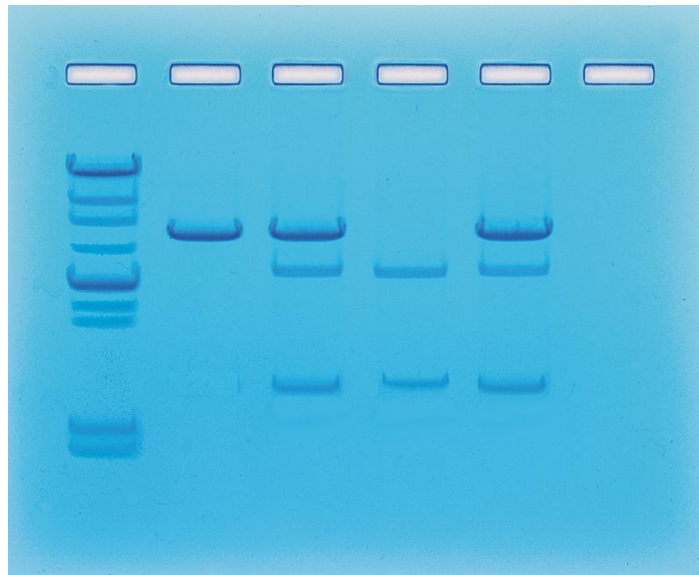


Detektion von Marker-Genen



Alle Komponenten des Kits sind ausschließlich für die pädagogische Forschung bestimmt. Sie können nicht zu diagnostischen Zwecken – weder am Menschen noch am Tier – verwendet werden.

Dieses KIT beinhaltet KEINE menschlichen DNS-Samples, noch stammen andere Komponenten aus humanen Quellen!

Was ist im Kit enthalten?

Was wird zusätzlich benötigt?

Hintergrundinformationen

Experimentelle Verfahrensanweisungen

Erstellen von Familienstammbäumen

Experimenteller Überblick

Allgemeine Hinweise

Elektrophorese

Gel-Vorbereitung

Durchführung der Elektrophorese

Färbung und Visualisierung von DNS

Methode 1: One-Step Färben und Entfärben mit InstaStain® Methylenblau

Methode 2: Färbung mit InstaStain® Methylenblau
Methode 3: Liquid Färbung mit Methylenblau Plus™
Fragen

Leitlinien für den Lehrer

Erläuterungen

Vorbereitungen

Vorbereitungen zur Durchführung der Agarose-Gel-Elektrophorese
Ergebnisse und Analyse

Fragen und Antworten

Sicherheitsdatenblätter

Inhalt des Kits

Ready-to-Load™ DNS-Proben für die Gelelektrophorese

- A Standard DNA Fragments
- B Control DNA
- C Patient Peripheral blood DNA
- D Patient Breast Tumor DNA
- E Patient Normal Breast Tissue DNA

Erforderliches Zubehör (im KIT enthalten)

- UltraSpec-Agarose™ Pulver
- Konzentrierter Elektrophorese-Puffer
- InstaStain® Methylenblau

- Methylenblau Plus™
- Gel-Lade-Puffer
- 1 ml Pipette
- 100 ml Messzylinder (Verpackungen für Proben)
- Transferpipetten

Erforderliches Zubehör (nicht im KIT enthalten)

- Horizontale Gelelektrophorese-Apparatur
- Gleichstrom-Netzteil
- Automatische Mikropipetten mit Tipps
- Waage
- Mikrowelle, Heizplatte oder Brenner
- Peleusball
- 250 ml Flaschen oder Becher
- Hitzestabile Handschuhe
- Schutzbrille und Einweg-Labor -Handschuhe
- Kunststoff-Färbewannen
- DNS-Visualisierungssystem (optimal: weißes Licht mit Bernsteinfilter)
- Destilliertes oder de-ionisiertes Wasser

Die im Kit enthaltenen DNS-Proben können bis zu einem Monat ungekühlt gelagert werden. Möchten Sie den Versuch erst später durchführen, so empfiehlt es sich die Proben und Pufferlösungen bei -4°C zu lagern. Die Lösungen und Proben sind gekühlt bis zu 2 Jahren haltbar.

Lernziele

Mit diesem Experiment lernen die Kursteilnehmer das Aufbereiten von DNS-Samples mit nachfolgender Agarose-Gelelektrophorese. Die abschließende Analyse dieses Experimentes ermöglicht eine konkrete Erklärung zu einer recht abstrakten Problemstellung zu erstellen.

Zeitaufwand

Gel-Vorbereitung: Für die Vorbereitung des Gels (unabhängig ob Sie selbst oder Ihre Schüler das Gel gießen) sollten Sie rund 30-40 Minuten einplanen. Weitere 20 Minuten benötigt das Gel für die vollständige Erstarrung.

Sie können die gegossenen Gele bis zum eigentlichen Gebrauch für ein bis zwei Wochen im Kühlschrank aufbewahren. Wickeln Sie hierfür die Gele in Frischhaltefolie ein oder legen Sie sie in einen Plastikbeutel mit Druckverschluss. Geben Sie zuvor ein bisschen Puffer auf das Gel – so können Sie vermeiden, dass das Gel austrocknet.

Wenn Sie am Ende der Unterrichtseinheit noch ungebrauchte, ausgehärtete Agarose(gele) haben, können Sie diese wieder in die Flasche zurückgeben und beim nächsten Mal nach

Erwärmen/Schmelzen wiederverwenden. Agarose kann in einer Laborflasche aufbewahrt und ohne Probleme nach Bedarf erhitzt/geschmolzen werden.

Versuchsablauf: Die Agarose-Gelelektrophorese eines Gels dauert ca. 40 min. Die Färbung kann entweder über Nacht oder innerhalb von 3 Stunden erfolgen.

Hintergrundinformationen

Familienstammbäume

Zur Erstellung von Familienstammbäumen beachten Sie bitte folgendes:

- Ein Kreis steht für eine Frau
- Das Quadrat steht für einen Mann
- Ein schattiger Kreis oder ein schattiges Quadrat bezieht sich auf eine Person, die irgendeine Form von Krebs hat
- Ein offenes (nicht schattiertes) Symbol steht für eine Person, die frei von Krebs ist.
- Ein Kreis oder Quadrat (entweder im Schatten oder offen) mit einem Schrägstrich repräsentiert eine an Krebs verstorbene Person



Abbildung 1: Darstellung der Tumorentstehung nach dem „Two-Hit“-Modell

Beim Li-Fraumeni-Syndrom handelt es sich um ein autosomal dominantes Tumorprädispositions-Syndrom, das durch das Auftreten multipler Tumoren im Kindes- und frühen Erwachsenenalter charakterisiert ist. Im Kindesalter werden Tumore der Nebenniere,

Weichteilsarkome, Leukämien und ZNS-Tumore am häufigsten beobachtet. Im Erwachsenenalter finden sich gehäuft Osteosarkome und Brustkrebs. Das Li-Fraumeni-Syndrom wird durch Mutationen im p53 Gen auf Chromosom 17 (17p13.1) verursacht. In etwa 75% der Fälle findet sich eine positive Familienanamnese, die übrigen Erkrankungsfälle werden durch Neumutationen verursacht. Die Diagnose eines Li-Fraumeni-Syndroms wird klinisch anhand folgender Kriterien gestellt:

- Auftreten eines Sarkoms vor dem 45. Lebensjahr und
- mindestens 2 Verwandte ersten oder zweiten Grades mit Karzinom vor dem 45. Lebensjahr oder einem Sarkom unabhängig vom Alter

Die Untersuchung ist ebenfalls indiziert bei:

- Vorliegen von drei unabhängigen Primärtumoren, von denen der erste vor dem 45. Lebensjahr diagnostiziert wurde oder
- einer Kombination von einem Tumor im Kindesalter oder einem Li-Fraumeni-Syndrom assoziierten Tumor vor dem 45. Lebensjahr und einem Verwandten I. oder II. Grades mit einem Li-Fraumeni-Syndrom assoziierten Tumor (unabhängig von dessen Alter) und einem Familienmitglied I. oder II. Grades mit irgendeinem Tumor vor dem 60. Lebensjahr.

