Praktikum für fortgeschrittene Nachwuchsmolekularbiologen/ -innen

Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Freiburg, jeweils September
Hermann-Herder-Straße 7, Lehrgebäude hinter dem Haus (s. Anfahrtskizze)

Ablauf

9:30	Begrüßung, Einführung zu den Experimenten	
10:00	**Experiment:**	PCR-Ansatz für Mutationsanalyse eines Prion-Gens
11:00	**Experiment:**	Nachweis von mitochondrialen Proteinen mit Antikörpern, (1) Elektroblott eines SDS-Gels
	Theorieteil:	Western Blotting, HIV-Test
12:00	**Experiment:**	Nachweis von mitochondrialen Proteinen mit Antikörpern, (2) 1. Antikörper
	Mittagspause	
13:30	**Experiment:**	Nachweis von mitochondrialen Proteinen mit Antikörpern, (3) 2. Antikörper
14:00	**Experiment:**	Auftrag des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel
	Theorieteil:	Mutationsanalyse eines Prion-Gens
14:30	**Experiment:**	Auswertung des PCR-Ansatzes für Mutationsanalyse
	Experiment:	Auswertung des Western Blots
15:30	**Pause**	
	<u>optional:</u>	
	Studienmöglichkeiten in Life Sciences	
	Bei Interesse Institutsrundgang	
ca. 16:30	Ende der Veranstaltung	

Jan Brix

© Weitergabe, Nachdruck nur mit Zustimmung durch o.g. Institut

Einleitung

Die PCR ist eine der bedeutendsten Erfindungen in der Molekularbiologie. Sie ermöglicht die millionenfache Vermehrung einer spezifischen DNA-Sequenz (*deoxyribonucleic acid*) im Reagenzglas (***in vitro***). Ihr Erfinder, Kary Mullis, erhielt dafür 1993 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie. Erstmals in der Diagnostik eingesetzt wurde diese Technik zur pränatalen Diagnose von Sichelzellenanämie.
Mittlerweile ist die PCR eine der wichtigsten Standardtechniken, sowohl in der medizinischen Diagnostik als auch in der Forschung. In diesem Praktikum werden Sie die PCR-Technik anwenden, um DNA-Bereiche des humanen Prion-Gens *in vitro* zu vermehren (**amplifizieren**). Sie analysieren anhand des PCR-Produktes, ob das Prion-Gen eine Mutation trägt und um welche Art von Mutation es sich dabei handelt. Das Prion-Gen kann verschiedenste Mutationen tragen, u. a. solche, die für Erbkrankheiten wie die Creutzfeld-Jakob-Krankheit oder die Fatale Familäre Insomnie verantwortlich sind.
Zusätzlich werden Sie selbstständig DNA isolieren, die für das humane Prion-Gen kodiert. Diese DNA werden sie mittels Restriktionsendonukleasen enzymatisch in Stücke schneiden, ebenfalls hinsichtlich Mutationen im Prion-Gen untersuchen und mit dem Ergebnis der PCR-Analyse vergleichen.

Grundlagen

Das Herstellen von Kopien eines spezifischen DNA-Abschnitts ist das Grundprinzip der PCR. Hierbei wird ein Vorgang aus der lebenden Zelle nachgeahmt: Die Replikation der DNA.

1. Die Replikation der DNA

Durch Replikation wird die DNA, der Träger der genetischen Information, in der Zelle verdoppelt. Die DNA-Replikation in Organismen gewährleistet, dass das komplette Erbgut bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben wird.

1.1. Aufbau und Struktur der DNA

Die DNA ist ein Polymer aus Desoxyribonukleotiden, die jeweils aus einer Base, dem Zucker ß-D-2-Desoxyribose und einer Phosphatgruppe bestehen. Zucker- und Phosphatgruppen haben eine strukturelle Aufgabe und bilden das Rückgrat eines Nukleotidstrangs. Die DNA besitzt vier verschiedene stickstoffhaltige Basen. Sie sind Derivate eines Purins (Adenin (A) bzw. Guanin (G)) oder eines Pyrimidins (Thymin (T) bzw. Cytosin (C)). Ihre Abfolge im Nukleotidstrang bestimmt die genetische Information. Die Basen sind immer über eine N-glykosidische Bindung an das C1´-Atom der Desoxyribose gebunden. Die Phosphatgruppe ist

jeweils durch eine Esterbindung mit der Hydroxylgruppe am C3´-Atom der Desoxyribose des einen Nukleotids und dem C5´-Atom der nächsten Desoxyribose verknüpft (Abb. 1A). Die DNA-Kette besitzt eine Polarität, da sie am 5´-Ende ein freie Phosphatgruppe und am 3'-Ende eine Hydroxylgruppe aufweist. DNA-Sequenzen werden der Konvention nach immer in 5'-3'-Richtung angegeben.

Die DNA liegt in Form eines Doppelstrangs vor und besteht aus zwei gegenläufigen (antiparallelen) Nukleotidketten. Hierbei paaren sich die im Doppelstrang gegenüberliegenden Basen durch Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken). Aufgrund ihrer chemischen Struktur paart A mit T (über 2 H-Brücken) und G mit C (über 3 H-Brücken). Die Paarung der Basen führt zu einer Verdrillung des Doppelstrangs und dadurch zur dreidimensionalen Struktur einer Doppelhelix (Abb. 1B). Die Stabilität der DNA-Doppelhelix wird durch hydrophobe Wechselwirkungen infolge Basenstapelung, durch ionische Wechselwirkungen der negativ geladenen Phosphatgruppen sowie zu einem geringeren Teil durch die H-Brücken zwischen den Basen gewährleistet. Physikalische Faktoren können die DNA-Stabilität beeinflussen z. B. kann durch Erhitzen der DNA auf ca. 95°C die Doppelhelix in ihre Einzelstränge aufgeschmolzen werden (= thermische Denaturierung). Die Denaturierung ist reversibel: Durch ein anschließendes langsames Abkühlen können die DNA-Einzelstränge wieder zum Doppelstrang assoziieren.

