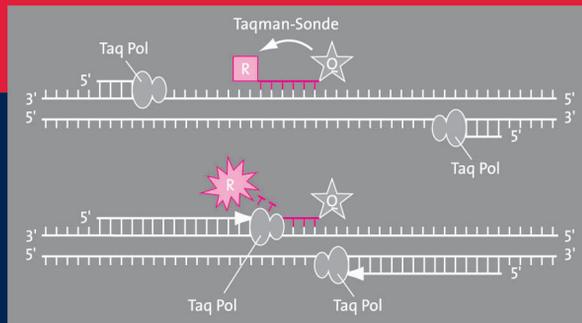


Annette Reineke

Gentechnik

Grundlagen, Methoden
und Anwendungen



Ulmer

UTB



UTB 2581

Eine Arbeitsgemeinschaft der Verlage

Beltz Verlag Weinheim · Basel

Böhlau Verlag Köln · Weimar · Wien

Wilhelm Fink Verlag München

A. Francke Verlag Tübingen und Basel

Haupt Verlag Bern · Stuttgart · Wien

Lucius & Lucius Verlagsgesellschaft Stuttgart

Mohr Siebeck Tübingen

C. F. Müller Verlag Heidelberg

Ernst Reinhardt Verlag München und Basel

Ferdinand Schöningh Verlag Paderborn · München · Wien · Zürich

Eugen Ulmer Verlag Stuttgart

UVK Verlagsgesellschaft Konstanz

Vandenhoeck & Ruprecht Göttingen

Verlag Recht und Wirtschaft Heidelberg

VS Verlag für Sozialwissenschaften Wiesbaden

WUV Facultas Wien

Annette Reineke

Gentechnik

Grundlagen, Methoden und Anwendungen

61 Abbildungen

5 Tabellen

11 Methodenboxen

Verlag Eugen Ulmer Stuttgart

Anschrift der Autorin:
Dr. Annette Reineke
Institut für Phytomedizin
Universität Hohenheim
Otto-Sander-Str. 5
70599 Stuttgart

Die Namen von Chemikalien, die zugleich eingetragene Warenzeichen sind, wurden als solche nicht besonders kenntlich gemacht. Es kann also aus der Bezeichnung der Ware mit dem für diese eingetragenen Warenzeichen nicht geschlossen werden, dass die Bezeichnung ein freier Warenname ist. Hinsichtlich der in diesem Buch angegebenen Dosierungen von Chemikalien usw. wurde die größtmögliche Sorgfalt beachtet. Fehler können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine Garantie für die Richtigkeit der Angaben kann daher nicht gegeben werden. Haftung für Schäden und Unfälle wird aus keinem Rechtsgrund übernommen.

Bibliografische Information der Deutschen Bibliothek

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN 3-8252-2581-X (UTB)

ISBN 3-8001-2834-9

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung außerhalb der engen Grenzen des Urheberrechtsgesetzes ist ohne Zustimmung des Verlages unzulässig und strafbar. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

© 2004 Verlag Eugen Ulmer GmbH & Co.,

Wollgrasweg 41, 70599 Stuttgart (Hohenheim)

Internet: www.ulmer.de

Lektorat: Dr. Nadja Kneissler, Dr. Katharina Munk

Satz: Wissenschaftliche PublikationsTechnik Kernstock, Kirchheim unter Teck

Druck: Gutmann Offsetdruck, Talheim

Bindung: Dollinger, Metzingen

ISBN 3-8252-2581-X (UTB-Bestellnummer)

Vorwort

„Biotechnologie und Molekularbiologie sind spannende und zukunftsweisende Forschungsbereiche, aber mit welchem Buch kann ich einen Einstieg in diese komplexe und schwer zugängliche Materie finden?“ Mit ähnlichen Fragen haben sich immer wieder Studenten, Praktikanten, aber auch Doktoranden v.a. der Fachrichtungen Agrarwissenschaften und Agrarbiologie an mich gewandt, die großes Interesse an der Anwendung biotechnologischer Methoden zeigten, denen aber im Rahmen von Studium oder Ausbildung nur oberflächliche Kenntnisse in diesem Themengebiet vermittelt worden waren.

