



# **Lernpartnerschaft mit der Oberstufe**

**Lehrkonzept zur  
Integration in eine Unterrichtseinheit**

# PCR-Diagnostik einer NCL-Erkrankung

---

## Computersimulation, PCR-Version

Die Mutationen, die der neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (NCL) zugrunde liegen, können durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nachgewiesen werden. Mittels einer internetbasierten Simulation soll die bei der juvenilen Form der NCL am häufigsten vorkommende Mutation genutzt werden, um bei einer fiktiven Familie die klinische Verdachtsdiagnose eines Kindes genetisch zu sichern und eine Stammbaumanalyse durchzuführen.

Die NCL bietet sich durch ihre monogene Vererbung als ideales Beispiel an, um die Regeln der klassischen Genetik sowie molekulargenetische Grundlagen und molekularbiologische Techniken in einem konkreten Szenario anzuwenden und zu verinnerlichen. Die Simulation sollte in eine inhaltlich passende Unterrichtseinheit eingebettet werden, in der die folgend aufgeführten Lehr-/Lerninhalte bzw. Kompetenzziele vorbereitet und die Ergebnisse reflektiert werden.

### **Kompetenzziele**

Durch die Simulation sollen im Rahmen der übergeordneten Unterrichtseinheit folgende Kompetenzziele erreicht und gefestigt werden:

Die Lernenden ...

- stellen Stammbäume auf.
- leiten klassische Erbgänge (hier insbesondere rezessive) ab und analysieren sie.
- setzen Genotypen mit Phänotypen (hier der Erkrankung NCL) in Verbindung.
- beschreiben den grundlegenden Aufbau eines Gens (hier besonders Introns/Exons).
- erklären Mutationstypen (hier Deletionen) und ihre Folgen.
- erklären das Prinzip der PCR und benennen die erforderlichen Komponenten.
- beschreiben das Prinzip der Agarosegelelektrophorese.
- werten das Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese aus.
- setzen ihr Wissen ein, um eine analytische PCR zu konzipieren, durchzuführen und auszuwerten.
- erläutern die Bedeutung genetischer Diagnostik.

Laborpraktische Aspekte sind keine expliziten Kompetenzziele dieser Simulation.

## Voraussetzungen

Für die Arbeit mit der Simulation sollten die Lernenden auf folgende Inhalte vorbereitet sein oder die zugehörigen Kenntnisse bereits besitzen:

- Vererbung, Allele, dominant/rezessiv
- Stammbaumdarstellungen
- Genbegriff, -funktion
- DNA-Struktur (Basenpaare, Doppelstrang, 5'/3')
- DNA-Replikation (DNA-Polymerase, Primer)

## Grundlagen

Unter Verweis auf einschlägige Literatur werden die inhaltlichen Grundlagen, auf denen die Simulation basiert, an dieser Stelle stichwortartig aufgelistet und anschließend in ihren wesentlichen Aspekten kurz ausgeführt:

- Neuronale Ceroid-Lipofuszinosen (NCL oder CLN, *ceroid lipofuscinosis, neuronal*) in 13 genetisch unterschiedlichen Formen (CLN1 bis CLN14, CLN9 nicht vergeben)
- Manifestation im Kindesalter, rascher Verlust der kognitiven und motorischen Fähigkeiten („Kinderdemenz“), früher Tod
- CLN3 (juvenile NCL) ist eine der beiden häufigsten Formen in Deutschland; in den meisten Fällen ausgelöst durch eine 966-bp-Deletion („1-kb-Deletion“) im *CLN3*-Gen
- Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung von DNA-Abschnitten, die durch kurze Primer begrenzt werden
- Analytische PCR durch geeignete Primerpositionen möglich
- Größenbestimmung der entstandenen DNA-Moleküle durch Agarosegelelektrophorese

