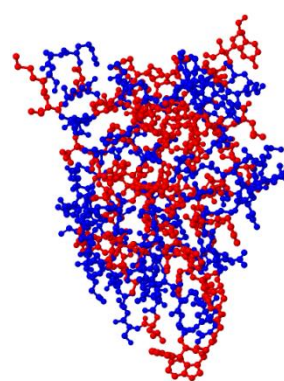
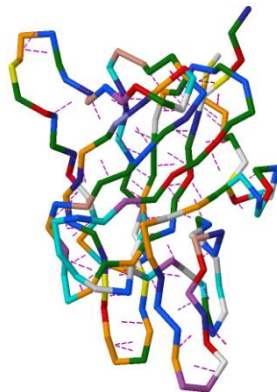
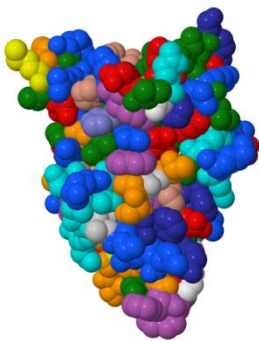
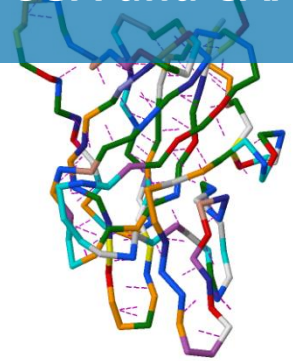
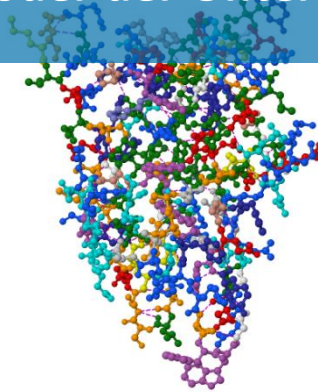
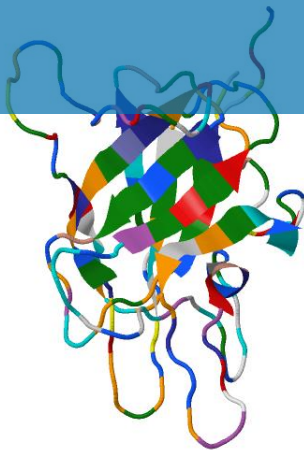
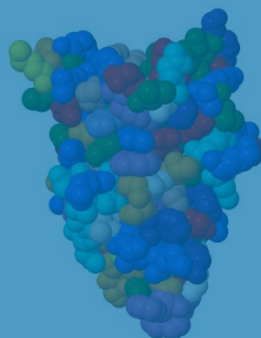
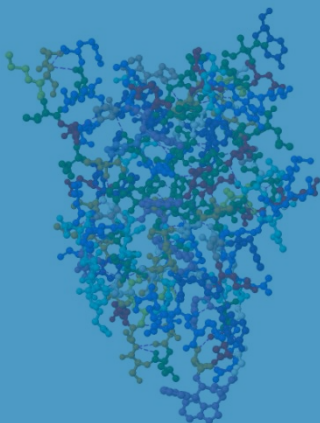


Die Faktor-V-Leiden-Mutation

oder der Unterschied zwischen CGA und CAA



Eine Mutationsanalyse in meiner Verwandtschaft



Maturaarbeit
Rebekka Leistner
November 2013
Kantonsschule Wettingen

Betreuer: Dr. Thomas Werner
Gegenleserin: Monika Langmeier

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	2
Abstract	3
1. Einleitung.....	4
1.1 Die DNA als Träger der Erbinformationen	4
1.2 Die Grundlagen der Blutgerinnung	6
1.3 Die Faktor-V-Leiden-Mutation	11
2. Material und Methoden	16
2.1 Rechtliche Aspekte	16
2.2 Erstellen eines Stammbaums	16
2.3 Probephase.....	16
2.4 DNA-Aufbereitung.....	17
2.3 Primer	19
2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
2.6 Gelelektrophorese.....	22
2.7 Reinigung der amplifizierten DNA.....	26
2.8 Verdau	27
2.9 Sequenzierung.....	28
3. Resultate.....	29
3.1 Stammbaum	29
3.2 Einverständniserklärung.....	29
3.3 Probephase.....	29
3.4 DNA-Extraktion.....	31
3.5 Gelelektrophorese nach PCR.....	32
3.6 Gelelektrophorese nach Verdau	34
3.7 Gelelektrophorese mittels Elchrom	35
3.8 Sequenzierung.....	36
4. Diskussion.....	38
Reflexion.....	42
5. Glossar	43
6. Referenzen	46
7. Anhang.....	49

Vorwort

Schon seit der Bezirksschule bin ich naturwissenschaftlich interessiert. Mit der Wahl des Schwerpunktfachs Biologie und Chemie konnte ich dieses Interesse weiter vertiefen und unter anderem in den spannenden Bereich der Molekularbiologie eintauchen.

Auf der Suche nach einem geeigneten Maturaarbeitsthema kam mir die Idee, eine molekularbiologische Arbeit durchzuführen und ich informierte mich über ähnliche, bereits realisierte Projekte.

Bald schon reizte es mich, selbstständig ein solches Forschungsprojekt in Angriff zu nehmen. Es war mir wichtig, dass ich einen persönlichen Bezug zum Thema habe. So war es naheliegend, eine genetische Analyse der sogenannten Faktor-V-Leiden-Mutation durchzuführen, von der meine Mutter, meine Schwester und ich betroffen sind. Ich hatte mich zuvor nie näher über diese Krankheit informiert, da ich mir keiner gravierenden Einschränkung bewusst war. Ursache und Folgen waren mir nicht genauer bekannt und so war es ein zusätzlicher Anreiz, durch meine Maturaarbeit herauszufinden, was genau hinter dieser relativ unbekanntem, aber nicht seltenen Erbkrankheit steckt. Wie sich durch meine genetische Analyse herausstellen sollte, sind wir drei nicht die einzigen Betroffenen in unserer Familie...

Ganz herzlich bedanke ich mich bei meiner Betreuungsperson Herr Dr. Thomas Werner, der mich während der gesamten Maturaarbeitszeit kompetent und zuverlässig betreut hat. Ein weiteres Dankeschön geht an Prorektor Herr Dr. Hansmartin Ryser bzw. die Kantonsschule Wettingen, die grosszügigerweise einen beachtlichen Teil der Materialkosten übernahm und an Frau Monika Langmeier, die sich als Gegenleserin zur Verfügung gestellt hat. Ebenso danke ich der Fachschaft Biologie, dass ich deren Laboreinrichtung benutzen durfte.

Ein inniger Dank gilt auch meinen Eltern, die mich bei Schwierigkeiten stets ermutigt und aufgemuntert haben.

Sie alle haben massgeblich dazu beigetragen, dass diese Arbeit überhaupt durchgeführt werden konnte.

Abstract

Diese Arbeit aus dem Bereich der Molekularbiologie befasst sich mit der Faktor-V-Leiden-Mutation und insbesondere mit deren Vererbung in meiner Verwandtschaft.

Die Faktor-V-Leiden-Mutation ist eine Erbkrankheit, die auf eine Punktmutation im F5-Gen zurückzuführen ist. Dieses Gen codiert für eines der rund 13 Enzyme, der sogenannten Gerinnungsfaktoren, die die Blutgerinnung auslösen. Aufgrund der Punktmutation kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Enzyms namens Faktor V, sodass dieses nicht einwandfrei gehemmt wird und seine gerinnungsfördernde Wirkung behält.

Die Faktor-V-Leiden-Mutation ist Ursache eine der häufigsten Thromboseneigungen in Europa. [5]

Ziel dieser Arbeit war es, mittels genetischer Analyse die Vererbung der Faktor-V-Leiden-Mutation in meiner Verwandtschaft zu untersuchen.

Dazu wurde die DNA aus den Mundschleimhautzellen extrahiert. Anschliessend wurde gezielt ein 267bp langes Fragment des F5-Gens durch die Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt. Dieses Fragment verfügt über einen Restriktionslängenpolymorphismus (RFLP): bei Vorliegen der Faktor-V-Leiden-Mutation geht eine Schnittstelle verloren, sodass beim Verdau mit dem Restriktionsenzym MnlI nur zwei anstatt drei Spaltprodukte entstehen. Diese wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und aufgrund des Bandenmusters der Genotyp bestimmt. [6] [11]

Bei 18 von insgesamt 23 Proben konnte der Genotyp bestimmt werden: 14 Proben direkt durch die genetische Analyse und 4 indirekt durch Annahme basierend auf der Vererbungslehre. Zwei bereits bekannte und vier neu diagnostizierte heterozygote Faktor-V-Leiden-Mutationen konnten bestätigt bzw. nachgewiesen werden. Diese Resultate sind in einem Stammbaum dargestellt.

Ein weiterer Teil dieser Arbeit umfasst die erarbeiteten Grundlagen über die komplexen Vorgänge der Blutgerinnung und die Faktor-V-Leiden-Mutation.

1. Einleitung

Anmerkung: Mir war es wichtig, durch eigene Recherchen vertiefte Kenntnisse über die Blutgerinnung und die Faktor-V-Leiden-Mutation zu erwerben. In den folgenden Kapiteln gehe ich demnach sehr detailliert auf diese Themen ein. Um jedoch auch „Nicht-Biologie- und Chemie-Bewanderten“ einen Einblick zu ermöglichen, habe ich als Hilfe am Ende dieser Arbeit ein Glossar angefügt, in dem Fachwörter aus der Molekularbiologie und Chemie erklärt werden. Die erklärten Fachwörter sind mit einem [↗] gekennzeichnet. Des Weiteren geben die Kapitel 1.1 und 1.2.1 einen guten Überblick über die DNA als Träger der Erbinformationen und der Blutgerinnung.

1.1 Die DNA als Träger der Erbinformationen

Der Träger der Erbinformationen ist die Desoxyribonukleinsäure – kurz DNA. Die DNA ist ein riesiges Makromolekül, das aus vielen miteinander verknüpften Bausteinen, den sog. Nukleotiden, besteht. Jeweils ein Zuckermolekül (Desoxyribose), ein Phosphat und eine Base bilden zusammen einen Nukleotiden. Es gibt vier verschiedene Nukleotide, die sich in ihrem Aufbau nur durch die Base, die entweder ein Adenin, Cytosin, Guanin oder Thymin ist, unterscheiden. Die Nukleotide werden nach ihrer Base benannt und somit mit den Buchstaben A, C, G oder T abgekürzt. In der DNA sind die Nukleotide kettenartig miteinander verknüpft; zwei sich umeinander windende Nukleotidketten bilden eine Struktur, die als Doppelhelix bezeichnet wird. Die Nukleotide verbinden sich im Innern dieser Helix miteinander mittels Wasserstoffbrücken. Dies geschieht jedoch nicht einfach beliebig: Adenin kann sich nur mit Thymin paaren und Cytosin nur mit Guanin. Die Basenabfolge des einen Strangs gibt somit diejenige des anderen vor. Folglich ergänzen sich die beiden Stränge; sie sind komplementär. Auf der folgenden Seite finden sich Abbildungen des DNA-Modells.

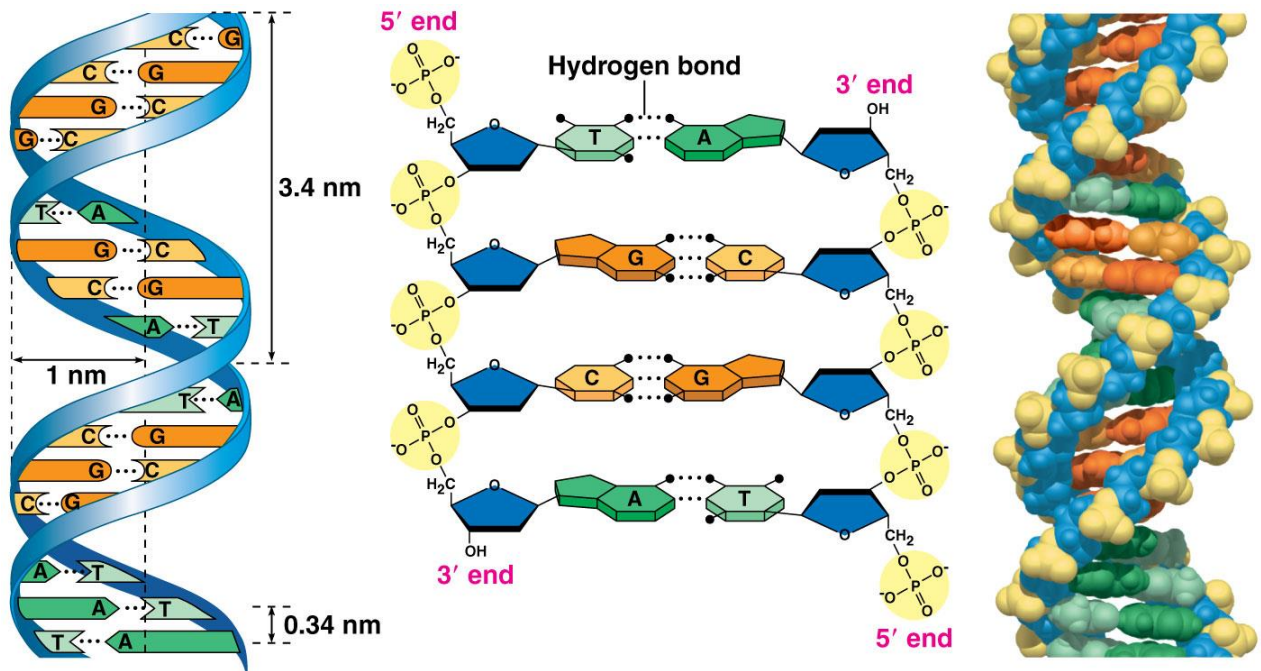


Abb. 1: Links: Die blauen Schleifen repräsentieren das Zucker-Phosphat-Rückgrat der beiden DNA-Stränge. Die beiden Stränge werden durch Wasserstoffbrücken (gepunktete Linien) zwischen den im Innern der Helix gepaarten Basen zusammengehalten.

Mitte: Die beiden DNA-Stränge „aufgedreht“. Die Abfolge von gelben Kreisen und blauen Sechsecken repräsentiert das Zucker-Phosphat-Rückgrat, das in der linken Abbildung als Schleife dargestellt wurde.

Rechts: Dreidimensionale Struktur der DNA.

Durch die Abfolge der Nukleotiden in der Kette ergibt sich ein langer Text, der die Erbinformationen darstellt. Jedes Merkmal wird durch einen Nukleotidabschnitt, ein sog. Gen, codiert. Durch kleine Unterschiede in der Nukleotidsequenz kann sich der Gehalt dieser Information jedoch unterscheiden, sodass verschiedene Ausprägungsformen - sog. Allele - desselben Merkmals entstehen. Jeder Mensch erbt von seinem Vater und seiner Mutter je eine Genkopie pro Merkmal, deren Gehalt sich unterscheiden kann. Sind die Allele von Vater und Mutter identisch, so spricht man von Homozygotie, unterscheiden sie sich, so wird dies als Heterzygotie bezeichnet. [44]

Die DNA kann somit mit einem riesigen Kochbuch verglichen werden, das viele Rezepte (Gene), nach denen jede Zelle des Organismus „kocht“ (Proteinbiosynthese), enthält. Die Merkmale von Lebewesen werden letztlich von Proteinen hervorgerufen, die aufgrund der auf den Genen enthaltenen Informationen hergestellt werden.

1.2 Die Grundlagen der Blutgerinnung

1.2.1 Ein Überblick



Abb. 2: Roter Thrombus (REM). Er dichtet die Wunde ab und begrenzt so den Blutverlust. In den Fibrinfäden, die den Thrombus verstärken, bleiben rote Blutkörperchen hängen. [3]

Das Hämostasesystem (griech. haima = Blut, stasis = Stillung) verleiht dem Blut die Fähigkeit zu gerinnen und schützt den Organismus dadurch bei Verletzungen vor zu grossem Blutverlust. Das dabei entstehende Gerinnsel - der sog. Thrombus - dient als Barriere, die den Blutverlust begrenzt.

Dabei ist die Gerinnselbildung so organisiert, dass sie lokal, d.h. auf die verletzten Gefässe begrenzt, gehalten wird und der Blutfluss in den unverletzten Gefässen nicht betroffen ist. Die Ausbildung des Thrombus ist der zentrale Vorgang bei der Hämostase; sie kommt jedoch nur durch das Zusammenspiel von verschiedenen Komponenten zustande. Dazu gehören das Blutgefäss selbst und die sich im Blut befindlichen Stoffe, wie z.B. die

Thrombocyten⁷ und Enzyme⁷. Nach der Blutstillung wird der Thrombus zur Wundheilung durch das fibrinolytische System wieder abgebaut.

Demnach wird das Hämostasesystem in vier miteinander vernetzte Systeme unterteilt, die auf eine Verletzung reagieren:

- **Vaskuläres** Gerinnungssystem: Reaktion der Blutgefässe.
- **Thrombocytäres** Gerinnungssystem: Reaktion der Thrombocyten.
- **Plasmatisches** Gerinnungssystem: Reaktion, der sich im Plasma befindlichen Enzyme.
- **Fibrinolytisches** System: Abbau des Thrombus zur Wundheilung.