Natürlich gibt es eine Vielzahl von umfangreichen Genetik-Lehrbüchern sowie speziellen Werken zu bestimmten gentechnischen Methoden, die allerdings gemeinsamer Verwendung bedürfen. Überschauliche, dünne – und damit nicht zuletzt auch preiswerte – deutschsprachige Kompendien zu dieser Thematik sind jedoch Mangelware.

Deshalb soll mit dem vorliegenden Lehrbuch der Versuch unternommen werden, in kurzer Übersicht sowohl die wesentlichen genetischen Grundlagen und Zusammenhänge verständlich zu präsentieren als auch praxisbezogen die derzeit gängigen molekularbiologischen „Kochrezepte“ vorzustellen und damit den Themenkomplex Biotechnologie-Molekularbiologie der oben genannten Leserschaft in hoffentlich schmackhafter und verdaulicher Form aufzutischen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gerhard Kubach für seine geduldige Diskussionsbereitschaft und wertvolle Korrekturarbeit! Ebenfalls herzlich danken möchte ich Frau Beate Breiting für Durchsicht und Korrektur des Manuskripts, Frau Sabine Seifert für die Anfertigung der Abbildungen sowie dem Verlag Eugen Ulmer – und hier insbesondere Frau Dr. Nadja Kneissler – für die gute Zusammenarbeit.

Stuttgart, im März 2004

Annette Reineke

Inhaltsverzeichnis

Teil I Grundlagen der Molekularbiologie 9

1	Aufbau und Eigenschaften von Nukleinsäuren.....	10
1.1	Nukleotide als Bausteine von Nukleinsäuren	10
1.2	Bestandteile und Struktur der DNA	12
1.3	Verpackung der DNA in Chromosomen	15
1.4	Bestandteile, Struktur und Formen der RNA	17
2	Prinzipien der Informationsweitergabe	18
2.1	Zellzyklus und Ablauf der Mitose	18
2.2	Replikation der DNA	20
2.3	Replikationsfehler und ihre Korrektur	23
3	Vom Gen zum Merkmal: Die Genexpression	24
3.1	Transkription	24
3.1.1	mRNA-Reifung bei Eukaryonten	26
3.2	Der genetische Code	27
3.3	Translation	29
3.4	Modifikation und Transport der neusynthetisierten Proteine.....	33
3.5	Regulation der Genexpression	34

Teil II Gentechnische Methoden und ihre Anwendung 37

4	Das Enzymrepertoire der Gentechnik	38
4.1	Nukleasen	38
4.2	Restriktionsendonukleasen	40
4.3	Ligasen	44

4.4	Polymerasen	46
5	Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren	50
5.1	Isolierung von genomischer DNA	50
5.2	Isolierung von Plasmid- und Phagen-DNA	53
5.3	Isolierung von RNA und mRNA	55
5.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	58
5.5	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration	60
6	Gelelektrophoresen	62
6.1	Trägerstoffe für Gelelektrophoresen	64
6.1.1	Agarosegele	64
6.1.2	Polyacrylamidgele	65
6.2	Nachweis der Nukleinsäuren in einem Gel	65
6.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Gelen	66
6.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	68
7	Prinzipien und Methoden der DNA-Klonierung	70
7.1	Vektoren: Vehikel für den Gentransfer	71
7.1.1	Plasmide	71
7.1.2	Bakteriophagen	74
7.1.3	Cosmide und YACs	77
7.2	Durchführung einer Klonierung mit einem Plasmidvektor	79
7.2.1	Herstellung rekombinanter DNA	80
7.2.2	Erzeugung kompetenter Bakterienzellen	81
7.2.3	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit einem rekombinanten Plasmid	82
7.2.4	Selektion rekombinanter Bakterienzellen	82
7.2.5	Vermehrung des gewünschten Klons und Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA	85
7.3	Herstellung von DNA-Banken	85
	Zusammenfassung DNA-Klonierung	89
8	PCR: Vermehrung von DNA ohne Klonierung	90
8.1	Grundprinzipien der PCR	90
8.2	Anwendungen der PCR	97
8.2.1	PCR mit degenerierten Primern	97
8.2.2	RT-PCR	99

