

1.1. Inhalt

1.1.	Inhalt	- 2 -
2.	Einleitung	- 4 -
3.	Material	- 5 -
3.1.	Verbrauchsmaterialien	- 5 -
3.2.	Geräte	- 5 -
4.	Methoden	- 7 -
4.1.	DNA Isolierung/Präparationstechniken	- 7 -
4.1.1.	Tissue DNA MiniKit („Blaue-Säulen-Methode“)	- 7 -
4.1.2.	Blood DNA MiniKit („Rote-Säule-Methode“)	- 7 -
4.2.	Differentielle Zentrifugation	- 8 -
4.3.	Zellentnahme	- 9 -
4.3.1.	Q-Tip-Methode	- 9 -
4.3.2.	NaCl-Methode	- 9 -
4.4.	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	- 9 -
4.4.1.	Theoretischer Hintergrund	- 9 -
4.4.2.	Praktische Durchführung	- 10 -
4.5.	Nested PCR („verschachtelte PCR“)	- 11 -
4.6.	Die Agarose-Gelelektrophorese	- 11 -
4.6.1.	Theoretischer Hintergrund	- 11 -
4.6.2.	Praktische Durchführung	- 11 -
4.7.	Erstellen einer Praktikumsvorschrift	- 12 -
5.	Ergebnisse und Diskussion der einzelnen Versuchen in chronologischer Reihenfolge	- 13 -
5.1.	PCR vom 07.10.2014 (vgl. Anhang F, S. 23)	- 13 -
5.2.	PCR vom 08.10.2014 (1) (vgl. Anhang F, S. 23)	- 14 -
5.3.	PCR vom 08.10.2014 (2) (vgl. Anhang F, S. 24)	- 14 -
5.4.	PCR vom 09.10.2014 (1) (vgl. Anhang F, S. 24)	- 15 -
5.5.	PCR vom 09.10.2014 (2) (vgl. Anhang F, S. 25)	- 15 -
5.6.	PCR vom 10.10.2014 (vgl. Anhang F, S. 25)	- 15 -
6.	Allgemeine Diskussion	- 16 -
7.	Persönliches Fazit	- 17 -
8.	Literaturverzeichnis	- 18 -
9.	Erklärung	- 18 -

Anhang

- A) Abkürzungsverzeichnis
- B) Glossar
- C) Primer: Schmelztemperatur und GC Gehalt
- D) Präparationsvorschrift Tissue DNA MiniKit („Blaue-Säule-Methode“)
- E) Präparationsvorschrift Blood DNA MiniKit („Rote-Säule-Methode“)
- F) Protokolle der Ergebnisse
 - PCR vom 07.10.2014
 - PCR vom 08.10.2014 (1)
 - PCR vom 08.10.2014 (2)
 - PCR vom 09.10.2014 (1)
 - PCR vom 09.10.2014 (2)
 - PCR vom 10.10.2014
- G) Praktikumsvorschrift Hennecke
- H) Präsentation zur Praktikumsvorbereitung

2. Einleitung

Im Rahmen kriminalistischer Ermittlungen ist es eine grundlegende Untersuchung, an Tatorten zurückgebliebene Spuren auf das Geschlecht des Täters hin zu untersuchen. Dazu wird ein Verfahren der DNA-Analyse verwendet, um von Körperflüssigkeiten, Haaren oder Hautschuppen auf den Täter oder die Täterin zu schließen. Das SRY-Gen (Sex Determining Region of the Y Chromosome) ist die Geschlecht bestimmende Region des Y-Chromosoms, welche beim Mann zur Hodenbildung führt. Der weibliche Karyotyp (46,xx) enthält kein Y-Chromosom und somit kein SRY-Gen. Demzufolge kann anhand des SRY-Gens das Geschlecht des Täters bestimmt werden. Die SRY-Gen-Diagnostik wird aber nicht zu kriminalistischen Zwecken genutzt, sondern auch für medizinische Zwecke verwendet, wie z.B. der Erkennung von genetisch bedingten Erkrankungen der Geschlechtsdifferenzierung und -entwicklung (vgl. <http://www.labor-leipzig.de/SRY-Gen-Diagnostik.152.0.html>).

Mit der Thematik der SRY-Gen-Diagnostik beschäftigten sich 2010 zwei Schüler in der Facharbeit „Entwicklung eines Kussdetektors mit Hilfe der PCR“ (Schulte, K., Mierswa, D. (2010)), in der sie einen Kussdetektor vorstellen, mit dessen Hilfe ein vorhergegangener Kuss nachgewiesen werden kann. Dieser Nachweis erfolgte durch das Auffinden männlicher DNA im weiblichen Speichel. Um dieses Experiment durchzuführen benötigt man eine Sequenz der DNA, die den Mann von der Frau unterscheidet. Die beiden Schüler wählten hier das oben beschriebene SRY-Gen. In ihrer Facharbeit konzentrierten sich die Schüler hauptsächlich auf Zeit und Intensität eines Kusses bzw. darauf, welche Rolle diese Faktoren für die DNA-Analyse spielen. Auf diese Faktoren werde ich in meiner Facharbeit nicht eingehen, da das Ziel meiner Facharbeit schwerpunktmäßig auf der Überprüfung der Versuchsergebnisse bezüglich der Geschlechtsdifferenzierung liegt und ich mich hauptsächlich mit der Fragestellung „Kann man männliche DNA anhand des SRY-Gens identifizieren?“ beschäftigen werde. Die Motivation hierzu liegt zum einen darin begründet, praktische Molekularbiologie betreiben zu können, zum anderen in der Möglichkeit, der kritischen Überprüfung der Ergebnisse von Schulte und Mierswa „Wir sind in der Lage das SRY-Gen des Mannes [...] nachzuweisen“ (Schulte, K., Mierswa, D. (2010)) und nicht zuletzt in der Möglichkeit die Ergebnisse meiner Forschungsarbeit in der Erstellung einer in der Schiller-Schule anwendbaren praktischen Versuchsvorschrift münden zu lassen, mit der SuS der Jahrgangsstufe 9 ebenfalls Erfahrungen in praktischer Molekularbiologie sammeln können.

