

Andreas Bechthold

Pharmazeutische Mikrobiologie kompakt



Andreas Bechthold

Pharmazeutische Mikrobiologie

kompakt

Reihe Kompakt-Lehrbuch

Andreas Bechthold

Pharmazeutische Mikrobiologie kompakt

1. Aufl., 2012

Derendorf · Gramatté · Schäfer · Staab

Pharmakokinetik kompakt

3. Aufl., 2011

Leistner · Breckle

Pharmazeutische Biologie kompakt

7. Aufl., 2008

Wätzig · Mehnert · Bühler

Mathematik und Statistik kompakt

1. Aufl., 2009

Weidenauer · Beyer

Arzneiformenlehre kompakt

1. Aufl., 2008

Andreas Bechthold

Pharmazeutische Mikrobiologie kompakt

Andreas Bechthold, Freiburg

Mit 66 Abbildungen und 50 Tabellen



Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart

Anschrift des Autors

Prof. Dr. Andreas Bechthold

Albert-Ludwigs-Universität
Institut für Pharmazeutische Wissenschaften
Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie
Stefan-Meyer-Straße 19
79104 Freiburg

Hinweise

Die in diesem Buch aufgeführten Angaben wurden sorgfältig geprüft. Dennoch können der Autor und der Verlag keine Gewähr für deren Richtigkeit übernehmen.

Ein Markenzeichen kann warenzeichenrechtlich geschützt sein, auch wenn ein Hinweis auf etwa bestehende Schutzrechte fehlt.

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet unter <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Jede Verwertung des Werkes außerhalb der Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist unzulässig und strafbar. Das gilt insbesondere für Übersetzungen, Nachdrucke, Mikroverfilmungen oder vergleichbare Verfahren sowie für die Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen.

ISBN 978-3-8047-2862-2

© 2012 Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
Birkenwaldstr. 44, 70191 Stuttgart
www.wissenschaftliche-verlagsgesellschaft.de

Printed in Germany

Typografie und Umschlaggestaltung: deblik, Berlin
Satz: primustype, Robert Hurler GmbH, Notzingen
Druck und Bindung: Beltz Druckpartner, Hemsbach
Umschlagabbildung: fotolia / Sebastian Kaulitzki

Vorwort

Nicht erst mit der Einführung der modularisierten Studienordnungen an den deutschen Hochschulen, an denen auch die Pharmazie nicht vorbeikommen wird, sind gute Grundlagenkenntnisse der Mikrobiologie gefragt. Die Mikrobiologie wird mehr und mehr zu einem zentralen Fach der naturwissenschaftlichen und medizinischen Ausbildung.

Der Begriff „pharmazeutische Mikrobiologie“ ist keinesfalls als Abgrenzung zur „biologischen“ und „medizinischen“ Mikrobiologie zu verstehen. Eher versteht sich die „pharmazeutische Mikrobiologie“ als eine Disziplin, die das mikrobiologische Wissen der Biologie und Medizin vereint.

Als Pharmazeut hat man in der Industrie heutzutage sehr gute Möglichkeiten. Berufsfelder für Pharmazeuten, die sich intensiv mit der Mikrobiologie beschäftigt haben, sind zahlreich. Dabei geht es um den Einsatz von Mikroorganismen in der Biotechnologie zur Herstellung von Arzneistoffen oder um die Erkennung und Behandlung von Krankheitserregern.

Auf dem Hintergrund meiner Erfahrungen aus Lehrveranstaltungen bieten wir den Studierenden der Pharmazie und anderer Lebenswissenschaften mit dem in diesem Buch zusammengestellten Wissen eine solide Grundlage speziell für den ersten Studienabschnitt. Beschrieben werden pathogene Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Parasiten), aber auch Mikroorganismen mit biotechnologischer Relevanz. Neben rein mikrobiologischen Themen werden auch Grundlagen der Molekularbiologie und Biochemie behandelt, ohne deren Kenntnisse moderne Mikrobiologie nicht möglich ist.

Gut verwendet werden kann das Buch auch zur Wissensauffrischung im zweiten Studienabschnitt und später im Berufsleben.

Der Autor dankt Frau Dr. Gabriele Weitnauer, Herrn Dr. Johannes Härle, Herrn Prof. Dr. Dr. Hoffmeister und Herrn Prof. Dr. T. Friedrich für Korrekturen und Anmerkungen.

Bei Stefanie bedanke ich mich für ihre Unterstützung, bei Carla und Mia für ihre Geduld.

Freiburg i. Breisgau, im Frühjahr 2012

Andreas Bechthold

Inhaltsverzeichnis

	Vorwort	V
	Abkürzungsverzeichnis	X
1	Molekularbiologie	1
1.1	Prokaryotische und eukaryotische Genetik	1
1.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	15
2	Biochemie	28
2.1	Stoffe und Stoffwechselwege des Primärstoffwechsels	28
2.2	Stoffe und Stoffwechselwege des Sekundärstoffwechsels	62
2.3	Biochemische Arbeitsmethoden zur Untersuchung von Enzymen	78
3	Mikroorganismen und ihre weltweite Bedeutung	84
3.1	Die Bedeutung von Mikroorganismen in der Geschichte der Menschheit ..	84
3.2	Die Bedeutung von Mikroorganismen in der heutigen Zeit	85
3.3	Mikroorganismen als biologische Waffen	87
3.4	Mikroorganismen als Helfer des Menschen	88
3.5	Mikroorganismen mit besonderen Aufgaben	88
4	Viren	91
4.1	Definition und Entdeckung	91
4.2	Aufbau eines Virus	92
4.3	Entwicklungsstadien eines Virus	92
4.4	Klassifizierung der Viren	93
4.5	Virale Diagnostik	123
4.6	Antivirale Arzneistoffe und deren Zielstrukturen	124
5	Bakterien	129
5.1	Definition und Entdeckung	129
5.2	Aufbau einer prokaryotischen Zelle	129
5.3	Nährmedien und Wachstumsverhalten	134
5.4	Kultivierung	136
5.5	Sterilisation und Desinfektion	136
5.6	Klassifizierung pharmazeutisch relevanter Bakterien	137
5.7	Endotoxine und Exotoxine	177
5.8	Bakterielle Lebensformen	179
5.9	Die Körperflora des Menschen	179
5.10	Probiotika	180
5.11	Mikroorganismen in der Tumorthherapie	180
5.12	Biofilm	180
5.13	Mikrobielle Diagnostik	181
5.14	Antibiotisch wirksame Verbindungen und deren Zielstrukturen	182
5.15	Antibiotika-Resistenz	189

6	Pilze	196
6.1	Definition und Entdeckung	196
6.2	Aufbau von Pilzen	196
6.3	Entwicklungsstadien	196
6.4	Klassifizierung der Pilze	197
6.5	Antimykotika und deren Zielstrukturen	206
7	Algen	209
7.1	Definition	209
7.2	Braunalgen (Phaeophyceae)	210
7.3	Rotalgen (Rhodophyceae)	210
7.4	Grünalgen (Chlorophyta)	211
7.5	Kieselalgen (Bacillariophyta)	211
7.6	Flechten	211
8	Eukaryotische Parasiten	214
8.1	Systematische Einteilung der eukaryotischen Parasiten	214
8.2	Mikroparasiten	214
8.3	Makroparasiten	218
8.4	Gegen Parasiten wirkende Arzneistoffe und deren Zielstrukturen	225
9	Immunität und Infektion	228
9.1	Unspezifische Verteidigungselemente des Körpers	228
9.2	Spezifische Verteidigungselemente des Körpers	229
9.3	Immunabwehr gegen Bakterien	230
9.4	Immunabwehr gegen Viren	230
9.5	Immunabwehr gegen Parasiten	231
10	Impfungen	233
10.1	Grundlagen	233
10.2	Gilt die Kinderlähmung nach Einführung von Impfstoffen als ausgerottet?	236
10.3	Die Entwicklung eines Impfstoffs am Beispiel des Grippeimpfstoffs	237
10.4	Impfungen, ja (oder nein?)	238
11	Der Einsatz von Mikroorganismen in der Biotechnologie	242
11.1	Herstellung von alkoholischen Getränken	242
11.2	Herstellung von Lebensmitteln	242
11.3	Herstellung von Aminosäuren mit Mikroorganismen	243
11.4	Herstellung von Vitaminen mit Mikroorganismen	244
11.5	Herstellung von organischen Säuren durch Mikroorganismen	245
11.6	Biotransformation durch Mikroorganismen	245
11.7	Mikroorganismen, die zum Abbau vom Polymeren befähigt sind	245
11.8	Mikroorganismen als Produzenten von niedermolekularen Arznei- stoffen	246
11.9	Gentechnologisch veränderte Mikroorganismen als Produzenten von neuen niedermolekularen Naturstoffen	248

