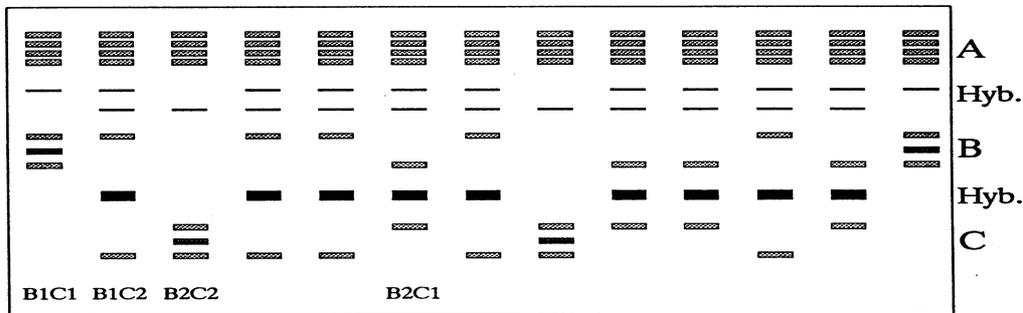
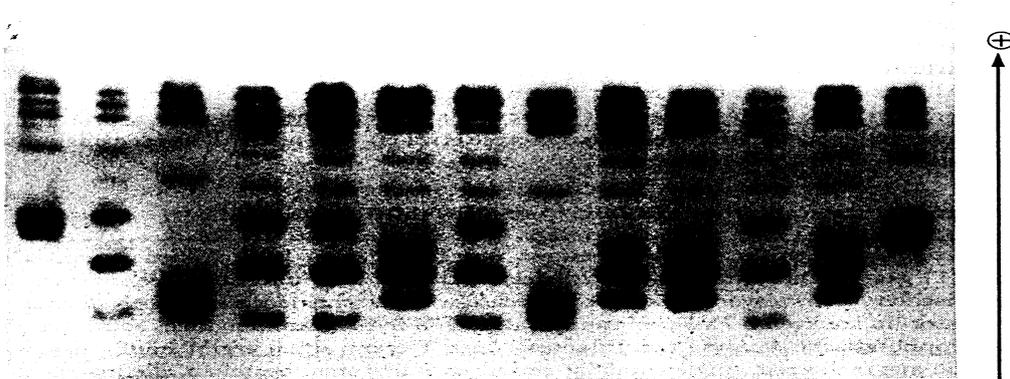
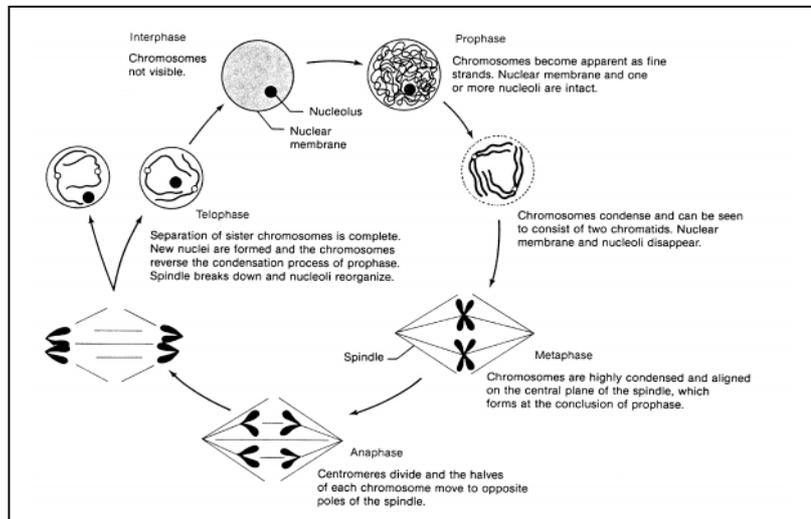
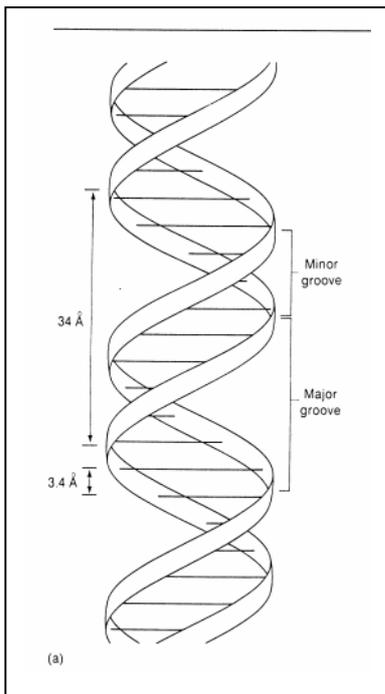


Teil B



Molekulare Grundlagen Der Genetik



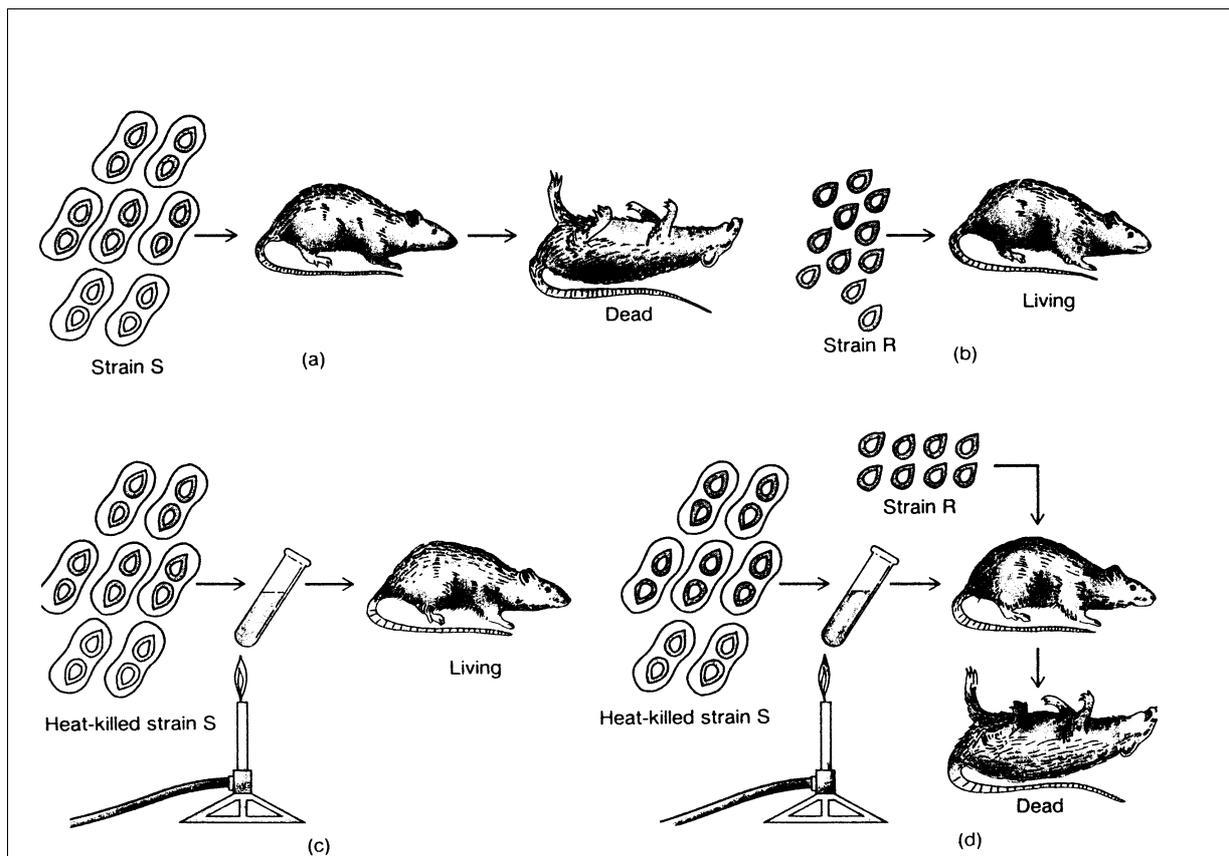
Speicherung und Transformation der genetischen Information

Speicherung und Transformation von Informationen in biologischen Systemen erfolgt über Moleküle. Bereits im Jahre 1928 führte GRIFFITH ein Experiment durch, welches darauf hindeutete, dass ein Molekül die genetische Information speichert und weitergibt. Heute wissen wir, dass das Molekül, welches die genetische Information enthält, die **Desoxyribonukleinsäure (DNS)** ist. Der Nachweis, dass DNS tatsächlich Träger der Erbinformation ist, gelang erst im Jahre 1944 durch ein Experiment von AVERY, MCLEOD und MCCARTY.

Die Versuche von GRIFFITH (1928)

GRIFFITH infizierte Mäuse mit einem Bakterium, welches Lungenentzündung hervorruft (**Pneumococcus**). Dieses Bakterium hat die Fähigkeit, aus Zucker eine Hülle zu synthetisieren, sich dadurch vor der Immunabwehr des Wirtes zu schützen und ihn krank zu machen. Pneumococcus tritt in der normalen, krankmachenden Form (**S-Form**) und in einer mutanten Form (**R-Form**) auf. Der **R-Form** fehlt infolge einer Mutation das Enzym für die Synthese der schützenden Kapsel; das Bakterium wird vom Immunsystem deshalb erkannt und es vermag den Wirt daher nicht zu infizieren.

1928 infizierte GRIFFITH Mäuse mit beiden Pneumococcus-Formen, wobei er auch durch Hitze abgetötete **S-Formen** verwendete. Das Experiment sah folgendermassen aus:



Aus WEAVER 1991

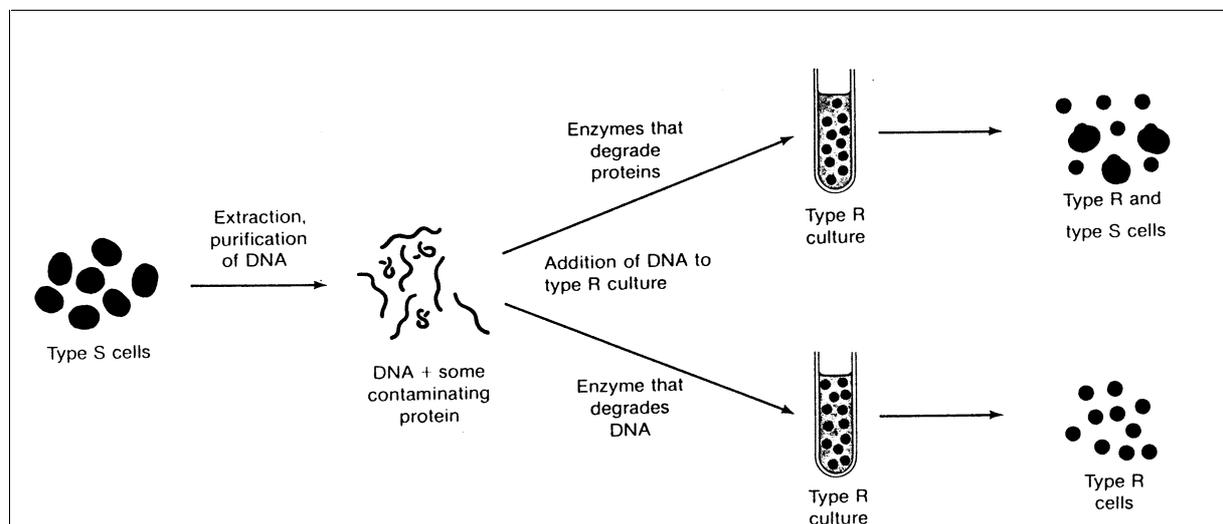
a) virulente S-Bakterien töten die Mäuse b) mutante R-Bakterien sind nicht virulent und können die Mäuse nicht töten c) durch Hitze abgetötete S-Bakterien sind nicht mehr virulent, die Mäuse überleben d) durch Hitze abgetötete S-Bakterien gemischt mit nicht virulenter R-Bakterien töten hingegen die Mäuse; die abgetöteten S-Bakterien haben die nichtvirulenten R-Bakterien in virulente verwandelt

Mäuse, denen eine Mischung aus einer kleinen Menge *R-Bakterien* und einer grossen Menge abgetöteter *S-Bakterien* injiziert wurden, starben an Lungenentzündung. Bakterien, die aus dem Blut der toten Mäuse isoliert wurden, waren reine *S-Formen*. Da reine Kulturen der *S-Form* vorlagen, kann eine Mutation von $R \rightarrow S$ ausgeschlossen werden, weil im Fall einer Mutation auch *R-Formen* in der Kultur hätten vorhanden sein müssen.

Die toten *S-Bakterien* müssen daher auf irgend eine Weise den lebenden *R-Bakterien* die Fähigkeit übertragen haben, eine Hülle zu synthetisieren, mit der sie der Immunabwehr der Mäuse entgehen und sie töten konnten. Zudem muss diese neu gewonnene Fähigkeit von den toten *S-Bakterien* geerbt worden sein. Irgend eine chemische Verbindung muss die Information der *S-Bakterien* gespeichert und an die *R-Bakterien* weitergegeben haben.

Der Versuch von AVERY – ein Meilenstein in der Genetik

Der Beweis, dass es sich bei dieser chemischen Verbindung um DNS handelt, gelang erst 1944 durch AVERY und Mitarbeiter. Sie führten folgendes einfaches Experiment durch:



Aus HARTEL 1987

Die genetische Information aus der extrahierten DNS von *S-Zellen* wurde nur dann an eine wachsende Kultur von *R-Zellen* weitervererbt, wenn nur die Proteine mittels eines Enzyms degradiert (zerstört) worden sind. Wurde hingegen die DNS degradiert, so unterblieb die Weitergabe der Information an die *R-Zellen*. Durch dieses einfache Experiment war der Nachweis erbracht, dass es die DNS der Zelle sein muss, welche die genetische Information enthält und auf die *R-Zellen* transformiert. **DNS muss also die Trägersubstanz der genetischen Information sein.**

Struktur und Vorkommen von DNS und RNS

Die genetische Information wird also in Nukleinsäuren und nicht in Proteinen gespeichert. Bei Bakterien und allen höheren Organismen ist die Trägersubstanz der genetischen Information die **DNS** während bei Viren und einigen Bakteriophagen die **RNS (Ribonukleinsäure)** diese Aufgabe übernimmt. Nukleinsäuren sind lange Kettenmoleküle, die aus Zuckermolekülen und Basen bestehen. Einen Überblick über Struktur und Vorkommen gibt folgende Tabelle:

Struktur			Vorkommen	
Desoxyribonukleinsäure DNS				
Zucker	Basen	Aufbau	Als Genmaterial	Intrazellulär
2-Desoxyribose	Adenin Guanin Thymin Cytosin	Doppelhelix aus zwei Strängen	Bakteriophagen Bakterien höhere Pflanzen Tiere	Zellkern Plastiden Mitochondrien
Ribonukleinsäure RNS				
Ribose	Adenin Guanin Uracil Cytosin	Einzelstrang	Bakteriophagen Viren	Zellkern Ribosomen Plasma

Nach HATTEMER et al. 1993

Erbträger der Prokaryonten (Organismen ohne Zellkern z.B. Viren, Eubakterien)

- Überwiegend einzellige Organismen
- Keine vollständige Abgrenzung der Kompartimente durch Membranen
- Keine Chromosomen, reine Nukleinsäuremoleküle ohne Histone und Nucleosomen

Erbträger der Eukaryonten (Organismen mit Zellkernen, z.B. Bakterien und höhere Organismen)

- Kompartimente, die vollständig mit Membranen umschlossen sind
 - Kern-Plasma Raum ¹⁾
 - Plastiden ¹⁾
 - Mitochondrien ¹⁾
 - Endoplasmatisches Retikulum
 - Ribosomen

1) enthalten Information tragende DNS Moleküle

Einige allgemeine Begriffe: Idiotyp, Plasmotyp und Genotyp

Idiotyp: Gesamtheit der in einem Individuum gespeicherten genetischen Information

Plasmotyp: Genetische Information in den Zellorganellen (Plastiden, Mitochondrien)

Genotyp: Genetische Information im Zellkern

Als Genotyp wird der Kürze halber aber auch das Trägerindividuum des Genotyps bezeichnet. Als Genotyp werden ferner auch Teile dieser genetischen Information in Form des Allelbestandes an bestimmten Genorten bezeichnet

Besonderheiten von Genen im Plasmotyp

Die Vererbung von Merkmalen, die von Genen in Zellorganellen kontrolliert werden, nennt man **extrachromosomale, extranukleare oder plasmatische Vererbung**. Sie weicht in verschiedener Hinsicht von der nuklearen Vererbung (durch Erbräger im Zellkern) ab:

- Vererbung folgt **nicht** den Mendelschen Regeln
- Phänotypen von reziproken ($\text{♀} \times \text{♂}$, $\text{♂} \times \text{♀}$) Kreuzungen unterscheiden sich im Typ oder in der Häufigkeitsverteilung
- Häufig tritt **uniparentale Vererbung** auf d.h. die Nachkommen haben stets den Phänotyp eines Elters. Bei Angiospermen ist die mütterliche (**maternale**) Vererbung weit verbreitet, während die väterliche (**paternale**) und die biparentale Vererbung nur selten ist. Beispiele für paternale Vererbung sind etwa *Abies alba*, *Sequoia sempervirens* oder *Calocedrus decurrens*, bei denen die Chloroplasten väterlich vererbt werden
- Gene im Plasmotyp sind stark konserviert d.h. sie weisen **sehr kleine Mutationsraten** auf, weil sie hochspezifische Funktionen in der Zelle wahrnehmen

Die uniparentale Vererbung der Gene im Plasmotyp kann für genetische Untersuchungen genutzt werden. Insbesondere für die Rekonstruktion der Rückwanderung von Baumarten und für die Herkunftsidentifikation können genetische Untersuchungen an Zellorganellen sehr wirksam eingesetzt werden, wie das folgende Beispiel zeigt:

Beispiel: Rückwanderungsgeschichte und Herkunftsidentifikation bei Eiche

Die **Chloroplasten** der Eiche werden maternal vererbt. Entsprechend lässt sich die Ausbreitung bzw. die Wiederbesiedlung nach der letzten Eiszeit rekonstruieren, da die Samen immer dieselben Chloroplasten-Gene aufweisen wie die Mütter, von denen sie stammen. Indem man die Verteilung der Chloroplasten-Gene in den heutigen Populationen untersucht, lassen sich folglich **Linien gleicher Abstammung** bzw. deren historische, räumliche Ausbreitung verfolgen. Dies setzt allerdings voraus, dass sich verschiedene Linien an einzelnen Genorten durch eine Mutation unterscheiden. Mit der PCR-RFLP Methode (s. später) ist es möglich, Mutationen auf bestimmten Abschnitten der **Chloroplasten DNS** zu erkennen. Es lassen sich dadurch unterschiedliche sogenannte **Haplotypen** (da haploid, nur von der Mutter) unterscheiden, die sich durch Vorhandensein oder Fehlen solcher Mutationen unterscheiden.

In einer französischen Untersuchung an Eichen aus ganz Europa konnten 25 verschiedene Haplotypen beobachtet werden, die aufgrund ihrer Mutationen auf 3 verschiedene Abstammungslinien zurückgehen müssen. Aufgrund der vorhandenen geographischen Verteilungsmuster liegt die Annahme nahe, dass diese drei Linien aus drei verschiedenen Refugialgebieten stammen, wo die Mutationen ursprünglich entstanden sind.

Sind einmal die räumlichen Verbreitungsmuster bekannt, so lassen sich auch Populationen erkennen, deren Haplotyp nicht in das Verteilungsmuster (= gleiche Linie = gleicher Rückwanderungsstrom) passen. Bei solchen Populationen liegt die Annahme nahe, dass sie nicht autochthon sind, sondern durch menschliche Aktivität, also durch Verwendung einer Herkunft aus einem anderen Gebiet (andere Abstammungslinie) dorthin verbracht worden sind.

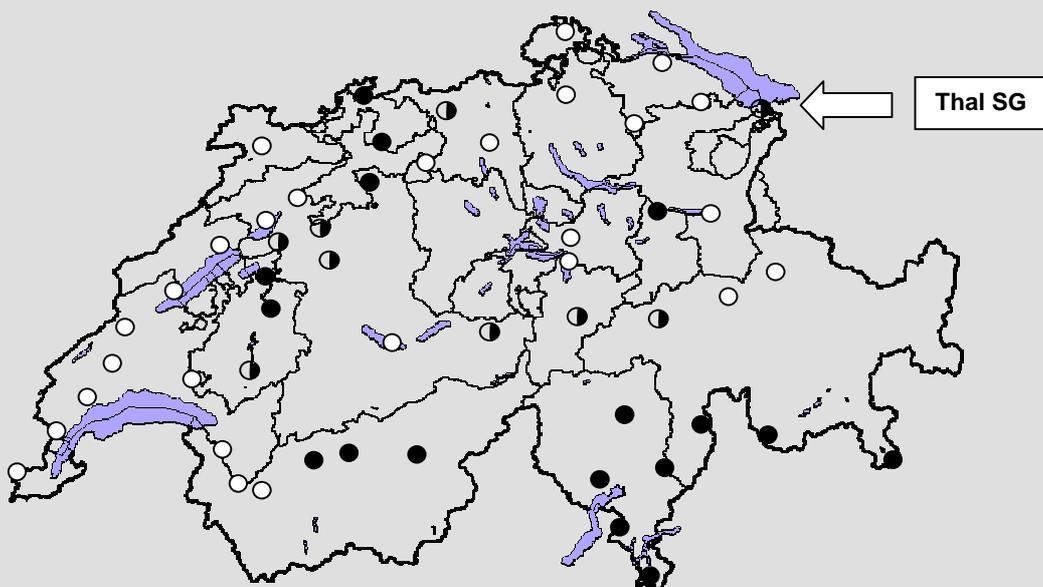


Aus DUCOUSO et al. 1997

Verteilung zweier Chloroplasten-DNS Haplotypen bei Eiche in Europa. Die Punkte gehören zur Linie 1, die auf ein Refugialgebiet auf der Iberischen Halbinsel zurückgeht. Die Kreuze markieren Individuen aus den Linien 2 und 3, die aus Refugialgebieten in Italien und dem Balkan stammen. Bekannt sind heute 25 Haplotypen aus noch weiteren Linien.

