

Versuch 8: Molekulare Medizin

Versuche:

1. **Regulation der Genaktivität am Beispiel des *lac Operons***
2. **DNA Isolierung**
3. **Molekulare Medizin: Analyse von Erbkrankheiten am Beispiel der cystischen Fibrose**

Wissensgebiete

DNA-Struktur, Replikation
Gen-Aufbau, Intron, Exon
RNA-Struktur, Transkription, reverse Transkription
tRNA-Struktur, Translation
rRNA-Struktur, Ribosomenstruktur
Genetischer Code
Eukaryontische und prokaryontische Transkriptionskontrolle
Mutationen
Enzym-Induktion und -Repression
Repressoren
Induktoren
Bakterienwand-Struktur und Biosynthese
Wirkung von Antibiotika auf Bakterienwandbiosynthese (Penicilin, Vancomycin)
Wirkung von Antibiotika auf Replikation (Novobiocin)
Wirkung von Antibiotika auf Transkription (Rifamycin und Actinomycin)
Wirkung von Antibiotika auf Translation (Streptomycin, Chloramphenicol, Tetracycline, Puromycin, Erythromycin)
Das Prinzip der Resistenz

Einleitung

Geben Sie in wenigen Sätzen den theoretischen Hintergrund zum Versuch wieder und fassen Sie den praktischen Teil der Versuche mit eigenen Worten kurz zusammen.

I. Regulation der Genaktivität am Beispiel des *lac Operons*

Eine fein abgestimmte, sehr komplexe Kontrolle der Transkription bei Eukaryonten ermöglicht es, bestimmte Gene sehr selektiv zu exprimieren oder abzuschalten. Die Mechanismen der Expressionskontrolle bei Prokaryonten sind sehr viel einfacher, so dass auch reprimierte Gene immer noch eine basale Expression zeigen. Die Promotoren, die durch die eukaryontische RNA-Polymerase II erkannt werden, sind erheblich länger und vielfältiger, als die Promotoren prokaryontischer Gene, ebenso beeinflussen Enhancer und Silencer, die weit entfernt vom Promotor liegen können, die Genexpression bei Eukaryonten.

Die Grundmechanismen der Expressionssteuerung ähneln sich aber, da sowohl bei Eukaryonten, wie auch bei Prokaryonten Proteine selektiv an regulatorische Gensequenzen binden und so die Geschwindigkeit verändern, mit der die Transkription initiiert wird.

Das vorliegende Experiment soll an einem einfachen Beispiel demonstrieren, welche Mechanismen in Bakterienzellen wirksam sind. Sie garantieren, dass die für den Anabolismus und Katabolismus erforderlichen Enzyme, sowie die zelleigenen Bausteine koordiniert und kontrolliert synthetisiert werden.

Die Regulation der Enzymaktivität bei der Synthese von kleinen Molekülen kann z.B. über den "feed back"-Mechanismus kontrolliert werden. Hier reguliert das Endprodukt die Aktivität des in einer Folge von Reaktionen am Anfang des Synthesewegs stehenden allosterischen Enzyms.

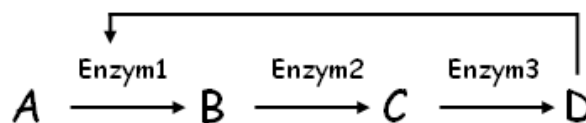


Abbildung 8-1: Eine Hemmung des Schlüsselenzyms durch das Endprodukt einer Synthesekette.

Die feed-back-Hemmung stellt die Feinregulierung dar, wobei die Enzymsynthesehemmung eine Grobregulierung ist. Die Synthese wird über die Mechanismen der Repression und Induktion der Proteinsynthese reguliert.

Die Synthese eines Enzyms kann so gesteuert werden, dass das Endprodukt einer multienzymatischen Synthese die Synthese des ersten an einer Reaktionssequenz beteiligten Enzyms und damit aller am Syntheseweg beteiligten Enzyme unterdrückt. Man nennt dies Repression oder koordinierte Enzym-Repression. Man findet sie vorwiegend bei der Synthese von Enzymen anabolischer Reaktionen.

Als Enzym-Induktion bezeichnet man den Mechanismus, der eine beträchtliche Steigerung der Enzymsynthese nur in Gegenwart des Substrats bewirkt. Hierbei handelt es sich meist um Enzyme katabolischer Reaktionen. Enzyme, die weder reprimierbar noch induzierbar sind, sondern ständig synthetisiert werden, nennt man konstitutive Enzyme.

Im vorliegenden Versuch soll die Induktion der Synthese von Enzymen katabolischer Reaktionen am Beispiel des Laktose-Operons von *E. coli* erläutert werden. Die *E. coli*-Zelle kann ihren Energiebedarf durch die Aufnahme vieler C-Quellen aus dem Nährmedium decken, u.a. durch Laktose und Glukose. Für die Verwertung von Laktose werden die erforderlichen Enzyme erst synthetisiert, wenn der Zelle Laktose angeboten wird. Die β -Galaktosidase, die die Laktose zu Galaktose und Glukose hydrolysiert, wird damit zu einem wesentlichen Enzym. Wächst *E. coli* auf anderen C-Quellen, enthält die

Bakterienzelle nur wenige β -Galaktosidase-Moleküle, in Anwesenheit von Laktose synthetisiert sie dagegen Tausende von Enzymmolekülen.