11.10	Mikroorganismen als Produzenten von Proteinen und Antikörpern	250
11.11	Mikroorganismen als Hochleistungsproduzenten	251
	Weiterführende Literatur	254
	Forschungsinstitute	254
	Lösungen zu den Wiederholungsfragen	256
	Sachregister	257
	Der Autor	271

Abkürzungsverzeichnis

A

ABC-Transporter	ATP-binding cassette transporter
AECOPD	akute Exazerbation einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung
A-T	Adenin und Thymin (verbunden über Wasserstoffbrückenbindungen)
ACP	Acyl-Carrier-Protein
AIDS	acquired immune deficiency syndrome
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat

B

BAC	bacterial artificial chromosome
BHK-21-Zellen	Baby-hamster-kidney-21-Zellen
bla	Betalactamase-Gen
BP	Basenpaare

C

C	Cytosin
CAP	catabolite activating protein
cAMP	zyklisches Adeninmonophosphat
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
CHO-Zellen	Chinese-hamster-ovary-Zellen
CIN	zervikale intraepitheliale Neoplasie
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COS-Zellen	<i>Cercopithecus-aethiops</i> -Zellen

D

DH	Dehydrogenase
DHC	3-Dehydrochinasäure
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dDNA	doppelsträngige DNA
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

E

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF	Elongationsfaktor
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
ELISA	enzyme linked immosorbent assay
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ER	Enoylreduktase
ESBL	extended spectrum beta-lactamases
et al.	et alii (m), et aliae (w): und andere
ETEC	enterotoxische <i>E. coli</i>

F

FAD	Flavinadenindinnukleotid
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FMN	Flavinadeninmononukleotid
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis

G

GABA	gamma aminobutyric acid (γ -Aminobuttersäure)
G-C	Guanosin und Cytosin (verbunden über Wasserstoffbrückenbindungen)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat

H

HA	Hämagglutinin
HbsAg	Hepatitis B surface antigen
HbcAg	Hepatitis B core protein antigen
HBV	Hepatitis-B-Virus
HCV	Hepatitis-C-Virus
HD-Zellen	humane diploide Zellen
HEF	Oberflächen-Hämagglutinin-Esterase-Fusions-Protein
Hek-293-Zellen	Human-embryonic-kidney-293-Zellen
HEV	Hepatitis-E-Virus
HHT	Hämagglutinations-Hemmtest
HHV	humanes Herpes-Virus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HPV	humanes Papillomavirus
HSV	Herpes-Simplex-Virus
HTLV	humanes T-Zell-Leukämie-Virus
HUGO	Humangenomprojekt (Human Genome Organisation)

I

IFT	Immunfluoreszenztest
Ig	Immunglobulin
IHF	integration host factor
FIS	factor for inversion
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IP	isoelektrischer Punkt
IPP	Isopentylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
IPV	inactivated poliomyelitis vaccine
iRNA	Initiator-RNA
iRT-PCR	immunoquantitative Echtzeit-PCR

K

k. A.	keine Angabe
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KDPG	2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat-Weg
KM	Michaelis-Menten-Konstante
KR	Ketoreduktase
KS	Ketosynthase

L

<i>lacZ</i>	β -Galactosidase-Gen
LPS	Lipopolysaccharid
LTRs	long terminal repeats

M

MS	Massenspektrometrie
Mb	Megabasen
MDCK	Madin-Darby canine kidney
MHC	major histocompatibility complex
mRNA	Messenger-RNA
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>

N

NA	Neuraminidase
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NP	Nukleoprotein
NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase
NSO-Zellen	Nonsecreting-myeloma-Zellen
nt	Nukleotide
NT	Neutralisationstest

O

ORF	offener Leserahmen
ori	Replikationsursprung
ox	oxidiert

P

Pi	anorganisches Phosphat
PAC	P1-derived artificial chromosom
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBP2a	Penicillin-bindendes Protein 2a
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDB	protein data base
PDGF	platelet derived growth factor (Plättchenwachstumsfaktor)
PDZ-Dömane	Proteininteraktionsdomäne
PEG	Paul-Ehrlich-Gesellschaft

PEP	Phosphoenolpyruvat
pI-Wert	isoelektrischer Punkt
PKS	Polyketidsynthese
PPi	anorganisches Pyrophosphat
Q	
QH ₂	reduziertes Ubichinon
qRT-PCR	quantitative Echtzeit PCR
R	
red	reduziert
RF	Releasing-Faktor
rHBsAg	recombinant hepatitis B surface antigen
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rRNA	ribosomale RNA
S	
S	Svedberg-Einheit
SARS	schweres akutes respiratorisches Syndrom
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyarylamide gel electrophoresis
snRNPs	small nuclear ribonucleoproteins
sp.	species (Art)
SPF	spezifiziert pathogenfrei
SSB	single strand binding
ssp.	subspecies (Unterart)
STIKO	Ständige Impfkommision
SV-40	Simian Virus 40
T	
TB	Tuberkulose
TCDB	transporter classification database
TDP	Thymidindiphosphat
TE	Thioesterase
tRNA	Transfer-RNA
TSE	transmissible spongiforme Enzephalopathie
TTX	Tetrodotoxin
U	
U	Uracil
UDP-NAM-Penta-peptid	Uridindiphosphat- <i>N</i> -Acetylmuramyl-Pentapeptid
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolett
V	
v	Geschwindigkeit
VAPP	vaccine-associated paralytic polyomyelitis

VLP	virus-like particles
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
W	
WHO	World Health Organisation
X	
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
Y	
YAC	yeast artificial chromosome
Z	
ZNS	zentrales Nervensystem

Molekularbiologie

1

Inhaltsvorschau

1962 erhielten Crick, Wilkins und Watson für ihr räumliches Modell der DNA den Nobelpreis für Medizin. Ihre Arbeiten, für die sie den Preis erhielten, hatten sie 1953 veröffentlicht. Man mag dies als Beginn des Zeitalters der Molekularbiologie bezeichnen. Tausende von Verfahren wurden in den kommenden Jahren entwickelt und weltweit etabliert. Die Molekularbiologie wurde zu derjenigen Wissenschaft unserer Zeit, die den höchsten Einfluss auf die Pharmazie, Medizin und Biologie genommen hat. Grundlagen der Molekularbiologie sind die prokaryotische und eukaryotische Genetik. Erneut war es Crick, der 1958 aus der Erkenntnis über genetische Zusammenhänge das zentrale Dogma der Molekularbiologie publizierte, in der er den möglichen Informationsfluss zwischen den Biopolymeren DNA, RNA und Protein beschreibt.

