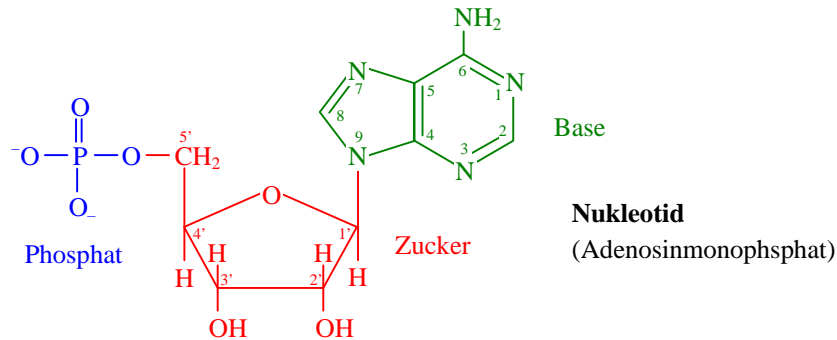


## Bau der Nucleinsäuren



Der Informationsträger der Nucleinsäuren sind fünf **Stickstoffbasen**, nämlich die vom **Purin** abgeleiteten Basen **Guanin** und **Adenin** sowie die vom **Pyrimidin** abgeleiteten Basen **Cytosin**, **Thymin** und **Uracil**.

Die Basen verbinden sich mit einem **Zucker**, nämlich  **$\beta$ -D-Ribose** oder  **$\beta$ -D-Desoxyribose**, an dessen 1'-Hydroxygruppe über eine N-glykosidische Bindung zu einem sog. **Nucleosid**. Dieses verestert dann noch an der 5'-Hydroxygruppe mit einem **Phosphat-Rest** zu einem sog. **Nucleotid**.

Aus den Nucleotiden können nun die **Nucleinsäure-Stränge** aufgebaut werden: Dabei verestert der Phosphat-Rest eines Nucleotids mit der 3'-Hydroxygruppe eines anderen Nucleotids, sodass sich ein Zucker-Phosphat-Gerüst ergibt, an dessen Seiten die Basen aufeinander folgen. Dabei ist zu beachten, dass der Strang **polar** ist, nämlich am **3'-Ende** mit einer freien 3'-Hydroxygruppe und am **5'-Ende** mit einem freien Phosphatrest am jeweils letzten Nucleotid endet.

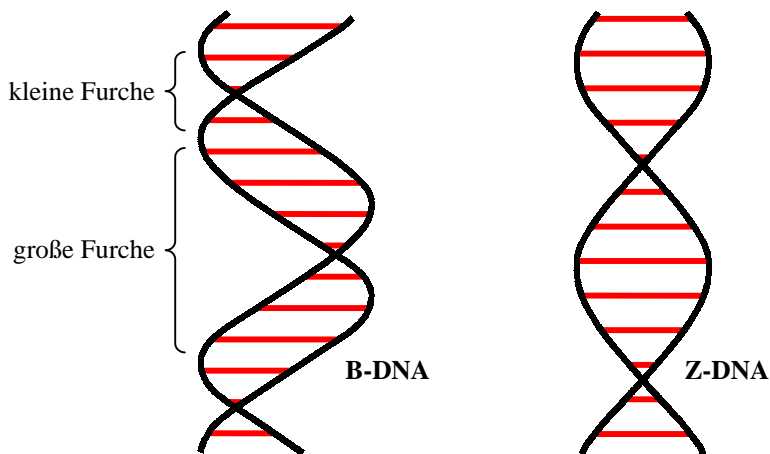
Die Größe eines Nucleinsäure-Strangs wird üblicherweise durch die Zahl der verknüpften Nucleotide angegeben. Da die DNA zweisträngig ist (s.u.), nimmt man als Einheit **Basenpaare (bp)**. 1000 bp sind **1 kb**, 1000 kb **1 MB**.

Man kann zwei Typen von Nucleinsäuren unterscheiden: Die **Ribonucleinsäure (RNA)** enthält als Zucker Ribose, als Basen Guanin, Adenin, Cytosin und Uracil. Die **Desoxyribonucleinsäure (DNA)** enthält dagegen Desoxyribose sowie Guanin, Adenin, Cytosin und Thymin.

Während die RNA nur Einzelstränge bildet, besteht die DNA außerdem aus einem **Doppelstrang**. Dieser wird zusammengehalten durch Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Basen, wobei sich stets eine Purin- und eine bestimmte Pyrimidin-Base gegenüber liegen: Adenin paart sich stets mit Thymin über zwei Wasserstoffbrücken-Bindungen, Guanin mit Cytosin über drei. Die beiden Stränge sind also **komplementär**, d.h., die Basensequenz des einen Strangs legt zwingend auch die des anderen fest.

Die beiden Einzelstränge sind weiterhin **antiparallel**, d.h., das 5'-Ende des einen liegt neben dem 3'-Ende des anderen.

Und schließlich bedingt die genaue Geometrie der Wasserstoffbrücken-Bindungen, dass der Strang nicht planar ist, sondern eine **Helix** ausbildet.



Die DNA kann dabei verschiedene Konformationen einnehmen: Der größte Teil der DNA liegt in der **B-Konformation** vor, einer rechtsgängigen Helix, die asymmetrisch ist mit einer kleinen und einer großen Furche. In Regionen, in denen sich ständig Purin- und Pyrimidinbasen abwechseln, liegt dagegen die **Z-Konformation** vor, die sich dadurch unterscheidet, dass die Helix linksgängig und symmetrisch ist und eine Ganghöhe von 12 bp statt 10 bp aufweist. (Daneben ist noch eine A-Konformation bekannt, die aber nur als Artefakt im Labor entsteht.)

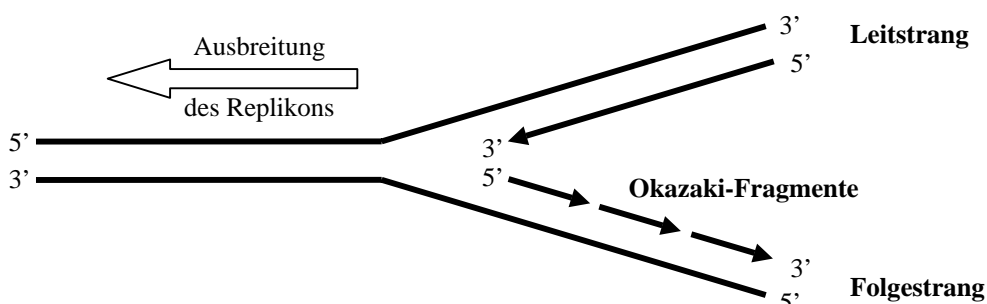
Während die Phosphodiesterbindungen sehr stabile Bindungen sind, kann man die Wasserstoffbrücken-Bindungen zwischen den Basenpaaren relativ leicht lösen. Durch Erhitzen oder durch Zugabe von Natronlauge kann man die DNA-Doppelhelix in zwei Einzelstränge aufspalten (**Denaturierung**, „Schmelzen“), beim Abkühlen oder Neutralisieren bildet sich dann der Doppelstrang zurück (**Renaturierung**). Dieser Sachverhalt kann beispielsweise genutzt werden, um eine DNA-Sonde in den Doppelstrang einzuschleusen und damit etwa ein Gen zu markieren.

## Replikation der DNA

Die Komplementarität der beiden Einzelstränge erlaubt eine im Prinzip sehr einfache Art der Replikation: Die beiden Stränge werden voneinander getrennt und dann jeweils wieder zum Doppelstrang ergänzt (**semikonservative Replikation**). Dabei beginnt der Vorgang bei Eukaryoten nicht am Ende des DNA-Fadens, sondern gleichzeitig an 30 000–300 000 Stellen (**Replikons**), sodass die Verdopplung relativ schnell abläuft.

Das Enzym, das den Tochterstrang erstellt, ist die **DNA-Polymerase**. Sie lagert die zur Matrize des vorliegenden Einzelstrangs komplementären Basen an und verknüpft diese, und das mit einer Geschwindigkeit von 20 bp/s. Ihre Tätigkeit ist dabei an zwei Einschränkungen gebunden: Sie kann zum einen nur in 5'→3'-Richtung synthetisieren und sie kann nicht einfach „im Nichts“ anfangen, sondern muss stets an ein bereits bestehendes 3'-OH-Ende anknüpfen.

Um ein solches freies Ende zu schaffen, wird vor Beginn der DNA-Polymerase-Tätigkeit ein 4–12 bp großes RNA-Stück (**Primer**) als Startmolekül an den jeweiligen DNA-Strang komplementär heransynthetisiert. RNA-Polymerasen können im Gegensatz zu DNA-Polymerasen „bei Null“ anfangen.



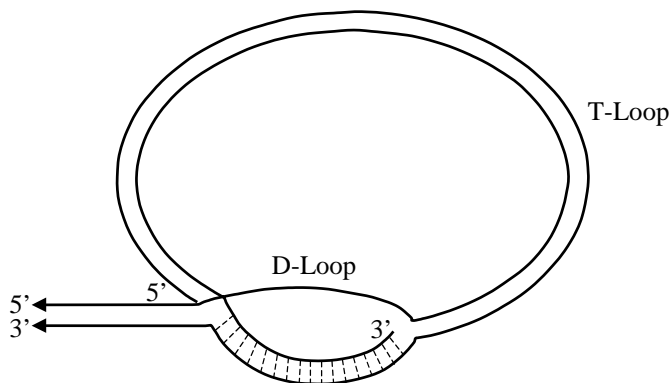
Wenn dann die DNA-Polymerase mit der Kettenverlängerung beginnt, entsteht ein weiteres Problem: Aufgrund der Antiparallelität der DNA-Stränge kann nur an einem Strang die Synthese auch wirklich in der Ausbreitungsrichtung des Replikons erfolgen (**Leitstrang, Leading strand**). Am anderen Strang (**Folgestrang, Lagging strand**) dagegen kann die DNA-Polymerase nur in umgekehrter Richtung arbeiten. Hier muss der Tochterstrang in Form von 100–200 bp großen Einzelstücken mit jeweils eigenem Primer synthetisiert werden (**Okazaki-Fragmente**).

Am Ende der Replikation werden sämtliche RNA-Primer entfernt, die Lücken durch die DNA-Polymerase mit DNA aufgefüllt und sämtliche Fragmente durch eine **DNA-Ligase** zu einem kontinuierlichen Tochterstrang verknüpft.

## Telomere

Die freien Enden des DNA-Fadens sind besonders anfällig gegenüber Schädigungen. Sie werden daher durch spezielle Strukturen geschützt, die **Telomere**.

Diese bestehen zunächst einmal aus 7–15 kb funktionslosen DNA-Abschnitten, die aus sich immer wiederholenden Basensequenzen bestehen, bei Wirbeltieren  $(TTAGGG)_n$ .



Des Weiteren endet der DNA-Strang nicht frei, sondern das Telomer bildet eine große Schlaufe (**T-Loop** von telomere).

Diese kann entstehen, da das 3'-Ende etwas länger ist als das 5'-Ende. Es schiebt sich etwas weiter proximal im Telomer in die Doppelhelix ein und paart sich mit dem Gegenstrang. Der eigentlich an dieser Stelle paarende Abschnitt des entsprechenden DNA-Strangs wird dadurch verdrängt und bildet den kurzen einzelsträngigen **D-Loop** (displacement).

Zusätzliche Stabilität erhält die Telomerschleife auch noch durch zahlreiche Proteine, die mit der DNA interagieren.

Die Telomere haben allerdings nicht nur eine rein mechanische Schutzfunktion, sie haben auch eine große Bedeutung bei der Replikation: Wenn am 5'-Ende der RNA-Primer abgelöst wird, kann dieses Stück nicht durch DNA ersetzt werden; mit jeder Replikation wird der DNA-Faden daher ein Stück kürzer. Die funktionslosen Sequenzen der Telomere schaffen hier die nötigen Reserven.

Gleichzeitig begrenzen die Telomere dabei die Vermehrungsfähigkeit der Zelle: Ist nach zahlreichen Teilungen das Telomer bis auf ca. 7 kb verkürzt, so tritt die Zelle in die Apoptose ein (**Zellalterung**).

In Zellen der Keimbahn sowie in rasch proliferierenden Geweben (z.B. Darmepithel, Knochenmarksstammzellen) muss jedoch die Teilungsfähigkeit erhalten bleiben. Dieses Problem wird gelöst durch die **Telomerase**, ein Enzym, das die Telomere verlängert, sodass die Verkürzung bei der Replikation aufgehoben wird.

Die Telomerase besteht aus einer RNA-Matrize sowie einer katalytischen Domäne, die diese Vorlage in einen DNA-Doppelstrang umschreibt (**Reverse Transkriptase**).

Die Telomerase ist auch ein Enzym mit großer medizinischer Bedeutung: Fast alle Krebszellen weisen eine pathologischen Telomerase-Aktivität auf!

Relativ selten ist dagegen ein Fehlen der Telomerase aufgrund einer Mutation (**Dyskeratosis congenita**). Dies führt z.B. zu Haarausfall, herdartigen Verhornungen der Schleimhäute (Leukoplakien), Hyper- und Depigmentierungen der Haut sowie zu Nagelwuchsstörungen.

## Organisation des nukleären Genoms

Die menschliche DNA enthält ca. 60 000 – 80 000 **Gene**. Ein Gen ist eine DNA-Sequenz, die in ein Produkt umgesetzt wird (**Expression**), das in der Zelle eine bestimmte Funktion erfüllt. Klassischerweise ist dies ein Peptid, heute kennt man aber auch zahlreiche Ausnahmen. (Der Begriff des Gens ist damit eher funktionell definiert, eine strukturelle Abgrenzung auf der DNA ist schwieriger.)

Insgesamt machen die codierenden DNA-Bereiche (Exon-Sequenzen) aber gerade einmal ca. 3 % der gesamten nukleären DNA aus. Hinzu kommen ca. 27 % Sequenzen, die unmittelbar mit den Genen im Rahmen ihrer Umsetzung und Regulati-on zusammenhängen (Intron-, Promotor-, Enhancer-Sequenzen).

Im weiteren Sinne kann man in diese Gruppe auch die **Pseudogene** rechnen. Sie zeigen zwar den Aufbau eines Gens, werden aber nicht exprimiert. Es handelt sich um evolutionäre Relikte, die durch Mutationen ihre Funktion verloren haben.

70 % der DNA machen allerdings genunabhängige Sequenzen aus, denen (bisher) keine erkennbare Funktion zugeordnet werden kann.

Bei einem Großteil davon handelt es sich nicht um Einzelkopie-Sequenzen, sondern um Motive, die sich mehrfach im Genom wiederfinden. Bei bis zu einigen wenigen Tausend Kopien spricht man von **mittelrepetitiven Sequenzen**, bei noch mehr Kopien (bis ca.  $10^6$ ) von **hochrepetitiven Sequenzen**.

Zum Teil sind die repetitiven Motive direkt hintereinander gereiht und bilden zusammenhängende Blöcke (**Tandemwiederholungen**). Bei einer Motivgröße von nur wenigen Basenpaaren spricht man dabei von **Mikrosatelliten-DNA**, bis ca. 100 bp von **Minisatelliten-DNA**, bei noch größeren Motiven (bis ca. 6500 bp) von **Satelliten-DNA**.

Andere repetitive Motive liegen dagegen allein zwischen den Genen vor und wiederholen sich nur bei Blick auf das gesamte Genom (**eingestreute Wiederholungen**). Bis zu einigen Hundert Basenpaaren Länge spricht man von **Short interspersed repeats**, darüber (bis ca. 6000 bp) von **Long interspersed repeats**. Eine bedeutende Gruppe der Short interspersed repeats sind beispielsweise die Alu-Sequenzen, die etwa alle 4 kb im Genom auftreten.

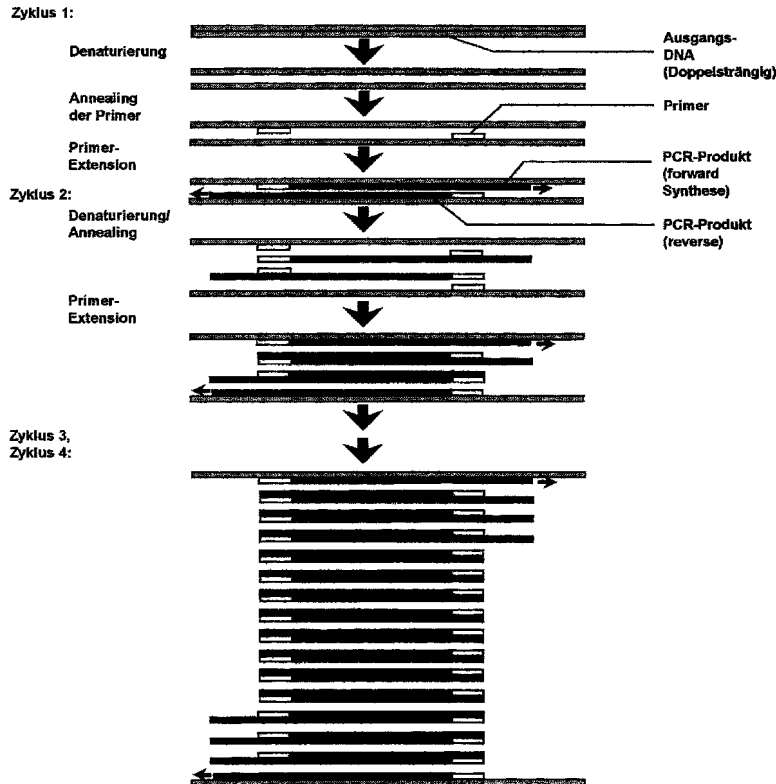
Gerade in den nicht codierenden Bereichen zeigen die DNA-Sequenzen verschiedener Menschen deutliche Unterschiede. Dies erklärt sich ganz einfach damit, dass hier keine negative Selektion von Mutationen stattfindet, da ja keine Genprodukte entstehen, die in ihrer Funktion beeinträchtigt sein könnten. Diese zahlreichen individuellen Unterschiede können etwa in der forensischen Medizin beim DNA-Fingerprinting genutzt werden.

## **Praktikum: Molekulare Diagnostik mittels PCR und Southern Blotting**

Die Duchenne'sche Muskeldystrophie (DMD) ist eine progressive Muskelerkrankung, die sich etwa ab dem 2. Lebensjahr manifestiert und meist vor Erreichen des 25. Lebensjahrs zum Tod des Patienten führt.

Die Krankheit geht auf eine Mutation in einem ca. 2,3 MB großen (!) Gen mit 79 Exons auf Chromosom Xp21 zurück, das für das Dystrophin codiert, ein Strukturprotein der Muskelzelle. Fast 70 % der DMD-Fälle sind durch Deletionen im Gen bedingt. Auf dasselbe Gen geht auch die Becker'sche Muskeldystrophie (BMD) zurück, bei der jedoch weniger schwer wiegende Veränderungen des Proteins vorliegen, sodass die Krankheit einen milderen Verlauf nimmt. Oft liegt auch hier als Ursache eine Deletion vor.

Wir wollen nun im Praktikum verschiedene Verfahren zur molekularen Diagnostik einer DMD bzw. BMD anwenden.



Eine Möglichkeit besteht in der Anwendung einer heute in der gesamten Molekularbiologie verbreiteten und bedeutenden Technik, der **Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction, PCR)**, die 1987 von Kary Mullis eingeführt wurde. Es handelt sich um eine enzymatische Methode zur in-vitro-Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte, die der natürlichen DNA-Replikation abgeschaut ist.

Die Technik wurde ermöglicht durch die Entdeckung von Bakterien, die in heißen Quellen leben und dort auch gedeihen. Aus dem Stamm *Thermophilus aquaticus* konnte dessen DNA-Polymerase (**Taq-Polymerase**) isoliert werden, die ausreichend thermostabil ist, um auch die Temperaturen zu überstehen, die zum Denaturieren genomischer DNA notwendig sind. Dieses Enzym ermöglicht es daher, alle Komponenten für die Amplifikation in einem Reaktionsgefäß zusammenzuführen und die DNA vollautomatisch in einem Thermocycler zu amplifizieren.

Neben der DNA-Probe und der Polymerase benötigt man für eine PCR dabei auch noch synthetische Oligonukleotide, die an die DNA-Probe binden und damit der Polymerase als Primer dienen können. Dies bedeutet natürlich, dass die PCR-Technik nur eingesetzt werden kann, wenn die Sequenz der DNA-Probe zumindest teilweise bekannt ist. Um beide Stränge zu kopieren, benötigt man außerdem zwei verschiedene Primer, die jeweils an einem der Stränge 3' von der zu amplifizierenden Sequenz binden; den Primer für den einen Strang bezeichnet man dann als Forward-, den für den anderen Strang als Reverse-Primer.

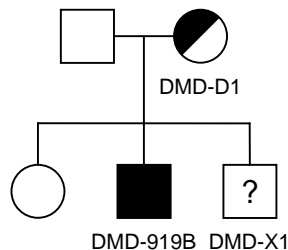
Schließlich müssen noch zugegeben werden Desoxynukleotidtriphosphate als Bausteine (dNTPs) für die Polymerisation.

Die PCR beginnt mit dem Erhitzen der Probe auf ca. 95 °C, um die DNA-Doppelhelix zu denaturieren. Anschließend wird wieder auf ca. 40–60 °C abgekühlt, sodass die Primer in Abhängigkeit ihres Schmelzwerts an die komplementären Sequenzen der DNA binden können (**Annealing**). Bei ca. 66–75 °C verlängert anschließend die Taq-Polymerase die Primer und kopiert die DNA (**Elongation**). Die Taq-Polymerase elongiert den entstehenden DNA-Doppelstrang so lange, bis sie am Ende von der DNA abfällt oder bis die Reaktion unterbrochen wird. Dies kann z.B. durch erneutes Erhöhen der Inkubationstemperatur auf 95 °C geschehen, sodass die DNA wieder denaturiert wird und ein neuer Zyklus beginnt.

Da jeder neu synthetisierte Strang im folgenden Zyklus als Vorlage für die Polymerasereaktion dienen kann, kommt es jeweils zu einer Verdopplung der zwischen den Primern liegenden Sequenz. Durch mehrfaches Wiederholen erfolgt somit eine exponentielle Vervielfältigung. Dies macht die Methode so empfindlich, dass z.B. DNA-Sequenzen aus einem einzigen Haar oder einer einzigen Zelle amplifiziert und nachgewiesen werden können.

