

Claus D. Volko und Lana Kosi

Gentechnologie für Mediziner

Vorwort

Die moderne Genetik ist eine der faszinierendsten Bereiche der Naturwissenschaft. Ihre Kenntnis kombiniert mit den Verfahren der Gentechnologie erlaubt es der Menschheit, ihr eigenes weiteres Schicksal in einem noch nie zuvor dagewesenen Ausmaß selbst zu bestimmen. Neben gewissen Risiken wie bei allen neuen Technologien bieten Genetik und Gentechnik enorme Chancen. Sie versprechen die Heilung oder gar Ausmerzungen von bisher unheilbaren Krankheiten und könnten mittelfristig zu einer möglicherweise sogar radikalen Veränderung der menschlichen Art führen. Manche sprechen bereits vom "transhumanen" Zeitalter, das den Übergang in eine vollkommen neue, "posthumane" Ära einleitet. Ob das wünschenswert ist, ist freilich eine andere Frage.

Uns als Medizinstudenten interessiert die Gentechnologie vor allem wegen der durch sie gebotenen Diagnose-, Therapie- und Heilungsmöglichkeiten. Diese werden sicherlich immer mehr und mehr Anwendung in der Heilkunde finden und viele alte Methoden langsam, aber sicher verdrängen.

Nachdem wir bereits in der Hauptvorlesung *Biologie für Mediziner* viel Theorie über Genetik und Gentechnik erfahren hatten, ergriffen wir mit Freude die Gelegenheit, im Rahmen der Übung *Gentechnologie für Mediziner*, eines Wahlfachs nach §13 UniStG, eine praktische Einführung in die Methoden der Gentechnologie zu erhalten. Wir opferten dafür gerne zwei Wochen unserer knapp bemessenen Semesterferien.

Sehr interessant war zu sehen, dass es auch in gesunden Menschen offenbar recht viele Genmutationen gibt, die sich auf das äußere Erscheinungsbild nicht auswirken.

Wir bedanken uns ganz herzlich bei Ao. Univ.-Prof. Dr. Sylvia Hagemann und Mag. Peter Wihlidal, die uns in die Materie einwiesen und während des Praktikums betreuten.

Das vorliegende Dokument enthält nur einige allgemeine Ausführungen zum Thema Gentechnologie, weil die Einzelheiten zum Praktikum nicht zur Veröffentlichung bestimmt sind.

Claus D. Volko

Lana Kosi

Danke an Mag. Brigitte Tempelmaier für einige Anmerkungen.

Inhaltsverzeichnis

1. Molekularbiologische Grundlagen der Genetik	5
1.1 Einführung	5
1.2 Das menschliche Genom	5
1.3 Proteine	6
1.4 Desoxyribonucleinsäure	7
1.5 Ribonucleinsäure	8
1.6 DNA-Replikation	9
1.7 Proteinsynthese	10
1.7.1 Transkription	10
1.7.2 Translation	11
1.7.3 Der genetische Code	12
1.8 Mutationen	13
2. Humangenetische Vererbungslehre	15
3. Methoden der Gentechnik	17
3.1 Gel-Elektrophorese	17
3.2 Restriktionsenzyme	17
3.3 Denaturierung und Hybridisierung	18
3.3.1 In-situ-Hybridisierung	18
3.3.2 Nucleinsäurehybridisierung	19
3.3.3 Selektion	19
3.4 Untersuchung klonierter Gene	21
3.5 DNA-Amplifikation und Polymerase-Kettenreaktion	21
3.6 Sequenzierung	22
4. Gentherapie	23
5. Das Hämoglobin	24
5.1 Vorkommen	24
5.2 Chemischer Aufbau	24
5.2.1 Das Myoglobin und seine Gemeinsamkeiten mit dem Hämoglobin	25
5.2.2 Die Häm-Gruppe (Eisen-Protoporphyrin IX)	25
5.2.3 Unterschiede zwischen Myoglobin und Hämoglobin	26
5.2.4 Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien des Menschen	27
5.2.5 Bindung von Sauerstoff	27
5.3 Biologische Funktionen und ihre chemischen Grundlagen	28
5.3.1 Stofftransport	28
5.3.1.1 Sauerstoff-Transport	28
5.3.1.2 Konformations- und Affinitätsänderungen	28
5.3.1.3 Allosterische Effektoren	30

5.3.1.4 Protonen- und Kohlendioxid-Transport	31
5.3.2 Pufferfunktion	31
5.4 Fehlfunktionen	32
5.4.1 Hämoglobinbildung	32
5.4.2 Fehltransporte	32
5.5 Evolution des Hämoglobins	32
5.6 Genetische Aberrationen und ihre Folgen	33
5.6.1 Hämoglobinpathien	33
5.6.1.1 Sichelzellenanämie (Drepanozytose)	33
5.6.1.2 Andere Hämoglobinpathien	34
5.6.2 Thalassämien	35
Referenzen	36

1. Molekularbiologische Grundlagen der modernen Genetik

1.1 Einführung

Die Gesamtheit der Erbanlagen (*Gene*) eines Lebewesens (*Organismus*) wird als *Genom* bezeichnet.

Molekularbiologisch betrachtet, befindet sich das Genom eines *Eukaryoten*, also im Gegensatz zu einem *Prokaryoten* Zellen mit Zellkernen (*Nuclei*) besitzenden Organismus, in speziellen Körperchen, die in den *Nuclei* der Körperzellen enthalten sind: den *Chromosomen*. Man unterscheidet zwischen zwei Arten von Chromosomen: allgemeine Chromosomen, auch *Autosomen* genannt, und geschlechtsspezifische Chromosomen, für welche auch der Begriff *Gonosomen* gebraucht wird.

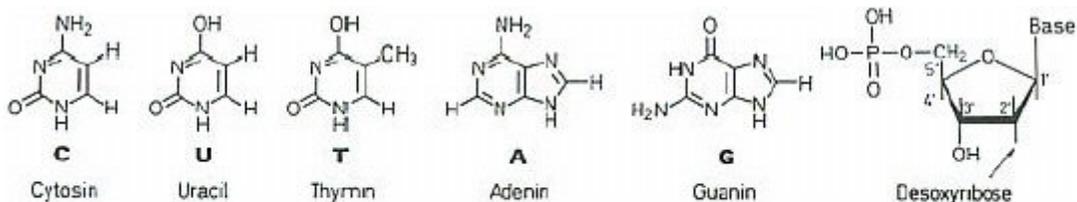
Jedes Chromosom besteht aus zwei Abschnitten, dem *p-Arm* und dem *q-Arm*, welche durch eine Region namens *Zentromer* verbunden sind. Nach dem Verhältnis der Längen der beiden Arme unterscheidet man zwischen *metazentrischen*, *submetazentrischen* und *akrozentrischen* Chromosomen. Metazentrische Chromosomen haben das Zentromer in der Mitte: Beide Arme sind etwa gleich lang. Bei submetazentrischen Chromosomen ist der p-Arm deutlich kürzer als der q-Arm; bei akrozentrischen ist der p-Arm so winzig klein, dass man auch sagen kann, er sei praktisch nicht vorhanden. Die vom Zentromer am weitesten entfernten Regionen heißen *Telomere*.

Chromosomen sind stets aus *Desoxyribonucleinsäure* (*desoxy-ribonucleic acid, DNA*) und basischen Eiweißen (*Proteinen*), den *Histonen*, aufgebaut. Es gibt verschiedene Histone; sie werden *H₁*, *H_{2A}*, *H_{2B}*, *H₃* und *H₄* genannt.

Bei der DNA handelt es sich um ein Makromolekül (*Polymer*), in dem unzählige kleinere Moleküle, die *Desoxyribonucleotide*, wie die Perlen in einer Perlenkette miteinander verbunden sind. Die Art der Verbindung heißt *Phospho(rsäure)diesterbindung*; es handelt sich um eine *kovalente* Bindung.

Jedes Nucleotid besteht aus einer *Base*, einem Fünferzucker (*Desoxyribose*) aus fünf Kohlenstoffatomen, welche als 1' bis 5' bezeichnet werden, und einem *Phosphorsäurerest*. Die wichtigste Komponente ist die Base; die Abfolge der verschiedenen Basen ist es, welche die Erbinformation (*genetische Information*) codiert. In der DNA gibt es insgesamt vier verschiedene Basen, die beiden *Purinbasen* *Adenin* (*A*) und *Guanin* (*G*) sowie die beiden *Pyrimidinbasen* *Thymin* (*T*) und *Cytosin* (*C*). An manchen Stellen befinden sich in der DNA außerdem *Methylgruppen*. Man sagt, die DNA ist dort *methyliert*.

In Prokaryoten befindet sich die DNA frei im *Zellplasma*; oft ist sie zirkulär, d.h. ringförmig aufgebaut.



Aus: Hirsch-Kauffmann, *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, S. 83
Links die vier verschiedenen Basen der DNA sowie das Uracil der RNA (siehe weiter unten),
rechts der prinzipielle Aufbau eines Desoxyribonucleotids.

1.2 Das menschliche Genom

Das Genom eines gesunden Menschen ist auf 22 Autosomen-Paare und ein Paar Gonosomen verteilt. Die Autosomen werden nach abnehmender Größe von 1 bis 22 nummeriert, die Gonosomen werden als X bzw. Y bezeichnet. Männer besitzen in der Regel je ein X- und ein Y-Chromosom, Frauen zwei X-Chromosomen und kein Y-Chromosom. Der gesamte

Chromosomensatz nimmt eine Länge von etwa 3 Milliarden *Basenpaaren (bp)* ein; da in der DNA vier verschiedene Basen auftreten, entspricht diese Zahl einem Informationsgehalt von $3 \cdot 10^9 \cdot 2 \log(4) \text{ bit} = 6 \text{ Gbit} = 750 \text{ MByte}$. So umfangreich dies auch zu sein scheint: Tatsächlich werden bei eukaryontischen Organismen wie dem Menschen nur bis zu 10% der DNA in Proteine übersetzt. Diese Protein codierenden Abschnitte der DNA werden als *Gene* bezeichnet.

Durch die *Sequenzierung* des menschlichen Genoms ist uns heute ein beträchtlicher Teil dieser besonders wichtigen Information bekannt. Das 1980 unter US-Führung gestartete, internationale *Human Genome Project* hat im Sommer 2000 (fünf Jahre früher, als die ursprüngliche Zielvorgabe lautete) aus der vollständigen Basen-Sequenz aller Chromosomen eine *Idealkarte* des menschlichen Genoms erstellt.

Man spricht von einer Idealkarte, weil die DNA nicht einem einzigen menschlichen Organismus entnommen wurde, sondern mehreren verschiedenen. Jeder Mensch enthält in seinem Genom durch *Mutationen* (d.h. während der Kernteilung aufgetretene Fehler, die zu Veränderungen der DNA führten) hervorgerufene Abweichungen von den am häufigsten auftretenden Versionen (*Allele*) der Gene; dies ist einer der Gründe, warum jeder Mensch anders ist. Um einen gemeinsamen Nenner zu finden, hat man daher verschiedenen Menschen solche Gensequenzen entnommen, die in der Weltbevölkerung möglichst weit verbreitet sind und keine der bekannterweise Erbkrankheiten auslösenden Defekte bergen.

Mit offenbar nur etwa 30000 bis 40000 Protein-Genen (und nicht 100000, wie vorher angenommen wurde) produziert das menschliche Genom etwas mehr als doppelt so viele verschiedene Proteine wie das einer Fruchtfliege. Die Identifikation der einzelnen Gene ist jedoch noch längst nicht abgeschlossen. Auch in Mitteleuropa wird deshalb die funktionelle Genomanalyse weiterhin mit Hochdruck vorangetrieben.

Das *Deutsche Humangenomprojekt* setzt zurzeit vor allem auf anwendungs- und funktionsorientierte Forschung. Die Genomanalyse soll helfen, die genetischen Mechanismen der "Volkskrankheiten" aufzudecken und daraus neue Therapiemöglichkeiten zu erschließen. Schwerpunkte der Forschungsarbeiten sind die Sequenzierung der Chromosomen, die Erforschung der genetischen Grundlagen polygener (d.h. über mehrere Gene vererbter) Erkrankungen und die Bestimmung von Methylierungsmustern in menschlicher DNA. Darüber hinaus arbeitet das Deutsche Humangenomprojekt an der Verbesserung der Methoden zur Genomanalyse selbst.

1.3 Proteine

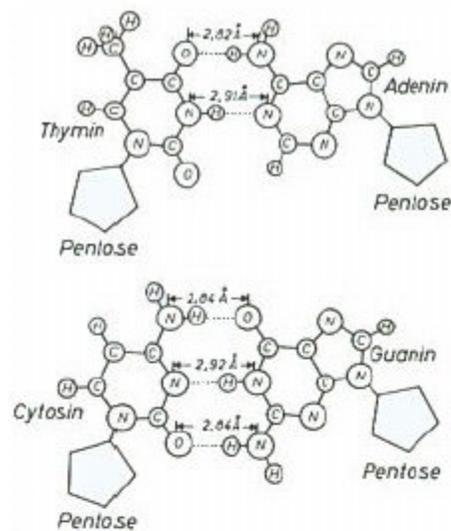
Proteine sind wichtige Genprodukte. Dies sind Stoffe, die wichtige, nützliche, aber unter Umständen auch schädliche Funktionen im Körper übernehmen. Nach ihren Funktionen unterscheidet man *Strukturproteine* (z.B. *Kollagen*), *Transportproteine* (z.B. *Hämoglobin*) und *Katalyseproteine* (*Enzyme*, z.B. *Polymerase*).

Proteine werden auf Grund ihres Vorkommens in Hühnereiern im Alltag auch als Eiweiße bezeichnet. Genauso wie Nucleinsäuren sind Proteine Makromoleküle. Während die Bausteine der DNA die Nucleotide sind, handelt es sich bei den Bausteinen der Proteine um die *Aminosäuren*. Diese sind in Proteinen durch die *Peptidbindung* miteinander verknüpft.

Es gibt viele verschiedene Aminosäuren. Davon kommen aber nur 20 regelmäßig in physiologisch relevanten, also für den Körper bedeutsamen Proteinen vor: *Glycin (Gly, G)*, *Prolin (Pro, P)*, *Alanin (Ala, A)*, *Valin (Val, V)*, *Leucin (Leu, L)*, *Isoleucin (Ile, I)*, *Methionin (Met, M)*, *Phenylalanin (Phe, F)*, *Cystein (Cys, C)*, *Serin (Ser, S)*, *Threonin (Thr, T)*, *Tryptophan (Trp, W)*, *Tyrosin (Tyr, Y)*, *Asparagin (Asn, N)*, *Glutamin (Gln, Q)*, *Asparaginsäure (Aspartat, Asp, D)*, *Glutaminsäure (Glutamat, Glu, E)*, *Lysin (Lys, K)*, *Arginin (Arg, R)* und *Histidin (His, H)*. Diese 20 Aminosäuren können durch die DNA codiert werden. Wir werden in einem späteren Kapitel noch auf den *genetischen Code* zu sprechen kommen.

1.4 Desoxyribonucleinsäure

Wie bereits eingangs geschildert, setzt sich die DNA aus einer großen Zahl von Nucleotiden zusammen. Die Nucleotide enthalten zwar Basen, aber auch Phosphorsäurereste; da Letztere im Vergleich zu den Purin- und Pyrimidinbasen einen relativ starken Elektrolytcharakter haben, ist die DNA insgesamt, wie ihr Name andeutet, sauer.



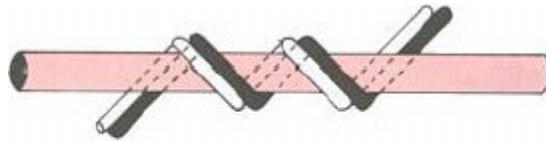
Aus: Buselmaier, *Biologie für Mediziner*, S. 61
 $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$.

Sofern sich die Zelle nicht in der *S-Phase* des Zellzyklus befindet, liegt die DNA in den Chromosomen immer doppelsträngig vor: Jedes Chromosom besteht nicht aus einem DNA-Strang, sondern aus zwei.

Diese beiden Stränge sind miteinander chemisch verbunden und zueinander *komplementär*.

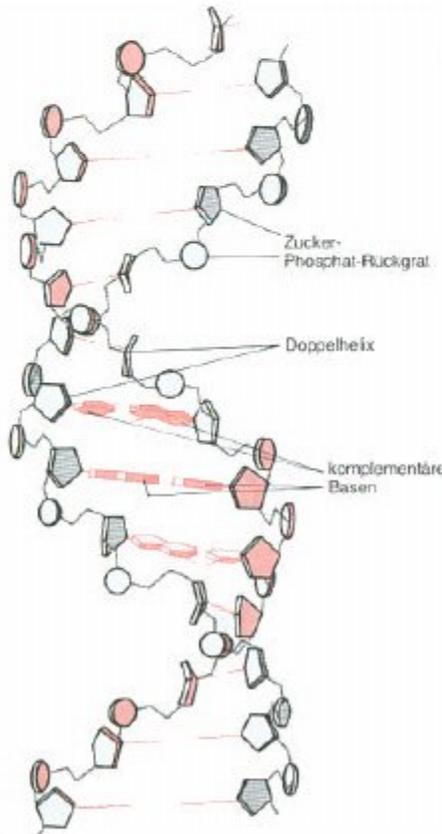
Komplementär bedeutet in diesem Fall: An jeder Stelle des einen Stranges befindet sich genau die Base, welche mit der Base, die am anderen Strang an dieser Stelle vorkommt, eine Bindung eingehen kann. Chemisch gesehen, handelt es sich bei der Art dieser Bindung um *Wasserstoffbrücken*. Zwischen Adenin und Thymin bestehen zwei, zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken.

