

**Methylierungsmarker zur Identifizierung von
Körperflüssigkeiten und Geweben aus forensischem
Spurenmaterial**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sophia Forat

aus

Bonn

Bonn, Mai 2014

Angefertigt mit Genehmigung der
Mathematisch Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich Wilhelms Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Johannes Oldenburg

2. Gutachter: Prof. Dr. Walter Witke

Tag der mündlichen Prüfung: 13.11.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Die in der Arbeit beschriebene Methode und die entwickelten
Methylierungsmarker sind im Juni 2013 zum Patent angemeldet worden

(Patent-Nr.: 10 2013 009 654.5)

Die Patentanmeldung ist auch der Grund dafür, dass die Arbeit bislang nicht
publiziert wurde.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Das forensische Problem.....	1
1.2 Die Methylierung der DNA.....	5
1.3.1 Grundlagen der DNA-Methylierung beim Menschen.....	5
1.3.2 Die differenzielle Methylierung.....	6
1.3.3 Zellspezifische Methylierung – wie stabil ist das Methylierungsmuster wirklich?.....	7
1.3.3.1 Methylierung und Entwicklung.....	8
1.3.3.2 Altersabhängigkeit des Methylierungsgrades	9
1.3.3.3 Inherente Faktoren, die den Methylierungsgrad beeinflussen	9
1.3.3.4 DNA-Methylierung in Carcinom-Zellen	10
1.4 Körperflüssigkeiten sind oft komplexe Mischungen	11
1.5 Die Strategie der Marker-Suche.....	12
1.6 Die Bisulfitsequenzierung.....	12
1.7 Die SNUPE Analyse.....	13
1.8 NGS-Untersuchung der Methylierungsgenorte	14
1.9 Fragestellung der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	16
2.1.2 Kommerziell erhältliche Kits und Enzyme	16
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	17
2.1.4 Arbeitsgeräte	17
2.1.5 Datenbanken und Online-Tools	17
2.1.6 Software	18
2.1.7 Oligonukleotide	18
2.1.7.1 Primer für Amplifikations-PCR.....	18
2.1.7.2 Primer für SNaPshot-Reaktion	18
2.1.7.3 Primer-Konstrukte für Next Generation Sequenzierung.....	19
2.2 Methoden.....	20
2.2.1 Sammlung von biologischem Probenmaterial	20
2.2.2 DNA-Extraktion	20

2.2.3 DNA-Quantifizierung und -Qualitätsbestimmung.....	21
2.2.4 Bisulfit-Konvertierung der DNA	21
2.2.5 Suche nach Kandidaten-Markern und Primer-Design	22
2.2.5.1 Illumina - Infinium HumanMethylation-27 und -450 BeadChip	22
2.2.5.2 Kandidaten-Auswahl	22
2.2.5.3 Design der Amplifikations-Primer	24
2.2.5.4 Design der SNUPE-Primer.....	25
2.2.6 Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung.....	27
2.2.6.2 Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte	29
2.2.6.3 Sequenzier-Reaktion.....	29
2.2.6.5 Datenauswertung: ESME-Analyse	30
2.2.7 Das SNUPE-Assay.....	30
2.2.7.1 PCR-Amplifikation und enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte.....	31
2.2.7.2 SNaPshot-Reaktion.....	31
2.2.7.3 Enzymatische Aufreinigung der SNaPshot-Produkte	32
2.2.7.4 Detektion der Marker-Signale.....	32
2.2.7.5 Datenauswertung mit Hilfe von GeneMapper Software	32
2.2.8 Next Generation Sequencing.....	33
2.2.8.1 Primerkonstrukte und PCR.....	33
2.2.8.2 Aufreinigung der PCR-Produkte mit Magnetic Beads.....	34
2.2.8.3 Fluorometrische Quantifizierung der PCR-Produkte.....	34
2.2.8.5 Endrepair-Reaktion.....	34
2.2.8.6 Ligation des library-spezifischen Adapters	35
2.2.8.7 Anreicherung von Library-Fragmenten und Homogenisierung.....	35
2.2.8.8 Qualitätskontrolle	35
2.2.8.9 Die Sequenzierung.....	36
2.2.9 Validierung der Methylierungs-Marker	37
2.2.9.1 Forensische Validierung.....	37
3 Ergebnisse	38
3.1 Illumina 1 und 2: Kandidaten-Recherche	38
3.2 Auswahl der Marker.....	38
3.3 Peripheres Blut	39
3.3.1 Methylierungs-Marker Blut-1	39
3.3.1.1 Die Genort-Eigenschaften	39
3.3.1.2 Konstruktion des Amplifikats	40
3.3.1.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung	40
3.3.1.4 Zielregion - SNUPE	41

3.3.1.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	42
3.3.1.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen	42
3.3.1.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte.....	43
3.3.1.8 Erweiterte Validierung	44
3.3.1.9 Forensische Validierung.....	44
3.3.1.10 Next Generation Sequenzierung.....	46
3.3.2 Methylierungs-Marker Blut-2	46
3.3.2.1 Die Genort-Eigenschaften	46
3.3.2.2 Konstruktion des Amplifikats	47
3.3.2.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung	47
3.3.2.4 Zielregion - SNUPE	48
3.3.2.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	49
3.3.2.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen	49
3.3.2.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte.....	50
3.3.2.8 Erweiterte Validierung	51
3.3.2.9 Forensische Validierung.....	51
3.3.2.10 Next Generation Sequenzierung.....	53
3.4 Menstrualblut	53
3.4.1 Methylierungs-Marker Mens-1	53
3.4.1.1 Die Genort-Eigenschaften	53
3.4.1.2 Konstruktion des Amplifikats	54
3.4.1.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung	54
3.4.1.4 Zielregion - SNUPE	55
3.4.1.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	56
3.4.1.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen	56
3.4.1.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte.....	57
3.4.1.8 Erweiterte Validierung	57
3.4.1.9 Forensische Validierung.....	59
3.4.1.10 Next Generation Sequenzierung.....	60
3.5 Speichel	61
3.5.1 Methylierungs-Marker Spei-1	61
3.5.1.1 Die Genort-Eigenschaften	61
3.5.1.2 Konstruktion des Amplifikats	62
3.5.1.3Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung	63
3.5.1.4 Zielregion - SNUPE	63
3.5.1.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	64
3.5.1.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen	65

3.5.1.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte.....	65
3.5.1.8 Erweiterte Validierung	66
3.5.1.9 Forensische Validierung.....	67
3.5.1.10 Next Generation Sequenzierung.....	69
3.5.2 Methylierungs-Marker Spei-2.....	70
3.5.2.1 Die Genort-Eigenschaften	70
3.5.2.2 Konstruktion des Amplifikats	70
3.5.2.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung	70
3.5.2.4 Zielregion - SNUPE	71
3.5.2.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	72
Stabil verlaufen in beiden Flüssigkeiten die Bestimmungen ab 500 pg.....	72
3.5.2.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen	72
3.5.2.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte.....	73
3.5.2.8 Erweiterte Validierung	73
3.5.2.9 Forensische Validierung.....	74
3.5.2.10 Next Generation Sequenzierung.....	75
3.6 Vaginalflüssigkeit	76
3.6.1 Methylierungs-Marker Vag-1/1628.....	76
3.6.1.1 Die Genort-Eigenschaften	76
3.6.1.2 Konstruktion des Amplifikats	77
3.6.1.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung	77
3.6.1.4 Zielregion - SNUPE	78
3.6.1.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	79
3.6.1.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen	79
3.6.1.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte.....	80
3.6.1.8 Erweiterte Validierung	80
3.6.1.9 Forensische Validierung.....	82
3.6.1.10 Next Generation Sequenzierung.....	83
3.6.2 Methylierungs-Marker Vag-2.....	84
3.6.2.1 Die Genort-Eigenschaften	84
3.6.2.2 Konstruktion des Amplifikats	84
3.6.2.3 Zielregion - SNUPE	84
3.6.2.4 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	85
3.6.2.5 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen	86
3.6.2.6 Individuelle Streuung der Methylierungswerte.....	86
3.6.2.7 Erweiterte Validierung	87
3.6.2.8 Forensische Validierung.....	88

3.6.2.9 Next Generation Sequenzierung.....	89
3. 7 Sperma.....	89
3.7.1 Methylierungs-Marker Sperm-1	90
3.7.1.1 Die Genort-Eigenschaften	90
3.7.1.2 Konstruktion des Amplifikats	90
3.7.1.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung	91
3.7.1.4 Zielregion - SNUPE	91
3.7.1.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	92
3.7.1.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen	92
3.7.1.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte.....	93
3.7.1.8 Erweiterte Validierung	93
3.7.1.9 Forensische Validierung.....	95
3.7.1.10 Next Generation Sequenzierung.....	96
3.7.2 Methylierungs-Marker Sperm-2/Men3	97
3.7.2.1 Die Genort-Eigenschaften	97
3.7.2.2 Konstruktion des Amplifikats	98
3.7.2.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung	98
3.7.2.4 Zielregion - SNUPE	99
3.7.2.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	99
3.7.2.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen	100
3.7.2.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte.....	100
3.7.2.8 Erweiterte Validierung	101
3.7.2.9 Forensische Validierung.....	102
3.7.2.10 Next Generation Sequenzierung.....	103
3. 8 Haut	104
3.8.1 Methylierungs-Marker Haut-1.....	104
3.8.1.1 Die Genort-Eigenschaften	104
3.8.1.2 Konstruktion des Amplifikats	105
3.8.1.3 Zielregion - SNUPE	105
3.8.1.4 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse.....	106
3.8.1.5 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen	107
3.8.1.6 Individuelle Streuung der Methylierungswerte.....	107
3.8.1.7 Erweiterte Validierung	108
3.8.1.9 Next Generation Sequenzierung.....	109
3.9 Einfluss von Tumoren auf die verwendeten Methylierungs-Loci	110
3.10 Genetischer Einfluss auf die Methylierung.....	112
4 Diskussion	120

4.1 Vergleich mit ähnlichen Methoden	120
4.1.1 Differentielle Methylierung zur Unterscheidung von Körperflüssigkeiten	121
4.1.2 RNA-Marker zur Unterscheidung von Körperflüssigkeiten.....	125
4.2 Verwendete Methoden und Neuentwicklungen	128
4.3 Bewertung der Validierungsexperimente	128
4.3.1 Test auf Trennkraft.....	129
4.3.2 Nachweis der spezifischen Flüssigkeit aus Mischungen	130
4.3.3 Test auf Stabilität unter forensischen Bedingungen.....	130
4.3.4 Validierung mit 80-100 Proben pro Körperflüssigkeit.....	131
4.4 Einfluss von Tumoren auf die Aussagesicherheit des Systems.....	133
4.5 Einfluss von Sequenzvarianten und nicht konvertierten Cytosinen auf die Aussagesicherheit des Systems.....	135
4.6 Artefakte bei NGS nach Bisulfitierung.....	138
4.7 Methodenvergleich (SNUPE-Analyse, Bisulfitsequenzierung, NGS Roche 454, Illumina MiSeq)	138
4.8 Perspektiven und Ausblick.....	139
5 Zusammenfassung.....	141
6 Quellenverzeichnis.....	143
Danksagung	151
Eidesstattliche Versicherung	152

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ASM	Allel-spezifische Methylierung
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CGI	CpG-Insel
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CpG	Cytosin – Phosphat - Guanin
DACT1	Dapper Antagonist of Catenin 1 (Gen)
ddATP	2'3'-Didesoxyadenosine-5'-Triphosphate
ddCTP	2'3'-Didesoxycytidine-5'-Triphosphate
ddGTP	2'3'-Didesoxyguanosine-5'-Triphosphate
ddTTP	2'3'-Didesoxythymidine-5'-triphosphate
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EDX	Energy Dispersive X-ray
ES	Embryonale Stammzellen
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
G	Guanin
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (Gen)
GSTP1	Glutathion-S-Transferase P1
HhaI	Haemophilus haemolyticus (GCG [^] C)
HIS	Histatin (Gen)
5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
HNPCC	Hereditäres non-polypöses kolorektales Karzinom
HOXA4	Homeobox A4 (Gen)
HTN3	Histatin-3 (Gen)
IGF2	Insulin-like Growth Factor 2
LKA	Landeskriminalamt
mC	Millicoulomb
5-mC	5-Methylcytosin

miRNA	Micro-RNA
µL	Mikroliter
mM	millimolar
MMP	Matrix-Metalloprotease (Gen)
MPS	myeloproliferatives Syndrom
mQTL	metabolomic Quantitative Trait Locus
mRNA	Messenger RNA
NAR	Nucleic Acids Research
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NGS	Next Generation Sequencing
ng	Nanogramm
PBGD	Porphobilinogen Deaminase (Gen)
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFN3	Profilin 3
pg	Picogramm
PRM	Protamine
PSA	Prostate Specific Antigen
qPCR	quantitative Polymerase Chain Reaction
QTL	Quantitative Trait Locus
RNA	Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RSID	Rapid Stain Identification
s	Sekunde
SALIgAE	SALIgAE® saliva test
SAP	Seminal Acid Phosphatase
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNuPE	Single Nucleotide Primer Extension
SPTB	Spectrin, Beta, Erythrocytic (Gen)
STATH	Statherin (Gen)
STR	Short Tandem Repeat
T	Thymin
tDMR	Tissue-Specific Differentially Methylated Regions
U	Uridin
Upm	Umdrehungen pro Minute
USP49	Ubiquitin Specific Peptidase 49 (Gen)
UV	Ultraviolett
XRF	X-ray Fluorescence

1 Einleitung

1.1 Das forensische Problem

Zwei Fragen richtet der polizeiliche Ermittler oder die Staatsanwaltschaft an den Bearbeiter von biologischen Spuren an einem Tatort: Welch einen genetischen Fingerabdruck ergeben die Spuren und um welches biologische Material handelt es sich? Der genetische Fingerabdruck ist mittlerweile eines der wirkungsvollsten Werkzeuge zur Täteridentifizierung. Er wird aus der DNA, die aus dem Spurenmaterial isoliert wird, gefertigt. DNA ist überraschenderweise eine der robustesten biologischen Substanzen. Auch nach mehreren Jahren Einwirkung von Licht, Wärme und Feuchtigkeit ist sie oft verhältnismäßig intakt und erlaubt noch das Herstellen eines genetischen Fingerabdrucks. Die Frage nach der Art des biologischen Materials vor allem bei Gewaltverbrechen stellt sich fast immer bei dem Versuch den Tathergang zu rekonstruieren. Dabei geht es meistens um die sichere Identifikation von peripherem Blut, Menstrualblut, Vaginalflüssigkeit, Sperma, Speichel oder Haut. Häufig muss die Gegenwart einer oder mehrerer dieser Komponenten aus einer Mischung bewerkstelligt werden. Wenn solche Spuren über längere Zeit den äußeren physikalischen oder mikrobiologischen Einflüssen ausgesetzt waren, ist das analytische Problem mit den bisher zur Verfügung stehenden biochemischen Werkzeugen nicht lösbar. Das Analysensubstrat bei solchen Fragestellungen sind Proteine oder in der letzten Zeit RNA. Diese Substanzklassen sind wegen ihrer außerordentlichen Empfindlichkeit denkbar schlecht geeignet zur Lösung forensischer Probleme.

Während die Bedeutung des genetischen Fingerabdrucks immer eindeutig und fast immer die gleiche ist, kann der erwünschten Identifikation von Körperflüssigkeiten eine Vielzahl von konkreten Fragestellungen zugrunde liegen.

Im September 2009 war eine junge Türkin mit 56 Messerstichen ermordet in ihrer Wohnung aufgefunden worden. Ihr getrennt lebender Ehemann kam schnell in Verdacht. Er gab zu in der Tatnacht Verkehr mit dem Opfer gehabt zu haben, er bestritt aber den Mord. Die Gutachten zum Todeszeitpunkt hätten dem Verdächtigen ein Alibi gegeben. Auch Zeugenaussagen blieben widersprüchlich. Am Tatort waren zahlreiche biologische Spuren gesichert worden. Der genetische Fingerabdruck des Verdächtigen war an mehreren Stellen nachzuweisen, aus dem Vaginalraum der Getöteten konnte man zwar keine Spermien isolieren, wohl aber Spuren von Samenflüssigkeit. Mit Y-chromosomalen Markern genotypisierte das LKA Hessen diese Spuren – sie waren eindeutig dem Verdächtigen zuzuordnen. Letzterer war sterilisiert. - Alles Hinweise und Indizien, aber keine Beweise vor dem Hintergrund der Aussagen des Verdächtigen und einiger Zeugen. Infolgedessen wird der Verdächtige kurze Zeit nach seiner Festnahme wieder frei gelassen. Vier Wochen später entdecken die Ermittler des LKA an der Armbanduhr des Verdächtigen sehr feine, dem Opfer

zuzuordnende Blutspritzer, die eigentlich charakteristisch für den angenommenen Tatverlauf sind.

- Der Verdächtige wird erneut in Haft genommen. Inzwischen ist die Beweislage noch unübersichtlicher geworden, weil ein neues Gutachten zur Tatzeit das Alibi des Verdächtigen entwertet. Es wird offenbar, dass der Fahrtschreiber des von ihm gefahrenen Transporters manipuliert worden ist. In dieser neuen Lage äußert sich der Angeklagte zum ersten Mal zu dem Tatabend, er hat keine durchgehend plausiblen Erklärungen, aber er behauptet jetzt, das Opfer habe menstruiert und dementsprechend sei die Blutspur an der Uhr Menstrualblut. Das war zunächst einmal nicht zu widerlegen und blockierte jede weitere Entscheidung des Gerichtes. Mit der in dieser Dissertation entwickelten Methode konnte unter Verwendung zahlreicher biologischer Spuren vom Opfer und vom Verdächtigen der Nachweis erbracht werden, dass es sich nicht um Menstrualblut handelte. Der Angeklagte wurde zu lebenslanger Haft verurteilt. Der Bundesgerichtshof bestätigte das Urteil (Schneider, Forat & Olek, 2012).

Selbst der Nachweis von peripherem Blut ist manchmal sehr schwer zu führen, wenn das Material verschmutzt ist, lange Zeit im Freien gelegen hat und es sich um sehr geringe Materialmengen handelt. In den folgenden Abschnitten wird die oft notwendige, in der Art einer Stufendiagnostik durchgeführte Prozedur erläutert. Alle bisher verfügbaren Methoden kranken an der einen oder anderen, die Ermittlungen gefährdenden Stelle. Die meisten Methoden wirken mehr oder weniger degradierend auf die Spur ein und insbesondere die DNA, die man ja für den genetischen Fingerabdruck nutzen will (Virkler & Lednev 2009). Gerade bei Spuren mit wenig Material muss man sich entscheiden, auf welche Körperflüssigkeit hin man denn untersuchen will. Die Bluttests unterscheiden in aller Regel nicht zwischen tierischem und menschlichem Blut (McLaughlin et al. 2014). Meist setzt man zunächst einen nicht besonders spezifischen aber empfindlichen Test ein und dann einen möglichst spezifischen. Eine der gängigsten konventionellen Methoden für den Nachweis von Blut ist ein Test mit der Chemolumineszenz Luminol (Tobe et al. 2007). Der am meisten gravierende Nachteil ist die Beeinträchtigung oder gar der Verlust des Materials für die DNA-Analyse.

Fast ebenso häufig geht es an Tatorten darum Sperma eindeutig zu identifizieren. Auch dabei steht neben Empfindlichkeit und Spezifität die Schonung des Materials für die DNA-Analyse im Vordergrund. Auch hier unterscheidet man zwischen Vortests und spezifischen Bestätigungstests. Eine Reihe von UV-Lampen wird zur vorläufigen Spermienidentifizierung genutzt. Es gibt viele falschpositive Ergebnisse, die DNA ist natürlich gefährdet (Santucci et al. 1999). Am meisten verbreitet sind die Verfahren, deren Prinzip der Nachweis der sauren Phosphatase aus der Samenflüssigkeit (SAP). Alle zeigen Falschpositive unter anderem wegen ihrer Kreuzreaktion mit pflanzlichem Material, aber vor allem aber mit dem gleichen Enzym aus der Vaginalflüssigkeit. Manche Laboratorien trennen deswegen diese beiden Proteine mit isoelektrischer Fokussierung

(Virkler & Lednev 2009). Der hauptsächliche Nachteil liegt natürlich in der Empfindlichkeit des Enzymproteins gegenüber den üblichen exogenen Einflüssen wie Licht, Wärme und Feuchtigkeit (James, 2003). Mit einigen anderen Enzymen sind ebenfalls solche Nachweisverfahren für Spermien entwickelt worden. Zahlreiche prinzipiell andere Verfahren sind in der Literatur beschrieben und werden auch benutzt. Beispielsweise weist man Cholin oder Spermin nach. Sie sind zum Teil technisch sehr aufwändig.

Manche Laboratorien setzen für den Nachweis von Spermien EDX-Röntgengeräte ein. Auch andere Bestätigungstests stehen zur Verfügung. Beispielsweise wird mikroskopisch nach den Spermien gesucht. Vorher werden die Spermienköpfe angefärbt mit dem Christmass tree Farbstoff. Ein großer Nachteil des Verfahrens ist, dass man Spurenleger mit Azoospermie nicht identifizieren kann. Am meisten verbreitet ist der PSA-Nachweis (Allery et al. 2003). Das Verfahren hat den Vorteil, dass PSA auch in der Samenflüssigkeit gefunden wird. Allerdings produziert männlicher Urin Falschpositive. Es gibt viele kommerziell erhältliche Kits, fast alle stellen immunologische Verfahren dar. In dieser Vielzahl von Nachweisverfahren ist nur eines beschrieben, welches keine Falschpositive produziert, es handelt sich dabei um einen ELISA-Test auf SAP. Das System soll Sperma noch in einer Verdünnung von 1:100000 nachweisen (Allan, 1995). Auch für Sperma arbeiten zahlreiche Arbeitsgruppen an einem RNA-Verfahren. Die Basis dazu lieferten die Ergebnisse von Juusola und Ballantyne, welche die in Samenflüssigkeit exprimierten Gene PRM1 und PRM2 per RT-PCR als Substrat benutzten (Haas et al. 2008). Gleichzeitig wurden viele immunologischen Tests beschrieben. Manche ermöglichten auch den Nachweis von Samenflüssigkeit ohne Anwesenheit von Spermien (Sato et al. 2007). Der Lösung dieses Problems ist auch eine Studie gewidmet, die ein methylierungssensitives Restriktionsenzym einsetzt (Wasserstrom et al. 2013).

Ein besonderes Problem stellt auch der Speichelnachweis aus forensischen Spuren dar. Es existiert eine Reihe von Vortests, aber es gibt keinen richtigen Bestätigungstest. Für eine erste Betrachtung der Spuren setzt man auch für dieses Problem verschiedene Lichtquellen ein, vorzugsweise UV-Licht. Der Test ist nicht spezifisch für Speichel. Der am meisten gebrauchte Test ist der Nachweis von Amylase 1. Die Tests können jedoch nicht zwischen Amylase 1 und Amylase 2 unterscheiden. Letztere stört bei dem Verfahren (Greenfield, 2003). Außerdem ist die Amylase neben dem Speichel auch in Blutserum, Urin, Pankreas sowie einigen Pflanzen und Bakterien vorhanden (Madi et al. 2012). Ebenso beim Problem Speichel wird die mRNA-Technik versucht. Juusola und Ballantyne (2007) setzen die mRNA der Speichel-spezifischen Gene STATH und HTN3. Die Empfindlichkeit des Verfahrens wird mit 9 ng angegeben. Als interner Standard dient das Housekeeping-Gen GAPDH.

Das häufigste analytische Problem bei der Aufklärung von Sexualstraftaten stellt der Nachweis von Vaginalflüssigkeit und Menstrualblut dar. Für die Identifikation von Menstrualblut wurden vor kurzem zwei Tests beschrieben, die auf der Fibrin-Komponente des Menstrualblutes basieren (Akutsu et al. 2012, Barker et al. 2011). Keines der beiden Tests ist für die forensische Anwendung validiert worden. Für den Nachweis von Vaginalflüssigkeit gibt es einige neue Ansätze, die die bakterielle Mikroflora aus dem Vaginalraum für die Identifikation verwenden. Zuletzt stellten sich Benschop et al (2012) die Frage, ob man den vaginalen Ursprung einer Spur anhand der Bakterien aus der Vaginalflora nachweisen könne. Mit Hilfe der neusten NGS- und Mikroarray-Technik wurden hunderte von verschiedenen Bakterienarten identifiziert, die in individuell unterschiedlichen Mengen und Variationen bei den Probandinnen zu finden waren.

In den letzten Jahren wurden mehrere Lösungsansätze beschrieben, die mit Hilfe von Multiplex-Assays spezifische mRNA-Spezies in Körperflüssigkeiten nachweisen (Jusola & Ballantyne 2005, Setzer et al. 2008, Flemming et al. 2010). Von dem neusten Ansatz zum Nachweis von diversen Körperflüssigkeiten mit Hilfe von mRNA berichten Roeder und Haas (2013). Sie testen ein Set aus jeweils 5 bis 7 bereits beschriebenen mRNA-Markern für Speichel, peripheres Blut, Menstrualblut Vaginalflüssigkeit, Haut, Schweiß und Sperma.

Hanson et al (2009) erarbeiten ein Panel aus 14 differentiell exprimierten Mikro-RNAs, die ähnlich wie mRNA-Marker die Körperflüssigkeiten voneinander unterscheiden, jedoch auch für stark belastete Spuren geeignet sein sollen - auf Grund ihrer Kürze (18-22 Basen).

In dieser Situation entstand 2009 in unserer Arbeitsgruppe die Idee, die differenzielle Methylierung als Werkzeug der Körperflüssigkeitsanalyse einzusetzen. Zu diesem Zeitpunkt war erwiesen, dass sich Zellen durch ihr Methylierungsmuster voneinander unterscheiden lassen und als Analysensubstrat konnte man die enorm stabile DNA einsetzen.

Den Beginn dieser Arbeit stellte die Suche nach geeigneten Genorten mit differenzieller Methylierung dar. Zu diesem Zweck wurden letztlich zwei genomweite Methylierungsstudien vorgenommen. Dabei wurden die im forensischen Kontext relevanten Körperflüssigkeiten bzw. Gewebe studiert und entsprechende Markersysteme aufgebaut.

In den folgenden Jahren erkannten auch zwei andere Gruppen den Nutzen der differenziellen Methylierung für die Körperflüssigkeitsanalyse. Dabei wurde allerdings eine ganz andere Nachweisstrategie verfolgt.

Als erste beschreiben Frumkin et al (2009) ein aus 15 differenziell methylierten Genloci bestehendes System, das nach Verdau mit einem methylierungssensitiven Restriktionsenzym zur Unterscheidung von Körperflüssigkeiten eingesetzt wird. Eine andere Gruppe, untersucht einen Teil dieser Genorte, nämlich die Gene DACT1, USP49, HOXA4, PFN3 und PRMT2 (Lee et al.

2012). Die zur Analyse eingesetzten Proben werden bisulfitiert, kloniert und sequenziert. Es wird angegeben, dass alle untersuchten Körperflüssigkeiten aufgrund der Zahl der methylierten bzw. nicht methylierten Klone voneinander unterscheidbar seien. In einer späteren Arbeit beschreibt diese Gruppe die Entwicklung eines Multiplex-Ansatzes für die parallele Untersuchung von DACT1, USP49, PRMT2 und PFN3. Damit kann Sperma von anderen Flüssigkeiten unterschieden werden (An et al. 2013). In ihrer letzten Arbeit ergänzen die Autoren ihre Methode um den Nachweis von Vaginalflüssigkeit und Speichel mit Hilfe von spezifischer, bakterieller DNA in den beiden Flüssigkeiten (Choi et al. 2014).

Das Phänomen der differenziellen Methylierung ist sicher in idealer Weise für die Identifizierung und den Nachweis von Körperflüssigkeiten geeignet, weil das Analysensubstrat die vergleichsweise stabile DNA ist. Da die Methylierung der DNA aber offensichtlich vielerlei Funktion hat, muss gleichzeitig die Frage gestellt werden, wie stabil eine gegebene Methylgruppe an einem gegebenen Ort in der DNA eines Organismus ist, welche physiologischen oder pathologischen Einflüsse also können die Methylierung an solch einem Genort beeinflussen. Diese Frage muss vor allem in dem hier diskutierten Zusammenhang möglichst umfassend experimentell beantwortet werden. – In der Realität einer Anwendung der in der vorliegenden Arbeit entwickelten Marker geht es fast immer um die gerichtliche Entscheidung für Schuld oder Unschuld eines Menschen.

1.2 Die Methylierung der DNA

Im menschlichen Genom ist fast ausschließlich das Cytosin in CpG-Dinukleotiden das Ziel einer Methylierung am 5-Kohlenstoffatom, dabei entsteht 5-Methylcytosin (CmpG). Der Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) an das 5'-C-Atom des Cytidin-Ringes wird von DNA-Methyltransferasen katalysiert.

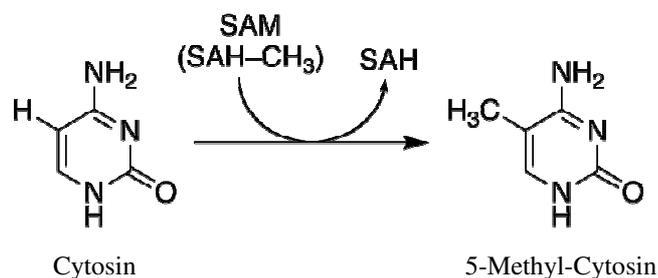


Abbildung 1 Darstellung der Methylierung des Cytosins

1.3.1 Grundlagen der DNA-Methylierung beim Menschen

Die Methylierung ist bei Vertebraten praktisch über das ganze Genom verteilt. Aber insgesamt wird nur ein geringer Teil der Cytosinreste methyliert, beim Menschen ca. 3% und zwar vor allem in der CpG-Form. In den Zellen des erwachsenen Organismus findet sich nur ein geringer Teil der Methylcytosine im CpH-Kontext (H steht für ein beliebiges Nukleotid). 5-Methylcytosin ist in den

Zeiträumen der Evolution gesehen, chemisch nicht stabil. So verringert sich im Laufe der Evolution die Zahl der CpG-Gruppen, weil diese ständig in TpG umgewandelt werden. Bei einigen Spezies etwa bei der Hefe *S. cerevisiae* und dem Fadenwurm *C. elegans* wird die DNA offenbar überhaupt nicht methyliert. Die Bakterien beschränken die Methylierung auf einen Teil der Adenin- und Cytosinreste. Hier fungiert die Methylierung als Abwehrmechanismus der Wirtszelle. – Die zelleigenen Restriktionsenzyme erkennen und schneiden eindringende, unmethylierte Phagen-DNA an ihren Erkennungssequenzen. Diese sind in der Wirtszelle methyliert und damit geschützt.

Im Vertebratengenom ist die Häufigkeit der CpG-Dinukleotide niedriger als statistisch anzunehmen. Im menschlichen Genom hat man jedoch etwa 30000 so genannte CpG-Inseln nachgewiesen (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001). Dabei handelt es sich um bis zu einige hundert Basen lange, relativ weniger methylierte Sequenzen, welche die normale, zu erwartende CpG-Häufigkeit haben (>50% GC). Häufig markieren diese Bereiche das 5'-Ende eines Gens. Hier befindet sich die Promotorregion des Gens, von wo aus dessen Aktivität in der Zelle gesteuert wird.

Aber auch in den Introns vieler Gene finden sich CpG-Strukturen. Ein beträchtlicher Anteil an CpGs findet sich in repetitiven Strukturen oder in deren unmittelbarer Nachbarschaft.

Schon bald nach der Entdeckung der Methylierung wurde ein Mechanismus postuliert, der die Vererbung von Methylierungsmustern ermöglichen würde: Eine DNA-Methyltransferase erkennt auf einem Strang eine Methylgruppe und methyliert den gerade replizierten Strang. Ein solcher Mechanismus erklärt auch die spezifischen Muster verschiedener Zelltypen (Riggs, 1975).

Die Methylierung des Cytosin in CpG-Einheiten ist nicht nur ein Werkzeug der Genexpressionssteuerung, sondern inaktiviert auch mobile genetische Elemente, die in das Genom eines Organismus eingepflanzt werden. Möglicherweise verhindern sie auch Rekombination zwischen repetitiven Sequenzen – ohne solch eine Funktion würde es wahrscheinlich sehr viel mehr Chromosomenanomalien geben. Die bedeutsamste Aufgabe sieht man aber dennoch in der Expressionssteuerung der Gene. Manche Autoren spekulieren auch, dass die Methylierung selbst nicht unbedingt die Genexpression blockiert, sondern dass vielmehr andere Mechanismen dies bewirken, dass aber die Methylierung diesen ursprünglichen Vorgang in gewisser Weise versiegelt (Beck, 2003).

1.3.2 Die differenzielle Methylierung

Wenn klar ist, dass die Methylierung Teil der Expressionssteuerung ist, ist auch wahrscheinlich, dass die Methylierung Gewebe- bzw. Zellspezifisch ist. Auf jeden Fall aber sollte ein spezifischer Zelltyp ein charakteristisches Methylierungsmuster aufweisen. Diese Annahme ist auf sehr präzise

Art und Weise bestätigt worden, indem man einen aus mehreren Loci bestehenden Methylierungsfingerabdruck zur Charakterisierung von Zelltypen einsetzte (Baron et al. 2006). Die höchsten Ansprüche an Reinheit der einzelnen Zellpopulationen stellt man in Behandlungskonzepten, bei denen man dem Organismus bestimmte Zellen zuführt. Es muss sicher sein, dass es sich wirklich und ausschließlich um die gewollten Zellen handelt. Das trifft zu für das so genannte Tissue engineering z.B. den Knorpelersatz. Die in-vitro gewachsenen Chondrozyten müssen auf Reinheit und Charakter geprüft werden, ebenso für die Stammzelltherapie bei Lymphompatienten nach Chemotherapie oder für Behandlung von Patienten mit Autoimmunkrankheiten.

Diesen Erfordernissen wird man nicht gerecht durch die an sich nahe liegende mRNA-Analyse. Zwei selbst unter identischen Bedingungen gezüchtete Zellen können sich in ganz unterschiedlichen Stoffwechselsituationen befinden, so dass ihre Expressionsmuster sich stark unterscheiden. Die für die Charakterisierung ausgewählten Genprodukte werden im Grenzfall in nicht mehr nachweisbaren Mengen gebildet. Dass die zellspezifische Methylierung ein robustes, langlebiges Merkmal einer Zelllinie ist, war schon früher gezeigt worden (Bird, 2002). Baron et al beschreiben in der oben zitierten Arbeit einen aus 4 unterschiedlichen Methylierungs-Loci bestehenden Barcode oder Fingerabdruck, mit dessen Hilfe eindeutig Keratinozyten, Melanozyten, Adipozyten, Chondrozyten, Fibroblasten und mesenzymale Stammzellen aus Kultur charakterisiert werden können.

Die Methylierungsorte, die einer Zell-oder Gewebespezifischen Methylierung unterworfen sind – im Englischen tissue specific differentially methylated regions (tDMR) - sind so unterschiedlich verteilt wie die CpG-Regionen. Sie finden sich in den Promotor-nahen CpG-Inseln, in Introns und in oder nahe bei Repeats, aber es finden sich auch im intergenischen Bereich mit niedriger CpG-Dichte solche Regionen. Viele dieser tDMR-Bereiche sind zwischen Maus und Mensch konserviert (Song et al. 2009).

1.3.3 Zellspezifische Methylierung – wie stabil ist das Methylierungsmuster wirklich?

Nun stellt sich aber für die hier diskutierte Anwendung die Frage, bleibt das Methylierungsmuster lebenslang erhalten oder ändert es sich im Laufe der Entwicklung und dann später beim Erwachsenen im Laufe des Lebens? Da viel darüber spekuliert wird, dass neben dem Genotyp auch die Methylierung zum Phänotyp beiträgt, muss man sich auch Gedanken machen über das Ausmaß der interindividuellen Variabilität der Methylierung. Selbst die Ernährung könnte einen Einfluss auf das Methylierungsmuster haben. Gesichert dagegen ist der massive Einfluss von Tumoren auf die Methylierung. Man kann davon ausgehen, dass die CpG-Inseln normalerweise stabil sind und

als solche erhalten bleiben, aber es könnten z.B. in einer CpG-Insel einzelne CpGs ihren Methylierungsgrad ändern. Das würde höchstwahrscheinlich keine phänotypischen Änderungen nach sich ziehen, könnte aber eventuell das analytische CpG betreffen und dann die hier als Nachweis dienende SNUPE-Analyse beeinträchtigen. Das würde auch für die meisten anderen Nachweismethoden zutreffen, abgesehen von der NGS. Vor diesem Hintergrund erschien auch unsere Suchstrategie absolut unumgänglich, nämlich dass auf dem Wege der kompletten Genomuntersuchungen eine große Zahl von differenziell methylierten Genorten verfügbar gemacht wurde. Nur so kann man die besten und sichersten Unterscheider identifizieren.

1.3.3.1 Methylierung und Entwicklung

Entwicklung und Differenzierung eines höheren Organismus wird also stark beeinflusst und gesteuert von der Methylierung. Trotzdem verändert sich das Methylierungsmuster eines Genoms als Ganzes im Laufe der Entwicklung mehrfach dramatisch. Die DNA in den primordialen Keimzellen des Embryos ist anfangs stark methyliert. Im Laufe der Entwicklung kommt es zu einer fortschreitenden Demethylierung. Beim Übergang der Urkeimzellen in die Keimdrüsen sind diese praktisch vollständig demethyliert. Während der Entwicklung der Gonaden und der Entstehung der ersten Keimzellen beobachtet man wieder eine Methylierung des Genoms. So ist die DNA der reifen Spermien und Eizellen sehr stark methyliert. Das Genom der Spermien ist stärker methyliert als das der Eizelle. In frühem Stadium ist die befruchtete Eizelle deswegen auch hoch methyliert. Bei vielen Genen unterscheiden sich dabei die Methylierungsmuster von väterlichen und mütterlichen Allelen. Noch vor der Einnistung des Embryos kommt es zu einer allgemeinen Demethylierung des Genoms. Während des Prä-Gastrulastadiums setzt dann wieder eine Methylierung ein. Der Grad der Methylierung unterscheidet sich aber jetzt sehr stark zwischen den einzelnen Zelllinien.

Für die Suche nach zellspezifischen Methylierungsmarkern in dieser Arbeit war der Umstand wichtig, dass keineswegs immer der Methylierungsgrad in der 5'-Region eines Gens mit dessen Expression in einer bestimmten Zelle korreliert. Es können durchaus CpG-Bereiche differenziell methyliert sein, die nicht unmittelbar mit der Expression eines Gens zu tun haben (Walsh & Bestor 1999). Trotzdem gilt: Die DNA in Chromatinbereichen mit aktiver Transkription unterscheidet sich von der DNA in inaktiven Bereichen durch eine Reihe von Merkmalen z.B. den Grad der Komprimierung und eben auch der Methylierung. Die Methylierung von CpG-Inseln stromabwärts von Promotoren behindert die Transkription nicht (Jones, 1999). Sicher ist dagegen, dass die Methylierung von Promotor-Regionen die Transkription abschaltet.

1.3.3.2 Altersabhängigkeit des Methylierungsgrades

Essentiell für das Leben höherer Organismen ist die phänotypische Stabilität der verschiedenen Zelltypen. In gewissem Maße ändern aber diese spezialisierten Zellen im Laufe des Alters durchaus ihren Phänotyp. Sich ändernder Methylierungsgrad könnte die Expression von Genen vermindern oder verstärken – mit fatalen pathogenen Folgen, aber auch als normaler, natürlicher Altersvorgang. Beispielsweise beschrieben Issa et al (1996) eine altersabhängige Änderung des Methylierungsgrades bei IGF2. Von Bedeutung für die hier vorgelegte Arbeit ist der Unterschied zwischen globaler Methylierung und der Methylierung in den CpG-Inseln der Promotoren: Erstere sinkt wahrscheinlich mit zunehmendem Alter, während die Promotor-Methylierung bei einigen Genen sinkt, bei anderen aber zunimmt (Issa, 1999). Mit zunehmendem Alter des Gewebes steigt der Methylierungsanteil innerhalb von CpG-Inseln, während die Methylierung der Loci, die außerhalb der CpG-Inseln sich befinden, sinkt (Christensen et al. 2009). Die DNA-Methylierung variiert stärker zwischen unterschiedlichen Geweben innerhalb eines Organismus als intraindividuell, selbst im Vergleich zum Schimpansen-Genom (Pai et al. 2011).

Die ersten umfassenden Daten über eine altersabhängige Methylierung in allen relevanten Bereichen des Genoms sind bei Fraga et al (2006) zu finden. An 80 eineiigen Zwillingspaaren zwischen 3 und 50 Jahren wurde eine genomweite Methylierungs-Studie durchgeführt. Dabei wurde der Gesamt-5mC-Gehalt bestimmt, es wurden darüber hinaus mit Methylierungs-sensiblen Restriktionsenzymen differenziell methylierte Regionen isoliert. Die Fragmente, die jeweils zwischen zwei Zwillingen unterschiedlich waren – bei einem existierte das Fragment, bei dem anderen nicht – wurden kloniert und sequenziert. So konnte der Typus der differenziell methylierten Genorte bestimmt werden. Es handelte sich in der Mehrzahl um Alu-Fragmente, um andere repetitive Strukturen und in 13% um Single-Copy-Gene. Bei letzteren wurde eine Expressionsanalyse angeschlossen. Das signifikante Ergebnis war: Je älter die Zwillingspaare waren, desto unterschiedlicher war das Methylierungsmuster. Das Methylierungsmuster korrelierte auch mit den Expressionsdaten.

1.3.3.3 Inherente Faktoren, die den Methylierungsgrad beeinflussen

Neben diesen oben erläuterten Einflussgrößen wie Alter des untersuchten Individuums und der Herkunft einer Zelle – Keimzelle oder somatisch – kennt man inzwischen auch solche, die individualspezifisch sind. So geht man davon aus, dass die genetische Umgebung, also die DNA-Sequenz selbst den Methylierungsgrad eines differenziell methylierten CpGs beeinflussen kann. Bekannt geworden sind dabei SNPs, deren Allele – auch einen z. T. weit entfernten Methylierungsort - bezüglich des Methylierungsgrades beeinflussen können. – Prinzipiell also genetische Faktoren, die die Methylierung an bestimmten Genorten steuern. Man erkennt zwei Gruppen von solchen Zusammenhängen: Zum Einen dauerhafte und nicht individualspezifische

und zum Anderen individualspezifische. Zur ersteren Gruppe gehört genetisches Imprinting und die Inaktivierung des X-Chromosoms. Beides ist wahrscheinlich in engen Grenzen für die einzelnen Spezies fest programmiert – sowohl den Zeitpunkt als auch den Ort betreffend. Das Instrument der Inaktivierung ist die Methylierung. In der zweiten Gruppe wirkt genetische Variabilität auf bestimmte Methylierungsorte ein. Auch hier kann man wieder zwei unterschiedliche Phänomene erkennen: Wie aus der Genetik selbst bekannt, können mehrere im Prinzip variable Genorte – SNPs oder andere variable genetische Strukturen – den Methylierungsgrad eines CpG oder einer CpG-Insel (CGI) beeinflussen. Da es sich dabei um beliebige Kombinationen der Allele der an der Einflussnahme beteiligten Genorte handelt, kann man den Methylierungsgrad des betrachteten CpG in der Art eines QTL betrachten. Das bedeutet, der Methylierungsgrad kann gewissermaßen stufenlos alle Werte bei unterschiedlichen Individuen annehmen (mQTL). Dieses Phänomen ist nachgewiesen worden bei Zhang et al (2010). Auf der anderen Seite beobachtet man genetische Variablen, deren eines Allel den Methylierungsgrad eines CpG auf 0%, während das andere Allel 100% Methylierung bewirkt. Wirklich nachgewiesen hat man bisher nur einige wenige dieser SNP/CpG-Paarungen (Kerkel et al. 2008). Eine Genom-weite Analyse spricht allerdings dafür, dass ein wesentlicher Teil der Methylierung der CpGs bzw. der CGI der Steuerung einzelner genetischer Variablen unterliegt (Shoemaker et al. 2010). Dieser Mechanismus wird Allel-spezifische Methylierung genannt (ASM). Im Ergebnis äußern sich beide mQTL und ASM ganz ähnlich: Sie führen zu dem Befund, dass der Methylierungsgrad eines CpG zwischen 0 und 100% liegt. Bei ASM sollten die Methylierungswerte bei reinen Zelllinien um 0%, 50% oder 100% bewegen (Heterozygotie/Homozygotie), bei mQTL kann man alle Werte zwischen 0 und 100 erwarten. Ein erheblicher Teil dieser ASM-Situationen kommt zustande durch SNPs in den CpGs selbst, und zwar vor allem in den methylierten CpGs durch deren hohe Mutationsfrequenz.

Die in dieser Arbeit untersuchten Körperflüssigkeiten bestehen aus mehreren verschiedenen Zelltypen. Auch deswegen wird man bei den Methylierungsmessungen keine mendelschen Zahlenverhältnisse erwarten können.

1.3.3.4 DNA-Methylierung in Carcinom-Zellen

Das Problem aberranter Methylierung durch Tumoren ist für die vorgelegte Arbeit natürlich bedeutsam, weil eine solche Tumor-bedingte Verformung des Methylierungsmusters fatale Fehlschlüsse bei der Anwendung des Systems auf forensische Fragestellungen erzeugen kann. Ob der Tumoreinfluss auf die Methylierung für unser Verfahren relevant ist, soll hier experimentell geklärt werden.

Die Frage muss man aus der Sicht des Analytikers präzisieren: Kann ein Tumor beispielsweise im Lungengewebe das Methylierungsmuster in Körperflüssigkeiten oder Geweben beeinflussen, die nicht unmittelbar mit dem Lungengewebe in Kontakt stehen? Kann ein Tumor, der in

unmittelbaren Kontakt mit dem zu untersuchenden Gewebe oder Körperflüssigkeit steht, das Methylierungsmuster dieses Gewebes oder Körperflüssigkeit beeinflussen? Ändert sich unter diesen Bedingungen der Methylierungsgrad der betrachteten Marker? Solche Fragen sind besonders wichtig bei der Betrachtung von Blut: Es ist bekannt, dass Methylierungsmarker, die dem frühen Nachweis von Tumoren dienen, auch im peripheren Blut bei ganz entfernt liegenden Tumoren zu finden sind und zwar in freier DNA. Dieser Umstand wird immer häufiger für einen frühen und spezifischen Tumornachweis genutzt. Goessl et al (2000) zeigen, dass der hypermethylierte Promotor der Glutathion-S-Transferase P1 (GSTP1) aus dem Prostata-Tumorgewebe des Patienten auch in Plasma, Serum, Ejakulat und Urin nachweisbar ist – wenn auch nur in Prozentsätzen von 36 – 74% der Proben.

Dieser Zusammenhang „Tumor/Methylierungsmuster“ ist von Gama-Sosa et al (1983) zum ersten Mal experimentell belegt worden. Die Autoren wiesen nach, dass in Tumorzellen genomweit die Methylierung erniedrigt war. Diese Hypomethylierung findet vor allem in und an den repetitiven bzw. parasitären Elementen des Genoms statt.

Auf der anderen Seite beobachtet man sowohl regionale Hypermethylierung als auch Hypomethylierung, vor allem an Promotorelementen in CpG-Inseln. Solche Methylierungseffekte finden offenbar zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Tumorgenese statt. Bis heute ist nicht klar, ob es sich dabei wirklich - mindestens zum Teil - um die Ursachen für die Tumorgenese handelt oder ob man dabei Phänomene beobachtet, die charakteristisch sind für sich sehr schnell teilende Zellen. Ursächlich für die Tumorgenese kann aber die DNA -Methylierung auf jeden Fall durch die erhöhte Mutagenität an 5mC sein.

1.4 Körperflüssigkeiten sind oft komplexe Mischungen

Körperflüssigkeiten sind in vielen Fällen komplexe Mischungen aus verschiedenen Zelltypen. Das macht den Einsatz der differenziellen Methylierung für die Identifikation bzw. Messung von Körperflüssigkeiten zusätzlich schwierig. Die differenziell methylierten Genloci sind natürlich zellspezifisch und nicht gewebespezifisch. Das bedeutet, wenn es die genomische Analyse auf differenziell methylierte Genorte zulässt, wird man noch versuchen eine besondere Auswahl zu treffen: Am besten sind Genorte geeignet, die bei der fragten Flüssigkeit/Gewebe methyliert sind und bei den übrigen, in Frage kommenden nicht methyliert. Der Methylierungsgrad sollte möglichst hoch sein, denn in den übrigen Zelltypen der Körperflüssigkeit ist dieser Genort möglicherweise nicht methyliert. Wenn nun, wie bei forensischen Spuren nicht ungewöhnlich, die Spur aus einer Mischung von Körperflüssigkeiten besteht, sollte auch bei sehr kleinen Anteilen der fraglichen Körperflüssigkeit das Methylierungssignal noch erkennbar sein. Wenn dagegen der Marker in der fraglichen Flüssigkeit nicht methyliert ist und in den übrigen methyliert, ist eine

Mischungsanalyse kaum mehr möglich. – Auch bei den übrigen Flüssigkeiten ist der Genort nicht komplett methyliert. Das bedeutet, man kann in Mischungen nur schwer unterscheiden, woher das Signal für Nichtmethylierung stammt. Trotzdem sind solche Marker als bestätigende Marker nützlich, weil sie die fragliche Flüssigkeit in reiner Form gut charakterisieren. Wegen der häufig existierenden zellulären Komplexität der Körperflüssigkeiten ist in der vorliegenden Arbeit für jede Körperflüssigkeit die Entwicklung mehrerer Marker angestrebt und realisiert worden.

1.5 Die Strategie der Marker-Suche

Da, wie in den voran gegangenen Abschnitten gezeigt, ein Methylierungsmarker mindestens theoretisch vielfachen Einflussgrößen ausgesetzt ist, sollte eine entsprechende Suchstrategie so angelegt sein, dass sie möglichst dicht das ganze Genom und darin alle Arten von CpGs erfasst. Augenblicklich erfüllt diesen Anspruch am ehesten die Infinium Methylierungs Technik 450K (Illumina). Damit werden rund 480.000 CpGs untersucht. Im Gegensatz zur schon länger verfügbaren 27K-Version werden damit auch die intergenischen, weniger dicht mit CpG besiedelten Bereiche erfasst. Bei beiden Techniken handelt es sich um Chip-Analysen, denen die gleichen Prinzipien zugrunde liegen. Nanometer-Kugeln tragen kovalent gebundene 23 bp lange, einzelsträngige DNA-Sequenzen, die sowohl zur Unterscheidung der Beads als auch zum hybridisierenden Binden des 50 bp langen, das analytische CpG enthaltenden Fragment der Probe dienen. Bei 27K werden zwei verschiedene Arten von Beads verwendet. Die Einen binden das methylierte Gegenstück aus der Probe, die Anderen das nicht mehr methylierte Gegenstück nach Bisulfitierung. Es findet eine Primerextension-Reaktion statt, die entweder das fluoreszenzmarkierte G oder am anderen Bead-Typ das fluoreszenzmarkierte A anbaut. Beide sind Rot-markiert. Die Unterscheidung der Beads findet durch die 23 bp-Sequenzen statt. Bei 450K findet zusätzlich eine andere Detektionsart statt: Ein Bead-Typ und die 4 fakultativ einzubauenden ddNTPs unterschiedlich fluoreszenzmarkiert.

In einer solchen Chip-Analyse erhält man also sowohl für ein methyliertes CpG als auch für ein nicht methyliertes CpG ein eigenes Signal. Zur Identifikation von zellspezifisch differenziell methylierten CpGs werden Bisulfit-konvertierte DNA-Proben der interessierenden Flüssigkeiten auf den Chip gegeben. Mit wenig komplexen Software-Hilfen kann man in kurzer Zeit den Methylierungsstatus dieser 480.000 CpGs abfragen. Die Auswertung ist nicht quantitativ aber eben auch keine Ja-Nein-Antwort. Das bedeutet, die erhaltenen Aussagen müssen mit einer anderen Methode bestätigt werden, vor allem natürlich an mehreren Individuen.

1.6 Die Bisulfitsequenzierung

Das klassische Verfahren für diesen nächsten Schritt ist die Bisulfitsequenzierung (Olek et al. 1996). Die chemische Reaktion, die dahinter steht, ist die Bisulfit-Konvertierung der DNA. Dabei

werden die nicht methylierten Cs in Us umgewandelt. In den PCR-Amplifikaten tauchen diese schließlich als T auf. Die methylierten Cs bleiben in der Reaktion unverändert.

Im Einzelnen findet dabei eine reversible Addition des Bisulfitions an das C-6 Atom des Cytosinrings statt. Das resultierende Cytosin-Sulfonat wird durch hydrolytische Desaminierung zu Uracil-Sulfonat modifiziert und anschließend durch Alkali-Einwirkung zu Uracil desulfoniert wird (Abbildung 2). Alle unmethylierten Cytosine werden in Uracile konvertiert. Bei methylierten Cytosinen läuft der nukleophile Angriff durch das Bisulfitanion dagegen nur langsam ab, so dass die 5-Methylcytosine unverändert bleiben (Beck, 2003). Nach der Bisulfit-Behandlung liegen zwei nicht mehr zueinander komplementäre Einzelstränge vor.

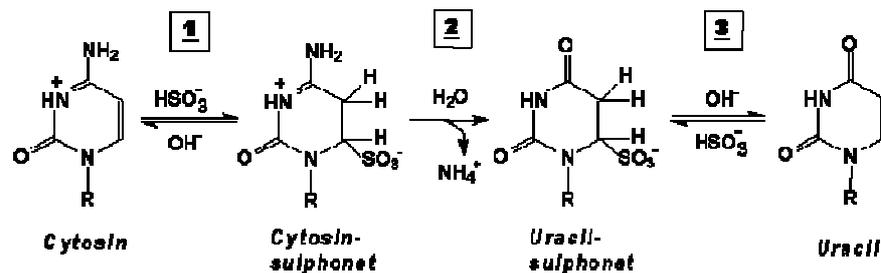


Abbildung 2 Chemischer Ablauf der Bisulfit-induzierten hydrolytischen Desaminierung von Cytosin zu Uracil (www.grailmaster.com/genetics/diplomhtml/methoden.htm)

In der folgenden Sequenzanalyse der Ziel-DNA kann man so methylierte von nicht methylierten CpGs unterscheiden. Da es sich um eine chemische Reaktion handelt, werden nicht alle Reaktionsprodukte in ihre Endprodukte umgewandelt. Bisulfitierte DNA verhält sich oft etwas anders als unbehandelte DNA, oft ist der Untergrund der Sequenzierreaktion ausgeprägter als bei un behandelter DNA. Zu einem trotzdem aussagekräftigen Analysenergebnis kommt man meist mit Hilfe einer speziellen Software. Diese normalisiert die Signale der Sequenzanalyse, korrigiert die unvollständige Bisulfitierungsreaktion und erlaubt in Grenzen eine quantitative Betrachtung (Lewin et al. 2004).

1.7 Die SNUPE Analyse

Ein langfristiges, strategisches Ziel der Arbeit war es, mit den entwickelten Markersystemen einen Kit zu erstellen. Die Bisulfit-Sequenzierung selbst ist für einen diagnostischen Test, wie hier benötigt, ungeeignet. Vor allem nach der Bisulfitierungs-Reaktion kann eine Sanger-Sequenzierung auf keinen Fall als quantitative Nachweismethode dienen. Sowohl bei der Bisulfit-Sequenzierung als auch bei Single Nucleotide Primer Extension (SNUPE) wird der Verhältniswert von methyliert zu nicht-methyliert am betrachteten Genort bestimmt. Der zusätzliche Vorteil des SNUPE-Assays gegenüber der Bisulfit-Sequenzierung ist - durch ein einziges Methylierungs-Signal, der ausschließlich von markerspezifischen Flüssigkeit gesendet wird, kann die Ziel-Flüssigkeit auch innerhalb von Gemischen nachgewiesen werden. Es ist nicht selbstverständlich, dass alle CpG-

Stellen innerhalb des Marker-Locus gleich methyliert sind. Häufig ist es nur ein bestimmtes CpG, welches die Unterscheidung gewährleistet.

Bei SNUPE handelt es sich um eine Primer-Extension Reaktion, mit der an einem CpG-Ort fakultativ mit je einem Fluoreszenzfarbstoff entweder das ddC (methyliert) enzymatisch angeheftet wird oder das ddT (nicht methyliert). Im Fall der reversen Detektionsrichtung des SNUPE-Primers sind es die komplementären ddG oder ddA. Die Reaktion läuft auf der Basis des SNaPshot-Kitsystems der Firma ABI ab (Kaminsky et al. 2005). In der Abbildung 3 ist das Prinzip der SNaPshot-Analyse nochmal verdeutlicht.

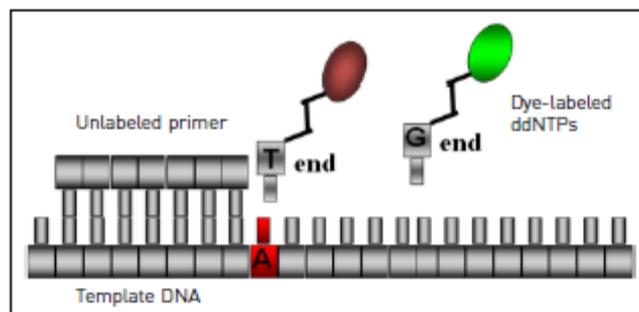


Abbildung 3 Prinzip der Single-Base Extension mit einem fluoreszenzmarkierten ddNTP (DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide, www.invitrogen.com)

Das Verfahren ist auch für quantitative Messungen geeignet. Unter der Voraussetzung einer geeigneten Zielsequenz des SNUPE-Primers, kann der wahre Methylierungs-Wert eines CpGs mit einer Genauigkeit von plus minus 5% bestimmt werden (Kaminsky et al. 2005). Ausgewertet wird das Ergebnis der im DNA-Sequenziergerät durchgeführten Fragmentlängenmessung durch Vergleich der Peak-Höhen und Peak-Flächen des Methylierungs-Signals mit dem Nicht-Methylierungs-Signal. Die Methode sollte validiert werden durch ein direkteres Messverfahren. Dafür kam nach Lage der Dinge nur eine Klonierung infrage oder eine Sequenzierung mit Hilfe einer Methode der so genannten Next Generation Sequenzierung (NGS).

1.8 NGS-Untersuchung der Methylierungsnorte

Die massiv parallele Sequenzierung der für den hier vorgestellten Ansatz eingesetzten Amplifikate diente auch der Analyse möglicher genetischer Störeinflüsse. SNPs am analytischen CpG würden eventuell ein falsches Ergebnis vortäuschen oder mindestens eine erhebliche Signalvarianz.

Darüber hinaus ist wohl von einer relativ hohen Konstanz der Gesamtmethylierung in den Promotor-assoziierten CGIs berichtet worden, aber innerhalb dieser CGIs kann das für die Genregulation verantwortliche CpG interindividuell ein anderes sein. Auch das könnte zu einer Verfälschung des SNUPE-Ergebnisses führen (Bock et al. 2008). Auch ASM, die durch weit entfernt positionierte SNPs bewirkt wird, scheinen zu einer Beeinflussung mehrerer CpGs in der betrachteten CGI zu führen (Shoemaker et al. 2011, Bell et al. 2011).

Es gibt in der Literatur keine Hinweise darauf, wie sich SNPs in unmittelbarer Nähe des analytischen CpGs auswirken.

1.9 Fragestellung der Arbeit

Bis heute existiert keine sichere Methode zur Identifizierung von Körperflüssigkeiten aus forensischem Spurenmaterial. Vor allem, wenn es sich um ältere oder starken Umwelteinflüssen ausgesetzte Materialien handelte. Dieser Dissertation liegt die Idee zugrunde, dass die zellspezifische, differenzielle Methylierung ein geeignetes Instrument zur Lösung des Problems ist. Es sollten auf dem Wege einer Genom-weiten Suche differenziell methylierte Genorte identifiziert werden, die die relevanten Körperflüssigkeiten bzw. Gewebe aus forensischem Material zu identifizieren gestatten. Es ist nicht klar, wie stabil solche Marker unter den zu erwartenden extremen Bedingungen wirklich sind. Im Effekt und aus der Sicht der Analytik verhält sich ein Methylierungsmarker wie ein quantitatives Merkmal. Die den Analyten, also den Methylierungsgrad eines CpGs, bestimmenden Einflüsse können verschiedenen Kategorien zugeordnet werden: Zahlreiche Methylierungsgenorte sind elterlich geprägt – entweder das mütterliche oder das väterliche Homologe sind per Methylierung inaktiviert. Die Inaktivierung des X-Chromosoms erfolgt ebenfalls durch Methylierung. Das Alter eines Individuums bestimmt den Methylierungsgrad von CpGs. Ein Tumor kann das Methylierungsmuster von Zellen verformen. Die entsprechende DNA wird, wenn auch spurenweise über Körperflüssigkeiten weit im betroffenen Organismus verbreitet. Genetische Variablen scheinen auf bisher unverstandene Art und Weise den Methylierungsgrad einzelner CpGs, ganzer CGIs oder sogar von Genclustern zu bestimmen.

Die in der Dissertation für die Körperflüssigkeitsanalyse identifizierten CpG-Orte sollten durch ausgiebige Validierungsexperimente unter forensischen Bedingungen, an gesunden Kontrollpersonen und Patienten diverser Tumoren zu einer sicheren analytischen Basis für forensische Untersuchungen gemacht werden. Durch massiv parallele Sequenzierung wird ein Goldstandard für die Analyse der betrachteten Methylierungsloci erstellt. Mit der gleichen Methode werden eventuelle SNP-Einflüsse untersucht.

Damit sollte zum ersten Male eine validierte, molekularbiologische Methode zur Analyse von Körperflüssigkeiten aus forensischem Material zur Verfügung gestellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Name	Hersteller
Agarose	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Borsäure $\geq 99,8\%$ (H_3BO_3)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Desoxynukleosidtriphosphat-Set (dNTP)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Merck KGaA, Darmstadt
GeneScan™ 120 LIZ™ Size Standard	Applied Biosystems by Life Technologies, Kalifornien-USA
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems by Life Technologies, Kalifornien-USA
Loading Buffer (Blaumarker)	AB Applied Biosystems, Warrington UK
Oligonukleotide	Metabion International AG, München
TRIS $\geq 99,9\%$ ($C_4H_{11}NO_3$)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe

2.1.2 Kommerziell erhältliche Kits und Enzyme

Name	Hersteller
Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter Inc., Krefeld, D
Agilent DNA Serie II Kit	Agilent Technologies, Böblingen, D
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1	Applied Biosystems by Life Technologies, Kalifornien, USA
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, D
Dream Taq Polymerase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
EpiTect® Bisulfite Plus Kit, EpiTect® 96 Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden, D
Exonuklease I	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Infinium HumanMethylation27 und -450 BeadChip Kit	Illumina Inc., San Diego, USA
Klenow DNA Polymerase	NEB, Frankfurt am Main, D
Min Elute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, D
Performa® DTR V3 96-Well Short Plates	Edge BioSystems, Gaithersburg, USA
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
Qubit™ dsDNA High Sens Assay Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
SNaPshot Multiplex Kit	Applied Biosystems by Life Technologies, Kalifornien, USA
SwabSolution™	Promega, Madison, USA
Taq DNA Polymerase, inklusive 10x PCR Buffer und 25 mM $MgCl_2$;	Qiagen, Hilden, D
T4-Taq-Polymerase	NEB, Frankfurt am Main, D
T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt am Main, D

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Abstrichbesteck mit Holz-Watteträger steril	Copan, I
Erlenmeyerkolben	Faust, Meckenheim, D
GelBond® PAGfilm	Pharmacia Biotech, SE
Microseal™ Versiegelungsfolie	Biozym, Hess. Oldendorf, D
PCR-Tubes (0,2 mL)	Roth, Karlsruhe, D
Pipettenspitzen mit Filter	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Reaktionsgefäße (0,5-, 1,5-, und 2,0 mL)	Eppendorf, Hamburg, D
Röhrchen mit Schraubverschluss (50 mL)	Sarstedt, Nümbrecht, D
96V-well Mikrotiterplatten für die PCR	Biozym, Hess. Oldendorf, D

2.1.4 Arbeitsgeräte

Gerät	Hersteller
Agilent 2100 Bioanalyser	Agilent Technologies, Böblingen, D
3730xl und ABI PRISM 310 DNA Analyzer	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Genome Analyzer IIx	Illumina Inc., San Diego, USA
Illumina MiSeq	Illumina Inc., San Diego, USA
Laborwaage Typ FA-1500-2	Faust, Meckenheim, D
Magnetrührer Mini MR1 basic	IKA Labortechnik, Staufen, D
Nanodrop™ ND-1000 Spectrometer	NanoDrop, Wilmington, USA
Photometer	LKG Biochom, Boston, USA
Pipetten Pipetman P2, P10, P100, P200, P1000	Gilson, Middleton, USA
Pipetten: 8-Kanal 0,5-10µL, Multipette Plus	Eppendorf, Hamburg, D
Qubit 2.0 Fluorometer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Roche 454 Genome Sequencer GS FLX+	Roche Diagnostics, Basel, CH
Rühr-Heizblock Monotherm	Faust Laborbedarf AG, Schaffhausen, CH
Thermocycler PTC-200 MJ Research	Biozym, Hess. Oldendorf, D
Thermocycler T1 und T3	Biometra, Göttingen, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
UV-Bank Fluo-Link	Biometra, Göttingen, D
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach, D

2.1.5 Datenbanken und Online-Tools

Homepage
http://www.biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/tools/BiConverter
http://www.ebi.ac.uk
http://www.ensembl.org/BLAST
http://www.grailmaster.com/genetics/diplomhtml/methoden.htm
http://www.eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer
http://www.illumina.com/products/methylation_450_beadChip
http://www.medical-genome.kribb.re
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP
http://www.repeatmasker.org

2.1.6 Software

Name	Hersteller
Sequencing Analysis Software v5.2	Applied Biosystems by Life Technologies, Kalifornien, USA
ESME	Epigenomics, D
GeneMapper v3.7 und GeneMapper ID v3.2	Applied Biosystems by Life Technologies, Kalifornien, USA
Geneious 6.1	Biomatters Ltd, Auckland New Zealand
CLC Genomics Workbench 6	CLC bio, Aarhus-DK

2.1.7 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden HPLC-gereinigt von Metabion International AG (München, D) und Eurofins MWG Operon (Ebersberg, D) bezogen.