Der große Vorteil der PCR, ihre extreme Empfindlichkeit, ist zugleich auch ein nicht zu unterschätzendes Problem. Kleinste Verunreinigungen, etwa durch Pipettieren übertragene Aerosole, können ein falsch positives Ergebnis herbeiführen. Negativkontrollen, Positivkontrollen und Kontaminationsschutzmaßnahmen gehören zu jedem PCR-Experiment.

Die Verwendungsmöglichkeiten der PCR in Forschung und Diagnostik sind wegen ihrer hohen Sensitivität, geringer Kosten und auch wegen der Schnelligkeit sehr vielfältig. In der klinischen Diagnostik findet sie z.B. Anwendung im Nachweis pathogener Mikroorganismen, in der Untersuchung von Tumoren auf Punktmutationen, Deletionen und sonstige Rearrangements, zum Mutationsnachweis bei Erbkrankheiten (einschließlich Pränataldiagnostik) sowie zum (semi-)quantitativen Nachweis von veränderter Genexpression nach dem Umschreiben von RNA in cDNA (RT-PCR).



In einer Familie (Stammbaum) zeigt ein jetzt 5-jähriger Sohn (DMD-919B) deutliche klinische Symptome der DMD. Sein jüngerer Bruder (DMD-X1), 2 Jahre alt, zeigt (derzeit) keine Symptome. Wir wollen nun beide Patienten molekulardiagnostisch untersuchen. Hierfür suchen wir durch PCR von einzelnen Exons nach Deletionen im Gen. Die DMD-PCR wird als Multiplex-PCR durchgeführt, d.h., mehrere Primerpaare werden in ein Röhrchen pipettiert und die entsprechenden Amplifikationsprodukte bilden sich gleichzeitig.

Anschließend trennen wir die PCR-Produkte durch eine **Gelelektrophorese** auf. Diese Technik basiert auf der Tatsache, dass die DNA aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen ist und daher in einem elektrischen Feld zur Anode wandert. Als Träger wird hierfür z.B. ein Agarosegel verwendet, durch dessen „Poren“ im dreidimensionalen Molekülnetzwerk die DNA „hindurchschlüpfen“ muss. Aufgrund dieses Widerstands wandern größere DNA-Stücke langsamer in das Gel hinein als kurze, d.h., es kommt zur Auftrennung der Fragmente nach der Größe. Je höher konzentriert die Agarose im Gel ist, desto langsamer erfolgt die Wanderung, desto höher ist aber auch die Auflösung der getrennten Fragmente. (Besonders hohe Auflösungen werden mit einem Polyacrylamid-Gel erreicht.)

Zur praktischen Durchführung:

Reagenzien:

- Primer-Mix 1:

- 25 pmol/µl Exon 45 Forward-Primer
- 25 pmol/µl Exon 45 Reverse-Primer
- 5 pmol/µl Exon 19 Forward-Primer
- 5 pmol/µl Exon 19 Reverse-Primer
- 5 pmol/µl Exon 17 Forward-Primer
- 5 pmol/µl Exon 17 Reverse-Primer
- 5 pmol/µl Exon 51 Forward-Primer
- 5 pmol/µl Exon 51 Reverse-Primer
- 5 pmol/µl Exon 8 Forward-Primer
- 5 pmol/µl Exon 8 Reverse-Primer
- 5 pmol/µl Exon 12 Forward-Primer
- 5 pmol/µl Exon 12 Reverse-Primer
- 5 pmol/µl Exon 44 Forward-Primer
- 5 pmol/µl Exon 44 Reverse-Primer
- 5 pmol/µl Exon 4 Forward-Primer
- 5 pmol/µl Exon 4 Reverse-Primer

- Primer-Mix 3:  
Wie Primer-Mix 1 für den Promotor des Gens sowie Exon 3, 50, 6, 53, 60, 7
- 5x Chamberlain-PCR-Puffer:  
82 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
335 mM Tris  
33,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM β-Mercaptoethanol  
0,034 mM EDTA  
850 µg/ml BSA (Bovine Serum Albumine)
- dNTP-Mix:  
25 mM dATP  
25 mM dCTP  
25 mM dGTP  
25 mM dTTP
- DNA-Proben:  
DNA vom DMD-Patient (DMD-919B), DNA-Konzentration 50 ng/µl  
DNA vom Bruder (DMD-X1), DNA-Konzentration 50 ng/µl  
DNA von Kontrollperson ohne Deletion (NORM-1622A), DNA-Konzentration 50 ng/µl
- Taq-Polymerase (5 u /ml)

Zunächst setzen wir zwei sog. Mastermixe an, die sämtliche für die Reaktion benötigten Substanzen enthalten. Für den Mastermix 1 pipettieren wir dabei in ein Eppendorf-Tube, das auf Eis steht, 80 µl H<sub>2</sub>O, 25 µl 5x Chamberlain-PCR-Puffer, 5 µl dNTP-Mix, 2,5 µl Primermix 1 und 2,5 µl Taq-Polymerase. In ein zweites Eppendorf-Tube ebenfalls auf Eis pipettieren wir Mastermix 3 mit 77 µl H<sub>2</sub>O, 25 µl 5x Chamberlain-PCR-Puffer, 5 µl dNTP-Mix, 5 µl Primermix 3 und 2,5 µl Taq-Polymerase. Für jeden Mastermix brauchen wir nun vier Tubes, in denen wir nun die PCR-Ansätze herstellen (wiederum auf Eis). Dabei kommt in jedes Tube 23 µl Mastermix sowie 2 µl von *einer* der vier Proben, d.h., in das erste Tube DNA DMD-919B, in das zweite Tube DNA DMD-X1, in das dritte Tube DNA NORM-1622A und in das vierte Tube H<sub>2</sub>O.

Die Ansätze stellen wir ins PCR-Gerät und programmieren dieses: Zunächst erhitzen wir 4 min auf 94 °C, um die genomische DNA vollständig zu denaturieren. Es folgen 30 PCR-Zyklen mit jeweils 30 s bei 94 °C (Denaturierung), 30 s bei 60 °C (Annealing) und 30 s bei 65 °C (Elongation). Zum Abschluss wird noch 2 min bei 65 °C inkubiert, um evtl. unvollständig kopierte Stränge noch vollständig zu elongieren, und dann auf 4 °C abgekühlt.

In der Zwischenzeit können wir die Gelelektrophorese vorbereiten:

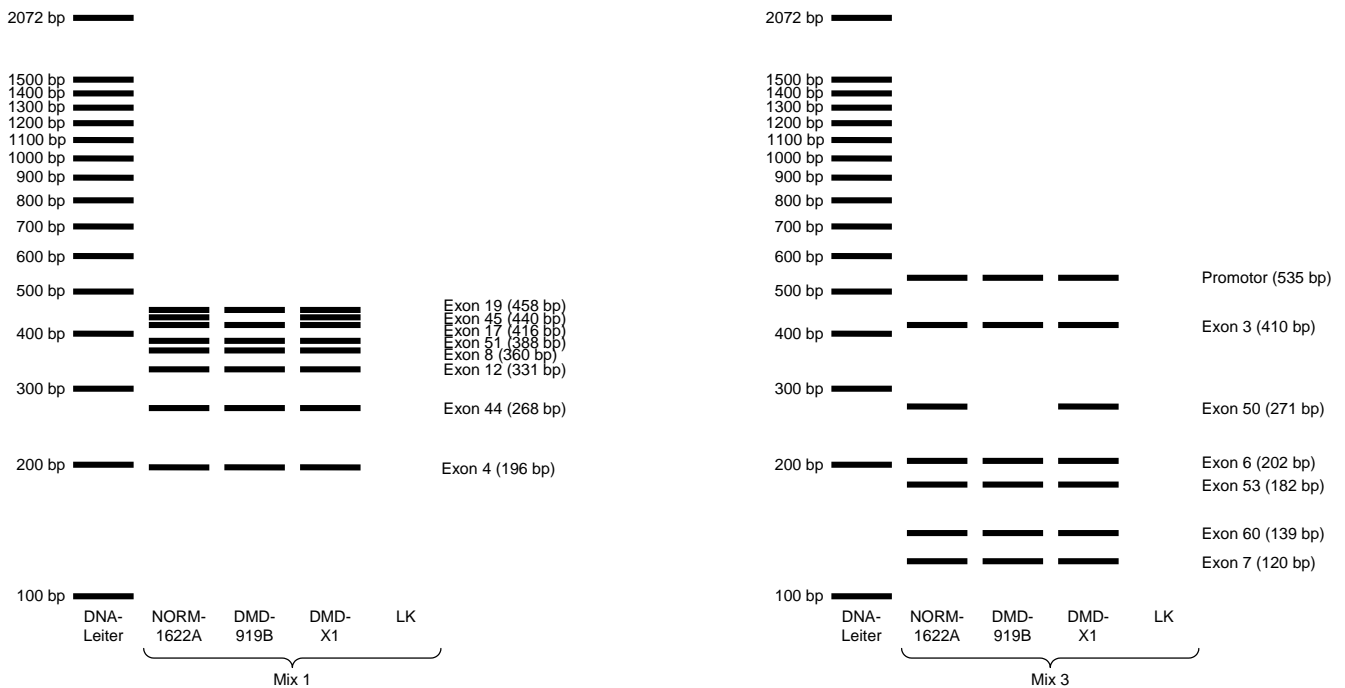
- Reagenzien:
- 1x TBE-Puffer:  
10,8 Tris, 5,5 g Borsäure, 4 ml 0,5 M EDTA / Liter
  - 6x Orange-G-Loading-Puffer:  
20 g Ficoll, 1 ml 1 M Tris, 0,1 g Orange G / 100 ml
  - Ethidiumbromid-Lösung (0,5 mg/l)

Um ein 3 %-iges Agarose-Gel zu erhalten, lösen wir 1 g Nusieve-Agarose in 33 ml 1x TBE in einem Erlenmeyerkolben. Dieser wird gewogen, die Lösung daraufhin in der Mikrowelle gut durchgekocht und anschließend mit H<sub>2</sub>O wieder auf das ursprüngliche Gewicht aufgefüllt. Nach ca. 5 min Abkühlen wird das Gel in die Elektrophoresekammer (mit einem Kamm für 10 Taschen) gegossen. Nach etwa einer Stunde ist es ausgehärtet.

Die Elektrophoresekammer wird mit 1x TBE aufgefüllt und der Kamm entfernt. Zu jedem PCR-Produkt geben wir nun je 5 µl 6x Loading-Puffer und pipettieren anschließend vorsichtig 5 µl in eine der Geltaschen. (Aufgrund ihrer durch das Ficoll bedingten größeren Dichte sinkt die DNA-Lösung dabei unter den Laufpuffer ab.) In die beiden Randspuren wird 1 µl eines DNA-Größenstandards pipettiert. Die Elektrophorese erfolgt bei 150 V für etwa 2,5 h, bis am unteren Gel-Ende die orangene Farbe angekommen ist.

Nun wird das Gel vorsichtig aus der Kammer gehoben und ca. 30 min in Ethidiumbromid gefärbt. (Cave: Ethidiumbromid ist sehr mutagen – Handschuhe aus Nitril tragen!). Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der spezifisch DNA anfärbt, indem er in die Doppelhelix interkaliert.

Unter UV-Licht werden die angefärbten DNA-Fragmente sichtbar und können zur Auswertung fotografiert werden.



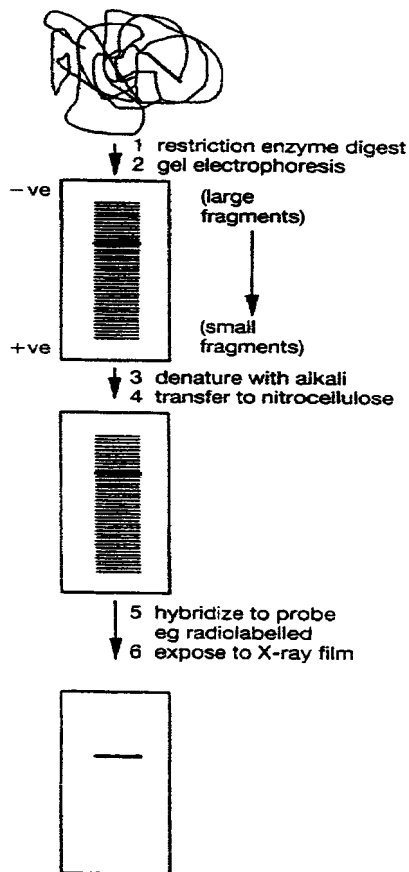
Der PCR-Ansatz mit Wasser dient als Leerkontrolle (LK), die keine Banden zeigen darf, wenn alle Ansätze sauber und nicht verunreinigt waren.

Das Bandenmuster von NORM-1622A benutzen wir als Vergleichsmuster, in dem alle amplifizierten Exons durch jeweils eine Bande repräsentiert sind.

Bei DMD-919B fehlen die Banden von Exon 45 und Exon 50, d.h., aufgrund einer Deletion der Primer-Bindungsstellen konnte kein PCR-Produkt erstellt werden. Die Deletion dürfte den gesamten Bereich von Exon 45 bis Exon 50 umfassen. Die klinische Diagnose einer DMD kann damit molekular bestätigt werden.

DMD-X1 zeigt dagegen alle Banden und ist nicht von der Krankheit betroffen.

(NB: Die PCR-Methode kann bei der DMD sinnvollerweise nur bei Männern durchgeführt werden, da bei weiblichen Überträgerinnen einer Deletion immer noch ein gesundes Allel auf dem anderen X-Chromosom vorhanden ist und es somit stets zur Amplifikation entsprechender Abschnitte kommt. Zur Klärung der Frage eines möglichen Überträgerstatus bei weiblichen Angehörigen eines Patienten mit DMD können heute spezifische DMD-Gensonden auf Chromosomenpräparate hybridisiert werden (FISH-Diagnostik). Liegt bei diesen Frauen eine Deletion vor, so findet man im Gegensatz zu anderen Frauen nur auf einem der beiden X-Chromosomen ein Hybridisierungssignal.)



Eine zweite Möglichkeit in der molekularen Diagnostik ist die **Southern-Blot-Analyse** die 1975 von Edward M. Southern eingeführt wurde. Die Grundlage dieser Technik sind die **Restriktionsenzyme**, Enzyme bakterieller Herkunft, die bestimmte DNA-Sequenzen erkennen und die DNA dort selektiv zerschneiden. Man kennt heute zahlreiche verschiedene Restriktionsenzyme; so erkennt z.B. EcoRI (aus *Escherichia coli*) die Sequenz 5'–GAATTC–3', HindIII (aus *Haemophilus influenzae*) die Sequenz 5'–AAGCTT–3' oder PstI (aus *Providencia stuartii*) die Sequenz 5'–CTGCAG–3'.

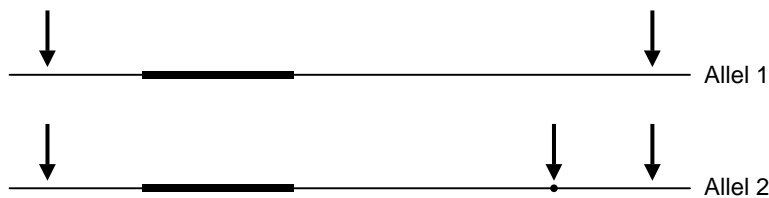
Man kennt verschiedene DNA-Bereiche, an denen manche Menschen eine Schnittstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym zeigen, andere jedoch nicht (**polymorphe Schnittstelle**). Beim Zerschneiden entstehen dadurch unterschiedliche große Fragmente (**Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus, RFLP**).

Der erste Schritt einer Southern-Blot-Analyse ist der enzymatische Verdau der Patienten-DNA. Die Restriktionsfragmente werden anschließend auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Durch die Vielzahl der entstehenden Fragmente sind im Gel keine distinkten Banden zu erkennen, sondern ein „DNA-Schmier“. Weil sich alle Restriktionsfragmente in diesem Schmier verstecken, lässt sich nicht erkennen, ob das gesuchte Fragment die normale Fragmentlänge aufweist.

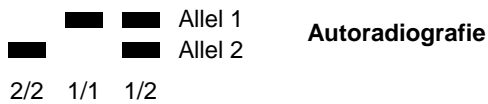
Die DNA wird nun denaturiert und mittels geeigneter Pufferlösungen, welche durch das Gel gesaugt werden, auf ein Gitter aus Nitrozellulose oder Nylon transferiert (**Blotting**) und dort kovalent gebunden.

Nun kann das gesuchte Fragment sichtbar gemacht werden. Hierfür verwendet man eine DNA-Sonde, die zu seiner Sequenz komplementär ist und daher daran binden kann. Man hybridisiert die Sonde einfach auf den Blot und wäscht anschließend überschüssige Sonden ab.

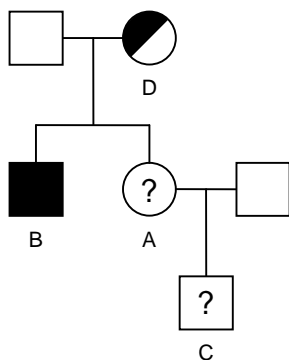
Das Entscheidende ist dabei, dass die Sonde radioaktiv markiert ist, z.B. mit  $^{32}\text{P}$ . Die Sonde vermag daher einen auf den Blot gelegten Röntgenfilm zu schwärzen (**Autoradiografie**). Da die DNA auf dem Filter so fixiert ist, wie sie im Gel aufgetrennt wurde, erscheint die Bande auch genau an der Position des Restriktionsfragments.



**Schematische Darstellung eines einfachen RFLPs**



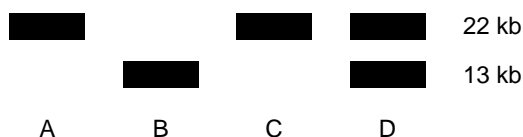
Die obige Abbildung zeigt drei Beispiel-Autoradiogramme: Besitzt der Proband die entsprechende Schnittstelle (Allel 2), ist das Fragment kürzer und erscheint weiter vom Auftragungsort der Gelelektrophorese entfernt als bei Probanden ohne Schnittstelle (Allel 1). Das abgebildete Autoradiogramm zeigt Probanden, die homozygot für Allel 2 (Genotyp 2/2) bzw. Allel 1 (1/1) oder heterozygot (1/2) sind.



In einer Familie leidet ein Mann (B) an der Becker'schen Muskeldystrophie. Eine Deletionsuche im Dystrophin-Gen mit der PCR-Methode bleibt erfolglos, d.h., es handelt sich wahrscheinlich um eine Punktmutation.

Uns interessiert nun, ob die Mutation auch auf den Neffen des Patienten (C) vererbt wurde, der bisher noch keine Symptome zeigt.

Die Fragestellung lässt sich durch eine Southern-Blot-Analyse klären, die wir im Praktikum aber leider nicht selbst durchführen können. Es werden jedoch Autoradiogramme einer 99-6-Hybridisierung ausgeteilt:



Die Sonde 99-6 erkennt einen PstI-RFLP auf dem X-Chromosom. Wenn die PstI-Schnittstelle vorhanden ist, bildet sich ein Fragment von 13 kb; schneidet PstI nicht, so entsteht ein Fragment von 22 kb.

Der 99-6-RFLP liegt zwar außerhalb des Dystrophin-Gens, in Verbindung mit dem Stammbaum können wir dieses aber dennoch indirekt analysieren, da der 99-6-RFLP und das Dystrophin-Gen im Prinzip immer gekoppelt vererbt werden.

Bei Frau D, die ja heterozygot für das Dystrophin-Gen sein muss, erkennen wir nun beim Southern-Blotting, dass sie durch einen glücklichen Zufall auch für den 99-6-RFLP heterozygot ist. Jede Bande repräsentiert damit quasi eines der beiden X-Chromosomen und auf einem davon liegt das defekte Dystrophin-Allel.

Dies muss der 13-kb-Bande entsprechen, da diese auch bei ihrem erkrankten Sohn (B) auftritt. Ihre Tochter (A) zeigt jedoch nur die 22-kb-Bande, d.h., sie hat das X-Chromosom mit dem intakten Dystrophin-Allel erhalten. Diese Diagnose ist möglich, da durch einen weiteren glücklichen Zufall vom Vater offensichtlich ebenfalls ein 22-kb-Allel kam (das hier ebenfalls mit dem intakten Dystrophin-Allel gekoppelt ist, sonst wäre der Vater ja ebenfalls krank).

Für Frau A können wir damit einen Überträgerstatus ausschließen und auch ihr Sohn (C) ist nicht betroffen.



Dem Promotor übergeordnet ist ein weiteres cis-agierendes Element, der **Enhancer**. Er liegt im Unterschied zum Promotor i.d.R. in recht großer Distanz zum Gen, und zwar kann er sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung liegen. Er bedient außerdem meist mehrere Gene, und das in beiden Richtungen. Die Wirkung des Enhancers liegt in einer Verstärkung der Promotoraktivität bestimmter Gene. Beispielsweise bindet der aktivierte Steroidhormon-Rezeptor als trans-agierender Faktor an einen Enhancer und schaltet auf diese Weise mehrere Gene an.

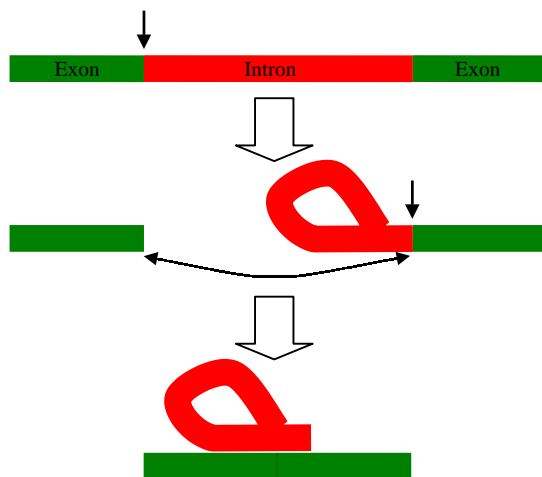
Die eigentliche Transkription wird von einer **RNA-Polymerase** ausgeführt. Man unterscheidet dabei drei Typen: Die **RNA-Polymerase I** synthetisiert **ribosomale RNA (rRNA)**, die **RNA-Polymerase II** synthetisiert **Messenger-RNA (mRNA)**, die in Proteine umgesetzt wird, die **RNA-Polymerase III** synthetisiert **Transfer-RNA (tRNA)**.

