

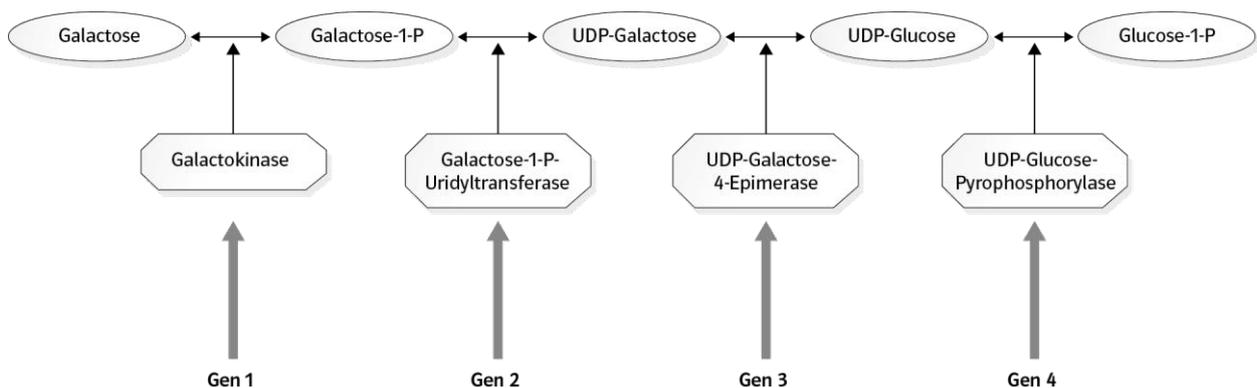
# Galactosämie

Die klassische Galactosämie ist eine seltene erbliche Störung im Stoffwechsel, bei der sich zu viel Galactose-1-phosphat in den Roten Blutzellen, der Leber, dem Gehirn und der Niere anreichert. Ausgelöst wird diese Stoffwechselerkrankung durch eine Mutation des Gens für das Enzym Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase (GALT). Das Gen für das Enzym GALT liegt auf dem Chromosom 9. Weltweit tritt die Erkrankung bei einem von 40 000 Neugeborenen auf. In Deutschland werden alle Neugeborenen im Rahmen des Neugeborenen-Screenings mithilfe eines Bluttests auf Galactosämie getestet.



1 Neugeborenen-Screening

Säuglinge mit Galactosämie leiden an einer Trinkschwäche und nehmen infolgedessen kaum an Gewicht zu. Begleitet wird die Krankheit durch Übelkeit, Erbrechen und eine Gelbsucht. Im späteren Verlauf kommt es bei weiterem Milchkonsum zu schweren Leberfunktionsstörungen, Leberschäden und einem Leberkoma, in dem die betroffenen Kinder schließlich versterben. Durch die Ablagerung von Galactose-1-phosphat in den Nervenzellen des Gehirns kommt es außerdem zu geistigen Entwicklungsstörungen. Bei der klassischen Galactosämie handelt es sich um eine chronische Erkrankung und die Betroffenen müssen lebenslang Diät halten. Sie dürfen keine galactose-, aber auch keine lactosehaltigen Lebensmittel konsumieren, da bei der Spaltung von Lactose Galactose entsteht.



2 Galactoseabbau

- 1 Erläutern Sie das Prinzip einer Genwirkkette am Beispiel des Abbaus von Galactose zu Glucose-1-phosphat bei einem gesunden Neugeborenen.
- 2 Fassen Sie zusammen, wie es ausgehend von der genetischen Ursache zum Krankheitsbild der Galactosämie kommt.
- 3 Begründen Sie mithilfe der Eigenschaften von Enzymen, warum Galactose-1-phosphat nicht von einem anderen Enzym aus Abb. 2 abgebaut werden kann.
- 4 Begründen Sie, warum der Galactosämie-Test Teil des Neugeborenen-Screenings ist.

## ARBEITSBLATT

## Galactosämie

## Lösungen

- Galactose wird durch das Enzym Galactokinase zu Galactose-1-phosphat phosphoryliert. Aus diesem wiederum entsteht mithilfe des Enzyms Galactose-1-phosphat-Uridyltransferase (GALT) UDP-Galactose. UDP-Galactose wird durch das Enzym UDP-Galactose-4-Epimerase zu UDP-Glucose umgesetzt. Abschließend katalysiert das Enzym UDP-Glucose-Pyrophosphorylase die Umwandlung von UDP-Glucose zu Glucose-1-phosphat. An der Umwandlung von Galactose zu Glucose-1-phosphat sind vier Enzyme beteiligt. Jedes dieser Enzyme wird durch ein Gen codiert. Nur wenn alle vier Enzyme funktionsfähig sind, kann Glucose-1-phosphat aus Galactose gebildet werden. Finden mehrere voneinander abhängige Stoffwechselprozesse statt, die von Enzymen gesteuert werden, spricht man von einer Genwirkkette.
- Die Galactosämie hat ihren Ursprung in einer Mutation des Gens für das Enzym GALT auf dem Chromosom 9. Durch dieses defekte Enzym kann Galactose-1-phosphat nicht länger zu UDP-Galactose umgewandelt werden. Folglich reichern sich größere Mengen an Galactose-1-phosphat an. Dieses lagert sich in Roten Blutzellen, Leberzellen, Nervenzellen des Gehirns und in der Leber an und wirkt zellschädigend. Dies erklärt auch die Krankheitssymptome wie Leberfunktionsstörungen, Leberschäden, Leberkoma und die geistige Entwicklungsstörung.
- Enzyme sind substrat- und wirkungsspezifisch. Galactose-1-phosphat passt aufgrund seiner Substratspezifität zu GALT in kein anderes aktives Zentrum. Des Weiteren kann auch nur das Enzym GALT Galactose-1-phosphat in UDP-Galactose umwandeln. Dieses Produkt ist für die weiteren Schritte innerhalb der Genwirkkette notwendig.
- Obwohl Galactosämie eine eher seltene Krankheit ist, wird sie im Rahmen des Neugeborenen-Screenings untersucht, weil eine unerkannte Erkrankung für den Säugling zu massiven Schädigungen bis hin zum Tode führen kann. Eine Heilungsmöglichkeit besteht zwar nicht; erkennt man die Krankheit jedoch rechtzeitig, können mithilfe einer galactose- und lactosefreien Diät schwerwiegende gesundheitliche Folgen vermieden werden.

## Zusatzinformation

## Neugeborenen-Screening

Das Neugeborenen-Screening ist eine Reihenuntersuchung von Neugeborenen, um angeborene Stoffwechsel- und Hormonerkrankungen frühzeitig zu erkennen und zu behandeln. Getestet werden ausgewählte Erkrankungen, die sich mit hoher Sicherheit diagnostizieren lassen und bei denen eine Therapiemöglichkeit besteht. Das Neugeborenen-Screening ist seit dem Jahr 2005 Teil der gesetzlichen Krankenversicherungsleistung und wird deutschlandweit nach einem Einverständnis der Eltern durchgeführt. Dabei wird frühestens nach einem Lebensalter von 36 Stunden Fersenblut entnommen und auf Filterpapierkarten in die dafür vorgesehenen Felder aufgetropft. Die Karten werden eine Stunde lang getrocknet und noch am selben Tag an ein Screening-Labor zur Auswertung geschickt.

Folgende Erkrankungen werden dabei getestet: Adrenogenitales Syndrom (AGS), Ahornsirupkrankheit, Biotinidasemangel, Carnitinstoffwechseldefekte, Galactosämie, Glutaratazidurie Typ I, Hypothyreose, Isovalerianazidämie, LCHAD-Mangel (Long-Chain-Hydroxy-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel), VLCAD-Mangel (Very-Long-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel), MCAD-Mangel (Medium-Chain-Acyl-CoA-Dehydrogenase-Mangel), Phenylketonurie (PKU), Hyperphenylalaninämie (HPA), Tyrosinämie, Cystische Fibrose (Mukoviszidose).

## Differenzierende Aufgabe

- Galactosämie wird autosomal-rezessiv vererbt. Ein Mann und eine Frau, beide heterozygote Träger des veränderten Allels, möchten ein Kind bekommen. Berechnen Sie, mit welcher Wahrscheinlichkeit das Neugeborene die Krankheit haben wird.

## Lösung

- G = gesundes Allel, dominant  
g = krankes Allel, rezessiv  
Parentalgeneration: Gg x Gg

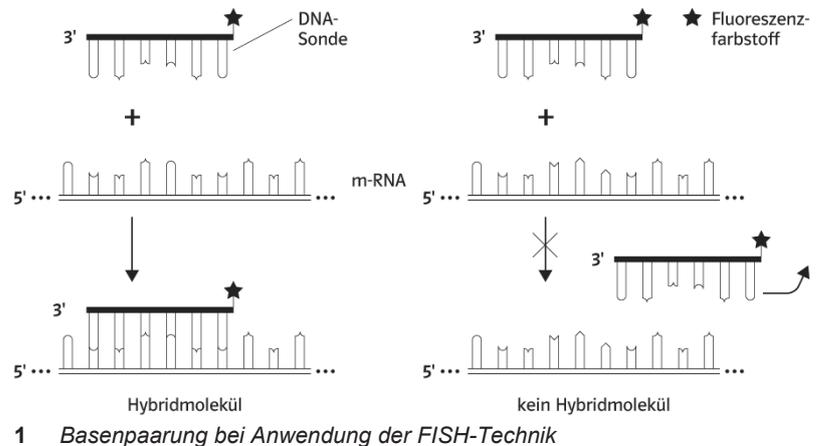
	G	g
G	GG	Gg
g	Gg	gg

Somit liegt die Wahrscheinlichkeit, dass das Paar ein krankes Kind bekommt, bei 25%. Die Wahrscheinlichkeit, dass das Paar ein phänotypisch gesundes Kind bekommt, das die Krankheit aber an seine Nachkommen weitergeben kann, liegt bei 50%.

# FISH-Technik: eine Möglichkeit zum Auffinden der m-RNA in einer Zelle

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) (lat. hybrida = Mischwesen) bietet die Möglichkeit, Nucleinsäuren direkt in einer Zelle mikroskopisch zu lokalisieren und zu identifizieren.

Die Grundlage für die Technik ist, dass einsträngige Nucleinsäureabschnitte mit komplementären Basensequenzen dazu tendieren, Basenpaarungen zu bilden (Abb. 1): Sie hybridisieren. Bei nicht komplementären Sequenzen passiert das nicht. Die bei der FISH-Technik eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe – gebunden an eine Basensequenz, die als Sonde fungiert – absorbieren bestimmte Wellenlängen und senden dann farbiges Licht aus.



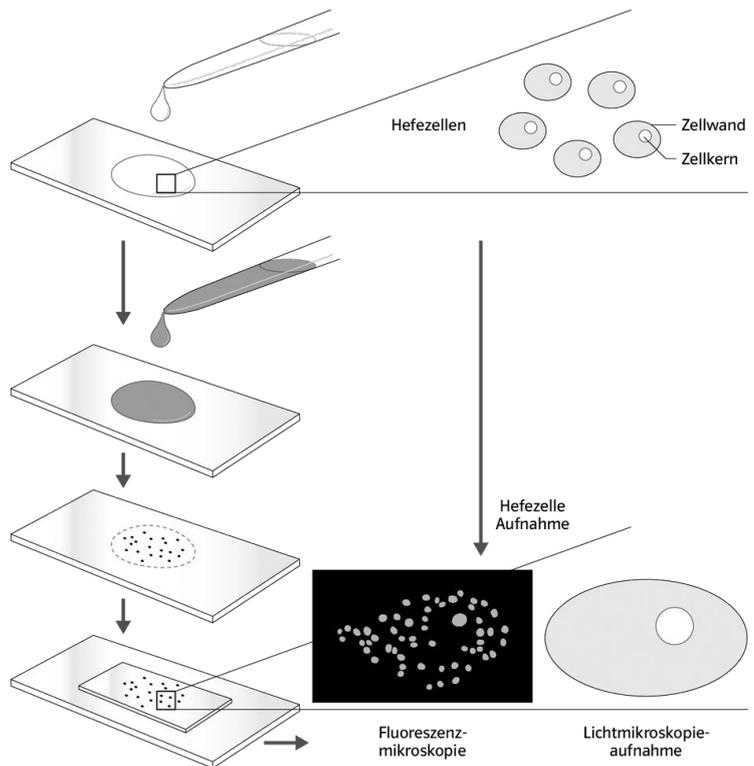
## FISH-Analyse bestimmter m-RNA in Zellen der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

- Fixieren der Zellen
  - Erzeugen poröser Zellen durch Enzyme
  - Waschen der Zellen

- Zugabe der Hybridisierungslösung. Die 20 bis 50 Basen langen einsträngigen synthetischen DNA-Oligonucleotide in dieser Lösung sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.
  - Die Inkubationszeit beträgt mehrere Stunden bei 37 ° bis 50 °C.

- Entfernen der überschüssigen Hybridisierungslösung durch Abspülen
  - Trocknen der Probe

- Abdecken der Probe mit einem Deckglas
  - Mikroskopieren mit einem Fluoreszenzmikroskop



## 2 Ablauf des FISH-Verfahrens und Beobachtungen

- 1 Beschreiben Sie die Hybridisierung (Abb. 1, Abb. 2) und die Genauigkeit des Verfahrens.
- 2 Markieren Sie im folgenden Beispiel den m-RNA-Bereich, an dem die DNA-Sonde hybridisieren würde.  
 DNA-Sonde: 5' ★ CCGTAATGATGCGATAGTGA 3'  
 m-RNA: 5' ... GCAUUAGCAGUGUCACUAUCGCAUCAUUACGGUGAAUCGCGAU... 3'
- 3 Erläutern Sie die Beobachtungen zur Fluoreszenz in Abb. 2 bezüglich Zellkern und Zellplasma.