Durch eine Verletzung werden Endothelzellen, die unsere Blutgefässe auskleiden, zerstört. Dadurch wird die subendotheliale Matrix⁷ freigelegt und kommt mit gerinnungsfördernden Substanzen in Kontakt, die dadurch aktiviert werden und die Hämostase auslösen. [1] [2]

Es ist jedoch wichtig festzuhalten, dass es keiner Verletzung bedarf, sondern auch schon eine deutliche Verlangsamung des Blutstromes, z.B. durch langes, abgeknicktes Sitzen, genügen kann, um die Hämostase auszulösen. Thromben werden also nicht immer nur als Schutz vor Blutverlust gebildet, sondern auch „fälschlicherweise“, wenn gar keine Verletzung vorliegt; dies äussert sich in Thrombosen. [3]

Im Folgenden werde ich genauer auf die Aktivierung und den Ablauf der Hämostase eingehen. Diese sind sehr komplex, müssen jedoch genau beschrieben werden, um die Symptome der Faktor-V-Leiden-Mutation erklären zu können.*

1.2.2 Ablauf der Hämostase

Die Hämostase kann in zwei Phasen unterteilt werden [4]:

Primäre Hämostase

- **Zweck:** Bildung eines Thrombus und somit erster Wundverschluss.
- **Beteiligte Systeme:** vaskuläres und thrombocytäres Gerinnungssystem.
- **Ablauf:** Durch eine Verletzung des Blutgefäßes werden die glatten Muskelfasern der Gefäßwand gereizt, sodass eine Gefäßverengung erfolgt. Die Strömungsgeschwindigkeit des Blutes wird verringert und das verletzte Gewebe somit weniger durchblutet (vaskuläres Gerinnungssystem). [1]

Die Aktivierung des thrombocytären Gerinnungssystems erfolgt durch die Freilegung der subendothelialen Matrix. Die Kollagenfasern⁷ sind nun für die Thrombozyten frei zugänglich, sodass diese daran haften können (s. Abb. 2). Beim Anhaften wechseln die Thrombozyten ihre Gestalt (shape change). Dadurch setzen sie verschiedene Substanzen frei, die gefäßverengend wirken und auch weitere Thrombozyten „herbeirufen“. Diese Ansammlung von Thrombozyten bezeichnet man als Thrombus, der die Wunde erstverschliesst. [2]

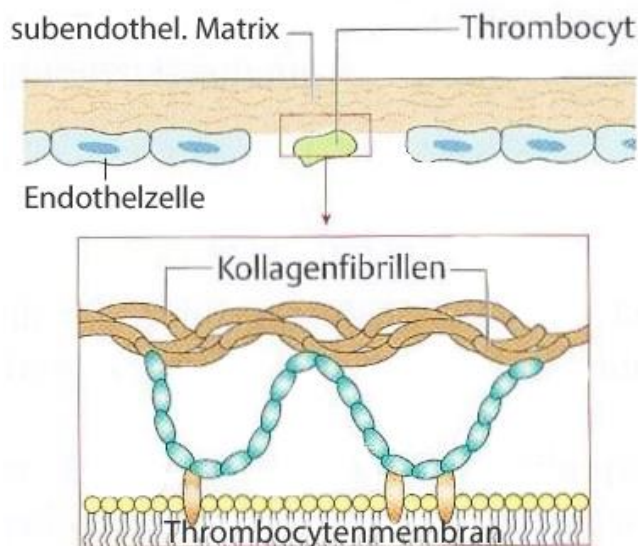


Abb. 3: Thrombozytenadhäsion. Über Rezeptoren (orange) bindet der Thrombocyt an die Kollagenfibrillen der Matrix. Die Bindung wird durch den sog. Van-Willebrand-Faktor (hellblau) erleichtert, indem er eine Art Brücke zwischen Kollagenfibrille und Thrombocyt bildet.

* Der Einfachheit halber wird im Folgenden der extrinsische Weg (bei Verletzung des Gewebes) beschrieben und der intrinsische Weg (bei Verletzung der Blutgefäßinnenwand) weggelassen. Der intrinsische Weg ist für eine normal ablaufende Hämostase nicht relevant, da eine vollständige Inaktivierung desselben zu keiner Blutungsneigung führt. [20]

Sekundäre Hämostase

- **Zweck:** Die sekundäre Hämostase unterstützt den endgültigen Wundverschluss und die Wundheilung. Dies wird durch die Produktion von Fibrin aus der Vorstufe Fibrinogen erreicht. Fibrin, ein nichtwasserlösliches Protein, vernetzt und verstärkt den bei der primären Hämostase entstandenen Thrombus. Dadurch wirkt es wie ein Klebstoff, der ein erneutes Aufreissen der Wunde verhindert. [4]

- **Beteiligte Systeme:** plasmatisches Gerinnungssystem. Dieses System besteht aus Enzymen, den sog. Gerinnungsfaktoren, die vorwiegend in der Leber gebildet werden. Die meisten Gerinnungsfaktoren sind Proteasen, d.h. Enzyme, die Proteine an einer bestimmten Stelle spalten können. Dadurch erfolgt auch die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren, die zunächst alle in inaktiver Form vorliegen: in einer Kaskade⁷ aktivieren sich die Gerinnungsfaktoren gegenseitig und nehmen ihre Funktion wahr. Die Gerinnungsfaktoren werden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung mit römischen Ziffern benannt, sind sie aktiviert so wird ein a (=aktiviert) angefügt. [2]

- **Ablauf:**

1. *Initiation.* Schon während der Bildung des Thrombus wird das plasmatische Gerinnungssystem aktiviert (s. Abb. 3). Dies erfolgt dadurch, dass durch die Gewebeerletzung der Tissue Faktor (TF) freigelegt wird und als Cofaktor mit Faktor VII einen Komplex bildet. Diese Komplexbildung führt schliesslich zur vollständigen Aktivierung des Letzteren und der Faktoren IX und X. Faktor Xa aktiviert nun Faktor II; initiales⁷ Thrombin (Faktor IIa) wird gebildet. [2]

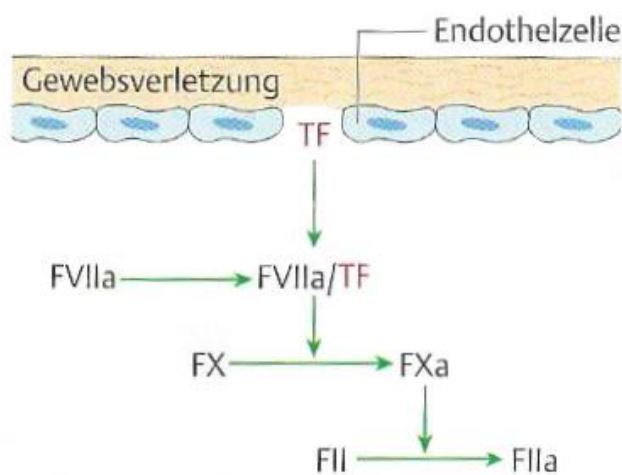


Abb. 4: Initiation. Durch Freilegen des TF kann initiales Thrombin (FIIa) gebildet werden.

2. *Verstärkung.* Das initial entstandene Thrombin (Faktor IIa) ist für die Verstärkung der Koagulation verantwortlich, indem es seine eigene Produktion selbst ankurbelt (s. Abb. 4). Es aktiviert die Faktoren V, VIII, XI, die dann weiter reagieren: Faktor VIIIa und Faktor IXa bilden den Tenasekomplex, der mehr Faktor X aktiviert. Dieser bildet mit dem nun ebenfalls vorliegenden Faktor Va den Prothrombinasekomplex, der noch mehr Thrombin aktiviert. Durch die beiden Verstärkungsmechanismen Tenase- und Prothrombinasekomplex wird also eine genug hohe Thrombinkonzentration

erreicht, sodass die Fibrinproduktion eingeleitet werden kann. Dabei spielt der Faktor V eine sehr wichtige Rolle: nur durch ihn kann der Prothrombinasekomplex und somit Thrombin gebildet werden. Er wirkt dadurch geschwindigkeitsbestimmend in der Thrombinbildung! [2]

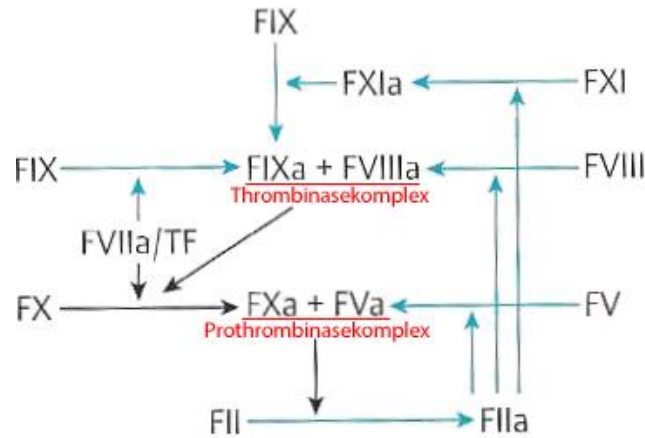


Abb. 5: Verstärkung. Das initiale Thrombin aktiviert weitere Faktoren (blaue Pfeile) und kurbelt dadurch seine eigene Produktion an.

- Fibrinbildung.** Das Thrombin spaltet Teile des Fibrinogens ab, wodurch dieses polymerisiert⁷. Gleichzeitig aktiviert das Thrombin den Faktor XIII, der die Polymere⁷ dann miteinander zu einem engmaschigen, stabilisierenden Netz, dem Fibrin, verknüpft. [2]

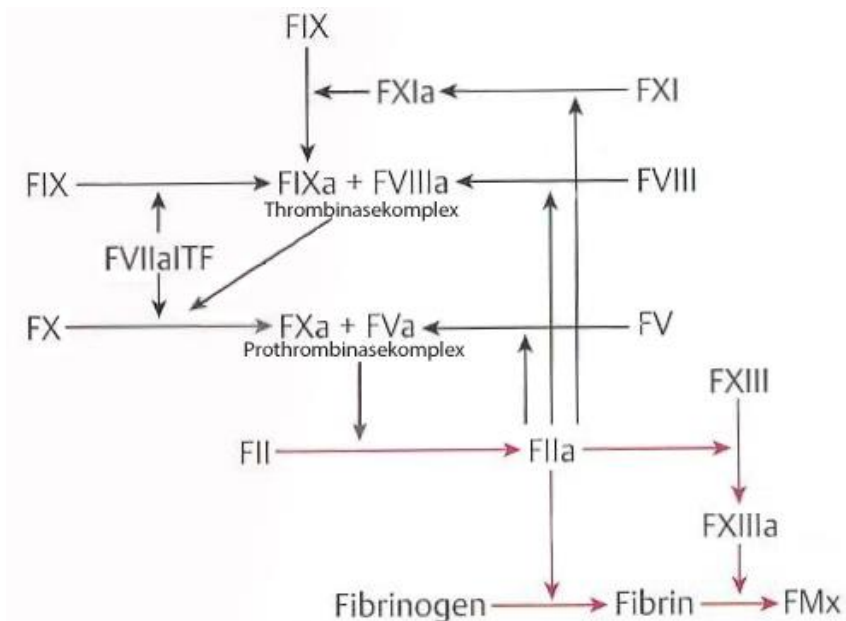


Abb.6: Fibrinbildung. Die durch die Einwirkung von Thrombin entstandenen Fibrinpolymere werden anschliessend von FXIII miteinander verknüpft (rote Pfeile).

1.2.3 Das fibrinolytische System

Im Anschluss an die Blutstillung findet die Wundheilung statt. Dabei wird u.a. das Fibrinnetz abgebaut. Dieser Vorgang wird Fibrinolyse (griechisch lysis = Auflösung) genannt und wird von dem Enzym Plasmin übernommen. Durch den Abbau des Fibrinnetzes fällt auch der Thrombus langsam auseinander und löst sich schliesslich auf.

Des Weiteren werden die noch aktiven Gerinnungsfaktoren inaktiviert. Dies schützt vor weiterer, ungewollter Thrombusentstehung und verhindert somit thrombotische Gefässverschlüsse. Die Inaktivierung der Gerinnungsfaktoren wird von drei Substanzen übernommen: [4]

- Antithrombin: komplexiert alle Gerinnungsfaktoren ausser Va und VIIIa.
- Aktives Protein C (APC): übernimmt die Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa.
- Protein S: unterstützt Protein C als Cofaktor.

Durch die Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa werden zwei kritische Punkte reguliert: es kann kein Prothrombinase- und Tenasekomplex mehr entstehen und somit keine genug hohe Thrombinkonzentration, die eine Fibrinproduktion auslösen könnte, erreicht werden. [2]

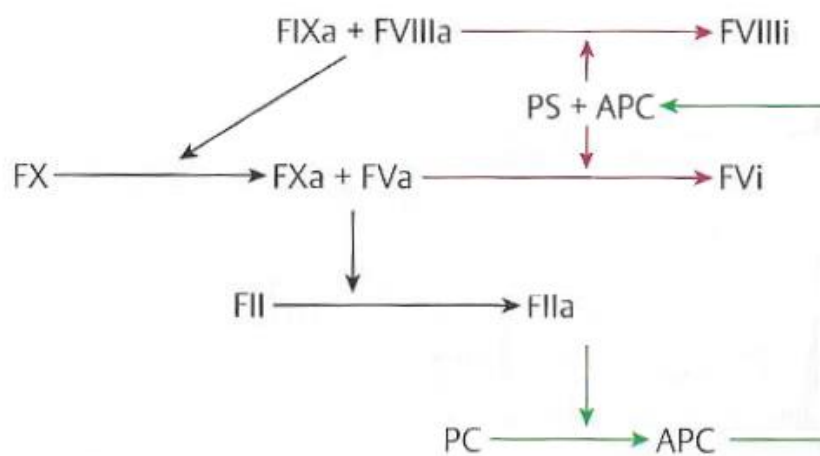


Abb. 7: Das Protein-C-System. Thrombin wirkt nun selbst antikoagulant, indem es das Protein C (PC) aktiviert (grüne Pfeile). Dieses deaktiviert dann FVIIIa und FVa (rote Pfeile).

Wie sich zeigt, ist das plasmatische Gerinnungssystem strengstens reguliert. Es sind immer nur so viele Gerinnungsfaktoren aktiv wie nötig. Diese Regulation ist auch äusserst wichtig, denn in einem Milliliter Blut steckt ausreichend Gerinnungspotential, um alles Fibrinogen im Körper innert 10 bis 15 Sekunden zu Fibrin erstarren zu lassen! [4]

Gerinnungsfördernde und -hemmende Vorgänge laufen in geringem Masse wahrscheinlich immer nebeneinander ab. Durch Störung des Gleichgewichts zwischen diesen beiden Vorgängen kann es zu einer Blutungsneigung oder zu einer Thromboseneigung kommen. [24] Das Letztere ist auch bei der Faktor-V-Leiden-Mutation, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird, der Fall.

1.3 Die Faktor-V-Leiden-Mutation

1.3.1 Vererbung und Vorkommen

Die Faktor-V-Leiden-Mutation (sprich „Faktor-Fünf-Leiden-Mutation“*) ist eine Erbkrankheit, die autosomal[↗] dominant[↗] vererbt wird. Mit einer Prävalenz[↗] in den europäischen Staaten von 2-15% ist sie die häufigste Ursache für eine Thromboseneigung. [6]

Laut einigen Studien rührt dieses hohe Vorkommen daher, dass die Faktor-V-Mutation nebst negativen Aspekten auch einen Selektionsvorteil[↗] bewirkt: durch die erhöhte Gerinnung ist der Blutverlust bei Verletzungen, Operationen und Geburten geringer. In Asien und Afrika ist diese Erbkrankheit praktisch nicht nachweisbar. [5]

1.3.2 Geschichtlicher Abriss



Abb. 8: Björn Dahlbäck.

Die Faktor-V-Mutation wurde erstmals im Jahre 1993 vom schwedischen Forscher Björn Dahlbäck beschrieben. Bei einem seiner Patienten, in dessen Familie Thrombosen gehäuft auftraten, beobachtete Dahlbäck bereits 1986, dass die Zugabe von APC ins Plasma nicht zu einer Verlängerung der Gerinnungszeit führt, wie dies bei gesunden Personen der Fall ist. Um die Ursache dieser Anomalie festzustellen, wurden weitere Experimente durchgeführt. Dabei konnten weder ein APC-Inhibitor im Plasma noch ein Mangel an Protein S festgestellt werden. Daraus schloss Dahlbäck, dass einer der beiden Faktoren Va oder VIIIa, die durch APC inaktiviert werden, resistent gegen diese Inaktivierung sein muss. Nach Jahren intensivster Forschung konnte schliesslich ein veränderter Faktor V als

Ursache der APC-Resistenz identifiziert werden. Im Mai 1994 bestimmte eine holländische Arbeitsgruppe rund um Prof. Dr. Rogier Bertina eine Genmutation als Ursache des gegen APC resistenten Faktors V. Die Mutation wurde gemäss dem Ort ihrer Entdeckung (Universität Leiden, NL) als Faktor-V-Leiden-Mutation benannt. [6]

1.3.3 Ursache und Folgen

Die Faktor-V-Mutation ist auf eine Punktmutation[↗] im F5-Gen, das auf dem Chromosom 1 an der Stelle 1q23 liegt, zurückzuführen. Am Nukleotiden 1'691 des F5-Gens ist die Base Guanin durch Adenin ausgetauscht (c.1'691G>A). Dadurch wird bei der Proteinbiosynthese[↗] die Aminosäure Glutamin an Stelle von Arginin eingebaut, was zu einer strukturell veränderten Spaltstelle Arg506 führt (s. Abb.7).

*Der Einfachheit halber wird im Folgenden nur noch von der „Faktor-V-Mutation“ gesprochen.

Nimmt man wieder die Kochbuchanalogie zur Hand, so könnte man sagen, dass das Rezept zur Herstellung des Proteins Faktor V einen Druckfehler, ein A statt ein G, enthält. Die Zelle folgt jedoch immer diesem fehlerhaften Rezept und produziert dadurch den strukturell veränderten Faktor V.

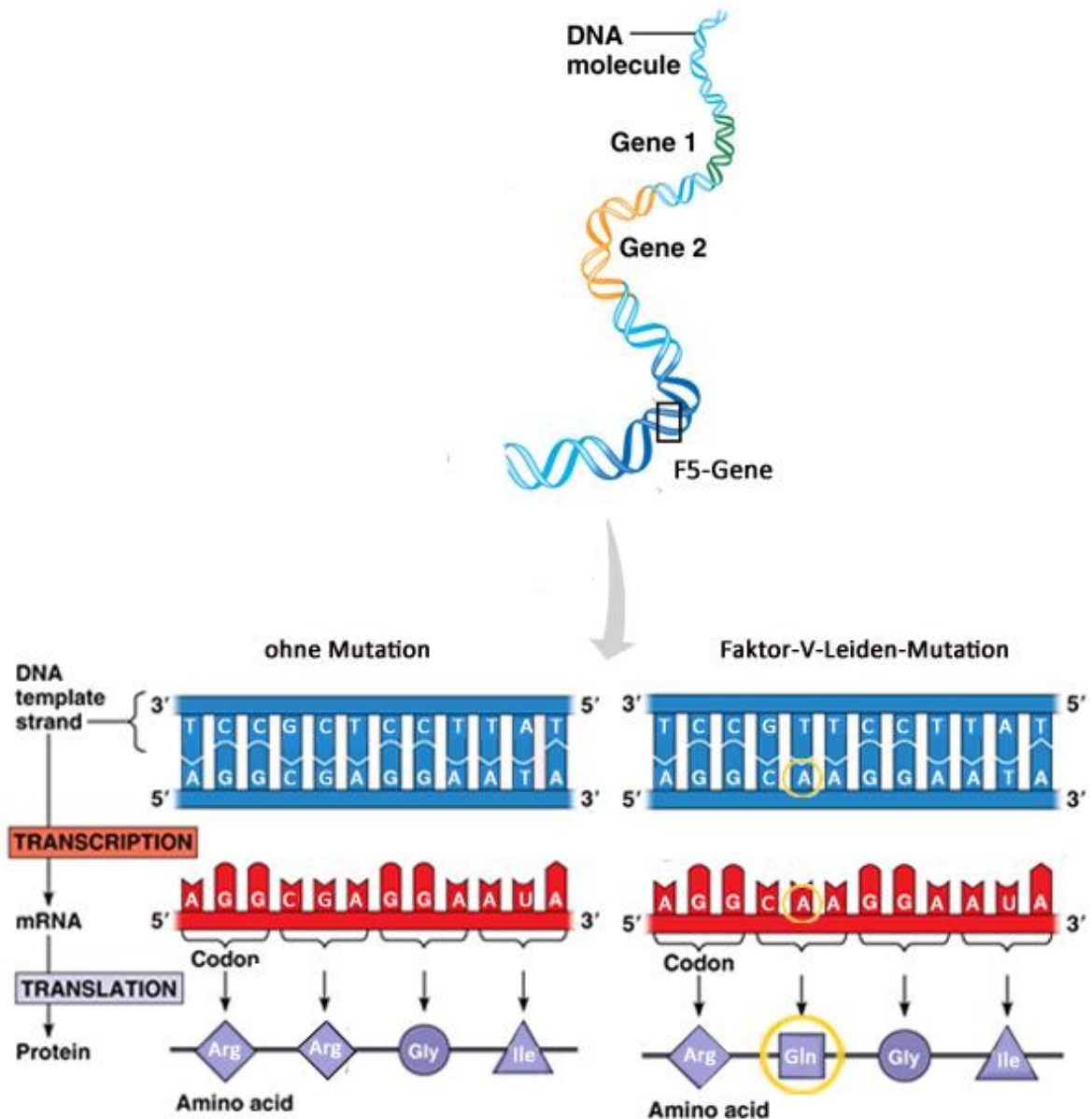


Abb. 9: Auswirkung der Mutation bei der Proteinbiosynthese. Durch die Punktmutation liegt die Base Adenin statt Guanin vor. Dadurch entsteht bei der Transkription ein Codon⁷, das für die Aminosäure Glutamin anstelle von Arginin codiert.

