

Der Weg zum ersten rekombinanten Wirkstoff

Rossana De Lorenzi
Christina Gritti

Insulin

Deutsche
Version

ELLS – European Learning Laboratory for the Life Sciences



Rossana De Lorenzi und Christina Gritti



Der Weg zum ersten rekombinanten Wirkstoff

Insulin

Ein Gemeinschaftsprojekt von:

EMBL  ELLS - European Learning Laboratory for the Life Sciences

 CUSMIBio
Centro Università di Milano -
Scuola per la diffusione delle bioscienze

Vorwort



In den Bereichen der Prävention, Linderung und Heilung von Krankheiten sind im Laufe des letzten Jahrhunderts enorme Fortschritte erzielt worden. Diese Entwicklungen lassen sich auf Erfolge in Molekularbiologie und Gentechnik zurückführen. Eines der besten Beispiele dafür, wie Erkenntnisse und Anwendungen dieser naturwissenschaftlichen Disziplinen gemeinsam zur erfolgreichen Behandlung einer Krankheit geführt haben, ist das **Insulin**. Mit der Entdeckung und Isolierung dieses Hormons durch Banting und Best wurde im Jahre 1921 der Weg frei für die Entwicklung einer Therapie, die zahlreichen Diabetespatienten das Leben gerettet hat. Als erstes Protein wurde 1951 das Insulin sequenziert – ein bedeutender Wendepunkt der Molekularbiologie. 1976 war Insulin wegbereitend als erster rekombinanter Wirkstoff, der mit Hilfe neuer gentechnischer Methoden gewonnen und zur Behandlung von Menschen eingesetzt wurde. Fünf Wissenschaftlern wurde für ihre Forschungsarbeit in Zusammenhang mit Insulin der Nobelpreis verliehen.

Die vorliegende Lehrereinheit zeichnet mit Hilfe von IT-Tools die pharmazeutische Geschichte des Insulins nach. Auf eine Beschreibung der Eigenschaften des Hormons folgt eine Darstellung der unterschiedlichen Typen des Diabetes. Zur Behandlung von Diabetes sind im Laufe der Geschichte zwei Ansätze verfolgt worden, die eine Insulintherapie erforderlich machen:

- Anfänglich wurde das Insulin aus Schlachtvieh (Schweinen oder Rindern) extrahiert. Mit Hilfe **bioinformatischer Tools** werden wir die Proteinsequenz verschiedener tierischer Insuline vergleichen, um herauszufinden, welches der menschlichen Isoform des Hormons am nächsten verwandt und somit für die Behandlung von Diabetes am besten geeignet ist.
- In neuester Zeit ist man zur Produktion von rekombinantem Humaninsulin übergegangen. Hier werden wir – nach Erklärungen zu den bedeutendsten gentechnischen Fortschritten, die in diesem Wirkstoff Anwendung finden – die Lernenden in einem **Laboreinsatz** durch die wichtigsten Etappen der Herstellung von rekombinantem Humaninsulin begleiten.

Inhaltsübersicht



	1 Insulin	6
	1.1 Eine kurze Geschichte der Entdeckung des Insulins	6
	1.2 Die Produktion von Insulin	7
	1.3 Die Struktur des Insulins	9
	1.4 Wirkungsmechanismen des Insulins	10
	1.5 Die Regulierung der Insulinproduktion	11
	1.6 Insulin in anderen tierischen Organismen	13
	2 Diabetes mellitus	14
	2.1 Klassifikation	14
	2.2 Epidemiologie	14
	2.3 Pathophysiologie	14
	2.3.1 Insulinresistenz	14
	2.3.2 Typ-1-Diabetes	15
	2.3.3 Typ-2-Diabetes	15
	2.4 Diagnose	16
	2.4.1 Symptome	16
	2.4.2 Vorsorge	16
	2.5 Behandlung	17
	2.6 Folgeschäden	17
	3 Klassische Diabetestherapie	19
	3.1 Behandlung mit tierischem Insulin	19
	Lernheit I – Bioinformatik	20
	AI.1 Wichtigste Internetquellen	20
	www.expasy.org	20
	http://workbench.sdsc.edu	21
	www.ncbi.nlm.nih.gov	21
	AI.2 Auffinden der Proteinsequenz des Insulins	21
	AI.3 Vergleich der Proteinsequenzen	24
	AI.4 Visualisierung der Raumstruktur	32



	4	Behandlung mit rekombinantem Insulin	37
	4.1	Rekombinantes Insulin:Entwicklungsstufen.....	37
	4.1.1	Restrictionsenzyme	37
	4.1.2	Ligasen	37
	4.1.3	Klonen.....	38
	4.1.4	Rekombinante DNA-Technologie.....	38
	4.2	Synthese menschlichen rekombinanten Insulins	40
	4.2.1	Die Genentech-Strategie	40
	4.2.2	Die Biogen-Strategie	40
	4.3	Herstellung von rekombinantem Insulin.....	40
	4.3.1	Insulin aus Bakterien.....	41
	4.3.2	Insulin aus der Hefe	43
		Lerneinheit II – Molekularbiologie	45
	All.1	Einführung	45
	All.2	Versuchsprotokoll	46
	All.3	Reagenzien und Geräte	51
	All.3.1	Reagenzien für die Durchführung dieser Lerneinheit.....	51
	All.3.2	Materialien und Lösungen für die Durchführung der Lerneinheit	52
	All.3.3	Geräte für die Durchführung der Lerneinheit.....	52
	All.4	Allgemeine Vorschriften zur Arbeitssicherheit im Labor.....	53
	All.4.1	Allgemeine Vorschriften.....	53
	All.4.2	Sicherheitsvorschriften für den Einsatz elektrischer Geräte.....	53
	All.4.3	Sicherheitsvorschriften für den Umgang mit toxischen Substanzen.....	54
	All.4.4	Sicherheitsvorschriften für den Umgang mit biologischen Materialien	54
	All.4.5	Sicherheitsvorschriften für den Umgang mit UV-Strahlen	54
	All.4.6	Sicherheitsvorschriften für den Einsatz von Zentrifugen	55
	All.4.7	Einsatz der Mikrowelle	55
	All.4.8	Einsatz des Elektrophorese-Apparats	56
		Anhang I.....	57
		Anhang II.....	61
		Anhang III	62
	5	Bibliographie und Referenzen.....	69

1 Insulin

Das Insulin ist ein Eiweißhormon. Seine Bezeichnung ist vom lateinischen „insula“ (= Insel) abgeleitet, da das Insulin von Gruppen endokriner (innersekretorischer) Zellen im Pankreas (Bauchspeicheldrüse), den sogenannten Langerhans-Inseln (auch: Langerhanssche Inseln) ausgeschüttet wird. Insulin befördert allgemein den Traubenzucker-(Glucose-)Stoffwechsel, indem es die Glykolyse in Gang setzt; es fördert die Glucoseanreicherung in Form von Glycogen in der Leber und begünstigt die Fettspeicherung.

1.1 Eine kurze Geschichte der Entdeckung des Insulins

Im Jahre 1869 entdeckte der junge Medizinstudent **Paul Langerhans** bei der Untersuchung des Aufbaus der Bauchspeicheldrüse über das Organ verteilte kleine Bereiche durchsichtiger Zellen (Langerhans-Inseln). Seit jener Zeit versuchen Forscher die Funktion dieser Zellen zu ergründen. Man glaubte, sie produzierten ein Sekret, das an der Verdauung beteiligt sei.

1889 stellten **Oscar Minkowski** und **Joseph von Mering** fest, dass Hunde, denen sie die Bauchspeicheldrüse entfernt hatten, an Diabetes erkrankten. Diese Drüse, und insbesondere die Langerhans-Inseln (wie später, im Jahre 1901, **Eugène Opie** herausfand), spielten somit offensichtlich eine Rolle bei der Regulierung des Blutzuckerspiegels.

In den darauf folgenden Jahren wurden mehrere Versuche unternommen, das Sekret der Langerhans-Inseln zu isolieren. Erst 1920 jedoch gelang es **Frederick Banting** nach der Lektüre eines Artikels von Minkowski, hierfür eine Methode zu finden. Banting erkannte, dass das innere Sekret aus den Langerhans-Inseln das äußere (exokrine) Sekret aus dem Pankreas zerstörte und dieser somit entfernt werden musste. In den folgenden Sommermonaten arbeitete er an der University of Toronto unter **John James Rickard Macleod** mit Unterstützung des Medizinstudenten **Charles Best** und kam auf den Gedanken, die Bauchspeicheldrüsengänge in Hunden durch Abbinden zu blockieren. Dies führte zum Tod der Tiere und zur Reabsorption der Verdauungszellen durch das Immunsystem; die Langerhans-Inseln aber blieben unberührt. Die Wissenschaftler extrahierten das Sekret dieser Zellen und nannten es „Isletin“ (später: „Insulin“). Auf die Verabreichung des Extrakts reagierten Hunde, denen die Bauchspeicheldrüse fehlte, mit einem sinkenden Blutzuckerspiegel! Die folgenden Monate verbrachten Banting und Best mit dem Versuch, den Extraktionsvorgang zu verbessern und zu beschleunigen (die Extraktion von Insulin aus Tieren dauerte sechs Wochen!). Sie

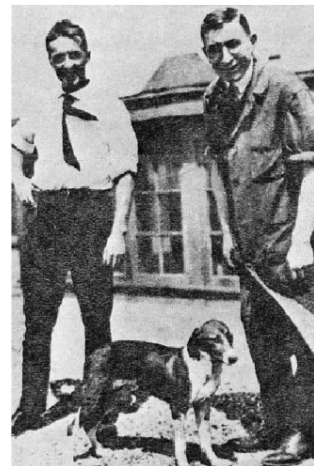


Abb. 1.1 links: Charles Best und Frederick Banting (Bildquelle: www.lillydiabete.it), rechts oben: J. J. R. Macleod (Bildquelle: www.uihealthcare.com), unten: James B. Collip (Bildquelle: www.medicalhistory.uwo.ca)

verwendeten die Bauchspeicheldrüse von Rinderfeten, deren Verdauungsdrüsen nicht entwickelt waren; in einer späteren Zusammenarbeit mit dem Biochemiker **James Bertram Collip** reinigten sie den Extrakt. 1922 begannen die klinischen Tests: Erfolgreich wurde diabeteskranken Kindern gereinigtes Insulin injiziert. Im November desselben Jahres nahm das Pharma-Unternehmen Eli Lilly die Produktion von gereinigtem Insulin auf.

Frederick Banting and John Macleod wurden 1923 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet; auf eigenen Wunsch teilten sie das Preisgeld mit Best und Collip.

1958 ging der Nobelpreis für Chemie an den britischen Molekularbiologen **Frederick Sanger** für die Bestimmung der Proteinsequenz des Insulins. 1969 bestimmte die Chemie-Nobelpreisträgerin **Dorothy Crowfoot Hodgkin** mit Hilfe der Röntgenbeugung die Raumstruktur des Insulins. 1977 schließlich erhielt **Rosalyn Sussman Yalow** den Nobelpreis für Medizin für ihre Entwicklung eines Radioimmuntests (Radioimmunoassay, RIA) zur Insulinbestimmung.

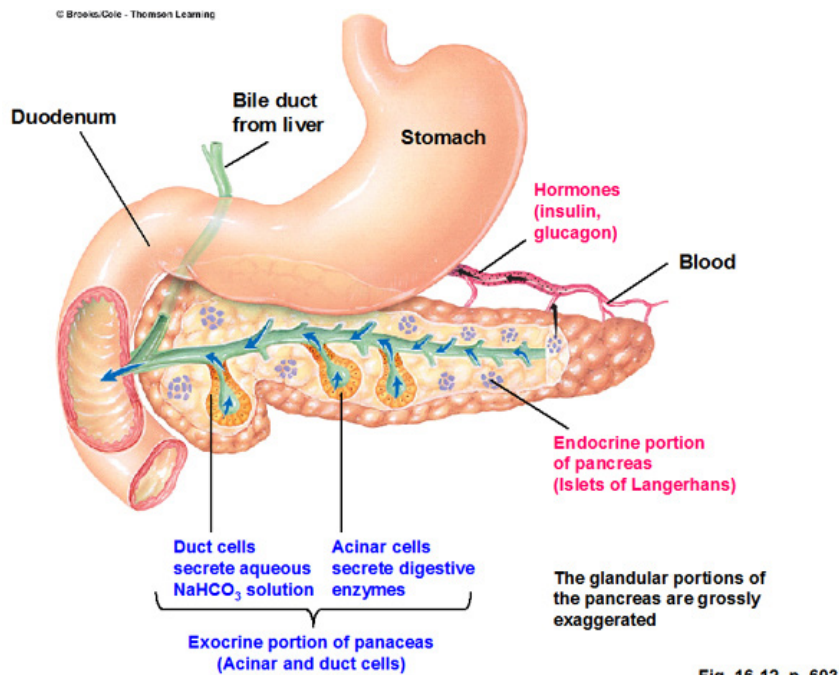


Fig. 16-12, p. 603

Abb. 1.2 Aufbau der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) (Bildquelle: www.colorado.edu)

1.2 Die Produktion von Insulin

In Säugetieren wird das Insulin in der Bauchspeicheldrüse synthetisiert, einer exokrinen Drüse, die Verdauungssäfte produziert. Lediglich 2% der Gesamtmasse des Pankreas haben eine endokrine Funktion. Diesen Anteil besetzen die Langerhans-Inseln, die aus mindestens vier Zelltypen zusammengesetzt sind:

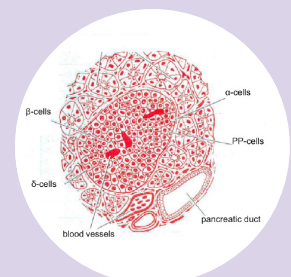


Abb. 1.3 Unterschiedliche Zelltypen der Langerhans-Insel (Bildquelle: www.staminali.aduc.it)

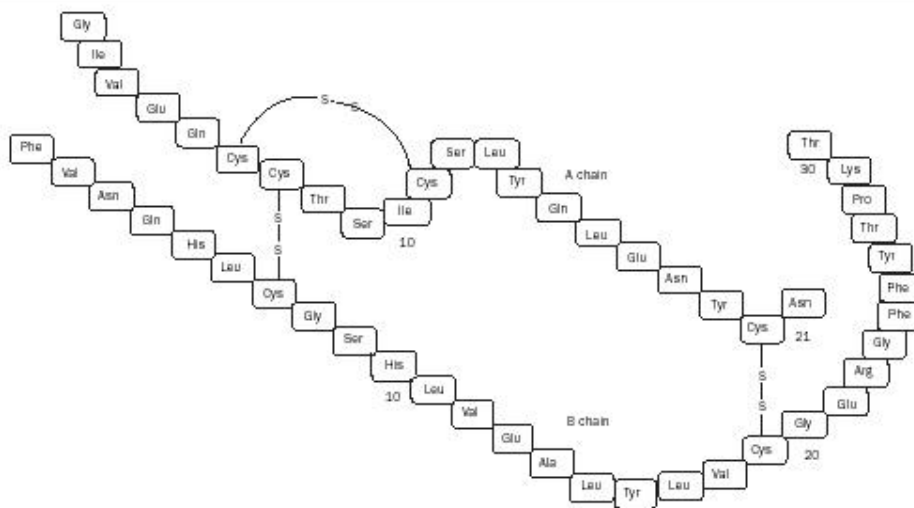


Abb. 1.4 Struktur des Insulins (Bildquelle: www.chemistryexplained.com)

- β -Zellen (65-80%), die Insulin produzieren;
- α -Zellen (15-20%), die Glucagon produzieren (ein Hormon, das an der Freisetzung von in Leberglycogen eingelagerter Glucose in den Blutstrom beteiligt ist);
- γ -Zellen (3-10%), die Somatostatin produzieren (ein Hormon, das ebenso die Freisetzung von Insulin und Glucagon wie die Synthese des Hypophysenwachstumshormons hemmt);
- PP-Zellen (ca. 1%), die das pankreatische Polypeptid produzieren (ein Hormon, das die exokrine Sekretion der Bauchspeicheldrüse steuert).

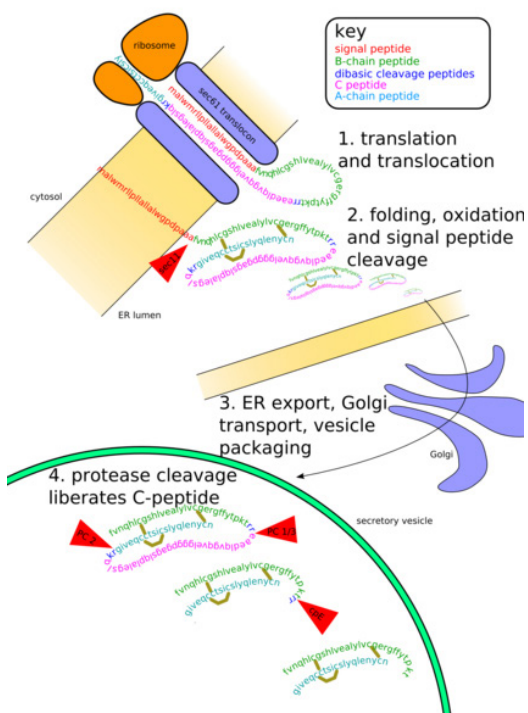


Abb. 1.5 Posttranslationale Modifikationen des Insulins (Darstellung der Zellkomponenten und Moleküle nicht maßstabsgetreu) (nach: www.en.wikipedia.org/wiki/Insulin)

1.3 Die Struktur des Insulins

Insulin setzt sich aus zwei Polypeptidketten (A- und B-Kette) zusammen, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind; eine dritte Disulfidbrücke befindet sich innerhalb der A-Kette. Die A-Kette besteht aus 21, die B-Kette aus 30 Aminosäuren.

Insulin wird zunächst als Präproinsulin synthetisiert, ein Polypeptid aus 110 Aminosäuren, das zusätzlich die folgenden Sequenzen enthält:

- eine „Prä“-Aminoterminus-Sequenz (Signalpeptid aus 24 Aminosäuren), die die Proteinsekretion ermöglicht;
- eine zentrale „Pro“-Sequenz (C-Peptid aus 35 Aminosäuren), die das korrekte Falten des Proteins steuert.

Nach der Translation des Präproinsulins im Endoplasmatischen Retikulum entfernt ein Enzym die 24 Aminoterminus-Aminosäuren. Übrig bleibt Proinsulin, das sich faltet und die Bildung der Disulfidbrücken zwischen den Cystein-Resten ermöglicht. Zu diesem Zeitpunkt wandert das Protein in den Golgi-Apparat, wo das C-Peptid entfernt wird. Im Ergebnis liegt reifes Insulin vor, das anschließend eingelagert wird.

Die **Sekundärstruktur** (Abb. 1.6) wird von zwei α -Helices in der A-Kette bestimmt, die eine zentrale β -Faltblattregion umgeben. Die B-Kette enthält einen Haupt- α -Helixabschnitt und faltet sich eng um die A-Kette.

Die **Tertiärstruktur** (Abb. 1.7) wird durch die Disulfidbrücken stabilisiert. Der äußere Teil des Proteins ist polar, der innere Teil hingegen weitgehend hydrophob.

Hinsichtlich seiner **Quartärstruktur** (Abb. 1.8) neigt Insulin in gelöster Form zur Bildung von Dimeren, was auf die Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den C-Termini (Carboxyl-Enden) der B-Kette zurückzuführen ist.

Im Beisein von Zink-Ionen kann Insulin Hexamere (Gruppen aus sechs Molekülen, Abb. 1.9) bilden und nimmt dann die Form eines Torus (Wulst, auch: Doughnut, Donut oder Kringel) an, in dem das Insulin in β -Zellen gespeichert und in den Blutkreislauf freigesetzt wird. Die aktive Form jedoch ist ein Monomer.