β -Galaktosidase (*lacZ*) ist also ein induzierbares Enzym. Gleichzeitig werden noch zwei weitere Enzyme synthetisiert: die β -Galaktosid-Permease (*lacY*), die für den Transport durch die Zellmembran erforderlich ist, und die β -Galaktosid-Transacetylase (*lacA*), deren physiologische Rolle unbekannt ist (in vitro überträgt sie den Acetylrest von Acetyl-CoA auf C₆ des Thiogalaktosids). Der physiologische Induktor ist die Allolaktose, die durch Transglykosylierung von Laktose durch die wenigen vorhandenen β -Galaktosidase-Moleküle synthetisiert wird. Einige Induktoren sind Induktoren, ohne selbst Substrat der Galaktosidase-Reaktion zu sein. Ein solcher ist das Isopropylthiogalaktosid (IPTG), ein synthetisch hergestellter Induktor.

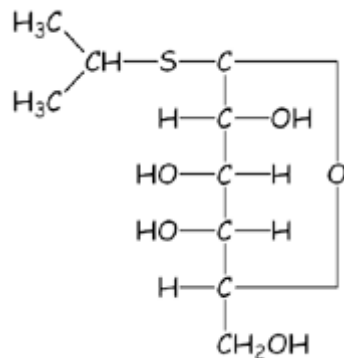


Abbildung 8-2: Isopropylthiogalaktosid (IPTG)

Die Information (Erbanlage) für die Primärstruktur der drei Enzyme der Laktose-Verwertung (Laktose Operon) ist linear als "cluster" angelegt. Sie sind "polycistronisch"

An dieser Stelle soll darauf hingewiesen werden, dass bei Eukaryonten die Gene in der Regel einzeln angelegt sind und häufig Introns enthalten.



Abbildung 8-3: *lac operon*, ein polycistronisches Gen. Das Operon enthält eine Promotor (P)- und eine Operator (O)- Bindungsstelle [1].

Die Information der DNA wird in die mRNA transkribiert. Die mRNA-Synthese wird durch die RNA-Polymerase katalysiert, die an die Promotor (p-Region) bindet und die RNA-Synthese startet, wenn der Operator, (o-Region), frei ist. Durch ein "Schlüsselprotein", den Repressor, kann der Operator blockiert werden. Der Repressor ist das Produkt des Regulatorgens (*lacI*), der auf einem völlig anderen DNA-Abschnitt lokalisiert sein kann.

Strukturelemente und Strukturgene stellen hier die funktionelle Einheit, das Operon, dar. Die am Operon synthetisierte mRNA ist ein polycistronischer (die Information mehrerer Gene enthaltender) Messenger.

Der Repressor hat zwei spezifische Bindungsstellen, eine für den Operator und eine für den Induktor.



Abbildung 8-4: *lac operon*, wenn keine Laktose vorhanden ist. Der Repressor haftet am Operator [1].

Wenn Induktormoleküle anwesend sind, binden sie an die Induktorbindungsstelle. Die Konformation des Repressors, ein allosterisches Protein, wird verändert. Der Repressor löst sich vom Operator, die Strukturgene sind nun frei für die Transkription. β -Galaktosidase wird gebildet.

Der Beginn der Transkription selbst wird durch ein anderes Protein, das sogenannte CAP-Protein (Catabolic Activating Protein) um das zwanzigfache beschleunigt. In Form eines cAMP-CAP-Komplexes bindet dieses Protein an die DNA direkt vor der Anheftungsstelle der RNA-Polymerase. Dies führt zu einer besseren Anheftung der RNA-Polymerase an die Promotorregion. Die RNA-Polymerase allein kann offenbar die Startstelle nicht stabil genug binden.

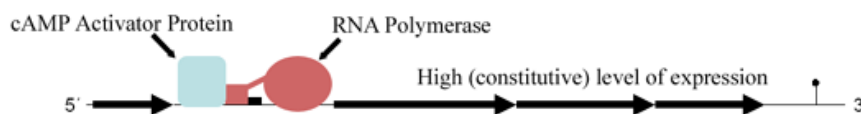


Abbildung 8-5: *lac operon*, wenn Laktose vorhanden ist. Die Konformation des Repressors wird allosterisch von Laktose verändert und kann nicht mehr am Operator haften. Die RNA-Polymerase wird nicht mehr behindert, die Transkription startet [1].

Die Repression der Synthese von Enzymen anabolischer Reaktionen durch ein biosynthetisches Endprodukt lässt sich analog erklären. Freie Repressormoleküle besitzen eine Konformation, die keine Bindung an den Operator erlaubt. Die Transkription kann stattfinden. Häuft sich das biosynthetische Endprodukt im Medium an, wirkt es als Korepressor, indem es mit dem Repressor komplexiert und an den Operator bindet. Keine Transkription findet statt.

Es gibt also zwei Klassen von Repressor-Molekülen:

Die eine ist an der Kontrolle der Induktion, die andere an der Kontrolle der Repression durch Endprodukte beteiligt.

