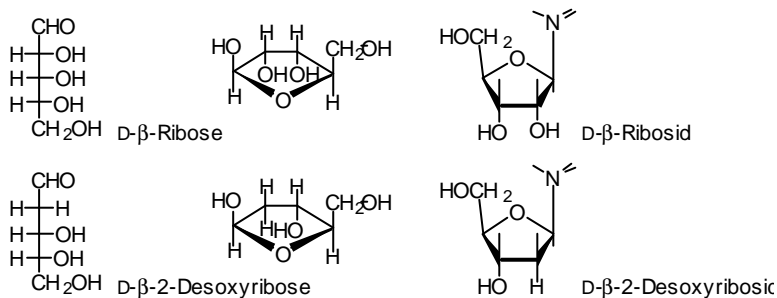


13. Nucleoside, Nucleotide, Nucleinsäuren, genetischer Code, Genexpression, Gentechnik

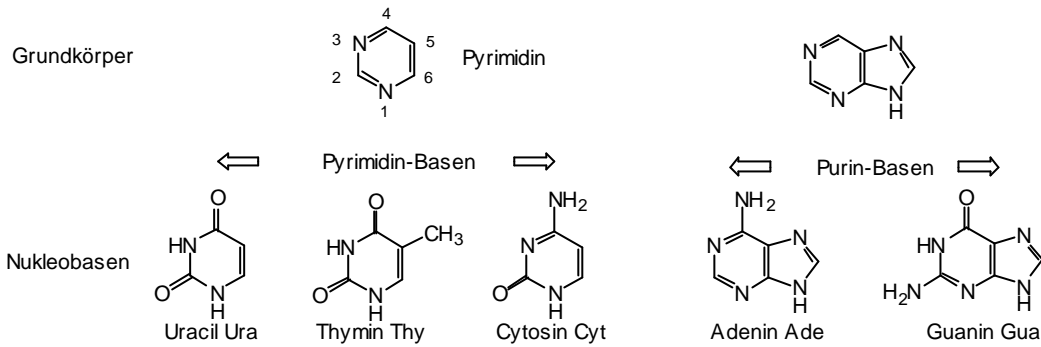
13.1 Nucleoside

13.1.1 Struktur der Nucleoside, Bausteine der Nucleinsäuren

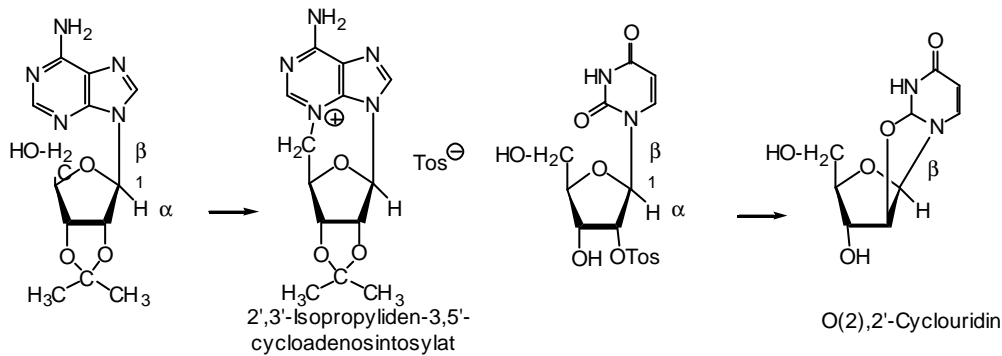
Als *Nucleoside* wurden ursprünglich nur die *N-D-Riboside* [*Ribonucleoside*, *Riboside*] und *N-D-2-Desoxyriboside* [*Desoxyribonucleoside*, *Desoxyriboside*] von Purin- und Pyrimidinderivaten, die als Bestandteile der Nucleinsäuren vorkommen, bezeichnet. Heute hingegen versteht man unter Nucleosiden im erweiterten Sinne auch *N-Glykoside* (vgl. 5.) anderer heterocyclischer Systeme wie die Nucleosid-Antibiotica (13.) sowie verschiedene Bausteine von Coenzymen (10.) und Vitaminen (20.). In den Ribonucleinsäuren [RNA] bzw. den 2-Desoxyribonucleinsäuren [DNA] liegen die Riboside bzw. 2-Desoxyriboside in der Furanoseform [*N-β-D-Ribofuranoside* bzw. *N-2'-Desoxy-β-D-ribofuranoside*] vor und sind *N-β-D-glykosidisch* mit den jeweiligen Nucleobasen verbunden. Als Aglyka kommen in den Ribonucleosiden die Purinderivate Adenin und Guanin sowie die Pyrimidinderivate Uracil und Cytosin vor, in den Desoxyribonucleinsäuren tritt an Stelle des Uracils das Thymin.



Adenin [1*H*-Purin-6-amin, Ade] ist eine Purinbase, die überwiegend gebunden in Mono-, Di- und Polynucleotiden sowie in Adenosin und dessen Derivaten vorkommt. *Guanin* [Gua] ist die zweite Purinbase in den Nucleinsäuren. *Cytosin* [4-Amino-2(1*H*)-pyrimidinon, Cyt] ist ebenso weitverbreitet. Durch NaHSO₃ kann Cytosin leicht zu *Uracil* [1*H*-Pyrimidin-2,4-dion, Ura] desaminiert werden. Letzteres ist außerdem auch in Antibiotika wie z.B. den Tunicamycinen (14.) enthalten. Die Einwirkung von Licht kann zu Dimeren führen, eine Reaktion, die beim nahe verwandten Thymin für photochemische Läsionen an genetischem Material verantwortlich gemacht wird. Als weitere Pyrimidinbase findet man *Thymin* [5-Methyluracil, Thy] (Formel 12-1 und Tab. 12-1). Neben diesen Hauptbasen werden vor allem in den Nucleosiden der RNA noch zahlreiche seltene Basen vorgefunden (Tab. 12-2).



Formel 13-1. Pyrimidin- und Purinbasen der Nucleoside und ihre IUPAC-IUBC-Abkürzungen.



Nucleoside besitzen Trivialnamen, die Pyrimidinderivate werden nach den Basen mit der Endung "idin" [Uracil \Rightarrow Uridin, Thymin \Rightarrow Thymidin, Cytosin \Rightarrow Cytidin], Purinderivate mit der Endung "-osin" [Adenin \Rightarrow Adenosin, Guanin \Rightarrow Guanin] versehen. Die 2-Desoxyribonucleoside werden dementsprechend als Desoxycytidin, Desoxyadenosin, etc. bezeichnet (Namen und Abkürzungen der Nucleobasen und Nucleoside in Tab. 13-1).

Adenosin [6-Aminopurin-9H- β -D-ribofuranosid, Ado oder A] wurde vor mehr als 90 Jahren aus Hefenucleinsäuren isoliert. Es entsteht im Organismus durch Abbau von Adenosinmonophosphat AMP und übt zahlreiche regulierende Funktionen aus. *Cytidin* ist das 4-Amino-1- β -D-ribofuranosid [Cyd oder C], das Arabinosid des Cytosins wirkt gegen Leukämie. *Thymidin* [Desoxythymidin, 1-(2-Desoxy- β -D-ribofuranosyl)-5-methyluracil, Desoxyribofuranosylthymidin, dThd oder dT] ist das Thymin-Glykosid der 2-Desoxyribose. *Uridin* [1- β -D-Ribo-furanosyluracil, Urd oder U] kann *in vitro* durch Hydrolyse von Hefenucleinsäuren hergestellt werden.

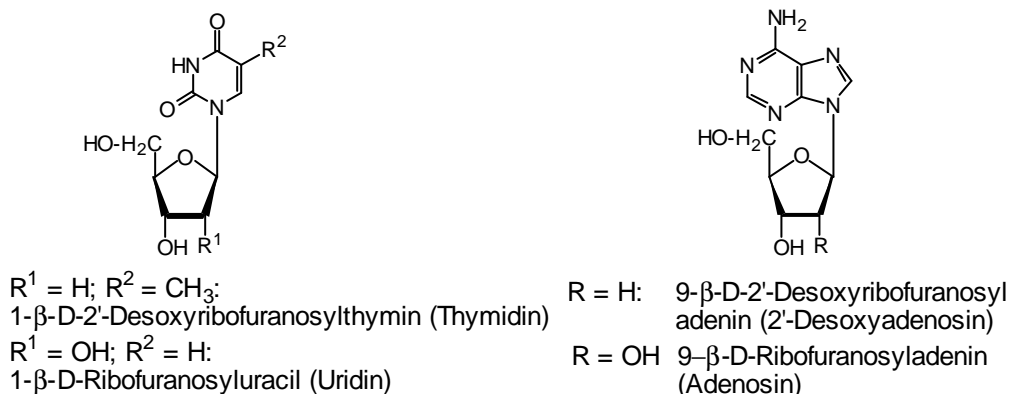


Tabelle 13-1. Namen und Abkürzungen (nach IUPAC-IUBC) der wichtigsten Nucleobasen und Nucleoside.

Nucleobasen		Nucleoside (Riboside)*		
Name	Abk.	Name	Abk.**	
Adenin	Ade	Adenosin	Ado	A
Guanin	Gua	Guanosin	Guo	G
Xanthin	Xan	Xanthosin	Sao	X
Hypoxanthin	Hyp	Inosin	Ino	I
unbekannte Purinbase	Pur	Purinnucleosid	Üuo	R
Thymin	Thy	Ribosylthymin	Thd	T***
Cytosin	Cyt	Cytidin	Cyd	C
Uracil	Ura	Uridin	Urd	U
Orotsäure	Oro	Orotidin	Ord	O
		Pseudouridin	Ψrd	Ψ oder Q
		Dihydrouridin		D
unbekannte Pyrimidinsäure	Pyr	Pyrimidinnucleosid	Pyd	Y
unbekannte Base	Base	Nucleosid	Nuc	N

* Desoxyriboside werden durch ein vorgesetztes d gekennzeichnet, also 2'-Desoxyadenosin = dAdo bzw. dA; Thymin)2'-Desoxyribosylthamin) = dThd bzw. dT.

** Einbuchstabensymbole für Oligo- und Polynucleotide. Ein verbindender Strich bedeutet 3',5'-Phosphorsäurediesterbindung zwischen den Nucleosiden.

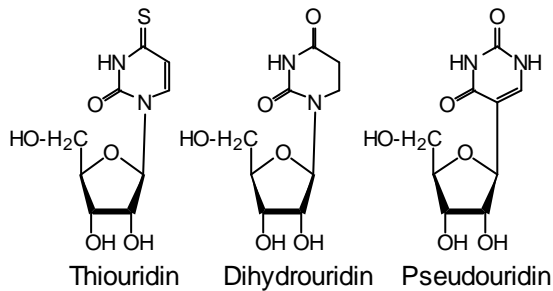
*** Nicht Thyminid!

Neben den fünf Hauptbasen werden in den Nucleosiden der Ribo- bzw. Desoxyribonucleinsäuren zahlreiche seltene Basen vorgefunden. Dabei handelt es sich vor allem um 5-substituierte Pyrimidinderivate sowie methylierte Derivate der Pyrimidine (in 3-Stellung sowie an der exocyclischen C-9-Aminogruppe) und der Purine (in 1- und 7-Stellung sowie an der exocyclischen Aminogruppe) (Tab. 13-2). Dabei handelt es sich um Glykoside mit den Basen 4-Thiouracil, Dihydrouracil und das C-Glykosid Pseudouridin. 2-Thiouracil tritt in Kohlarten sowie vereinzelt als Nucleosid (2-Thiouridin) auf, das aus t-RNS isoliert werden kann. Einige 6-Alkylaminoderivate der Purine wie das N(6)-Isopentenyladenin besitzen Cytokinin-Aktivität. Diese Nebenbasen kommen an bestimmten Stellen der t-RNA vor, sowie in der ribosomalen und chromosomalen RNA.

Tabelle 13-2. Seltene Basen der Nucleinsäuren.

Derivate von	RNA [RNA]	DNA [DNA]
Uracil:	5-Methyluracil (Thymin), 3-Methyl-, 5,6-Dihydro-, 5-Hydroxy-, 5-Carboxymethyl-, 5-Hydroxymethyluracil, 4-Thiouracil, 5-Carboxymethylthiouracil, 5-Methylaminomethyl-2'-thiouracil, Pseudouridin	
Cytosin:	5-Methyl-, 3-Methyl-, N(4)-Methyl-, 5-Hydroxymethyl-, N(4)-Acetyl-, 2-Thiocytosin	5-Methylcytosin
Adenin:	1-Methyl-, 7-Methyl-, N(6)-Methyl-, N(6)-Dimethyl-, N(6)-Isopentenyladenin, Hypoxanthin, 1-Methylhypoxanthin	N(6)-Methyladenin

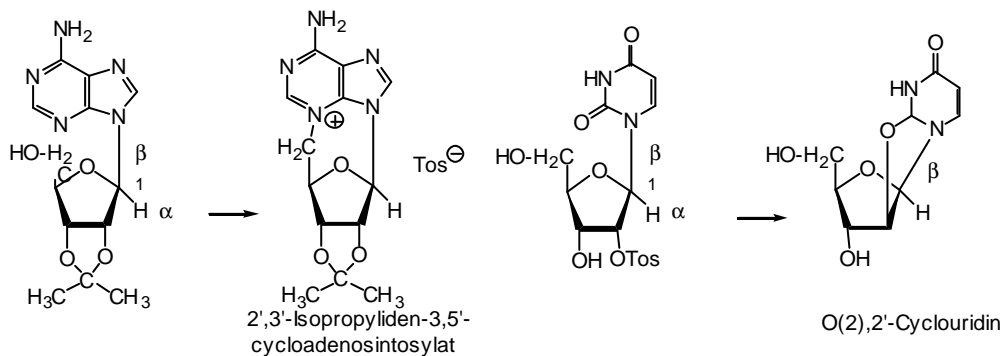
Guanin: 1-Methyl-, N(2)-Methyl-, N(2)-Dimethyl-, 7-Methylguanin 1-Methyl-, 7-Methyl-, N(2)-Dimethylguanin



Die Strukturaufklärung der Nucleobasen geht im wesentlichen auf Untersuchungen der Arbeitsgruppen um LEVENE und TODD in den dreißiger und vierziger Jahren zurück. Die Basen und Zuckerkomponente wurden nach säurekatalysierter Hydrolyse identifiziert. Die große Hydrolysestabilität schloss eine *O*-glykosidische Bindung des Zuckerrestes aus. Durch die erfolgreiche Desaminierung von Cytidin, Adenosin und Guanosin mit HNO_2 ohne Zerstörung der Nucleosidstruktur kam auch die exocyclische Aminogruppe nicht für die Bindung der Zuckerreste in Frage. Der Substitutionsort an der heterocyclischen Base ergab sich durch die Methylierung der Nucleoside und anschließende Charakterisierung der methylierten Basen. Die Furanosidstruktur ging aus dem Verhalten gegenüber Periodat hervor (3.), der endgültige Strukturbeweis gelang durch die Synthese.

Eine Vielzahl von Pentopyranosyl- und Hexopyranosyl-Oligonucleotide wurden als *p*-RNA und *homo*-DNA im Züricher Laboratorium von A. ESCHENMOSER synthetisiert, um zu klären, warum die Natur Pentose- und nicht Hexose-Nucleinsäuren für den genetischen Code (13.5.) verwendet.

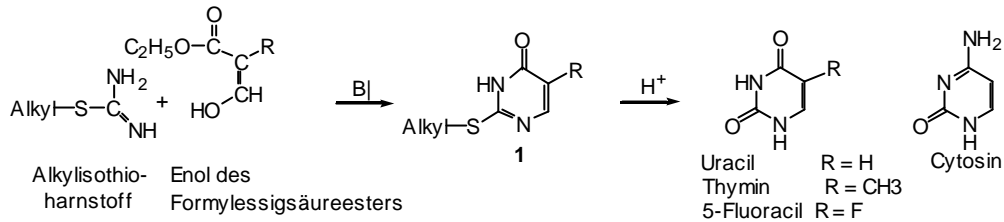
Die Zuordnung der glykosidischen Bindung als α - oder β -Glykosid (5.) wurde erst durch Röntgenstrukturanalyse sowie durch die Bildung von Cyclonucleosiden [TODD, 1957] ermöglicht. Cyclonucleoside können nur aus der *b*-Konfiguration der Substituenten gebildet werden. Heute werden für die Konfigurationsbestimmung von Nucleosiden die NMR-Spektroskopie und chiroptische Methoden herangezogen.



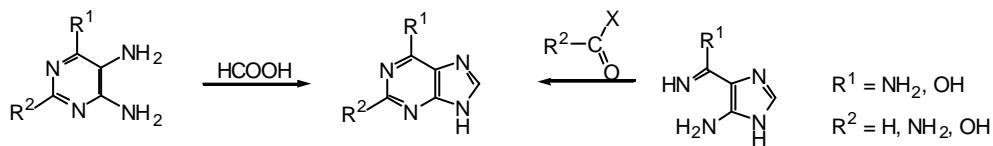
Formel 13-2. Bildung von Cyclonucleosiden aus der β -Konfiguration.

13.1.2 Synthese der Nucleobasen

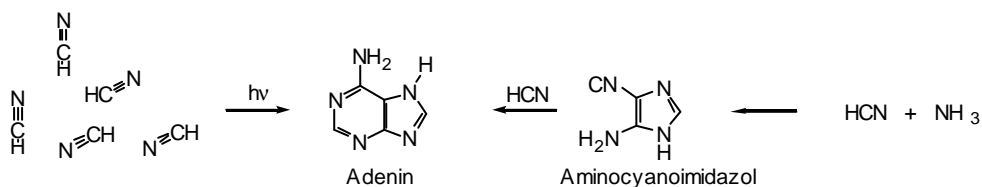
Eine allgemeine Synthese von *Pyrimidinen* beruht auf der Kondensation von Guanidin, Harnstoff oder Thioharnstoff mit einer C₃-Einheit [PINNER, TRAUBE]. 5-Substituierte Uracilderivate lassen sich durch Umsetzen von Alkylisothioharnstoff mit substituierten Formylessigsäureestern und anschließende Entschwefelung der 2-Thioalkyl-Derivate **1** erhalten. Cytosin kann aus Uracil über die 2,4-Dithioverbindung, Aminierung und Hydrolyse gebildet werden.



Die verbreitetste Methode zur Synthese des Purinringsystems beruht auf Cyclisierung von 4,5-Diaminopyrimidinen mit Ameisensäure [TRAUBE], das Ringsystem kann jedoch auch durch Cyclisierung eines Imidazolderivates mit Ameisensäure (X = OH, R² = H) oder Harnstoff (R², X = NH₂) aufgebaut werden.

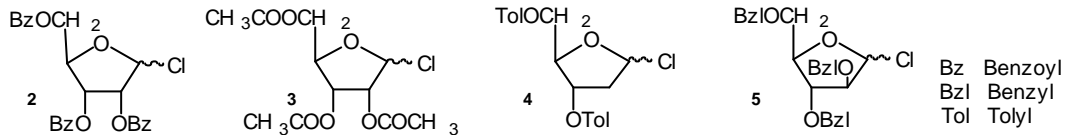


Von Interesse sind abiogene Synthesen, wie sie auch für die Genese der elementaren Bausteine des Lebens in der Uratmosphäre abgelaufen sein können. So entsteht z.B. Adenin durch UV-Bestrahlung von Blausäure, letztere durch Bestrahlung von Methan, Ammoniak, Wasser und Wasserstoff [MILLER, Uratmosphäre]. Ein weiterer abiogener Syntheseweg zu Adenin ist über Aminocyanoimidazol denkbar.

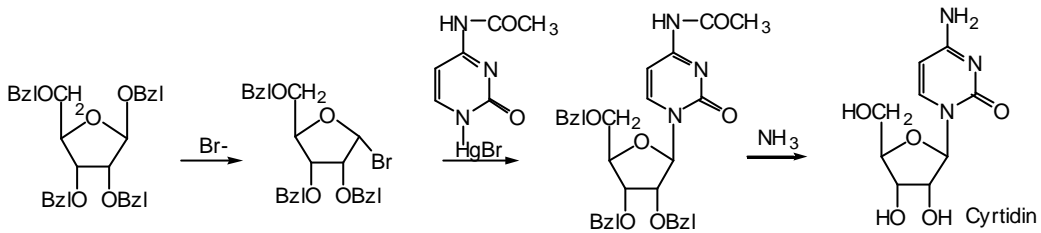


13.1.3 Nucleosidsynthesen

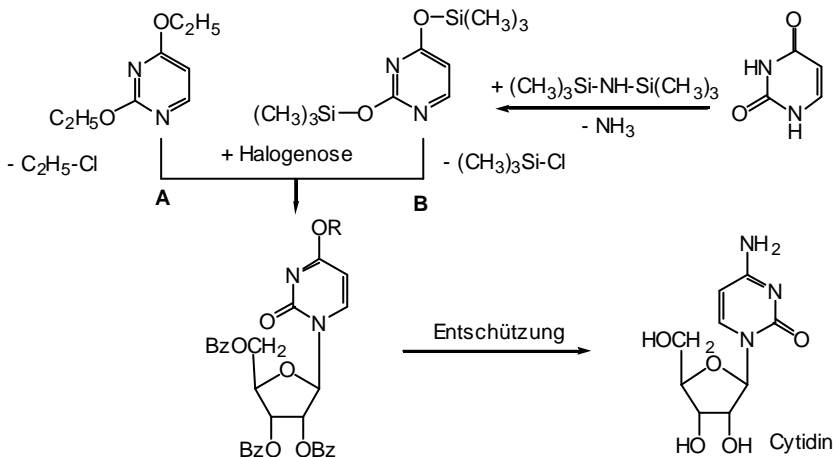
Zur *Nucleosidsynthese*, der Kondensation zwischen der C-1-Hydroxygruppe einer Aldose mit einem N-Wasserstoffatom der Nucleobase, werden fast ausschließlich hydroxygeschützte Halogenzucker [Halogenosen] eingesetzt. Typische Halogenosen sind 2,3,5-Tri-O-benzoyl-ribofuranosylchlorid **2** und 2,3,5-Triacetyl-O-ribofuranosylchlorid **3** für die Synthese von Ribosiden, 3,5-Di-O-tolyl-2-desoxyribofuranosylchlorid **4** für die Synthese von Desoxyribosiden, und 2,3,5-Tri-O-benzyl-arabinofuranosylchlorid **5** für die Synthese der als Antimetabolite [13.1.4] bedeutenden Arabinoside.



Die Synthese der N-Ribofuranoside gelingt aus dem perbenzylierten Ribosederivat **6**. Dessen labile 1-Benzylgruppe kann selektiv zu **7** bromiert werden. Umsetzung solcher α -Brom- (oder α -Chlor)-pentosen mit Pyrimidinderivaten und Silber- bzw. Quecksilbersalzen [FISCHER-HELPERICH-Methode] der Pyrimidine liefert β -Nukleoside, wie z.B. Cytidin.

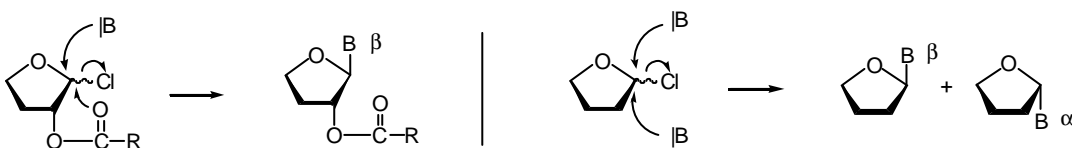


Nach der HILBERT-JOHNSON-Methode zur Synthese von Pyrimidiniumnucleosiden werden Dialkoxypyrimidine mit Halogenosen umgesetzt (Weg **A** in Formel 13-3). Dieser Syntheseweg wurde von TODD zur ersten Darstellung von Cytidin gewählt. Moderne Methoden greifen auf die Trimethylsilylether zurück, die in hoher Ausbeute in Gegenwart von Katalysatoren wie AgClO_4 mit Halogenosen (Weg **B** in Formel 12-3) reagieren.



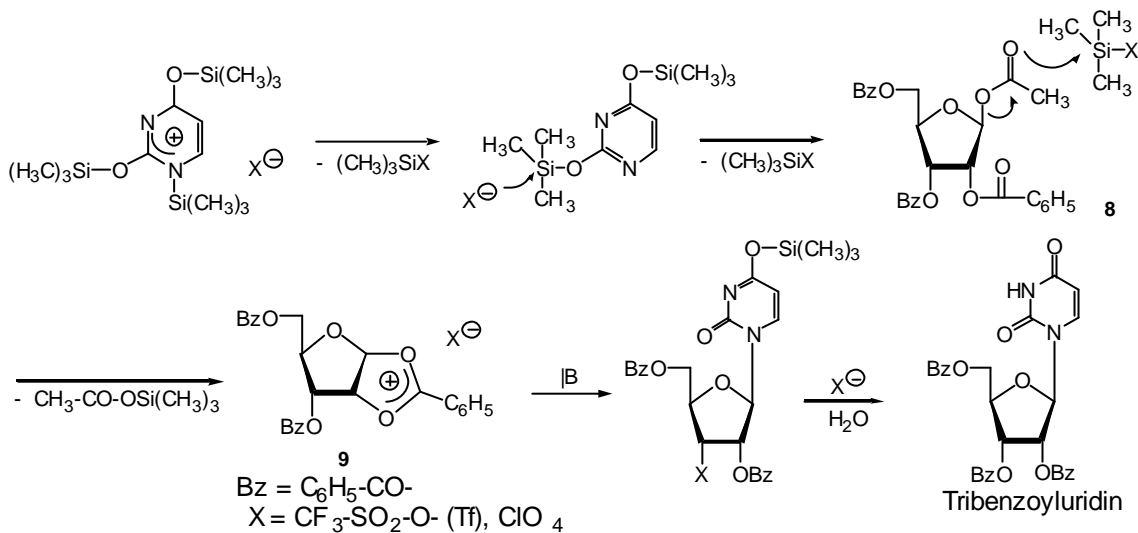
Formel 13-3. Synthese von Pyrimidinnucleotiden.

Durch Umsetzung der Hg-Salze als auch der Silylether der Nucleobasen mit Halogenosen sollten unter S_N1 -Bedingungen beide Anomere des Nucleosids entstehen. Bei der Lewisäure-katalysierten Synthese der Riboside geben 2-Acylribohalogenide jedoch aufgrund der Beteiligung des 2-Acyloxyrestes bevorzugt die β -Anomeren

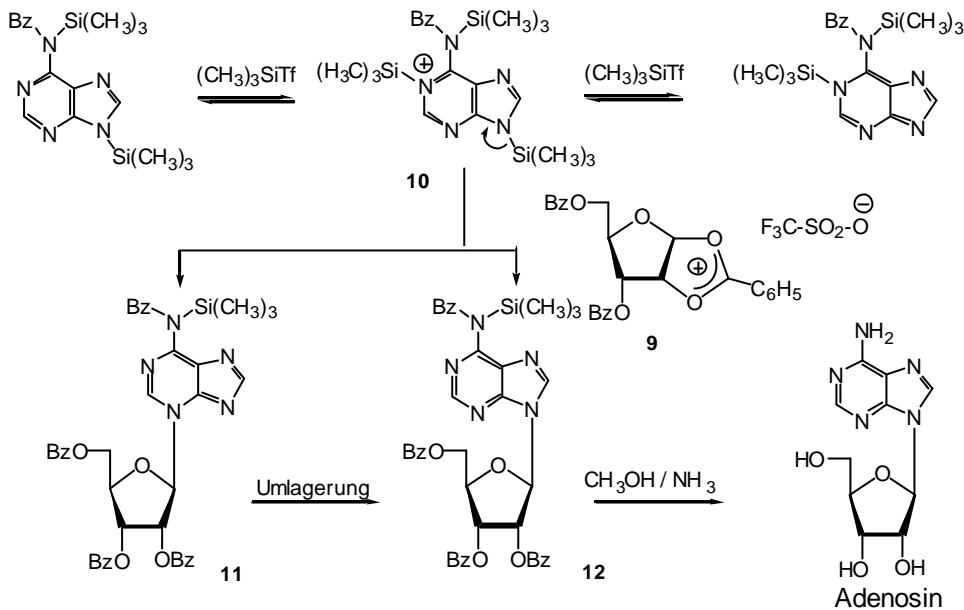


(Nachbargruppeneffekt, *trans*-Regel von BAKER, vgl. 4.). Bei der Synthese der 2-Desoxyribofuranoside (kein Nachbargruppeneffekt) entsteht hingegen auch das α -Anomer.

Anstelle der Lewisäure-Katalysatoren können auch die Trimethylsilylperchlorate bzw. -trifluormethansulfonate [Triflate] der Nucleobasen eingesetzt werden, als Zuckerbausteine dienen O-Acetyl- (**8**) oder O-Benzoyl-derivate. Unter dem Einfluss von Trimethylsilyltriflat als Elektrophil wird direkt der Carbonylsauerstoff der Acetylgruppe unter Bildung des Acyloxoniumions **9** angegriffen. Da das Silyltriflat kaum Tendenz zeigt, mit der heterocyclischen Pyrimidin-Base zu reagieren, kann der Heterocyclen nun das Kohlenhydratcarbeniumion von der β -Seite (Nachbargruppeneffekt) angreifen. Abspaltung der Basenschutzgruppe führt zur Bildung von tribenzoylgeschütztem β -Uridin (Formel 13-4). Die Reaktion der entsprechenden 2'-Desoxyzucker führt bei dieser Methode ebenso zu einem Gemisch der α - und β -Anomeren.



Auch Purinnucleoside sind nach dieser Methode zugänglich. Silyliertes Purin **10** wird mit O-Acylribose **9** in Gegenwart von Trimethylsilyltriflat umgesetzt. Es ist möglich, dass sich primär das N-3-Glykosid **11** kinetisch kontrolliert bildet. Dieses lagert sich aber in das thermodynamisch stabilere N-9-Glykosid **12** um. Die Abspaltung der Schutzgruppen mit Ammoniak ergibt Adenosin (Formel 12-5).



Formel 13-5. Synthese von Adenosin nach der Triflat-Methode.

13.1.4 Nucleosid-Antimetabolite

Unter *Antimetaboliten* versteht man strukturelle Analoga von essentiellen Metaboliten, die nach dem Prinzip der kompetitiven Hemmung in den Nucleinsäure- oder Eiweißstoffwechsel eingreifen. Aufgrund der Ähnlichkeit im chemischen Aufbau mit den natürlichen Nucleosiden, denen eine konkrete Aufgabe im Organismus zukommt, können Antimetaboliten als Enzyminhibitoren wirken, antibiotische Eigenschaften aufweisen oder als "falsche" Komponenten an Stelle natürlicher Nucleoside in die DNA oder RNA eingebaut werden.

Ein Zugang zu *natürlichen Antimetaboliten* (13.15.1) ist durch gezieltes Screening in Kulturfiltraten von Mikroorganismen möglich. Die natürlichen Nucleosidanaloga können im Basenteil und/oder im Zucker teil variiert sein. So wird im *Pentostatin* (13.15.1.1) an Stelle des Adenins ein Tetrahydroimidazol-(4,5-d)-(1,3)-diazepin-System gefunden. *Puromycin* (13.15.11) hingegen besitzt strukturelle Ähnlichkeit mit dem Aminoacyl-*t*-RNA-Ende, wird damit an das Ribosom gebunden und inhibiert die Proteinbiosynthese. Ein weiteres Nucleosid-Antibiotikum ist das *Showdomycin* (13.15.1.2). Interessant ist das Auftreten eines Oxetanrings im *Oxetanocin* (13.). Viele dieser Verbindungen zeichnen sich durch gute antivirale und cytotoxische Eigenschaften aus.

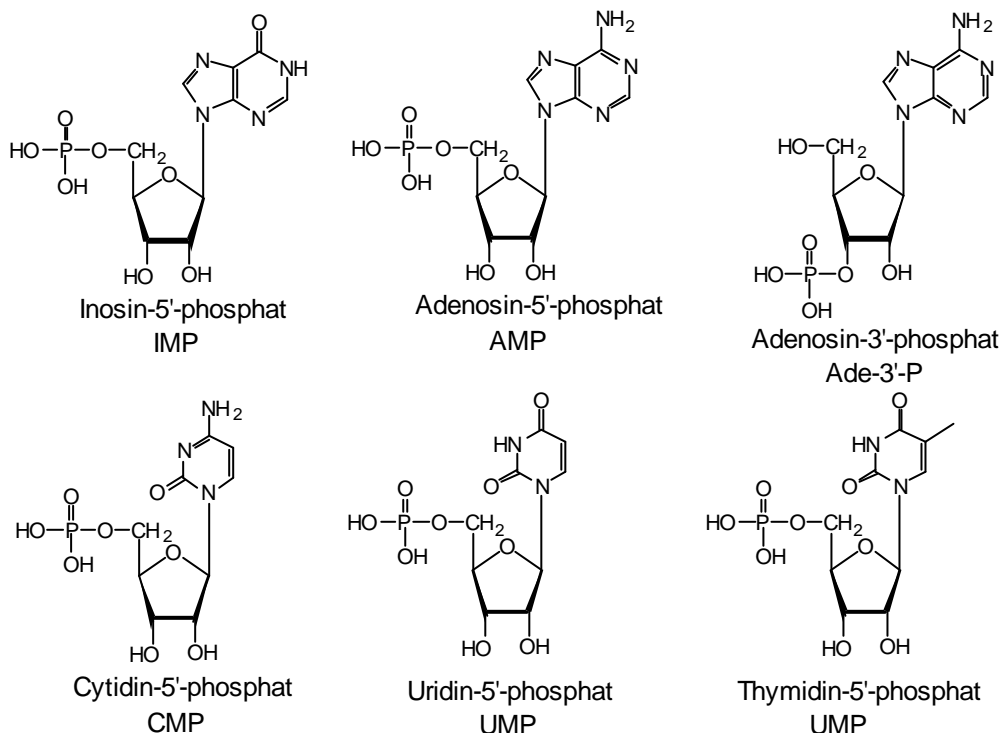
Speziell natürliche carbocyclische Nucleoside (13.15.1.2) zeichnen sich durch gute Aktivität gegen Tumore und Viren bei einer guten therapeutischen Breite aus. Hierbei ist vor allem *Aristeromycin* und *Neplanocin A regularis* zu nennen (13.15.1.2), die Adenosin-Derivate darstellen.

Synthetische Antimetabolite, meist Syntheseveränderungen natürlicher Antimetabolit-Leitstrukturen, werden therapeutisch angewendet. Besondere Bedeutung zur Behandlung von AIDS [HIV, *human immunodeficiency virus*] hat das Didesoxycytidin [ddC] und vor allem das AZT [3'-Azidothymidin] erlangt. Aciclovir ist das bisher einzige, wirklich selektive Derivat gegen Herpes-Viren (13.15.2).

13.2 Mononucleotide

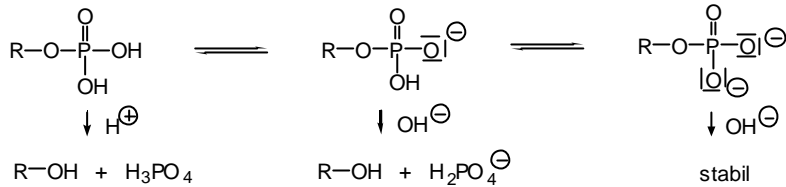
13.2.1 Struktur der Nucleotide

Nucleotide [Nucleosidphosphate] sind die Phosphorsäureester der Nucleoside, je nach Zahl der Nucleosidkomponenten unterscheidet man Mono-, Di-, Tri-, Oligo- und Polynucleotide. Bei den *Mononucleotiden* sind eine oder mehrere Hydroxygruppen mit Phosphorsäure verestert, Riboside können die Phosphorsäure in 2'-, 3'- oder 5'-Stellung, 2-Desoxyriboside nur in 3'- oder 5'-Stellung des Zuckerrestes tragen. Die wichtigsten Mononucleotide sind O-5'-Phosphate, O-5'-Diphosphate und O-5'-Triphosphate, nur für sie gelten z.B. die Abkürzungen AMP, ADP, ATP, CMP, CDP, *etc.* Die 3'-Phosphate werden durch Ziffern gekennzeichnet, z.B. Ade-3'-P für Adenosin-3'-phosphat, usw.



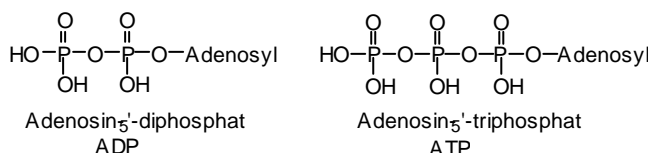
Am längsten bekannt sind die 5'-Phosphate. *Inosin-5'-phosphat* [IMP, Inosinsäure] wurde bereits 1847 von LIEBIG aus Rindfleischextrakt isoliert, *Adenosin-5'-phosphat* [AMP, Adenosylsäure] 1927 aus Muskelgewebe.

Die Monophosphate dissoziieren in zwei Stufen, deren pK-Werte bei 1 und 6 liegen. Der pK-Wert der zweiten Dissoziationsstufe ist bei den 3'-Phosphaten etwas kleiner als bei den 2'- und 5'-Phosphaten, was für eine Trennung dieser Isomere mittels Ionenaustauschchromatographie ausreicht.



Wie andere Phosphorsäureester sind die Nucleotide gegenüber Alkali stabil. Sie werden aber relativ leicht durch Säuren gespalten. Unter diesen Bedingungen wird auch die glykosidische Bindung gespalten. In schwach saurer oder alkalischer Lösung tritt eine intramolekulare Phosphatwanderung zwischen den Hydroxygruppen in 2'- und 3'-Stellung ein, die über ein Cyclophosphat verläuft.

Adenosin-3'-monophosphat [3'-Adenylsäure] lässt sich aus Nucleinsäuren isolieren. *Adenosin-5'-monophosphat* [AMP, 5'-Adenylsäure, Adenosin-5'-phosphorsäure] entsteht bei der Abspaltung von Diphosphat aus Adenosintriphosphat oder durch Biosynthese aus Inosin-5'-diphosphat. *Adenosin-5'-diphosphat* [ADP] kann durch Hydrolyse von Adenosin-5'-triphosphat oder durch Phosphatübertragung von ATP auf andere Moleküle gebildet werden. *Adenosin-3',5'-bisphosphat* ist Bestandteil des acylgruppenübertragenden Coenzym A (13.4.2). *Adenosin-5'-triphosphat* [ATP] nimmt im Stoffwechsel aller Lebewesen eine zentrale Rolle als Energiespeicher und -lieferant und Phosphatüberträger ein. Es wird im Organismus durch Phosphorylierung von ADP durch Substratketten-Phosphorylierung, in der Atmungskette und in der Photosynthese gebildet. ATP speichert Energie in Phosphorsäure-Anhydrid-Bindungen und gibt sie als Energiequelle zum Antrieb enzymatischer Reaktionsabläufe wieder ab. Im Neutralen beträgt die bei der hydrolytischen Spaltung der terminalen Phosphatgruppe freiwerdende Energie 28 - 32 kJ/mol, im Alkalischen liegt dieser Wert noch höher (pH 9: ca. 40 bis 44 kJ/mol). Damit ermöglicht ATP die Muskelarbeit, treibt die Flagellen und Wimperhärchen von Mikroorganismen, bewirkt den aktiven Transport von Molekülen durch Biomembranen und von Chromosomen bei der Zellteilung. Elektrische Fische erzeugen elektrische Ströme mit Hilfe von ATP, Glühwürmchen lumineszieren unter Beteiligung von ATP-Hydrolase. Die entsprechende Luciferase-Reaktion stellt gleichzeitig einen empfindlichen ATP-Nachweis dar.

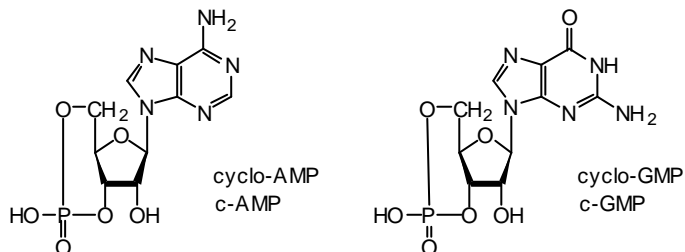


Die 5'-Phosphate können außer mit Phosphorsäure auch mit anderen Säuren Anhydride bilden. Durch die Bildung solcher *gemischter Anhydride* werden in der Zelle bestimmte Säuren zu ihrer Übertragung auf entsprechende Substrate aktiviert. Gemischte Anhydride von Carbonsäuren mit AMP werden als Zwischenprodukte bei der Übertragung von Acylresten auf das Coenzym A in Gegenwart von ATP als Co-

Substrat gebildet (13.4.1). Anhydride mit Zucker-1-phosphaten (sog. Zuckernukleotide) wie *UDP-Galactose*, *UDP-Glucose* oder *GCP-Mannose* dienen als Glykosylüberträger bei der Polysaccharidsynthese, *CDP-Cholin* überträgt Cholin bei der Phospholipidsynthese. Der Schwefelsäurerest von *Adenosin-3'-phosphat-5'-phosphosulfat* [PAdoPS, sog. *aktives Sulfat*] wird auf Kohlenhydrate oder Phenole übertragen.



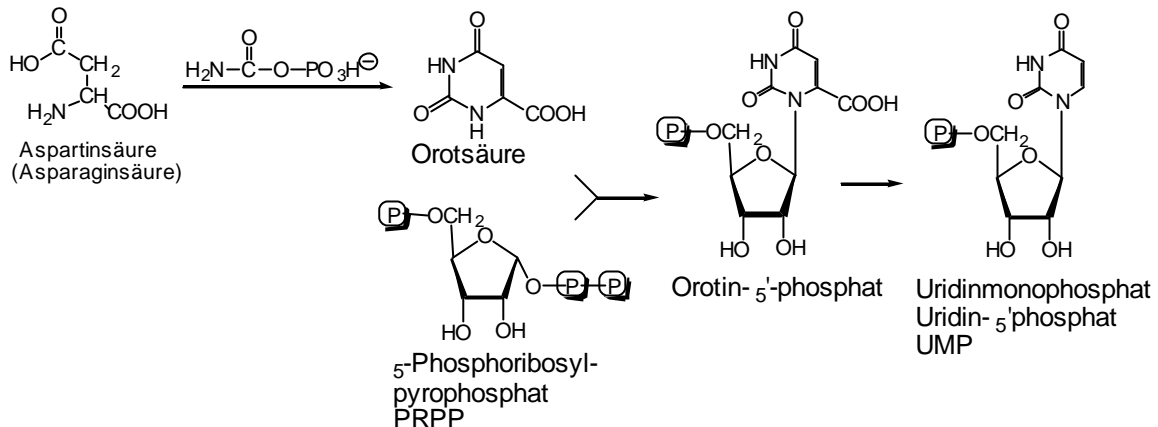
Große biologische Bedeutung besitzen die cyclischen 3',5'-Nucleotide *Adenosin-3',5'-phosphat* [cyclo-AMP, cAMP], das durch EARL SUTHERLAND entdeckt wurde [Nobelpreis 1971], und *Guanosin-3',5'-phosphat* [cGMP]. Sie übernehmen als *second messenger* wichtige Aufgaben bei hormonellen Steuerungsprozessen. cAMP wird bei Einwirkung verschiedener Hormone [*first messenger*], durch Neurotransmitter und andere externe Signalstoffe aus Adenosintriphosphat gebildet. Die Hormonsignale werden mit Hilfe von Rezeptoren auf der Zellwand über sog. *G-Proteine* ins Zellinnere geleitet [Signaltransduktion]. Das cAMP beeinflusst Transkription und Stoffwechselprozesse und lenkt zahlreiche enzymatische Reaktionen. cAMP, bei dem ein Phosphorsäurerest gleichzeitig in 3'- und 5'-Position der Ribose verestert ist, ist im Gegensatz zu den anderen Adenosinphosphaten weitgehend gegen Säuren und Basen stabil. cAMP wird im Organismus rasch abgebaut und ist nicht in der Lage, die Zellmembran zu passieren. Unter den membrangängigen cAMP-Derivaten ist besonders das an der 6-Amino- und 2'-Hydroxygruppe acylierte Dibutyryl-cAMP zu erwähnen.



