

Dominic W. S. Wong

Das ABC des Genklonens

 Springer

Das ABC des Genklonens

Dominic W. S. Wong

Das ABC des Genklonens

 Springer

Dominic W. S. Wong
Western Regional Research Center
Albany, USA

Dieses Buch ist eine Übersetzung des Originals in Englisch „The ABCs of Gene Cloning“ von Wong, Dominic W. S., publiziert durch Springer Nature Switzerland AG im Jahr 2018. Die Übersetzung erfolgte mit Hilfe von künstlicher Intelligenz (maschinelle Übersetzung durch den Dienst DeepL.com). Eine anschließende Überarbeitung im Satzbetrieb erfolgte vor allem in inhaltlicher Hinsicht, so dass sich das Buch stilistisch anders lesen wird als eine herkömmliche Übersetzung. Springer Nature arbeitet kontinuierlich an der Weiterentwicklung von Werkzeugen für die Produktion von Büchern und an den damit verbundenen Technologien zur Unterstützung der Autoren.

ISBN 978-3-031-22189-7 ISBN 978-3-031-22190-3 (eBook)
<https://doi.org/10.1007/978-3-031-22190-3>

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

Springer

© Der/die Herausgeber bzw. der/die Autor(en), exklusiv lizenziert an Springer Nature Switzerland AG 2018, 2023

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von allgemein beschreibenden Bezeichnungen, Marken, Unternehmensnamen etc. in diesem Werk bedeutet nicht, dass diese frei durch jedermann benutzt werden dürfen. Die Berechtigung zur Benutzung unterliegt, auch ohne gesonderten Hinweis hierzu, den Regeln des Markenrechts. Die Rechte des jeweiligen Zeicheninhabers sind zu beachten.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen. Der Verlag bleibt im Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutionsadressen neutral.

Planung/Lektorat: Sarah Koch

Springer ist ein Imprint der eingetragenen Gesellschaft Springer Nature Switzerland AG und ist ein Teil von Springer Nature.

Die Anschrift der Gesellschaft ist: Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland

An: Benji und Theo

Vorwort zur dritten Auflage

Bei der Vorbereitung dieser dritten Auflage ist der Autor mehr denn je davon überzeugt, dass die Beherrschung der Grundlagen des Sprechens und Lesens der „Sprache“ des Genklonierens der Schlüssel zum Verständnis seiner Schönheit ist. Das Gesamtziel bleibt das gleiche wie bei den beiden vorherigen Ausgaben, wobei der Schwerpunkt auf dem Erlernen des Vokabulars und der Sprache des Genklonierens liegt. Zu diesem Zweck wurden in den Teilen I und II die Kapitel über Klonierungstechniken, Klonierungsvektoren und Transformation aktualisiert. Ein neues Kapitel befasst sich mit dem Konzept und der Vorgehensweise bei der Entwicklung von Genvektorkonstrukten für das Expressionsklonieren.

In den zwölf Jahren, die seit der Erstellung der zweiten Auflage vergangen sind, hat es bemerkenswerte Fortschritte in der Anwendungstechnologie des Genklonierens gegeben. Bei der Überarbeitung dieses Buchs wurden neue Themen aufgenommen, die insbesondere den Bereich der medizinischen Wissenschaft und Technologie betreffen. Zu den neuen Abschnitten gehören: Identifizierung von Krankheitsgenen durch Exomsequenzierung, rekombinante adenoassozierte virusvermittelte Gentherapie, künstliche Nukleasen und CRISPR für Gen-/Genom-Editing sowie Next-generation-Sequenzierung. Auch andere Kapitel wurden überarbeitet und aktualisiert.

Es war eine erfreuliche und inspirierende Erfahrung, den Beitrag zahlreicher Wissenschaftler zu dem sich ständig weiterentwickelnden Gebiet des Genklonierens kennenzulernen. Ich danke den Autoren, auf deren Veröffentlichungen und Materialien in diesem Buch verwiesen wird, sowie den Verlagen für die Erlaubnis, die urheberrechtlich geschützten Materialien zu verwenden. Mein Dank gilt auch vielen meiner Kollegen und Studenten für die jahrelange Forschungszusammenarbeit, die dem Umfang und der Präsentation dieses Buchs Sinn und Bedeutung verliehen hat.

Vorwort zur zweiten Auflage

In den neun Jahren seit der ersten Auflage bin ich nach wie vor der Meinung, dass ein effektiver Ansatz zum Verständnis des Themas Genklonierung darin besteht, das „Vokabular“ und die „Sprache“ zu lernen. Dieses Buch legt den Schwerpunkt auf das Wesentliche, nämlich die Sprache des Genklonierens zu lesen und zu sprechen. Es zeigt den Lesern, wie man zwischen einem Gen und einer DNA unterscheidet, wie man eine Gensequenz liest und schreibt, wie man intelligent über das Klonieren spricht, wie man wissenschaftliche News liest und wie man Seminare mit einem gewissen Maß an Verständnis genießt.