2.1.7.1 Primer für Amplifikations-PCR

Name	Vorwärts Sequenz (5'-3')	Rückwärts Sequenz (5'-3')
Blut1(o/p)	TGGGTTGTTTTGGAAATAAATA	CCTCTACACCCCTCCTAAA
Blut2 (o/p)	TATAATTTGTATTAGGGAAATGATGA	TCCCTCACATTCCTTTTTCC
Mens1 (o/p)	GATTAGGTTTAGGGAAAGTTTTTAT	ACCCTCTAAAACCTTATACTCCC
Mens2 (q/r)	CTACCATATAATCAAAACCCA	GTTGTTGAGGTTTGAAGGATA
Spei1 (q/r)	CTACAAAAATAAATATAAATATAAAA	TTTTGGTGGTTTGGGGTTTA
Spei2 (q/r)	ATTTCCCCCTTAACAAACAA	AAAAGGAAAGGTATTTTGTAAGAG
Vag1 (o/p)	GGTATATGGATTTGGGTTTG	AATTACTAAAAATACCACTAAAAAACAT
Vag2 (o/p)	ATTAAGAAGAGTTTTAGGGGATAT	TTCCCCCCTTCAAAAT
Sperm1 (q/r)	CATACATAAACTTTTCTTCAAACAT	AAAGGTAAGGGTTAGAGTTTAG
Sperm2 (q/r)	ACTAAATCTAAACTAAAAACTACCC	ATAGTTTTGAGTTGTTTTGGTAGGTG
Haut1 (o/p)	GAGGGGGGTTATGATGTTAG	TAAAATCTAACAACATAAACCACAAAC
Geschl1 (o/p)	ATTTTTAGGTAGGGAGGAGT	TTTAACCCAAATCCCACACC
Geschl2 (o/p)	GTTTTAGTTAAGTTTGGTTATTATTG	TCACAAAACAAAACAAAACACTT

2.2.7.2 Primer für SNaPshot-Reaktion

Name	Vorwärts Sequenz (5'-3')	Rückwärts Sequenz (5'-3')
Blut1-1f+2r	GGGGTATAGTTGTTTAGTAATAGG	CTAAAAAATACAAACTTAAAAAATACAAAAC
Blut1-1f+2r	GTAGTTTTGGTAAGAATTAAGGAA	CCATATACCCTAAAATTCTACCAC
Mens1-F3m	GGCGTTTGTTGTTGGTTC	
Mens1-F3nm	GTGTTTGTTGTTGGTTTGG	
Mens2-f	ACTAACTTATTTCTACATAAAACCAC	
Spei1-Fm	CTTTCACAACGCTCACG	
Spei1-Fnm	CTTCTTTCACAACACTCACAT	
Spei2-3r		GAGTAGGTATATTGTTTTTTGTTTTTTT
Vag1-1r		TAATTAATAAAAAAAAAATCATCAACATAAAC
Vag2-1f	ATATTTGGGTAGAGTTATTTTTTTGTT	
Sperm1-4r		TTTTTTTTTATATGTGAGGAAAGAG
Sperm2-3r		GTGGGGAGTTGGGTTTT
Haut1-1f+2r	TGAGTTTGTGTTGGTTTTAGAGAA	CCCAAAAACCCCTAAAACAC
Geschl1-1f+2r	GTTTTGTTAGTATTGTTAGTTATT	CCACAAAACAAAATAAAAAATCCC
Geschl2-	GGTTATTATTGTTTTGTTTATGTTTTTTA	CACCCAACATCCTACTAAAC

1f+2r

2.1.7.3 Primer-Konstrukte für Next Generation Sequenzierung

Name	Vorwärts Sequenz (5'-3')
NGS1-Blut1_fwd	ACACACGTTGGGTTGTTTTGGAAATAAATA
NGS1-Blut2_fwd	ACGTAGTCAGTATAATTTGTATTAGGGAAATGATGA
NGS1-Mens1_fwd	GTAGAGTCGATTAGGTTTAGGGAAAGTTTTTAT
NGS1-Mens2_fwd	ACGTACCACAGTCTACTACCATATAATCAAAACCCA
NGS1-Spei1_fwd	ACGGACTAGTTACATCTACAAAATAAATATAAATATAAAA
NGS1-Spei2_fwd	ACGTGTGTTATTTCCCCCTTAACAAACAA
NGS1-Vag1_fwd	ACGTACACGGGTATATGGATTTGGGTTTG
NGS1-Vag2_fwd	ACGTCACAATTAAGAAGAGTTTTAGGGGATAT
NGS1-Sperm1_fwd	ACGAGATCCATACATAAAACTTTTCTTCAAACATAT
NGS1-Sperm2_fwd	ACCGATATCTAAAATCTAAACTAAAAACTACCC
NGS1-Haut1_fwd	ACCGTATAGAGGGGGTTATGATGTTAG

Name	Rückwärts Sequenz (5'-3')
NGS1-Blut1_rev	ACTGACACGTCCTCTACACCCCTCCTAAA
NGS1-Blut2_rev	ACTGAGTCAGTCCCTCACATTCCTTTTCC
NGS1-Mens1_rev	ACTGAGAGTCACCCTCTAAAACCTTATACTCCC
NGS1-Mens2_rev	ACGTAAGTGCACAGTGTGTTGAGGTTTGAAGGATA
NGS1-Spei1_rev	ACGTTGGACTAGTTGGTGGTTTGGGGTTTA
NGS1-Spei2_rev	ACGTTGGTGTGTTAAAAGGAAAGGTATTTTGTAAAGAG
NGS1-Vag1_rev	ACGTTGGTACACAATTACTAAAAATACCACTAAAAAACAT
NGS1-Vag2_rev	ACGTTGGTCACATTTCCCCCCTTCAAAAT
NGS1-Sperm1_rev	ACGTTGGAGATCAAAGGTAAGGGTTAGAGTTTAG
NGS1-Sperm2_rev	ACGTGCGATATATAGTTTTGAGTTGTTTTGGTAG
NGS1-Haut1_rev	ACTGCGTATATAAAATCTAACAACCTAAATAACCAAAC

 >>>> 6-Basen-Barcode im Forward-Primer

 >>>> 8-Basen-Barcode im Reverse-Primer

 >>>> 2-6-Basen-Linker-DNA

2.2 Methoden

2.2.1 Sammlung von biologischem Probenmaterial

Für die erste Validierungsrunde wurden Proben von 20 – 30 verschiedenen Probanden pro relevante Körperflüssigkeit gesammelt. Daraufhin wurde eine große Validierungsstudie durchgeführt wegen der vielfältigen Parameter, die auf den Methylierungsgrad Einfluss nehmen können. Für diesen Zweck wurden von weiteren 70-80 Probanden Proben von jeder Körperflüssigkeit genommen. Die Proben für peripheres Blut, Speichel und Haut sind in Rahmen einer Bachelorarbeit gesammelt worden (Miller, 2013). Die an dieser Studie teilnehmenden rund 600 Personen stammten aus der Uni-Klinik Bonn, der Fachhochschule Bonn-Rhein/Sieg, dem Hochtaunusklinikum Bad Homburg v.d.H. (HTK), mehreren Schulen, einer onkologischen Praxis in Bad Homburg und privat angesprochenen Personen. Alle sind ausführlich informiert worden über Charakter und Ziel der Studie. In der Uni-Klinik Bonn und im HTK wurde ein entsprechender Antrag an die Ethik-Kommission gestellt und bewilligt.

Die Carcinomproben wurden gesammelt in:

- Gynäkologische Abteilung des Hochtaunus-Klinikums in Bad Homburg
- Andrologische Abteilung Dermatologische Klinik Universität Bonn
- Onkologische Praxis Dr. Rohwedder, Bad Homburg

2.2.2 DNA-Extraktion

Das Menstrualblut sowie die Speichel- und Vaginal-Abstriche wurden mit dem *DNeasy® Blood & Tissue Kit* oder dem *QIamp® DNA Mini Kit*, beide von Qiagen, nach dem Standard-Protokoll für getrocknete Blut-/Körperflüssigkeits-Proben bearbeitet (*QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook*, 2007). Dafür wurden die Binden- oder Tampon-Stücke bzw. die Watte von den Abstrich-Stäbchen verwendet.

Das periphere Blut wurde mit dem *QIamp® DNA Mini Kit* nach dem Protokoll für flüssiges Blut/Körperflüssigkeiten extrahiert.

Die Spermaproben wurden ebenfalls mit dem *QIamp® DNA Mini Kit* nach demselben Protokoll für flüssiges Blut/Körperflüssigkeiten bearbeitet. Zusätzlich wurden für die Dauer der Lyse 20µl 1M DTT (Dithiothreitol) zugegeben.

Für die Extraktion der einzelnen Hautschuppen wurde die *SwabSolution™* von Promega verwendet.

2.2.3 DNA-Quantifizierung und -Qualitätsbestimmung

Die UV/Vis-Spektrophotometrie wurde in einem NanodropTM ND-1000 der Firma *NanoDrop Technologies* bestimmt. Hierbei wird die Absorption (optische Dichte = OD) der Nukleinsäurelösung bei 260 und 280 nm gemessen.

2.2.4 Bisulfit-Konvertierung der DNA

Die Bisulfit-Konvertierung erfolgte mit den Kits *Epi Tect Plus Bisulfite Kit* und dem *EpiTect® 96 Bisulfite Kit* (Qiagen) nach Hersteller-Protokoll (*EpiTect Plus Bisulfite Conversion Handbook*, 2010 und *EpiTect 96 Bisulfite Handbook*, 2009). Jeweils 40µl DNA-Extrakte wurden mit 85µl in gelösten Bisulfit-Mix und 15µl Protection-Buffer (zum Schutz der DNA vor dem alkalischen Reaktions-Milieu) zu einem Total-Volumen von 140µl gemischt und im Thermo-Cycler dem folgenden Inkubations-Programm (ca. 5h Dauer) unterworfen:

Programm-Parameter	Dauer	Temperatur
(1) Denaturierung	5 min	95°C
(2) Inkubation	25 min	60°C
(3) Denaturierung	5 min	95°C
(4) Inkubation	85 min	60°C
(5) Denaturierung	5 min	95°C
(6) Inkubation	175 min	60°C
(7) Kühlung halten	∞	20°C

Zur Aufreinigung der konvertierten DNA wurden 310µl Puffer BL (bei Bedarf mit 1µg Carrier-RNA versetzt) hinzu pipettiert, die Proben gevortext, 150µl Ethanol (≥99,8%) zugegeben und nochmal gevortext. Dieser Ansatz wurde auf die DNA-Bindungssäulen (MinElute-Spin Columns) überführt und zentrifugiert. Dann folgten ein Waschschrift mit Buffer BW und ein Waschschrift mit Buffer BD. Der letztere Puffer dient der Desulfonierung und sollte 15 Minuten auf die Säulen-Membran mit gebundener DNA einwirken, bevor die Säulen wieder zentrifugiert werden. Nach zwei weiteren Waschschriften mit Buffer BW und einem mit reinem Ethanol (≥99,8%), wurde die Bisulfit-konvertierte DNA mit Elutions-Puffer EB eluiert.

Welche Menge an Elutions-Puffer eingesetzt wurde, war abhängig von der Konzentration des eingesetzten DNA-Extraktes und von dem Ziel des Experimentes. Beispielsweise wurden bei den Standard Validierungsproben einer Konzentration von 50 ng/µl in 40 µl Extrakt 2000ng DNA erwartet. Diese wurden mit 60µl Elutions-Puffer eluiert und enthielten dementsprechend ca. 33ng/µl Bisu-DNA.

2.2.5 Suche nach Kandidaten-Markern und Primer-Design

2.2.5.1 Illumina - Infinium HumanMethylation-27 und -450 BeadChip

Um alle CpG-Orte des Genoms, auch außerhalb der CpG-Inseln, möglichst umfassend zu untersuchen wurden zwei Genom-weite Discovery-Analysen mit dem Infinium Methylation Assay - Infinium HumanMethylation27 und 450 BeadChip - von Illumina durchgeführt.

Pro Körperflüssigkeit (peripheres Blut, Menstrualblut, Speichel, Sperma und Vaginalflüssigkeit) wurden 8 DNA-Proben einer Konzentration von 50ng/µl zu 2 Proben gepoolt, erneut vermessen und bisulfitiert. Zusätzlich zu den zehn Proben-Pools wurden im 1. Experiment zwei Endometrium-Proben und im 2. Experiment jeweils eine Endometrium-, Haut-, Penisschleimhaut und spermafremde Samenflüssigkeits-Probe mit getestet. Die 1. Untersuchung wurde auf dem Methylation27 BeadChip gemeinsam mit der Firma Epiontis in Berlin durchgeführt, die 2. Analyse auf dem Methylation450 BeadChip in dem Forschungsinstitut Life&Brain in Bonn. Das Protokoll für Infinium Methylation Assay kann auf der Firmen-Homepage einsehen werden (http://www.illumina.com/products/methylation_450_beadChip).

Die Methylierungsergebnisse liegen als eine Excel-Datei vor. In den Tabellen-Zeilen sind die einzelnen ClusterCGs des Chips aufgelistet (27.580 Cluster beim 27BeadChip und über 485.000 Cluster beim 450BeadChip). Pro Cluster wird der Methylierungsstatus eines bestimmten CpGs im Genom gemessen. Die Spalten enthalten neben diversen Cluster-Informationen (Chromosom-Nummer, Genort-Koordinaten, Strang-Informationen, RefGene-Namen- und Accession, genomische Sequenz etc., und falls zutreffend CpG-Insel-Namen und SNP-Nummer) die Methylierungs-Werte 0 bis 1 (AVG_Beta-Wert) der gemessenen DNA-Proben. Diese geben den prozentualen Methylierungswert des gemessenen CpGs wieder. Anhand von diesen Zahlenwerten wurde nach denjenigen CG-Clustern gesucht, die vordefinierte Unterscheidungskriterien erfüllten.

2.2.5.2 Kandidaten-Auswahl

Die notwendige Eigenschaft für einen geeigneten Marker-Locus war - der Methylierungsstatus sollte sich in den Zielflüssigkeiten/Gewebe von dem der übrigen Flüssigkeiten maximal unterscheiden. Um diesen Marker später zum Nachweis der spezifischen Körperflüssigkeit auch innerhalb von Gemischen einsetzen zu können, musste eine zusätzliche Bedingung gegeben sein - die übrigen Flüssigkeiten sollten in dem Locus vollständig unmethyliert und nur die Zielflüssigkeit methyliert sein. In diesem Fall würde ein Methylierungssignal das Vorhandensein der Zielflüssigkeit in einem unbekanntem Gemisch nachweisen, unabhängig davon welche und wie viele andere Flüssigkeiten/Gewebe beigemischt sind. Andererseits kann ein Locus in der Zielflüssigkeit vollständig unmethyliert sein, in allen übrigen Geweben aber mehr oder weniger methyliert. Dann war das ein geeigneter Marker-Kandidat, um durch den Methylierungssignal unbekannte Beimischungen anderer Körperflüssigkeiten in der Ziel-Flüssigkeit anzuzeigen.

Dementsprechend wurde in den Methylierungsergebnissen von den Illumina-Chips nach jenen Cluster-CGs gesucht, die in der Zielflüssigkeit/Gewebe methyliert und in den übrigen Körperflüssigkeiten nicht methyliert waren oder umgekehrt. Die AVG-Werte über 0,4 wurden als methyliert und Werte unter 0,05 als nicht-methyliert definiert. In der Tabelle 1 ist ein Beispiel für zwei reziproke Kandidaten für peripheres Blut dargestellt. Der obere Kandidat (Nr. 320596) ist in Blut durchschnittlich über 50% und in übrigen Flüssigkeiten unter 5% methyliert. Der untere Kandidat (Nr. 23060) ist dagegen in Blut unmethyliert (unter 3%) und in übrigen Proben 50 bis 95% methyliert.

Tabelle 1 Methylierungs-Werte zweier Blut-Kandidaten aus dem Illumina 450 BeadChip

		peripheres Blut	Menstrualblut	Vaginal- flüssigkeit	Speichel	Sperma	Endometrium
Index	ClusterCG-ID	Ø AVG_Beta	Ø AVG_Beta	Ø AVG_Beta	Ø AVG_Beta	Ø AVG_Beta	Ø AVG_Beta
320596	cg17525495	0,53592230	0,3676791	0,02070355	0,04307932	0,01693343	0,0606476
23060	cg23093496	0,02836053	0,49814470	0,73879040	0,50809840	0,94879920	0,8654272

Um die besten CG-Cluster für diese Auswahlprinzipien zu finden wurde die Excel-Formel "UND" verwendet. Dabei werden für eine Zeile bestimmte Bedingungen formuliert, und falls sie zutreffen als WAHR gekennzeichnet. Diese Funktion kann für alle Zeilen in der Tabelle übernommen werden.

Die in der Ergebnis-Tabelle mit angegebenen Ursprungs-Sequenzen (ca. 50 Basen) der Kandidaten-Cluster mit dem höchsten Unterscheidungspotential wurden in das Such-Programm BLAST auf der Internet-Seite des Ensembl Genome-Browsers (<http://www.ensembl.org>) eingesetzt. Die erhaltenen genomischen Sequenzen der Kandidaten-Regionen, etwa 300 Basen vor und nach dem gesuchten Sequenzfragment, wurden auf weitere Eigenschaften untersucht. Ausschluss-Kriterien in diesem Stadium waren erstens eingeschlossene Repeatsequenzen in unmittelbarer Umgebung des Ziel-CpGs. Dies wurde mit Hilfe des Online-Programms Repeat-Masker überprüft (<http://www.repeatmasker.org>). Zweitens wurden die Kandidaten-Sequenzen auf integrierte bekannte SNPs kontrolliert. Dafür wurde eine Recherche in der SNP-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) durchgeführt. An den in dieser ersten Kontrollrunde aussortierten Sequenzen wurden Assay-Primer entworfen.

Die entwickelten Kandidaten-Assays wurden jeweils gruppenweise getestet. Die eingehenden Untersuchungen wurden an den Proben durchgeführt, die auch auf dem Illumina-Chip analysiert wurden. Wenn sich das Unterscheidungspotential in diesen Proben bestätigte, wurden in weitergehenden Analysen andere Proben einbezogen.

2.2.5.3 Design der Amplifikations-Primer

Nach der Bisulfit-Behandlung liegen zwei nicht mehr zueinander komplementäre Einzelstränge vor. Diese gehen aus den beiden Komplementärsträngen der genomischen DNA hervor (Abbildung 4, oben). Für den Primer-Design wird die genomische DNA-Sequenz zunächst virtuell Bisulfit-konvertiert. Dafür gibt es ein spezielles Online-Tool, genannt Biq-Analyzer (<http://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de/tools/BiConverter>). Wenn man den Forward-Strang für die Konvertierung verwendet erhält man den 1. Bisu-Strang. Konvertiert man den komplementären Reverse-Strang, so entsteht daraus der 2. Bisu-Strang. Das Primer-Design findet sowohl an dem 1. als auch an dem 2. Bisu-Strang immer an dem Forward- (5'→3') Strang statt (Abbildung 4, unten). Somit können die Primer für einen und denselben bisulfitierten DNA-Locus an zwei unterschiedlichen Sequenzen konstruiert werden.

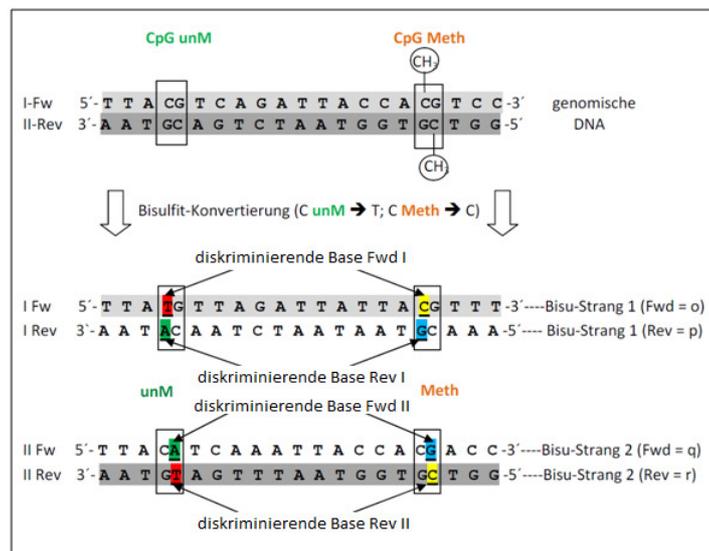


Abbildung 4 Darstellung der Bisulfit-Konvertierung einer Beispiel-DNA-Sequenz mit einem methylierten und einem unmethylierten CpG (eigene Darstellung).

Die Basen-Verteilung in den beiden Bisu-Strängen ist nicht identisch. Ein Strang ist GC-reich, der andere AT-reich. Dies hat Auswirkung auf die Schmelztemperatur der Primer. Je höher der GC-Gehalt des Oligonukleotids, desto höher ist seine Schmelztemperatur und umso höher muss die Annealing-Temperatur in der PCR gewählt werden. Die Schmelztemperatur (T_m) eines DNA-Doppelstrangs ist definiert als jene Temperatur bei der 50% des Doppelstrangs in einzelsträngiger Form vorliegt. Sie ist abhängig von Länge, Basenzusammensetzung, Salzkonzentration der PCR-Reaktion sowie der Konzentration des Oligonukleotids. Die Primer binden an die Zielsequenz solange deren Schmelztemperatur erreicht ist. Bei der PCR wählt man normalerweise eine Temperatur, die ca. 3 °C unter der errechneten Schmelztemperatur liegt, damit ein Annealing der Primer an die Zielsequenz sichergestellt ist.

Damit die PCR unter einheitlichen Bedingungen ablaufen kann, sollten die Schmelztemperaturen aller Amplifikations-Primer für alle Marker ungefähr gleich sein. Aus diesem Grund und wegen der

unausgeglichene Basen-Verteilung in den beiden bisulfitierten DNA-Strängen eignete sich entweder der 1. oder der 2. Strang besser für das Primer-Design.

Die folgenden Kriterien wurden bei dem Design der Amplifikationsprimer beachtet:

- Schmelztemperatur $T_M = 57-58^\circ\text{C}$; $T_M [\text{Primer Fwd}] = T_M [\text{Primer Rev}]$
- Die Primersequenzen müssen außerhalb von CpGs liegen, damit sowohl methylierte als auch demethylierte DNA-Moleküle amplifiziert werden können.
- Die Amplikons sollten maximal 300 bp lang sein, damit die PCR auch mit degradierter DNA funktioniert.
- Die Länge der Primer sollte zwischen 17 und 30bp liegen.
- Die Primer-Sequenz wird stets in 5'→3'-Richtung geschrieben; somit werden die reversen Primer als reverse Komplementär-Sequenz angegeben
- Die Primer dürfen keine Homodimer- und Heterodimerstrukturen ausbilden (Selbstdimerisierung: $\Delta G > -5 \text{ kcal/mol}$, Heterodimerisierung: $\Delta G > -8 \text{ kcal/mol}$)

Die Schmelztemperatur und die Dimerisierungsenergie der Primer wurden mit Hilfe des Online-Programms Oligoanalyzer errechnet (<http://eu.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer>).

Dabei wurden die folgenden Reaktions-Parameter in Oligoanalyzer eingegeben:

Oligokonzentration: 0,25 μM ; Na^+ Konz.=50mM; Mg^{++} =2,5mM; dNTP=0,2mM

2.2.5.4 Design der SNuPE-Primer

Die Methode der Single Nukleotid Primer-Extension basiert auf dem Oligonukleotid, welches ein Nukleotid vor der Position der variablen bzw. diskriminierenden Zielbase endet. In der SNaPshot-Reaktion verlängert dann die Polymerase den Primer an seinem 3'-Ende um ein einziges - zu der polymorphen Base komplementäres - ddNTP. Die Zielbase ist das methylierte C oder das unmethylierte T des CpG-Dinukleotids, welches vorher auf dem Illumina-Chip in dem ausgewählten Kandidaten-Cluster gemessen wurde. Der SNuPE-Primer kann für die Detektion sowohl als forward- als auch in reverse-Primer entworfen werden. Er sollte aber mit seinem 3'-Ende immer vor der diskriminierenden Base enden. In der Abbildung 5 ist eine methylierte und eine unmethylierte Beispiel-Sequenz eines ersten Bisu-Strangs und die Lage der möglichen forward- und reverse-Primer für das Ziel-CpG (gelb und grün markiert) abgebildet. In diesem Fall ist die diskriminierende Base das C oder das T in dem oberen 5'-3' Forward-Strang bzw. G oder A in dem unteren komplementären 3'-5'-Reverse-Strang. Im zweiten Bisu-Strang wären es G/A im 5'-3'-Strang und C/T im 3'-5'-Strang (siehe dazu Abbildung 4 im vorhergehenden Kapitel).

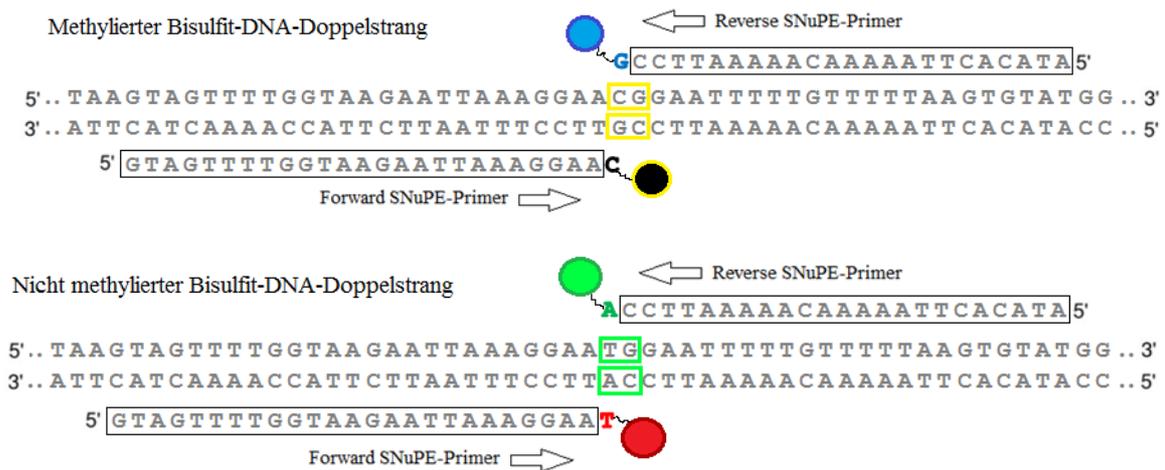


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Lage und Detektion von forward und reverse SNUPE-Primern an einem methylierten und einem nicht-methylierten DNA-Doppelstrang (eigene Darstellung).

Leider ist es vor allem in Amplikons mit hoher CpG-Dichte nicht immer möglich den Primer so zu positionieren, dass er die gewünschte Base erreicht. Die Zielsequenz des Primers darf keine CpGs enthalten, da an dieser Stelle eine variable Base vorliegt. Der Primer hätte dann entweder in der methylierten oder in der unmethylierten Sequenz ein Mismatch in der Bindungsstelle und könnte an die entsprechenden Sequenzen nicht spezifisch binden.

Für derartig schwierigen Amplikons wurde ein alternatives Detektions-System entwickelt, welches das Problem mit CpGs in der Primer-Bindungsstelle überlistet und diese sich sogar zunutze macht. Die notwendige Bedingung für das System ist - es müssen zwei oder mehrere CpGs in der Primer-Zielsequenz enthalten sein. Der Methylierungsanteil wird dabei nicht mit einem Standard SNUPE-Primer gemessen, sondern mit zwei sequenzspezifischen Primern - einem methylierungsspezifischen und einem nicht-methylierungsspezifischen Primer. Ersterer bindet nur an methylierte DNA-Moleküle. Der zweite Primer bindet an derselben Stelle, aber an unmethylierte DNA-Kopien. Beide Primer werden später gleichzeitig in einem Reaktions-Ansatz analysiert. Sie müssen daher unterschiedlich lang sein und mit dem 3'-Ende vor zwei unterschiedlichen Basen enden. In der Abbildung 6 ist die Konstruktion von zwei sequenzspezifischen Forward-Primern, die sich über zwei CpGs erstrecken, abgebildet. Der methylierungsspezifische Primer, der an methylierte DNA-Kopien bindet, wird später bei der Analyse der SnaPshot-Produkte als blaues Signal detektiert. Durch den Längenunterschied von 2bp erreicht man beim nicht-methylierungsspezifischen Primer ein anderes Laufverhalten, was sich in einem getrennten roten Signal zeigt.

Methylierter Bisulfit-DNA-Doppelstrang



Nicht methylierter Bisulfit-DNA-Doppelstrang



Abbildung 6 Schematische Darstellung der Lage von einem methylierungs- und einem nicht-methylierungsspezifischen Primer des alternativen SNUPE-Detektions-Systems (eigene Darstellung).

Die SNUPE-Primer wurden ebenfalls mit Hilfe des Oligoanalyzers auf die nötigen Eigenschaften hin untersucht, wobei dieselben Konzentrationsangaben wie für die Amplifikations-Primer verwendet wurden. Die Bedingungen bezüglich der Primer-Länge und der Homodimerisierungs-Energie waren ebenso identisch. Die angestrebte Schmelztemperatur T_M der Oligonukleotide lag bei 58 bis 60°C.

2.2.6 Methylierungsanalyse mittels Bisulfit-Sequenzierung

Die Methode der Bisulfit-Sequenzierung ermöglicht es den Methylierungsstatus aller Cytosine in CpG-Dinukleotiden eines DNA-Amplifikates zu bestimmen. Die Bisulfit-Konvertierung gewährleistet die Unterscheidung zwischen methylierten und nicht-methylierten Cytosinen. Letztere erscheinen als TpG-Dinukleotide in der Sequenz. Diese Unterschiede werden nach einer Sanger-Sequenzierung durch den Vergleich der Ergebnisse mit der Ausgangssequenz mit Hilfe einer speziellen Software bestimmt.

Mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung konnte ein Überblick über den Methylierungs-Status der einzelnen CpG-Stellen innerhalb der Marker-Loci gewonnen werden.

2.2.6.1 PCR-Amplifikation

Für bestimmte Amplifikations-Primer erwies sich eine Reaktionszusammensetzung mit einer höheren $MgCl_2$ -Konzentration als optimal, um unspezifische PCR-Produkte zu vermeiden. Andere Primer haben besser in einem PCR-Gemisch ohne zusätzliche $MgCl_2$ -Zugabe funktioniert. Deswegen beinhaltet das PCR-Protokoll zwei verschiedene Zusammensetzungen. Alle Primer wurden für die Amplifikation in einer Konzentration von 4,5 pmol benötigt.

In dieser Arbeit werden für jeden Marker zwei Namen verwendet. Der zweite Name stellt eine systematische Benennung für die Patentanmeldung dar.

Tabelle 2 Alte und neue Marker-Bezeichnungen

Ursprüngliche Bezeichnung	Neue Bezeichnung	Nachweis von
1572	Blut-1	Peripheres Blut
Blut4	Blut-2	Peripheres Blut
Men8	Mens-1	Menstrualblut
21867	Mens-2	Menstrualblut
Spei7	Spei-1	Speichel
1622	Spei-2	Speichel
1628	Vag-1	Vaginalflüssigkeit
SpVa1	Vag-2	Vaginalflüssigkeit
Men1	Sperm-1	Sperma
Men3	Sperm-2	Sperma
Haut1	Haut-1	Haut (-schuppen)
Sprm1	Geschl-1	Geschlecht (männl., weibl.)
Sprm3	Geschl-2	Männliches Blut/Sperma

Die Amplifikations-Primer tragen die Bezeichnungen der Marker mit voran gestellten Abkürzung "AMP" und die Benennung der beiden Forward- und Reverse-Primer, in Abhängigkeit von dem Bisu-Strang, an dem die Amplifikation stattfindet ("o" und "p" für die beiden Primer an dem 1. Bisu-Strang, "q" und "r" für die an dem 2. Bisu-Strang).

Für die Primer Blut-1, Blut-2, Spei-1, Spei-2, Vag-1, Vag-2, Sperm-1 und Haut-1 ist das Reaktions-Gemisch (Neu) wie folgt zusammengesetzt:

PCR-Komponente - Neue Zusammensetzung	Volumen je Reaktion (µl)
Wasser	14,30
PCR-Buffer 10x	2,50
MgCl ₂ (25mM)	2,00
dNTP Mix (2,5 pmol each)	2,00
Hot Start Taq-Polymerase (Qiagen)	0,20
Primer (4,5 pmol)	3,00
Bisulfitierte DNA	1,00

Die Primer Mens-1, Mens-2, Seprm-2, Geschl-1 und Geschl-2 sind hingegen unter folgenden Bedingungen (Alt) effektiver.

PCR-Komponente - Alte Zusammensetzung	Volumen je Reaktion in µl
Wasser	18,10
PCR-Buffer 10x	2,50
dNTP Mix (je 25 pmol)	0,20
Hot Start Taq-Polymerase (Qiagen)	0,20
Primer (4,5 pmol)	3,00
Bisulfitierte DNA	1,00

Das ursprüngliche PCR-Programm wurde nach dem Touchdown-Prinzip von Korbie & Mattick (2008) modifiziert. In dem nachfolgenden PCR-Protokoll wird die Annealing-Temperatur in 3

Schritten von 56°C auf 54°C abgesenkt. Das PCR-Programm ist für alle Marker gleich, da alle Primer eine ungefähr gleiche Schmelztemperatur von 58°C aufweisen.

Cycling-Parameter		
(1) Denaturierung	15 min	95°C
(2) Denaturierung	1 min	95°C
(3) Annealing	45 sec	56°C
(4) Elongation	1 min	72°C
→ go to (2) 9 x		
(5) Denaturierung	1 min	95°C
(6) Annealing	45 sec	55°C
(7) Elongation	1 min	72°C
→ go to (5) 15 x		
(8) Denaturierung	1 min	95°C
(9) Annealing	45 sec	54°C
(10) Elongation	1 min	72°C
→ go to (8) 14 x		
(11) Elongation	10 min	72°C
(12) Cool down	∞	8°C

2.2.6.2 Enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte

Für jeweils 5µL aufzureinigendes Produkt wurden 1,0 µL Alkaline Phosphatase *FastAP* (1U/µL), 0,25 µL *ExoI* (10U/µL), 0,5 µL Puffer (10x Konz.) und 0,25µl Wasser gemischt und zupipettiert. Das Temperaturprogramm für den Thermo-Cycler beginnt mit 37°C, die 90 Minuten gehalten werden. Anschließend wird das Gemisch für 15 Minuten auf 85°C erhitzt und am Ende auf 8°C abgekühlt.

2.2.6.3 Sequenzier-Reaktion

Für die Sanger-Sequenzierung der Amplifikationsprodukte wurde der kommerzieller Kit *BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1* von Applied Biosystems by Life Technologies verwendet. Zusätzlich zu den im Kit bereits enthaltenen dNTPs, wurde eine weitere dNTP-Lösung (0,1pmol) in die Reaktion zugegeben. Damit wurden die stark verschobenen Basen-Anteile in den bisulfitierten DNA-Strängen ausgeglichen.

Cycling-Parameter		
(1) Denaturierung	2 min	96°C
(2) Denaturierung	30 sec	96°C
(3) Annealing	15 sec	55°C
(4) Elongation	4 min	60°C
→ go to (2) 24 x		
(5) Cool down	∞	4°C

2.2.6.4 Sequenzierung der Marker-Amplifikate

Zur Entfernung der restlichen, freien Komponenten aus der Sequenzier-Reaktion wurde der *DTR V3 96-Well Short Plate Kits* der Firma EdgeBio verwendet. Die Reinigungs-Platten wurden entsprechend dem Hersteller-Protokoll vorbereitet, die Reaktionsansätze auf das Gelbett der Platte aufgetragen und bei 850 G 5 min zentrifugiert. Die gereinigten Sequenzierprodukte wurden mit 10µl Hi-Di Formamid gemischt und bei 90°C 3 Minuten denaturiert. Die kapillarelektrophoretische Auftrennung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente erfolgte in einem ABI 3730 DNA Analyzer mit Einstellungen für das Standard Sequencing Run-Modul mit 36cm-Array, den POP-7 Performance Polymer als Trennmedium sowie den BigDye Set E. Die primäre Datenauswertung erfolgte mit der *ABI Sequencing Analysis Software v5.2* in Verbindung mit der KB Basecaller und im weiteren Verlauf mit dem Programm *ESME*.

2.2.6.5 Datenauswertung: ESME-Analyse

Die Analyse der aus dem ABI-Basecaller resultierenden Sequenzen in Form von ab1-Dateien wurde mit Hilfe einer von Epigenomics entwickelten Software (ESME) durchgeführt (Lewin et al. 2004). Mit Hilfe dieses Programms wird der Methylierungs-Status durch das Verhältnis der überlagerten C- und T-Signale an jeder einzelnen CpG-Stelle abgeschätzt.

Für die Analyse werden die ab1-Sequenzdateien sowie die für das Amplikon-Design verwendeten Marker-Sequenzen in Text-Format, benötigt. Zunächst normalisiert die Software die Cytosin-Signale in der Sequenz, da diese in der direkten Bisulfit-Sequenzierung meist überproportional zu den anderen drei Signalarten skaliert sind (Lewin et al. 2004). Danach wird die Bisulfitsequenz mit der jeweiligen Referenzsequenz zur Deckung gebracht. Anschließend werden die durchschnittlichen DNA-Methylierungswerte durch Auswertung von C und T Signalen an CpG Positionen berechnet. Die berechneten Werte werden in Form einer Gelb-Blau Farbskala (von gelb= 0% methyliert bis blau= 100% methyliert) in einer Übersichts-Matrix dargestellt. In den Reihen werden pro Amplikon die einzelnen CpGs und in den Spalten die einzelnen Proben angeordnet. Zusätzlich erstellt ESME Bilddateien von den einzelnen Sequenzen und eine Text-Tabelle mit den Methylierungs-Werten der analysierten CpGs in den Sequenzen. Mit Hilfe der Bilddateien kann die Richtigkeit der angegebenen prozentualen Methylierung überprüft werden und, falls notwendig, in der Text-Tabelle korrigiert werden. Die korrigierte Tabelle kann in die korrigierte Matrix umgewandelt werden.

2.2.7 Das SNUPE-Assay

Schon in einem frühen Stadium der Arbeit hat sich die Messung der Methylierung mit Hilfe der Single Nukleotid Primer Extension, als die Methode der Wahl herausgestellt. Ihr Vorteil ist, dass

gezielt nur ein bestimmtes - das am besten diskriminierende CpG in dem Marker-Amplikon - untersucht werden kann. Dadurch ist die Methode relativ einfach zu validieren.

Das SNUPE-Assay besteht aus mehreren Schritten. Die PCR-Amplifikation sowie die anschließende enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte sind identisch mit den entsprechenden Schritten für die Bisulfit-Sequenzierung. Danach folgen die eigentliche SNaPshot-Reaktion mit spezifischen SNUPE-Primern, ein zweiter Aufreinigungsschritt und die Detektion der Marker-Signale mit Hilfe der Kapillarelektrophorese. In der Abbildung 7 sind die Vorbereitungsschritte sowie die einzelnen Arbeitsschritte des Assays und die dazu nötigen Reagenzien/ kommerziellen Kits zusammengefasst.

Extraktion der genomischen DNA	• Blood&Tissue/Investigator Kit (<i>Qiagen</i>)
Bisulfit-Konvertierung der DNA	• EpiTect Bisulfite Kit, (<i>Qiagen</i>)
Amplifikation der BISU-DNA	• 10x PCR buffer (<i>Qiagen</i>) • HotStart Taq Polymerase (<i>Qiagen</i>) • dNTPs (<i>Fermentas</i>) • Marker-Amplifikationsprimer
Purifikation der PCR-Produkte	• ExoSAP-IT® (<i>USB</i>)
SNaPshot-Reaktion	• SNaPshot® Multiplex Kit (<i>AB</i>) • Marker-SNUPE-Primer
Purifikation der SNaPshot-Produkte	• Shrimp Alkaline Phosphatase SAP (<i>USB</i>)
ABI PRISM Elektrophorese	• GeneScan™-120LIZ™ Size Standard (<i>AB</i>)
SNUPE-Auswertung	• GeneMapper v3.5 Software (<i>AB</i>)

Abbildung 7 Ablauf der Vorbereitungs- und Arbeitsschritte des SNUPE-Assays und die dazu nötigen Komponenten (eigene Darstellung)

2.2.7.1 PCR-Amplifikation und enzymatische Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR und die nachfolgende enzymatische Aufreinigung der Amplifikate erfolgten nach dem gleichen Protokoll wie in der Bisulfit-Sequenzierung (siehe Kapitel 2.2.6.1 und 2.2.6.2).

2.2.7.2 SNaPshot-Reaktion

Die gereinigten PCR-Produkte wurden in die SNaPshot-Reaktion eingesetzt. Diese erfolgte mit dem *SNaPshot Multiplex Kit* von Applied Biosystems by Life Technologies nach Hersteller-Protokoll. Das Prinzip dieser Reaktion ähnelt dem der PCR - sie erfolgt ebenfalls in den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation. Der Unterschied besteht darin, dass die Elongation lediglich um die eine Base erfolgt, die komplementär zu der diskriminierenden Base ist. Die Einzelbasenelongation des Extensionprimers erfolgt über den Einbau eines der vier Arten

fluoreszenzmarkierter ddNTPs, die in dem Kit-Reaktions-Mix neben Polymerase und Puffer mit enthalten sind. In die Reaktion wurden je 1pmol SNUPE-Primer und 3µl enzymatisch aufgereinigte PCR-Produkte eingesetzt.

Die Temperatur-Schritte wurden wie folgt durchgeführt:

Cycling-Parameter		
(1) Denaturierung	10 sec	96°C
(2) Annealing	7 sec	55°C
(3) Elongation	30 min	60°C
→ go to (1) 24 x		
(4) Cool down	∞	4°C

2.2.7.3 Enzymatische Aufreinigung der SNaPshot-Produkte

Zu dem gesamten Reaktions-Mix wurden 1µl *Fast-AP* (1U/µL) sowie 1µl Fast-Puffer (10x Konz.) zugegeben. Das Temperatur-Programm in dem Thermocycler startet mit 37°C für 60 Minuten. Danach wird das Enzym bei 75°C für 15 Minuten Hitze-denaturiert und anschließend das Reaktionsgemisch auf 8°C abgekühlt.

2.2.7.4 Detektion der Marker-Signale

Vor der Analyse im ABI 3730 Sequencer wurden 1µl der aufgereinigten Probe mit 9µl Formamid Hi-Di und 0,25µl internem Längenstandard GeneScan™ 120 LIZ™ versetzt. Das für die Analyse nötige Run-Modul enthielt als Vorlage das Hersteller-Modul HTSNP36_POP7, mit den Einstellungen für 36cm-Array, den POP-7 Performance Polymer als Trennmedium und das G5-RCT Dye Set. Vor der Analyse in dem Gerät wurde das Gemisch zunächst 3 Minuten bei 90°C denaturiert.

2.2.7.5 Datenauswertung mit Hilfe von GeneMapper Software

Die Auswertung der Marker-Signale erfolgte mit der ABI-Software *GeneMapper v3.7* oder *GeneMapper ID v3.2*. Zunächst wurden die Rohdaten, unter Eingabe der entsprechenden Einstellungen für Längen-Standard GS120Liz und Analysis Method - SNaPshot Default, analysiert. Dann wurden alle Proben eines Datensatzes in der Sample-Liste ausgewählt und die richtigen Methylierungs- und/oder Nicht-Methylierungs-Signale in den einzelnen Plot-Fenstern markiert. Die Flächen- und Höhen-Werte zu den markierten Peaks wurden als Text-Tabelle exportiert und in Excel-2007 bearbeitet.

Für die Berechnung des prozentualen Methylierungs-Wertes der Probe wurden die Höhe und die Fläche des Methylierungs-Signals in Relation zu der Gesamt-Höhe bzw. -Fläche der beiden Methylierungs- und Nicht-Methylierungs-Signale gesetzt. Aus den beiden Methylierungswerten, die aus Peak-Höhe und Peak-Fläche resultierten, wurde dann der Durchschnitt gebildet.

2.2.8 Next Generation Sequencing

Die eigentliche NGS-Analyse erfolgte an den Geräten Roche 454 Genome Sequencer GS FLX+ und Illumina MiSeq im Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MP-GC).

2.2.8.1 Primerkonstrukte und PCR

In die Untersuchung wurden alle Marker (Blut-1 und 2, Mens-1 und 2, Spei-1 und 2, Vag-1 und 2, Sperm-1 und 2 sowie Haut-1), außer den beiden Geschlechtmarker, einbezogen. Es sollten sowohl Forward- als auch Reverse-Amplifikate der elf Marker, zusammen in einem einzigen Pool analysiert werden. Dafür wurde den 22 Amplifikationsprimern ein eigener spezifischer Barcode vergeben. Für die Herstellung der NGS-geeigneten Primerkonstrukte wurden die 22 Primer an ihrem 5'-Ende um 6- oder 8-Basen-Barcode (6-Basen-Barcode bei Forward-Primern und 8-Basen-Barcode bei Reverse-Primern) und um einen 2- bis 8-Basen-Linker ergänzt (Abbildung 8). Die kurzen DNA-Linker wurden für jeden Primer so gestaltet, dass alle 22 forward- und reverse-Amplifikate sich in ihrer Länge um mindestens zwei Basen unterschieden. Dies ist vor allem bei der Analyse auf Roche-454 Sequencer von Bedeutung, wenn alle Proben gepoolt in einem einzigen NGS-Run analysiert werden. Bei zwei unterschiedlichen Amplifikaten, die längere Basen-Homopolymere in der Sequenz enthalten und gleich lang sind, könnte es dazu kommen, dass beide als eine einzige Sequenz gelesen werden. Die Illumina-Technologie ist in dem Fall wesentlich unempfindlicher gegen Basenhomopolymere.

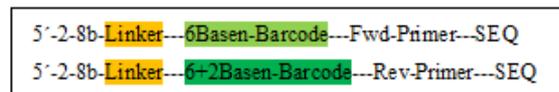


Abbildung 8 Grundaufbau der Längen- und Barcode-unterschiedenen Primerkonstrukte für NGS

Die Amplifikations-PCR wurde nach dem eigenen Standard-Protokoll (alte PCR-Zusammensetzung, Kapitel 2.2.6.1), nur mit 3 statt 1µl Template, durchgeführt. Für die Amplifikation sollte im Normalfall eine Taq-Polymerase verwendet werden, die glatte DNA-Enden hinterlässt, da für die Ligation der Adaptoren in den nachfolgenden Schritten stumpfe Amplifikat-Enden benötigt werden. Viele Taq-Polymerasen hängen häufig ein zusätzliches dATP oder ein anderes beliebiges Nukleotid an das Ende des synthetisierten Doppelstrangs nach jedem Elongationsschritt – auch das hier verwendete Qiagen-Produkt.

Für alle drei Untersuchungsreihen wurden Bisulfit-DNA-Proben verwendet, welche bereits mit SNUPE analysiert wurden. Für die Klärung der ersten Fragestellung - inwiefern sich die Methylierungs-Ergebnisse aus den verschiedenen Detektions-Methoden in der NGS-Analyse bestätigen lassen - wurden Proben eingesetzt, die sowohl mit SNUPE als auch mit Bisulfit-Sequenzierung gemessen wurden.

2.2.8.2 Aufreinigung der PCR-Produkte mit Magnetic Beads

Für die Reinigung der PCR-Produkte mit Magnetic Beads standen zwei Kits zur Verfügung - *AMP Clean/CleanPCR* (GC Biotech) und *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter). Beide funktionieren nach dem gleichen Prinzip. Die Durchführung erfolgte nach dem Hersteller-Protokoll.

Das eingesetzte Volumen der Beads-Lösung kann von 1,3- bis 1,8-fach - bezogen auf das Proben-Volumen - variiert werden. Beim Einsatz von 1,8-fachen Volumen werden alle DNA-Moleküle aus der Probe an die Beads gebunden. Man verwendet diese Menge zur Aufkonzentrierung der Proben. Zum Abtrennen der Primer- oder Adaptor-Dimere aus der Reaktion, wird das 1,3-fache Proben-Volumen verwendet. Damit werden nur die längeren DNA-Fragmente (über 100 bp) an den Beads fest gehalten und die kürzeren werden im Verlauf der Waschschrte entfernt. Am Ende wurde mit 15µl Elutionspuffer EB (Qiagen) eluiert.

2.2.8.3 Fluorometrische Quantifizierung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe von *Qubit 2.0 Fluorometer* (Invitrogen) und dem zugehörigen *QubitTM dsDNA High Sens (HS) Assay Kit*, der für die Messung von 0,2-100ng dsDNA geeignet ist, quantifiziert. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Arbeitsvorschriften des Kits.

2.2.8.4 Einstellung der Äuimolarität

Die einzelnen Marker-Amplifikate müssen für Analyse äquimolar vorliegen. Die optimale Gesamtmenge für beide Systeme liegt bei ca. 500ng. Dementsprechend sollte pro Marker ca. 45,5ng eingesetzt werden. Das Gesamtvolumen musste für die nachfolgende PCR per Magnetic Beads auf 15 µl konzentriert werden

2.2.8.5 Endrepair-Reaktion

In diesem Schritt werden die überstehenden Amplikon-Enden, die durch die Taq-Polymerase bei der Amplifikation erzeugt wurden, mit dATP's für die spätere Adaptors-Ligation aufgefüllt (A-Tailing). Bei dieser Reaktion sind zwei unterschiedliche DNA-Polymerasen beteiligt. Die *Klenow DNA Polymerase* besitzt nur eine 3'->5'-Exonukleasefunktion, aber keine 5'->3'-Polymerase-Aktivität und ist bei 25°C aktiv. Sie baut die überstehenden, einzelsträngigen 3'-Enden ab. Die gewöhnliche *T4-Taq-Polymerase*, die erst bei einer höheren Temperatur aktiv ist, füllt mit ihrer 5'->3'-Funktion die Enden mit dATP's auf, da nur diese Sorte von Desoxynukleotidtriphosphaten in dem End-Repair-Puffer enthalten sind.

Die Reaktion für Roche 454 wurde nach den Angaben des Protokolls für Fragment End Repair im Rapid Library Preparation Method Manual (2010) von *Roche*, vorbereitet und durchgeführt. Der Ansatz für Illumina MiSeq wurde entsprechend dem Protokoll für NEBext End Prep im NEBNext

Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina - Instruction Manual (2013) von *New England Biolabs* bearbeitet.

2.2.8.6 Ligation des library-spezifischen Adapters

Nach Hinzufügen des 3'-Adenin-Überhangs erfolgte die TA-Ligation des spezifischen Adapters an die Enden der Amplikons - bei beiden Analysemethoden mit Hilfe einer *T4-DNA-Ligase* (NEB). Die Adaptern enthalten eine spezifische Erkennungssequenz, die später bei der bioinformatischen Verarbeitung der NGS-Reads die Zuordnung der Library ermöglicht. Außerdem ist in den Adapter-Sequenzen eine Bindungsstelle für die universellen Primer integriert, die in der späteren Anreicherungs-PCR eingesetzt werden.

Die Durchführung der Reaktionen erfolgte ebenfalls nach den entsprechenden Angaben im Hersteller-Protokoll (siehe oben).

Im Anschluss an die Ligation wurde der Pool zur vollständigen Beseitigung der nicht gebundenen Adaptern zwei Mal mit *Magnetic Beads* gereinigt (siehe Kapitel 2.2.8.2). Um die Bindung der Beads an den Magneten zu vereinfachen, wurde das Reaktionsvolumen zunächst auf 100µl mit Wasser aufgefüllt. Die Beads-Lösung wurde in 1,3-fachen Volumen eingesetzt, damit die Adapterndimere auf keinen Fall mit gebunden werden. Nach dem ersten Reinigungsschritt wurde mit 100µl Wasser eluiert. Am Ende der zweiten Reinigung wurden die Library-Produkte mit 20µl EB-Puffer eluiert.

2.2.8.7 Anreicherung von Library-Fragmenten und Homogenisierung

Diese PCR dient zur Homogenisierung und Anreicherung der Ligations-Produkte und wird mit universellen Primern ausgeführt, die an die Zielsequenz in den Adaptern binden. Auch hier wurden die Reaktionen nach den entsprechenden Hersteller-Vorgaben durchgeführt. Die beteiligte *Dream Taq Polymerase* (ThermoScientific) amplifiziert Fragmente bis 20kb und kann auch modifizierte Basen einbauen.

Nach der PCR wurde die Library wieder mit 1,3-fachen Volumen *Magnetic Beads*-Lösung gereinigt, mit 15µl EB-Puffer eluiert (siehe Kapitel 2.2.8.2) und anschließend mit Hilfe von *Qubit* und dem *High Sens Kit* fluorometrisch quantifiziert (siehe Kapitel 2.2.8.3).

2.2.8.8 Qualitätskontrolle

In der Qualitäts-PCR werden die Vollständigkeit des Pools und die Richtigkeit der vorhergehenden Messungen überprüft. Aus den Quantifizierungs-Ergebnissen errechnet sich der Verdünnungsfaktor für den Einsatz des Pools in die PCR. Es sollten möglichst exakt 1×10^8 Moleküle pro µl in die PCR eingesetzt werden. Diese sollen später im Agarosegel die gleiche Banden-Intensität zeigen, wie diejenigen mit getesteten Positiv-Kontrollen, welche genau diese Konzentration an Molekülen

enthalten. Es wurden zwei Reaktionen mit Library-DNA als Template, zwei Positiv-Kontrollen und zwei Negativ-Kontrollen angesetzt und wie folgt amplifiziert:

Cycling-Parameter		
(1) Denaturierung	1 min	95°C
(2) Denaturierung	30 sec	95°C
(3) Annealing	1 min	60°C
(4) Elongation	1 min	72°C
→ go to (2) 19 x		
(5) Elongation	10 min	72°C
(6) Cool down	∞	4°C

Nach der PCR wurde zu den einzelnen Reaktionen jeweils 1µl *Exonuclease I* (NEB) zugesetzt und das Gemisch für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 10µl der gereinigten Produkte mit 5µl 1xTE-Puffer und 3µl orange Dye gemischt und zusammen mit zwei high- und low range Leitern im 1,5-prozentigem Agarosegel aufgetrennt.

Die Banden der Library-Proben sollten eine ähnliche Intensität aufweisen wie die beiden Positiv-Kontrollen. Zudem sollten die Amplifikate aus dem Pool, falls sie größenunterschiedlich sind, in einzelnen Banden erkennbar sein.

Parallel zu der Kontrolle auf dem Agarosegel wurden 1µl der gereinigten Library-Produkte im Plattenfluorometer *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) mit Hilfe des zugehörigen *DNA Serie II Kits*, nach den Angaben des Hersteller-Protokolls, vermessen. Diese Technik bietet eine hochauflösende Analyse der PCR-Fragmente durch kapillarelektrophoretische Auftrennung und bestimmt gleichzeitig die Konzentration der gemessenen Probe. Die direkte Quantifizierung erfolgt dabei mithilfe der FAM Markierung des Adapters und eines mitgeführten Standards.

2.2.8.9 Die Sequenzierung

Die Library der ersten Versuchsreihe - zur Verifizierung der Methylierungswerte aus den SNUPE-Messungen - wurde sowohl auf dem Roche 454 Genome Sequencer GS FLX+ als auch auf dem Illumina MiSeq sequenziert. Für die 454-Technik wurden dabei 20000 Reads (Lib 601.B) und für Illumina 100000 250bp-paired-End Reads angestrebt (Lib 601.C). Das Experiment zur Suche nach möglichen die Methylierung beeinflussenden Sequenzvarianten wurden ausschließlich mit der Illumina-Technologie durchgeführt (Lib 813. A), wobei jeweils 100000 250bp-paired-End Reads pro Library angestrebt wurden.

Die Sequenzdaten wurden entsprechend den Library-spezifischen Adapter-Sequenzen und den 22 verschiedenen markerspezifischen forward- und reverse-Barecodes gesplittet und mit Hilfe der Software *Geneious* und *CLC Genomics Workbench 6* ausgewertet.

2.2.9 Validierung der Methylierungs-Marker

Die besten SNUPE-Methylierungs-Marker wurden geprüft auf Nachweisgrenze, Wiederholbarkeit und Nachweisgrenze von Flüssigkeiten in Mischproben. Die Experimente wurden spezifisch für die einzelnen Marker durchgeführt. Die Beschreibung findet sich in den entsprechenden Kapiteln im Ergebnisteil.

2.2.9.1 Forensische Validierung

Für alle Marker und alle fünf Körperflüssigkeiten wurde die Langzeitstabilität unter forensischen Bedingungen geprüft. Die forensische Validierung des Haut-Markers wurde gesondert durchgeführt. Dieser wurde auf Unterarm- und Kopfhautschuppen sowie Hautschuppen aus der echten Fallarbeit getestet.

Bis zu 6 Monaten wurden die Proben Wärme, Feuchtigkeit, Sonneneinstrahlung und der Einwirkung von Erde (Mikroben) ausgesetzt. Die Gestaltung dieses Experimentes erfolgte in Anlehnung an die Arbeit von Setzer et al (2008).

Drei unterschiedliche Umweltbedingungen wurden simuliert:

- 1) Trockene Umgebung: bei Raumtemperatur gelagert, lichtgeschützt in Plastik-Tüten (Abbildung 9a)
- 2) Feuchte Umgebung: bei Raumtemperatur gelagert, lichtgeschützt in Exsikkator (Abbildung 9b)
- 3) Außenbedingungen: wetterbedingte Umgebung (Sonne, Regen, Mikroorganismen) auf Erde gelagert (Abbildung 9c)



Abbildung 9 Trocken (a), feucht (b) und außen gelagerte (c) simulierte forensische Spuren.

Es wurden sechs gleiche Sets von Spuren - bestehend aus peripherem Blut, Menstrualblut, Speichel, Sperma und Vaginalflüssigkeit - vorbereitet. Für die Blut, Menstrualblut- und Sperma-Spuren wurden jeweils 50µl der Flüssigkeit verwendet. Vaginalflüssigkeit und Speichel-Spuren wurden als Abriebe angefertigt. Die Spuren-Sets wurden auf die oben beschriebenen drei Arten bis zu sechs Monaten gelagert. Das erste Set wurde direkt bearbeitet und analysiert. Die Methylierungswerte der Marker aus der ersten Analyse zum Zeitpunkt 0 wurden mit den Werten aus den nachfolgenden Monaten verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Illumina 1 und 2: Kandidaten-Recherche

Es wurden zwei große Screeningläufe mit den Illumina HumanMethylation Bead Chips 27K und 450K durchgeführt. Pro Zielgewebe wurden 15 bis 20 Kandidaten-Loci gefunden, die den beiden definierten Suchkriterien entsprachen und gemäß den Chip-Ergebnissen ein hohes Unterscheidungspotential aufwiesen. Nach dem Ausschluss von Loci, die Repeat-Sequenzen enthielten, mehr als 3 bekannte SNPs in der Umgebung des Cluster-CGs aufwiesen und die aufgrund ihrer Bisulfit-konvertierten Sequenz als schwierig eingestuft wurden, war das Ergebnis insgesamt eine Gruppe von rund 150 tauglich erscheinenden CpGs. Grundsätzlich wurden pro Körperflüssigkeit zwei entgegengesetzt detektierende Marker angestrebt - einen, der in der Zielflüssigkeit methyliert und einen, der unmethyliert ist. Entsprechende Loci konnten für alle fünf Körperflüssigkeiten gefunden werden.

3.2 Auswahl der Marker

Ausgehend von den Ergebnissen der ersten Methylierungsuntersuchung auf dem Illumina's Infinium HumanMethylation27 BeadChip wurden in der ersten Runde 25 Kandidaten - 17 potentielle Unterscheider von Menstrualblut und peripherem Blut und 8 Unterscheider von Vaginalflüssigkeit und Speichel - identifiziert und in mehreren Analysereihen mit der Bisulfit-Sequenzierung getestet. Die ersten drei Marker sind dabei erarbeitet worden: Blut-1 (1572, Marker für peripheres Blut), Spei-2 (1622, Marker für Speichel) und Vag-1 (1628, Marker für Vaginalflüssigkeit).

Unter Einbezug der Ergebnisse von dem ersten und zweiten Illumina-Chip wurden weitere 7 Kandidaten-Assays für peripheres Blut, 7 für Vaginalflüssigkeit, 12 für Menstrualblut, 12 für Speichel, 5 für Sperma und 2 für Haut entwickelt.

Nachdem die Entscheidung fiel die Analyse der Körperflüssigkeiten als SnaPshot-Assay durchzuführen, wurden die darauffolgenden Kandidaten immer satzweise mit Amplifikations-Primern und den zugehörigen SNUPE-Primern entworfen. Insgesamt sind im Laufe der Zeit rund 50 verschiedene Kandidaten-Loci für die Körperflüssigkeiten bzw. Gewebe peripheres Blut, Menstrualblut, Speichel, Sperma, Vaginalflüssigkeit, Haut und Penisschleimhaut getestet worden. In etwa einem Viertel der Fälle konnten die Methylierungs-Ergebnisse aus der Illumina-Studie schon in der ersten Testrunde mit denselben Illumina-Proben nicht reproduziert werden. Mindestens die Hälfte der Kandidaten ist in einem weiteren Test mit allen Körperflüssigkeiten ausgeschieden, da sie entweder falsch positive oder falsch negative Signale gezeigt haben. Von den besten Unterscheidern wurden diejenigen ausgewählt, die das höchste Methylierungs- bzw. Demethylierungssignal in der markerspezifischen Flüssigkeit und den kleinsten Signal in den

restlichen vier Flüssigkeiten in mehreren Analyse-Reihen gezeigt haben. Als validierungswürdig haben sich letztendlich 13 Marker erwiesen. Der aktuelle Marker-Satz besteht aus zwei Marker für peripheres Blut, zwei für Menstrualblut, zwei für Speichel, zwei für Vaginalflüssigkeit, zwei für Sperma, einem Hautmarker und zwei Geschlechtsmarker (Tabelle 3).

Tabelle 3 Zusammenstellung des aktuellen Marker-Satzes

Marker-Name	Zielflüssigkeit bzw. - Gewebe	BeadChip	TargetID
Blut-1	Peripheres Blut	27	cg26285698
Blut-2	Peripheres Blut	450	cg03363565
Mens-1	Menstrualblut	450	cg09696411
Spei-1	Speichel	450	cg21597595
Spei-2	Speichel	27	cg15227982
Sperm-1	Sperma	27	cg22407458
Sperm-2	Sperma	27	cg05656364
Vag-1	Vaginalflüssigkeit	27	cg14991487
Vag-2	Vaginalflüssigkeit	27	cg03874199
Haut-1	Haut-/Schuppen	450	cg06833110

3.3 Peripheres Blut

Für die Untersuchung von peripherem Blut wurden zwei entgegengesetzt detektierende Marker entwickelt. Mit dem ersten Marker lassen sich Beimischungen anderer Flüssigkeiten im Blut nachweisen. Der zweite Marker reagiert ausschließlich auf peripheres Blut mit einem spezifischen Methylierungssignal.

3.3.1 Methylierungs-Marker Blut-1

3.3.1.1 Die Genort-Eigenschaften

Tabelle 4 Die Genort-Beschreibung des Markers Blut-1

Marker	Chr	CpG-Insel	Gen Symbol	Genprodukt	Locus Architektur
Blut-1	16	nein (63% GC) 8cg/344bp	C16orf54	Transmembranprotein c16orf54	Exon: 16orf54-001

Der Blut1-Marker ist in dem peripheren Blut vollständig unmethyliert. In den übrigen Körperflüssigkeiten (peripheres Blut, Menstrualblut, Speichel und Vaginalflüssigkeit) und Haut zeigt er unterschiedliche Anteile an Methylierung. Der Locus befindet sich auf der Bande p11.2 des Chromosoms 16, auf dem Minus-Strang, in einem proteincodierenden Genbereich mit offenem Leseraster, was für ein Transmembranprotein c16orf54 codiert. Lokalisiert sind diese Proteine in der Membran verschiedener Zellkompartimente. Die spezifische Funktion des Proteins in vivo ist bislang aber nicht bekannt, auch gibt es keinen nachgewiesenen Phänotyp (www.ncbi.nlm.nih.gov). Genexpressions-Untersuchungen an normalen - und Tumorgeweben zeigen eine hohe Expressionsrate in Blut und Nieren und nahezu keine Expression in anderen getesteten Geweben (<http://medical-genome.kribb.re>).

3.3.1.2 Konstruktion des Amplifikats

Das 344bp lange Blut1-Amplikon weist keine CpG-Inseln auf. Der durchschnittliche GC-Gehalt in der genomischen Sequenz des Amplikons liegt bei 63% (Tabelle 4). Es enthält zwei bekannte SNPs, die außerhalb von Primer-Bindungsstellen liegen. Zu den beiden SNPs gibt es keine Frequenz-Angaben. Im Verlauf der Arbeit wurde das Amplikon auf 176bp verkürzt, so dass die stark belasteten forensischen Proben durch kürzere Amplifikate effektiver amplifiziert werden konnten. Aus der Abbildung 10 wird ersichtlich, dass für die folgende SNUPE-Analyse zwei verschiedene CpG-Stellen verwendet werden.

```

TGGGTTGCTTTGGAACAAACACTCCCCAGGGGCAGACAGTTGGGGCACAGTTGCCAGCAACAGGCGGTGCCCTCCCTTCGCCTTCAT
CGAGGCCGGCCTCTACCTGTGAGAGGCGGACCCCTGCACCCCTCCAAGCCTGCACCTCTTAGTCCAGCACCAGGAAGAGTGGCTCTAG
GAGGGAGAGGAGCCCAGGGACTGACCCAA GTGAGTTGAGGGGTGCAGGAGGCCCCCTGCAGATGGAGGATGTGGGGACAGAGAGGTGTG
CAGAGACAAA CGAGAGATAGAGACAGGCCAGGCCTGGCAAAGCTGGGGAGCCCAGGAGGGGTGCAGAGG

```

Abbildung 10 Genomische Sequenz des Blut1-Locus. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die zwei bekannten SNPs grün, die Primer-Stellen sind grau unterlegt (forward-Primer dunkelgrau, reverse-Primer hellgrau), die beiden CpGs, deren Methylierung im SNUPE-Assay gemessen wird, sind rot markiert und die Bindungsstellen der beiden SNUPE-Primer sind unterstrichen.

