

Biotechnologie-Praktikum für Studierende für das Höhere Lehramt

Geschlechtschromosomen-Nachweis mittels PCR

Gerd Scherer mit Elke Bausch

Literatur

Knippers: *Molekulare Genetik*, 8. Aufl., Thieme 2001, Kap. 18 (S. 518-524)
Strachan und Read: *Molekulare Humangenetik*, 3. Aufl., Spektrum 2006

Einleitung

Die Geschlechtsentwicklung beim Menschen verläuft in drei Stufen: erstens, in der Festlegung des chromosomalen Geschlechts bei der Befruchtung; zweitens, in der Differenzierung der bipotenten Gonade in Hoden (Testis) bzw. Eierstock (Ovar) entsprechend dem chromosomalen Geschlecht (gonadales Geschlecht); und drittens, in der Differenzierung der inneren und äußeren Genitalien entsprechend dem gonadalen Geschlecht (phänotypisches Geschlecht). Da der weibliche Phänotyp auch bei komplettem Fehlen der Gonaden ausgeprägt wird, kann man das weibliche Geschlecht als das konstitutive, das männliche Geschlecht als das induzierte Geschlecht betrachten.

Aneuploidien der Geschlechtschromosomen wie XXY beim Klinefelter-Mann und XO bei der Turner-Frau zeigen, daß das Y-Chromosom einen Locus für einen Testis-determinierenden Faktor (TDF) enthalten muß, der die Entwicklung der bipotenten Gonade in Richtung Testis festlegt. Zwei schon früh im Testis produzierte Hormone gewährleisten, daß die Genitalentwicklung vom konstitutiven weiblichen Weg in Richtung männlichen Phänotyp gelenkt wird. Das Anti-Müllersche Hormon (AMH), das von den Sertolizellen sezerniert wird, führt zur Regression der Müllerschen Gänge, die bei der Frau zu Eileiter, Uterus und oberer Vagina werden. Und die von den Leydig-Zellen produzierten Androgene, speziell Testosteron, stimulieren die Differenzierung der Wolffschen Gänge in Samenleiter, Nebenhoden und Samenblase. Bei der Frau degenerieren die Wolffschen Gänge.

In den Jahren 1990/1991 wurde das *SRY*-Gen (*SRY* steht für „sex-determining region of the Y chromosome“) als dasjenige Gen identifiziert, das den Y-chromosomalen Testis-determinierenden Faktor TDF codiert. *SRY* ist ein intronloses Gen und codiert für einen 204 Aminosäuren umfassenden Transkriptionsfaktor. Welches Zielgen von *SRY* reguliert wird, ist noch unbekannt.

Trotz ihrer erheblichen morphologischen Unterschiede haben die Geschlechtschromosomen X und Y zwei Bereiche in den Telomerregionen, in denen sie identische Sequenzen tragen. Diese Bereiche werden als pseudoautosomale Regionen bezeichnet, PAR1 und PAR2. Die PAR1 befindet sich an der Spitze der kurzen Arme von X und Y und umfaßt 2.6 Mbp, die PAR2 liegt an der Spitze der langen Arme von X und Y und umfaßt 320 kbp. In diesen sequenzidentischen Abschnitten kommt es zu einem obligatorischen Crossover zwischen X und Y analog den Crossovern zwischen homologen Autosomen-Paaren; daher die Bezeichnung „pseudoautosomal“ für diese X/Y-homologen Bereiche (Abb. 1A). Bei ca. 1 auf 20.000 männlichen Meiosen kommt es dagegen zu einem ungleichen Crossover, das häufig zwischen den verwandten Genen *PRKX* auf dem X-

Chromosom und *PRKY* auf dem Y-Chromosom erfolgt. Dies führt zu einem Transfer des *SRY*-Gens, das nur 5 kb von der PAR1 entfernt ist, auf das väterliche X-Chromosom und zum XX-Mann. Das reziproke Produkt ist ein *SRY*-deletiertes Y-Chromosom, wie es bei manchen XY-Frauen vorliegt (Abb. 1B). Die Charakterisierung der bei XX-Männern vorhandenen und bei XY-Frauen fehlenden Y-spezifischen Sequenzen trug entscheidend zur Lokalisierung und Klonierung von *SRY* bei (ein Paradebeispiel für Positionsklonierung).

