

Schiller-Schule-Bochum

Jahrgangsstufe Q1.1

Schuljahr 2013/14

FACHARBEIT

im Leistungskurs Biologie

Thema:

**Untersuchungen zur Vererbung des PV92 Fragments
als „Vortest“ zur Täterüberführung**

Verfasserin: Nele Riecks

Kursleiter, Betreuungslehrer: Frau Wirbals, Herr Schaller

Bearbeitungszeit: 25.11.2013 – 20.12.2013

Abgabetermin: 20.12.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	3
2	Von der Spur zum DNA-Profil	4
2.1	Spurensicherung	4
2.2	DNA-Extraktion	5
2.3	Welche Abschnitte der DNA werden zur Erstellung eines DNA-Profils verwendet?	6
2.4	Multiplex-STR-PCR	7
2.5	Kapillarelektrophorese	7
2.6	Das vollständige DNA-Profil	8
2.7	Die Verwendung des DNA-Profils bei der Täterüberführung	9
3	Versuch: Nachweis des PV92 Fragments in der menschlichen DNA	10
3.1	Extraktion der DNA aus Mundschleimhautzellen	10
3.1.1	Zellgewinnung und Zellyse	10
3.1.2	Bindung der DNA an eine Säulenmatrix	11
3.1.3	Waschen der DNA	11
3.1.4	Elution der DNA von der Säulenmatrix	11
3.2	Polymerase chain reaction (PCR)	11
3.3	Agarosegelelektrophorese	12
3.4	Ergebnis	13
3.5	Diskussion	14
4	Ist eine DNA-Typisierung auf Grundlage des PV92 Fragments als Vortest sinnvoll, um den Personenkreis der Tatverdächtigen einzugrenzen?	15
5	Glossar	16
6	Literatur- und Quellenverzeichnis	17
7	Bildnachweis	18
8	Anhang	19
9	Erklärung	24

1. Einleitung

Über die Behandlung des Themas „Täterüberführung“ im Unterricht im Rahmen des Themenbereichs „Genetik“, habe ich mir die Frage gestellt, wie so eine Täterüberführung bei der Kriminalpolizei professionell durchgeführt wird. Da man in der Presse immer wieder hört, dass Täter mit Hilfe einer DNA-Analyse überführt werden, hat mich dieses Thema besonders interessiert.

Nach ersten Recherchen bin ich auf den Begriff des „DNA-Profiles“ gestoßen und habe überlegt, ob es für mich möglich wäre selber ein DNA-Profil zu erstellen bzw. bei der Analyse der Rechtsmedizin im Labor dabei sein zu können. Aus diesem Grund habe ich dann Kontakt mit der Polizeipräsidentin von Bochum, Diana Ewert, aufgenommen. Diese vermittelte mir dann den Kontakt zu Prof. Micaela Poetsch von der Rechtsmedizin an der Universität Essen. Ein Besuch im Labor war jedoch nicht möglich, da die Kontaminationsgefahr zu groß ist. Da ich trotzdem eine praktische Arbeit durchführen wollte, versuchte ich in der Schule eine vereinfachte DNA-Typisierung auf Grundlage des Pv92 Fragments durchzuführen.

In meiner Arbeit möchte ich zunächst die Verfahren der DNA-Profil-Erstellung im Labor der Polizei vorstellen, um dann die Durchführung meines Versuchs zu beschreiben und sie anschließend miteinander zu vergleichen. Abschließend möchte ich die Frage diskutieren, ob eine Typisierung auf Grundlage des PV92 Fragments eine Möglichkeit für einen „Vortest“ wäre, um im Vorfeld den Kreis der Tatverdächtigen einzugrenzen.

2. Von der Spur zum DNA-Profil

2.1 Spurensicherung

Die Spuren, die von forensischen Genetikern untersucht werden, sind die sogenannten biologischen Spuren. Das sind alle Spuren, die von einem Organismus stammen und somit DNA enthalten.

Die Spurensicherung wird am Tatort von der KTU (kriminaltechnische Untersuchung) oder von der Polizei durchgeführt. Eine solche Spurensicherung umfasst die Dokumentation der Zustände am Tatort, das Erkennen der Spur und schließlich die Sicherung und das Konservieren. Am häufigsten werden DNA-Spuren wie Haare, Hautzellen, Schuppen und Speichel gefunden. Solche Spuren können z.B. in der Innenseite einer Mütze, im Filter eines Zigarettenstummels oder auf der Oberfläche von einem Klebeband gefunden werden. An den Tatorten muss sehr genau gearbeitet werden, um solche versteckten Spuren zu entdecken. Außerdem muss bei der Sicherung vorsichtig vorgegangen werden, damit die Spuren nicht durch Kontaminationen, z.B. fremder DNA, verunreinigt werden. Um dem vorzubeugen, tragen die Beamten spezielle Schutzanzüge mit Mundschutz etc. (siehe Anhang A) (COURTS 2013 b, o.S (online))

Die auf diese Weise gesicherten Spuren kommen dann ins Labor und werden dort weiter untersucht.

Hier werden die Spuren dann von allen Ansichten fotografiert und später in einer speziellen Datenbank eingeordnet und gesammelt.

Falls man nicht direkt auf die Art der Spur (z.B. Blut, Speichel) schließen kann wird die Spur speziellen Vortests unterzogen, um sie zu bestimmen.

- Benzidin wird für den Nachweis von Hämoglobin verwendet
- Ein Amylasetest wird für den Nachweis von Speichel verwendet
- Mikroskopisch werden Spermienköpfe und Haarmorphologie nachgewiesen
- Mit Hilfe von saurer Phosphatase wird Spermasekret identifiziert (POETSCH o.J., Folie 13)

2.2 DNA-Extraktion

Ziel dieses Schrittes ist die Gewinnung von reiner und unbeschädigter DNA aus den Zellen der Spur. In der forensischen Forschung wird vorwiegend die Silica-Membran-Methode für die Extraktion verwendet. Dabei wird sich die Eigenschaft des Silica, DNA stark zu binden, zu Nutze gemacht.

Zunächst wird die Zellmembran chemisch zerstört. Jetzt liegen alle Zellbestandteile frei vor. Durch das Hinzufügen von dem Enzym Proteinase K werden die Proteine zerstört. Dann wird das Gemisch in eine Eppendorff Gefäß gegeben, das eine Silica-Membran enthält. Nachdem sich die vollständige DNA an die Silica-Membran gebunden hat, werden die restlichen Zellbestandteile gewaschen. Im letzten Schritt wird die DNA mit Hilfe eines Elutionspuffers von der Membran gelöst. Nun liegt eine unbeschädigte und saubere DNA für weitere Schritte vor.