3.3.1.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung

Die Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung (Abbildung 11) ermöglichen einen direkten Vergleich der Methylierung in den einzelnen Proben-Gruppen für den untersuchten Marker-Locus. Die beiden analytischen CpGs (cg68 und cg125), sowie die sechs übrigen untersuchten CpGs, sind in den Zellen des peripheren Blutes vollständig unmethyliert. Eine Unterscheidung des peripheren Blutes von den übrigen Körperflüssigkeiten Sperma, Speichel, Vaginalflüssigkeit und Menstrualblut sollte möglich sein.

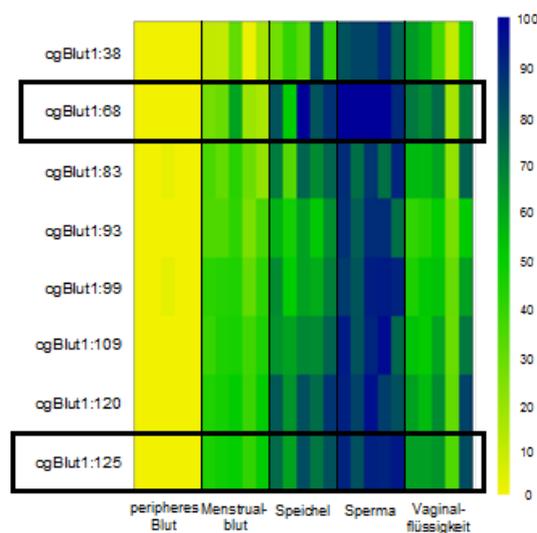


Abbildung 11 DNA-Methylierung im Blut1-Locus. Einbezogen sind fünf Proben von fünf Körperflüssigkeiten, wobei jede Spalte eine Probe darstellt. Die Zeilen repräsentieren die 8 analysierten CpGs innerhalb des Amplikons. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung) - entsprechend der Farbskala auf der rechten Seite. Die beiden analytischen CpGs sind durch schwarze Rechtecke umrandet.

3.3.1.4 Zielregion - SNuPE

Die Basenzusammensetzung der Bisulfit-konvertierten Blut1-Sequenz ist mit einem GC-Gehalt von 37% relativ unausgeglichen. Der hohe Anteil an A- und T-Basen verringert die Schmelztemperatur des Primers. Da der normale SNuPE-Primer keine CpGs innerhalb seiner Bindungsstelle enthalten darf, kamen beim Primerdesign für diesen Kandidaten nur diejenigen CpGs in Frage, die mindestens 25 bis 30 Basen voneinander entfernt lagen. Von drei konstruierten und getesteten SNuPE-Primern haben sich zwei als gleich gute Unterscheider gezeigt. Der erste Extension-Primer Blut1-1f detektiert in die Forward-Richtung (Abbildung 12), der zweite Primer Blut1-2r in reverse-Richtung (Abbildung 13).

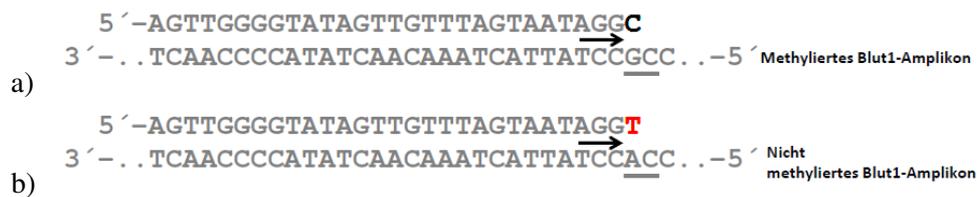


Abbildung 12 Die Reaktion des forward SNuPE-Primers Blut1-1f. Die Amplikonsequenz ist in 3'-5'-Richtung abgebildet. Da das Amplikon sich auf dem 1. Bisulfit-Strang befindet, wird das 3'-Ende des Forward-Primers entweder um ein C (schwarz, a) an der methylierten Sequenz oder um ein T (rot, b) an der nicht methylierten Amplikon-Sequenz verlängert.

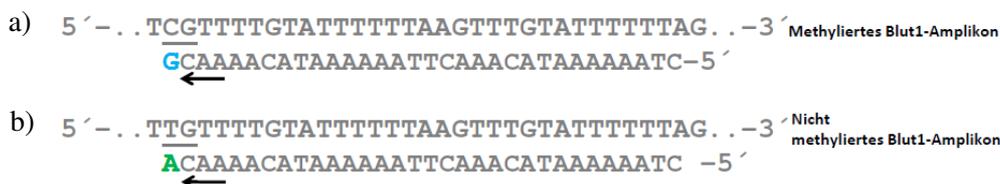


Abbildung 13 Die Reaktion des reversen SNuPE-Primers Blut1-2r. Die Amplikonsequenz ist in 5'-3'-Richtung abgebildet. Der Reverse-Primer wird an seinem 3'-Ende entweder um ein G (blau) an der methylierten Sequenz oder um ein A (grün) an der nicht methylierten Amplikon-Sequenz verlängert.

Die beiden SNuPE-Primer unterscheiden sich in ihrer Länge um 3 Basen (28 und 31 Basen). Daher kann bei dem Blut1-Assay die Detektion - als eine Diplex-Reaktion - mit zwei Primern gleichzeitig erfolgen und dementsprechend die Methylierung an zwei unterschiedlichen CG-Stellen gemessen werden. Die Signale beider Primer sind in der Abbildung 14 dargestellt.

Grundsätzlich hat die parallele Analyse von zwei unterschiedlichen CpGs den Vorteil, dass bei einem Ausfall des ersten Ziel-CpGs durch eventuelle Mutationen, das zweite CpG die Identifikation der Körperflüssigkeit gewährleistet.

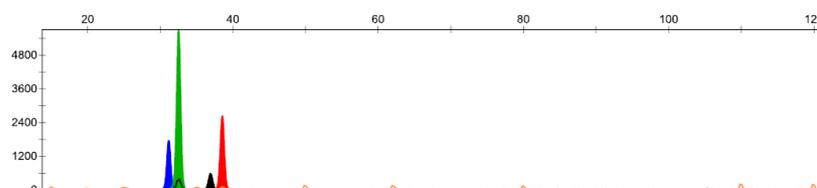


Abbildung 14 Gleichzeitige Detektion der Blut1-SNuPE-Primer 2r (blau-grün) und 1f (schwarz-rot); Abbildung eines Plot-Fensters nach der Datenauswertung mit GeneMapper ID 3.2.

3.3.1.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse

Die Detektion wurde als stabil eingestuft, wenn mit der eingesetzten Template-Menge in vier unabhängigen Analysen sowohl eine PCR-Bande im Agarosegel erzeugt wurde, als auch die Signale aus der entsprechenden Körperflüssigkeits-DNA korrekt detektiert wurden. Die Messreihen für Blut1 wurden mit der Zielflüssigkeit - peripheres Blut und zusätzlich mit Menstrualblut-DNA durchgeführt. Das Menstrualblut wurde analysiert, um Schwankungen der Methylierungswerte in einer Flüssigkeit zu vermessen, die in dem Blut1-Locus Methylierung zeigt. Das Blut ist normalerweise unmethyliert (0-3% Methylierung).

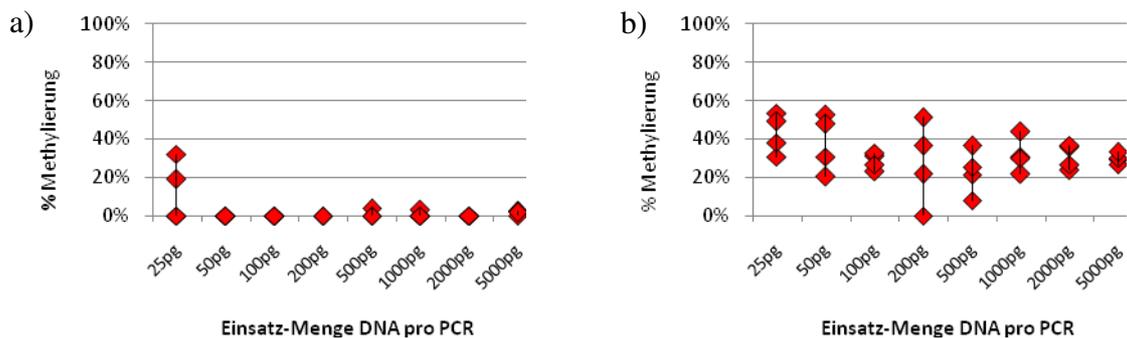


Abbildung 15 Marker Blut1-2r - Messung der Nachweisempfindlichkeit in jeweils vier unabhängigen Analysen von acht unterschiedlichen Konzentrationen der Blut-DNA (a) und Menstrualblut-DNA (b); die eingesetzten DNA-Mengen pro PCR sind auf der Abszisse aufgelistet.

In beiden Fällen - Messung von peripherem Blut und Menstrualblut - konnten die PCR-Amplifikate bereits beim Einsatz von 25pg DNA in die PCR erzeugt werden (Abbildung 15). Dabei ist die Streuung sehr hoch. Mit dem Einsatz von 50pg DNA und mehr verläuft die Detektion von peripherem Blut jedoch stabil.

3.3.1.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen

Bei den meisten Spuren muss man von einer Mischung verschiedener Körperflüssigkeiten ausgehen. Dabei kann es im Prinzip eine wechselseitige Beeinflussung der Methylierungswerte geben. Deswegen wurde für jeden Marker der jeweils zu erwartende Methylierungswert mit dem real gefundenen Messwert bei unterschiedlich großen Beimengungen der nicht spezifisch von dem Marker nachgewiesenen Körperflüssigkeiten verglichen.

Hierzu wurden DNA-Proben angesetzt, die 100%, 80%, 60%, 40%, 20% und 0% Blut-DNA enthielten. Der jeweils restliche Anteil der Proben enthielt ein Gemisch gleicher Konzentration (20ng/µl), bestehend aus der DNA der übrigen vier Flüssigkeiten.

Der errechnete Soll-Methylierungswert der Proben mit 0% peripherem Blut müsste 75% Methylierung zeigen, der Sollwert der reinen Blut-Probe 0% Methylierung. Die Soll-Werte der Proben, die 20, 40, 60 und 80% Blut-DNA enthielten, können dem Diagramm (Abbildung 16) entnommen werden.

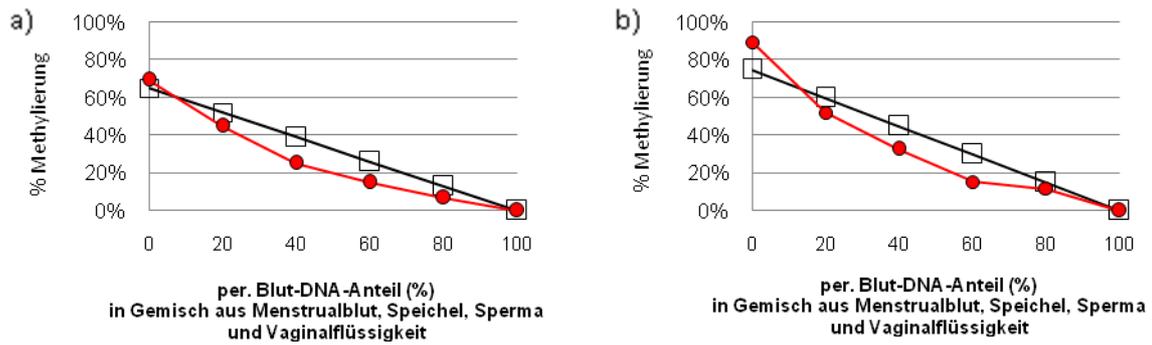


Abbildung 16 Marker Blut1 - Messung von peripherem Blut in einem Flüssigkeitsgemisch mit den Primern 1f (a) und 2r (b). Der Sollwert (schwarz) entspricht dem errechneten Methylierungswert, der sich aus den Werten der fünf Körperflüssigkeiten ergibt, und dem Anteil der Blut-DNA in der jeweiligen Mischprobe. Der Istwert (rot) entspricht dem tatsächlich detektierten Wert.

Die Methylierungswerte der beiden SNuPE-Primer 2r und 1f fallen in den 20-, 40-, 60- und 80%-Mischproben kleiner aus als errechnet. Grundsätzlich ist jedoch eine plausible lineare Abnahme der Methylierung zu beobachten. Bei 0% und 100% Blut-DNA in der Mischung stimmen bei dem 1f-Primer der Erwartungswert und der tatsächlich detektierte Wert überein. Bei dem 2r-Primer liegt bei der Messung von der Probe mit 0% Blut-DNA der detektierte Wert höher als der Sollwert. Insgesamt gesehen ist eine Beeinflussung des blutspezifischen Signals zu beobachten.

3.3.1.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte

In der ersten Validierungsrunde wurden jeweils 20 Proben (verschiedene Probanden) von fünf Körperflüssigkeiten - peripheres Blut, Menstrualblut, Vaginalflüssigkeit, Speichel und Sperma - vermessen. Damit sollte die maximale Streuung der Methylierungswerte aus den Körperflüssigkeiten, die in dem Locus Blut1 methyliert sind, bestimmt werden. Zudem konnte hiermit überprüft werden, ob eine andere Flüssigkeit, außer peripherem Blut, ein falsch positives Signal liefern kann. In der Abbildung 17 sind die Ergebnisse dieses Experimentes zusammengefasst.

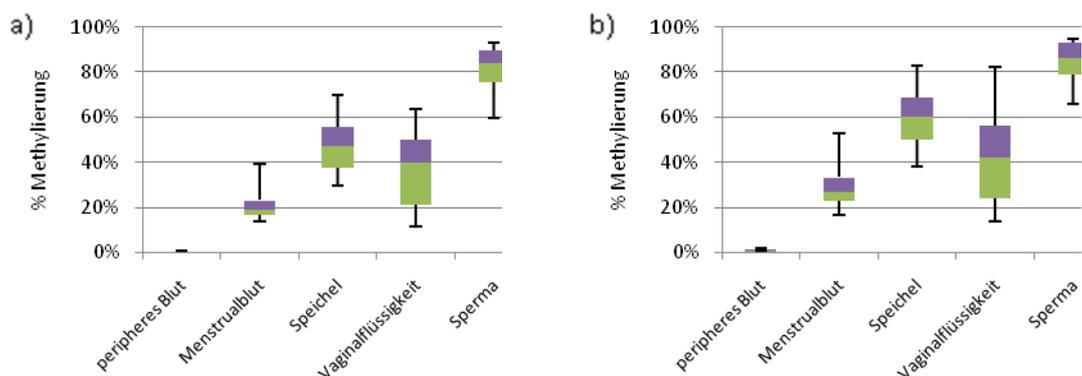


Abbildung 17 Marker Blut1 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungswerte in 20 DNA-Proben von 5 Körperflüssigkeiten, vermessen mit SNuPE-Primer 1f (a) und 2r (b).

3.3.1.8 Erweiterte Validierung

Für die weitergehende statistische Validierung der beiden Blut-Marker wurden zu den 20 Blut-Proben, die für die erste Validierungsrunde untersucht wurden, weitere 80 Proben von peripherem Blut herangezogen. Die Ergebnisse beider Validierungsexperimente wurden jeweils zusammengefasst. Abbildung 18 zeigt die Altersverteilung der Blut-Spender.

■ < 20 ■ 20-30 ■ 31-40 ■ 41-50 ■ > 50

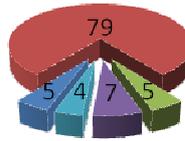


Abbildung 18 Alter der Probanden/innen für peripheres Blut, deren Proben in die Untersuchung der beiden Blut-Marker Blut1 und Blut2 einbezogen wurden; 49 männliche und 51 weibliche Personen (n=100).

Vier Proben sind bei der Untersuchung ausgefallen. Die Methylierungswerte des 2r-SNuPE-Primers zeigen eine schiefe Verteilung - die meisten Werte (40 von 96) weisen eine Methylierung von 1,0 bis 1,9 Prozent auf (Abbildung 19). Der durchschnittliche Methylierungswert für den 2r-Primer bei allen Blut-Proben liegt bei 1,3%. Der 1f-SNuPE-Primer ist in 90 von 96 Proben vollständig unmethyliert, wobei sein durchschnittlicher Methylierungswert 0,3% beträgt.

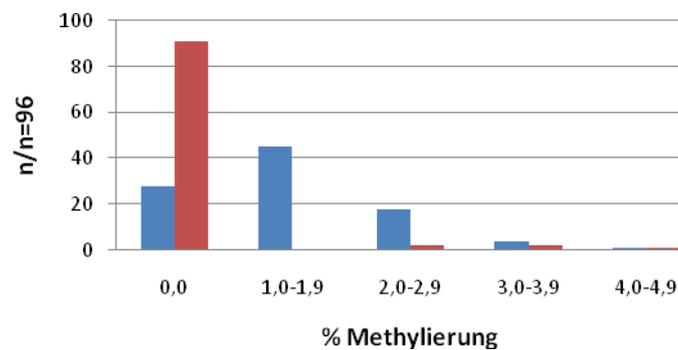


Abbildung 19 Marker Blut1 - Verteilung der Methylierungswerte von n= 96 Blut-Proben. Die Werte der beiden SNuPE-Primer 2r und 1f sind farblich unterschiedlich dargestellt. Die roten Balken zeigen die Ergebnisse des 1f-Primers und die blauen die des 2r-Primers. Auf der Abszisse sind die Werte-Gruppen angegeben, wobei die Einteilung in Gruppen in Abhängigkeit von der Gesamtheit der Werte, willkürlich gewählt ist. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Proben aufgezählt, deren Werte in die entsprechende Kategorie fallen.

Eine Alters- und Geschlechtsabhängigkeit war nicht zu beobachten.

3.3.1.9 Forensische Validierung

Forensische Spuren sind normalerweise diversen Umwelteinflüssen ausgesetzt. Um die Stabilität bzw. die Zuverlässigkeit eines Messsystems zu bestimmen, müssen diese äußeren Einflüsse in entsprechenden Kontrollexperimenten simuliert werden. Letztere sind in der vorliegenden Arbeit unter standardisierten, in der forensische Literatur beschriebenen Bedingungen durchgeführt worden (Setzer et al. 2008).

Es musste geprüft werden, ob die exogenen Einflüsse die Stabilität des Methylierungssignals bei der Zielflüssigkeit (hier peripheres Blut), aber auch bei den übrigen zur Diskussion stehenden Körperflüssigkeiten beeinträchtigen (Abbildung 20). Theoretisch könnte solch ein Einfluss dazu führen, dass sich die Methylierungssignale der Zielflüssigkeit denen der übrigen Körperflüssigkeiten annähern.

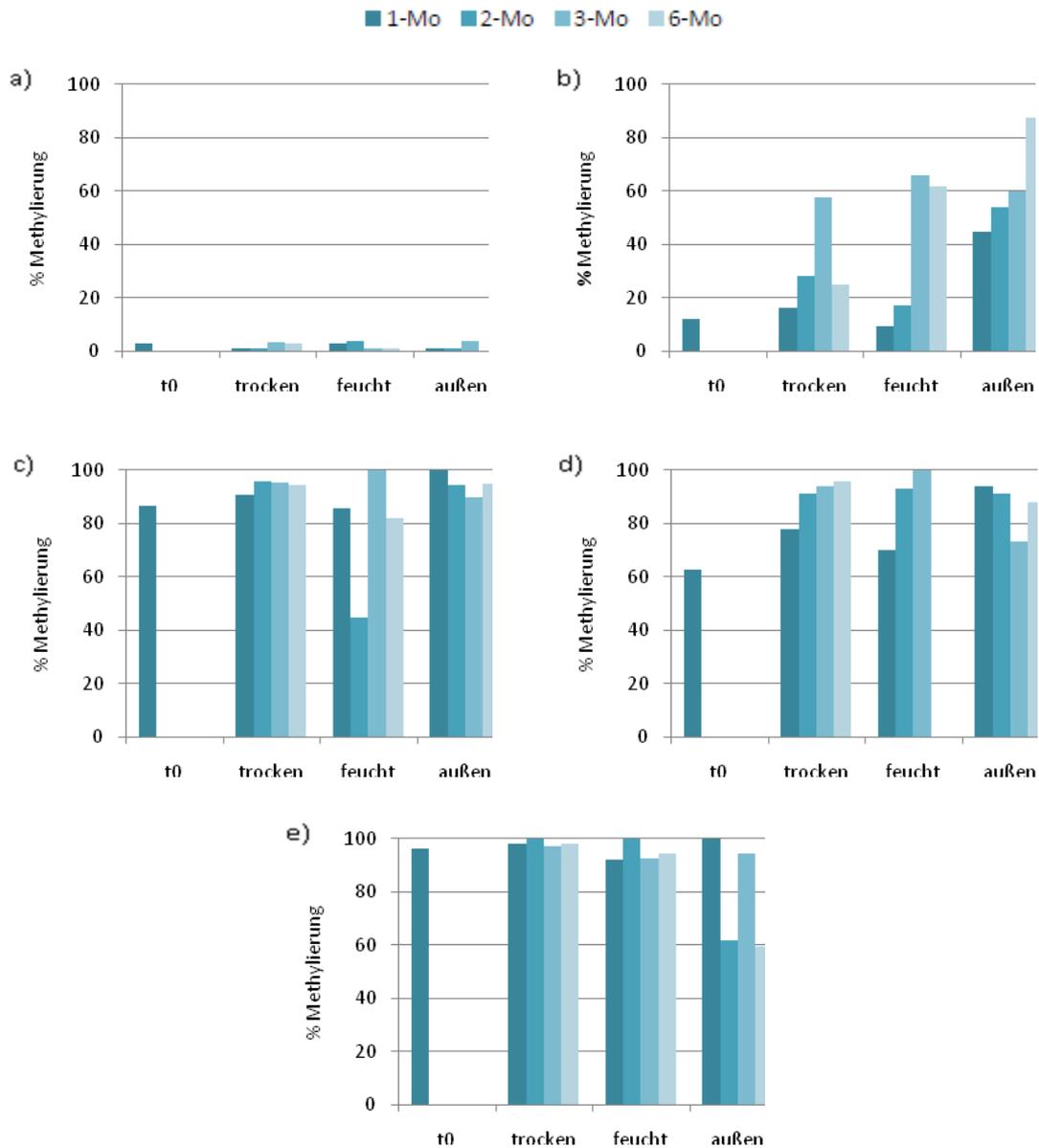


Abbildung 20 Marker Blut1-2r - Methylierungsergebnisse der simulierten forensischen Spuren, die unter trockenen und feuchten Bedingungen, sowie außen, gelagert wurden. Die Lagerungsdauer beträgt 1, 2, 3 und 6 Monate. Die Werte aus den verschiedenen Alterungszeitpunkten sind farblich differenziert (siehe Legende). Peripheres Blut (a), Menstrualblut (b), Vaginalsekret (c), Speichel (d) und Sperma (e). Der Ausgangsmethylierungswert der entsprechenden Flüssigkeit in dem Marker Blut1 ist als t0 vorangestellt.

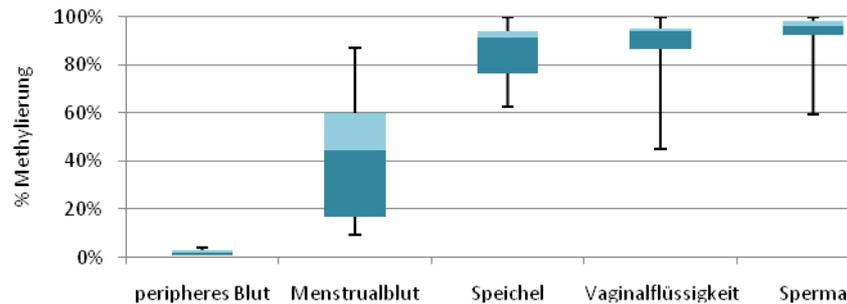


Abbildung 21 Marker *Blut1-2r* - Box-Plot zur Streuung der Methylierungs-Werte im Spurenalterungs-Experiment. Einbezogen sind alle Werte der entsprechenden Flüssigkeit aus dem gesamten Experiment.

Die Blut-Proben waren sowohl bei trockenen als auch feuchten Lagerung über 6 Mo stabil unmethyliert bei einer Schwankung der Methylierungswerte von 0 bis 3% (Abbildung 20a und Abbildung 21). Bei Außenlagerung entstehen mit der Zeit höhere Materialverluste, so dass einige 6 Monate alte Blut-Proben nicht amplifizierbar waren.

3.3.1.10 Next Generation Sequenzierung

Die erste NGS-Messreihe sollte dazu dienen, die tatsächliche Methylierung an den Ziel-CpGs der SNUPE-Primer zu präzisieren und damit die Messgenauigkeit der in der Arbeit angewendeten Methoden zu überprüfen. Das Diagramm in Abbildung 22 fasst die Ergebnisse zusammen.

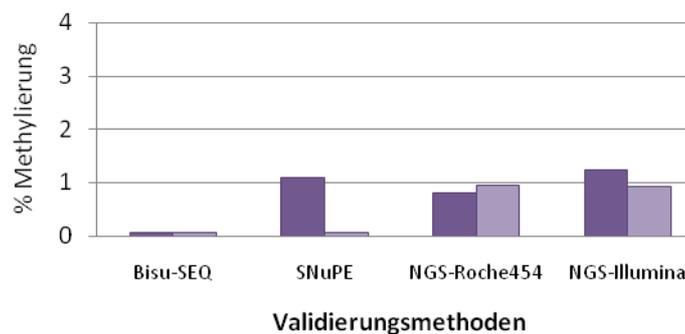


Abbildung 22 Marker *Blut1* - Gegenüberstellung der Methylierungsergebnisse von einer gleichen Blut-Probe aus vier verschiedenen Analysemethoden: Bisulfid-Sequenzierung, Single Nucleotide Primer Extension sowie Next Generation Sequencing mit Roche454 (2769 Reads) und Illumina MiSeq (47400 Reads). Die Werte des 2r-CpGs sind dunkelviolett, die Werte des 1f-CpGs hellviolett dargestellt.

Insgesamt gesehen zeigen diese Ergebnisse, dass die Messung der Methylierung per Primer-Extension empfindlicher ist als mit Hilfe der konventionellen Sequenzierung nach Sanger.

3.3.2 Methylierungs-Marker Blut-2

3.3.2.1 Die Genort-Eigenschaften

Tabelle 5 Die Genort-Beschreibung des Markers *Blut-2*

Marker	Chr	CpG-Insel	Gen Symbol	Genprodukt	Locus Architektur
Blut-2	16	Nein (47% GC) 7cg/232bp	RAB11FIP3	Rab11 Family Interacting Protein	5'UTR: RAB11FIP3

Der Marker Blut2 zeigt in dem peripheren Blut ein Methylierungssignal, in den übrigen relevanten Körperflüssigkeiten ist er unmethyliert. Der Locus befindet sich auf der Bande p13.3 des Chromosoms 16, auf dem Minus-Strang, in einem nicht klassifizierten und nicht codierenden regulatorischen Sequenzbereich, etwa 1000bp in 5'-Richtung entfernt von dem proteincodierenden Gen RAB11FIP. Das Rab11 Effektor Protein reguliert den Vesikeltransport aus dem endosomalen recycling Compartment in der Plasmamembran und ist an der Rezeptor-vermittelten Endozytose der Endosomen beteiligt. Außerdem agiert es als ein Regulator der Zellpolarität. In der Literatur wird das RAB11FIP auch als ein Onkogen beschrieben, dessen Überexpression bei einigen Brusttumor-Arten beobachtet wurde (Melchor et al. 2006). Ob zwischen dem Blut2-Locus und dem RAB11-Gen Zusammenhang besteht, ist fraglich. Jedenfalls befinden sich cis-aktive regulatorischen Elemente oft in weiter Entfernung von ihrem Zielgen, so dass der Blut2-Genort durchaus in einer Beziehung zu RAB11FIP stehen könnte.

3.3.2.2 Konstruktion des Amplifikats

Das 232bp lange Blut2-Amplikon enthält, wie auch Blut-1, keine CpG-Inseln. Der durchschnittliche GC-Gehalt in seiner genomischen Sequenz liegt bei 47% (Tabelle 5). In dem Fragment befinden sich drei SNPs. Ein SNP liegt in der Zielsequenz des 2r-SNuPE-Primers. Dieses SNP (rs73494349) wurde bislang nur in einer einzigen Arbeit an zwei untersuchten Genotypen einer afrikanischen Population beschrieben. Die Allele C und T sind für den Plusstrang angegeben, mit jeweils einer Häufigkeit von 0,5. Zu den beiden anderen SNPs gibt es keine Frequenz-Angaben.

Für die SNuPE-Analyse werden bei dem Blut2-Marker zwei verschiedene CpGs verwendet (Abbildung 23).

```

CATAATTTGTATCAGGGAAATGATGAACTTGTATTTTACACACCATGGGCACCAACACAAGATATGGTTTCGTAAGCAGCTTTGGCAAGA
ACCAAAGGAAcGGAACCTCTGCTTCCAAGTGTAcGTcAGcAGCAGcGTGTTAATTAAGTGAGTCATCTTCcGTGGCgGAATCCCAGGGTA
CATGGACCAGACTTcGcGAGGCTGGCATTAGGAAAAGGAATGTGAGGGA
  
```

Abbildung 23 Genomische Sequenz des Blut2-Locus. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die drei bekannten SNPs grün, die Primer-Stellen sind grau unterlegt (forward-Primer dunkelgrau, reverse-Primer hellgrau), die beiden Cytosine, deren Methylierung im SNuPE-Assay gemessen wird, sind rot markiert und die Bindungsstellen der beiden SNuPE-Primer sind unterstrichen.

3.3.2.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der Bisulfitierungssequenzierung einschließlich der beiden analytischen CpGs (cg102 und cg163). Das Menstrualblut ist in diesem Locus schwach methyliert, was durch den Anteil an peripherem Blut in Menstrualblut zustande kommt. Das Ziel-CpG (cg102) des f1-SNuPE-Primers zeigt das höchste Unterscheidungspotential.

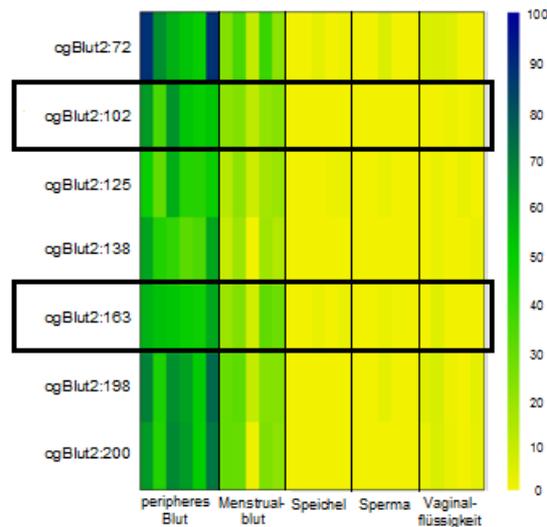


Abbildung 24 DNA-Methylierung im Blut2-Locus. Einbezogen sind fünf Proben von Menstrualblut, Speichel, Sperma und Vaginalflüssigkeit, sowie sechs Proben vom peripheren Blut. Jede Spalte stellt eine Probe dar. Die Zeilen repräsentieren die 7 analysierten CpGs innerhalb des Amplikons. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung) - entsprechend der Farbskala auf der rechten Seite. Die beiden analytischen CpGs sind durch schwarze Rechtecke umrandet.

3.3.2.4 Zielregion - SNUPE

Die Bisulfit-konvertierte Sequenz des Blut2-Markers besitzt einen GC-Gehalt von 30%, so dass auch in diesem Fall der hohe Anteil an A- und T-Basen die Schmelztemperaturen der Primer verringert. Dennoch konnten zwei SNUPE-Primer entworfen werden, die sich als gute Unterscheider gezeigt haben (siehe Abbildung 23). Der erste Extension-Primer Blut2-f1 detektiert in die Forward-Richtung (Abbildung 25), der zweite Primer Blut2-r2 in Reverse-Richtung (Abbildung 26). Auch hier kann die simultane Analyse von zwei unterschiedlichen CpGs zusätzliche Analysensicherheit bringen.

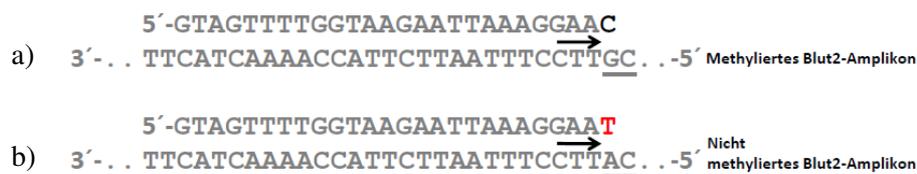


Abbildung 25 Die Reaktion des forward SNUPE-Primers Blut2-f1. Die Amplikonsequenz ist in 3'-5'-Richtung abgebildet. Da das Amplikon sich auf dem 1. Bisulfit-Strang befindet, wird das 3'-Ende des Forward-Primers entweder um ein C (schwarz, a) an der methylierten Sequenz oder um ein T (rot, b) an der nicht methylierten Amplikon-Sequenz verlängert.

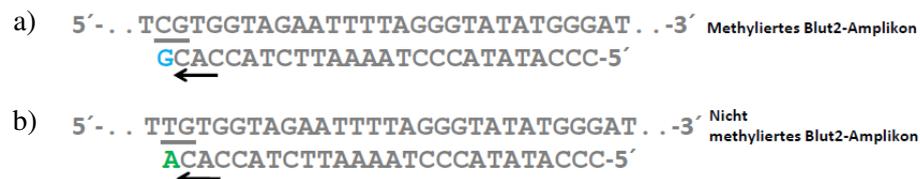


Abbildung 26 Die Reaktion des reversen SNUPE-Primers Blut2-r2. Die Amplikonsequenz ist in 5'-3'-Richtung abgebildet. Der r2-Primer wird an seinem 3'-Ende entweder um ein G (blau, a) an der methylierten Sequenz oder um ein A (grün, b) an der nicht methylierten Amplikon-Sequenz verlängert.

Die beiden Primer sind 25 und 26 Basen lang und können in einem Duplex-Ansatz gleichzeitig analysiert werden. Auf Grund der unterschiedlich großen Farbmarkierungen der eingebauten ddNTPs haben die blau-grün detektierenden Primer ein etwas anderes Laufverhalten in dem POP7-Polymer als die rot-schwarz detektierenden Primer. Deswegen ist der Abstand zwischen den beiden Primer-Signalen in der Abbildung 27 größer als eine Base.

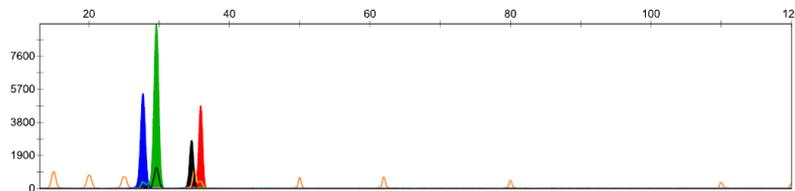


Abbildung 27 Gleichzeitige Detektion der Blut2-SNuPE-Primer r2 (blau-grün) und f1 (schwarz-rot); Abbildung eines Plot-Fensters nach der Datenauswertung mit GeneMapper ID 3.2.

3.3.2.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse

Für den Blut2-Marker wurde die Messreihe mit DNA aus peripherem Blut durchgeführt. In der Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Analyse-Wiederholungen für die beiden 1f- und 2r-Primer getrennt dargestellt.

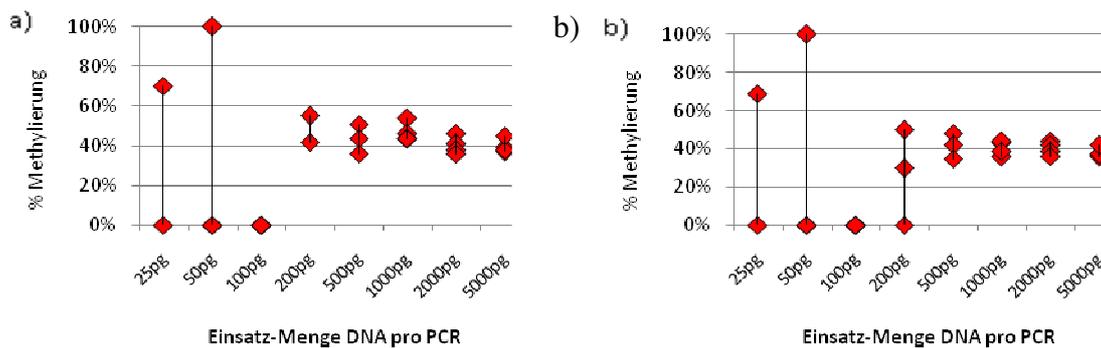


Abbildung 28 Marker Blut2 - Messung der Nachweisempfindlichkeit der SNuPE-Primer f1 (a) und r2 (b) in jeweils vier unabhängigen Analysen von acht unterschiedlichen Konzentrationen von Blut-DNA; die eingesetzten DNA-Mengen pro PCR sind auf der Abszisse aufgelistet.

Die PCR-Amplifikate konnten bereits beim Einsatz von 25pg DNA in die PCR erzeugt werden. Als stabil kann man die Analyse ab 500 pg DNA ansehen.

3.3.2.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen

Für den Marker Blut2 wurde dieselbe Probenreihe mit unterschiedlichen Blut-DNA-Anteilen verwendet, wie für den Marker Blut1. Der jeweils restliche Anteil der Proben enthielt einen gleich konzentrierten Gemisch (20ng/ μ l), bestehend aus der DNA von Vaginalflüssigkeit, Sperma und Speichel.

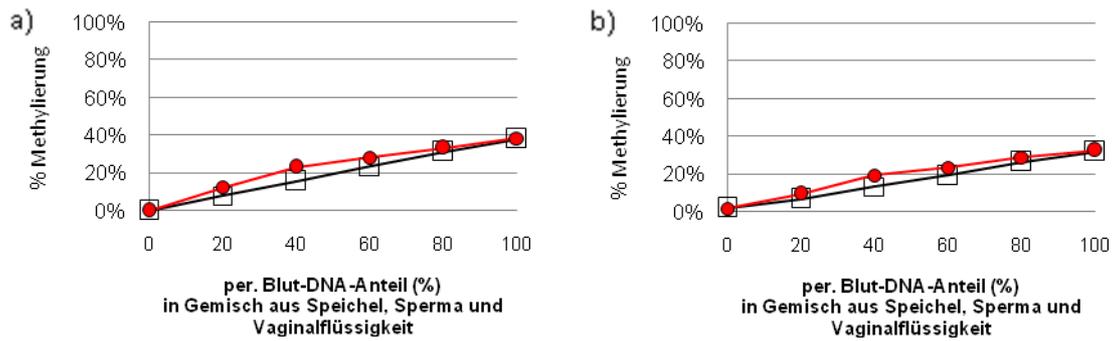


Abbildung 29 Marker Blut2 - Messung von peripherem Blut in einem Flüssigkeitsgemisch mit den Primern f1 (a) und r2 (b). Der Sollwert (schwarz) entspricht dem errechneten Methylierungswert, der sich aus den Werten der fünf Körperflüssigkeiten ergibt, und dem Anteil der Blut-DNA in der jeweiligen Mischprobe. Der Istwert (rot) entspricht dem tatsächlich detektierten Wert.

Die Abbildung 29 zeigt, dass die Erwartungswerte im Wesentlichen deckungsgleich mit den in den Mischungen gemessenen Werten sind. Eine wechselseitige Beeinflussung der verschiedenen Proben findet offenbar nicht statt.

3.3.2.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte

Für die Validierung des Blut2-Markers wurden in einer ersten Runde ebenfalls jeweils 20 verschiedene Proben von fünf Körperflüssigkeiten - peripheres Blut, Menstrualblut, Vaginalflüssigkeit, Speichel und Sperma - vermessen. In der Abbildung 30 sind die Ergebnisse dieses Experimentes zusammengefasst.

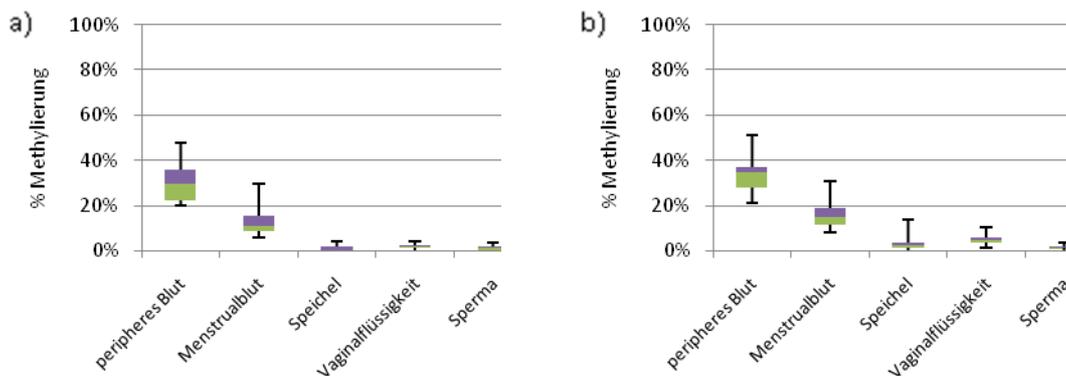


Abbildung 30 Marker Blut2 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungswerte in 20 DNA-Proben von 5 Körperflüssigkeiten, vermessen mit SNuPE-Primer f1 (a) und r2 (b).

Die Werte von Menstrualblut überschneiden sich geringfügig mit den Blutwerten. Die übrigen Flüssigkeiten sind gut zu unterscheiden. Der f1-Primer (Abbildung 30a) unterscheidet das periphere Blut eindeutiger von den übrigen Flüssigkeiten und ist vor allem für den Nachweis von Blut in Mischungen besser geeignet.

3.3.2.8 Erweiterte Validierung

Für die weitergehende statistische Validierung des Blut2-Markers wurden dieselben 80 Blutproben verwendet, die auch mit dem Blut1-Marker analysiert wurden. Die Altersverteilung der Blutspender ist in der Abbildung 18 im Kapitel 3.3.1.8 abgebildet. Die Blut2-Ergebnisse für peripheres Blut aus der ersten Validierungsrunde (vorhergehendes Kapitel 3.3.2.7) und dieser großen Validierung wurden im Folgenden zusammengefasst. Zwei Proben sind bei der Analyse ausgefallen.

In der Abbildung 31 sind die Ergebnisse dargestellt. Die Methylierungswerte beider SNUPE-Primer f1 und r2 zeigen eine relativ gute Normalverteilung. Die meisten Werte liegen zwischen 31 und 40 Prozent Methylierung. Der durchschnittliche Methylierungswert von beiden Primern beträgt 35% Methylierung. Die Streuung der f1-Werte reicht von 20 bis 50% Methylierung, bei dem r2-Primer sind es 19 bis 52% Methylierung. Insofern stimmen die Ergebnisse mit der kleineren Validierungsstudie überein.

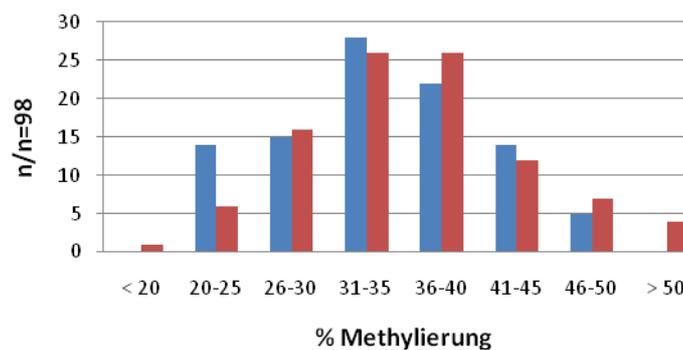


Abbildung 31 Marker Blut2 - Verteilung der Methylierungswerte von n= 98 Blut-Proben. Die Werte der beiden SNUPE-Primer f1 und r2 sind farblich unterschiedlich dargestellt. Die blauen Balken zeigen die Ergebnisse des f1-Primers und die roten die des r2-Primers. Auf der Abszisse sind die Werte-Gruppen angegeben, wobei die Einteilung in Gruppen in Abhängigkeit von der Gesamtheit der Werte, willkürlich gewählt ist. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Proben aufgezählt, deren Werte in die entsprechende Kategorie fallen.

Für die Ermittlung der Ausreißer wurde die zweifache Standardabweichung von dem Mittelwert als statistisches Maß verwendet. Demnach liegen alle Werte des f1-Primers innerhalb des Toleranzbereichs (21,4 bis 48,2%). Bei dem r2-Primer (Toleranzbereich 20,1 bis 50,5%) gibt es nach dieser Ausreißer-Definition 5 Werte, die außerhalb der Toleranzgrenzen liegen. Die Proben mit den extremen Messwerten wurden wiederholt analysiert und deren Werte sind bestätigt worden.

Es zeigte sich keine Alters- oder Geschlechtsabhängigkeit.

3.3.2.9 Forensische Validierung

Der Marker Blut2 wurde an dem gleichen Satz forensischer Proben getestet wie die übrigen Marker.

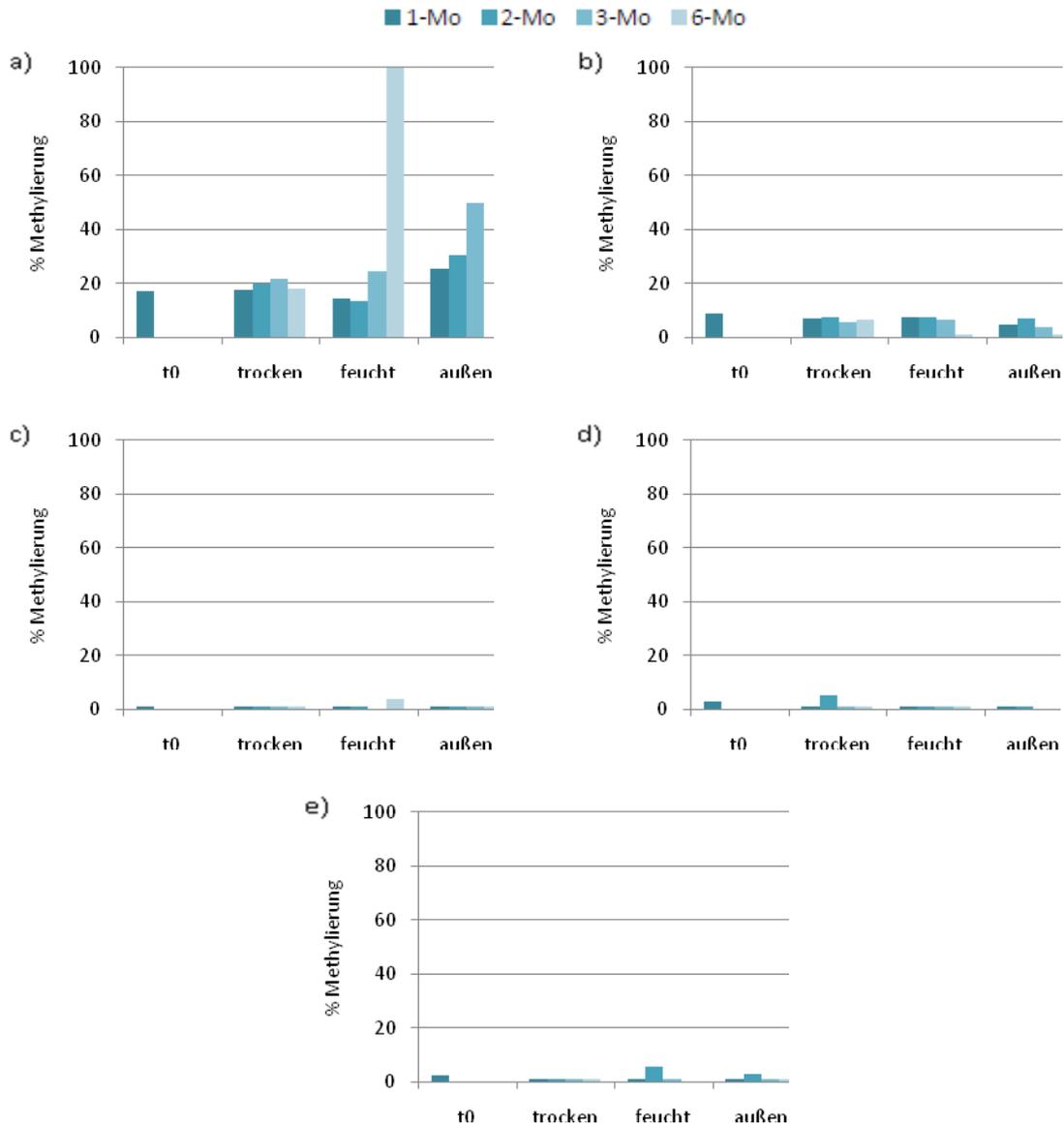


Abbildung 32 Marker Blut2-f1 - Methylierungsergebnisse der simulierten forensischen Spuren, die unter trockenen und feuchten Bedingungen, sowie außen, gelagert wurden. Die Lagerungsdauer beträgt 1, 2, 3 und 6 Monate. Die Werte aus den verschiedenen Alterungszeitpunkten sind farblich differenziert (siehe Legende). Peripheres Blut (a), Menstrualblut (b), Vaginalflüssigkeit (c), Speichel (d) und Sperma (e). Der Ausgangsmethylierungswert der entsprechenden Flüssigkeit in dem Marker Blut2 ist als t0 vorangestellt.

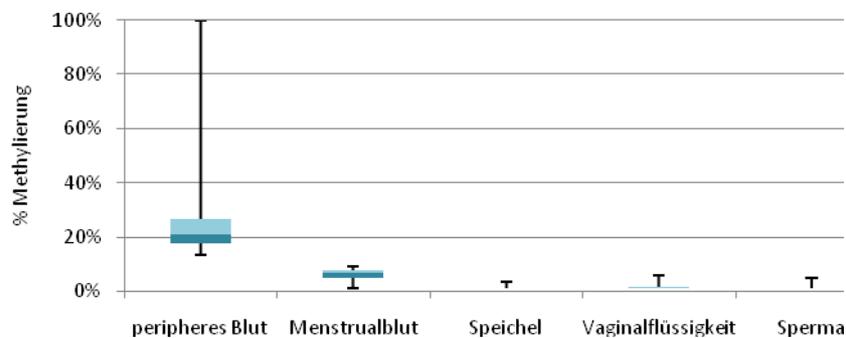


Abbildung 33 Marker Blut2-f1 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungs-Werte im Spurenerungs-Experiment. Einbezogen sind alle Werte der entsprechenden Flüssigkeit aus dem gesamten Experiment.

In der Abbildung 32 sind die Ergebnisse dieses Experimentes für den ersten SNUPE-Primer f1 dargestellt. Das Methylierungssignal der Blut-Probe ist mit 19% Methylierung zum Zeitpunkt Null relativ gering. Dieser Wert bleibt bei den Blut-Proben bei trockener Lagerung über 6 Mo nahezu unverändert. Die Blut-Proben, die außen gelagert wurden, zeigen ein stetig steigendes Methylierungssignal im Verlauf der Zeit. Eine 6-Monate alte Probe war nicht amplifizierbar – wahrscheinlich war durch mikrobiologische Einwirkung das Material zersetzt (Abbildung 32a).

3.3.2.10 Next Generation Sequenzierung

Die Ergebnisse aus dem ersten NGS-Experiment, das zur Überprüfung der Messgenauigkeit der in der Arbeit angewendeten Methoden dienen sollte, sind in der Abbildung 34 zusammengefasst. Die Werte der beiden im SNUPE-Assay verwendeten CG-Stellen (f1 und 2r) weisen in allen Messungen relativ vergleichbare Methylierungswerte auf.

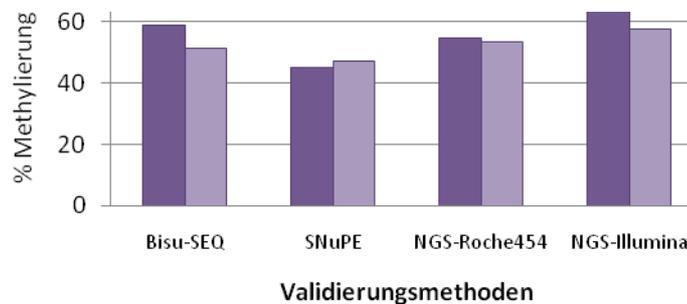


Abbildung 34 Marker Blut2 - Gegenüberstellung der Methylierungsergebnisse von einer gleichen Blut-Probe aus vier verschiedenen Analysemethoden: Bisulfit-Sequenzierung, Single Nucleotide Primer Extension sowie Next Generation Sequencing mit Roche454 (786 Reads) und Illumina MiSeq (7494 Reads). Die Werte des r2-CpGs sind dunkelviolett, die Werte des f1-CpGs hellviolett dargestellt.

3.4 Menstrualblut

Für den Nachweis von Menstrualblut wurden zwei Marker entwickelt. Die Ergebnisse des 2. Markers werden in dieser Arbeit nicht dargestellt.

3.4.1 Methylierungs-Marker Mens-1

3.4.1.1 Die Genort-Eigenschaften

Tabelle 6 Die Genort-Beschreibung des Markers Mens-1

Marker	Chr	CpG-Insel	Gen Symbol	Genprodukt	Locus Architektur
Mens-1	12	Ja (69% GC) 25cg/293bp	SLC26A10	Solute Carrier Family 26 Member 10 Pseudogene (Chloride/bicarbonate exchanger)	5'UTR: SLC26A10 in der Region von NMD

Der Marker Mens-1 ist in Menstrualblut und Endometrium methyliert. In übrigen relevanten Körperflüssigkeiten, einschließlich peripheren Bluts, ist er unmethyliert. Der Mens1-Locus

befindet sich auf dem Chromosom 12 und dem Plusstrang der Bande q13.3. Er verläuft mitten in einer genassozierten prozessierten Transcript-Sequenz - dem Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) - von dem proteincodierenden Gen SLC26A10. Das NMD ist ein Qualitäts-Kontrollmechanismus in eukaryotischen Zellen, der die Expression verkürzter Proteine verhindert in dem er vorzeitige (Nonsense) Stoppcodons in der mRNA erkennt und diese fehlerhaften Transkripte beseitigt (Chang et al. 2007). Das SLC26A10 codiert für ein Solute-Transportprotein und gehört zu der Genfamilie SLC26 (Solute carrier family). Das Transportprotein hat normalerweise eine zelluläre Funktion als multifunktionaler Anion-Austauscher für mono- und bivalente Anionen wie beispielsweise Chlorid und Bikarbonat. Das Mitglied A10 der SLC26-Familie ist aber vermutlich ein Pseudogen, da es kein offenes Leseraster zeigt. Viele von den anderen intakten Mitgliedern der Gen-Familie weisen eine gewebespezifische Genexpression auf (Mount & Romero 2004).

3.4.1.2 Konstruktion des Amplifikats

Das 293bp lange Mens1-Amplikon enthält nach den Angaben des CpG-Insel-Suchprogramms des europäischen Instituts für Bioinformatik (<http://www.ebi.ac.uk>) mindestens eine CpG-Insel am 5'-Ende des Fragments. Gemäß der Definition sind CpG-Inseln Regionen im Genom, die einen GC-Gehalt von mindestens 60% und eine statistisch erhöhte Dichte an CG-Dinukleotiden aufweisen. Sie finden sich am häufigsten innerhalb von Promotorbereichen im 5'-UTR vor den Genen (Beck 2003). Die Eigenschaften des Mens1-Locus entsprechen weitgehend diesen Angaben (siehe Tabelle 6).

In dem Mens1-Fragment befindet sich außerdem ein bekanntes SNP, zu dem es jedoch keine Frequenzangaben gibt. Für die SNUPE-Analyse werden zwei benachbarten CpGs in einem einzigen Detektions-System verwendet (Abbildung 35).

```
GACCAGGCTCAGGGAAGCTCTCACCGAGGCTCGGTTCATCAGCTTTCAGGGGCGAAGAGCAGGAACCGGAGCTACCTGAAGAGCGCGGC
TTTCCC CGGCTCTT CGGGCTGTGGAGGCTGCGGGCTCGCGCTTGTTCCGGGACAGGGGCGTGGGCGCTGCTGGCTGGCTGCCCGCGC
TGCACTGGCTGCCCATTAACCGCTGGCGGGCTGGCTGCTCGGAGATGCGGTGGCCGAGTGACCGTGGGATCGTGACGTGCCCCAGGG
TGAGAGGCCCTAACAGCAGC
```

Abbildung 35 Genomische Sequenz des Mens1-Locus. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, ein bekanntes SNP grün und die Primer-Stellen sind grau unterlegt (forward-Primer dunkelgrau, reverse-Primer hellgrau). Die beiden Cytosine, die im SNUPE-Assay für die Messung der Methylierung verwendet werden, sind rot markiert und die Bindungsstelle der beiden methylierungs- und nichtmethylierungsspezifischer SNUPE-Primer ist unterstrichen.

3.4.1.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitequenzierung

Die Farbenverteilung der Endometriumprobe in Abbildung 36 macht deutlich, dass der im Vergleich zu den übrigen Körperflüssigkeiten hohe Methylierungsgrad des Menstruationsblutes bei den gezeigten 21 CpGs von dem Anteil an Endometriumgewebe herrührt. In letzterem scheinen die CpGs 155-247 zu 100% methyliert zu sein. Die beiden für diese Arbeit ausgewählten analytischen CpGs cg155 und cg170 zeigen einen relativ hohen Grad an Methylierung und sind andererseits in den übrigen vier Flüssigkeiten vollständig unmethyliert (0%).

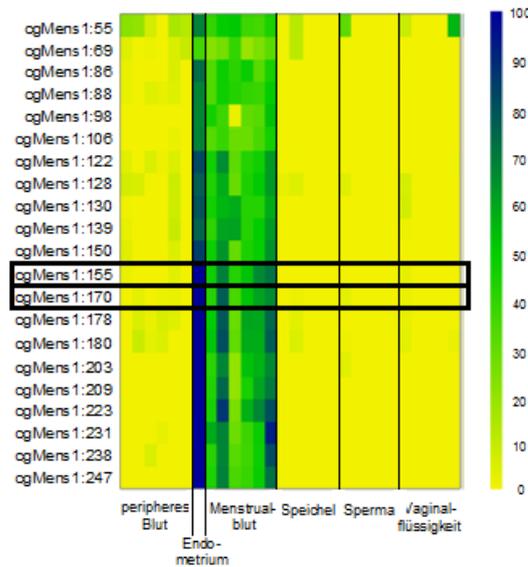


Abbildung 36 DNA-Methylierung im Mens1-Locus. Einbezogen sind sechs Proben vom peripheren Blut, eine Endometriumprobe, sechs Proben von Menstrualblut, sowie jeweils fünf Proben von Speichel, Sperma und Vaginalflüssigkeit. Jede Spalte stellt eine Probe dar. Die Zeilen repräsentieren die 21 analysierten CpGs innerhalb des Amplikons. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung) - entsprechend der Farbskala auf der rechten Seite. Die beiden analytischen CpGs sind durch schwarze Rechtecke umrandet.

3.4.1.4 Zielregion - SNUPE

Die Bisulfit-konvertierte Sequenz des Mens1-Markers besitzt einen GC-Gehalt von 46% und 25 CG-Dinukleotide. Auf Grund der hohen CpG-Dichte in dem Amplikon (siehe Abbildung 35) konnten keine konventionellen Extension-Primer entworfen werden. Die normalen Primer dürfen keine CpGs innerhalb der Bindungsstellen enthalten, damit sie unabhängig von dem Methylierungsstatus der Sequenz binden können. Daher wurden zwei Primer entwickelt, die jeweils an die methylierten oder die nicht methylierten Mens1-Amplifikate spezifisch binden. Dieses Konstruktions-Prinzip wurde bereits in dem Kapitel 2.2.5.4 ausführlich beschrieben. Die Lage der Fm- und Fnm-Primer ist in der Abbildung 37 dargestellt. Beide detektieren in die Forward-Richtung.

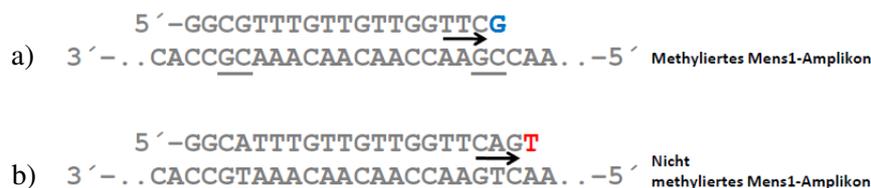


Abbildung 37 Die Reaktion der sequenzspezifischen SNUPE-Primer Mens1-Fm und Fnm. Das Amplikon befindet sich auf dem 1. Bisu-Strang. Die Amplikonsequenz ist in 3'-5'-Richtung abgebildet. Der methylierungsspezifische Fm-Primer (a) bindet nur an diejenigen Amplifikate, die an den beiden unterstrichenen Ziel-CpGs methyliert sind, und wird an seinem 3'-Ende um ein G (blau) verlängert. Der nicht-methylierungsspezifische Fnm-Primer (b), bindet dagegen an Amplifikate, die an den beiden CpGs nicht methyliert sind, und wird um ein T (rot) verlängert.

Der methylierungsspezifische Primer Fm (blaues Signal) besteht aus 19 und der nicht-methylierungsspezifische Primer Fnm (rotes Signal) aus 21 Basen, so dass beide Signale in einem

gewissen Abstand von einander detektiert werden (Abbildung 38). Unter der Voraussetzung, dass die Primer gleiche Bindungsaffinität zu ihrer Zielsequenz aufweisen, gibt das Verhältnis der beiden Primersignale zueinander, den Methylierungs-Status der Probe wieder (in der Abbildung 38: 75% Methylierung).

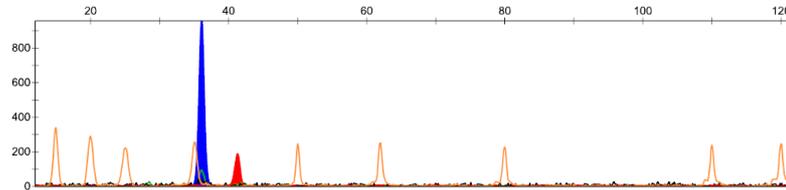


Abbildung 38 Detektion des Mens1-SNuPE-Primer-Systems. Der methylierungsspezifische Fm-Primer zeigt das blaue Signal und der nicht-methylierungsspezifische Fnm-Primer das rote Signal. Abbildung eines Plot-Fensters nach der Datenauswertung mit GeneMapper ID 3.2.

3.4.1.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse

In der Abbildung 39 werden die Ergebnisse der Sensitivitätsbestimmung gezeigt. Die Messung wurde mit Menstrualblut-DNA durchgeführt. Aus vier verschiedenen DNA-Extrakten wurden die angegebenen Mengen vermessen.

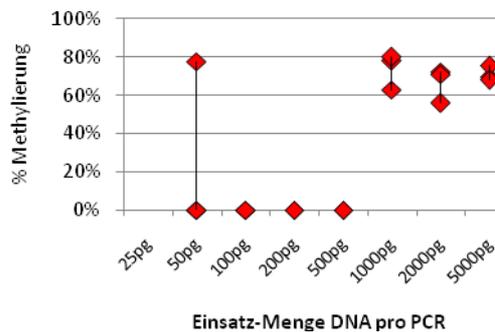


Abbildung 39 Marker Mens1 - Messung der Nachweisempfindlichkeit in jeweils vier unabhängigen Analysen von acht unterschiedlichen Konzentrationen von Menstrualblut-DNA; die eingesetzten DNA-Mengen pro PCR sind auf der Abszisse aufgelistet.

Stabile und reproduzierbare Messwerte werden ab 1000pg erreicht.

3.4.1.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen

Zur Bestimmung eventueller gegenseitiger Beeinflussung der verschiedenen Flüssigkeits-DNA wurde nach dem vorher beschriebenen Muster eine Mischungsanalyse vorgenommen (Abbildung 40).

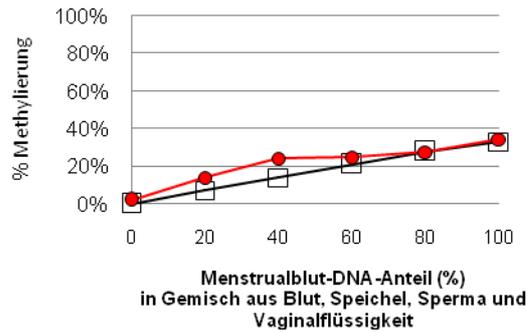


Abbildung 40 Marker Mens1 - Messung von Menstrualblut in einem Flüssigkeitsgemisch. Der Sollwert (schwarz) entspricht dem errechneten Methylierungswert, der sich aus den Werten der fünf Körperflüssigkeiten ergibt, und dem Anteil der Blut-DNA in der jeweiligen Mischprobe. Der Istwert (rot) entspricht dem tatsächlich detektierten Wert.

Die Messpunkte für die Methylierung der Menstrualblut-DNA verlaufen bei 20, 40 und 60% Anteil Menstrualblut-DNA in Mischung etwas höher als die Erwartungswerte. Das lässt nicht auf wechselseitige Beeinflussung der Flüssigkeiten schließen.

3.4.1.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte

Der Grad der Überlappung der einzelnen Wertegruppen ist in Abbildung 41 dargestellt.

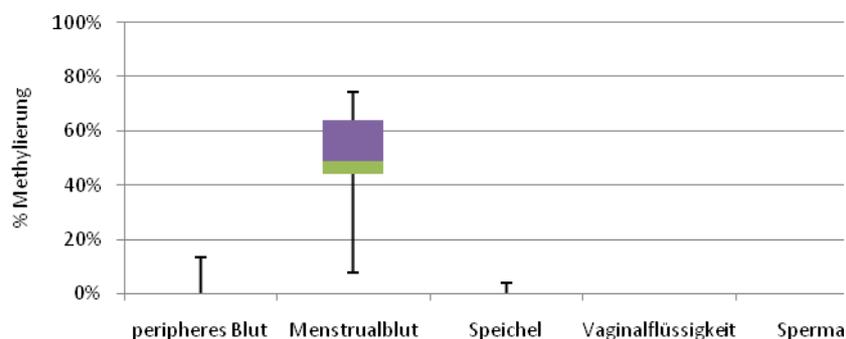


Abbildung 41 Marker Mens1 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungswerte in 20 DNA-Proben von 5 Körperflüssigkeiten, vermessen mit SNUPE-Primern F3m+F3nm.

