

Eine forensische Methode zur Einzelzelluntersuchung mit Sequenzierung des D-Loops
der mtDNA

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Verena Thias, geb. Pipper
aus Siegen

Gießen 2008

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
des Fachbereichs Medizin der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Gießen
Leiter/Direktor: Prof. Dr. Dr. R. Dettmeyer

Gutachter: PD Dr. M. A. Verhoff
Gutachter: Prof. Dr. D. Nolte

Tag der Disputation: 19.01.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
1.1 Forensische DNA-Analyse	1
1.1.1 Verfahren zur forensischen DNA-Untersuchung	1
1.1.2 Bedeutung der mtDNA für die forensische DNA-Analyse	1
1.1.3 Untersuchung von Einzelzellen	2
1.2 Mitochondriale DNA	3
1.2.1 Molekularstruktur der mtDNA	3
1.2.2 mtDNA im menschlichen Körper	6
1.2.3 Heteroplasmien	6
1.2.4 Maternale Vererbung	8
1.3 Interpretation von mtDNA-Sequenzen	9
1.4 Anwendungsmöglichkeiten der Einzelzell-Untersuchungen an mtDNA . .	10
1.4.1 Identifizierung von Individuen aus minimalem Spurenmaterial . .	10
1.4.2 Differenzierung von Mischspuren	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit	11
2 Material und Methoden	13
2.1 Überblick über die Arbeitsschritte	13
2.2 Testlauf mit PVP in der Real-Time-PCR	14
2.3 Gewinnung der Einzelzellen	17
2.3.1 Probenmaterial	17
2.3.2 Single-Cell-Picking mit dem Mikromanipulator	17
2.3.2.1 Vorbereitung der Probe zum Picken	19
2.3.2.2 Herstellung der Glaspipetten	20
2.3.2.3 Mikromanipulation	21
2.3.2.4 Überführung der Zelle in das Reaktionsgefäß	23
2.4 DNA-Analyse der Einzelzellen	25
2.4.1 Lyse der Zelle im Reaktionsgefäß	25
2.4.2 Amplifizierung	27
2.4.2.1 Kontrollen	27
2.4.2.2 Amplifizierung der HV1-Region	28
2.4.2.3 Amplifizierung der HV2-Region	29
2.4.2.4 Koamplifizierung der HV1- und HV2-Region	30
2.4.3 DNA-Quantifizierung mittels Agarosegelelektrophorese	32

INHALTSVERZEICHNIS

2.4.4	Aufreinigung	33
2.4.5	Sequenzierungsreaktion	34
2.4.6	Ethanol-fällung	36
2.4.7	Kapillarelektrophorese	37
2.5	mtDNA-Sequenzierung der Testpersonen	38
2.5.1	<i>IQ</i> [®] -Extraktion	38
2.5.2	Amplifizierung	40
2.6	Einzelzellen von einer Zigarettenkippe	40
2.7	Analyse von Mischspuren	41
2.8	Analyse von Spermien	41
2.9	Alternative Einzelzellgewinnung	42
3	Ergebnisse	44
3.1	Vergleichs-Sequenzen der Testpersonen	44
3.2	Testlauf mit PVP in der Real-Time-PCR	47
3.3	Ergebnisse der Amplifizierung der HV1-Region	47
3.3.1	Zellen ohne Lysereaktion	47
3.3.2	Zellen mit Lysereaktion	48
3.4	Ergebnisse der Amplifizierung der HV2-Region	49
3.5	Ergebnisse der Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region	50
3.5.1	Ergebnisse bei den Testpersonen	50
3.5.2	Unterschiedliche Ansätze bei der Lyse-Reaktion	51
3.5.3	Ergebnisse mit der endgültigen Methode	53
3.6	Versuch mit Zigarettenkippe	54
3.7	Versuch mit Mischspur	55
3.8	Versuch mit Spermien	57
3.9	Heteroplasmien	57
3.10	Alternative Einzelzellgewinnung	59
4	Diskussion	60
4.1	Interpretation von Sequenzen	60
4.1.1	Identitätswahrscheinlichkeiten	60
4.1.2	Heteroplasmien	61
4.1.3	Maternaler Vererbungsmodus	63
4.2	Qualität und Verwendbarkeit der erhaltenen Sequenzen	64
4.3	Beiträge zur Verbesserung der Methodik	66
4.3.1	Verbesserung des Single-Cell-Pickings mit dem Mikromanipulator	66
4.3.2	Lysereaktion	68
4.3.3	Koamplifizierung	70
4.4	Weiterführende Versuche	72
4.4.1	Versuch mit Zigarettenkippe	72
4.4.2	Versuch mit Mischspur	73
4.4.3	Versuch mit Spermien	74
4.5	Kritische Bewertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit	75

INHALTSVERZEICHNIS

4.6	Erklärungsmöglichkeiten für die Ausfallquote	78
4.7	Ausblick	80
4.7.1	Alternative Zellpräparation	80
4.7.2	Verwendung eines <i>AmpliGrid</i> [™] -Systems	81
5	Zusammenfassung	83
6	Abstract	85
	Literaturverzeichnis	87
	Tabellenanhang	101
6.1	Tabellen HV1-Region	102
6.2	Tabellen HV2-Region	106
6.3	Tabellen Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region	108
6.4	Tabelle Versuch mit Zigarettenkippe	118
6.5	Tabellen Versuche mit Mischspur	118
6.6	Tabelle Versuch mit Spermien	120
	Erklärung	121
	Lebenslauf	122
	Danksagung	123

1 Einleitung

1.1 Forensische DNA-Analyse

1.1.1 Verfahren zur forensischen DNA-Untersuchung

Die Untersuchung von Spurenmaterial auf DNA zur Identifizierung des Spurenverursachers ist ein fester Bestandteil der forensischen Fallarbeit geworden. Die Art der DNA-Analyse ist dabei abhängig von Qualität und Quantität der zur Verfügung stehenden DNA-Probe. Das heutzutage übliche Verfahren der Typisierung ist die Amplifizierung von sogenannten Short Tandem Repeats (STRs). Es handelt sich dabei um bestimmte Abschnitte der Kern-DNA (ncDNA), die sich wiederholende Nukleotidabfolgen aufweisen und aufgrund ihrer individuell unterschiedlichen Anzahl an Wiederholungen hervorragend zur Identifizierung geeignet sind (Brinkmann, 2004; Butler, 2007).

Bei degradiertem Spurenmaterial oder geringer DNA-Menge bleibt die STR-Analyse jedoch häufig erfolglos. In solchen Fällen hat sich in der forensischen DNA-Analyse die Sequenzierung der hypervariablen Regionen der mitochondrialen DNA (mtDNA) etabliert (Morley et al., 1999; Sullivan et al., 1991). Die mtDNA-Analyse kann auch eine STR-Analyse ergänzen, wenn diese nicht ausreichend valide ist (Szibor et al., 2006; Röper et al., 2007).

1.1.2 Bedeutung der mtDNA für die forensische DNA-Analyse

Ein Vorteil der mtDNA gegenüber ncDNA liegt in der hohen Kopienzahl pro Zelle (vgl. Kap. 1.2.2), wodurch die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Amplifizierung erhöht

wird (Lutz-Bonengel et al., 2007). Weiterhin weist die mitochondriale DNA eine hohe Stabilität auf und besitzt damit Vorteile bei der Identifizierung von Spurenmaterial in degradiertem Zustand, wie vor allem bei Knochen und Haaren (Holland et al., 1993; Bender et al., 2000; Melton et al., 2005; Foran, 2006). Aufgrund ihrer Widerstandsfähigkeit lässt sich mtDNA auch aus lange gelagerten und bakteriellen oder chemischen Einflüssen ausgesetzten Zellen, beispielsweise aus Urinproben, amplifizieren (Castella et al., 2006).

1.1.3 Untersuchung von Einzelzellen

In der forensischen DNA-Analytik müssen Individuen häufig anhand schlecht erhaltenen oder nur in minimalen Mengen vorliegenden Spurenmaterials identifiziert werden (Hopwood et al., 1996; Bright und Petricevic, 2004). Es ist vorstellbar, dass vom Täter nur eine einzelne Zelle hinterlassen wurde, die für eine Typisierung zur Verfügung steht.

DNA-Analysen aus Einzelzellen sind in der Literatur vereinzelt beschrieben worden. Dabei handelt es sich meist um Amplifizierungen von kodierenden Abschnitten der ncDNA, beispielsweise aus Tumorzellen (Klein et al., 2002) oder Lymphozyten (Ray et al., 2001). Im Rahmen noninvasiver Pränataldiagnostik wurde die DNA einzelner kernhaltiger Erythrozyten untersucht (von Eggeling et al., 1997; Garvin et al., 1998). Auch kodierende Abschnitte der mtDNA aus Einzelzellen, meist aus Zellkulturen oder Muskulatur gewonnen, wurden erfolgreich untersucht (He et al., 2002; Nekhaeva et al., 2002; Taylor et al., 2001). Die Analyse von informationstragenden Teilen des menschlichen Genoms besitzt jedoch aus forensischer Sicht keine Aussagekraft, da sie keine individuelle Typisierung ermöglicht und eine Kontaminationskontrolle fehlt.

Eine für die Identifizierung von Individuen geeignete STR-Analyse wurde von Henderson et al. (2001) für einzelne Korneazellen beschrieben. Allerdings fehlen Angaben über verwendete Reagenzien oder PCR-Protokolle, so dass keine Möglichkeit der Reproduzierbarkeit gegeben ist. Es wird lediglich erläutert, dass die Isolierung der Zellen schwierig war und hohe Kontaminationsraten zu beobachten waren. Eine Untersuchung von STRs an Einzelzellen wurde erstmals von Findlay et al. (1995) beschrieben. Die Gewinnung der Einzelzellen ist jedoch zweifelhaft und die Arbeit entstand ohne forensischen Bezug. Im

darauf folgenden Jahr publizierte Findlay erneut über eine Einzelzelluntersuchung unter Verwendung von STR-Typisierungen zur Kontaminationskontrolle, allerdings finden sich hier keine Angaben zur Methodik der Zellpräparation (Findlay und Quirke, 1996). In einer weiteren Veröffentlichung des Autors wird von einer erfolgreichen Amplifizierung von 6 STR-Systemen an etwa der Hälfte der 226 getesteten Einzelzellen aus Wangenschleimhautepithel berichtet (Findlay et al., 1997). Findlay verweist auf die Anwendbarkeit seiner Methode in der Forensik, allerdings fehlen in dieser Publikation detaillierte Informationen bzgl. des Protokolls zur DNA-Analytik sowie konkrete Angaben über die Präparation der Einzelzellen (vgl. Kap. 4.5).

1.2 Mitochondriale DNA

1.2.1 Molekularstruktur der mtDNA

Die mitochondriale DNA ist ein ringförmiges Molekül mit einer Länge von 16.569 Basenpaaren, wie erstmals von Anderson et al. (1981) beschrieben (siehe Abbildung 1.2). Sie setzt sich aus einer schweren (H-Strang) und einer leichten Kette (L-Strang) zusammen (Tully et al., 2001) und enthält kodierende Abschnitte für eine 12S und eine 16S rRNA, 22 tRNAs und 13 Proteine der Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe (Cytochrom-Oxidase-b und -c, NADH-Dehydrogenase und ATPase).

Die mtDNA trägt außerdem nicht-kodierende Regionen, die unter anderem in der forensischen DNA-Analyse genutzt werden (Sano et al., 2000; Ginther et al., 1992). Die größte Bedeutung hat dabei der 1122 Basenpaare umfassende sogenannte D-Loop (displacement-loop, siehe Abbildung 1.1), auch als Kontrollregion bezeichnet, da dieser Bereich eine sehr hohe Mutationsfrequenz aufweist und daher für die Unterscheidung von Individuen geeignet ist (Horai und Hayasaka, 1990; Holland et al., 1993; Murakami et al., 2002). Der D-Loop besitzt laut Morley et al. (1999) eine fünf- bis zehnmal höhere Mutationsfrequenz als Kern-DNA. Er verfügt als Besonderheit über eine dreisträngige Struktur mit einem zusätzlich synthetisierten Abschnitt des H-Stranges von etwa 680 Basenpaaren, bezeichnet als 7S-DNA (Annex und Williams, 1990). Trotz fehlender kodierender

1 Einleitung

Funktion enthält der D-Loop L- und H-Strang-Promoter, Bindungsstellen für mitochondriale Transkriptions-Faktoren, den Ursprung der H-Strang-Replikation, regulatorische Elemente für die Transkription sowie die Terminationssequenz (Crews et al., 1979; Tully et al., 2001). Die größte Sequenzvariabilität ist in zwei je etwa 300 Basenpaaren langen hypervariablen Segmenten, der HV1- und der HV2-Region, vorhanden (Stoneking et al., 1991; Budowle et al., 1999). Der Bereich der HV1-Region liegt zwischen den Positionen 16024 und 16365, die HV2-Region erstreckt sich von 73 bis 340. Darüber hinaus existiert zwischen 438 und 574 die HV3-Region (Lutz et al., 1997), die bei nicht ausreichender Aussagekraft der beiden anderen Regionen zur weiteren Differenzierung genutzt werden kann (Lutz et al., 2000). Die 1981 ermittelte und heute als Standard eingesetzte Sequenz der hypervariablen Region wird nach Ihrem Erstbeschreiber „Anderson-Sequenz“ genannt. An einigen Stellen der Literatur wird auch der Name „Cambridge Reference Sequence“ verwendet, da Anderson seine Versuche an der Universität von Cambridge durchführte (Andrews et al., 1999).

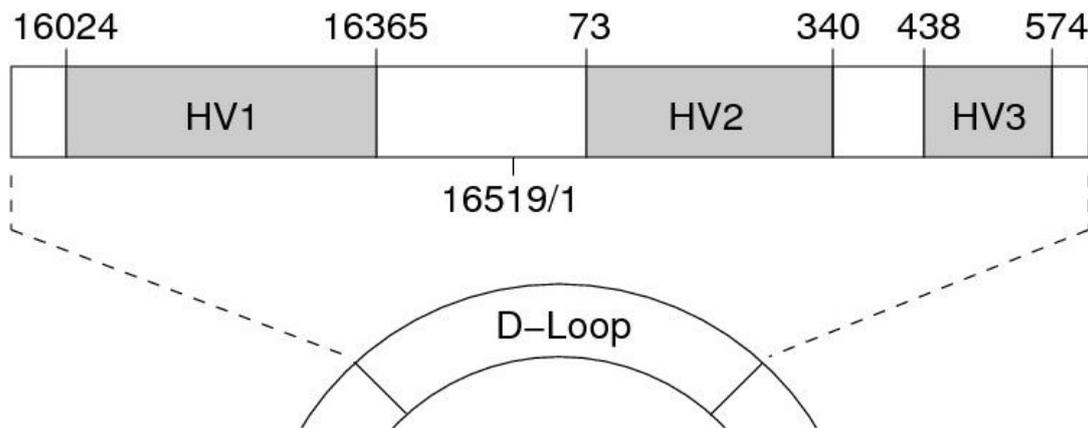


Abbildung 1.1: D-Loop

1 Einleitung

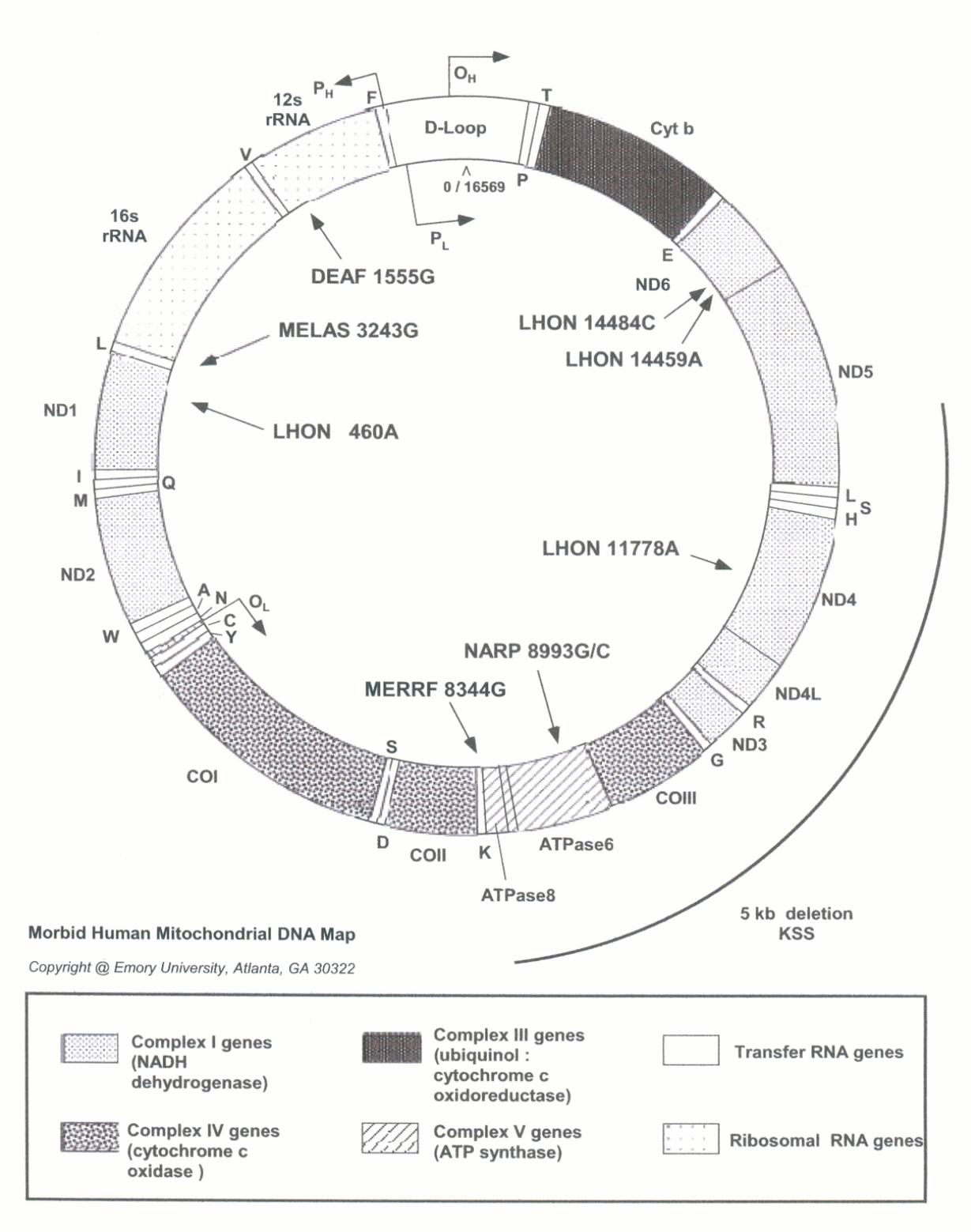


Abbildung 1.2: mtDNA-Molekül

1.2.2 mtDNA im menschlichen Körper

Die Anzahl von mtDNA-Molekülen in einer Zelle unterscheidet sich in verschiedenen Gewebetypen. Dieser Aspekt ist für die Einzelzellanalyse von besonderer Bedeutung, da die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Sequenzierung mit der Zahl der zur Verfügung stehenden mtDNA-Moleküle zunehmen dürfte. Die Angaben in der Literatur reichen von wenigen 100 Kopien in Spermien (Bender et al., 2000) über 800 in Lungenfibroblasten (Malik et al., 2002) bis hin zu 6000 in Hautfibroblasten (Reis und Goldstein, 1983). Für die in dieser Arbeit vorwiegend verwendeten Epithelzellen werden etwa 5000 Moleküle pro Zelle beschrieben (Bender et al., 2000).

In der Studie von Lutz-Bonengel et al. (2007) konnte mittels einer sogenannten Low-volume-PCR gezeigt werden, dass bereits 2,5 pg ncDNA-Verdünnung und weniger für eine erfolgreiche Amplifizierung und Sequenzierung ausreichen. Diese Menge entspricht in etwa 320 mitochondrialen Genomen und liegt damit deutlich unter der von Bender et al. (2000) beschriebenen Anzahl von mtDNA-Kopien in einer Epithelzelle, so dass eine solche Einzelzelle theoretisch für eine mtDNA-Analyse ausreichen sollte.

1.2.3 Heteroplasmien

Heteroplasmien sind ein bei mtDNA sehr häufig auftretendes Phänomen, das bei der Interpretation von mtDNA-Sequenzen Schwierigkeiten bereiten und zu Fehleinschätzungen führen kann (Bär et al., 2000; Bendall et al., 1996). Eine Heteroplasmie liegt vor, wenn sich mehrere nebeneinander existierende mtDNA-Moleküle an einer Basenposition unterscheiden (Hühne et al., 1999). Diese unterschiedlichen mtDNA-Moleküle können in verschiedenen Gewebetypen eines Individuums, in verschiedenen Zellen eines Gewebetyps, in Mitochondrien einer Zelle oder sogar innerhalb eines Mitochondriums vorkommen (Kramer et al., 2003; Matthews et al., 1994). Die Häufigkeit von Heteroplasmien differiert dabei in verschiedenen Organen (Jazin et al., 1996; Kramer et al., 2003).

Bei der Auswertung von mtDNA-Sequenzen können an einer Basenposition verschiedene Basen parallel detektiert werden, wenn mehrere Zellen mit unterschiedlicher Ba-

1 Einleitung

senabfolge in der Probe vorlagen. Bei der Untersuchung von Einzelzellen würden bei einer Heteroplasmie innerhalb der Mitochondrien dieser Zelle mindestens zwei Sequenzen parallel vorliegen, die sich ebenfalls wie oben beschrieben an einer Basenposition unterscheiden. Heteroplasmien zwischen mehreren Einzelzellen würden bei der Analyse auffallen, wenn die Sequenz einer Zelle im Vergleich zu den anderen um eine Base abweichen würde.

Neben dem Austausch einer einzelnen Base (Punktheteroplasmie) ist die Längenheteroplasmie, bei der es sich um eine Insertion oder Deletion von Basen handelt, sehr verbreitet. Am häufigsten ist die Längenheteroplasmie des C-Stretches, eines homopolymeren Bereichs zwischen 16183 und 16194 in der HV1-Region und zwischen 304 und 310 in der HV2-Region (Tully et al., 2001). Im Falle einer Transition von T (Thymin) nach C (Cytosin) an der Position 16189 tritt häufig eine Längenheteroplasmie auf (Bär et al., 2000). Szibor et al. (2007) beschreiben als weitere, interpersonelle Längenheteroplasmie eine $(CA)_n$ (Cytosin, Adenin) Dinukleotid-Wiederholung zwischen den Positionen 514 und 523 in der HV3-Region, die in einigen Fällen zur Typisierung geeignet ist.

Sowohl Punkt- als auch Längenheteroplasmien verursachen im Allgemeinen Probleme bei der Interpretation von Sequenzen für forensische Fragestellungen (Salas et al., 2001). So sind beispielsweise unterschiedliche Längenheteroplasmien der HV2-Region in verschiedenen Haaren eines Individuums beschrieben worden (Stewart et al., 2001), die für eine eindeutige Personen-Identifizierung nicht geeignet sind. Unterscheiden sich zwei Sequenzen in nur einer Base, kann nicht festgestellt werden, ob es sich dabei um eine Punktheteroplasmie handelt oder eine Neumutation vorliegt, so dass eine Übereinstimmung der beiden Proben nicht sicher ist (Bär et al., 2000). Heteroplasmien können jedoch auch vorteilhaft bei der Typisierung sein, wenn zwei zu vergleichende Proben an einer Stelle die gleiche Heteroplasmie aufweisen, da sich dadurch die Identitätswahrscheinlichkeit erhöht (Bär et al., 2000). Lutz et al. (1996) stellen einen Fall dar, in dem eine Heteroplasmie aufgrund einer Neumutation bei der Vererbung auf die nachfolgende Generation entstanden ist, wodurch es möglich wird, in maternaler Linie verwandte Personen zu differenzieren (vgl. Kap. 1.2.4). Weiterhin können die Längenheteroplasmien in

der HV3-Region genutzt werden, um bei in der Bevölkerung sehr häufig vorkommenden Abweichungen in HV1- und HV2-Region zusätzliche Informationen zu gewinnen (Chung et al., 2005).

Neben ihrer Bedeutung für die Forensik stehen Heteroplasmien auch im Zusammenhang mit bestimmten mitochondrial vererbten neuromuskulären oder Stoffwechsel-Erkrankungen des Menschen (Sukernik et al., 2002; Wallace et al., 1992; Marchington et al., 1996).

1.2.4 Maternale Vererbung

Eine weitere Besonderheit der mtDNA besteht in der rein maternalen Vererbung, wie von Hutchison et al. (1974) erstmals beschrieben und später durch Giles et al. (1980) erneut gezeigt. Dieses Phänomen wird dadurch begründet, dass sich die Mitochondrien lediglich im Hals eines Spermiums befinden und bei der Befruchtung nicht mit in die Eizelle gelangen. Somit stammt die mtDNA des Kindes vollständig von der Mutter. Durch Manfredi et al. (1997) wird berichtet, dass väterliche mtDNA zwar bei der Befruchtung in die Eizelle gelangt, aber durch bisher unbekannte Mechanismen wieder eliminiert wird. Aufgrund des maternalen Vererbungsmodus kann mtDNA effektiv genutzt werden, um auch über mehrere Generationen hinweg Abstammungslinien zu verfolgen (Weichhold et al., 1998; Gill et al., 1994).

In einer Falldarstellung von Schwartz und Vissing (2002) wird von einer paternalen mtDNA-Vererbung berichtet. Laut dieser Studie erbt ein 28-jähriger Mann, der an einer mitochondrialen Myopathie erkrankt war, 90% der Muskel-mtDNA von seinem Vater. Nach weiteren Untersuchungen wird davon ausgegangen, dass die paternale Vererbung von mtDNA zwar sehr selten vorkommt, aber trotzdem Einfluss auf forensische oder anthropologische mtDNA-Untersuchungen haben könnte (Schwartz und Vissing, 2004; Taylor et al., 2003).

1.3 Interpretation von mtDNA-Sequenzen

Die vollständige Sequenz der mtDNA wurde zuerst von Anderson et al. (1981) für den L-Strang beschrieben und dient seither als Referenzsequenz für die Nomenklatur der mtDNA-Analyse des D-Loops (Bär et al., 2000). Die Sequenz einer Probe, beispielsweise aus Spurenmaterial, wird mit der Anderson-Sequenz verglichen und die einzelnen Basenabweichungen werden gekennzeichnet. Sie sind relativ spezifisch (s.u.) und zur Identifizierung von Personen geeignet. Als häufigste Abweichung tritt die Transition auf, also der Austausch einer Purinbase (Adenin, Guanin) durch eine andere Purinbase bzw. einer Pyrimidinbase (Cytosin, Thymin) durch eine andere Pyrimidinbase. Der relative Anteil betrug für Kaukasoiden in einer Studie von Lutz et al. (1998) 75%, laut Budowle et al. (1999) mehr als 92,9%. Bei den Transversionen, dem Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase und umgekehrt, ist der Wechsel von Adenin und Cytosin am weitesten verbreitet. Die durchschnittliche Anzahl unterschiedlicher Nukleotide zwischen zwei Individuen ist von der Ethnie abhängig und liegt bei Kaukasoiden zwischen 7,2 und 8,4 (Budowle et al., 1999).

Stimmen zwei verglichene mtDNA-Sequenzen in ihren Abweichungen zur Anderson-Sequenz überein, ist eine Identität zunächst nicht sicher, da bestimmte Sequenzen in der Bevölkerung unterschiedlich häufig vorkommen. Um eine Identitätswahrscheinlichkeit zu berechnen, sind mtDNA-Datenbanken wie die Innsbrucker Datenbank notwendig (Parson et al., 2004; Imaizumi et al., 2002), die über eine hohe Anzahl von gespeicherten mtDNA-Sequenzen aus unterschiedlichen ethnischen Gruppen verfügt.

Je mehr Unterschiede zwischen zwei Sequenzen vorliegen, desto eher ist eine Übereinstimmung der Proben auszuschließen (Tully et al., 2001). Theoretisch wäre bereits eine einzelne Basenabweichung ein Ausschlusskriterium, doch es gilt zu bedenken, dass die hohe Mutations- und Heteroplasmierate der mtDNA diesbezüglich zu Fehleinschätzungen führen kann (vgl. Kap. 1.2.3).

1.4 Anwendungsmöglichkeiten der Einzelzell-Untersuchungen an mtDNA

1.4.1 Identifizierung von Individuen aus minimalem Spurenmaterial

Eine einzelne Zelle stellt die geringste morphologisch noch abgrenzbare Einheit dar, die der forensischen DNA-Analyse nach Präparation des Spurenmaterials zugeführt werden kann. In Fällen von minimalem Spurenmaterial könnte die erfolgreiche mtDNA-Sequenzierung aus einer Zelle eine Identifizierung ermöglichen. Bei forensischen Spuren handelt es sich überwiegend um Epithelzellen aus Hautabschilferungen und Sekreten, beispielsweise auf Zigarettenkippen (Hochmeister et al., 1991; Watanabe et al., 2003), Briefmarken (Liechti-Gallati und Neeser, 1996; Hochmeister et al., 1998), Tatwerkzeugen oder Kleidung (Bright und Petricevic, 2004). Auch Spermien könnten für eine Einzelzelluntersuchung zur Verfügung stehen, z.B. von Unterhosen oder aus Vaginalabstrichen.

Zur Gewinnung von forensischem Spurenmaterial für die DNA-Analyse wird gewöhnlich ein Abstrich entnommen und einer Lysereaktion zugeführt. Dadurch entsteht ein Verlust an DNA, die tatsächlich auf dem Spurenläger vorhanden ist. Deshalb wäre es wünschenswert, die vorliegenden Zellen direkt vom Spurenläger zu gewinnen. Mit der optischen Auflösung eines herkömmlichen Mikroskops ist dieses jedoch nicht möglich. Im Rahmen dieser Arbeit sollte mit Hilfe eines hochauflösenden Stereomikroskops versucht werden, dieses Problem zu umgehen und Einzelzellen ohne Ausstrich von verschiedenen Oberflächen zu isolieren (vgl. Kap. 2.9).

1.4.2 Differenzierung von Mischspuren

In der forensischen DNA-Analytik kommt es vor, dass das zu untersuchende Spurenmaterial von zwei oder mehr Individuen stammt und somit eine Mischspur vorliegt, beispielsweise in Vaginalabstrichen nach Vergewaltigung (Gyllensten et al., 1992), in Blutspuren nach Schlägereien oder auf von mehreren Personen genutzten Oberflächen wie Lenkrädern oder Lichtschaltern. Bei einer gewöhnlichen mtDNA-Sequenzierung ist die

Unterscheidung zwischen einer Mischspur, Kontaminationen und Heteroplasmien nicht möglich und die Sequenzen der beteiligten Personen lassen sich nicht sicher voneinander trennen (Balogh et al., 2003). Zur Auflösung von mtDNA-Mischspuren sind alternative Technologien notwendig, wie beispielsweise Klonierung (Hatsch et al., 2007; Walker et al., 2004), Real-time-PCR (Niederstätter et al., 2006), Pyrosequencing (Andréasson et al., 2006) oder Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC) (Larberge et al., 2003). Obwohl diese Ansätze die Möglichkeit aufzeigen, Mischspuren zu analysieren und durch paarweise Abgleichung einzelne Individuen zu identifizieren, sind diese Methoden zum Großteil nicht im forensischen Routinelabor durchführbar oder nicht generell anwendbar (vgl. Kap. 4.5).

