

# Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Vorwort</b>	
<b>II.</b>	<b>Abstract</b>	
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1.	DNA (Desoxyribonukleinsäure)	3
1.2.	Mikrosatelliten	3
1.3.	DNA Fingerprinting	3
	Verfahren	
	Fingerprinting in der Kriminalistik	
1.4.	Verwandtschaftsanalysen	4
	Vaterschaftstests	
	Rechtliche Aspekte	
1.5.	Fragestellung	5
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>6</b>
<b>A)</b>	<b>Molekularbiologie</b>	
2.1.	PCR (Polymerase Chain Reaction)	6
2.2.	Gel-Elektrophorese	6
	Herstellung der Agarosegele	
	Verfahren	
	Färben der Gele	
2.3.	Rechtliche Abklärung	8
2.4.	DNA-Extraktion	9
2.5.	DNA-Vortest	10
2.6.	Volumenoptimierung	11
2.7.	Primer	11
	Was ist ein Primer?	
	Auswahl der Primer	
	Primerverdünnung	
	Primertest	
2.8.	DNA Fingerprinting Vortests (mit Agarosegel)	15
2.9.	Gel-Elektrophorese mit Elchromgelen	16
2.10.	Auswertung der Elchromgele	17
<b>B)</b>	<b>Umfrage</b>	
2.11.	Umfrage und persönliche Stellungnahme zur Ähnlichkeit der Probanden	17
<b>C)</b>	<b>Probleme</b>	
2.12.	Wiederholungen einzelner Tests	19
<b>3.</b>	<b>Resultate</b>	<b>20</b>
3.1.	DNA-Extraktion	20
3.2.	Test der DNA-Extraktionen	20
3.3.	Volumenoptimierung	20
3.4.	Elchrom-Gele nach der Elektrophorese	21
3.5.	Die genetische Ähnlichkeit aller Probanden	22
3.6.	Phenotypische Betrachtung der Ähnlichkeit	30
3.7.	Auswertung der Ähnlichkeitsumfrage	31
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>33</b>
<b>5.</b>	<b>Reflexion</b>	<b>37</b>
<b>6.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>Quellenverzeichnis</b>	<b>39</b>

## **I. Vorwort**

Im Vorwort erläutere ich, wie das Thema meiner Maturaarbeit zustande gekommen ist.

Ich finde Biologie sehr interessant und arbeite gerne im Labor. Das dreiwöchige Praktikum in der dritten Klasse hatte ich bereits im Bereich Labormedizin im Kantonsspital Aarau absolviert und Erfahrung mit Pipettieren und genauem Arbeiten gesammelt.

Nach der Kantonsschule will ich eine Lehre als Biomedizinische Analytikerin beginnen. Daher war für mich klar, dass meine Maturaarbeit ein Thema aus diesem Bereich beinhalten soll, um selbstständig molekularbiologische Experimente durchführen und auszuwerten zu können. Vor Beginn der Maturaarbeit führte ich mit meiner Biologielehrerin Saskia Demir einige Gespräche über die Ähnlichkeit der Gene von Geschwistern. Nach weiteren Gesprächen mit Kollegen habe ich mich entschlossen, meine Maturaarbeit diesem Thema zu widmen. Es gilt, das äusserliche Erscheinungsbild von Geschwistern mit deren Gen-Profilen zu vergleichen. Zusätzlich soll dies auch bei eineiigen Zwillingen untersucht werden. Die Kantonsschule Wettingen besitzt die notwendigen Gerätschaften, sodass sich die Suche nach einer Universität erübrigte und ich alle Experimente selbstständig durchführen konnte.

Für mich war stets klar, dass ich die Arbeit alleine durchführen wollte, um meine Praktikumskenntnisse effizient zu erweitern und selbstständig Ergebnisse auszuwerten.

Durch meine Biologielehrerin wurde mir Thomas Werner vermittelt, der mir zu Beginn einige Tipps gegeben hat und der sich später freundlicherweise als Betreuungsperson zur Verfügung stellte. Saskia Demir wird als Gegenleserin fungieren.

Oberflachs, 06. August 2009

Martina Hartmann

## II. Abstract

Meine Maturaarbeit aus dem Bereich der Molekularbiologie beinhaltet die Analyse der DNA-Proben von sieben Probanden (3 Geschwister, deren Cousine, 1 externe Person sowie eineiige Zwillinge).

Durch DNA-Fingerprinting wird ein DNA-Profil jedes Probanden angefertigt. Die Auswertung ermöglicht es, den genetischen Verwandtschaftsgrad zu bestimmen und mit einem durch eine Umfrage gewonnenen visuellen Ähnlichkeitsgrad der Probanden zu vergleichen. In einem weiteren Schritt wollte ich abklären, ob phenotypisch sichtbare Ähnlichkeiten genetisch nachweisbar sind.

Die zusammengefassten Resultate wurden statistisch ausgewertet und dienen als Grundlage zur abschliessenden Diskussion. Die genetischen Vergleiche der Geschwister zeigen eine deutlich erhöhte Übereinstimmung im Vergleich mit den übrigen Probanden. Die eineiigen Zwillinge stimmen genetisch wie erwartet sehr gut überein. Damit bestätigte die genetische Analyse den tatsächlichen Verwandtschaftsgrad der Probanden.

Die phenotypische Ähnlichkeit einer bei allen Probanden identischen Auswahl von Merkmalen ergab einheitlichere Resultate als die subjektive Umfrage unter mehr als 100 Teilnehmern. Diese verglichen Fotos und gewichteten Merkmale nach eigenem Ermessen, ohne feste Vorgabe. Daher ergaben sich vermeintliche Übereinstimmungen, welche durch die genetischen Tests nicht nachgewiesen wurden.

## 1. Einleitung

Während meiner Maturaarbeit habe ich mich im praktischen Teil hauptsächlich mit der Methode des genetischen Fingerprintings beschäftigt. Nachstehend einige Informationen dazu.

### 1.1. DNA (Desoxyribonukleinsäure)

Die DNA ist Träger der gesamten Erbinformationen. Das DNA-Molekül enthält vier unterschiedliche Basen: Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin, die sich paarweise – immer Adenin und Thymin sowie Cytosin und Guanin – aneinander lagern und die Sprossen der DNA-Doppelhelix bilden.

Man unterscheidet zwischen codierender und nicht codierender DNA. Die codierende DNA (Exons) enthält die Bauanleitung der Proteine und sagt so z.B. etwas über die Augenfarbe aus. Für eine Verwandtschaftsanalyse werden diese Sequenzen jedoch nicht beachtet, da sie sich von Mensch zu Mensch zu wenig unterscheiden. Die DNA zweier Menschen unterscheidet sich lediglich um 0,1%. Daher wird mit der nicht codierenden DNA gearbeitet (Introns und intergenische DNA-Abschnitte). Sie macht etwa 96% des gesamten Erbguts aus und gibt grösstenteils keine Informationen über äusserliche Merkmale, weil sie keine Bauanleitungen für Proteine enthält. Die bestimmten nicht codierenden Sequenzen sind hochindividuell und können daher gut in der DNA-Analytik verwendet werden [1].

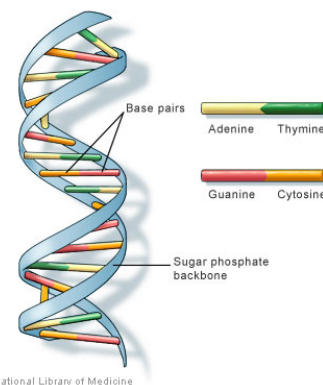


Abb. 1: Aufbau der DNA

### 1.2. Mikrosatelliten

Für meine Analysen habe ich Mikrosatelliten, auch SSR (Simple Sequence Repeats) genannt, verwendet. Diese kurzen, nicht codierenden DNA-Sequenzen werden im Genom eines Organismus oft wiederholt. Es ist häufig der Fall, dass sich viele Wiederholungen am selben Locus, das heisst an derselben Position eines bestimmten DNA-Abschnittes, konzentrieren. Die wiederholte Sequenz im Mikrosatelliten besteht aus zwei bis vier Nukleotiden und kann 10- bis 100-mal wiederholt auftreten [2].

Die Verwendung der Mikrosatelliten eignet sich gut, da sich die Anzahl der Wiederholungen bei jedem Individuum unterscheidet. Dadurch resultieren bei einer enzymatischen Spaltung DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge.

### 1.3. DNA Fingerprinting

#### Verfahren

Unter Fingerprinting oder einem genetischen Fingerabdruck versteht man das charakteristische DNA Profil eines Individuums. Die DNA wird aus Gewebeteilen, Speichel, Sperma oder auch aus Hautzellen gewonnen. Das Verfahren wurde im Jahr 1984 zufällig von Alec Jeffreys entdeckt. Für das Verfahren wird vorerst die PCR (Poly-Chain-Reaction) angewendet, um die DNA vervielfältigen zu können.

Beim Fingerprinting werden die Satelliten und Mikrosatelliten untersucht. Dabei wird die Anzahl der wiederholten Sequenzen angeschaut. Je nach Anzahl der Wiederholungen hat der vervielfältigte Abschnitt eine bestimmte Länge. Diese kann durch eine Gel-Elektrophorese im Agarosegel als einzelne Bande dargestellt werden. Die Gel-Elektrophorese werde ich später in meiner Arbeit erwähnen. Durch die Visualisierung mehrerer Banden entsteht ein DNA- Profil [2].

Wenn eine Person an einem bestimmten Ort auf einem Chromosom heterozygot ist, entstehen zwei unterschiedliche Banden. Diese Person besitzt also beispielsweise ein Mikrosatelliten-Allel mit 20 Wiederholungen und eines mit 30. Somit unterscheidet sich die Länge der Sequenzen auf beiden homologen Chromosomen. Wenn der Proband homozygot ist, wird nur eine Bande sichtbar. Man kann somit sagen, dass es sich beim DNA Fingerprinting um eine DNA-Fragmentlängen-Analyse handelt.

### **Fingerprinting in der Kriminalistik**

Die DNA spielt in der Kriminalistik eine immer wichtigere Rolle. Mittlerweile kann ein DNA-Fingerabdruck mit 20 bis 50 Nanogramm DNA hergestellt werden. Durch das Fingerprinting wird eine DNA-Probe, beispielsweise aus Spermaspuren einer Vergewaltigung mit der DNA-Probe des Verdächtigen verglichen. Bei einer Übereinstimmung des Bandenprofils kann der Täter überführt werden.

Es gibt ferner die Möglichkeit, Abstriche der Mundschleimhaut zu machen. So wurden bei sogenannten DNA-Raster-Fahndungen tausende verdächtige Personen untersucht. Diese Methode war bisher sehr oft erfolgreich [6].

### **1.4. Verwandtschaftsanalysen**

Das Verfahren meiner Arbeit ist im Grunde genommen ähnlich wie bei einem Vaterschaftstest. Die DNA wird von den Mundschleimhautzellen isoliert und anschliessend wie oben beschrieben untersucht.

#### **Vaterschaftstests**

Der Vaterschaftstest wird zur Klärung der Vaterschaft zwischen Kind und möglichem Vater herangezogen. Dies erfolgt durch einen Vergleich hochvariabler DNA-Abschnitte. Dazu werden verschiedene DNA-Merkmale (Mikrosatelliten) auf verschiedenen Chromosomen untersucht. Diese werden bei der Fortpflanzung zu gleichen Teilen an die Nachkommen weitervererbt. Da jedes Kind je ein homologes Chromosom von der Mutter und eines vom Vater erbt, muss jedes Kind auch für jeden Mikrosatelliten je ein Allel von der Mutter und ein Allel vom Vater besitzen.

Durch die Kombination der Allele der Mutter und des vermuteten Vaters muss also genau die Hälfte der gefundenen Banden des Kindes mit den Banden des Vaters übereinstimmen, während alle anderen Banden im DNA-Profil der Mutter vorkommen müssen. Ist diese Übereinstimmung nicht vorhanden, muss die Vaterschaft ausgeschlossen werden [3].

Bei einer Verwandtschaftsanalyse zwischen Geschwistern ist die Sache etwas komplexer. Hier besteht eine Wahrscheinlichkeit für identische Chromosomen von 50%, da jedes Kind zufällig eines von je zwei homologen Chromosomen erhält. Da aber bereits die Eltern gleiche Mikrosatelliten haben können, ist eine Übereinstimmung über 50% zu erwarten. Deshalb ist auch kein fixes Verhältnis des Ähnlichkeitsgrades vorhanden, weil die Geschwister zufällig verschiedene oder gleiche Varianten des jeweiligen elterlichen Chromosoms bekommen.

Beim Vaterschaftstest ist ein fixes Verhältnis des Ähnlichkeitsgrades vorhanden. Bei der Analyse zwischen Cousin und Cousine liegt die genetische Ähnlichkeit bei mindestens 12.5%. Für solche Verwandtschaftsanalysen sind bedeutend mehr Primer notwendig, um eine klare Aussage machen zu können.

### **Rechtliche Aspekte**

Die Durchführung von Verwandtschaftsanalysen ist in umfangreichen Gesetzen geregelt. Erst wenn schriftliche Zustimmungen aller Probanden vorliegen, darf mit dem Verfahren begonnen werden. Die Zustimmung kann jederzeit widerrufen werden. Wer beispielsweise heimlich einen Vaterschaftstest durchführt wird mit einer Busse oder Gefängnis bestraft [3].

Weitere Gesetze sind unter folgendem Link zu finden:

<http://www.admin.ch/ch/d/as/2007/669.pdf>

### **1.5. Fragestellung**

Während meiner Maturaarbeit werde ich mich damit beschäftigen, DNA-Profile von sieben Probanden zu erstellen und sie anschliessend zu vergleichen. Des Weiteren erfolgt eine persönliche Bewertung, bei der die phenotypischen Merkmale, also z.B. die Augenfarbe, der Probanden verglichen werden. Meine Fragestellung beruht darauf, ob mit den uns zur Verfügung stehenden Markern eine Korrelation zwischen phenotypischen und genetischen Unterschieden nachgewiesen werden kann. Zusätzlich wird eine subjektive Ähnlichkeitsanalyse durchgeführt, bei der die Fotos der Probanden in einer Umfrage verglichen werden.

Durch dieses Verfahren werde ich Genaueres über die genetische Ähnlichkeit zwischen meinen Geschwistern, meiner Cousine und mir erfahren. Dazu gehört auch die Untersuchung der Zwillinge. Sind sie wirklich eineiig?