In unserem Versuch wollen wir einen Geschlechtschromosomen-Nachweis mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR für „polymerase chain reaction“, durchführen. Die PCR erlaubt die exponentielle Amplifikation eines zwischen den Bindungsstellen zweier Oligonucleotid-Primer liegenden DNA-Abschnittes (Abb. 2). Bei der Reaktion wird die doppelsträngige DNA zuerst durch Hitzebehandlung bei 94°C denaturiert (Denaturierung), dann werden die beiden Primer an die entsprechenden komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge bei niedrigerer Temperatur (55°C-65°C) anhybridisiert (Annealing), und schließlich wird die Zielsequenz mit Hilfe einer hitzeresistenten DNA-Polymerase (Taq-Polymerase) ausgehend von den Primern bei 72°C synthetisiert (Extension). Da die neu synthetisierten Einzelstränge über die Position des Primers auf dem jeweiligen Gegenstrang hinausreichen, können sie ihrerseits als Matrizen für die Synthese komplementärer Stränge mit der gewünschten Länge dienen. Dabei gibt der Primer die 5'-Enden vor; die 3'-Enden sind fixiert, da die Synthese nicht über das Ende des gegenüberliegenden Primers hinausgehen kann. Die Reaktionsmischung wird wiederum erhitzt zur Trennung der Originalstränge und der neu synthetisierten Stränge, die nun für weitere Zyklen von Primer-Annealing, Extension und Denaturierung zur Verfügung stehen. Der ganze Zyklus wird in der Regel 30mal durchlaufen und führt somit zu einer theoretisch 2^{30} (10^9)-fachen, realiter ca. 10^5 -fachen Amplifikation eines DNA-Fragmentes, das die Kopie der zwischen den Bindungsstellen der Primer liegenden DNA-Sequenz darstellt. Um ausreichende Mengen des Zielfragmentes ohne Nebenprodukte zu erhalten, müssen Annealingtemperatur und Dauer der Reaktionsschritte sowie die Mg^{++} -Konzentration des Reaktionsansatzes optimiert werden.

Die PCR-Primer sind normalerweise etwa 20 Nucleotide lang für Zielsequenzen in komplexer genomischer DNA. Beim Design eines Primerpaares muß man vermeiden, daß die letzten Nucleotide am Ende der beiden Primer komplementär sind, da es sonst zu Primer-Dimerbildung kommen kann, die die Effizienz der PCR verringert. Ferner ist darauf zu achten, daß beide Primer etwa gleich lang sind und etwa den gleichen GC-Gehalt haben bzw. die annähernd gleiche Schmelztemperatur T_m . Eine einfache Formel zur Berechnung der T_m von Oligos ist: $2 \times \text{Anzahl der AT-Nucleotide} + 4 \times \text{Anzahl der GC-Nucleotide}$. Die optimale Annealing-Temperatur ist dann $T_m - 5^\circ\text{C}$.

Wir benutzen für unseren Versuch zwei PCR-Primerpaare. Das erste PCR-Primerpaar (*SRY-F* + *SRY-R*) flankiert die codierende Region des *SRY*-Gens und liefert ein Y-spezifisches PCR-Produkt von 764 bp. Das zweite PCR-Primerpaar (*PABX-F* + *PABX-R*) liegt im Bereich der pseudoautosomalen Grenze (*PAB*, pseudoautosomal boundary) der PAR1 des X-Chromosoms und liefert ein X-spezifisches PCR-Produkt von 291 bp (Abb. 1A). Weibliche DNA sollte nur ein *PABX*-PCR-Produkt, männliche DNA sowohl ein *PABX*- wie ein *SRY*-PCR-Produkt liefern. Für diesen Versuch wollen wir selbst isolierte eigene genomische DNA verwenden, die aus Epithelzellen der Wangenschleimhaut gewonnen wird.