Jeweils eine Purin- und eine Pyrimidin-Base sind zueinander komplementär: Adenin paart mit Thymin, Guanin mit Cytosin.

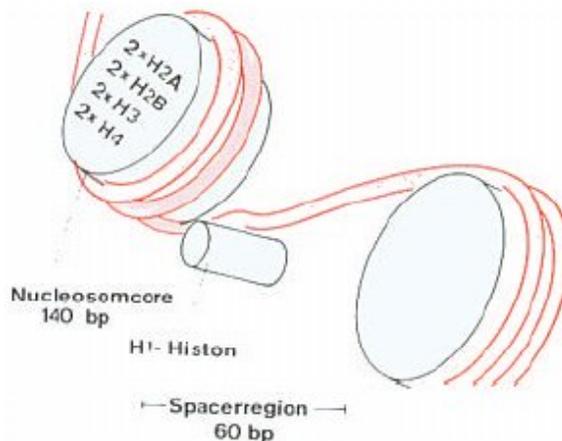


Aus: Buselmaier, *Biologie für Mediziner*, S. 65
 Plektonemische Wicklung der DNA.

Die beiden DNA-Stränge bilden eine spiralförmige *Doppelhelix*. Diese ist auf charakteristische Weise (*plektonemisch*) um die in den Chromosomen enthaltenen basischen Proteine, die Histone, gewickelt. Ein Histonkomplex und die um ihn gewickelte DNA werden zusammen *Nucleosom* genannt.



Aus: Hirsch-Kauffmann, *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, S. 83



Aus: Hirsch-Kauffmann, *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, S. 48

Bei genauerer Betrachtung erkennt man, dass die DNA aus *chromosomalen Regionen* besteht, welche die Gene und dazwischen liegende *Spacer* enthalten. Bei Letzteren handelt es sich um nicht codierende Bereiche zwischen den Genen; da man bei ihrer Entdeckung keine andere Funktion feststellen konnte, werden sie manchmal auch als *Junk-DNA* bezeichnet.

Jedes Gen selbst gliedert sich in *Exons*, codierende Bereiche mit einer durchschnittlichen Länge von 100 Basenpaaren, und *Introns*, welche nicht codierende Bereiche darstellen.

Die DNA eines menschlichen Chromosoms ist im Durchschnitt 150 Millionen Nucleotide lang. Um sie sequenzieren zu können, ist es notwendig, sie in kleine Abschnitte unterteilen. Ein wichtiges Teilziel des Human Genome Project ist es darum gewesen, lückenlose "Leitern" aus überlappenden DNA-Fragmenten (*Contigs*) herzustellen, welche die Chromosomen vollständig abdecken.

Französischen Forschern ist es vor einigen Jahren gelungen, Contigs für alle menschlichen Chromosomen zu erzeugen. Allerdings waren die einzelnen Fragmente dieser Contigs mit über 1 Million Basenpaaren (Mbp) noch sehr lang, und die Contigs waren nicht frei von Fehlern. Seither konzentriert man sich weltweit auf die Erzeugung von Leitern aus kleineren DNA-Fragmenten; die Fragmentgrößen liegen zwischen 40 und einigen 100 Kilobasenpaaren (kbp; 1 kbp = 1000 bp).

Als "Meilensteine" für die topographische Kartierung und Sequenzierung wurden im menschlichen Genom *Sequence-tagged Sites (STS)* definiert. Dabei handelt es sich um kurze, chromosomal lokalisierte DNA-Sequenzen, die sich mit Hilfe der *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)* und geeigneten *PCR-Primern* einfach nachweisen lassen. (Der für die Gentechnik grundlegenden Verfahren der PCR ist ein eigenes Kapitel gewidmet.)

Auch die *genetische Kartierung* des menschlichen Genoms, das heißt die Erstellung eines lückenlosen Rasters aus gekoppelten genetischen Markern, hat große Fortschritte gemacht, vor allen Dingen durch die Einführung von Methoden zum Nachweis hochpolymorpher (also stark variabler) *Mikrosatellitenmarker*.

Seit es diese Mikrosatellitenmarker gibt, sind die Kartierung von monogenen, d.h. nur durch eine Mutation in einem einzigen Gen hervorgerufenen Erbkrankheiten und die Suche nach eng gekoppelten Markern zur Routine geworden. In darauf spezialisierten Laboratorien mit großem Probendurchsatz lassen sich derartige Untersuchungen innerhalb von wenigen Wochen durchführen.

Für viele Erbkrankheiten stehen bereits hoch informative, gekoppelte DNA-Merkmale zur Verfügung, welche in Familien eine zuverlässige Erkennung von Anlageträgern und gegebenenfalls vorgeburtliche (*pränatale*) Diagnosen erlauben. Die genaue Zuordnung zu den Chromosomen hat die Suche nach den molekularen Ursachen von Erbkrankheiten sehr erleichtert.

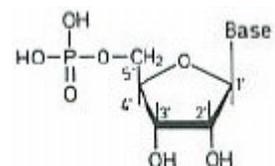
Eine Besonderheit des menschlichen Chromosomensatzes ist die hohe Variabilität des Genoms. Fast alle sequenzierten Gene weisen DNA-Polymorphismen auf. Das sind Mutationen innerhalb einer Bevölkerung (*Population*), die mit einer Häufigkeit von mehr als 1% auftreten.

Solange sich die Mutation in einem Intron befindet und die Aminosäuresequenz des Proteins nicht beeinflusst, führen die Polymorphismen zu einem funktionell unveränderten Genprodukt. Solche harmlosen Polymorphismen haben mittlerweile eine immense Bedeutung für die Kriminalistik gewonnen: Auf ihnen beruht der *genetische Fingerprint*.

Führt eine Mutation zu einem veränderten Genprodukt, so könnte dieses auch eine andere Funktion als das normalerweise erzeugte Protein haben.

1.5 Ribonucleinsäure

Im Zuge der Proteinsynthese werden verschiedene Substanzen gebraucht, welche aus der *Ribonucleinsäure (ribonucleic acid,*



Aus: Hirsch-Kauffmann, *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, S. 83
Ribonucleotid.

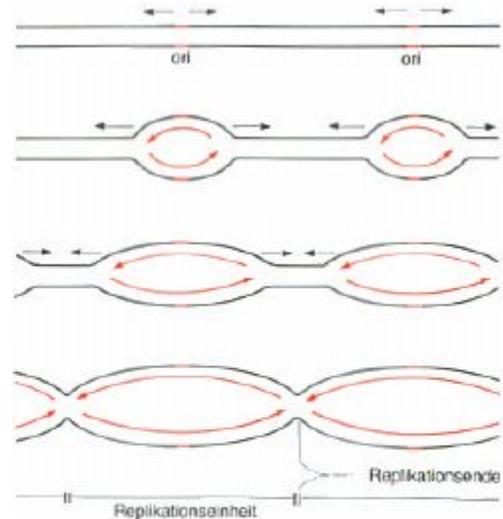
RNA) gebildet werden. RNA hat aber auch weit darüber hinaus gehende Funktionen. Wie der Name schon sagt, ist die RNA eng mit der DNA verwandt. Die Unterschiede zwischen RNA und DNA bestehen darin, dass RNA in den *Ribonucleotiden* an Stelle der Desoxyribose die *Ribose* enthält (welche am Kohlenstoffatom an der Position 2' einen zusätzlichen Sauerstoff besitzt) und das Thymin durch die Pyrimidinbase Uracil ersetzt ist. Außerdem kommt RNA nicht in Form langer Doppelstränge vor, sondern kann hochkomplexe Strukturen bilden.

Bei der Proteinsynthese kommen viele verschiedene RNAs vor. Man unterscheidet nach ihrer Funktion u.a. zwischen *Messenger-RNA (m-RNA)*, *Transfer-RNA (t-RNA)* und *ribosomaler RNA (r-RNA)*. Auf ihre Aufgaben bei der Proteinsynthese wird im dazu gehörigen Abschnitt noch näher eingegangen werden.

1.6 DNA-Replikation

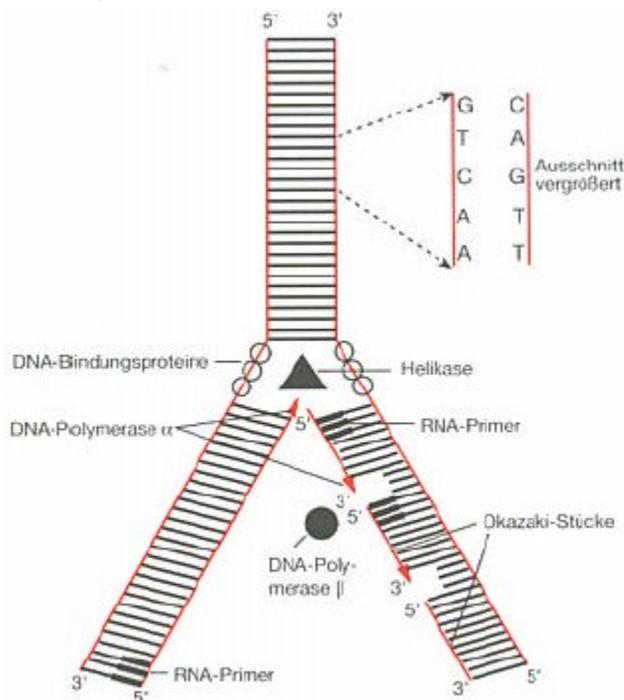
Vor der Mitose (Kernteilung) muss auch das Genom verdoppelt werden, weil eine Tochterzelle ohne lebensnotwendige Gene bald eingehen würde. Dies geschieht in der S-Phase des Zellzyklus. Der Vorgang heißt *identische DNA-Replikation*.

Die DNA-Replikation erfolgt *semikonservativ*. Diese Bezeichnung rührt daher, dass jede Tochterzelle einen Strang der Mutterzelle (einen *parentalen* Strang) haben wird, während der zweite Strang hinzusynthetisiert wird. Die Replikation setzt bei Prokaryonten an einer, bei Eukaryonten an mehreren Stellen (*Origins*, abgekürzt *ori*) gleichzeitig ein. Zunächst schraubt das Enzym *Helicase* die Doppelhelix auf. Dabei werden durch die *Topoisomerase* Einzelstrangbrüche ausgelöst; sie dienen dazu, die Spannung zu vermindern. Außerdem werden die Einzelstränge durch verschiedene *DNA-Bindungsproteine* stabilisiert.



Aus: Hirsch-Kauffmann, *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, S. 87

Stark vereinfachtes Schema der DNA-Replikation.



Aus: Buselmaier, *Biologie für Mediziner*, S. 62
Ein etwas detaillierteres Schema der DNA-Replikation an einem Origin.

Da bei der DNA-Synthese neue Nucleotide stets an die OH-Gruppe am 3'-Ende eines Strangs angehängt werden (man sagt daher, die Replikation verlaufe von 5' nach 3'), kann nur in eine Richtung synthetisiert werden. Der neue DNA-Strang entsteht dabei komplementär zum parentalen Strang. Verläuft der parentale Strang von 3' nach 5', kann der neue Strang in einem Zug synthetisiert werden. Beim anderen Strang beginnt die Synthese einige Basenpaare vom 5'-Ende entfernt; sobald das 5'-Ende erreicht worden ist, springt das für die Synthese verantwortliche Enzym, die *DNA-Polymerase alpha*, zurück und synthetisiert einen weiteren Abschnitt. Man nennt diese Abschnitte nach ihrem japanischen Entdecker *Okazaki-Stücke*. Ein Okazaki-Stück ist 1000 bis 2000 bp lang.

Es mag paradox klingen, aber die DNA-Polymerase kann nur an solche Nucleinsäure-Abschnitten andocken, die bereits doppelsträngig sind. Die Doppelsträngigkeit wird hierbei durch eine *RNA-Polymerase*, die

Primase, vorgetäuscht. Diese bindet RNA-Moleküle mit komplementärer Nucleotidsequenz an die Stelle der DNA, an der die Replikation einsetzen soll. Man nennt diese RNA-Moleküle *RNA-Primer*. Die RNA-Primer werden schließlich mit Hilfe der *DNA-Polymerase β* durch DNA ersetzt, d.h. Thymin und Uracil werden ausgetauscht und der 2'-Kohlenstoff oxygeniert. Außerdem werden die bei der Replikation eingeführten Einzelstrangbrüche durch die *Ligase* wieder rückgängig gemacht.

Der gesamte Vorgang der Replikation kann in drei Teilprozesse gegliedert werden: *Initiation*, *Elongation* und *Termination*.

Bei Eukaryonten setzt die DNA-Synthese in der *S-Phase* des Zellzyklus ein (S steht dabei für Synthese).

Der Vorgang kann durch Markierung mit *Tritium*-haltigem *Thymidin autoradiographisch* sichtbar gemacht werden, weil die vom radioaktiven Tritium ausgesandte ionisierende Strahlung in der Lage ist, geeignete Photoplatten zu schwärzen.

Während der Replikation können durch Umwelteinflüsse Mutationen hervorgerufen (*induziert*) werden. Diese Fehler eliminiert großteils ein komplexer *Proof-reading-Mechanismus*. Er entfernt falsch eingebaute Basen wieder und ersetzt sie durch die richtigen.

1.7 Proteinsynthese

1.7.1 Transkription

Die Transkription (Abschrift) ist der erste Schritt der Proteinsynthese. Der Vorgang findet bei Eukaryonten im Zellkern (*Nucleus*) statt. Er ähnelt der Replikation, mit dem Unterschied, dass nicht die gesamte DNA "abgeschrieben" wird, sondern nur ein kleiner Teil: das Gen, welches das jeweilige Protein codiert. Als Genkopie entsteht am Ende des Prozesses außerdem eine Ribonucleinsäure, die m-RNA, anstatt eines DNA-Stücks. Sie enthält die genetische Information in komplementärer Sequenz.

Viele Proteine besitzen mehrere Untereinheiten. So auch das Hämoglobin: Die beim erwachsenen Menschen überwiegende Form besteht aus zwei α - und zwei β -Ketten. Die menschlichen β -Globin-Gene sind auf Chromosom 11 an fünf Stellen verteilt und ähneln einander stark in ihrer Sequenz.

Das Abschreiben des Gens wird durch das Enzym *RNA-Polymerase* bewerkstelligt, das als Substrat DNA und die *Nucleosidtriphosphate ATP, UTP, CTP* und *GTP* benötigt. Daraus wird komplementär zu einem DNA-Strang eine fortlaufende RNA-Kette, die m-RNA synthetisiert, wobei zwei der drei Phosphatreste eines jeden Triphosphats abgespalten werden.

Die RNA-Polymerase bindet an jenen DNA-Strang, der eine bestimmte Nucleotidsequenz enthält, welche man als *Promotor* bezeichnet. Damit ist die Richtung der Synthese festgelegt. Den DNA-Strang mit dem Promotor nennt man *codogenen* Strang. Er enthält die Geninformation. Der Proteinkomplex der RNA-Polymerase entwindet die DNA lokal, synthetisiert die m-RNA und sorgt wieder für die Spiralisierung der DNA.

Das erste Transkriptionsprodukt ist eigentlich nicht die fertige m-RNA, sondern ein Vorläufermolekül, das *Prä-m-RNA* oder auch *heterogene nukleäre RNA (hn-RNA)* genannt wird. Heterogen ist es deswegen, weil RNA-Moleküle verschiedener Länge entstehen. Aus diesen werden dann in einem Prozess, den man als *Splicing* oder *Spleißen* bezeichnet, die Introns entfernt, so dass nur die tatsächlich das Protein codierenden Teile, die Exons, übrig bleiben.

Die für das Splicing verantwortlichen Körperchen heißen *Spliceosomen* und können Exons und Introns voneinander unterscheiden. Es ist bekannt, dass Introns auf dem Strang, von dem abgelesen wird, mit der Sequenz *GT* anfangen und mit *AG* enden. Nicht immer werden jedoch alle Introns herausgespleißt. Dies hat zur Folge, dass ein und dasselbe Gen mehrere verschiedene Proteine codieren kann.

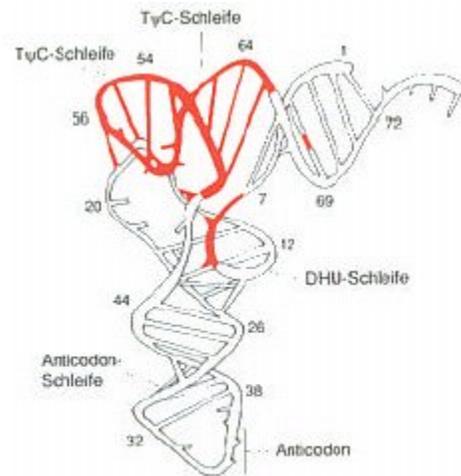
An das 5'-Ende der hn-RNA wird die *Cap-Region*, bestehend aus GTP, angehängt; sie dient als Erkennungsmerkmal für die Syntheserichtung. Außerdem kommt an das 3'-Ende ein *Poly-Adenylat-Schwanz*, bestehend aus mehreren Nucleotiden mit der Base Adenin. Dieser hat die Funktion, die Lebensdauer der m-RNA zu erhöhen. Während die m-RNA in Proteine translatiert wird, wird sie nämlich vom 3'-Ende aus bereits wieder von einer *Exonuclease* abgebaut: Diese trennt einzelne Nucleotide vom Gesamtmolekül ab. Der Abbau durch die Exonuclease ist der Grund, warum die m-RNA in der Zelle nur eine gewisse Halbwertszeit aufweist.

