nM	0,09
RB1 Ex25 IPC r235	100µM	900nM	0,09
RB1 2727 MGB (VIC)	100µM	200nM	0,02
pRB1 IPC	1 Million Kopien/µl	20000 Kopien	0,02
A.bidest			0,68
<b>Endvolumen</b>			<b>2</b>

**Tabelle 3: Herstellung eines Prä-Mastermix für die rt-qPCR**

Reagenz	Volumen pro Ansatz (µl)
Prä-Mastermix	2
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2X), no AmpErase™ UNG (Applied Biosystems)	5
DNA	3
<b>Endvolumen</b>	<b>10</b>

**Tabelle 4: Herstellung eines 10µl rt-qPCR-Mastermix**

<b>Block type</b>	96-Well 0,1ml Block
<b>Experiment type</b>	Standard curve
<b>Chemistry</b>	TaqMan <sup>R</sup> Reagent
<b>Run mode</b>	Fast
<b>Volume</b>	10µl
<b>Cover</b>	105,0°C
<b>Hold Stage</b>	95°C, 00:20 Min.
<b>PCR Stage</b>	
Step 1	95°C, 00:03 Min. (Rampe 4,14°C/Sek.)
Step 2	60°C, 00:30 Min. (Rampe 3,17°C/Sek.)
<b>Zyklen</b>	40
<b>Treshhold</b>	
MGB_AlYb8	0,11
pmtIPC	0,12

**Tabelle 5: Einstellungen am QuantStudio™ 5Real-Time PCR Instrument**

## 10.9 Autosomale STR-Analyse

Für die Amplifikation von autosomalen STRs in der extrahierten DNA wird der PowerPlex ESX 17 System PCR Kit (Promega) verwendet. Im Kit sind alle für die Multiplex-PCR notwendigen Chemikalien enthalten. Die Pipettiervorgänge werden mit dem Pipettierroboter Tecan Freedom Evo 100 automatisiert durchgeführt. Dabei werden je 15µl Mastermix vorgelegt und die DNA bzw. gegebenenfalls A.bidest zugegeben (siehe Tab. 6). Es wird eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle (A.bidest) mitgeführt. Die im Kit enthaltene Positivkontrolle (2800M DNA, 250ng, 10ng/µl) wird auf eine Konzentration von

0,1ng/µl mit A.bidest verdünnt und anschließend mit 5 µl (0,5ng) in die PCR eingesetzt. Das Thermocycler-Protokoll (siehe Tab. 8) wird am ProFlex PCR System (Thermo Fisher) mit Thermal Cycler Fleet Control Software (Thermo Fisher) durchgeführt.

Die in die jeweilige PCR-Reaktion einzusetzende DNA-Menge ergibt sich aus der bei der DNA-Quantifizierung ermittelten DNA-Konzentration (siehe Tab. 7). Wenn weniger als das Maximalvolumen eingesetzt wird, wird das Restvolumen durch A. bidest ausgeglichen. In der Tabelle 9 sind die konkreten Bezeichnungen der STR-Systeme sowie die Lage im menschlichen Genom angegeben. Das PCR-System Amelogenin (Xp22.1-p22.3/Yp11.2) wurde für die Identifikation der biologischen Geschlechtseigenschaft der Probe verwendet.

Reagenz	Volumen pro Ansatz (µl)
PowerPlex ESX 5X Master Mix	5
PowerPlex ESX 17 10X Primer Pair	2,5
A. bidest	7,5
DNA (ggf. mit A. bidest ausgeglichen)	10
<b>Endvolumen</b>	<b>25</b>

**Tabelle 6: Herstellung eines 25 µl PCR-Mastermix für die autosomale STR-Analyse**

Konzentration (ng/µl)	DNA-Menge (ng)	DNA-Menge (µl)
≤ 0,1	Max. 1	10
0,1-5	1	1
≥ 5	0,5	
z.B. 5	0,5	0,2 (entspricht 1:5 Verdünnung)
z.B. 10	0,5	0,05 (entspricht 1:20 Verdünnung)

**Tabelle 7: DNA-Einsatzmenge in 25 µl PCR-Ansatz nach DNA-Konzentration**

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
96°C	2 Min.	
94°C	20 Sek.	
59°C	120 Sek.	30
72°C	30 Sek.	
72°C	5 Min.	
60°C	10 Min.	
20°C	fortlaufend	

**Tabelle 8: PowerPlex ESX 17 System Thermocycler Protokoll mit 30 Zyklen**

STR-Systeme	Chromosomale Lokalisation
D3S1358	3p21.31
VWA	12p12-pter
D16S539	16q24.1
D2S1338	2q35
D8S1179	8q
FGA	4q28
D21S11	21q21.1
D18S51	18q21.33
D19S433	19q12
TH01	11p15.5
SE33	6q14
D1S1656	1q42
D10S1248	10q26.3
D22S1045	22q12.3
D12S391	12q
D2S441	2p14

**Tabelle 9: STR-Marker PowerPlex ESX 17 System**

## 10.10 Y-chromosomale STR-Analyse

Für die Amplifikation von Y-chromosomalen STRs in der extrahierten DNA wird der PowerPlex Y23 System Kit (Promega) verwendet. Im Kit sind alle für die Multiplex-PCR notwendigen Chemikalien enthalten. Es werden je 15µl Mastermix vorgelegt und 10µl DNA zugegeben (siehe Tab. 10). Eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle (A.bidest) werden mitgeführt. Die im Kit enthaltene Positivkontrolle (2800M DNA, 250ng, 10ng/µl) wird auf eine Konzentration von 0,1ng/µl mit A.bidest verdünnt und anschließend mit 5µl (0,5ng) in die PCR eingesetzt. Das Thermocycler-Protokoll (siehe Tab. 11) wird am ProFlex PCR System (Thermo Fisher) mit Thermal Cycler Fleet Control Software (Thermo Fisher) durchgeführt. In der Tabelle 12 sind die konkreten Bezeichnungen der Y-chromosomalen-STR-Systeme angegeben.

Reagenz	Volumen pro Ansatz (µl)
PowerPlex Y23 5X Master Mix	5
PowerPlex Y23 10X Primer Pair	2,5
A. bidest	7,5
DNA	10
<b>Endvolumen</b>	<b>25</b>

**Tabelle 10: Herstellung eines 25 µl PCR-Mastermix für die Y-chromosomale STR Analyse**

Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
96°C	2 Min.	
94°C	10 Sek.	
61°C	1 Min.	30
72°C	30 Sek.	
60°C	20 Min.	
20°C	fortlaufend	

**Tabelle 11: PowerPlex Y23 System Thermocycler Protokoll mit 30 Zyklen**

STR-Systeme
DYS576
DYS389I/II
DYS448
DYS19
DYS391
DYS481
DYS549
DYS533
DYS438
DYS437
DYS570
DYS635
DYS390
DYS439
DYS392
DYS643
DYS393
DYS458
DYS385a/b
DYS456
Y-GATA-H4

**Tabelle 12: Y-chromosomale-STR-Marker PowerPlex Y23 System**

## 10.11 Kapillarelektrophorese

Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte werden für die Auftrennung mittels Kapillarelektrophorese am ABI 3500XL Genetic Analyzer HID (Thermo Fisher Applied Biosystems) vorbereitet und in ein denaturierendes, ionen-armes Medium überführt. 1,3µl des jeweiligen PCR-Produkts wird mithilfe der Liquid Handling Workstation epMotion 5070 (Eppendorf) in Hi-Di Formamide (Thermo Fisher) überführt, welches zuvor mit einem PCR-Kit abhängigen DNA-Größenstandard (Interner Längenstandard ILS) versetzt wurde (siehe Tab. 13). Die im PowerPlex ESX 17 System PCR Kit enthaltene allelische Leiter wird mit 1µl und jene im PowerPlex Y23 System PCR Kit mit 1,5µl zu je 10µl mit ILS versetztem Hi-Di Formamide in die Kapillarelektrophorese eingesetzt.

Anschließend werden die Amplifikate und die allelische Leiter durch Erhitzen in einem Thermocycler für 3 Minuten bei 95°C denaturiert.

**Hi-Di Formamide mit WEN Internal Lane Standard 500 (WEN ILS 500, PowerPlex ESX System) oder WEN Internal Lane Standard 500 Y23 (WEN ILS 500 Y23, PowerPlex Y23 System)**

ILS mit ca. 25µl/ml in Hi-Di Formamide

exemplarisch für 4,1ml:

- Hi-Di Formamide: 4ml
- WEN ILS 500 bzw. WEN ILS500 Y23: 100µl

Reagenz	Volumen pro Ansatz (µl)
Hi-Di Formamide mit WEN ILS500 bzw. ILS500 Y23	10
PCR-Produkt	1,3
<b>Endvolumen</b>	<b>11,3</b>

**Tabelle 13: Herstellung eines 11,3µl CE-Ansatz**

Die Amplifikate werden elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt, wobei kürzere DNA-Fragmente schneller durch die Kapillare wandern als längere. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden durch einen Laser angeregt und das produzierte Signal mit einer CCD-Kamera detektiert. Mit Hilfe des Internen Längenstandards wird die Länge der einzelnen DNA-Fragmente bestimmt. Die Signalstärke ist proportional zur Konzentration jedes DNA-Fragments in einer Probe.