Der durchschnittliche Methylierungsstatus der Menstrualblutproben beträgt 50,4%. Eine Blut-Probe hat ein Methylierungssignal von 13% und eine Speichelprobe 3% gezeigt. Die übrigen Proben vom peripheren Blut, Vaginalflüssigkeit, Speichel und Sperma sind 0% methyliert.

3.4.1.8 Erweiterte Validierung

Zur Analyse der Werteverteilung wurden 96 Proben von 60 Probandinnen untersucht.

Einige Probandinnen haben keine genauen Altersangaben gemacht (Abbildung 42).

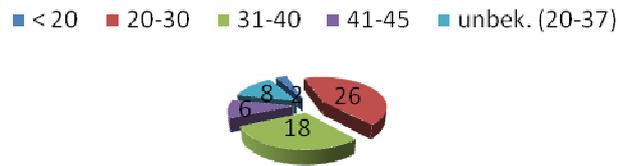


Abbildung 42 Alter der Probandinnen für Menstrualblut (n=60).

In das Diagramm der Abbildung 43 sind alle Proben, unabhängig vom Zyklustag aufgenommen worden. Damit sollte zunächst die forensische Realität abgebildet werden. Trotzdem handelt es sich offenbar annähernd um eine Normalverteilung. Der Mittelwert der Methylierung in der erweiterten Validierung beträgt 48%.

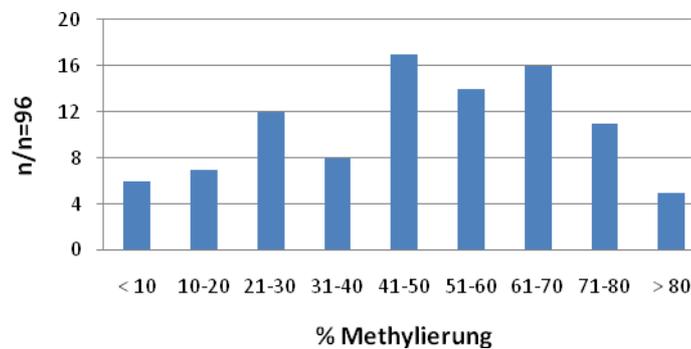


Abbildung 43 Marker Mens1 - Verteilung der Methylierungswerte von n= 96 Menstrualblut-Proben (60 Probandinnen). Auf der Abszisse sind die Werte-Gruppen angegeben, wobei die Einteilung in Gruppen in Abhängigkeit von der Gesamtheit der Werte, willkürlich gewählt ist. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Proben aufgezählt, deren Werte in die entsprechende Kategorie fallen.

Von 10 Personen wurden jeweils an Tag 1 bis zum letzten Blutungstag Proben genommen. Der letzte Blutungstag war abhängig von dem Zyklus der jeweiligen Probandin Tag 3 bis 6. Daraus ergaben sich 46 Werte.

In der Abbildung 44 sind alle 96 Messwerte nach den Blutungstagen aufgeteilt.

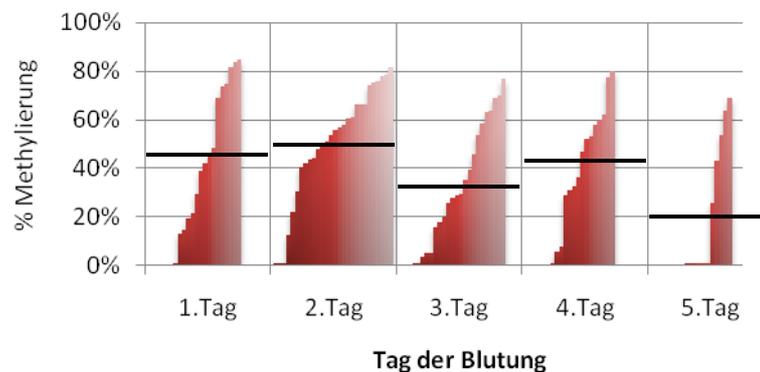
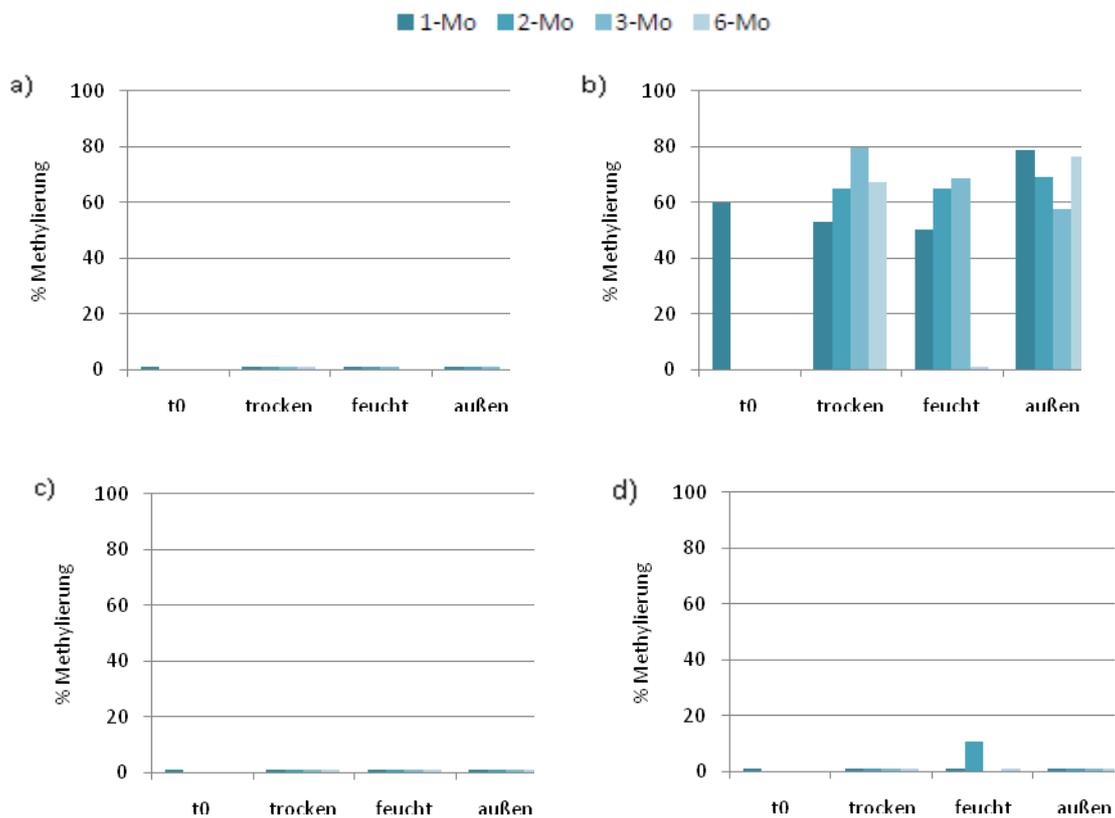


Abbildung 44 Marker Mens1 - Methylierungswerte im Verlauf der Blutungstage. Die Datenpunkte der Blutungstage 1. bis 5. sind in Form von einzelnen Säulen dargestellt; 16 Werte für 1.Tag, 28 Werte für 2.Tag, 22 Werte für 3.Tag, 15 Werte für 4. Tag und 11 Werte für 5.Tag. Die Methylierungswerte sind in den fünf Blutungstag-Gruppen von Minimalwert zum Maximalwert sortiert angeordnet. Die horizontalen Linien kennzeichnen den Mittelwert der Methylierungswerte.

Die Anzahl der Werte für die einzelnen Blutungstage sind unterschiedlich, weil von weitaus den meisten Probandinnen nur eine Probe genommen wurde. Bei der Mehrzahl der Probandinnen war Tag 2 der Tag der stärksten Blutung, an dem dann auch die Probe genommen wurde. Demgegenüber wird der Tag 5 bei den meisten Probandinnen gar nicht mehr als Blutungstag wahrgenommen, entsprechend geringer ist die Zahl der erhaltenen Werte. Bei den extrem niedrigen Methylierungswerten (n=12) handelt es sich in den meisten Fällen mit höchster Wahrscheinlichkeit um Artefakte, die durch die Art der Probennahme zu erklären sind: Der Marker ist ein differenziell methyliertes CpG im Endometrium.

3.4.1.9 Forensische Validierung

Auch die Menstrualblutproben sind den in Kapitel 2.2.9.4 beschriebenen simulierten und standardisierten, forensischen Einflüssen unterworfen worden.



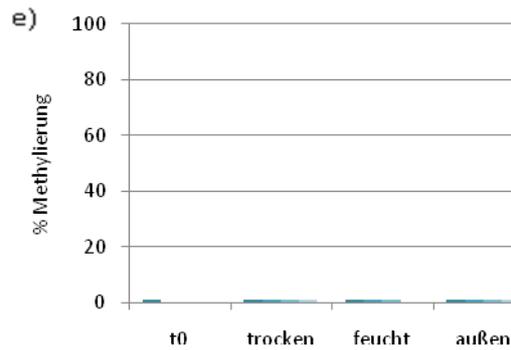


Abbildung 45 Marker Mens1 - Methylierungsergebnisse der simulierten forensischen Spuren, die unter trockenen und feuchten Bedingungen, sowie außen, gelagert wurden. Die Lagerungsdauer beträgt 1, 2, 3 und 6 Monate. Die Werte aus den verschiedenen Alterungszeitpunkten sind farblich differenziert (siehe Legende). Peripheres Blut (a), Menstrualblut (b), Vaginalflüssigkeit (c), Speichel (d) und Sperma (e). Der Ausgangsmethylierungswert von Marker Mens1 ist als t0 gekennzeichnet.

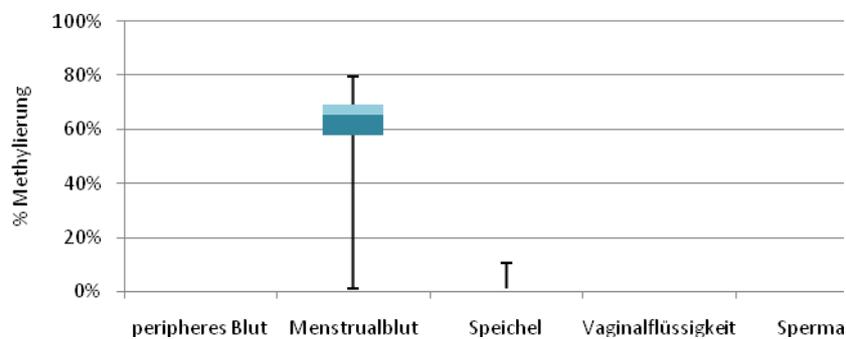


Abbildung 46 Marker Mens1 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungs-Werte im Spurenalterungs-Experiment. Einbezogen sind alle Werte der entsprechenden Flüssigkeit aus dem gesamten Experiment.

Die Methylierungswerte des Markers bleiben unter den hier untersuchten forensischen Bedingungen in der Zielflüssigkeit Menstrualblut weitgehend stabil. Bei einer Menstrualblut-Probe, die 6 Monate feucht gelagert wurde, ist das Methylierungssignal ausgefallen (Abbildung 45b). In den übrigen Körperflüssigkeiten bleiben die Methylierungswerte beim Ausgangswert t0. Die einzige Ausnahme stellt dabei der Methylierungswert einer Speichel-Probe - 2 Monate feucht gelagert - dar (Abbildung 45d).

3.4.1.10 Next Generation Sequenzierung

In welchem Maß die SNuPE-Nachweismethode die tatsächliche Methylierungssituation einer gegebenen Menstrualblutprobe widerspiegelt, ist per NGS geprüft worden.

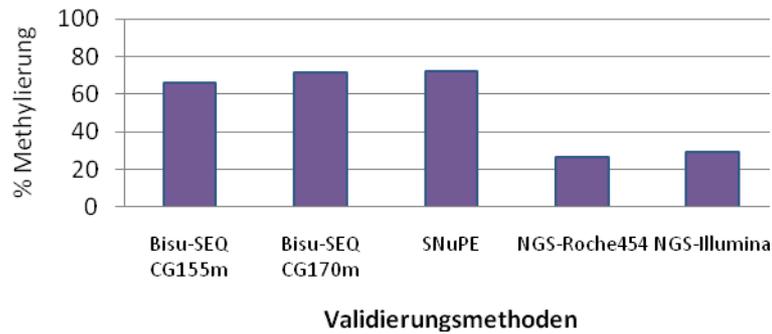


Abbildung 47 Marker Mens1 - Gegenüberstellung der Methylierungsergebnisse von einer gleichen Menstrualblut-Probe aus vier verschiedenen Analysemethoden: Bisulfit-Sequenzierung, Single Nucleotide Primer Extension sowie Next Generation Sequencing mit Roche454 (977 Reads) und Illumina MiSeq (4404 Reads). Bei der Bisulfit-Sequenzierung gab es für die beiden Positionen CG155 und CG170 zwei separate Werte; sie sind getrennt dargestellt. Bei den Ergebnissen der beiden NGS-Experimente sind die Werte nur von denjenigen Sequenzen gezeigt, die in den beiden Ziel-CpGs CG155 und CG170 methyliert sind.

Der Marker Mens1 funktioniert nach dem im Kapitel 2.2.5.4 beschriebenen Detektionsprinzip. Der methylierungsspezifische SNUPE-Primer bindet an das Amplifikat nur wenn beide CG-Positionen - 155 und 170 - methyliert sind. Der nicht-methylierungsspezifische Primer bindet nur an diejenigen Sequenzen, die an beiden Stellen nicht methyliert sind. Die Probe (Abbildung 47) zeigt in beiden NGS-Experimenten (Roche-454 und Illumina MiSeq) 7% Sequenzen mit methyliertem CG155 und nicht-methyliertem CG170 und 1% Sequenzen mit nicht-methyliertem CG155 und methyliertem CG170. Der Anteil der Sequenzen, die an beiden Stellen methyliert sind, beträgt bei Roche-454 27% und bei Illumina MiSeq 29%.

3.5 Speichel

Für den Nachweis von Speichel wurden zwei Marker entwickelt. Beide Marker detektieren Speichel durch die Anwesenheit eines Methylierungssignals. Der erste Marker Spei-1 unterscheidet Speichel von allen übrigen Körperflüssigkeiten. Der zweite Marker Spei-2 unterscheidet Speichel von Vaginalflüssigkeit.

3.5.1 Methylierungs-Marker Spei-1

3.5.1.1 Die Genort-Eigenschaften

Tabelle 7 Die Genort-Beschreibung des Markers Spei1

Marker	Chr	CpG-Insel	Gen Symbol	Genprodukt	Locus Architektur
Spei-1	2	Nein (58% GC) 13cg/211bp	SOX11	Transkriptions-Faktor Sox11	332500bp-5'UTR: SOX11

Der Marker Spei-1 zeigt im Speichel ein Methylierungssignal. In übrigen getesteten Geweben wie peripheres Blut, Menstrualblut, Sperma, Vaginalflüssigkeit, Urin und Haut ist er vollständig unmethyliert. Der Spei1-Locus befindet sich auf dem Minusstrang, auf der letzten Bande p25.2 des

2. Chromosoms. In diesem Bereich verläuft eine unklassifizierte und nicht codierende regulatorische Sequenz, die einen erhöhten GC-Gehalt und einen Zinkfinger-Motif aufweist. Das nächste proteincodierende Gen SOX11 liegt 332500bp in 3'-Richtung von dem Locus entfernt. Das Gen gehört zu den SRY (sex determining region of Y)-box verwandten Genen. Die Sox-Proteine enthalten, wie auch SRY, eine DNA-bindende HMG-box-Domäne, die bei vielen Säugern stark konserviert ist (Jay et al. 1995). Der Transkriptionsfaktor SOX11 spielt vor allem in der frühen embryonalen Entwicklung des zentralen Nervensystems eine Rolle und wird in unreifen Neuronen, normalerweise jedoch nicht in allen anderen erwachsenen Geweben, exprimiert. Somit sollte erwartungsgemäß die Promotorregion dieses Gens in allen erwachsenen Geweben methyliert sein. Ausschlaggebend für die Expression des Gens scheint jedoch nur die unmittelbar an Promotor anschließende CpG-Insel zu sein. Da der Spei1-Locus jedoch über 3 Millionen Basen von SOX11 entfernt liegt, ist es unwahrscheinlich, dass er einen unmittelbaren Bezug zu der Regulation des Gens hat.

Die Expression des SOX11-Gens im erwachsenen Organismus wird mit der Progression von diversen Tumoren in Verbindung gebracht. Die Hochregulation des SOX11-Gens wird daher häufig zu diagnostischen Zwecken für verschiedene Tumoren verwendet. Beispielsweise werden hohe Konzentrationen des Sox11-Proteins bei der konventionellen Form der Mastzellenleukämie (cMCL) nachgewiesen, bei der milden Form - mit einer besseren Überlebensrate, jedoch nicht (Fernández et al. 2010). Auch bei der Entwicklung von malignen Hautmelanomen, Lungencarcinom, bestimmten Brust- und Ovarialcarcinom-Arten scheint SOX11 involviert zu sein.

3.4.1.2 Konstruktion des Amplifikats

Das 211bp lange Spei1-Amplikon enthält keine CpG-Inseln. Der durchschnittliche GC-Gehalt in seiner genomischen Sequenz liegt bei 58% (Tabelle 7). Auf dem Plus-Strang befinden sich zwei SNPs. Das Erste (rs17356301) weist die Allele A und G auf, wobei das A das Wildtyp-Allel ist. Dieses SNP wurde bei 980 Individuen aus Europa, Asien und Afrika getestet. Die meisten Europäer und alle Asiaten besitzen das homozygote A-Allel, die Frequenz von A/G-Heterozygoten liegt je nach Population zwischen 0,033 und 0,333. Das zweite SNP (rs1722379) liegt in der Zielsequenz des Reverse-Primers (Abbildung 48). Zu der Frequenz dieses SNPs gibt es jedoch keine Angaben.

Für die SNUPE-Analyse werden zwei benachbarten CpGs in einem einzigen Detektions-System verwendet.

```

CTACAGAGATAAGTATGAATGTGAGGCGATTTAAACGTGTCTCCAGCGCAGGGTAGGAAATCACTTCCTTCTTTCACAAAGCTCAAGTC
CAAAACTGCCCGTGTTCAGTCCACCAGGGGGCGCTGCCTCACCGAAAAGGGGAGGGCGGTGGCTCCCATCACTTGACTGACCGCCAGCCCAA
TGGAAGGCGTGGGCCAGGCCACCAGAG

```

Abbildung 48 Genomische Sequenz des Spei1-Locus. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, zwei bekannte SNPs grün und die Primer-Stellen sind grau unterlegt (forward-Primer dunkelgrau, reverse-Primer hellgrau). Die beiden Cytosine, die im SNUPE-Assay für die Messung der Methylierung verwendet werden, sind rot markiert und die Bindungsstelle der beiden methylierungs- und nichtmethylierungsspezifischer SNUPE-Primer ist unterstrichen.

3.5.1.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung

Das Amplikon Spei1 enthält 10 CpGs, die in der Bisulfitsequenzierung auf ihren Methylierungsgrad hin untersucht wurden. Die größte Unterscheidungskraft zwischen Speichel und den übrigen Flüssigkeiten zeigt in dieser Untersuchung das cg49 und cg82 (Abbildung 49). Für die SNUPE-Analyse werden allerdings cg82 und cg88 verwendet. Dies hat einen Grund. Das CpG 49 wurde vorher ebenfalls per SNUPE untersucht. Anders als in der Bisulfit-Sequenzierung zeigte das CpG 49 hier Methylierungssignale nicht nur in Speichel, sondern auch in Vaginalflüssigkeit und Sperma. Daher erschien das CpG 49 für ein SNUPE-Assay als ungeeignet.

Der Farbskala ist zu entnehmen, dass diese beiden Marker Speichel von den 4 übrigen Körperflüssigkeiten unterscheiden.

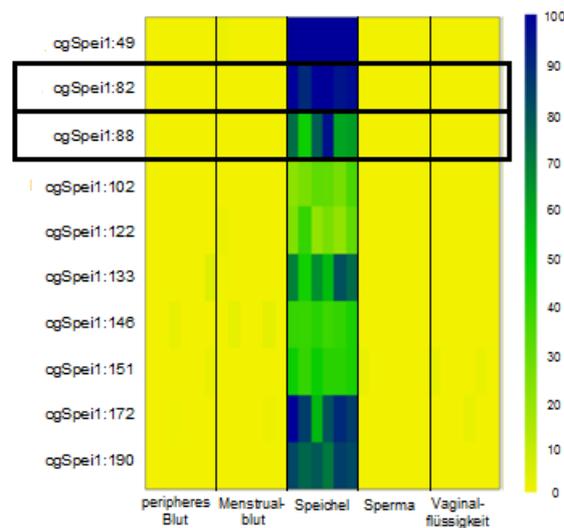


Abbildung 49 DNA-Methylierung im Spei1-Locus. Einbezogen sind jeweils sechs Proben vom peripheren Blut, Menstrualblut, Speichel, Sperma und Vaginalflüssigkeit. Jede Spalte stellt eine Probe dar. Die Zeilen repräsentieren die 10 analysierten CpGs innerhalb des Amplikons. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbverlauf im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung) - entsprechend der Farbskala auf der rechten Seite. Die beiden analytischen CpGs sind durch schwarze Rechtecke umrandet.

3.5.1.4 Zielregion - SNUPE

Die Bisulfit-konvertierte Sequenz des Spei1-Markers besitzt einen GC-Gehalt von 36% und 13 CG-Dinukleotide. Aus den Ergebnissen der Bisulfit-Sequenzierung wird deutlich, dass die größten Unterschiede im Methylierungsstatus am 5'-Ende des Amplikons vorliegen (in der Abbildung 49 oben). Um die Ziel-CpGs zu messen, wurde das bereits beim Men1-Marker (Kapitel 3.4.1.4 und 2.2.5.4) beschriebene Detektionssystem mit zwei sequenzspezifischen Primer entwickelt. Diese binden spezifisch an die methylierten oder die nicht methylierten Spei1-Amplifikate und detektieren in Forward-Richtung. Die Lage der Fm- und Fnm-Primer ist in der Abbildung 50 dargestellt.

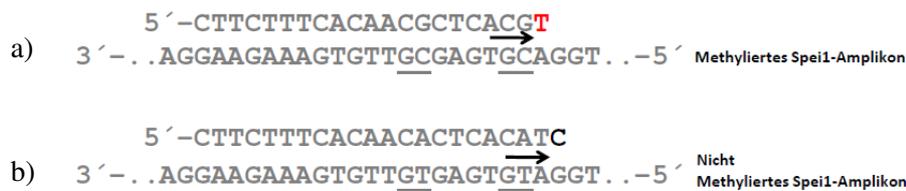


Abbildung 50 Die Reaktion der sequenzspezifischen SNUPE-Primer Spei1-Fm und Fnm. Das Amplikon befindet sich auf dem 2. Bisu-Strang. Die Amplikonsequenz ist in 3'-5'-Richtung abgebildet. Der methylierungsspezifische Fm-Primer (a) bindet nur an diejenigen Amplifikate, die an den beiden unterstrichenen Ziel-CpGs methyliert sind, und wird an seinem 3'-Ende um ein T (rot) verlängert. Der nicht-methylierungsspezifische Fnm-Primer (b), bindet dagegen an Amplifikate, die an den beiden CpGs nicht methyliert sind, und wird um ein C (schwarz) verlängert.

Der Fm-Primer besteht aus 20 und der Fnm-Primer aus 21 Basen. Auf Grund der etwas größeren roten Fluoreszenzgruppe der ddNTPs, erscheint das rote Signal des Fm-Primers größer als das schwarze Signal des Fnm-Primers (Abbildung 51). Unter der Voraussetzung, dass die Primer gleiche Bindungsaffinität zu ihrer Zielsequenz aufweisen, gibt das Verhältnis der beiden Primersignale zueinander, den Methylierungs-Status der Probe wieder. In Abbildung 51 sind es 68% Methylierung.

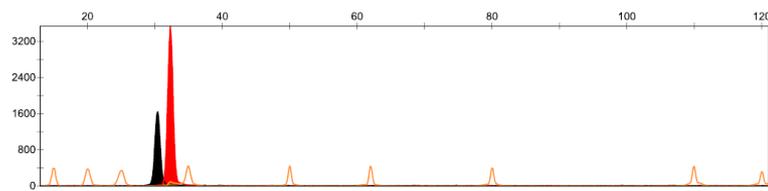


Abbildung 51 Detektion des Spei1-SNUPE-Primer-Systems. Der methylierungsspezifische Fm-Primer zeigt das rote Signal und der nicht-methylierungsspezifische Fnm-Primer das schwarze Signal. Abbildung eines Plot-Fensters nach der Datenauswertung mit GeneMapper ID 3.2.

3.5.1.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse

Die Nachweisempfindlichkeit des Systems ist in Abbildung 52 dargestellt. Für den Spei1-Marker wurde die Messreihe mit Speichel-DNA durchgeführt. Stabile Signale ergeben sich ab 200 pg eingesetzter DNA.

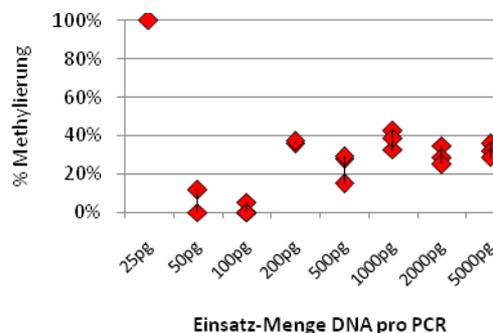


Abbildung 52 Marker Spei1 - Messung der Nachweisempfindlichkeit in jeweils drei unabhängigen Analysen von acht unterschiedlichen Konzentrationen von Speichel-DNA; die eingesetzten DNA-Mengen pro PCR sind auf der Abszisse aufgelistet.

3.5.1.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen

Auch dieser Marker wurde in Mischungen aus Zielflüssigkeit und den übrigen Körperflüssigkeiten überprüft. Dazu wurden DNA-Proben eingesetzt, die 100%, 80%, 60%, 40%, 20% und 0% Speichel-DNA enthielten. Der jeweils restliche Anteil der Proben bestand aus einer gleich konzentrierten (20ng/μl) DNA-Mischung der übrigen 4 Flüssigkeiten. Die Abbildung 53 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung.

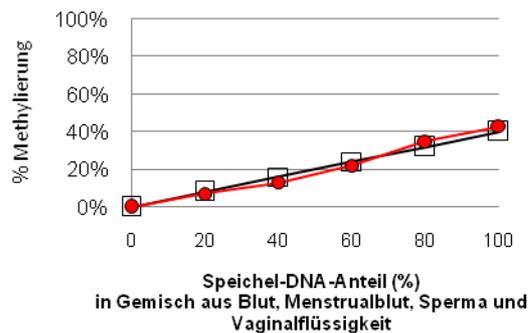


Abbildung 53 Marker Speil - Messung von Speichel in einem Flüssigkeitsgemisch. Der Sollwert (schwarz) entspricht dem errechneten Methylierungswert, der sich aus den Werten der fünf Körperflüssigkeiten ergibt, und dem Anteil der Blut-DNA in der jeweiligen Mischprobe. Der Istwert (rot) entspricht dem tatsächlich detektierten Wert.

Die Messpunkte für die Methylierung der Speichel-DNA verlaufen fast parallel zu den Erwartungswerten. Bei 0% Speichel-DNA in der Mischung entspricht der Erwartungswert dem tatsächlich gemessenen Wert (0% Methylierung), so dass keine nennenswerte Beeinflussung des speichelspezifischen Signals durch andere Flüssigkeiten stattfinden kann.

3.5.1.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte

Die Zuverlässigkeit der Differenzierung zwischen Speichel und den übrigen 4 Flüssigkeiten wurde in einer ersten Validierungsrunde mit jeweils 20 Proben von jeder der 5 Flüssigkeiten untersucht (Abbildung 54).

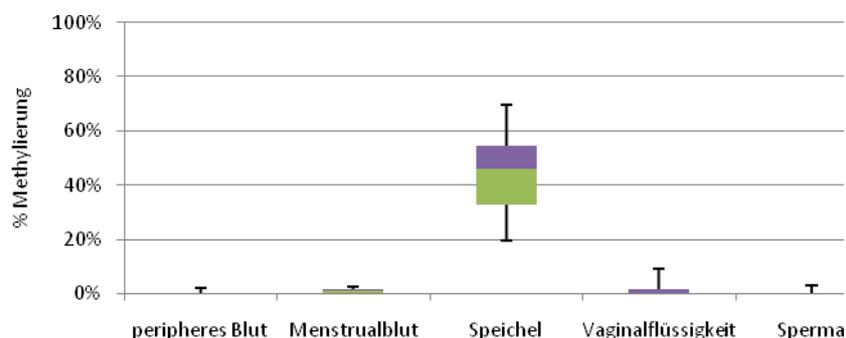


Abbildung 54 Marker Speil - Box-Plot zur Streuung der Methylierungswerte in 20 DNA-Proben von 5 Körperflüssigkeiten, vermessen mit SNuPE-Primern Fm+Fnm.

Die Speichel-Proben weisen eine relativ breite Streuung auf und eine durchschnittliche Methylierung von 46%. Der niedrigste detektierte Methylierungswert beträgt 20%. Menstrualblut

und Vaginalflüssigkeit zeigen sehr kleine Streuung, peripheres Blut und Sperma gar keine. Eine Vaginalflüssigkeits-Probe hat ein Methylierungssignal von 9% gezeigt.

3.5.1.8 Erweiterte Validierung

Wegen der theoretisch möglichen exogenen Einflussgrößen wurde eine größere Validierungsstudie mit 80 weiteren Proben vorgenommen. Die Proben stammten aus dem Probenlager der Firma LFA GmbH. Es handelt sich dabei in jedem Fall um Proben von Individuen, die ihre Zustimmung zur wissenschaftlichen Nutzung dieses Materials schriftlich gegeben haben. Die Abbildung 55 gibt die Altersverteilung des gesamten Probandenkollektivs wieder. Die Anteile der Probanden in den verschiedenen Alterskategorien sind gut verteilt.

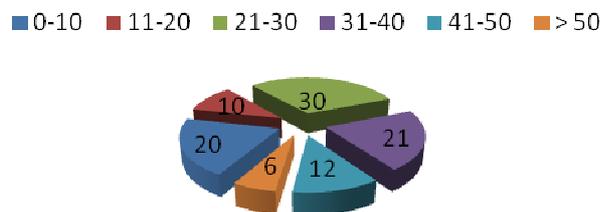


Abbildung 55 Alter der Probanden/innen für Speichel, deren Proben in die Untersuchung der beiden Speichel-Marker Spei1 und Spei2 einbezogen wurden; 45 männliche und 55 weibliche Personen (n=100).

Die Speichel-Ergebnisse der ersten Validierungsrunde (vorhergehendes Kapitel, Abbildung 54) und der erweiterten Validierung mit 80 Proben sind im Folgenden zusammengefasst. Eine Probe ist ausgefallen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 56 dargestellt.

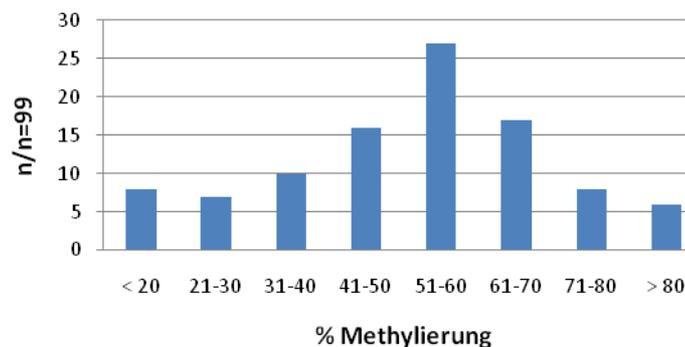


Abbildung 56 Marker Spei1 - Verteilung der Methylierungswerte von n= 99 Speichel-Proben. Auf der Abszisse sind die Werte-Gruppen angegeben, wobei die Einteilung in Gruppen in Abhängigkeit von der Gesamtheit der Werte, willkürlich gewählt ist. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Proben aufgezählt, deren Werte in die entsprechende Kategorie fallen.

Die Gesamtheit der Methylierungswerte des Spei1-Markers ist annähernd normalverteilt. Die meisten Proben weisen 51 bis 60% Methylierung auf. Der durchschnittliche Methylierungswert beträgt 53% und liegt damit höher als der Durchschnittswert der Speichel-Proben von 46% Methylierung in der kleinen Validierungsrunde (siehe Abbildung 54). Für die Ermittlung der Ausreißer wurde die zweifache Standardabweichung von dem Mittelwert als statistisches Maß verwendet. Demnach liegen 4 Werte unterhalb des Toleranzbereichs (13,8 bis 89,1%).

Eine ausgeprägte Altersabhängigkeit der Methylierungswerte kann auch in der forensischen Betrachtung wichtig sein, weil sie eventuell Rückschlüsse auf das Alter des Spurenlegers zulässt. Auch das Geschlecht kann Einfluss auf die Methylierung nehmen. In der Abbildung 57 sind die Werte aus der statistischen Validierung nach Alter und Geschlecht differenziert.

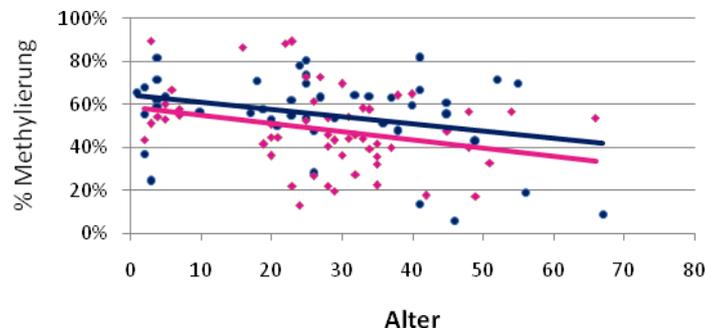
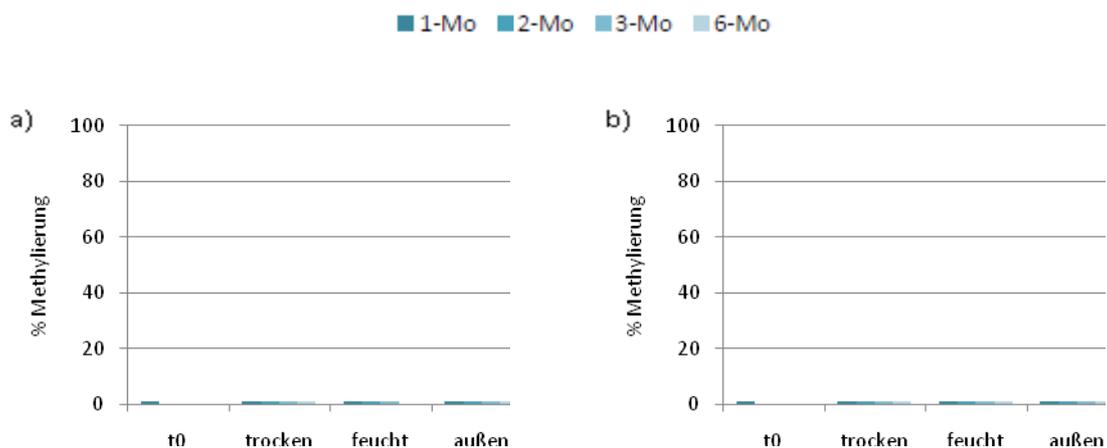


Abbildung 57 Marker Speil - Geschlechts- und Altersabhängigkeit der Methylierungswerte Die Datenpunkte der beiden Geschlechter der Probanden ist farblich differenziert, die Ergebnisse der männlichen Probanden sind blau dargestellt und die Ergebnisse der weiblichen Proben pink. Das Alter ist auf der Abszisse aufgetragen. An die Datenpunkte ist eine lineare Trendlinie gelegt, die ebenfalls in den oben genannten Geschlechtersfarben abgebildet ist.

Die durchschnittliche Methylierung beträgt 56% bei männlichen Proben und 48% bei weiblichen Proben. Die Darstellung in der Abbildung 57 zeigt auch, dass tatsächlich eine Abhängigkeit von dem Alter existiert. Im forensischen Kontext ist diese aber vermutlich nicht stark genug.

3.5.1.9 Forensische Validierung

Die Abbildung 58 a-e zeigt die Ergebnisse der forensischen Simulationsstudie. Die Bedingungen entsprechen dem im Methoden-Kapitel beschriebenen, standardisierten Vorgehen.



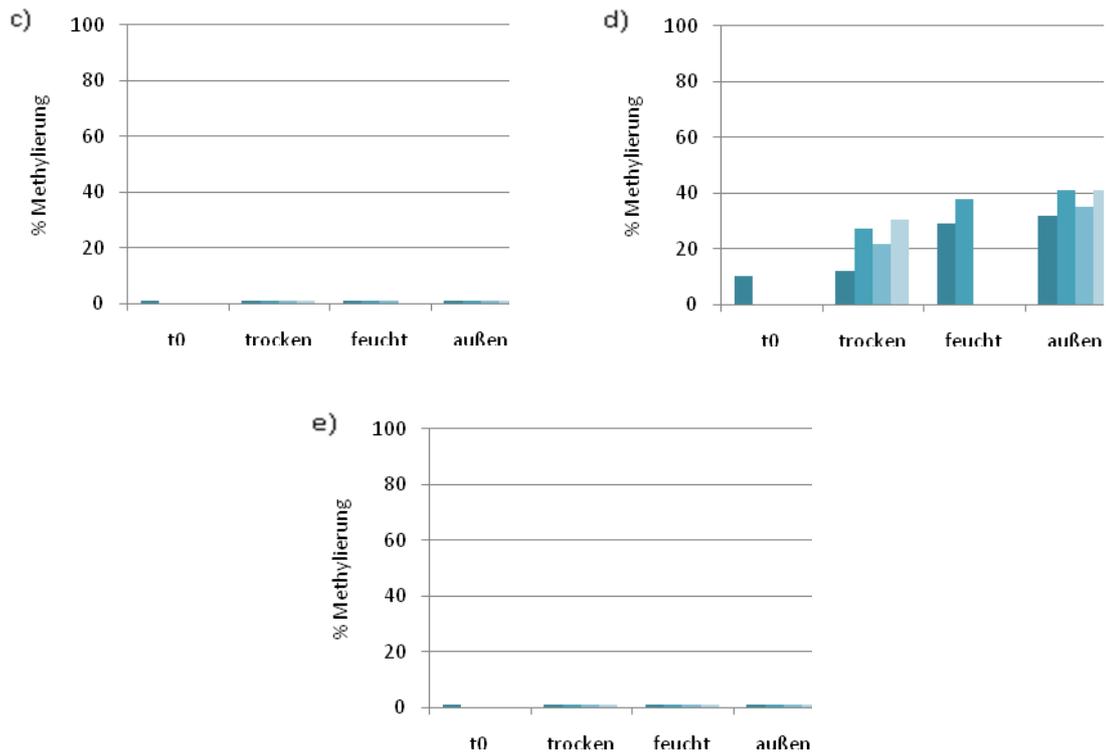


Abbildung 58 Marker Spei1 - Methylierungsergebnisse der simulierten forensischen Spuren, die unter trockenen und feuchten Bedingungen, sowie außen, gelagert wurden. Die Lagerungsdauer beträgt 1, 2, 3 und 6 Monate. Die Werte aus den verschiedenen Alterungszeitpunkten sind farblich differenziert (siehe Legende). Peripheres Blut (a), Menstrualblut (b), Vaginalflüssigkeit (c), Speichel (d) und Sperma (e). Der Ausgangsmethylierungswert von Marker Spei1 ist als t0 gekennzeichnet.

Unter feuchten Lagerungsbedingungen bleibt entweder die Methylierung nicht erhalten oder die komplette DNA ist – wahrscheinlich – durch Mikroben- oder Pilzeinwirkung nach 3 Monaten in der Speichelprobe abgebaut (Abbildung 58d). Unter den übrigen Bedingungen – „trocken“ und „außen“ bleiben die Signale aller Flüssigkeiten stabil.

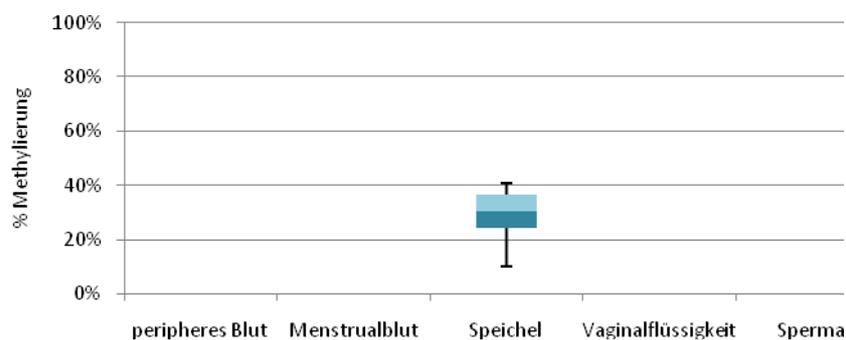


Abbildung 59 Marker Spei1 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungswerte im Spurenalterungs-Experiment. Einbezogen sind alle Werte der entsprechenden Flüssigkeit aus dem gesamten Experiment.

Die in Abbildung 59 dargestellten Messwerte zeigen, dass auch nach Zusammenfassen aller Werte aus dem Alterungsexperiment keine Überlappung zwischen den Speichel-Werten auf der einen Seite und den Werten von Blut, Menstrualblut, Vaginalflüssigkeit und Sperma auf der anderen Seite entsteht.

3.5.1.10 Next Generation Sequenzierung

Mit Hilfe von NGS wurde überprüft, inwieweit die routinemäßig angewendete SNuPE-Nachweismethode die tatsächliche Methylierungssituation des Spei1-Locus widerspiegelt. Die im Augenblick objektivste Messmethode ist NGS, weil man damit im Prinzip den Methylierungsstatus der einzelnen Moleküle bestimmt.

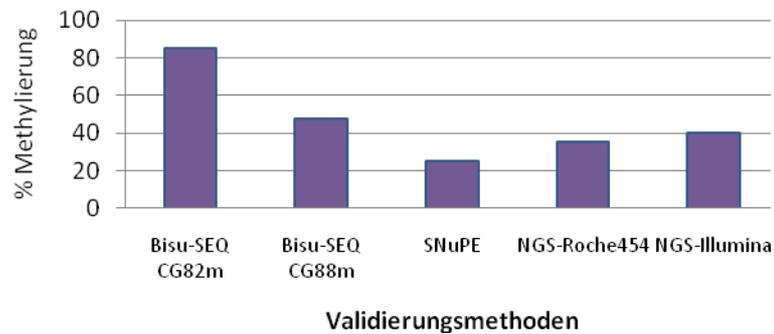


Abbildung 60 Marker Spei1 - Gegenüberstellung der Methylierungsergebnisse von einer gleichen Speichel-Probe aus vier verschiedenen Analysemethoden: Bisulfit-Sequenzierung, Single Nucleotide Primer Extension sowie Next Generation Sequencing mit Roche- und Illumina-Technologie. Bei der Bisulfit-Sequenzierung gab es für die beiden Positionen CG82 und CG88 zwei separate Werte; sie sind getrennt dargestellt. Bei den Ergebnissen der beiden NGS-Experimente sind die Werte nur von denjenigen Sequenzen gezeigt, die in den beiden Ziel-CpGs CG82 und CG88 methyliert sind.

In der SNuPE-Analyse ist der Methylierungswert des Markers von den Methylierungseigenschaften der beiden benachbarten CpGs - CG82 und CG88 - abhängig (die Zahl bezeichnet die Position des CpGs in dem Amplikon). Der methylierungsspezifische Fm-Primer bindet an das Amplifikat nur wenn es an beiden CG-Positionen 82 und 88 methyliert ist. Der nicht-methylierungsspezifische Fnm-Primer bindet nur an diejenigen Sequenzen, die an beiden Stellen nicht methyliert sind. Wie auch bei dem Marker Mens1, stellt sich hier die Frage - gibt es Sequenzen, die entweder nur an der ersten oder nur an der zweiten Position methyliert sind. Diese Frage kann mit Hilfe von NGS beantwortet werden. Die Probe aus der Abbildung 60 zeigt bei der NGS 22% (Roche454) und 26% (Illumina MiSeq) Sequenzen mit methyliertem CG82 und nicht-methyliertem CG88. Es gab keine Sequenzen mit nicht-methyliertem CG82 und methyliertem CG88. Der Anteil der Sequenzen, die an beiden Stellen methyliert sind, beträgt bei Roche454 33% und bei Illumina MiSeq 36%. Wodurch die niedrigeren Werte bei SNuPE (23%) und die höheren Werte bei der Bisulfit-Sequenzierung (46% und 83%) zustande kommen wird in dem Kapitel 4.5 diskutiert.

Nach der Erkenntnis, dass die beiden analytischen CpGs ungleich methyliert sind, wurde ein zweiter methylierungsspezifischer SNuPE-Primer entwickelt, dessen Zielsequenz an Position CG82 methyliert ist und an Position CG88 nicht methyliert.

3.5.2 Methylierungs-Marker Spei-2

3.5.2.1 Die Genort-Eigenschaften

Tabelle 8 Die Genort-Beschreibung des Markers Spei2

Marker	Chr	CpG-Insel	Gen Symbol	Genprodukt	Locus Architektur
Spei-2	10	Nein (55% GC) 9cg/292bp	WBP1L/ OPA1L	WW domain binding protein 1-like	3'-Ende: Exon WBP1L-001 (OPA1L, C10orf26)

Der Marker Spei-2 unterscheidet Speichel und Vaginalflüssigkeit voneinander. Er zeigt im Speichel ein Methylierungssignal und in der Vaginalflüssigkeit ist er unmethyliert. In Sperma, peripherem Blut und Menstrualblut ist der Marker ebenfalls methyliert. Der Spei2-Locus befindet sich auf dem Plusstrang, auf der Bande q24.32 des Chromosoms 10.

Das 3'-Ende des Amplikons (169 von 305bp) liegt in einem Exon des Pseudogens WBP1L (WW domain binding protein 1-like). Dieses Gen ist unter dem Namen OPA1L (Outcome predictor in acute leukemia 1) bekannt geworden, da es eine Zeit lang zu diagnostischen Zwecken der akuten lymphoblastischen Leukämie in der Kindheit (ALL) eingesetzt wurde. Hollemann et al (2006) haben festgestellt, dass die OPA1L-Expression nicht als ein unabhängiges und alleiniges diagnostisches Merkmal für ALL verwendet werden kann. Vor allem bei Patienten mit intensiver medikamentöser und chemotherapeutischer Behandlung war die OPA1L-Expression nicht signifikant hoch.

Desweiteren erstreckt sich über den gesamten Spei2-Lokus eine unklassifizierte regulatorische Sequenz mit Bindungsstellen für Proteine, die ein Helix-Turn-Helix-Motiv aufweisen.

3.5.2.2 Konstruktion des Amplifikats

Das 292bp lange Spei2-Amplikon enthält keine CpG-Inseln. Der durchschnittliche GC-Gehalt in seiner genomischen Sequenz liegt bei 55% (Tabelle 8). In dem Abschnitt befinden sich mehrere SNPs. Zu keinem dieser Polymorphismen gibt es Frequenz-Daten. Zwei SNPs liegen innerhalb von CpG-Dinukleotiden und Eines in der Zielsequenz des Reverse-Primers (Abbildung 61). Für die SNUPE-Analyse wird ein CpG verwendet, welches kein SNP enthält.

```

ATTTC CCCCTTGGCAGACAGCTT CGGCTTTGCTG CGTCTGAGATATGTCA CGAGAAGGTGGGGTGGGCCAGAGCCAGGCAGGGGGAGTAG
CGAGGAGAGCAGGAGACAGTGTGCTGCT CGGTCCCAGGACTCTGTTTACTTTGTCTGCTTTGCTAAAGAAGGC GTGAACCAGGACCAC
CGCACACACAGGCCACCAGGGGCAATGCT ATTCCAAGACCTTAACTTTAAGAGCCCTTGTTCCA ACTTAGTGTGGA CGATGCTCTT
GCAGGATG CTTTCCTTTT

```

Abbildung 61 Genomische Sequenz des Spei2-Locus. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die bekannten SNPs grün und die Primer-Stellen sind grau unterlegt (forward-Primer dunkelgrau, reverse-Primer hellgrau). Das CpG-Dinukleotid, das im SNUPE-Assay für die Messung der Methylierung verwendet wird, ist rot markiert und die Bindungsstelle des 3r-SNUPE-Primers ist unterstrichen.

3.5.2.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung

In Abbildung 62 werden die Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung an 7 CpGs des Spei2-Amplikons gezeigt. Anhand der Farbunterschiede wird deutlich, dass das cg245 Speichel und Sperma von den

übrigen Körperflüssigkeiten unterscheidet. Dieses CpG kann auch dazu dienen, Vaginalflüssigkeit von allen übrigen Körperflüssigkeiten zu unterscheiden. In Vaginalflüssigkeit ist es komplett unmethyliert.

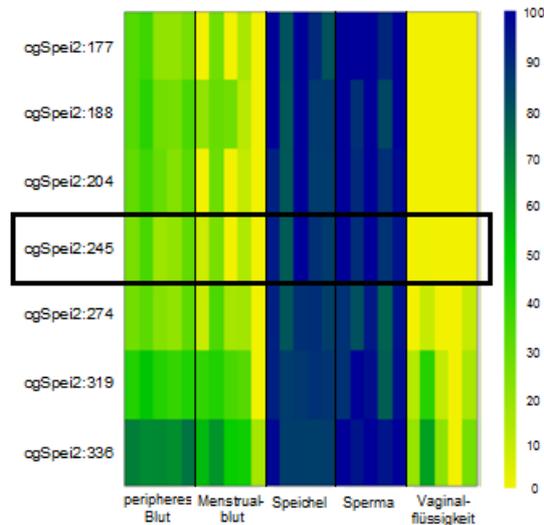


Abbildung 62 DNA-Methylierung im Spei2-Locus. Einbezogen sind jeweils fünf Proben vom peripheren Blut, Menstrualblut, Speichel, Sperma und Vaginalflüssigkeit. Jede Spalte stellt eine Probe dar. Die Zeilen repräsentieren die 7 analysierten CpGs innerhalb des Amplikons. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung) - entsprechend der Farbskala auf der rechten Seite. Das analytische CpG ist durch das schwarze Rechteck umrandet.

3.5.2.4 Zielregion - SNUPE

Die Bisulfit-konvertierte Sequenz des Spei2-Markers besitzt einen GC-Gehalt von 29% und 9 CpGs. Der hohe Anteil an A- und T-Basen verringert die Schmelztemperaturen der Primer. Diese müssen entsprechend länger sein, um unter einheitlichen Temperaturbedingungen mit anderen Markern zusammen analysiert zu werden. Von drei getesteten SNUPE-Primern, hat ein Primer die beste Unterscheidung zwischen Speichel und Vaginalflüssigkeit gezeigt. Daher wird im Spei2-Assay, im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Markern, die Methylierung nur an einem Ziel-CpG gemessen (Abbildung 63).

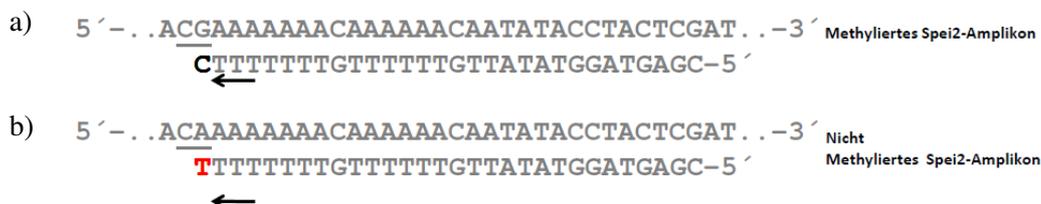


Abbildung 63 Die Reaktion des reversen SNUPE-Primers Spei2-3r. Das Amplikon befindet sich auf dem 2. Bisulfit-Strang. Die Amplikonsequenz ist in 5'-3'-Richtung abgebildet. Der 3r-Primer wird an seinem 3'-Ende entweder um ein C (schwarz, a) an der methylierten Sequenz oder um ein T (rot, b) an der nicht methylierten Amplikon-Sequenz verlängert.

Der SNUPE-Primer 3r besteht aus 28 Basen. Bei der Detektion des Primers repräsentiert das schwarze Signal den Anteil der methylierten Amplikon-Kopien und das rote Signal den Anteil der

nicht methylierten Kopien in der Probe. Das Verhältnis der beiden Primersignale zueinander, gibt den Methylierungs-Status der Probe wieder (in der Abbildung 64 sind es 73% Methylierung).

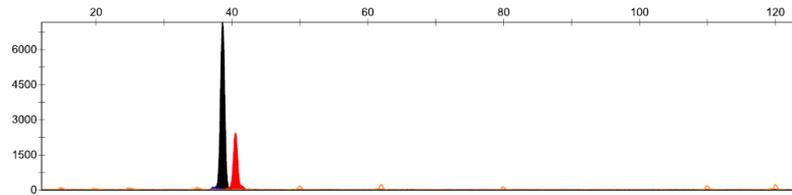


Abbildung 64 Detektion des Spei2-SNuPE-Primers 3r. Abbildung eines Plot-Fensters nach der Datenauswertung mit GeneMapper ID 3.2.

3.5.2.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse

Die Nachweisempfindlichkeit des Spei2-Markers ist in der Abbildung 65 dargestellt. Die Messreihen wurden mit der Zielflüssigkeit - Speichel und zusätzlich mit Vaginalflüssigkeit durchgeführt. Die Vaginalflüssigkeit wurde analysiert, um zu prüfen, ob eine Flüssigkeit, die in dem Spei2-Marker nicht methyliert ist, bei extrem niedrigen Konzentrationen falsch-positive Ergebnisse zeigt. Die Vaginalflüssigkeit ist normalerweise nicht methyliert (durchschnittlich 5% Methylierung).

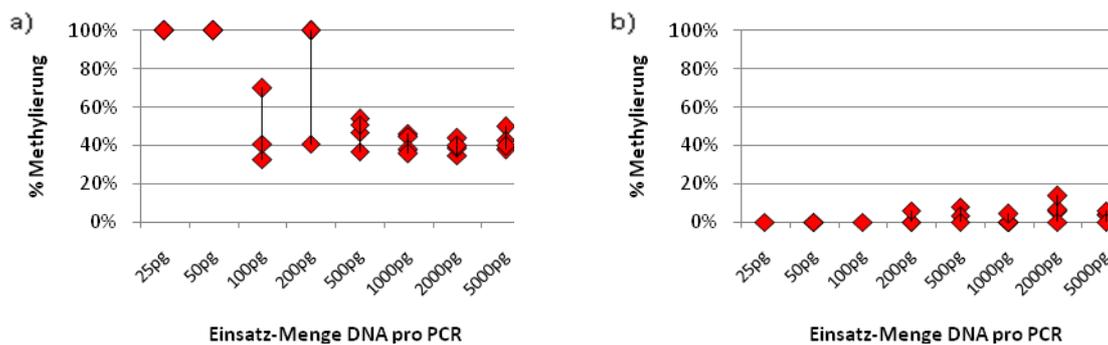


Abbildung 65 Marker Spei2 - Messung der Nachweisempfindlichkeit in jeweils vier unabhängigen Analysen von acht unterschiedlichen Konzentrationen der DNA aus Speichel (a) und der DNA aus Vaginalflüssigkeit (b); die eingesetzten DNA-Mengen pro PCR sind auf der Abszisse aufgelistet.

Stabil verlaufen in beiden Flüssigkeiten die Bestimmungen ab 500 pg.

3.5.2.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen

Das nach dem gleichen Prinzip wie vorher gestaltetes Mischungsexperiment zeigt eine deutliche Erniedrigung der Methylierungswerte von Speichel-DNA gegenüber dem Erwartungswert. Hier muss man deswegen von einer Beeinflussung durch die übrigen Flüssigkeiten ausgehen (Abbildung 66).

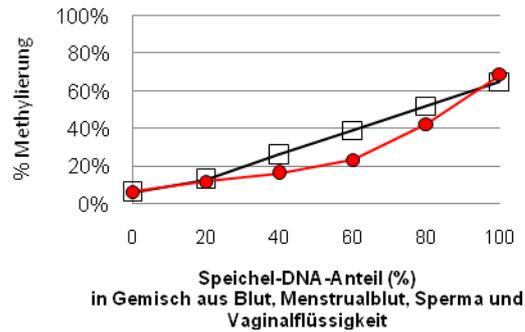


Abbildung 66 Marker Spei2 - Messung von Speichel in einem Flüssigkeitsgemisch. Der Sollwert (schwarz) entspricht dem errechneten Methylierungswert, der sich aus den Werten der fünf Körperflüssigkeiten ergibt, und dem Anteil der Blut-DNA in der jeweiligen Mischprobe. Der Istwert (rot) entspricht dem tatsächlich detektierten Wert.

3.5.2.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte

Wie aus Abbildung 67 ersichtlich, gibt es eine komplette Überlappung zwischen der Zielflüssigkeit Speichel (durchschnittlich 67% methyliert) und Sperma (durchschnittlich 82% methyliert). Dagegen gibt es keinerlei Überlappung zwischen Speichel und peripherem Blut, Menstrualblut und Vaginalflüssigkeit.

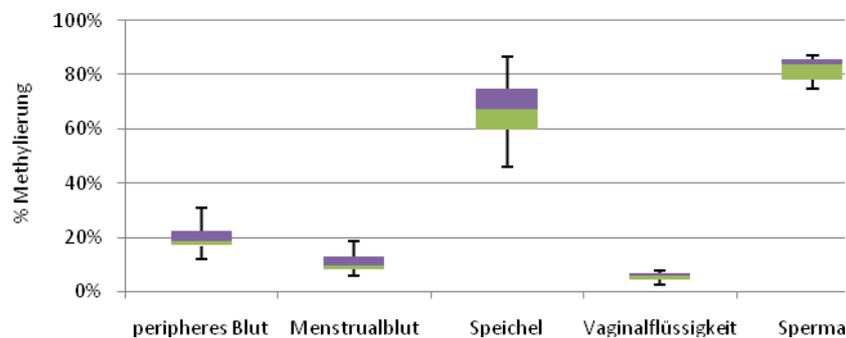


Abbildung 67 Marker Spei2 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungswerte in 20 DNA-Proben von 5 Körperflüssigkeiten, vermessen mit SNuPE-Primer 3r.

3.5.2.8 Erweiterte Validierung

Für die große statistische Validierung des Spei2-Markers wurden die 80 Speichelproben verwendet, welche auch mit dem Spei1-Marker analysiert wurden. Die Altersverteilung der Speichelprobanden ist in der Abbildung 55 im Kapitel 3.5.1.8 dargestellt. Die Ergebnisse für Speichel aus der ersten Validierungsrunde (vorhergehendes Kapitel 3.5.2.7) und der erweiterten Validierung wurden im Folgenden zusammengefasst. Fünf Proben sind bei der Analyse mit Spei2-Marker ausgefallen. Die Methylierungswerte der 95 vermessenen Proben sind annähernd normalverteilt (Abbildung 68).

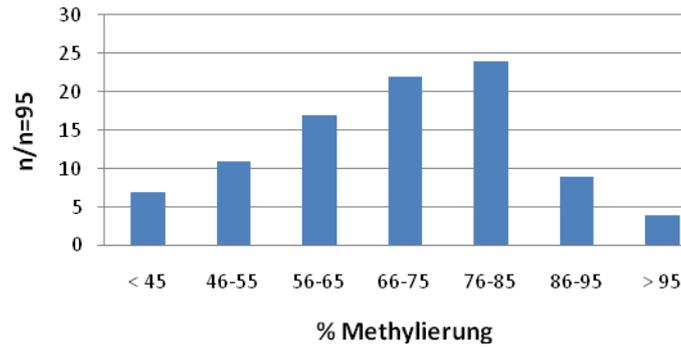
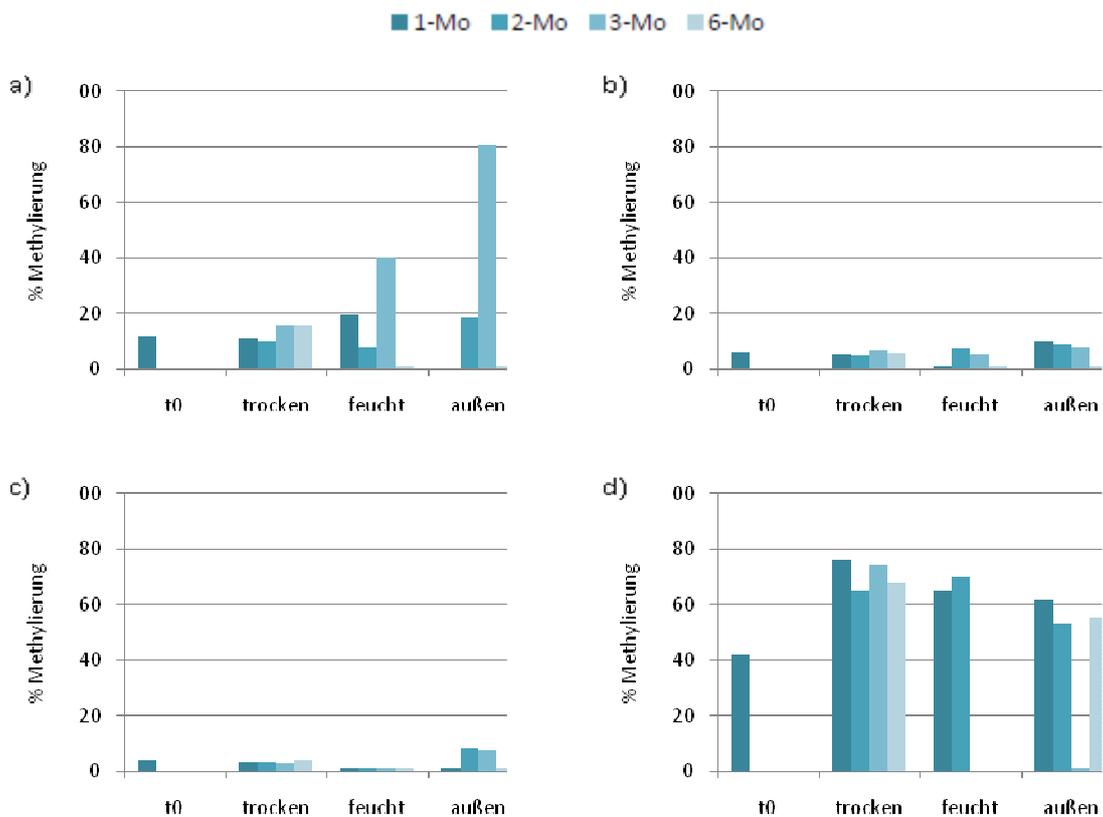


Abbildung 68 Marker Spei2 - Verteilung der Methylierungswerte von n= 95 Speichel-Proben. Auf der Abszisse sind die Werte-Gruppen angegeben, wobei die Einteilung in Gruppen in Abhängigkeit von der Gesamtheit der Werte, willkürlich gewählt ist. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Proben aufgezählt, deren Werte in die entsprechende Kategorie fallen.

Im Gegensatz zu dem Marker Spei1 besteht bei dem Spei2-Marker keine signifikante Abhängigkeit der Methylierungswerte vom Alter und Geschlecht.

3.5.2.9 Forensische Validierung

Die Abbildung 69 a-e zeigt die Ergebnisse der forensischen Simulationsstudie.



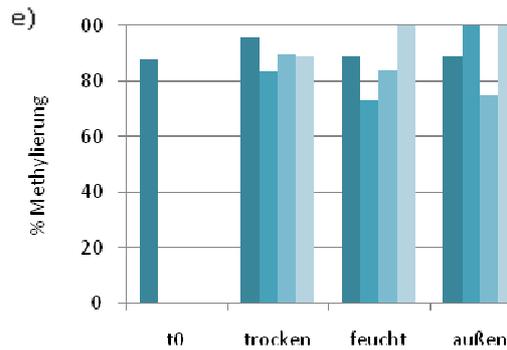


Abbildung 69 Marker Spei2 - Methylierungsergebnisse der simulierten forensischen Spuren, die unter trockenen und feuchten Bedingungen, sowie außen, gelagert wurden. Die Lagerungsdauer beträgt 1, 2, 3 und 6 Monate. Die Werte aus den verschiedenen Alterungszeitpunkten sind farblich differenziert (siehe Legende). Wo ist denn die Farbe geblieben? Peripheres Blut (a), Menstrualblut (b), Vaginalflüssigkeit (c), Speichel (d) und Sperma (e). Der Ausgangsmethylierungswert von Marker Spei2 ist als t0 gekennzeichnet.

Die Methylierungswerte des Spei2-Markers bleiben unter den untersuchten forensischen Bedingungen sowohl in Speichel als auch in Vaginalflüssigkeit, Sperma und Menstrualblut weitgehend stabil. Bei Speichel sind Ausfälle des Signals unter feuchten Bedingungen und bei Außenbedingungen zu beobachten. Generell werden die Speichersignale höher mit der Zeit (Abbildung 69d). Bei der Untersuchung des Blutes zeigen drei Monate alte Spuren unter feuchten Bedingungen und außen höhere Signale als der Blut-Nullwert (Abbildung 69a).

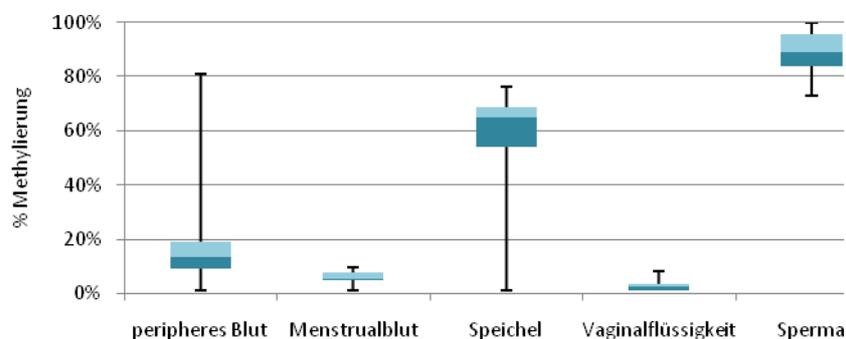


Abbildung 70 Marker Spei2 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungs-Werte im Spurenalterungs-Experiment. Einbezogen sind alle Werte der entsprechenden Flüssigkeit aus dem gesamten Experiment.