13.2.2 Biosynthese und Abbau der Nucleotide

Die *Biosynthese* der *Nucleotide* verläuft bei Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren jeweils auf ähnlichem Wege. Die *de novo*-Synthesen gehen von acyclischen Precursoren aus.

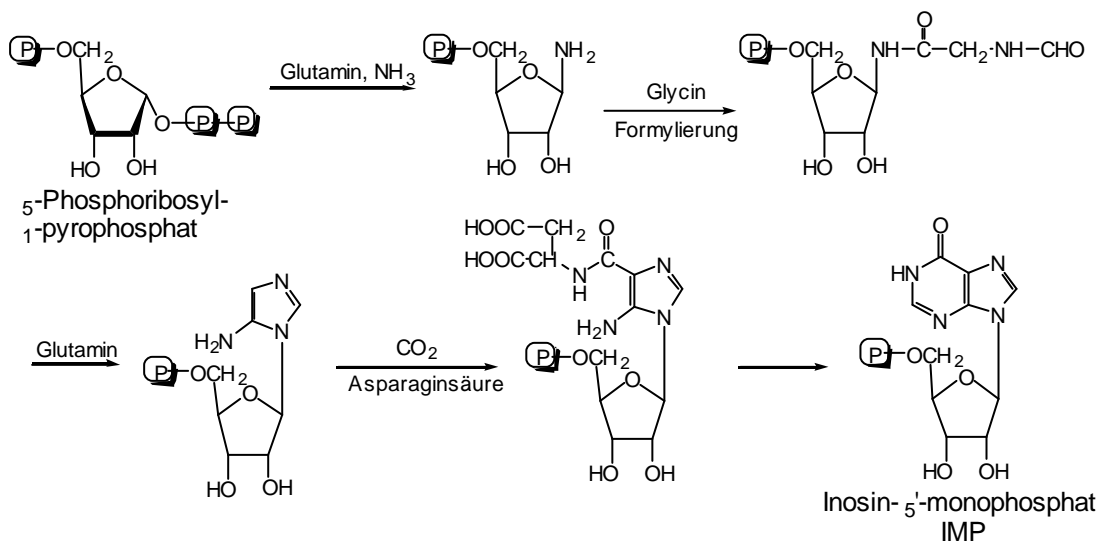
Bei den Pyrimidinnucleotiden erfolgt zunächst der Aufbau des Pyrimidinringes aus Carbamylphosphat und Aspartat zu Orotsäure und anschließend durch Glykosidierung und Decarboxylierung zu Uridinmonophosphat



[UMP] (Formel 13-6). Von UMP leiten sich durch Aminierung oder Methylierung alle anderen Pyrimidinnucleotide ab.

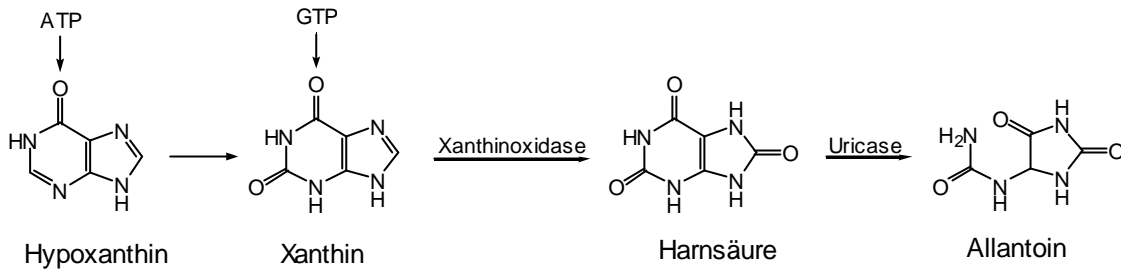
Formel 13-6. Biosynthese der Pyrimidinnucleotide (□ = Phosphat).

Im Unterschied zu den Pyrimidinnucleotiden wird bei den Purinderivaten das heterocyclische Ringsystem unmittelbar an der Ribose aufgebaut. Ausgehend von 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat wird der erste Stickstoff von Glutamin übertragen. An das entstehende 5-Phosphoribosyl-1-amin wird Glycin addiert, mit N-Formyltetrahydrofolsäure zu **13** formyliert und mit Glutamin über ein Amidin zum Imidazol cyclisiert (Formel 13-7). Carboxylierung und Umsetzung mit Asparaginsäure führt zu einem Amid, Eliminierung von Fumarat und Formylierung mit N-Formyltetrahydrofolat induziert die Cyclisierung zum ersten Purinnucleotid Inosin-5'-phosphat [IMP]. Aus IMP entstehen durch Aminierung der Monophosphate oder durch Oxidation die anderen Purinnucleotide.



Formel 13-7. Biosynthese von Inosin-5'-phosphat.

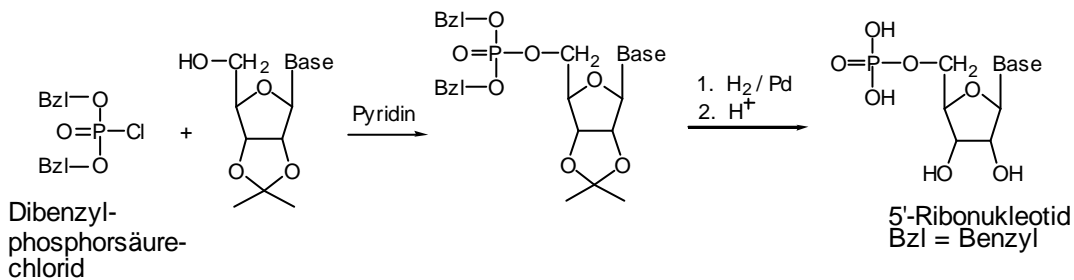
Die Purinnucleotide werden im tierischen Organismus über *Hypoxanthin* bzw. *Xanthin* oxidativ zu *Harnsäure* abgebaut, das Hauptausscheidungsprodukt stickstoffhaltiger Verbindungen bei Reptilien und Vögeln und das Endprodukt des Purinabbaus bei Primaten. Die übrigen Säuger bauen Harnsäure weiter zu *Allantoin* ab (Formel 13-8). Xanthinoxidase-Hemmer werden gegen Harnsäureablagerung therapeutisch bei Gicht eingesetzt. Bei einigen höheren Pflanzen ist Xanthin das Ausgangsprodukt für die Biosynthese der Purin-Alkaloide (13.).



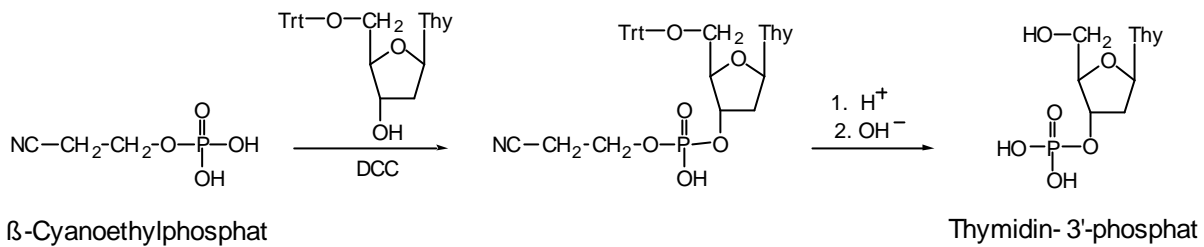
Formel 13-8. Abbau der Purinnucleotide zu Harnsäure und Allantoin.

13.2.3 Mononucleotidsynthesen

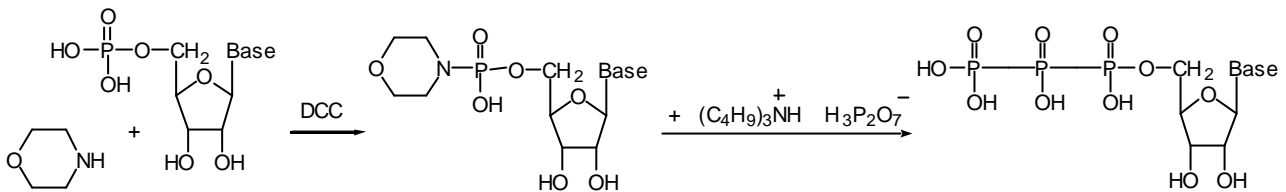
Die chemische Synthese von Mononucleotiden erfolgt fast ausschließlich durch Phosphorylierung entsprechend geschützter Nucleoside (vergl.). Ein wichtiges Phosphorylierungsreagenz ist das von TODD eingeführte Dibenzylphosphorsäurechlorid, wie am Beispiel der Synthese eines 5-Ribonucleotids aufgezeigt wird. Die Benzylreste lassen sich leicht durch katalytische Hydrierung abspalten, abschließend wird der Isopropylidenrest entfernt.



Für die Phosphorylierung von acetonidgeschütztem Isopropylguanidin sowie der 3'-Hydroxygruppen von in 5'-Stellung geschützten Nucleosiden war Dibenzylphosphorsäurechlorid nicht geeignet. Als weitere Phosphorylierungsmittel wurden deshalb Phosphorsäureester eingeführt, die durch ein Kondensationsmittel (z.B. DCC) aktiviert werden müssen. Von besonderer Bedeutung ist das β -Cyanoethylphosphat.



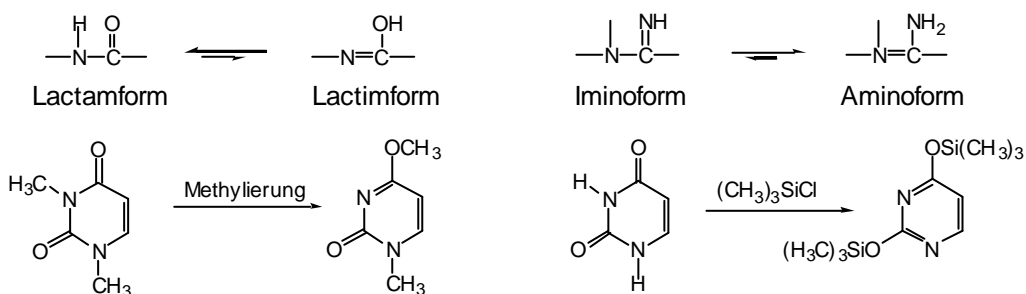
Die Synthese von 5'-Triphosphaten kann durch Umsetzung des 5'-Phosphomorpholids mit Tributylammoniumpyrophosphat in Gegenwart von DCC erfolgen [MOFFATT und KHORANA].



13.2.4 Physikalisch-chemische Eigenschaften

13.2.4.1 Tautomerie

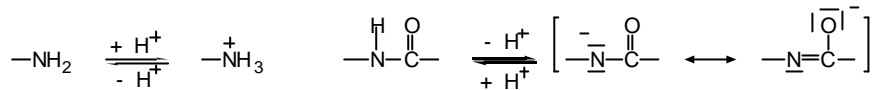
Die Pyrimidin- und Purinbasen sowie deren Nucleoside und Nucleotide können in verschiedenen tautomeren Formen vorliegen. Die Berücksichtigung dieser Lactam-Lactim- bzw. Imino-Amino-Tautomerie ist von besonderer Bedeutung für die Ausbildung von Wasserstoffbrücken (13.4.3.1) und damit für die Struktur der Nucleinsäuren. Die jeweilige Struktur kann durch Vergleich der UV-, IR- und NMR-Spektren der Verbindungen mit denen ihrer methylierten Derivate ermittelt werden, bei denen jeweils eine tautomere Form fixiert ist.



Im elektronischen Grundzustand und unter physiologischen Bedingungen werden die Lactam- und Aminoformen als die thermodynamisch stabileren bevorzugt. Die Menge der anderen tautomeren Form liegt unter 1 %, bei 4-Thiouracil ist die Thioketoform gegenüber der Thiolform bevorzugt. Im angeregten Zustand aber, z.B. energiereicher Strahlung, sind Amino- und Iminoform etwa gleichberechtigt. Somit könnte die Iminform des Cytosins Anlaß für eine geänderte Basenpaarung und damit für Mutationen (13.4.3.1) sein.

13.2.4.2 Dissoziation

Die Nucleinsäurebasen sowie deren Nucleoside und Nucleotide verfügen mit der Amino- bzw. Lactamgruppe über Strukturen, die mit Säuren bzw. Basen reagieren können. Die pK-Werte der Aminogruppe liegen bei 2,5 - 4,3, die der Lactamgruppe bei ca. 9,5 (vgl. Tab. 13-3).



Durch den Glykosylrest wird der pK_S-Wert etwas verringert. Riboside besitzen einen etwas geringeren pK-Wert als Desoxyriboside (z.B. pK_S-Wert von Uracil = 9,45; 2'-Desoxyuridin = 9,3 und Uridin = 9,17). Bei den Nucleotiden und Nucleinsäuren kommt zusätzlich noch die Dissoziation der Phosphorsäureestergruppe hinzu.

Tabelle 13-3. pK_S-Werte der Nucleobasen, Nucleoside und Nucleotide

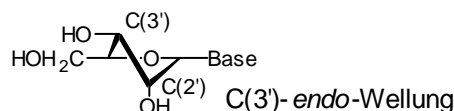
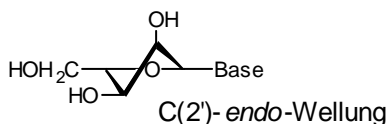
	Dissoziation im Sauren*		Dissoziation im Alkalischen		
	Base	Nucleosid	Base	Nucleosid	Phosphorsäureestergruppe der 5'-Phosphate pK ₁ pK ₂
Adenin	4.1	3.5 – 3.8	9.7**		0.9 6.1
Guanin	3.3	1.6 – 2.5	9.4***	9.2	0.7 6.1
Uracil			9.5***	9.2 – 9.3	1.0 6.4
Thymin			9.8***	9.8	
Cytosin	4.5	4.2 – 4.3	-	-	0.8 6.3

* Aminogruppe, ** Imidazo-NH, *** Lactamgruppe

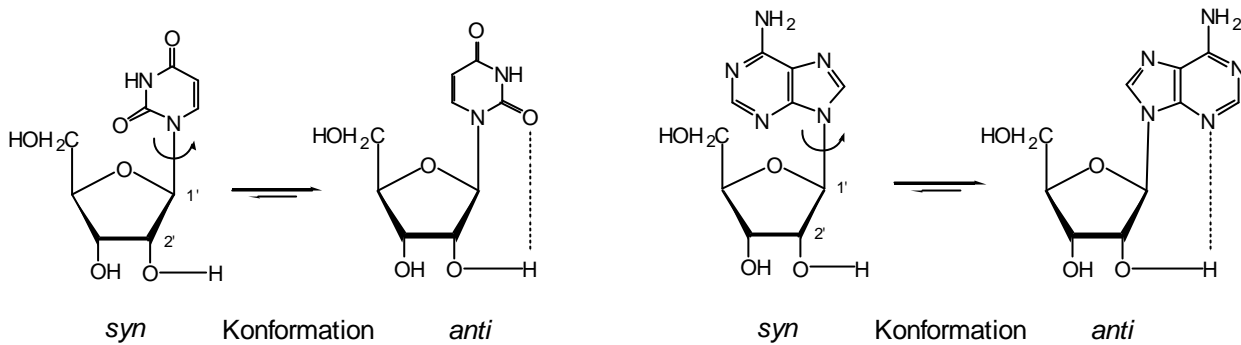
Unterschiedliche pK_S-Werte werden für die Trennung der Nucleinsäurebausteine ausgenutzt. Die wichtigsten Methoden sind die Elektrophorese (1.) und die Ionenaustauschchromatographie (1.). Bei der elektrophoretischen Fraktionierung von Nucleotiden, Polynucleotiden und Nucleinsäuren ist jener pH-Wert optimal, bei dem die Ladung der zu trennenden Komponenten unterschiedlich ist. Die Chromatographie an Kationenaustauschern wird zur Trennung von Mischungen von Nucleosiden und Nucleotiden herangezogen, zur Fraktionierung von Nucleotiden und Nucleinsäuren dient die Chromatographie an Anionenaustauscherharzen (S.).

13.2.4.3 Konformation

Die Purin- und Pyrimidinbasen sind als heteroaromatische Ringsysteme im wesentlichen planar gebaut. Dagegen bevorzugt 5,6-Dihydrouracil, das als Nebenbase in bestimmten Abschnitten der tRNA (13.4.1.2) vorkommt, eine Halbsessel-Konformation.



Die Rotation der Basen um die glykosidische C-(1')-N-Bindung ist vor allem durch den C-(2')-Wasserstoff behindert. Die beiden dadurch bedingten Rotationskonformere werden als *syn*- und *anti*-Konformation bezeichnet. In der *anti*-Orientierung sind die sperrigen Reste O-2 (Pyrimidin) und N-3 (Purin) vom Zucker weggedreht, während sie in der *syn*-Orientierung sterisch ungünstig über dem Zucker liegen (Formel 13-9). Die *anti*-Konformation wird in den Ribosiden zusätzlich durch die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der



Hydroxy-Gruppe an C-(2') und dem N-(3) im Purinsystem bzw. der HO-Gruppe und O-(2) im Pyrimidinsystem begünstigt (Formel 13-9). Ein weiterer wichtiger Strukturparameter ist die Orientierung um die C-4'—C-5'-Bindung, die bevorzugt (+)-*gauche* (*synclinal*) ist, d.h. \angle C-3'—C-4'—C-5'—O-5' ist etwa 60°.

Formel 12-9. *syn*- und *anti*-Konformation von Purin- und Pyrimidinnucleosiden (--- Wasserstoffbrückenbindung).

Allgemein läßt sich die "Standard-Konformation" eines Nucleotids beschreiben durch:

Zucker: C-(2')-*endo* oder C-(3')-*endo*, C-(4')-C-(5')-Bindung (+) *gauche*
glykosidische Bindung: *anti*

Wichtige Strukturparameter sind ferner die Orientierungen um die C(5')-O(5')- und C(3')-O(3')-Bindungen, die im *trans*-Bereich liegen, sowie um die P-O(3')- und P-O(5')-Bindungen, die bei der DNA-Doppelhelix stets (-) *gauche* sind.

Durch sperrige Substituenten in 8-Stellung der Purinnucleoside bzw. 6-Stellung der Pyrimidinnucleoside (z.B. beim Orotidin, 6-Methyluridin) wird die *syn*-Konformation erzwungen. Die 5'-Phosphate dieser Nucleoside sind aufgrund ihrer veränderten Konformation keine Substrate mehr für Nucleotid-Polymerasen. 4-Thiouridin liegt kristallin in der *syn*-Konformation, in Lösung jedoch in der *anti*-Konformation vor.

Hinweise auf die Konformation der Nucleoside in Lösung liefern vor allen NMR-spektroskopische, durch Abschirmung bestimmter Protonen oder den Kern-OVERHAUSER-Effekt, und chiroptische Untersuchungen (13.2.4.5).

13.2.4.4 UV-Spektren

Pyrimidine mit Lactamgruppierung zeigen oberhalb 200 nm $\pi \rightarrow \pi^*$ -Banden. Säurezusatz verändert die Lage der Banden nicht, dagegen erfolgt beim Übergang zu pH-Werten > 7 bei den Pyrimidinbasen eine bathochrome Verschiebung (Tab. 13-4). Substitution am N-Atom der Nucleoside bewirkt bathochrome Verschiebung des Absorptions-Maximums, die pH-Abhängigkeit geht verloren bzw. äußert sich nur noch in einer Erniedrigung der Extinktion bei höheren pH-Werten. Adeninderivate besitzen ein langwelliges Maximum bei 260 nm, bei Guaninderivaten wird diese Bande aufgespalten.

Tabelle 13-4. Langwellige Maxima der UV-Spektren von Nucleosiden

Verbindung	pH der wäßrigen Lösung	λ_{\max}	$\epsilon \cdot 10^{-3}$
Uracil	2	259	8.2
	12	284	6.2
Uridin	2	262	10.2
	12	262	8.5
Thymidin	2	267	9.6
	12	267	7.4
Cytidin	2	280	13.4
	14	272	9.2
Adenosin	2	257	14.6
	12	260	14.9
Guanosin	1	278	8.3*
	11	267	11.2

* Intensivste Bande liegt wie bei Adenosin bei 257 nm (pH 1: $\epsilon = 122000$; pH 11: $\epsilon = 11200$)

Die Elektronenspektren der Nucleoside gestatten nicht nur Rückschlüsse auf deren Struktur (z.B. Lage des Tautomeriegleichgewichtes), sondern dienen vor allem zur Identifizierung und Quantifizierung der Nucleinsäurekomponenten z.B. nach chromatographischer Trennung.

13.2.4.5 Chiroptische Eigenschaften

Nucleoside und Nucleotide besitzen in den Zuckerkomponenten mehrere Chiralitätszentren und sind optisch aktiv. Gegenüber anderen Zuckerderivaten werden allerdings von den meisten Pyrimidinnucleosiden die HUDSONSchen Isorotationsregeln (5.) nicht befolgt. Verbindungen der β -D-Reihe drehen also im Unterschiede zu den Purinnucleosiden und den meisten anderen Zuckerderivaten den polarisierten Lichtstrahl nach rechts, Verbindungen der α -D-Reihe nach links.

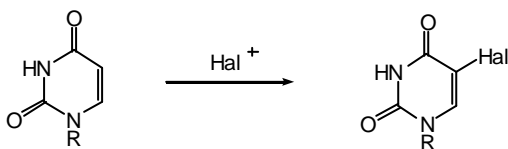
Da der Pyrimidin- bzw. Purinrest der Nucleoside bzw. Nucleotide im UV-Bereich Absorptionsmaxima zeigt (Tab. 13-4), ergeben Nucleoside bzw. Nucleotide gut auswertbare ORD- oder CD-Spektren. Im allgemeinen geben in der β -Reihe Pyrimidinnucleoside positive und Purinnucleoside negative COTTON-Effekte.

13.2.5 Chemische Reaktivität

13.2.5.1 Einwirkung elektrophiler Reagenzien

Elektrophile Reagenzien greifen die Nucleobasen sowohl am Kohlenstoff als auch an den cyclischen und den exocyclischen Stickstoff-Atomen an. Obwohl Pyrimidin ein π -Mangel-Heterocyclus ist, sind bei Anwesenheit elektronenspendender Amino- oder Hydroxygruppen elektrophile Substitutionsreaktionen möglich. Bevorzugt erfolgt dabei der Angriff am Ring-C-5.

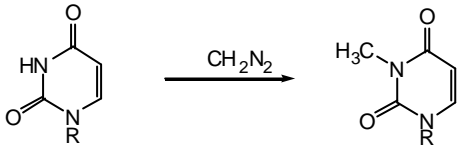
Besondere Bedeutung hat die *Halogenierung*, z.B. zur Synthese von Nucleosid-Antimetaboliten. Die Bromierung erfolgt bereits unter sehr milden Bedingungen, 2'-Desoxyuridin läßt sich mit Iod in Gegenwart von



Salpetersäure iodieren.

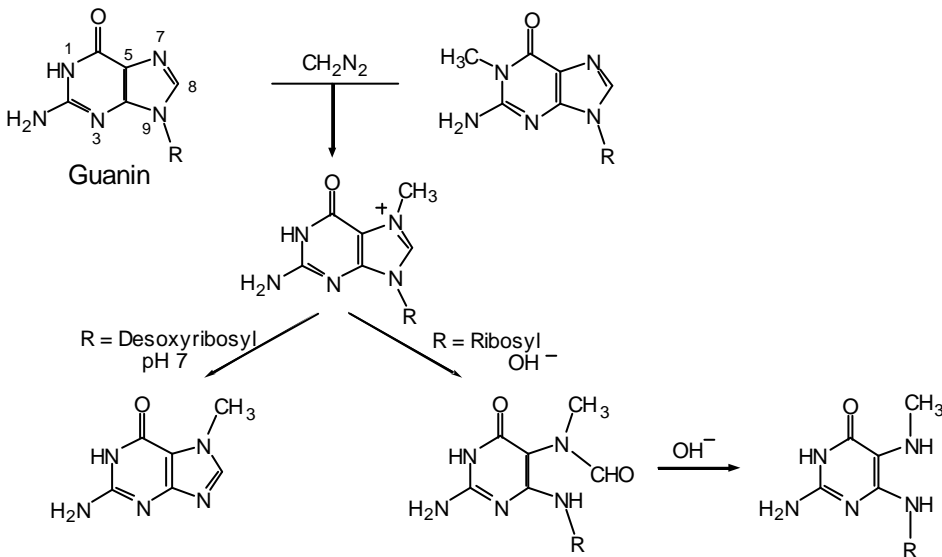
Auch bei den Purinen wird die Reaktivität gegenüber elektrophilen Reagentien durch Amino- oder Hydroxygruppen erhöht, die Substitution erfolgt bevorzugt an C-8.

Pyrimidin- und Purinnukleoside sowie deren Derivate lassen sich relativ leicht alkylieren. In 1-Stellung substituierte Pyrimidine werden mit Diazomethan oder Dimethylsulfat in 3-Stellung N-methyliert, potentielle Diazomethanbildner wie Nitrosomethylharnstoff führen ebenfalls zu Alkylierungen.

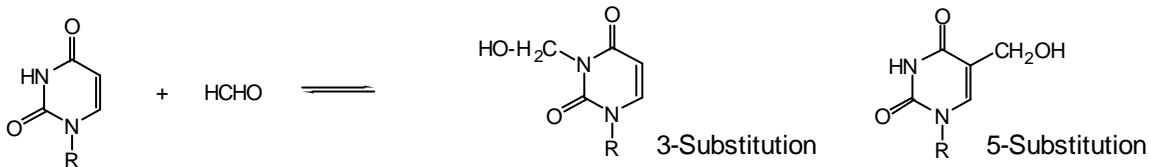


Von den Purinnukleosiden werden am leichtesten die Guanin-Derivate alkyliert. Die *Alkylierung* erfolgt in N-3- und vor allem in N-7-Stellung. In der DNA werden die N-Atome, die an Wasserstoffbrücken beteiligt sind, weniger angegriffen. Hier erfolgt der Angriff bevorzugt am N-7 der Guanosinreste.

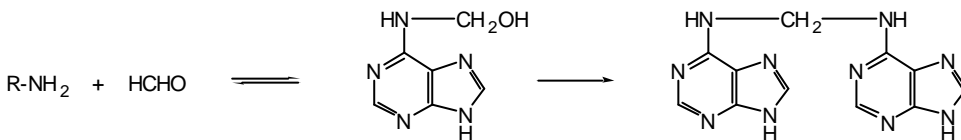
Die quaternären N-7-Alkylverbindungen sind recht unbeständig. Bei 2-Desoxyribosiden erfolgt Spaltung an der N-glykosidischen Bindung, bei Ribosiden wird im Alkalischen der Imidazolring aufgespalten. Unter härteren Bedingungen erfolgt die Spaltung des Imidazolringes auch bei nichtalkylierten Verbindungen.



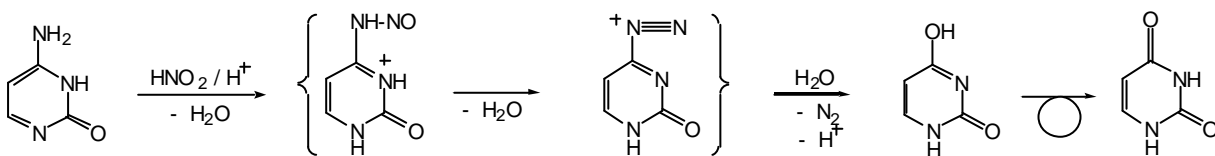
Die Einwirkung von *Formaldehyd* kann zu einer Reaktion mit exocyclischen Aminogruppen, zur Hydroxymethylierung von N-H-Gruppen sowie unter drastischen Bedingungen zur Hydroxymethylierung in 5-Stellung des Pyrimidinringes führen. Hydroxymethylierung am heterocyclischen Ring tritt bei Uracil-, Thymin- und Hypoxanthin-Derivaten auf, sie erfolgt wie Alkylierungen in 3-Stellung der Pyrimidinbasen. Eine elektrophile Substitution ist auch die biogene Bildung der 5-Hydroxymethylpyrimidine. Der Hydroxymethylrest läßt sich *in vitro* durch Erhitzen der Pyrimidinnucleoside mit Formaldehyd in Gegenwart von 0,1 M Salzsäure einführen.



Bei Cytidin, Guanosin und Adenosin erfolgt der elektrophile Angriff des Formaldehyds an der exocyclischen Aminogruppe, zunächst unter Bildung einer Hydroxymethylaminogruppe, die dann mit einem weiteren Mol Amin zu Verbindungen der Struktur R–NH–CH₂–NH–R reagieren kann.

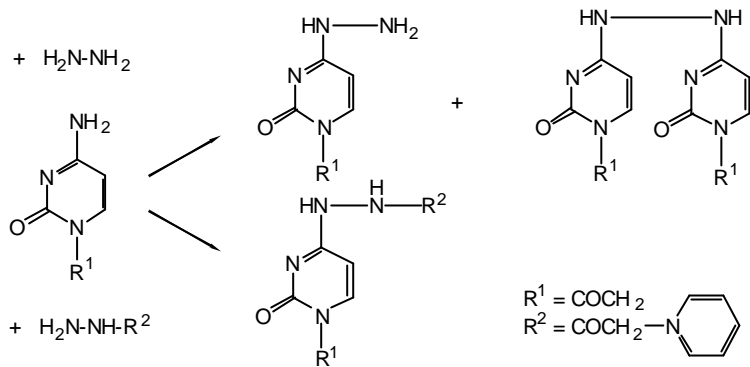


Die Reaktion der primären Aminogruppen der Nucleoside mit salpetriger Säure führt zu N-Nitrosaminen, die in wäßrigem Medium die entsprechenden Hydroxyverbindungen ergeben. Auf diese Weise lassen sich Cytosin- in Uracilreste, Adenin- in Hypoxanthinreste und Guanin- in Xanthinreste überführen.

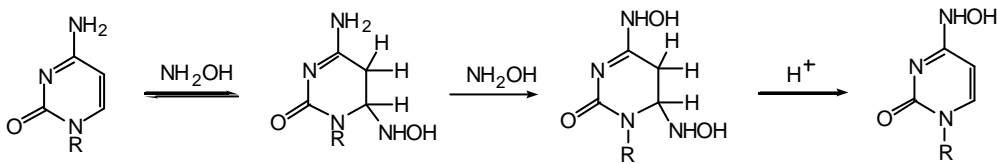


13.2.5.2 Einwirkung nucleophiler Reagenzien

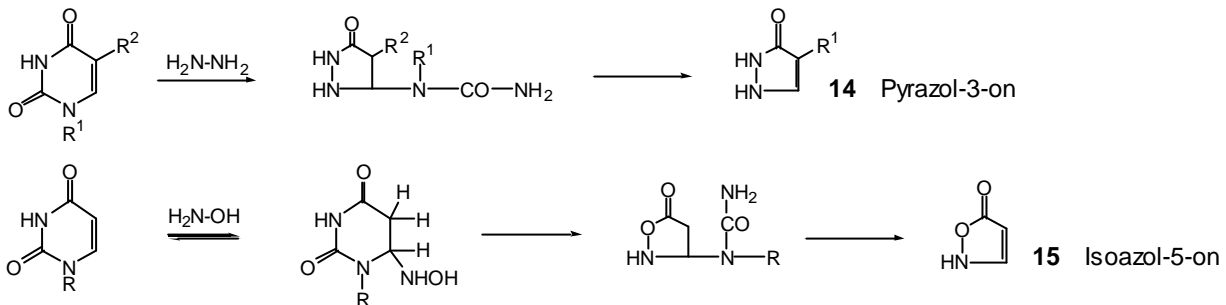
Stark *nucleophile Reagenzien* können zu einem Austausch von Ringsubstituenten sowie zu einer Öffnung des heterocyclischen Ringes führen. Pyrimidinderivate werden leichter durch nucleophile Agenzien angegriffen als Purinderivate. Eine Öffnung des Imidazolringes der Purinnucleoside tritt z.B. bei der Einwirkung von Alkali ein (13.2.5.1). Besondere Bedeutung hat die Reaktion von Hydrazinen und Hydroxylaminen, die im neutralen oder schwach sauren Milieu zu einem Austausch der Aminogruppe des Cytosins durch nucleophile Substitution führt. Unter bestimmten Bedingungen wird nur die Aminogruppe von Cytosinresten ausgetauscht und kann zur selektiven chemischen Modifizierung von Cytosin in Nucleinsäuren herangezogen werden.



Bei der Einwirkung von Hydroxylamin auf Cytosin erfolgt zunächst eine nucleophile Substitution am C-6. C-5-Methyl- oder Hydroxymethyl-derivate reagieren langsamer. Ausgehend von Cytosin, Cytidin oder 2'-Desoxycytidin werden Bis-Hydroxylamin-Derivate gebildet.



Im Alkalischen erfolgt dagegen unter der Einwirkung von Hydrazin bzw. Hydroxylamin eine Spaltung des Pyrimidinringes. Eine erneute Cyclisierung führt zur Bildung von Pyrazol-3-onen **14** bzw. Isoxazol-5-onen **15**.



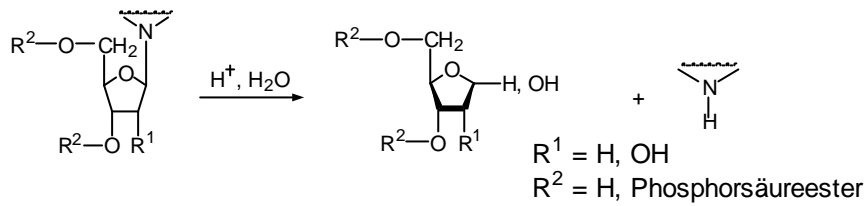
Bei längerer Einwirkung von Hydrazin bzw. Hydroxylamin auf die Pyrimidin-(Harnstoff)-Verbindungen werden Glykosylhydrazin bzw. -hydroxylamin gebildet. Diese selektive Abspaltung der Pyrimidinbasen kann zur Darstellung sog. *Apyrimidin-DNA* herangezogen werden.

13.2.5.3 Hydrolytische Spaltung der N-glykosidischen Bindung.

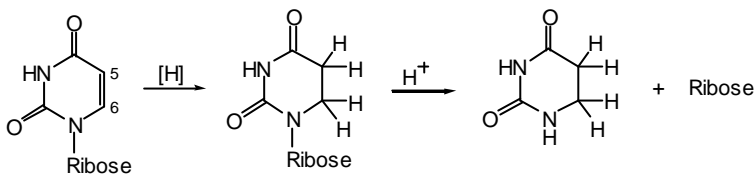
Bei längerer Einwirkung von Hydrazin bzw. Hydroxylamin auf die Pyrimidin-(Harnstoff)-Verbindungen werden Glykosylhydrazin bzw. -hydroxylamin gebildet. Diese selektive Abspaltung der Pyrimidinbasen kann zur Darstellung sog. *Apyrimidin-DNA* herangezogen werden.

13.2.5.3 Hydrolytische Spaltung der N-glykosidischen Bindung.

Nucleoside werden als N-Glykoside säurekatalytisch gespalten, wenn auch wesentlich langsamer als O-Glykoside. Die Spaltgeschwindigkeit hängt von der Struktur der Base als auch von der der Zuckerkomponente ab. Purinnucleoside werden 100 - 1000mal schneller als entsprechende Pyrimidin nucleoside hydrolysiert, Guaninderivate sind geringfügig labiler als Adeninderivate. Die Stabilität der Purinnucleoside wird noch wesentlich verringert durch eine Alkylierung an N-7, z.B. sind 7-Methyl-2'-desoxyguanosin-Derivate bereits bei pH 7 und 37 °C in kurzer Zeit hydrolysiert.



Pyrimidin-N-glykoside werden erst unter Bedingungen gespalten, die bereits zu einer weitgehenden Zersetzung des Zuckers führen. Die Stabilität der Pyrimidinnucleoside kann jedoch durch Hydrierung der 5,6-Doppelbindung wesentlich verringert werden.

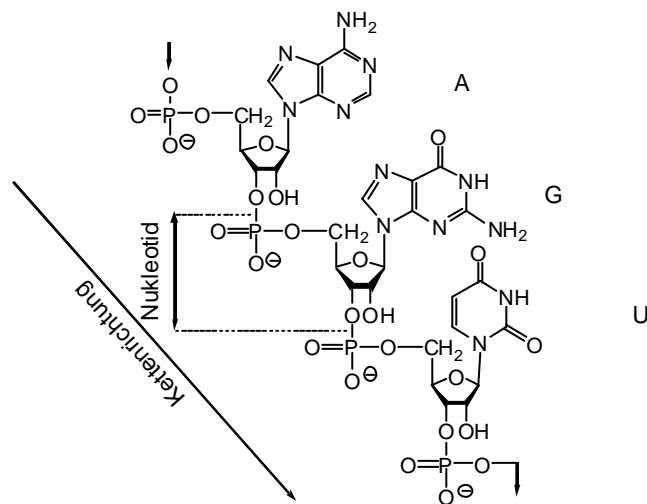


Desoxyriboside sind generell um den Faktor 10^2 bei den Pyrimidin- und 10^3 bei den Purinderivaten leichter spaltbar als die entsprechenden Riboside. Die leichte Spaltbarkeit der N-glykosidischen Bindung der DNA wird zum histochemischen Nachweis nach der FEULGEN-Reaktion herangezogen.

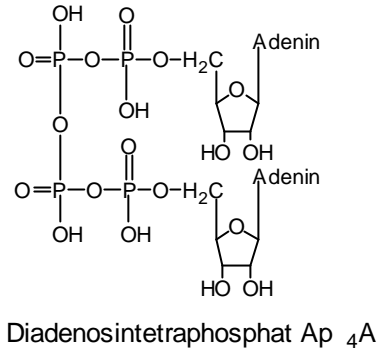
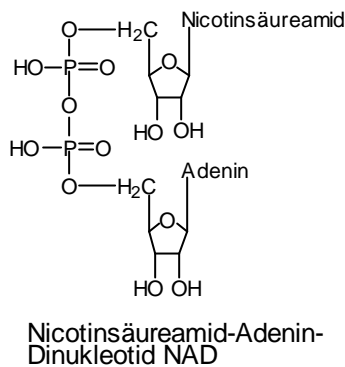
13.3 Oligo- und Polynucleotide

13.3.1 Struktur und Nomenklatur

Oligonucleotide als die Bausteine der Nucleinsäuren werden durch Phosphatverknüpfung der 5'-Stellung der einen Nucleotidkomponente mit der 3'-Hydroxygruppe der benachbarten Nucleotidkomponente gebildet.



Eine Gruppe von Dinucleotiden mit unterschiedlicher Verknüpfung kommt in einigen Coenzymen (12.) vor. Dabei werden die Dinucleotide durch eine Anhydridbildung zwischen zwei 5'-Phosphaten gebildet ("Schwanz-Schwanz"-Verknüpfung). Beispiele hierfür sind *Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid* [NAD,] und *Flavin-Adenin-Dinucleotid* [FAD,]. P^1, P^4 -Di(adenosin-5')-tetraphosphat [Ap₄A] ist ein intrazellulärer Signalstoff und wirkt als Alarmon bei Hitzeschock und oxidativem Stress der Zelle.



Synthetische Oligo- und *Polynucleotide* wurden vor allem in der Gentechnik benötigt. Die Aufklärung des genetischen Codes gelang nach der Synthese aller 64 möglichen Trinucleotide der in der DNA vorkommenden Basen und deren Polymerisation zu Sequenz-Homopolymeren. Polynucleotide sind ferner als Interferon-Induktoren interessant geworden. Der am besten untersuchte Interferon-Induktor ist das doppelsträngige Polyribonucleotid Poly(I)-Poly(C). Außerdem dienen Oligo- und Polynucleotide als Nucleinsäure-Modelle sowie zum Studium des Wirkmechanismus mancher Pharmaka.

Zur *Kurzbezeichnung* der Oligonucleotide dienen Ein-Buchstaben-Symbole (Tab. 13-1). Die Phosphatgruppe wird mit p abgekürzt. Eine Phosphatgruppe in 5'-Stellung wird als p vor dem Großbuchstaben des Nucleosids, eine in 3'-Stellung als p nach dem Großbuchstaben angegeben. Das Dinucleotid aus Adenosin und Uridin (13.3.1) kann also in der Kurzform als pApUp bezeichnet werden. Bei längeren Sequenzen (Polynucleotiden) wird das p durch einen Bindestrich ersetzt. Ein Komma zwischen den Großbuchstaben bedeutet, daß die Reihenfolge nicht genau bekannt ist.

13.3.2 Oligo- und Polynucleotidsynthesen

13.3.2.1 Schutzgruppen und Kondensationsmittel

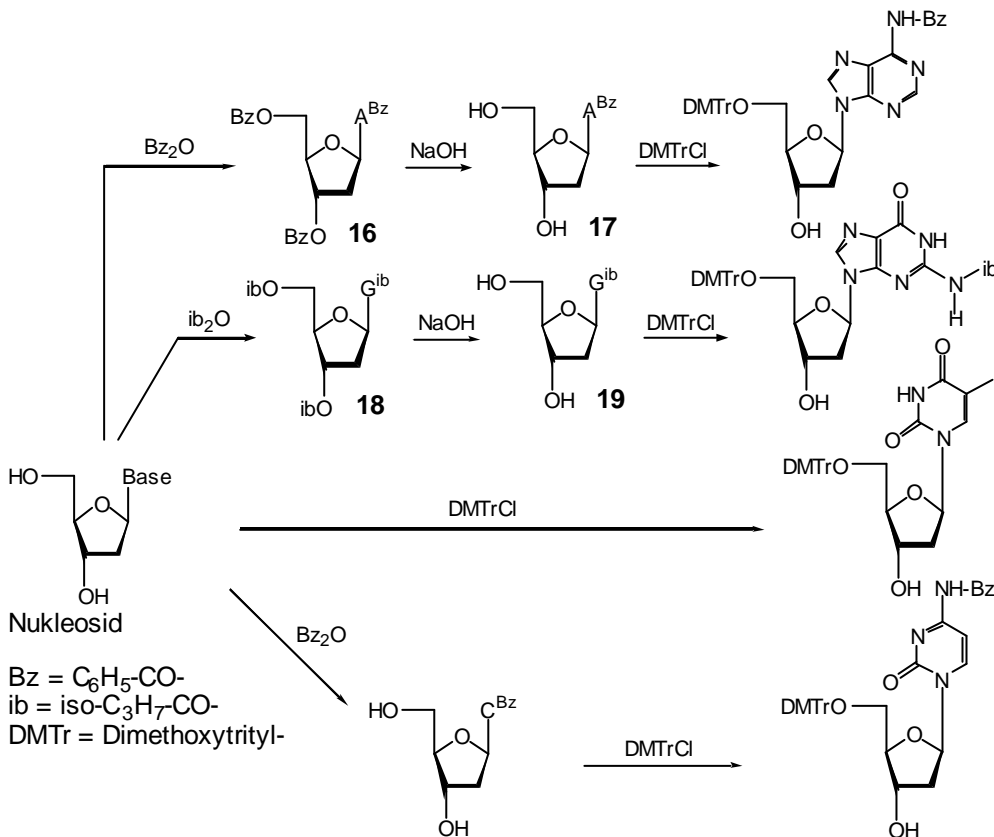
Die *in vitro*-Verknüpfung von Mono- bzw. Oligonucleotiden über eine 3',5'-Phosphorsäurediester-Bindung zu Oligo- bzw. Polynucleotiden kann nicht-enzymatisch oder enzymatisch erfolgen. Bei der nicht-enzymatischen Synthese sind alle nicht umzusetzenden nukleophilen Gruppen durch Schutzgruppen zu blockieren und nach erfolgter Synthese diese wieder zu entfernen. Zu schützen sind primäre und sekundäre Hydroxygruppen der Zucker, Aminogruppen der Basen Adenin, Guanin und Cytosin sowie gegebenenfalls

Phosphorsäuremonoestergruppen, um die Bildung von Pyrophosphaten und Verzweigungen zu verhindern. In Tab. 13-5 sind einige der gebräuchlichsten Schutzgruppen zusammengestellt.