## ARBEITSBLATT

## Wie wurde der genetische Code geknackt?

## Lösungen

- 1 Triplets aus Ribonucleotiden (im Beispiel UCU) wurden mit Ribosomen und beladenen t-RNA-Molekülen zusammengegeben. Von den an die t-RNA-Moleküle gebundenen Aminosäuren war nur eine (Serin) radioaktiv markiert. Nach einiger Zeit wurde das Gemisch filtriert. Das Filterpapier war wegen seiner Porengröße nur für freie Aminosäuren durchlässig. Der Filtrückstand und das Filtrat wurden überprüft. Auf dem Filterpapier blieben als Rückstand die Ribosomen und an sie gebundene Moleküle zurück. Ungebundene Moleküle, die kleiner als die Ribosomen waren, gelangten durch den Filter ins Filtrat. Im Filtrückstand war Radioaktivität zu messen (Serin<sup>\*</sup>), im Filtrat dagegen nicht.
- 2 Da im Filtrückstand bei Verwendung des Triplets UCU die radioaktiv markierte Aminosäure Serin festzustellen war, konnten die Forscher schlussfolgern, dass sowohl die t-RNA mit eben dieser Aminosäure als auch das passende m-RNA-Triplett an das Ribosom gebunden waren. Hätte eine andere t-RNA mit einer anderen nicht markierten Aminosäure am Ribosom gebunden, so hätte man die Radioaktivität im Filtrat gefunden. Somit war, nachdem alle 20 Aminosäuren getestet worden waren, die Eindeutigkeit des Triplett-Codes und die Zuordnung der Codons zu einer bestimmten Aminosäure entdeckt worden: Das Codon UCU codiert für die Aminosäure Serin.
- 3 Die m-RNA Poly-UC wurde mit Ribosomen und 20 verschiedenen beladenen t-RNA-Molekülen zusammengegeben. Die Produktanalyse ergab das Protein Poly-Serin-Leucin. Da das Codon UCU (Abb. 1) bekannt war, konnte auf das Codon CUC für Leucin rückgeschlossen werden. Weiterhin ergab sich aus diesem Versuch, dass der genetische Code kommafrei und nicht überlappend ist.
- 4 Kennzeichen des genetischen Codes:
  - Triplett-Code (Bestätigung, keine Neuentdeckung): Abb. 2, Abb. 3 alle Versuche außer Nr. 1
  - Eindeutigkeit der Aminosäurezuordnung (Bestätigung, keine Neuentdeckung): Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3 alle Versuche, Ausnahme sind die Stopp-Codons: Versuch Nr. 4 (UAG), Versuch Nr. 5 (UAA)
  - Kommafreiheit: Abb. 2, Abb. 3 Versuch-Nr. 2, 6, 7
  - keine Überlappung: Abb. 2, Abb. 3 alle Versuche außer Nr. 1
  - Redundanz: Abb. 1 Ser (UCU), Abb. 3 Versuch-Nr. 5 Ser (AGU), Versuch-Nr. 7 Ser (UCA), Abb. 2 Leu (CUC), Abb. 3 Versuch-Nr. 3 Leu (UUG), Versuch-Nr. 6 Leu (UUA, CUU), Versuch-Nr. 1 Phe (UUU), Versuch-Nr. 7 Phe (UUC), Versuch-Nr. 2 Val (GUG), Versuch-Nr. 4 und 5 Val (GUA)
  - Leserichtung: 5'–3'-Richtung: Abb. 3 Versuch-Nr. 6 und 7

## Zusatzinformation

## Herstellung eines zellfreien Systems:

- 1 Zentrifugation (5 min/15000 g) eines Zellhomogenats von *E. coli*.
- 2 Überstand (zellfreies System) enthält Ribosomen, lösliche Proteine, m-RNA, t-RNA, DNA-Bruchstücke, niedermolekulare Substanzen. Sediment enthält Zellwandbruchstücke, Membranbruchstücke, große Zellorganellen (Mitochondrien).
- 3 Zur weiteren Verwendung des zellfreien Systems für die In-vitro-Proteinsynthese werden die vorhandenen RNA-Moleküle durch eine RNase abgebaut.

## Zusatzaufgabe

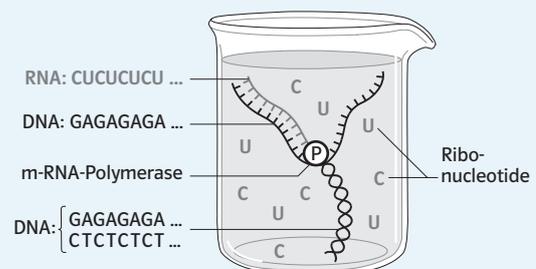
## Herstellung einer m-RNA mit bekannter Basenabfolge aus zuvor synthetisierter DNA (Khorana, 1964)

- 1 Erläutern Sie die abgebildete m-RNA-Herstellung.

## Lösung

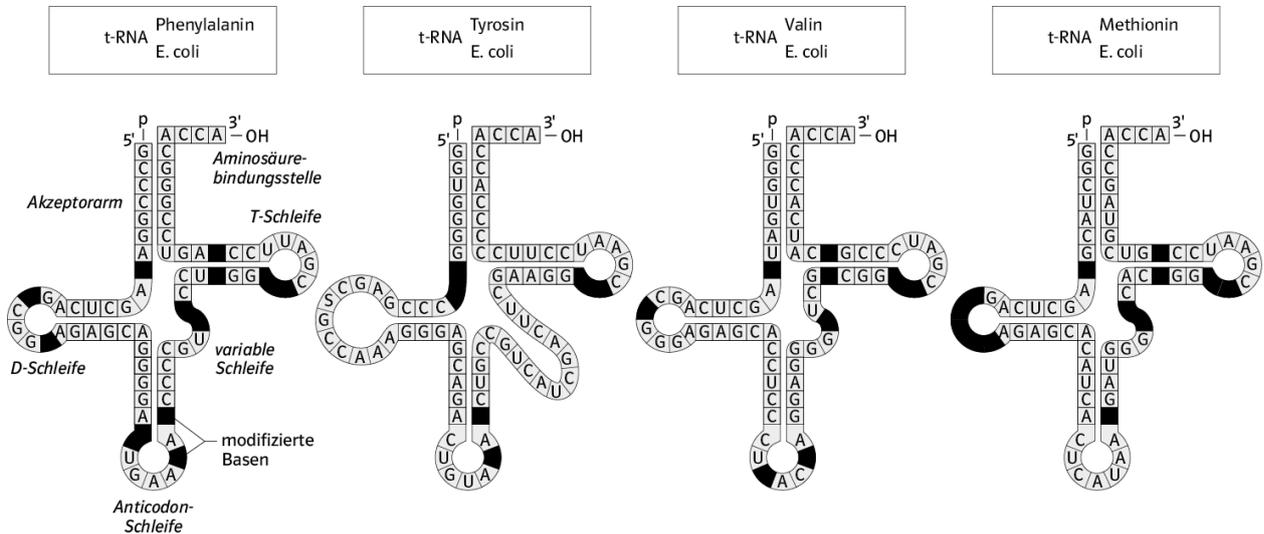
- 1 Das DNA-Material wird in eine Lösung mit RNA-Polymerasen und Ribonucleotiden (Ribonucleosidtriphosphate) gegeben. Die angebotenen Ribonucleotide sind komplementär zu dem gewünschten

DNA-Einzelstrang. Da die RNA-Polymerase unter diesen Bedingungen zufällig an verschiedenen Positionen an der DNA binden kann, wird durch die Wahl der zur Verfügung stehenden Nucleotide garantiert, dass nur eine bestimmte m-RNA gebildet wird und nicht zwei. Durch die Genauigkeit der Arbeitsweise der m-RNA-Polymerase wird die fehlerfreie Herstellung der gewünschten m-RNA ermöglicht.



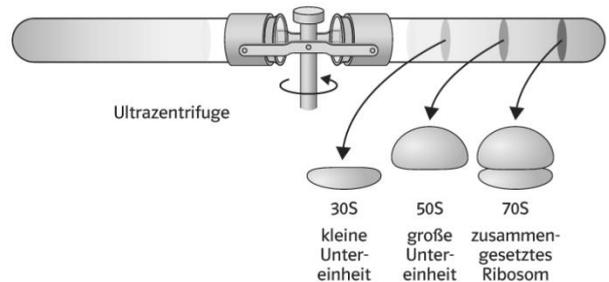
# Die Zusammenarbeit von t-RNA-Molekülen und Ribosomen

Die Transfer-RNA-Moleküle (kurz t-RNA-Moleküle) haben die Aufgabe, in einer Zelle die passenden Aminosäuren zur m-RNA an den Ribosomen zu transportieren, wo die Polypeptide gebildet werden. Alle t-RNA-Moleküle in Lebewesen sind nach dem gleichen Prinzip aufgebaut (Abb. 1). Darin enthaltene modifizierte Basen weichen zwar strukturell von den Standard-Nucleotiden ab, bleiben aber im Bindungsverhalten unverändert.



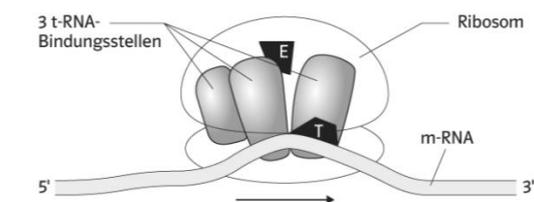
1 Vier t-RNA-Moleküle aus *E. coli*

Ein *E. coli*-Bakterium enthält ca. 10 000 Ribosomen. Bei diesen handelt es sich um 25 nm große Partikel. Ihr Aufbau wurde durch Ultrazentrifugation im Dichtegradienten untersucht (Abb. 2). Dabei wurde festgestellt, dass die beiden ribosomalen Untereinheiten neben Proteinen zu 75 % verschiedene ribosomale RNA (r-RNA)-Moleküle enthalten. Die Sedimentationsgeschwindigkeit wird in Svedberg-Einheiten (S) gemessen. Sie ist abhängig von der Masse und der Gestalt der Teilchen.



2 Zusammensetzung des Ribosoms von *E. coli*

Die Translation im Ribosom ist ein dynamischer Vorgang, bei dem die r-RNA-, die t-RNA- und die m-RNA-Moleküle im Ribosom zusammenarbeiten. So werden die eintreffenden, beladenen t-RNA-Moleküle von bestimmten Bereichen der r-RNA gebunden. Die entstehende Polypeptidkette gelangt durch einen Tunnel, der von der r-RNA gebildet wird, nach außen.



3 Wirkung von Antibiotika (T: Tetracyclin, E: Erythromycin) im Ribosom

Antibiotika verhindern auf verschiedene Art und Weise das Bakterienwachstum: Tetracyclin bindet aufgrund seiner chemischen Struktur an die 16S-r-RNA im Ribosom. Erythromycin bindet im Ribosom an die 23S-r-RNA. Beide Antibiotika verhindern die Bildung von Polypeptiden.

- 1 Beschreiben Sie die Gemeinsamkeiten in Bezug auf charakteristische Strukturen der t-RNA-Moleküle (Abb. 1) und recherchieren Sie die Bedeutung dieser Strukturen.
- 2 Werten Sie Abb. 2 aus.
- 3 Erläutern Sie die Wirkung der beiden vorgestellten Antibiotika (Abb. 3) unter Bezugnahme auf die im Ribosom ablaufenden Prozesse (s. Schülerbuch S. 117).

## ARBEITSBLATT

## Die Zusammenarbeit von t-RNA-Molekülen und Ribosomen

### Lösungen

#### 1 Gemeinsamkeiten:

- eine ungepaarte Aminosäurebindungsstelle am 3'-Ende (hier -ACCA)
- zur D-Schleife führt ein Arm mit variabler Basenpaaranzahl (hier drei bis vier), die Schleifengröße ist ebenfalls variabel (hier acht bis elf Nucleotide)
- die Anticodonschleife ist eine 7-Nucleotid-Schleife, zu ihr führt ein Arm mit hier immer fünf Basenpaarungen
- variable Schleife, Größe extrem variabel
- zur T-Schleife führt ein Arm mit hier immer fünf Basenpaaren, die Schleifengröße beträgt sieben Nucleotide

#### Bedeutung:

- Aminosäurebindungsstelle: Die zum Codon bzw. Anticodon passende Aminosäure wird am 3'-Ende der t-RNA enzymatisch gebunden (verestert).
- D-Schleife: spielt eine Rolle bei der Anlagerung der t-RNA an die Aminoacyl-t-RNA-Synthetase
- Anticodon: komplementär zum Codon auf der m-RNA, Codon-Anticodon-Paarung
- variable Schleife: noch nicht geklärt
- T-Schleife: Bereich bindet an die 5S-r-RNA der großen Ribosomenuntereinheit

2 In einem Zentrifugenröhrchen liegt ein Dichtegradient vor, d. h. die Dichte der Lösung steigt zum Boden des Röhrchens an. Die kleinen Untereinheiten (30S) der Ribosomen sammeln sich bei der Dichtegradienten-Zentrifugation in einer Bande in dem Bereich mit der geringsten Dichte. Die großen Untereinheiten (50S) bilden eine Bande bei einer mittleren Dichte. Die Bande der kompletten Ribosomen (70S) liegt im Bereich der größten Dichte. Je größer die Dichte der Stoffe ist, desto geringer ist der Abstand der Bande zum Boden des Zentrifugenröhrchens. Da die Banden sich immer in dem Bereich der Lösung befinden, der ihrer eigenen Dichte entspricht, und da die Banden im gleichen Abstand zueinander liegen, kann man schlussfolgern, dass die S-Werte der Banden nicht additiv sind.

3 Tetracyclin besetzt die Akzeptorstelle in der kleinen Untereinheit des Ribosoms und verhindert damit den Neuzugang von beladenen t-RNA-Molekülen. Erythromycin hemmt die Bildung von Peptidbindungen zwischen zwei benachbarten t-RNA-Molekülen und blockiert zudem auch den Ausgangstunnel für die wachsende Peptidkette aus dem Ribosom.

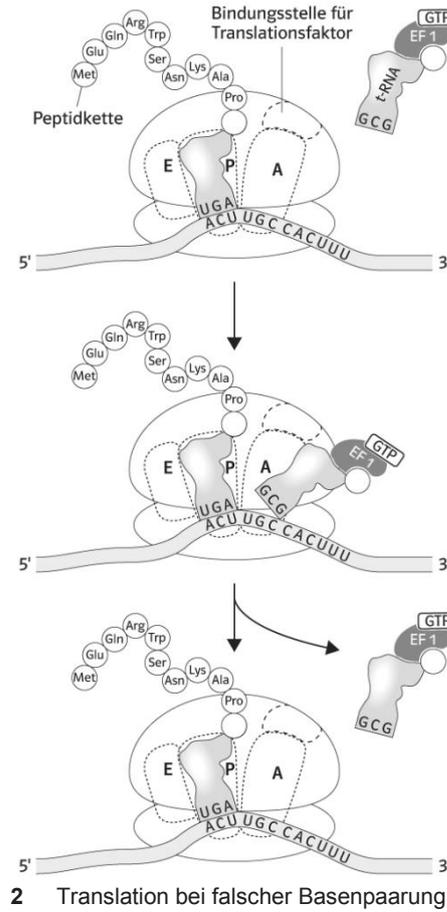
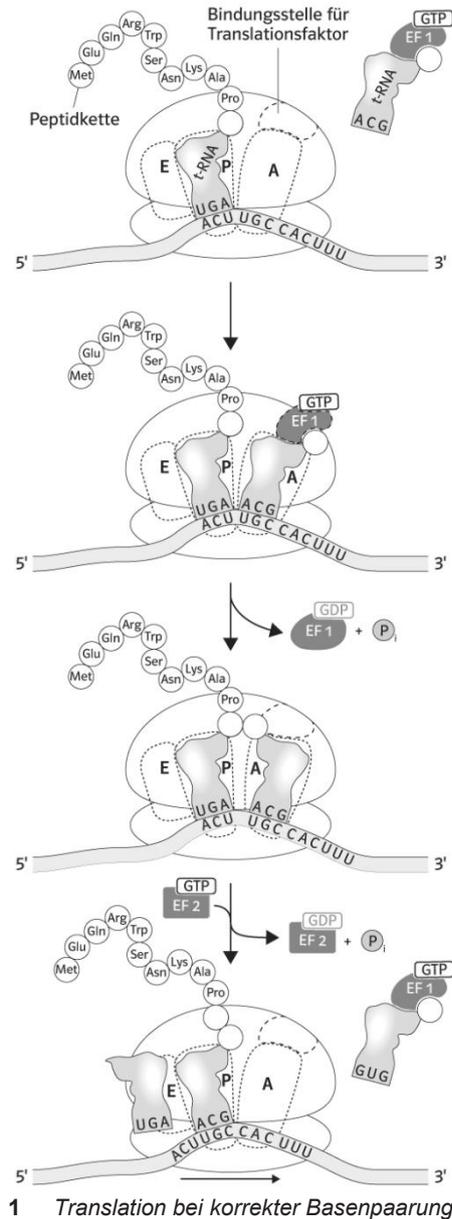
### Zusatzinformation

Die Sedimentationsgeschwindigkeit von Ribosomen und ihren Untereinheiten wird mit der Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation ermittelt. Dies ist eine gebräuchliche Methode zur analytischen Auftrennung von biologischen Makromolekülen. Die untersuchten Partikel sedimentieren bei einer künstlich erzeugten Zentrifugalkraft aufgrund ihrer unterschiedlichen Masse, Dichte, Größe oder Gestalt unterschiedlich schnell. Da die Sedimentationsgeschwindigkeit von biologischen Molekülen sehr klein ist, hat man die Svedberg-Einheit eingeführt. Die Zeit von  $10^{-13}$  Sekunden wird als 1 Svedberg (S) bezeichnet. Der schwedische Chemiker Theodor Svedberg (1884 – 1971) konstruierte die ersten Ultrazentrifugen. Es gilt: Je größer das Molekül ist, desto größer ist die Sedimentationsgeschwindigkeit, also der S-Wert. Allerdings ist zu beachten, dass bei zunehmender Molekülmasse die Sedimentationsgeschwindigkeit nicht linear steigt. Daher ist der S-Wert eines kompletten Ribosoms nicht die Summe der S-Werte seiner Untereinheiten. Die einzelnen S-Werte addieren sich nicht.