Die Abbildung 70 zeigt, dass bis auf einen Wert jeweils bei Speichel und Blut die Werte unter den forensischen Bedingungen stabil bleiben.

3.5.2.10 Next Generation Sequenzierung

Auch der Marker Spei2 ist per NGS untersucht worden, um die tatsächliche Methylierungssituation des Spei2-Locus zu überprüfen (Abbildung 71).

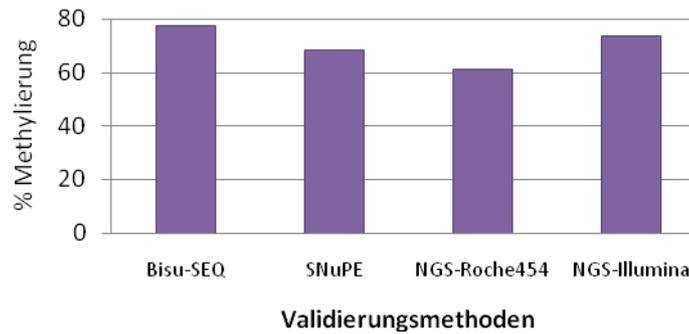


Abbildung 71 Marker *Spei2* - Gegenüberstellung der Methylierungsergebnisse an dem Ziel-CpG (3r-Detektionsstelle) von einer gleichen Speichel-Probe aus vier verschiedenen Analysemethoden: Bisulfit-Sequenzierung, Single Nucleotide Primer Extension sowie Next Generation Sequencing mit Roche454 (415 Reads) und Illumina (2998 Reads).

Bei diesem Marker ist offenbar die Messgenauigkeit zwischen Bisulfitsequenzierung, SNUPE-Methode, NGS-Roche 454 und NGS-Illumina sehr gut vergleichbar.

3.6 Vaginalflüssigkeit

Für den Nachweis von Vaginalflüssigkeit wurden zwei Marker entwickelt. Beide Marker detektieren Vaginalflüssigkeit durch die Anwesenheit eines Methylierungssignals. Beide Marker *Vag-1* und *Vag-2* unterscheiden Vaginalflüssigkeit von allen übrigen Körperflüssigkeiten.

3.6.1 Methylierungs-Marker *Vag-1/1628*

3.6.1.1 Die Genort-Eigenschaften

Tabelle 9 Die Genort-Beschreibung des Markers *Vag1*

Marker	Chr	CpG-Insel	Gen Symbol	Genprodukt	Locus Architektur
Vag-1	2	Ja (58% GC) 20cg/272bp	HOXD4	Sequenzspezifischer HXD4	TF Exon: HOXD4-001

Der Marker *Vag-1* unterscheidet Vaginalflüssigkeit von Speichel, Sperma und peripherem Blut. In Menstrualblut ist er leicht methyliert. Der *Vag1*-Locus liegt auf dem Plusstrang, zentral auf dem langen Arm des Chromosoms 2, auf der Bande q31.1.

Das gesamte Amplikon (272bp) liegt in einem Exon des *HOXD4*-Gens, dessen Genprodukt ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor ist. Die Homeobox- (Hox-) Gene kodieren Transkriptionsfaktoren, die die Expression verschiedener essentieller Proteine kodierender Zielgene für Zelldifferentiation und -proliferation regulieren. So sind sie beispielweise in die Skelett-Morphogenese und Chondrozyten-Differenzierung involviert. Die vier Gencluster A, B, C und D aus 9 bis 11 Genen sind an unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Das *HOXD4* Gen wird vorwiegend während der Entwicklung in mesodermalen Geweben und im zentralen Nervensystem exprimiert und ist für die gewebespezifische morphologische Entwicklung von

Extremitäten zuständig (Rastegar et al 2004). Nach den Informationen aus mRNA-Expressions-Daten und der UniProtKB Datenbank wird dieses Gen ubiquitär exprimiert. Grundsätzlich weisen die HOX-Gene jedoch ein kompliziertes Expressionsmuster auf und werden vorwiegend in der Entwicklungsphase des Körpers exprimiert (Hérault et al 1995).

3.6.1.2 Konstruktion des Amplifikats

Das 272bp lange Vag1-Amplikon enthält nach den Angaben des CpG-Insel-Suchprogramms des europäischen Instituts für Bioinformatik (<http://www.ebi.ac.uk>) mindestens eine CpG-Insel. Der durchschnittliche GC-Gehalt in seiner genomischen Sequenz liegt bei 58% (Tabelle 9). In dem Abschnitt befinden sich mehrere SNPs. Zu dem Ersten der vier SNPs gibt es Frequenzangaben. Dieses C/T-Polymorphismus (rs75770990) wurde in einer Gruppe von 118 Personen untersucht. In der entsprechenden Arbeit zeigte das C-Allel die Häufigkeit von 0,941, das T-Allel 0,059. Eine Aufteilung in homo- und heterozygote Genotypen wurde nicht vorgenommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Alle SNPs liegen außerhalb der Primerzielsequenzen (Abbildung 72).

```
GGCACATGGACCTGGGCCTGCGGGCTCTAATTGCGCGCTTATGTTGATGATTTTTTTTTTAATCACAGCAGCCCCCAGTTTAGCGGACTG
ATTTACTCCCGGTATTGGTAAATATGATCACGTGGGC CGCGCGACCAATGGTGGAGGCTGAGCCTGCGAACTAGT CGGTGG TCGGGCGC
CGGCGGGGAGCTGCTCGGCGCGGACAGTGTAATGTTGGG GGGAGTGGG ACGCCTCAAAATGTCTTCCAGTGGCACCCCTCAGCAACT
```

Abbildung 72 Genomische Sequenz des Vag1-Locus. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die bekannten SNPs grün und die Primer-Stellen sind grau unterlegt (forward-Primer dunkelgrau, reverse-Primer hellgrau). Das CpG-Dinukleotid, das im SNUPE-Assay für die Messung der Methylierung verwendet wird, ist rot markiert und die Bindungsstelle des 1r-SNUPE-Primers ist unterstrichen.

3.6.1.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung

Der zur Identifizierung der Vaginalflüssigkeit eingesetzte Marker wurde ausschließlich mit Hilfe der Illumina-Chip-Analyse und der sofort nachfolgenden SNUPE-Analyse ausgewählt, weil sich die Sequenzierung nach Bisulfitierung oft als nicht zuverlässig herausgestellt hatte. Es handelte sich um das CpG cg38. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde die Bisulfitsequenzierung trotzdem durchgeführt, um einen Methodenvergleich zu ermöglichen. Die Abbildung 73 zeigt, dass auch bei der Sequenzierung die Unterscheidung der Vaginalflüssigkeit von Speichel, Blut und Sperma sehr deutlich ist. Die geringsten Unterschiede ergeben sich zwischen Vaginalflüssigkeit und Menstrualblut.

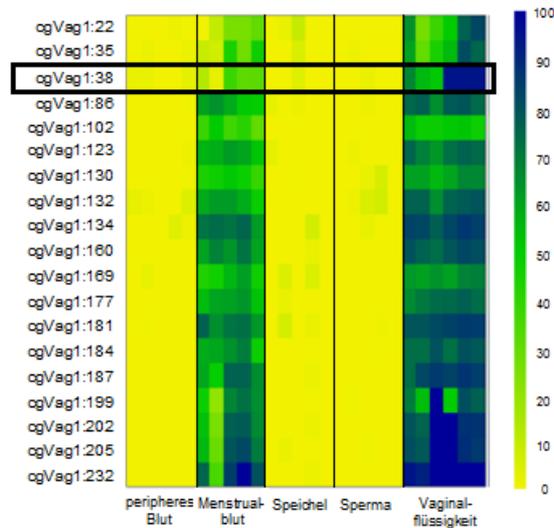


Abbildung 73 DNA-Methylierung im Vag1 (AMP1628)-Locus. Einbezogen sind jeweils fünf Proben vom peripheren Blut, Menstrualblut, Speichel und Sperma, sowie sechs Proben von Vaginalflüssigkeit. Jede Spalte stellt eine Probe dar. Die Zeilen repräsentieren die 19 analysierten CpGs innerhalb des Amplikons. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung) - entsprechend der Farbskala auf der rechten Seite. Das analytische CpG ist durch das schwarze Rechteck umrandet.

3.6.1.4 Zielregion - SNUPE

Die Bisulfit-konvertierte Sequenz des Vag1-Markers besitzt einen GC-Gehalt von 40% und 20 CpG-Dinukleotide. Vor allem das 3'-Ende des Amplikons ist von CpGs dicht besiedelt. Von mehreren entworfenen SNUPE-Primern, hat ein Primer eine gute Unterscheidung zwischen Vaginalflüssigkeit und anderen Körperflüssigkeiten gezeigt. Im Vag1-Assay wird die Methylierung nur an einem CpG gemessen. Der 1r-SNUPE-Primer detektiert die Methylierung des Ziel-CpGs in reverse Richtung (Abbildung 74).

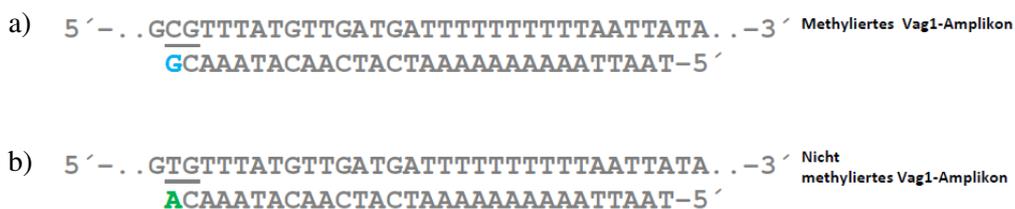


Abbildung 74 Die Reaktion des reversen SNUPE-Primers Vag1-1r. Das Amplikon befindet sich auf dem 1. Bisulfit-Strang. Die Amplikonsequenz ist in 5'-3'-Richtung abgebildet. Der 1r-Primer wird an seinem 3'-Ende entweder um ein G (blau, a) an der methylierten Sequenz oder um ein A (grün, b) an der nicht methylierten Amplikon-Sequenz verlängert.

Der SNUPE-Primer 1r besteht aus 29 Basen. Er arbeitet nach dem konventionellen Prinzip der Methylierungs-Messung per SNUPE - der Extensions-Primer wird entweder um die methylierte oder die nicht methylierte Base verlängert. Bei der Detektion des Primers repräsentiert das blaue Signal den Anteil der methylierten Amplikon-Kopien und das grüne Signal den Anteil der nicht methylierten Kopien in der Probe. Der Methylierungs-Prozentsatz wird errechnet aus dem

Verhältnis der Peakhöhe des Methylierungs-Peaks (blau) zur Summe der Peakhöhen für Methylierung und Nichtmethylierung (in der Abbildung 75 sind es 52%).

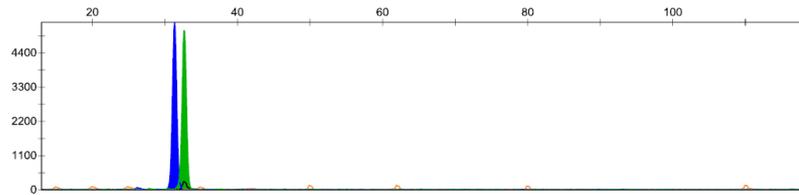


Abbildung 75 Detektion des Vag1-SNuPE-Primers 1r. Abbildung eines Plot-Fensters nach der Datenauswertung mit GeneMapper ID 3.2.

3.6.1.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse

In Abbildung 76 wird das Ergebnis eines Sensitivitäts- und Stabilitätstestes mit jeweils 4 Proben einer Konzentration gezeigt.

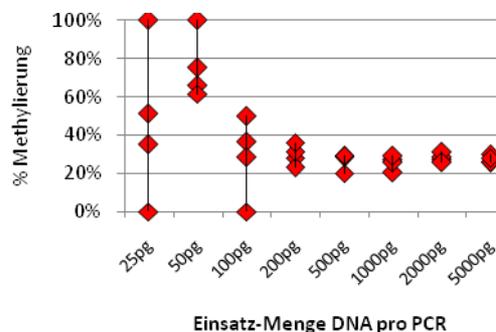


Abbildung 76 Marker Vag1 - Messung der Nachweisempfindlichkeit in jeweils vier unabhängigen Analysen von acht unterschiedlichen Konzentrationen von DNA aus Vaginalflüssigkeit; die eingesetzten DNA-Mengen pro PCR sind auf der Abszisse aufgelistet.

Als Nachweisgrenze wird diejenige DNA-Menge angesehen, von der ab sich eine stabile Wiederholbarkeit zeigt. Dieser Wert liegt für Marker Vag1 bei 200 pg. Jede Messung wurde in diesem Fall vier Mal durchgeführt, so dass man erkennen kann, ob man sich im Bereich für eine stabile Messung befindet oder nicht.

3.6.1.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen

Im Mischungsexperiment ergab der Vaginalmarker Vag1 höhere Methylierungswerte als die Erwartungswerte. Also muss man von einer wechselseitigen Beeinflussung der 5 Flüssigkeits-DNAs ausgehen (Abbildung 77).

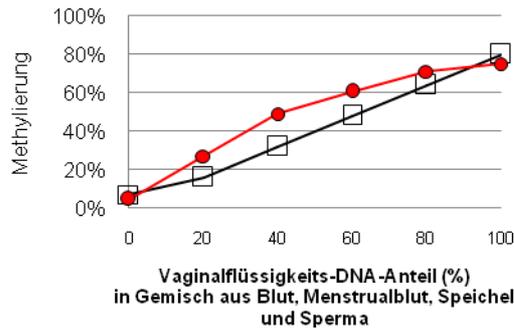


Abbildung 77 Marker Vag1 - Messung von Vaginalflüssigkeit in einem Flüssigkeitsgemisch. Der Sollwert (schwarz) entspricht dem errechneten Methylierungswert, der sich aus den Werten der fünf Körperflüssigkeiten ergibt, und dem Anteil der Blut-DNA in der jeweiligen Mischprobe. Der Istwert (rot) entspricht dem tatsächlich detektierten Wert.

3.6.1.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte

In Abbildung 78 ist das Differenzierungspotential des Markers Vag1 gegenüber den übrigen Körperflüssigkeiten dargestellt. Eine Überlappung der Werte beobachtet man nur beim Menstrualblut.

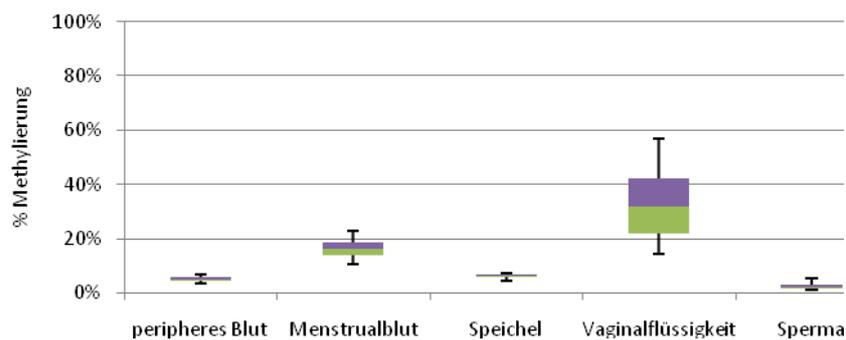


Abbildung 78 Marker Vag1 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungswerte in 20 DNA-Proben von 5 Körperflüssigkeiten, vermessen mit SNUPE-Primer 1r.

Die Vaginalflüssigkeits-Proben weisen eine relativ breite Streuung auf und eine durchschnittliche Methylierung von 33%. Der niedrigste detektierte Methylierungswert beträgt 15%. Peripheres Blut, Speichel und Sperma zeigen sehr geringe Streuung. Der Mittelwert bei Menstrualblut beträgt 16% Methylierung. Zwischen der Wertegruppe für die Vaginalflüssigkeit und der für das Menstrualblut ist eine ca. 10%ige Überlappung zu erkennen.

3.6.1.8 Erweiterte Validierung

Um statistisch relevante Daten zu erhalten, wurden 55 Personen mit den beiden Markern Vag1 und Vag2 überprüft. Die Altersverteilung der Probandinnen ist in der Abbildung 79 dargestellt.

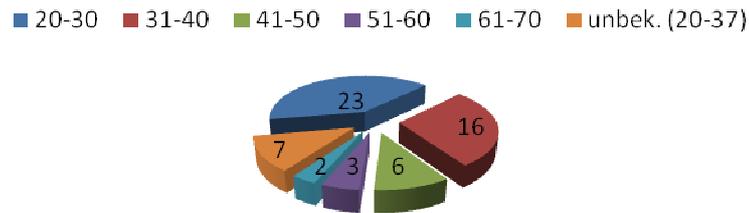


Abbildung 79 Alter der Probandinnen für Vaginalflüssigkeit, deren Werte in die Untersuchung der Vag1 und Vag2-Marker einbezogen wurden (n=55).

Da eine deutliche Abhängigkeit zwischen Methylierungsgrad und Zykluszeitpunkt bzw. Hormonstatus besteht (siehe Abbildung 81), ist keine Normalverteilung zu erwarten. Die meisten Methylierungswerte liegen zwischen 41 und 50% Methylierung (Abbildung 80). Der Mittelwert der Methylierung beträgt 39%.

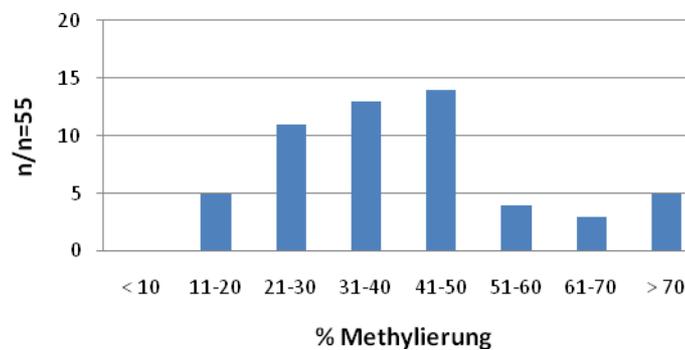


Abbildung 80 Marker Vag1 - Verteilung der Methylierungswerte von n= 55 Vaginalflüssigkeits-Proben. Auf der Abszisse sind die Werte-Gruppen angegeben, wobei die Einteilung in Gruppen in Abhängigkeit von der Gesamtheit der Werte, willkürlich gewählt ist. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Proben aufgezählt, deren Werte in die entsprechende Kategorie fallen.

Signifikante Abhängigkeiten vom Zykluszeitpunkt und vom Alter könnten für die Beurteilung einer Spur von Bedeugung sein. In der Abbildung 81 ist die Abhängigkeit des Methylierungssignal von dem Alter und Zyklustag der Frauen dargestellt. In das Diagramm sind 41 von 55 Werten einbezogen, da nicht von allen 55 Probandinnen Angaben zum Zyklustag vorlagen.

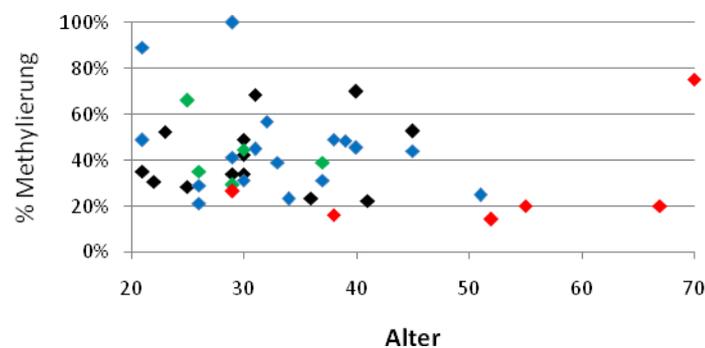


Abbildung 81 Marker Vag1 - Zykluszeitpunkt-und Altersabhängigkeit der Methylierungswerte. Die Datenpunkte der verschiedenen Zykluszeitpunkte sind farblich differenziert. Die Ergebnisse der Proben aus Zyklusbeginn (n=14) sind schwarz, die Ergebnisse aus Zyklus-Mitte/Eisprung (n=5) grün, die Ergebnisse aus Zyklus-Ende (n=20) blau und die Ergebnisse der Proben von Frauen mit erniedrigtem Östrogenspiegel (Menopause oder nach einer Entbindung, n=6) sind rot dargestellt. Das Alter ist auf der Abszisse aufgetragen. An die Datenpunkte ist eine lineare Trendlinie gelegt, die in den entsprechenden Farben abgebildet ist.

Die Methylierungswerte sind eindeutig abhängig vom Östrogenspiegel: Frauen in der Menopause oder nach der Schwangerschaft zeigen im Vergleich zu den drei übrigen Gruppen deutlich erniedrigte Methylierungswerte mit einem Mittelwert von 29%. Die übrigen Gruppen zeigen höhere Methylierungswerte und ihr Mittelwert unterscheidet sich kaum voneinander (44% bei Zyklus-Anfang, 43% bei Zyklus-Mitte und 43% bei Zyklus-Ende). Eine signifikante Altersabhängigkeit ist nicht zu beobachten.

3.6.1.9 Forensische Validierung

Die forensischen Simulationsexperimente sind in Abbildung 82 dargestellt.

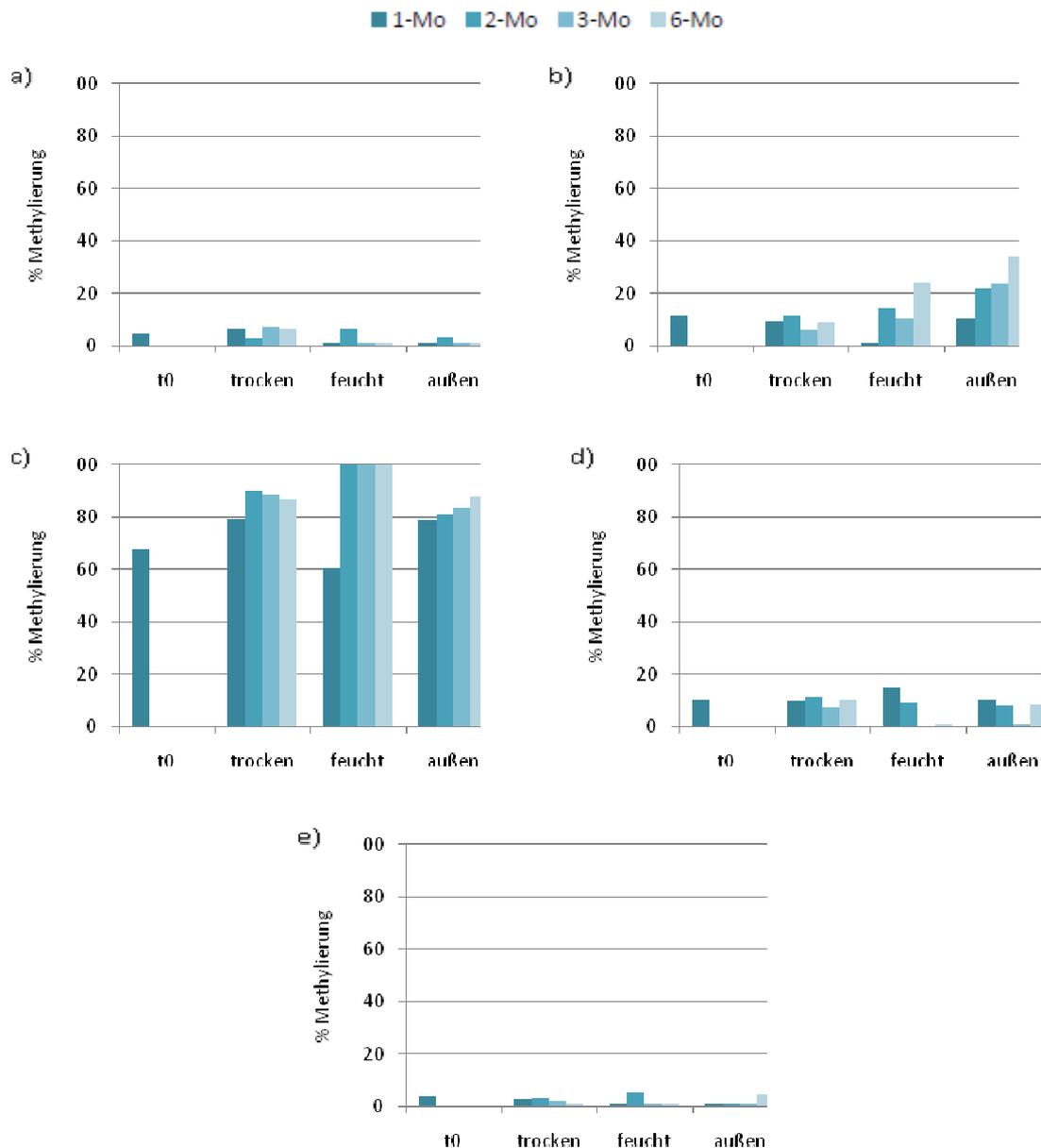


Abbildung 82 Marker Vag1 - Methylierungsergebnisse der simulierten forensischen Spuren, die unter trockenen und feuchten Bedingungen, sowie außen, gelagert wurden. Die Lagerungsdauer beträgt 1, 2, 3 und 6 Monate. Die Werte aus den verschiedenen Alterungszeitpunkten sind farblich differenziert (siehe Legende). Peripheres Blut (a), Menstrualblut (b), Vaginallflüssigkeit (c), Speichel (d) und Sperma (e). Der Ausgangsmethylierungswert von Marker Vag1 ist als t0 gekennzeichnet.

Abgesehen von dem Methylierungswert der im Feuchtmedium gelagerten Vaginalflüssigkeits-Probe (Abbildung 82c) bleiben die Werte aller Flüssigkeiten unter den untersuchten forensischen Bedingungen relativ stabil. Eine drei Monate alte Speichel-Probe, die feucht gelagert wurde, hat keine Ergebnisse gezeigt (Abbildung 82c).

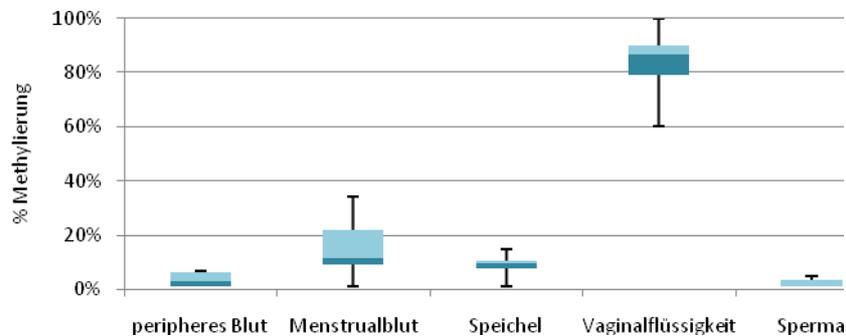


Abbildung 83 Marker Vag1 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungs-Werte im Spurenalterungs-Experiment. Einbezogen sind alle Werte der entsprechenden Flüssigkeit aus dem gesamten Experiment.

Abbildung 83 zeigt, dass die Methylierungswerte durch die simulierten, forensischen Bedingungen ihr Differenzierungspotential nicht verlieren.

3.6.1.10 Next Generation Sequenzierung

Inwieweit die routinemäßig angewendete SNUPE-Nachweismethode die tatsächliche Methylierungssituation widerspiegelt, ist per NGS geprüft worden (Abbildung 84).

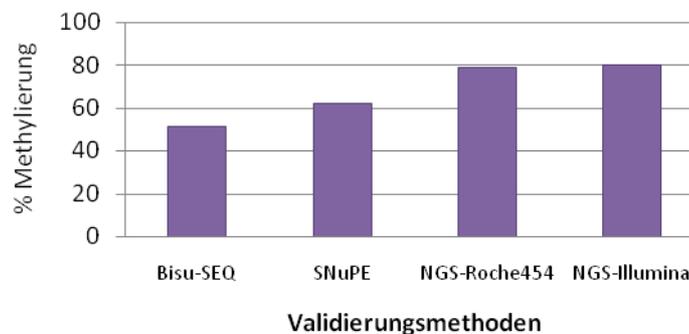


Abbildung 84 Marker Vag1 - Gegenüberstellung der Methylierungsergebnisse an dem Ziel-CpG (1r-Detektionsstelle) von einer gleichen Vaginalflüssigkeits-Probe aus vier verschiedenen Analysemethoden: Bisulfit-Sequenzierung, Single Nucleotide Primer Extension sowie Next Generation Sequencing Roche454 (1638 Reads) und Illumina MiSeq (15746 Reads).

Die Bisulfitsequenzierung zeigt die niedrigsten Messwerte. Von der Auswertemethode her ist die Bisulfitsequenzierung von allen vier Methoden die ungenaueste. Den höchsten Aussagewert haben die beiden angewendeten, verschiedenen NGS-Methoden. Das SNUPE-Verfahren kann nicht so exakt wie NGS sein aber das Auswerteprinzip ist sehr viel klarer und einfacher als die Bisulfitsequenzierung.

3.6.2 Methylierungs-Marker Vag-2

3.6.2.1 Die Genort-Eigenschaften

Tabelle 10 Die Genort-Beschreibung des Markers Vag2

Marker	Chr	CpG-Insel	Gen Symbol	Genprodukt	Locus Architektur
Vag-2	2	Ja (57% GC) 8cg/188bp	HOXD12	Sequenzspezifischer TF HXD12	74bp-5'UTR: HOXD12-001

Der Marker Vag2 unterscheidet, wie auch der erste Vaginalmarker Vag1, die Vaginalflüssigkeit von Speichel, Sperma und peripherem Blut. In Menstrualblut ist er ebenfalls leicht methyliert. Der Vag2-Locus liegt auf dem Plusstrang, auf dem Chromosom 2, etwa 19000bp 5'-stromaufwärts entfernt von dem Vag1-Locus, auf derselben Bande q31.1. Vag2 liegt im 5'UTR-Bereich des Gens HOXD12, 74bp entfernt von dem ersten Exon. Das HOXD12-Genprodukt ist ein sequenzspezifischer Transkriptionsfaktor, der wie HOXD4, in dem HOXD-Gencluster auf dem Chromosom 2 kodiert ist. Die Hox-Gene werden während der Embryonalentwicklung entlang der vegetativen Achse exprimiert und regulieren die Morphogenese der Extremitäten. Im erwachsenen Körper kontrollieren diese Gene die Gewebe- oder Organspezifität. Eine gestörte Expression der Hox-Gene - auch diejenige von HOXD12 - ist mit der Entwicklung von Tumoren und Progression von Metastasen assoziiert (Makiyama et al. 2005).

3.6.2.2 Konstruktion des Amplifikats

Das 188bp lange Vag2-Amplikon enthält keine CpG-Inseln. Jedoch befindet sich eine Insel in unmittelbarer Nähe in 5'-Richtung entfernt von dem Locus. Der durchschnittliche GC-Gehalt in der genomischen Sequenz des Amplikons liegt bei 57% (Tabelle 10). Es befinden sich 2 SNPs in dem Abschnitt. Zu einem zweiten SNP gibt es Frequenz-Angaben, zu dem ersten nicht. Das SNP rs114010776 ist ein G/T-Polymorphismus und wurde in einer Gruppe von 120 Personen untersucht. Das G-Allel zeigt die Häufigkeit von 0,975, das T-Allel 0,025. Auch hier wurde keine Aufteilung in homo- und heterozygote Genotypen vorgenommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Das zweite SNPs liegt in der Zielsequenz des reversen Primers (Abbildung 85).

```

ACCAAGAAGAGTCCAGGGGACACTTGGGCAGAGTCACCCTCTTGCCATGTCCCCAGCTGCTGAAGCCGGCCTGGAACC CGCAGACA
GTTAGTCTT CGCTCAACCTGATTTGGCTCTCTGGCAGCCTCGTCCTT CGCCATCGAACATGCGGGTGTATCATAATACTCTGAAGGG
GGGAAA

```

Abbildung 85 Genomische Sequenz des Vag2-Locus. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die zwei bekannten SNPs grün und die Primer-Stellen sind grau unterlegt (forward-Primer dunkelgrau, reverse-Primer hellgrau). Das CpG-Dinukleotid, das im SNuPE-Assay für die Messung der Methylierung verwendet wird, ist rot markiert und die Bindungsstelle des 1f-SNuPE-Primers ist unterstrichen.

3.6.2.3 Zielregion - SNuPE

Die Bisulfit-konvertierte Sequenz des Vag2-Markers besitzt einen GC-Gehalt von 32%. Acht CpG-Dinukleotide sind enthalten. Auch in diesem Fall zeigte ein einzelner SNuPE-Primer die beste

Unterscheidung zwischen Vaginalflüssigkeit und anderen Körperflüssigkeiten. So wird Vag2-Assay die Methylierung ebenfalls nur an einem CpG gemessen. Der 1f-SNuPE-Primer detektiert die Methylierung des Ziel-CpGs in die forward-Richtung (Abbildung 86).

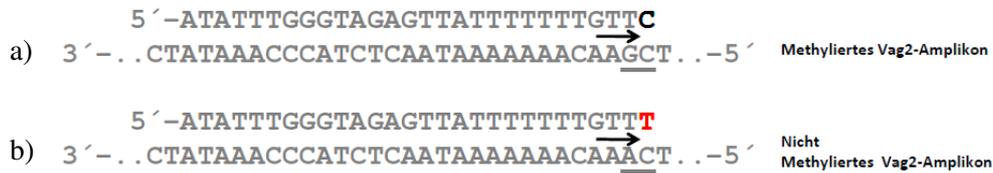


Abbildung 86 Die Reaktion des forward SNuPE-Primers Vag2-1f. Das Amplikon befindet sich auf dem 1. Bisu-Strang. Die Amplikonsequenz ist in 3'-5'-Richtung abgebildet. Der 1f-Primer wird an seinem 3'-Ende entweder um ein C (schwarz, a) an der methylierten Sequenz oder um ein T (rot, b) an der nicht methylierten Amplikon-Sequenz verlängert.

Der SNuPE-Primer 1f besteht aus 27 Basen. Der Primer arbeitet nach dem konventionellen Prinzip der Methylierungs-Messung per SNuPE - er wird entweder um die methylierte oder die nicht methylierte Base verlängert. Bei der Detektion des Primers repräsentiert das schwarze Signal den Anteil der methylierten Amplikon-Kopien und das rote Signal den Anteil der nicht methylierten Kopien in der Probe. Das Verhältnis der beiden Primersignale zueinander, gibt den Methylierungs-Status der Probe wieder (in der Abbildung 87 sind es 47% Methylierung).

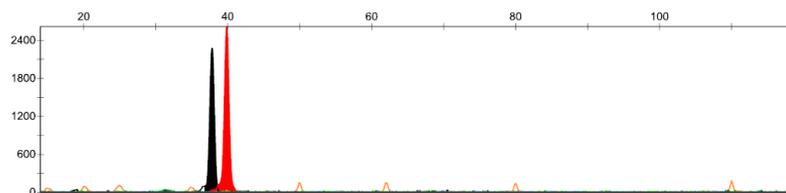


Abbildung 87 Detektion des Vag2-SNuPE-Primers 1f. Abbildung eines Plot-Fensters nach der Datenauswertung mit GeneMapper ID 3.2.

3.6.2.4 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse

Die Abbildung 88 zeigt das Ergebnis des Sensitivitäts- und Stabilitätstestes mit jeweils 4 Proben Vaginalflüssigkeits-DNA einer Konzentration.

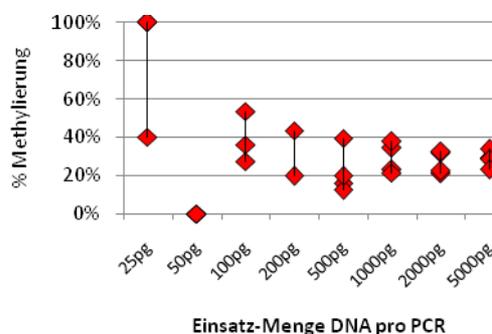


Abbildung 88 Marker Vag2 - Messung der Nachweisempfindlichkeit in jeweils vier unabhängigen Analysen von acht unterschiedlichen Konzentrationen von DNA aus Vaginalflüssigkeit; die eingesetzten DNA-Mengen pro PCR sind auf der Abszisse aufgelistet.

Stabile Messungen erreicht man ab 500 pg. Auch bei diesem Marker definieren wir diesen Wert als Empfindlichkeitsgrenze.

3.6.2.5 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen

Die eventuelle gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Körperflüssigkeiten wird im Mischungsexperiment überprüft (Abbildung 89).

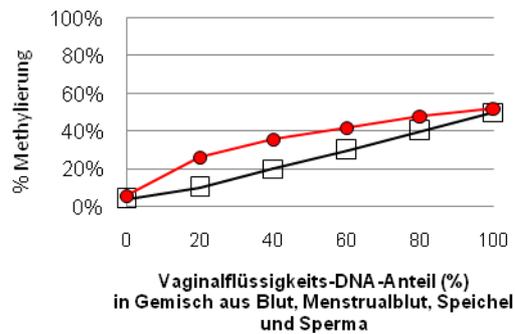


Abbildung 89 Marker Vag2 - Messung von Vaginalflüssigkeit in einem Flüssigkeitsgemisch. Der Sollwert (schwarz) entspricht dem errechneten Methylierungswert, der sich aus den Werten der fünf Körperflüssigkeiten ergibt, und dem Anteil der Blut-DNA in der jeweiligen Mischprobe. Der Istwert (rot) entspricht dem tatsächlich detektierten Wert.

Auch hier verlaufen die Messpunkte für die Methylierung der Vaginalflüssigkeits-DNA etwas höher als die Erwartungswerte.

3.6.2.6 Individuelle Streuung der Methylierungswerte

In Abbildung 90 ist das Differenzierungspotential des Markers Vag2 gegenüber den übrigen Körperflüssigkeiten dargestellt. Eine Überlappung der Werte beobachtet man nur beim Menstrualblut.

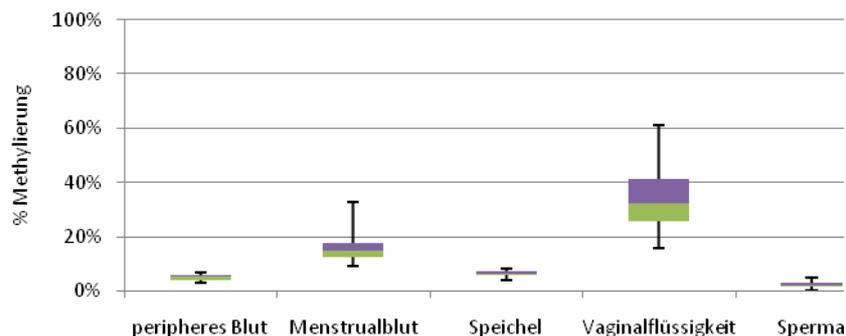


Abbildung 90 Marker Vag2 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungswerte in 20 DNA-Proben von 5 Körperflüssigkeiten, vermessen mit SNUPE-Primer 1f.

Die Vaginalflüssigkeits-Proben weisen eine vergleichsweise breite Streuung auf und eine durchschnittliche Methylierung von 34%. Der niedrigste Methylierungswert beträgt hier 17%. Wie auch bei dem Vag1-Marker, zeigen Peripheres Blut, Speichel und Sperma sehr geringe Streuung. Der Durchschnittswert bei Menstrualblut beträgt 16% Methylierung.

3.6.2.7 Erweiterte Validierung

Die Probandengruppe entspricht der beim Marker Vag1 eingesetzten (siehe Abbildung 79).

Wegen der auch bei diesem Marker beobachtbaren Abhängigkeit vom Zykluszeitpunkt bzw. Hormonstatus ist nicht unbedingt eine Normalverteilung zu erwarten. Im Gegensatz zu dem Vag1-Marker zeigen hier die meisten Werte 31 bis 40% Methylierung (Abbildung 91). Der Mittelwert der Methylierung beträgt hier 40%.

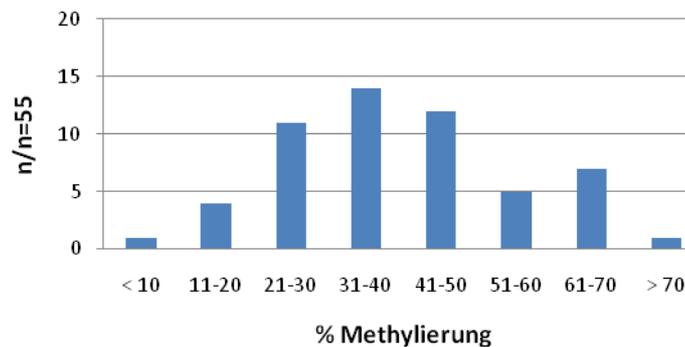


Abbildung 91 Marker Vag2 - Verteilung der Methylierungswerte von n= 55 Vaginalflüssigkeits-Proben. Auf der Abszisse sind die Werte-Gruppen angegeben, wobei die Einteilung in Gruppen in Abhängigkeit von der Gesamtheit der Werte, willkürlich gewählt ist. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Proben aufgezählt, deren Werte in die entsprechende Kategorie fallen.

In der Abbildung 92 ist die Abhängigkeit des Methylierungssignal von dem Alter und Zyklustag der Frauen dargestellt. In das Diagramm sind 41 von 55 Werten einbezogen, da nicht von allen Probandinnen Angaben zum Zyklustag vorlagen.

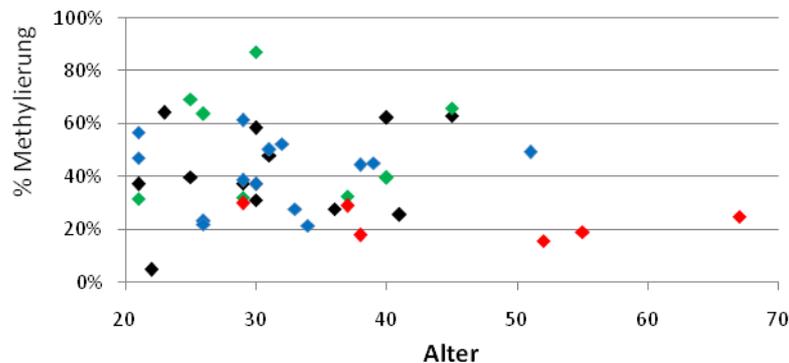


Abbildung 92 Marker Vag2 - Zykluszeitpunkt-und Altersabhängigkeit der Methylierungswerte. Die Datenpunkte der verschiedenen Zykluszeitpunkte sind farblich differenziert. Die Ergebnisse der Proben aus Zyklusbeginn (n=13) sind schwarz, die Ergebnisse aus Zyklus-Mitte/Eisprung (n=8) grün, die Ergebnisse aus Zyklus-Ende (n=14) blau und die Ergebnisse der Proben von Frauen mit erniedrigtem Östrogenspiegel (Menopause oder nach einer Entbindung, n=6) sind rot dargestellt. Das Alter ist auf der Abszisse aufgetragen. An die Datenpunkte ist eine lineare Trendlinie gelegt, die in den entsprechenden Farben abgebildet ist.

Auch hier zeigen Frauen in der Menopause oder nach der Schwangerschaft im Vergleich zu den drei übrigen Gruppen niedrigeren Methylierungswerte (durchschnittlich 22%). Die Vaginalflüssigkeits-Proben aus Zyklus-Mitte zeigen den höchsten Mittelwert von 53%. Die Proben aus Zyklus-Anfang und Zyklus-Ende weisen den gleichen durchschnittlichen Wert von 41%

Methylierung auf. Damit besteht bei dem Vag2-Marker eine größere Differenz der Werte zwischen den verschiedenen Zyklus-Zeitpunktgruppen als bei dem Marker Vag1.

3.6.2.8 Forensische Validierung

Die forensischen Simulationsexperimente sind in der Abbildung 93 dargestellt.

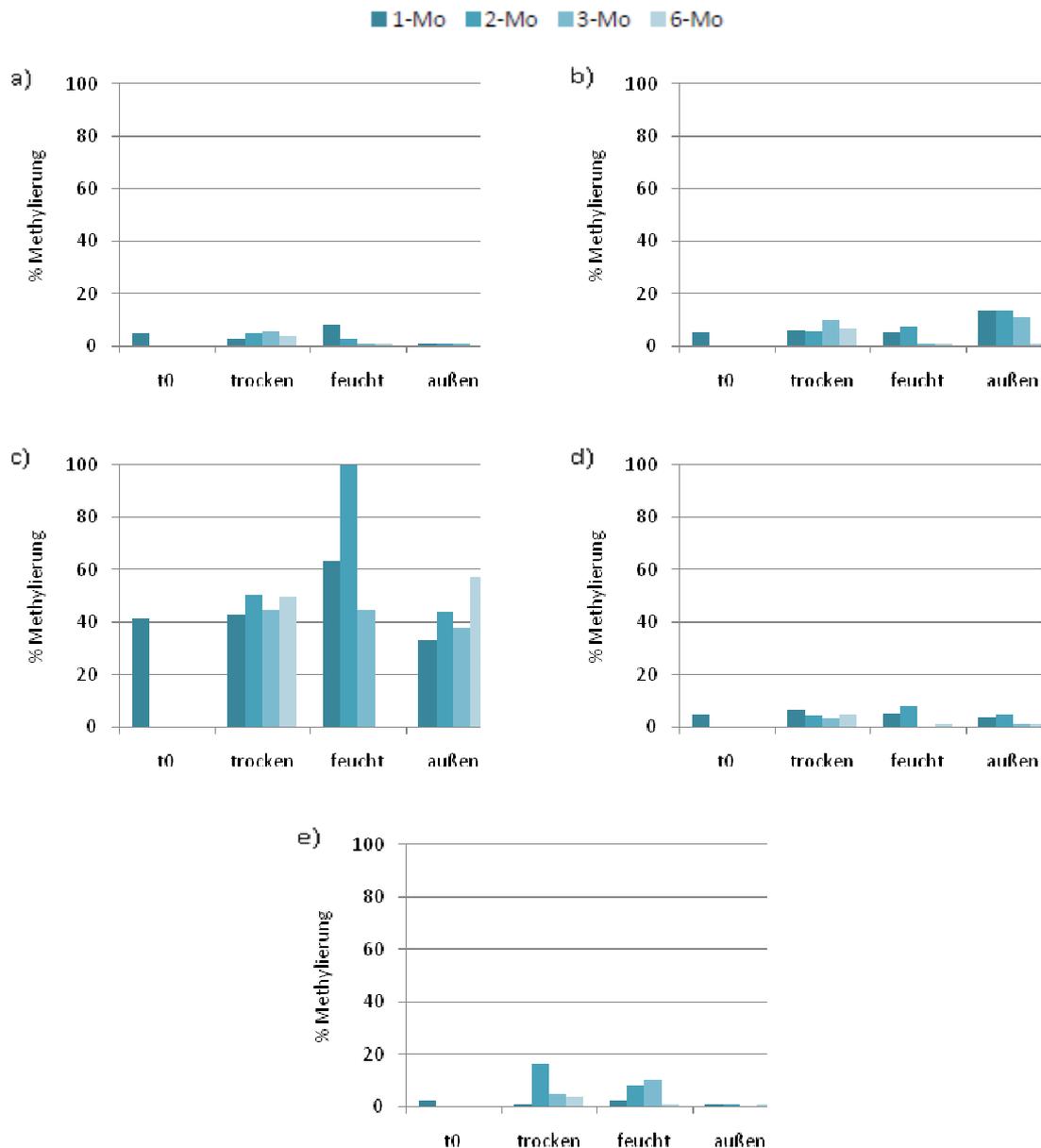


Abbildung 93 Marker Vag2 - Methylierungsergebnisse der simulierten forensischen Spuren, die unter trockenen und feuchten Bedingungen, sowie außen, gelagert wurden. Die Lagerungsdauer beträgt 1, 2, 3 und 6 Monate. Die Werte aus den verschiedenen Alterungszeitpunkten sind farblich differenziert (siehe Legende). Peripheres Blut (a), Menstrualblut (b), Vaginalflüssigkeit (c), Speichel (d) und Sperma (e). Der Ausgangsmethylierungswert von Marker Vag2 ist als t0 gekennzeichnet.

Bei Vaginalflüssigkeits-Spuren bleiben die Werte, abgesehen von dem Methylierungswert der im Feuchtmedium 2 Monate gelagerten Probe (100% Methylierung) und einem Signalausfall nach sechsmonatiger Lagerung, unter den hier simulierten forensischen Bedingungen stabil (Abbildung

93c). Die Methylierungswerte der übrigen Flüssigkeiten weichen ebenfalls nur geringfügig von dem Nullwert ab.

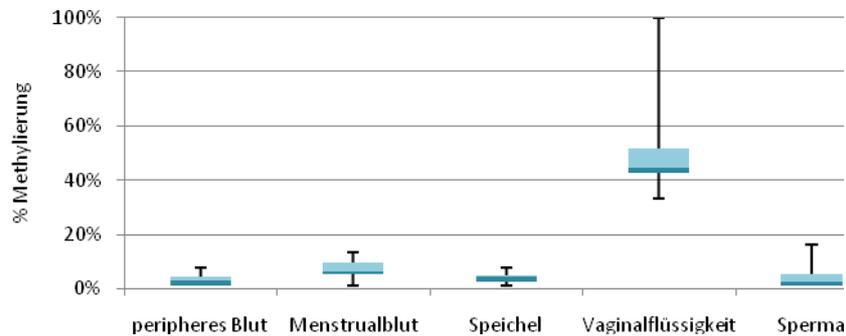


Abbildung 94 Marker Vag2 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungs-Werte im Spurenalterungs-Experiment. Einbezogen sind alle Werte der entsprechenden Flüssigkeit aus dem gesamten Experiment.

Abbildung 94 zeigt, dass die Methylierungswerte durch die simulierten, forensischen Bedingungen ihr Differenzierungspotential nicht verlieren.

3.6.2.9 Next Generation Sequenzierung

Auch hier wurde mit Hilfe von NGS überprüft, wie gut die SNUPE-Nachweismethode die tatsächliche Methylierungssituation widerspiegelt (Abbildung 95).

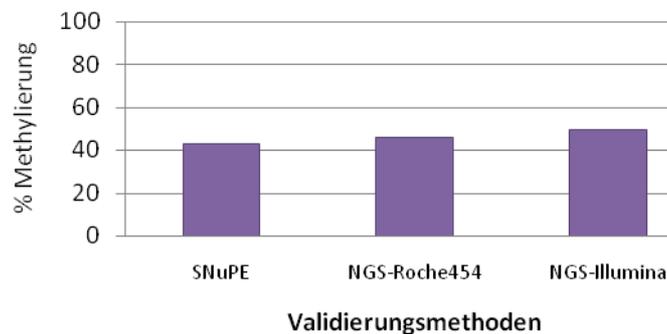


Abbildung 95 Marker Vag2 - Gegenüberstellung der Methylierungsergebnisse an dem Ziel-CpG (1f-Detektionsstelle) von einer gleichen Vaginalflüssigkeits-Probe aus vier verschiedenen Analysemethoden: Bisulfit-Sequenzierung, Single Nucleotide Primer Extension sowie Next Generation Sequencing mit Roche454 (949 Reads) und Illumina MiSeq (9690 Reads).

Der SNUPE-Messwert ist mit 43% auch hier etwas niedriger als die Werte der beiden Goldstandard-Methoden der NGS. Sie betragen 46% bei der Roche-Messung und 49% bei der Illumina-Messung. Für diesen Marker liegen keine Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung vor.

3.7 Sperma

Für die Untersuchung von Sperma wurden zwei entgegengesetzt detektierende Marker entwickelt. Mit dem ersten Marker lassen sich Beimischungen anderer Flüssigkeiten im Sperma nachweisen. Der zweite Marker reagiert ausschließlich auf Sperma mit einem spezifischen Methylierungssignal.

3.7.1 Methylierungs-Marker Sperm-1

3.7.1.1 Die Genort-Eigenschaften

Tabelle 11 Die Genort-Beschreibung des Markers Sperm1

Marker	Chr	CpG-Insel	Gen Symbol	Genprodukt	Chromosom	Genlocus	Locus Architektur
Sperm-1	6	Nein (66% GC) 13cg/217bp	TCP11	T-complex protein homolog	11	5'-Ende: Exon	TCP11-009

Der Marker Sperm1 ist normalerweise in dem männlichen Sperma vollständig unmethyliert. In den übrigen Körperflüssigkeiten (peripheres Blut, Menstrualblut, Speichel und Vaginalflüssigkeit) und Haut zeigt er nahezu vollständige Methylierung. Der Locus befindet sich auf der Bande p21.31 des Chromosom6, auf dem Plus-Strang. Sein 5'-Ende (116bp) liegt in einem Exon des Gens TCP11. Das Gen kodiert einen hodenspezifischen T-Komplex Protein 11 - ein Peptidrezeptor für FPP (Fertilization promoting peptide). Die biologische Funktion des FP-Peptids ist die Vermittlung der Kapazitation (physiologischer Reifungsprozess des Spermiums, aktiviert durch die Zervixflüssigkeit in dem weiblichen Genitaltrakt) und Akrosomreaktion in dem Spermiumkopf (Liu et al. 2011). Das TCP11-Gen wird spezifisch nur in reifen und erwachsenen Hoden exprimiert. Genexpressions-Untersuchungen an normalen - und Tumorgewebe zeigen eine hohe Expressionsrate in normalen Hodengewebe und nahezu keine Expression in anderen getesteten Geweben sowie in dem Hodengewebe beim Vorhandensein von Hodencarcinom (<http://medical-genome.kribb.re>).

3.7.1.2 Konstruktion des Amplifikats

Das 217bp lange Sperm1-Amplikon weist, trotz des relativ hohen GC-Gehalts in seiner genomischen Sequenz (66%), keine CpG-Inseln auf (Tabelle 11). Der Abschnitt enthält zwei bekannte SNPs, die außerhalb von Primer-Bindungsstellen liegen. Zu dem zweiten SNPs gibt es Frequenzangaben. Dieses C/T-Polymorphismus (rs117820670) wurde in einer Gruppe von 120 Personen untersucht. In dieser Arbeit zeigte das C-Allel die Häufigkeit von 0,942, das T-Allel 0,058. Eine Aufteilung in homo- und heterozygote Genotypen wurde auch hier nicht vorgenommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Für die folgende SNUPE-Analyse wird ein - im Amplikon relativ zentral gelegenes - CpG verwendet (Abbildung 96).

```

CATGCATGGGGCTTTTCTTCAGGCIGT TTGGACAGC CGAGAAGC CGAGCCACACCCAGGAGGGTTGTTTCACAGCG TGTGCG CAGGGGCG
CAGGGGCG CG CTCTTTCCTCACATGTGGGAGAAG CGGAGGAGCC CCAGGGCTGGGCCAGGC CTG CCACTGGGGTTC CGCCCTTGT
CGCCCTC CG CCTC CTGGGCTCTAGCCCTTGCCCTT

```

Abbildung 96 Genomische Sequenz des Sperm1-Locus. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die zwei bekannten SNPs grün und die Primer-Stellen sind grau unterlegt (forward-Primer dunkelgrau, reverse-Primer hellgrau). Das CpG-Dinukleotid, das im SNUPE-Assay für die Messung der Methylierung verwendet wird, ist rot markiert und die Bindungsstelle des 4r-SNUPE-Primers ist unterstrichen.

3.7.1.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitequenzierung

Die in Abbildung 97 gezeigten Ergebnisse der Bisulfitequenzierung machen wahrscheinlich, dass an diesem Genort alle CpGs eine Unterscheidung zwischen Sperma und den übrigen Körperflüssigkeiten gestatten. Den insgesamt schärfsten Unterschied zeigte das CpG cg101, welches in dem SNUPE-Assay als das analytische CpG verwendet wird.

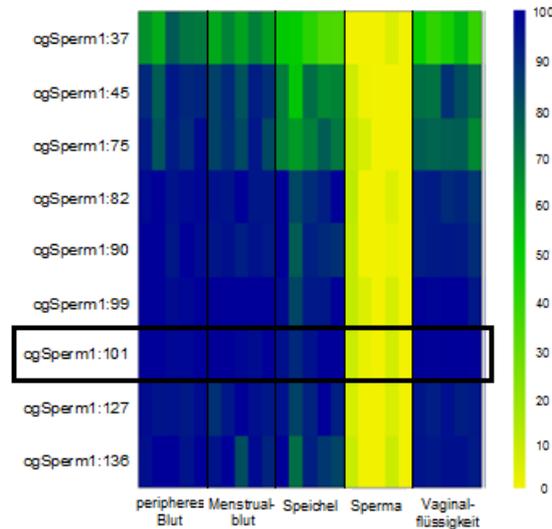


Abbildung 97 DNA-Methylierung im Sperm1-Locus. Einbezogen sind jeweils fünf Proben vom peripheren Blut, Menstrualblut, Speichel und Sperma, sowie sechs Proben von Vaginalflüssigkeit. Jede Spalte stellt eine Probe dar. Die Zeilen repräsentieren die 9 analysierten CpGs innerhalb des Amplikons. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung) - entsprechend der Farbskala auf der rechten Seite. Das analytische CpG ist durch das schwarze Rechteck umrandet.

3.7.1.4 Zielregion - SNUPE

Die Bisulfite-konvertierte Sequenz des Sperm1-Markers besitzt einen GC-Gehalt von 38% und es sind 13 CpG-Dinukleotide in dem Amplikon enthalten. Der 4r-SNUPE-Primer zeigte die beste Unterscheidung zwischen Sperma und anderen Körperflüssigkeiten, so dass in dem Sperm1-Assay die Methylierung nur an einem CpG gemessen. Der 4r-Primer detektiert die Methylierung des Ziel-CpGs in die reverse-Richtung (Abbildung 98).

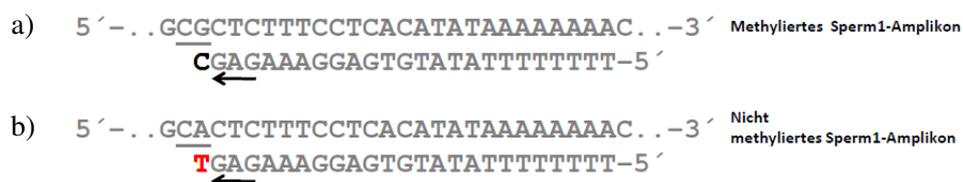


Abbildung 98 Die Reaktion des reversen SNUPE-Primers Sperm1-4r. Das Amplikon befindet sich auf dem 2. Bisustrang. Die Amplikonsequenz ist in 5'-3'-Richtung abgebildet. Der 4r-Primer wird an seinem 3'-Ende entweder um ein C (schwarz, a) an der methylierten Sequenz oder um ein T (rot, b) an der nicht methylierten Amplikon-Sequenz verlängert.

Der SNUPE-Primer 4r besteht aus 24 Basen. Der Primer funktioniert nach dem konventionellen Prinzip der Methylierungs-Messung per SNUPE - er wird entweder um die methylierte oder die nicht methylierte Base verlängert. Bei der Detektion des Primers repräsentiert das schwarze Signal den Anteil der methylierten Amplikon-Kopien und das rote Signal den Anteil der nicht

methylierten Kopien in der Probe. Der Sperm1-Marker ist in seiner Zielflüssigkeit Sperma – nahezu vollständig unmethyliert und zeigt somit ein einziges rotes Signal (Abbildung 99a) Die restlichen Flüssigkeiten – peripheres Blut, Menstrualblut, Speichel und Vaginalflüssigkeit - sind methyliert und zeigen dementsprechend schwarze Signale (Abbildung 99b). Ein Mischsignal (schwarz und rot) – wie es in den anderen beschriebenen Markern zu sehen ist - bedeutet in diesem Fall, dass neben Sperma noch mindestens eine weitere Flüssigkeit in der Probe enthalten ist.

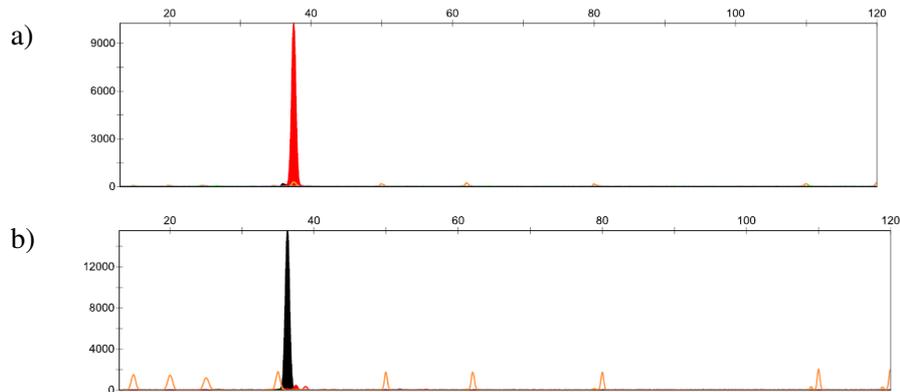


Abbildung 99 Detektion des Sperm1-SNuPE-Primers 4r in einer Sperma-Probe (a) und einer Blut-Probe (b). Abbildung von zwei Plot-Fenstern nach der Datenauswertung mit GeneMapper ID 3.2

3.7.1.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse

In Abbildung 100 wird das Ergebnis des Sensitivitäts- und Stabilitätstestes mit jeweils 4 Proben Sperma-DNA einer Konzentration gezeigt.

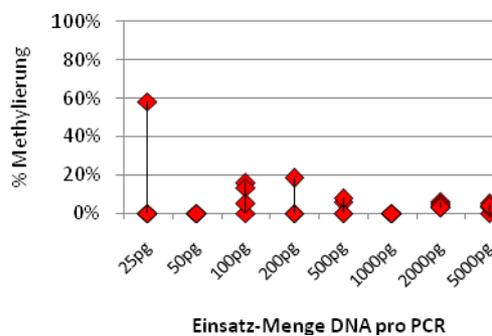


Abbildung 100 Marker Sperm1 - Messung der Nachweisempfindlichkeit in jeweils vier unabhängigen Analysen von acht unterschiedlichen Konzentrationen von Sperma-DNA; die eingesetzten DNA-Mengen pro PCR sind auf der Abszisse aufgelistet.

Die Nachweisgrenze liegt für den Marker Sperm1 bei 100 pg. Grundsätzlich wird jede Messung an einer biologischen Spur als Triplikatmessung durchgeführt, so dass man erkennen kann, ob man sich im Bereich für eine stabile Messung befindet oder nicht.

3.7.1.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen

Die eventuelle gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Körperflüssigkeiten wird im Mischungsexperiment überprüft (Abbildung 101).

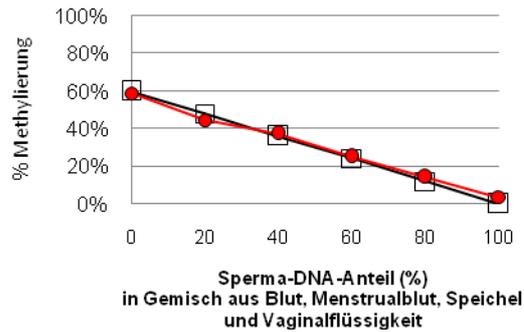


Abbildung 101 Marker Sperm1 - Messung von Sperma in einem Flüssigkeitsgemisch. Der Sollwert (schwarz) entspricht dem errechneten Methylierungswert, der sich aus den Werten der fünf Körperflüssigkeiten ergibt, und dem Anteil der Blut-DNA in der jeweiligen Mischprobe. Der Istwert (rot) entspricht dem tatsächlich detektierten Wert.

Die Übereinstimmung zwischen Soll - und Istwert ist bei dem Sperm1-Marker nahezu perfekt. Keine Beeinflussung des spermaspezifischen Signals ist festzustellen.

3.7.1.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte

In Abbildung 102 ist das Differenzierungspotential des Markers Sperm1 gegenüber den übrigen Körperflüssigkeiten dargestellt. Eine Überlappung der Werte beobachtet man nicht.

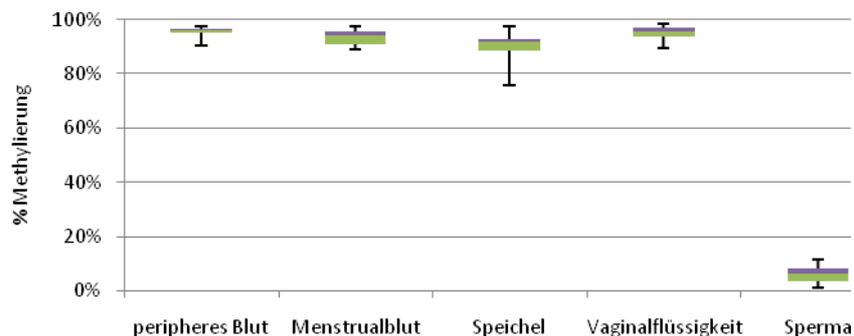


Abbildung 102 Marker Sperm1 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungswerte in 20 DNA-Proben von 5 Körperflüssigkeiten, vermessen mit SNUPE-Primer 4r.

Das Sperma weist einen Streubereich von 1 bis 11% auf und einen durchschnittlichen Methylierungswert von 6%. Die Durchschnittswerte der Methylierung bei den übrigen Flüssigkeiten liegen zwischen 91% bei Speichel und 96% bei peripherem Blut.

3.7.1.8 Erweiterte Validierung

Um statistisch relevante Daten zu erhalten, wurden insgesamt 91 männliche Personen mit den beiden Sperma-Markern Sperm1 und Sperm2 überprüft. Die Altersverteilung der Probanden ist in der Abbildung 103 dargestellt.

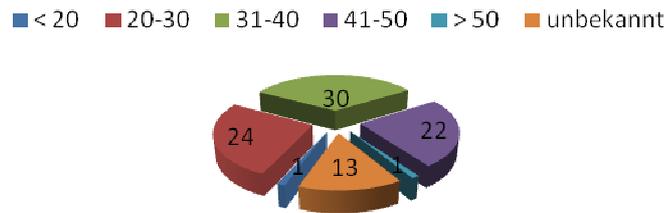


Abbildung 103 Alter der Sperma-Probanden, deren Werte in die Untersuchung der Marker Sperm1 und Sperm2 einbezogen wurden (n=91).