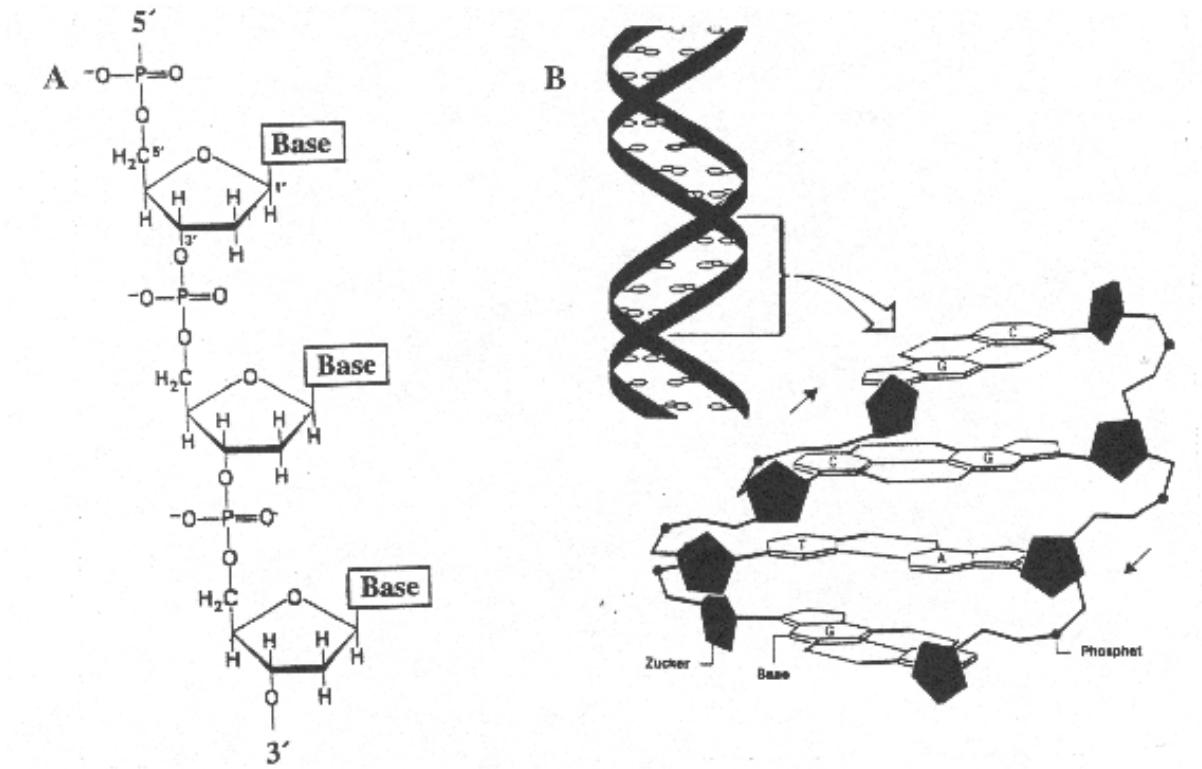


Abb. 1: Aufbau (A) und Struktur (B) der DNA

1.2. DNA-Replikation

Bei der DNA-Replikation kommt es zur Aufspaltung der beiden Doppelstränge, von denen dann jeder als Matrize zur Synthese eines neuen Strangs dient. Damit besteht jeder aus der Replikation hervorgegangene DNA-Doppelstrang aus einem parentalen und einem neu-synthetisierten Strang. Die Replikation wird deshalb auch als **semikonservativ** bezeichnet. Sie beginnt in der Zelle immer an einer definierten Basenpaarabfolge auf der DNA, dem sog. Replikationsstartpunkt oder „**origin of replication**“ (***ORI***). Die Replikation läßt sich in drei Stadien einteilen:

1. Initiation: Der ***ori*** wird von einem spezifischen Proteinkomplex erkannt, der u. a. eine Helikase enthält. Die Helikase katalysiert eine lokale Entwindung der DNA-Doppelhelix. Die für die Strangtrennung nötige Energie wird durch die Hydrolyse von ATP geliefert. Es bildet sich eine sog. Replikationsgabel aus. Um den entwundenen Teil der DNA einzelsträngig zu halten, binden SSB (Single Strand Binding) Proteine und verhindern eine Reassoziation. Der neue DNA-Strang wird durch das Enzym DNA-Polymerase synthetisiert. Dieses Enzym kann die Synthese aber nicht selbständig beginnen sondern benötigt dazu das freie 3’-OH-Ende eines Nukleotids. Dazu wird durch das Enzym Primase ein kurzes komplementäres RNA-Fragment am DNA-Einzelstrang synthetisiert. Am freien 3’-OH Ende dieses, als **Primer** bezeichneten, Oligonukleotids kann die DNA-Polymerase die Polymerisierung beginnen. Da die Basen A mit T bzw. G mit C paaren, ist die Sequenz des neuen Stranges durch seine parentale Matrize vorgegeben.

2. Elongation (Verlängerung): DNA-Polymerasen können nur in 5’-3’-Richtung DNA synthetisieren. Da die Doppelstränge der DNA antiparallel verlaufen, kann nur ein Strang kontinuierlich synthetisiert werden (= **Führungsstrang** oder „***leading strand***“). Die Synthese des anderen Stranges erfolgt diskontinuierlich in Stücken aus bis zu 1000 Basen, welche nach ihrem Entdecker als **Okazaki**-Fragmente bezeichnet werden. Hierbei werden immer wieder an der wandernden Replikationsgabel neue Primer synthetisiert und verlängert, bis sie auf das vorherige Fragment treffen. Dieser DNA-Strang wird als **verzögerter Strang** oder „***lagging strand***“ bezeichnet (Abb. 2).

3. Termination: Um einen funktionellen DNA-Doppelstrang zu erhalten, müssen die RNA-Primer herausgeschnitten und die entstandenen Lücken aufgefüllt werden. Die Primer werden in Bakterien von der RibonukleaseH (RNaseH) und der 5’-3’-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase I herausgeschnitten. In Eukaryonten werden die Primer hauptsächlich von der Flap Endonuklease 1 (FEN-1) entfernt. Abschließend verbindet die DNA-Ligase die aneinandergesetzten DNA-Fragmente zu einem durchgehenden DNA-Strang.

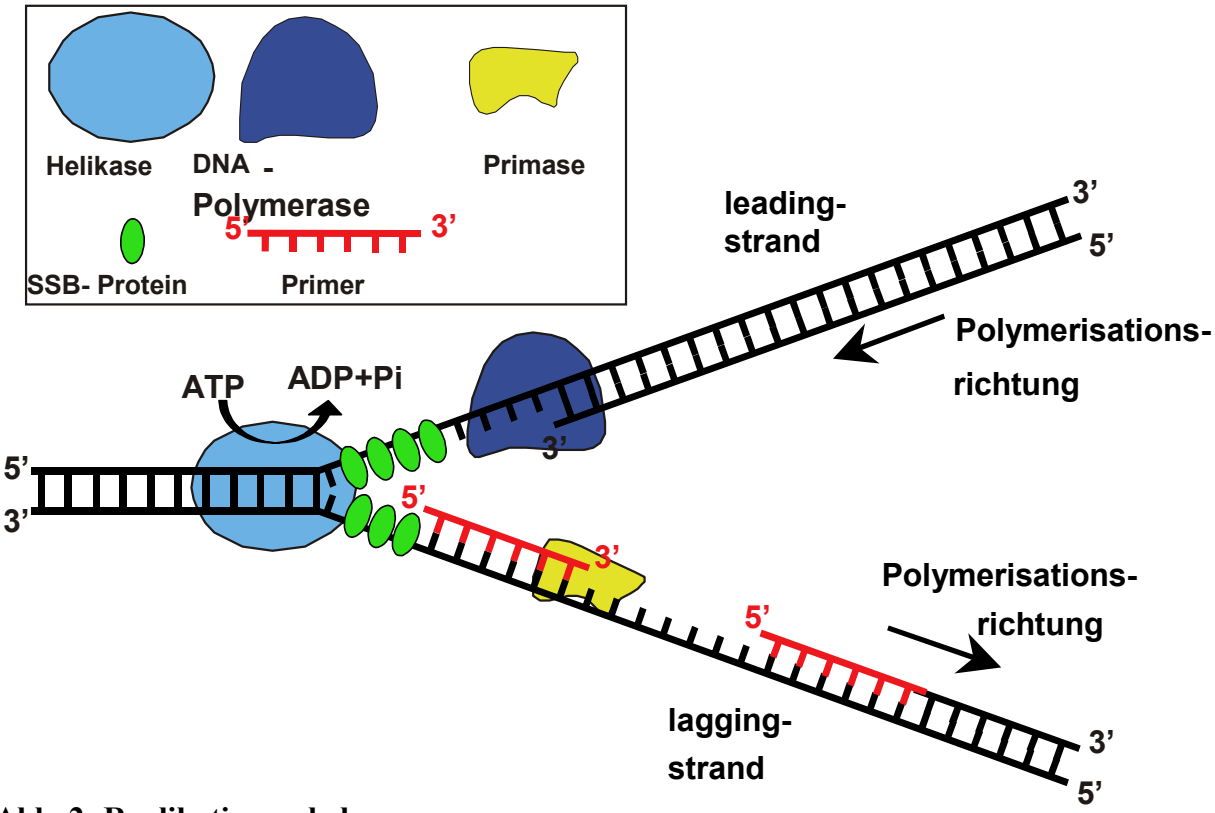


Abb. 2: Replikationsgabel

2. Mechanismus der PCR

Die PCR-Technik ist in ihren Grundzügen mit der Replikation im lebenden Organismus vergleichbar, viele Schritte sind jedoch vereinfacht (Abb. 3):

Die doppelsträngige DNA-Matrize ("***Template***"), welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz enthält, wird durch Erhitzen auf ca. 95°C in Einzelstränge thermisch aufgeschmolzen. Das Bereitstellen eines freien 3´-OH-Endes für die DNA-Polymerase erfolgt in der PCR durch Zugabe zweier chemisch synthetisierten einzelsträngigen DNA-Primer (zwischen 15-25 Basen lang). Diese können nach Abkühlung der Probe auf ca. 40-60°C jeweils an einen komplementären Bereich im Einzelstrang der Ziel-DNA binden (**hybridisieren**). Der Vorgang wird als "***Annealing***" bezeichnet. Durch die Wahl der Primer kann man exakt bestimmen, welcher Bereich der DNA amplifiziert werden soll. (Abb. 3). Anschließend werden beide DNA-Einzelstränge durch die DNA-Polymerase zum jeweiligen Doppelstrang verlängert. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Annealing und Elongation kann mehrfach wiederholt werden und führt zu einer exponentiellen Amplifikation der Ziel-DNA. Bei 20 Zyklen erfolgt eine 2^{20}-fache Anreicherung, d.h. ausgehend von einem einzigen DNA-Template werden theoretisch eine Million Kopien hergestellt.