Beispiel für die Herkunftsidentifikation

Die Analyse der Eiche in der Schweiz an einem bestimmten Abschnitt der Chloroplasten-DNS (mit und ohne Mutation) zeigt folgendes Verteilungsmuster der beiden Haplotypen (schwarz/weiss):



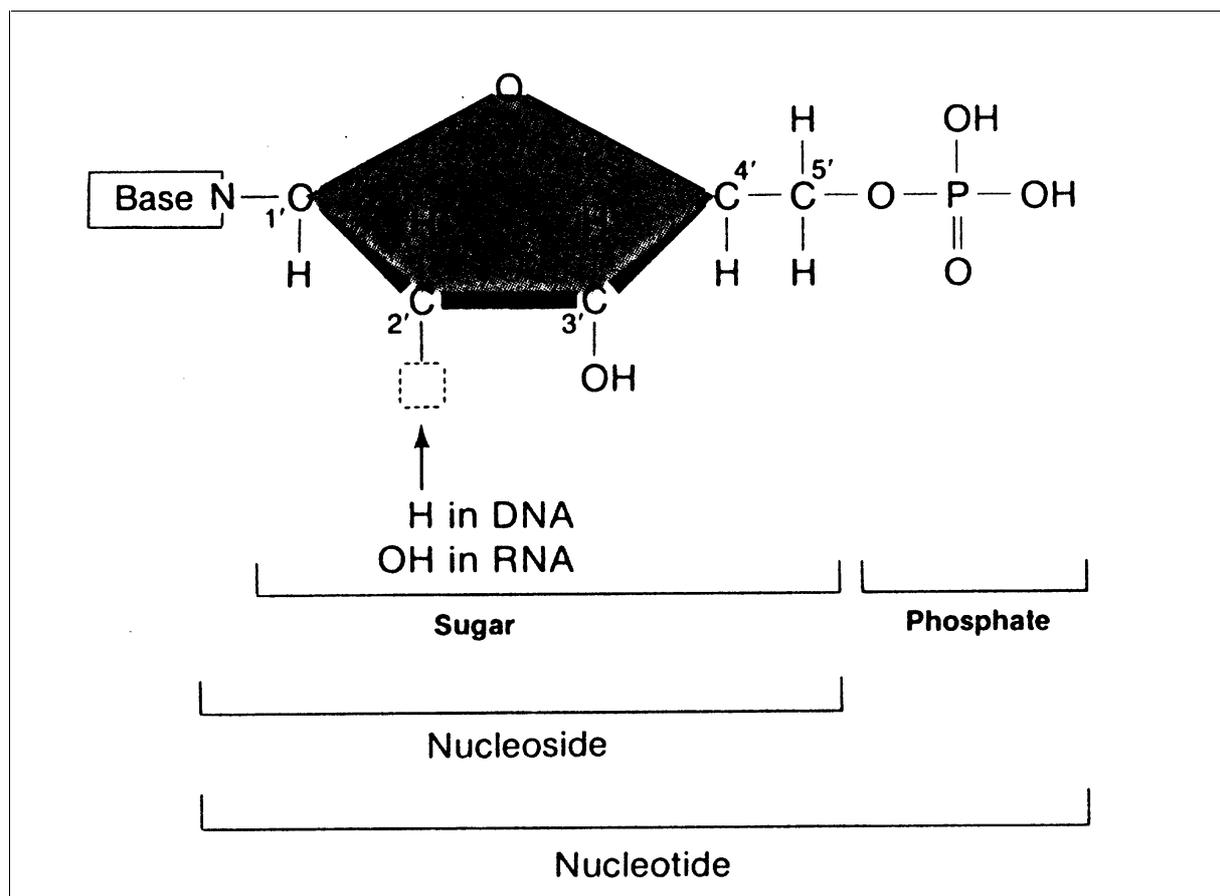
Aus MATYAS (unveröffentlicht)

Die Untersuchung der Chloroplasten-DNS der Eiche in der Schweiz ergibt folgende Befunde:

- In der Schweiz kommen beide Haplotypen vor (schwarz und weiss)
- Die beiden Haplotypen sind nicht zufällig verteilt, sondern sie kommen in klar voneinander getrennten Gebieten vor (an Kontaktzonen auch gemischt). Dieses Muster kann mit grosser Wahrscheinlichkeit auf die nacheiszeitliche Wiedereinwanderung der Eiche in die Schweiz zurückgeführt werden
- Aufgrund der Verteilung der Haplotypen können Rückschlüsse auf die vom Menschen verursachten Veränderungen gezogen werden. Die Fläche in Thal (SG) beispielsweise weist beide Haplotypen auf, obwohl in dieser Region ursprünglich nur der weisse Typ vorgekommen ist. Es ist deshalb anzunehmen, dass es sich hierbei um eine Pflanzung mit nicht autochthonem Material aus dem Gebiet des schwarzen Haplotypen handelt.

Aufbau der DNS

Nukleinsäuren sind lange Kettenmoleküle, die aus **Nukleotiden** zusammengesetzt sind. Nukleotide bestehen aus drei Komponenten: einer **Pentose** (Zucker), einer **Stickstoffbase** und einem **Phosphatrest**:

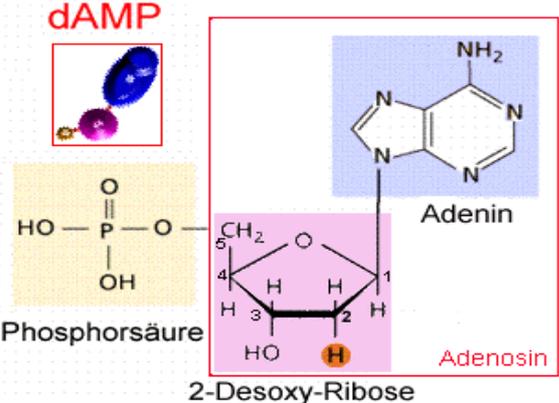
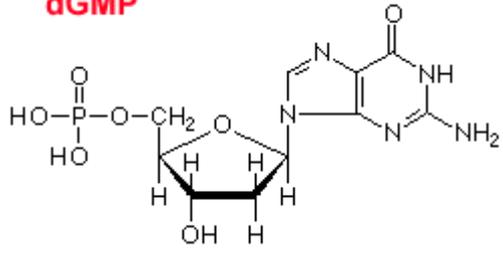
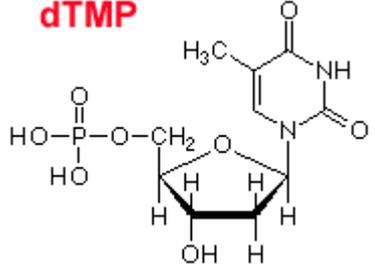
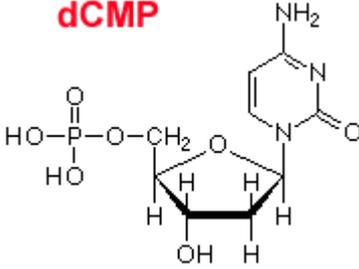


Aus HARTEL 1987

Die Pentose (Desoxyribose) befindet sich im Zentrum. Auf der einen Seite ist sie mit dem Phosphatrest, auf der anderen Seite mit der Stickstoffbase verknüpft. Die Verbindung der Nukleotiden erfolgt durch Bindung des Phosphatrestes eines Nukleotides mit der Pentose des nächsten Nukleotides. Nukleotide sind folglich die Polymerisationseinheiten der DNS.

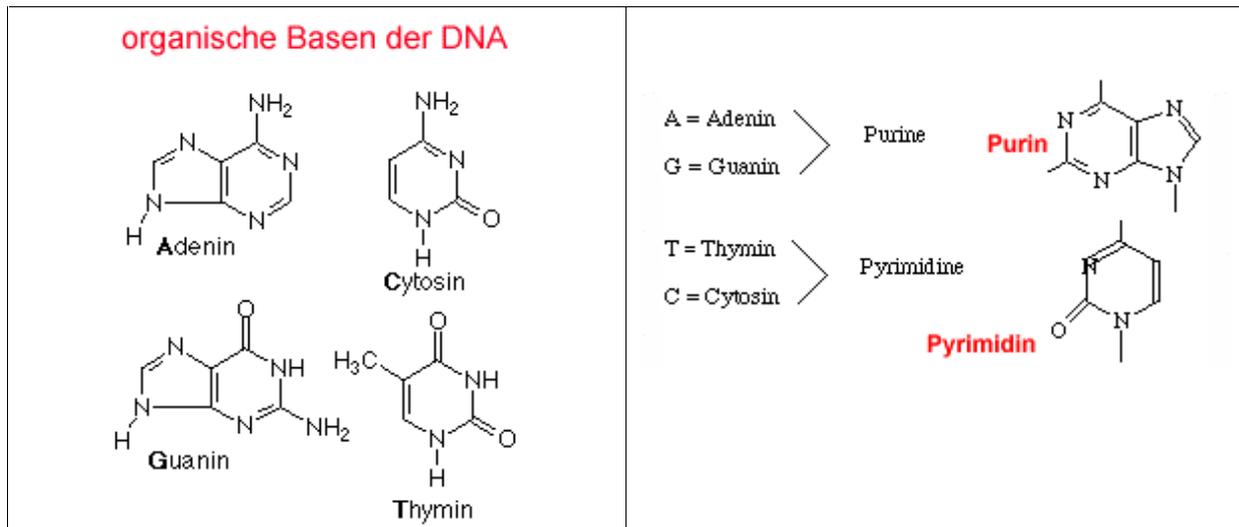
Die Polynukleotidstränge weisen eine Polarität auf: Auf der einen Seite ein **3' Ende** welches mit $-OH$ aufhört und auf der anderen Seite ein **5' Ende**, welches mit einer Phosphoryl Gruppe endet (*siehe Abb. Seite 8*). In der DNS kommen nur vier verschiedene Nukleotidtypen vor, die sich allein durch ihre Stickstoffbasen unterscheiden. Adenin und Guanin sind Derivate des Purins (**Purinbasen**), während Cytosin und Thymin Derivate des Pyrimidins darstellen (**Pyrimidinbasen**). Im Gegensatz zur RNS besteht ein DNS-Molekül nicht aus einem sondern aus zwei Polynukleotid-Strängen. Im DNS Molekül verbinden sich **zwei Stränge in gegenläufiger Polarität** zu einem schraubenförmigen Doppelstrang (**Doppelhelix**), dessen Struktur erstmals von WATSON und CRICK 1953 beschrieben worden ist. In diesem Doppelstrang liegen die Basen der Einzelstränge nach innen und werden durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten. Aufgrund spezifischer physio-chemischer Eigenschaften können sich jedoch stets nur Adenin mit Thymin (bzw. Uracil in RNS) und Guanin und Cytosin «paaren», weshalb die nachfolgend genannten Gesetzmässigkeiten zustande kommen. Diese selektive Paarung ist eine wesentliche Voraussetzung für die korrekte Transkription bei der Realisierung der Information als auch für die Replikation der DNS im Rahmen der Zellteilung:

Die vier Nukleotide der DNS:

<p>2-Desoxy-Adenosin-Monophosphat</p> <p>dAMP</p>  <p>Phosphorsäure</p> <p>2-Desoxy-Ribose</p> <p>Adenin</p> <p>Adenosin</p>	<p>2-Desoxy-Guanosin-Monophosphat</p> <p>dGMP</p> 
<p>2-Desoxy-Thymidin-Monophosphat</p> <p>dTMP</p> 	<p>2-Desoxy-Cytidin-Monophosphat</p> <p>dCMP</p> 

Aus BECK 2000

Die organischen Basen der DNS:

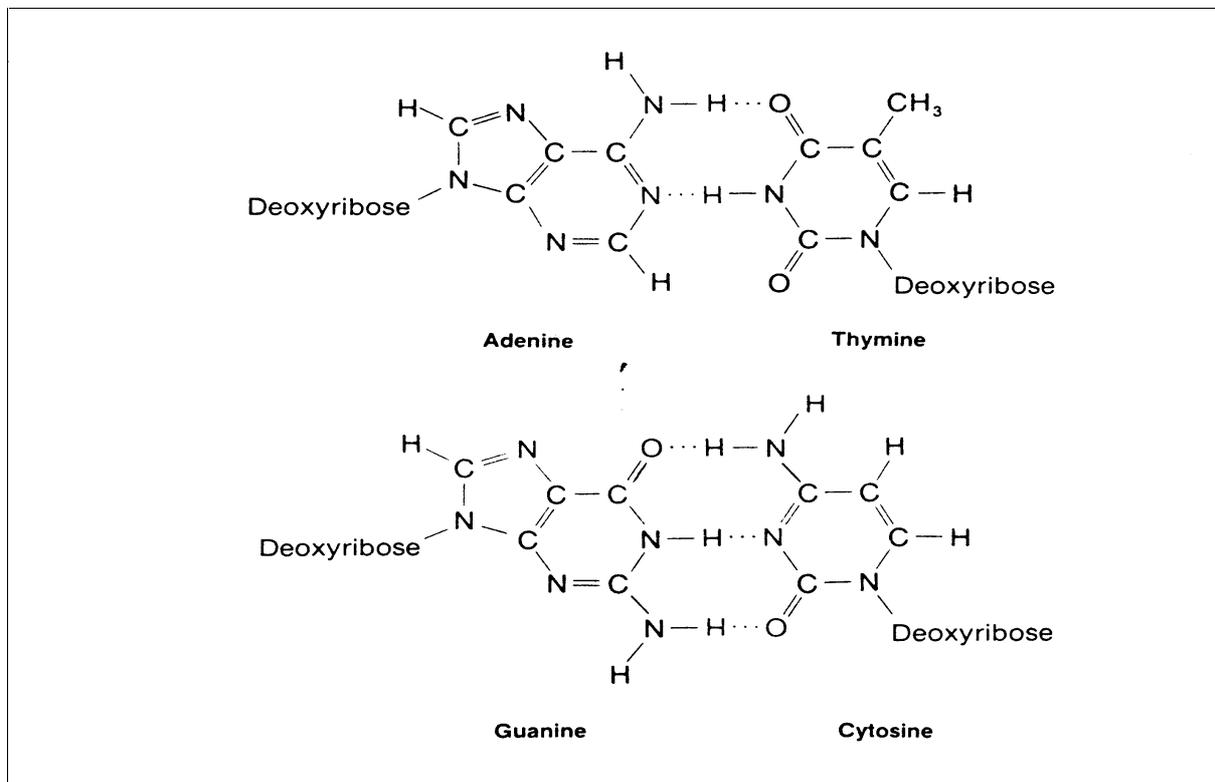


Aus BECK 2000

Die Konzentration der Purinbasen in der DNS entspricht der Konzentration der Pyrimidinbasen d.h.

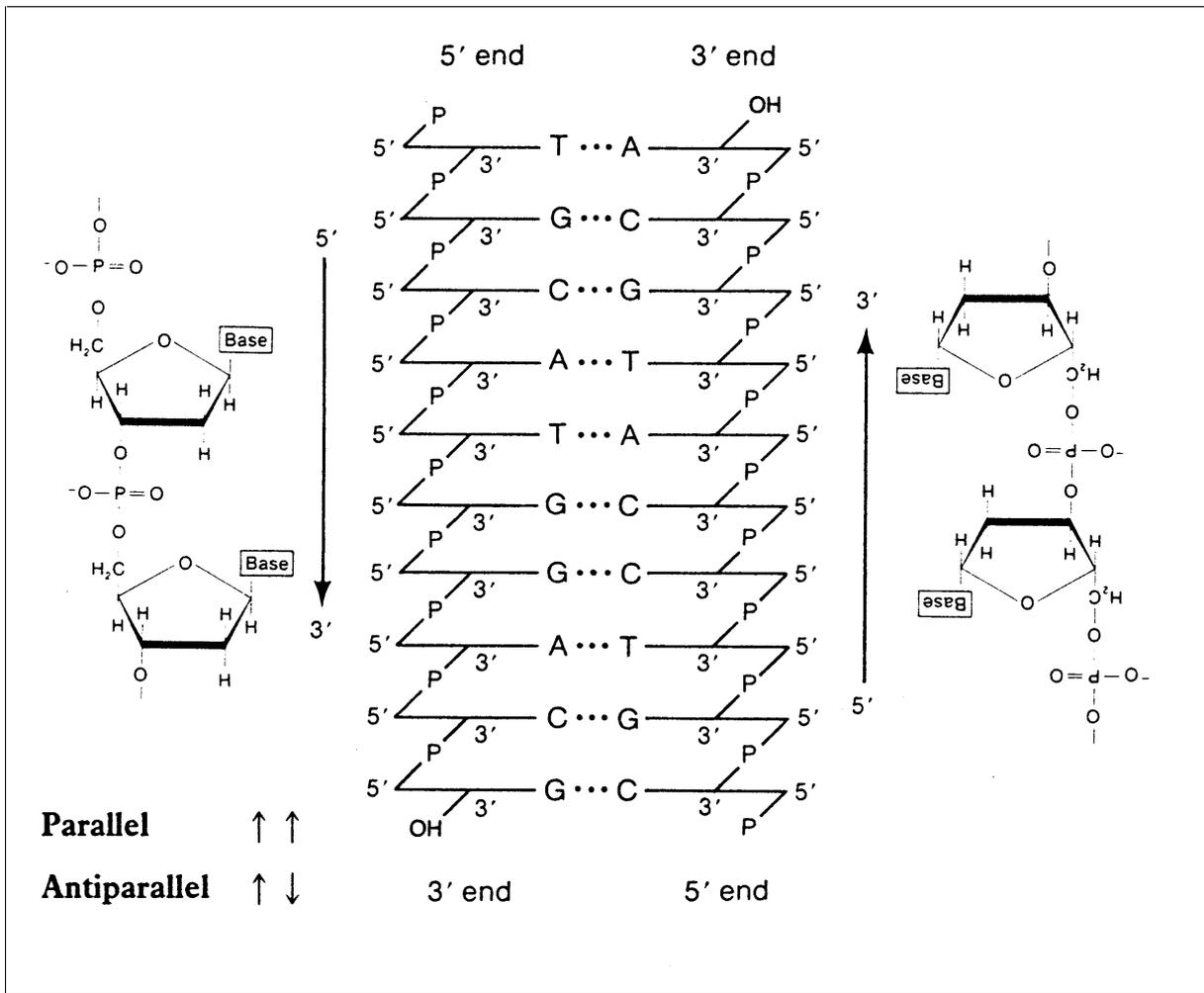
1. Totale Purine [= Adenin und Guanin] = Totale Pyrimidine [= Cytosin und Thymin]
2. Adenin = Thymin und Guanin = Cytosin

Selektive Paarung und Wasserstoffbrücken



Aus HARTEL 1987

Zwei Stränge in gegenläufiger Richtung



Aus HARTEL 1987

Doppelhelix – Basen nach Innen

Minor groove

Major groove

34 Å

3.4 Å

DNA-Doppelhelix

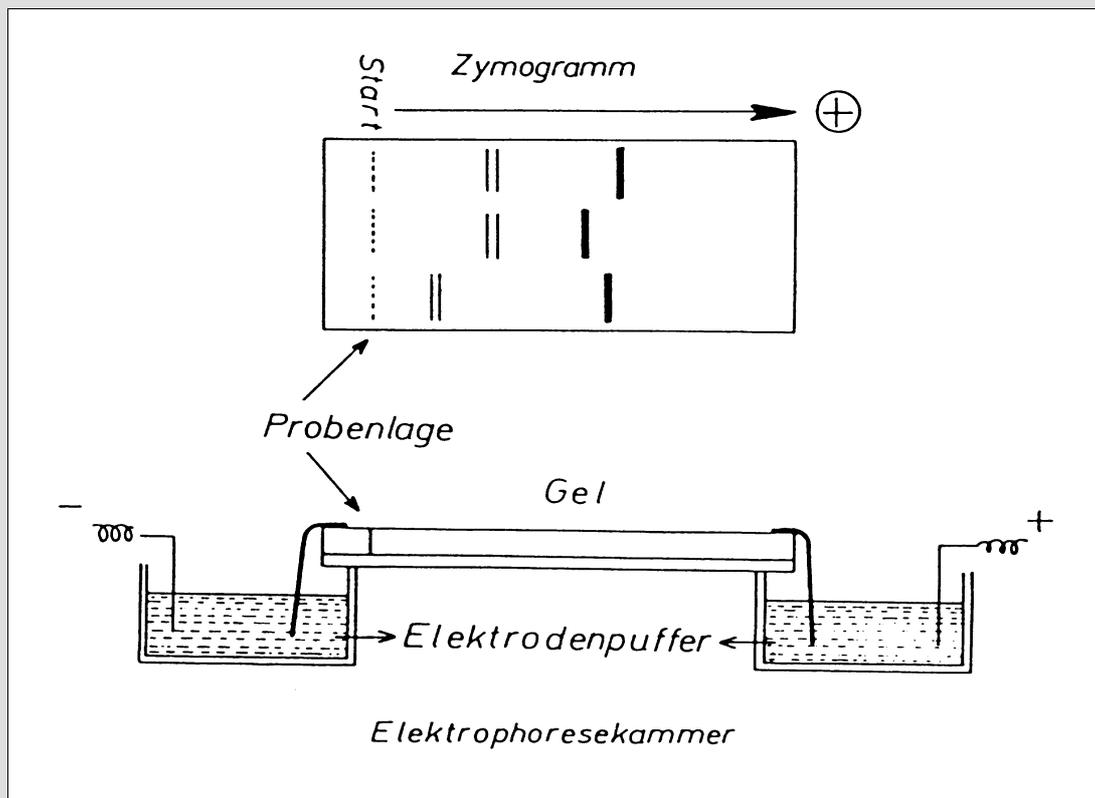
Aus BECK 2000

Aus HARTEL 1987

Polypeptide

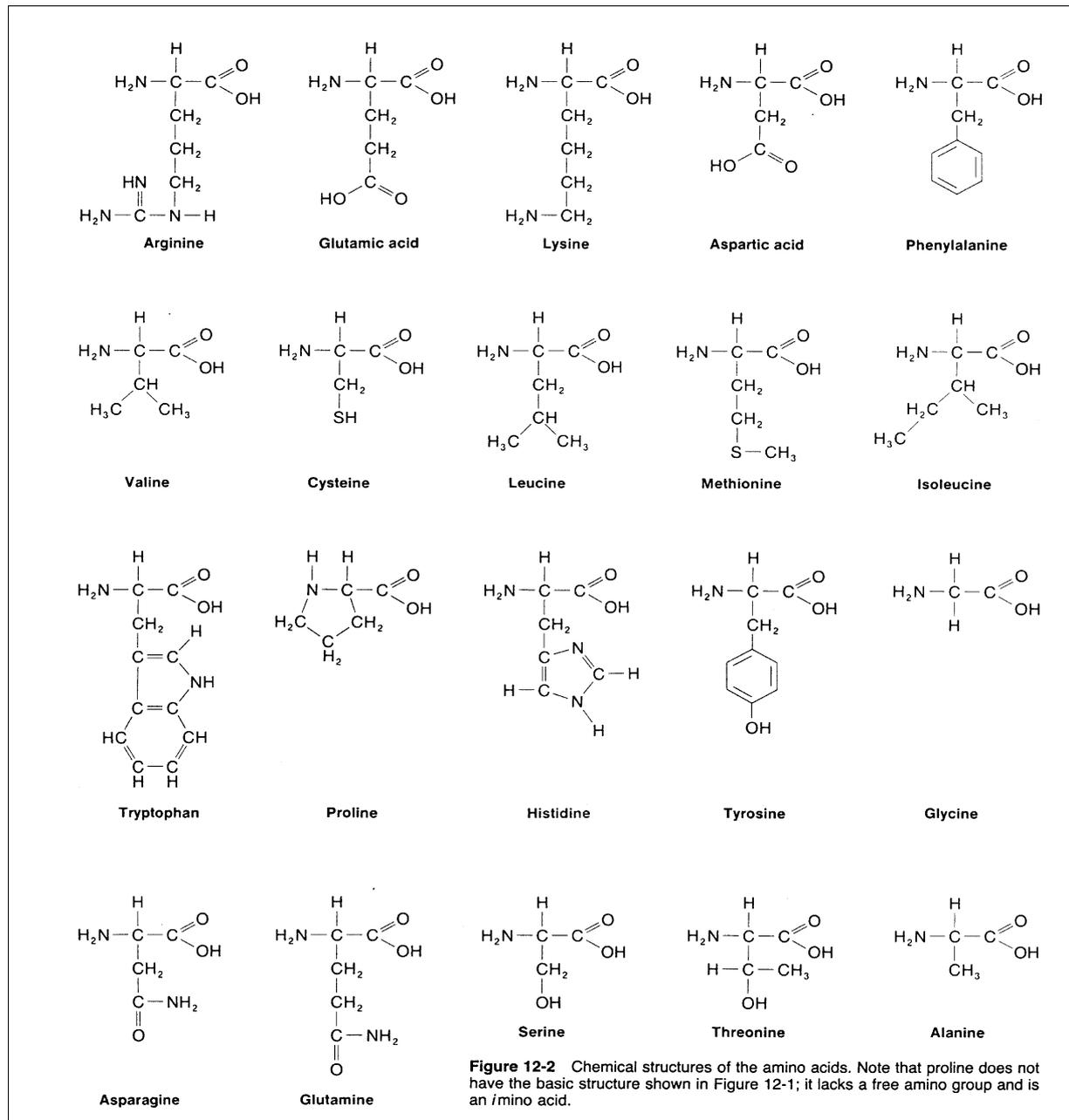
Polypeptide bestehen aus kettenförmig verknüpften **Aminosäuren**. Sie können als einzelne Ketten oder in Form von Aggregaten (aus zwei oder mehreren Polypeptid-Einheiten aufgebaut) auftreten und kommen im Organismus in der **Funktion als Enzyme, Struktur-, Speicher- oder Transport-Proteine** vor. Für den Aufbau von Polypeptiden stehen **20 verschiedene Aminosäuren** zur Verfügung. Fünf dieser Aminosäuren (Aspargin- und Glutaminsäure, Histidin, Lysin, Arginin) besitzen einen organischen Rest, der ihnen eine elektrische Ladung verleiht. Polypeptide, die eine dieser fünf Aminosäuren enthalten, weisen daher eine **Nettoladung** auf, weshalb sie in einem elektrischen Feld (je nach Ladung) unterschiedlich wandern. Dieser Umstand kann bei der Analyse von Polypeptiden verwendet werden, um sie in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Diese Technik wird als **Elektrophorese** bezeichnet. Sie wird beispielsweise eingesetzt, um verschiedene Varianten von Enzymen, die sich in ihrer Aminosäuren-Zusammensetzung unterscheiden, sichtbar zu machen. Da es sich bei Polypeptiden um Transkriptionsprodukte der DNS handelt, lässt sich bei Vorliegen verschiedener Varianten unmittelbar folgern, dass auf dem kodierenden Abschnitt der DNS eine Mutation vorliegen muss (bzw. dass an diesem Abschnitt (=Genort) verschiedene Allele vorliegen -> Definitionen siehe später). Die Aminosäuresequenz eines Polypeptides wird Primärstruktur bezeichnet.