Im Großen und Ganzen ist die zweite Auflage nicht weiter fortgeschritten als die erste, um das Buch übersichtlich zu halten und die Leser nicht mit unnötigen Details zu belasten. Nichtsdestotrotz waren Änderungen erforderlich und neue Materialien wurden in die Überarbeitung aufgenommen. Teil I enthält ein neues Kapitel, das eine Anleitung zum Lesen von prokaryotischen und eukaryotischen Gensequenzen bietet. Teil II besteht aus mehreren Ergänzungen, die neue Techniken und Klonierungsvektoren betreffen. Die Themen in Teil III wurden in separaten Abschnitten neu geordnet – Teil III konzentriert sich nun auf Anwendungen des Genklonierens in der Landwirtschaft, und Teil IV ist ganz den Anwendungen in der Medizin gewidmet. Die Kapitel über Gentherapie, Gen-Targeting und DNA-Typisierung wurden gründlich überarbeitet. Zusätzliche Kapitel behandeln das Klonen von Tieren und die Sequenzierung des menschlichen Genoms. Die intensive Beschäftigung mit der Neufassung und Erweiterung von Teil IV spiegelt den raschen Fortschritt in der Technologie und die zunehmende Bedeutung des Genklonierens wider.

Ich habe das Schreiben und Überarbeiten dieses Buchs mit großer Befriedigung genossen. Es war eine inspirierende Erfahrung, die bemerkenswerte Entwicklung auf dem Gebiet des Genklonierens und den unermüdlichen Einsatz Tausender von Wissenschaftlern mitzuerleben, die die Gene zum Ticken bringen.

Vorwort zur ersten Ausgabe

Das Klonieren von Genen hat sich zu einem schnell wachsenden Bereich mit weitreichenden Auswirkungen auf alle Bereiche unseres Lebens entwickelt. Das Thema des Genklonierens kann für einen Anfänger mit wenig formaler Ausbildung in Biologie einschüchternd wirken. Dieses Buch soll keine elementare Behandlung der rekombinanten DNA-Technologie darstellen, da es bereits eine Reihe von Büchern in dieser Kategorie gibt. Ziel dieses Buchs ist es, interessierten Lesern, die keine Vorkenntnisse auf diesem Gebiet haben, eine echte Einführung in das Klonieren von Genen zu geben, damit sie das Vokabular erlernen und einige Kenntnisse im Lesen und Sprechen der „Sprache“ erwerben können.

Beim Schreiben dieses Buchs war der Autor ständig mit der Frage konfrontiert, wie er die Sprache eines komplexen Fachgebiets auf einfache und zugängliche Weise darstellen kann. Ich habe mich dafür entschieden, Teil I dieses Buchs der Darstellung einiger grundlegender Konzepte der Biologie in einer einfachen und zugänglichen Weise zu widmen. Meine Absicht ist es, nur das Wesentliche hervorzuheben, das für das Verständnis des Genklonierens am wichtigsten ist. Wer sich eingehender mit der Genetik oder Molekularbiologie befassen möchte, kann auf zahlreiche hervorragende Literatur zurückgreifen. Teil II des Buchs beschreibt Klonierungstechniken und -ansätze, die in mikrobiellen, pflanzlichen und Säugetiersystemen verwendet werden. Ich glaube, dass eine Diskussion über Mikroben hinaus eine Voraussetzung für ein besseres Verständnis der Sprache und der praktischen Anwendungen des Genklonierens ist. Teil III beschreibt ausgewählte Anwendungen in der Landwirtschaft und Lebensmittelwissenschaft sowie in der Medizin und verwandten Bereichen. Ich habe den Ansatz gewählt, zunächst die Hintergrundinformationen für jede Anwendung vorzustellen, gefolgt von einem Beispiel für in der Literatur veröffentlichte Klonierungsstrategien. Die Einbeziehung von Veröffentlichungen ist ein effizienter Weg, um zu zeigen, wie das Klonieren von Genen durchgeführt wird, und es mit den in Teil I und II entwickelten Konzepten in Verbindung zu brin-

gen. Darüber hinaus ermöglicht es den Lesern, das kohärente Thema, das die Prinzipien und Techniken des Genklonierens unterstreicht, zu „sehen“. Entsprechend seinem einführenden Charakter ist der Text reichlich illustriert, und die Inhalte werden in einer logischen Reihenfolge entwickelt. Jedes Kapitel wird durch eine Liste von Wiederholungsfragen als Studienhilfe ergänzt.