Für das PowerPlex ESX System PCR Kit und das PowerPlex Y23 System Kit ist das G5 WEN Promega Dye-Set (Matrix) zu verwenden. Die Injektionsbedingungen werden mit 5kV7s festgelegt. Die Rohdaten werden von der 3500 Series Data Collection Software 4 Version 4.0.1 aufgezeichnet und die Beurteilung erfolgt mithilfe der Genemapper ID-X Software. Die Berechnung der Fragmentlängen der Amplifikate wird mit dem jeweiligen internen Längenstandard durchgeführt, der in jeder Probe mitgeführt wird. Mit der GeneMapper ID-X Software wird eine Local Southern Berechnungsvariante durchgeführt, wobei zur Berechnung die Migrationsdauer der beiden nächst kleineren und der beiden nächst größeren Fragmenten im ILS herangezogen werden. Jedem DNA-Fragment (=Allel) wird somit eine diskrete, apparente

Fragmentlänge zugeordnet. Es gilt die auf der Repeatanzahl basierende Nomenklatur, wie von ISFG und EDNAP empfohlen. Die von den Herstellern der STR-Multiplexen mitgelieferten allelischen Leitern gelten als Vorlage und Bezugsquelle für die Allelzuordnung und -benennung.

### **10.12 Kriterien zur Effizienzbewertung**

Folgende Kriterien werden zur Effizienzbewertung der DE-Methoden herangezogen: die Gewinnung der Spermien-DNA (DNA-Ausbeute) in den Pelletfraktionen (P) und die Effizienz der Trennung als Veränderung des Verhältnisses von Opfer-DNA zu Spermien-DNA in den Pelletfraktionen (P), ausgehend von der „gemischten“ Ausgangsprobe (STR-Profilinformationen). Zusätzlich wird die Laborarbeit jeder Methode in Bezug auf den Gesamtzeitaufwand, das Probenhandling und die Arbeitsabläufe beurteilt.

### **10.13 Datenaufbereitung und statistische Auswertung**

Die STR Ergebnisse werden anhand von Punktdiagrammen dargestellt. Um eine Rückverfolgbarkeit auf Probandinnen und Probanden zu verhindern, werden in der Masterarbeit keine STR-Profile gezeigt. In einem Punktdiagramm werden die Relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU's) der Allele, die eindeutig der Abstrich-Spenderin, und jene, die eindeutig dem Samen-Spender zugeordnet werden können, in jeweils einer Probe dargestellt.

In Mischspuren können Allele an Stutter-Positionen maskiert sein. Allele die sich in Frontstutterposition befinden werden korrigiert und jeweils 10% der RFU's des n+4 Peaks (bei Tetrarepeat-Markern) vom Allel in Stutterposition (n-4 Peak) abgezogen. Der Trirepeat-Marker D22S1045 weist regelmäßig einen Back-Stutter auf (in diesem Fall n+3 bp), weshalb in diesem System zusätzlich für die Backstutterposition eine Stutterkorrektur von 10% miteinberechnet wird. Die RFU's homozygoter Allele werden halbiert.

Um Aufschluss über die Komponentenanteile zu erhalten, wird in Mischspuren die Mischungs-Ratio ( $M_r$ ) berechnet. Die  $M_r$  wird nicht berechnet, wenn sich ein eindeutiges Hauptprofil (HP) ableiten lässt und wenn die Spur nur von einem Spurenverursacher, d.h. als „reines“ Profil (P) vorliegt.

# 11. Ergebnisse

## 11.1 Quantifizierungs- und Y-STR Ergebnisse

Die Quantifizierungsergebnisse der Pelletfraktionen (P) sind in der Tabelle 14 und die der Überstandsfraktionen (Ü) in der Tabelle 15 zusammengefasst. Die humane DNA-Konzentrationen aus den gemittelten Doppelansätzen der rt-qPCR finden sich in der Spalte „DNA-Konzentration (ng/µl)“. Bei jenen Pelletfraktionen (P), bei denen eine Amplifikation von Y-chromosomalen STRs erfolgte, wurden die RFU's jedes amplifizierten Y-STRs addiert und durch die Anzahl der 23 Allele gemittelt. Die durchschnittliche RFU Höhen der Y-STRs finden sich in der Spalte „ $\bar{x}$  RFU Y-STRs“.

Quantifizierungsergebnisse der Pelletfraktionen (P)					
Probe	DNA-Konzentration (ng/µl)	$\bar{x}$ RFU Y-STRs	Probe	DNA-Konzentration (ng/µl)	$\bar{x}$ RFU Y-STRs
<b>konventionelle DE</b>					
P 1+AI_1	0,1715	5671	P 2+BI_1	0,0402	988
P 1+AI_2	0,1334	5952	P 2+BI_2	0,0504	1165
<b>keine EZ2 DNA Investigator Sep&amp;Prep Analyse von 1+AI</b>					
<b>Maxwell DE Casework</b>					
P 1+AI_5	0,4876	1194	P 2+BI_5	1,6718	487
P 1+AI_6	0,5448	418	P 2+BI_6	1,1509	1124
<b>Erase Sperm Isolation</b>					
P 1+AI_7	0,0176		P 2+BI_7	0,0264	
P 1+AI_8	0,0099		P 2+BI_8	0,0161	
<b>konventionelle DE</b>					
P 1+AII_1	0,0870	1097	P 2+BII_1	0,0437	302
P 1+AII_2	0,0777	1032	P 2+BII_2	0,0268	558
<b>EZ2 DNA Investigator Sep&amp;Prep</b>					
P 1+AII_3	0,1799		P 2+BII_3	0,0458	
P 1+AII_4	0,1148		P 2+BII_4	0,1950	
<b>Maxwell DE Casework</b>					
P 1+AII_5	0,4442	966	P 2+BII_5	2,4099	141
P 1+AII_6	1,1699	1354	P 2+BII_6	1,0826	319
<b>Erase Sperm Isolation</b>					
P 1+AII_7	0,0059		P 2+BII_7	0,0336	
P 1+AII_8	0,0644		P 2+BII_8	0,0304	
<b>konventionelle DE</b>					
P 1+AIII_1	0,0460	214	P 2+BIII_1	0,0549	49
P 1+AIII_2	0,0299	261	P 2+BIII_2	0,0522	30
<b>EZ2 DNA Investigator Sep&amp;Prep</b>					
P 1+AIII_3	0,0205				
P 1+AIII_4	0,0388				

Maxwell DE Casework					
P 1+AIII_5	0,2738	79	P 2+BIII_5	1,5371	162
P 1+AIII_6	0,8322	346	P 2+BIII_6	0,6176	138
Erase Sperm Isolation					
P 1+AIII_7	0,0238		P 2+BIII_7	0,0170	
P 1+AIII_8	0,0049		P 2+BIII_8	0,0077	
konventionelle DE					
P 1+AIV_1	0,0179		P 2+BIV_1	0,0473	
P 1+AIV_2	0,0132		P 2+BIV_2	0,0244	
keine EZ2 DNA Investigator Sep&Prep Analyse von 1+AIV					
Maxwell DE Casework					
P 1+AIV_5	0,7962		P 2+BIV_5	1,0736	
P 1+AIV_6	0,2454		P 2+BIV_6	0,7480	
Erase Sperm Isolation					
P 1+AIV_7	0,0118		P 2+BIV_7	0,0069	
P 1+AIV_8	0,0061		P 2+BIV_8	0,0162	
konventionelle DE			EZ2 DNA Investigator Sep&Prep		
P 1:200_QG_1	0,0979		P 1:200_QG_4	0,1889	
P 1:200_QG_2	0,0607		P 1:200_QG_5	0,1454	
P 1:200_QG_3	0,1059		P 1:200_QG_6	0,1330	
konventionelle DE			EZ2 DNA Investigator Sep&Prep		
P 1:800_QG_1	0,0611		P 1:800_QG_4	0,0317	
P 1:800_QG_2	0,0470		P 1:800_QG_5	0,0797	
P 1:800_QG_3	0,0454		P 1:800_QG_6	0,1195	

**Tabelle 14: Ergebnisse der DNA-Konzentration der Pelletfraktionen sowie der mittleren RFU Höhe der Y-STRs**

Quantifizierungsergebnisse der Überstandsfraktionen (Ü)			
Probe	DNA-Konzentration (ng/µl)	Probe	DNA-Konzentration (ng/µl)
konventionelle DE			
Ü 1+AI_1	24,40	Ü 2+BI_1	29,18
Ü 1+AI_2	19,40	Ü 2+BI_2	32,35
keine EZ2 DNA Investigator Sep&Prep Analyse von 1+AI			
Maxwell DE Casework			
Ü 1+AI_5	49,55	Ü 2+BI_5	64,03
Ü 1+AI_6	62,48	Ü 2+BI_6	46,94
Erase Sperm Isolation			
Ü 1+AI_7	21,21	Ü 2+BI_7	17,61
Ü 1+AI_8	16,87	Ü 2+BI_8	17,34
konventionelle DE			
Ü 1+AII_1	28,65	Ü 2+BII_1	29,36
Ü 1+AII_2	29,18	Ü 2+BII_2	38,07
EZ2 DNA Investigator Sep&Prep			
Ü 1+AII_3	50,19	Ü 2+BII_3	57,89
Ü 1+AII_4	43,29	Ü 2+BII_4	43,97