Der Vorteil der in dieser Arbeit vorgestellten Methode liegt in ihrer einfachen Durchführbarkeit mit den Mitteln der Routine-DNA-Analytik. In Fällen von erfolgloser STR-Analyse und Hinweisen auf eine Mischspur in der mtDNA-Sequenzierung könnte die Einzelzelluntersuchung aus dem Spurenmaterial eine Typisierung der beteiligten Individuen liefern und somit eine sinnvolle Ergänzung zur konventionellen DNA-Analyse in der forensischen Routine darstellen. Durch die Analyse von einzelnen Zellen wären auch geringste Spurenmengen unter minimalem DNA-Verlust einer Typisierung zugänglich und das Verhältnis zwischen den Komponenten der Mischspur hätte keinen Einfluss mehr auf die Interpretation der Sequenzierungs-Ergebnisse.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die von Löw (2007) entwickelte Methode zur mtDNA-Sequenzierung an Einzelzellen weiter zu entwickeln und an einer größeren Anzahl von Proben zu testen. Basierend auf der bei Löw (2007) dargestellten Versuchsdurchführung sollten einzelne Zellen von mehreren Probanden mit Hilfe eines Mikromanipulators, wie er für die **Intracytoplasmatische Spermieninjektion** (ICSI) verwendet wird, isoliert werden. Dabei sollte die Methodik des Single-Cell-Pickings dahin gehend verbessert werden, dass die praktische Handhabung einfacher und schneller durchführbar sein würde. Weiterhin

1 Einleitung

sollte die Sichtkontrolle bei der Überführung der Zelle ins Reaktionsgefäß optimiert werden.

Löw (2007) war es bereits gelungen, nach der Isolierung von Einzelzellen deren HV1-Region erfolgreich zu sequenzieren. Eine gemeinsame Amplifizierung von HV1- und HV2-Region in einem Ansatz wurde versucht, ergab jedoch nur in der HV2-Region auswertbare Sequenzen. Die Analyse einer Zigarettenkippe lieferte positive Ergebnisse in der HV1-Region für einen einzelnen Spurenverursacher, die Typisierung bei einer Mischspur war jedoch nicht möglich.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten sowohl die HV1- als auch die HV2-Region von Einzelzellen sequenziert werden, zunächst getrennt und später auch gemeinsam im Sinne einer Koamplifizierung. Es sollte erneut versucht werden, Zellen von einer Zigarettenkippe zu gewinnen und zu analysieren und auch eine Mischspur zu untersuchen. Zusätzlich sollte die Methode auch an einzelnen Spermien hinsichtlich ihrer Möglichkeiten geprüft werden.

Das Ziel der dargestellten Versuche ist die Entwicklung einer in der forensischen Fallarbeit einsetzbaren Methode zur Typisierung bei minimalem Spurenmaterial oder Mischspuren.

2 Material und Methoden

2.1 Überblick über die Arbeitsschritte

Um später eine mtDNA-Sequenzierung durchführen zu können, mussten im ersten Arbeitsschritt die Einzelzellen aus dem Probenmaterial gewonnen werden. Dazu wurde das verwendete Spurenmaterial zunächst entsprechend vorbereitet, um anschließend einzelne Zellen daraus mit Hilfe eines Mikromanipulators zu isolieren und in das spätere Reaktionsgefäß zu überführen. In diesem Gefäß fanden die weiterführenden Schritte der DNA-Analyse wie Lysereaktion und PCR statt. Die Methodik des Single-Cell-Pickings sollte hinsichtlich der praktischen Schritte vereinfacht und verbessert werden.

Zu Beginn wurde nur die HV1-Region amplifiziert, in darauf folgenden Versuchen dann auch die HV2-Region sowie letztlich beide Regionen kombiniert in einer Koamplifizierung. Zur erfolgreichen Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region war es erforderlich, die Mengen einzelner Reagenzien des Lyseschlittes und der PCR minimal zu variieren und somit schließlich die Methode zu optimieren.

Für eine Quantifizierung des mtDNA-Amplifikates musste eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt werden, um die richtige Menge des PCR-Produktes in der Sequenzierungsreaktion einsetzen zu können.

In weiterführenden Analysen wurde versucht, anderes Spurenmaterial zu verwenden, um weitere Einsatzmöglichkeiten der Einzelzelluntersuchungen in der Forensik zu prüfen.

Bei allen Arbeiten im DNA-Labor wie auch im ICSI-Labor wurden die Richtlinien zur Vermeidung von Kontaminationen beachtet. Hierzu zählen die Verwendung von Einmalhandschuhen und Schutzbekleidung sowie speziell gereinigten Pipettenspitzen und

UV-Sterilisation bzw. Dampfautoklavierung der verwendeten Materialien (Bär et al., 2000).

2.2 Testlauf mit PVP in der Real-Time-PCR

Als Neuerung zur Optimierung des Single-Cell-Pickings mit Hilfe des Mikromanipulators sollte Polyvinyl Pyrrolidone – kurz PVP – eingesetzt werden. Es handelt sich dabei um eine hochvisköse Verbindung, die bei der ICSI verwendet wird, um die Motilität der Spermien zu verlangsamen und die von den osmotischen Eigenschaften einer isotonischen Kochsalzlösung entspricht (Balaban et al., 2003; Barak et al., 2001). Die Einzelzellen sollten mit dem PVP in das Reaktionsgefäß für die PCR überführt werden, wobei man sich durch die im Vergleich zu Wasser erhöhte Viskosität eine Verringerung der Geschwindigkeit der Zelle beim Ansaugen und Ausstoßen mit der Pipette erhoffte, wodurch eine vereinfachte Handhabung sowie eine verbesserte Sichtkontrolle erreicht würden. Die Isolierung von Einzelzellen mit Hilfe von PVP wurde bereits von Löw (2007) erfolgreich durchgeführt. Es zeigte sich jedoch hier, dass bei keiner der mit PVP gewonnenen Zellen eine positive Sequenzierung möglich war. Daher wurde vermutet, dass das PVP aufgrund von Interaktionen mit den Reagenzien negative Auswirkungen auf den Verlauf der späteren PCR habe.

Dieser Aspekt musste nun zu Beginn der Versuche genauer untersucht werden, da das PVP für das Single-Cell-Picking vorteilhaft war. Das Verfahren der Real-Time-PCR schien dafür geeignet, die Auswirkungen von PVP auf die PCR-Reaktion zu überprüfen. Es wird in der forensischen Routinediagnostik verwendet, um die amplifizierbare Menge an humaner Kern-DNA einer DNA-Probe zu messen.

Das Prinzip beruht auf der üblichen PCR-Reaktion mit einer variablen Anzahl von Zyklen, jeweils bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und Elongation. Bei der Real-Time-PCR wird neben den spezifischen Primern zusätzlich eine sequenzspezifische Hybridisierungssonde zugegeben, welche ebenfalls während des Hybridisierungsschrittes an die DNA bindet. Die Sonde ist an einem Ende mit einem fluoreszierenden Repor-

2 Material und Methoden

ter und am anderen Ende mit einem nicht-fluoreszierenden Quencherfarbstoff markiert, welcher aufgrund der räumlichen Nähe die Lichtemission des Reporters unterdrückt, so dass kein Fluoreszenzsignal messbar ist. Sobald die Polymerase während der Elongation auf die hybridisierte Sonde trifft, wird die Sonde zerschnitten und damit zerstört. Somit wird die räumliche Nähe der beiden Farbstoffe unterbrochen und das emittierte Reporter-Licht messbar. Entsprechend der Amplifikation steigt dieses Fluoreszenzsignal an, d.h. die Fluoreszenzzunahme ist dem Zuwachs an PCR-Amplifikat direkt proportional. Da die Fluoreszenzsignale bei jedem PCR-Zyklus messbar sind (Real-Time = Echtzeit), kann anhand einer Eichgeraden aus Standardwerten auf die amplifizierbare Ausgangsmenge an Proben-DNA zurückgerechnet werden.

Die Real-Time-PCR wurde unter Verwendung des *Quantifiler Human DNA Quantification Kit* des Herstellers *Applied Biosystems* durchgeführt. Die dabei eingesetzte Hybridisierungssonde bindet an ein 62bp-Fragment des humanen Telomerase/reverse Transkriptase-Gens, welches auf Chromosom 5 lokalisiert ist. Als Positivkontrolle enthält jede zu analysierende Probe eine im Kit enthaltene interne PCR-Kontrolle (IPC) mit eigenem Template sowie Template-spezifischen Primern. Weiterhin werden bei jeder PCR ein Standard sowie Negativkontrollen mitgeführt.

Zur Durchführung der Real-Time-PCR wird zunächst für alle Proben ein Mastermix angesetzt, welcher sämtliche benötigten Reagenzien enthält. Pro Probe werden 10,87 µl *Quantifiler PCR Reaction Mix*, bestehend aus PCR-Puffer, dNTPs, MgCl₂ sowie AmpliTaq Gold Polymerase, und 9,13 µl *Quantifiler Human Primer Mix*, bestehend aus Vorwärts- und Rückwärtsprimern, Hybridisierungssonde, Template und Primern für die IPC sowie dem internen ROX-Standard, benötigt. Über den internen Standard können Pipettierfehler von der Software zurückgerechnet und somit ausgeglichen werden. Von der zu amplifizierenden Probe werden 2 µl eingesetzt. Pro Real-Time-PCR werden weiterhin zwei Negativkontrollen sowie 8 Verdünnungen des im Kit enthaltenen DNA-Standards angesetzt, welche dann die Eichpunkte zur Erstellung der Eichgeraden ergeben.

2 Material und Methoden

Die Proben werden in eine Mikrotiterplatte pipettiert, welche mit Klebefolie verschlossen wird. Die Amplifizierung erfolgt im Real-Time-Cycler *ABI Prism 7000* mit dem nachfolgenden Temperatur-Zeit-Programm:

- 1 Zyklus: 95 °C 10 Minuten (Aktivierung der Polymerase)
- 40 Zyklen: 95 °C 15 Sekunden (Denaturierung)
60 °C 60 Sekunden (Hybridisierung und Elongation)

Die Real-Time-PCR sollte in diesem Fall nicht zur Quantifizierung benutzt werden, sondern man wollte nur untersuchen, ob das PVP einen Störfaktor bei der PCR darstellt. Dafür wurden vier Proben eingesetzt, davon zwei Ansätze mit demineralisiertem Wasser und 1 µl PVP, der Menge, die in etwa in die späteren Einzelzell-Proben gelangen würde, sowie zwei mit PVP isolierte Einzelzellen in demineralisiertem Wasser. Eine Beobachtung des Verlaufs der PCR sollte dabei anhand der internen PCR-Kontrolle erfolgen. Da nur 2 µl der Probe für die folgende Real-Time-PCR verwendet wurden, konnte nicht gewährleistet werden, dass sich die Zelle im PCR-Ansatz befand, und es fand keine vorherige Lysereaktion statt. Demnach war nicht zu erwarten, dass die Real-Time-PCR amplifizierbare DNA nachweisen würde. Der Einsatz der Einzelzellen diente nur dazu, den späteren Versuchsablauf nachzuempfinden.

Wie bereits ausführlich dargestellt, beruht das Verfahren der Real-Time-PCR auf der Zunahme eines Fluoreszenzsignals, die vom Real-Time-Cycler *ABI Prism 7000* kontinuierlich gemessen wird. Für die Auswertung wird von der auf das Gerät abgestimmten Software zunächst ein Schwellenwert (Threshold) für die Fluoreszenz festgelegt und überprüft, bei welcher Zykluszahl die Fluoreszenz einer DNA-Probe diesen Schwellenwert erreicht. Diese Zykluszahl wird als CT (Threshold-Cycle) bezeichnet. Anhand der mitgeführten Standard-DNA-Proben mit bekannter Konzentration wird eine Eichgerade erstellt, über die die DNA-Konzentration unbekannter Proben bestimmt werden kann. Proben mit einer hohen Konzentration an Ausgangs-DNA erreichen den Schwellenwert nach einer geringeren Zykluszahl als Proben mit einer geringen Ausgangskonzentration. Je höher demnach der CT-Wert, desto geringer ist die DNA-Konzentration der Probe.

Die interne PCR-Kontrolle (IPC) wird parallel zur Proben-DNA amplifiziert und ein für die IPC spezifischer CT-Wert für jede Probe bestimmt. Die CT-Werte für die IPC der Standard-DNA-Proben stellen die Normwerte dar. Ein im Vergleich zum Normwert erhöhter CT-Wert der IPC einer Probe zeigt die ausbleibende bzw. verlangsamte Zunahme der Fluoreszenz und damit eine Hemmung der PCR-Reaktion an. Ein eventuell bestehender Einfluss von PVP auf die PCR wäre demnach am CT-Wert der IPC erkennbar.

2.3 Gewinnung der Einzelzellen

2.3.1 Probenmaterial

Als Ausgangsmaterial für die Versuche wurden Mundschleimhautzellen von Testpersonen verwendet. Es wurden Mundschleimhautzellen als Probenmaterial gewählt, da sie leicht mit Hilfe eines Abstriches zu gewinnen sind und überdies eine hohe Anzahl von mtDNA-Molekülen (ca. 5000 mtDNA Moleküle pro Zelle) enthalten (Bender et al., 2000).

Die mtDNA-Sequenzen der Testpersonen wurden zuvor anhand einer Speichelprobe analysiert (vgl. Kap. 2.5), damit nachher ein direkter Vergleich mit den Einzelzellergebnissen stattfinden konnte. Insgesamt wurden die Sequenzen von 15 verschiedenen Testpersonen bestimmt. Für die durchgeführten Experimente standen aber letztlich aus organisatorischen und labortechnischen Gründen (z.B. Kettenabbrüche in der HV1-Region) nur 7 Probanden zur Verfügung. Die Testpersonen durften nicht in die praktischen Tätigkeiten im Labor eingebunden sein, um falsch positive Ergebnisse durch Kontaminationen zu verhindern. Zusätzlich wurde meine eigene mtDNA-Sequenz ermittelt, um eine mögliche Kontamination während der Versuchsdurchführung aufzudecken.

2.3.2 Single-Cell-Picking mit dem Mikromanipulator

Die Isolierung der einzelnen Zellen sollte mit Hilfe eines Mikromanipulators erfolgen, wie er zur Intracytoplasmatischen Spermieninjektion (ICSI) verwendet wird (Tesarik und

2 Material und Methoden

Mendoza, 1999). Die eingesetzte Apparatur hat ihren Standort in der Gießener Universitätsfrauenklinik und wurde von der Klinikleitung für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um eine Gerätekombination aus einem Mikroskop der Firma *Olympus*, zwei Pipetten mit einer Ansaugvorrichtung sowie Joysticks zur Steuerung der Pipetten (siehe Abb. 2.1).

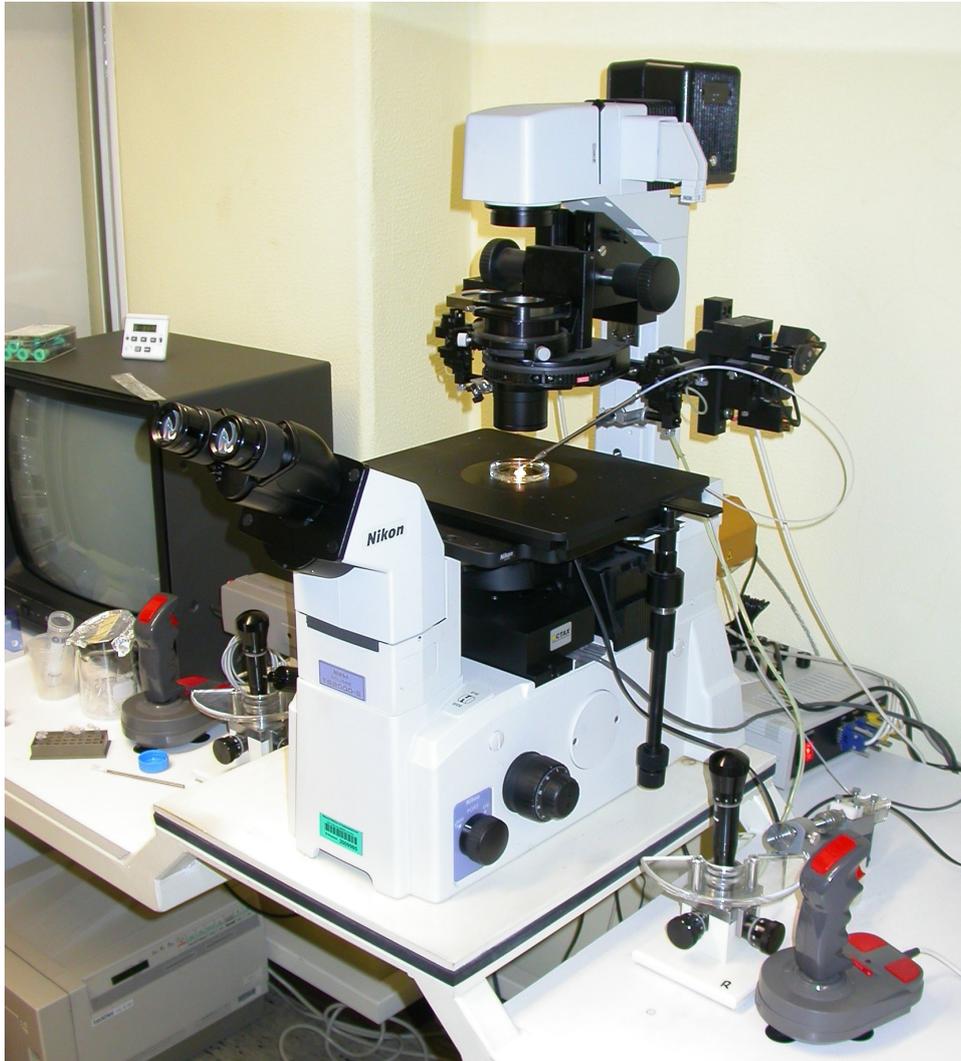


Abbildung 2.1: Mikromanipulator

Eine erfolgreiche Methode zur Gewinnung von Einzelzellen aus Mundschleimhautabstrichen unter Verwendung des Mikromanipulators wurde bereits durch Löw (2007) entwickelt und eingesetzt. Die weiterführenden Schritte bestanden nun in einer Verbesserung

dieser Methode, um eine Vereinfachung des praktischen Ablaufs zu erreichen. Es sollten weiterhin möglichst wenige Arbeitsschritte zur Isolierung einer Zelle nötig sein, um Kontaminationen zu vermeiden. Die ständige mikroskopische Kontrolle, die der Sicherstellung diente, dass sich die gepickte Zelle im Reaktionsgefäß befand, war unbedingt erforderlich, hatte sich jedoch bei Löw (2007) als problematisch erwiesen. Die Technik sollte dahin gehend optimiert werden, dass die Zelle in der Pipette sowie später beim Einbringen in das Gefäß zur PCR deutlich sichtbar blieb. Neuerungen dazu bestanden in der Verwendung von PVP und in einer anderen Technik zur Überführung der Einzelzelle in das Reaktionsgefäß.

2.3.2.1 Vorbereitung der Probe zum Picken

Herstellung des PVP-Gemischs Zu Beginn der Versuche wurde die Aufnahme und Überführung der Einzelzellen mit dem Mikromanipulator unter Verwendung von fertigem, im Handel erhältlichem PVP-Medium der Firma *MediCult* getestet. Die Mischung erwies sich jedoch als nicht ausreichend viskös, um die Zellen sicher handhaben zu können. Daher wurde zur eigenen Herstellung eines PVP-Gemischs übergegangen, wobei PVP-Pulver von *Sigma*[®] und sterilfiltriertes HTF-Medium von *Cambrex* verwendet wurden. Das HTF-Medium wird ebenfalls bei der In-Vitro-Fertilisation eingesetzt und besitzt im Hinblick auf die folgenden Arbeitsschritte günstige Oberflächeneigenschaften. Nach Austestung verschiedener Mischungsverhältnisse stellte sich die Menge von 0,2 g PVP-Pulver gelöst in 900 µl HTF-Medium als geeigneter Ansatz heraus. Das in einem 1,5 ml *Safe-Lock Eppendorf*-Tube angemischte PVP konnte im Kühlschrank bei 4 bis 8°C aufbewahrt werden.

Überschichtung des Zellausstrichs Die Mundschleimhautabstriche wurden mit Hilfe eines sterilen Wattetupfers entnommen und auf dem Boden einer sterilen Petrischale (*Falcon*[®] *Easy Grip*TM *Petri Dish 60×15 mm*) ausgestrichen. War der Abstrich bereits eingetrocknet, musste der Tupfer vorher mit einigen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet werden. Nachdem der Ausstrich trocken war, wurde mit einer sterilen

Pipettenspitze eine geringe Menge an PVP-Gemisch – in etwa 600 μl – entnommen und gleichmäßig auf dem gesamten Ausstrich verteilt, so dass eine dünne Schicht entstand. Anschließend wurde die PVP-Schicht mit Mineralöl (*Sigma*[®]) überzogen, um ein Austrocknen des PVPs zu verhindern.

2.3.2.2 Herstellung der Glaspipetten

Da im Handel nur vorgefertigte Pipetten zur Isolierung von Spermien, nicht aber von Schleimhautzellen erhältlich waren, mussten passende Pipetten aus Glas gezogen und geschmiedet werden. Diese konnten dann in den Mikromanipulator eingespannt werden.

Zum Ziehen (Pullen) der Glaspipette wurde eine Glaskapillare in den *Flaming/Brow Micropipett Puller*, Modell P87 der Firma *Sutter Instruments Co.* eingespannt. Die Glaskapillare wurde hierbei durch eine Öse aus Platin geführt und an beiden Enden befestigt, so dass sich die Öse ungefähr in der Mitte der Glaskapillare befand. Dann wurde das entsprechende Programm gestartet, in diesem Fall *Programm 6* mit den Angaben *HE-AT: 890; PULL: 70; VEL: 50; TIME: 200*. Im Gerät wurde die Platinöse erhitzt und die eingespannte Glaskapillare an beiden Enden unter Zugspannung gesetzt. Nach Erreichen der notwendigen Temperatur riss die Glaskapillare in der Mitte durch und man erhielt zwei Pipetten mit dünnen Spitzen.

Nach dem Pullen war der Durchmesser der Pipettenöffnung noch zu gering. Um den gewünschten Durchmesser von ca. 80 μm zu erreichen, der für die Aufnahme einer Schleimhautzelle benötigt wird (Anuradha und Sivapathasundharam, 2007), wurde die Pipette an der Stelle abgebrochen, an der sie den gewünschten Durchmesser aufwies.

Hierzu wurde sie in eine Pipettenschmiede der Firma *Marishige* eingespannt, unter deren Mikroskop bei einer 100fachen Vergrößerung beliebige Stellen der Pipette und somit verschiedene Durchmesser eingestellt werden konnten. Mit Hilfe eines Okkularmikrometers ließ sich der Innendurchmesser der Pipettenspitze messen. Danach wurde die Pipette mit einer Glaskugel in Berührung gebracht, die über einen Platindraht erhitzt werden konnte. Die Dauer des Erhitzens wurde per Fußschalter reguliert. Die Glaskugel wurde genau so lange erhitzt, bis sich die Hitze auf die Pipette übertrug und diese an der

vorher eingestellten Stelle mit gewünschtem Durchmesser brach. Anschließend wurde die Bruchstelle abgerundet, indem die Spitze vorsichtig in die Nähe der erhitzten Glaskugel gebracht wurde, um so die scharfen Kanten an der Spitze der Pipette rund zu schmelzen.

Damit die Spitze im Mikromanipulator annähernd parallel zum Objektträger geführt werden konnte, musste sie abgewinkelt werden. Dies wurde erreicht, indem man die Pipette mit der Stelle, an der der Winkel entstehen sollte, in die Nähe der erhitzten Glaskugel brachte und sie so eine Biegung in Richtung der Glaskugel erfuhr. Dieser Vorgang wurde wiederum unter mikroskopischer Sicht kontrolliert, bis die Biegung der Pipette den gewünschten Winkel erreicht hatte.

2.3.2.3 Mikromanipulation

Im Anschluss an das Schmieden wurde die Pipette in den Mikromanipulator eingespannt. Sie wurde hierbei in eine Vorrichtung eingeschraubt, die über Joysticks in allen drei Ebenen verschoben werden konnte, wobei es je einen Joystick für die grobe Ausrichtung und für den Feintrieb gab. Die Pipette befand sich nun oberhalb des Objektstischs des Mikroskops und musste zunächst richtig ausgerichtet werden. Dazu wurde die Pipettenspitze direkt über das Objektiv bewegt und unter Sicht in ihrer Achse gedreht, bis die Spitze parallel zum Objektstisch verlief und scharf dargestellt werden konnte.

Der zum Ansaugen und Ausstoßen der Zelle benötigte Unter- bzw. Überdruck wurde mit Hilfe einer Hydraulik erzeugt: Die Pipette war über einen ölfüllten Schlauch mit einer Schraubvorrichtung verbunden, mit der man den Ölspiegel innerhalb der Pipette regeln konnte. Zu Beginn musste die Pipettenspitze komplett mit Öl gefüllt sein und durfte keine Luftblasen enthalten, damit die hydraulische Steuerung optimal funktionierte.

Die vorbereitete Petrischale mit dem Zellausstrich wurde auf dem Objektstisch positioniert, und die einzelnen Zellen konnten unter dem Mikroskop betrachtet werden.

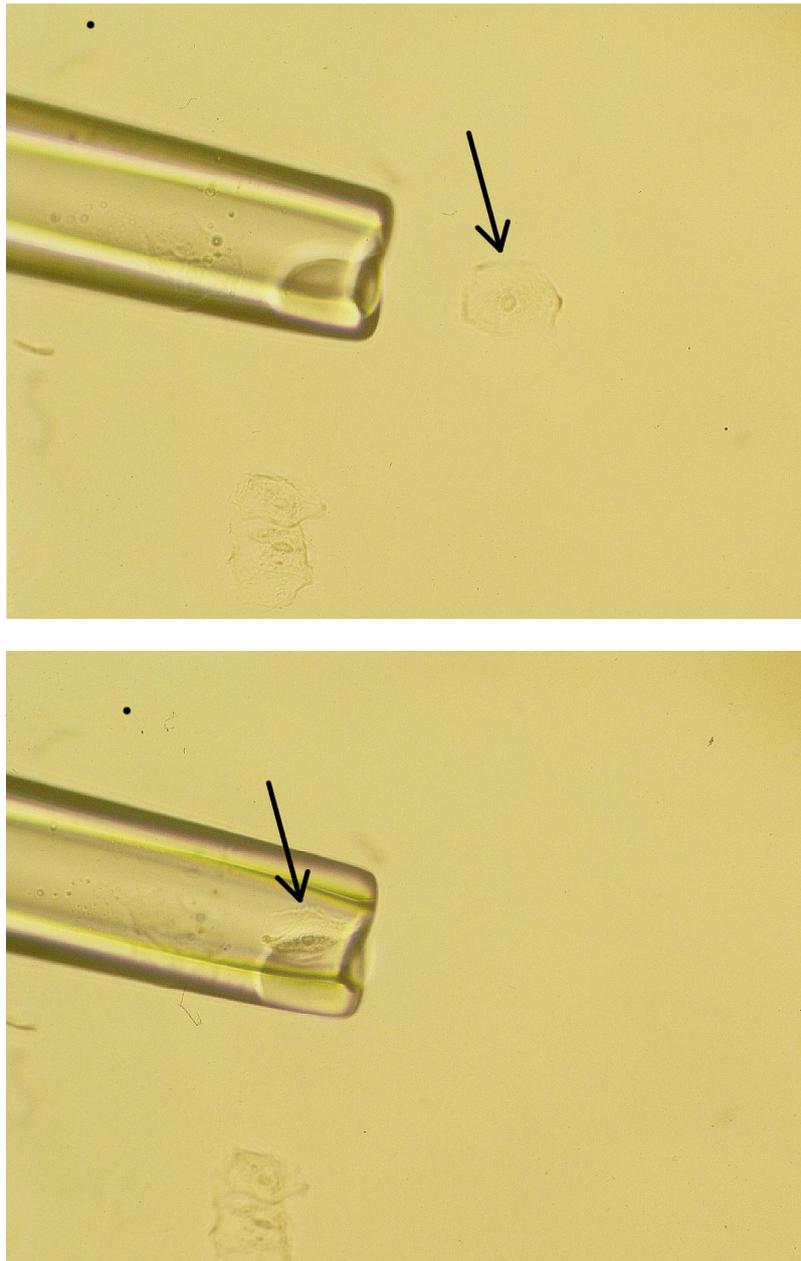


Abbildung 2.2: Einsaugen der Zelle (↓) in die Pipettenspitze

Nach der Auswahl einer geeigneten Zelle wurde die Pipettenspitze durch die Ölschicht in das PVP-Medium eingebracht und direkt an die Zelle herabewegt. Meistens war es erforderlich, die Zelle mit Hilfe der Pipettenspitze vorsichtig vom Boden des Schälchens zu lösen. Anschließend konnte sie mit Hilfe der Ansaugvorrichtung in die Pipettenspitze eingesaugen werden, wobei sie im Idealfall stets sichtbar blieb (siehe Abb. 2.2). Ande-

renfalls musste die Zelle durch feine Regulation an der Hydraulik wieder in die Spitze bewegt werden.

Durch den Einsatz eines ausreichend viskösen PVP-Gemischs konnten die Bewegungen der Zelle in der Pipette und damit auch deren Ansaugen optimaler kontrolliert werden. Unter der Verwendung von Wasser war die Geschwindigkeit, mit der die Zelle bewegt wurde, sehr hoch und die ständige Sichtkontrolle dadurch stark erschwert.

2.3.2.4 Überführung der Zelle in das Reaktionsgefäß

Die Pipette, in deren Spitze sich die Einzelzelle befand, konnte nun wieder aus der Schale herausbewegt werden. Die Schale wurde aus dem Sichtbereich des Objektivs entfernt und die Pipettenspitze erneut fokussiert, so dass die Position der Zelle abermals kontrolliert werden konnte.

Während bei Löw (2007) das Reaktionsgefäß, in dem später die weiteren Schritte der DNA-Analyse stattfinden sollten, auf einen Objektträger gelegt wurde, um die Zelle zu überführen, wurde jetzt eine neue Technik angewandt. Dazu wurde die Vorrichtung des Mikromanipulators, die der Steuerung der zweiten Pipette diente, verwendet. An Stelle einer weiteren Pipette wurde jedoch ein Einsatz für das Reaktionsgefäß in die mit den Joysticks steuerbare Halterung eingeschraubt. Es handelte sich dabei um eine Metallstange, die von ihrer Größe her an die Halterung des Mikromanipulators angepasst war, und an deren Ende ein dem Reaktionsgefäß gleichendes Tube befestigt wurde. In dieses Tube konnte dann das Reaktionsgefäß (0,2 ml PCR Tube mit Deckel von *Eppendorf*) problemlos eingesteckt werden (siehe Abb. 2.3).

Die für die Aufnahme der Zelle benötigte Menge an demineralisiertem Wasser (für gewöhnlich 16,15 µl, vgl. Kap. 2.4.1) wurde an den Rand des mit der Öffnung schräg nach unten positionierten Reaktionsgefäßes pipettiert, so dass der Wassertropfen ein wenig über den Rand hinausragte (siehe Abb. 2.3). Der Tropfen wurde über das Objektiv bewegt und konnte so in unmittelbarer Nähe zu der bereits scharf dargestellten Pipettenspitze fokussiert werden. Unter Verwendung der Joysticks wurde der Wassertropfen auf die Pipettenspitze zubewegt und diese in den Tropfen eingebracht (siehe Abb. 2.4).

2 Material und Methoden

Mit Hilfe der hydraulischen Ansaugvorrichtung konnte die Zelle unter mikroskopischer Sichtkontrolle in den Wassertropfen ausgestoßen werden. Dabei wurde angenommen, dass das Flüssigkeitsvolumen, das beim Ausstoßen zusammen mit der Zelle in den Wassertropfen gelangte, stets 1 μl betrug. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß wieder von der Pipettenspitze wegbewegt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Zelle nicht an der Pipette haften blieb. Das Reaktionsgefäß konnte leicht aus der Halterung entfernt, umgedreht und verschlossen werden.