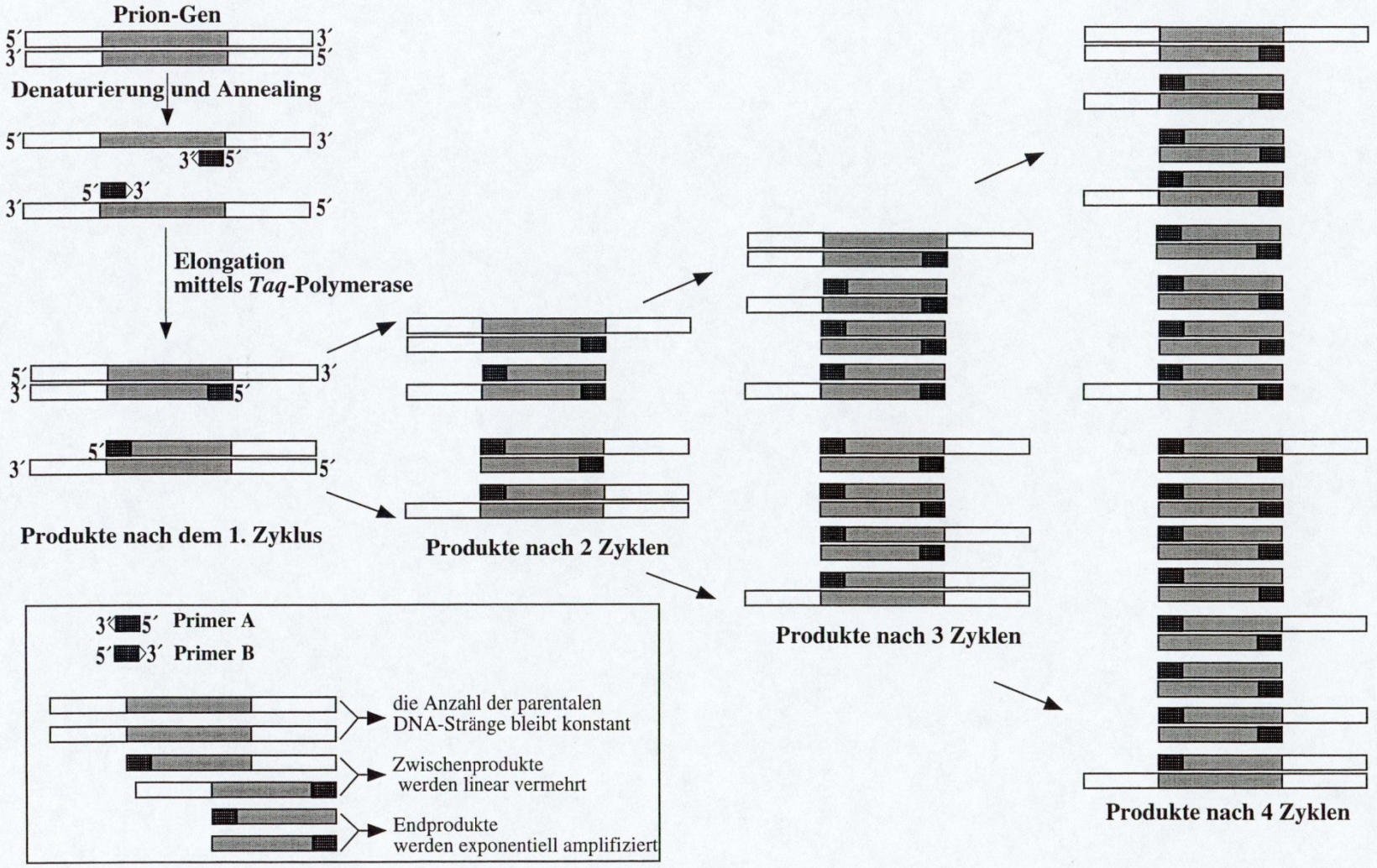


Abb. 3: Mechanismus der PCR

Die gesamte PCR wird in einem einzigen Reaktionsgefäß durchgeführt, welches Template, Primer, Desoxyribonukleotide (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) und DNA-Polymerase enthält. Früher verwendete man bakterielle DNA-Polymerase, die durch die Denaturierung inaktiviert wurde und anschließend nach jedem Zyklus neu zugesetzt werden musste. Heute wird eine hitzestabile DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium ***T**hermus **aq**uaticus* verwendet (***Taq*-Polymerase)**. Die ***Taq*-Polymerase** muss nur zu Beginn der Reaktion einmal zugegeben werden und ermöglicht die Automatisierung der PCR.

3. Anwendungen der PCR

Die PCR hat ein weites Anwendungsgebiet in Medizin und Molekularbiologie, von dem hier nur ein Ausschnitt erläutert werden kann. Folgende Anwendungen werden angesprochen: Die Entdeckung von Genen, welche für Erbkrankheiten verantwortlich sind, die Diagnose von bekannten Mutationen im Erbgut und die Klonierung von bestimmten DNA-Fragmenten.

3.1. "Positional Cloning"

Durch verschiedene Ursachen können bei der Replikation oder Reparatur der DNA Fehler in Gene eingebaut werden. Dadurch entstehen Mutationen, welche oft keinen veränderten Phänotyp haben. Diese genetischen Variationen werden dann **Polymorphismen** genannt. Manchmal verursachen diese Mutationen jedoch Krankheiten, da das von dem mutierten Gen kodierte Protein seine Funktion nicht mehr ausführen kann oder einen zellulären Vorgang stört. Tritt eine solche negative Mutation in Keimbahnzellen auf, wird sie an die Nachkommen weitergegeben. Man spricht dann von einer Erbkrankheit. Beim "positional cloning" wird das für eine Erbkrankheit verantwortlich gemachte Gen entsprechend der Information über seine chromosomale Position identifiziert. Hierbei wird die DNA von möglichst vielen Mitgliedern einer großen Familie mit mehreren erkrankten Personen analysiert (Stammbaumanalyse). Wegen der großen Sensitivität der Methode benötigt man dazu nur wenig Blut aus peripheren Blutgefäßen; zum Teil kann auch archiviertes und fixiertes Gewebematerial von schon verstorbenen Mitgliedern der Familie verwendet werden. Aus den im Blut befindlichen Lymphozyten oder den Gewebezellen wird die chromosomale DNA isoliert und solche DNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert, deren Sequenz innerhalb der menschlichen Bevölkerung eine sehr hohe Heterogenität besitzt. Diese natürlich vorkommenden Polymorphismen (polymorphe Marker) gibt es in statistischer Verteilung auf allen Chromosomen und sie werden in der Meiose durch Rekombination immer neu gemischt. Je geringer der Abstand des polymorphen Markers zum mutierten Gen ist, desto häufiger findet man ihn in von der Krankheit betroffenen und desto seltener in gesunden Familienmitgliedern. Wenn der chromosomale Ort des mutierten Gens nahe genug eingeengt ist, wird die DNA zwischen den am nächsten liegenden polymorphen Markern durch PCR amplifiziert und sequenziert. Das auf

dieser DNA befindliche offene Leseraster (potentiell für ein Protein kodierender DNA-Abschnitt) und die dazu gehörigen regulatorischen Sequenzen werden auf Mutationen hin untersucht. Inzwischen wurden schon mehrere hundert Gene auf diese Weise kloniert, mehr als durch jede andere Methode. Beispiele sind Brustkrebs-assoziierte Gene, BRCA1 und BRCA2, und ein Gen, dessen Mutation die Parkinson-Krankheit auslösen kann (s.u. Abb. 6).

3.2. Diagnose von bekannten Mutationen

Der Nachweis einer Mutation in einem Patienten kann von großer medizinischer Bedeutung sein. So erleichtert es dem behandelnden Arzt die Diagnose, vor allem dann, wenn die Symptome mehrdeutig sind oder eine frühzeitige Diagnose essentiell für die Erfolgsaussichten der Behandlung ist (z.B. Mutationen in Tumorsuppressorgenen). Bei rezessiven Krankheiten, die in der Familie des Patienten schon häufiger aufgetreten sind, kann festgestellt werden, ob und mit welcher Wahrscheinlichkeit ein Kind von der entsprechenden Krankheit betroffen sein wird (z.B. von der Willebrand-Krankheit, bei der das Gen für einen Blutgerinnungsfaktor mutiert ist). Pränatale Diagnostik kann mittels PCR z.T. schon an fötalen Zellen im peripheren mütterlichen Blut durchgeführt werden, wobei die Risiken der Ammniozentese oder anderer invasiver Methoden umgangen werden.

