

Ort: Praktikumsraum der Physiologie MAFO Ebene 0 Raum 222 Süd

Zeit: 14.15 – 17.00 Uhr gemäß Gruppenverteilungsplan

Leiter: Prof. Dr. J.T. Epplen, Dr. L. Arning, Dr. G. Dekomien, Dr. W. Gerding, Dr. B. Mitterski, Dr. S. Stemmler, Dr. A.D. Akkad, Dr. S. Wieczorek, Dipl. Biol. R. Kropatsch

MOLEKULARBIOLOGIE 1

Inhalt:

- Einleitung

- Ablaufplan

- Versuchsmaterialien und -Durchführung

1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

2. Agarose-Gelelektrophorese

- Hintergrundinformation

- Begriffe und Techniken

- Risiko für Thromboembolie bei Mutation im *Faktor V*-Gen (Faktor V-Leiden Mutation)

Voraussetzungen

Die Erteilung eines Teilnahmetests setzt die Kenntnis des Inhalts dieser Kursvorschrift voraus sowie eine zufrieden stellende Bearbeitung der gestellten Aufgaben. Ein Fehltestat muss durch eine mündliche Nachprüfung ausgeglichen werden.

Sicherheitshinweis

Nach Maßgabe der Vorschriften zum Umgang mit Gefahrstoffen im Hochschulbereich (TRGS 451) wird darauf hingewiesen, dass es in diesem Praktikumsteil der "Biologie für Mediziner" unumgänglich ist, mit folgenden Gefahrstoffen umzugehen:

<u>Ethidiumbromid</u> : besondere Gefahr, giftig beim Verschlucken, erbgutschädigend
--

Vorbemerkung

Die eingehende Lektüre der Kapitel "Molekulare Biologie" und "Gentechnologie" im Lehrbuch "Biologie für Mediziner", Hirsch-Kauffmann + Schweiger (Thieme-Verlag, Stuttgart), sind Voraussetzung für die erfolgreiche Praktikumsteilnahme.

Einleitung

Die Zelle ist die Grundeinheit der biologischen Organisation. In der biologischen Entwicklungsgeschichte (Evolution) sind die zuerst aufgetretenen Organismen höchstwahrscheinlich einzellig gewesen. Zu den einzelligen Mikroorganismen gehören auch die heute vorkommenden Bakterien. Bakterien besitzen im Gegensatz zu **Eukaryonten** (Pilze, Tiere, Pflanzen) keinen "echten" Zellkern (fehlende Zellkernmembran) und werden daher **Prokaryonten** genannt. Einzellige Eukaryonten werden als Protisten bezeichnet. Im Laufe der Evolution vereinigten sich einige pro- und eukaryontische Zellen zu mehr- oder vielzelligen Organismen. Die Funktion der Einzelzelle wurde hierbei völlig dem Überleben des Gesamt-Organismus untergeordnet. Mehrzellige Prokaryonten sind z.B. Cyanobakterien (blaugrüne Algen); vielzellige Eukaryonten schließen die meisten Tiere und Pflanzen ein.

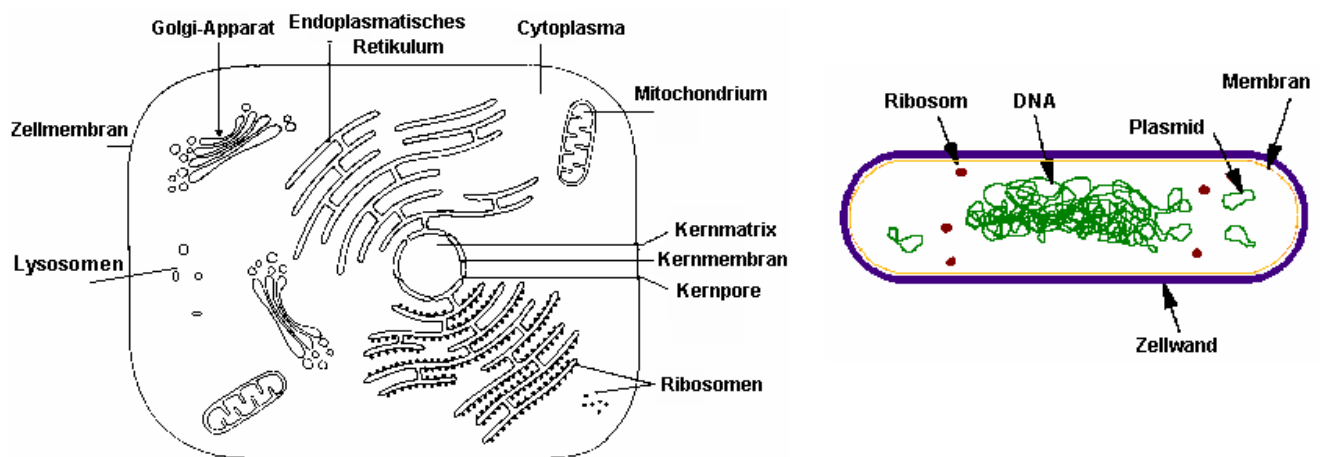


Abb.1: Vergleich der Modelle einer "typischen" Eukaryonten-Zelle mit Kernmembran gegenüber einer Prokaryontenzelle ohne Kernmembran.