<b>Maxwell DE Casework</b>			
Ü 1+AII_5	49,64	Ü 2+BII_5	44,78
Ü 1+AII_6	57,99	Ü 2+BII_6	55,14
<b>Erase Sperm Isolation</b>			
Ü 1+AII_7	20,46	Ü 2+BII_7	18,50
Ü 1+AII_8	20,43	Ü 2+BII_8	7,69
<b>konventionelle DE</b>			
Ü 1+AIII_1	61,51	Ü 2+BIII_1	46,88
Ü 1+AIII_2	27,09	Ü 2+BIII_2	29,51
<b>EZ2 DNA Investigator Sep&amp;Prep</b>			
Ü 1+AIII_3	59,98		
Ü 1+AIII_4	54,63		
<b>Maxwell DE Casework</b>			
Ü 1+AIII_5	64,22	Ü 2+BIII_5	63,12
Ü 1+AIII_6	55,08	Ü 2+BIII_6	56,60
<b>Erase Sperm Isolation</b>			
Ü 1+AIII_7	21,05	Ü 2+BIII_7	5,78
Ü 1+AIII_8	27,13	Ü 2+BIII_8	21,21
<b>konventionelle DE</b>			
Ü 1+AIV_1	28,29	Ü 2+BIV_1	49,63
Ü 1+AIV_2	30,77	Ü 2+BIV_2	40,67
<b>Maxwell DE Casework</b>			
Ü 1+AIV_5	42,43	Ü 2+BIV_5	72,78
Ü 1+AIV_6	73,43	Ü 2+BIV_6	73,44
<b>Erase Sperm Isolation</b>			
Ü 1+AIV_7	32,97	Ü 2+BIV_7	23,05
Ü 1+AIV_8	24,84	Ü 2+BIV_8	24,51
<b>konventionelle DE</b>		<b>EZ2 DNA Investigator Sep&amp;Prep</b>	
Ü 1:200_QG_1	22,59	Ü 1:200_QG_4	29,85
Ü 1:200_QG_2	22,28	Ü 1:200_QG_5	26,02
Ü 1:200_QG_3	55,73	Ü 1:200_QG_6	29,75
<b>konventionelle DE</b>		<b>EZ2 DNA Investigator Sep&amp;Prep</b>	
Ü 1:800_QG_1	52,00	Ü 1:800_QG_4	29,15
Ü 1:800_QG_2	53,17	Ü 1:800_QG_5	29,37
Ü 1:800_QG_3	43,22	Ü 1:800_QG_6	27,26

**Tabelle 15: Ergebnisse der DNA-Konzentration der Überstandsfraktionen**

## 11.2 Mittlere männliche und weibliche DNA-Konzentration

In der Tabelle 16 sind die Ergebnisse der durchgeführten DNA Quantifizierung der rein männlichen Samen-Verdünnungen und der rein weiblichen Abstriche dargestellt. Eine STR-Typisierung von Proben mit einem Quantifizierungswert unterhalb von 0,002ng/µl (Cut-Off) führt aus Erfahrung zu keinen (verwertbaren) Resultaten. Die ausgewählten Samen-Verdünnungen befinden sich oberhalb und auch unterhalb dieses Grenzwerts und sind als simulierte Beweismittel mit einem schwierigen Mischungsverhältnis als besonders herausfordernd einzustufen. Die geringe Spermienanzahl in den hohen Verdünnungen und der Verlust im DNA-Extraktionsprozess führen dazu, dass die Quantifizierungswerte teilweise sehr gering ausfallen. So kann es sein, dass obwohl Spermien-DNA an den Spurentägern aufgetragen wurde, diese durch den Verlust während des DNA-Extraktionsprozesses nicht nachweisbar ist. Mit der durchgeführten Extraktionsmethode ergibt sich ein mittlerer DNA-Extraktionsverlust von erfahrungsgemäß in etwa 50%. Für die Bewertung und den Vergleich unterschiedlicher DE-Methoden ist es wichtig, Probenmaterial mit realistischen Mischungsverhältnissen von Täter und Opfer-Anteilen zu untersuchen.

Jeweils zwei Werte derselben Samen-Verdünnungen ergeben einen etwas niedrigeren Quantifizierungswert. Diese Proben wurden im Zuge der Herstellung der zweiten Probencharge der simulierten Beweismittel für den Maxwell DE Casework und den Erase Sperm Isolation Kit einige Monate später aus den bei -20°C gelagerten Samen-Verdünnungen hergestellt. Für eine weitere Überprüfung der Vergleichbarkeit werden Y-STRs der 1:100 Samen-Verdünnungen (AI bzw. BI) aus jeweils einer Probe der ersten und der zweiten Charge analysiert. Die Verdünnungen werden jeweils maximal mit 10µl in die PowerPlex Y23 System PCR eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen eine vergleichbare mittlere RFU-Höhe der jeweiligen 1:100 Verdünnung (siehe Tab. 16) weshalb davon auszugehen ist, dass die Proben trotz des einmaligen Einfrierens vergleichbar sind.

Probe	DNA-Konzentration (ng/μl)	$\bar{x}$ RFU Y-STRs	Probe	DNA-Konzentration (ng/μl)	$\bar{x}$ RFU Y-STRs
<b>AI</b>	0,1336	3795	<b>BI</b>	0,0233	386
	0,1051			0,0286	
	0,0636	4850		0,0125	563
	0,0594			0,0138	
$\bar{x}$	<b>0,0904</b>		$\bar{x}$	<b>0,0195</b>	
<b>AII</b>	0,0521		<b>BII</b>	0,0090	
	0,0461			0,0132	
	0,0212			0,0047	
	0,0281			0,0049	
$\bar{x}$	<b>0,0369</b>		$\bar{x}$	<b>0,0079</b>	
<b>AIII</b>	0,0064		<b>BIII</b>	0,0022	
	0,0089			0,0022	
	0,0105			0,0011	
	0,0131			0,0018	
$\bar{x}$	<b>0,0097</b>		$\bar{x}$	<b>0,0018</b>	
<b>AIV</b>	0,0009		<b>BIV</b>	0,0002	
	0,0004			0,0003	
	0,0001			0,0000	
	0,0000			0,0000	
$\bar{x}$	<b>0,0003</b>		$\bar{x}$	<b>0,0001</b>	
<b>1</b>	35,27		<b>2</b>	25,25	
	43,08			24,43	
	27,92			29,97	
	31,98			22,87	
$\bar{x}$	<b>34,56</b>		$\bar{x}$	<b>25,63</b>	

**Tabelle 16: Ergebnisse der mittleren männlichen und weiblichen DNA-Konzentration sowie der mittleren RFU Höhe der Y-STRs**

### 11.3 Konventionelle Differentielle Extraktion

Die Amplifikation von autosomalen STRs der konventionellen DE erfolgt von allen 22 Pelletfraktionen (P) (8 Duplikate, 2 Triplikate) und von 16 ausgewählten Überstandsfraktionen (Ü) der 1:200 (2 Duplikate, 1 Triplikat), der 1:400 (2 Duplikate) und 1:800 (1 Duplikat, 1 Triplikat) Verdünnungen (siehe Tab. 17). Die Pelletfraktionen werden jeweils maximal mit 10µl in die PowerPlex ESX 17 System PCR eingesetzt, bei den Überstandsfraktionen ergibt sich die Zugabe der entsprechenden Menge der zu amplifizierenden DNA aus der, bei der DNA-Quantifizierung ermittelten DNA-Konzentration (siehe Tab. 7). Alle Überstandsfraktionen ergaben ein korrekt rein weibliches autosomales STR-Profil.

Um die Y-chromosomalen Untersuchungen der Maxwell DE Casework Methode mit der konventionellen DE zu vergleichen, werden Y-chromosomale STRs analysiert. Die Amplifikation von Y-chromosomalen STRs der konventionellen DE erfolgt von den Pelletfraktionen der 1:100, 1:200 und 1:400 Verdünnungen. Die Pelletfraktionen werden jeweils maximal mit 10µl in die PowerPlex Y23 System PCR eingesetzt.

Probe	Verdünnung	Kopien Nr.	autosomale STR	Y-chromosomale STR
1+AI	1:100	1	P	P
1+AI	1:100	2	P	P
1+AII	1:200	1	P/Ü	P
1+AII	1:200	2	P/Ü	P
1+AIII	1:400	1	P/Ü	P
1+AIII	1:400	2	P/Ü	P
1+AIV	1:800	1	P	/
1+AIV	1:800	2	P	/
1+BI	1:100	1	P	P
1+BI	1:100	2	P	P
1+BII	1:200	1	P/Ü	P
1+BII	1:200	2	P/Ü	P
1+BIII	1:400	1	P/Ü	P
1+BIII	1:400	2	P/Ü	P
1+BIV	1:800	1	P/Ü	/
1+BIV	1:800	2	P/Ü	/
QG	1:200	1	P/Ü	/
QG	1:200	2	P/Ü	/
QG	1:200	3	P/Ü	/
QG	1:800	1	P/Ü	/
QG	1:800	2	P/Ü	/
QG	1:800	3	P/Ü	/

**Tabelle 17: Übersicht STR Untersuchungen Konventionelle DE Methode**

## 11.4 EZ2 DNA Investigator Sep&Prep Kit

Die Amplifikation von autosomalen STRs der EZ2 DNA Investigator Sep & Prep Methode erfolgt von allen untersuchten 6 Pellet (P)- sowie Überstandsfraktionen (Ü) der 1:200 (2 Duplikate) und 1:400 (1 Duplikat von 1+AIII) Verdünnungen (siehe Tab. 18). Die Pelletfraktionen werden jeweils maximal mit 10µl in die PowerPlex ESX 17 System PCR eingesetzt, bei den Überstandsfraktionen ergibt sich die Zugabe der entsprechenden Menge der zu amplifizierenden DNA aus der bei der DNA-Quantifizierung ermittelten DNA-Konzentration (siehe Tab. 7). Alle Überstandsfraktionen ergaben ein korrekt rein weibliches autosomales STR-Profil. Es werden keine Y-chromosomalen STRs bei der EZ2 DNA Investigator Sep&Prep Methode untersucht.