Beispiel: Sichtbarmachung von genetischer Variation mittels Elektrophorese



Schematische Darstellung einer Elektrophorese-Apparatur (unten) und ein zugehöriges Zymogramm mit Enzymbändern von 3 genetisch verschiedenen Proben

Aus HATTEMER et al. 1993

Die 20 Aminosäuren:

Aus HARTEL 1987

Die Übertragung der genetischen Information:

Die DNS muss zwei wichtige Funktionen erfüllen können:

1. Unveränderte **Weitergabe** der Information bei Zellteilung und Produktion von Gameten (= *Geschlechtszellen*)
⇒ die **autokatalytische Funktion**
2. **Realisierung** der gespeicherten Information in der Zelle oder im Organismus
⇒ die **heterokatalytische Funktion**

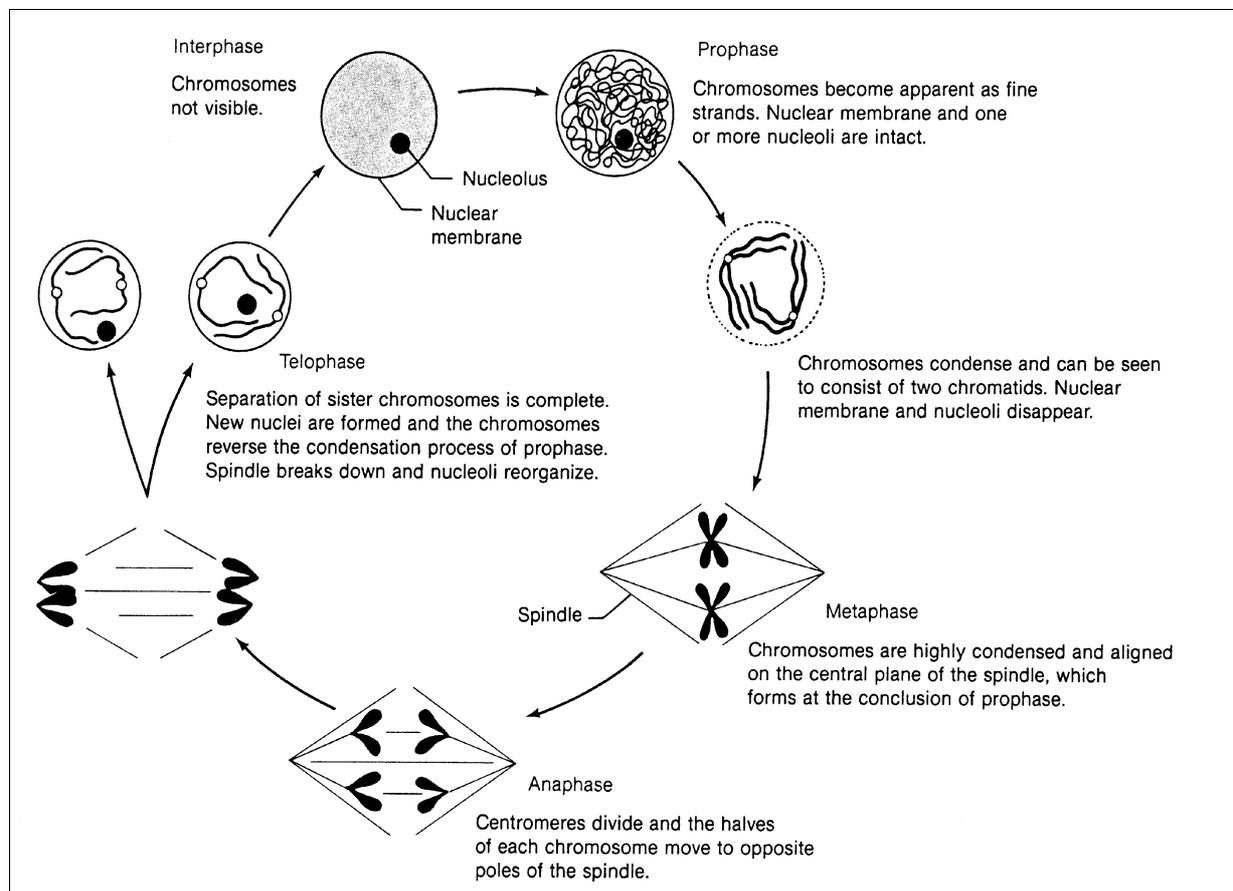
Die autokatalytische Funktion

Die autokatalytische Funktion der DNS kommt bei zwei Prozessen zur Anwendung:

- Somatische Zellteilung: **Mitose**
- Geschlechtliche Zellteilung: **Meiose**

Die somatische Zellteilung bei höheren Organismen (Mitose)

Bei höheren Organismen ist die genetische Information auf mehrere **Chromosomen** (s. später) verteilt, weshalb die Information in einem komplizierten Verteilungsprozess an die Tochterzellen weitergegeben wird. Demgegenüber replizieren Viren und Bakterien einfach ihre RNS oder DNS, die nicht in chromosomalen Strukturen organisiert ist. Der Verteilungsprozess der Chromosomen (**Kernteilung oder Mitose**) bei höheren Organismen folgt einem charakteristischen Ablauf in mehreren Phasen:



Aus HARTEL 1987

Die einzelnen Phasen in der Übersicht:

Prophase

Kondensation der ursprünglich lang gestreckten Chromosomen -> Transportform; Aufspaltung in zwei Chromatiden, die durch ein Zentromer miteinander verbunden sind

Metaphase

Ausbildung des Spindelapparates und Anheften der Spindelfasern an der Zentromerregion

Anaphase

Teilung am Zentromer -> Auftrennung der beiden Chromatiden, Wanderung in entgegengesetzter Richtung zu den Polen

Telophase

Streckung der Chromosomen an den beiden Polen, Bildung neuer Kernmembranen, Kernteilung

Die geschlechtliche Zellteilung (Meiose)

Höhere Organismen haben eine unterschiedliche Anzahl von Chromosomen im Zellkern (Verschiedene **Idiogramme** d.h. Abbildung aller verschiedener Chromosomen). Geschlechtschromosomen werden **Gonosomen**, nicht Geschlechts-Chromosomen **Autosomen** genannt. **Heterosomen** schliesslich sind Gonosomen mit unterschiedlicher Morphologie wie etwa das X und Y Chromosom beim Menschen. Die meisten höheren Organismen haben in den somatischen Zellen einen doppelten Chromosomensatz (**diploid bzw. $2n$**); jedes Autosom kommt zweifach vor, dazu kommen beide Gonosomen (bzw. Heterosomen). Wären nun die Gameten ebenfalls diploid, so käme es bei jeder Befruchtung (d.h. bei der Verschmelzung zweier Gameten) zu einer Verdoppelung des Chromosomensatzes. Ausnahmsweise kommen solche Störungen vor, so dass **polyploide Individuen** ($2n$, $3n$, $4n$...*siehe später*) entstehen können (bspw. triploide Aspen). Im Normalfall erfolgt jedoch vor der Befruchtung eine Halbierung der Chromosomenzahl (diploid ($2n$) -> haploid ($1n$)) in den Gameten, was während der Meiose geschieht. Aus der Verschmelzung zweier haploider Gameten entsteht dann wieder eine diploide Zygote.

Die Meiose läuft in zwei Teilschritten ab: **1. und 2. Reifungsteilung** genannt. Während in der 1. Reifungsteilung der Chromosomensatz reduziert wird, teilen sich in der 2. Reifungsteilung die Reduktionsprodukte mitotisch. Beide Meioseschritte werden in die selben Phasen wie bei der Mitose unterteilt:

1. Reifungsteilung: (Darstellung siehe nächste Seite)

Die einzelnen Phasen in der Übersicht:

Prophase

Kondensation der ursprünglich lang gestreckten Chromosomen, paarweise Anordnung der jeweils zwei Homologen (mütterliches und väterliche Exemplar aller Chromosomen), auch Chromosomenpaarung (**Synapsis**) genannt; Längsspaltung in jeweils zwei Chromatiden -> 4 Stränge (Chromosomentetrade, Tetradenstadium)

Metaphase

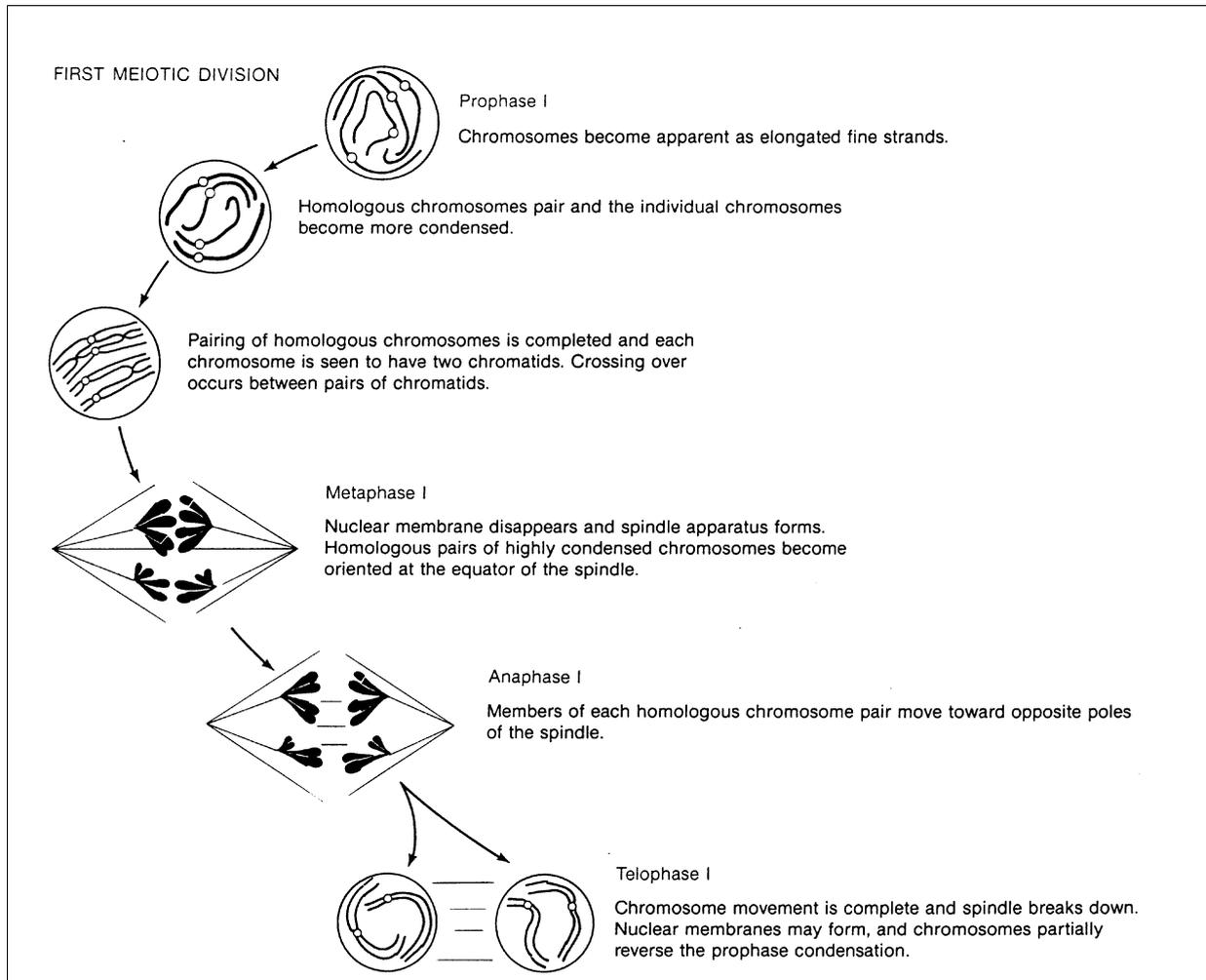
Auflösung der Kernmembrane, Ausbildung der Spindel und Anheften der Spindelfasern an der Zentromerregion, zufällige Anordnung der Chromatidenpaare in der Äquatorialebene

Anaphase

Teilung auch am Zentromer -> Trennung der beiden Chromatidenpaare, Wanderung in entgegengesetzter Richtung zu den Polen

Telophase

Streckung der Chromosomen an den beiden Polen, Bildung neuer Kernmembranen

Darstellung der 1. Reifungsteilung

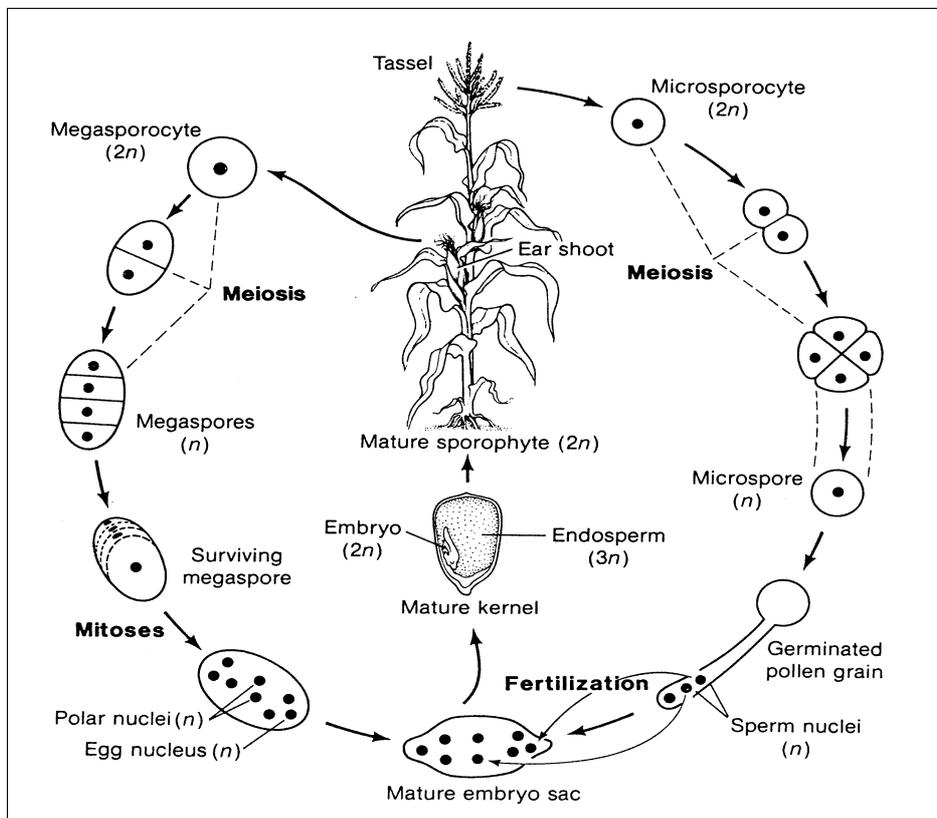
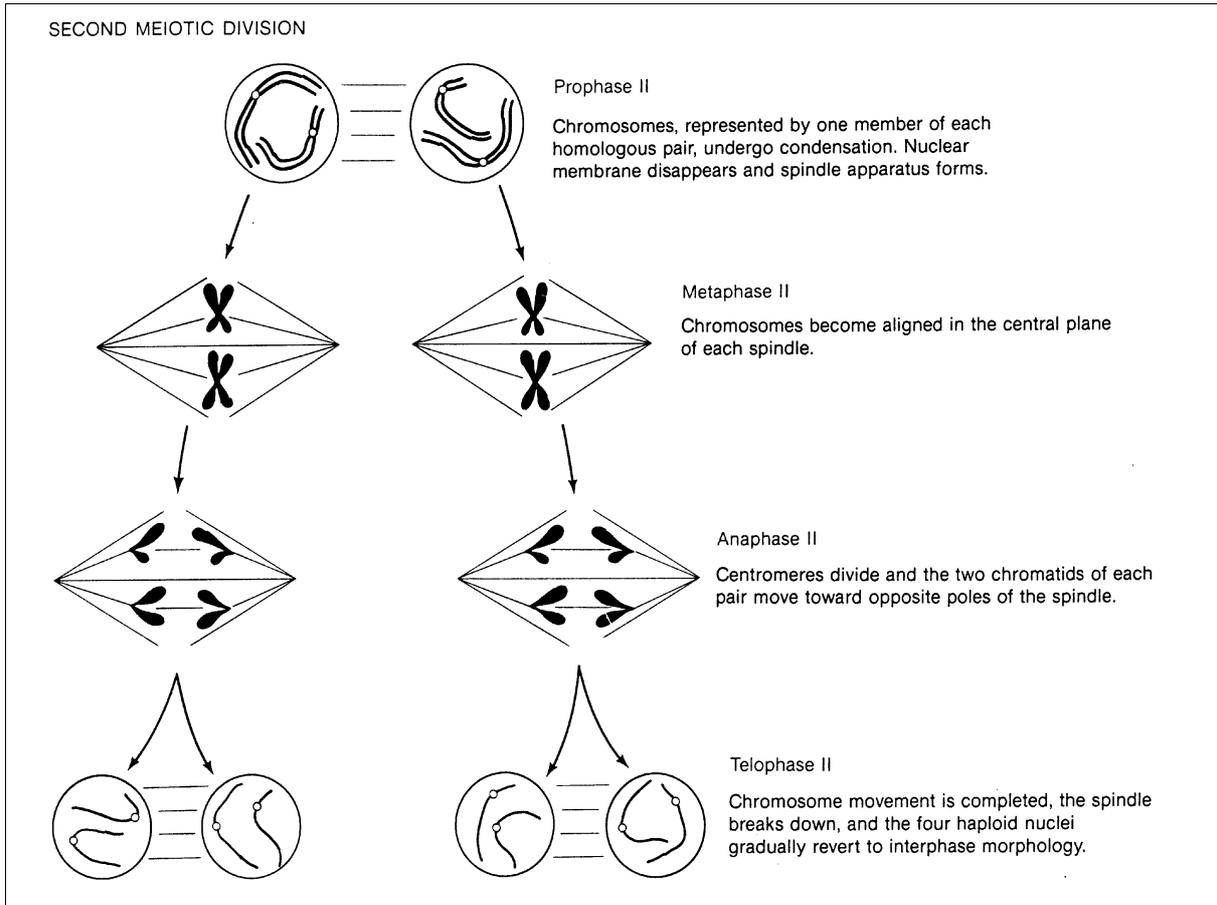
Aus HARTEL 1987

2. Reifungsteilung

Die 2. Reifungsteilung läuft wie eine Mitose ab. In beiden haploiden Kernen werden die beiden Schwesterchromatiden aller Chromosomen voneinander getrennt und auf zwei Zellkerne verteilt, so dass am Ende der Meiose 4 haploide ($1n$) Zellkerne vorliegen (Darstellung siehe nächste Seite).

Nach der Bildung der Zellmembrane entstehen so vier reduzierte Gameten bzw. 1 Eizelle, indem drei Zellkerne degenerieren. Dies ist am Beispiel von *Zea mays* auf der nächsten Seite illustriert:

Darstellung der 2. Reifungsteilung



Aus HARTEL 1987

Ein wichtiger Aspekt der Meiose: Die Rekombination genetischer Information

Während der Meiose wird nicht nur der Chromosomenbestand reduziert, sondern die genetische Information wird zugleich neu kombiniert. Eine solche **Rekombination** ist in zweifacher Hinsicht möglich:

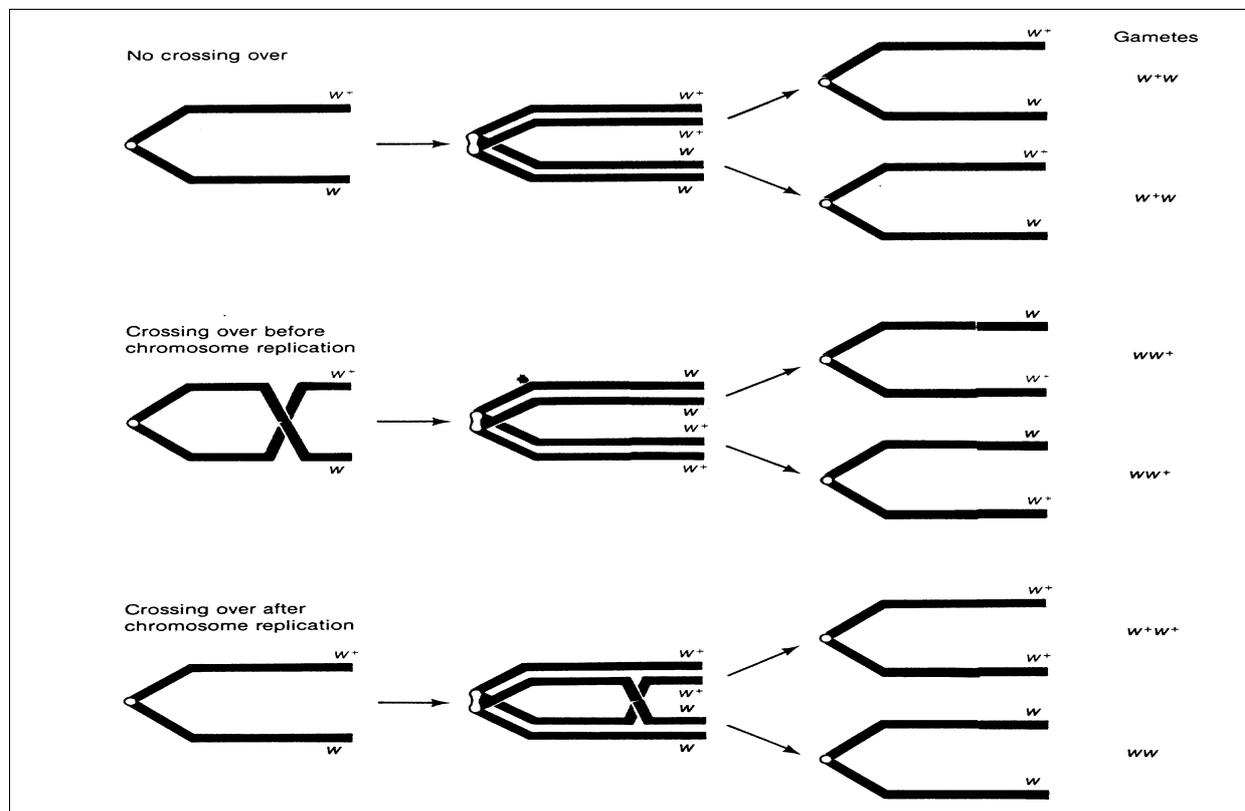
1. **zufällige Anordnung der homologen Chromatidenpaare** in der Äquatorialebene in der Metaphase und damit zufällige Verteilung der beiden Elter Chromosomen (Chromatiden) auf die entstehenden Gameten. Wird auch **interchromosomale Rekombination** oder **meiotische Segregation** genannt.