# Das Ribosom als Roboter: die richtige t-RNA am richtigen Platz

Der Ablauf der Translation wurde am Bakterium *E. coli* modellhaft genau untersucht. Besonders die hohe Geschwindigkeit von Aminosäureverknüpfungen – ca. 20 Aminosäuren in der Sekunde – und die geringe Fehlerrate – ca. 1 Einbaufehler pro 1000 eingebaute Aminosäuren – warfen Fragen auf.

Die t-RNA-Moleküle haben die Aufgabe, in einer Zelle die passenden Aminosäuren in der richtigen Reihenfolge zur m-RNA in den Ribosomen zu transportieren. Dies ist nur durch die Hilfe sogenannter Translationsfaktoren möglich. Das sind Proteine, die entsprechend ihrer Beteiligung in den drei Schritten der Translation als Initiationsfaktoren (IF, Initiation = Anfang), als Elongationsfaktoren (EF, Elongation = Verlängerung) oder als Terminationsfaktoren (RF, Termination = Beendigung) bezeichnet werden. Sie fördern und dirigieren chemische Reaktionen zwischen allen beteiligten Molekülen im Ribosom.



**Die drei t-RNA-Bindungsstellen im Ribosom**  
 A-Stelle: Aminosäurestelle, Akzeptorstelle, Erkennungsort  
 P-Stelle: Polypeptidstelle, Bindungsstelle  
 E-Stelle: Exitstelle, Ausgangsort

- 1 Ermitteln Sie mithilfe der Codesonne die möglichen Codons für die Aminosäuren der fertiggestellten Peptidkette (Abb. 1). Geben Sie auch die restlichen Aminosäuren gemäß der m-RNA an (Abb. 1 und 2).
- 2 Erläutern Sie den Ablauf der Translation bei korrekter Basenpaarung anhand der Darstellung (Abb. 1).
- 3 Beschreiben und erklären Sie den Ablauf der Translation bei falscher Basenpaarung (Abb. 2).

## ARBEITSBLATT

## Das Ribosom als Roboter: die richtige t-RNA am richtigen Platz

### Lösungen

- 1 Codons: Met (AUG), Glu (GAA/G), Gln (CAA/G), Arg (CGA/G/C/U, AGG/A), Trp (UGG), Ser (UCA/G/C/U, AGC/U), Asn (AAC/U), Lys (AAA/G), Ala (GCA/G/C/U), Pro (CCA/G/C/U)  
Aminosäuren für: ACU (Thr), UGC (Cys), CAC (His), UUU (Phe)
- 2
  - a) Die passende, beladene t-RNA gelangt an die A-Stelle des Ribosoms.
  - b) Die t-RNA bindet komplementär mit ihrem Anticodon an das Codon der m-RNA. Der an der t-RNA zusätzlich befindliche Translationsfaktor EF 1 kann in der zugehörigen Bindungsstelle binden. Hier wird das am EF 1 gebundene GTP unter Freisetzung eines Phosphat-Ions gespalten und der Komplex aus EF 1 und GDP wird abgegeben.
  - c) Die t-RNA kann nun in Richtung der P-Stelle rotieren, wo die Peptidbindung zwischen den benachbarten Aminosäuren hergestellt wird.
  - d) Ein anderer Translationsfaktor EF 2 bindet kurzzeitig im Ribosom, auch dieses GTP wird unter Freisetzung eines Phosphat-Ions gespalten und der Komplex aus EF 2 und GDP wird abgegeben. Dadurch wird ermöglicht, dass das Ribosom um ein Basen-triplett weiter in Richtung 3'-Ende der m-RNA wandert. Die mit der Peptidkette beladene t-RNA wechselt dabei aus der A-Stelle in die P-Stelle des Ribosoms. Die ehemals in der P-Stelle befindliche t-RNA ist nicht mehr beladen und befindet sich nun in der E-Stelle, von der aus sie das Ribosom verlässt. Eine neue passende, beladene t-RNA gelangt an die A-Stelle des Ribosoms.
- 3
  - a) Eine nicht passende, beladene t-RNA gelangt an die A-Stelle des Ribosoms.
  - b) Die t-RNA bindet mit ihrem Anticodon nur teilweise an das Codon der m-RNA. Da die 1. Base im Codon nicht komplementär zum Anticodon ist, gelangt die t-RNA räumlich nicht vollständig in die A-Stelle des Ribosoms. Der Translationsfaktor EF 1 kann nicht in seiner Bindungsstelle binden, sodass auch GTP nicht gespalten wird.
  - c) Folglich wird die komplette unpassende t-RNA samt EF 1 und gebundenem GTP wieder entfernt.

### Zusatzinformation

Die Translationsfaktoren sind GTP-bindende Proteine, die durch Spaltung des GTP und Entfernen des Komplexes aus Translationsfaktor und GDP eine Konformationsänderung im Ribosom hervorrufen. Diese Veränderung bewirkt dann eine sogenannte Rotation, eine Verschiebung oder Wanderung des Ribosoms.

Translationsgeschwindigkeit bei Prokaryoten: 10 — 20 Aminosäuren/Sekunde

Translationsgeschwindigkeit bei Eukaryoten: 2 Aminosäuren/Sekunde

# Das Insulin-Gen

Das Insulin-Gen codiert für das Peptidhormon Insulin, das in den Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet wird. Das Gen befindet sich auf Chromosom 11. Abb. 1 zeigt einen Ausschnitt des nicht-codogenen Strangs des 4992 Basenpaare (bp) langen Gens, der die wichtigen Bereiche (Abb. 2) für die Insulinsynthese enthält. Als primäres Produkt entsteht das Präproinsulin (Abb. 3), das posttranslational zum aktiven Insulin, das nur aus der A- und der B-Kette besteht, umgebildet wird.

[1-1360]

```

1361 5' gtccggggac agggctctgg ggacaggggt gtggggacag gggctctgggg acaggggtgt ggggacaggg gtgtggggac
1441 aggggtctgg ggacaggggt gtggggacag gggctcgggg acaggggtgt ggggacaggg gtctggggac aggggtgtgg
1521 ggacaggggt gtggggacag gggctctgggg acaggggtgt ggggacaggg gtctggggac aggggtgtgg gggacagggg
1601 tgtggggaca ggggtgtggg gacaggggtg tggggacagg ggtcctgggg ataggggtgt ggggacaggg gtgtggggac
1681 aggggtcccg gggacagggg tgtggggaca ggggtgtggg gacaggggtc ctggggacag ggggtctgagg acaggggtgt
1761 gggcacaggg gtctggggga caggggtctt ggggacaggg gtctggggga caggggtctg gggacagcag cgaaagagc
1841 cccgccctgc agcctccagc tctcctggtc taatgtggaa agtggcccag gtgagggctt tgctctcctg gagacatttg
1921 cccccagctg tgagcagggg caggtctggc caccggggcc ctggttaaga ctctaataac ccgctgtgct tgaggaaag
2001 gtctgtgaag caaggagat cttccacagc acccagcacc agggaaatgg tccggaaatt ccgctccagc cccccagcca
2081 tctgccgacc cccccacccc gcctaattgg gccagggcggc aggggttgac aggtagggga gatgggctct gagactataa
2161 agccagcggg ggcccagcag ccctcagccc tccaggacag gctgcatcag aagaggccat caagcaggtc tggtccaagg
2241 gcctttgcgt caggtgggct caggggtcca ggggtggctg accccaggcc ccagctctgc agcagggagg acctggctgg
2321 gctctggaag catgtggggg tgagcccagg gggcccagg atggggcaga ggctctcagc gcctctcagc ctgctgtc
2401 tcccagatca ctgtccttct gccatggccc tgtggatgcg cctcctgccc ctgctggcgc tgcctggcct ctggggacct
2481 gaccagcccg cagcctttgt gaaccaacac ctgtgctggc cacacctggt ggaagctctc tacctagtgt gcgggaaacg
2561 aggcttcttc tacacaacca agaccggcgg gggagcagag gacctgcagg gtgagccaac cgccccattg tggcctggc
2641 cgccccagc caccctctgc tctggcgtc cccaccagc atggggcagaa gggggcagga gggctccacc cagcaggggg
2721 tcaggtgcac ttttttaaaa agaagttctc ttggtcacgt cctaaaagt accagctccc tgtggcccag tcagaatctc
2801 agcctgagga cgggtgtggc ttcggcagcc cggagataca tcagaggtg ggcacgctcc tccctcact cgcccctcaa
2881 acaaatgcc cgcagcccat ttctccacc tcatttgatg acccagatt caagtgttt gttaagtaaa gtcctgggtg
2961 acctggggtc acaggggtcc ccacgtgccc cgaacacccc atcacgccc gaggaggcgg aagatgctgg ggacagggcc
3041 cctgagtggg ccagaccctt gtcgccagcc tcacggcagc tccatagtca ggagatgggg aagatgctgg ggacagggcc
3121 tggggagaag tactgggatc acctgttcag gctcccactg tgacgctgcc ccggggcggg ggaaggaggt gggacatgtg
3201 ggcgttgggg cctgtaggtc cacaccaggt gtgggtgacc ctccctctaa cctgggtcca gccccgctgg agatgggtgg
3281 gagtgcgacc tagggctggc gggcagggcg gcactgtgtc cctctgactg tctcctctg tgctcctctg cctcgcctg
3361 gttccggaac ctgctctgcg cggcacgtcc tggcagtggg gcaggtggag ctggggcggg gtcctgggtg aggcagcctg
3441 cagccttggg ccctggaggg gtccctgcag aagcgtggca ttgtggaaca atgctgtacc agcatctgct cccttacca
3521 gctggagaac tactgcaact agacgcagcc tgcaggcagc cccacacccc ccgctctctg caccagagaga actggaataa
3601 agccctgaa cagccctctg tgtgctctg gtgtgtctt ggggcccctg gccaagcccc acttccggc gatgtgtga
3681 gcccttcca gctctctcca cgctctctgg gtgcccacag gtgccaacgc caggcagggc cagcatcgag tggctctccc 3'

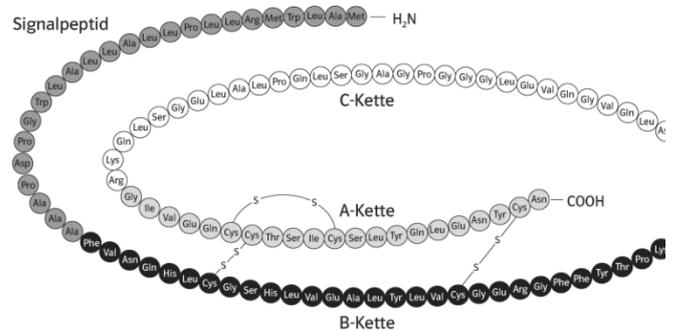
```

[3761-4992]

## 1 Insulin-Gen (Ausschnitt)

Nucleotid-Bereich	Funktion
2186 – 3615	Prä-m-RNA
2186 – 2227	Exon 1
2407 – 2610	Exon 2
3397 – 3615	Exon 3
2228 – 2406	Intron 1
2611 – 3396	Intron 2
2424 – 2495	Signalsequenz
3477 – 3539	A-Kette
2496 – 2585	B-Kette
2586 – 2610	C-Kette
3397 – 3476	
1800 – 2185	Promotorregion
2156 – 2161	1. Erkennungsstelle (TATA-Box)
2124 – 2135	2. Erkennungsstelle

## 2 Wichtige DNA-Bereiche im Insulin-Gen



## 3 Primärstruktur des Präproinsulins

1 Markieren Sie die angegebenen wichtigen Bereiche in dem DNA-Ausschnitt des Insulin-Gens farblich (Abb. 1 und 2).

- 2 Geben Sie an, wie das Insulin-Gen aufgebaut ist, und ermitteln Sie dabei auch in den Bereichen der gespleißten m-RNA das Start- und das Stopp-Codon.
- 3 Erläutern Sie anhand des Materials die molekulargenetischen Schritte, die zum Präproinsulin führen.
- 4 Vergleichen Sie das Insulingen mit einem prokaryotischen Gen.

ARBEITSBLATT

# Das Insulin-Gen

Lösungen

1 siehe Tabelle

```
[1-1360]
1361 5 gtcggggac agggctctgg ggacaggggt gtggggacag gggctctggg acagggstgt ggggacaggg gtgtggggac
1441 aggggtctgg ggacaggggt gtggggacag gggctctggg acagggstgt ggggacaggg gtctggggac aggggtctgg
1521 ggacaggggt gtggggacag gggctctggg acagggstgt ggggacaggg gtctggggac caggggtgtg gggacagggg
1601 gtggggacag ggggtctggg ggacaggggt gtggggacag gggctctggg atagggstgt ggggacaggg gtgtggggac
1681 aggggtctgg gggacagggg gtggggacag ggggtctggg ggacaggggt ctggggacag ggggtctggg acagggstgt
1761 ggggacaggg gtctctggga caggggtctt ggggacaggg gtctctggga caggggtctt ggggacaggg cgtgggggtg
1841 ccgcccttgc agctctcagc ttctctgtgt taalgtggaa aglggccag gtgaggccll tctctctcg gagacallg
1921 ccccaactgt tgagcagggg caggtctggc caccggggcc ctggttaaga ctctaagac ccgtctgtcc tgggaagagg
2001 ggtctgacga ccaaggagat ctcccacag acccagcacc agggaaatg tccgaaatg gcagcctcag ccccacccc
2081 ttgtccatc ccccacccc gccctaaatg ttctaaatg gttcttacc aggttataa ttatpctctc gaaatataa
2161 ccccccagg gggcagcag cccctggccc tccaggarag gctgctatag aagagccat caagcagtc tgttcaagg
2241 gctcttgcct caggtggctt caggttccc ggggtctgg accccagacc ccgctctgc agcagagag acatggctgg
2321 gctctgagc cgtgagaaa tgggtccagg gggcccaagg cagggacct gctctcagc ctgctcagc ctgctctgt
2401 tccagatca ctgtctcttc cccctggggg cctgggtggc cctctggggc tctctggggc tctctggggc cctggggacc
2481 gggcggggc cagctcttgc gggcccaac ctatcagct cacacctgt ggaagcttc taccctgtt gggggaaag
2561 aggtctcttc tacacacca agaccggcg gggagagag gacctgcagg gtgagccaac gcgccattgc tgcccctggc
2641 cggcccacg caccctctc tctggcctc ccaccacgc atggggacaa gggggcagga gggctccacc cagcaggggg
2721 tcagggtgac tttttaaaa agaagttct ttgtcacgt ctaaaaagt accagctccc tgtgcccag tcagaatctc
2801 agcctgaga cgggttggc ttggcgacc ccagatata tcagagggtg ggcacgctcc tccctccat cggccctcaa
2881 acaaatgcc cgcagctcat ttctccacc tcattgatg acccgagat caagttttt gtaagtaaa gtccctgggtg
2961 acctggggc acaggtgcc caagctgcc tgcctctgg ccagaccctc atcagctcc gggggggc tgcctctg
3041 cctgagtgcc cagaccctc gtgcccagc tcacggcgc tccatagca gggagatggg aagatgctg ggcagagccc
3121 tggggagag tactgggatc acctttagc gctccactg tgacgtgcc cggggcggg ggaaggagt gggacatgtg
3201 gggcttggg cctgtagtc cacaccagt gtgggtgacc ctctctcaa cctgggtcca gcccggctg agatgggtg
3281 gagtggcag taggctggc gggcagggc gcactgtgc tcctcactg tgtctctgt tctctctg cctgcccct
3361 gttcgaac ctgctctgc cggcagctc tggcagtggc gtaggtgag ctggcggg accctctgc agcagcctc
3441 cagccctgg tctgaaagg gtccctcag gaccctgag gtagctgag ctactgagc ttactgagc tttttttaa
3521 ggggggggg ggggggggg agaccagcc tgcagcagc cccacaccg cccctctctg taccgagaa gaggaaalaa
3601 ggggggggg ccaagcttgc tgtgtctgt gtgtcttgg ggggcttgg gccaagctc acttctcgg actgtgtga
3681 ggggggggg gctctctca cgtctctgg gtgcccag gtgccaagc caggcaggtc cagcatgag tggctctccc
[3761-4992]
```