Die Messergebnisse der ersten Validierungsrunde (vorhergehendes Kapitel, Abbildung 102) und der großen Validierung mit weiteren 71 Proben sind im Folgenden zusammengefasst. Drei Proben sind ausgefallen. Die Verteilung der Methylierungswerte ist in der Abbildung 104 dargestellt.

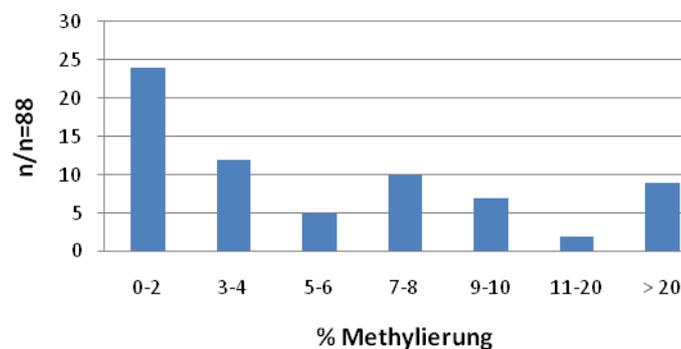


Abbildung 104 Marker Sperm1 - Verteilung der Methylierungswerte von n= 88 Sperma-Proben. Auf der Abszisse sind die Werte-Gruppen angegeben, wobei die Einteilung in Gruppen in Abhängigkeit von der Gesamtheit der Werte, willkürlich gewählt ist. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Proben aufgezählt, deren Werte in die entsprechende Kategorie fallen.

Die Gesamtheit der Methylierungswerte des Sperm1-Markers entspricht einer extrem schiefen Verteilung. Die meisten Proben weisen 0 bis 2% Methylierung auf. Der durchschnittliche Methylierungswert beträgt 8% und liegt damit 2% höher als der Durchschnittswert der Sperma-Proben in der kleinen Validierungsrunde (siehe Abbildung 102). Von den 88 gemessenen Proben zeigen 9 Proben Werte, die über 20% Methylierung betragen. Vier Proben liegen außerhalb der zweifachen Standardabweichung von 35% und fallen damit in die Kategorie der statistischen Ausreißer-Werte. Die zugehörigen Probanden sind im Alter von 25 bis 35 Jahren. Die Ursache ist durch Einsatz des Vaginalmarkers gefunden worden: Die Vaginalflüssigkeit ist in dem Sperm1-Marker vollständig methyliert. Die Probanden hatten offenbar kurz vor der Probenabgabe Geschlechtsverkehr hatten. Alle Proben stammten aus der Samenbank der dermatologischen Klinik der Universität Bonn.

In der Abbildung 105 sind die Werte aus der statistischen Validierung nach Alter der männlichen Probanden gegliedert.

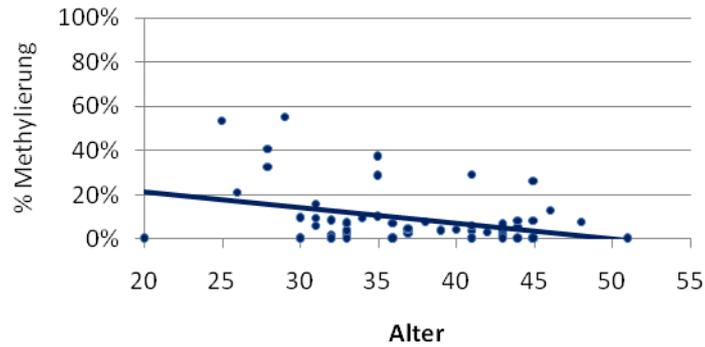
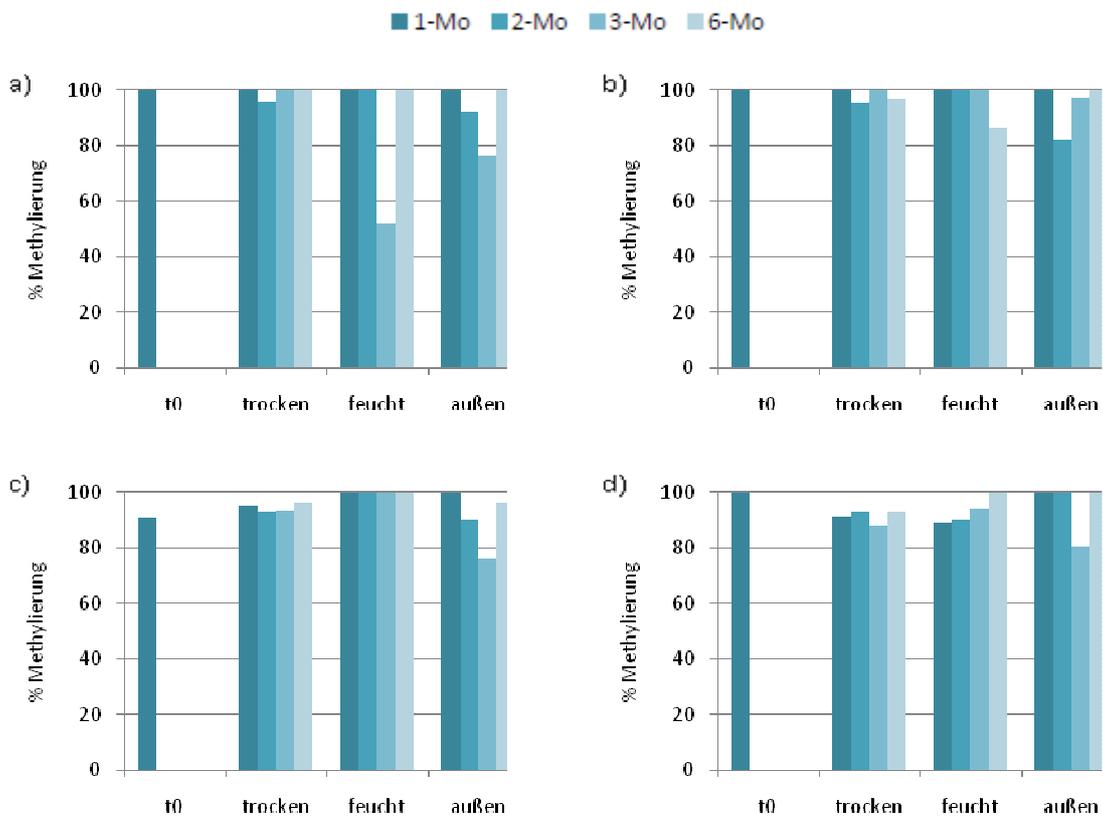


Abbildung 105 Marker Sperm1 - Altersabhängigkeit der Methylierungswerte. Einbezogen sind die Werte der Probanden, deren Alter bekannt war (n=57). An die Datenpunkte ist eine lineare Trendlinie gelegt; sie zeigt normalerweise die gleichmäßige Zunahme oder Abnahme von Werten.

Auf den ersten Blick scheint tatsächlich eine Abhängigkeit der Methylierungswerte von dem Alter zu existieren. Lässt man jedoch die 4 Werte der statistischen Ausreißer weg, verläuft die Regressionsgerade vollkommen parallel zu der X-Achse und zeigt keine Altersabhängigkeit mehr.

3.7.1.9 Forensische Validierung

Die forensischen Simulationsexperimente sind in Abbildung 106 dargestellt.



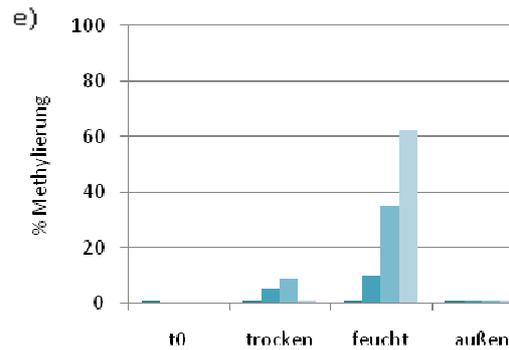


Abbildung 106 Marker Sperm1 - Methylierungsergebnisse der simulierten forensischen Spuren, die unter trockenen und feuchten Bedingungen, sowie außen, gelagert wurden. Die Lagerungsdauer beträgt 1, 2, 3 und 6 Monate. Die Werte aus den verschiedenen Alterungszeitpunkten sind farblich differenziert (siehe Legende). Peripheres Blut (a), Menstrualblut (b), Vaginalflüssigkeit (c), Speichel (d) und Sperma (e). Der Ausgangsmethylierungswert von Marker Sperm1 ist als t0 gekennzeichnet.

Die Methylierungswerte der meisten Flüssigkeitsspuren sind auch unter den simulierten, forensischen Bedingungen stabil. Eine 3 Monate alte Blut-Probe zeigt unter feuchten Lagerbedingungen ein um 50% herabgesetztes Methylierungssignal. Nach weiteren 3 Monaten Lagerung unter den gleichen Bedingungen lässt sich das erniedrigte Signal jedoch nicht wieder bestätigen (Abbildung 106a). Die feuchte Umgebung scheint sich auch auf die Methylierung der Sperma-Proben auszuwirken. Hier verursacht sie den entgegengesetzten Effekt - die Methylierung steigt im Verlauf der Zeit (Abbildung 106e).

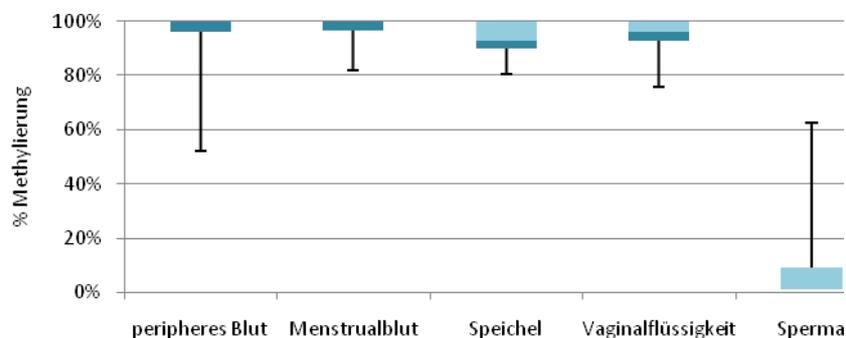


Abbildung 107 Marker Sperm1 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungs-Werte im Spurenalterungs-Experiment. Einbezogen sind alle Werte der entsprechenden Flüssigkeit aus dem gesamten Experiment.

Die forensische Differenzierungskraft geht unter den forensischen Bedingungen nicht verloren, wie aus Abbildung 107 hervor geht.

3.7.1.10 Next Generation Sequenzierung

Von der Auswertungsmethode her ist es nicht überraschend, dass bei erwarteten annähernd 0% Methylierung die Bisulfitsequenzierung das ungenaueste Ergebnis liefert beim Vergleich mit SNUPE und NGS (Abbildung 108).

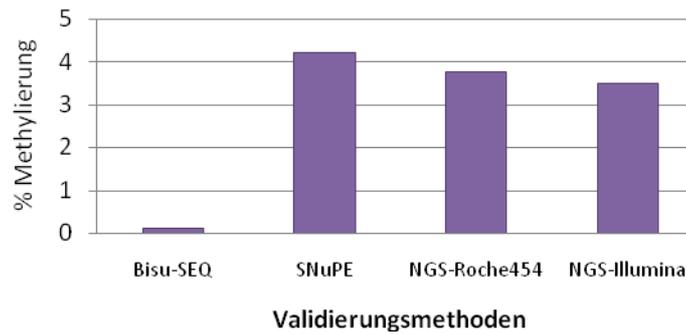


Abbildung 108 Marker Sperm1 - Gegenüberstellung der Methylierungsergebnisse an dem Ziel-CpG (4r-Detektionsstelle) von einer gleichen Sperma-Probe aus vier verschiedenen Analysemethoden: Bisulfit-Sequenzierung, Single Nucleotide Primer Extension sowie Next Generation Sequencing mit Roche454 (821 Reads) und Illumina MiSeq (7276 Reads).

Die Differenz zwischen den Werten aus SNUPE-Analyse und NGS-Messung beträgt weniger als 1%. Mit Hilfe von Bisulfit-Sequenzierung konnte der geringe Methylierungsstatus der Spermaprobe nicht detektiert werden. Hier war das Ergebnis 0% Methylierung.

3.7.2 Methylierungs-Marker Sperm-2/Men3

3.7.2.1 Die Genort-Eigenschaften

Tabelle 12 Die Genort-Beschreibung des Markers Sperm2

Marker	Chr	CpG-Insel	Gen Symbol	Genprodukt	Locus Architektur
Sperm-2	2	Nein (62% GC) 7cg/215bp	VAMP8	Vasicle-Associated Membrane Protein 8	158bp-3'UTR: VAMP8-003

Der Marker Sperm2 zeigt in der Regel in dem männlichen Sperma vollständige Methylierung. In den übrigen Körperflüssigkeiten (peripheres Blut, Menstrualblut, Speichel und Vaginalflüssigkeit) und Haut ist er nahezu vollständig unmethyliert. Der Sperm2-Marker arbeitet somit in entgegengesetzte Richtung, verglichen mit dem Sperm1-Marker. Der Locus befindet sich auf der Bande p11.2 des Chromosoms 2, auf dem Minus-Strang. Sein 3'-Ende liegt 158 bp entfernt von einem Exon des Gens VAMP8 (Vasicle-associated membrane protein 8). Das Gen kodiert ein integrales Membranprotein (Rezeptor), das die Fusion Transportvesikeln mit ihrer Zielmembran bei der rezeptorvermittelten Exocytose reguliert. Beispielsweise ist es bei der geregelten Sekretion in pankreasspezifischen Acinarzellen, Mastzellen, cytotoxischen T-Lymphocyten, Thrombozyten und Epithelzellen der Nieren-Sammelrohre beteiligt (Behrendorff et al. 2011). Nach Angaben der Proteindatenbank des UniProt Consortiums (www.uniprot.org) wird das VAMP8-Gen spezifisch in Thrombozyten exprimiert. Das Gen scheint bei der Cancerogenese von Melanomen beteiligt zu sein, in dem es in Melanozyten herunter reguliert wird (Hoek et al. 2004). Bediaga et al (2010) stellten eine Hypomethylierung des VAMP8-Gens in 82 % der Proben von Brusttumorgewebe fest.

3.7.2.2 Konstruktion des Amplifikats

Das 215bp lange Sperm2-Amplikon enthält keine CpG-Inseln und weist einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 62% auf (Tabelle 12). In dem Fragment sind zwei bekannte SNPs enthalten, die außerhalb von Primer-Bindungsstellen liegen. Zu dem ersten SNP in Abbildung 109 gibt es Frequenzangaben. Das C/T-Polymorphismus (rs117820670) liegt im Gegensatz zu dem Sperm2-Amplikon auf dem Plus-Strang. In einer Gruppe von 180 Personen zeigte das C-Allel die Häufigkeit von 0,907 und das T-Allel die Häufigkeit von 0,093. Eine Aufteilung in homo- und heterozygote Genotypen wurde auch hier nicht vorgenommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Für die folgende SNUPE-Analyse wird ein am 3'-Ende des Amplikons gelegenes CpG verwendet.

```
GCTGGAATCTGAACTGGGAAGTCCCGAGGCCTGCCTGGTGTGGTGTCAACACCCCGCCTCGGGCTCCCTGGAGGAGGAAGGCACAACAA
CTCTTTGCCTGGAATTGGAGCCCCCATCGGCGCTGGCACTGAAGCCCAGTCCCCACCAGCACAGAGGTGAGGGGAGGGAGGGAGAAGGA
GTAGAAACACCTGCCAGGACAGCTCAGAGCTAT
```

Abbildung 109 Genomische Sequenz des Sperm2-Locus. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die zwei bekannten SNPs grün und die Primer-Stellen sind grau unterlegt (forward-Primer dunkelgrau, reverse-Primer hellgrau). Das CpG-Dinukleotid, das im SNUPE-Assay für die Messung der Methylierung verwendet wird, ist rot markiert und die Bindungsstelle des 3r-SNUPE-Primers ist unterstrichen.

3.7.2.3 Methylierungsmuster - Ergebnisse der Bisulfitequenzierung

Die Ergebnisse der Bisulfitequenzierung in der Abbildung 110 weisen das analytische CpG der SNUPE-Nachweismethode cg57 als das am deutlichsten differenzierende aus. Es ist danach hoch methyliert in Sperma, während der Methylierungsgrad bei den übrigen Flüssigkeiten gegen 0 geht.

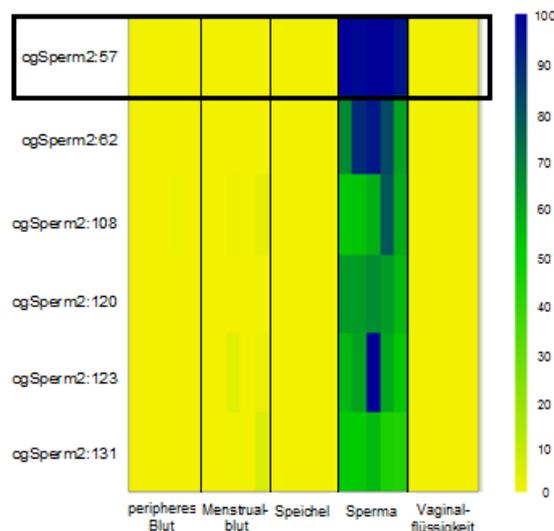


Abbildung 110 DNA-Methylierung im Sperm2 (AMP10008)-Locus. Einbezogen sind jeweils fünf Proben vom peripheren Blut, Menstrualblut, Speichel und Sperma, sowie sechs Proben von Vaginalflüssigkeit. Jede Spalte stellt eine Probe dar. Die Zeilen repräsentieren die 6 analysierten CpGs innerhalb des Amplikons. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung) - entsprechend der Farbskala auf der rechten Seite. Das analytische CpG ist durch das schwarze Rechteck umrandet.

3.7.2.4 Zielregion - SNuPE

Die Bisulfit-konvertierte Sequenz des Sperm2-Markers besitzt einen GC-Gehalt von 33% und enthält 7 CpG-Dinukleotide. Von drei getesteten SNuPE-Primern zeigte der 3r-Primer die beste Unterscheidung zwischen Sperma und anderen Körperflüssigkeiten. Der 3r-Primer detektiert die Methylierung des Ziel-CpGs in die reverse-Richtung (Abbildung 111).

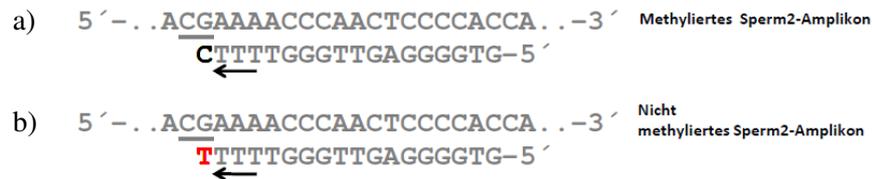


Abbildung 111 Die Reaktion des reversen SNuPE-Primers Sperm2-3r. Das Amplikon befindet sich auf dem 2. Bisu-Strang. Die Amplikonsequenz ist in 5'-3'-Richtung abgebildet. Der 3r-Primer wird an seinem 3'-Ende entweder um ein C (schwarz, a) an der methylierten Sequenz oder um ein T (rot, b) an der nicht methylierten Amplikon-Sequenz verlängert.

Der SNuPE-Primer 3r besteht aus 17 Basen und funktioniert, wie auch der Sperm1-Marker, nach dem konventionellen Prinzip der Methylierungs-Messung per SNuPE. Bei der Detektion des Primers stellt das schwarze Signal den Anteil der methylierten Amplikon-Kopien dar und das rote Signal - den Anteil der nicht methylierten Kopien in der Probe. Der Sperm2-Marker ist in seiner Zielflüssigkeit Sperma – nahezu vollständig methyliert und zeigt in einer solchen Probe ein schwarzes Signal (Abbildung 112a) Die restlichen Flüssigkeiten – peripheres Blut, Menstrualblut, Speichel und Vaginalflüssigkeit - sind nicht methyliert und zeigen entsprechend rote Signale (Abbildung 112b). Ein Methylierungssignal in einer unbekanntem Mischprobe weist auf das Vorhandensein von Sperma hin.

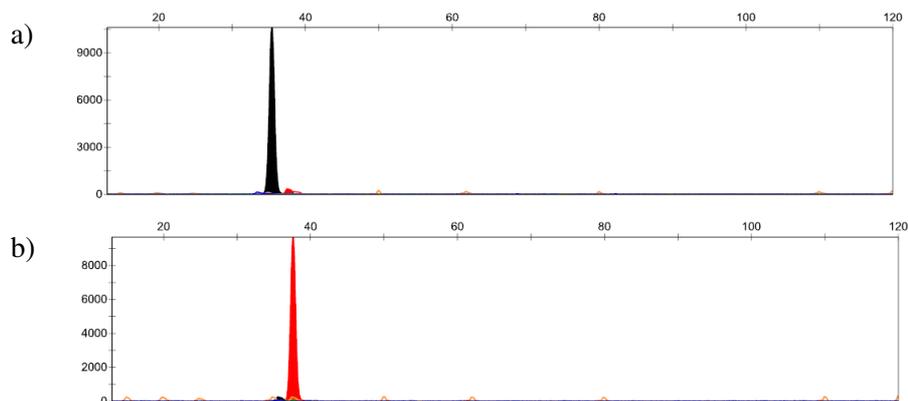


Abbildung 112 Detektion des Sperm2-SNuPE-Primers 3r in einer Sperma-Probe (a) und einer Blut-Probe (b). Abbildung von zwei Plot-Fenstern nach der Datenauswertung mit GeneMapper ID 3.2

3.7.2.5 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse

In Abbildung 113 wird das Ergebnis eines Sensitivitäts- und Stabilitätstestes mit jeweils 4 Proben einer Konzentration gezeigt.

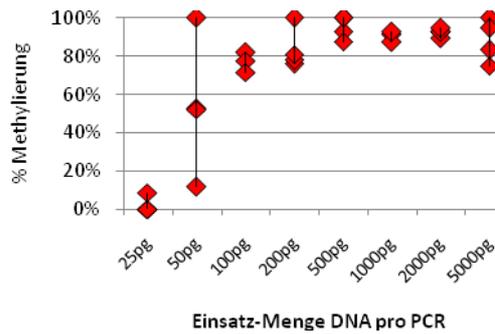


Abbildung 113 Marker Sperm2 - Messung der Nachweisempfindlichkeit in jeweils vier unabhängigen Analysen von acht unterschiedlichen Konzentrationen von Sperma-DNA; die eingesetzten DNA-Mengen pro PCR sind auf der Abszisse aufgelistet.

Stabile Signale ergeben sich bei dem Marker Sperm2 ab 100 pg eingesetzter DNA.

3.7.2.6 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen

Die Abbildung 114 zeigt das Ergebnis des Mischungs-Experimentes.

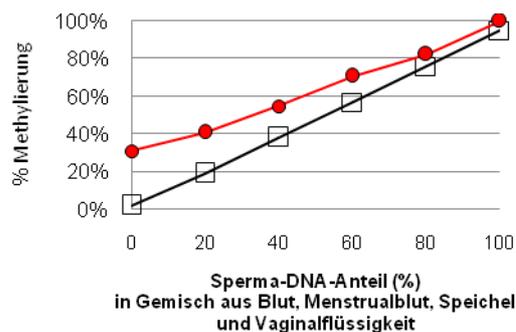


Abbildung 114 Marker Sperm2 - Messung von Sperma in einem Flüssigkeitsgemisch. Der Sollwert (schwarz) entspricht dem errechneten Methylierungswert, der sich aus den Werten der fünf Körperflüssigkeiten ergibt, und dem Anteil der Blut-DNA in der jeweiligen Mischprobe. Der Istwert (rot) entspricht dem tatsächlich detektierten Wert.

Bei dem Marker Sperm2 findet offensichtlich insofern eine Beeinflussung durch die DNA der übrigen Körperflüssigkeiten statt, als systematisch zu hohe Anteile gemessen werden. Je geringer der Anteil an Sperma-DNA ist, desto höher ist die Abweichung vom Sollwert.

3.7.2.7 Individuelle Streuung der Methylierungswerte

In der Abbildung 115 ist das Differenzierungspotential des Markers Sperm2 gegenüber den übrigen Körperflüssigkeiten dargestellt. Auch bei diesem Sperma-Marker ist keine Überlappung der Werte zu beobachten.

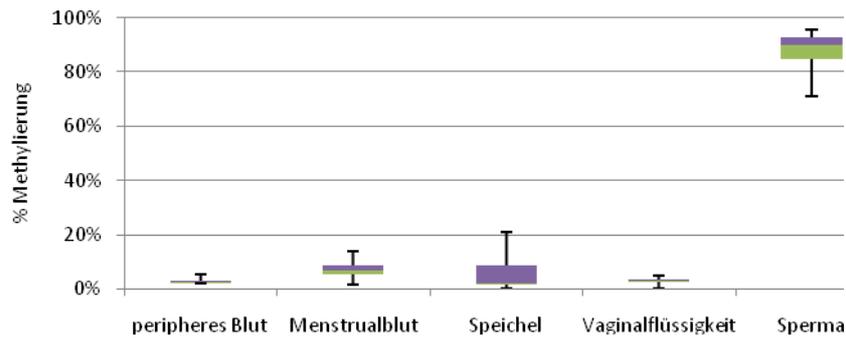


Abbildung 115 Marker Sperm2 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungswerte in 20 DNA-Proben von 5 Körperflüssigkeiten, vermessen mit SNuPE-Primer 3r.

Das Sperma weist einen Methylierungswerte von 70 bis 96% auf und einen Durchschnittswert von 89%. Die durchschnittliche Methylierung liegt bei den übrigen Flüssigkeiten zwischen 2,7% bei Vaginalflüssigkeit und 7,4% bei Menstrualblut. Speichel zeigt, trotz einer relativ breiten Streuung der Werte, im Durchschnitt 5,4% Methylierung.

3.7.2.8 Erweiterte Validierung

Es wurde das gleiche Probenkollektiv verwendet wie für Sperm1.

Die Methylierungswerte der 91 gemessenen Sperma-Proben zeigen eine schiefe Verteilung. Die meisten Proben zeigen 91 bis 99% Methylierung (Abbildung 116).

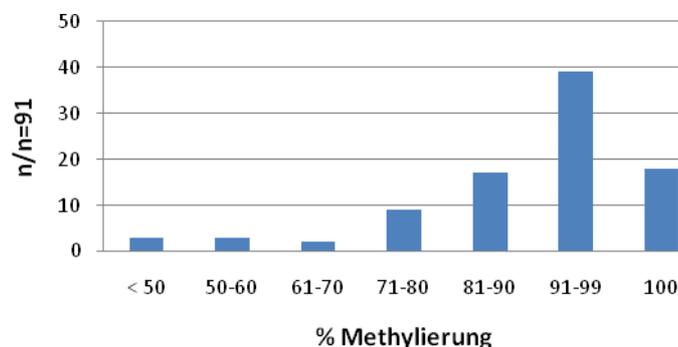


Abbildung 116 Marker Sperm2 - Verteilung der Methylierungswerte von n= 91 Sperma-Proben. Auf der Abszisse sind die Werte-Gruppen angegeben, wobei die Einteilung in Gruppen in Abhängigkeit von der Gesamtheit der Werte, willkürlich gewählt ist. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Proben aufgezählt, deren Werte in die entsprechende Kategorie fallen.

Der durchschnittliche Methylierungswert von 88,3% und liegt damit nur 0,7% niedriger als in der kleinen Validierungsrunde (siehe Abbildung 115).

Von den 91 gemessenen Proben zeigen 6 Proben Werte unter 60% Methylierung. Fünf Proben liegen außerhalb der zweifachen Standardabweichung von 56% und fallen damit in die Kategorie der statistischen Ausreißer-Werte. Drei von den fünf Proben zeigen auch bei dem Marker Sperm1 Werte, die außerhalb der zweifachen Standardabweichung liegen. Die entsprechenden Probanden

sind 28, 29 und 35 Jahre alt. Es handelt sich um die gleichen Personen. Das untermauert die Erklärung durch die Präsenz von Vaginalflüssigkeit in den entsprechenden Sperma-Proben.

Ohne Berücksichtigung der Ausreißer ergibt sich auch für diesen Marker keine Altersabhängigkeit (Abbildung 117).

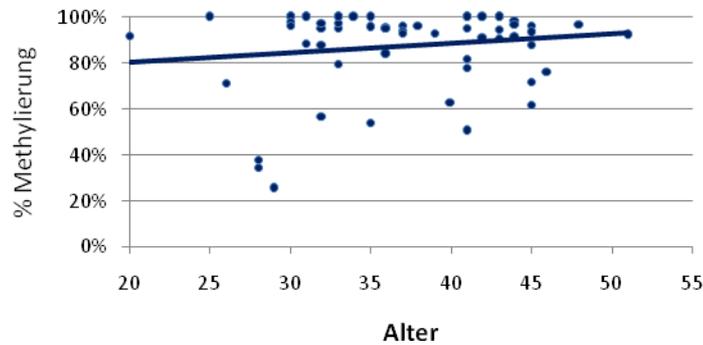
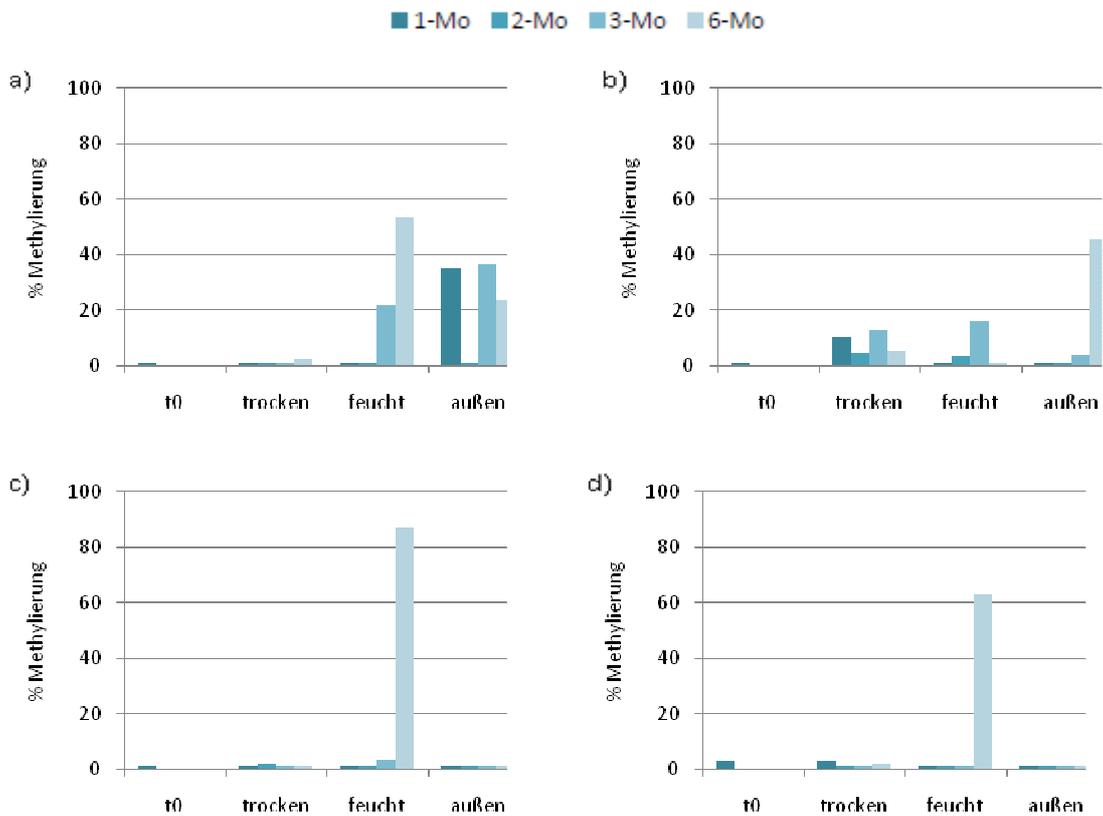


Abbildung 117 Marker Sperm2 - Altersabhängigkeit der Methylierungswerte. Einbezogen sind die Werte der Probanden, deren Alter bekannt war (n=58). An die Datenpunkte ist eine lineare Trendlinie gelegt; sie zeigt normalerweise die gleichmäßige Zunahme oder Abnahme von Werten.

3.7.2.9 Forensische Validierung

Die forensischen Simulationsexperimente für den Marker Sperm2 sind in der Abbildung 118 dargestellt.



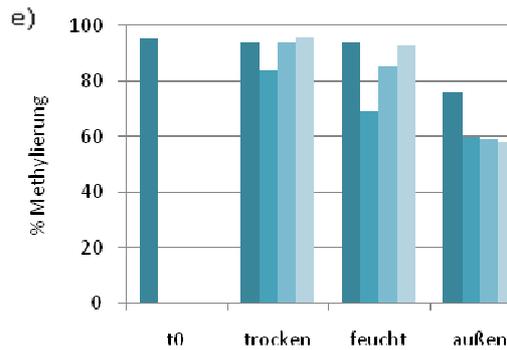


Abbildung 118 Marker Sperm2 - Methylierungsergebnisse der simulierten forensischen Spuren, die unter trockenen und feuchten Bedingungen, sowie außen, gelagert wurden. Die Lagerungsdauer beträgt 1, 2, 3 und 6 Monate. Die Werte aus den verschiedenen Alterungszeitpunkten sind farblich differenziert (siehe Legende). Peripheres Blut (a), Menstrualblut (b), Vaginalflüssigkeit (c), Speichel (d) und Sperma (e). Der Ausgangsmethylierungswert von Marker Sperm2 ist als t0 gekennzeichnet.

Der exogene Einfluss auf den mit Sperm2 gemessenen Methylierungsgrad ist am größten bei den außen gelagerten Proben. Möglicherweise ist das die Wirkung von Mikroben (Abbildung 118e). Die Blut- und Menstrualblut-Proben zeigen unter feuchten und Außen-Bedingungen ebenfalls Werte, die von dem Normalzustand abweichen (Abbildung 118a und b). Bei Vaginalflüssigkeits- und Speichel-Spuren zeigen nur Proben, die 6 Monate feucht gelagert wurden, Einfluss auf den Methylierungssignal. Die übrigen Messwerte dieser Flüssigkeiten weisen keine Abweichungen von dem Nullwert auf (Abbildung 118 c und d).

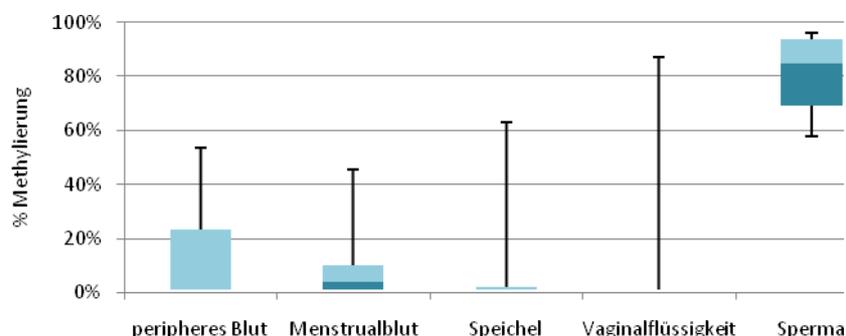


Abbildung 119 Marker Sperm2 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungs-Werte im Spurenalterungs-Experiment. Einbezogen sind alle Werte der entsprechenden Flüssigkeit aus dem gesamten Experiment.

Bei Vaginalflüssigkeit und bei Speichel gibt es einen Wert (feucht gelagert), der sich im Bereich der Spermawerte befindet (Abbildung 119).

3.7.2.10 Next Generation Sequenzierung

Im Vergleich zu Sperm1 erscheint bei hohem Methylierungsgrad auch die Bisulfatsequenzierung beim Sperm2 zuverlässig (Abbildung 120).

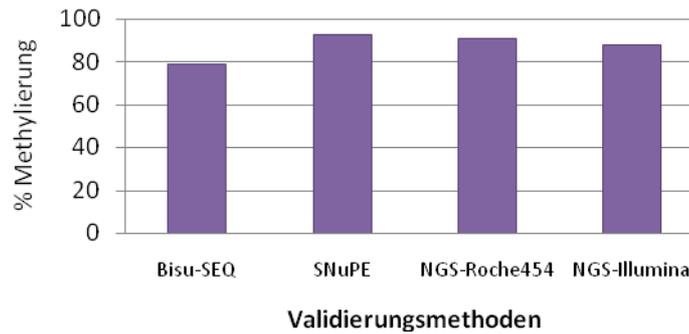


Abbildung 120 Marker Sperm2 - Gegenüberstellung der Methylierungsergebnisse an dem Ziel-CpG (3r-Detektionsstelle) von einer gleichen Sperma-Probe aus vier verschiedenen Analysemethoden: Bisulfit-Sequenzierung, Single Nucleotide Primer Extension sowie Next Generation Sequencing mit Roche454 (426 Reads) und Illumina MiSeq (1598 Reads).

Der Wert der SNUPE-Analyse liegt mit 92% Methylierung sehr nah bei den Ergebnissen aus der NGS-Messung (Roche-454: 91%, MiSeq: 88%). Bisulfit-Sequenzierung der untersuchten Sperma-Probe zeigt den kleinsten Methylierungswert von 79%.

3. 8 Haut

Die Idee - zusätzlich zu den fünf zentralen Körperflüssigkeiten, auch Haut nachweisen und unterscheiden zu können, kam im Verlauf der Arbeit nach zahlreichen Gesprächen mit Kriminaltechnikern und Tatortermittlern. Vor allem der sichere Nachweis von Hautschuppen als solche, schien bislang ein wesentliches Problem darzustellen. Für den Nachweis von Haut und Hautschuppen wurde ein Marker Haut1 entwickelt.

3.8.1 Methylierungs-Marker Haut-1

3.8.1.1 Die Genort-Eigenschaften

Tabelle 13 Die Genort-Beschreibung des Markers Haut1

Marker	Chr	CpG-Insel	Gen Symbol	Genprodukt	Locus Architektur
Haut-1	2	Nein (64% GC) 12cg/173bp	MEIS1	Homeobox-Protein MEIS1, HOX-Cofaktor	Intron: MEIS1

Der Marker Haut1 weist Haut durch ein spezifisches Methylierungssignal nach. In den Hautproben und den meisten Haut- und Kopfhautschuppen ist der Marker methyliert. In den Körperflüssigkeiten - peripheres Blut, Menstrualblut, Speichel, Vaginalflüssigkeit und Sperma - ist er unmethyliert. Der Haut1-Locus befindet sich auf der Bande p14 des Chromosoms 2, auf dem Plus-Strang, in dem Intron-Bereich des Gens MEIS1. Das 5'-Ende des Locus liegt knapp 820 bp entfernt von dem Exon 017 des Gens. Das MEIS1-Protein ist ein Homeobox-(HOX)-Cofaktor. Es reguliert die Transkription von PAX6 (Paired Box Proteine Pax-6) und dient gemeinsam mit PBX1 oder PBX2 als Transkriptions-Aktivator von PF4 (Platelet Factor 4). Dieses chemotaktische Cytokin wirkt als ein Wachstumsinhibitor von Endothelzellen, als ein Heparin-neutralisierendes

Protein sowie als ein Aktivierungsfaktor für Megakaryocyten (Okada et al. 2003). Das MEIS1-Protein ist somit bei Hämatopoese sowie der Megakaryocyten- und Gefäßsystem-Entwicklung beteiligt. Es wird schwach in normalen immunohepatopoietischen Geweben und der fetalen Leber, stärker im Kleinhirn, exprimiert. Eine differentielle Überexpression des Gens wird bei einigen myeloiden und lymphoblastischen Leukämie-Formen beobachtet, wie beispielsweise der akuten myeloblastischen Leukämie (Novak et al. 2012). Bei dem kolorektalen Carcinom wurde eine Hypermethylierung des MEIS1-Promoters beobachtet, die mit einer erniedrigten Expression des Gens einhergeht. Besonders bedeutsam für den Verlauf der Cancerogenese ist der Ausfall von Exon 8, welches die Funktion eines Tumorrepressors zu besitzen scheint (Dihal et al. 2013).

3.8.1.2 Konstruktion des Amplifikats

Das 173bp lange Haut1-Amplikon weist keine CpG-Inseln auf. Der durchschnittliche GC-Gehalt in der genomischen Sequenz liegt bei 64% (Tabelle 13). Der Abschnitt enthält zwei SNPs, von denen sich eins in der Zielsequenz des Forward-Primers befindet (Abbildung 121). Dieses A/C-Polymorphismus (rs116331472) zeigt in einer Gruppe von 118 Personen die Häufigkeit 0,975 für das A-Allel (Wildtyp) und 0,025 für das C-Allel. Eine Aufteilung in homo- und heterozygote Genotypen wurde auch hier nicht vorgenommen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>). Zu dem zweiten SNP liegen keine Frequenz-Angaben vor. Für die folgende SNuPE-Analyse werden zwei CpGs verwendet.

```
GAGGGGGCCATGATGCTAGGCGTCCGAGGCGAGGGTTGAGCCTGTTGGCTTCAGAGAAATGCGGTTCCACCGAAGCGGGGCGCGTGTCTTCTAGGGGCCCTTGGGTGGATTAGGGGGCGCCAAGAGGGGTTAGGCGAGGAGAGGCCTGGCCACCCAGTTGCTAGACTTTA
```

Abbildung 121 Genomische Sequenz des Haut1-Locus. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die zwei bekannten SNPs grün und die Primer-Stellen sind grau unterlegt (forward-Primer dunkelgrau, reverse-Primer hellgrau). Die beiden CpG-Dinukleotide, die im SNuPE-Assay für die Messung der Methylierung verwendet werden, sind rot markiert und die Bindungsstellen der f- und r-SNuPE-Primer sind unterstrichen.

3.8.1.3 Zielregion - SNuPE

Die Bisulfit-konvertierte Sequenz des Haut1-Markers besitzt einen GC-Gehalt von 50% und enthält 12 CpG-Dinukleotide. Es konnten zwei SNuPE-Primer entworfen werden, die sich zugleich als gute Unterscheider gezeigt haben. Der erste Extension-Primer Haut1-f detektiert die Methylierung in die Forward-Richtung (Abbildung 122), der zweite Primer Haut1-r in Reverse-Richtung (Abbildung 123).

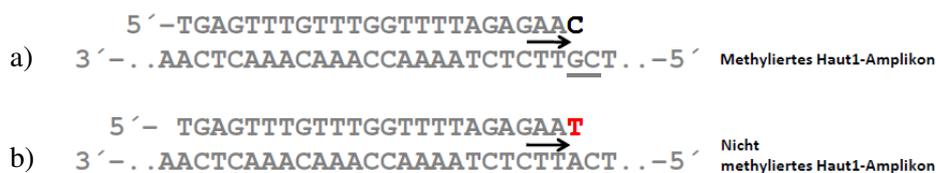


Abbildung 122 Die Reaktion des forward SNuPE-Primers Haut1-f. Die Amplikonsequenz ist in 3'-5'-Richtung abgebildet. Da das Amplikon sich auf dem 1. Bisulfit-Strang befindet, wird das 3'-Ende des Forward-Primers entweder um ein C (schwarz, a) an der methylierten Sequenz oder um ein T (rot, b) an der nicht methylierten Amplikon-Sequenz verlängert.

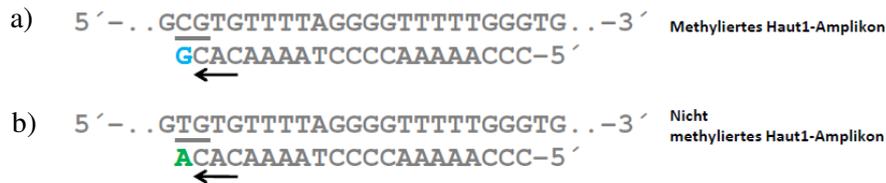


Abbildung 123 Die Reaktion des reversen SNUPE-Primers Haut1-r. Die Amplikonsequenz ist in 5'-3'-Richtung abgebildet. Der r-Primer wird an seinem 3'-Ende entweder um ein G (blau, a) an der methylierten Sequenz oder um ein A (grün, b) an der nicht methylierten Amplikon-Sequenz verlängert.

Die beiden SNUPE-Primer sind 20 (r-Primer) und 23 (f-Primer) Basen lang und können in einem Diplex-Ansatz gleichzeitig analysiert werden. Beide Primer funktionieren nach dem konventionellen Prinzip der Methylierungs-Messung per SNUPE - sie werden entweder um die methylierte oder die nicht methylierte Base verlängert. Bei der Detektion des f-Primers repräsentiert das schwarze Signal den Anteil der methylierten Amplikon-Kopien und das rote Signal den Anteil der nicht methylierten Kopien in der Probe. Beim r-Primer entspricht das blaue Signal dem Anteil an methylierten Amplikon-Kopien und das grüne Signal dem Anteil an nicht methylierten Kopien in der Probe (Abbildung 124). Das Verhältnis der beiden Primersignale zueinander (schwarz zu rot und blau zu grün), gibt den Methylierungs-Status der Probe wieder.

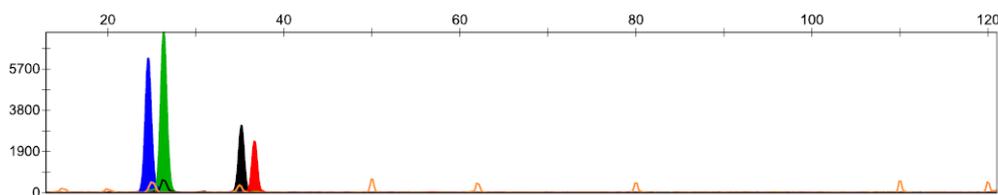


Abbildung 124 Gleichzeitige Detektion der Haut1-SNUPE-Primer r (blau-grün) und f (schwarz-rot); Abbildung eines Plot-Fensters nach der Datenauswertung mit GeneMapper ID 3.2.

3.8.1.4 Nachweisempfindlichkeit und Wiederholbarkeit der Ergebnisse

In Abbildung 125 wird das Ergebnis eines Sensitivitäts- und Stabilitätstestes mit jeweils 3 Proben einer Konzentration gezeigt.

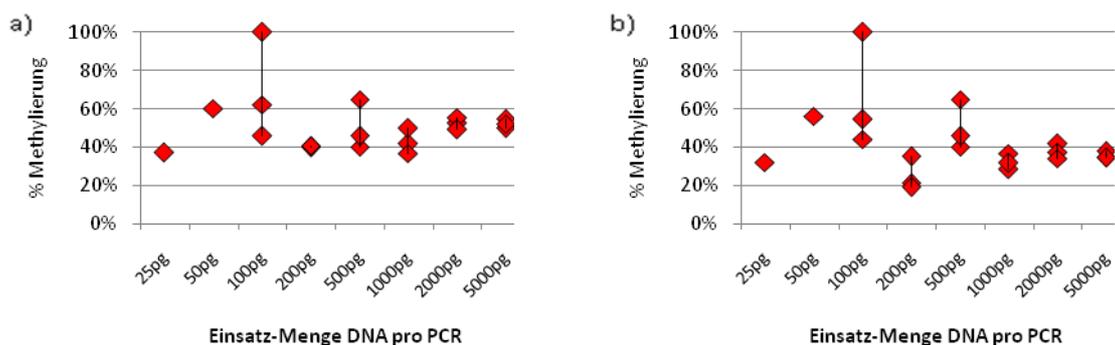


Abbildung 125 Marker Haut1 - Messung der Nachweisempfindlichkeit der SNUPE-Primer f (a) und r (b) in jeweils drei unabhängigen Analysen von acht unterschiedlichen Konzentrationen von Haut-DNA; die eingesetzten DNA-Mengen pro PCR sind auf der Abszisse aufgelistet.

Stabile Messungen erreicht man ab 200 pg DNA.

3.8.1.5 Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen

Die eventuelle Beeinflussung des hautspezifischen Signals durch Körperflüssigkeiten wird im Mischungsexperiment überprüft. Dazu wurden DNA-Proben eingesetzt, die 100%, 80%, 60%, 40%, 20% und 0% Haut-DNA enthielten. Der jeweils restliche Anteil der Proben bestand aus einer gleich konzentrierten (20ng/μl) DNA-Mischung der 5 Körperflüssigkeiten - peripheres Blut, Menstrualblut, Vaginalflüssigkeit, Speichel und Sperma. In der Abbildung 126 die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt.

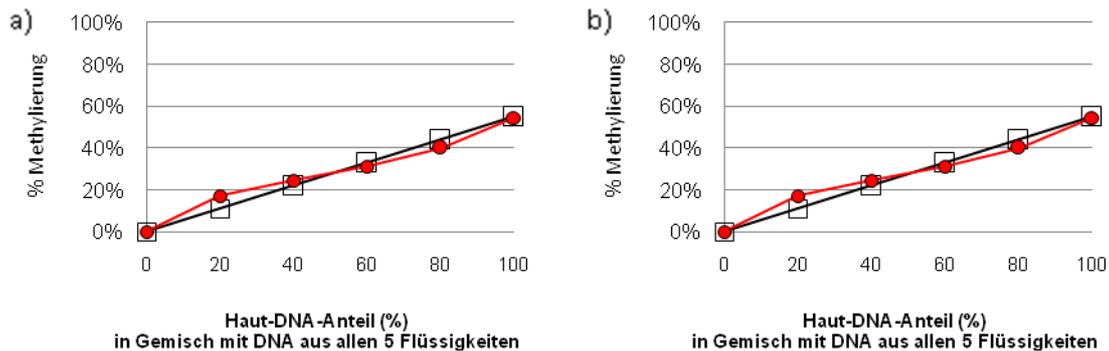


Abbildung 126 Marker Haut1 - Messung von Haut in einem Flüssigkeitgemisch mit den Primern f (a) und r (b). Der Sollwert (schwarz) entspricht dem errechneten Methylierungswert, der sich aus den Werten der fünf Körperflüssigkeiten ergibt, und dem Anteil der Blut-DNA in der jeweiligen Mischprobe. Der Istwert (rot) entspricht dem tatsächlich detektierten Wert.

Es ergab sich kein Hinweis auf wechselseitige Beeinflussung.

3.8.1.6 Individuelle Streuung der Methylierungswerte

Die Messungen der fünf Körperflüssigkeiten wurden an den Probenextrakten vorgenommen, die bereits für die Validierung anderer Marker verwendet wurden. Als Haut-Proben wurden für dieses Experiment 5 Biopsie-Proben von verschiedenen Personen aus dem Unterarm und einzelne Hautschuppen herangezogen. In Abbildung 127 ist das Differenzierungspotential der beiden SNUPE-Primer des Haut1-Markers gegenüber den fünf untersuchten Körperflüssigkeiten dargestellt. Keine Überlappung der Werte ist zu beobachten.

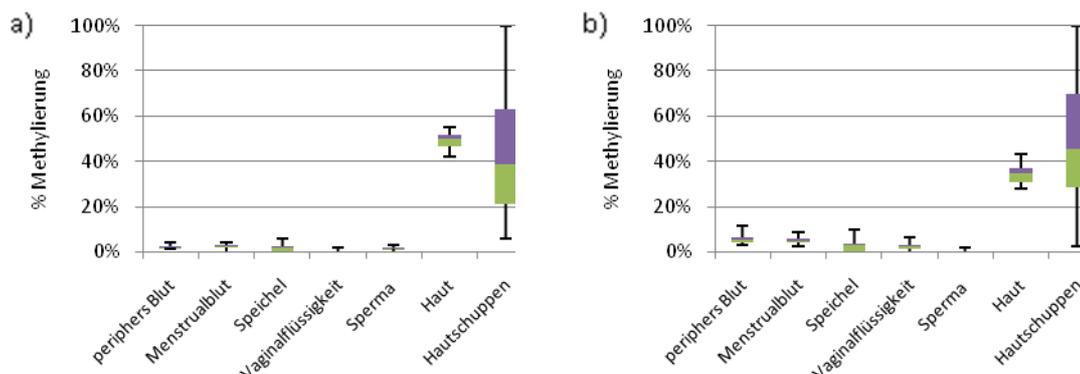


Abbildung 127 Marker Haut1 - Box-Plot zur Streuung der Methylierungswerte in jeweils 20 DNA-Proben von peripherem Blut, Menstrualblut, Speichel, Vaginalflüssigkeit und Sperma; in 5 Proben von Hautbiopsien und 46 (in Abb. a) und 55 (in Abb. b) Proben von Kopfhaut- und Armhautschuppen, vermessen mit SNUPE-Primer f (a) und r (b).

Da einzelne Hautschuppen aus unterschiedlichen Hautschichten stammen können, ist zu erwarten, dass auch die DNA von Schuppe zu Schuppe sehr heterogen sein kann bezüglich Methylierung. Die Werte der Hautschuppen reichen von nahezu 0 bis 100%. Die Haut-Biopsien zeigen dagegen einen stabilen Methylierungsstatus: 42 bis 55% Methylierung bei dem f-Primer und 28 bis 46% bei dem r-Primer. Der mittlere Methylierungswert des f-Primers in den Hautbiopsie-Proben beträgt 49% und liegt damit höher als die mittlere Methylierung der Hautschuppen (45%). Der r-Primer zeigt dagegen durchschnittlich 35% Methylierung in den Hautbiopsie-Proben und durchschnittlich 51% Methylierung in den Hautschuppen.

3.8.1.7 Erweiterte Validierung

Insgesamt wurden 5 Haut-Biopsien (Unterarm) und 217 einzelne Hautschuppen (Kopfhautschuppen und Hautschuppen von dem Unterarm) von 41 verschiedenen Personen untersucht. In Abbildung 128 ist die Altersverteilung der Probengeber dargestellt.

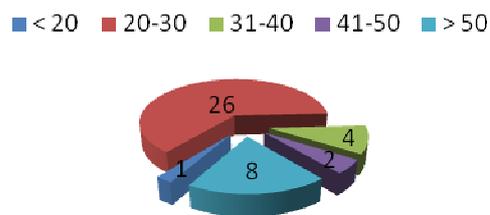


Abbildung 128 Alter der Probanden/innen für die Haut-Biopsien sowie Kopfhaut- und Unterarmschuppen, deren Werte in die Untersuchung des Haut1-Markers einbezogen wurden; 11 männliche und 30 weibliche Personen (n=41).

103 Hautschuppenproben (48%) enthielten sehr wenig oder gar keine DNA und wurden nicht in die Untersuchung einbezogen. Von den restlichen 114 analysierten Proben zeigten die beiden SNUPE-Primer f und r in 14 Proben (13%) kein Signal. In 20 Proben (18%) zeigte nur einer der beiden Primer ein Signal. Die Ergebnisse dieser 34 Proben wurden in der Statistik ebenfalls nicht berücksichtigt.

In der Tabelle 14 sind die durchschnittlichen Methylierungswerte der Kopfhaut- und Armschuppen-Proben für die beiden SNUPE-Primer f und r zusammengefasst. Angegeben ist der Durchschnitt von der Gesamtheit der Probenwerte (1. Spalte), der Durchschnitt ohne 0%-Werte (2. Spalte) und der Durchschnitt ohne 0%- und 100%-Werte (3. Spalte). Die Anzahl der Proben, die bei der Berechnung des jeweiligen Durchschnitts berücksichtigt wurde, ist in den Spalten rechts angegeben. In der letzten Tabellenspalte ist die Standardabweichung der entsprechenden Datenreihe angegeben.

Tabelle 14 Marker Haut1 f und r auf Kopfhaut- und Armschuppen - die durchschnittlichen Methylierungswerte

	Ø Total	Anzahl n	Ø ohne 0%	Anzahl n	Ø ohne 0% und 100%	Anzahl n	StdABW ohne 0% und 100%
f-Kopf	22,8%	70	44,1%	37	38,1%	31	20,4%
r-Kopf	36,7%	60	51,1%	44	41,1%	38	18,4%
f-Arm	31,6%	16	56,2%	9	34,4%	6	12,7%
r-Arm	48,9%	12	55,0%	10	40,9%	7	21,5%

Einen Überblick über die Ergebnisse aller Proben, einschließlich der 0%- und 100%-Werte, gibt die Abbildung 129.

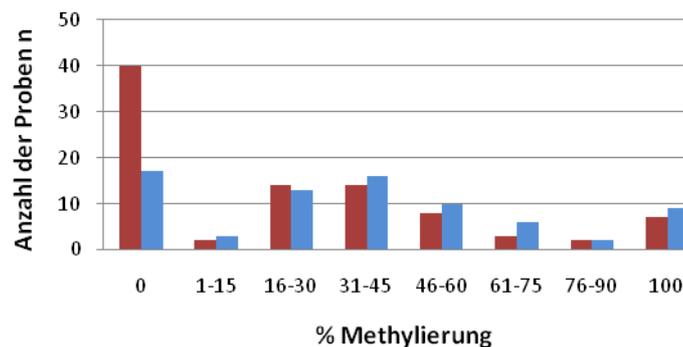


Abbildung 129 Marker Haut1 - Verteilung der Methylierungswerte von Arm- und Kopfhautschuppen-Proben. Die Werte der beiden SNUPE-Primer f und r sind farblich unterschiedlich dargestellt. Die roten Balken zeigen die Ergebnisse des f-Primers (86 Werte) und die blauen die des r-Primers (72 Werte). Von dem r-Primer gibt es 14 Werte weniger, da er in einigen Proben kein Signal zeigte. Auf der Abszisse sind die Werte-Gruppen angegeben, wobei die Einteilung in Gruppen in Abhängigkeit von der Gesamtheit der Werte, willkürlich gewählt ist. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Proben angegeben, deren Werte in die entsprechende Kategorie fallen.

Beide Wertegruppen – Hautschuppen und Kopfhautschuppen haben den Charakter einer trimodalen Verteilung, ebenso wie das beide Gruppen enthaltende Diagramm in der Abbildung 129. Da Hautschuppen durchaus verschiedene Zelltypen enthalten können, wäre eine solche Unterteilung der Methylierungswerte möglich. Einen tieferen Einblick in dieses Phänomen der trimodalen Verteilung gestattet aber die NGS-Analyse der Hautzellen (siehe Kapitel Diskussion 4.3). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch an einer Falluntersuchung, die für das LKA Hessen durchgeführt wurde: Von 13 Hautschuppen zeigte eine überhaupt kein PCR-Signal, drei waren nicht methyliert und 9 waren methyliert.

3.8.1.9 Next Generation Sequenzierung

Mit Hilfe von NGS wurde auch bei dem Haut-Marker überprüft, wie gut die SNUPE-Nachweismethode die tatsächliche Methylierungssituation widerspiegelt (Abbildung 130).

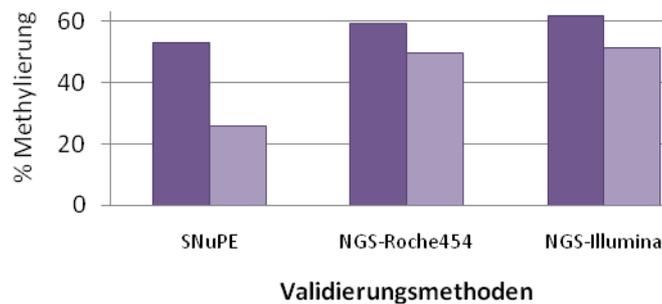


Abbildung 130 Marker Haut1 - Gegenüberstellung der Methylierungsergebnisse von einer gleichen Haut-Probe aus drei verschiedenen Analysemethoden: Single Nucleotide Primer Extension sowie Next Generation Sequencing mit Roche454 (2769 Reads) und Illumina MiSeq (47400 Reads). Die Werte des f-CpGs sind dunkelviolet, die Werte des r-CpGs hellviolett dargestellt.

Für den Haut-Marker liegen keine Ergebnisse der Bisulfitsequenzierung vor. Auch erscheinen die Werte dieser nur semiquantitativen SNUPE-Messung mit den NGS-Daten vergleichbar.

3.9 Einfluss von Tumoren auf die verwendeten Methylierungs-Loci

Es ist bekannt, dass Tumoren das Methylierungsmuster ändern können (siehe Kapitel 1.3.7). In der hier konzipierten Kontrolluntersuchung konnte natürlich nur eine begrenzte Auswahl von Tumoren auf ihren möglichen Einfluss auf die von mir entwickelten Methylierungsmarker überprüft werden. Im Allgemeinen kann man davon ausgehen, dass ein Effekt nur in dem betroffenen Gewebe oder Körperflüssigkeit zu beobachten ist. Eine Ausnahme könnte das Blut sein, weil es Spuren freier DNA transportiert, die natürlich auch aus anderen Geweben oder Körperflüssigkeiten stammen könnten.

Die Abbildung 131 gibt Zahl und Art der Tumorproben wieder. Die Tumorproben wurden anonymisiert zur Verfügung gestellt von der Hautklinik, Universität Bonn, der gynäkologischen Abteilung des Hochtaunus-Klinikums in Bad Homburg und der Praxis Dr. Rohwedder in Bad Homburg. Die Studie wurde von der Ethik-Kommission der Universität Bonn und der Ethik-Kommission Bad Homburg genehmigt.



Abbildung 131 Anzahl der Proben der verschiedenen Tumorpatienten (n=34). CA=Carcinom, CLL=chronische lymphatische Leukämie, CML=chronische myeloische Leukämie, MPS=myeloproliferatives Syndrom

Das Konzept der Untersuchung war: Alle Leukämieformen wurden ausschließlich im Blut untersucht. Es wurden aber alle 10 Marker analysiert. Die Speiseröhrentumorprobe wurde in

Speichel untersucht – ebenfalls für alle 10 Marker. Endometrium-, Cervix- und Ovarial-Carcinom sowie Endometriose wurden im Vaginalabstrich untersucht, und dort für alle 10 Marker. Die Hodentumorprobe wurde in Sperma für alle 10 Marker untersucht. Brustkrebs und zwei Formen von Darmkrebs - familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und hereditäres nicht-Polyposis-assoziiertes kolorektales Karzinom (HNPCC) - wurden in Blut und ebenfalls unter Einsatz von allen 10 Markern untersucht.

Ein Methylierungssignal wurde als beeinflusst durch den Tumor angesehen, wenn der Methylierungswert in mindestens einer Probe außerhalb des Normbereichs für die entsprechende Flüssigkeit lag.

Die Abbildung 132 zeigt die Wirkung der verschiedenen Tumoren auf die Methylierungsorte. Aufgeführt sind nur diejenigen Marker, die eine Signalabweichung in mindestens einem Tumor gezeigt haben. Genauso sind nur diejenigen Tumorarten dargestellt, die in mindestens einem Marker eine Abweichung aufwiesen. Letzteres gilt für 8 von 12 getesteten Tumorarten.

Art von Tumor; untersuchte Flüssigkeit	Blut2-f	Blut2-r	Mens1	Spei1	Spei2	Vag1	Vag2	Sperm1	Sperm2	Haut1-f	Haut1-r
CLL peripheres Blut	1/7 (19↓)	1/7 (22↓)	1/7 (10↑)	2/7 (3-6↑)	4/7 (22-57↑)	4/7 (7-38↑)	6/7 (19-54↑)	1/7 (40↓)	-	7/7 (11-63↑)	4/7 (8-22↑)
CML peripheres Blut	-	-	-	-	-	1/3 (9↑)	1/3 (15↑)	1/3 (19↓)	2/3 (13-25↑)	1/3 (15↑)	-
MPS peripheres Blut	-	-	-	-	-	-	1/3 (8↑)	1/3 (49↓)	-	-	-
B-Zell Lymphom peripheres Blut	-	-	-	-	-	1/2 (13↑)	1/2 (29↑)	-	-	-	-
Cervix CA Vaginalflüssigkeit	-	-	-	1/2 (5↑)	2/2 (12-62↑)	2/2 (13-17↓)	1/2 (12↓)	1/2 (23↓)	-	-	-
Ovarial CA Vaginalflüssigkeit	-	-	-	1/2 (6↑)	-	-	-	-	-	-	-
Brust CA peripheres Blut	1/9 (20↓)	1/9 (26↓)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Darm CA peripheres Blut	1/3 (19↓)	1/3 (23↓)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Abbildung 132 Ergebnisse der Carcinom-Untersuchung. Die obere Zahl gibt an, wie viele Proben von der Gesamtzahl der untersuchten Proben einer Tumorart eine Abweichung des Methylierungswertes gezeigt haben. Die untere Zahl in Klammern gibt die Differenz zwischen dem gemessenen Methylierungswert und dem Durchschnittswert des Markers in der untersuchten Flüssigkeit wieder, wobei der Pfeil die Richtung der Abweichung angibt. Wenn mehrere Proben einer Tumorart abweichend waren, werden die kleinste und größte Abweichung als eine Range angegeben.

Von drei getesteten Darmkrebs-Proben hat eine HNPCC-Probe ein abweichendes Signal in Form eines herabgesetzten Methylierungswertes in dem Blut2-Marker (15% r-Primer, 12% f-Primer) gezeigt. Die restlichen 9 Marker blieben in dieser Probe unauffällig. Der Menstrualblutmarker Mens1 zeigte in einer einzigen Probe - CLL-Blutprobe von einer 67-jährigen Patientin- ein falsch positives Signal. Dieselbe CLL-Probe zeigte außerdem in Blut2 ein erniedrigtes

Methylierungssignal und in den Markern Spei2, Vag1, Vag2, Sperm1 und Haut1 ein erhöhtes Signal. Die Marker Blut1, Spei1 und Sperm2 blieben in dieser Probe unauffällig. Der zweite Spermamarker Sperm2 zeigte nur in einer Tumorart (CML) Signalabweichungen. Die beiden Speichelmarker, die beiden Vaginalmarker und der Sperm1-Marker zeigten in zwei oder mehr Tumorarten abweichende Signale. Die Methylierungseigenschaft des Vag2-Locus scheint von den meisten getesteten Tumoren (5 von 12) beeinflusst zu werden. Interessant ist, dass das Ziel-CpG des r-Primers in dem Haut1-Marker weniger von Tumoreinwirkung betroffen ist als das Ziel-CpG des f-Primers. Von allen getesteten Tumoren zeigt CLL im peripheren Blut den meisten Einfluss auf fast alle Marker, mit Ausnahme von Sperm2.

Der Marker Blut1 zeigte in keiner Tumorprobe eine Abweichung von dem erwarteten Normwert. Die Vaginalflüssigkeitsproben von den Endometriumcarcinom- und Endometriose-Patientinnen und die Spermaprobe von dem Hodentumor-Patienten wiesen in keinem der 10 Marker einen Einfluss auf.