Zum Abschluss sei noch gesagt, dass man die Transkription genauso wie die Replikation in die drei Teilprozesse der Initiation, Elongation und Termination unterteilen kann.

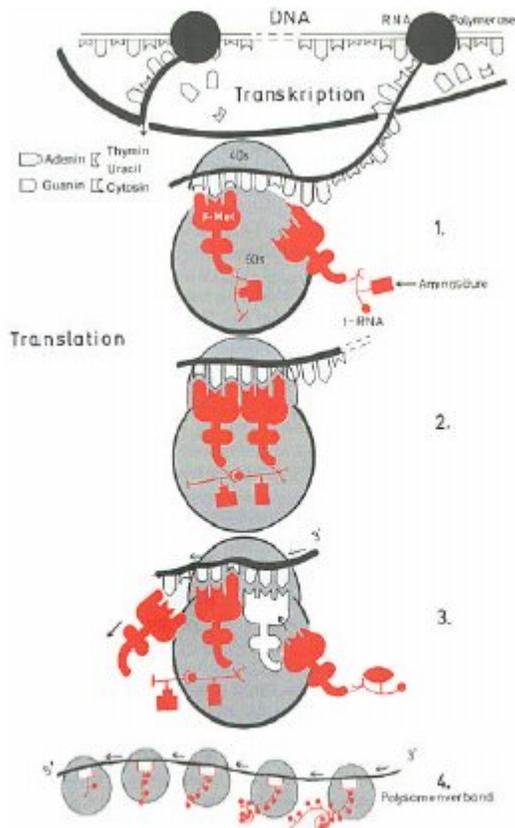
1.7.2 Translation

An der Translation (Übersetzung) sind eine Menge von Enzymen sowie viele mit Aminosäuren beladene t-RNA-Moleküle und die m-RNA beteiligt.

Die t-RNA-Moleküle fungieren als eine Art Übersetzermoleküle, da sie am einen Ende eine spezifische Aminosäure und am anderen ein *Anticodon* besitzen, das auf ein bestimmtes Codon passt. Ein Anticodon passt prinzipiell dann auf ein Codon, wenn es zu ihm komplementär ist. Es kann aber auch unspezifische Basen enthalten, welche in der m-RNA nicht vorkommen. Diese können an mehrere Basen der m-RNA binden.



Aus: Buselmaier, *Biologie für Mediziner*, S. 81
Modell der t-RNA.



Aus: Buselmaier, *Biologie für Mediziner*, S. 85
Transkription und Translation.

t-RNA-Moleküle zirkulieren in der Zelle im *Zellplasma*. Zu jeder der 20 biologisch wichtigen Aminosäuren gibt es ein passendes t-RNA-Molekül.

Neben den auch in der m-RNA auftretenden Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Uracil finden sich in der t-RNA auch andere, seltene Nucleotide wie *Inosin* (mit der Base *Hypoxanthin*), *Dihydrouridin* (*DHU*) und *Pseudouridin* (*y*).

Die Anticodon-Schleife dient dem Abtasten der m-RNA. Die beiden anderen Schleifen besitzen Funktion bei der Anheftung ans *Ribosom*, jener Zellorganelle, die für die Proteinsynthese zuständig ist. Sie werden im Zellplasma durch das Enzym *Aminoacyl-t-RNA-Synthetase* mit den benötigten Aminosäuren beladen.

Das Ribosom ist selbst aus RNA und Proteinen aufgebaut; man bezeichnet diesen Typ von RNA als r-RNA. Es besteht aus zwei verschiedenen großen Untereinheiten, die bei Eukaryonten als 40 S bzw. 60 S-Einheit bezeichnet werden. Die Einheit S heißt *Svedberg*. Es handelt sich um das Verhältnis zwischen Geschwindigkeit und

Beschleunigung in der Ultrazentrifuge. Ein Svedberg entspricht 10^{-13} Sekunden.

Bei der Proteinsynthese "hangelt" sich das Ribosom von Codon zu Codon und katalysiert die Verknüpfung der durch t-RNA zugeführten, zum jeweiligen Codon passenden Aminosäuren mit der bisherigen Peptidkette durch Peptidbindung.

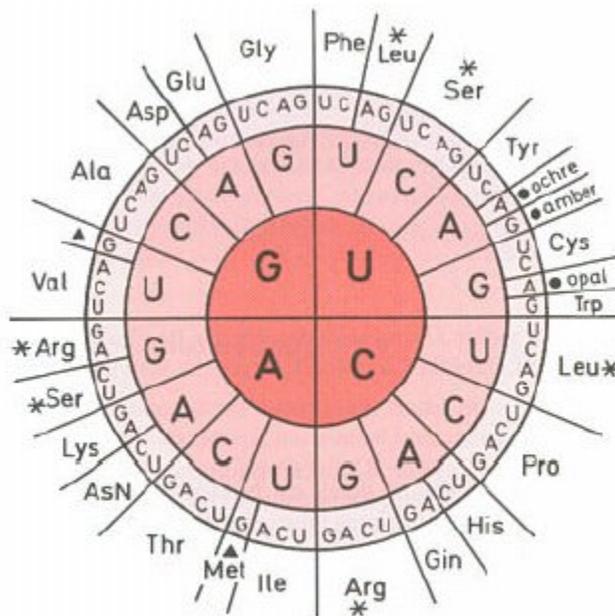
Meistens arbeiten mehrere Ribosomen gleichzeitig am selben RNA-Strang. Man spricht dann von einem *Polysomenverband*.

Das Startsignal für die Synthese wird durch eine bestimmte Nucleotidsequenz in der m-RNA, meist *AUG*, manchmal auch *GUG*, gegeben. Diese wird als erstes abgeschrieben. Man nennt sie *Start-Codon*. Die Beendigung der m-RNA-Synthese wird ebenfalls durch eine m-RNA-Nucleotidsequenz, das *Stopp-Codon*, ausgelöst. Mögliche Stopp-Codons sind *UAA*, *UAG* und *UGA*.

Auch die Translation kann in Initiation, Elongation und Termination unterteilt werden.

1.7.3 Der genetische Code

Beim genetischen Code handelt es sich um einen *Tripletcode*: Jeweils drei Nucleotide bilden ein Codon. Insgesamt gibt es somit $4^3 = 64$ verschiedene Codons. Es werden jedoch nur 20 Aminosäuren codiert. Dazu kommen die Stopp-Codons, welche nach den Farben *ochre*, *amber* und *opal* benannt sind. Die beiden Start-Codons *AUG* und *GUG* stehen auch für Aminosäuren, nämlich Methionin bzw. Valin, Tatsächlich beginnt zunächst jedes durch Translation von m-RNA entstandene Protein mit einem Methionin- oder Valin-Rest; dieser wird jedoch bald darauf in einem Vorgang, den man *Processing* nennt, wieder abgespalten.



Aus: Buselmaier, *Biologie für Mediziner*, S. 71

Der abgebildete genetische Code der m-RNA wird von innen nach außen gelesen.

Da es im genetischen Vokabular weit mehr Wörter als Bedeutungen gibt, bezeichnet man den genetischen Code auch als *degeneriert*. Dieser Ausdruck klingt freilich in Bezug auf den *genetischen* Code etwas seltsam. Viele Wissenschaftler ziehen daher den Terminus *redundant* vor.

Ein in Vorlesungen oft zitierter Merkspruch lautet außerdem: "*Der genetische Code ist universell und interpunktionslos.*"

Universell bedeutet, dass der genetische Code in jeder Zelle fast jedes Lebewesens der gleiche ist. Eine Ausnahme stellen Zellorganellen wie die *Mitochondrien* dar: Diese besitzen zwar auch DNA und können eigene Proteine synthetisieren, der Code ist hier aber ein anderer.

Interpunktionslos (*kommatafrei*) ist der genetische Code, weil es in ihm keine Satzzeichen gibt. Dies ist der Grund, warum es zu *Frame-shift-Mutationen* kommen kann: Durch Insertion oder Deletion einer durch 3 nicht teilbaren Zahl von Nucleotiden kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens. Entfernte man beispielsweise aus der m-RNA-Sequenz AUGAUGAUGUGA das zweite Adenin, so entstünde nicht ein Dipeptid aus zwei Methionin-Resten, sondern gar nichts; denn das Stopp-Codon UGA würde unmittelbar auf das Start-Codon AUG folgen.

1.8 Mutationen

Mutationen sind Veränderungen der DNA, die während der Kernteilung (Mitose) oder der Reifeteilung (*Meiose*) auftreten. (Die Meiose dient der Erzeugung von Keimzellen. Diese besitzen im Gegensatz zu normalen Körperzellen, in denen der Chromosomensatz in doppelter, *diploider* Ausführung vorliegt, einen einfachen, *haploiden* Chromosomensatz, also nur 22 Autosomen und ein Gonosom.)

Es gibt drei verschiedene Arten von Mutationen: *numerische Chromosomenmutationen*, *strukturelle Chromosomenmutationen* und *Genmutationen*.

Man spricht von einer numerischen Chromosomenmutation (*Aneuploidie*), wenn die Zahl der Chromosomen einer Zelle oder eines Organismus von der ihrer Mutterzelle bzw. seiner Eltern abweicht. Ist die Zahl zu groß, nennt man das Phänomen *Hyperploidie*, ist sie hingegen zu klein, so bezeichnet man das als *Hypoploidie*. Mögliche Ursachen der Aneuploidie sind der Verlust von Chromosomen und die *Non-disjunction*.

Das Phänomen der Non-disjunction tritt vor allem während der Meiose sporadisch auf: Die beiden Chromosomen eines Paares trennen sich nicht und gelangen beide in dieselbe Keimzelle, während in der anderen Keimzelle dieses Chromosom völlig fehlt. Verschmilzt dann die Keimzelle, in der das Chromosom zweifach vorhanden ist, mit einer gesunden, so besitzt der Fetus dieses Chromosom in dreifacher Ausführung; man spricht von einer *Trisomie*.

Beim Menschen führt die Mehrzahl der Trisomien von Autosomen zur sofortigen Abtreibung (*Spontanabort*). Überlebensfähig sind lediglich Individuen mit Trisomien der Chromosomen 21 (*Down-Syndrom*, *Mongolismus*), 18 (*Edwards-Syndrom*) und 13 (*Patau-Syndrom*), allerdings sind diese Menschen sowohl körperlich als auch geistig zum Teil schwer behindert und ihre Lebenserwartung vermindert; am harmlosesten ist hier noch die Trisomie 21, deren Konsequenz u.a. Imbezilität bis Idiotie ist.

Es gibt auch Trisomien des X-Chromosoms und andere die Gonosomen betreffenden Aberrationen wie etwa das *Turner-Syndrom*, die Monosomie des X-Chromosoms. Turner-Patienten sind nach außen (*phänotypisch*) weiblich, jedoch kleinwüchsig, haben einen Flügelhals sowie Probleme, sich emotional in andere Menschen hineinzusetzen und sich im Raum zu orientieren, sind aber ansonsten offenbar geistig und körperlich weitgehend normal.

Bei den strukturellen Chromosomenmutationen unterscheidet man zwischen *Deletionen*, *Insertionen*, *Inversionen* und *Translokationen*.

Bei Deletionen fehlen einzelne Chromosomenabschnitte. Ein Beispiel für eine durch Deletion hervorgerufene Erbkrankheit des Menschen ist das *Cri-du-Chat-Syndrom*: Hier fehlt ein Stück des kurzen Armes des Chromosoms 5. Konsequenzen sind der charakteristische Katzenschrei bei der Geburt (daher der Name des Syndroms), ein relativ großer Augenabstand und geistige Behinderung.

Im Gegensatz dazu ist im Fall einer Insertion ein neuer Abschnitt in die DNA eingefügt worden. Eine Art der Insertion ist die *Duplikation*. Man nimmt an, dass durch Duplikation (und anschließende Genmutationen) z.B. die verschiedenen Globin-Gene, welche Bausteine des Hämoglobins codieren, entstanden sind.

Bei einer *Inversion* wird eine Nucleotidsequenz aus einem Chromosom herausgeschnitten und in es wieder verkehrt eingefügt.

Translokation bedeutet, dass eine Nucleotidsequenz aus einem Chromosom herausgeschnitten und in ein anderes eingefügt wird. Tauschen auf diese Weise zwei Chromosomen Teile ihrer Nucleotidsequenzen miteinander aus, so spricht man von einer *reziproken Translokation*. Wird dagegen nur eine Sequenz eines Chromosoms an ein anderes Chromosom angehängt, ohne dass das erste Chromosom von diesem neue Nucleotide zurückerhält, handelt es sich um eine *nichtreziproke Translokation*.

Ein besonderer Fall ist die *zentrische Fusion*, auch *Robertsonsche Translokation* genannt. Sie tritt ausschließlich bei akrozentrischen Chromosomen auf. Hier fusionieren die q-Arme zweier homologer Chromosomen miteinander; die p-Arme werden verworfen. Das Ergebnis ist ein neues Chromosom, dessen p- und q-Arme identisch sind. Solche Chromosomen nennt man *Isochromosomen*.

Genmutationen schließlich entstehen durch Fehler während der Replikation, die dazu führen, dass falsche Nucleotide eingesetzt werden.

Solange diese Mutationen Spacer-Regionen oder Introns betreffen, bleiben sie in der Regel ohne Auswirkungen. Genmutationen, welche sich auf die Exons auswirken, können hingegen, je nachdem, welche Gene betroffen sind, sogar *letal* sein, d.h. die mutierte Zelle ist nicht mehr überlebensfähig und stirbt über kurz oder lang ab. Findet eine solche Mutation in den Keimzellen statt, so wirkt sie sich auf den gesamten damit gezeugten Organismus aus: Meistens kommt es dann nicht einmal zur Geburt. Manche Mutationen in den Exons sind jedoch harmlos. Diese verschiedenen Arten von Mutationen können nicht nur schädlich, sondern sogar nützlich sein: Sie bilden die Grundlage der Evolution. Gäbe es keine Mutationen, so hätten sich nicht aus einem einzigen Urvorgänger alle die verschiedenen Spezies entwickelt, die heute oder in vergangenen Zeiten auf unserem Planeten heimisch sind bzw. waren.

Man unterscheidet zwei Arten von Genmutationen auf DNA-Ebene, die zu einem veränderten Genprodukt führen: Werden nur eine einzige oder vereinzelte Nucleotide ausgetauscht, so spricht man von einer *Punktmutation*; wurden hingegen mehrere aufeinander folgende Aminosäuren verändert, handelt es sich um eine *Blockmutation*.

Offenbar treten Genmutationen ohne äußere Einwirkungen recht häufig von selbst auf; man bezeichnet sie dann als *Spontanmutationen*. Meist betreffen sie aber nur einzelne Körperzellen oder werden während der Replikation durch den Proof-reading-Mechanismus erkannt und rückgängig gemacht.

Von *induzierten Mutationen* spricht man, wenn sie nach Einwirkung einer mutagenen Substanz oder eines mutagenen Mechanismus, z.B. ionisierender Strahlung, aufgetreten sind. Tatsächlich lösen aber Phänomene wie Radioaktivität die Mutationen nicht unmittelbar aus, sondern erhöhen nur die Häufigkeit von Spontanmutationen.

2. Humangenetische Vererbungslehre

Die Vererbungslehre ist bereits etwas älter als die moderne Molekulargenetik. Ihre Regeln wurden im Prinzip schon im 19. Jahrhundert durch den Brünner Mönch *Gregor Mendel* entdeckt. Ohne näher auf die Experimente einzugehen, an Hand derer Mendel diese Regeln aufstellte, möchten wir kurz die für die Humangenetik relevanten Vererbungsmechanismen erläutern.

Zunächst unterscheidet man, je nachdem, ob ein Gen auf einem Autosom oder dem X-Chromosom sitzt, zwischen *autosomaler* und *X-chromosomaler* Vererbung. Auf dem Y-Chromosom gibt es beim Menschen nur sehr wenige Gene. Das wichtigste ist der *Testis determinierende Faktor*, es löst die Differenzierung der Geschlechts-Stammzellen zu Hoden aus.

Gene existieren in verschiedenen "Versionen", welche man als *Allele* bezeichnet; wir erwähnten dies bereits, als wir den Begriff des DNA-Polymorphismus einführten. Jedes Allel führt zu einem leicht veränderten Genprodukt (Protein); Genprodukte verschiedener Allele ein- und desselben Gens erfüllen in der Regel ihre Funktion in unterschiedlichem Maße, können manchmal aber auch eine etwas andere Funktion haben oder überhaupt funktionslos sein.

Da der Chromosomensatz beim gesunden Menschen doppelt vorliegt (je ein gleichartiges, *homologes* Chromosom stammt von der Mutter, das andere vom Vater), hat man die meisten Gene in zweifacher Ausführung. Liegt beide Male das gleiche Allel vor, so spricht man von *Homozygotie*, andernfalls von *Heterozygotie*. Kommt ein Gen jedoch im gesamten (doppelten) Chromosomensatz nur einmal vor, bezeichnet man diesen Zustand als *Hemizygotie*. Hemizygot sind z.B. Männer für Gene, welche X-chromosomal vererbt werden, da sie ja nur ein X-Chromosom besitzen.

Ist ein Individuum nun für ein bestimmtes Gen heterozygot, so lassen sich drei Fälle unterscheiden:

- Beide Allele führen zu denselben Genprodukten, die auch im homozygoten oder hemizygoten Träger des jeweiligen Allels erzeugt werden. Man spricht dann von einem *codominanten* Erbgang.
- Keines der beiden Allele führt zu denselben Genprodukten, die auch im homozygoten oder hemizygoten Träger des jeweiligen Allels erzeugt werden. Stattdessen entsteht ein neues Produkt, welches oftmals als eine Art Zwischenprodukt betrachtet werden kann, weil es Merkmale der regulären Produkte beider Allele trägt. Man spricht dann von einem *intermediären* Erbgang.
- Ein Allel führt zu demselben Genprodukt, das auch in seinem homozygoten oder hemizygoten Träger erzeugt wird; das andere Allel wird hingegen überhaupt nicht exprimiert. Das erste Allel nennt man in diesem Fall *dominant*, das zweite *rezessiv*.