Kombination	Verdünnung	Kopien Nr.	autosomale STR	Y-chromosomale STR
1+AII	1:200	3	P/Ü	/
1+AII	1:200	4	P/Ü	/
1+AIII	1:400	3	P/Ü	/
1+AIII	1:400	4	P/Ü	/
1+BII	1:200	3	P/Ü	/
1+BII	1:200	4	P/Ü	/
QG	1:200	4	P/Ü	/
QG	1:200	5	P/Ü	/
QG	1:200	6	P/Ü	/
QG	1:800	4	P/Ü	/
QG	1:800	5	P/Ü	/
QG	1:800	6	P/Ü	/

**Tabelle 18: Übersicht STR Untersuchungen EZ2 DNA Investigator Sep&Prep Methode**

## 11.5 Maxwell DE Casework Kit

Die Amplifikation von autosomalen STRs der Maxwell DE Casework Methode erfolgt von allen 16 Pellet (P)- sowie Überstandsfraktionen (Ü) (jeweils 8 Duplikate, siehe Tab. 19). Aufgrund der hohen DNA-Konzentrationen in beiden Fraktionen ergibt sich die Zugabe der entsprechenden Menge der zu amplifizierenden DNA aus der, bei der DNA-Quantifizierung ermittelten DNA-Konzentration (siehe Tab. 7). Alle Überstandsfraktionen ergaben ein korrekt rein weibliches autosomales STR-Profil. Aufgrund des überwiegend weiblichen Anteils in den Pelletfraktionen der STR-Profile werden Y-chromosomale STRs analysiert. Die Amplifikation von Y-chromosomalen STRs der Maxwell DE Casework Methode erfolgt von den Pelletfraktionen der 1:100, 1:200 und 1:400 Verdünnungen. Die Pelletfraktionen werden jeweils maximal mit 10µl in die PowerPlex Y23 System PCR eingesetzt.

Kombination	Verdünnung	Kopien Nr.	autosomale STR	Y-chromosomale STR
1+AI	1:100	5/7	P/Ü	P
1+AI	1:100	6/8	P/Ü	P
1+AII	1:200	5/7	P/Ü	P
1+AII	1:200	6/8	P/Ü	P
1+AIII	1:400	5/7	P/Ü	P
1+AIII	1:400	6/8	P/Ü	P
1+AIV	1:800	5/7	P/Ü	/
1+AIV	1:800	6/8	P/Ü	/
1+BI	1:100	5/7	P/Ü	P
1+BI	1:100	6/8	P/Ü	P
1+BII	1:200	5/7	P/Ü	P
1+BII	1:200	6/8	P/Ü	P
1+BIII	1:400	5/7	P/Ü	P
1+BIII	1:400	6/8	P/Ü	P
1+BIV	1:800	5/7	P/Ü	/
1+BIV	1:800	6/8	P/Ü	/

**Tabelle 19: Übersicht STR Untersuchungen Maxwell DE Casework Methode**

## 11.6 Erase Sperm Isolation Kit

Die Amplifikation von autosomalen STRs der Erase Sperm Isolation Methode erfolgt von allen 16 Pelletfraktionen (P) (8 Duplikate) und von 8 ausgewählten Überstandsfraktionen (Ü) der 1:200 (2 Duplikate) und 1:400 (2 Duplikate) Verdünnungen (siehe Tab. 20). Die Pelletfraktionen werden jeweils maximal mit 10µl in die PowerPlex ESX 17 System PCR eingesetzt, bei den Überstandsfraktionen ergibt sich die Zugabe der entsprechenden Menge der zu amplifizierenden DNA aus der, bei der DNA-Quantifizierung ermittelten DNA-Konzentration (siehe Tab. 7). Alle Überstandsfraktionen ergaben ein korrekt rein weibliches autosomales STR-Profil. Es werden keine Y-chromosomalen STRs bei der Erase Sperm Isolation Methode untersucht.

Kombination	Verdünnung	Kopien Nr.	autosomale STR	Y-chromosomale STR
1+AI	1:100	7	P	/
1+AI	1:100	8	P	/
1+AII	1:200	7	P/Ü	/
1+AII	1:200	8	P/Ü	/
1+AIII	1:400	7	P/Ü	/
1+AIII	1:400	8	P/Ü	/
1+AIV	1:800	7	P	/
1+AIV	1:800	8	P	/
1+BI	1:100	7	P	/
1+BI	1:100	8	P	/
1+BII	1:200	7	P/Ü	/
1+BII	1:200	8	P/Ü	/
1+BIII	1:400	7	P/Ü	/
1+BIII	1:400	8	P/Ü	/
1+BIV	1:800	7	P	/
1+BIV	1:800	8	P	/

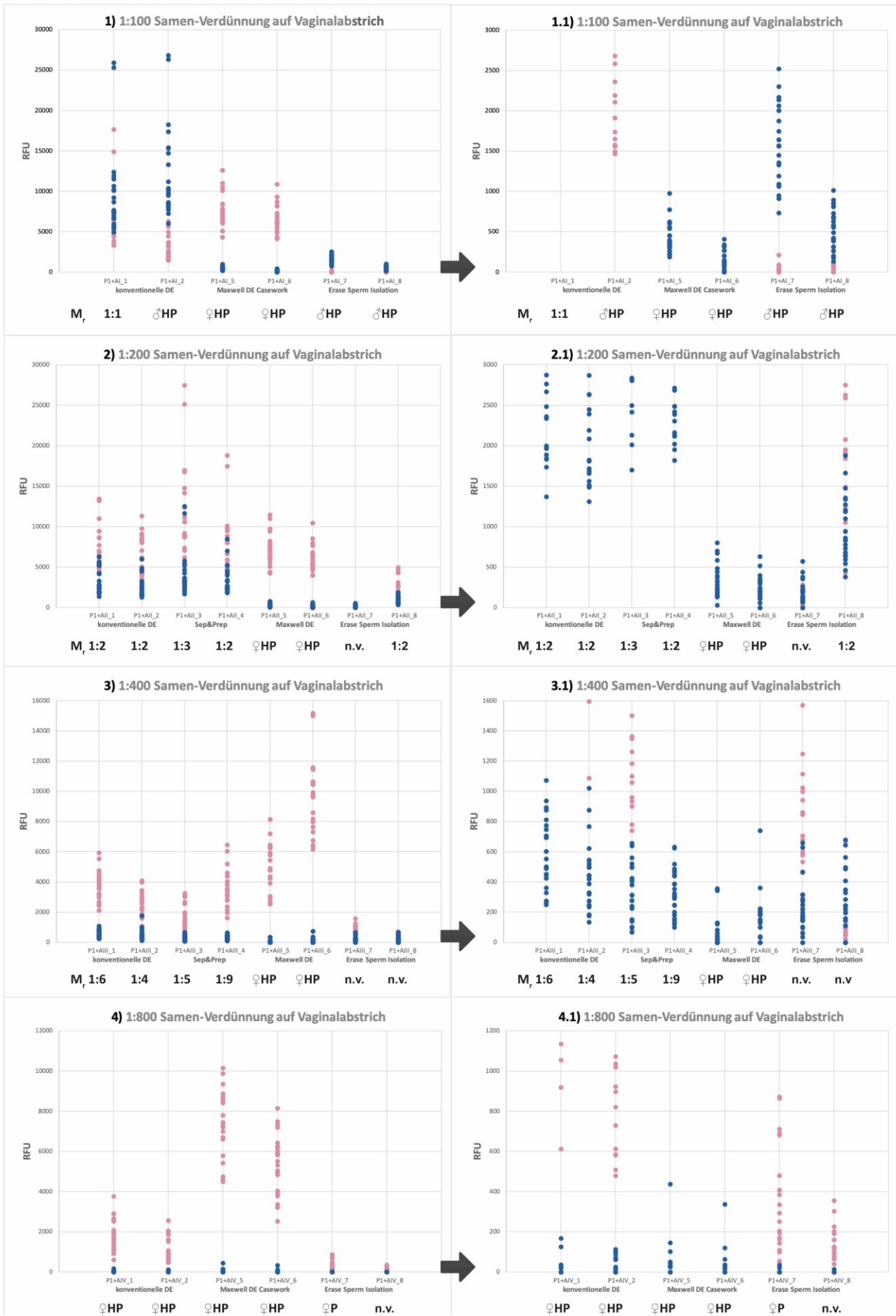
**Tabelle 20: Übersicht STR Untersuchungen Erase Sperm Isolation Methode**