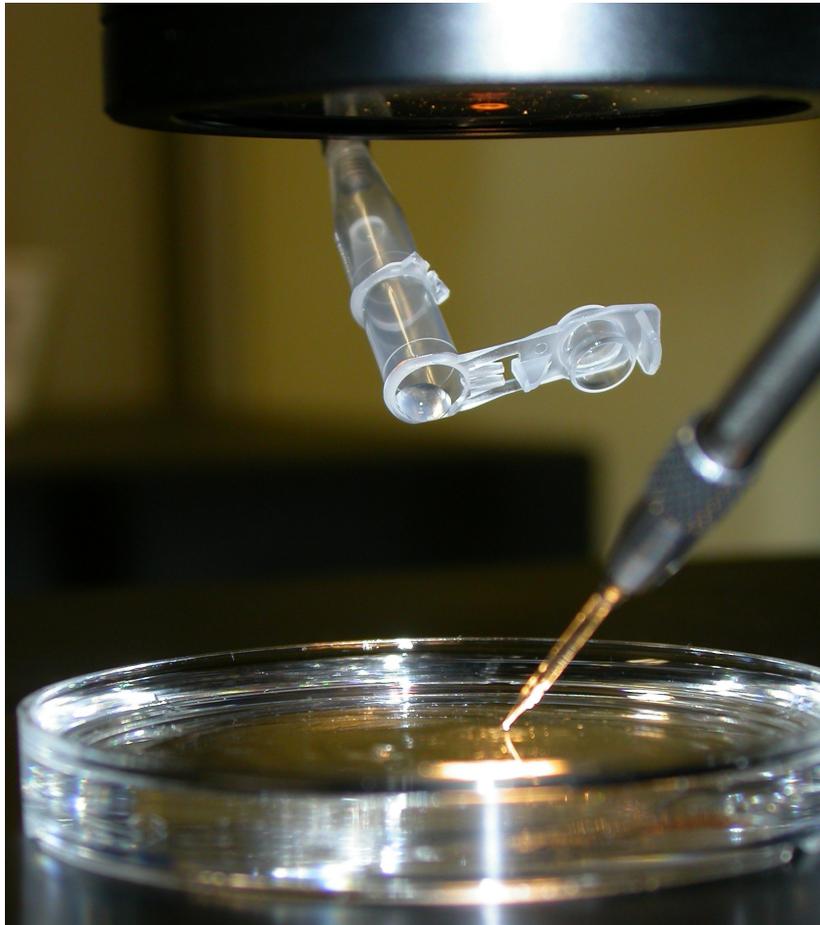


Abbildung 2.3: Hängender Tropfen im Reaktionsgefäß

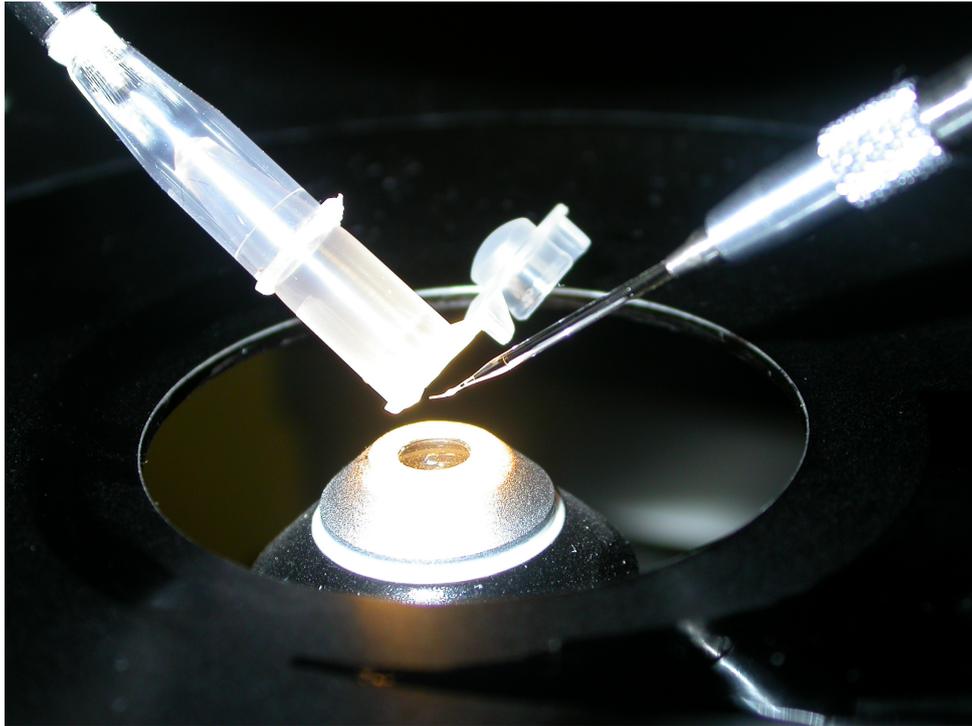


Abbildung 2.4: Transfer der Zelle ins Reaktionsgefäß

2.4 DNA-Analyse der Einzelzellen

2.4.1 Lyse der Zelle im Reaktionsgefäß

Zunächst wurde davon ausgegangen, dass vor der PCR der mtDNA einzelner Zellen kein Lyseschritt erforderlich sei, um das mtDNA-Material aus der Zelle und den Mitochondrien freizusetzen. Es wurde vermutet, dass die Zellmembran und die Membran der Mitochondrien durch das Tiefrieren sowie das Einbringen in demineralisiertes Wasser, welches die Zellen aufgrund seiner osmotischen Wirkung zum Platzen bringen müsste, ausreichend zerstört würden. Bei dem anschließenden Erhitzen der Proben auf 96 °C bei der PCR würde eine weitere Schädigung der Membranen auftreten.

Zu Beginn der Versuche wurden 28 Zellen von drei verschiedenen Personen ohne vorhergehende Lysereaktion der PCR zugeführt. Die Quote positiver Sequenzierungen erreichte mit 21,4% in etwa die von Löw (2007) beschriebene Erfolgsquote von 19,2% (vgl. Kap. 3.3.1).

2 Material und Methoden

Daraufhin wurde der Amplifizierung eine Lysereaktion im selben Reaktionsgefäß vorgeschaltet (von Eggeling et al., 1997), um zu überprüfen, ob sich dadurch eine Verbesserung der Erfolgsquote erreichen ließe.

Dazu wurden tiefgefrorene Proben zunächst bei Raumtemperatur aufgetaut (zum Tiefrieren s.u.). Alle Proben wurden kurz gevortext und 1 Minute lang bei 13.000 U/min zentrifugiert, um eventuelle Anhaftungen der Zelle bzw. Zellfragmente von der Wand des Reaktionsgefäßes zu lösen. Dann wurden 0,6 µl Proteinase K (20 mg/ml von *peqlab*) und 2 µl 10x PCR-Puffer (*TaKaRa*) hinzugegeben. Nach erneutem kurzem Vortexen und einminütiger Zentrifugation bei 13.000 U/min erfolgte eine Inkubation der Proben für 2 Stunden bei 60°C. Durch anschließendes Erhitzen auf 94°C für 2 Minuten wurde die Proteinase K inaktiviert. Im nächsten Schritt konnte nun die Einzelzell-PCR im gleichen Reaktionsgefäß durchgeführt werden, das jetzt die erforderliche Menge von 19,75 µl Lysat enthielt.

Es stellte sich die Frage, ob nach Einfügen eines Lyseschlittes dem Tieffrieren der Proben noch eine große Bedeutung zukam, da der Effekt der Proteinase für die Zerstörung der Membranen vermutlich stärker war. Zur Untersuchung dieses Aspektes wurden 16 Einzelzellen von einer Testperson gepickt, von denen 8 Zellen im Anschluss tiefgefroren wurden, während bei den übrigen 8 Zellen direkt die Lysereaktion erfolgte.

Bei den erhaltenen mtDNA-Sequenzen zeigten sich keine Unterschiede, die auf eine Wirkung des Tieffrierens auf die Einzelzellen hindeuten würden (vgl. Kap. 3.3.2). Aus diesem Grund wurde im Folgenden ausschließlich je nach praktischem Verlauf entschieden, ob die Proben nach dem Single-Cell-Picking tiefgefroren wurden, um sie für wenige Tage zu lagern, oder ob die Proben direkt weiter verarbeitet wurden.

Für die Koamplifizierung der HV1- und HV2-Region wurde ein um 1 µl geringeres Endvolumen des Lysats benötigt (vgl. Kap. 2.4.2.4). Dazu war es notwendig, entweder die Menge an demineralisiertem Wasser, in das die Einzelzelle aufgenommen wurde, oder die Menge an Reagenzien in der Lysereaktion geringfügig zu verändern.

Es folgten verschiedene Ansätze:

aqua dest. (μl)	Zelle (μl)	Proteinase (μl)	Puffer (μl)	Endvolumen (μl)
15,15	1	0,6	2,0	19,75
16,15	1	0,6	1,5	20,25
15,65	1	0,6	1,5	19,75
16,15	1	0,6	1,0	19,75

Die Ergebnisse werden in Kapitel 3.5.2 dargestellt. Als endgültige Methode wurde die Einzelzelle für die Koamplifizierung schließlich in einen Wassertropfen von 16,15 μl aufgenommen und die Lyse mit 0,6 μl Proteinase K und 1,0 μl 10x PCR-Puffer wie beschrieben durchgeführt.

2.4.2 Amplifizierung

2.4.2.1 Kontrollen

Die Kontrollen wurden nach den Richtlinien der DNA-Kommission der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin durchgeführt. Jeder PCR-Ansatz enthielt zusätzlich je eine positive Kontrolle K562 (Hersteller *Gene Print*[™]) und eine negative Kontrolle (nach Tully et al., 2001). Die negative Kontrolle bestand nur aus demineralisiertem Wasser ohne DNA oder mtDNA und sollte der Detektion von Kontaminationen dienen. Im Falle von Verunreinigungen der Proben durch fremde DNA oder mtDNA würde diese in der PCR amplifiziert und in der Gelelektrophorese in Form einer fluoreszierenden Bande sichtbar. Durch anschließende Sequenzierung der Negativkontrolle könnte man Kontaminationsquellen aufdecken, indem man die erhaltene Sequenz mit denen der an den Arbeitsschritten beteiligten Personen vergleicht, wie im Protokoll von Bär et al. (2000) empfohlen. Mit Hilfe der positiven Kontrolle sollte überprüft werden, ob alle Reaktionen regelrecht abliefen.

2.4.2.2 Amplifizierung der HV1-Region

Die zur Amplifizierung der mtDNA notwendige PCR fand in dem Gefäß statt, in das die Einzelzelle mit Hilfe des Mikromanipulators überführt worden war. Wie bereits erwähnt wurde davon ausgegangen, dass das Flüssigkeitsvolumen, das beim Ausstoßen zusammen mit der Zelle in den Wassertropfen gelangte, 1 µl betrug. Als Ausgangsmaterial für die PCR dienten demnach entweder 19,75 µl demineralisiertes Wasser mit einer Zelle bzw. 19,75 µl Lysat, wenn zuvor eine Lysereaktion durchgeführt worden war. Zu jeder Probe wurden 5,25 µl des sog. Mastermixes gegeben, so dass das Endvolumen 25 µl betrug. Eine Ausnahme bildeten die aus der Lysereaktion mit einem Volumen von 20,25 µl hervorgegangenen Proben, bei denen sich das Endvolumen nach Zugabe des Mastermixes auf 25,5 µl belief (vgl. Kap. 2.4.1).

Der Mastermix für die Amplifizierung der HV1-Region setzte sich wie folgt zusammen:

2,5 µl	10x ExTaq Puffer		(<i>TaKaRa</i>)
1,0 µl	dNTP-Mix	(2,5 mM)	(<i>TaKaRa</i>)
0,5 µl	BSA	(10 mg/ml)	
0,5 µl	Primer F15989	(10 pmol/µl)	(<i>Gibco BRL</i>)
0,5 µl	Primer R16420	(10 pmol/µl)	(<i>Gibco BRL</i>)
0,25 µl	ExTaq Polymerase	(5 U/µl)	(<i>TaKaRa</i>)

Primer	Nukleotidsequenz
F15989 (HV1)	5'-CCCAAAGCTAAGATTCTAAT-3'
R16420 (HV1)	5'-TGATTTTCACGGAGGATGGTG-3'

Die Vorversuche von Löw (2007) ergaben für die PCR bei Einzelzellen eine optimale Zyklenzahl von 38. Diese Zyklenzahl deckt sich mit der Literatur, in der 34-40 Zyklen für sehr geringes oder stark degradiertes Spurenmaterial sowie für Knochen und Haarschäfte beschrieben sind (Lien et al., 1993; Bender et al., 2000; Hellmann et al., 2001). Die ermittelte optimale Zyklenzahl von 38 ergab sich sowohl für die Single-PCR HV1 und Single-PCR HV2 als auch für die komplette HV1/HV2- Amplifikation. Den Zyklen

ging eine 3-minütige Denaturierung bei 94°C voraus, um eventuell bereits vorliegende Bindungen der DNA-Stränge aufzutrennen. Ein Zyklus bestand jeweils aus:

96°C 45 Sekunden (Denaturierung)

56°C 60 Sekunden (Hybridisierung)

72°C 60 Sekunden (Elongation)

Es folgten 10 Minuten bei 72°C zum Verbrauch der restlichen Polymeraseaktivität.

2.4.2.3 Amplifizierung der HV2-Region

Um die Aussagekraft der Identifizierung einer Person mittels Sequenzierung der mtDNA zu erhöhen, sollten mehrere hypervariable Regionen der mtDNA sequenziert werden. In der forensischen Molekularbiologie werden üblicherweise die HV1- und die HV2-Region untersucht. Zunächst wurde versucht, auch die HV2-Region von Einzelzellen zu amplifizieren und anschließend zu sequenzieren.

Die notwendigen Reagenzien zur Herstellung des Mastermixes entsprachen mit Ausnahme der Primer denen, die für die Amplifizierung der HV1-Region verwendet wurden:

2,5 µl	10x ExTaq Puffer		(<i>TaKaRa</i>)
1,0 µl	dNTP-Mix	(2,5 mM)	(<i>TaKaRa</i>)
0,5 µl	BSA	(10 mg/ml)	
0,5 µl	Primer F15	(10 pmol/µl)	(<i>biomers.net</i>)
0,5 µl	Primer R429	(10 pmol/µl)	(<i>biomers.net</i>)
0,25 µl	ExTaq Polymerase	(5 U/µl)	(<i>TaKaRa</i>)

Primer	Nukleotidsequenz
F15 (HV2)	5'-CACCCCTATTAACCACTCACG-3'
R429 (HV2)	5'-CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA -3'

Zur Amplifizierung der HV2-Region wurde ebenfalls eine Zyklenzahl von 38 gewählt, denen ebenfalls eine 3-minütige Denaturierung bei 95 °C vorausging. Ein Zyklus bestand jeweils aus:

95 °C 45 Sekunden (Denaturierung)

50 °C 60 Sekunden (Hybridisierung)

72 °C 60 Sekunden (Elongation)

Es folgten 10 Minuten bei 72 °C zum Verbrauch der restlichen Polymeraseaktivität.

2.4.2.4 Koamplifizierung der HV1- und HV2-Region

In der forensischen „Routinediagnostik“ geschieht die Amplifizierung und Sequenzierung von HV1- und HV2-Region zumeist getrennt in zwei verschiedenen Ansätzen. Dieses ist möglich, wenn genügend Ausgangsmaterial für die Untersuchung vorhanden ist, nicht jedoch, wenn das Spurenmaterial aus nur einer einzigen Zelle besteht. In der Arbeit von Löw (2007) wurde bereits die Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region beschrieben und an einer Probe mit drei Zellen erfolgreich durchgeführt. Dieser Ansatz sollte weitergeführt und dahin gehend optimiert werden, dass die Methode für Reihenuntersuchungen an Einzelzellen einsetzbar sein würde.

Zunächst wurde das Verfahren an einigen Speichelproben der Versuchspersonen getestet, da hierbei in jedem Fall ausreichende Mengen an mtDNA zu erwarten waren. Die DNA war bereits extrahiert und wurde tiefgefroren gelagert (vgl. Kap. 2.5).

Um ein Amplifikat der HV1- als auch der HV2-Region in einem Schritt zu erhalten, sollte der gesamte Abschnitt des D-Loops amplifiziert werden, der sich zwischen dem Beginn der HV1-Region und dem Ende der HV2-Region befindet (vgl. Kap. 1.2). Daher wurden der HV1-Vorwärtsprimer F15989 sowie der HV2-Rückwärtsprimer R429 eingesetzt. Bei der Koamplifizierung wurden 2 µl dNTP-Mix verwendet, um für die Elongation des zu amplifizierenden längeren mtDNA-Strangs genügend dNTPs zur Verfügung zu stellen. Daher musste bei der späteren Verwendung von Einzelzellen das aus der Lyse-reaktion hervorgehende Endvolumen entsprechend verringert werden (vgl. Kap. 2.4.1).

2 Material und Methoden

Der Mastermix zur Koamplifizierung der Speichelproben der Testpersonen setzte sich wie folgt zusammen:

2,5 µl	10x ExTaq Puffer		(<i>TaKaRa</i>)
2,0 µl	dNTP-Mix	(2,5 mM)	(<i>TaKaRa</i>)
0,5 µl	BSA	(10 mg/ml)	
0,5 µl	Primer F15989	(10 pmol/µl)	(<i>Gibco BRL</i>)
0,5 µl	Primer R429	(10 pmol/µl)	(<i>biomers.net</i>)
0,125 µl	ExTaq Polymerase	(5 U/µl)	(<i>TaKaRa</i>)
13,875 µl	aqua dest.		

Jede Probe enthielt 1 µl DNA, 4 µl demineralisiertes Wasser und 20 µl Mastermix. Für die PCR wurde das gleiche Thermocycler-Programm verwendet wie bei der alleinigen Amplifizierung der HV2-Region, jedoch mit einer verringerten Zyklenzahl von 32:

95 °C	45 Sekunden	(Denaturierung)
50 °C	60 Sekunden	(Hybridisierung)
72 °C	60 Sekunden	(Elongation)

Ebenfalls ging eine 3-minütige Denaturierung bei 95 °C voraus und es folgten 10 Minuten bei 72 °C zum Verbrauch der restlichen Polymeraseaktivität.

Da die Koamplifizierung der Speichelproben der Testpersonen mit diesem Ansatz erfolgreich verlief (Ergebnisse siehe Kap. 3.5.1), wurde nun die simultane Amplifizierung von HV1- und HV2-Region an Einzelzellen getestet. Der Mastermix entsprach bis auf die Menge des dNTP-Mixes und die Auswahl der Primer denen der einfachen Amplifizierung von HV1- oder HV2-Region an einzelnen Zellen:

2,5 µl	10x ExTaq Puffer		(<i>TaKaRa</i>)
2,0 µl	dNTP-Mix	(2,5 mM)	(<i>TaKaRa</i>)
0,5 µl	BSA	(10 mg/ml)	
0,5 µl	Primer F15989	(10 pmol/µl)	(<i>Gibco BRL</i>)
0,5 µl	Primer R429	(10 pmol/µl)	(<i>biomers.net</i>)
0,25 µl	ExTaq Polymerase	(5 U/µl)	(<i>TaKaRa</i>)

Die für die PCR notwendigen Temperaturdurchläufe entsprachen exakt denen der alleinigen Amplifizierung der HV2-Region.

Die Ergebnisse der Koamplifizierung an den Einzelzellen waren abhängig von den vorhergehenden Modifikationen an der Lysereaktion. Eine ausführliche Darstellung findet sich in Kapitel 3.5.

2.4.3 DNA-Quantifizierung mittels Agarosegelelektrophorese

Im Anschluss an die Amplifizierung wurde eine halbquantitative Agarosegelelektrophorese mit einem Fluoreszenzfarbstoff durchgeführt, um festzustellen, welche DNA-Mengen in den einzelnen Proben nach der PCR enthalten waren.

Zur Herstellung einer Agarosegelplatte, im Folgenden auch als Minigel bezeichnet, wurde 1 g Agarose in pulverisierter Form mit 50 ml 1xTBE-Puffer gemischt und durch Rühren und Aufkochen in der Mikrowelle vollständig gelöst, so dass eine klare gallertartige Flüssigkeit entstand. Diese wurde in eine an die Elektrophoresekammer angepasste Form gegeben. Anschließend wurden zwei sogenannte Kämmchen in die Form eingehängt, die in dem Gel mehrere Taschen hinterlassen sollten, die später zur Aufnahme der Proben dienten. Dabei konnte aus drei verschiedenen Kämmchen gewählt werden, die zur Entstehung von entweder 8, 10 oder 12 Geltaschen führten. Nach Abkühlung des Agarosegels auf Raumtemperatur nahm es eine feste Form an, woraufhin die Kämmchen entfernt und das Gel im Kühlschrank bei 4 bis 8°C aufbewahrt werden konnten.

Zur Quantifizierung der DNA wurden 2 µl des Fluoreszenzfarbstoffes *Sybr*[®] *Green* der Firma *Sigma*[®] in einer Verdünnung von 1:500 und 2 µl *Blue Dextran Loading Solution* von *Promega* mit 3 µl des PCR-Produktes versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert, das zuvor in die mit 1xTBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt wurde. An der Kammer wurde für etwa 10 Minuten eine Gleichspannung von 100 Volt angelegt. In dem dadurch erzeugten elektrischen Feld wanderten die verschieden großen mtDNA-Fragmente unterschiedlich schnell und weit.

Die Auswertung der Gelelektrophorese geschah unter einer UV-Lampe, die den an die DNA gebundenen fluoreszierenden Farbstoff sichtbar machte. Die Stärke der Fluoreszenz variierte je nach gebundener DNA-Menge und wurde in Stufen von 0 bis 3 beurteilt.

Mit Hilfe der Fluoreszenzstärke konnte die Menge an aufgereinigtem PCR-Produkt festgelegt werden, die später in der Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden sollte. Weiterhin konnte anhand der Fluoreszenz von Positiv- und Negativkontrolle beurteilt werden, ob die PCR regelrecht verlaufen war und ob sich Hinweise auf Kontaminationen ergaben. Zur Arbeits- und Kostenersparnis konnte auf die Sequenzierung von Proben ohne Fluoreszenz (entspricht Grad 0) oftmals verzichtet werden, da in diesem Falle eine positive mtDNA-Sequenzierung unwahrscheinlich war.

2.4.4 Aufreinigung

Im Anschluss an die Amplifizierung mittels PCR folgte eine Aufreinigung des PCR-Produktes, die dazu diente, überschüssige Primer, dNTPs und störende Proteine aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen, da diese zu unerwünschten Interaktionen bei der anschließenden Sequenzierungsreaktion führen würden.

Für diese Aufreinigung wurde das *MinElute PCR Purification Kit* der Firma *Quiagen* verwendet. Dieses System reinigt nach dem Prinzip der Säulenchromatographie die DNA so auf, dass das Aufreinigungsprodukt nur komplementär gebundene DNA im Bereich von 70 bp bis 4 kbp enthält.

Die verbliebene Menge des PCR Produktes, entsprechend 22 μ l, wurde zusammen mit dem 5fachen Volumen eines PB-Puffers auf eine Säule gegeben, die ein Silicagel mit einer hohen Salzkonzentration enthielt. Die Säule wurde dann bei 13.000 U/min eine Minute lang zentrifugiert. Die Amplifikate sollten sich an das Silicagel binden, während überschüssige, kurze und ungepaarte DNA-Fragmente sowie andere Verunreinigungen durch 700 μ l Waschpuffer in einem zweiten Schritt wieder aus der Säule entfernt wurden, wobei die Säule erneut bei 13.000 U/min eine Minute lang zentrifugiert wurde. Anschließend wurde mit 35 μ l demineralisiertem Wasser bei einer Inkubationszeit von 2 Minuten die gebundenen DNA vom Silicagel getrennt und durch 1-minütige Zentrifugation bei 13.000 U/min

aus dem Gel herausgelöst. So befand sich im Eluat die aufgereinigte DNA, mit der die Sequenzierungsreaktion durchgeführt werden konnte.

2.4.5 Sequenzierungsreaktion

Abhängig vom Fluoreszenzgrad in der Gelelektrophorese konnte eine variable Menge des Aufreinigungsproduktes – zwischen 1 µl und 6,5 µl – in der Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden.

Für die Sequenzierung der HV1-Region wurden noch hinzugegeben:

- 2,0 µl Ready Reaktion Mix (*Applied Biosystems*)
- 1,0 µl 5xSequencing Puffer (*Applied Biosystems*)
- 0,5 µl Primer aus PCR

Ready Reaktion Mix und Sequencing Puffer sind Bestandteil des *Big Dye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits* (*Applied Biosystems*). Mit 0 - 5,5 µl demineralisiertem Wasser wurde die Probe auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Als Primer wurde meist der bereits zur Amplifizierung verwendete Vorwärtsprimer F15989 (10 pmol/µl) eingesetzt. Der komplementäre Strang konnte jedoch ebenso in entgegengesetzter Richtung sequenziert werden, indem man den Primer R16420 (10 pmol/µl) benutzte (sog. Rückwärts-Sequenzierung). Dieses Vorgehen wurde zur Sequenzierung nach Koamplifizierung gewählt (s.u.). Die zweifache Sequenzierung aus beiden Richtungen erhöht die Sicherheit der erhaltenen Sequenz und macht damit Fehlinterpretationen unwahrscheinlicher. Im allgemeinen wurde bei den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen der DNA-Strang aus Kosten- und Zeitersparnisgründen nur in einer Richtung sequenziert. Ausnahmen bildeten ein Großteil der Kontroll-Speichelproben der Testpersonen, bei denen durch die zusätzliche Analyse des komplementären Stranges Heteroplasmien eindeutiger erkannt werden konnten (siehe Probanden 5 und 12, Kap. 3.1), sowie wenige zweifelhafte Fälle bei der Einzelzelluntersuchung mit Verdacht auf Heteroplasmien.

2 Material und Methoden

Zur Sequenzierung der HV2-Region wurden andere Mengen der Reagenzien verwendet:

- 3,0 µl Ready Reaktion Mix (*Applied Biosystems*)
- 0,5 µl 5xSequencing Puffer (*Applied Biosystems*)
- 0,5 µl Primer aus PCR

Die zum Erreichen des Endvolumens von 10 µl benötigte Menge an demineralisiertem Wasser betrug 0 - 5 µl. Als Primer wurden entweder F15 oder R429 (10 pmol/µl) eingesetzt.

Nach Einführung der Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region mussten beide Regionen getrennt sequenziert werden. Dazu wurden der HV1-Rückwärtsprimer R16420 und der HV2-Vorwärtsprimer F15 verwendet. Bei Einsatz des HV1-Vorwärtsprimers oder des HV2-Rückwärtsprimers wäre auch der mtDNA-Abschnitt sequenziert worden, der sich zwischen HV1- und HV2-Region befindet und der bei der Koamplifizierung mit amplifiziert worden war (vgl. Kap. 2.4.2.4). Dies hätte zu einem unnötigen Verbrauch an Reagenzien in der Sequenzierungsreaktion geführt, während sich durch die entgegengesetzte Sequenzierung der beiden Regionen eindeutige Kettenabbrüche erreichen ließen.

Das Sequenzierungsprogramm im Thermocycler begann mit einer Denaturierung von 30 Sekunden bei 96°C zur Trennung von bereits vorliegenden DNA-Doppelbindungen. Es folgten 25 Zyklen, bestehend aus:

- 96°C 10 Sekunden
- 50°C 5 Sekunden
- 60°C 4 Minuten

Die dabei ablaufende Reaktion war eine modifizierte Sequenzierung nach dem Prinzip der sog. Kettenabbruchreaktion, wie bei Sanger et al. (1977) beschrieben. Der Ready Reaktion Mix enthält Desoxynukleotide und Didesoxynukleotide. Diese Didesoxynukleotide sind je nach enthaltener Base (Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin) mit einem von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Kommt es bei der Amplifizierungsreaktion zum zufälligen Einbau eines Didesoxynukleotids erfolgt ein Kettenabbruch, da kein weiteres Desoxynukleotid angefügt werden kann. Die Begründung liegt darin, dass an einem Didesoxynukleotid die OH-Gruppe an der 3'-Stelle der Desoxyribose des Nu-

kleotids fehlt, die erforderlich wäre, um die Verbindung mit der Phosphatgruppe am 5'-Ende dieses Zuckers des folgenden Nukleotids einzugehen. Während der Sequenzierungsreaktion entstehen folglich viele verschieden lange Fragmente, die sich jeweils um die Länge eines Basenpaares unterscheiden und an ihrem Ende jeweils eine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Base tragen. Anhand der Farbe lässt sich nun bestimmen, welche Base das zuletzt eingebaute Nukleotid enthält. Die entsprechenden Positionen ergeben sich aus der Länge der Nukleotidstränge.

2.4.6 Ethanolfällung

Die Ethanolfällung diente zur Konzentration der Amplifikate im Anschluss an die Sequenzierungsreaktion.

Zum Sequenzierungsprodukt wurden 40 µl 100%iges Ethanol hinzugegeben. Anschließend wurde das Gemisch in ein 1,5 ml *Safe-Lock Eppendorf*-Tube pipettiert, in dem bereits 5 µl drei-molarer Natriumacetat-Lösung vorgelegt waren, und bei 13.000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Die DNA im Ansatz wurde dadurch gefällt und setzte sich am Boden des Reaktionsgefäßes ab. Der Überstand wurde abdekantiert, und das Tube wurde trockengetupft, ohne es vorher umzudrehen, da beim Umdrehen der Bodensatz durch zurücklaufende Flüssigkeit wieder gelöst und beim anschließenden Trockentupfen verloren gehen könnte. Derselbe Ablauf wurde nach Zugabe von jeweils 250 µl vorher frisch angesetzten 70%igen Ethanols noch zweimal wiederholt, um soviel mtDNA wie möglich zu fällen.

Dann wurde das Reaktionsgefäß mit dem Bodensatz in der *Speedvak*, einer beheizten Zentrifuge, etwa 5 Minuten lang trocken zentrifugiert, um letzte Flüssigkeitstropfen aus dem Reaktionsgefäß zu entfernen. Zuletzt wurden zum Bodensatz 20 µl TSR (Template Suppression Reagent) der Firma *Applied Biosystems* hinzugegeben, in dem sich die gefällte mtDNA löste.

2.4.7 Kapillarelektrophorese

Die Sequenzanalyse wurde mit dem Gerät *ABI Prism 310 Genetic Analyser* durchgeführt und beruht auf dem Prinzip der Kapillarelektrophorese. Die aus Sequenzierungsreaktion und Ethanol-fällung hervorgegangene Lösung bestand nun neben 20 µl TSR aus DNA-Fragmenten, die sich hinsichtlich ihrer Länge wie auch ihrer terminalen Basenmarkierung unterschieden. Die Probe wurde in eine mit dem Polymer POP6 (*Applied Biosystems*) gefüllte Glasfaserkapillare *Rapid green (47cm)* injiziert, in der die DNA-Fragmente ihrer Länge nach elektrophoretisch aufgetrennt wurden, so dass deren Reihenfolge ihrer Anzahl an gebundenen Desoxynukleotiden entsprach. Der Nachweis der terminal fluoreszenzmarkierten Base erfolgte durch Laser-induzierte Photodetektion, wobei die verwendeten Farbstoffe eine unterschiedliche Emissionswellenlänge besitzen. Anhand der Position innerhalb der Kapillare und der Lichtemission des Farbstoffs konnte demnach die komplette Sequenz des zuvor amplifizierten mtDNA-Abschnitts bestimmt werden. Die detektierten Rohdaten wurden dazu durch die *Sequencing Analysis* Software von *Applied Biosystems* auf dem an das Gerät angeschlossenen PC analysiert, wobei sich überlappende Emissionsspektren der unterschiedlichen Farbstoffe nach vorher angegebenen Analyseparametern automatisch korrigiert wurden.