Mittlerweile wurden bereits viele unterschiedliche Faktoren entdeckt, die zur Entstehung von Krebs beitragen, wozu auch bestimmte Karzinogene in unseren Lebensmitteln und in unserer Umwelt gehören. Die Entstehung einiger weniger Krebsarten werden familiär begünstigt. Gerade diese erblichen Formen von Krebs gehen oft mit einer Veränderung oder Störung der Funktion des p53-Gen einher. Auch wenn diese speziellen Formen von erblichem Krebs nur einen sehr kleinen Teil der Gesamt-Krebserkrankungen ausmachen, so treten sie in dominanten Mustern auf. Keimbahnmutationen des p53-Genes beispielsweise, werden direkt von der Mutter an das Kind weitervererbt. Solche Veränderungen können so starke Einflüsse aufzeigen, dass sie in Familienstammbäumen nachvollzogen werden können. Somatische Mutationen sind lediglich das Einzelindividuum betreffende, körperliche Veränderungen. Sie werden während des Lebens von eben dieser Einzelperson erworben. Die Muster einer typisch erblichen und einer sporadisch erworbenen, nicht-erblichen Krebserkrankung sehen Sie in den Stammbäumen der Zeichnung:

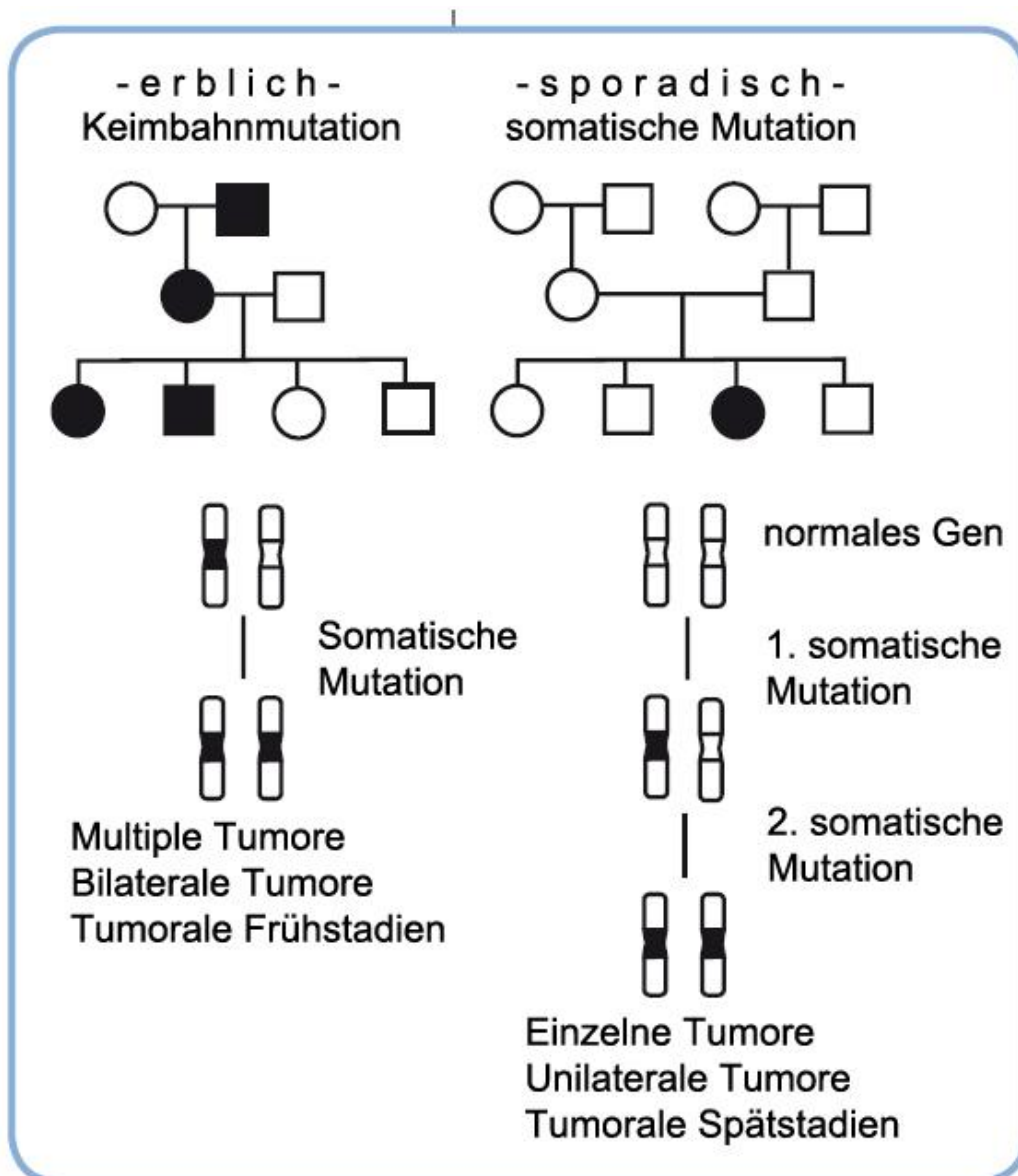


Abbildung 2: Darstellung der Tumorentstehung nach dem „Two-Hit“-Modell

Liegt eine erbliche Mutation (Keimbahnmutation) vor, so kann eine weitere somatische Mutation innerhalb des Suppressor-Genes dazu führen, dass beide Allele inaktiviert werden. Zum Vergleich: normal vererbte Suppressor-Gene, die frei von Mutationen sind, erfordern mindestens zwei somatische Mutationen die eine Veränderung innerhalb der Sequenz verursachen um ein Tumorwachstum zu begünstigen. Auf dieses Modell bezieht sich die "Two-hit" Hypothese. Dieser Begriff ist historisch geprägt, da einige der ersten identifizierten Gene das Retinoblastom-Gen (RB), Wilm`s Tumor (WT1), Neurofibromatose Typ II-Gen und Li-Fraumeni-Syndrom enthielten. Das Li-Fraumeni-Syndrom zeigt im Familienstammbaum häufig mindestens ein Sarkom-Patient und mindestens zwei direkte Verwandte mit anderen

Krebsarten, die vor dem 45. Lebensjahr zum Ausbruch kommen. Außerdem finden sich weitere Familienmitglieder mit unterschiedlichen Krebsarten (siehe Abbildung 2).