Eine spezielle Methode der Silica-Membran-Methode wird mit sogenannten magnetic beads, kleinen Magnetkugeln, durchgeführt. Dabei befindet sich die Silica-Membran an der Außenseite dieser Kugeln. Da durch diese Methode eine sehr saubere DNA entsteht, wird sie von forensischen Genetikern bevorzugt: (COURTS 2013 c, o.S (online)) (Verfasser nicht angegeben o.J., o.S. (online)).

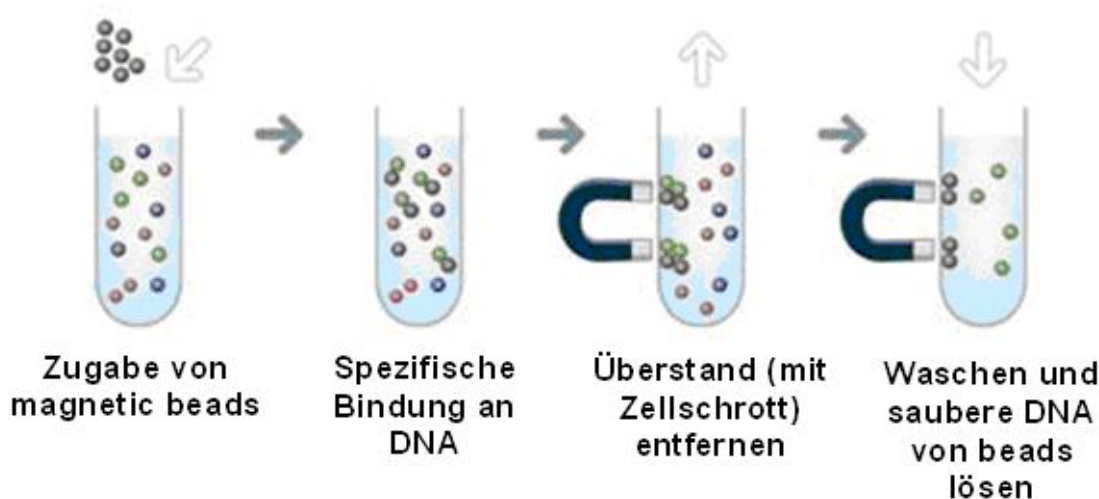


Abb. 1: Die Methode der Silica-Membran-Extraktion mit Hilfe von „magnetic beads“¹

¹ <http://scienceblogs.de/bloodnacid/files/2012/06/23679-02.jpg>

2.3 Welche Abschnitte der DNA werden zur Erstellung einer DNA-Profiles verwendet?

Für die Erstellung eines DNA-Profiles werden bestimmte Abschnitte auf der DNA untersucht. Diese müssen bestimmte Bedingungen erfüllen, damit das, für eine Person entstehende DNA-Profil, mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit einmalig ist:

- nach Aufbewahrungszeiten oder Umwelteinflüssen noch analysierbar
- kleine Fragmentlängen
- viele Allele
- müssen an einer bekannten Stelle des Chromosoms liegen
- müssen unabhängig vererbbar sein
- sie dürfen nicht so anfällig für Mutationen sein (POETSCH o.J., Folie 18)

Zur DNA-Profil Erstellung werden aus diesen Gründen sogenannte repetitive Sequenzen verwendet, die auf nicht codierenden Teilen der DNA liegen und den Vorteil haben, dass sie auf allen Chromosomen verteilt und dort immer am gleichen Ort liegen. Da jedes Chromosom beim Menschen zweimal vorkommt, sind auch alle repetitiven Sequenzen zweimal vorhanden. Jedoch befinden sie sich auf den Chromosomen in unterschiedlichen Ausprägungen (Allele). Außerdem sind sie nicht codierend. Sie bestehen in der Regel aus 10-30 Kopien von Sequenzen mit etwa 6bp und sind deshalb für eine Analyse mit Hilfe einer PCR und eine Typisierung geeignet (BROWN 2007, S.75).

Eine Untereinheit dieser repetitiven DNA sind die „tandem repeats“, die noch 9% des menschlichen Genoms ausmachen und sich wiederum in drei Untereinheiten einteilen: Die Satelliten-DNA, die Mikrosatelliten und die Minisatelliten.

Bei der heutzutage üblichen Methode zur Erstellung eines DNA-Profiles werden die Mikrosatelliten betrachtet, die die STRs (short tandem repeats) als repetitive Sequenzen auf der DNA beinhalten. STRs bestehen aus Wiederholungseinheiten (z.B. AATCAATC...) deren Wiederholungsanzahl häufig zwischen 1-40 schwankt und somit für die DNA-Fragmentlängenbestimmung herangezogen werden können. (COURTS 2013 d, o.S (online))

2.4 Multiplex-STR-PCR

Um mit den STRs weiterarbeiten zu können, müssen sie zunächst vervielfältigt werden, damit genug verwertbares DNA-Material für den Folgeschritt, die Kapillarelektrophorese (s. 3.5), vorhanden ist.

Die Multiplex-STR-PCR (vgl. Anhang B) ermöglicht eine simultane Amplifikation und Analyse von bis zu 16 STRs. Da zur Vervielfältigung eines DNA-Abschnitts immer 2 Primer (forward und reverse primer) benötigt werden, kann die Multiplex-STR-PCR mit bis zu 32 Primern arbeiten.

Damit für die Kapillarelektrophorese (s.3.5) die DNA-Fragmente markiert sind, werden die Primer mit einem Fluoreszenzfarbstoff versetzt. Indem dann die Primer an die Einzelstränge der DNA binden, werden dadurch die DNA-Fragmente markiert. Später ermöglicht dies eine Unterscheidung der verschiedenen Fragmentlängen. Die Fragmentlänge beschreibt die Anzahl der Basenpaare des STRs. Für Loci mit gleicher Fragmentlänge stehen verschiedene Fluoreszenzfarben zur Verfügung und für STR-Loci, die sich eindeutig zuordnen lassen, wird dieselbe Farbe verwendet.