Anschließend konnten die Daten durch Laden in das Programm *Sequencing Navigator* nachbearbeitet werden. Zur Auswertung erschien die Sequenz als Abfolge von Peaks, die entsprechend der jeweiligen Base durch deren Buchstaben sowie vier verschiedene Farben markiert waren. Außerdem war jedem Peak eine Position in der Sequenz zugeordnet. Die erhaltenen Daten wurden nun mit der Andersonsequenz verglichen (Bär et al., 2000). Die Sequenz von Rückwärtsreaktionen musste vorher komplett umgekehrt werden. Der Abgleich konnte automatisch mit Hilfe einer *Alignment*-Funktion oder manuell erfolgen. Abweichungen zur Andersonsequenz wurden von der Software automatisch gekennzeichnet und mussten auf ihre Richtigkeit hin überprüft werden. Um die Güte der Sequenzierung bzw. der vorangehenden Amplifizierung festzustellen, konnte die Sequenz der Positivkontrolle K562, deren spezifische Abweichungen zur Referenz bekannt wa-

ren, ausgewertet werden. Weiterhin sollte die PCR-Negativkontrolle keine auswertbare Sequenz zeigen, d.h. über dem Grundrauschen durften keine Peaks auftreten.

2.5 mtDNA-Sequenzierung der Testpersonen

2.5.1 IQ[®]-Extraktion

Um festzustellen, ob die aus der Analyse der Einzelzellen hervorgegangenen mtDNA-Sequenzen wirklich von den Testpersonen stammten und nicht etwa durch Kontaminationen zustande kamen, mussten die Sequenzen im Voraus bestimmt werden, damit später ein Vergleich stattfinden konnte.

Dazu wurde von jeder Testperson mit einem sterilen Wattetupfer eine Speichelprobe entnommen. Um aus diesem Material die darin enthaltene mtDNA zu gewinnen, wurden die Proben einer IQ[®]-Extraktion unter Verwendung des *DNA IQ[®] Systems* von *Pro-mega* unterzogen. Diese Art der DNA-Extraktion eignet sich vor allem für Spurenträger, bei denen man einen besonders hohen Anteil an DNA vermutet, wie beispielsweise Blutspuren, Zigarettenkippen oder eben Mundschleimhautabstriche. Der Vorteil liegt darin begründet, dass mit dieser Methode immer eine konstante Menge an DNA isoliert wird und außerdem der Reinigungsgrad der extrahierten DNA sehr hoch ist.

Der eigentlichen IQ[®]-Extraktion ging eine Lysereaktion voraus, um die DNA aus den Zellen freizusetzen. Dazu wurde zunächst mit Hilfe einer sterilen Schere ein Teil der Watte vom Tupfer abgetrennt und in ein 1,5 ml *Safe-Lock Eppendorf*-Tube überführt. Nach Hinzupipettieren von 15 µl Proteinase K (20 mg/ml von *peqlab*) und 250 µl 1xLysepuffer (10 mM Tris; 100 mM EDTA; 10 mM NaCl; 2% SDS) wurde die Probe durch mehrmaliges Aufziehen in der Pipettenspitze und kurzes Vortexen gut durchmischt und bei 56 °C im Thermoshaker über Nacht lysiert.

Nach der Lyse wurden die Reaktionsgefäße bei 13.000 U/min kurz anzentrifugiert, um die Spurenträger zu sedimentieren. Im Anschluss wurden ca. 100 µl des Lysats in ein weiteres *Eppendorf* Tube überführt und mit 200 µl IQ[®]-Lysepuffer vermischt.

2 Material und Methoden

Die nun anschließenden Reaktionsschritte fanden in einer Mikrotiterplatte statt, in welche folgende Reagenzien vorgelegt wurden:

Spalte	A:	7 μ l	<i>IQ</i> [®] Resin
Spalten	A-C:	100 μ l	<i>IQ</i> [®] Lysepuffer-Lysat-Probengemisch
Spalte	D:	100 μ l	<i>IQ</i> [®] Lysepuffer
Spalten	E-G:	100 μ l	<i>IQ</i> [®] Waschpuffer
Spalte	H:	100 μ l	<i>IQ</i> [®] Elutionspuffer

Das verwendete Resin enthält Silica-gekoppelte paramagnetische Partikel. Die DNA bindet nach Zugabe dieses Gemisches an die Silicapartikel und kann durch den magnetischen Anteil in den Partikeln unter Mithilfe eines Elektromagneten im *KingFisher*-Automaten bewegt werden. Auf diese Weise erfolgten automatisiert die folgenden Arbeitsschritte:

1. 1 Minute DNA binden in Spalte A
2. 1 Minute DNA binden in Spalte B
3. 1 Minute DNA binden in Spalte C
4. 1 Minute Waschen in Spalte D
5. 15 Sekunden Waschen in Spalte E
6. 15 Sekunden Waschen in Spalte F
7. 15 Sekunden Waschen in Spalte G
8. 7 Minuten Trocknen
9. 10 Minuten Eluieren in Spalte H

Nach Abarbeitung der Proben im *KingFisher*-Automaten (Verhoff und Heidorn, 2003) wurde die Mikrotiterplatte entnommen. Die nun im Elutionspuffer vorliegende DNA in der Spalte H wurde komplett in ein beschriftetes Reaktionsgefäß zur Lagerung überführt und konnte für weitere Reaktionen wie die Amplifizierung verwendet werden. Die Konzentration der extrahierten DNA-Probe wird exakt durch die eingesetzte Menge an Resin bestimmt und sollte nun 1 ng/ μ l betragen.

2.5.2 Amplifizierung

Die aus den Speichelproben der Testpersonen extrahierte DNA musste vor der Sequenzierungsreaktion amplifiziert und anschließend aufgereinigt werden. Die Amplifizierung erfolgte zunächst getrennt für die HV1- und die HV2-Region, bevor die Koamplifizierung für beide Regionen eingesetzt wurde (dazu siehe Kap. 2.4.2.4).

Zur Amplifizierung der HV1-Region wurde neben 1 μl extrahierter DNA pro Probe ein Mastermix aus folgenden Reagenzien verwendet:

2,5 μl	10x ExTaq Puffer		(<i>TaKaRa</i>)
2,0 μl	dNTP-Mix	(2,5 mM)	(<i>TaKaRa</i>)
0,5 μl	BSA	(10 mg/ml)	
0,5 μl	Primer F15989	(10 pmol/ μl)	(<i>Gibco BRL</i>)
0,5 μl	Primer R16420	(10 pmol/ μl)	(<i>Gibco BRL</i>)
0,125 μl	ExTaq Polymerase	(5 U/ μl)	(<i>TaKaRa</i>)
13,875 μl	aqua dest.		

Zur Amplifizierung der HV2-Region wurden als einzige Abweichung entsprechend je 0,5 μl der Primer F15 und R429 (10 pmol/ μl) von (*biomers.net*) eingesetzt.

Die Temperatur-Zeit-Programme im Thermocycler glichen denen zur mtDNA-Amplifizierung an Einzelzellen (siehe Kap. 2.4.2.2 und 2.4.2.3) bei einer verringerten Zyklenzahl von 32.

2.6 Einzelzellen von einer Zigarettenskippe

Um die praktische Anwendbarkeit der vorgestellten Methode zur mtDNA-Sequenzierung an Einzelzellen für die forensische DNA-Analyse zu prüfen, wurde eine Zigarettenskippe als typischer Spureträger gewählt.

Die Zigarette wurde von einer der Versuchspersonen geraucht und die Kippe in einem sterilen Glasgefäß bis zur anschließenden Analyse aufbewahrt. Der Zigarettensammel wurde mit physiologischer Kochsalzlösung leicht befeuchtet und auf dem Boden einer

sterilen Petrischale (*Falcon*[®] *Easy Grip*TM *Petri Dish 60×15 mm*) ausgestrichen. Die darauf folgenden Arbeitsschritte entsprachen denen der Einzelzellgewinnung aus Mundschleimhautabstrichen (vgl. Kap. 2.3.2.1). Im DNA-Labor fand eine Amplifizierung und Sequenzierung der HV1-Region statt.

2.7 Analyse von Mischspuren

Beim Vorliegen einer Mischspur könnte die Einzelzelluntersuchung der konventionellen mtDNA-Sequenzierung überlegen sein, bei der mehrere Spuren nicht sicher voneinander getrennt werden können (vgl. Kap. 1.4.2).

Um die Anwendbarkeit der entwickelten Methode in einem solchen Fall zu testen, wurde eine Mischspur erzeugt, indem zwei der bekannten Versuchspersonen gemeinsam eine Zigarette rauchten. Mit der Kippe wurde anschließend entsprechend der bereits dargestellten Methode der Analyse einer Zigarettenkippe (vgl. Kap. 2.6) verfahren. Es folgten eine Koamplifizierung und die Sequenzierung von HV1- und HV2-Region.

2.8 Analyse von Spermien

Da sich die Analyse von Einzelzellen nicht auf Epithelzellen beschränken sollte, wurde als weiteres, in der Forensik weit verbreitetes Spurenmaterial eine Spermienprobe verwendet. Die Probe stammte aus der Abteilung für In-vitro-Fertilisation der Gießener Universitätsfrauenklinik und wurde vom Spender für Forschungszwecke zur Verfügung gestellt. Der Spender war mir namentlich nicht bekannt und es lag kein weiteres DNA-Material für eine Vergleichsanalyse vor. Es sollte lediglich versucht werden, einzelne Spermien in das Reaktionsgefäß zu überführen und eventuell eine DNA-Spur nachzuweisen.

In die Petrischale (*Falcon*[®] *Easy Grip*TM *Petri Dish 60×15 mm*) wurde eine geringe Menge, in etwa 10 µl, der Probe pipettiert und ohne vorheriges Trocknen mit PVP sowie Mineralöl überschichtet. Die darauf folgenden Arbeitsschritte entsprachen denen der Gewinnung von einzelnen Epithelzellen mit dem Mikromanipulator (vgl. Kap. 2.3.2.3),

es wurde lediglich ein verringerter Pipettendurchmesser von etwa 50 μm gewählt. Als DNA-Analyse erfolgte die Amplifizierung und Sequenzierung der HV1-Region.

2.9 Alternative Einzelzellgewinnung

Als Ausblick für eine Alternative zur dargestellten Einzelzellgewinnung mit dem Mikromanipulator der Gießener Universitätsfrauenklinik wurde das in Abbildung 2.5 dargestellte hochauflösende Stereomikroskop *Lumar.V12* der Firma *Zeiss* mit einer Arbeitsplattform von *aura optik (Jena)* getestet (Verhoff et al., 2006).

Es wurde versucht, Einzelzellen auf verschiedenen Materialoberflächen darzustellen und schließlich zu isolieren. Dazu wurden sowohl der Kunststoffgriff als auch die Metallschneiden einer Schere über die Handflächen einer Testperson gestrichen, um Epithelzellanhaftungen zu verursachen. Weiterhin wurden ein Glasobjektträger mit Fingern angefasst und eine Briefmarke an der gummierten Seite beleckt. Zunächst wurde versucht, die Zellen mit dem *SteREOLumar.V12* von *Zeiss* unter Verwendung einer Kaltlichtquelle und einer Mikroskop-Lampe *HBO100* mit Fluoreszenzfilter-Sets für UV, FITC, Rhodamin und GFP, jeweils benutzt als Aufsicht bei einer Vergrößerung von 150x, auf den Oberflächen zu betrachten. Zur Isolierung der Zellen verfügte die Arbeitsplattform über einen Mikromanipulator mit digitaler Steuerung (siehe Abb. 2.6).

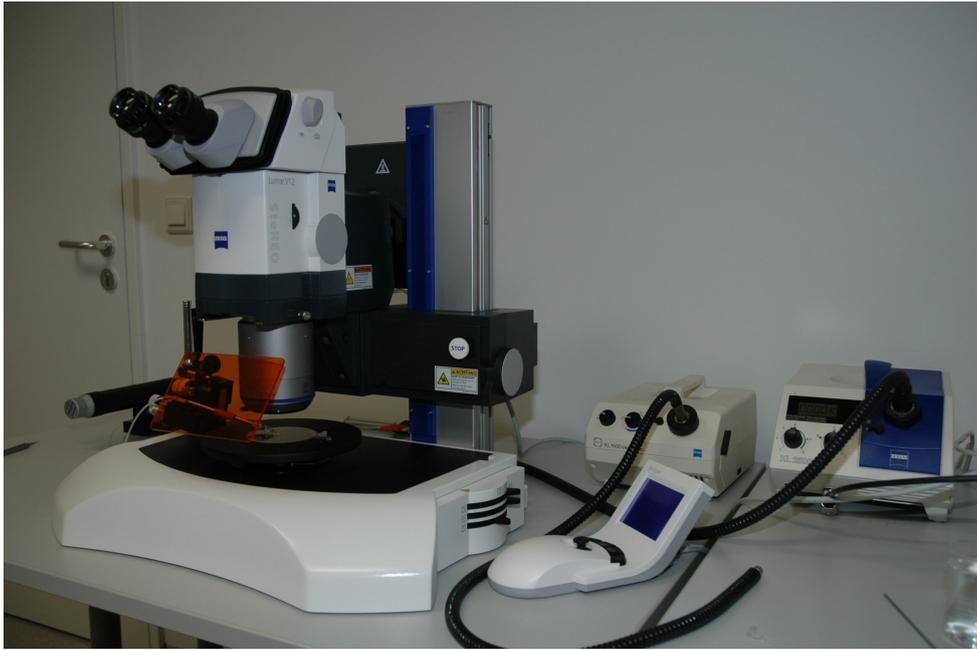


Abbildung 2.5: Stereomikroskop *Lumar.V12* von *Zeiss* mit Arbeitsplattform *aura optik*

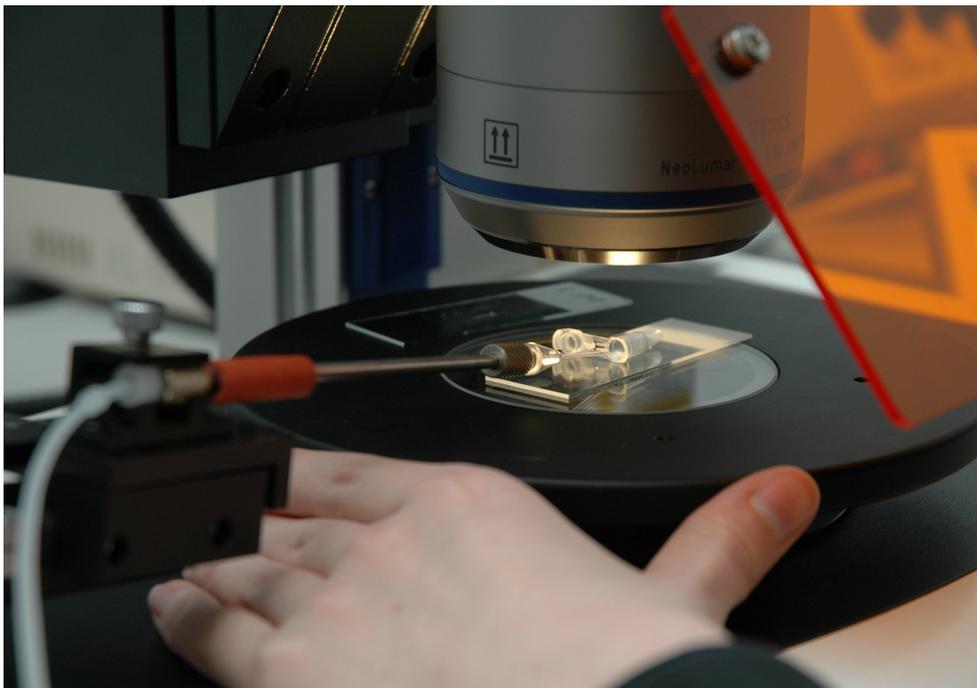


Abbildung 2.6: Transfer einer Zelle ins Reaktionsgefäß mit dem Mikromanipulator

3 Ergebnisse

3.1 Vergleichs-Sequenzen der Testpersonen

Damit eine in der Einzelzellanalyse erhaltene mtDNA-Sequenz als positives Ergebnis gewertet werden konnte, musste sie sicher mit der im Voraus ermittelten Sequenz des Probanden übereinstimmen, da nur so eine reine Amplifizierung und Sequenzierung von durch Kontamination eingebrachter DNA ausgeschlossen werden konnte (vgl. Kap. 2.3.1). Die folgende tabellarische Aufstellung der erhaltenen Vergleichs-Sequenzen beschränkt sich auf die 7 Testpersonen, die für die Experimente zur Verfügung standen, sowie die Autorin (Person 6).

Zeichenerklärung:

- Pos. Basenposition
- A Andersonsequenz
- P Person
- Del. Deletion
- Ins. Insertion
- > Heteroplasmie (stärker)

3 Ergebnisse

Abweichungen	Person 1 (m)			Person 5 (m)			Person 6 (w)		
	Pos.	A	P	Pos.	A	P	Pos.	A	P
1	16294	C	T	16051	A	G	Anderson		
2	16296	C	T	16162	A	G			
3	16304	T	C						

Abweichungen	Person 7 (m)			Person 10 (w)			Person 12 (m)		
	Pos.	A	P	Pos.	A	P	Pos.	A	P
1	16126	T	C	16356	T	C	16114	C	A
2	16294	C	T				16192	C	T
3	16296	C	T				16256	C	T
4	16304	T	C				16270	C	T
5							16294	C	T

Abweichungen	Person 13 (m)			Person 15 (w)		
	Pos.	A	P	Pos.	A	P
1	Anderson			16263	T	C

Tabelle 3.1: Vergleichssequenzen der Testpersonen und der Autorin (Person 6): HV1-Region

3 Ergebnisse

Abweichungen	Person 1 (m)			Person 5 (m)			Person 6 (w)		
	Pos.	A	P	Pos.	A	P	Pos.	A	P
1	73	A	G	73	A	G	186	C	A
2	263	A	G	263	A	G	263	A	G
3	315.1	/	Ins. C	309.1	/	Ins. C (>)	315.1	/	Ins. C
4				315.1	/	Ins. C			

Abweichungen	Person 7 (m)			Person 10 (w)			Person 12 (m)		
	Pos.	A	P	Pos.	A	P	Pos.	A	P
1	73	A	G	73	A	G	73	A	G
2	146	T	C	195	T	C	152	T	C
3	151	C	T	263	A	G	263	A	G
4	263	A	G	310	T	Del.	309.1	/	Ins. C (>)
5	315.1	/	Ins. C				315.1	/	Ins. C

Abweichungen	Person 13 (m)			Person 15 (w)		
	Pos.	A	P	Pos.	A	P
1	152	T	C	263	A	G
2	194	C	T			
3	263	A	G			
4	315.1	/	Ins. C			

Tabelle 3.2: Vergleichssequenzen der Testpersonen und der Autorin (Person 6): HV2-Region

Innerhalb der Sequenzen in der HV2-Region traten in zwei Fällen Heteroplasmien auf. Bei beiden Proben lag jeweils bei einem Teil der amplifizierten mtDNA eine zusätzliche Insertion der Base Cytosin an der Position 309.1 vor. Die Sequenz mit der Insertion bildete jeweils den stärkeren Anteil an den beiden parallel bei dem Individuum vorkommenden Sequenzen.

3.2 Testlauf mit PVP in der Real-Time-PCR

Für die Einzelzellanalyse war eine Quantifizierung von DNA nicht von Bedeutung, da lediglich ein eventuell störender Einfluss von PVP auf die PCR-Reaktion anhand der IPC untersucht werden sollte. Zwei Proben waren frei von DNA und die beiden weiteren Proben enthielten jeweils eine Epithelzelle (vgl. Kap. 2.2). Ein Nachweis von amplifizierter ncDNA aus den Zellen wurde nicht erwartet. Wie bereits in Kap. 2.2 erläutert, zeigt ein im Vergleich zum Normwert erhöhter CT-Wert der IPC einer Probe die ausbleibende bzw. verlangsamte Zunahme der Fluoreszenz und damit eine Hemmung der PCR-Reaktion an.

Bei allen vier Proben lag der CT-Wert der IPC im Normbereich, wich also nicht um mehr als einen Zyklus vom Mittelwert der CT-Werte für die IPC der Standard-DNA-Proben ab. Wie zu erwarten konnte kein zusätzliches DNA-Material amplifiziert werden. Durch den Einsatz der Real-Time-PCR konnte also gezeigt werden, dass PVP keinen hemmenden Effekt auf die PCR-Reaktion aufweist.

3.3 Ergebnisse der Amplifizierung der HV1-Region

3.3.1 Zellen ohne Lysereaktion

Zu Beginn wurden insgesamt 28 Zellen nach der in Kap. 2.3 ausführlich erläuterten Methode isoliert und deren HV1-Region zunächst auf die bereits von Löw (2007) beschriebene Weise, also ohne vorherige Lysereaktion, amplifiziert.

Die erhaltene mtDNA-Sequenz der HV1-Region wurde als positives Ergebnis gewertet, wenn sie in den Abweichungen zur Anderson-Sequenz mit der zuvor bestimmten Vergleichssequenz der entsprechenden Testperson vollständig übereinstimmte. In der tabellarischen Darstellung 3.3 finden sich die Versuchsperson, die jeweilige Menge an gepickten Einzelzellen sowie die Anzahl positiver Ergebnisse in Minigel und Sequenzierung.

3 Ergebnisse

Person	Anzahl Zellen	Minigel positiv	Sequenz positiv
1	10	10	4
5	10	9	2
10	8	6	0
Σ	28	25 (89,3 %)	6 (21,4 %)

Tabelle 3.3: Ergebnisse HV1-Region ohne Lysereaktion

Mit Ausnahme einer Probe von Person 5 wurden alle gewonnenen Zellen sequenziert, auch die Proben, die im Minigel keine Bande zeigten. Die nicht als positiv zu wertenden Sequenzierungen waren nicht auswertbar, d.h. es fand sich keine identifizierbare Sequenz (18 Proben), oder es lagen der Vergleichssequenz nicht entsprechende Abweichungen zur Anderson-Sequenz vor (3 Proben), die als Verunreinigung zu werten sind (vgl. Kap. 4.2). In einem Fall wurde die reine Anderson-Sequenz ermittelt, wobei es sich um eine Kontamination beispielsweise durch mich während der Versuchsdurchführung handeln könnte. Dieser Aspekt wird in Kap. 4.2 weiter erörtert. Eine detaillierte Aufstellung der Einzelergebnisse findet sich im Tabellenanhang.

3.3.2 Zellen mit Lysereaktion

Nach Einführung einer Lysereaktion vor der PCR wurden insgesamt 57 Einzelzellen von 4 verschiedenen Probanden isoliert. Die HV1-Region wurde amplifiziert und die Sequenzierung ergab die in Tabelle 3.4 dargestellten Ergebnisse.

Mit Ausnahme einer Probe von Person 1 (zweite Tabellenzeile) wurden auch alle Proben mit negativem Minigel sequenziert. Insgesamt ergaben sich 14 nicht auswertbare Ergebnisse bei der Sequenzierung. Bei einer Zelle von Person 1 trat eine zusätzliche Basenabweichung gegenüber der Kontrollsequenz auf. Diese Abweichung kann im Sinne einer Heteroplasmie interpretiert werden und wurde als positive Sequenzierung gewertet (vgl. Kap. 4.1.2). Eine detaillierte Aufstellung der Einzelergebnisse findet sich im Tabellenanhang.

3 Ergebnisse

Person	Anzahl Zellen	Minigel positiv	Sequenz positiv
1	9	9	9
1	6	5	4 (V.a. HP)
5	8	8	8
5	8	8	8
7	10	3	3
10	16	11	10
Σ	57	44 (77,2%)	42 (73,7%)

Tabelle 3.4: Ergebnisse HV1-Region mit Lysereaktion (V.a. HP = Verdacht auf Heteroplasmie)

Um zu überprüfen, ob das Einfrieren der Zellen vor der Lyse einen Einfluss auf die Amplifizierung haben würde, bzw. ob dem Einfrieren nach Einführung einer Lysereaktion noch eine große Bedeutung zukommen würde, wurden von den 16 gepickten Zellen von Person 5 (Tabellenzeilen 3 und 4) 8 Zellen vor der Lyse eingefroren, die anderen 8 Zellen wurden direkt lysiert.

Weder im Minigel, noch in der Sequenzierung ergaben sich Unterschiede zwischen den beiden Ansätzen. Das Tieffrieren hatte demnach keine positiven oder negativen Auswirkungen auf die folgenden Analyseschritte und die Ergebnisse, so dass im Folgenden darauf verzichtet werden konnte, wenn die Zellen aus praktischen Gründen nach dem Picken direkt weiter verarbeitet werden sollten.

3.4 Ergebnisse der Amplifizierung der HV2-Region

Nach der erfolgreichen mtDNA-Sequenzierung der HV1-Region an Einzelzellen mit vorangehender Lysereaktion wurde versucht, auch die HV2-Region zu analysieren. Dazu wurden in drei Schritten insgesamt 22 Einzelzellen von einem Probanden gepickt. Unabhängig vom Minigel wurden alle Proben sequenziert, wobei drei nicht auswertbar waren.

Eine detaillierte Aufstellung der Einzelergebnisse findet sich im Tabellenanhang, zum Heteroplasmieverdacht siehe Kap. 3.3.2.

Person	Anzahl Zellen	Minigel positiv	Sequenz positiv
1	8	6	6
1	6	6	5 (V.a. HP)
1	8	8	8
Σ	22	20 (90,9%)	19 (86,4%)

Tabelle 3.5: Ergebnisse HV2-Region mit Lysereaktion (V.a. HP = Verdacht auf Heteroplasmie)

3.5 Ergebnisse der Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region

3.5.1 Ergebnisse bei den Testpersonen

Die Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region wurde zunächst an den Speichelproben der Testpersonen versucht, da darin eine ausreichende Menge an mtDNA zu erwarten war. Die bereits vorliegenden DNA-Extraktionen der Probanden 1 bis 7 wurden nach der in Kap. 2.4.2.4 dargestellten Methode amplifiziert. Im Minigel zeigten sich bei allen Proben starke Banden, so dass die Koamplifizierung als Erfolg gewertet wurde. Die Probe von Testperson 1 wurde anschließend dazu verwendet, die Sequenzierbarkeit der Amplifikate zu überprüfen. Die Ergebnisse der HV1- und der HV2-Region aus der Sequenzierung waren gut auswertbar und die Basenabweichungen gegenüber der Anderson-Sequenz entsprachen den bereits getrennt amplifizierten und sequenzierten Proben der Testperson 1. Die Methode musste demnach nicht weiter modifiziert werden, und im Anschluss wurden alle weiteren Speichelproben (Probanden 12 bis 15) nach der angewendeten Methode koamplifiziert, wodurch Zeit und Arbeitsmaterial eingespart werden konnten.

3.5.2 Unterschiedliche Ansätze bei der Lyse-Reaktion

Um das Lysat für den Einsatz in die Koamplifizierung um 1 µl zu reduzieren, wurden verschiedene Ansätze bei der Lyse-Reaktion getestet (vgl. Kap. 2.4.1).

Ansatz 1 (15,15 µl aqua dest., 0,6 µl Proteinase, 2,0 µl Puffer, 19,75 µl Endvolumen) wurde an insgesamt 69 Zellen von den zwei Probanden 1 und 7 getestet. Sämtliche Proben zeigten keine Bande im Minigel, wurden nicht in die Sequenzierung eingesetzt und als negatives Ergebnis gewertet.

Dieser Ansatz enthielt die gleichen Mengen an Proteinase und Puffer wie sie bei der Lyse vor erfolgreicher Sequenzierung entweder der HV1- oder der HV2-Region nach Simplex-PCR verwendet wurden. Es war zu vermuten, dass damit die besten Ergebnisse erzielt werden würden, da eine im Verhältnis kleine Verringerung der Menge an aqua dest., in das die Zelle beim Picken aufgenommen wurde, eine geringere Veränderung bei der Lyse-Reaktion erwarten ließ als eine verhältnismäßig große Abweichung bei den Lysereagenzien.

Es zeigte sich jedoch, dass mit diesem Ansatz keine positiven Amplifizierungen zu erreichen waren. Die hohe Anzahl an eingesetzten Zellen erklärt sich dadurch, dass dieser Ansatz am Anfang der Experimente zur Koamplifizierung entwickelt wurde und wie oben erläutert erwartungsgemäß gute Resultate hervorbringen sollte. Die Erfolglosigkeit bei der Amplifizierung hätte sich zu diesem Zeitpunkt durch die noch nicht ausgereifte Methode der Koamplifizierung an Einzelzellen erklären lassen und schien wahrscheinlicher als eine erfolglose Lyse durch die geringfügige Änderung bei der Reagenzienmenge (vgl. Kap. 4.3.2).

Schließlich wurde versucht, die Mengen an eingesetzten Reagenzien zu variieren, um eine eventuell in der Lyse-Reaktion begründete Ursache der negativen Amplifizierungen aufzudecken. Wie in diesem Kapitel beschrieben, gelang dadurch letztlich die Koamplifizierung nach entsprechender Modifikation der Methode.

Da die negativen Ergebnisse der 69 eingesetzten Zellen offenbar durch die Änderungen bei der Lyse-Reaktion und nicht durch die Methode der Einzelzellgewinnung oder der Koamplifizierung verursacht wurden und dieses Problem schließlich durch die in

3 Ergebnisse

diesem Kapitel beschriebenen Versuche beseitigt werden konnte, werden diese Proben in der späteren Aufstellung der „Erfolgsquoten“ nicht berücksichtigt und als eigenständiges Experiment im Vorfeld der eigentlichen Versuche mit der endgültigen Methode aufgefasst.

Ansatz	Person	Anzahl Zellen	Sequenz positiv
1	1	12	0
	1	12	0
	1	6	0
	1	12	0
	7	19	0
	7	8	0
2	1	8	7
	1	6	6
	7	8	7
3	7	4	3
4	7	4	4

Tabelle 3.6: Ergebnisse der Versuche zur Anpassung der Lysereaktion

Nach Ansatz 2 (16,15 µl aqua dest., 0,6 µl Proteinase, 1,5 µl Puffer, 20,25 µl Endvolumen) wurde mit insgesamt 22 Zellen der Probanden 1 und 7 verfahren. Daraus ließen sich 20 Proben erfolgreich im Minigel darstellen und deren HV1- und HV2-Region sequenzieren. Diese Proben sind in der Aufstellung in Kap. 3.5.3 enthalten.

Ansatz 3 (15,65 µl aqua dest., 0,6 µl Proteinase, 1,5 µl Puffer, 19,75 µl Endvolumen) und Ansatz 4 (16,15 µl aqua dest., 0,6 µl Proteinase, 1,0 µl Puffer, 19,75 µl Endvolumen) wurden an jeweils 4 Zellen von Person 7 getestet. Die Proben aus Ansatz 3 ergaben 3 positive Sequenzierungen in HV1- und HV2-Region, die vierte Sequenz entsprach nicht der Testperson und wurde als negativ gewertet. Die vier Proben aus Ansatz 4 wurden in beiden Regionen erfolgreich sequenziert. Die genannten 8 Zellen finden sich ebenfalls in

der Aufstellung in Kap. 3.5.3. Da mit Ansatz 4 alle Zellen komplett positiv sequenziert werden konnten und die vier Proben im Minigel gegenüber den vier Proben aus Ansatz 3 deutlich stärkere Banden zeigten, wurde dieser Ansatz weiter verfolgt und letztlich als endgültige Methode verwendet. Tabelle 3.6 fasst die Ergebnisse der Versuche zur Anpassung der Lysereaktion zusammen. Eine detaillierte Aufstellung der Einzelergebnisse findet sich im Tabellenanhang.