Rezessive Allele werden nur bei homo- oder hemizygoten Trägern exprimiert.

Ein Beispiel für eine Krankheit mit codominantem Erbgang ist die *Sichelzellenanämie*. Ihr ist im Kapitel über das Hämoglobin ein eigener Abschnitt gewidmet.

Das Allel für den *erblichen Veitstanz (Chorea Huntington)* ist dominant. Es genügt, dieses Allel von nur einem Elternteil geerbt zu haben, und man wird unweigerlich erkranken.

Normalerweise treten dominant vererbte Krankheiten eher selten auf, weil kranke Individuen von potentiellen Partnern erkannt werden und der Sexualkontakt mit ihnen vermieden wird (*Selektionsnachteil*). Die Chorea Huntington stellt jedoch eine Ausnahme dar, weil die ersten Symptome (massive Koordinationsprobleme, geistige Retardierung) erst im vierten Lebensjahrzehnt, also eine lange Zeit nach der Erlangung der Geschlechtsreife, manifest werden. Bis dahin scheinen die Träger des kranken Allels völlig gesund zu sein (sofern sie nicht auch an anderen Krankheiten leiden). Das ist der Grund, warum die Chorea Huntington in einigen Regionen weit verbreitet ist. Im Norden Venezuelas gibt es sogar einen Landstrich, in

dem fast die gesamte Bevölkerung Träger des Chorea-Allels ist; diese Menschen dürften alle von einer einzigen kranken Person abstammen, die vor einigen Jahrhunderten aus Europa eingewandert ist.

Hingegen sind heterozygote Träger rezessiver Krankheitsgene völlig gesund. Paaren sie sich jedoch mit einem anderen heterozygoten Träger desselben Krankheitsallels, so wird, statistisch gesehen, voraussichtlich ein Viertel ihrer Nachkommen homozygot und daher krank sein; paaren sie sich mit einem homozygoten Träger, also einem Kranken, wird sogar nur die Hälfte der Kinder gesund sein.

Krankheiten mit rezessivem Erbgang sind der Grund, warum Verwandtenehen sehr risikoreich sind. Denn hier ist es wahrscheinlicher, dass zwei nach außen gesunde, heterozygote Träger desselben Krankheitsgens aufeinander treffen und ein krankes Kind zeugen.

Besonders interessant sind X-chromosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen wie die *Bluterkrankheit (Hämophilie)* oder die *Rot-Grün-Blindheit*. Bei Frauen verhalten sie sich wie autosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen und treten dementsprechend selten auf. Männer hingegen sind für X-chromosomal vererbte Gene hemizygot. Somit genügt das Vorhandensein *eines* krankhaften Allels, und der Träger wird unweigerlich erkranken.

Da ein Mann sein X-Chromosom stets von seiner Mutter erbt, ist es aus diesem Grund enorm wichtig, bei Fortpflanzungsabsicht die X-Chromosome der Frau vorher auf Krankheits-Allele zu untersuchen. Umgekehrt besteht bei einem beispielsweise an Hämophilie erkrankten Vater *keinerlei* Risiko, dass seine Kinder ebenfalls diese Krankheit bekommen werden, vorausgesetzt, die Mutter ist nicht Trägerin desselben Krankheitsallels.

Dabei ist aber stets zu berücksichtigen, dass es vor und nach der Geburt zu spontanen oder induzierten Mutationen kommen kann, welche Krankheiten hervorrufen können. Es gibt einige äußerst seltene genetische Erkrankungen wie etwa die *frühzeitige Vergreisung (Progerie)*, eine Hemmung des die Telomere stabilisierenden Enzyms *Telomerase*, welche vorwiegend durch solche pränatalen Mutationen hervorgerufen werden. Dieses Restrisiko lässt sich auch mit sorgfältiger Partnerwahl und humangenetischen Untersuchungen (z.B. durch die Genetische Beratungsstelle des Instituts für Medizinische Biologie der Medizinischen Universität Wien) vor der Zeugung nicht eliminieren.

3. Methoden der Gentechnik

Unter dem Begriff Gentechnik (auch: *Rekombinationstechnik, genetic engineering*) versteht man jene gentechnologischen Methoden, die der Analyse und Modifikation von DNA, RNA oder Proteinen dienen. Keine von ihnen ist älter als einige wenige Jahrzehnte. Die Gentechnik steckt noch mitten in der Entwicklung. Ständig werden neue Verfahren entwickelt, die eine spürbare Performance-Steigerung mit sich bringen. Die größte Revolution war freilich die Erfindung der *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)* in den 80er Jahren des 20. Jahrhunderts. Erst sie hat eine effiziente Untersuchung des Genoms ermöglicht.

Im Folgenden werden einige der meistbenutzten Verfahren vorgestellt.

3.1 Gel-Elektrophorese

Für viele Verfahren (z.B. *Southern-Transfer, Sequenzierung*) ist es notwendig, DNA-Fragmente nach ihrer Länge zu sortieren. Dazu bedient man sich der Gel-Elektrophorese.

Bei einem Gel handelt es sich um ein Polymer aus organischen Substanzen wie *Agarose* oder *Acrylamid*. Es dient als Unterlage. Die DNA wird nun an den Rand des Gels gegossen und eine elektrische Spannung angelegt: Der Minuspol befindet sich dabei in der Nähe des Orts, an dem die DNA aufgetragen wurde, und der Pluspol auf der gegenüber liegenden Seite. Die DNA ist negativ geladen. Aus diesem Grund wird sie von negativen Ladungen abgestoßen, von positiven angezogen und wandert somit von minus nach plus.

Die Geschwindigkeit der Wanderung nimmt mit zunehmender Größe des Moleküls, d.h. mit zunehmender Anzahl von Nucleotiden, ab. Die kleinsten Moleküle erreichen den Pluspol zuerst, die größten zuletzt. Lässt man die Elektrophorese daher einige Zeit laufen – so lange, dass sich nicht mehr alle Fragmente nahe der Ausgangsposition befinden, aber auch noch nicht alle den Pluspol erreicht haben –, so lassen sich die einzelnen Fragmente relativ deutlich voneinander unterscheiden.

Um die DNA im Gel sichtbar zu machen, macht man von physikalischen Methoden wie der *Fluoreszenzfärbung* Gebrauch.

3.2 Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind *Endonucleasen* mit der Fähigkeit, DNA an bestimmten Stellen zu schneiden. Sie sind für die Gentechnik von essentieller Bedeutung, weil es praktisch nur mit ihrer Hilfe möglich ist, bestimmte Nucleotidsequenzen aus der DNA zu entfernen und durch andere zu ersetzen.

Jedes Restriktionsenzym setzt an einer für das Enzym spezifischen Nucleotidsequenz an. In der Regel handelt es sich um *palindromische* Sequenzen¹. Das sind solche Sequenzen, die auf dem einen Strang von 5' nach 3' und auf dem anderen von 3' nach 5' gelesen gleich lauten.

Diese Sequenzen müssen also zu sich selbst komplementär sein. Daraus folgt, dass sie aus einer geraden Anzahl von Nucleotiden bestehen müssen, wobei, wenn n für die Gesamtlänge der Nucleotidsequenz steht, das erste Nucleotid den Index 0 und das letzte den Index $n-1$ hat, das Nucleotid an der Position i zu jenem an der Position $n-i$ komplementär sein muss. Ein Beispiel für eine solche Nucleotidsequenz ist GAACGTTTC.

Restriktionsenzyme können die DNA auf zwei verschiedene Arten teilen: Sie können *blunt ends* (stumpfe Enden) oder *sticky ends* (klebrige Enden) erzeugen.

¹ In der Sprachwissenschaft versteht man unter dem Begriff *Palindrom* Wörter, die sowohl von vorne nach hinten als auch von hinten nach vorne gelesen Sinn ergeben, z.B. Esel / lese und Regen / Neger.

Bei blunt ends wird die DNA genau in der Mitte der palindromischen Nucleotidsequenz geteilt. In unserem Beispiel werden aus dem einen Strang die Teilstränge mit den Enden GAAC und GTTC, aus dem anderen CTTG und CAAG.

Sticky ends entstehen hingegen, wenn der Doppelstrang nicht gerade durchgeschnitten wird, sondern so geteilt wird, dass überhängende Enden entstehen. Auf diese Weise entstehen Teilstränge mit unterschiedlicher Länge, z.B. G und AACGTTC bzw. CTTGCAA und G. Die DNA-Enden sind somit stellenweise einsträngig.

Sticky ends haben gegenüber blunt ends den Vorteil, dass es wesentlich leichter ist, die Stränge wieder zu verbinden (zu *ligieren*). Fremd-DNA kann damit leichter eingebracht werden, sofern diese zum einzelsträngigen Teil der DNA komplementär ist. Die Bindung zwischen dem eingebrachten *Insert* und den Nachbarnucleotiden der Schnittstelle wird durch das Enzym Ligase bewerkstelligt.

Es gibt zig Restriktionsenzyme, die in der Gentechnik Verwendung finden. Um nur wenige Beispiele zu nennen: *EcoRI* und *EcoRV* des Bakteriums *Escherichia coli* sowie *BamHI* und *Sau3A*.

In der Natur besteht die Funktion der Restriktionsenzyme in der Abwehr von Viren, die Bakterien befallen (*Bakteriophagen*). Diese befallen eine Zelle, indem sie ihre eigene genetische Information in das Genom des Bakteriums oder in sein(e) Plasmid(e) einbringen. (Bei Viren, welche in RNA-Form vorliegen, geschieht dies mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Es dient der Umwandlung von RNA in DNA. Diese Viren bezeichnet man auch als *Retroviren*.) Die Restriktionsenzyme schneiden nämlich nur dann Sequenzen heraus, wenn diese nicht ein bestimmtes *Methylierungsmuster* aufweisen. So kann sie die dem Bakterium eigene DNA von viraler Fremd-DNA unterscheiden.

Indem man eine Nucleotidsequenz mit mehreren Restriktionsenzymen schneidet und die Fragmente mit Hilfe von Gel-Elektrophorese auftrennt, kann man eine *Restriktionskarte* erstellen. Das ist eine Übersicht über die Positionen der Schnittstellen verschiedener Restriktionsenzyme in der gegebenen DNA. Die *Restriktionskartierung* ist eine relativ effiziente Methode, um einen ersten, groben Überblick über eine Nucleotidsequenz zu erhalten.

Unter *Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP)* versteht man eine Variabilität der Länge von *Restriktionsfragmenten*; Restriktionsfragmente sind Teilsequenzen, welche von Schnittstellen von Restriktionsenzymen umgeben sind. Die Ursache des RFLP besteht in Veränderungen auf DNA-Ebene wie Punktmutationen, kleinen Insertionen oder Deletionen. Beim Menschen sind einige hundert RFLPs bekannt. Sie lassen sich mit Hilfe der Restriktionskartierung leicht nachweisen.

3.3 Denaturierung und Hybridisierung

Da es sich bei Wasserstoffbrücken nicht um Haupt-, sondern um Nebervalenzbindungen handelt, ist die Bindung zwischen den Nucleotidbasen zweier DNA-Stränge nur schwach. Durch chemische Einwirkung oder Erhitzen können die beiden Stränge einer Doppelhelix getrennt werden. Dieser Prozess heißt *Denaturierung*.

Bei Abkühlung können sich komplementäre Einzelstränge wieder vereinen. Man spricht dann von *Renaturierung*. Nicht komplementäre Stränge vereinen sich hingegen nicht. Dies ist die Grundlage einer der wichtigsten Methoden, um bestimmte Nucleotidsequenzen zu erkennen: Hat man einen Einzelstrang definierter Herkunft, so kann man prüfen, mit welchem Einzelstrang er sich verbindet (*hybridisiert*); dieser Strang muss zu ihm komplementär sein.

3.3.1 In-situ-Hybridisierung

Die In-situ-Hybridisierung (lateinisch für Vor-Ort-Hybridisierung) ermöglicht es, mit einem Mikroskop oder mit Hilfe einer Photoplatte festzustellen, ob sich ein Gen in einer bestimmten Probe wie einem Gewebe befindet. Dazu muss die Nucleotidsequenz dieses Gens physisch

vorhanden sein; dies lässt sich durch *Klonierung*, also durch Kopie aus einer DNA-Sequenz, erreichen. Daraus wird durch Markierung eine Sonde hergestellt.

Parallel behandelt man Zellisolate mit einem Fixiermittel und heftet sie an einen Objektträger. Durch Hinzufügen des Enzyms *Ribonuclease* und der starken Base *Natriumhydroxid (NaOH)* werden die eventuell vorhandene m-RNA, t-RNA und r-RNA abgebaut und die DNA denaturiert. Dann wird eine Probe des klonierten und markierten Gens dem Präparat zugesetzt. Das klonierte Gen und sein Gegenstück auf dem Chromosom hybridisieren nun miteinander das bedeutet, dass sich die markierte Sonde an das komplementäre DNA-Stück anlagert..

Bei radioaktiver Markierung wird nun eine Photoplatte auf den Objektträger gelegt – ist das Gen vorhanden, wird dadurch ein schwarzer Fleck auf der Photoplatte verursacht (*Autoradiographie*). Arbeitet man mit Fluoreszenzmarkierung, so benötigt man ein spezielles Lichtmikroskop zur Detektion. Letztere Methode heißt *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)*. Indem man unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, lassen sich auch mehrere Gene gleichzeitig nachweisen.

3.3.2 Nucleinsäurehybridisierung

Zwei einzelsträngige Nucleinsäuremoleküle haben die Fähigkeit, Basenpaarungen miteinander auszubilden. Wenn die Polynucleotide zueinander komplementär sind, entsteht auf diese Weise ein stabiler Doppelstrang. Bei DNA-Molekülen bildet sich eine Doppelhelix. Mit dieser Hybridisierung kann man einen bestimmten rekombinanten Klon identifizieren, wenn man eine DNA-Sonde besitzt, die zu dem gesuchten Klon komplementär ist.

Mit dieser Methode lassen sich auch rekombinierte DNA-Moleküle in Bakterienkolonien und Bakteriophagenplaques nachweisen. Zuerst überträgt man die Kolonien oder Plaques auf eine Nitrocellulose- oder Nylon-Membran und behandelt sie so, dass alle Verunreinigungen entfernt werden und nur die DNA vorliegt. Eine solche Behandlung führt zur Denaturierung der DNA.

Nach zwei Stunden kann man diese Moleküle fest an die Membran binden, bei Nitrocellulose durch kurzes Erhitzen auf ca. 80°C und bei Nylon durch UV-Bestrahlung. Dabei werden die Moleküle mit ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat an die Membran geheftet, so dass die Basen frei bleiben. Nun muss man die Sonde markieren, durch Erhitzen denaturieren und zusammen mit einer Lösung von Substanzen, welche die Nucleinsäurehybridisierung begünstigen, auf die Membran bringen.

Man kann die Hybridisierungssonde sowohl radioaktiv als auch nichtradioaktiv markieren. Das radioaktive Markierungsverfahren ist aber gefährlich und wegen der Probleme mit der Entsorgung radioaktiver Abfälle unbeliebt.

Bei der nichtradioaktiven Markierung greift man meistens auf zwei Methoden zurück. Bei der ersten benutzt man *Desoxyuranosintriphasphat-Nucleotide (dUTP)*, die durch eine Reaktion mit *Biotin* abgewandelt worden sind. Biotin ist ein organisches Molekül, das eine sehr hohe Affinität zum Protein *Avidin* besitzt. Nach der Hybridisierung kann man die Positionen der gebundenen, biotinmarkierten Sonden bestimmen, indem man das Filter mit einem fluoreszierenden Marker gekoppeltem Avidin wäscht.

Bei dem zweiten Verfahren koppelt man die DNA-Sonde mit dem Enzym *Meerrettichperoxidase*. Zum Nachweis bedient man sich der Fähigkeit des Enzyms, die chemische Substanz *Luminol* so umzusetzen, dass dabei *Chemolumineszenz* entsteht. Das Signal kann man auf einem normalen photographischen Film festhalten. Am häufigsten wird die Markierung mit *Digoxigenin (DIG)* verwendet.

3.3.3 Selektion

Selektion wird z.B. benötigt, um zwei Dinge festzustellen: erstens, ob eine Bakterienkolonie tatsächlich ein als Vektor dienendes Plasmid aufgenommen hat, und zweitens, ob dieser Vektor tatsächlich auch das gewünschte Gen enthält.

Eine einfache Methode der direkten Selektion besteht darin zu untersuchen, ob ein Plasmid mit einem Gen aufgenommen wurde, welches dem Bakterium Resistenz gegen ein bestimmtes Antibiotikum verleiht, z.B. *Ampicillin*. Dazu überträgt man die Bakterien nach der Transformation auf Nährboden, welche dieses Antibiotikum enthalten, so dass nur die Bakterien, die rekombinante Plasmide aufgenommen haben, überleben.

Um zusätzlich festzustellen, welche Plasmide mit hoher Wahrscheinlichkeit auch tatsächlich das Gen aufgenommen haben, bedient man sich eines weiteren Tricks: Die Vektoren sind so konzipiert, dass bei Aufnahme eines fremden Gens (*Ligation*) ein Gen überschrieben wird, was mit chemischen Methoden sichtbar gemacht werden kann.