## 11.7 STR Ergebnisse

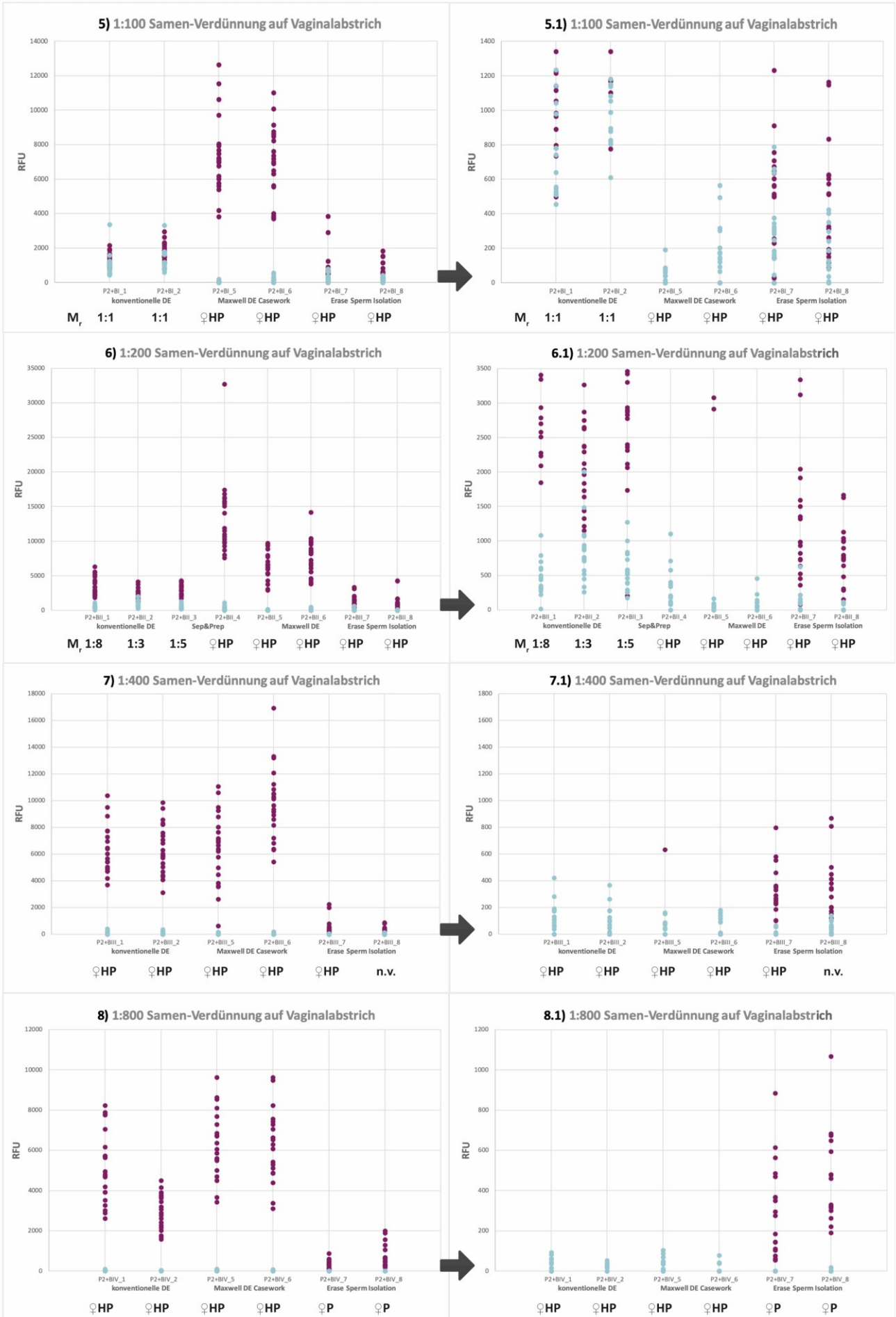
Die STR-Profile aller Pelletfraktionen (P) sind in den folgenden Diagrammen dargestellt (siehe Abb. 10). Alle analysierten Überstandsfraktionen (Ü) ergaben ein korrekt rein weibliches autosomales STR-Profil, weshalb keine Diagramme generiert wurden. Die Mischungs-Ratio  $M_r$  ( $\text{♂}:\text{♀}$ ) wurde in Mischspuren berechnet, die eine höhere weibliche Hauptkomponente und eine vergleichsweise niedrigere männliche Minorkomponente aufweisen. Die  $M_r$  wurde mit der  $M_x$  (Mischungs-Proportion) des Amelogenin-Systems überprüft. Es wurde keine  $M_r$  in Proben berechnet, die ein eindeutig männliches Hauptprofil ( $\text{♂HP}$ ), ein weibliches Hauptprofil ( $\text{♀HP}$ ) mit niedrigen männlichen Signalen oder ein weibliches Profil ( $\text{♀P}$ ) ohne Hinweis auf einen männlichen Anteil aufweisen, sowie in Proben welche nicht verwertbar (n.v.) sind. Proben sind nicht verwertbar, wenn sie beispielsweise zu niedrig und wegen des Mischungsverhältnisses, sowie allelischen Drop-In's bzw. Drop-Out's nicht interpretierbar sind.

Anzumerken ist, dass mit Ausnahme des Maxwell DE Casework Kits alle Pelletfraktionen der unterschiedlichen Methoden für die Vergleichbarkeit mit 10µl in die PCR eingesetzt wurden. Aufgrund der hohen DNA-Konzentrationen ergibt sich beim Maxwell DE Casework Kit die Zugabe der entsprechenden Menge der zu amplifizierenden DNA aus der bei der DNA-Quantifizierung ermittelten DNA-Konzentration (siehe Tab. 7).

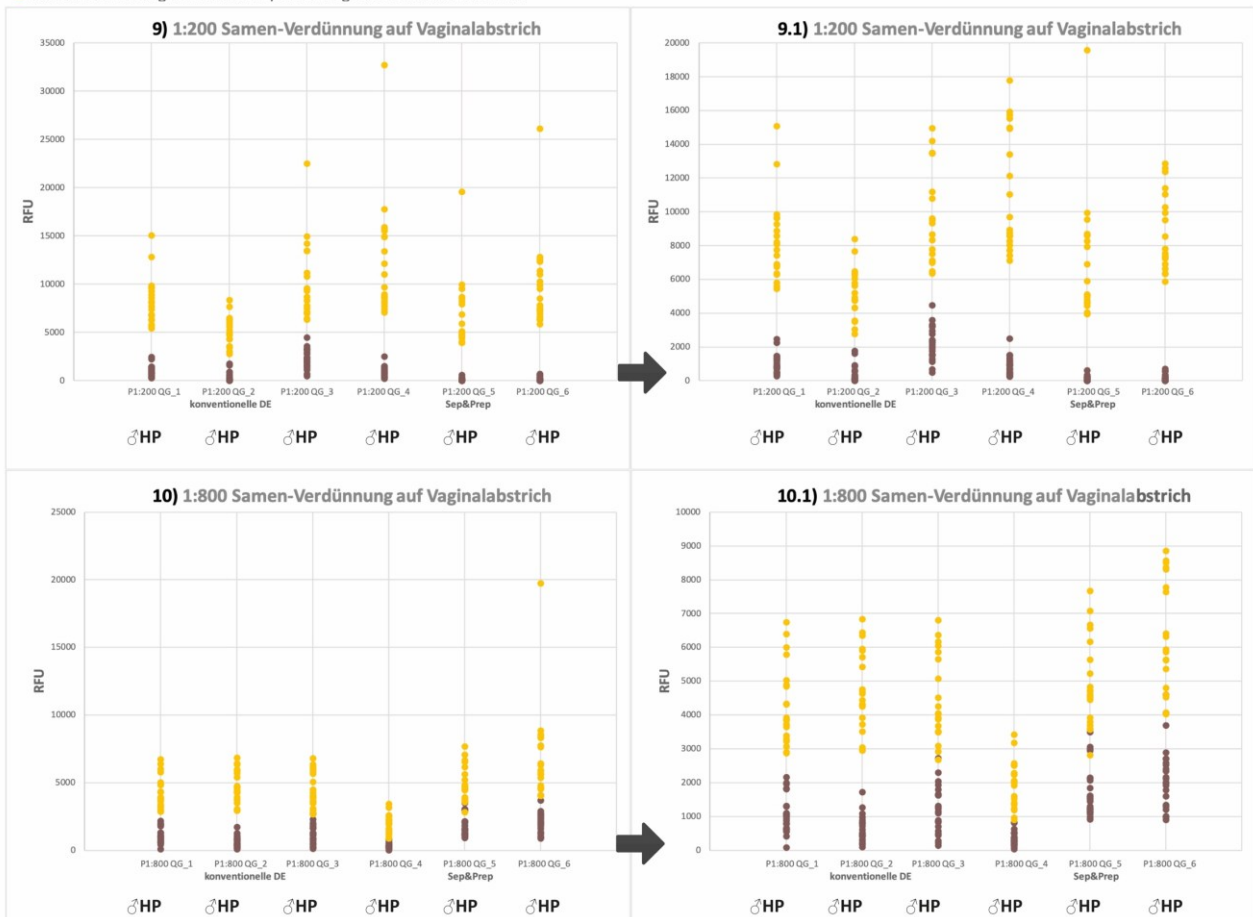
- Allele die eindeutig der Abstrich-Spenderin zugeordnet werden können
- Allele die eindeutig dem Samen-Spender zugeordnet werden können



- Allele die eindeutig der Abstrich-Spenderin zugeordnet werden können
- Allele die eindeutig dem Samen-Spender zugeordnet werden können



- Allele die eindeutig der Abstrich-Spenderin zugeordnet werden können
- Allele die eindeutig dem Samen-Spender zugeordnet werden können



**Abbildung 10: Diagramme 1-10 der STR-Ergebnisse der Pelletfraktionen (P).** Die  $M_r$  (♂:♀) wurde in Mischspuren berechnet, die eine höhere weibliche Hauptkomponente und eine vergleichsweise niedrigere männliche Minorkomponente aufweisen. Es wurde keine  $M_r$  in Proben berechnet, die ein eindeutig männliches Hauptprofil (♂HP), ein weibliches Hauptprofil (♀HP) mit niedrigen männlichen Signalen oder ein weibliches Profil (♀P) ohne Hinweis auf einen männlichen Anteil aufweisen, sowie in Proben welche nicht verwertbar sind (n.v.). Proben sind nicht verwertbar, wenn sie beispielsweise zu niedrig und wegen des Mischungsverhältnisses, sowie allelischen Drop-In's bzw. Drop-Out's nicht interpretierbar sind. Anzumerken ist, dass mit Ausnahme des Maxwell DE Casework Kits alle Pelletfraktionen (P) der unterschiedlichen Methoden für die Vergleichbarkeit mit 10µl in die PCR eingesetzt wurden. Aufgrund der hohen DNA-Konzentrationen ergibt sich beim Maxwell DE Casework Kit die Zugabe der entsprechenden Menge der zu amplifizierenden DNA aus der bei der DNA-Quantifizierung ermittelten DNA-Konzentration (siehe Tab. 7). links = Originaldiagramm, rechts = veränderte Y-Achsenkalierung.