8.2.3	Quantitative Real-time PCR	101
8.2.4	Herstellung genetischer Fingerabdrücke	105
9	Sequenzierung von DNA	108
9.1	Methoden zur DNA-Sequenzierung	108
9.1.1	Sanger-Coulson-Methode (Kettenabbruch- methode)	108
9.1.2	Maxam-Gilbert-Methode	110
9.2	Markierung und Detektion der im Ketten- abbruchverfahren entstandenen Fragmente	112
9.2.1	Radioaktive Markierung und Detektion über Autoradiographie	113
9.2.2	Nichtradioaktive Markierung mit Fluores- zenzfarbstoffen und Detektion mittels Laser	114
10	Blotting und Hybridisieren	116
10.1	Methoden des Blottings	116
10.1.1	Southern Blot	117
10.1.2	Northern Blot	119
10.1.3	Screening von cDNA- und genomischen Genbanken	120
10.2	Herstellung der Sonden, Markierung von DNA ..	121
10.2.1	Markierung der Sonden über Nick-Translation ..	122
10.2.2	Markierung der Sonden über Oligolabelling oder PCR	122
10.3	Hybridisieren und Detektion	123
10.3.1	Nachweis der gebundenen Sonde über Autoradiographie	124
10.3.2	Immunologischer Nachweis nicht-radioaktiv markierter Sonden	124
	Zusammenfassung Blotting, Hybridisieren und Detektion	125
11	Analyse der Genexpression mit Hilfe von Microarrays (Gen-Chips)	128
	Literatur.....	132
	Bildquellen	133
	Glossar und Abkürzungsverzeichnis	134
	Stichwortverzeichnis	140

Teil I
Grundlagen der
Molekularbiologie

1 Aufbau und Eigenschaften von Nucleinsäuren

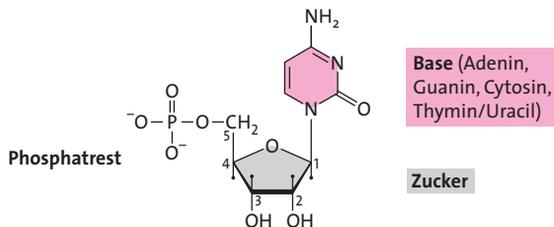
1.1 Nucleotide als Bausteine von Nucleinsäuren

Im Mittelpunkt aller gentechnischen und molekularbiologischen Experimente stehen die Nucleinsäuren, die Träger der Erbinformation.

In fast jedem Organismus kommen zwei verschiedene Arten von Nucleinsäuren vor: **Desoxyribonucleinsäure** (engl.: deoxyribonucleic acid) und **Ribonucleinsäure** (engl.: ribonucleic acid), mit den Abkürzungen DNA und RNA (bzw. DNS und RNS in der deutschen, heute allerdings kaum mehr üblichen Bezeichnung). Nucleinsäuren sind lange Ketten aus einzelnen **Nucleotiden**, die sich jeweils aus drei Komponenten zusammensetzen, einem Zucker, einer Phosphatgruppe und einer Base (Abbildung 1.1).

Abb. 1.1.

Bausteine eines Nucleotids. Jedes Nucleotid besteht aus einem Zucker, einer Phosphatgruppe und einer Base.



Bei dem **Zucker** handelt es sich um eine Pentose (griech.: penta, fünf): Er besteht aus fünf C-Atomen und kommt in zwei verschiedenen Formen in Nucleinsäuren vor, als **Ribose** in RNA und als **Desoxyribose** in DNA. Die Ribose der RNA trägt am 2. C-Atom eine OH-Gruppe, während wir bei Desoxyribose der DNA hier nur ein H-Atom finden.

