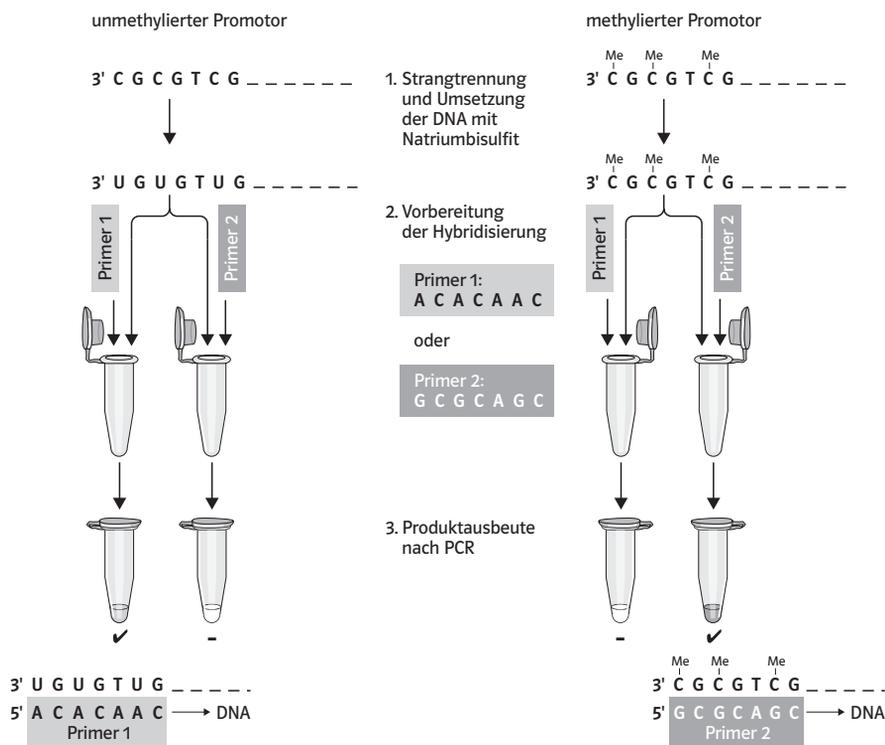


PCR — Einsatz bei der Krebserkennung

In Krebszellen sind die Gene für die Kontrolle der Zellteilung zwar intakt, aber inaktiviert. Ein Grund dafür kann die Methylierung des Promotors sein, die das Ablesen des dahinter liegenden Gens verhindert. Dafür hängen spezifische Enzyme eine Methylgruppe (-CH₃) an die Nucleotidbase Cytosin (in Abb. 1 gekennzeichnet durch Me-). Durch die daraus resultierende Veränderung der Raumstruktur können die Polymerasen, die normalerweise Arbeitskopien von den Genen herstellen, nicht mehr an den Startbereich binden und es wird kein Genprodukt mehr gebildet. Das Gen ist also inaktiviert.

Eine einfache Methode, diese Promotor-Methylierung zu erkennen, ist die methylierungsspezifische PCR. Dabei werden in der DNA die Cytosin-Basen zunächst mithilfe von Natriumbisulfit in die Base Uracil umgewandelt, die methylierten Cytosine bleiben davon jedoch unberührt. Anschließend werden für die Synthese der DNA in der PCR spezifische Primer eingesetzt, sodass man anhand der Produkte erkennen kann, ob ursprünglich eine DNA-Methylierung vorlag. Das Verfahren wird hier vereinfacht für einen hypothetischen Promoter dargestellt:



1 Prinzip der methylierungsspezifischen PCR

Anwendungsbeispiel:

Um bei einem zentralen Gen, das häufig für die Entstehung von Lungenkrebs verantwortlich ist, entscheiden zu können, ob es aktiviert oder inaktiviert vorliegt, wird die Sequenz des dazugehörigen Promotors überprüft:

Promotorsequenz:

3' CGCTGAAGTCGGGGCCCGCC 5'

oder

Me Me Me
3' CGCTGAAGTCGGGGCCCGCC 5'

- 1 Beschreiben Sie das in Abb. 1 dargestellte Verfahren.
- 2 Erklären Sie, warum man anhand der Versuchsergebnisse für Primer 2 auf Krebszellen schließen kann.
- 3 Erläutern Sie, welche synthetische Primersequenz Sie für die Identifizierung des methylierten Promotors im Anwendungsbeispiel oben wählen würden.