Nucleotid-Bereich	Funktion
2186 - 3615	m-RNA-Primärtranskript
2186 - 2227	Exon 1
2407 - 2610	Exon 2
3397 - 3615	Exon 3
2228 - 2406	Intron 1
2611 - 3396	Intron 2
2424 - 2495	Signalpeptid
3477 - 3539	A-Kette
2496 - 2585	B-Kette
2586 - 2610	C-Kette
3397 - 3476	C-Kette
1800 - 2185	Promotorregion
2156 - 2161	1. Erkennungsstelle (TATA-Box)
2124 - 2135	2. Erkennungsstelle

1 Abbildung der markierten Bereiche im Insulin-Gen

2 Aufbau des Insulin-Gens:  
 Promotor mit zwei Erkennungssequenzen für die m-RNA-Polymerase liegt vor dem späteren Primärtranskript. Diese Prä-m-RNA enthält die Bereiche Exon 1 — Intron 1 — Exon 2 — Intron 2 — Exon 3. Im Exon 2 befinden sich die Codierungen für das spätere Signalpeptid, die B-Kette und den ersten Teil der C-Kette. Im Exon 3 befinden sich die Codierungen für den 2. Teil der C-Kette und die A-Kette. Der Translationsstart liegt in Exon 2 an Position 2424 (aug). Der Translationsstopp liegt in Exon 3 an Position 3540 (uag).

- 3 Erläuterung der molekularbiologischen Schritte:
- Binden der m-RNA-Polymerase an die Erkennungsstellen im Promotor
  - Transkription (Nr. 2186 — 3615) und Synthese der Prä-m-RNA
  - Anhängen einer Kappen-Sequenz an das 5'-Ende der Prä-m-RNA zur erleichterten Bindung an das Ribosom und zum Verlangsamen des enzymatischen RNA-Abbaus
  - Anhängen eines Poly-A-Schwanzes an das 3'-Ende der Prä-m-RNA, ebenfalls zum Verlangsamen des enzymatischen RNA-Abbaus
  - Spleißen der Prä-m-RNA, sodass die zwei Introns entfernt und die drei Exons miteinander verbunden werden
  - Translation der reifen m-RNA vom Start-Codon Nr. 2424 bis zum Stopp-Codon Nr. 3540, sodass das komplette Präproinsulin vorliegt. Dabei wird deutlich, dass die reife m-RNA länger ist als der tatsächlich translatierte m-RNA-Bereich.

4 Beim Insulingen handelt es sich um ein eukaryotisches Gen. Prokaryotische Gene liegen frei im Cytoplasma, während sich eukaryotische Gene im Zellkern befinden. Eukaryotische Gene enthalten im Gegensatz zu prokaryotischen Genen Bereiche, die nicht transkribiert werden (Introns). Vor der Translation werden zuerst die Introns aus der Prä-m-RNA herausgeschnitten (Spleißen). Zusätzlich können auch Exons (translatierte Bereiche) oder Teile davon herausgeschnitten werden (alternatives Spleißen). Im Anschluss daran wird die entstandene mRNA noch prozessiert, indem ein Poly-A-Schwanz an das 3'-Ende sowie eine Kappe an das 5'-Ende angehängt wird.

Zusatzinformation

Die Benennung der verschiedenen Ketten im Präproinsulin hat historische Gründe. Frederick Sanger (1918 — 2013) erhielt 1958 den Nobelpreis Chemie für die Strukturaufklärung von Insulin und seine Methode der Proteinsequenzierung. Er sequenzierte die beiden Polypeptidketten des Rinderinsulins, die kürzere A- und die längere B-Kette. Später wurde bei Versuchen zur Synthese von Insulin die C-Kette entdeckt. Ihre Bedeutung liegt darin, dass sie im Proinsulin für die richtige räumliche Anordnung und damit für die Herstellung der korrekten Disulfidbrücken sorgt. Das abschließend identifizierte Signalpeptid dient nur im Biosyntheseweg zum Eintritt des Präproinsulins ins Endoplasmatische Reticulum.

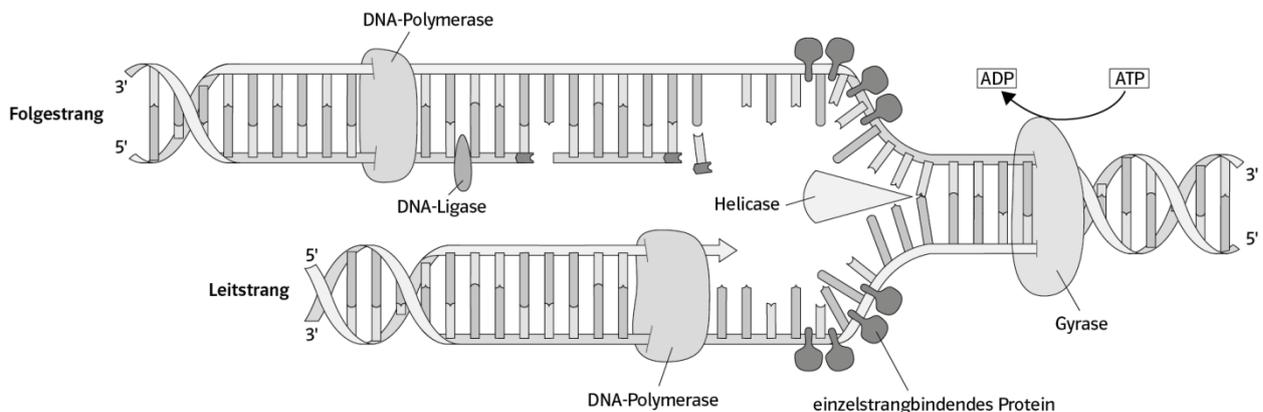
# Das Antibiotikum Ciprofloxacin

Antibiotika greifen in verschiedene Stoffwechselwege von Bakterien ein und hemmen dabei unter anderem bestimmte bakterielle Enzyme. Ein solches bakterielles Enzym ist die Gyrase, die eine wichtige Rolle bei der DNA-Replikation spielt und daher für die Vermehrung von Bakterien lebensnotwendig ist.

Wenn im Zuge der DNA-Replikation die Helicase die DNA zu einer Replikationsgabel geöffnet hat, verhindern im Normalfall einzelstrangbindende Proteine das erneute Zusammenlagern der beiden Einzelstränge. Während die Helicase die DNA öffnet, kommt es außerdem zum Überdrehen des DNA-Doppelstrangs in den nachfolgenden DNA-Abschnitten. Um dieses Überdrehen aufzuheben, greift das Enzym Gyrase ein, indem es unter ATP-Verbrauch einen Doppelstrangbruch katalysiert. Der entstandene Doppelstrangbruch wird im Anschluss durch eine DNA-Ligase repariert.

Ciprofloxacin ist ein Antibiotikum, das zur Behandlung verschiedener bakterieller Erkrankungen eingesetzt wird. Als sogenannter Gyrasehemmer heftet es sich genau dann an die Gyrase, wenn der DNA-Doppelstrang aufgebrochen wurde. Die Gyrase wird dadurch blockiert und kann nicht weiter den DNA-Strang entlangwandern.

Gyrasehemmer können im Dünndarm unter anderem an Magnesium- und Calcium-Ionen binden und einen sogenannten Chelatkomplex bilden, der wegen seiner Molekülgröße in nur sehr geringem Maße von den Dünndarmepithelzellen aufgenommen werden kann.



1 Aktive Enzyme bei der bakteriellen DNA-Replikation

- 1 Erläutern Sie mithilfe von Abb. 1 den Ablauf der bakteriellen DNA-Replikation.
- 2 Erläutern Sie die Wirkung von Ciprofloxacin auf die bakterielle DNA-Replikation und dessen Einsatz als Antibiotikum.
- 3 Begründen Sie, warum auf der Packungsbeilage von Ciprofloxacin der Hinweis steht, dass Ciprofloxacin nicht zusammen mit Milch, Milchprodukten und Fruchtsäften eingenommen werden sollte.
- 4 Das Antibiotikum Novobiocin hemmt die ATPase-Reaktion, die durch die Gyrase katalysiert wird. Erläutern Sie die antibiotische Wirkung von Novobiocin.

## ARBEITSBLATT

## Das Antibiotikum Ciprofloxacin

## Lösungen

- 1 Das Enzym Helicase bindet an einen DNA-Doppelstrang und öffnet diesen durch Spalten der Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Einzelsträngen. Es entsteht eine Replikationsgabel, an die sich die einzelstrangbindenden Proteine heften, um ein erneutes Zusammenlagern der beiden Einzelstränge zu verhindern. Die durch die Öffnung des DNA-Doppelstrangs entstandene Überdrehung wird durch das Enzym Gyrase reduziert. Die DNA-Polymerase wandert nun den Leitstrang kontinuierlich ab und verknüpft freie komplementäre Nucleotide, wodurch ein neuer DNA-Doppelstrang entsteht. Auf dem Folgestrang kann die Synthese nur diskontinuierlich ablaufen. Hier heften sich mehrere Primer an und die Abschnitte zwischen den Primern werden von der DNA-Polymerase neu synthetisiert (Okazaki-Fragmente).
- 2 Das Enzym Gyrase verhindert unter ATP-Verbrauch ein Überdrehen der DNA-Abschnitte, indem es einen Doppelstrangbruch herbeiführt. Der DNA-Strang wird dadurch entwunden. Das Antibiotikum Ciprofloxacin heftet sich an die Gyrase, nachdem diese den Doppelstrangbruch herbeigeführt hat. Die Gyrase kann jetzt nicht mehr den DNA-Strang entlangwandern, sodass auch alle nachfolgenden Schritte der DNA-Replikation blockiert sind. Ist die DNA-Replikation des Bakteriums unterdrückt, kann dieses sich nicht mehr vermehren.
- 3 In Milchprodukten und Fruchtsäften sind Magnesium und Calcium enthalten. Ciprofloxacin geht im Dünndarm eine Bindung mit diesen Stoffen ein. Dabei entsteht ein Chelatkomplex, der zu groß ist, um die Dünndarmepithelzellen zu passieren. Somit kann nicht mehr genügend Antibiotikum ins Blut gelangen. Folglich ist die Antibiotikakonzentration im Blut zu gering und die Bakterien können sich weiter vermehren. Das Medikament ist somit nicht wirksam.
- 4 Das Antibiotikum Novobiocin hemmt die Gyrase direkt, indem es verhindert, dass ATP gespalten werden kann. Dadurch fehlt der Gyrase die benötigte Energie, um einen Doppelstrangbruch durchzuführen, der wiederum für die DNA-Replikation notwendig ist.

## Praktische Tipps

Das Überdrehen der DNA während der Replikation kann den Schülerinnen und Schülern mithilfe eines einfachen Modells veranschaulicht werden. Dazu werden zwei Wäscheleinen oder Gummischnüre an einem Ende zusammengehalten und vom anderen Ende her miteinander verdreht. Zieht man die beiden Leinen oder Schnüre nun an einer beliebigen Stelle auseinander, sieht man, dass es in den nicht geöffneten Bereichen zu einer Überdrehung kommt.

## Zusatzinformation

## Wirkung von Antibiotika

Antibiotika lassen sich grob nach ihrem Wirkmechanismus in zwei Gruppen einteilen: Die eine hemmt die Zellwand- oder die Proteinbiosynthese am Ribosom, die andere wirkt auf bakterielle Nucleinsäuren bzw. deren Replikation und Transkription. Zu letztgenannter Gruppe gehören die sogenannten Gyrasehemmer, die die DNA-Replikation hemmen, sowie Folsäureantagonisten und Ansamycine, die die bakterielle RNA-Polymerase bei der Transkription unterdrücken.

## Topoisomerasen

Das Enzym Gyrase gehört zur Gruppe der Topoisomerasen. Diese regulieren die Überstrukturen (z. B. supercoil, nicked circle) der DNA-Doppelhelix und vermeiden somit Torsionsspannungen, die die DNA-Replikation negativ beeinflussen würden. Man kann zwischen Typ-I-DNA-Topoisomerasen und Typ-II-DNA-Topoisomerasen unterscheiden. Erstere führen Einzelstrangbrüche durch, während letztere Doppelstrangbrüche auslösen. Zu den Typ-II-DNA-Topoisomerasen gehört das Enzym Gyrase.

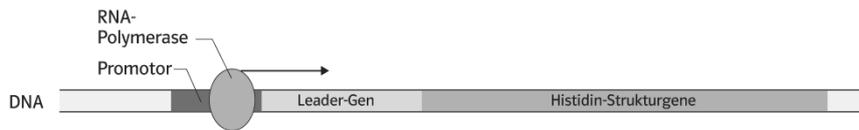
# Regulation der Histidin-Synthese

Die Aminosäure Histidin kann von dem Bakterium *Salmonella typhimurium* selbst synthetisiert werden. Werden Zellen von *S. typhimurium* auf Nährböden mit bzw. ohne Histidin kultiviert, sieht man, dass sie auf beiden Nährböden wachsen. Konzentrationsmessungen des Enzyms Histidinol-Phosphatase, eines der an der Histidinsynthese beteiligten Enzyme, zeigen die folgenden Ergebnisse (Abb. 1).

Der Syntheseweg des Histidins verläuft über insgesamt zehn Reaktionsschritte, die jeweils durch ein spezifisches Enzym katalysiert werden. Die Gene für diese Enzyme liegen benachbart auf der DNA des Histidin-Operons (his-Operon). Ein vorgeschaltetes sogenanntes Leader-Gen stellt hier das bakterielle Messgen für Histidin dar.