Beispiel

Ein Individuum habe an einem Genort (Abschnitt der DNS) zwei unterschiedliche DNS-Sequenzen, die verschiedene Polypeptide kodieren (man nennt dies **zwei verschiedene Allele**). Bezeichnen wir das Allel an diesem Genort auf dem einen Chromosom als A1 und jenes auf dem anderen Chromosom als A2. In den Nachkommen dieses Individuums finden sich aufgrund der meiotischen Segregation in der Hälfte der Gameten das Allel A1 und in der anderen Hälfte das Allel A2, sofern die Stichprobe genügend gross ist.

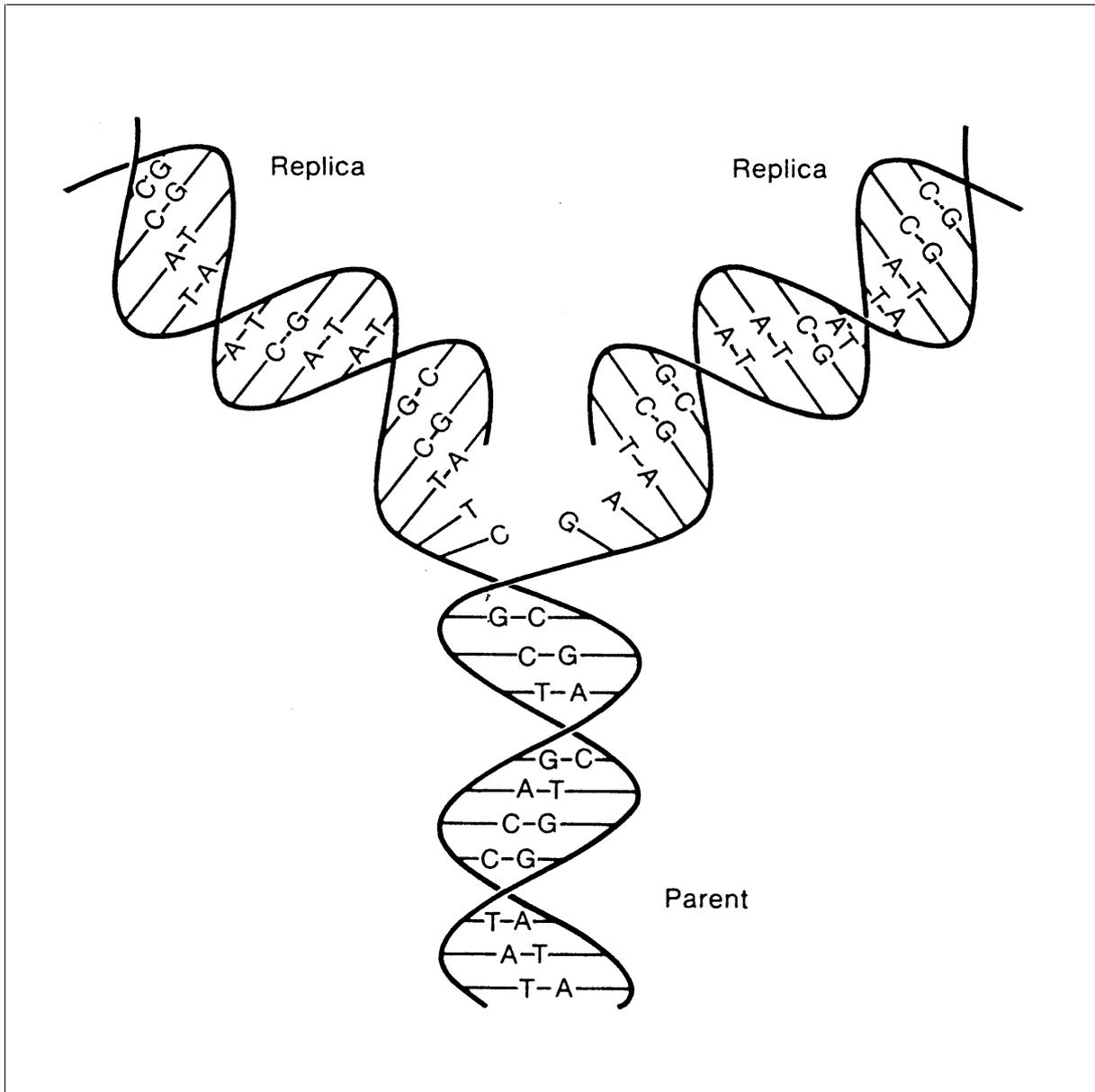
Für die Rekombination von Genen, die auf dem gleichen Chromosom liegen, ist ein zweiter Rekombinationsmechanismus verantwortlich, welcher **intrachromosomale Rekombination** genannt wird:

2. **Crossing over** d.h. ein Austausch homologer Chromosomensegmente (Gene) zwischen Nichtschwester-Chromatiden im Tetradenstadium. Die Häufigkeit hängt von der Länge der Chromosomen ab, in der Regel erfolgt dies 2 bis 3 mal pro Chromosom.



Die autokatalytische Funktion der DNS: Ablauf der Replikation

Bei der Zellteilung oder der Produktion von Gameten muss die genetische Information verdoppelt bzw. vervielfacht werden. Es muss daher einen Mechanismus geben, der die DNS identisch kopiert. Bei der Verdoppelung der DNS wird eine Doppelhelix vollständig kopiert durch die sogenannte **semikonservative Replikation**. Für die Replikation entwinden sich zunächst die beiden Einzelstränge der Helix, worauf sich dann an jedem der alten Einzelstränge ein neuer, komplementärer Strang anlagert:



Aus HARTEL 1987

An der Replikation sind verschiedene Enzyme beteiligt, insbesondere **DNS-Polymerasen und Ligasen**. Da bei höheren Organismen die DNS Moleküle in den Chromosomen sehr lang sind, wird die DNS nicht in einem kontinuierlich durchlaufenden Prozess repliziert. Die DNS eines Chromosoms ist vielmehr in **Replikationseinheiten** unterteilt (**Replikons**), die mehr oder wenig gleichzeitig mit der Replikation beginnen.

Die heterokatalytische Funktion der DNS: Realisierung der gespeicherten Information

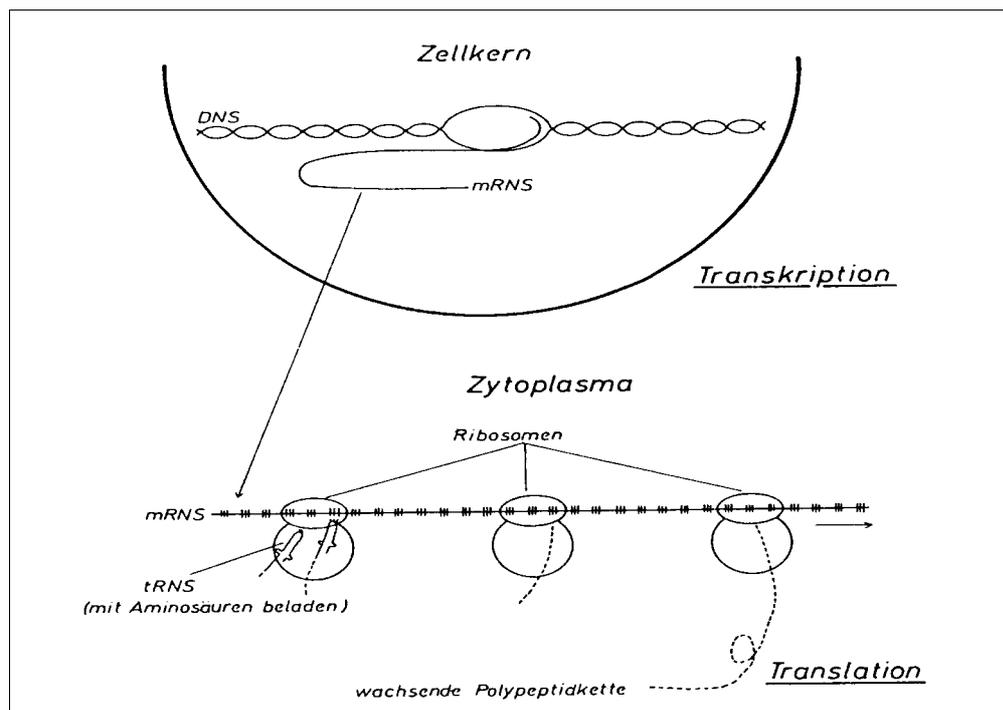
Die in der DNS gespeicherte Information wird über die Synthese von Enzymen und anderen Proteinen (Enzyme, Struktur-, Speicher- und Transport-Proteine) im Organismus wirksam. Die heterokatalytische Funktion der DNS erfolgt in zwei Teilschritten:

- **Transskription** -> Weitergabe der genetischen Information an ein RNS-Molekül
- **Translation** -> Synthese des Polypeptides

Transskription

Bei der Transskription wird die auf einem DNS-Abschnitt (Gen; Begriff siehe später) gespeicherte genetische Information an ein **RNS-Molekül** weitergegeben. Bei dieser Übertragung wird stets nur die Information eines DNS-Stranges abgelesen. Die Ablesung erfolgt mittels eines Enzyms (**RNS Polymerase**), welches nach der Anheftung an einer bestimmten Stelle (eine spezielle Nukleotidsequenz am Beginn eines Genes) die Trennung des Doppelstranges, die Anlagerung komplementärer Nukleotide sowie die Verknüpfung dieser Nukleotide zu einem RNS-Strang katalysiert. Der so gebildete RNS-Strang wird **Messenger-RNS (mRNS)** genannt, weil sie die Aufgabe wahrnimmt, die von der DNS abgelesene genetische Information in das Plasma zu transportieren und dort als Matritze für die Polypeptid-Synthese zu dienen.

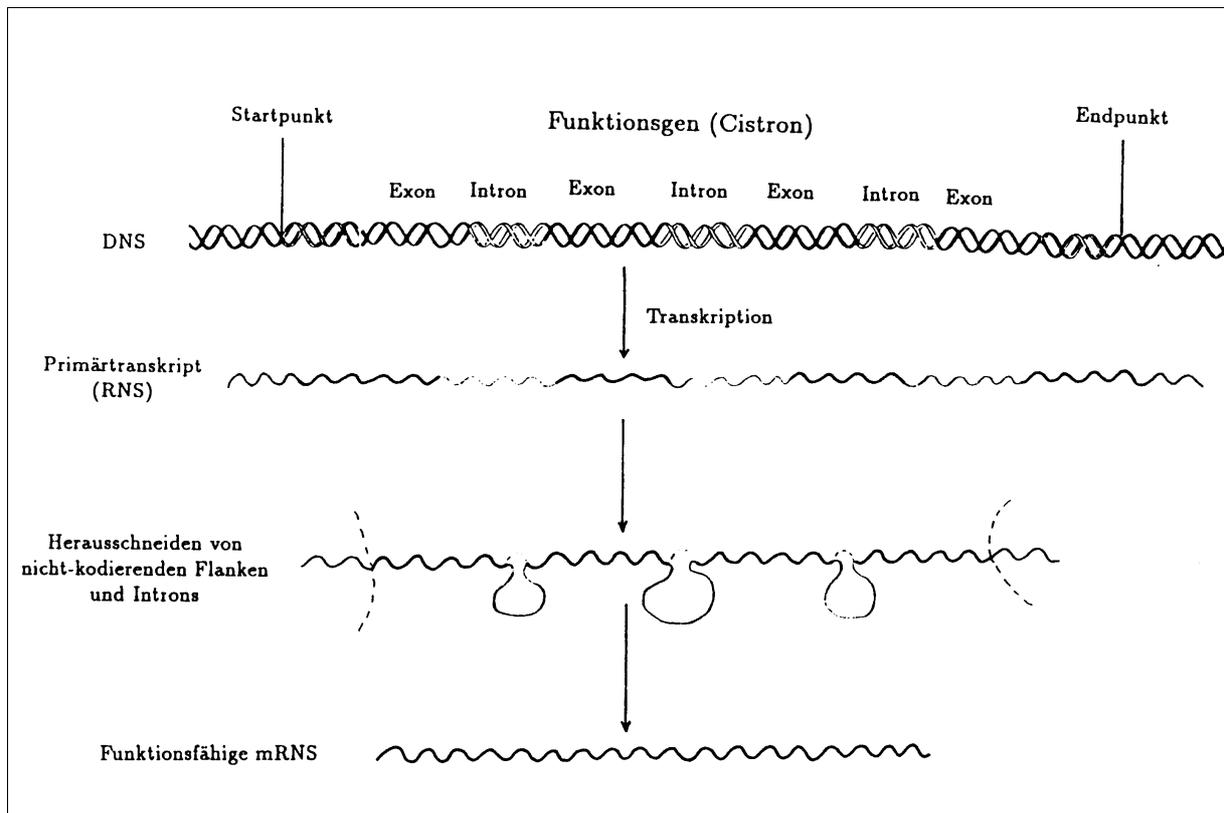
Bei Bakterien und anderen Prokaryonten beginnt unmittelbar nach der Transskription die Translation. Bei den höheren Organismen sind vorher noch einige komplizierte Schritte notwendig, weil ihre Gene eine höhere strukturelle Spezifizierung aufweisen. Zum einen verfügen sie am Anfang und am Ende über **nichtkodierende Sequenzen** (Regulatorische Region, Erkennungsregion, Bindungsregion, Endpunkt), zum anderen weisen viele Gene neben kodierenden Abschnitten (**Exons**) auch nicht kodierende Abschnitte (**Introns**) auf. Diese nichtkodierenden Sequenzen müssen in mehreren komplizierten Prozessen herausgeschnitten und die kodierenden zu einer funktionsfähigen mRNS zusammengefügt werden.



Aus HATTEMER et al. 1993

Translation

Im Plasma verbindet sich die mRNA mit einigen der vielen **Ribosomen** (Organelle, die aus verschiedenen Proteinen und ribosomaler RNA (**rRNA**) bestehen) und bilden einen sogenannten Polysomenverband (*siehe Abb. S. 17*). In diesen Ribosomen erfolgt die **Translation d.h. die Polypeptid-Synthese**, wobei die mRNA als Matritze für die Aminosäuresequenz des entstehenden Polypeptides dient und auf diese Weise die in ihr enthaltene genetische Information des entsprechenden DNA-Abschnittes in ein Polypeptid übersetzt. Beginnend am 5' Ende der mRNA wird an jedem Ribosom je ein Molekül des entsprechenden Polypeptides synthetisiert. Die benötigten Aminosäuren werden von spezifischen Molekülen, der sogenannten **Transfer-RNA (tRNA)** ausgewählt und zu den Ribosomen transportiert. Diese Funktion bewerkstelligt die tRNA dadurch, dass sie zwei wichtige Erkennungsregionen aufweist, nämlich eine Matritzen-Erkennungsregion und eine Aminosäuren-Erkennungsregion.



Aus HATTEMER et al. 1993

Die Kodierung der genetischen Information

Nach den biochemischen Aspekten der durch die DNA gesteuerten Polypeptidsynthese soll nun betrachtet werden, wie das System die Information speichert. Die zentrale Frage hierbei ist, **wie mit einem System von lediglich vier verschiedenen Elementen (Nukleotiden bzw. Basen) Information auf ein System mit 20 verschiedenen Aminosäuren übertragen werden kann**. Es ist offensichtlich, dass dabei die vier Nukleotide kombiniert eingesetzt werden müssen. Hierbei stellt sich allerdings folgendes Problem:

- Kombinationseinheiten aus 2 Nukleotiden lassen lediglich 4^2 d.h. 16 Kombinationsmöglichkeiten zu, was zu wenig ist, um 20 Aminosäuren zu Kodieren

- Kombinationseinheiten aus 3 Nukleotiden lassen hingegen 4^3 d.h. 64 Kombinationsmöglichkeiten zu, was zu viele Kombinationsmöglichkeiten ergibt

Aufgrund von *in vitro* Versuchen steht heute fest, dass die **Informationseinheiten der Aminosäuren** tatsächlich aus jeweils drei Nukleotiden (**Triplets**) bestehen.

Beispiel für die in vitro Bestimmung der Informationseinheiten

Gibt man eine nur aus Uracil (U) bestehende RNS zu einem Zellhomogenat, so entsteht nach kurzer Zeit ein Polypeptid, welches nur aus Phenylalanin besteht. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass die Nukleotid-Sequenz UUU das für Phenylalanin determinierende Triplet ist. Aufgrund gleicher Experimente ist es gelungen, die Bedeutung aller 64 möglicher Triplets zu bestimmen.

Die Folgerung aus dem oben dargestellten Problem ist, dass der Kode nicht ausschliesslich ist d.h. dass die meisten Aminosäuren von mehr als einem Triplet determiniert werden. Man nennt dies auch **Degeneration des genetischen Kodes**. Zumeist variiert allerdings nur das dritte Nukleotid des Triplets. Einige Triplets fungieren zudem als Start- und Stopsequenzen.

Dieser genetische Kode ist **nahezu universell** d.h. vom Virus bis zum Menschen werden die Aminosäuren von denselben Triplets kodiert.

Table 12-2 The “universal” genetic code

First position (5' end)	Second position				Third position (3' end)
	U	C	A	G	
U	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr Stop Stop	Cys Cys Stop Trp	U C A G
C	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	U C A G
A	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	U C A G
G	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	U C A G

Note: The boxed codons are used for initiation.

Aus HARTEL 1987

Organisationsformen des genetischen Materials

Die in der DNS gespeicherte Information wird, wie vorher gezeigt, über die folgende Abfolge realisiert:

DNS \Rightarrow **mRNS** \Rightarrow **Polypeptid** \Rightarrow **Enzym (Protein)** \Rightarrow **Stoffwechsel (Struktur)**

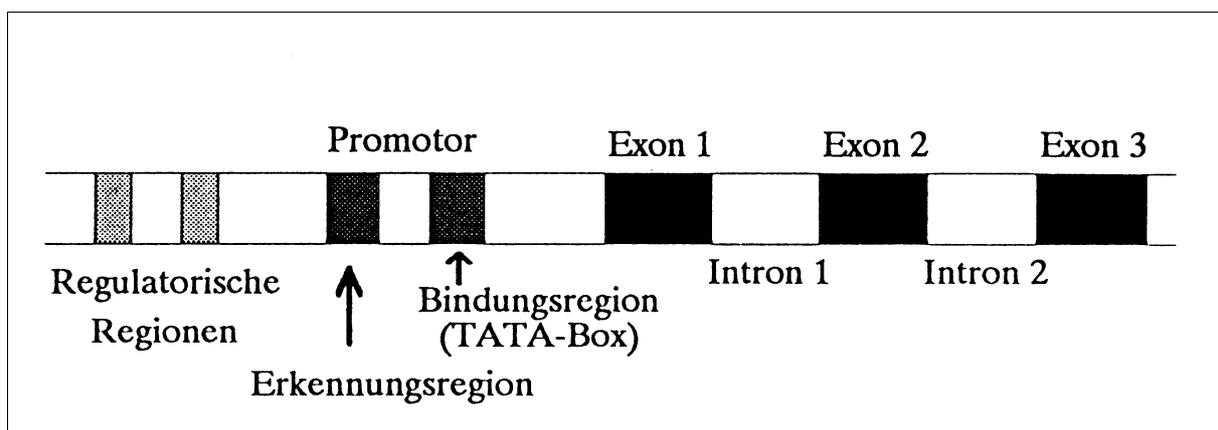
Als Informationseinheiten der DNS fungieren Triplets, die jeweils eine Aminosäure kodieren. Diese Triplets müssen nun aber, um funktionsgerechte Polypeptide produzieren zu können, in höheren Einheiten organisiert sein. Dies sind die sogenannten **Gene**

Was ist ein Gen?

Das Funktionsgen

Als übergeordnete Einheit gilt zunächst nur der DNS-Abschnitt, der die mRNS eines funktionsfähigen Polypeptides transskribiert. Dieser DNS-Abschnitt stellt somit die Funktionseinheit für ein Polypeptid dar. Man nennt ihn auch **Funktionsgen oder Cistron**. In höheren Organismen ist ein kolinearer Zusammenhang zwischen der Tripletabfolge der DNS und der Aminosäureabfolge im Polypeptid allerdings nicht mehr gegeben, da neben proteinkodierenden Sequenzen auch nicht kodierende Sequenzen und weitere Regionen vorkommen, die den Ableseprozess steuern.

Am Anfang eines Funktionsgens befinden sich eine oder mehrere Stellen, welche die Aktivität des Genes steuern, die sogenannte **Regulatorregion**. Anschliessend befindet sich eine **Erkennungsregion**, an welcher die RNS Polymerase das zu transskribierende Gen erkennt sowie eine **Bindungsregion**, an welcher sich die RNS Polymerase mit der DNS kovalent verbindet. Die letzten beiden Regionen werden auch als **Promotor** bezeichnet. Nach dem Promotor folgt schliesslich die eigentliche kodierende Sequenzabfolge, von der allerdings lediglich die Exons (und nicht die Introns) in ein Polypeptid übersetzt werden.



Aus HATTEMER et al. 1993

Beispiel

Das Funktionsgen des β -Globins, welches aus 1'400 Nukleotiden besteht, könnte theoretisch 466 Aminosäuren kodieren; tatsächlich kodiert es aber lediglich ein Polypeptid, das aus 146 Aminosäuren besteht.

Geschätzte Anzahl von Nukleotiden und Cistrons in den Genomen verschiedener Organismen

Organismus	Nukleinsäuretyp	Anzahl Nukleotiden	Anzahl Cistrons
Tabakmosaik-Virus	RNS Einzelstrang	6'400	8 – 10
Bakteriophag T4	DNS Doppelhelix	2 X 10 ⁵ Paare	80 – 100
E. coli (Bakterium)	DNS Doppelhelix	4 X 10 ⁶ Paare	ca. 3'000
Insekt	DNS Doppelhelix	6 X 10 ⁸ Paare	ca. 10'000
Säugetier	DNS Doppelhelix	2 X 10 ⁹ Paare	ca. 30'000
Mensch	DNS Doppelhelix	3 X 10 ⁹ Paare	60'000 – 100'000

Aus HATTEMER et al. 1993

Das Mendel-Gen

Darunter versteht man kodierende Bereiche von mehr oder weniger komplexen Merkmalen (z.B. Blütenfarbe), die als Einheit von den Eltern auf die Nachkommen weitergegeben werden.

Die zwei Gen-Begriffe in der Gegenüberstellung:

	Funktionsgen	Mendel-Gen
Definition	Ein Abschnitt auf der DNS, welche ein bestimmtes Polypeptid oder Enzym kodiert	Die Einheit der Weitergabe genetischer Information von Eltern an ihre Nachkommen
	Das Mendel-Gen entspricht einem Funktionsgen oder es umfasst mehrere Funktionsgene. Viele Mendel-Gene (bspw. Isoenzyme) entsprechen einem Funktionsgen, andere Mendel-Gene umfassen mehrere bis viele Funktionsgene (oligogen bzw. polygen)	
Nachweis	Molekulargenetische Experimente zur Isolierung des Cistrons und Bestimmung des von ihm kodierten Polypeptides bzw. Enzyms	Kreuzungsexperimente zum Nachweis der Vererbung und des Vererbungsmodus; Analyse von Stammbäumen

Nach HATTEMER et al. 1993

Die Chromosomen

Die genetische Information bei den Eukaryonten ist so gross, dass sie nicht mehr in einem einzigen DNS-Molekül untergebracht werden kann, sondern auf verschiedene Erbträger verteilt ist. Der grösste Teil der genetischen Information (Ausnahme Gene im Plasmotyp) befindet sich in komplex aufgebauten Strukturen, den sogenannten Chromosomen, die sich im Zellkern (Nukleus) befinden. Die Chromosomen im Zellkern sind makroskopische nicht sichtbar, ausser in bestimmten Phasen der Zellteilung. Die Anzahl Chromosomen unterscheidet sich zwischen den Organismen. Bei Nadelbäumen findet man häufig 11 bis 12 Chromosomen, bei Laubbäumen sind grössere Unterschiede in der Chromosomenzahl festzustellen, wie die Tabellen auf der nächsten Seite zeigen. Neben diploiden Arten kommen auch polyploide vor (zu ihrer Entstehung siehe später).