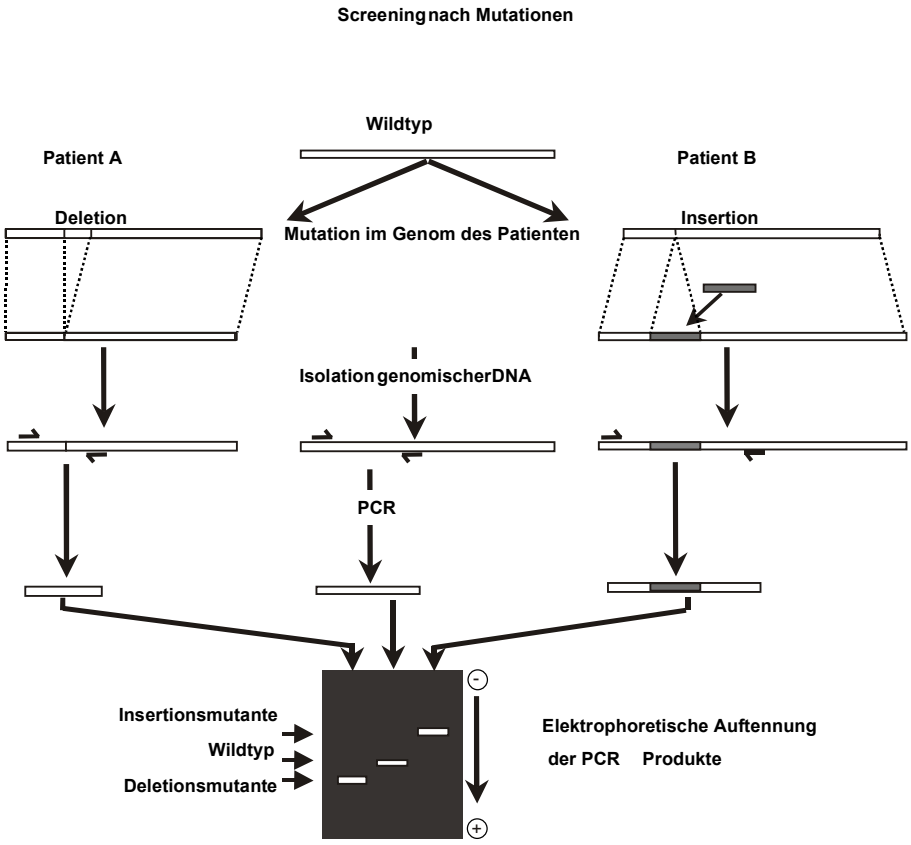


Abb. 4 : Detektion einer Deletion und Insertion im Prion-Gen

- Detektion von Deletionen und Insertionen

Deletionen (Verlust eines DNA-Fragments) und Insertionen (Einfügung eines DNA-Fragmentes) sind Ursachen von einigen Erbkrankheiten (z.B. Willebrand-Faktor; Fragile-X-Syndrom; Huntington-Krankheit; Creutzfeld-Jakob-Krankheit, s.u. Teil 4). Eine PCR, welche die entsprechende chromosomale Region amplifiziert, produziert von Isolaten aus Gesunden und Kranken, DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, welche elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert werden können (Abb. 4). Im praktischen Teil dieses Versuchs werden Sie einen DNA-Abschnitt von drei verschiedenen Isolaten des Prion-Gens amplifizieren und nachweisen. Eines der Isolate enthält eine Insertion und eines eine Deletion.

- Detektion von Punktmutationen - Restriktionsanalyse

Die PCR kann auch zur Analyse von Punktmutationen verwendet werden. Es gibt Enzyme, welche die DNA in sequenzspezifischer Weise schneiden. Diese Enzyme werden Restriktionsendonukleasen genannt und erkennen spezifische Sequenzen von 4 bis 8 Basenpaaren. Diese Erkennungssequenzen sind häufig **Palindrome**, d.h. beide Stränge in 5'->3'-Richtung gelesen sind gleich (z.B. *Alu*I, *Eco*RI, *Pst*I, *Not*I, Abb. 5). Für die Entdeckung der Restriktionsendonukleasen wurde 1978 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie an W. Arber, D. Nathans, H. Smith verliehen.

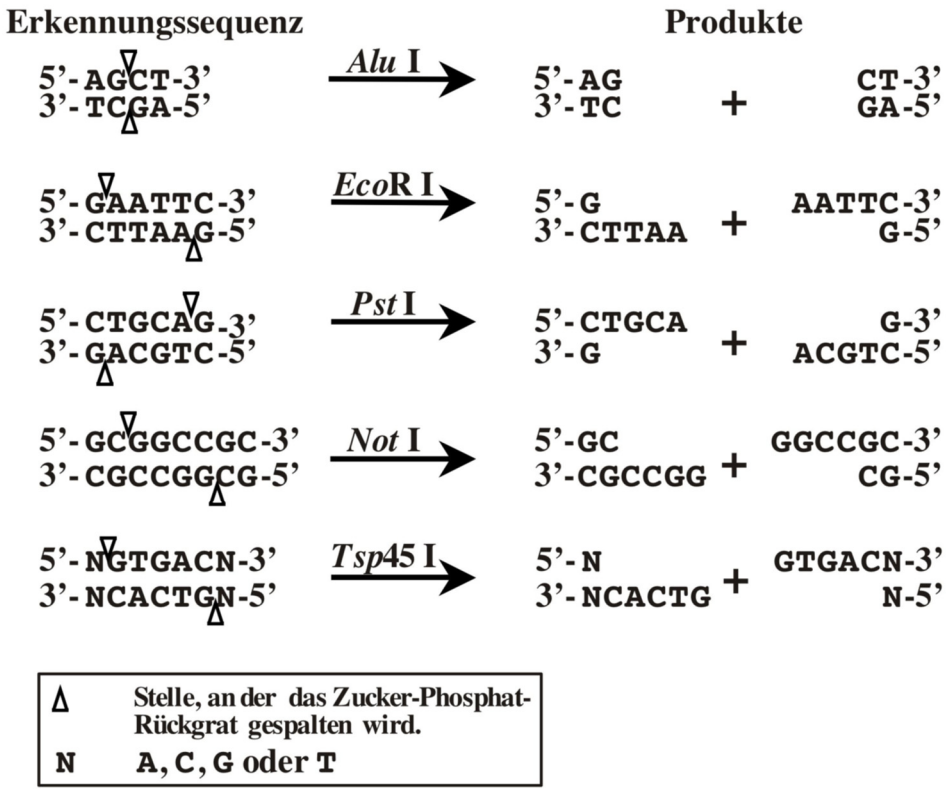


Abb. 5: Einige Beispiele für Restriktionsendonukleasen

Durch den Nukleotidaustausch einer Punktmutation kann eine Restriktionsstelle verschwinden oder eine neue entstehen. Inkubiert man nun das durch PCR amplifizierte DNA-Fragment mit dem entsprechenden Restriktionsenzym, so wird das Fragment im einen Fall geschnitten und im anderen nicht. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente führt dann zu unterschiedlichen Bandenmustern, wodurch die DNA-Fragmente mit Mutation identifiziert werden kann (z.B. Parkinson-Krankheit, Abb. 6).