Die ersten Erfolge beim Einsatz molekularbiologischer Arbeitsmethoden traten vor etwa 40 Jahren ein, als es gelang, Restriktionsenzyme und Ligasen im Reagenzglas einzusetzen und dadurch DNA neu zu kombinieren. Unter Einsatz von Vektoren, zunächst Lambda-Vektoren, später Plasmiden, begann man in großem Umfang DNA zu klonieren und zu vervielfältigen. Dabei spielte die Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) eine sehr wichtige Rolle. Bald wurden Genbibliotheken erstellt, die Ausgangsmaterial für tiefgehende Forschungsprojekte waren. Die Weiterentwicklung von Vektoren führte dazu, dass heute für jedes gentechnologische Experiment (z. B. Klonieren eines Gens, Expression eines Gens, Herstellung von cDNA-Banken, Deletion eines Gens, Sequenzierung eines Gens) spezielle Vektoren existieren. Die Etablierung ausgearbeiteter Protokolle und die Bereitstellung von Kits für die Molekularbiologie führten dazu, dass heute weltweit molekularbiologische Arbeitsmethoden fast überall eingesetzt werden.

Die moderne Mikrobiologie kommt ohne die Molekularbiologie nicht mehr aus. Das vorliegende Kapitel gibt eine allgemeine Einführung in Themen der Genetik und in Techniken der Molekularbiologie. Beides ist für das Verständnis mikrobiologischer Zusammenhänge essenziell.

Prokaryotische und eukaryotische Genetik

1.1

Struktur der DNA

1.1.1

Die DNA besteht aus zwei Polynukleotidsträngen. Ein Nukleotid ist aus drei Bausteinen aufgebaut, aus einer Base, einem Zucker und einem Phosphat (● Abb. 1.1). Zucker und Phosphat sind immer abwechselnd miteinander verbunden und bilden das Rückgrat der DNA. Die Basen sind mit den Zuckern N-glykosidisch verknüpft. In der Doppelhelix winden sich zwei Polynukleotidstränge umeinander. Sie werden durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden. Es stehen sich immer eine Purin- und eine Pyrimidinbase gegenüber (A-T oder G-C). Adenin und Thymin sind mit zwei, Guanin und Cytosin mit drei Wasserstoffbrücken verbunden. Folglich ist die A-T-Bindung leichter zu lösen (z. B. durch die Einwirkung von Wärme) als die G-C-Bindung. Die Helix ist nach außen hin aufgrund der Phosphatreste negativ geladen. DNA kommt in drei biologisch aktiven Konformationen in

DNA: Biomolekül das die Erbinformation beinhaltet

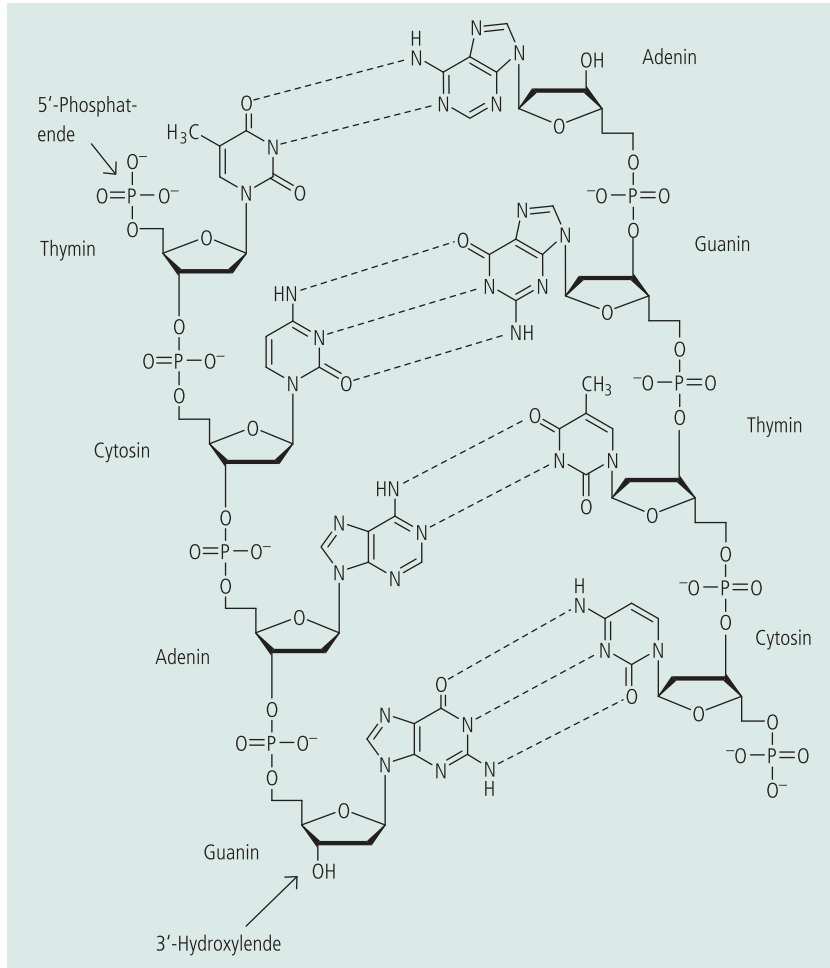
Doppelhelix: Beschreibung für die räumliche Anordnung der DNA

der Zelle vor, der A-, B- und Z-Form. Am häufigsten sind die rechtsdrehenden Formen A und B anzutreffen, die linksdrehende Z-Form findet man vor allem in GC-reichen Sequenzen. Alle drei Formen unterscheiden sich außerdem im Durchmesser, der Anzahl an Basenpaaren pro Windung und den sich daraus ergebenden Parametern.

1.1.2 Chromosom und Topoisomerasen

Um den ganzen DNA-Faden in einer Zelle unterzubringen, muss die DNA »aufgewickelt« werden. Man spricht von Superspiralisierung. In eukaryotischen Zellen spielen Histon-Oktamere bei diesem Prozess eine große Rolle. Einen Komplex aus DNA und Histon-Oktamer nennt man Nukleosom. Ketten aus Nukleosomen bezeichnet man als Filamente, und wie ein Telefonkabel verdrehte Filamente nennt man Fibern. Die meisten Prokaryoten besitzen ein einzelnes, lineares oder zirkuläres Chromosom.

Chromosom:
Zusammenlagerung
von Proteinen und DNA



● **Abb. 1.1** Nukleotide eines DNA-Doppelstranges

Eine wesentliche Rolle bei der Bildung superhelikaler Strukturen spielen Topoisomerasen. Sie werden je nachdem, ob sie Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche katalysieren können, in unterschiedliche Typen eingeteilt. Sie kommen in allen pro- und eukaryotischen Zellen vor. In Bakterien wird die Topoisomerase des Typ 2 als Gyrase bezeichnet. Gyrasen weisen die Fähigkeit auf, doppelsträngige DNA aus einem energiearmen, relaxierten Zustand unter ATP-Verbrauch in einen energiereichen, negativ überspiralisierten Zustand zu überführen. Wie auch andere Topoisomerasen sind sie für die Replikation der DNA und die Transkription essenziell.

Plasmide

Häufig findet man, besonders in prokaryotischen Zellen, extrachromosomale DNA, die, wenn sie zirkulär ist, als Plasmid bezeichnet wird. Diese können bis zu 1000 kb groß sein und in geringer oder großer Kopienzahl in einer Zelle vorkommen. Sie enthalten ein Replikon, das ihre Vermehrung garantiert. Plasmide mit unterschiedlichen Replikons können in einer Zelle nicht miteinander koexistieren (Inkompatibilität). Viele Plasmide enthalten Antibiotika- oder Schwermetall-Resistenzgene. Oft sind sie über Konjugation von Zelle zu Zelle übertragbar.

Merke

Unterschiedliche Plasmide, die das gleiche Replikon aufweisen, können in einer Zelle meist nicht miteinander koexistieren.

1.1.3

Plasmid: meist autonom replizierendes DNA-Molekül



Genomsequenzen

In den letzten Jahren sind weltweit Sequenzier-Technologien entwickelt worden, mit denen sich ganze Genome in kurzer Zeit sequenzieren lassen. Alleine im National Center for Biotechnology Information in den USA sind derzeit 2544 virale Genome, 1412 komplette Bakteriengenome, 17 Pilzgenome, 18 Protozoengenome, 14 Genome von wirbellosen Tieren und neun Genome von Säugern hinterlegt. Dazu kommen zahlreiche sequenzierte Genome aus anderen Datenbanken. Mit modernen Sequenzierern lässt sich ein durchschnittliches Genom eines Bakteriums in einer Woche vollständig sequenzieren. Das Lesen der Daten, das Verstehen und Verarbeiten der Information wird die Herausforderung der kommenden Jahre sein. ■ Tab. 1.1 beschreibt einige Meilensteine der Genomsequenzierung.