3. Material

3.1. Verbrauchsmaterialien

- Agarose Standard Roti®garose von Roth
- Agarose TAE Puffer Rotiphorese ® 50xTAE Puffer von Roth
- EP
- Eppis (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)
- FS1 Puffer, eigene Herstellung
- FS2 Puffer, eigene Herstellung
- FS3 Puffer, eigene Herstellung
- Gelladepuffer, Roth
- DNA-Marker, Roth
- Master Mix for PCR, Bio-Rad
- Mundschleimhautzellen/ DNA Template
- NaCl Lösung (0,9 %), Roth
- peq Gold Tissue DNA Mini Kit, peqlab
- Primer: 1. SRY – 678: for/ SRY – 678: rev
2. SRY – 532: for/ SRY – 532: rev
3. SRY – 420: for/ SRY – 420: rev
- Proteinase K, peqlab
- Q-Tips, Discounter
- RNase, Sigma Aldrich
- WP1, Puffer, eigene Herstellung
- WP2, Puffer, eigene Herstellung

3.2. Geräte

Gelelektrophoresezubehör

- Elektrophoresekammer, Kisker Biotech GmbH & Co.
- Electrophoresis Power Supply, Kisker Biotech GmbH & Co.

Inkubationsschüttler

- Thermomixer 5433, Eppendorf
- Mgw LAUDA MT/M6 Wasserbad, Lauda

Pipetten

- Peqlab 0,5-10 µl

- Peqlab 2-20 µl
- Peqlab 100-1000 µl

Thermocyclers

- peQSTAR 96 Universal Gradient, peqlab

Zentrifugen

- Perfect Spin 24 Plus, peqlab
- Perfect Spin Mini, peqlab

4. Methoden

4.1. DNA Isolierung/Präparationstechniken

Die DNA-Isolierungs- und Präparationstechniken dienen zur Reinigung der DNA. Es gibt viele verschiedene Methoden, DNA zu reinigen. Im Folgenden werden die Methoden Tissue DNA Minikit und die Blood DNA MiniKit vorgestellt.

4.1.1. Tissue DNA MiniKit („Blaue-Säulen-Methode“)

Für die Durchführung der Tissue DAN MiniKit-Methode werden zunächst ca. 1ml Speichelproben (vgl. 3.3.1 oder 3.3.2) mittels Zentrifugation (vgl. 3.2) sedimentiert (zwei Minuten bei 10.000xg). Zur Homogenisierung und Lyse werden zu dem Sediment 400 µl DNA Lysis Buffer T, 20 µl Proteinase K und 15 µl RNase A (20 mg/ml) gegeben (Kitsystem der Firma peqlab) und 10 sec lang gevortexet. Nach einer Inkubation bei 50 °C im Schüttelwasserbad für mindestens eine Stunde wird die Probe 30 sec bei 10.000xg zentrifugiert.

Um die DNA zu binden, werden 200 µl DNA Binding Buffer zum Überstand geben und sorgfältig durch mehrmaliges Ein- und Auspipettieren gemischt. Der gesamte Ansatz wird nun auf eine Perfect Bind-DNA Column (blaue Säule) geladen. Anschließend wird das Eppi für zwei Minuten bei 10.000xg zentrifugiert. Die DNA ist jetzt an die Silikamembran in der Säule gebunden, und der Säulendurchlauf kann entfernt werden. Die DNA wird nun gewaschen, wodurch alle zelluläre Bestandteile und andere Kontaminationen durch das zweifache Waschen mit 650 µl DNA Wash Buffer (komplettiert mit EtOH) und einer jeweilig anschließenden Zentrifugation (eine Minute mit 10.000xg) entfernt werden. Während einer abschließenden zweiminütigen Zentrifugation bei 10.000xg wird die Säule getrocknet.

Die Elution der DNA erfolgt durch das Hinzugeben von 200 µl Elution Buffer (auf 70°C vorgewärmt) auf die Matrix, einer dreiminütigen Inkubation bei Raumtemperatur und einer abschließenden Zentrifugation (1 min bei 6.000xg).

Ein Präparationsprotokoll befindet sich im Anhang (Anhang D).