Ein Beispiel ist das Gen für das Enzym *Beta-Galactosidase*. Dieses reagiert mit Luftsauerstoff und *5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactopyranosid (X-Gal)* zu einem deutlich blau gefärbten Molekül, dem *5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo*. Ist ein Plasmid so designt, dass das Gen für die Beta-Galactosidase bei der Ligation überschrieben wird, bleiben die Bakterien hingegen farblos. Somit lassen sie sich sehr gut von denen unterscheiden, die kein inserthaltiges Plasmid aufgenommen haben. Voraussetzung ist freilich, dass der Nährboden X-Gal enthält.

3.4 Untersuchung klonierter Gene

Die drei wichtigsten Typen von Methoden, mit denen man den Aufbau eines Genoms untersuchen kann, sind:

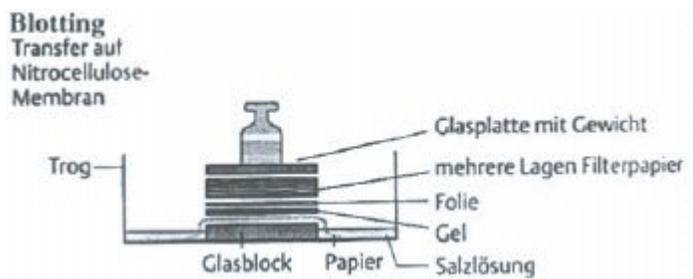
- Methoden, um die Position eines Gens in einem größeren DNA-Molekül zu ermitteln;
- Methoden zur DNA-Sequenzierung (siehe hierzu ein eigenes Kapitel);
- Methoden, um mit Hilfe eines klonierten Gens die Gesamtstruktur des Genoms zu untersuchen, zu dem es normalerweise gehört.

Bei kleinen Molekülen wie Plasmiden und *Bakteriophagen* (Viren, die Bakterien befallen) wird eine andere Methode zur Lokalisierung eines Gens angewendet als bei Genen in eukaryontischen Chromosomen.

Sobald der Klon vorliegt, möchte man wissen, in welchem der EcoRE-Fragmente sich das Gen befindet. Zuerst muss man die mit EcoRE behandelte DNA in einem Agarose-Gel elektrophoretisch auftrennen, so dass man die einzelnen Fragmente erkennen kann. Das rekombinierte Molekül soll dabei markiert und als Sonde für Restriktionsfragmente benutzt werden. Dies kann erreicht werden, solange sich die Fragmente noch im Elektrophorese-Gel befinden.

Weil die Gelsubstanz selbst zu einer starken unspezifischen Hintergrundhybridisierung führt, die das spezifische Hybridisierungssignal überdeckt, muss man die Banden auf eine Membran aus Nitrocellulose oder Nylon übertragen. Diese stellt für die Hybridisierung ein wesentlich saubereres Umfeld dar.

Die Übertragungsmethode wurde 1975 von *E.M. Southern* entwickelt und heißt deshalb heute *Southern-Transfer* oder *Southern-Blot*. Man legt die Membran auf das Gel und saugt eine Pufferlösung hindurch, welche die DNA mitnimmt und aus dem Gel auf die Membran überträgt, wo die Fragmente gebunden werden.



Es gibt raffinierte Geräte, die diesen Vorgang vereinfachen. Im Praktikum haben wir allerdings eine selbst gebastelte Anordnung mit vielen Papiertüchern verwendet. Die gleiche Methode kann man auch für die Übertragung von RNA-Molekülen anwenden. Dann heißt sie *Northern Blot* (was freilich nichts mit irgendeinem Herrn oder einer Dame namens Northern zu tun hat). Wenn Proteine übertragen werden, nennt man die Methode *Western Blot*.

Durch den Southern-Blot erhält man eine Membran mit einem Abklatsch der DNA-Banden aus dem Agarose-Gel. Wenn man nun die markierte Sonde zusetzt, findet die Hybridisierung statt und es zeigt sich, welches Restriktionsfragment das klonierte Fragment enthält.

Mit dem Southern-Transfer kann man auch die genaue Position eines klonierten Gens innerhalb eines rekombinierten DNA-Moleküls ermitteln. Dies ist wichtig, denn oftmals ist das klonierte DNA-Fragment relativ lang, z.B. bei Cosmidvektoren (Plasmid mit Verpackungssequenzen des E.Coli-Virus Lambda) bis zu 40 kbp, während das gesuchte Gen, das irgendwo innerhalb dieses Abschnitts liegt, vielleicht noch nicht einmal 1 kbp umfasst.

3.5 DNA-Amplifikation und Polymerase-Kettenreaktion

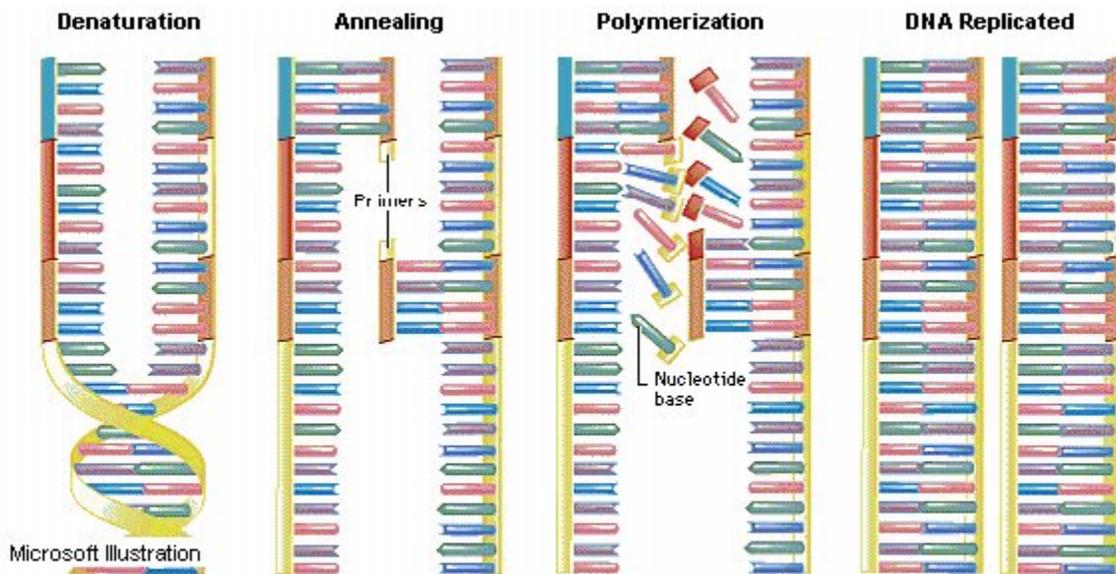
Mittels eines Systems aufeinander folgender DNA-Synthesen kann ein DNA-Abschnitt vermehrt (*amplifiziert*) werden, ohne lebende Zellen zu verwenden. Diese Vermehrungstechnik heißt *Polymerase-Kettenreaktion* (*polymerase chain reaction, PCR*). So kann ein DNA-Abschnitt millionenfach angereichert werden, damit er in ausreichender Menge für Untersuchungen vorliegt.

Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei zeitlich genau aufeinander abgestimmten Reaktionen, für die verschiedene Temperaturen erforderlich sind: Denaturierung, Hybridisierung (manchmal auch *Annealing* genannt) und *Inkubation* (*Polymerisation*).

Die durch Denaturierung entstandenen Einzelstränge dienen als Vorlage zur Synthese neuer DNA. Meistens wird zur Denaturierung eine Temperatur von 95°C oder 368,15 K verwendet.

Danach folgen Abkühlung und die Hybridisierung mit dem Primer. Der Primer wird meistens synthetisch hergestellt und hat eine Länge von ungefähr 20 Basen.

Die Inkubation erfolgt mit Hilfe der DNA-Polymerase und vier *Desoxynucleosidtriphosphaten* (*dNTP*). Die Polymerase heftet sich ans 3'-OH-Ende der Primer an. Da die PCR wegen des Schrittes der Denaturierung unter hohen Temperaturen abläuft, bei denen normale Polymerasen gerinnen (*koagulieren*) würden, muss eine spezielle, hitzestabile Polymerase verwendet werden, z.B. die *Taq-Polymerase* des Bakteriums *Thermophilus aquaticus*.



Aus: MS Encarta 98

Die Vorgänge der Denaturierung, Hybridisierung und Inkubation werden zyklisch wiederholt. Bei jedem Zyklus dient die gesamte zu diesem Zeitpunkt vorhandene DNA als Vorlage und wird verdoppelt. So kommt es zur *exponentiellen* Amplifikation: In nur 25 Zyklen kann eine Sequenz 4 Millionen mal amplifiziert werden.

Die Länge der Sequenz hängt von der Entfernung der Stellen in der DNA, welche zu den Primern komplementär sind, ab; sie kann bis zu 10000 bp betragen.

Diese Methode ist in der medizinischen Genetik zu einem der wichtigsten Verfahren geworden, weil sie es gestattet, auch geringe Ausgangsmengen zu analysieren. Auch in der Kriminalistik wird die DNA aus kleinsten Spuren von Blut, Spermazellen oder Speichel mittels PCR vervielfältigt, so dass nach Restriktionsverdau Zuordnungen zu einzelnen Individuen getroffen werden können.

3.6 Sequenzierung

Zur Sequenzierung einer Nucleotidsequenz verfährt man heute meistens nach der enzymatischen Methode nach *Frederick Sanger* (Nobelpreis 1980). Dabei handelt es sich um eine spezielle Art der DNA-Replikation mit Hilfe von *Didesoxynucleotiden*. Diesen Nucleotiden fehlt am 3'-Ende ein Sauerstoffatom, so dass die Polymerase beim Einsetzen dieser Nucleotide keine Phosphodiesterbindung zum nächsten Nucleotid bilden kann; somit hört die Replikation auf, sobald ein Didesoxynucleotid eingebaut worden ist.

Man amplifiziert zunächst die zu sequenzierende DNA mit Hilfe von PCR und teilt das Produkt auf vier Probegefäße auf. In jedes dieser Gefäße kommt neben Puffern, Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiven Markern sowie der DNA, Polymerase, Primern und *dNTP* jeweils eine Art von *Didesoxynucleosidtriphosphaten* (*ddNTP*): ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP. Dadurch wird erreicht, dass unterschiedlich lange Fragmente repliziert werden, wobei jedes Fragment mit dem jeweiligen Didesoxynucleotid endet.

Je nachdem, von welcher Seite ausgehend sequenziert werden soll, verwendet man entweder vorwärts laufende oder reverse Primer (z.B. *M13-Forward Primers*, *M13-Reverse Primers*). Moderne Sequenzierer besitzen zwei Laser, die Licht verschiedener Wellenlängen emittieren und es so gestatten, beide Arten von Primern gleichzeitig zu verwenden, so dass man beide Stränge simultan von 3' nach 5' sequenzieren kann.

Mit *Gel-Elektrophorese* ordnet man nun die Fragmente nach ihrer Größe. Dazu bringt man den Inhalt jedes Gefäßes in eine eigene Säule mit *Acrylamid* und *Harnstoff*, der auf DNA eine denaturierende Wirkung ausübt, als Unterlage und legt eine elektrische Spannung an. Da die DNA negativ geladen ist, wandert sie vom Minus- zum Pluspol; je kürzer das Fragment ist, desto früher erreicht es den Pluspol. Nach einigen Stunden lassen sich somit die einzelnen Fragmente gut voneinander unterscheiden. Man liest nun das so entstandene Bandenmuster von plus nach minus ab. Im Regelfall unterscheiden sich zwei aufeinander folgende Banden nur durch ein einziges, hinzutretendes Nucleotid. Da man weiß, mit welchen Didesoxynucleotiden die Fragmente in den einzelnen Säulen enden müssen, kann man auf diese Weise die Sequenz ablesen.

Dies braucht heutzutage nicht mehr manuell zu geschehen, sondern kann von einem Computer bewerkstelligt werden. Hierzu wird das Gel mit Hilfe eines Lasers abgetastet, die Bildinformation digitalisiert (*eingescannt*) und anschließend durch ein Programm ausgewertet. Softwaretechnisch ist die Auswertung mit Hilfe eines *Interpolationsalgorithmus* realisiert. Oft ist aber eine manuelle Nachbearbeitung erforderlich, wenn die Kontrastunterschiede oder Abstände zwischen zwei Banden nur undeutlich ausfallen. Hier ist die Erfahrung des auswertenden Wissenschaftlers gefragt.

Möglicherweise ließe sich der Arbeitsaufwand aber in Zukunft durch Methoden der *Artificial Intelligence (AI)* reduzieren.

4. Gentherapie

Die Gentechnologie eröffnet für Human- und Veterinärmedizin völlig neue Möglichkeiten der Heilung. Mit ihr lassen sich möglicherweise endlich Krankheiten heilen, welche bislang als unheilbar galten, wie etwa die Sichelzellenanämie, die *zystische Fibrose (Mukoviszidose)*, *AIDS* und *Krebs*.

Man unterscheidet zwei Arten der Gentherapie: die *somatische Therapie* und die *Keimbahntherapie*.

Bei der somatischen Therapie werden nur Zellen des erkrankten Gewebes, in welchen das krankhafte Allel exprimiert wird, gentechnisch manipuliert. Der restliche Körper bleibt genetisch unverändert.

Es gibt nach unserem Kenntnisstand heute keine ethischen Bedenken gegen die somatische Therapie. Ihr Vorteil besteht darin, dass sie rasch wirkt. Der Nachteil: Sie ist äußerst schwer anzuwenden. Es müssen einzelne Zellen extrahiert, *in vitro* gentechnisch manipuliert und dann wieder eingesetzt (*implantiert*) werden. Nur in äußerst seltenen Fällen werden sich allerdings alle Zellen, welche das krankheitserregende Protein produzieren, auf diese Weise behandeln lassen: Es sind einfach zu viele. Man kann also nur einen Teil der Zellen "reparieren". Ob dies ausreicht, wird von Fall zu Fall verschieden sein.

Effektiver ist die Keimbahntherapie. Sie wirkt sich allerdings nicht auf den Kranken selbst, sondern nur auf dessen noch ungezeugte Nachkommen aus. Man ersetzt die krankhaften Allele in den Keimzellen (*Gonaden*) durch gesunde, so dass die krankhaften Allele nicht mehr weitervererbt werden. Hier bestehen massive ethische Bedenken, vor allem von Seiten der Kirchen, welche diese Art der Gentherapie als Eingriff in die göttliche Schöpfung betrachten.

Eine andere Art der Therapie, die durch die Gentechnologie ermöglicht wird, ist die *Stammzellentherapie*. Indem noch völlig undifferenzierte (*totipotente*) oder nur wenig differenzierte Stammzellen dem Menschen entnommen, kloniert und künstlich am Leben erhalten werden, gewinnt man eine Reserve, aus der sich (beinahe) beliebiges neues, körpereigenes Gewebe erzeugen lässt. So können nach Unfällen z.B. abgetrennte Arme wieder ersetzt werden, ohne dass man mit Prothesen arbeiten muss oder das Risiko einzugehen braucht, dass Implantate von fremden Körpern abgestoßen werden oder gar zu gefährlichen Infektionen führen.

Es gibt zwei Arten von Stammzellen: adultes und embryonales. Die ethische Debatte entzündet sich vor allem an den embryonalen Stammzellen. Diese werden als zukunftsfruchtig betrachtet, weil sie tatsächlich totipotent sind. Das bedeutet aber auch, dass sich aus ihnen theoretisch vollwertige Menschen entwickeln könnten. Viele Moraltheologen und -philosophen betrachten es als Verstoß gegen den Grundsatz der Menschenwürde, Lebensformen mit dem Potenzial, sich zu einem menschlichen Wesen zu entwickeln, an ihrer Entwicklung zu hindern.

Ebenfalls kontroversiell ist die *Pränataldiagnostik*. Hier wird der Fetus kurz nach der Verschmelzung von Ei- und Samenzelle genetisch untersucht. Falls Erbkrankheiten festgestellt werden, können die Eltern entscheiden, ob sie das Kind trotzdem empfangen oder aber abtreiben wollen. So gut wie alle geistlichen, aber auch viele weltliche Ethiker lehnen Abtreibung, also Tötung ungeborenen Lebens, strikt ab.

Eine spezielle Variante der Pränataldiagnostik ist die *Präimplantationsdiagnostik*. Diese kann bei künstlicher Befruchtung (*In-Vitro-Fertilisation*) angewandt werden. Ei- und Samenzelle werden an Hand ihrer genetischen Merkmale ausgewählt, noch bevor es zur Verschmelzung kommt.

Schließlich hat die moderne Genetik und Gentechnologie die Diskussion um die Erbgesundheitslehre (*Eugenik*) neu angefacht, in deren Namen im 20. Jahrhundert viele Verbrechen verübt wurden.

5. Das Hämoglobin

Gegenstand des Praktikums war die Sequenzierung eines Gens, welches einen Bestandteil des *Hämoglobins*, nämlich das *b-Globin*, codiert. Deshalb möchten wir im Folgenden zunächst auf den chemischen Aufbau und die biologische Funktion des Hämoglobins eingehen.

Grob gesprochen, handelt es sich beim Hämoglobin um ein Eiweiß (Protein), welches vor allem dem Transport von Sauerstoff durch den menschlichen oder auch tierischen Organismus dient. Sauerstoff wird in allen Zellen für lebenswichtige Funktionen benötigt.