## 12. Diskussion

Das Probandenpaar 2+B ergab besonders herausfordernde Proben mit einer deutlich niedrigeren Spermien-DNA Konzentration als Proben des Probandenpaares 1+A mit der gleichen Samen-Verdünnung (siehe Tab. 16). Die Proben der Firma Qiagen (Verdünnung 1:200/1:800) enthalten gegenüber den eigenen Proben in den Pelletfraktionen einen deutlich höheren männlichen Anteil. Da jedes Ejakulat unterschiedliche Mengen an Spermien enthält, sind Ergebnisse aus verschiedenen Publikationen nur eingeschränkt miteinander vergleichbar. Die Proben für den Maxwell DE Casework und den Erase Sperm Isolation Kit wurden einige Monate später aus den bei -20°C gelagerten Samen-Verdünnungen hergestellt. Die Quantifizierungsuntersuchungen der reinen Spermaproben dieser Charge ergaben zwar einen etwas niedrigeren Wert, die nachfolgend durchgeführten Y-STR Untersuchungen jedoch eine vergleichbare mittlere RFU-Höhe (siehe Tab. 16). Somit werden die Proben trotz des einmaligen Einfrierens der Samen-Verdünnungen als vergleichbar eingestuft. Die rt-qPCR-Ergebnisse der reinen Samen-Verdünnungen ergeben bei den Verdünnungen AIV, BIV sowie teilweise BIII einen Quantitätswert unterhalb des in unserem Labor etablierten Cut-Off Wertes von 0,002ng/µl (siehe Tab. 16). Eine Typisierung von STR-Systemen bei Proben unterhalb dieses Wertes führen aus Erfahrung zu keinen (verwertbaren) Resultaten. Für die Extraktion der reinen Samen-Verdünnungen wurde die gleiche automatisierte Extraktionsmethode wie in der konventionellen DE angewandt (EZ2 DNA Investigator Large Volume RT Protokoll). Berücksichtigt man den zusätzlichen Verlust von Spermien bei einer DE im Prozess der vorangegangenen differentiellen Zelltrennung ist es nicht überraschend, dass die DE bei Proben mit hohen Samen-Verdünnungen keine verwertbaren Ergebnisse erbracht hat. Jene Proben mit zu niedriger männlicher DNA-Ausgangs-Konzentration führten auch mit den anderen Extraktionsprotokollen wie dem EZ2 Sep & Prep Protokoll, dem Maxwell DE System und dem für die Pelletfraktionen des Erase-Kits verwendeten EZ2 DNA Trace Protokoll zu keiner verwertbaren männlichen DNA-Ausbeute.

Der DNA Investigator Sep & Prep Kit gibt reproduzierbare und meist vergleichbare Ergebnisse im Vergleich zur konventionellen DE (siehe Abb. 10,

2/2.1, 3/3.1, 6/6.1, 9 und 10). In einer mittels Sep & Prep Kit extrahierten Pelletfraktion (P2+BII\_4) konnte jedoch nur mehr ein weibliches Hauptprofil analysiert werden, während die zweite Pelletfraktion (P2+BII\_3) der Doppelbestimmung eine  $M_r$  von 1:5 zu den Proben der konventionellen DE mit einer  $M_r$  von 1:8 und 1:3 ergaben (siehe Abb. 10 6/6.1). In einem kritischen Vergleich zeigt sich eine niedrigere Sensitivität bei Proben mit hohen Samenflüssigkeits-Verdünnungen bzw. extrem niedrigen Spermienkonzentrationen, die mit dem Sep & Prep Kit extrahiert wurden im Vergleich zur konventionellen DE. In den P1+All Proben wurde mit dem Sep & Prep Kit eine  $M_r$  von 1:3 und 1:2 und mit der konventionellen DE jeweils eine  $M_r$  von 1:2 ermittelt (siehe Abb. 10 2/2.1). Die P1+AIII Proben ergaben mit dem Sep & Prep Kit eine  $M_r$  von 1:5 und 1:9 und mit der konventionellen DE eine  $M_r$  von 1:6 und 1:4. Die mit Sep & Prep extrahierten Proben (P1+AIII\_3 und P1+AIII\_4) zeigen hier auch eine niedrigere durchschnittliche RFU Höhe bei Allelen, die eindeutig dem Samen-Donor zugeordnet werden können (siehe Abb. 10 3/3.1). Alle Pelletfraktionen aus den Proben der Firma Qiagen, sowohl die 1:200 und die 1:800 Verdünnungen ergaben jeweils mit der konventionellen DE sowie mit dem Sep & Prep Kit erfolgreich ein männliches Hauptprofil (siehe Abb. 10 9-10).

Der Maxwell DE Casework Kit ergab in allen Pelletfraktion in der rt-qPCR zwar einen vergleichsweise hohen DNA-Quantitätswert, in den STR-Profilen konnte dann aber durch den signifikant höheren weiblichen Opfer-DNA-Anteil nur mehr ein weibliches Hauptprofil nachgewiesen werden (siehe Tab. 14 und Abb. 10). Dies weist auf eine hohe Verschleppung von Opfer-DNA in die Pelletfraktion und somit ein schlechtes Trennpotential hin. Die gemittelten RFU-Werte der Y-STRs der mit dem Maxwell DE extrahierten Pelletfraktionen sind mit jenen der konventionellen DE im Allgemeinen vergleichbar (siehe Tab. 14). Dies deutet darauf hin, dass zwar ein unterrepräsentierter Spermien-DNA-Anteil vorhanden ist, dieser aber durch den überrepräsentierten Opfer-DNA-Anteil in der STR-Analyse jedoch im Elektropherogramm nicht darstellbar ist. Im Maxwell DE Casework Kit Protokoll gibt es in der Probenvorbereitung vor der automatisierten Maxwell Extraktion keinen Pellet-Waschschritt (siehe Abb. 8). Im Unterschied zum EZ2 DNA Investigator System, wo ein Pipettieren verschiedener Lösungen und somit ein Waschen des Spermienpellets möglich ist, wird in der automatisierten Extraktionstechnik beim DNA IQ System die DNA

mit einem Magneten „nur“ festgehalten und in mehrere Reaktionsgefäße überführt. Wahrscheinlich könnte man durch einen zusätzlichen Waschschrift der Pelletfraktion vor der automatisierten DNA Extraktion im Maxwell DE Casework Kit eine bessere Entmischung erzielen.

In den mit dem Erase Sperm Isolation Kit extrahierten Pelletfraktionen (P1AI\_7/8) der 1:100 Verdünnung konnte erfolgreich ein männliches Hauptprofil typisiert werden (siehe Abb. 10 1/1.1). In den vergleichenden Pelletfraktionen der konventionellen DE konnte ein männliches Hauptprofil und eine 1:1 Mischung typisiert werden. Dies deutet zwar auf eine besser getrennte Pelletfraktion überwiegend frei von Opfer-DNA der Erase Proben hin, im Vergleich der RFU-Höhen zur konventionellen DE weisen diese jedoch eine deutlich niedrigere DNA-Ausbeute auf. Klein et al. konnten ebenfalls zeigen, dass der Erase Sperm Isolation Kit Spermienfraktionen mit einem höheren Verhältnis von „männlicher“ zu „weiblicher“ DNA (zugunsten der „männlichen“ DNA) erzeugte, dass diese aber gleichzeitig eine 6-fach niedrigere Konzentration der gesamten männlichen DNA enthalten (33). Abstriche, welche in der Studie mit dem Erase Sperm Isolation Kit bearbeitet wurden, wiesen eine geringere Spermien-DNA-Rückgewinnung auf, die weibliche DNA-Verschleppung in die Spermienfraktion war allerdings deutlich geringer als in der Studie verwendeten konventionellen DE (33). In den höheren Verdünnungen in allen weiteren von uns analysierten Proben ergab der Erase Sperm Isolation Kit im Vergleich zur konventionellen DE einen deutlich höheren Spermien-DNA-Verlust. Während in den P1+AI-Proben der 1:200 Verdünnung der konventionellen DE und des Sep & Prep Kits die in der Mischung unterrepräsentierte Spermien-DNA noch als männliche Komponente identifizierbar war, war dies bei den Erase Proben nur in einer Probe (P1+AI\_8) der Doppelbestimmung möglich (siehe Abb. 10 2/2.1). In den höheren Verdünnungen aller weiteren von uns mit Erase extrahierten Pelletfraktionen waren nur weibliche (Haupt)-Profile oder aufgrund von allelischen Drop-In's/Drop-Out's und inkonsequenten Mischungsverhältnissen nicht verwertbare Profile nachweisbar (siehe Abb. 10 3-8). Vermutlich führt die Nuklease-Aktivität im Erase Sperm Isolation Kit bei bereits geschädigten oder vielleicht auch durch Trocknung vorlysierten Spermien zu einem unbeabsichtigten Abbau der Spermien-DNA.