Ich hoffe, dass es diesem Buch gelingt, nicht nur die wunderbare Sprache des Genklonens zu vermitteln, sondern auch ein Gefühl für die Relevanz dieser Wissenschaft in unserem täglichen Leben. Abschließend möchte ich meinen Lehrern und Kollegen, insbesondere Professor Carl A. Batt (Cornell University) und Professor Robert E. Feeney (UC Davis), dafür danken, dass sie mein Interesse an biologischen Molekülen und Prozessen geweckt haben. Besonderer Dank gebührt Dr. Eleanor S. Reimer (Chapman & Hall), die mich bei der Verwirklichung dieses Buchs sehr unterstützt hat.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort zur dritten Auflage	VII
Vorwort zur zweiten Auflage	IX
Vorwort zur ersten Ausgabe	XI
Teil I Grundlagen der genetischen Prozesse	
1 Einführende Konzepte	3
1.1 Was ist DNA und was ist ein Gen?	3
1.2 Was ist Genklonieren?	4
1.3 Zellorganisationen	5
1.4 Vererbungsfaktoren und Merkmale	7
1.5 Mitose und Meiose	9
1.6 Zusammenhang zwischen Genen und vererbten Merkmalen	11
1.7 Warum Genklonieren?	11
2 Strukturen von Nukleinsäuren	15
2.1 5'-P- und 3'-OH-Enden	15
2.2 Purin- und Pyrimidinbasen	17
2.3 Komplementäre Basenpaarung	18
2.4 Schreiben eines DNA-Moleküls	19
2.5 Beschreiben von DNA-Größen	20
2.6 Denaturierung und Renaturierung	20
2.7 Ribonukleinsäure	21
3 Strukturen von Proteinen	23
3.1 Aminosäuren	23
3.2 Die Peptidbindung	25
3.3 Strukturelle Organisation	26
3.4 Posttranslationale Modifikation	27
3.5 Enzyme	28

- 4 Der genetische Prozess** 31
 - 4.1 Von Genen zu Proteinen 31
 - 4.2 Transkription 31
 - 4.3 Translation 32
 - 4.4 Der genetische Code 33
 - 4.5 Warum eine Sequenz mithilfe des kodierenden Strangs darstellen? 34
 - 4.6 Der Leserahmen 35
 - 4.7 DNA-Replikation 37
 - 4.8 Das Replikon und der Replikationsursprung 39
 - 4.9 Zusammenhang zwischen Replikation und Genklonierung ... 39

- 5 Organisation von Genen** 41
 - 5.1 Das Laktose-Operon 41
 - 5.2 Kontrolle der Transkription 42
 - 5.2.1 Wo befinden sich Start- und Endpunkt der Transkription? 42
 - 5.2.2 Wann beginnt oder endet die Transkription? 44
 - 5.3 Kontrolle der Translation 46
 - 5.3.1 Ribosomenbindungsstelle und Startcodon 46
 - 5.3.2 Terminierungsort der Translation 47
 - 5.4 Das Tryptophan-Operon 47
 - 5.4.1 Co-Repressor 48
 - 5.4.2 Abschwächung 49
 - 5.4.3 Hybride Promotoren 50
 - 5.5 Das Kontrollsystem in eukaryotischen Zellen 50
 - 5.5.1 Transkriptionelle Kontrolle 50
 - 5.5.2 Introns und Exons 52
 - 5.5.3 Abdeckungen und Nachlauf 53
 - 5.5.4 Ribosomenbindungssequenz 53
 - 5.5.5 Monocistronisch und polycistronisch 53

- 6 Ablesen der Nukleotidsequenz eines Gens** 57
 - 6.1 Das *E.-coli*-Gen *dut* 57
 - 6.2 Das menschliche *bgn*-Gen 60
 - 6.2.1 Ablesen der genomischen Sequenz 60
 - 6.2.2 Ablesen der cDNA-Sequenz 64

Teil II Techniken und Strategien des Genklonierens

- 7 Bei der Klonierung verwendete Enzyme** 71
 - 7.1 Restriktionsenzyme 71
 - 7.2 Ligase 72
 - 7.3 DNA-Polymerasen 73
 - 7.3.1 *E.-coli*-DNA-Polymerase I 73
 - 7.3.2 Bakteriophage-T4- und -T7-Polymerase 76
 - 7.3.3 Reverse Transkriptase 77
 - 7.4 Phosphatase und Kinase 77

