

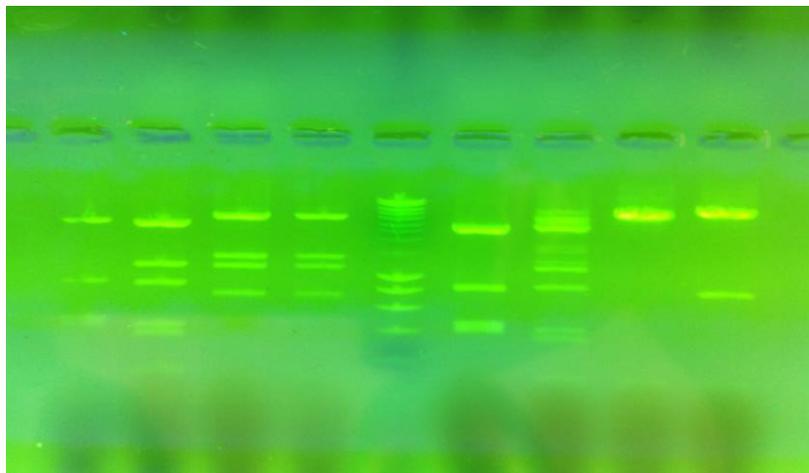
Themenkoffer: DNA

Eine Zusammenarbeit der Universität Freiburg
und dem Naturhistorischen Museum Freiburg

DNA in medizinischen Diagnosen

Protokoll für SchülerInnen

Léonard Cardinaux, Adrien Pairraud, Marie-Pierre Chevron



Überarbeitung : Luc Le Grand Catherine Pfister Aspert, Lisa Schild,
Dank : D^r Peter Wandeler, Jean-Christophe Lallement

INHALT

Dieses molekularbiologische Experiment dient der Illustration der Themen DNA, Erbgut, Weitergabe von genetischen Merkmalen und Restriktions-Enzyme und demonstriert die klassische RFLP-Technik (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus).

Die dazu gehörenden Unterlagen beinhalten die Anleitung der Arbeitsschritte und geben die Möglichkeit, Kenntnisse in folgenden Bereichen zu vertiefen: DNA, Restriktions-Enzyme, Anwendungen des Restriktions-Polymorphismus.



ANLEITUNG

Arbeitsblatt 1 : RFLP, Allgemeines Prinzip

Arbeitsblatt 2 : Material und Sicherheit

Arbeitsblatt 3 : Versuchsprotokoll



RESULTATE UND ÜBERLEGUNGEN

Arbeitsblatt 4 : Aufgaben



THEORIE

Arbeitsblatt 5 : Restriktionsenzyme und RFLP

Arbeitsblatt 6 : Elektrophorese in Agarose-Gel

Arbeitsblatt 7 : Duchenne-Muskeldystrophie

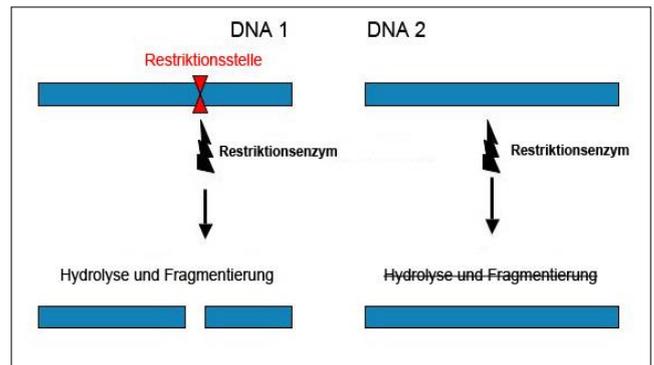


Vergleich von polymorpher DNA

Zwei DNA-Proben werden verglichen, um herauszufinden, ob sie sich in ihren Nukleotidsequenzen unterscheiden. Diese Analyse kann mit Proben von allen lebendigen Organismen durchgeführt werden. DNA-Vergleiche macht man beispielsweise bei einem Gen-Test zur Erforschung einer Krankheit, um Spuren eines Verbrechens zu untersuchen, um zwei Spezies (Tiere, Pflanzen, Bakterien, ...) zu vergleichen, usw.

Enzymatische Verdauung

Die enzymatische Verdauung ist eine Technik, welche mittels Restriktionsenzymen DNA in Stücke schneidet. Ein Restriktions-Enzym erkennt eine bestimmte kurze DNA-Basen-Sequenz (Restriktionsstelle) und hydrolisiert diese, wobei jede Enzym-Art eine eigene Erkennungssequenz hat. Wenn also ein Restriktionsenzym zur DNA gegeben wird, so "sucht" es die Stellen, auf die es programmiert ist, und trennt die DNA an diesen Stellen durch.