Bei den neuronalen Ceroid-Lipofuszinosen (NCL oder CLN) handelt es sich um eine Gruppe von Erberkrankungen, in deren Verlauf es zu fortschreitenden Schädigungen von Nervenzellen kommt. Aufgrund genetischer Unterschiede werden sie mittlerweile in 13 verschiedene Formen (CLN1 bis CLN10) eingeteilt, die sich teilweise in unterschiedlichem Lebensalter manifestieren. Da die meisten Formen im Kindesalter ausbrechen und es im Verlauf zu einem umfassenden geistigen Abbau kommt, wird auch von „Kinderdemenz“ gesprochen. Eine kausale, heilende Therapie ist kaum möglich, es sind jedoch Gentherapien in der Entwicklung bzw. klinischen Testung. Für eine der Formen (CLN2) ist seit wenigen Jahren (2016/17) eine medikamentöse Therapie verfügbar, die das Fortschreiten der Erkrankung aufhalten kann. In allen anderen Fällen kommt es bislang im Verlauf einiger Jahre zum Verlust der kognitiven und motorischen Fähigkeiten und schließlich zum Tod. Der zeitliche Verlauf und symptomatische Details hängen von der Form und damit der genetischen Ursache ab. Bis auf eine Ausnahme liegt den Erkrankungsformen ein rezessiver Erbgang zugrunde. Die Erkrankungsrate schwankt von Land zu Land im Bereich von etwa 1:100.000 (Deutschland) bis 1:20.000 Lebendgeborenen.

CLN3 ist mit CLN2 die in Deutschland häufigste Form. Es handelt sich bei CLN3 um die klassische juvenile NCL, die sich typischerweise zu Beginn der Schulzeit manifestiert. Zu den ersten auffälligen Symptomen zählt wie bei anderen Formen eine Sehstörung, die rasch bis zur Erblindung fortschreitet. Charakteristisch ist eine Mutation im *CLN3*-Gen auf Chromosom 16. Die Mehrzahl der Patienten weist eine Deletion von 966 Basenpaaren auf („1-kb-Deletion“, in älterer Literatur „1,02-kb-Deletion“), durch die zwei Exons verlorengehen und es durch eine Leserasterverschiebung zu einer weiteren Verkürzung des Proteins kommt. Die zellbiologischen Details der Proteinfunktion und die genaue Pathogenese sind wie bei den meisten übrigen Formen nur unzureichend bekannt.

Die Erkrankung folgt daher einem rezessiven Erbgang, daher sind heterozygote Träger symptomlos. Es ist deshalb möglich, und aufgrund der relativen Seltenheit der Erkrankung üblich, dass in Familienstammbäumen in mehreren Generationen niemand erkrankt, da nur selten zwei mutierte Allele an eine Person weitergegeben werden. Hinzu kommt, dass homozygote Träger, die das mutierte Allel in jedem Fall weitergeben würden, aufgrund der Krankheitsschwere meist keine Eltern werden.

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung ausgewählter DNA-Abschnitte aus einer DNA-Vorlage. Dazu werden Primer eingesetzt, die als kurze einzelsträngige DNA-Stücke dem linken und rechten Bereich des zu vervielfältigenden Abschnittes entsprechen und sich an den komplementären Einzelstrang anlagern. Die eigentliche Synthese der DNA erfolgt durch eine DNA-Polymerase, die dafür einen geeigneten Reaktionspuffer sowie als Bausteine dNTPs benötigt. Da die DNA-Polymerase DNA-Fragmente wie die Primer nur am 3'-Ende verlängern kann, müssen die Primer so gewählt werden, dass ihre 3'-Enden aufeinander gerichtet sind, wenn sie durch Basenpaarung an die Vorlagen-DNA gebunden haben.

Die PCR-Reaktion besteht aus sich mehrfach (typischerweise 25- bis 30fach) wiederholenden Zyklen, die jeweils aus drei Schritten bei unterschiedlichen Temperaturen bestehen. Im ersten Schritt werden DNA-Doppelstränge bei 95 °C getrennt (Denaturierung). Im zweiten Schritt wird soweit abgekühlt, dass sich die relativ kurzen Primer an die Einzelstränge anlagern können (Annealing/Anlagerung). Im dritten Schritt erfolgt die DNA-Synthese bei 72 °C, der Arbeitstemperatur der hitzestabilen DNA-Polymerase (Elongation). Die Temperatureinstellung wird von einer PCR-Maschine vorgenommen, die über eine entsprechende Kühl- sowie Heizfähigkeit verfügt und auf die benötigten Temperaturen programmiert werden kann. Pro Zyklus kommt es (nahezu) zu einer Verdopplung der Anzahl der gewünschten DNA-Abschnitte.

