

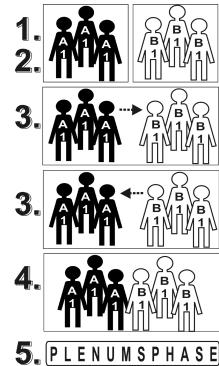
Liebe GeniE-Teilnehmer/innen,

Sie haben nun die molekularbiologischen Methoden DNA-Isolation und das PCR-Verfahren kennengelernt. Damit Sie auf Basis dieser Grundinformationen das genaue Verfahren des Genetischen Fingerabdrucks selbstständig erarbeiten können, werden wir ein Expertenpuzzle durchführen. Auf dieser Seite erhalten Sie Informationen über den **Ablauf des Expertenpuzzles** und ein paar grundlegende Informationen über das **menschliche Genom**. Wichtig ist, dass diese Informationen von allen Gruppen genau gelesen werden, da sie die Grundlagen für das folgende Expertenpuzzle darstellen.

Informationen zum Ablauf des EXPERTENPUZZLES

Schritte 1. und 2. (12 Min.)	Während des Expertenpuzzles arbeitet Ihre Versuchsgruppe mit einer Partnergruppe zusammen (z.B. A1 mit B1). Beide Partnergruppen lesen GenFinger 9. Die Arbeitsblätter GenFinger 10 und Genfinger 11 werden aufgeteilt. Lesen Sie mit ihrer Gruppe die Infotexte und bearbeiten Sie die Aufgaben 1 und 2 (Gilt für beide Partnergruppen!).
Schritt 3: (10 Min.)	Stellen Sie ihrer Partnergruppe ihr Thema (GenFinger 10 oder 11) vor und lassen Sie sich das Thema ihrer Partnergruppe erklären.
Schritt 4: (8 Min.)	Verbleiben Sie in der Großgruppe (z.B. A1 mit B1). Nutzen Sie die Informationen beider Partnergruppen, um das genaue Verfahren des genetischen Fingerabdrucks zu erarbeiten (Aufgabe 3).
Schritt 5:	In der Plenumsphase werden die Ergebnisse gesammelt und das genaue Verfahren auf dem Arbeitsblatt GenFinger 3 (unten) notiert.

Abb.1: Darstellung des Ablaufs des Expertenpuzzles

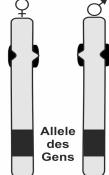


Informationen zum menschlichen Genom:

Das **Genom** jedes Menschen umfasst über 3 Milliarden Basenpaare, die auf **46 Chromosomen** bzw. **23 homologen Chromosomenpaaren** verteilt sind. Jedes Chromosom liegt doppelt vor, man spricht daher auch von einem **diploiden Chromosomensatz**. Je ein Chromosom der Chromosomenpaare wird von der Mutter (**maternal**) und das andere vom Vater (**paternal**) vererbt. Die Chromosomenpaare **1 bis 22** werden als **Autosome** (nicht geschlechtsgebundene Chromosome) und das Chromosomenpaar **23** als **Gonosom** (Geschlechtschromosom) bezeichnet. **Frauen** besitzen im gonosomalen Bereich zwei **XX** Chromosomen. **Männer** hingegen besitzen ein **X** und ein kleineres **Y** Chromosom (siehe Abb. 2).

Die **Zwei-Chromatid-Chromosomen** werden nur bei teilungsfähigen Zellen (Stammzellen) im Stadium der Mitose des Zellzyklus sichtbar (siehe Abb. 3). Dabei dient das **Chromosom** als **verdoppelte und stark kondensierte Transportform der DNA**. In diesem Zustand ist die DNA nicht funktional sondern stark kondensiert (um die Histone gewickelt), so dass die Proteinbiosynthese nicht ablaufen kann. Bei den meisten ausdifferenzierten und nicht teilungsfähigen Zellen liegt die DNA im Zellkern entspiralisiert vor, so dass die Proteinbiosynthese ablaufen kann. Zudem liegt die DNA nicht verdoppelter Form vor, wie dies vor einer Mitose der Fall ist. Würde man daher die DNA einer ausdifferenzierten Zelle kondensieren, würden sich **Ein-Chromatid-Chromosomen** zeigen.