Alle biologischen Strukturen entstanden und entstehen aus anderen biologischen Strukturen durch Informationsübertragung. In Abhängigkeit von seiner Organisationshöhe (sog. organismische Komplexität) besitzt jedes biologische System (jeder Organismus) einen entsprechend komplexen Informationsgehalt. Proteinmoleküle sorgen für die funktionelle Umsetzung der Information in der Zelle. Die Informationen für die Funktion(en) eines Proteins sind in der linearen Primärstruktur festgelegt. Die eindimensionale Abfolge der Proteinbausteine, der ~20 verschiedenen Aminosäuren, bestimmt letztendlich auch ihre Sekundär- und Tertiärstruktur. Daher ist für die Festlegung der Proteinsequenzen auch eine eindimensionale Informationsspeicherung in Form der Nucleinsäuren (**R**ibonucleic acid, **RNA**; **D**eoxyribonucleic acid, **DNA**) möglich. Die Einzelbausteine der Nucleinsäuren sind die Nucleotide (Zucker-Phosphat-basischer Ring, der basische Ring wird oft verkürzt auch einfach Base genannt). Die ‚Wendeltreppe‘ des Doppelhelix-Moleküls der DNA besteht also aus zwei gegenläufigen Zucker-Phosphat-„Rückgraten“ und den basischen Ringen als ‚Treppenstufen‘, die nach innen gerichtet sind. Im DNA-Doppelstrang stehen sich immer 2 komplementäre Basen (Abkürzung = Anfangsbuchstabe) gegenüber, welche über 2 (AT) bzw. 3 (GC) stabile H-Brückenbindungen verknüpft sind.

Adenin (A) = Thymin (T)

Thymin (T) = Adenin (A)

Cytosin (C) ≡ Guanin (G)

Guanin (G) ≡ Cytosin (C)

Die Komplementarität der Nukleinsäuren wird für die meisten molekularbiologischen Untersuchungsmethoden ausgenutzt (Trennen des Doppelstrangs in die zwei Einzelstränge, Anlagern komplementärer Moleküle an Einzelstränge = Hybridisieren).

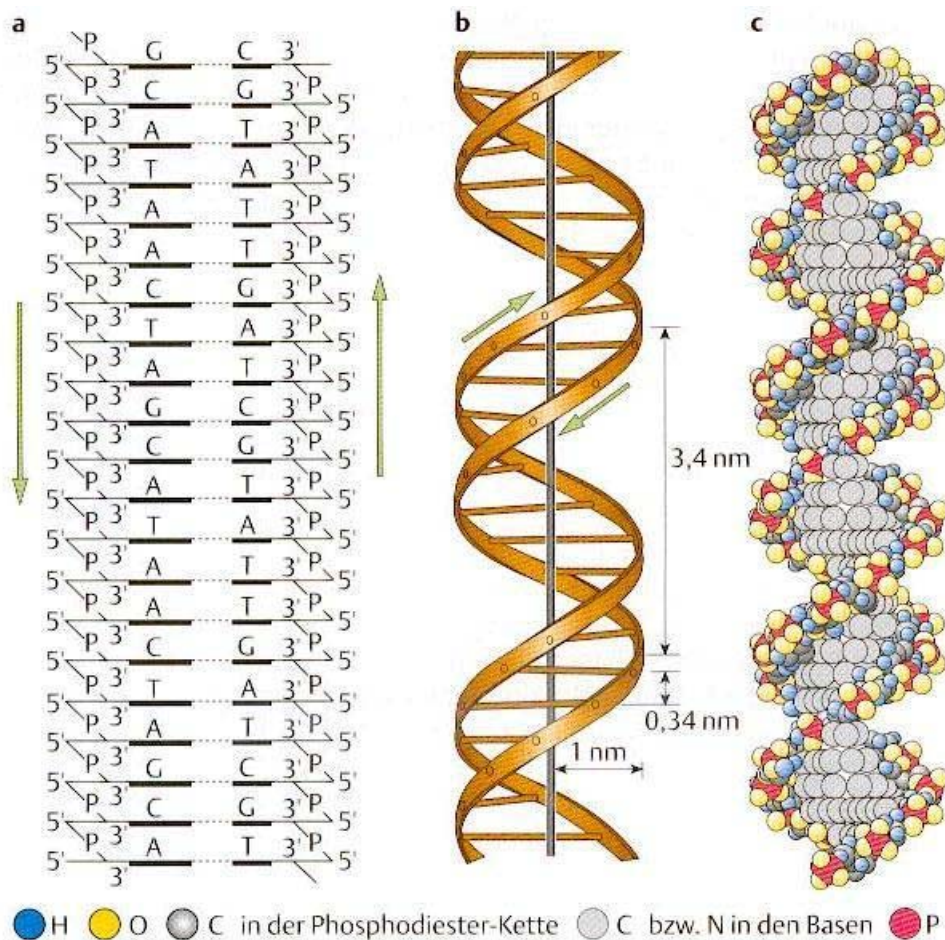


Abb. 2: Struktur-Modelle der DNA-Doppelhelix; a) Die beiden ‚Zucker-Phosphat-Rückgrate‘ der DNA verlaufen antiparallel; b) Dimensionen der DNA-Doppelhelix; c) Kalottenmodell.

Jeder eukaryontische Organismus besitzt in jeder kernhaltigen Zelle eine bestimmte Menge an Erbgut -DNA. Sie wird Genom genannt. Die jeweiligen Genomgrößen sind charakteristisch für jede Tier- oder Pflanzenart. Während Genome von Prokaryonten oft sehr dicht mit Erbinformationen gepackt sind (z. T. sind sogar Gene bekannt, deren Information sich überlappt), gibt es in den Genomen der meisten Eukaryonten auch große Abschnitte, die keinerlei Information (keine Gene) für die Entwicklung, das Verhalten und Befinden des Organismus tragen. Da dieser Anteil des Genoms keine Gene trägt, stellt sich die Frage, ob diese DNA dann als völlig überflüssig anzusehen ist.