An das 5. C-Atom der Zuckermoleküle ist über eine Esterbindung eine **Phosphatgruppe** gebunden, die aus einem, zwei oder drei Phosphatresten bestehen kann. Entsprechend finden wir die Bezeichnung Mono-, Di- oder Triphosphate. Der Phosphatrest verleiht dem Nukleotid eine wichtige Eigenschaft, die wir uns beim späteren Arbeiten mit Nucleinsäuren zu Nutze machen werden: Er trägt eine negative Ladung – und damit sind auch DNA und RNA immer negativ geladen.

Der dritte und charakterisierende Bestandteil eines Nukleotids sind schließlich die **Basen**. Sie sind über eine N-Glykosidbindung an das 1. C-Atom des Zuckers gebunden und werden je nach ihrer chemischen Struktur zwei Gruppen zugeordnet: den **Pyrimidinen** und den **Purinen**. Das sind stickstoffhaltige Ringstrukturen, wobei die Pyrimidine aus einem einfachen Sechser-Ring, die Purine aus einem Fünfer- und einem Sechser-Ring bestehen. Als Bestandteile der Nukleotide treten die drei Pyrimidinbasen **Cytosin**, **Thymin** und **Uracil** auf, während zwei weitere Basen, **Adenin** und **Guanin**, der Gruppe der Purine angehören (Abbildung 1.2). DNA und RNA unterscheiden sich auch hier wieder: Bei der DNA finden wir die vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin, bei der RNA ist das Thymin durch **Uracil** ersetzt. Die Bezeichnung eines Nukleotids richtet sich dabei nach der jeweiligen Base, das es trägt: So werden die Nukleotide als Adenosin, Guanosin, Cytidin, Thymidin und Uridin bezeichnet und mit A, G, C, T und U abgekürzt.

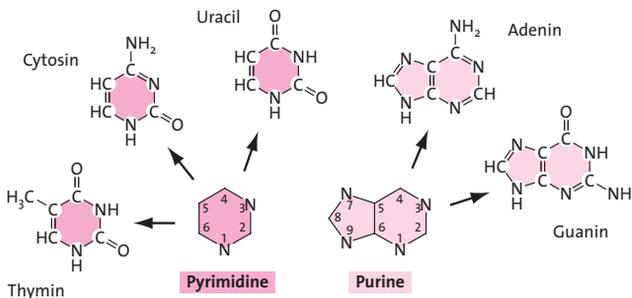


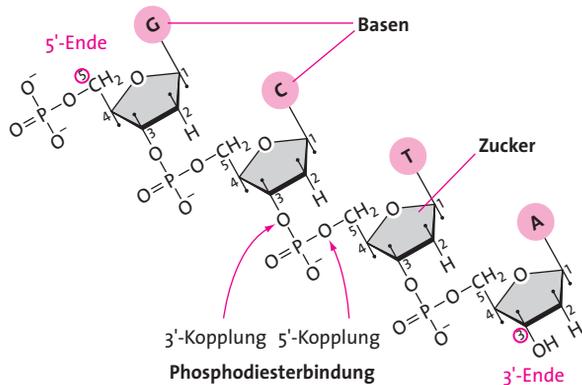
Abb. 1.2.
Chemische Struktur der Basen. Thymin, Uracil und Cytosin sind Pyrimidinbasen, Adenin und Guanin gehören zu den Purinbasen (nach ALBERTS et al. 1994).

Nucleinsäuren entstehen nun durch die kettenförmige Verknüpfung solcher Nukleotide. Dabei erfolgt diese immer in einer bestimmten „Laufrihtung“, wobei an das 3. C-Atom des Zuckers eines bereits vorhandenen Nukleotidstranges