Abb. 4: Genlocus eines Gens mit zwei Allelen (Ein-Chromatid Chromosomenpaar)



Als **Gen** wird ein Abschnitt der DNA bezeichnet, der die Grundinformationen zur Herstellung einer biologisch aktiven RNA enthält. Ein Gen ist daher an einem ganz bestimmten Ort auf der DNA bzw. dem Chromosom lokalisiert, man spricht vom **Genlocus** (Genort). Das Gen eines diploiden Organismus setzt sich aus zwei **Allelen** (Zustandsformen) zusammen. Gleichen sich die Informationen der beiden Allele spricht man von **Homozygotie** (Reinerbigkeit), unterscheiden sie sich von **Heterozygotie** (Mischerbigkeit).

Abb. 2: Humanes Karyogramm der Metaphasechromosomen

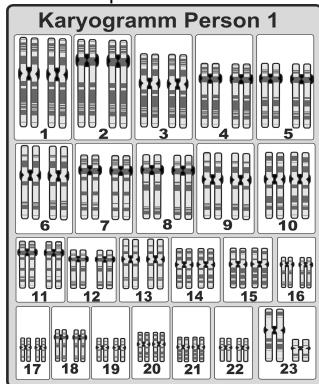
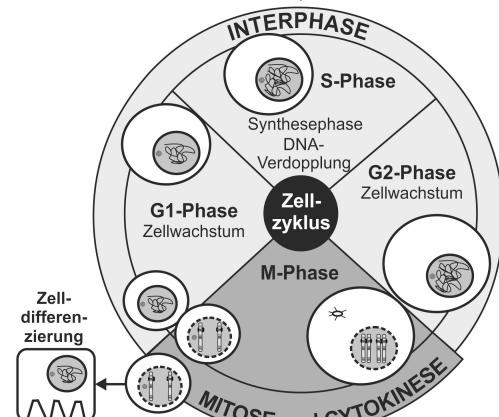


Abb. 3: Ablauf des Zellzyklus am Beispiel eines Chromosomenpaares

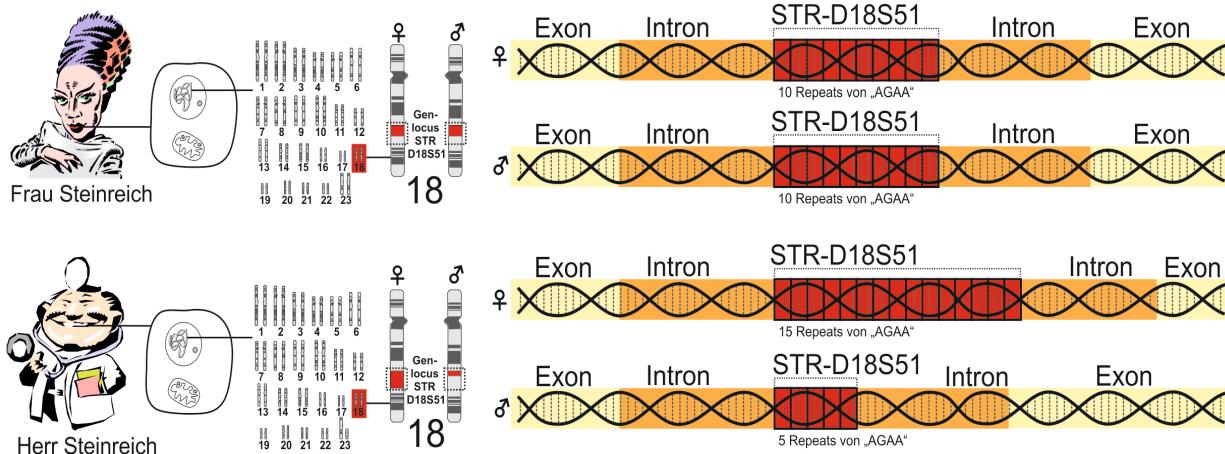


Expertengruppe 1: VNTR und STR-Bereiche:

Lediglich ein geringer Teil des humanen Genoms besteht aus aktiven (kodierende) Genen (**Exons**). Die restlichen nicht kodierenden Basensequenzen (**Introns**) sind Bereiche, deren Bedeutung noch nicht genauer geklärt ist. In den Intron-Bereichen des Genoms befinden sich Sequenzabschnitte die bei **jedem Menschen vorkommen**, sich aber in ihrer **Länge** unterscheiden. Für den genetischen Fingerabdruck nutzt man die sogenannten **VNTR**-Abschnitte (Variable Number of Tandem Repeats) aus den Intron-Bereichen des humanen Genoms. Heute konzentriert man sich auf die sehr kurzen **STR-Bereiche** (Short Tandem Repeats). STR-Bereiche sind DNA-Sequenzen, die aus **tandemartigen Wiederholungen von Basensequenzen (Repeats)** bestehen. Im Verlauf der menschlichen Evolution haben sich von jedem STR-Bereich verschiedene **STR-Allele** mit einer unterschiedlichen Repeatanzahl und **Länge** gebildet. Die Varianz der Repeatanzahl lässt sich durch Fehler beim Crossingover (Meiose) erklären. Diese werden von Generation zu Generation von den Eltern an die Kinder weitervererbt und führen so bei unterschiedlichen Personen zu individuellen Repeatwiederholungen auf den STR-Allelen.

Wir untersuchen den **STR-Bereich D18S51**, der auf dem menschlichen Chromosom 18 lokalisiert ist (siehe Abb. 1). Die **Repeatsequenz** des **STR-Bereich D18S51** lautet „**AGAA**“. Die Varianz der Repeatwiederholung des D18S51-Bereichs liegt zwischen 5-27 Repeats. Homozygote Allelverteilungen, bei der bei einer Person beide STR-Bereiche eines Genlocus gleich lang sind, sind äußerst selten. Häufig liegt eine heterozygote Allelverteilung vor. Das menschliche Genom ist durch das **Human-Genom-Projekt** komplett sequenziert. Die DNA-Sequenzen vor und nach den STR-Bereichen sind bekannt und bei allen Menschen gleich. Der **Genetische Fingerabdruck** basiert heutzutage auf dem **PCR-Verfahren**, so dass geringste Tatortspuren (eine Zelle) analysiert werden können. **Primer** mit gewünschter Basensequenz können von Firmen innerhalb von einem Tag produziert werden.

Abb.1: Personenbeispiele für den STR-Genlocus D18S51



Aufgabe 1: Analysieren Sie die Länge der STR-Bereiche D18S51 von Frau und Herrn Steinreich und überlegen Sie wie viele unterschiedliche lange DNA-Fragmente bei einer PCR des D18S51 STR-Bereichs auftreten werden.

Aufgabe 2: Diskutieren Sie darüber, ob durch den Längenvergleich des STR-Bereichs D18S51 ein Täter eindeutig überführt werden kann.

Aufgabe 3: Überlegen Sie, welches Verfahren Ihnen zur Durchführung eines genetischen Fingerabdrucks noch fehlt und was dieses Verfahren leisten müsste.

Aufgabe 4: Komplettieren Sie nach dem Expertenpuzzle das Verfahren zum Genetischen Fingerabdruck. Benennen Sie die drei zu verwendenden Verfahren (Versuche) und deren Aufgaben (Funktionen) ↗ **Arbeitsblatt GenFinger 3**



Expertengruppe 2: Gelelektrophorese:

Zur **Längenauf trennung** geladener Moleküle, wie z.B. von **DNA-Fragmenten**, wird häufig die **Gelelektrophorese** mittels Agarosegel eingesetzt. **Agarose** ist ein ungiftiges Polysaccharid unterschiedlicher Galactosen, das aus Rotalgen gewonnen wird. Zum Betrieb wird eine Gelelektrophoresekammer, ein Agarosegel mit Taschen (Einstülpungen) zur Probenaufnahme, eine Pipette, eine Pufferlösung (definierte Ionenlösung) und eine Spannungsquelle (mit Anode und Kathode) benötigt. Durch das Aufkochen der pulverförmigen Agarose in einer wässrigen Pufferlösung (z.B. TAE-Puffer) und dem anschließenden Erhärtungsprozess während der Abkühlungsphase, entsteht ein festes Gel. Je höher die Agarosekonzentration ist, desto engmaschiger werden die **Poren im Gel** und desto feiner erfolgt die Längenauf trennung. Bei hohen Agarosekonzentrationen muss jedoch die Laufzeit der Gelelektrophorese verlängert werden, um eine Auf trennung der DNA-Fragmente zu erzielen.