Durch geeignete Wahl der Primerpositionen kann eine PCR zu analytischen Zwecken eingesetzt werden, etwa um eine Deletion zu erkennen. Werden die Primer seitlich der Deletionsstelle platziert, entsteht bei Vorliegen der Deletion ein kürzeres Produkt als beim Ausgangsallel. Es sollte vermieden werden, dass einer oder beide Primer im Bereich der Deletion liegen, da in diesem Fall bei Vorliegen der Deletion kein Produkt entsteht. Heterozygote Träger werden so mit hoher Wahrscheinlichkeit übersehen, da ihr normales Allel das gleiche Fragment ergibt, das man auch bei Gesunden beobachtet, und die klassische PCR bestenfalls eingeschränkt quantifizierbare Ergebnisse liefert. In der Praxis werden Designs wie das letztgenannte auch aufgrund der eingeschränkten Kontrollmöglichkeit (Ergebnis entspricht der Negativkontrolle) nach Möglichkeit nicht genutzt.

Die Agarosegelelektrophorese nutzt das größenabhängige Wanderungsverhalten unterschiedlich großer DNA-Moleküle im elektrischen Feld. Dazu wird die Lösung mit den zu analysierenden DNA-Fragmenten in die Taschen eines Agarosegels eingefüllt und der Gellauf durch Anlegen einer Spannung gestartet. Da DNA bei sichtbarem Licht transparent ist, werden der Lösung zuvor ein oder zwei Farbstoffe zugesetzt, um die Wanderung der Probe verfolgen zu können. Die Detektion der DNA erfolgt unter UV-Licht mithilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes. Die DNA-Fragmente bilden abhängig von ihrer Größe an bestimmten Positionen Banden unterhalb der Taschen. Die tatsächliche Größe kann durch Vergleich abgeschätzt werden, indem mindestens eine Tasche mit einem Marker beladen wird, der aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten bekannter Länge besteht.

## Szenario

Der Simulation liegt das Szenario zugrunde, dass bei einem 6-jährigen Jungen aufgrund charakteristischer Augenprobleme in Verbindung mit einem epileptischen Anfall der Verdacht auf juvenile NCL besteht. Um dies abzuklären, soll eine PCR-Untersuchung durchgeführt werden. Gleichzeitig soll die engere Familie des Jungen untersucht werden, um ggf. weitere Betroffene zu identifizieren bzw. eine humangenetische Beratung weiterer Verwandter zu ermöglichen. Der Junge hat einen eineiigen Zwillingsbruder und eine jüngere Schwester. In direkter Linie leben neben den beiden Eltern noch beide Großmütter; die Großväter sind vor wenigen Jahren verstorben. Somit ist eine genetische Untersuchung von sieben Personen erforderlich.

## Aufgabenstellung

- Es soll eine analytische PCR konzipiert und durchgeführt werden, mit deren Hilfe ein *CLN3*-Allel mit der 1-kb-Mutation neben dem unveränderten Allel detektiert werden kann.
- Aus den Analyseergebnissen soll ein genetischer Stammbaum der Familie erstellt werden.
- Welche Rückschlüsse lassen sich auf die Genotypen der Großväter ziehen?

Es empfiehlt sich, das Szenario und die Aufgabenstellung schon vor dem Aufrufen der Simulation zu besprechen. In Abhängigkeit vom Wissensstand der Lerngruppe können ggf. schon im Vorfeld Lösungsansätze entwickelt werden.