Chromosomenzahlen bei Nadel- und LaubbäumenEinige Nadelbäume

Klasse, Unterklasse, Familie	Gattung	Anzahlen
Klasse <i>Ginkgoatae</i>	<i>Ginkgo</i>	12
Klasse <i>Pinatae</i>		
Unterkl. <i>Pinidae</i>		
Fam. <i>Araucariaceae</i>		13
Fam. <i>Pinaceae</i>		12
aber:	<i>Pseudotsuga</i>	12,13
	<i>Pseudolarix</i>	22
Fam. <i>Taxodiaceae</i>		11
aber:	<i>Sequoia</i>	33
	<i>Sciadopitys</i>	10
Fam. <i>Cupressaceae</i>		11
aber:	<i>Fitzroya</i>	22
	<i>Juniperus</i>	11,22
Fam. <i>Podocarpaceae</i>		
z. Beispiel	<i>Dacrydium</i>	9,10,11,12,15
	<i>Podocarpus</i>	10,11,12,13,17,18,19
Unterkl. <i>Taxidae</i>	<i>Taxus</i>	12

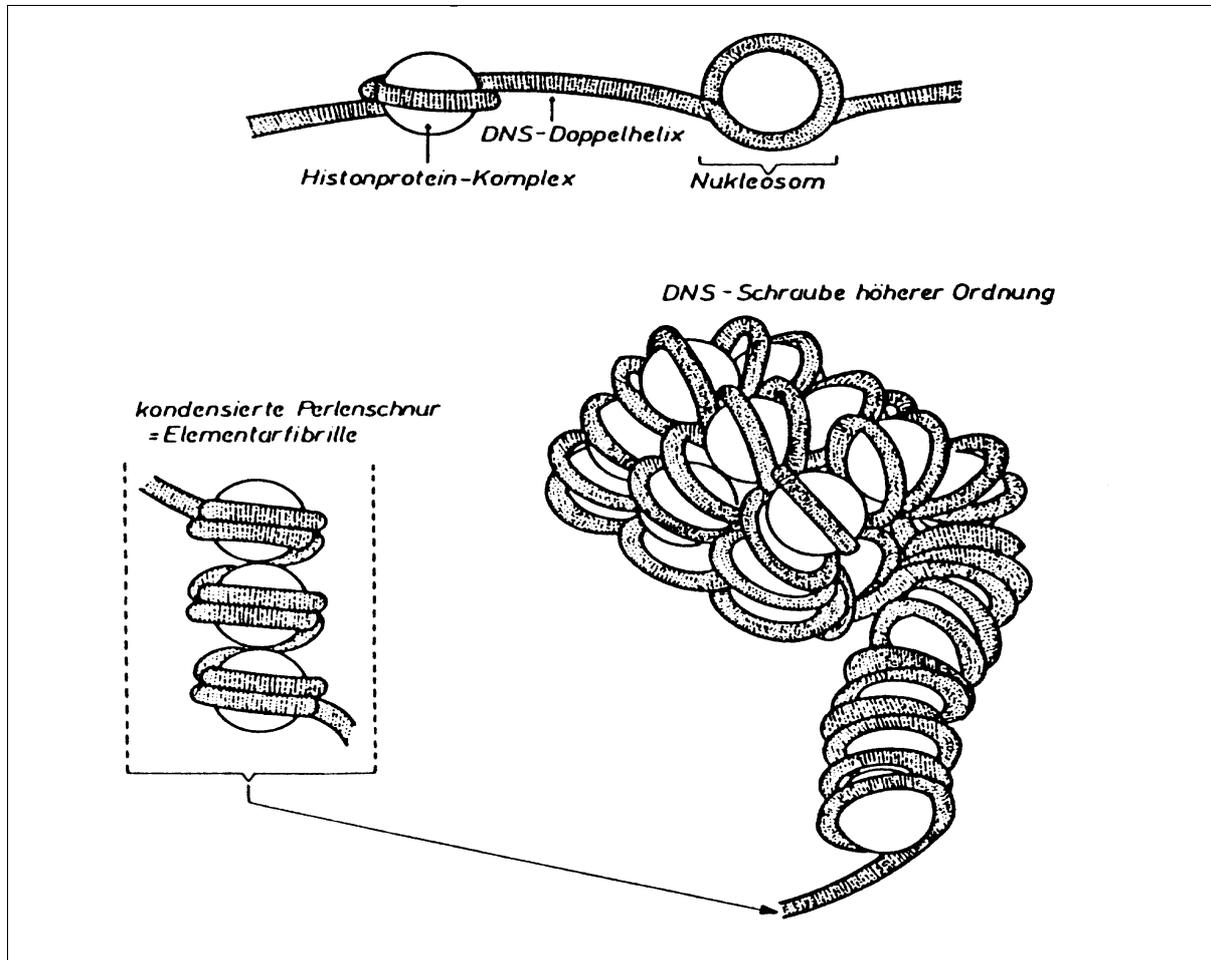
Einige Laubbäume

Tab. 3-6: Chromosomen-Grundzahlen x von Gattungen holziger Angiospermen. Gattungen, die polyploide Arten oder gar polyploide Reihen enthalten, sind mit * gekennzeichnet (nach Seitz 1951a, Wright 1976 u.a.)

Familie	Gattung	x	Familie	Gattung	x
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus</i>	19	<i>Platanaceae</i>	<i>Platanus</i>	21
	<i>Salix</i> *	19,22		<i>Rosaceae</i>	<i>Rosa</i> *
<i>Juglandaceae</i>	<i>Juglans</i>	16	<i>Prunus</i> *		8
	<i>Pterocarya</i>	16	<i>Crataegus</i> *		17
	<i>Carya</i> *	16	<i>Malus</i> *		17
<i>Betulaceae</i>	<i>Alnus</i> *	14	<i>Pyrus</i> *	17	
	<i>Betula</i> *	14	<i>Sorbus</i> *	17	
	<i>Corylus</i>	14	<i>Fabaceae</i>	<i>Robinia</i>	10
	<i>Carpinus</i> *	8	<i>Tiliaceae</i>	<i>Tilia</i> *	41
	<i>Ostrya</i>	8	<i>Hippocastanaceae</i>	<i>Aesculus</i> *	20
<i>Fagaceae</i>	<i>Fagus</i>	12	<i>Aceraceae</i>	<i>Acer</i> *	13
	<i>Quercus</i>	12	<i>Celastraceae</i>	<i>Evonymus</i>	8
	<i>Castanea</i>	12	<i>Rhamnaceae</i>	<i>Rhamnus</i>	10,12,13
	<i>Nothofagus</i>	13	<i>Cornaceae</i>	<i>Cornus</i>	9,10,11
<i>Ulmaceae</i>	<i>Ulmus</i> *	14	<i>Oleaceae</i>	<i>Frazinus</i> *	23
	<i>Celtis</i> *	10,11,14	<i>Caprifoliaceae</i>	<i>Sambucus</i>	16,18,19,21
<i>Moraceae</i>	<i>Morus</i> *	14		<i>Viburnum</i> *	9,16

Aus HATTEMER et al. 1993

Die Chromosomen bestehen aus RNS und aus einem kugelförmigen Proteinkomplex aus acht Histonmolekülen, um welche die Doppelhelix der DNS gewickelt ist. Diese DNS-Histoneinheit wird als **Nukleosom** bezeichnet. Die Struktur ähnelt einer ausgestreckten Perlschnur, vor allem während der Transkription. Üblicherweise liegt diese Perlschnur in kondensierter Form vor, so dass die Nukleosomen dicht nebeneinander liegen.



Aus HATTEMER et al. 1993

Die Menge an DNS in den Chromosomen variiert stark zwischen den einzelnen Organismen, selbst zwischen Arten derselben Gattung. Dies hängt damit zusammen, dass ein grosser Teil der DNS in Form von sogenannter **repetitiver DNS** vorliegt (mehrfach wiederholte Nukleotidsequenzen), deren Anteile an der Gesamt-DNS von Organismus zu Organismus stark variieren. Die Funktion dieser repetitiven DNS ist nach wie vor nicht bekannt. Vermutet wird, dass sie lediglich als Träger bzw. Gerüst für die kodierenden Abschnitte dient. Auch die Anzahl und Länge der Exons und Introns innerhalb von Genen können zwischen verschiedenen Organismen variieren.

Die DNS höherer Organismen setzt sich aus folgenden drei Typen von Nukleotidsequenzen zusammen:

- **Unikale Sequenzen** (single copy DNA) mit 1- 10 Kopien/Genom ⇒ meistens Struktur-gene
- **Mittelrepetitive Sequenzen** mit 10^2 bis 10^4 Kopien/Genom ⇒ Histon- und Immunopro-tein-Gene, RNS-Gene (tRNS, rRNS)
- **Hochrepetitive Sequenzen** mit 10^5 bis 10^6 Kopien/Genom ⇒ ???

Veränderung genetischer Information durch Mutation

In der Regel wird die Information in der Nukleotidsequenz des Funktionsgens unverändert an die Gameten bzw. an die nächste Generation weitergegeben. Ohne Abweichung von dieser Regel gäbe es keine **genetische Variation**. Genetische Variation ist aber eine Voraussetzung für die **Evolution** d.h. für die Weiterentwicklung und Anpassung an veränderte Umweltbedingungen. Durch Rekombination entstehen so nämlich Individuen mit ganz verschiedenen Genotypen, deren Phänotypen (Zusammenwirken von Genotyp und Umwelt) sich in Bezug auf die verschiedensten Merkmale ebenfalls unterscheiden können. Durch Selektion (Überleben der tauglichen Genotypen, Ausscheiden der untauglichen Genotypen) kann sich eine Population aus verschiedenen Genotypen an bestimmte Umweltverhältnisse oder an Umweltveränderungen anpassen. Genetische Variation ist daher unerlässlich für den Fortbestand und die Evolution einer Art.

Genetische Variation entsteht durch spontane Veränderungen der genetischen Information an einzelnen Funktionsgenen (oder Cistrons). Diese Veränderungen nennt man **Mutationen**, die Träger solcherart veränderte Information bezeichnet man als **Mutanten**. Mutation ist folglich die Ursache sämtlicher genetischer Variation.

Mutationen können in allen Geweben vorkommen (**somatische Mutation**), sie manifestieren sich allerdings nur dann in Nachkommen, wenn sie bis in die Gameten (Keimzellen) gelangen. Erfolgt eine Mutation nur in einer einzelnen somatischen Zelle, so fällt sie kaum auf und verschwindet beim Tod des Individuums.

Spontane Mutationen sind selten. In der Regel trägt einer von 10^5 bis 10^8 Gameten pro Generation eine Mutation an einem Gen. Die Mutationsraten einzelner Gene sind jedoch unterschiedlich; sie sind relativ hoch für Resistenzgene (rasche Anpassung notwendig) und sehr gering für Gene, die überlebenswichtige Funktionen kodieren (Beispiel Chloroplasten-Gene). Da Bäume aber 10'000 oder mehr Gene besitzen, ist das Vorkommen von Mutationen im Gesamtgenom natürlich höher. Man schätzt bei Koniferen, dass 1 % der Gameten pro Generation Mutationen mit einem sichtbaren quantitativen Effekt aufweisen.

Die Veränderung der genetischen Information kann auf verschiedenen Ebenen auftreten. Es lassen sich folgende **Arten von Mutationen** unterscheiden:

- **Gen-Mutationen:** Änderungen der Nukleotidsequenzen eines Cistrons
- **Chromosomen-Mutationen:** Strukturveränderungen innerhalb eines Chromosoms
- **Genom-Mutationen:** Veränderung der Chromosomenanzahlen

Gen-Mutationen

Als Genmutationen werden alle Veränderungen der Nukleotidsequenz innerhalb eines Cistrons bezeichnet. Solche Veränderungen sind **zufällig**. Veränderungen der Nukleotidsequenz können auf **verschiedene Arten** erfolgen und haben je nach Art **unterschiedliche Auswirkungen**:

- **Punktmutationen** -> Austausch eines Nukleotides
- **Frame-shift-Mutationen** -> Änderung des gesamten Codes ab Mutationsstelle
- **Segmentmutationen** -> Mutationen längerer DNS-Segmente

Punktmutationen

Austausch eines Nukleotides durch ein anderes Nukleotid: Erzeugt ein neues Triplet innerhalb des Cistrons. Infolge der A : T bzw. C : G Paarung hat dies auch im zweiten Doppelstrang ein neues Triplet zur Folge. Punktmutationen können ohne Wirkung für das kodierte

Polypeptid sein (**synonyme Mutation**), weil der genetische Kode nicht ausschliesslich ist. Dies ist häufig der Fall, wenn nur das dritte Nukleotid des Triplets betroffen ist. Eine **heteronyme Mutation** an einem Triplet bewirkt jedoch den Einbau einer anderen Aminosäure und damit entsteht ein verändertes Polypeptid. Wird durch eine Punktmutation aus einem Aminosäure-Codon ein Stopp-Codon, so wird nur ein Teilmolekül des Polypeptides gebildet, weil die Synthese vorzeitig abgebrochen wird.

Frame-shift-Mutationen

Gehen an einer Stelle ein oder mehrere Nukleotide (Anzahl ≠3 oder Vielfache von 3) verloren oder werden sie hinzugefügt, so verändert sich ab dieser Stelle die gesamte weitere Tripletsequenz bis zum Ende des Cistrons. Es entsteht in der Folge ein mehr oder weniger stark verändertes Polypeptid.

Segmentmutationen

Mutationen, die nicht nur wenige Nukleotide sondern längere DNS-Segmente betreffen bspw. Verluste grosser DNS-Stücke (**Deletion**), Verdoppelung längerer Sequenzen (**Duplikation**) oder Verdrehung von Segmenten (**Inversion**). Als Folge von Segmentmutation entstehen in der Regel Polypeptide mit deutlich veränderten Aminosäuresequenzen und Eigenschaften, sofern die Synthese überhaupt noch möglich ist.

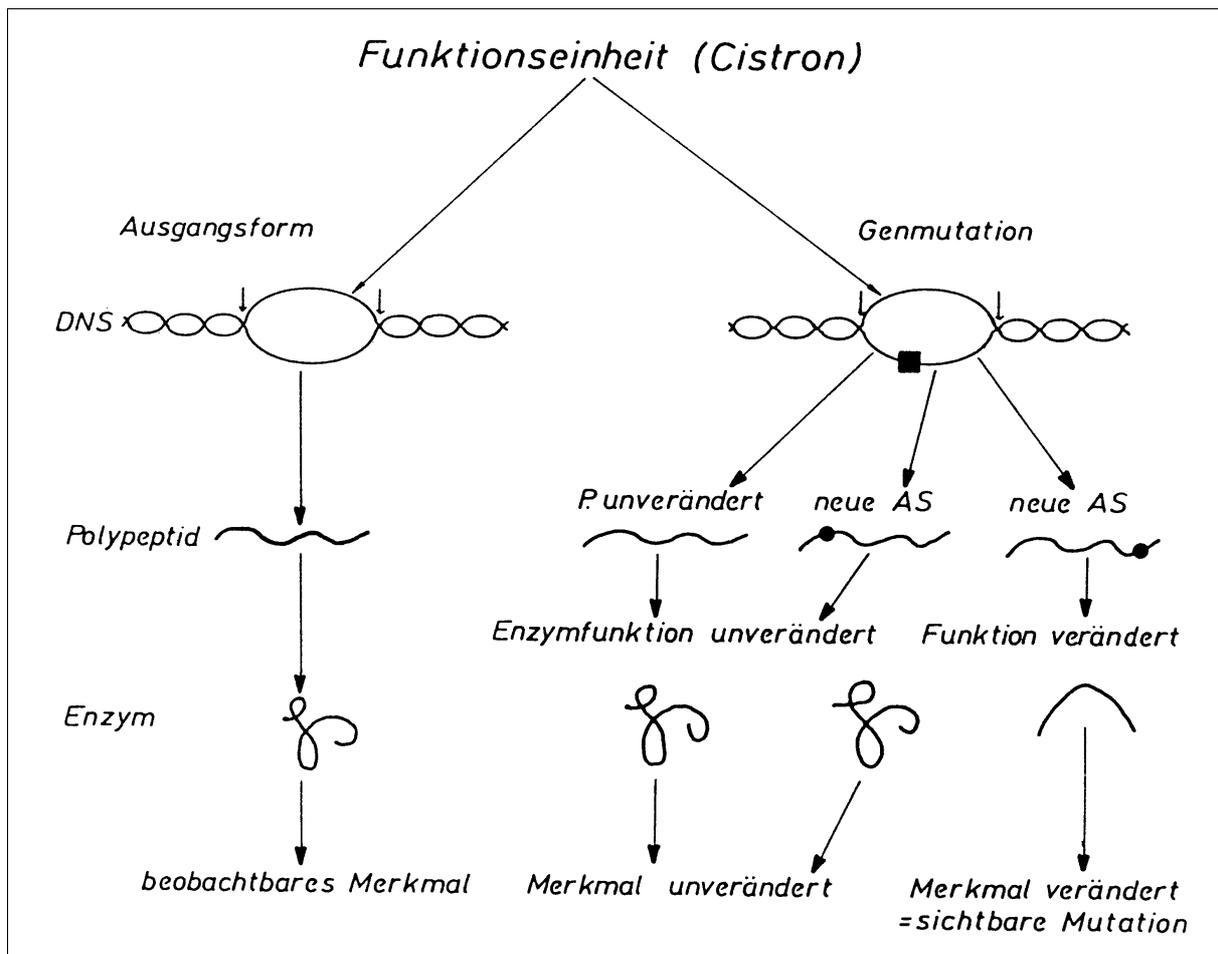
<p>GCA GTA AAC CGA Arg His Leu Ala</p> <p style="text-align: center;">⇓</p>	Tripletsequenz in der DNS Aminosäuresequenz im Polypeptid
<p>GCA GTG AAC CGA Arg His Leu Ala</p> <p style="text-align: center;">⇓</p>	Synonyme Punktmutation Keine Änderung der AS-Sequenz
<p>GCA GTT AAC CGA Arg Glu Leu Ala</p> <p style="text-align: center;">⇓</p>	Heteronyme Punktmutation Änderung der AS-Sequenz
<p>+ A →</p> <p>GCA GAT AAA CCG A Arg Leu Phe Gly</p> <p style="text-align: center;">⇓</p>	Fram-shift-Mutation infolge Addition eines Nukleotids
<p>GCA TAA ACC GA- Arg Iso Thy Leu</p> <p style="text-align: center;">⇓</p>	Frame-shift-Mutation infolge Verlust eines Nukelotids

- A

Nach HATTEMER et al. 1993

Je nach der Änderung in der DNS-Sequenz und den daraus resultierenden Änderungen im Polypeptid sind auch die Auswirkungen auf die Funktion der Enzyme bzw. der anderen Proteine recht verschieden. Die Mutationen können einen geringen oder einen starken Einfluss auf das Erscheinungsbild oder die Funktionen haben. Enzyme können in ihrer Aktivität oder Spezifität verändert werden, sie können aber auch ganz funktionsuntüchtig werden (**negative Mutation**). Dies kann sehr nachteilige Konsequenzen haben bis hin zur gänzlichen Lebensuntüchtigkeit (**lethale Mutation**). Eine Veränderung der Aktivität oder Spezifität eines Enzyms kann die Lebenstüchtigkeit gelegentlich aber auch erhöhen, insbesondere in veränderten oder zukünftigen Umweltbedingungen kann sie positiv sein (**positive Mutation**).

Auswirkung von Genmutationen auf die Enzymfunktion und ein Merkmal



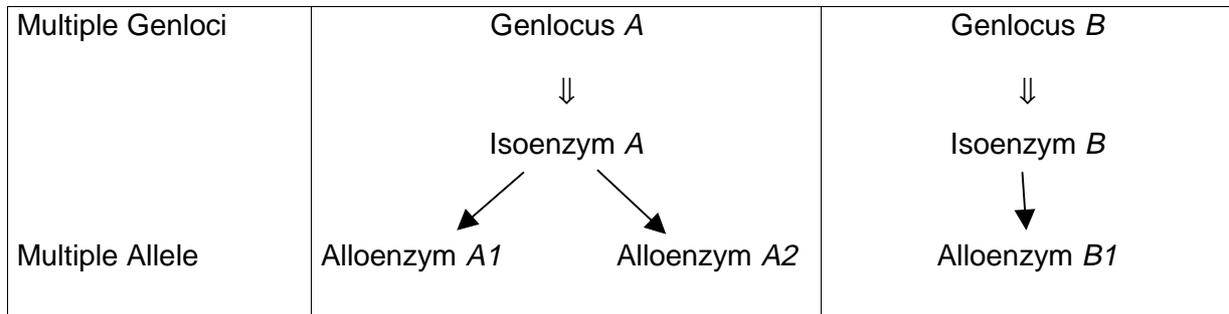
Aus HATTEMER et al. 1993

Möglichkeiten zur Identifizierung von Gen-Mutationen

Viele Mutationen bleiben unbemerkt. Verursacht eine Genmutation jedoch deutlich erkennbare Veränderungen eines Merkmals, so treten Individuen mit verschiedenen Ausprägungen dieses Merkmals auf. Das dieses Merkmal kodierende Gen kann in diesem Fall indirekt durch Kreuzungsexperimente zwischen Trägern unterschiedlicher Merkmalsausprägungen identifiziert werden (*zur Methode siehe später*). Verschiedene Formen solcher Gene (bspw. ursprüngliche Form = ursprüngliches Merkmal = Wildform und mutierte Form) bezeichnet man als **Allele**. Sind mehr als zwei Formen vorhanden so spricht man von multiplen Allelen. Die verschiedenen Allele eines Cistrons (Gens) sind in homologen Chromosomen an homologen Stellen lokalisiert, die man **Genort** oder **Genlocus** bezeichnet.

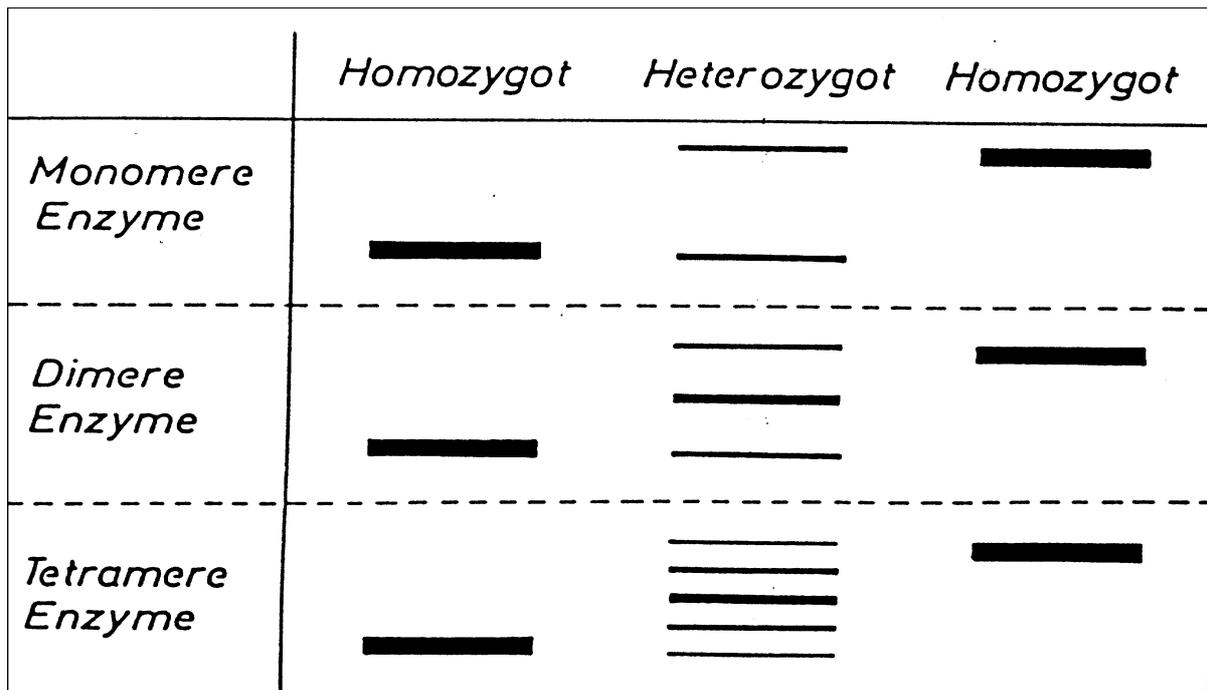
Handelt es sich bei den Merkmalen um Primärprodukte der DNS wie etwa um Enzyme, Struktur- oder Transportproteine, so lassen sich häufig die Art und die Anzahl der Genmutationen im kontrollierenden Gen feststellen. Weil Punktmutationen in den meisten Fällen die Aminosäuresequenz der kodierten Polypeptide und damit die Struktur und Ladung der resultierenden Enzyme bzw. Proteine verändern, existieren verschiedene Molekülformen eines Enzyms oder Proteins in einer Zelle. Solche verschiedene Molekülformen bezeichnet man als **Isoenzyme** (bzw. Isoporteine). Neben Isoenzymen, die als Produkte von Genmutationen entstehen und deshalb Produkte verschiedener Allele eines Genortes sind, kommen auch Isoenzyme vor, die von mehreren Genorten kodiert werden, wenn diese Genorte die gleiche oder eine ähnliche Funktion besitzen. Das Vorkommen mehrerer Genorte mit gleicher oder

ähnlicher Funktion kann durch Gen-Dupplikationen im Laufe der Evolution oder durch Arthybridisierung bedingt sein. Zur Unterscheidung werden Isoenzyme, die von verschiedenen Allelen eines Genortes kodiert werden, **Alloenzyme** genannt (von Allel).