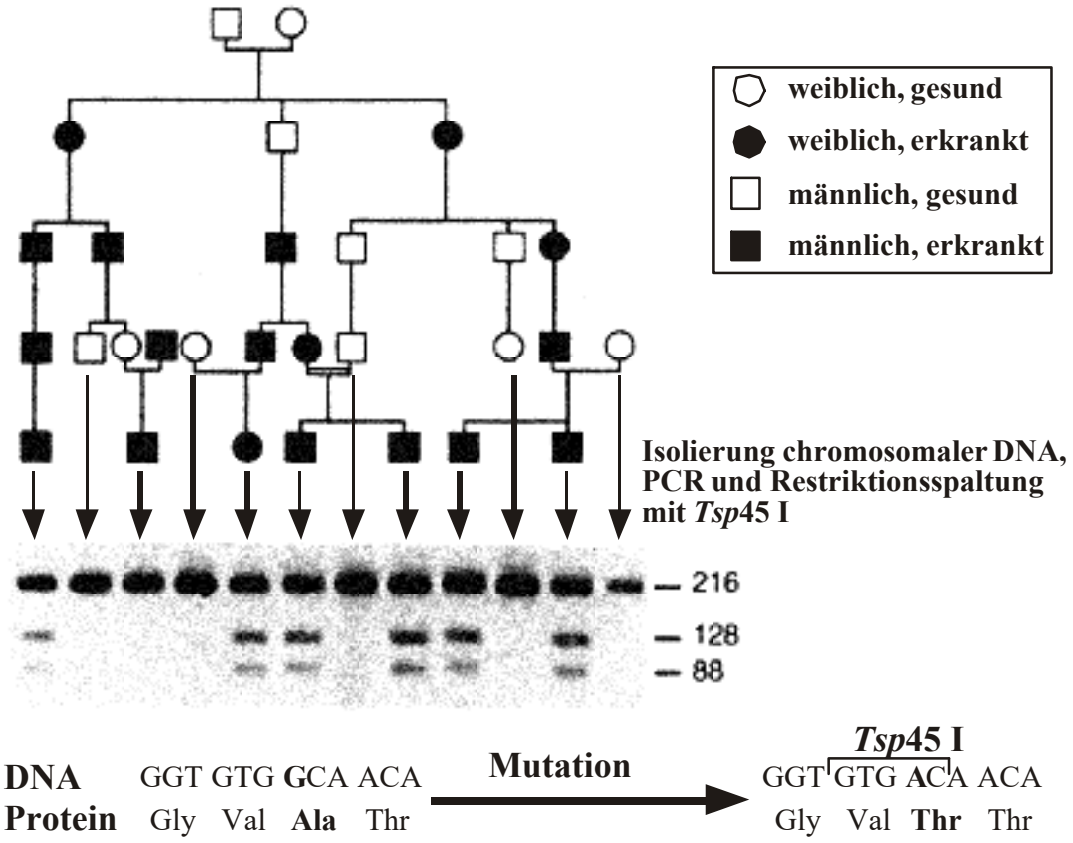


Abb. 6: Identifizierung einer mit Parkinson-Krankheit assoziierten Mutation im Gen für α-Synuclein (Polymeropoulos et al. (1997) Science **256**:2045-2047)

3.3. Untersuchung von Polymorphismen

Wie oben bereits erwähnt haben nicht alle Sequenzvariationen pathogene Auswirkungen (z.B. MHC). Diese können, wie ein Fingerabdruck, zur Identifizierung einer Person verwendet werden und werden daher genetischer Fingerabdruck genannt. Beim Vaterschaftstest kann so durch die PCR mit weniger Aufwand und mit größerer Sicherheit als mit den herkömmlichen Blutgruppentests eine entsprechende Person als Vater eines Kindes identifiziert werden. Auch in der Gerichtsmedizin wird die PCR eingesetzt, um aus Blutspuren, Haarbalg-Zellen oder Spermienflecken ein Opfer zu identifizieren oder einen Angeschuldigten als Täter zu überführen.

3.4. Klonierung eines Gens

Um zu verstehen wie eine bestimmte Mutation eine Krankheit hervorruft, muss man die Funktion des kodierten Proteins biochemisch analysieren. Dazu braucht man ausreichende Mengen des Wildtyp- und des Mutantenproteins. Diese kann man meist nicht aus den entsprechenden Geweben isolieren, da viel Proteine nur in sehr geringen Mengen vorkommen. Ein Ausweg ist die Klonierung des Gens und die Herstellung des Proteins in Zellkulturen oder niederen Organismen, wie Hefe und Bakterien.

Hierzu könnte man chromosomale DNA mit Restriktionsenzymen spalten, ein bestimmtes DNA-Fragment isolieren und in eine Träger-DNA (z.B. Plasmide) einbauen. Da die relative Häufigkeit des gewünschten DNA-Fragments im Vergleich zur gesamten genomischen DNA-Menge sehr klein ist, amplifiziert man das Zielgen mittels PCR. Bei der PCR-Amplifikation benutzt man Primer, welche neben der notwendigen, zu dem Zielgen komplementären Sequenz, auch noch Sequenzen für bestimmte Restriktionsendonukleasen enthalten. Die amplifizierten Fragmente können dann mit den Restriktionsenzymen geschnitten und in den Vektor mittels DNA-Ligase eingebaut werden (Abb. 7).

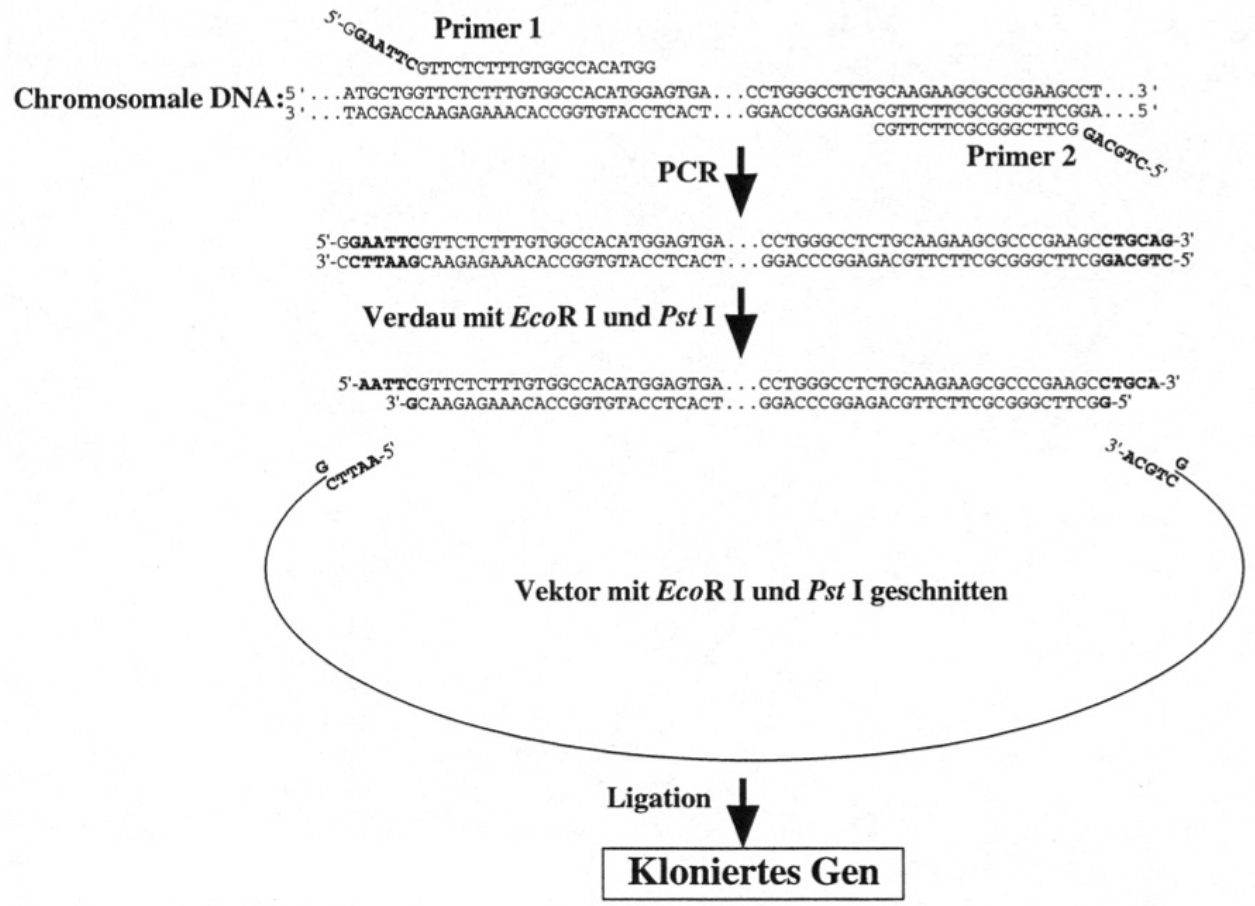


Abb. 7: Klonierung eines Gens

Im praktischen Teil werden Sie die Gelegenheit haben, Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen zu isolieren. Ein Fragment des Prion-Gens wurde unter Verwendung der Restriktionsendonuklease *Eco*RI in die Plasmid-DNA kloniert. Die Plasmid-DNA werden Sie mit *Eco*RI schneiden und die Fragmente elektrophoretisch auftrennen. Anhand der Größe der Fragmente können Sie feststellen, ob das Prion-Gen eine Deletions- beziehungsweise Insertionsmutation trug.