Wachstum von <i>S. typhimurium</i> auf	Konzentration von Histidinol-Phosphatase (relative Werte)
Vollmedium (mit Histidin)	0,2
Minimalmedium (ohne Histidin)	1,0

1 Bakterienwachstum und Enzymkonzentrationen

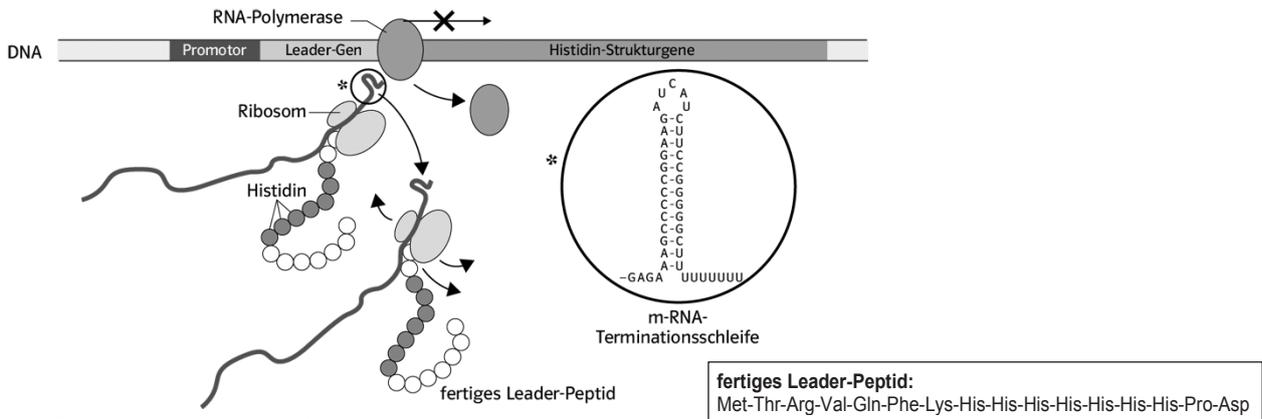


2 Struktur des his-Operons

Die Regulation der Histidinsynthese wurde bei ausreichend Histidin (Abb. 3) und bei Histidinmangel (Abb. 4) untersucht:

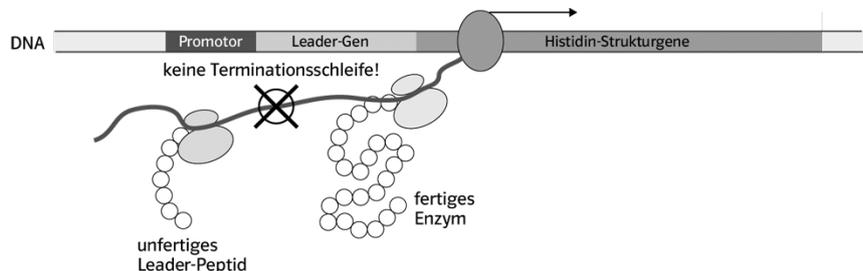
## Versuchsauswertung

Wenn sich ausreichend Histidin in der Zelle befindet, dann kann das Ribosom schnell die m-RNA des Leader-Gens translatieren, Histidin wird in das Peptid eingelagert und die m-RNA bildet eine Terminationsschleife zur Beendigung der Transkription aus.



3 Funktionsweise des his-Operons bei ausreichend Histidin

Bei Histidinmangel in der Zelle kann das Ribosom diese Translation nicht beenden, die m-RNA kann nicht schnell genug in das Ribosom geführt werden. Die m-RNA wird gestreckt, es bildet sich keine Terminationsschleife. Die Transkription wird fortgesetzt.



4 Funktionsweise des his-Operons bei Histidinmangel

- 1 Vergleichen Sie die Struktur des his-Operons (Abb. 2) mit einem Ihnen bekannten Operon-Modell.
- 2 Werten Sie die Befunde aus Abb. 1 aus.
- 3 Beschreiben und erläutern Sie das Regulationsprinzip beim his-Operon (Abb. 3 und 4).

## ARBEITSBLATT

## Regulation der Histidin-Synthese

## Lösungen

- 1 Individuelle Lösung.  
 Beispiel: Vergleich mit Lactose-Operon  
 Gemeinsamkeiten: Die Operons enthalten Strukturgene und einen vorgeschalteten Promotor für die RNA-Polymerase.  
 Unterschiede: Das Histidin-Operon besitzt kein Regulatorgen und folglich kein Repressorprotein. Es enthält auch keinen Operator, stattdessen ein Leader-Gen.
- 2 Bei ausreichend Histidin im Nährmedium wird kaum Histidinol-Phosphatase im Rahmen der Histidinsynthese gebildet, folglich wird kaum Histidin synthetisiert. Bei Histidinmangel im Nährmedium wird sehr viel Histidinol-Phosphatase hergestellt. Da die Strukturgene für die Enzyme in enger Nachbarschaft liegen, ist davon auszugehen, dass die beobachtete Regulation nicht nur für Histidinol-Phosphatase, sondern auch für weitere Enzyme gilt. Die Enzymsynthese wird ablaufen, bis ausreichend Histidin hergestellt worden ist.
- 3 Unabhängig vom Histidingehalt in der Zelle bindet die RNA-Polymerase am Promotor und transkribiert die DNA des Leader-Genes. An die entstehende m-RNA lagert sich ein Ribosom an und die Translation beginnt. Wenn Histidin vorhanden ist, läuft die Peptidbildung des Leader-Peptids schnell ab und die gebildete Terminationsschleife bewirkt das Ablösen der RNA-Polymerase von der DNA, anschließend werden das Ribosom, die m-RNA und das Peptid frei. Bei Histidinmangel kann kein Histidin eingebaut werden und das Ribosom verharrt an seiner Position auf der m-RNA, wodurch diese gestreckt wird. Es wird keine Terminationsschleife gebildet und die RNA-Polymerase liest die sich anschließenden Strukturgene ab. Ein weiteres Ribosom lagert sich an die m-RNA und das erste Enzym für die Histidinsynthese wird anschließend translatiert.

## Zusatzinformation

Dieser Mechanismus der Genregulation wird als Attenuatorregulation bezeichnet (Attenuator: Abschwächer). Das vorgestellte Prinzip der Transkriptionsregulation ist bei einigen Operons der Aminosäure-Biosynthese gefunden worden: Leucin-, Phenylalanin-, Threonin-, Isoleucin-, Valin-, Histidin-Operon. Das Attenuator-Gen entspricht dem Leader-Gen.

## Zusatzaufgaben

Das Leader-Gen im his-Operon von *Salmonella typhimurium* wird als Messgen für die Histidinkonzentration innerhalb der Zelle bezeichnet. Der folgende Ausschnitt aus der m-RNA des Leader-Genes ist bekannt:

5' ...UUUAUGACACGCGUCAAUUUAAACACCACCAUCAUCACCAUCAUCCUGACUAGUCU... 3'

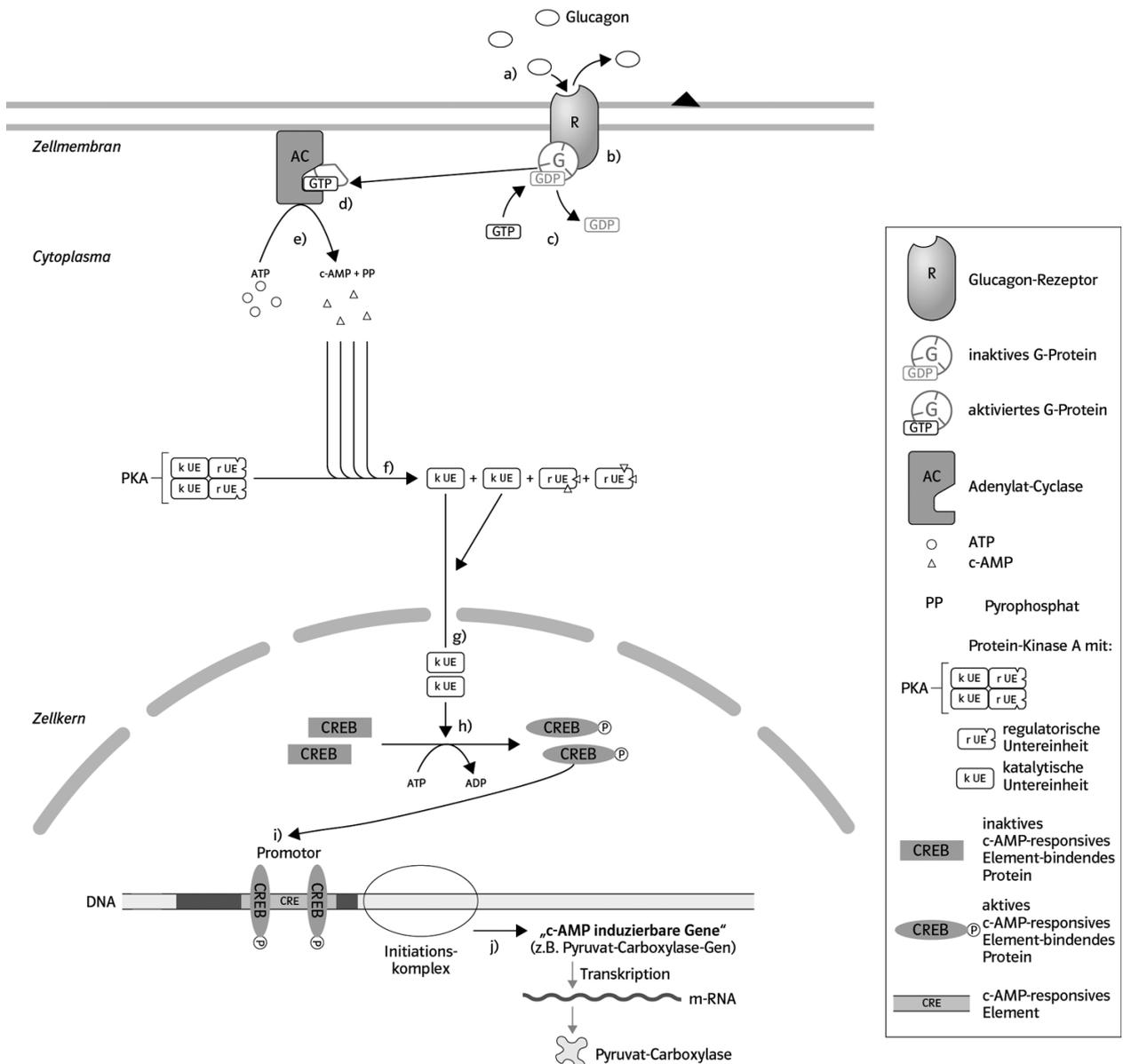
- 1 Übersetzen Sie die vorgegebene Basensequenz der m-RNA in die Aminosäuresequenz.
- 2 Erklären Sie, warum das Leader-Gen als Messgen bezeichnet werden kann.

## Lösungen

- 1 Met-Thr-Arg-Val-Gln-Phe-Lys-His-His-His-His-His-His-Pro-Asp  
 Die Aminosäuresequenz wird nur zwischen Start- und Stopp-Codon hergestellt.
- 2 Bei der Translation der m-RNA soll ein histidinreiches Peptid gebildet werden. Die in der Zelle vorhandene Konzentration von Histidin wird dabei indirekt gemessen, da bei Histidinmangel kaum mit Histidin beladene t-RNAs vorhanden sind, also das Leader-Peptid nicht fertiggestellt werden kann. Folglich ist die Codierung von vielen Histidin-Aminosäuren im Leader-Gen eine Form der Messung des Histidingehalts in der Zelle. Bei Bedarf wird durch die entstehende Terminationsschleife bei ausreichend Histidin in der Zelle die Transkription automatisch beendet.

# Genregulation beim Menschen – Enzyminduktion

Der tägliche Glucosebedarf liegt bei einem erwachsenen Menschen im Ruhezustand bei ungefähr 200 g. Wird dieser Wert unterschritten, so findet in den Leberzellen die Neusynthese von Glucose, die Gluconeogenese, statt. Sie wird durch das Peptidhormon Glucagon initiiert. Das Hormon aktiviert Prozesse, die die Transkription von bestimmten Zielgenen ermöglichen, sodass Enzyme für den Glucoseaufbau aus Pyruvat gebildet werden. Dieser Signaltransduktionsweg benötigt als signalisierendes Molekül das cyclische Adenosinmonophosphat (c-AMP) sowie einen Transkriptionsfaktor. Dabei wird eine Signalverstärkung beobachtet. Insgesamt spricht man in diesem Zusammenhang auch von einer Enzyminduktion.



1 Vereinfachtes Modell der Genregulation (Enzyminduktion) durch c-AMP in der Leberzelle

- 1 Beschreiben Sie das Schema zur Genregulation der Enzymsynthese (Abb. 1).
- 2 Erklären Sie, welcher der in Abb. 1 dargestellten Bestandteile der Genregulation ein Transkriptionsfaktor ist.
- 3 Erklären Sie, ob in diesem Beispiel (Abb. 1) ein Enhancer (verstärkender Transkriptionsfaktor) vorkommt.

## ARBEITSBLATT

## Genregulation beim Menschen — Enzyminduktion

## Lösungen

- 1
  - a) Glucagon bindet an den Glucagon-Rezeptor in der Membran der Leberzelle.
  - b) Der Rezeptor ist ursprünglich an der Membranınnenseite mit einem G-Protein gekoppelt, das GDP gebunden hat und damit inaktiv ist.
  - c) Durch die Bindung von Glucagon wird der Rezeptor aktiviert. Dadurch wird im G-Protein das GDP durch GTP ausgetauscht. Das G-Protein ist aktiviert.
  - d) Das GTP löst sich vom aktivierten G-Protein und bindet an die ebenfalls membranständige Adenylat-Cyclase.
  - e) Die Adenylat-Cyclase katalysiert die Umwandlung von ATP in c-AMP und Pyrophosphat.
  - f) Das gebildete c-AMP bindet dann an die Protein-Kinase A, die aus 4 Untereinheiten besteht, an die regulatorischen Einheiten. Dadurch zerfällt die Protein-Kinase A, die beiden regulatorischen Untereinheiten werden entfernt und die beiden katalytischen Untereinheiten werden freigesetzt.
  - g) Die katalytischen Kinase-Einheiten diffundieren durch die Kernporen in den Zellkern.
  - h) Dort katalysieren die Kinase-Moleküle die Phosphorylierung des ebenfalls im Zellkern befindlichen Proteins CREB mit ATP. Dadurch wird CREB aktiviert.
  - i) Zwei aktivierte CREB-Proteine binden an die DNA-Basensequenz CRE am Promotor der Zielgene und der Initiationskomplex für die Transkription kann gebildet werden.
  - j) Die Transkription und anschließend die Translation der für die Gluconeogenese benötigten Enzyme, z. B. Pyruvat-Carboxylase, können gestartet werden.

Zusatzinformation: Das Pyruvat-Carboxylase-Gen ist durch c-AMP induzierbar, weil nur die Bildung des second messengers c-AMP die Weiterleitung des ursprünglichen Signals, nämlich der extrazellulären Bindung von Glucagon an den passenden Rezeptor, ermöglicht.

- 2 CREB ist der Transkriptionsfaktor, der an bestimmten DNA-Sequenzen binden und so die Transkription regulieren kann. In diesem Fall binden 2 aktivierte CREB-Moleküle an die DNA-Sequenz CRE.
- 3 CRE ist die typische Basenabfolge auf der DNA, an der der Enhancer CREB binden kann, wodurch die Transkription verstärkt wird.

## Zusatzinformation

Eric Richard Kandel (\*1929), Arvid Carlsson (1923 — 2013) und Paul Greengard (1925 — 2019) erhielten im Jahr 2000 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für ihre Entdeckungen betreffs der Signalübertragung im Nervensystem. Kandels Arbeit umfasste auch Erkenntnisse über die Rolle von c-AMP und CREB (c-AMP response element binding protein) bei der Funktion des Langzeitgedächtnisses (s. Literatur- und Medienhinweise, Lehrband S. 218).

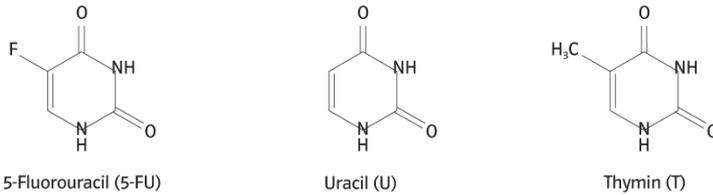
Mittlerweile ist bekannt, dass der Transkriptionsfaktor CREB an bis zu 5000 menschliche Promotorsequenzen binden kann. Er wird dabei unterschiedlich aktiviert, nicht nur durch c-AMP, sondern auch durch Calcium-Ionen oder andere Faktoren.