1.1.4

Genom: Gesamtheit der DNA einer Zelle

DNA-Replikation

1959 erhielten S. Ochoa und A. Kornberg den Nobelpreis für Physiologie und Medizin für ihre Entdeckung der biologischen Synthese von DNA und RNA. 1956 hatte Kornberg die DNA-Polymerase I aus *Escherichia coli* isoliert. DNA wird durch DNA-Polymerasen (Polymerase III und I) repliziert. Dabei werden an einen bestehenden Strang vom 5' - zum 3' -Ende des neuen Strangs Nukleotide angeknüpft. Da ganz am Anfang der Replikation kein Strang als Ansatzpunkt für die DNA-Polymerase vorhanden ist, werden von Primasen kleine RNA-Stückchen (Okazaki-Frag-

1.1.5

Replikation: Vorgang der Vervielfältigung der DNA

■ **Tab. 1.1** Die Geschichte der Genomsequenzierung

Jahr	Organismus, dessen Genom veröffentlicht wird (Mbp)
1977	Bakteriophage Phi X 174 (0,006)
1982	Bakteriophage λ (0,005)
1984	HIV (9000 b)
1990	HCV (9500 bp)
1990	Beginn des Humangenomprojekts (HUGO)
1993	Variola (0,186)
1995	<i>Haemophilus influenzae</i> (1,8)
1996	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (12)
1997	<i>Escherichia coli</i> (5)
1998	<i>Caenorhabditis elegans</i> (97)
2000/2001	Das menschliche Genom wird veröffentlicht (3200)
2000	<i>Arabidopsis thaliana</i> (125), <i>Drosophila melanogaster</i> (117)
2001	<i>Fugu rubripes</i> (400)
2001/2002	<i>Streptomyces avermitilis</i> (9) und <i>Streptomyces coelicolor</i> (9)
2007	<i>Sorangium cellulosum</i> (13)

mente, Initiator-RNA, iRNA) synthetisiert, die als Startpunkt für die Replikation dienen (● Abb. 1.2). Die RNA-Fragmente werden wieder entfernt.

Um die DNA überhaupt verdoppeln zu können muss der Doppelstrang an einer Stelle geöffnet werden. Diese Stelle nennt sich » ori C« (origin of replication) und besteht aus einer konservierten Sequenz, d. h. die Basenabfolge ist in vielen Organismen gleich.

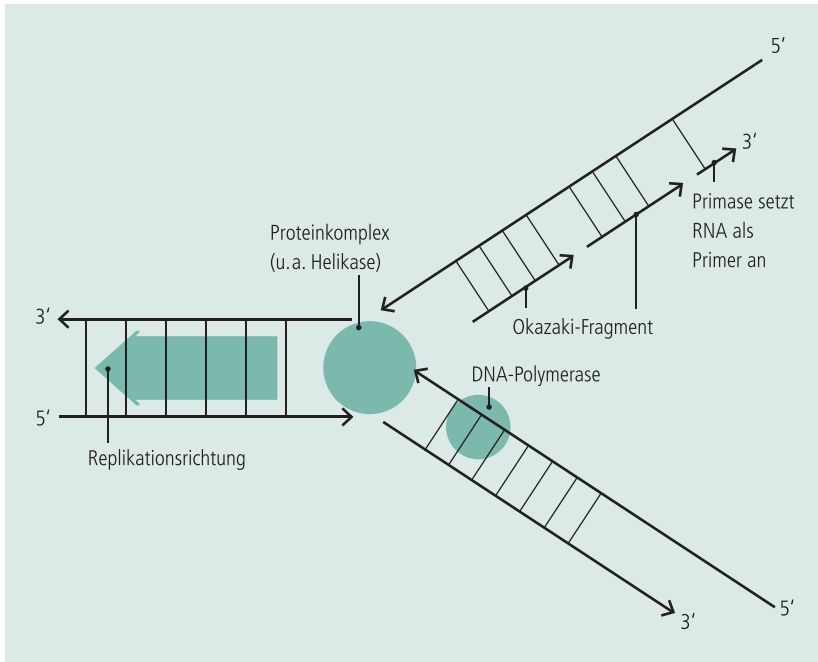
Die drei Phasen der Replikation

Die Replikation verläuft in den Organismen sehr ähnlich. Gut untersucht ist die Replikation in *Escherichia coli*, auf die im Folgenden genauer eingegangen wird.

Die Replikation lässt sich in drei Phasen untergliedern, die Initiationsphase, die Elongationsphase und die Terminationsphase. Gelegentlich wird die Elongationsphase noch in Elongations- und Interphase unterteilt.

Initiationsphase: Um die meist verdrillt vorliegende DNA zu entwinden, wird zunächst eine Topoisomerase benötigt. Diese führt kontrollierte Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche durch, entwindet die DNA und fügt die Stränge dann wieder zusammen. Bei Eukaryoten müssen zusätzlich Histon-Proteine und andere Proteine entfernt werden, bevor die Replikation beginnt. Der Replikationsursprung ist Ausgangspunkt für die Initiationsphase. Er besteht aus einer konservierten Sequenz, die von an der Replikation beteiligten Enzymen erkannt wird. Initiationsproteine (DnaA) lagern sich an die DNA an, weitere Proteine (IHf, FIS) helfen bei der Aus-

Wichtige Enzyme der Replikation:
Topoisomerasen,
Initiationsproteine,
Helikasen, SSB-Proteine,
DNA-Polymerasen,
RNAseH, Ligasen



● **Abb. 1.2** Replikationsgabel. Für die Verdopplung von DNA wird die doppelsträngige DNA mithilfe einiger Enzyme in beide Einzelstränge aufgetrennt. Die Synthese der DNA mittels DNA-Polymerase findet von 5' nach 3' (bezogen auf den neu synthetisierten Strang) statt. Okazaki-Fragmente werden benötigt um die Synthese der DNA an dem Strang, der in entgegengesetzter Richtung zur Replikationsrichtung synthetisiert werden muss, zu ermöglichen.

bildung einer haarnadelähnlichen Struktur der DNA. Die Entwindung der DNA erfolgt dann mit einer Helikase (DnaB), deren Funktion von einem weiteren Protein (DnaC) gesteuert wird. Es entstehen zwei separierte Einzelstränge, die durch SSB-Proteine voneinander getrennt gehalten werden und die beide als Matrize für die Replikation dienen. Die Helikase sorgt dafür, dass kontinuierlich einzelsträngige DNA-Stränge entstehen. Vor der eigentlichen DNA-Synthese werden RNA-Primer bereitgestellt, die von der DNA-Polymerase benötigt werden.

Elongationsphase und Interphase: In der Elongationsphase werden nun von der DNA-Polymerase die komplementären Einzelstränge synthetisiert. Die Synthese findet an beiden Strängen statt, am Leitstrang und am Folgestrang. Da die DNA immer von 5' nach 3' synthetisiert wird, ist nur die Synthese am Leitstrang kontinuierlich möglich. Die Synthese am Folgestrang erfolgt mit Unterbrechungen, da die Synthese in entgegengesetzter Richtung zur Helikase verläuft. Die Arbeiten zur Synthese der DNA am Folgestrang werden durch eine RNase H (entfernt die RNA-Primer), eine DNA-Polymerase (schließt entstandene Lücken) und eine Ligase (knüpft die letzte Bindung zwischen zwei Strängen) unterstützt.

In der Interphase werden beide Stränge komplementär angeordnet und zusammengefügt.