Hydroxygruppen werden als Ester, Ether, Ketale bzw. Acetale geschützt, für primäre Hydroxygruppen dienen vor allem der Triphenylmethanrest [Tritylrest, Tr] bzw. die leichter zu entfernenden Mono- [MMTr] oder Di-*p*-methoxytritylreste [DMTr]. Jede *p*-ständige Methoxygruppe am Tritylrest erhöht die Säurelabilität jeweils um den Faktor 10. Die vicinalen Hydroxygruppen der Riboside werden meist durch Überführung in Acetonide [=CMe₂] geschützt. Zum Schutz der Phosphorsäuremonoestergruppierungen dienen Benzylreste bzw. leicht durch alkalische Hydrolyse zu entfernende β -substituierte Alkylreste wie die β -Cyanoethylengruppe.

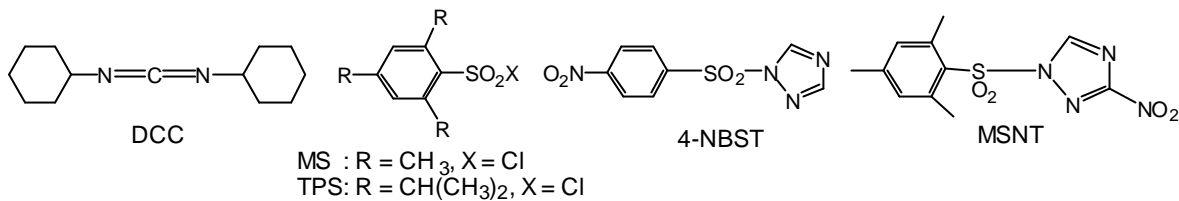
Geschütztes Adenosin erhält man durch Reaktion von Adenosin mit Benzoesäureanhydrid (Formel 13-10). Das tribenzoylierte Produkt **16** wird mit 5*N* NaOH umgesetzt, dabei erfolgt die Hydrolyse der 3'- und 5'-Alkohole zum *N*'-Benzoyladenosin **17**. Die primäre 5'-Hydroxygruppe kann mit Dimethoxytritylchlorid [DMTrCl] selektiv vor der sekundären C-3'-Hydroxygruppe geschützt werden.

In analoger Weise wird Guanosin an C-5' und an der Aminogruppe blockiert. Dabei hat sich die Isobutyrylgruppe [ib] vorteilhafter als die Benzoylgruppe erwiesen. In Thymidin wird die C-5'-OH-Gruppe mit DMTrCl geschützt. Cytosin kann direkt an der Aminofunktion des Heterocyclus benzoyliert werden.



Formel 13-10. Herstellung geschützter Nucleoside

Die Kondensationsreaktion eines 3'-Phosphorsäuremonoesters mit der gewünschten primären 5'-Hydroxygruppe der anderen Nucleotid-Komponente gelingt nur nach Aktivierung des Monoesters. Als geeignete *Kondensationsmittel*, die über eine Zwischenreaktion diese Aktivierung bewirken, haben sich vor allem Carbodiimide wie das von KHORANA und TODD eingeführte Dicyclohexylcarbodiimid [DCC] sowie sterisch gehinderte Sulfonsäurechloride wie Mesitylsulfonylchlorid [MS] oder Triisopropylbenzolsulfonsäurechlorid [TPS] bewährt. Ähnlich werden sie auch zur Peptid- und Phospholipidsynthese eingesetzt. Weiter finden Gemischen aus TPS mit Tetrazol oder 1-Methylimidazol sowie Trialkylbenzolsulfoazolide (X = Triazolid, Tetrazolid, 3-Nitro-1,2,4-triazolid u.a.) Anwendung. Ein besonders aktives Kondensationsmittel ist das 1-(4-



Nitrophenyl-sulfonyl)1H-1,2,4-triazol [4-NBST] und das Mesitylsulfonyl-3-nitro-1,2,4-triazol [MSNT].

Das eigentlich phosphorylierend wirkende Agens ist das entsprechende Metaphosphat. Dessen Bildung erfolgt bei den Sulfonsäurechloriden wahrscheinlich über ein gemischtes Anhydrid bzw. in Anwesenheit von Pyridin über einen Pyridin-Komplex, beim Carbodiimid über ein Isoharnstoffderivat.

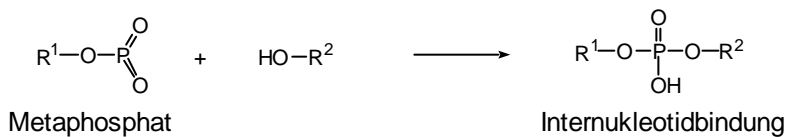
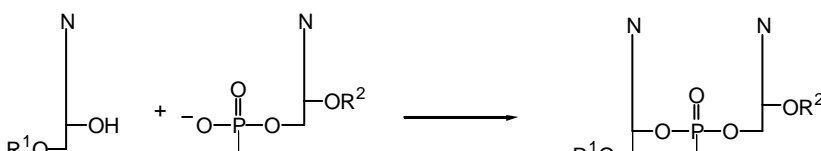


Tabelle 13-5. Schutzgruppen bei Nucleosid- und Nucleotidsynthesen

Zu schützende Gruppe	Schutzgruppe			
	Name	Abkürz.	Einführung mittels	Entfernung durch
-CH ₂ OH	Trityl	Tr	Triphenylmethylchlorid (Tritylchlorid)	Säurekatalysierte Hydrolyse
	Mono- bzw. Di-p-methoxy trityl	MMTr DMTr	Mono- bzw. Di-p-methoxytritylchlorid	Milde säurekatalysierte Hydrolyse
	Isobutyryl	ib	Isobuttersäureanhydrid	
>CHOH	Acetyl	Ac	Essigsäureanhydrid/Pyridin	Alkalische Hydrolyse
	Benzoyl	Bz	Benzoylchlorid/Pyridin	Alkalische Hydrolyse
-CH-OH -CH-OH	Isopropyliden	=Cme ₂	Aceton/Orthoameisensäureester	Säurekatalysierte Hydrolyse
-NH ₂ der Basen	Anisoyl	An	Anisoylchlorid/Pyridin	Alkalische Hydrolyse
=CHOH, -NH ₂	Pivaloyl	Piv	Pivaloylchlorid	Milde alkalische Hydrolyse (NH ₃)
-O-PO ₃ H ₂	Cyanoethyl	CNEt	β-Cyanoethylphosphat, DCC	Milde alkalische Hydrolyse

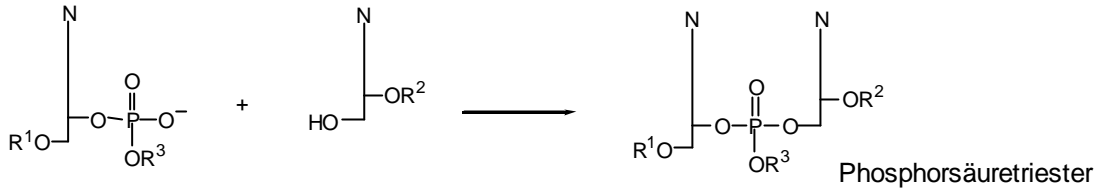
13.3.2.2 Nicht-enzymatische Synthesen

Bei der *nicht-enzymatischen* Synthese der Internukleotidbindung lassen sich verschiedene Varianten

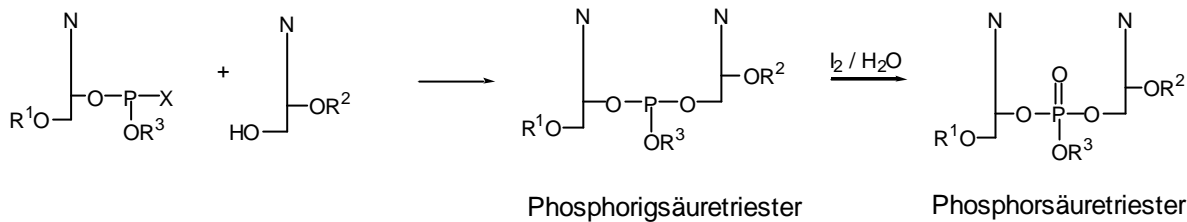


unterscheiden:

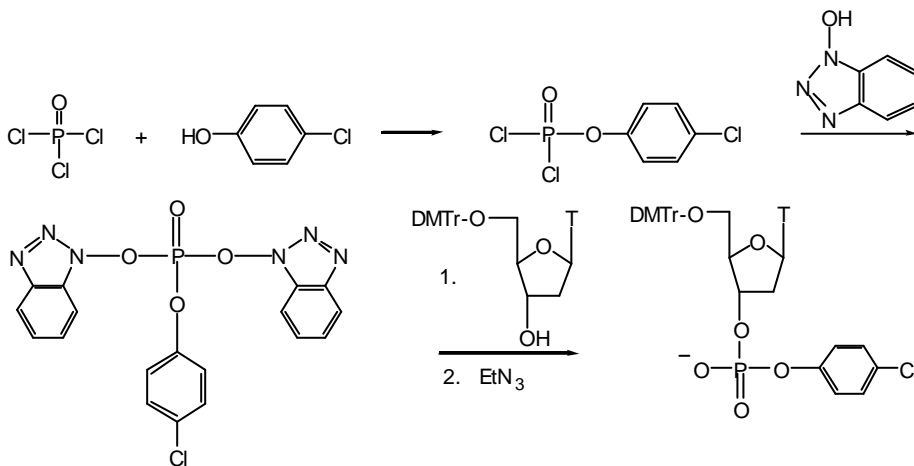
- die *Diestermethode*,
- die favorisierte *Triestermethode*



- und die *Phosphit-Triestermethode*, die von Phosphorigsäureestern ausgeht.

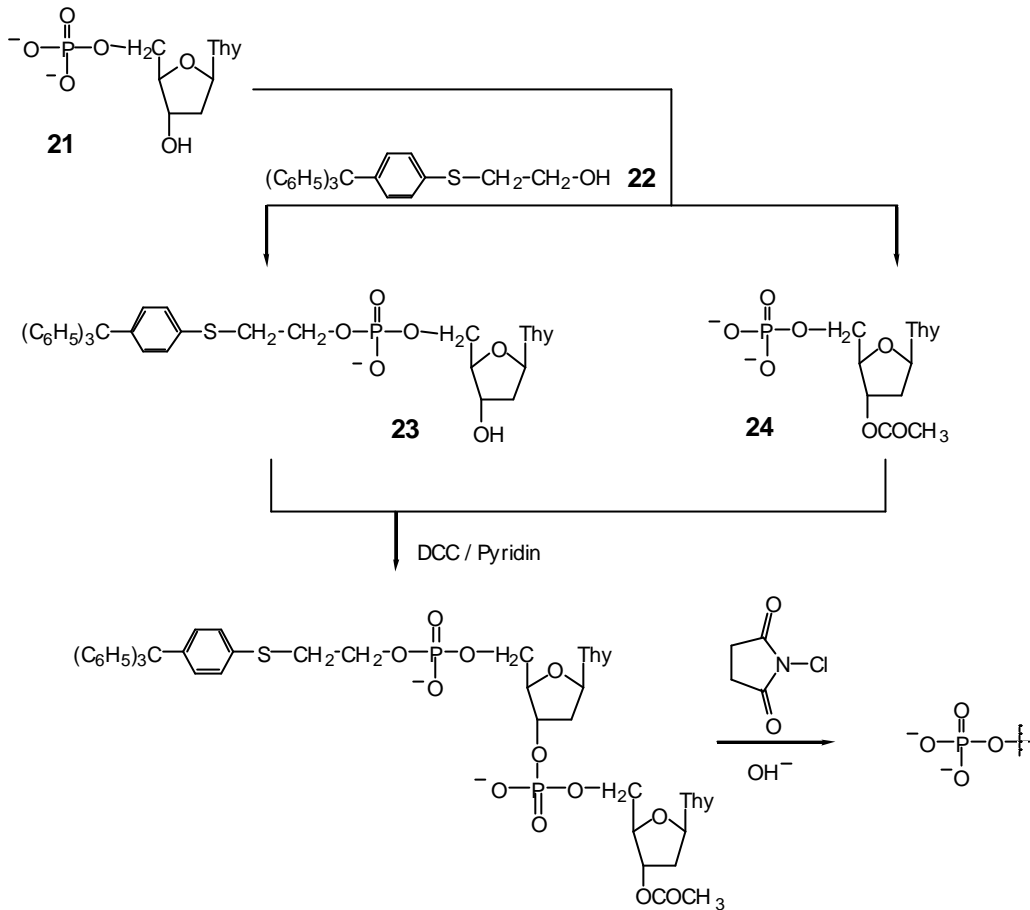


Bei der Triestermethode wird Phosphoroxychlorid mit p-Chlorphenol und anschließend mit 1-Hydroxybenzotriazol umgesetzt. Mit diesem Reagenz gelingt die Phosphorylierung der 2'-Desoxyribonukleoside. In den entstehenden Desoxyribonukleotiden ist ein Sauerstoff der Phosphorgruppe mit einem p-Chlorphenylrest als Ester geschützt.



Die Synthese von Oligoribonukleotiden ist bedeutend schwieriger als die der 2'-Desoxyribonukleotide, da hierbei zusätzlich noch die 2'-Hydroxygruppe selektiv zu schützen ist, die sich in ihrer chemischen Reaktivität kaum von der in 3'-Stellung unterscheidet.

Oligomere 2'-Desoxyribonukleotide werden nach KHORANA aus dem 5'-Phosphat **21** einer 2'-Desoxyribose [dRib] dargestellt (Formel 13-13). Umsetzung mit einem Alkohol [2-(4-Tritylphenyl)thioethanol, TPTE **22**] ergibt einen Phosphorsäurediester **23**, während durch Acetylierung das Monoester-Acetat **24** entsteht. Durch Aktivierung mit DCC werden die beiden verknüpft.



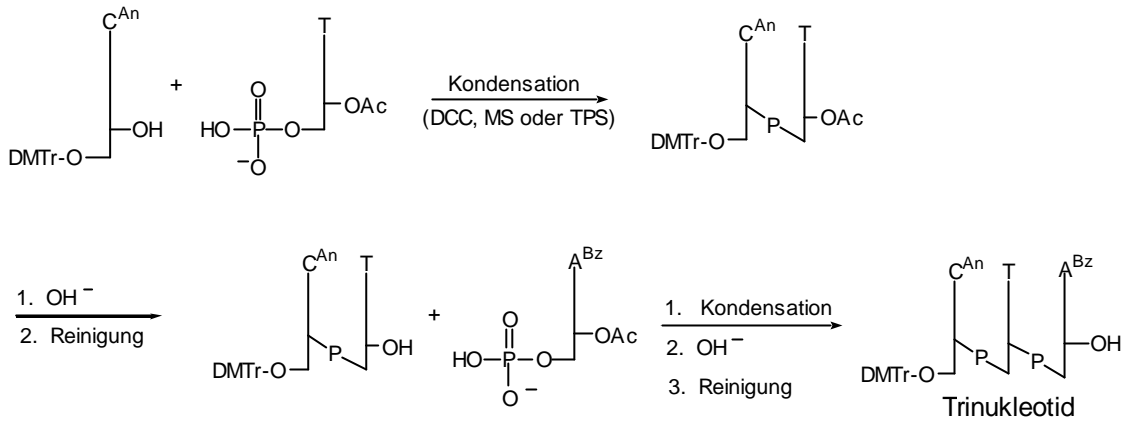
Formel 13-11. Oligoribonucleotidsynthese nach KHORANA und TODD.

Die *Reinigung* der durch die Synthese anfallenden Produkte erfolgt meist durch chromatographische Trennung, vor allem mittels HPLC an RP-, DEAE-Cellulose- und Anionenaustauscher-Säulen.

Bei der *Polynucleotidsynthese* unterscheidet man die Polymerisation zu Homopolymeren, die schrittweise Synthese, die Block-Kondensation vorgebildeter Oligonucleotide und die Synthese an makromolekularen Trägern.

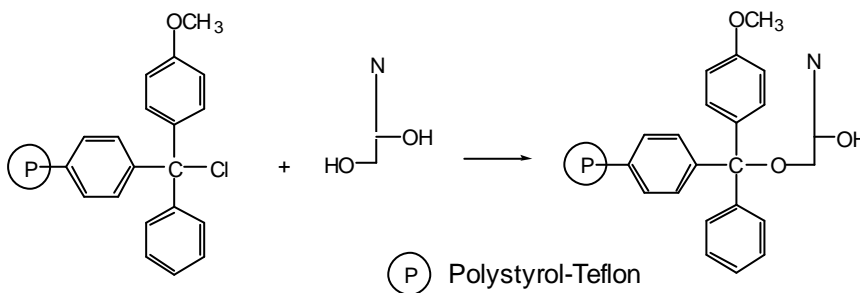
Homopolymere lassen sich durch Behandeln der 5'-Nucleotide mit Kondensationsmitteln und anschließende chromatographische Trennung der anfallenden Gemische erhalten. Auf diese Weise wurden z.B. Poly(dT), Poly(dA), Poly(dG) und Poly(dC) synthetisiert. Solche Homopolymere eignen sich u.a. als Template (S.) für die DNA-Polymerase.

Die *schrittweise Synthese* beruht auf der wiederholten Umsetzung der Phosphorsäuremonoestergruppe von 5'-Mononucleotiden mit der 3'-Hydroxygruppe der wachsenden Oligonucleotidkette. Als Beispiel sei die Synthese eines geschützten Trinucleotids herausgegriffen.



Die durch schrittweise Synthese dargestellten Oligonucleotide können anschließend durch *Block-Kondensation* zu Polynucleotiden umgesetzt werden. Die Kondensationsmittel sind die gleichen wie bei den anderen chemischen Methoden. Obwohl die Ausbeuten bei der Kondensation von Blöcken geringer sind als bei der Anknüpfung eines Mononucleotids, wird diese Methode häufig eingesetzt, da die Reinigung der Syntheseprodukte relativ leicht ist.

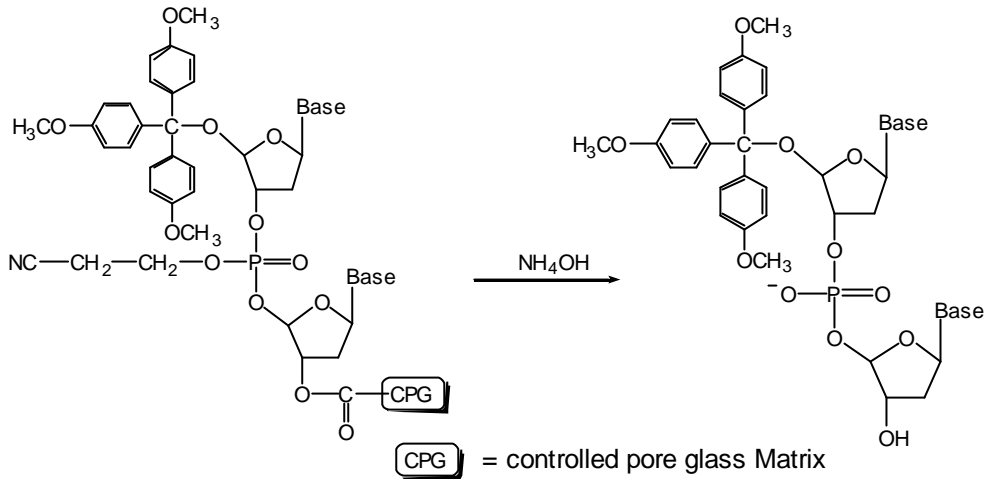
Die *Synthese von Polynucleotiden* an makromolekularen Trägern ist ähnlich der Peptidsynthese nach MERRIFIELD (10.9.4.2). Als unlöslicher Träger [*Festkörpersynthese*] diene zunächst Polystyrol. Für automatische Festphasensynthesen werden Polystyrol-Copolymere (z.B. Polystyrol-Teflon), poröse Gläser und Kieselgele eingesetzt. Die Bindung des ersten Nucleotids an den Träger erfolgt über sog. Ankergruppen. So dient zur Verankerung des ersten Nucleosids an Polystyrol-Teflon Methoxytritylchlorid zur weiteren Umsetzung nach der Diestermethode.



Nach erfolgten Syntheseschritten zur Verlängerung der Nucleotidkette kann das Produkt durch säurekatalysierte Hydrolyse wieder vom Träger getrennt werden. Diese Methode ist nur sinnvoll, wenn die Ausbeuten weitgehend quantitativ sind. Die meisten Arbeitskreise, die DNA-Synthesen durchführen, wenden heute die *β-Cyanoethyl-Phosphoamidit-Methode* [H. KÖSTER] an, wobei die sich wiederholenden Reaktionsschritte immer häufiger von *DNA-Syntheseautomaten* [*DNA-Synthesizer*] übernommen werden. An einem festen Träger gebunden wachsen die DNA-Ketten zur vorher festgelegten Sequenz durch periodische Wiederholungen der Einzelreaktionen, die durch Waschvorgänge voneinander abgesetzt sind. Die Reagenzlösungen werden in zeitlich vorprogrammierter Weise auf den Träger gegeben und die DNA-Kette dadurch Baustein um Baustein verlängert, bis das gewünschte DNA-Stück synthetisiert ist. Die Abspaltung des DNA-Stücks vom polymeren Träger sowie die

Entfernung der während der Synthese benötigten Schutzgruppen gelingt bei den β -Cyanoethyl-Phosphoamiditen in einem Schritt durch Ammoniak.

Mit automatischen DNA-Synthesemaschinen gelangen heute mehr als 100 Basenadditionen, der apparative Aufwand ist zurückgegangen. Die Zykluszeit beträgt in modernen Maschinen nur einige Minuten, nicht umgesetzte Komponenten und Fehlsequenzen werden durch "Capping" als 5'-Acetat entfernt bzw. blockiert, die



Oxidation erfolgt durch I_2 .

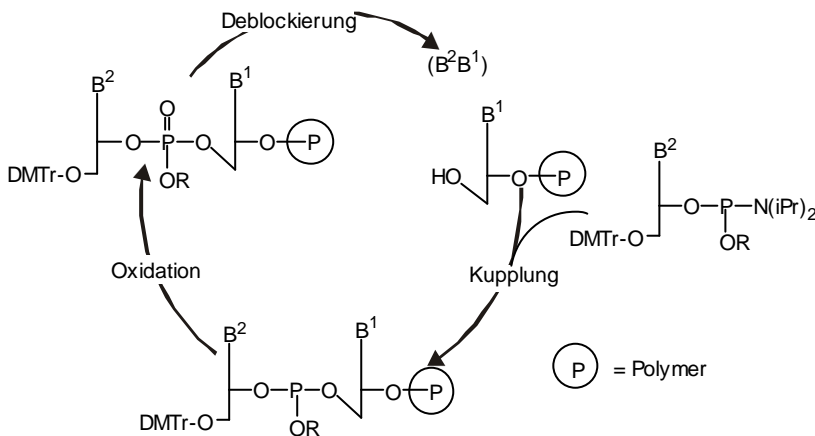


Abbildung 13-1. Zyklus zur automatischen Nucleotidsynthese nach der Phosphoramiditmethode.

Die Synthese an löslichen Polymeren [*Liquid-Phase-Methode*, BAYER und Mitarb.] arbeitet im Unterschied zur heterogenen Festkörpersynthese in homogener Phase. Die Abtrennung niedermolekularer Verbindungen erfolgt hier durch Ultrafiltration. Als Träger kann z.B. ein Polyethylenglycol mit endständiger Aminogruppe dienen, an die das erste Nucleotid über eine Phosphoramidbindung geknüpft ist (Abb. 13-2).

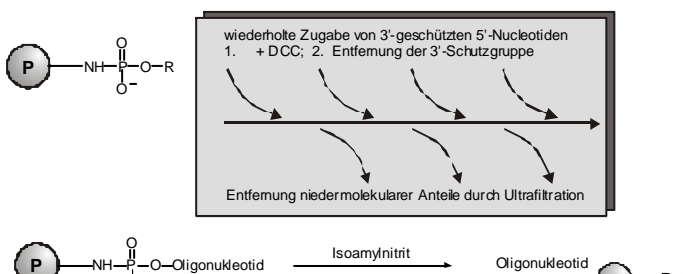


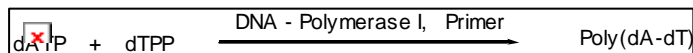
Abbildung 13-2. Schematische Darstellung der Liquid-Phase-Methode nach BAYER.

13.3.2.3 Enzymatische Nucleotidsynthese

Polynucleotid-synthetisierende Enzyme () haben die Möglichkeiten gezielter Polynucleotid-Synthesen wesentlich erweitert und werden für Kettenlängen von 30 - 60 Nucleotideinheiten eingesetzt. Aufgrund der Spezifität der Enzyme kann auf Schutzgruppen verzichtet werden, aus praktischen Gründen können meist nur Mengen unter 1 mg synthetisiert werden.

Die von KORNBERG zuerst aus *Escherichia coli* isolierte *DNA-Polymerase I* synthetisiert *in vivo* in Anwesenheit der Triphosphate aller vier Desoxyribonucleotide, Magnesiumionen und einer einsträngigen Primer-DNA eine doppelsträngige (vgl. 13.) DNA. Diese synthetische DNA hat die gleiche Zusammensetzung wie die Primer-DNA. Mg^{2+} wirkt als eine Art anorganisches Coenzym, die Triphosphatgruppen dienen als Energiequelle.

Unter bestimmten Bedingungen können mit DNA-Polymerase auch künstliche Polydesoxyribonucleotide synthetisiert werden. Das erste künstliche DNA-Analogon Poly(dA-dT) wurde 1960 von SCHACHMAN und Mitarb. aus dATP und dTTP dargestellt.



KHORANA *et al.* gelang 1965, ausgehend von chemisch synthetisierten Di-, Tri- oder Tetranucleotiden, doppelsträngige Polydesoxyribonucleotide mit sich wiederholenden Oligonucleotideinheiten zu synthetisieren, wobei allerdings mit steigender Oligonucleotidsequenz die Reaktionsgeschwindigkeit ab- und die erforderliche Primerkonzentration zunahm. Durch Einsatz der *T4-Polynucleotid-Kinase* gelang dem gleichen Arbeitskreis 1970 die Totalsynthese des Gens für die Alanin-spezifische tRNA aus Hefe (Abb. 13-3).

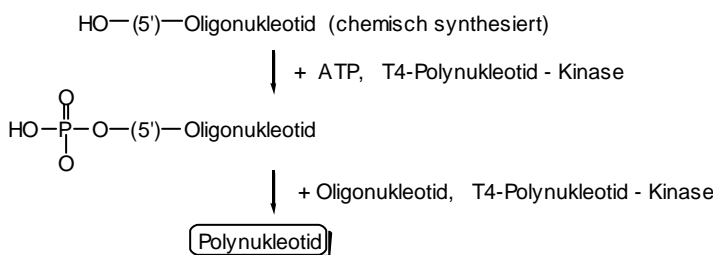


Abbildung 13-3. Schematische Darstellung einer enzymatischen *in vitro*-Synthese eines Polynucleotids mit definierter Sequenz.

a) Chemische Synthese von Oligodesoxyribonucleotiden mit 8 - 12 Nucleotideinheiten und endständigen freien 3'- und 5'-Hydroxygruppen nach bekannten Verfahren. Die Segmente wurden so gewählt, dass sich Überlappungen ergaben (Abb. 13-4).

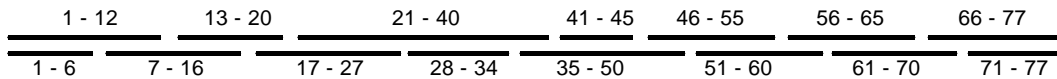


Abbildung 13-4. Schematische Darstellung der zur Synthese der Alanin-spezifischen tRNA durch Polynukleotid-Ligase miteinander verknüpften Oligonukleotid-Einheiten (nach KHORANA).

- b) Phosphorylierung der endständigen 5'-Hydroxygruppe der Segmente mit ATP in Gegenwart von T4-Polynukleotid-Kinase.
- c) Kopf-Schwanz-Verknüpfung der Segmente durch T4-Polynukleotid-Kinase.

Mit der *Polymerase-Kettenreaktion* [*Polymerase Chain Reaction*, PCR, 13.7.] werden heute *in vitro* Subnanogramm-DNA- oder RNA-Mengen als Template enzymatisch in fortlaufenden Zyklen kopiert und vervielfältigt (amplifiziert). In jedem Zyklus wird spezifisch mittels einer DNA-Polymerase eine Kopie eines Templates angefertigt. Templat und Kopie werden anschließend durch Hitzedenaturierung getrennt, um die einzelsträngigen Moleküle neuerlich als Template für die nächste Polymerase-Runde bereitzustellen. Durch Verwendung einer hitzestabilen Polymerase kann die Kopier-Reaktion über viele Runden ausgeführt werden, die zu Produktausbeuten im Mikrogramm-Bereich führen.

13.4 Nucleinsäuren

13.4.1 Aufbau und Vorkommen

Nucleinsäuren sind aus Nucleotiden aufgebaute Biopolymere [Polynucleotide] mit einem Molekulargewicht zwischen 20.000 und mehreren Millionen und gehören zu den wichtigsten Bestandteilen aller lebenden Zellen, Viren und Bakteriophagen. Sie wurden erstmals 1869 aus Eiterzellen und Lachssperma [MIESCHER] unter dem Namen *Nuclein* isoliert, aufgrund ihrer sauren Eigenschaften wurde später der Begriff Nucleinsäuren eingeführt. Zwei Hauptklassen der Nucleinsäuren werden nach den Kohlenhydratkomponenten unterschieden: die Desoxyribonucleinsäuren DNA enthalten D-2-Desoxyribose als Zuckerbaustein, die Ribonucleinsäuren RNA enthalten D-Ribose. Das Rückgrat der Nucleinsäuren wird aus den über 3',5'-Phosphorsäurediesterbrücken verbundenen Zuckerresten gebildet, an denen die Nucleobasen sitzen (Abb. 13.5).

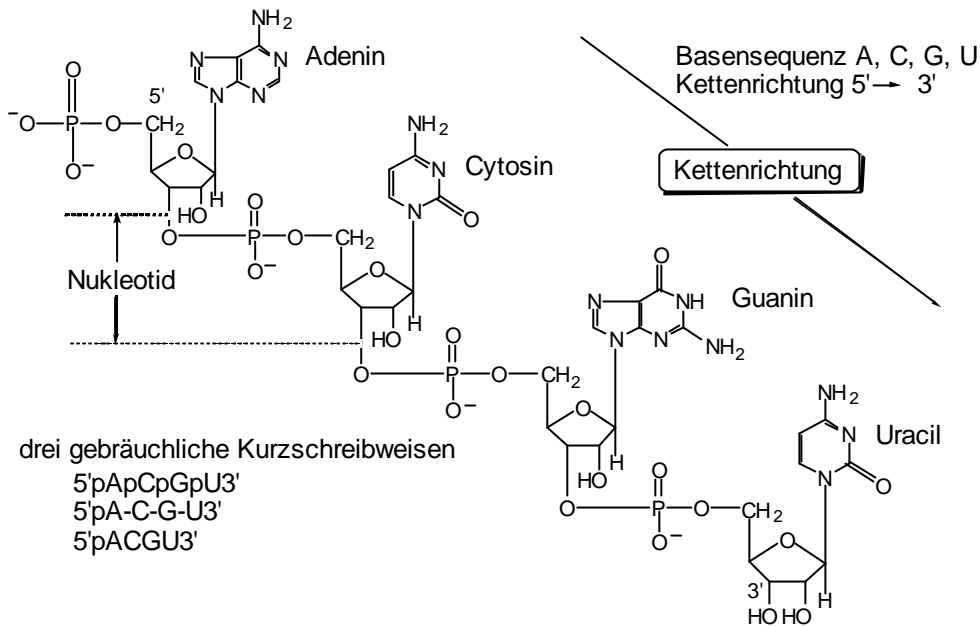


Abbildung 13-5. Chemische Struktur einer RNA.

Die Nucleinsäuren unterscheiden sich bezüglich ihrer Struktur durch die Zuckerkomponente, durch Besonderheiten der Primärstruktur (Nebenbasen, ungewöhnliche terminale Sequenzen), die Länge der Polynucleotidkette (unterschiedliche Molmassen) sowie in ihrer räumlichen Struktur (gestreckt oder kugelförmig, einzel- oder doppelsträngig, acyclisch oder cyclisch, vgl. Sekundärstruktur, 13.4.).

Durch säurekatalysierte Hydrolyse der Nucleinsäuren wird vorzugsweise die Phosphatbindung zur primären 5'-Hydroxygruppe gespalten und es entstehen 3'-Phosphate. Enzymatische Spaltung der Nucleinsäuren ergibt je nach dem Angriffspunkt der *nucleinsäurespaltenden Enzyme* [*Ribonucleasen, RNasen*] entweder 5'- oder 3'-Phosphate.

13.4.1.1 Desoxyribonucleinsäuren DNA

Die *Desoxyribonucleinsäure DNA* (MG bis zu 10^7) kommt bei den Eukaryoten¹ vor allem (90 - 95 %) im Zellkern, bei Prokaryoten¹ hauptsächlich im Kernäquivalent, den Chromosomen, vor. *Chromosomen* sind lineare oder ringförmige Moleküle der DNA mit oder ohne angelagerten Proteinen. Neben dieser *chromosomalen DNA* kommt die DNA noch in Form der sog. Satelliten-DNA, in Zellorganellen, in den Chloroplasten der pflanzlichen Zellen oder den Mitochondrien der tierischen Zellen sowie als Plasmide der Bakterien vor. Erst 1944 entdeckte man, dass Nucleinsäuren das genetische Material in lebenden Zellen darstellen und zur Speicherung der genetischen Information dienen [AVERY, MACLEOD und MCCARTY]. Die DNA aus Pneumokokken, die Lungenentzündung hervorrufen, ließ sich extrahieren und auf andere Bakterienstämme übertragen.

¹Die *Eukaryoten* [*Eukaryonten*] sind hochdifferenzierte Zellen, die Bausteine in Tieren, Pflanzen, Protozoen, Pilzen und Algen sind und im Unterschied zu den Prokaryonten einen Zellkern besitzen, der durch eine Membran von der übrigen Zelle abgegrenzt ist. Ihren Zelltypus, der durch viele individuelle Kompartimente gestaltet ist, nennt man *Euzyte*. Zu den *Prokaryonten* [*Prokaryonten*], weniger differenzierten Zellen, gehören Bakterien und Blaualgen. Bei ihnen fehlt vor allem ein von einer Membran umschlossener Zellkern. *Heterokaryot* ist eine Zelle, in der genetisch unterschiedliche haploide Zellkerne nebeneinander bestehen (z.B. bei der Zellfusion) und sich vermehren.

Die *Satelliten-DNA* des Cytoplasmas unterscheidet sich von der chromosomalen DNA vor allem wegen der Unterschiede im G/C-Gehalt in ihrer Dichte.

Plasmide sind kleine ringförmige, außerhalb der Chromosomen lokalisierte und sich autonom replizierende Doppelstrang-DNA-Moleküle, die vorwiegend in Bakterien und z.T. in Eukaryoten (Hefen und einigen Pilzen) als Informationsträger nachgewiesen wurden. Sie besitzen ein MG zwischen 1.5×10^6 bis 2×10^8 . Da Plasmide die Eigenschaft besitzen, dem genetischen Material der Zelle Fremdgene beizufügen, für die kein homologer Bereich im Chromosom besteht, sind sie ideal einsetzbar als *Vektoren* ["*Genfähren*"] und werden nach entsprechender Modifikation intensiv in der Gentechnologie genutzt. Ein solcher geeigneter DNA-Vektor muss unabhängig vom Hauptgenom der Wirtszelle repliziert werden, so dass eine hohe Kopienzahl der klonierten DNA pro Wirtszelle erreicht werden kann. Der Vektor muß die DNA aufnehmen können und mit hoher Effizienz in die Wirtszelle eingeführt werden können. Sowohl Plasmide wie Viren erfüllen diese Bedingungen und finden als Vektoren Verwendung. Durch Plasmide werden eine Reihe unterschiedlicher Zellfunktionen codiert: Fertilität, Resistenz gegen Schwermetalle und UV-Licht, Produktion von Antibiotika, Bildung von Toxinen und Antigenen und Tumorinduktion. Sie tragen auf ihrem Gen oft Information zur Inaktivierung von Antibiotika [*Genmarker*] und sind für Antibiotika-Resistenz verantwortlich.

Cosmide sind Plasmid-Vektoren mit einem DNA-Fragment des Bakteriophagen λ , das die Sequenz an der kohäsiven Enden (*cos*-Stelle, cohesive end site) enthält. *Cosmide* (ca. 5 kbp)¹ erlauben den spezifischen Einbau und Klonierung von Fremd-DNA einer Größe von 32 – 47 kbp und sind zur Erstellung von Genbanken geeignet.

¹Die Angabe der Länge der Nukleinsäuren erfolgt häufig als Basenpaare [bp] oder Kilobasenpaare [kbp].

In jeder somatischen Zelle entspricht der DNA-Gehalt, wenn alle Gene aneinandergereiht sind, einem etwa 2 m langen B-DNA-Molekül (vgl. 13.). Die natürliche DNA ist an Basen (basische Proteine oder biogene Amine) assoziiert. So enthält das aus dem Zellkern der Eukaryoten isolierbare Material, das *Chromatin*, neben DNA noch basische Proteine, die *Histone*, sowie RNA und Nichthistonproteine. Die Histonmoleküle ordnen sich

dabei um stark gefaltete [*supercoil*] DNA-Abschnitte an [*Nukleosomen, μ -bodies*], wodurch die enge Packung im Zellkern erreicht wird. Die DNA der Spermatozoen und Phagen-Köpfe ist an Polyamine wie Spermin, Spermidin oder Putrescin gebunden.

Aufgrund der Schwierigkeiten, die zunächst bei der Sequenzanalyse der DNA auftraten, hatten Methoden, die Teilinformationen über die Struktur lieferten, eine besondere Bedeutung. Dazu gehörten vor allem die Analyse des Basenverhältnisses und die Nachbarschaftsanalyse. Einen wesentlichen Beitrag zur Strukturaufklärung hat CHARGAFF durch die Analyse des Basenverhältnisses der 4 Hauptnukleotide von DNA verschiedener Herkunft (Tab. 13-6) geliefert. Die von ihm 1950 aufgestellten Regeln besagen, daß in der DNA Carbonyl- und Aminogruppen sowie Purin- und Pyrimidinreste mit gleicher Häufigkeit auftreten. Das Verhältnis von Ade/Thy zu Gua/Cyt ist für jede Tierart charakteristisch und für phylogenetisch weit voneinander entfernte Arten recht unterschiedlich.

Tabelle 13-6. Relativer Nukleotidgehalt der DNA verschiedener Herkunft (in Mol% nach CHARGAFF)

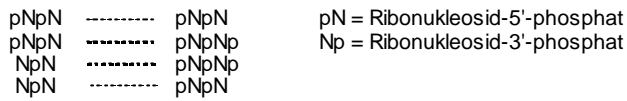
DNA	Adenin	Guanin	Cytosin	Thymin	5-Methylcytosin
Kalbsthymus	28.2	21.5	21.2	27.8	1.3
Heringsperma	27.9	19.5	21.5	28.2	2.8
Weizenkeime	27.3	22.7	16.8	27.1	6.0
Hefe	31.3	18.7	17.1	32.9	
<i>Escherichia coli</i>	26.0	24.9	25.1	23.9	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	15.1	24.9	35.4	14.6	
Phage FC 174	24.3	24.5	18.2	32.3	

Das Basenverhältnis kann durch Hydrolyse der Nukleinsäuren, chromatographische Trennung und Bestimmung der Monomeren ermittelt werden. Bei sehr kleinen Nukleinsäuremengen kann für orientierende Angaben auch die Dichtebestimmung oder die Bestimmung der Phasenumwandlungstemperatur herangezogen werden, die beide vom G/C-Gehalt abhängen. Bei der *Nachbarschaftsanalyse* [*nearest-neighbour-frequency analysis*] wird die Häufigkeit bestimmt, mit der ein Nukleotid einem anderen Nukleotid in 5'-Stellung benachbart ist.

13.4.1.2 Ribonukleinsäuren RNA

Bis zu 25% des Trockengewichtes einer Zelle kann aus *Ribonukleinsäure RNA* bestehen. Letztere besitzen ein aus einer Ribose-Phosphat-Kette bestehendes Grundgerüst, die 3'- und 5'-Hydroxygruppen der Ribosereste sind über Phosphodiesterbindungen verknüpft. Man unterscheidet je nach Vorkommen bzw. biologischen Funktionen die ribosomale RNA, die Transfer-RNA [tRNA], die Matrizen-RNA (auch Boten-RNA oder messenger RNA) [mRNA] und die virale Ribonukleinsäure. Neben diesen finden sich noch Ribonukleinsäuren im Zellkern (Kern- oder nukleare RNA [nRNA], ein Vorläufer der mRNA) sowie in den Chloroplasten bzw. Mitochondrien. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass RNA auch enzymatische Aktivitäten besitzen kann.

An den 3'- und 5'-Enden der Ribonucleinsäuren können sich entweder Hydroxygruppen oder Phosphorsäuremonoestergruppen befinden, so dass folgende 4 Typen unterschieden werden können:



In einigen Fällen kann am 5'-Terminus auch ein Di- oder Triphosphatrest sitzen, wie z.B. in der Virus-RNA.

Im Unterschied zu den DNAs sind die RNAs gegenüber Alkali labil. Diese ungewöhnliche Eigenschaft von Phosphorsäurediestern ist durch die 2'-Hydroxygruppe bedingt, die die Ausbildung von 2',3'-Cyclophosphaten ermöglicht.