3.5.3 Ergebnisse mit der endgültigen Methode

Nachdem durch die Modifikation der Lyse-Reaktion positive Ergebnisse nach einer Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region erzielt werden konnten (vgl. Kap. 3.5.2), wurde die Methode an weiteren Reihen von Einzelzellen getestet. Insgesamt wurden 112 Zellen von 5 verschiedenen Probanden untersucht. Die Ergebnisse für beide hypervariablen Regionen sind in der Tabelle 3.7 zusammengefasst (zum Teil präsentiert auf der 15. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin: Pipper et al., 2006). Eine detaillierte Aufstellung der Einzelergebnisse findet sich im Tabellenanhang, zum Heteroplasmieverdacht siehe Kap. 3.3.2.

Die Proben, die im Minigel eine Bande gezeigt hatten, wurden in die Sequenzierung eingesetzt. Zunächst wurde die HV1-Region analysiert. Wenn diese erfolgreich verlief, also zumindest eine positive Probe enthielt, wurde anschließend die HV2-Region untersucht. Bei zwei Ansätzen konnte trotz positiven Minigels keine positive Sequenzierung der HV1-Region erreicht werden, so dass auf eine Analyse der HV2-Region verzichtet wurde. Die negativ gewerteten Proben waren alle nicht auswertbar, d.h. es lag keine zu analysierende Sequenz vor.

Es zeigte sich, dass die Ergebnisse für die HV2-Region deutlich schlechter waren als die für die HV1-Region. Der Anteil positiver Sequenzierungen lag um etwa 10% niedriger, obwohl zu erwarten gewesen war, dass bei beiden Regionen der Anteil an positiven Sequenzierungen gleich sein würde, da es sich um die identische Probe handelte. Die Ursachen möglicher Ausfälle bei den Sequenzierungen werden ausführlich in Kap. 4.3.3 und Kap. 4.6 diskutiert.

3 Ergebnisse

Person	Anzahl Zellen	Minigel positiv	HV1 Sequenz positiv	HV2 Sequenz positiv
1	8	7	7 (V.a. HP)	7 (V.a. HP)
1	6	6	6 (V.a. HP)	6
7	8	7	7	7
7	8	8	7	7
10	10	9	8	8
10	10	8	8	8
12	10	9	9 (V.a. HP)	6 (V.a. HP)
12	8	5	0	/
13	10	10	10	8
13	10	3	3	3
13	8	5	5	4
13	8	5	5	0
13	8	8	0	/
Σ	112	90 (80,4%)	75 (67,0%)	64 (57,1%)

Tabelle 3.7: Ergebnisse HV1- und HV2-Region nach Koamplifizierung (V.a. HP = Verdacht auf Heteroplasmie)

3.6 Versuch mit Zigarettenskippe

Um die Methode auch für realistische forensische Spurenträger zu testen, wurde eine Zigarettenskippe untersucht. Die Zigarette wurde von Person 1 geraucht und anschließend wurde wie in Kap. 2.6 beschrieben verfahren.

Im Minigel waren bei 5 Proben schwache Banden erkennbar. Die Sequenzierung der HV1-Region wurde an allen 8 Proben durchgeführt und ergab 6 mal die erwarteten Basenabweichungen zur Andersonsequenz von Proband 1, die anderen 2 Proben waren nicht auswertbar. Somit gelang es erfolgreich, Einzelzellen von einer Zigarettenskippe zu analysieren.

3.7 Versuch mit Mischspur

Es sollte untersucht werden, ob aus einer Mischspur mit Hilfe der Einzelzellanalyse verschiedene Sequenzen zur eindeutigen Täteridentifikation gewonnen werden könnten. Dazu wurde zweimal eine Mischspur von zwei Testpersonen auf einer Zigarette erzeugt (vgl. Kap. 2.7).

Die erste Zigarette wurde von den Probanden 1 und 11 geraucht und es konnten 17 Zellen isoliert werden. Mit 9 Proben daraus wurde eine Sequenzierung der HV1-Region durchgeführt, mit den restlichen 8 Proben eine Koamplifizierung, allerdings nach der Lyse mit Ansatz 1 (15,15 µl aqua dest., 0,6 µl Proteinase, 2,0 µl Puffer, 19,75 µl Endvolumen), der schließlich als erfolglos bewertet wurde (vgl. Kap. 3.5.2).

Im Minigel war bei keiner der Proben eine Bande zu erkennen. Trotzdem wurden alle Proben sequenziert, es ergab sich jedoch keine auswertbare Sequenz, d.h. alle 17 Proben waren negativ.

Die zweite Zigarette wurde von den Probanden 1 und 15 geraucht und es konnten 24 Zellen isoliert werden. Es erfolgten eine Koamplifizierung und anschließende Sequenzierung von HV1- und HV2-Region mit den in Tabelle 3.8 dargestellten Ergebnissen.

Bei der zweiten Zigarettenkippe konnte ein Großteil der Einzelzellen, nämlich zu 83,3% in der HV1- und zu 62,5% in der HV2-Region, erfolgreich sequenziert werden. Wie bereits bei der Koamplifizierung der Einzelzellen aus Mundschleimhaut-Zellausstrichen der einzelnen Probanden gestaltete sich die Sequenzierung der HV2-Region deutlich schwieriger mit erhöhter Ausfallquote (vgl. Kap. 3.5.3). Für die HV1-Region gelang eine eindeutige Zuordnung der beiden Probanden. Proband 1 konnte 16mal nachgewiesen werden, die Sequenz von Proband 15 in 4 Fällen. Somit konnte die Methode der Einzelzellanalyse bei Mischspuren erfolgreich angewendet werden. Bei der HV2-Region konnte lediglich die Sequenz von Person 1 in 14 Proben festgestellt werden, die den Proben entsprachen, die in der HV1-Region auch Proband 1 ergaben. Ein Nachweis von Proband 15 war nicht erfolgreich, da sämtliche Proben, die in der HV1-Region dieser Testperson zugeordnet wurden, in der HV2-Region nicht auswertbar waren.

3 Ergebnisse

Zelle	Minigel	Sequenz HV1	Sequenz HV2
1	+	Proband 1	Proband 1
2	-	/	/
3	+	NA	NA
4	+	Proband 1	Proband 1
5	+	Proband 1	Proband 1
6	-	/	/
7	-	/	/
8	+	Proband 1	Proband 1
9	+	Proband 1	Proband 1
10	+	Proband 15	NA
11	+	Proband 15	NA
12	+	Proband 1	Proband 1
13	+	Proband 1	Proband 1
14	+	Proband 15	NA
15	+	Proband 1	Proband 1
16	+	Proband 1	Proband 1
17	+	Proband 1	Proband 1
18	+	Proband 1	Proband 1
19	+	Proband 1	Proband 1
20	+	Proband 15	NA
21	+	Proband 1	Proband 1
22	+	Proband 1	Proband 1
23	+	Proband 1 (V.a. HP)	NA
24	+	Proband 1	Proband 1
Σ	21 (87,5%)	20 (83,3%)	15 (62,5%)

Tabelle 3.8: Ergebnisse HV1- und HV2-Region von Zellen aus Mischspur

Zeichenerklärung:

NA nicht auswertbar

/ keine Sequenzierung durchgeführt

V.a. HP Verdacht auf Heteroplasmie

3.8 Versuch mit Spermien

Die Gewinnung von einzelnen Spermien war problematisch, da sie aufgrund ihrer geringen Größe nicht so leicht in die Pipettenspitze eingesogen werden konnten wie die Epithelzellen und die Sichtkontrolle sehr schwierig war. Es konnten schließlich 12 einzelne Spermien oder zumindest Teile einer Spermie gewonnen werden. Weiterhin fanden sich im Ejakulat Epithel- oder Urothelzellen, von denen 6 als mögliche Kontrollen zum Sequenzabgleich isoliert werden konnten.

Alle Proben wurden in der HV1-Region amplifiziert, im Minigel zeigte sich aber nur 1 positive Bande. Es folgte eine Sequenzierung von 6 der Spermienproben, bei der die Probe mit der positiven Minigelbande enthalten war, sowie von 3 der Kontrollproben.

Die Kontrollproben ergaben 3 mal die Andersonsequenz, d.h. eine Kontamination durch die Untersucherin kann nicht sicher ausgeschlossen werden. Bei 2 der Spermienproben konnten bei schlechter, unsauberer Qualität der Peaks im Auswertungsprogramm Teile einer Sequenz erkannt werden. Die Abweichungen zur Andersonsequenz der beiden Proben konnten jedoch nicht sicher bestimmt werden, so dass der Versuch insgesamt als negativ gewertet werden muss, da keine eindeutigen Sequenzen nachgewiesen werden konnten.

3.9 Heteroplasmien

Heteroplasmien führen zu Schwierigkeiten bei der Interpretation von Sequenzen (vgl. Kap. 1.2.3). Bei den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen ergab sich in 8 Fällen der Einzelzellanalysen jeweils eine zusätzliche Basenabweichung gegenüber der Vergleichssequenz des Probanden. Die Proben sind in den Ergebnistabellen sowie im Tabellenanhang entsprechend gekennzeichnet. Man kann diese zusätzliche Abweichung im Sinne einer intraindividuellen Heteroplasmie interpretieren. Da die restliche Sequenz der des Probanden entsprach, wurden die Proben als positives Ergebnis gewertet (vgl. Kap. 4.1.2).

Bei der mtDNA-Sequenzierung der Kontroll-Speichelproben der Probanden traten in zwei Fällen intraindividuelle Heteroplasmien in der HV2-Region auf (vgl. Kap. 3.1). In

3 Ergebnisse

den Einzelzell-Untersuchungen wurde lediglich die HV2-Region einer dieser Personen, nämlich Proband 12, untersucht. Bei den entsprechenden Proben ergab sich jeweils die als stärker gekennzeichnete Sequenz.

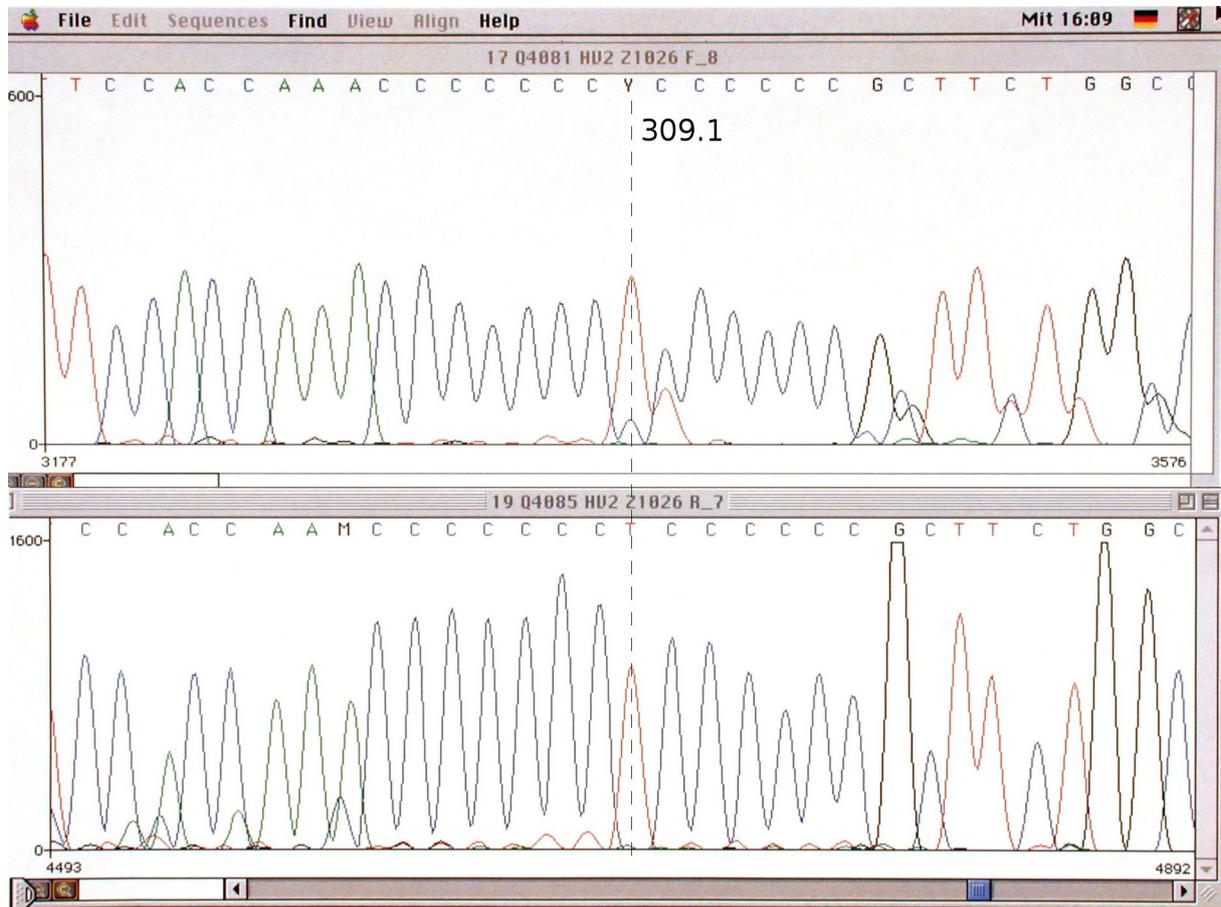


Abbildung 3.1: Längenheteroplasmie bei einer Einzelzelle

Als Besonderheit konnte eine Heteroplasmie innerhalb einer Zelle bei einer Probe von Person 1 nachgewiesen werden. Abbildung 3.1 zeigt einen Ausschnitt von Vorwärts- und Rückwärtsreaktion einer mtDNA-Sequenzierung der HV2-Region. An der Stelle 309.1 ist eine Längenheteroplasmie bei der Einzelzelle sichtbar, nämlich ein zusätzliches C bei einer Minderheit der mtDNA-Fragmente, erkennbar als schwächerer Peak. Die in Abbildung 3.1 dargestellten mtDNA-Abschnitte zeigen eine sich daraus ergebende Verschiebung um eine Base bei der betroffenen selteneren Sequenz, jeweils sichtbar als schwächerer Peak.

3.10 Alternative Einzelzellgewinnung

Mit Hilfe des hochauflösenden Stereomikroskops *Lumar.V12* der Firma *Zeiss* war der Nachweis von kernhaltigen Einzelzellen auf allen Oberflächen mit Kaltlicht und noch besser mit UV-Licht erfolgreich. Es wurde versucht, die Zellen mit dem in die Arbeitsplattform integrierten Mikromanipulator zu isolieren. Am besten gelang das Picken von Metall und Kunststoff, bei Glas war die Adhäsion der Zellen stärker ausgeprägt. Auf Papier waren die Zellen von Fasern umschlungen und konnten nur erschwert gelöst werden. War eine Zelle in die Pipettenspitze aufgenommen worden, konnte sie in das vorbereitete Reaktionsgefäß mit 16,15 μl aqua dest. transferiert werden. Lediglich die Kontrolle über die Ausstoßung der Zelle war limitiert, da die Sicht durch das Material des Tubes eingeschränkt war, so dass eine vollständige Kontrolle der Überführung von Einzelzellen in das Reaktionsgefäß nicht garantiert war.

4 Diskussion

4.1 Interpretation von Sequenzen

4.1.1 Identitätswahrscheinlichkeiten

Nach einer mtDNA-Analyse gilt es, die erhaltene Sequenz zu interpretieren, um einen Personenabgleich durchführen zu können. Bei der Auswertung ergeben sich häufig Schwierigkeiten hinsichtlich eventueller Heteroplasmien und der maternalen Vererbung. Diese Aspekte werden in den folgenden beiden Kapiteln diskutiert. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass eine Mischspur vorlag, die die eindeutige Typisierung erschwert (siehe dazu Kap. 4.4.2).

Entsprechen sich die mtDNA-Sequenzen zweier Proben vollständig in ihren Abweichungen zur Anderson-Sequenz, kann eine Identität zunächst nicht ausgeschlossen werden. Man muss eine Identitätswahrscheinlichkeit ermitteln, indem die Sequenzen mit einer Datenbank abgeglichen werden (vgl. Kap. 1.3), wie bei Bender et al. (2000) beschrieben. Zur Wahrscheinlichkeitsberechnung eignet sich beispielsweise die Innsbrucker Datenbank, aus der man Häufigkeiten von Sequenzvarianten abrufen kann. In der kaukasoïden Bevölkerungsgruppe kommt der häufigste HV1/HV2-Typ mit 7% vor, 12 weitere Typen werden zu etwa 0,5% gefunden (Parsons und Coble, 2001). Wie auch bei der Typisierung durch STR-Systeme muss eine mtDNA-Sequenz-Analyse auf die entsprechende ethnische Gruppe abgestimmt sein, da sich die Variationsbreite sowie die jeweils häufigsten Abweichungen zur Anderson-Sequenz zwischen den verschiedenen Bevölkerungsgruppen unterscheiden (Meyer et al., 1999; Hedman et al., 2007; Mabuchi et al., 2007).

Die Aussagekraft der ermittelten Identitätswahrscheinlichkeit hängt vom Umfang der Datenbank, also der Anzahl der abgespeicherten Sequenzen, ab (Wittig et al., 2000). In den meisten existierenden Datenbanken sind jedoch zu wenige Einträge vorhanden, um für alle Bevölkerungsgruppen exakte Berechnungen vorzunehmen (Rousselet und Mangin, 1998; Röhl et al., 2001). Problematisch ist oft auch die hohe Fehlerhaftigkeit und die fehlende Kontrolle der eingetragenen Sequenzen (Dennis, 2003; Parson et al., 2004; Turchi et al., 2007). Weiterhin gibt es keine internationale Datenbank, die als weltweit gültige Referenz genutzt werden könnte.

Die errechnete Identitätswahrscheinlichkeit bei kompletter Übereinstimmung zweier mtDNA-Sequenzen liegt stets unter 100% und erreicht nicht die hohen Werte einer STR-Analyse von ncDNA. Es können jedoch auch kodierende mtDNA-Regionen zusätzlich untersucht werden, um die Identifikationswahrscheinlichkeit zu erhöhen (Finnilä et al., 2000; Coble et al., 2006). Auch eine Analyse von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), die über das mitochondriale Genom verteilt sind, kann für eine weitere Abklärung hilfreich sein (Vallone et al., 2004; Röper et al., 2007).

Obwohl die Identität zweier Proben aufgrund übereinstimmender mtDNA-Sequenzen nicht vollständig gesichert ist, ist es dennoch möglich, anhand einer mtDNA-Analyse einen möglichen Täter als Spurenverursacher auszuschließen. Unterscheiden sich zwei Sequenzen beim Vergleich in drei oder mehr Basen, ist von einer Nicht-Identität auszugehen (Piercy et al., 1993).

4.1.2 Heteroplasmien

Wie bereits in Kapitel 1.2.3 erläutert, erschwert die hohe Heteroplasmierate der mtDNA eine eindeutige Auswertung von mtDNA-Sequenzierungen, da sie nicht eindeutig von Verunreinigungen, Mischspuren oder Punktmutationen abgrenzbar sind. Das Wissen über Heteroplasmien, beispielsweise über deren Verteilung im menschlichen Körper, ist immer noch ungenügend. Bei einer Sequenzierung fallen sie meist durch zwei übereinanderliegende Peaks an einer Basenposition in der Kapillarelektrophorese auf. Durch das Höhenverhältnis der Peaks lassen sich Rückschlüsse auf die Anteile der jeweiligen

Sequenz in der Probe ziehen, aber es ist nicht feststellbar, an welcher Stelle sich die Heteroplasmie befindet. Das heißt, die beiden unterschiedlichen Sequenzen könnten zum jeweiligen Anteil in zwei verschiedenen Zellgruppen der Probe vorliegen, oder aber die Heteroplasmie bestünde innerhalb aller einzelnen Zellen. Mit Hilfe der Einzelzellanalyse ließe sich diese Frage klären, so dass die in dieser Arbeit vorgestellte Methode auch zur Heteroplasmieforschung geeignet wäre.

Bei der Analyse der Kontrollspeichelproben wurden in zwei Fällen Heteroplasmien in der HV2-Region beobachtet, wobei von einem Probanden auch Einzelzellen einer mtDNA-Sequenzierung der HV2-Region zugeführt wurden. Dabei ergab sich jeweils die Sequenz, die den stärkeren Peak bei der Kontrolle zeigte (vgl. Kap. 3.9). Da sowohl zwischen als auch innerhalb der einzelnen Zellen keine Heteroplasmien auffällig waren, kann man davon ausgehen, dass bei diesem Probanden zwei unterschiedliche Gruppen von Mundschleimhautepithelzellen mit jeweils anderer Sequenz existieren, wobei der eine Teil seltener ist und keine Einzelzelle daraus gewonnen wurde.

Bei einer Probe von Person 1 wurde eine Längenheteroplasmie innerhalb der Einzelzelle beobachtet (vgl. Kap. 3.9), die bei diesem Individuum so selten sein muss, dass sie in der Kontrolle nicht feststellbar war. Ob es sich allerdings um eine Heteroplasmie zwischen allen Mitochondrien dieser Zelle oder aber nur innerhalb einzelner Mitochondrien handelt, ist auch mit der Methode der Einzelzellanalyse nicht feststellbar. Dazu müssten die Mitochondrien einzeln isoliert und deren mtDNA sequenziert werden.

Unterscheiden sich zwei Proben in nur einer Base, ist das Ergebnis nicht eindeutig, da sowohl die Möglichkeit besteht, dass bei übereinstimmenden Proben eine Heteroplasmie oder eine Verunreinigung vorliegt, als auch, dass eine Identität dadurch unwahrscheinlich ist (Bär et al., 2000). Man muss bei der Auswertung auch die unterschiedlichen Heteroplasmieraten einzelner Gewebetypen bedenken, die die Wahrscheinlichkeit einer Heteroplasmie in solch einem Fall beeinflussen (Paneto et al., 2007).

Bei den in dieser Arbeit dargestellten Versuchen ergab sich in 8 Fällen der Einzelzellanalysen jeweils eine zusätzliche Basenabweichung gegenüber der Vergleichssequenz des Probanden. Wie soeben erläutert, ist dieses Ergebnis nicht eindeutig. Da es sich um

einzelne Zellen eines Probanden handelt, ist eine Mischspur auszuschließen. Es bestünde die Möglichkeit, dass die untersuchte Zelle von einer anderen Person stammt, die eine nur in einer Base unterschiedliche mtDNA-Sequenz aufweist. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass in allen 8 Fällen eine Kontamination durch fremde Zellen mit zudem sehr ähnlicher Sequenz vorlag. Die erhaltenen Sequenzen wurden daher als positiv gewertet, d.h. eine Übereinstimmung mit dem Probanden wurde angenommen. Aufgrund der hohen Heteroplasmierate der mtDNA ist es nicht unwahrscheinlich, dass sich einzelne Zellen in einer Base unterscheiden, so dass in den vorliegenden 8 Fällen der Verdacht auf eine Heteroplasmie besteht. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Kontamination durch DNA-Bruchstücke während der Analysen im DNA-Labor (vgl. Kap. 4.2), die aber auch zu einer positiven Bewertung der Sequenzen geführt hätte. Die Proben sind jedoch im Tabellenanhang entsprechend gekennzeichnet, da die Ergebnisse zwar für die Fragestellung dieser Arbeit (sog. begrenztes Szenario) eine hohe Identitätswahrscheinlichkeit besitzen, aber nicht für eine eindeutige Verwendbarkeit vor Gericht ausreichen würden.

4.1.3 Maternaler Vererbungsmodus

Aufgrund der maternalen Vererbung der mtDNA ist durch eine mtDNA-Sequenzierung eine Individualisierung nur begrenzt möglich, da alle in maternaler Linie verwandten Personen die selbe Sequenz in der Kontrollregion aufweisen müssten, falls zwischen den Generationen keine Punktmutationen aufgetreten sind. Mehrere in maternaler Linie verwandte Tatverdächtige sind also durch die mtDNA-Analyse einer Spur nicht zu differenzieren.

Der Vorteil der maternalen Vererbung liegt jedoch in der Möglichkeit, Personen, von denen keine DNA zum Vergleich gewonnen werden kann, über Verwandte in maternaler Linie zu identifizieren. So können auch flüchtige oder vermisste Menschen als Verursacher einer Spur erkannt oder ihre Überreste identifiziert werden.

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche ist dieser Aspekt von untergeordneter Bedeutung, da die Testpersonen untereinander nicht verwandt sind, so dass bei übereinstimmender Sequenz von einer Identität ausgegangen werden konnte.

4.2 Qualität und Verwendbarkeit der erhaltenen Sequenzen

Das langfristige Ziel der dargestellten Experimente ist die mtDNA-Sequenzierung an einzelnen Zellen in der forensischen Fallarbeit. Um die Methode sicher für diesen Zweck etablieren zu können, muss eine hohe Qualität der erhaltenen Sequenzen garantiert sein, da nur so eine eindeutige Typisierung möglich ist. Auch bei der bereits standardmäßig eingesetzten DNA-Analyse von mehrzelligen Proben stellen Kontaminationen ein großes Problem im forensischen DNA-Labor dar. Durch die Verwendung von einzelnen Zellen als Probenmaterial rückt dieser Aspekt noch weiter in den Vordergrund, da die minimalen DNA-Mengen noch leichter von Kontaminationen überlagert werden können. Weiterhin musste für die PCR eine im Vergleich zur konventionellen Amplifizierung von mehrzelligen Proben relativ hohe Zyklenzahl gewählt werden, um das geringe Ausgangsmaterial entsprechend zu vervielfältigen. Dadurch fallen auch eventuelle Kontaminationen in der Probe stärker ins Gewicht. Es wurde gezeigt, dass ein Verhältnis von verunreinigender Substanz zu Probe größer als 8:1 zu einer fehlerhaften Basenerkennung in der Kapillarelektrophorese führt. Daher wurde ein Verhältnis von 10:1 als Obergrenze für eine akzeptable Kontaminationsmenge festgesetzt (Andréasson et al., 2006).

Kontaminationen können vielfältige Ursachen haben und bei jedem Arbeitsschritt entstehen. Häufige Quellen sind Zellen oder DNA-Bruchstücke von Personen, die mit der Probe, den Arbeitsmaterialien oder den Reagenzien in Kontakt waren, aber auch DNA-freie Substanzen wie bestimmte Chemikalien oder Enzyme, die mit der DNA interagieren oder die Analysen stören, beispielsweise DNAsen.

Um die Gefahr von Kontaminationen während der Versuchsdurchführung zu verringern, wurden die von Bär et al. (2000) aufgeführten Empfehlungen der „DNA commission of the international society for forensic genetics“ beachtet. Dazu zählen die Verwendung von Handschuhen, Kitteln und speziellen, für die DNA-Analyse zugelassenen Pipettenspitzen, die Reinigung von Arbeitsoberflächen sowie die strikte Trennung von prä- und post-PCR-Arbeitsbereichen im Labor. Weiterhin wurden die verwendeten Reagenzien in

kleinen Mengen regelmäßig neu angesetzt, beispielsweise die Primer, oder bei Verdacht auf Kontaminationen ausgetauscht. Sollte eine Kontrollprobe eines Probanden in seltenen Fällen zusammen mit den Einzelzellproben analysiert werden, so wurde die Kontrolle ans Ende der Probenreihe gestellt, um eine Verschleppung der DNA in darauffolgende Reaktionsgefäße zu vermeiden. Die besonders empfindliche Sequenzierungsreaktion wurde unter einer Sterilbank angesetzt, die durch UV-Licht dekontaminiert werden konnte. Im Anschluss an die PCR wurde eine Aufreinigung durchgeführt, um eventuelle verunreinigende Substanzen in der Probe zu minimieren.

Die Qualität der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen war überwiegend sehr gut. Die meisten Sequenzen waren rein und eindeutig auswertbar, so dass sie für forensische Zwecke verwertbar gewesen wären. Einige Proben wiesen leichte Verunreinigungen in Form von zusätzlichen flachen Peaks in der Kapillarelektrophorese auf, die jedoch von der eigentlichen Hauptsequenz problemlos abgrenzbar waren und die Auswertung nicht beeinträchtigten. Proben mit sehr starken Verunreinigungen, bei denen die Sequenz aufgrund von sich überlagernden Peaks nicht sicher bestimmbar war, wurden als negativ gewertet.

Insgesamt fünf Proben aus verschiedenen Reihen wiesen eine vollständig andere Sequenz als die zum Probanden gehörige auf und wurden als negativ gewertet. Bei einer dieser Proben handelte es sich um die Anderson-Sequenz in der HV1-Region. Da die Untersucherin in der Kontroll-Region keine Abweichungen zur Referenz aufweist, ist eine Kontamination durch sie während der Versuchsdurchführung anzunehmen. Die vier anderen Sequenzen könnten von einer Kontamination durch fremde Zellen oder Zellbestandteile herrühren, mit denen Arbeitsmaterial verunreinigt gewesen sein könnte. Auch DNA-Bruchstücke könnten ursächlich sein, da die erhaltenen Sequenzen sehr unrein und nicht vollständig auswertbar waren.

In acht Fällen kam es zu einer zusätzlichen Basenabweichung gegenüber der Kontrollprobe des jeweiligen Probanden. Ob es sich dabei um die Sequenz einer anderen Person, eine Heteroplasmie oder eine Verunreinigung handelt, ist nicht mit Sicherheit festzulegen. Dieser Aspekt wurde bereits in Kapitel 4.1.2 diskutiert. Bei einer Probenreihe trat

bei allen acht Proben in der HV2-Region die gleiche Veränderung auf, nämlich ein zusätzlicher Peak an Position 69 und ein kurzer Abschnitt mit neben der Hauptsequenz sichtbaren kleineren Peaks zwischen Position 80 und 90. Die Lage der zusätzlichen Peaks entsprach nicht exakt den Hauptpeaks, so dass eine Heteroplasmie eher unwahrscheinlich ist. Da es sich stets um die selben Veränderungen handelte und diese immer im gleichen Bereich der Sequenz vorkamen, ist hier von einer Kontamination auszugehen. Mit Ausnahme dieser Probenreihe waren alle anderen beobachteten Verunreinigungen nicht regelmäßig, so dass es sich vermutlich um einzelne Kontaminationen handelte, die durch Zufall oder durch vereinzelt verunreinigte Arbeitsmaterialien entstanden sein könnten.

Zur Feststellung von Kontaminationen ist es in der forensischen DNA-Analyse üblich, eine Negativkontrolle bei jeder PCR mitzuführen. Ist die Negativkontrolle positiv, beispielsweise als sichtbare Bande im Minigel, kann durch die Sequenzierung der Kontrolle eine Kontaminationsquelle aufgedeckt werden. Im Rahmen der Versuche für die vorliegende Arbeit war nur in einem Fall eine eindeutig positive Bande im Minigel sichtbar. Die Sequenzierung ergab die Sequenz der beiden letzten Proben in dieser Reihe, so dass von einer Verschleppung der DNA dieser Proben in die darauf folgende Negativkontrolle auszugehen ist. Bei allen anderen Probenreihen, auch denen mit in der Kapillarelektrophorese sichtbaren Verunreinigungen, ergab die Sequenzierung der Negativkontrolle keine sichtbare Basenabfolge. Kontaminationen durch verunreinigte Reagenzien traten demnach bei den durchgeführten Versuchen nicht auf.

4.3 Beiträge zur Verbesserung der Methodik

4.3.1 Verbesserung des Single-Cell-Pickings mit dem Mikromanipulator

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die von Löw (2007) entwickelte Methode der mtDNA-Sequenzierung an Einzelzellen zu verbessern, um dadurch später eine Anwendbarkeit in

der forensischen Fallarbeit erreichen zu können. Zur Isolierung der Einzelzellen sollte weiterhin ein Mikromanipulator benutzt werden. Löw (2007) beschreibt verschiedene Techniken, mit denen die Überführung der Zellen vom Ausstrich in das Reaktionsgefäß versucht wurde. Als endgültige, weil am besten geeignete Methode erwies sich die Isolierung der Einzelzellen direkt vom Objektträger unter Verwendung von demineralisiertem Wasser als Medium. Zur Überführung in das spätere Reaktionsgefäß wurde dieses auf einen Objektträger gelegt. Am Rand des Gefäßes befand sich das Wasser für die PCR, in das die Zelle schließlich mit Hilfe des Mikromanipulators eingebracht wurde.