Im Vergleich zu einem Vaterschaftstest ist meine Arbeit viel komplexer. Ich untersuche die Ähnlichkeit mit vielen Primerpaaren und kann nicht ausgehend von einem Primerpaar bestimmen, welches Verwandtschaftsverhältnis vorliegt.

## 2. Material und Methoden

Der praktische Teil meiner Arbeit wurde in mehrere Abschnitte gegliedert, die ich nacheinander beschreiben werde. Es handelte sich meistens um vorgängige Tests mit anschliessender Analyse. Oft wurde auch experimentiert, um das bestmögliche Resultat zu erhalten.

Da die Kantonsschule Wettingen über alle benötigten Gerätschaften verfügt, konnte alles im Schullabor durchgeführt werden. Zuerst möchte ich die zwei Hauptverfahren und einige verwendete Gerätschaften vorstellen.

### 2.1. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Die Polymerase Chain Reaction bezeichnet eine Methode, bei der von bestimmten Abschnitten der DNA eine exponentiell wachsende Vielzahl von Kopien angefertigt wird.

Um die PCR durchführen zu können, werden mehrere grundlegende Komponenten benötigt. Zuerst braucht es die zu vervielfältigende DNA. Als nächstes werden 2 Primer verwendet, die den zu vervielfältigenden Abschnitt begrenzen und auf beiden Einzelsträngen der DNA als Startpunkt für die DNA-Synthese dienen. Die DNA-Polymerase, welche sehr temperaturresistent ist, kopiert die DNA-Sequenz. Zusätzlich braucht es Bausteine (Desoxyribonucleosidtriphosphate) für den synthetisierten DNA-Strang. Die Pufferlösung bietet schlussendlich eine geeignete chemische Umgebung für die DNA-Polymerase.

Der PCR Zyklus erfolgt in drei Phasen. Bei der Denaturierung wird bei 94°C der Doppelstrang in zwei Einzelstränge zerlegt. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen. Erst dann können die Primer an die DNA-Stränge binden. In der zweiten Phase, dem Annealing, lagern sich die Primer an die DNA-Abschnitte der zwei Einzelstränge an. Dies erfolgt bei einer Temperatur, die ca. 1 bis 2°C unter dem Schmelzpunkt des Primers liegt. Zum Schluss erfolgt die Elongation. Hier wirkt das Enzym, die DNA-Polymerase. Sie füllt die fehlenden Stränge mit freiliegenden Nukleotiden (Bausteinen) auf. Sie beginnt am 3'-Ende des angelagerten Primers und folgt dann dem DNA-Strang. Dieser Schritt findet bei 72°C statt. Die einzelnen Zyklen werden wiederholt, sodass sich der originale DNA-Strang exponentiell vervielfacht. Die Reaktion verläuft in einem sogenannten Thermocycler [2].



Abb. 2: Thermocycler

### 2.2. Gel-Elektrophorese

Bei der Gel-Elektrophorese handelt es sich um einen Vorgang, bei dem in einem elektrischen Feld DNA-Stränge ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Je nach Grösse wandern die DNA-Moleküle unterschiedlich schnell durch das als Molekularsieb wirkende Gel. Dabei wandern die DNA-Moleküle in Richtung des positiven Pols, da die DNA selbst negativ geladen ist. Je grösser die Konzentration des Gels ist, desto schwerer ist es für die Moleküle, durch das „Gitter“ zu kommen. So sammeln sich Moleküle gleicher Grösse an der gleichen Stelle im Gel. Diese sind nach der Färbung als Banden sichtbar [6].

## Herstellung der Agarosegele

Für meine primären Tests wurde die Elektrophorese mit Agarosegelen durchgeführt. Diese Gelart ist verhältnismässig billig und eignet sich gut für gewisse Vortests, um schauen zu können, ob das durch PCR gewonnene Material genügend aussagekräftig ist. Es reicht durch sein geringes Auflösungsvermögen nicht aus, feine Unterschiede bei den Bandengrössen zu erkennen.

Für die Herstellung des Agarosegels benötigt man ein Elektrophorese-Gerät. Die dazugehörigen Schalen bilden die Form des Gels.

Zuerst wird in einem Erlenmeyerkolben 0.3g der Agarose abgewogen. Diese wird mit 30ml des 1x TAE Puffers (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) vermischt. Die 1%-Lösung wird anschliessend in der Mikrowelle aufgekocht, bis keine glitzernden Stückchen mehr zu sehen sind und die Lösung vollständig klar ist. Dann wird die Lösung in die vorbereitete Schale gegossen.

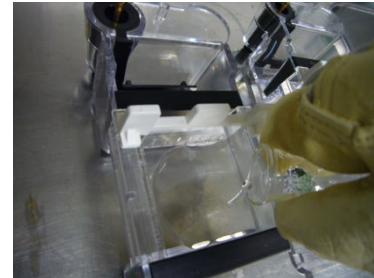


Abb. 3: Giessen des Gels

Nach dem Erkalten ist das fertige Agarosegel für die Elektrophorese bereit. Eine Bilderdokumentation zur Herstellung des Gels ist im Arbeitsjournal zu finden.

## Verfahren

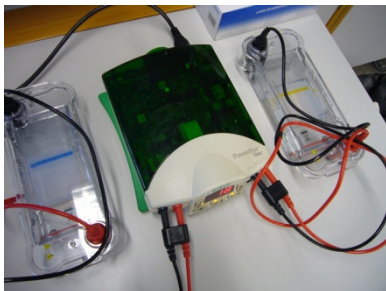


Abb. 4: Die Gel- Elektrophorese

Bei der Gel-Elektrophorese wird zuerst das Gel in die Schale gelegt, welche mit 0.25x TAE Puffer gefüllt ist. Anschliessend können die Geltaschen mit den DNA-Proben gefüllt werden. Bei meiner Arbeit pipettierte ich meistens 16µl der jeweiligen DNA-Probe und 4µl des „Loading Dies“ zusammen, bevor ich die 20µl in die Geltasche füllte. Der „Loading Die“ ist blau gefärbt und zeigt an, welche Geltaschen bereits besetzt sind. Während der Elektrophorese dient der „Loading Die“ als Hinweis dafür, wie weit die DNA-Fragmente im Gel bereits gewandert sind. In die erste Geltasche kam immer der Marker, welcher aus DNA-Fragmenten mit bekannter Grösse zusammengesetzt ist und als Molekularer Massstab verwendet werden kann. Nach dem Pipettieren folgte die Elektrophorese während 20 Minuten bei 200 Volt.

Bei der Gel-Elektrophorese wird zuerst das Gel in die Schale gelegt, welche mit 0.25x TAE Puffer gefüllt ist. Anschliessend können die Geltaschen mit den DNA-Proben gefüllt werden. Bei meiner Arbeit pipettierte ich meistens 16µl der jeweiligen DNA-Probe und 4µl des „Loading Dies“ zusammen, bevor ich die 20µl in die Geltasche füllte. Der „Loading Die“ ist blau gefärbt und zeigt an, welche Geltaschen bereits besetzt sind. Während der Elektrophorese dient der „Loading Die“ als Hinweis dafür, wie weit die DNA-Fragmente im Gel bereits gewandert sind. In die erste Geltasche kam immer der Marker, welcher aus DNA-Fragmenten mit

## Färben der Gele



Abb. 5: Rocker

Um die aufgetrennten DNA-Fragmente auf dem Gel sichtbar zu machen, wurden sie direkt nach der Elektrophorese gefärbt. Für die Färbelösung verwendete ich 20ml der Färbung (Fast-Blast, Bio Rad) und 80ml H<sub>2</sub>O. In dieser Mischung wurde das Gel in einer Schale gebadet. Damit die Färbung regelmässiger erscheint, legt man die Schale auf einen sogenannten Rocker, welcher das Gel in der Schale hin und her bewegt. Nach 15 Minuten kann das Gel herausgenommen und mit Wasser abgespült werden, bis die Banden im Gel erkennbar sind.



### 2.3. Rechtliche Abklärung

Die Einverständniserklärung diente als rechtliche Absicherung. Bei einer einzigen Ablehnung hätte ich die Analyse nicht durchführen dürfen. Untenstehendes Formular wurde an alle Probanden und deren Eltern geschickt. Die Formulare wurden von jedem Proband und Elternteil separat ausgefüllt und direkt an Herrn Werner geschickt. Damit wurde die Anonymität unter den 15 beteiligten Personen gewahrt.

#### Maturaarbeit 2009

Martina Hartmann  
Rebbergstr. 22  
5108 Oberflachs

Oberflachs, den 9. Mai 2009

Einverständniserklärung

#### Liebe Teilnehmer/Innen, Liebe Eltern

Während meiner Maturaarbeit werde ich gezielt Verwandtschaftsanalysen durchführen. Dies erfolgt mit einem genetischen Fingerabdruck, einem persönlichen DNA-Profil, aller Probanden. Bei dieser Methode werde ich mit Hilfe von PCR Abschnitte Ihrer DNA, bzw. von derjenigen Ihres Kindes, vervielfältigen und anschliessend mit Gel-Elektrophorese auftrennen. Das charakteristische DNA-Profil aller Probanden wird mit diesem Verfahren sichtbar werden. Die erkennbaren Profil-Unterschiede werde ich untersuchen, bzw. vergleichen.

Ich möchte Sie darauf hinweisen, dass mit dieser Methode Aussagen über die verwandtschaftliche Nähe der Probanden gemacht werden können. Ihre Zusage würde mich sehr freuen. Für Fragen stehe ich gerne zur Verfügung.

Name: \_\_\_\_\_ Vorname: \_\_\_\_\_

Bitte zutreffendes ankreuzen

Ich stimme zu  Ich lehne ab

Datum, Unterschrift:

\_\_\_\_\_

Das unterzeichnete Formular schicken Sie bitte direkt an:

**Herr  
Thomas Werner  
Rosenauweg 16  
5430 Wettingen**

Freundliche Grüsse und vielen Dank.

Martina Hartmann

## 2.4. DNA- Extraktion

Zu Beginn der praktischen Arbeit benötigt man die Mundschleimhautzellen der Probanden. Die Zellen werden gewonnen, indem jeweils drei Eppendorfröhrchen zur Hälfte mit dem Speichel der Probanden gefüllt werden. Mit Zahnstochern wird etwas von der Mundschleimhaut abgekratzt und im Speichel verrührt.

Folgende Probanden wurden getestet:

Stefan, Daniela, Martina (Geschwister); Sandra (Cousine); Matthias (ausenstehend); Philipp und Roman (ausenstehende Zwillinge).

Anschliessend konnte die DNA-Extraktion beginnen.

Damit später genügend isolierte DNA vorhanden war, wurde die DNA bei allen Probanden drei Mal isoliert. Bei der Matrix handelte es sich um die InstaGene Matrix von Bio Rad. Die Isolation geschah in mehreren Schritten:

1. In die vorbereiteten Eppendorf-Röhrchen pipettiert man 50µl der 1x TAE Pufferlösung. Eine eindeutige Beschriftung sichert die Zuordnung der Proben.
2. Zur Pufferlösung werden 100µl der jeweiligen DNA-Probe hinzu pipettiert. Die Eppendorfs mit dem Gemisch werden danach während 2 Minuten zentrifugiert.
3. Nun sollte ein Pellet ersichtlich sein. Ist dies nicht der Fall, wird Schritt zwei wiederholt. Der Überstand des Pellets wird verworfen, indem der Puffer vorsichtig ausgegossen wird. Das Pellet wird nochmals zentrifugiert.
4. Jetzt kann man den Mastermix erstellen. Dieser besteht aus 5ml der vorhandenen Matrix und 17µl der Protease (Bio Rad). Vom Mastermix werden jeweils 200µl zum Pellet gegeben. Diese Matrix verleiht der Probe eine negative Ladung. Anschliessend wird die Probe gut gevortext.
5. Die resuspendierten Zellen werden nun bei 56°C für 10 Minuten inkubiert. Die Hitze deaktiviert die Enzyme, welche die DNA abbauen könnten. Nach 5 Minuten werden die Proben nochmals gevortext.
6. Um Kondenswasser am Deckel zu entfernen, werden alle Proben zentrifugiert, bevor es zum nächsten Wasserbad geht. In diesem werden die Proben während 10 Minuten bei 100°C inkubiert. Dadurch platzen die Zellen, sodass nun die freie DNA in der Lösung ist.
7. Die Proben werden nochmals 10 Minuten (bei 13200 U/min) zentrifugiert.
8. Der Überstand, die freie DNA, kann nun in neue, beschriftete Eppendorfs pipettiert werden (50µl). Wichtig ist, dass keine Reste der Matrix hinzukommen (Die PCR würde dadurch gehemmt werden).
9. Die isolierte DNA steht nun für weitere Tests zur Verfügung.

## 2.5. DNA-Vortest

Um sicher zu stellen, dass in allen Proben DNA vorhanden war, wurde ein DNA-Vortest durchgeführt. Da von jedem Probanden mehrere Proben genommen wurden, diente er zusätzlich zur Auswahl der besten DNA-Probe, welche für spätere Analysen verwendet wurde. Die verwendeten Kits und Protokolle wurden von der Firma Qiagen geliefert (siehe auch Arbeitsjournal).

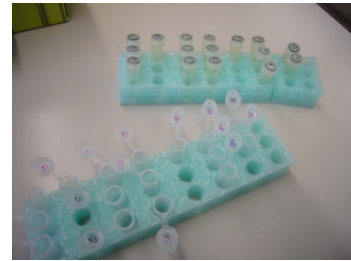


Abb. 6: Eppendorf-Röhrchen mit DNA-Proben

<u>Mastermix</u>	<u>Volume per Sample</u>	<u>Volume for 17 Samples</u>
DNA	1µl	einzeln 1µl
Buffer (15mM)	5µl	85µl
dNTP's (10mM)	1µl	42.5µl
Primer (TH01, 10µM)	2µl	34µl
dd H <sub>2</sub> O	40.75µl	692.75µl
Hs Taq	0.25µl	4.25µl
<b>Total</b>	<b>50µl</b>	<b>859.5µl</b>

Bei diesem Test wurde vorgängig jede einzelne gereinigte DNA-Probe in ein PCR-Tube pipettiert. Anschliessend wurden vom Mastermix in jede Kapsel 49µl beigefügt. Die Proben wurden gut verschlossen und in den Thermocycler gestellt. Für das Primerpaar TH01 wurde eine Annealingtemperatur von 56°C gewählt.

Der PCR Zyklus verlief folgendermassen:

Zyklen	1x	38x	1x	∞
1	95°C für 15 min.	94°C für 45 sec.	72°C für 10 min.	4.0°C für ∞
2		56°C für 45 sec.		
3		72°C für 60 sec.		