8	Techniken des Klonierens	81
8.1	DNA-Isolierung	81
8.2	Gelelektrophorese	81
8.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	82
8.2.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	82
8.3	Western Blot	83
8.4	Southern-Transfer	84
8.5	Kolonie-Blot	85
8.6	Hybridisierung	87
8.7	Kolonie-PCR	88
8.8	Immunologische Verfahren	89
8.9	DNA-Sequenzierung	90
8.10	Polymerasekettenreaktion	93
8.11	Ortsgerichtete Mutagenese	95
8.12	Nichtradioaktive Nachweismethoden	98
9	Klonierungsvektoren für das Einbringen von Genen in Wirtszellen	101
9.1	Vektoren für bakterielle Zellen	101
9.1.1	Plasmidvektoren	101
9.1.2	Bakteriophagenvektoren	108
9.1.3	Cosmide	112
9.1.4	Phagemiden	112
9.2	Hefe-Klonierungsvektoren	114
9.2.1	Der 2-micron-Circle	114
9.2.2	Die <i>Pichia-pastoris</i> -Expressionsvektoren	116
9.3	Vektoren für Pflanzenzellen	117
9.3.1	Binäres Vektorsystem	118
9.3.2	Kointegratives Vektorsystem	118
9.3.3	Genetische Marker	121
9.3.4	Pflanzenspezifische Promotoren	123
9.4	Vektoren für Säugetierzellen	123
9.4.1	SV40-Virusvektoren	124
9.4.2	Direkter DNA-Transfer	125
9.4.3	Insekten-Baculovirus	127
9.4.4	Retrovirus	131
10	Gen-Vektor-Konstruktion	137
10.1	Klonierung oder Expression	137
10.2	Die grundlegenden Komponenten	137
10.2.1	Expressionsvektoren	138
10.3	Lesen einer Vektorkarte	139
10.4	Die Klonierungs-/Expressionsregion	140
10.5	Das Gen muss zur Expression mit dem Vektor im Leseraster ligieren	141
10.6	Linker und Adapter für die Einführung von Restriktionsstellen	142

11	Transformation	145
	11.1 Behandlung mit Kalziumsalz	145
	11.2 Elektroporation	146
	11.3 Agrobacterium-Infektion	146
	11.4 Der biolistische Prozess	146
	11.5 Virale Transfektion	147
	11.6 Mikroinjektion	147
	11.7 Kerntransfer	148
	11.8 Zellfreie Expression	149
12	Isolierung von Genen für die Klonierung	151
	12.1 Die genomische Bibliothek	151
	12.2 Die cDNA-Bibliothek	152
	12.3 Auswahl der richtigen Zelltypen für die mRNA-Isolierung ...	154
Teil III	Auswirkungen des Genklonierens: Anwendungen in der Landwirtschaft	
13	Verbesserung der Qualität von Tomaten durch Antisense-RNA	159
	13.1 Antisense-RNA	159
	13.2 Eine Strategie für das Engineering von Tomaten mit Antisense-RNA	161
14	Transgene Nutzpflanzen mit Insektizidwirkung	165
	14.1 <i>Bacillus-thuringiensis</i> -Toxine	165
	14.2 Klonierung des <i>cry</i> -Gens in die Baumwollpflanze	166
	14.2.1 Modifizierung des <i>cry</i> -Gens	166
	14.2.2 Der intermediäre Vektor	166
	14.2.3 Transformation durch <i>Agrobacterium</i>	167
15	Transgene Nutzpflanzen mit Herbizidresistenz	169
	15.1 Glyphosat	169
	15.2 Klonierung des <i>aroA</i> -Gens	171
16	Wachstumsverbesserung bei transgenen Fischen	173
	16.1 Gentransfer bei Fischen	173
	16.2 Klonieren von Lachsen mit einem chimären Wachstumshormon-Gen	174
Teil IV	Auswirkungen des Genklonierens: Anwendungen in der Medizin und verwandten Bereichen	
17	Mikrobielle Produktion von rekombinantem Humaninsulin	179
	17.1 Struktur und Wirkung von Insulin	179
	17.2 Klonierung des menschlichen Insulin-Gens	180

18	Suche nach krankheitsverursachenden Genen	183
18.1	Genetische Kopplung	183
18.1.1	Häufigkeit der Rekombination	185
18.1.2	Genetische Marker	185
18.2	Positionsklonierung	186
18.2.1	Chromosomen-Walking	186
18.2.2	Chromosomen-Jumping	186
18.2.3	Künstliches Hefechromosom	188
18.3	Exonamplifikation	189
18.4	Isolierung des Fettleibigkeitsgens der Maus	190
18.5	Exomsequenzierung	191
18.5.1	Gezielte Anreicherung durch Sequence Capture	191
18.5.2	Identifizierung von Krankheitsgenen	192
19	Gentherapie beim Menschen	195
19.1	Physikalische und chemische Methoden	195
19.2	Biologische Methoden	197
19.2.1	Lebenszyklus von Retroviren	197
19.2.2	Konstruktion eines sicheren Retrovirusvektors	198
19.2.3	Gentherapie der schweren kombinierten Immunschwäche	198
19.3	Adenoassoziiertes Virus	200
19.3.1	Lebenszyklus des adenoassoziierten Virus	201
19.3.2	Rekombinantes adenoassoziiertes Virus	201
19.3.3	Rekombinante-adenoassoziierte-Virus-vermittelte Gentherapie bei Leberscher kongenitaler Amaurose Typ 2	202
19.4	Therapeutische Impfstoffe	203
19.4.1	Konstruktion von DNA-Impfstoffen	204
19.4.2	Lieferung von DNA-Impfstoffen	204
20	Gen-Targeting und Genomeditierung	207
20.1	Rekombination	207
20.2	Ersatz-Targeting-Vektoren	208
20.3	Gen-Targeting ohne selektierbare Marker	210
20.3.1	Die PCR-Methode	210
20.3.2	Die Double-Hit-Methode	210
20.3.3	Die Cre/loxP-Rekombination	212
20.4	Gen-Targeting für Xenotransplantate	212
20.5	Konstruierte Nukleasen: ZFN, TALEN, CRISPR	214
20.5.1	Zinkfinger-nukleasen	215
20.5.2	Transkriptionsaktivatorähnliche Effektornukleasen	215