Wie bereits erwähnt, spielt der Faktor V eine wichtige Rolle im plasmatischen Gerinnungssystem. Im Anschluss an die Blutstillung muss er jedoch wieder inaktiviert werden. Dies übernimmt das aktive Protein C (APC), indem es an drei Stellen (Arg506, Arg679, Arg 306) im Faktor V die Peptidbindungen spaltet. [7] Eine Spaltung an Stelle Arg506 selbst führt zu keiner Inaktivierung, sie ist jedoch nötig, damit die zwei weiteren Spaltstellen Arg306 und Arg679 frei zugänglich werden. Durch die Spaltung an diesen zwei Stellen verliert der Faktor V ungefähr 70% bzw. 30% seiner Aktivität. [28]

Da das APC aber nun nicht mehr einwandfrei auf die Spaltstelle passt, läuft die Spaltung viel langsamer ab. Der Faktor V kann nicht ausreichend inaktiviert werden und behält seine gerinnungsfördernde Wirkung.

Kommt es dadurch zum Verschluss einer Vene, so bezeichnet man dies als Thrombose. Diese treten vor allem in den Beinen auf, da dort das Blut herzwärts hochgepumpt werden muss. Tritt eine Thrombose auf, so ist dies meist schmerzhaft und führt zu geschwollenen Beinen. Die gefährlichste Komplikation einer Thrombose ist die Lungenembolie. Dabei löst sich der Thrombus und wandert mit dem Blut Richtung Lunge, wo er dann Lungengefäße verschliessen kann. [25]

Durch die Faktor-V-Mutation ist das Thromboserisiko für Personen, die einen heterozygoten Defekt aufweisen, 5-10fach erhöht, während es bei einem homozygoten Defekt sogar um das 50-100fache erhöht ist. [6]

Die Faktor-V-Mutation ist zu 95% die Ursache einer APC-Resistenz. [28]

Nebst der Faktor-V-Mutation bestehen weitere Mutationen, die zu einer leichten APC-Resistenz führen können. Dies sind zum Beispiel die Faktor-V-Mutation Hongkong oder Faktor-V-Mutation Cambridge. Beide Mutationen bewirken eine strukturelle Änderung der Spaltstelle Arg306. [29] Der Einfluss weiterer Mutationen und Polymorphismen im F5-Gen ist Gegenstand aktueller Forschung und wissenschaftlicher Diskussion.

1.3.4 Therapie

Solange noch keine Thrombose aufgetreten ist, erfolgen keine Vorsorgemassnahmen. Nur in besonderen Risikosituationen, wie Operationen und längerer Ruhestellung (z.B. Flugreisen, Bettlägrigkeit), erfolgt eine Thromboseprophylaxe. In diesen Situationen ist der Blutfluss verlangsamt, was ausreichen kann, die Hämostase und somit auch den Faktor V zu aktivieren. Die Prophylaxe kann medikamentös durch Heparin oder auch physikalisch durch das Tragen von Kompressionsstrümpfen, Hochlagern der Beine oder einer frühzeitigen Mobilisation erfolgen. Heparin unterstützt Antithrombin in seiner Funktion und wirkt somit antikoagulant⁷.

Nach Auftreten einer Thrombose werden antikoagulatorische Medikamente während 6-12 Monaten eingenommen; kommt es jedoch zu wiederholt auftretenden Thrombosen, so erfolgt eine dauerhafte Therapie. [5]

Bei Vorliegen der Faktor-V-Mutation wird von der Einnahme östrogenhaltiger **Antibabypillen** abgeraten. Östrogen wirkt koagulatorisch⁷ und erhöht dadurch das ohnehin schon bestehende Thromboserisiko zusätzlich.

Mehrere Studien bestätigen zudem, dass eine mütterliche Faktor-V-Mutation ein erhöhtes **Abortrisiko** hervorruft. [8] [21] Schwangeren Frauen ohne Thrombosen in der Vorgeschichte wird daher eine Gerinnungskontrolle, das Tragen von Strümpfen während der Schwangerschaft und eine Heparinprophylaxe im Wochenbett empfohlen. Frauen mit Thrombosen in der Vorgeschichte werden während der gesamten Schwangerschaft mit Heparin behandelt. [5] [9]

1.3.5 Diagnostik

Die Diagnose kann durch einen funktionellen Test im Plasma (Zugabe von APC, s. Dahlbäck) oder durch eine genetische Analyse erfolgen. Da der funktionelle Test nur den Phänotypen nachweist und keinerlei Aufschluss über den Genotypen gibt, wird eine genetische Analyse empfohlen. Nur im Wissen, ob der Defekt hetero- oder homozygot vorliegt, kann das Thromboserisiko abgeschätzt und die Therapie bestimmt werden. [10]

Zur genetischen Analyse wird entweder die DNA-Sequenzierung oder der Nachweis durch Restriktionslängepolymorphismus (RFLP) verwendet. Beim RFLP, zu dem ich mich u.a. aus Kostengründen entschieden habe, wird eine zuvor gezielt vervielfältigte DNA-Sequenz mit einem Restriktionsenzym verdaut. Dies sind Enzyme, die eine spezifische Basenabfolge als Spaltstelle erkennen und den DNA-Doppelstrang an dieser Stelle durchtrennen. [11]

Für die Diagnostik der Faktor-V-Mutation wird gemäss Bertina [12] vorgegangen und das Restriktionsenzym MnlI verwendet. Dieses schneidet den gezielt durch PCR vervielfältigten Abschnitt des F5-Gens an zwei Stellen, die die Basenabfolge 5'-CCTC-3' bzw. 3'-GGAG-5' aufweisen. Somit entstehen drei Fragmente. Liegt die Mutation jedoch vor, so geht eine dieser Schnittstellen verloren: aufgrund der Substitution von Guanin durch Adenin ist die Abfolge nun 3'-GGAA-5'. MnlI kann diese Schnittstelle nicht erkennen, es entstehen also nur zwei Fragmente. Nach dem Verdau kann durch Gelelektrophorese analysiert werden, ob die Mutation vorliegt oder nicht. [7]

Wildtyp

Faktor-V-Mutation

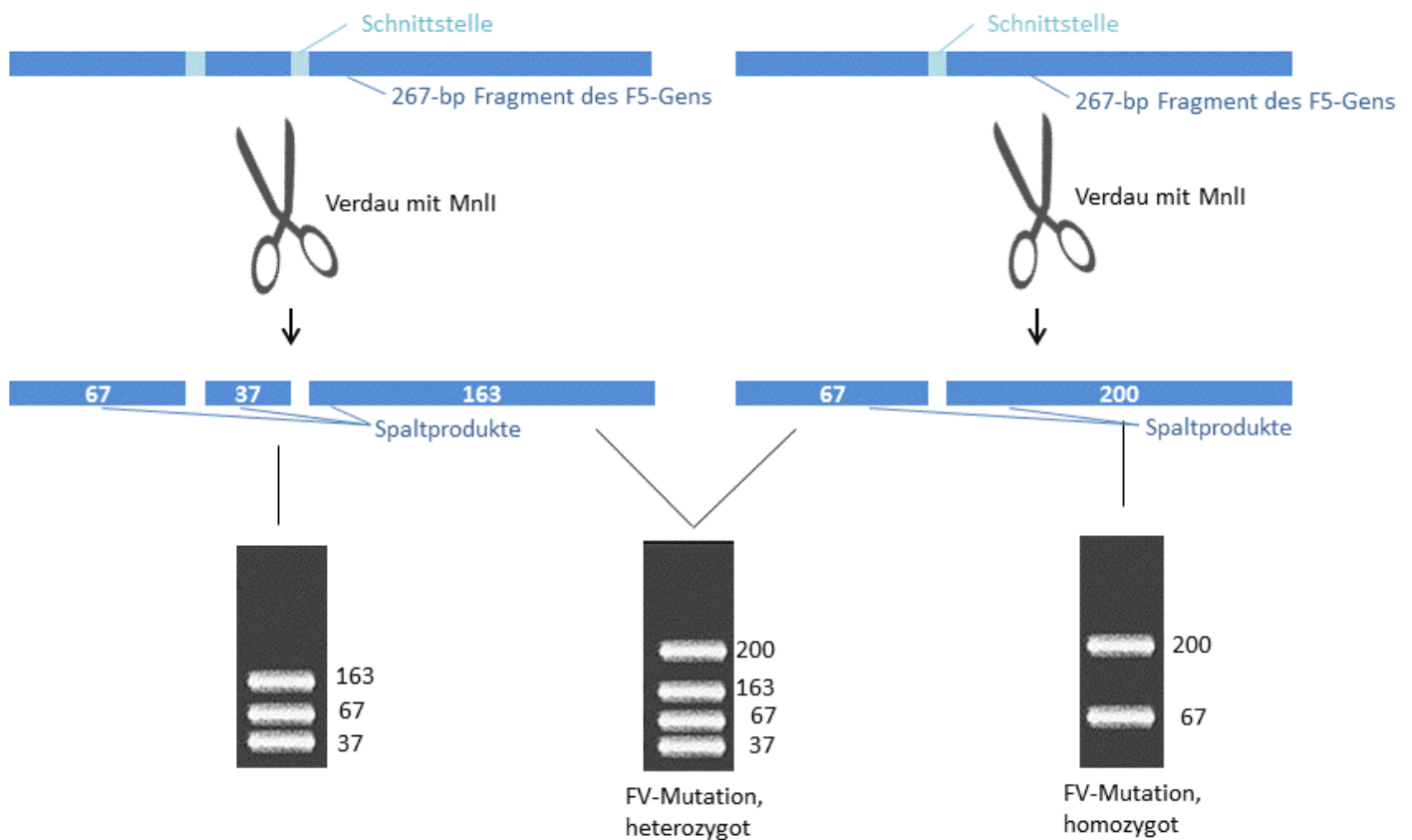


Abb.10: Nachweis durch RFLP. Durch die Mutation geht eine Schnittstelle verloren, sodass zwei anstatt drei Spaltprodukte entstehen. Werden die Spaltprodukte anschliessend mittels Gelelektrophorese getrennt, sind folgende Fragmente bzw. Banden sichtbar:

- Wildtyp: drei Fragmente (37bp[↑], 67bp, 163bp)
Faktor-V-Mutation: - heterozygot: vier Fragmente (37bp, 67bp, 163bp, 200bp)
- homozygot: zwei Fragmente (67bp, 200bp)

1.3.6 Fragestellung

Ich bin selbst von der Faktor-V-Mutation betroffen. Die Mutation wurde, wie externe genetische Untersuchungen zeigen, von meiner Mutter an meine Schwester und mich vererbt; mein Vater ist nicht betroffen. Nun stellt sich die Frage, ob in meiner Verwandtschaft - vor allem mütterlicherseits - noch weitere Mutationen vorliegen. Mein Ziel ist es, herauszufinden, ob es mit den an der Kantonsschule Wettingen zur Verfügung stehenden Mitteln möglich ist, eine Methode zum Nachweis der Faktor-V-Mutation zu etablieren, die zuverlässige Resultate liefert. In einem weiteren Schritt möchte ich meine Verwandten auf die Faktor-V-Mutation testen und dadurch deren Vererbung in meiner Familie untersuchen. Dies ist auch von wichtiger praktischer Bedeutung: durch die genetische Analyse können meine Verwandten erfahren, ob sie ein erhöhtes Thromboserisiko aufweisen. Dadurch können vorbeugend Massnahmen getroffen werden, um Thrombosen zu verhindern.

2. Material und Methoden

2.1 Rechtliche Aspekte

Bevor die genetische Analyse erfolgen konnte, mussten alle Verwandten damit einverstanden sein, dass ihre DNA gezielt auf die Faktor-V-Mutation untersucht wird und die Resultate anonymisiert in der schriftlichen Arbeit veröffentlicht werden dürfen. Zudem war es mir wichtig, die Verwandten zwecks besserer Meinungsbildung auch über die Analyse und die Faktor-V-Mutation selbst zu informieren.

Ich informierte mich über die rechtlichen Aspekte einer genetischen Untersuchung [13] und erstellte eine Einverständniserklärung (vgl. Anhang). Als Voraussetzung für die Durchführung der genetischen Analyse mussten dieser *alle* zustimmen und sie, aus Gründen des Persönlichkeitsschutzes, in anonymisierter Form meiner Betreuungsperson Herr Th. Werner zustellen.

2.2 Erstellen eines Stammbaums

Um die Resultate übersichtlich darstellen und während der Arbeit den Überblick behalten zu können, erstellte ich mittels dem Programm *yED Graph Editor* einen Stammbaum.

2.3 Probephase

Bevor ich mich an die DNA-Analyse der gesamten Verwandtschaft wagte, führte ich eine Probephase mit nur zwei Proben durch. Während dieser Phase wiederholte und verfeinerte ich die Methoden mehrmals, bis ich das geeignetste Vorgehen gefunden hatte und ein zufriedenstellendes Resultat vorlag.

2.4 DNA-Aufbereitung

Zweck

Bei der DNA-Aufbereitung wird die zu analysierende DNA aus den im Speichel enthaltenen Mundschleimhautzellen extrahiert.

Funktionsweise

Durch das erste Inkubieren (Punkt 9) werden Zellklumpen aufgelöst und die Plasmamembran⁷ weich gemacht. Zudem erfolgt durch die Hitze ein erstes Inaktivieren von Enzymen, sog. DNasen, die DNA verdauen und damit zerstören können. Durch das zweite Inkubieren (Punkt 10), nun bei grösserer Hitze, platzen die Zellen und alle Zellinhaltsstoffe, darunter auch die DNA, und werden freigesetzt. Die InstaGene Matrix besteht aus kleinsten Kügelchen und chelatisiert⁷ Mg^{2+} -Ionen, die von DNasen als Cofaktoren benötigt werden, um überhaupt funktionsfähig zu sein. Bei der Extraktion wird also durch das Inkubieren und die InstaGene Matrix sichergestellt, dass die DNasen unwirksam gemacht werden und die DNA, die später analysiert werden soll, keinen Schaden nimmt. [14]

Material (pro Proband)

3 leere Eppendorfröhrchen

3 Eppendorfröhrchen mit je 500 μl ⁷ TAE-Puffer (Bio-Rad)

a.) Aufbereitung mit InstaGene Matrix

1 Schraubdeckelröhrchen mit 200 μl InstaGene Matrix (Bio-Rad)

1 PCR-Tube

b.) Aufbereitung mit Blood & Tissue Kit

Blood-and-Tissue Kit (Qiagen)

1 PCR Tube

Vorgehen [14]

Der Proband gibt drei mit Speichel halbvoll gefüllte Eppendorfröhrchen ab. Die Speichelentnahme erfolgt in mehreren Schritten:

1. Eine Weile auf den Wangen kauen, um den Speichel mit Zellen anzureichern.
2. Den Speichel in ein Eppendorfröhrchen abgeben.
3. Mit einem Wattestäbchen die Wangeninnenwand gründlich und mit Druck abreiben. Das Wattestäbchen danach in das mit Speichel gefüllte Eppendorfröhrchen tauchen und ausdrücken.
4. Die Schritte 1-3 erfolgen ebenfalls für die zwei weiteren Eppendorfröhrchen.

Die drei Eppendorfröhrchen werden gekühlt ca. 20min stehen gelassen, sodass sich die Zellen am Röhrchengrund ablagern. Die Röhrchen werden folgendermassen „weiterverarbeitet“:



Abb. 11: Pellet aus Mundschleimhautzellen.

5. Vom Röhrchengrund mit abgeschnittener Spitze je 100 µl Speichel abpipettieren. Diesen in je ein mit 500 µl TAE-Puffer gefülltes Eppendorfröhrchen geben.

6. Die Eppendorfröhrchen in der Mikrozentrifuge bei voller Geschwindigkeit 2min zentrifugieren[↗], sodass ein weissliches Zell-Pellet[↗] entsteht, das mindestens streichholzkopfgross sein sollte.

7. Den Überstand vorsichtig dekantieren[↗] und das Pellet durch gründliches Vortexen[↗] resuspendieren[↗]. Zwei der drei Eppendorfröhrchen als Backups[↗] einfrieren.

Mit dem dritten Eppendorfröhrchen erfolgt die eigentliche DNA-Aufbereitung:

a.) Aufbereitung mit InstaGene Matrix [14]

1. Die Zellen mittels einer 20 µl-Pipette in ein mit 200 µl InstaGene Matrix gefülltes Schraubdeckelröhrchen übertragen. Mischen durch vortexen.

2. Das Röhrchen bei 56°C für 10min im Wasserbad inkubieren. Zwischendurch 2-3 Mal vortexen.

3. Das Röhrchen dem Wasserbad entnehmen, vortexen und bei 100°C für 6min im Wasserbad inkubieren.

4. Das Röhrchen dem Wasserbad entnehmen, vortexen und bei mittlerer Geschwindigkeit 5min zentrifugieren, um die InstaGene Matrix als Pellet zu sedimentieren[↗].

5. Vom Überstand, der die DNA enthält, 60 µl abpipettieren und in ein PCR-Tube geben. Dabei darauf achten, dass keine InstaGene Matrix mitpipettiert wird, da diese die PCR hemmen könnte.

b.) Aufbereitung mit Blood & Tissue Kit [45]

1. 180 µl ATL Puffer in das Eppendorfröhrchen geben.

2. 20 µl Proteinase K in das Eppendorfröhrchen geben und anschliessend gut vortexen.

3. 200 µl AL Puffer (Lysis Buffer) in das Eppendorfröhrchen geben und anschliessend 10sec vortexen.