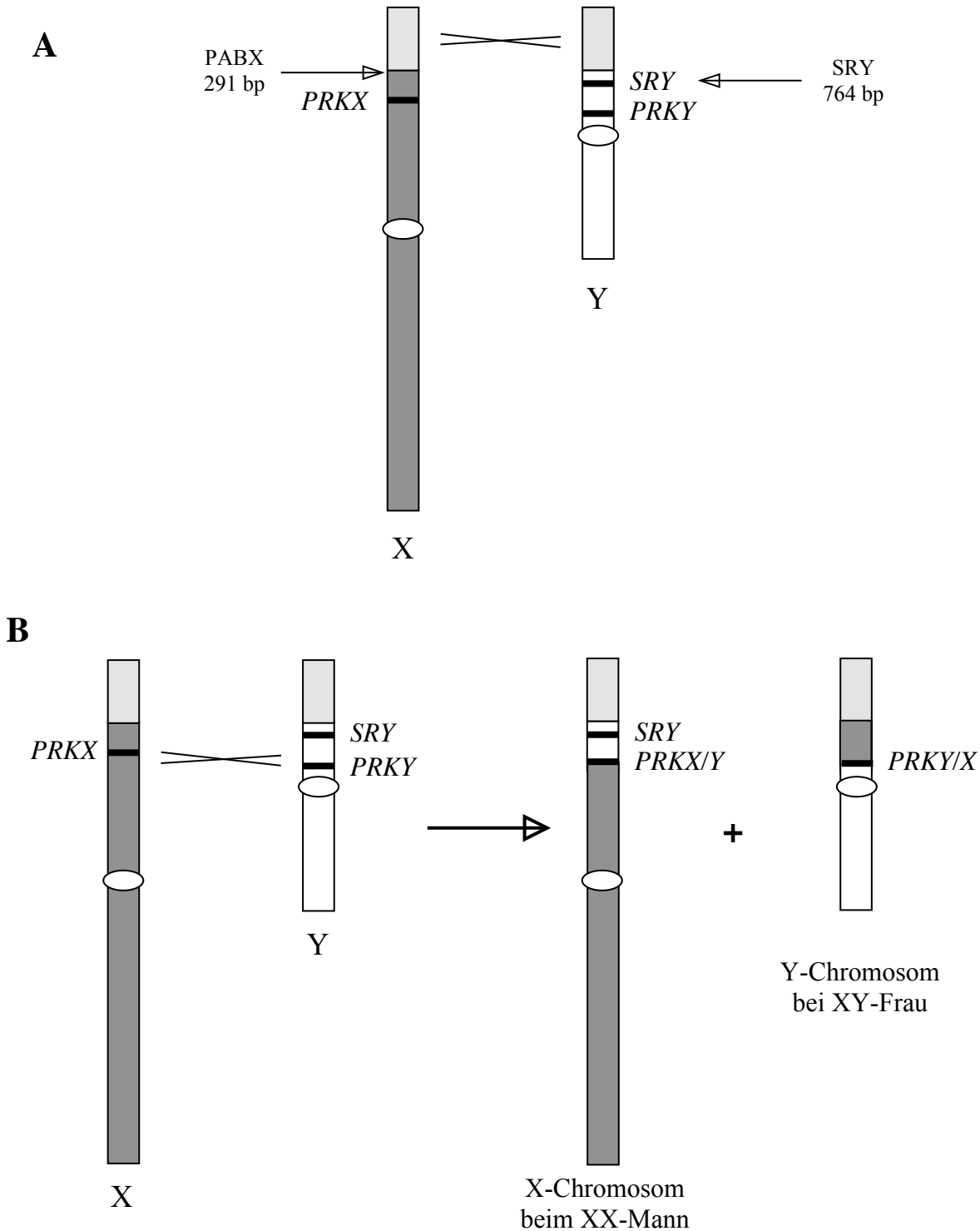
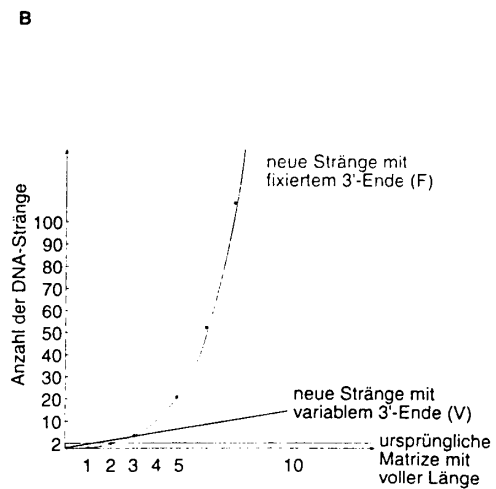