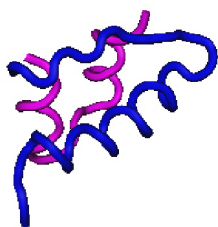


Abb. 1.6 Struktur des Insulins
– violett: A-Kette, blau: B-Kette
(nach: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)

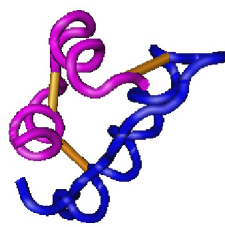


Abb. 1.7 Struktur des Insulins
– orange: Disulfidbrücken
(nach: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)

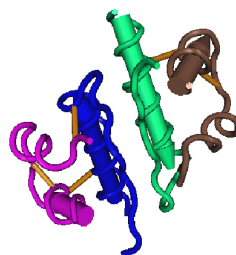


Abb. 1.8 Insulindimere – zylinderförmige Elemente: α -Helices
(nach: www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)

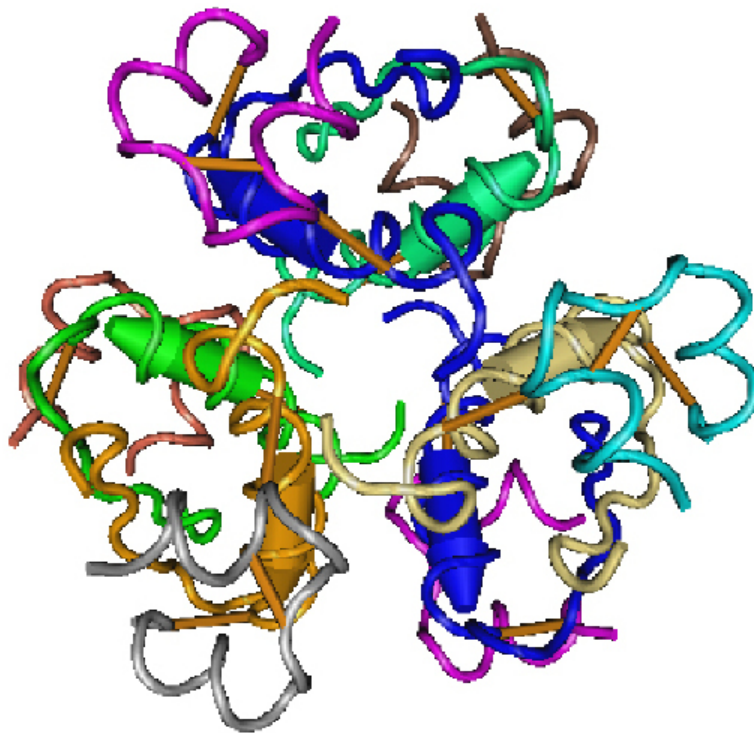


Abb. 1.9 Insulinhexamer – zylinderförmige Elemente: alpha-Helices
(nach: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)

1.4 Wirkungsmechanismen des Insulins

Insulin wirkt, direkt oder indirekt, auf die Mehrzahl aller Körpergewebe ein, nicht jedoch auf das Gehirn. Die Wirkungsmechanismen des Hormons lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Insulin erhöht die Aufnahme von Glucose in Zellen, indem es eine erleichterte Diffusion (passiver Transport) ermöglicht: Dies führt zu vermehrter Glykolyse sowie zur Synthese von Fett und Glycogen.
- Es steigert die Synthese von Glycogen: durch eine Verstärkung der erleichterten Diffusion von Glucose in Zellen, aber auch durch Stimulation des Enzyms, das die Synthese katalysiert.
- Es steigert die Synthese von Fettsäuren und die Bildung von Triglyceriden, da es die Fettzellen dazu anregt, im Blutstrom vorhandene Lipide aufzunehmen, und gleichzeitig die Aktivität des Enzyms hemmt, das den Abbau von Triglyceriden katalysiert.
- Es fördert den aktiven Aminosäuretransport in Zellen – insbesondere in Muskelzellen – und führt so ebenso einen Anstieg in der Konzentration der Metabolite (Stoffwechselprodukte) wie eine Verstärkung der Synthese herbei; zusätzlich reduziert es die Proteolyse.
- Es stimuliert die am Zuckerstoffwechsel beteiligten Enzyme und hemmt Enzyme, die bei der Glucosesynthese eine Rolle spielen (Rückgang der Gluconeogenese).
- Es stimuliert die Kaliumaufnahme in den Zellen.

- Es begünstigt die Relaxation der glatten (längsgestreiften) Muskelzellen in den Arterienwänden und steigert dadurch die Durchblutung insbesondere der kleineren Kapillargefäße.

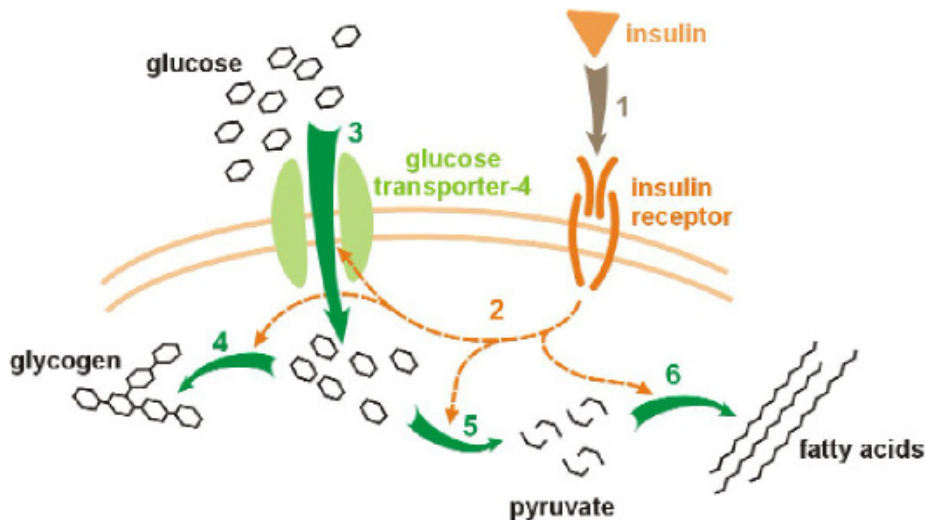


Fig. 1.10 Auswirkungen des Insulins auf den Zuckerstoffwechsel: Die Anbindung des Hormons an seinen Membranrezeptor löst verschiedene Reaktionen aus: Aufnahme von Zucker ins Zytoplasma (3), Glykogensynthese (4), Glykolyse (5) und Synthese von Fettsäuren (6). (Bildquelle: www.en.wikipedia.org/wiki/Insulin)

Anmerkung: Der Glucosetransporter in Abb. 12 wird GLUT4 (Glucose Transporter 4) genannt: Dieses Protein ist in der Plasmamembran von Fettmuskelzellen und quergestreiften (d. h. Herz- und Skelett-) Muskelzellen zu finden. Ist kein Insulin vorhanden, wird GLUT4 im Zellinnern gespeichert. Dockt das Insulin an seinen Rezeptor an, setzt dies die Verteilung von GLUT4 in der Membran in Gang, wo das Protein die erleichterte Diffusion von Glucose ermöglicht.

Muskeln und Fett (die durchschnittlich zwei Drittel aller Zellen im Körper des Menschen ausmachen) werden hinsichtlich ihrer Glucose-Aufnahme von allen Geweben am stärksten vom Insulin beeinflusst. Dennoch hat das Insulin gleichzeitig ebenso wenig eine modifizierende Wirkung auf die Glucose-Absorption in Gehirnzellen wie auf den aktiven Glucose-Transport im Nierenkanälchen oder im Magen-Darm-Epithel.

1.5 Die Regulierung der Insulinproduktion

Die Ausscheidung von Insulin wird vorwiegend über die Konzentration von Zucker in dem Blut gesteuert, das die Bauchspeicheldrüse durchfließt, sowie insbesondere über die β -Zellen (Abb. 1.11). Dies geschieht mittels eines negativen Rückkoppelungsmechanismus: Steigt der Blutzuckerwert, steigt auch die

Insulinsekretion. Diese führt eine Aufnahme des Zuckers in den Zellen und damit einen Rückgang des Zuckerspiegels im Plasma herbei. Der gesunkene Blutzucker bremst die weitere Ausscheidung von Insulin.

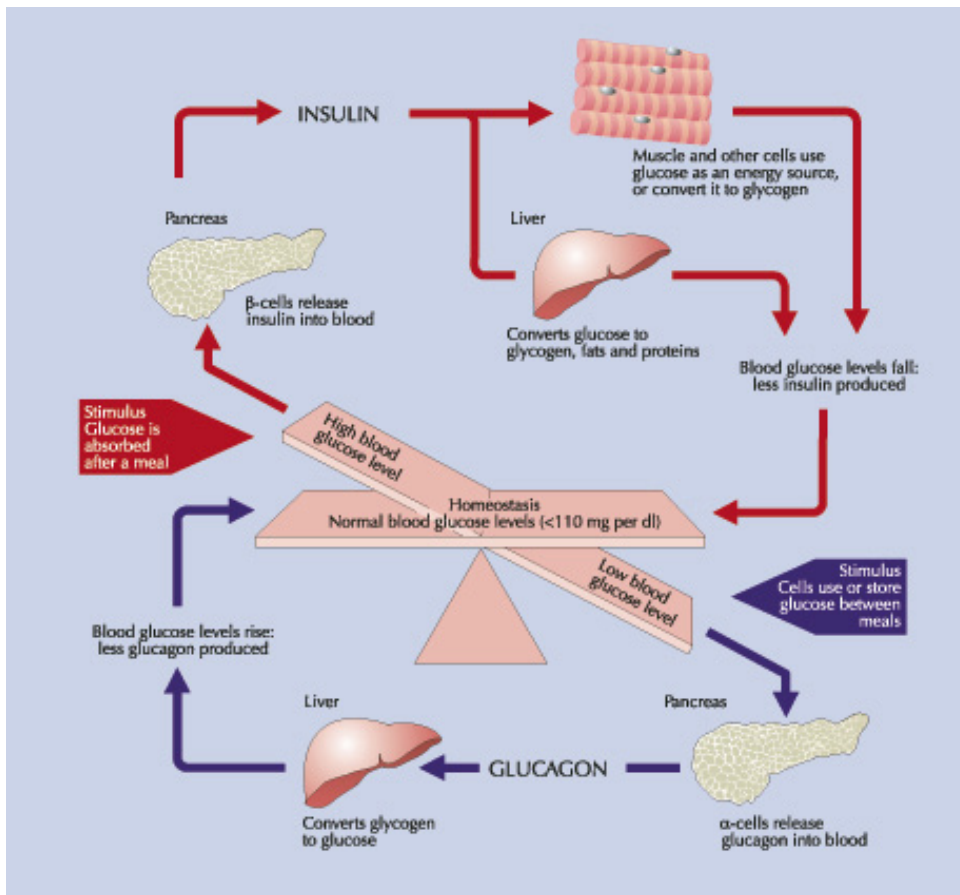


Abb. 1.11 Glucose-Regulation (Bildquelle: www.scienceinschool.org/2006/issue1/diabetes/italian)

Der spezifische Mechanismus, über den die Insulinsekretion erfolgt, ist bis heute nicht geklärt. Aus den bisher vorliegenden Erkenntnissen lässt sich jedoch ein Modell ableiten: Der Eintritt von Glucose in die β -Zellen des Pankreas wird von GLUT2 vermittelt, das ausschließlich in der Membran von β -Zellen sowie in Zellen der Leber, des Hypothalamus, des Dünndarms und des Nierenkanälchens vorkommt. Der Zucker kommt bei Glycolyse und Zellatmung zum Einsatz, in Verbindung mit der Produktion von ATP (Adenosintriphosphat). Der Anstieg der ATP-Konzentration führt zur Schließung der Kaliumkanäle und zu einer Depolarisierung der Membranen. In der Folge dringen Kalziumionen in die Zelle ein und werden aus dem Endoplasmatischen Retikulum ins Zytoplasma freigesetzt. Man vermutet, dass dieser Anstieg der Kalziumkonzentration die Abgabe des in den Sekretionsvesikeln des Golgi-Apparats gespeicherten Insulins herbeiführt. Darüber hinaus scheint der Anstieg der Glucose-Konzentration in den β -Zellen weitere, von Kalzium unabhängige Stoffwechselwege zu aktivieren, die bei der Insulinsekretion ebenfalls eine Rolle spielen. Auch intrazelluläre Glucose stimuliert die Transkription des Insulin-Gens und die Translation von dessen mRNA.

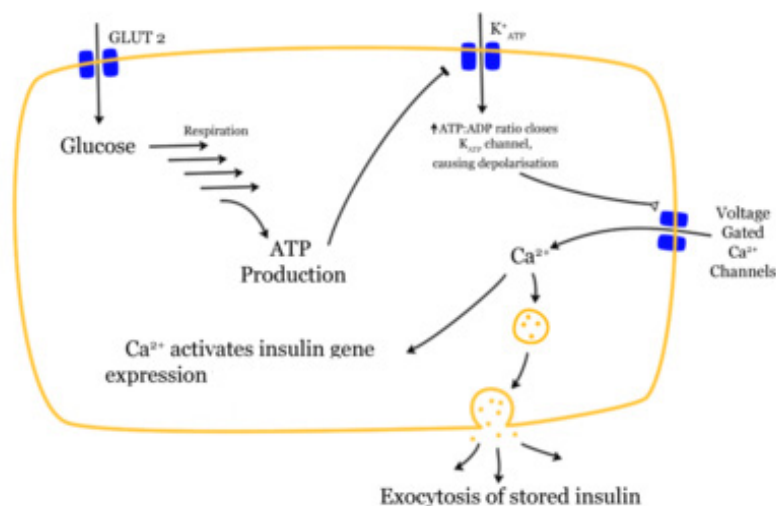


Abb. 1.12 Glucose-abhängiger Reaktionsweg bei der Insulinproduktion (nach: <http://en.wikipedia.org/wiki/Insulin>)

Die Glucose ist jedoch nicht der alleinige Steuerungsfaktor bei der Insulinsekretion (wenn auch der wichtigste). Die Aufnahme von Nahrung insgesamt, d. h. nicht nur in Form von Kohlehydraten, führt zu einer erhöhten Ausschüttung des Hormons. Daneben wird der Insulin-Ausstoß über das Nervensystem (d. h. über durch Nahrungsmittel ausgelöste visuelle und geschmackliche Stimulation) und Hormone (Magen-Darm-Hormone u. a.) kontrolliert.

1.6 Insulin in anderen tierischen Organismen

Die Proteinsequenz des Insulins sieht bei jeder Spezies anders aus (mitunter sind zusätzliche Aminosäuren vorhanden). Es gibt jedoch hoch konservierte Regionen, darunter die Position der Disulfidbrücken, beide Enden der A-Kette und das Carboxyl-Ende (C-Terminus) der B-Kette. Dementsprechend gleichen sich die dreidimensionalen Strukturen sehr. Das Insulin von Säugetieren ist hoch konserviert: Das Hormon des Rinds unterscheidet sich lediglich in drei Aminosäuren vom menschlichen Insulin, das des Schweins sogar nur in einer einzigen! Selbst unter den Wirbeltieren sind gewisse Ähnlichkeiten erkennbar: In einigen Fischarten reichen die Gemeinsamkeiten mit dem Humaninsulin aus, um eine Wirksamkeit des Hormons beim Menschen zu gewährleisten. Beträchtlich sind demgegenüber im Artenvergleich die Abweichungen im C-Peptid des Proinsulins.

2 Diabetes Mellitus

Der Begriff *Diabetes mellitus* entstand aus dem Altgriechischen und Lateinischen und bedeutet „honigsüßer Durchfluss“. Diese Benennung geht auf eine Zeit zurück, als Ärzte zur Diagnose von Diabetes noch den Harn eines Patienten schmeckten. Der süßliche Geschmack des Urins galt als Indikator für Diabetes mellitus – im Gegensatz zu *Diabetes insipidus* (lat.: „geschmacklos“), einer Störung, die sich ebenfalls durch verstärkten Harndrang auszeichnet. Es gibt mehrere Formen von Diabetes mellitus; ihnen allen gemeinsam sind erhöhte Blutzuckerwerte.

2.1 Klassifikation

Die am häufigsten auftretenden Krankheitsformen werden Typ-1- und Typ-2-Diabetes genannt. Der Typ-1-Diabetes tritt üblicherweise in jungen Jahren auf, während der Kindheit oder im Jugendalter. Jedoch können auch Erwachsene diese Form des Diabetes entwickeln, mitunter sogar im Alter von 40 oder 50 Jahren. Der Typ-2-Diabetes hingegen entwickelt sich typischerweise im Erwachsenenalter. Infolge der wachsenden Häufigkeit von Übergewicht erkranken jedoch auch viele junge Menschen an dieser Form des Diabetes, teilweise sogar Heranwachsende. Zu den übrigen Formen der Krankheit gehören Gestations- oder Schwangerschaftsdiabetes (er betrifft schwangere Frauen), Diabetes infolge einer Pankreasresektion sowie einige seltene durch Genmutationen ausgelöste Diabetes-Formen.

2.2 Epidemiologie

Rund 90% aller Diabetes-mellitus-Patienten leiden an Typ-2-Diabetes. Schätzungen zufolge sind weltweit 150 Millionen Menschen von dieser Krankheit betroffen, wobei sich diese Zahl im Laufe der nächsten 20 Jahre verdoppeln könnte. Ein Zuwachs wird für Industriestaaten wie Indien und China erwartet. Für die USA, wo die Zahl der Zuckerkranken bereits heute hoch ist, besagen Prognosen, dass ein Drittel aller US-Bürger an Typ-2-Diabetes erkranken wird.

2.3 Pathophysiologie

2.3.1 Insulinresistenz

Die Mehrzahl der Typ-2-Diabetes-Patienten weist ebenso wie Personen im prädiabetischen Zustand eine Insulinresistenz auf. Im Körper dieser Patienten sind die Insulinwerte zwar normal oder sogar hoch, im Vergleich zum Insulin gesunder Menschen aber ist die Wirksamkeit des Hormons bei ihnen reduziert. Eine Resistenz gegen peripheres Insulin vermindert die Wirkung des Insulins bei der Einschleusung von Glucose in Muskelzellen. In der Leber ist das Insulin nicht in der Lage, die Produktion neuer Glucose (Gluconeogenese) und die Lysis (den Zerfall) von Glykogen zu hemmen.

2.3.2 Typ-1-Diabetes

Der Typ-1-Diabetes ist eine Autoimmunerkrankung. Bei Menschen mit einer entsprechenden genetischen Veranlagung kommt es, vermutlich nach einer Virusinfektion, zu einer Entzündung der β -Zellen in der Bauchspeicheldrüse. Da nur die β -Zellen Insulin produzieren, ist Insulinmangel die Folge. Typ-1-Diabetes-Patienten müssen daher mit Insulin behandelt werden.

2.3.3 Typ-2-Diabetes

Der Typ-2-Diabetes wird typischerweise durch eine Verbindung von genetischer Veranlagung und Umweltfaktoren hervorgerufen. Die genetische Komponente ist dabei stärker als beim Typ-1-Diabetes: Beim Zwillingspartner eines vom Typ-2-Diabetes betroffenen Patienten wird sich die Krankheit fast sicher ebenfalls entwickeln. Weitere maßgebliche Faktoren sind Fehlernährung und Bewegungsmangel. Bei Lebensmittelknappheit etwa ist die Zahl der Typ-2-Diabetes-Erkrankungen sehr gering.

Ein anschauliches Beispiel für das Zusammenspiel von genetischem Hintergrund und Lebensstil bilden die Pima-Indianer. Von den in Mexiko lebenden Vertretern dieses Volkes sind etwa 8% an Diabetes erkrankt – bei den in die USA emigrierten Pima hingegen, wo eine sitzende Lebensweise vorherrscht und energiereiche (fette) Lebensmittel vorhanden sind, liegt die Diabetesrate bei bis zu 50%.

Haupttrisikofaktor beim Typ-2-Diabetes ist Übergewicht. Epidemiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass übergewichtige Männer und Frauen (mit einem Body-Mass-Index >35) im Vergleich zu schlanken Menschen einem um 60 bzw. 90 Prozent erhöhten Risiko ausgesetzt sind, an Typ-2-Diabetes zu erkranken. Aus genetischer Sicht ist der Typ-2-Diabetes eine multifaktorielle Krankheit, da sein Auftreten sich nicht auf ein einzelnes Gen zurückführen lässt.

Anders als bei Typ-2-Diabetikern entwickelt sich bei prädiabetischen (an Insulinresistenz leidenden) Patienten ohne Nahrungszufuhr keine Hyperglykämie. Unterzieht man diese Patienten jedoch einem oralen Glucosetoleranztest (oGTT), bei dem ihnen 75 g Glucose zugeführt werden, weisen sie stark erhöhte Blutzuckerwerte auf.

Um die reduzierte Wirkung des Insulins (Insulinresistenz) auszugleichen, produzieren die β -Zellen im Pankreas kurzzeitig viel Insulin. Aus diesem Grund weisen zahlreiche prädiabetische Patienten hohe Insulinwerte im Blutplasma auf. In den meisten Fällen jedoch sterben mehr β -Zellen, als neue Zellen produziert werden, was insgesamt zu einer Verminderung der β -Zellen führt. Wenn die Insulinproduktivität im Pankreas den infolge der Insulinresistenz erhöhten Insulinbedarf nicht decken kann, erkrankt der prädiabetische Patient an Typ-2-Diabetes.

Zur Entstehung von Hyperglykämie tragen im Wesentlichen drei Faktoren bei:

1. Die Insulinresistenz im Muskel verursacht eine verminderte Glucoseaufnahme aus dem Blut.



Abb. 2.1 Pima Indianer
(Bildquelle:
www.scienceinschool.org)

2. In der Bauchspeicheldrüse wird kein Insulin ausgeschüttet.
3. Infolge der Insulinresistenz in der Leber steigt dort die Glucoseproduktion.

2.4 Diagnose

2.4.1 Symptome

Zu den Frühsymptomen einer Diabeteserkrankung zählen Müdigkeit, allgemeines Unwohlsein und eine verstärkte Infektanfälligkeit (z. B. Blasenentzündungen). Bei einer stärker ausgeprägten Hyperglykämie beginnen Patienten Glucose im Harn auszuscheiden und insgesamt mehr Harn zu produzieren. In diesem Stadium treten die charakteristischen Symptome des Diabetes auf, die gleichzeitig kennzeichnende Frühsymptome des Typ-1-Diabetes sind: vermehrtes Wasserlassen (Polyuria, Harnflut), gefolgt von verstärktem Durstgefühl (Polydipsia), sowie in der Folge Flüssigkeitsverlust (Dehydration) und Gewichtsabnahme.

2.4.2 Vorsorge

In den Frühphasen des Typ-2-Diabetes sind die Symptome häufig sehr unauffällig, sodass die Erkrankung unter Umständen über Jahre unerkannt bleibt. Unglücklicherweise entwickeln sich die Folgeschäden des Diabetes (wie unten beschrieben) meist in dieser Phase. Risikopatienten – d. h. übergewichtige oder familiär vorbelastete Personen sowie früher bereits an Gestationsdiabetes erkrankte Frauen – müssen daher unbedingt regelmäßig untersucht werden. Die Vorsorgeuntersuchung kann entweder durch die Messung des Blutzuckerspiegels auf nüchternen Magen oder durch einen oGGT (s. oben) erfolgen. In Tabelle 1 sind die wichtigsten Kriterien der Diabetesdiagnose aufgeführt.