Die RNA-Polymerase wird vom Initiationskomplex (Transkriptionsfaktoren) gebunden, und durch Phosphorylierung aktiviert. Anschließend dissoziiert der Initiationskomplex von der DNA ab und die RNA-Polymerase beginnt die DNA entlang zu wandern und unter vorübergehender Aufwindung der Doppelhelix komplementäre RNA-Nucleotide anzulagern und zu verknüpfen. (An Adenin lagert sie dabei Uracil an, das dem Thymin in der DNA entspricht.)

Das Produkt der RNA-Polymerase II ist noch keine „reife“ mRNA, sondern eine sog. **prä-mRNA**, die noch verschiedenen Veränderungen unterzogen wird.

Eine Ursache liegt darin, dass eukaryontische Gene nicht kontinuierlich als Ganzes auf der DNA angeordnet sind. Vielmehr sind i.d.R. codierende Sequenzen (**Exons**) durch nicht-codierende Sequenzen (**Introns**) unterbrochen. Die Introns müssen dann aus dem Primärtranskript entfernt und die Exons verknüpft werden (**Spleißen**), was von einem großen Multienzymkomplex durchgeführt wird, der als **Spleißosom** bezeichnet wird.

Die nötige Information für den korrekten Spleiß-Vorgang steckt natürlich in der Sequenz der DNA bzw. des Primärtranskripts. Der Beginn des Introns wird als **Spleiß-Donor** bezeichnet, er beginnt stets mit GU. Das Ende des Introns ist der **Spleiß-Akzeptor**, er endet stets mit AG.



Der Spleiß-Prozess beginnt mit dem Abschneiden des Introns am Spleiß-Donor. Dessen Ende bleibt dabei nicht frei, sondern wird an Sequenzen im Innern des Introns (**Verzweigungspunkt**) gebunden und bildet somit eine charakteristische lassoartige Struktur (**Lariat**). Schließlich wird das Intron auch am Akzeptor abgeschnitten und die beiden Exons verknüpft. Tatsächlich wird der Spleiß-Prozess auch noch reguliert von Sequenzen innerhalb der Exons (**Spleiß-Enhancer**), d.h., diese Abschnitte haben eine Doppelfunktion: Organisation der RNA und Codierung des Proteins!

Eine komplexe Regulation des Spleiß-Vorgangs ist auch deshalb nötig, weil über 50 % der Gene nicht nur auf eine einzige Weise, sondern in verschiedenen Geweben auf verschiedene Weisen gespleißt werden (**alternatives Spleißen**). Durch unterschiedliche Kombination von Exons erhält man so verschiedene Proteine. So wird z.B. das Parathormon in der Schilddrüse und ein Neurotransmitter im ZNS vom selben Gen codiert.

Das Spleißen ist auch medizinisch von großer Bedeutung: 15 % der genbedingten Krankheiten entstehen nämlich nicht

„wie üblich“ durch Mutationen in den Exonbereichen, sondern durch Mutationen in den Intronbereichen, die ein fehlerhaftes Spleißen nach sich ziehen.

Neben dem Spleißen unterliegt die prä-mRNA allerdings auch noch anderen Modifikationen: am 5'-Ende erfolgt das sog. **Capping** durch Anhängen eines 7-Methylguanosin-Rests über eine ungewöhnliche 5',5'-Triphosphatbindung. Am 3'-Ende wird ein sog. **Poly-A-Schwanz** aus ca. 100-250 Adenosin-Resten angehängt. Beide Modifikationen dienen dem Schutz der Enden und spielen auch eine Rolle in der Regulation der Translation.

## Translation

Der Hauptweg der Umsetzung der genetischen Information führt zur Synthese von Proteinen anhand der Vorlage der mRNA (**Translation**). Daneben gibt es aber auch noch die rRNA, tRNA und immer mehr weitere Beispiele, die bekannt werden, in denen die RNA selbst der Funktionsträger ist.

Die Information für die Aminosäure-Sequenz des Proteins steckt in der Basensequenz der mRNA. Dabei codiert jeweils ein Basentriplett (**Codon**) für eine Aminosäure, und zwar ist der genetische Code bei allen Lebewesen gleich (**universal**). Der genetische Code ist **degeneriert**, d.h., es existieren meist verschiedene Codons für dieselbe Aminosäure; der Unterschied liegt dabei meist an der dritten Base (**Wobble base**). Der genetische Code verfügt schließlich über ein **offenes Leseraster**, d.h., er besitzt keine „Satzzeichen“ zur Trennung der Codons. Vielmehr wird von einem im Prinzip willkürlichen Startpunkt an einfach kontinuierlich die Basensequenz in Form von aufeinanderfolgenden Triplets abgelesen. Die Deletion oder Insertion einer Base führt daher natürlich dazu, dass dann völlig falsche Dreierpaare zu einem Codon zusammengefasst werden und somit kein sinnvolles Proteinprodukt mehr gebildet werden kann (Leserasterverschiebung).

Die Organellen an denen die Translation erfolgt, sind die **Ribosomen**, die aus einer **großen Untereinheit** und einer **kleinen Untereinheit** bestehen. Die Ribosomen der Eukaryoten unterscheiden sich von denen der Prokaryoten und werden als 80 S-Ribosomen bezeichnet, die große Untereinheit ist die 60 S-Untereinheit, die kleine die 40 S-Untereinheit. (Die Bezeichnung bezieht sich auf das Sedimentationsverhalten in der Zentrifuge, gemessen in der Svedberg-Einheit.)

Die Untereinheiten der Ribosomen bestehen aus rRNA und Proteinen. Bei Eukaryoten sind dabei vier verschiedene rRNAs beteiligt.

rRNAs machen ca. 75 % der RNA einer Zelle aus! Sie werden codiert von ca. 200 identischen Genen auf den akrozentrischen Chromosomen (13, 14, 15, 21, 22). Diese Chromosomen bilden zusammen den **Nucleolus**, der in sehr stoffwechselaktiven Zellen deutlich sichtbar ist. Hier erfolgt die Transkription der rRNA sowie der Zusammenbau der vollständigen Untereinheiten. Deren Proteine werden allerdings wie alle Proteine im Zytoplasma synthetisiert und anschließend durch die Kernporen in den Zellkern importiert. Durch die Kernporen verlassen dann auch die fertigen Untereinheiten den Kern.

Weiterhin ist für die Translation noch ein weiterer Typ von RNA nötig, die **tRNA**. Sie macht immerhin 15 % der RNA einer Zelle aus. tRNAs sind ca. 80 bp lang und lagern sich an verschiedenen Stellen komplementär zu einem intramolekularen Doppelstrang zusammen, sodass eine charakteristische Kleeblattstruktur entsteht. Für die Translation sind v.a. zwei Bereiche der tRNA wichtig: Etwa in der Mitte besitzt sie ein Basentriplett, das sich mit dem Codon der mRNA paart (**Anticodon**), am Ende besitzt sie eine Bindungsstelle, an der die zugehörige Aminosäure angekoppelt ist.

Wie die Transkription wird auch die Translation von zahlreichen verschiedenen **Initiationsfaktoren** eingeleitet, die hier ans 5'-Cap der mRNA binden. Diese binden daraufhin die kleine Untereinheit des Ribosoms, die nun die RNA entlang wandert, bis sie auf die Sequenz AUG (**Startcodon**) trifft. Dieses legt das Leseraster der mRNA fest.

Am Startcodon dissoziiert der Initiationskomplex weg, die große Untereinheit des Ribosoms lagert sich an die kleine an und die Synthese der Polypeptidkette beginnt. Dabei werden jeweils die entsprechenden tRNAs angelagert, die Aminosäu-

ren verknüpft und die tRNA daraufhin wieder abgelöst. Die Verknüpfung der Aminosäuren erfolgt durch die **Peptidyl-Transferase**, die kein Protein (Enzym) ist, sondern rRNA aus der großen Untereinheit (**Ribozym**)! Trifft das Ribosom schließlich auf ein **Stoppcodon** (UAA, UAG oder UGA), dissoziiert das Ribosom und die Polypeptidkette ist fertig.

Zu erwähnen ist schließlich noch, dass nie nur ein Ribosom ein mRNA-Molekül translatiert, sondern dass dieses grundsätzlich von mehreren Ribosomen besetzt wird (**Polysomenkette**).

## Mitochondriales Genom

Die Mitochondrien in der Zelle besitzen eigene DNA. Hiervon existieren in einer Zelle wesentlich mehr Kopien als vom nukleären Genom: Ein einzelnes Mitochondrium kann bereits bis zu zehn Kopien enthalten, und insgesamt gibt es mehrere tausend Mitochondrien pro Zelle.

Die mitochondriale DNA weist zahlreiche Unterschiede zur nukleären DNA auf, sie ist tatsächlich wie bei Prokaryoten gebaut: Das DNA-Molekül ist zirkulär, es ist anders als die Chromosomen nicht mit einer komplizierten Proteinstruktur assoziiert, die Replikation der DNA geht immer nur von genau einem spezifischen Punkt aus (**Origin of Replication, ORI**) und die Gene enthalten keine Introns.

Die mitochondriale DNA zeigt außerdem auch eine höhere Mutationsrate als die nukleäre. Dies ist darauf zurückzuführen, dass wie gesagt keine schützende Proteinverpackung vorliegt, dass nur ein sehr einfaches System der DNA-Reparatur existiert und dass in den Mitochondrien als Folge des Sauerstoff-Stoffwechsels auch zahlreiche Sauerstoffradikale auftreten, die die DNA schädigen.

Das mitochondriale Genom des Menschen besitzt eine Größe von 16,6 kb, es codiert für 13 Polypeptide, 22 tRNAs und 2 rRNAs. Bei den Peptiden handelt es sich um Untereinheiten der Enzyme für die oxidative Phosphorylierung. Allerdings wird tatsächlich nur der geringere Teil dieser Enzyme auch von den Mitochondrien selbst codiert und synthetisiert, die Mehrheit wird vielmehr nukleär codiert, im Zytosol synthetisiert und dann in die Mitochondrien importiert. Teilweise werden sogar verschiedene Untereinheiten desselben Enzyms z.T. mitochondrial, z.T. nukleär codiert, so z.B. bei der Cytochrom-c-Oxidase.

Defekte in diesen Enzymen können dementsprechend entweder auf mitochondriale als auch auf nukleäre Mutationen zurückzuführen sein. Bei diesen **Mitochondriopathien**, die mit einer Häufigkeit von 1:15000 auftreten, sind energieabhängige Gewebe betroffen, v.a. Auge, Ohr, Skelettmuskulatur, ZNS, Herz und Endokriniem, die Krankheit verläuft progredient und endet mit dem Tod.

Bei einer mitochondrialen Mutation zeigen sich dabei aber einige Besonderheiten, die sie von den „gewöhnlichen“ nukleär bedingten Erbkrankheiten unterscheidet:

Tritt in einem Mitochondrium eine Neumutation auf, so kann diese sich natürlich nicht auf all die anderen Mitochondrien in der Zelle ausbreiten. Daraus ergibt sich als Konsequenz, dass es stets Mitochondrien mit unterschiedlichem Genotyp in jeder Zelle gibt (**Heteroplasmie**). Bei jeder Zellteilung werden daher auch völlig zufällig unterschiedliche Mischungen von Genotypen auf die Tochterzellen verteilt. Bei Mitochondriopathien führt dieses Phänomen dazu, dass im Laufe des Lebens die Symptomatik in den verschiedenen Organen mal mehr, mal weniger ausgeprägt sein kann.

Die zweite Besonderheit mitochondrialer Mutationen liegt im Mechanismus der Vererbung, die nicht den Mendel'schen Gesetzen nukleärer Mutationen gehorcht: Alle Mitochondrien eines Menschen gehen ausschließlich auf die Mutter zurück, da vom Spermium keine Organellen in die Eizelle gelangen. Dies bedeutet, dass ein kranker Mann die Mutation nie weiter vererben wird, sondern immer nur die Mutter, diese aber sowohl auf Söhne als auch auf Töchter (**maternale Vererbung**).

## Zellzyklus

Die Teilung und Vermehrung von Zellen erfolgt nach einem zyklischen Schema mit vier Phasen: In der **S-Phase (Synthese)**, die 7 Stunden dauert, wird die DNA repliziert, in der **M-Phase (Mitose)**, die 1 Stunde dauert, teilt sich die Zelle und ihren Inhalt in zwei Tochterzellen. Dazwischen liegen jeweils Phasen, in denen die DNA auf Fehler kontrolliert wird, nämlich die 12 Stunden lange **G1-Phase (Gap)** vor Beginn der S-Phase sowie die 4 Stunden lange **G2-Phase** zwischen S-Phase und M-Phase.

Der Zellzyklus wird reguliert durch die **Cycline**, spezielle Proteine, die zyklisch synthetisiert und wieder abgebaut werden. Sie aktivieren dann im Zytosol ständig vorhandene **Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk)**, spezielle Proteinkinasen zur Weitergabe der Information an Zielproteine.

Um sich jedoch teilen zu können, benötigt die Zelle ein exogenes Wachstumssignal (**Mitogen**). Ohne dieses ist der Zellzyklus abgeschaltet, da sämtliche Cycline abgebaut sind. Die Zelle ist in der **G0-Phase**.

Wird die Zelle dann durch ein Mitogen aktiviert, werden nun zunächst als erste Antwort innerhalb weniger Minuten sog. **IE-Gene (Immediate early)** angeschaltet. Hierbei handelt es sich z.B. um Transkriptionsfaktoren, die in einer zweiten Antwort nach einigen Stunden zur Aktivierung sog. **DE-Gene (Delayed early)** führen. Hier ist nun entscheidend v.a. das **Cyclin D**, dessen beginnende Synthese und Akkumulation in der Zelle den Übergang in die G1-Phase des Zellzyklus markiert.

Cyclin D assoziiert in der Folge mit der **Cdk 4** und **Cdk 6**, die nun zur Aktivierung des Transkriptionsfaktor **E2F** führen, indem sie dessen Inhibitor, das **Rb-Protein (Retinoblastoma)** phosphorylieren und damit inaktivieren.

E2F wiederum initiiert die Synthese von **Cyclin E**, das mit der **Cdk 2** assoziiert, welche ebenfalls mithilfe, das Rb-Protein zu phosphorylieren. Es kommt damit zur Akkumulation von Cyclin E in der Zelle. Wird eine bestimmte Konzentration erreicht, überschreitet die Zelle den sog. **Restriktionspunkt** der G1-Phase, von dem aus keine weiteren Faktoren mehr zum Eintritt in die S-Phase benötigt werden und umgekehrt auch keine Möglichkeit mehr besteht, in der G1-Phase zu verharren. Auch die anderen Phasen des Zellzyklus werden durch ihre typischen Cycline und Cdk's aktiviert: In der S-Phase wird **Cyclin A** synthetisiert, das die **Cdk 2** aktiviert. In der G2-Phase erfolgt durch **Cyclin B** und die **Cdk 1** die Einleitung der M-Phase.

Da die Cycline naturgemäß kurzlebige Faktoren sein müssen, erfolgt nach jeder vollendeten Phase des Zellzyklus auch ein rascher Abbau. Hierfür wird an die Cycline das kleine Protein **Ubiquitin** angehängt, das sie zum Abbau in Proteasomen markiert.

Neben den erwähnten Cyclinen und Cdk's wird der Zellzyklus tatsächlich noch von wesentlich mehr Faktoren reguliert, die ein äußerst komplexes Signalnetzwerk in der Zelle bilden und eine geordnete Teilung oder eben auch Nicht-Teilung der Zellen innerhalb des jeweiligen Gewebekontexts sicherstellen.

In Fehlern innerhalb dieses regulatorischen Systems ist damit auch die Ursache für Tumorentstehungen zu suchen. Und ihren Ausgang nehmen diese von der DNA-Ebene. Man kennt dabei heute zwei verschiedene Arten von Genen, die bei der Tumorentstehung eine Rolle spielen:

Die eine Klasse stellen die **Onkogene**, deren Vorhandensein bereits in einer Kopie (dominant) eine maligne Zellproliferation auslöst. Onkogene leiten sich ab von den **Protoonkogenen**, deren Produkte normalerweise eine entscheidende Rolle im Rahmen der physiologischen Zellproliferation und Gewebedifferenzierung spielen, z.B. als Wachstumsfaktoren, Proteinkinasen, G-Proteine oder Transkriptionsfaktoren. Sie werden erst zum eigentlichen Onkogen, wenn das Produkt nicht mehr der normalen Regulation unterliegt.

Eine solche pathologische Onkogen-Aktivierung kann zum einen durch qualitative Änderungen wie z.B. Punktmutationen

oder auch größere Läsionen in Form von Tumorfusionen (z.B. beim „Philadelphia-Chromosom“ bei Formen der chronischen myeloischen Leukämie) geschehen.

Daneben können aber auch quantitative Änderungen der Auslöser sein, d.h. eine zu hohe Expression eines normal strukturierten Onkogens bzw. seine Synthese im falschen Gewebekontext oder zu einem unphysiologischen Entwicklungszeitpunkt. Zu Pathomechanismen dieser Art zählt die Amplifikation von Onkogensequenzen und die Entkopplung eines Tumorgens von seinen eigenen Regulatormechanismen im Rahmen chromosomaler Translokationen.

Den Onkogenen gegenüber steht die Gruppe der **Tumorsuppressorgene**, deren Produkte normalerweise eine hemmende Funktion bei der Kontrolle der Zellproliferation ausüben. Erst der Funktionsverlust beider Kopien eines Tumorsuppressorgens (rezessiv) trägt zur Karzinogenese bei. Bei vererbten Defekten in Tumorsuppressorgenen ist dabei zunächst meist nur ein Allel defekt, z.B. durch Deletion (in allen Körperzellen). Das zweite Allel kann dann etwa durch somatische Mutation noch verändert werden, etwa in Hautzellen durch die Einwirkung von UV-Licht. Die Wahrscheinlichkeit, dass sich zwei defekte Allele in einer Zelle finden, ist aber eben höher als bei nicht vererbten Mutationen, d.h., hier kommt es häufiger zu Tumoren.

Beispiele für Tumorsuppressorgene, die bei erblichen Krebserkrankungen eine Rolle spielen, sind *rb* beim Retinoblastom, *p53* beim Li-Fraumeni-Syndrom, *apc* bei der familiären adenomatösen Polyposis oder *brca1* und *brca2* beim familiären Brust- und Ovarialkrebs.

Gerade bei erblichen Krebsformen (aber natürlich auch bei somatischen Mutationen) ist aber anzumerken, dass die Aktivierung eines Onkogens oder die vollständige Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens mitnichten zwangsläufig immer zu einem Tumor führt! Tatsächlich entsteht nur eine (starke) Veranlagung zu Tumorerkrankungen, die aber mit weniger als 100 % Wahrscheinlichkeit auftreten. (Diese Wahrscheinlichkeit heißt auch die **Penetranz** des Gens.)

Außerdem dürfte sich die Entwicklung eines Tumors stets in mehreren Schritten vollziehen und den Funktionsverlust *mehrerer* Tumorsuppressorgene sowie die Aktivierung *mehrerer* Onkogene erfordern (**Multi-Hit-Hypothese**). So tragen z.B. beim Kolonkarzinom angeborene und/oder erworbene genetische Veränderungen von *apc*, *K-ras*, *dcc*, *p53*, verschiedenen DNA-Reparaturgenen und weiteren, derzeit noch unbekannt Genen zur malignen Transformation einer Kolonzelle bei.

## **Praktikum: Sequenzierung des Tumorsuppressorgens p53**

*p53* ist das wohl prominenteste Tumorsuppressorgen. Veränderungen dieses Gens spielen eine wichtige Rolle in der Progression vieler humaner Tumore. Analysen von 5000 Proben bei 43 verschiedenen Krebsarten zeigten, dass in 50–60 % der Fälle eine *p53*-Mutation vorliegt. Auch die Entstehung von Tumoren bei Menschen mit einer vererbten *p53*-Mutation (Li-Fraumeni-Syndrom) oder Mäusen mit einer Keimbahnmutation von *p53* zeigt, dass ein Verlust der *p53*-Aktivität zur Entstehung von Tumoren beiträgt. Das normale *p53*-Protein kann zudem an Proteinprodukte von Viren gebunden und dadurch inhibiert werden; auch dieser Pathomechanismus trägt zur Onkogenese bei.

Das Produkt des *p53*-Gens ist ein im Kern lokalisiertes, 393 Aminosäuren (53 kDa) großes Protein, das nach zellulärem Stress wie DNA-Schäden (UV-Licht, ionisierende Strahlung, chemische mutagene Substanzen) oder Hypoxie den Zellzyklus in der G1-Phase anhält, die DNA-Reparatur stimuliert oder Apoptose auslöst.

Das menschliche *p53*-Gen ist auf Chromosom 17q13 lokalisiert, es erstreckt sich über eine Länge von 20303 bp und enthält 11 Exons, die durch große Intronsequenzen voneinander getrennt sind.