Terminationsphase: Die Termination der Replikation kann durch Terminationssequenzen angezeigt werden. An diese Sequenzen können Proteine wie das Protein Tu binden, die dann die Funktion der Helikase beeinträchtigen. Aber auch das Aufeinander-Zulaufen zweier Replikationsgabeln führt letztendlich zum Abbruch der Replikation.

Merke

DNA- und RNA-Polymerasen lesen die DNA bzw. RNA von von 3' nach 5', folglich synthetisieren sie die DNA bzw. die RNA von 5' nach 3'.

1.1.6 Transkription

47 Jahre nach seinem Vater erhielt R. D. Kornberg ebenfalls den Nobelpreis für Medizin. Er erhielt diesen Preis für seine Arbeiten zur Aufklärung der eukaryotischen Transkription. Die genetische Information, die sich in der DNA verbirgt, wird letztendlich für die Synthese von Enzymen benötigt. In den meisten Fällen wird DNA zunächst in Messenger-RNA (mRNA) übersetzt. Dieser Prozess, der durch RNA-Polymerasen katalysiert wird, wird als Transkription bezeichnet. Statt Desoxynucleotiden werden Nucleotide eingebaut, die statt Desoxyribose Ribose als Strukturelement aufweisen. Statt Thymin wird Uracil eingebaut. Auch die RNA-Polymerase arbeitet von 3' nach 5', folglich synthetisiert sie die RNA von 5' nach 3' (● Abb. 1.3).

Die RNA-Polymerase benötigt einen Promoter, eine Erkennungssequenz, die vor einem Gen oder Operon liegt. Man unterscheidet:

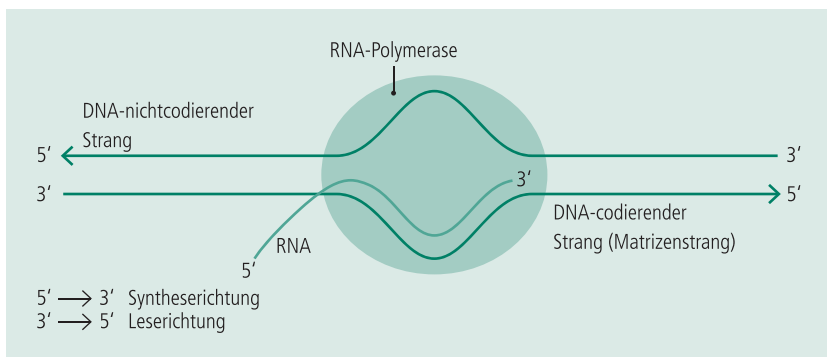
- konstitutive Promotoren, die zu einer konstanten Transkription führen,
- induzierbare Promotoren und
- reprimierbare Promotoren.

Das Ende der Transkription wird durch Terminatoren festgelegt.

Transkription: Umschreibung der DNA in mRNA

Promoter: für die Transkription essenzieller DNA-Bereich, an den die RNA-Polymerase bindet; Operon: Organisationseinheit von Genen

Terminator: DNA-Bereich, der das Ende der Transkription bewirkt



● **Abb. 1.3** Transkription. Die Biosynthese der RNA erfolgt mithilfe einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase. Die RNA-Polymerase benötigt den codierenden DNA-Strang als Matrize für die Synthese der mRNA.



● **Abb. 1.4** RNA-Sequenz vor dem Spleißvorgang. Die »fettgedruckten« Basen sind häufig konserviert. Gespalten wird die RNA in den mit ---- gekennzeichneten Bereichen. Mit CCCUUU ist ein pyridinhaltiger Bereich gekennzeichnet, der oft konserviert ist. N steht für eine beliebige Base.

RNA-Synthese bei eukaryotischen Mikroorganismen

Der Vorgang der Transkription ist bei prokaryotischen und eukaryotischen Zellen ähnlich, Unterschiede finden sich vor allem in der Regulation und in der Modifikation der mRNA. Bei Prokaryoten findet man Operatoren, bei Eukaryoten Enhancer oder Silencer, die die Transkription steuern. Eukaryotische mRNA wird nach der Synthese mit einer Cap-Struktur versehen, am 3'-Ende polyadenyliert und anschließend gespleißt.

Unter Spleißen versteht man das Entfernen von Introns und das Verbinden der Exons miteinander. Das Spleißen findet an definierten, oft konservierten Stellen der RNA statt. Introns beginnen fast immer mit der Nukleotid-Sequenz GU und enden fast immer mit AG (in 5'-3'-Richtung). Einige andere wichtige Nukleotide in der Nähe der Spleiß-Stellen sind weniger gut konserviert. Die Verzweigungsstelle (branch site) liegt etwa 20–50 Basen stromaufwärts der Akzeptorstelle und hat die Konsensus-Sequenz CU(A/G) A (C/U). Als Spleiß-Donor wird das 5'-Ende des Introns bezeichnet, während der Spleiß-Akzeptor vom 3'-Ende des Introns gebildet wird. Für das RNA-Spleißen wird ein Spleißosom gebildet, das an die Spleiß-Stellen bindet und die Exons zusammenbringt. Die mRNA wird am 5'-Ende an einem konservierten GU in der ersten Spleißstelle gespalten. Über das G wird dann der erste Teil des Introns auf die 2'-OH-Gruppe eines Adenosins übertragen. Eine zweite Spleißstelle liegt hinter einem konservierten AG vor dem 2. Exon (● Abb. 1.4). Nach dem 2. Spaltvorgang wird dann Exon I mit Exon II fusioniert. Katalysiert wird der Spleißvorgang u. a. durch snRNPs (small nuclear ribonucleoproteins).

Es ist anzumerken, dass das Vorkommen von Introns nicht nur auf Eukaryoten begrenzt ist. Auch in Bakteriophagen und Cyanobakterien sind Introns gefunden worden.

Ribozyme

Für die Entdeckung der Ribozyme wurden S. Altman und T. R. Cech 1989 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle. In jeder Zelle kommen zahlreiche Ribozyme vor, am bekanntesten sind:

- Ribozyme, die die Verknüpfung von Peptidbindungen katalysieren,
- Ribozyme, die virale RNA modifizieren oder
- Ribozyme, die am Spleißvorgang beteiligt sind.

Operator: DNA-Bereich auf einem Operon, an den ein Regulationsprotein binden kann;
 Enhancer und Silencer: DNA-Bereich, die bei Eukaryoten die Anlagerung von RNA-Polymerasen beeinflussen;
 Spleißen: Vorgang bei Eukaryoten, bei dem aus prä-mRNA mRNA gebildet wird

Ribozyme: katalytische RNA-Moleküle

1.1.7 Translation

Die mRNA ist die Matrize für die Synthese von Enzymen und Proteinen. Diese Synthese findet an den Ribosomen statt. Ribosomen selbst bestehen aus ribosomaler RNA und Proteinen. V. Ramakrishnan, T. A. Steitz und A. Yonath erhielten 2009 für die Aufklärung der gesamten Struktur des Ribosoms den Nobelpreis. Eine wichtige Rolle bei der Übersetzung des genetischen Codes in das Protein spielen Transfer-RNAs (tRNAs, ● Abb. 1.5). Für die Bindung der mRNA an das Ribosom ist eine spezielle Sequenz, die Ribosomenbindestelle (Shine-Dalgarno-Sequenz), essenziell. Der Translationsstart wird durch das Startcodon angegeben. Das Ende der Translation wird durch ein Stoppcodon angezeigt.