ARBEITSBLATT

PCR — Einsatz bei der Krebserkennung

Lösungen

- Im Experiment werden zwei Ansätze verwendet. Die Proben der DNA-Einzelstränge werden mit Natriumbisulfit umgesetzt, sodass unmethylierte Cytosin-Basen in Uracil-Basen umgewandelt werden, die in den PCR-Schritten nur eine Basenpaarung mit Adenin eingehen können. Methylierte Cytosin-Basen paaren wie erwartet mit Guanin. Folglich werden zwei Primer in beiden Ansätzen getestet: Primer 1 ist komplementär zum umgebauten, weil nicht methylierten DNA-Abschnitt. Primer 2 ist komplementär zum methylierten DNA-Abschnitt. Wenn Primer 1 im 1. Ansatz erfolgreich an die Matrize bindet, war der Promotor nicht methyliert. Wenn Primer 2 nicht erfolgreich bindet, bestätigt dies, dass die DNA nicht methyliert war. Beim 2. Ansatz bindet Primer 2, da eine Methylierung vorlag.
- Im Ansatz mit Primer 2 bindet dieser, es sind keine Veränderungen in der Basensequenz festzustellen. Die Umwandlung der Cytosin-Basen war nicht erfolgreich, was für eine Methylierung spricht. Krebszellen kann man z.B. an einer Methylierung des Promoters erkennen.
- Eine Desaminierung der DNA-Probe mit Natriumbisulfit führt zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Basen zu Uracil. Zur Wahl der Primersequenz werden die komplementären Basenpaarungen U/A, C/G, G/C, T/A, A/T beachtet.
Primersequenz für den methylierten Primer: 5' G C A A C T T C A G C C C C A A G C A A 3'

Zusatzaufgabe

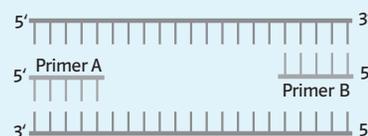
Ein Beispiel für die Primer-Wahl:

Mit der PCR lassen sich Gene nachweisen, die wichtig für die Entstehung von Krebs sind. Ein Beispiel dafür ist das p53-Gen, dessen Produkt ein zentraler Wächter über die Zellteilung ist. Ist in einer Zelle die Funktion dieses Wächters gestört, kann sich diese Zelle zur Krebszelle entwickeln. Es sind verschiedene krebserregende Varianten des p53-Gens bekannt. Wenn eine Krebserkrankung durch eine Mutation im p53 Gen hervorgerufen wird, so können für die Diagnostik die wichtigen Bereiche dieses Gens im extrahierten DNA-Material vervielfältigt werden. Weil Mutationen des p53-Gens meistens in den Exons 5, 6, 7 und 8 auftreten, werden passende Primer für diese Exons ausgewählt:

DNA-Region	Primer	Basensequenz	Länge
Exon 5 (205 bp)	A	5' — TTCCTCTTCTG CAGTACTCCCTGCCCTC	30 b
	B	5' — GCTCACCATCGCTATCTGAGC	21 b
Exon 6 (130 bp)	A	5' — GATTGCTCTTAGGTCTGGCCCTCCTCAGC	30 b
	B	5' — CAGACCTCAGGCGGCTCATAGG	22 b
Exon 7 (118 bp)	A	5' — CTAGGTTGGCTCTGACTGTACCACCTCC	29 b
	B	5' — TGACCTGGAGTCTTCCAGTGTG	22 b
Exon 8 (141 bp)	A	5' — GTAGTGGTAATCTACTGGGACGGAAACAGC	29 b
	B	5' — CTCGCTTAGTGCTCCCTGGGGC	23 b

1 Verschiedene Exons mit zugehörigen Primern

Die Zuordnungen der Primer A und B verläuft folgendermaßen (s. auch Schülerbuch S. 152, Abb. 1):



2 Komplementäre Bindung der Primer

- Geben Sie für eines der vier Exons die DNA-Bereiche an, an die die Primer binden werden.

Lösung

- Bildung der komplementären DNA-Sequenzen wie in Abb. 2, z.B. (Exon 5):
 5' T T C C T C T T C C T G C A G T A C T C C C C T G C C C T C 3' (Primer A)
 3' A A G G A G A A G G A C G T C A T G A G G G G A C G G G A G 5' (DNA)

 5' G C T C A C C A T C G C T A T C T G A G C 3' (Primer B)
 3' C G A G T G G T A G C G A T A G A C T C G 5' (DNA)