## Durchführung/Lösung

- Die Simulation ist im Internet verfügbar unter [www.wissim.de/nclpcr](http://www.wissim.de/nclpcr). Im unwahrscheinlichen Fall, dass die Simulation dort aufgrund technischer Probleme nicht verfügbar ist, kann auf [www.wissim-seminare.de/nclpcr](http://www.wissim-seminare.de/nclpcr) ausgewichen werden.
- Die Simulation wird von oben nach unten durchgearbeitet, die einzelnen Schritte sind stichwortartig oder durch kurze Erläuterungstexte selbsterklärend; aktuell nicht durchzuführende Schritte sind inaktiviert. Um die Simulation auf Wunsch abubrechen und neu zu starten, muss die Seite neu geladen werden.

- 1. Primerauswahl:

Es öffnet sich eine schematische Darstellung des exonhaltigen Teils des *CLN3*-Gens<sup>1</sup> (türkis). Die eingetragenen Blöcke entsprechen den Exons. Der im Falle der Mutation deletierte Bereich ist rot markiert.

Oberhalb und unterhalb der Gendarstellung befindet sich je ein blauer Pfeil. Jeder Pfeil symbolisiert einen Primer und zeigt von 5'- in 3'-Richtung. Mit der Maus können die Primer verschoben werden, per Doppelklick ändert sich die Richtung. Zur besseren Sichtbarkeit sind die Primer länger dargestellt als sich maßstäblich ergeben würde. Die tatsächliche Bindestelle befindet sich am Beginn des Pfeils. Die genaue Bindestelle, Länge, Sequenz und grob berechnete Annealing-Temperatur ( $T_a$ , zur Verwendung im PCR-Programm) werden unter der Grafik angegeben. Mithilfe der roten Pfeile können die Position und die Länge der Primer bei Bedarf basengenau angegeben werden (Primerlänge im Bereich der typischen 18 bp bis 25 bp).

Die gewählten Primer können übernommen werden, sobald der Abstand im Bereich von 100 bp bis 2000 bp liegt und sich die Annealing-Temperaturen um maximal 5 °C unterscheiden (andere Abstände oder größere Temperaturunterschiede führen zu zunehmenden methodischen Schwierigkeiten bei der PCR).

Die erfolgreiche Übernahme der Primer garantiert nicht die für die PCR oder die analytische Fragestellung korrekte Positionierung! Die Simulation liefert in diesen Fällen die entsprechend „falschen“ Ergebnisse. Im Idealfall sollten die Primer auf beiden Seiten außerhalb des Deletionsbereichs binden und in Richtung der Deletion zeigen. In diesem Fall entsteht bei der PCR aus einem mutierten Allel ein verkürztes DNA-Molekül, das 966 bp kleiner ist als das DNA-Molekül, das sich aus dem Ausgangsallel ergibt.

Die Positionsangaben beziehen sich auf die Basennummerierung des *CLN3*-Gens<sup>2</sup>. Da das Gen gemäß Richtungskonvention auf dem Gegenstrang des Chromosom 16 liegt, wird es gegenläufig zum Genom nummeriert und daher in der Simulation anders herum gedreht gezeigt als in einer genomischen Ansicht.

*Vertiefungsmöglichkeiten:* Die Annealing-Temperatur kann durch den GC-Gehalt und die Länge des Primers gezielt beeinflusst werden. Warum? (Anzahl der Wasserstoffbrücken) In welche Richtung? (höhere  $T_a$  bei höherem GC-Gehalt wegen 3 H-Brücken vs. 2 bei AT-Paaren sowie bei längerem Primer) Wer findet den Primer mit der höchsten/niedrigsten Annealing-Temperatur?

- 2. Weitere Komponenten für die PCR auswählen:

Es müssen die zusätzlich zu den Primern erforderlichen Komponenten für die PCR-Reaktion ausgewählt werden (dNTPs, DNA-Polymerase und Puffer/ $Mg^{2+}$ ). Die Auswahl ist aus didaktischen Gründen auf maximal drei Komponenten beschränkt, da die zusätzliche Zugabe „falscher“ Komponenten den Ablauf der PCR nicht signifikant beeinflusst. Durch die Beschränkung hat eine Falschwahl zur Folge, dass eine essentielle Komponente fehlt und die PCR fehlschlägt.