Durch dieses Verfahren ergaben sich jedoch zwei große Probleme. Zum einen wurde durch die physikalischen Eigenschaften des gewählten Mediums Wasser die Zelle in der dünnen Pipettenspitze sehr stark beschleunigt. Zum anderen war die Fokussierung durch das parallel zum Objektträger positionierte Reaktionsgefäß kaum möglich. Durch diese beiden Aspekte war die ständige Sichtkontrolle, die nötig ist, um die sichere Isolierung einer einzelnen Zelle zu garantieren, erschwert. Sowohl beim Einsaugen als auch beim Ausstoßen der Zelle war diese Kontrolle nicht immer gegeben.

Um die Geschwindigkeit, mit der die Zelle in der Pipettenspitze bewegt werden konnte, leichter regulieren zu können, wurde statt demineralisiertem Wasser PVP als Medium eingesetzt. Die Isolierung von Einzelzellen mit Hilfe von PVP wurde bereits von Löw (2007) durchgeführt. In ihrer Arbeit war jedoch bei keiner der mit PVP gewonnenen Zellen eine positive Sequenzierung möglich. Die Vermutung, dass das PVP aufgrund von Interaktionen mit den Reagenzien negative Auswirkungen auf den Verlauf der späteren PCR habe, wurde durch einen Testlauf in der Real-Time-PCR widerlegt (vgl. Kap. 3.2). Im Vergleich zu Wasser besitzt PVP eine höhere Viskosität, wodurch die Position der Zelle in der Pipettenspitze gut kontrolliert werden konnte. Das verwendete PVP-Medium musste vorher angemischt werden, um den optimalen Viskositätsgrad zu erreichen (vgl. Kap. 2.3.2.1). War das Gemisch zu dünnflüssig, war die Geschwindigkeit der Zelle beim Picken weniger gut zu kontrollieren, war es zu dickflüssig, verstopfte die dünne Pipettenspitze. Die Zubereitung des PVP-Gemischs stellt eine mögliche Kontaminationsquelle dar, durch regelmäßig frisches Ansetzen ist diese Gefahr jedoch zu minimieren.

Zur Verbesserung der Sicht bei der Überführung der Zelle wurde das spätere Reaktionsgefäß am zweiten Arm des Mikromanipulators befestigt, wobei sich am unteren Rand der Wassertropfen befand, in den die Zelle ausgestoßen werden sollte. Eine genaue Beschreibung der Technik findet sich in Kapitel 2.3.2.4. Durch diese Methode wurde ein über den Gefäßrand hinaus reichender, hängender Tropfen erzielt, in den mit dem Mikroskop hinein fokussiert werden konnte. Die zusätzliche Sichtbarriere der Gefäßwand wurde damit umgangen. Nach Einführung der Pipettenspitze in den Tropfen konnte die Spitze neu fokussiert werden und war inklusive der im Inneren befindlichen Zelle deutlich sichtbar.

Durch diese beiden Verbesserungsschritte konnte eine nahezu vollständige Sichtkontrolle der Zellen erreicht werden. Es mussten nur noch sehr wenige Zellen verworfen werden, bei denen die Überführung nicht eindeutig und kontrolliert gelang. Dieser Aspekt ist von großer Bedeutung, wenn mit minimalem Spuren- und damit Zellmaterial gearbeitet werden soll. Mit zunehmendem Geschick bei der Verwendung des Mikromanipulators war schließlich die Isolierung der Einzelzellen sicher und relativ schnell und einfach möglich.

4.3.2 Lysereaktion

Löw (2007) führte vor der Amplifizierung keine Lysereaktion durch, da davon ausgegangen wurde, dass die Membranen der Zellen durch die osmotische Wirkung des demineralisierten Wassers, das Tiefrieren sowie die Denaturierung in der PCR ausreichend geschädigt würden und so die DNA für die Amplifizierung in freier Form vorliegen würde. Zunächst sollte die bereits von Löw (2007) erfolgreich eingesetzte Versuchsdurchführung reproduziert werden. Dazu wurden 28 Zellen ohne vorhergehende Lysereaktion der PCR zugeführt. Die Quote positiver Sequenzierungen in der HV1-Region erreichte mit 21,4% in etwa die beschriebene „Erfolgsquote“ von 19,2% (vgl. Kap. 3.3.1).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war eine Verbesserung der Methode, um die Quote positiver Sequenzierungen zu steigern. Für eine Anwendung in der forensischen Routine wäre es wünschenswert, wenn aus rarem Spurenmaterial jede Zelle erfolgreich analysiert werden könnte. Bei mehrzelligen Proben ist es im Allgemeinen üblich, vor der PCR

eine Lysereaktion zur DNA-Extraktion durchzuführen (Klintschar und Neuhuber, 2000; Bienvenue et al., 2006). Es sollte geklärt werden, ob sich auch bei den Einzelzellen durch eine zusätzliche Lyse mehr positive Sequenzierungen erzielen ließen. Nachdem die ersten Versuchsreihen für die HV1-Region vielversprechende Ergebnisse lieferten, wurde die Lyse standardmäßig bei allen Proben angewendet.

Für die Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region musste die Lysereaktion hinsichtlich der Reagenzienmengen angepasst werden. Die verschiedenen Ansätze sowie deren Ergebnisse wurden in Kapitel 3.5.2 dargestellt. Es war zu erwarten, dass mit gegenüber der Amplifizierung nur einer der beiden großen hypervariablen Regionen gleichbleibenden Mengen an Puffer und Proteinase die Lyse am erfolgreichsten sein würde, da die Verringerung der Menge an aqua dest. im Verhältnis minimal war. Mit diesem Ansatz konnte jedoch keine positive Sequenzierung erzielt werden. Erst eine im Verhältnis sehr große Abweichung bei der Puffermenge, nämlich eine Verringerung um die Hälfte, führte zu auswertbaren Ergebnissen in der Kapillarelektrophorese. Da auch das Minigel beim erfolglosen Lyseansatz stets negativ war, ist davon auszugehen, dass entweder die PCR oder die Lyse ansich durch die Änderungen gestört wurde. Sowohl demineralisiertes Wasser als auch der Puffer sind feste Bestandteile jeder PCR, so dass eine Beeinträchtigung bei der Amplifizierung unwahrscheinlich ist. Warum eine Abnahme des Verhältnisses von Wasser zu Puffer allerdings die Lysereaktion so stark beeinträchtigen sollte, dass anschließend keine Amplifizierung mehr möglich ist, bleibt unklar. Selbst die Quote von etwa einem Fünftel positiver Sequenzierungen, wie sie ohne vorherige Lyse erreicht wurde, konnte nicht erzielt werden, so dass eine beträchtliche Schädigung der DNA zu vermuten ist. Ob dieses durch einen zu hohen Pufferanteil möglich ist, bleibt klärungsbedürftig.

Durch das Hinzufügen der Lysereaktion zur üblichen Versuchsdurchführung konnte bei insgesamt 57 Zellen eine Quote von 73,7% positiver Sequenzierungen in der HV1-Region nach einfacher HV1-PCR erreicht werden. Nach Amplifizierung der HV2-Region lag der Anteil bei 86,4% von insgesamt 22 analysierten Zellen. Die Erfolgsrate war demnach deutlich höher als bei den von Löw (2007) durchgeführten Versuchen ohne Lyse. Durch diesen zusätzlichen Schritt ließ sich also eine enorme Verbesserung erzielen.

4.3.3 Koamplifizierung

Bei der vorgestellten Methode zur mtDNA-Analyse an Einzelzellen fand die PCR im selben Reaktionsgefäß statt, in das die Zelle nach der Isolierung überführt und in dem auch die Lysereaktion angesetzt wurde. Dadurch ist eine maximale Ausbeute an Templates für die PCR zu erwarten und die Gefahr von DNA-Verlust oder Kontaminationen wird vermindert. Wird allerdings die Zelle für einen PCR-Ansatz verwendet, der beispielsweise der Amplifizierung der HV1-Region dient, wäre eine anschließende Amplifizierung der HV2-Region erst nach aufwändigen Aufreinigungsschritten möglich, wodurch ein erheblicher Verlust an DNA zu erwarten ist. Folglich kann bei diesem Vorgehen aus einer Zelle entweder nur die HV1- oder die HV2-Region amplifiziert und sequenziert werden. Die Aussagekraft der forensischen mtDNA-Analyse steigt aber, wenn sowohl Sequenzen der HV1- also auch der HV2-Region für einen Personenabgleich zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund sollte eine gleichzeitige Amplifizierung dieser beiden hypervariablen Regionen in einem Ansatz erfolgen, um aus nur einer Zelle die vollständige Information der mtDNA-Analyse zu gewinnen.

In der Arbeit von Löw (2007) wurde bereits der Versuch beschrieben, eine Koamplifizierung bei Proben mit verschiedener Zellzahl bis hin zu Einzelzellen durchzuführen. Für die PCR wurden die beiden Vorwärtsprimer F15989 und F15 eingesetzt. Im Minigel zeigten sich zwei Banden, die als HV1- und HV2-Bande bezeichnet wurden. Aufgrund der verwendeten Primer dürfte es sich allerdings dabei um ein langes Amplifikat vom Beginn der HV1- bis zum Ende der HV2-Region sowie ein kürzeres Amplifikat der HV2-Region handeln. Die HV2-Region wäre im Ansatz stärker vertreten. Um eine ausgewogenere Menge beider Regionen und viele gleich lange Amplifikate zu erhalten, wurden in der vorliegenden Arbeit der HV1-Vorwärtsprimer F15989 und der HV2-Rückwärtsprimer R429 verwendet, wodurch ein langes Amplifikat entstehen sollte, in dem beide hypervariablen Regionen enthalten sind (vgl. Kap. 2.4.2.4). Als Alternative zu der kompletten Amplifikation von HV1- und HV2-Region hätte eine Duplex-PCR mit 2 Primerpaaren in einem Ansatz (Chong et al., 2005) versucht werden können. Bei dem Einsatz von 2 Primerpaaren ist jedoch eine vermehrte Artefaktbildung im Sinne unspezifischer

PCR-Produkte zu erwarten, insbesondere durch die erhöhte Zyklenzahl bei der Einzelzellanalyse.

In den Experimenten von Löw (2007) gelang eine Sequenzierung der HV1- und HV2-Region aus koamplifizierten Proben mit mindestens 3 Zellen. Die Analyse von Einzelzellen blieb erfolglos. Die Versuche der vorliegenden Arbeit ergaben nach Koamplifizierung an insgesamt 112 untersuchten Einzelzell-Proben eine Quote positiver Sequenzierungen von 67,0% in der HV1-Region und 57,1% in der HV2-Region. An über der Hälfte der isolierten Zellen war somit nach Koamplifizierung eine Typisierung möglich, so dass eine erfolgreiche Identifizierung aus Einzelzellen bei minimalem Spurenmaterial mit dieser Methode wahrscheinlich ist. Die Quoten erfolgreicher Sequenzierungen lagen unter denen, die nach einfacher HV1- oder HV2-PCR erreicht wurden. Die Ursache könnte in einer erschwerten Amplifizierung von längeren DNA-Abschnitten bei geringem Spurenmaterial liegen (Gabriel et al., 2001; Hellmann et al., 2001).

Ist die Negativkontrolle einer Probenreihe frei von DNA, so wäre eine positive Bande im Minigel bereits als erfolgreiche Amplifizierung zu werten. Die HV1-Region von im Minigel positiven Proben konnte nach einfacher PCR zu 95,5% erfolgreich sequenziert werden. Für die HV2-Region lag der Anteil bei 95,0%. Nach Koamplifizierung ergaben sich bei 80,4% der 112 isolierten Zellen sichtbare Banden im Minigel. Daraus konnten die HV1-Region in 83,3% und die HV2-Region in 71,1% der Fälle sequenziert werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine erfolgreiche Amplifizierung mit Schwierigkeiten bei der anschließenden Sequenzierungsreaktion. Durch die Koamplifizierung mit einem langen Amplifikat könnten vermehrt Artefakte und Fehler aufgetreten sein, die eine erfolgreiche Sequenzierung verhindert haben könnten. Auffällig ist auch die höhere Ausfallquote in der HV2-Region bei Zellen, deren HV1-Region bereits erfolgreich dargestellt werden konnte. Dafür könnten Faktoren wie unterschiedliches Primer-Bindungsverhalten oder unterschiedlich fehleranfällige Basenabfolgen in den beiden Regionen verantwortlich sein.

Die Amplifizierung eines langen DNA-Abschnitts könnte bei der Anwendung in der forensischen Fallarbeit problematisch sein, da es sich dabei nicht um kontrolliert per Abstrich entnommene Zellen, sondern um degradiertes Spurenmaterial handeln würde. Für

die Anwendung in der forensischen Praxis wäre deshalb in weiterführenden Untersuchungen eventuell der Einsatz einer Nested PCR (Dimo-Simonin et al., 2000; Brandstätter und Parson, 2003; Imaizumi et al., 2007) zu versuchen.

Auch die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bereits verwendete Methode der Real-Time-PCR könnte bei der Einzelzelluntersuchung Verwendung finden. Sie eignet sich beispielsweise zur Quantifizierung von mtDNA-Mengen aus stark degradiertem Spurenmaterial (Alonso et al., 2004) oder zur Mischspuranalyse (vgl. Kap. 4.5). Wäre die in der Probe enthaltene DNA-Menge bekannt, könnten weitere Untersuchungsschritte, z.B. die Zyklenzahl in der PCR, entsprechend angepasst werden. Zu stark beschädigte DNA könnte erkannt werden, so dass dadurch die kostenintensiven Folgeanalysen eingespart werden könnten. Bei degradiertem Material wäre prinzipiell die Amplifizierung von kurzen DNA-Abschnitten zu erwägen, da in diesen Fällen eine Koamplifizierung mit einem langen DNA-Strang nicht Erfolg versprechend ist (s.o.).

4.4 Weiterführende Versuche

4.4.1 Versuch mit Zigarettenkippe

Nach erfolgreicher mtDNA-Sequenzierung an einzelnen Zellen aus Mundschleimhaut-Abstrichen sollte die Anwendbarkeit der Methode bei forensischem Spurenmaterial getestet werden. Dazu wurde als typischer Spureenträger eine Zigarettenkippe gewählt (vgl. Kap. 2.6). Diese Versuchsdurchführung wurde bereits von Löw (2007) beschrieben und bei 5 von 9 isolierten Zellen war eine positive Sequenzierung der HV1-Region möglich. Für die vorliegende Arbeit wurden 8 Einzelzellen gewonnen, von denen 6 die richtige Sequenz in der HV1-Region aufwiesen. Es gelang somit erfolgreich, das durch Löw (2007) erreichte Ergebnis auch mit den Modifikationen in der Methodik zu reproduzieren.

Löw (2007) beschreibt auch den Versuch einer Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region an Reihen mit mehreren bis hin zu einzelnen Zellen, die von einer Zigarettenkippe gewonnen wurden. Dabei konnten jedoch für die HV1-Region keine positiven Ergebnisse

erzielt werden. Die Sequenzierung der HV2-Region war nur aus einer Probe mit 5 Zellen möglich. Folglich gelang keine Koamplifizierung von Einzelzellen einer Zigarettenkippe.

4.4.2 Versuch mit Mischspur

Beim Vorliegen einer Mischspur könnte die Einzelzelluntersuchung der konventionellen mtDNA-Sequenzierung überlegen sein (vgl. Kap. 1.4.2). Löw (2007) berichtet über die Isolierung einzelner Zellen aus einer für den Versuch hergestellten Mischspur von einer Zigarettenkippe mit anschließender Amplifizierung der HV1-Region. Es wurden insgesamt 79 Zellen gewonnen, von denen 38 in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt wurden. Davon waren 7 (8,9%) positiv und es konnte zwischen den beiden Testpersonen differenziert werden.

In den weiterführenden Versuchen dieser Arbeit sollten die bisher erzielten Ergebnisse zunächst unter Anwendung der Modifikationen in der Methode reproduziert werden. Es wurden eine Amplifizierung und Sequenzierung der HV1-Region an 9 Proben versucht, die jedoch erfolglos blieben. Auch eine Koamplifizierung von 8 Proben mit allerdings noch nicht optimierter Lyse ergab keine auswertbare Sequenz (vgl. Kap. 3.7). Erst nach Änderung der Lysereaktion war auch die Koamplifizierung einer Mischspur möglich. Ein Großteil der 24 isolierten Einzelzellen konnte erfolgreich sequenziert werden, nämlich 83,3% in der HV1- und 62,5% in der HV2-Region. Eine eindeutige Zuordnung der Probanden war nur in der HV1-Region möglich, da sämtliche Proben der einen Testperson in der HV2-Region nicht auswertbar waren. Dennoch ist das Experiment als Erfolg zu werten, da eine Differenzierung der beiden Spurenanteile der Mischspur zumindest in der HV1-Region gelang und für eine der Personen auch die Sequenzen der HV2-Region bestimmt werden konnten, wodurch eine höhere forensische Aussagekraft gegeben ist. Für eventuell folgende Versuche in der Zukunft gilt es, die eindeutigen Schwierigkeiten bei der Sequenzierung der HV2-Region nach der in dieser Arbeit vorgestellten Methode der Koamplifizierung zu untersuchen und wenn möglich zu beheben, da hierin eine wichtige Ursache für die Ausfallquote zu liegen scheint (vgl. Kap. 4.3.3). Alternative Techniken zur Analyse von Mischspuren werden in Kapitel 4.5 erläutert.

4.4.3 Versuch mit Spermien

Da sich die Anwendung der Einzelzellanalyse nicht auf Epithelzellen beschränken sollte, wurden Spermien als weiteres, in der forensischen Routine sehr häufig vorkommendes Probenmaterial untersucht. Gerade bei Verdacht auf Vergewaltigung ist eine Mischung der Spuren von Täter und Opfer häufig, wobei meistens Spermien des Täters zu finden sind. Die in solchen Fällen durchgeführte differentielle Lyse führt nicht immer zur erfolgreichen Trennung der DNA-Muster (Anslinger et al., 2005; Hatsch et al., 2007), so dass der Untersuchung von Einzelzellen dabei große Bedeutung zukommen könnte.

Die Gewinnung der einzelnen Spermien mit dem Mikromanipulator gestaltete sich jedoch sehr schwierig, da sie beim Abkratzen vom Boden der Petri-Schale mit der Pipettenspitze geschädigt oder zerteilt wurden. Auch der ständige Sichtkontakt bei der Überführung ins Reaktionsgefäß war aufgrund der geringen Größe schwer zu gewährleisten. Von den 12 isolierten Spermien konnte keines erfolgreich sequenziert werden. Die durchschnittliche Anzahl von mtDNA-Molekülen in Spermien liegt bei nur etwa 1/500 der Kopienzahl in einer Epithelzelle (Bender et al., 2000), so dass hierin die wahrscheinlichste Ursache für die negativen Ergebnisse liegt. Um in Zukunft auch die mtDNA-Sequenzierung an einzelnen Spermien erfolgreich durchführen zu können, müsste die Technik der Einzelzellgewinnung mit dem Mikromanipulator noch weiter verbessert werden, um zumindest den Transfer eines kompletten Spermiums sicherzustellen. Dabei kommt dem Medium wahrscheinlich große Bedeutung zu, da frei in Flüssigkeit bewegliche Zellen einfacher zu gewinnen sind als am Boden anhaftende. Weiterhin könnte eine erhöhte Zyklenzahl versucht werden, auch wenn dann verstärkt mit Verunreinigungen und Artefakten zu rechnen ist.

4.5 Kritische Bewertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Ziel der Arbeit war eine Verbesserung der von Löw (2007) beschriebenen Methode zur mtDNA-Sequenzierung an Einzelzellen, so dass ihr Einsatz in der forensischen Routine zur Typisierung bei minimalem Spurenmaterial oder Mischspuren möglich werden sollte. Die Fortschritte bei der Versuchsdurchführung wurden bereits ausführlich in Kapitel 4.3 diskutiert. Im Folgenden soll die Bedeutung der experimentellen Arbeit im Vergleich zu anderen, in der Literatur beschriebenen Methoden erörtert werden.

In Kapitel 1.1.3 wurden bereits einige Publikationen zur Einzelzellanalyse vorgestellt. Wie dort dargelegt, haben die Versuche mit kodierenden ncDNA- oder mtDNA-Abschnitten keine Bedeutung für forensische Fragestellungen und sollen hier nicht weiter diskutiert werden. Findlay et al. (1995) beschrieben erstmals eine Untersuchung von STRs an einzelnen Zellen zur Kontaminationskontrolle in der Präimplantationsdiagnostik. Zur Gewinnung der Einzelzellen wurde eine Probe mit Zellen in PBS-Puffer gewaschen und in 100 µl PBS überführt. Unter Verwendung eines Mikroskops und einer feinen Pipette wurden die Zellen mehrfach in 1-2 µl PBS-Puffer gewaschen, wodurch sichergestellt sein sollte, dass sich nur eine einzelne Zelle in der Pipette befand, die dann in ein Eppendorf-Tube gegeben wurde. Diese Methode ist äußerst fraglich, da es sich dabei quasi nur um eine Verdünnung auf Einzelzellniveau handelt. Über eine Sichtkontrolle sowie die Technik der Überführung ins Reaktionsgefäß wird nicht berichtet. Weiterhin ist die Arbeit ohne forensischen Bezug entstanden und Kontrollen bei der STR-Analyse waren nicht vorhanden. Im darauf folgenden Jahr wurde über ein ähnliches Thema mit STRs zur Kontaminationskontrolle publiziert (Findlay und Quirke, 1996), wobei keine Angaben über die Gewinnung der Einzelzellen gemacht werden.

Die erste Veröffentlichung über eine STR-Analyse an Einzelzellen mit forensischem Bezug stammt von Findlay et al. (1997). Die Autoren berichten über die Isolierung von 226 einzelnen Mundschleimhaut-Epithelzellen von vier verschiedenen Probanden mit Hilfe eines Mikromanipulators. An der Hälfte dieser Zellen sei eine erfolgreiche Analyse von

6 STR-Systemen durchgeführt worden. Es fehlen jedoch detaillierte Informationen bzgl. des Protokolls zur DNA-Analytik sowie konkrete Angaben über die Präparation und Gewinnung der Zellen. Auf dem „International Symposium on Forensic DNA Technologies“ im Rahmen der 82. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin 2003 in Münster referierte Findlay über seine Versuche, die Grundlage für die Nature-Publikation waren (Findlay, 2003). In der anschließenden Diskussion wurde er nach seiner Methode der Einzelzellgewinnung gefragt. Findlay antwortete, dass er die auf Papier befindlichen Zellen unter dem Mikroskop eingestellt und mit einem Spatel abgekratzt habe. Danach habe er die Spatelspitze in das Reaktionsgefäß getaucht. Er bestritt nicht, dass durch diese Methode völlig unkontrolliert zwischen 0 und möglicherweise bis zu 100 Zellen zur Analyse gelangen konnten. Somit bestand bei den publizierten Versuchen keine Kontrolle über die in die PCR eingesetzte Zellzahl, womit die genannte Erfolgsquote auch im Hinblick auf die für eine Einzelzellanalyse sehr niedrige Zyklenzahl von 34 in der PCR hinreichend erklärt wäre.

In Kapitel 1.4.2 wurden bereits die Vorteile einer Einzelzelluntersuchung bei der Analyse von Mischspuren dargelegt. In der Literatur sind mehrere Methoden beschrieben, mit denen aus einer Mischspur Personen differenziert werden können, ohne auf Einzelzellniveau herunter zu gehen. Hatsch et al. (2007) beschreiben eine mtDNA-Analyse mit Hilfe der Klonierung. Nach differentieller Lyse eines Vaginalabstrichs nach Vergewaltigung wurde die männliche Fraktion kloniert, wobei sich in der anschließenden mtDNA-Sequenzierung eine Mischspur ergab. Da die Vergleichssequenzen von Opfer und Verdächtigtem bekannt waren, wurde versucht, die Mischspur durch eine RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)-Analyse zu trennen und daraufhin erneut zu sequenzieren. Es konnte keine vor Gericht verwertbare Typisierung erreicht werden, es ergab sich lediglich ein Verdacht auf Übereinstimmung der DNA-Muster der männlichen Fraktion und des Verdächtigen. Problem dieser Methode ist das hohe Kontaminationsrisiko durch die vielfältigen Arbeitsschritte. Nur bei Vorliegen einer Vergleichssequenz kann die Mischspur differenziert werden, wobei eine Trennung durch RFLP nicht in allen Fällen und nicht zu 100% möglich ist.

Walker et al. (2004) verwendeten ebenfalls eine Klonierungs-Technik, wobei die Amplifikate einer artifiziellen Mischspur von drei Probanden kloniert und anschließend sequenziert wurden, bis drei verschiedene, den Probanden entsprechende Sequenzen gefunden wurden. Auch diese Methode weist Einschränkungen auf, beispielsweise das ebenfalls hohe Kontaminationsrisiko und die fehlende Kontrolle, ob eine ermittelte Sequenz wirklich nur von einem Individuum stammt, vor allem, wenn noch keine Vergleichsproben vorliegen.

Eine weitere Methode ist die Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC), wie sie unter anderem von LaBerge et al. (2003) beschrieben wurde. Damit werden mtDNA-Amplifikate paarweise, nämlich unbekannte Probe gegen bekannte Kontrolle, abgeglichen. Die Amplifikate werden denaturiert und wieder renaturiert, wodurch eine Mischung aus unterschiedlich stark aneinander gebundenen DNA-Strängen entsteht, je nachdem, wie stark die beiden Sequenzen voneinander abweichen (sog. Heteroduplices). Stimmen beide Sequenzen überein, binden alle Stränge gleichmäßig aneinander (sog. Homoduplices), so dass die Sequenz der Probe anhand der Vergleichsequenz ermittelt werden kann. LaBerge et al. (2003) beschreibt auch die Trennung einer artifiziellen Mischspur mit dieser Methode, wobei zwei Fraktionen durch ihr unterschiedliches Bindungsverhalten aufgrund von Basenabweichungen chromatographisch getrennt wurden. Anschließend wurden die beiden Fraktionen getrennt aus dem Chromatographen entnommen und sequenziert. Auch bei dieser Versuchsdurchführung besteht ein hohes Kontaminationsrisiko durch die vielen Arbeitsschritte. Die Trennung war für eine Mischspur erfolgreich, die artifiziell in einem Mischungsverhältnis von 1:1 hergestellt wurde. Es ist fraglich, ob auch bei unausgewogeneren Mischungen sowie bei mehr als zwei DNA-Mustern eine Differenzierung möglich wäre. Bei geringem oder degradiertem Spurenmaterial könnte der hohe Verbrauch an DNA für die Chromatographie problematisch sein (Bei dem dargelegten Experiment wurde eine Klonierungs-Technik zur DNA-Vervielfältigung eingesetzt.).

Als weitere Methode zur Analyse einer Mischspur wurde durch Andréasson et al. (2006) das Pyrosequencing beschrieben. Die Autoren untersuchten damit SNPs in der

Kontrollregion und in kodierenden mtDNA-Abschnitten. Mit dieser Technik ist keine eigentliche Sequenzierung möglich, sondern es wurde lediglich die Quantifizierung von Anteilen einer Mischspur aufgezeigt. Diese kann bei der Interpretation von gemischten mtDNA-Sequenzen hilfreich sein, wenn die Fraktionen unterschiedlich groß sind. Auch durch eine Real-time-PCR (Niederstätter et al., 2006) ist solch eine Quantifizierung möglich, sie liefert jedoch ebenso wenig direkte Informationen über die mtDNA-Sequenz.

Im Gegensatz zu den dargestellten Techniken ist die Methode der mtDNA-Sequenzierung an Einzelzellen, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, nicht auf spezielle Fälle beschränkt. Die Anzahl der an der Mischspur beteiligten Personen sowie die jeweiligen quantitativen Anteile stellen kein Problem dar, da jede Zelle einzeln gewonnen und analysiert werden kann. Mit Ausnahme des Single-Cell-Pickings mit dem Mikromanipulator können alle weiteren Arbeitsschritte durch ein forensisches Routinelabor geleistet werden, da keine speziellen Geräte erforderlich sind. Die Analyse beschränkt sich auf die notwendigsten Bestandteile einer DNA-Analyse, nämlich Lyse, PCR und Sequenzierung, so dass das Risiko von Kontaminationen gering gehalten wird und der Arbeitsaufwand nicht sehr hoch ist. Auch Mischspuren in minimalen Mengen können erfolgreich analysiert werden, und als Ergebnis liegen vollständige Sequenzen mit forensischer Aussagekraft vor.

4.6 Erklärungsmöglichkeiten für die Ausfallquote

Da nicht aus allen isolierten Einzelzellen eine positive Sequenzierung möglich war, stellt sich die Frage, wodurch diese Ausfälle begründet sein könnten. Die Ursachen könnten in sämtlichen Arbeitsschritten vom Single-Cell-Picking bis zur Kapillarelektrophorese liegen. Da die Ausfälle jedoch unterschiedliche Muster zeigten, ist eine grobe Differenzierung möglich. Beispielsweise zeigte sich, dass komplette Probenreihen nicht mit Erfolg amplifiziert werden konnten, was sich in einem vollständig negativen Minigel äußerte. Diese reihenweisen Ausfälle traten im Rahmen der noch nicht optimierten Lysereaktion auf, so dass hier eine fehlerhafte Lyse als Ursache wahrscheinlich ist (vgl. Kap. 4.3.2).

Weiterhin gab es Fälle von anscheinend gelungener Amplifizierung mit sichtbaren Banden im Minigel, bei denen die Sequenzierung jedoch nicht möglich war. Dabei könnte zum einen das Ergebnis des Minigels durch eine reine Vermehrung von Verunreinigungen begründet sein, wobei diese Möglichkeit bei kontaminationsfreier Negativkontrolle weniger wahrscheinlich ist, zumal Verunreinigungen im Allgemeinen nicht so starke Banden im Gel verursachen. Zum anderen könnte das Ausgangsmaterial so stark degradiert gewesen sein, dass die Amplifizierung und die anschließende Sequenzierungsreaktion keine vollständigen und korrekt analysierbaren DNA-Stränge hervorbringen konnten. Weiterhin wäre ein Verlust des Sequenzierungsprodukts bei den Arbeitsabläufen der Ethanolfällung denkbar, da sich das Template in der Flüssigkeit lösen und mit ihr abdekantiert werden könnte. Diese Möglichkeit käme vor allem bei in der Wiederholung gelungenener Sequenzierung in Betracht. Die nach Koamplifizierung aufgetretenen Ausfälle bei der Sequenzierung der HV2-Region nach bereits erfolgreicher Sequenzierung der HV1-Region wurden schon in Kapitel 4.3.3 diskutiert.

Auch nach Anpassung der Lysereaktion gab es einzelne Proben, bei denen die Amplifizierung negativ verlief, so dass keine Bande im Minigel zu erkennen war. In diesen Fällen ist davon auszugehen, dass nicht genug Template für die PCR zur Verfügung stand. Das Fehlen der ganzen Zelle im Reaktionsgefäß kann dafür nicht ursächlich sein, da der Transfer mit dem Mikromanipulator unter ständiger mikroskopischer Sichtkontrolle erfolgte, die nach Optimierung der Methode gewährleistet werden konnte (vgl. Kap. 4.3.1). Es besteht die Möglichkeit, dass nicht genügend mtDNA aus der Zelle frei wurde, die bei der PCR hätte amplifiziert werden können. Eigentlich sollten aber der hypotone Effekt des destillierten Wassers sowie der zusätzliche Lyse-Schritt für eine Auflösung der Zellwände und mitochondrialen Membranen ausreichend sein. Eine weitere Hypothese zur Erklärung dieser einzelnen Ausfälle ist, dass die Zelle, nachdem sie in den hängenden Wassertropfen hinein pipettiert wurde, beim Umdrehen des Reaktionsgefäßes nicht mit dem Tropfen auf den Boden gelangte, sondern an der Wand haften blieb. Dieser Schritt ist als einziger bei der Präparation nicht unter mikroskopischer Sichtkontrolle durchzuführen. Verbleibt die Zelle relativ weit oben an der Wand des Gefäßes, ist durch den

fehlenden Kontakt mit den später hinzu pipettierten PCR-Reagenzien die Amplifizierung nicht möglich.