Die DNA-Vervielfältigung wird wie bei der üblichen PCR durchgeführt. Mit der Ausnahme, dass eine simultane DNA-Amplifikation von vielen STR-Systemen möglich ist (KNAPP u.a. 2010, o.S. (online)) (Courts 2013 e, o.S. (online)) (Courts 2013 a, o.S. (online))

2.5 Kapillarelektrophorese

Mit Hilfe der Kapillarelektrophorese, die heutzutage zur DNA-Sequenzierung herangezogen wird, sollen die DNA-Fragmentlängen bis auf 1bp (Basenpaar) genau gemessen werden. Dazu wird sich das klassische Prinzip der Elektrophorese (vgl. Anhang Material C) zu Nutze gemacht, indem die Geschwindigkeit mit der ein negativ geladenes DNA-Fragment zur Anode wandert von der Länge des Fragments abhängt.

Das Gel einer Agarosegelelektrophorese wird bei der Kapillarelektrophorese durch eine hauchdünne Kapillare, die in das Reaktionsgefäß mit den PCR-Produkten eingetaucht wird, ersetzt. In dieser Kapillare befindet sich ein polymeres Gel zur Verbesserung der Trennung. Nun wird ein elektrisches Feld erzeugt, damit die DNA-Fragmente durch die Kapillare in Richtung Anode wandern. Am Ende der Kapillare kommen die DNA-Fragmente an einer kleinen Öffnung vorbei durch die ein Laserstrahl geworfen wird, der die DNA-Fragmente zur Fluoreszenz anregt. In Abhängigkeit von der Dauer der Fluoreszenz werden Signale zu einem Computer gesendet, der diese dann als

Elektropherogramm aufzeichnet. Für die ungefähre Bestimmung der Fragmentlängen wird ein DNA-Fragmentlängenstandard verwendet, der DNA-Fragmente bis zu einer Genauigkeit von 50 Basen misst. Für die exakte Längenbestimmung dienen dann Allelleiter deren Wiederholungseinheiten bekannt sind und die dann mit den Messergebnissen der Spur verglichen werden. Diese werden dann verschiedenen Allelen zugeordnet (PUERS 2003, o.S. (online)) (COURTS 2013 e, o.S. (online)).

2.6 Das vollständige DNA-Profil

Die einzelnen Fragmentlängen, die während der Kapillarelektrophorese gemessen wurden, ergeben ein nahezu einzigartiges DNA-Profil.

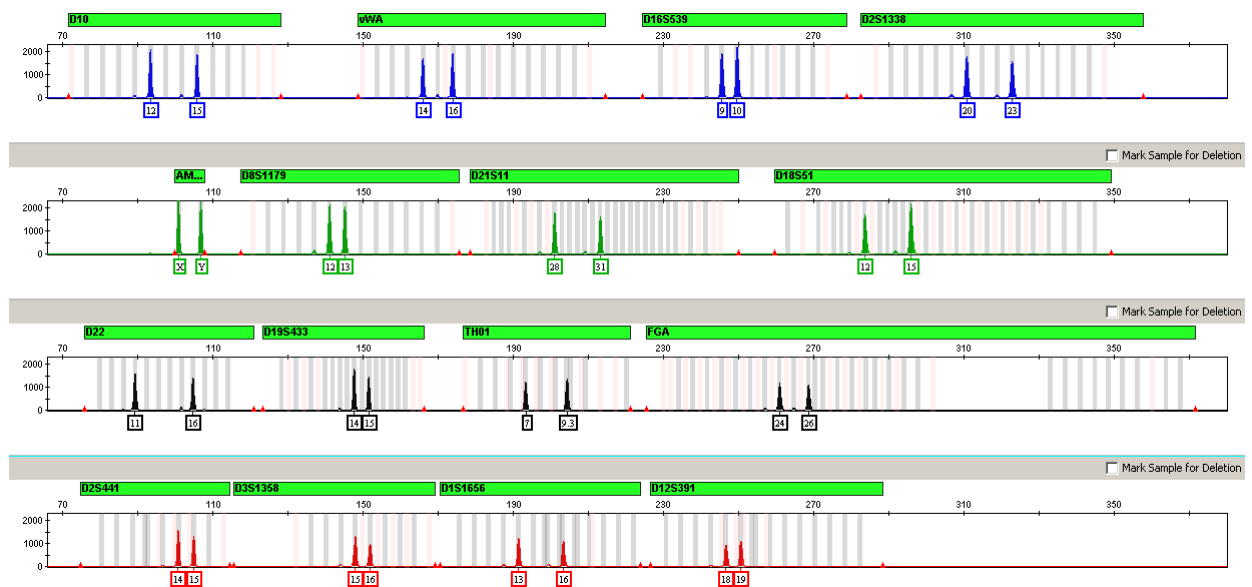


Abb. 2: Auswertung eines Elektropherogramms²

Im Beispiel werden 15 autosomale STR-Systeme und das gonosomale STR-System als grüne Balken dargestellt. Jedem STR-System sind zwei Allele zugeordnet, die an den zackenförmigen Erhebungen, Peaks, zu erkennen sind. Insgesamt stellt das Elektropherogramm also dar, welche Allele die untersuchte Person in den betrachteten STR-Systemen besitzt.

² <http://www.dcvv.at/Bilder/electropherogramm.gif>

Da STRs untersucht wurden, die auf nicht codierenden Teilen der DNA liegen, sagt das DNA-Profil nichts über Eigenschaften der betreffenden Person aus, ist aber mit hoher Wahrscheinlichkeit einzigartig (COURTS 2013 e, o.S. (online)).

2.7 Die Verwendung des DNA-Profiles bei der Täterüberführung

Das DNA-Profil kann nun verwendet werden, um den Täter zu überführen. So könnten zum Beispiel in tatverdächtigen Personkreisen Reihenuntersuchungen durchgeführt werden, um ihre DNA-Profile mit dem des Täters zu vergleichen. Das Bundeskriminalamt hat außerdem eine Datenbank angelegt, in der alle DNA-Profile von Kapitalverbrechern, wie Morde, Todschläge oder Körperverletzungen mit Todesfolgen, gespeichert sind. Wenn das DNA-Profil des Täters nicht mit einem der Personen aus den tatverdächtigen Personenkreisen übereinstimmt, kann über die Datenbank weiter ermittelt werden. Dies kann dann möglicherweise zu einer schnelleren Täterüberführung führen.

3. Versuch: Nachweis des PV92 Fragments in der menschlichen DNA

Alu Elemente, wozu das untersuchte PV92 Fragment gehört, sind eine Gruppe aus kurzen Wiederholungssequenzen, die im gesamten Genom der Primaten vorkommt. Diese Elemente existieren ungefähr 500000-mal in jedem haploiden Genom (COMAS u.a. 2000, o.S (online)).