Nach diesem Verlauf folgte die Gel-Elektrophorese. Die DNA-Proben wurden alle in die Geltaschen pipettiert. Nach der Elektrophorese wurde das Gel gefärbt und abgewaschen. Das Ergebnis konnte auf dem Leuchttisch betrachtet werden.

## 2.6. Volumenoptimierung

Beim Volumentest ging es darum, das minimale Volumen für die PCR zu bestimmen, um unter Anderem teure Reagenzien zu sparen. Daher wurden vier Reaktionen angesetzt. Je eine mit 50 $\mu$ l, 40 $\mu$ l, 30 $\mu$ l und 25 $\mu$ l. Nun galt es, den Mastermix anzusetzen. Da es bei jedem Test der gleiche Mastermix sein durfte, wurde das Verhältnis für 150 $\mu$ l berechnet. Für diesen Test wurde das Primerpaar TH01 mit einer Schmelztemperatur von 56°C verwendet. Ausserdem wurde für diesen Test überall die gleiche DNA genommen.

Mastermix	Volume
DNA	3 $\mu$ l
Buffer (15mM)	15 $\mu$ l
dNTP's (10mM)	3 $\mu$ l
Primer (TH01)	6 $\mu$ l
dd H <sub>2</sub> O	122.25 $\mu$ l
Hs Taq	0.75 $\mu$ l
<b>Total</b>	<b>150<math>\mu</math>l</b>

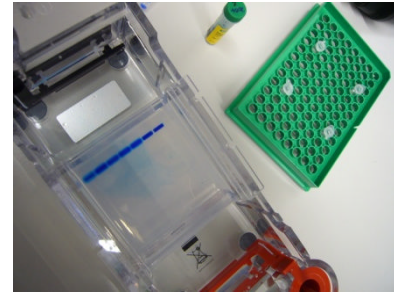


Abb. 7: Bereit zur Elektrophorese

Von den 150 $\mu$ l wurden 50 $\mu$ l, 40 $\mu$ l, 30 $\mu$ l und 25 $\mu$ l je in ein PCR-Röhrchen pipettiert. Bei der späteren Elektrophorese soll ersichtlich sein, mit welchem Volumen die PCR am Besten funktioniert.

PCR- Zyklus für die Volumenoptimierung:

Zyklen	1x	38x	1x	$\infty$
1	95°C für 15 min.	94°C für 45 sec.	72°C für 10 min.	4.0°C für $\infty$
2		56°C für 45 sec.		
3		72°C für 60 sec.		

Anschliessend wurde die Gel-Elektrophorese nach dem oben beschriebenen Verfahren durchgeführt. Nach dem Färben und Abwaschen des Gels wurde das Gel für die Analyse bereitgelegt.

## 2.7. Primer

### Was ist ein Primer?

In der Molekularbiologie werden Primer auch als Oligonukleotide bezeichnet. Wenn die Enden des zu vervielfältigenden DNA-Stücks bekannt sind, werden die Primer nahe den beiden Enden des DNA-Stücks eingesetzt. Dort startet anschliessend das DNA-replizierende Enzym. Ein solches Enzym ist beispielsweise die DNA-Polymerase. Diese benötigt eine Hydroxylgruppe, um ihre Reaktion am DNA-Strang starten zu können. So bieten die Primer mit ihrem 3'OH- Ende eine passende Hydroxyfunktion [2,6].

### Auswahl der Primer

Bei der Primerauswahl wurde darauf geachtet, dass sie schon einmal für Verwandtschaftsanalysen verwendet worden waren. Im Internet konnten viele gefunden werden. Das Ziel war, Primer für möglichst alle Chromosomen zu finden. Zusätzliche Angaben wie Sequenz, Schmelztemperatur und Fragmentlänge mussten im Internet mit geeigneten bioinformatischen Anwenderprogrammen ausfindig gemacht werden. Dies geschah mit speziellen Hilfsmitteln im Internet, wie beispielsweise mit Primerfox, Oligonucleotide properties calculator und BLAST (NCBI) [4]. Somit konnten die benötigten Angaben gefunden und berechnet werden. Die Sequenz war für die Primerherstellung notwendig, die Schmelztemperatur für die Optimierung der PCR und die Fragmentlänge für die anschließende Elektrophorese. Schlussendlich wurde anhand der bisherigen Angaben entschieden, 15 Primer zu testen. Auf der folgenden Seite sehen Sie die Primer in Blöcken dargestellt [5]. T<sub>m</sub> entspricht der Schmelztemperatur.

Die Primer wurden freundlicherweise von der Firma Microsynth aus Balgach (SG) zu einem guten Preis hergestellt.

### Primerverdünnung

Die Primer wurden pulverförmig geliefert. Daher mussten sie zuerst mit sterilestem Wasser (entionisiertes Wasser) aufgelöst werden. Die Verdünnung wurde so angesetzt, dass jeder Primer schlussendlich in einer Konzentration von 100µM vorlag. Die beiden zusammengehörigen Primer (forward und reverse) wurden anschliessend gemischt. Damit die Primer einsatzfähig waren, wurden sie nochmals mit dem Vortex-Gerät gemischt und kurz auf 65°C erhitzt. Durch diesen Vorgang wurden allfällige Klumpen gelöst. Die Primer waren nun fertig verdünnt.

Nähere Angaben zur spezifischen Verdünnung stehen im Arbeitsjournal.



Abb. 8: Angaben zu den Primern

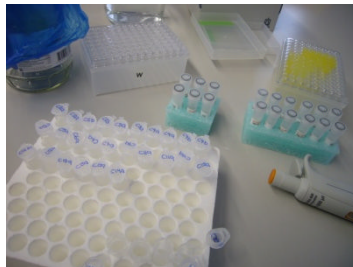


Abb. 9: Vorbereitung



Abb. 10: Pipettieren

## Primertest

Für den Primertest wurden die 15 Primer nach ihren Schmelztemperaturen geordnet, sodass PCR's mit verschiedenen Primerpaaren gleichzeitig im Thermocycler durchgeführt werden konnten. Der Test diente dazu, sicher zu stellen, dass alle Primer einwandfrei funktionieren. Insgesamt wurden die Primer in drei Blöcke mit drei verschiedenen Schmelztemperaturen eingeteilt.

Abk.	Name	Sequenz	Tm	Locus	Fragmentlänge
C2b	D2S1334 for	For: 5' AGG CCT CTC TTC GAA TGA TT 3'	52	chromosome 2	256
C2b	D2S1334 rev	Rev: 5' CTC CAT GAT CCA GTC ACC TC 3'	51	chromosome 2	256
C3a	D3S1358 for	For: 5' ACT GCA GTC CAA TCT GGG T 3'	51	chromosome 3	130
C3a	D3S1358 rev	Rev: 5' ATG AAA TCA ACA GAG GCT TG 3'	49	chromosome 3	130
C7a	D7S820 for	For: 5' ATG TTG GTC AGG CTG ACT ATG 3'	52	chromosome 7	242
C7a	D7S820 rev	Rev: 5' GAT TCC ACA TTT ATC CTC ATT GAC 3'	51	chromosome 7	242
C12b	D12S391 for	For: 5' AAC AGG ATC AAT GGA TGC AT 3'	49	chromosome 12	224
C12b	D12S391 rev	Rev: 5' TGG CTT TTA GAC CTG GAC TG 3'	52	chromosome 12	224
C14a	D14S1434 for	For: 5' ACA ATT CCA GAA ACT TCC CC 3'	49	chromosome 14	221
C14a	D14S1434 rev	Rev: 5' ATC AGT GAG CCA ATT CCT TG 3'	51	chromosome 14	221

Abb. 11: Block 1 mit der Annealingtemperatur von 48°C

C4a	FGA for	For: 5' GGC TGC AGG GCA TAA CAT TA 3'	53	chromosome 4	325
C4a	FGA rev	Rev: 5' ATT CTA TGA CTT TGC GCT TCA GGA 3'	57	chromosome 4	325
C4b	D4S3248 for	For: 5' TTC AGG AGT TTA GCT TTC TAT GC 3'	53	chromosome 4	243
C4b	D4S3248 rev	Rev: 5' CTA CAC CAT CAG TAC TCA CTA GGC 3'	56	chromosome 4	243
C12a	VWA for	For: 5' CCC TAG TGG ATG ATA AGA ATA ATC AGT ATG 3'	57	chromosome 12	149
C12a	VWA rev	Rev: 5' GGA CAG ATG ATA AAT ACA TAG GAT GGA TG 3'	56	chromosome 12	149
C13a	D13S317 for	For: 5' TGA CCC ATC TAA CGC CTA TCT GTA 3'	56	chromosome 13	397
C13a	D13S317 rev	Rev: 5' CAA TGA ATA GCC TTA GAT CAA GTA GAG TT 3'	57	chromosome 13	397
C15a	FES/FPS for	For: 5' GCT GTT AAT TCA TGT AGG GAA GGC 3'	55	chromosome 15	241
C15a	FES/FPS rev	Rev: 5' GTA GTC CCA GCT ACT TGG CTA CTC 3'	57	chromosome 15	241
C16a	D16S539 for	For: 5' GGG GGT CTA AGA GCT TGT AAA AAG 3'	55	chromosome 16	285
C16a	D16S539 rev	Rev: 5' GGT TGT GTG TGC ATC TGT AAG CAT GTA TC 3'	60	chromosome 16	285

Abb. 12: Block 2 mit der Annealingtemperatur von 53°C

C2a	TPOX for	For: 5' ACT GGC ACA GAA CAG GCA CTT AGG 3'	59	chromosome 2	231
C2a	TPOX rev	Rev: 5' GGA GGA ACT GGG AAC CAC ACA GGT TA 3'	59	chromosome 2	231
C5a	CSF1PO for	For: 5' AAC CTG AGT CTG CCA AGG ACT AGC 3'	59	chromosome 5	318
C5a	CSF1PO rev	Rev: 5' TTC CAC ACA CCA CTG GCC ATC TTC 3'	58	chromosome 5	318
C6a	F13A01 for	For: 5' GAG GTT GCA CTC CAG CCT TTG CAA 3'	60	chromosome 6	286
C6a	F13A01 rev	Rev: 5' TTC CTG AAT CAT CCC AGA GCC ACA 3'	58	chromosome 6	286
C11a	TH01 for	For: 5' ATT CAA AGG GTA TCT GGG CTC TGG 3'	57	chromosome 11	186
C11a	TH01 rev	Rev: 5' GTG GGC TGA AAA GCT CCC GAT TAT 3'	58	chromosome 11	186

Abb. 13: Block 3 mit der Annealingtemperatur von 56°C

Nun konnten erneut die Mastermixe für die drei Blöcke hergestellt werden. Neben dem bekannten Mastermix wurde für jeden Primer zusätzlich ein Mastermix mit erhöhter Konzentration an  $MgCl_2$  angefertigt, da die PCR je nach Primer bei unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen optimal verläuft. Da aber ein möglichst gutes Ergebnis erzielt werden wollte, war dieses Experiment sinnvoll.

<b>Mastermix</b>	<i>V. per Sample</i>	<i>for 5 Samples</i>	<i>for 6 Samples</i>	<i>for 4 Samples</i>
DNA	0.5µl	2.75µl	3.25µl	2.25µl
Buffer (10x)	2.5µl	13.75µl	16.25µl	11.25µl
dNTP's (10mM)	0.5µl	2.75µl	3.25µl	2.25µl
Primer (10µM)	1µl	einzeln 1µl	einzeln 1µl	einzeln 1µl
dd H <sub>2</sub> O	20.4µl	112.2µl	132.6µl	92.25µl
Hs Taq	0.1µl	0.55µl	0.65µl	0.45µl
<b>Total</b>	<b>25µl</b>	<b>137.5µl</b>	<b>162.5µl</b>	<b>112.5µl</b>

<b>Mastermix MgCl<sub>2</sub></b>	<i>V. per Sample</i>	<i>for 5 Samples</i>	<i>for 6 Samples</i>	<i>for 4 Samples</i>
MgCl <sub>2</sub>	1.5µl	8.25µl	9.75µl	6.75µl
DNA	0.5µl	2.75µl	3.25µl	2.25µl
Buffer (10x)	2.5µl	13.75µl	16.25µl	11.25µl
dNTP's (10mM)	0.5µl	2.75µl	3.25µl	2.25µl
Primer (10µM)	1µl	einzeln 1µl	einzeln 1µl	einzeln 1µl
dd H <sub>2</sub> O	18.9µl	103.95µl	122.85µl	85.05µl
Hs Taq	0.1µl	0.55µl	0.65µl	0.45µl
<b>Total</b>	<b>25µl</b>	<b>137.5µl</b>	<b>162.5µl</b>	<b>112.5µl</b>

Nachdem die jeweiligen Mastermixe in die Eppendorfs pipettiert wurden, konnten sie blockweise in den Thermocycler gestellt werden. Auch hier gab es blockweise andere PCR Zyklen, da es für jeden Primer spezifische Annealingtemperaturen braucht. Nachstehend die Zyklen:

<b>Block 1</b>				
Zyklen	1x	38x	1x	∞
1	95°C für 15 min.	94°C für 60 sec.	72°C für 10 min.	4.0°C für ∞
2		48°C für 60 sec.		
3		72°C für 60 sec.		

<b>Block 2</b>				
Zyklen	1x	38x	1x	∞
1	95°C für 15 min.	94°C für 60 sec.	72°C für 10 min.	4.0°C für ∞
2		53°C für 60 sec.		
3		72°C für 60 sec.		

<b>Block 3</b>				
Zyklen	1x	38x	1x	∞
1	95°C für 15 min.	94°C für 60 sec.	72°C für 10 min.	4.0°C für ∞
2		56°C für 60 sec.		
3		72°C für 60 sec.		

Nach Abschluss der jeweiligen Zyklen wurde die Elektrophorese durchgeführt. Anschliessend wurden die Gele gefärbt und abgewaschen.

## 2.8. DNA Fingerprinting Vortests (mit Agarosegel)

Die allgemeinen Vortests waren nun alle abgeschlossen. Es sollten nun alle DNA's mit den einzelnen Primern getestet werden. Dies diente zur Vorbereitung für die spätere Elchrom-Gel-Elektrophorese. Diese erfolgt mit einem speziellen Gerät, welches unterschiedliche DNA-Fragmente wesentlich besser auflöst. Sollten jedoch bereits auf dem Agarosegel keine Banden zu sehen sein, lohnt es sich nicht mit dem Elchromgerät weiterzuarbeiten. Die PCR müsste neu angesetzt werden.