	Normalwerte	abweichende Glucose-toleranz oder abweichender Nüchternblutzuckerwert	Diabetes
Nüchternblutzuckerwert	<110 mg/dl <6.1 mmol/l	110-125 mg/dl 6.1-6.9 mmol/l	≥126 mg/dl ≥7.0 mmol/l
2 Std. nach oGGT	<140 mg/dl <7.8 mmol/l	140-199 mg/dl 7.8-11.1 mmol/l	140-199 mg/dl 7.8-11.1 mmol/l

Tabelle 1: Diagnosekriterien für Typ-2-Diabetes Diagnostic criteria for type 2 diabetes

Der wichtigste Indikator bei der Diabetesvorsorge ist das glycosylierte Hämoglobin (HbA1c), dessen Konzentration mit einem steigenden Blutzuckerspiegel ebenfalls zunimmt. Hämoglobin wird in den roten Blutkörperchen transportiert, deren Halbwertszeit bei etwa 120 Tagen liegt. Der HbA1c-Wert spiegelt somit die Blutzuckerwerte in den drei Monaten vor der Analyse wider. Ein HbA1c-Wert von unter 6,1% gilt als normal; bei Diabetespatienten liegt er üblicherweise bei etwa 7%, kann jedoch auch nur 6,5% betragen.

2.5 Behandlung

Von grundlegender Bedeutung für eine wirksame Diabetestherapie ist die Aufklärung der Patienten über Ursachen und Mechanismen der Krankheit, Folgeschäden, Ernährung und pharmakologische Behandlungsmöglichkeiten.

Diabetespatienten müssen hinsichtlich der Ernährungsumstellung, der Bedeutung von körperlicher Betätigung und der in den meisten Fällen erforderlichen Gewichtsabnahme geschult werden. Typ-2-Diabetiker, denen es gelingt, ihren Lebensstil grundlegend zu verändern und ihr Gewicht zu reduzieren, haben gute Chancen, die Krankheitssymptome in den Griff zu bekommen. Leider jedoch schafft dies nur ein geringer Prozentsatz aller Patienten.

Steigen die HbA1c-Werte über 7%, sind Ernährungsumstellung und Bewegung nicht länger ausreichend; eine pharmakologische Behandlung wird erforderlich. Zahlreiche der Hyperglykämie entgegenwirkende Antidiabetika sind auf dem freien Markt erhältlich: Metformin reduziert die Glucoseproduktion in der Leber, Sulfonylharnstoffpräparate steigern die Ausscheidung von Pankreas-Insulin, und Glitazone vermindern die periphere Insulinresistenz.

Liegen die HbA1c-Werte trotz einer Behandlung mit oralen Antidiabetika über 7%, muss die Therapie auf Insulin umgestellt werden. Die Behandlung setzt zunächst mit der Injektion eines lang wirksamen (Langzeit-)Insulins für die Nachtstunden ein. Ähnlich wie die Typ-1-Diabetiker benötigen viele Typ-2-Diabetespatienten letztlich eine volle Insulintherapie. Dabei wird entweder zweimal täglich eine Kombination aus lang und rasch wirksamen Insulinen injiziert, oder es werden in einer intensivierten Behandlung nachts oder morgens Langzeitinsulininjektionen verabreicht und zu den Mahlzeiten rasch wirksame Insuline gespritzt. Zur Vermeidung von hyper- oder hypoglykämischen Schocks muss eine Insulininjektion stets in Verbindung mit der Nahrungsaufnahme erfolgen.

Aufgrund des erhöhten Risikos für kardiovaskuläre Folgeschäden (s. unten) müssen neben den vom Blutzuckerwert abhängigen Symptomen unbedingt auch die Risikofaktoren des Herz-Kreislauf-Systems, z. B. Bluthochdruck und erhöhte Cholesterinwerte, unter Kontrolle gehalten werden.

2.6 Folgeschäden

Infolge der großen Häufigkeit von Folgeschäden reduziert sich die Lebenserwartung von Diabetespatienten. Die vom Typ-2-Diabetes herbeigeführte Schädigung der kleineren Blutgefäße (Mikroangiopathie) führt dazu, dass diese Form des Diabetes in den Industrieländern die häufigste Ursache für Erblindungen im Erwachsenenalter (diabetische Retinopathie), Nierenversagen (diabet. Nephropathie) und Amputationen (diabet. Fußsyndrom) darstellt. Die am weitesten verbreitete Schädigung der kleineren Blutgefäße ist die diabetische Neuropathie, eine Störung, die im Allgemeinen die distalen sensorischen Neuronen betrifft und zur gestörten Wahrnehmung von Erschütterungen und Temperaturen sowie zu Schmerzen in Händen und Füßen

führt. Im fortgeschrittenen Stadium kann diabetische Neuropathie starke Schmerzen verursachen.

Der Typ-2-Diabetes wird häufig mit Schädigungen der größeren Blutgefäße wie der Arterien (Makroangiopathie) sowie mit einem zwei- bis fünffach erhöhten Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen, also Herzinfarkte und Schlaganfälle in Verbindung gebracht.

3 Klassische Diabetestherapie

Der Diabetes ist eine chronische Krankheit und es gibt derzeit keine wirkungsvollen Therapiemethoden zu seiner vollständigen Heilung.

Eine Behandlung ist vor allem zur Vermeidung ernster Folgeschäden erforderlich, die bei einem ungehinderten Krankheitsverlauf zu akuten Funktionsstörungen und zum Tod des Patienten führen können.

Die Therapie bei juvenilem insulinabhängigem Diabetes mellitus ist „substitutiv“, d. h. hierbei wird Insulin von „außen“ zugeführt.

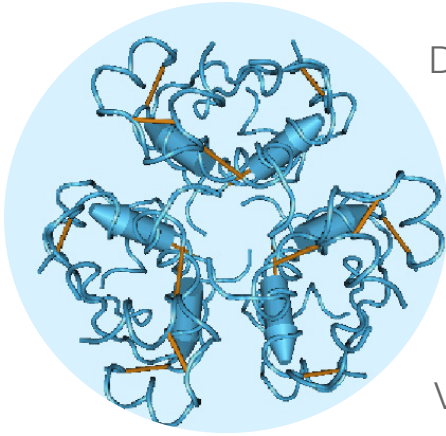
Seit der Entdeckung des Insulins im Jahre 1922 ist die Insulintherapie wesentlich weiterentwickelt worden, angefangen bei der klassischen substitutiven Behandlung mit aus tierischen Bauchspeicheldrüsen extrahiertem Insulin bis hin zu Behandlungsmethoden mit dem rekombinanten Insulin seit den 1970er-Jahren.

3.1 Behandlung mit tierischem Insulin

Nach seiner Entdeckung wurde das Insulin über lange Zeit aus Tiergewebe gewonnen und für die Anwendung als Wirkstoff zur Diabetesbehandlung gereinigt. Auf der Suche nach notwendig gewordenen alternativen Insulinquellen zur Versorgung einer wachsenden Zahl von Diabetespatienten beschlossen Forscher zu einem späteren Zeitpunkt, über zwei einfache Verfahren Humaninsulin zu gewinnen: über die chemische Insulinsynthese aus einzelnen Aminosäuren (ein praktikables, aber kostspieliges Verfahren) und über die Umwandlung von Schweineinsulin zu Humaninsulin durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure. Diese zweite Strategie verfolgte in den 1970er-Jahren das Pharma-Unternehmen Novo Nordisk A/S, das die Produktion von „halbsynthetischem“ Insulin aufnahm. Dabei wurde ein Alaninrest auf der B-Kette durch ein Threonin ersetzt.

Lerneinheit I – Bioinformatik

Insulin und die molekulare Evolution



Diese Lerneinheit Bioinformatik möchte die Lernenden auf eine Reise durch die Welt der Proteindatenbanken mitnehmen. Dabei sollen sie die Proteinsequenz des Humaninsulins und Sequenzen anderer Spezies suchen und anschließend vergleichen, um Sequenz-Homologien und potenzielle artenübergreifende phylogenetische Verbindungen herauszuarbeiten. Ausgehen von diesem Vergleich lässt sich feststellen, welches Tier am besten zur Extraktion des Hormons für die Behandlung von Diabetes beim Menschen geeignet ist. Die vorliegende Lerneinheit wurde in Teilen aus bioinformatischen Materialien konzipiert und weiterentwickelt, die auf der Internetseite <http://www.gtac.edu.au> zu finden sind.

AI.1 Wichtigste Internetquellen

www.expasy.org

ExPASy – „Expert Protein Analysis System“ – ist der Proteomik-Server des SIB (Schweizerisches Institut für Bioinformatik) und dient der Molekularbiologie sowie insbesondere der Analyse von Proteinsequenzen und -strukturen. Zum Zeitpunkt seiner Entstehung 1993 gehörte ExPASy zu den ersten Internet-Servern im Bereich Biologie. Seitdem kontinuierlich aktualisiert und verbessert, ermöglicht ExPASy heute Zugriff auf mehrere Genfer Datenbanken wie Swiss-Prot, PROSITE, SWISS-3DPAGE und ENZYME, aber auch auf andere Datenbanken wie EMBL/GenBank/DDBJ, OMIM, Medline, FlyBase, ProDom, SGD und SubtiList. Darüber hinaus kann man über den Server auf mehrere analytische Tools zur Identifizierung von Proteinen, zur Analyse von deren Sequenz und zur Vorhersage ihrer Tertiärstruktur zugreifen.

ExPASy bietet zudem fachbereichsbezogene Dokumente und Links zu den wichtigsten Informationsquellen im Internet.

Vor allem Swiss-Prot (www.expasy.org/sprot) ist eine gut annotierte Sammlung von Proteinsequenzen, die qualitativ hochwertige Informationen bereitstellen will (z. B. die Beschreibung der Funktion eines Proteins, seiner Struktur, posttranslationalen

Modifikationen, Varianten usw.), redundante Angaben auf ein Mindestmaß beschränkt und ein hohes Maß an Integration mit anderen Datenbanken gewährleistet.

<http://workbench.sdsc.edu>

Biology WorkBench ist eine Internet-Schnittstelle, die bioinformatische Tools zu Forschungs-, Übungs- oder Lehrzwecken allgemein und frei zugänglich macht. Seit Juni 1996 im Netz, stellt Biology WorkBench ein Portal zu Internet-Datenbanken, Datensammlung und verschiedenen weiteren Anwendungen. Die Schnittstelle zeichnet sich durch ihre große Einfachheit aus: Zahlreiche Übergänge bedürfen lediglich eines „Ansteuern und Anklicken“. Die aktuelle Version umfasst eine gewaltige Sammlung von Datenbanken und Rechentools; für die Molekularbiologie am besten geeignet sind davon solche, die die Beziehung zwischen Proteinsequenzen und Nucleinsäuren illustrieren.

www.ncbi.nlm.nih.gov

NCBI – National Center for Biotechnology Information – wurde 1988 ins Leben gerufen; dieses Institut baut öffentlich zugängliche Datenbanken auf, stellt bioinformatische Suchfunktionen, entwickelt Software zur Analyse von Genomdaten und dient der Verbreitung biomedizinischer Erkenntnisse. Ziel des Instituts ist es, molekulare Prozesse, die mit Gesundheits- und Krankheitsprozessen beim Menschen in Verbindung stehen, besser verständlich zu machen. Die Webseite umfasst Datenbanken zum Genom des Menschen und anderer Lebewesen sowie Nukleotid- und Proteinsequenzen, Molekularstrukturen und wissenschaftliche Literatur (z. B. „PubMed“, die große bibliografische Datenbank im Bereich Biomedizin). **NCBI-Entrez** bietet mit **MMDB** (Molecular Modeling Database) eine Datenbank experimentell bestimmter biomolekularer Raumstrukturen, die überwiegend mit Hilfe der Röntgenkristallografie und der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) erschlossen wurden und Informationen zu biologischen Funktionen, Evolutionsgeschichte und makromolekularen Wechselwirkungen enthalten. Diese Datenbank ist naturgemäß kleiner als eine Protein- oder Nukleotid-Datenbank (denn die Raumstruktur ist bisher lediglich von einem Bruchteil aller bekannten Proteine bestimmt worden), jedoch stimmen zahlreiche Proteine in diesem Bereich mit bereits vorhandenen überein.

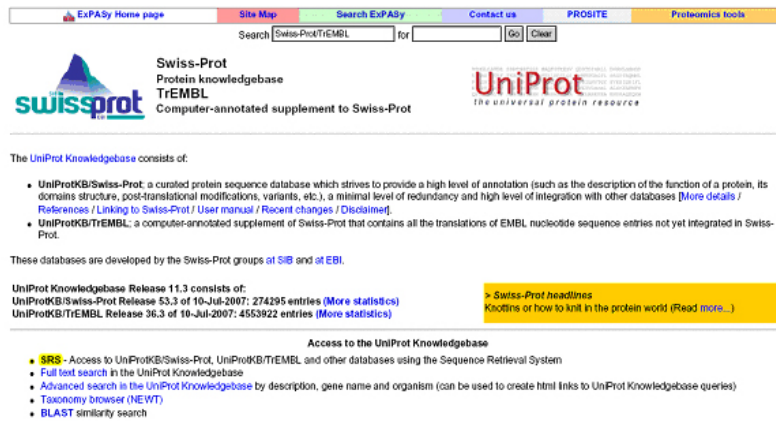
AI.2 Auffinden for the protein sequence

- Die Internetseite www.expasy.org/sprot aufrufen.

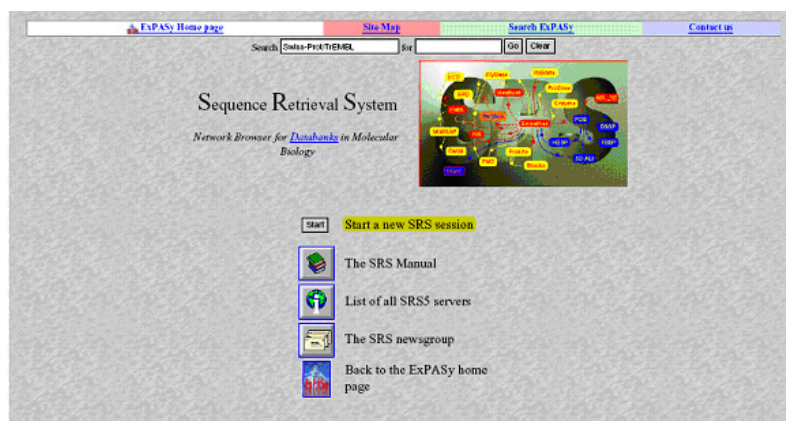
Über **Access to the UniProt Knowledgebase** auf UniProt (Universal Protein Resource) zugreifen: Diese Datenbank bietet die weltweit umfassendste Sammlung von Angaben über Proteine. Sie bildet das Zentralarchiv für Proteinsequenzen, da hier die Informationen mehrerer Datenbanken zusammengeführt werden: Swiss-Prot, TrEMBL (Translated EMBL – Datenbank aus der Translation

der in der EMBL-Datenbank hinterlegten genetischen Information) und PIR (Protein Information Resource, eine öffentlich zugängliche und integrierte Bioinformatik-Ressource des Georgetown University Medical Center, GUMC).

- **SRS** (Sequence Retrieval System) anklicken.



- Anschließend auf **Start** klicken (Beginn einer neuen SRS-Sitzung).



- Zum Auffinden der Insulinproteinsequenzen verschiedener Tiere muss an dieser Stelle eine Anfrage gestartet werden. Dafür SWISS-PROT und TREMBL auswählen und auf **Continue** (Weiter) klicken.
- Links oben im obersten Eingabefeld aus dem Dropdown-Menü **GeneName** auswählen und „ins“ (für Insulin) eingeben.
- In der zweiten Zeile **Organism** auswählen und daneben „chordata“ eingeben.
- Die Angabe “Entry list in chunks of” (Angaben pro Seite) sollte auf 200 eingestellt sein. Anschließend **Do Query** (Anfrage starten) anklicken.

Top Page Query Form Query Manager View Manager Databanks [Help](#)

Search [SWISS_PROT](#) [TREMBL](#)

Do Query Reset Combine searches with ☒ Append wildcard "*" to words.

Info	GeneName	ins
Info	Organism	chordata
Info	AllText	
Info	AllText	

Include fields in output: ☐ ID ☐ AccNumber ☐ Date ☐ SubmissionDate ☐ Description ☐ GeneName ☐ Keywords

Display in: ☒ list ☐ table

Entry List in chunks of:

Sequence Format:

Use view:

Retrieve set of:

[Alternative Query Form](#) Separate multiple values by & (and), | (or), ! (and not)

- Nun erscheint eine Liste von Proteinen verschiedener Tiere: Hier gilt es, ausschließlich diejenigen auszuwählen, die von Interesse sind (Vorsicht: Es werden auch Proteine angezeigt, deren GeneName die Buchstabenkombination „ins“ enthalten!). Wir konzentrieren uns hier auf die Proteine, bei denen auf die Buchstaben INS der Code für die jeweilige Tierart folgt (Kürzel-Liste s. Anhang 1), z. B.: INS1_MOUSE, INS_CHICK, INS_HORSE, INS_HUMAN, INS_HYDCO, INS_MYXGL, INS_ONCKE, INS_PANTR, INS_PIG, INS_RABIT, INS_SHEEP, INS_BOVIN.
- Beim Befehl „Perform operation on“ (Anwenden auf) **selected** (Auswahl) anklicken; anschließend neben dem Wort „with“ **FastaSeqs** auswählen und auf **Save** (Speichern) klicken.

Top Page Query Form Query Manager View Manager Databanks [Help](#)

Query "[lib=swiss_prot trembl]-GeneName: ins" & [lib=Organism: chordata"] " found 199 entries

Perform operation on: ☒ all but selected ☐ selected

[link](#)

selected entries in chunks of:

[save](#) [view](#) with

RootLibs	acc	desc	sz
☒ SWISS_PROT:INS1_MOUSE	P01315 Q9D907	Insulin-1 precursor [Contains: Insulin-1 B chain; Insulin-1 A chain]	108
☐ SWISS_PROT:INS1_BAT	P01322	Insulin-1 precursor [Contains: Insulin-1 B chain; Insulin-1 A chain]	110

- An dieser Stelle erscheint eine Bestätigung. Ist in dem mit „Use view“ (Ansicht) markierten Eingabefeld **FastaSeqs** ausgewählt, kann mit **Save** erneut gespeichert werden.

Top Page Query Form Query Manager View Manager Databanks [Help](#)

Download chunk with entries: Sequence Format:

Use view: ☒ Save table as ASCII text/table with

column separator: record separator:

use mime type:

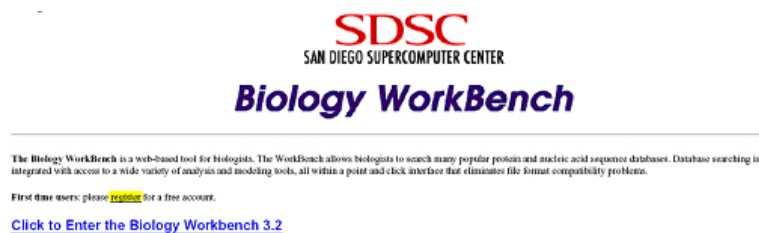
[SAVE](#) [Reset](#)

- Für jedes der ausgewählten Proteine werden hier in einer Liste die Proteinsequenzen aufgezeigt. Textinhalt in eine .txt-Datei kopieren und speichern (z. B. unter dem Dateinamen „ins_sequences“ / „ins_sequenzen“). Die Buchstabencodes der Aminosäuren sind in Anhang II zu finden.

```
>INS1_MOUSE
MALLVHFLPLLALLALWEPKPTQAFVKQHLGSHLVEALYLVGGERGFFYTPKSRREVED
PQVGALELAGGPGAGGLEGGPPQKRGIVEQCCTSIQSLYQLENYCN
>INS_BOVIN
MALWTRLPLPLLALLALWEPKPTQAFVKQHLGSHLVEALYLVGGERGFFYTPKARREVEG
PQVGALELAGGPGAGGLEGGPPQKRGIVEQCCTSIQSLYQLENYCN
>INS_CHICK
MALWIRSLPLLALLVFSQPGTSTYAAANQHLGSHLVEALYLVGGERGFFYSPKARRDVEQ
PLVSSPLRGEAGVLPQQEYEVKVRGIVEQCCHFTCSLYQLENYCN
>INS_HORSE
FVNQHLGSHLVEALYLVGGERGFFYTPKAIIEAEDPQVGEVELGGGPGGLGLQPLALAG
PQQXGIVEQCCTGICSLYQLENYCN
>INS_HUMAN
MALWMRLPLPLLALLALWGPDPAAAFVNQHLGSHLVEALYLVGGERGFFYTPKTRREAED
LQVGGVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSIQSLYQLENYCN
>INS_HYDCCO
VPTQRLGSHLVDALYFVCGERGFFYSPKPIRELEPLLIVEQCCHNTCSLANLEGYCN
>INS_MYXGL
MALSPFLAAVPLVLLLSRAPPSADTTRTHLQKDLVHALYIACGVGGFFYDPTQMKRD
TGALAAFLPLAYAEDNESQDDESGINEVLKSRGIVEQCCHKRCSTHLENYCN
>INS_ONCKE
MAFWLQAASLLVLLALSPGVDAALAAQHLGSHLVDALYLVGGERGFFYTPKRDVDPGLIF
LSPKSAKENEYPPFDQTEMVVRGIVEQCCHFCNIFDLQNYCN
>INS_PANTR
MALWMRLPLPLLALLALWGPDPASAFVNQHLGSHLVEALYLVGGERGFFYTPKTRREAED
LQVGGVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSIQSLYQLENYCN
>INS_PIG
MALWTRLPLPLLALLALWAPAPAFVNQHLGSHLVEALYLVGGERGFFYTPKARREAEN
PQAGAVELGGGLGLQALALEGPPQKRGIVEQCCTSIQSLYQLENYCN
>INS_RABIT
MASLAALLPLPLLALLVLCRLDPAQAFVNQHLGSHLVEALYLVGGERGFFYTPKSRREVEE
LQVGAELGGGPGAGGLQPSALELALQKRGIVEQCCTSIQSLYQLENYCN
>INS_SHEEP
MALWTRLPLPLLALLALWAPAHAFVNQHLGSHLVEALYLVGGERGFFYTPKARREVEG
PQVGALELAGGPGAGGLEGGPPQKRGIVEQCCTSIQSLYQLENYCN
```

AI.3 Vergleich der Proteinsequenzen

- Die Seite <http://workbench.sdsc.edu> aufrufen. Da hier eine (kostenlose) Registrierung erforderlich ist, **Register** anklicken.