*Vertiefungsmöglichkeiten:* Pufferabhängigkeit der Enzymaktivität/3D-Struktur, Unterschiede DNA/RNA, Doppelfunktion von ATP als Ribonukleotid der RNA und Energiespeicher im Zellstoffwechsel

- 3. PCR-Maschine: Programmieren und starten:

Für die einzelnen PCR-Schritte muss die zugehörige Temperatur ausgewählt werden. Der Vorgabetemperaturwert, die für Schritt 2 (Annealing/Anlagerung) auszuwählen ist, passt sich automatisch der Primerauswahl an (niedrigste der beiden Temperaturen). Nach Eingabe der gewünschten Zyklenzahl lässt sich die PCR starten (die zeitliche Dauer der einzelnen Schritte ist kein Lernziel und daher nicht variierbar). Die Auswahl falscher Temperaturen wird beim Start der PCR mit einer Fehlermeldung abgelehnt, die sich nach einigen Sekunden selbst schließt. Die Zyklenzahl wird wie eingegeben simuliert. Die Randbedingungen sind so angelegt, dass die PCR wie typischerweise ab etwa 25 Zyklen beginnt, verlässliche Ergebnisse

---

<sup>1</sup>Referenz:

[https://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000016.9?report=graph&from=28474159&to=28507216&strand=true&app\\_context=Gene&asm\\_context=GCF\\_000001405.25#](https://ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000016.9?report=graph&from=28474159&to=28507216&strand=true&app_context=Gene&asm_context=GCF_000001405.25#)

<sup>2</sup>Referenz: <https://ncbi.nlm.nih.gov/gene/1201>

zu liefern und ab ca. 30 Zyklen in eine Sättigung übergeht. Bei zu niedriger Zyklenzahl ist erwartungsgemäß kein Produkt nachweisbar. Die Produkte entstehen grob äquimolar, d. h., kürzere Fragmente ergeben in der Gelanalyse schwächere Banden, sofern sich die PCR-Reaktion und die Detektionsmethodik noch nicht in der Sättigung befinden. Diese klassische Form der PCR eignet sich jedoch nicht für eine (verlässliche) Quantifizierung.

Die PCR wird automatisch mit neun Proben durchgeführt: Zu den sieben DNA-Proben der Familienmitglieder kommen eine Negativkontrolle (nur Ausgangsallel) und eine Positivkontrolle (nur mutiertes Allel) hinzu. Da keine „Schmutzeffekte“ einer Durchführung im realen Labor simuliert werden (da diese kein Lernziel sind), wird keine „Wasserkontrolle“ mitgeführt.

Während die PCR simuliert wird, wird das Display der PCR-Maschine eingeblendet. Die Anzeige erfolgt in 10fachem Zeitraffer, ganz unten wird die vergangene simulierte Zeit in Minuten und Sekunden angezeigt.

*Vertiefungsmöglichkeiten:* Zweck und Art von Kontrollen (Überprüfung der Methode, des Materials, des Ergebnisses; Positiv-, Negativ-Kontrollen etc., Doppelwerte, unabhängige Wiederholungen, alternatives Experiment mit anderer Methodik, Verblindung, ...), Potenzrechnung am Beispiel der PCR, z. B. ideal  $2^n$ , real 1,9 oder 1,8 als Basis – Wie groß ist die Auswirkung nach unterschiedlichen Zyklenzahlen, ggf. in Prozent?, Berechnung der mindestens erforderlichen Zyklenzahl für z. B. forensische PCR auf einem einzigen Template-Molekül (100 ng Nachweisgrenze im Agarosegel, 500-bp-Fragment angenommen:  $500 \text{ bp} \cdot 618 \text{ g}:(\text{mol}\cdot\text{bp}) = 309000 \text{ g}:\text{mol}$ ;  $100 \text{ ng} : 309000 \text{ g}:\text{mol} \approx 324 \text{ fmol} = 3,24 \cdot 10^{-13} \text{ mol}$ ;  $3,24 \cdot 10^{-13} \text{ mol} \cdot 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1} \approx 2 \cdot 10^9$ ;  $\log_2(10^9) = \lg(10^9) : \lg(2) \approx 9 : 0,3 = 30$ ; in der Praxis eher 40 Zyklen, die ersten Zyklen „fassen“ nicht jedes Mal, die Effizienz ist etwas geringer als Faktor 2, und man möchte sicher über die Nachweisgrenze kommen)