Im Versuch werden zwei *E. coli* Stämme untersucht: Wildstamm *E. coli* K12 sowie eine konstitutive Mutante (*E. coli lac i⁻o⁺z⁺a⁺*).

Beim Wildstamm *E. coli* K12 ist das Enzym, die β -Galaktosidase, induzierbar. Es gibt Mutanten, die die β -Galaktosidase auch ohne Induktor ständig bilden. Diese nennt man konstitutive Mutanten. Die Mutation liegt entweder im Regulatorgen (*i⁻*), so dass kein aktiver Repressor gebildet werden kann,

oder im Operatorgen (o^-) (z.B. *E. coli lac i^+ o^- z^+ a^+*), so dass der Operator nicht vom aktiven Repressor blockiert werden kann.

Im folgenden Experiment wird gezeigt, dass die Enzymsynthese der β -Galaktosidase im Wildstamm *E. coli* K12 (W), der normalerweise kaum mehr als ein Molekül β -Galaktosidase pro Zelle enthält, durch das Galaktosid Isopropylthiogalaktosid (IPTG) induziert wird. Diese Enzymsynthese wird mit der Synthese in einer konstitutiven Mutante *E. coli lac i^+ o^+ z^+ a^+* verglichen.

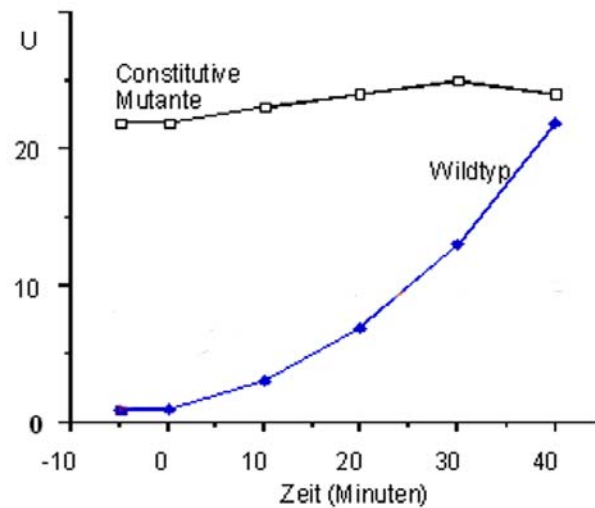


Abbildung 8-6: Bestimmung der Enzymaktivität der β -Galaktosidase in den *E. coli*-Stämmen W und C. Induktion des Enzyms im Wildstamm W durch Zugabe von IPTG.

Die Induktion wird mit IPTG als Induktor durchgeführt, das nicht von der β -Galaktosidase hydrolysiert werden kann. Der Nachweis der gesteigerten Synthese des Enzyms β -Galaktosidase wird indirekt über die Enzymaktivität bestimmt. Es wird dafür ein einfacher, empfindlicher photometrischen Test mit dem Substrat *o*-Nitrophenyl- β -Galaktosid (ONPG) geführt, das vom Enzym zu einem farbigen Produkt, *o*-Nitrophenol (ONP), hydrolysiert wird. Das ONP vertieft seine gelbe Farbe (436 nm) bei alkalischem pH.

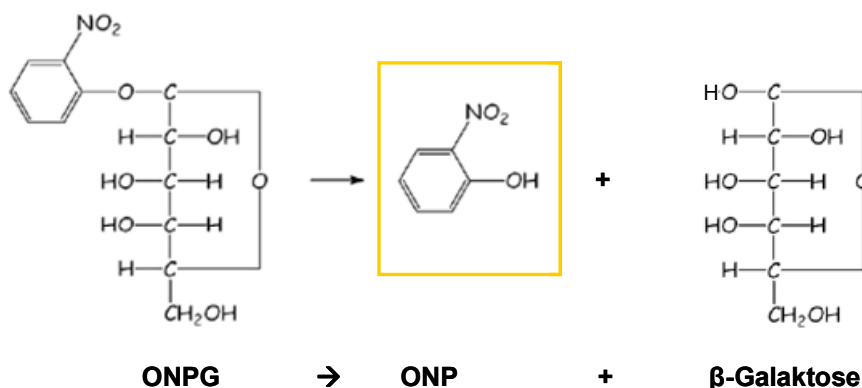


Abbildung 8-7: Die Spaltung von *o*-Nitrophenyl- β -galaktosid (ONPG) zu *o*-Nitrophenol (ONP) durch β -Galaktosidase.

II. DNA-Isolierung

Das gesamte Genom eines Organismus ist in der DNA jeder kernhaltigen Körperzelle als Kopie enthalten. Zur Analyse eines beliebigen Gens kann also DNA aus leicht zugänglichen Zellen, wie Fibroblasten, Lymphozyten oder Epithelzellen, herangezogen werden (Schnellpräparation, mit Proteinen verunreinigt, siehe PCR-Versuch).

Um eine größere Menge relativ sauberer DNA zu gewinnen, sind einige zusätzliche Schritte nötig. Wir wollen hier der Einfachheit halber bakterielle chromosomale DNA isolieren. Bakterien enthalten häufig neben der genomischen DNA noch zusätzlich Plasmide, ringförmige DNA-Moleküle, die z. B. Gene für Antibiotika-Resistenzen tragen. Da Plasmide leicht künstlich in Bakterien eingeschleust werden können, werden sie häufig in der rekombinanten DNA-Technologie eingesetzt (siehe Versuch 7).