Es wurde jeweils die beste DNA-Probe des jeweiligen Probanden verwendet. Als Kontrolle wurden bei zwei Probanden jeweils zwei verschiedene DNA-Proben parallel getestet. Dies erfolgte für die DNA von mir und diejenige von Philipp. Neben den DNA-Proben wurden die Primer und die benötigten Materialien für den Mastermix bereitgestellt. Der Mastermix wurde immer pro Primerpaar angefertigt. Vorgängig wurde die DNA jeweils einzeln in die PCR-Tubes pipettiert. Die PCR verlief bei diesem Test in 4 Blöcken.

Insgesamt gab es pro Primerpaar 10 Ansätze (7 Probanden, 2 Kontrollproben und eine Wasserkontrolle ohne DNA). Die Wasserkontrolle diente als Nachweis, dass keine unerwünschten DNA-Spuren in die Reaktionen gelangt waren.

Mastermix	V. for 10.5 Samples
DNA	einzel 0.5µl
Buffer (15mM)	26.25µl
dNTP's (10mM)	5.25µl
Primer (10µM)	10.5µl
dd H <sub>2</sub> O	214.2µl
Hs Taq	1.05µl
<hr/>	
Total	257.75µl

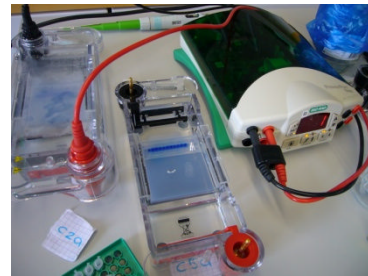


Abb. 14: Elektrophorese

Dieser Mastermix galt für jeden einzelnen Primer. Nun wurde der PCR Zyklus festgelegt. Dafür teilte ich die Primer in vier Blöcke, dass ich nicht zuviel Arbeit aufs Mal hatte. Der erste und dritte Block blieb gleich. Die PCR für den zweiten Block wurde in zwei Teilen durchgeführt. Unten sehen Sie die Einteilung.

1. PCR- Zyklus für die Primer C2b, C3a, C7a, C12b und C14a
2. PCR- Zyklus für die Primer C4a, C4b und C12a
3. PCR- Zyklus für die Primer C13a, C15a und C16a
4. PCR- Zyklus für die Primer C2a, C5a, C6a und C11a  
(PCR- Zyklus der einzelnen Blöcke: siehe Primertest)

*Zur Information:* Bei der Abkürzung der Primernamen steht C für Chromosom und die Zahl für die Chromosomnummer.

Nach der PCR folgte die Agarose-Gel-Elektrophorese. Hier wurde pro Primer ein Gel gegossen. Von den 15 Geltaschen wurden also 10 Taschen mit den DNA-Proben und dem Loader gefüllt. Zusätzlich wurde in die erste Geltasche der Marker pipettiert. Dieser diente als Kontrolle und als Mass für die Grösse der DNA-Fragmente. Die Reihenfolge der DNA-Proben wurde so festgelegt:

Stefan/ Daniela/ Martina/ Kontrolle/ Sandra/ Matthias/ Philipp/ Kontrolle/ Roman/ H<sub>2</sub>O



Nach der Elektrophorese wurden die Gele gefärbt und abgewaschen. Sie waren nun zur Analyse bereit.

## 2.9. Gel-Elektrophorese mit Elchromgelen



Abb. 15: Elchrom-Gerät

Nachdem alle Agarosegel-Elektrophoresen zu einem befriedigenden Resultat geführt hatten, konnte ich mit der Elchrom-Gel-Elektrophorese beginnen. Für diese Methode wurde nur sehr wenig DNA benötigt. Daher konnte die DNA des vorherigen PCR-Verlaufs weiter verwendet werden. Dies war sinnvoll, da diese Tests schlussendlich alle positiv ausgefallen waren.

Das Elchrom-Gerät ermöglicht ein sehr gutes Auflösungsvermögen und zeigt im Idealfall nach der Färbung schöne, klare Banden, auch wenn der Fragmentunterschied nur wenige Nukleotide beträgt. Die Elektrophorese dauert jedoch einiges länger. Für diese Methode nimmt man keine Agarosegels, sondern Elchrom Spreadex Gele. Die genaue Zusammensetzung dieser Gele wird von

Elchrom geheim gehalten. Die Funktion bleibt jedoch dieselbe. Für meine Arbeit habe ich die Elchrom Spreadex Gele 600 S-2x25 verwendet. Es gibt verschiedene Grössen der Gele, je nach Fragmentgrösse der Primer. Zusätzlich benötigte ich einen Marker für diese Gele. Hier habe ich mit dem M1 Marker (Grösse range of 67 - 622 bp) gearbeitet. Er war ideal für die Basenpaarängen meiner PCR-Produkte.

Das Gerät wird folgendermassen gestartet: Zuerst muss das Gerät mit dem Puffer gefüllt werden. Es handelt sich um den 40x TAE Puffer, von dem 50ml mit 2L Seradest vermischt werden. Danach muss die Lösung auf 55°C erhitzt werden. Nachher setzt man das leere Gel in die Kammer und schaltet die Pumpe aus. Diese wird später benötigt, damit der Puffer immer dieselbe Temperatur beibehält. Pro Elektrophorese konnte ich 2 Gele zusammen testen. Dies entspricht 4 getesteten Primerpaaren, da ein Gel 25 Geltaschen enthält. Zuerst kam bei beiden Gelen der Marker in die erste Geltasche. Anschliessend folgte die gleiche Reihenfolge der DNA-Proben wie beim Agarosegel.

Das Laden der Gele funktionierte jedoch etwas anders. Wie schon erwähnt braucht es hier sehr wenig DNA. Daher konnte ich lediglich 5µl in eine Geltasche pipettieren. Zu der DNA-Probe benötigte es wie zuvor einen Loading Die. Als Vorrat habe ich 50µl des Loading Dies mit 100µl Seradest gemischt. Von dieser Lösung konnte ich anschliessend je 3µl mit 2µl einer DNA-Probe mischen und direkt in die Geltasche pipettieren. Dies habe ich vorerst bei vier Primern gemacht. Das Gerät konnte ich nun auf 120 Volt während 150 Minuten stellen. Zu Beginn der Elektrophorese bleibt die Pumpe ausgeschaltet. Andernfalls würden die pipettierten Proben ausgespült werden. Nach 1.5 Minuten schaltet das Gerät automatisch um und die Pumpe wird aktiviert. Da ich 15 Primer hatte, folgte dieser Verlauf noch drei Mal.

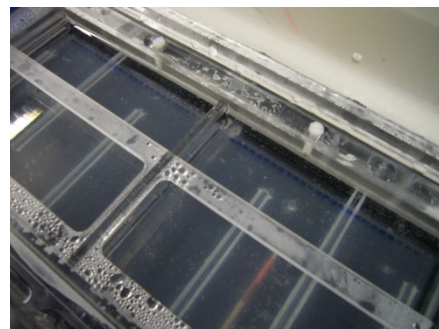


Abb. 16: Geladenes Gel

Nach der Elektrophorese wurde das Gel herausgenommen und in einer Schale vom Plastik gelöst. Dann kam das Gel in die Färbelösung. Diese bestand aus 50ml 1x TAE Puffer und aus 7µl der Sybr Gold Färbung, welche sehr lichtempfindlich ist. Das Gel schwenkte dann während 40 Minuten in der Färbelösung. Die ganze Färbung wurde im Dunkeln durchgeführt.

Die gefärbten DNA-Fragmente konnten danach mit einer UV-Lampe sichtbar gemacht werden. Um die Gele fotografieren zu können, wurde eine Glocke über das beleuchtete Gel gelegt. Die Kamera, welche das Gel von oben fotografierte, war direkt mit einem Fotoprogramm auf dem Computer verbunden, sodass die Bilder auf dem Bildschirm erschienen. Die Bilder konnten so direkt bearbeitet werden.



Abb. 17: Fotografieren

## 2.10. Auswertung der Eichromgele

Nach Abschluss der praktischen Tests wurden die Gele ausgewertet. Um ein korrektes Resultat bezüglich der Ähnlichkeit der Probanden zu erhalten, musste ich pro Primer jeweils alle Banden miteinander vergleichen. Im Excel Programm wurde zu jedem Probanden eine Tabelle angefertigt, in der identische und unterschiedliche Banden des betreffenden Probanden mit allen anderen Probanden verglichen wurden. Dazu wählte ich jeweils einen Probanden aus und zählte dessen sichtbare Banden, ebenso beim gewählten Vergleichsprobanden. Banden auf gleicher Höhe wurden nur einmal gezählt. So erhielt man ein Bandentotal und eine Anzahl übereinstimmender Banden. Durch dieses Verhältnis konnte ich direkt die Prozentzahl der Ähnlichkeit bezüglich dieses Markers und der Probanden bestimmen.

Dieses Verfahren wurde bei allen Primerpaaren und allen Probanden durchgeführt. Schlussendlich resultierte eine Tabelle, in der die Resultate zur Ähnlichkeit aller Vergleichsprobanden aufsummiert wurden. So ergab sich jeweils ein Durchschnitt des Ähnlichkeitswertes über alle verwendeten Primer. Die statistischen Analysen sind in Form einer Tabelle im Arbeitsjournal zu finden.

## 2.11. Umfrage und persönliche Stellungnahme zur Ähnlichkeit der Probanden

Um meiner Fragestellung gerecht zu werden, war zusätzlich eine Umfrage bezüglich der äusserlichen Ähnlichkeit der Probanden notwendig. Dazu habe ich von den Probanden einen Satz Fotos zusammengestellt. Es musste jeder Proband mit jedem verglichen werden. Die Ähnlichkeitsbewertung erfolgte im Bereich von 1 (gleichen sich minim) bis 5 (gleichen sich stark). So konnte ich die Ergebnisse später graphisch darstellen. An der Umfrage haben total 107 Personen teil genommen. Für diese Umfrage wurden die Zwillinge nicht berücksichtigt. Folgende Fotos wurden für die Umfrage verwendet:



Die Geschwister: Stefan, Daniela und Martina



Sandra: die Cousine der Geschwister

Matthias: der externe Proband

Ergänzend zu der allgemeinen Umfrage habe ich selber eine phenotypische Betrachtung durchgeführt. Dazu habe ich ebenfalls die Bewertung von 1 bis 5 verwendet. So konnte ich pro Vergleichspaar den Mittelwert der persönlichen Ähnlichkeitseinschätzung bestimmen. Dies diente zur Überprüfung des Gesamteindruckes. Sehr wahrscheinlich werden die Fotos aus persönlicher Sicht anders bewertet. Unten ist die Tabelle mit den einzelnen Werten abgebildet (E steht für Extern, C für Cousine und GS für Geschwister).

	Augen- farbe	Haar- farbe	Ohren- grösse	Nasen- form	Lippen- form	Kinn	Lachen	Hand- grösse	Finger- nägel	Zähne	Augen- form	Haar- form	Mittel- wert
Matthias & Martina E	1	2	1	2	1	3	1	5	2	4	1	1	1.67
Matthias & Daniela E	1	2	4	3	1	3	1	3	2	4	1	1	2.33
Matthias & Sandra E	3	1	3	3	1	2	2	3	3	3	1	2	2.17
Matthias & Stefan E	4	2	3	4	1	3	3	5	2	3	1	1	2.83
Martina & Sandra C	2	2	2	3	5	4	4	3	2	3	3	3	3.00
Sandra & Daniela C	2	2	3	2	3	4	4	4	2	4	4	3	2.67
Sandra & Stefan C	3	2	3	2	4	4	3	3	2	4	4	4	3.00
Martina & Stefan GS	1	5	2	2	4	5	4	5	4	3	4	4	3.17
Stefan & Daniela GS	1	5	4	4	3	5	4	3	3	4	4	4	3.67
Martina & Daniela GS	4	5	2	3	3	5	5	3	3	3	5	5	3.67

## 2.12. Wiederholung einzelner Tests

Die praktische Arbeit verlief nicht immer reibungslos. Nachstehend die Beschreibung der aufgetretenen Probleme:

1. Nach der DNA-Extraktion hatte ich nicht bei jeder Probe genügend DNA zur Verfügung. Dies war jedoch nicht weiter schlimm, da ich jeweils drei Proben hatte und es überall mindestens einmal geklappt hat. Nach der Elektrophorese musste ich jedoch feststellen, dass die PCR nicht überall funktioniert hatte. Da der Volumentest zum gleichen Zeitpunkt durchgeführt wurde, und den gleichen Mastermix enthielt, war es ziemlich sicher, dass dieser auch nicht klappen würde. Daher habe ich den gesamten Volumentest und den DNA-Test wiederholt. Ich vermute, dass mit dem verwendeten Primer FGA etwas nicht gestimmt hat. Für den wiederholten Test wurde der Primer TH01 verwendet.

2. Ein weiterer Stolperstein waren die Primertests. Bei folgenden Primern musste die PCR neu angesetzt werden: C2b, C3a, C12b und C12a. Hier waren die Banden nur undeutlich erkennbar. Daher wurde der Mastermix neu mit der Q-Solution (5x) angesetzt. Diese sollte mögliche hinderliche Sekundärstrukturen der Oligonukleotide auflösen. Unten ist der Mastermix inklusive Q-Solution dargestellt. Zum Vergleich wurde jeweils eine PCR mit und eine ohne Q-Solution durchgeführt.

<b>Mastermix</b>	<i>Volume per Sample</i>
DNA	0.5µl
Q- Solution	5µl
Buffer (15mM)	2.5µl
dNTP's (10mM)	0.5µl
Primer	1µl
dd H <sub>2</sub> O	15.4µl
Hs Taq	0.1µl
<hr/>	
Total	25µl

3. Das Fingerprinting für die Primer C3a, C7a, C11a und C12b mit dem Agarosegel hat ebenfalls nicht auf Anhieb geklappt. Somit habe ich den Mastermix nochmals neu angesetzt. Beim Primer C3a waren die Banden nach dem zweiten Durchlauf jedoch immer noch nicht gut ersichtlich. Daher wurde entschieden, das PCR-Programm zu verändern. Die Annealing-Temperatur wurde von 48°C auf 47°C runtergesetzt, um das Annealing für die Primer zu erleichtern. Zusätzlich wurde die Anzahl Zyklen von 38 auf 40 erhöht.

4. Bei der Auswertung der Elchrom-Gele musste ich feststellen, dass bei zwei Primern die Banden aufgrund der grossen DNA-Fragmente schlecht zu unterscheiden waren. Deshalb habe ich beschlossen, die Elektrophorese mit den Primern C4a und C13a mit dem Elchrom-Gerät zu wiederholen. Damit sich die DNA-Fragmente schöner aufteilen würden, wurde die Elektrophorese zeitlich auf 1440 Minuten verlängert und die Spannung auf 70 Volt reduziert.