SDSC
SAN DIEGO SUPERCOMPUTER CENTER

Biology WorkBench

The Biology WorkBench is a web-based tool for biologists. The WorkBench allows biologists to search many popular protein and nucleic acid sequence databases. Database searching is integrated with access to a wide variety of analysis and modeling tools, all within a point-and-click interface that eliminates file format compatibility problems.

First time users: please [register](#) for a free account.

[Click to Enter the Biology Workbench 3.2](#)

- Nach dem Ausfüllen der nötigen Felder nochmals auf **Register** klicken.

Biology WorkBench

User Registration

Please supply the requested confidential information

Full Name:	
eMail Address:	
User ID: <i>Single word (alphanumeric characters only)</i>	
Password:	
Password: (again)	

- Wieder auf der Anfangsseite, **Click to Enter the Biology Workbench** (Zugang zur Biology WorkBench) anklicken, *Benutzer-ID* und *Passwort* eingeben und Zugang starten.

SDSC
SAN DIEGO SUPERCOMPUTER CENTER

Biology WorkBench

The Biology WorkBench is a web-based tool for biologists. The WorkBench allows biologists to search many popular protein and nucleic acid sequence databases. Database searching is integrated with access to a wide variety of analysis and modeling tools, all within a point and click interface that eliminates file format compatibility problems.

First time users: please [register](#) for a free account.

[Click to Enter the Biology Workbench 3.2](#)

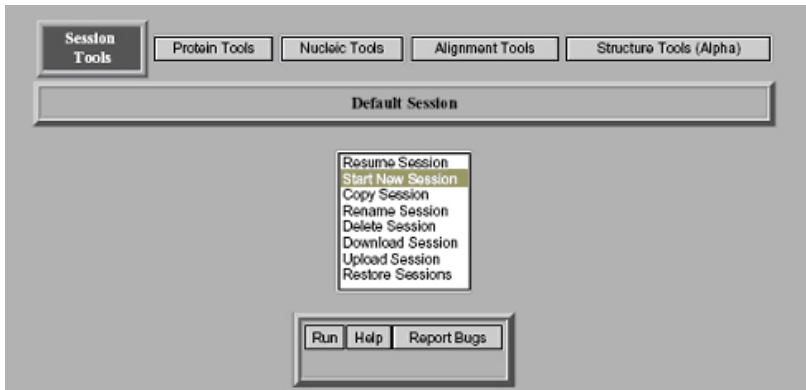
- Auf der angewählten Seite auf **Session Tools** scrollen (Anmerkung: Hintergrundfarbe wahlweise grau, pink oder blau).

Setting up [Helper Applications](#) used by the Biology WorkBench 3.2.

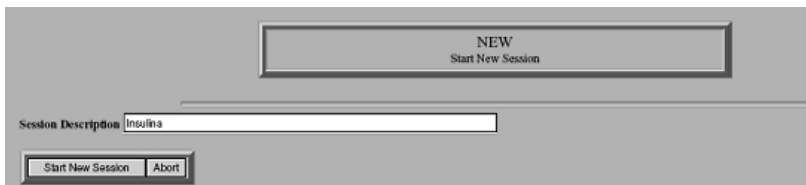
Session Tools	Protein Tools	Nucleic Tools	Alignment Tools	Structure Tools (Alpha)
---------------	---------------	---------------	-----------------	-------------------------

Color: ☒ Gray ☐ Rose ☐ Blue

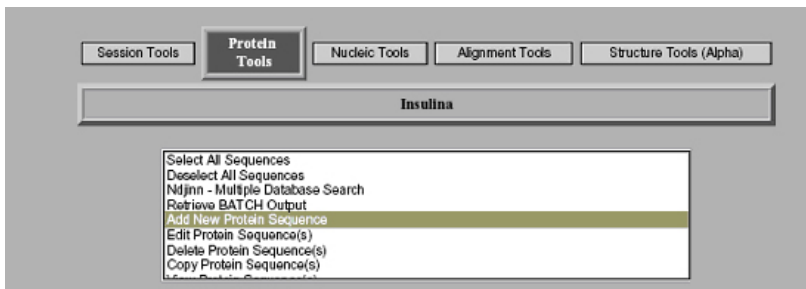
- Aus der Liste im weißen Eingabefeld **Start New Session** (Neue Sitzung starten) auswählen, anschließend auf **Run** (Los) klicken.



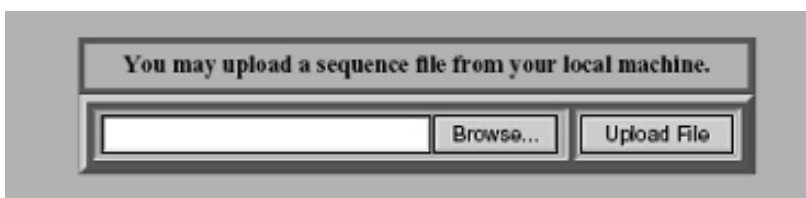
- Die neue Sitzung benennen (z. B. „Insulin“) und nochmals auf **Start New Session** klicken.



- Die vorherige Seite erscheint erneut, nun mit Name und Datum der neuen Sitzung. Jetzt **Protein Tools** anklicken; aus der Liste im weißen Eingabefeld **Add New Protein Sequence** (Neue Proteinsequenz hinzufügen) auswählen und auf **Run** klicken.



- Die zuvor gespeicherte Datei (z. B. „insulin_sequences.txt“) über den Befehl **Browse** ansteuern und durch Auswahl ins Eingabefeld holen; anschließend über **Upload File** hochladen.



- Nun müssen die Sequenzen einzeln in WorkBench importiert werden (durch Herunterscrollen überprüfen). Danach über den Befehl **Save** speichern.

- An dieser Stelle wird die Anfangsseite von „Protein Tools“ mit dem Namen der Sitzung und den importierten Proteinsequenzen aktualisiert.

Wir beginnen mit dem Vergleich zweier Sequenzen: der menschlichen und der des Huhns. Die Auswahl erfolgt durch Markieren des Kästchens neben der Bezeichnung für den jeweiligen Organismus. Im weißen Eingabefeld (in der Mitte) auf den Eintrag **CLUSTALW – Multiple Sequence Alignment** (Anordnung mehrerer Sequenzen) herunterscrollen und diesen auswählen. Anschließend über den Befehl **Run** starten.

- Die nun erscheinende Seite zeigt die ausgewählten Sequenzen an: Auswahl über den Befehl **Submit** (Absenden) bestätigen bzw. auf die vorherige Seite zurückkehren und Auswahl wiederholen.
- Auf der neuen Seite zum Eintrag „Sequence alignment“ herunterscrollen. In Blau erscheinen hier all jene Aminosäuren, die in den Sequenzen beider Arten konserviert sind: Als entsprechendes Symbol erscheint ein blaues Sternchen (*); die Unterschiede, die keine Auswirkungen auf die Struktur des Insulins haben, sind

mit einem grünen Doppelpunkt (:) markiert. Demgegenüber bezeichnet ein dunkelblauer Punkt (.) jene Aminosäuren, welche die Struktur des Moleküls beeinflussen; schwarz schließlich (ohne Symbol) erscheinen jene Aminosäuren, die in allen Arten unterschiedlich sind.

```

Sequence alignment

Consensus key (see documentation for details)
* - single, fully conserved residue
: - conservation of strong groups
. - conservation of weak groups
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

INS_HUMAN      MALWMRLRLPLLALLALLWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED
INS_CHICK      MALWIRSLPLLALLLVFSGPGTSYAAANQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYSPKARRDVEQ
               ****:* *****:  **..:  *  .*****:*****:***:*.*:

INS_HUMAN      LQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN
INS_CHICK      PLVSS-PLRGEAGVLPFQQEYEK--VVRGIVEQCCHNTCSLYQLENYCN
               *..  * * .*. .:*  *  ***** . *****

```

Aufgaben

- 1) Betrachte das menschliche Insulin: Die A-Kette besteht aus 21, die B-Kette aus 30 Aminosäuren. Weist die vorliegende Sequenz tatsächlich insgesamt 51 Aminosäuren auf?
- 2) Insulin wird zunächst in Form des sogenannten „Präproinsulins“ synthetisiert, eines Polypeptids aus 110 Aminosäuren. Dieses Polypeptid enthält zusätzliche Sequenzen, die später entfernt werden: eine N-terminale „Prä“-Sequenz (Signalpeptid, 24 Aminosäuren), welche die Ausscheidung des Proteins ermöglicht, und eine „Pro“-Sequenz (C-Peptid), die die korrekte Faltung der Polypeptidkette steuert. Auf der Polypeptidkette sind die Teilsequenzen folgendermaßen angeordnet: Signalpeptid – B-Kette – C-Peptid – A-Kette. Identifiziere die einzelnen Segmente in der Proteinsequenz von Mensch und Huhn!

```

INS_HUMAN      MALWMRLRLPLLALLALLWGPDPAAAFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED
INS_CHICK      MALWIRSLPLLALLLVFSGPGTSYAAANQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYSPKARRDVEQ
               ****:* *****:  **..:  *  .*****:*****:***:*.*:

INS_HUMAN      LQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSICSLYQLENYCN
INS_CHICK      PLVSS-PLRGEAGVLPFQQEYEK--VVRGIVEQCCHNTCSLYQLENYCN
               *..  * * .*. .:*  *  ***** . *****

```

- 3) Zu wieviel Prozent stimmen die einzelnen Segmente überein, d. h. sind homolog? Ergänze die Tabelle:

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_CHICK								

- 4) Welche Sequenzen sind stärker konserviert? Welche weniger stark? Nenne mögliche Ursachen für den unterschiedlichen Grad der Konservierung bei den Sequenzen!
- 5) Warum enthält die Sequenzfolge INS_CHICK Gedankenstriche (-)? Welche evolutionären Erklärungen könnte es dafür geben?
- 6) Die Insulinsequenz des Menschen lässt sich mit der jedes beliebigen anderen Tiers vergleichen, z. B. INS_HUMAN vs. INS_PANTR oder INS_HUMAN vs. INS_PIG usw. Berechne den Grad der Konservierung für die einzelnen Segmente!
- Nun wollen wir sämtliche verfügbaren Insulin-Proteinsequenzen miteinander vergleichen. Dazu über den Befehl **Return** zur Startseite „Protein Tools“ zurückkehren. Alle Sequenzen markieren (im Kästchen mit einem Haken versehen), **CLUSTALW – Multiple Sequence Alignment** auswählen und über den Befehl **Run** starten.
 - Auf der anschließend erscheinenden Seite überprüfen, ob alle gewünschten Sequenzen ausgewählt sind, und über **Submit** absenden.
 - Auf der neuen Seite zu „Sequence alignment“ herunterscrollen und folgende Aufgaben bearbeiten:

Aufgaben

- 7) In mehreren Regionen der Proteine verschiedener Tiere sind die Sequenzen nicht konserviert. Zu welchen Segmenten gehören sie?
- 8) Warum variieren diese Sequenzen stärker?
- 9) In welchen Segmenten der Polypeptidkette erscheinen die Sternchen?

- Steuere durch Herunterscrollen den Abschnitt „Clustal W Dendrogram“ an und beobachte: Ausgehend von den Unterschieden in den Proteinsequenzen erstellt das Programm einen Stammbaum (Dendrogramm, phylogenetischer Baum). Ein solcher Stammbaum weist „Zweige“ auf, die sich jeweils aus einem „Verzweigungspunkt“ (Divergenz von einem gemeinsamen Vorfahren) entwickeln und in „Blättern“ enden – hier die Sequenzen jedes Taxons. Die Länge eines Zweigs illustriert den geschätzten Zeitraum seit dem Auftreten der Divergenz. Dendrogramme treten in zwei Erscheinungsformen auf: Es gibt „gewurzelte“ und „ungewurzelte“ Stammbäume. Bei einem gewurzelten Stammbaum wird ein einzelnes, evolutionär von den übrigen entfernt gelegenes Ereignis als Ausgangspunkt (Wurzel) angesehen; bei einem ungewurzelten Stammbaum ist ein solcher Bezugspunkt nicht vorhanden. Mit Hilfe des Dendrogramms lässt sich der stammesgeschichtliche Abstand zwischen bestimmten Gruppen von Lebewesen untersuchen.
- Betrachte den Stammbaum und löse die folgenden Aufgaben

Aufgaben

- 10) Betrachte den ungewurzelten Baum: Welche zwei Arten sind am nächsten miteinander verwandt? Erläutere die Gründe!
- 11) Die Länge der „Zweige“ veranschaulicht die stammesgeschichtliche Distanz: Drucke das Dendrogramm aus und messe (in mm) den Abstand zwischen Mensch und den folgenden Tieren:
- Mensch und Pferd:
 - Mensch und Chimäre:
 - Mensch und Kaninchen:
 - Mensch und Schwein:
 - Mensch und Schleimaal:
 - Mensch und Rind:
 - Mensch und Schaf:
 - Mensch und Huhn:
 - Mensch und Lachs:
 - Mensch und Schimpanse:
 - Mensch und Maus:
- 12) Steht das Schaf-Insulin stammesgeschichtlich dem Insulin des Huhns näher oder dem des Menschen?
- 13) Welche evolutionäre Verwandtschaft besteht zwischen Schwein, Schaf und Rind?
- 14) Welche Bedeutung haben diese Ergebnisse vor dem Hintergrund dessen, was du in den vorhergehenden Kapiteln erfahren hast? Erläutere!

- Nun zum Seitenende herunterscrollen und **Import Alignments** anklicken.



- Das Kästchen links von der Angabe **CLUSTALW – Protein** markieren, danach im mittleren weißen Eingabefeld **DRAWGRAM – Draw Rooted Phylogenetic Tree from Alignment** (Gemäß der Anordnung gewurzelter Stammbaum zeichnen) anwählen. Über **Run** starten.



- Anweisung auf der nun erscheinenden Seite mit **Submit** bestätigen. Es erscheint ein gewurzelter Stammbaum – löse mit seiner Hilfe die folgenden Aufgaben.

Aufgaben

- Welche Spezies steht dem Rind stammesgeschichtlich näher? Welche dem Lachs?
- Betrachte die Paarungen „Schimpanse-Mensch“, „Lachs-Schleimaal“, „Schaf-Rind“: Jede wird durch einen einzelnen „Verzweigungspunkt“ differenziert. Welche Unterschiede in der Divergenz dieser Lebewesen sind erkennbar?
- Der Begriff „Homologie“ bezeichnet ein Merkmal oder eine Struktur, das bzw. die sich in zwei oder mehr Arten aus einem gemeinsamen Vorfahren entwickelt hat. In ähnlicher Weise bezieht sich der Begriff „Sequenzhomologie“ auf Übereinstimmungen in DNA-Nukleotidsequenzen oder in den Aminosäure-Sequenzen der Proteine. Finde die beiden Arten, die beim Insulin das größte Maß an Homologie aufweisen!
- Beachte: Diese mit Hilfe bioinformatischer Tools erstellten Dendrogramme gründen auf Daten, die sich auf einzelne Nukleotid- oder Proteinsequenzen beziehen! Zur Bestimmung der stammesgeschichtlichen Verwandtschaft zwischen einzelnen Arten müssen neben der Sequenzhomologie weitere Methoden verwendet werden. Welche sind dir bekannt?

Nun wollen wir zum eigentlichen Sinn und Zweck unserer Lerneinheit zurückkehren:

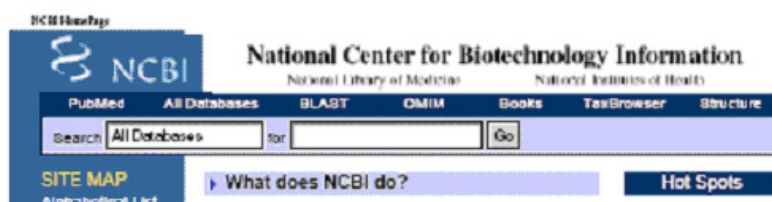
Welches Tier würdest du wählen, wenn du ein Insulin zur medizinischen Behandlung extrahieren wolltest, das dem menschlichen Insulin am ähnlichsten ist?

Aufgaben

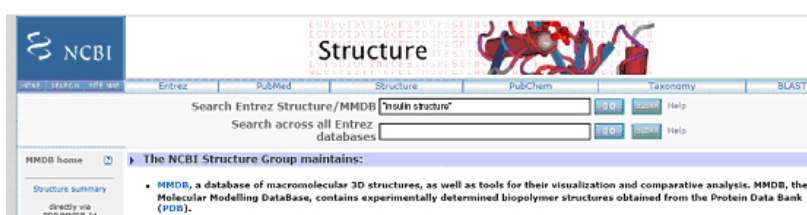
- 19) Welche Spezies ist auf Grundlage der Sequenzhomologie nach deiner Einschätzung am besten zur Insulin-Extraktion geeignet?
- 20) Was meinst du – würde die Verwendung dieses Tiers ethische oder wirtschaftliche Probleme aufwerfen? (Berücksichtige Aspekte wie Verbreitung, Zuchteignung, Artengefährdung!)
- 21) Ausgehend von diesen Überlegungen sowie unter Einbeziehung der Homologie: Welches Tier wäre nun der ideale „Spender“?

AI.4 Visualisierung der Raumstruktur

- Auch die räumliche Struktur von Proteinen ist in Datenbanken hinterlegt: Die Seite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> aufrufen und auf der blauen Menüleiste oben **Structure** auswählen.



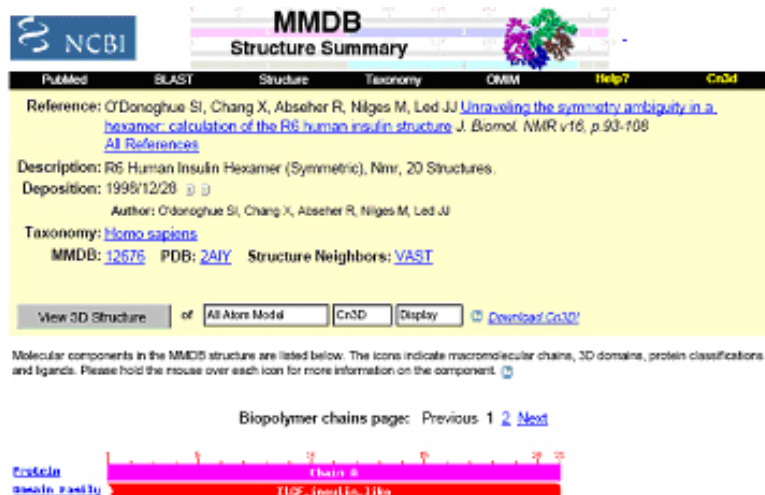
- Gebe auf dieser Seite bei „Search Entrez Structure/MMDB“ das Protein ein, dessen Struktur du sichtbar machen möchtest (hier, in Anführungszeichen: „insulin structure“), und starte die Suche mit dem Befehl **GO**.



- Als Suchergebnis erscheinen verschiedene Modelle, die jeweils mit einem Code bezeichnet sind (z. B. **2AIY**). Mit Hilfe des Programms Cn3D (das man von dieser Seite aus kostenlos herunterladen kann) lässt sich die räumliche Struktur von Proteinen visualisieren. Zusätzliche Informationen können über Anklicken des Proteincodes und **Related Structures** (Verwandte Strukturen) aufgerufen werden. Im Folgenden ein Beispiel:



- Der zugehörige wissenschaftliche Artikel (**Reference**) kann wertvolle Informationen liefern, etwa zum Insulin-Typ (rekombinant oder nicht) oder zu Methode und Bedingungen, mit der bzw. unter denen die Raumstruktur des Proteins analysiert wurde (So weisen manche Artikel darauf hin, dass das Hormon in einer zusätzlichen Substanz, z. B. in Phenol, gelöst wurde, die dann auch in der Strukturdarstellung erscheint).
- Informationen zu den dargestellten Polypeptidketten (**Biopolymer chains page**): Deutet man mit dem Cursor auf eine bestimmte Kette, wird deren Aminosäurezahl angezeigt. Darüber hinaus wird die Kette der Proteinfamilie zugeordnet, der sie angehört (rote Sequenz). Das Insulin beispielsweise ist innerhalb der Untergruppe „insulin-like“ (Insulin-artig) bei den Wirbeltieren Teil der „IGF_like family“ – der Proteinfamilie also, die dem Insulin-artigen Wachstumsfaktor („Insulin-like Growth Factor“) ähnelt. Die Seite teilt mit, dass zu dieser Proteinfamilie das Insulin sowie die Insulin-artigen Wachstumsfaktoren I und II gehören – Peptide, die in Steuerungsprozessen wie Stoffwechsel, Wachstum, Differenzierung und Fortpflanzung eine Vielzahl von Funktionen erfüllen. Auf der zellulären Ebene steuern sie Zellkreislauf, Apoptose (Zelltod), Zellwanderung und -differenzierung. Mit Ausnahme des Insulin-artigen Wachstumsfaktors setzen sich die aktiven Formen dieser Peptidhormone aus zwei Ketten (A- und B-Kette) zusammen, die über zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Vor allem in der A-Kette ist die Position der vier Cystein-Reste in hohem Maße konserviert: Cys1 verbindet sich innerhalb der Kette über eine Disulfidbrücke mit Cys3, während Cys2 und Cys4 an Cystein-Reste der B-Kette binden. Beide Ketten werden aus einem Propeptid gebildet.
- Anzeige der u. U. vorhandenen Lösungssubstanz (z. B. Phenol) über **Ligand**



- Durch Anklicken der Abbildung wird die Raumstruktur des Insulins aufgerufen (**2AIY – Cn3D 4.1**); in einem gesonderten Fenster werden zudem die Proteinsequenzen der dargestellten Ketten genannt (**2AIY – Sequence/Alignment Viewer**).