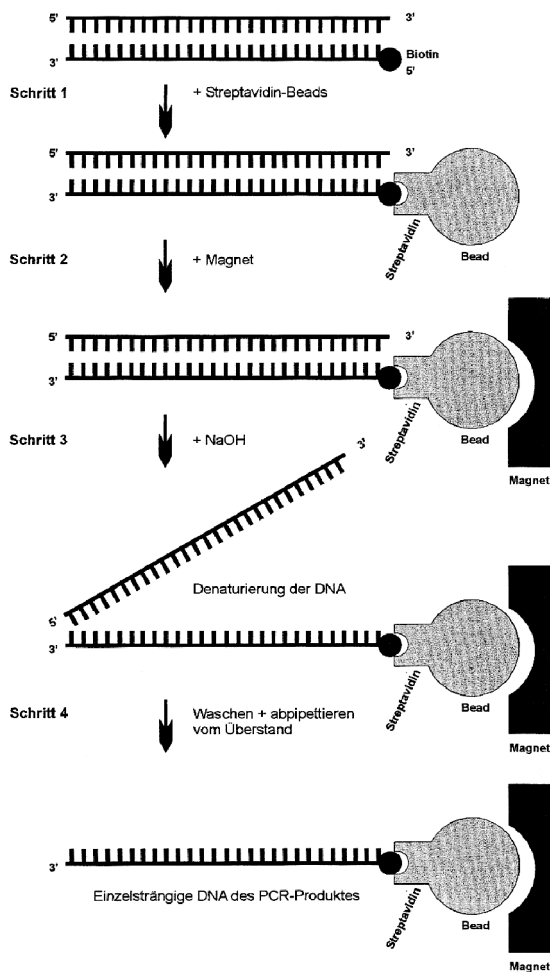
```

13901 GAGATTCCAT CTCAAAAAA AAAAAAAG GCCTCCCCTG CTGCCCAG
13951 GTCTCCCAA GCGCACTGG CCTCATCTG GGCCTGTGTT ATCTCCTAG
14001 TTGGCTCTGA CTGTACCACC ATCCACTACA ACTACATGTG TAACAGTTCC
14051 TGCATGGCGC GCATGAACCG GAGGCCATC CTCACCATCA TCACACTGGA
14101 AGACTCCAGG TCAGGAGCCA CTTGCCACCC TGCACACTGG CCTGCTGTGC
14151 CCCAGCCTCT GCTTGCCGCT GACCCCTGGG CCCACCTCTT ACCGATTCT

```

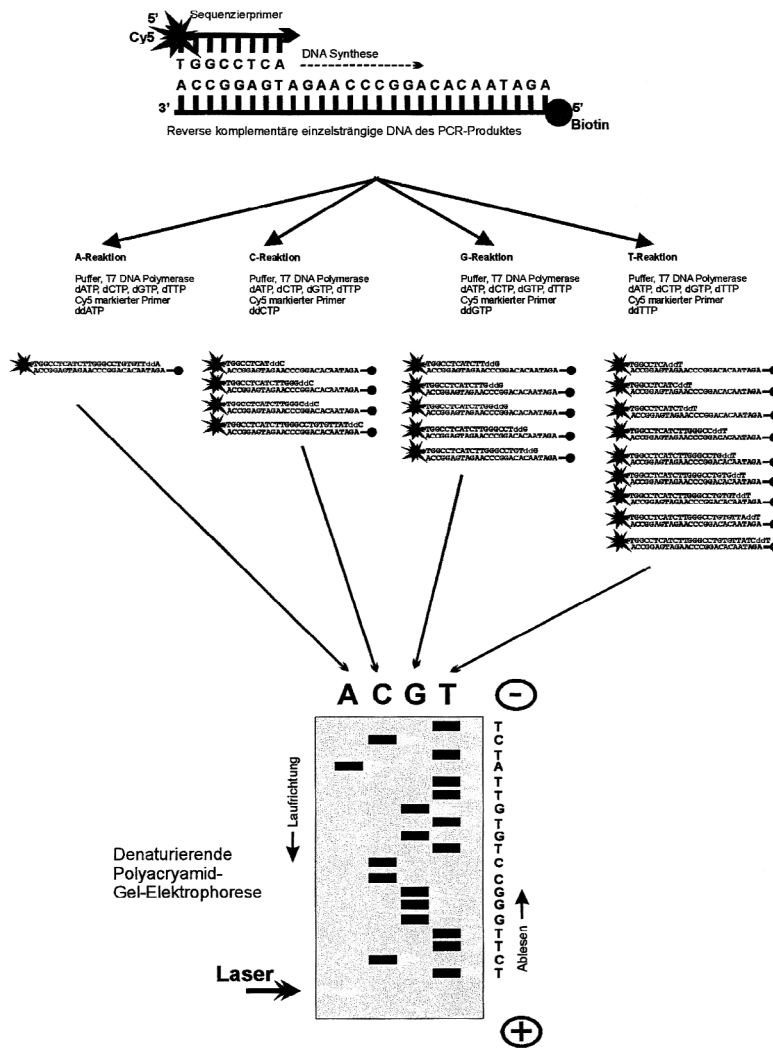
*dicker Pfeil: 5'-PCR-Primer*  
*dicker Pfeil mit Kreis: 3'-PCR-Primer, Biotin*  
*dünner Pfeil mit Stern: Sequenzierprimer, Cy5*  
*Kasten: Exon 7*  
*kleiner Kasten: Codon 248*

Wir werden nun im Praktikum Exon 7 sequenzieren. Hierfür wird dieser Genbereich zunächst durch PCR amplifiziert mittels zweier Primer, die an spezifische Intronsequenzen binden, die das Exon am 5'- und am 3'-Ende flankieren. Anschließend muss aus dem PCR-Produkt einzelsträngige DNA aufgereinigt werden. Dies verhindert eine Konkurrenz zwischen komplementärem Strang und Sequenzierprimer bei der Sequenzierungsreaktion und ermöglicht so eine zuverlässigere Sequenzierung im Vergleich zum Einsatz von doppelsträngiger DNA als Ausgangsmaterial.



Zu diesem Zweck wurde der für die PCR-verwendete 3'-Primer zuvor mit Biotin markiert. Nun wird das PCR-Produkt mit Streptavidin-beladenen Eisenkügelchen (Beads) inkubiert. Das Streptavidin bindet an den biotinylierten Primer und die Beads können mit der DNA an einen Magneten gezogen werden. Im nächsten Schritt wird die DNA durch Natronlauge denaturiert und anschließend gewaschen und der Überstand inklusive des nicht-biotinylierten DNA-Strangs abpipettiert. Zurück bleibt die biotinylierte einzelsträngige DNA, mit der wir die eigentliche Sequenzierungsreaktion durchführen. Wir benutzen hierfür die heute übliche enzymatische Methode nach Fred Sanger, bei der mit Hilfe einer DNA-Polymerase der Einzelstrang wieder zum Doppelstrang ergänzt wird.

Entscheidend für diese Technik ist dabei die Fähigkeit der DNA-Polymerase, auch natürlicherweise nicht vorkommende *Didesoxynucleotidtriphosphate* (ddNTPs) als Substrat zu verwenden. Diese sind nicht nur an der 2'-, sondern auch an der 3'-Position der Ribose desoxygeniert. Daher können sie zwar über ihren 5'-Phosphatrest in eine wachsende DNA-Kette eingebaut werden, führen aber zum Abbruch der Kettenverlängerung, da sie nicht mehr mit dem nächsten Nucleotid verestern können.



Gelesene Sequenz: 5'-TCTTGGGCCTGTGTTATCT-3'

Als Startmaterial benutzen wir den biotinylierten DNA-Einzelstrang. Ein durch einen Farbstoff (Cy5) markierter Sequenzierprimer bindet komplementär in unmittelbarer Nachbarschaft der zu bestimmenden Sequenz des Einzelstrangs.

Die DNA wird in vier verschiedene Reaktionsgefäße aufgeteilt, die jeweils *alle* vier Desoxynucleotide, eine geringe Konzentration *eines* der vier Didesoxynucleotide (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) und die DNA-Polymerase enthalten.

Im Reaktionsgefäß mit ddATP entstehen so z.B. Cy5-markierte DNA-Ketten unterschiedlicher Länge, deren Synthese jeweils beim Einbau eines ddATP unterbrochen wurde. Die Kettenlängen geben den Abstand bzw. die Position des jeweils eingebauten Adenosins zum Sequenzierprimer an. Entsprechendes gilt für die anderen drei Reaktionen mit ddCTP, ddGTP und ddTTP.

Durch eine hoch auflösende elektrophoretische Trennung der in den vier Reaktionen entstandenen Moleküle kann man dann über die unterschiedliche Kettenlänge die relative Position der vier Nucleotide zueinander in ihrer Sequenz bestimmen.

Man verwendet hierfür heute automatische Sequenzer, bei denen ein Laser die vorbeilaufenden DNA-Ketten zur Fluoreszenz anregt, was mittels lichtempfindlicher Dioden registriert und von einem Computer zu einem Diagramm verarbeitet wird.

Nun zur praktischen Durchführung:

Reagenzien:

- 1x STE-Puffer (1 M NaCl, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0)
- 5 M NaCl
- 0,1 N NaOH
- 10 T / 0,1 E (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 7,5)
- 5x TBE-Puffer (0,445 M Tris, 0,445 M Borsäure, 0,05 M EDTA, pH 8,0)

- D-Beads-Streptavidin-Lösung
- DNA-Probe

Die verwendeten DNA-Proben sind bereits durch PCR amplifiziert und mit einem PCR-Purification-Kit aufgereinigt (Entfernen von überschüssigen Primern, Nukleotiden, Polymerase und Salzen). Verwendet werden zwei verschiedene DNA-Proben: eine Buffy-coat-Probe (normale DNA aus Leukozyten) sowie DNA der Leukämie-Zelllinie Namalwa (1416) mit einer Punktmutation in Codon 248 des p53-Gens.

Zunächst müssen die Beads, die in konservierender Lösung aufbewahrt werden, aufgereinigt werden. Hierfür werden 50 µl der gut gemischten D-Beads-Streptavidin-Lösung in ein Eppendorf-Tube pipettiert. Das Tube wird in einen Magneten gestellt, sodass sich die Beads absetzen, der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und verworfen. Nun wird zweimal gewaschen: Es werden 50 µl 1× TBE-Puffer zugegeben, mit der Pipette gemischt, das Tube wieder in den Magneten gestellt, der Überstand abpipettiert und verworfen.

Nach dem zweiten Waschen wird nun 100 µl 1× STE-Puffer zugegeben und gemischt. Weiterhin wird zugegeben 100 µl gereinigtes PCR-Produkt und 20 µl 5 M NaCl-Lösung. Nun wird 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, unter leichtem Schütteln, damit die Beads nicht absinken. In dieser Zeit binden die biotinmarkierten PCR-Produkte an das Streptavidin der Beads.

Anschließend wird das Tube wieder in den Magneten gestellt und der Überstand verworfen. Es folgt wiederum eine zweifache Waschung mit jeweils 50 µl 1× STE-Puffer.

Anschließend werden 8 µl 0,1 N NaOH zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA-Doppelstränge werden dadurch denaturiert und nun haftet nur noch ein Strang an den Beads.

Das Tube wird erneut in den Magneten gestellt und der Überstand (mit den unmarkierten Strängen) abpipettiert. Anschließend wird einmal mit 50 µl 0,1 N NaOH und daraufhin einmal mit 50 µl 10 T / 0,1 E gewaschen. Schließlich werden die Beads (mit der gebundenen DNA) mit 12 µl H<sub>2</sub>O gemischt, das PCR-Produkt ist nun für die Sequenzierreaktion vorbereitet.

Nun wird in die mit 80 % Ethanol gereinigte Glasplatteneinheit des Sequenzierers ein Polyacrylamid-Geld gegossen (0,5 mm Dicke) und unter UV-Licht polymerisiert.

Nun zur eigentlichen Sequenzierreaktion: Wir verwenden hierfür T7-DNA-Polymerase (aus dem Bakteriophagen T7), die bei 37 °C arbeitet. Dies ist möglich, da uns im Gegensatz zur PCR hier ein Reaktionszyklus genügt, d.h., es muss nicht erhitzt werden. Da eine große Zahl DNA-Moleküle in der Probe vorliegen (PCR!), werden trotzdem auch genügend Abbruchvarianten entstehen.

Zunächst bereiten wir vier Eppendorf-Tubes vor, indem wir sie mit A, C, G und T beschriften, jeweils 2,5 µl A-, C-, G- oder T-Mix hineinpipettieren und die Tubes wieder auf Eis stellen.

Nun mischen wir unsere DNA-Probe (12 µl) mit 2 µl Sequenzier-Primer (Cy5-markiert, 10 pmol/µl) und 2 µl Annealing-Puffer. Es wird 5 min bei 65 °C inkubiert, kurz anzentrifugiert, 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 5 min bei 37 °C inkubiert. Wir geben 1 µl Extension-Puffer und 2 µl T7-DNA-Polymerase (3 U/µl) zu.

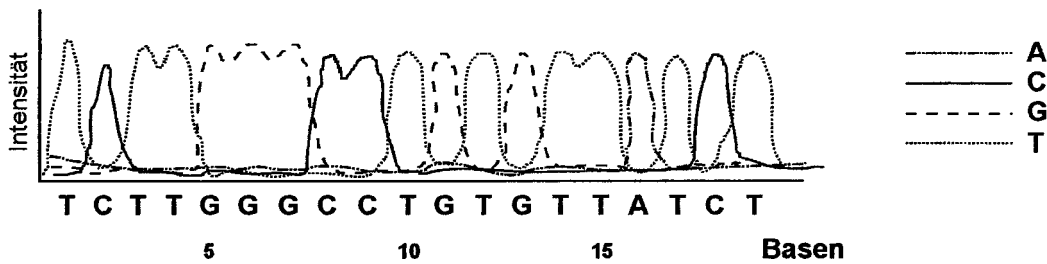
Die vier Nukleotid-Mixe (A, C, G, T) werden 1 min bei 37 °C vorinkubiert. Nun wird jeweils 4,5 µl DNA-Probe in die Nukleotid-Mixe pipettiert und jeweils 5 min bei 37 °C inkubiert. Jetzt erfolgt die Verlängerung der Primer mit zufälligem Kettenabbruch.

Zum Stoppen der Reaktion wird dann sofort 5 µl Stopp-Lösung (Dextranblau, Formamid, Puffer mit EDTA) zugegeben und die Reaktion auf Eis gestellt.

Vor dem Auftragen auf das Gel werden die Proben 3 min bei 85 °C denaturiert und dann zum Abkühlen auf Eis gestellt.

Als Laufpuffer wird 0,5× TBE benötigt, der durch Verdünnen von 5× TBE hergestellt wird. Er wird in die Pufferwannen des Sequenzierers eingefüllt. Nun werden je 5 µl aus den A-, C-, G- bzw. T-Tubes in die dafür vorgesehenen Taschen pipettiert und der Sequenzierer gestartet.

Die Auswertung erfolgt über ein Computerprogramm, das die Fluoreszenzsignale als Kurvendiagramm darstellt:

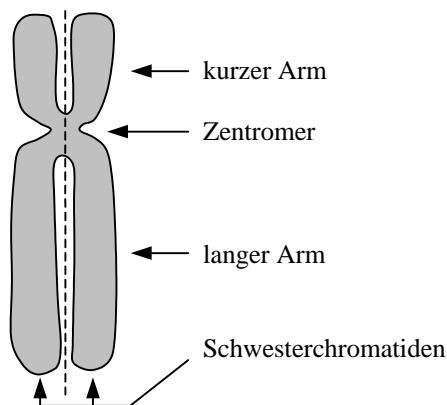


## Chromosomenaufbau

Die nukleäre DNA ist in Form der Chromosomen organisiert. Das DNA-Molekül ist dabei assoziiert mit zahlreichen Proteinen. Ca. 50 % davon stellen die **Histone**, die für die Verpackung der DNA verantwortlich sind, die restlichen 50 % sind eine Vielzahl verschiedener Proteine, die etwa regulative oder enzymatische Funktionen bei der Genexpression haben.

Die Baueinheit des Chromosoms ist das **Nukleosom**, das durch ein **Oktamer** aus je zwei Proteinen **Histon 2A**, **Histon 2B**, **Histon 3** und **Histon 4** gebildet wird, um das sich ein 126 bp langes DNA-Stück als 1,75-fache Schlaufe herumlegt. In den Bereichen zwischen zwei Nukleosomen ist die DNA assoziiert mit dem **Histon 1**.

Während der Zellteilung wird das Chromosom weiter organisiert durch mehrfache Spiralisierung des DNA-Protein-Fadens, sodass das Chromosom schließlich für eine kurze Zeit des Zellzyklus als abgegrenzte Struktur innerhalb des Zellkerns sichtbar wird (**Kondensation**).



Das Chromosom nimmt dabei die bekannte X-förmige Struktur ab. Es besteht aus den beiden **Schwesterchromatiden**, die am **Zentromer** zusammenhängen. Die Doppelstruktur geht dabei auf die DNA-Replikation während der S-Phase zurück. Könnte man ein Chromosom einer ruhenden Zelle (G<sub>0</sub>- oder G<sub>1</sub>-Phase) sehen, so bestünde dieses nur aus einem einzelnen „Chromatid“. Die beiden während der Teilung sichtbaren Schwesterchromatiden sind also eigentlich zwei Kopien desselben Chromosoms, die dann in der Mitose getrennt und damit wieder zu eigenständigen Chromosomen werden.

Das Zentromer wird in der Beschreibung der Morphologie eines Chromosoms als wichtiger Orientierungspunkt benutzt. Liegt das Zentromer in etwa in der Mitte des Chromosoms, spricht man von einem **metazentrischen Chromosom**, liegt es zu einem Ende hin verschoben, von einem **submetazentrischen Chromosom**, liegt es fast ganz an einem Ende des Chromosoms, von einem **akrozentrischen Chromosom**. Durch diese asymmetrische Lage unterscheidet man auch einen **kurzen Chromosomenarm (p-Arm)** von einem **langen Chromosomenarm (q-Arm)**. (Bei den metazentrischen Chromosomen wurde die Bezeichnung des p- und des q-Arms in der internationalen Nomenklatur willkürlich festgelegt.)

Beim Menschen verteilt sich die nukleäre DNA auf 46 Chromosomen (**diploider Satz**). Jeweils die Hälfte davon (**haploider Satz**) stammt vom Vater bzw. der Mutter.

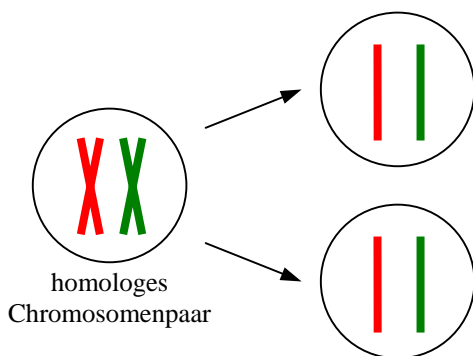
22 der 23 Chromosomen im haploiden Satz werden dabei als **Autosomen** bezeichnet, bei ihnen kommt von Vater und Mutter jeweils ein exaktes Äquivalent, d.h., ein Chromosom mit derselben Struktur und denselben Genen (**homologes Chromosom**). Die Autosomen werden in der internationalen Nomenklatur mit den Ziffer 1–22 bezeichnet.

Die zwei übrigen Chromosomen sind die **Geschlechtschromosomen (Gonosomen)**, die sich bei Mann und Frau unterscheiden: Im weiblichen Organismus enthalten alle Zellen zwei **X-Chromosomen**, im männlichen Organismus ein X-Chromosom und ein **Y-Chromosom**. Das Y-Chromosom ist es auch, das die Geschlechtsbestimmung bewirkt: Ohne Y-Chromosom entsteht ein weiblicher Keim, liegt dagegen ein Y-Chromosom vor, entsteht ein männlicher Keim, selbst wenn neben der normalen Ausgabe noch zusätzliche X-Chromosomen vorliegen.

Für die Geschlechtsbestimmung ist dabei nur ein Gen verantwortlich, nämlich das **SRY-Gen** (Sex-determining region Y) auf Yp11, das für den sog. Testis-determining factor codiert. Dieser bewirkt die Entwicklung der indifferenten Gonade hin zum Hoden, während sie sich sonst von allein zum Ovar entwickelt.

Der Chromosomensatz einer Zelle wird durch den sog. **Karyotyp** beschrieben. Dabei gibt man zunächst die Gesamtzahl der Chromosomen an und dann die Situation der Geschlechtschromosomen. Eine normale weibliche Zelle hat also den Karyotyp 46,XX, eine normale männliche Zelle 46,XY.

## Mitose



Die Zellteilung wird in mehrere Abschnitte unterteilt:

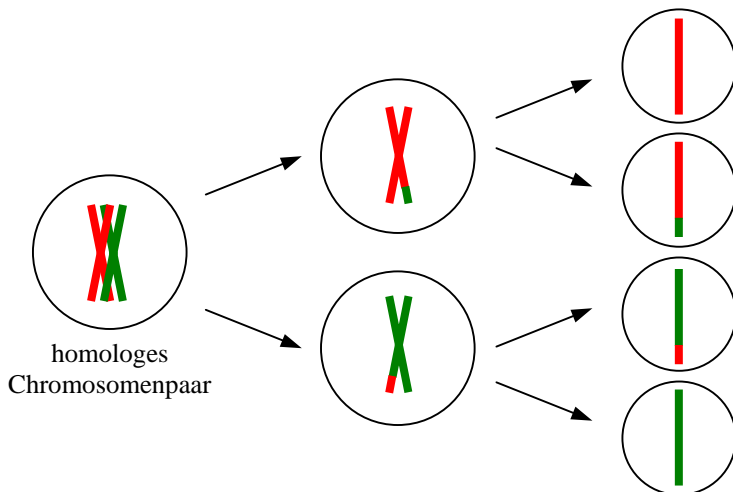
In der **Prophase** beginnen die Chromosomen zu kondensieren; weiterhin beginnt sich aus dem Mikrotubuli-System die Mitosespindel zu bilden und die Kernhülle wird abgebaut.

In der **Metaphase** sind die Chromosomen nunmehr vollständig verkürzt; am Zentromer setzen die Mikrotubuli des Spindelapparats an und die Chromosomen ordnen sich dadurch in der Äquatorialebene der Zelle an.

In der **Anaphase** geschieht dann das entscheidende Ereignis der Mitose: Die beiden Schwesterchromatiden eines jeden Chromosoms werden voneinander getrennt und zu den entgegengesetzten Zellpolen gezogen.

In der **Telophase** wird die Zellteilung abgeschlossen durch den Wiederaufbau der Kernhülle sowie durch die Halbierung des Zytoplasmas mit allen Organellen.

## Meiose



Die Bildung von Keimzellen erfolgt durch die Meiose, einen Vorgang, der sich von der mitotischen Teilung in einigen Details unterscheidet.

Die Meiose besteht aus zwei Zellteilungen, die als die **1. Reifeteilung** und die **2. Reifeteilung** bezeichnet werden. Jede Teilung erfolgt prinzipiell ähnlich wie eine Mitose und zeigt auch genau dieselben Phasen.

Der entscheidende Unterschied der 1. Reifeteilung zur Mitose ist, dass sich hier in der Prophase die beiden homologen Chromosomen eng zusammenlagern und es dabei auch zum DNA-Austausch zwischen den beiden Chromosomen kommt (**Crossing-over**). Weiterhin werden in der Anaphase nicht die Schwesterchromatiden voneinander gelöst, sondern es wird je ein vollständiges Chromosom aus dem Homologenpaar zu den Zellpolen gezogen.