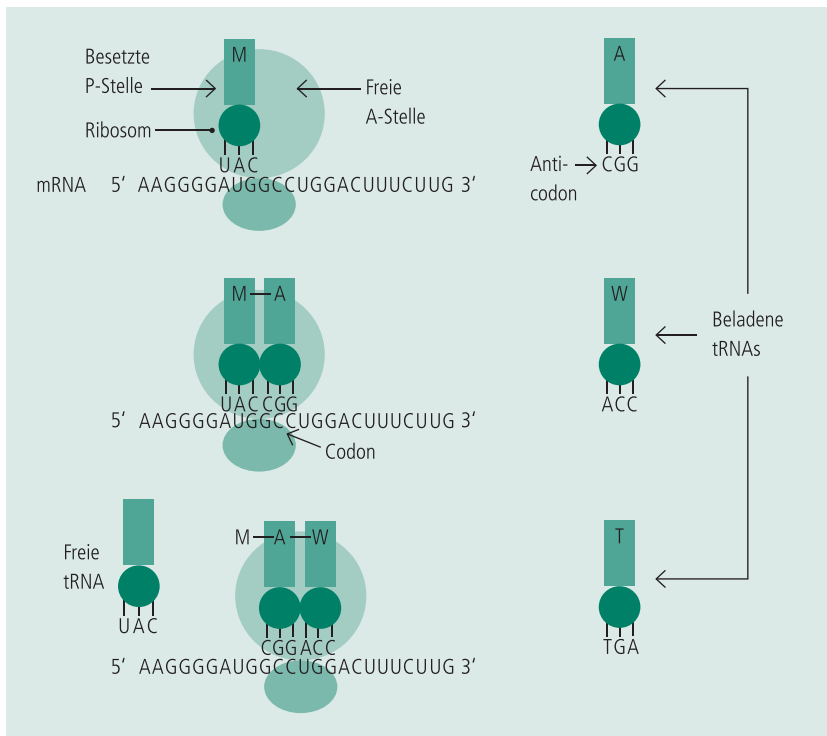
Translation: Proteinbiosynthese

Für die Translation essenzielle Enzyme: Initiations-, Elongations-, Terminations- und Ribosom-Recycling-Faktoren

tRNA: kleine RNA-Moleküle, die Aminosäuren an die Ribosomen transportieren

Die verschiedenen Phasen der Translation

Die Translation lässt sich in verschiedene Phasen einteilen: die Initiationsphase, die Elongationsphase und die Terminationsphase. Vorgänge innerhalb dieser drei Phasen werden durch hoch spezialisierte Enzyme katalysiert. Die Synthese von tRNA-



● **Abb. 1.5** Elongationsphase der Translation. Die Biosynthese von Proteinen findet am Ribosom statt. Mit Aminosäuren beladene tRNAs gelangen in der Elongationsphase zur A-Stelle. Die zuvor gebundene Aminosäure (hier Methionin, M) wird über eine Peptidbindung an die zweite Aminosäure (hier Alanin, A) gebunden. In der Translokation werden die unbeladene tRNA zur E-Stelle (nicht eingezeichnet) und die nun zwei Aminosäuren tragende tRNA zur P-Stelle verschoben. Anschließend gelangt die nächste mit einer Aminosäure (hier Tryptophan, T) beladene tRNA an die A-Stelle.

Molekülen ist ebenfalls Bestandteil des Translationsvorgangs, genau wie posttranslationale Veränderungen der Proteine und Enzyme, welche die Synthese der Eiweißmoleküle abschließen.

Aminoacyl-tRNA-Synthese: tRNA-Moleküle weisen die Form eines Kleeblatts auf und besitzen ein Anticodon, das an das komplementäre Codon der mRNA binden kann. Am 3'-Ende werden tRNAs, katalysiert durch Aminoacyl-tRNA-Synthetasen unter ATP-Verbrauch mit Aminosäuren beladen. Für alle Aminosäuren gibt es mehr als eine tRNA. Die Anzahl an tRNA-Molekülen pro Organismus variiert, ebenso variiert die Konzentration der einzelnen tRNA-Moleküle. Da die Paarung zwischen Codon und Anticodon auch dann funktionieren kann, wenn die Basen an der dritten Position nicht zur Basenpaarung nach der Watson-Crick-Regel befähigt sind, reichen weniger als 61 tRNAs aus, um die 61 möglichen Codons (UAA, UAG und UGA nicht einberechnet) zu bedienen. Außerdem enthalten tRNAs auch seltene Basen im Anticodon (z. B. Inosin), die mit verschiedenen Basen interagieren können. In der Praxis beobachtet man jedoch, dass nicht jede mRNA in jedem Organismus in ein aktives Protein überführt werden kann. Dies spielt besonders bei der biotechnologischen Herstellung von Proteinen eine große Rolle.

Initiationsphase: Die eigentliche Synthese der Proteine und Enzyme beginnt mit der Initiationsphase. Die Initiationsfaktoren IF1–IF3, mRNA mit der Ribosomenbindestelle, die kleinere 30S-Untereinheit der Ribosomen, eine mit *N*-Formyl-Methionin beladene tRNA und GTP werden benötigt, um den Translationsprozess zu initiieren. Die kleine Untereinheit nimmt regulative Funktionen wahr: Sie bindet die mRNA, erkennt das Startsignal für die Proteinsynthese und führt die Decodierung der genetischen Information durch. Erst wenn sich eine mRNA als Abschrift eines Gens, mehrere Proteine (Initiationsfaktoren) sowie eine mit der modifizierten Aminosäure *N*-Formyl-Methionin beladene tRNA an die 30S-Untereinheit des Ribosoms angelagert haben, bindet auch die 50S-Untereinheit unter Bildung des 70S-Initiationskomplexes.

Svedberg-Konstante: Ribosomen haben einen Sedimentationskoeffizienten von 70S (S = Svedberg-Konstante). In Anwesenheit von Magnesium zerfällt das Ribosom in eine 50S- und eine 30S-Untereinheit.

Elongationsphase: Nach Abdissoziation der Initiationsfaktoren und Anlagerung der 50S-Untereinheit wird nun in der Elongationsphase das Protein gebildet. Benötigt werden ein Elongationsfaktor EF-Tu, GTP, beladene tRNAs (ternärer Komplex, der für die Bereitstellung der Aminosäuren verantwortlich ist), ein Elongationsfaktor EF-G und GTP (beide sind für die Bewegung des Ribosoms an der mRNA verantwortlich) und die Peptidyltransferaseaktivität des Ribosoms, die die Peptidbindung knüpft.

Nach Assoziation der 50S-Untereinheit, die das enzymatische Zentrum für die Bildung der Peptidbindung enthält, kann die Proteinsynthese beginnen. Die tRNAs übernehmen die Rolle eines Adapters, der

- einerseits ein zu dem jeweiligen Codon der mRNA komplementäres Anticodon trägt und
- andererseits an einer weiteren Bindungsstelle die dazu passende Aminosäure.

Das vollständige Ribosom weist drei funktionelle Bindungsbereiche für tRNA-Moleküle auf:

- den als P-Stelle bezeichneten Bereich, an dem sich zuerst die *N*-Formyl-Methionin-tRNA und später jeweils die Peptidyl-tRNA mit der verlängerten Peptidkette anlagert,
- die A-Stelle, an der alle neu eintretenden Aminoacyl-tRNAs binden sowie
- die E-Stelle (exit), an der nach Abspaltung der wachsenden Peptidkette vorübergehend freie tRNA gebunden ist, bevor sie das Ribosom verlässt.

Liegt der funktionsfähige 70S-Initiationskomplex mit korrekt positionierter mRNA vor, tritt die Proteinbiosynthese in die Elongationsphase ein. Bei diesem repetitiven Reaktionszyklus wird schrittweise die durch Basen-Triplets (Codons) vorgegebene genetische Information unter Beteiligung von Elongationsfaktoren und Aminoacyl-tRNAs in eine Aminosäureabfolge umgesetzt. Zentrale Reaktion ist dabei die Knüpfung von Peptidbindungen durch die enzymatische Aktivität einer Peptidyl-Transferase, bei der es sich um Teile des 23S-rRNA-Moleküls handelt. Die 23S-rRNA besteht aus über 100 individuellen Helices, die wiederum in sechs verschiedene Domänen eingeteilt sind. Aufgrund der Sekundärstruktur der ribosomalen RNA liegen alle für die Peptidyl-Transferase-Aktivität relevanten Nukleotide in einem als Domäne V bezeichneten Bereich.