Einige der Alu Elemente tauchen im menschlichen Genom an einer ganz bestimmten Stelle auf und sind dort polymorph, d.h. vielgestaltig. Aus diesen Gründen sind diese polymorphen Alu Elemente gut geeignet für genetische Forschungen. Neben ihrer Vielgestaltigkeit haben sie noch andere Vorteile: Diese DNA-Abschnitte sind schnell und einfach zu typisieren und selektionsneutral (COMAS u.a. 2000, o.S (online)).

Das Alu Element PV92 liegt auf Chromosom 16 und es wurde bewiesen, dass es bei jedem Menschen unterschiedlich ist (COMAS u.a. 2000, o.S (online)).

Im folgenden wird der Versuch beschrieben das PV92 Fragment in der menschlichen DNA nachzuweisen. Dabei wurde die DNA von 5 Personen untersucht.

Der Versuch wurde in Anlehnung an das „Blood DNA Mini Kit“ von peqlab durchgeführt.

3.1 Extraktion der DNA aus Mundschleimhautzellen

Eine DNA-Extraktion muss drei Bedingungen erfüllen, um DNA zu liefern, die für die Untersuchungen weiter verwendbar sind:

- Es darf keine DNA während der Extraktion verloren gehen
- Die DNA muss möglichst unbeschädigt extrahiert werden
- Alle Inhibitoren müssen aus der DNA entfernt werden

3.1.1 Zellgewinnung und Zellyse

Um genügend Mundschleimhautzellen zu lösen, müssen zunächst 10ml einer 0.9%-igen NaCl-Lösung über eine Minute im Mund bewegt werden. 1,5ml dieser Speichelprobe werden dann in ein Eppendorff Gefäß gegeben und bei 21.000-facher Erdbeschleunigung (21.000g) zentrifugiert. Auf dem Boden des Gefäßes haben sich nun Mundschleimhautzellen gesammelt. Der Überstand wird verworfen. Es werden dann nochmals 1,5ml Speichelprobe einpipettiert und der Vorgang wiederholt. Der Überstand wird wiederum verworfen und ein Sediment aus Mundschleimhautzellen

bleibt im Eppendorff Gefäß zurück. Dieses Sediment wird mit 250ml destilliertem Wasser und 250µl BL Puffer aufgefüllt. Zusätzlich werden 15µl Proteinase K mit einer Konzentration von 20mg/ml, zur Zerstörung der noch vorhandenen Proteine hinzugegeben. Das Gemisch wird nun gevortext, damit sich das Sediment löst, und dann für 10min auf 70°C erhitzt, um die Zellmembran zu zerstören.

3.1.2 Bindung der DNA an die Säulenmatrix

Zum Lysat wird zunächst 250µl Isopropanol gegeben. In ein Eppendorff Gefäß wird nun eine Säule gesteckt auf dessen Boden sich eine Silicamembran befindet. An diese soll sich die DNA binden, da Silica (Siliziumdioxid, SiO₂) stark DNA bindend ist. Die 750µl Lysat werden auf die Säule gegeben und für eine Minute bei 8.000g zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen. Zurück bleibt die DNA, die an der Silicamembran heftet.

3.1.3 Waschen der DNA

Das Waschen der DNA besteht aus 3 Schritten: Zunächst werden 500µl PW Puffer auf die Säule gegeben und für eine Minute bei 8.000g zentrifugiert. Die DNA wird dann zweimal mit 600µl DNA Wash Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Zum Schluss wird die Säule aus dem Eppendorff Gefäß genommen und alleine für zwei Minuten bei 10.000g zentrifugiert. Insgesamt dient der Schritt des Waschens der Entfernung übriggebliebener Zellbestandteile und anderen Kontaminationen.

3.1.4 Elution der DNA von der Säulenmatrix

Im letzten Schritt der DNA-Extraktion werden 200µl Elutions Puffer, der auf 70°C vorgewärmt ist, direkt auf die Silicamembran der Säule gegeben. Damit sich die DNA löst, wird das Gefäß für 2 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 1 Minute bei 5.000g zentrifugiert. Damit ist die DNA-Extraktion abgeschlossen. Es liegt eine reine DNA vor, die als Template für die PCR eingesetzt werden kann.

3.2. Polymerase chain reaction (PCR)

Die PCR dient der Vervielfältigung der PV92 Fragmente (vgl. Anhang B).

Zunächst wird ein Mastermix für jedes Präparate erstellt, die jeweils aus 3.5µl Wasser (H₂O), 2,5µl Puffer, 1µl dNTPs (freie Nukleotide, Nukleosidtriphosphate) und jeweils 1µl forward bzw. reverse Primer. Dabei synthetisiert der forward Primer, PV92A (5'-AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT-3'), den Leitstrang in 5' ->3'-Richtung und der

reverse Primer, PV92B (5'-TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG-3'), den Komplementärstrang in 3'-> 5'-Richtung. Zu jedem PCR-Ansatz werden zusätzlich 1µl Taq-Polymerase und 15µl DNA-Template. Insgesamt besteht jeder PCR-Ansatz aus 25µl (COMAS u.a. 2000, o.S (online)).

Die PCR-Ansätze werden jetzt in den Thermocycler gestellt und der PCR-Zyklus wird gestartet. Der verwendete Thermocycler beginnt den Vorgang mit der Erwärmung des Deckels auf 110°C, damit es zu keiner Verdunstung der PCR-Ansätze kommt. Im zweiten Schritt werden die PCR-Ansätze für auf 95°C aufgeheizt, die Temperatur wird für 2 Minuten gehalten bevor die Zyklen beginnen. Insgesamt müssen die Zyklen 40-mal wiederholt werden, um ausreichend DNA zu erhalten. Für die Denaturierung werden die Versuchsansätze für 1 Minute auf 95°C aufgeheizt, um die DNA in Einzelstränge zu trennen. Für die Hybridisierung kühlt der Thermocycler die Reaktion dann für 1 Minute auf 52°C ab. Die Einstellung der Temperatur während der Hybridisierung ist von den Primern, die während der Reaktion verwendet werden abhängig. Für die Elongation wärmt sich der Thermocycler dann für 1 Minute auf 72°C auf. Im Anschluss an die 40 Zyklen der PCR bleibt die Temperatur noch einmal für 10 Minuten bei 72°C, damit die Taq-Polymerasen auch noch die restlichen Komplementärstränge synthetisieren kann. Um die PCR zu beenden und weitere Reaktionen zu vermeiden, wird der Versuchsansatz auf 8°C heruntergekühlt.