4. Ein neuer Infektionsmechanismus - die "Prion-Hypothese"

In diesem Praktikum analysieren sie Mutationen im **Prion-Gen**. Veränderungen des Prion-Gens können Ursache der sogenannten Prion-Krankheiten, wie der Creutzfeld-Jakob-Krankheit beim Menschen oder Scrapie bei Schafen, sein (s. Tabelle 4). Prion-Krankheiten sind mit der Entstehung amyloider Plaques im Gehirn betroffener Menschen und Tiere, sowie einer rasch fortschreitenden Demenz verbunden.
Neben genetischen Defekten kann auch die Aufnahme von Prion-infiziertem Fremdgewebe Ursache des Krankheitsausbruchs sein (z.B. BSE/Rinderwahnsinn). Dieser zuvor unbekannte Infektionsmechanismus ist somit nicht auf bakterielle oder virale Infektionen zurückzuführen, sondern ist an die Präsenz eines "proteinhaltigen infektiösen Partikels" (**Prion**) gekoppelt. Die Entdeckung dieses neuen Infektionswegs durch Stanley B. Prusiner wurde 1997 mit dem Nobelpreis für Medizin geehrt.

Tabelle 4: Prion Krankheiten

Krankheit	Organismus	Pathogenitätsmechanismus
Kuru	Mensch	Infektion durch rituellen Kannibalismus
Creutzfeld-Jakob	Mensch	Keimbahn oder somatische Mutationen im PrP-Gen
Gerstmann-Sträussler-Scheinker	Mensch	Keimbahn-Mutationen im PrP-Gen
Fatale familiäre Insomnie	Mensch	Keimbahn-Mutation im PrP-Gen
Scrapie	Schaf	Infektion in Schafen
BSE (bovine spongiform encephalopathy)	Rind	Infektion durch kontaminiertes Material

4.1. Das Prion-Protein

Den Hauptbestandteil und höchstwahrscheinlich die infektiöse Komponente des Prion-Partikels stellt das Prion-Protein **PrP** dar. Dieses körpereigene Protein ist extrazellulär an die Plasmamembran gebunden. Seine Funktion ist noch unbekannt. Prion-Krankheiten werden durch die Aggregation von Prion-Proteinen verursacht. Man unterscheidet zwischen nativem Prion-Protein **PrP^C** (C : „*cellular form*“) und infektiösem Prion-Protein **PrP^{Sc}** (Sc: „*Scrapie form*“). Beide Proteine unterscheiden sich in ihrer dreidimensionalen Struktur (**Konformation**). Der α-helikale Anteil ist in PrP^{Sc} stark reduziert, während die Menge an β-Faltblättern zunimmt. Diese strukturellen Veränderungen bedingen unterschiedliche physikalische Eigenschaften beider Proteine. Die infektiöse Form ist unlöslich in Detergenzien, zeigt eine stark erhöhte Protease-Resistenz und polymerisiert zu amyloiden Fibrillen.

4.2. Die Bildung von Prion-Partikeln

Wie kommt es zur Bildung und späteren Akkumulation der infektiösen PrP^{Sc}-Form? Prion-Krankheiten können durch genetische Defekte, d.h. Mutationen im Prion-Gen, oder durch externe Aufnahme von Prion-infiziertem Material verursacht werden. Die familiäre Creutzfeld-Jakob-Krankheit wird auf unterschiedliche Mutationen im Prion-Gen zurückgeführt. Diese bedingen Aminosäureaustausche, die höchstwahrscheinlich die Struktur des endogenen PrP^C destabilisieren und somit die Umwandlung in die infektiöse PrP^{Sc}-Konformation erleichtern (s. Abbildung 8A). Patienten mit Symptomen der Creutzfeld-Jakob-Krankheit können mit Hilfe der PCR-Technologie auf potentielle Mutationen im Prion-Gen untersucht werden (s. Kapitel 3.2). Eine Unterscheidung zwischen genetisch bedingter oder einer eventuell durch den Konsum von Prion-verseuchtem Rindfleisch verursachten Creutzfeld-Jakob-Krankheit wird somit ebenfalls ermöglicht.

Das Füttern mit infiziertem Tierfutter bedingte das Auftreten von schätzungsweise 1 Million infizierter Rinder in Großbritannien. Das infizierte Material wirkt höchstwahrscheinlich als Kristallisationskeim zur Bildung von PrP^{Sc}-Aggregaten und katalysiert die Umwandlung von endogenem PrP^C zu PrP^{Sc} (Abb. 8B). Die Vermehrung bzw. Entstehung der infektiösen Prion-Partikel ist daher an das Vorhandensein des zelleigenen Proteins gekoppelt. Transgene Mäuse mit einer Deletion des Prion-Gens sind gegenüber einer Infektion mit Prion-infiziertem Material resistent. Der Zeitraum zwischen der Aufnahme von infiziertem Material und Ausbruch der Krankheit ist von der Menge und Art (**Spezies-Barriere**) des aufgenommenen PrP^{Sc} abhängig. Therapeutische Ansätze zielen auf eine Stabilisierung des endogenen Prion-Proteins, um dessen Umwandlung in die infektiöse PrP^{Sc}-Form zu verhindern.

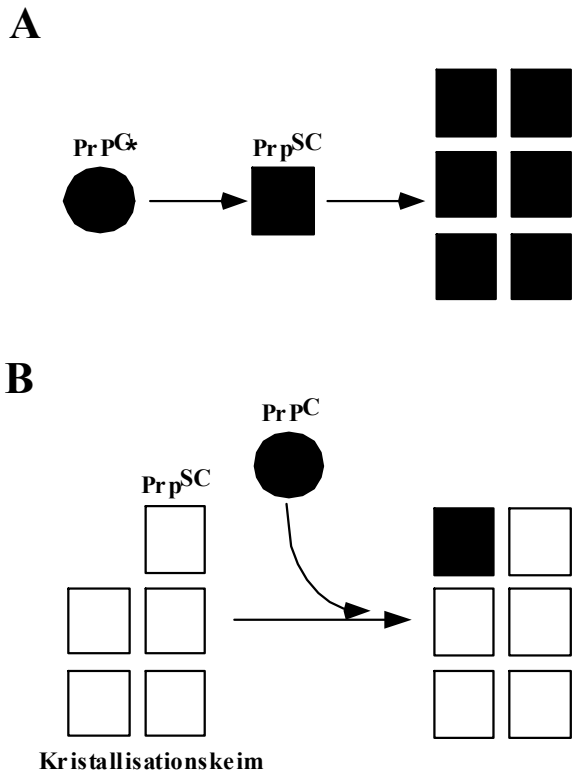


Abb. 8: Schematisches Modell der Umwandlung von PrP^{C} zu PrP^{Sc}

A: Eine Mutation im Prion-Gen führt zur Synthese eines veränderten Prion-Proteins (PrP^{C*}), welches sich schnell in die infektiöse Konformation PrP^{Sc}umlagert.

B: Der Krankheitsausbruch ohne zugrunde liegende Mutation im Prion-Gen beruht auf der externen Aufnahme von Prion-infiziertem Material, welches als Kristallisationskeim wirkt und die Umwandlung von zelleigenem PrP^{C} zu PrP^{Sc} beschleunigt.

Arbeitsanleitung

Bitte alle Materialien (Spitzen, Reaktionsgefäße etc.) nach Gebrauch in die gekennzeichneten Abfallgefäße geben!

1. PCR Ansatz

Sie erhalten Template DNA vom Assistenten in speziellen, dünnwandigen Reaktionsgefäßen für die PCR ausgeteilt; PCR Puffer, Desoxynukleotide (dNTPs), Primer und Taq DNA Polymerase finden Sie im Eisbad (einmal pro Tisch).
Pipettieren Sie nacheinander folgende Komponenten in das PCR Gefäß:

5 µl PCR Puffer
5 µl Primergemisch
5 µl dNTP's
5 µl Taq DNA Polymerase

ACHTUNG: Benutzen Sie für jede Komponente eine neue gelbe Spitze!