In unserem Beispiel offenbart das ausgewählte Bild **2AIY** die Raumstruktur eines Hexamers, d. h. des Molekularkomplexes, der aus der Verbindung von sechs Insulin-Monomeren hervorgeht, die jeweils aus A- und B-Ketten gebildet werden. Aufgrund seiner dreikantigen Symmetrie lässt sich der Komplex auch als Verbindung dreier Insulin-Dimere interpretieren.

- Die Abbildung kann in jede beliebige Richtung gedreht werden, indem man den Cursor auf einen Abbildungsteil bewegt und nach Anklicken bei heruntergedrückter linker Maustaste bewegt.
- Zwei Optionen sind nun möglich:
 - Auswahl der Darstellungsweise (Kugel-Stab-, Röhrenmodell usw.) im Menü über **Style_Rendering Shortcuts**. Bei der Option *worms* wird eine gut interpretierbare wurmförmige Struktur angezeigt.
 - Auswahl des Farbgebungsmodus über **Style_Coloring Shortcuts**: Die Option **Secondary Structure** hebt α -Helix- und β -Blatt-Struktur verschiedenfarbig hervor; bei Molecule wird jeder Polypeptidkette eine andere Farbe zugeordnet; **Hydrophobicity** markiert hydrophile und hydrophobe Regionen, **Charge** die jeweiligen Ladungen usw.
 - Eine gewählte Abbildung lässt sich über **Style _ Favorites _ Add/Replace** mit einem Dateinamen in den Favoriten abspeichern.
 - Über **Style _ Edit Global Style** sind die allgemeinen Einstellungen einsehbar und können verändert werden: Über **Settings** lassen sich Darstellungsweise, Farbgebung der Ketten und Hintergrund modifizieren. Weitere Darstellungsoptionen betreffen externe Moleküle (Zinkionen, Phenol u. dgl.), die Objekte, die die Sekundärstruktur darstellen, sowie die Disulfidbrücken. Um dich

mit den unterschiedlichen Optionen vertraut zu machen, schalte diese ein und aus und beobachte, wie sich die Abbildung verändert. Die Option **Labels** macht die Bezeichnungen der Aminosäuren sichtbar (über „Spacing“ lässt sich jede Aminosäure, eine einzelne oder aber zwei, drei usw. anzeigen). Die Option Details ermöglicht eine Einstellung der Größe einer jeweiligen Darstellung (z. B. des Durchmessers der wurmförmigen Struktur).

- Über **Show/Hide _ Pick Structures** ... kannst du festlegen, ob du alle oder nur einige Ketten sichtbar machen möchtest. Diese Option kann sinnvoll sein, um die A- und B-Ketten in den einzelnen Monomeren zu identifizieren.
- Die Option **View _ Animation _ Spin** zeigt ein automatisch rotierendes Modell.

- Unser Vorschlag für eine Lerneinheit:

Aufgaben

22) Wähle für Abbildung 2AIY unter **Style _ Coloring Shortcuts** den Farbmodus Molecule. Zeige über **Show/Hide _ Pick Structures** ... nur ein einzelnes Insulin-Monomer (A- und B-Kette) an und blende über **Style _ Edit Global Style** externe Moleküle und Objekte aus, die auf die α -Helix hinweisen.

Richte das Monomer so aus, dass du es bequem betrachten kannst. Markiere im Fenster **2AIY - Sequence/Alignment Viewer** die letzten drei aa der B-Kette (P-K-T, d. h. Prolin-Lysin-Threonin): Sie erscheinen in der Abbildung nun gelb markiert.

Kehre dann, ohne die Abbildung zu schließen, auf die Seite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/> zurück und suche die Struktur eines rekombinanten Insulins, z. B. des Lyspro-Insulins. Dies kann durch Eingabe von „Lys pro – human insulin“ (mit Anführungszeichen!) erfolgen; angezeigt werden dann mehrere mutierte Insulinmoleküle. Das Kürzel des gesuchten Moleküls lautet 1LPH: Lys(B28) pro(B29) -Human Insulin (menschliches rekombinantes Insulin, das durch die Positionierung eines Lysin-Rests an Position 28 der B-Kette sowie eines Prolins an Position 29 der B-Kette gewonnen wurde).

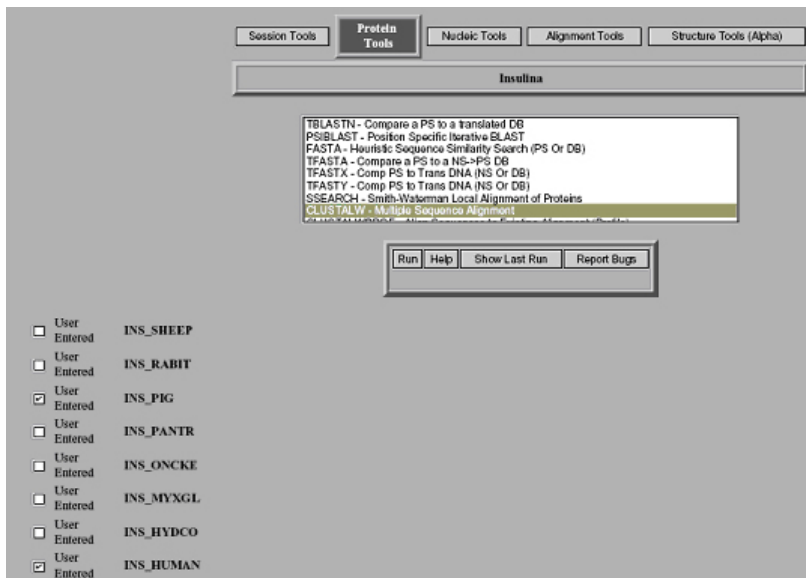
Öffne nun die dreidimensionale Abbildung, zeige wie beim 2AIY-Insulin nur ein Monomer an und markiere im Kasten **1LPH - Sequence/Alignment Viewer** die letzten drei aa der B-Kette (K-P-T).

Vergleiche nun die beiden Proteine: Eine bessere Ansicht der Winkel lässt sich durch die Auswahl des Röhrenmodells über **Style _ Rendering Shortcuts** erreichen; mit Hilfe der Option **Show/Hide _ Show Selected Residues** kannst du die Ketten bis auf die markierten Aminosäuren ausblenden.

23) Welche Unterschiede lassen sich beobachten?

24) Zum Vergleich des Humaninsulins mit einer anderen Rekombinante aus der Datenbanksuche kann diese Übung wiederholt werden.

25) Kehre zur „Insulin“-Sitzung zurück, indem du erneut auf <http://workbench.sdsc.edu/> gehst (dort unter **Session Tools** die Sitzung auswählen und über den Befehl **Resume Session** im mittleren weißen Eingabefeld wieder aufnehmen, anschließend über **Run** starten)! Markiere in **Protein Tool** Human- und Schweineinsulin und vergleiche die Proteinsequenzen über **CLUSTALW – Multiple Sequence Alignment** (Befehle **Run** und **Submit**)!



Identifiziere A- und B-Kette und erläutere den Unterschied!

```

INS_PIG      MALWTRLPLLLALLALWAPAPAQAFVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKARRAEEN
INS_HUMAN    MALWMRLPLLLALLALWGPDAAFVNQHLGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRAED
          **** *
          **** *

INS_PIG      PQAGAVELGGGLGG--LQALALEGPPQKRLEVEQCTFISGLYDLENYCH
INS_HUMAN    LQVGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRLEVEQCTFISGLYDLENYCH
          *.* ***** *. **.******. *****

```

Auf der Internetseite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez> als Suchbegriff „porcine insulin“ (mit Anführungszeichen!) eingeben. Raumstruktur (von 7INS) anzeigen, wie oben nur A- und B-Kette einblenden und jenen Rest markieren, der sich vom Humaninsulin unterscheidet. Vergleiche!

4 Behandlung mit rekombinantem Insulin

Nachteilig bei der Diabetesbehandlung mit tierischem Insulin war neben der für diese Methode zu hohen Nachfrage die Tatsache, dass diese Form des Insulins bei manchen Patienten eine Immunabwehrreaktion auslöste. Die Verwendung von halbsynthetischem Insulin bot dabei nur eine Teillösung, da die Herstellung auch hier vom Zugriff auf Schweineinsulin abhing. Die Chance, menschliches Insulin in unbegrenzten Mengen zu produzieren, versprach daher einen bedeutenden Wandel auf dem Wirkstoffmarkt.

4.1 Rekombinantes Insulin: Entwicklungsstufen

Wegbereitend für die Herstellung von rekombinantem Humaninsulin waren mehrere bedeutende wissenschaftliche Entdeckungen im vergangenen Jahrhundert, die die Behandlung des Diabetes revolutionieren sollten.

4.1.1 Restrictionenzyme

Im Jahre 1962 führte der Schweizer Biochemiker Werner Arber den Nachweis von Proteinen, die in der Lage sind, DNA zu zerschneiden, und nannte sie „molekulare Scheren“. Arber zeigte auf, dass das Bakterium *E. coli* mit einem enzymatischen Immunsystem ausgestattet ist, das exogene DNA erkennen und unschädlich machen sowie seine eigene DNA modifizieren kann, um deren Zerstörung zu verhindern.

Arber und seine Kollegen (Daniel Nathans und Hamilton Smith) nannten diese Proteingruppe „Restriktionsenzyme“; für ihre Entdeckung wurden sie 1978 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet. Die Forscher wiesen außerdem nach, dass die Aktivität dieser Enzyme kontrolliert abläuft: Jedes Enzym greift an einer spezifischen DNA-Sequenz (Consensus-Sequenz oder Restriktionsort genannt) an, welche es erkennt und aufspaltet.

4.1.2 Ligasen

Kurz nach Arbers Entdeckung fand Arthur Kornberg heraus, dass sich DNA-Fragmente durch den Einsatz eines Enzyms zusammenfügen lassen, das er „DNA-Ligase“ nannte.

Kornberg versuchte zu jener Zeit, aus Bruchstücken viraler DNA eine künstliche Virus-DNA herzustellen; es war ihm jedoch bis dahin nicht gelungen, biologisch aktive Moleküle zu synthetisieren. Als er nun die Ligase ins Spiel brachte, stellte er fest, dass dieses Enzym DNA-Fragmente zusammenfügen und die Phosphodiester-Bindungen zwischen den Nukleotiden wiederherstellen konnte.

Die so entstandene künstliche DNA war biologisch aktiv – sie konnte sich autonom vermehren. In

Wissenschaftskreisen galt Kornberg daher als der Wissenschaftler, der „in einem Reagenzglas Leben erschaffen konnte“.

4.1.3 Klonen

Ende der 1960er-Jahre waren die Methoden zur Aufspaltung und Zusammenfügung von DNA verbessert worden. Immer noch jedoch suchten die Wissenschaftler nach einer Möglichkeit, DNA zu kopieren, um ausreichende Mengen davon für ihre Forschungsarbeit zur Verfügung zu haben.

Diese Möglichkeit wurde schließlich 1971 entdeckt, als Wissenschaftler die bakterielle Transformation entwickelten. Bei dieser Methode wird die Einschleusung kleiner DNA-Molekülringe (sogenannter Plasmide, s. Abb. 4.1) in Bakterien (z. B. *Escherichia coli*, s. Abb. 4.2) verstärkt, ein Prozess, der auch in der Natur vorkommt, dort jedoch selten ist. Die bakterielle Transformation wird durch die Modifikation mehrerer chemisch-physikalischer Eigenschaften der Bakterienmembran ermöglicht; dazu werden chemische Substanzen (CaCl_2) in Verbindung mit einer schockartigen Erwärmung (Hitzeschock) oder einem elektrischen Schock unter Hochspannung (Elektroporation) eingesetzt. Die Bakterien werden dadurch kurzzeitig für exogene DNA durchlässig gemacht (permeabilisiert; s. Abb. 4.3).

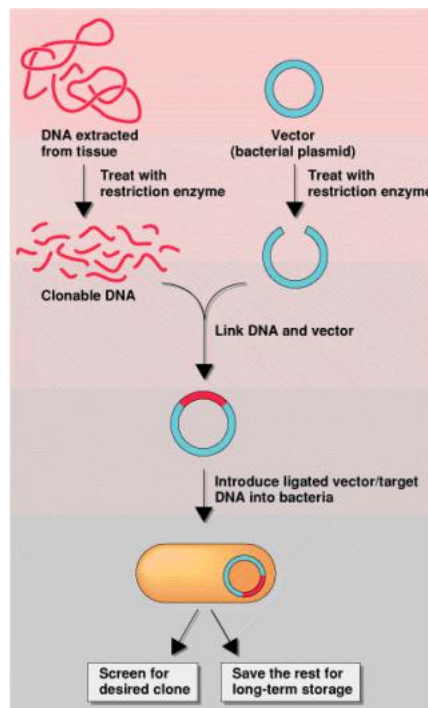


Abb. 4.3 Klonierungsphasen (Bildquelle: www.courses.cm.utexas.edu)

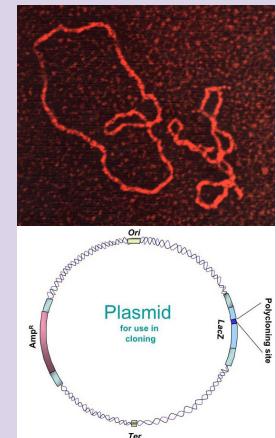


Abb. 4.1 Oben: Plasmide (Bildquelle: www.gen.cam.ac.uk); Unten: Plasmidkarte (Bildquelle: www.langara.bc.ca)

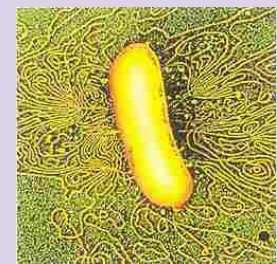


Abb. 4.2 *Escherichia Coli* (Bildquelle: www.littletree.com)

4.1.4 Rekombinante DNA-Technologie

Nun wussten die Wissenschaftler, wie DNA sich zerschneiden, zusammenfügen und kopieren lässt. Noch während sie mit der Verbesserung dieser Methoden beschäftigt

waren, begannen sie über mögliche Anwendungen nachzudenken.

Der Begriff „rekombinante DNA“ (rDNA) bezeichnet eine durch die Kombination von Genmaterial aus unterschiedlichen Lebewesen künstlich hergestellte DNA-Sequenz, wie sie bei einem Plasmid vorliegt, das ein gewünschtes Gen enthält.

Die rekombinante DNA-Technologie basiert auf der Entdeckung (durch Herbert W. Boyer und Stanley Cohen zu Beginn der 1970er-Jahre), dass menschliche Gene sich in Plasmide und anschließend in Bakterien einfügen lassen, wo sie, kontinuierlich aktiviert, funktionsfähige Proteine hervorbringen. Mit der rekombinanten DNA wurde ein neues Zeitalter der Biologie eingeläutet: Die Erkenntnis, dass DNA ihre Funktionsfähigkeit auch nach einem Transfer in einen anderen Organismus behält, hat der Forschung unzählige Möglichkeiten eröffnet.

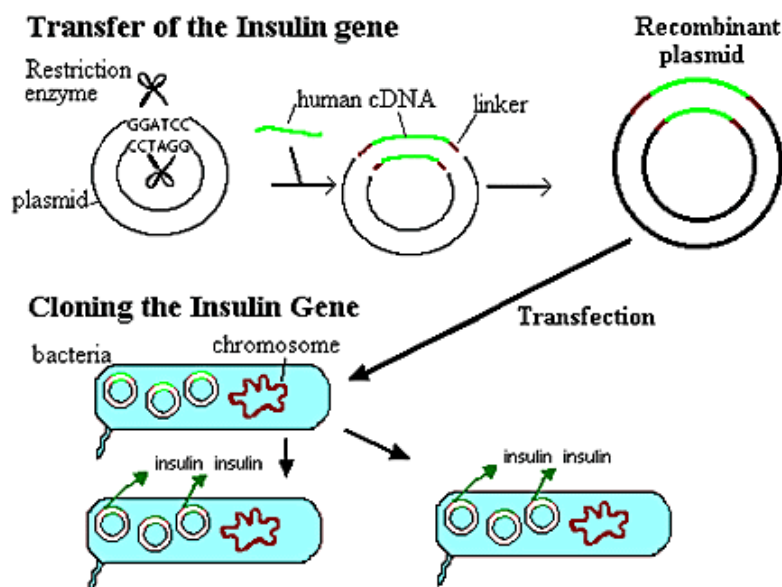


Abb. 4.4 Synthese von Humaninsulin durch rekombinante DNA-Technologie (Bildquelle: www.accessexcellence.org)

Mit der Zusammenführung der oben beschriebenen Methoden in einem einzigen Experiment zur Herstellung eines menschlichen Proteins aus rekombinanter DNA (Abb. 4.4) wurde 1976 die Biotechnologie Wirklichkeit. Mit Hilfe von Restriktionsenzymen plante man das menschliche Insulin-Gen in ein Plasmid einzufügen, das anschließend durch Transformation in Bakterien eingebracht werden sollte. Infolge der Expression des Humangens in Bakterien würden der Forschung auf diese Weise unbegrenzte Mengen des Hormons zur Verfügung stehen.

Insulin wurde zum ersten Marktprodukt der Biotechnologie: Anstelle des aus der Bauchspeicheldrüse von Schlachttieren gewonnenen Insulins konnten Diabetespatienten nun ein Hormon erhalten, dass mit dem im gesunden menschlichen Körper produzierten Insulin identisch war.

4.2 Synthese menschlichen rekombinanten Insulins

In den 1970er-Jahren stellten sich zwei Biotechnologie-Unternehmen – Genentech and Biogen – der Aufgabe, mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie Insulin zu synthetisieren. So simpel das Prinzip erscheinen mochte, gab es dennoch erhebliche Probleme: Die Nukleotidsequenz des menschlichen Insulins war gänzlich unbekannt, und der Herstellung menschlicher rekombinanter DNA waren, wie oben beschrieben, nach der Konferenz von Asilomar enge Grenzen gesetzt worden.

Zur Lösung der Nukleotidsequenz des Insulins und dessen bakterieller Transformation versuchte man es mit zwei Vorgehensweisen. Erfolg haben sollte letztlich nur eine der beiden Strategien und eines der beiden Unternehmen.

4.2.1 Die Genentech-Strategie

Eine Synthese von Humaninsulin mit Hilfe der rekombinanten DNA-Technologie war nur möglich, wenn man die Sequenz der Insulin-DNA kannte. Die Aminosäuresequenz des Insulins war kein Geheimnis mehr. Von ihr leiteten die Forscher von Genentech daher die Nukleotidsequenz des Humaninsulins ab. Anschließend generierte man die hergeleitete Sequenz, baute sie in ein Plasmid ein und fügte dieses zur Insulinherstellung durch Transformation in Bakterien ein.

Auf diese Weise gelang es den Forschern, die Sequenz des Humaninsulins zu rekonstruieren, ohne selbst menschliche DNA verwenden zu müssen, womit sie die Beschränkungen der Konferenz von Asilomar hinsichtlich der menschlichen rekombinanten DNA umgehen konnten.

4.2.2 Biogen strategy

Walter Gilbert und seine Forschungsgruppe bei Biogen wollten Humaninsulin gewinnen, indem sie die DNA-Sequenz isolierten, die für das Hormon kodiert. Die Sequenz des Insulins der Ratte war bekannt. Da die DNA-Sequenzen von Human- und Ratteninsulin einander sehr ähnlich sind, würde man die Rattensequenz als DNA-Sonde verwenden und auf diese Weise die Humansequenz isolieren können. Dazu griffen die Forscher auf eine in Bakteriophagen angelegte „Bibliothek“ humaner DNA-Sequenzen zurück. Die DNA-Sequenz der Ratte wurde mit einem radioaktiven Marker versehen und als Sonde zur Auffindung der Phage mit der Sequenz des Humaninsulins eingesetzt. Die so gefundene DNA-Sequenz wurde anschließend isoliert und in Bakterien eingeschleust. So vielversprechend diese zweite Strategie erschien – sie misslang: Aufgrund einer Kontamination während der Experimente erwies sich die von den Forschern isolierte DNA als Ratten- statt wie erwartet als Humaninsulin-Sequenz.

4.3 Herstellung von rekombinantem Insulin

Wer in Bakterien Insulin (oder jedes beliebige andere eukaryotische Protein) herstellen möchte, muss mehrere Faktoren berücksichtigen: Die Gene von

Eukaryoten (z. B. des Menschen) enthalten „Introns“ genannte Sequenzen, die nicht für ein Protein kodieren. Bakterien hingegen haben in ihren Genen keine Introns; dementsprechend fehlt ihnen das biochemische Instrumentarium zur Entfernung dieser Zwischensequenzen.

Ebenso ist zu berücksichtigen, dass manche eukaryotischen Proteine nach der Translation Veränderungen erfahren. Dies ist beim Insulin der Fall, das zunächst zu Präproinsulin translatiert wird und erst nach anschließenden Reifungsvorgängen in seiner endgültigen Sequenz und Konformation vorliegt. Derartige Reifungsphasen finden in Bakterien nicht statt; daher musste man nach Alternativlösungen suchen.