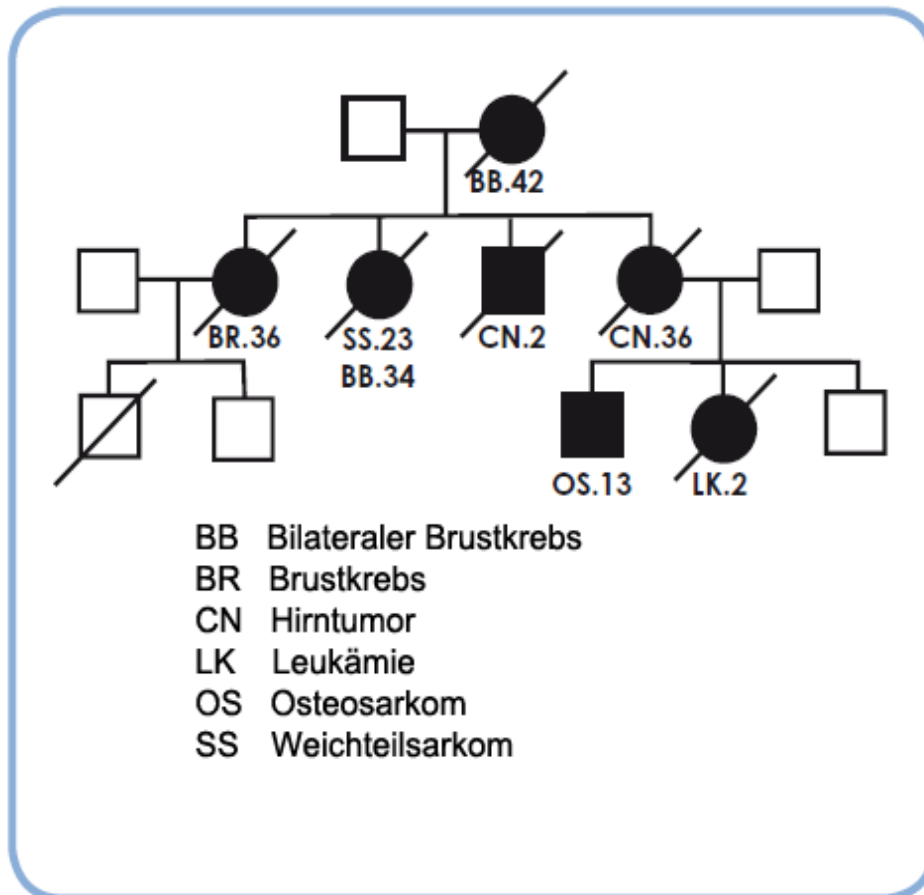


Abbildung 3: Darstellung der Tumorentstehung nach dem „Two-Hit“-Modell

Mit dem Aufkommen von molekularbiologischen Anwendungen in der Medizin, Gen-Karten und dem Wissen an welcher Stelle auf einem Chromosom sich ein bestimmtes Gen befindet, wurden Gene zu Werkzeugen bei der Ermittlung von Prädisposition verschiedener Erkrankungen. Die Vorgehensweise zur Beschaffung dieser Informationen sind DNA-Isolierung und die Analyse von Punktmutationen in Hotspot-Regionen von Krebs-Genen, wie p53. Die klassische DNA-Sequenzierung ist hierbei nur eine von mehreren Analysemethoden zum Nachweis von Punktmutationen in Genen.

Das Human-Genom-Projekt wird in Kürze dazu führen, dass viele zusätzliche Gene, die mit verschiedenen Krebs- und anderen Krankheiten verbunden sind identifiziert werden können. Wie bei den meisten neuen Technologien müssen die so erhaltenen Informationen jedoch zunächst mit Vorsicht behandelt werden. Untersuchungen zu vererbten Krebserkrankungen

und Krebs allgemein ermöglicht Molekularbiologen nach Genen, die vor allem für die Entwicklung normaler Zellen von entscheidender Bedeutung sind und der Krebsentstehung.

Auf molekularer Ebene, bezeichnet Krebs nichts anderes als eine Veränderung in entweder den dominanten Onkogenen und/oder einem der Tumor-Suppressor-Genen, wie beispielsweise dem p53-Gen. Suppressoren sind normale zelluläre Proteine, die an der Begrenzung des Zellwachstums beteiligt sind. Im Gegensatz dazu fördern Onkogene das Wachstum von Zellen. In den letzten Jahren mutierte das p53 Tumorsuppressor-Protein zum zentralen Protein der Onkologie.

1979 wurde das p53 im Komplex mit einem viralen Tumorantigen des Affenvirus SV40 entdeckt und man nahm an, dass es ein virales Protein sei. Nach einigen Jahren war jedoch geklärt, dass es kein virales Protein darstellt, weswegen man ihm den Namen NVT (nicht-virales Tumorantigen) gab. Der Begriff „Antigen“ ist hier etwas irreführend verwendet, da er lediglich aussagen soll, dass dieses Protein in geeigneten Tieren nach Immunisierung eine Immunantwort auslösen kann. Erst Anfang der 80er Jahre wurde es folgerichtig in die Klasse der Onkogene eingeordnet. Das zugehörige Gen für das p53-Protein (*TP53*) befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 (Chromosom 17p13.1). Es kodiert für ein 53.000 kb großes, nukleares Phospho-Protein und wird kursiv geschrieben (*TP53* war früher ein Synonym für menschliches p53)

Das p53-Protein kann in drei Domänen unterteilt werden. Die erste enthält den Amino-Terminus (und damit Region, die für die korrekte Ausführung der Transkription verantwortlich ist), eine Zentral-Domäne in der eine Großzahl der kritischen „Hot-Spots“ verankert sind.

Diese „Hot-Spots“ sind Regionen in denen Mutationen häufig anzutreffen sind. Sie befinden sich zwischen Exon 5 und 8 (95% aller Mutationen finden sich hier). Innerhalb dieser Region befinden sich weitere fünf Unterregionen in denen Punktmutationen beim Auftreten von Krebs gefunden werden. Beispiele für Hot-Spots sind die Codons 165 und 175 in Exon 5, 196 und 213 in Exon 6, 245 und 248 in Exon 7, 273 und 282 in Exon 8, alle befinden sich innerhalb der codierenden Region des p53-Protein. Einige dieser Mutationen führen zur Konformationsänderung des p53-Proteins. Dadurch wird die Stabilität dahingehend verändert, dass das mutierte Protein bindungsunfähig und dadurch quasi inaktiviert wird.

Mit seiner Entdeckung war das Li-Fraumeni-Syndrom noch sehr selten. Trat es auf, so waren meist junge Familienmitglieder betroffen und die Mortalitätsrate sehr hoch. Zwei Physiker, Li und Fraumeni beschrieben dieses Syndrom erstmals nachdem sie 648 Sarkome bei Kindern untersucht hatten. Es wurde in vier Familien entdeckt, wo Geschwister und Cousins während der Kindheit Sarkome ausbildeten. Weitere Analysen zeigten, dass mehr als 50% der Familienmitglieder der betroffenen Familien auffällige Phänotypen (Gehirn-, Brustkrebs und Leukämien) zeigten. Zellen der Personen mit Li-Fraumeni-Syndrom zeigten lediglich

eine einzige Kopie des Wildtyp-p53-Allel. Die Untersuchung des *TP53* zeigte eine Korrelation von Mutationen in dem gezeigten Protein wie oben beschrieben.

Familienstammbäume

Ein erster Schritt bei der Suche und Zuordnung des Li-Fraumeni-Syndrom ist die Erstellung eines Stammbaum des Patienten. Dieser erste Teil des Experiments basiert auf den durch Hausarzt und Onkologe zur Verfügung gestellten Informationen. In unserem Fall erstellen Sie einen Stammbaum für eine junge Frau, die im Verdacht steht unter dem Li-Fraumeni-Syndrom zu leiden. Bei der monatlichen Selbstuntersuchung der Brust, fand Valerie Brown, mit 36 Jahren, einen kleinen, unregelmäßigen Knoten. Sie war besorgt, weil sie wusste, dass ihre Mutter bereits in ihren späten Dreißigern eine Mastektomie hatte. Valerie bespricht diesen Verdacht mit ihrem Hausarzt, der sie umgehend an einen Spezialisten in einem lokalen Krebszentrum überweist. Dort wird ihr Brustkrebs diagnostiziert. Im Rahmen seiner Arbeit erkundigte sich der Onkologe nach Valeries Familiengeschichte. Er erfuhr, dass sowohl ihr Vater, als auch in dessen Familie keine Krebserkrankungen vorliegen. In der Familie von Valeries Mutter traten mehrere Fälle von Krebs auf.