Die Längenauf trennung erfolgt, da die **Geschwindigkeit** mit der die geladenen Moleküle im elektrischen Feld wandern, proportional zu ihrer Ladung ist. Im physiologischen pH-Bereich (pH 7,4), der durch den TAE-Puffer eingestellt ist, trägt die Phosphatgruppe der DNA eine _____ Ladung. Die Gesamtladung eines DNA-Moleküls ist direkt proportional zu seiner Länge (konstantes Masse-Ladungsverhältnis). Das Agarosegel wirkt wie ein engmaschiges Sieb, dessen Porengröße die Geschwindigkeit der verschiedenen langen DNA-Moleküle unterschiedlich stark abbremst. Die DNA-Stücke können Sie sich wie gekochte Nudelstücke (unterschiedlicher Länge) vorstellen, die vom Querschnitt her durch die Löcher des Siebs schlüpfen können. Die zurückhaltende Kraft ist dabei umgekehrt proportional zur Molekülmasse (-länge). Da die DNA im sichtbaren Licht keine Absorption zeigt, müssen die elektrophoretisch aufgetrennten **DNA-Banden** durch **Anfär bungen** (in unserem Falle Azur-B-Lösung) sichtbar gemacht werden.

Aufgabe 1a: Tragen Sie die Ladungen in die Kreise der Abb. 2 ein und ordnen Sie diesen die Begriffe „Anode“ und „Kathode“ zu (Tipp: Anionen sind negativ geladen).

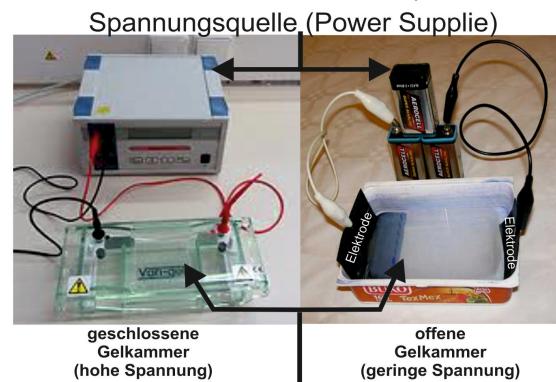
Aufgabe 1b: Vergleichen Sie die Banden des DNA-Markers (Spur 1) und erklären Sie ihre Beobachtungen. Erklären Sie die Funktion des DNA-Markers und zeichnen Sie die Bandenmuster für die DNA-Proben 1 bis 3 in die Spuren 2 bis 4 ein.

Aufgabe 2: Vor dem Pipettieren in die Geltaschen werden die DNA-Proben mit Hilfe eines Ladepuffers angefärbt und „beschwert“. Erklären Sie warum dies notwendig ist.

Aufgabe 3: Erklären Sie, warum eine Pufferlösung (Ionenlösung) und kein Aqua Dest. bei der Gelelektrophorese verwendet wird.

Aufgabe 4: Komplettieren Sie nach dem Expertenpuzzle das Verfahren zum Genetischen Fingerabdruck. Benennen Sie die drei zu verwendenden Verfahren (Versuche) und deren Aufgaben (Funktionen)  **Arbeitsblatt GenFinger 3**

Abb.1: Geschlossene und offene Gelelektrophorese



Agarosegel mit Pufferlösung überschichtet

Agarosekonzentrationen muss jedoch die Laufzeit der Gelelektrophorese verlängert werden, um eine Auf trennung der DNA-Fragmente zu erzielen.

Abb.2: Gelelektrophorese