Im Versuch werden die Bakterienzellwände zuerst mit Lysozym angedaut und anschließend werden die Zellen durch Detergenzien aufgeschlossen und Proteine denaturiert. Chloroform und Isoamylalkohol lösen die Lipide. Durch Zentrifugation werden Wasser und Chloroform/Amylalkohol abgetrennt. In der Unterphase befinden sich die Lipide, die ausgefallten Proteine sammeln sich in der Zwischenphase und in der wässrigen Oberphase bleibt die DNA gelöst.

III. Analyse von Erbkrankheiten am Beispiel der cystischen Fibrose (Mukoviszidose)

Die cystische Fibrose ist eine autosomal-rezessive Erbkrankheit der exokrinen und der Schweißdrüsen. Sie beginnt bereits im Kindesalter. Primär werden Verdauungs- und Atmungstrakte betroffen. Die Hauptsymptome sind chronische Infektionen des Atmungstrakts, Pankreasinsuffizienz, ausgesprochen viskoses Schleimsekret und eine Empfindlichkeit für Hitzebelastung. Jeder 25.-30. ist heterozygoter Träger der Erbanlage, jedes 3000. Neugeborene ist erkrankt.

Das bei der cystischen Fibrose betroffene Gen ist seit **1989** bekannt und danach sind viele Mutationen entdeckt worden, die die Krankheit verursachen. [Eine Untersuchung in Deutschland](#) im Jahre 1994 ergab als Ergebnis über 50 Mutationen. Das Genprodukt wird als "Cystic Fibrosis Transmembrane-Conductance Regulator" (CFTR) bezeichnet. Das membranständige Protein (170 kDa) ist ein Chlorid-Ionenkanal.

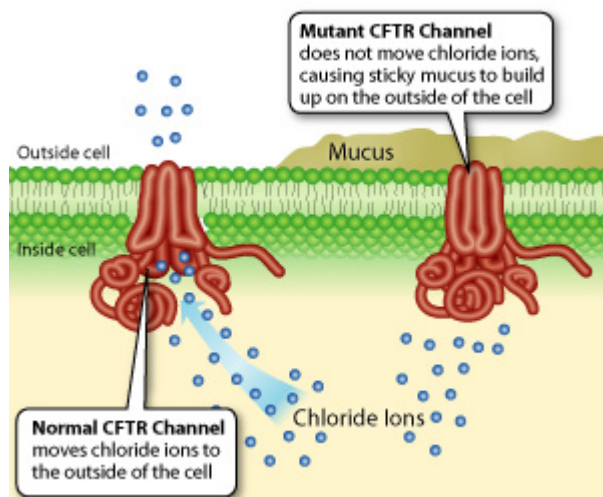


Abbildung 8-8: Der CFTR Kanal transportiert Chloridionen aus der Zelle, der mutierte Kanal kann keine Ionen mehr transportieren und es bildet sich ein viskoses Schleimsekret auf der Außenseite der Zelle.

Die Schwere der Erkrankung ist abhängig von der Lokalisation der Mutation in bestimmten Domänen des Proteins. Neben mehreren Transmembranbereichen wurden durch Sequenzvergleiche auch zwei Nukleotid bindende Bereiche postuliert. 70% der Mutationen betreffen eine drei Basenpaare umfassende Deletion, die einen Verlust des Phenylalanins an Position 508 bewirken ($\Delta F508$). Die restlichen 30 % der Mutationen sind über das Gen verteilt. Für die exakte Bestimmung dieser Mutationen müssen die kodierenden Bereiche des Gens sequenziert werden, die der mRNA entsprechen. Der anschließende Vergleich der daraus abgeleiteten Primärstruktur des Proteins mit der Primärstruktur des Wildtyps ergibt die genaue Lokalisation der Mutation.

Wenn Sie auf dem Gebiet der cystischen Fibrose klinisch forschend tätig sind, werden Sie im Vergleich zu anderen Kliniken einen höheren Zulauf von Patienten haben. Es wird erforderlich sein, die CFTR-Sequenz der Patienten zu ermitteln. Nur so können Sie neben dem Phänotyp weitere Informationen erhalten, um eine gezielte Diagnose und Prognose individuell für jeden Patienten zu erstellen.

Computer und Datenbanken sind wichtige Werkzeuge in der molekularen Medizin geworden. Am Beispiel der cystischen Fibrose sollen Sie einen Einblick in deren Einsatz bekommen. Im Zentrum für Angewandte Informatik der Universität zu Köln (ZAIK) steht das "Wisconsin Sequence Analysis Package", eine Sammlung von über ein Hundert Sequenzanalyseprogrammen, allen Angehörigen der Universität zur Verfügung. Von allen am UKLAN (Local Area Network der Universität zu Köln) angeschlossenen Rechnern kann man über das Netz seine Arbeit am gendb-Server durchführen. Die Nutzung der Programme ist jedoch im Rahmen eines Anfängerpraktikums schwierig zu erlernen.