Der Familienstammbaum wurde auf Grundlage der folgenden Informationen erstellt:

- Mutter Diane: Brustkrebs ___ Diagnose mit 39 Jahren, behandelt
- Schwester Mabel: Hirntumor ___ im Alter von 2 Jahren verstorben
- Bruder James: Darmkrebserkrankung ___ operiert, Chemotherapeutische Behandlung
- Großmutter Elsie: Bilateraler Brustkrebs ___ im Alter von 42 verstorben
(mütterlicherseits)
- Großvater Elmer: ohne Vorgeschichte ___ heute 88 Jahre alt
(mütterlicherseits)
- Vetter Patrick: Hirntumor ___ im Alter von 14 verstorben (Sohn von James)
(mütterlicherseits)
- Cousine Jane: Kinderleukämie ___ im Alter von 2 Jahren verstorben
(Patricks Schwester)
- Patricks Brüder: Robert (28) und Curtis (30) erfreuen sich bester Gesundheit
- Schwester Nancy: frei von Krebs
- Michael: Sarkom ___ diagnostiziert mit 3 Jahren, geheilt
(Sohn von Nancy) Osteosarkom ___ diagnostiziert mit 18 Jahren

John, Jessica: gesund

(Kinder von Nancy)

Valerie selbst hat fünf Kinder: Justin (16), Sheila (14), Robert (10), Angela (8), und Anthony (6), von denen keines Anzeichen von Krebs zu diesem Zeitpunkt zeigen. Alle unterzogen sich einem spezifischen diagnostischen Test, um festzustellen, ob sie Mutationen im p53-Gen geerbt haben.

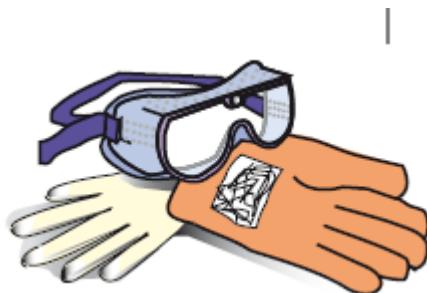
Erstellung von Familienstammbäumen

Die familiäre Abstammung deutet stark auf das Li-Fraumeni-Syndrom. In einem solchen Fall wird zunächst ein sekundärer diagnostischer Test durchgeführt: In unserem Szenario wird eine Probe von Valeries Blut und eine Tumorseite auf *TP53* analysiert. Diagnostisches Standardverfahren zur Erkennung von Punktmutationen in den Hotspots ist zunächst die Polymerasekettenreaktion (PCR).

Anschließend erfolgt ein Simulationsexperiment: Dazu wird Valeries DNS mit Restriktionsenzymen verdaut, die die mutierte Hotspot-Sequenz im Palindrom (=Schnittstelle für Restriktionsenzyme mit spezifischer Rekognition-Site CAGCTG) am Nukleotid 165 erkennen. Die so aufgearbeitete DNS wird zusammen mit einer Kontroll-DNS und verschiedenen Standard-Markern in einem Agarosegel aufgetrennt. Die verdauten Fragmente einer normal amplifizierten DNS ergeben im Agarosegel ein charakteristisches Banden-Muster. Die DNS die aus Valeries Blut erhalten wurde, zeigt ein alternierendes Bandenmuster – nämlich Fragmente des normalen Allels und des mutierten *TP53*-Allel. Die DNS-Analyse des Tumorgewebe zeigt hingegen nur das Bandenmuster beider mutierten Tumor-Allele.

Die vorverdauten DNS-Proben der Wildtyp-Kontrolle und des DNS-Markers werden ebenfalls im Agarosegel aufgetrennt und anschließend gefärbt.

Zielsetzung:



Wie hängt die Expression eines intakten *TP53* mit der Krebsentstehung zusammen?

SICHERHEIT IM LABOR:

1. Handschuhe und Schutzbrille tragen
2. Besondere Vorsicht beim Umgang mit Heizgeräten
3. Nicht mit dem Mund pipettieren
4. Vorsicht bei der Verwendung von elektrischen Betriebsmitteln im Labor
5. Hände immer gründlich nach dem Umgang mit Reagenzien und biologische Materialien waschen.

Laborbuch:

Folgende Arbeitsschritte und Vorgehensweisen sollten unbedingt im Laborbuch festgehalten werden:

Vor dem Experiment:

- Schreiben Sie eine Hypothese, die das Experiment widerspiegelt!
- Welche Ergebnisse erwarten Sie?
- Notieren Sie Ihre Anmerkungen und/oder fotografieren Sie die Ergebnisse!

Nach dem Experiment:

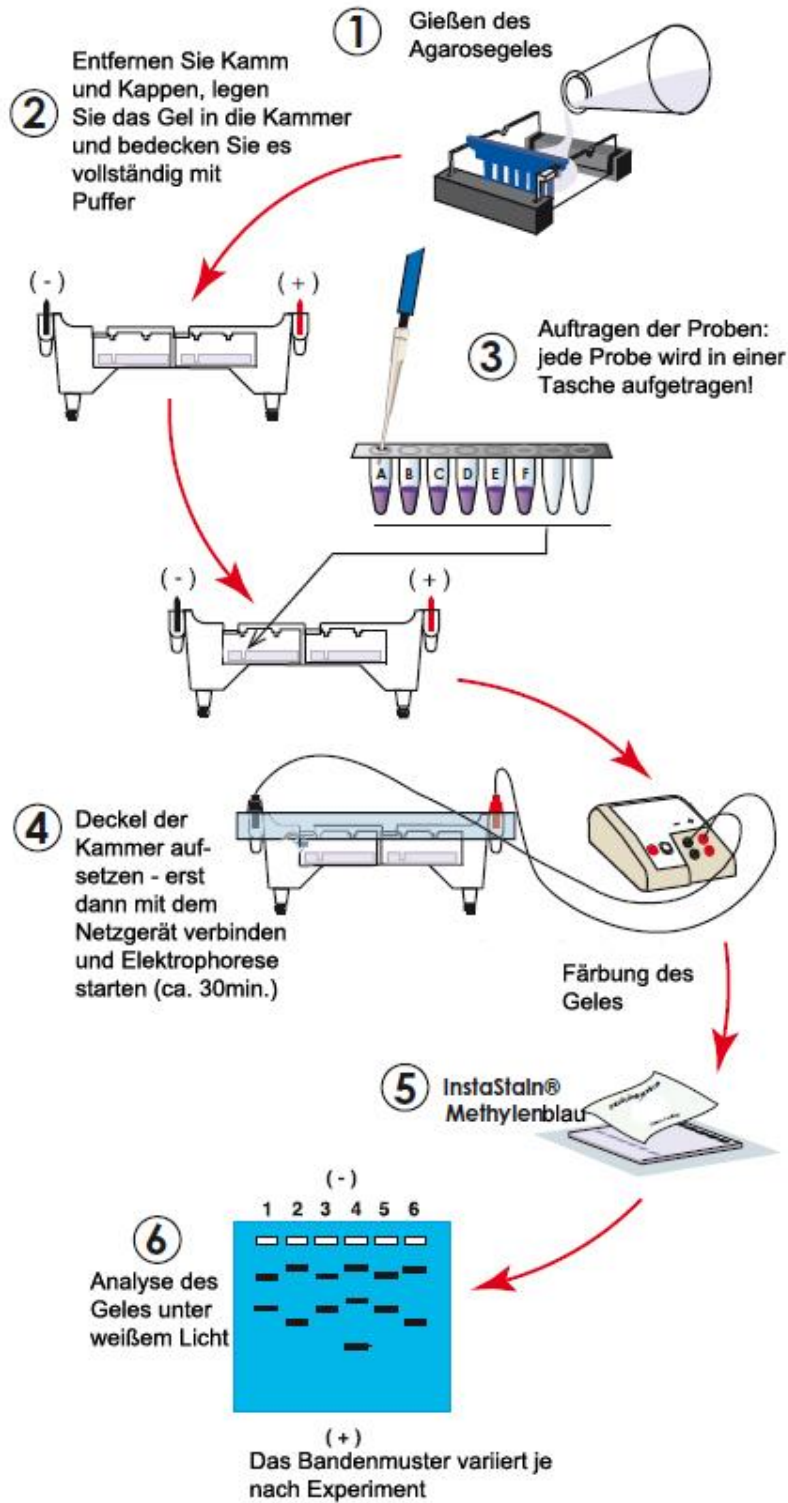
- Formulieren Sie Ergebnisse
- Wurden Änderungen im Versuchsablauf vorgenommen?