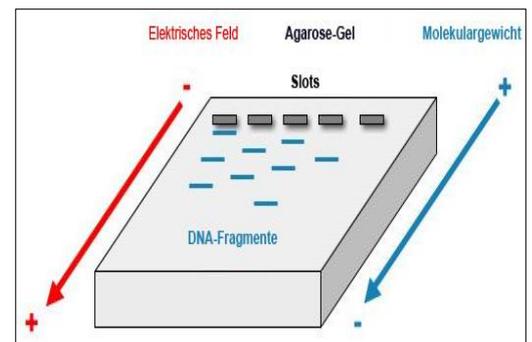
Wenn die DNA keine solche spezifische Stelle hat, bleibt sie intakt.

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

Siehe Arbeitsblatt 5

Migration durch Elektrophorese

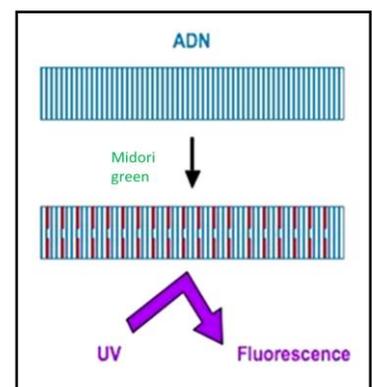
Die Fragmente, welche man durch die enzymatische Hydrolyse erhalten hat, werden in ein Agarosegel gegeben und einem elektrischen Feld ausgesetzt. Darin bewegen und positionieren sie sich in Abhängigkeit von ihrem molekularen Gewicht (kleine Fragmente wandern schnell, große langsam). Die Beigabe eines blauen Farbstoffs zur DNA-Fragmente-Lösung erhöht die Dichte der Lösung, damit sie einfacher eingefüllt werden kann und visualisiert durch die Farbe die Bewegung der Fragmente im Gel.



Siehe Arbeitsblatt 6

Visualisierung der Fragmente

Die DNA-Fragmente sind für das bloße Auge nicht sichtbar. Um sie nach der Wanderung erkennbar zu machen, wurde dem Gel eine chemische Verbindung (Midori Green) beigegeben, welches an der DNA anhaftet und im UV-Licht fluoresziert. Es können auch andere Farbmarker verwendet werden.