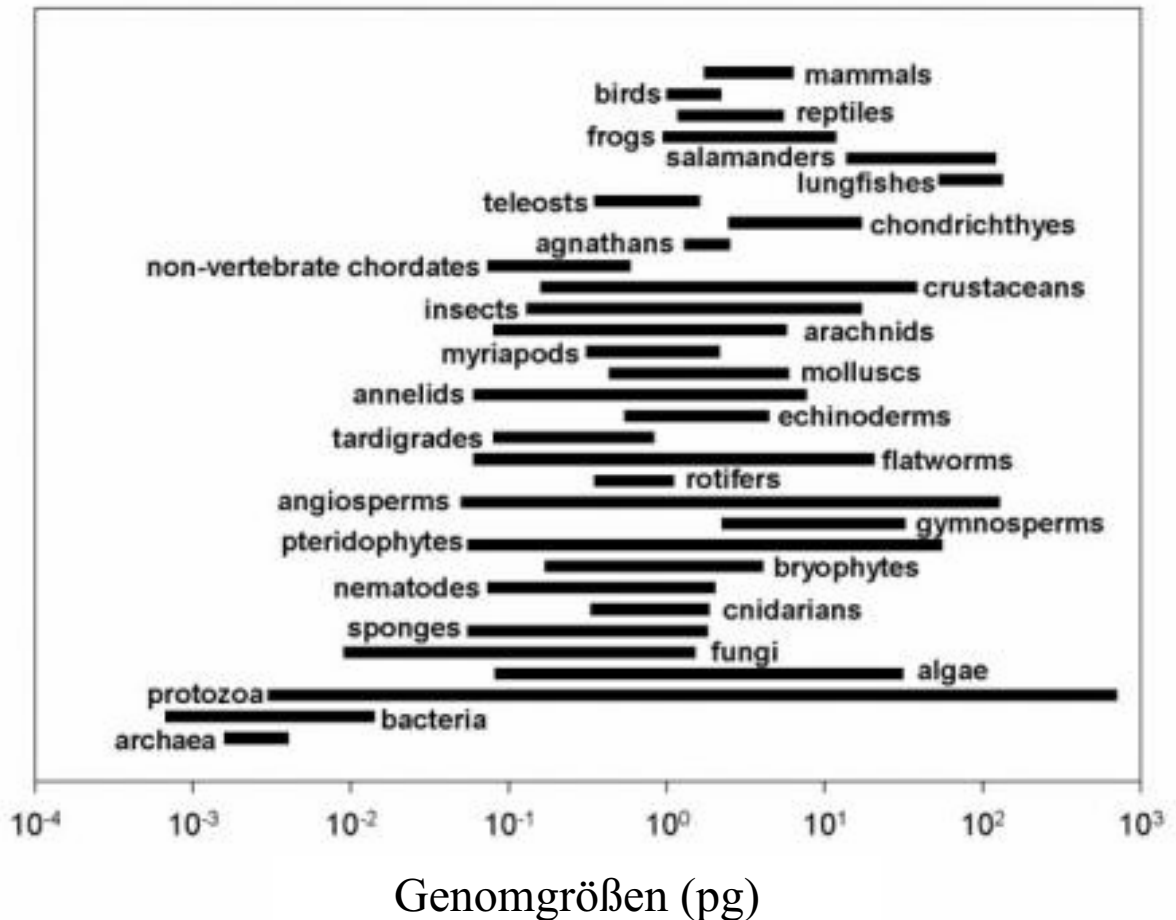


Abb. 3: DNA-Gehalte verschiedener Organismen

Das diploide Genom eines Menschen besteht aus ~7 Milliarden Nukleotidpaaren. Bei 7 Milliarden Informationseinheiten in einem diploiden, das heißt mit einem doppelten Chromosomensatz ausgestatteten Genom ergeben sich $\sim 10^{2000000000}$ verschiedene Anordnungsmöglichkeiten der Nukleotide. Nun kann jedoch nicht an jeder Stelle im Genom ein beliebiges Nukleotid stehen, da nur bestimmte Basenfolgen (Sequenzen) nach der Proteinbiosynthese (Transkription und Translation) mit der in ihnen enthaltenen Information eine sinnvolle Abfolge von Aminosäuren ergeben, die wiederum für die Struktur und Funktion lebenswichtiger Proteine (zum Beispiel Enzyme) verantwortlich sind. Deshalb weisen entsprechende Genorte (Loci) bei verschiedenen Menschen nur eine vergleichsweise geringe Variabilität auf, das bedeutet, innerhalb solcher Regionen finden sich nur wenige Unterschiede in Bezug auf die Basenfolge. Der Grund dafür ist, daß die meisten sprunghaften Veränderungen in der Basenfolge (Mutationen), wegen der damit verbundenen Struktur- und Funktionsänderung der entsprechenden Proteine, zum Nachteil oder gar zum Tod des betreffenden Organismus führen, bevor die mutierten Gene an Nachkommen weitergegeben werden können. Genloci mit diesen sequenzabhängigen Informationen machen aber nur 5 Prozent des menschlichen Genoms aus.

Über die biologische Bedeutung der übrigen 95 Prozent der DNA, in der keine sequenzabhängige Information enthalten ist, herrscht zur Zeit noch weitgehend Unklarheit. Da der Austausch oder Wegfall eines Nukleotids, beziehungsweise die Umlagerung ganzer Sequenzteile innerhalb dieser Regionen, nicht zu einer Fehlfunktion innerhalb des Organismus führt und daher toleriert werden kann, zeichnet sich dieser Teil der DNA durch eine wesentlich größere Variabilität aus. Im kürzlich veröffentlichten Humangenomprojekt wurde abgeschätzt, dass das menschliche Genom $\leq 30\,000$ Gene enthält.

Zwischenfrage: Was überhaupt ist ein Gen?

Klassische Definition:

Ein Abschnitt der DNA oder ein Abschnitt des Genoms, der die Information für die Herstellung eines Proteins trägt.

Diese Beschreibung ist für Prokaryonten im allgemeinen weiterhin gültig.