## Praktische Tipps

Als weitere Sicherung des Modells einer eukaryotischen Genregulation können die Sätze aus der Lösung oben ohne Reihenfolge vorgegeben werden, mit der Aufgabe, diese in der richtigen Reihenfolge in die Schülerunterlagen einzukleben.

# Schwere Nebenwirkung einer Chemotherapie

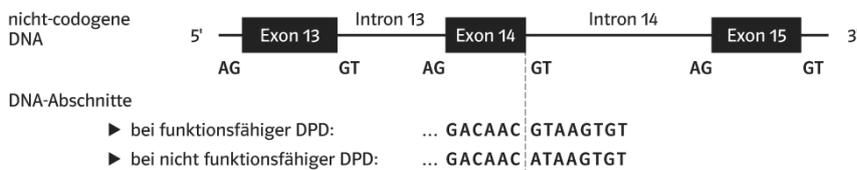
Die Entstehung von Krebs beruht auf vielen unkontrollierten Zellteilungen. Die Chemotherapie verschiedener Krebserkrankungen mit dem Chemotherapeutikum 5-Fluorouracil (5-FU) ist heute eine der Standardtherapien. Das Medikament hat die Eigenschaft, die Zellteilung und die Proteinbiosynthese in Zellen zu hemmen. Dadurch wird das Wachstum von Zellen verlangsamt oder diese werden sogar abgetötet.



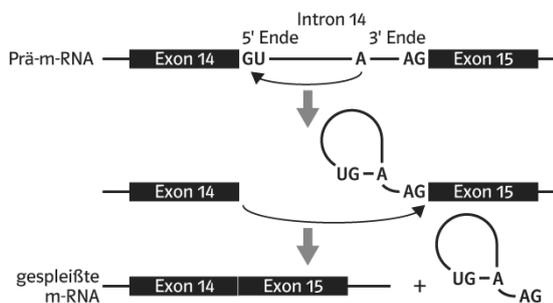
## 1 Chemische Strukturen von 5-Fluorouracil, Uracil, Thymin

Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) ist das Schlüsselenzym beim Abbau von Pyrimidin-Basen, so auch von dem Chemotherapeutikum 5-FU.

Bei ca. 3–5% der mit 5-FU behandelten Patienten treten schwerwiegende Nebenwirkungen auf, bis hin zu vereinzelt Todesfällen aufgrund von 5-FU-Unverträglichkeit. Die lebensbedrohlichen Nebenwirkungen einer 5-FU-Chemotherapie basieren auf dem funktionsuntüchtigen Enzym DPD.



## 2 Genstruktur des funktionstüchtigen und des funktionsuntüchtigen Enzyms DPD



## 3 Vorgänge beim Spleißen der unveränderten Prä-m-RNA

Untersuchungen zum Spleißen haben ergeben, dass die Introns der Prä-m-RNA meist am 5'-Ende mit GU beginnen und meist am 3'-Ende mit AG enden. Dadurch werden chemische Reaktionen ausgelöst, die zur Bildung einer lassoähnlichen Struktur führen und somit das Spleißen ermöglichen.

Ergebnisse des Spleißens von DPD-m-RNA:



## 4 Spleißergebnisse für die m-RNA des Enzyms DPD

- 1 Nennen und erläutern Sie mögliche Ursachen, warum 5-FU (Abb. 1) die Zellteilung und die Proteinbiosynthese in Zellen hemmt.
- 2 Beschreiben Sie die hier gezeigte molekularbiologische Ursache, die zur Bildung des funktionsuntüchtigen DPD-Enzyms (Abb. 2) führt.
- 3 Erklären Sie, warum das mutierte DPD-Enzym funktionsuntüchtig ist (Abb. 3 und 4).

## ARBEITSBLATT

## Schwere Nebenwirkung einer Chemotherapie

## Lösungen

- 1 5-FU ähnelt in seiner chemischen Struktur den natürlichen Pyrimidinbasen Thymin und Uracil. Deshalb kann es anstelle dieser Basen in die DNA und die RNA eingebaut werden. So entsteht eine fehlerhafte m-RNA, die die Proteinbiosynthese hemmt. Die DNA-Synthese kann ebenfalls durch den Einbau von 5-FU gehemmt werden.
- 2 Die DNA des Enzyms DPD besteht aus 23 Exons und 22 Introns. Im Fall des funktionsuntüchtigen DPD-Enzyms zeigt das 14. Intron am Beginn eine Genmutation, den Basenaustausch G → A.
- 3 Da die Introns der Prä-m-RNA an der 5'-Stelle mit GU beginnen und an der 3'-Stelle mit AG enden, fehlt durch den Basenaustausch die Basenkombination, die beim Spleißvorgang in der Prä-m-RNA für die Bildung der lassoähnlichen Struktur sorgt. Dadurch fehlt die Voraussetzung zum Verknüpfen der benachbarten Exons 14 und 15. Folglich kann das Intron 14 nicht herausgeschnitten werden. Die Spleißergebnisse zeigen, dass das Intron 14 allerdings nicht in der reifen m-RNA verbleibt, sondern dass es gemeinsam mit Intron 13 und Exon 14 herausgeschnitten wurde. Die Exons 13 und 15 wurden direkt verknüpft. Demnach muss der Spleißvorgang mit einer größeren Lassostruktur, zwischen dem GU-Ende von Exon 13 und dem AG-Ende von Exon 15, abgelaufen sein.  
Im mutierten Enzym ist ein Teil der Aminosäuresequenz nicht vorhanden, da in der reifen m-RNA das komplette Exon 14 fehlt und so nicht translatiert werden kann. Dies hat Auswirkungen auf die Tertiärstruktur des Enzyms DPD. Die Raumstruktur des aktiven Zentrums wird dadurch so verändert, dass das Substrat 5-FU nicht abgebaut werden kann.

## Zusatzinformation

Die beschriebene Mutation wird als Exon-14-Skipping-Mutation bezeichnet (engl. skipping = Überspringen). Dabei wird das Exon 14 bei der Bildung der reifen m-RNA übersprungen. In Nordeuropa sind 3% der Bevölkerung Träger einer Mutation im DPD-Enzym. Ein Viertel davon ist Träger der Exon-14-Skipping-Mutation. Nach Verabreichung von 5-FU können bereits heterozygote Anlageträger Vergiftungserscheinungen zeigen. Daher ist eine molekulargenetische Mutationsanalyse des DPD-Gens vor Beginn der Chemotherapie mit 5-FU empfehlenswert. Dafür wird die m-RNA der Weißen Blutzellen einer Blutprobe isoliert und einer reversen Transkription unterzogen. Die gesuchten DNA-Fragmente werden mittels PCR amplifiziert. Anschließend kann die Exon-14-Skipping-Mutation elektrophoretisch ermittelt werden.

## Zusatzaufgaben

## Weitere Mutationen im DPD-Gen

In den Beispielen werden die Nucleotidsequenzen der nicht-codogenen DNA aufgeführt.

Fall 1: Mutation im Exon 2

DNA-Nucleotide	Aminosäuren
Wildtyp 1 ... CTG TGT TCC ...	_____
Mutante 1 ... CTG CGT TCC ...	_____

Fall 2: Mutation im Exon 14

DNA-Nucleotide	Aminosäuren
Wildtyp 2 ... AGC TCC TTT CTG AAT ...	_____
Mutante 2 ... AGT CCT TTC TGA AT ...	_____

- 1 Ermitteln Sie die Mutationen und leiten Sie mithilfe der Codesonne (s. Schülerbuch S. 114) die zu erwartenden Aminosäuresequenzen ab.
- 2 Leiten Sie aus Ihren Befunden ab, welche Folgen diese Mutationen für die Struktur und die Funktion des Enzyms haben.

## Lösungen

- 1 Mutante 1: im 2. Triplet, 1. Position: Basenaustausch T → C, Missense-Mutation  
Wildtyp 1: ... Leu-Cys-Ser ... Mutante 1: ... Leu-Arg-Ser ...  
Mutante 2: Im 1. Triplet: Basenverlust an 3. Position (-C), Leserastermutation (Deletion)  
Wildtyp 2: ... Ser-Ser-Phe-Leu-Asn ... Mutante 2: ... Ser-Pro-Phe-(Stopp)
- 2 Fall 1: Die veränderte Raumstruktur (Tertiärstruktur) durch eine andere oder fehlende Disulfidbrücke führt zu einer herabgesetzten Funktionstüchtigkeit oder Funktionslosigkeit des Enzyms.  
Fall 2: Die veränderte Basenabfolge führt dazu, dass bei der m-RNA ein Stopp-Codon als drittes Codon hinter dem Mutationsort vorliegt. Folglich bricht die Proteinbiosynthese im Exon 14 ab (normalerweise 23 Exons), das Enzym ist unvollständig, seine Raumstruktur kann keine Enzymtätigkeit ermöglichen.

## Wenn Favabohnen gefährlich werden

Ein Mangel an Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD), einem wichtigen Enzym des Glucosestoffwechsels, ist die weltweit häufigste Enzymmangelerkrankung. Besonders häufig von dieser Erkrankung betroffen sind Bewohner der Mittelmeerländer, Afrikas, Südasiens und des Nahen Ostens.

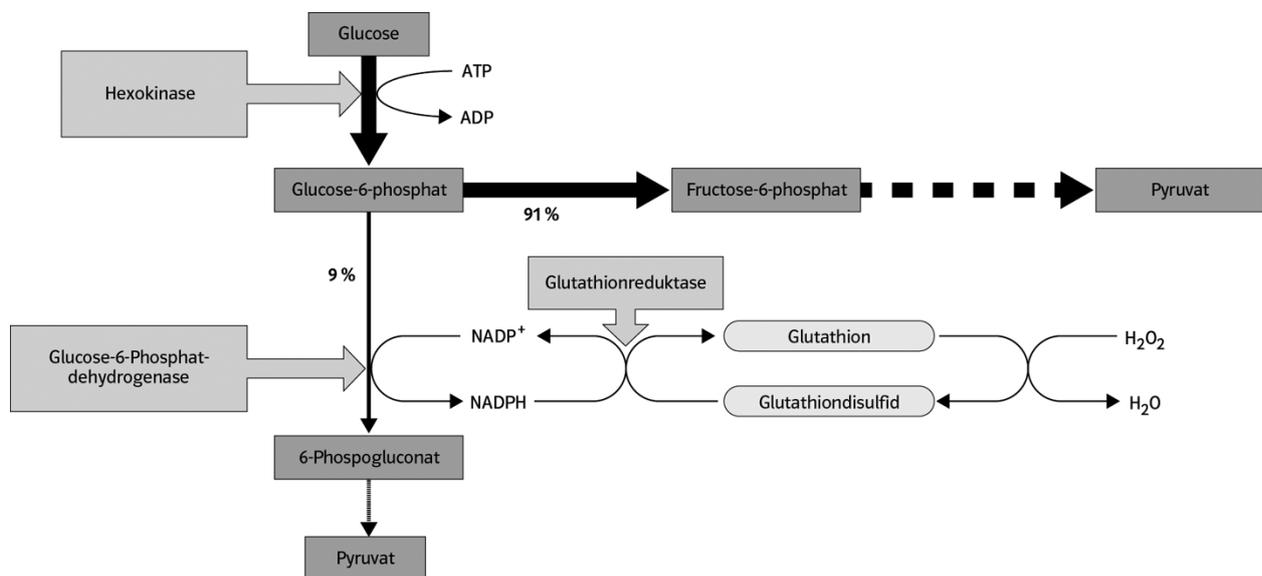
Der Mangel des Enzyms G6PD ist angeboren und auf eine Mutation des G6PD-Gens auf dem X-Chromosom zurückzuführen. Die Symptome eines G6PD-Mangels sind hoch variabel: Manche Menschen sind beschwerdefrei, während bei anderen eine lebensbedrohliche sogenannte hämolytische Krise auftreten kann, bei der in kurzer Zeit 50 % der Roten Blutzellen zerfallen (Hämolyse). In den meisten Fällen erfolgt eine Hämolyse nur dann, wenn Nahrungsmittel aufgenommen werden, die in hohem Maße Wasserstoffperoxid bilden. Dies ist unter anderem bei nicht ausreichend gekochten Favabohnen der Fall, weshalb die Krankheit auch als Favismus bezeichnet wird. Favabohnen sind aufgrund ihres hohen Kohlenhydrat- und Proteingehalts ein wichtiges Nahrungsmittel im afrikanischen Raum und der Mittelmeerregion.

Ist zu wenig G6PD vorhanden, kann im Verlauf des Glucosestoffwechsels das Glutathion, ein Antioxidans, nicht ausreichend gebildet werden. Die Roten Blutzellen (Erythrocyten) sind dadurch einer größeren Zahl von zellschädigenden, sehr reaktionsfreudigen Sauerstoffverbindungen, wie z. B. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), ausgesetzt.

Das G6PD-Gen hat eine Größe von circa 18 000 Basenpaaren und weist 13 Exons auf. In unten stehender Tabelle (Abb. 1) sind ein Ausschnitt des Exons 6 des G6PD-Gens bei einer gesunden Person sowie Mutationsformen bei zwei weiteren Personen dargestellt.

	Base Nr.	40	50
nicht mutierte DNA, codogener Strang (Person A)	3'	AGA	GGC TGG AAC CGC 5'
mutierte DNA, codogener Strang (Person B)	3'	AGA	AGC TGG AAC CGC 5'
mutierte DNA, codogener Strang (Person C)	3'	AGA	GCT GGA ACC GCA 5'

1 Ausschnitt des Exons 6 der DNA-Sequenz des G6PD-Gens



2 Abbau von Glucose bei einer gesunden Person

- 1 Beschreiben Sie mithilfe von Abb. 2 den Ablauf des Glucoseabbaus bei einem gesunden Menschen.
- 2 Erstellen Sie mithilfe der Codesonne die Aminosäuresequenz des Exons 6 des nicht mutierten Gens für Glucose-6-phosphat.
- 3 Beschreiben Sie die Veränderung der Basensequenz des Gens für Glucose-6-phosphat bei Person A und B und ermitteln Sie die jeweils daraus resultierende Aminosäuresequenz.
- 4 Erläutern Sie, welche Auswirkungen diese dargestellten Veränderungen auf die Struktur und die Funktion des gebildeten Proteins Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase haben könnten.

## ARBEITSBLATT

## Wenn Favabohnen gefährlich werden

## Lösungen

1 Aus Glucose entsteht unter ATP-Verbrauch mithilfe des Enzyms Hexokinase Glucose-6-phosphat. Dieses wird zu 91% zu Fructose-6-phosphat umgewandelt, das in mehreren Schritten zu Pyruvat weiterverarbeitet wird. Die verbleibenden 9% des Glucose-6-phosphats werden von der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase unter Anwesenheit von  $\text{NADP}^+$  zu 6-Phosphogluconat umgebaut.  $\text{NADP}^+$  wird dazu von der Glutathionreduktase durch Oxidation von  $\text{NADPH}$  und gleichzeitiger Reduktion von Glutathiondisulfid zu Glutathion bereitgestellt. Das Glutathion wird im Anschluss durch Wasserstoffperoxid wieder zu Glutathiondisulfid oxidiert, dabei wird das Wasserstoffperoxid zu Wasser reduziert. Das 6-Phosphogluconat wird in mehreren Schritten zu Pyruvat weiterverarbeitet.

2 DNA 3' AGA GGC TGG AAC CGC 5'  
m-RNA 5' UCU CCG ACC UUG GCG 3'  
AS Ser Pro Thr Leu Ala

3 DNA 3' AGA AGC TGG AAC CGC 5'  
m-RNA 5' UCU UCG ACC UUG GCG 3'  
AS Ser Ser Thr Leu Ala

Bei Person B gab es eine Punktmutation an der ersten Stelle des zweiten Basentriplets. Dort wurde die Base Guanin durch Adenin ausgetauscht.

