

Klassische Hämophilie – Genklonierung von Faktor VIII

von Jonas Breuer und Dr. Monika Pohlmann



© Getty Images Plus/stock/LeaTheWind

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 Stammanalyse Hypothesen zum möglichen Vererbungsmodus der Hämophilie und überprüfen diese auf der Grundlage ihrer Kenntnisse zur Meiose und der Mendelschen Regeln.

Impressum

RAABE UNTERRICHTS-MATERIALIEN Biologie Sek. II

Das Werk, einschließlich seiner Teile, ist urheberrechtlich geschützt. Es ist gemäß § 60b UrhG hergestellt und ausschließlich zur Veranschaulichung des Unterrichts und der Lehrpläne an Bildungseinrichtungen bestimmt. Die Dr. Josef Raabe Verlags-GmbH erteilt Ihnen für das Werk das einseitig nicht übertragbare Recht zur Nutzung für den persönlichen Gebrauch gemäß vorgenannter Zweckbestimmung. Unter Einhaltung der Nutzungsbedingungen sind Sie berechtigt, das Werk zum persönlichen Gebrauch gemäß vorgenannter Zweckbestimmung in Klassensatzstärke zu vervielfältigen. Jegliches darüber hinausgehende Verwertung ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Hinweis zu § 60b Abs. 1 UrhG: Das Werk oder Teile hiervon dürfen nicht ohne eine solche Einwilligung an Schulen oder in Unterrichts- und Prüfungsstätten (§ 60b Abs. 3 UrhG) vervielfältigt, insbesondere kopiert oder eingescannt, verbreitet oder in ein Netzwerk eingestellt oder sonst öffentlich zugänglich gemacht oder wiedergegeben werden. Dies gilt auch für Intranets von Schulen und sonstigen Bildungseinrichtungen. Die Aufführung abgedruckter musikalischer Werke ist ggf. GEMA-meldepflichtig.

Für jedes Material werden Fremdrechte recherchiert und ggf. angefragt.

Dr. Josef Raabe Verlags-GmbH
Ein Unternehmen der Klett-Gruppe
Rotebühlstraße 77
70178 Stuttgart
Telefon +49 711 62900-0
Fax +49 711 62900-60
mailto:info@RAABE-raabe.de
www.raabe.de

Redaktion: Anne Zörlein
Verlag: Rosen MEDIA GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bildrechte: Titel: Getty Images Plus/iStock/LoveTheWind
Korrektur: Stefan Mayer

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

Kompetenzprofil:

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

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 Faktor-VIII-Proteins: Ligation

Zuerst müssen vor bzw. hinter dem für Faktor VIII codierenden Gen experimentell Schnittstellen für das Restriktionsenzym EcoRI eingefügt werden. Dieser Gen-Abschnitt wird anschließend durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Anschließend werden dieser Gen-Abschnitt und der 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 mit 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 β -Galactosidase, die den gelben Farbstoff XGal aus dem 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) β -Galactosidase exprimiert, welches die mutierte genomische Peptidsequenz

ersetzen kann. Dies ist aber nur möglich, solange im Plasmid kein DNA-Abschnitt zwischen der Schnittstelle des Enzyms EcoRI eingebaut wird, da sonst das lacZ-Gen seine Wirkung verliert. Idealerweise ergibt sich nach dem Ausplattieren der Zellen eine Aufspinnung 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 X-Gal 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)

Der RAABE Webshop: Schnell, übersichtlich, sicher!



Wir bieten Ihnen:



Schnelle und intuitive Produktsuche



Übersichtliches Kundenkonto



Komfortable Nutzung über
Computer, Tablet und Smartphone



Höhere Sicherheit durch
SSL-Verschlüsselung

Mehr unter: www.raabe.de