Alle analysierten Überstandsfraktionen ergaben korrekt ein rein weibliches autosomales STR-Profil. Auffällig ist eine deutlich höhere DNA-Ausbeute in den Überstandsfraktionen der mit dem Maxwell-DE-System extrahierten Proben. Im Gegensatz dazu zeigt sich eine deutlich geringere DNA-Ausbeute in den Überstandsfraktionen beim Erase Sperm Isolation Kit (siehe Tab. 15). Diese Ergebnisse decken sich mit denen einer Studie von Klein et al., die ebenfalls eine geringere DNA-Ausbeute in der Quantifizierung der Nicht-Spermienfraktionen im Vergleich zur Standardmethode analysierten, was laut Firma PTC auf den im Erase Sperm Isolation Kit verwendeten firmeneigenen Extraktionspuffer zurückzuführen ist (persönliche Mitteilung) (33).

Bei Proben aus Sexualdelikten mit sehr ungünstigem Mischungsverhältnis von „männlicher“ DNA zu „weiblicher“ DNA oder Proben ohne Spermien, z.B. bei Ausbleiben einer Ejakulation, bei Vorliegen einer Azoospermie oder Vasektomie, sind Y-STR Untersuchungen die einzige Möglichkeit, DNA-Merkmale des männlichen Anteils der Täterschaft zu typisieren. Die deutlich geringere DNA-Ausbeute in den Proben des Erase Sperm Isolation Kits kann sich in solchen Fällen ungünstig auf das Erzielen eines verwertbaren Ergebnisses auswirken.

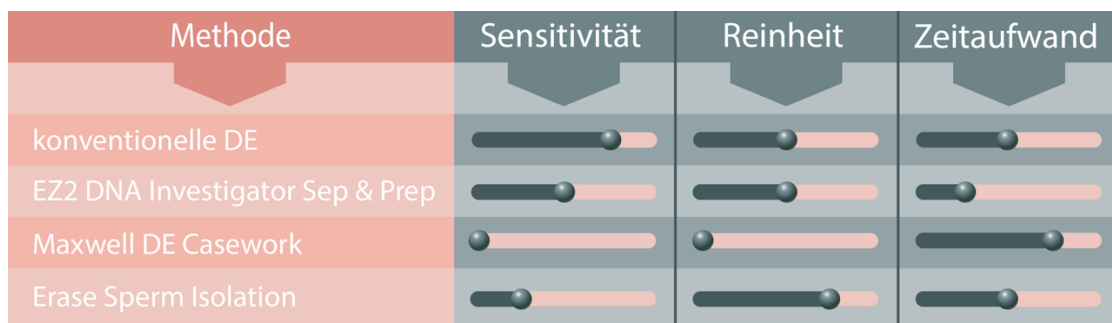
Was den Gesamtzeitaufwand und die Laborarbeit betrifft, sind die semiautomatisierten Kits (EZ2 DNA Investiagtor Sep & Prep Kit & Maxwell DE Casework Kit) bei einer großen Anzahl von Proben zeiteffizienter als die manuellen DE-Protokolle (konventionelle DE und Erase Sperm Isolation Kit). Manuelle Waschschrte sind zeitaufwändig und laufen beim Sep & Prep Kit automatisiert in einem Gerät für 24 Proben parallel ab. Bei einer geringen Anzahl von Proben sind die manuellen DE-Protokolle jedoch zeiteffizienter durchführbar als die Anwendung der semi-automatisierten Kits. So lassen sich manuelle DE-Protokolle besser in unseren aktuellen Laborarbeitsablauf und die Downstream-Analysen am hiesigen Institut integrieren und es sind keine zusätzlich aufwändigen Gerätevorbereitung erforderlich, da die DE-Proben in unserem Arbeitsablauf parallel zu den Routineproben mitextrahiert werden. Der Sep & Prep Kit reduziert zwar die Anzahl der manuellen Schritte bei einer DE, ist jedoch für die physikalische Trennung der Spermien weiterhin auf einen manuell durchzuführenden Zentrifugationsschritt angewiesen. Der Maxwell DE Kit ist in der manuellen Proben- und Gerätevorbereitung die aufwändigste der

vier DE-Methoden. Aufgrund der komplexen Schritte, die bei der Probenverarbeitung (z.B. Flüssigkeitstransfer, Zentrifugation) notwendig sind, konnte in den semi-automatisierten Kits nur ein Teil des DE-Prozesses automatisiert werden. Eine vollständige Automatisierung wäre zwar wünschenswert, ist in der vorliegenden technischen Umsetzung derzeit nur schwer vorstellbar.

In dieser Arbeit wurden Proben jeweils in einer Doppelbestimmung untersucht. Eine größere Fallzahl gleicher Proben wäre für die Beurteilung der Zuverlässigkeit wünschenswert, ist allerdings bei mehreren untersuchten Methoden durch den zusätzlichen Zeitaufwand und die anfallenden Kosten limitiert. Als simulierte forensische Proben für diese Masterarbeit wurden Abstrichproben (Vaginalabstriche mit Sperma) ausgewählt, da diese die aussagekräftigsten Spurenträger bei Sexualdelikten darstellen. Im Rahmen der Bearbeitung eines Sexualdeliktes können aber auch weitere Spurenträger, wie beispielsweise Abriebe oder Ausschnitte aus Originalspurenträgern (Kleidungsstücke, Bettwäsche, Kondome etc.) mit unterschiedlichsten Oberflächeneigenschaften, als Probenmaterial für die DNA-Analyse herangezogen werden. In unserer Laborpraxis, bei Anwendung der konventionellen DE, beobachten wir sporadisch unterschiedliche Größen und Eigenschaften der Pelletfraktionen. Bei Kondomabrieben kann beispielsweise eine zusätzliche Phase an der Flüssigkeitsgrenze auftreten. Zur Evaluation der hier getesteten semi-automatisierten Ansätze für eine differentielle Lyse sind weitere Untersuchungen bezüglich möglicher Limitationen bei den verschiedenen Arten von Spurenträgern, die bei Sexualdelikten anfallen, empfehlenswert.

Die Forschungsfrage wird abschließend damit beantwortet, dass trotz des hohen Durchsatzes semi-automatisierter Systeme wie dem EZ2 Sep & Prep Kit die konventionelle DE-Methode bei extrem niedrigen Spermienkonzentrationen aufgrund geringerer DNA-Verluste für unser Labor weiterhin den Goldstandard darstellt. Obwohl die Automatisierung (z.B. EZ2 Sep & Prep) eine Alternative für hohe Probenaufkommen in der Forensik sein kann, bleibt die konventionelle manuelle DE aufgrund ihrer überlegenen Sensitivität bei geringen Spermienkonzentrationen der unverzichtbare Standard (siehe Tab. 21). Andere Ansätze, wie der Erase Sperm Isolation Kit, weisen zwar eine gute

Trennleistung auf, führen aber gleichzeitig zu signifikanten DNA-Verlusten, die den Erfolg der Individualisierung bei Spuren mit niedriger Täterschafts-DNA gefährden. Der Maxwell DE Casework Kit ist durch das schlechte Trennpotential in seiner jetzigen Form nicht empfehlenswert. Die konventionelle DE funktioniert in den meisten Fällen und ist für die meisten Proben effektiv. Die vorliegende Arbeit verdeutlicht allerdings auch, dass wenn die Spermienanzahl zu gering ist, die konventionelle DE aufgrund von Verlusten bei den Zellseparationsschritten oder im DNA-Extraktionsprozess zu keinen verwertbaren Resultaten führen kann. Weitere Forschungsarbeiten und technologische Weiterentwicklungen moderner Zellseparations-Ansätze werden zeigen, ob zukünftig eine Implementierung in forensischen Routinelaboren möglich sein wird, was insbesondere für Proben, bei denen die konventionelle DE an ihre Grenzen stößt, hilfreich sein könnte.



**Tabelle 21: Vergleich der DE-Methoden hinsichtlich Sensitivität, Reinheit und Zeitaufwand.**

Die Skalierung reicht von gering (links) bis hoch (rechts). Die Sensitivität bemisst die Nachweisbarkeit der männlichen Minorkomponente in den STR-Profilen der aus DNA-Mischproben (mit hohem Opfer-Anteil) gewonnenen Pelletfraktionen. Die Reinheit beschreibt die Trennungseffizienz (Verschiebung des Verhältnisses von Opfer- zu Spermien-DNA), während der Zeitaufwand die Dauer des gesamten Arbeitsablaufs abbildet.