3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der größenspezifischen Auftrennung von DNA-Fragmenten.

Zunächst wird ein 2%-iges Agarosegel in eine Form gegossen. Nun werden die PCR-Produkte mit Glycerin-Bromphenol-Xylencyanolblau als Gelladepuffer versetzt. Dadurch sind diese blau gefärbt. Nun werden 13 Taschen des Agarosegels mit zwei verschiedenen Leitern für 100 bzw. 50 bp (Basenpaaren), die später als Längenmaß für die Banden dienen, den PCR-Ansätzen und den Lysaten gefüllt:



Abb. 3: Geltaschen der Agarosegelelektrophorese

Die Gelkammer wird verschlossen und an den Strom angeschlossen. Die Gelelektrophorese läuft ca. 1 Stunde. In dieser Zeit wandern die DNA-Fragmente in Richtung Pluspol und trennen sich der Größe nach auf, sodass sich im Gel Banden bilden.

3.4 Ergebnis

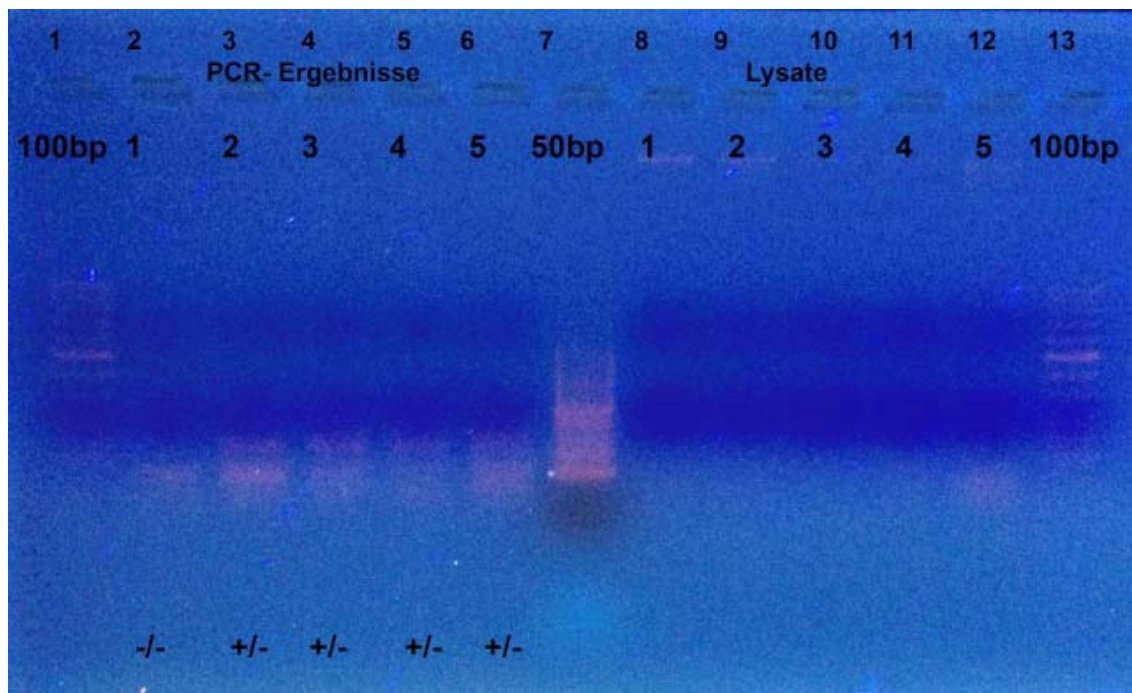


Abb. 4: Fragmentmuster der unterschiedlichen Genotypen des PV92 Fragments; 2%-iges Agarosegel, angefärbt mit Ethidiumbromid, mit UV- Licht angeregt; Spur 2-6: PCR-Ergebnisse der genomischen DNA, Spur 8-12 Lysate von 5 Probanden

An den Ergebnissen ist zu erkennen, dass alle Durchführungsschritte funktioniert haben. Die Banden in der Gelelektrophorese der Ergebnisse der Lysate zeigen, dass

in allen Proben ausreichend DNA vorhanden war. An den Banden der PCR-Ergebnissen ist folgendes zu erkennen:

Bei Person 1 hat sich nur eine Bande ausgebildet, bei den Personen 2,3,4 und 5 jeweils 2 Banden. Dies lässt sich wie folgt erklären: Jeder Mensch besitzt einen doppelten Chromosomensatz. Das PV92 Fragment liegt also doppelt und kann in den Allelen unterschiedlich ausgebildet sein. Das bedeutet, dass die PV92 Fragmente auf den Allelen unterschiedliche Längen haben und sich deshalb bei der Gelelektrophorese unterschiedlich verhalten. Das längere Fragment (+) hat etwa eine Länge von 443 bp und wandert deshalb in der Gelelektrophorese nicht so weit wie das kürzere Fragment (-), das etwa eine Länge von 129 bp hat (INSTITUT FÜR UMWELTWISSENSCHAFTEN 2010, o.S. (online)) (COMAS u.a. 2000, o.S. (online)). Da Person 1 nur eine Bande besitzt, sind beide Allele gleich und damit der Locus PV92 homozygot. Bei den Personen zwei bis fünf sind zwei Banden zu erkennen, d.h. die Fragmentlängen der Allele sind unterschiedlich und damit der Locus PV92 heterozygot.

Wenn man den Versuch durch die Untersuchung von weiteren DNA-Abschnitten erweitern würde, würde sich das DNA-Profil jeder einzelnen Person verfeinern und die Personen würden sich weiter voneinander unterscheiden. Dies sollte möglich sein, da es vom PV92- Fragment zahlreiche polymorphe Loci gibt.

3.5 Diskussion

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Nachweis des PV92 Fragments in der menschlichen DNA möglich ist und darüber eine Aussage getroffen werden kann, ob das untersuchte PV92 Fragment bei einer Person homozygot oder heterozygot ist. Damit ist eine Personifikation mittels Amplifikation des PV92 Fragments prinzipiell möglich. Über die genaue Länge des Fragments kann aber keine Aussage getroffen werden, da das Agarosegel nur eine Bestimmung bis auf 50bp zulässt. Außerdem kann durch ein nicht steriles Umfeld bei der DNA- Extraktion fremde DNA in das Gefäß gelangen, wodurch Kontaminationen entstehen. Dadurch kann das Ergebnis ungenau und verfälscht werden.