20.5.3	Das CRISPR/Cas-System	216
20.5.4	Nichthomologes Endjoining und homologiegeleitete Reparatur	217
20.5.5	Expression gentechnisch veränderter Nukleasen in Zielzellen	217
21	DNA-Typisierung	219
21.1	Variable Anzahl von Tandemwiederholungen	219
21.2	Polymorphismusanalyse mit VNTR-Markern	220
21.3	Einzellokus- und Multilokussonden	221
21.4	Analyse von Vaterschaftsfällen	222
21.5	Short-tandem-repeat-Marker	223
21.5.1	Das kombinierte DNA-Indexsystem	224
21.6	Mitochondriale DNA-Sequenzanalyse	225
22	Transpharmers: Bioreaktoren für pharmazeutische Produkte	229
22.1	Allgemeines Verfahren zur Erzeugung transgener Tiere	230
22.2	Transgene Schafe für α_1 -Antitrypsin	230
23	Klonen von Tieren	233
23.1	Zelldifferenzierung	233
23.2	Kerntransfer	234
23.3	Das Klonen von Dolly	235
23.4	Gentransfer für landwirtschaftliche Nutztiere	237
24	Gesamtes Genom und Next-generation-Sequenzierung	239
24.1	Genetische Karten	239
24.1.1	DNA-Marker	240
24.1.2	Stammbaumanalyse	241
24.2	Physikalische Karten	241
24.2.1	Sequenzmarkierte Stellen	241
24.2.2	Radiation-Hybridisierung	242
24.2.3	Klonbibliotheken	243
24.2.4	Der bakterielle Vektor für künstliche Chromosomen	244
24.3	Umfassende integrierte Karten	244
24.4	Strategien für die Genomsequenzierung	245
24.4.1	Hierarchische Shotgun-Sequenzierung	245
24.4.2	Shotgun-Sequenzierung gesamter Genome	247
24.5	Next-generation-Sequenzierung gesamter Genome	248
24.5.1	Das Grundschema der Next-generation-Sequenzierung	248
	Empfohlene Lektüre	253



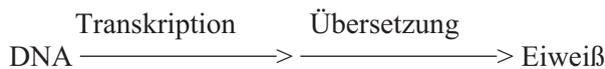
Teil I

Grundlagen der genetischen Prozesse



EINFÜHRENDE KONZEPTE

Die Bausteine aller Formen des Lebens sind Zellen. Einfache Organismen wie Bakterien bestehen aus einzelnen Zellen. Pflanzen und Tiere bestehen aus vielen Zelltypen, die jeweils in Geweben und Organen mit spezifischen Funktionen organisiert sind. Die Bestimmungsfaktoren der genetischen Merkmale lebender Organismen sind im Kern jeder Zelle in Form einer Art von Nukleinsäure enthalten, der Desoxyribonukleinsäure (DNA). Die genetische Information in der DNA wird für die Synthese von zellspezifischen Proteinen verwendet. Die Fähigkeit der Zellen, die von der DNA kodierten Informationen in Form von Proteinmolekülen auszudrücken, wird durch den zweistufigen Prozess von Transkription und Translation erreicht.



1.1 Was ist DNA und was ist ein Gen?

Ein DNA-Molekül enthält zahlreiche diskrete Informationen, die jeweils für die Struktur eines bestimmten Proteins kodieren. Jedes Stück der Information, das ein Protein spezifiziert, entspricht nur einem sehr kleinen Segment des DNA-Moleküls. Der Bakteriophage λ , ein Virus, der Bakterien infiziert, enthält alle seine 60 Gene in einem einzigen DNA-Molekül. Beim Menschen gibt es etwa 20.000 Gene, die in 46 Chromosomen organisiert sind, komplexen Strukturen von DNA-Molekülen, die mit Proteinen verbunden sind.