Alternativ können einfachere Analysen auch im Internet an spezialisierten, öffentlichen Servern erfolgen. In diesem Teilversuch wird eine solche einfache Aufgabe durchgeführt. Dazu vergleichen Sie die Aminosäuresequenz eines gesunden Menschen mit der eines CF-Patienten.

Übungsaufgaben

1. Durch welchen Mechanismus kann ein einziges Gen die Expression von Proteinen unterschiedlicher Größe bewirken?
2. Woran binden Transkriptionsfaktoren? Was bewirken sie?
3. Durch welche strukturelle Komponente eines Proteins wird festgelegt, ob es sezerniert wird?
4. Geben Sie Mechanismen an, die der Entstehung der Antikörpervariabilität zugrunde liegen.
5. Zeichnen Sie auf DNA-Ebene drei prinzipiell unterschiedliche Beispiele für eine Mutation.
6. Formulieren Sie eine aus 6 Nukleotidpaaren bestehende Palindromstruktur.
7. Geben Sie Beispiele für folgende Mutationen an: Substitution, Deletion und Insertion.
8. Wie beeinflusst Penicillin den Metabolismus von *Escherichia coli*?

Literatur

1. Die Abbildungen 3,4 und 5 sind entnommen aus: http://en.wikipedia.org/wiki/Lac_operon.
2. Abbildung 8 ist aus: <http://learn.genetics.utah.edu/content/disorders/whataregd/cf/>

Versuchsdurchführung

Teil I: Bestimmung der Enzymaktivität und der Bakteriendichte

Geräte:

Bakterienwachstumsröhrchen mit Belüftungsvorrichtung	
Laborwecker	
Spektralphotometer	
Glasküvetten	
Pipetten	10 ml, 5 ml, 2 ml, 1 ml
Reagenzgläser	36
Schüttelwasserbad	37 °C
Vortexer	

Lösungen:

200 ml von wachsenden Bakterienkulturen:	W: (Wildstamm) <i>E. coli</i> K12 C: (Constitutive Mutante) <i>E. coli</i> (lac i ⁻ o ⁺ z ⁺) Beide Kulturen wachsen in synthetischem M9-Medium mit 4·10 ⁻² M Glycerin als Kohlenstoffquelle. Titer ca. 3x10 ⁸ Bakterien/ml bei einer OD von 1,0 (623 nm).
Medium: (Vor Gebrauch 20 ml 1 M MgSO ₄ zusetzen)	Bactotryptone 20 g Yeastextrakt < 5 g NaCl 0,5 g aqua dest. ad 1 l
BME-Puffer	450 ml H ₂ O, 50 ml 0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7 und 1 ml Mercaptoethanol
Isopropylthio-β-Galaktosid (IPTG)	0,01 M
Na ₂ CO ₃	1 M
o-Nitrophenyl-β-Galaktosid (ONPG)	0,003 M in 0,25 M Natriumphosphatpuffer
Toluol in Tropfflaschen	

Dies ist vor Praktikumsbeginn bereits geschehen!

Bakterien wurden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zu 6 verschiedenen Zeitpunkten wurden vom Assistenten Aliquots der Kulturen entnommen, mit C₀-C₅ bzw. W₀-W₅ beschriftet und auf Eis gestellt:

Anfang	W ₀ und C ₀
Nach 5'	W ₁ und C ₁
Nach 7'	Induktion der Genexpression durch Zugabe von 10ml 0,01M IPTG zu Kultur W
Nach 10'	W ₂ und C ₂
Nach 15'	W ₃ und C ₃
Nach 25'	W ₄ und C ₄
Nach 45'	W ₅ und C ₅

START ➡ 2x je 12 Reagenzgläser beschriften mit C₀-C₅ und W₀-W₅
(1x für Enzymaktivitätsbestimmung, 1x für Bakterienzahl)

In einer Reihe 4 ml Wasser vorlegen (für Bestimmung der Bakteriendichte).

In anderer Reihe je 1 ml BME-Puffer und 1 (!!!) Tropfen Toluol vorlegen (Enzymaktivitätsbestimmung).

Nun je 1ml der entsprechenden Bakterienkulturen (C_x und W_x) in die entsprechenden Röhrchen (C_x und W_x) pipettieren (Achtung: Aliquots mit Bakterienstammlösungen bitte vor Entnahme invertieren).

Bakteriendichtebestimmung:

Proben zur Bestimmung der Bakteriendichte jeweils sofort nach Erhalt im Photometer bei **623 nm** messen (Glasküvetten)!

OD = 1 entspricht 3×10^8 Bakterien

Leerwert: 4 ml Wasser + 1 ml Medium (steht am Platz!)

Für Leerwert und Bakteriendichtemessungen immer dieselbe Küvette benutzen (Küvettenfehler)!

Tabelle 1: Messung der Bakteriendichte

Zeitpunkt (min)	Wildtyp			Konstitutive Mutante		
	Glas	OD 623nm	Bakterien- zellzahl	Glas	OD 623nm	Bakterien- zellzahl
0	W ₀			C ₀		
5	W ₁			C ₁		
10	W ₂			C ₂		
15	W ₃			C ₃		
25	W ₄			C ₄		
45	W ₅			C ₅		

Tabelle 1: Die gemessene optische Dichte (OD) soll hier eingetragen werden, sowie die Umrechnung des OD-Wertes in die tatsächliche Bakterienzah! Eine OD von 1 entspricht 3×10^8 Bakterien. Beachten Sie den Verdünnungsfaktor (VF), der noch mit einberechnet werden muss.