Intermediäre Definition, die auch Eukaryontengenome (mit Introns, funktionellen mRNAs, die regulierend wirken und nicht translatiert werden, etc.) voll einschließen kann:

Ein DNA-Abschnitt, der in der Sequenzabfolge seiner Nukleotide die Information trägt, die in mRNA umgesetzt wird.

Warum wird so umständlich formuliert? Die kodierenden Abschnitte der eukaryontischen Gene (Exons) werden von sog. Introns unterbrochen, die keine sequenzspezifische Information für dieses Gen tragen.

Neueste Version der Gendefinition (2006):

Eine lokalisierbare Region genomischer Sequenz, die einer Erb-Einheit entspricht, welche assoziiert ist mit regulatorischen Regionen, transkribierten Regionen und/oder anderen funktionellen Sequenzregionen.

Ablaufplan Molekularbiologie-Praktikum

Einführungsbesprechung (incl. Hinweise auf Sicherheitsrichtlinien)

1. Versuch:

Präparation von *E. coli* DNA

E. coli-Kultur zentrifugieren (6 x 50ml)

Resuspendieren der *E. coli*-Zellen → Zelllyse (SDS-Zugabe, dann Inkubation für 0,5 min im Wasserbad, 60°C), NaCl-Fällen der Proteine, Abtrennen der Proteine durch Zentrifugation

Äthanol-Fällung der DNA, ‚angeln‘ der DNA und lösen in Puffer

Abschlussdiskussion inkl. Demonstration und Beurteilung von DNA-Testergebnissen, deren Bedeutung in der Praxis der Humangenetik (genetische Beratung) anhand von ausgewählten Demonstrationsfällen.

2. Versuch:

Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Agarose abwiegen, in Laufpuffer suspendieren und aufkochen, Gel gießen (Ethidiumbromid!)

Gel mit Laufpuffer überschichten, Geltaschen-Kamm entfernen, Auftragen der verschied. DNA-Proben, Gel-Elektrophorese (~80-100 Volt!)

UV-Leuchtschirm: Beurteilung der DNA-Auftrennung (UV-Licht!)

Versuchsmaterialien und –Durchführung

1. Isolierung von *E. coli*-DNA aus *E. coli*-Zellen

Vorbemerkung: Im 1. Programmpunkt des Praktikums wird zunächst prokaryontische DNA aus einem Sicherheitsstamm des Bakteriums *Escherichia coli* (Entdecker Escherich; *Colon* = Dickdarm) präpariert. Das Bakterium kommt physiologischerweise im Dickdarm jedes Menschen und von vielen Tieren vor. Es hat normalerweise keinerlei pathologische Bedeutung.

Aufgabe 1 (Präparation von *E. coli*-DNA):

Zentrifuge incl. Röhren, Wasserbad, ‚Glasangeln‘, Pipetten (-Spitzen)

E. coli-K12 Sicherheitsstamm Luria broth (Medium zur Bakterienzellkultur), stationäre Kultur

E. coli-Zellpellet (gefroren)

Lysislösung (0,15 M NaCl, 0,1 M Na₂EDTA, pH 8,0)

10%ige SDS-Lösung

gesättigte NaCl-Lösung

EtOH (abs.)

Durchführen:

- 1 Resuspendieren der für ~ 5 min abzentrifugierten (pelletierten) *E. coli*-Zellen in 2,5 ml Lysislösung, dann sofort 60°C Inkubation für 0,5 min
- 2 Zugabe von 0,5 ml 10%iger SDS-Lösung, gut durchmischen, weitere Inkubation für <2 min im Wasserbad, 60°C
- 3 NaCl-Fällung der Proteine (Zugabe 1 ml gesättigter NaCl-Lösung)
- 4 Kurze Inkubation (0,5 min bei Raumtemperatur)
- 5 Abtrennen der Proteine durch Zentrifugation (4000 Umdrehungen/min für 20 min)
- 6 Überführen des Überstands in sauberes Zentrifugenröhrchen
- 7 DNA-Fällen durch Zugabe von ~10 ml Ethanol (abs.)
- 8 ‚Angeln‘ des DNA-Präzipitats mit Pasteur-Pipette, abtropfen lassen
- 9 Lösen der gefällten DNA in Wasser oder Puffer

2. Agarose-Gelelektrophorese

Vorbemerkung: Im 2. Versuch wird das zur Verfügung gestellte PCR-Produkt des *FaktorV*-Gens im elektrischen Feld mittels der Agarosegelelektrophorese entsprechend der Fragmentlänge nach Restriktionsverdau aufgetrennt. Diese Technik stellt eine essentielle Methode des molekularbiologischen Labors dar, die dort tagtäglich vielfach angewendet wird.

Aufgabe 2 (horizontale Agarose-Gelelektrophorese zur DNA-Auftrennung):

Feinwaage, (Mini-)Gelkammern mit Gieß-Kämmen, Spannungsquelle (*power supply*) mit Kabeln, UV-Leuchtschirm (*cave*: Hornhaut- und Linsenepithelschädigungen, daher sind Schutzvorrichtungen nötig: Plexiglasplatte, Schutzbrille)

Agarose

Gelpuffer (zur Herstellung Hinweis auf chemisches Praktikum)

Ethidiumbromid-Färbelösung (*cave*: kein direkter Kontakt, da potenter mutagener und kanzerogener Stoff aufgrund der hohen Affinität zur DNA)

DNA-Lösungen

Gel-Ladepuffer incl. Ladefarbe (Ficoll, Xylencyanol + Bromphenolblau)

Durchführen:

1 Feinwaage: Abwiegen des Agarose-Pulvers für 50 ml eines 1,5-2%igen Gels

2 Agarose suspendieren, lösen (Aufkochen); nach Ethidiumbromid-Zugabe auf ~50°C abkühlen lassen

3 Vorbereiten der Kammer (abdichten, Geltaschen-Kamm einsetzen)

4 heiße Agarose-Lösung in Gelkammer gießen (Gel verfestigt sich nach Abkühlen)