### 3. Resultate

#### 3.1. DNA-Extraktion

Bei der DNA-Extraktion verlief alles nach Plan. Pro Proband hatte ich drei Eppendorfröhrchen mit der jeweiligen Mundschleimhaut und extrahierte die DNA aus allen drei Proben. Schlussendlich war nicht in allen Extraktionen genügend DNA vorhanden, sodass teilweise nur ein Eppendorf mit qualitativ hochwertiger isolierter DNA verfügbar war, was für die weiteren Versuche aber ausreichend war.

#### 3.2. Test der DNA-Extraktionen

Um die Qualität der DNA-Extrakte zu testen, wurde mit allen Extrakten eine PCR mit dem Primerpaar TH01 durchgeführt. Für weiterführende Untersuchungen war wichtig, dass in diesem Test alle DNA-Amplifikationen positiv ausgefallen sind. Klare Banden waren leider erst nach einer Wiederholung der PCR sichtbar.

Die DNA-Extraktion jedes Probanden, welche zum jeweils besten sichtbaren PCR-Produkt führte, wurde für die weiteren Tests ausgewählt.

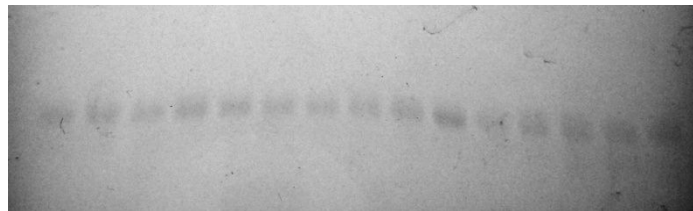


Abb. 18: Banden des DNA-Tests

#### 3.3. Volumenoptimierung

Das Test-Ziel bestand darin, das minimal nötige Volumen für die PCR zu bestimmen. Bei meinem Test war die Probe mit 25 $\mu$ l gleichwertig wie diejenige mit 50 $\mu$ l. Daher wurde von da an immer mit einem Volumen von 25 $\mu$ l gearbeitet. So konnten teure Reagenzien und Enzyme gespart und trotzdem ein aussagekräftiges Resultat erzielt werden.

### 3.4. Elchrom- Gele nach der Elektrophorese

Nachstehend sind einige Gele nach der Elektrophorese im Elchromgerät dargestellt, wie sie als Grundlage zur Auswertung dienen. Die Banden waren unter dem UV- Licht nach der Färbung relativ deutlich bestimmbar. Eigentlich wären hier nur eine oder zwei Banden pro Primer zu erwarten gewesen. Je nach dem, ob der Proband homo- oder heterozygot ist. Die wahrscheinliche Ursache der multiplen Banden und ihre Folge für die Datenanalyse werden in der Diskussion besprochen.

Hier nochmals die Reihenfolge der DNA-Proben:

Stefan/ Daniela/ Martina/ Kontrolle/ Sandra/ Matthias/ Philipp/ Kontrolle/ Roman/ H<sub>2</sub>O  
Pro Gel wurden zwei Primer mit den jeweiligen DNA-Proben angesetzt.



Abb. 19: M1 marker

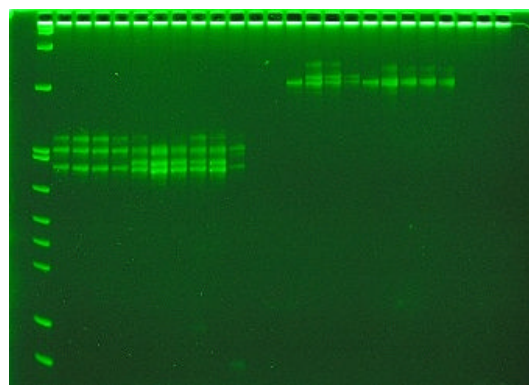


Abb. 20:  
Banden mit den Primern C2a und C5a

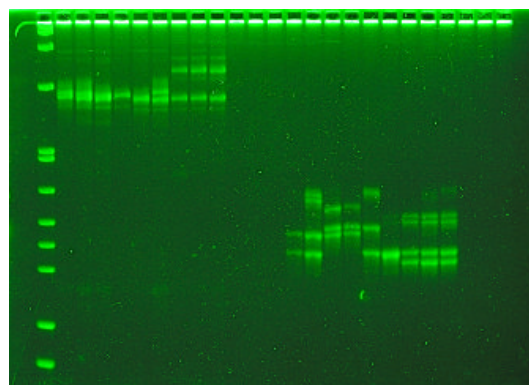


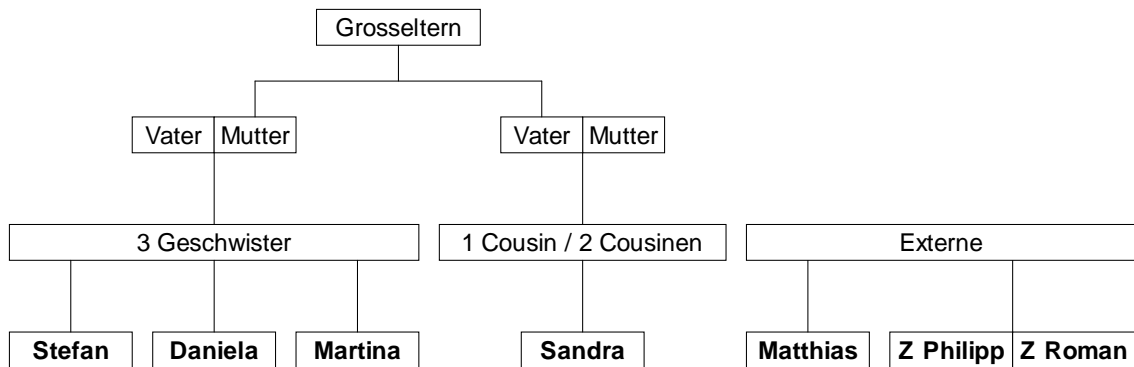
Abb. 21:  
Banden mit den Primern C6a und C11a

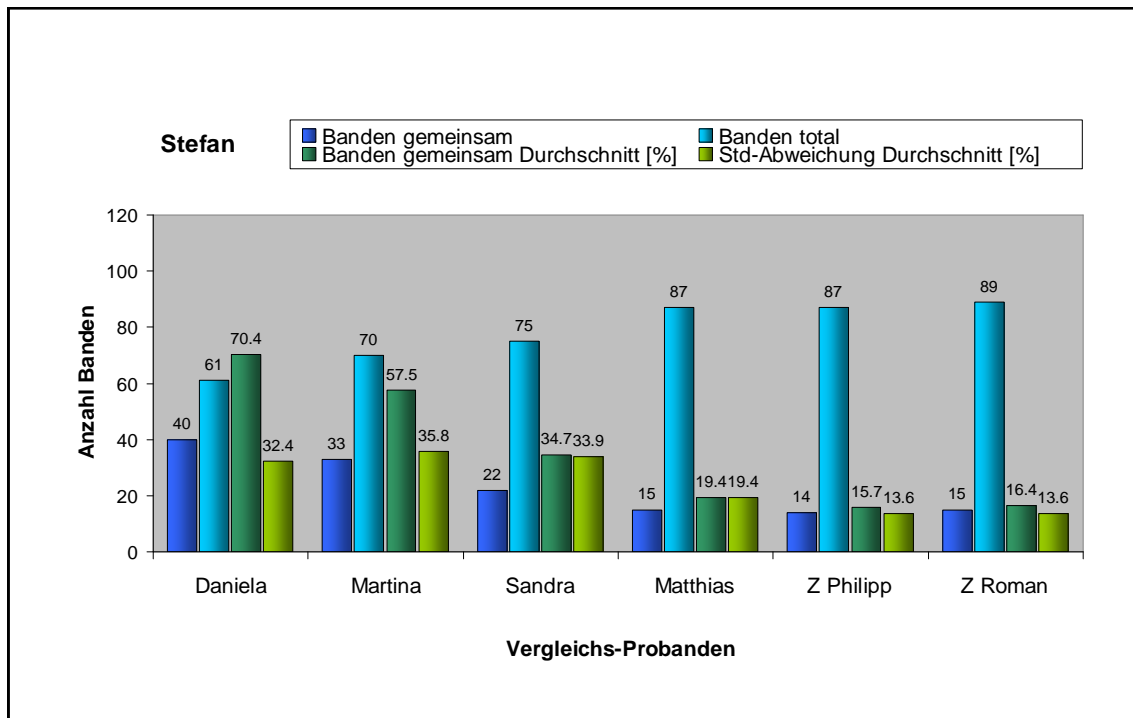
### 3.5. Die genetische Ähnlichkeit aller Probanden

In den folgenden Diagrammen wird jeweils die genetische Ähnlichkeit eines Probanden mit den übrigen Vergleichs-Probanden dargestellt.

Des Öfteren ist die Standardabweichung sehr hoch, was bedeutet, dass der prozentuale Ähnlichkeitsgrad pro Primer oft recht uneinheitlich ausgefallen ist (0-100%).

Ergänzend zu den Diagrammen ist nachstehend der Verwandtschaftsstammbaum der Probanden dargestellt.



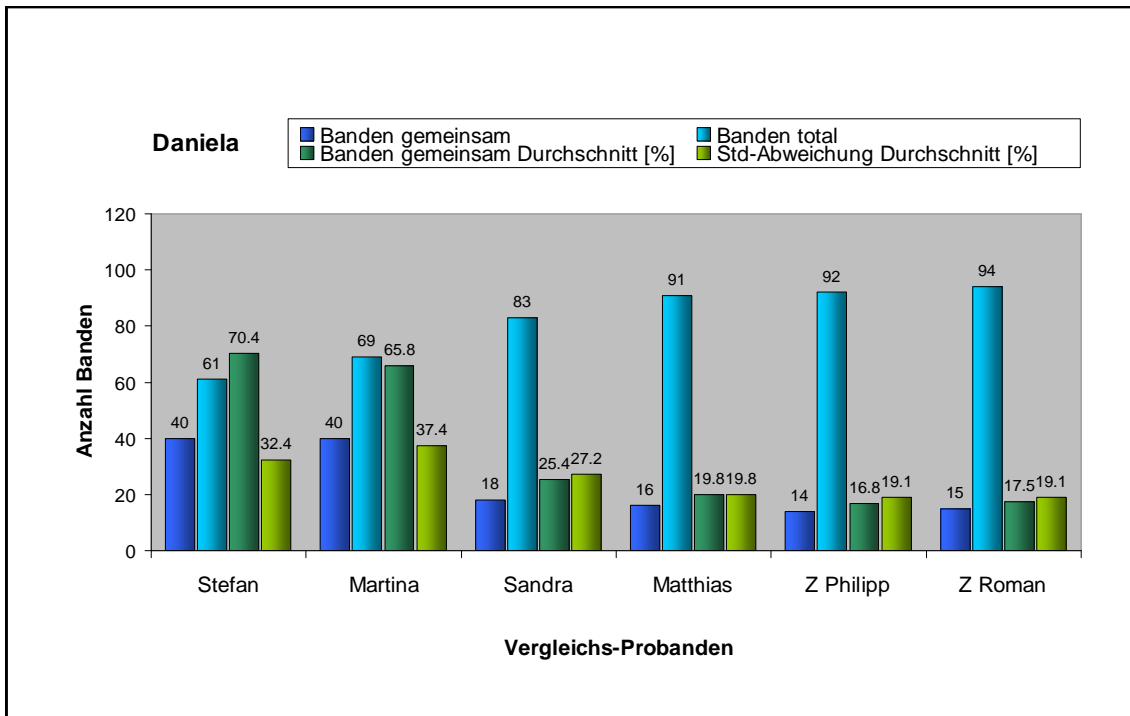


**Graphik 1 (Stefan):** Daniela ist ihm mit 70,4% Übereinstimmung am Ähnlichsten. Zudem ist die Standard- Abweichung verhältnismässig gering.

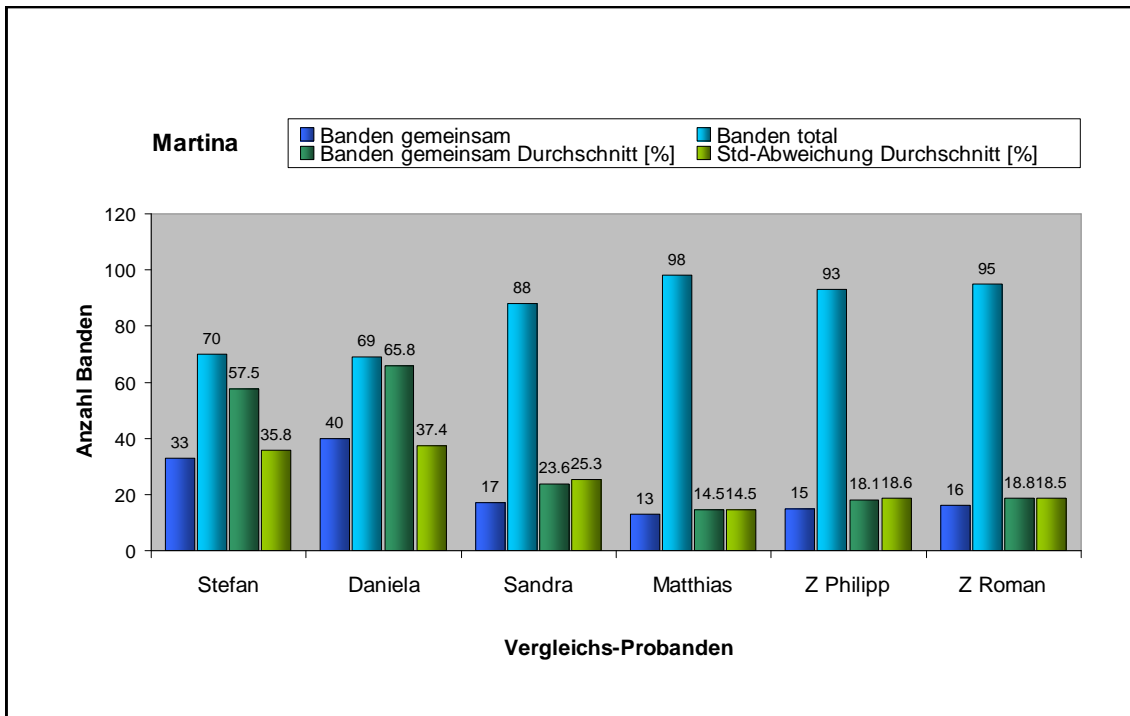
Es ist gut zu sehen, dass ihm die Geschwister Daniela und Martina genetisch ähnlicher sind als die restlichen Probanden. Die Übereinstimmung mit den Geschwistern beträgt wie erwartet über 50%. Seine Cousine Sandra scheint ihm ähnlicher zu sein, als die externen Probanden Matthias und die Zwillinge Philipp und Roman. Aufgrund der hohen Abweichungsrate ist dies jedoch nur eine qualitative Aussage.