DNA 3' AGA GCT GGA ACC GCA 5'  
m-RNA 5' UCU CGA CCU UGG CGU 3'  
AS Ser Arg Pro Trp Arg

Bei Person C gab es eine Deletion der Base Guanin an der zweiten Stelle des zweiten Basentriplets. Als Folge hat sich das Leseraster verschoben.

4 Bei Person B führt der Austausch einer Base zum Einbau einer anderen Aminosäure. Dies kann zu einem anderen Protein, also einer nicht funktionsfähigen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase führen, wenn das aktive Zentrum betroffen ist. Diese Mutation kann aber auch ohne schwerwiegende Folgen bleiben, nämlich dann, wenn die neu eingebaute Aminosäure (hier Serin) nicht das aktive Zentrum betrifft. Bei Person C führt die Leserastermutation dazu, dass alle nachfolgenden Aminosäuren falsch eingebaut werden. Diese Mutation führt daher zu einem defekten Enzym.

## Zusatzaufgabe

1 Stellen Sie eine begründete Vermutung an, warum fast ausschließlich Jungen und Männer von der Krankheit betroffen sind.

## Lösung

1 Vermutlich handelt es sich um einen X-chromosomal rezessiven Erbgang. Hierbei sind Frauen in den meisten Fällen Überträgerinnen, weil sie einen Defekt auf einem X-Chromosom durch ihr zweites X-Chromosom ausgleichen können. Männer sind immer dann von der Krankheit betroffen, wenn sie von ihrer Mutter ein defektes X-Chromosom vererbt bekommen haben.

## Zusatzinformation

## Albinismus

Die Ursachen von Albinismus sind äußerst vielfältig, da diese Erkrankung durch die Mutation an 50 verschiedenen Genen ausgelöst werden kann. Die häufigste Ursache ist eine Punktmutation auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11, die zum Verlust des Enzyms Tyrosinase führt. Dieses Enzym wird für die Produktion des Farbstoffs Melanin benötigt, der Haut, Haare und die Iris im Auge färbt. Als Folge dieses Enzymmangels haben Menschen mit Albinismus weißblondes Haar, hellblaue bis rötliche Augen und eine hellrosa Haut. Durch die fehlende Hautpigmentierung besteht für Menschen mit Albinismus ein erhöhtes Risiko, an Hautkrebs zu erkranken. In den meisten Fällen leiden sie zudem an einer hohen Lichtempfindlichkeit der Augen und einer Sehschwäche.

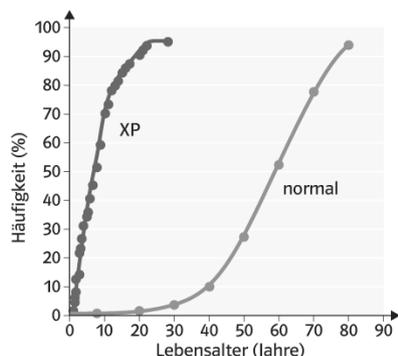
## Hämophilie A (Bluterkrankheit)

Hämophilie A ist eine Krankheit, die auf die Mutation eines Gens auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms zurückzuführen ist und von der vorwiegend Männer betroffen sind. Der Blutgerinnungsfaktor VIII, der beim gesunden Menschen für eine schnelle Gerinnung des Blutes notwendig ist, fehlt hier. Schon kleinere Verletzungen können zu einem hohen Blutverlust führen und somit lebensbedrohlich werden.

# Mondscheinkrankheit – ein Fehler im DNA-Reparatursystem



1 Kind mit UV-Schutzanzug



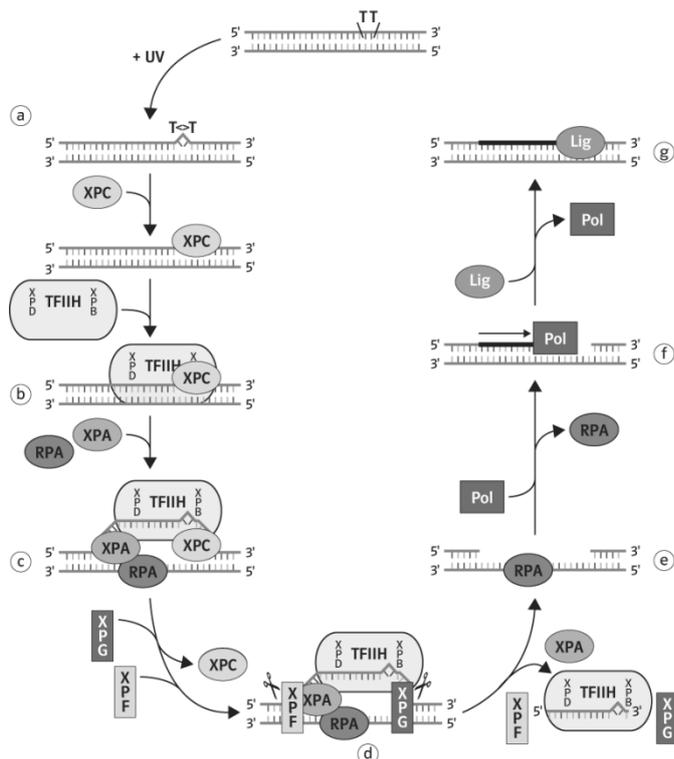
2 Hautkrebswahrscheinlichkeit

Mondscheinkinder leiden an der genetisch vererbten Hautkrankheit Xeroderma pigmentosum (XP). Sie müssen das Sonnenlicht meiden, da sie im Vergleich zu Gesunden ein bis zu 5000-fach erhöhtes Hautkrebsrisiko haben. In Deutschland liegt die Erkrankungshäufigkeit bei ca. 1 : 1 000 000. Betroffene müssen in abgedunkelten Räumen leben, deren Fenster mit UV-Schutzfolie beklebt sind. Außerhalb ihrer Wohnung können sie sich nur nachts oder tagsüber mit besonderen Lichtschutzmaßnahmen aufhalten. Solche Maßnahmen beinhalten z. B. das Auftragen von Hautcreme mit dem Lichtschutzfaktor 60 oder das Anziehen eines UV-undurchlässigen Schutzanzuges (Abb. 1). An sonnenexponierten Hautstellen sowie an den Augen entstehen Verbrennungssymptome, die sich zu bösartigen Hautkrebsformen entwickeln können.

Durch UV-Strahlen werden Thymin-Dimere in der DNA der Hautzellen gebildet, sodass bei der Replikation die Arbeit der DNA-Polymerase nicht mehr möglich ist. Bei gesunden Menschen wird dieser DNA-Schaden schnell repariert. Bei XP-Patienten funktioniert der Reparaturmechanismus nicht.

Die DNA-Reparatur verläuft über einen Reaktionsweg mit mehreren Schritten unter Beteiligung von Enzymen oder Transkriptionsfaktoren (Abb. 3).

Da ein längerer Abschnitt von Nucleotiden aus der DNA geschnitten wird, spricht man von Nucleotid-Exzisionsreparatur (lat. excisio = herauschneiden).



3 Vereinfachtes Schema der Nucleotid-Exzisionsreparatur

TT	Thymin-Dimer
UV	UV-Strahlung
XPA, XPC	Proteine zum Erkennen des DNA-Schadens
TFIIH	Transkriptionsfaktor
XPB, XPD	Helicasen zum Entspiralisieren der Doppelhelix
XPD, TFIIH, XPB	Komplex aus Transkriptionsfaktor und den Helicasen
XPG, XPF	Endonucleasen zum Einschneiden des defekten Bereichs
Pol	Polymerase zur Resynthese
Lig	Ligase zur Verknüpfung der DNA-Teilstücke
RPA	Einzelstrang bindendes Replikationsprotein

- 1 Vergleichen Sie die Hautkrebswahrscheinlichkeit bei XP-Patienten und Gesunden (Abb. 2).
- 2 Beschreiben Sie die Phasen der Exzisionsreparatur (Abb. 3) unter Berücksichtigung der beteiligten Proteine.
- 3 Erläutern Sie, wie es dazu kommen kann, dass bei XP-Patienten der Mechanismus der Nucleotid-Exzisionsreparatur nicht abläuft.

## ARBEITSBLATT

## Mondscheinkrankheit – ein Fehler im DNA-Reparatursystem

### Lösungen

- Bei XP-Patienten ist ein Hautkrebsrisiko von Geburt an vorhanden. Dieses steigt später steil an, ab dem Alter von 20 Jahren liegt das Risiko bei 95 %. Die Lebenserwartung ist gering. Nur wenige Patienten werden älter als 30 Jahre.  
Bei Patienten ohne XP steigt das Hautkrebsrisiko erst ab einem Alter von ca. 40 Jahren exponentiell an. Bei einem Alter von 80 Jahren liegt das Risiko für Hautkrebs bei 95 %.
- a) Erkennen der „Auswölbung“ des Thymin-Dimers durch XPC; b) Binden des Transkriptionsfaktors TFIIH, der die Helicasen XPB und XPD enthält; c) Binden des Erkennungsproteins XPA und des Einzelstrang stabilisierenden Proteins RPA nach der Entspiralisierung des DNA-Bereichs durch die Helicasen, Ablösen des Proteins XPC; d) Schneiden des DNA-Einzelstrangs beiderseits des Thymin-Dimers durch Endonucleasen: XPF am 5'-Ende, XPG am 3'-Ende; e) Entfernen des DNA-Einzelstrangbereichs mit dem fehlerhaften Thymin-Dimer zusammen mit dem TFIIH-Komplex und dem Erkennungsprotein XPA; f) Ergänzen des komplementären Strangs durch die DNA-Polymerase und Entfernen von RPA; g) Verbinden der DNA-Stücke durch die Ligase.
- Mutationen an Genen, die für die an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine (XPA bis XPG) codieren, können zu XP führen. Für den Ablauf des Reparaturmechanismus müssen alle beteiligten Proteine funktionstüchtig sein.

### Zusatzaufgaben

Die XP-Krankheit kann durch verschiedene Mutationen verursacht werden. So können z. B. diverse Mutationen im Gen A gleichermaßen für das Auftreten eines anormalen Proteins XPA bei Patienten verantwortlich sein, das zur Mondscheinkrankheit führt. Das Protein XPA hat eine Länge von insgesamt 276 Aminosäuren. Das codierende Gen ist normalerweise aus 6 Exons aufgebaut.

Fall 1: gesund: Codon-Nr. 108 UGU, Patient: Codon-Nr. 108 UUU

Fall 2: gesund: Codon-Nr. 116 UAU, Patient: Codon-Nr. 116 UAA

Fall 3: gesund: 3'-m-RNA-Ende des 3. Introns mit der Basenfolge AG  
Patient: 3'-m-RNA-Ende des 3. Introns mit der Basenfolge AC

Fall 4: Basensequenz von Exon 6 ab Codon-Nr. 261:

gesund: ... ACUUGUACUAUGUGUGGCAUGAACUGACAUAUGAAAAAUGUGA ...

Patient: ... AUUCUUUUGUACUAUGUGUGGCAUGAACUGACAUAUGAAAAAUGUGA ...

- Ermitteln Sie für die Fälle 1 und 2 die Mutationen und leiten Sie mithilfe der Codesonne (s. Schülerbuch S. 114) die zu erwartenden Ergebnisse ab.
- Erläutern Sie für Fall 3 die möglichen Folgen der dargestellten Mutation.
- Ermitteln Sie die in Fall 4 vorliegende Mutation und erstellen Sie mithilfe der Codesonne (s. Schülerbuch S. 114) die zu erwartenden Aminosäuresequenzen.
- Stellen Sie eine Hypothese auf, warum es sich bei den Fällen 1 bis 3 um schwere Formen von XP, bei Fall 4 dagegen nur um eine milde Form von XP handelt.

### Lösungen

1 Fall 1: Basenaustausch G → U (DNA: C → A) ist eine Missense-Mutation: Cys → Phe

Fall 2: Basenaustausch U → A (DNA: A → T) ist eine Nonsense-Mutation: Tyr → Stopp

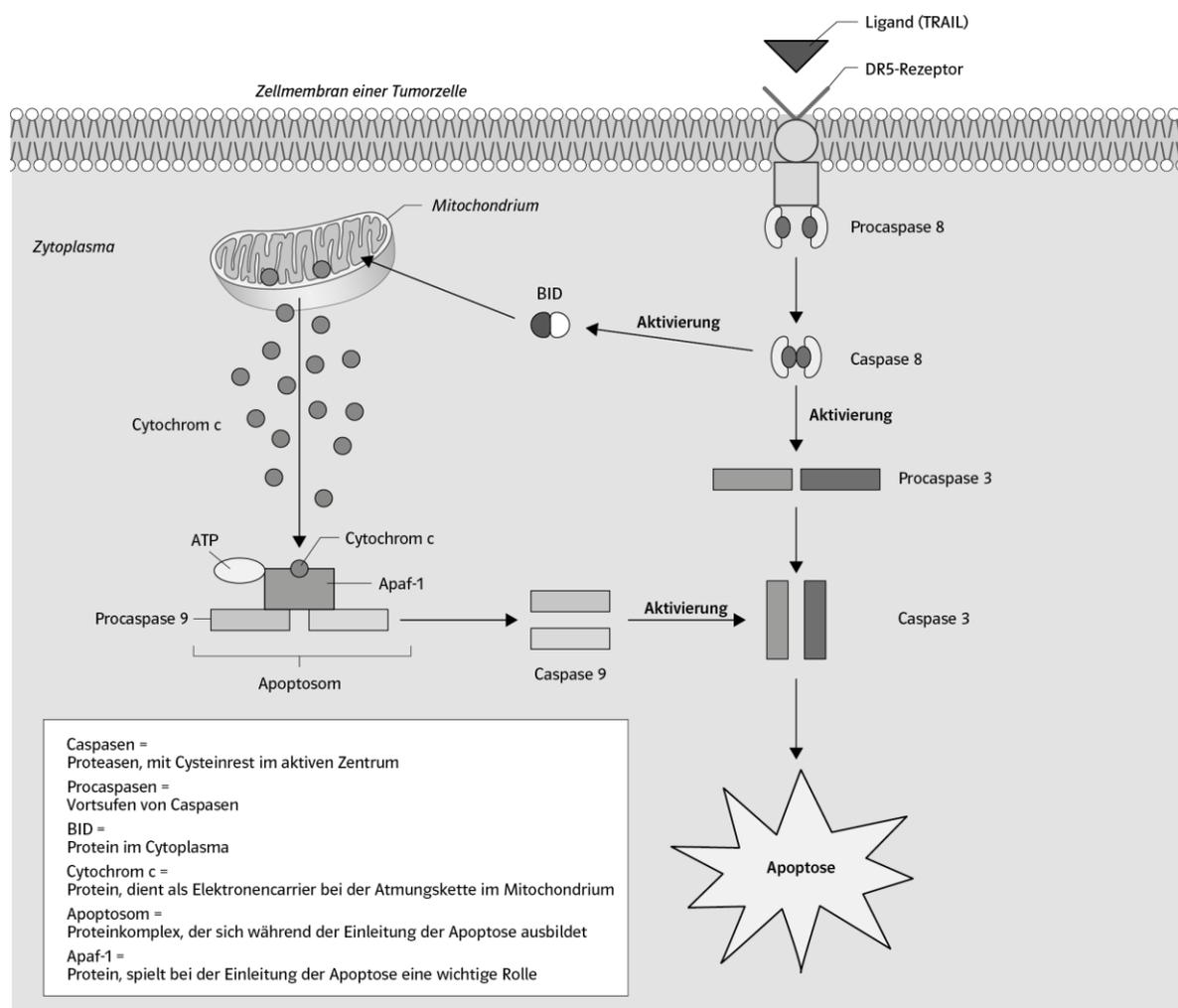
2 Fall 3: Wenn durch einen Basenaustausch am 3'-Ende des Introns der Prä-m-RNA die Base Guanin durch Cytosin (DNA: C → G) ersetzt worden ist, dann kann hier keine lassoähnliche Struktur gebildet werden. An dieser Stelle findet kein Spleißen statt (s. Lehrband S. 222/223). Der Spleißvorgang wird an einer weiter entfernten, passenden Stelle durchgeführt, sodass eine verkürzte m-RNA und folglich ein verkürztes Protein entsteht.