5 Gel mit Elektrophorese-Puffer überschichten (1-2 mm über Geloberfläche)

6 Gel-Kamm entfernen

7 Geltaschen mit DNA-Lösungen und Längenmarkern beladen

8 Spannung (60-100 Volt!) anlegen für ~20 min

9 Spannungsgeber abschalten, Kabel entfernen, Transport zum UV-Leuchtschirm

UV-Belichtung des Gels (*cave*: UV-Licht), Analyse des Gels: Banden und DNA-Fragmentlängenbestimmung durch Vergleich mit Längenmarkerbanden (pUC19- Plasmid-DNA verdaut mit Restriktionsenzym: 2686 Basenpaare (bp), 501 bp, 489 bp, 404 bp, 331 bp, 242bp, 190 bp, 147 bp, 111 bp, 110 bp, 67 bp, 34 bp, 34 bp, 26bp).

10 Theoretisch wird dann behandelt:

- a.) Fixieren der DNA in der Gelmatrix oder Membranttransfer („Southern-Blot“)
- b.) Hybridisieren mit Sonden („molekulare Spürhunde“, Komplementaritätsprinzip), die leicht nachweisbare Reportergruppen tragen (Radioaktivität oder Farbstoffe)
- c.) Auswertung von Hybridisierungsergebnissen z.B. auf Röntgenfilmen

Aufgabe 3 (Biochemiker; Agarose-Gelelektrophorese zur Kontrolle der *E. coli*-DNA):

Vorbemerkung: Im 3. Versuch wird die im Versuch 1 isolierte *E. coli*-DNA im elektrischen Feld mittels der Agarosegelelektrophorese entsprechend ihrer Fragmentlänge und Konformation aufgetrennt.

Materialien: siehe Aufgabe 2

Durchführen:

1 Ultraschallbehandlung eines Teils der gelösten *E. coli*-DNA

2 Feinwaage: Abwiegen des Agarose-Pulvers für 50 ml eines 0.8%igen Gels

Weiteres Vorgehen vergleiche Aufgabe 2

3 UV-Belichtung des Gels (*cave*: UV-Licht), Analyse des Gels: Banden- und „Schmiersignale“, DNA-Fragmentlängenbestimmung durch Vergleich mit Längenmarkerbanden (λ -Phagen-DNA verdaut mit Restriktionsenzym: 23100 Basenpaare (bp), 9400 bp, 6600 bp, 4400 bp, 2300 bp, 2000bp, 560 bp).

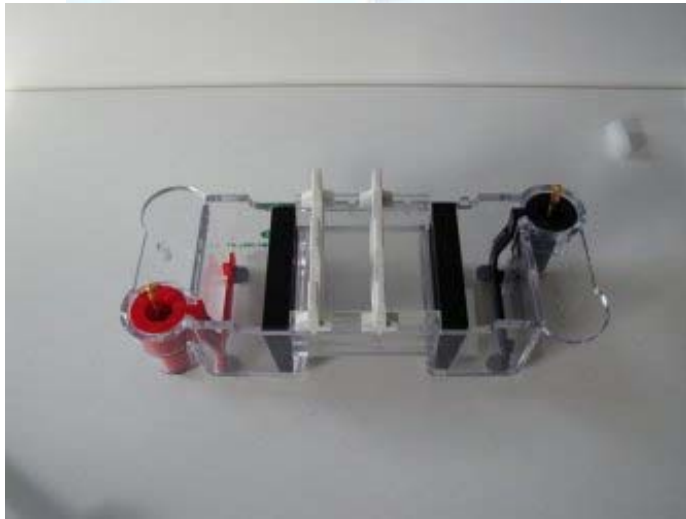
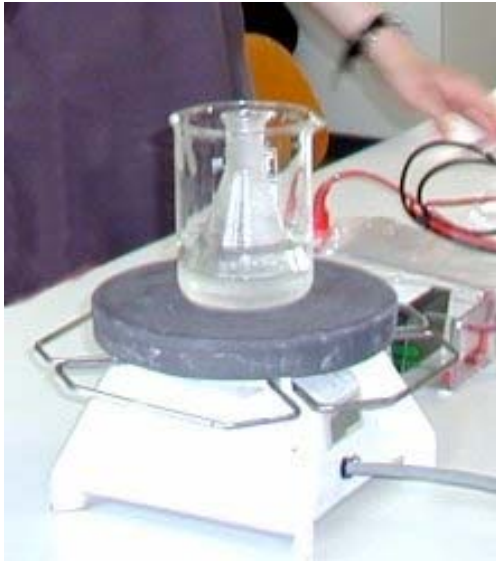
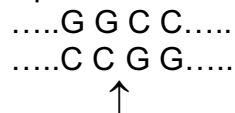


Abb. 4: Vorbereiten, Gießen, Erstarren lassen und Beschicken eines horizontalen Agarosegels mit DNA-Proben

Ad Hintergrundinformation: Isolieren, Schneiden (= Verdauen = Spalten = Restringieren) und Auftrennen der DNA

