Klassische Hämophilie – Genklonierung von Faktor VIII

von Jonas Breuer und Dr. Monika Pohlmann

© Getty Images Plus/iStock/LoveTheWind

VORSCHAU

Diese Leistungskontrolle für die gymnasiale Oberstufe basiert auf grundlegenden molekulargenetischen Kompetenzen zur Proteinbiosynthese, zum Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion, aber auch zur klassischen Genetik. Die Schülerinnen und Schüler formulieren in einer Stammbaumanalyse Hypothesen zum möglichen Vererbungsmodus der Hämophilie und überprüfen diese auf der Grundlage ihrer Kenntnisse zur Meiose und der Mendel'schen Regeln.

netzwerk lernen

zur Vollversion

Klassische Hämophilie – Genklonierung von Faktor VIII

Niveau: weiterführend, vertiefend

von Jonas Breuer und Dr. Monika Pohlmann

Methodisch-didaktische Hinweise 1

Vorausgesetztes Fachwissen 2

M 1: Hämostase – Prozess der Blutstillung 3

M 2: Hämophilie – eine genetisch bedingte Erkrankung 5

M 3: Klonierung von Faktor VIII 6

Lösungen 9

Literaturverzeichnis 16

© RAABE 2020

VORSCHAU

Kompetenzprofil:

Kompetenz	Anforderungs-bereich	Basiskonzept	Material
Fachwissen, Erkenntnisgewinnung	I–III	Struktur und Funktion, Steuerung und Regelung	M 1–3

netzwerk lernen

zur Vollversion

M 3 Klonierung von Faktor VIII

Bis ins Jahr 2002 wurden Menschen mit klassischer Hämophilie mit Transfusionen aus menschlichem Blutplasma behandelt, die den Faktor VIII enthielten. Diese Form der Therapie beinhaltete das Risiko einer Infektion mit Hepatitis-Viren (Leberentzündung) und in neuerer Zeit mit HI-Viren (Aids). Mithilfe von biochemischen Reinigungsverfahren und gentechnischer Methoden ist es gelungen, das für Faktor VIII codierende Gen zu isolieren und in Zellkulturen zu exprimieren (Abb. 3). Dieser Vorgang wird als Klonierung des Faktor-VIII-Proteins bezeichnet. Faktor VIII wird heute als rekombinantes Konzentrat gentechnisch hergestellt. Dies bietet hohe Sicherheit vor Verunreinigungen, z. B. mit Viren. Außerdem ist jederzeit eine ausreichende Versorgung der Patienten gewährleistet.

Schritt der Klonierung des Fakto-VIII-Proteins: Ligation

Zuerst müssen vor bzw. hinter dem für Faktor VIII codierenden Gen experimentell Schnittstellen für das Restriktionsenzym EcoRI hinzugefügt werden. Dieser Gen-Abschnitt wird anschließend durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Anschließend werden dieser Gen-Abschnitt und ein Expressionsvektor mit EcoRI geschnitten und zur Ligation zusammengebracht. Als Expressionsvektoren können Plasmide eingesetzt werden. Im Klonierungsexperiment wird das für Faktor VIII codierende Gen entweder in den Expressionsvektor an der Schnittstelle von EcoRI eingebaut oder die Ligase verknüpft nur Teile des Expressionsvektors, sodass das Gen nicht eingebaut wird.

Schritt der Klonierung des Faktor-VIII-Proteins: Selektion

Besondere Bedeutung haben das lacZ-Gen und der gentechnisch veränderte E.-coli-Stamm DH5-α. Das lacZ-Gen codiert für eine ß-Galactosidase, die den gelben Farbstoff XGal in einen blauen Indigo-Farbstoff und Galaktose spaltet. Bakterien des E.-coli-Stamms DH5-α tragen auf ihrem lacZ-Gen eine Mutation, sodass diese Zellen keine enzymatisch aktive β-Galactosidase synthetisieren können. Die mutierte, funktionslose β-Galactosidase kann jedoch durch das Genprodukt des intakten lacZ-Gens auf dem Plasmid in eine enzymatisch aktive β-Galactosidase umgewandelt werden. Auf dem Plasmid wird ein kurzes Peptid (α-Peptid) der tetrameren (= bestehend aus 4 Untereinheiten) Galactosidase exprimiert, welches die mutierte genomische Peptidsequenz

VORSCHAU
© RAABE 2020

netzwerk lernen
zur Vollversion

ersetzen kann. Dies ist aber nur möglich, solange im Plasmid kein DNA-Abschnitt an der Schnittstelle des Enzyms EcoRI eingebaut wird, da sonst das lacZ-Gen seine Wirkung verliert. Idealerweise ergibt sich nach dem Ausplattieren der Zellen eine Auftrennung in weiße und blaue Kolonien, die als Blau-Weiß-Selektion bezeichnet wird.

Aufgaben

1. **Beschreiben** Sie auf molekularem Niveau die Blutgerinnungsstörung bei Menschen mit klassischer Hämophilie (M 1). (8 Punkte)

2. **Beschreiben und analysieren** Sie den Erbgang für klassische Hämophilie und **bestimmen** Sie für alle aufgeführten Personen des Familienstammbaums den Genotyp (M 2). (23 Punkte)

3. **Erklären** Sie die Funktion der einzelnen Komponenten des Expressionsvektors (Abb. 3) und **beschreiben** Sie die wesentlichen Schritte einer Polymerase-Kettenreaktion (M 3). (11 Punkte)

4. **Erläutern** Sie das molekulare Prinzip, welches der Blau-Weiß-Selektion zugrunde liegt (M 3) und **beurteilen Sie begründend**, welche Kolonien weiter behandelt werden müssen, um das Faktor-VIII-Protein zu isolieren. (13 Punkte)

5. Die Genetikerin Clara F. will das Faktor-VIII-Protein klonieren. Nach dem Ausplattieren wartet sie einen Tag lang, bis die Bakterienzellen Kolonien gebildet haben. Am Folgetag findet sie auf der XGal- und Ampicillin-haltigen Agarplatte lediglich blaue Kolonien.

   Entwickeln Sie begründete **Hypothesen,** wie es zu diesem Ergebnis gekommen sein könnte, und **nennen** Sie mindestens fünf Merkmale, warum sich E. coli als Modellorganismus für dieses Experiment eignet. (11 Punkte)

© RAABE 2020

VORSCHAU

netzwerk lernen
zur Vollversion