Wann, wie und wo die Synthese der einzelnen Proteine erfolgt, wird genau kontrolliert. Biologische Systeme sind auf Effizienz optimiert; Proteine werden nur dann hergestellt, wenn sie benötigt werden. Das bedeutet, dass Transkription und Translation eines Gens bei der Herstellung eines Proteins durch eine Reihe von Steuerelementen, von denen viele auch Proteine sind, in

hohem Maß reguliert werden. Diese regulatorischen Proteine werden wiederum von einer Reihe von Genen kodiert.

Es ist daher sinnvoller, ein Gen als eine funktionelle Einheit zu definieren. Ein Gen ist eine Kombination von DNA-Segmenten, die alle für seine Expression notwendigen Informationen enthalten, die zur Produktion eines Proteins führen. Ein in diesem Zusammenhang definiertes Gen würde (1) die strukturelle Gensequenz, die das Protein kodiert, und (2) die Sequenzen, die an der Regulierungsfunktion des Prozesses beteiligt sind, umfassen.

1.2 Was ist Genklonieren?

Beim Klonieren von Genen wird eine fremde DNA (oder ein Gen) in eine Wirtszelle (eine Bakterienzelle, eine Pflanze oder ein Tier) eingeführt. Um dies zu erreichen, wird das Gen in der Regel in einen Vektor (ein kleines Stück DNA) eingefügt, um ein rekombinantes DNA-Molekül zu bilden. Der Vektor dient als Vehikel für die Einführung des Gens in die Wirtszelle und für die Steuerung der richtigen Replikation (DNA -> DNA) und Expression (DNA -> Protein) des Gens (Abb. 1.1).

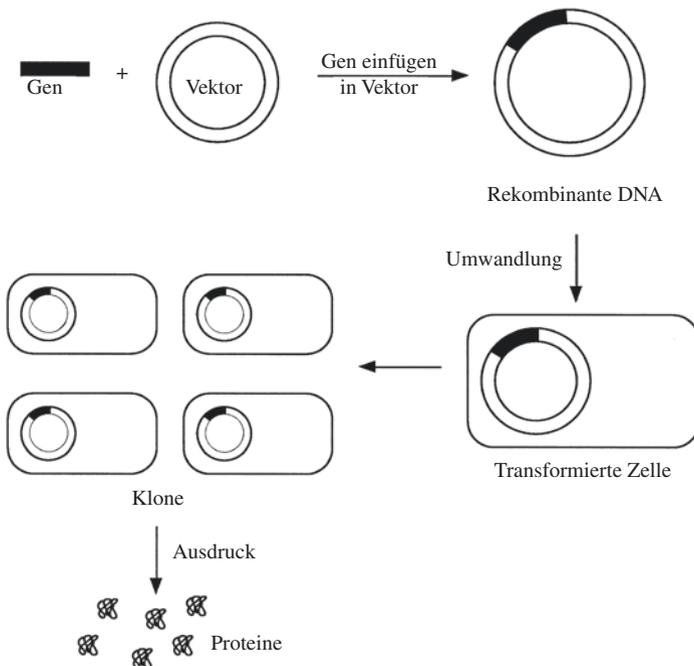


Abb. 1.1 Allgemeines Schema der Genklonierung

Der Prozess, bei dem der genhaltige Vektor in eine Wirtszelle eingeführt wird, wird Transformation genannt. Die Wirtszelle, die nun das fremde Gen beherbergt, ist eine transformierte Zelle oder ein Transformant.

Die Wirtszelle, die den genhaltigen Vektor trägt, produziert Nachkommen, die alle das eingefügte Gen enthalten. Diese identischen Zellen werden als Klone bezeichnet.

In der transformierten Wirtszelle und ihren Klonen wird das eingefügte Gen transkribiert und in Proteine übersetzt. Das Gen wird also exprimiert, wobei das Genprodukt ein Protein ist. Dieser Vorgang wird als Expression bezeichnet.

1.3 Zellorganisationen

Richten wir unsere Aufmerksamkeit für einen Moment auf die Organisation und die allgemeinen strukturellen Merkmale einer Zelle, deren Kenntnis erforderlich ist, um die Sprache des Genklonierens zu beherrschen. Es gibt zwei verschiedene Arten von Zellen (Abb. 1.2). Bei einem einfachen Zelltyp gibt es keine getrennten Kompartimente für das genetische Material und andere interne Strukturen.