Auswertung fürs Protokoll:

Die Bakterienzellzahlen des Wildtyps und der Mutante werden als 2 separate Kurven gegen die Zeit (min) auf einem Din A4 Blatt Millimeterpapier aufgetragen (**Diagramm 1**). Bitte an die Beschriftung der Achsen denken.

Enzymaktivitätsbestimmung:

Proben zur Enzymaktivitätsbestimmung stehen lassen, bis **alle** Aliquots zusammenpipettiert sind.

Dann **gut Schütteln** und **2 ml Na₂CO₃ zu C₀ und W₀** (Leerwerte) hinzufügen. Dies stoppt die Umsetzung von ONPG, und wird beim Leerwert daher zuerst hinzugefügt!

In alle Proben **1 ml ONPG** zufügen → **schütteln**

Nach 10 min.: 2 ml Na₂CO₃ zu C₁-C₅

Nach 60 min.: 2 ml Na₂CO₃ zu W₁-W₅ zufügen.

Nach Stopp der Reaktion: Proben in **Glasküvetten bei 436 nm** messen. Bei einer Extinktion >1: 1 ml Probe mit 4 ml Wasser verdünnen und neu messen! **Achtung:** Bei verdünnten Proben muss auch der Leerwert entsprechend verdünnt werden! (neuen Verdünnungsfaktor bei der Berechnung beachten!)

Tabelle 2: Messung der Enzymaktivität

Zeitpunkt (min)	Wildtyp			Konstitutive Mutante		
	Glas	Extinktion 436nm	Enzymaktivität	Glas	Extinktion 436nm	Enzymaktivität
0	W ₀	0	0	C ₀	0	0
5	W ₁			C ₁		
7: Induktion						
10	W ₂			C ₂		
15	W ₃			C ₃		
25	W ₄			C ₄		
45	W ₅			C ₅		

Da eine Extinktion von 0,0075 einer ONPG-Menge von 1 nmol entspricht, ergibt sich daraus folgende Formel zur Umrechnung der E_{436nm} in die Enzymaktivität:

Formel 1:

$$X \text{ nmol ONPG} = \frac{E_{436\text{nm}} * 1\text{nmol} * 5 \text{ (VF)}}{0,0075 * y \text{ min}}$$

Die gemessene Extinktion setzt man in diese Formel ein. Die Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor (VF) 5 errechnet sich, da man vor der Extinktionsmessung 1 ml BME, 1 ml ONPG und 2 ml Na₂CO₃ mit 1 ml der Lösung mischt. Gegebenenfalls neuen Verdünnungsfaktor beachten, wenn Extinktion > 1 war. Für „y“ setzt man die Inkubationszeit ein wie lange die Umsetzung stattgefunden hat (10 min für C und 60 min für W). Das Ergebnis hat die **Einheit U!**

Auswertung fürs Protokoll:

Die Enzymaktivität (U) des Wildtyps und der Mutante werden als zwei separate Kurven gegen die Zeit (min) [entspricht Zeitpunkt der Probenentnahme] auf einem Din A4 Blatt Millimeterpapier aufgetragen (**Diagramm 2**). Vergessen sie nicht die Achsen zu beschriften.

Teil II: DNA-Isolierung

Geräte:

Glasstab	
Schliffmesspipette	10 ml
UV-Spektrometer	Quarz-Küvette
Vollpipette	2 ml
Wasserbad	37 °C, 60 °C
Zentrifugen	2
Zentrifugengläser	1 x 50 ml-Glas, 2 x 10 ml-Gläser

Lösungen:

Bakterienkultur	50 ml
Chloroform-Isoamylalkohol	24:1
Isopropanol	
NaCl	0,15 M, enthält 0,1 M Na ₂ EDTA, pH 8,0
Lysozym-Lösung	10 mg/ml
NaClO ₄	3 M
Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS)	12,5 %ig

Für jede Gruppe stehen je zwei 15 ml Plastikröhrchen bereit. Eines enthält ein Bakterienpellet. Das andere wird später benötigt (enthält manchmal Reste von Spülwasser).

Pellet in **5 ml 0,15 M NaCl / 0,1 M Na₂EDTA** (steht fertig gemischt am Platz) resuspendieren. **0,5 ml Lysozymlösung** hinzufügen (um die Zellen aufzuschließen), vorsichtig mischen (aber nicht vortexen!), danach **30 min, 37°C** im Wasserbad inkubieren (zwischendurch mischen).

1 ml 12,5% SDS-Lösung (denaturiert Proteine) hinzufügen, mischen → **10 min, 60°C** im Wasserbad.

2 ml 3 M Na-Perchlorat hinzufügen (denaturiert ebenfalls Proteine), mischen und **dann** zu gleichen Teilen auf das zweite Plastikröhrchen aufteilen. Zu **beiden** Röhrchen je **4 ml Chloroform/Isoamylalkohol** (24:1) geben und gut schütteln (Phasentrennung). Proben zurück zum Assistenten, der sie dann 10 min zentrifugiert.