Fragen:

- Was ist der Unterschied zwischen einem Tumorsuppressor und einem Onkogene?
- Was sind die Auswirkungen von "Hot Spots" in der p53-Protein-Struktur?
- Warum zeigt Valerie's DNA-Probe aus dem tumorösen Gewebe weniger Banden als die Probe aus peripheren Blut?
- Was ist der Zweck der Kontroll-Spur?
- Was kann ein Arzt mit den Daten dieser molekularbiologischen Diagnose anfangen?

Das Experiment

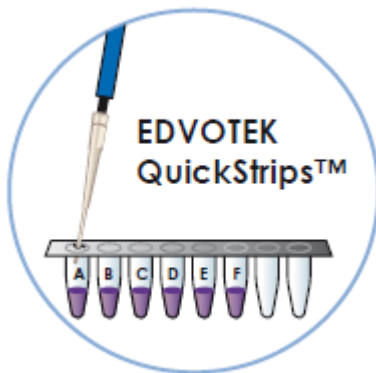


Experimenteller Überblick und generelle Informationen

Vorbereitung der Proben

Sie finden die Proben für unsere Kits entweder als Pre-aliquotierte QuickStrip™ Tubes oder in 1,5 ml oder 0,5 ml Röhrchen Eppendorf-Gefäßen:

Pre-aliquotierte QuickStrip™ Tubes



Jeder Satz QuickStrip™ Stripes enthält mehrere Tubes mit genau richtig vor-aliquotierten Mengen an „Ready-to-load“-Proben für ein Gel. Die Stripes sind durch eine schützende Folie verschlossen und müssen lediglich geöffnet und aufgetragen werden. Klopfen Sie die Proben vor dem Öffnen sanft auf den Tisch um zu garantieren, dass sich die Flüssigkeit auf dem Boden des Eppendorf-Gefäßes sammelt.

Schneiden Sie eine Reihe bereits aliquotierter QuickStrip Proben für jede Laborgruppe ab. Wenn Sie mit Reaktions-gefäßen arbeiten, lassen Sie die Probengefäße rumgehen oder pipettieren Sie für jede Laborgruppe 50 µl von jeder Probe in ein Reaktionsgefäß. Jede Laborgruppe erhält 6 Proben.

Individuelle 1,5ml oder 0,5ml Tubes

Aliquotieren Sie die Proben entweder für Ihre Schüler vor, oder lassen Sie die Schüler selbst die Proben aus den entsprechenden Röhrchen entnehmen.

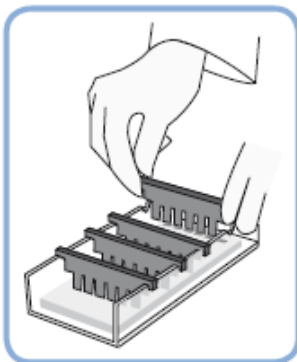


Überprüfen Sie das Probenvolumen. Manchmal bleibt eine kleine Menge der aufzutragenden Probe an den Wand des Eppis zurück.

Stellen Sie sicher, dass die gesamte Probe aufgetragen wird und zentrifugieren Sie die Probengefäße vor dem Auftragen kurz ab.

Jede Laborgruppe benötigt:

- 1 Gel
- 1 Satz DNA Proben
- 1 Mikropipette (40 µl Fixvolumen oder 5 bis 50 µl einstellbar oder Transferpipette mit Mikrospitze)
- 1 InstaStain Methylenblau Färbekarten
- 1 Becherglas mit warmem Leitungswasser (37°C)

Praktische Hinweise zum Beladen eines Geles

Sorgfältiges Bearbeiten der Proben führt zu den bestmöglichen Ergebnissen im Gel. Pipettierfehler können dazu führen, dass die Probe verwässert oder mit Puffer verunreinigt werden kann. Daher sollte beim Auftragen darauf geachtet werden, dass Sie je Probe eine neue Pipettenspitze verwenden. Außerdem sollte die Pipettenspitze NIEMALS so tief in die Geltasche versenkt werden, dass dies zu einem Schaden des Geles führt. Lassen Sie Ihre Schüler die Technik des Beladens zuvor an einem „Probegel“ üben.

1. Stellen Sie zunächst ein Gel mit der maximalen Anzahl von Taschen her
2. Nachdem das Gel erstarrt ist, legen Sie es unter Puffer in eine Färbewanne.
3. Tragen Sie die Proben auf – hierbei ist wichtig die Probe langsam in die Geltasche „einlaufen zu lassen“ ohne das Gel selbst oder die Gel-Tasche mit der Pipettenspitze zu punktieren oder zu beschädigen.

→ Ziel dieser Übung ist es, Ihren Schülern das Pipettieren IN einer Flüssigkeit beizubringen!

Auftragen der Proben:**Pipettieren mit der 40 µl Minipipette:**

- Klopfen Sie behutsam die QuickStrip™ Stripes vorsichtig auf den Labortisch, um sicherzustellen, dass die Proben sich am unteren Ende der Tubes sammeln
- Durchstechen Sie die Schutzfolie der Tubes vorsichtig mit einer frischen Pipettenspitze
Drücken Sie den Pipettenkolben bis zum ersten Anschlag, tauchen Sie die Spitze in die Probe und lassen Sie den Pipettenkolben vorsichtig los (die Probe wird in die Spitze aufgenommen).
- Tauchen Sie die Pipettenspitze mit der Probe in eine Geltasche und lassen Sie die Probe LANGSAM durch behutsames Senken des Pipettenkolbens in die Tasche laufen.
- Wechseln Sie die Pipettenspitze.
- Wiederholen Sie diese Schritte mit einer frischen Pipettenspitze für jede Probe.

Pipettieren mit einer einstellbare Mikropipette:

- Diese Pipetten verfügen über zwei Druckpunkte: Einen ersten weichen Druckpunkt und einen zweiten festen Druckpunkt.
- Setzen Sie eine saubere gelbe Mikropipettenspitze auf das Ende Ihrer Pipette.
- Stellen Sie die Mikropipette auf 40 µl ein (greifen Sie hierfür bei Bedarf auf die Gebrauchsanweisung der Pipette zurück).
- Entfernen Sie den Deckel von dem Gefäß mit dem Übungs-Ladepuffer.
- Drücken Sie den Kolben bis zum ersten Druckpunkt hinunter und tauchen Sie erst dann mit der Spitze in die Flüssigkeit ein.
- Tauchen Sie mit dem Ende der Mikropipettenspitze in den Übungs-Ladepuffer und ziehen Sie 40 µl der dunkelblauen Flüssigkeit durch langsames Nachgeben/Loslassen des Kolbens in die Pipettenspitze auf.
- Beladen Sie damit eine der Geltaschen des Gels („Trockenbeladung“): Drücken Sie hierfür den Kolben bis zum zweiten festen Druckpunkt hinunter. Wenn Sie alle Flüssigkeit aus der Pipettenspitze hinaus gedrückt haben, ziehen Sie die Pipette mit gedrücktem Kolben aus der Geltasche heraus.

Transferpipetten mit feiner Spitze:

Ein vorsichtiges Drücken des Pipettenstamms im Vergleich zum Saugbalg ermöglicht Ihnen eine bessere Kontrolle beim Pipettieren.