Terminationsphase: Die Termination tritt ein, wenn ein Stopcodon in der A-Stelle erscheint. Releasing-Faktoren (RF1–RF3) und ein Ribosom-Recycling-Faktor katalysieren die Trennung der Untereinheiten und somit das Ende der Translation.

Co- und posttranslationale Modifikationen: Unter cotranslationalen Modifikationen versteht man den Einbau von Selenocystein und Pyrrolysin in ein Protein. Dies wird durch spezifische tRNA-Moleküle ermöglicht, die ein Stopcodon für den Einbau verwenden.

Posttranslationale Veränderungen sind u. a. die Verkürzung von Proteinen, die Einführung von Disulfidbrücken, Glykosilierung, Methylierung und Acetylierung. Letztendlich beeinflussen derartige Modifikationen auch die Faltung und die Stabilität eines Proteins.

Merke

Ein Dogma der Genetik ist, dass die DNA mittels Transkription in mRNA übersetzt wird. Die mRNA dient am Ribosom als Matrize für die Biosynthese der Proteine (Translation).

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie

1958 publizierte F. Crick, ein »Dogma« der Molekularbiologie, das den möglichen Informationsfluss zwischen DNA, RNA und Proteinen beschreibt. Crick erklärte zu einem späteren Zeitpunkt, dass sein »Dogma« eigentlich als »Hypothese« gemeint war. 1970 spezifizierte Crick seine »Theorie« und definierte drei Übertragungsarten der Information:

- die allgemeinen Übertragungsarten (Replikation, Transkription und Translation),
- die speziellen Übertragungsarten (RNA-Replikation, die Synthese der DNA aus RNA und die direkte Synthese von Protein aus DNA) und
- die unbekanntes Übertragungsarten (die Synthese von DNA, RNA und Proteinen) aus Proteinen.

Kritiker weisen jedoch darauf hin, dass auch die Erklärungen von 1970 unzureichend sind. Angeführt werden Prionen, die als Proteine über Protein-Protein-Wechselwirkungen Informationen an andere Proteine weitergeben können, und Feedbackmechanismen, über die Proteine z. B. die Transkription eines Gens regulieren können. Trotz aller Kritik wird das »Dogma« von F. Crick auch heute noch gerne in der Lehre den Studenten vermittelt.

Der genetische Code

Der Ablauf der Proteinbiosynthese zeigt, dass man einem mRNA-Triplett (Codon) ein komplementäres Anticodon auf der tRNA zuordnen kann und dass sich daraus dann die Aminosäure ergibt, die in ein Protein eingebaut wird. Für fast alle Aminosäuren codieren mehrere Triplets, dies bezeichnet man als Redundanz (Degeneration) des genetischen Codes. Für die Triplets UAG, UGA und UAA codiert keine Aminosäure, diese Triplets bezeichnet man als Stopcodons. Startcodons sind AUG, GUG und UUG (■ Tab. 1.2).


Der genetische Code ist hochkonserviert, er kommt in fast allen Organismen in identischer Form vor. Unterschiede ergeben sich jedoch daraus, wie häufig ein bestimmtes Codon in einem Organismus verwendet wird, oder besser: verwendet werden kann. Die Expression eines Gens, das einen hohen GC-Gehalt (ca. 80 %) hat, in *Escherichia coli* (GC-Gehalt in *E. coli* etwa 50 %) kann eingeschränkt sein, weil *E. coli* die eine oder andere tRNA nicht in ausreichender Konzentration bilden kann, um beispielsweise alle GC-reichen Triplets zu bedienen. Die Folge ist, dass das Protein entweder nur in geringen Mengen produziert wird oder dass die Proteinbiosynthese nicht vollständig abläuft.

Genetischer Code: drei aufeinanderfolgende Basen (Triplett, Codon), die bei der Translation zusammen in eine Aminosäure übersetzt werden

■ **Tab. 1.2** Der genetische Code

	U		C		A		G	
U	UUU	Phenylalanin	UCU	Serin	UAU	Tyrosin	UGU	Cystein
	UUC	Phenylalanin	UCC	Serin	UAC	Tyrosin	UGC	Cystein
	UUA	Leucin	UCA	Serin	UAA	STOP	UGA	STOP
	UUG	Leucin	UCG	Serin	UAG	STOP	UGG	Tryptophan
C	CUU	Leucin	CCU	Prolin	CAU	Histidin	CGU	Arginin
	CUC	Leucin	CCC	Prolin	CAC	Histidin	CGC	Arginin
	CUA	Leucin	CCA	Prolin	CAA	Glutamin	CGA	Arginin
	CUG	Leucin	CCG	Prolin	CAG	Glutamin	CGG	Arginin
A	AUU	Isoleucin	ACU	Threonin	AAU	Asparagin	AGU	Serin
	AUC	Isoleucin	ACC	Threonin	AAC	Asparagin	AGC	Serin
	AUA	Isoleucin	ACA	Threonin	AAA	Lysin	AGA	Arginin
	AUG	Methionin	ACG	Threonin	AAG	Lysin	AGG	Arginin
G	GUU	Valin	GCU	Alanin	GAU	Asparaginsäure	GGU	Glycin
	GUC	Valin	GCC	Alanin	GAC	Asparaginsäure	GGC	Glycin
	GUA	Valin	GCA	Alanin	GAA	Asparaginsäure	GGA	Glycin
	GUG	Valin	GCG	Alanin	GAG	Asparaginsäure	GGG	Glycin

1.1.8 Aufbau eines prokaryotischen Gens

Ein typisches prokaryotisches Gen ist in  Abb. 1.6 dargestellt. Vor dem eigentlichen Strukturgen kann ein Promotor liegen, an den die RNA-Polymerase binden kann, um die Transkription zu katalysieren. Hinter einer Ribosomenbindestelle folgt dann ein Translationsstartcodon, das Ende des zu translatierenden Bereichs wird durch ein Stopcodon angezeigt. Terminatoren (Haarnadelschleifen) können das Transkriptionsende bewirken.

Eukaryotische Gene unterscheiden sich von prokaryotischen Genen darin, dass sie meist zwischen den codierenden Bereichen (Exon) eines Genes Bereiche enthalten, deren Informationen nicht in Proteine übersetzt werden (Intron, → Kap. 1.1.6).

Merke

- Promotoren sind Sequenzabschnitte, an denen die RNA-Polymerase bindet, um die Transkription eines Gens zu ermöglichen.
- Prokaryotische und eukaryotische Gene unterscheiden sich in ihrem Aufbau. Eukaryotische Gene enthalten Introns, deren Sequenz nicht in Protein übersetzt wird.

```

A C T T A A A A A T T T C A G T T G C T T A A T C C T A C A A T T C T T G A T A T A A T A T T C T C
A T C C C G G G C C C G G G C A C A C A G G A A A C A G C T A T G G C A A G A T C A C G T G G A G
A G C G G A C G C C G G C G G C T C G G C G G A T C A C C T C A C G C A A C G C T C G T T T C C A G
C A G T G G C A G G C A C T A A C G C C G C G A C C G C G A T C C T C T A C G A A G C G G T A C G G
C A G C G G A T C A G C G G A A G A A C C G C A A C A A C T C C C T G A G C A G C C G G G G G T A
G T T G T A C C T G G C C A T A A A C C G A T A C A A T T A A A G G C T C C T T T T G G A G C C T
T T T T T T T T G G A G A C C T A T A C C T T

```

• **Abb. 1.6** Aufbau eines prokaryotischen Gens. Dargestellt ist nur ein Strang der DNA. 5' vor dem eigentlichen Gen liegt der Promoter mit einer meist AT-reichen Sequenz um die Position -43 und mit konservierten Basen in den Regionen um die Position -35 und -10 (Pribnow-Box). Der Transkriptionsstartpunkt liegt bei +1 (**A**). Es folgt die Shine-Dalgarno-Sequenz (Ribosomenbindestelle, **AGGAAA**) und das Translationsstartcodon (**ATG**). Das Translationsstopcodon (**TGA**) zeigt das Ende des in Protein übersetzten Bereichs an, der Terminator stromabwärts des TGA-Codons beendet die Transkription.