4. Das Eppendorfröhrchen bei 56°C für 10min im Wasserbad inkubieren.

5. 200 µl Ethanol (95-100%) in das Eppendorfröhrchen geben und anschliessend 15sec vortexen.

6. 15sec zentrifugieren.
7. Den Inhalt des Eppendorfröhrchens (ohne den Rückstand am Röhrchengrund) auf die Säule einer DNeasy Mini Spin Column bringen.
8. 1min bei 6000 x g (8000 rpm) zentrifugieren.
9. Die durchzentrifugierte Flüssigkeit verwerfen und die Säule zurück ins leere Tube setzen, 500 µl Waschpuffer AW1 auf die Säule geben.
10. 1min bei 6000 x g (8000 rpm) zentrifugieren.
11. Die durchzentrifugierte Waschflüssigkeit verwerfen und die Säule zurück ins leere Tube setzen. 500 µl Waschpuffer AW2 auf die Säule geben.
12. 1min bei 20000 x g (14000 rpm = max. speed) zentrifugieren.
13. Die Säule auf ein neues, sauberes Eppendorfröhrchen setzen.
14. Eluieren⁷ der DNA durch 100 µl ddH₂O. 1min bei Raumtemperatur inkubieren und danach bei 6000 x g (8000 rpm) 1min zentrifugieren.

2.3 Primer

2.3.1 Verwendete Primer⁷

Ich verwendete die in der Publikation von Bertina RM beschriebenen Primer [12], hergestellt von Microsynth AG, Balgach. Durch sie wird bei der PCR gezielt eine 267bp lange DNA-Sequenz des F5-Gens vervielfältigt.

Name	Sequence	Length	Melt. Point	Scale	Purification
Primer Forward	5'-TGC CCA GTG CTT AAC AAG ACC A-3'	22	57.7°C	genomics	desalted
Primer Reverse	5'-TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA-3'	20	51,3°C	genomics	desalted

2.3.2 Primerverdünnung

Zweck

Das Verdünnen bringt die Primer in die für die PCR geeignete Konzentration. Durch das Aliquotieren⁷ wird ermöglicht, dass nicht immer alle Primer für die PCR aufgetaut und wieder eingefroren werden müssen.

Material

Primer Forward 5'-TGC CCA GTG CTT AAC AAG ACC A-3'

Primer Reverse 5'-TGT TAT CAC ACT GGT GCT AA-3'

ddH₂O

Vorgehen

1. Um eine Lösung mit $c=100\ \mu\text{M}$ herzustellen, gemäss dem mitgelieferten Quality Certificate das entsprechende Volumen ddH₂O zu den Primern hinzufügen.

Primerlösungen, $c=100\ \mu\text{M}$	Volume ddH ₂ O
Primer Forward	331,8 μl
Primer Reverse	542,8 μl

2. Lösen der Primer im Wasserbad bei 60°C für 10min. Zwischendurch vortexen.

3. Um die je 5x200 μl Aliquots pro Primer, $c=10\ \mu\text{M}$, herzustellen, die in 1. hergestellten Lösungen im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnen.

2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zweck

Durch die PCR wird die zu analysierende 267bp DNA-Sequenz des F5-Gens gezielt vervielfältigt, sodass sie in einer genug grossen, analysierbaren Menge vorliegt.

Funktionsweise



Nach der DNA-Extraktion liegt die DNA in geringer Menge vor, die für eine Analyse nicht ausreichend ist. Deshalb wird die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt, bei der die DNA *in vitro* vervielfältigt wird. Die bereits vorliegende DNA dient dabei als Matrize. Dazu wird in einem PCR-Röhrchen die DNA zum Mastermix gegeben, der alle für die Vervielfältigung nötigen Komponenten enthält. Dazu zählen u.a. die Nukleotiden (dNTP), aus denen die neuen Stränge gebaut werden, die Polymerase, die das Kopieren vornimmt und die Primer. Nach dem Mischen werden die Tubes auf den Heizblock des sog. Thermocyclers gestellt. Dies ist ein Gerät, das die Temperaturzyklen gemäss dem zuvor programmierten Protokoll selbstständig durchführt. [15]

Dieses Protokoll beinhaltet:

Abb. 12: Thermocycler.

• **Hot Start:** Um unspezifische Vervielfältigungen zu verhindern, liegt die Taq-Polymerase zunächst inaktiv vor. Erst durch die hohe Temperatur (95°) beim Hot Start erfolgt deren Aktivierung. Somit wird sichergestellt, dass die Taq-Polymerase erst dann mit der Vervielfältigung beginnt.

• **Replikationszyklus⁷**:

1. *Denaturieren*. Trennen der Stränge durch Hitze, sodass diese einzeln vorliegen.
2. *Anlagern der Primer*. Durch sequenzspezifische Primer kann gezielt bestimmt werden, welche Sequenz vervielfältigt werden soll. Hier ist es eine 267bp-lange Sequenz des F5-Gens, auf der die Mutation vorliegen kann.
3. *Elongation*. Zwei Enzyme, die sog. Taq-Polymerasen, arbeiten auf beiden Einzelsträngen, indem sie diese von den Primern aus mit passenden Nukleotiden ergänzen. So wird das gewünschte DNA-Stück kopiert.

Der Replikationszyklus wird mehrere Male (ca. 35-40 Mal) repetiert, dabei wird die durch die vorherigen Zyklen synthetisierte⁷ DNA als Matrize für die folgenden Zyklen verwendet.

Material

HotStarTaq Plus PCR-Kit (Qiagen): PCR Puffer, dNTP (aliquotiert), HotStarTaq Plus DNA Polymerase
Forward- und Reverse-Primer
ddH₂O

Vorgehen [16]

Mastermix (MM)

Reagenz	Volumen pro Tube
PCR Puffer	5 µl
dNTP (je 10mM)	1 µl
Primer F	2.5 µl
Primer R	2.5 µl
ddH ₂ O	23.75 µl
Taq Polymerase	0.25 µl
DNA Template	15 µl
Total V pro Tube	50 µl
MM pro Tube	35 µl

Anmerkung: Nebst den Volumen für die jeweiligen Proben werden zusätzlich die Volumen für eine Negativkontrolle und eine Volumenreserve (1 pro 10 Proben) einberechnet. Die folgenden Arbeitsschritte erfolgen auf der Sterilbank⁷, um Kontaminationen⁷ zu verhindern. Die Umluft wird dazu jedoch während des Pipettierens abgestellt, um eine erhöhte Verdunstung und damit Volumenverringerung der Reagenzien zu vermindern. Bei grosser Probenanzahl kann ein Arbeiten auf Eis nützlich sein.

1. Alle Reagenzien bis und mit ddH₂O in einem Eppendorfröhrchen mischen. Vortexen.
2. Die Taq-Polymerase erst jetzt aus dem Gefrierschrank nehmen und hinzugeben. Die Pipettenspitze dabei nicht ganz in die Enzymlösung eintauchen, sondern von der Oberfläche

wegpipettieren. Dadurch wird vermieden, dass zusätzliche Enzymlösung auf der Pipettenaussenseite mitgenommen und das Volumen dadurch verfälscht wird. Von nun an sollte aufgrund des Enzyms nicht mehr gevortext, sondern nur noch durch durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt werden.

3. Je 35 µl Mastermix in die PCR-Tubes geben.
4. Je 15 µl DNA Template in die PCR-Tubes geben.
5. Durch leichtes Antippen mischen und anschliessend kurz zentrifugieren.
6. Die PCR-Tubes auf den Heizblockstellen und gut festdrücken.
7. Anschliessend folgendes Protokoll ausführen:

Zyklus	Schritt	Anzahl Wiederholungen
1	95°C für 5min	1x
2	95°C für 45s / 54°C für 45s / 72°C für 60s	36x
3	20°C für ∞	1x

2.6 Gelelektrophorese

2.6.1 Gelelektrophorese nach der PCR

Zweck

Bevor die DNA weiterverwendet und verdaut werden kann, muss überprüft werden, ob sie bei allen Proben ausreichend vervielfältigt wurde. Zudem muss die vorliegende DNA-Konzentration in µg/µl für das weitere Vorgehen abgeschätzt werden. Damit nicht zu viel PCR-Produkt bei dieser Gelelektrophorese eingesetzt werden muss, werden feine Kämme⁷ verwendet.

Funktionsweise

Die Gelelektrophorese trennt DNA-Fragmente unterschiedlicher Grösse voneinander. Dabei wird die DNA in die Einbuchtungen des Agarosegels, die sog. Taschen, pipettiert. Nebst der DNA wird auch ein Grössenmarker auf das Gel geladen. Er besteht aus DNA-Fragmenten bekannter Grösse und ist daher ein Massstab, mit dem man die Grösse der DNA bei der Auswertung unter UV-Licht bestimmen kann.

Nach dem Laden des Gels wird elektrische Spannung angelegt und die DNA beginnt aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung Pluspol zu wandern. Das Gel wirkt dabei wie ein Netz, in dem unterschiedlich grosse Fragmente unterschiedlich schnell wandern können. Gleich grosse Fragmente sammeln sich in Banden und werden dadurch voneinander getrennt.

Nach einer bestimmten Zeit wird das Gel aus der Wanne gehoben und auf dem UV-Tisch betrachtet, dabei ist die DNA als leuchtende Bande auf dem Gel zu erkennen.

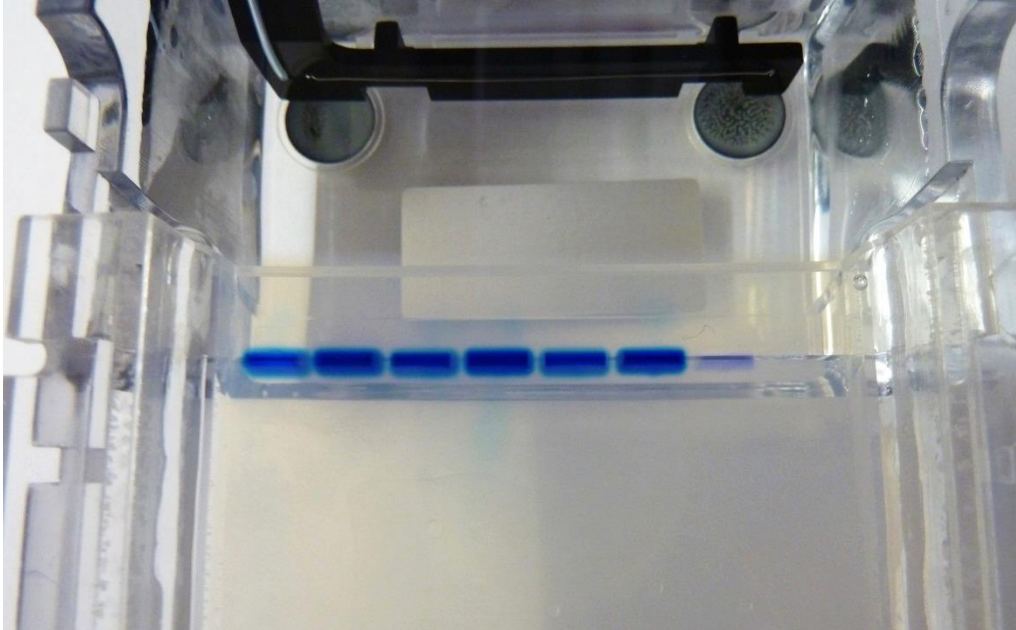


Abb. 13: Geladenes Gel in der Wanne. Die DNA in den Taschen ist durch den Loading Dye blau angefärbt.

Material

amplifizierte DNA (PCR-Produkte)
Agarose (Bio-Rad)
TAE-Puffer (Laufpuffer, Bio-Rad)
Loading Dye 5x (Bio-Rad)
Größenmarker 100bp (NEB)
SYBR® Safe DNA Gel Stain 10'000x (Farbstoff)

Vorgehen [17]

Herstellung 1.5% Agarosegel:

1. Gelkammern, Wanne, Kamm und Blöcke mit Seradest auswaschen.
2. 0.45g Agarose in einem 150 ml Erlenmeyerkolben mit 32 ml TAE Puffer mischen.
3. Lösen der Agarose in der Mikrowelle bei 600W bis das Gel klar ist (ca. 2min). Erlenmeyer dabei mit Kleenex abdecken, immer wieder nach einem kurzen Intervall das Erhitzen unterbrechen und den Erlenmeyer schwenken. Gel anschliessend auf 60°C abkühlen lassen.
4. 3 µl SYBR® Safe DNA Gel Stain zugeben. Gel anschliessend mit Alufolie bedecken und im Kühlschrank 30min erstarren lassen.

Laden des Gels:

5. Blöcke und Kamm entfernen. Kammer mit TAE-Puffer füllen.
6. Pro Probe 1.25 µl Loading Dye (5x) in Tropfen auf Parafilm pipettieren. Je 5 µl pro PCR Produkt in Tropfen pipettieren. Tropfen „zueinander ziehen“. Mischen durch auf- und abpipettieren.
7. Pipettieren dieser 6.25 µl pro Probe in die jeweiligen Taschen.

8. 2 μl Grössenmarker (100bp) in Tasche pipettieren.
9. Gel vor Licht geschützt bei 100V 15min laufen lassen.
10. Dokumentation des Gels unter UV-Licht (254nm). Fotografieren.

2.6.2 Gelelektrophorese nach dem Verdau

Zweck

Durch den Verdau sind verschieden grosse DNA-Spaltprodukte entstanden, die nun durch die Gelelektrophorese nach ihrer Grösse aufgetrennt werden. Aufgrund der entstehenden Banden kann bestimmt werden, ob die Mutation vorliegt.

Material

verdaute DNA
Agarose (Bio-Rad)
TAE-Puffer (Laufpuffer)
Loading Dye (Bio-Rad)
Grössenmarker 100bp (NEB)
SYBR® Safe DNA Gel Stain 10'000x (Farbstoff)

Vorgehen [17]

Herstellung 2% Agarosegel:

1. Gelkammern, Wanne, Kamm und Blöcke mit Seradest auswaschen.
2. 0.6g Agarose in einem 150 ml Erlenmeyerkolben mit 32 ml TAE Puffer mischen.
3. Lösen der Agarose in der Mikrowelle bei 600W bis das Gel klar ist (ca. 2.5min). Erlenmeyer dabei mit Kleenex abdecken, immer wieder nach einem kurzen Intervall das Erhitzen unterbrechen und den Erlenmeyer schwenken. Gel anschliessend auf 60°C abkühlen lassen.
4. 3 μl SYBR® Safe DNA Gel Stain zugeben. Gel anschliessend mit Alufolie bedecken und im Kühlschrank 30min erstarren lassen.

Laden des Gels:

5. Blöcke und Kamm entfernen. Kammer mit TAE-Puffer füllen.
6. Je 20 μl der verdauten DNA mit 5 μl Loading Dye in PCR Tubes mischen.
7. Pipettieren dieser 25 μl pro Probe in die jeweiligen Taschen.
8. 3 μl Grössenmarker (100bp) in Tasche pipettieren.
9. Gel vor Licht geschützt bei 100V laufen lassen.
10. Auswertung des Gels unter UV-Licht (254nm). Mehrmals betrachten (nach 25min/35min), um die Auftrennung der Fragmente zu verfolgen. Fotografieren.

2.6.3 Gelelektrophorese mit ORIGINS von Elchrom™

Zweck

Die DNA-Spaltprodukte werden feiner aufgetrennt, dadurch wird ein eindeutigeres Resultat erzielt.

Funktionsweise

Durch das hohe Auflösungsvermögen von ORIGINS von Elchrom™ ist es möglich, DNA-Fragmente viel feiner aufzutrennen und dadurch die geringen Grössenunterschiede der DNA-Spaltprodukte besser zu sehen.

Im Prinzip funktioniert die Gelelektrophorese mit ORIGINS gleich wie herkömmliche Gelelektrophoresen mit Agarosegel. Der Hauptunterschied ist, dass die Gelelektrophorese in einem geschlossenen Gerät, dem sog. ORIGINIS, durchgeführt wird und viel weniger DNA (2-8 µl) eingesetzt wird. Zudem wird ein anderer Farbstoff (SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain) eingesetzt, durch den diese Methode sehr sensitiv ist.

Material

verdaute DNA

Gel: Spreadex EL 600 Wide Mini S-2x25 (Elchrom)

ORIGINS (Elchrom)

PEEL-IT (Elchrom)

TAE-Puffer (Bio-Rad)

Loading Dye (5x)

Grössenmarker M1

SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain

Vorgehen

1. Vorbereiten des ORIGINS gemäss Manual: Füllen der Kammern mit TAE-Puffer, ORIGINS auf 55°C aufwärmen lassen, das Gel anschliessend auf dem Katamaran platzieren und 30min vorwärmen.
2. Je 5 µl verdaute DNA mit 1.25 µl Loading Dye in einem PCR Tube mischen.
3. 0.2 µl Grössenmarker mit 1 µl Loading Dye und 3.8 µl Seradest mischen.
4. Pipettieren dieser 6.25 µl pro Probe in die jeweiligen Taschen.
5. Grössenmarker in erste und letzte Tasche pipettieren.
6. Gel bei 120V 72min laufen lassen.
7. Gel aus dem ORIGINS herausnehmen und mittels PEEL-IT vom Plastik ablösen.
8. 7 µl SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain zu 50ml TAE-Puffer geben. In dieser Lösung das Gel auf dem Rocker⁷ 40min lang färben.
9. Auswertung des Gels unter UV-Licht (254nm). Fotografieren.

2.7 Reinigung der amplifizierten DNA

Zweck

Durch die Reinigung der amplifizierten DNA werden PCR-Restprodukte wie Primer, Enzyme, Nucleotide entfernt und so ein für das Restriktionsenzym ideales Milieu geschaffen, sodass es beim anschließenden Verdau optimal arbeiten kann. Es ist ratsam diesen Schritt durchzuführen, da die Verunreinigungen den nachfolgenden Verdau beeinträchtigen könnten.