#### ○ 4. Gel beladen, starten und DNA detektieren:

Auf dem Gel stehen zehn Spuren zur Verfügung. Es muss festgelegt werden, welche Probe in welche Geltasche/Spur gegeben wird. Jede Probe kann nur in eine Tasche gegeben werden, lediglich der Marker steht unbegrenzt zur Verfügung. Taschen können auch leer gelassen werden.

Nach dem Start des Gels öffnet sich ein Fenster mit der Ansicht des Gels. Zunächst ist zu sehen, wie die Taschen des Gels beladen werden, dann startet der Gellauf in 10fachem Zeitraffer. Die beiden Farbstoffbanden laufen bei jeweils etwa 2000 bp bzw. 500 bp. Der Gellauf kann nach dem Einlaufen der Proben ins Gel durch einen Klick auf „Gel stoppen“ angehalten werden. Das angehaltene Gel kann per Klick unter UV-Licht betrachtet werden, sodass die DNA-Banden sichtbar werden (die Darstellung erfolgt wie bei Geldokumentationsanlagen üblich in Graustufen). Nach dem Ausschalten des UV-Lichts können die Proben bei Bedarf über den zum Stoppen verwendeten Knopf weiter aufgetrennt werden. Eine gute Trennung der Fragmente ist üblicherweise nach etwa einer halben Stunde (3 min nach Gelstart in der Simulation) erreicht.

Der Marker enthält folgende Fragmentgrößen: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500 und 2000 bp. Das 500-bp- und das 1000-bp-Fragment sind in größerer Menge enthalten und erscheinen dadurch intensiver.

*Vertiefungsmöglichkeiten:* Polung des Gels (Plus unten, Minus oben, da DNA negativ geladen ist), Fluoreszenz/Fluoreszenzfarbstoffe, Toxizität interkalierender DNA-Farbstoffe (Veränderung der DNA-Struktur und damit der Proteininteraktion), Nachweisgrenze/Hintergrundintensität, digitale Bildanalyse (Histogrammanalyse, Intensitätsquantifizierung, Kontrastverschiebung/Neuskalierung der Intensitäten; das Gelbild lässt sich dafür per Rechtsklick über die Zwischenablage in ein übliches Grafikprogramm, z. B. Gimp, kopieren, niedrige Zyklenzahlen verwenden im Bereich von knapp 25)

#### ○ Stammbaum:

Zum Abschluss der Aufgabenstellung kann ein Stammbaum erstellt werden (Informationen s. <https://de.wikipedia.org/wiki/Stammbaumanalyse>). Das Ergebnis der PCR sollte sein, dass die Verdachtsdiagnose einer Erkrankung mit juveniler NCL (CLN3) bestätigt wird, da das Kind zwei mutierte Allele trägt. Als eineiiger Zwilling ist der Bruder erwartungsgemäß ebenfalls betroffen. Die Schwester ist heterozygot, ebenso die Eltern und die Großmutter väterlicherseits. Die Großmutter mütterlicherseits trägt kein mutiertes Allel, daher muss der Großvater mütterlicherseits mindestens heterozygot sein. Da der Großvater erst kürzlich gestorben ist (und außerdem die Krankheit nach Manifestation nicht zu übersehen ist), kann davon ausgegangen werden, dass er nicht homozygot, sondern heterozygot war. Der Genotyp