4.1.2. Blood DNA MiniKit („Rote-Säule-Methode“)

Für die Durchführung der Blood DNA MiniKit-Methode werden zunächst verschiedene Speichelproben mittels Zentrifugation (vgl. 3.2) sedimentiert (zwei Minuten bei 10.000xg). Zur Lyse werden die sedimentierten Mundschleimhautzellen mit Mikropistill oder durch Ein- und Auspipettieren im 1,5ml Eppi homogen mit der Zugabe von 200µL Puffer FS1 und 10 µl Proteinase K (40 mg/mL) vermischt. Nach einer Zugabe von 200µL Puffer FS2 wird das Eppi geschlossen, kräftig geschüttelt und zehn Minuten bei 60°C belassen; ggf. geschüttelt oder gevortexet. Zusätzlich zur Probe wird ein Eppi mit

Elutionspuffer (EP) in das Inkubationsbad gestellt, da dieser für spätere Schritte auf 60°C vorgewärmt werden muss.

Die Bindung der DNA erfolgt durch die Zugabe von 360µl Puffer FS3, welcher durch kräftiges Schütteln mit dem Ansatz vermischt wird. Der gesamte Ansatz wird durch zügiges Überschütten oder durch Pipettieren auf die rote Säule im 2ml Eppi geladen. Im darauffolgenden Schritt wird der Ansatz eine Minute bei 11.000xg zentrifugiert. Danach kann der Säulendurchlauf entleert werden, da die DNA nun an die Membran der Säule gebunden ist.

Der Waschvorgang unterteilt sich in folgende drei Schritte: Zuerst werden 400µL WP1 auf die Säule gegeben und das Eppi wird nach der Zentrifugation (1min, 11.000xg) entleert. Der darauffolgende Schritt besteht aus zweimaligem Waschen des Ansatzes mit jeweils 600µL WP2 und einer jeweilig anschließenden Zentrifugation (1min, 11.000xg). Das Eppi wird nach jeder Zentrifugation entleert. Als abschließender Schritt folgt eine Trockenzentrifugation der Säule im entleerten Eppi für 3 Min bei 11.000xg.

Die Elution erfolgt durch die Überführung der Säule in ein neues, vorher beschriftetes 1,5mL Eppi und der Zugabe von 200µL Elutionspuffer (EP, 60°C). Der Ansatz wird zwei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Präparationsvorgang ist nach einer einminütigen Zentrifugation bei 6.000xg abgeschlossen und die Säule kann verworfen werden.

Ein Präparationsprotokoll befindet sich im Anhang (Anhang E).

4.2. Differentielle Zentrifugation

Die differentielle Zentrifugation ist ein Trennverfahren, bei dem zelluläre Bestandteile durch mehrere serielle Zentrifugationen bei immer höheren Geschwindigkeiten aufgetrennt werden. Dabei macht man sich zunutze, dass durch die Zentrifugation Zellkomponenten nach Größe und Dichte aufgetrennt werden. Große und dichte Komponenten wandern dabei am schnellsten, setzen sich also schon bei verhältnismäßig niedrigen Geschwindigkeiten ab und bilden ein Sediment (vgl. Praktikumsvorschrift Hennecke, Anhang G). Da bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit DNA, welche im Zellkern liegt, gearbeitet wird, müssen lediglich einmalige Zentrifugationen durchgeführt werden, um ein Sediment mit Zellkernen herzustellen. Denn diese setzen sich als schwerste zelluläre Bestandteile schon bei einer Zentrifugation ab 1000xg ab. Bei einer Zentrifugation sind die Angaben zu Dauer und Umdrehungsgeschwindigkeit der Zentrifuge, häufig in Erdbeschleunigung „g“ angegeben, sehr wichtig, da diese je nach Versuch variieren können. Außerdem spielt das Gleichgewicht innerhalb der Zentrifuge eine wichtige Rolle: Die Eppis müssen sich immer austariert im Rotor befinden und demnach nicht nebeneinander, sondern immer gegenüber in die Zentrifuge gestellt werden.

4.3. Zellentnahme

4.3.1. Q-Tip-Methode

Zur Zellentnahme wird ein Q-Tip großflächig durch die Mundhöhle der entsprechenden Person gestrichen. Die Watte wird mit einer Pinzette vom Q-Tip gelöst und in ein Eppi übergeführt. Mit der Watte wird die Lyse der Mundschleimhautzellen durchgeführt, wobei die Watte nach der Zugabe des FS3 Puffers (rote Säule) bzw. des Binding Buffers (blaue Säule) ausgedrückt und entfernt wird.

4.3.2. NaCl-Methode

Zur Zellentnahme spült die Testperson den Mund ca. 2 Minuten mit 0,9% NaCl Lösung aus. Um ein Mundschleimhautzellensediment zu erhalten, wird die Lösung zwei Minuten bei 11.000xg zentrifugiert. Mit dem Sediment kann nun die DNA Präparation (vgl. 3.1.) durchgeführt werden.

4.4. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

4.4.1. Theoretischer Hintergrund

Die PCR dient im Allgemeinen der exponentiellen Amplifikation von DNA *in vitro*, ist jedoch vergleichbar mit dem Prozess der DNA-Replikation in der lebenden Zelle (*in vivo*).

Sie stellt ein wichtiges Verfahren der heutigen Molekularbiologie dar, da die Amplifikation von Genabschnitten bzw. DNA-Spuren oft für Klonierungszwecke, wie z.B. dem Vaterschaftstest oder der Täterüberführung bei der Kriminalpolizei, dient.

Erweiterungen der üblichen PCR, wie z.B. die real-time PCR, quantitative PCR, reverse-transkriptions PCR, ermöglichen außerdem, dass biologische und physiologische Prozesse verstanden werden können.