Dann den **klaren Teil der oberen Phase** („wässrige Phase“) abnehmen (0,5-1 ml über der Interphase stehen lassen, damit keine Proteine verschleppt werden) und in Becherglas mit **50 ml Isopropanol** (fällt DNA aus) überführen. DNA mit dem Glasstab umrühren, herausfischen und den Stab an der Luft trocknen lassen, bis er nicht mehr nach Alkohol riecht.

Konzentrationsbestimmung der DNA sowie deren Reinheit:

DNA in **1 ml Wasser** vom Glasstab durch Rühren ablösen. Die Extinktionen bei **260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette** messen (Quarzküvette beim Assistenten), Leerwert jeweils Wasser. Nur bei einer Extinktion von > 1 wird die DNA verdünnt (0,1 mL DNA in 5 ml Wasser lösen) und erneut gemessen.

Reine DNA hat ein Verhältnis der Extinktionen von E_{260}/E_{280} von 1,8-2. Ein kleineres Verhältnis zeigt die Verunreinigung mit Proteinen an, die bei 280 nm absorbieren.

Auswertung fürs Protokoll:

Den Quotienten der Extinktionen 260nm/280nm bilden und beurteilen wie rein die isolierte DNA ist. DNA Konzentration bestimmen: E_{260} von 1 entspricht 50 mg/l DNA. Falls die Probe verdünnt wurde, muss der Verdünnungsfaktor beachtet werden!

Teil III: Analyse von Erbkrankheiten am Beispiel der Cystischen Fibrose

Aufgabe:

Die CFTR Aminosäure-Sequenz des Wildtyps und die eines CF-Patienten werden Ihnen unter Ihrer Gruppennummer zur Verfügung gestellt. Ihre Aufgaben sind:

1. Die Wildtyp Sequenz mit der Proteinsequenz des Patienten vergleichen.
2. Das Ergebnis protokollieren und die Art der Mutation angeben.

In diesem Versuch bezieht sich die Mutation nur auf die Punktmutationen (Insertion, Substitution, Deletion und ihre Folgen auf das kodierte Protein), nicht auf die chromosomalen Mutationen oder Anzahl der Duplikationen etc.

Auf der Seite <http://www.uni-koeln.de/med-fak/biochemie/> muss unter **Praktikum**

Punkt 8 **Molekulare Medizin – Mutanten, Erbkrankheiten** die **HTML-Datei** angeklickt werden.

Sie erhalten eine bereits translatierte CFTR-Sequenz einer gesunden Person (unter **eine Kopie**) sowie eines CF-Patienten unter ihrer Gruppennummer

[Gruppe 1](#), [Gruppe 2](#), [Gruppe 3](#), [Gruppe 4](#), [Gruppe 5](#), [Gruppe 6](#), [Gruppe 7](#), [Gruppe 8](#), [Gruppe 9](#), [Gruppe 10](#), [Gruppe 11](#), [Gruppe 12](#)

Mit Hilfe des Programms **Blast2** erstellen Sie ein Sequence Alignment (Sequenzvergleich).

Vergessen Sie nicht, das Programm auf "Blastp" zu stellen. Fügen Sie dann zunächst die Aminosäuresequenz der gesunden Person unter „Enter Query Sequence“ ein und anschließend die Sequenz des CF-Patienten unter „Enter Subject Sequence“. Das Alignment wird durch den BLAST Button gestartet.

Der erhaltene Sequenzvergleich kann nun ausgedruckt und ausgewertet werden.

Ein Sequenzvergleich kann wie folgt aussehen:

Beispiel 1

Wildtyp	Query	1	MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYSRQLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDR
Vergleich			MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYSRQLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDR
Patient	Sbjct	1	MQRSPLEKASVVSKLFFSWTRPILRKGYSRQLELSDIYQIPSVDSADNLSEKLEREWDR

Bsp. 1: 100%-ige Übereinstimmung der Sequenzen

Beispiel 2

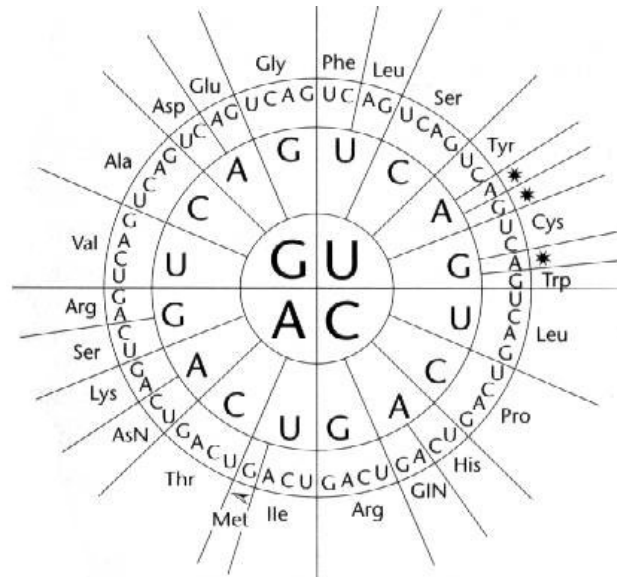
Wildtyp	Query	61	LASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGFILYLC ⁺ EVTKAVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIA
Vergleich			LASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGFILYLC+VTKAVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIA
Patient	Sbjct	61	LASKKNPKLINALRRCFFWRFMFYGFILYLCVTKAVQPLLLGRIIASYDPDNKEERSIA

Bsp. 2: Aminosäureaustausch. „+“ deutet an, dass die Aminosäuren ähnliche Eigenschaften aufweisen.