über eine Phosphodiesterbindung der Phosphatrest eines weiteren Nucleotids gebunden wird. Kurz gesagt wird also eine Esterbindung zwischen dem 5. C-Atom des Zuckers von Nucleotid 1 und dem 3. C-Atom des Zuckers von Nucleotid 2 gebildet (Abbildung 1.3). Betrachten wir nun eine ganze Kette von solchen verknüpften Nucleotiden: Es wird deutlich, dass eines der beiden Enden mit einem Phosphatrest am 5. C-Atom anfängt, während sich am anderen Ende eine freie OH-Gruppe am 3. C-Atom befindet. Wir bezeichnen diese beiden Enden daher auch als das **5'-Ende** bzw. das **3'-Ende** des Nucleinsäure-Stranges. Die fortlaufende Reihenfolge der vier Basen Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin bzw. Uracil in der Nucleotidkette der DNA bzw. RNA in der Leserichtung – der Konvention folgend immer in 5'→ 3'-Richtung – wird auch als **Basensequenz** bezeichnet. Die Basensequenz im Beispiel der Abbildung 1.3 wäre demnach 5'-GCTA-3'.

Abb. 1.3.

Verknüpfung einzelner Nucleotide zu einem Nucleinsäure-Strang. Zwei Nucleotide werden über eine Phosphodiesterbindung zwischen dem 5. C-Atom des Zuckers (5'-Kopplung) von Nucleotid 1 und dem 3. C-Atom des Zuckers (3'-Kopplung) von Nucleotid 2 miteinander verknüpft (nach ALBERTS et al. 1994).



1.2 Bestandteile und Struktur der DNA

Die DNA liegt in der Zelle nur zu bestimmten Zeitpunkten (→ Kapitel 2.1) einzelsträngig vor, ansonsten immer in Form eines DNA-Doppelstranges. Dieser entsteht, indem sich zwischen den Basen eines Stranges und denen eines anderen Wasserstoffbrückenbindungen bilden (Abbildung 1.4). Dabei lagert sich Adenin an Thymin und Guanin an Cytosin an, wobei man hier von **komplementärer Basenpaarung** spricht. Das hat zur Folge, dass in einem DNA-Doppelstrang immer gleich viel Adenin wie Thymin und Guanin

wie Cytosin eingebaut ist (Molverhältnisse G:C=1:1; A:T=1:1). Weiterhin ist die Anzahl der Purinbasen gleich der Anzahl der Pyrimidinbasen ($A + G = C + T$). Diese von ERWIN CHARGAFF verfassten **Chargaff-Regeln** werden in der Praxis dahingehend genutzt, dass man die vollständige prozentuale Basenzusammensetzung einer DNA bestimmen kann, auch wenn der Prozentgehalt von nur einer Base bekannt ist.

Betrachtet man Abbildung 1.4 genauer, fällt ein weiteres wichtiges Kennzeichen der Wasserstoffbrückenbildung auf: Zwischen Adenin und Thymin werden nur zwei, zwischen Guanin und Cytosin aber drei Wasserstoffbrücken ausgebildet. Dies hat zur Konsequenz, dass zwischen G und C eine stabilere Bindung besteht als zwischen A und T.

Haben sich nun die komplementären Basen zweier DNA-Einzelstränge vollständig mittels dieser Wasserstoffbrücken gepaart, so bleibt das entstandene zweisträngige „Band“ nicht einfach in der Ebene liegen, sondern wird weiter raumfüllend schraubenartig verdreht. Man bezeichnet diese Struktur des DNA-Doppelstrangs als **Doppelhelix**. Sie wird durch das „Watson-Crick-Modell der DNA“ illustriert und ist zu einem bedeutenden Meilenstein der modernen Molekularbiologie geworden. Dabei stützt sich die Modellentwicklung durch JAMES WATSON und FRANCIS CRICK im Jahr 1953 in hohem Maße auf die von ROSALIND FRANKLIN und MAURICE WILKINS gelieferten Röntgendaten.

Diese DNA-Doppelhelix hat folgende wichtige Eigenschaften (Abbildung 1.5):

- Die beiden Einzelstränge sind **antiparallel** (= gegenläufig) orientiert, d.h. neben dem 5'-Ende des einen Stranges liegt das 3'-Ende des anderen.
- Beide Stränge sind nach rechts schraubenartig um eine (gedachte) Längsachse gewunden, wobei jeweils 10 Nukleotidpaare eine Windung (diese ist 3,4 nm lang) bilden.