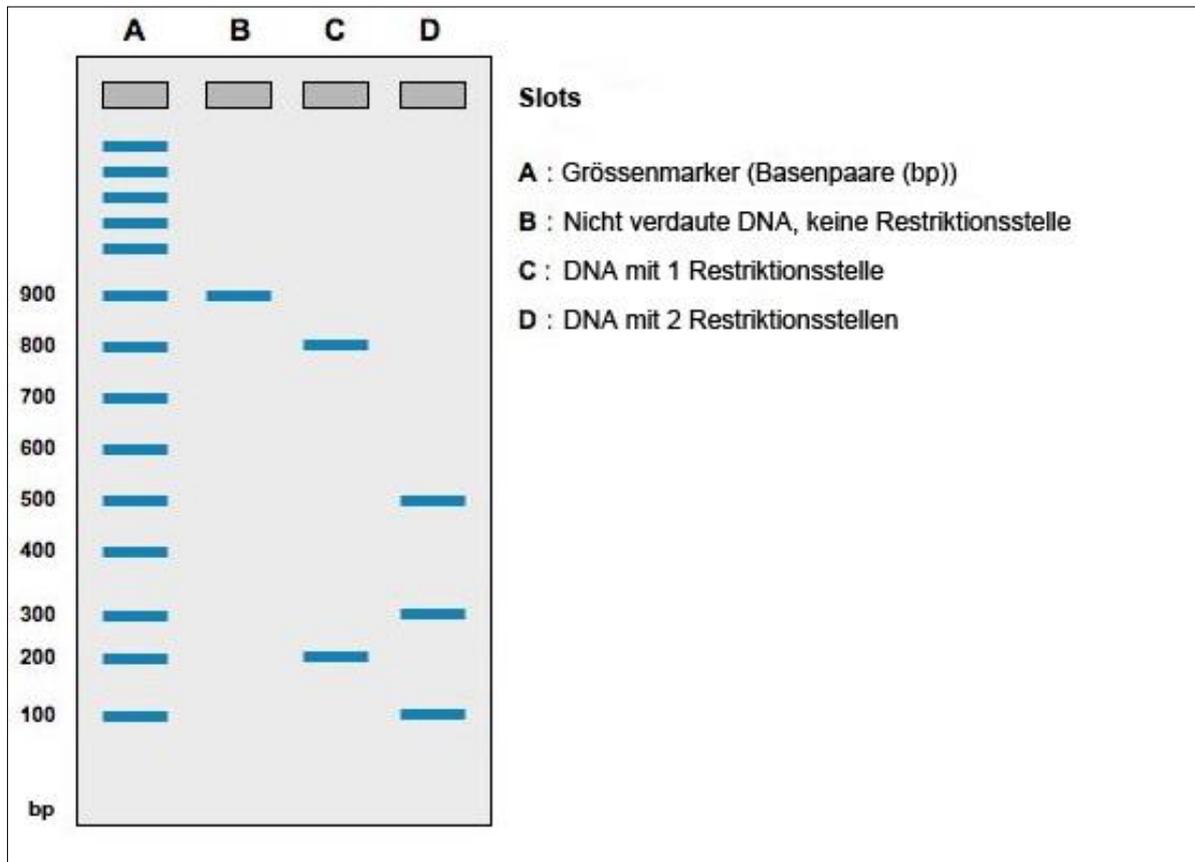


Analyse der Ergebnisse

Am Schluss liegen die Resultate in Form einer Fotografie vor, welche die im UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden zeigt.

Eine ungeteilte DNA-Probe erscheint als einzelnes Band. Eine hydrolisierte Probe zeigt zwei oder mehrere Stücke unterschiedlicher Grösse auf, je nachdem, wie viele Restriktionsstellen sie enthält.

Die Grösse der DNA-Stücke wird im Vergleich mit einem Referenzmarker, der aus DNA-Fragmenten mit bekannter und standardisierter Grösse besteht, bestimmt.





1. Sicherheit und Verhalten im Labor

Die Arbeit an den Experimenten dieses Lehrkoffers erfordert Disziplin, Vorsicht und striktes Einhalten der Hygiene- und Sicherheitsregeln. Folgende Anweisungen sind zu beachten:

- ✓ Labormaterial ist empfindlich und teuer.

Mit grösster Sorgfalt behandeln, vor allem Zentrifugen, Mikropipetten und Elektrophorese-Generatoren.

- ✓ Biologisches Material ist empfindlich auf Temperatur und Verunreinigungen.

Für Sauberkeit von Arbeitsflächen, Händen und Instrumenten sorgen.
Insbesondere für die Lagerung der Enzyme: Temperatur-Angaben beachten.
Alle Behälter klar beschriften: Inhalt, verantwortliche Person.

- ✓ Gewisse Apparate und Produkte sind gefährlich.

Latex-Handschuhe tragen, insbesondere bei der Arbeit mit dem Gel, welches Midori Green (krebserregend) in hoher Konzentration enthält.

UV-Strahlen können schwere Verbrennungen verursachen. Wer direkter Strahlung ausgesetzt ist, muss sich mit Handschuhen schützen.

Für die Arbeit mit Midori Green muss ein spezieller Arbeitsbereich eingerichtet werden. Insbesondere muss saugfähiges Papier unter den Elektrophorese-Gefässen ausgelegt werden. Vor dem Einräumen des Materials in den Koffer muss alles (Gefässe, UV-Kammer,...) gründlich gereinigt werden, um alle Spuren von Midori Green zu beseitigen.

Bei Unsicherheiten immer nachfragen !

2. Material

Labormaterial:

Micropipetten
Zentrifuge
Microtubes-Halter
Inkubator
Präzisionswaage
Mikrowellen-Ofen
Gel-Giessform und Kamm
Elektrophoresegefäss und -generator
Erlenmeyer-Kolben und Reagenzglas
UV oder LED-Kammer

Reagenzmittel und Verbrauchsmaterial:

Pipetten-Spitzen
Microtubes
Steriles destilliertes Wasser
TAE Buffer (Tris-Acetat, EDTA)
Agarose
Midori Green
Ladepuffer
Grössenmarker
Verdauungspuffer
Latex-Handschuhe

Biologisches Material:

DNA-Proben und Restriktionsenzyme PstI und XhoI



1. Enzymatische Verdauung

✓ Pro Gruppe :

1. 1x DNA1-Referenz 16 µl ; 1x DNA2-Embryo 16 µl
2. 1 x PstI 2 µl ; 1x XhoI 2 µl
3. Verdauungsbuffer 10 µl
4. Steriles H₂O

Die in der folgenden Tabelle aufgeführten Mischungen mit Hilfe einer Mikropipette in Microtubes erstellen. Die Spitze nach jedem Pipettieren auswechseln.

Die Volumenangaben ganz genau einhalten!

Probe	DNA	H2O	Buffer	Enz. PstI	Enz. XhoI	Tot Vol.
Pst_1	8 µl DNA1	9 µl	2 µl	1 µl	-	20 µl
Pst_2	8 µl DNA2	9 µl	2 µl	1 µl	-	20 µl
Xho_1	8 µl DNA1	9 µl	2 µl	-	1 µl	20 µl
Xho_2	8 µl DNA2	9 µl	2 µl	-	1 µl	20 µl

- ✓ Kurz zentrifugieren und die Proben bei 37°C während 20 – 45 Minuten inkubieren.