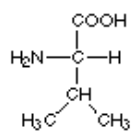
Beispiel 3

Wildtyp	Query	481	KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYS ⁺ IKACQLEEDISKFAEKDNIV
Vergleich			KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYS IKACQLEEDISKFAEKDNIV
Patient	Sbjct	481	KIKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYS ⁺ IKACQLEEDISKFAEKDNIV

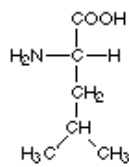
Bsp. 3: Aminosäureaustausch von Aminosäuren mit unterschiedlichen Eigenschaften



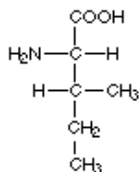
Aminosäuren mit hydrophoben Resten



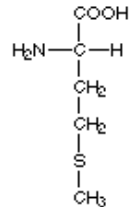
Valin
V



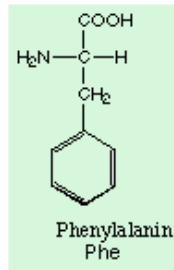
Leucin
L



Isoleucin
I

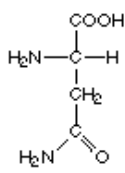


Methionin
M

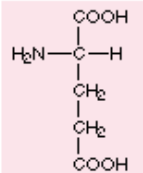


Phenylalanin
F

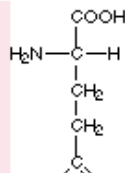
Aminosäuren mit hydrophilen Resten



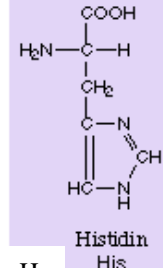
Asparagin
Asn
N



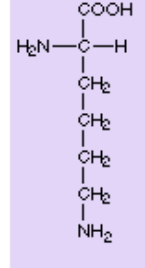
Glutaminsäure
Glu
E



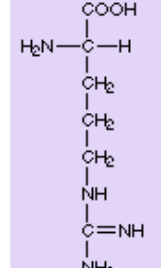
Glutamin
Gln
Q



Histidin
His
H



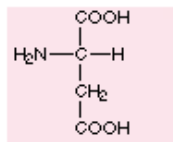
Lysin
Lys
K



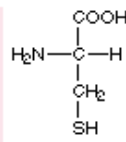
Arginin
Arg
R

saure Aminosäuren

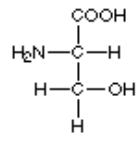
Basische Aminosäuren



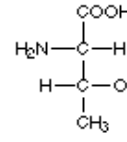
Asparaginsäure
Asp
D



Cystein
Cys
C

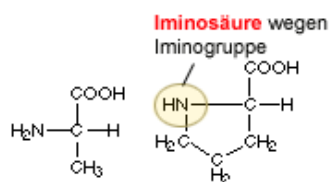


Serin
Ser
S

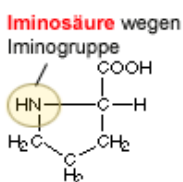


Threonin
Thr
T

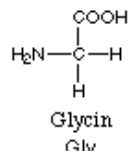
Neutrale Aminosäuren



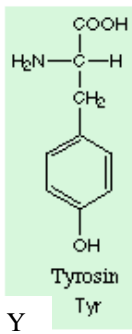
Alanin
Ala
A



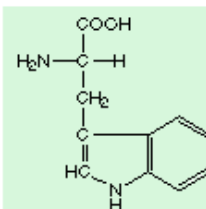
Prolin
Pro
P



Glycin
Gly
G



Tyrosin
Tyr
Y



Tryptophan
Trp
W

aromatische Aminosäuren

Protokoll - Diskussion

Zu I)

- Vergleich konstitutive Mutante und Wildtyp:
- Graphen beschreiben wie sie sind, wie sie theoretisch sein sollten und wenn sie divergieren, warum?
- Eigene Werte verwenden, keine Werte anderer Gruppen oder Literaturwerte, auch wenn sie noch so seltsam sind, Graph zeichnen.
- Was bedeutet das Ergebnis?

Zu II)

- DNA-Konzentration errechnen und eine Aussage über die Reinheit der DNA treffen, wenn verunreinigt, warum? Bei welchem Schritt könnte Verunreinigung passiert sein?

Zu III)

- Bitte markieren Sie alle Mutationsstellen und geben die Art der Mutation an. Die Aminosäuren werden in "Einbuchstabencode" angegeben. Benutzen Sie den [genetischen Code](#) und schlagen anhand einer Mutationsstelle mögliche Basenaustausche vor.
- Bei Aminosäurenaustausch, welche Eigenschaften (z.B. hydrophob) hatte die „alte“ und welche die „neue“ Aminosäure?