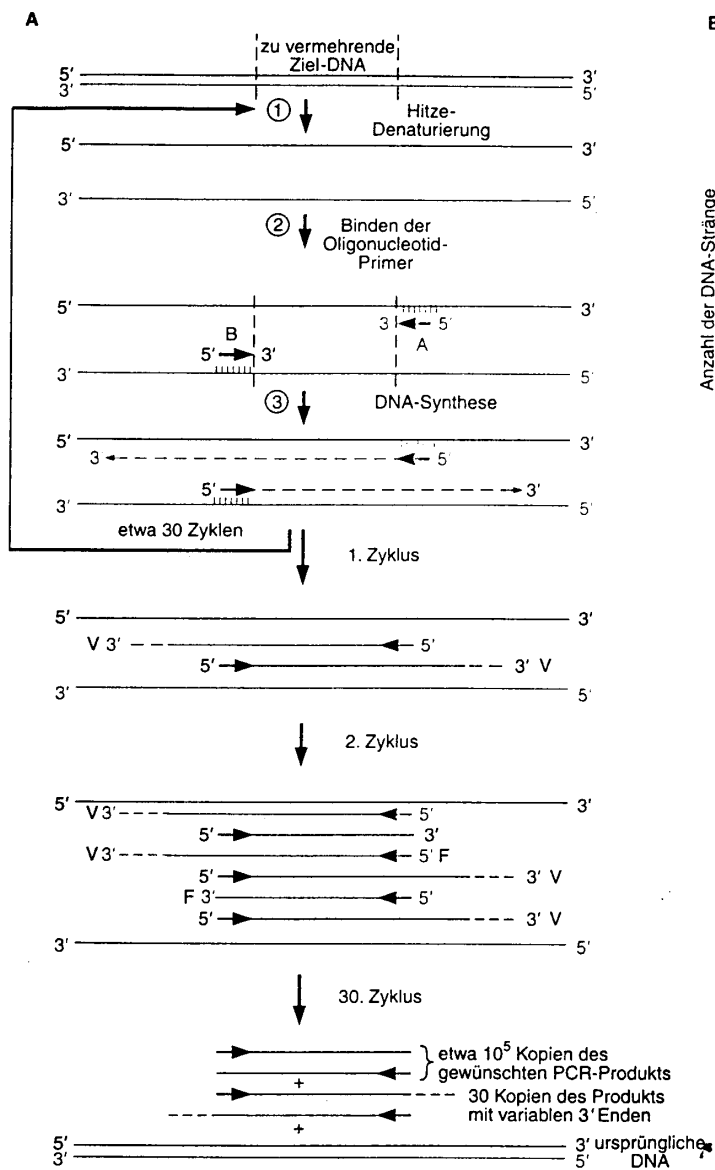