Erforderliches Zubehör für dieses Experiment

- Agarosegele in der Größe: 7 x 7 cm or 7 x 14 cm
- Anzahl der Taschen: 5
- Konzentration der Agarosegele: 0.8%

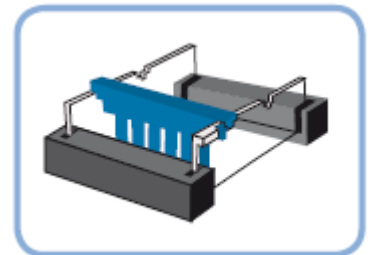


Vorbereitung eines Agarosegels

Verschließen Sie die offenen Enden eines sauberen und trockenen Gel-Schlittens mit Gummikappen oder Klebeband:

A. Verwendung von Gummikappen:

Stecken Sie je eine Gummikappe auf jedes Ende des Gelschlittens und stellen Sie sicher, dass die Kappen fest mit dem Schlitten verbunden sind.



B. Taping mit TESA oder Klebeband:

Verschließen Sie die Enden des Gelschlittens mit Tesaband und erweitern Sie das

Band über die Seiten und den unteren Rand des Bettes.
Falten Sie die erweiterten Ränder des Bandes

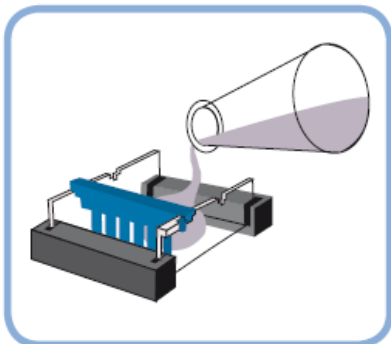
Stecken Sie den Kamm in die dafür vorgesehenen Kerben und achten Sie auf einen festen Sitz.

Mischen Sie die Agarose in einer mikrowellensicheren Flasche:

- 3 g UltraSpec Agarose
- 375 ml verdünnten Elektrophoresepuffer

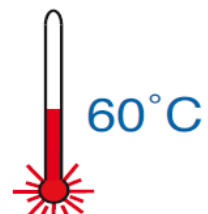
Schwenken Sie die Flasche zum Durchmischen.

Erhitzen Sie die Flasche für eine Minute in der Mikrowelle, schwenken Sie die Flasche erneut und wiederholen Sie diesen Vorgang, bis die Agarose im Puffer gelöst ist. Wenn Sie keine Mikrowelle zur Verfügung haben, können Sie hierfür auch einen Autoklaven oder eine Heizplatte verwenden.



VORSICHT – Die Agarose ist nun heiß und kann Überlaufen (Siedeverzug)!

Lassen Sie die Agaroselösung vor dem Gießen unbedingt bis auf 60°C abkühlen, sonst laufen Sie Gefahr Ihre Gelkammer irreparabel zu beschädigen.



Lassen Sie die Agarose-Lösung langsam und vorsichtig in die versiegelte Gelkammer einfließen. Das Gel ist fertig, wenn es vollständig erkaltet und milchig trüb ist. Erst jetzt

werden Gummikappen (Tesa-Film) und Kamm entfernt (Vorsicht, bei diesem Schritt rutscht das Gel sehr schnell aus dem Schlitten und man beginnt von vorne!)

Das Laden der Proben

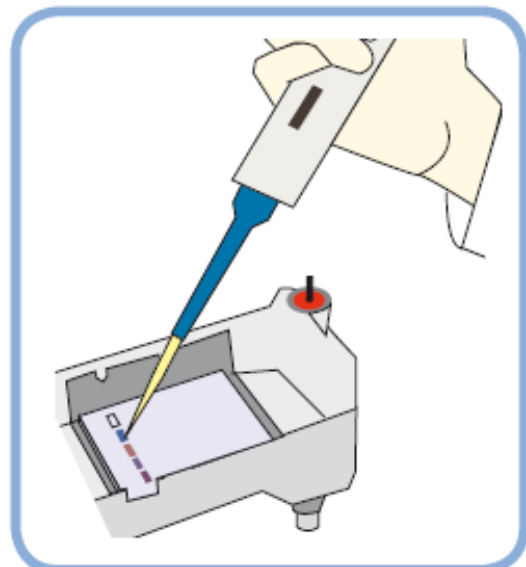
Tipp: Wenn Sie auf einer Arbeitsbank mit heller Oberfläche arbeiten, sollten Sie zum einfacheren Beladen des Gels ein Stück dunkles Papier unter das Gel / die Geltaschen legen.

Das trockene Beladen des Gels

- Wenn Sie Quickstrips verwenden, müssen Sie zuerst mit einer sauberen Pipettenspitze die Folienabdeckung der Probe durchstechen. Klopfen Sie gegen das Reaktionsgefäß, so dass sich die Probe unten im Gefäß sammelt. Wenn Sie mit Reaktionsgefäßen arbeiten, ziehen Sie das Probenvolumen mit einer Mikropipette auf. Klopfen Sie an das Reaktionsgefäß oder zentrifugieren Sie das Gefäß für ein paar Sekunden, so dass sich das Probenvolumen unten im Reaktionsgefäß sammelt.
- Laden Sie 40 µl der Probe A in die Geltasche 1.
- Wechseln Sie die Mikropipettenspitze (oder spülen Sie die Pipette mit Mikrospritze im Becherglas mit warmem Wasser aus).
- Setzen Sie das Laden der Proben in aufeinanderfolgende Geltaschen fort.
- Bringen Sie Ihr Gel zur Elektrophoresekammer.
- Setzen Sie das Gel vorsichtig in die Kammer ein. Achten Sie darauf, dass die Geltaschen am negativen Ende (schwarze Elektrode (Anode)) zu liegen kommen.
- Bedecken Sie das Gel VORSICHTIG UND LANGSAM mit verdünntem Elektrophoresepuffer. Achten Sie darauf, dass Sie die Proben hierbei nicht aus den Geltaschen heraus spülen.

Das nasse Beladen des Gels

- Setzen Sie das Gel vorsichtig in die Kammer ein. Achten Sie darauf, dass die Geltaschen am negativen Ende (schwarze Elektrode (Anode)) zu liegen kommen.
- Bedecken Sie das Gel mit verdünntem Elektrophoresepuffer. Achten Sie darauf, dass das Gel vollständig mit Puffer bedeckt ist.
- Wenn Sie Quickstrips verwenden, müssen Sie zuerst mit einer sauberen Pipettenspitze die Folienabdeckung der Probe durchstechen.

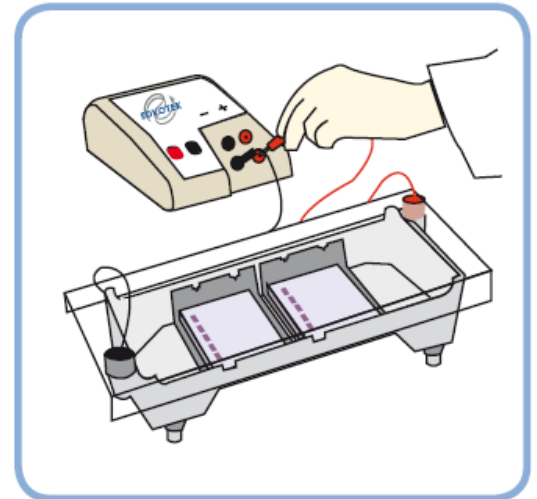


- Laden Sie 40 µl der Probe A in die Geltasche 1.
- Wechseln Sie die Mikropipettenspitze (oder spülen Sie die Pipette mit Mikrospritze im Becherglas mit Wasser aus).
- Setzen Sie das Laden der Proben in aufeinanderfolgende Geltaschen fort.

Das Laufen der Gele

Setzen Sie den Deckel auf die Elektrophoresekammer und schließen Sie diese an das Netzgerät an. Schalten Sie das Gerät ein.

Kontrollieren Sie, ob an der roten positiven Elektrode (Kathode) Blasen aufsteigen.