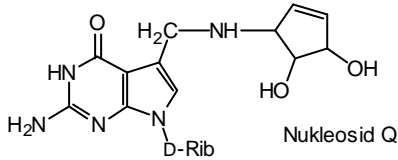
Mit der *ribosomalen RNA* [rRNA] (MG bis 2×10^6) sind etwa 50 - 80 % der gesamten RNA der eukaryotischen Zelle in den Ribosomen lokalisiert. *Ribosomen* sind subzelluläre Ribonucleinsäure-Protein-Komplexe, die etwa 50 - 60 % RNA enthalten und an der Proteinsynthese beteiligt sind. Sie können unter bestimmten Bedingungen in zwei ungleiche Untereinheiten dissoziieren. Die kleinere Untereinheit enthält eine, die größere zwei RNA-Komponenten.

Die Basenzusammensetzung der RNA-Komponenten hängt von der Herkunft der rRNA ab. Das Verhältnis $(G + C)/(A + U)$ schwankt bei Tieren zwischen 0.5 - 2.0, bei den Pflanzen zwischen 0.8 und 1.6. Im allgemeinen ist der $(G + C)$ -Anteil bei höher entwickelten Organismen größer als bei niederen Arten. Bei den höchstentwickelten Organismen, den Liliatae und Säugetieren, ist der $G + C$ -Anteil der großen ribosomalen Untereinheit höher als der der kleinen.

Nächst der rRNA kommt die *transfer-RNA* [tRNA] mit ca. 15 % der Gesamt-RNA der Zelle am häufigsten vor. Ihren Namen hat sie aufgrund ihrer Funktion als Aminosäureadapter bei der Proteinbiosynthese (Kap. 13.) erhalten. Aufgrund der Löslichkeit im Cytoplasma der Zellen wurde sie ursprünglich auch als *lösliche RNA* [soluble RNA, sRNA] bezeichnet. Die tRNA besitzt die kleinste Molmasse der Nucleinsäuren und besteht aus 73 - 93 Nucleosidbausteinen (MG 23.000 - 28.000). Sie ist deshalb auch die Nucleinsäure, über deren Primär-, Sekundär- und auch Tertiärstruktur (vgl. Kap. 13.) die detailliertesten Kenntnisse vorhanden sind. Die Sequenzen einiger hundert analysierter tRNA-Moleküle aus Bakterien und Eukaryoten haben eine kleeblattähnliche Sekundärstruktur gemeinsam.

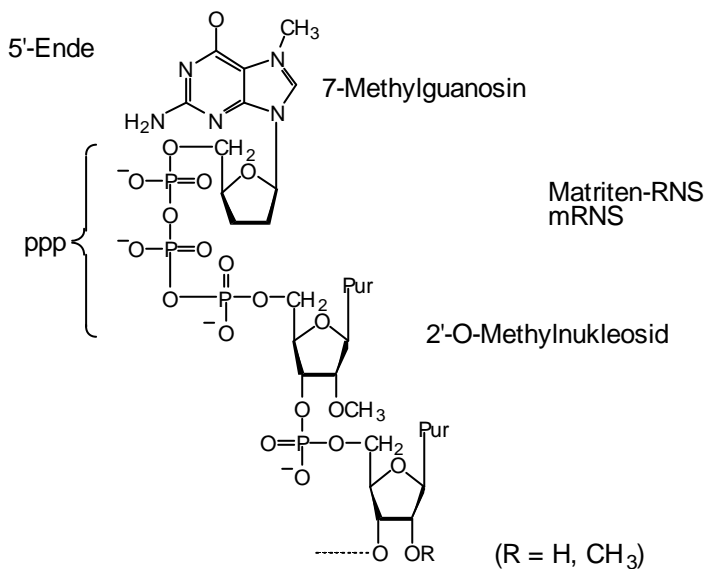
Alle tRNA enthalten am Aminosäure-Acceptor-Arm (3'-Terminus, Abb. 13-) die Sequenz -C-C-A, am 5'-Terminus befindet sich ein G- oder C-Rest. Die Basenzusammensetzung der tRNA ist durch das Vorkommen von Nebenbasen charakterisiert. Die Nebenbasen sind häufig in bestimmten Regionen des Moleküls lokalisiert, so Dihydrouracil in der Dihydrouracil-Schleife und Pseudouridin in der Pseudouridin-Schleife (Abb. 13-). Sie unterscheiden sich durch ihre Lichtabsorption von den normalen Purin- und Pyrimidinbasen. Im sog. Extra-Arm findet man bei 75 % aller tRNA variabel 3 - 5 Nucleotide.

In einigen tRNA von Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren wurde in der ersten Position des Anticodons das in seiner Struktur ungewöhnliche *Nucleosid Q* gefunden, bei dem es sich um ein Cyclopentenderivat handelt.



Das primäre Transkriptionsprodukt (vgl. 13.) der tRNA-Gene [tDNA] ist länger als die fertige tRNA und enthält noch nicht die modifizierten Nucleotide. Aus der Vorläufer-RNA werden in mehreren Schritten die einzelnen tRNA-Sequenzen herausgeschnitten, gleichzeitig setzt die enzymatische Modifikation zu den atypischen Basen ein.

Die *Matrizen-RNA* [mRNA] gehört zu den Ribonucleinsäuren mit der geringsten metabolischen Stabilität. Sie macht etwa 5 - 10 % der Gesamt-RNA der Zelle aus. Die Molmasse liegt zwischen 300.000 und 500.000. Die mRNA eukaryotischer Zellen besitzt charakteristische Endgruppen. Am 3'-Ende befindet sich ein langer Schwanz von Polyadenylsäure, während am 5'-Ende ein 7-Methylguaninrest über eine ungewöhnliche 5',5'-Triphosphatbrücke an 2'-O-methylierte Nucleoside gebunden ist. Prokaryotische mRNA beginnen am 5'-Terminus mit pppNp.



13.4.1.3 Viren und virale Nucleinsäuren

Viren sind mobile genetische Elemente, die als *Nucleoproteine* im Gegensatz zu Bakterien oder anderen Zellen eigentlich nur aus Erbgut bestehen und die einfachsten biologischen Strukturen darstellen. Ihnen fehlt die Möglichkeit zum Proteinaufbau und damit zur Fortpflanzung. Sie sind damit auf den Stoffwechsel des Wirts angewiesen, können jedoch dessen Enzymapparat zu ihrer Replikation ausnutzen, gelegentlich ihr Genom (13.) in reversibler Weise in das des Wirts integrieren oder die Eigenschaften der Wirtszelle transformieren. Das

virale Genom codiert Proteine, die in Zusammenarbeit mit der Wirtszelle die Vervielfältigung des Virus bewirken. Während in zellulären Organismen stets beide Typen von Nukleinsäuren vorkommen, findet man in Viren entweder nur RNA oder DNA. Diese *viralen Nukleinsäuren* alleine sind die Träger der infektiösen Wirkung. Man kennt heute mehr als 400 human- und zahlreiche tier- und pflanzenpathogene Viren, z.B. solche mit doppelsträngiger DNA wie Hepatitis B-, Warzen-, Pocken-, Herpes- und Adenoviren, sowie mit einzelsträngiger RNA wie Tabakmosaik-, Poliomyelitis-, Schnupfen-, Grippe-, Maser-, Tollwut- und Leukämie-Viren. Viren, die Bakterien befallen, werden als *Bakteriophagen* bezeichnet (Abb. 13-6 zeigt einige Formen von Viren). Viren sind teilweise kristallisierbar, wobei solche, die Tiere und Menschen befallen, schwerer zu kristallisieren sind als Pflanzenviren. So gelang erst 1955 die Kristallisation des Poliomyelitis-Erregers. Viren zeigen als Grenzlebewesen nur begrenzte Reizreaktionen, weisen jedoch die drei Eigenschaften der Gene auf, nämlich Merkmalsauslösung, Reduplikation und Mutantenbildung.

Die aus Protein-Untereinheiten [*Capsomeren*] bestehende Schutzhülle [*Capsid*] ist in der Regel symmetrisch aufgebaut und besitzt entweder Helix-Struktur oder ist zu einem symmetrischen Hohlkörper (Polyeder) vereinigt. Die einfachsten Formen bestehen aus einer Proteinmembran als Kopf, einem Schwanzstift, der Abschlussplatte und den Schwanzfibern. *Granulose-Viren* und *Kernpolyeder-Viren* sind darüber hinaus mit einer lipidhaltigen Membran als Virushülle umgeben. Ein Protein im Schwanzteil ist für die Anheftung verantwortlich, die Nukleinsäure wird dann in das Bakterium injiziert.

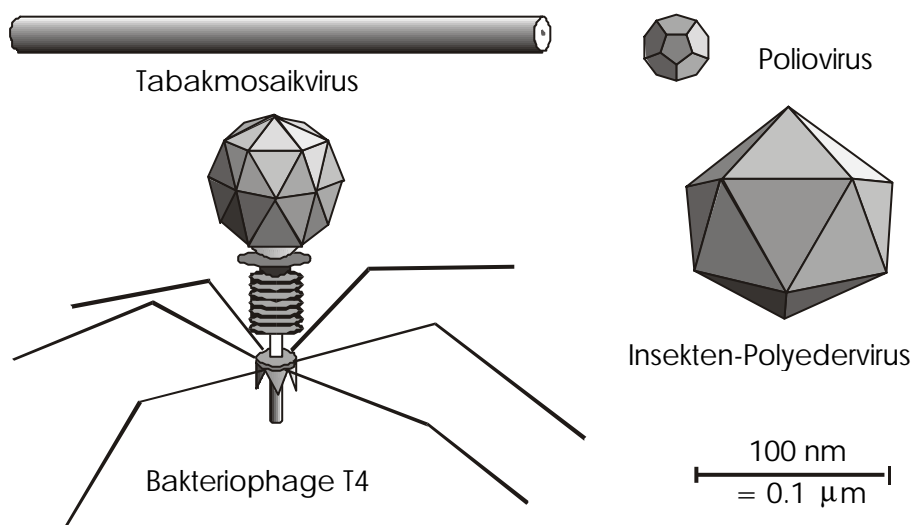


Abbildung 13-6. Relative Größe und Gestalt einiger Viren.

Die Viren werden nach den von ihnen befallenen Zellen oder nach der Art der Nukleinsäuren (DNA- oder RNA-Viren) eingeteilt (Tab. 13-7). Vollentwickelte infektiöse, aber extrazelluläre und daher vorübergehend in einer Ruhephase befindliche Virenpartikel werden *Virionen* bezeichnet. Der Durchmesser der Virionen variiert zwischen 10 und 300 nm, sie haben die Form von Kugeln, Stäbchen, Spiralen, Würfeln, Polyedern, Nadeln, Ellipsoiden, etc. *Retroviren* stellen eine Gruppe von Viren dar, die bei zahlreichen Wirbeltieren nachgewiesen worden sind. Diesen Viren ist gemeinsam, dass ihre Erbsubstanz im Viruspartikel als RNA vorliegt, ihre

Vermehrung hingegen eine Desoxyribonukleinsäure-Zwischenstufe einschließt. Ihre virale Erbsubstanz-RNA wird mithilfe des viralen Enzyms *Reverse Transkriptase* (Polymerase) in eine DNA transkribiert, damit diese in die Chromosomen-DNA der Wirtszelle integriert werden kann und dort als genetisches Element verbleibt. Zu ihnen zählt auch das 1983 isolierte und AIDS auslösende HIV-1-Virus [*human immunodeficiency virus I*]. Dank gentechnischer Verfahren ist es möglich geworden, das HIV-Virus zu isolieren und detailliert zu beschreiben. Seit längerem sind pflanzliche Retroviren bekannt, denen das Hüllprotein fehlt und die nur aus zirkulärer RNA bestehen. Diese kleinsten Viren werden *Viroide* genannt. Sie wirken als Krankheitserreger für wirtschaftlich bedeutende Pflanzen wie Kartoffeln, Gurken, Citruspflanzen, Hopfen, Kokospalmen, usw. Bestimmte Pflanzenkrebsformen und tierische Tumoren werden durch sog. Tumor-Viren hervorgerufen, so z.B. das Epstein-Barr-Virus, welches das Pfeiffersche Drüsenfieber und den sog. Burkitt-Tumor erzeugt. Insektenartspezifische Viren wie z.B. *Baculo-Viren* und *Granulose-Viren* werden als biologische Insektizide im Pflanzenschutz eingesetzt. Zielobjekte sind wichtige Mais-, Baumwoll- und Tabakschädlinge sowie Obst- und Fichtenschadinsekten.

Tabelle 13-7. Klassifizierung der Viren

Befallene Zellen	RNA-Viren	DNA-Viren
Bakterien*	MS 2 von <i>Escherichia coli</i>	Große Phagen: T-, P-Phagen, λ , Φ 80 Kleine Phagen: Φ_C 174, S 13, fd
Pflanzen	Nahezu alle Pflanzenviren (z.B. Tabakmosaik-, Kartoffel-X)	Blumenkohlmosaik-Virusgruppe
Arthropoden (vor allem Insekten)	Cytoplasmatische Polyederviren	Kapselviren, nukleäre Polyederviren (Gelbsucht der Seidenraupe, Wipfelkrankheit der Nonne <i>L. monacha</i>)
Wirbeltiere	Picorna-Viren (<i>Poliomyelitis</i> , Maul- und Klauenseuche) Reo-Viren Myxo-Viren Paramyxo-Viren (Masern, Mumps, Staupe, Rinderpest) Rhabdo-Viren (Tollwut) Toga-Viren (Schweinepest, Röteln, Gelbfieber) Ebola-Virus (hämorrhagisches Fieber) Onkogene Viren	Adeno-Viren (Erkrankungen der Atemwege) Herpes-Viren (<i>Herpes simplex</i> , Fischpocken) Pox-Viren (Pocken)

* Viren, die Bakterien befallen, werden als Phagen bezeichnet.

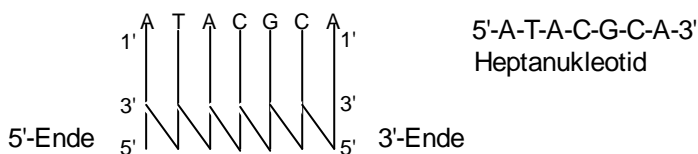
Eine Reihe gefährlicher, meist neuer Erkrankungen, sog. *Zoonosen*, beruht auf der Übertragung eines tierischen Krankheitserregers auf den Menschen und basiert auf viralen Infektionen. Grippe kann von landwirtschaftlichen Nutztieren auf den Menschen übertragen werden, vom *Grippevirus A* gibt es verschiedene Stämme, die auf die Infektion bestimmter Arten wie z.B. Pferd, Geflügel, Schwein, Meeressäuger, - und natürlich dem Menschen, spezialisiert sind. Sein Genom besteht aus acht unabhängigen RNS-Segmenten, so dass die Fehlerhäufigkeit bei der RNS-Replikation steigt und Mutationen entstehen können, die das Virus mit neuen Eigenschaften versehen. Zum anderen bewirken die unabhängigen Segmente das seltene Phänomen des *Antigen-Shiftings* bei Genen, die

für Hüllproteine codieren. Eine solche Mutation ist besonders gefährlich, wenn sie beim Schwein stattfindet, das sowohl vom Enten- als auch vom Humanvirus infiziert werden kann. Bei einer Co-Infektion kann einer der Hüllprotein-codierenden Abschnitte des Humanvirus durch das Pendant des Enten- oder Schweinevirus ersetzt werden, und damit kann das Immunsystem unseres Organismus den neuen Stamm nicht mehr erkennen und bekämpfen. Die letzte Geflügelpestepidemie in Europa, ausgelöst durch das Grippevirus, hat in mehreren europäischen Ländern zum Verlust von Zigmillionen Geflügeltieren geführt. Das *Coronavirus*, Erreger der kürzlich aufgetauchten SARS-Epidemie, besitzt kein segmentiertes Genom. Die Ausbreitung und heimtückische Form der SARS-Epidemie hat die wachsende Notwendigkeit der Erforschung der Phänomene viraler Übertragung von Tier zu Mensch an den Tag gelegt. AIDS und das *HIV-Virus* scheint ursprünglich vom Schimpansen auf den Menschen übertragen worden zu sein. Auch das *Marburg-Virus*, welches in den Sechzigerjahren in Deutschland innerhalb weniger Stunden 23 Menschen an einem hämorrhagischen Fieber sterben ließ, und das 1997 entdeckte verwandte *Ebola-Virus* werden von Affen auf den Menschen übertragen. Seit Mitte der Neunzigerjahre sorgt das Ebola-Virus in den tropischen Zonen Afrikas für Epidemien, die neben der menschlichen Katastrophe auch Gorillas und Schimpansen dezimiert. Es handelt sich um ein sehr langes fadenförmiges Virus, das heftige Fieberschübe und innere Blutungen auslöst, die beim Menschen wie beim Affen häufig zum Tode führen. Das *Hantavirus*, welches in Osteuropa kleine Nager infiziert, kann auf den Menschen übergehen, und insbesondere auf Waldarbeiter und Landwirte. Die Viren *Hendra* und *Nipah*, die 1994 und 1999 entdeckt wurden, scheinen von Früchte fressenden Fledermäusen in den südostasiatischen Wäldern zu stammen.

13.4.2 Primärstruktur und Sequenzanalyse

13.4.2.1 Basensequenz und Primärstruktur

Als *Primärstruktur* der Nukleinsäuren wird die Reihenfolge der einzelnen Nukleotidbausteine bezeichnet, die durch die Sequenz der einzelnen *Basen* angegeben wird. Für die Kurzschreibweise werden Basen-Einbuchstaben-Symbole verwendet und von links mit dem 5'-Ende begonnen.



Da die Molmassen insbesondere bei den DNA außerordentlich hoch sind und nur vier verschiedene Bestandteile auftreten, erwies sich die Bestimmung der Primärstruktur bis zur Entdeckung spezifisch spaltender Enzyme als überaus schwierig. Ein Meilenstein in der Geschichte der Sequenzierung von Ribonukleinsäuren wurde mit der Sequenzbestimmung einer alaninspezifischen tRNA aus Hefe gesetzt [R.W. HOLLEY und Mitarb., 1965] und gelang erst 12 Jahre später als die erste Sequenzanalyse eines Proteins. Noch im gleichen Jahr wurde von F.

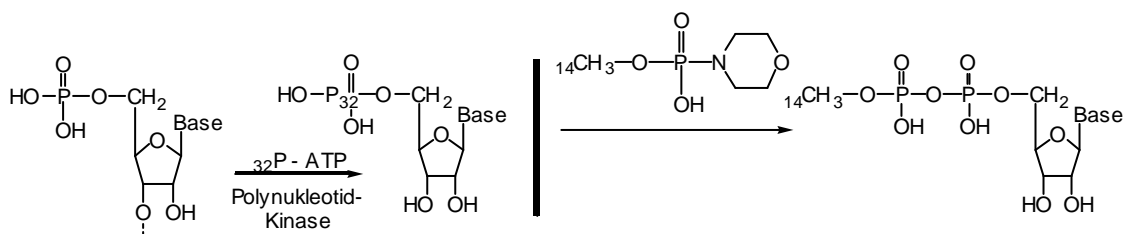
SANGER, G.G. BROWNLEE und B.G. BARREL eine Sequenzierungsmethode für ^{32}P -markierte RNA am Beispiel einer rRNA beschrieben.

Die Bestimmungen der Basensequenzen beschränkten sich zunächst auf die relativ niedermolekularen tRNA. Bis 1973 wurde die Primärstruktur von über 60 tRNAs, vorwiegend aus niederen Organismen, aufgeklärt. Aufsehen erregte die 1976 abgeschlossene Sequenzanalyse des aus 3 Genen und insgesamt 3569 Nucleotiden bestehenden RNA-Virus-Genoms des Bakteriophagen MS 2 [FIERS]. Ein Jahr später wurde von F. SANGER und Mitarb. die vollständige Nucleotid-Sequenz des DNA-Bakteriophagen $\Phi_{\chi}174$ veröffentlicht. 1984 war die Sequenzanalyse des Epstein-Barr-Virus (13.4.1.3) mit 172.282 bp abgeschlossen. Im selben Jahr waren etwa 10 % der gesamten Nucleotidsequenz (ca. 5 Mill. bp) von *E. coli* bekannt. Die Bäckerhefe [*Saccharomyces cerevisiae*] war der erste höhere (eukaryote) Organismus, dessen komplettes Genom erforscht ist. In Zusammenarbeit von 35 Laboratorien aus 17 Ländern (147 Autoren!) konnte 1992 die Sequenz bestimmt werden. Das Chromosom ist etwa 315.000 Basen lang und enthält rund 200 Gene. Ende der neunziger-Jahre wurden bereits mehrere Genom-Projekte abgeschlossen. So wurde z.B. das 4100 Gene enthaltende und 4214816 bp lange Genom des grampositiven Bakteriums *Bacillus subtilis* vollständig sequenziert. Das Genom des Archaeobakteriums *Archaeoglobus fulgidus* enthält 2436 Gene und ist 2178400 bp lang. Die Aufschlüsselung des menschlichen Genoms hat mit der Vorlage des ersten Sequenzentwurfs der drei Milliarden Basenpaare einen Höhepunkt erreicht. Das Genom kodiert hunderttausende von Proteinen und Peptiden, deren Größe sich zwischen einigen hundert Dalton und dreihundert Kilodalton bewegt. Eine Zusammenfassung der aufgeklärten Nucleinsäuresequenzen wird im *Handbook of Nucleic Acid Sequences* (Hrsg. BARREL und CLARK) angeboten. Inzwischen gibt es bereits einige Nucleinsäure-Datenbanken.

13.4.2.2 Sequenzanalyse

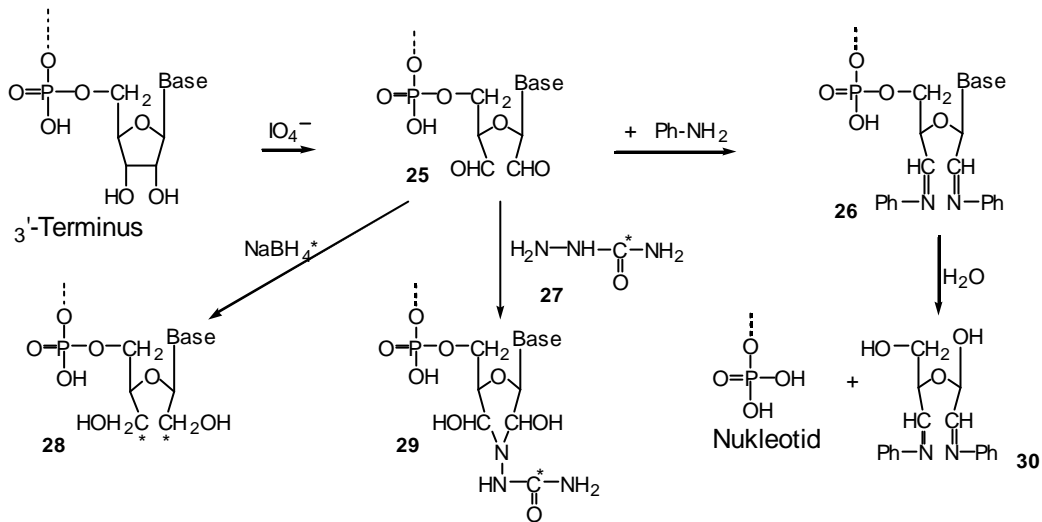
Die *Sequenzanalyse* oder *Sequenzierung* spezifischer Nucleinsäuren wird zur Zeit mit großer Intensität betrieben. Sie beginnt üblicherweise mit der chromatographischen Aufreinigung der Nucleinsäure. Anschließend erfolgt die Endgruppenbestimmung der 5'- und 3'-terminalen Sequenzen, gefolgt von enzymatischer oder chemischer Fragmentierung des Makromoleküls zu definierten, sich überlappenden Oligonucleotiden. Die Oligonucleotide werden isoliert und deren Sequenz ermittelt. Aus der Überlappung der Einzelsequenzen der Bruchstücke ergibt sich die Totalsequenz.

Die *Endgruppenbestimmung* erfolgt meist durch die Einführung radioaktiver Isotope (^{32}P , ^{14}C oder ^3H). Eine Methode zur *Markierung des 5'-Terminus* beruht darauf, daß die primäre 5'-Hydroxygruppe mit radioaktiv ^{32}P -markiertem ATP in Gegenwart des Enzyms Polynucleotid-5'-hydroxyl-Kinase aus *Escherichia coli*



phosphoryliert wird. Eine weitere Möglichkeit ist die ^{14}C -Markierung durch Umsetzung mit ^{14}C -Methylphosphomorpholid.

Für die Markierung des 3'-Terminus (Formel 13-12) wird die vicinale Diolgruppierung zunächst mit Periodat zum entsprechenden Dialdehyd **25** oxidiert. **25** läßt sich dann durch Reduktion mit tritiummarkiertem NaBH_4 oder Umsetzen mit ^{14}C -Semicarbazid **27** relativ stabil markieren. Durch überführen z.B. in die Dianilino-Verbindung **26**, deren glykosidische Bindung außerordentlich labil ist, läßt sich diese Methode auch zum stufenweisen Abbau vom 3'-Terminus her heranziehen.



Formel 13-12. Markierung des 3'-Terminus bei der Nucleotidsequenzierung.

Zur *Fragmentierung* der Nucleinsäuren werden meist enzymatische Methoden herangezogen, die gegenüber chemischer Fragmentierung spezifischer sind. Am verbreitetsten ist der Einsatz der Endonucleasen Guanylrribonuclease und Ribonuclease I oder anderer Enzyme vergleichbarer Spezifität. Als Beispiel sei der 5'-Terminus der alaninspezifischen tRNA der Hefe herausgegriffen, der durch Guanylrribonuclease und Ribonuclease I fragmentiert wird.

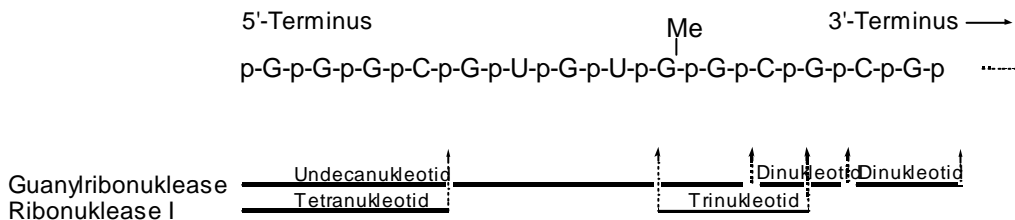
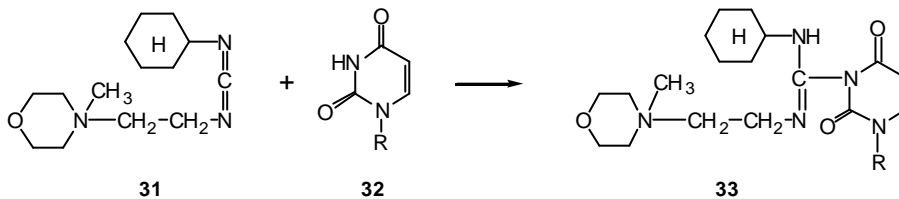


Abbildung 13-7. Fragmentierung des 5'-Terminus der alaninspezifischen tRNA der Hefe durch Guanylrribonuclease und Ribonuclease I.

Die Auftrennung der Oligonucleotide erfolgt üblicherweise durch Ionenaustauschchromatographie oder durch hochauflösende Polyamidgel-Elektrophorese (bei $\text{pH} = 8.3$ tragen RNAs, deren Kettenlänge um je ein Nucleotid zunimmt, auch jeweils eine Ladung mehr und werden aufgrund dieser Ladungsdifferenz elektrophoretisch

aufgetrennt) in Form endständig radioaktiv markierter Fragmente mit autoradiographischer Auswertung. Die beiden durch Guanylribonuklease gebildeten identischen Dinukleotide liefern nach der Hydrolyse nur Gp und Cp, aus der Spezifität dieses Enzyms ergibt sich die Sequenz CpGp. Das größere Fragment, ein Undecanukleotid, muss zur Sequenzanalyse noch weiter gespalten werden. Die mit Ribonuklease I gebildeten Oligonukleotide liefern nach der vollständigen alkalischen Hydrolyse nur Gp bzw. MeGp und Cp. Da das Enzym nach Pyrimidinnucleosiden spaltet, muß Cp am 3'-Terminus des jeweiligen Oligonukleotids stehen (Abb. 13-7). Die Reihenfolge für das Trinukleotid ergäbe sich z.B. durch Spaltung mit Schlangengift-Phosphodiesterase, bei der pCp, pG und MeG anfallen würde.

Die Sequenzierung kann auch durch selektive chemische Modifikationen bestimmter Basen und anschließende enzymatische Fragmentierung erfolgen. 7-Methylguanosenreste, durch Methylierung mit Dimethylsulfat gebildet, sind zum Unterschied zu Guanosen resistent gegenüber Guanylribonuklease. Nach chemischer Modifizierung von Uracil **32** durch Umsetzen mit Carbodiimiden (z.B. **31**) erfolgt die Spaltung mit Ribonuklease I ausschließlich nach C-Resten. Mit Carbodiimiden reagieren ausser Uracilresten auch andere Basen mit einem pK ~ 9 wie z.B. Guanin. Vorteilhaft ist, daß sich der die enzymatische Resistenz bedingende Rest unter relativ milden Bedingungen wieder entfernen läßt.



Aufgrund der enormen Größe der DNA-Moleküle waren ursprünglich Sequenzierungen nicht möglich. Erst mit der Entdeckung der *Restriktionsenzyme*, in Bakterien weitverbreitete Sequenz-spezifische DNA-Endonukleasen, konnten die langen, doppelsträngigen DNA-Moleküle in kürzere, definierte und sequenzierbare Fragmente (z.B. Genbruchstücke) mit einer Länge von etwa 100 bis 1000 bp geschnitten werden. Die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme werden von 4 bis 6 Basenpaaren gebildet. Der Bruch des DNA-Doppelstranges erfolgt innerhalb dieser Erkennungssequenzen, so dass jeweils zwei einsträngig komplementäre, sog. "klebende" Enden [*sticky ends*] entstehen. Die nachfolgende Abb. 13-8 zeigt Beispiele für die Restriktionsenzyme Eco RI (aus *Escherichia coli* Plasmid RI) und Bam I (aus *Bacillus amyloliquefaciens*), Tab. 13-8 die Erkennungssequenzen einiger kommerziell erhältlicher Restriktionsenzyme.

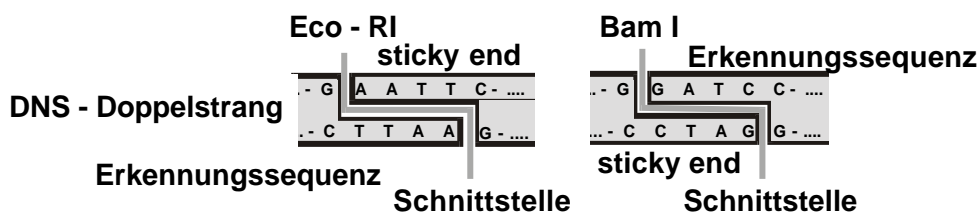


Abbildung 13-8. Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme Eco-R I und Bam I und spezifische Bruchstellen in einem DNA-Doppelstrang.

Diese verschiedenen Restriktionsfragmente können durch DNA-Klonierung vervielfacht und die vermehrten DNA-Bruchstücke mit definierten Techniken nochmals in ein Gemisch kürzerer Subfragmente zerlegt werden. Letztere lassen sich der Kettenlänge entsprechend gelelektrophoretisch auftrennen und identifizieren.

Tabelle 13-8. Liste einiger kommerziell erhältlicher Restriktionsenzyme

Erkennungs-Schnittstelle ^{a)}	Name, Handelsname	Quelle	Erkennungs-Schnittstelle ^{a)}	Name, Handelsname	Quelle
G [↓] AATT C C [↑] TTAA G	Eco RI	<i>E. coli</i>	C [↓] CG G G GC [↑] C	Hpa II, Msp I, Hap II	<i>Moraxella sp.</i> <i>H. parainfluenza</i>
↓CCWGG GGWCC [↑]	Eco RII	<i>E. coli</i>	GG [↓] CC CC [↑] GG	Hae III	<i>Haemophilus aegyptus</i>
G [↓] GATC C C CTAG [↓] G	Bam I	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	A [↓] CG T T GC [↑] A	Mae II	
C TGCA [↓] G G [↑] ACGT C	Pst I	<i>Providencia stuarti</i>	RG [↓] G [↓] NCCY YCCN [↓] G [↑] GR	Dra II, Pss I, Eco 0109	
G [↓] ANT C C TNA [↑] G	Hinf I	<i>Haemophilus influenzae</i>			

^{a)} W = A oder T, R = A oder G, N = irgendein Nukleotid, Y = C oder T.

^{b)} Die Schnittsequenzen werden üblicherweise nach den zuerst veröffentlichten Enzymen benannt, die Handelsnamen beziehen sich oft auf die käuflichen und billigeren Isochizomeren.

Die wesentlichen Techniken zur Sequenzanalyse der Restriktionsfragmente sind die Plus-Minus-Methode von F. SANGER und A.R. COULSON, das Didesoxy- oder Kettenabbruch-Verfahren nach SANGER und die Dimethylsulfat-Hydrazin-Methode von M.A. MAXAM und W. GILBERT.

Nach der *Plus-Minus-Methode* werden zunächst von der zu untersuchenden doppelsträngigen DNA ein vollständiger Einzelstrang als Matrize [*Template*] sowie ein doppelsträngiges Restriktionsfragment zusammengegeben. Durch Denaturierung und anschließende Renaturierung lagert sich an den kompletten Einzelstrang der komplementäre Teil des Doppelstrang-Fragments an [*Hybridisierung* = Ausbildung von Doppelsträngen von DNA oder RNA, erfolgt zwischen Molekülen mit komplementärer Basensequenz], der nun als *Primer* wirkt. Für den Fall einer RNA-Sequenzierung wird erst ein komplementärer DNA-Primer an das 3'-Ende der RNA-Matrize angebracht und mittels einer RNA-abhängigen Polymerase [reverse Transkriptase] die entsprechende komplementäre *copy DNA* [cDNA] synthetisiert (GUCAUC → CAGTAG in Abb. 13-9). Dies geschieht durch Zugabe von DNA-Polymerase und allen 4 Nukleosidtriphosphaten, von denen eines ³²P-markiert ist. Im Idealfall verläuft die cDNA-Synthese völlig asynchron und liefert [³²P]cDNAs aller Kettenlängen. Nach der Einigung wird das cDNA-Gemisch mit einer DNA zum Doppelstranggemisch hybridisiert und in acht Proben unterteilt, von denen vier der *mMinus*-Reaktion und 4 der *plus*-Reaktion unterworfen werden. Die *minus-Reaktion* beruht darauf, daß nur jeweils drei der vier Nukleosidtriphosphate dNTPs zugegeben werden. Unter diesen Bedingungen verlängert das Enzym die [³²P]cDNAs nur so lange, bis in der Matrize die zum fehlenden dNTP komplementäre Base erreicht ist. Fehlt z.B. dATP (*minus-A-Reaktion*,

vgl. Abb. 13-9), so tritt Synthesestop ein. Im plus-System dagegen werden die gleichen Gegenstrangfragmente durch die Exonuklease-Aktivität der zugesetzten T4-DNA-Polymerase (aus mit Bakteriophagen T4-infizierten *E. coli*) und unter Zusatz des im entsprechenden Minus-System fehlenden Nucleosidtriphosphates bis zu der Stelle abgebaut, an der das dem Plus-System zugesetzte, aber im Minus-System fehlende Nucleosid vorkommt (Abb. 13-9). Die erhaltenen Desoxyribooligonucleotide werden dann nach Abtrennen des DNA-Templates mittels Polyacrylamidgel-Elektrophorese aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Aus dem erhaltenen Bandenmuster läßt sich die Position der Nucleotide ermitteln, die Sequenz ergibt sich durch Kombination aller 4 möglichen Minus- und Plus-Systeme.

Vollautomatische Nucleotid-Sequenzierer arbeiten üblicherweise nach der SANGER'schen Kettenabbruch-Methode, aber auch nach der MAXAM-GILBERT-Methode lassen sich Sequenzierungen bearbeiten.

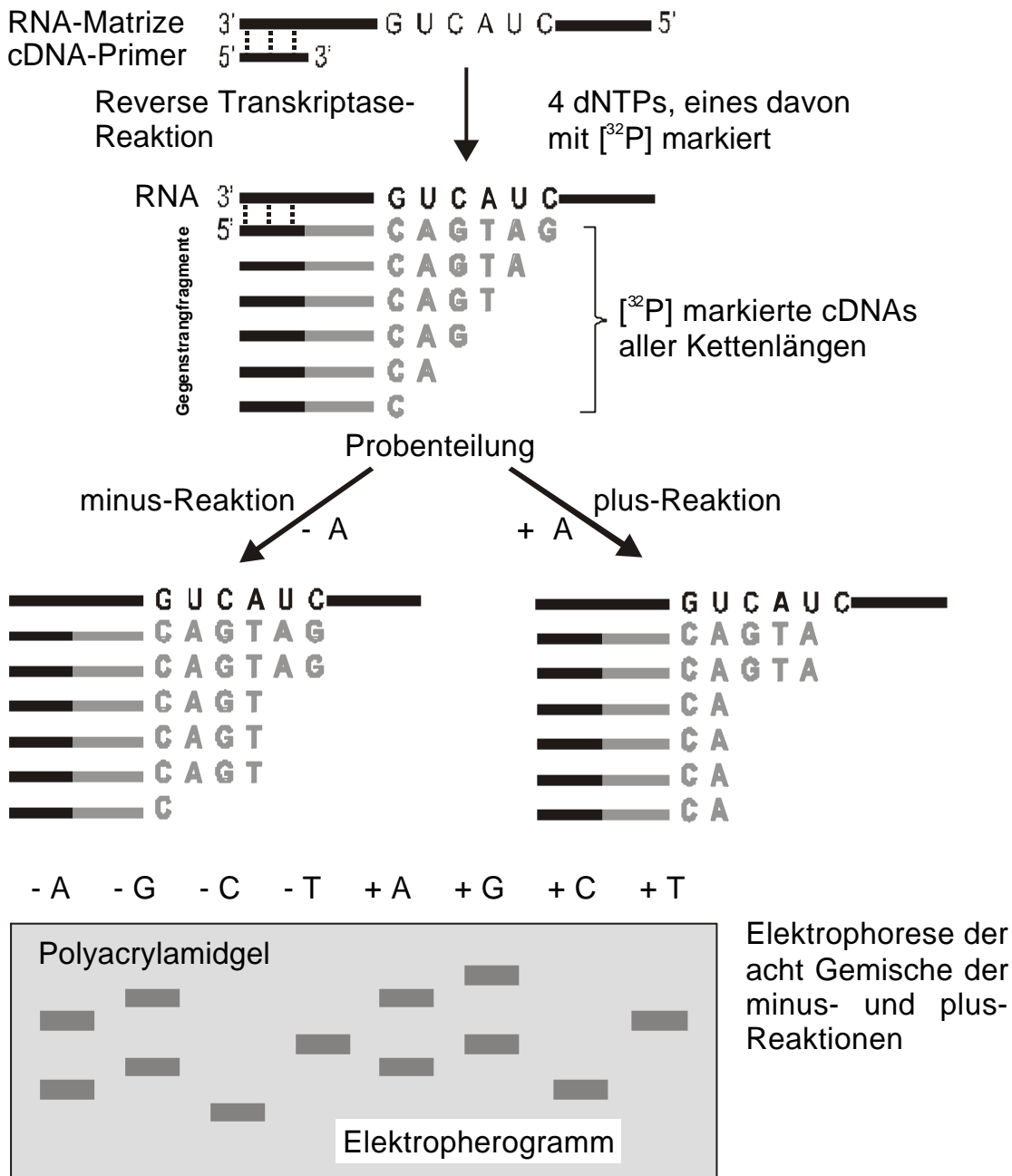
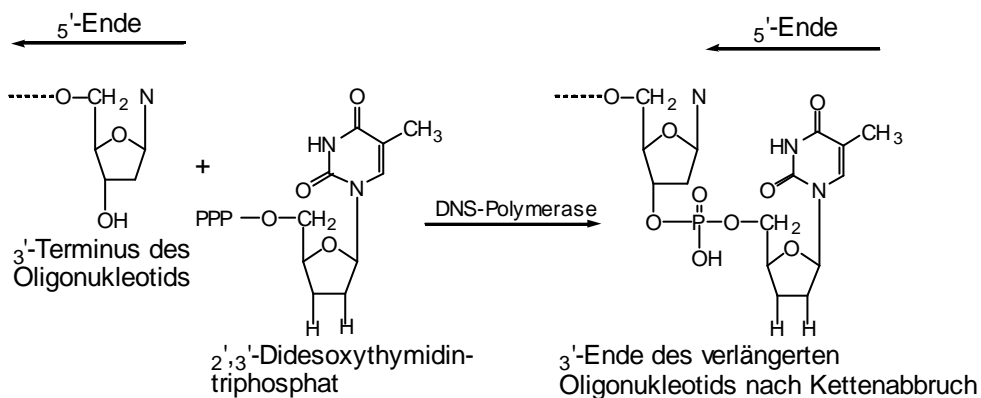


Abbildung 13-9. Sequenzierung einer RNA über die cDNA nach der Plus-Minus-Methode nach F. SANGER und A.R. COULSON. Der zum 3'-Ende der RNA-Matrize komplementäre DNA-Primer wird in einer enzymatischen Reaktion mit den vier dNTPs verlängert. Da eines der vier dNTPs radioaktiv ist, sind die entstehenden cDNAs mit [³²P]-markiert. In der minus- und plus-Reaktion (hier ist die minus-A- und plus-A-Reaktion gezeigt) erfolgt Verlängerung bzw. Abbau der [³²P]cDNA. Die Fragmente jeder der acht Reaktionen werden elektrophoretisch aufgetrennt.

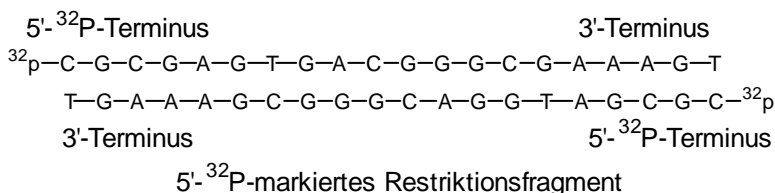
Schneller und exakter arbeitet das ebenfalls von F. SANGER entwickelte *Didesoxy-* oder *Kettenabbruch-Verfahren*, das auf partieller enzymatischer Neusynthese des zu sequenzierenden DNA-Matrizeinzelstranges mittels DNA-Polymerase beruht (Formel 13-13). Da die DNA-Polymerase nicht imstande ist, an einer einzelsträngigen DNA-Matrize die DNA-Synthese zu starten, wird in Nachbarschaft der zu sequenzierenden Region ein kurzes komplementäres Starternucleotid als Primer anhybridisiert, von dessen 3'-Hydroxygruppe aus die DNA-Synthese startet. Die neue DNA-Kette wächst also in 5'→3'-Richtung. Die Verwendung von spezifischen Analogen der normalen Desoxyribonucleosidtriphosphate wie z.B. 2',3'-Didesoxynucleosidtriphosphaten [ddNTP] als Substrat führt wegen der fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Kettenabbruch der wachsenden Primerkette. Das Verhältnis von ddNTPs zu dNTPs wird dabei so gewählt, daß sowohl lange wie kurze, markierte Primerketten entstehen, die alle ein gemeinsames 5'-Ende (des anhybridisierten Primers), aber ein unterschiedliches, in der Länge variiertes 3'-Ende aufweisen. Nach Beendigung der Reaktion werden die radioaktiv markierten oder mit basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Gemische der Doppelstränge hitzedenaturiert und auf einem Sequenziergel nach ihren Kettenlängen aufgetrennt.