4. Ist eine DNA-Typisierung auf Grundlage des PV92 Fragments als Vortest sinnvoll, um den Personenkreis der Tatverdächtigen einzugrenzen?

Nach der Auseinandersetzung mit der kriminalistischen Methode der DNA-Profil-Erstellung und dem Schülerversuch, stellt sich die Frage inwieweit man die Versuchsmethode in eine Täterüberführung integrieren kann.

In dem Schülerversuch wird nur ein Merkmal der DNA untersucht. Es kann als homozygot oder heterozygot erkannt werden. Über dieses „kleine DNA-Profil“ lässt sich ein Personenkreis in zwei Gruppen differenzieren, da ein Merkmal immer hetero- oder homozygot vorhanden ist. Würde man dies mit einem Täterprofil, das am Tatort gesichert wurde, vergleichen, würden bereits jetzt viele Personen als Täter ausscheiden. Das Verfahren ist kostengünstig. Die Untersuchung eines PV92 Fragments kostet ca. 1,50€, dagegen die Erstellung eines kompletten DNA-Profiles 89€. Außerdem ist die Untersuchung eines PV92 Fragments unter vergleichbar einfachen Bedingungen durchzuführen. Würde man bei einer Tätersuche zum Beispiel einen Massentest benötigen könnte man hierüber bereits einen großen Personenkreis ausschließen. Dadurch würde der Aufwand der kriminalistischen Methode verringert, der Täter könnte unter Umständen früher gefunden werden und man würde Kosten sparen. Für eine solche Tätersuche könnte also ein „Vortest“ in Form des Schülerversuchs sinnvoll sein. Durch die Untersuchung weiterer PV92 Fragmente kann der Personenkreis immer weiter eingeschränkt werden. Wenn ein überschaubarer Personenkreis vorliegt, ist die weitere Vorgehensweise der kriminalistischen DNA-Typisierung sinnvoll. Hier können bis zu 16 Merkmale einer Person gleichzeitig untersucht werden. Es wird ein genaueres Bild der DNA erstellt und es kann dann in allen Merkmalen dem Täterprofil gegenübergestellt werden. Damit kann mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Täter überführt werden.

Abschließend lässt sich feststellen, dass der Schülerversuch zur Eingrenzung einer tatverdächtigen Personengruppe durchaus als „Vortest“ vorstellbar ist. Zur sicheren Täterüberführung ist er jedoch nicht aussagekräftig genug. Hier kann nur die kriminalistische DNA-Typisierung ein sicheres Ergebnis bringen.

5. Glossar

Agarosegelelektrophorese: Art einer Elektrophorese, die dazu verwendet wird DNA-Fragmente größenspezifisch aufzutrennen

Allel: Eine von zwei möglichen Ausprägungen eines Gens

Amplifikation: Vervielfältigung von Genen

DNA-Template: Die einzelsträngige oder doppelsträngige DNA

Elektropherogramm: Die grafische Darstellung der Elektrophorese-Ergebnisse.

Elution: Das Ablösen eines Moleküls von einer Chromatographiesäule (z.B. Silicamembran)

Extraktion: Das Herauslösen eines Stoffes aus einem Gemisch (z.B. DNA aus dem Zellkern)

Heterozygotie: Die Allele für ein Merkmal sind verschieden

Homozygotie: Beide Allele für ein Merkmal sind identisch

Inhibitor: Ein Hemmstoff

Kapillarelektrophorese: Spezielle Methode der Elektrophorese, anstelle des Gels wandern die Ionen durch eine Kapillare

PCR: Polymerasekettenreaktion, Methode zur exponentiellen Amplifikation von DNA-Fragmenten

Proteinase K: Ein Enzym, das Proteine zerstört

PV92: Ein polymorphes Alu Element des menschlichen Genoms.

Selektionsneutral: Aus der Evolution ausgeschlossen

STRs: Eine sich tandemartig wiederholende Einheit auf der DNA

Oligonukleotid: Ein kurzes einzelsträngiges DNA-Molekül

6. Literatur-und Quellenverzeichnis

Brown Terry A. (³2007): Genome und Gene Lehrbuch der molekularen Genetik, Spektrum Akademischer Verlag, Berlin Heidelberg, S.43,59,75

Comas David, Plaza Stéphanie, Calafell Francesc, Sajantila Antti, Bertranpetit Jaume (2000): Recent Insertion of an Alu Element Within a Polymorphic Human-Specific Alu Insertion, www.Mbe.oxfordjournals.org, 29.10.13, o.S (online)

Courts Cornelius (2013) a: PCR-Techniken in der forensischen Molekularbiologie, www.scienceblogs.de, 25.11.13, o.S (online)

Courts Cornelius (2013) b: Forensische Genetik - Spurenkunde, www.scienceblogs.de, 25.11.13, o.S (online)

Courts Cornelius (2013) c: Forensische Genetik - DNA-Extraktion, www.scienceblogs.de, 25.11.13, o.S (online)

Courts Cornelius (2013) d: Forensische Genetik - Short Tandem Repeats und DNA-Profile, www.scienceblogs.de, 25.11.13, o.S (online)

Courts Cornelius (2013) e: Forensische Genetik - Multiplex-STR-PCR und Kapillarelektrophorese, www.scienceblogs.de, 25.11.13, o.S (online)

Graw Jochen (⁵2010): Genetik, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, S.89

Knapp Michael, Finstermeier Knut, Horn Susanne, Stiller Mathias, Hofreiter Michael (2010): Neue PCR-Technologien für alte DNA, www.biospektrum.de, 28.11.13, o.S (online)

Poetsch Micaela (o.J.): Forensische Genetik (.ppt), www.uk-essen.de, 28.11.13, Folie 13, 18

Puers Christoph (2003): DNA-Analyse in der Kriminaltechnik, www.uni-tuebingen.de, 28.11.13, o.S (online)

Verfasser nicht angegeben (o.J.), Isolation von forensischen Proben, www.dna-planet.de, 26.11.13, o.S (online)

Institut für Umweltwissenschaften (2010): Skript zur Lehrveranstaltung Populationsgenetik/ Molekulare Ökologie SS 2010, www.uni-landau.de, 8.12.13, o.S (online)