Schon hier kann man feststellen, dass die Zwillinge beinahe denselben Ähnlichkeitswert bezüglich Stefan haben.

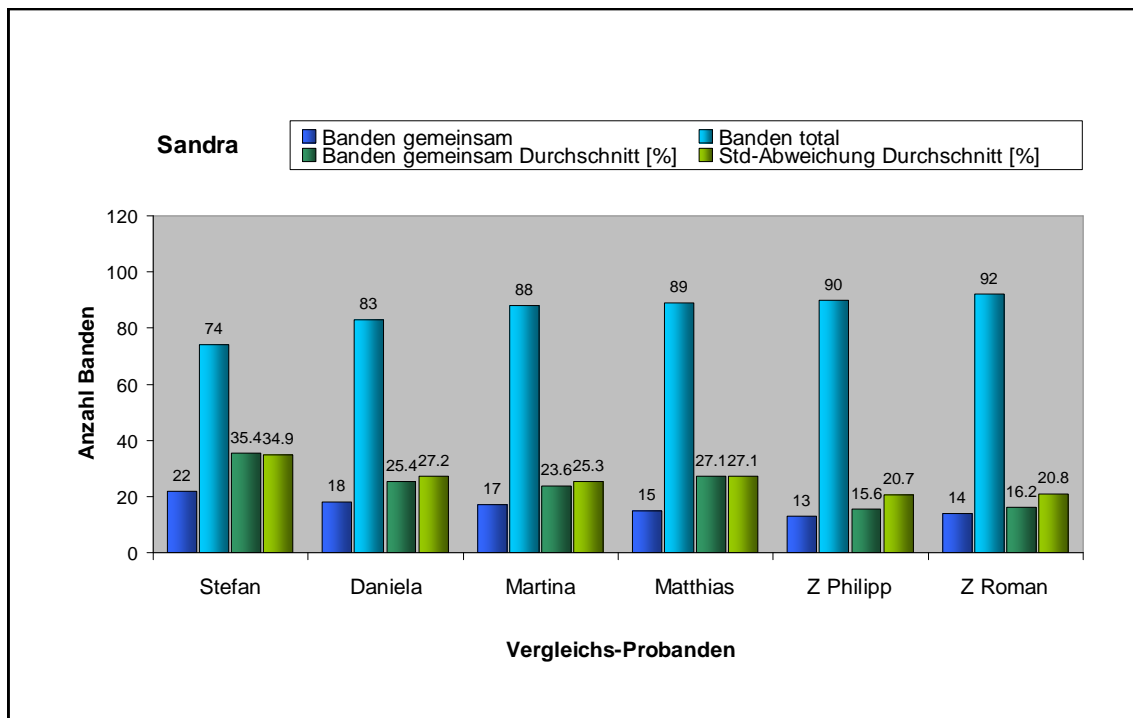




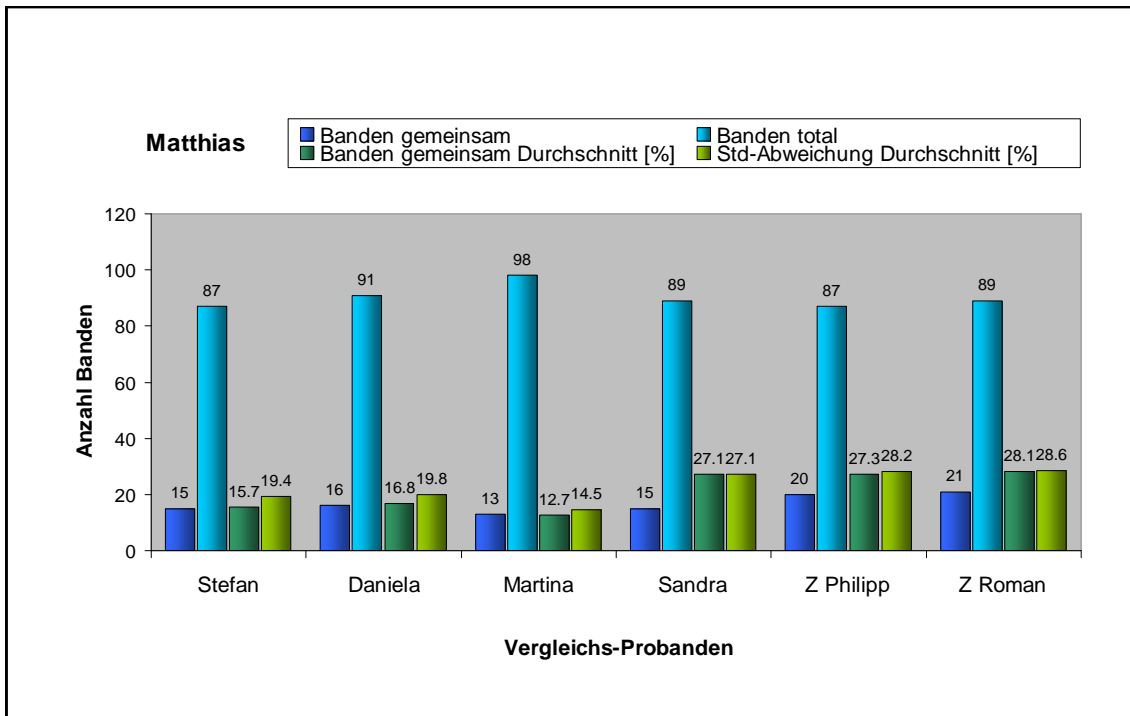
**Graphik 2 (Daniela):** Daniela und Martina zeigen die zweitbeste Übereinstimmung unter den Geschwistern, welche ebenfalls über 50% liegt. Daniela hat also mit beiden Geschwistern genetisch gesehen eine grosse Ähnlichkeit. Auch ihre Cousine Sandra ist ihr qualitativ gesehen immer noch ähnlicher als die externen Probanden.



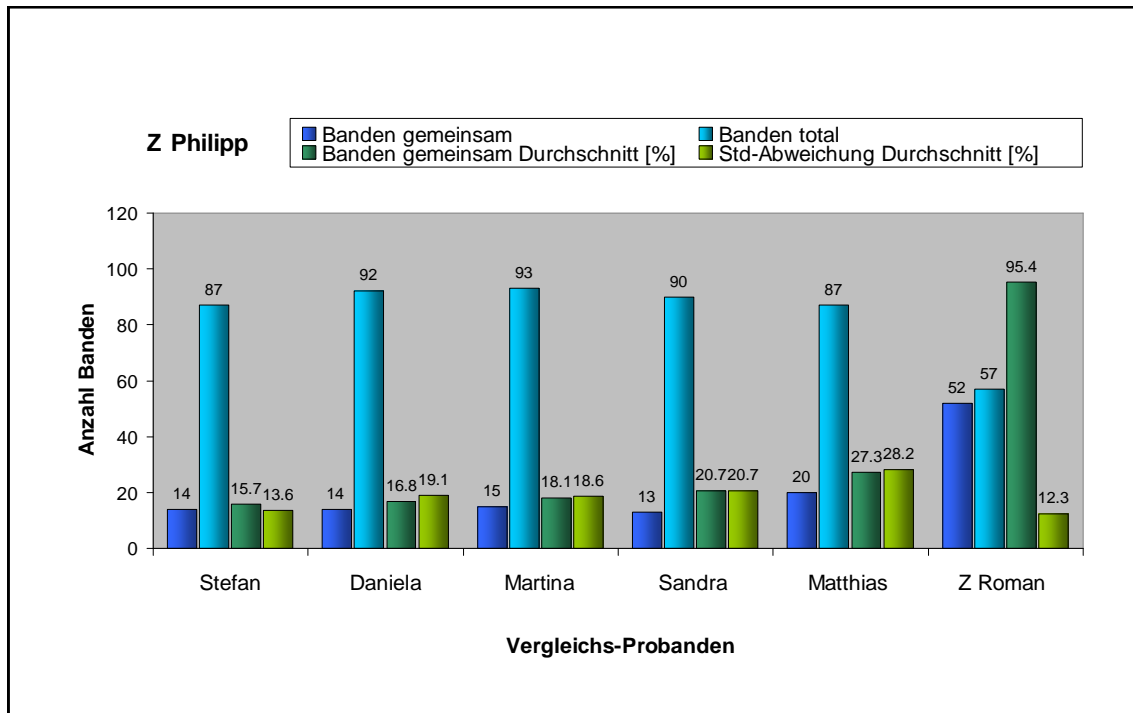
**Graphik 3 (Martina):** Die Übereinstimmung mit ihrer Cousine Sandra ist etwas geringer als diejenige zwischen Daniela und Sandra, die Ähnlichkeit zu den Geschwistern wieder über 50%. Der Verwandtschaftsgrad ist also bestätigt. Die externen Probanden zeigen eine deutlich geringere Übereinstimmung.



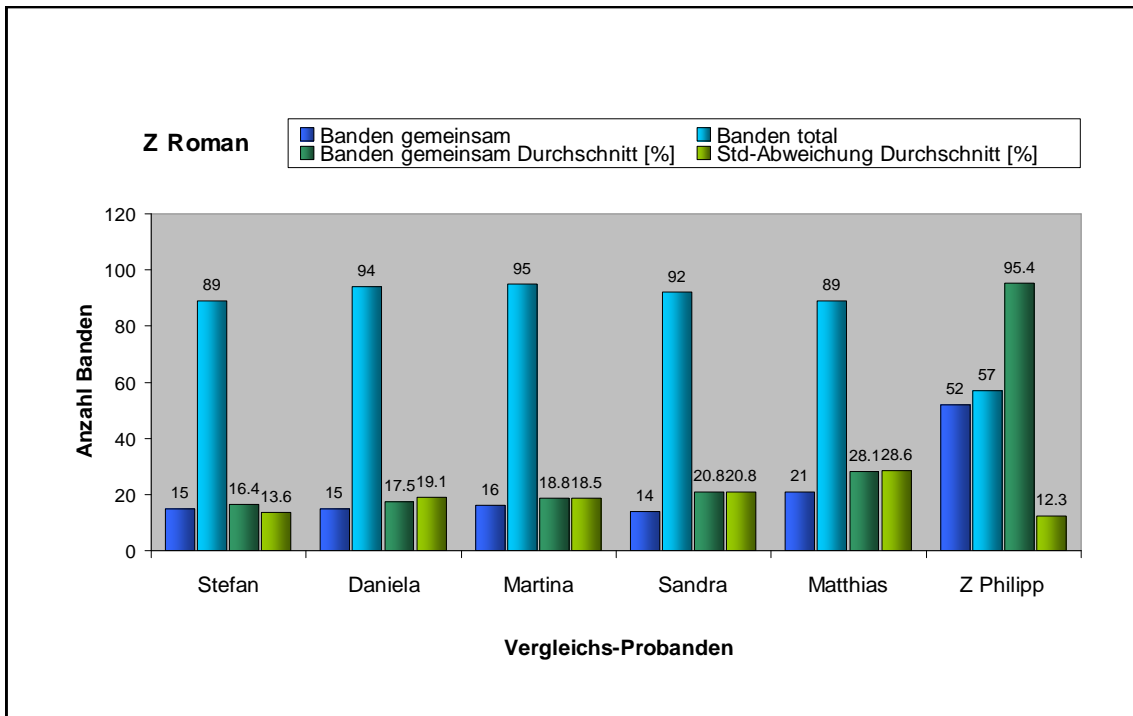
**Graphik 4 (Sandra):** Wie erwartet weist Sandra keine hohen Ähnlichkeiten zu anderen Probanden auf, wie es unter den Geschwistern zu sehen war. Der externe Proband Matthias ist Sandra interessanterweise ähnlicher als ihre Cousinen Martina und Daniela. Die im Vergleich mit Sandra generell hohen Standardabweichungen relativieren jedoch diese Feststellung. Im Durchschnitt gelten jedoch diese Werte.



**Graphik 5 (Matthias):** Erstaunlich ist hier die sehr grosse Streuung, die bei allen Vergleichs- Probanden vorliegt. Wahrscheinlich eine Folge der Tatsache, dass Matthias keine bekannte Verwandtschaft mit den Geschwistern Stefan, Daniela, Martina oder den Zwillingen Philipp und Roman besitzt. Trotzdem sind ihm nebst Sandra die Zwillinge ähnlicher als die Geschwister.



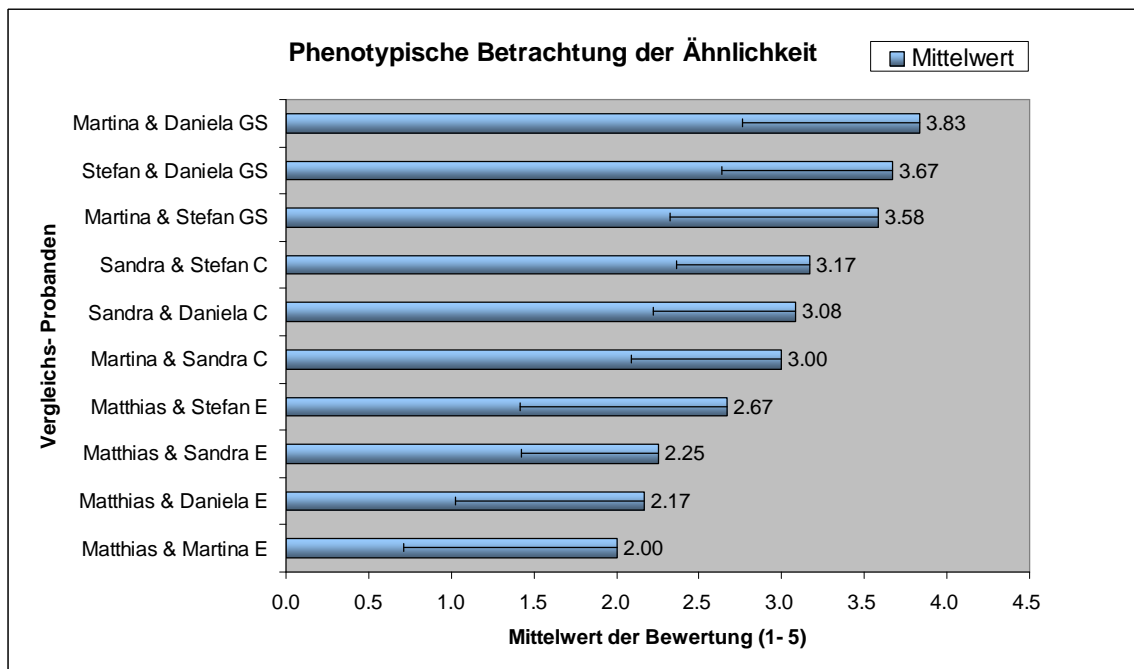
**Graphik 6 (Z Philipp):** Auf einen Blick ist die enorme Übereinstimmung mit seinem Zwillingenbruder Roman sichtbar. Daraus lässt sich schliessen, dass die Zwillinge mit 95,4% einig sind. Dieses Resultat wird durch die geringe Streuung bestärkt. Die restlichen 4.6% beruhen wahrscheinlich auf schlecht bestimmbar Banden, welche bei der Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Des Weiteren haben Sandra und Matthias mit Philipp eine bessere Übereinstimmung als mit den Geschwistern Stefan, Daniela, Martina.