2. Zubereitung des Agarose-Gels – HANDSCHUHE OBLIGATORISCH

- ✓ Auf der Präzisionswaage Agarose abwiegen.
- ✓ Buffer TAE 1X abmessen.
- ✓ Im Erlenmeyer-Kolben Agarose und TAE mischen, dann das Gemisch im Mikrowellen-Ofen zum Sieden bringen (ACHTUNG, GEFAHR VON HEISSEN SPRITZERN!).
- ✓ Das Gemisch 2 Minuten abkühlen lassen, dann Midori Green hinzufügen (Handschuhe nicht vergessen!).
- ✓ Die Mischung vorsichtig in die Giessform umfüllen, ohne Luftblasen zu verursachen, Kamm befestigen und in Ruhe polymerisieren (fest werden) lassen. Sobald das Gel fest ist, kann es transportiert werden. Es kann bedeckt von einer Plastikfolie bei 4°C aufbewahrt werden. (Nie in einem Kühlschrank mit Esswaren lagern!)

Benötigte Mengen (hängt von der Grösse der Gel-Giessform ab):

Gel-Giessform	Agarose	TAE 1X	Midori Green
100 ml	0.65 g	100 ml	10 µl
80 ml	0.55 g	80 ml	8 µl
60 ml	0.4 g	60 ml	6 µl
50 ml	0.35 g	50 ml	5 µl
20 ml	0.15 g	20 ml	2 µl

3. Einfüllen der Proben und Elektrophorese – HANDSCHUHE OBLIGATORISCH

- ✓ Den Kamm sorgfältig aus dem verfestigten Gel ziehen – es entstehen Aussparungen im Gel, diese werden Taschen oder Slots genannt.
- ✓ Das Gel in das Elektrophoresengefäß legen.
- ✓ Das Gel mit TAE 1X bedecken (ca. 500 ml).
- ✓ Die verdauten Proben aus dem Inkubator nehmen und jeder Probe 4 µl Ladepuffer beifügen, kurz zentrifugieren.
- ✓ Vorsichtig 5 µl Grössenmarker in den ersten Slot pipettieren.
- ✓ Vorsichtig 20 µl der Probe in die Slots pipettieren, je ein Slot pro Probe. Dabei nach jeder Probe die Pipettenspitze wechseln.
- ✓ Das Elektrophoresengefäß schliessen und am Generator anschliessen (der negative Pol (schwarz) muss auf der Seite der Slots angeschlossen werden).
- ✓ Das Gel 30 Minuten bei 100 V wandern lassen (die Amperezahl wird automatisch geregelt).

4. Visualisierung der Fragmente – HANDSCHUHE OBLIGATORISCH

- ✓ Den Generator ausschalten und den Deckel des Gefäßes entfernen.
- ✓ UV-Kammer: Das Gel in der Form aus dem Gefäß nehmen, abtropfen lassen, in die UV-Kammer legen und fotografieren.
- ✓ LED-Lampe: Das Gel im Elektrophoresen-Bad lassen und den LED-Deckel darauf legen und anschalten, fotografieren.

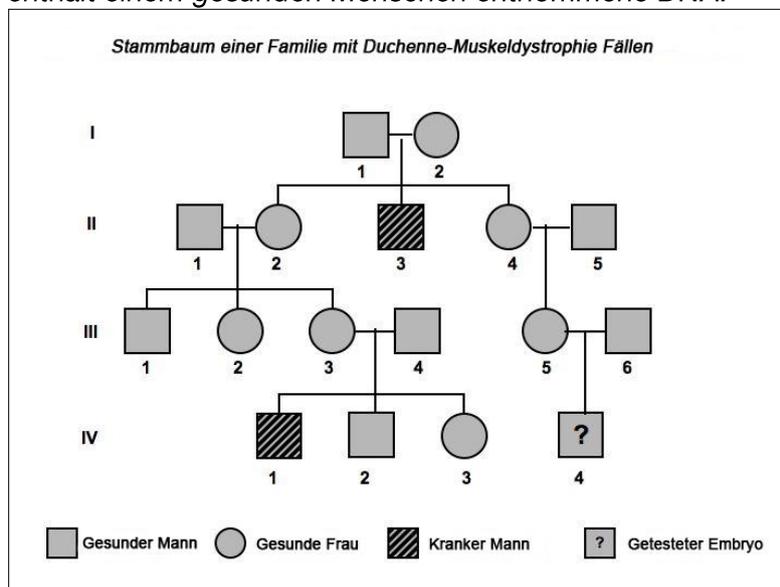


Klinischer Fall : Gentest zur Erkennung der Duchenne-Muskeldystrophie

Ein Paar (III 5 & III 6) geht bei der ersten Schwangerschaft der Frau zum Arzt, um zu erfahren, ob ihr Kind von Duchenne-Muskeldystrophie betroffen ist. Die Krankheit trat in der Familie der Mutter über mehrere Generationen mehrfach auf; der Muskelschwund, den diese unheilbare Krankheit mit sich bringt, führt zu schwersten Behinderungen und zum Tod (Arbeitsblatt 7).