Abb. 1 Homologes und ungleiches XY-Crossover in der männlichen Meiose

A: Zeigt schematisch das obligate meiotische Crossover zwischen homologen Sequenzen der pseudoautosomalen Paarungsregion 1 (hellgrau) der männlichen Geschlechtschromosomen. Die Position und Größe der PCR-Produkte PABX im Bereich der pseudoautosomalen Grenze auf dem X-Chromosom sowie von SRY im Bereich des *SRY*-Gens sind angegeben. [Die PAR2 an der Spitze der langen Arme von X und Y ist zur Vereinfachung nicht gezeigt]

B: Zeigt schematisch das ungleiche Crossover außerhalb der pseudoautosomalen Paarungsregion, das zum Transfer von *SRY* auf das väterliche X-Chromosom führt und zum XX-Mann. Das reziproke Produkt ist ein *SRY*-deletiertes Y-Chromosom, wie es bei manchen XY-Frauen vorliegt. Dieses ungleiche Crossover erfolgt häufig zwischen den sequenzverwandten Genen *PRKX* und *PRKY*.



6.1 Die PCR ist eine *in vitro*-Methode, die mit Hilfe definierter Oligonucleotid-Primer DNA-Sequenzen amplifizieren kann. Die Oligonucleotid-Primer A und B, die zu den DNA-Sequenzen von zwei komplementären Strängen passen, umrahmen die Region, die vermehrt werden soll. Haben die Primer gebunden, werden sie in die neu synthetisierten DNA-Stränge eingebaut. Im ersten Zyklus entstehen zwei neue DNA-Stränge, deren 5'-Ende vom Oligonucleotid-Primer markiert wird, deren 3'-Ende aber variabel ist. Die beiden neuen Stränge können dann wiederum als Matrizen für die Synthese komplementärer Stränge mit der gewünschten Länge dienen. Dabei gibt der Primer die 5'-Enden vor; die 3'-Enden sind fixiert, da die Synthese nicht über das Ende des gegenüberliegenden Primers hinausgehen kann. Nach nur wenigen Zyklen überwiegen Produkte mit der gewünschten Länge.

Abb. 2 Prinzip der PCR-Technik (aus Strachan + Read)

Versuchsdurchführung

1) DNA-Isolierung

Sie sollen aus Epithelzellen Ihrer Wangenschleimhaut genomische DNA isolieren. Das verwendete Protokoll stammt aus der Kriminalistik und wird dort bei der DNA-Analyse verdächtiger Personen eingesetzt (sog. Gentest). Der Wangenschleimhautabrieb erfolgt dabei mit sterilen Wattestäbchen. Die an der Watte haftenden Zellen und Zellkerne werden durch Behandlung mit Proteinase K bei 56°C aufgeschlossen und die Proteine proteolytisch abgebaut, wodurch die DNA aus dem Chromatin freigesetzt wird. Das während dieser Behandlung anwesende Chelex-Harz cheliiert polyvalente Kationen und entfernt somit PCR-inhibierende Metallionen aus der Lösung.

Material:

5% Chelex-Lösung: 5g Chelex 100 Resin (BIO-RAD Nr. 143-2832) in 100 ml H₂O
Proteinase K-Lösung (20 mg/ml)
Wattestäbchen, steril
Skalpell, steril
1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße
Gilson-Pipettenspitzen: blau; gelb, normal und abgeschnitten
Gilson-Mikropipetten: 1 ml, 200 µl, 20 µl
Vortex
Eppendorf-Zentrifuge
56°C-Thermoblock
100°C-Thermoblock oder –Wasserbad

Durchführung:

Am Tag vor dem Versuch:

1. Mit sterilem Wattestäbchen 3-4mal an der Wangenschleimhaut entlangreiben, Stäbchen dabei drehen (Speichel zuvor hinunterschlucken).
2. Mit sterilem Skalpell Wattebausch längs aufschneiden und vom Holzstäbchen abstreifen, in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen, 500 µl Chelex-Lösung dazugeben (diese direkt davor gut vortexen, um die Chelex-Kügelchen homogen zu suspendieren).
3. 5 µl Proteinase K-Lösung zugeben.
4. Ansatz vortexen; darauf achten, daß Wattebausch vollständig in der Lösung ist.
5. Bei 56°C über Nacht (mindestens 2 Std.) inkubieren.

Am Versuchstag:

6. Proben vortexen.
7. Proben für 10 Min. in auf 100°C vorgeheizten Thermoblock (Wasserbad) setzen.
8. Proben für mindestens 30 Sek. vortexen.
9. Proben zentrifugieren: 5 Min., 14.000 g, Eppendorf-Zentrifuge.
10. Vom Überstand 300 µl mit abgeschnittener gelber Spitze abnehmen und in neues, beschriftetes 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführen; beim Abnehmen des Überstandes darauf achten, daß keine Chelex-Kügelchen mitabgenommen werden, Tip: Watte als Filter benutzen.
11. 10 µl des Überstandes für PCR einsetzen.