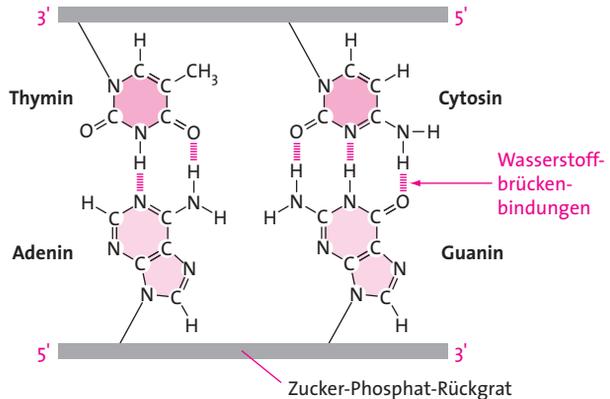
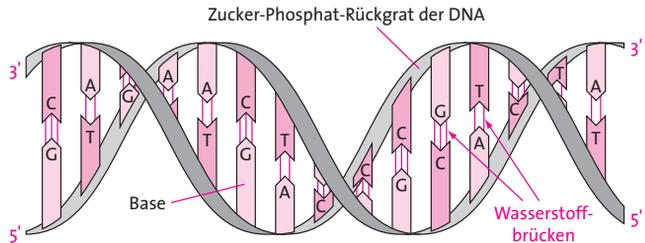


Abb. 1.4. Die komplementäre Basenpaarung. Zwischen den Basen Adenin und Thymin bzw. Guanin und Cytosin bilden sich zwei bzw. drei Wasserstoffbrückenbindungen aus (nach ALBERTS et al. 1994).

- Die durch Wasserstoffbrückenbindungen verknüpften Basen sind nach innen gerichtet, während Zucker und Phosphatrest außen liegen und das so genannte **Zucker-Phosphat-Rückgrat** der DNA bilden.
- Die vertikalen Abstände zwischen den beiden DNA-Einzelsträngen sind nicht gleich groß, es wird abwechselnd eine „kleine“ und eine „große“ Furche gebildet.

Abb. 1.5.

Struktur der DNA-Doppelhelix. Die DNA besteht aus zwei schraubig ineinander verdrehten und über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbundenen komplementären DNA-Einzelsträngen mit gegenläufiger Polarität (nach ALBERTS et al. 1994).



Die komplementäre Basenpaarung macht man sich für viele der in den folgenden Kapiteln aufgeführten molekularbiologischen Techniken zu Nutze, denn aus der Basenabfolge des eines Stranges kann immer die des anderen bestimmt werden, da der eine Strang die genaue negative Vorlage für den anderen darstellt. Folgende kurze DNA-Sequenz soll dies verdeutlichen: Hat der erste Strang die Basenabfolge 5'-AGCTTAACGT-3', so hat der komplementäre Strang demnach die Basensequenz: **3'-TCGAATTGCA-5'**.

Kann nun die Ausbildung eines DNA-Doppelstranges wieder rückgängig gemacht werden, d.h. kann dieser ohne Beschädigung wieder in seine zwei Einzelstränge zerlegt werden? Tatsächlich ist es so, dass die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen zwei komplementären Basen durch die Einwirkung von Hitze oder alkalischen Lösungen leicht wieder aufgebrochen werden können. Man bezeichnet dies als **Denaturierung der DNA**. Erfolgt die Denaturierung der DNA durch Hitze, so ergeben sich je nach der Basenzusammensetzung unterschiedliche Schmelztemperaturen: Je höher der Gehalt an Guanin und Cytosin (**der GC-Gehalt**), desto höher ist die Schmelztemperatur der betreffenden DNA, da – wie zuvor beschrieben – zwischen diesen zwei Basen eine stabilere Bindung ausgebildet ist als zwischen Adenin und Thymin. Auch bei der Denaturierung handelt es sich um einen reversiblen Prozess. Wird die Temperatur oder