Zuerst wird der Stammbaum (siehe Bild unten) erstellt, dann das Fruchtwasser untersucht, um das Geschlecht des Embryos zu bestimmen und seine DNA für einen Gentest zu entnehmen.

Die dem Embryo entnommene DNA entspricht der Probe « DNA2 » in diesem Experiment. Probe « DNA1 » enthält einem gesunden Menschen entnommene DNA.



F1 : Mit Hilfe des Stammbaums und Blatt 7 "Duchenne-Muskeldystrophie":

- Beschreiben Sie die Hauptsymptome der Krankheit.
- Geben Sie an, wie sie weitervererbt wird (dominant/rezessiv; autosomal/gonosomal).
- Welche Rolle spielt das DMD-Gen beim Funktionieren der Muskeln?
Die Informationen müssen durch mindestens zwei verschiedene Quellen bestätigt werden. Notieren Sie die Quellen.

F2 : Vor der enzymatischen Verdauung waren mehrere experimentelle Schritte nötig. Welche?

F3 : Präzisieren Sie mit Hilfe von Blatt 6 "Elektrophorese in Agarose-Gel":

- Wie ist die elektrische Ladung der DNA im Elektrophoresegefäß?
- Welcher Faktor bestimmt die Geschwindigkeit, mit welcher die DNA-Fragmente im Agarose-Gel wandern?

F4 : Die folgende Tabelle zeigt die Restriktions-Stellen, die theoretisch für die normalen und mutierten Allele des DMD-Gens zu erwarten sind. Geben Sie das zu erwartende Restriktionsprofil (Anzahl der Banden) für die unten aufgeführten Situationen an.

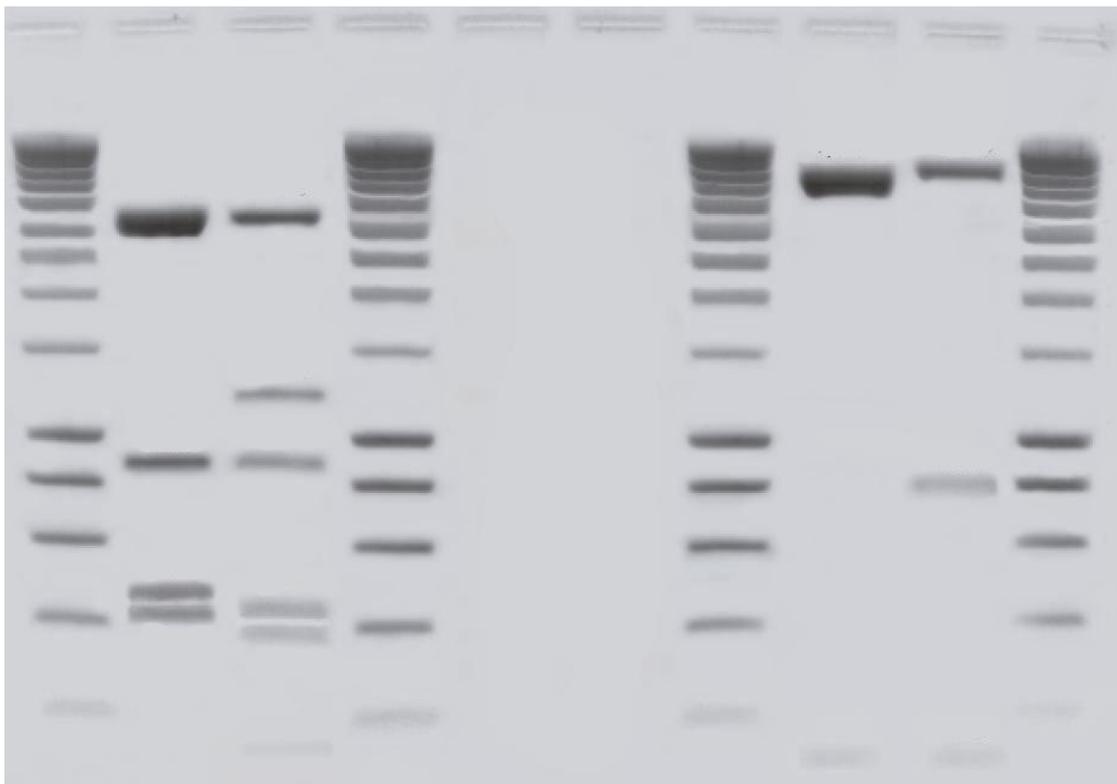
	Normales Allel	Pathologisches Allel
PstI	2	3
XhoI	0	1

F5 : Die Fotografie unten zeigt die Resultate, welche Sie bei der Visualisierung der Fragmente erhalten haben.