2) PCR-Reaktion

Jede Gruppe soll mit der zuvor isolierten eigenen genomischen DNA sowie mit je einer weiblichen und männlichen Kontroll-DNA eine Multiplex-PCR durchführen, bei der gleichzeitig das PABX- und das SRY-Primerpaar in einer Reaktion eingesetzt werden. Zusätzlich zu den 4 PCR-Ansätzen mit DNA (Annahme: 2 Mitglieder pro Gruppe) soll eine Leerwert-Kontrolle mit Wasser statt DNA angesetzt werden (Kontaminations-Kontrolle).

Material:

10 x PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.3/500 mM KCl/15 mM MgCl₂/
0.25 % Nonidet P 40/0.25 % Tween 20/0.25 mg/ml BSA)

10 x dNTP-Lösung (je 2.0 mM dATP/dCTP/dGTP/TTP)

25 mM MgCl₂

Enhancer (Fa. PeqLab)

Taq-Polymerase (Haus-Taq; Humangenetik; ~ 2 units/ l)

Aqua bidest., autoklaviert

Primer:

PABX-F : 5'-GGA CTC AGA CCT TAG TTA TAG-3' (10 pmol/ l)

PABX-R : 5'-CAG TCC AGT GCC TGT GAT GA-3' (10 pmol/ l)

SRY-F : 5'-CGT AAC AAA GAA TCT GGT AGA AGT G-3' (10 pmol/ l)

SRY-R : 5'-CGT AAA AAG GAG CAT CTA GGT AGG TC-3' (10 pmol/ l)

Selbstisolierte DNA

Männliche Kontroll-DNA: 300 g/ml

Weibliche Kontroll-DNA: 300 g/ml

Greiner-Reaktionsgefäße: 0,5 ml

Gilson-Mikropipetten: 200 l, 20 l

Gilson-Pipettenspitzen, gelb

PCR-Gerät: PTC 100, MJ Research

Durchführung:

Die PCR soll in einem Endvolumen von 50 l ablaufen. Sie pipettieren zuerst folgenden Mix mit 40 l ohne DNA:

Aqua bidest.	19 l
10 x PCR-Puffer	5 l
25 mM MgCl ₂	3 l
10 x dNTP-Lösung	3 l
Enhancer	5 l
PABX-F-Primer	1 l
PABX-R-Primer	1 l
SRY-F-Primer	1 l
SRY-R-Primer	1 l
Taq-Polymerase (2u/ l)	1 l
Mix	40 l

Sie haben 5 PCR-Ansätze insgesamt. Es empfiehlt sich, zur Sicherheit einen 6-fachen Mastermix herzustellen (weniger Pipettierschritte, geringere Volumenfehler beim Pipettieren) und diesen auf Eis zu stellen. Nun die Röhren beschriften und wie folgt pipettieren:

Röhren		bidest H ₂ O	Mastermix	DNA
1	Leerwert	10 l	40 l	-
2	männl. Kontrolle	9 l	40 l	1 l
3	weibl. Kontrolle	9 l	40 l	1 l
4	eigene DNA #1	-	40 l	10 l
5	eigene DNA #2	-	40 l	10 l

Der PCR-Zyklus ist wie folgt:

Anfangs-Denaturierung:	94 ⁰ C, 3 Min.	
Denaturierung:	94 ⁰ C, 30 Sek.	} 30 Zyklen
Annealing:	58 ⁰ C, 30 Sek.	
Extension:	72 ⁰ C, 45 Sek.	
End-Extension:	72 ⁰ C, 3 Min.	--> Herunterfahren auf 25 ⁰ C

3) Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente lassen sich in Agarose-Gelen elektrophoretisch auftrennen. Infolge ihrer negativen Ladung (Phosphatgruppen des Phosphodiester-Rückgrates) wandern sie zur Anode, wobei kleinere Fragmente schneller laufen als große. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Logarithmus der Molmasse (gilt nicht für sehr große Fragmente). Üblicherweise werden Standardfragmente bekannter Größe als Größenmarker in einer separaten Gelspur mit aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgt in Gegenwart des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, der zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert und als Folge der Interkalierung eine höhere Fluoreszenz aufweist als in Lösung. Durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht von 254 nm oder 302 nm Wellenlänge können die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden; das vom Farbstoff emittierte Licht liegt im rot-orangen Teil des sichtbaren Spektrums bei 590 nm.