**Graphik 7 (Z Roman):** Da die Zwillinge eineiig sind, zeigt das Diagramm nahezu dasselbe wie bei Philipp (Graphik 6). Die Streuung zu den restlichen Probanden ist ebenfalls recht gross.

### 3.6. Phenotypische Betrachtung der Ähnlichkeit

Im Diagramm sind die Mittelwerte der Auswertung pro Probandenpaar in absteigender Reihenfolge zu sehen. Die phenotypische Ähnlichkeit der Geschwister ist deutlich zu erkennen. Damit stimmen die phenotypischen Merkmale mit dem genetischen Vergleich weitgehend überein.



**Graphik 8:** Das Diagramm weist drei Stufen auf. Zu oberst stehen die Geschwister, welche einen Ähnlichkeits- Mittelwert von über 3.5 haben. Des Weiteren haben die Vergleiche der Geschwister mit der Cousine einen Mittelwert von 3 bis 3.17, also ungefähr eine gleichmässige Übereinstimmung. Unter 3 liegen die Vergleiche mit dem externen Probanden, wobei trotz der tiefsten Bewertung von 2 eine gewisse Ähnlichkeit vorhanden ist. Die Zwillinge sind hier nicht bewertet.

In den Balken ist mit dem schwarzen inneren Balken ein Vergleichsmass für die Standard-Abweichung dargestellt. Aus der Graphik ist ersichtlich, dass diese bei den Geschwistern verhältnismässig klein ist. Ein noch etwas klareres Ergebnis liegt bei den Vergleichspaaren zwischen den Geschwistern und der Cousine vor.

### 3.7. Auswertung der Ähnlichkeitsumfrage

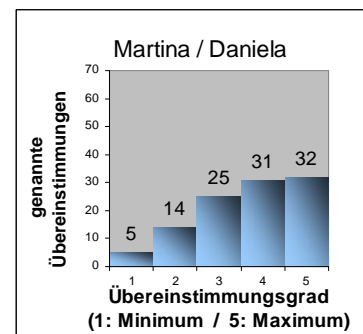
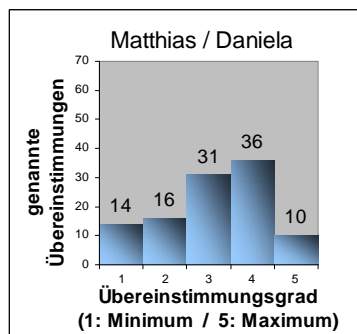
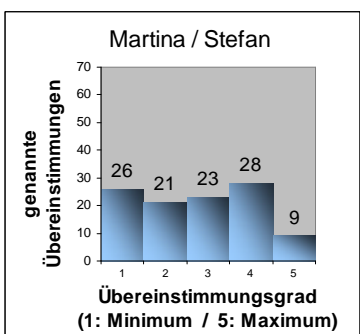
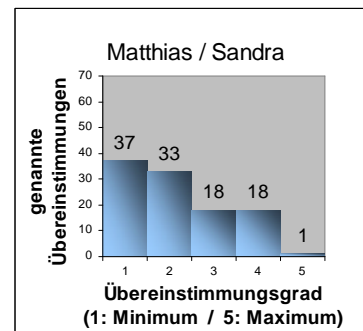
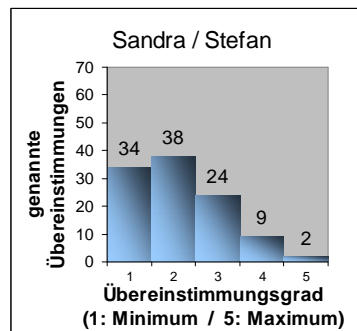
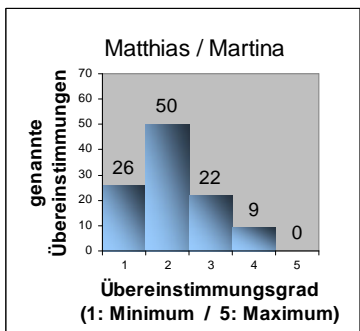
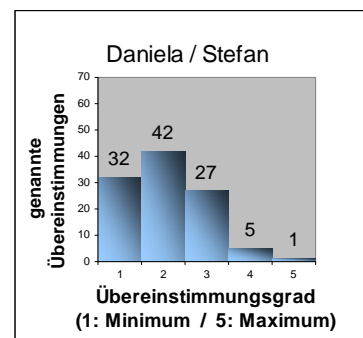
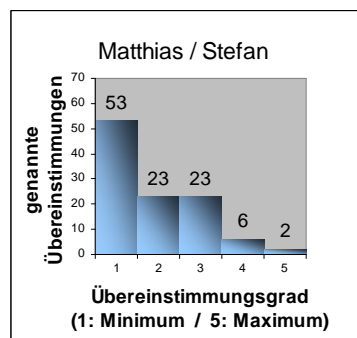
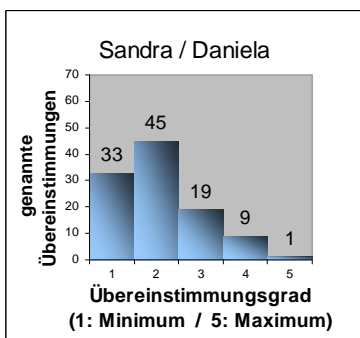
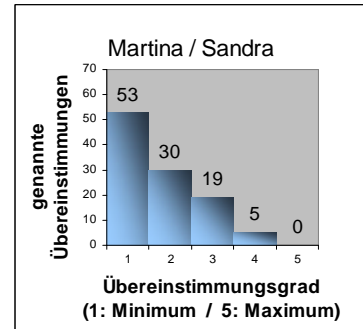
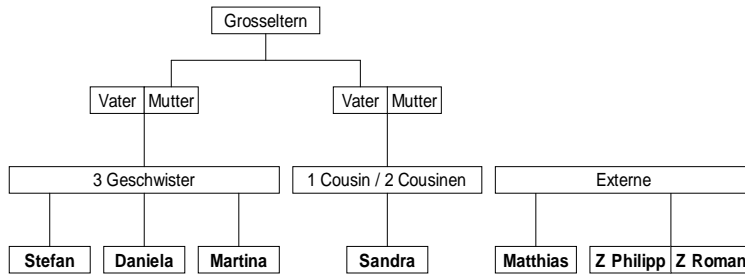
Die folgenden Diagramme zeigen die Anzahl genannter Übereinstimmungen von den 107 Befragten pro Übereinstimmungsgrad (1-5). Die Reihenfolge der Diagramme zeigt zu Beginn die geringste und zum Schluss die als höchste bewertete Ähnlichkeit. Nach diesen Werten würden die tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnisse nicht mit der Subjektiven Wahrnehmung aussenstehender Personen übereinstimmen. Es ist jedoch eine Korrelation zwischen den Schwestern erkennbar. Bei Stefan und Martina bestanden die grössten Diskrepanzen bei der Ähnlichkeitsbewertung. Die Bewertungen fielen generell recht unterschiedlich aus. Der Verwandtschaftsgrad als Geschwister zwischen Stefan und Daniela wird wenig wahrgenommen.

Sandra wurde die höchste Ähnlichkeit mit Stefan zugesprochen. Dies entspricht auch dem Verwandtschaftsgrad als Cousine.

Matthias (Aussenstehender) Erscheinungsbild wurde erstaunlicherweise oft mit einer hohen Ähnlichkeit zu Daniela bewertet. Seine Ähnlichkeit zu den anderen Vergleichs-Probanden wurde als geringer eingestuft.

In der Diskussion ist zusammenfassend ein Diagramm dargestellt (Graphik 9). Nachfolgend sind die Ähnlichkeitsauswertungen pro Proband graphisch dargestellt.





#### 4. Diskussion

Die Aufgabe bestand darin, die Ähnlichkeit zwischen verwandten und nicht verwandten Probanden mit einem genetischen Vergleich, einem systematischen Vermessen äusserlicher Eigenschaften und der subjektiven Wahrnehmung Aussehenstehender zu analysieren.

Zuerst zur genetischen Analyse: Im Grossen und Ganzen darf ich feststellen, dass meine Arbeitsweise sehr erfolgreich war. Durch die systematischen vorgängigen Tests der DNA-Extrakte und der Primerpaare wurde mir viel Arbeit erspart. So konnte ich beispielsweise bei verschwommenen Bandenergebnissen die PCR optimieren indem Q-Solution zugegeben wurde, ohne dass ich die PCRs für alle 7 Probanden wiederholen musste. Bei schwachen Banden optimierte ich die PCR durch Erniedrigung der Annealing-Temperatur und Erhöhung der Zykluszahl. Dadurch erzielte ich schneller ein gutes Resultat. Schwierigkeiten mit mangelhaften PCR Produkten, wie auch mit der Sichtbarkeit der Banden wurden so im Voraus vermieden. Im Nachhinein als unnötig erwiesen sich lediglich die PCR-Ansätze mit erhöhten Magnesiumkonzentrationen. Dies wahrscheinlich, da die Primer relativ heterogene Basenabfolgen besaßen und erhöhte Magnesiumkonzentrationen oft nur notwendig sind, wenn in einem Primer die gleiche Base mehrfach hintereinander vorkommt.

Zur Positivkontrolle für die Richtigkeit der PCR-Produkte setzte ich von zwei Probanden jeweils zwei unterschiedliche DNA-Extrakte ein. Als Negativkontrolle für Verunreinigungen mit Fremd-DNA setzte ich pro PCR-Reihe je eine Reaktion ohne DNA an. Die gute Qualität dieser Kontrollen bestätigte mir, dass meine Ergebnisse korrekt waren.

Das Material musste ich aus finanziellen Gründen gut einteilen. Mehrheitlich gelang mir das sehr gut, jedoch konnte ich es nicht vermeiden, ganz fehlerlos zu pipettieren. Das Pipettieren an sich hat mir jedoch viel Spass gemacht. Das selbstständige und unabhängige Arbeiten bereitete mir ebenfalls Freude. Das Färben der Gele war immer wieder eine spannende Situation. Entweder hatte es geklappt mit der PCR, oder nicht. Meistens war ich aber erleichtert, wenn ich die Banden auf dem Gel erblicken konnte. Nun möchte ich auf die einzelnen Ergebnisse zu sprechen kommen. Für meine Testergebnisse erwartete ich zu Beginn bei den Geschwistern eine Korrelation von mindestens 50%. Beim Vergleich mit der Cousine müssten mindestens 12.5% der DNA übereinstimmen. Als Positivkontrolle sollten die Zwillinge eine Ähnlichkeit von 100% aufweisen. Matthias wurde als externer Proband als Negativkontrolle eingesetzt. Diese Kontrollen haben sich bewährt. Bei den Auswertungen konnte ich deutlich ersehen, dass der externe Proband Matthias mit den anderen Probanden nicht verwandt ist. Auch bei den Zwillingen war das Resultat sehr deutlich. Dadurch wurde die statistische Qualität meiner Arbeitsweise bestätigt. In den nächsten Abschnitten werde ich auf die Resultate aller Probanden zu sprechen kommen.

Die Geschwister wiesen folgende genetische Übereinstimmungen auf: Stefan und Daniela haben eine Korrelation von 70,4%. Daniela und Martina stimmen mit 65,8%, Martina und Stefan mit 57,5% überein. Alle drei Ergebnisse liegen somit über dem Durchschnitt unter Geschwistern und bestätigen deren Verwandtschaftsgrad (**Graphiken 1, 2 und 3**).

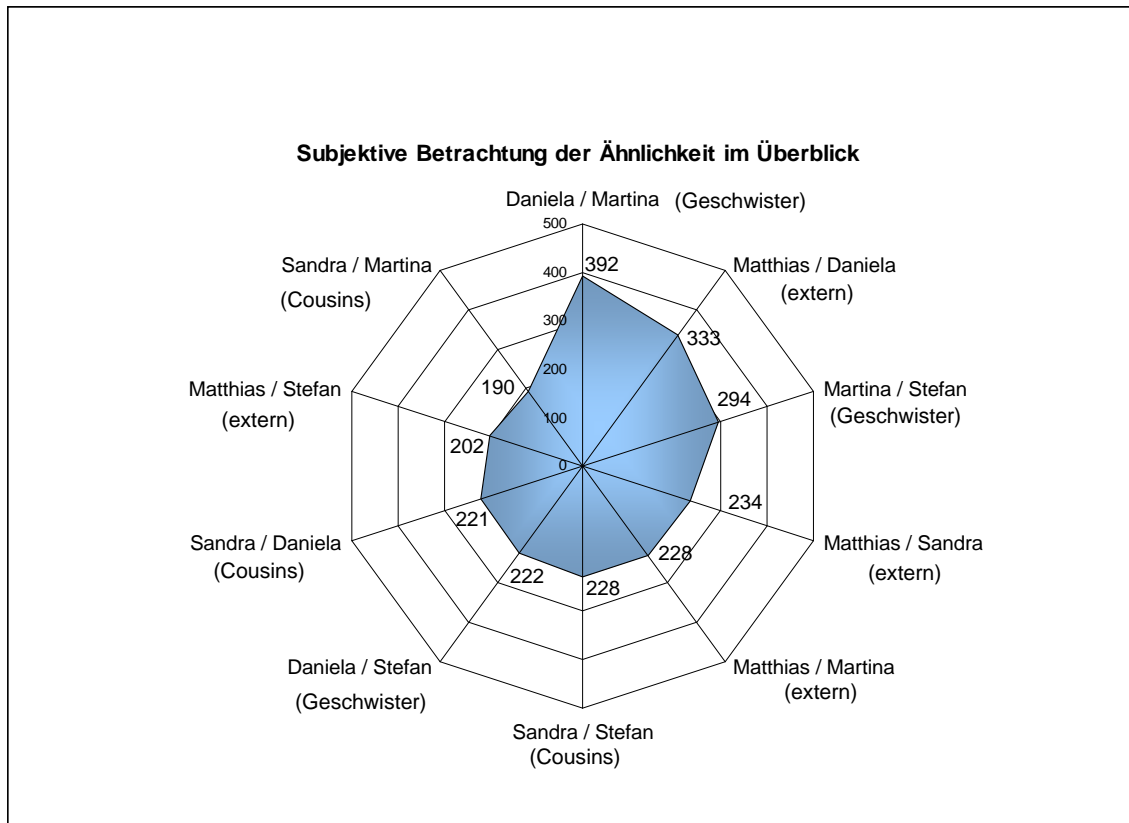
Die Cousine Sandra zeigt zu den Geschwistern Vergleichswerte von ca. 23% bis ca. 34% und liegt damit weit über dem erwarteten Bereich von 12.5%. Matthias weist zu den Geschwistern wie erwartet eine deutlich geringere Ähnlichkeit von ca. 12% bis 17% auf. Die Prozentzahl liegt im Vergleich zu Sandra und den Zwillingen recht hoch. Dies lässt sich damit erklären, dass auch nicht direkt verwandte Menschen zufällig auf einzelnen Loci die gleichen Allele besitzen können. Die Korrelation beträgt ca. 27%, allerdings mit einer grossen Streuung (**Graphik 5**).