Organismen mit dieser Art der zellulären Organisation werden als Prokaryoten bezeichnet. Das genetische Material von Prokaryoten, wie z. B. Bakterien, liegt in einer einzigen zirkulären DNA in einer klaren Region vor, die Nukleoid genannt wird und mikroskopisch beobachtet werden kann. Einige Bakterien enthalten auch kleine zirkuläre DNA-Moleküle, die als Plasmide bezeichnet werden (Plasmide sind die DNA, die für die Konstruktion von Vektoren beim Klonieren von Genen verwendet wird; siehe Abschn. 9.1). Der Rest des Zellinneren ist das Zytoplasma, das zahlreiche winzige kugelförmige Strukturen enthält, die Ribosomen genannt werden – die Orte für die Proteinsynthese. Abgegrenzte Strukturen wie Ribosomen werden als Organellen bezeichnet. Der restliche (flüssige) Teil des Zytoplasmas ist das Zytosol, eine Lösung aus chemischen Bestandteilen, die verschiedene Funktionen der Zelle aufrechterhalten. Alle intrazellulären Materialien werden von einer Plasmamembran umschlossen, einer Doppelschicht aus Phospholipiden, in die verschiedene Proteine eingebettet sind. Darüber hinaus enthalten einige Bakterienzellen eine äußere Schicht aus Peptidoglykan (ein Polymer aus Aminozuckern) und eine Kapsel (eine schleimige Schicht aus Polysacchariden).

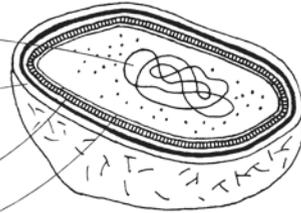
Im Gegensatz dazu hat die überwiegende Mehrheit der lebenden Arten, darunter Tiere, Pflanzen und Pilze, Zellen, die das genetische Material in einem membrangebundenen Zellkern enthalten, der von anderen inneren Kompartimenten, die ebenfalls von Membranen umgeben sind, getrennt ist. Organismen mit dieser Art der Zellorganisation werden als Eukaryoten bezeichnet. Die Anzahl und Komplexität der Organellen in eukaryotischen Zellen übersteigt die von Bakterien bei Weitem (Abb. 1.2). In tierischen Zellen sind die Organellen und die Bestandteile durch eine Plasmamembran verbunden. In Pflanzen und

Nukleoid: Ein klarer Bereich, der aus genetischem Material in einer einzigen zirkulären DNA besteht.

Kapsel: Eine Schleimschicht aus Polysacchariden.

Peptidoglykan-Schicht: Eine Schicht aus Polymeren von Amino-Zuckern.

Plasmamembran: Selektive Permeation spezifischer Moleküle in und aus der Zelle.



Bakterienzelle (1-10 µm)

Kernumhüllung

Chromatin: Chromosomale DNA, die mit Histonproteinen in einem dispergierten Zustand verbunden ist.

Nukleolus: Ort für den Zusammenbau der Ribosomen.

Endoplasmatisches Retikulum: Ein strukturelles Netzwerk im Zytoplasma, das mit der Kernhülle verbunden ist.

1. **Raues ER:** Die Proteinsynthese erfolgt durch Ribosomen an seiner Außenfläche.
2. **Glattes ER:** Ort der Lipidsynthese.

Golgi-Apparat: Transfer, Lagerung und Verpackung von Makromolekülen aus dem ER zur Sekretion an andere Organellen.

Lysosomen, Peroxisomen: Entsorgung von unerwünschten zellulären Materialien, die in der Zelle entstehen.



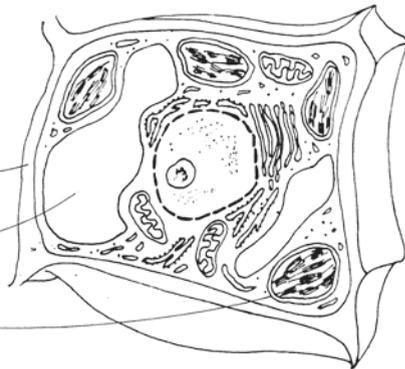
Tierische Zelle (10-30 µm)

Mitochondrien: Ort der Energieerzeugung (ATP) aus Nahrung und Sauerstoff.

Pflanzliche Zellwand: Starre Wand, die aus Zellulosematerialien in einer Matrix aus anderen Polysacchariden besteht.*

Vakuole: Reservoir für Abfallprodukte und deren Verdauung.

Chloroplast Ort der Photosynthese.



Pflanzenzelle (10-100 µm)

Abb. 1.2 Zeichnung von Zellen mit Details der Organellen

Pilzen gibt es zusätzlich eine äußere Zellwand, die hauptsächlich aus Zellulose besteht (in Pflanzen- und Pilzzellen muss die Zellwand in einigen Fällen entfernt werden, bevor eine fremde DNA in die Zelle eingeschleust werden kann, wie in Abschn. 11.1 beschrieben).