Die 2. Reifeteilung entspricht dann der Mitose im Prinzip völlig. Der Unterschied besteht jedoch nun darin, dass zuvor keine S-Phase mehr erfolgt. Wenn hier nun die Schwesterchromatiden in der Anaphase getrennt werden, hat jede Tochterzelle nur noch eine Kopie eines jeden Chromosoms und nicht mehr eine maternale und eine paternale wie die Körperzellen. Aus einer diploiden Ausgangszelle sind damit vier haploide Tochterzellen entstanden.

Beim Mann sind dies auch tatsächlich vier funktionsfähige Spermien, bei der Frau geht aus jeder Meiose aber nur eine Eizelle hervor: Hier wird das Zytoplasma so ungleichmäßig verteilt, dass es eine der vier Zellen vollständig erhält und die anderen drei nur kleine Anhangsgebilde aus Chromatin bilden (**Polkörperchen**).

Ein weiterer Unterschied zwischen Mann und Frau ist außerdem, dass beim Mann die Meiose mit der Pubertät einsetzt und dann ständig eine große Zahl an Spermien produziert wird. Bei der Frau dagegen setzt die Meiose bereits pränatal ein, alle Zellen bleiben dann aber in der Prophase I stehen. Mit der Pubertät entwickeln sich dann im weiblichen Zyklus wenige Zellen weiter, bleiben aber dann in der Metaphase II erneut stehen. Erst bei der Befruchtung wird die Meiose abgeschlossen. Medizinisch von Bedeutung ist der lange Arrests der Keimzellen in der Prophase I: Er bewirkt bei älteren Frauen ein erhöhtes Risiko für eine chromosomale Fehlverteilung in der Meiose.

Das Crossing-over in der 1. Reifeteilung ist ein ganz wesentliches Ereignis in der Meiose. Es erhöht die genetische Vielfalt unter den Keimzellen bzw. Nachkommen, da dadurch letztlich keine zwei Keimzellen gleich sind. Es ist damit ein wichtiger Motor der Evolution.

In der Genetik hat das Crossing-over außerdem Bedeutung, da man hiermit eine genetische Karte erstellen kann.

Man betrachtet hierbei in einer möglichst großen Messreihe die Häufigkeiten, mit denen zwei Gene entweder zusammen oder unabhängig voneinander vererbt werden. Liegen die Gene auf verschiedenen Chromosomen, so beträgt die statistische Rekombinationshäufigkeit 50 %.

Liegen die Gene auf verschiedenen Chromosomen, müsste man zunächst einmal davon ausgehen, dass sie immer zusammen vererbt werden (**Kopplung**), also 0 % Rekombination auftritt. Durch Crossing-over-Ereignisse entsteht aber tatsächlich ein von null verschiedener Prozentsatz. Und dabei kann man davon ausgehen, dass ein Crossing-over umso wahrscheinlicher wird, je weiter die Gene auf dem Chromosom voneinander entfernt liegen. Als Faustregel besteht alle 1000 kb 1 % Wahrscheinlichkeit für ein Crossing-over, auch als 1 **Centi-Morgan (cM)** bezeichnet.

Misst man nun die Rekombinationshäufigkeit mehrerer Gene untereinander, so kann man daraus die relative Anordnung dieser Gene auf dem Chromosom zueinander ermitteln (**genetische Karte**).

Über den tatsächlichen Abstand, wie ihn eine DNA-Sequenzierung (**physikalische Karte**) liefert, sagen die Ergebnisse aber nichts aus. Der Grund ist, dass die Wahrscheinlichkeit für ein Crossing-over nicht über das gesamte Chromosom konstant ist, sondern vom Zentromer zum Telomer hin zunimmt. In den peripheren Bereichen hat man durch Kopplungsanalyse daher den Eindruck größerer Abstände zwischen den Genen, als tatsächlich zutrifft.

## **Praktikum: Chromosomenanalyse und molekulare Zytogenetik**

Numerische und strukturelle Abweichungen des Chromosomensatzes vom normalen Karyotyp 46,XX bzw. 46,XY sind mit zumeist schweren Krankheiten verbunden.

Die klassische Diagnose einer solchen Erkrankung erfolgt durch die **Chromosomenanalyse**, d.h. durch lichtmikroskopische Untersuchung eines Chromosomenpräparats. Dies kann nur in der Metaphase des Zellzyklus erfolgen, da nur hier die Chromosomen kondensiert und sichtbar sind. Voraussetzung für die Durchführung einer Chromosomenanalyse sind also kernhaltige und teilungsfähige Zelle, z.B. Blutzellen (nicht Erythrozyten) oder Fruchtwasserzellen.

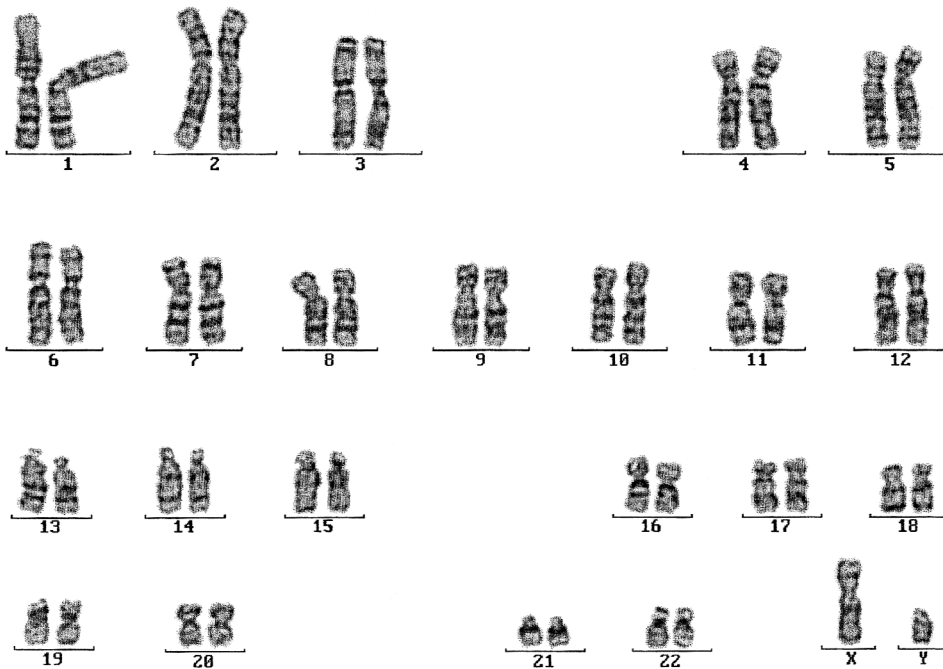
Vor der Chromosomenpräparation werden die zu untersuchenden Zellen zunächst in einer Zellkultur unter Stimulation durch Wachstumsfaktoren wie Phythämagglutinin (PHA) vermehrt. Anschließend wird Kolchizin zugegeben, das den Spindelapparat hemmt und so die Zellteilung in der Metaphase anhält. In der Kultur reichern sich damit die Zellen im Stadium der Metaphase stark an.

Durch eine hypotone KCl-Lösung bringt man die Zellen nun zum Platzen, sodass die Chromosomen besser voneinander getrennt werden. Schließlich wird das Präparat fixiert und gefärbt.

Mit den klassischen Färbetechniken kann man die Chromosomen allerdings nur nach Größe und Lage des Zentromers in sieben Gruppen (A–G) einteilen.

Eine genauere Unterscheidung der Chromosomen wurde erst in den 70-er Jahren durch die **Chromosomenbänderung** möglich. Prototyp ist die **G-Bänderung**: Dabei werden die Chromosomen mit der Protease Trypsin behandelt, die die mit der DNA assoziierten Proteine abbaut. Da verschiedene Bereiche des Chromosoms unterschiedlich stark kondensiert sind, werden diese auch unterschiedlich schnell abgebaut. Färbt man hinterher die Proteine des Chromosoms durch eine Giemsa-Färbung an, so kann man Regionen unterscheiden, die noch relativ viele Proteine enthalten und damit dunkel erscheinen, von hellen Regionen, in denen die Proteine stärker abgebaut wurden. Es entsteht somit ein Bandenmuster, das für jedes Chromosom charakteristisch ist.

Damit kann man nun also auch die einzelnen Chromosomen im Präparat ansprechen. Man kann dann die Chromosomen in einem **Karyogramm** anordnen.



Numerische Chromosomenaberrationen, d.h. Veränderungen der Chromosomenzahl, werden so auf den ersten Blick offensichtlich. Aber auch strukturelle Chromosomenaberrationen, d.h. Veränderungen einzelner Chromosomen (z.B. Deletionen von Abschnitten) lassen sich erkennen, da hieraus Veränderungen im Bandenmuster resultieren. Allerdings bleiben kleinere Veränderungen in der Chromosomenanalyse verborgen, die Auflösungsgrenze liegt bei ca. 10 MB (eine Bande).

Um die Lokalisation struktureller Veränderungen auf dem Chromosom beschreiben zu können, wurde anhand der G-Bänderung auch eine internationale Nomenklatur zu den verschiedenen Abschnitten eines Chromosoms geschaffen.

Jeder Arm wurde zunächst willkürlich in verschiedene Regionen unterteilt, innerhalb dieser Regionen werden die Banden durchnummeriert. Bei noch nicht vollständig verkürzten Chromosomen zeigen sich zudem teilweise Subbanden, diese werden als „Dezimalen“ angegeben.

Die Bezeichnung „14q32.2“ bedeutet damit z.B., dass vom langen Arm von Chromosom 14 die Rede ist, und hier von Region 3, Bande 2, Subbande 3.

Neben der G-Bänderung kennt man heute auch verschiedene andere Bänderungstechniken, die bei spezifischen Fragestellungen zum Einsatz kommen. So färbt etwa die C-Bänderung spezifisch die Zentromer-Region an.

Wir wollen nun im Praktikum eine G-Bänderung durchführen.

Reagenzien:

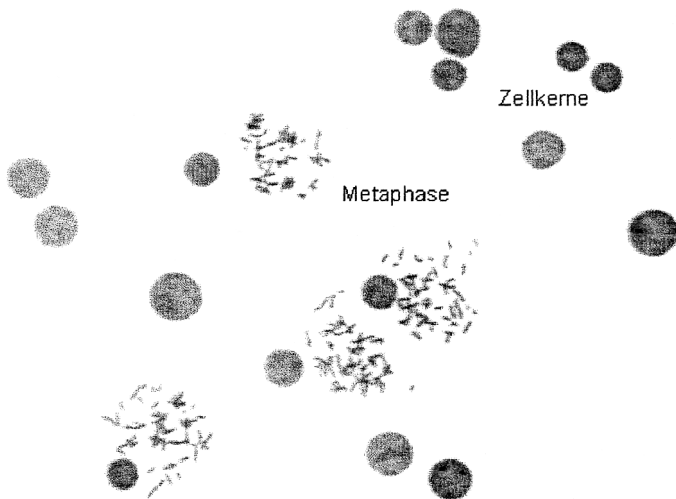
- 0,9 % NaCl
- Trypsinlösung:  
0,5 ml Bactotrypsin auf 100 ml 0,9 % NaCl
- Färbelösung:  
50 ml Sörensen-Puffer A (1/15 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )  
50 ml Sörensen-Puffer B (1/15 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )  
5 ml Gurr-Giemsa R66

Die Trypsinlösung wird in einer Glasküvette auf 37 °C vorgewärmt. In zwei weitere Glasküvetten wird 0,9 % NaCl eingefüllt, in eine Küvette die Färbelösung, in eine Küvette  $\text{H}_2\text{O}$ .

Es werden Objektträger mit Phythämagglutinin-stimulierten, mittels Kolchizin in der Metaphase arretierten, hypoton behandelten und fixierten menschlichen Lymphozyten ausgeteilt.

Diese werden 40–50 s in die Trypsinlösung gestellt und anschließend in 0,9 % NaCl zweimal gespült. Nun werden die Objektträger 15 min in die Färbelösung gestellt, anschließend in  $\text{H}_2\text{O}$  gespült und schließlich luftgetrocknet.

Das Präparat wird unter dem Mikroskop zunächst bei 10-facher Vergrößerung begutachtet, eine vollständige und gut aufgetrennte Metaphase dann bei 100-facher Vergrößerung gezeichnet und einzelne Chromosomen identifiziert.

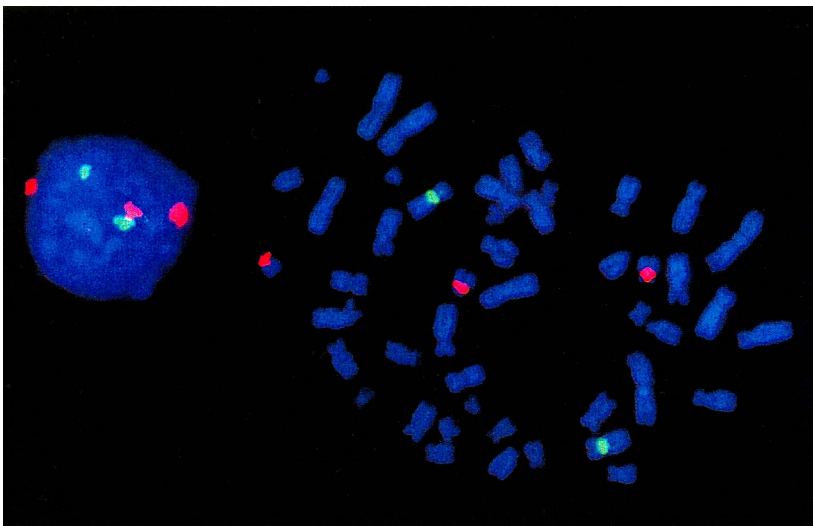


Ende der 80-er Jahre konnte die Diagnostik chromosomaler Veränderungen wesentlich verbessert werden durch die Einführung der **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**, die die Brücke bildet zwischen klassischer Chromosomenanalyse und molekularer DNA-Diagnostik.

Hierbei hybridisiert man die Chromosomen mit fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden und kann somit ausgewählte Chromosomen oder Chromosomenbereiche im Fluoreszenzmikroskop farbig darstellen.

Durch diese Technik steigt die Auflösung bei der Diagnose struktureller Anomalien auf ca. 5 kb, d.h., man kann nun auch kleinere Deletionen oder unauffällige Translokationen erkennen. Selbst einzelne Gene können nun analysiert und beispielsweise eine Deletion einzelner Exons nachgewiesen werden (z.B. auch als Nachweis einer Heterozygotie).

Besonders interessant an der FISH-Technik ist auch, dass man damit numerische Chromosomenaberrationen ohne Metaphasepräparat diagnostizieren kann. Man kann die Hybridisierungssignale auch direkt am Interphase-Zellkern auswerten und ist somit auch nicht auf teilungsfähige Zellen angewiesen. Zudem geht die Analyse wesentlich schneller als die klassische Chromosomenanalyse.



In der Abbildung ist eine Metaphase und ein Interphase-Zellkern zu erkennen. Das Präparat wurde mit zentromerspezifischen DNA-Sonden für Chromosom 18 (rote Fluoreszenz) und Chromosom X (grüne Fluoreszenz) hybridisiert. Deutlich sichtbar sind bereits im Zellkern die drei Hybridisierungssignale für Chromosom 18, d.h., es liegt eine Trisomie 18 vor.

Auf diese Weise kann heute in der Pränataldiagnostik ein Schnelltest auf die häufigsten numerischen Chromosomenaberrationen durchgeführt werden, indem mit Sonden für die Chromosomen 13, 18, 21, X und Y hybridisiert wird. Das Ergebnis liegt nach spätestens einem Tag vor, während die klassische Chromosomenanalyse ein bis zwei Wochen dauert. Diese wird im Anschluss allerdings auch noch durchgeführt, da nur so auch weitere Veränderungen erkannt werden.

Eine weitere Möglichkeit der Anwendung der FISH-Technik ist die spezifische Anfärbung ganzer Chromosomen. Dies ge-

lingt, indem man die DNA eines kompletten menschlichen Chromosoms in einem biologischen Wirtssystem vermehrt (kloniert), markierte Nukleotide einbaut und die DNA dann in kleinere Stücke schneidet. Auf diese Weise erhält man DNA-Sonden, die sich bei der Hybridisierung über das gesamte Chromosom verteilen.

Dabei ergibt sich jedoch ein Problem durch repetitive DNA-Sequenzen, die auf allen Chromosomen vorkommen (z.B. die Alu-Sequenzen): Dadurch bindet eine nicht geringe Zahl der Sonden eben nicht wie gewünscht spezifisch an das gesuchte Chromosom, sondern völlig unspezifisch auch an alle anderen. Die Lösung bringt klonierte, unmarkierte repetitive DNA. Gibt man diese dem Hybridisierungsansatz im Überschuss zu, bindet sie an die unspezifischen Sonden, die damit nicht mehr an das Chromosomenpräparat hybridisieren und abgewaschen werden können.

Indem man nun verschiedene Farbstoffe kombiniert und anschließend die Informationen digital nachbearbeitet, kann man ein Falschfarbenbild erhalten, in dem jedes Chromosomenpaar mit einer spezifischen Farbe dargestellt wird (**24-Farben-FISH, Chromosome painting**). Diese Technik ermöglicht v.a. die Analyse komplexer Translokationen, wie sie häufig in Tumoren zu finden sind.

Wir wollen im Praktikum nun die FISH-Technik nutzen, um nach dem erwähnten Schnelltest-Verfahren Patienten auf numerische Chromosomenaberrationen zu untersuchen.

Reagenzien:

- Hybridisierungsmix 1:
  - 50 ng Chromosom 18-spezifische Sonden-DNA (markiert mit DEAC-dUTP, blaue Fluoreszenz)
  - 50 ng Chromosom X-spezifische Sonden-DNA (markiert mit FITC-dUTP, grüne Fluoreszenz)
  - 50 ng Chromosom Y-spezifische Sonden-DNA (markiert mit Cy3-dUTP, rote Fluoreszenz)
  - in 2,5 µl deionisiertem Formamid + 2,5 µl Mastermix (2x SSC, 20 % Dextransulfat)
- Hybridisierungsmix 2:
  - 50 ng Chromosom 13-spezifische Sonden-DNA (markiert mit FITC-dUTP, grüne Fluoreszenz)
  - 50 ng Chromosom 21-spezifische Sonden-DNA (markiert mit Cy3-dUTP, rote Fluoreszenz)
  - in 2,5 µl deionisiertem Formamid + 2,5 µl Mastermix (2x SSC, 20 % Dextransulfat)
- 20x SSC:
  - 175,3 g NaCl, 88,2 g Na-Citrat auf 1 l H<sub>2</sub>O, pH 7,0
- 100 % Tween-20
- DAPI-Färbelösung: 40 µg DAPI / ml 2x SSC
- Antifade

Es werden Objektträger mit Chromosomenpräparaten von Patienten mit Verdacht auf Trisomie 13, Trisomie 18, Trisomie 21, 47,XXY und 45,X verteilt. Hierauf werden 5 µl des zu verwendenden Hybridisierungsmixes aufgetropft und ein 15 × 15 mm Deckglas aufgelegt. Der Objektträger wird auf den Boden einer Metallbox gelegt, diese verschlossen und 5 min bei 75 °C im Wasserbad inkubiert. Hierbei denaturiert sowohl die DNA des Chromosomenpräparats als auch die der Sonde. (Die relativ niedrige Temperatur von 75 °C wird ermöglicht durch die 50 % Formamid im Hybridisierungsmix.)

Anschließend wird die Metallbox in ein 37 °C warmes Wasserbad überführt und hier 2-3 h inkubiert. Hier hybridisiert nun die einzelsträngige Sonde an die einzelsträngige chromosomale DNA.

Nun wird durch Verdünnen der vorhandenen Lösungen 100 ml Waschlösung 1 (0,4x SSC, 0,02 % Tween-20) angesetzt und in einer Glasküvette auf 75 °C vorgewärmt. Ebenso werden 100 ml Waschlösung 2 (2x SSC) angesetzt (Raumtemperatur).

Nach 2-3 h Hybridisierungszeit wird das Präparat aus der Metallbox genommen und das Deckglas abgelöst. Um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen, wird nun zunächst in Waschlösung 1 2 min bei 75 inkubiert, anschließend in Waschlösung 2 1 min bei Raumtemperatur.

Nun wird in einer Küvette mit DAPI 3-5 min gefärbt, anschließend mit H<sub>2</sub>O gespült und luftgetrocknet. DAPI ist ein DNA-Farbstoff, der hier dazu dient, die Chromosomen und Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen, damit man die Hybridisierungssignale auch in einen sinnvollen Kontext einordnen kann.

Zum Schluss wird auf die Hybridisierungsstelle des Chromosomenpräparats ein kleiner tropfen Antifade gegeben und mit einem 24 × 50 mm Deckglas eingedeckt. Das Präparat ist nun fertig für die Auswertung am Fluoreszenz-Mikroskop.

## Numerische Chromosomenanomalien

Bei den numerischen Chromosomenanomalien liegt ein Chromosomensatz größer oder kleiner als 46 vor. Daraus resultiert, dass eine falsche Gendosis, entweder im Sinne von zu viel Genprodukt oder von zu wenig, jedenfalls wird das Gleichgewicht gestört, das vor allem bei Genen, die Entwicklungsprozesse steuern, wichtig ist. Und da bei Chromosomenanomalien gleich sehr viele Gene auf einmal betroffen sind, handelt sich um sehr schwer wiegende Mutationen, die meist bereits in utero zum Tod und damit zum Spontanabort führen. Nur sehr wenige Konstellationen erlauben überhaupt eine Lebensfähigkeit, sind jedoch i.d.R. mit schweren Störungen verbunden und werden ebenfalls spontan abortiert.

Ist der gesamte Chromosomensatz vervielfältigt, spricht man von einer **Polyplloidie**. Eine recht häufige Aberration ist dabei die **Triploidie** mit einem dreifachen Chromosomensatz (Karyotyp 69,XXX, 69,XXY oder 69,XYY). Ursache ist meist eine Befruchtung mit zwei Spermien. Die Triploidie ist mit schweren Missbildungen verbunden, sie führt i.d.R. zum Spontanabort. Relativ selten kommt es aber auch zu einer Lebendgeburt, das Kind verstirbt allerdings dann meist nach wenigen Tagen.