Mischen Sie die Komponenten und zentrifugieren Sie das PCR-Gefäß für 10 Sekunden. Stellen Sie danach das mit Edding auf dem Deckel beschriftete PCR-Gefäß in den PCR Thermocycler und merken Sie sich die Position von Ihrem PCR-Gefäß.

2. Analyse der Produkte der PCR-Reaktion und der Restriktionsspaltung mittels Agarosegelelektrophorese

Die Größe Ihrer Produkte aus der PCR-Reaktion und dem Restriktionsansatz werden nun mittels Elektrophorese im Agarosegel analysiert. Die DNA besitzt durch ihre Phosphatgruppen eine negative Ladung und wandert im elektrischen Feld zum Pluspol hin. Je größer ein DNA Fragment ist, umso langsamer wandert es in der Agarosematrix.
Das Gießen der Agarosegele wird von einem Assistenten demonstriert. Setzen Sie nun eine 2% Agarosesuspension in 50 ml TAE-Puffer (40 mM Tris, 19 mM Essigsäure, 2 mM EDTA, pH=8,0) in einem 250 ml Erlenmeyerkolben an. Bringen Sie die Agarose durch 1-2 min Erhitzen in der Mikrowelle in Lösung (**Vorsicht: Gefahr eines Siedeverzuges** - tragen Sie eine **Schutzbrille** und **Handschuhe).** Nehmen Sie den Erlenmeyerkolben mit einer **Greifhilfe** aus der Mikrowelle. Halten Sie die Öffnung des Erlenmeyerkolbens mit der erhitzten Agaroselösung immer fern von sich selbst und anderen Personen und schwenken Sie den Erlenmeyerkolben im Abzug, damit sich die Agaroselösung gut vermischt. Warten Sie, bis sich

die Agaroselösung etwas abgekühlt hat (man kann den Erlenmeyerkolben kurzzeitig mit der Hand halten) und dichten Sie die Agarosegelapparatur auf beiden Seiten mit 1 ml Agaroselösung ab. Nachdem die Agarose zum Abdichten erstarrt ist, gießen Sie die restliche Agaroselösung in die Apparatur. Setzen Sie den Probentaschenkamm oben ein und lassen Sie das Gel mindestens 30 min fest werden.
Zum Starten des Gels entfernen Sie die Stege zum Gelgießen, füllen Sie die Apparatur mit 1x TAE Puffer bis das Agarosegel reichlich mit Puffer bedeckt ist (aber auf keinen Fall so voll, dass der Puffer überläuft) und ziehen Sie den Probentaschenkamm vorsichtig aus dem Agarosegel. Die Probentaschen sollen sich dabei mit dem 1x TAE Puffer füllen. Bereiten Sie Ihre Proben für die Agarosegelelektrophorese vor. Pipettieren Sie **5 µl von Ihrer PCR Reaktion** in ein frisches Eppendorfgefäß, geben Sie **10 µl Wasser und** 5 µl 4x **Agarosegel-Probenpuffer** (30% Glycerin, 1 mM EDTA, 0,125% Bromphenolblau, 16x SYBR Green I) dazu. Die mit Agarosegel-Puffer versetzten Proben werden noch kurz zentrifugiert, damit Sie Ihre Proben leichter auf das Agarosegel auftragen können. Pipettieren Sie zunächst den Marker (**10 µl pro Spur**) in die beiden Randspuren und dann Ihre mit dem Probenpuffer versetzte PCR-Probe (je 20 µl) vollständig in eine Probentasche dazwischen. Tragen Sie Ihre Probennummer in die unten stehende Tabelle ein.
Setzen Sie erst den Deckel auf die Agarose-Gelapparatur und verbinden Sie die Apparatur mit dem ausgeschalteten Netzgerät, um die Gefahr eines Elektrounfalls zu vermeiden (Polung: DNA ist negativ geladen und läuft zum Pluspol). Stellen Sie das Netzgerät auf 75 V und 400 mA ein und starten Sie die Agarosegelelektrophorese. Nach zwei Minuten sollten Sie kontrollieren, ob Sie Ihr Gel richtig gepolt haben. (Bromphenolblau sollte aus den Taschen in das Gel in die gewünschte Richtung eingelaufen sein). Stoppen Sie Ihr Gel nach 30 min und betrachten Sie Ihre DNA-Proben in Ihrem Gel auf einer UV-Durchlichtbank (**Vorsicht UV-Strahlung – tragen Sie Schutzbrille und Handschuhe**). Lassen Sie Ihr Gel eventuell noch weiterlaufen (evtl. TAE-Puffer nachfüllen) damit Sie eine gute Auftrennung der unterschiedlich großen DNA-Banden haben. Ihr Gel wird von einem Assistenten fotografiert und Sie erhalten einen Ausdruck für die Auswertung.

Gruppe													
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Marker													Marker

Western-Blotting

1. Einführung

Analog zum Southern-Transfer von DNS gibt es unter dem Namen „Western-Blotting“ auch ein Verfahren zum Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose. Der Transfer der Proteine erfolgt dabei elektrophoretisch. Die ungefärbten SDS-Proteingele werden dazu zusammen mit der Nitrozellulose zwischen zwei große Elektroden einer eigens dafür gebauten Blot-Apparatur gelegt und dann für ca. eine Stunde bei hoher Stromstärke an ein Spannungsgerät angeschlossen. Zur Übertragung der Feldstärke müssen Gel und Nitrozellulose hinreichend mit einem Blotpuffer getränkt sein, weshalb auf die Elektroden einige Lagen Filterpapier gelegt werden.
Nach dem Western-Transfer kann man die übertragenen Proteine durch den roten Farbstoff Ponceau anfärben. Entscheidend ist aber, dass man die Nitrozellulose-Blots mit spezifischen Antikörpern inkubieren kann. Diese binden an die Nitrozellulose-gebundenen Proteine, gegen die sie spezifisch gerichtet sind. Die gebundenen Antikörper werden dann durch einen zweiten Antikörper nachgewiesen, wobei dieser zweite Antikörper zum einen mit dem ersten Antikörper reagiert, zum anderen aber auch mit einem Enzym verbunden ist, über dessen Aktivität sich der Antikörper auf dem Blot lokalisieren lässt. Meist handelt es sich beim ersten Antikörper um einen Kaninchen-Antikörper, weil man in den Instituten normalerweise Kaninchen mit Proteinen immunisiert, an denen man besonders interessiert ist. Der zweite Antikörper wird von bestimmten Firmen geliefert und normalerweise aus dem Blut von Ziegen gewonnen, die mit dem Kaninchen-Antikörpern immunisiert wurden.

Der zweite Antikörper ist in vielen Fällen mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Nach Zugabe der beiden Substrate Diaminobenzidin und Wasserstoffperoxid wird von der Peroxidase die Oxidation des farblosen Diaminobenzidins zu einem farbigen, unlöslichen Produkt katalysiert, das sich an der Stelle des Protein-Antikörper-Komplexes niederschlägt, also dort, wo das nachzuweisende Protein vorliegt.

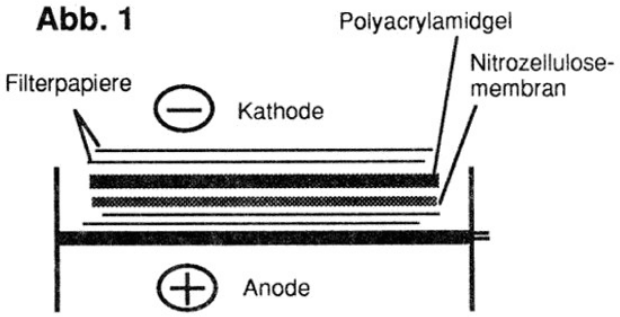
2. Protokoll

Die Durchführung des Experiments ist auf den folgenden Seiten genauer beschrieben.