Für einen PCR Ansatz benötigt man synthetische DNA Primer (forward und reverse), welche an das „gene of interest“ binden, eine DNA Matrize, die als Vorlage der zu amplifizierenden Sequenzen dient, und eine thermostabile DNA Polymerase. Hier wird meistens die Taq-Polymerase aus der *Thermophilus aquaticus* verwendet, da sie auch bei hohen Temperaturen ihre Aktivität behält. Weiterhin werden Desoxynukleotidtriphosphate (dATP + dTTP + dCTP + dGTP = dNTPs) und ein geeigneter Reaktionspuffer, welche die Aktivität der Polymerase steigert, benötigt. Für den Vorgang der PCR wird der Reaktionsansatz einer Folge von zyklischen Temperaturänderungen, welche von dem Thermocycler gesteuert werden, unterworfen. In der ersten Phase (Phase der Denaturierung) wird das Gemisch auf 95°C aufgeheizt. Dadurch werden die Wasserstoffbrücken, die die zwei Stränge der DNA Doppelhelix

zusammenhalten, aufgebrochen, und es entstehen DNA-Einzelstränge. Die zweite Phase eines jeden Zyklus' bildet das sogenannte Primer-Annealing. Hierbei wird die Temperatur im Thermocycler gesenkt, was die Bindung der Primer an die spezifischen Stellen ermöglicht, da diese synthetischen Primer im Überschuss im Ansatz vorhanden sind. Je nach Länge und GC-Gehalt der Primer (und der damit korrelierenden Anzahl an Wasserstoffbrückenbindungen) liegt die Annealing-Temperatur meist zwischen 50 und 60°C. In der Elongation, der dritten und letzten Phase eines Zyklus', wird das Gemisch auf 72°C aufgeheizt, da diese Temperatur das Temperatur-Optimum der Taq-Polymerase darstellt. In dieser Phase werden die Primer verlängert und die zur Template komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Dann werden die DNA-Moleküle wieder getrennt und der Zyklus meistens bis zu 30-35-mal wiederholt. Das führt zu einer exponentiellen Amplifikation von DNA-Fragmenten, deren Sequenzen von einem Primer zum andern reichen („gene of interest“).

4.4.2. Praktische Durchführung

Zur Vorbereitung der Polymerase-Kettenreaktion werden 4 µl Wasser, 2 µl Primer forward, 2 µl Primer reverse (jeweils 250 µl Endkonzentration im PCR Ansatz) mit 2 µl isolierter DNA (vgl. 3.1.) vermischt und 10 µl Master Mix bzw. eine Mischung aus Wasser (H₂O), Taq-Puffer, MgCl₂ und dNTPs hinzugefügt.

Die Proben variieren zum einen durch die Methode der Zellentnahme (vgl. 3.3.), zum anderen durch die Methode der DNA-Isolierung (vgl. 3.1.) beziehungsweise durch die Untersuchung männlicher oder weiblicher DNA sowie durch die unterschiedlichen Primer (420, 532 oder 678 bp).

Die genauen Probenaufstellungen der einzelnen PCRs befinden sich im Anhang (Anhang F).

Für eine genaue Identifizierung und spätere Wiedererkennung müssen die 0,5 Eppis nun beschriftet in den Thermocycler gegeben werden.

Die verschiedenen PCR-Programme für den Thermocycler gliedern sich wie folgt auf:

	1.PCR	2.PCR	3.PCR	4.PCR	5.PCR	6.PCR
Initiierungsschritt	95°C für 2 Min.					
Loops(35x): Denaturierung	95°C 30 sec	95°C 30 sec	94°C 50 sec	95°C 30 sec	95°C 30 sec	95°C 30 sec
Primer-Annealing	53°C 90 sec	50°C 90 sec	58°C 50 sec	53°C 90 sec	53°C 90 sec	53°C 90 sec
Elongation	72°C 80 sec	72°C 80 sec	72°C 2 min	72°C 80 sec	72°C 80 sec	72°C 80 sec
Langschritt	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 5 min	72°C 10 min	72°C 10 min	72°C 10 min
Lagerung	Lagerung bei 4°C					

Bei dem ersten, vierten, fünften und sechsten PCR-Programm handelt es sich um die Vorgaben aus der Facharbeit aus von Schulte und Mierswa (2010). Bei dem zweiten und dritten Programm wurde die Primer-Annealing Temperatur verändert.

4.5. Nested PCR („verschachtelte PCR“)

Bei der Nested PCR wird das gleiche Prinzip der PCR verwendet, es werden hierbei jedoch zwei PCRs nacheinander geschaltet. Der Unterschied besteht also darin, dass das Endprodukt der ersten PCR als Template bzw. Ausgangsprodukt für eine zweite PCR mit anderen Primern dient, und nicht wie bei der „normalen“ PCR, in der genomische DNA die Matrize bildet. In dem Template wird durch ein zweites Primerpaar, das an Sequenzbereiche innerhalb dieser Matrize bindet (nested primer), ein kürzeres DNA-Fragment amplifiziert.

4.6. Die Agarose-Gelelektrophorese

4.6.1. Theoretischer Hintergrund

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine analytische Methode, bei der DNA-Fragmente ihrer Größe nach, also entsprechend der Anzahl der Nukleotide bzw. der Basenpaare [bp] aufgetrennt werden.