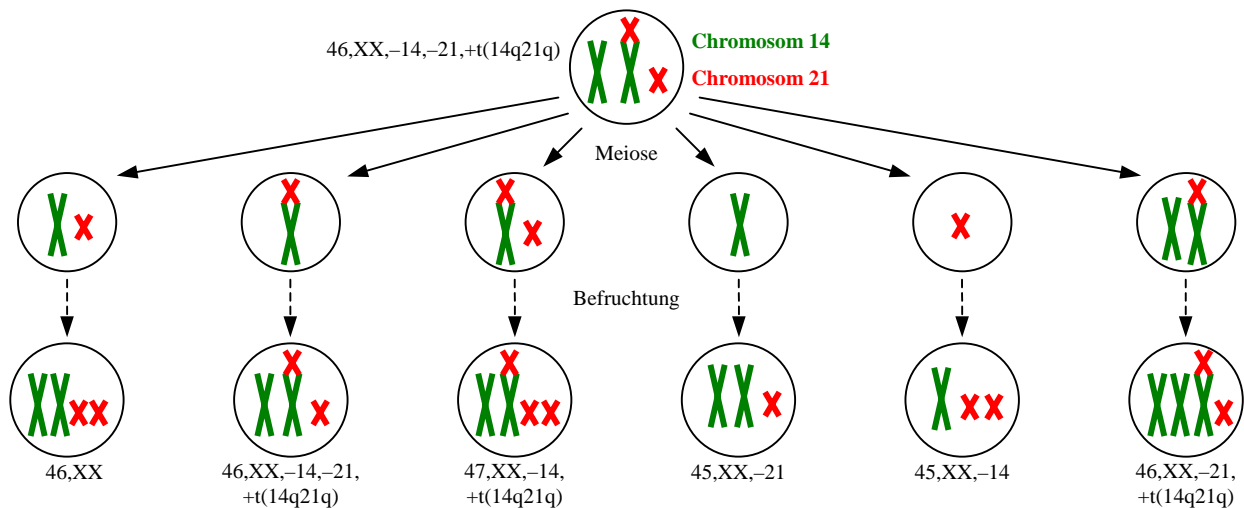
Ist nur ein einzelnes Chromosom in seiner Anzahl verändert, spricht man von einer **Aneuploidie**. Bei einer **Hypoploidie** fehlt dabei mindestens eine Ausgabe eines Chromosoms, bei einer **Hyperplloidie** liegen zu viele Kopien eines Chromosoms vor.

**Autosomale Aneuploidien** sind für den Keim praktisch immer letal, lediglich bei einigen wenigen autosomalen Trisomien treten regelmäßig auch Lebendgeburten auf:

Die bekannteste und verbreitetste autosomale Trisomie ist das **Down-Syndrom (Trisomie 21)**, Karyotyp 47,XX+21 bzw. 47,XY+21), das bei einem von 650 Neugeborenen auftritt. Die Lebenserwartung dieser Kinder ist häufig recht gut bis sogar normal. Das Down-Syndrom ist jedoch immer mit einer geistigen Retardierung verbunden, die ein eigenständiges Leben unmöglich macht. Typisch ist außerdem das äußere Erscheinungsbild mit kleinem runden Kopf, Epikanthus, mongoloider Lidachsenstellung, Vierfingerfurche und Sandalenlücke. (I.d.R. findet sich eine Kombination mehrerer dieser morphologischer Symptome, selten aber alle zusammen; einzelne kommen auch durchaus bei Gesunden vor, ohne hier von Bedeutung zu sein!) In etwa der Hälfte der Fälle finden sich beim Down-Syndrom auch Missbildungen an inneren Organen, v.a. am Herz und am Duodenum.

Ursache für das Down-Syndrom wie für alle Trisomien ist meist eine Fehlverteilung der Chromosomen in der Meiose (**Nondisjunction**). Aufgrund des langen Arrests der Meiose in Prophase I bei der Frau steigt das Risiko mit dem Alter der Mutter. So ist das Risiko für eine 35-jährige Frau, ein Kind mit Down-Syndrom zu bekommen, gegenüber einer 20-Jährigen um den Faktor 20 erhöht. In absoluten Zahlen ausgedrückt, ist es jedoch auch dann nicht dramatisch hoch, beträgt nämlich nur 0,5 %! Der Grund dafür, dass trotz dieses geringen Risikos dennoch beinahe flächendeckend Fruchtwasserpunktionen angeboten und durchgeführt werden, liegt v.a. in der Absicherung von Gynäkologen gegenüber Regressforderungen! Und da das Risiko, durch die Untersuchung eine Fehlgeburt auszulösen, ebenfalls 0,5 % beträgt, kann diese meist unnötige Untersuchung ab dem 35. Lebensjahr gerechtfertigt werden.

Neben der „freien Trisomie“, die auf Nondisjunction zurückgeht, findet man in ca. 3 % der Fälle auch eine **Translokationstrisomie**. Hier ist die Ursache eine sog. **Robertson'sche Translokation**, d.h. die Fusion zweier akrozentrischer Chromosomen. Beim Down-Syndrom „hängt“ dabei meist ein Chromosom 21 an einem Chromosom 14 und entzieht sich so dem normalen Verteilungsprinzip bei der Meiose. Das Risiko für eine Translokationstrisomie ist nicht vom Alter der Mutter abhängig!



Die Translokationstrisomie entsteht häufig spontan, sie kann aber auch auf eine **balancierte Translokation** bei einem Elternteil zurückgehen, d.h., hier stimmt zwar die Menge an Chromosomenmaterial, die Translokation liegt aber bereits vor. In diesem Fall ist das Risiko, ein betroffenes Kind zu bekommen, gegenüber dem Bevölkerungsdurchschnitt erhöht! Bei der Meiose gibt es theoretisch sechs Möglichkeiten der Chromosomenverteilung, wenn je ein normales Chromosom 14 und 21 sowie ein Fusionschromosom vorliegt: Drei der Konstellationen sind letal (Monosomie 21, Monosomie 14, Translokationstrisomie 14), lebensfähige Kinder können entweder einen völlig normalen Chromosomensatz haben, eine balancierte Translokation oder eben eine Translokationstrisomie 21. Es besteht damit rechnerisch ein Risiko von 33 %, ein krankes Kind zu bekommen. Tatsächlich, d.h. nach empirischen Beobachtungen liegt das Risiko aber nur bei 5–10 %, da die meisten Keime mit Trisomie 21 durch Spontanabort aussortiert werden. (NB: Es kommen auch Translokationen mit Fusion der beiden Chromosomen 21 vor; in diesem Fall sind alle lebend geborenen Kinder betroffen!)

Eine andere autosomale Trisomie ist das **Patau-Syndrom (Trisomie 13, Karyotyp  $47,XX+13$  bzw.  $47,XY+13$ )**, das mit einer Häufigkeit von 1:5000 auftritt. In 20 % der Fälle handelt es sich um eine Translokationstrisomie. Die Kinder sterben meist noch vor Erreichen des 1. Lebensjahrs. Sie haben eine schwerste geistige Retardierung, zum typischen Erscheinungsbild gehört häufig eine doppelte Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte, eine Mikrozephalie und eine postaxiale Hexdaktylie. Hinzu kommen wieder häufig Fehlbildungen der inneren Organe, v.a. von ZNS, Herz und Niere.

Das **Edwards-Syndrom (Trisomie 18, Karyotyp  $47,XX+18$  bzw.  $47,XY+18$ )** tritt 1:3000 auf, dabei praktisch immer als freie Trisomie. Auch hier sterben die Kinder meist vor Erreichen des 1. Lebensjahrs. Neben einer schweren geistigen Retardierung und Fehlbildungen an inneren Organen (v.a. Herz, Niere) zeigen die Kinder häufig einen Minderwuchs, eine Mikrozephalie, einen auffallend kleinen Gesichtsschädel sowie ein Überschlagen des 2. über den 3. Finger.

**Gonosomale Aneuploidien** sind weniger schwerwiegend als autosomale. Ein Beispiel sind Männer mit **Klinefelter-Syndrom (Karyotyp  $47,XXY$ )**. Sie haben eine völlig normale Lebenserwartung, zeigen aber kleine Hoden und sind infertil. Sie sind weiterhin größer als der Familiendurchschnitt, können eine Gynäkomastie und eine weibliche Fettverteilung zeigen und erkranken oft frühzeitig an Osteoporose. Anders als früher spricht man heute nicht mehr von einer geistigen Retardierung, da die Intelligenz völlig im Rahmen der normalen Schwankungsbreite liegt. Die Symptome des Klinefelter-Syndroms lassen sich gut durch eine Testosteron-Substitution behandeln.

Die einzige bekannte lebensfähige Monosomie sind Frauen mit **Turner-Syndrom (Karyotyp  $45,X$ )**, deren Lebenserwartung ebenfalls normal ist. Sie haben jedoch Ovarien, die nur als bindegewebige Stränge angelegt sind, und sind dementsprechend infertil. Sie sind außerdem immer kleiner als der Familiendurchschnitt. Weitere häufig auftretende Symptome sind Fuß- und Handrückenödeme nach der Geburt, Flügelfellbildung am Hals (Pterygium colli) und eine Aortenisthmusstenose. Wie beim Klinefelter-Syndrom spricht man auch hier heute nicht mehr von einer geistigen Retardierung.

## X-Inaktivierung

Um die Frage zu beantworten, warum gonosomale Aberrationen weniger Probleme verursachen als autosomale, muss man einen näheren Blick auf die X-Chromosomen einer Zelle werfen.

Während Männer nur ein X-Chromosom haben, besitzen Frauen zwei, d.h., sie müssten eigentlich die doppelte Gendosis haben. Da dies aber nicht sein darf (vergleiche die Auswirkungen einer autosomalen Trisomie!), existiert ein Mechanismus, der dafür sorgt, dass in allen Zellen stets nur ein einzelnes X-Chromosom auch wirklich aktiv ist. Das zweite X-Chromosom einer Frau wird inaktiviert und liegt als Heterochromatin am Rand des Zellkerns (**Barr body**, in Granulozyten auch „Drum stick“) vor. Auch bei noch mehr X-Chromosomen in einer Zelle ist stets nur eines aktiv, d.h. bei einer X-chromosomalen Aneuploidie tritt kein Dosiseffekt auf.

Die Entscheidung, welches X-Chromosom inaktiviert wird, wird in der frühen Embryonalentwicklung für jede Zelle unabhängig und völlig zufällig getroffen, danach aber für alle Tochterzellen beibehalten. Statistisch findet sich daher in einer Frau ein Mosaik aus 50 % aktiven maternalen X-Chromosomen und 50 % aktiven paternalen X-Chromosomen. Dies erklärt auch, warum Frauen bei X-chromosomal rezessiven Erkrankungen (meist) nicht erkranken! Allerdings kann es durchaus auch mal vorkommen, dass die Inaktivierung sehr ungleich auf eine Seite verschoben ist (**Skewed X-inactivation**); wenn dadurch gerade in dem Gewebe, in dem ein bestimmtes Gen gebraucht wird, nur das defekte Allel vorliegt erkrankt also auch die eigentlich heterozygote Frau.

Wenn aber alle X-Chromosomen bis auf eines inaktiviert werden, stellt sich die Frage, warum gonosomale Aberrationen überhaupt Probleme machen, ganz offensichtlich kommt es eben doch zu einem gewissen Dosiseffekt. Dies erklärt sich damit, dass die Inaktivierung nicht vollständig ist.

Tatsächlich bleiben auch auf dem inaktivierten X-Chromosom 20 % der Gene aktiv. Hierzu zählen u.a. etwa die Endbereiche des Chromosoms, in denen sich Sequenzen finden, die mit den Endbereichen des Y-Chromosoms identisch sind (**Pseudoautosomale Regionen**). Dort liegt z.B. auch das SHOX-Gen, das durch das Fehlen einer Kopie beim Turner-Syndrom für den Kleinwuchs verantwortlich ist.

Die X-Inaktivierung wird gesteuert durch das **xist-Gen** (X-inactive specific transcript), das auf Xq13 lokalisiert ist. Produkt dieses Gens ist eine RNA, die nicht in ein Protein umgesetzt wird, sondern im Zellkern mit dem X-Chromosom interagiert und dadurch die meisten Gene abschaltet.

In der frühen Entwicklung wird nun auf einem zufällig ausgewählten X-Chromosom in jeder Zelle das xist-Gen inaktiviert, alle anderen X-Chromosomen exprimieren dieses Gen und schalten so die Mehrheit ihrer Gene ab.

Die Regulation der xist-Aktivität selbst ist ein Beispiel für einen **epigenetischen Prozess**, d.h., seine Expression wird nicht auf der Ebene der DNA-Sequenz gesteuert, sondern durch die Modifikation von DNA und Histonen.

Ein Mechanismus der epigenetischen Regulation ist die Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin in CG-reichen Abschnitten, wie sie sich u.a. im Promotorbereich von Genen finden. Die Methylierung erfolgt durch verschiedene **Methyltransferasen** und muss nach jeder DNA-Replikation am neu synthetisierten Strang erneut erfolgen. Da dies aber auch wirklich abläuft, erklärt sich auch, warum die Entscheidung, welches X-Chromosom inaktiv ist, für alle Tochterzellen beibehalten wird.

Die Methylierung von Cytosin inaktiviert ein Gen zum einen dadurch, dass Transkriptionsfaktoren nicht mehr ankoppeln können, zum anderen sind die Methylgruppen auch attraktiv für weitere inaktivierende Faktoren.

Diese rekrutieren dann eine **Histon-Deacetylase**, die an Seitenketten des Histonoktamers hängende Acetylketten abspaltet. Nun kann sich die DNA quasi enger um den Histonkern herum wickeln, was zusätzlich zur Inaktivierung beiträgt.

Daneben spielen auch noch andere Vorgänge an den Histonen in der Regulation der Genaktivität eine Rolle, beispielsweise

Phosphorylierungen oder Methylierungen von Seitenketten. Man spricht daher heute neben dem genetischen Code auch von einem **Histon-Code**, der für das Genom von Bedeutung ist.

Epigenetische Prozesse spielen nicht nur bei der X-Inaktivierung eine Rolle, sondern sie haben allgemein eine große Bedeutung, wenn es darum geht, Gene langfristig abzuschalten. Dabei sind die Modifikationen auch durchaus reversibel: Die Methylierung der DNA geht etwa schnell verloren, wenn nach der Replikation keine Methylierung des Tochterstrangs mehr stattfindet; ob auch eine aktive Demethylierung existiert, ist dagegen unklar. An die demethylierte DNA können dann jedoch wieder Transkriptionsfaktoren binden, diese rekrutieren dann auch Histon-Acetyltransferasen, die wieder Acetylgruppen in die Histone einbauen und damit quasi Platz für die Transkription schaffen.

Epigenetische Prozesse spielen eine Rolle bei der Regulation der Phasen unterschiedlicher Genaktivität während der Embryonalentwicklung, bei der Regulation der gewebespezifischen Genexpression und beim sog. Imprinting, bei dem die Genaktivität von der elterlichen Herkunft abhängt.

Fehlregulationen epigenetischer Prozesse haben außerdem eine große Bedeutung in der Entstehung von Krebs!

## Strukturelle Chromosomenaberrationen

Strukturelle Chromosomenaberrationen betreffen im Gegensatz zu den numerischen nur Teilabschnitte einzelner Chromosomen. Sie entstehen durch Bruchereignisse innerhalb des Chromosoms, die falsch wieder zusammengesetzt werden.

Strukturelle Chromosomenaberrationen verursachen häufig keine Konsequenzen, da die Bruchstellen oft in nicht-codierenden Bereichen liegen, von denen es ja viel mehr gibt als Gene. Nur wenn durch den Bruch ein Gen zerstört wird oder durch den Reparaturmechanismus die Genmenge verändert wird, entstehen klinische Symptome.

Problematisch an strukturellen Chromosomenaberrationen ist aber, dass sie, selbst wenn sie zunächst keine Symptome verursachen, bei der Meiose zu Problemen bei der Paarung der homologen Chromosomen führen können. In der nächsten Generation besteht daher das Risiko von schwereren Chromosomenstörungen, die dann mit entsprechenden Krankheitsfolgen oder einer erhöhten Abortrate verbunden sein können.

Eine Form der strukturellen Chromosomenaberration ist die **Inversion** (Abkürzung im Karyotyp: inv), bei der ein Segment zwischen zwei Chromosomenbrüchen bei der Reparatur um 180° gedreht wird. Liegen beide Bruchpunkte auf demselben Chromosomenarm, d.h., das Zentromer ist nicht mit eingeschlossen, dann spricht man von einer **parazentrischen Inversion**, bei Bruchpunkten zu beiden Seiten des Zentromers von einer **perizentrischen Inversion**.

Bei einer **Duplikation** (dup) liegt ein Chromosomensegment mit zwei Kopien vor. Ursache ist z.B. ein ungleiches Crossing-over bei der Meiose. Liegen in diesem Bereich Gene, so liegt eine partielle Trisomie vor.

Bei einem **Ringchromosom** (r) verschmilzt das Chromosom an den Enden zu einem geschlossenen Ring. Das Ringchromosom an sich macht noch keine Probleme, meist werden aber vor der Ringbildung die Randbereiche deletiert, sodass es zu einer partiellen Monosomie kommt.

Ein **Isochromosom** (i) entsteht durch transversale statt longitudinale Teilung des Zentromers während der Meiose, auf die Keimzellen verteilen sich dann ein Chromosom aus zwei langen Armen und ein Chromosom aus zwei kurzen Armen. Es kommt damit zu einer Kombination aus partieller Monosomie und partieller Trisomie, die meist letal ist. Regelmäßig zu Lebendgeburten kommt es eigentlich nur beim Karyotyp 46,X,i(Xq), der phänotypisch als Turner-Syndrom erscheint.

Bei einer **Translokation** (t) wird ein Chromosomenstück auf ein anderes Chromosom übertragen, entweder als wechselseitiger Austausch (**reziproke Translokation**) oder aber nur einseitig (**nicht-reziproke Translokation**). Eine Sonderform ist noch die **Robertson'sche Translokation**, bei der gleich ein ganzes (akrozentrisches) Chromosom auf ein anderes (akrozentrisches) Chromosom übertragen wird.

Beispiel für eine reziproke Translokation mit pathologischer Bedeutung ist das **Philadelphia-Chromosom** (46,XX,t(9;22)(q34;q11) bzw. 46,XY,t(9;22)(q34;q11)). Durch Fusion zweier Onkogene entsteht hier eine Form der chronischen myeloischen Leukämie.

Bei einer **Deletion** (del) fehlt ein Chromosomenstück vollständig. Ist das Ende des Chromosoms betroffen, spricht man von einer **terminalen Deletion**, bei Verlust eines Stücks im Innern des Chromosoms von einer **interstitiellen Deletion**. Die Deletion ist mit einer partiellen Monosomie verbunden.

Bekanntestes Beispiel ist das **Cri-du-chat-Syndrom** (46,XX,5p- bzw. 46,XY,5p-), das mit 1:25 000 auftritt. Typisches Symptom ist ein hoher monotoner Schrei während der ersten Lebensmonate. Hinzu kommen eine geistige Retardierung, Gesichtsdysmorphien, Minderwuchs und Herzfehler.

Sehr kleine Deletionen (**Mikrodeletionen**) sind heute auch bekannt, können aber durch normale Chromosomenanalyse kaum diagnostiziert werden. Klinisch kann man sie aber von monogenen Krankheitsbildern unterscheiden, da hierbei mehrere benachbarte Gene ausfallen (**Contiguous-gene-Syndrom**).

Ein Beispiel ist das **Williams-Beuron-Syndrom** (46,XX,del(7q11.2) bzw. 46,XY,del(7q11.2)). Die Kinder zeigen eine supralvalvuläre Aortenstenose, eine geistige Retardierung, Gesichtsdysmorphien (z.B. schmale Oberlippe, dicke Unterlippe) und einen Minderwuchs.

## Mendel'sche Gesetze

Die grundlegenden Gesetze der Vererbung wurden bereits 1865 von Gregor Mendel anhand von Kreuzungsversuchen mit Erbsen erkannt. Mendel ging davon aus, dass jede Eigenschaft, z.B. Form und Farbe der Erbse, durch genau ein Gen bestimmt wird (wenn er auch diesen Begriff noch nicht gebrauchte). Er erkannte auch bereits allein aufgrund seiner Beobachtungen, dass jeweils zwei Genkopien im Organismus vorliegen, von denen eine vom Vater und eine von der Mutter stammt. (Mit unserem heutigen Wissen über Chromosomen, Meiose und Befruchtung ist das natürlich klar.)

Weiterhin kann ein Gen in verschiedenen Varianten vorkommen, die **Allele** genannt werden. Liegen in einem Organismus beide Genkopien in derselben Form (selbes Allel) vor, so nennt man diesen **reinerbig (homozygot)**, sind die beiden Genkopien verschieden, so nennt man ihn **mischerbig (heterozygot)**.

Heute wissen wir: Auch wenn ein Organismus nur zwei verschiedene Allele haben kann, können in der Population als ganzes durchaus eine größere Zahl an Varianten von ein und demselben Gen vorkommen (**multiple Allelie**). Ein Beispiel sind etwa die Blutgruppen beim Menschen, von denen es mit A, B und 0 drei Allele gibt.

Vergleicht man die Allelsituation eines Organismus (**Genotyp**) mit seinem äußeren Erscheinungsbild (**Phänotyp**), so stellte Mendel fest, dass bei Heterozygoten meist ein Allel das andere überwiegt und allein für die Ausprägung des Merkmals maßgebend ist. Es wird als das **dominante Allel** bezeichnet im Gegensatz zum **rezessiven Allel**. Besitzt z.B. eine Erbse ein Allel für runde Form (R) und eines für runzelige Form (r), so ist sie mit dem Genotyp Rr rund und nicht von einer Erbse mit Genotyp RR zu unterscheiden; runzelige Erbsen treten nur beim Genotyp rr auf.

Der zweite Fall, den Mendel feststellte, war ein **intermediäres Verhalten** der Allele: Trägt eine Wunderblume ein Allel für rote Blütenfarbe (r) und eines für weiße Blütenfarbe (w), so ist die Blüte rosa und liegt somit genau in der Mitte zwischen rot (rr) und weiß (ww).