Zur Verminderung der Ausfallquote bei Anwendung der Methode in der forensischen Routine wären schlussfolgend weitere Verbesserungen in der Amplifizierung, v.a. bei der durch den langen DNA-Strang fehleranfälligen Koamplifizierung, wünschenswert. Die Zellpräparation mit dem Mikromanipulator ist dahin gehend zu optimieren, dass die Zelle sich nach der Präparation sicher im späteren PCR-Ansatz befindet. Die Pipettierung der Zelle in einen Wassertropfen am Rand des Gefäßes ist kritisch zu sehen und wäre eventuell durch alternative Techniken zu vermeiden, beispielsweise durch den Einsatz des *AmpliGrid*[™]-Systems. Dieser Aspekt sowie weitere Möglichkeiten, die zukünftig zu Verbesserungen bei der Einzelzellanalyse beitragen könnten, werden ausführlich im folgenden Kapitel diskutiert.

4.7 Ausblick

4.7.1 Alternative Zellpräparation

Dass die erfolgreiche Präparation von einzelnen Zellen mit einem Mikromanipulator möglich ist, konnte durch die vorliegende Arbeit, deren Grundlage von Löw (2007) beschrieben wurde, gezeigt werden. Es sind jedoch auch Alternativen denkbar, die den Einsatz der Einzelzellanalyse erweitern könnten. In Kapitel 3.10 wurde bereits die Anwendung eines hochauflösenden Stereomikroskops beschrieben, mit dessen Hilfe Einzelzellen direkt von verschiedenen Oberflächen gewonnen werden konnten. Der Transfer der Zelle ins Reaktionsgefäß war zum damaligen Zeitpunkt nicht kontrolliert möglich, konnte aber in nachfolgenden Experimenten verbessert werden (Verhoff et al., 2006). Die Arbeitsplattform von *aura optik (Jena)* mit einem Mikromanipulator wurde zunächst um eine Mikropipette erweitert, durch die die Einzelzellgewinnung jedoch weiterhin schwierig war. Als Alternative wurde eine Mikropinzette eingesetzt, mit der ein Microcarrier in Form einer *Pronectin*[®]*F*-beschichteten Kugel gegriffen und bewegt werden konnte. Die einzelnen Zellen hafteten an dem Carrier und konnten unter mikroskopischer Kontrolle

in einen Tropfen Klebstoff auf Silikonbasis, der in den Boden des Reaktionsgefäßes gegeben wurde, eingebracht werden. Mit Hilfe dieser Technik könnten in Zukunft Einzelzellen direkt vom Spurenlager isoliert werden. Durch die Verwendung von Microcarriern, wie sie durch Verhoff et al. (2006) beschrieben wurde, könnte das Problem umgangen werden, dass die Zelle beim Umdrehen des Reaktionsgefäßes am Rand haften bleiben könnte (vgl. Kap. 4.6).

Als weitere Alternative zum Mikromanipulator könnte die Laser Micro Dissection (LMD), auch als Laser Capture Microdissection (LCM) bezeichnet, zum Einsatz kommen. Dieses bevorzugt in der Pathologie oder biologischen Forschung gebräuchliche Verfahren kann an Zellausstrichen angewendet werden und wird zunehmend auch in der Forensik benutzt, beispielsweise zur Vaterschaftsbestimmung (Bauer et al., 2002; Budimlija et al., 2005), in Vergewaltigungsfällen (Elliott et al., 2003) oder zur Haaranalyse (Martino et al., 2004b). Da die Zellen bei dieser Methode nicht berührt werden müssen, ist die Gefahr von Kontaminationen geringer als beim Pipettieren mit dem Mikromanipulator. Beide Verfahren können jedoch auch kombiniert werden, wie bei Bauer et al. (2002) beschrieben. Die Microdissection ist auch zur Trennung von Mischspuren geeignet (Anoruo et al., 2007) und aufgrund ihrer Genauigkeit auch zur Präparation auf Einzelzellniveau benutzbar (Martino et al., 2004a; Geigl und Speicher, 2007; Schütze et al., 2007). Bei dieser Methode werden jedoch im Allgemeinen Färbungs- und Fixationstechniken eingesetzt, die bei degradiertem Spurenmaterial zu weiteren DNA-Schädigungen führen könnten (Martino et al., 2004a). Die weitere Forschung auf diesem Gebiet wird zeigen können, inwiefern eine Typisierung an durch Microdissection gewonnenen Einzelzellen für forensische Zwecke möglich ist.

4.7.2 Verwendung eines AmpliGrid™-Systems

In den letzten Jahren wurde von der Industrie ein neues Produkt zur Analyse kleinster DNA-Mengen auf den Markt gebracht, nämlich das sogenannte *AmpliGrid*™-System, auch als Strukturierter BioChip oder Reaction Slide bezeichnet. Dabei handelt es sich um eine chemisch strukturierte Glasplatte mit mehreren Reaktionskammern, in denen eine

vollständige PCR-Reaktion ablaufen kann. In einer Veröffentlichung von Schmidt et al. (2006) wurde ein *AmpliGrid*[™]-Chip von *Aloplex* mit unterschiedlich stark verdünnten DNA-Mengen getestet. Eine STR-Analyse konnte in diesen Versuchen bei einem DNA-Gehalt von 1000 bis 32 pg erfolgreich durchgeführt werden. Trotz der räumlichen Nähe der Proben zueinander traten keine Kontaminationen auf. In weiteren Experimenten folgte ein Vergleich zwischen mtDNA-Amplifizierungen auf dem Reaction Slide und in konventionellen Tubes (Lutz-Bonengel et al., 2007). Es zeigte sich, dass bei geringen mtDNA-Mengen, einem Äquivalent von 2,5 bis 1 pg ncDNA, die Chip-Analyse bessere Ergebnisse lieferte als die Amplifizierung im Tube.

Das *AmpliGrid*[™]-System ist auch für die Analyse von Einzelzellen geeignet (Verhoff et al., 2006). Der Vorteil liegt darin, dass die Zellen direkt in den auf der Glasplatte befindlichen Flüssigkeitstropfen zur späteren PCR transferiert werden können. Eine ständige Sichtkontrolle ist gegeben und die Technik einfach durchzuführen. Der Tropfen muss nach der Überführung der Zelle nicht mehr bewegt werden, so dass keine Gefahr des Zellverlusts besteht. Nachteil der Methode ist jedoch das extrem geringe Reaktionsvolumen von 1 µl. Die Menge ist nicht ausreichend für eine zusätzliche Untersuchung im Minigel, für eine Wiederholung der Sequenzierung oder die gleichzeitige Sequenzierung von beiden mtDNA-Strängen, wie sie für forensische Analysen wünschenswert wäre. Die weitere Forschung muss zeigen, ob Einzelzellen mit den Chips erfolgreich untersucht werden können und ob die Methode eventuell als Ergänzung zur konventionellen DNA-Analyse in Spezialfällen Verwendung finden kann.

5 Zusammenfassung

Eine erfolgreiche Analyse von einzelnen Zellen auf ihr DNA-Muster könnte für die forensische DNA-Analyse einen enormen Fortschritt bei der Untersuchung von minimalem Spurenmaterial bedeuten. In der Literatur finden sich Berichte von STR-Typisierungen an Einzelzellen, die jedoch in der forensischen Praxis bisher nicht reproduziert werden konnten. Es existiert aber eine funktionierende Methode zur mtDNA-Sequenzierung an einzelnen Epithelzellen, die es weiter zu verbessern galt, um eine Anwendbarkeit in der forensischen Routine zu erreichen.

Mit Hilfe eines Mikromanipulators wurden Zellen aus Ausstrichen isoliert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Technik des Single-Cell-Pickings konnte optimiert werden, so dass sie relativ einfach durchzuführen war und die ständige Sichtkontrolle gewährleistet werden konnte. Durch das Hinzunehmen einer Lysereaktion vor der PCR konnte die Quote positiver Ergebnisse erhöht werden. Im Anschluss an die Lyse fanden eine Amplifizierung sowie eine Sequenzierung der mitochondrialen Kontrollregion statt.

Nach erforderlichen Anpassungen in der Versuchsdurchführung wurden schließlich insgesamt 191 Epithelzellen aus Mundschleimhautabstrichen von 6 verschiedenen Probanden untersucht. Aus 57 Zellen wurde eine Amplifizierung der HV1-Region durchgeführt, und bei 73,7% der Proben konnte die Sequenz der jeweiligen Testperson nachgewiesen werden. In der HV2-Region wurden 22 Zellen amplifiziert, von denen 86,4% erfolgreich sequenziert wurden. An weiteren 112 Zellen erfolgte eine Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region in einem Ansatz, eine Methode, die bisher noch nicht mit Erfolg an Einzelzellen durchgeführt werden konnte. Die richtige Sequenz wurde bei 67,0% der Proben in der HV1-Region nachgewiesen, für die HV2-Region lag die Quote bei 57,1%.

5 Zusammenfassung

Auch die Gewinnung und Sequenzierung von Epithelzellen, die sich auf einer Zigarettenspitze befanden, war möglich. Ebenfalls auf einer Zigarettenspitze wurde eine künstliche Mischspur von zwei Probanden durch gemeinsames Rauchen erzeugt. Nach einer Koamplifizierung an 24 isolierten Einzelzellen konnten in der HV1-Region 20 Zellen positiv sequenziert werden, wobei eine Differenzierung zwischen den beiden Probanden möglich war. Für die HV2-Region gelang nur der Nachweis des einen Probanden an 15 Proben.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine mtDNA-Sequenzierung an einzelnen Epithelzellen mit einer hohen Erfolgsquote durchgeführt werden kann. Auch eine Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region ist an Einzelzellen möglich. Forensisches Spurenmaterial wie eine Zigarettenspitze ist genauso wie eine Mischspur für eine Analyse mit dem vorgestellten Verfahren geeignet. Erweiterungen könnten sich durch den Einsatz eines hochauflösenden Stereomikroskops ergeben, mit dessen Hilfe Zellen direkt vom Spurenlagerer gewonnen werden können. Die präsentierte Methode könnte in der forensischen Routine Anwendung finden, wenn eine STR-Analyse oder konventionelle mtDNA-Sequenzierung kein Ergebnis lieferte. Das könnte vor allem bei minimalem oder degradiertem Spurenmaterial sowie Mischspuren der Fall sein. Weiterhin ließe sich das Phänomen der Heteroplasmie näher untersuchen, was die Berechnung von Identitätswahrscheinlichkeiten präzisieren könnte.

6 Abstract

A successful analysis of single-cell DNA-samples could be a major advance for the investigation of minimal trace-material in forensic DNA-analysis. In literature there are reports on STR-typing of single cells, which could not be reproduced in forensic casework yet. There is already an efficient method for mtDNA-sequencing of single epithelial cells, which had to be improved in order to achieve an applicability in forensic casework.

With the help of a micromanipulator cells from a smear were isolated and transferred to a reaction-tube. The procedure of Single-Cell-picking was successfully optimised, so that it could be carried out easily and a permanent visual control was guaranteed. By adding a lysis before PCR, the rate of positive results was increased. The lysis was followed by an amplification and a sequencing of the mitochondrion control region.

After some required adjustments in the practical application of the experiments, a total of 191 epithelial cells from buccal cell-smears of 6 different test persons were analysed. There was an amplification of the HV1-region out of 57 cells, and the sequence of the particular test person could be verified in 73,7% of the samples. Amplification of the HV2-region was performed on 22 cells, out of which 86,4% were successfully sequenced. For another 112 cells there was a combined amplification of the HV1- and the HV2-region in one PCR-batch, a method which could not be implemented with success for epithelial cells before. The correct sequence was verified in 67,0% of the samples for the HV1-region, the rate for the HV2-region was 57,1%.

The isolation and sequencing of epithelial cells, which were located on a cigarette butt, were possible, too. On another cigarette butt an artificial mixed trace of two test persons was generated by shared smoking as well. After a coamplification of 24 isolated single

cells, 20 cells could be sequenced correctly in the HV1-region, in which a discrimination between the two test persons was possible. For the HV2- region, a verification could only be achieved for one of the persons in 15 of the samples.

Recapitulating it can be stated, that mtDNA-sequencing of single epithelial cells can be performed with a high success rate. Also a coamplification of HV1- and HV2-region is possible for single cells. Forensic trace material like cigarette butts are just as appropriate for an analysis with the presented method as a mixed trace. Extensions could result from the use of a high-resolution stereomicroscope, which allows the isolation of cells directly from the trace material. The presented method could find application in forensic casework, in case a STR-analysis or conventional mtDNA-sequencing did not provide results. This could particularly be the case for minimal or degraded trace material and mixed traces. Furthermore the phenomenon of heteroplasmy could be examined more closely, what could bring more precision to the calculation of identity probability.

Literaturverzeichnis

- Alonso, A.; Martín, P.; Albarrán, C.; García, P.; García, O.; Simón, L. F. de; García-Hirschfeld, J.; Sancho, M.; La Rúa, C. de; Fernández-Piqueras, J.: Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci Int*, 139(2-3): 141–149, 2004.
- Anderson, S.; Bankier, A. T.; Barrell, B. G.; Bruijn, M. H. de; Coulson, A. R.; Drouin, J.; Eperon, I. C.; Nierlich, D. P.; Roe, B. A.; Sanger, F.; Schreier, P. H.; Smith, A. J.; Staden, R.; Young, I. G.: Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 290(5806): 457–465, 1981.
- Andrews, R. M.; Kubacka, I.; Chinnery, P. F.; Lightowlers, R. N.; Turnbull, D. M.; Howell, N.: Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nat Genet*, 23(2): 147, 1999.
- Andréasson, H.; Nilsson, M.; Budowle, B.; Frisk, S.; Allen, M.: Quantification of mtDNA mixtures in forensic evidence material using pyrosequencing. *Int J Legal Med*, 120(6): 383–390, 2006.
- Annex, B. H.; Williams, R. S.: Mitochondrial DNA structure and expression in specialized subtypes of mammalian striated muscle. *Mol Cell Biol*, 10(11): 5671–5678, 1990.
- Anoruo, B.; Oorschot, R. van; Mitchell, J.; Howells, D.: Isolating cells from non-sperm cellular mixtures using the PALM microlaser micro dissection system. *Forensic Sci Int*, 173(2-3): 93–96, 2007.

LITERATURVERZEICHNIS

- Anslinger, K. D.; Bayer, B. R.; Rolf, B.; Eisenmenger, W.: mtDNA investigations after differential lysis. *J Forensic Sci*, 50(3): 579–581, 2005.
- Anuradha, A.; Sivapathasundharam, B.: Image analysis of normal exfoliated gingival cells. *Indian J Dent Res*, 18(2): 63–66, 2007.
- Balaban, B.; Lundin, K.; Morrell, J. M.; Tjellström, H.; Urman, B.; Holmes, P. V.: An alternative to PVP for slowing sperm prior to ICSI. *Hum Reprod*, 18(9): 1887–1889, 2003.
- Balogh, M. K.; Burger, J.; Bender, K.; Schneider, P. M.; Alt, K. W.: STR genotyping and mtDNA sequencing of latent fingerprint on paper. *Forensic Sci Int*, 137(2-3): 188–195, 2003.
- Barak, Y.; Menezo, Y.; Veiga, A.; Elder, K.: A physiological replacement for polyvinylpyrrolidone (PVP) in assisted reproductive technology. *Hum Fertil (Camb)*, 4(2): 99–103, 2001.
- Bauer, M.; Thalheimer, A.; Patzelt, D.: Paternity testing after pregnancy termination using laser microdissection of chorionic villi. *Int J Legal Med*, 116(1): 39–42, 2002.
- Bendall, K. E.; Macaulay, V. A.; Baker, J. R.; Sykes, B. C.: Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region. *Am J Hum Genet*, 59(6): 1276–1287, 1996.
- Bender, K.; Schneider, P. M.; Rittner, C.: Application of mtDNA sequence analysis in forensic casework for the identification of human remains. *Forensic Sci Int*, 113(1-3): 103–107, 2000.
- Bienvenue, J. M.; Duncalf, N.; Marchiarullo, D.; Ferrance, J. P.; Landers, J. P.: Microchip-based cell lysis and DNA extraction from sperm cells for application to forensic analysis. *J Forensic Sci*, 51(2): 266–273, 2006.
- Brandstätter, A.; Parson, W.: Mitochondrial DNA heteroplasmy or artefacts – a matter of the amplification strategy? *Int J Legal Med*, 117(3): 180–184, 2003.

LITERATURVERZEICHNIS

- Bright, J.-A.; Petricevic, S. F.: Recovery of trace DNA and its application to DNA profiling of shoe insoles. *Forensic Sci Int*, 145(1): 7–12, 2004.
- Brinkmann, B.: Forensische DNA-Analytik. *Dtsch Arztebl*, 101: A2329–A2335, 2004.
- Budimlija, Z. M.; Lechpammer, M.; Popiolek, D.; Fogt, F.; Prinz, M.; Bieber, F. R.: Forensic applications of laser capture microdissection: use in DNA-based parentage testing and platform validation. *Croat Med J*, 46(4): 549–555, 2005.
- Budowle, B.; Wilson, M. R.; DiZinno, J. A.; Stauffer, C.; Fasano, M. A.; Holland, M. M.; Monson, K. L.: Mitochondrial DNA regions HVI and HVII population data. *Forensic Sci Int*, 103(1): 23–35, 1999.
- Butler, J. M.: Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. *Biotechniques*, 43(4): ii–iv, 2007.
- Bär, W.; Brinkmann, B.; Budowle, B.; Carracedo, A.; Gill, P.; Holland, M.; Lincoln, P. J.; Mayr, W.; Morling, N.; Olaisen, B.; Schneider, P. M.; Tully, G.; Wilson, M.: Guidelines for mitochondrial DNA typing. DNA Commission of the International Society for Forensic Genetics. *Vox Sang*, 79(2): 121–125, 2000.
- Castella, V.; Dimo-Simonin, N.; Brandt-Casadevall, C.; Robinson, N.; Saugy, M.; Taroni, F.; Mangin, P.: Forensic identification of urine samples: a comparison between nuclear and mitochondrial DNA markers. *Int J Legal Med*, 120(2): 67–72, 2006.
- Chong, M. D.; Calloway, C. D.; Klein, S. B.; Orrego, C.; Buoncristiani, M. R.: Optimization of a duplex amplification and sequencing strategy for the HVI/HVII regions of human mitochondrial DNA for forensic casework. *Forensic Sci Int*, 154(2-3): 137–148, 2005.
- Chung, U.; Lee, H. Y.; Yoo, J.-E.; Park, M. J.; Shin, K.-J.: Mitochondrial DNA CA dinucleotide repeats in Koreans: the presence of length heteroplasmy. *Int J Legal Med*, 119(1): 50–53, 2005.

LITERATURVERZEICHNIS

- Coble, M. D.; Vallone, P. M.; Just, R. S.; Diegoli, T. M.; Smith, B. C.; Parsons, T. J.: Effective strategies for forensic analysis in the mitochondrial DNA coding region. *Int J Legal Med*, 120(1): 27–32, 2006.
- Crews, S.; Ojala, D.; Posakony, J.; Nishiguchi, J.; Attardi, G.: Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. *Nature*, 277(5693): 192–198, 1979.
- Dennis, C.: Error reports threaten to unravel databases of mitochondrial DNA. *Nature*, 421(6925): 773–774, 2003.
- Dimo-Simonin, N.; Grange, F.; Taroni, F.; Brandt-Casadevall, C.; Mangin, P.: Forensic evaluation of mtDNA in a population from south west Switzerland. *Int J Legal Med*, 113(2): 89–97, 2000.
- Eggeling, F. von; Michel, S.; Günther, M.; Schimmel, B.; Claussen, U.: Determination of the origin of single nucleated cells in maternal circulation by means of random PCR and a set of length polymorphisms. *Hum Genet*, 99(2): 266–270, 1997.
- Elliott, K.; Hill, D. S.; Lambert, C.; Burroughes, T. R.; Gill, P.: Use of laser microdissection greatly improves the recovery of DNA from sperm on microscope slides. *Forensic Sci Int*, 137(1): 28–36, 2003.
- Findlay, I.: DNA identification from extreme samples such as single cells and difficult samples: uses including forensics and counter-terrorist applications. *Oral Presentation: International Symposium on Forensic DNA Technologies, Münster (Germany), 19.-20.09.2003, Abstract (IP-2) in Rechtsmedizin*, 13: 273–274, 2003.
- Findlay, I.; Quirke, P.: Fluorescent polymerase chain reaction: Part I. A new method allowing genetic diagnosis and DNA fingerprinting of single cells. *Hum Reprod Update*, 2(2): 137–152, 1996.
- Findlay, I.; Taylor, A.; Quirke, P.; Frazier, R.; Urquhart, A.: DNA fingerprinting from single cells. *Nature*, 389(6651): 555–556, 1997.

LITERATURVERZEICHNIS

- Findlay, I.; Urquhart, A.; Quirke, P.; Sullivan, K.; Rutherford, A. J.; Lilford, R. J.: Simultaneous DNA 'fingerprinting', diagnosis of sex and single-gene defect status from single cells. *Hum Reprod*, 10(4): 1005–1013, 1995.
- Finnilä, S.; Hassinen, I. E.; Ala-Kokko, L.; Majamaa, K.: Phylogenetic network of the mtDNA haplogroup U in Northern Finland based on sequence analysis of the complete coding region by conformation-sensitive gel electrophoresis. *Am J Hum Genet*, 66(3): 1017–1026, 2000.
- Foran, D. R.: Relative degradation of nuclear and mitochondrial DNA: an experimental approach. *J Forensic Sci*, 51(4): 766–770, 2006.
- Gabriel, M. N.; Huffine, E. F.; Ryan, J. H.; Holland, M. M.; Parsons, T. J.: Improved MtDNA sequence analysis of forensic remains using a "mini-primer set" amplification strategy. *J Forensic Sci*, 46(2): 247–253, 2001.
- Garvin, A. M.; Holzgreve, W.; Hahn, S.: Highly accurate analysis of heterozygous loci by single cell PCR. *Nucleic Acids Res*, 26(15): 3468–3472, 1998.
- Geigl, J. B.; Speicher, M. R.: Single-cell isolation from cell suspensions and whole genome amplification from single cells to provide templates for CGH analysis. *Nat Protoc*, 2(12): 3173–3184, 2007.
- Giles, R. E.; Blanc, H.; Cann, H. M.; Wallace, D. C.: Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77(11): 6715–6719, 1980.
- Gill, P.; Ivanov, P. L.; Kimpton, C.; Piercy, R.; Benson, N.; Tully, G.; Evett, I.; Hagelberg, E.; Sullivan, K.: Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis. *Nat Genet*, 6(2): 130–135, 1994.
- Ginther, C.; Issel-Tarver, L.; King, M. C.: Identifying individuals by sequencing mitochondrial DNA from teeth. *Nat Genet*, 2(2): 135–138, 1992.

LITERATURVERZEICHNIS

- Gyllensten, U. B.; Josefsson, A.; Schemschat, K.; Saldeen, T.; Petterson, U.: DNA typing of forensic material with mixed genotypes using allele-specific enzymatic amplification (polymerase chain reaction). *Forensic Sci Int*, 52(2): 149–160, 1992.
- Hatsch, D.; Amory, S.; Keyser, C.; Hienne, R.; Bertrand, L.: A rape case solved by mitochondrial DNA mixture analysis. *J Forensic Sci*, 52(4): 891–894, 2007.
- He, L.; Chinnery, P. F.; Durham, S. E.; Blakely, E. L.; Wardell, T. M.; Borthwick, G. M.; Taylor, R. W.; Turnbull, D. M.: Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30(14): e68, 2002.
- Hedman, M.; Brandstätter, A.; Pimenoff, V.; Sistonen, P.; Palo, J. U.; Parson, W.; Sajantila, A.: Finnish mitochondrial DNA HVS-I and HVS-II population data. *Forensic Sci Int*, 172(2-3): 171–178, 2007.
- Hellmann, A.; Rohleder, U.; Schmitter, H.; Wittig, M.: STR typing of human telogen hairs – a new approach. *Int J Legal Med*, 114(4-5): 269–273, 2001.
- Henderson, T. R.; Findlay, I.; Matthews, P. L.; Noble, B. A.: Identifying the origin of single corneal cells by DNA fingerprinting: part II – application to limbal allografting. *Cornea*, 20(4): 404–407, 2001.
- Hochmeister, M. N.; Budowle, B.; Jung, J.; Borer, U. V.; Comey, C. T.; Dirnhofer, R.: PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts. *Int J Legal Med*, 104(4): 229–233, 1991.
- Hochmeister, M. N.; Rudin, O.; Ambach, E.: PCR analysis from cigaret butts, postage stamps, envelope sealing flaps, and other saliva-stained material. *Methods Mol Biol*, 98: 27–32, 1998.
- Holland, M. M.; Fisher, D. L.; Mitchell, L. G.; Rodriguez, W. C.; Canik, J. J.; Merrill, C. R.; Weedn, V. W.: Mitochondrial DNA sequence analysis of human skeletal remains: identification of remains from the Vietnam War. *J Forensic Sci*, 38(3): 542–553, 1993.

LITERATURVERZEICHNIS

- Hopwood, A. J.; Mannucci, A.; Sullivan, K. M.: DNA typing from human faeces. *Int J Legal Med*, 108(5): 237–243, 1996.
- Horai, S.; Hayasaka, K.: Intraspecific nucleotide sequence differences in the major non-coding region of human mitochondrial DNA. *Am J Hum Genet*, 46(4): 828–842, 1990.
- Hutchison, C. A.; Newbold, J. E.; Potter, S. S.; Edgell, M. H.: Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, 251(5475): 536–538, 1974.
- Hühne, J.; Pfeiffer, H.; Brinkmann, B.: Heteroplasmic substitutions in the mitochondrial DNA control region in mother and child samples. *Int J Legal Med*, 112(1): 27–30, 1999.
- Imaizumi, K.; Parsons, T. J.; Yoshino, M.; Holland, M. M.: A new database of mitochondrial DNA hypervariable regions I and II sequences from 162 Japanese individuals. *Int J Legal Med*, 116(2): 68–73, 2002.
- Imaizumi, K.; Akutsu, T.; Miyasaka, S.; Yoshino, M.: Development of species identification tests targeting the 16S ribosomal RNA coding region in mitochondrial DNA. *Int J Legal Med*, 121(3): 184–191, 2007.
- Jazin, E. E.; Cavelier, L.; Eriksson, I.; Orelund, L.; Gyllensten, U.: Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(22): 12382–12387, 1996.
- Klein, C. A.; Seidl, S.; Petat-Dutter, K.; Offner, S.; Geigl, J. B.; Schmidt-Kittler, O.; Wendler, N.; Passlick, B.; Huber, R. M.; Schlimok, G.; Baeuerle, P. A.; Riethmüller, G.: Combined transcriptome and genome analysis of single micrometastatic cells. *Nat Biotechnol*, 20(4): 387–392, 2002.
- Klitschar, M.; Neuhuber, F.: Evaluation of an alkaline lysis method for the extraction of DNA from whole blood and forensic stains for STR analysis. *J Forensic Sci*, 45(3): 669–673, 2000.
- Kramer, N.; Heidorn, F.; Weiler, G.; Verhoff, M. A.: Heteroplasmy in mtDNA in a set of dizygotic twins. *Arch Kriminol*, 211(3-4): 98–105, 2003.

LITERATURVERZEICHNIS

- LaBerge, G. S.; Shelton, R. J.; Danielson, P. B.: Forensic utility of mitochondrial DNA analysis based on denaturing high-performance liquid chromatography. *Croat Med J*, 44(3): 281–288, 2003.
- Liechti-Gallati, S.; Neeser, D.: Efficient and reliable PCR-based detection of the ABO blood group alleles: genotyping on stamps and other biological evidence samples. *J Forensic Sci*, 41(4): 653–657, 1996.
- Lien, S.; Kamiński, S.; Aleström, P.; Rogne, S.: A simple and powerful method for linkage analysis by amplification of DNA from single sperm cells. *Genomics*, 16(1): 41–44, 1993.
- Lutz-Bonengel, S.; Sängler, T.; Heinrich, M.; Schön, U.; Schmidt, U.: Low volume amplification and sequencing of mitochondrial DNA on a chemically structured chip. *Int J Legal Med*, 121(1): 68–73, 2007.
- Lutz, S.; Weisser, H. J.; Heizmann, J.; Pollak, S.: mtDNA as a tool for identification of human remains. Identification using mtDNA. *Int J Legal Med*, 109(4): 205–209, 1996.
- Lutz, S.; Weisser, H. J.; Heizmann, J.; Pollak, S.: A third hypervariable region in the human mitochondrial D-loop. *Hum Genet*, 101(3): 384, 1997.
- Lutz, S.; Weisser, H. J.; Heizmann, J.; Pollak, S.: Location and frequency of polymorphic positions in the mtDNA control region of individuals from Germany. *Int J Legal Med*, 111(2): 67–77, 1998.
- Lutz, S.; Wittig, H.; Weisser, H. J.; Heizmann, J.; Junge, A.; Dimo-Simonin, N.; Parson, W.; Edelmann, J.; Anslinger, K.; Jung, S.; Augustin, C.: Is it possible to differentiate mtDNA by means of HVIII in samples that cannot be distinguished by sequencing the HVI and HVII regions? *Forensic Sci Int*, 113(1-3): 97–101, 2000.
- Löw, M.: Entwicklung einer forensischen Methode zur mtDNA-Sequenzierung an einzelnen Epithelzellen. *Inauguraldissertation, Medizinische Fakultät, Gießen*, 2007.

LITERATURVERZEICHNIS

- Mabuchi, T.; Susukida, R.; Kido, A.; Oya, M.: Typing the 1.1 kb control region of human mitochondrial DNA in Japanese individuals. *J Forensic Sci*, 52(2): 355–363, 2007.
- Malik, S.; Sudoyo, H.; Pramoonjago, P.; Sukarna, T.; Darwis, D.; Marzuki, S.: Evidence for the de novo regeneration of the pattern of the length heteroplasmy associated with the T16189C variant in the control (D-loop) region of mitochondrial DNA. *J Hum Genet*, 47(3): 122–130, 2002.
- Manfredi, G.; Thyagarajan, D.; Papadopoulou, L. C.; Pallotti, F.; Schon, E. A.: The fate of human sperm-derived mtDNA in somatic cells. *Am J Hum Genet*, 61(4): 953–960, 1997.
- Marchington, D. R.; Poulton, J.; Sellar, A.; Holt, I. J.: Do sequence variants in the major non-coding region of the mitochondrial genome influence mitochondrial mutations associated with disease? *Hum Mol Genet*, 5(4): 473–479, 1996.
- Martino, D. D.; Giuffrè, G.; Staiti, N.; Simone, A.; Donne, M. L.; Saravo, L.: Single sperm cell isolation by laser microdissection. *Forensic Sci Int*, 146 Suppl: S151–S153, 2004a.
- Martino, D. D.; Giuffrè, G.; Staiti, N.; Simone, A.; Todaro, P.; Saravo, L.: Laser microdissection and DNA typing of cells from single hair follicles. *Forensic Sci Int*, 146 Suppl: S155–S157, 2004b.
- Matthews, P. M.; Hopkin, J.; Brown, R. M.; Stephenson, J. B.; Hilton-Jones, D.; Brown, G. K.: Comparison of the relative levels of the 3243 (A→G) mtDNA mutation in heteroplasmic adult and fetal tissues. *J Med Genet*, 31(1): 41–44, 1994.
- Melton, T.; Dimick, G.; Higgins, B.; Lindstrom, L.; Nelson, K.: Forensic mitochondrial DNA analysis of 691 casework hairs. *J Forensic Sci*, 50(1): 73–80, 2005.
- Meyer, S.; Weiss, G.; Haeseler, A. von: Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA. *Genetics*, 152(3): 1103–1110, 1999.