Die genetische Ähnlichkeit der Zwillinge von 95,4% bestätigt sinngemäss die zu erwartenden Resultate. Da eigentlich eine Übereinstimmung von 100% vorliegen müsste, ist es möglich, dass bei der Auswertung schwach anzeigende Banden zu wenig berücksichtigt wurden. Trotzdem ist es ein gutes Resultat, weil eine sehr geringe Streuung von 12,3% vorliegt (**Graphiken 6 und 7**).

Diese Auswertungen stimmen mehrheitlich mit den tatsächlichen Verwandtschaftsverhältnissen überein. Die Schwierigkeit war hier, die Banden richtig auszuzählen. Dies war recht zeitaufwändig und erforderte eine hohe Konzentration. Teilweise war es recht schwierig zu bestimmen, welche Banden ich zählen sollte und welche nicht, da es meistens recht viele und unterschiedlich stark ausgeprägte Banden in einem Profil gab. Dies führe ich darauf zurück, dass bei der PCR mehrere Produkte amplifiziert wurden, was sich durch leicht unspezifisches Binden der Primer an ähnliche, aber nicht identische Matrizensequenzen zurückführen lässt.

Man kann sich fragen, ob die Primeranzahl genügend war, um statistisch klare Aussagen machen zu können. Vor Allem auch in Bezug auf die Verwandtschaft zur Cousine. Um diese Analysen ausführlicher zu gestalten, waren Zeit und Mittel aber zu knapp. Total habe ich immerhin 1833 Banden ausgewertet. Davon stimmten 490 Banden überein. Dies reichte für eine statistisch eindeutige Bestätigung der Verwandtschaft zwischen unter den Geschwistern. Weiter konnte gezeigt werden, dass die Zwillinge tatsächlich eineiig sind.

Nun zu den Resultaten der beiden anderen Vergleichsvarianten. Die Analyse der subjektiven Betrachtung bezieht sich auf die allgemeine Umfrage unter fremden Personen. Hier fehlt jegliche persönliche Beziehung zu den Probanden. Dies garantiert die notwendige Unabhängigkeit bei der Bewertung. Die Anzahl der Bewertungen war mit 107 Teilnehmern um einiges höher und daher grundsätzlich aussagekräftiger als eine Einzelbewertung. Die Wahrnehmung bei den Befragten ist jedoch sehr unterschiedlich, da jeder die Merkmale anders wahrnimmt und sie individuell gewichtet. Daraus erkläre ich mir den grossen Unterschied zur genetischen Analyse. Weiter könnte die Auswahl der Fotos eine wichtige Rolle spielen. Optimieren liesse sich hier der Vergleich vielleicht, wenn bei allen Fotos Stellung der Probanden, Hintergrund und Mimik möglichst konstant gehalten werden würden. Im nächsten Diagramm sind die einzelnen Bewertungen der Vergleichspaare dargestellt.

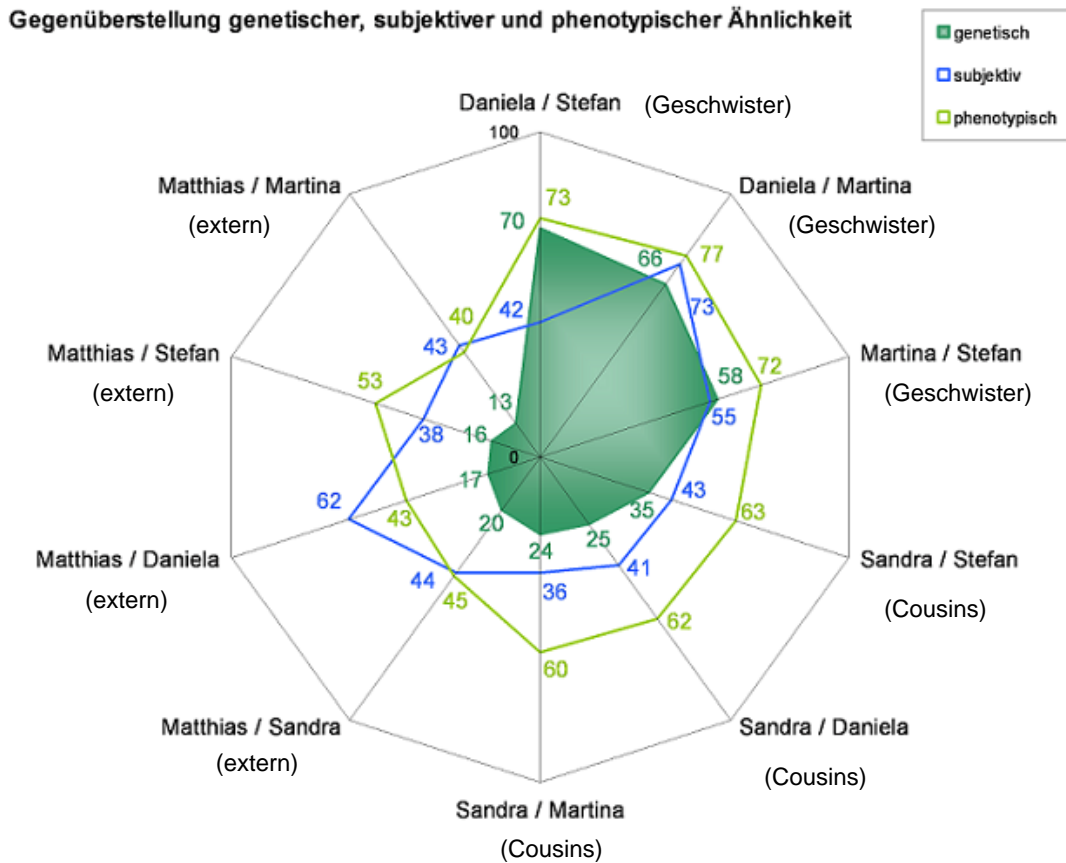


**Graphik 9:** In dieser Graphik ist die subjektive Ähnlichkeit aus der Umfrage ersichtlich. Die Skala zeigt die mit jeweils von 1 bis 5 gewichteten Antworten von total 107 Teilnehmern. Die Schwestern Martina und Daniela wurden am Ähnlichsten bewertet. Matthias und Daniela sind sogar besser bewertet als die Geschwister Martina und Stefan. Der externe Proband Matthias zeigt verhältnismässig gute Übereinstimmungen mit den Geschwistern und meiner Cousine Sandra. Am Schlechtesten abgeschnitten hat das Vergleichspaar Sandra und Martina, obwohl sie Cousinen sind.

Beim dritten Ähnlichkeitsvergleich handelte es sich um die phenotypische Betrachtung. Sie bezog sich auf willkürlich gewählte Merkmale: Augenfarbe, Haarfarbe, Ohrengrösse, Nasenform, Lippenform, Kinn, Lachen, Handgrösse, Fingernägel, Zähne, Augenform und Haarform (gekraust, glatt, etc.). Solche Merkmale scheinen mir besonders geeignet, da sich die Menschen gegenseitig vor Allem über das Gesicht identifizieren. Diese Betrachtung sollte die subjektive Betrachtung ergänzen, da hier präzise Merkmale verglichen wurden.

Im Vergleich zu der genetischen Analyse sind diese Betrachtungen wohl weniger aussagekräftig. Hier spielen wohl unbewusst persönliche Einschätzungen und Vorlieben von mir mit, die das Resultat beeinflussen. Trotzdem entsprechen die Resultate sehr gut der genetischen Untersuchung. Diese Auswertung kann in diesem Fall als Kontrollfunktion verwendet werden.

Untenstehend ist das Diagramm aller Vergleichsanalysen dargestellt.



**Graphik 10:** In dieser Graphik habe ich die subjektiven Ergebnisse (blau) und die phenotypischen Ergebnisse (hellgrün) den genetischen Resultaten (dunkelgrün) gegenübergestellt. Auf einen Blick kann festgestellt werden, dass die Übereinstimmung der subjektiven Betrachtung zu den anderen Ergebnissen nicht vorhanden ist. Das Vergleichspaar Daniela / Stefan wurde in der Umfrage nicht als Geschwister wahrgenommen. Interessanterweise hat Daniela mit Matthias eine subjektiv hohe Bewertung erhalten, obwohl dies genetisch nicht zutrifft. Bei den übrigen Probanden wurde die Ähnlichkeit subjektiv überbewertet. Was aber sehr schön zu erkennen ist, ist die Übereinstimmung der phenotypischen Analyse mit der genetischen Analyse. Daraus lässt sich schliessen, dass das subjektive Empfinden in diesem Zusammenhang keine durchwegs zuverlässigen Daten liefert. Ganz im Gegensatz zu der phenotypischen Betrachtung.

Als weiterführendes spannendes Projekt ist eine Untersuchung mehrerer Geschwister aus verschiedenen Familien denkbar. Zusätzlich wäre es interessant zu schauen, ob mein Phänotypenraster auch bei anderen Familien so erfolgreich ist.

## 5. Reflexion

Die Arbeit hat mir sehr viel Spass bereitet und eine Menge neuer Erkenntnisse vermittelt. Die erwähnten Motivationspunkte in der Vereinbarung blieben bestehen, was heisst, dass ich auch in der Zukunft weiterhin in diesem Bereich tätig sein möchte. Die Ergebnisse über den Verwandtschaftsgrad waren interessant, da ich des Öfteren höre, wir Geschwister würden uns stark gleichen. Diese Aussage trifft nun auch genetisch gesehen zu.

Dass ich mit so tollen Geräten arbeiten durfte war für mich eine Ehre. Es war sehr spannend mit Leuten aus diesem Bereich der Biologie zu sprechen. All diese Gespräche haben mir geholfen, meine Arbeit zu verwirklichen.

In Bezug auf den Arbeitsprozess hat trotz anfänglicher Bedenken mehrheitlich alles gut funktioniert. Mit den erzielten Ergebnissen bin ich sehr zufrieden.

Die Auswertung der Gele war eine Herausforderung, wie auch das genaue Arbeiten beim Pipettieren. Genau dies waren jedoch die Punkte, die ich erreichen und bewältigen wollte. Dem Ergebnis zufolge habe ich die Bestätigung, dass ich präzise und ausdauernd arbeiten kann. Dies ist mir viel wert.

Natürlich musste ich für die Arbeit viel Freizeit opfern. Trotzdem hat es sich gelohnt. Die Maturaarbeitszeit werde ich trotz der Anstrengungen als gute und befriedigende Zeit in Erinnerung behalten.

## **6. Danksagung**

Für die kompetente Unterstützung und die zuverlässige Betreuung meiner Maturaarbeit danke ich Thomas Werner recht herzlich. Er hat auch durch die zur Verfügung gestellten Gerätschaften und Materialien meine Arbeit ermöglicht.

Ich danke zudem Silvia Karer, der Biologie- Laborantin, die mir bei etlichen Tests Ihre wertvolle Hilfe anbot.

Ein weiteres Dankeschön geht an Herrn Dr. Hansmartin Ryser von der Schulleitung, der mir einen namhaften Teil der Materialkosten gesponsert hat.

Nicht zu vergessen sind die Firmen Microsynth, Qiagen und Elchrom Scientific, die mich materiell und finanziell unterstützt haben.

Zum Schluss danke ich Allen, die Interesse an meiner Arbeit gezeigt und mich in verschiedenster Weise unterstützt haben.

## 7. Quellenverzeichnis

Internet:

- [1] Facharbeit von Katrin Thust. 2003.  
<http://www.benecke.com/katrin.html>
  
- [2] Wikipedia. 2009.  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Mikrosatellit>  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Fingerprinting>  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion>  
<http://de.wikipedia.org/wiki/Primer>
  
- [3] Microsynth. 2009.  
<http://www.vaterschafts-test.ch/76.0.html>
  
- [4] Primer- Berechnungen. 2009.  
<http://www.primerfox.com/>  
<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligoalc.html>  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
  
- [5] Primer. 2009.  
[http://www.fbr.org/swksweb/bi\\_promega\\_primers.html](http://www.fbr.org/swksweb/bi_promega_primers.html)  
<http://www.atslab.com/PDFs/AnalyticalMethodsForIgnitableLiquidResidues.pdf>  
[http://miami.uni-muenster.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-2782/01\\_diss\\_krause\\_daniel.pdf](http://miami.uni-muenster.de/servlets/DerivateServlet/Derivate-2782/01_diss_krause_daniel.pdf)  
<http://research.marshfieldclinic.org/genetics/geneticResearch/sets/Set10PrimerSequences.htm>

Buch:

- [6] Biotechnologie für Einsteiger  
2. Auflage 2007  
Prof. Dr. Reinhard Renneberg  
Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier GmbH

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1: (Quelle: <http://www.formed-ffm.de/images/content/contentpics/dna-.jpg>)  
14.10.09

Abb. 2- 21: (Quelle: Bilder aus eigener Produktion)

Graphik 1- 10: (Quelle: Diagramme aus eigener Produktion)