7. Bildnachweis

Abb.1: <http://scienceblogs.de/bloodnacid/files/2012/06/23679-02.jpg>

Abb.2: <http://www.dcwv.at/Bilder/electropherogramm.gif>

Abb.5: <http://scienceblogs.de/bloodnacid/2011/03/24/forensische-genetik-spurenkunde/>

Abb.6:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4a/Polymerasekettenreaktion.svg/840px-Polymerasekettenreaktion.svg.png>

Abb.7: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrcopies.gif>

Abb.8: <http://de.wikipedia.org/wiki/Agarose>

8. Anhang

A: Sicherungsmethoden von verschiedenen Spuren

Spurenart	Zustand der Spur	Sicherungsmethoden
Blut	trocken	Bakteriette*
		Ausschnitt (z.B. aus Kleidung)
		Abgekratzten/-schaben
		Abheben (z.B. mit Klebeband)
	kompletten Gegenstand asservieren	
feucht	Bakteriette	
	FTA Papier [§]	
Vergleichsprobe	Blutabnahme (z.B. bei Tatverdächtigen)	
Sperma	trocken oder feucht	s. bei Blut
	Kondom	kompletten Gegenstand asservieren
	versch. Zustände	Sexualdelikt-Kit [§]
Vaginalsekret (Opfer)	trocken oder feucht	s. bei Blut; oft an Tatverdächtigen asserviert
Speichel	trocken oder feucht	s. bei Blut; oft an Bisswunden
	Vergleichsprobe	Abrieb (Mundschleimhaut) Filterpapier
Haare	Kopf- und Schamhaare	Abheben (z.B. mit Klebeband)
		Transfer (mit Pinzette)
		Sauger (nicht zu empfehlen)
Fingernägel, Kratzspur	versch. Zustände	Abgeknipst
		Kratzspur
Knochen	versch. Zustände	In Behälter einfrieren
Zähne	versch. Zustände	Behälter
Gewebe, Organe	feucht	verschiedene

Abb. 5: Sicherungsmethoden von verschiedenen Spuren³

B: Methode der PCR

Die PCR (polymerase chain reaction) dient der exponentiellen Amplifikation eines DNA-Abschnitts. Die Reaktion findet in einem Reaktionsgefäß statt. Es werden nicht zwangsläufig lebende Zellen benötigt, da die Vervielfältigung nicht von der Zelle selbst durchgeführt wird, sondern von thermostabilen DNA-Polymerasen, den sogenannten Taq-Polymerasen, die aus dem in heißen Quellen lebenden Bakterium „*Thermus aquaticus*“ isoliert wurde und deshalb ein hohes Temperaturoptimum (72°C) besitzt. Neben diesen Polymerasen werden für die PCR außerdem die zwei spezifischen Oligonukleotidprimer, deren Anheftungsstellen bekannt sein müssen, um sie entsprechend synthetisieren zu können, und alle vier Desoxynukleotidtriphosphate, die als freie Basen vorliegen, um sich an den Einzelstrang zu binden und so eine Amplifikation zu ermöglichen, benötigt.

³ <http://scienceblogs.de/bloodnacid/2011/03/24/forensische-genetik-spurenkunde/>

Für die PCR werden sogenannte Thermocycler verwendet. Dies sind Geräte, die Versuchsbedingungen, wie die Temperatur in jedem Reaktionsabschnitt oder die Dauer dieser Abschnitte, automatisch steuern können. Die Reaktion einer PCR besteht aus einem Zyklus der mehrere Male wiederholt wird. Dieser Zyklus besteht aus 3 Phasen: In der ersten Phase findet die Denaturierung der DNA statt. Dazu wird das Reaktionsgemisch auf 94°C erhitzt, damit sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Einzelsträngen lösen. Nun wird die Temperatur auf 50-60°C reduziert und die synthetischen Primer binden an das 3'-Ende der beiden Matrizen. Dieser Vorgang wird als Hybridisierung bezeichnet. Nachdem die Temperatur nun wieder auf 72°C, was dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase entspricht, angehoben wurde, beginnt sich die Polymerase an die Primer zu binden und den Komplementärstrang zu synthetisieren (Elongation).

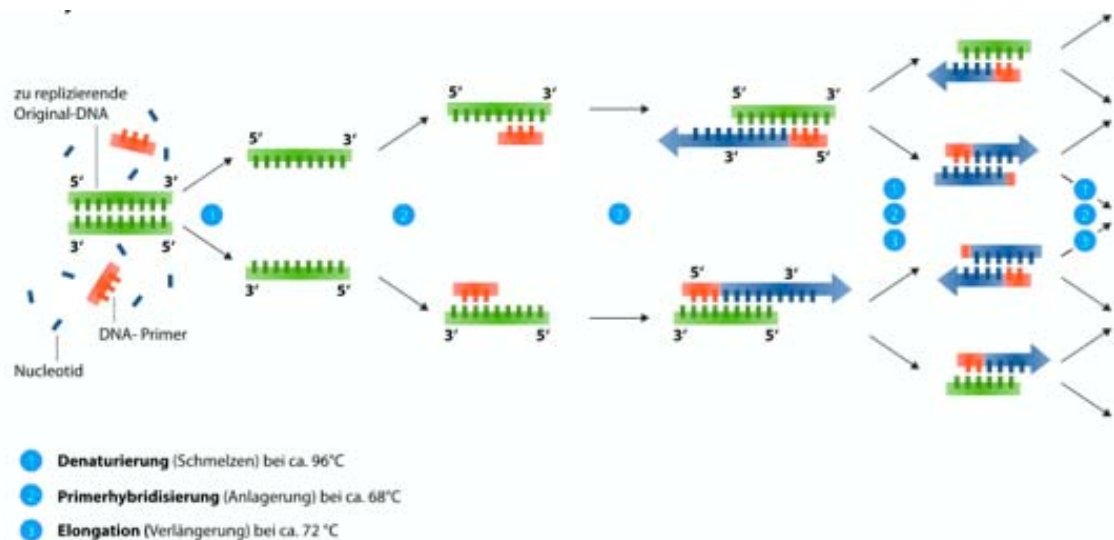


Abb. 6: Die drei Phasen eines PCR-Zyklus ⁴

4

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4a/Polymerasekettenreaktion.svg/840px-Polymerasekettenreaktion.svg.png>

In den nun folgenden Zyklen steigt die Zahl der PCR-Produkte exponentiell an.