Im Experiment wird die Methode genutzt, um die PCR-Ansätze zu analysieren bzw. nachzuweisen, ob die jeweilige DNA amplifiziert wurde. Dazu wird zunächst ein 2%iges Agarosegel hergestellt. Agarose ist eine Reinform von Agar, der wiederum aus Algen gewonnen wird. Agarosegele besitzen eine siebartig-poröse Struktur, durch die die negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld wandern. Entsprechend ihrer Größe wandern die DNA-Fragmente dabei unterschiedlich schnell im Gel in Richtung Pluspol. Nach Beendigung der Elektrophorese erscheinen die DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe als distinkte Bereiche (Banden) im Gel. Kleinere DNA-Fragmente befinden sich weiter unten, größere DNA-Fragmente dementsprechend weiter oben im Gel. Die genaue Größe bzw. Länge der doppelsträngigen DNA-Fragmente (PCR-Produkte) kann im Vergleich mit einem Marker in Form der Anzahl der vorhandenen Basenpaare nach Anfärbung mit Ethidiumbromid und Anregung durch UV-Licht ermittelt werden.

4.6.2. Praktische Durchführung

Für das 2%ige Agarosegel werden 100 ml TAE-Puffer der Firma Roth abgemessen und zusammen mit abgewogenen 2g Agarose in der Mikrowelle im 300 ml Erlenmeyerkolben erhitzt, bis die Agarose geschmolzen ist. Die Flüssigkeit wird,

nachdem sie sich auf ca. 60°C abgekühlt hat, in den abgedichteten Gelschlitten mit einem oder zwei Kämmen für je 20 Taschen gegossen. Nach Erstarren der Agarose werden die Dichtungen und der Kamm entfernt und das Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer gegeben.

Um die PCR-Ansätze aufzutragen, werden zu den PCR-Ansätzen je 2µL Gelladepuffer pipettiert, die Stoffe durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt und anschließend 13µL der angefärbten PCR-Ansätze bzw. 13µl des DNA-Markers in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Hierbei ist es ratsam, ein Muster anzulegen, um die verschiedenen Proben richtig aufzutragen und nicht zu vertauschen.

Die Elektrophorese erfolgt für 35-45 Minuten bei 130 Volt. Anschließend erfolgt die Visualisierung des an die DNA gebundenen Ethidiumbromids durch Anregung mit UV-Licht. Mithilfe der Kamera wird das Gel dokumentiert (Anhang F).

4.7. Erstellen einer Praktikumsvorschrift (vgl. Praktikumsvorschrift Hennecke, Anhang G)

Durch das Erstellen einer Praktikumsvorschrift können und sollen die Erkenntnisse meiner Facharbeit an andere SuS weitergegeben werden, die somit Versuche im Bereich der Molekularbiologie machen können. Da der Schwerpunkt meiner Facharbeit auf der Geschlechterdifferenzierung liegt, musste ein adäquates Fallbespiel kreiert werden, in dem eine Identifizierung zwischen einem Mann und einer Frau erfolgen muss. Durch diese relativ geringe Ergebnisspannbreite reduzierte sich die Menge der Differenzierungsmöglichkeiten. Alle drei der hier entwickelten Gruppenaufgaben bearbeiten dementsprechend den gleichen Untersuchungsschwerpunkt, nämlich die Identifizierung und Unterscheidung von männlicher und weiblicher DNA. Da jedoch eine möglichst abwechslungsreiche und selbstständige Arbeit der SuS ermöglicht werden sollte, wurden zu einer übergeordneten Situation (Hausparty) drei Situationen entwickelt, in denen eine Geschlechterdifferenzierung zur Identifizierung sinnvoll ist. Diese Situationen entsprechen der Anwendung von DNA-Untersuchungen in der Realität (Kriminaluntersuchungen).

Ein besonderes Augenmerk wurde auf eine ansprechende und den Jugendlichen bekannte Situation gelegt, so dass diese motiviert sind, die Aufgabenstellungen zu bearbeiten.

Als Vorlage diente eine unveröffentlichte Praktikumsvorschrift (Schaller 2013)

5. Ergebnisse und Diskussion der einzelnen Versuchen in chronologischer Reihenfolge

Erstens war das Ziel der Facharbeit nachzuweisen, dass man eine Geschlechtsdifferenzierung mittels molekularbiologischer Methoden und dem SRY Gen durchführen kann. Durch die Facharbeit „Entwicklung eines Kussdetektors mit Hilfe der PCR“ (Schulte, K., Mierswa, D. (2010)) konnte vermutet werden, dass diese Differenzierung per PCR durchgeführt werden kann, obwohl die Ergebnisse der Arbeit nicht vollkommen eindeutig erscheinen.

Bei dem SRY Gen handelt es sich um einen 35 kb langen Abschnitt auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms. Durch das SRY Gen und dem TDF (testis determinig factor) auf dem Y-Chromosom entwickelt sich der männliche Phänotyp. Wenn das SRY Gen fehlt, also bei dem weiblichen Karyotypen (46, xx) oder bei Y-chromosomalen Deletionen, bildet sich der weibliche Phänotyp heraus. Das SRY-Gen ist insoweit geschlechtsdeterminierend, als dass der Transkriptionsfaktor, der durch das SRY-Gen kodiert wird, über seine DNA bindende Funktion genregulatorische Aufgaben übernimmt (vgl. <http://www.genetikzentrum.de/diagnostik/geschlechtsdiff.shtml>). Durch die einzigartige Basenabfolge sollte sich also mithilfe der PCR ein bestimmter Bereich dieses Gens, das - durch die spezifischen Primer abgegrenzt - aus dem männlichen Genom amplifizieren lassen. In den folgenden Versuchen wurden die Sequenzen des Bereichs „Homo sapiens SRY EXON1 bp 5011-5897“ verwendet.