Funktionsweise

Das PCR-Produkt wird in ein Röhrchen pipettiert, das mit einer Siliziummembran ausgekleidet ist. In Anwesenheit von hoher Salzkonzentration und einem pH-Wert ≤ 7.5 bindet die DNA an diese Membran. Dabei bilden positiv geladene Natriumionen (Kationen) eine Brücke zwischen den negativ geladenen Sauerstoffionen (Anionen) der Siliziummembran und dem negativ geladenen Sauerstoffion im Phosphat-Rückgrat der DNA. PCR-Restprodukte hingegen binden nicht an die Membran und können durch Waschen mit Puffern und Zentrifugieren entfernt werden. Das Eluieren der DNA erfolgt anschliessend mittels ddH₂O, somit also bei niedriger Salzkonzentration und einem pH-Wert zwischen 7.0 und 8.5. Durch das ddH₂O fällt die Brückenwirkung weg und die negativen Sauerstoffionen der Membran und diejenigen der DNA stossen sich ab, sodass sich die DNA von der Membran löst. Die DNA liegt schliesslich gereinigt und hochkonzentriert vor. [18]

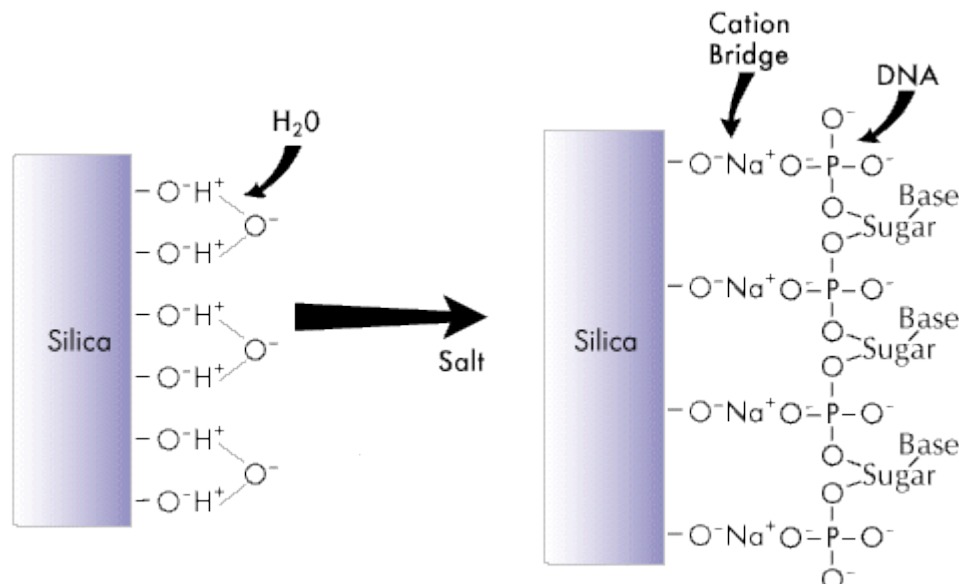


Abb. 14: Adsorption der DNA an der Siliziummembran. Die Natriumkationen verdrängen Wasser von der Siliziummembran und binden selbst an deren Sauerstoffanionen. Die negativ geladene DNA wiederum kann über die Natriumkationen an die Siliziummembran binden.

Material

MinElute PCR Purification Kit (Qiagen)

ddH₂O

Vorgehen [19]

Anmerkung: Die Reinigung erfolgt auf der Sterilbank, um Kontaminationen zu verhindern. Die Umluft wird dazu jedoch während des Pipettierens abgestellt, um eine erhöhte Verdunstung und damit Volumenverringerung der Reagenzien zu verhindern.

1. 450 µl Puffer PBI zu 90 µl amplifizierte DNA (PCR-Produkt) geben und mischen.
2. Eine MinElute Column in ein 2ml Sammelröhrchen stellen.
3. *Binden der DNA:* die Probe auf die Säule geben und für 1min zentrifugieren.
4. Durchfluss verwerfen und die Säule wieder ins Sammelröhrchen stellen.
5. *Waschen:* 750 µl Puffer PE auf die Säule geben und für 1min zentrifugieren.
6. Durchfluss verwerfen und die Säule wieder ins Sammelröhrchen stellen.
7. 1 min zentrifugieren.
8. Die Säule in ein sauberes Eppendorfröhrchen stellen.
9. *Eluieren der DNA:* 10 µl ddH₂O in die Mitte der Membran geben. Säule 1min stehen lassen und anschliessend für 1min zentrifugieren. Säule um 180° in der Zentrifuge drehen und erneut kurz zentrifugieren, um alle DNA ins Eppendorfröhrchen zu bringen.

2.8 Verdau

Zweck

Verdau des gezielt amplifizierten Abschnitts des F5-Gens, um aus den entstehenden Spaltprodukten feststellen zu können, ob die Mutation vorliegt oder nicht.

Funktionsweise

Siehe Einleitung (Die Faktor-V-Mutation, Diagnostik)

Material

gereinigte DNA

Restriktionsenzym MnlI (NEB)

NEB Puffer (NEB)

BSA (NEB)

ddH₂O

Vorgehen

Component	Volumen pro Tube
NEB Puffer	2.5 µl
BSA 10x	2.5 µl
ddH ₂ O	9 µl
Gereinigte DNA	10 µl
MnlI	1 µl
Total V pro Tube	25 µl

Anmerkung: Die folgenden Arbeitsschritte erfolgen auf der Sterilbank, um Kontaminationen zu verhindern. Die Umluft wird dazu jedoch während des Pipettierens abgestellt, um eine erhöhte Verdunstung und damit Volumenverringerung der Reagenzien zu vermeiden.

1. Alle Reagenzien bis und mit der gereinigten DNA in je einem PCR-Tube mischen. Vortexen.
2. Das MnlI erst jetzt aus dem Gefrierschrank nehmen und hinzugeben. Die Pipettenspitze dabei nicht ganz in die Enzymlösung eintauchen, sondern von der Oberfläche wegpipettieren. Von nun an sollte aufgrund des Enzyms nicht mehr gevortext, sondern nur noch durch mehrmaliges auf- und abpipettieren gemischt werden.
3. Durch leichtes Antippen mischen und anschliessend kurz zentrifugieren.
4. Die PCR-Tubes auf den Heizblock stellen und gut festdrücken.
5. Die Proben im PCR-Cycler bei 37°C 2h lang verdauen.

2.9 Externe Sequenzierung

Um die Qualität meiner Arbeit zu überprüfen, liess ich 1.5 µl DNA (60ng) von zwei positiven (9, 18) und zwei negativen (5, 13) Proben durch Microsynth sequenzieren⁷. Die DNA-Konzentration wurde dazu durch Frau Dr. Iris Spörri-Werner (Unispital Basel) gemessen.

Die Sequenzierungsergebnisse verwendete ich in verschiedenster Weise weiter:

- Um zu überprüfen, ob das von mir vervielfältigte 267bp-Fragment tatsächlich Teil des F5-Gens ist, verwendete ich BLAST. [20] In dieses Programm können die Sequenzen im Fasta-Format, das die Basenabfolge im Ein-Buchstaben-Code (A, C, G, T) darstellt, eingegeben werden. [21] Daraufhin wird die Gendatenbank nach übereinstimmenden Sequenzen abgesucht.
- Um die Sequenzen der vier Proben miteinander vergleichen zu können, habe ich sie mittels ClustalW2 aligniert⁷. Dabei werden die Sequenzen der vier Proben so übereinander angeordnet, dass sie verglichen werden können. [22]
- Um die Sequenzierungsergebnisse zu visualisieren, habe ich Chromas verwendet. [23] Bei der Sequenzierung werden die ddNTPs⁷ mit Fluorophoren⁷ verknüpft. Im Fluoreszenzdetektor⁷ führt jede Base zu einem Peak⁷. Diese Peaks und somit die Sequenz werden auf einem Peakdiagramm dargestellt, wobei für jede Base eine andere Farbe verwendet wird: grün für Adenin, blau für Cytosin, schwarz für Guanin und rot für Thymin.

3. Resultate

3.1 Stammbaum

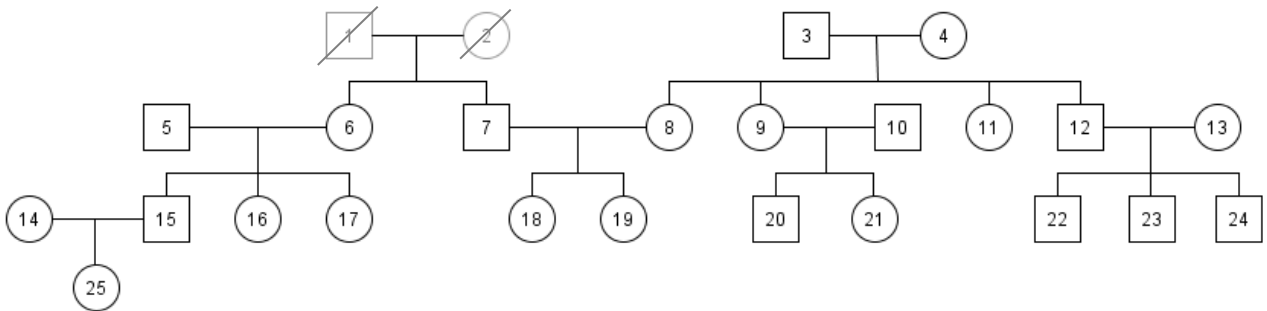
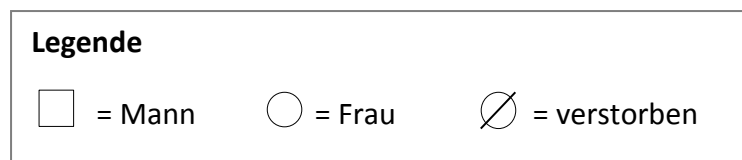


Abb. 15 : Stammbaum meiner Verwandtschaft.



Obenstehend der Stammbaum meiner Verwandtschaft. Der linke Ast zeigt die Verwandten väterlicherseits und der rechte diejenigen mütterlicherseits.

3.2 Einverständniserklärung

Die Einverständniserklärung wurde von allen Verwandten unterzeichnet, sodass die genetische Analyse stattfinden konnte. Sie diente nicht nur der rechtlichen Absicherung, sondern auch der Information der Verwandten.

3.3 Probephase

Die wichtigsten Erkenntnisse, die ich während der Probephase sammelte, sind in der Tabelle auf der folgenden Seite ersichtlich.

Extraktion	Datum	Methoden
	06.06.2013	Mit InstaGeneMatrix
	22.08.2013	Mit Blood-and-Tissue Kit

PCR	Datum	DNA	MgCl/Q-Solution	Bemerkungen
	06.06.2013	5µl, verdünnt (1:3)	Zugabe von MgCl	
	24.06.2013	1,25µl, 5µl, 20µl, verdünnt (1:3)	kein MgCl, 10µl Q-Solution	
	27.06.2013	5µl, 20µl, verdünnt (1:3)	kein MgCl, keine Q-Solution	mit neuem Kit
	15.07.2013	1,25µl, 5µl, 20µl, verdünnt (1:3)	kein MgCl, keine Q-Solution	mit Ready-To-Go Beads
	17.07.2013	10µl, 15µl, unverdünnt	kein MgCl, keine Q-Solution	ohne Ready-To-Go Beads
	19.07.2013	15µl, unverdünnt	kein MgCl, keine Q-Solution	ohne Ready-To-Go Beads
	22.08.2013	15µl, unverdünnt, gereinigt mit Kit	kein MgCl, keine Q-Solution	ohne Ready-To-Go Beads

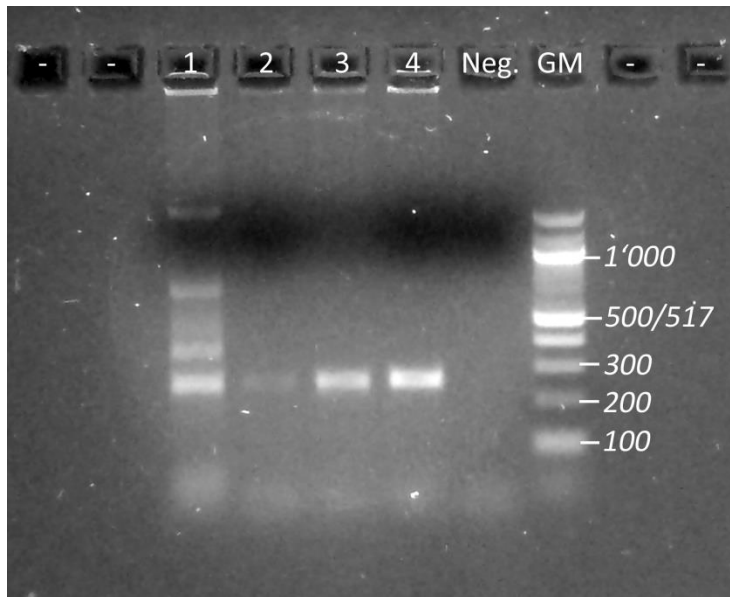
1. Gelelektrophorese	Datum	Gel	Geladenes	Arbeitsweise
	13.06.2013	1,5% Agarosegel	15µl PCR-Produkt + 3.75 LD	35min bei 120V, grosser Kamm
	20.06.2013	1,5% Agarosegel	15µl PCR-Produkt + 3.75 LD	15min bei 100V, grosser Kamm
	15.07.2013	1,5% Agarosegel	5µl PCR-Produkt + 1,25µl LD	15min bei 100V, feiner Kamm

Reinigung	Datum	PCR-Produkt
	02.07.2013	60µl
	22.07.2013	90µl

Verdau	Datum	Gesamtvolumen	ger. DNA	MnII	Verdauzeit, Temperatur
	02.07.2013	30µl	9µl	0.5µl	30min bei 37°C
	22.07.2013	40µl	10µl	1µl	1h und 4h bei 37°C
	16.08.2013	25µl	10µl	1µl	2h bei 37°C

2. Gelelektrophorese	Datum	Gel	Geladenes	Arbeitsweise
	22.07.2013	2% Agarosegel	13µl bzw. 23µl verd. DNA + 3.25µl bzw. 5.75µl LD	15min/22min/30min bei 100V
	16.08.2013	2% Agarosegel	20µl verd. DNA + 5µl LD	24min/32min/40min bei 100V
	23.08.2013	2% Agarosegel	20µl verd. DNA + 5µl LD	25min/35min/40min bei 100V

Tabelle 1: Die obige Tabelle zeigt alle Parameteränderungen, die während der Probephase vorgenommen wurden. Rot umrahmt diejenigen Methoden, die zuverlässige Resultate lieferten und daher dann bei der eigentlichen Analysephase mit der DNA aller Verwandten verwendet wurden.



Proben

- | | |
|------|--|
| 1 | PCR mit Ready-To-Go Beads:
20 µl DNA, verdünnt |
| 2 | HotStar Taq Polymerase PCR:
20 µl DNA, verdünnt |
| 3 | HotStar Taq Polymerase PCR:
10 µl DNA, un verdünnt |
| 4 | HotStar Taq Polymerase PCR:
15 µl DNA, un verdünnt |
| Neg. | Negativprobe |
| GM | 3 µl Grössenmarker |

Abb. 16: 1.5% Agarosegel mit amplifizierter DNA unterschiedlicher PCR-Methoden.

Dieses Gel zeigt die durch die verschiedenen PCR-Methoden resultierende, unterschiedlich grosse DNA-Menge und -Qualität. Die PCR mit Ready-To-Go Beads (1) zeigt nebst der 267bp-Bande weitere Banden. Wird die DNA verdünnt (2), so führt dies einer schwachen Bande, während die PCR mit unverdünnter DNA (3, 4) starke Banden zeigt und somit erfolgreich ausfällt.

3.4 DNA-Aufbereitung

Bei den meisten Proben erhielt ich grosse Pellets, bei den Proben 11, 22, 24 und 25 war jedoch wenig Zellmaterial vorhanden, sodass die drei Pellets zusammen pipettiert werden mussten. Daher konnten von diesen Proben keine Backups eingefroren werden.

3.5 Gelelektrophorese nach PCR

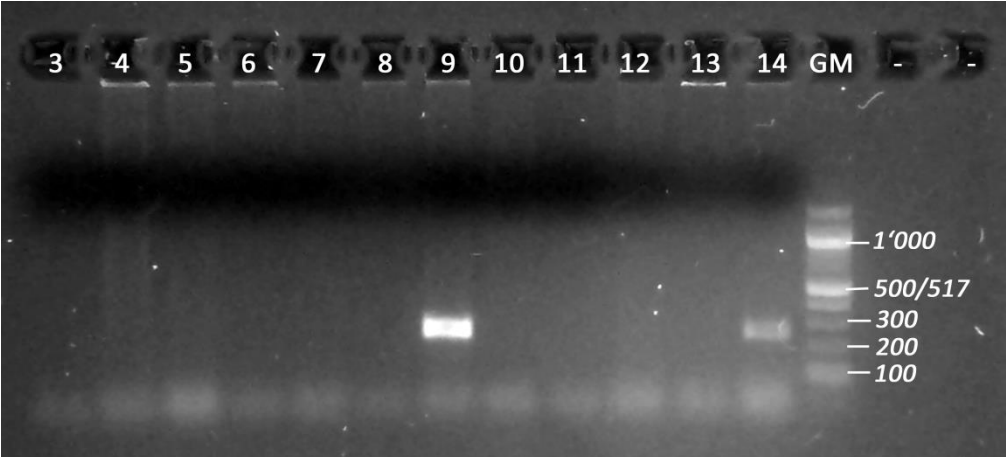


Abb. 17: 1.5% Agarosegel 1, amplifizierte DNA (5 µl, Proben 3-14).

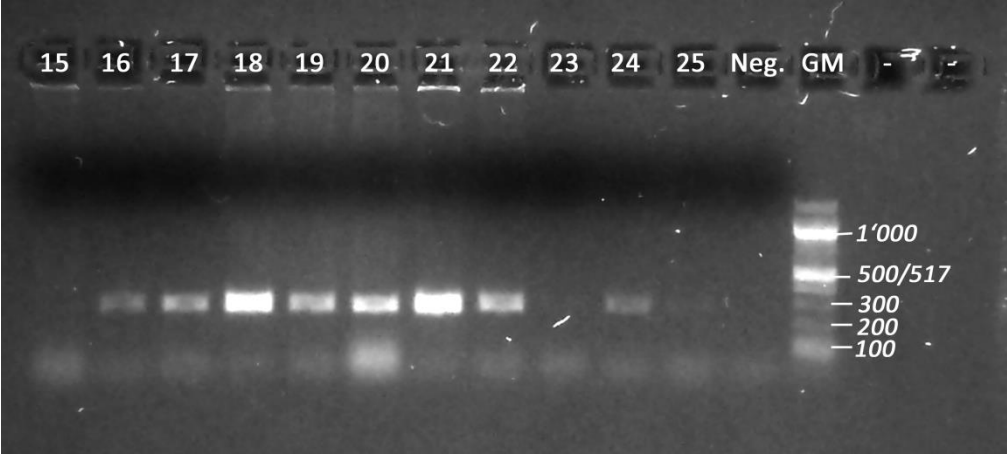


Abb. 18: 1.5% Agarosegel 2, amplifizierte DNA (5 µl, Proben 15-25).