3 Fall 4: Insertionen in Codon-Nr. 261 und 262: +UU (DNA: +AA) sind Leserastermutationen.  
gesund: ... Thr-Cys-Thr-Met-Cys-Gly-His-Glu-Leu-Thr-Tyr-Glu-Lys-Met. Stopp  
Patient: ... Ile-Leu-Leu-Tyr-Tyr-Val-Trp-Pro. Stopp

4 Da das Protein XPA sowohl an DNA mit Thymin-Dimeren als auch an den Transkriptionsfaktor TFIIH bindet, werden Mutationen (Fälle 1 bis 3), die diese Bindungsbereiche verändern (Änderung der Raumstruktur, Verkürzungen), schwere Auswirkungen haben. Wenn die Mutationen im 4. Fall nur geringe Auswirkungen haben, liegt das daran, dass die Veränderungen in einer Region liegen, die nicht die Bindungsbereiche betreffen. Insgesamt ist die Aminosäurekette nur um 6 Aminosäuren verkürzt und die letzten 8 endständigen Aminosäuren sind ausgetauscht.

## Zielgerichtete Apoptose als ein Mittel gegen Krebs?

In jeder Sekunde gehen Millionen gealterte oder kranke Zellen unseres Körpers zugrunde, damit andere, gesunde Zellen leben können. Dieser Vorgang des programmierten Zelltods wird als Apoptose bezeichnet. Eine beeinträchtigte Apoptose spielt neben der ungezügelt Vermehrung entarteter Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krebserkrankungen. Forscher konnten zeigen, dass die Resistenz mancher Tumorzellen gegenüber der Chemo- oder der Bestrahlungstherapie ebenfalls auf Störungen des zellulären Apoptoseprogramms zurückzuführen ist. Viele Medikamente im Einsatz gegen Tumore entfalten einen Großteil ihrer Wirkung indirekt über den programmierten Zelltod. Gelingt es, eine gestörte Apoptose in entarteten Zellen wieder in Gang zu bringen, eröffnen sich neue Perspektiven in der Krebstherapie. Ein möglicher Ansatzpunkt ist der körpereigene Botenstoff TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand). Er löst speziell in Tumorzellen den programmierten Zelltod aus, hat aber auf gesunde Zellen in der Regel keine Wirkung. Man hat beobachtet, dass es unter Gabe von TRAIL bei gleichzeitiger Chemotherapie bzw. Bestrahlung zur Apoptose der betroffenen Zelle und damit zu einem Absterben der Tumorzellen kommt.



### 1 TRAIL-induzierte Apoptose

- 1 Beschreiben Sie mithilfe von Abb. 1 die Schritte, die zur Apoptose bei Tumorzellen führen, nachdem der Ligand TRAIL gebunden hat.
- 2 Stellen Sie auf Basis von Abb. 1 eine Hypothese auf, warum die Apoptose in manchen entarteten Zellen nicht mehr funktioniert.
- 3 Anders als bei Tumorerkrankungen kann auch eine verstärkte Apoptose krankhafte Veränderungen verursachen, wie z. B. bei Multipler Sklerose, Alzheimer-Demenz oder Parkinson. Bei diesen Erkrankungen werden gesunde Zellen vorzeitig abgebaut und nicht durch neue Zellen ersetzt. Stellen Sie eine begründete Hypothese auf, wie die Struktur des DR5-Rezeptors zu einer verstärkten Apoptose führen könnte.

## ARBEITSBLATT

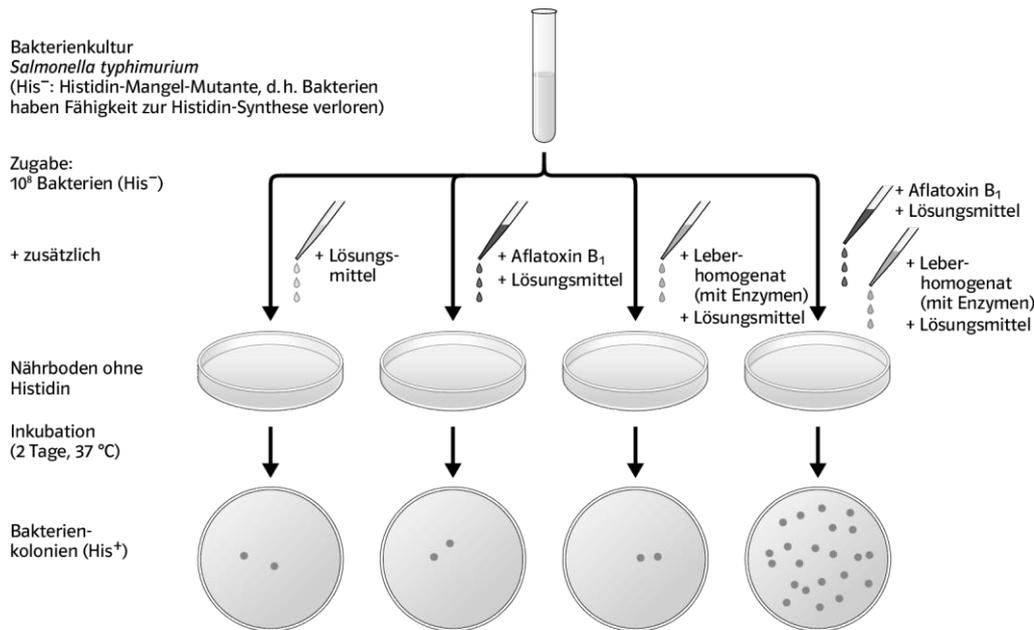
## Zielgerichtete Apoptose als ein Mittel gegen Krebs?

## Lösungen

- 1 Ein Ligand (TRAIL) bindet an der Membranaußenseite einer Tumorzelle nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an den DR5-Rezeptor eines Proteins. An dieses Protein ist die Procaspase 8 gekoppelt, die daraufhin zur Caspase 8 umgebaut wird. Die Caspase 8 wiederum aktiviert die Procaspase 3. Es kommt zu einer Umordnung des Moleküls und eine funktionsfähige Caspase 3 entsteht. Die Caspase 8 aktiviert zudem das Protein BID. BID dringt in die Mitochondrien ein, woraufhin diese verstärkt Cytochrom c freisetzen. Cytochrom c bindet an Apaf-1, ebenso wie ein ATP-Molekül. Der Komplex bindet nun an eine Procaspase 9 und bildet in seiner Gesamtheit ein Apoptosom. Als Folge der Bindung von Apaf-1, Cytochrom c und ATP an die Procaspase 9 wird diese zu Caspase 9 gespalten. Caspase 9 aktiviert die bereits zuvor gebildete Caspase 3 und es kommt zur Apoptose der Zelle.
- 2 Die Signalkette kann an mehreren Stellen behindert und die Apoptose dadurch verhindert werden. Zum Beispiel kann eine Mutation im DR5-Rezeptor diesen verformt haben, sodass kein TRAIL mehr daran binden kann, um die Signalkette in Gang zu setzen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch Mutation eine der Caspasen, die für die Apoptose notwendig sind, nicht gebildet werden kann.
- 3 Kommt es zu einer strukturellen Veränderung des DR5-Rezeptors, könnte dessen Selektivität beeinträchtigt sein. Es könnten dann auch andere Liganden daran binden und die Apoptose fälschlicherweise in Gang setzen.

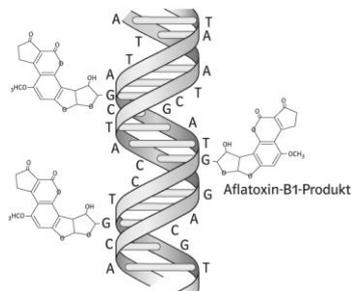
# Aflatoxin B<sub>1</sub> – ein hochwirksames krebserregendes Mutagen

Aflatoxin B<sub>1</sub>, ein Produkt des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus*, ist sehr giftig. Der Schimmelpilz kommt überall vor, lebt aber bevorzugt in verrottendem Pflanzenmaterial. Vorteilhaft für ihn sind besonders tropische Regionen mit feuchtem und heißem Klima. Die Lagerungsbedingungen von landwirtschaftlichen Ernten, wie z. B. Mais, anderen Feldfrüchten und Nüssen, bieten dem Pilz dort ein Umfeld, in dem er gut wachsen und besonders hohe Giftkonzentrationen entwickeln kann. Die Ernteerzeugnisse sind dadurch mit dem Gift kontaminiert. Deutlich wird dies in einer hohen Leberzellkrebsrate in der dortigen Bevölkerung. Aflatoxin B<sub>1</sub> wird in der Leber enzymatisch abgebaut, wodurch der Körper entgiftet wird. Das dabei entstehende Zwischenprodukt kann allerdings zum Teil in den Zellkern der Leberzelle eindringen und dort Veränderungen an der DNA hervorrufen. Stoffe, die wie Aflatoxin B<sub>1</sub> eine Krebserkrankung auslösen oder wahrscheinlicher machen, werden als Karzinogene bezeichnet. Zur Überprüfung der Mutagenität von Aflatoxin B<sub>1</sub> wurde der Ames-Test durchgeführt.



1 Ames-Test mit Aflatoxin B<sub>1</sub>

Die Hälfte der Patienten mit Leberzellkrebs aus den von einer Aflatoxin-B<sub>1</sub>-Kontamination betroffenen Regionen der Erde zeigen in ihrem Tumorsuppressor-Gen (TP53) die gleiche Mutation, die das zugehörige p53-Protein funktionslos macht.



2 Bindung zwischen DNA und enzymatisch synthetisiertem Aflatoxin-B<sub>1</sub>-Produkt

TP53	normal	mutiert
Triplet-Nr.	247 248 249 250	247 248 249 250
Basensequenz	5'... AAC CGG AGG CCC ...3' 3'... TTG GCC TCC GGG ...5'	5'... AAC CGG AGT CCC ...3' 3'... TTG GCC TCA GGG ...5'

3 Mutation im TP53-Gen

- 1 Beschreiben und erklären Sie die Durchführung und Ergebnisse des Ames-Tests mit Aflatoxin B<sub>1</sub> (Abb. 1).
- 2 Erklären Sie, welche Mutation durch Aflatoxin B<sub>1</sub> hervorgerufen wurde (Abb. 3). Beschreiben Sie, welche Wirkung Aflatoxin B<sub>1</sub> auf die Replikation hat (Abb. 2).
- 3 Erläutern Sie, ob Mutagene immer gleichzeitig auch Karzinogene sind.

## ARBEITSBLATT

## Aflatoxin B<sub>1</sub> – ein hochwirksames krebserregendes Mutagen

### Lösungen

- 1** Durchführung: Gleiche Mengen von His-Bakterien werden auf vier Nährböden ohne Histidin (His-Mangel-Nährböden) übertragen. Auf die Nährböden werden folgende Proben gegeben:

Nährboden 1: Lösungsmittel,  
 Nährboden 2: Lösungsmittel und Aflatoxin B<sub>1</sub>,  
 Nährboden 3: Leberhomogenat und Lösungsmittel,  
 Nährboden 4: Aflatoxin B<sub>1</sub> und Lösungsmittel sowie Leberhomogenat und Lösungsmittel.

Beobachtung: Auf den ersten drei Mangel-Nährböden wachsen nur je 2 His<sup>+</sup>-Bakterienkolonien, auf dem Nährboden mit der Wirkstoffkombination wachsen 22 His<sup>+</sup>-Kolonien.

Erklärung: Normalerweise wachsen His-Mutanten nicht auf den His-Mangel-Nährböden, es sei denn, ihre DNA ist spontan rückmutiert und die Bakterien-Mutanten können sich vermehren. Die ersten drei Proben sind Kontrollproben: Probe 1, die nur das Lösungsmittel beinhaltet, ist die Negativkontrolle. Sie soll sicherstellen, dass das Lösungsmittel nicht mutagen ist. Die Proben 2 und 3 belegen, dass Aflatoxin B<sub>1</sub> allein oder Leberenzyme allein nicht mutagen sind. Alle diese 3 Proben zeigen die normale Rückmutationsrate. Nur beim Zusammenwirken von Lösungsmittel, Leberhomogenat und Aflatoxin B<sub>1</sub> entfaltet das Abbauzwischenprodukt von Aflatoxin B<sub>1</sub> seine mutagene Wirkung. Das Aflatoxin B<sub>1</sub> ist daher nur indirekt mutagen, es bedarf einer enzymatischen Aktivierung. Weil Bakterien nicht über Leberenzyme verfügen, müssen diese in der Versuchsreihe zugesetzt werden.
- 2** In TP53 fand im Basentriplett Nr. 249 an der dritten Position ein Basenaustausch von G → T statt. Diese Missense-Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Arginin → Serin. Die Ursache für diese Mutation ist die Anlagerung eines enzymatisch synthetisierten Aflatoxin-B<sub>1</sub>-Produktes, einer großen polycyclischen Kohlenwasserstoff-Verbindung, an die DNA-Base Guanin (Abb. 2). So wird die DNA-Replikation gestört und es kommt gehäuft zu einem Einbau einer falschen Base.
- 3** Ein Mutagen bewirkt eine DNA-Veränderung in einer Zelle, ein Karzinogen ruft unregelmäßiges Zellwachstum hervor. Beide Eigenschaften hängen eng zusammen. Ein Mutagen kann auch ein Karzinogen sein, das ist aber nicht immer der Fall. Betrifft die Mutation ein Tumorsuppressorgen, ist die Wahrscheinlichkeit, dass Krebs ausgelöst wird, deutlich erhöht.

### Zusatzinformation

Es sind ca. 25 Aflatoxine bekannt, von denen Aflatoxin B<sub>1</sub> das stärkste Gift ist.  
 letale Dosis von Aflatoxin B<sub>1</sub> (Mensch): 1–10 mg/kg Körpergewicht  
 letale Dosis von Aflatoxin B<sub>1</sub> (Ratte): 7,2 mg/kg Körpergewicht  
 karzinogene (krebserregende) Tagesdosis von Aflatoxin B<sub>1</sub> (Ratte): 10 µg/kg Körpergewicht

Chemische Mutagene sind z. B.:

- Nitrosamine (können beim Frittieren, Braten und Grillen entstehen)
- basenanaloge Stoffe
- polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (in Tabakrauch, Rohöl etc. enthalten)
- Schimmeligifte

Physikalische Mutagene sind z. B.:

- Röntgenstrahlung
- ionisierende Strahlung
- UV-Strahlung

Der Ames-Test wird seit den 1970er-Jahren zum Nachweis von potenziell mutagenen Substanzen genutzt. Durch die Verwendung von Leberenzymen im zugesetzten Leberhomogenat werden In-vivo-Bedingungen im System Säuger simuliert. Viele polycyclische Kohlenwasserstoffverbindungen, die als Karzinogene eingestuft sind, werden erst bei den Entgiftungsreaktionen in der Leber aktiviert und dann mutagen. Im Test wird das potenzielle Mutagen mit Rattenleberhomogenat vermischt, bevor es zu den Bakterien gegeben wird, damit es von den Leberenzymen gegebenenfalls aktiviert wird.