Zur DNA -Isolierung eignen sich alle Gewebe oder Zellen, die Zellkerne enthalten. Dabei ist es gleichgültig, ob sie aus Blut, Sperma, Urin, Speichel, Haarwurzeln oder einem beliebigen Gewebe stammen. Die DNA wird nach den für die einzelnen Zelltypen optimierten Verfahren isoliert. Es ist möglich isolierte DNA mittels eines DNA-spaltenden Enzyms (Restriktionsendonuklease) zu ‚verdauen‘. Diese Enzyme erkennen bestimmte DNA-Sequenzen und durchtrennen den DNA-Doppelstrang an dieser Stelle. So erkennt z.B. die Restriktionsendonuklease Hae III die Sequenz



und schneidet sie, wie mit dem Pfeil dargestellt. Durch diesen ‚Verdau‘ erhält man DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Diese Fragmente können mittels Gelelektrophorese im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei macht man sich den Umstand zunutze, dass DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge verschieden schnell durch ein Gel wandern: Die DNA-Fragmente sind aufgrund ihrer molekularen Struktur (Zucker-Phosphat-‚Rückgrat‘) negativ geladen. Legt man elektrische Spannung an ein Gel, das man sich am besten als ein engmaschiges dreidimensionales Gitternetz vorstellt, so wandern die einzelnen Fragmente wegen ihrer negativen Ladung in dem elektrischen Feld in Richtung Anode (+ Pol). Lange Fragmente bewegen sich aufgrund ihrer Größe langsamer durch das engmaschige Gitter als kürzere. DNA-Fragmente lassen sich also auf diese Weise entsprechend ihrer Länge auftrennen. Die Gele befinden sich hierzu meist in wässrigen Puffer-(Elektrolyt-) Systemen. Mit derartigen Methoden werden alle Längenunterschiede der DNA (und RNA) darstellbar. Unterschiedliche Medien haben unterschiedliche Trennbereiche (Standard-Agarosegele 500 -25000 Basen, verschiedene Polyacrylamidgele von 1 -1500 Basen).

Die Darstellung der DNA-Fragmente im Gel erfolgt in aller Regel durch Anfärbung mit Ethidiumbromid. Dieser Fluoreszenz-Farbstoff interkaliert. Unter Interkalation versteht man eine spezifische Wechselwirkung von flachen Farbstoffmolekülen, die ungefähr die Größe eines Basenpaares besitzen. Das Farbstoffmolekül schiebt sich zwischen zwei benachbarte Basenpaare der DNA-Doppelhelix und bildet einen relativ stabilen Komplex. Durch die eingestrahlte Energie in Form von UV-Licht werden Elektronen des Moleküls derart angeregt, dass sie auf ein höheres Energieniveau gehoben werden (Anregungswellenlänge 302 nm). Beim Zurückfallen in den Grundzustand wird ein Teil der Energie in Form von sichtbarem Licht (Fluoreszenz) wieder abgegeben (Emissionswellenlänge 590 nm).

Sicherheitshinweis: Aufgrund der Affinität zur DNA und wegen der hohen Mutagenität (Schädigung des Erbguts) ist direkter Kontakt mit Ethidiumbromid (Resorption über die Haut, durch Einatmen oder Verschlucken des Feststoffs oder in Lösung) unbedingt zu vermeiden.

Im Laboralltag kann die DNA nach der Elektrophorese direkt im Gel fixiert oder auf eine Membran übertragen werden (sog. *Southern-Blot*-Verfahren, s. Abbildung 6). Bei diesem Verfahren wird der DNA-Doppelstrang durch Behandlung zum Beispiel mit einem alkalischen Reagens in seine Einzelstränge zerlegt (Denaturieren). Um in der Vielzahl der Fragmente diejenigen sichtbar zu machen, die bestimmte einfach repetitive Regionen enthalten, wird eine Sonde (DNA-Einzelstrang), die komplementär zu den Zielregionen ist, zu dem Gel gegeben. Diese Sonden müssen vorher markiert werden, um sie nach der Anlagerung an die DNA nachweisen zu können. Die Markierung erfolgt meist noch mittels radioaktiver Phosphorisotope (^{32}P). Es existieren mittlerweile vermehrt nicht-radioaktive Verfahren, die auf der Basis von Farbreaktionen oder Chemolumineszenz arbeiten. Die

markierten Sonden lagern sich während der sog. Hybridisierung an die ihnen komplementären Stellen der DNA an. Danach wird überschüssiges Sondenmaterial durch mehrmaliges Waschen entfernt. Anschließend werden die Stellen, an denen sich die Sonde angelagert hat, mittels einer -für die jeweilige Markierung spezifischen Methode - nachgewiesen. Dies geschieht im Fall der radioaktiven Markierung durch das Auflegen eines Röntgenfilms, der an diesen Stellen durch die radioaktive Strahlung der gebundenen Probe geschwärzt wird (Autoradiographie). Dadurch entsteht auf dem Film ein eventuell komplexes Bandenmuster (s. Abbildung 6). Bei der Wahl geeigneter Kombinationen von Restriktionsendonuklease und Sonde stellen die erhaltenen Bandenmuster einen oder mehrere (Gen-)Orte dar (s. theoretische Erläuterungen am Ende des Praktikums). Im Vorgriff seien nur folgende Grundtatsachen erwähnt: Man kann Sonden verwenden, mit denen viele Gen-Loci gleichzeitig (Multi-Locus Sonden) oder nur ein einzelner Locus (Einzel-Locus Sonden) nachgewiesen wird. Das Vielbandenmuster reduziert sich dann auf höchstens zwei Banden pro Individuum, wobei eine Bande einem der beiden väterlichen und die andere einem der beiden mütterlichen Genorte (Allele) entsprechend muss. Auch solche Systeme können hochvariabel sein.