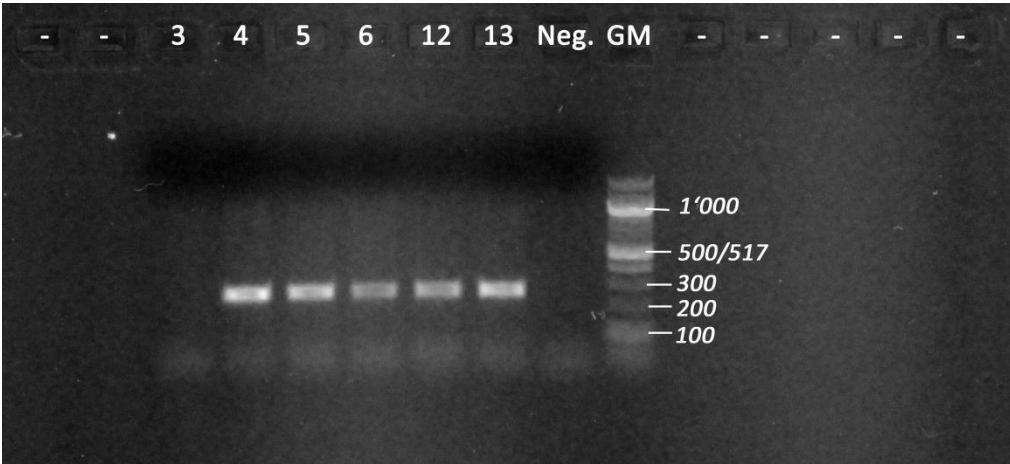


Abb. 19: 1.5% Agarosegel 3, amplifizierte DNA (5 µl, wiederholte Proben, mit sensitiverer Extraktionsmethode).

Gel 1 und 2 (s. Abb. 17/18) zeigen die Resultate der PCR mit der DNA aller Verwandten. Für das weitere Verfahren (Reinigung, Verdau, Gelelektrophorese) war es wichtig, dass die PCR bei allen Proben erfolgreich ausfiel und die DNA somit in genügend grosser Menge vorlag. Nur dadurch sind die Banden bei der abschliessenden Gelelektrophorese genügend stark und somit auswertbar.

Dies war nicht bei allen Proben der Fall: die Proben 3-8, 10-13, 15, 23 zeigen keine Banden. Die restlichen Proben zeigen alle Banden auf der erwarteten Höhe (267bp⁷) knapp unter der 300bp-Markierung und sind von unterschiedlicher Stärke. Hier wurde das 267bp-Fragment des F5-Gens somit amplifiziert.

Nebst den Banden knapp unter der 300bp-Markierung sind weitere unter der 100bp-Markierung zu sehen, die aus nicht angelagerten Primern bestehen.

Die Negativkontrolle zeigt keine Bande; Kontaminationen sind somit auszuschliessen.

Gel 3 (s. Abb. 19) zeigt die Resultate der PCR von sechs gezielt ausgewählten Proben, aus deren Zellpellets (Backups) mittels einer sensitiveren Extraktionsmethode aufgereinigte DNA extrahiert wurde. Dieser zweite PCR-Durchlauf zeigt bei den Proben 4, 5, 6, 12, 13 durchwegs starke Banden auf der erwarteten Höhe. Probe 3 zeigt keine Bande. Auch hier sind wieder Banden aus den nichtangelagerten Primern zu sehen.

Die Negativkontrolle zeigt keine Bande; Kontaminationen sind somit auszuschliessen.

3.6 Gelelektrophorese nach Verdau

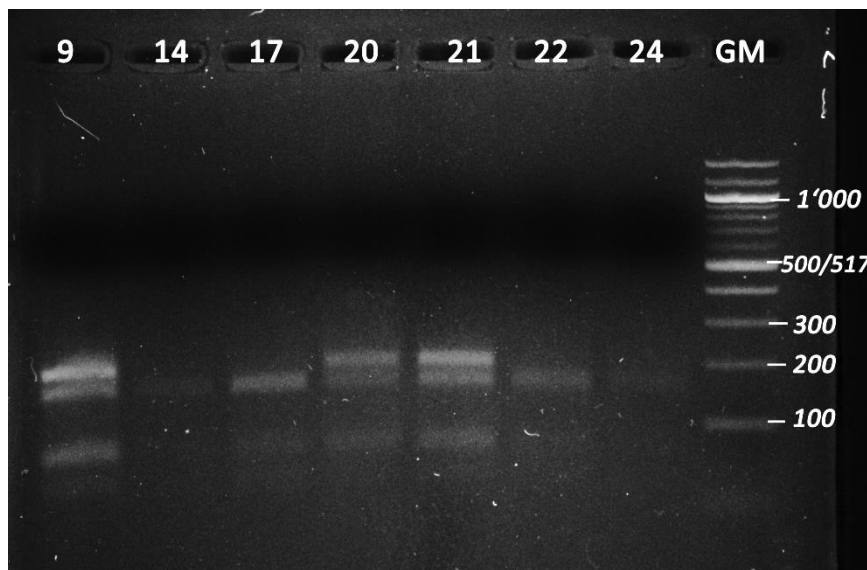


Abb. 20: 2% Agarosegel 1, verdaute DNA (20 µl).

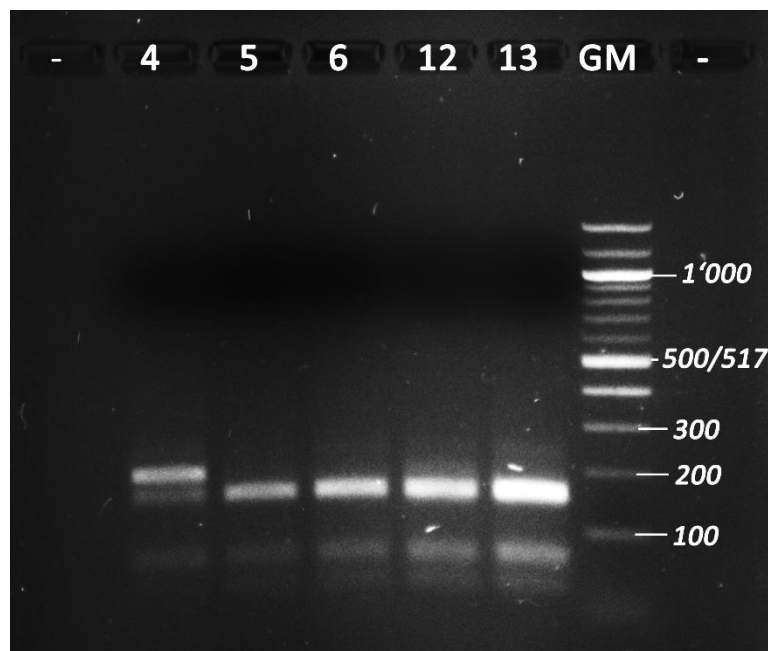


Abb. 21: 2% Agarosegel 2, verdaute DNA (20 µl).

Gel 1 und 2 (s. Abb. 20/21) zeigen die verdaute DNA mehrerer Proben. Jede Probe zeigt mehrere Banden, die aus den beim Verdau entstandenen Spaltprodukten mit unterschiedlicher Länge bestehen. Bei allen Proben, die ein 200bp Fragment aufweisen, liegt die Faktor-V-Mutation vor. Ist das grösste Fragment jedoch 163bp lang, so liegt die Faktor-V-Mutation nicht vor. Aus den Gelen können somit folgende Resultate abgelesen werden:

Probe	Anzahl Fragmente (sichtbar)	Länge in bp	Genotyp
4, 9, 20, 21	4	37, 67, 163, 200	positiv, heterozygot
5, 6, 12, 13, 14, 17, 22, 24	3	37, 67, 163	negativ

3.7 Gelelektrophorese mittels Elchrom

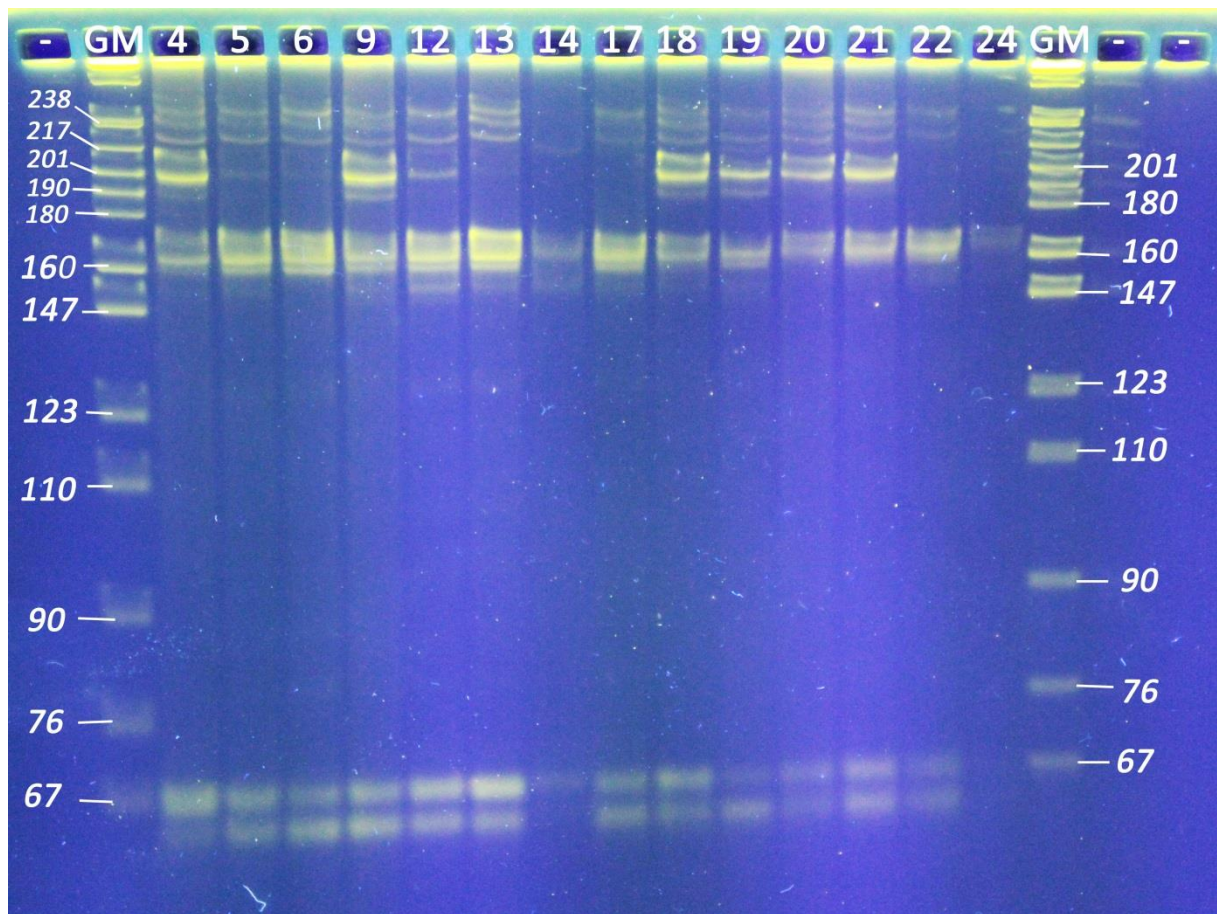


Abb. 22: Elchromgel mit allen verdauten DNA-Proben (5 μ l).

Abb. 22 zeigt das Elchromgel mit allen erfolgreich verdauten DNA-Proben. Zu erkennen ist das 67bp- und das 163bp-Fragment bei allen Proben und das 200bp-Fragment bei den Proben 4, 9, 18, 19, 20, 21. Das 37bp-Fragment ist bei keiner Probe zu sehen. Daraus lässt sich folgendes schliessen:

Probe	Anzahl Fragmente (sichtbar)	Länge in bp	Genotyp
4, 9, 18, 19, 20, 21	3	67, 163, 200	positiv, heterozygot
5, 6, 12, 13, 14, 17, 22, 24	2	67, 163	negativ

Zudem sind auf dem Gel viele weitere, schwache Banden zu erkennen; v.a. direkt unter oder über den oben genannten Fragmenten und im Bereich >217bp.

3.8 Sequenzierung

Die Ergebnisse der Sequenzierung bestätigen meine bei der genetischen Analyse erhaltenen Resultate:

- Mittels BLAST identifizierte ich das von mir vervielfältigte 267-bp Fragment als 100% übereinstimmend mit einer Sequenz des F5-Gen.

Download ▾ GenBank Graphics ▾ Next ▲ Previous ▲ Descriptions

Homo sapiens chromosome 1, alternate assembly CHM1_1.1
Sequence ID: [ref|NC_018912.2|](#) Length: 250522664 Number of Matches: 1

Range 1: 170940918 to 170941117 GenBank Graphics ▾ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
370 bits(200)	5e-100	200/200(100%)	0/200(0%)	Plus/Minus

Features: [coagulation factor V precursor](#)

Query	Score	Subject	Score
1	60	170941058	60
61	120	170940998	120
121	180	170940938	180
181	200	170940937	200

Related Information
[PubChem BioAssay - bioactivity screening](#)

Abb. 23: Screenshot aus BLAST.

- Untenstehend ein Ausschnitt der mit CLUSTAL alignierten Sequenzen. Die Nukleotiden der vier Proben werden miteinander verglichen; stimmen sie überein, so wird dies mit einem * dargestellt. An der blau umrahmten Stelle fehlt der * jedoch, das heisst, dass der Nukleotid der Proben 9 und 18 an dieser Stelle nicht mit demjenigen der Proben 3 und 15 übereinstimmt. Das R indiziert, dass der Unterschied aber nur auf einer Genkopie besteht, die Veränderung also heterozygot vorliegt.

```

2_9_Forward      AGACATCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAG 60
4_18_Forward     AGACATCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAG 60
3_13_Forward     -GACATCGCCTCTGGGCTAATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAG 59
1_5_Forward      -----ATAGGACTACTTCTAATCTGTAAGAGCAGATCCCTGGACAG 41
                  *****

2_9_Forward      GCRAGGAATACAGGTATTTGTCCCTTGAAGTAACCTTTTCAGAAATCTGAGAATTTCTTC 120
4_18_Forward     GCRAGGAATACAGGTATTTGTCCCTTGAAGTAACCTTTTCAGAAATCTGAGAATTTCTTC 120
3_13_Forward     GCGAGGAATACAGGTATTTGTCCCTTGAAGTAACCTTTTCAGAAATCTGAGAATTTCTTC 119
1_5_Forward      GCGAGGAATACAGGTATTTGTCCCTTGAAGTAACCTTTTCAGAAATCTGAGAATTTCTTC 101
                  **R*****

2_9_Forward      TGGCTAGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGT 180
4_18_Forward     TGGCTAGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGT 180
3_13_Forward     TGGCTAGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGT 179
1_5_Forward      TGGCTAGAACATGTTAGGTCTCCTGGCTAAATAATGGGGCATTTCCTTCAAGAGAACAGT 161
                  *****

```


- Untenstehend ein Ausschnitt aus dem Peakdiagramm von Probe 9. An der Stelle 63 sind ein grüner und ein schwarzer Peak zu sehen (s. blauer Pfeil); das heisst, dass auf der einen Genkopie an dieser Stelle ein Adenin und auf der anderen ein Guanin vorliegt. Liegt ein Adenin vor, so ergibt dies das Basentriplett CAA, das für Arginin codiert. Liegt jedoch ein Guanin vor, so ergibt dies das Basentriplett CGA, das für Glutamin codiert.

Liest man die drei nach dem R folgenden Basen in 3' zu 5' Richtung, so ergibt sich das Basenquartett 3'-GGAG-5'. Genau dies ist eine der Spaltstellen, die das Restriktionsenzym MnlI erkennt. Liegt aber eine Substitution von Guanin zu Adenin und somit die Faktor-V-Mutation vor, so ergibt sich das Basenquartett 3'-AGAG-5', das MnlI nicht erkennen und daher die DNA an dieser Stelle nicht spalten kann. Dies ist im Gel der Gelelektrophorese nach dem Verdau zu sehen.

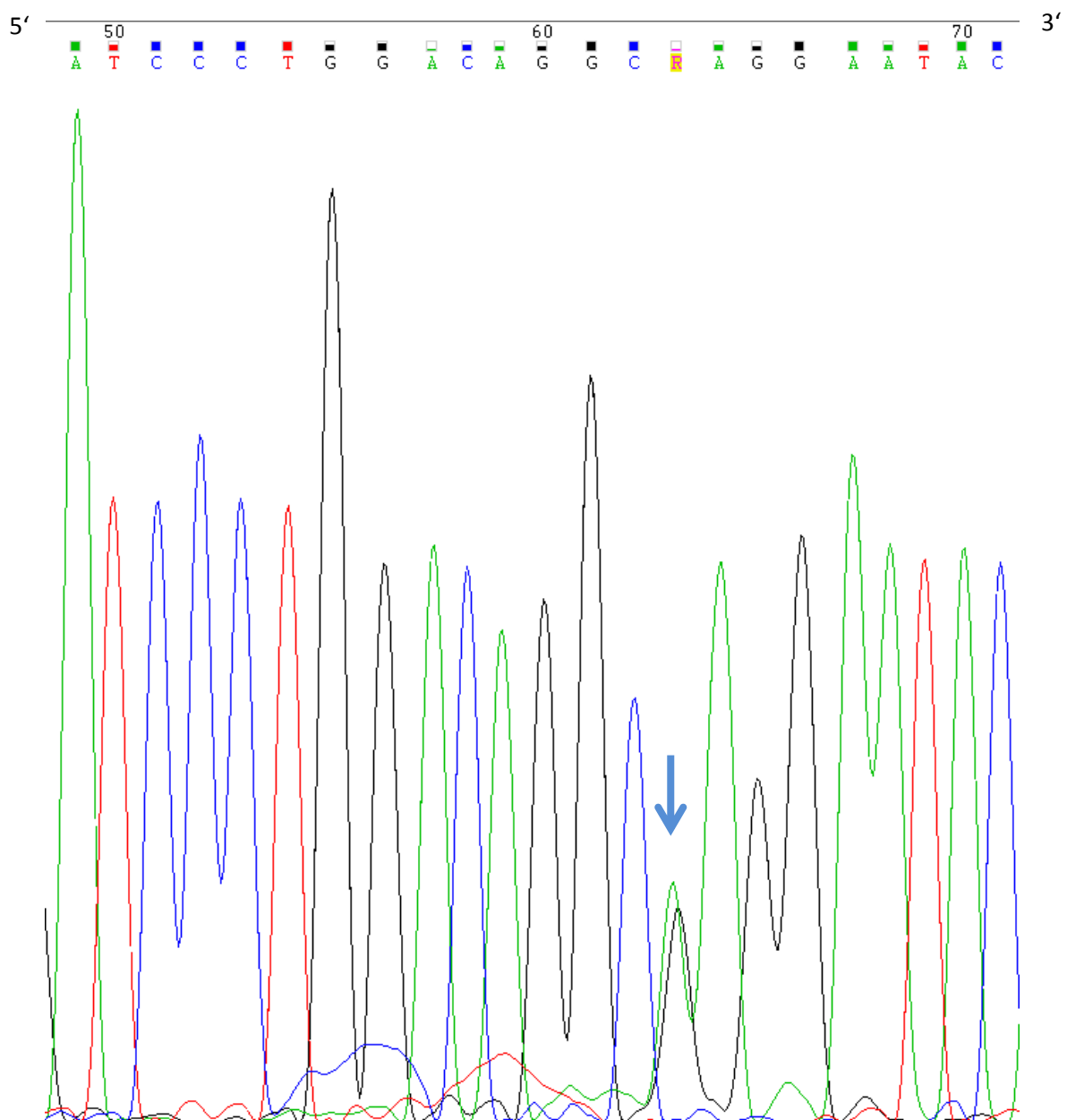


Abb. 24: Ausschnitt aus dem Peakdiagramm von Probe 9. Die Basen werden in unterschiedlichen Farben dargestellt: Adenin = grün, Thymin = rot, Guanin = schwarz, Cytosin = blau

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, mittels genetischer Analyse meine Verwandten auf die Faktor-V-Mutation zu testen und damit deren Vererbung in meiner Familie zu untersuchen.