In der Tabelle 15 sind Häufigkeiten des Vorkommens der untersuchten Tumorarten unter der deutschen Bevölkerung aufgeführt. Die häufigste Erkrankung in der mittleren Lebensphase ist Endometriose bei Frauen und HNPCC-Form des Darmkrebses bei Männern.

Tabelle 15 Prävalenz und durchschnittliches Erkrankungsalter der untersuchten Carcinomformen.

Carcinom	Prävalenz	Durchschnittliches Erkrankungsalter
Speiseröhren-CA	4-7 : 100.000 EW	66-70 J, Männer häufiger
Endometrium-CA	25 : 100.000 Frauen	66-85% Frauen in der Menopause
Cervix-CA	13,3 : 100.000 Frauen	45-55 J
Ovarial-CA	11,5 : 100.000 Frauen	69 J
Endometriose	4000-12000 : 100.000 Frauen	36 J
Hoden-CA	8-10 : 100.000 Männer	20-40 J
CLL	4 : 100.000 EW	70-75 J, Männer häufiger
CLM	1,5 : 100.000 EW	55-60 J, Männer häufiger
MPS	1-2 : 100.000 EW	50-60 J, Männer häufiger
B-Zell-Lymphom	7 : 100.000 EW	55-60 J, Männer häufiger
Brust-CA	123 : 100.000 Frauen	63 J
HNPCC	200 : 100.000 EW	45 J
FAP	5-10 : 100.000 EW	39 J

3.10 Genetischer Einfluss auf die Methylierung

Inzwischen berichtet die Literatur über genetische Faktoren, die die Methylierung steuern.

Für das vorgelegte Projekt wären solche Einflüsse von großer Bedeutung, weil sie die Aussagen über die Präsenz von bestimmten Körperflüssigkeiten eventuell verfälschen würden. Obwohl die Verteilung der Methylierungswerte bei den einzelnen Markern annähernd normal ist, gibt es bei jedem Marker Ausreißer und natürlich Extremwerte. Die Validierungsstudie besagt, dass solche Abweichungen gering sind. Wegen der meist enormen prozessualen Bedeutung der

Körperflüssigkeitsanalyse muss aber geklärt werden, ob und in welchem Ausmaß solche genetische Mechanismen bei den verwendeten Marker-Loci existieren.

Es würde bei weitem den Rahmen einer Dissertation sprengen, wenn man jede Probe für jeden Marker mit geeigneten Methoden überprüfen würde. Deswegen ist hier eine NGS-Untersuchung an einem Pool von 50 Probanden vorgenommen worden. Damit sollte festgestellt werden können, ob und wie z.B. SNPs auf die Methylierung benachbarter CpGs Einfluss nehmen können. Denkbar und z.T. in der Literatur beschrieben sind die folgenden Ereignisse:

- Ein weit außerhalb des Amplikons liegendes SNP steuert die Methylierung eines CpGs oder einer CpG-Insel (Zhang et al. 2010).
- Ein innerhalb des Amplikons liegendes SNP steuert die Methylierung eines CpGs oder einer CpG-Insel (Hellmann & Chess 2010).
- Ein SNP innerhalb der SNUPE-Primer-Bindungsstelle beeinflusst das Ausmaß der Primerbindung und damit der Signalhöhe.
- Ein SNP befindet sich unmittelbar an der Position des analytischen CpGs. Damit würde direkt der Nachweis beeinträchtigt.

Formalgenetisch kann man die eventuellen Einflussnahmen zusammenfassen in:

- die so genannte mQTL-Wirkung
- Allel-spezifische Methylierung
- Imprinting Effekte

Die 10 Marker wurden in einem einzigen Pool auf dem MiSeq von Illumina analysiert. Die Anteile der pro Marker auswertbaren Reads sind in der Abbildung 133 angegeben. Die Auswertung der 250bp-paired Reads erfolgte mit dem Programm CLC Genomic Workbench 6.5.1.

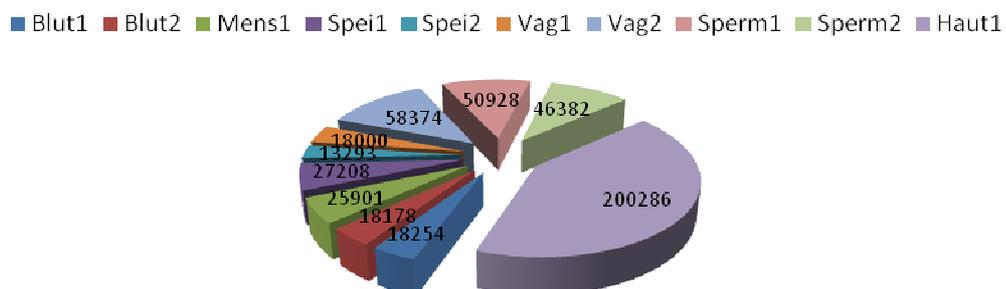


Abbildung 133 Anzahl der generierten Reads von den einzelnen Amplikons in dem Library-Pool 813.E, bei der Durchführung von NGS auf MiSeq (Illumina); die Gesamtzahl der Reads beträgt 430669.

Da in jeder Marker-Probe die DNA von 50 verschiedenen Individuen vertreten war, müsste ein bei mindestens einer Person vorhandenes SNP in etwa 2% der Reads bei Homozygotie bzw. in 1% der Reads bei Heterozygotie zu sehen sein. Dementsprechend wurde nach Abweichungen von der

Referenz-Sequenz gesucht, die in mindestens 1% der Reads vorkamen und sowohl in forward- als auch in reverse-Sequenzen beobachtet wurden.

Vier verschiedene Konstellationen wurden untersucht: SNPs, Kombinationen von SNPs – Haplotypen, kleine Deletionen/Insertionen und unvollständige Methylierung.

Es wurden verschiedene Arten von Abweichungen gefunden. Häufig waren es Insertionen oder Deletionen einzelner oder mehrerer Basen. Viele Einzel - oder Mehrfachbasen-Transitionen wurden beobachtet. Meist waren es T-C-Transitionen bei Markern, die sich auf dem 1. Bisu-Strang befinden (Blut1, Blut2, Mens1, Vag1, Vag2 und Haut1) oder A-G-Transitionen, bei den Markern auf dem 2. Bisu-Strang (Spei1, Spei2, Sperm1 und Sperm2). Es handelte sich dabei um Positionen in der Amplikon-Sequenz, aber außerhalb von CpG-Dinukleotiden. Es kann sich nicht um SNPs handeln; das sieht man beim Vergleich der Bisulfit-konvertierten mit der genomischen Sequenz.

Das Phänomen der unvollständigen Methylierung

Eine Erklärung ist: Die chemische Reaktion der Bisulfitierung ist an diesen Stellen nur unvollständig abgelaufen. Das allein würde aber nicht erklären, dass bei einigen Markern eine solche unvollständige Bisulfitierung einen signifikanten Einfluss auf die Methylierung der benachbarten CpGs ausübt. Im folgenden Text werden diese Positionen als nicht konvertierte Cytosine bezeichnet.

Die meisten Varianten wiesen eine Frequenz von ca. 1% auf. Einige der nicht konvertierten Cytosine kamen jedoch viel häufiger vor (bis zu 8%). In einigen Fällen wurde eine Beeinflussung der Methylierung beobachtet, die auf einen Haplotyp aus bestimmten Varianten und zusätzlich einem unkonvertierten C zurück zu führen war.

Ergebnis - Blut1

Bei der Untersuchung des Markers Blut 1 wurde eine Reihe von Varianten gefunden. Alle waren die nicht konvertierten Cytosine. Die häufigsten kamen mit einer Frequenz von 1,3 bis 1,7% in den 18254 Blut1-Reads vor. Kein Einfluss dieser Stellen auf die Methylierung der insgesamt 9 CpGs ist zu beobachten.

Ergebnis - Blut2

Bei Marker Blut2 (18178 Reads) gab es keine Varianten, abgesehen von zwei benachbarten nicht konvertierten Cytosinen. Sie wurden aufgrund der hohen Frequenz (7,6% und 5,7%) für die Untersuchung ausgewählt. Sie üben keinen Einfluss auf die Methylierung aus.

Ergebnis - Mens1

CG-Position	25	32	55	69	86	88	98	106	122	128	130	139	150	155*	170**	178	180	203	209	223	231	238	248	256	262	Frequenz (%)	
Keine Abweichung																											
Del-T 91																											2,6
Nicht konv. C 157																											1,8

Abbildung 134 Marker Mens1 - Einfluss von Sequenz-Varianten auf die Methylierung. Die CpG-Positionen in dem Amplikon sind in der obersten Zeile aufgeführt. Die Sternchen (*) und (**) markieren die beiden analytischen CpGs. Die zweite Zeile zeigt die Methylierung, die im Normalfall an den einzelnen CpGs vorliegt. Die nachfolgenden Zeilen zeigen die Methylierungswerte, die in den Reads, die die links angegebene Abweichung tragen, gegeben sind. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung); ausgewertet aus 25901 Reads.

```
GATTAGGTTTAGGGAAGTTTTATCGAGGTTGGTTTTATTAGTTTTTAGGGGCGAAGAGTAGGAATCGGAGTTATTGAAGAGCGCGT
TTTTTTCGGTTTTTCGGGTTGTGGAGTTGCGGTTCCGCTTTGTTTCGGGATAGGGGCGTGGCGTTGTTGTTGGTTCCGTTGTTCCGCT
TGTATTGGTTGTTTTATTATCGTTGGCGGTTTGGTTGTTCCGAGATCGGTGGTCCGAGTGATCGTGGGTATCGTGTACCGTGTATTAGGG
TGAGAGGTTTTAATAGTAGT
```

Abbildung 135 Bisulfit-konvertierte Sequenz des Markers Mens1. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, das nicht konvertierte C orange, die Deletion blau und die Primer-Stellen sind grau unterlegt. Die Bindungsstelle der Fm und Fnm-SNuPE-Primer ist unterstrichen.

In den 25901 Reads von Markerlocus Mens1 wurde eine Deletion mit einer Frequenz von 2,6% (T-91) gefunden. Diese Variante erniedrigt die Methylierung von CpGs - Cg25 bis Cg180- stark (Abbildung 134). Die nicht konvertierte Cytosinstelle (C-157, Frequenz 1,8%) erniedrigt die Methylierungsrate an Cg86 und Cg203, hat aber sonst keinen Effekt, obwohl sie in der Zielsequenz liegt (Abbildung 135).

Ergebnis - Spei1

CG-Position	28	37	46	50	83*	89**	103	123	134	147	152	173	191	Frequenz (%)
Keine Abweichung														
SNP T>C 38														4,0
SNP T>C 90														2,8
Nicht konv. C 99														8,4
Ins-A 133^134														2,8
Del-A 135														13,2
Haplotyp 99 + A>T 176														1,3 (T)

Abbildung 136 Marker Spei1 - Einfluss von Sequenz-Varianten auf die Methylierung. Die CpG-Positionen in dem Amplikon sind in der obersten Zeile aufgeführt. Die Sternchen (*) und (**) markieren die beiden analytischen CpGs. Die zweite Zeile zeigt die Methylierung, die im Normalfall an den einzelnen CpGs vorliegt. Die nachfolgenden Zeilen zeigen die Methylierungswerte, die in den Reads, die die links angegebene Abweichung tragen, gegeben sind. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung); ausgewertet aus 27208 Reads.

```
CTACAAAAATAAATAAATAAATAAATCGATTAAACGATCTACCGAACGCAAAATAAAAAATCACTTCCTTCTTTACAAACGCTCAACGTC
CAAAACTACCGGTATCAATCCACCAAAAAACGCTACCTCACCGAAAAAAAAACGATACGACTCCCATCACTTAACTAAACGCCACCCAA
TAAAAAACGTAAACCCCAAAACCAAAAA
```

Abbildung 137 Bisulfit-konvertierte Sequenz des Markers Spei1. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die drei SNPs rot, das nicht konvertierte C orange, die Position der Insertion lila, die Deletion blau und die Primer-Stellen sind grau unterlegt. Die Bindungsstelle der Fm und Fnm-SNuPE-Primer ist unterstrichen.

In den 27208 Spei1-Reads wurden die in Abbildung 136 und Abbildung 137 gezeigten Varianten gefunden. Das SNP an der Position176 kam ausschließlich mit dem SNP an der Position 99 vor und konnte daher nur als Haplotyp bewertet werden. Dies ist gleichzeitig die Variante, die den signifikantesten Einfluss auf die Methylierung zeigt, nämlich auf Cg103 (0% Methylierung gegenüber normalen 18,8%) und Cg123 (100% Methylierung gegenüber normalen 19,0%). Die Transition in Position 99 ist ein nicht konvertiertes C. Alleinstehend übt sie den gleichen nicht

methylierenden Effekt auf das Cg103 aus und einen schwächeren methylierenden Effekt auf das Cg123 aus (57,4% Methylierung gegenüber normalen 19,0%).

Die beschriebenen Effekte betreffen in keinem Fall die beiden analytischen CpGs - Cg83 und Cg89.

Ergebnis - Spei2

CG-Position	25	36	52	93*	122	167	184	253	265	Frequenz (%)
Keine Abweichung										
Nicht konv. C 57										1,9
Del-A 81										6,8
Nicht konv. C 123										3,6
SNP G>A 167										14,7
SNP T>C 209										1,2

Abbildung 138 Marker Spei2 - Einfluss von Sequenz-Varianten auf die Methylierung. Die CpG-Positionen in dem Amplikon sind in der obersten Zeile aufgeführt. Das Sternchen (*) markiert das analytische CpG. Die zweite Zeile zeigt die Methylierung, die im Normalfall an den einzelnen CpGs vorliegt. Die nachfolgenden Zeilen zeigen die Methylierungswerte, die in den Reads, die die links angegebene Abweichung tragen, gegeben sind. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung); ausgewertet aus 13293 Reads.

```

ATTCCCCCTTAAACAAACA CTT CGACTTTACTA CGTCTAAAATATATCA CGAAAA ATAATAATAAACCCAAACCAAC AAAAAAATAA
CGAAAAAACAAAAACAATATACCTACT CGATCCCAAAACTCTATTACTTTATCTACTTTACTAAAAAACCC ATAAACCAAAACCAC
CGCACACACAAACCCACCAAAAACA AACTCATTCCAAAACCTTAACCTTTAAAAACCTTTATTCCAA CGTTAATATAAA CGATACTCTT
ACAAAATACCTTTTCCTTTT

```

Abbildung 139 Bisulfit-konvertierte Sequenz des Markers Spei2. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die zwei nicht konvertierten C orange, die Deletion blau, die zwei SNPs rot und die Primer-Stellen sind grau unterlegt. Die Bindungsstelle der Fm und Fnm-SNuPE-Primer ist unterstrichen.

In den 13293 Spei2-Reads wurden die in Abbildung 138 und Abbildung 139 gezeigten Varianten gefunden. Da sich der Spei2-Marker wie auch der Spei1-Marker auf dem 2. Bisu-Strang befindet, erscheint ein nicht konvertiertes C als ein G, wobei in der Bisulfit-konvertierten Referenz-Sequenz an der Stelle ein A steht.

Die A-Deletion an der Position 81 zeigt keine auffälligen Auswirkungen auf die Methylierung. Sie liegt am Anfang einer poly-A-Sequenz und ist wahrscheinlich analysebedingt (Abbildung 139).

Das SNP an Position 167 befindet sich an dem G eines CpG-Dinukleotids (G>A-Transition) und ist auf dem 2. Bisu-Strang der Normalzustand des CpGs in seiner nicht methylierten Form. Dementsprechend lässt sich das A-Allel des SNPs in der unmethylierten Sequenz nicht von der normalen unmethylierten CA-Sequenz des CpGs unterscheiden. In die Auswertung wurden nur die Reads einbezogen, die das A an der G-Stelle enthalten - d.h. Reads, die an dem Cg167 nicht methyliert sind. Daher erscheint dieses CpG in der Abbildung 138 als vollständig nicht methyliert. Die übrigen CpGs in den Reads, die diese Abweichung enthalten, sind 21 bis 43% methyliert. Somit ist das Cg167 in diesen Reads das am wenigsten methylierte CpG. In normalen Reads ist es dagegen das am höchsten methylierte CpG.

Das SNP an der Position 209 ist eine T>C-Transition. Die geringe Häufigkeit des seltenen Allels spricht dafür, dass es sich nur um eine heterozygot betroffene Person im untersuchten Pool handelt. Es übt seine Wirkung auf das benachbarte Cg253 aus (8% gegenüber normalen 51,3 %).

Das analytische Cg93 ist nicht oder im gleichen Maß wie die restlichen CpGs in dem Amplikon betroffen.

Ergebnis - Vag1

CG-Position	21	34	37*	85	101	122	129	131	133	159	168	176	180	183	186	198	201	204	231	236	Frequenz (%)	
Keine Abweichung	Green																					
Ins-T 51^52	Green	3,6																				
Del-T 52	Green	15,3																				
Nicht konv. C 152	Green	1,5																				
Nicht konv. C 174	Green	Green	Green	Blue	1,3																	
Nicht konv. C 182	Green	Green	Green	Blue	8,2																	
Nicht konv. C 196	Green	Green	Green	Blue	4,0																	
Haplotyp 182+196	Green	Green	Green	Blue																		
Haplotyp 182+152	Green	Green	Green	Blue																		
Haplotyp 182+52	Green	Green	Green	Blue																		

Abbildung 140 Marker Vag1 - Einfluss von Sequenz-Varianten auf die Methylierung. Die CpG-Positionen in dem Amplikon sind in der obersten Zeile aufgeführt. Das Sternchen (*) markiert das analytische CpG. Die zweite Zeile zeigt die Methylierung, die im Normalfall an den einzelnen CpGs vorliegt. Die nachfolgenden Zeilen zeigen die Methylierungswerte, die in den Reads, die die links angegebene Abweichung tragen, gegeben sind. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung); ausgewertet aus 18000 Reads.

GGTATAATGGATTGGGTTTCGGGTTTTAAATTGCGCGTTTATGTGATGATTTTTTTTTAAATTATAGTAGTTTTAGTTTAGCGGATTG
 ATTTATTTTTCGGTATTGGTAAATATGATTAATCGTGGGTTCGGCGGATTAATGGTGGAGGTTGAGTTTTCGAATTAGTTCGGTGGTTCGGGCGT
 CCGCGGGGAGTTTCGGCGCGCGGATAGTGAATGTTGGGTGGGAGTTCGGGACCTTTTAAAATGTTTTTAGTGGTATTTTAGTAATT

Abbildung 141 Bisulfit-konvertierte Sequenz des Markers Vag1. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die Position der Insertion lila, die Deletion blau, die vier nicht konvertierten C orange und die Primer-Stellen sind grau unterlegt. Die Bindungsstelle des 1r-SNuPE-Primers ist unterstrichen.

Bei der Untersuchung der 18000 Vag1-Reads wurden die in Abbildung 140 gezeigten Varianten und ihre Auswirkung auf die Methylierung der benachbarten CpGs gefunden.

Auffallend ist die Erhöhung der Methylierung durch die nicht konvertierten Cytosine an Positionen 174, 182 und 196 - zwischen Cg85 und Cg235. Einen ähnlichen Effekt hat ein Haplotyp aus 182 und dem -T-Allel der Deletion in Position 52. Ein Haplotyp aus nicht konvertierten Cytosinen 182 und 152 führt bei Cg21, Cg34 und dem analytischen CpG Cg37 zur vollständigen Demethylierung (Abbildung 140).

Ergebnis - Vag2

CG-Position	48*	70	84	101	133	140	146	155	Frequenz (%)
Keine Abweichung	Green								
Del-T 38	Green	1,9							
SNP A>T 109	Green	22,5							
Nicht konv. C 143	Green	Green	Green	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	5,0
SNP A>G 151	Green	1,4							
Haplotyp 109+143	Green	Green	Green	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	
Haplotyp 109+143+151	Green	Green	Green	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	

Abbildung 142 Marker Vag2 - Einfluss von Sequenz-Varianten auf die Methylierung. Die CpG-Positionen in dem Amplikon sind in der obersten Zeile aufgeführt. Das Sternchen (*) markiert das analytische CpG. Die zweite Zeile zeigt die Methylierung, die im Normalfall an den einzelnen CpGs vorliegt. Die nachfolgenden Zeilen zeigen die Methylierungswerte, die in den Reads, die die links angegebene Abweichung tragen, gegeben sind. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung); ausgewertet aus 58374 Reads.

ATTAAGAAGAGTTTTAGGGGATATTGGGTAGAGTTATTTTTTGTTTCGATGTTTTAGTTGTTGAAGTTCGGTTTGAAA
 TTTCGTAGATAGTTAGTTTTCGTTTAAATTCGATTTGGTTTTGTTGGTAGTTTCGTTTTTCGTATCGAATATTTCGGGTGTT
 ATTATAATATTTTGAAGGGGGGAAA

Abbildung 143 Bisulfit-konvertierte Sequenz des Markers Vag2. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die Deletion blau, die beiden SNPs rot, das nicht konvertierte C orange und die Primer-Stellen sind grau unterlegt. Die Bindungsstelle des 1f-SNuPE-Primers ist unterstrichen.

Bei Marker Vag2 (58374 Reads) wurden eine Deletion, zwei SNPs und ein nicht konvertiertes Cytosin auf ihre Wechselwirkung mit den benachbarten CpGs hin untersucht (Abbildung 142).

Die Deletion eines Thymins an der Position 38 liegt am Anfang einer Poly-T-Sequenz aus 8 Ts. Sie befindet sich in der Zielsequenz des SNUPE-Primers (Abbildung 143). Sie übt offenbar keinen Einfluss auf die Methylierung der 8 CpGs des Amplikons aus – eventuell, weil es sich um ein Sequenzierartefakt handelt.

Das SNP an Position 151 setzt den Methylierungsgrad aller CpGs herab, bis auf Cg101. Am stärksten verändert ein Haplotyp, bestehend aus den jeweils selteneren Allelen von SNPs an Positionen 109 und 151 sowie dem nicht konvertierten C-143, den Methylierungsgrad von allen CpGs im Amplikon (stark demethyliert), abgesehen von Cg101, welches dagegen 100% methyliert ist.

Das zweite SNP an der Position 151 ist eine A>G-Transition, die zu einer schwach herabgesetzten Methylierung des gesamten Bereichs führt.

Ergebnis - Sperm1

In 50928 Reads des Marker Sperm1 wurden 5 verschiedene Varianten auf ihren Methylierungseinfluss hin untersucht. Zwei A-Deletionen an Positionen 57 und 119 befinden sich am Anfang einer Poly-A-Sequenz und sind wahrscheinlich Sequenzierartefakte. Zwei G-Deletionen an Positionen 38 und 128 bewirken den Ausfall eines CpGs. Das SNUPE-Detektions-CpG ist dabei nicht betroffen. Ein nicht konvertiertes C mit einer Frequenz von 1,7% wurde ebenfalls mit untersucht. Kein Einfluss der gefundenen Abweichungen auf die Methylierung der insgesamt 13 CpGs ist zu beobachten.

Ergebnis - Sperm2

In den 46382 Reads des Markers Sperm2 wurden zwei Deletionen, zwei Insertionen und ein SNP auf ihren Methylierungseinfluss hin untersucht. Die Deletionen und die Insertionen sind wahrscheinlich Sequenzierartefakte (Anfang einer poly-A-Sequenz). Das SNP ist eine T>C-Transition mit einer Frequenz von 3,6%. Keine der gefundenen Abweichungen übt einen Einfluss auf die Methylierung aus.

Ergebnis - Haut1

CG-Position	22	25	30	60*	65	71	75	81	86	88*	121	138	Frequenz (%)
Keine Abweichung	gelb												
Ins T 25^26	gelb	6,8											
MNV TT 29..30	gelb	1											
Nicht konv. C 41	blau	6,2											
Nicht konv. C 42	gelb	1,4											

Abbildung 144 Marker Haut1 - Einfluss von Sequenz-Varianten auf die Methylierung. Die CpG-Positionen in dem Amplikon sind in der obersten Zeile aufgeführt. Das Sternchen (*) markiert das analytische CpG. Die zweite Zeile zeigt die Methylierung, die im Normalfall an den einzelnen CpGs vorliegt. Die nachfolgenden Zeilen zeigen die Methylierungswerte, die in den Reads, die die links angegebene Abweichung tragen, gegeben sind. Die prozentualen Werte der DNA-Methylierung entsprechen einem Farbwert im kontinuierlichen Farbverlauf von gelb (= 0% Methylierung) nach blau (= 100% Methylierung); ausgewertet aus 200286 Reads.

```
GAGGGGGGTTATGATGTTAGCGTTCGAGCCGAGGGTTGAGTTTGTTGGTTTATAGAGAACGATGCCGGTTCCATCCGAAGCGGGGCGCGTG
TTTTAGGGGTTTTGGGTGGATTAGGGGGCGTTAAGAGGGGTTAGGCCAGGAGAGGTTTGTTATTTAGTTGTTAGATTTTA
```

Abbildung 145 Bisulfit-konvertierte Sequenz des Markers Haut1. Die CpG-Dinukleotide sind gelb markiert, die Position der Insertion lila, die Multi(Di-)nukleotid-Variation rot, zwei nicht konvertierten Cytosine orange und die Primer-Stellen sind grau unterlegt. Die Bindungsstellen der beiden SNUPE-Primer sind unterstrichen.

Die 200286 Reads des Markers Haut1 zeigten 4 Varianten (Abbildung 144). Alle Abweichungen üben einen enormen Einfluss auf die Methylierung aus. Die Insertion eines Thymins zwischen zwei benachbarten CpGs - Cg22 und Cg25 (Abbildung 145) wirkt auf die CpGs des gesamten Amplikons stark demethylierend.

Vergleichbar wirkt sich auch der Austausch von einem Guanin und einem Cytosin durch zwei Thymine an den Positionen 29 und 30 aus. Diese Dinukleotid-Transition ist jedoch kein echter Austausch von zwei Basen, sondern eine einzelne G>T-Transition, die dem nicht methylierten Cg30 (TpG) benachbart ist. Dieser Haplotyp kommt in 1% der Reads vor.

Das T an der Position 29 wurde in den Reads nicht mit dem methylierten Cg30 zusammen gefunden. Das bedeutet, das SNP kommt ausschließlich in Reads vor, die an dem Cg30 nicht methyliert sind.

Das nicht konvertierte C-41 (Frequenz 6,2%) führt dazu, dass alle CpGs hoch oder vollständig methyliert sind. Ist dagegen das unmittelbar benachbarte nicht konvertierte C-42 in dem Read enthalten, sind die CpGs 5 bis maximal 14,5% methyliert.

4 Diskussion

Die Körperflüssigkeitsanalyse aus forensischem Material ist für den forensischen Genetiker ein bisher ungelöstes Problem, weil die zurzeit routinemäßig genutzten Analyten Proteine oder RNA-Moleküle sind. Deswegen erscheint schon vom Analysenmaterial her die Untersuchung differentiell methylierter Genorte als eine gute Alternative, weil es sich dabei um DNA handelt. Auch die eigentlich zu bestimmende Größe - nämlich der Methylierungsgrad - ist, wie in dieser Arbeit zum ersten Male gezeigt werden konnte, stabil gegenüber den lang wirkenden, exogenen Einflüssen, die viele forensische Analysen so problematisch machen. Das Problem der Methylierungsanalyse ist eher, dass es viele biologische Faktoren gibt, die den Methylierungsgrad beeinflussen können. Das Problem der Nachweisteknik selbst ist: Die zur Diskussion stehenden Körperflüssigkeiten sind zum Teil komplexe Mischungen aus verschiedenen Zellarten. Das Phänomen der differentiellen Methylierung betrifft aber Zellen und nicht Gewebe oder Körperflüssigkeiten. Deswegen wird man nur in Ausnahmefällen 0% oder 100% Methylierung erwarten können. Das Ziel der vorgelegten Arbeit war deswegen, zum einen in zwei Genom-weiten Studien die am besten differenzierenden Methylierungsgenorte zu identifizieren und zum anderen möglichst genau alle die Methylierung ändernden Einflüsse zu erfassen.

Die Genom-weite Suche nach den differentiell methylierten CpGs wurde in einer ersten Runde mit dem Infinium HumanMethylation27K-Chip und anschließend in einer vertieften Suche mit dem 450K – Chip durchgeführt. Letzterer erlaubte die Untersuchung von CpGs außerhalb der CpG-Inseln. Die in dieser Arbeit benutzten CpGs hatten das höchste Differenzierungspotential bezüglich der hier relevanten Körperflüssigkeiten.

4.1 Vergleich mit ähnlichen Methoden

Der entscheidende Vorteil der hier vorgestellten SNUPE-Methode ist der eindeutige Nachweis der Zielflüssigkeit in Mischungen durch das flüssigkeitsspezifische Signal. Die Marker-Loci, die ihre Zielflüssigkeit bzw. Zielgewebe durch eine vorhandene Methylierung anzeigen (Blut2, Mens1, Spei1, Spei2, Vag1, Vag2, Sperm2 und Haut1), zeigen in allen anderen forensisch relevanten Flüssigkeiten keinen Methylierungssignal. Dadurch kann jede Zielflüssigkeit auch in einem Überschuss von unbekanntem Flüssigkeitsgemisch immer noch nachgewiesen werden. Dagegen sind die in dieser Arbeit als reziprok bezeichneten Marker - für peripheres Blut (Blut-1) und für Sperma (Sperm-1) - ausschließlich in ihrer Zielflüssigkeit unmethyliert, in anderen Flüssigkeiten zeigen sie Methylierung. Auf diese Art und Weise zeigen sie Beimischungen von andern Flüssigkeiten in Blut bzw. Sperma an. Die Identifikation der Beimischung erfolgt dann durch die übrigen o.g. Marker.

Ein anderes, bislang ungelöstes Problem ist der eindeutige Nachweis von Menstrualblut. Eine Unterscheidung des Menstrualblutes nicht nur von peripherem Blut, sondern auch von der Vaginalflüssigkeit, ist vor allem bei Vergewaltigungen und Fällen von sexueller Nötigung von großer Bedeutung. Der folgende Fall stellt ein Standardproblem bei der Aufklärung von sexuellen Gewalttaten dar: Es ergibt sich der Verdacht auf eine Vergewaltigung. Die mutmaßliche Tat liegt schon länger zurück, so dass eine körperliche Untersuchung von Verletzungen nicht mehr möglich ist. Tatsächlich offenbaren sich die meisten Opfer erst in Rahmen einer normalen, Tage oder Wochen später stattfindenden ärztlichen Konsultation (Germerott et al. 2012). Das Opfer behauptet, dass es durch die vaginale Penetration innere Verletzungen davon getragen habe und das Blut am Tatort oder an dem von dem Arzt entnommenen Vaginalabstrich das Blut von der Verletzung sei. Der männliche Verdächtige bestreitet aber die Erzwingung des Geschlechtsverkehrs und besteht darauf, dass die Blutspuren Menstrualblut seien. In einer solchen Situation muss man das Menstrualblut von einem Gemisch aus Blut und Vaginalflüssigkeit unterscheiden können. Der Nachweis von Blut und Vaginalflüssigkeit wird nicht sinnvoll sein, da ja beides in Menstrualblut natürlicherweise enthalten ist. Ein Marker, der das Menstrualblut durch die Anwesenheit von Vaginalflüssigkeit nachweist, wird in diesem Fall ebenfalls nicht weiter helfen. Der in dieser Arbeit entwickelte Menstrualblut-Marker Mens1 leistet jedoch die Unterscheidung des Menstrualblutes von den übrigen Flüssigkeiten. Er ist in Vaginalflüssigkeit und peripherem Blut vollständig unmethyliert, sowie in übrigen Flüssigkeiten - außer Menstrualblut. Ein zusätzliches Methylierungssignal weist ausschließlich auf die Anwesenheit von Menstrualblut bzw. Endometrium hin. Entscheidend ist: Mit Hilfe dieses Markers kann das Menstrualblut auch in Mischungen mit Blut- und Vaginalflüssigkeitsanteil nachgewiesen werden.

4.1.1 Differentielle Methylierung zur Unterscheidung von Körperflüssigkeiten

Als erste auf dem Gebiet beschreiben Frumkin et al. (2011) 15 Loci, die eine differentielle Methylierung zwischen Blut, Speichel, Sperma, Vaginalflüssigkeit, Urin und Haut aufweisen. In einer genomweiten, softwaregestützten Suche nach zufälligen CpG-Inseln, die eine HhaI-Erkennungssequenz enthalten, wurden zunächst 205 Loci als Kandidaten ausgewählt. Achtunddreißig davon zeigten differenzielle Methylierung zwischen den untersuchten Geweben. Die besten 15 gewebespezifischen differenziell methylierte Regionen (tDMRs) wurden zunächst in eigenständigen Marker-Ansätzen untersucht und später daraus ein Multiplex-Assay entwickelt. Die Methode funktioniert auf der Basis von einem methylierungsempfindlichen Restriktionsenzym-PCR (MSRE-PCR). Dazu wird die extrahierte genomische DNA zunächst mit einem methylierungsempfindlichen Restriktionsenzym HhaI verdaut. Dieses Enzym schneidet die DNA an seiner Erkennungssequenz (GCG^AC) nur wenn das CpG in der Sequenz unmethyliert ist. Die an dieser Stelle methylierte DNA bleibt intakt. Die HhaI-verdaute DNA-Probe wird mit

fluoreszenzmarkierten und die Schnittstelle flankierenden Primern amplifiziert. Die Amplifikations-Fragmente werden kapillarelektrophoretisch detektiert. Die Intensität des Fluoreszenz-Signals entspricht folglich dem Anteil der an der entsprechenden Marker-Schnittstelle methylierten Fragmente. Auf die Art und Weise wurde aus jeder Körperflüssigkeit ein spezifisches Methylierungsmuster erstellt. Es wurden insgesamt 50 Proben untersucht. Keine weitergehende Validierung der Marker wurde vorgenommen. Die Methylierungssignale an den 15 Loci unterscheiden sich in den verschiedenen Körperflüssigkeiten lediglich aufgrund ihrer Intensität. Keine der Flüssigkeiten war vollständig unmethyliert an den beschriebenen Loci. In jeder Flüssigkeit wird die Gesamtmethylierungsrate an zwei kombinierten Loci gemessen. Dabei weist jede Art der Flüssigkeit einen bestimmten Mittelwert der Methylierung auf und ein eigens Streuungsbereich der Werte, welches sich in den meisten Fällen zwischen den Flüssigkeiten überschneidet. Die Autoren geben an, dass die kombinierten Methylierungsraten in den einzelnen Flüssigkeiten und Haut signifikant unterschiedlich seien. Eine sichere Identifizierung mit Hilfe dieses Systems war jedoch nur für Sperma möglich. Dieses konnte auch in einer Mischung mit Speichel korrekt nachgewiesen werden. Der eindeutige Nachweis von anderen Flüssigkeiten - rein oder im Gemisch - ist durch dieses System prinzipiell nicht möglich, da die Intensität der einzelnen Markersignale im Methylierungsprofil der Probe überlagert wäre und die errechnete Gesamtmethylierungsrate keine spezifische Aussage liefern würde.

In einer weiteren Arbeit zeigt diese Gruppe (Wasserstrom et al. 2013), das gleiche Prinzip nutzend, einen Nachweis-Kit für Sperma (Nucleix DSI-Semen Kit). Dafür werden 5 der vorher beschriebenen Loci eingesetzt. Drei davon weisen spermaspezifische Methylierungssignale auf. Die Effektivität des Kits für den Spermanachweis wird an insgesamt 135 verschiedenen Flüssigkeits- und Gewebeprobe sowie an Mischproben getestet. Eine ausführlichere Validierung dieses Kits wird von LaRue et al. (2013) durchgeführt. Eine stabile Nachweisbarkeit von Sperma wird ab 62pg Sperma-DNA erreicht.

In einem ähnlichen Ansatz studiert eine koreanische Gruppe mehrere aus einer Literaturrecherche stammende Kandidatenregionen (Lee et al. 2012). Mit Hilfe der Bisulfit-Sequenzierung wurden diese auf ihr Unterscheidungspotential überprüft. Aus insgesamt 5 Loci wurden spezifische Methylierungsprofile erstellt, die eine Unterscheidung des Spermas von Blut, Speichel, Menstrualblut und Vaginalsekret ermöglichen sollten. Zusätzlich erlaubten 4 von den 5 Loci die Unterscheidung des peripheren Blutes und Speichels von Menstrualblut und Vaginalsekret. Dabei können Menstrualblut und Vaginalsekret untereinander nicht unterschieden werden. Das Gleiche gilt für peripheres Blut und Speichel.

In ihrer nächsten Arbeit berichtet dieselbe koreanische Arbeitsgruppe (An et al. 2013) von der Weiterentwicklung der Methode. Gearbeitet wird mit Proben (venöses Blut/Menstrualblut,

Speichel, Sperma und Vaginalflüssigkeit) von insgesamt 6 weiblichen und 10 männlichen Spendern. An den 5 Loci, die in ihrer vorhergehenden Arbeit (Lee et al. 2012) erarbeitet wurden, werden zwei Multiplex-PCR-Systeme entwickelt. In einem System werden methylierungsempfindliche Restriktionsenzyme verwendet und ein spezifisches Methylierungsmuster aus PCR-Signalen erzeugt - ähnlich wie bei Frumkin et al (2011). Das andere System verwendet die gleichen Loci, um die Methylierungsunterschiede mit Hilfe der SNaPshot-Reaktion an der Bisulfit-konvertierten DNA zu detektieren.

Dem Prinzip nach gleicht der SNaPshot-Ansatz von An et al der in meiner Arbeit vorgestellten SNUPE-Methode. Die 4 Loci (DACT1, USP49, PRMT2 und PFN3), die die Unterscheidung in der Arbeit von An et al leisten sollen, sind in 29 von 35 Spermaproben vollständig unmethyliert (ein Nichtmethylierungs-Peak) und in anderen vier Flüssigkeiten mittelmäßig bis hoch methyliert (ein Methylierungs- und ein Nichtmethylierungspeak). Das prinzipielle Methylierungs-Verhältnis der Loci entspricht den Eigenschaften des Sperm1-Markers in meiner Arbeit. Die 4 Marker gestatten somit die Identifizierung von Sperma. Da Sperma in allen 4 Markern nicht methyliert ist, wird die Beimischung einer oder mehrerer anderer Flüssigkeiten zu einem Mischsignal in allen 4 Loci führen, was dann keine eindeutige Zuordnung von Sperma mehr ermöglicht. Außerdem haben die Marker in 6 Spermaproben gemischte Signale (Methylierungs- und Nichtmethylierungs-Peak) und können damit in 17% der reinen Sperma-Proben keine Unterscheidung zu anderen Flüssigkeiten leisten.

Der Marker PFN3 soll Vaginalflüssigkeit und Menstrualblut von Blut und Speichel unterscheiden. Er weist allerdings in allen 6 Vaginalsekret-Proben und 5 von 6 Menstrualblut-Proben ein gemischtes Signal (ca. 40-60% Methylierung) auf. In den Blut-Proben ist er durchschnittlich 93% und in Speichel-Proben durchschnittlich 83% methyliert. Die Streuung der Werte wird nicht angegeben. Insofern basiert die Unterscheidung der Paare lediglich auf den Unterschieden in dem Methylierungsstatus der Proben, der - wie die Ergebnisse der großen Validierung in meiner Arbeit gezeigt haben - starken interindividuellen Schwankungen ausgesetzt ist. Diese sind auch in der hier diskutierten Untersuchung eindeutig zu beobachten - die Werte von nur 12 Vaginalsekret- und Menstrualblut-Proben weisen schon eine Schwankungsbreite von ca. 20% auf. In dem Fall einer Flüssigkeitsmischung - beispielweise aus Vaginalflüssigkeit und peripherem Blut - würde der Marker ein Mischsignal mit intermediärem Methylierungswert (zwischen 40% und 90%) erzeugen z.B. 70% Methylierung. Man könnte dieses Mischsignal nicht von einer stärker methylierten Vaginalflüssigkeits- und/oder Menstrualblutprobe oder einer schwächer methylierten Blut- und/oder Speichelprobe unterscheiden. Damit kann der Marker keine Aussage über die Zusammensetzung der Probe erlauben.

Choi et al (2014) ergänzen im darauf folgenden Jahr in einer Arbeit das Nachweissystem von An et al (2013). Ein weiterer Spermamarker wurde hinzugefügt sowie ein Nachweissystem für Speichel

und Vaginalflüssigkeit, welches jetzt bakterielle DNA nutzt. Letzteres beruht auf dem Nachweis von bakterienspezifischen 16S-rRNA- oder 16S-23S rRNA-Genen. Speichel kann demnach durch die Anwesenheit von *Streptococcus salivarius* und/oder *Streptococcus mutans* von anderen Körperflüssigkeiten unterschieden werden (Nakanishi et al. 2011, Hsu et al. 2012). In der Vaginalflüssigkeit werden *Lactobacillus crispatus*, *L.gasseri*, *L.iners* und/oder *L.jensenii* spezifisch detektiert (Akutsu et al. 2012, Benschop et al. 2012). In der Arbeit von Benschop wird über die Präsenz von 88 verschiedenen Bakteriengattungen in der weiblichen Vaginalflora berichtet. Sie wurden per NGS und Mikro-Array nachgewiesen. Elf davon wurden ausschließlich in Vaginalflüssigkeit beobachtet. In 19% (8/43) der untersuchten Vaginalproben konnten die spezifischen Bakterien allerdings nicht nachgewiesen werden.

Die Daten von Choi et al (2014) werden an 20 männlichen Blut-, Speichel- und Sperma-Proben und lediglich 14 weiblichen Menstrualblut- und Vaginalflüssigkeitsproben erhoben. Es werden Verdünnungen zwischen 1000pg und 15pg analysiert. Zusätzlich werden einige simulierte Fallproben und jeweils zwei 75-Tage bei Raumtemperatur gelagerte Proben von jeder Flüssigkeit untersucht. Hinzu kommen Mischungen von Vaginalflüssigkeit-Speichel, Vaginalflüssigkeit-Sperma und Sperma-Speichel im 1:1- und 1:2-Verhältnis.

Als Ergebnis ist fest zu halten: Nur Sperma erzeugt ein spezifisches Methylierungssignal, welches allerdings bei sterilen Männern wegfällt. USP49, DACT1 und PFN3 erzeugen in allen Flüssigkeiten und ca. der Hälfte der Sperma-Proben ein Signal. Die Analyse bakterieller DNA zeigte in mehreren Proben falsch positive und falsch negative Signale.

Korrekte Signale wurden bei einem Einsatz von 500pg DNA aus Speichel und Sperma und beim Einsatz von 250pg DNA aus Vaginalflüssigkeit detektiert. Unter 125pg wurden Allel-drop-in- und Allel-drop-out-Signale festgestellt. Der Nachweis bakterieller DNA verlief insgesamt empfindlicher als der Methylierungs-Nachweis (125pg).

Der Speichel-Nachweis durch tDMRs ist bei 75 Tage bei Raumtemperatur gelagerten Speichel-Proben ausgefallen. Bakterielle DNA aus Speichel wurde jedoch detektiert.

In einer 1:1 Mischung von Vaginalflüssigkeit und Sperma konnte ohne differentielle DNA-Extraktion kein Sperma nachgewiesen werden.

Eine andere Gruppe (Madi et al. 2012) beschreibt die Differenzierung von Blut, Speichel, Sperma, Wangenschleimhautzellen und Haut mit 4 tMDRs mit Hilfe von Pyrosequenzierung an einem PyroMark Q24 Pyrosequencer (Qiagen). Es werden 10 bis 11 Proben von jeder Körperflüssigkeit/Gewebe getestet. Für die Unterscheidung werden Gesamtmethylierungswerte an mehreren CpGs innerhalb der Marker-Loci verwendet. Die Streuung der einzelnen Wertegruppen ist so hoch, dass bis auf den Spermamarker das System nicht tauglich ist. Eine Mischungsanalyse ist überhaupt nicht möglich. Die hohe Einsatzmenge an DNA pro Analyse (mindestens 1,5ng) macht das Verfahren ungeeignet für die forensische Anwendung.

Fasst man aus den oben geschilderten Arbeiten über den Ansatz und den Einsatz der Methylierungsanalyse für die Identifizierung von Körperflüssigkeiten die Folgerungen zusammen, so ergibt sich folgendes Bild:

- Es existiert kein Nachweissystem, welches alle Körperflüssigkeiten voneinander unterscheidet
- Es existiert kein Nachweissystem, welches jede einzelne Körperflüssigkeit in einer beliebigen Mischung der übrigen Körperflüssigkeiten identifiziert
- In keiner der Studien wird eine forensische Validierung vorgenommen
- Es existiert kein Hinweis auf mögliche Störeinflüsse von Tumorerkrankungen
- Es existiert kein Hinweis oder eine Prüfung von genetischen Einflüssen auf den Methylierungsgrad
- Nur in einer Studie wurde eine Validierung vorgenommen - für den Sperma Nachweis-Kit Nucleix DSI-Semen (LaRue et al. 2013).

4.1.2 RNA-Marker zur Unterscheidung von Körperflüssigkeiten

Seit Beginn dieser Dissertation sind mehrere Lösungsansätze beschrieben worden, in deren Zentrum meist Multiplex-Assays zum Nachweis spezifischer mRNAs stehen. Zuletzt berichten Roeder und Haas (2013) von einer auf RT-PCR (Reverse Transcription PCR) basierten Schnellmethode, die aus einem Set von 5 bis 7 mRNA-Markern pro Körperflüssigkeit (Speichel, peripheres Blut, Menstrualblut, Vaginalflüssigkeit, Haut, Schweiß und Sperma) besteht. Sie verwenden diejenigen Marker, die bereits von andern Arbeitsgruppen vorher beschrieben wurden (Haas et al. 2009, Juusola & Ballantyne 2005). Die Autoren geben an, dass außer den Sperma-Markern alle anderen Marker nicht allein im Zielgewebe Signale gezeigt haben, sondern eine Kreuzreaktivität mit den anderen getesteten Geweben aufweisen.

Die European DNA Profiling Group (EDNAP) hat in den vergangenen 3 Jahren 4 Kooperationsstudien organisiert und publiziert (Haas et al. 2011, Haas et al. 2012, Haas et al. 2013, Haas et al. 2014). Teilgenommen hatten im Mittel über 20 europäische Laboratorien. Dabei wurden jeweils mehrere RNA-Marker-Loci an je 6-8 Proben getestet. Bei Studie 1 handelte es sich um 3 Blut spezifische Marker, bei Studie 2 um 7 Blut spezifische Marker, bei Studie 3 um ein Speichel spezifisches System bestehend aus 3 Markern und ein Sperma spezifisches System mit 5 Markern. Studie 4 beschrieb 6 Menstrualblut- und 6 Vaginalflüssigkeitsmarker.

In Studie 1 (Haas et al. 2011) wurden 7 Blutproben bearbeitet. Es wurden 3 Marker eingesetzt, einer davon war die Hämoglobin B mRNA (HBB). Letztere funktionierte auch am stabilsten. Die beiden übrigen Marker (SPTB und PBGD) zeigten in manchen Analysen weitere Peaks, die aber nicht störend wirken sollten. Der HBB-Nachweis funktioniert auch noch in extremen

Verdünnungen (50% der Labors konnten HBB noch nachweisen). Die beiden übrigen Marker funktionierten in den größeren Verdünnungen (<0,1µl Blut) in allen Labors nur noch ausnahmsweise.

In Studie 2 (Haas et al. 2012) wurden ebenfalls 6 Blutproben und zwei Verdünnungsreihen mit nun 7 Markern - einer empfindlichen Diplex (HBA und HBB) und einer weniger empfindlichen Pentaplex (ALAS2, CD3G, ANK1, SPTB und PBGD) untersucht. Auch hier zeigte sich das Hämoglobin B Gen als sehr sensitiv. Unterscheidung von Menstrualblut war mit keinem der Marker möglich. Nur bei zwei Markern war bei Sperma eine Kreuzreaktion zu beobachten.

In Studie 3 (Haas et al. 2013) wurden 10 Speichel- und 10 Spermaproben (auf unterschiedliche Arten präpariert, z.B. auf Papier, Textilien etc.), 4 Verdünnungsansätze (10-0,01µl Speichel, 5-0,01µl Sperma) und 10 simulierte forensische Spuren bearbeitet. Vier Labors haben tierische Speichel- und Spermaproben und diverse humane Gewebe (Gehirn, Leber, Lunge etc.) untersucht. Insgesamt haben 20 Labors bei der Studie teilgenommen, 13 Labors haben ihre Ergebnisse bereit gestellt. Die der Literatur entnommenen 3 Speichel-Marker (HTN3, STATH und MUC7) und 5 Sperma-Marker (PRM1, PRM2, PSA, SEMG1 und TGM4) erschienen empfindlich genug für eine forensische Anwendung.

Der Nachweis von Speichel gelang bei Marker 1 (HTN) bei einer Probe von 5µl Speichel auf Papier weniger als 25% der beteiligten Labors, bei einer Probe von Kaugummi weniger als 50% der Labors. Eine Kreuzreaktion hat HTN bei der Speichelprobe einer Katze gezeigt. Bei Marker 2 (STATH) gelang bei 5 verschiedenen Arten von Speichel-Proben weniger als 50% der Labors der Nachweis von Speichel. Kreuzreaktionen gab es mit einer Vaginalprobe und mit der Speichelprobe von einem Hund. Bei Marker 3 (MUC7) gelang bei der Probe von 5µl Speichel auf Papier nur weniger als 25% der Nachweis, bei einer Probe von 5µl Speichel auf einem Objektträger weniger als 50% der Labors. MUC7 hat bei 30% der Labors ein falsch positives Signal mit Vaginalflüssigkeit gezeigt. Weitere Kreuzreaktionen gab es mit Sperma und steriler Samenflüssigkeit.

Der Nachweis von Sperma gelang bei Marker 1 (PSA) bei 2 Proben (Sperma auf weißem Textil und Latex) weniger als 25% der Labors, bei zwei anderen Proben weniger als 50% der Labors. Der Marker 2 (PRM2) hat bei Proben von sterilem Samen in weniger als 25% der Labors funktioniert. Der Marker 3 (SEMG1) zeigte Kreuzreaktion mit Vaginalflüssigkeit. Bei Marker 4 (TGM4) bei 3 Proben waren weniger als 50% der Labors erfolgreich, bei einer Probe von 3µl Sperma auf Latex weniger als 25% der Labors.

Die Grenze der Nachweisbarkeit lag in den meisten Labors bei 0,5µl Speichel und Sperma.

Als Ergebnis sehen die Autoren, dass die getesteten Marker zum Nachweis der Zielflüssigkeiten tauglich erscheinen, dass aber noch Richtlinien erarbeitet werden müssten, welche die

Kreuzreaktivität der Marker zu interpretieren gestattet. Die Anwendbarkeit in Mischungen soll in zukünftigen Ringversuchen erörtert werden.

In Studie 4 (Haas et al. 2014) wurden 7 Menstrualblutproben (6 Probandinnen) mit zwei aus jeweils drei Markern bestehenden Triplex-Ansätzen (MMP-Triplex: MMP7, MMP10 und MMP11; MB-Triplex: MSX1, LEFTY2 und SFRP4) und 7 Vaginalflüssigkeitsproben (6 Probandinnen) mit zwei aus je drei Markern bestehenden Triplex-Ansätzen (Vag-Triplex: MYOZ1, CYP2B7P1 und MUC4; Lactobacillus-Triplex: Ljen, Lcris, Lgas) geprüft. Der zweite Triplex-Ansatz für Vaginalflüssigkeit war spezifisch für häufig in der Vaginalflüssigkeit vorkommende Bakterien und nicht für die Vaginalflüssigkeit selbst. Generell ist der Studie zu entnehmen, dass zum mindesten in dieser kleinen, ausgewählten Probenkohorte die RNA stabil ist. Allerdings reagiert eine Menstrualblutprobe überhaupt nicht. Im ersten Multiplex-System für Menstrualblut konnten die meisten Labors Menstrualblut nachweisen, im zweiten System sank die Erfolgsrate auf weit unter 50%. Vaginalflüssigkeit zeigte in einem hohen Prozentsatz ebenfalls mit beiden Markersätzen eine Reaktion (24/60 Markersatz 1, 2/60 Markersatz 2), Blut reagierte ebenfalls (7/60 Markersatz 1, 0/60 Markersatz 2). Im ersten Multiplex-System für Vaginalflüssigkeit konnten die meisten Labors die Zielflüssigkeit nachweisen, im zweiten Multiplex-System kam nur einer der drei Marker auf mehr als 50% Treffer, die übrigen zeigten extreme Schwankungen (0/22-22/22), im Mittel war die Trefferquote 8/22. Ohne Angabe von Zahlen wird darauf hingewiesen, dass die Menstrualblutmarker Reaktion mit Sperma zeigen. Die Vaginalmarker reagieren auch mit Haut.

Damit liefert keines der geprüften Systeme den Nachweis, dass es für den Ernstfall einer Falluntersuchung tauglich ist: Es gibt unspezifische Reaktionen mit anderen Körperflüssigkeiten. In dieser von den mindestens teilweise wichtigsten europäischen, forensischen Institutionen durchgeführten Studie bearbeitet man seit 4 Jahren jeweils 6-8 Proben, was keinerlei Rückschlüsse auf die Zuverlässigkeit der Systeme zulässt.

Da man bei mRNA als Substrat doch hohe Empfindlichkeit gegenüber exogenen Einflüssen befürchten muss, wurde nach einer alternativen Methode gesucht, die mit relativ kurzen Amplifikaten funktioniert und damit die Bearbeitung von extrem belastetem Spurenmaterial ermöglicht (An et al. 2012). Mikro-RNAs sind kurze nicht kodierende 18 bis 22 Basen lange Oligonukleotide, die die Genregulation auf posttranskriptionaler Ebene regulieren. Als erste entwickelten Hanson et al (2009) ein Panel an differentiell exprimierten Mikro-RNAs, die mit Hilfe von qRT-PCR (quantitative Reverse Transcription PCR) in den verschiedenen Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden. Da keiner der 179 gefundenen Mikro-RNA-Kandidaten ausschließlich in einer einzigen Flüssigkeit exprimiert wurde, verlief der Nachweis über ein charakteristisches Expressionsmuster, das die einzelnen Körperflüssigkeiten erzeugen. Abgesehen von den falsch

positiven Signalen, die in fast allen Flüssigkeiten nachgewiesen wurden, würde eine Mischung zu einer Überlagerung der spezifischen Werte führen und keine Differenzierung der Körperflüssigkeiten erlauben. Ein Jahr später konnten Zubakov et al (2010) mit Hilfe einer genomweiten Mikroarray Analyse 718 potentielle Mikro-RNA-Kandidaten für die Unterscheidung von forensisch relevanten Körperflüssigkeiten identifizieren, 14 davon wurden näher untersucht. Tatsächlich konnten damit nur peripheres Blut und Sperma unterschieden werden. Keine der in dem Gesamtgenom gefundenen Mikro-RNAs konnte Vaginalflüssigkeit, Menstrualblut und Speichel nachweisen.

4.2 Verwendete Methoden und Neuentwicklungen

Nach unseren beiden Genom-weit durchgeführten Suchen nach differentiell methylierten Genorten standen zahlreiche Kandidaten-Loci zur Verfügung. Generell wurde daraus eine engere Auswahl mit Hilfe der Bisulfitsequenzierung durchgeführt. Diese Methode wird in der wissenschaftlichen Literatur oft auch als Werkzeug zur Quantifizierung der Methylierung angegeben. Für die hier angestrebten Ziele war dieses Verfahren aber nicht zu gebrauchen, weil ein gegen Null gehender Methylierungsgrad, der durchaus für unser Verfahren relevant ist, per Bisulfitsequenzierung schon vom Auswerteprinzip her nicht sicher bestimmbar ist. Noch problematischer wäre die Analyse einer Körperflüssigkeitsmischung. Da letzteres ein essentieller Teil des Verfahrens sein sollte, wurde das SNaPshot-Prinzip gewählt. Mit dieser Methode wurde eine weitere Vorauswahl der Marker-Loci getroffen. Für die 10 am besten differenzierenden Methylierungsgenorte wurden nach Maßgabe der speziellen sequenzspezifischen Eigenschaften Nachweistests auf der Basis der SNUPE-Analyse entwickelt. Dabei handelte es sich je nach Genort um die normale Primer-Extension-Methode mit einem Primer, den kombinierten Einsatz von zwei auf verschiedene CpGs zielende Primer oder um ein spezielles Hybridisierungsverfahren, in welchem ein Primer zwei CpGs analysiert. Die Notwendigkeit dafür ergab sich, wegen der dicht nebeneinander liegenden CpGs in den entsprechenden Loci (Mens1 und Spei1). Erwartungsgemäß ergaben sich nur in Ausnahmefällen tatsächlich Werte von 0% oder von 100% Methylierung. Das erklärt sich zum Einen aus der zellbiologischen Heterogenität der Körperflüssigkeiten und zum Anderen aus der Tatsache, dass auch die SNUPE-Messung keine quantitative ist; letztere setzt sich immerhin zusammen aus der Bisulfitreaktion, einer PCR, einer Hybridisierung, einer Polymerasereaktion und einer relativen Fluoreszenzmessung. Die zum Vergleich heran gezogene NGS-Analyse funktionierte wesentlich besser mit dem Illumina-System als mit Roche 454. Letzteres zeigte ein hohes Maß an Kettenabbrüchen.

4.3 Bewertung der Validierungsexperimente

Zur Absicherung der Markereigenschaften ist in dieser Arbeit eine Reihe verschiedener Validierungsstudien durchgeführt worden.

4.3.1 Test auf Trennkraft

Für diese Studie sind mit dem jeweils spezifischen Marker die Zielflüssigkeit und die übrigen 4 Flüssigkeiten untersucht worden. Für jede Flüssigkeit wurden 20 Personen analysiert. Ziel des Experimentes war den Grad der Überlappung der Wertegruppe für die Zielflüssigkeit mit den Wertegruppen der übrigen Körperflüssigkeiten zu ermitteln. Der Marker Blut1 (beide SNUPE-Primer 1f und 2r) zeigte keine Überschneidung mit den Werten aus Sperma, Speichel, Menstrualblut und Vaginalflüssigkeit. Das gleiche gilt für den Menstrualblutmarker Mens1 und den Speichelmarker Spei1 in Bezug auf die übrigen Flüssigkeiten. Die Werte des Blut2 (beide SNUPE-Primer f1 und r2) im peripheren Blut überschneiden sich zu ca. 10% mit den Werten der Menstrualblut-Proben. Unter Einbezug von 50% der Werte in die Verteilung (die "Box" in der BoxPlot-Darstellung) ergibt sich bei Blut2 ein Abstand von 7% (f1) und 10% (r2) zwischen den Wertegruppen von peripherem Blut und Menstrualblut. Spei2 überlappt bei Speichel komplett mit dem Sperma-Signal, aber mit keinem anderen. Der Vaginalflüssigkeits-Marker Vag1 überlappt bei Vaginalflüssigkeit zu 9% mit der Wertegruppe aus Menstrualblut. Der Marker Vag2 weist 19% Überlappung zwischen den beiden Wertegruppen auf. Unter Einbezug von 50% der Werte in die Verteilung (die "Box" in der BoxPlot-Darstellung) ergibt sich bei Vag1 ein Abstand von 8% zwischen den Wertegruppen von Vaginalflüssigkeit und Menstrualblut, bei Vag2 sind es 14% Abstand. Beide Sperma-Marker Sperm1 und Sperm2 zeigen keine Überlappung mit den Werten der übrigen Wertegruppen.

Für die Entwicklung des Hautmarkers gab es im Vergleich zu den Körperflüssigkeiten andere forensisch-genetische Argumente: Naturgemäß ist bei einer solchen Spur nicht die Frage nach der Unterscheidung zu Blut und anderen Flüssigkeiten relevant, sondern der positive Nachweis, dass es sich um Haut handelt. Aus diesem Grunde ist bei der Überprüfung der Trennkraft der einzelnen Marker keine Haut eingesetzt worden. Der Hautmarker selbst ist aber in allen übrigen Flüssigkeiten überprüft worden, es gab keine Überlappung der Werte mit den Körperflüssigkeiten.

Peripheres Blut und Vaginalflüssigkeit sind natürliche Bestandteile von Menstrualblut. Am 1. bis 3. Blutungstag beträgt der Blutanteil in ausgeschiedenem Menstrualblut bis zu 50% (Fraser et al. 1985). Die Überlappung der Vaginalmarker-Signale und des Blutmarkers Blut2 mit den Menstrualblutwerten beeinträchtigt die Aussagesicherheit des Systems nicht, weil grundsätzlich alle Marker zur Körperflüssigkeitsanalyse eingesetzt werden und in diesem Fall trifft bei Grenzwerten der Menstrualblutmarker Mens1 eine eindeutige Entscheidung. Er ist in peripherem Blut und Vaginalflüssigkeit vollständig unmethyliert (ein roter Peak), so dass ein Methylierungssignal (ein blauer Peak) ausschließlich die Anwesenheit von Menstrualblut anzeigt.

4.3.2 Nachweis der spezifischen Flüssigkeit aus Mischungen

Vorstellbar ist, dass das Signal eines spezifischen Markers verfälscht wird durch die Präsenz der entsprechenden Template-DNA aus anderen Körperflüssigkeiten. Deswegen ist für jeden Marker ein Mischungsexperiment durchgeführt worden, in welchem neben der DNA der Zielflüssigkeit die DNA der vier übrigen Körperflüssigkeiten (6 verschiedene Konzentrationen) auf ihren Methylierungsgrad hin untersucht wurden.

Gegenüber dem Erwartungswert waren die Methylierungswerte aus der Mischung bei Blut1, Spei2 z.T. bis zu 20% erniedrigt. Die Werte von Blut2, Spei1, Sperm1, Haut1 entsprachen dem Erwartungswert. Die Werte von Mens1, Vag1, Vag2, Sperm2 waren gegenüber dem Erwartungswert leicht erhöht in Sperm2 z.T. bis zu 20%.

In den meisten Flüssigkeiten ist die untere noch sicher detektierbare Menge der Zielflüssigkeit ca. 20% Anteil an der Mischung.

Vor allem bei Blutspuren ist es eine häufige Ermittlerfrage, ob es sich um reines Blut oder eine Mischung aus mehreren Körperflüssigkeiten handelt. Deswegen wurden zwei bezüglich Ihres Methylierungssignals komplementäre Marker entwickelt: Blut2 hat ausschließlich bei peripherem Blut ein Methylierungssignal. Blut1 ist bei Blut komplett demethyliert und bei allen anderen Körperflüssigkeiten methyliert. Das bedeutet, Blut 2 identifiziert Blut – auch in Mischungen – Blut1 zeigt an, ob es sich um eine Blut enthaltende Mischung handelt oder um reines peripheres Blut.

Auch für den Nachweis von Sperma konnten zwei komplementäre Marker entwickelt werden: Sperm2 ist in Sperma hochgradig methyliert (89% durchschnittlich) und in den übrigen Flüssigkeiten ist er demethyliert. Insofern identifiziert Sperm2 das Sperma auch in Mischungen. Dagegen ist Sperm1 in Sperma komplett demethyliert und in den übrigen Flüssigkeiten fast vollständig methyliert, so dass er die Reinheit einer Sperma-Probe anzeigen kann.

4.3.3 Test auf Stabilität unter forensischen Bedingungen

Alle Marker bis auf Haut 1 sind in einem standardisierten Simulationsversuch bis zu 6 Monate getestet worden. Grundsätzlich ergaben sich die größten Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert bei den feucht gelagerten Proben: In einigen Fällen war nach 6 Monaten das Ausgangsmaterial nicht mehr nachzuweisen (Mens1: 6 Monate, Spei1 und Spei2: 3 Monate, Vag2: 6 Monate), bei Sperm1 erhöht sich nach 3 Monaten der Methylierungsgrad. Diese Signalveränderungen oder -ausfälle haben primär nichts mit der Nachweismethode zu tun, sondern mit dem Zerfall des Probenmaterials: Unter den Feuchtbedingungen können auch Mikroben eine weitgehende Zersetzung des Probenmaterials bewirken. Das ist nicht beeinflussbar. Auf der anderen Seite sind mit der in dieser Arbeit entwickelten Methode eindeutig z.B. Spermaspuren

nachgewiesen worden, die über 15 Jahre als Asservate gelagert worden sind. In einem weiteren Experiment wurde überprüft, ob sich die Überlappung der Wertegruppen aus den einzelnen Flüssigkeiten im Verlauf der forensischen Lagerungsbedingungen änderte. Abgesehen von den oben genannten Extremwerten einzelner Proben, war dies bei keinem Marker der Fall.

Der Aufbau des Versuchs und die Simulation der forensischen Spuren wurde in Anlehnung an die Arbeit von Setzer et al. (2008) durchgeführt. Setzer et al haben die Ausbeute und Stabilität von RNA in simulierten umweltbelasteten Vaginalflüssigkeits-, Blut-, Sperma- und Speichelspuren untersucht. Getestet wurden der Einfluss von trockener Umgebung bei Raumtemperatur, feuchter und warmer Umgebung, Außenbedingungen (Regen, Sonne, Mikroorganismen) und der Einfluss von UV-Strahlen auf die Proben. In der Arbeit wird der eigentliche Schwachpunkt der mRNA-Analyse in Zahlen dargestellt. Wird bei Probenlagerung Feuchtigkeit zugelassen, ist nach folgenden Zeitabschnitten die jeweilige Zielflüssigkeit nicht mehr nachweisbar: Blut 3Tage, Speichel 1 Tag, Sperma 7 Tage, Vaginalflüssigkeit 3 Tage.

4.3.4 Validierung mit 80-100 Proben pro Körperflüssigkeit

Um die Zuverlässigkeit der Analysenmethode genauer zu bestimmen, erschien eine größere Studie notwendig, in welcher der Verteilungscharakter der einzelnen Wertegruppen überprüft werden konnte. Die Validierungsstudie wurde mit den folgenden Probenzahlen vorgenommen: peripheres Blut: n=96/98, Menstrualblut n=96 (die Proben stammen von 60 Probandinnen), Speichel n=99/95, Vaginalabstriche n=55, Sperma n=88/ 91, Kopfhautschuppen n=70, Armhautschuppen n= 16. Zwei Werte werden für die Probenzahl n angegeben, wenn bei den beiden verwendeten Markern für eine Flüssigkeit nicht bei allen Proben Signale erhalten wurden.