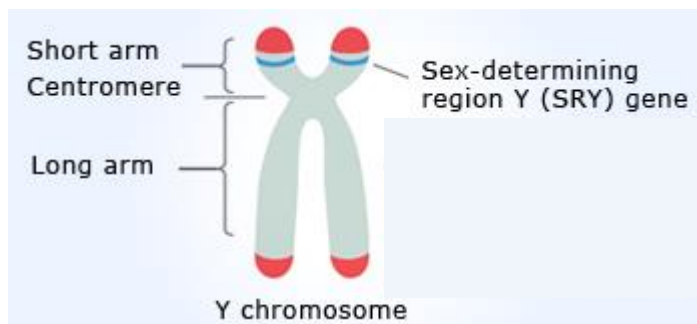


Abb. 1: Bereich des SRY-Gen auf dem Y-Chromosom

(http://www.wonderwhizkids.com/wwkimages/Know_Why/Nature_imgs/Nature_img18.jpg)

Um den Nachweis des SRY-Gens auf männlicher DNA nachzuvollziehen, wurden folgende Experimente durchgeführt.

5.1. PCR vom 07.10.2014 (vgl. Anhang F, S. 23)

In der ersten PCR wurden hauptsächlich das Programm der Facharbeit „Entwicklung eines Kussdetektors mit Hilfe der PCR“ (Schulte, K., Mierswa, D. (2010)) übernommen. Das heißt, die Mundschleimhautzellen wurden mit der Q-Tip Methode (vgl. 3.3.1.) entnommen sowie männliche und weibliche DNA isoliert. Es wurde jedoch nicht nur die

vorgegebene Extraktionsmethode, nach Tissue DNA MiniKit (vgl. 3.1.1.) verwendet, sondern auch die Rote-Säule-Methode (vgl. 3.1.2.), um einen Vergleich und eine damit verbundene Optimierung des Arbeitsvorgangs der Präparation herbeizuführen. Das Gel dieser PCR zeigte allerdings kein Ergebnis, es war also weder ein Nachweis der männlichen DNA noch ein Vergleich der beiden Isolierungsmethoden möglich. Folgende zwei Fehlermöglichkeiten kamen in Frage: Zum einen kann eine zu hohe Primer-Annealing-Temperatur dazu führen, dass die Primer unspezifisch oder gar nicht binden. Auf der anderen Seite könnte die Zellentnahme durch die Q-Tip-Methode (vgl. 3.3.1.) nicht geeignet sein, da sich kein sichtbares Sediment gebildet hatte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde nach einer weiteren Methode gesucht, um die Mundschleimhautzellen zu entnehmen. Deshalb wurde bei der nächsten Versuchsanordnung eine Entnahme mittels der NaCl Methode durchgeführt (vgl. 3.3.2.).

5.2. PCR vom 08.10.2014 (1) (vgl. Anhang F, S. 23)

In der zweiten PCR beschränkte man sich zunächst auf die männlichen Zellen bzw. auf den Vergleich der beiden Isolierungsmethoden (vgl. 3.1.1./3.1.2.), setzte die Primer-Annealing Temperatur auf 50°C hinab und entnahm die Zellen mithilfe der neuentwickelten NaCl Lösung (vgl. 3.3.2.), bei der sich nach der Zentrifugation des Ansatzes ein deutliches Sediment bildete. Die Ergebnisse im Gel zeigen klare Banden in Spur 3 und 6, was bedeutet, dass beide Isolierungstechniken funktionieren. In den folgenden Experimenten wurde ausschließlich mit der Isolierungstechnik (vgl. 3.1.2.) gearbeitet, da diese mit deutlich weniger Zeitaufwand durchzuführen ist und ausgeprägtere Banden im Gel zeigt. Das Gel zeigt, dass bei dieser PCR jedoch ausschließlich die Fragmente des SRY-420 Primers amplifiziert wurden. Bei den längeren Fragmenten mit SRY-532 und SRY-678 Primern war keine Bande im Gel zu erkennen. SRY-Primer 532 und 678 haben eine niedrigere Schmelztemperatur (ca. 55°C) (Anhang C) und einen kleineren GC-Gehalt als der SRY-420 Primer. Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass eine zu hohe Annealing-Temperatur der Grund für das Misslingen der PCR war.

5.3. PCR vom 08.10.2014 (2) (vgl. Anhang F, S. 24)

Die Hypothese aus dem vorangegangenen PCR-Durchlauf wurde zum Anlass einer neuen PCR genommen. Bei dieser PCR durchliefen männliche DNA Proben, die mit der NaCl Methode entnommen wurde, ein Thermocycler-Programm mit einer Primer-Annealing-Temperatur von 58°C. In diesem dritten Gel konnte jedoch gezeigt werden,

dass die vorher nicht sichtbaren Fragmente des SRY-532 Primers synthetisiert wurden (Spur 1+2). Somit wurde die Hypothese aus der vorangegangenen PCR (PCR vom 08.10.2014 (1)) widerlegt.