Die grösste Schwierigkeit während der genetischen Analyse war, auf den Gelen starke, gut sichtbare Banden zu erhalten. Daher war es bei allen Schritten wichtig, möglichst viel DNA zu gewinnen (Aufbereitung), zu amplifizieren (PCR), zu reinigen oder zu verdauen.

Durch die Probephase wurde schliesslich eine an der Kantonsschule Wettingen durchführbare Methode gefunden, die, wie das Überprüfen durch Sequenzieren zeigt, zuverlässige Ergebnisse liefert. Die wichtigsten Erkenntnisse, die während der Probephase gesammelt wurden (Tab. 1, S. 30) und zu Änderungen in der Methodik führten, werden nachfolgend erläutert und diskutiert. Ein weiterer Teil der Diskussion bildet der Stammbaum mit den Resultaten der genetischen Analyse.

4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Mit dem Ändern verschiedener PCR-Parameter wurde versucht, die Menge an amplifizierter DNA zu erhöhen. Weder durch die Zugabe von $MgCl_2$ (Mg^{2+} unterstützt als Cofaktor die Taq-Polymerase in ihrer Funktion), noch durch diejenige von Q-Solution (verändert das Schmelzverhalten der DNA), konnte die gewünschte DNA-Menge erreicht werden. Deshalb wurde beim weiteren Vorgehen auf die Zugabe dieser Reagenzien verzichtet.

Um eventuelle Fehlerquellen durch das eigene Mischen des Mastermixs auszuschliessen, wurde ein Versuch mit Ready-To-Go Beads gestartet. Diese enthalten alle für die PCR nötigen Komponenten in getrockneter Form; nur noch die DNA und ddH_2O müssen zugegeben werden. Doch auch diese Methode zeigte nicht den gewünschten Erfolg. Im Gegenteil: auf dem Gel (Abb. 16, Tasche 1) waren Schmierer zu sehen, die auf unspezifische Vervielfältigungen hindeuten. Deshalb kam ich wieder von dieser Methode ab.

Als nächste Parameteränderung wurde höher konzentrierte DNA verwendet, da mehr Template zu mehr amplifizierter DNA führen sollte. Dazu wurde die DNA nach der Extraktion nicht noch im Verhältnis 1:3 mit ddH_2O verdünnt. Dieser Schritt war zwar heikel, da zu viel Template die Effizienz der PCR verringern kann, doch es zeigte sich im Vorversuch bei Probe 19 der gewünschte Erfolg (Abb. 16, Taschen 3 und 4). Als die PCR dann jedoch mit allen Proben durchgeführt wurde, waren nicht bei allen starke Banden zu sehen (Abb. 17, 18). Dass es bei einigen Proben sehr gut und bei anderen überhaupt nicht funktioniert hat, lässt darauf schliessen, dass die Qualität der DNA eine entscheidende Rolle spielt. Die von mir verwendete PCR-Methode ist demnach sehr sensibel, sodass für ein einwandfreies Funktionieren reine und qualitativ hochwertige DNA verwendet werden muss.

4.2 DNA-Aufbereitung

Ein möglicher Grund für das unzuverlässige Funktionieren der PCR könnte somit die DNA-Aufbereitung mit InstaGene Matrix sein: durch diese Methode werden wohl Produkte der Zellyse, die für die PCR hinderlich sind, entfernt, die DNA wird dabei jedoch nicht aufgereinigt. Des Weiteren könnten beim Abpipettieren des Überstandes Matrixkügelchen mitgekommen sein, die anschliessend in der PCR als Inhibitoren fungierten (komplexieren das für die Taq-Polymerase nötige Mg^{2+}).

Deshalb entschied ich mich, eine selektivere Extraktionsmethode (Blood & Tissue Kit), durch die man aufgereinigte DNA erhält, anzuwenden und anschliessend erneut eine PCR durchzuführen. Um jedoch die benötigte Menge der teuren PCR-Reagenzien minimieren zu können, wurden dafür nur sechs ganz bestimmte Proben (3, 4, 5, 6, 12, 13) ausgewählt.

Durch die Bestimmung ihrer Genotypen hoffte ich, auch diejenigen ihrer Nachkommen (15, 16, 23, 25) indirekt durch Vererbungslehre, also ohne deren DNA zu analysieren, zu bestimmen.

Die PCR wurde im doppelten Ansatz durchgeführt, um möglichst viel DNA (90 μ l) reinigen zu können.

4.3 Verdau

Das Verdauvolumen wurde sukzessive verringert, um eine höhere DNA-Konzentration und somit stärkere Banden auf dem Gel zu erreichen. Dabei musste aber darauf geachtet werden, dass das in der Enzymlösung enthaltene Glycerol nicht mehr als 5%ig vorlag. Der Verdau erfolgte im PCR-Cycler, da darin die Temperatur konstanter ist als im Wasserbad.

4.4 Gelelektrophorese

Nebst einer Gelelektrophorese mit Agarosegel wurde eine Gelelektrophorese mit ORIGINS von ElchromTM durchgeführt. Auf dem Gel (Abb. 22) sind nebst den bekannten Fragmenten auch weitere Banden zu sehen, die zuvor auf dem Agarosegel nicht sichtbar waren. Dies könnten unspezifisch amplifizierte DNA-Fragmente aus der PCR oder Nebenspaltprodukte sein. Dies ist darauf zurückzuführen, dass durch das hohe Auflösungsvermögen der Gelelektrophorese durch ORIGINS sogar DNA-Fragmente zu sehen sind, die sich um nur 1bp Länge unterscheiden.

Nebenspaltprodukte sind besonders deutlich im Bereich der bekannten Fragmente zu erkennen. Bei der 67bp-Bande beispielsweise ist deutlich eine weitere Bande zu sehen, die aus Fragmenten mit ca. 66bp Länge besteht. MnlI schneidet die DNA 6 bis 7bp neben der Erkennungsstelle (recognition site) mit einer Base Überhang. Nach dem Verdau wurde das Enzym nicht hitzeinaktiviert, sodass es gut möglich ist, dass es exonukleasisch wirkte und diesen Überhang, der instabiler ist als die Doppelhelix, abbaute. [43] Dadurch könnten die um eine Base kürzeren Fragmente entstanden sein.

4.5 Stammbaum

Die durch die genetische Analyse erhaltenen Resultate wurden wie folgt in den Stammbaum eingetragen:

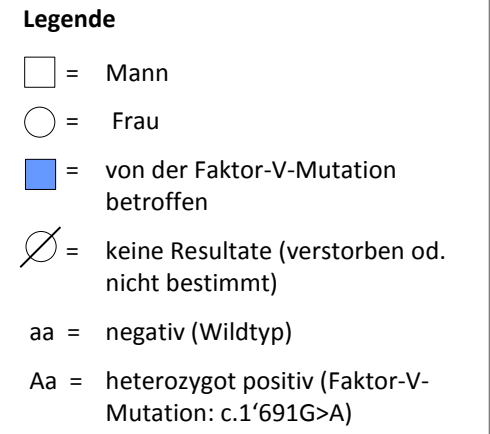
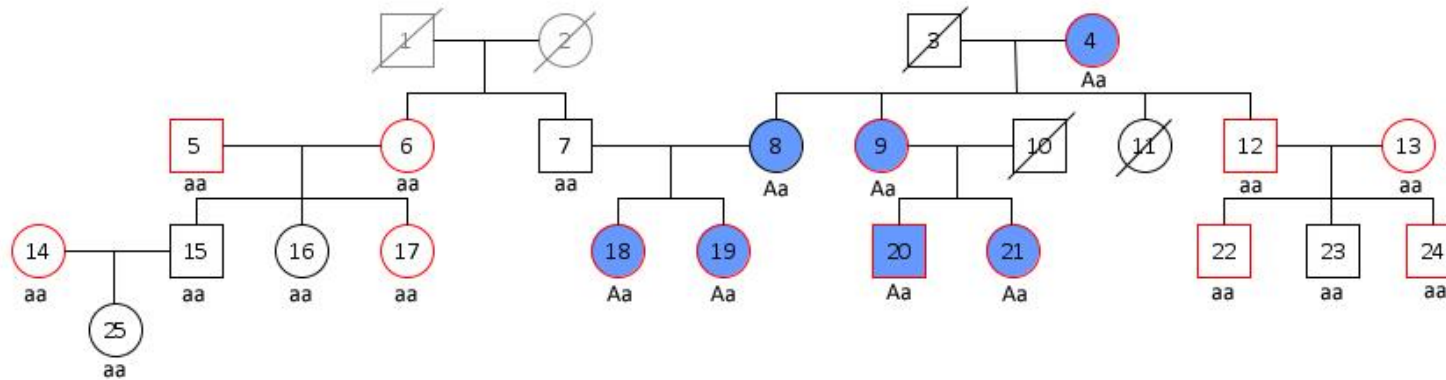


Abb. 25: Die Resultate der Analyse im Stammbaum.

- Folgende Proben konnten von mir analysiert und **direkt durch RFLP bestimmt** werden (rot umrahmt):
4, 5, 6, 9, 12-14, 17, 18 – 22, 24
- Folgende Proben konnten **indirekt durch die Vererbungslehre bestimmt** werden:
15, 16, 23, 25
- Folgende Proben konnten von mir nicht analysiert und bestimmt werden. Es liegen jedoch **Resultate durch früher durchgeführte Untersuchungen** vor:
7, 8
- Von folgenden Proben sind **keine Resultate** vorhanden, weder durch mich noch durch unabhängig durchgeführte Untersuchungen:
3, 10, 11

Es ist wichtig festzuhalten, dass nicht ganz ausgeschlossen werden kann, dass die Probanden, deren Proben indirekt durch die Vererbungslehre bestimmt wurden (15, 16, 23, 25), nicht von der Faktor-V-Mutation betroffen sind. Mutationen aus der Vererbungslehre abzuleiten, ist insofern heikel, da dadurch allfällige Neumutationen nicht berücksichtigt werden.

Ursachen für eine Neumutation können folgende drei Phänomene sein:

- Genetisches Mosaik: Durch ein genetisches Mosaik ist es möglich, dass nicht alle Zellen eines Individuums denselben Genotypen aufweisen. Es kann sein, dass nur die Keimzellen von der Faktor-V-Mutation betroffen sind, somatische Zellen jedoch nicht.
- Keimbahnmutation: Bei einer Keimbahnmutation tritt die Mutation nur in einer einzigen Keimzelle auf.
- Eine in der befruchteten Eizelle selbst entstehende Mutation.

Durch diese Phänomene befindet sich die Mutation in der Keimbahn und kann somit von den Eltern an Nachkommen weitergegeben werden. Alle Zellen des Nachkommens weisen die Mutation auf und diese wird, obwohl sie bereits in den Eltern entstand, erst beim ihm ersichtlich. [26] [27]

Durch die genetische Analyse der DNA der Mundschleimhautzellen werden in der Keimbahn oder befruchteten Eizelle auftretende Mutationen nicht erfasst, sodass es nicht ganz korrekt ist, von dem Genotypen der Eltern (z.B. Proben 5, 6) denjenigen ihrer Nachkommen (z.B. Proben 15, 16) abzuleiten.

Allen Probanden wurde ihr Resultat mitgeteilt. Die betroffenen Probanden 9, 20, 21 liessen die Faktor-V-Mutation durch eine ärztliche Untersuchung bestätigen. Ihnen wurde für Risikosituationen das Antikoagulans Xarelto® verschrieben, zudem musste bei einer Probandin ein Wechsel auf die östrogenfreie Antibabypille Cerazette® vorgenommen werden. Probandin 4 verzichtete auf eine ärztliche Untersuchung, da sie aus anderen Gründen bereits antikoagulatorische Medikamente einnimmt.

Die Probanden 3, 10, 11, deren Proben nicht analysiert werden konnten, verzichteten auf eine weitere, externe Abklärung.

Mein Ziel, die DNA meiner Verwandten auf die Faktor-V-Mutation zu untersuchen, ist erreicht und ich erachte meine Arbeit somit als abgeschlossen.

Reflexion

Die Zeit, während der ich mich mit meiner Maturaarbeit beschäftigte, war spannend und sehr intensiv.

Ich durfte viel Neues lernen, sei es über molekulargenetische Analysen oder über die Faktor-V-Mutation selbst. Den persönlichen Bezug zum Thema schätzte ich sehr, zumal es aufregend war, meine eigene DNA und diejenige der Verwandten zu untersuchen.

Vier bisher nicht bekannte Mutationen zu diagnostizieren und den Verwandten anschliessend die Resultate bekanntgeben zu können, waren für mich die Höhepunkte dieser Arbeit. Ich bin froh, die Betroffenen auf ihr erhöhtes Thromboserisiko aufmerksam gemacht und ihnen dadurch gesundheitlich weitergeholfen zu haben.

Zudem kamen zur Abgabe der Speichelproben seit langer Zeit die in der ganzen Schweiz verteilt wohnenden Verwandten wieder einmal zusammen, was der Maturaarbeit durchaus einen wiedervereinenden Charakter verleiht.

Bei Arbeiten im Bereich der Molekularbiologie muss sehr genau und gewissenhaft vorgegangen werden, zumal kleinste Ungenauigkeiten zum Scheitern der gesamten Analyse führen können. Es gibt weder eine Gelinggarantie noch ein Erfolgsrezept, wonach man sich richten und worauf man hundertprozentig vertrauen könnte. Präzision und Ausdauer sind daher zwei unerlässliche Eigenschaften, die bei mir zwar durch mein Betreiben von Leistungssport bereits vorhanden sind, durch die vielen Schwierigkeiten während der Laborarbeit aber ganz klar gestärkt wurden.

Da mit durchsichtiger Materie gearbeitet wird, kann erst am Schluss der Arbeit festgestellt werden, ob die gewünschten Resultate erzielt wurden und sich damit die vielen, einsamen Arbeitsstunden ausgezahlt haben. Diese Ungewissheit und u.a. ein Gefrierschrankausfall, der das Auftauen aller Reagenzien und Proben bewirkte, liessen mich nervlich sehr angespannt sein, sodass ich sehr froh war, die Laborarbeit abschliessen zu können.

Die Laborarbeit selbst würde ich wohl nicht wiederholen wollen, sodass ich später eher nicht in der Forschung tätig sein möchte. Ich erlebte die Aufenthalte im Labor als sehr einsam, zumal nur selten andere, arbeitende Personen anwesend waren.

Mein Interesse an der Medizin wurde aber vor allem durch die Recherchen über die Blutgerinnung und die Faktor-V-Mutation erneut bestätigt.

5. Glossar

alignieren | Durch das Alignieren (engl. anpassen, ausrichten, in eine Linie bringen) werden mehrere DNA-Sequenzen so angeordnet, dass sie miteinander vergleichbar und Unterschiede erkennbar sind.

aliquotieren | Anteilmässig aufteilen. In der Molekularbiologie heisst dies, dass man einen Ansatz mit grossem Volumen in mehrere Teile mit kleinen Volumen aufteilt und dann so portioniert einfriert. Dadurch werden mehrmaliges Auftauen bzw. Einfrieren und Verunreinigungen verhindert. [30] [31]

Aminosäure | Organische Säure, die neben der Carboxylgruppe (-COOH) eine Aminogruppe (-NH₂) enthält. Aminosäuren sind die Bausteine von Proteinen. [32]

amplifizieren | vervielfältigen

antikoagulatorisch | gerinnungshemmend

autosomal | Allele, die auf den 22 nicht geschlechtsbestimmenden Chromosomen (Autosomen) des Menschen liegen, werden autosomal vererbt. [32] [37]

Backup | engl. Sicherheitskopie. Bedeutung hier ist, dass Zellmaterial jeder Probe für die allfällige Wiederholung der genetischen Analyse zur Sicherheit im Gefrierschrank hinterlegt wird.

bp | Abkürzung für **Basenpaare**. Hier verwendet, um die Länge der DNA-Fragmente anzugeben („Längeneinheit“ in der Molekularbiologie).

chelatisieren | Wird ein Metall chelatisiert, so wird es von einem organischen Molekül „in die Zange genommen“ (griech. chele = Krebszange) und dadurch vereinfacht gesagt an dieses gebunden. [33]

Codon | Ein aus 3 Nucleotiden bestehender m-RNA-Abschnitt (Basentriplett), der für eine Aminosäure codiert. [32]

dekantieren | eine Flüssigkeit vom Bodensatz abgiessen. [30]

ddNTP | **Didesoxinukleosid-Triphosphat**, die bei der Sequenzierung verwendet werden und zum Abbruch der DNA-Synthese führen. [32]

DNA-Polymerase | Enzym, das die DNA-Verdoppelung katalysiert und für die Reparatur des DNA-Strangs verantwortlich ist. [38]

dominant | Bei dominanter Vererbung reicht die Anwesenheit eines Allels aus, um das Merkmal zur Ausprägung zu bringen. [32]

eluieren | einen Stoff von einem adsorbierenden Mittel ablösen, auswaschen, ausspülen. [30]

Enzym | Protein, das als Biokatalysator wirkt und dadurch die chemische Umsetzung bei Stoffwechselprozessen beschleunigt. [32]

Fluoreszenz | Eigenschaft von Stoffen unmittelbar nach der Anregung durch Lichtstrahlen die absorbierte Energie wieder abzugeben und dadurch zu „leuchten“. [34]

Fluorophor | fluoreszierender Stoff (Fluoreszenzträger) [30]

initial | anfänglich, erst, zuerst [30]

in vitro | lat. = im Glas. Im Reagenzglas durchgeführt. Hier bedeutet es, dass die DNA nicht natürlicherweise im Organismus durch Mitose, sondern im PCR-Röhrchen vervielfältigt wird. [30]

Kamm | Nach dem Erstarren des Gels wird der Kamm herausgezogen. Die Aussparungen, die im Gel zurückbleiben, werden als Taschen bezeichnet, in welche dann die DNA hinein pipettiert wird. [35]

Kaskade | Wasserfall. Im Bezug auf die Blutgerinnung meint dies, dass die Aktivierung der Gerinnungsfaktoren vom Tissue Faktor angestoßen wird und dann nacheinander alle Faktoren dominoartig aktiviert werden. [30]

koagulatorisch | gerinnungsfördernd

Kollagenfaser | Kollagenfasern bestehen aus spiralig verschlungenen Aminosäureketten und sind wichtigster Bestandteil des Binde- und Stützgewebes. [34]

Kontamination | Verunreinigung, Verschmutzung [30]

Milieu | Umgebung. Enzyme können nur dann gut arbeiten, wenn ihr Milieu bestimmte Bedingungen wie z.B. Temperatur und pH-Wert erfüllt. Jedes Enzym besitzt ein Temperatur- und pH-Wert Optimum, bei dem es am besten arbeitet. [30] [36]

Mutagene | chemischer oder physikalischer Wirkstoff, der mit der DNA interagieren und dadurch eine Mutation hervorrufen kann. [37]

Peak | engl. Spitze, Höchstwert

Pellet | engl. beim Zentrifugieren entstehender Rückstand

Plasmamembran | Auch Zellmembran genannt. Dünnes, feines Häutchen um jede Zelle, das die Zellen voneinander abgrenzt. [30] Die Zellmembran wirkt zudem als eine selektive Barriere und reguliert dadurch den Stoffaustausch der Zelle. [37]

Polymer | Stoff, dessen Moleküle aus einer Vielzahl kleiner Bausteine (Monomere) bestehen. [34]

polymerisieren | sich zu einem grösseren Molekül (Polymer) vereinigen. [39]

Prävalenz | Rate der an einer bestimmten Krankheit Erkrankten. [30]

Primer | Kurze, einsträngige Nukleotidkette, die komplementär zum Matrizenstrang ist. Indem er an den DNA-Matrizenstrang bindet, dient er der Polymerase als Anknüpfungspunkt und

signalisiert den Startpunkt der Elongation. [32]

Proteinbiosynthese | Herstellung von Proteinen gemäss den Informationen der DNA. Dabei wird die Information zunächst von der DNA abgelesen (Transkription) und dann von der Gensprache (Basen) in die Proteinsprache (Aminosäuren) übersetzt.