5.1 Vorkommen

Das Hämoglobin (*Hb*) findet sich im menschlichen Organismus praktisch ausschließlich in den roten Blutkörperchen. Dort liegt es in einer durchschnittlichen Massenkonzentration von 150 Gramm pro Liter (g/l) vor. Genauer: Bei Frauen beträgt der Hämoglobin-Gehalt des Blutes 120 bis 160 g/l, bei Männern 140 bis 180 g/l. In jedem Fall ist er doppelt so hoch wie der der Plasmaproteine (50 bis 80 g/l).

Entdeckt wurde das Hämoglobin im Jahre 1864 von *Hoppe-Seyler*, welcher es nach unserem Wissensstand als erster kristallisierte und benannte.

Die roten Blutkörperchen werden auch *Erythrocyten* genannt. Bei ihnen handelt es sich um sehr kleine Zellen mit einem Durchmesser von 6 bis 9 Mikrometern (μm). In jedem Kubikzentimeter des Blutes befinden sich 5 Milliarden Erythrocyten. Gesunde Erythrocyten, welche vorwiegend Hb A (siehe weiter unten) enthalten, sind kreisrunde, bikonkave Scheibchen; sie erscheinen also in der Mitte eingedellt, als ob ein winziges Wesen sie zwischen Daumen und Zeigefinger zusammengedrückt hätte.

Gebildet werden die Erythrocyten aus Vorläufer-Stammzellen, den Hämocytoplasten. Reife Erythrocyten besitzen weder Zellkerne noch Mitochondrien oder innere Membranen wie das Endoplasmatische Reticulum; somit sind sie unvollständige, rudimentäre Zellen, die sich nicht reproduzieren können. Im menschlichen Körper haben sie eine Lebensdauer von nur etwa 120 Tagen.

Die wesentliche Funktion der Erythrocyten ist der Transport von Hämoglobin. Dieses ist in ihrem *Cytosol* in hoher Konzentration, nämlich ungefähr 34 Massen-%, gelöst.

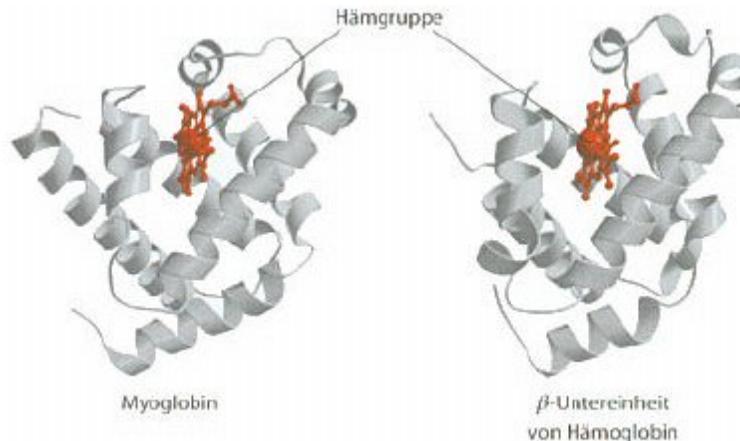
5.2 Chemischer Aufbau

Das Hämoglobin ist ein Protein, das sich aus vier Untereinheiten zusammensetzt; man bezeichnet es daher auch als *Tetramer*. Beim erwachsenen Menschen handelt es sich dabei meistens um je zwei α - und zwei β -*Globine*; wie wir später feststellen werden, setzen sich aber nicht alle Hämoglobin-Moleküle des Menschen aus diesen beiden Globinen zusammen. Zu den Protein-Untereinheiten tritt eine Nicht-Protein-Gruppe hinzu, das *Häm* (Eisen-Protoporphyrin IX). Man bezeichnet solche "hinzutretenden" Gruppen auch als *prosthetische Gruppen*. Jedes Globin trägt ein Häm-Molekül. Das Häm besteht aus einem Eisenatom und einem ringförmigen (zyklischen) Kohlenwasserstoff. Das Ringsystem wird Porphyrin genannt; es enthält vier Pyrrol-Ringe und neun fortlaufend konjugierte Doppelbindungen. Da das Häm Sauerstoff binden kann, ist es für die physiologische Funktion des Hämoglobins essentiell. Den Aufbau des Häms werden wir in einem der folgenden Kapitel genauer besprechen.

Die Tertiärstruktur des Hämoglobins, d.h. seine Faltung oder *Kettenformation*, ähnelt sehr der eines anderen, einfacher gebauten Häm-haltigen Proteins, des *Myoglobins* (*Mb*). Bevor wir den chemischen Aufbau des Hämoglobins im Detail diskutieren, wollen wir uns daher zunächst dem Myoglobin zuwenden.

5.2.1 Das Myoglobin und seine Gemeinsamkeiten mit dem Hämoglobin

Das Myoglobin ist, wie die Vorsilbe "myo" andeutet, ein Protein des Muskels. Es besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 153 Aminosäureresten und einer Häm-Gruppe, die es ihm ermöglicht, Sauerstoff zu binden. Die Polypeptidkette kann in acht Segmente unterteilt werden; das längste besteht aus 23 Aminosäureresten. Die Segmente werden mit den Buchstaben A bis H bezeichnet. Sie weisen die für *globuläre* Proteine charakteristische α -Helix-Struktur auf und sind über gebogene Umkehrschleifen verschiedener Länge miteinander verknüpft. Insgesamt stecken etwa 78% der Aminosäurereste des Myoglobins in diesen α -Helices.



Aus: Nelson, *Lehninger Biochemie*, S. 220

Obwohl sich Hämoglobin und Myoglobin in ihren Aminosäuresequenzen unterscheiden, sind ihre Faltungen einander sehr ähnlich. Da auch zwischen den Globinen verschiedener Tierarten große Ähnlichkeiten bezüglich der Kettenkonformation bestehen, ist zu vermuten, dass in dieser bestimmten Tertiärstruktur eine optimale Anordnung um das Häm-Molekül erreicht wird. Diese Anordnung ermöglicht es dem Häm, in der Lunge Sauerstoff aufzunehmen, ihn während des Transports sicher zu binden und schließlich in den Zellen, welche ihn benötigen, freizusetzen.

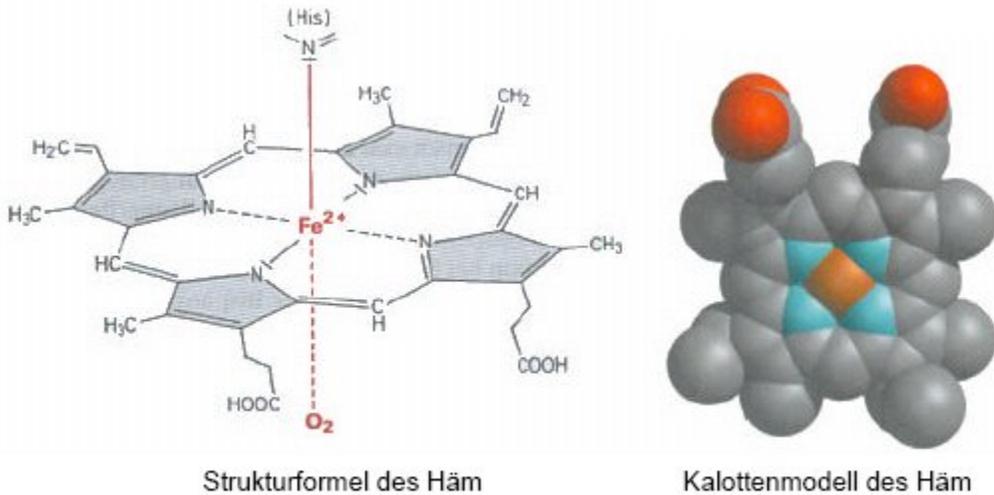
5.2.2 Die Häm-Gruppe (Eisen-Protoporphyrin IX)

Beim Häm handelt es sich um einen *Chelatkomplex*. "Chelat" leitet sich vom altgriechischen Wort *chele* ab, zu deutsch Krepsschere. Ein Chelatkomplex enthält einen mehrzähligen, d.h. aus mehreren Gruppen mit einem freien Elektronenpaar (wie etwa die Aminogruppe NH_2) bestehenden Liganden, welcher ein Zentralatom wie eine Klaue umgreift. Die Anzahl der Ligandenzähne, die an das Zentralatom über Nebervalenzbindungen angelagert werden können, wird durch dessen Koordinationszahl bestimmt; diese hängt wiederum von seiner Oxidationszahl (Wertigkeit) ab.

Beim Häm ist das Zentralatom Eisen-II (Fe^{2+}) und der mehrzählige Ligand das *Porphyrin*; wegen dieser chemischen Zusammensetzung heißt das Häm auch Eisen-Protoporphyrin IX. Porphyrin ist ein zyklisches, organisches Molekül, welches aus vier miteinander verbundenen, substituierten Pyrrolringen besteht. Jeder dieser vier Pyrrolringe wird an das Eisen gebunden. Porphyrin gehört zu den aromatischen Kohlenwasserstoffen; über den eben gebauten (planaren) Ring sind 18 delokalisierte π -Elektronen verteilt.

Da das Eisen-II die Koordinationszahl 6 hat, können noch zwei weitere Substanzen gebunden werden. Diese lagern sich ober- bzw. unterhalb der Ebene des Porphyrinrings an. Bei der einen Substanz handelt es sich um einen Aminosäurerest des Globins, genauer gesagt den Imidazolring eines Restes der basischen Aminosäure Histidin, welcher an eines der α -Helix-Segmente des Proteins gebunden ist; man nennt diesen Rest auch *proximales* (nahes) Histidin.

Die andere Stelle bestimmt die Funktion des Proteins. Hier kann u.a. das Sauerstoffmolekül (O_2) gebunden werden, welches im Blut transportiert werden soll. Es können dort aber auch Kohlendioxid (CO_2) und andere Stoffe angelagert werden. Beim CO_2 ist dies sinnvoll, weil auch der Abtransport des CO_2 eine wichtige physiologische Funktion des Hämoglobins darstellt. Werden jedoch andere Stoffe wie etwa Kohlenmonoxid (CO) gebunden, kann dies zu Fehlfunktionen, Krankheiten und im Extremfall sogar zum Verlust des Lebens führen (siehe weiter unten).



Aus: Karlson, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, S. 37;
Nelson, *Lehninger Biochemie*, S. 215

In der unmittelbaren Nähe des sauerstoffbindenden Zentrums des Häm befindet sich der Imidazolring eines weiteren Histidin-Rests. Offenbar dient er dem Schutz dieser Stelle des Häm durch *sterische Hinderung*. Sterische Hinderung bedeutet, dass zwei Teile eines Moleküls den gleichen Raumbereich beanspruchen; dadurch steigt die Energie, die benötigt wird, um einen der beiden Teile in diesen Bereich zu bringen. Auf diese Weise werden Schadstoffe wie CO daran gehindert, sich so fest an die Häm-Gruppe zu binden, wie dies normalerweise der Fall wäre.

Im Prinzip sind diese beiden, auf Grund des Faltungsmusters des Proteins dicht neben dem Eisenatom gelegenen Imidazolsubstituenten die funktionell wichtigsten Komponenten des Häm. Die restliche Polypeptidkette dient als Hülle; sie schirmt das aktive Zentrum von Fremdkörpern ab und kontrolliert seine Reaktionskinetik.

Da die koordinierten Stickstoffatome Elektronendonatoren sind, helfen sie außerdem, die Umwandlung des Eisen-II-Atoms in die *Ferriform* (Fe_{3+}) durch Oxidation zu verhindern. Käme es zur Oxidation, so könnte das Häm nicht länger O_2 binden; siehe dazu auch das Kapitel über Hämoglobin.

Auf Grund seiner energetischen Eigenschaften erscheint der Häm-Komplex rot; er ist somit für die charakteristische Farbe der Erythrocyten verantwortlich.

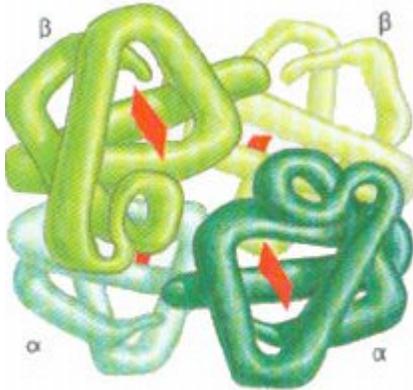
Die Häm-Gruppe findet sich aber nicht nur in Proteinen, die Sauerstoff transportieren, sondern u.a. auch in den Cytochromen, welche an Redox-Reaktionen teilnehmen.

5.2.3 Unterschiede zwischen Myoglobin und Hämoglobin

Ebenso wie das Myoglobin ist auch das Hämoglobin ein Häm-haltiges und damit zur Bindung von Sauerstoff befähigtes, globuläres - also annähernd kugelförmiges - Protein. Allerdings besteht es nicht nur aus einer einzigen Polypeptidkette, sondern aus vier. Jede dieser Ketten wird als Globin bezeichnet.

Es gibt mehrere Arten von Hämoglobin; wir wollen darauf im folgenden Kapitel noch näher eingehen. 98% der Hämoglobin-Moleküle des erwachsenen Menschen sind vom Typ Hb A₁. Diese Moleküle enthalten zwei symmetrisch angeordnete α -Globine mit jeweils 141 Aminosäureresten und zwei β -Globine mit jeweils 146 Resten. Zu jeder Kette gehört eine eigene Häm-Gruppe; dies ist der Grund, warum pro Hämoglobin-Molekül vier O₂-Moleküle gebunden werden können.

Jede Globin-Einheit hat eine relative Molekülmasse von etwa 16000. Somit beträgt die Masse eines Hämoglobin-Moleküls ungefähr 64 Kilodalton (kDa); die in der Literatur angegebenen Werte schwanken zwischen 64,5 und 68 kDa. Der Durchmesser des Hämoglobins beträgt 5,5 Nanometer (nm).



Aus: Alberts, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, S. 160
Ein Modell des Hämoglobins A₁.

Zwischen zwei Polypeptidketten desselben Typs (also α -oder β -Globin) bestehen viele Kontaktstellen. Außerdem sind je ein α - und ein β -Globin dicht aneinander angelagert. Die intramolekularen Wechselwirkungen sind vor allem zwischen den ungleichen Untereinheiten stark ausgeprägt. Die $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_2$ -Grenz- und Berührungsflächen werden aus jeweils über 30 Aminosäureresten gebildet. Die Bindungen sind so stabil, dass auch bei milder Behandlung des Hämoglobins mit Harnstoff das *Dimer* intakt bleibt. An den $\alpha_1\beta_2$ - und $\alpha_2\beta_1$ -Kontaktflächen sind je 19 Reste beteiligt. Die Wechselwirkungen sind überwiegend hydrophober Natur, aber es gibt auch viele Wasserstoffbrücken und einige Ionenpaare (*ionische Salzbrücken*). Sie bewirken die Quartärstruktur des Hämoglobins, also die Weise, wie die einzelnen Ketten angeordnet und verbunden sind.

Obwohl an nur 27 Positionen eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von Myoglobin, α -Globin und β -Globin herrscht, sind ihre dreidimensionalen Strukturen einander sehr ähnlich. Warum überhaupt eine teilweise Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen herrscht, wird Gegenstand eines eigenen Kapitels sein.

5.2.4 Unterschiede zwischen den Entwicklungsstadien des Menschen

Man unterscheidet im Allgemeinen fünf verschiedene Typen des Globins. Sie werden mit den griechischen Buchstaben α , β , γ , δ und ϵ bezeichnet. Das α -Globin besteht aus 141, die anderen Formen aus je 146 Aminosäuren.

Das Blut eines gesunden, erwachsenen Menschen besteht zu 98% aus Hb A₁. Diese Form hat den Aufbau $\alpha_2\beta_2$. Die restlichen 2% sind das Hb A₂ mit dem Aufbau $\alpha_2\delta_2$; es hat eine höhere O₂-Affinität.

Weitere Formen treten beim gesunden Menschen nur während der Embryonal- und Fetalentwicklung auf. Sie haben höhere O₂-Affinitäten als die beiden Formen von Hb A. Dies ist notwendig, weil der werdende Mensch Sauerstoff aus dem mütterlichen Blutkreislauf (vor allem aus der Plazenta) übernehmen muss.

Die in den ersten drei Lebensmonaten auftretenden embryonalen Hämoglobine haben die Zusammensetzung $\alpha_2\epsilon_2$, ϵ_4 oder $\alpha_2\gamma_2$. Letztere Form bezeichnet man auch als Hb F; es handelt sich um das fetale Hämoglobin. Dieses überwiegt dann bis zur Geburt. In den ersten Lebensmonaten wird es schließlich nach und nach durch das adulte Hb A ersetzt.

5.2.5 Bindung von Sauerstoff

Mit der sechsten Koordinationsstelle des im Häm enthaltenen Eisens koordiniert im Oxy-Hämoglobin das Sauerstoffmolekül (O₂) oder in der Desoxy-Form das Wasser (H₂O). Wichtig ist,

dass das Eisen als Fe_{2+} vorliegen muss. Die Fe_{3+} -Form kann O_2 nicht binden, weil sie zu wenige Koordinationsstellen hat.

Sobald der Sauerstoff bindet, herrschen im Eisen neue energetische Verhältnisse. Die Farbe der Erythrocyten geht von einem Dunkelpurpur, das in sauerstoffarmem, venösem Blut vorherrscht, in das für sauerstoffreiches, arterielles Blut charakteristische Hellrot über.

Da die reversible Bindung von O_2 ans Hämoglobin große Gemeinsamkeiten mit der Bindung eines Substrats an ein Enzym aufweist, bezeichnet man das Hämoglobin auch scherzhaft als "Enzym honoris causa".

Bei der Aufnahme von O_2 spielt der *allosterische Effekt* eine große Rolle. Er wird in einem der folgenden Abschnitte näher erläutert werden.