Diese Unterscheidung wird im Prinzip auch heute noch benutzt, wenn man auch einschränkend sagen muss, dass sich heute die Begriffe dominant und rezessiv nicht mehr ganz so streng aufrecht erhalten lassen. Intermediäre Erbgänge sind medizinisch irrelevant, allerdings gibt es eine ähnliche Form, die Bedeutung hat: Die Blutgruppen werden **kodominant** vererbt, d.h., Heterozygote mit den Allele A und B prägen beide Merkmale gleichermaßen aus.

Als 1. Mendel'sches Gesetz wird das **Uniformitätsgesetz** bezeichnet: Kreuzt man zwei homozygote Eltern, so zeigen alle Nachkommen einen einheitlichen Phänotyp.

Beispiel soll die Kreuzung von Erbsen sein, die jeweils homozygot Allele für runde Form (R) bzw. für runzelige Form (r) aufweisen.

RR × rr

Gameten	R	R	
r	Rr	Rr	100 % rund
r	Rr	Rr	

Das 2. Mendel'sche Gesetz ist das **Spaltungsgesetz**: Kreuzt man die uniformen Nachkommen untereinander, so erfolgt in der folgenden Generation eine Aufspaltung der Merkmale.

Rr × Rr

Gameten	R	r	
R	RR	Rr	75 % rund, 25 % runzelig
r	Rr	rr	

Das 3. Mendel'sche Gesetz ist das **Unabhängigkeitsgesetz**: Betrachtet man zwei verschiedene Merkmale, so werden diese unabhängig voneinander vererbt. (Heute muss man einschränken: ... wenn die Gene auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind.)

Beispiel soll hier die Kreuzung von Erbsen sein mit Allelen für runde (R) und runzelige (r) Form sowie gelbe (G) und grüne (g) Farbe sein.

RR GG × rr gg

Gameten	R G	R G	
r g	Rr Gg	Rr Gg	100 % rund/gelb
r g	Rr Gg	Rr Gg	

Rr Gg × Rr Gg

Gameten	R G	R g	r G	r g	
R G	RR GG	RR Gg	Rr GG	Rr Gg	56 % rund/gelb, 19 % rund/grün, 19 % runzelig/gelb, 6 % runzelig/grün
R g	RR Gg	RR gg	Rr Gg	Rr gg	
r G	Rr GG	Rr Gg	rr GG	rr Gg	
r g	Rr Gg	Rr gg	rr Gg	rr gg	

## Monogene Krankheitsbilder mit autosomal-dominantem Erbgang

Charakteristikum einer dominanten Erkrankung ist, dass bereits ein mutiertes Allel genügt, damit die Krankheit zum Ausbruch kommt.

Nun entstehen aber Erbkrankheiten durch den Ausfall eines Genprodukts bzw. seiner biologisch aktiven Form – nicht etwa, wie man vielleicht gerade bei dominanten Erkrankungen annehmen könnte, durch das Hinzukommen eines neuen, quasi „giftigen“ Genprodukts. Dies bedeutet, dass bei Heterozygoten nach wie vor eine funktionsfähige Genkopie vorliegt. Bei dominanten Erkrankungen ist es nun aber so, dass die von dieser Kopie allein produzierte Menge des Genprodukts nicht mehr ausreicht, dass also der Ausfall einer Kopie nicht kompensiert werden kann (**Haploinsuffizienz**).

Allerdings muss der Begriff „dominant“ im Mendel'schen Sinne etwas eingeschränkt werden: Zwar liegt bereits bei Hete-

rozygotie eine klinische Symptomatik vor, diese entspricht aber sicher noch nicht dem vollen Krankheitsbild. Dieses entsteht erst durch den vollständigen Ausfall des Genprodukts im homozygoten Zustand und ist weit schwerer. Teilweise stellt Homozygotie auch einen **Letalfaktor** dar, d.h., der Keim ist nicht lebensfähig und wird spontan abortiert.

Eine zweite Einschränkung ist die, dass auch ein eigentlich dominantes Allel nicht immer zwangsläufig auch zur Ausprägung kommen muss, bei manchen Krankheiten geschieht dies tatsächlich nur zu einem gewissen Prozentsatz, der als die **Durchschlagkraft (Penetranz)** des Allels bezeichnet wird. Außerdem kann auch der Phänotyp bei verschiedenen Betroffenen sich unterscheiden, häufig ist nur eine Teilsymptomatik vorhanden (**variable Expressivität**).

Sieht man jedoch von diesen Punkten ab und betrachtet den Erbgang einer dominanten Erkrankung nach den Mendel'schen Gesetzen, so kann man sagen, dass immer nur kranke Eltern auch kranke Kinder bekommen können, wenn es sich nicht um eine Neumutation handelt. Dabei sind bei autosomalen Erkrankungen Jungen und Mädchen gleichermaßen betroffen. Die Wahrscheinlichkeit für ein krankes Kind, wenn ein Elternteil von der Krankheit (heterozygot) betroffen ist, beträgt 50 %.

Beispiel für eine autosomal-dominante Erkrankung ist das **Marfan-Syndrom**, das mit einer Häufigkeit von 1:25 000 auftritt und durch einen Defekt im Fibrillin-Gen entsteht. Da dessen Produkt ein ubiquitärer Bestandteil des gesamten Bindegewebes ist, ist klar, dass sich die Krankheit nicht nur in einem einzelnen Merkmal zeigt, sondern sehr weitreichende Auswirkungen auf multiple Organe hat (**Pleiotropie**) Typisch für das Marfan-Syndrom sind Skelettanomalien wie ein übermäßiges Längenwachstum der Extremitäten, Spinnenfingrigkeit (Arachnodaktylie) mit positivem Daumen-Handgelenks-Zeichen, ein längliches, schmales Gesicht sowie eine Trichter- oder Hühnerbrust (Pectus excavatum bzw. carinatum). Typisch sind weiterhin Linsluxationen und Aortenaneurysmen.

Ein zweites Beispiel ist die **Neurofibromatose**, die etwa 1:3000 auftritt. Hier liegt ein Defekt im Neurofibromin vor, das eine Rolle bei der Signaltransduktion im Rahmen der Zellproliferation und -differenzierung spielt. Typische Symptome sind sog. Café-au-lait-Flecken auf der Haut sowie zahlreiche Neurofibrome am ganzen Körper, gutartige Tumoren aus Haut- und Nervengewebe. Die Patienten haben außerdem ein erhöhtes Risiko, an einem Hirntumor zu erkranken.

## Monogene Krankheitsbilder mit autosomal-rezessivem Erbgang

Bei rezessiven Erkrankungen kann im Gegensatz zu den dominanten der Ausfall einer Genkopie durch die andere kompensiert werden, d.h., zum Ausbruch der Krankheit sind zwei mutierte Genkopien nötig.

Allerdings muss man auch hier heute einschränken: Wenn man auf den ersten Blick gesunde Heterozygote genauer untersucht, kann man auch hier meist bereits eine diskrete Haploinsuffizienz nachweisen, z.B. bei der Phenylketonurie (s.u.) in Form eines leicht erhöhten Phenylalanin-Spiegels. Der Unterschied zwischen dominant und rezessiv ist also bei weitem nicht so scharf, wie Mendel ihn gesehen hat.

Sieht man hiervon ab, kann man sagen, dass anders als bei den dominanten Erkrankungen bei den rezessiven auch gesunde Eltern kranke Kinder bekommen können – sind beide heterozygot, so beträgt die Wahrscheinlichkeit für ein krankes Kind 25 %. Bekommt ein Betroffener Kinder, so sind diese im Gegensatz zu dominanten Erkrankungen aber nur betroffen, wenn auch vom Partner ein defektes Allel kommt.

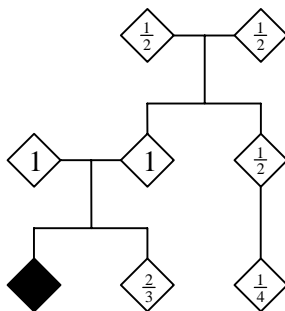
Die Risikoberechnung für ein krankes Kind spielt eine große Rolle in der genetischen Beratung. Als Beispiel soll hier die Phenylketonurie (s.u.) dienen, von der bekannt ist, dass die Heterozygotenfrequenz in der Bevölkerung 1:50 beträgt.

Die Wahrscheinlichkeit, dass zufällig zwei heterozygote Partner zusammenkommen, beträgt damit  $\frac{1}{50} \cdot \frac{1}{50} = \frac{1}{2500}$ . Da jedoch nach Mendel nur 25 % der Kinder das defekte Allel homozygot erhalten werden, beträgt das Risiko für ein krankes Kind in der Normalbevölkerung also  $\frac{1}{2500} \cdot \frac{1}{4} = \frac{1}{10000} = 0,01 \%$ .

Etwas anders sieht es aus, wenn eine Familie bereits ein krankes Kind hat. Hier müssen die Eltern zwangsläufig heterozygot sein. Wir wollen nun das Risiko für ein (gesundes) Geschwister des kranken Kindes berechnen, mit einem zufällig ausgewählten Partner ebenfalls ein krankes Kind zu bekommen. Dieses Geschwister kann entweder homozygot gesund sein oder heterozygoter Überträger der Krankheit. Nach Mendel ist die Wahrscheinlichkeit für Heterozygotie aber doppelt so groß, d.h., sie beträgt  $\frac{2}{3}$ . Die Wahrscheinlichkeit für eine Paarung mit einem ebenfalls heterozygoten Partner ist damit  $\frac{2}{3} \cdot \frac{1}{50} = \frac{1}{75}$ , bzw. die Wahrscheinlichkeit, ein krankes Kind zu bekommen  $\frac{1}{75} \cdot \frac{1}{4} = \frac{1}{300} = 0,3\%$ . Das Risiko ist damit zwar gegenüber der Normalbevölkerung erhöht, absolut betrachtet aber immer noch klein.

Noch einmal anders sieht es aus bei Verwandtenehen. In Deutschland sind diese zwar selten, in anderen ethnischen Kontexten aber durchaus nicht unüblich. So entstehen etwa im Bereich der Türkei häufiger Ehen zwischen Cousin und Cousine, im Bereich Indiens zwischen Onkel und Nichte.

Wir gehen davon aus, dass das Geschwister des kranken Kindes seinen Cousin bzw. seine Cousine heiratet.



Das Risiko, ebenfalls heterozygot zu sein, beträgt für den Cousin  $\frac{1}{4}$ . Damit ist die Wahrscheinlichkeit für ein krankes Kind  $\frac{2}{3} \cdot \frac{1}{4} \cdot \frac{1}{4} = \frac{1}{24} = 4,2\%$ . Dies ist nun ein Risiko, das wirklich als hoch betrachtet werden kann.

Ein Beispiel für eine autosomal-rezessive Erkrankung ist die **zystische Fibrose (Mukoviszidose)**, die 1:2000 auftritt. Hier liegt ein Defekt im CFTR vor, einem Cl<sup>-</sup>-Kanal in exokrinen Drüsen. Als Folge kommt es zu einem extrem zähflüssigen Sekret, v.a. in der Lunge und im Pankreas. In der Lunge führt dies zu einem Verkleben der Alveolen und damit zu einer Behinderung der Atmung, außerdem stellt der Schleim einen ständigen Nährboden für Pneumonien dar. Im Pankreas kann der Ausführungsgang verstopfen und es damit zu einer Pankreatitis einerseits und zu Verdauungsstörungen und fettigen Durchfällen andererseits kommen.

In 70 % der Fälle wird die zystische Fibrose durch die sog.  $\Delta F508$ -Mutation verursacht, eine Deletion eines Phenylalanin im Codon 508. Die Mutation führt zu einer Veränderung der Raumstruktur des CFTR-Proteins mit der Folge, dass es falsch erkannt und intrazellulär abgebaut wird. Diese Mutation ist im Prinzip für den „typischen“ Phänotyp der zystischen Fibrose verantwortlich.

Bei anderen Mutationen kann die Symptomatik aber auch etwas variieren. Ziemlich aus der Reihe fällt dabei eine bekannte Mutation im Spleiß-Akzeptor vor Exon 9, die dazu führt, dass Exon 8 direkt an Exon 10 gespleißt wird. Bei dieser Mutation nun funktionieren die exokrinen Drüsen vollkommen normal, hier liegt aber eine Aplasie des Ductus deferens vor, d.h., der (männliche) Patient ist unfruchtbar.

Ein zweites Beispiel für eine autosomal-rezessive Erkrankung ist die **Phenylketonurie**, die 1:10 000 (s.o.) auftritt. Hier liegt ein Defekt der Phenylalaninhydroxylase vor, sodass Phenylalanin nicht verstoffwechselt werden kann. Der hohe Phenylalaninspiegel bewirkt in den ersten Lebensmonaten im Gehirn eine Störung der Myelinisierung, die zu einer psychomotorischen Retardierung führt, die dann nicht mehr reversibel ist.

Da das Problem aber erst nach der Geburt entsteht, kann man die Phenylketonurie gut therapieren, nämlich durch eine strenge Phenylalanin-arme Diät. Voraussetzung ist natürlich, dass die Krankheit rechtzeitig erkannt wird. In Deutschland wird daher flächendeckend ein Screening aller Neugeborenen durchgeführt.

Die Diagnose ist beispielsweise über den **Guthrie-Test** möglich: Er basiert auf einer speziellen *Bacillus-subtilis*-Kultur, die nur in Anwesenheit von Phenylalanin wachsen kann. Zum Test wird dem Neugeborenen ein Tropfen Fersenblut entnommen und auf Filterpapier auf die Kultur gegeben; liegt ein erhöhter Phenylalaninspiegel vor, so kommt es zu einem Wachstum der Bakterien an dieser Stelle.

## Monogene Krankheitsbilder mit X-chromosomal-rezessivem Erbgang

Im Gegensatz zu den autosomal bedingten Krankheiten treten bei den X-chromosomalen deutliche Geschlechtsunterschiede auf. Männer sind hier benachteiligt, da sie nur eines statt zwei X-Chromosomen haben, man spricht von einer **Hemizygotie** der entsprechenden Gene. Damit genügt ihnen auch bei rezessiven Erkrankungen nur ein einziges defektes Allel, um zu erkranken. Frauen dagegen erkranken erst bei zwei defekten Genkopien.

Allerdings muss man auch hier heute wieder etwas einschränken: Tatsächlich haben ja auch Frauen immer nur ein X-Chromosom pro Zelle aktiviert. Da aber im statistischen Mittel in 50 % der Zellen das eine und in 50 % der Zellen das andere X-Chromosom inaktiviert ist, kommt dies normalerweise nicht zum Tragen.

Nun gibt es aber auch Fälle, in denen die X-Inaktivierung sehr ungleich in eine Richtung verschoben ist (**Skewed X-inactivation**). Wenn dabei ausgerechnet das funktionierende Allel inaktiviert wird, ist auch die Wahrscheinlichkeit sehr groß, dass dieses gerade in dem Gewebe fehlt, wo es gebraucht wird. Hier erkrankt also auch eine eigentlich heterozygote Frau an einer X-chromosomal rezessiven Erkrankung.

Sieht man hiervon ab, kann man jedoch sagen, dass praktisch nur Männer von X-chromosomal rezessiven Krankheiten betroffen sind. Bekommt nun ein betroffener Mann Kinder, so werden 50 % seiner Töchter Überträgerinnen, für seine Söhne erhöht sich aber das Risiko nicht gegenüber der Normalbevölkerung, denn diese bekommen von ihm ja das Y-Chromosom. Bekommt eine heterozygote Frau (**Überträgerin**) Kinder, so werden 50 % ihrer Töchter ebenfalls wieder Überträgerinnen und 50 % ihrer Söhne werden erkranken.

Beispiel für eine X-chromosomal rezessive Erkrankung ist die **Duchenne'sche Muskeldystrophie**, die 1:3000 aller neugeborenen Jungen trifft. (In immerhin einem Drittel der Fälle handelt es sich um eine Neumutation!) Bei der Krankheit liegt ein Defekt im Dystrophin vor, einem Zytoskelett-Protein der Muskelzelle, das zwischen den Aktinfilamenten und der Plasmamembran vermittelt. Der Defekt führt zum Untergang von Muskelzellen.

Die Krankheit manifestiert sich etwa ab dem 2. Lebensjahr durch eine progressive Muskelschwäche. Typisch ist etwa das Gowers-Zeichen: Beim Aufstehen vom Boden müssen die Kinder „an sich selbst hochklettern“, da ihnen ansonsten die nötige Kraft fehlt. Weiterhin zeigt sich als typisches Symptom eine Pseudohypertrophie der Wadenmuskulatur durch bindegewebigen Ersatz des Muskelgewebes, im Labor ist als Zeichen den Untergangs von Muskelzellen die Kreatinkinase (CK) erhöht.

Mit zehn Jahren sind die meisten Betroffenen auf einen Rollstuhl angewiesen, Atmungs- und Lungenprobleme führen meist zum Tod vor Erreichen des 25. Lebensjahrs.

## Monogene Krankheitsbilder mit X-chromosomal dominantem Erbgang

X-chromosomal dominante Erkrankungen betreffen sowohl Frauen als auch Männer, allerdings unterschiedlich schwer: Heterozygote Frauen können (bei halbwegs symmetrischer X-Inaktivierung) den Ausfall einer Genkopie wenigstens noch ein wenig kompensieren, bei Männern liegt dagegen stets ein vollständiger Ausfall vor.

Bekommt ein betroffener Mann Kinder, so werden alle seine Töchter krank sein, während für seine Söhne wiederum kein erhöhtes Risiko besteht. Bekommt eine (heterozygot) betroffene Frau Kinder, so trägt sowohl für Söhne als auch für Töchter das Risiko 50 %, die Krankheit zu erben.

Beispiel für eine X-chromosomal dominante Erkrankung ist etwa die **Vitamin-D-resistente Rachitis**, die allerdings nur selten auftritt. Dabei liegt eine Störung der renalen Phosphatrückresorption vor mit der Folge einer Hypophosphatämie. Als Reaktion wird Phosphat aus dem Knochen mobilisiert, was zum Krankheitsbild der Rachitis führt mit Verbiegung der langen Röhrenknochen und Minderwuchs.

Ein zweites Beispiel ist die **Incontinentia pigmenti**, die 1:75 000 aller neugeborenen Mädchen (!) betrifft. Die Krankheit führt pränatal zu schweren entzündlichen Hautläsionen, von denen Jungen am ganzen Körper betroffen sind, was einen Letalfaktor darstellt, d.h., alle betroffenen männlichen Keime werden spontan abortiert. Mädchen dagegen sind nur an den Stellen betroffen, wo das X-Chromosom mit dem funktionierenden Allel inaktiviert wurden. Sie sind lebensfähig, nach der Geburt verheilen die Läsionen in den ersten Lebensmonaten und lassen nur noch eine Hyperpigmentierung zurück. Interessant ist dabei das Muster, das die Läsionen zeigen: Sie verlaufen streifenförmig über den Körper (**Blaschko-Linien**) und zeigen damit, dass die Entwicklung der Zellen (nach der X-Inaktivierung) immer einem bestimmten Muster folgt.

## Phänokopie

Als Phänokopie bezeichnet man eine Erkrankung, die im Phänotyp einer Erbkrankheit gleicht, tatsächlich aber auf eine exogene Noxe (**Teratogen**) während der Entwicklung zurückzuführen ist. Die Klärung, ob eine erbliche Krankheit oder eine Phänokopie vorliegt, kann für den Betroffenen sehr wichtig sein: Bei einer Phänokopie besteht kein gegenüber der Normalbevölkerung erhöhtes Risiko, ein Kind mit derselben Krankheit zu bekommen.

Die hauptsächliche Gefahr einer teratogenen Schädigung besteht in der 3.–9. Entwicklungswoche (Embryonalzeit). Vor der Embryonalzeit (Blastozyste) passiert entweder gar nichts oder aber es kommt gleich zum Spontanabort, nach der Embryonalzeit (Fetalzeit) bleiben die Auswirkungen einer eventuellen Schädigung gering, da die Organentwicklung weitestgehend abgeschlossen ist.

Ein Beispiel ist die **Chondrodysplasia punctata**, eine Störung der Knorpelbildung. Sie manifestiert sich in Fehlbildungen etwa der Nasenflügel, insbesondere aber auch des Skeletts (v.a. an Hand und Fuß), das ja aus einem Knorpelmodell hervorgeht. Typisch sind dabei auch punktförmige Verkalkungen im Knorpel, z.B. an den Epiphysen.

Die Chondrodysplasia punctata kann dabei sowohl auf eine X-chromosomal dominante Erbkrankheit zurückzuführen sein als auch auf eine Therapie mit Antikoagulantien vom Cumarin-Typ während der Schwangerschaft.

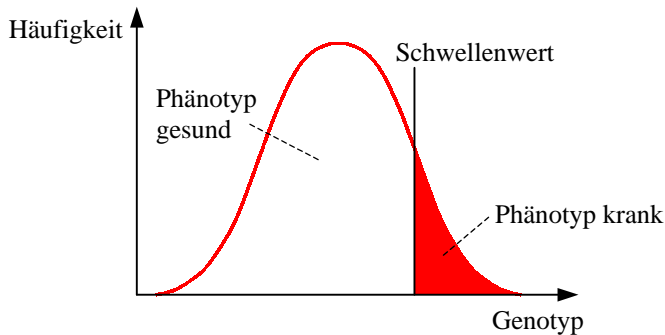
## Multifaktorielle Vererbung

Die monogenen Erkrankungen machen insgesamt nur 3–5 % aller Krankheiten aus. Der weitaus größere Teil entsteht – wie allgemein die meisten Eigenschaften – durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Gene und auch noch durch Beeinflussung durch Umweltfaktoren. Dabei kann der Einfluss von Genen und Umweltfaktoren ganz unterschiedlich ausfallen: Manche Merkmale werden praktisch ausschließlich genetisch determiniert, manche praktisch ausschließlich durch die Umwelt, manche stehen in der Mitte.

Beispiele für solche multifaktoriellen Eigenschaften sind etwa Körpergröße, Gewicht oder Intelligenz, bei den Krankheiten Diabetes mellitus, Hypertonie oder psychiatrische Erkrankungen.

Typisch für all diese Beispiele ist, dass es Phänotypen in sämtlichen Abstufungen gibt, die Häufigkeit folgt dabei einer Gauß'schen Normalverteilung.