Beschriften Sie die Abbildung sorgfältig mit der Bezeichnung der Probe, dem benutzten Enzym und der Grösse der verdauten Fragmente.

Können Sie die sichtbaren Unterschiede zwischen den Restriktionsprofilen beider Allele ausfindig machen?

Was schliessen Sie bezüglich des proportionalen Risikos, dass das zukünftige Neugeborene an Duchenne-Muskeldystrophie erkrankt?





Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonukleasen, welche jedes DNA-Molekül an spezifischen Stellen schneiden. Diese Stellen nennt man Restriktionsstellen, und sie entsprechen kurzen spezifischen Nukleotid-Sequenzen von 4 bis 8 Nukleotiden.

Beispiele von Restriktionsstellen

PstI

5' ...CTGCA▼G... 3'
3' ...G▲ACGTC... 5'

XhoI

5' ...C▼TCGAG... 3'
3' ...GAGCT▲C... 5'

Die ersten Restriktionsenzyme wurden vom Schweizer Werner Arber 1962 entdeckt. Er zeigte, dass diese Enzyme dem Immunsystem von Bakterien dienen, sich gegen Viren (Phagen) zu verteidigen. Jedes Enzym kann die DNA von Phagen an einer bestimmten Restriktionsstelle schneiden.

1970 isolierte der Amerikaner Hamilton O. Smith zum ersten Mal ein Restriktionsenzym (HaeI) aus der Bakterie Haemophilus influenzae. Im darauf folgenden Jahr setzte es sein Landsmann Daniel Nathans zum Aufschneiden der DNA des Virus SV40 ein. Diese drei Forscher erhielten 1978 den Nobelpreis für Medizin.

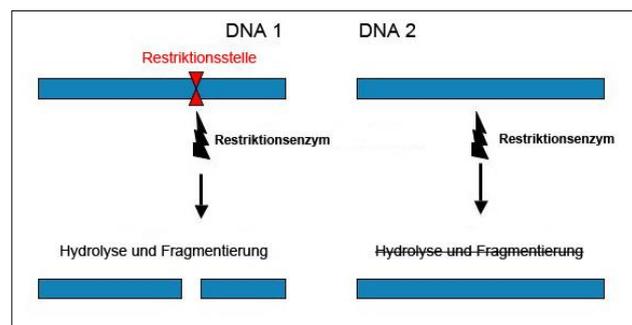
Seitdem wurden etwa hundert Restriktionsenzyme isoliert, regelrechte Molekular-Scheren, welche es erlauben, DNA beliebig zu schneiden, wodurch in der Gentechnik eine bemerkenswerte Anzahl Methoden entwickelt werden konnten. Unter diesen haben die RFLP-Techniken einen hohen Stellenwert

Restriktionspolymorphismus, RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restriktionspolymorphismen basieren auf spezifischen Eigenschaften von Restriktionsenzymen. Diese schneiden gleichermassen kodierende und nichtkodierende DNA, wo sie spezifische Restriktionsstellen erkennen, welche in kleinerer oder grösserer Zahl vorkommen können. Die kleine Grösse der Restriktionsstellen und ihre grosse Anzahl in einem Genom machen sie besonders empfindlich für jegliche Veränderung der Nukleotidsequenz: Mutationen durch Deletion, Insertion, Translation von Chromosomen.

Restriktionsenzyme werden also dafür gebraucht, Polymorphismen in DNA-Proben eines Genoms, eines isolierten Gens, eines Plasmids etc. sichtbar zu machen.

Die RFLP-Methode allein oder kombiniert mit anderen Techniken, hauptsächlich PCR und Hybridisierung, wird dazu benutzt, Arten, Varietäten und Individuen zu identifizieren. Durch RFLP können molekulare Stammbäume erstellt, gewisse genetische Krankheiten diagnostiziert, die Abstammung bestimmt oder bei kriminalistischen Untersuchungen der oder die Schuldige erkannt werden.