4.3.1 Insulin aus Bakterien

Eine Produktion rekombinanter Proteine ist in verschiedenen Systemen möglich: in Bakterien, Hefe, Insekten- oder Säugerzellen. Bakterienzellen haben den Vorteil, dass sie leicht zu handhaben sind; zudem ist ihre Replikationszeit kurz und sie erzielen hohe Erträge bei niedrigen Produktionskosten.

Zur Herstellung von Insulin aus Bakterien bedienten sich die Forscher zweier unterschiedlicher Methoden:

a) Die Zwei-Ketten-Methode

Diese Methode wurde anfänglich von Genentech in Zusammenarbeit mit Eli Lilly and Company angewandt. Wie bereits beschrieben wird dabei auf Grundlage der Aminosäuresequenzen von A- und B-Kette zunächst ein DNA-Strang synthetisiert. Anschließend erfolgt unter Zuhilfenahme eines „DNA-Polymerase“ genannten Enzyms die Synthese des Komplementärstrangs. Auf diese Weise erhielten die Forscher die beiden DNA-Fragmente, die es in die Plasmide einzuführen galt.

Jedes Fragment wird daraufhin in ein Plasmid innerhalb des Gens eingeführt, das für β -Galactosidase (LacZ) codiert, woraufhin die Bakterien große Mengen an Fusionsproteinen (F-Proteinen) produzieren, die die am Ende des LacZ-Enzyms befestigte Insulinsequenz enthalten. Ebenfalls im Plasmid enthalten ist das Resistenzgen für Tetracyclin: Da die Plasmide in den Bakterien eine Transformation durchlaufen, wird dieses Antibiotikum hinzugegeben, um das Wachstum nicht transformierter Bakterien zu hemmen.

Sind die transformierten Bakterien gewachsen, wird das Fusionsprotein aus β -Galactosidase und Insulin extrahiert und gereinigt. Die Trennung der Insulinketten von der β -Galactosidase erfolgt durch Zugabe von Bromcyan (auch: Cyanogenbromid, Cyanobromid), einer Chemikalie, die auf Methioninreste folgende Peptidbindungen durchtrennt. Da in den Fusionsproteinen zwischen β -Galactosidase und den Insulinketten ein Methioninrest eingefügt ist, bringt die Behandlung mit Bromcyan intakte und von den F-Proteinen gelöste Insulinketten hervor. Abschließend werden die zwei Proteinketten vermisch, wobei sich unter Idealbedingungen Disulfidbrücken ausbilden. Im Ergebnis führt diese Vorgehens-

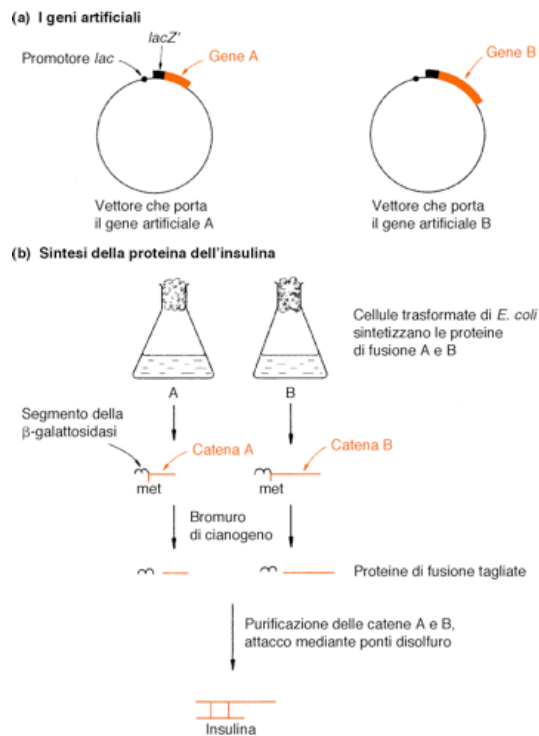


Abb. 4.5 Herstellung von rekombinantem Insulin nach der Zwei-Ketten-Methode (Bildquelle: www.zanichelli.it)

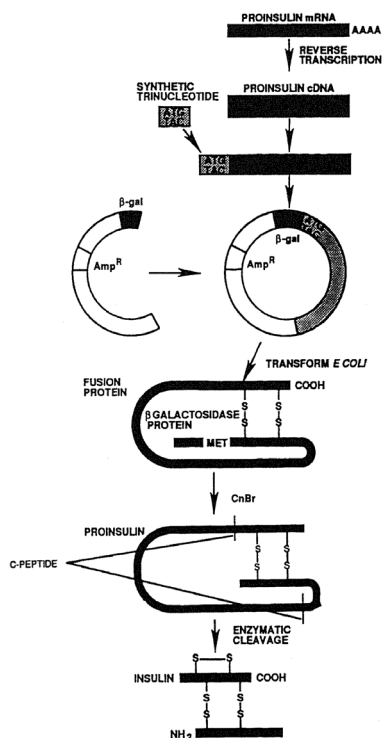


Abb. 4.6 Die Proinsulin-Methode (Bildquelle: Recombinant DNA - a short course; Watson JD et al, 1983)

weise zur Synthese funktionsfähigen Insulins in Bakterien.

b) Die Proinsulin-Methode

Die Zwei-Ketten-Methode wurde später abgewandelt, indem man ein einzelnes β-Galactosidase-Insulin-Fusionsprotein herstellte, das sich in nur einem Arbeitsschritt zertrennen lässt und reifes Insulin freigibt. Bei dieser Methode wird aus der mRNA die Proinsulin-cDNA synthetisiert und deren Sequenz dabei durch Hinzufügen eines Codons am 5'-Ende modifiziert, das für Methionin codiert. Die solchermaßen modifizierte cDNA wird anschließend in ein Plasmidgen (z. B. das in der oben beschriebenen Methode verwendete LacZ) eingeführt und in Bakterien amplifiziert. Das in den Bakterien

produzierte Proinsulin wird sodann durch den Abbau des Methioninrests vom β -Galactosidase-Enzym getrennt. Zur erneuten Auffaltung angeregt, kann die Kette im Anschluss die Disulfidbrücken ausbilden; nach der Entfernung des C-Peptids durch eine enzymatische Reaktion liegt schließlich das reife Protein vor.

4.3.2 Insulin aus der Hefe

Zur Vereinfachung des Reinigungsverfahrens beschlossen die Forscher eine Methode zu entwickeln, bei der das im Zellinnern produzierte Insulin direkt ins Nährmedium ausgeschieden würde. Hierzu verwendeten sie Hefe statt Bakterien.

Die Hefe ist ein Eukaryot, ein Organismus also, der mit einem Kern ausgestattet und daher in der Lage ist, den Reifungsprozess von Humaninsulin zu vollenden. Bei dieser Methode wird die Proinsulinsequenz in ein Plasmid eingebracht; die Transformation des so entstandenen rekombinanten Plasmids vollzieht sich in der Hefe. In dieser Phase kann die Hefe ein Proinsulin produzieren, das auf dieselbe Weise verarbeitet wird wie im Menschen (Abb. 4.7). Das Proinsulin faltet sich zu einer geschlossenen Struktur, und zwischen den Cysteinresten können sich reguläre Disulfidbrücken bilden. Die Prosequenz aus 33 Aminosäuren wird regulär entfernt und das reife Protein freigegeben. Proinsulin aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde erstmals vom Unternehmen Novo Nordisk S/A produziert.

Es gibt heute unterschiedliche Insulinpräparate: rasch, kurz (auch: regulär), intermediär (mittellang) und lang wirksame sowie vorgemischte Insuline. Bei grundsätzlich identischer Wirkungsweise unterscheiden sich diese Insuline allein in ihrer Wirkdauer.

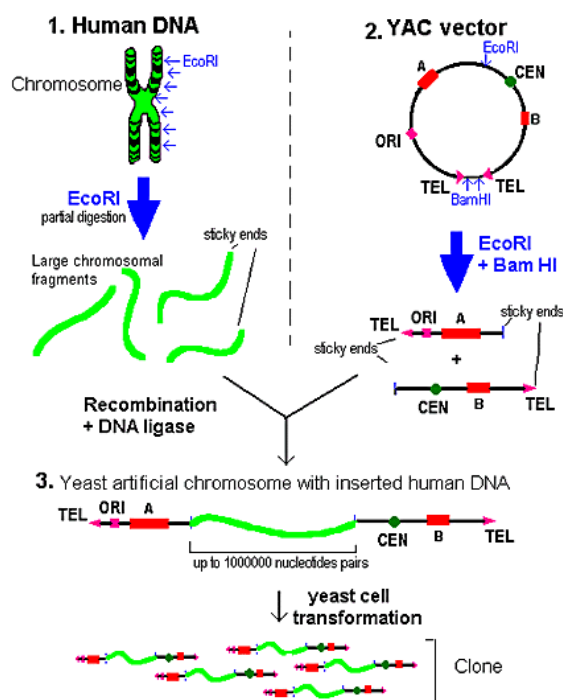


Abb. 4.7 Herstellung von Insulin aus Hefe (Bildquelle: www.accessexcellence.org)

Aus klinischer Sicht verteilen sich Monomere und Dimere rascher im Blut als die aus sechs Bausteinen bestehenden Hexamere. Dementsprechend werden Insulinpräparate, die überwiegend hexameres Insulin enthalten, vom Körper langsamer aufgenommen. Die Forscher bemühten sich daher, rekombinante Insulinmoleküle mit einer verminderten Tendenz zur Dimer- und Hexamerbildung herzustellen. Ein solches Präparat ist „Lispro“, ein sogenanntes „intelligentes Insulin“, das durch Inversion von Lysin- und Prolinresten am C-Terminus (Carboxyl-Ende) der B-Kette hergestellt wird (Abb. 4.8): Infolge dieser Modifikation kann das Hormon rascher aufgenommen werden, ohne dass dafür die Rezeptorstelle verändert werden müsste.

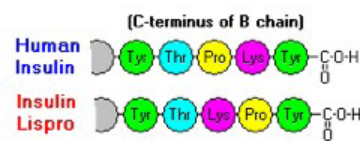


Abb. 4.8 Lispro-Insulin (Bildquelle: www.minerva.unito.it)

Parallel zur Optimierung des Injektionsverfahrens sind in den letzten Jahren neue Programme zur zielgerechten Behandlung mit Insulin entwickelt worden. Dank der heute möglichen Kombination von Insulinen mit unterschiedlicher Wirkdauer lässt sich der Blutzuckerspiegel gut kontrollieren. Von maßgeblicher Bedeutung ist dabei auch die parallele Verwendung eines rasch wirksamen Insulins zu den Hauptmahlzeiten und eines lang wirksamen Präparats zur Deckung des nächtlichen Insulinbedarfs sowie für die hyperglykämischen Phasen des Tages.

Lernheit II – Molekularbiologie

Simulation der Synthese von rekombinantem Insulin

All.1 Einführung

In dieser Lerneinheit sollen die wichtigsten Schritte der Synthese von rekombinantem Humaninsulin nachvollzogen werden.

Das Insulin-Gen lässt sich heutzutage mit einer Methode aus dem Genom isolieren, die man Polymerase-Kettenreaktion oder kurz PCR (Polymerase Chain Reaction) nennt.

Noch bis Mitte der 1980er-Jahre konnte man DNA-Kopien ausschließlich durch Einfügen einzelner DNA-Fragmente in Bakterien herstellen; aus unzähligen Kolonien auf einer Platte galt es anschließend das gewünschte Fragment auszusondern. 1985 entwickelte Kary Mullis eine äußerst präzise Methode zur Selektion und Amplifizierung eines DNA-Fragments. Diese Methode wird heute allgemein PCR genannt; Mullis wurde für seine bahnbrechende Erfindung 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.

Die PCR ermöglicht die Amplifizierung von Nukleinsäurefragmenten, sofern Anfangs- und Endsequenzen dieser Fragmente bekannt sind. Mit Hilfe der PCR lassen sich *in vitro*, d. h. außerhalb des lebenden Organismus, und in kurzer Zeit große Mengen an Genmaterial herstellen.

Das Insulin-Gen kann, sobald es isoliert ist, modifiziert werden, indem man an seinen Enden Sequenzen anfügt, die von einem Restriktionsenzym erkannt werden. Dieses Enzym erkennt darüber hinaus eine spezifische Sequenz auf dem Plasmid. Das Restriktionsenzym schneidet sowohl das Plasmid als auch die Endsequenzen des Insulin-Gens spezifisch und asymmetrisch; so entstehen kohäsive Enden (engl.: sticky ends), die eine Einfügung des Gens in das Plasmid erleichtern (Abb. All.1).

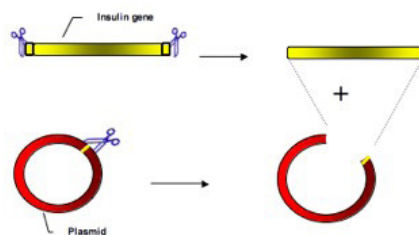


Abb. All.1 Bau des rekombinanten Plasmids

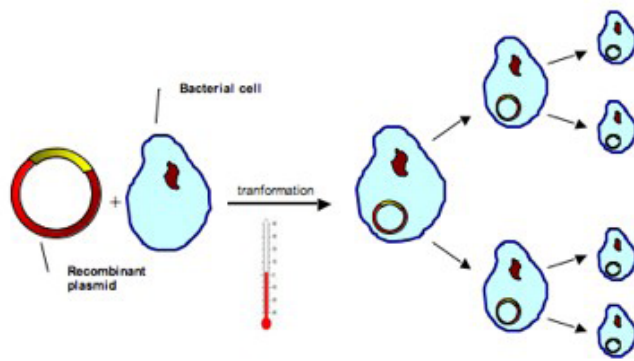


Abb. AII.2 Integration des rekombinanten Plasmids in die Bakterienzellen

Das so entstandene rekombinante Plasmid wird anschließend in die Bakterienzelle integriert (auf dem Wege der sogenannten Transformation; Abb. AII.2). Es enthält sämtliche für die Transkription des Insulin-Gens benötigten Elemente, sodass das Gen in der Folge von der Translationsmaschinerie des Bakteriums translatiert wird.

AII.2 Versuchsprotokoll

Für diese Lerneinheit erhält jede Gruppe ein Reagenzglas mit den verschiedenen rekombinanten Plasmiden, die durch die Einfügung des Insulin-Gens in ein Plasmid entstanden und anschließend mit dem gleichen Restriktionsenzym verdaut worden sind.

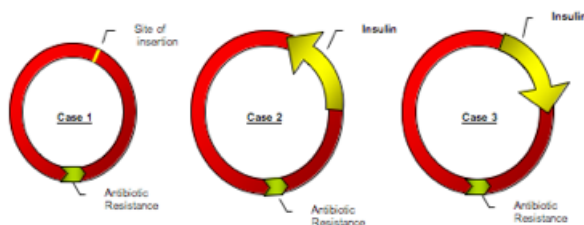


Abb. AII.3 Die verschiedenen möglichen Interaktionen zwischen Gen und Plasmid

Unterschiedliche Reaktionen zwischen Gen und Plasmid sind denkbar:

Fall 1 – Das Plasmid schließt sich, ohne mit dem Gen in Wechselwirkung zu treten.

Fall 2 – Das Gen fügt sich in der falschen Ausrichtung ins Plasmid ein.

Fall 3 – Das Gen fügt sich in der richtigen Ausrichtung ins Plasmid ein.

Unser Ziel besteht in der Auswahl jener Fälle, in denen sich das Gen korrekt ins Plasmid eingefügt hat und ein funktionstüchtiges Protein produziert.

Um das mit korrekter Gen-Ausrichtung entstandene rekombinante Plasmid

erkennbar zu machen, muss man das Ligationsprodukt (das sämtliche Verbindungen aus der Interaktion von Gen und Plasmid enthält) auf dem Wege der Transformation in Bakterien einführen. Ein Teil der Bakterienzellen wird im Laufe dieses Prozesses dem rekombinanten Plasmid Zugang gewähren.

Zur Einführung der verschiedenen rekombinanten Plasmide in die Bakterienzellen (**REAGENZGLAS B**) führt jede Gruppe eine Transformation durch.

1. 3 µl des rekombinanten Plasmids entnehmen und mit 50 µl Bakterien mischen.
2. Reagenzglas durch seitliches Klopfen mit dem Finger schütteln und 30 min lang auf Eis inkubieren.

Im nächsten Schritt wird die Temperatur plötzlich gesteigert, um den Eintritt der Plasmide in die Bakterien zu unterstützen.

3. Reagenzglas im Anschluss an die Inkubation auf Eis 2 min lang einer Temperatur von 42°C aussetzen.
4. Sofort danach Reagenzglas für die Dauer von 2 min einer Inkubation auf Eis aussetzen.
5. 500 µl LB-Pufferlösung ins Reagenzglas geben und 30 min lang bei 37°C inkubieren. Die transformierten Bakterien können sich dadurch besser vom Hitzeschock erholen und während dieser Zeit das Antibiotika-Resistenzgen exprimieren.
6. Reagenzglas 1 min lang bei 3000 U/min zentrifugieren. 500 µl Überstand dekantieren (entfernen). Restlichen Glasinhalt gründlich mischen.
7. 50 µl des Glasinhalts auf eine Agarplatte (mit dem Antibiotikum) geben und mit einem Spatel auf der Oberfläche der Platte verstreichen.
8. Platte mit dem Boden nach oben über Nacht bei 37°C inkubieren.

Im Plasmid enthalten ist ein Gen, das die Bakterien gegen ein spezifisches Antibiotikum resistent macht. Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, können daher im Beisein des Antibiotikums wachsen.

Die auf der Platte wachsenden Bakterien bilden aus identischen Zellen bestehende Kolonien. Jede Kolonie entstammt einer anderen Zelle und enthält somit ein anderes rekombinantes Plasmid. Unser Ziel ist es nun, eine Bakterienkolonie zu finden, in deren Plasmid das Gen in korrekter Ausrichtung eingefügt wurde: Diese Zellen sind in der Lage, rekombinantes Insulin zu produzieren.

Am folgenden Tag ist sichtbar, wie viele Kolonien nach der Transformation auf der

Platte entstanden sind.

Nun können wir die Kolonien analysieren und jene auswählen, die das Plasmid während der Transformation korrekt aufgenommen haben. Dafür müssen die Kolonien getrennt angesetzt werden; so können sich die Bakterien in Suspension amplifizieren.

9. Jede/r Gruppenteilnehmer/in wählt eine Kolonie von PLATTE A aus und überträgt sie in ein Reagenzglas, das 3 ml LB-Puffer und das Antibiotikum enthält.

10. Bakterien zum Wachstum über Nacht bei 37°C inkubieren.

Am folgenden Tag gilt es, die Plasmid-DNA aus der Bakteriensuspension zu isolieren und zu reinigen.

11. 2 ml Bakteriensuspension in ein 2 ml-Glas geben.

12. Bei höchster Geschwindigkeit 15 s lang zentrifugieren; anschließend können die Zellen geerntet werden.

13. Überstand dekantieren.

14. Bakterienpellet in 300 µl P1-Puffer resuspendieren (Vortex).

15. 300 µl P2-Puffer hinzugeben und Reagenzglas vorsichtig 3–5 Mal auf den Kopf drehen.

16. 5 min lang auf dem Labortisch ruhen lassen.

Der P2-Puffer zerteilt die Bakterienmembran und die RNA und isoliert dabei die DNA von den Bakterien. Die Inkubationszeit gewährleistet, dass das Plasmid aus den Bakterien freigegeben wird, die Chromosomen-DNA dagegen zurückbleibt.

17. 300 µl P3-Puffer hinzugeben und Reagenzglas vorsichtig schütteln.

18. 10 min lang auf Eis inkubieren.

Der P3-Puffer fällt sämtliche Zellabfälle aus; das rekombinante Plasmid bleibt dabei im Überstand zurück.

19. Bei Höchster Geschwindigkeit 10 min lang zentrifugieren.

20. 900 µl Überstand (mit dem rekombinanten Plasmid) in ein sauberes 1,5

ml-Glas geben.

21. 630 µl Isopropanol hinzugeben, um die DNA auszufällen.

22. Bei höchster Geschwindigkeit 20 min lang zentrifugieren.

23. Überstand entfernen und zur Reinigung der DNA 200 µl 70%iges Ethanol hinzugeben.

24. Bei höchster Geschwindigkeit 2 min lang zentrifugieren.

25. Überstand entfernen und DNA-Pellet einige Minuten lang trocknen lassen.

26. DNA in 50 µl Wasser erneut suspendieren.

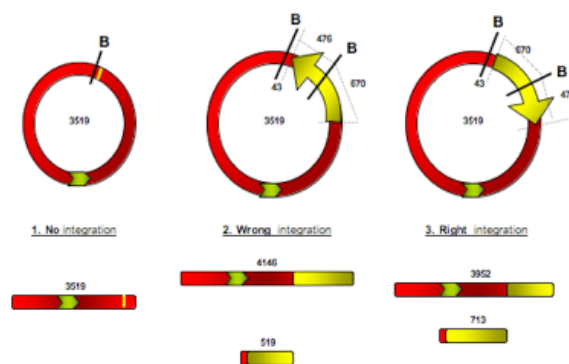


Abb. AII.4 Analyse von DNA-Banden zur Bestimmung der Kolonien, die rekombinantes Insulin produzieren können

Nun kann untersucht werden, ob die untersuchte Bakterienkultur während der Transformation das richtige rekombinante Plasmid aufgenommen hat.