5.3 Biologische Funktionen und ihre chemischen Grundlagen

5.3.1 Stofftransport

Das Hämoglobin ist ein Transportprotein. Seine wichtigste Aufgabe besteht darin, O_2 von der Lunge in die Gewebe und CO_2 sowie H^+ von den Geweben zurück in die Lunge oder in die Nieren zu befördern, wo diese Stoffe ausgeschieden werden.

5.3.1.1 Sauerstoff-Transport

Warum benötigen wir überhaupt ein spezielles Transportsystem für den molekularen Sauerstoff? Das liegt daran, dass O_2 im Wasser schlecht löslich ist. Deshalb kann er durch einfaches Lösen im Blutserum nicht in ausreichenden Mengen zu den Geweben befördert werden. Diffusion ist ebenfalls nur über geringe Distanzen, die eine Größe von wenigen Millimetern nicht überschreiten, effizient. Daher setzte die Entstehung höherer Organismen die Entwicklung von körpereigenen Stoffen voraus, die Sauerstoff reversibel binden können.

Übergangsmetalle wie Eisen und Kupfer sind hierfür besonders geeignet, weil sie eine starke Neigung besitzen, Sauerstoff zu binden. Freies Eisen würde allerdings die Bildung von hoch reaktiven Sauerstoffspezies wie etwa Hydroxyl-Radikalen fördern; diese könnten wichtige Makromoleküle wie die Nucleinsäuren schädigen. Daher muss das Eisen abgeschirmt und seine Reaktionsfähigkeit herabgesetzt werden; dies wird im menschlichen Organismus durch die Einbindung in eine proteingebundene prosthetische Gruppe, das uns bereits bekannte Häm, erreicht.

Es ist wichtig anzumerken, dass bei der Bindung bzw. Abgabe von O_2 die Oxidationsstufe des Eisens unverändert bleibt. Es handelt sich bei diesen Vorgängen nicht um eine Oxidation oder eine Reduktion, sondern um eine *Oxygenierung* bzw. *Desoxygenierung*. Jedes Liter Hämoglobin kann in den Erythrocyten maximal 0,2 l O_2 binden; dies ist das 70-fache der physikalisch gelösten Stoffmenge. Im Blut der Arterien, welches von den Lungen durch das Herz in die peripheren Gewebe fließt, beträgt die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins 96%. In den Venen, die zum Herzen zurückführen, ist das Hämoglobin nur mehr zu 64% mit O_2 gesättigt. Das heißt, dass etwa ein Drittel des vom Blut beförderten Sauerstoffs während eines Kreislaufzyklus freigesetzt wird.

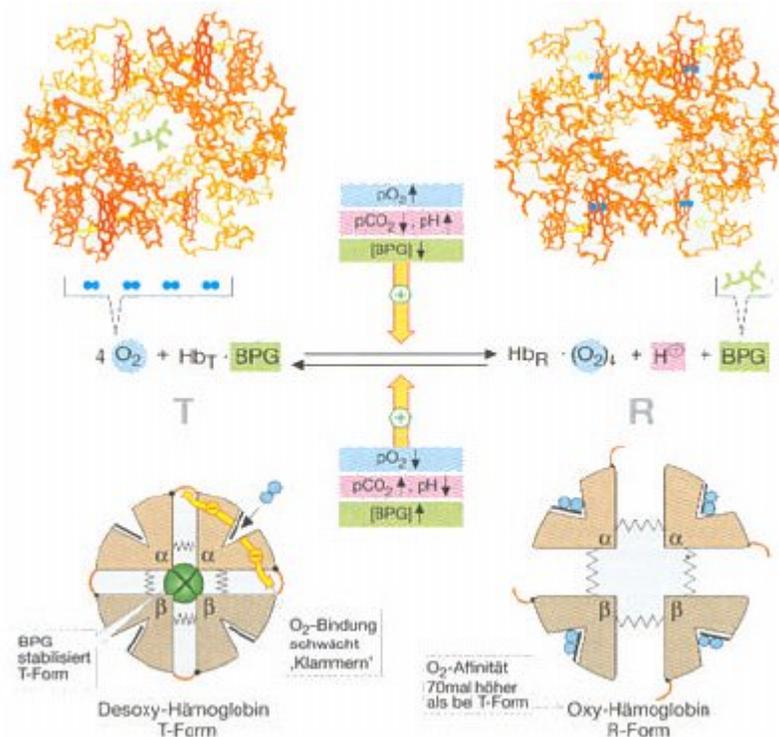
Auf Meereshöhe ist die Bindung von O_2 für einen gesunden Menschen so reguliert, dass die Stoffmenge, welche den Geweben zugeführt wird, fast 40% der maximal im Blut beförderbaren Menge entspricht.

5.3.1.2 Konformations- und Affinitätsänderungen

Bei der Bindung von O_2 wirken die vier Untereinheiten des Hämoglobins allosterisch. Effektiv bedeutet das: Sobald die erste Einheit mit O_2 beladen worden ist, wird die Affinität der anderen drei für O_2 erhöht. Der Zweck dieses Verhaltens besteht darin sicherzustellen, dass nur

entweder komplett unbeladene oder vollständig beladene (oxygenierte) Hämoglobin-Moleküle im Blut transportiert werden.

Durch Röntgenstrukturanalyse hat man herausgefunden, dass das Hämoglobin zwei Zustände (*Konformationen*) einnehmen kann. Man bezeichnet diese als *T-Form* (*tense*, gespannt) bzw. *R-Form* (*relaxed*, entspannt).



Aus: Koolman, *Taschenatlas der Biochemie*, S. 267

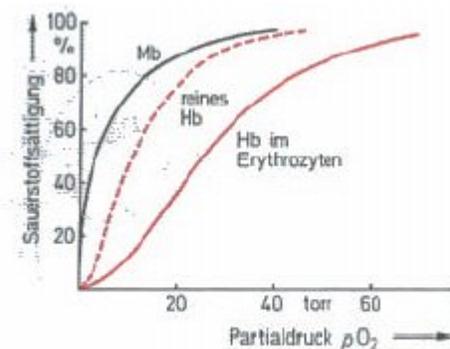
Die Bedeutung des BPG wird in einem der nächsten Kapitel behandelt.

Die R-Form hat eine höhere Sauerstoffaffinität, weil O_2 auf sie stabilisierend wirkt. Hingegen ist die T-Form die bevorzugte Form des Desoxyhämoglobins. Sie wird durch Ionenpaare an den $\alpha_1\beta_1$ - und $\alpha_2\beta_2$ -Berührungsflächen stabilisiert.

Sobald O_2 an eine der Untereinheiten der T-Form bindet, kommt es zu einer lokalen Änderung der Konformation; da das Eisen durch die Bindung von O_2 tiefer in das Häm hineingezogen und einen der an ihm gebundenen Histidinreste mitnimmt, schrumpft das Molekül. Gleichzeitig wird der Zusammenhalt zwischen den Untereinheiten geschwächt. Die Paare der $\alpha\beta$ -Globine gleiten aneinander vorbei und drehen sich; dadurch verengt sich die Höhlung zwischen den β -Untereinheiten. Einige Ionenpaare, die den T-Zustand stabilisierten, werden dabei gebrochen, andere neu gebildet.

Mit zunehmendem O_2 -Partialdruck gehen immer mehr Moleküle in die R-Form über. Dies hat zur Folge, dass die O_2 -Affinität des Hämoglobins mit zunehmendem Partialdruck ansteigt. Man nennt die so resultierende Sättigungskurve hybrid, S-förmig oder *sigmoid*.

Die beschriebene Konformationsänderung, welche eine Änderung der Affinität zur Folge hat, ist für die Transportfunktion des Hämoglobins sehr wichtig, weil es



Aus: Karlson, *Kurzes Lehrbuch der Biochemie*, S. 38

O₂ in einem Bereich mit einem hohen Partialdruck von etwa 13,3 Kilopascal (kPa), der Lunge, binden und in einem Bereich mit einem niedrigen Partialdruck von etwa 4 kPa, den Geweben, freisetzen muss.

Da die O₂-Affinität des Hämoglobins mit zunehmendem O₂-Partialdruck steigt und mit abnehmendem sinkt, ist dies möglich. Würde Hämoglobin hingegen O₂ ständig mit hoher Affinität binden, so würde es seine Aufgabe in der Lunge effizient erfüllen, nicht jedoch in den Geweben; der umgekehrte Fall würde eintreten, wenn die Affinität gering und für die Bindung gerade noch ausreichend wäre.

Ein Transportprotein, das nur eine einzige Koordinationsstelle aufweist, könnte keine sigmoide Sättigungskurve haben, weil die Bindung des Liganden nicht von einem anderen Molekül beeinflusst werden könnte, so wie es beim Hämoglobin durch seine Untereinheiten geschieht.

Die T- und R-Zustände des Hämoglobins sind bereits gut erforscht, doch anno 2001 sind die Details bezüglich des T-R-Übergangs noch unzureichend bekannt. Man arbeitet derzeit noch mit Gedankenmodellen aus den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts, welche von Monod, Koshland und deren Kollegen formuliert wurden.

5.3.1.3 Allosterische Effektoren

Die allosterische Regulation, kurz *Allosterie* genannt, erfolgt durch *Effektoren* (auch *Modulatoren* bzw. je nach ihrer Wirkung *Aktivatoren* oder *Inhibitoren* genannt). Dies sind Stoffe, die in Proteinen an bestimmten Stellen als Liganden gebunden werden. Durch die Bindung verändern sie seine Konformation und damit Eigenschaften wie die enzymatische Aktivität. Der Begriff allosterisch kommt aus dem Altgriechischen: *allos* heißt "anders", *stereos* "fest" oder "Form".

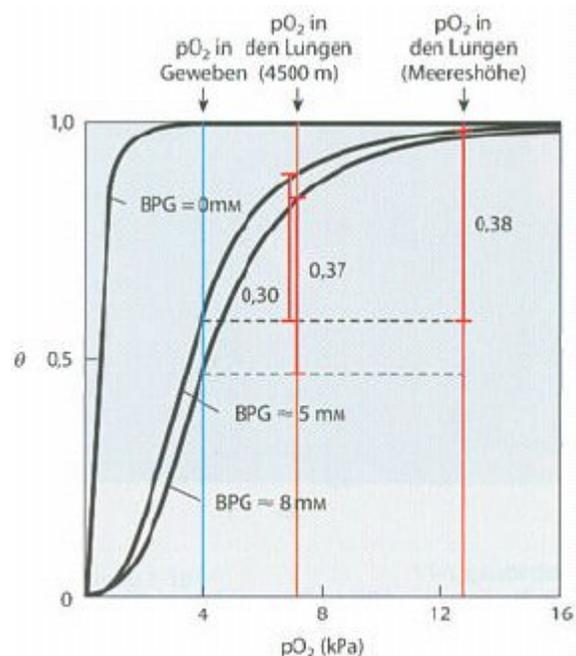
Die Wechselwirkung wird als *homotrop* bezeichnet, wenn der physiologische Ligand mit dem Effektor identisch ist; handelt es sich um verschiedene Moleküle, spricht man von einer *heterotropen* Wechselwirkung.

Wie aus den Erläuterungen des vorigen Abschnitts ersichtlich ist, handelt es sich bei O₂ um einen homotropen Effektor des Hämoglobins. Zu den wichtigsten heterotropen Effektoren zählen beim Hämoglobin CO₂, Protonen (H⁺) und 2,3-Bisphosphoglycerat (BPG).

Die Tatsache, dass Protonen aufs Hämoglobin als allosterische Effektoren wirken, erklärt, warum die Funktion des Hämoglobins vom pH-Wert der Umgebung abhängig ist. Die H⁺-Konzentration im Blutplasma und im Extrazellularraum beträgt 40 Nanomol pro Liter (nmol/l), was einem pH-Wert von 7,40 entspricht. Nur sehr geringfügige Abweichungen von diesem Wert sind mit dem Leben vereinbar.

Welche konkreten Auswirkungen Protonen als Effektoren auf den Stoffwechsel haben, wird Gegenstand des nächsten Kapitels sein.

Wichtig ist auch die Konzentration von BPG in den Erythrocyten. BPG kann in der zentralen Höhlung des Desoxy-Hämoglobins zwischen den β-Untereinheiten eingelagert werden. Die Phosphat-Anionen treten dabei mit den positiven Gruppen der Aminosäuren Lysin und Histidin aus dem β-Globin in Wechselwirkung. Sie stabilisieren den T-Zustand, wodurch die O₂-Affinität des Hämoglobins stark sinkt. Während ohne BPG die Halbsättigung schon bei einem O₂-



Aus: Nelson, *Lehninger Biochemie*, S. 229
Der Bezeichner θ steht für die O₂-Sättigung.

Partialdruck von 10 Torr erreicht ist, stellt sie sich nun erst bei etwa 26 Torr ein. Anders als beim O_2 , von dem ja pro Hämoglobin je vier Moleküle gebunden werden, wird nur ein einziges BPG-Molekül pro Hämoglobin angelagert. Sinkt die BPG-Konzentration zu weit ab, wird ein Teil des Desoxy-Hämoglobins den O_2 so fest binden, dass es ihn nicht mehr im peripheren Gewebe abgeben wird. Somit erfüllt dieses Hämoglobin seine Transportfunktion nicht. Da das Molekül bei Übergang in den R-Zustand schrumpft und sich der zentrale Hohlraum verengt, wird das BPG bei O_2 -Aufnahme wieder abgegeben.

Der Grund, warum das fetale Hb F eine höhere O_2 -Affinität als das adulte Hb A hat, liegt in seiner geringeren Bindungsfähigkeit für das BPG.

In Notsituationen, bei denen der O_2 -Partialdruck auf ein unzureichendes Maß herabsinkt (z.B. im Hochgebirge), kann der BPG-Spiegel in den Erythrocyten steigen. Die BPG-Konzentration steigt auch bei Personen, die an *Hypoxie* leiden, einer verminderten Sauerstoffversorgung der peripheren Gewebe.

5.3.1.4 Protonen- und Kohlendioxid-Transport

Bei der Zellatmung, also der Oxidation organischer Brennstoffe in den Mitochondrien, entstehen die Endprodukte H^+ und CO_2 . Diese werden zu 20% vom Hämoglobin von den Geweben zu den Lungen und den Nieren transportiert, wo sie anschließend entsorgt werden.

Die Transporte von O_2 und den Endprodukten sind durch einen ausgeklügelten Mechanismus miteinander koordiniert. Nach seinem Entdecker, dem dänischen Physiologen Christian Bohr (Vater des berühmten Physikers Niels Bohr), wird er *Bohr-Effekt* genannt.

Da Desoxy-Hämoglobin eine schwächere Säure als Oxy-Hämoglobin ist, nimmt Desoxy-Hämoglobin nach Abgabe von O_2 gleichzeitig Protonen auf, und zwar etwa 0,35 mol H^+ pro mol O_2 . Die daraus resultierende Abnahme der Protonenkonzentration hat zur Folge, dass die Kohlensäure (H_2CO_3 ; im Organismus meist in Form von Kohlendioxid und Wasser: CO_2 und H_2O) vermehrt zu H^+ und Hydrogencarbonat (HCO_3^-) dissoziiert. In den Lungenkapillaren wird Hämoglobin auf Grund des dort herrschenden hohen O_2 -Partialdrucks wieder oxygeniert, die Oxy-Form gibt H^+ ab, und H^+ reagiert mit HCO_3^- zu H_2CO_3 ; dieses zerfällt in H_2O und CO_2 .

Mit anderen Worten: In den Geweben, wo ein hoher CO_2 -Partialdruck herrscht, binden einige CO_2 -Moleküle ans Hämoglobin und verringern auf diese Weise seine Affinität für O_2 ; daraufhin wird dieser freigesetzt. Sobald nun Hämoglobin die Lungen erreicht, führt der hohe O_2 -Partialdruck zu einer verstärkten Bindung von O_2 und zur Freisetzung von CO_2 . So bewirkt der Bohr-Effekt den optimal integrierten Transport von O_2 , CO_2 und H^+ durch Erythrocyten.

Während O_2 an die Eisenatome der Häm-Gruppen bindet, kann sich H^+ an einen von mehreren möglichen Aminosäureresten im Protein anlagern. Einen wichtigen Beitrag zum Bohr-Effekt leistet ein Histidinrest des β -Globins, der als His HC3 bezeichnet wird. Nach Abgabe von O_2 gelangt seine basische Gruppe in die Nähe der sauren Carboxygruppe eines Asparaginsäurerests. Dadurch wird die Aufnahme von Protonen begünstigt.

Auch die terminalen Amino-Gruppen der α -Globine sind am Bohr-Effekt beteiligt: CO_2 wird als Carbamat-Gruppe an sie gebunden; dabei entsteht ein Carbaminohämoglobin. Durch Bindung zusätzlicher ionischer Salzbrücken werden der T-Zustand stabilisiert und die Freisetzung von O_2 begünstigt. Sobald das Hämoglobin in der Lunge mit O_2 beladen wird, zerfallen diese Carbamat-Gruppen wieder in CO_2 und die freien Amino-Gruppen. So wird etwa die Hälfte des pro Mol O_2 gebildeten CO_2 vom Ort des Stoffwechsels zur Lunge befördert.

5.3.2 Pufferfunktion

Da Hämoglobin H^+ binden und das Verhältnis zwischen den Konzentrationen von H_2CO_3 und HCO_3^- regulieren kann, wirkt es auch als pH-Puffer. Tatsächlich ist Hämoglobin, da es im Blut in einer wesentlich größeren Konzentration als die Plasmaproteine vorliegt, sogar für den größten Teil der Pufferkapazität der Blutproteine verantwortlich.