Gensequenzen zur Aufklärung verwandtschaftlicher Beziehungen der Organismen

1.1.9

Die Sequenzen der Gene, die für rRNAs codieren, werden zur Aufklärung von verwandtschaftlichen Beziehungen der Organismen herangezogen. rRNA gehört zur Grundausstattung einer jeden Zelle. Man vermutet, dass ribosomale RNA schon bei ersten lebenden Organismen eine Rolle spielte und dass rRNA-Gene fast nie über horizontalen Gentransfer weitergegeben werden. Somit spiegelt die Sequenz der rRNA-Gene die Entwicklungsgeschichte eines gesamten Organismus wider. Sie gelten als ideale »molekulare Chronometer«, mit deren Hilfe sich verwandtschaftliche Beziehungen rekonstruieren lassen. In der Phylogenie vergleicht man die Sequenz der rRNA-Gene. Verwandtschaft und Abstammung von Organismen kann man in Stammbäumen grafisch darstellen.

Phylogenie: Evolutionsgeschichte (Stammesgeschichte) der Lebewesen

Merke

rRNAs gelten als ideale »molekulare Chronometer«, mit deren Hilfe sich verwandtschaftliche Beziehungen rekonstruieren lassen.



Mutationen

1.1.10

Mutationen treten mit einer Häufigkeit von 10^{-9} – 10^{-10} pro Basenpaar und Generation auf. Diese Mutationen entstehen natürlicherweise durch photochemische Reaktionen oder Fehler bei der Replikation. Außerdem können chemische Substanzen (Ethidiumbromid, Akridinorange, oxidative Säuren, Basenanaloga) Mutationen erzeugen. Allgemein können einzelne Basen verändert werden, es können aber auch ganze DNA-Abschnitte entfernt (Deletion) oder zusätzlich eingefügt werden (Insertion). Es gibt sehr viele durch Mutationen entstandene Krankheiten; schon lange bekannt ist z. B. die Sichelzellenanämie, die in Verbindung mit Malaria in → Kap. 8.2.1 diskutiert wird.

Mutation: dauerhafte Erbgutveränderung

1.1.11 DNA-Reparatur

Der Körper ist täglich einer Vielzahl von Einflüssen ausgesetzt, die zu Mutationen führen. Ohne ein funktionsfähiges DNA-Reparatursystem wäre das Leben auf der Erde kaum entstanden. Am besten untersucht ist das Reparatursystem von *Escherichia coli*. Es sind Enzyme bekannt, die Fehlbasenpaarungen korrigieren (DnaQ, MutH, MuS, MutL, Dam, Vsr, Ung, MutY), alkylierte Basen entfernen (Ada, AlkA, AlkB), oxidative Schäden beseitigen (MutT, MutM) und Strahlenschäden reparieren (PhrB, UvrA, UvrB, UvrC, UvrD, PolII, DinB, UmuC und UmuD). Dabei ist die Korrekturlesefunktion von DNA-Polymerasen (DnaQ, PolII, DinB, UmuC und UmuD) oft essenziell.

1.1.12 Rekombinationen

Rekombination:
Neuanordnung von
genetischem Material

Die Rekombination nimmt eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung von Leben ein, denn bei der Verschmelzung von Eizelle und Samenzelle kommt es zu Rekombinationsereignissen, die das ganze Genom betreffen. Dabei versteht man unter Rekombination eine Neuverknüpfung von DNA.

Homologe Rekombination: Die homologe Rekombination ist ein natürliches Ereignis, bei dem DNA-Abschnitte, die an einem bestimmten Bereich identische oder ähnliche DNA-Abschnitte aufweisen, neu kombiniert werden. Beteiligt an diesen Vorgängen sind die sog. Rec-Proteine. Bei Bakterien ist die homologe Rekombination sicher die Basis dafür, dass DNA, die über den horizontalen Gentransfer aufgenommen wird, ins Genom eingebaut wird. Aber auch Mikrobiologen machen es sich bei der Generierung von Mutanten zunutze, dass Bakterien zur homologen Rekombination in der Lage sind.

Nichthomologe Rekombination: Bei den nichthomologen Rekombinationsvorgängen wird DNA an bestimmte Positionen im Genom eines Wirtes (attachment site) integriert, sie muss keine identische oder ähnliche DNA zur DNA des Wirtes haben. Beteiligt sind an diesem Prozess Integrasen. Auch diese Art der Rekombination wird von Mikrobiologen genutzt, um DNA in das Genom eines Wirtes hineinzubringen. Ortschaftspezifische Rekombinasen wurden ursprünglich in Hefen und Phagen gefunden. Hierbei verlaufen die Rekombinationen über kurze Erkennungsstellen. Bekannte Rekombinasen dieses Typs sind die Enzyme Cre, Flp und Dre.

1.1.13 Transformation, Konjugation, Transduktion und Transfektion

Die Übertragung von DNA ist in der Natur weit verbreitet. Nachgewiesen ist, dass Bakterien untereinander, aber auch Prokaryoten und Eukaryoten DNA austauschen. Die Übertragung freier DNA wird als Transformation bezeichnet, die Übertragung von DNA zwischen zwei Zellen als Konjugation und der Transfer durch Phagen als Transduktion.

Transformation: Unter Transformation versteht man die Übertragung von DNA durch die Zellwand eines Bakteriums, ohne dass dabei zwei Zellen miteinander in

Kontakt treten. Im Labor wird vor allem die Transformation eingesetzt, um DNA in einen Organismus einzuschleusen.

Konjugation: Unter Konjugation versteht man einen Prozess, bei dem Bakterien Gene untereinander austauschen. Die Übertragung der DNA erfolgt über Pili, durch die DNA von einem Bakterium zum anderen gelangen kann.

Transduktion: Die Übertragung von DNA eines Bakteriums in ein anderes mittels Phagen wird als Transduktion bezeichnet.

Transfektion: Die Übertragung proteinfreier DNA in eine Zelle wird als Transfektion bezeichnet. Zur Abgrenzung von der Transformation wird der Begriff »Transfektion« häufig nur für die Aufnahme von DNA durch eukaryotische Zellen verwendet.

Molekularbiologische Arbeitsmethoden

1.2

Vervielfältigung von DNA mittels Polymerasekettenreaktion

1.2.1

1993 erhielten Michael Smith und K. B. Mullis den Nobelpreis für Chemie für ihre Entwicklung der PCR zur Vervielfältigung von DNA. Sie hatten gezeigt, dass man in geringster Konzentration vorkommende DNA-Mengen nachweisen kann, wenn man geeignete Primer, Desoxynukleotide, einen geeigneten Magnesium- und ATP-haltigen Puffer und eine DNA-Polymerase I zur Verfügung hat. Maßgebend für eine erfolgreiche Reaktion ist, dass Denaturierungs-, Annealings- und Elongations-schritte hintereinandergeschaltet werden, um die Trennung von doppelsträngiger DNA (Denaturierung, ca. 94 °C), das Anlagern von Primern (Annealing, 55–65 °C) und die Reaktion der Polymerase (Elongation, 72 °C) zu ermöglichen. Während die klassische PCR der reinen Vervielfältigung von DNA dient, wurden die quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) entwickelt, um die Expressionsrate eines Gens zu ermitteln, die Multiplex-PCR zur Identifizierung komplexer Erbkrankheiten, die immunoquantitative Echtzeit-PCR (iRT-PCR) zur Aufspürung von geringsten Mengen eines Pathogens und die Nested-PCR zur Vervielfältigung aller kleinster Mengen DNA.

PCR: molekularbiologische Technik zur Vervielfältigung von DNA