Dazu muss die DNA mit einem weiteren Restriktionsenzym (dem sogenannten BamHI) digeriert werden, das je nach der Ausrichtung des Gens im Plasmid unterschiedlich lange Fragmente hervorbringt

27. Reaktionsmischung für die enzymatische Reaktion vorbereiten. Für jede DNA-Probe werden benötigt:

- 1 µl Enzym (BamHI)
- 2 µl BamHI-Puffer
- 13.9 µl Wasser
- 0.1 µl BSA 100X

28. In jedes Reagenzglas 17 µl Reaktionsmischung und 3 µl DNA geben.

29. Bei 37°C inkubieren.

Die enzymatische Reaktion dauert etwa 1 Stunde.

Anschließend lädt jede Gruppe das Produkt auf eine Agarose-Gel.

30. 1 g Agarose abwiegen und in einem Kolben mit 50 ml TAE 1x-Puffer auflösen. Lösung in der Mikrowelle kochen und vorsichtig mischen, bis sie klar ist.

31. Einen Elektrophorese-Schlitten an den Rändern mit Klebeband abdichten und Taschenformer (Kamm) einsetzen.

32. Agarose-Lösung in den Elektrophorese-Schlitten gießen. Setzen (polymerisieren) lassen.

Als Kontrollversuch (**C**) muss auf dasselbe Gel eine geschlossenes unverdautes Plasmid geladen werden. So wird überprüft, ob tatsächlich eine enzymatische Reaktion stattgefunden hat und das Plasmid digerierte wurde. Wenn unsere Probe im Gel genauso aussieht wie das Kontrollgel, ist das Plasmid noch geschlossen und das Enzym hat nicht funktioniert.

Um die Proben auf das Gel zu laden, muss zunächst in jedes Reagenzglas ein Ladepuffer (**LB**) gegeben werden. Diese Pufferlösung „beschwert“ die Probe, sodass sie auf den Boden der Tasche sinken kann.

Zur Bestimmung der Größe der DNA-Fragmente, die infolge der enzymatischen Reaktion entstanden sind, muss das Gel außerdem mit einem Molekularmassensmarker (**S**) beladen werden, der aus einer Mischung von DNA-Fragmenten bekannter Länge besteht.

33. Klebeband um das Gel entfernen. Gel in die Kammer einspannen und diese mit TAE 1X-Puffer füllen (die Flüssigkeit muss das Gel bedecken).

34. Vom Produkt des Digerierens 10 µl abnehmen und in ein sauberes Reagenzglas geben.

35. In Produkt und Kontrollgel (C) je 4 µl Ladepuffer (LB) einpipettieren.

36. 14 µl Kontrollgel (C) in die erste Tasche geben.

37. In die zweite Tasche 14 µl TUBE E geben.

38. In die dritte Tasche 5 µl Marker (S) geben.

39. Gel bei 100 V etwa 40 min polymerisieren lassen.

40. Mit UV-Licht die Größe der DNA-Fragmente untersuchen.

Indem wir mit Hilfe der Marker-DNA (Größenordnung: Basenpaare, bp) die Größe

der Fragmente in der Probe vergleichen, können wir feststellen, ob unsere Bakterienkolonie das korrekt ausgerichtete rekombinante Plasmid aufgenommen hat oder nicht. Bakterienkolonien, die ein Plasmid enthalten, dessen Insulin-Gen korrekt ausgerichtet ist, werden weiter amplifiziert; entsprechend stimuliert, produzieren sie rekombinantes Insulin.

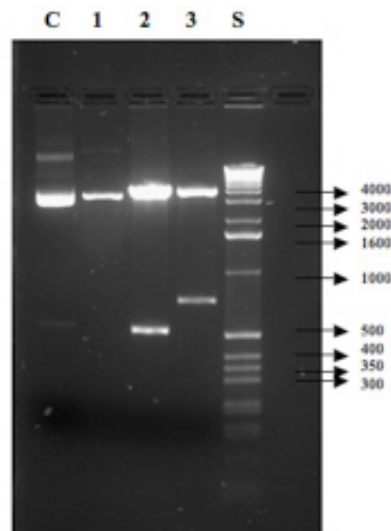


Abb. AII.5 Proben auf dem Agarose-Gel (Foto)
 – C: Kontrollversuch (geschlossenes Plasmid),
 Probe 1 (leeres Plasmid), Probe 2 (Plasmid mit falsch ausgerichtetem Gen), Probe 3 (Plasmid mit richtig orientiertem Gen), S: Bezugsgröße

AII.3 Reagenzien und Geräte

AII.3.1 Reagenzien für die Durchführung dieser Lerneinheit

- **TUBE A:** Dieser Reaktionsansatz enthält die unterschiedlichen Produkte der Wechselwirkung zwischen Plasmid (pCR® -Blunt II-TOPO®, 3519 bp; Vertrieb durch Invitrogen) und Insert (Sequenz aus 1.146 bp, im Labor amplifiziert).
- **TUBE B:** *Escherichia.coli*-Stamm DH5α. Durch Behandlung mit Calciumchlorid wurden diese Bakterien für die Aufnahme von Plasmid-DNA kompetent gemacht.
- **LB-Puffer** (für 1 l Lösung): 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, pH-Wert 7.0
- **Antibiotikum:** Kanamycin, Endkonzentration 25 µg/ml
- **P1-Puffer:** Tris-Cl 50 mM, pH 8.0; EDTA 10mM; RNase A 100 µg/ml
- **P2-Puffer:** NaOH 200 mM, SDS 1%
- **P3-Puffer:** Kaliumacetat 3 M, pH 5.5
- **BamHI:** Restriktionsenzym zur Erkennung der Sequenz (GGATCC)
- **BamHI-Puffer:** NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, BSA

100 µg/ml

- **DNA interkalierendes Agent:** SYBR Safe™ DNA Gel-Farbstoff in TAE 1X; Vertrieb durch Invitrogen
- **TAE 1X-Puffer:** Tris-Acetat 0.04 M, EDTA 0.001 M
- **Ladepuffer (LB) 6X:** Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA 50 mM, Ficoll 400 10%, Bromophenolblau 0.25%
- **Kontroll-Gel (C):** geschlossenes Plasmid aus der Fusion von Plasmid und Insert (4.665 bp)
- **Marker (S):** 1 Kb DNA-Leiter; Vertrieb durch Invitrogen

All.3.2 Materialien und Lösungen für die Durchführung der Lerneinheit

- Schutzhandschuhe
- Pipetten (P2, P200, P1000)
- Pipettenspitzen
- Eppendorf-Röhrchen (1,5 ml, 2 ml)
- Eiskübel
- Zeitschaltuhren
- Glaskolben
- Bakterien-Ösen
- Bakteriengläser
- steriles Wasser
- Isopropanol
- 70%iges Ethanol
- Eis
- Agarose
- Agarplatten mit Antibiotikum

All.3.3 Geräte für die Durchführung der Lerneinheit

- Elektrophorese-Kammern, Netzanschluss
- Mikrowelle
- Vortex
- Wärmeblock
- Inkubator (Brutschrank), 37°C
- Ultrazentrifuge
- UV-Transilluminator

All.4 Allgemeine Vorschriften zur Arbeitssicherheit im Labor

All.4.1 Allgemeine Vorschriften

Im Labor nicht allein arbeiten.

Das Rauchen ist innerhalb des Labors untersagt.

Es ist verboten, im Laborraum zu essen oder zu trinken oder Lebensmittel in den Kühlschränken einzulagern, in denen Labormaterialien aufbewahrt werden.

Innerhalb des Laborraums müssen Laborschutzkittel getragen werden. Vor Betreten von Aufenthaltsräumen und Bibliothek sowie vor den Mahlzeiten muss der Kittel abgelegt werden.

Zum Reinigen von Labormaterialien unter keinen Umständen Säure verwenden, sondern geeignete Reinigungsmittel.

Vor dem Umgang mit Gefahrstoffen stets mit den erforderlichen Sicherheitsvorschriften vertraut machen. Auf sämtlichen Originalverpackungen weist ein Symbol auf die mit der Verwendung der jeweiligen Substanz verbundenen Gefahren hin (T – giftig, Xi – reizend, C – ätzend, E – explosionsgefährlich usw.).

Jeder Laborraum muss mit einem Verbandkasten sowie mit einem Merkblatt über Erste-Hilfe-Maßnahmen bei Unfällen ausgestattet sein.

Zersplittertes oder gesprungenes Glas nicht verwenden. Bei der Durchführung gefährlicher Arbeiten Einweghandschuhe tragen, diese nach Gebrauch entsorgen.

Die letzte Person, die abends das Labor verlässt, hat sich vom ordnungsgemäßen Zustand der Laborausstattung (Lösungsmittel, Geräte, Chemikalien, Kulturen usw.) zu überzeugen.

All.4.2 Sicherheitsvorschriften für den Einsatz elektrischer Geräte

An Mehrfachsteckdosen niemals mehr als ein Gerät anschließen!

Defekte an elektrischen Geräten, verschlissene oder beschädigte Kabel und Stecker sind dem technischen Personal zu melden.

Elektrische Geräte, an denen ein Defekt festgestellt wird, unverzüglich vom Netzanschluss trennen und um fachkundige Hilfe nachsuchen!

Mit Elektromotor ausgestattete Geräte nicht neben brennbare oder explosionsgefährliche Stoffe platzieren. Die Hochspannung von Geräten (z. B. Elektrophorese-Apparat) kann tödlich sein. Solche Geräte sind mit entsprechenden Warnschildern zu versehen.

All.4.3 Sicherheitsvorschriften für den Umgang mit toxischen Substanzen

Giftige Substanzen im Labor sind mit entsprechenden Hinweisen zu versehen. Einnahme, Berühren und Einatmen giftiger Substanzen können Gesundheitsschäden hervorrufen. Um die Einnahme toxischer Substanzen zu verhindern, ist die Einnahme von Lebensmitteln und Getränken im Labor untersagt.

Während der Laborarbeiten sind stets Schutzhandschuhe von angemessener Qualität zu tragen; vor dem Abnehmen Handschuhe abspülen.

Um eine Kontamination der außerhalb der Labors gelegenen Bereiche zu vermeiden, Handschuhe vor dem Verlassen des Laborbereichs ablegen.

Arbeiten mit flüchtigen Substanzen sind ausschließlich unter der Abzugshaube durchzuführen.

Bei Bedarf eine Schutzmaske tragen.

All.4.4 Sicherheitsvorschriften für den Umgang mit biologischen Materialien

Zu den infektiösen Agenzien gehören Parasiten, Protozoen, Helminthen, Pilze, Bakterien und Viren. Beim Kontakt mit Tieren oder mit tierischem Gewebe, Ausscheidungen, Blut und Urin besteht Infektionsrisiko.

Beim Umgang mit biologischen Materialien menschlichen Ursprungs (Blut, Gewebe, Zelllinien) ist mit besonderer Vorsicht vorzugehen. Die hierbei geltenden Sicherheitsvorschriften entsprechen der Risikogruppe 2 (§3 Biostoffverordnung).

Jeder Laborraum ist mit einem Desinfektionsmittel von angemessener Qualität für Erstrettungsmaßnahmen auszustatten. Das Pipettieren mit dem Mund sowie Essen, Trinken und Rauchen sind im Labor verboten.

Vor dem Verlassen des Labors sind die Hände zu waschen.

All.4.5 Sicherheitsvorschriften für den Umgang mit UV-Strahlen

Ultraviolette (UV-) Lichtquellen werden im Labor häufig eingesetzt (z. B. für die Betrachtung von DNA-Elektrophorese-Gels oder Chromatogrammen oder bei keimtötenden Lampen). Diese Lampen müssen mit einem Schutzschirm versehen sein bzw. dürfen nur mit UV-Schutzbrillen verwendet werden.

Durch eine photochemische Reaktion mit Sauerstoff in der Atemluft führen kurzwellige UV-Strahlen zur Entstehung von Ozon. Eine Ozonkonzentration von mehr als 0,1 ppm in der Luft kann Reizungen von Augen, Nase und Hals hervorrufen. Um Gefährdungen durch erhöhte Ozonwerte zu vermeiden, sollte der Raum, in dem sich die UV-Lichtquelle befindet, stets gut belüftet werden.

All.4.6 Sicherheitsvorschriften für den Einsatz von Zentrifugen

Der Umgang mit Zentrifugen erfordert zu jeder Zeit ein bewusstes und umsichtiges Arbeitsverhalten der im Labor Tätigen. Vor Inbetriebnahme des Geräts ist sicherzustellen:

- dass sämtliche Zentrifugen mit einem Sicherheitsmechanismus ausgestattet sind, der den Betrieb bei geöffnetem Deckel verhindert;
- dass auch hinsichtlich der Dichte des zu zentrifugierenden Materials die höchste Geschwindigkeit nicht überschritten wird;
- dass die Zentrifuge stets ausbalanciert ist;
- dass Bedienungsanleitungen für Zentrifuge und Rotor in Reichweite des Geräts liegen.

Beim Umgang mit der Zentrifuge ist darüber hinaus Folgendes zu beachten:

- Wenn die Zentrifuge vibriert oder ungewöhnliche Geräusche von sich gibt, ist sie unverzüglich abzuschalten.
- Nach dem Gebrauch sind Zentrifuge und Rotor absolut sauber zu hinterlassen, um bei der nächsten Inbetriebnahme die Gefahr einer Kontamination zu verhindern, falls toxische oder ansteckende Substanzen verwendet wurden.

All.4.7 Einsatz der Mikrowelle

Nie eine leere Mikrowelle einschalten!

In der Mikrowelle kein brennbares Material verwenden!

Keine versiegelten Behälter ins Gerät einstellen (Explosionsgefahr): Flaschendeckel aufdrehen, Deckel entfernen.

Im Gerät kein Metall, metallbeschichtete Gegenstände (z. B. in Folie gewickelte Flaschen) oder Aluminiumfolie verwenden.

Behälter nicht bis zum Rand füllen: Flüssigkeit könnte überkochen.

Stärke und Dauer der Erhitzung im Verhältnis zum Wasservolumen des zu erhitzenden Gegenstands bestimmen. Insbesondere bei wässrigen Lösungen besteht die Gefahr, dass sich die Flüssigkeit über den Siedepunkt erhitzt, ohne dass sich Blasen bilden. Dies kann zu plötzlichem Überlaufen der kochenden Flüssigkeit führen. Um dies zu verhindern, Lösung vor dem Einstellen mischen und vor dem Herausnehmen einige Minuten ruhen lassen.

Zum Herausnehmen erhitzter Behälter Thermo-Handschuhe verwenden.

Nach Gebrauch Küchenpapier mit Glasreiniger befeuchten und das Gerät auswischen.

Im Brandfalle im Innern des Geräts Mikrowellentür geschlossen halten, Gerät ausschalten, Netzstecker ziehen und warten, bis die Flammen erstickten.



All.4.8 Einsatz des Elektrophorese-Apparats

Vor dem Verbinden der Kabel ist der Netzstecker zu ziehen.

Vor dem Verbinden der Kabel ordnungsgemäße Position des Kammertür überprüfen.

Nach Gebrauch vor dem Öffnen der Kammertür Stromversorgung unterbrechen und Kabelverbindungen trennen.

Anhang I: Zur Insulin-Vergleichsanalyse verwendete Tierarten



Bildquelle: <http://www.probertencyclopaedia.com/>

BOVIN – *Bos Taurus* (Rind)

Reich: Animalia (Tierreich)

Stamm: Chordata (Chordatiere)

Unterstamm: Vertebrata (Wirbeltiere)

Klasse: Mammalia (Säugetiere)

Ordnung: Artiodactyla (Paarhufer)

Familie: Bovidae (Hornträger)

Gattung: ***Bos***

Art: ***B. taurus***



Bildquelle: <http://www.probertencyclopaedia.com/>

CHICK – *Gallus gallus* (Huhn)

Reich: Animalia

Stamm: Chordata

Unterstamm: Vertebrata

Klasse: Aves (Vögel)

Ordnung: Galliformes (Hühnervögel)

Familie: Phasianidae (Fasanenartige)

Gattung: ***Gallus***

Art: ***G. gallus***



Bildquelle: <http://www.probertencyclopaedia.com/>

HORSE – *Equus caballus* (Pferd)

Reich: Animalia

Stamm: Chordata

Unterstamm: Vertebrata

Klasse: Mammalia

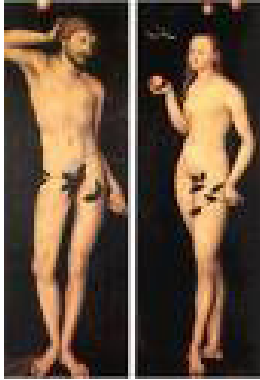
Ordnung: Perissodactyla (Unpaarhufer)

Unterordnung: Hyppomorpha (Pferdeverwandte)

Familie: Equidae (Pferdeartige)

Gattung: ***Equus***

Art: ***E. caballus***



Ölgemälde von Lucas Cranach; Uffizien, Florenz

HUMAN – *Homo sapiens* (Mensch)

Reich: Animalia

Stamm: Chordata

Unterstamm: Vertebrata

Klasse: Mammalia

Ordnung: Primates (Herrentiere)

Überfamilie: Hominoidea (Menschenartige)

Familie: Hominidae (Menschen[affen])

Gattung: ***Homo***

Art: ***H. sapiens***



Bildquelle: <http://filaman.ifm-geomar.de/>

HYDCO – *Hydrolagus colliei* (Chimäre)

Reich: Animalia

Stamm: Chordata

Unterstamm: Vertebrata

Klasse: Chondrichthyes (Knorpelfische)

Ordnung: Chimaeriformes (Seekatzenartige)

Familie: Chimaeridae (Seekatzen)

Gattung: ***Hydrolagus***

Art: ***H. colliei***



Bildquelle: <http://musmusculus.info/>

MOUSE – *Mus musculus* (Hausmaus)

Reich: Animalia

Stamm: Chordata

Unterstamm: Vertebrata

Klasse: Mammalia

Ordnung: Rodentia (Nagetiere)

Familie: Muridae (Langschwanzmäuse)

Gattung: ***Mus***

Art: ***M. musculus***



Bildquelle: <http://www.fishbase.org/>

MYXGL – *Myxine glutinosa* (Inger / Schleimaal)

Reich: Animalia

Stamm: Chordata

Unterstamm: Craniata (Schädeltiere)

Ordnung: Myxiniiformes (Inger, Schleimaale)

Familie: Myxinidae (Inger, Schleimaale)

Gattung: ***Mixine***

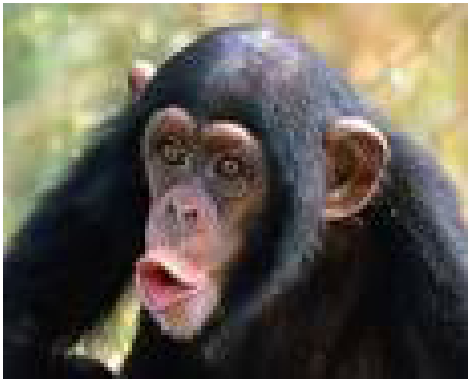
Art: ***M. glutinosa***



Bildquelle: <http://www.blevinsphoto.com/>

ONCKE – *Oncorhynchus keta*
(Keta-Lachs / Chum-Lachs / Hundslachs)

Reich: Animalia
Stamm: Chordata
Unterstamm: Vertebrata
Klasse: Osteichthyes (Knochenfische)
Unterklasse: Actinopterygii (Strahlenflosser)
Ordnung: Salmoniformes (Lachsartige)
Familie: Salmonidae (Lachsfische)
Gattung: ***Oncorhynchus***
Art: ***O. keta***



Bildquelle: www.raitre.rai.it/

PANTR – *Pan troglodytes* (Schimpanse)

Reich: Animalia
Stamm: Chordata
Unterstamm: Vertebrata
Klasse: Mammalia
Ordnung: Primates
Überfamilie: Hominoidea
Familie: Hominidae
Gattung: ***Pan***
Art: ***M. troglodytes***



Bildquelle: www.raitre.rai.it/

PIG – *Sus scrofa* (Schwein)

Reich: Animalia
Stamm: Chordata
Unterstamm: Vertebrata
Klasse: Mammalia
Ordnung: Artiodactyla
Unterordnung: Suiformes (Schweineartige)
Familie: Suidae (Schweine)
Gattung: ***Sus***
Art: ***S. scrofa***



Bildquelle: <http://www.ischiainformazioni.net/>

RABIT – *Oryctolagus cuniculus* (Wildkaninchen)

Reich: Animalia
Stamm: Chordata
Unterstamm: Vertebrata
Klasse: Mammalia
Ordnung: Lagomorpha (Hasenartige)
Familie: Leporidae (Hasen)
Gattung: ***Oryctolagus***
Art: ***O. cuniculus***



Bildquelle: <http://gattivity.blogosfere.it/>

SHEEP – *Ovis aries* (Schaf)

Reich: Animalia

Stamm: Chordata

Unterstamm: Vertebrata

Klasse: Mammalia

Ordnung: Artiodactyla

Familie: Bovidae

Unterfamilie: Caprinae (Ziegenartige)

Gattung: ***Ovis***

Art: ***O. aries***

Anhang II: Aminosäuren und ihre Abkürzungen

Aminosäure	Ein-Buchstaben-code	Drei-Buchstaben-code
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Asn+Asp	B	Asx
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Gln+Glu	Z	Glx
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

Anhang III: Lösungen zu den Aufgaben

- 1) Betrachte das menschliche Insulin: Die A-Kette besteht aus 21, die B-Kette aus 30 Aminosäuren. Weist die vorliegende Sequenz tatsächlich insgesamt 51 Aminosäuren auf?

Nein, es sind mehr: 110.