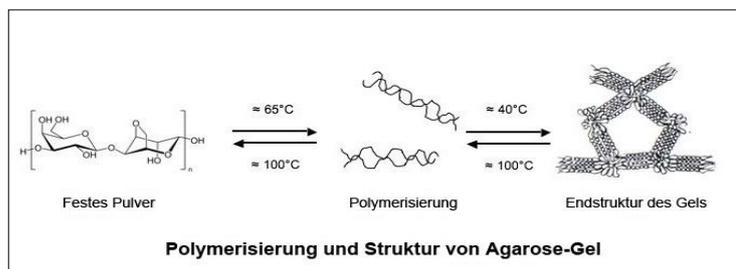


Mit dieser Methode können lineare DNA-Fragmente nach ihrem Molekulargewicht auseinander getrieben werden, indem man sie in porösem Gel einem elektrischen Feld aussetzt.

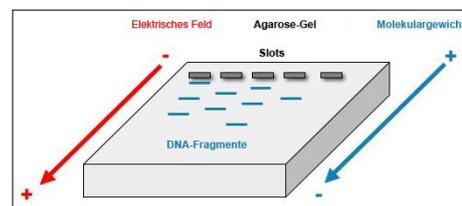
Das DNA Molekül ist ein Polynukleotid, jedes Nukleotid ist aus drei Bestandteilen aufgebaut: der Desoxyribose, der Nukleobase und dem Phosphatrest (H_2PO_4 , welches sich zu PO_4^{2-} ionisieren kann).

In basischem Milieu (der TAE-Puffer hat einen pH-Wert von gegen 8) lädt sich die DNA negativ ($H_2PO_4 \rightarrow 2 H^+ + PO_4^{2-}$) und wird zur Polyanion-Kette. Die elektrische Ladung ist gleichförmig, die Moleküle migrieren daher in Richtung Anode, darum werden die Slots auf der Seite der Kathode eingefüllt.

Agarose ist ein gelbildendes Polymer auf der Basis von purifiziertem Agar-Agar, welches im Wesentlichen aus nicht-verzweigt-kettiger Galactose besteht. Agarose wird aus der Zellwand bestimmter Rotalgen gewonnen. In weniger reiner Form wird sie zur Fabrikation von Chemischen Milieus für in vitro Kulturen und als Lebensmittelzusatzstoff (E406) verwendet.

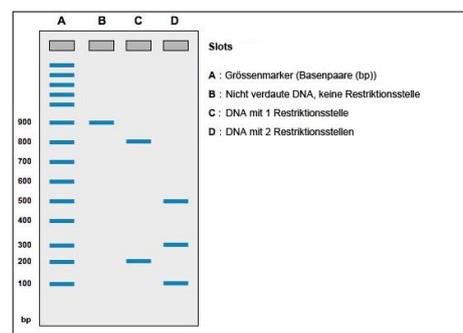


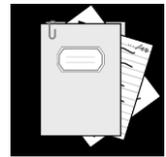
Die DNA-Migration unter Einfluss des elektrischen Feldes findet in der Schicht des porösen Agarose-Gels statt, worin die DNA platziert wurde. Die Poren des Gels wirken wie ein Sieb, welches die Wanderung der DNA-Fragmente bremst. Der Widerstand des Gels zur Wanderung der Fragmente ist proportional zu deren Größe; die kleinsten Fragmente wandern am schnellsten und somit am weitesten.



Die Agarose-Konzentration im Gel beeinflusst dessen Auflösung. Je konzentrierter die Agarose ist, umso besser werden kleine oder winzige, nur aus einigen Nukleotiden bestehende Fragmente, getrennt. Bei ungenügender Auflösung (zu wenig Agarose oder zu viel DNA) erhält man in der Regel eine Schliere („smear“). Die übliche Auflösungsgrenze liegt ungefähr bei 300Bp. Für feinere Trennungen werden im Allgemeinen Polyacrylamid-Gele verwendet.

Man kann erkennen, dass Dicke und Leuchtkraft der auf dem elektrophoretischen Profil visualisierten Streifen mit der Distanz zu den Slots abnehmen. Dies hängt mit bestimmten Eigenschaften von Midori Green zusammen: Es reagiert fluoreszierend auf UV-Strahlung und fixiert sich zwischen den DNA-Basen. Die Menge an Midori Green in jedem Streifen ist proportional zur Anzahl Nukleotiden der DNA, auf welchem es fixiert ist. Die Dicke und Leuchtkraft der Elektrophorese-Streifen, wie sie im UV/LED-Licht erscheinen, ist somit proportional zur Größe der DNA-Fragmente: die grössten Fragmente wandern am wenigsten weit.





Symptome

Die von Guillaume Duchenne 1858 beschriebene Krankheit kommt durch fortschreitenden Muskelschwund zum Ausdruck. Massgeblich betroffen sind Herz- und Atemmuskulatur, und so sind die häufigsten Todesursachen Herz- oder Atemstillstand.

Symptome treten vor dem 5. Lebensjahr auf: symmetrische Muskelschwäche, Hypertrophie der Waden. Spätestens mit 13 Jahren können die Betroffenen nicht mehr laufen.