des Großvaters väterlicherseits ist offen – eine theoretisch mögliche Homozygotie kann aus genannten Gründen ausgeschlossen werden, Heterozygotie ist wegen der geringen Frequenz des mutierten Allels unwahrscheinlich, sodass er vermutlich zwei unveränderte Allele trug.  
*Vertiefungsmöglichkeiten:* Einsatzmöglichkeiten von Stammbaumanalysen, ethische und rechtliche Aspekte genetischen Testens (Recht auf Nichtwissen, Rückschlüsse auf den Genotyp verwandter inkl. noch nicht geborener Personen, Konsequenz der Information, Erfassung in Datenbanken wie Gesundheitskarte/Versicherungen, ...), psychologische Aspekte genetischen Testens (z. B.: „Gene kann ich nicht verändern“: „Dann ist es egal“ vs. „Dann brauche ich mich auch nicht anstrengen“ vs. „Dann muss ich erst recht veränderliche Faktoren beeinflussen“ vs. Depression; unterschiedliche Beurteilung je nach untersuchtem Aspekt: nicht therapierbare Krankheit mit 100%iger Penetranz vs. durch Lebensstil beeinflussbare Veranlagung, humangenetische Beratung mit Blick auf Familienplanung – medizinische, soziale, ethische, religiöse Beurteilung)

## Technische Hinweise

- Es werden keine Cookies verwendet, keine speziellen Freigaben benötigt und keine lokale Speicherung durch die Internetseite genutzt.
- Javascript muss aktiviert sein (Standardeinstellung aktuell üblicher Browser).
- Aufgrund einer aktuell von Safari noch nicht unterstützten Funktion wird die in der Realität zu beobachtende, zunehmende Unschärfe der Banden bei diesem Browser nicht dargestellt. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die Interpretation der Banden und ihrer Laufweiten.
- Nachdem die Seite aufgerufen ist, wird für die Durchführung der Simulation keine weitere Internetverbindung benötigt. Das zum Laden benötigte Datenvolumen beträgt nur wenige Dutzend Kilobyte.

## Weitere Hinweise

- Der Fokus der Simulation liegt auf den Prinzipien der PCR und ihrem analytischen Einsatz. Daher sind für verschiedene Aspekte wie die Volumina/Konzentrationen der Reaktionskomponenten oder die Zeiten der Temperaturschritte keine Eingaben vorgesehen, um aus didaktischen Gründen den Umfang der zu beachtenden Zusammenhänge für einen schulischen Kontext überschaubar zu halten.  
In einer alternativ einsetzbaren Basis-Version der Simulation entfällt die Primerauswahl und damit die Entwicklung der analytischen PCR, sodass der inhaltliche Umfang dort geringer ist und der Schwerpunkt auf der Auswertung der Bandenmuster liegt.
- Bei der beschriebenen Interpretation der Ergebnisse und des Stammbaumes sind seltene, verkomplizierende Aspekte wie z. B. gemischte Heterozygotie nicht berücksichtigt.
- Individuelle Schwankungen in der Effizienz der PCR und der Template-Qualität werden mitsimuliert, dadurch sind die Bandenintensitäten realistischerweise nicht exakt reproduzierbar.
- Wenn durch die Deletion ein Teil der Primerbindung im 5'-Bereich verloren geht, führt dies zu einer entsprechend verminderten Effizienz der PCR, da das Annealing durch die scheinbare Primerverkürzung negativ beeinflusst wird.
- Fehlbindungen der Primer oder Primerdimer werden nicht simuliert. Durch die automatische Anpassung der Annealing-Temperatur und weiterer Rahmenbedingungen ist das Risiko, dass diese Artefakte bei einer realen Durchführung auftreten würden, reduziert aber nicht ausgeschlossen.

## Ausgewählte Literatur

- Ceroid Lipofuscinosis, neuronal, 3; CLN3; Eintrag in der Datenbank *Online Mendelian Inheritance in Man*; [www.omim.org/entry/204200](http://www.omim.org/entry/204200)
- Mirza et al.: The CLN3 gene and protein: What we know; *Mol Genet Genomic Med* 2019, 7, 12; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31568712>
- Mülhardt: Der Experimentator Molekularbiologie / Genomics; beliebige Auflage
- Standardwerke der Biochemie oder Humangenetik

*Autor: Dr. Alexander Laatsch, [www.wisssim.de](http://www.wisssim.de)*

*Das Projekt wurde realisiert mit freundlicher*

*Unterstützung der Klaus Tschira Stiftung.*