- 2) Insulin wird zunächst in Form des sogenannten „Präproinsulins“ synthetisiert, eines Polypeptids aus 110 Aminosäuren. Dieses Polypeptid enthält zusätzliche Sequenzen, die später entfernt werden: eine N-terminale „Prä“-Sequenz (Signalpeptid, 24 Aminosäuren), welche die Ausscheidung des Proteins ermöglicht, und eine „Pro“-Sequenz (C-Peptid), die die korrekte Faltung der Polypeptidkette steuert. Auf der Polypeptidkette sind die Teilsequenzen folgendermaßen angeordnet:



Identifiziere die einzelnen Segmente in der Proteinsequenz von Mensch und Huhn!

```

INS_HUMAN  MALWMRLRLPLALLALLWGPDPAAAFVNHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED
INS_CHICK  MALWIRSLPLALLLVFSGPCTSYAAANQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYSPKARRDVEQ
          ****:* *****.:**.:* .*****:*****:***:**:.*:

INS_HUMAN  LQVCGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKRLIVEQCCCTSICTSLYQLENYCN
INS_CHICK  PLVSS-PLRCEAGVLPFQQEYEEK--VKRLIVEQCCCHNTCTSLYQLENYCN
          *..  * * .*.:.:*  * *****.*****
  
```

- 3) Zu wie viel Prozent stimmen die einzelnen Segmente überein, d. h. sind homolog? Ergänze die Tabelle:

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_CHICK	15	62,5	26	86,7	11	31,4	18	85,7

- 4) Welche Sequenzen sind stärker konserviert? Welche weniger stark? Nenne mögliche Ursachen für den unterschiedlichen Grad der Konservierung bei den Sequenzen!

Die Sequenzen für A- und B-Kette sind stärker konserviert; Signalpeptid und vor allem C-Peptid sind weniger stark konserviert.

Die Insuline von Mensch und Huhn unterscheiden sich überwiegend in Signalpeptid und C-Peptid.

Vermutlich sind die Mutationen, die in diesen Segmenten möglicherweise stattgefunden haben, durch die natürliche Selektion nicht eliminiert worden, da sie keinen unmittelbaren Einfluss auf die aktive Form des Insulins haben.

- 5) Warum enthält die Sequenzfolge INS_CHICK Gedankenstriche (-)? Welche stammesgeschichtlich relevanten Erklärungen könnte es dafür geben?

Man wollte für die Sequenzanordnung den bestmöglichen statistischen Wert erhalten. So könnte man annehmen, dass durch die Evolution der Einschub einiger weniger Aminosäuren in das Humaninsulin verursacht wurde.

- 6) Die Insulinsequenz des Menschen lässt sich mit der jedes beliebigen anderen Tiers vergleichen, z. B. INS_HUMAN vs. INS_PANTR oder INS_HUMAN vs. INS_PIG usw. Berechne den Grad der Konservation für die einzelnen Segmente!

```

INS_HUMAN      MALWMRLLPALLALLALWGPDFAAAEFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED
INS1_MOUSE     MALLVHFLPLLALLALWEPKPTQAFVKQHLCCGPHLVEALYLVCGERGFFYTPKSAREVED
***  ::*****  *.:  ***:*****:*****:*****:*****:***.***

INS_HUMAN      LQVGQVELCGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSIICSLYQLENYCN
INS1_MOUSE     PVEQLELCGSP--CDLQTLALEVAROKRGIVDCCCTSIICSLYQLENYCN
**  *:****.*  *..*.*.*  :  *****:*****:*****:*****

```

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_MOUSE	16	66,7	27	90	23	65,7	20	95,2

```

INS_HUMAN      MALWMRLLPALLALLALWGPDFAAAEFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED
INS_HORSE      -----EFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKAXXEAED
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

INS_HUMAN      LQVGQVELCGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSIICSLYQLENYCN
INS_HORSE      PQVGQVELCGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVDCCCTSIICSLYQLENYCN
***:*****  *..*.*.*  *  *****:*****:*****:*****

```

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_HORSE	0	0	29	96,7	24	68,6	20	95,2

```

INS_HYDCO      -----VPTQRLCGSHLVDALYFVCCGERGFFYSPKPIRELEF
INS_HUMAN      MALWMRLLPALLALLALWGPDFAAAEFVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED
.  .*:*****:***:*****:***.***

INS_HYDCO      L-----LG-----IIVEQCCHNTCLANLECYCN
INS_HUMAN      LQVGQVELCGGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTSIICSLYQLENYCN
*      **      *****  .  ***  :**.*.*

```

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_HYDCO	0	0	22	73,7	6	17,1	14	66,7

INS_MYXGL **M**ALSPFLAAV**I**PLVLLSRAPP**S**AD**T**RT**T**GH**L**CGKDLVN**A**LY**I**ACGVRGFF**Y**DPT**K**MR**D**
 INS_HUMAN **M**ALWMRLL**P**LL**L**ALLALWG**--PDP**AAAFVN**Q**HL**C**GSHLVEAL**Y**LV**C**GERGFF**Y**TP**K**TR**R**E
 *** * .:..*: * . * . : .. ****.***:***:*** ***** * :*:

 INS_MYXGL **T**GALAAFL**P**L**A**Y**A**ED**N**ESQ**D**DES**I**G**I**NEVL**K**SK**R**L**I**VE**D**CG**C**H**K**R**C**S**I**Y**D**LE**N**Y**C**N
 INS_HUMAN **A**ED**L**Q**V**G**-Q**VELGG**G**PGAGSL**Q**PL**A**LEGS**L**Q**-K**R**I**VE**D**CG**C**T**S**I**C**SL**Y**Q**L**EN**Y**C**N**
 : * . : . . : .:..: : : ***** . *:*:*****

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_MYXGL	8	30,8	18	58,1	5	13,9	16	76,2

INS_ONCKE **M**AFWL**Q**AASLLVLL**A**LS**-PG**-VD**AAA**Q**H**L**C**GSHLVDAL**Y**LV**C**G**E**K**G**FF**Y**TP**K**--**R**EV**D**P
 INS_HUMAN **M**ALWMRLL**P**LL**L**ALLALWG**PDP**AAAFVN**Q**HL**C**GSHLVEAL**Y**LV**C**GERGFF**Y**TP**K**TR**R**E**A**ED
 :.. .**.* * . * . **:*****:***** *:..

 INS_ONCKE **L**-IGFLSP**K**SA**K**ENE**E**Y**P**FK**D**Q**T**EM**M**V**K**R**I**VE**D**CG**C**H**K**PC**N**IF**D**LE**N**Y**C**N
 INS_HUMAN **L**Q**V**CQ**V**ELGG**G**PGAGSL**Q**PL**A**LEGS**L**Q**K**R**I**VE**D**CG**C**T**S**I**C**SL**Y**Q**L**EN**Y**C**N**
 * :* :. . . : ***** . *:*:*****

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_ONCKE	11	45,8	24	80	5	14,3	13	61,9

INS_PANTR **M**ALWMRLL**P**LLVLLALWG**PDP**AS**A**AFVN**Q**HL**C**GSHLVEAL**Y**LV**C**GERGFF**Y**TP**K**TR**R**E**A**ED
 INS_HUMAN **M**ALWMRLL**P**LL**L**ALLALWG**PDP**AAAFVN**Q**HL**C**GSHLVEAL**Y**LV**C**GERGFF**Y**TP**K**TR**R**E**A**ED
 ***** .*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

 INS_PANTR **L**Q**V**CQ**V**ELGG**G**PGAGSL**Q**PL**A**LEGS**L**Q**K**R**I**VE**D**CG**C**T**S**I**C**SL**Y**Q**L**EN**Y**C**N**
 INS_HUMAN **L**Q**V**CQ**V**ELGG**G**PGAGSL**Q**PL**A**LEGS**L**Q**K**R**I**VE**D**CG**C**T**S**I**C**SL**Y**Q**L**EN**Y**C**N**
 *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_PANTR	22	91,7	30	100	35	100	21	100

INS_PIG **M**ALW**T**RLL**P**LL**L**ALLALW**A**P**A**Q**A**AFVN**Q**HL**C**GSHLVEAL**Y**LV**C**GERGFF**Y**TP**K**A**R**E**A**EN
 INS_HUMAN **M**ALWMRLL**P**LL**L**ALLALWG**PDP**AAAFVN**Q**HL**C**GSHLVEAL**Y**LV**C**GERGFF**Y**TP**K**TR**R**E**A**ED
 **** ***** * * *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

 INS_PIG **P**QAGAV**E**LG**G**GL**G**--**L**Q**A**LE**G**PP**Q**K**R**I**V**E**D**CG**C**T**S**I**C**SL**Y**Q**L**EN**Y**C**N**
 INS_HUMAN **L**Q**V**CQ**V**ELGG**G**PGAGSL**Q**PL**A**LEGS**L**Q**K**R**I**VE**D**CG**C**T**S**I**C**SL**Y**Q**L**EN**Y**C**N**
 * * ***** * * ***** *****:*****:*****:*****:*****:*****

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_PIG	20	83,3	29	96,7	24	68,6	21	100

INS_RABIT MASLAALLPLLALLVLCRLDPAQAEVFNQHLGCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKSRREVEE
 INS_HUMAN MALWMRLPLLALLALWGPDPAAAEVFNQHLGCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED
 **** *****.* *** *****:***.*:

INS_RABIT LQVQAELEGCGPGAGGLOPSALELALQKRGIVEQCCTFICSLYOLENYCN
 INS_HUMAN LQVQVELEGCGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTFICSLYOLENYCN
 *****.* *** :*****:

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_RABIT	15	62,5	29	96,7	28	80	21	100

INS_SHEEP MALWTRLVPLLALLALWAPAPAHAEVFNQHLGCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKSRREVEE
 INS_HUMAN MALWMRLPLLALLALWGPDPAAAEVFNQHLGCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED
 **** *:*****.* *** *****:***.*:

INS_SHEEP POVCALELAGGPGAG-----GLEGPPQKRGIIVEQCCTFICSLYOLENYCN
 INS_HUMAN LQVQVELEGCGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTFICSLYOLENYCN
 *** *:***** .***. *****:*****:

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_SHEEP	19	79,2	29	96,7	21	60	18	85,7

INS_HUMAN MALWMRLPLLALLALWGPDPAAAEVFNQHLGCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED
 INS_BOVIN MALWTRLRPLLALLALWPPPPARAEVFNQHLGCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKSRREVEE
 **** * ***** * *** *****:***.*:

INS_HUMAN LQVQVELEGCGPGAGSLQPLALEGSLQKRGIVEQCCTFICSLYOLENYCN
 INS_BOVIN POVCALELAGGPGAG-----GLEGPPQKRGIIVEQCCTFICSLYOLENYCN
 *** *:***** .***. *****:*****:

	Signalpeptid		B-Kette		C-Peptid		A-Kette	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_BOVIN	19	79,2	29	96,7	21	60	19	90,5

7) In mehreren Regionen der Proteine verschiedener Tiere sind die Sequenzen nicht konserviert. Zu welchen Segmenten gehören sie?

In den meisten Fällen zum Signalpeptid und zum C-Peptid.

8) Warum variieren diese Sequenzen stärker?

Die Evolution hat vermutlich im Signalpeptid und C-Peptid eine größere artenübergreifende Varianz zugelassen. Vermutlich sind die Mutationen, die in diesen Segmenten stattgefunden haben könnten, durch die natürliche Selektion nicht eliminiert worden, weil sie keinen direkten Einfluss auf die aktive Form des Insulins haben.

9) In welchen Segmenten der Polypeptidkette erscheinen die Sternchen?

In den Segmenten für A- und B-Kette.

10) Betrachte den ungewurzelten Baum: Welche zwei Arten sind am nächsten miteinander verwandt? Erläutere die Gründe!

Mensch und Schimpanse: Sie sind nur durch einen Verzweigungspunkt voneinander getrennt und ihre Zweige sind sehr kurz, d. h. sie haben sich erst vor relativ kurzer Zeit aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt (Differenzierung).

11) Die Länge der „Zweige“ veranschaulicht die stammesgeschichtliche Distanz: Drucke das Dendrogramm aus und messe (in mm) den Abstand zwischen Mensch und den folgenden Tieren:

Anmerkung: Je nach Größe des Ausdrucks können die gemessenen Werte unterschiedlich ausfallen. Wir nennen hier daher lediglich die Reihenfolge der Paarungen nach zunehmender Entfernung.

- Mensch und Schimpanse
- Mensch und Schwein
- Mensch und Pferd
- Mensch und Rind
- Mensch und Schaf
- Mensch und Kaninchen
- Mensch und Maus
- Mensch und Chimäre
- Mensch und Huhn
- Mensch und Lachs
- Mensch und Schleimaal

12) Steht das Schaf-Insulin stammesgeschichtlich dem Insulin des Huhns näher oder dem des Menschen?

Anhand der Zahl der Verzweigungspunkte sowie der Länge der Zweige, die die einzelnen Arten voneinander trennen, lässt sich ableiten, dass das Schaf-Insulin dem des Menschen ähnlicher ist.

13) Welche evolutionäre Verwandtschaft besteht zwischen Schwein, Schaf und Rind?

Die zu den Insulin-Varianten führende Abstammungslinie bei den drei Arten hat sich zu einem bestimmten

Zeitpunkt in eine neue Linie ausdifferenziert, aus der das Schwein hervorging; demgegenüber entstand der Zweig, der zur Entstehung von Rind und Schaf führte, erst später. Diese beiden Spezies haben einen relativ jungen gemeinsamen Ahnen und scheinen daher phylogenetisch näher miteinander verwandt zu sein. Der gemeinsame Vorfahr von Schaf-Rind-Schwein hingegen liegt in der stammesgeschichtlichen Vergangenheit weiter zurück.

- 14) Welche Bedeutung haben diese Ergebnisse vor dem Hintergrund dessen, was du in den vorhergehenden Kapiteln erfahren hast? Erläutere!

Erwartungsgemäß sind Fisch und Schleimaal im Vergleich zu den übrigen Tieren, die ausnahmslos Landtiere sind, am gegenüberliegenden Ende des Dendrogramms zu finden. Das Huhn, das zu den Vögeln gehört, hat sich von den anderen Tieren, die den Säugern angehören, abgespalten.

- 15) Welche Spezies steht dem Rind stammesgeschichtlich näher? Welche dem Lachs?

Das Schaf ist näher mit dem Rind verwandt, der Schleimaal mit dem Lachs.

- 16) Betrachte die Paarungen „Schimpanse-Mensch“, „Lachs-Schleimaal“, „Schaf-Rind“: Zwischen beiden liegt jeweils nur ein „Verzweigungspunkt“. Welche Unterschiede in der Divergenz dieser Lebewesen sind erkennbar?

Die Divergenz der Paarung „Lachs-Schleimaal“ liegt weiter zurück; die Paarung „Schimpanse-Mensch“ hat sich erst vor relativ kurzer Zeit auseinanderentwickelt.

- 17) Der Begriff „Homologie“ bezeichnet ein Merkmal oder eine Struktur, das bzw. die sich in zwei oder mehr Arten aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt hat. In ähnlicher Weise bezieht sich der Begriff „Sequenzhomologie“ auf Übereinstimmungen in DNA-Nukleotidsequenzen oder in den Aminosäure-Sequenzen der Proteine. Finde die beiden Arten, die beim Insulin das größte Maß an Homologie aufweisen!

Mensch und Schimpanse.

- 18) Beachte: Diese mit Hilfe bioinformatischer Tools erstellten Dendrogramme gründen auf Daten, die sich auf einzelne Nukleotid- oder Proteinsequenzen beziehen! Zur Bestimmung der stammesgeschichtlichen Verwandtschaft zwischen einzelnen Arten müssen neben der Sequenzhomologie weitere Methoden verwendet werden. Welche sind dir bekannt?

Mit Hilfe bioinformatischer Tools lassen sich aussagekräftigere Stammbäume erstellen, in denen die Sequenzhomologie einer größeren Anzahl von Genen und/oder Proteinen berücksichtigt werden. Traditionell basiert die Phylogenetik der Tiere auf Unterschieden in Körperstruktur, Anatomie und Physiologie, embryonaler Entwicklung, Fortpflanzung usw.

Nun wollen wir zum eigentlichen Sinn und Zweck unserer Lerneinheit zurückkehren: **Welches Tier würdest du wählen, wenn du ein Insulin zur medizinischen Behandlung extrahieren wolltest, das dem menschlichen Insulin am ähnlichsten ist?**

19) Welche Spezies ist auf Grundlage der Sequenzhomologie nach deiner Einschätzung am besten zur Insulin-Extraktion geeignet?

Der Schimpanse.

20) Was meinst du – würde die Verwendung dieses Tiers ethische oder wirtschaftliche Probleme aufwerfen? (Berücksichtige Aspekte wie Verbreitung, Zuchteignung, Artengefährdung!)

Der Schimpanse bringt sicher das Insulin mit, das dem menschlichen am ähnlichsten ist. Dieses Tier jedoch ist nicht weit verbreitet, und aus tierschutzrechtlichen Gründen würde seine Züchtung in Gefangenschaft Probleme aufwerfen. In den tropischen Regenwäldern und Feuchtsavannen Afrikas – von der Westküste des Kontinents bis zu östlichen Regionen in Uganda, Ruanda, Burundi und Tansania – leben weniger als 200.000 Exemplare. Ebenso wie andere Affenarten (Gorilla, Orang-Utan, Bonobo) gehört auch der Schimpanse zu den stark gefährdeten Tierarten; Ursachen hierfür sind die Zerstörung seines Lebensraums, seine Bejagung zum Verzehr und der illegale Handel mit Jungtieren, deren Muttertiere getötet werden. Zu Forschungszwecken werden Schimpansen darüber hinaus in Gefangenschaft gezüchtet. Die in Afrika lebenden Schimpansen werden als „vom Aussterben bedroht“ eingestuft; in den USA in Gefangenschaft lebende Tiere gelten als „stark gefährdet“. In einem kürzlich veröffentlichten Bericht (Reuters, 24. Mai 2007, Autor: Will Dunham) wurde bekannt, dass das staatliche National Institute of Health (NIH) der USA, das verschiedene biochemische Studien an Tieren unterstützt, die Züchtung von institutseigenen Schimpansen zu Forschungszwecken einstellen wird. Aus diesen Überlegungen heraus ist eine Züchtung von Schimpansen zur Gewinnung von Insulin zu Therapie Zwecken nicht durchführbar. Auch Schweineinsulin ist dem menschlichen in hohem Grade ähnlich. Anders als Schimpansen sind Schweine weit verbreitet und zur Züchtung gut geeignet (allein in den EU-Ländern leben 120 Millionen Schweine!); zur Fleischgewinnung werden täglich viele der Tiere geschlachtet. Eine „Opferung“ von Schweinen zu wissenschaftlichen oder medizinischen Zwecken wirft daher fraglos weniger ethische Vorbehalte auf als die Verwendung von Primaten. Tatsächlich wird das Schwein auch zur Heterotransplantation (auch: Xenotransplantation) genutzt. Das Pferd produziert ebenfalls ein Insulinprotein, das dem menschlichen Insulin sehr ähnlich ist. Die Züchtung von Pferden ist jedoch kostspieliger und weniger „produktiv“ als die Schweinezucht.

21) Ausgehend von diesen Überlegungen sowie unter Einbeziehung der Homologie: Welches Tier wäre nun der ideale „Spender“?

Das Schwein.

5 Bibliographie und Referenzen

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M, **DNA ricombinante**, Zanichelli Editore

Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, **Fisiologia dell'uomo**, II
Pensiero Scientifico Editore

Ladisch MR and Kohlmann KL, **Recombinant Human Insulin**,
Biotechnol. Progr. 1992, (8)

469-478

Dugi K, Diabetes mellitus, **Science in School** 2006, (1) 61-65

<http://www.dnai.org/b/index.html>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Insulin>

<http://www.vivo.colostate.edu>

<http://www.med.unibs.it>

<http://www.biotopics.co.uk/as/insulinproteinstructure.html>

<http://www.scienceinschool.org>

<http://www.gtac.edu.au>

<http://www.cusmibio.unimi.it>

Danksagung



Dieses Projekt wurde von der „Fondazione Banca del Monte di Lombardia“ im Rahmen des „Progetto Professionalità Ivano Becchi“ gefördert. Wir danken der Stiftung für ihre Unterstützung dieser wissenschaftlichen Zusammenarbeit.

Für formaltechnische Anregungen im Laufe der Projektvorbereitungen sowie für die kritische Lektüre des Entwurfs geht unser Dank an Daniela Marazziti, Cinzia Grazioli, Olivier Mirabeau, Daniele Malpetti, Alexandra Manaia und Julia Willingale-Theune.

Ebenfalls danken möchten wir schließlich dem Liceo Statale „G. Galilei“ in Caravaggio (Bergamo, Italien).

Titelbild: „Structure Composing“ von Paul Tucker, aus den Archiven des EMBL Photolab (Originaldatei: „composing/layers“);

Bearbeitung: Rossana De Lorenzi und Corinne Kox;

Deutsche Übersetzung: Nicola Fischer, Heidelberg;

Druck: EMBL Photolab (Fotolabor des Europäischen Laboratoriums für Molekularbiologie).



ELLS employs creative commons copyrights to protect material produced for ELLS LLABs which will subsequently be used by teachers and other institutions. The copyright symbols also appear on the ELLS TeachingBASE website and in the downloadable pdfs/docs/ppts.



Attribution Non-commercial Share Alike

This license lets others remix, tweak, and build upon your work non-commercially, as long as they credit you and license their new creations under the identical terms. Others can download and redistribute your work just like the by-nc-nd license, but they can also translate, make remixes, and produce new stories based on your work. All new work based on yours will carry the same license, so any derivatives will also be non-commercial in nature.

Furthermore, the author of the derivative work may not imply that the derivative work is endorsed or approved by the author of the original work.

Explanation of the copyright symbols

-  to Share
-  to Remix
-  Attribution
-  Noncommercial
-  Share alike

For further details, see <http://creativecommons.org>

© Copyright European Molecular Biology Laboratory 2010