Formel 13-13. Didesoxy- oder Kettenabbruch-Verfahren nach F. SANGER.

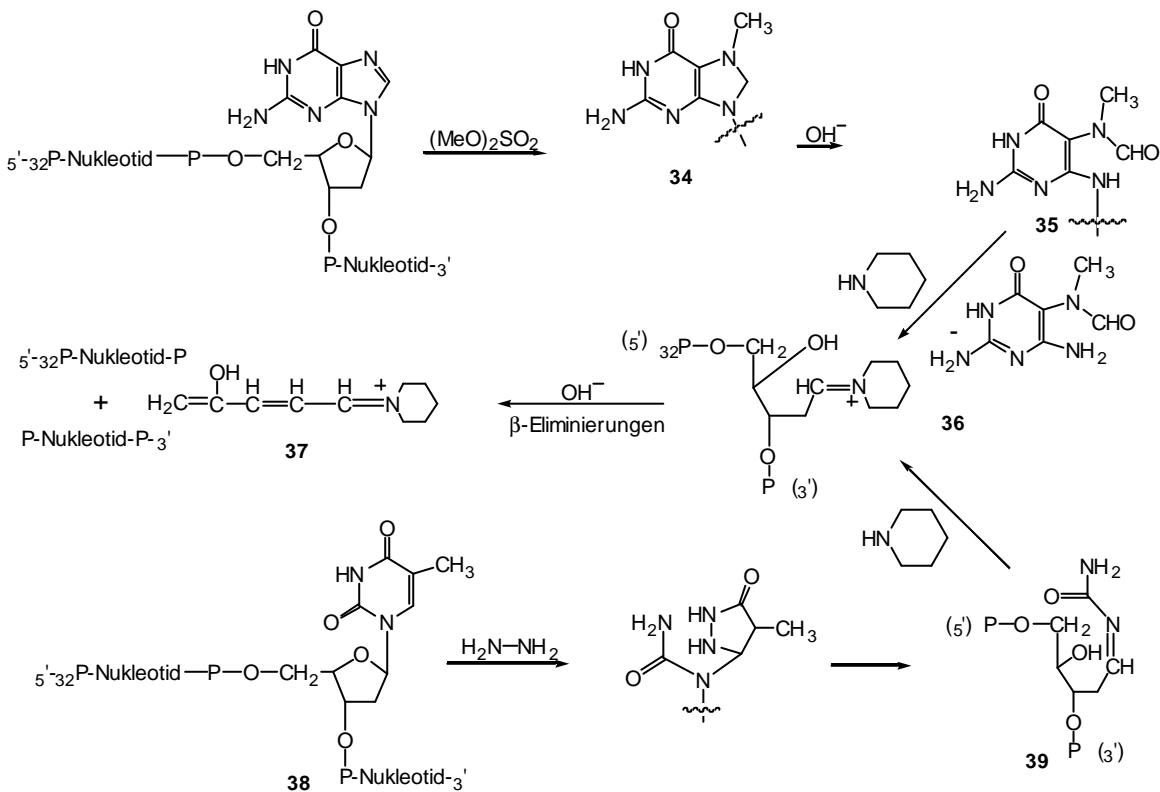
Mit einem *Phagen-Vektor* werden die synthetischen DNA-Fragmente kloniert, aus den dort gebildeten neuen Phagen können dann die einzelsträngigen DNA in genügender Menge isoliert werden.

Nach M.A. MAXAM und W. GLBERT wird von doppelsträngigen DNA-Restriktionsfragmenten ausgegangen, die enzymatisch an beiden 5'-Enden mit ^{32}P -markiertem ATP markiert werden. Anschließend werden die beiden Stränge durch Hitze denaturiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Falle einer RNA-Sequenzierung markiert



man üblicherweise durch Übertragung des Mononucleosiddiphosphats [$5' \text{-} ^{32}\text{P}$]pCp auf das 3'-Hydroxyl des 3'-Endes der RNA als $5' \text{-RNA-3' \text{-} ^{32}\text{p-U}$.

Die nachfolgende chemische Sequenzierung nach der *Dimethylsulfat-Hydrazin-Methode* (Formel 13-14) basiert auf selektiver chemischer Modifikation einer der Purin- oder Pyrimidinbasen und anschließender selektiver Spaltung des Makromoleküls. Die chemische Modifikation wird in einer getrennten Probe durchgeführt. Es wird unter Bedingungen gearbeitet, unter denen nur eine geringe Zahl von Basen reagiert. Durch Alkylierung mit Dimethylsulfat wird z.B. 7-Methylguanodin **34** gebildet und der Imidazoleteil des Purinsystems zwischen C-8 und C-9 zu **35** gespalten. Piperidin spaltet anschließend quantitativ die N-glykosidischen Bindungen unter gleichzeitiger Öffnung des Furanrings und Bildung eines Iminiumkations **36**. Zweifache Eliminierung der Phosphatgruppe ergibt unter Verlust des Guanosins die Kettenspaltung des DNA-Fragments an dieser Stelle (G-Reaktion) unter Bildung zweier Fragmente ($5'$ - ^{32}P -Fragment + Fragment- $3'$ -P), von denen eines radioaktiv markiert ist. Die Geschwindigkeit der Abspaltung der modifizierten Basen ist unterschiedlich: Bei pH 7 und 90 °C erfolgt die Spaltung der modifizierten Guanodinreste schneller als die der Adenosinreste (G>A), mit



Ameisensäure und bei 0 °C die der Adenosinreste schneller als die der Guanodinreste (A>G-Reaktion). Das Reagenz Diethylpyrocarbonat modifiziert sowohl A als auch G, A verläuft jedoch schneller (A>G).

Formel 13-14. Selektive Spaltung von DNA an Guanidin- bzw. Thyminresten während der Fragmentierungstechnik nach A. MAXAM und W. GILBERT.

Unter Bildung von Ureido-Verbindungen und Hydrazonen werden von Hydrazin spezifisch nur die Pyrimidinbasen angegriffen. In Gegenwart von NaCl reagiert nur Cytosin (C-Reaktion). Der nukleophilen Angriff am C-6 bewirkt eine Ringöffnung des Pyrimidinrings. Die anschließende Cyclisierung gibt ein Pyrazol-3-on **38**, das unter Öffnung des Zuckerfuranosids abgespalten wird **39**. Substitution des Harnstoffs durch Piperidin bildet ein Iminiumkation **36**, wiederum gefolgt von einer Eliminierung der Phosphate unter Kettenspaltung. Die Pyrimidinbasen von DNA-Fragmenten reagieren mit Hydrazin in der Reihenfolge Cytosin > Thymin. Durch die Wahl der Reaktionsbedingungen kann eine Spaltung von C und T (C+T-Reaktion) oder selektiv nur an C (C-Reaktion) erfolgen (Abb. 13-10 zeigt exemplarisch die Modifikation des oberhalb gewählten DNA-Restriktionsfragments bei der Modifizierung an den Guanosenresten).

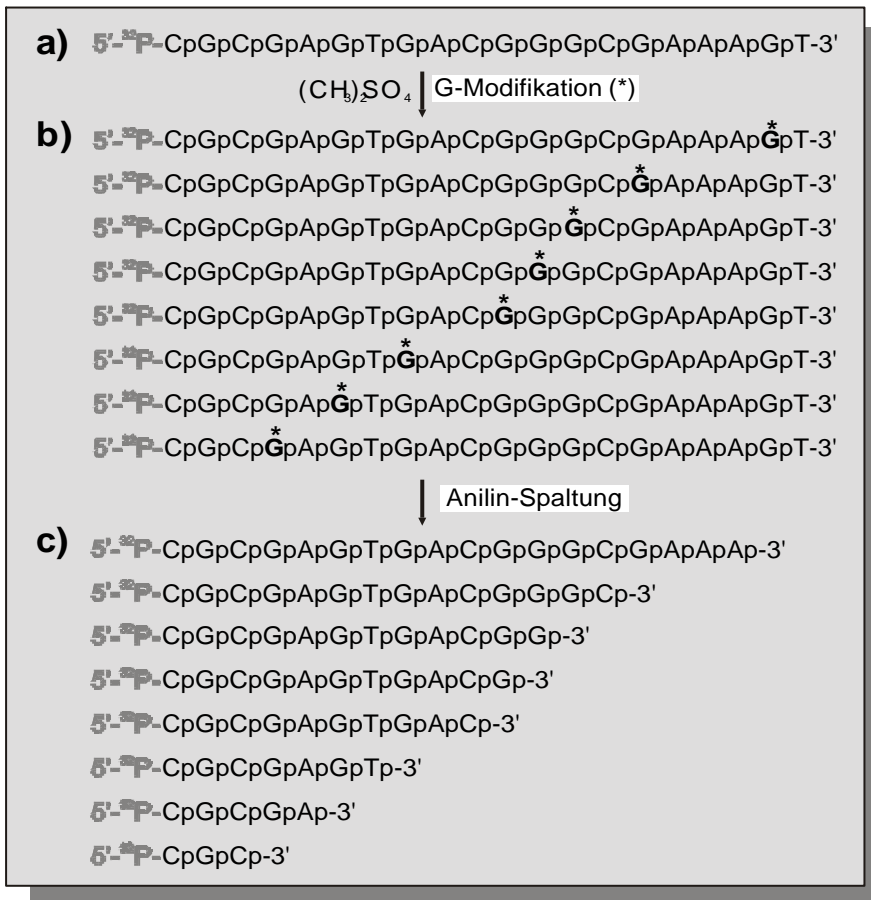
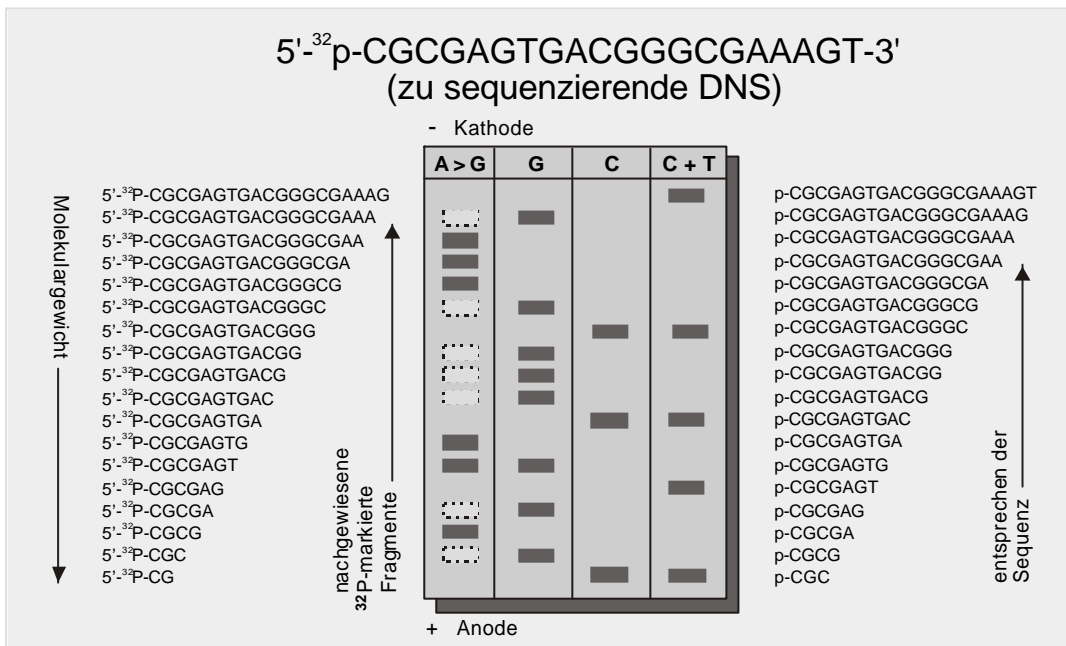


Abbildung 13-10. Modifizierung einer $5' \text{-}^{32}\text{P}$ -markierten DNA an den Guanosenbasen mit Dimethylsulfat unter limitierenden Bedingungen (G-Reaktion). **a)** markierter DNA-Strang, **b)** in jeder DNA nur ein G modifiziert, **c)** radioaktiv-markierte Fragmente nach Anilinspaltung.

Die durch diese Selektivspaltungen [G, A>G, C und C+T] erhaltenen Fragmentierungsnucleotide werden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die vom 5'-Terminus ausgehenden Fragmente autoradiographisch identifiziert (Abb. 13-11). Das erhaltene Bandenmuster der Oligonucleotide erlaubt die Aufklärung der Sequenz unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Spezifitäten der chemischen Methoden.

Die Analyse spezifischer Gen-Nukleotidsequenzen geschah gewöhnlich durch Klonierung des Gens und Vergleich der klonierten DNA mit der Sequenz bekannter *Allele* [= durch Mutation entstandene alternative Formen des Gens]. Da der Klonierungsprozeß jedoch aufwendig ist, erscheint eine direkte Sequenzierung von DNA erstrebenswert. Während bis vor wenigen Jahren die direkte enzymatische Sequenzierung genomischer DNA nur an Hefe gelang, ist durch die selektive Amplifizierung eines DNA-Fragmentes mittels PCR (13.) auf das 10fache sogar eine direkte Sequenzierung von Säugetiergenen möglich. In der enzymatischen Sequenzierung nichtklonierter cDNA besteht eine weitere Vereinfachung der Sequenzanalyse. Hierbei werden synthetische Oligonukleotide an die komplementäre DNA oder direkt an die RNA hybridisiert und anschließend



ohne vorherige Klonierung direkt sequenziert.

Abbildung 13-11. DNA-Sequenzierung und Autoradiogramm eines Eicosanucleotids. In vier getrennten Reaktionen wird ein Gemisch aus markierten, einzelsträngigen Oligodesoxynucleotiden erzeugt und elektrophoretisch aufgetrennt. Alle vier Fragmentreihen weisen definierte Enden auf, am anderen Ende ist immer G, A, T oder C.

Eine noch höhere Sequenzierquote scheint mit dem Verfahren des *Multiplex-Sequenzierers* möglich zu sein, das auf der chemischen Sequenzierung nach MAXAM und GILBERT basiert. Es wird dabei pro Sequenzreaktion jedoch nicht nur ein DNA-Fragment bearbeitet, sondern ein Gemisch von Fragmenten, die an ihren Enden unterschiedliche, allerdings eindeutig definierte Oligonucleotidsequenzen besitzen. Solche erhält man durch Einklonieren der Fragmente in verschiedene Vektoren, deren Klonierungsstellen von eben diesen verschiedenen Sequenzen eingerahmt sind. Aus den rekombinanten Plasmiden werden anschließend mit den Restriktionsenzymen Not I die zu analysierenden Fragmente nun mit den flankierenden Linkersequenzen wieder herausgeschnitten und gemeinsam den vier basenspezifischen Reaktionen der MAXAM/GILBERT-Technik unterworfen. Danach werden sie elektrophoretisch getrennt, die vier DNA-Sequenzleitern des Gels auf Nylon

transferiert und fixiert, und durch Inkubation mit einem radioaktiv markierten spezifischen Oligodesoxynukleotid, das zu einem der Oligodesoxynukleotidlinker komplementär ist, zum Doppelstrang hybridisiert. Damit werden ein Teil des Fragmentgemisches sichtbar gemacht und die Sequenz lässt sich direkt ablesen. Nach Abwaschen der komplementären, markierten Oligonukleotide kann man den Filter neuerdings mit anderen komplementären Oligonukleotiden hybridisieren und den ganzen Vorgang oftmals wiederholen. Die Autoradiographien werden über einen optischen Scanner ausgewertet. Prinzipiell können mit dieser Methode zig-Tausende von Nucleotiden pro Tag in ihrer Sequenz aufgeklärt werden.

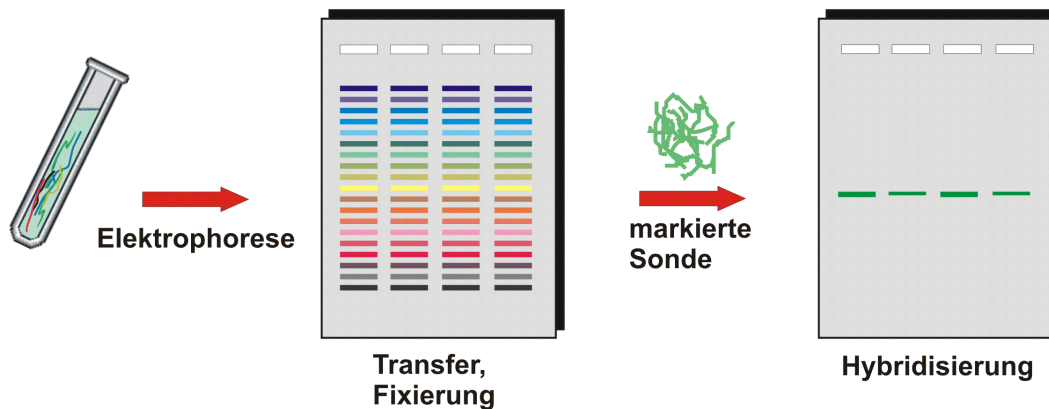


Abb. 13- . Das aus mehreren tausend Genen bestehende mRNA-Gemisch wird gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nylonfilter transferiert und mit einer markierten Sonde inkubiert. Bei dieser Hybridisierung binden die markierten Sondenmoleküle spezifisch nur an die RNA-Moleküle mit komplementärer Sequenz. Nach Entfernung der nicht-gebundenen Sondenmoleküle stellt die Menge der spezifisch gebundenen Sonden ein Maß für die Menge der vorliegenden RNA des untersuchten Gens dar.

Automatische Sequenziermaschinen stehen seit über 10 Jahren zur Verfügung und werden inzwischen weltweit eingesetzt. Mit solchen Geräten lassen sich heute in einer Stunde Sequenzen mit einigen hundert Basen bestimmen.

13.4.3 Sekundär- und Tertiärstruktur von Nucleinsäuren

Die reaktiven NH_2 -, OH - und NH -Gruppen der Basen sind für bestimmte Eigenschaften wie z.B. der Ausbildung von Wasserstoffbrücken und damit für die Sekundärstruktur wichtig. Die konjugierten Doppelbindungen der Heterocyclen bedingen spezifische Absorptionen im UV, gleichzeitig bedingt die Sekundärstruktur auch die Höhe der Absorption.

Im Vergleich zu den Polypeptiden besitzen die Polynukleotide wesentlich mehr Bindungen, die durch mehr oder weniger eingeschränkte Rotation um ihre Achse die konformative Flexibilität der Polynukleotidkette beeinflussen können. Allein in der Internukleotidbindung bestimmen die 5 Torsionswinkel Φ' , ω' , ω , Φ und Ψ die Stereochemie der Kette (Abb. 13-12). Weitere Faktoren sind die konformative Flexibilität des Tetrahydrofuranringes () sowie die Rotation um die glykosidische Bindung (). Energiekalkulationen sowie

die Ergebnisse der Röntgendiffraktion an Nucleosiden und Nucleotiden ergaben, daß die Torsionswinkel $\Phi' \sim 240^\circ$, $\omega' \sim 290^\circ$, $\omega \sim 290^\circ$, $\Phi \sim 180^\circ$ und $\Psi \sim 60^\circ$ betragen (ohne Berücksichtigung der Wasserstoffbrücken zwischen den Basen).

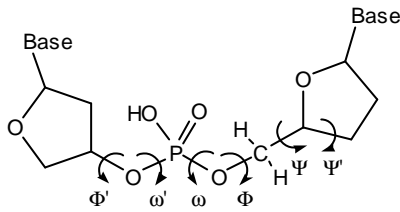


Abbildung 13-12. Torsionswinkel der Polynucleotidkette.

Nucleinsäuren können als Einzel- oder Doppelstrang sowie in Form linearer oder ringförmiger Strukturen vorliegen. Strukturumwandlungen der DNA werden z.B. durch Histone und andere DNA-bindende Proteine sowie Enzyme wie Topoisomerasen und Helicasen kontrolliert. Die Umwandlungen sind vom pH-Wert, der Ionenstärke oder der Temperatur abhängig (vgl. Kap. 13.2.5). Bei höherer Temperatur oder Änderung der Ionenkonzentration erfolgt meist die Zerstörung der Sekundärstruktur durch Denaturierung.

13.4.3.1 Doppelhelix und andere Formen der DNA

Aus Untersuchungen von E. CHARGAFF [1950] ging hervor, daß die Verhältnisse der Basen A/T und G/C in den DNA verschiedener Organismen (Tab. 13-6) stets 1.0 sind, während A/G und C/T oder andere Verhältnisse stark variieren. Auf der Grundlage dieser konstanten Basenverhältnisse und basierend auf Röntgenfaserdiagrammen der DNA von WILKINS und FRANKLIN wurde 1953 von WATSON und F.H.C. CRICK [Medizinnobelpreis 1962] das Doppelhelix-Modell für die dreidimensionale Struktur der DNA entwickelt. Zwei antiparallele (entgegenläufige) Polynucleotidstränge winden sich in Form einer rechtsgängigen Doppelhelix um eine gemeinsame Achse (Abb. 13-13). Die Basen ragen dabei wie Leitersprossen senkrecht ins Innere des Duplex, wobei die Ringebenen leicht zur Helixachse geneigt sind (Tab. 13-8).

Aus Modellbetrachtungen nahmen WATSON und CRICK als bindende Kräfte zwischen den beiden Nucleotidsträngen Wasserstoffbrücken an. Als Wasserstoffbrücken-Donor fungiert ein an Stickstoff gebundenes Wasserstoff-Atom, als Acceptor das freie Elektronenpaar eines Sauerstoff- oder Stickstoff-Atoms. Aus Gründen des Raumbedarfs innerhalb der Doppelhelix kamen dafür nur Wasserstoffbrücken zwischen einer kleineren Pyrimidin- und einer größeren Purinbase in Frage, eine Paarung zwischen jeweils zwei Purinen oder zwei Pyrimidinen ist nicht möglich. Das Paar AT hat die gleiche Größe wie GC und die Sprossen der DNA-Leiter sind alle gleich lang. Der Raum für zwei gegenüberliegende Purine reicht für eine Wasserstoffbrückenbindung nicht aus, während die Entfernung zwischen zwei Pyrimidinen zu groß ist. Die Röntgenfaserdiagramme der B-Form der DNA [M.H.F. WILKINS, Medizinnobelpreis 1962], die als die biologisch aktive angesehen wird, zeigten Röntgenreflexe, die auf 10 Basenpaare pro Windung hinweisen. Das entspricht einer helikalen Drehung

von 36° pro Basenpaar und sich wiederholende Strukturelemente in Abständen von 0.34 und 3.4 nm, dem Abstand der Basenpaare und der Stufenhöhe der Helix 3.4 nm entsprechend (Abb. 13-13).

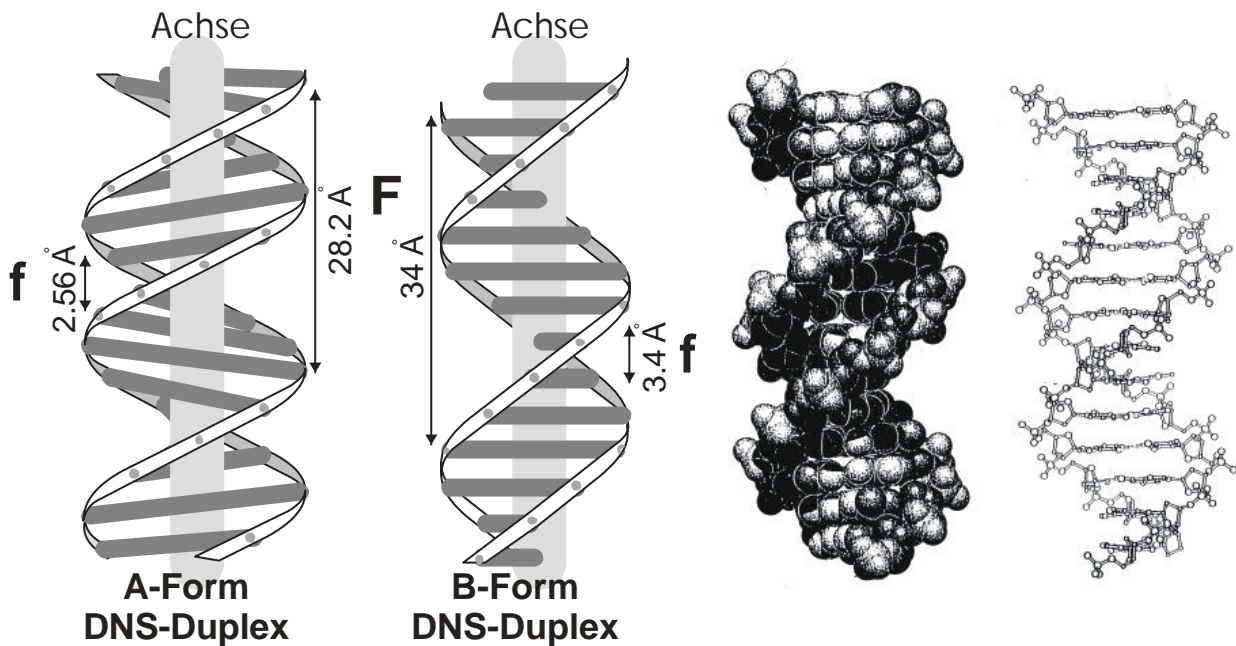


Abbildung 13-13. Schema der DNA-Doppelhelix mit großer (**F**) und kleiner (**f**) Furche.

Die WATSON-CRICK-Paarungen postulieren für das Paar Adenin/Thymin zwei und für das Paar Guanin/Cytosin drei Wasserstoffbrücken. Die Wechselwirkung G/C ist etwa 100 mal stärker als die in den A/T- bzw. A/U-Paaren. Basenpaarungen zwischen jeweils zwei Purinen oder zwei Pyrimidinen ist aus räumlichen Gründen nicht möglich. Der Raum für zwei gegenüberliegende Purine reicht für eine Wasserstoffbrücke nicht aus, während die Entfernung zwischen zwei Pyrimidinen zu groß ist. Die Basenpaare zwischen dem Rückgrat der Einzelstränge wirken wie Sprossen einer Strickleiter. Die Einzelstränge sind antiparallel angeordnet. Jede Base des einen Einzelstranges mit 'Sinn-Sequenz' [*sense*] ist einer komplementären Base mit 'Gegensinn-Sequenz' [*antisense*] zugeordnet und bestimmt eindeutig die Reihenfolge der Basen im gegenläufigen Strang. So paart [*hybridisiert*] z.B. ein Einzelstrang mit der Sense-Sequenz (3'-5')-d(A-T-G-C-T-T-G) mit dem komplementären Einzelstrang der Antisense-Sequenz (5'-3')-d(T-A-C-G-A-A-C) (Abb. 13-14). Das Modell erklärte den Replikationsmechanismus des genetischen Materials und die Transkription.

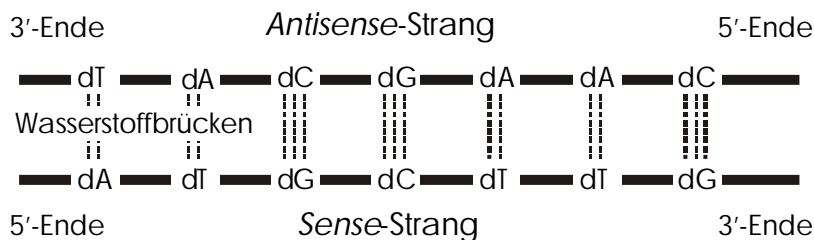
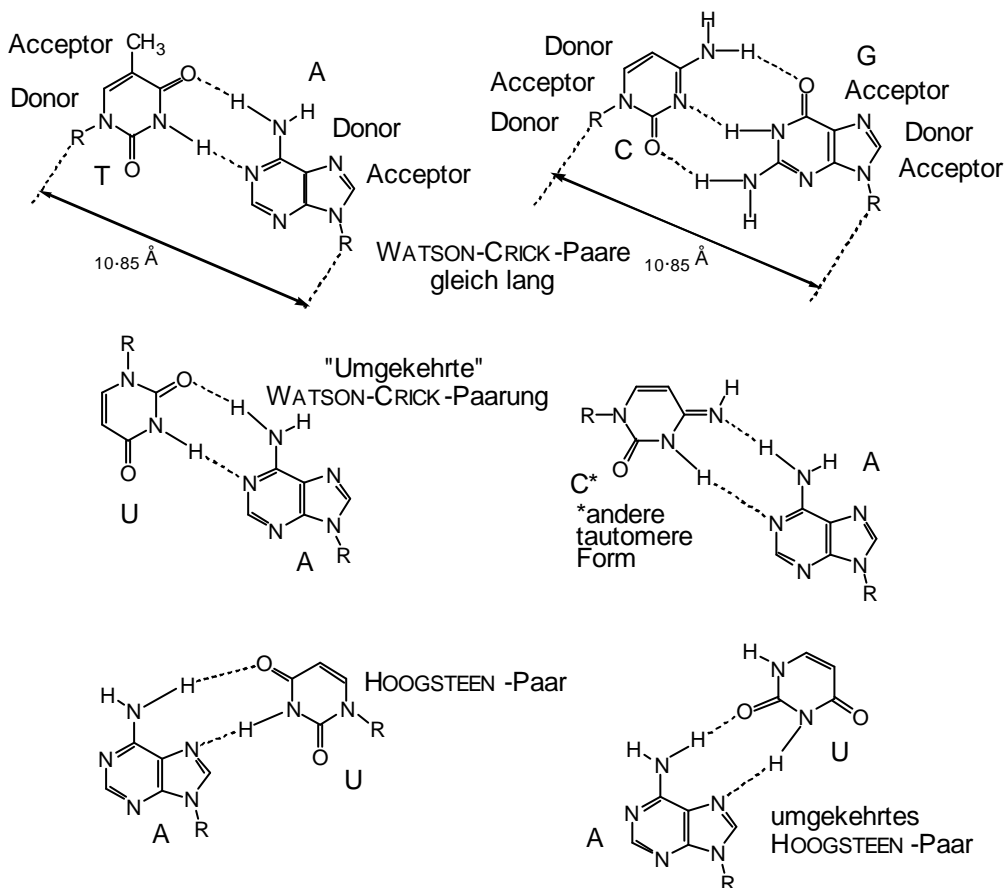


Abbildung 13-14. WATSON-CRICK-Basenpaarung zwischen zwei antiparallelen DNA-Einzelsträngen.

Diese WATSON-CRICK-Paare sind jedoch nicht die einzig möglichen Strukturen. Weitere Paarungen, die ebenso auf der Basen-Komplementarität basieren, sind durch Drehung der Pyrimidinbasen [*reverses Paar*] sowie unter Einbeziehung des N-7 vom Imidazolrest der Purine [*HOOGSTEEN-Paar*] möglich (Abb. 13-15). Eine HOOGSTEEN-Paarung findet statt bei der Cokristallisation von Mischungen der Nucleoside von Adenin und Thymin. Eine reverse HOOGSTEEN-Paarung tritt bei Komplexen ein, an deren Bildung 5-Bromuracil beteiligt ist. Für das Paar G/C wurde bisher nur eine WATSON-CRICK -Paarung nachgewiesen. Die Beteiligung anderer tautomerer Formen der Nucleosidbasen (A*, C*, G*, vgl. Kap. 13.1.3.1) an Basenpaarungen wie A*/C, A/C*, G*/C oder G/C* dient zur Erklärung von Punktmutationen (13.6.1.4). Ein T mit O-4-Sauerstoff in Enolform



wirkt wie ein C und ist daher zu G komplementär.

Abbildung 12-15. Wichtigste Basenpaarungen und die entsprechenden Wasserstoffbrückenbindungen.

Die Bildung von H-Brücken reicht jedoch nicht aus, um die Stabilität der Basenpaare zu erklären. Die Hydratation in wässriger Lösung sollte zur Aufhebung der Wasserstoffbrücken führen, dagegen bilden komplementäre Einzelstränge selbst in Lösung thermodynamisch stabile Duplexe. Neben den Basenpaarungen wird die Ausbildung der DNA-Doppelhelix hauptsächlich durch die Basenstapelung begünstigt. Dieser Effekt stabilisiert den Duplex und wirkt der elektrostatischen Abstoßung der negativ geladenen Phosphatgruppen entgegen. Neben den horizontalen Basen-Wechselwirkungen zwischen den komplementären Duplex-Strängen wirken die Stapelkräfte [*stacking forces*] vertikal zwischen benachbarten Basen eines einzelnen Stranges.

Basenpaarung zwischen Oligonukleotid-Einzelsträngen relativ zur Paarung der gleichen Anzahl isolierter Basen ist mit einem Gewinn an Freier Enthalpie verbunden.

Hinweise auf eine stapelförmige Anordnung der Nucleobasen ergaben sich durch drastische Viskositäts erhöhungen von Mono- und Oligonukleotidlösungen unter bestimmten Bedingungen, z.B. bei pH 4 - 5 in einer konzentrierten wäßrigen GMP-Lösung. Diese Viskositäts erhöhungen wurden auf Wechselwirkungen zwischen den Basen zurückgeführt. Die Basenstapelung läßt sich durch verschiedene physikalische Methoden nachweisen, z.B. durch eine Verschiebung der NMR-Signale oder anhand der Dampfdruckerniedrigung. Am bedeutendsten sind aber die Auswirkungen auf die optischen Eigenschaften der Nucleinsäuren. So ist die optische Aktivität der Nucleinsäuren wesentlich gegenüber der der Nucleotide erhöht. Durch ORD-Messungen von Poly(A) konnte die Basenstapelung auch erstmals nachgewiesen werden [HOLKOMB und TINOCO, 1965].

Table 13-8. Strukturparameter von Nucleinsäure-Helices.

Nucleinsäure	Schraubenrichtung	Basen/Steighöhe der Helix	Orientierung um glyk. Bindung	Steighöhe der Helix (nm)	Neigung der Basenpaar-Ebene gegen die Achse
A-DNA	Rechts	11	<i>anti</i>	2.82	19°
B-DNA	Rechts	10	<i>anti</i>	3.40	-6°
C-DNA	Rechts	9.3	<i>anti</i>	3.07	-8°
D-DNA	Rechts	8	<i>anti</i>	2.40	-16°
Z-DNA	links	12	<i>G syn, C anti</i>	4.45	-7°
Doppelsträngige RNA		10 - 11		3.05	15°

Die Wechselwirkung zwischen den Basen wirkt sich auch auf die *UV-Absorption* aus. Bei der Hydrolyse der Nucleinsäuren steigt die Absorption bei 260 nm an. Die Summe der Absorption der einzelnen Nucleotide ist größer als die Absorption der Nucleinsäuren. Die Stapelung der Basen ruft also einen hypochromen Effekt hervor. Auf der anderen Seite steigt die Absorption beim Übergang geordneter in weniger geordnete Strukturen. Dieser hyperchrome Effekt wird zur Ermittlung der Phasenübergangstemperatur der Nucleinsäuren (Übergang von nativer zu denaturierte Nucleinsäure) herangezogen.

In Übereinstimmung mit den Röntgenbeugungsdaten steht auch ein Alternativmodell der DNA, das ein reißverschlußartiges Aneinanderlegen der beiden DNA-Stränge mit Paarungen zwischen den komplementären Basen vorsieht [*side by side-Modell*]. Solche side by side-Strukturen könnten auch lokal innerhalb der WATSON-CRICK-Doppelhelix auftreten.

Als "klassische" DNA-Strukturen sind die A-, B-, C- und D-DNA zu nennen, deren Strukturparameter (Tab. 13-8) aus Röntgenfaserdiagrammen [M.H.F. WILKINS, S. ARNOTT] ermittelt wurden. Die B-DNA wird als die native Form angesehen, die Flächen der Basen sind annähernd senkrecht zur Längsachse der Helix angeordnet. Durch Ausfällen aus wäßrigen Lösung mit Ethanol kann je nach Wassergehalt die A- und B-Form entstehen. Die kristalline A-Form enthält 70 - 80 %, die semikristalline B-Form über 90 % Wasser. In dieser Form liegt die DNA in wäßriger Lösung vor, wie aus CD-Messungen und Röntgenstreuung hervorgeht. Entzieht man der DNA

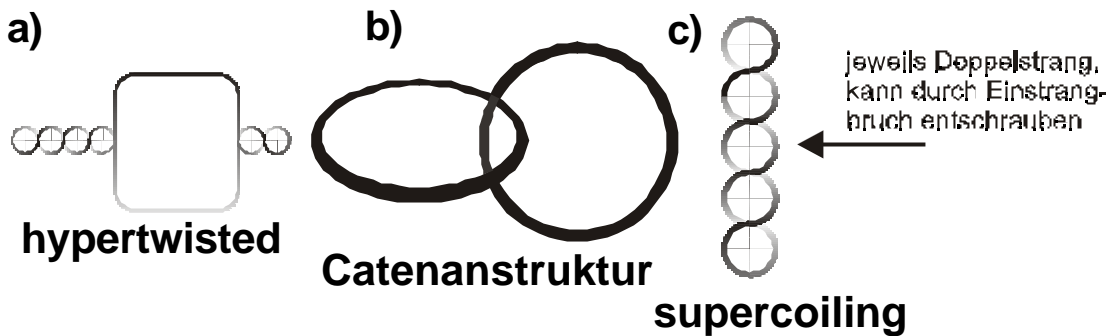
durch Erhöhung der Ionenstärke oder Alkoholzusatz das Hydrat-Wasser, so wandelt sich B-DNA (wahrscheinlich über eine C-DNA) in A-DNA um. Entscheidend für den Übergang A-DNA \rightarrow B-DNA soll die Hydratation der kleinen Furche sein. Die DNA-Formen A, B, C und D unterscheiden sich im wesentlichen durch die Konformation der Zuckerreste. Der Unterschied zwischen der A-Form und den anderen DNA-Formen liegt vor allem in der Zuckerwellung, A-DNA besitzt C-3'-*endo*, B-, C- und D-DNA C-2'-*endo* (oder die verwandte D-3'-*exo*-Form). RNA liegt ausschließlich in der C-3'-*endo*-Wellung vor. D-DNA ist mit 8 Basenpaaren pro Windung sehr eng geschraubt und wird nur bei alternierenden Sequenzen wie Poly-d(A-T) oder Poly-d(G-C) gefunden. Der B-DNA-Duplex hat einen Durchmesser von 2 nm, eine volle Helixwindung schließt zehn (unter physiologischen Bedingungen 10.5) Basenpaare ein, jedes Paar ist um 36° verdreht. Die Doppelhelix weist zwei Furchen auf, die unterschiedlich weit sind. Die große Furche ist nahezu 1 nm weit, in beiden Furchen befinden sich zwei (große Furche) bzw. eine (kleine Furche) Kette aufeinanderfolgender Wassermoleküle (B-DNA ist stark hydratisiert und enthält ca. 95 % rel. Feuchtigkeit). Der A-DNA-Duplex ist dehydratisiert (75 % rel. Feuchtigkeit), 11 - 12 Basenpaare liegen auf einer Helix-Windung, die große Furche ist tief, aber eng, die kleine Furche ist flach und liegt an der Oberfläche.

1980 wurden bei alternierenden Poly-d(C-G) eine *linksgängige DNA-Doppelhelix* entdeckt [A. RICH], die als Z-DNA ("Z" für Zickzack des Desoxyribosephosphat-Rückgrates) bezeichnet wurde. Diese Z-DNA wird durch klassische WATSON-CRICK-Basenpaarungen zusammengehalten und unterscheidet sich von der B-DNA dadurch, daß die Nukleobasen alternierend *syn*- und *anti*-Orientierung einnehmen. Guanosin nimmt im Zuckeranteil die Konformationen C-3'-*endo*, *trans* und *syn* ein, während das Cytidin die normalen Konformationen C-2'-*endo*, (+)-*gauche* und *anti* einnimmt, wodurch die Linkswindung ermöglicht wird. Z-DNA-Abschnitte scheinen durch Methylierung der Basen begünstigt werden. Es mag sein, daß die in mehreren DNA beobachteten längeren C-G-Sequenzen biologische Implikationen haben, wenn sie in Z-DNA-Form vorliegen. So wurde gefunden, daß ein Abschnitt des Histidin-D-Gens aus *Salmonella* mit acht alternierenden C-G-Resten ein Mutations-"Hotspot" ist. Carcinogene greifen bevorzugt N-7 oder C-8 von Guanosin an, und es mag sein, daß die häufigen in C-G-Sequenzen gefundenen 5-methylierten Cytidine, die vor allem in inaktiven Genen auftreten, auf Modifikation von Z-DNA zurückzuführen sind und regulatorische Funktionen haben.

Der strukturelle Unterschied zwischen den drei Konformationstypen hat Konsequenzen auf ihre Funktion. Für Wechselwirkungen mit anderen Molekülen ist die Zugänglichkeit der Furchen maßgeblich. DNA-bindende Proteine, Peptid-Analoga und andere Moleküle, die mit DNA in supramolekulare Wechselwirkungen treten, können Konformationsänderungen bewirken, die Helix verbiegen, das Furchenprofil verändern und damit die DNA-Funktion beeinträchtigen.

In den Mitochondrien der tierischen Zellen finden sich DNA-Sekundärstrukturen mit auffälligen Formen. Die verbreitetste ist eine ringförmige Doppelhelix [*circuläre DNA*]; durch die Cyclisierung hat die DNA-Kette weniger Drehungen als eine offenkettige DNA. Es kommt daher bei der ringförmigen Doppelhelix zu

zusätzlichen Verdrillungen (*hypertwisted*, Abb. 13-16 a). Daneben kommen noch sehr große, miteinander verschlungene Ringe (*Catenanstruktur*, Abb. 13-16 b) vor, auch ein *supercoiling* ist möglich (Abb. 13-16 c). Bei den Plasmiden der Bakterien und der DNA der Chloroplasten handelt es sich ebenfalls um ringförmige DNA, die etwa gleich groß ist wie die in den Mitochondrien. Seit Jahren sind auch dreisträngige Tripelhelix-



Strukturen in der Natur bekannt.

Abbildung 13-16. DNA-Form der Mitochondrien tierischer Zellen. a) Ringförmige hyperspiralige Form, b) Catenanstruktur, c) supercoiling.

Eine ausgefallene Struktur besitzt die DNA des lysogenen Phagen λ . Dessen DNA-Ketten besitzen am 5'-Ende Segmente aus 12 Nucleotiden, die antiparallel eine komplementäre Sequenz aufweisen. Durch Basenpaarung der Endsegmente wird dadurch Ringschluß möglich.