Tipp: Wenn keine Blasen aufsteigen, sollten Sie die Verbindungskabel überprüfen und kontrollieren, ob das Netzgerät angeschaltet ist! Lassen Sie das Gel so lange laufen, bis die Proben gut aufgetrennt sind. Richtlinien hierzu finden Sie weiter unten. Lassen Sie das Gel so lange laufen, bis der blaue Farbstoff etwas mehr als die Hälfte des Gels durchlaufen hat. Richten Sie sich dabei auch nach folgenden Angaben:

Volt	M6 Kammer	M12 & HexaGel Kammer
150	15-20 Minuten	25-35 Minuten
125	20-30 Minuten	35-45 Minuten
75	35-40 Minuten	55-85 Minuten

Das Färben des Gels

Handhaben Sie Ihr Gel nun sehr vorsichtig, es ist jetzt besonders glitschig. Tragen Sie für diesen Arbeitsschritt Handschuhe!

Methode 1: Ein-Schritt-Färben und Entfärben mit InstaStain® Methyleneblau -Karten



1-Schritt:
Färben und
Entfärben

Agarosegele können in einem einfachen Schritt mit InstaStain ge- und entfärbt werden. Dieses Ein-Schritt-Verfahren kann über Nacht oder innerhalb von 3 Stunden durchgeführt werden:

- Entfernen Sie die 7 x 7 cm Agarosegele aus ihrem Schlitten und legen Sie sie in ein mit

75 ml destilliertem oder deionisiertem Wasser oder verwendetem Elektrophoresepuffer gefüllte Wanne. Das Agarose-Gel sollte vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein.

- Legen Sie eine 7 x 7 cm InstaStain® Methyleneblau-Karte mit der blauen Seite nach unten in die Lösung.
- Lassen Sie das Gel ungestört für ca. 3 Stunden in der Flüssigkeit. Das Gel kann auch über Nacht gefärbt werden, allerdings sollten Sie dann die Färbewanne mit Folie bedecken um ein Austrocknen zu verhindern.
- Nach dem Färben und Entfärben ist das Gel bereit für die Visualisierung.

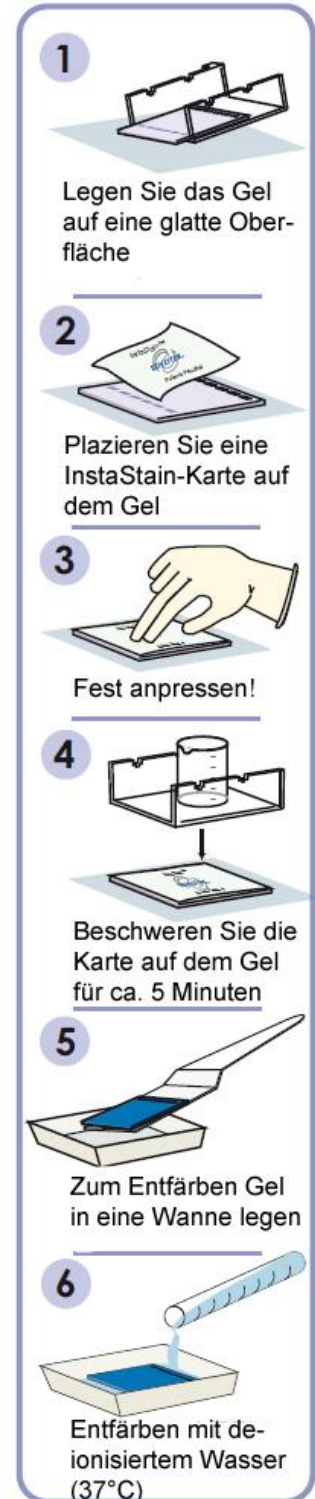
Lagerung und Entsorgung von InstaStain® Methyleneblau-Karten und Gelen:

Gele können im Kühlschrank mehrere Wochen gelagert werden. Legen Sie das Gel in einen verschließbaren Plastikbeutel mit Entfärber-Flüssigkeit. NICHT EINFRIEREN!
Gebrauchte InstaStain®-Karten und entfärbte Gele in den Abfall entsorgt werden.

Tipp: Wenn die Banden nach 30 Minuten nicht sichtbar werden, sollten Sie den Färbeprozess mit einer frischen Färbekarte wiederholen. Färben Sie in diesem Fall über Nacht (siehe Methode 1)!

Methode 2: Liquid Färbung mit Methyleneblau Plus™

Verdünnen Sie die 10x Stammlösung durch Mischen von 1 Teil Lösung mit 9 Teilen destilliertem oder deionisiertem Wasser.



1

Legen Sie das Gel auf eine glatte Oberfläche

2

Plazieren Sie eine InstaStain-Karte auf dem Gel

3

Fest anpressen!

4

Beschweren Sie die Karte auf dem Gel für ca. 5 Minuten

5

Zum Entfärben Gel in eine Wanne legen

6

Entfärben mit deionisiertem Wasser (37°C)

Entfernen Sie das Gel aus dem Schlitten und bedecken Sie es in einer Färbewanne unter leichtem Schütteln für mindestens 30min mit einem Gemisch aus 600ml der verdünnten Methylenblau Plus™-Lösung und 600ml destilliertem Wasser, welches auf 37°C erwärmt wurde.

Anschließend entfernen Sie die Lösung und bedecken das Gel erneut mit 600ml auf 37°C vorgewärmtes, destilliertes Wasser für weitere 15 Minuten. Dann die Lösung verwerfen und diesen Schritt noch zweimal wiederholen.

Nach dem zweiten Waschschrift sollten bereits erste Banden erkennbar sein. Sie können das Gel auch über Nacht entfärben, allerdings ist hier die Gefahr recht groß, dass die Banden zu stark verblassen und ein weiterer Färbeschritt vorgenommen werden muss.

Methode 3: Färben mit Instastain ® Methylenblau-Karten

- Entnehmen Sie das Gel aus der Gießform.
- Legen Sie die InstaStain Karte mit der blauen Färbeseite nach unten auf die Oberfläche des Gels.
- Streichen Sie mit den Fingern fest über die Oberfläche der Färbekarte, um eventuell vorhandene Blasen zwischen Gel und Karte wegzustreichen.
- Setzen Sie ein leichtes Gewicht (wie zum Beispiel ein leeres Becherglas) auf die Karte und das Gel.
- Warten Sie für 5 bis 10 Minuten.
- Nehmen Sie die Färbekarte vom Gel und waschen Sie das Gel so lange in 100 ml warmem Wasser (37°C), bis die Banden sichtbar werden (zwischen 10 und 15 Minuten).

Entfärbung und Visualisierung von DNA

Legen Sie das Gel in eine Färbewanne.

Entfärben Sie mit etwa 100ml destilliertem Wasser unter leichtem Schütteln und wechseln Sie so oft wie nötig das Wasser.

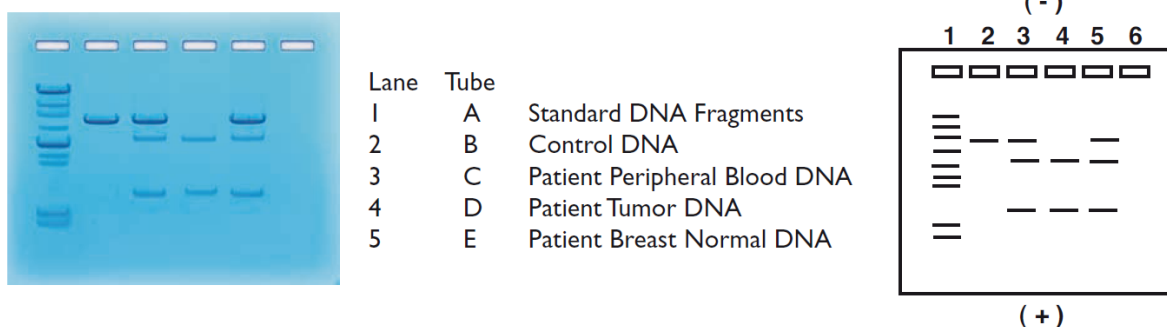
Die größeren DNA-Banden werden zunächst als dunkelblaue Banden gegen einen sichtbaren, hellblauen Hintergrund abgebildet. Ist das Gel vollständig entfärbt, so erscheint der gesamte Hintergrund nur noch schwach hellblau und die Banden zeichnen sich diskreter und größer ab.