Western Blot (1. Teil): Durchführung eines Elektro-Blottes

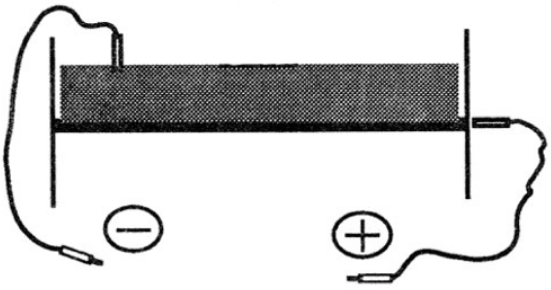
Nach erfolgter elektrophoretischer Auftrennung von Proteinen wird das Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran in die Elektro-Blot-Apparatur gelegt. Der Boden der Apparatur bildet den Pluspol (Anode), die zweite Elektrode (Kathode) befindet sich im Deckel.
Um einen Stromfluß zwischen Kathode und Anode zu ermöglichen, werden über und unter das Gel und die Nitrozellulosemembran in Puffer getränkte Filterpapiere gelegt (Abb. 1). Diese Methode des Elektro-Blotting wird auch als Semi-Dry-Blot bezeichnet.

Abb. 1

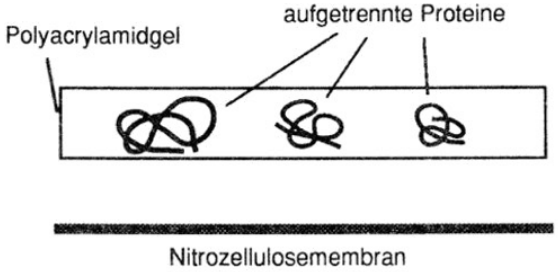


Den Deckel oben aufsetzen, diesen mit einem Gewicht beschweren und die Blotkammer an ein Spannungs-gerät anschließen, dabei auf die richtige Polung achten! (Abb. 2)
1 Stunde bei 250 mA blotten.

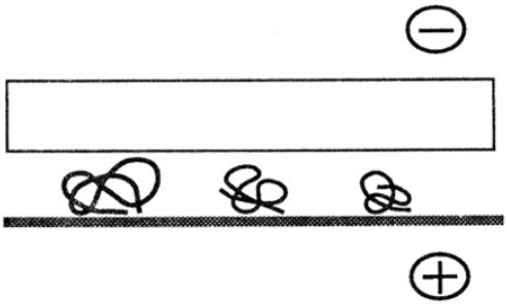
Abb. 2



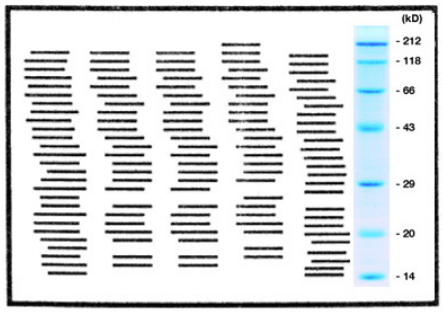
Vor Transfer:



Nach erfolgtem Transfer:



MGM



Die Apparatur auseinander bauen und die Nitrozellulosemembran in eine Lösung des Farbstoffs **Ponceau S** einlegen. Die auf der Nitrozellulose gebundenen Proteine werden dabei rot angefärbt.
Die Molekulargewichtsmarkerproteine (MGM) nachzeichnen sowie Proteinspuren oben markieren.

Western Blot (2. Teil):
Nachweis eines bestimmten Proteins über Antikörper-Reaktion

- Mitochondriale Proteine werden in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und durch einen Elektro-Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen
- Die Nitrozellulosemembran wird in einer Lösung des roten Farbstoffs **Ponceau S** geschwenkt

- Jede Gruppe erhält einen Streifen der Nitrozellulosemembran auf dem rot angefärbten Proteine zu sehen sind
- **Markieren** des oberen Endes des Nitrozellulosestreifens sowie Nachzeichnen der einzelnen Molekulargewichtsmarkerproteine mit Kugelschreiber
- In ein 50 ml Röhrchen werden 20 ml **Milchpulverlösung** (5%) gegeben, der Nitrozellulosestreifen hineingelegt, das Röhrchen verschlossen und für ca. 5 Minuten zur Inkubation auf den Schüttler gelegt

In diesem Schritt werden die noch proteinfreien Bereiche auf der Nitrozellulosemembran mit Proteinen abgesättigt. Dies ist nötig, um eine unspezifische Hintergrundreaktion zu vermeiden.

- Zu der Milchpulverlösung werden 20 µl Antiserum (aus Kaninchen) pipettiert und die Lösung wie oben mit dem Nitrozellulosestreifen für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert

- Das Antiserum enthält Antikörper, die spezifisch gegen eines der mitochondrialen Proteine gerichtet sind (im Verlauf des Praktikums werden verschiedene Antiseren verwendet).
- Zurückgießen der Antikörperlösung in ein Vorratsgefäß
- Der Streifen wird zweimal für einige Minuten mit einer gepufferten Salzlösung (TBS-Puffer) gewaschen

Dieser Waschschritt entfernt unspezifisch an die Membran gebundene Antikörper.

- 20 ml der Lösung des **2. Antikörpers** (Antikörper (aus der Ziege), gerichtet gegen Kaninchen-Antikörper, gekoppelt an das Enzym Peroxidase) werden in das Röhrchen pipettiert und wiederum für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert
- Zurückgießen der Antikörperlösung in ein Vorratsgefäß
- Der Streifen wird zweimal für 5 Minuten (oder länger) mit TBS-Puffer gewaschen

- **Farbreaktion:** Der Nitrozellulosestreifen wird in der Entwicklerlösung (0,6 mg/ml Diaminobenzidin; 0,03% H_2O_2) geschwenkt, bis Banden sichtbar werden

Anhang: Prinzipien molekularbiologischer Techniken

Antikörper erlauben den spezifischen Nachweis bestimmter Proteine, und zwar auch dann noch, wenn es sich um Proteine handelt, die in winziger Menge und vermischt mit sehr vielen anderen Proteinen vorkommen. Hier begegnen wir wieder einem sehr charakteristischen Aspekt der Molekularbiologie, nämlich der eingangs bereits angesprochenen Aufgabe, Substanzen zu charakterisieren, die nicht in beliebiger Menge rein auf dem Tisch liegen, sondern die es nur in winzigen Mengen unter Tausenden anderer sehr ähnlichen Substanzen gibt. Die Möglichkeit, überhaupt so etwas wie Molekularbiologie betreiben zu können, beruht wesentlich auf den Methoden, mit denen Proteinen und Nukleinsäuren in hoher Verdünnung nachgewiesen und charakterisiert werden können. Diese Methoden umfassen mehrere durchaus unterschiedliche Techniken:

1. Die Möglichkeit, Nukleinsäuren spezifisch vervielfältigen zu können, so dass eine Nukleinsäure, von der zunächst nur sehr wenig vorhanden ist, schließlich in größerer Menge vorliegt.
2. Der Einsatz von spezifischen Antikörpern, die ihre Antigene selbst dann noch finden, wenn diese in einer Mischung mit sehr vielen anderen sehr ähnliche Substanzen gegeben sind. Die Antikörper können über eine enzymatische Reaktion lokalisiert werden, wobei die enzymatische Reaktion so lange laufen kann, bis ein zunächst sehr schwaches Signal hinreichend amplifiziert ist. Hier wird also nicht das Antigen selbst, sondern die Nachweisreaktion amplifiziert.
3. Auf eine weitere sehr wichtige Technik sei hier nur am Rande hingewiesen: Man kann einzelne Substanzen, ja sogar Atome, im Stoffwechsel wie in experimentellen Ansätzen sehr gut nachweisen und in ihren Modifikationen verfolgen, wenn sie radioaktiv markiert sind. Große Mengen an Radioaktivität sind hierzu gar nicht nötig, denn es reicht dem Molekularbiologen, wenn er die Stoffe, die ihn interessieren, gerade eben nachweisen kann. So kann man Proteine radioaktiv markieren, gewöhnlich mit dem Schwefel-Isotop 35^{s}, und die markierten Proteine nach beliebigen Experimenten durch SDS-Gelelektrophorese mit nachfolgendem Auflegen eines Röntgenfilmes nachweisen. Alle anderen Proteine der Probe wird man auf dem Röntgenfilm nicht sehen, da sie nicht radioaktiv sind. Das Prinzip dieser Technik ist hier also die spezifische Markierung.

Wenn die Methoden der Molekularbiologie auch ständig weiterentwickelt werden und es auch für die Molekularbiologen selber kaum möglich ist, den Überblick über die vielen Neuentwicklungen zu behalten, so fällt doch auf, dass es immer wieder die gleichen Prinzipien sind, die zur Anwendung kommen.