Material:

DNA-Größenstandard (100 bp-Leiter, BioLabs; 0.5 g/10 l; Fragmentgrößen in bp:
1517, 1200, **1000**, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100)
Ladelösung: 15 % Ficoll / 0.25 % Bromphenolblau
10 x TBE-Puffer: 900 mM Tris-Borat, pH 7.4 / 20 mM EDTA
Ethidiumbromid (10 mg/ml)
Seakem-LE-Agarose
1 l Erlenmeyerkolben
Mikrowellenherd oder Heizplatte

Elektrophorese-Trog, Gelkämme, Gelelektrophorese-Apparatur, Spannungsgerät
UV-Transilluminator
Polaroid-Sofortbild-Kamera
Gilson-Mikropipetten: 20 l

Durchführung:

Zunächst wird ein 2 %-Agarosegel gegossen. Hierfür wird die entsprechende Menge Agarose in einen 1 l Erlenmeyerkolben eingewogen und in 250 ml 0.5 x TBE-Puffer durch Aufkochen im Mikrowellenherd (auf der Heizplatte) gelöst. Anschließend wird Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0.1 g/ml zugegeben, die Lösung auf ca. 60°C abgekühlt und das Gel in einem UV-transparenten, gut abgedichteten Geltrog (20 x 20 cm) mit zwei Gelkämmen für je 22 Taschen gegossen. Nach Erhärtung des Gels (ca. 20 min bei Raumtemperatur) wird es in die Elektrophorese-Apparatur gelegt und mit 0.5 x TBE-Puffer überschichtet, und die Kämmen werden vorsichtig herausgezogen.

Die 50 l PCR-Ansatz werden durch Zugabe von 10 l Ladelösung auf 1,5 % Ficoll eingestellt. Das Ficoll erhöht die Dichte der Lösung, die somit beim Auftragen nach unten in die Geltaschen sinkt. Der Farbstoff Bromphenolblau, der wie die DNA zur Anode läuft, dient als Laufmarker. Neben den Proben werden 0.5 g des Größenstandards mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 200 V/ 80 mA für 30-40 min, bis das Bromphenolblau ca. 6 cm weit gelaufen ist. Nach Beendigung des Laufes wird das Gel auf die Quarzplatte des Transilluminators gelegt, von unten mit UV-Licht von 302 nm bestrahlt und mit einer Polaroid-Sofortbild-Kamera durch ein Orange-Filter photographiert.

Pro Geltasche sollen 20 l aufgetragen werden. Die Beladung der Geltaschen soll dabei in folgender Reihenfolge geschehen:

- Größenmarker
- Eigene DNA #1
- Eigene DNA #2
- Weibliche Kontroll-DNA
- Männliche Kontroll-DNA
- Leerwert-Kontrolle
- Leerspur
- Nächste Gruppe

Vorsicht: Beim Aufkochen der Agarose kann Siedeverzug auftreten.
Ethidiumbromid ist ein starkes Mutagen. Beim Hantieren mit dem Agarose-Gel und dem Elektrophorese-Puffer Einmal-Handschuhe überziehen.
Beim Photographieren des Gels Schutzbrille tragen, nicht ungeschützt ins UV-Licht schauen.

Zum Protokoll:

Ergebnis des Versuches anhand des Gelfotos dokumentieren und diskutieren, vor allem, wenn es nicht wie erhofft geklappt hat (Fehlerdiskussion). Bitte auch im Protokoll angeben, was Ihnen gefallen hat und was nicht (Versuch zu einfach, zu schwer, gerade richtig?), damit wir den Versuch beim nächsten Mal modifizieren können. Verbesserungsvorschläge sind willkommen.