Nun gibt es aber gerade bei Krankheiten auch zahlreiche Beispiele, bei denen zwar der Genotyp gemäß der Gauß'schen Normalverteilung variiert, die Krankheit selbst aber nicht: So kommt beispielsweise eine **Lippen-Kiefer-Gaumenspalte** entweder vor oder eben nicht, es gibt keine Fälle dazwischen, quasi mit Einkerbungen im Millimeterbereich. Offensichtlich ist hier eine gewisse Anzahl mutierter Allele nötig, um die Krankheit zum Ausbruch zu bringen, darüber ist sie aber stets voll ausgeprägt (**Schwellenwert**).



Interessant dabei ist, dass der Schwellenwert teilweise auch Geschlechtsunterschiede zeigt. So betrifft z.B. die **kongenitale Hüftluxation** v.a. Mädchen, die **Pylorusstenose** dagegen v.a. Jungen.

Die Risikoberechnung bei multifaktoriellen Krankheitsbildern gestaltet sich komplizierter als bei den monogenen. Zwar gelten auch hier natürlich für jedes einzelne Gen die Mendel'schen Regeln, insgesamt ist das Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren aber viel zu komplex, um diese auch in der Praxis anwenden zu können.

Vielmehr basiert die Risikoberechnung hier auf empirischen Beobachtungen und daraus abgeleiteten statistischen Betrachtungen. So hängt das Wiederholungsrisiko für ein krankes Kind etwa davon ab, wie viele Personen in der Familie bereits betroffen sind und wie nah diese miteinander verwandt sind.

Insgesamt kann man jedoch davon ausgehen, dass das Wiederholungsrisiko wesentlich geringer ist als bei monogenen Krankheitsbildern, selten höher als 5–10 % (während ja das Wiederholungsrisiko bei dominanten monogenen Leiden 50 %, bei rezessiven 25 % beträgt).

## Populationsgenetik

Die Populationsgenetik beschäftigt sich mit der Verteilung von Allelen im Genpool einer Population. Gemäß dem **Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Hardy-Weinberg-Äquilibrium)** kann man dabei in einer „idealen Population“ davon ausgehen, dass die Häufigkeiten der Allele eines Gens über die Generationen hinweg konstant bleiben. Auch ein rezessives Allel, das homozygot mit schweren Nachteilen verbunden ist, wird im Genpool erhalten bleiben, da es in weit größerer Anzahl in Heterozygoten vorliegt.

(Eine interessante Konsequenz daraus ist, dass jeder Versuch von Eugenik fehlschlagen muss und unsinnig ist – ganz abgesehen davon, dass er natürlich ethisch nicht zu rechtfertigen ist. Selbst, wenn man alle Erbkranken sterilisiert oder gar tötet, wird dadurch die Krankheit nicht verschwinden!)

Die Allelhäufigkeit im Hardy-Weinberg Gleichgewicht wird durch zwei einfache Formeln angegeben: Zunächst gilt für die Gesamthäufigkeit zweier Allele p und q im Genpool  $p + q = 1$ . Weiterhin gilt für die Häufigkeiten der einzelnen Genotypen  $(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1$ , wobei  $p^2$  und  $q^2$  die Häufigkeiten der homozygoten Genotypen angeben,  $2pq$  die Häufigkeit für Heterozygotie.

Dies ist nun auch medizinisch interessant. Als Beispiel soll die **Heterozyotenfrequenz** der Phenylketonurie bestimmt werden. Die Krankheit tritt mit einer Häufigkeit von 1:10 000 auf, d.h.  $q^2 = \frac{1}{10000}$  bzw.  $q = \frac{1}{100}$ . Wegen  $p + q = 1$  und  $q \ll 1$  gilt (für alle Erbkrankheiten) näherungsweise  $p \approx 1$ . Die Heterozyotenfrequenz beträgt also  $2pq = 2 \cdot 1 \cdot \frac{1}{100} = \frac{1}{50} = 2\%$ .

Das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht gilt jedoch wie gesagt streng genommen nur für eine „ideale Population“. Tatsächlich kann die konstante Häufigkeitsverteilung der Allele durch verschiedene Faktoren gestört werden.

Tritt ein **Selektionsvorteil** für ein Allel ein, so wird sich die Allelhäufigkeit verschieben und sich ein neues Gleichgewicht einstellen. Ein interessanter Punkt hierbei ist, dass wohl teilweise auch Heterozygotie einen Selektionsvorteil darstellt. Die Sichelzellanämie ist z.B. im homozygoten Zustand mit einer schweren Krankheit verbunden, Heterozygote sind jedoch vor Malaria geschützt. Dies führt dazu, dass im Mittelmeerraum die Häufigkeit des „defekten“ Allels deutlich höher ist als in unseren Breiten. Ein ähnlicher Effekt wird z.B. auch bei der zystischen Fibrose diskutiert, die bei uns im Vergleich mit anderen Gebieten relativ häufig vorkommt und die einen Schutz vor Durchfallerkrankungen darstellen soll.

Aufgrund dieser regionalen Unterschiede hat auch die Vermischung mit Angehörigen einer anderen Bevölkerungsgruppe einen Einfluss auf das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. Dadurch können auch neue Allele in den Genpool eingeführt werden (**Gründereffekt, Founder-Effekt**). Dieser Effekt war z.B. gut nachweisbar bei den Immigrationswellen in die USA.

Eine weitere Voraussetzung für das Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ist die **Panmixie**, d.h., jede Partnerkombination muss gleich wahrscheinlich sein. In der Realität ist dies jedoch stark eingeschränkt, da die Partnerwahl eben nicht zufällig erfolgt. Stattdessen wählen wir i.d.R. einen Partner aus, der von uns selbst nicht allzu stark abweicht, z.B. in Bezug auf die Intelligenz.

Schließlich kann auch eine Veränderung der Mutationsrate des Gens das Gleichgewicht verschieben.

## Mutationen

Als Mutation bezeichnet man allgemein die spontane Veränderung des Erbmateri als. Dabei ist von großer Bedeutung, in welchen Zellen eine Mutation stattfindet: **Keimbahnmutationen** entstehen im Rahmen der Keimzellenentwicklung; die Mutation betrifft damit zum einen alle Zellen des Nachkommens und sie wird fortan (gemäß den Mendel'schen Regeln) von Generation zu Generation weiter vererbt. **Somatische Mutationen** entstehen dagegen in Körperzellen; sie bleiben damit zum einen auf das Individuum und zum anderen auch auf den Gewebsverband beschränkt.

Man unterscheidet verschiedene Typen von Mutationen: Als **Genommutationen** bezeichnet man die numerischen Chromosomenaberrationen, als **Chromosomenmutationen** die strukturellen Chromosomenaberrationen, als **Genmutationen** die Veränderung eines einzelnen Gens auf DNA-Ebene. Ist bei der Genmutationen nur eine einzelne Base verändert, so spricht man auch von einer **Punktmutation**.

Die häufigste Mutation ist dabei die **Substitution** einer Base. Als **Transition** bezeichnet man dabei den Austausch einer Purinbase gegen eine andere Purinbase bzw. einer Pyrimidinbase gegen eine andere Pyrimidinbase, als **Transversion** den Austausch einer Purinbase gegen eine Pyrimidinbase bzw. umgekehrt.

Die Substitution kann mit sehr unterschiedlichen Konsequenzen verbunden sein: So hat etwa eine Substitution der Wobble-Base mit keinerlei Auswirkungen auf das gebildete Protein und wird als **stumme Mutation** bezeichnet.

Führt die Substitution dagegen Austausch einer Aminosäure im Produkt, spricht man von einer **Missense-Mutation**. Hat die substituierte Aminosäure ähnliche Eigenschaften wie die ursprüngliche, so ist jedoch auch hier eine biologische Konsequenz unwahrscheinlich (**konservative Missense-Mutation**), bei einer Aminosäure mit stark unterschiedlichen Eigenschaften besteht jedoch auch durchaus bereits bei nur einer Aminosäure die Möglichkeit einer deutlichen Beeinträchtigung durch eine Konformationsänderung des Proteins (**nicht-konservative Missense-Mutation**). Beispiel ist hier etwa die Si-

chelzellanämie, die meist durch Substitution von Glutamat gegen Valin im Codon 6 der  $\beta$ -Kette des Hämoglobins entsteht. Entsteht durch die Substitution ein Stopp-Codon, spricht man von einer **Nonsense-Mutation**; hier ist praktisch immer mit biologischen Folgen zu rechnen.

Eine zweite Möglichkeit der Genmutation neben der Substitution ist die **Insertion** oder die **Deletion** entweder einer einzelnen Base (Punktmutation) oder auch eines größeren Bereichs im Gen. Das Problem hierbei liegt darin, dass außer bei Insertion bzw. Deletion vollständiger Triplets eine **Leserasterverschiebung (Frameshift)** stattfindet, d.h., die gesamte folgende Aminosäuresequenz wird verändert und meist tritt dann auch recht bald ein Stopp-Codon auf. Frameshift-Mutationen sind somit ebenfalls Nonsense-Mutationen.

Ein weiterer Typus der Genmutation ist die **Trinukleotidexpansion**, die z.B. bekannt ist bei der Chorea Huntington, einer autosomal-dominant vererbten progredienten Erkrankung des Gehirn, die zum vollständigen Verlust von motorischer Kontrolle und intellektuellen Fähigkeiten führt, oder beim fragilen X-Syndrom, der häufigsten Form von erblichem Schwachsinn bei Männern. Ort der Veränderung im Erbgut sind bei diesen Erkrankungen Trinukleotidrepeats in einem Gen oder auch in Gennähe, deren Anzahl auch bei Gesunden innerhalb einer gewissen Bandbreite variiert. Kommt es jedoch zu einer Amplifikation darüber hinaus, wird das Gen instabil und die Anzahl der Repeats nimmt mit jeder Zellteilung explosionsartig immer weiter zu (**dynamische Mutation**). Ein typisches Charakteristikum einer solchen Mutation ist daher auch, dass die Krankheit im Laufe der Generationen immer schlimmer wird (**Antizipation**).

Zur Entstehung von Mutationen: Die meisten Mutationen entstehen einfach als Fehler in der Chromosomenverteilung oder der DNA-Replikation bei Mitose oder Meiose (**Spontanmutation**). Da jedoch ein komplexes DNA-Reparatursystem existiert, werden die meisten Fehler sofort wieder korrigiert. Übrig bleibt eine **Mutationsrate** von ca.  $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$  pro Gen und Generation. Zwischen verschiedenen Genen existieren hier durchaus beträchtliche Unterschiede, deren Ursache aber unklar ist. Aber dadurch kann man z.B. davon ausgehen, dass es sich beim Apert-Syndrom zu 95 % um Neumutationen handelt, bei der Chorea Huntington aber zu 99 % um vererbte Fälle.

Die Mutationsrate nimmt im Alter für manche Gene zu. Wenn daher ältere Männer Kinder bekommen, steigt im Prinzip das Risiko für bestimmte monogene Erbkrankheiten. In der Praxis spielt dieser Effekt allerdings kaum eine Rolle, ganz im Gegensatz zur Abhängigkeit chromosomaler Aberrationen vom Alter der Mutter.

Neben den Spontanereignissen können Mutationen aber auch durch exogene Noxen (**Mutagene**) ausgelöst werden, z.B. durch **ionisierende Strahlung** (radioaktive und Röntgenstrahlung). Sie wirkt indirekt, nämlich durch Bildung von Radikalen, die dann mit der DNA reagieren und z.B. zu Doppelstrangbrüchen führen.

Theoretisch kann zwar jede noch so kleine Strahlenexposition Mutationen verursachen, als Faustregel kann man aber davon ausgehen, dass sich statistisch erst bei einer Strahlendosis von 1 Sv die Mutationsrate verdoppelt. Die jährliche Strahlenexposition des Menschen beträgt gerade einmal ca. 3,5 mSv, davon zwei Drittel aus natürlichen Quellen. Daran wird deutlich, dass die Anwendung ionisierender Strahlung in der medizinischen Diagnostik (Röntgen, Szintigrafien, ...) letztlich so gut wie gar kein Risiko darstellt und von der Öffentlichkeit stark überschätzt wird.

**UV-Strahlung** als nicht-ionisierende Strahlung wirkt direkt an der DNA. Die Elektronen im aromatischen Ringsystem der Basen absorbieren UV-Strahlung mit einem Maximum bei 260 nm Wellenlänge. Derart angeregt können sie daraufhin mit benachbarten Basen reagieren, sodass sich z.B. Thymin-Dimere oder Thymin-Cytosin-Querverbindungen bilden. Dadurch werden auch die Wasserstoffbrückenbindungen zum komplementären Strang beeinflusst und als Folge werden bei der DNA-Replikation falsche Basen eingebaut.

Chemische Mutagene sind z.B. **Alkylantien** wie Nitrosamine, die zu einer Methylierung oder Ethylierung der Basen führen. Auf diese Weise kann z.B. aus Guanin das  $O^6$ -Methylguanin entstehen, das nicht mehr mit Cytosin, sondern mit Thymin paart und somit ebenfalls bei der Replikation zu einer Basensubstitution führt.

Die Überprüfung der Mutagenität eines Stoffs kann durch verschiedene Methoden erfolgen: Im **Dominant-Letaltest** setzt man Mäuse der Noxe aus und nimmt die Zahl der abgestorbenen Embryonen als Maß für die Mutagenität. Im **Ames-Test** benutzt man mutierte Bakterienstämme, die z.B. auf Nährböden ohne Histidin nicht wachsen; ist der zu testende Stoff mutagen, wird er auch Rückmutationen auslösen, sodass es zu einem Bakterienwachstum kommen wird. An Zellkulturen kann man durch Mutagene entstehende Chromosomenstörungen schließlich auch direkt nachweisen.

## DNA-Reparatur

Mutationen entstehen ständig spontan im gesamten Genom. Um daraus resultierende Schäden zu verhindern, existiert auch ein sehr komplexes DNA-Reparatursystem, das praktisch auf alle möglichen Fehler vorbereitet ist und diese meist auch wieder spurlos korrigiert.

Ein relativ einfaches System, das sich bereits bei Bakterien findet, ist die sog. **Fotoreaktivierung**. Dabei beseitigt ein spezielles Enzym die durch UV-Strahlung induzierten Pyrimidin-Dimere. Beim Menschen spielt dieses System jedoch wohl kaum eine Rolle, hier ist das wesentliche System zur Beseitigung von Einzelstrangdefekten die Exzisionsreparatur.

Dabei kann man zwei verschiedene Systeme unterscheiden, die jeweils von einer Vielzahl verschiedener Faktoren bewerkstelligt werden:

Die **Nukleotidexzisionsreparatur** beseitigt die „groben“ DNA-Schäden wie die besagten Pyrimidin-Dimere. Der Schaden wird dabei erkannt durch das sog. XPC-Protein, das daraufhin zwei Endonukleasen aktiviert: Die XPG-Endonuklease spaltet den betroffenen Einzelstrang in 3'-Richtung präzise im Abstand von 5 bp ein, die XPF-Endonuklease in 5'-Richtung im Abstand von 24 bp. Das dazwischen liegende Stück mitsamt dem DNA-Schaden kann so entfernt werden, die Lücke wird anschließend von einer DNA-Polymerase anhand der Vorlage des unbeschädigten Gegenstrangs aufgefüllt und eine DNA-Ligase verbindet das neu gebildete Stück mit dem alten Strang.

Fällt einer der Faktoren der Nukleotidexzisionsreparatur aus, entsteht das Krankheitsbild der **Xeroderma pigmentosum**. Die Patienten sind extrem anfällig gegenüber UV-Strahlung und bekommen an allen dem Tageslicht exponierten Körperbereichen sehr schnell eine trockene und pigmentierte Haut mit einem stark erhöhten Hautkrebsrisiko.

Das zweite System der Einzelstrangreparatur ist die **Basenexzisionsreparatur**, die die „kleineren“ Schäden, d.h. chemisch veränderte oder falsch gepaarte Basen korrigiert. Hier spaltet zunächst eine spezifische Glykosylase die fehlerhafte Base vom Nukleotid ab. Anschließend entfernt eine sog. A-Purin- bzw. A-Pyrimidin-Endonuklease den basenlosen Zucker, woraufhin eine DNA-Polymerase das fehlende Nukleotid ersetzt und eine DNA-Ligase die Lücken schließen kann.

Nukleotidexzisionsreparatur und Basenexzisionsreparatur finden im Grunde immer statt, arbeiten jedoch in einer ruhenden Zelle nur sehr ineffektiv. Bei der Transkription von Genen (**transkriptionsgekoppelte Reparatur**) und nach der Replikation der DNA (**Basenfehlpaarungsreparatur, Mismatch-Reparatur**), bei denen es auf die Richtigkeit des Erbguts besonders ankommt, werden jedoch zusätzlich noch weitere Faktoren aktiviert, die Schäden erkennen können und daraufhin dann wiederum die Nukleotid- oder Basenexzisionsreparatur spezifisch an dieser Stelle aktivieren.

Ein Ausfall in der transkriptionsgekoppelten Reparatur führt zum **Cockayne-Syndrom**, bei dem die Transkription gestört ist und man eine erhöhte Apoptose-Rate findet. Die Krankheit äußert sich in einer geistigen Retardierung, in Minderwuchs, Infektanfälligkeit und Gesichtsdysmorphien (Mikrozephalie, Hakennase).

Ausfälle in der Mismatch-Reparatur stehen in Verbindung mit dem hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom.

Neben dem Einzelstrangreparatursystem existiert auch ein System, das Doppelstrangbrüche beseitigt, wie sie etwa durch ionisierende Strahlung verursacht werden.

Ein sehr effizienter Mechanismus ist die **homologe Rekombination**, die jedoch nur stattfinden kann nach erfolgter DNA-

Replikation, wenn zwei Schwesterchromatiden vorhanden sind. Dann wird das intakte Chromatid als Matrize benutzt, um den defekten Bereich neu synthetisieren zu können. Dadurch kann der Schaden restlos beseitigt werden. Ausfälle in diesem System stehen in Verbindung mit dem erblichen Brustkrebs.

Existieren keine zwei Schwesterchromatiden, kann nur eine **Verknüpfung nicht-homologer Enden** erfolgen, d.h., die DNA-Fragmente werden mehr oder weniger zufällig wieder zusammengefügt. Hierbei kann es jedoch zu Veränderungen der Erbinformation kommen.

## Imprinting

Als Imprinting bezeichnet man ein Phänomen, das für ca. 30–40 Gene bekannt ist, bei denen die Genaktivität abhängig davon ist, ob das Gen vom Vater oder von der Mutter kommt. So gibt es Gene, die ausschließlich in der paternalen Kopie aktiv sind, und Gene, die ausschließlich in der maternalen Kopie aktiv sind.

Einen ersten Hinweis darauf, dass Gen nicht immer gleich Gen ist, lieferten Experimente an Mäusezygoten, die so manipuliert wurden, dass sie statt der normalen Situation entweder zwei Vorkerne aus Eizellen oder aber zwei Vorkerne aus Spermien enthielten. In beiden Fällen war der Keim nicht lebensfähig, wobei sich bei einem ausschließlich maternalen Genom keine Plazenta entwickelte und bei einem ausschließlich paternalen Genom der Embryo selbst nur rudimentär blieb.

Mittlerweile kennt man auch einige Krankheiten beim Menschen, bei denen Imprinting-Prozesse eine Rolle spielen.

Das **Prader-Willi-Syndrom** entsteht durch einen Funktionsverlust eines noch unbekanntes Gens auf Chromosom 15q11 in der väterlichen Kopie. Die betroffenen Kinder fallen zunächst nach der Geburt durch eine ausgeprägte Muskelhypotonie auf. Ab dem 2.–3. Lebensjahr treten dann Fressattacken auf, die zu einer starken Adipositas führen. Weiterhin sind die Kinder geistig retardiert.

Beim **Angelman-Syndrom** ist es dagegen ein mütterliches Gen, das ausfällt, nämlich das UBE3A-Gen, das ganz in der Nähe auf Chromosom 15q12 liegt. Die Patienten zeigen eine schwere geistige Retardierung, eine Ataxie und fallen durch unmotiviert Lachattacken auf.

Die Inaktivierung einer Genkopie in Abhängigkeit der Herkunft erfolgt durch epigenetische Prozesse, d.h., v.a. durch DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung. Offenbar ist dabei typisch, dass mehrere dem Imprinting unterliegende Gene als Cluster vorliegen (wie beim Prader-Willi-Syndrom und Angelman-Syndrom) und es davor ein sog. **Imprinting center** gibt, das die Inaktivierung steuert. Der genaue Mechanismus ist aber noch unklar.

Bekannt ist jedoch, dass das Imprinting während der Gametogenese geschieht. Dabei wird zunächst die vorhandene Inaktivierung aufgehoben, d.h., nun sind beide Genkopien aktiv. In der Eizellenbildung werden anschließend Gene wie das für das Prader-Willi-Syndrom verantwortliche Gen vollständig auf beiden Chromosomen inaktiviert, in der Spermatogenese entsprechend Gene wie das UBE3A-Gen.

Für die Krankheiten, bei denen Imprinting eine Rolle spielt, sind verschiedene Pathmechanismen denkbar: In den meisten Fällen liegt eine Deletion des verantwortlichen Gens vor: Wenn z.B. beim Angelman-Syndrom die UBE3A-Kopie von der Mutter fehlt, dann nutzt auch die eigentlich intakte Kopie des Vaters nichts, da diese ja inaktiviert ist.

Ein anderer Fall ist eine **uniparentale Disomie**, d.h., beide Chromosomen und damit auch Genkopien stammen vom selben Elternteil. Eine solche Situation kann entstehen, wenn in der Zygote ursprünglich eine Trisomie vorliegt, der Embryo dann aber eines der Chromosomen beseitigt.

Sowohl die Deletion als auch die uniparentale Disomie sind i.d.R. sporadische Ereignisse während der Meiose, d.h., für die Eltern besteht nur ein geringes Wiederholungsrisiko, noch ein zweites krankes Kind zu bekommen.

Daneben gibt es aber auch Fälle, in denen Punktmutationen im Imprinting center oder im entsprechenden Gen selbst für die

Krankheit verantwortlich sind. In diesen Fällen besteht ein Wiederholungsrisiko gemäß den Mendel'schen Regeln: Ist z.B. eine Frau (asymptomatische) Überträgerin einer UBE3A-Mutation, so werden 50 % ihrer Kinder am Angelman-Syndrom erkranken. Ist ein Mann Überträger, wird er dagegen nur gesunde Kinder bekommen, von den Kindern seiner Töchter werden aber 25 % am Angelman-Syndrom erkranken.