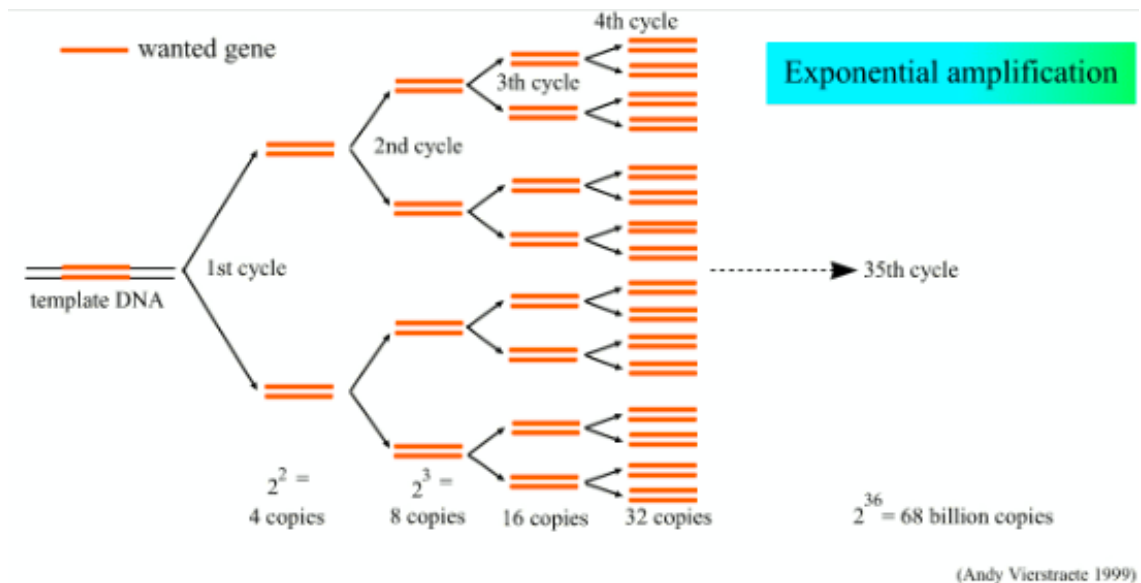


Abb. 7: Die exponentielle Amplifikation des DNA-Fragments ⁵

Die PCR-Produkte können durch verschiedene Verfahren sichtbar gemacht werden. Eine der geläufigsten Verfahren ist die Agarosegelelektrophorese.

Die Methode der PCR hat sowohl Vorteile, als auch Nachteile:

Für die PCR müssen die zu amplifizierenden Bereiche auf der DNA bereits bekannt sein, damit die spezifischen Primer verwendet werden können. Dies führt dazu, dass Bereiche im Genom, die noch nie untersucht wurden, nicht mit Hilfe einer PCR vervielfältigt werden können. Außerdem kann eine PCR nur DNA-Fragmente bis zu einer Größe von ca. 40kb vervielfältigen. Ab einer Größe von über 100kb ist eine Amplifikation des Bereichs unmöglich. Ein Vorteil der PCR ist, dass sie ein sehr einfaches Verfahren ist, da sie wenig fehleranfällig ist. Außerdem ist sie in der Molekularbiologie vielseitig einsetzbar, z.B für die Größenbestimmung verschiedener DNA-Fragmente mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese oder zur Erstellung eines DNA-Profiles mit Hilfe der Kapillarelektrophorese (BROWN 2007, S.59) (GRAW 2010, S.89).

C: Methode der Agarosegelelektrophorese

Die Methode der Gelelektrophorese dient der Trennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Länge. Im weitesten Sinne bedeutet „Elektrophorese“ die Bewegung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Die Eigenschaft der DNA aufgrund ihrer

⁵ <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrcopies.gif>

Phosphatreste negativ geladen zu sein, wird sich bei der Gelelektrophorese zu Nutze gemacht, um die Länge der verschiedenen DNA-Fragmente zu bestimmen:

Für die DNA-Trennung werden Agarosegele verwendet. Sie wirken wie ein Molekularsieb, da die Agarosegele aus vielen Poren bestehen, durch die die DNA-Fragmente wandern müssen. Dabei können kürzere Fragmente schneller in Richtung Anode wandern als größere Fragmente. In Abhängigkeit von der Agarosekonzentration im Gel steht die Größe der Poren. Daraus lässt sich schließen, dass Agarosegele mit hoher Konzentration kleinere Poren besitzen und so zur Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente dienen. Deshalb muss die Länge der DNA-Fragmente vorher ungefähr bekannt sein, um eine erfolgreiche Agarosegelelektrophorese durchführen zu können.

Agarose-Konzentration	Auftrennungsbereich in bp
0,5	1000-30000
0,7	800-12000
1,0	500-10000
1,2	400-7000
1,4	200-4000
2,0	50-2000

Abb. 8: Die Abbildung zeigt, wie die Konzentration der Agarose im Gel in Abhängigkeit zur Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente steht ⁶

Die Gele sind eine Lösung von Agarosepulver in einer Pufferlösung, wobei die Agarose durch Erhitzen gelöst wird. Das fertige Gel wird in eine Form aus Acrylglas gegeben, nachdem zuvor ein Kamm in diese Form gesteckt wurde, um die Probetaschen zu formen. Wenn das Agarosegel hart geworden ist, wird die Form in die Elektrophoresekammer gesetzt, in der dann ein elektrisches Feld erzeugt wird, indem beide Seiten der Elektrophoresekammer entweder an den Plus-/ oder Minuspol angeschlossen werden. Die Probetaschen, in die dann die PCR-Produkte, die mit einem Laufpuffer angefärbt wurden, und die Marker gegeben werden, befinden sich im Agarosegel auf der Seite des Minuspols. Die Marker dienen sozusagen als Längenmaß, damit hinterher die Größe der DNA-Fragmente an den Banden im Gel abgelesen werden kann. Nach einiger Zeit wird der Stromfluss zwischen den Polen gestoppt und das Gel wird aus der Form genommen. Die DNA-Fragmente werden erst

⁶ <http://de.wikipedia.org/wiki/Agarose>

sichtbar, nachdem das Gel nach der Elektrophorese in Ethidiumbromid getaucht und dann mit UV-Licht bestrahlt wird.

Auf diesem Gel sind dann neben den Banden der DNA-Fragmente, die Banden der Marker zu erkennen, welche ablesen lassen aus wie vielen Basenpaaren die DNA in den Banden besteht (BROWN 2007, S.43).

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.

Ort, Datum

Unterschrift