Enzyme besitzen bei einem bestimmten *PH*-Wert einer Lösung eine bestimmte Nettoladungen. In einem elektrischen Feld wandern sie daher mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, so dass man unterschiedliche Isoenzyme mittels **Elektrophorese** trennen und in einem **Zymogramm** sichtbar machen kann (durch Chemikalien, die mit dem Enzym reagieren und eine Farbveränderung verursachen). Dadurch lässt sich die Anzahl Allele an verschiedenen Genorten bestimmen und damit genetische Variation quantifizieren und beschreiben (zum Beispiel in **genetischen Inventuren**). Diese Technik hat in den letzten 10 Jahren erhebliche Fortschritte in der forstgenetischen Forschung ermöglicht.

Im einfachsten Fall besteht ein von einem Genlocus kodiertes Enzym aus nur einem Polypeptid (**monomere Struktur**). In diesem Fall kodieren Individuen, welche zwei gleiche Allele an diesem Genort aufweisen (**homozygote Individuen** A1A1 oder A2A2) jeweils nur ein Alloenzym (ein Band im Zymogramm), während Individuen mit zwei unterschiedlichen Allelen (**heterozygote Individuen** A1A2) zwei Alloenzyme produzieren und daher zwei Banden im Zymogramm aufweisen. Die Begriffe homozygot und heterozygot werden im Kapitel über Mendelgenetik noch näher erläutert.



Aus HATTEMER et al. 1993

Ein an einem Genlocus kodiertes Enzym kann aber auch aus zwei (**dimere Struktur**) oder mehreren Polypeptiden bestehen. Im Fall eines dimeren Enzyms kodieren heterozygote Individuen insgesamt drei Alloenzyme (A_1 , A_2 , und ein Hybrid-Enzym welches aus A_1 und A_2 gebildet wird und welches eine mittlere Wanderungsgeschwindigkeit aufweist); folglich erscheinen drei Banden im Zymogramm.

Beispiel der genetischen Charakterisierung eines Enzyms-Systems im Zymogramm

Zymogramm (Anfärbung auf ein Enzym-System)	biochemische Charakterisierung nach Elektrophorese	genetische Charakterisierung nach genetischer Analyse	Genotyp des Individuums	biochemisch-genetische Klassifizierung
	4 Elektromorphe eines dimeren Enzymsystems	Alloenzym A_1 Alloenzym A_1A_2 Alloenzym A_2 Alloenzym B_1	A_1A_2 B_1B_1	Isoenzym A Isoenzym B

Aus HATTEMER et al. 1993

Dreifach-Band-Konfigurationen können aber ebenso durch **Interlocus-Hybriden** entstehen, indem Polypeptide von verschiedenen Genloci zu aktiven Isoenzymen aggregieren können. Für die Interpretation von Zymogrammen braucht es daher zunächst eine genetische Analyse, die eine klare Zuordnung der Banden zu Allelen und Genorten erlaubt. Ein Beispiel eines komplexen Enzymsystemes ist auf der folgenden Seite dargestellt.

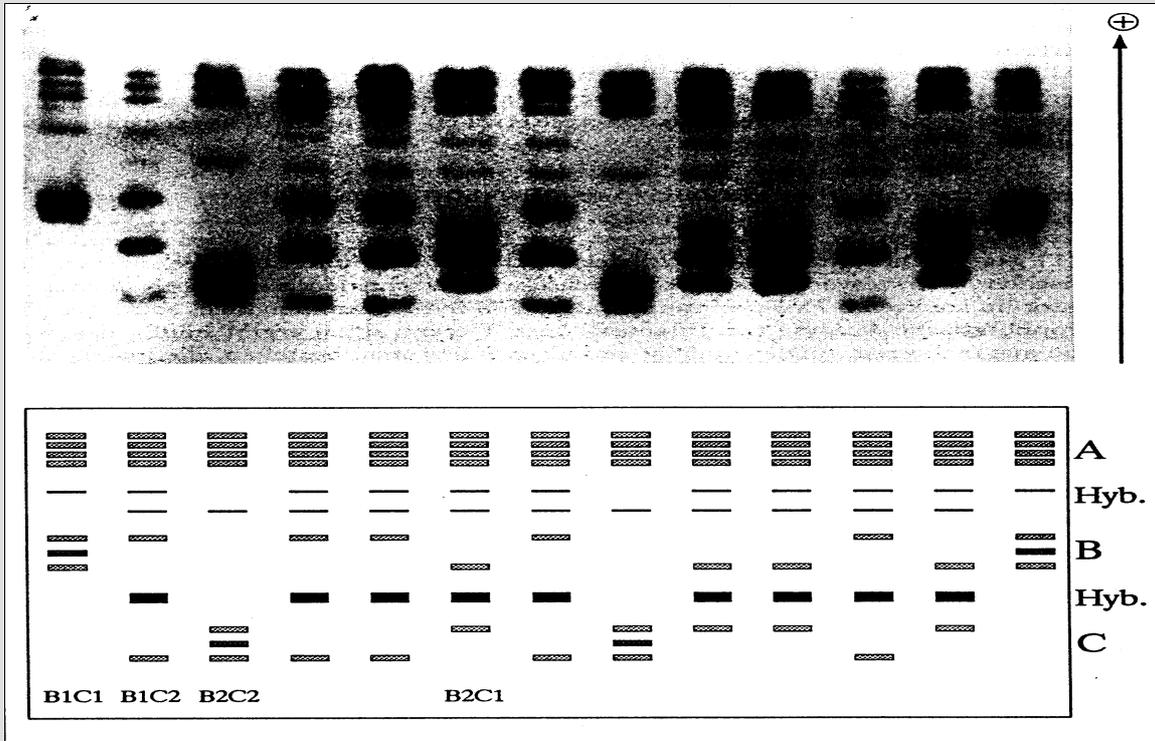
Die genetische Analyse lässt sich bei Nadelhölzern einfacher bewerkstelligen, weil ein Gewebe des Samens (Endosperm) haploid ist, so dass sich die Segregation des Samenelters in diesem Gewebe direkt beobachtet lässt. Bei diploiden Laubhölzern müssen zunächst kontrollierte Kreuzungen zwischen Individuen mit bekanntem Genotyp gemacht werden, damit die Vererbung in den Nachkommen analysiert und die Bande den Allelen und Genorten zugewiesen werden können.

Isoenzyme haben eine Reihe wichtiger **Eigenschaften**, die sie für die genetische Forschung interessant machen:

- In weiten Grenzen sind sie **unabhängig von der Umwelt**; sie können so als neutrale Marker verwendet werden, lassen sich aber für Fragen der Anpassung nur bedingt einsetzen
- Sie sind in verschiedenen Stadien der Ontogenese (in verschiedenen Geweben) **konstant exprimiert**
- Sie werden **kodominant** vererbt; dies bedeutet, dass bei heterozygoten Individuen beide Allele exprimiert werden und sich homo- und heterozygote Individuen unterscheiden lassen
- An zahlreichen Enzym-Genorten tritt relativ **viel Variation** auf
- Viel Enzyme nehmen **Schlüsselstellungen im Stoffwechsel** ein; sie stehen deshalb für wichtige genetische Information
- Für die Analyse sind nur **kleine Probemengen** notwendig, so dass bspw. Endosperm und Embryo in einem Samenkorn separat untersucht werden können (dadurch lässt sich der mütterliche und der väterliche Anteil bestimmen -> Genfluss, Paarungssystem kann untersucht werden)

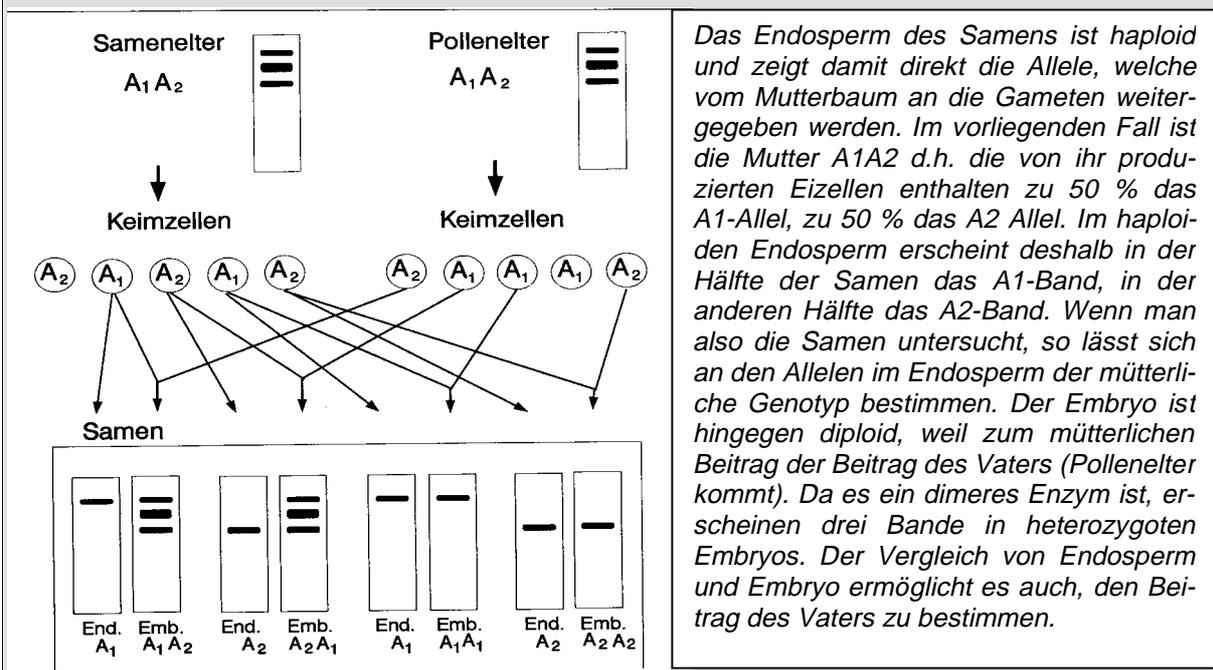
- Sie sind **einfach und billig** zu erfassen, so dass grosse Probemengen untersucht werden können

Beispiel eines komplexeren Enzymsystems



Zymogramm der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDH) aus 13 haploiden Samenendospermen der Fichte. Die Komplexität dieses Zymogramms resultiert aus der Überlappung von Locus B und C. Alloenzym C1 wandert in die Zone B und Alloenzym B2 in die Zone C. Zusätzlich bilden sich Interlocus-Hybridbänder zwischen A und B/C und zwischen B und C. Eine genetische Analyse ist hier zwingend, um die Bande richtig interpretieren zu können (nach HATTEMER et al. 1993)

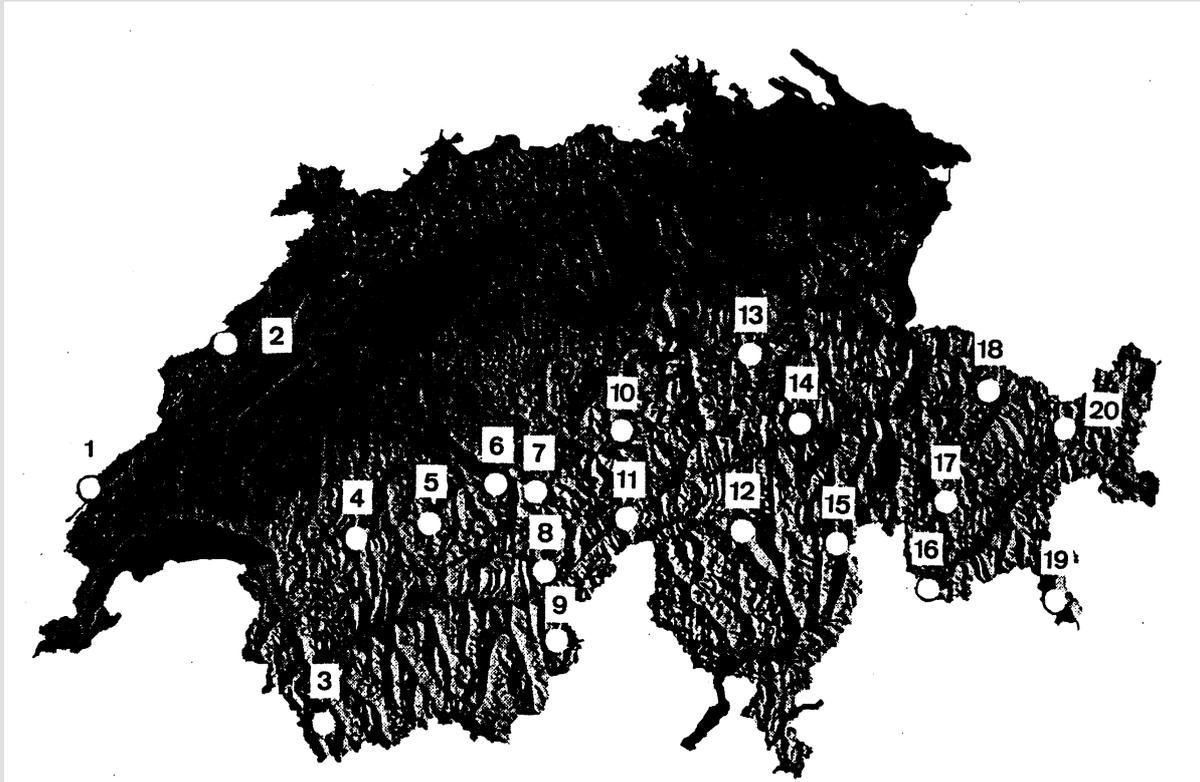
Meiotische Segregation an den haploiden Endospermen einer Konifere (nach SCHROEDER 1986)



Das Endosperm des Samens ist haploid und zeigt damit direkt die Allele, welche vom Mutterbaum an die Gameten weitergegeben werden. Im vorliegenden Fall ist die Mutter A1A2 d.h. die von ihr produzierten Eizellen enthalten zu 50 % das A1-Allel, zu 50 % das A2 Allel. Im haploiden Endosperm erscheint deshalb in der Hälfte der Samen das A1-Band, in der anderen Hälfte das A2-Band. Wenn man also die Samen untersucht, so lässt sich an den Allelen im Endosperm der mütterliche Genotyp bestimmen. Der Embryo ist hingegen diploid, weil zum mütterlichen Beitrag der Beitrag des Vaters (Pollenelter kommt). Da es ein dimeres Enzym ist, erscheinen drei Bande in heterozygoten Embryos. Der Vergleich von Endosperm und Embryo ermöglicht es auch, den Beitrag des Vaters zu bestimmen.

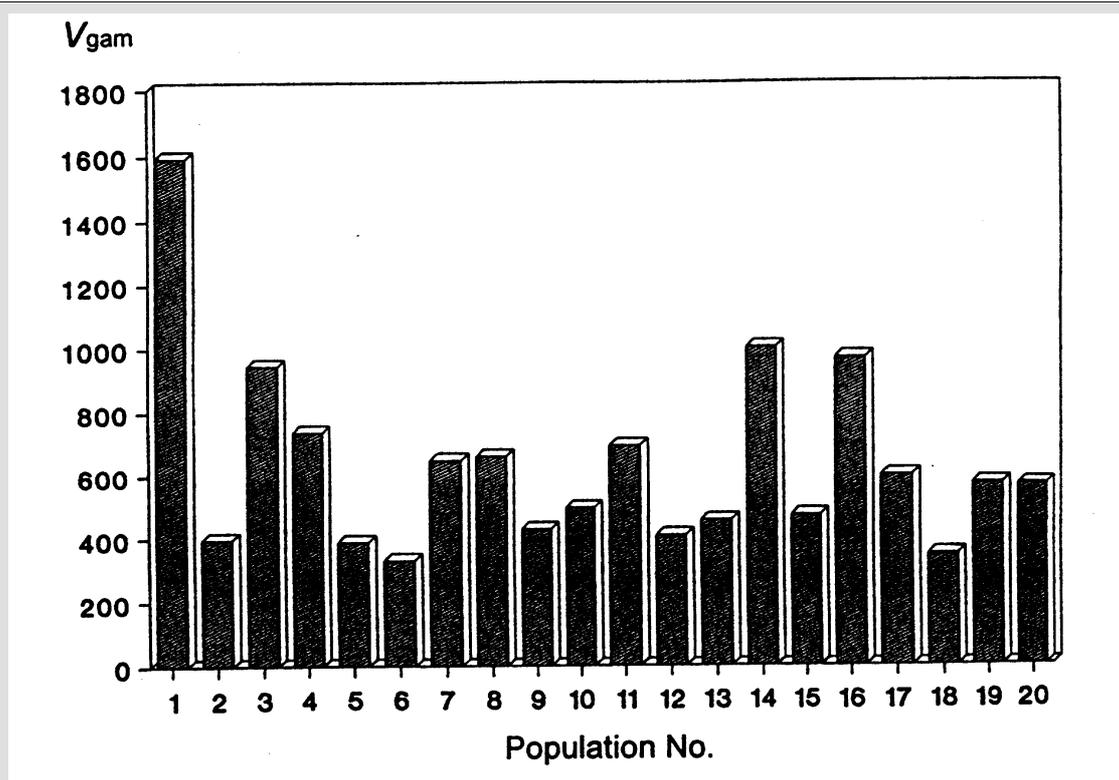
Falls die Vererbung durch eine genetische Analyse geklärt ist, können Isoenzyme deshalb als **Genmarker** verwendet werden und in zahlreichen allgemein-genetischen, populations-genetischen und züchterischen Teilbereichen eingesetzt werden. Nachfolgend sind zwei Beispiele dargestellt, wie Isoenzym-Genmarker für praktische Fragestellungen eingesetzt werden können:

Beispiel: Ausscheidung von Genreservaten für die Fichte in der Schweiz



Als Grundlage für die Auswahl von Genreservaten wurden in der Schweiz an der WSL 20 Fichtenbestände (siehe Karte) isoenzymatisch untersucht. An 18 Genorten, die 13 verschiedene Enzyme kodieren, wurden gesamthaft 60 verschiedene Allele identifiziert. Aufgrund der Allelbesetzung lassen sich verschiedene genetische Variationsparameter berechnen, die es erlauben, die genetische Struktur der Bestände zu beschreiben und sie miteinander zu vergleichen. Als Beispiel sei hier nur die gametische Multilocus Diversität dargestellt. Dieses Mass, berechnet aufgrund der gefundenen Allele und ihrer Häufigkeit, beschreibt die Fähigkeit der untersuchten Populationen, genetisch unterschiedliche Gameten (Eizellen, Pollen) zu produzieren. Dieses Mass drückt also das Potential der Populationen aus, in den Nachkommen genetische Variation zu erzeugen bzw. auf sie zu übertragen. Da die genetische Variation besonders bei Baumpopulationen eine Voraussetzung für die langfristige Anpassungsfähigkeit an Umweltveränderungen ist, sind für Genreservate daher jene Bestände besonders interessant, die sich durch hohe Werte der gametischen Diversität auszeichnen. Die Ergebnisse der genetischen Inventur sind auf der folgenden Seite graphisch dargestellt. Folgende Feststellungen können gemacht werden:

- Herausragend ist vor allem die Population 1 (Le Brassus), die besonders hohe Werte aufweist. In dieser Population wurde inzwischen bereits ein Genreservat (Risoux) eingerichtet. Weniger interessant für ein Genreservat sind hingegen die Bestände 2, 5, 6, und 18, die Werte unter 400 aufweisen:



Aus MÜLLER-STARCK 1995

Gestützt auf die Anzahl Allele und deren Häufigkeiten konnten aus dieser Inventur folgende allgemeine Schlussfolgerung gezogen werden:

- Da die genetische Variation innerhalb der Bestände bei Fichte relativ gross, die Variation zwischen den Beständen hingegen relativ gering ist, ist es für die Erhaltung genetischer Variation in Genreservaten angezeigt, lieber wenige, dafür grosse Reservate auszuscheiden als viele kleinere Bestände auszuwählen. Vorteilhafterweise wählt man in erster Linie Bestände mit einer überdurchschnittlichen gametischen Vielfalt

Genetische Grundlagen für die Erhaltung des Speierlings (*Sorbus domestica*) in der Schweiz:

Mit heute rund 300 bekannten Individuen ist der Speierling die seltenste Baumart in der Schweiz. Überalterung, fehlende Verjüngung und Zersplitterung in isolierte Vorkommen lassen befürchten, dass diese Baumart gefährdet ist. Insbesondere muss erwartet werden, dass die genetische Vielfalt in den kleinen Kollektiven verloren geht. Das Studium der genetischen Struktur dieser Baumart ist daher eine wichtige Voraussetzung für effiziente Erhaltungsmassnahmen. In der nachfolgenden Tabelle sind Ergebnisse einer genetischen Inventur mittels 12 Isoenzym-Genmarker dargestellt. Zum Vergleich sind auch Bestände im Hauptverbreitungsgebiet in Deutschland untersucht worden, weil der Speierling dort noch in grösseren Vorkommen auftritt. Ebenfalls untersucht wurden 82 Plusbäume, die für eine Schweizer Erhaltungs-Samenplantage in allen Vorkommen der Schweiz ausgelesen und vegetativ vermehrt worden sind. Da der Speierling in der Natur oft isoliert vorkommt, kann er sich gegenseitig nur noch ungenügend paaren. Infolge von Inzucht und Verwandtenpaarung geht die genetische Vielfalt zurück und die Nachkommen haben eine schlechte Viabilität. In einer Erhaltungsplantage (künstliche Population) soll eine gegenseitige Paarung zwischen allen Individuen wieder ermöglicht werden. Auf diese Weise lässt sich Saatgut mit einer möglichst grossen Vielfalt erzeugen. Damit die Nachkommen auch eine möglichst gute Form und Qualität aufweisen, wurden lediglich die qualitativ besten Individuen als Plusbäume gewählt. Es stellt sich nun die Frage, ob die 82 Plusbäume die genetische Struktur des Gesamtvorkommens einigermaßen repräsentiert, ob die Auswahl nach qualitativen Kriterien die genetische Struktur in der Plantage beeinflusst hat, und ob die genetische Vielfalt in der Plantage genügend gross ist, obwohl lediglich 82 Bäume ausgewählt worden sind. Folgende Ergebnisse sind erzielt worden:

Kollektiv	N_{tot}	M	G	AL	v	v_{gam}	H_a	D_j
Schaffhausen	132	28	41	2.33	1.435	108.1	0.265	0.113
Basel	22	28	39	2.33	1.488	180.8	0.303	0.129
West-Schweiz	39	28	38	2.33	1.451	116.5	0.273	0.081
Tauberbischofsheim	119	29	40	2.42	1.397	71.5	0.260	0.066
Schweinfurt	102	29	37	2.42	1.380	60.3	0.265	0.083
Freiburg	20	26	30	2.17	1.310	33.6	0.242	0.108
Mittelwert	72.3	28	37,5	2.33	1.410	95.1	0.268	0.092
Genpool Schweiz	193	29	45	2.42	1.468	134.4	0.271	-
Plusbäume Schweiz	82	28	41	2.33	1.490	169.4	0.273	-

M : Gesamtanzahl Allele; G : Gesamtanzahl Genotypen; AL : Mittlere Anzahl Allele pro Genort; v : allelische Diversität; v_{gam} : potentielle gametische Diversität; H_a : mittlerer Heterozygotiegrad; D_j : Differenzierung jedes Kollektives vom übrigen Bestand (aus Diplomarbeit WAGNER (1998)).