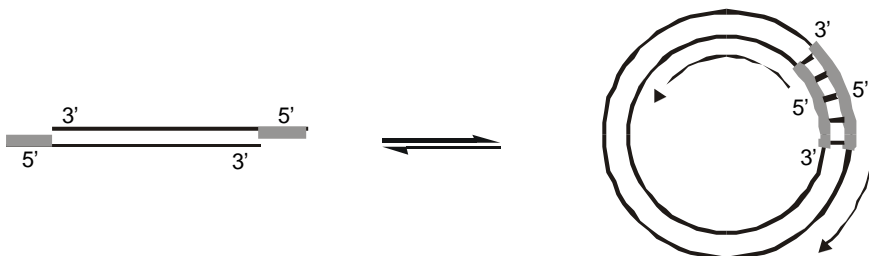


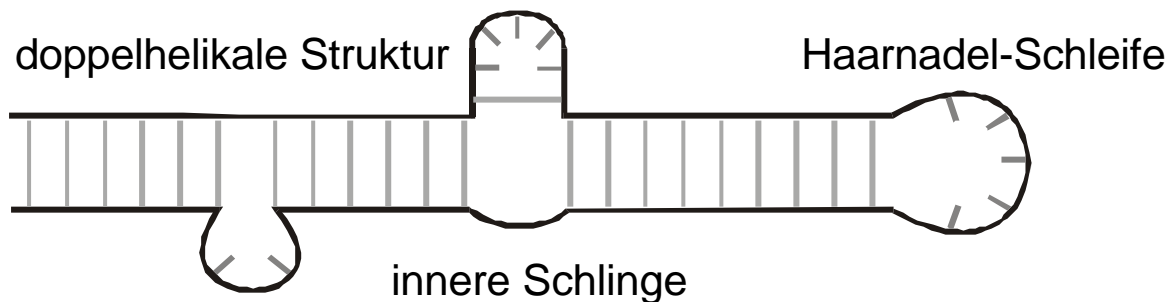
Abbildung 13-17. DNA-Struktur des lysogenen Phagen λ .

13.4.3.2 Ribonucleinsäuren

Während die DNA durch die Ausbildung der Doppelhelix stäbchenförmige Moleküle bildet, liegt die RNA in geknäuelter Form vor, wie aus hydrodynamischen Untersuchungen hervorgeht. In dieser geknäuelten Form befinden sich die Basen jedoch auch nur selten ohne eine bevorzugte Orientierung zueinander. Eine amorphe Form tritt nur bei bestimmten synthetischen Polynucleotiden [z.B. Poly(U)] oder bei hohen Temperaturen (nach der Denaturierung) auf. Im allgemeinen bilden sich bei den Polyribonucleotiden Zustände verschiedenen Ordnungsgrades durch Wechselwirkungen zwischen den Basen heraus. Auf solche Wechselwirkungen kann man aus den optischen Eigenschaften schließen.

Unterhalb des Phasenüberganges liegen viele Polynukleotide wie Poly(A) in einer einfachen *einsträngigen Helix-Struktur* vor, die durch Wechselwirkungen zwischen benachbarten Basen möglich wird. Es kommt zu einer Basenstapelung ohne Basenpaarung mit Ringebenen senkrecht zur Helixachse. Diese Struktur ist wie die amorphe Form noch weitgehend flexibel. Die optischen Eigenschaften dieser einfachen Helix unterscheiden sich jedoch infolge der Basenstapelung von denen der amorphen Form.

Die größte Bedeutung für die Ausbildung bestimmter RNA-Konformationen haben Basenpaarungen innerhalb einer Polynukleotidkette. Durch Zurückfalten des Stranges kommt es zu Wechselwirkungen zwischen komplementären Basen. Es entstehen auf diese Weise partiell *einzelsträngige Doppelhelix-Strukturen* [Haarnadel-Strukturen, Abb. 13-18], die von Schleifen unterbrochen werden. Solche Strukturen werden charakterisiert durch die Zahl der Basen pro Schleife, die Zahl der ungepaarten Basen pro Schleife und die Zahl der ungepaarten Basen, die die Schleifen miteinander verbinden und sind umso stabiler, je mehr



Basenpaarungen möglich sind.

Abbildung 13-18. Schematische Darstellung einzelsträngiger Doppelhelix-Strukturen.

Am besten untersucht sind die tRNA. Alle in ihrer Primärstruktur aufgeklärten tRNA können trotz Unterschieden in der Sequenz und der Länge der Kette unter Berücksichtigung von WATSON-CRICK-Paarungen (anstelle von T tritt U) in einer "Kleeblatt"-Anordnung formuliert werden (Abb. 13-19), wobei vier basengepaarte Bereiche und 3 bis 4 Schleifen unterschieden werden können. Die genaue räumliche Struktur konnte jedoch erst durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt werden, nachdem es 1968 gelungen war, die Phenylalanin-tRNA aus Hefe zu kristallisieren. Die erste Aufklärung der Tertiärstruktur einer tRNA (1973 und 1975, Röntgenstrukturanalyse mit einer Auflösung von 0,25 nm) sicherte eine T-förmige Gestalt des Moleküls (Abb. 13-19). An der Ausbildung dieser Struktur sind nicht nur Wasserstoffbrücken zwischen den Basen, sondern auch die 2'-Hydroxygruppe und Phosphatgruppen beteiligt. Weiterhin wurde festgestellt, dass es durch die Anwesenheit eines G/U-Paares mit nur zwei Wasserstoffbrücken zu einer Deformation der Helix kommt.

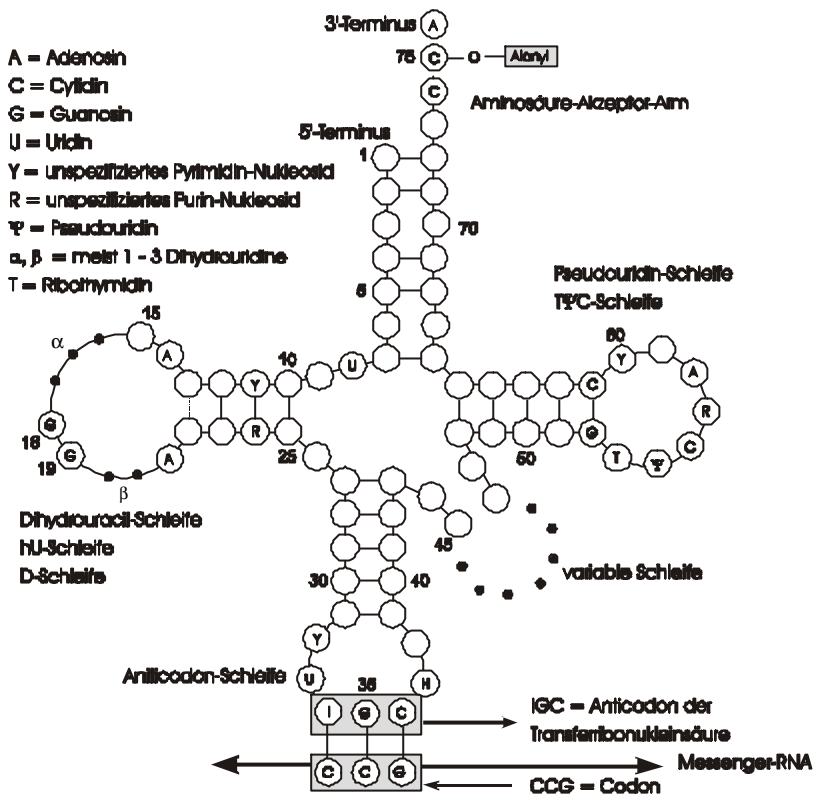


Abbildung 13-19. Schematische Darstellung der Alanin-spezifischen tRNA aus *Escherichia coli*.

Einige tierische und pflanzliche Viren enthalten doppelsträngige RNA. Die zwei antiparallel angeordneten Ketten werden durch WATSON-CRICK-Basenpaarungen zusammengehalten. Die so gebildete doppelsträngige RNA-Doppelhelix ist der A-Form der DNA-Doppelhelix sehr ähnlich (Tab. 12-10). Doppelhelices werden auch von synthetischen Polyribonukleotiden wie Poly(A).Poly(U) oder Poly(I).Poly(C) gebildet. Bestimmte homopolymere Polyribonukleotide, z.B. Komplexe zwischen Poly(A) und Poly(U), können außer als Doppelhelix mit WATSON CRICK-Paarungen Tripelhelices [z.B. Poly(A).2Poly(U)] mit der in Abb. 13-21 dargestellten Basenpaarung bilden.

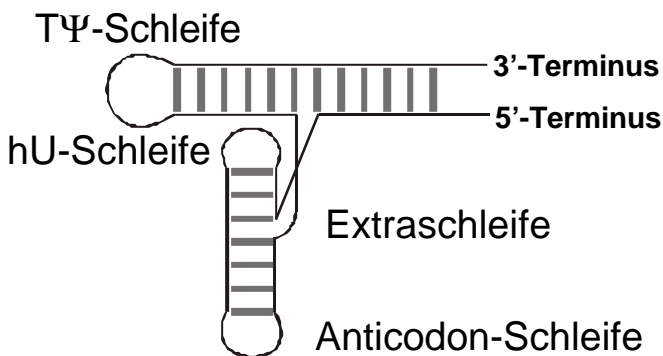


Abbildung 13-20. Schematische Darstellung der Tertiärstruktur von Phenylalanin-tRNA aus Hefe (nach KIM, QUIGLEY, DUDDATH, MCPHERSON, SUEDEN, WEINZIERL und RICH).

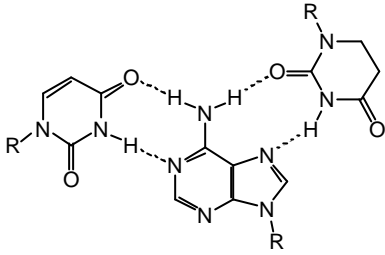


Abbildung 12-19. Basenpaarung in der Poly(A).2Poly(U)-Tripelhelix.

Unterschiede zwischen den Wasserstoffbrücken in DNA und RNA und damit mögliche Bedeutung für die Unterschiede zwischen deren Struktur und Funktion wurden erst in 2004 entdeckt. Offenbar sind N(1)···N(3)-Wasserstoffbrückenbindungen in einem A:U-Basenpaar in einer RNA-Duplex stärker als die eines A:T-Basenpaars in einer doppelsträngigen Helix.

13.4.3.3. Nucleinsäuren von Viren

Die DNA der kleinsten Phagen ist einzelsträngig und cyclisch, die aller mittelgroßen und großen Viren doppelsträngig. Die RNA ist meist einzelsträngig, Retro-Viren und Insekten-Viren enthalten doppelsträngige RNA. Das bereits 1892 entdeckte Tabakmosaikvirus [TMV] (MG 39,400.000), der Erreger der Blattfleckenkrankheit, ist ein stäbchenförmiges Virus mit einer Länge von 3000 Å und einem Durchmesser von 180 Å. In der Mitte ist ein Loch von 40 Å. Es ist ein mechanisch übertragbares, einsträngiges RNA-Virus (13.4.1.3), an dessen RNA-Spirale (bestehend aus ca. 6.400 Nucleotiden) etwa 2.130 identische Proteinuntereinheiten (Capsomere, M_r 17.500) gebunden sind, die eine rechtshändige Helix bilden. Wegen seiner Länge ist das röhrenförmig gebaute TMV ein viel untersuchtes Studienobjekt der Virologie.

Die Viroid-RNA besteht aus 250 - 400 Nucleotiden, deren Einzelstrang kovalent zum Ring geschlossen wurde. Die Viroid-RNAs weisen strukturelle und dynamische Eigenschaften auf, die an anderen Nucleinsäuren bisher nicht beobachtet wurden. Das am besten untersuchte Viroid PSTV [*potato spindle tuber viroid*] bildet durch weitgehende WATSON-CRICK-Basenpaarung ein Stäbchen von 0,05 µm Länge, in welchem kurze Doppelhelices mit kurzen, ungepaarten Abschnitten abwechseln.

13.4.4 Physikalisch-chemische Eigenschaften der Nucleinsäuren

13.4.4.1 Denaturierung

Ähnlich wie bei den Peptiden wird eine Veränderung der nativen Sekundärstruktur der Nucleinsäuren als *Denaturierung* bezeichnet. Dabei geht die helikale Struktur in den kompakteren geknäuelten Strang [*random coil*] über. Dieser Übergang von der geordneten in die weniger geordnete Struktur entspricht einem Phasenübergang (*Helix-Knäuel-Übergang*), man spricht deshalb auch von einem Schmelzen der Nucleinsäuren.

Die thermische Denaturierung ist von der Zunahme der *optischen Dichte* der Lösung begleitet (*hyperchromer Effekt*), beim langsamen Abkühlen kann es aufgrund der Möglichkeit der Schleifenbildung durch Basenpaarungen zwischen anderen Regionen der DNA oft nur zu einer teilweisen Renaturierung kommen. DNA aus Bakterien renaturiert im allgemeinen besser als Zellkern-DNA höherer Organismen.

Der Phasenübergang kann durch Erhöhung der Temperatur, drastische Veränderung des pH-Wertes oder Zusatz organischer Lösungsmittel ausgelöst werden. Er läßt sich durch sprunghafte Änderung der hydrodynamischen (Abfall der Viskosität, Erhöhung der Dichte) oder optischen Eigenschaften (Erniedrigung der optischen Aktivität und Erhöhung der UV-Absorption) nachgewiesen werden. So zeigt Poly(A).Poly(U) eine hohe optische Aktivität, durch Temperaturerhöhung sinkt jedoch die Drehung drastisch infolge des Zerbrechens der Helix. Dagegen weist Poly(U), dessen Helixgehalt praktisch Null zu setzen ist, bei Raumtemperatur nur eine sehr geringe Drehung auf.

Der Phasenübergang findet bei den höher geordneten DNA innerhalb von 5 °C statt. Die Übergangstemperatur (Schmelztemperatur) ist u.a. abhängig von der Basenzusammensetzung der Nucleinsäure sowie von der Ionenstärke und dem pH-Wert der Lösung und ist dem G/C-Gehalt der DNA direkt proportional. Durch Interkalation (13.4.4.4) wird sie nach höheren Werten verschoben.

Die Phasenübergangstemperatur der RNA-Doppelhelix liegt bei ähnlicher Basenzusammensetzung um etwa 10° höher als die der DNA. Die doppelsträngigen cyclischen DNA der Viren können praktisch nicht denaturiert werden, da sie sofort wieder renaturieren. Der Phasenübergang der einzelsträngigen RNA erstreckt sich über einen größeren Temperaturbereich als der der doppelsträngigen DNA.

Die durch Denaturierung getrennten Nucleinsäurestränge können wieder rekombiniert werden. Die Rekombination von Mischungen denaturierter Nucleinsäuren erlaubt die Isolierung von DNA-DNA- oder DNA-RNA-Hybriden [*Hybridisierung*].

13.4.4.2 Löslichkeit

Die Phosphorsäurediestergruppierungen der Nucleinsäuren ($pK_s = 1,0$) sind im physiologischen Bereich praktisch vollständig dissoziiert. Die Nucleinsäuren unterscheiden sich durch ihre *Löslichkeit* in Salzlösungen. Durch konzentrierte NaCl-Lösung wird hochmolekulare RNA, nicht aber DNA oder niedermolekulare RNA ausgefällt. Wie die Proteine werden Nucleinsäuren auch durch organische Lösungsmittel ausgefällt. Mit mehrwertigen Metallionen bilden sie schwerlösliche Niederschläge, schwerlösliche und feste Komplexe werden auch mit Proteinen [*Nucleoproteine*] eingegangen. Zu solchen Nucleoproteinen gehören die Histone, das Chromatin des Zellkerns, Ribosomen lassen sich als Ribonucleoproteine auffassen, auch die Viren sind

Nucleinsäure-Protein-Komplexe. Die Zerstörung der Proteinkomplexe und die Abtrennung der Proteine sind Voraussetzung für die Isolierung reiner Nucleinsäuren, die wegen ihres relativ stark sauren Charakters meist als Na-, K- oder NH_4 -Salze isoliert werden. Wechselwirkungen zwischen Nucleinsäuren und Proteinen spielen bei der Wirkung der Enzyme während der Nucleinsäure- und Proteinbiosynthese eine entscheidende Rolle.

13.4.4.3 Molmassen

Nucleinsäuren sind Makromoleküle, deren *Molmassen* in einem sehr weiten Bereich (Tab. 13-9) schwanken. Die Bestimmung der Molmassen bereitet außerordentliche Schwierigkeiten, da die großen DNA-Moleküle mechanisch bereits beim Rühren und Pipettieren zerbrechen können, die RNA wiederum schneller durch nucleinsäurespaltende RNasen zersetzt werden. Zur *Molmassenbestimmung* dienen vor allem Sedimentation mit der Ultrazentrifuge oder Streulichtmessungen. Die Aussagen beider Methoden hängen aber u.a. sehr stark von der räumlichen Gestalt der Moleküle ab (DNA ist stäbchenförmig, RNA sphärisch). Die Massenbestimmung der langen DNA-Moleküle kann auch durch Längenmessung erfolgen. Bei kleineren Nucleinsäuren kann die Bestimmung der Endgruppen zur Errechnung der Molmassen herangezogen werden. Die Masse ergibt sich dann aus dem Verhältnis von Endgruppen, z.B. in Form von radioaktivem Phosphat, zur Gesamtnucleotidzahl, das als Gesamtphosphat bestimmt wird).

Tabelle 13-9. Molmassen verschiedener Nucleinsäuren

Nucleinsäure	Molmasse
RNA:	
TRNA	$3 \cdot 10^4$
mRNA	$10^5 - 10^6$
rRNA	$3,5 \cdot 10^4$; $6 \cdot 10^5$; $1,2 \cdot 10^6$
einzelsträngige RNA von Viren	10^6
DNA:	
DNA der kleinsten Viren	$1,7 \cdot 10^6$
mitochondriale DNA	$1 \cdot 10^7$
doppelsträngige DNA der größten DNA-Viren	$1,75 - 1,92 \cdot 10^8$
chromosomale DNA	$2,5 \cdot 10^9$

Im allgemeinen haben die RNAs niedrigere Molmassen als die DNAs. Die kleinsten Moleküle sind die tRNA mit nur 75 - 85 Nucleotideinheiten. Die größten menschlichen Viren sind Herpesviren und Pockenviren und bestehen aus 150.000 - 250.000 bp. Die DNA einer Bakterienzelle hingegen enthält etwa 4.000.000 bp. Ein menschliches Genom ist etwa drei Größenordnungen höher, die DNA einer menschlichen Zelle hat 5,4 Milliarden Basenpaare. Sehr große Molmassen besitzt die chromosomale DNA mit einer Nucleotidzahl bis zu 10^9 und einer Länge von über 1 mm.

13.4.4.4 Interkalation

Xenobiotica und Arzneimittel können sich zwischen die gestapelten Basenpaare einschieben [*interkalieren*] und die DNA-Expression verhindern. Durch diesen als Interkalation bezeichneten Einschub kommt es zu einer Streckung und Versteifung der DNA-Helix ohne Störung der Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren (Abb. 13-20). Gleichzeitig werden damit die hydrodynamischen und optischen Eigenschaften (λ und ϵ des UV-Spektrums) der DNA verändert. Die Phasenübergangstemperatur der Nucleinsäure steigt durch die Interkalation.

Strukturelle Voraussetzungen für ein Einschubreagens sind ein flaches, planares carbo- oder heterocyclisches Ringsystem mit einer Fläche von mindestens $2,8 \text{ nm}^2$ und einer Höhe von maximal $0,34 \text{ nm}$. Durch zusätzliche hydrophobe Bindungen zwischen diesem Ringsystem und den DNA-Basen kommt es zu einer Stabilisierung der Helixstruktur der DNA, was deren teilweise Entfaltung während der Replikation erschwert. Substituenten wie Aminogruppen stabilisieren die Bindungen durch zusätzliche elektrostatische Wechselwirkungen mit den sauer reagierenden Phosphorsäurediestergruppierungen oder Wasserstoffbrücken.

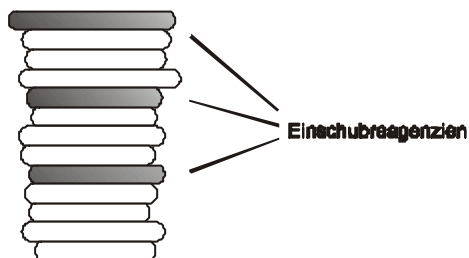


Abbildung 13-20. Schematische Darstellung der Interkalation in die DNA-Doppelhelix.

Die wichtigsten Einschubreagenzien sind basisch substituierte Chinolin-, Acridin-, Phenanthridin-, Phenoxazon-, Anthrachinon- oder Fluorenon-Derivate sowie planare polycyclische Kohlenwasserstoffe. Bezüglich ihrer Wirkung gehören zu den Einschubreagenzien Antibiotika (Actinomycine, Anthracycline), Antimalaria-Mittel (Chinin, Chlorochin, Mepacrin) sowie Verbindungen mit trypanozider (Acriflavin, Ethidiumbromid) oder antiviraler Wirkung (Tiloron). Das Verhältnis zwischen Einschubreagenz/Basenpaar schwankt zwischen $1/40$ bei Chinin, $1/12,5 - 1/5,5$ bei Actinomycinen und $1/\text{ca. } 2$ bei Chlorochin oder Mepacrin. Mepacrin wird bevorzugt an A-T-Paare gebunden, Actinomycin D an G-C-Paare. Die stärkste Bindung wurde bei den Aminoacridinen mit $24 - 40 \text{ kJ/mol}$ festgestellt. Ethidiumbromid ist das meist verwendete, aber wegen seiner mutagenen Wirkung nicht unproblematische Reagenz für die Nucleinsäureanfärbung in der Elektrophorese.

13.5 Gene - genetischer Code - Protein- und Nucleinsäurebiosynthese

Bei der Zellteilung müssen alle Erbinformationen ohne Fehler auf die Tochterzellen weitergegeben werden. Die Chromosomen sind die Träger der Erbanlagen und stellen die Transportform des Chromatins, einem Komplex aus DNA und Proteinen, bei der Zellteilung dar. Zu diesem Zweck wird die chromosomale DNA exakt kopiert und in gleicher Anzahl auf die Tochterzellen verteilt. Der Mensch hat 46 Chromosomen, 44 von ihnen kommen in jeder Körperzelle [*diploide Zelle*] paarweise in Form von 22 völlig gleichartigen Chromosomenpaaren

[Nicht-Geschlechtschromosomen, *Autosomen*] vor. Keimzellen [*haploide Gameten*] hingegen enthalten nur einen einfachen Chromosomensatz, also nur 22 Autosomen und jeweils ein Geschlechtschromosom [X oder Y, *Gonosomen*]. Wird eine Eizelle von einer Samenzelle befruchtet, entsteht daraus eine neue Tochterzelle, die wiederum 46 Chromosomen enthält und deren Chromosomen zur Hälfte von der Eizelle der Mutter und zur Hälfte von der Samenzelle des Vaters stammen. Zwei weitere Geschlechtschromosomen legen das Geschlecht fest: Mädchen haben zwei X-Chromosomen [XX], Knaben ein X- und ein Y-Chromosom [XY]. Ein Gen des Y-Chromosoms, das SRY-Gen bestimmt das Geschlecht des Menschen. Ist es vorhanden, ist die Person männlich. Bei Mutationen am SRY erfolgt eine Geschlechtsumwandlung vom Männlichen zum Weiblichen, das sog. *Swyer-Syndrom*. Diese Menschen sind genetisch männlich (wegen des XY-Chromosomenpaars), werden jedoch mit weiblichen Fortpflanzungsorganen geboren.

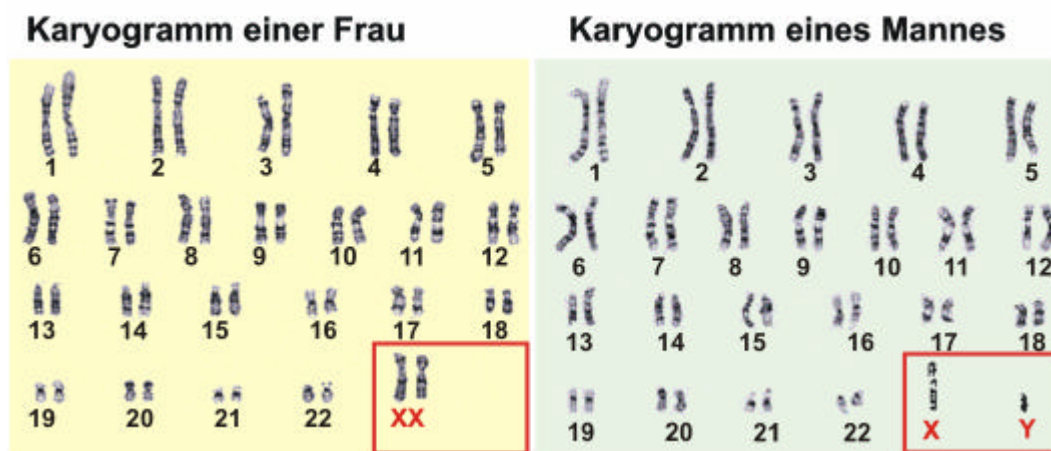


Abbildung 13- . Karyogramm einer Frau und eines Mannes, jeweils 44 Nicht-Geschlechtschromosomen (Autosomen) und zwei Geschlechtschromosomen (Gonosomen, rot umrandet).

Chromosomen lassen sich im Zellkern durch Färbung sichtbar machen und nach Größe aufgereiht als *Karyogramm* abbilden. Sie bestehen aus zwei Kernfäden, jedes dieser *Chromatiden* enthält ein doppelhelikales DNA-Molekül. Jeden codierenden Abschnitt [*Exon*] der DNA, der genetische Information trägt und damit auch Erbmateriale beinhaltet, bezeichnet man als *Gen*. Das Y-Chromosom des Menschen besteht zum Großteil nur aus sich wiederholenden Sequenzen, von denen viele nur auf diesem Chromosom vorkommen.

Ein Gen besitzt die Funktion zur *Merkmalsauslösung* und muss zur *identischen Reproduktion* und *Mutantenbildung* befähigt sein. Ein Gen kann für viele Phänotypen (Merkmale) zuständig sein, es können jedoch auch mehrere Gene an der Ausbildung nur einer Eigenschaft beteiligt sein. Das *Genom* ist die Gesamtheit der chromosomengebundenen Gene einer Prokaryoten-Zelle bzw. des Chromosomensatzes des Eukaryoten-Zellkerns. Die Angabe der Genomgröße von Organismen erfolgt meist in Basenpaaren [*bp*].

Alle Lebewesen werden in ihren Eigenschaften durch ihre Gene bestimmt, die sämtliche Lebensvorgänge steuern. Entscheidend für die Funktion der Gene ist dabei die Regulation ihrer Aktivität, d.h. wann, unter welchen Bedingungen und an welchem Ort (Zellen, Gewebe, Organen) die Information abzurufen ist.

Entsprechend fällt ein hoher Anteil der Gene auf regulative Funktionen. So codieren selbst bei der relativ einfachen einzelligen Bäckerhefe [*S. cerevisiae*] etwa 10 Prozent der ca. 6.200 Gene Faktoren für die Erzeugung von mRNAs.

Es konnte gezeigt werden, dass die DNA der Träger des vererbaren Informationsgehalts der Zelle ist und damit die molekulare Basis der Erbanlagen darstellt. Die Weitergabe der gespeicherten Information erfolgt durch drei Prozesse:

1. Die DNA-Synthese durch Verdopplung der DNA-Moleküle (Replikation),
2. die Weitergabe der Information von der DNA zur mRNA (Transkription), und
3. die Übertragung der Information von der RNA auf das Protein (Translation).

Der genetische Informationsfluß geht von der Nukleinsäure zu den Proteinen, was als das *Zentrale Dogma* der Molekularbiologie bezeichnet wurde: *Die genetische Information der Nukleinsäuren geht in die funktionelle Information der Proteine über. Ein Informationsfluss in umgekehrter Richtung findet nicht statt.*

13.5.1 Der genetische Code

In der Basensequenz der Polynukleotidstränge liegt der *genetische Code*, d.i. die Information zur Proteinbiosynthese und damit zur Biogenese lebenswichtiger Proteine, Enzyme und Hormone. Die Aufklärung des genetischen Codes gelang u.a. KHORANA, NIRENBERG und OCHOA mit Hilfe synthetischer Oligo- und Polynukleotide. Danach wird jede proteinogene Aminosäure durch linearen Zusammenschluss von je drei Nukleobasen, dem *Codon*, codiert. Die einzelnen Basen-Triplets werden hintereinander, d.h. kommafrei und nicht überlappend angeordnet. Das ergibt für vier verschiedene Basen $4^3 = 64$ Code-Möglichkeiten (Tab. 13-10). 61 der 64 möglichen *Codon-Triplets* stehen für 20 bei der Protein-Synthese eingebauten Aminosäuren zur Verfügung. Jede Aminosäure wird daher durch mehr als ein Triplet codiert, den meisten (außer Methionin und Tryptophan) sind 2 - 6 Codons [*synonyme Codons*] zugeordnet (z.B. UUU und UUC für Phenylalanin, Tab. 13-10). Man spricht von einem *entarteten Code*. Die restlichen 3 der 64 Triplets sind sog. *Nonsens-Triplets*, die als *Stopp-Codons* [*Terminator-Codons*] zur Terminierung des Translationsprozesses oder als *Initiationscodon* dienen (vgl. Abb. 13-).

Der genetische Code wurde ursprünglich als universell angesehen, d.h. bei allen Organismen sollte die Translation nach dem gleichen Code erfolgen. Dieser Tatbestand war u.a. der Beweis für den gemeinsamen Ursprung aller Organismen. Dieses molekulargenetische Dogma mußte inzwischen allerdings etwas relativiert werden, nachdem sich herausgestellt hat, dass z.B. bei der DNA nichtpflanzlicher Mitochondrien Abweichungen von der Universalität des genetischen Codes auftreten, bei Eukaryoten unterbrochene Gene und bei Bakteriophagen überlappende Gene vorkommen.

Tabelle 13-10. Der genetische Code

(Die Angabe der Triplets bezieht sich auf die mRNA in 5' → 3'-Richtung)

1. Position	2. Position				3. Position
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stopp	Stopp*	A
	Leu	Ser	Stopp	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met**	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

* bzw. unter bestimmten Bedingungen die 21. bzw. 22. proteinogene Aminosäure Selenocystein bzw. Pyrrolysin

** auch als Initiationscodon wirksam

Das menschliche Genom mit seinen 10^{12} Basenpaaren wird zur Zeit in einem internationalen Humangenomprojekt untersucht. Teilziele des Projekts sind die Erstellung von Genkarten menschlicher Chromosomen, insbesondere des X-Chromosoms, das mit einer Vielzahl von Erkrankungen assoziiert ist. Weiters werden cDNA-Bibliotheken menschlicher Zellen angelegt. Die genetischen Hintergründe von Krankheiten sollen aufgeklärt werden und entsprechende Gendefekte und unerwünschte Genfunktionen aufgezeigt werden. Die vollständige Kartierung wird in den nächsten fünf Jahren erwartet, die Identifizierung der Genome weiterer Organismen (z.B. Maus, Drosophila, Hefe) sollen das Projekt unterstützen. Ein vollständiges Sequenzverzeichnis des Hefegenoms ist als Publikation und in elektronischer Form erhältlich.

13.5.2 Replikation, Transkription und Translation

13.5.2.1 Replikation der DNA

Bei der *Replikation* dienen beide Stränge der doppelsträngigen Eltern-DNA als Kopiermatrize [*Templat*] für die Synthese der Tochter-DNA. Am Einzelstrang mit *Sense*-Anordnung seiner Basen wird der zum neuen Duplex benötigte komplementäre Einzelstrang mit *Antisense*-Anordnung synthetisiert. Die Replikation ist die Basis für das Leben. Allerdings darf sie nicht völlig fehlerfrei sein, sonst würde es keine Variation und damit keine Evolution geben [M. EIGEN]. Die Sequenzen der doppelsträngigen Tochter-DNA sind durch die komplementäre Basenpaarung mit denen der Eltern-DNA identisch, jeweils ein DNA-Strang der Tochter-DNA stammt vom DNA-Eltern-Molekül, der andere ist neu synthetisiert worden [*semikonservative Replikation*]. Das ist die molekulare Grundlage der MENDELSchen Vererbungsgesetze. Die *identische Replikation* und die Entstehung identischer Tochtermoleküle ist eine notwendige Voraussetzung für jede Zellteilung, dabei wird die DNA vor

der Kernteilung verdoppelt. Der Zellkern speichert das Erbmateriale, die Spezifität der Enzyme, etc. Die fehlerfreie Weitergabe der in der DNA gespeicherten Information von Generation zu Generation bildet die Grundlage für die Erhaltung der Arten.

Der Mechanismus der *semikonservativen Replikation* geht aus dem WATSON und CRICK-Modell hervor und ist in *E. coli*-Bakterien durch Markierungsexperimente und Nachweis des Markers in der Tochtergeneration nachgewiesen worden. Die Verdopplung der DNA erfolgt durch Trennung der Doppelhelix [*unwinding*] und Anlagerung der komplementären Nucleotide. Der neue Strang kann nur in seiner (5' → 3')-Richtung wachsen, da die 2-Desoxyribonucleoside, die als Bausteine fungieren, jeweils in 5'-Stellung Triphosphateinheiten aufweisen (Abb. 13-23). Diese Vorwärtsreplikation kann jedoch nur am "führenden" Einzelstrang [*leading strand*] in kontinuierlicher Weise erfolgen. Am nachrückenden, "nachhinkenden" Strang [*lagging strand*] findet eine Rückwärtsreplikation von kurzen Einzelstrang-Stücken statt, die später erst durch Ligasen verknüpft werden [*semidiskontinuierliche Replikation*].

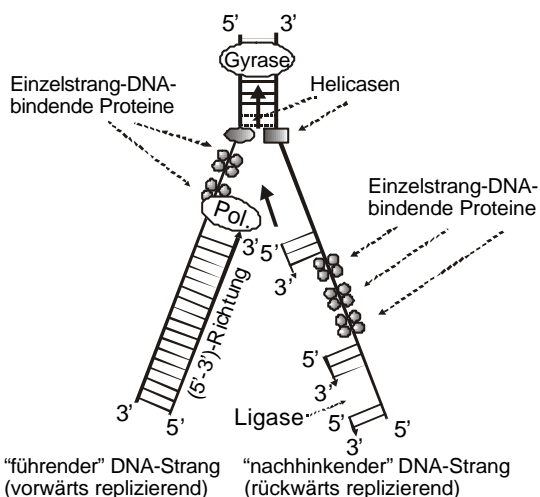


Abbildung 13-22. Schematische Darstellung der semikonservativen Replikation mit kontinuierlicher Vorwärts- und diskontinuierlicher Rückwärtsreplikation (Pol = Polymerase).

Für die DNA-Synthese sind außer der Matrize noch ein kurzer Nucleinsäurestrang als Starter [*Primer*], die vier Nucleosidtriphosphate sowie das entsprechende Enzym *DNA-Polymerase* [*DNA-Nucleosidtransferase*, A. KORNBERG, Nobelpreis 1959] erforderlich (vgl. 13.). Das Startzeichen zur Synthese geben die Primer, die durch Basenpaarung mit der Matrize die Synthesemaschinerie in Gang bringen.

Telomere werden in der Biologie die Endstücke der Chromosomen bezeichnet, die aus DNA mit repetitiver Basen-Sequenz bestehen. Bei der Replikation bedürfen sie spezieller Enzyme, der *Telomerasen*, die teilweise komplementäre Ribonucleinsäure als essentiellen Bestandteil enthalten. Ist keine Telomeraseaktivität vorhanden, so verkürzt sich die Chromosomenlänge bei jeder Replikation. Zunächst für die Lebensfähigkeit Zelle ohne Belang, können nach wiederholten Replikationen auch endständige Gene und damit die Zelle irreparabel geschädigt werden.

Neben der semikonservativen Replikation sind noch andere Replikationsmechanismen möglich, z.B. durch *Einzelstrangbruch* und *Haarnadelbildung*.

13.5.2.2 Transkription der DNA auf mRNA

Die Schwierigkeit, der DNA die Rolle der Information zur Biosynthese von Proteinen und Enzymen zuzuschreiben, lag darin, dass dies ausserhalb des Kerns im Zell-Cytoplasma stattfindet, das keine DNA besitzt. Auch in Abwesenheit von Zellkernen (und damit von DNA) kann die Proteinsynthese stattfinden. Der genetische Code der DNA muss spezifisch an einen Informationsträger transferiert werden, der *Matrizen-RNA* [*mRNA*, *messenger RNA*, *Boten-RNA*], die die Information an den Ort der Proteinsynthese im Cytoplasma bringt.

Die meist einzelsträngige mRNA stellt eine Arbeitskopie des Gens dar und wird enzymatisch an der DNA angefertigt. Immer nur eine bestimmte Region eines Einzel-DNA-Stranges, die den Code trägt, wird in ähnlicher Weise wie bei der Replikation komplementär kopiert, der Prozess ist *strangspezifisch*. Die Synthese erfolgt in Gegenwart des Enzyms RNA-Nucleotidtransferase [*Transkriptase*, DNA-abhängige RNA-Polymerase]. Aufgrund ihrer Biosynthese ist die Basensequenz komplementär zu der des codogenen DNA-Stranges [*sequenzspezifisch*], lediglich Thymin wird durch Uracil ersetzt. Als Zuckerkomponente dient nun die Ribose. Der Vorgang heisst *Transkription* und stellt den ersten Schritt der molekularen Ausprägung eines Gens dar. Die mRNA als komplementäres DNA-Bild wird durch *RNA-Ligasen* abgelöst und dieses Primärtranskript durch posttranskriptionale Reifung in funktionsfähige RNA-Moleküle umgewandelt. Über Transportmechanismen gelangt es anschließend von den *Chromosomen* zu den *Ribosomen*, dem Ort der Proteinbiosynthese.

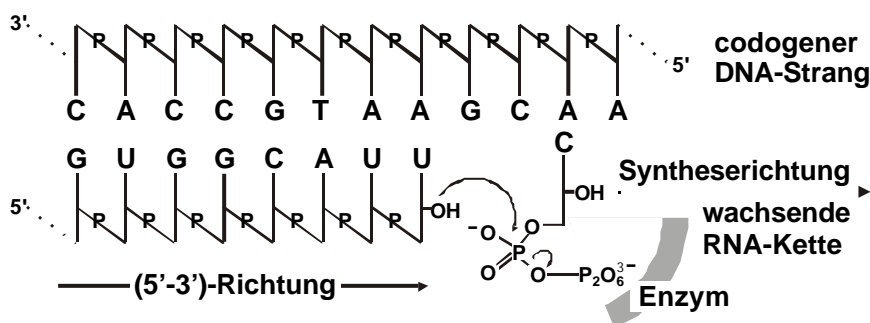


Abbildung 13-23. Schematische Darstellung der RNA-Synthese (Transkription, Enzym = Transkriptase, RNA-Nucleosidtransferase).

Früher glaubte man, dass der Informationsfluß nur von der DNA zur RNA erfolgt und von dort zu den Proteinen. Heute kennt man krebserzeugende Viren (*RNA-Viren*), die *in vitro* eine vererbare Transformation normaler Zellen in maligne Krebszellen hervorrufen. Im Unterschied zu allen Zellen kann bei diesen RNA-Viren die RNA Träger der genetischen Information sein. Mit Hilfe des Enzyms *Transkriptionsrevertase* [RNA-

abhängige Polymerase] wird bei diesen Viren die Krebs-Gene enthaltende RNA zu einer DNA transkribiert, die jetzt als vererbare Nucleinsäure in der Wirtszelle eingebaut ist.

Mit der Entdeckung, dass RNA essentieller Bestandteil eines Enzymsystems sein kann, welches die durch Translation gewonnene RNA [*precursor tRNA*] zu einer tRNA prozessiert, konnte gezeigt werden, dass Nucleinsäuren auch Enzymaktivitäten besitzen und als Biokatalysatoren fungieren können. In Gegenwart von viel Mg^{2+} zeigt ein kloniertes und translatiertes Gen (M1-RNA) mit mehreren Substraten Ribonuclease-P-typische Spaltreaktionen, ohne dadurch selbst strukturell verändert zu werden, und genügt damit den für Enzyme üblichen Auswahlkriterien. Der RNA-Anteil dieser Ribonuclease stellt damit das eigentliche Enzym dar, während der Proteinteil lediglich als nichtessentieller Cofaktor dient.

13.5.2.3 Translation des genetischen Codes - Genexpression - Proteinsynthese

Die *Ausprägung* [*Expression*] der DNA-Information erfolgt über die Proteinbiosynthese, die das Zentralgeschehen der molekularen Biologie darstellt. Dieser dritte Schritt dieses Genprocessing ist die *Translation*, also die Übersetzung des Codes der mRNA in die festgelegte Aminosäuresequenz des Proteins (Abb. 13- zeigt die Summe der molekularen Ausprägung [*Expression*] von Genen).

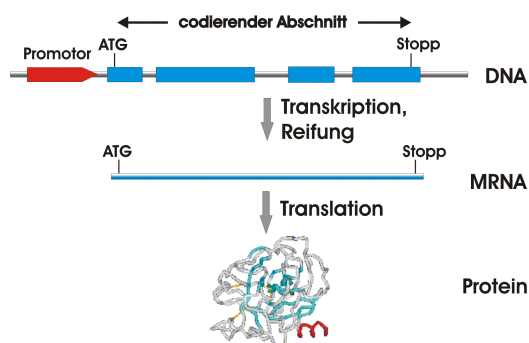
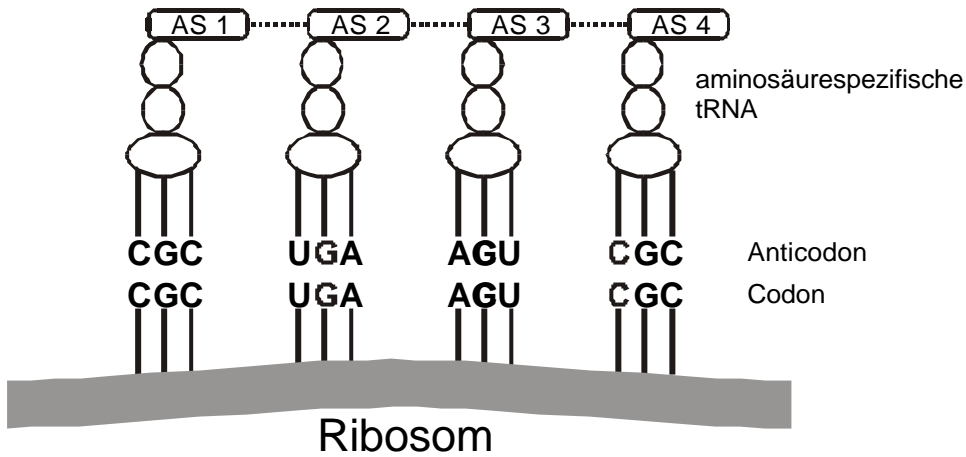


Abb. 13- . Ein Gen-DNA-Faden umfasst die Kontrolleinheit [Promoter] und den codierenden Abschnitt mit Stoppcodon. Reaktion zwischen Transkriptionsfaktoren und dem Promoter bewirkt die Aktivierung des Gens und Transkription des codierenden Abschnitts in die mRNA. Nach Reifung der mRNA (Entfernung nicht codierender Bereiche) wird die Nucleotidsequenz in eine Aminosäuresequenz übersetzt (Translation).