## 13. Literaturverzeichnis

1. Statistik Austria. 2\_SAEMTLICHE\_DELIKTE\_2024.ods [Internet]. [zitiert 9. November 2025]. Verfügbar unter: <https://www.statistik.at>
2. Olaf Kapella, Andreas Baierl, Christiane Rille-Pfeiffer, Christine Geserick, Eva-Maria Schmidt. Gewalt in der Familie und im nahen sozialen Umfeld: Österreichische Prävalenzstudie zur Gewalt an Frauen und Männern. 2011.
3. Statistik Austria. Geschlechtsspezifische Gewalt gegen Frauen in Österreich. 2022.
4. World Health Organization (WHO). Rape Statistics by Country 2025 [Internet]. [zitiert 9. November 2025]. Verfügbar unter: <https://worldpopulationreview.com/country-rankings/rape-statistics-by-country>
5. Gill P, Jeffreys AJ, Werrett DJ. Forensic application of DNA 'fingerprints'. *Nature*. Dezember 1985;318(6046):577–9.
6. Cupples Cannon C, Herausgeber. *Forensic DNA Analysis: Methods and Protocols* [Internet]. New York, NY: Springer US; 2023 [zitiert 6. Juli 2024]. (Methods in Molecular Biology; Bd. 2685). Verfügbar unter: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-0716-3295-6>
7. Herrmann B, Saternus KS. *Biologische Spurenkunde: Band 1 Kriminalbiologie*. Springer Berlin Heidelberg; 2007
8. Vuichard S, Borer U, Bottinelli M, Cossu C, Malik N, Meier V, u. a. Differential DNA extraction of challenging simulated sexual-assault samples: a Swiss collaborative study. *Investig Genet*. Dezember 2011;2(1):11.
9. Butler M. *Fundamentals of Forensic DNA Typing*. Elsevier; 2010
10. Fonnelløp AE, Johannessen H, Heen G, Molland K, Gill P. A retrospective study on the transfer, persistence and recovery of sperm and epithelial cells in samples collected in sexual assault casework. *Forensic Sci Int Genet*. November 2019;43:102153.
11. Cotton RW, Fisher MB. Review: Properties of sperm and seminal fluid, informed by research on reproduction and contraception. *Forensic Sci Int Genet*. September 2015;18:66–77.
12. Aitken RJ, Baker MA. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int J Dev Biol*. 2013;57(2-3-4):265–72.
13. Sween KR, Quarino LA, Kishbaugh JM. Detection of Male DNA in the Vaginal Cavity After Digital Penetration Using Y-Chromosome Short Tandem Repeats. *J Forensic Nurs*. Jänner 2015;11(1):33–40.
14. Schneider H, Sommerer T, Rand S, Wiegand P. Hot flakes in cold cases. *Int J Legal Med*. Juli 2011;125(4):543–8.
15. Axler-DiPerte G, Orans S, Singh A, Caragine T, Prinz M, Budimlja ZM. Comparison and optimization of DNA recovery from sperm vs. epithelial cells using laser capture microdissection technology and an immunofluorescent staining system. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. Dezember 2011;3(1):e224–5.
16. Alsalafi D, Goodwin W. Capturing spermatozoa for STR analysis of sexual assault cases using anti-sperm antibodies. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser*. Dezember 2019;7(1):707–10.
17. Zhao XC, Wang L, Sun J, Jiang BW, Zhang EL, Ye J. Isolating Sperm from Cell Mixtures Using Magnetic Beads Coupled with an Anti-PH-20 Antibody

- for Forensic DNA Analysis. Rittschof D, Herausgeber. PLOS ONE. 21. Juli 2016;11(7):e0159401.
18. Grosjean F, Favre M, Castella V. Comparison between MACSprep™ forensic sperm microbead kit and Erase Sperm Isolation kit for the enrichment of sperm fractions recovered from sexual assault samples. *Int J Legal Med.* Jänner 2023;137(1):267–78.
  19. Williamson VR, Laris TM, Romano R, Marciano MA. Enhanced DNA mixture deconvolution of sexual offense samples using the DEPArray™ system. *Forensic Sci Int Genet.* Mai 2018;34:265–76.
  20. Fokias K, Bekaert B. Separation of sperm and epithelial cells based on fluorescence-activated cell sorting. *Forensic Sci Int Genet Suppl Ser.* Dezember 2022;8:239–41.
  21. Dash HR. Advancements in differentiation between sperm cells and epithelial cells for efficient forensic DNA analysis in sexual assault cases. *Int J Legal Med.* November 2024;138(6):2209–27.
  22. Clark C, Turiello R, Cotton R, Landers JP. Analytical approaches to differential extraction for sexual assault evidence. *Anal Chim Acta.* Jänner 2021;1141:230–45.
  23. Calvin HI, Bedford JM. Formation of disulphide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.* Mai 1971;13:Suppl 13:65-75.
  24. Hennekens CM, Cooper ES, Cotton RW, Grgicak CM. The Effects of Differential Extraction Conditions on the Premature Lysis of Spermatozoa . *J Forensic Sci.* Mai 2013;58(3):744–52.
  25. Lounsbury JA, Nambiar SM, Karlsson A, Cunniffe H, Norris JV, Ferrance JP, u. a. Enhanced recovery of spermatozoa and comprehensive lysis of epithelial cells from sexual assault samples having a low cell counts or aged up to one year. *Forensic Sci Int Genet.* Jänner 2014;8(1):84–9.
  26. Champroux A, Torres-Carreira J, Gharagozloo P, Drevet JR, Kocer A. Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic Clin Androl.* Dezember 2016;26(1):17.
  27. Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 2007;8(9):227.
  28. Sartori Blanc N, Senn A, Leforestier A, Livolant F, Dubochet J. DNA in Human and Stallion Spermatozoa Forms Local Hexagonal Packing with Twist and Many Defects. *J Struct Biol.* April 2001;134(1):76–81.
  29. Roszkowski M, Mansuy IM. High Efficiency RNA Extraction From Sperm Cells Using Guanidinium Thiocyanate Supplemented With Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine. *Front Cell Dev Biol.* 21. April 2021;9:648274.
  30. Yoshida K, Sekiguchi K, Mizuno N, Kasai K, Sakai I, Sato H, u. a. The modified method of two-step differential extraction of sperm and vaginal epithelial cell DNA from vaginal fluid mixed with semen. *Forensic Sci Int.* März 1995;72(1):25–33.
  31. Norris JV, Manning K, Linke SJ, Ferrance JP, Landers JP. Expedited, Chemically Enhanced Sperm Cell Recovery from Cotton Swabs for Rape Kit Analysis\*. *J Forensic Sci.* Juli 2007;52(4):800–5.
  32. Wiegand P, Schürenkamp M, Schütte U. DNA extraction from mixtures of body fluid using mild preferential lysis. *Int J Legal Med.* November 1992;104(6):359–60.
  33. Klein SB, Buoncristiani MR. Evaluating the efficacy of DNA differential

- extraction methods for sexual assault evidence. *Forensic Sci Int Genet.* Juli 2017;29:109–17.
34. EZ2 DNA Investigator Sep&Prep Kit Handbook.
  35. Frégeau CJ, De Moors A. Competition for DNA binding sites using Promega DNA IQ™ paramagnetic beads. *Forensic Sci Int Genet.* September 2012;6(5):511–22.
  36. Duchamp V, Haley J, Liberty A, Krsicka O, Golob N, Dierig L. Comparison of two DNA extraction platforms for use in forensic casework applications: EZ2® Connect Fx versus Maxwell® FSC Instrument.
  37. Davis CP, King JL, Budowle B, Eisenberg AJ, Turnbough MA. Extraction platform evaluations: A comparison of Automate Express™, EZ1® Advanced XL, and Maxwell® 16 Bench-top DNA extraction systems. *Leg Med.* Jänner 2012;14(1):36–9.
  38. Garvin AM, Bottinelli M, Gola M, Conti A, Soldati G. DNA Preparation from Sexual Assault Cases by Selective Degradation of Contaminating DNA from the Victim. *J Forensic Sci.* November 2009;54(6):1297–303.
  39. Garvin AM, Fischer A, Schnee-Griese J, Jelinski A, Bottinelli M, Soldati G, u. a. Isolating DNA from sexual assault cases: a comparison of standard methods with a nuclease-based approach. *Investig Genet.* 2012;3(1):25.
  40. Campbell R, Pierce SJ, Sharma DB, Shaw J, Feeney H, Nye J, u. a. Comparing Standard and Selective Degradation DNA Extraction Methods: Results from a Field Experiment with Sexual Assault Kits. *J Forensic Sci.* Jänner 2017;62(1):213–22.
  41. Wong H, Mihalovich J. Automation of the Differential Digestion Process of Sexual Assault Evidence,. *J Forensic Sci.* März 2019;64(2):539–50.
  42. Baranovskii AG, Buneva VN, Nevinsky GA. Human Deoxyribonucleases. *Biochem Mosc.* Juni 2004;69(6):587–601.
  43. Hartmann G. Nucleic Acid Immunity. In: *Advances in Immunology* [Internet]. Elsevier; 2017 [zitiert 29. November 2025]. S. 121–69. Verfügbar unter: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065277616300529>
  44. Wong HG, Mihalovich JS, Sensabaugh G. Automating the Differential Digestion Method in the Analysis of Sexual Assault Cases using Selective Degradation. 2012;
  45. Hall A, Ballantyne J. Novel Y-STR typing strategies reveal the genetic profile of the semen donor in extended interval post-coital cervicovaginal samples. *Forensic Sci Int.* September 2003;136(1–3):58–72.
  46. Gill P, Sparkes R, Pinchin R, Clayton T, Whitaker J, J. Buckleton. Interpreting simple STR mixtures using allele peak areas. *Forensic Sci Int.* Jänner 1998;91(1):41–53.
  47. Gill P, Sparkes B, Clayton TM, Whittaker J, Urquhart A, Buckleton JS. Interpretation of Mixtures Based on Peak Area - Identification of Genetic Anomalies, Stutters and Other Artefacts.