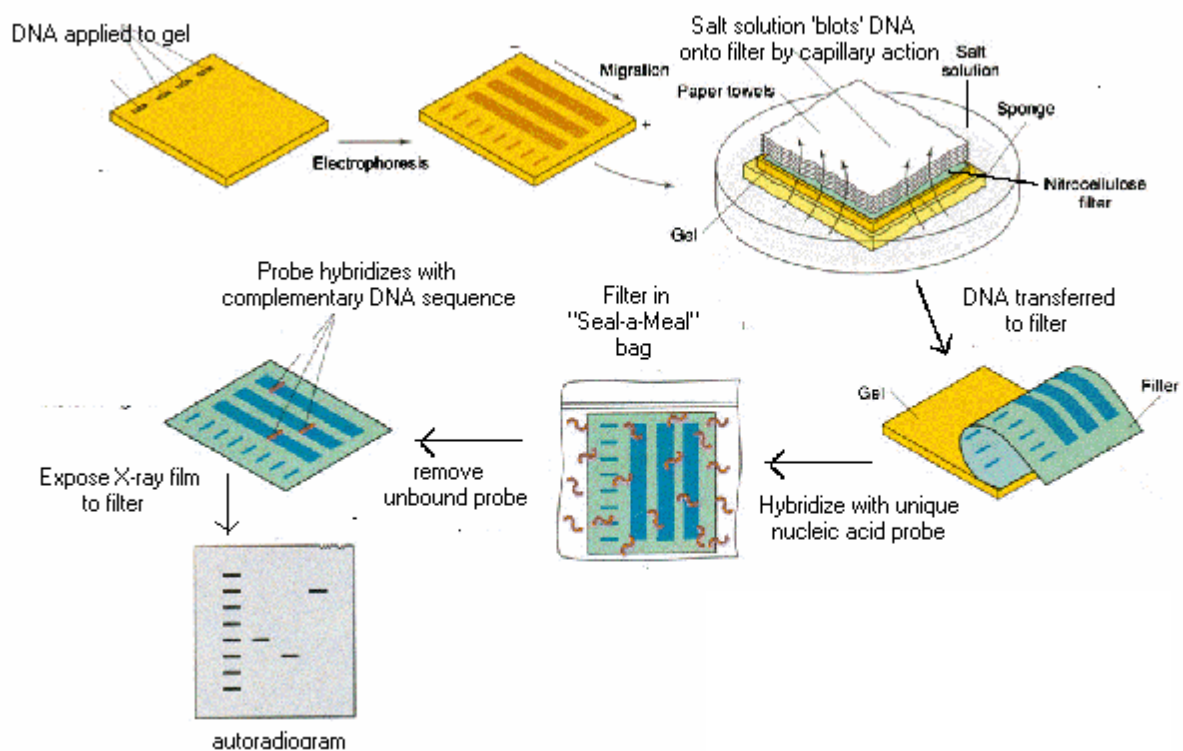


Abb. 5: Schematische Darstellung der ‚Southern-Blot‘-Hybridisierung

Verschieden lange DNA-Fragmente werden gelelektrophoretisch gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt: kurze Fragmente laufen schneller durch die Gelmatrix, lange DNA-Moleküle langsamer. Mittels sequenzspezifischer Sonden werden aus der Vielzahl der möglichen nur einzelne DNA-Fragmente an ihrer charakteristischen Wanderungsposition im Gel dargestellt.

Begriffe und Techniken

Allel Zustandsform eines Gens oder eines DNA-Locus; Allele stammen von einem genetischen Locus und unterscheiden sich in ihrer DNA-Sequenz

Assoziation statistisch signif. gehäuftes, gemeinsames Auftreten zweier Merkmale

DNA-Diagnostik Gesamtheit molekulargenetischer Untersuchungsverfahren (mit Sonden, Markern, Sequenzierungen über Gelelektrophorese, Hybridisieren)

direkte DNA-Diagnostik Analyse eines (Teils eines) Gens in seiner Sequenz

indirekte DNA-Diagnostik Analyse des Phänotyps/ Krankheitslokus über gekoppelte DNA-Marker

DNA-Marker DNA-Sequenz bekannter Lokalisation im Genom

DNA-Profil Darstellung einzelner hypervariabler DNA-Loci (auch in Kombination) zur genetischen Differenzierung

Genetische Kopplung Tendenz, dass Allele von benachbarten Loci in einem Chromosom gemeinsam vererbt werden. Loci mit einer meiotischen Rekombinationsrate von weniger als 0,5 werden als gekoppelt bezeichnet

Genetischer Fingerabdruck mittels Multilokus-Sonden molekulargenetisch erzeugtes Strich- bzw. Bandenmuster zur Darstellung der genetischen Individualität

Genotyp genetische Information von einem Locus, einer Gruppe v. Loci oder des gesamten Genoms

Hypervariabilität extrem hohes Ausmaß an Polymorphie

Keimbahn Zelllinie, die Keimzellen hervorbringt

Klon eine Zellpopulation, die aus **einem** gemeinsamen Vorläufer hervorgeht

Kopplungsungleichgewicht auf Kopplung beruhende allelische Assoziation

Locus (Plural Loci) physikalische Position eines Erbmerkmals in einem Chromosom oder in einer genetischen Karte

Mikrosatelliten-DNA in tandem sich wiederholende, simple repetitive DNA-Motive einer Grundeinheit von 1 bis 6 Basen; ab einer bestimmten Länge meist polymorph

Minisatelliten-DNA in tandem sich wiederholende, repetitive DNA-Motive einer Grundeinheit von 10 bis 100 Basen; ab einer bestimmten Länge hypervariabel

Oligonukleotid chemisch synthetisierter DNA-Einzelstrang von wenigen bis ca. 30 oder mehr Basen

Palindrom in tandem angeordnete, komplementäre DNA-Sequenzen, die entweder unmittelbar hintereinander geschaltet sind oder durch wenige Nukleotide getrennt sind; Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen sind zumeist palindromisch

(z.B. 5'-GAATTC-3' für Restriktionsenzym *EcoRI*)
3'-CTTAAG-5'

Phänotyp beobachtbare Eigenschaften eines Organismus (außer DNA), die aus der Interaktion von Erbe und Umwelt resultieren

Polymerasekettenreaktion (PCR) molekulargenet. Verfahren zur DNA-Vervielfältigung *in vitro* mithilfe von bekannten, chemisch synthetisierten Primern und (thermostabiler Taq) DNA-Polymerase durch 20-30 der folgenden Temperaturzyklen:

- 1 DNA denaturieren (95°C),
- 2 spezifische Primeranlagerung an komplementäre DNA-Sequenzen (z.B. 60°C),
- 3 DNA-Synthese (72°C)

Polymorphismus gleichzeitiges Auftreten von mindestens 2 verschiedenen Allelen an einem Locus mit jeweils >1%iger Häufigkeit in der gegebenen Population

Primer Startmolekül für die DNA-Synthese des komplementären Strangs, welches an einzelsträngige Ziel-DNA oder -RNA bindet

Rekombination Austausch genetischen Materials zw. Chromosomen oder Chromatiden

Satelliten-DNA in tandem organisierte, hochrepetitive DNA, die sich aufgrund ihrer einheitlichen spezifischen Dichte vom Rest des Genoms durch Ultrazentrifugation abtrennen lässt

Selektion (umweltabhängige) differentielle, nicht zufällige Vermehrung von Individuen mit unterschiedlichem Phänotyp in einer Population

Sonde mit Reportermolekülen markierte Nukleinsäure mit bekanntem Sequenzinhalt, die aufgrund ihrer Komplementarität an bestimmte Zielsequenzen hybridisiert

Taq Polymerase wird zur *in-vitro* Vervielfältigung von DNA benutzt; ist vergleichsweise Hitze-resistent, da aus Bakterien isoliert, die in der Umgebung heißer Schwefelquellen vorkommen

Risiko für Thromboembolie bei Mutation im Faktor V-Gen (Faktor V-Leiden Mutation)

Thrombosen kommen bei ~1:1000 Personen pro Jahr vor. Die Faktor V-Leiden Mutation ist der häufigste genetisch bedingte Defekt, der mit venösen thromboembolischen Erkrankungen assoziiert ist. Faktor V ist an der Gerinnungs-Kaskade beteiligt und kann physiologischerweise durch aktiviertes Protein C (über proteolytische Spaltung des Faktors Va) inaktiviert werden. Die Mutation ‚Leiden‘ im Faktor V-Gen ist durch einen Nukleotid-Austausch verursacht, hierdurch kommt es zum Aminosäure-Austausch. Durch diese Veränderung wird die hemmende Aktivität des Proteins C auf den Faktor V herabgesetzt (aktivierte Protein C-Resistenz) und somit das Gleichgewicht zugunsten gerinnungsfördernder Reaktionen verschoben.

Etwa 5 % der westlichen Bevölkerung sind heterozygote Träger eines Faktor V-Leiden Allels, bei diesen Personen ist das individuelle Thromboserisiko bis 10-fach erhöht. Für homozygote Träger der Faktor V-Leiden Mutation ist das Risiko für Thrombosen sogar bis 100-fach erhöht. Orale Kontrazeptiva erhöhen zusätzlich das Thromboserisiko für mutations-betroffene Frauen. Eine Kombination der Faktor V-Leiden Mutation mit anderen genetisch bedingten Störungen (z.B. Prothrombin-Polymorphismen) kann das individuelle Thromboserisiko weiter steigern.

Bei folgenden Indikationen ist es sinnvoll, auf Faktor V-Leiden Mutation zu testen:

- Personen mit erhöhtem Thromboserisiko (positive Familienanamnese für Thromboembolien, zur Abklärung rezidivierender Thrombosen)
- Patientinnen mit thromboembolischen Komplikationen während der Schwangerschaft oder unter Einnahme oraler Kontrazeptiva.

Für Untersuchungen auf Leiden-Mutation im Faktor V Gen wird eine Blutprobe (EDTA-antikoaguliert) benötigt, aus der DNA extrahiert wird. Mittels PCR wird der Bereich des fraglichen Nukleotid-Austauschs im Faktor V Gen vervielfältigt und mit Restriktionsenzym X gespalten. Der Verdau findet nur statt, wenn das mutierte Allel **M** vorhanden ist, nicht im Normalfall (N) ohne Mutation.

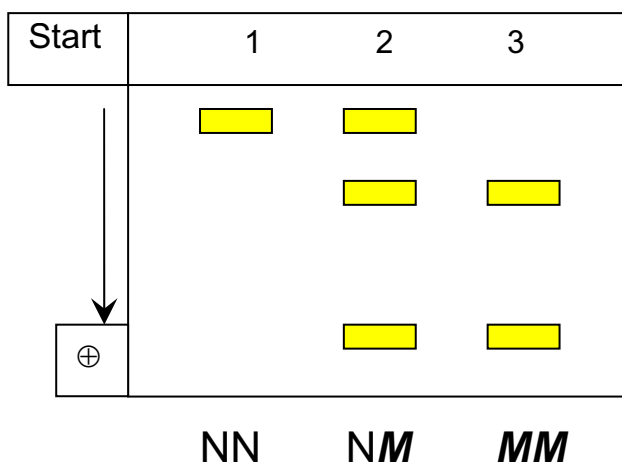


Abb. 6: Agarose-Gelabbildung mit drei verschiedenen DNA Fragmentmustern

Lernziele

1. Der Student soll Struktur, Eigenschaften und Funktion der DNA erläutern können sowie Grundprinzipien zur DNA-Isolierung kennen.
2. Es sollen ungefähre Größen, Aufbau und prinzipielle Funktionsweisen von Eukaryonten- und Prokaryonten-Genomen bekannt sein sowie deren prinzipielle Unterschiede.
3. Wesentliche Techniken der Nukleinsäure-Charakterisierung wie Gelelektrophorese, Restriktionsenzym-Spaltung der DNA, Southern Blot-Hybridisierung und allgemeine Prinzipien des Klonierens sowie der DNA-Sequenzanalyse sollen beschrieben werden können.
4. Der Student soll den Gen-Begriff sowie praktische Anwendungen von DNA-Tests erklären können.