LITERATURVERZEICHNIS

- Morley, J. M.; Bark, J. E.; Evans, C. E.; Perry, J. G.; Hewitt, C. A.; Tully, G.: Validation of mitochondrial DNA minisequencing for forensic casework. *Int J Legal Med*, 112(4): 241–248, 1999.
- Murakami, H.; Ota, A.; Simojo, H.; Okada, M.; Ajisaka, R.; Kuno, S.: Polymorphisms in control region of mtDNA relates to individual differences in endurance capacity or trainability. *Jpn J Physiol*, 52(3): 247–256, 2002.
- Nekhaeva, E.; Bodyak, N. D.; Kravtsov, Y.; McGrath, S. B.; Orsouw, N. J. V.; Pluzhnikov, A.; Wei, J. Y.; Vijg, J.; Khrapko, K.: Clonally expanded mtDNA point mutations are abundant in individual cells of human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8): 5521–5526, 2002.
- Niederstätter, H.; Coble, M. D.; Grubwieser, P.; Parsons, T. J.; Parson, W.: Characterization of mtDNA SNP typing and mixture ratio assessment with simultaneous real-time PCR quantification of both allelic states. *Int J Legal Med*, 120(1): 18–23, 2006.
- Paneto, G. G.; Martins, J. A.; Longo, L. V. G.; Pereira, G. A.; Freschi, A.; Alvarenga, V. L. S.; Chen, B.; Oliveira, R. N.; Hirata, M. H.; Cicarelli, R. M. B.: Heteroplasmy in hair: differences among hair and blood from the same individuals are still a matter of debate. *Forensic Sci Int*, 173(2-3): 117–121, 2007.
- Parson, W.; Brandstätter, A.; Alonso, A.; Brandt, N.; Brinkmann, B.; Carracedo, A.; Corach, D.; Froment, O.; Furac, I.; Grzybowski, T.; Hedberg, K.; Keyser-Tracqui, C.; Kupiec, T.; Lutz-Bonengel, S.; Mevag, B.; Ploski, R.; Schmitter, H.; Schneider, P.; Syndercombe-Court, D.; Sørensen, E.; Thew, H.; Tully, G.; Scheithauer, R.: The EDNAP mitochondrial DNA population database (EMPOP) collaborative exercises: organisation, results and perspectives. *Forensic Sci Int*, 139(2-3): 215–226, 2004.
- Parsons, T. J.; Coble, M. D.: Increasing the forensic discrimination of mitochondrial DNA testing through analysis of the entire mitochondrial DNA genome. *Croat Med J*, 42(3): 304–309, 2001.

LITERATURVERZEICHNIS

- Piercy, R.; Sullivan, K. M.; Benson, N.; Gill, P.: The application of mitochondrial DNA typing to the study of white Caucasian genetic identification. *Int J Legal Med*, 106 (2): 85–90, 1993.
- Pipper, V.; Heidorn, F.; Gruber, C.; Weiler, G.; Verhoff, M. A.: Sequenzierung des D-Loops der mtDNA aus Einzelzellen nach Duplex-PCR. *15. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin - Region Nord vom 09.-10.06.2006 in Dresden (Vortrag), Abstract in Tagungsband*, S. 54–55.
- Ray, P. F.; Vekemans, M.; Munnich, A.: Single cell multiplex PCR amplification of five dystrophin gene exons combined with gender determination. *Mol Hum Reprod*, 7(5): 489–494, 2001.
- Reis, R. J. S.; Goldstein, S.: Mitochondrial DNA in mortal and immortal human cells. Genome number, integrity, and methylation. *J Biol Chem*, 258(15): 9078–9085, 1983.
- Rousselet, F.; Mangin, P.: Mitochondrial DNA polymorphisms: a study of 50 French Caucasian individuals and application to forensic casework. *Int J Legal Med*, 111(6): 292–298, 1998.
- Röhl, A.; Brinkmann, B.; Forster, L.; Forster, P.: An annotated mtDNA database. *Int J Legal Med*, 115(1): 29–39, 2001.
- Röper, A.; Reichert, W.; Mattern, R.: Analysis of mitochondrial SNPs in addition to conventional STR-typing in a case of aggravated theft. *Arch Kriminol*, 219(3-4): 98–104, 2007.
- Salas, A.; Lareu, M. V.; Carracedo, A.: Heteroplasmy in mtDNA and the weight of evidence in forensic mtDNA analysis: a case report. *Int J Legal Med*, 114(3): 186–190, 2001.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12): 5463–5467, 1977.

LITERATURVERZEICHNIS

- Sano, K.; Takayanagi, K.; Kaneko, T.; Liu, C.; Kinoshita, T.; Nakamura, N.; Asamura, H.; Ito, M.; Fukushima, H.; Hotchi, M.: Application of short tandem repeat of genomic DNA and mitochondrial DNA for identification of mixed-up tissue specimens. *Pathol Int*, 50(1): 1–6, 2000.
- Schmidt, U.; Lutz-Bonengel, S.; Weisser, H.-J.; Sanger, T.; Pollak, S.; Schön, U.; Zacher, T.; Mann, W.: Low-volume amplification on chemically structured chips using the PowerPlex16 DNA amplification kit. *Int J Legal Med*, 120(1): 42–48, 2006.
- Schwartz, M.; Vissing, J.: Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N Engl J Med*, 347(8): 576–580, 2002.
- Schwartz, M.; Vissing, J.: No evidence for paternal inheritance of mtDNA in patients with sporadic mtDNA mutations. *J Neurol Sci*, 218(1-2): 99–101, 2004.
- Schütze, K.; Niyaz, Y.; Stich, M.; Buchstaller, A.: Noncontact laser microdissection and catapulting for pure sample capture. *Methods Cell Biol*, 82: 649–673, 2007.
- Stewart, J. E.; Fisher, C. L.; Aagaard, P. J.; Wilson, M. R.; Isenberg, A. R.; Polansky, D.; Pokorak, E.; DiZinno, J. A.; Budowle, B.: Length variation in HV2 of the human mitochondrial DNA control region. *J Forensic Sci*, 46(4): 862–870, 2001.
- Stoneking, M.; Hedgecock, D.; Higuchi, R. G.; Vigilant, L.; Erlich, H. A.: Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *Am J Hum Genet*, 48(2): 370–382, 1991.
- Sukernik, R. I.; Derbeneva, O. A.; Starikovskaia, E. B.; Volod’ko, N. V.; Mikhailovskaia, I. E.; Bychkov, I. I.; Lott, M.; Brown, M.; Wallace, D.: The mitochondrial genome and human mitochondrial diseases. *Genetika*, 38(2): 161–170, 2002.
- Sullivan, K. M.; Hopgood, R.; Lang, B.; Gill, P.: Automated amplification and sequencing of human mitochondrial DNA. *Electrophoresis*, 12(1): 17–21, 1991.

LITERATURVERZEICHNIS

- Szibor, R.; Plate, I.; Heinrich, M.; Michael, M.; Schöning, R.; Wittig, H.; Lutz-Bonengel, S.: Mitochondrial D-loop (CA)_n repeat length heteroplasmy: frequency in a German population sample and inheritance studies in two pedigrees. *Int J Legal Med*, 121(3): 207–213, 2007.
- Szibor, R.; Plate, I.; Schmitter, H.; Wittig, H.; Krause, D.: Forensic mass screening using mtDNA. *Int J Legal Med*, 120(6): 372–376, 2006.
- Taylor, R. W.; Taylor, G. A.; Durham, S. E.; Turnbull, D. M.: The determination of complete human mitochondrial DNA sequences in single cells: implications for the study of somatic mitochondrial DNA point mutations. *Nucleic Acids Res*, 29(15): E74–E74, 2001.
- Taylor, R. W.; McDonnell, M. T.; Blakely, E. L.; Chinnery, P. F.; Taylor, G. A.; Howell, N.; Zeviani, M.; Briem, E.; Carrara, F.; Turnbull, D. M.: Genotypes from patients indicate no paternal mitochondrial DNA contribution. *Ann Neurol*, 54(4): 521–524, 2003.
- Tesarik, J.; Mendoza, C.: In vitro fertilization by intracytoplasmic sperm injection. *Bioessays*, 21(9): 791–801, 1999.
- Tully, G.; Bär, W.; Brinkmann, B.; Carracedo, A.; Gill, P.; Morling, N.; Parson, W.; Schneider, P.: Considerations by the European DNA profiling (EDNAP) group on the working practices, nomenclature and interpretation of mitochondrial DNA profiles. *Forensic Sci Int*, 124(1): 83–91, 2001.
- Turchi, C.; Buscemi, L.; Previderè, C.; Grignani, P.; Brandstätter, A.; Achilli, A.; Parson, W.; Tagliabracci, A.; Group, G.: Italian mitochondrial DNA database: results of a collaborative exercise and proficiency testing. *Int J Legal Med*, 2007.
- Vallone, P. M.; Just, R. S.; Coble, M. D.; Butler, J. M.; Parsons, T. J.: A multiplex allele-specific primer extension assay for forensically informative SNPs distributed throughout the mitochondrial genome. *Int J Legal Med*, 118(3): 147–157, 2004.

LITERATURVERZEICHNIS

- Verhoff, M. A.; Brück, S.; Pipper, V.; Evers, H.; Weiler, G.; Heidorn, F.: Single-cell-picking directly from material evidence with the help of the „Lumar.V12“ stereomicroscope from Zeiss and the aura optik work platform. *85. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Rechtsmedizin und „DNA in Forensics 2006“ vom 26.-30.09.2006 in Innsbruck (Poster), Abstract in Abstract book*, S. 32, 2006.
- Verhoff, M. A.; Heidorn, F.: Automated extraction using the DNA IQ™ System on the KingFisher® Magnetic Particle Processor. *Identity*, 1: 2–3, 2003.
- Walker, J. A.; Garber, R. K.; Hedges, D. J.; Kilroy, G. E.; Xing, J.; Batzer, M. A.: Resolution of mixed human DNA samples using mitochondrial DNA sequence variants. *Anal Biochem*, 325(1): 171–173, 2004.
- Wallace, D. C.; Lott, M. T.; Shoffner, J. M.; Brown, M. D.: Diseases resulting from mitochondrial DNA point mutations. *J Inherit Metab Dis*, 15(4): 472–479, 1992.
- Watanabe, Y.; Takayama, T.; Hirata, K.; Yamada, S.; Nagai, A.; Nakamura, I.; Bunai, Y.; Ohya, I.: DNA typing from cigarette butts. *Leg Med (Tokyo)*, 5 Suppl 1: S177–S179, 2003.
- Weichhold, G. M.; Bark, J. E.; Korte, W.; Eisenmenger, W.; Sullivan, K. M.: DNA analysis in the case of Kaspar Hauser. *Int J Legal Med*, 111(6): 287–291, 1998.
- Wittig, H.; Augustin, C.; Baasner, A.; Bulnheim, U.; Dimo-Simonin, N.; Edelmann, J.; Hering, S.; Jung, S.; Lutz, S.; Michael, M.; Parson, W.; Poetsch, M.; Schneider, P. M.; Weichhold, G.; Krause, D.: Mitochondrial DNA in the Central European population. Human identification with the help of the forensic mt-DNA D-loop-base database. *Forensic Sci Int*, 113(1-3): 113–118, 2000.

Tabellenanhang

Aus Gründen der Übersichtlichkeit erfolgt soweit möglich eine gemeinsame Darstellung von Amplifizierung und Sequenzierung in einer Tabelle. Einzelne wiederholt sequenzierte Proben sind entsprechend gekennzeichnet.

Jeder einzelnen Zelle ist eine Identifikations-Nummer zugeordnet. Dabei entspricht die erste Zahl vor dem Punkt der Nummer der Testperson, nach dem Punkt sind die Einzelzellen dieser Testperson durchnummeriert. Beispielsweise ist Z13.024 die 24. Einzelzelle, die von Person 13 gepickt und analysiert wurde.

Zeichenerklärung:

F	Vorwärtsreaktion
R	Rückwärtsreaktion
Wdh.	Wiederholte Sequenzierung
Z	Zelle
NeKo	Negativkontrolle
H_2O	Menge an aqua dest. beim Single-Cell-Picking
Pu	Menge Puffer
Pr	Menge Proteinase K
+	Sequenzierung positiv
-	keine Sequenz
and.	andere Sequenz, entspricht nicht Proband
zus.	eine zusätzliche Basenabweichung gegenüber Proband, Verdacht auf Heteroplasmie
NA	nicht auswertbar
/	nicht durchgeführt
HP	Heteroplasmie
Teile	Teile einer Sequenz, nicht sicher auswertbar

6.1 Tabellen HV1-Region

Probe	Minigel	Sequenzierung F	Sequenzierung R
K562	3	+	+
Z1.001	2	NA	NA
Z1.002	1	+	+
Z1.003	1	+	+
Z1.004	2	NA	NA
Z1.005	2	+	+
Z1.006	2	NA	NA
Z1.007	2	NA	NA
Z1.008	1	+	+
Z1.009	1	and.	and.
Z1.010	1	NA	NA
NeKo	0	-	-
10	10	4	4

Tabelle 6.1: 18,75 µl H_2O , keine Lyse, PCR: HV1

Probe	Minigel	Sequenzierung F	Sequenzierung R
K562	3	+	+
Z10.001	0	NA	NA
Z10.002	1	NA	NA
Z10.003	2	NA	NA
Z10.004	1	NA	NA
Z10.005	1	NA	NA
Z10.006	1	NA	NA
Z10.007	0	NA	NA
Z10.008	2	NA	NA
NeKo	0	-	-
8	6	0	0

Tabelle 6.2: H_2O : 18,75 µl, Lyse: keine, PCR: HV1

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung F
K562	3	+
Z5.001	2	NA
Z5.002	2	NA
Z5.003	1	and.
Z5.004	2	NA
Z5.005	2	+
Z5.006	1	and.
Z5.007	0	/
Z5.008	2	and.
Z5.009	2	NA
Z5.010	2	+
NeKo	0	-
10	9	2

Tabelle 6.3: H_2O : 18,75 μ l, Lyse: keine, PCR: HV1

Probe	Minigel	Sequenzierung F
K562	3	+
Z1.011	2	+
Z1.012	1	+
Z1.013	2	+
Z1.014	2	+
Z1.015	2	+
Z1.016	2	+
Z1.017	2	+
Z1.018	2	+
Z1.019	1	+
NeKo	0	-
9	9	9

Tabelle 6.4: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung F
K562	3	+
Z7.001	0	NA
Z7.002	1	+
Z7.003	1	+
Z7.004	0	NA
Z7.005	2	+
Z7.006	0	NA
Z7.007	0	NA
Z7.008	0	NA
Z7.009	0	NA
Z7.010	0	NA
NeKo	0	-
10	3	3

Tabelle 6.5: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1

Probe	Minigel	Sequenzierung F
K562	3	+
Z5.011	1	+
Z5.012	1	+
Z5.013	1	+
Z5.014	1	+
Z5.015	1	+
Z5.016	1	+
Z5.017	1	+
Z5.018	1	+
NeKo	0	-
8	8	8

Tabelle 6.6: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1, ohne Einfrieren

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung F
K562	3	+
Z5.019	1	+
Z5.020	2	+
Z5.021	1	+
Z5.022	1	+
Z5.023	1	+
Z5.024	1	+
Z5.025	1	+
Z5.026	1	+
NeKo	0	-
8	8	8

Tabelle 6.7: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1, mit Einfrieren

Probe	Minigel	Sequenzierung F	Sequenzierung R
K562	3	+	/
Z10.009	1	zus.	+
Z10.010	0	NA	/
Z10.011	1	+	+
Z10.012	1	+	/
Z10.013	1	+	/
Z10.014	1	+	/
Z10.015	1	+	/
Z10.016	1	+	/
Z10.017	0	NA	/
Z10.018	1	+	/
Z10.019	0	NA	/
Z10.020	1	NA	/
Z10.021	1	+	+
Z10.022	1	+	+
Z10.023	0	NA	/
Z10.024	0	NA	/
NeKo	0	-	/
16	11	10	4

Tabelle 6.8: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung R	Wdh. R
K562	1	/	/
Z1.060	1	zus.	zus.
Z1.061	1	+	+
Z1.062	1	NA	+
Z1.063	1	NA	+
Z1.064	0	/	/
Z1.065	1	NA	/
NeKo	0	/	/
6	5	2	4

Tabelle 6.9: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1

6.2 Tabellen HV2-Region

Probe	Minigel	Sequenzierung F	Sequenzierung R
K562	3	+	/
Z1.020	3	+	+
Z1.021	0	NA	/
Z1.022	3	NA	+
Z1.023	3	+	+
Z1.024	3	+	+
Z1.025	3	+	+
Z1.026	3	+ (HP)	+ (HP)
Z1.027	0	NA	/
NeKo	0	-	/
8	6	5	6

Tabelle 6.10: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV2

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung F
K562	3	+
Z1.090	2	+
Z1.091	2	+
Z1.092	2	+
Z1.093	2	+
Z1.094	1	NA
Z1.095	2	zus.
NeKo	0	-
6	6	5

Tabelle 6.11: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV2

Probe	Minigel	Sequenzierung F
K562	3	+
Z1.096	2	+
Z1.097	2	+
Z1.098	2	+
Z1.099	2	+
Z1.100	2	+
Z1.101	2	+
Z1.102	2	+
Z1.103	2	+
NeKo	0	-
8	8	8

Tabelle 6.12: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV2

6.3 Tabellen Koamplifizierung von HV1- und HV2-Region

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 F	Sequenzierung HV2 F
K562	3	+	+
Z1.028	3	+	+
Z1.029	3	+	+
Z1.030	3	+	+
Z1.031	3	+	+
Z1.032	3	+	+
Z1.033	2	+	zus.
Z1.034	0	NA	NA
Z1.035	3	zus.	+
NeKo	0	-	-
8	7	7	7

Tabelle 6.13: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,5 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung
K562	3	/
Z7.011	0	/
Z7.012	0	/
Z7.013	0	/
Z7.014	0	/
Z7.015	0	/
Z7.016	0	/
Z7.017	0	/
Z7.018	0	/
Z7.019	0	/
Z7.020	0	/
Z7.021	0	/
Z7.022	0	/
Z7.023	0	/
Z7.024	0	/
Z7.025	0	/
Z7.026	0	/
Z7.027	0	/
Z7.028	0	/
Z7.029	0	/
NeKo	0	/
19	0	0

Tabelle 6.14: H_2O : 15,15 μ l, Lyse: 2,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Probe	Minigel	Sequenzierung
K562	3	/
Z1.036	0	/
Z1.037	0	/
Z1.038	0	/
Z1.039	0	/
Z1.040	0	/
Z1.041	0	/
Z1.042	0	/
Z1.043	0	/
Z1.044	0	/
Z1.045	0	/
Z1.046	0	/
Z1.047	0	/
NeKo	0	/
12	0	0

Tabelle 6.15: H_2O : 15,15 μ l, Lyse: 2,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung
K562	3	/
Z1.048	0	/
Z1.049	0	/
Z1.050	0	/
Z1.051	0	/
Z1.052	0	/
Z1.053	0	/
Z1.054	0	/
Z1.055	0	/
Z1.056	0	/
Z1.057	0	/
Z1.058	0	/
Z1.059	0	/
NeKo	0	/
12	0	0

Tabelle 6.16: H_2O : 15,15 μ l, Lyse: 2,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Probe	Minigel	Sequenzierung
K562	3	/
Z1.066	0	/
Z1.067	0	/
Z1.068	0	/
Z1.069	0	/
Z1.070	0	/
Z1.071	0	/
NeKo	0	/
6	0	0

Tabelle 6.17: H_2O : 15,15 μ l, Lyse: 2,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung
K562	3	/
Z1.072	0	/
Z1.073	0	/
Z1.074	0	/
Z1.075	0	/
Z1.076	0	/
Z1.077	0	/
Z1.078	0	/
Z1.079	0	/
Z1.080	0	/
Z1.081	0	/
Z1.082	0	/
Z1.083	0	/
NeKo	0	/
12	0	0

Tabelle 6.18: H_2O : 15,15 μ l, Lyse: 2,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Probe	Minigel	Sequenzierung
K562	3	/
Z1.084	0	/
Z1.085	0	/
Z1.086	0	/
Z1.087	0	/
Z1.088	0	/
Z1.089	0	/
NeKo	0	/
6	0	0

Tabelle 6.19: H_2O : 15,15 μ l, Lyse: 2,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
K562	3	+	+
Z1.104	1	+	+
Z1.105	2	+	+
Z1.106	2	+	+
Z1.107	2	+	+
Z1.108	2	zus.	+
Z1.109	2	+	+
NeKo	0	-	-
6	6	6	6

Tabelle 6.20: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,5 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
K562	3	+	+
Z7.030	0	/	/
Z7.031	1	+	+
Z7.032	2	+	+
Z7.033	1	+	+
Z7.034	1	+	+
Z7.035	1	+	+
Z7.036	1	+	+
Z7.037	1	+	+
NeKo	0	-	-
8	7	7	7

Tabelle 6.21: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,5 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Probe	Minigel	Sequenzierung
K562	3	/
Z7.038	0	/
Z7.039	0	/
Z7.040	0	/
Z7.041	0	/
Z7.042	0	/
Z7.043	0	/
Z7.044	0	/
Z7.045	0	/
NeKo	0	/
8	0	0

Tabelle 6.22: H_2O : 15,15 μ l, Lyse: 2,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
K562	3	+	+
Z7.046	1	+	+
Z7.047	1	+	+
Z7.048	1	+	+
Z7.049	1	and.	and.
4	4	3	3

Tabelle 6.23: H_2O : 15,65 μ l, Lyse: 1,5 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2, gemeinsam mit PCR Tabelle 6.24

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
Z7.050	2	+	+
Z7.051	2	+	+
Z7.052	2	+	+
Z7.053	2	+	+
NeKo	0	-	-
4	4	4	4

Tabelle 6.24: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2, gemeinsam mit PCR Tabelle 6.23

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
K562	3	+	/
Z13.001	1	+	+
Z13.002	1	+	+
Z13.003	1	+	+
Z13.004	1	+	+
Z13.005	1	+	NA
Z13.006	1	+	NA
Z13.007	1	+	+
Z13.008	1	+	+
Z13.009	1	+	+
Z13.010	1	+	+
Z7.031 (Wdh.)		+	/
Z7.036 (Wdh.)		+	/
NeKo	1	+	/
10	10	10	8

Tabelle 6.25: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2, NeKo verunreinigt (Proband 7)

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
K562	3	/	/
Z13.011	0	/	/
Z13.012	1	+	+
Z13.013	0	/	/
Z13.014	1	+	+
Z13.015	1	+	+
Z13.016	0	/	/
Z13.017	0	/	/
Z13.018	0	/	/
Z13.019	0	/	/
Z13.020	0	/	/
NeKo	0	/	/
10	3	3	3

Tabelle 6.26: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2, Sequenzierung gemeinsam mit Proben Tabelle 6.27

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
K562	3	+	/
Z13.021	1	+	+
Z13.022	1	+	+
Z13.023	0	/	/
Z13.024	1	+	NA
Z13.025	0	/	/
Z13.026	2	+	+
Z13.027	1	+	+
Z13.028	0	/	/
NeKo	0	-	/
8	5	5	4

Tabelle 6.27: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
K562	3	+	/
Z13.029	0	/	/
Z13.030	0	/	/
Z13.031	0	/	/
Z13.032	1	+	NA
Z13.033	1	+	NA
Z13.034	1	+	NA
Z13.035	1	+	NA
Z13.036	1	+	Teile
NeKo	0	-	/
8	5	5	0

Tabelle 6.28: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
K562	3	NA	/
Z13.037	2	NA	/
Z13.038	2	NA	/
Z13.039	2	NA	/
Z13.040	2	NA	/
Z13.041	2	NA	/
Z13.042	2	NA	/
Z13.043	2	NA	/
Z13.044	2	NA	/
8	8	0	/

Tabelle 6.29: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2, gemeinsam mit PCR Tabelle 6.30

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
Z12.001	2	NA	/
Z12.002	2	NA	/
Z12.003	0	/	/
Z12.004	1	NA	/
Z12.005	0	/	/
Z12.006	2	NA	/
Z12.007	2	NA	/
Z12.008	0	/	/
NeKo	0	-	/
8	5	0	/

Tabelle 6.30: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2, gemeinsam mit PCR Tabelle 6.29

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F	Wdh. HV2 F
K562	3	+	/	/
Z12.009	1	+	NA	Teile
Z12.010	2	+	+	/
Z12.011	0	NA	/	/
Z12.012	1	zus.	NA	+
Z12.013	1	+	+	/
Z12.014	2	+	zus.	+
Z12.015	2	+	+	/
Z12.016	2	+	NA	Teile
Z12.017	2	+	+	/
Z12.018	2	+	NA	Teile
NeKo	0	-	/	/
10	9	9	5	2

Tabelle 6.31: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
K562	3	+	+
Z10.025	1	+	+
Z10.026	1	NA	NA
Z10.027	3	+	+
Z10.028	3	+	+
Z10.029	3	+	+
Z10.030	3	+	+
Z10.031	3	+	+
Z10.032	0	/	/
Z10.033	3	+	+
Z10.034	3	+	+
NeKo	0	-	-
10	9	8	8

Tabelle 6.32: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 R	Sequenzierung HV2 F
K562	3	+	+
Z10.035	3	+	+
Z10.036	3	+	+
Z10.037	3	+	+
Z10.038	0	/	/
Z10.039	0	/	/
Z10.040	2	+	+
Z10.041	1	+	+
Z10.042	1	+	+
Z10.043	2	+	+
Z10.044	1	+	+
NeKo	0	-	-
10	8	8	8

Tabelle 6.33: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1,0 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2

6.4 Tabelle Versuch mit Zigarettenkippe

Probe	Minigel	Sequenzierung F	Sequenzierung R
K562	3	+	/
Kippe Z1	0	+	NA
Kippe Z2	0	+	NA
Kippe Z3	0	+	NA
Kippe Z4	1	+	NA
Kippe Z5	1	+	+
Kippe Z6	1	+	+
Kippe Z7	1	NA	/
Kippe Z8	1	NA	/
NeKo	0	-	/
8	5	6	2

Tabelle 6.34: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1, Zigarettenkippe

6.5 Tabellen Versuche mit Mischspur

Probe	Minigel	Sequenzierung F
K562	3	+
X01	0	NA
X02	0	NA
X03	0	NA
X04	0	NA
X05	0	NA
X06	0	NA
X07	0	NA
X08	0	NA
X09	0	NA
NeKo	0	-
9	0	0

Tabelle 6.35: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1, Mischspur

Tabellenanhang

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 F
K562	3	+
X10	0	NA
X11	0	NA
X12	0	NA
X13	0	NA
X14	0	NA
X15	0	NA
X16	0	NA
X17	0	NA
NeKo	0	-
8	0	0

Tabelle 6.36: H_2O : 15,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2, Mischspur

Probe	Minigel	Sequenzierung HV1 F	Sequenzierung HV2 R
Y01	2	Proband 1	Proband 1
Y02	0	/	/
Y03	1	NA	NA
Y04	2	Proband 1	Proband 1
Y05	2	Proband 1	Proband 1
Y06	0	/	/
Y07	0	/	/
Y08	2	Proband 1	Proband 1
Y09	1	Proband 1	Proband 1
Y10	1	Proband 15	NA
Y11	1	Proband 15	NA
Y12	2	Proband 1	Proband 1
Y13	2	Proband 1	Proband 1
Y14	1	Proband 15	NA
Y15	2	Proband 1	Proband 1
Y16	2	Proband 1	Proband 1
Y17	1	Proband 1	Proband 1
Y18	2	Proband 1	Proband 1
Y19	2	Proband 1	Proband 1
Y20	1	Proband 15	NA
Y21	2	Proband 1	Proband 1
Y22	2	Proband 1	Proband 1
Y23	1	Proband 1, zus.	NA
Y24	2	Proband 1	Proband 1
NeKo	0	-	-

Tabelle 6.37: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 1 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1+2, Mischspur

6.6 Tabelle Versuch mit Spermien

Probe	Minigel	Sequenzierung F
K562	3	+
Sm1	0	NA
Sm2	0	Teile
Sm3	0	NA
Sm4	0	NA
Sm5	0	NA
Sm6	0	/
Sm7	0	/
Sm8	0	/
Sm9	0	/
Sm10	0	/
Sm11	2	Teile
Sm12	0	/
KoZ1	0	Anderson
KoZ2	0	Anderson
KoZ3	0	Anderson
KoZ4	0	/
KoZ5	0	/
KoZ6	0	/
NeKo	0	-
8	8	8

Tabelle 6.38: H_2O : 16,15 μ l, Lyse: 2 μ l Pu + 0,6 μ l Pr, PCR: HV1, Spermien (Sm) und Kontroll-Epithelzellen (KoZ)

Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Verena Thias, geb. Pipper
Anschrift Teichwiesenweg 7
35037 Marburg
Geburtsdatum/-ort 08.07.1981, Siegen
Familienstand verheiratet

Schulbildung

1988 – 1990 Mariengrundschule, Siegen
1990 – 1992 Grundschule Eichen, Kreuztal
1992 – 1997 Friedrich-Flick-Gymnasium, Kreuztal
1997 – 2001 Fürst-Johann-Moritz-Gymnasium,
Siegen, Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

07.09.2001 Einschreibung am Fachbereich Humanmedizin der Philipps-
Universität Marburg
19.09.2003 Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)
22.11.2007 Abschluss: medizinisches Staatsexamen M2 (Note: sehr gut)
27.11.2007 Ärztliche Approbation

Praktisches Jahr am Klinikum der Philipps-Universität Marburg

21.08.2006 – 10.12.2006 Psychiatrie und Psychotherapie
11.12.2006 – 01.04.2007 Innere Medizin
02.04.2007 – 22.07.2007 Visceral-, Thorax- u. Gefäß-/Unfall-, Wiederherstellungs- u.
Handchirurgie

Berufliche Tätigkeit

01.03.2008 Anstellung als Assistenzärztin in Weiterbildung in der Kli-
nik für Psychiatrie und Psychotherapie, Zentrum für Soziale
Psychiatrie Haina gGmbH

Danksagung

Ich möchte mich zum Schluss bei den vielen Menschen bedanken, die das Entstehen dieser Arbeit ermöglicht und die zu ihrer Fertigstellung beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn PD Dr. Marcel A. Verhoff für die Bereitstellung des Themas sowie für seinen Rat in fachlichen Fragen als auch bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. Claas Mehnert bedanken, der die Arbeit am Mikromanipulator der Universitätsfrauenklinik in Gießen ermöglicht und mich in dessen Benutzung eingearbeitet hat.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Frank Heidorn, dem Leiter des DNA-Labors, sowie seinen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, insbesondere Dr. Christin Gruber, Valentina Kempf, Kai Edler, Marion Hornivius und Inessa Foos, für die Bereitstellung der Geräte, die fachliche Beratung sowie die große Hilfe und Unterstützung bei der Versuchsdurchführung.

Ich danke weiterhin den Probanden, die durch ihre bereitwillige Abgabe von Proben diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Sebastian Thias, der die Abfassung dieser Arbeit in LaTeX möglich gemacht und mir damit viel Ärger erspart hat, und der mich immer wieder getröstet und motiviert hat, wenn das Ziel der Promotion unerreichbar erschien.