Punktmutation | Unter einer Mutation versteht man eine spontane oder durch Mutagene⁷ verursachte Veränderung in der Nukeotidsequenz der DNA und somit des genetischen Materials. Bei einer Punktmutation liegt die Veränderung nur an einer Stelle („Punkt“) durch einen einzigen Basenaustausch vor. [32] [37]

Replikation | Bildung einer exakten Kopie von Genen bzw. Chromosomen durch selbstständige Verdoppelung des genetischen Materials. [30]

resuspendieren | wieder in Lösung bringen.

sedimentieren | sich ablagern, niederschlagen, setzen. [30] Hier ist gemeint, dass durch das Zentrifugieren ein Bodensatz gebildet wird.

Selektionsvorteil | Vorteil bei der (natürlichen) Auslese und Fortentwicklung durch Überleben der jeweils stärkeren Individuen einer Art. [30]

sequenzieren | die Reihenfolge der Basen in der DNA bestimmen. [30]

Sterilbank | Arbeitstisch in einem Gehäuse, das so belüftet wird, dass das

Ausdringen von Mikroorganismen und Aerosolen erschwert ist. Dadurch wird der Arbeitende geschützt und Kontamination des Arbeitsgegenstandes verhindert. [40]

subendotheliale Matrix | unter dem Endothel liegendes Bindegewebe.

synthetisieren | aus einfacheren Stoffen chemisch herstellen. [41]

Thrombocyt | Blutplättchen.

ul | Mikroliter (10^{-6} l)

uM | Mikromolar (Konzentrationsangabe, 10^{-6} mol/l)

Verdau | Wird die DNA von einem Restriktionsenzym sogenannten „verdaut“, so wird sie in Fragmente gespalten.

vortexen | Auf einem sog. Vortexmischer (lat. Vortex = Wirbel) werden Reaktionsansätze durch Vibrieren durchmischt.

zentrifugieren | Beim Zentrifugieren entsteht durch schnelle Rotation eine Fliehkraft, durch die der Stoff mit der grösseren Dichte nach aussen, an den Boden des Reagenzglases, gedrückt wird und dadurch sedimentiert⁷. Die Trennung von Sediment und Überstand erfolgt danach durch dekantieren⁷. [42]

6. Referenzen

Referenzen im Text

- [1] www.labor-duesseldorf.de/20/haemostaselogie.pdf. S.3 (17.10.2013)
- [2] Dörner, Klaus. *Klinische Chemie und Hämatologie: Taschenlehrbuch*. 7. Auflage 2009 ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1989. S. 299, 302, 309-312
- [3] Mailverkehr mit Dr. med. Hannelore Rott (5.8.2013)
- [4] www.boehi.ch/docs/Gerinnungsphysiologie.pdf (9.5.2013)
- [5] www.gzrr.de/assets/files/infomaterial/Die%20Gerinnung/2010_02Faktor%20VArtGerinnungrott.pdf (9.5.2013)
- [6] Dahlbäck, B. *The discovery of activated protein C resistance*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003, 1: 3–9. doi: 10.1046/j.1538-7836.2003.00016.x
Gelesen auf: onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1538-7836.2003.00016.x/full (4.10.2013)
- [7] [www.aerzteblatt.de/archiv/13154/APC-Resistenz-\(Faktor-V-Mutation\)-Klinische-Bedeutung-Pathophysiologie-und-Diagnostik](http://www.aerzteblatt.de/archiv/13154/APC-Resistenz-(Faktor-V-Mutation)-Klinische-Bedeutung-Pathophysiologie-und-Diagnostik) (10.5.2013)
- [8] Vocke, Franziska. *Einfluss hereditärer Thrombophilien auf das Abortrisiko bei Paaren mit rezidivierenden Fehlgeburten*, 2010.
Gelesen auf: http://edoc.ub.uni-muenchen.de/12020/1/Vocke_Franziska.pdf (5.8.2013)
- [9] www.meduniwien.ac.at/frauenheilkunde/SOP/GH/Thromboseprophylaxe_in_der_Schwangerschaft_2.pdf (5.8.2013)
- [10] <http://flexikon.doccheck.com/de/Faktor-V-Mutation> (10.10.2013)
- [11] www.medizinische-genetik.de/index.php?id=7117 (10.10.2013)
- [12] Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, et al. *Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C*. *Nature* 1994; 369: 64-7.
- [13] Bundesgesetz über genetische Untersuchungen beim Menschen: www.admin.ch/opc/de/federal-gazette/2004/5483.pdf (16.5.2013)
- [14] Zehnder, Sylvia. Skript Schwerpunktfach BiC Biologie zur PV92 PCR Allele-Analyse, 2013
- [15] Weber, Ulrich. *Biologie Oberstufe Gesamtband*, 2.Auflage 2010 ed. Berlin: Cornelsen Verlag, 2009. S. 152
- [16] HotStar Taq Plus PCR Handbook, Qiagen. S.15-18
- [17] Werner, Thomas. Skript zu Wolbachia
- [18] www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring99/lauren/page3-silica.gif (10.10.2013)
- [19] Qiagen (Hersteller). *MinElute Purification Kit Protocol*.
- [20] Anwendung Blast: blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
- [21] <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/FASTA/> (14.09.2013)
- [22] Anwendung Clustal: www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/

- [23] Anwendung Chromas: www.microsynth.ch/de/10202/Software-and-Links.html
- [24] Hans D. Bruhn, Viola Hach-Wunderle, Christian M. Schambeck, Rüdiger E. Scharf. *Hämostaseologie für die Praxis*. 2. Auflage 2011. Stuttgart: Schattauer GmbH. S. 11.
- [25] www.gzrr.de/assets/files/infomaterial/Thromboseneigung/thrombophilie_gzrr_s.pdf S.8, 9, 29. (10.10.2013)
- [26] www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5191/#IX-D (24.10.2013)
- [27] Mailverkehr mit Prof. Marc Bühler anlässlich BioValley College Day 2013 (21.10.2013)
- [28] David Williamson, Karen Brown, Roger Luddington, Caroline Baglin and Trevor Baglin, *Factor V Cambridge: A New Mutation (Arg306®Thr) Associated With Resistance to Activated Protein C*, *bloodjournal* 1998 91: 1140-1144
- [29] Neut Kofschoten, Marijin van der. *Structural and functional studies on human coagulation factor V*, Leiden: University Medical Center, 2005.
- [43] <https://www.neb.com/products/r0163-mnli#pd-quality-control> (2.10.2013)
- [44] Langmeier, Monika. Skript Grundlagenfach Biologie zur DNA, 2012.
- [45] Qiagen (Hersteller). *Protokoll zum DNeasy Blood & Tissue Kit*.

Referenzen im Glossar

- [30] Duden Online-Wörterbuch: <http://www.duden.de/woerterbuch> (26./27.10.2013)
- [31] <http://www.chemieonline.de/forum/showthread.php?t=12728> (26.10.2013)
- [32] *Natura 3*, 1. Auflage 2005, Zug: Klett und Balmer AG. S. 450, 452, 453, 462
- [33] Haag, Manon. Skript *Analytik* im Schwerpunktfach BiC. S.48
- [34] Microsoft Encarta Enzyklopädie, Microsoft Corporation, 2007.
- [35] <http://www.elektrophorese.de/Wissen/Agarose-Gelelektrophorese-A3.html> (26.10.2013)
- [36] <http://www.bio-kompakt.de/stoffwechsel/enzyme/abhaengigkeit-der-enzymwirkung> (26.10.2013)
- [37] Reece, Jane B., Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, and Robert B. Jackson. *Campbell Biology*. 9. Auflage 2010 ed. San Francisco: Pearson Education. S. G1 – G37 (Glossar).
- [38] http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/pcr_einfuehrung/einfuehrung.vlu/Page/vsc/de/ch/16/biochem/pcr/p (26.10.2013)
- [39] <http://www.wissen.de/rechtschreibung/polymerisieren?keyword=polymerisieren> (26.10.2013)
- [40] <http://www.envair-deutschland.de/informationen/mikrobiologische-sicherheitswerkbaenke> (26.10.2013)
- [41] <http://www.wissen.de/fremdwort/synthetisieren?keyword=synthetisieren> (26.10.2013)
- [42] <http://www.seilnacht.com/versuche/zentrif.html> (26.10.2013)

Abbildungsverzeichnis

Abb. auf dem Deckblatt: Verschiedene Darstellungen des C2-Bereichs des Enzyms Faktor V.

<http://www.rcsb.org/pdb/explore/jmol.do?structureId=1CZT&opt=3&bionumber=1>

Abb. 1: Reece, Jane B., Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, and Robert B. Jackson. *Campbell Biology*. 9. Auflage 2010 ed. San Francisco: Pearson Education. S. 355.

Abb. 2: www.uni-heidelberg.de/md/presse/ruca/2011-3/p29.jpg (5.08.2013)

Abb. 3-7: Dörner, Klaus. *Klinische Chemie und Hämatologie: Taschenlehrbuch*. 7. Auflage 2009. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. S. 302/310/311/312. Bearbeitet mit Photoshop Elements 11.

Abb. 8: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/112/1/19.abstract> (4.10.2013)

Abb. 9: Reece, Jane B., Lisa A. Urry, Michael L. Cain, Steven A. Wasserman, Peter V. Minorsky, and Robert B. Jackson. *Campbell Biology*. 9. Auflage 2010 ed. San Francisco: Pearson Education. S. 375. Bearbeitet mit Photoshop Elements 11 (Nucleotidsequenz für F5-Gen angepasst)

Abb. 10: Eigene Produktion (19.9.2013). Dazu verwendete Gelausschnitte (modellhaft!) von Schubert, Mario, 18.05.2006, Heidelberg.

Abb. 11: Eigenes Foto

Abb. 12: Eigenes Foto

Abb. 13: Eigenes Foto

Abb. 14: www.bio.davidson.edu/courses/Molbio/MolStudents/spring99/lauren/page3-silica.gif (10.10.2013)

Abb. 15: Eigene Produktion mittels yED Graphic Editor

Abb. 16: Eigenes Foto, bearbeitet mit Photoshop Elements 11 (SW, Tonwertkorrektur)

Abb. 17: Eigenes Foto, bearbeitet mit Photoshop Elements 11 (SW, Tonwertkorrektur)

Abb. 18: Eigenes Foto, bearbeitet mit Photoshop Elements 11 (SW, Tonwertkorrektur)

Abb. 19: Eigenes Foto, bearbeitet mit Photoshop Elements 11 (SW, Tonwertkorrektur)

Abb. 20: Eigenes Foto, bearbeitet mit Photoshop Elements 11 (Tonwertkorrektur)

Abb. 21: Eigenes Foto, bearbeitet mit Photoshop Elements 11 (Tonwertkorrektur)

Abb. 22: Eigenes Foto, bearbeitet mit Photoshop Elements 11 (Tonwertkorrektur)

Abb. 23: Ausschnitt aus BLAST

Abb. 24: Ausschnitt aus Chromas

Abb. 25: Eigene Produktion mittels yED Graphic Editor

7. Anhang

7.1 Einverständniserklärung

Rebekka Leistner
Kalchweg 1
5210 Windisch

Maturaarbeit 2013

Windisch, im Mai 2013

Liebe Verwandte

Im Rahmen meiner Maturaarbeit möchte ich den Erbgang der Faktor-V-Leiden-Mutation in unserer Verwandtschaft mittels einer Genanalyse untersuchen. Bevor die geplante Analyse jedoch erfolgt, möchte ich euch aus rechtlichen Gründen, um euer Einverständnis bitten, dass eure DNA im Rahmen meiner Maturaarbeit gezielt auf die Genmutation, die Ursache dieser Krankheit ist, untersucht wird. Eure DNA-Probe wird nur zu diesem Zweck verwendet werden. Zur besseren Meinungsbildung habe ich untenstehend einige Grundlagen der Blutgerinnung, der Faktor-V-Leiden-Mutation und der Genanalyse erläutert.

Die Blutgerinnung | Die Blutgerinnung ist lebensnotwendig. Bei einer Verletzung muss die Wunde sofort geschlossen werden, um den Blutverlust möglichst gering zu halten. Die "Erste Hilfe" wird von Blutplättchen übernommen, die sich an der verletzten Stelle ansammeln und miteinander verkleben. Dieser erste Verschluss muss dann aber in einem zweiten Schritt noch stabilisiert werden, sodass ein erneutes Aufreißen der Wunde verhindert und der Heilungsprozess somit ungehindert ablaufen kann. Daher läuft in einem zweiten Schritt eine Kettenreaktion von mehreren Proteinen - sog. Gerinnungsfaktoren - ab, die in der Produktion eines stabilisierenden, unlöslichen Stoffes - dem sog. Fibrin gipfelt. Dieses Fibrin bildet zusammen mit den Blutplättchen ein engmaschiges Netz; der so entstandene Blutpfropf stoppt die Blutung. Danach werden die Gerinnungsfaktoren durch andere Proteine wieder deaktiviert, die Kettenreaktion also unterbrochen und die Gerinnung wird gestoppt.

Die eine Aufgabe des Körpers ist also die Blutgerinnung, die andere jedoch auch die ständige Antikoagulation und damit die Gewährleistung einer kontinuierlichen Blutströmung. Die gerinnungsfördernden und -hemmenden Faktoren stehen somit stets in einem Gleichgewicht.

Die Faktor-V-Leiden-Mutation | Die Faktor-V-Mutation ist eine genetisch bedingte, vererbliche Blutgerinnungsstörung, die ein erhöhtes Thromboserisiko bei den betroffenen Personen zur Folge hat. Die Ursache ist eine Mutation im Gen für den Gerinnungsfaktor V, die sich darin äussert, dass dieser Faktor nicht wie üblich inaktiviert werden kann, sondern seine aktive Form und somit seine gerinnungsfördernde Wirkung behält. So verschiebt sich das bereits erwähnte Gleichgewicht auf die Seite der Gerinnungsförderung, was ein erhöhtes Thromboserisiko zur Folge hat.

Das Analyseverfahren | Wie bereits erwähnt, liegt der Krankheit eine Genmutation zu Grunde. Der Nachweis erfolgt also mittels Genanalyse. Dabei werden dem Probanden Mundschleimhautzellen mit einem

Wattestäbchen entnommen und die darin enthaltene DNA anschliessend in einem komplexen Verfahren analysiert.

Resultate und Erkenntnisse | Durch die Genanalyse ist es mir möglich festzustellen, ob eine Mutation des Gens vorliegt und somit ob eine Person von der Faktor-V-Leiden-Mutation betroffen ist. An dieser Stelle möchte ich auch darauf hinweisen, dass mit der Genanalyse Aussagen über die verwandtschaftliche Nähe der Probanden gemacht werden kann. Für die bei der Analyse erhaltenen Resultate übernehme ich keine Haftung. Die erhaltenen Resultate werden stets vertraulich behandelt und in Form eines anonymen Stammbaums in der schriftlichen Dokumentation in meiner Maturarbeit veröffentlicht werden.

Eure Zusage würde mich sehr freuen. Für Fragen stehe ich gerne zur Verfügung.

Liebe Grüsse
Rebekka Leistner



Einverständniserklärung zur DNA-Untersuchung

Den vorhergehenden Text habe ich gelesen und zur Kenntnis genommen und stimme der Durchführung der DNA-Untersuchung zu:

Ja

Nein

Ort, Datum: _____

Unterschrift der zu untersuchenden Person (oder des gesetzlichen Vertreters): _____

Anm.: Gemäss BG 5 III kann diese Zustimmung jederzeit widerrufen werden.

Das unterzeichnete Formular ist möglichst schnell, spätestens aber bis XXXXX zu senden an:

Herr
Thomas Werner
Rosenauweg 16
5430 Wettingen
(Meine Betreuungsperson)

7.2 Bekanntgabe der Resultate

Rebekka Leistner
Kalchweg 1
5210 Windisch

Maturaarbeit 2013

Windisch, im Oktober 2013

Liebe XY

Nun sind bereits einige Monate vergangen, seit wir uns das letzte Mal anlässlich der Speichelprobenabgabe gesehen haben. Mittlerweile ist die Laborarbeit abgeschlossen und die Resultate liegen vor.

Die Molekularbiologie ist ein sehr komplexer Arbeitsbereich, in dem unberechenbare Probleme auftreten können. Auch während meiner Analyse war dies der Fall. Es war mir nicht möglich, von allen Proben Resultate zu erhalten. Insgesamt wurden aber doch 18 von 23 Proben analysiert.

Dein Resultat:

z.B. Deine Probe konnte analysiert werden: du bist nicht von der Faktor-V-Leiden-Mutation betroffen.

z.B. Deine Probe konnte analysiert werden: du bist von der Faktor-V-Leiden-Mutation betroffen (heterozygot).

z.B. Deine Probe konnte leider nicht analysiert werden. Vielen Dank für Dein Verständnis.

z.B. Deine Probe konnte leider nicht analysiert werden. Da Deine Eltern jedoch nicht betroffen sind, kann angenommen werden, dass auch Du nicht von der Faktor-V-Leiden-Mutation betroffen bist (Neumutationen nicht annehmend).

Bist Du daran interessiert, was hinter der Faktor-V-Leiden-Mutation steckt und wie ich Deine Speichelprobe analysiert habe? Dann bist du ganz herzlich zur Präsentation meiner Maturaarbeit am Freitag, 15.11.2013, an der Kantonsschule Wettingen eingeladen. Sie wird zwischen 15.00 und 21.00 Uhr stattfinden (genauere Infos folgen).

Liebe Grüsse