Entfernen Sie vorsichtig das Gel aus der Lösung und betrachten Sie es auf einem Visualisierungssystem mit Bernsteinfilter (Leuchtpult mit weißem Licht oder Overhead-Projektor können ebenfalls eingesetzt werden, allerdings sind Banden hier schwieriger zu erkennen).

VORSICHT! Ist das Gel zu stark entfärbt, so verschwinden die kleineren Banden. In diesem Fall empfiehlt es sich zwei Aufnahmen des Gels zu machen (eine Aufnahme nach dem ersten Waschschrift, eine weitere nach dem zweiten Waschschrift).

Ergebnisse

Sie sollten folgendes auf Ihrem Gel sehen:



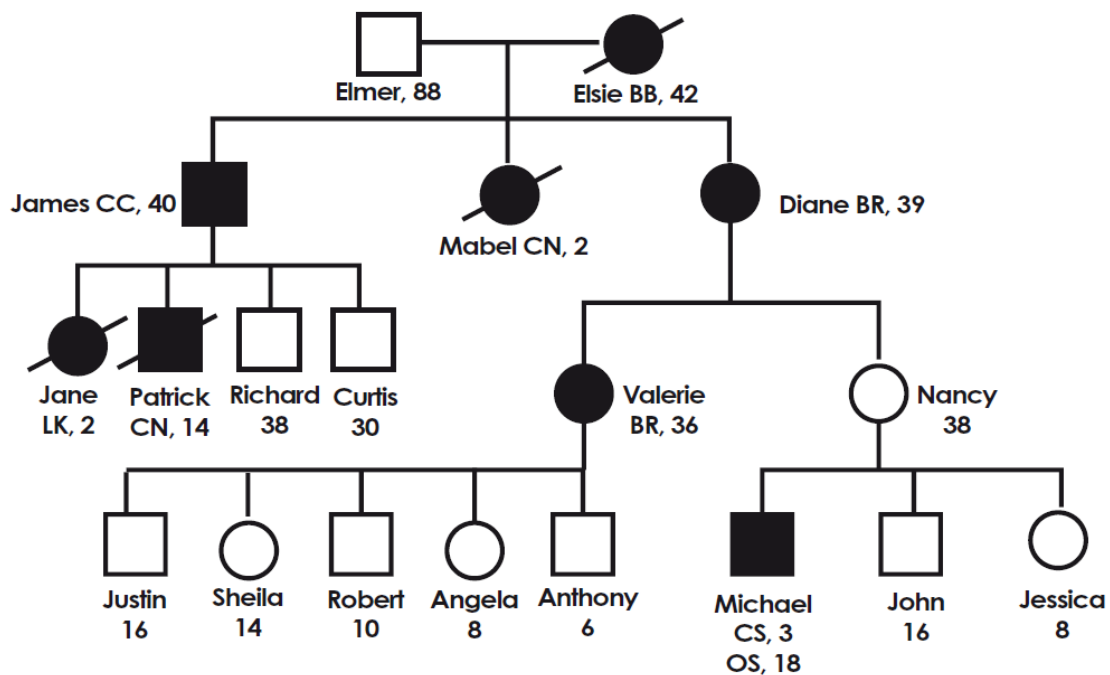
Die schematische Zeichnung rechts stellt die Position der idealisierten Banden dar – in der Realität kann sich das Bandenmuster jedoch stark verzerrt darstellen.

Diskussion

Spur B zeigt die Auftrennung der DNS einer nicht-mutierten Gewebekultur (Kontrolle). Nach der Amplifikation mittels PCR werden die DNS-Segmente mit einem spezifischen Restriktionsenzym für mutiertes *TP53* geschnitten. Da die Kontroll-DNA keine Mutation im *p53*-Gen zeigt wird sie nicht von diesem Restriktionsenzym geschnitten – daher sieht man im Gel nur eine (recht stark ausgeprägte) Bande.

Spuren C, E: die Patientin Valerie trägt ein normales *p53*-Allel und ein mutiertes *p53*-Allel. Das Restriktionsenzym schneidet das mutierte *p53*-Allel in zwei Segmente; das normale *p53*-Allel bleibt erhalten. Im Gel stellt sich diese Reaktion in der Auftrennung dreier Banden dar. Die obere, stark ausgeprägte Bande steht für das normale *p53*-Allel, die unteren, schwächeren Banden zeigen das verdaute, mutierte *p53*-Allel.

Spur D: Im Tumorgewebe der Patientin Valerie findet sich lediglich das mutierte p53-Allel, welches vollständig vom spezifischen Restriktionsenzym geschnitten wurde. Es sind klar die beiden Banden des mutierten, verdauten p53-Allel zu erkennen.



Lösungen

Worin besteht der Unterschied zwischen einem Tumor-Suppressor und einem Onkogen?

Tumor-Suppressoren, wie beispielsweise p53 sind normale zelluläre Proteine, die im Organismus einem unkontrollierten Wachstum von Zellen entgegenwirken. Eine Person mit Mutation in einem der beiden p53-Allele ist anfällig für entartetes Zellwachstum (und damit der Entstehung von Tumoren), sobald das gesunde p53-Allel ebenfalls durch Mutation (auch induzierter wie beispielsweise durch Rauchen etc...) geschädigt wird.

Onkogene initiieren das (unkontrollierte) Zellwachstum.

Welchen Effekt haben die Hotspots auf die p53-Proteinstruktur?

Hotspots sind Seitenketten von Aminosäureresten innerhalb der Proteinstruktur die häufig mutiert werden. Einige dieser Mutationen führen zu einer Konformationsänderung des Proteins und beeinträchtigen dessen Stabilität erheblich. Manche p53-Mutationen aggregieren mit dem normalen p53, was zu einer Inaktivierung des Gens führt.

Warum zeigen die DNS-Proben aus Valeries Tumorgewebe weniger Banden als die DNS-Proben aus peripherem Blut?

Patientin Valerie trägt ein normales p53-Allel und ein mutiertes p53-Allel. Das Restriktionsenzym schneidet das mutierte p53-Allel in zwei Segmente; das normale p53-Allel bleibt erhalten. Im Gel stellt sich diese Reaktion in der Auftrennung dreier Banden dar. Die obere, stark ausgeprägte Bande steht für das normale p53-Allel, die unteren, schwächeren Banden zeigen das verdaut, mutierte p53-Allel.

Warum wird eine Kontrolle im Experiment mitgeführt?

Bei der Durchführung molekularbiologischer Experimente ist es unabdinglich eine Kontrolle mitzuführen um sicher zu stellen, dass es sich bei den erhaltenen (im Idealfall reproduzierbaren) Ergebnissen nicht um zufällig entstandene Reaktions-Artefakte handelt.

Was kann ein Arzt mit den Daten dieser molekularbiologischen Diagnose anfangen?

Ein Arzt erstellt medizinische Diagnosen, die auf einer Vielzahl unabhängiger Informationsquellen basieren. In diesem Fall werden folgende Verfahren herangezogen: die Auswertung des Familienstammbaumes, die Auswertung der DNS-Analyse sowie die Sequenzierung der DNS. Derzeit sind DNS-basierte diagnostische Tests in Deutschland nicht alleinig zur Diagnose zugelassen, weswegen Ärzte diese Methoden noch vorsichtig einsetzen.