5.4 Fehlfunktionen

Neben den physiologisch sinnvollen Funktionen können die chemischen Eigenschaften des Hämoglobins auch zu schädlichen Fehlfunktionen führen. Die wichtigsten werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

5.4.1 Hämoglobinbildung

Verschiedene Oxidationsmittel (z.B. Nitrite, Chlorate, H_2O_2 , Kaliumchlorid, Phenazopyridin, Phenacetin, Sulfonamide, Chinin, p-Aminosalicylsäure, Amylnitrit, Nitroglycerol, Lokalanästhetika, Nitrobenzol, Paraquat und Anilinderivate) können das Eisen-II des Häms zu Eisen-III (der Ferriform) oxidieren. Ein derart verändertes Hämoglobin wird als *Hämoglobin* oder auch *Methämoglobin* bezeichnet. Hämoglobin ist für den O_2 -Transport ungeeignet. Ein Hämoglobingehalt des Bluts von mehr als 45% führt zum Kollaps, einer von über 70% zum Verlust des Lebens durch innere Erstickung.

Der Hämoglobin-Anteil wird im gesunden Organismus durch Enzyme niedrig gehalten. Deshalb beträgt er in der Regel nur 1 bis 2%.

Bei einem zu hohen Hämoglobin-Gehalt spricht der Mediziner von einer *Methämoglobinämie*. Symptome sind Zyanose (meistens schokoladenbraune Färbung des Bluts), Kopfschmerz, Übelkeit, Tachykardie, Atemnot, Unruhe und bei besonders starker Hämoglobinbildung hämolytische Anämie.

Methämoglobinämie kann durch Einnahme von hämoglobinbildenden Substanzen ausgelöst werden. Beim Säugling ist nitratgedüngtes Gemüse wie Spinat die wichtigste Ursache einer Hämoglobinbildung; Nitrat wird nämlich im Verdauungstrakt zu Nitrit reduziert. Die Krankheit kann aber auch genetisch bedingt sein, wenn beide Allele für das Enzym NADH-Methämoglobinreduktase (NADH steht für Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Wasserstoff) defekt sind oder man Träger des Gens der dominant vererbten Hämoglobin-M-Krankheit ist.

Zur Therapie empfiehlt sich ein Vermeiden des Kontaktes mit Hämoglobin bildenden Substanzen sowie aus psychologischen oder kosmetischen Gründen die Einnahme von Methylenblau, um die Farbe des Bluts wiederherzustellen.

5.4.2 Fehltransporte

Neben O_2 , CO_2 und H^+ kann Hämoglobin eine Reihe weiterer Stoffe binden, darunter CO , Stickoxid (NO) und Blausäure (Cyanwasserstoff, HCN). Dies ist schädlich.

Da die Affinität von Hämoglobin zu CO etwa 300mal größer als die zu O_2 ist, verdrängt CO den O_2 vom Hämoglobin. Deshalb ist CO für aerobe Organismen hoch giftig. Die Auswirkungen einer CO -Vergiftung reichen von leichten Sehstörungen über Kopfschmerzen, Unwohlsein und Schwindel bis zu tiefer Bewusstlosigkeit und Verlust des Lebens.

Solange ein mit CO Vergifteter noch am Leben ist, muss man ihn reinen Sauerstoff einatmen lassen, damit dieser das CO wieder aus den Bindungen im Hämoglobin verdrängen kann.

5.5 Evolution des Hämoglobins

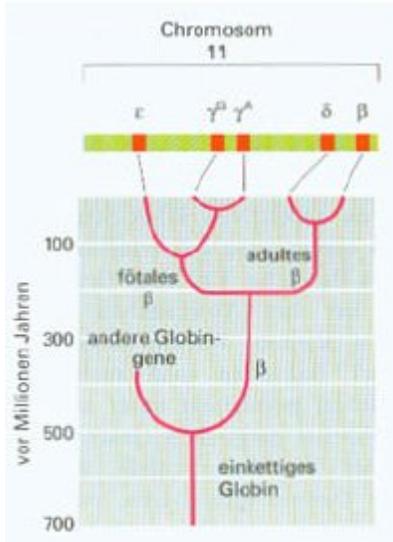
Die Globin-Proteine sind im Genom der Organismen codiert. Durch Transkription und Translation werden die Gene in die Polypeptidketten übersetzt.

Die einzelnen Globinketten finden sich an unterschiedlichen Stellen des Genoms. So befindet sich etwa beim Menschen das α -Globin auf Chromosom 16 und das β -Globin auf Chromosom 11.

Beim Vergleichen der Nucleotid-Sequenzen der β -Globin-Gene und ihrer Organisation in verschiedenen Organismen hat man große Sequenzübereinstimmungen gefunden. So stimmen

α -, β -, γ - und δ -Globin in 50 Aminosäuren überein, β -, γ - und δ -Globin in 103 und β - und δ -Globin in 136; Myoglobin und α -Globin entsprechen einander zumindest zu etwa 30%.

Man nimmt an, dass diese Kongruenzen nicht zufällig entstanden sind, sondern dass aus einem monomeren Ur-Hämoglobin aus ungefähr 160 Aminosäuren durch schrittweise Mutationen das Myoglobin, das α -Globin, das β -Globin und all die anderen Polypeptidketten des heutigen Hämoglobins hervorgegangen sind.



Aus: Alberts, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, S. 312

Es wird geschätzt, dass sich die α - und γ -Ketten vor etwa 600 Millionen Jahren, als sehr viele Algenarten existierten und die primitiven Tiere und Pflanzen erst am Beginn ihrer Entwicklung standen, und die β - und δ -Ketten sich vor 44 Millionen Jahren getrennt haben. Weiters vermutet man, dass eine Aminosäuresubstitution in der Proteinevolution etwa alle 14,5 Millionen Jahre auftritt.

Man nimmt an, dass die Voraussetzung für die Entwicklung verschiedener Globin-Typen wiederholte Gen-Duplikationen waren. Diese Duplikationen dürften das Ergebnis seltener Rekombinationen zwischen homologen Chromosomen gewesen sein, welche zum Einbau von zusätzlichen Gen-Kopien in eines der beiden Chromosomen führten. Man nennt diese Art der Rekombination *ungleiches Crossing-over*.

Tatsächlich fallen die Unterschiede zwischen den Hämoglobin-Molekülen verschiedener Arten umso geringer aus, je näher sie einander evolutionär stehen. So ist z.B. das Hb A des Menschen mit dem des Schimpansen identisch.

5.6 Genetische Aberrationen und ihre Folgen

5.6.1 Hämoglobinpathien

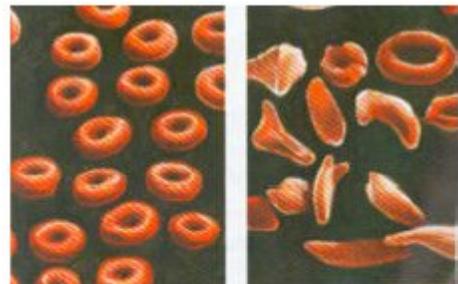
In der menschlichen Bevölkerung sind weltweit mehr als 300 genetische Varianten des Hämoglobins bekannt. Die meisten von ihnen unterscheiden sich in nur einem einzigen Aminosäurerest. Meist sind die Auswirkungen auf Struktur und Funktion von Hämoglobin ohne Bedeutung. In einigen Fällen sind sie jedoch dramatisch.

Man spricht in diesen Fällen von einer *Hämoglobinopathie*. Hämoglobinpathien sind Erkrankungen in Folge pathologischer Hämoglobin-Bildung auf Grund von genetischen Defekten. Es sind vor allem α - und β -Globin betroffen. Meistens ist eine Aminosäure ausgetauscht; es können aber auch Aminosäuren fehlen oder Hämoglobin aus nur einem Globin-Typ gebildet werden (Beispiele: Hb H = β_4 ; Hb-Bart's = γ_4).

Der Nachweis einer Hämoglobinopathie erfolgt durch chromatographische Verfahren oder durch Hämoglobinelektrophorese.

5.6.1.1 Sichelzellenanämie (Drepanozytose)

Die Sichelzell(en)anämie, auch unter dem Namen Drepanozytose bekannt, ist vermutlich die bekannteste Hämoglobinopathie. Entdeckt wurde sie im Jahre 1949 von *Pauling*.



Aus: Alberts, *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*, S. 213
Gesunde Zellen, Sichelzellen.

Der Erbgang wird meistens als autosomal-rezessiv bezeichnet. Tatsächlich ist er jedoch codominant, denn auch beim heterozygoten Merkmalsträger treten Symptome auf, wenngleich in wesentlich milderer Form.

Die Ursache der fast ausschließlich bei Menschen afrikanischer Abstammung vorkommenden Erkrankung ist eine Punktmutation, die zum Austausch der sechsten Aminosäure des β -Globins führt: Statt der Base Adenin findet sich in der Messenger-RNA (m-RNA) das Uracil; aus dem Codon GAG wird so das Codon GUG, welches als Valin translatiert wird; beim gesunden Menschen stünde an dieser Stelle Glutaminsäure. Im Gegensatz zur Monoaminodicarbonsäure Glutaminsäure hat das Valin eine rein hydrophobe Seitenkette. Damit hat das Sichelzell-Hämoglobin (abgekürzt Hb S) eine negative Ladung weniger; deshalb lässt es sich auch durch Elektrophorese vom normalen Hämoglobin unterscheiden. Sein Anteil beträgt bei homozygoten Trägern des zugehörigen Gens 70 bis 99%.

Das Fehlen der negativen Ladung hat schwer wiegende Folgen: Erstens bindet Hb S weniger O_2 , zweitens kristallisiert Desoxy-Hb S, da es weniger löslich als normales Hämoglobin ist, im venösen Blut aus und bildet röhrenartige Fasern. Dadurch verändert der Erythrocyt seine Form: Er nimmt eine lange, dünne, halbmondförmige Gestalt an, die an eine Sichel erinnert (daher der Name der Krankheit), und wird fragiler. Gleichzeitig wird die Blutviskosität erhöht, es kommt zur Verstopfung der Blutgefäßkapillaren und der Nierentubuli, zur Stauung in Organen und zu deren Beschädigung. Die deformierten Zellen werden in der Milz rasch abgebaut. Dies führt schließlich zur Blutarmut: Der Hämoglobin-Gehalt des Blutes beträgt nun nur mehr die Hälfte des normalen Wertes.

Symptome der Sichelzellenanämie sind Schwächeanfälle, Kurzatmigkeit, ungewöhnliche Herzgeräusche und eine erhöhte Pulsfrequenz.

Die Prognose für homozygote Träger des Gens für Hb S ist düster: Sie haben derzeit praktisch keine Überlebenschance; unbehandelt sterben sie schon im Kindesalter. Einzig eine Transplantation des Knochenmarks könnte helfen. Wahrscheinlich ließe sich Sichelzellenanämie aber durch somatische Gentherapie heilen.

Heterozygote Träger des Sichelzell-Gens sind auf Meeresebene meist symptomfrei; der Gehalt des Blutes an Hb S ist weit geringer als 50%. Sie haben eine fast normale Lebenserwartung und können ein beinahe völlig normales Leben führen, solange sie anstengendes Training oder andere Stress-Situationen für den Kreislauf vermeiden. Nur gelegentlich tritt *Hämaturie* (pathologische Ausscheidung von Erythrocyten im Harn) auf. Ist jedoch der O_2 -Partialdruck gering, was z.B. in größeren Höhen der Fall ist, so kristallisiert das Hb S aus, und Sichelzellen erscheinen im Blut.

Tatsächlich wurde die Sichelzellenanämie in den USA beim Flug afroamerikanischer Soldaten über das Hochgebirge der Rocky Mountains entdeckt, als die Mehrzahl der Passagiere über heftige Bauchschmerzen klagte.

Interessanterweise haben die heterozygoten Träger der Sichelzellenanämie einen Selektionsvorteil: Sie sind relativ resistent gegen *Malaria tropica*. Der Malariaparasit *Plasmodium falciparum* macht nämlich einen Teil seiner Entwicklung im Erythrocyten durch. Dabei verbraucht er O_2 , wodurch die Ausbildung von Sichelzellen begünstigt wird. Auf Grund der Durchlässigkeit ihrer Membranen verlieren die Sichelzellen positiv geladene Kalium-Ionen. Dadurch werden die Malariaparasiten abgetötet, bevor sie zur Reifung gelangen. Dies ist der Grund, warum im tropischen Afrika die heterozygoten Hb S-Träger bis zu 40% der Population stellen.

5.6.1.2 Andere Hämoglobinpathien

Neben der Sichelzellenanämie sind viele weitere Hämoglobinpathien bekannt. Sie wurden zunächst mit Großbuchstaben (S, E, C usw.), später nach dem Entdeckungsort (Hb-Memphis, Hb-Zürich, Hb-Köln usw.) und der chemischen Abweichung (z.B. Hb-Köln = $\alpha_2\beta_2$ 98 Val \rightarrow Met) benannt.

Die klinische Bedeutung ist je nach der Lokalisation in der Peptidkette und dem Erbmodus sehr unterschiedlich. Manche Hämoglobinpathien verursachen weder bei homozygoten noch bei heterozygoten Trägern der Anlage Symptome; ein Beispiel hierfür ist Hb-Accra. Andere führen bei homozygoten Trägern zu einer hämolytischen Anämie, während die heterozygoten Träger erscheinungsfrei sind (z.B. Hb S, Hb C, Hb D, Hb E). Bei einigen Formen tritt jedoch bereits bei Heterozygoten eine gesteigerte Hämolyse auf, wie etwa beim Hb-Köln.

Allgemein lässt sich sagen, dass bei genetischen Erkrankungen immer dann pathologische Erscheinungen auftreten, wenn das reaktive Zentrum eines Enzyms betroffen ist.

Als Beispiel sei noch Hb C aufgegriffen. Hier wird an Stelle der Glutaminsäure, welche bei der Sichelzellenanämie durch Valin ersetzt wird, Lysin synthetisiert. Da Lysin aber ebenso wie Glutaminsäure polare Eigenschaften besitzt, ist dieser Fehler weniger gravierend.

5.6.2 Thalassämien

Thalassämien sind an sich Hämoglobinpathien, werden aber meistens als eigene Krankheitsgruppe betrachtet, weil hier nicht nur einzelne Aminosäuren ersetzt worden sind, sondern ganze Globine ausfallen. Die Ursache ist eine quantitative Störung der Genexpression und damit der Globinsynthese.

Wie die Hämoglobinpathien werden auch die Thalassämien codominant vererbt. Am weitesten ist die β -Thalassämie verbreitet. Bei homozygoten Merkmalsträgern nimmt sie einen schweren Verlauf (*Thalassaemia major*), bei heterozygoten tritt sie in einer mildereren Form (*Thalassaemia minor*) auf. Letztere verläuft ohne klinische Symptome, während es bei der ersten ähnlich wie bei der Sichelzellenanämie zu einer hämolytischen Anämie durch erhöhten Abbau der Erythrocyten in der Milz kommt.

Thalassämien sind in der Bevölkerung des Mittelmeerraums und Vorderasiens besonders weit verbreitet.

Bei *Thalassaemia major* sollte man zur Therapie möglichst früh Stammzellen von Geschwistern mit identischem HLA-System (*human leucocyte antigen system*) transplantieren, um eine Heterozygotie künstlich herzustellen. In 90% der Fälle kommt es nach einer Knochenmarktransplantation zu einer deutlichen Besserung. Dennoch ist bei β -Thalassämie ein Verlust des Lebens im frühen Erwachsenenalter durch Eisenablagerung (Siderose) im Herzen zu erwarten.

Die Hämoglobin-S-Betathalassämie ist eine Kombination aus Thalassämie und Hämoglobinpathie im engeren Sinn. Diese Krankheit tritt auf, wenn sowohl die Erbanlagen für β -Thalassämie als auch für Sichelzellenanämie vorhanden sind. Ihr Verlauf ist jedoch milder als der jeder dieser beiden schweren Anämien.

Referenzen

Bücher

Alberts et al.: *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. 3. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH 2001.

Buselmaier: *Biologie für Mediziner*. 8. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer 1998.

Hirsch-Kauffmann et al.: *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 4. Aufl. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag 2000.

Kaiser et al.: *Medizinische Chemie. Bd. 1: Allgemeine und anorganische Chemie für Mediziner*. 2. Aufl. Wien: Facultas 1993.

Kaiser et al.: *Medizinische Chemie. Bd. 2: Organische Chemie. Eine Einführung für Medizinstudenten*. 3. Aufl. Wien: Facultas 1989.

Karlson et al.: *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 14. Aufl. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag 1994.

Koolman et al.: *Taschenatlas der Biochemie*. 2. Aufl. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag 1998.

Müllner et al.: *Biochemische Übungen für Mediziner*. 1. Aufl. Wien: Facultas 1993.

Murken et al.: *Humangenetik*. 6. Aufl. Stuttgart: Enke 1996.

Nelson et al.: *Lehninger Biochemie*. 3. Aufl. Berlin Heidelberg New York: Springer 2001.

Psychrembel Klinisches Wörterbuch. 259. Aufl. Berlin: Walter de Gruyter 2001.

Trautwein et al.: *Physik für Mediziner, Biologen und Pharmazeuten*. 5. Aufl. Berlin New York: Walter de Gruyter 2000.

Vollhardt et al.: *Organische Chemie*. 3. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH 2000.

Internet-Ressourcen

Deutsches Ärzteblatt. <http://www.deutschesaerzteblatt.de>

Karl-Franzens-Universität Graz. <http://www.kfunigraz.ac.at/imhwww/lehre/grundlagen.html>

CD-ROMs

MS Encarta 98. Redmond: Microsoft 1998.