5.4. PCR vom 09.10.2014 (1) (vgl. Anhang F, S. 24)

In der vierten PCR sollte nun der im ersten Versuch gescheiterte Vergleich zwischen männlicher und weiblicher DNA erneut aufgegriffen werden. Die weibliche DNA sollte im Gegensatz zu der männlichen DNA keine amplifizierten Fragmente im Gel aufweisen, da die Primer hier nicht an das geschlechtsspezifische SRY Gen binden können.

In diesem Gel sieht man klare Banden beim 532 und 420 Primer bei der männlichen DNA-Matrize (Spur 5+6), allerdings ist auch eine leichte Bande bei der weiblichen DNA erkennbar, welche auf eine Kreuzreaktion bei dem 420 bp langen Primer hinweist (Spur 3). Zusammen mit der Tatsache, dass immer noch kein SRY-678 Fragment zu sehen war, war diese Kreuzreaktion der Anlass einer neuen PCR.

5.5. PCR vom 09.10.2014 (2) (vgl. Anhang F, S. 25)

Da ein Schwerpunkt meiner Facharbeit die Überprüfung der Ergebnisse der Facharbeit von Schulte und Mierswa war: „Wir sind in der Lage das SRY-Gen des Mannes [...] nachzuweisen“ (Schulte, K., Mierswa, D. (2010)), wurde nochmals die Methode der Zellentnahmen mit einem Q-Tip getestet. Hiermit sollten andere mögliche Fehler der ersten PCR, wie eine zu kurze Zentrifugation oder ähnliches, ausgeschlossen werden. Diese PCR führte allerdings erneut zu keinem Ergebnis, woraus sich schließen lässt, dass bei dieser Methode entweder Fehler in der Anleitung oder bei der Durchführung vorliegen. Im Gegensatz dazu sind in allen PCRs, die mit der Methode durch NaCl durchgeführt wurden, klare Banden und Ergebnisse zu erkennen.

5.6. PCR vom 10.10.2014 (vgl. Anhang F, S. 25)

Um auszuschließen, dass das Ergebnis der vierten PCR, bei dem man eine Bande bei der weiblichen DNA sehen konnte, eine andere Ursache als die einer Kreuzreaktion hatte, wurde in dieser sechsten PCR erneut eine Probe mit weiblicher DNA und dem SRY-420 Primer angesetzt. In diesem Gel ist keine Bande mehr zu sehen (Spur 5). Die Kreuzreaktion in der vierten PCR kann also möglicherweise durch eine verunreinigte Pipette oder ähnliches verursacht worden sein. Da bis zu diesem Punkt noch keine Probe zu einem Ergebnis unter Verwendung des SRY-678 Primers führte, stellte sich

die Frage, ob insgesamt zu wenig DNA amplifiziert wurde, um sie im Gel sichtbar zu machen. Es war aber auch denkbar, dass andere Fehler, wie z.B. eine zu hohe oder zu niedrige Primerkonzentration zu Negativergebnissen führten. Deshalb wurde in dieser PCR auch die Methode der Nested PCR verwendet (vgl. 3.5.). So wurde die PCR mit den SRY-678 und SRY-532 Fragmenten zusammen mit dem SRY-420 Primer angesetzt. Das Ergebnis zeigt, dass bei beiden Fragmenten die DNA amplifiziert wurde (Spur 3+4). Das bedeutet, dass in den PCR-Amplifikanten mit 678-Primern amplifizierte DNA enthalten ist, aber nicht genug, um sie allein im Gel sichtbar zu machen. Die Nested PCR-Methode kann also tatsächlich zur Amplifikation bei geringer Matrizenkonzentration angewendet werden.

6. Allgemeine Diskussion

Die hier vorgestellten Versuchsergebnisse können eindeutig die in der Einleitung gestellte Frage (Kann man männliche DNA anhand des SRY-Gens identifizieren?) beantworten. Denn diese zeigen, dass zumindest mit dem 420 und dem 532 Primer männliche DNA nachweisbar ist. Auch mit dem 678 Primer kann man diesen Nachweis durchführen, allerdings ist hier das Verfahren einer nachgeschalteten Nested PCR notwendig. Damit lassen sich auch die Ergebnisse der Facharbeit „Entwicklung eines Kussdetektors mit Hilfe der PCR“ (Schulte, K., Mierswa, D. (2010)) bestätigen, die durch den DNA-Nachweis einen Kuss feststellen konnten. Außerdem wurde gezeigt, dass die angewandten Methoden geeignet sind, um eine DNA Analyse menschlicher DNA durchzuführen. Trotzdem ergeben sich aus den hier beschriebenen Experimenten einige Verbesserungsvorschläge bzw. Korrekturen. So führten die drei Durchläufe, in denen die Mundschleimhautzellen mit der Q-Tip-Methode entnommen wurden, zu keinem Ergebnis. Dafür erhielt man mit der NaCl Methode klare Ergebnisse. Die in der Facharbeit verwendete DNA-Isolierungsmethode mit der Tissue DNA MiniKit führte zwar zu Ergebnissen, kann aber durch die Methode des Blood DNA MiniKit ersetzt werden, da diese weniger zeitaufwändig ist.