Die Proteinsynthese findet bei Eukaryoten in den Ribosomen, aus Ribonucleoproteinen bestehende Zellpartikel, statt. Die mRNA wird am Ribosom in Form des mRNA/Ribosomen-Komplex ausgelegt. Nach der von CRICK entwickelten *Adaptor-Hypothese* übernehmen 20 (bzw. 21) oligonucleotidische *Adaptoren* spezifisch den Transport jeweils einer der 20 (bzw. 21, vgl. 4.) proteinogenen Aminosäuren zur mRNA. Diese Adaptoren erwiesen sich später als ein relativ kurzkettiger RNA-Strang in Form der *Transfer-RNA* [*tRNA*]. Die Erkennung erfolgt wiederum durch antiparallele Basenpaarung zwischen dem Codon der mRNA und dem sog. Anticodon der mit der zugehörigen Aminosäure beladenen tRNA [*Aminoacyl-tRNA*] (Abb. 13-24). Die Codon-Anticodon-Paarung erfolgt nur für die Position 1 und 2 des Anticodons, in der dritten Position des Tripletts können seltene Nucleotide mit modifizierten Basen- und Riboseresten wie Inosin oder 2'-O-Methylguanosin vorkommen. Diese

führen bei der Codon-Anticodon-Wechselwirkung auch zu nicht-klassischen Basenpaaren (sog. Wobble-Paare nach CRICK). Inosin vermag sich z.B. mit U, C oder A zu paaren. Andererseits ist auch die 3. Base bei den meisten Codons (Tab. 13-10) austauschbar, ohne daß dadurch die Zuordnung zu einer Aminosäure verändert wird. Dadurch wird nicht für alle 61 Aminosäure-Codons jeweils eine spezifische tRNA benötigt, in der Regel



nur 30 bis 40 tRNA-Spezies.

Abbildung 13-24. Proteinbiosynthese.

Die Aminosäure hängt als aktiver Ester an der 3'-OH-Gruppe (oder auch der 2'-OH-Gruppe) der Ribose an der posttranskriptional angebrachten Cytidyl-cytidyl-adenosin-Sequenz, dem A-C-C-Ende der *transfer*-RNA, die relativ niedermolekular ist und aus ca. 73 - 93 Nucleotideinheiten (MG 24.000 - 28.000) besteht. Die tRNA ist einsträngig, die zweidimensionale Sekundärstruktur besitzt die Form eines Kleeblatts mit drei Hauptschleifen und 4 Stammabschnitten (Abb. 13-25), die dreidimensional Tertiärstruktur zeigt eine charakteristische L-Faltung. Die Dihydrouracil-DiHU-Schleife und die Thymin-Pseudouracil-TΨ-Schleife sind bei fast allen tRNA identisch und spielen vielleicht bei der Anbindung an das Ribosom eine Rolle.

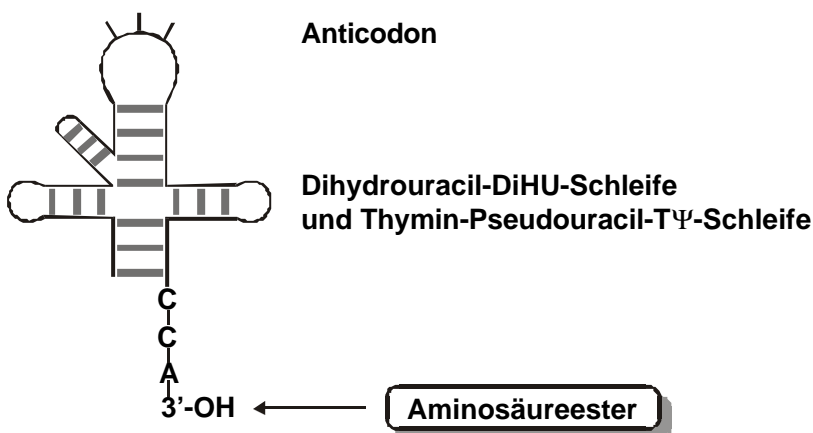
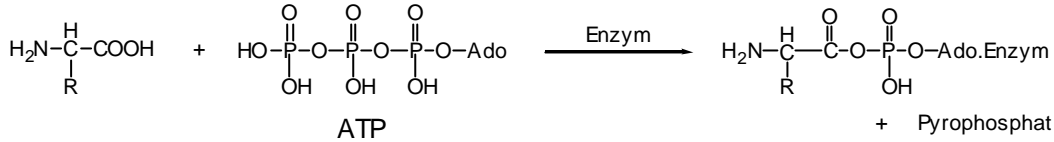


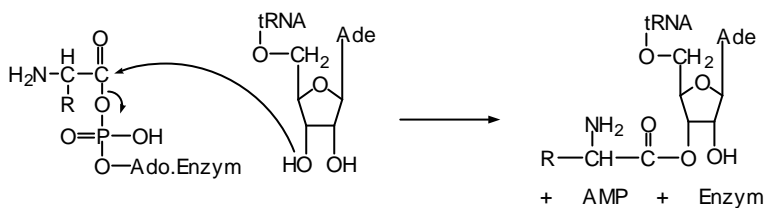
Abbildung 13-25. Schematische Darstellung der tRNA.

Proteinsynthese und *Nucleinsäuresynthese* und hängen dadurch eng zusammen, dass die DNA der gemeinsame Informationsträger sowohl für die Reihenfolge der monomeren Bausteine der Proteine als auch der

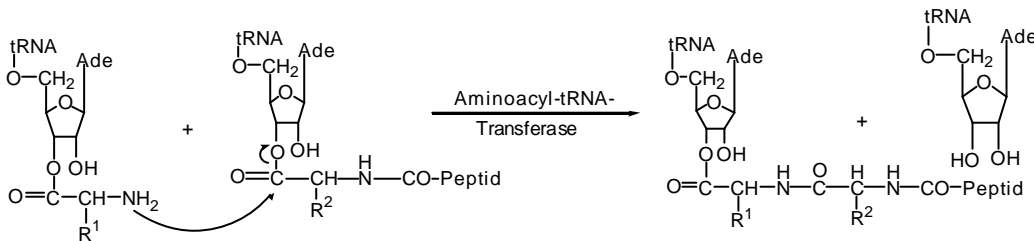
Nucleinsäuren ist. Bei der eigentlichen Proteinsynthese werden drei Einzelschritte, die *Initiation*, die *Elongation* und die *Termination* unterschieden. Bei der *Initiation* werden die Carboxylgruppen der Aminosäuren zunächst durch Reaktion mit ATP in Gegenwart von Aminoacyl-tRNA-Synthetase zum gemischten Anhydrid aktiviert.



Die Aminosäure wird dann als enzymgebundenes gemischtes Anhydrid auf die 3'-Hydroxygruppe der Ribose des terminalen Adenosinrestes der aminosäurespezifischen tRNA übertragen. Es kann jedoch primär auch zunächst zur Reaktion mit der 2'-Hydroxygruppe kommen, bevor die Anbindung an die 3'-Position erfolgt.



Bei der *Elongation* erfolgt der Angriff der Aminogruppe dieser Donor-Aminoacyl-tRNA an der Estergruppierung der bereits in den vorangehenden Stufen gebildeten Polypeptidyl-tRNA und führt zur Peptidbindung. Das Protein wird also vom Aminoende schrittweise aufgebaut.



Die depeptidierte tRNA verlässt den Komplex, die wachsende Polypeptidkette bewegt sich während der Proteinsynthese relativ zum Ribosom [*Translokation*]. Das Ribosom verschiebt sich relativ zur mRNA um ein Codon, wobei die Peptidyl-tRNA mitrutscht und den Ort der vorigen Donor-tRNA einnimmt (Abb. 13-26).

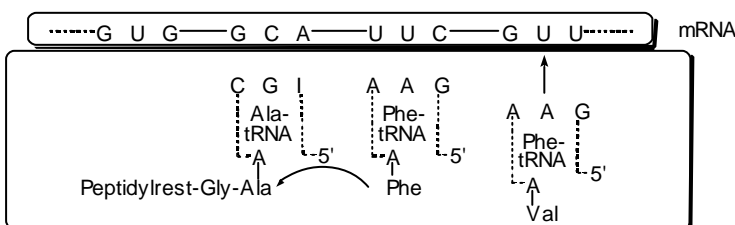


Abbildung 13-26. Schematische Darstellung der Proteinsynthese am Beispiel der Anknüpfung von Ala, Phe und Val an eine wachsende Peptidkette.

Bei der *Termination* muss die am Ribosom für ihre biologische Konformation noch ungefaltete oder falsch gefaltete, neusynthetisierte Polypeptidkette durch *Molekularchaperons* ("Protein-Anstandsdamen") erst in die funktionelle Konformation gebracht werden. Das am besten untersuchte Chaperon-System ist das GroEL-System der Prokaryoten: Das Tetradecamer GroEl bindet an die Proteinkette und bewirkt die Faltung des Protein-Substrats.

Viele pharmakologisch wichtige Peptide gehören zur Gruppe der nichtribosomalen Peptide [NRPs] und werden Gen-kodiert an großen Multienzymkomplexen (nicht-ribosomale Peptidsynthetasen, NRPS) biosynthetisiert. Deren Funktionsweise lässt sich mit einem molekularen Fließband vergleichen, an dessen hintereinander geschaltete Montageplätzen (? Modulen) jeweils ein bestimmter Baustein erkannt, aktiviert und mit dem wachsenden Peptidprodukt verknüpft wird (Fig. 13-). Diese Enzyme können neben den proteinogenen Aminosäuren auch eine Reihe ungewöhnlicher Aminosäuren sowie Hydroxy- und Carboxysäuren in die Peptidsequenz einbauen. Zudem werden die primär synthetisierten linearen Peptide häufig cyclisiert, mit Fettsäuren und Zuckern verknüpft oder strukturell modifiziert.

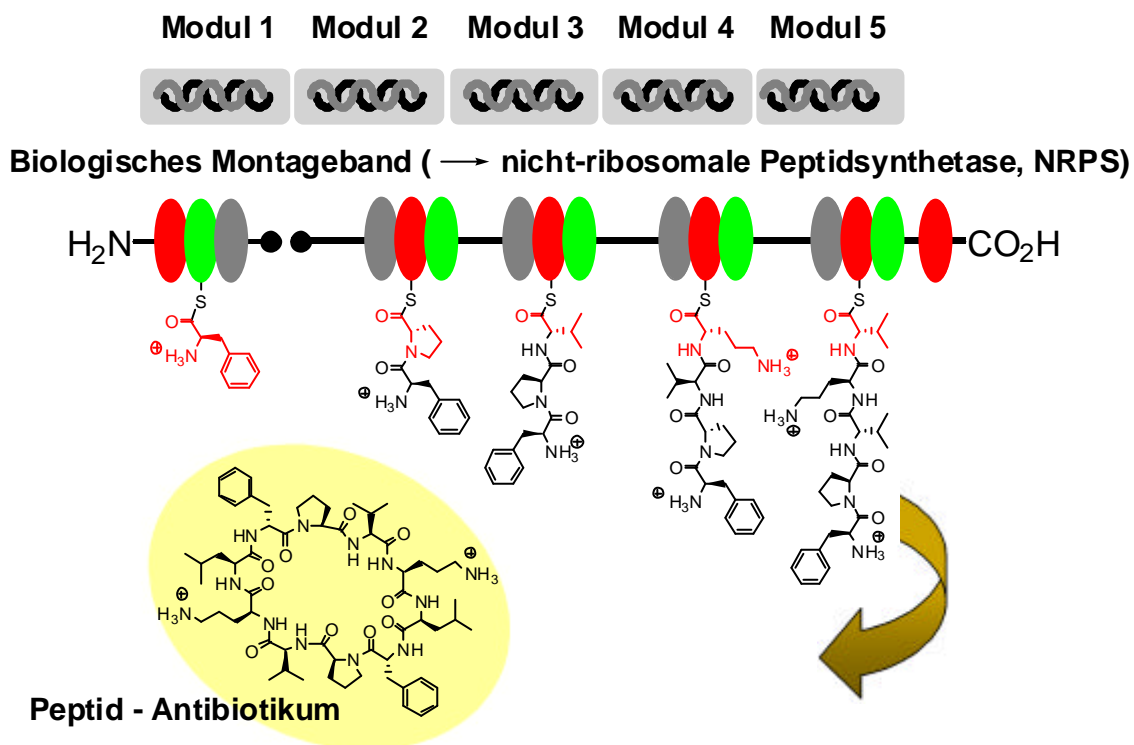


Fig. 13- . Gen-kodiertes enzymatisches Montageband zur Biosynthese nichtribosomaler Proteine [NRPs]. Jedes Modul ist für den den Einbau eines bestimmten Aminosäurebausteins verantwortlich und besteht aus mindestens drei essentiellen Domänen: Adenylierungsdomäne (A, rot), Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne (PCP, grün) und Kondensationsdomäne (C, grau).

13.5.2 Biosynthese der Nucleinsäuren

Bei der Biosynthese der Nucleinsäuren müssen zwei miteinander gekoppelte Prozesse unterschieden werden,

1. die eigentlichen Synthesereaktionen in Gegenwart entsprechender Enzyme und
2. die Einhaltung einer bestimmten Reihenfolge der Nucleotide bei den Nucleinsäuren.

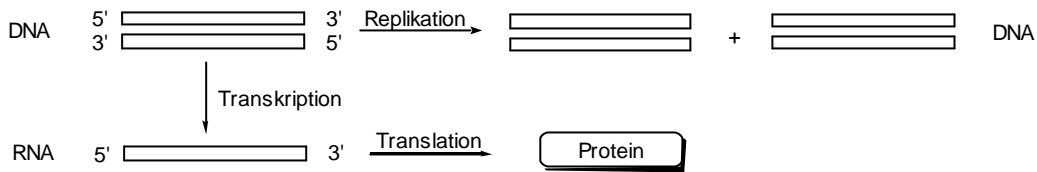
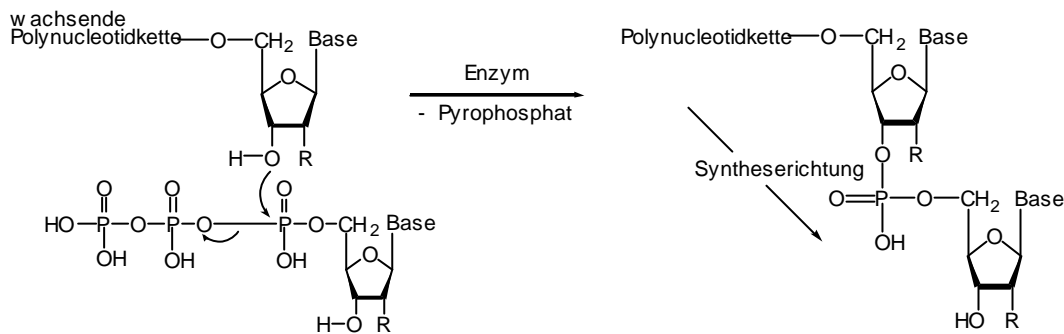


Abbildung 13-27. Beziehungen zwischen Nucleinsäure- und Proteinsynthese.

Die Synthesereaktion zum Aufbau der Nucleinsäuren beginnt mit dem nucleophilen Angriff der durch das Enzym (Tab. 13-11) aktivierten terminalen 3'-Hydroxygruppe des Polynucleotidbausteins am α -Phosphoratom des entsprechenden durch die Säureanhydridbindung energiereichen Mononucleotid-5'-triphosphats. Die Synthese erfolgt damit in 5'-3'-Richtung (Formel 13-13).



Formel 13-13. Nucleinsäurebiosynthese.

Wenn man z.B. die vier DNA-Nucleotide, A, G, C, und T in Form der 5'-Triphosphate in Gegenwart des Enzyms DNA-Polymerase, Magnesiumionen und einer Primer-DNA polymerisiert, hat die so synthetisierte DNA die gleiche Zusammensetzung wie der Primer, auch wenn die relativen Nucleotidkonzentrationen verschieden sind. Mg^{2+} ist dabei eine Art anorganisches Coenzym, das Triphosphat die Energiequelle, die 12 kcal bei der Spaltung Triphosphat \Rightarrow Pyrophosphat beiträgt.

Tabelle 13-11. Polynucleotid-synthetisierende Enzyme

Enzym	Substrat	Produkt
Polynucleotid-Phosphorylase aus Mikroorganismen (Poly ribonucleotidnucleotidyltransferase)	Ribonucleotid-5'-phosphate Oligonucleotide als Primer	Polyribonucleotide mit statischer Sequenz
DNA-abhängige DNA-Polymerase (KORNBERG-Enzym)	Alle 4 Desoxyribonucleosid-Triphosphate, Mg^{2+} , DNA als Primer und Templat	DNA, Templat-DNA bestimmt Sequenz
DNA-abhängige RNA-Polymerase	Alle 4 Ribonucleotidtriphosphate, Mg^{2+} , DNA als Templat	Einzelsträngige RNA, DNA-Templat bestimmt Sequenz

Polynucleotid-Ligase (Polynucleotid-Synthetase)	DNA-Segmente (z.B. DNA mit Einzelstragnbrüchen)	Doppelsträngige DNA ohne Brüche
--	--	------------------------------------

13.5.3 Regulation der Genaktivität - Genkontrolle

Die Expression von Genen, die *Genaktivität*, muß reguliert werden, schließlich sind die Gene ja gleichermaßen in allen Zellen des Individuums, werden jedoch nur in bestimmten Organen oder Geweben in bestimmten Situationen aktiv. Diese Regulation könnte eine Enzyminduktion sein. z.B. gelangt das Substrat in die Zelle und regt die entsprechende Enzymbildung durch *Enzyminduktion* an. Oder es gibt außer den *Strukturgenen* auch *Regulatorgene*, die für die Bildung von Repressor-Molekülen verantwortlich sind, die die Strukturgene blockieren. Das An- und Abschalten der Genaktivität wird von regulatorischen Proteinen besorgt, die die Gentranskription durch RNA-Polymerase beeinflussen, indem sie an Kontrollsequenzen auf dem DNA-Strang in Nachbarschaft der Bindungsstelle für RNA-Polymerase, des Promoters, binden. Ein aus 66 Aminosäuren bestehendes Protein "*Cro-Repressor*", das die Transkription der DNA unterbindet, wurde DNA-frei kristallisiert und seine Struktur röntgenographisch aufgeklärt. Das CAP-Protein [*catabolite gene activator protein*], ein regulatorisches Protein für die Expression mehrerer Gene in *E. coli* und anderen Bakterien, das aus 201 Aminosäuren besteht, wurde mit cAMP kokristallisiert. Es schaltet mit dem cAMP als allosterischer Effektor die Transkription ein.

Effektoren sind Biokatalysatoren, die die Wirkung von Enzymen fördern oder hemmen. Auf molekularbiologische Vorgänge bezogen versteht man darunter speziell die Regulation der Enzymaktivität, allgemein solche Substrate oder Metaboliten, die auf regulatorisch wirkende Enzyme auf dem Umweg über deren Repressoren wirken. Ein Effektor (z. B. als Endprodukt einer enzymatischen Reaktion auftretend), aktiviert den spezifischen Repressor, der daraufhin die Synthese des entsprechenden Enzyms hemmt (negativer Effektor oder Inhibitor), häufig handelt es sich dabei um *isosterische Effektoren*, die dem Enzymsubstrat sehr ähnlich sind und mit diesem in Konkurrenz treten, also eine kompetitive Hemmung hervorrufen. Andererseits kann ein Effektor (z.B. als Ausgangssubstrat einer enzymatischen Reaktion) den spezifischen Repressor *inaktivieren*, der daraufhin die Enzyme nicht mehr zu blockieren vermag (*positiver Effektor, Aktivator, Induktor*). Solche Effektoren sind entweder Substrate oder Hormone.

13.6 Chemische und physikalische Modifizierung von DNA und RNA, Cancerogenität, Mutagenität

Eine Veränderung der DNA durch chemische oder physikalische Faktoren stellt einen wesentlichen Eingriff in den Lebensprozess einer Zelle dar. Die Eingriffe in die Nukleinsäure- und damit auch die Proteinsynthese können vor allem durch

1. Chemische Veränderungen der Nukleinsäuren, hervorgerufen

- a) durch physikalische Einflüsse (energiereiche Strahlung), chemische Reagenzien, die meist an den Nukleinsäurebasen angreifen (z.B. Alkylanzien), oder

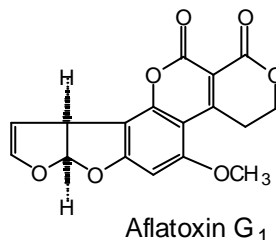
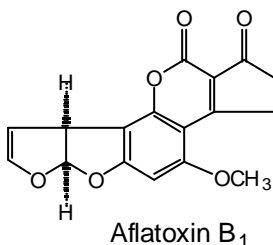
- b) während der Replikation durch Einschub von Reagenzien zwischen die Basen (Interkalation), Einbau falscher Basen (Antimetabolite), der zu anderer Basenpaarung führen kann, erfolgen.
2. Ähnliches bewirkt die Hemmung von Enzymsystemen, die bei der Nucleinsäuresynthese benötigt werden, durch natürlich vorkommende Nucleosidantibiotika oder synthetisch erhaltene Analoga der natürlichen Basen oder Nucleoside (Antimetabolite), oder
 3. die Hemmung der Proteinsynthese durch Beeinflussung verschiedener Vorgänge während der Translation durch Antibiotika.

Ein solcher Eingriff kann entweder zum Tode der Zelle (letaler Effekt), zu bleibenden DNA-Veränderungen (mutagener Effekt) oder zu einem Wachstumsstillstand (cytostatischer Effekt) führen. Eine irreversible Veränderung der DNA wird als Mutation bezeichnet. Die Verursachung des Wachstumsstillstands einer Zelle wird zur Bekämpfung von Viren (Virostatika), zur Wachstumshemmung von Krebszellen (Cancerostatika) oder zur immunsuppressiven Wirkung (Immunsuppressiva) verwendet. Die Auslösung von Krebs durch chemische Substanzen (Carcinogene) kann ebenfalls durch die Veränderung des Erbmaterials verstanden werden. Viele dieser Carcinogene und Mutagene werden erst durch Biotransformation in die eigentlichen aktiven Verbindungen umgewandelt.

13.6.1 Cancerogene, Cocancerogene, Mutagene

13.6.1.1 Modifizierung der Nucleinsäuren

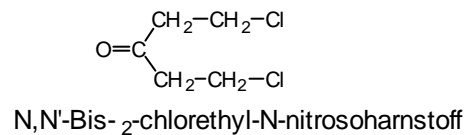
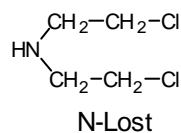
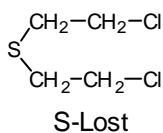
Natürlich vorkommende *Cancerogene* sind u.a. die Pyrrolizidin-Alkaloide (Kap. 14.) und die Aflatoxine (Kap.). Letztere sind Lebercarcinogene und werden von dem Schimmelpilz *Aspergillus flavus* gebildet, der auf verdorbenen Erdnüssen, Käse und Getreideerzeugnissen vorkommt. Diese hochtoxischen Verbindungen werden primär zum Furan-Epoxid oxidiert und anschließend an die RNA von Lebermikrosomen gebunden.



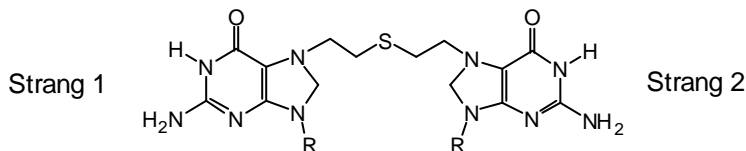
Hemmstoffe der Proteinbiosynthese sind z.B. unter den Antibiotika zu finden. So enthält z.B. Actinomycin (13.) ein Phenoxazinringsystem, daß sich mit Desoxyguanosin verbindet und damit wahrscheinlich die Basenpaarung verhindert. Andere Antibiotika wie Chloromycetin, Streptomycin, etc. haben Ähnlichkeit mit der Endgruppe der tRNA und hemmen die Proteinsynthese an den Ribosomen. In neuerer Zeit sind antimikrobielle Antibiotika mit Antitumor-Wirkung bekannt, deren Wirksamkeit auf der Spaltung doppelsträngiger DNA beruht.

Alkylierende Verbindungen wie z.B. Diazomethan, Dimethylsulfat, Methyljodid, Sulfonsäureester und Epoxide substituieren *in vitro* die NH-Protonen der Pyrimidin- bzw. Purin-Stickstoffatome und sind daher außerordentlich toxisch und wirken mutagen oder cancerogen. Die Alkylierung erfolgt vorwiegend in 7-Stellung der Guaninreste (13.2.5.1). Die 7-Alkylreste können anstelle von Cytosinresten eine Basenpaarung mit Thyminresten eingehen. Einige alkylierte Nucleinsäurederivate werden als Krebschemotherapeutika eingesetzt. Allgemein konnten neben 7-Alkylguanidin (DNA, RNA) aus alkylierten Nucleinsäuren auch 3-Alkyladenin (DNA), 1-Alkyladenin (RNA) sowie 3-Alkylcytosin (RNA, DNA) isoliert werden. Ferner kommt es zu Alkylierungen der Phosphorsäurediestergruppierungen.

Cytotoxischer als monofunktionelle Alkylanzien sind bifunktionelle Verbindungen, die zu Quervernetzungen [*cross linking*] der DNA führen können. Zu diesen Verbindungen gehören vor allem Alkylhalogenide mit einem O-, S- oder N-Atom in β -Stellung (Loste) und Bis-Sulfonsäureester (Bisulfan). Das im 1. Weltkrieg als Kampfgas verwendete S-Lost [Senfgas, 2,2'-Dichlordiethylsulfid] bzw. N-Lost [2,2'-Dichlordiethylamin] wird zur Tumorchemotherapie angewendet. N-Alkyl-N-nitrosoharnstoff-Derivate werden ebenfalls als Cytostatika verwendet. Diese Verbindungen sind Vorstufen von Diazoalkylverbindungen, welche durch Abspaltung von Stickstoff alkylierend wirken. Zur Behandlung von Hirntumoren eignet sich N,N-Bis-2-chlorethyl-N-nitrosoharnstoff. Aufgrund der guten Lipidlöslichkeit können diese Verbindungen die Blut-Hirn-Schranke durchdringen.

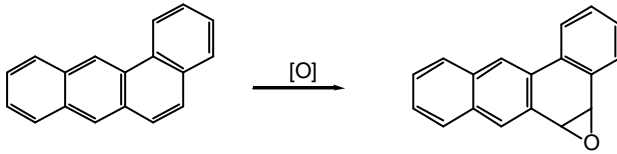


Die hohe Reaktivität dieser Verbindungsklasse erklärt sich durch eine Nachbargruppenbeteiligung des Schwefels bzw. des Stickstoffs bei der nucleophilen Substitution des Chlorids. Die Reaktion führt letztendlich zur Verknüpfung zweier Polynucleotidstränge.



Der genetische Code kann verändert werden, wenn man DNA *in vitro* oder *in vivo* mit HNO_2 behandelt. Dabei werden die primären NH_2 -Gruppen von Adenin, Cytosin und Guanin in OH-Gruppen umgewandelt. Dies kann zur Veränderung des Erbgutes einer Zellpopulation führen und bewirkt die mutagene Wirkung von nitrierenden Agentien.

Die krebserzeugende Wirkung von polycyclischen aromatischen Verbindungen, wie z.B. Benz-[a]-anthracen ist ebenfalls in ihrer alkylierenden Wirkung begründet verstanden. Die Verbindung wird, vor allem in der Leber, zu einem Epoxid oxidiert.



Eine weitere Wechselwirkung dieser Aromaten ergibt sich durch Interkalation (13.4.4.4) in die DNA-Doppelhelix. Weitere Beispiele sind Ethidiniumbromid und Chinin.

Die Reaktion mit Formaldehyd hat praktische Bedeutung zur Inaktivierung infektiöser Virus-RNA sowie zur histochemischen Fixierung von Nucleinsäuren. Die Reaktion tritt praktisch nicht bei doppelsträngigen Nucleinsäuren ein, da hier die reagierenden Gruppen durch Wasserstoffbrücken blockiert sind und kann daher zur Untersuchung der Sekundärstruktur eines Polynukleotids herangezogen werden. Die Umsetzung von Nucleinsäuren mit anderen Aldehyden stellt eine Möglichkeit für die chemische Modifizierung von Nucleinsäuren dar.

13.6.1.2 Cocarcinogene

Cocarcinogene sind Stoffe, die ohne Vorliegen bereits irreversibel cancerinitiierteter Zellen noch keine Tumoren erzeugen. So rufen geringe Dosen von 7,12-Dimethylbenz-[a]-anthracen bei Mäusen noch keine Tumoren hervor, sondern erst nach nachträglicher Applikation eines selbst nicht carcinogenen Phorbolesters. Zu solchen *Tumorpromotoren* gehören bestimmte Phorbolester, und bestimmte Diterpenester aus Wolfsmilch- und Seidelbastgewächsen. Zu den cocarcinogen wirksamen Substanzen gehören u.a. Natriumcitrat und Natriumascorbat, bestimmte Indol-Alkaloide und Limonen.

13.6.1.3 Mutagenitätstest - AMES-Test

Bei der Entwicklung neuer chemischer Substanzen, Pharmaka, Pestizide, Herbizide, Konservierungsstoffe oder Chemikalien, die das menschliche Erbgut schädigen können, ist heute immer eine Prüfung auf Mutagenität und Cancerogenität vorgeschrieben. Als Screeningtest der Wahl hat sich der sog. AMES-Test, ein Mutagenitätstest, bewährt. Anfang der 70er Jahre fand man in den USA [AMES] geeignete Bakterienstämme, die es erlauben, die Mutagenität von Chemikalien auf mikrobiologischem Weg sicher und reproduzierbar nachzuweisen.

Das Prinzip des *AMES-Test*, bei den meist Histidin-Mangelmutanten von *Salmonella typhimurium* eingesetzt werden, ist eine durch Mutagene induzierte Reversion von der Histidinauxotrophie zur Histidinprototrophie, die als Messparameter dient. Zusammen mit der Testsubstanz werden die Stämme auf einem histidinfreien Medium

bebrütet. Ausserdem werden eine tierische Lebermikrosomen-Fraktion zugesetzt, um Metaboliten der Testsubstanz, wie sie im Säugetier-Organismus entstehen können, im Test mitzuerfassen. Die Anzahl der gebildeten Kolonien ist ein Maß für die Mutagenität. Der AMES-Test gibt jedoch alleine noch keine absolute Sicherheit und erfordert zusätzliche Tests, z.B. mit tierischen Zellkulturen, erlaubt jedoch die schnelle Vorprüfung potentieller Mutagene und eine Reduktion von Tierversuchen.

13.6.1.4 Mutationen, Mutanten

Eine *Mutation* ist eine sprunghafte, vererbare Änderung einer Anlage. Spontane Mutationen treten zufällig und mit bestimmter Wahrscheinlichkeit auf, zusätzliche Mutationen jedoch dann, wenn mutationsauslösende Agenzien oder mutagene Strahlung auf den Organismus einwirken. Die Spontanrate hat sich im Lauf der Evolution für jeden Organismus auf einen optimalen Wert eingestellt. Eine *Punktmutation* wird durch Veränderung einer einzigen Basenposition im DNA-Strang hervorgerufen.

Mutanten wurden zuerst vorallem bei Insekten (Mehlmotte *Ephestia*, und Taufliege *Drosophila*) untersucht [A. KÜHN und A. BUTENANDT], später bei Schimmelpilzen (*Neurospora crassa*) untersucht. Wenn eine Mutante bestimmte Stoffwechselforgänge nicht mehr eingehen kann, muss oft ein essentieller Nahrungsfaktor zugeführt werden. Dies liegt oft daran, dass die Mutation verursachende Gen an der entsprechenden Enzymsynthese direkt beteiligt ist.

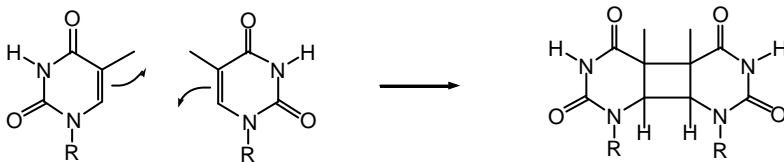
Beim Menschen ist die Störung im Phenylalanin-Tyrosin-Stoffwechsel bekannt, beim *Albinismus* ist der zum Melanin führende Seitenweg unterbrochen (S.). Ein weiteres Beispiel ist das Auftreten des *Sichelzellanämie*, einer Erbanomalie bei Negern, die als Sichelzellanämie in Afrika auftritt. 1957 fand V.M. INGRAM, dass im Hämoglobin HbS (Sichelzell-Hämoglobin) der 6. Aminosäurerest der β -Kette ein Valin ist, statt der Glutaminsäure im normalen Hämoglobin. Das Protein besitzt dadurch eine negative Ladung weniger und kann elektrophoretisch von normalem Hämoglobin abgetrennt werden. Das entsprechende Gen befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 11 und charakterisiert damit die Sichelzellanämie als „molekulare Krankheit“.

Das menschliche Genom, mit dessen Sequenzierung begonnen wurde, enthält etwa drei Milliarden Basen und 100.000 Gene, die in unterschiedlich lange, nicht-codierende Abschnitte [*Introns*] eingestreut sind. Der Anteil der nicht-codierenden DNA an der Gesamt-DNA liegt bei etwa 90 %. Mutationen in diesen Abschnitten sind in der Regel für das betreffende Individuum bedeutungslos, werden aber an die Nachkommen weitergegeben. So entstand mit der Zeit eine Vielfalt an Sequenz-Variationen, die beim "*DNA-Fingerprinting*" ausgenutzt wird. Spaltet man die DNA verschiedener Individuen (z.B. Menschen) mittels Restriktionsenzymen, so entstehen Fragmentmuster, die für ein Individuum charakteristisch sind. Die Technik des "*genetischen Fingerabdrucks*" [*DNA-typing*] kann auf verschiedenen Gebieten wie der Forensik, für Vaterschafts- und

Verwandschaftsnachweise, in der Tier- und Pflanzenzucht, zur Kontrolle von Knochenmarktransplantationen, für Tumoruntersuchungen oder zur *in situ*-Hybridisierung auf Chromosomen eingesetzt werden.

Man nimmt an, dass von den natürlichen Basen in geringem Umfang auch tautomere Formen existieren, die "falsche" Donor-Acceptor-Eigenschaften aufweisen und zu falschem Baseneinbau beim Komplementärstrang führen. Dies kann für die Erklärung von Mutationen in natürlicher DNA relevant sein und die Ursache von Erbkrankheiten und verschiedenen Formen von Krebs sein.

Die physikalische Beeinflussung des Erbmaterials durch elektromagnetische Strahlung wird zur experimentellen Erzeugung von Mutanten in der Mikrobiologie verwendet. Bereits die UV-Bestrahlung von DNA führt durch eine [2+2]-Cycloaddition zu einem Thymidindimer.



Mit "synthetischen Mutationen" und verfeinerten Ausleseprinzipien wurden erstaunliche Erfolge erzielt: zum Beispiel konnte die Ausbeute an Penicillin innerhalb von 25 Jahren auf diese Weise auf das Tausendfache der Ausgangswerte gesteigert werden.

13.7 Gentechnik - Gentechnologie

Die *Gentechnologie* [*Gentechnik*] ist gleichzeitig eine Disziplin der Biotechnologie, der Genetik und der Molekularbiologie. Die Entwicklung der Gentechnik hat zu einer Revolution der Biologie geführt und ist zu einer der Schlüsseltechnologie für das 21. Jahrhundert geworden. Mit ihrer Hilfe lässt sich das genetische Programm einer Zelle durch Modifikation oder Einbau fremden genetischen Materials manipulieren und u.a. zur mikrobiologischen Produktion menschlicher, tierischer und viraler Proteine heranziehen. Natürlich ist dies nur deshalb möglich, weil der genetische Code universell ist und in (fast) allen Organismen gilt. Damit gelang die Gentechnologie auch in den Mittelpunkt industrieller Interessen, selbst kleinere Firmen haben mittlerweile auch den Einstieg in dieses neue Gebiet geschafft und stellen gentechnologische Produkte her. Man unterscheidet die einzelnen Arbeitsschritte: Gewinnung des codierenden Gens, *in vitro*-Rekombination der Nucleinsäuren, Vermehrung der Rekombinanten-DNA und die Genexpression (Abb. 13-27).

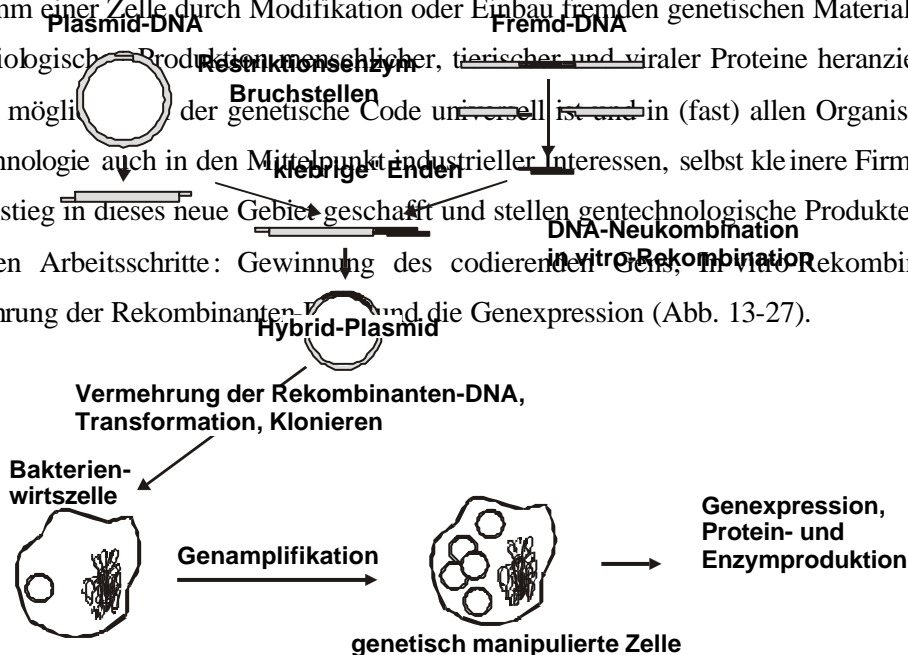


Abbildung 13-27. Schematische Darstellung der Prozesse der Gentechnik.

13.7.1 Gentechnologische Proteinproduktion

13.7.1.1 Gewinnung der codierenden DNA

Die Gewinnung der codierenden DNA kann auf drei Wegen erfolgen: durch enzymatische Synthese aus mRNA, durch chemische Synthese oder durch Isolierung des Genabschnittes.

Die erste *Gensynthese* gelang 1967 GOULIAN, KORNBERG und SINSHEIMER durch *in vitro*-Replikation kleiner Bakteriophagen Genome. Die enzymatische Synthese der DNA aus mRNA erfolgt über die Bildung der komplementären DNA (cDNA) mit Hilfe des Enzyms Transkriptase. KHORANA *et al.* gelang später durch Kombination von chemischen und enzymatischen Methoden die Totalsynthese des Gens für Alanin-tRNA (13.3.2.3). Dabei wird der DNA-Doppelstrang aus Sequenzen von 8 bis 12 Nucleotideinheiten aufgebaut (Abb. 13-3), die einzelnen komplementären Nucleotidabschnitte müssen jeweils überlappen.

1970 die Isolierung des ersten Restriktionsenzym, 1972 die erste Herst. von rekombinierten DNA-Molekülen durch Verknüpfung mit DNA-Ligase, 1973 die Klonierung von Staphylococccen-DNA in *E. coli*, 1977 die Klonierung von Somatostatin als erstes menschl. Hormon, 1982 die Produktionsaufnahme von gentechn. hergest. Human-Insulin

Mit der Isolierung des ersten Restriktionsenzym [1970] (13.4.2.2) lernte man, große DNA-Moleküle spezifisch in kleinere Stücke zu zerlegen. Solche Restriktionsenzyme sind bakteriellen Ursprungs und zerschneiden doppelsträngige DNA durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen sequenzspezifisch. Nach dem "Herausschneiden" aus der DNA eines Virus, Bakteriums oder der einer höheren Zelle erfolgt die elektrophoretische Auftrennung. Diese Genbruchstücke lassen sich anschließend mittels spezifischer Ligasen wieder verknüpfen.

Bei der biochemischen Isolierung der DNA ist zu beachten, dass die Gene eukaryotischer Zellen im Unterschied zu denen von Prokaryoten neben codierenden Abschnitten [*Exons*] auch nicht codierende Abschnitte [*Introns*] enthalten, die während der Genexpression herausgeschnitten werden.

13.7.1.2 *In vitro*-Rekombination der DNA

Als *Rekombination* bezeichnet man die Neukombination von Erbanlagen zweier Individuen einer Art, die im allgemeinen an der Vermischung elterlicher Erbanlagen in den Nachkommen resultiert. Bakterien besitzen nur ein Chromosom, ein zentrales ringförmiges DNA-Molekül von 1 – 2 mm Länge, auf dem etwa 4.000 Erb-

anlagen angeordnet sind. Manche Bakterien enthalten neben ihrem zentralen Chromosom kleinere zirkuläre DNA-Moleküle, die *Plasmide*, die sich in Bakterienzellen rasch vermehren können und oft die Resistenz gegen Antibiotika bedingen. Die Einschleusung einer nach den oben beschriebenen Methoden erhaltenen Erbinformation in die Zelle erfolgt mittels solcher geeigneter *Vektoren*. Die mittels Restriktionsenzymen herausgeschnittenen DNA-Fragmente müssen vor dem Einbau in den Vektor durch Anhängen kurzer, synthetischer DNA-Abschnitte [*Linker*] an den Enden noch so verändert werden, dass die eingesetzte Restriktionsendonuclease „klebrige Enden“ links und rechts vom eigentlichen Gen produziert. Mit den gleichen Restriktionsenzymen wie bei der oberhalb beschriebenen DNA-Gewinnung wird der cyclische Plasmid-DNA Doppelstrang an einer oder zwei Stellen gespalten und linearisiert. Dort kann nun das „Passagier“-DNA-Fragment insertiert werden. Dazu werden synthetisches oder isoliertes DNA-Fragment und Plasmid-Fragment vermischt und mit DNALigase, die die klebrige Enden zur sog. Rekombinanten-DNA verknüpft, behandelt. 1972 gelang die erste Herstellung von rekombinierten DNA-Molekülen durch Verknüpfung mit DNA-Ligase. Durch diese Vektorisierung entsteht ein um das Gen erweitertes Molekülhybrid, ein *rekombiniertes Plasmid*, das wie das ursprüngliche durch Transformation (Inkubation „nackter“ Vektor-DNA) oder Transfektion (Virus-Infektion) in eine Bakterienzelle eindringen und sich vermehren kann (Abb. 13-28). Bei dem Vorgang werden ausser den Strukturgenen noch zusätzliche Sequenzen, z.B. Signalsequenzen und Markierungsgene eingebaut. Durch den Einbau der Passagier-DNA darf der Vektor als solcher nicht geschädigt werden, außerdem sollte die DNA in ein Gen für Antibiotikaresistenz eingebaut werden, um später die transformierten Wirtszellen leichter zu erkennen und zu isolieren.