Blutmarker Blut1 zeigt die erwartete schiefe Verteilung (Maximum der Werte bei 0% Methylierung). Blut2 ist annähernd normal verteilt. Beide zusammen erfüllen die einander ergänzende Funktion: Marker 2 identifiziert peripheres Blut, Marker 1 zeigt an, ob das Blut rein ist oder ein Gemisch. Für beide Marker können bei gleich bleibender Analysenqualität zwei unterschiedliche Primer verwendet werden.

Obwohl bewusst keine Gliederung nach Alter und nach dem Tag der Menstruation vorgenommen wurde, ergab sich beim Menstrualblutmarker Mens1 für die Wertegruppe annähernd eine Normalverteilung. Im Verlauf der Validierungs-Studie wurde festgestellt, dass Mens1 in 15 von 96 untersuchten Proben kein menstrualblutspezifisches Methylierungssignal anzeigt. Acht dieser Proben sind vom 5. Tag der Blutung. Die restlichen 7 Proben sind von früheren Blutungstagen (1 von Tag 1., 3 von Tag 2., 2 von Tag 3. und 1 von Tag 4.). Allerdings stammen sie aus Tampons und nicht aus Binden. Welche Folgen sich dadurch für Menstrualblutprobe ergeben können, wird weiter unten diskutiert.

Die normale Monatsblutung dauert bei den meisten Frauen 5 bis 6 Tage. Bei Einnahme von Antibabypille verkürzt sich die Blutungsphase um 1 bis 2 Tage und die Menge an ausgeschiedenem Blut nimmt signifikant ab (Mihm et al. 2011). Unabhängig von der Dauer der Blutung zeigen die letzten beiden Blutungstage nur einen Blutschmier und enthalten erwartungsgemäß viel Vaginalsekret. Der Blutanteil in der ausgeschiedenen Flüssigkeit beträgt an starken Blutungstagen bis zu 50%. An den letzten bzw. "leichten" Tagen reduziert sich der Blutanteil auf rund ein Viertel der ausgeschiedenen Flüssigkeitsmenge (Fraser et al. 1985). Die meisten Frauen geben den zweiten Tag als den der stärksten Blutung an.

In der Validierungs-Untersuchung haben die Proben von dem 2. Blutungstag auch die höchste durchschnittliche Methylierung von 50% (n=28) gezeigt. Aus den Ergebnissen der Bisulfit-Sequenzierung (Kapitel 3.4.1.3.) wird deutlich, dass die für das spezifische Methylierungssignal verantwortliche Komponente des Menstrualblutes aus dem Endometrium stammt. Die Ausscheidung des abgebauten Endometriumgewebes nimmt im Verlauf der Regelblutung ab und ist individuellen Schwankungen unterlegen (Fraser et al. 1985). Dies äußert sich in den Validierungsergebnissen von Mens1 durch die weitreichende Streuung der Methylierungssignale und den gelegentlichen Signalausfall. Insofern spielt der Blutungstag in dem forensischen Kontext eine wichtige Rolle. Eine Menstrualblut-Spur von dem 5. Blutungstag als Menstrualblut zu identifizieren wird nicht in allen Fällen mit Mens1 möglich sein. In solchen Grenzfällen wird der routinemäßig im hier beschriebenen Verfahren eingesetzte Vaginalmarker je nach Art des Falles eine Entscheidung ermöglichen. Im oben beschriebenen EDNAP-Ringversuch – Studie 4 (Haas et al. 2014) - gelingt mit MMP-Triplex bei der Probe vom 3. Blutungstag 75% der Labors ein Nachweis, am 4. Blutungstag 41%. Mit dem MB-Triplex sind es 45% bzw. 36%. Menstrualblutproben vom 5. Blutungstag wurden in diese Untersuchung gar nicht einbezogen.

Ein weiterer Grund für den Ausfall des Methylierungssignals in meiner Arbeit ist die Benutzung von Tampons für die erweiterte Validierung des Markers. In einen Tampon wird signifikant mehr Vaginalsekret mit aufgenommen als in eine Binde. Der Tampon wird intravaginal eingeführt und befindet sich somit direkt an den Drüsenausgängen (Fraser et al. 1985). Dieser Zusammenhang bestätigt sich in den Ergebnissen der beiden Validierungsstudien. Für die erste Runde wurden 20 Proben auf Binden gesammelt - es gab keine Signalausfälle. Dagegen wurden die Proben für die erweiterte Validierung auf Tampons gesammelt. Alle 15 Signalausfälle wurden hier beobachtet.

Die Werte der beiden Speichelmarker haben annähernd eine Normalverteilung. Das Differenzierungspotenzial bleibt auch in dieser großen Wertegruppe erhalten. Der Vaginalmarker Vag1 hat einen verhältnismäßig hohen Anteil an Werten mit hohem Methylierungsgrad, so dass die gesamte Wertegruppe nicht normal verteilt erscheint. Annähernd normal verteilt sind dagegen die Werte aus Vag2. Der Marker Sperm1 erscheint nicht normal verteilt oder enthält möglicherweise mehrere Grundgesamtheiten. Sperm2 stellt eine schiefe Normalverteilung dar. Die

Methylierungswerte des Hautmarkers zeigen klar erkennbar drei verschiedene Grundgesamtheiten, die sich wahrscheinlich mit den aus den NGS-Experimenten ergebenden Befunden erklären lassen (siehe Kap. 4.7.2).

Für forensische Aspekte wäre eine signifikante Alters-und/oder Geschlechtsabhängigkeit bedeutsam. Allein bei den beiden Speichelmarkern ist eine geringfügige Abhängigkeit von Alter und Geschlecht zu erkennen. Die Korrelation ist aber für forensische Erwägungen beispielsweise zum Tathergang nicht stark genug.

4.4 Einfluss von Tumoren auf die Aussagesicherheit des Systems

Da Tumoren Einfluss auf das Methylierungsmuster haben, wurde in einer Reihe von Patienten geprüft, ob die Existenz eines Tumors zu einem falsch-positiven oder einem falsch-negativen Ergebnis bei der hier konzipierten forensischen Körperflüssigkeits- oder Gewebeidentifizierung führen kann. Anhand der Ergebnisse und mit Hilfe der Tumorprävalenzen (siehe Tabelle 15) sollte abschließend eine Einschätzung der quantitativen Bedeutung dieses potentiellen Störfaktors vorgenommen werden.

In der Arbeit sind 12 verschiedene, relativ häufige Krebsformen untersucht worden, die von ihrem Auftrittsorgan her im Zusammenhang mit einer zur Debatte stehenden Körperflüssigkeit relevant erschienen. Es handelte sich um:

Speiseröhrencarcinom – Speichel; Ovarialcarcinom, Endometriumcarcinom, Cervixcarcinom, Endometriose – Vaginalflüssigkeit; Hodencarcinom – Sperma/Samenflüssigkeit; CLL, B-Zell-Lymphom, CML, MPS, Brustkrebs und zwei Formen von Darmkrebs (– peripheres Blut. Bei Menstrualblut stand uns nur eine Probe zur Verfügung von einer Patientin mit Cervixcarcinom.

In jeder Flüssigkeit wurden alle Marker untersucht. Für einige Tumoren wurde in der jeweiligen Körperflüssigkeit/Gewebe eine Abweichung beim spezifischen Methylierungsmarker vom erwarteten Normwert gefunden:

Eine der 7 getesteten CLL-Proben zeigte in dem Blut2-Marker eine Erniedrigung des spezifischen Signals um 19 bis 22%. Das Methylierungssignal derselben Probe war auch in den übrigen Markern auffällig. Die Probe stammt von einer 67-jährigen Patientin.

Die beiden Cervixcarcinom-Proben haben in dem Vaginalmarker Vag1 ein um 13 bis 17% herabgesetztes Signal gezeigt. Eine der beiden Proben hat auch in dem zweiten Marker Vag2 ein 12% erniedrigtes Methylierungssignal gezeigt. Die Abstrich-Probe, die in beiden Markern abweichende Signale lieferte, enthielt einen äußerlich sichtbaren Blutanteil, da die Patientin eine Operation hinter sich hatte. Insofern wurde hier der Anteil der DNA aus der Vaginalflüssigkeit durch die DNA aus dem peripheren Blut verdünnt.

Die übrigen getesteten Tumoren wiesen keine Abweichung beim spezifischen Methylierungsmarker auf. Es stellt sich dabei jedoch die Frage, auf welcher Ebene eine Verformung des Methylierungsmusters geschehen kann:

- Es ist nachgewiesen worden, dass im Tumorgewebe selbst das Methylierungsmuster an vielen Stellen verändert ist.
- Entartete Zellen können in die betrachtete Körperflüssigkeit gelangen – je mehr sie mit dem Tumor in Berührung kommt.
- Die hier entwickelten Marker können bei manchen Tumoren von Zellen stammen, die selbst von der Entartung betroffen sind.
- Freie DNA des Tumorgewebes kann in Körperflüssigkeiten gelangen (Goessl et al. 2000).

Bei den Blutmarkern wäre eine Beeinflussung des Methylierungsgrads im Blut durch Bluttumoren bzw. dabei betroffenen Zellen nicht überraschend gewesen, weil der Marker-Locus mit seinem charakteristischen, die Körperflüssigkeit identifizierenden Methylierungsgrad möglicherweise in einem betroffenen Zelltyp liegt. Beim Hodentumor wäre in der Samenflüssigkeit die Präsenz freier DNA aus Tumorgewebe denkbar, in welchem der Methylierungsgrad des Markerlocus stark verändert ist. Auch bei Speiseröhrencarcinom hätte freie DNA mit stark verändertem Methylierungsmuster am Marker-Genort stören können.

Bei fast allen Patienten mit CLL, CML, MPS, B-Zelllymphom zeigte der Vaginal-Marker im Blut Abweichungen von der Norm. Das bedeutet, eine Tatort-Blutspur, von der man keinerlei Vorinformation hätte, würde von einem Blutmarker als Blut identifiziert werden, der zweite Blutmarker würde beispielsweise die Information liefern, dass es sich um reines peripheres Blut handelt. Der Vaginalmarker würde aber Vaginalflüssigkeit anzeigen. - An sich kein falsch positives Ergebnis, aber ein Konflikt.

Die Loci Vag1 und Vag2 befinden sich innerhalb des Genclusters HOXD. Vag1 liegt innerhalb eines Exons des HOXD4-Gens und Vag2 im 5'UTR-Bereich des HOXD12-Gens. Die HOX-Gene haben 39 Mitglieder in 4 Genclustern. Sie codieren für verschiedene Transkriptionsfaktoren, die unter anderem die zelluläre Differenzierung reifer Leukozyten während der Hämatopoese steuern. Es ist bekannt, dass einige HOX-Gene bei der Entwicklung verschiedener Tumorarten, unter anderem diversen Leukämie-Formen, beteiligt sind. Sie weisen - in Abhängigkeit vom Gewebe - sowohl eine Tumorsupressor- als auch eine Onkogen-Aktivität auf. Bei der Initiierung und Progression des Tumors spielen epigenetische Veränderungen eine entscheidende Rolle (Kanduri et al. 2013).

Der größte Einfluss liegt bei Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie in dem Vag2-Marker vor. Alle sieben getesteten Proben weisen hier ein Methylierungssignal im peripheren Blut auf.

Aus dieser Studie ergibt sich kein Hinweis auf Tumor-bedingte falsch-positive oder falsch-negative Analysenergebnisse. Trotzdem gebietet die allgemein hohe prozessuale Bedeutung einer Körperflüssigkeitsanalyse eine konservative Einschätzung der Fehlerhäufigkeit. In der für forensische Betrachtungen relevanten Altersklasse für Frauen und Männer (20 bis 64 Jahre) muss man für das Jahr 2014 eine Prävalenz aller Krebserkrankungen von ca. 370.000 Betroffenen annehmen (Krebsregister Robert-Koch-Institut, Stand 2013). Damit wäre statistisch jeder 170ste Spurenleger ein Tumorpatient. Bei den 10 von uns geprüften Krebsarten sehen wir keine Hinweise auf falsch-positive oder falsch-negative Aussagen, wohl aber vor allem bei den verschiedenen Leukämieformen einander eventuell widersprechende Aussagen bei der Messung verschiedener Körperflüssigkeiten. Solche Konflikte sind aber erkennbar. Auch wenn man letztere mit in die Fehlerbetrachtung einbezieht, käme man auf eine Aussagesicherheit von ca. 99,5%.

4.5 Einfluss von Sequenzvarianten und nicht konvertierten Cytosinen auf die Aussagesicherheit des Systems

Die Marker Blut1 und Blut2 zeigen keinerlei Sequenzvarianten mit Auswirkung auf die Methylierung der jeweiligen CpG-Cluster.

Bei Marker Mens1 wurde eine Deletion (T-91) gefunden, die wohl den Methylierungsgrad beträchtlich herabsetzt, aber nicht wirklich die Analysenqualität mindert (Frequenz 2,6% der Reads).

Bei Marker Spei1 ist keine Beeinflussung des analytischen CpGs zu erkennen.

Bei Marker Spei2 ist eine Sequenzvariante in 14,7% der Reads nachgewiesen worden (SNP G>A 167), die zu einer erniedrigten Methylierung des analytischen CpG führt. Auch hier wird nicht die Nachweiskraft des Markers wirklich eingeschränkt.

Beim Marker Vag1 führt ein Haplotyp aus zwei nicht konvertierten Cs (182, 152) zu einer kompletten Demethylierung des analytischen CpG und zweier weiteren benachbarten CpGs. Bemerkenswert ist, dass demgegenüber die meisten übrigen CpGs höher methyliert sind als in der Normalsequenz. Die Frequenz dieses Haplotyps liegt bei ca. 1%. Die Konvertierungsrate der DNA liegt bei dem für die Arbeit verwendeten Kit (EpiTect Plus DNA Bisulfite Kit, Qiagen) bei über 99% (Madi et al. 2012). Insofern ist eine unvollständige Bisulfitkonvertierung als Grund für dieses Phänomen nicht auszuschließen. Man müsste sich jedoch fragen, weswegen die Konvertierung nur an diesen beiden Stellen unvollständig ist und dies einen solch starken Effekt auf die Methylierung in der benachbarten Sequenz ausübt.

Ein ähnliches Phänomen beobachtet man beim Marker Vag2: Ein aus zwei Sequenzvarianten und einem nicht konvertierten C bestehender Haplotyp (109, 143, 151) führt zu einer fast kompletten Demethylierung des gesamten CpG-Clusters. Die Frequenz dieses Haplotyps liegt ebenfalls bei ca. 1%.

Beim Hautmarker Haut1 wurden 2 Sequenzvarianten und 2 nicht konvertierte Cytosine nachgewiesen, die alle extremen Einfluss auf die Methylierung des gesamten CpG-Clusters haben - einschließlich des analytischen CpGs (Ins-T25²⁶, MNV-TT29³⁰, nicht konvertiertes C-41 und C-42). Insertion (T25²⁶) und Dinukleotidvariation (TT29³⁰) führen zur fast kompletten Demethylierung, C41 erhöht die Methylierung am gesamten CpG-Cluster stark, während C42 zu leichter Erniedrigung führt. Die Validierungsstudie mit 111 Hautschuppen-Proben (Unterarm- und Kopfhautschuppen) spiegelt eigentlich diese Verhältnisse wieder. Während die Hautbiopsien erwartungsgemäß mit beiden Primern stabile Methylierungs-Signale lieferten, beobachtet man vier klar voneinander unterscheidende Datengruppen bei den Schuppen:

- kein PCR-Produkt
- PCR-Produkt, aber 0-2% Methylierungssignal
- PCR-Produkt und 24-87% Methylierungssignal
- PCR-Produkt und 100% Methylierungssignal

Die anfängliche Vermutung, dass es sich bei den verschiedenen Wertegruppen (2-4) um Methylierungssignale unterschiedlicher Zelltypen handele, wurde nach Auswertung der NGS-Ergebnisse verworfen: Hier zeigt sich ein klares Beispiel für ASM – Allel-spezifische Methylierung (Shoemaker et al. 2010). Bei klassisch genetischer Betrachtungsweise und unter der Annahme, dass die Sequenzvarianten ausschließlich in cis-Orientierung wirken (Bell et al. 2011), ist allerdings der Prozentsatz mit 0%-Methylierungssignalen erstaunlich hoch.

Die beschriebene NGS-Studie zeigt, dass die in der Literatur für Gehirngewebe (Zhang et al. 2010) beschriebenen genetischen Einwirkungen in Gestalt von Sequenzvarianten auch in den in dieser Arbeit diskutierten differentiell methylierten Genorten existieren. In den meisten Fällen haben sie den Charakter von mQTLs (Deng et al. 2009), weil eine Sequenzvariante nur graduell den Methylierungsgrad an einem oder mehreren CpGs verändert. Demgegenüber handelt es sich bei dem Haut-Marker1 offensichtlich um ASM.

Überraschend ist der Effekt, den manche nicht-konvertierte Cytosine auf die benachbarte Methylierung ausüben.

Man weiß inzwischen, dass neben der Methylgruppe noch mindestens drei weitere Modifikationsarten an den Cytosin-Basen in der DNA existieren. Das 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) entsteht aus dem 5-mC nach einer Konversion, die von den so genannten ten-eleven translocation (TET) Hydroxylasen katalysiert wird. Weitere Oxidationsschritte des 5-hmC führen zur Entstehung von Oxidations-Derivaten 5-Formylcytosin (5-fC) und 5-Carboxylcytosin (5-caC) (Dawson & Kouzarides 2012). Das 5-Hydroxymethylcytosin ist nach 5-mC die am besten bekannte DNA-Modifikation. Es kommt vor allem in den Purkinje-Zellen des Gehirns und den embryonalen Stammzellen vor. Hier beträgt sein Anteil bis zu 20% aller Cytosine innerhalb von CG-

Dinuklotiden. In anderen Geweben wird das 5-hmC in geringerem Maße auch gefunden.. Die Schlüsselfunktion von 5-hmC liegt in der Regulation der Transkription auf mehreren Ebenen. Unter anderem ist es aktiv und passiv an dem Prozess der DNA-Demethylierung beteiligt. Zusätzlich scheinen alle Oxidations-Derivate des 5-Methylcytosins einige noch unerforschte epigenetische Signalfunktionen aufzuweisen. Die Arbeitsgruppe von Huang et al (2010) stellt fest, dass sich das methylierte und das hydroxymethylierte Cytosin nach der Bisulfit-Behandlung nicht voneinander unterscheiden lassen. Außerdem scheinen mehrere aufeinander folgende 5-hmC's die Aktivität der Taq-Polymerase beeinträchtigen und somit die Amplifikation der 5-hmC-Regionen in der bisulfitierten DNA zu stören.

In der Säugetier-DNA kommt sowohl das konventionelle 5-mC als auch das 5-hmC am häufigsten in dem Kontext der CG-Dinukleotide vor - jedoch nicht ausschließlich (Huang et al. 2010). Das methylierte Cytosin kann sich auch an den sogenannten CpH-Stellen befinden, wobei das H für A, T oder C steht. In den embryonalen Stammzellen (ES) befinden sich etwa 25% methylierte Cytosine außerhalb von den CpGs (Lister et al. 2009). Auch in induzierten pluripotenten Stammzellen, Oozyten und Gehirnzellen ist das Methylcytosin im nicht-CpG-Kontext in nennenswerten Mengen vorhanden. In geringeren Mengen wurde die nicht-CpG-Methylierung auch in somatischen Geweben, wie Skelettmuskulatur und Placenta, nachgewiesen. Der Sequenz-Kontext, in dem sich das nicht-CpG-Methylcytosin befindet, scheint variabel zu sein. In ES tritt es am häufigsten in CAG-Trinukleotiden auf. In menschlichen Gehirnzellen ist es eine CAC-Sequenz (Varley et al. 2013). Ichiyangi et al (2012) haben in der DNA männlicher Keimzellen insgesamt 23% der methylierten Cytosine außerhalb von CpG-Stellen beobachtet. Die häufigste nicht-CpG-Dinukleotid-Sequenz war CpA (9,8% aller methylierten Dinukleotide), die am seltensten gefundene - CpC.

Die nicht konvertierten Cytosine, die in dieser Arbeit einen Einfluss auf die benachbarte Methylierung gezeigt haben, befinden sich vor unterschiedlichen Basen. Auffällig ist jedoch die Base, die vor dem nicht konvertierten Cytosin steht. Von insgesamt 6 Einfluss nehmenden Cytosinen in den Markern Vag1, Vag2 und Haut1, befinden sich 4 nach einem Guanin und 2 nach einem Cytosin. Die übrigen in dieser Arbeit gefundenen, nicht konvertierten Cytosine, die keine Auswirkung auf die Methylierung erkennen ließen, befinden sich ebenfalls alle nach einem G oder C.

Damit lassen die NGS-Experimente dieser Arbeit zwei Arten von Einwirkungen auf den Methylierungsgrad eines CpGs erkennen: Zum einen Sequenzvarianten, die sich in ihrem intra – und interindividuellen Vorkommen genetisch verhalten – sie tauchen in einer bestimmten Frequenz in einer Population auf und sie sind im betroffenen Organismus in allen Zellen heterozygot oder homozygot enthalten, und zum anderen die nicht-konvertierten, Methylierungs-relevanten

Cytosine, die durchaus in jedem Individuum und dort zellspezifisch vorhanden sein könnten, weil es sich um ein epigenetisches Phänomen handelt.

4.6 Artefakte bei NGS nach Bisulfitierung

Es ist bekannt, dass die NGS-Analyse der bisulfitkonvertierten DNA mit einigen Schwierigkeiten verbunden ist: Die in der Bisulfitierung robust chemisch behandelte DNA führt zu zahlreichen abgebrochenen Reads und letztlich schlechter Lesequalität (Lewin et al. 2004). In dem hier präsentierten NGS-Experiment waren demgegenüber 90 bis 95% der auf dem MiSeq ausgeführten 250bp-paired-end Reads vollständig und konnten zusammengeführt werden. Die für die Auswertung benutzte Genomics Workbench Software wertet überdies nur Sequenzvarianten aus Reads, die eine vorgegebene Mindestqualität erfüllen sowie eine Mindestcoverage von 1000 Reads aufweisen.

Bei der NGS-Untersuchung von Sequenzvarianten und deren Einfluss auf die Methylierung, wurden in mehreren Markern Deletionen und Insertionen beobachtet. Meistens hatten diese Sequenzvariationen keine Auswirkung und befanden sich am Anfang oder am Ende einer homologen Basen-Sequenz. Sie wurden als Sequenzierartefakte angesehen. Die Insertion eines Thymins T25[^]26 zwischen zwei benachbarten CpGs in dem Marker Haut1 übt allerdings einen eindeutig demethylierenden Effekt auf alle CpG's in dem Haut1-Amplikon aus. In dem Marker Mens1 zeigt die Deletion eines Thymins (T-91) eine schwache, aber signifikante demethylierende Auswirkung auf die CpGs. Sie ist die erste Base am Anfang einer Sequenz aus 7 T's.

4.7 Methodenvergleich (SNUPE-Analyse, Bisulfitsequenzierung, NGS

Roche 454, Illumina MiSeq)

Die Bisulfitsequenzierung ist selbst unter Zuhilfenahme aufwändiger Software nicht als quantitative Methode anzusehen (Lewin et al. 2004). Auch der hier verwendete SNUPE-Test ist sicher keine quantitative Bestimmungsmethode. Sie ist aber für die zur Debatte stehende Anwendung das ungleich zuverlässigere Verfahren. Es stellt sich trotzdem die Frage, wo in den Grenzbereichen ihrer forensischen Anwendung die methodischen Unsicherheiten liegen. Deswegen wurde der Vergleich von SNUPE und Bisulfit-Sequenzierung mit den beiden Methoden der NGS Roche-454 bzw. MiSeq (Illumina) angestellt. Dem Experiment lag die Annahme zugrunde, dass die NGS-Werte der biologischen Wirklichkeit am nächsten liegen.

Bei Marker Blut2 lag der NGS-Wert etwa 18 bis 20% höher als der per SNUPE quantifizierte Methylierungswert.

Der Wert von Spei1 betrug in der SNUPE-Untersuchung 23% Methylierung. Demgegenüber zeigte die NGS-Untersuchung (Illumina) in 36% der Reads Methylierung an beiden analytischen CpG-

Stellen. In der Bisulfit-Sequenzierung war das erste analytische Cg82 46% methyliert und das zweite Cg88 83% methyliert.

Beim Marker Mens1 betrug der Methylierungs-Wert in der SNUPE-Messung 72% und bei der Bisulfit-Sequenzierung 66 bis 71%. Dagegen ergab die NGS-Untersuchung mit Illumina MiSeq 29% Methylierung.

Zwei Ursachen sind für diese Abweichungen denkbar:

- Bei der SNUPE-Methode wird der Methylierungsgrad als $5mC/5mC+C$ in Prozent ausgedrückt. Idealerweise ist die Bisulfit-Konvertierung vollständig abgelaufen und die 4 Fluoreszenzfarbstoffe im SNaPshot-Kit (AB) - dR6G (A, grün), dTAMRA™ (C, schwarz), dR110 (G, blau) und dROX™ (T, rot) – werden mit der gleichen spezifischen Intensität detektiert. Es existieren aber Unterschiede in der spezifischen Intensität. Wahrscheinlich würde jedoch ein solcher Effekt bei allen Markern zu beobachten sein, was nicht der Fall ist.
- Ein anderes Problem kann bei den Markern auftreten, die die Methylierung simultan mit Hilfe eines methylierungsspezifischen und eines nicht-methylierungsspezifischen SNUPE-Primer messen (siehe Kapitel 2.2.5.4). Das trifft zu bei den Markern Mens1 und Spei1. Weist einer der beiden Primer eine weniger affine Bindung an seine Zielsequenz auf, wird sein Signal bei der kapillarelektrophoretischen Auftrennung schwächer detektiert. Ein verschobenes Verhältnis von methylierten zu nicht-methylierten PCR-Templates ist die Folge.

Da der Methodenvergleich bei den Markern Mens1 und Spei2 signifikante Differenzen zeigte, wurden nach Abschluss der NGS-Experimente andere SNUPE-Primer entworfen. Der zu hohe Wert in der SNUPE-Messung bei Mens1 kam durch die geringere Affinität des nicht-methylierungsspezifischen Primers zustande. Bei dem Spei1-Marker bewirkte die schlechtere Bindung des methylierungsspezifischen Primers den niedrigeren Wert in der SNUPE-Messung, verglichen mit den Ergebnissen von NGS. Die Signale der neuen Primer zeigten in ihren Zielflüssigkeiten ein verschobenes Verhältnis der methylierten und nicht methylierten Kopien und ergaben die korrekten Methylierungswerte. In den übrigen Körperflüssigkeiten, die in dem jeweiligen Markerlocus nicht methyliert sind, hat sich dadurch nichts verändert. Unverändert bleibt auch die Nachweiseigenschaft der beiden Marker - ein vorhandenes Methylierungssignal weist die Anwesenheit der Zielflüssigkeit in der Probe nach, unabhängig von dem prozentualen Methylierungswert.

Alle übrigen Marker ergaben eine hohe Übereinstimmung zwischen SNUPE-Messung und den NGS-Werten.

4.8 Perspektiven und Ausblick

Aus zwei Arbeitsbereichen konnte man im Jahre 2009 eine Lösung für das Problem der Körperflüssigkeitsanalyse aus forensischem Material erwarten: Zum einen der differenziellen

Methylierung und zum anderen der verfeinerten RNA-Analyse. Es existierte das Kongress-Poster einer koreanischen Gruppe, in dem auf die eventuellen Möglichkeiten der differenziellen Methylierung in der forensischen Körperflüssigkeitsanalyse hingewiesen wurde. Es gab zahlreiche Arbeiten, die über den letztlich vergeblichen Versuch berichteten, per mRNA-Analyse die Körperflüssigkeitsanalyse vorzunehmen (Juusola & Ballantyne 2005, Setzer et al. 2008, Flemming et al. 2010, Roeder & Haas 2013). Die Strategie beim Abfassen dieser Dissertation war: Es sollte ein komplettes, für die Identifizierung und den Nachweis in Mischungen funktionierendes analytisches Instrument geschaffen werden, das für alle relevanten Körperflüssigkeiten tauglich ist. Es sollte unter forensischen Aspekten validiert sein. Es sollte durch das Vermessen einer hohen Probenzahl statistisch für die Fallarbeit abzusichern sein. Es sollte eine aus statistischer Sicht vernünftige Basis für die Annahme geschaffen werden, dass häufige Tumoren keinen Störfaktor darstellen. Es sollte geprüft werden, ob Sequenzvarianten in unmittelbarer Nachbarschaft der analytischen CpGs deren Methylierungsgrad beeinflussen. Jedes dieser Ziele ist erreicht worden. Damit steht zum ersten Male ein Verfahren zur Verfügung, mit dem man eine alle relevanten biologischen Körperflüssigkeiten umfassende Analyse in der forensischen Fallarbeit einsetzen kann. Alle bisher zu diesem Thema publizierten Verfahren stellen in diesem Sinne fragmentarische Ansätze dar, welche den Einsatz in der Fallarbeit höchstens ausnahmsweise gestatten.

Trotzdem wird man sich bemühen insbesondere die eventuellen Einflüsse von Tumoren und von DNA-Varianten besser quantitativ zu erfassen. Das Spektrum der überprüften Tumoren wird erweitert werden und die Zahl der Proben/Tumorart wird erhöht werden. Die Prinzipien der SNP-Einwirkungen werden aus dem in Kapitel gezeigten NGS-Experiment deutlich: Wenn Effekte zu beobachten waren, lagen sie im Bereich 1 bis 22,4% der Read-Zahl des entsprechenden Markers. In den meisten Fällen bewirkt eine benachbarte DNA-Variante Erhöhung oder Erniedrigung der Methylierung eines einzelnen CpGs. Eine Ausnahme bildete der Hautmarker: Hier war wie vorher beschrieben eine klare Allel-spezifische Methylierung zu beobachten, die den gesamten Bereich der analytischen CpG-Insel betrifft. Bei den Markern Vag1 und Vag2 haben seltene Haplotypen eine Änderung der Methylierung bewirkt. Die im Text als nicht-konvertierte Cytosine bezeichneten Varianten haben in mehreren Positionen die Methylierung beeinflusst. Es ist bei breiterer Anwendung des Verfahrens nicht auszuschließen, dass ein seltener Polymorphismus das analytische CpG selbst betrifft oder dass ein entfernt liegender SNP die Methylierung verändert. Die sicherste Maßnahme, um ein solches Ereignis zu erkennen, wäre die Analyse per NGS. Darüber hinaus würde man mit der Sequenzierung selbst die dem analytischen CpG benachbarten CpGs für die Identifizierung der Körperflüssigkeiten heran ziehen können.

5 Zusammenfassung

Biologische Tatortspuren sollen helfen Täter zu identifizieren und einen Tathergang zu rekonstruieren. Letzteres erreicht man sehr häufig durch eine eindeutige Beschreibung des Gewebes oder der Flüssigkeit, aus der die Spur besteht. Das biologische Material an einem Tatort ist fast immer massiven chemischen, physikalischen oder mikrobiologischen Einflüssen ausgesetzt, die zu seiner vollständigen oder partiellen Zersetzung führen. Am besten charakterisieren Proteine Zellen, Gewebe oder Körperflüssigkeiten. Proteine verlieren aber sehr schnell ihre spezifischen Eigenschaften durch diese exogenen Einflüsse. RNA kann ebenso für die Identifizierung von Körperflüssigkeiten eingesetzt werden, wird aber noch schneller zersetzt. Chemisch-physikalische Messungen können zum mindesten für einen Vortest eingesetzt werden. Gegenwärtig ist keine Methode verfügbar, welche die für die Kriminalistik relevanten Körperflüssigkeiten aus forensischem biologischem Spurenmaterial eindeutig identifizieren könnte. Bei den Körperflüssigkeiten handelt es sich in erster Linie um peripheres Blut, Menstrualblut, Vaginalflüssigkeit, Sperma, Speichel und Haut. In dieser Arbeit wird für den Nachweis von Körperflüssigkeiten und Haut mit der wesentlich stabileren DNA als Analysensubstrat gearbeitet. Die DNA ist zum Teil zellspezifisch methyliert.

Im Verlauf von zwei Genom-weiten Studien (Illumina 27K, 470K) sind zahlreiche differenziell methylierte Genorte identifiziert worden, die als Kandidaten für die Identifizierung der genannten Körperflüssigkeiten infrage kamen. Nach Voruntersuchungen auf der Basis von Bisulfidsequenzierung und SNaPshot-Methode wurden die 10 Methylierungsgenorte mit dem höchsten Differenzierungspotential für die Körperflüssigkeitsanalyse weiter bearbeitet. Als die Methode mit dem höchsten Potential für die praktische forensische Spurenanalyse erwies sich die SNUPE-Analyse. Auf dieser technischen Basis wurden, angepasst an die Sequenzstrukturen der jeweiligen Methylierungsgenorte, verschiedene Verfahren entworfen und etabliert. Dabei handelt es sich um die übliche Primer-Extension Reaktion mit einem Primer, Hybridisierungsverfahren, die gleichzeitig zwei analytische CpGs nachweisen und Kombinationen von mehreren Primer-Extension Reaktionen. Für peripheres Blut, Speichel, Sperma und Vaginalflüssigkeit wurden so jeweils zwei Marker entwickelt, für Menstrualblut und Haut jeweils einer. Die Markerpaare sind z.T. so konzipiert, dass der eine Marker spezifisch auch in Mischungen seine Zielflüssigkeit nachweist und der zweite deren Mischung mit verschiedenen Körperflüssigkeiten anzeigt.

Das hauptsächliche Problem bei der Nutzung von Methylierungsmarkern zur Analyse einer bestimmten biologischen Größe ist der Umstand, dass zahlreiche – auch noch unbekannte – Faktoren den Grad der Methylierung eines CpGs beeinflussen können. Vor allem, um das Ausmaß solch unbekannter Faktoren einschätzen zu können, wurde für jede Körperflüssigkeit bzw. jede spezifische Markergruppe jeweils eine Validierungsstudie mit 80 bis 100 Proben durchgeführt. Trennschärfe, Sensitivität, Analysierbarkeit aus Mischungen und die Robustheit des Verfahrens gegenüber typisch forensischen

Einflüssen wurden in kleineren Studien untersucht. Das SNUPE-Verfahren wurde zusammen mit der Bisulfitsequenzierung in Bezug auf seine quantitative Verlässlichkeit mit zwei NGS-Methoden verglichen (Roche 454, Illumina MiSeq). Während die Bisulfitsequenzierung vor allem bei niedrigen Methylierungsgraden unbefriedigend ist, erwies sich SNUPE als zuverlässig und mit NGS vergleichbar.

Seit langem ist der Effekt von Tumoren auf das Methylierungsmuster bekannt. Von hoher prinzipieller Bedeutung war daher die Frage, ob die Markerqualität durch Tumoren beeinträchtigt werden kann. In der Arbeit wurden 10 relativ häufige Tumoren auf diesen Aspekt hin überprüft. Für jeden Marker bzw. seine Zielflüssigkeit wurde ein Tumor, von dem aus eine unmittelbare Einwirkung auf den entsprechenden Methylierungsort denkbar erschien, untersucht – z.B. peripheres Blut und Leukämie. Gleichzeitig wurden jeweils auch die übrigen Marker untersucht. Nicht direkt auf den Marker-Locus der Zielflüssigkeit, wohl aber auf einige der anderen Marker-Loci hatte die Tumorsituation Einfluss. Es wurde eine konservative Abschätzung der durch beliebige Tumorsituationen erzeugten Aussageunsicherheit vorgenommen.

Im Prinzip bekannt, aber im Einzelnen schwer einzuschätzen ist der Einfluss von Sequenzvarianten auf den Methylierungsgrad eines einzelnen CpGs oder einer Gruppe davon. In dieser Arbeit konnte nicht für jede einzelne Probe die Frage nach einer solchen Beeinflussung beantwortet werden, aber es wurde ein Konzept entworfen, welches die grundsätzliche Bedeutung eines solchen Phänomens für das hier zur Debatte stehende Projekt klären sollte. 50 Proben von jeder hier untersuchten Körperflüssigkeit wurden gepoolt und per NGS (Illumina Miseq) sequenziert. Es sollte dabei überprüft werden, ob Sequenzvarianten den SNUPE-Test unmittelbar am analytischen CpG beeinflussen, das Hybridisierungsverhalten des SNUPE-Primers stören oder ob solche Sequenzvarianten auf unbekannte Art und Weise den Methylierungsgrad beeinflussen können. Für solche Effekte wurden eindeutige Beispiele gefunden. Einige, nicht in der Bisulfitreaktion umgesetzte Cytosine zeigten erheblichen Einfluss auf den Methylierungsgrad, so dass man spekulieren konnte, dass es sich um Cytosine handelte, die eine Hydroxymethyl – Gruppe enthalten. Diese Cytosine sind in diesem Fall nicht Teil eines CpGs. Solche Derivate scheinen einen Einfluss auf benachbarte Methylierung zu haben. In dieser Arbeit werden damit genetische und wahrscheinlich epigenetische Faktoren, die den Methylierungsgrad beeinflussen, identifiziert. Es werden mQTLs und ASM beobachtet. Im Falle des Hautmarkers ist durch ASM die Beeinträchtigung der Analysensicherheit denkbar. Insgesamt kann das entwickelte Verfahren als validiert angesehen werden. Es ist in der vorliegenden Form am 7.06.2013 zum Patent angemeldet worden. Perspektivisch wird eine Weiterentwicklung insofern diskutiert als man in Zukunft nicht ein einzelnes CpG als Analyten anvisiert sondern stattdessen die ganze, das analytische CpG umgebende CpG-Insel per NGS untersucht.

6 Quellenverzeichnis

Verzeichnis sämtlicher Publikationen

Akutsu, T., Watanabe, K., Motani, H., Iwase, H., Sakurada, K. Evaluation of latex agglutination tests for fibrin-fibrinogen degradation products in the forensic identification of menstrual blood. *Leg Med (Tokyo)* **14**(1), 51-54 (2012)

Allen, S.M. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of seminal fluid using a monoclonal antibody to prostatic acid phosphatase. *J Immunoassay* **16**(3), 297-308 (1995)

Allery, J.P., Telmon, N., Blanc, A., Mieusset, R., Rougé, D. Rapid detection of sperm: comparison of two methods. *J Clin Forensic Med* **10**(1), 5-7 (2003)

An, J.H., Choi, A., Shin, K.J., Yang, W.I., Lee, H.Y. DNA methylation-specific multiplex assays for body fluid identification. *Int J Legal Med* **127**(1), 35-43 (2013)

An, J.H., Shin, K.J., Yang, W.I., Lee, H.Y. Body fluid identification in forensics. *BMB Rep* **45**(10), 545-53 (2012)

Baker, D.J., Grimes, E.A., Hopwood, A.J. D-dimer assays for the identification of menstrual blood. *Forensic Sci Int* **212**(1-3), 210-214 (2011)

Baron, U., Türbachova, I., Hellwag, A., Eckhardt, F., Berlin, K., Hoffmuller, U., Gardina, P., Olek, S. DNA methylation analysis as a tool for cell typing. *Epigenetics* **1**(1), 55-60 (2006)

Bediaga, N.G., Acha-Sagredo, A., Guerra, I., Viguri, A., Albaina, C., Ruiz Diaz, I., Rezola, R., Alberdi, M.J., Dopazo, J., Montaner, D., Renobales, M., Fernández, A.F., Field, J.K., Fraga, M.F., Liloglou, T., de Pancorbo, M.M. DNA methylation epigenotypes in breast cancer molecular subtypes. *Breast Cancer Res* **12**(5), R77 (2010)

Behrendorff, N., Dolai, S., Hong, W., Gaisano, H.Y., Thorn, P. Vesicle-associated membrane protein 8 (VAMP8) is a SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) selectively required for sequential granule-to-granule fusion. *J Biol Chem* **286**(34), 29627-29634 (2011)

Bell, J.T., Pai, A.A., Pickrell, J.K., Gaffney, D.J., Pique-Regi, R., Degner, J.F., Gilad, Y., Pritchard, J.K. DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. *Genome Biol* **12**(1), 10.1186/gb-2011-12-1-r10 Epub (2011)

Benschop, C.C., Quaak, F.C., Boon, M.E., Sijen, T., Kuiper, I. Vaginal microbial flora analysis by next generation sequencing and microarrays; can microbes indicate vaginal origin in a forensic context? *Int J Legal Med* **126**(2), 303-310 (2012)

Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**(1), 6-21 (2002)

Bock, C., Walter, J., Paulsen, M., Lengauer, T. Inter-individual variation of DNA methylation and its implications for large-scale epigenome mapping. *Nucleic Acids Res* **36**(10), e55 (2008)

Christensen, B.C., Houseman, E.A., Marsit, C.J., Zheng, S., Wrensch, M.R., Wiemels, J.L., Nelson, H.H., Karagas, M.R., Padbury, J.F., Bueno, R., Sugarbaker, D.J., Yeh, R., Wiencke, J.K., Kelsey,

- K.T. Aging and Environmental Exposures Alter Tissue-Specific DNA Methylation Dependent upon CpG Island Context. *PLoS Genet* **5**(8), e1000602 (2009)
- Chang, Y-F.,** Imam, J.S. & Wilkinson, M.F. The Nonsense-Mediated Decay RNA Surveillance Pathway. *Annu Rev Biochem* **76**, 51-74 (2007)
- Dasharathy, S.S.,** Mumford, S.L., Pollack, A.Z., Perkins, N.J., Mattison, D.R., Wactawski-Wende, J., Schisterman, E.F. Menstrual bleeding patterns among regularly menstruating women. *Am J Epidemiol* **175**(6), 536-545 (2012)
- Dawson, M.A.** & Kouzarides, T. Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell* **150**(1), 12-27 (2012)
- Deng, J.,** Shoemaker, R., Xie, B., Gore, A., LeProust, E.M., Antosiewicz-Bourget, J., Egli, D., Maherali, N., Park, I.H., Yu, J., Daley, G.Q., Eggan, K., Hochedlinger, K., Thomson, J., Wang, W., Gao, Y., Zhang, K. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol* **27**(4), 353-360 (2009)
- Dihal, A.A.,** Boot, A., van Roon, E.H., Schrupf, M., Fariña-Sarasqueta, A., Fiocco, M., Zeestraten, E.C., Kuppen, P.J., Morreau, H., van Wezel, T., Boer, J.M. The Homeobox Gene MEIS1 Is Methylated in BRAF (p.V600E) Mutated Colon Tumors. *PLoS One* **8**(11), e79898 (2013)
- Fernández, V.,** Salamero, O., Espinet, B., Solé, F., Royo, C., Navarro, A., Camacho, F., Beà, S., Hartmann, E., Amador, V., Hernández, L., Agostinelli, C., Sargent, R.L., Rozman, M., Aymerich, M., Colomer, D., Villamor, N., Swerdlow, S.H., Pileri, S.A., Bosch, F., Piris, M.A., Montserrat, E., Ott, G., Rosenwald, A., López-Guillermo, A., Jares, P., Serrano, S., Campo, E. Genomic and gene expression profiling defines indolent forms of mantle cell lymphoma. *Cancer Res* **70**(4), 1408-1418 (2010)
- Filippini, S.,** Blanco, A., Fernández-Marmiesse, A., Álvarez-Iglesias, A., Ruíz-Ponte, C., Carracedo, A., Vega, A. Multiplex SNaPshot for detection of BRCA1/2 common mutations in Spanish and Spanish related breast/ovarian cancer families. *BMC Medical Genetics* **8**(40), doi:10.1186/1471-2350-8-40 (2007)
- Fleming, R.I.** & Harbison, S. The development of a mRNA multiplex RT-PCR assay for the definitive identification of body fluids. *Forensic Sci Int Genet* **4**(4), 244-56 (2010)
- Fraga, M.F.,** Ballestar, E., Paz, M.F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M.L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J.C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T.D., Wu, Y.Z., Plass, C., Esteller, M. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30), 10604-10609 (2005)
- Fraser, I.S.,** McCarron, G., Markham, R., Resta, T. Blood and total fluid content of menstrual discharge. *Obstet Gynecol* **65**(2), 194-198 (1985)
- Frumkin, D.,** Wasserstrom, A., Budowle, B., Davidson, A. DNA methylation-based forensic tissue identification. *Forensic Sci Int Genet* **5**(5), 517-524 (2011)
- Gama-Sosa, M.A.,** Midgett, R.M., Slagel, V.A., Githens, S., Kuo, K.C., Gehrke, C.W., Ehrlich, M. Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. *Biochim Biophys Acta* **740**(2), 212-219 (1983)

- Germerott, T.,** Bode-Jänisch, S., Thali MJ. Physical and gynecological examinations in female victims of sexual violence with special emphasis on crime-reporting behaviour. *Arch Kriminol* **230**(3-4), 88-98 (2012)
- Goessl, C.,** Krause, H., Müller, M., Heicappell, R., Schrader, M., Sachsinger, J., Miller, K. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res* **60**(21), 5941-5945 (2000)
- Haas, C.,** Hanson, E., Bär, W., Banemann, R., Bento, A.M., Berti, A., Borges, E., Bouakaze, C., Carracedo, A., Carvalho, M., Choma, A., Dötsch, M., Durianciková, M., Hoff-Olsen, P., Hohoff, C., Johansen, P., Lindenbergh, P.A., Loddenkötter, B., Ludes, B., Maroñas, O., Morling, N., Niederstätter, H., Parson, W., Patel, G., Popielarz, C., Salata, E., Schneider, P.M., Sijen, T., Sviežená, B., Zatkalíková, L., Ballantyne, J. mRNA profiling for the identification of blood--results of a collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* **5**(1), 21-26 (2011)
- Haas, C.,** Hanson, E., Anjos, M.J., Bär, W., Banemann, R., Berti, A., Borges, E., Bouakaze, C., Carracedo, A., Carvalho, M., Castella, V., Choma, A., De Cock, G., Dötsch, M., Hoff-Olsen, P., Johansen, P., Kohlmeier, F., Lindenbergh, P.A., Ludes, B., Maroñas, O., Moore, D., Morerod, M.L., Morling, N., Niederstätter, H., Noel, F., Parson, W., Patel, G., Popielarz, C., Salata, E., Schneider, P.M., Sijen, T., Sviežena, B., Turanská, M., Zatkalíková, L., Ballantyne, J. RNA/DNA co-analysis from blood stains--results of a second collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* **6**(1), 70-80 (2012)
- Haas, C.,** Hanson, E., Anjos, M.J., Banemann, R., Berti, A., Borges, E., Carracedo, A., Carvalho, M., Courts, C., De Cock, G., Dötsch, M., Flynn, S., Gomes, I., Hollard, C., Hjort, B., Hoff-Olsen, P., Hříbková, K., Lindenbergh, A., Ludes, B., Maroñas, O., McCallum, N., Moore, D., Morling, N., Niederstätter, H., Noel, F., Parson, W., Popielarz, C., Rapone, C., Roeder, A.D., Ruiz, Y., Sauer, E., Schneider, P.M., Sijen, T., Court, D.S., Sviežená, B., Turanská, M., Vidaki, A., Zatkalíková, L., Ballantyne, J. RNA/DNA co-analysis from human saliva and semen stains--results of a third collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* **7**(2), 230-239 (2013)
- Haas, C.,** Hanson, E., Anjos, M.J., Ballantyne, K.N., Banemann, R., Bhoelai, B., Borges, E., Carvalho, M., Courts, C., De Cock, G., Drobnic, K., Dötsch, M., Fleming, R., Franchi, C., Gomes, I., Hadzic, G., Harbison, S.A., Hartevelde, J., Hjort, B., Hollard, C., Hoff-Olsen, P., Hüls, C., Keyser, C., Maroñas, O., McCallum, N., Moore, D., Morling, N., Niederstätter, H., Noël, F., Parson, W., Phillips, C., Popielarz, C., Roeder, A.D., Salvaderi, L., Sauer, E., Schneider, P.M., Shanthan, G., Court, D.S., Turanská, M., van Oorschot, R.A., Vennemann, M., Vidaki, A., Zatkalíková, L., Ballantyne, J. RNA/DNA co-analysis from human menstrual blood and vaginal secretion stains: results of a fourth and fifth collaborative EDNAP exercise. *Forensic Sci Int Genet* **8**(1), 203-212 (2014)
- Haas, C.,** Klessner, B., Kratzer, A., Bär, W. mRNA profiling for body fluid identification. *Forensic Sci Int Genet* **1**, 37-38 (2008)
- Hanson, E.K.,** Lubenow, H., Ballantyne, J. Identification of forensically relevant body fluids using a panel of differentially expressed microRNAs. *Anal Biochem* **387**(2), 303-314 (2009)
- Hellman, A. & Chess, A.** Extensive sequence-influenced DNA methylation polymorphism in the human genome. *Epigenetics Chromatin* **3**(1), 1-11 (2010)
- Hérault, Y.,** Beckers, J., Kondo, T., Fraudeau, N., Duboule, D. Genetic analysis of a Hoxd-12 regulatory element reveals global versus local modes of controls in the HoxD complex. *Development* **125**(9), 1669-1677 (1998)

- Hoek, K.**, Rimm, D.L., Williams, K.R., Zhao, H., Ariyan, S., Lin, A., Kluger, H.M., Berger, A.J., Cheng, E., Trombetta, E.S., Wu, T., Niinobe, M., Yoshikawa, K., Hannigan, G.E., Halaban, R. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* **64**(15), 5270-5282 (2004)
- Holleman, A.**, den Boer, M.L., Cheok, M.H., Kazemier, K.M., Pei, D., Downing, J.R., Janka-Schaub, G.E., Göbel, U., Graubner, U.B., Pui, C.H., Evans, W.E., Pieters, R. Expression of the outcome predictor in acute leukemia 1 (OPAL1) gene is not an independent prognostic factor in patients treated according to COALL or St Jude protocols. *Blood* **108**(6), 1984-1990 (2006)
- Hsu, L.**, Power, D., Upritchard, J., Burton, J., Friedlander, R., Horswell, J., MacDonald, C., Kieser, J., Tompkins, G. Amplification of oral streptococcal DNA from human incisors and bite marks. *Curr Microbiol* **65**(2), 207-211 (2012)
- Huang, Y.**, Pastor, W.A., Shen, Y., Tahiliani, M., Liu, D.R., Rao, A. The behaviour of 5-hydroxymethylcytosine in bisulfite sequencing. *PLoS One* **5**(1), e8888 (2010)
- Ichihanagi, T.**, Ichihanagi, K., Miyake, M., Sasaki, H. Accumulation and loss of asymmetric non-CpG methylation during male germ-cell development. *Nucleic Acids Res* **41**(2), 738-745 (2012)
- International Human Genome Sequencing Consortium.** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001)
- Issa, J.P.**, Vertino, P.M., Boehm, C.D., Newsham, I.F., Baylin, S.B. Switch from monoallelic to biallelic human IGF2 promoter methylation during aging and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21), 11757-11762 (1996)
- Issa, J.P.** Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **32**(1), 31-43 (1999)
- Jay, P.**, Gozé, C., Marsollier, C., Taviaux, S., Hardelin, J.P., Koopman, P., Berta, P. The human SOX11 gene: cloning, chromosomal assignment and tissue expression. *Genomics* **29**(2), 541-545 (1995)
- Jones, P.A.** The DNA methylation paradox. *Trends Genet* **15**(1), 34-37 (1999)
- Juusola, J.** Ballantyne, J. Multiplex mRNA profiling for the identification of body fluids. *Frensic Sci Int* **152**(1), 1-12 (2005)
- Juusola, J.** & Ballantyne, J. mRNA profiling for body fluid identification by multiplex quantitative RT-PCR. *J Forensic Sci* **52**(6), 1252-1262 (2007)
- Kaminsky, Z.A.**, Assadzadeh, A., Flanagan, J., Petronis, A. Single nucleotide extension technology for quantitative site-specific evaluation of metC/C in GC-rich regions. *Nucleic Acids Res* **33**(10), e95 (2005)
- Kanduri, M.**, Sander, B., Ntoufa, S., Papakonstantinou, N., Sutton, L.A., Stamatopoulos, K., Kanduri, C., Rosenquist, R. A key role for EZH2 in epigenetic silencing of HOX genes in mantle cell lymphoma. *Epigenetics* **8**(12), 1280-1288 (2013)
- Kerkel, K.**, Spadola, A., Yuan, E., Kosek, J., Jiang, L., Hod, E., Li, K., Murty, V.V., Schupf, N., Vilain, E., Morris, M., Haghighi, F., Tycko, B. Genomic surveys by methylation-sensitive SNP analysis identify sequence-dependent allele-specific DNA methylation. *Nat Genet* **40**(7), 904-908 (2008)

- Kaminsky, Z.A.**, Assadzadeh, A., Flanagan, J., Petronis, A. Single nucleotide extension technology for quantitative site-specific evaluation of metC/C in GC-rich regions. *Nucleic Acids Res* **33**(10), e95 (2005)
- Korbie, D.J.** & Mattick, J.S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols* **3**, 1452 - 1456 (2008)
- LaRue, B.L.**, King, J.L., Budowle, B. A validation study of the Nucleix DSI-Semen kit--a methylation-based assay for semen identification. *Int J Legal Med* **127**(2), 299-308 (2013)
- Lee, H.Y.**, Park, M.J., Choi, A., An, J.H., Yang, W.I., Shin, K.J. Potential forensic application of DNA methylation profiling to body fluid identification. *Int J Legal Med* **126**(1), 56-62 (2012)
- Lewin, J.**, Schmitt, A.O., Adorján, P., Hildmann, H. and Piepenbrock, C. Quantitative DNA methylation analysis based on four-dye trace data from direct sequencing of PCR amplicates. *Bioinformatics* **20**(17), 3005-3012 (2004)
- Lin, A.C.**, Hsieh, H.M., Tsai, L.C., Linacre, A., Lee, J.C. Forensic applications of infrared imaging for the detection and recording of latent evidence. *J Forensic Sci* **52**(5), 1148-1150 (2007)
- Lister, R.**, Pelizzola, M., Dowen, R.H., Hawkins, R.D., Hon, G., Tonti-Filippini, J., Nery, J.R., Lee, L., Ye, Z., Ngo, Q.M., Edsall, L., Antosiewicz-Bourget, J., Stewart, R., Ruotti, V., Millar, A.H., Thomson, J.A., Ren, B., Ecker, J.R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**(7271), 315-322 (2009)
- Liu, Y.**, Jiang, M., Li, C., Yang, P., Sun, H., Tao, D., Zhang, S., Ma, Y. Human t-complex protein 11 (TCP11), a testis-specific gene product, is a potential determinant of the sperm morphology. *Tohoku J Exp Med* **224**(2), 111-117 (2011)
- Madi, T.**, Balamurugan, K., Bombardi, R., Duncan, G., McCord, B. The determination of tissue-specific DNA methylation patterns in forensic biofluids using bisulfite modification and pyrosequencing. *Electrophoresis* **33**(12), 1736-1745 (2012)
- Makiyama, K.**, Hamada, J., Takada, M., Murakawa, K., Takahashi, Y., Tada, M., Tamoto, E., Shindo, G., Matsunaga, A., Teramoto, K., Komuro, K., Kondo, S., Katoh, H., Koike, T., Moriuchi, T. Aberrant expression of HOX genes in human invasive breast carcinoma. *Oncol Rep* **13**(4), 673-679 (2005)
- McLaughlin, G.**, Doty, K.C., Lednev, I.K. Discrimination of human and animal blood traces via Raman spectroscopy. *Forensic Sci Int* **238**, 91-95 (2014)
- Melchor, L.**, Garcia, M.J., 1,2, Honrado, E., Pole, J.C.M., Alvarez, S., Edwards, P.A.W., Caldas, C., Brenton, J.D., Benitez, J. Genomic analysis of the 8p11-12 amplicon in familial breast cancer. *Int J Cancer* **120**, 714-717 (2006)
- Mihm, M.**, Gangooly, S., Muttukrishna, S. The normal menstrual cycle in women. *Anim Reprod Sci* **124**(3-4), 229-36 (2011)
- Mount, D.B.** & Romero, M.F. The SLC26 gene family of multifunctional anion exchangers. *Pflugers arch - Eur J Physiol* **447**, 710-721 (2004)
- Nakanishi, H.**, Ohmori, T., Hara, M., Takada, A., Shojo, H., Adachi, N., Saito, K. A simple identification method of saliva by detecting *Streptococcus salivarius* using loop-mediated isothermal amplification. *HJ Forensic Sci* **56** Suppl 1, S158-161 (2011)

- Novak, R.L.**, Harper, D.P., Caudell, D., Slape, C., Beachy, S.H., Aplan, P.D. Gene expression profiling and candidate gene resequencing identifies pathways and mutations important for malignant transformation caused by leukemogenic fusion genes. *Exp Hematol* **40**(12), 1016-27 (2012)
- Olek, A.**, Oswald, J., Walter, J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res* **24**(24), 5064-5066 (1996)
- Okada Y.**, Nagai R., Sato T., Matsuura E., Minami T., Morita I., Doi T. Homeodomain proteins MEIS1 and PBXs regulate the lineage-specific transcription of the platelet factor 4 gene. *Blood* **101**(12), 4748-4756 (2003)
- Pai, A.A.**, Bell, J.T., Marioni, J.C., Pritchard, J.K., Gilad, Y. A. Genome-Wide Study of DNA Methylation Patterns and Gene Expression Levels in Multiple Human and Chimpanzee Tissues. *PLoS Genet* **7**(2), e1001316 (2011)
- Pang, B.C.**, Cheung, B.K. Applicability of two commercially available kits for forensic identification of saliva stains. *J Forensic Sci* **53**(5), 1117-1122 (2008)
- Pei, L.**, Choi, J.H., Liu, J., Lee, E.J., McCarthy, B., Wilson, J.M., Speir, E., Awan, F., Tae, H., Arthur, G., Schnabel, J.L., Taylor, K.H., Wang, X., Xu, D., Ding, H.F., Munn, D.H., Caldwell, C., Shi, H. Genome-wide DNA methylation analysis reveals novel epigenetic changes in chronic lymphocytic leukemia. *Epigenetics* **7**(6), 567-78 (2012)
- Quarino, L.**, Dang, Q., Hartmann, J., Moynihan, N. An ELISA method for the identification of salivary amylase. *J Forensic Sci* **50**(4), 873-876 (2005)
- Rastegar, M.**, Kobrossy, L., Kovacs, E.N., Rambaldi, I., Featherstone, M. Sequential Histone Modifications at Hoxd4 Regulatory Regions Distinguish Anterior from Posterior Embryonic Compartments. *Mol Cell Biol* **24**(18), 8090-8113 (2004)
- Riggs, A.D.** X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* **14**(1), 9-25 (1975)
- Roeder, A.D.** & Haas, C. mRNA profiling using a minimum of five mRNA markers per body fluid and a novel scoring method for body fluid identification. *Int J Legal Med* **127**(4), 707-721 (2013)
- Santucci, K.A.**, Nelson, D.G., McQuillen, K.K., Duffy, S.J., Linakis, J.G. Wood's lamp utility in the identification of semen. *Pediatrics* **104**(6), 1342-1344 (1999)
- Sato, I.**, Barni, F., Yoshiike, M., Rapone, C., Berti, A., Nakaki, S., Yamazaki, K., Ishikawa, F., Iwamoto, T. Applicability of Nanotrap Sg as a semen detection kit before male-specific DNA profiling in sexual assaults. *Int J Legal Med* **121**(4), 315-319 (2007)
- Schneider, H.**, Forat, S., Olek, K. Die Verwendung von DNA-Methylierungsmarkern zum Nachweis von Menstrualblut. *Kriminalistik* **66**(3), 152-156 (2012)
- Setzer, M.**, Juusola, J., & Ballantyne, J. Recovery and Stability of RNA in Vaginal Swabs and Blood, Semen, and Saliva Stains. *J Forensic Sci* **53**(2), 296-305 (2008)
- Shoemaker, R.**, Deng, J., Wang, W., Zhang, K. Allele-specific methylation is prevalent and is contributed by CpG-SNPs in the human genome. *Genome Res* **20**(7), 883-889 (2010)
- Song, F.**, Mahmood, S., Ghosh, S., Liang, P., Smiraglia, D.J., Nagase, H., Held, W.A. Tissue specific differentially methylated regions (TDMR): Changes in DNA methylation during development. *Genomics* **93**(2), 130-139 (2009)

Tobe, S.S., Watson, N., Daéid, N.N. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. *J Forensic Sci* **52**(1), 102-109 (2007)

Trombka, J.I., Schweitzer, J., Selavka, C., Dale, M., Gahn, N., Floyd, S., Marie, J., Hobson, M., Zeosky, J., Martin, K., McClannahan, T., Solomon, P., Gottschang, E. Crime scene investigations using portable, non-destructive space exploration technology. *Forensic Sci Int* **129**(1), 1-9 (2002)

Varley, K.E., Gertz, J., Bowling, K.M., Parker, S.L., Reddy, T.E., Pauli-Behn, F., Cross, M.K., Williams, B.A., Stamatoyannopoulos, J.A., Crawford, G.E., Absher, D.M., Wold, B.J., Myers, R.M. Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues. *Genome Res* **23**(3), 555-567 (2013)

Vidaki, A., Daniel, B., Court, D.S. Forensic DNA methylation profiling--Potential opportunities and challenges. *Forensic Sci Int Genet* **7**(5), 499-507 (2013)

Virkler, K., Lednev, I.K. Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int* **188**(1-3), 1-17 (2009)

Walsh, C.P. & Bestor, T.H. Cytosine methylation and mammalian development. *Genes Dev* **13**(1), 26-34 (1999)

Zhang, D., Cheng, L., Badner, J.A., Chen, C., Chen, Q., Luo, W., Craig, D.W., Redman, M., Gershon, E.S., Liu, C. Genetic Control of Individual Differences in Gene-Specific Methylation in Human Brain. *Am J Hum Genet* **86**(12), 411-419 (2010)

Zubakov, D., Boersma, A.W., Choi, Y., van Kuijk, P.F., Wiemer, E.A., Kayser, M. MicroRNA markers for forensic body fluid identification obtained from microarray screening and quantitative RT-PCR confirmation. *Int J Legal Med* **124**(3), 217-26 (2010)

Zubakov, D., Hanekamp, E., Kokshoorn, M., van Ijcken, W., Kayser, M. Stable RNA markers for identification of blood and saliva stains revealed from whole genome expression analysis of time-wise degraded samples. *Int J Legal Med* **122**(2), 135-42 (2008)

Verzeichnis von Lehrbüchern

Beck, S. Olek, A. (Eds.) The Epigenome - Molecular Hide and Seek. WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA (2003)

Greenfield, A. Sloan, M. A. (Eds.) Forensic science: an introduction to scientific and investigative techniques. Boca Raton: CRC Press, USA (2003)

James, S.H. Nordby, J.J. Identification of bi-ological fluids and stains; Forensic science: an introduction to scientific and investigative techniques. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, USA (2003)

Madea, B. Brinkmann, B. (Hrsg.) Handbuch gerichtliche Medizin 2. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York (2003)

Reich, K. Forensic Test for Human blood. Independent Forensics Inc. US Patent App. 11/869,747 (2007)

Sonstige Quellen

Applied Biosystems by Life Technologies. DNA Fragment Analysis by Capillary Electrophoresis User Guide (2012)

Miller, B. Methodvalidierung zur Differenzierung von Körperflüssigkeiten aus forensischem Material mit gewebespezifischen Methylierungsmarkern. (unveröffentlichte Bachelorarbeit). Aachen: Fachbereich Biotechnologie der Fachhochschule Aachen, Campus Jülich (2013)

New England Biolabs Inc. NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina Instruction Manual Version 1.2 (Februar 2013)

Qiagen®. QIAamp®DNA Mini and Blood Mini Handbook, (November 2007)

Qiagen®. EpiTect Plus Bisulfite Conversion Handbook, (September 2010)

Qiagen®. EpiTect 96 Bisulfite Handbook (September 2009)

Roche. Rapid Library Preparation Method Manual, GS FLX Titanium Series (Januar 2010)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich von Herzen bei all denjenigen bedanken, die mich bei meiner spannenden Arbeit in den viereinhalb Jahren begleitet und unterstützt haben, sowie den Menschen, die dazu beigetragen haben, dass mein Projekt "Promotion" mit großem Erfolg zu Ende geführt wurde.

Den größten und herzlichsten Dank widme ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Klaus Olek. Ich danke Ihnen für Ihre herzliche Beharrlichkeit, jede erdenkliche, hilfreiche Unterstützung und viele spannende Diskussionen, die mich allzeit motiviert haben. Ihre Weisheit, Neugierde und Optimismus waren der größte Antrieb für mich in den langen Jahren. Sie haben mir den wichtigsten Stimulus -
Stimulus der Wissenschaft -
beigebracht!

Ich danke vielmals Herrn Prof. Dr. Oldenburg und Herrn Prof. Dr. Witke für Ihr spontanes Engagement und die Vertretung dieser umfassenden Dissertation.

Ich bedanke mich liebevoll bei meiner Schwester Jana und meinen Eltern für die seelische Unterstützung während der Zeit. Ich danke auch meinen Freunden, die jederzeit mir zur Seite standen und für die erholende Abwechslung an den Wochenenden gesorgt haben.

Ich danke euch auch für das allseits exotische Probenmaterial.

Dem gesamten Team von Firma „Epiontis“ - vor allem Sven Olek und Udo Baron- möchte ich für die methodische Einführung in die Methylierungsanalyse danken, und natürlich für den guten Grund diese wunderbare Stadt kennenzulernen – ich liebe Berlin.

Ich danke Dr. Richard Reinhard und Dr. Bruno Hüttel für die Durchführung des NGS-Experimentes und die freundliche Betreuung an dem Max-Planck Genomzentrum in Köln.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kolleginnen und Kollegen, sowie all den Menschen, die in den verschiedenen Phasen der Arbeit mitgeholfen haben.

Ich danke allen Spenderinnen und Spendern für die Bereitstellung des essentiellen Untersuchungs-Materials. Einen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle meinem lieben Schwager Alexander Abt aussprechen. Ohne seine engagierte Kooperation wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation persönlich, selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle kenntlich gemacht.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder mittelbar, noch unmittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Dissertation stehen. Die Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn ist mir bekannt.

Bonn, den 14.05.2014