Die Ursache für diese Symptome ist ein Dystrophin-Mangel im Muskelgewebe. Dieses Protein ist unter der Membran der Muskelzellen lokalisiert und sorgt normalerweise dafür, dass Muskeln bei Belastung erhalten bleiben, indem es den Aufbau der Muskelfasern erhält. Als Bindeglied zwischen extrazellulären Proteinen und Aktin, einem Protein des intrazellulären Zytoskeletts, stabilisiert es Protein-Komplexe von Muskelzellen.

Genetik

Es handelt sich um eine Mutation auf dem Chromosom X, weshalb vor allem Männer von dieser Krankheit betroffen sind, da sie nur ein X-Chromosom besitzen. Frauen sind normalerweise nur gesunde Trägerinnen der Krankheit, können die Krankheit in seltenen Fällen doch ausbilden (wegen Translokationen in den Chromosomen).

Auch wenn die Mutation einfach genetisch zu diagnostizieren ist, ist die Duchenne-Muskeldystrophie eine recht häufige Krankheit (1 von 3000 Knaben-Geburten), da das betroffene Gen sehr gross und somit anfällig auf Mutationen ist.

Die Krankheit ist auf Mutationen des Gens DMD, welches das Dystrophin codiert, zurückzuführen. Dieses Gen liegt auf dem Locus 21.1 des X-Chromosoms und ist 2,4 Mb lang. Es kodiert eine 14 kb lange mRNA. Diese enthält 79 Exone und 7 alternative Promotoren. Durch alternatives Spleissen können aus diesem Gen 7 verschiedene Isoformen von Dystrophin exprimiert werden. Je nach Zelltyp wird ein anderer Promotor exprimiert. Das entstehende Protein hat eine Masse von ungefähr 427 kDa.

Die für die Funktions-Anomalien verantwortlichen genetischen Veränderungen sind Deletionen (65%), Duplikationen (6%) und seltener Substitutionen eines einzelnen Nukleotids, Insertionen und Spleiss-Fehler.

Führen diese Mutationen zu einem Komplettausfall der Dystrophin-Produktion, spricht man von der schweren Krankheit Duchenne-Muskeldystrophie (DMD). Dafür sind Mutationen nötig, welche ein frühes STOP-Codon in der mRNA-Sequenz generieren, was zu einer totalen Unterbindung der Proteinproduktion führt.

Einige Mutationen sind weniger radikal und erlauben das Ablesen der DNA zu einer mRNA, welche als Plan für ein etwas verkürztes und nur teilweise funktionelles Protein führt. Hier spricht man von der Krankheit Becker-Muskeldystrophie (BMD), einer weniger gravierenden Form der Duchenne-Muskeldystrophie.

Beispiel eines BMD-Patienten mit einer Deletion von 70% des DMD-Gens: Diese grosse Deletion führt nicht zu einem vorzeitigen Stop-Codon, weshalb die mRNA abgelesen werden kann und ein zwar sehr kurzes, aber funktionelles Protein produziert wird, da die wichtigen Regionen des Proteins noch intakt sind.

Behandlung und Erkennung

Bis heute kann diese Krankheit nicht geheilt werden. Mit palliativen Therapien kann sie jedoch verlangsamt werden: Muskelrehabilitation, Beatmung und evtl. Operationen. Die Lebenserwartung eines betroffenen Menschen beträgt zurzeit 20 – 30 Jahre.

Die Diagnose wird oft im Alter von 2 – 3 Jahren gestellt, beim Auftreten der ersten klinischen Symptome. Üblicherweise wird eine Muskelbiopsie durchgeführt, das Blutbild analysiert und ein Elektrokardiogramm erstellt.

Bei Risikoschwangerschaften (Präzedenzfälle in der Familie oder bereits ein krankes Kind), wird geraten, eine Amniozentese (Fruchtwasseruntersuchung) und einen genetischen Erkennungstest durchzuführen, um zu bestimmen, welches Geschlecht das Kind hat und ob es von der Gen-Anomalie, welche zu der Krankheit führt, betroffen ist. In diesem Fall ist es möglich, einen therapeutischen Schwangerschaftsabbruch anzuwenden. Bei dieser Methode spricht man von Präimplantationsdiagnostik (PID), was heute (2015) in der Schweiz verboten ist. Die Schweizer Stimmberechtigten stimmten am 14. Juni 2015 mit 62 % Ja-Stimmen in einer Volksabstimmung einer Verfassungsänderung zu, die die Voraussetzungen zur Zulassung der PID schaffen sollte. Gestützt darauf hat die Bundesversammlung bereits eine Gesetzesänderung beschlossen, wonach die PID zugelassen wird für Paare, die Träger von schweren Erbkrankheiten sind, und für Paare, die auf natürlichem Weg keine Kinder bekommen können.