Da auch mein Interesse für dieses Projekt aus einem Praktikum anderer Schüler entstanden ist, war die Motivation groß, die Ergebnisse meiner Arbeit praktisch und anwendbar für SuS meiner Schule aufzuarbeiten. Denkbar wäre dies innerhalb des Themenbereichs Sexualunterricht in der 9. Klasse oder innerhalb des Themenbereichs Molekulargenetik oder Angewandte Genetik in der Q1. Ein Projektvorschlag wäre es, die Idee des Kussdetektors wieder aufzugreifen, allerdings verbessert durch die Rote-Säulen-Methode und der Zellentnahme durch NaCl, da Schüler und Schülerinnen schneller zu deutlicheren und klareren Ergebnissen kommen würden. In der Wissenschaft wird das SRY-Gen bereits benutzt, um das Geschlecht des Embryos nach der 7. Schwangerschaftswoche zu bestimmen. Man könnte bei einem Praktikum

zwar keine Zellen eines Embryos entnehmen, es wäre jedoch möglich, einen Fall zu konstruieren und die Zellen eines unbekanntes Erwachsenen zu nehmen. Sehr interessant fände ich eine modellierte „Täterüberführung“ wie bei der Kriminalpolizei, bei der man einen weiblichen von einem männlichen Täter unterscheiden muss. Hierbei wäre es sinnvoll, anhand von Zellen, z.B. einer Zigarette, den oben durchgeführten Versuch zu imitieren und erst nach der Gelelektrophorese zu erkennen, ob es sich um einen männlichen oder einen weiblichen Täter handelt. Bei einem solchen Praktikum müssten auf organisatorischer Ebene einige Abläufe, wie die Erstellung eines Mastermix', eines Gels oder der verschiedenen Puffer, vorbereitet werden.

7. Persönliches Fazit

Durch ein eintägiges Praktikum im MoBiL (Molekular Biologischem Labor) der Schiller-Schule ist mein Interesse an der Molekularbiologie geweckt worden. Dort untersuchten wir die spannende Fragestellung, die Schüler des Jahrgangs über uns in ihren Facharbeiten untersucht hatten: Ob und wie kann man nachweisen, dass sich in Dönerfleisch die DNA von Pferden, Rind und Huhn befindet? Fasziniert von deren Untersuchungen nahm ich Herrn Schallers Angebot, unsere Facharbeit über ein ähnliches Thema zu verfassen, an. Außerdem ermöglichte mir dieses Angebot, meine Facharbeit als praktische Arbeit zu schreiben, da alle notwendigen Geräte und Materialien vorhanden waren. Durch diesen Einblick in die biologische Forschung verstärkte sich zudem mein Wunsch, Medizin zu studieren.

Zusammenfassend hat diese praktische Arbeit viel Spaß gemacht, auch wenn der Zeitaufwand für dieses Projekt sehr hoch war. Doch die Anstrengung der fünf Arbeitstage und die zwischenzeitliche Frustration über misslungene Versuchsdurchführungen wurden durch die positive Pressemitteilung und die Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe wieder wettgemacht. Ich bin froh, diese Möglichkeit praktisch zu arbeiten, genutzt zu haben. Es war unglaublich spannend, mit solchen modernen Techniken zu forschen. Durch das selbstständige und eigenverantwortliche Handeln habe ich mich umso mehr über jedes gelungene Ergebnis gefreut. Deshalb empfehle ich jedem Schüler und jeder Schülerin, Möglichkeiten wie diese zu nutzen. Besonders werde ich mich darüber freuen, dass meine Ergebnisse durch die im Zusammenhang der Facharbeit verfassten Praktikumsvorschrift für das Schiller-Mobil Anwendung finden werden, und meine Facharbeit somit als Grundlage für ein interaktives „Schüler-erklären-Schülern“-Prinzip genutzt würde. Ich könnte mir außerdem vorstellen, diesen Projekttag, zwar mit Hilfe von Fachlehrern, aber grundsätzlich selbstständig zu leiten und die Praktikumsvorschrift mit den SuS durchzuarbeiten.

8. Literaturverzeichnis

Geschlechtsdifferenzierung (SRY).

<http://www.genetikzentrum.de/diagnostik/geschlechtsdiff.shtml> vom 22.11.2014

Hennecke, C. 2014. Wer war's? Identifizierung der männlichen DNA anhand des SRY-Gens. Unveröffentlichte Praktikumsvorschrift.

peq Gold Tissue DNA Mini Kit (ohne weitere Angaben)

Schaller, F. 2013. Identifizierung von Lebensmittelskandalen. Ist Pferdefleisch im Döner?, unveröffentlichte Praktikumsvorschrift.

Schulte, K./Mierswa, D. 2010. Entwicklung eines Kussdetektors mit Hilfe der PCR

SRY-Gen-Diagnostik.

<http://www.labor-leipzig.de/SRY-Gen-Diagnostik.152.0.html> vom 22.11.2014

Y-chromosome.

http://www.wonderwhizkids.com/wwkimages/Know_Why/Nature_imgs/Nature_img18.jpg
vom 22.11.2014

9. Erklärung

Ich erkläre, dass ich die Facharbeit ohne fremde Hilfe angefertigt und nur die im Literatur- und Quellenverzeichnis angeführten Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Bochum, den 24.11.2014