Folgende Schlussfolgerungen liessen sich aus der Inventur ziehen:

- Der Speierling in der Schweiz ist genetisch nicht eingeschränkt; er verfügt sogar über mehr genetische Variation als in den deutschen Hauptverbreitungsgebieten
- Die Variation entspricht jener von bestandesbildenden Arten (Buche, Eiche)
- Auch das kleine Kollektive Basel ist genetisch erstaunlich vielfältig
- Die genetische Differenzierung zwischen den Kollektiven (Unterschiede in der genetischen Struktur) ist relativ gross, auf jeden Fall grösser als bei bestandesbildenden Arten (Buche, Eiche)
- Die Auswahl der 82 Plusbäume repräsentiert den Gesamtgenpool sehr gut. Das Plusbaumkollektiv weist im Vergleich zum CH-Genpool eine höhere Diversität und eine höhere potentielle gametische Vielfalt auf. Die Nachkommen werden daher genetisch vielfältiger sein als es im besten Fall im Gesamtvorkommen möglich wäre. Die Plantage ist daher ein sehr brauchbares Instrument für die Erhaltung der genetischen Vielfalt des Speierlings in der Schweiz.

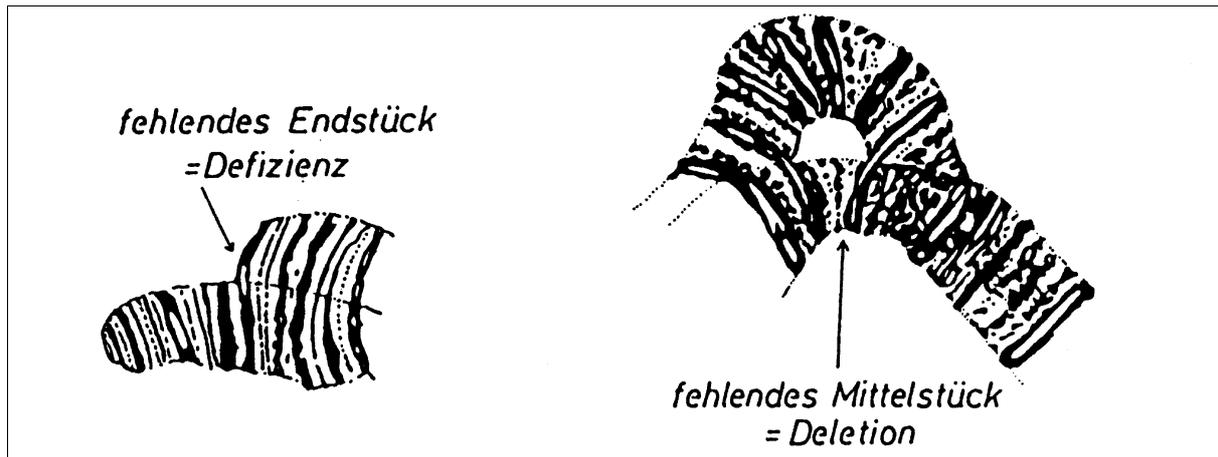
Chromosomen-Mutationen

Chromosomen-Mutationen sind grössere Strukturveränderungen innerhalb eines Chromosoms, welche im Gegensatz zu Segmentmutationen über das einzelne Gen hinausgehen. Die Ursache für Chromosomen-Mutationen sind Brüche einzelner Chromatiden oder ganzer Chromosomen. Man unterscheidet vier verschiedene Arten von Chromosomen-Mutationen:

- **Deletion** bzw. Defizienz
- **Dupplikation**
- **Inversion**
- **Transposition** bzw. Translokation

Deletion

Gehen nach einem Bruch **Chromosomenabschnitte mit ihren Gruppen von Genen verloren**, so bezeichnet man diesen Verlust als Deletion, wenn ein Mittelstück betroffen ist und als Defizienz, wenn ein Endstück verloren geht. Solche Strukturveränderungen lassen sich bei der Meiose beobachten, wenn sich die homologen Chromosomen während der Synapsis paaren. Ein Verlust mehrerer Gene hat sehr häufig eine grosse Auswirkung für den Träger, oft sind sie lethal. Beim Menschen etwa lösen solche Strukturveränderungen schwere Krankheiten häufig mit Todesfolge aus.



Aus HATTEMER et al. 1993

Duplikation

Eine **Verdoppelung eines Chromosomenabschnittes** kommt zustande, wenn ein Bruchstück an einer Bruchstelle des homologen Chromosoms neu angeheftet wird, wobei das neue Stück grösser sein muss als das ursprüngliche. Dies führt zwangsläufig zu einer Deletion am anderen Chromosom, sofern sich die beiden kleineren Stücke überhaupt wieder verbinden. Ein bekanntes Beispiel ist Duplikation der Bar-Region auf dem X-Chromosom von *Drosophila*, welche die Ausbildung einer veränderten Augenform bewirkt.

Inversion

Hat ein Chromosomenabschnitt eine im Vergleich zum ursprünglichen Chromosom **umgekehrte Gen-Reihenfolge**, so spricht man von einer Inversion. Dies kommt durch einen doppelten Bruch mit anschliessender Drehung um 180° zustande. Für das Trägerindividuum hat eine Inversion in der Regel nur geringe Auswirkungen, weil alle ursprünglichen Gene vorhanden sind. Bei der Meiose führt dies allerdings zu einer Schleifenbildung, weil sonst keine homologe Paarung am betroffenen Abschnitt möglich wäre.

Transposition

Damit wird die **Verlagerung von Abschnitten** bezeichnet. Wird ein Teilstück auf ein anderes, nicht homologes Chromosom verlagert oder zwei Stücke zu einem neuen Chromosom zusammengefügt, so bezeichnet man dies als **Translokation**. Aus diesen Strukturveränderungen entstehen bei der Meiose schwerwiegende Probleme, auf die hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

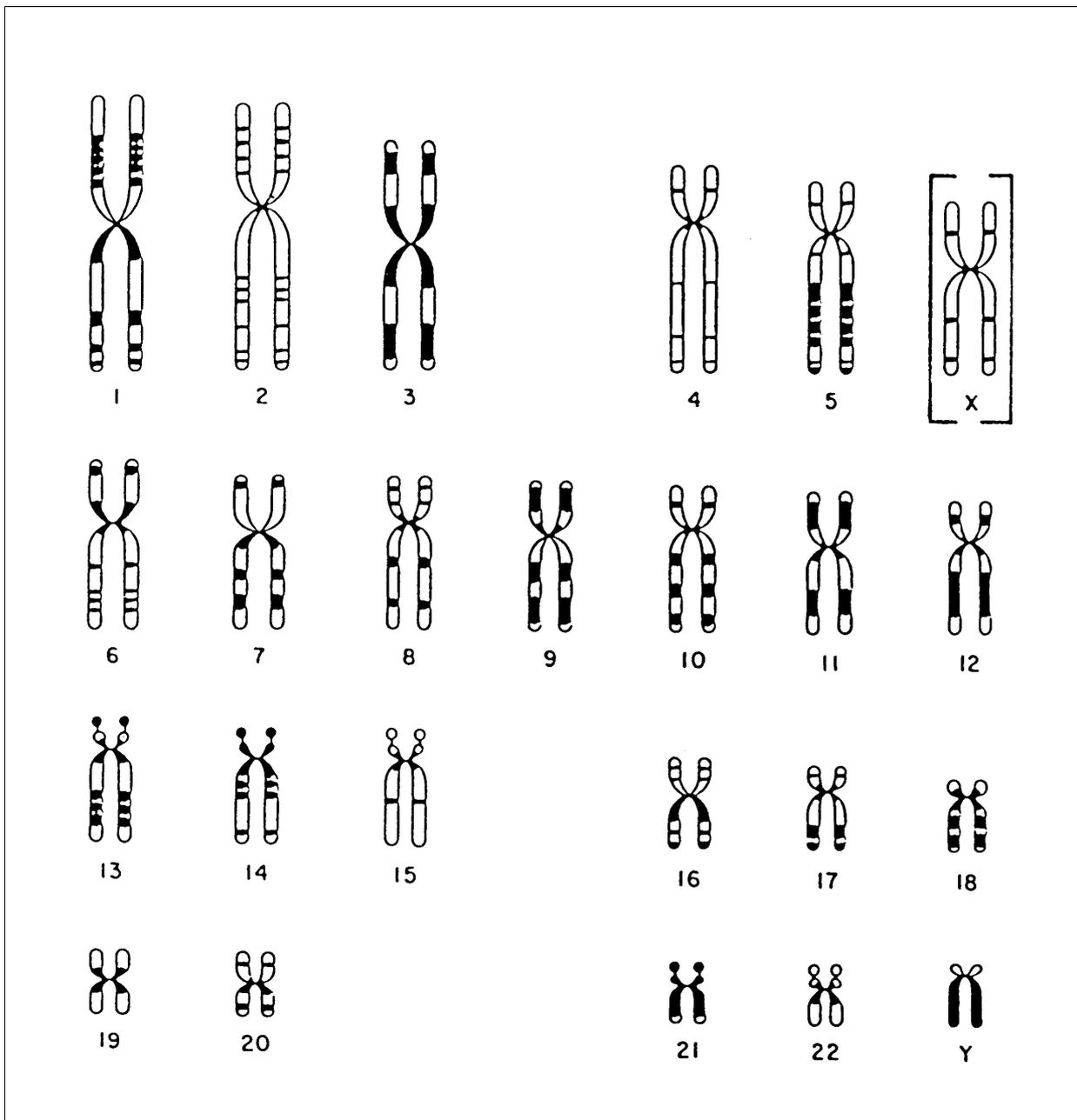
Genom-Mutationen

Bei Genom-Mutationen bleiben sowohl Gen-Anordnung als auch Chromosomenstruktur erhalten, hingegen verändert sich die **Anzahl Chromosomen**. Dabei sind zwei Fälle möglich:

- Einzelne Chromosomen eines Satzes fehlen oder sind überzählig (**Aneuploidie**)
- Der Bestand an Chromosomen ist um komplette Chromosomensätze vermehrt oder vermindert (**Euploidie**)

Aneuploidie

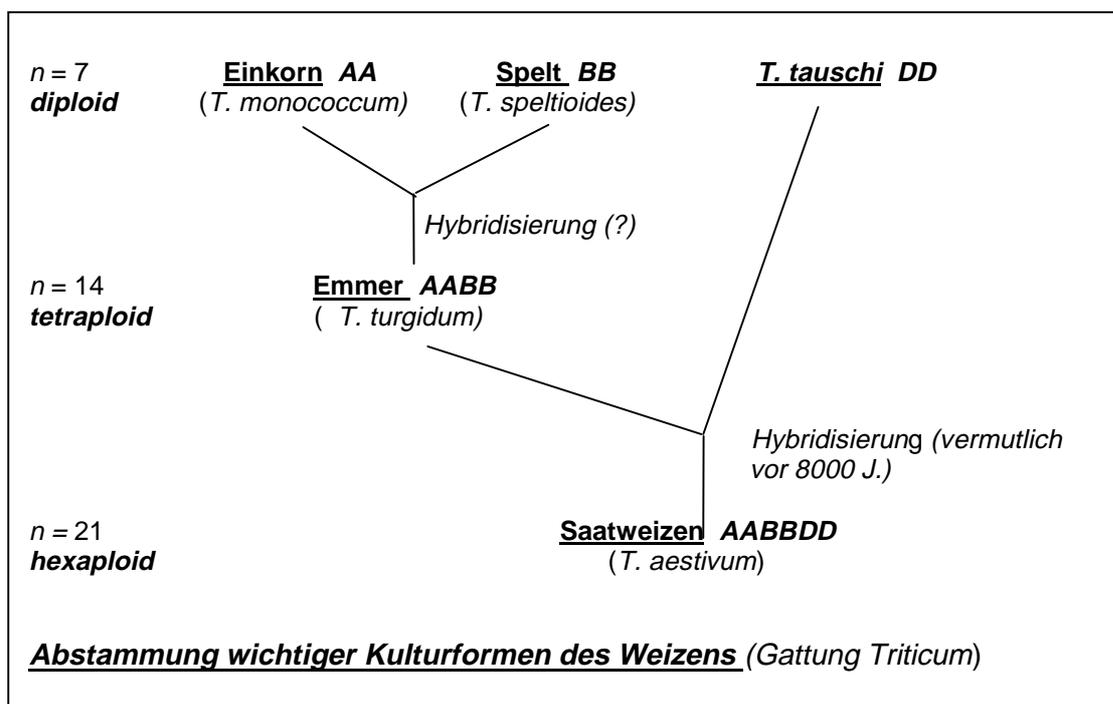
Diese Art der Genom-Mutation tritt vorwiegend im Verlauf von fehlerhaften Meiosen auf, bei denen es bspw. nicht zur Trennung eines Chromosomenpaares in der Anaphase kommt. Entsprechend besitzt dann der eine haploide Kern ein Chromosom zu viel, der andere eines zu wenig. Es entstehen dadurch einerseits Nachkommen, denen ein Chromosom eines homologen Paares fehlt (**Monosomie**) und andererseits solche, die drei homologe Chromosomen (**Trisomie**) besitzen. Der Verlust eines Chromosoms ist zumeist lethal oder bedeutet eine drastische Einschränkung der Lebensstüchtigkeit. Auch überzählige Chromosomen führen zu deutlichen physiologischen oder morphologischen Veränderungen. Bekannt ist beim Menschen bspw. das **Down-Syndrom**, bei dem das 21. Chromosom dreifach vorliegt (**Trisomie 21**) oder das Turner-Syndrom (eine intersexuelle, infantile Körperausbildung), bei welchem ein Geschlechtschromosom fehlt (Monosomie).



Idiogramm mit den 22 Autosomen und den zwei Heterosomen (X und Y) des Menschen (nach STERN 1973)

Euploidie

Euploidie findet sich vor allem bei Pflanzen, bei denen etwa die Hälfte aller Arten **polyploid** ($> 2n$) sind, beispielsweise triploid ($3n$) oder tetraploid ($4n$). Polyploide Pflanzen können gleiche (AAAA) (**Autopolyploidie**) oder verschiedene (AABB) (**Allopolyploidie**) Chromosomensätze aufweisen. Autopolyploide Formen entstehen meistens aufgrund von Störungen während der Meiose. Fehler bei der Synapsis oder Aufteilung der Chromosomen, aber auch Störungen des Spindelapparates können für die Bildung nicht-reduzierter (d.h. diploider) Gameten verantwortlich sein. Letzteres kann beispielsweise durch ein Alkaloid der Herbstzeitlosen (*Colchicum autumnale*), das sogenannte Colchizin, auch künstlich ausgelöst werden. Dieses „Spindelgift“ verhindert, dass in der Anaphase die Chromosomen zu den Polen gezogen werden, so dass ein Kern mit nicht reduzierter Chromosomenzahl verbleibt. Fusionieren solche nicht reduzierten Gameten mit normalen haploiden Gameten, so entstehen triploide Zygoten; fusionieren sie mit einem anderen nicht-reduzierten Gameten so entstehen tetraploide Zygoten. Allopolyploide Pflanzen entstehen meistens durch Hybridisierung zwischen verschiedenen Arten. Haben die beiden Pflanzen die Chromosomensätze AA und BB so entsteht daraus ein Hybrid AB. Wenn diese beiden Chromosomen vorwiegend inhomolog sind, so findet bei der Meiose keine Synapsis statt und solche Hybriden sind steril. Manchmal bleiben hingegen die nicht-paarenden Chromosomen zusammen und gelangen in einen Kern. Das Ergebnis sind dann zwei nicht-reduzierte Gameten mit dem Chromosomenbestand AB. Bei der Fusion solcher Gameten entsteht in der Folge eine allopolyploide Zygote (AABB).



Nach EHERNDORFER 1978, FELDMAN und SEARS 1981

In der **Pflanzenzüchtung** wird die künstliche Herstellung Allopolyploider durch Artkreuzung oder Autopolyploider durch die Anwendung von Colchizin praktisch eingesetzt. Da polyploide Pflanzen im Vergleich zu diploiden Ausgangsformen über grössere Zellkerne und oft auch über grössere Zellen verfügen, haben sie grössere Blüten und Früchte oder die ganze Pflanze weist grössere Dimensionen auf. Für die Züchtung ertragreicherer Sorten hat man deshalb die künstliche Herstellung polyploider Linien schon frühzeitig verwendet, etwa bei Getreidesorten, bei Zuckerrübe, Tomate, Kartoffel oder bei Obstsorten. Auch in der Forstpflanzenzüchtung sind polyploide Aspen und Pappeln entwickelt worden.

Genregulation und Differenzierung

Die genetische Information wird **nach Bedarf abgerufen** und in Primärprodukte umgesetzt. Es ist aus energetischen Gründen vorteilhaft und zum Zwecke der Differenzierung notwendig, dass nicht immer die gesamte genetische Information des Organismus zu jeder Zeit abgerufen wird. **Je nach Umweltbedingung oder Entwicklungsphase ist nur ein Teil der Gene aktiv**, um den jeweiligen Bedarf an Enzymen oder anderen Proteinen zu decken. Die dazu notwendigen Regulationsmechanismen sind bei den höheren Organismen bisher lediglich lückenhaft bekannt. Nach welchen Prinzipien die Regulation der Genaktivität erfolgt, lässt sich anhand der weitgehend bekannten Mechanismen bei den Prokaryonten hingegen vermuten.

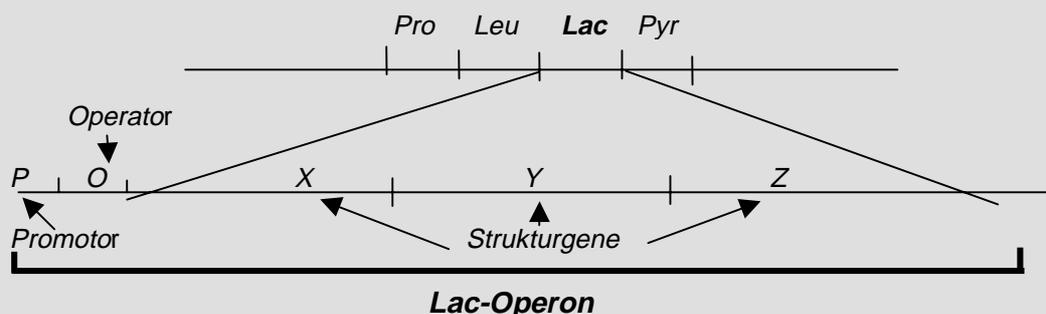
Regulation der Genaktivität bei Bakterien

Bakterienzellen enthalten zwei Arten von Enzymen: Enzyme, welche die lebenswichtigen Prozesse aufrechterhalten (**konstitutive Enzyme**) und Enzyme, die nur auftreten, wenn bestimmte Umweltbedingungen einen spezifischen Stoffwechselprozess auslösen (**adaptive Enzyme**). Wächst eine Bakterienkultur bspw. in einem glucosehaltigen Medium, so sind die Glucose abbauenden Enzyme ausreichend vorhanden, andere Enzyme bspw. jene zum Abbau von Lactose sind hingegen nur in Spuren vertreten. Überführt man die Kultur jedoch in ein lactosehaltiges Medium, so produzieren die Bakterien das für den Abbau von Lactose notwendige Enzym, und zwar bis zum 1000fachen der ursprünglichen Menge. Gleiches lässt sich auch für Enzyme beobachten, die Nährstoffe zwecks Energiegewinnung abbauen, die sogenannten **katabolischen Enzyme**. Die Synthese dieser Enzyme wird in diesem Fall durch die abzubauenen Stoffe induziert (**Substratindikation**).

Eine zweite Form der Regulation betrifft Enzyme, die am Aufbau bestimmter wichtiger Stoffe wie Aminosäuren oder Nukleotide beteiligt sind, sogenannte **anabolische Enzyme**. Diese Enzymsysteme sind primär dann aktiv, wenn die betreffende Aminosäure oder das betreffende Nukleotid nicht oder nur mehr in Spuren vorhanden ist. Hat die Konzentration dieser Stoffe nach längerer Biosynthese später ein bestimmtes Niveau erreicht, so wird die Bildung der betreffenden anabolischen Enzyme gehemmt oder ganz unterbunden. In diesem Fall vermögen also die Endprodukte die Bildung der für die Biosynthese verantwortlichen Enzyme zu stoppen (**Endprodukthemmung**). Man nennt diesen Regulationsmechanismus auch die **Repression anabolischer Enzyme**.