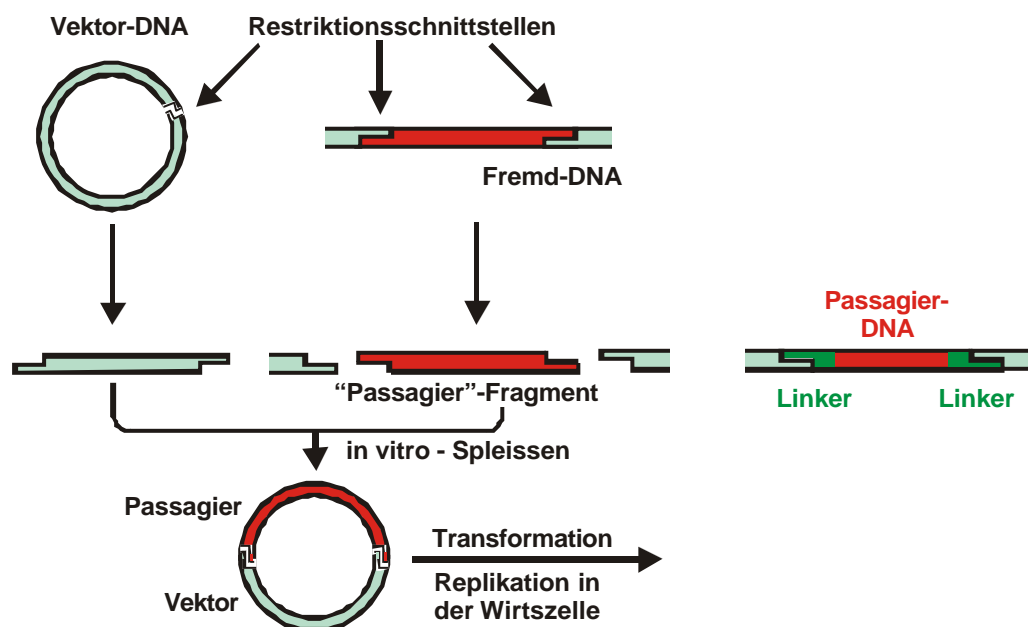


Abbildung 13-28. Rekombination von DNA.

13.7.1.3 Klonierung

Die Analyse der molekularen Funktion eines Gens ist ohne seine Vermehrung (Klonierung oder PCR) nicht möglich. Durch Einschleusen eines rekombinierten Plasmids (13.7.1.3) in eine Wirtszelle (Bakterienzelle, Zelle höherer Organismen) erfolgt die Vermehrung der Rekombinanten-DNA, das sog. *Klonieren*. Die Einschleusung gelingt durch Behandlung der Wirtszellmembran mit CaCl_2 , wodurch diese permeabel wird. Ist bei der Vektorisierung durch geeignete Wahl zweier Schnittstellen eine bestimmte Antibiotikaresistenz zerstört und eine zweite erhalten geblieben, so werden die das Plasmid enthaltenden Zellen sensitiv gegen das erstere Antibiotikum und resistent gegenüber dem zweiten. Damit kann jetzt eine Selektion durch Antibiotika-Behandlung erreicht werden und nur Bakterien mit dem neueingeführten Gen für die weitere Fermentation ausgewählt werden. Zellen ohne Plasmid sind sensitiv gegen beide Antibiotikatyphen und Zellen, die ein unverändertes Plasmid aufgenommen haben, sind resistent gegen beide. Die am häufigsten benutzten Marker sind Resistenz für Ampicillin, Tetracyclin und Kanamycin (14.). 1973 gelang die Klonierung von Staphylococcen-DNA in *E. coli*, 1977 die Klonierung von Somatostatin als erstes menschliches Hormon.

Mit der Entdeckung der Klonierungstechnik kann man jetzt einzelne Gene und isolierte Genfragmente aus dem gesamten Genomverband isolieren und in reiner Form in Bakterienzellen *amplifizieren*. Ein Stück menschlicher DNA dieser Art ist frei von benachbarter menschlicher zellulärer DNA.

Für die Klonierung in Bakterien werden üblicherweise nur Intron-freie Gene benötigt. Die α - und β -Interferon-Gene, die zur Herstellung von Interferon benötigt werden, enthalten glücklicherweise keine Introns, so dass diese Proteine zu den ersten Biotechnik-Produkten gehörten. Bei der biotechnologischen Humaninsulin-Herstellung in *E. coli* ist das Insulin-Gen in das Gen für Tetracyclin-Resistenz eingeschoben, das für Ampicillin-Resistenz verantwortliche Gen bleibt intakt und ermöglicht so eine Selektion.

Seit Jahrzehnten ist bekannt, daß bei Ersatz des Zellkerns eines unbefruchteten Froscheis durch einen fremden Frosch-Zellkern sich dennoch eine normale Kaulquappe aus dem Ei entwickeln kann. Inzwischen sind ähnliche Versuche der Genomübertragung aus differenzierten Zellen in Eizellen für andere Zelltypen, Tier- und Pflanzenarten durchgeführt worden, wobei auch die Grenzen der Art übersprungen wurden. Dies bedeutet, dass bis zu einem bestimmten Entwicklungsstadium die Zelle über ihr gesamtes Genom verfügt und in beliebiger Richtung differenzieren kann [*Totipotenz*]. Das bedeutet, dass die Spezialisierung der Körperzellen nach Aussehen und Funktion nicht durch unterschiedliche genetische Ausstattung der Zellen, sondern durch unterschiedliche Genexpression zustande kommt.

Die Eizellen des Säugers und seine Entwicklung unterscheiden sich fundamental von denen niederer Wirbeltiere. Sie sind etwa 1.000 mal kleiner und die frühe Embryoentwicklung kann langsamer ablaufen. Die frühen Zellen des Säugerembryos haben noch keine offensichtliche Asymmetrie und können noch bis zum 8-Zellstadium vertauscht werden [*Embryosplitting*], ohne dass ein anormales adultes Tier entsteht. Auch das Abtöten einer Zelle im 2-Zellstadium lässt aus dem "Halbembryo" noch ein normales Tier entstehen. Die

Herstellung einer größeren Zahl genetisch identischer Nachkommen durch Teilung eines Embryos hat seit 1986 zunehmend Einzug in die Tierproduktion gefunden. Die Klonierung von Tierembryonen erfolgt oft durch *Kerntransfer* durch Mikropipettierung (Abb. 13-28) und kann u.a. von Vorteil sein, um gentechnisch wertvollen oder gefährdeten Rassen Nachkommen zu sichern, oder um z.B. erhöhte Selektion auf Gesundheit, Fruchtbarkeit und qualitative Produktionsmerkmale zu erreichen.

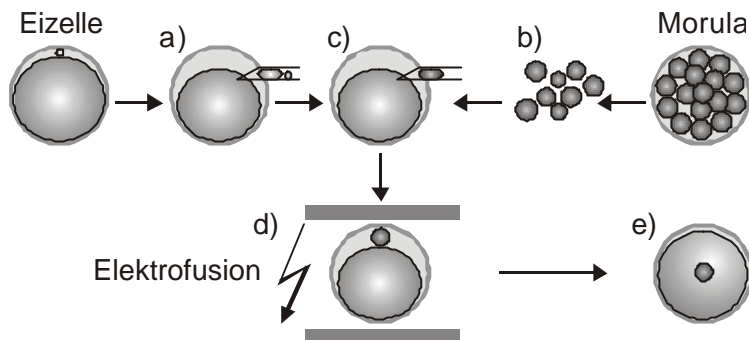


Abbildung 13-28. Embryoklonierung durch Kerntransfer. a) Mithilfe einer Mikropipette wird die in der Nähe des Polkörperchens liegende genetische Information einer Eizelle entfernt. b) Die Blastomeren einer *Morula* werden disaggregiert und c) eine Blastomere wird per Mikropipette unter die *Zona pellucida* der entkernten Eizelle gebracht. d) Nach Elektrofusion der Zellmembran e) gelangt der Kern in das Zytoplasma der entkernten Eizelle. Die rekonstruierten Kerntransferembryonen werden eine Woche lang bis zum Morula- bzw. Blastomerstadium kultiviert.

Damit ist "Dolly", das aus der Euterzelle eines ausgewachsenen Schafs klonierte schottische Schaf weniger eine wissenschaftliche Sensation, als vielmehr ein Teilerfolg der weltweit betriebenen Tierzüchtungsforschung.

13.7.1.4 Genexpression - Genausprägung

Dem Klonieren folgt die *Genexpression* oder *Genausprägung*, d.h. die Transkription der Information auf die mRNA und die Translation durch die Proteinsynthese. Zur Zeit bemüht man sich vor allem um die Verwendung eukaryotischer Zellen (z.B. Hefezellen) zur Genexpression. Die Technologie ist jedoch keineswegs nur auf den Bereich von Mikroben beschränkt. Derzeit arbeiten viele Laboratorien an der Ausprägung von Genprodukten von Säugern in Bakterien. Dies sollte die mikrobielle Produktion von Eiweißstoffen menschlicher Zusammensetzung in industriellem Maßstab ermöglichen.

Gene lösen die Produktion verschiedener Proteine aus, die in einem komplizierten Netzwerk enzymatischer Reaktionen miteinander verbunden sind. Mit der *Expressionsanalyse* werden z.B. funktionelle Zusammenhänge zwischen Genveränderungen und der Entstehung von Krankheiten und Wirkung von Medikamenten und Umweltschadstoffen entschlüsselt. Industriell gefertigte *Biochips* [*DNA-Chips*] nutzen in einer Rasteranordnung tausende verschiedene fixierte DNA-Abschnitte mit bekannten Sequenzen als sensitive Elemente zur

Ankopplung fluoreszenzmarkierter RNA-Probenmoleküle. Nach Belichtung wird sichtbar gemacht, an welchen Stellen eine Kopplungsreaktion stattfand und ob ein bestimmtes Gen aktiv war.

Durch Klonierung (13.7.1.3) oder Polymerase-Chain-Reaktion (13.7.1.5) kann die Zahl der Gene für das gewünschte Produkt erhöht (amplifiziert) und damit die Produktausbeute verbessert werden.

13.7.1.5 Polymerase Kettenreaktion – Polymerase Chain Reaction PCR

Die *Polymerase Kettenreaktion* [*Polymerase Chain Reaction PCR*] basiert auf einer Idee von K.B. MULLIS [1984, Chemie-Nobelpreis 1993], die von seinem Kollegen K. EHRLICH realisiert wurde. Es ist die Bezeichnung für eine in der Gentechnologie angewandte *in vitro*-Methode zur gezielten Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen und hat die klassische Technik des Klonierens abgelöst. Die PCR beruht auf drei wiederholt ablaufenden Reaktionsschritten, die so lange wiederholt werden, bis ausreichend viele Kopien vorhanden sind. Im ersten Schritt wird der vorliegende DANN-Doppelstrang mit der gewünschten Sequenz als Matrize durch vorsichtiges Erhitzen in die Einzelstränge getrennt. Die Sequenzfolgen an jeweils beiden Enden des Zielsequenzpaares müssen bekannt sein. Im zweiten Schritt werden synthetische Oligonukleotid-Primer P1 und P2 zugegeben, welche die komplementären Sequenzen der beiden Enden des gewünschten DNA-Sequenzabschnittes besitzen. Diese Primer hybridisieren mit den beiden terminalen Sequenzen der Matrize, der gesuchte Abschnitt ist nun durch die beiden Primer markiert. Im dritten Reaktionsschritt fügt man eine hitzestabile DNA-Polymerase hinzu, z.B. aus *Thermus aquaticus* [*Taq-Polymerase*], ein Enzym, das die Verlängerung eines DNA-Einzelstranges in Anwesenheit des komplementären Stranges katalysiert. Anschließend steigert man die Temperatur auf die optimale Arbeitstemperatur der Polymerase und erstellt ausgehend von den Primersequenzen eine Kopie der Ausgangs-DNA. Erneutes Erhitzen trennt den neugebildeten Doppelstrang und der Prozess kann mit den beiden Einzelsträngen neu durchlaufen werden.

In jedem solcher Zyklen verdoppelt sich jeweils die Menge des gesuchten Gens, was zu einer exponentiellen Vervielfältigung von 2^n führt. Innerhalb weniger Stunden sind über 20 Zyklen möglich und ein spezielles DNA-Fragment kann mittels PCR etwa 100.000fach vervielfältigt werden. Man beachte, daß der PCR-Kopiervorgang in der Regel nicht fehlerfrei verläuft. Im Durchschnitt geschieht bei jeder tausendsten Base ein Kopierfehler. Temperierautomaten vereinfachen den aufwendigen Temperaturwechsel der einzelnen Reaktionszyklen, Mikroprozessor-gesteuerte Heizblöcke sind als PCR-Maschinen im Handel.

Die Polymerase Chain Reaction zur Vervielfältigung, Synthese, Analyse und Reinigung von Oligonukleotiden gewinnt zunehmend an Bedeutung und hat weitreichende Anwendungen in der Molekularbiologie und medizinischen Diagnostik gefunden. Man kann aus geringsten Mengen DNA mithilfe spezifischer Oligonukleotide aus einer einzigen Kopie eines Gens soviel Material erhalten, dass das entsprechende Allel kloniert werden kann. Die Reaktion ermöglicht den sensitiven Nachweis von pathogenen Erregern, von

Mutationen und Polymorphismen in menschlichen Genen, und erleichtert Klonierungen und DNA-Sequenzierungen. In der Virus-Diagnostik können Virusgenome direkt im Patientenblut detektiert werden. Fruchtwasser kann bereits in einer frühen Embryonalphase gezielt nach Erbgutveränderungen untersucht werden. Bei dem heutzutage üblichen Vaterschaftstest werden bestimmte Teile der DNA, die keine proteincodierenden genetischen Informationen enthalten, mittels der Polymerase-Kettenreaktion auf den erforderlichen Grad der Übereinstimmung getestet.

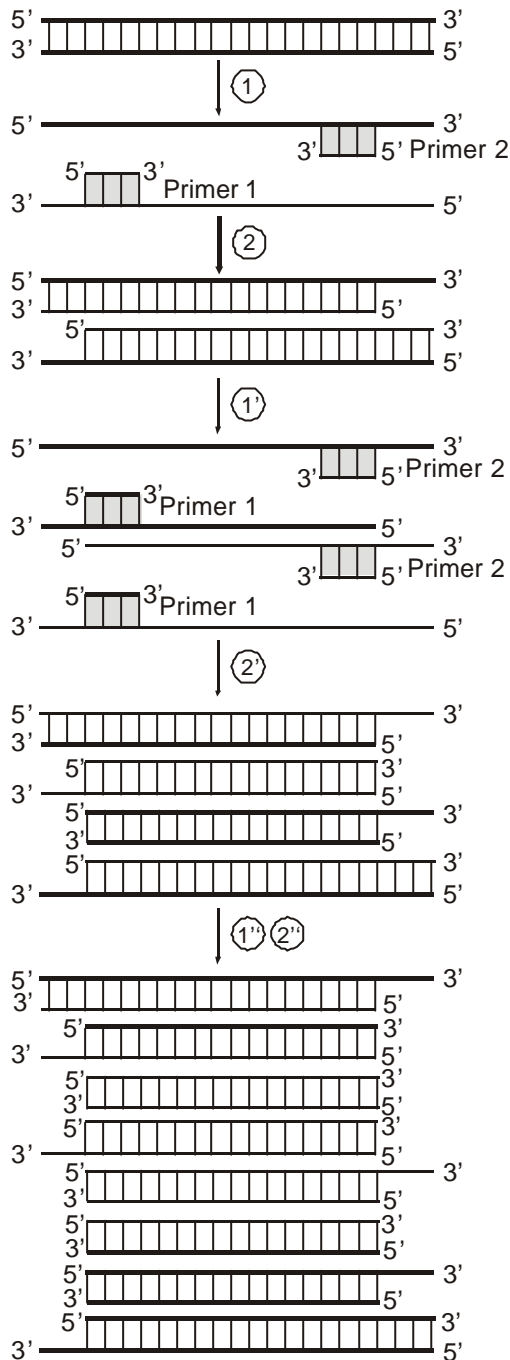


Abbildung 13-29. Darstellung dreier Zyklen der PCR mit Verachtfachung der Sequenzregion vom ursprünglichen DNA-Duplex.

13.7.2 Gentransformation - Genverpflanzung

Gentransformation ist die Übertragung von genetischem Material, das aus Zellen isoliert oder ausgeschieden wurde, in andere Zellen (Abb. 13-30). Die DNA des Spenders wird entweder durch Rekombination in das Wirtsgenom eingebaut, wodurch diese neue Eigenschaften erwerben kann, oder unabhängig als Plasmid repliziert. Der Transformationsfaktor ist dabei wegen des schnellen nucleolytischen Abbaus der Spender-DNA <



1 %. Zur Standard-Methoden bei tierischen und pflanzlichen Genen gehört auch die Wiedereinführung eines isolierten Gens in die Keimbahn des Ursprungsorganismus, um die biologische Funktion der isolierten DNA zu testen.

Abbildung 13-30. Schematische Darstellung der Gentransformation.

Zum Einschleusen der Fremd-DNA in die Zellen werden oft spezielle Vektoren bei Pflanzen und Tieren benutzt. Eine der wichtigsten neuen Techniken der Molekularbiologie ist die *Mikroinjektion* ganzer Zellkerne oder aus Zellkernen isolierter Gene in Oocyten. Fremdes genetisches Material kann so in ein befruchtetes (Säugetier-) Ei injiziert werden, welches zur weiteren Entwicklung dann in den Uterus eines schwangeren "Ammentieres" eingepflanzt wird. Die Expression des fremden genetischen Materials in den ausgetragenen transgenen Tieren entspricht einer Mutation des tiereigenen Genoms. Der Gentransfer spielt im Pflanzenschutz dann eine Rolle, wenn es um Merkmale geht, die die Pflanzen in den Stand versetzen, sich mit Abwehrmechanismen gegen Krankheiten und Schädlinge zu schützen und z.B. Virusresistenz, Pilzresistenz, Insektenresistenz, Herbizidresistenz, u.a. entwickeln. Zum Überträger pflanzlicher Fremdgene wird häufig das große Ti-Plasmid (Tumor induzierendes) des Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens*, das Tumorbildung bei Pflanzen verursacht, eingesetzt. Eine Voraussetzung für gentechnische Veränderungen höherer Pflanzen ist die Möglichkeit des Transfers einzelner Gene. *Transgene Organismen* sind also Tiere oder Pflanzen, in deren Zellen mithilfe der Gentechnologie Fremdgene [*Transgene*] eingeschleust wurden, die stabil in das Wirtsgenom integriert sind und von der Wirtszelle exprimiert werden. Die Integration des Transgens erfolgt in der Regel willkürlich an beliebigen Stellen des Genoms, so dass als Folge Mutationen auftreten können.

Wenn alle Zellen den kompletten Gensatz beinhalten, müssen sie sich in der Entwicklung differenzieren, z.B. durch Verlust einzelner Gene oder durch "An- und Abschalten" einzelner Gene. Wurde z.B. der Kern einer Darmzelle einer Kaulquappe in eine Eizelle eines Frosches, deren Gene mit UV-Licht zerstört worden waren, verpflanzt, so begann das Ei sich normal zu teilen und sich zu einer normalen Kaulquappe bzw. Frosch zu entwickeln. Allerdings wird eine Zelldifferenzierung erst nach 10 - 15 Eizellteilungen beobachtbar.

Transgene Organismen sind damit wichtige *in vivo*-Systeme zum Studium organ- und zellspezifischer Genexpression, der Tumorentstehung und Fragen zur Entwicklungsbiologie.

Die Transkription ist selektiv, man findet drei Arten von Polymerasen in Zellen mit Zellkern: Die Polymerase I bildet 18S- und 28S-rRNA, während die Polymerase II alle Gene abliest, die Polymerase III synthetisiert die 5S-rRNA und die tRNA (5S = 5 Svedbergeinheiten, die Größe des Moleküls kennzeichnend). Man kann die Polymerasen durch ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Knollenblätterpilztoxin α -Amanitin unterscheiden.

Durch Genübertragung können z.B. Bakterien, wie sie zur Herstellung von Single Cell Protein verwendet werden, so verändert werden, dass sie als Stickstoffquelle nicht mehr teure Aminosäuren, sondern einfache Ammoniumverbindungen verwerten.

13.7.3 Protein-Design durch Gentechnik

Mit dem Begriff *Protein-Design* (10.7.2) ist die gezielte Modifikation oder Neuschaffung eines Proteins oder neuer Proteinfunktionen verbunden. Meist geschieht dies unter Einsatz und Kombination von Methoden der Molekularbiologie mit NMR-Spektroskopie, Röntgenkristallographie und Datenverarbeitung. Zur gezielten Modifikation von Proteinen ist die Kenntnis der an der Funktion beteiligten Aminosäuren und aktiven Zentren bzw. der 3D-Struktur des Proteins erforderlich. Die Strukturermittlung basiert heute meist auf mehrdimensionaler *NMR-Spektroskopie* und *Röntgenstrukturanalyse*. Die methodischen Entwicklungen der letzten Jahre sowohl der NMR-Techniken als auch der Röntgenkristallographie sind vor allem auf die Verfügbarkeit geeigneter Computer zurückzuführen. Sind die 3D-Struktur eines Proteins und dessen aktive Zentren in ihrer Architektur bekannt, so kann man an Hand von Molekülgraphik-Darstellungen festlegen, welche gentechnische Änderung vorgenommen werden muss, um das gewünschte Design zu erzielen. Damit ergeben sich gute Voraussagen über eine geplante Mutation und dadurch bedingte Funktionsänderungen.

Erst mit dem Auffinden von Plasmiden, von Restriktionsenzymen, sowie dem Fortschritt in der Entwicklung von Sequenzier- und DNA-Synthese-Maschinen lassen sich diese Arbeit durchführen. Das Gen des betreffenden Proteins kann aus dem Mutterorganismus direkt oder durch Umkopieren der Boten-RNA in die entsprechende DNA gewonnen oder bei bekannter Aminosäuresequenz des Proteins das spezifische Gen mittels einer Synthesemaschine herstellen. An beliebiger Stelle des Gens lassen sich Mutationen einführen, die als Folge Änderungen auf Proteinebene erzeugen. Dies geschieht entweder auf synthetischem Weg durch Darstellung eines modifizierten Gens oder gentechnisch durch Anwendung eines der zahlreichen etablierten Verfahren zur Oligonukleotid-dirigierten Mutagenese. Solcherart isoliertes natürliches oder synthetisches Gen wird anschließend in ein entsprechendes Plasmid inkloniert. In manchen Fällen kann das exprimierte Protein sofort nach Entstehen aus der Produktionszelle ausgeschleust werden. Bei einem guten Überexpressionsvektor kann man pro Liter Kulturmedium etwa 10 - 1.000 mg des gewünschten Proteins erhalten.

13.7.4 Anwendungen der Gentechnik - Landwirtschaft - Umweltschutz - Medizinische Anwendungen – Grundlagenforschung - Risiken der Gentechnik

Eines der treibenden Argumente für die Anwendung der Gentechnik in der Landwirtschaft ist natürlich eine ausreichende Ernährung der Weltbevölkerung und die Zurverfügungstellung genügender Nahrungsmittel. Und obwohl es z.B. in den letzten 50 Jahren durch klassische Genetik und Düngung gelang, den Getreideertrag um ein Mehrfaches zu erhöhen, wird der weiter stetige Bevölkerungsanstieg gleichzeitig zu einer Verknappung

landwirtschaftlicher Nutzflächen führen. (Nach demographische Prognosen der Vereinten Nationen wird jedoch das Weltbevölkerungswachstum mit 85 prozentiger Wahrscheinlichkeit noch vor dem Ende dieses Jahrhunderts zum Stehen kommen!). Schon seit Jahren ist die proKopf-Produktion von Nahrungsmitteln trotz der hohen absoluten Steigerungsrate am sinken. Außerdem muss die natürliche Flora und Fauna zunehmend dem Flächenbedarf für Wohnen, Verkehr und Landwirtschaft weichen, die Monokultur Mensch nimmt der übrigen Natur den Lebensraum.

13.7.4.1 Anwendungen in der Landwirtschaft

Zucht und Landwirtschaft verändern eigentlich seit einigen tausend Jahren durch Selektion die Gene von Tieren und Pflanzen. Alle Kulturpflanzen sind im Vergleich zu ihren wildwachsenden Vorläufern *genetisch veränderte Pflanzen* [GVP]. Die Gentechnik hingegen stellt Methoden bereit, mit der die Ziele der Nutzpflanzenzucht, welche da sind Qualitätsverbesserung, Ertragssteigerung und Verbesserung der Widerstandsfähigkeit, effektiver als bisher zu erreichen sind. Derzeit wird u.a. weltweit versucht das *gesamte Genom* von Pflanzen aufzuklären. Der Bauplan ihres Lebens wird mit den Techniken der Molekularbiologie und mit Hilfe der Hochleistungscomputer der Bioinformatik entschlüsselt um Grundlagen für Wachstum und Ertrag aufzuklären. Es stimmt jedoch, dass die Gentechnik gleichzeitig die Artengrenzen hinter sich lässt und selbst den Sprung zwischen Pflanzen- und Tierreich nicht scheut, indem sie beispielweise Tiergene auf Pflanzen oder Bakterien überträgt. Die Einheitlichkeit alles Lebenden ist derart, dass auch entwicklungsgeschichtlich weit auseinanderliegende Arten zahlreiche Gene gemeinsam haben: 30 % zwischen Mensch und Hefe zum Beispiel.

Der pflanzliche Ertrag ist direkt mit der Intensität der Stickstoffdüngung gekoppelt. Deren hohe Kosten machen eine Verringerung der weltweiten Produktion von Stickstoffdünger wünschenswert. Es gibt nun verschiedene gentechnologische Ansätze um Nutzpflanzen zur biologischen Stickstofffixierung (vgl. 9.) zu befähigen:

- i) die Übertragung der für die Stickstofffixierung notwendigen bakteriellen (*nif*) Gene direkt in die Pflanzen;
- ii) die für die Stickstofffixierung der Leguminosen verantwortlichen Knöllchenbakterien genetisch so zu verändern, dass sie auch mit anderen Wirtspflanzen solche Symbiosen eingehen.

Bei vielen Nutzpflanzen könnte zudem der Ertrag gesteigert werden, wenn es, wie bei Kulturpflanzen mit Hilfe der klassischen Züchtungsgenetik seit Jahrtausenden versucht, gelingt, sie gentechnologisch an die jeweiligen Standorte und Witterungsbedingungen optimal anzupassen.

Im *Pflanzenschutz* wird die Gentechnik eingesetzt, um Kulturpflanzen mit Inhaltsstoffen und Eigenschaften so auszustatten, dass sie sich gegenüber Schädlingen und Krankheiten widerstandsfähig erweisen. Tabakpflanzen hat man genetisch verändert, so dass sie einen Fraßhemmstoff gegen den Tabakschädling *Manduca sexta* [Lepidoptera] produzieren und sich damit vor Fraßschäden schützen. Neben einem genetischen Beitrag zur Schwächung der Schädlinge und Stärkung der Nützlinge ist auch ein Eingriff in den biologischen Pflanzenschutz denkbar. Durch Gentransfer bestimmter Fremd-DNA in die Keimbahn gezüchteter weiblicher

Schadinsekten lassen sich nur männliche Nachkommen produzieren, so dass die unerwünschten Weibchen aus dem Reproduktionszyklus entfernt werden. Seit über einem Jahrzehnt wird z.B. *Bacillus thuringiensis*, ein insektenpathogenes Bakterium, vorwiegend gegen Raupen von Schadinsekten eingesetzt. Das von den Bakterien produzierte Insektengift wird von einem einzigen Gen codiert und könnte durch gentechnologische Methoden nicht nur in ausreichender Menge gewonnen, sondern auch in seinem Wirkspektrum so verändert werden, dass es Nutzinsekten nicht mehr angreift. In Zellkulturen wurden herbizidresistente Pflanzen "gezüchtet", denen Unkrautbekämpfungsmittel nichts mehr anhaben können. Zellen, die Herbizidattacken überlebten, wurden zu neuen Pflanzen regeneriert. So führt der Einbau eines DNA-Segments eines Bodenbakteriums in Sojapflanzen zur spezifischen Resistenz gegenüber einem bestimmten Herbizid.

Im Zeitalter der "Gentomate" stößt die Anwendung gentechnischer Methoden zur Herstellung von Arzneimitteln inzwischen auf breite Akzeptanz, wie es das Beispiel der Produktion von menschlichem Insulin durch genetisch veränderte Bakterien zeigt (13.7.4.3). Ungeachtet dessen hält die kontroverse Diskussion um *genetisch veränderte Organismen* [GVO] und genetisch veränderte (genmanipulierte) Pflanzen [GVP] und *transgene Pflanzen* in der Nahrungskette an. Natürlich sind gentechnisch veränderte Pflanzen für die Öffentlichkeit nur dann akzeptabel, wenn sie davon ausgehen kann, dass keine Gefährdung für Gesundheit und Umwelt besteht. In der EU sind Antragsverfahren für gentechnisch veränderten Baumwolle, Tabak, Raps, Mais, Kartoffel, Tomaten, Bananen, Erdbeeren, Melonen, Erbsen, Radicchio und Sojabohnen abgeschlossen bzw. die Produkte stehen bereits vor der Vermarktung. Dennoch liegt Deutschland bei Freilandversuchen noch weit hinter seinen Nachbarländern zurück.

13.7.4.2 Umweltschutz

Als Folge des stetigen Anstiegs der Bevölkerungszahl ist das Problem der Abfallproduktion und Abfallbeseitigung anzusehen. Nun macht sich der Mensch die Fähigkeit mancher Mikroorganismen zunutze, die Chemikalien in ihre Bestandteile metabolisieren, sie umwandeln und somit zum Stoffkreislauf auf der Erde beitragen. In Kläranlagen werden verunreinigte Abwässer durch gezielt eingesetzte Mikroben gereinigt. Hier könnte nun durch die Verwendung gentechnologischer Methoden deren Effektivität verbessert werden, gentechnologisch veränderte Mikroorganismen könnten auf Chemikalien angesetzt werden, die sich bisher einer biologischen Umsetzung entziehen.

Auch im Pflanzenschutz, der in Form der Anwendung von Insektiziden, Fungiziden und Herbiziden gleichermaßen ein Umweltproblem darstellen kann, kann die Gentechnologie durch verschiedenste Einsatzbereiche (13.7.4.1) zur Umweltentlastung beitragen.

13.7.4.3 Medizinische Anwendungen

Die Gentechnik dient im Bereich Gesundheit vor allem, um neue diagnostische Methoden und Medikamente zu entwickeln und Krankheiten zu bewältigen. So sollten sich körpereigene Stoffe des Menschen in ausreichender Menge als *Arzneimittel* produzieren lassen, neue Impfstoffe gefunden werden und die Herstellung schwer zugänglicher Peptide und Proteine (Hormone, Antigene, Antikörper, Plasmaproteine, Enzyme) in industriellem Maßstab erlauben.

Bis vor mehreren Jahren musste das Peptidhormon *Insulin* (10.) aus der Bauchspeicheldrüse von Schweinen und Rindern gewonnen werden; dieses Insulin ist jedoch nicht völlig baugleich dem menschlichen Hormon. 1982 kam humanes Insulin als erster gentechnisch erzeugter Wirkstoff auf den Markt. Es kann aus Bakterien, in die das Insulin-Gen vom Menschen eingeführt wurde, isoliert werden, ein Ansatz ergibt mehrere Kilogramm biotechnologisches Produkt. Damit ersetzt das von genetisch veränderten Bakterien erzeugte Human-Insulin die schrumpfenden Vorräte an Rinder- und Schweineinsulin und kann zur Behandlung der steigenden Zahl von Diabetikern herangezogen werden.

Rekombinante Verfahren erlauben die Herstellung humaner Proteine in beliebiger Menge und sichern den Ausschluss pathogener Verunreinigungen bei der Isolierung aus natürlichen Quellen. Ende 2001 betrug die Zahl der in Deutschland zugelassenen Medikamente, die gentechnisch hergestellte Proteinwirkstoffe enthalten, 85 (bei insgesamt 64 verschiedenen Wirkstoffen). Die Gentechnik ermöglicht außerdem, pharmakologisch relevante Eigenschaften von rekombinanten Proteinwirkstoffen durch Design von "Muteinen" (in ihrer Sequenz veränderten Proteinen) zu verbessern und Proteine „maßzuschneiden“. Die besondere Nützlichkeit der Gentechnologie erweist sich bei der Produktion von Hormonen, die aufgrund ihrer sehr niedrigen Konzentration im Säugetierorganismus mit herkömmlichen Methoden nicht gewinnbar sind. Das gentechnisch gewonnene *Erythropoietin* fördert die Bildung roter Blutkörperchen und wurde bereits vor 15 Jahren an anämische ("blutarmen") Patienten appliziert. Das gentechnisch hergestellte *Hormon G-CSF* zur Bildung weißer Blutkörperchen wurde bei Krebspatienten zur Erholung des Knochenmarks nach Chemotherapie angewendet. Das *Hormon GM-CSF* konnte in klinischen Versuchen bei AIDS-Patienten die Konzentration der weißen Blutkörperchen dosisabhängig auf normale Werte steigern.

Interferon- α wird zur Behandlung viraler Infektionen und verschiedener Krebserkrankungen verwendet. Humanes Interferon bildet eine durch 23 verschiedene Gene kodierte Proteinklasse. Durch Sequenzvergleich kann man Mutanten schaffen, von denen man sich erhöhte antivirale Aktivität erhofft.

Übliche monoklonale Antikörper [Mabs] aus Maus können im menschlichen Körper nur in speziellen Fällen als Arzneiwirkstoffe eingesetzt werden. Die Gentechnik erlaubt nun, MABs ohne Verlust ihrer Bindungseigenschaften in „chimäre“ (oder „humanisierte“) Antikörper umzuwandeln, bei denen die Maus-Sequenzen durch humanidentische Sequenzen ersetzt sind.

Die Gewinnung *industrieller Enzyme* (10.) durch gentechnisch modifizierte Mikroorganismen bietet gegenüber der herkömmlichen Gewinnung aus pflanzlichen und tierischen Zellen Vorteile wie z.B. Produktion in großen Quantitäten und die Möglichkeit ressourcenschonender Aufarbeitung. So sind Enzyme aus GVO bereits seit langem auf dem Markt sowie in der Lebensmittelherstellung präsent. Vereinzelt gibt es schon Produkte mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen wie Brauhefe, Backhefe, ferner Aminosäuren, Vitamine und Farbstoffe. Das rekombinante Enzym *Chymosin* z.B. ist in Deutschland seit 1997 zur Käseherstellung zugelassen. Würden bisher zur Herstellung von 10 Tonnen Enzymextrakt 70 Millionen Kälbermagen benötigt, kann jetzt z.B. die Herstellung in höherer Reinheit und gleichbleibender Qualität aus *Escherichia coli* erfolgen.

Die Impfung von Personen mit veränderten Viren, die noch eine korrekte Immunantwort (10.) auslösen, jedoch nicht mehr pathogen sind, ist eine der Perspektiven der angewandten Gentechnologie. Im Falle des Hepatitis-B-Virus ist dies bereits gelungen. Zur Zeit wird weltweit daran gearbeitet wird, auch einen *Impfstoff* gegen AIDS mit den Methoden der Gentechnologie zu gewinnen. Die Vermehrung von Viren in fremden Wirten kann z.B. eine Möglichkeit sein, ihnen ihren pathogenen Charakter zu nehmen.

Gentechnologische Methoden können zur vorhersagenden *prädiktiven Diagnostik* eingesetzt und damit ein erhöhtes Risiko für das Auftreten bestimmter Erkrankungen vorausgesagt oder ausgeschlossen werden. Auch die Methoden der bisher praktizierten *pränatalen Diagnostik* lassen sich damit verbessern. Durch die modernen DNA-Analyse-Techniken kann insbesondere bei schweren Stoffwechselerkrankungen die Diagnosesicherheit erhöht werden.

Die *Gentherapie* beinhaltet gezielte gentechnische Eingriffe mit dem Ziel, Krankheiten zu heilen. Dabei findet eine Behandlung der Krankheit auf dem Niveau der Erbinformation statt. Man unterscheidet *somatische Gentherapie* (wobei die Änderung im Erbgut nicht vererbbar ist) und *Keimbahn-Gentherapie* (die Veränderung des Erbgutes ist vererbbar). Methoden, die sich auf die Therapie menschlicher Körperzellen beziehen und zur Heilung beitragen, sind scharf von Methoden abzugrenzen, die an den Keimbahnzellen des Menschen angreifen. Die Enquete-Kommission des 10. Deutschen Bundestages zu den "Chancen und Risiken der Gentechnologie" empfahl dem Deutschen Bundestag "gentechnische Eingriffe in menschliche Keimbahnzellen strafrechtlich zu verbieten". In den USA ist Gentherapie bereits erfolgreich angewendet worden, in Deutschland sind erste Versuche gestartet worden. In der Schweiz ist die Keimbahntherapie auf Verfassungsebene verboten. Die Unterlassung der möglichen Heilung einer Krankheit am betroffenen Individuum durch gentechnologische Eingriffe in Körperzellen ist jedoch anders zu bewerten und nicht zu rechtfertigen. Gentherapie wird zur Zeit hauptsächlich eingesetzt bei Krebsleiden, Erbkrankheiten, AIDS, rheumaartige oder Gefäßerkrankungen.

13.7.4.4 Grundlagenforschung

Mit dem Ziel herauszufinden, welche Aufgaben einzelnen Genen im Organismus zukommen, ist die Gentechnologie in der *biologischen und medizinischen Grundlagenforschung* besonders fest verankert. Per Gentest bzw. Erbgut-Vergleich lässt sich z.B. die Identität bzw. Diversität bestimmter Tierarten nachweisen. Mit der Kenntnis der Auslösefaktoren von Erbkrankheiten, aber auch z.B. von Krebs, Virusinfektionen und Immunreaktionen, können genetisch bedingte Krankheiten ursächlich behandelt und vielleicht geheilt werden.

Die Analyse der molekularen Funktion eines Gens ist ohne seine Klonierung (d.h. Vermehrung in Bakterienzellen) nicht möglich. Deshalb werden weltweit die Gene von höheren Organismen systematisch in Hunderten von Labors im Darmbakterium *E. coli* kloniert und ihre Produkte anschließend analysiert. Zu den verwendeten Standard-Methoden bei tierischen und pflanzlichen Genen gehört auch die Wiedereinführung eines isolierten Gens in die Keimbahn des Ursprungsorganismus, um die biologische Funktion der isolierten DNA zu testen.

Ein Verzicht auf gentechnologische Methoden in der Forschung ist völlig undenkbar und wird wohl auch nirgends von ernstzunehmenden Gruppen in Erwägung gezogen. Ein Verbot würde einem Verbot der Grundlagenforschung überhaupt gleichkommen und wäre mit der Unterdrückung von Wissen identisch.

13.7.4.5 Risiken der Gentechnik

Weltweit gibt es heute einige tausend Firmen, die sich über alle Sparten mit Gentechnologie befassen. Im Bereich der Landwirtschaft, die vor allem als Ernährungsbasis für den Verbraucher interessant ist, zeigen etwa 1.500 gentechnische Patente von der rasanten Entwicklung. Obwohl bei den bisherigen Freisetzungen transgener Kulturpflanzen keine Gefahren aufgetreten sind, stößt die Gentechnik in Deutschland vor allem beim Verbraucher auf Skepsis. Die Risiken der Gentechnologie liegen weniger in der unbeabsichtigten Schaffung neuer pathogener Organismen, sondern vielmehr in der Empfindlichkeit der veränderten Stämme unter den beabsichtigten Einsatzbedingungen. Es besteht auch die Gefahr, dass unter diesen Bedingungen einmalig geschaffene genetische Information wieder verloren geht. Dennoch ist das Auftreten genetisch veränderter Mikroorganismen prinzipiell nicht auszuschließen. Es ist denkbar, dass einmal Varianten entstehen können, die Giftstoffe produzieren. Eine weitere potentielle Gefahrenquelle kann in der allgemeinen Verbreitung geringer Mengen von antibiotisch oder toxisch wirkender Substanzen liegen. Da wie bei jeder neuen Technologie gewisse Gefahren für Mensch und Umwelt nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden können, sind gentechnische Experimente nur unter bestimmten Sicherheitsvorkehrungen und in eigens dafür ausgerüsteten Laboratorien erlaubt und genehmigungspflichtig. Für Klonierungsexperimente werden zur Sicherheit meist eigens gezüchtete Mikroorganismen eingesetzt, die ausserhalb der Laboratoriumsatmosphäre und ihres spezifischen Nährmediums nicht lebensfähig sind. Abgelehnt werden gentechnische Eingriffe in die menschliche Keimbahn und die Herstellung biologischer Waffen. Weitgehend einig sind sich auch genetisch forschende Institutionen in der ethischen Bewertung der Gentechnik im Bereich der Pflanzen. *Gentechnik-*

Leitlinien der Chemischen Industrie, der Industrieverbände der einzelnen Länder und verschiedenster Untersuchungskommissionen beschreiben, empfehlen und regulieren den Einsatz gentechnologischer Methoden und restringieren ihn durch Erstellung von Kontrollvorschriften und Überwachungsinstitutionen. Die Konferenz von Asilomar, Kalifornien 1974, verabschiedete Richtlinien über Sicherheit und ethische Fragen zur der Gentechnik, die ständig weiterentwickelt wurden und heute unter dem Namen *NIH-Richtlinien* [*National Institutes of Health*] bekannt sind. Diese Richtlinien teilen gentechnische Experimente je nach Gefährlichkeit in vier Risikoklassen ein und verlangen Maßnahmen, die von üblicher mikrobiologischer Laborpraxis bis hin zu Arbeiten im Hochsicherheitslabor reichen. Aufgrund von Richtlinien der Bundesregierung konstituierte sich 1979 die Zentralstelle für Biologische Sicherheit [ZBS] zur Beurteilung von Sicherheitsfragen bei der *in vivo*-Neukombination von Nukleinsäuren. Biotechnologische Forschungsprojekte müssen vom Projektträger bei der Kommission zur Sicherheitsüberprüfung beantragt werden, die Projekte werden begutachtet und entsprechend den biologischen und Labor-Sicherheitsbedingungen zugeordnet und die Sicherheitsmaßnahmen überprüft. Anträge, denen die Kommission nicht zustimmt, müssen vom Antragsteller zurückgenommen oder den Vorschlägen der ZBS entsprechend neu formuliert werden. Die Kommission besteht aus Sachverständigen aus Hochschulen, Forschungsinstituten und Industrie sowie Vertretern der Gewerkschaften, der Industrieverbände, des Arbeitsschutzes und der forschungsfördernden Organisationen.

1990 wurde das *Gentechnikgesetz* der Bundesrepublik verabschiedet. Diese Gesetz [Novelle 1993] hat zum Ziel sowohl den Schutz von Mensch und Umwelt beim Umgang mit der Gentechnik zu gewährleisten als auch den rechtlichen Rahmen für die Förderung der Gentechnik zu schaffen. Der administrative Aufwand für Anmeldungen und Genehmigungen gentechnischer Aktivitäten wurde unangemessen hoch und zunehmend zur Belastung für Forschung und Wissenschaft. Gesetzliche Rahmenbedingungen sind ein wichtiger Faktor für Standortentscheidungen der Industrie über Forschungs- und Produktionskapazitäten. Prognosen im Bereich der modernen Biotechnologie sagten bis zum Jahr 2.000 die Entstehung von 2 Mio. Arbeitsplätzen allein in der EG voraus und ein Weltmarkt-Anstieg biotechnologischer Produkte von 10 Mrd. DM in 1990 auf rund 160 Mrd. im Jahr 2.000 wurde prognostiziert.