Beispiel: Regulation der Lactose abbauenden Steuereinheit (Lac-Operon) bei *E. coli*

Die Gene der drei Enzyme, welche Lactose abbauen, liegen auf dem Bakterienchromosom direkt nebeneinander. Diese **gekoppelten Strukturgene** werden gemeinsam gesteuert; sie bilden eine genetische Steuereinheit, die als **Operon** bezeichnet wird. Das **Lac-Operon** besteht aus drei gekoppelten Strukturgenen, welche die Polypeptidstruktur kodieren und zwei kleineren, vor den Strukturgenen lokalisierten DNS-Abschnitten. Der eine dieser Abschnitte – der Operator – kontrolliert die Transskription, der andere – der Promotor – dient als Ansatzstelle für die RNS-Polymerase:

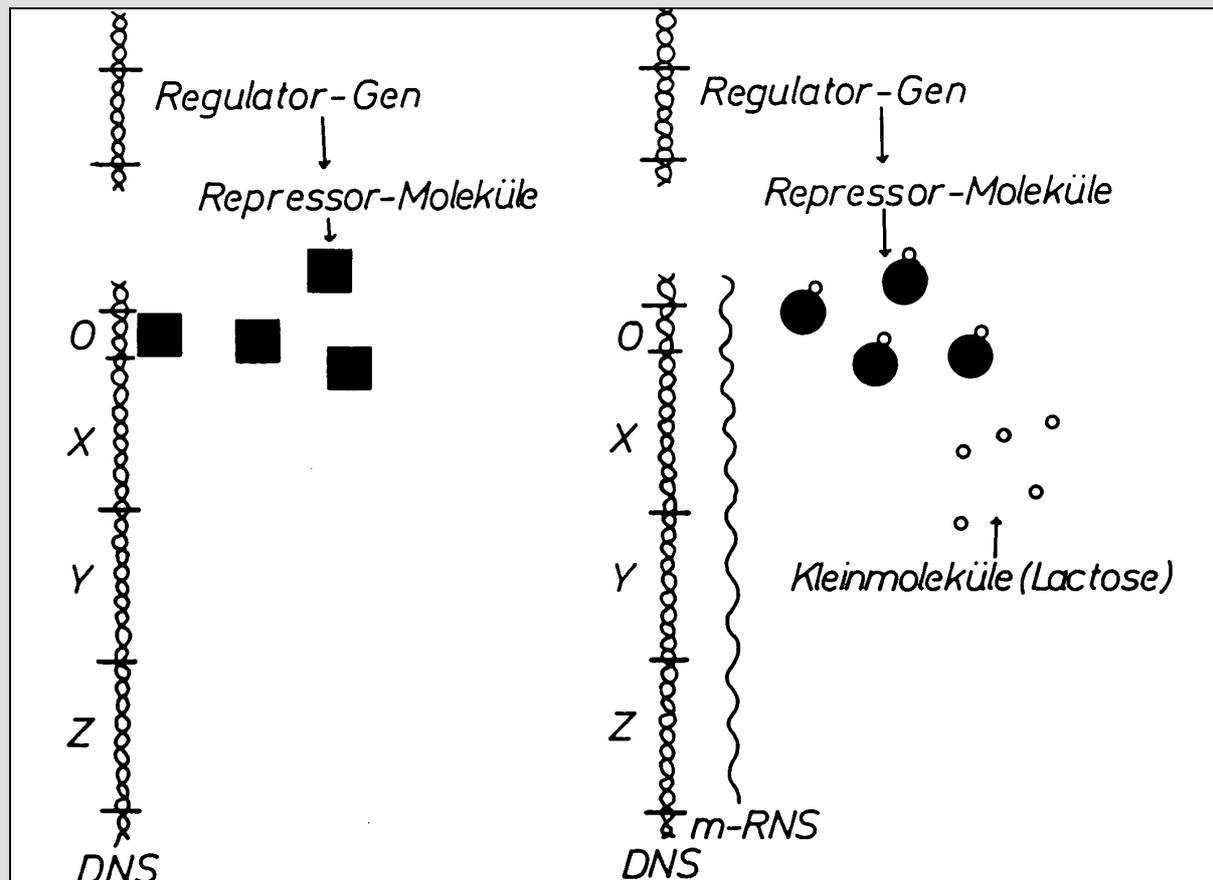


Der Operator kontrolliert nur die Aktivität der mit ihm verbundenen Strukturgene, indem er die ganze Gruppe zur Transskription freigibt oder indem er sie verhindert. Im Falle einer Freigabe werden die Strukturgene in eine zusammenhängendes mRNA transskribiert. Für die Steuerung der Freigabe oder Hemmung des Operators ist ein bestimmtes Molekül, das sogenannte **Repressor-Molekül**, zuständig, das sich an den Operator anlagern kann. Das Repressor-Molekül wird durch ein weiteres Gen, das sogenannte **Regulator-Gen**, produziert. Wir haben also folgende Komponenten des Regulationssystems:

- Strukturgene eines Operons inkl. Promotor
- Operator
- Regulator-Gen
- Repressor-Molekül
- Kleinmoleküle (Effektoren, in unserem Fall Lactose)

Die Enzym-Induktion

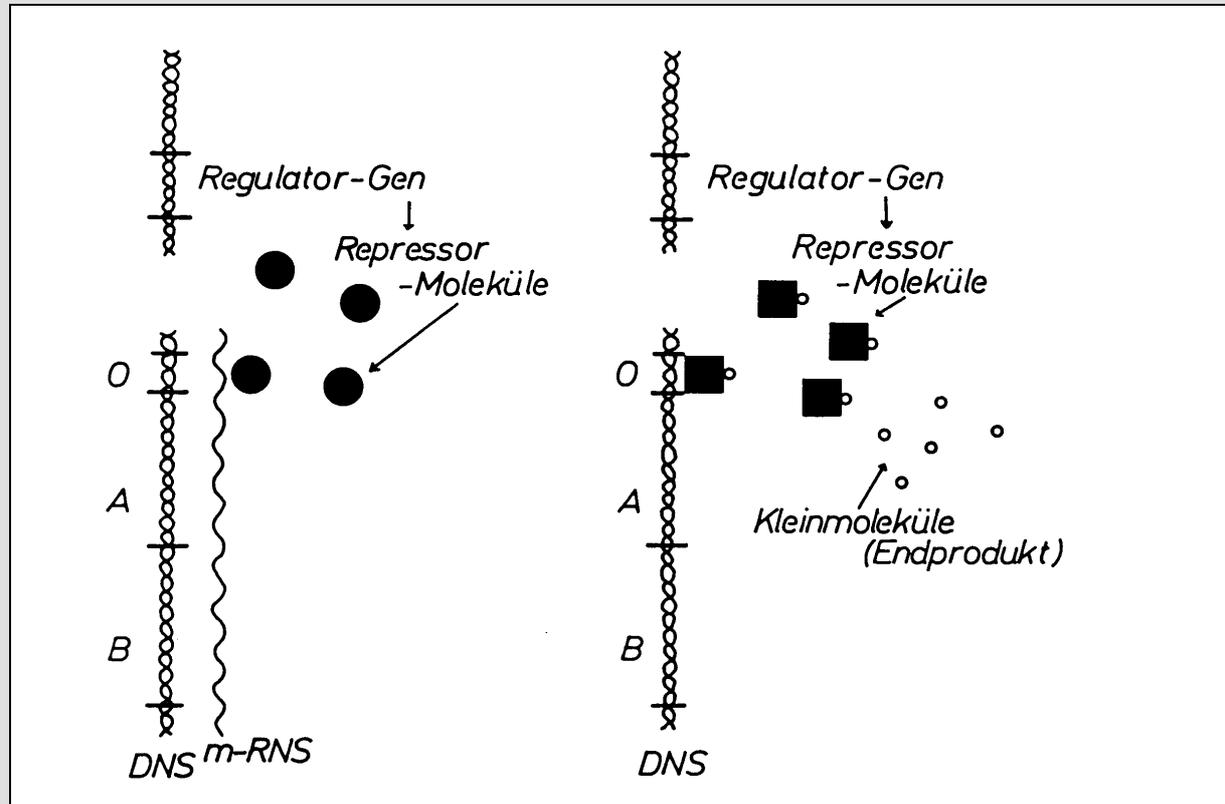
Der Operator ist anfänglich durch sein spezifisches Repressor-Molekül blockiert, so dass die RNS-Polymerase sich nicht am Promotor anlagern und deswegen keine Transskription stattfinden kann. Erscheinen nun Lactose-Moleküle (im Fall unseres Lac-Operon), so verbinden sie sich mit dem Repressor-Molekül. Durch diese Verbindung wird das Repressor-Molekül in seiner räumlichen Struktur derart verändert, dass es den Operator nicht mehr blockieren kann. Die Transskription mit der Bildung von RNS-Molekülen kann deshalb erfolgen und die Biosynthese des Lactose abbauenden Enzyms kann erfolgen.



Aus HATTEMER et al. 1993

Die Enzym-Repression

Bei der Enzym-Repression ist der Operator zunächst frei, so dass sich RNS-Polymerase am Promotor anheften kann und die Transkription normal abläuft; es wird also Enzym gebildet. Ist die Konzentration des Enzyms hoch genug, so modifiziert das Enzym das Repressor-Molekül in einer Weise, dass es sich wieder am Operator anlagern und ihn blockieren kann. Die mRNA-Synthese unterbleibt nunmehr und es wird kein Enzym mehr gebildet.



Aus HATTEMER et al. 1993

Das wichtigste Element dieses Regulationssystems ist das **Repressor-Molekül**, welches zwei spezifische Erkennungsstellen besitzt. Die eine dient dem Erkennen des Operators und ermöglicht eine Anlagerung, die andere selektiert bestimmte Kleinmoleküle in der Zelle, wobei das Repressor-Molekül mit diesen Kleinmolekülen interagiert. Der Repressor zeigt so an, ob neue Moleküle aus der Umwelt aufgenommen wurden (bspw. Lactose) oder ob Biosyntheseprodukte im Überfluss vorhanden sind. Er wirkt also wie ein Schalter, der je nach Bedingung die Synthese ein- oder ausschaltet.

Genregulation der Genaktivität bei höheren Organismen

Die Regulationsmechanismen höherer Organismen sind vielfältiger und komplexer als diejenigen von Mikroorganismen wie Bakterien. Höhere Organismen bestehen aus vielzelligen Strukturen in verschiedenen Geweben und Organen mit spezifischen Stoffwechselprozessen. Zudem verläuft die Ontogenese höherer Pflanzen und Tiere über unterschiedliche zeitlich und räumlich koordinierte Entwicklungsstadien bis zum adulten Individuum. Neben der **intrazellulären Regulation** ist daher auch eine **interzelluläre Regulation** notwendig. Bei höheren Organismen beginnt mit der Zellteilung der Zygote eine **Zelldifferenzierung**, die zunächst zu verschiedenen **Zell-Linien**, dann zu verschiedenen **Geweben** und **Organen** und schließlich zu ausdifferenzierten Individuen führt. Diese Ausdifferenzierung ist das Ergebnis von **differentieller Genaktivität** und **Genexpression**. In verschiedenen Entwicklungsstadien und Geweben sind jeweils verschiedene Gene aktiv. Dies lässt sich anhand

von Genprodukten nachweisen. So können etwa verschiedene mRNS-Typen und Konzentrationen festgestellt werden. Auch die Enzym- und Proteinausstattung variiert zwischen den Geweben oder Stadien eines Organismus. Häufig können bspw. Unterschiede in den elektrophoretischen Isoenzym- oder Proteinmustern beobachtet werden.

Die Regulationssysteme höherer Organismen müssen die Lebensprozesse somit auf verschiedenen Ebenen steuern:

- Auf extra- oder intrazelluläre Umweltveränderungen muss rasch mit der Produktion bestimmter Stoffwechselprodukte reagiert werden können. Dazu müssen Gene kurzfristig und reversibel an- und abgeschaltet werden können (**kurzfristige und reversible Regulation**)
- Dieser kurzfristigen Regulation muss ein System übergeordnet sein, welches die Aufgabe hat, Gene langfristig und irreversibel zu regulieren, damit im Rahmen der Gewebe- und Organdifferenzierung spezialisierte Zellen entstehen können (**langfristige, irreversible Regulation**)

Hormone (bspw. Steroide, Insulin, Thyroxin) und Phytohormone (bspw. Auxin, Gibbereline, Cytokinine, Abscisinsäure) spielen wahrscheinlich eine zentrale Rolle für die Aktivierung bestimmter Gene bei der interzellulären Regulation von Tieren respektive Pflanzen.

Ein schönes Beispiel für die Regulation der Genaktivität bei Pflanzen ist auf den folgenden Seiten beschrieben.

Biologische Zeitschrift

Gene und die *innere Uhr* der Pflanzen

Klaus Apel, Siegbert Melzer
und Dorothee Staiger

Menschen, Tiere und Pflanzen werden in ihrem Zeitempfinden nicht nur von aussen beeinflusst, sie haben auch eine innere Uhr. So reagieren Pflanzen parallel zum Tag-Nacht-Wechsel. Doch woher wissen Pflanzen, wann es Zeit ist zum Blühen? Genetische und molekularbiologische Methoden dringen immer tiefer in die Mechanismen der biologischen Uhr vor.

Unser eigenes Zeitgefühl wird durch zwei verschiedene Zeitgeber bestimmt: solche, die von aussen wirken, wie zum Beispiel der Tag-Nacht-Wechsel, und eine im Körper laufende physiologische Uhr. Diese wird nur dann von uns wahrgenommen, wenn es zu einer Desynchronisierung von innerer Uhr und äusserer Zeitangabe kommt, zum Beispiel nach einer Flugreise in eine andere Zeitzone oder beim Langschläfer, der durch den Wecker zu einer Zeit zum Aktivsein gezwungen wird, bei der die körpereigene Uhr noch eine Ruhephase anzeigt.

Das Geheimnis der circadianen Uhr

Die Existenz dieser inneren biologischen Uhr wurde erstaunlicherweise nicht beim Menschen, sondern zuerst bei Pflanzen entdeckt. Schon im letzten Jahrhundert fiel Wissenschaftlern auf, dass bei bestimmten Pflanzenarten, beispielsweise Bohnen, die Blätter ihre Position während der Nacht deutlich veränderten und eine so genannte Schlafstellung einnahmen. Obwohl diese Änderung der Blattstellung auch dann weiterlief, wenn die Pflanzen für längere Zeit ins Dunkle gestellt wurden, nahm man anfangs an, dass die im Dunkeln weiter-

laufende regelmässige Änderung der Blattstellung durch den ursprünglichen Wechsel von Tag und Nacht ausgelöst worden war und eine Art Nachschwingung ähnlich wie bei einem von aussen angestossenen Pendel darstellt. Man versuchte, diese Vorstellung dadurch zu erhärten, dass die Blätter der verdunkelten Pflanze an einem Holzgestell fixiert wurden, so dass die weitere Änderung der Blattstellung verhindert wurde. Zur Überraschung der Experimentatoren begann das Blatt aber im Dunkeln sofort

wieder seine Stellung im etwa 12/12-Stunden-Rhythmus zu verändern, sobald es aus der Fixierung befreit wurde. Dieser Versuch zeigte sehr überzeugend, dass das Verhalten der Pflanzen durch eine innere Uhr gesteuert sein muss. Da diese im etwa 24-Stunden-Rhythmus läuft, wurde sie auch als circadiane Uhr bezeichnet. Bei nachfolgenden Untersuchungen konnten ähnliche circadiane Uhren in vielen anderen Organismen nachgewiesen werden.

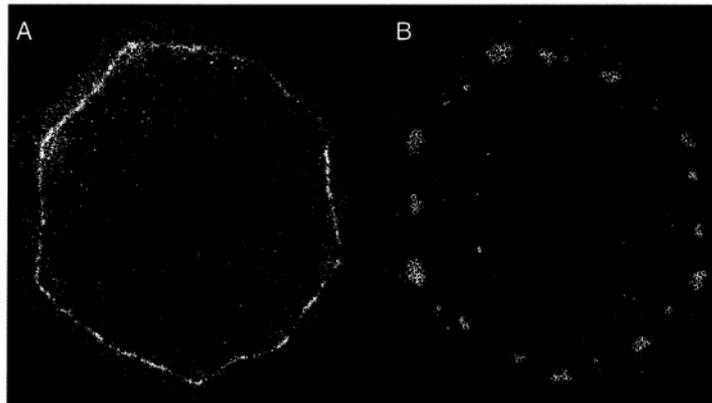


Abb. 1: Die circadiane Rhythmik einer RNA in der Zellteilungszone der Sprossachse vom Ackersenf. Querschnitte der Sprossachse wurden am Abend (A) oder morgens (B) entnommen und die RNA durch ein spezielles Färbeverfahren (In-situ-Hybridisierung) im Gewebe sichtbar gemacht. (Foto: C. Heintzen)

ne Zeit

Die Uhr

«Clock»-Proteine setzen komplizierte Kreisläufe in Gang

Über den molekularen Aufbau dieser physiologischen Uhr war lange Zeit so gut wie nichts bekannt. Erst in den letzten Jahren gelang es dann, durch Kombination von genetischen und molekularbiologischen Methoden bei einigen Organismen Gene zu identifizieren, deren Produkte für das Funktionieren der physiologischen Uhr essentiell sind. Zentraler Teil der inneren Uhr scheinen Gene zu sein, deren Produkte, so genannte «Clock»-Proteine, die weitere Übersetzung dieses Gens beeinflussen können. Während die molekulare Mechanik dieses zentralen Schwingkreises zurzeit sehr intensiv untersucht und zunehmend besser verstanden wird, ist über die Art und Weise, wie dieser zentrale Oszillator nachgeschaltete physiologische Prozesse beeinflussen kann, bislang nur sehr wenig bekannt. In unserer Arbeitsgruppe am Institut für Pflanzenwissenschaften der ETH Zürich versuchen wir dieses Problem am Beispiel der Pflanze *Arabidopsis thaliana* zu lösen.

Dabei wird ein Gen untersucht, das für ein so genanntes RNA-Bindeprotein kodiert. Gene bestehen aus einem definierbaren Abschnitt der DNA, die als Träger der Erbinformation im Zellkern lokalisiert ist. Jedes Gen lässt sich im Prinzip in zwei funktionell verschiedene Bereiche untergliedern. Der Bereich des so genannten Struktur-Gens wird zuerst in einen RNA-Strang übersetzt. Nach Fertigstellung löst sich dieses RNA-Molekül vom DNA-Strang und wird aus dem Zellkern exportiert. Nun kann das RNA-Molekül im Zusammenspiel mit anderen Faktoren in eine bestimmte Aminosäuresequenz überschrieben werden, die sich zu einem aktiven Protein falten kann. Diesem

Struktur-Gen-Abschnitt ist ein zweiter DNA-Sequenzbereich vorangestellt, der als so genannter Promotor eine wichtige regulatorische Rolle bei der Übersetzung des nachfolgenden Struktur-Gens spielt. Im Falle des von uns untersuchten RNA-Bindeprotein-Gens folgt die Akkumulation der vom Gen abgeleiteten RNA einer circadianen Rhythmik. Durch spezifische Färbemethoden lässt sich diese RNA im Gewebe der Pflanze nachweisen. In Abbildung 1 A wird beispielsweise ein Sprossachsenquerschnitt, der einer Pflanze am Abend entnommen wurde, untersucht. Die RNA ist zu diesem Zeitpunkt massiv akkumuliert. Entnimmt man die gleiche Gewebeprobe zwölf Stunden später, so stellt sich nach Anfärbung des Schnittes heraus, dass inzwischen die RNA für das RNA-Bindeprotein verschwunden ist (Abb. 1 B). Dieses pulsierende Auf und Ab der RNA-Konzentration in der Sprossachse setzt sich auch dann fort, wenn die Pflanze aus dem Tag-Nacht-Wechsel ins Dauerlicht gestellt wird. Wenn man neben der RNA-Konzentration zusätzlich auch die Konzentration des RNA-Bindeproteins selbst bestimmt, das von der RNA kodiert wird, zeigt auch dieses in seiner Konzentration eine circadiane Rhythmik. Allerdings werden die Maximalwerte der Proteinkonzentration vier bis fünf Stunden später erreicht als die der RNA-Konzentration. Also immer dann, wenn das RNA-Bindeprotein seine höchste Konzentration in der Zelle erreicht, nimmt die Konzentration der entsprechenden RNA stark ab (Abb. 2). Da von anderen RNA-Bindeproteinen bekannt ist, dass sie die Stabilität von RNA verringern können, lag es nahe, die zeitlich versetzten Schwingungen von RNA und Protein als Ausdruck einer negativen Rückwirkung des Proteins auf die Akkumulation der eigenen RNA zu interpretieren, die zur Etablierung eines circa-



dian schwingenden Regelkreises führen könnte.

Diese Vorstellung konnte experimentell in transgenen Pflanzen bestätigt werden. Dazu wurde das isolierte RNA-Bindeprotein-Gen so verändert, dass der eigene Promotor, der die circadian kontrollierte Übersetzung des nachfolgenden Struktur-Gens in RNA vermittelt, durch einen anderen Promotor ersetzt wurde, der unabhängig von der circadianen Uhr fortlaufend gleich aktiv ist. Dieses modifizierte Gen wurde anschliessend in Pflanzen übertragen und führte nun zu einer konstitutiv hohen Konzentration des RNA-Bindeproteins. Gleichzeitig wurde in den transgenen Pflanzen, wie in dem erwähnten Modell eines autokatalytischen Schwingkreises vorausgesagt, die normalerweise sehr auffällige circadiane Schwankung der RNA-Konzentration aufgehoben (Abb. 2). Weitere Versuche zeigten, dass der Gen-eigene Promotor trotz starker konstitutiver Akkumulation des RNA-Bindeproteins unverändert stark in seiner Aktivität durch die circadiane Uhr reguliert wird. Der von uns beschriebene circadiane Schwingungskreis kann deshalb nicht Teil einer zentralen inneren Uhr sein, sondern scheint als nachgeschalteter, so genannter «slave oscillator» an der Übermittlung und möglicherweise Verstärkung von circadianen Signalen beteiligt zu sein.

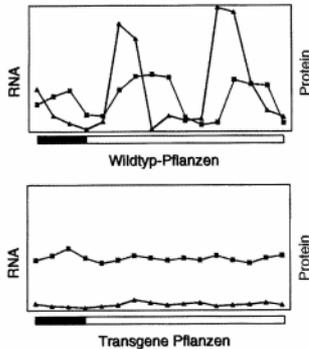


Abb. 2: Die circadiane Rhythmik des RNA-Bindeproteins und seiner RNA in Kontroll- und transgenen Pflanzen, die das Protein konstitutiv überexprimieren. In Wildtyp-Pflanzen beeinflussen Protein und RNA sich gegenseitig und führen so zur Ausbildung eines circadian kontrollierten «slave»-Oscillators. Durch konstitutive Überexpression wird in der transgenen Pflanze dieser Schwingkreis aufgehoben.

Die Uhr der Jahreszeiten

Die meisten Pflanzen können unter Ausnutzung der Sonnenenergie über den lichtabhängigen Prozess der so genannten Photosynthese energiereiche Substanzen wie zum Beispiel Zucker bilden. Der Tag-Nacht-Rhythmus hat deshalb einen sehr starken Einfluss auf den pflanzlichen Stoffwechsel, so dass es nicht überrascht, dass viele der an der Photosynthese beteiligten Proteine in ihrer Synthese über die circadiane Uhr kontrolliert werden. Daneben gibt es eine andere Art von Zeitmessung, die für das Überleben vieler Pflanzen absolut notwendig ist. Besonders an Standorten mit starken jahreszeitlichen Klimaschwankungen müssen Pflanzen sich so frühzeitig auf die nächste winterliche Kälteperiode einstellen, dass nicht nur rechtzeitig Blüten gebildet werden, sondern die heranwachsenden Samen auch noch ausreifen können. Da dieser Prozess insgesamt einige Monate dauern kann, muss eine Pflanze ihre Entwicklung umstellen, lange bevor beispielsweise ein Temperaturabfall den unmittelbar bevorstehenden Beginn des Winters anzeigt. Je nach lokalen Standortbedingungen können die Reaktionen von Pflanzen auf eine solche Messung von Jahreszeiten verschieden sein. So muss ein Buschwindröschen sehr frühzeitig mit der Blütenbildung beginnen und seinen Lebens-

zyklus abschliessen, bevor die am gleichen Standort stehenden Buchen ihre Blätter austreiben und danach den Boden so beschatten, dass nicht mehr genügend Licht vorhanden ist.

Der wichtigste Umweltfaktor, der von Pflanzen zur Messung von Jahreszeiten benutzt wird und der das Blühverhalten, die Einlagerung von Reservestoffen oder den Blattabfall auslösen kann, ist die tägliche Beleuchtungsdauer. In unseren Breitengraden verändert sich während des Jahres die Tageslänge kontinuierlich. Pflanzen können diese Information benutzen, um erstaunlich präzise den Zeitpunkt der Blütenbildung festzulegen. So gibt es Arten, die als Kurztagpflanzen bei einer täglichen Beleuchtungsdauer von acht Stunden ihre Blüten ausbilden, während sie unter Langtagbedingungen nur Blätter austreiben. Umgekehrt wachsen Langtagpflanzen unterhalb einer kritischen Tageslänge rein vegetativ und können erst zur Blüte kommen, wenn die Tageslänge auf 16 Stunden ausgedehnt wird. Da diese Kontrolle der Blütenbildung innerhalb einer Art auf ihre Nachkommen vererbt wird, muss es bestimmte Gene geben, die für die Induktion der Blütenbildung nach Behandlung mit einer kritischen Tageslänge verantwortlich sind.

Blütenbildung beschleunigen

In unserer Arbeitsgruppe haben wir versucht, solche Gene zu identifizieren. Dazu wurde mit einer Langtagpflanze, dem Senf, gearbeitet, die in der Klimakammer bei einer täglichen Beleuchtungsdauer von acht Stunden nur Blätter anlegt. Verlängert man dagegen die Beleuchtungsdauer auf 16 Stunden, werden schon nach dem ersten Langtag Veränderungen in der Spitzenregion der Sprossachse ausgelöst, die wenige Tage später dann zur Ausbildung von erkennbaren Blütenknospen führen. Es wurden Gene identifiziert, die unter Kurztagbedingungen inaktiv sind, unmittelbar nach einer Langtagbehandlung dann aber in RNA überschrieben werden. Die

Abb. 3: Aktivitätsnachweis eines Blühkontroll-Gens in der Spitzenregion der Sprossachse vor (A) und nach (B) Behandlung der Pflanzen mit blühinduzierendem Langtag. (C) Der Einfluss dieses Gens auf das Blühverhalten. In der transgenen Pflanze (rechts) wurde das Gen unter Kontrolle eines fremden, konstitutiv aktiven Promotors gestellt und führt so zu einer vorgezogenen Blüte, während in der Kontrollpflanze (links) mit dem unveränderten eigenen Blühkontroll-Gen lediglich eine Blattrosette ausgebildet wird.