1.4 Vererbungsfaktoren und Merkmale

In einem eukaryotischen Zellkern liegt die DNA in Komplexen mit Proteinen vor und bildet eine Struktur, die Chromatin genannt wird (Abb. 1.3). Während der Zellteilung verdichtet sich das faserartige Chromatin zu einer genauen Anzahl klar definierter Strukturen, die Chromosomen genannt werden und unter dem Mikroskop sichtbar sind.

Die Chromosomen sind aufgrund von Ähnlichkeiten in Form und Länge sowie der genetischen Zusammensetzung in Paaren zusammengefasst. Die Anzahl der Chromosomenpaare ist bei den verschiedenen Arten unterschiedlich. Karotten haben beispielsweise 9 Chromosomenpaare, Menschen haben 23 Paare usw. Die beiden ähnlichen Chromosomen eines Paares werden als homolog bezeichnet und enthalten genetisches Material, das die gleichen vererbaren Merkmale steuert. Befindet sich ein Erbfaktor (Gen), der ein bestimmtes Erbmerkmal bestimmt, auf einem Chromosom, so befindet er sich auch an derselben Stelle (Locus) auf dem homologen Chromosom. Die beiden Kopien eines Gens, die sich an denselben Loci in einem homologen Chromosomenpaar befinden, bestimmen dasselbe Erbmerkmal, können aber in ver-

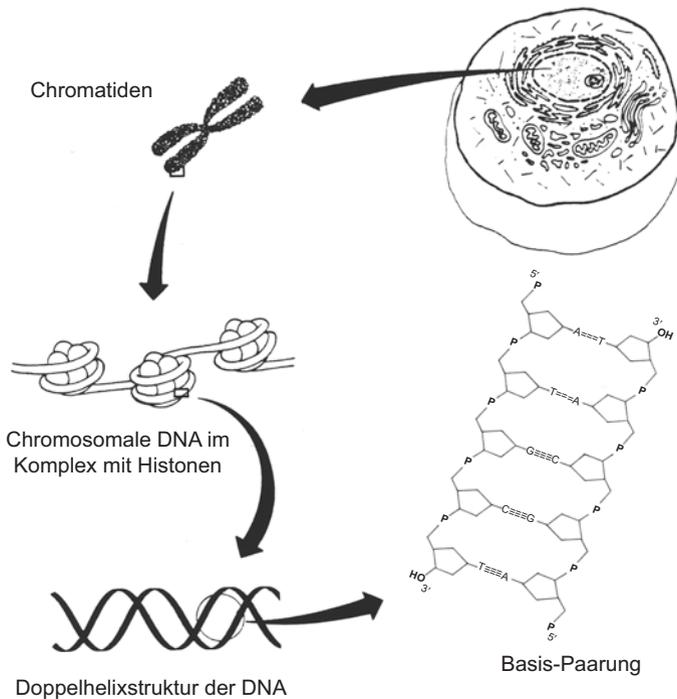


Abb. 1.3 Struktur eines zellulären Chromosoms

schiedenen Formen (Allelen) vorliegen. Vereinfacht ausgedrückt, es gibt für jedes Gen dominante und rezessive Allele.

Bei einem homologen Chromosomenpaar können die beiden Kopien eines Gens in drei verschiedenen Kombinationen vorliegen: zwei dominante Allele, ein dominantes und ein rezessives oder zwei rezessive. Dominante Allele werden mit Großbuchstaben bezeichnet, rezessive Allele mit dem gleichen Buchstaben, aber in Kleinbuchstaben. So wird beispielsweise die Form eines Erbsenkorns durch das Vorhandensein des R-Gens bestimmt. Die dominante Form des Gens wird mit R und die rezessive Form des Gens mit r bezeichnet. Die homologe Kombination der Allele kann eine der folgenden sein: (1) RR (beide dominant), (2) Rr (eines dominant, eines rezessiv) oder (3) rr (beide rezessiv). Diese genetische Zusammensetzung eines Vererbungsfaktors wird als Genotyp bezeichnet. Ein dominantes Allel ist die Form eines Gens, die immer exprimiert wird, während ein rezessives Allel in Gegenwart eines dominanten Allels unterdrückt wird. Im Fall der Genotypen RR und Rr erhalten die Erbsensamen also eine runde Form, während der Genotyp rr einen faltigen Samen ergibt. Das beobachtete Erscheinungsbild bei der Ausprägung eines Genotyps ist sein Phänotyp.

In diesem Beispiel hat eine Erbsenpflanze mit dem Genotyp RR oder Rr einen Phänotyp mit runden Samen. Wenn zwei Allele eines Gens gleich sind (z. B. RR oder rr), werden sie als homozygot (dominant oder rezessiv) bezeichnet. Wenn die beiden Allele unterschiedlich sind (z. B. Rr), sind sie heterozygot. Die Genotypen und Phänotypen der Nachkommen aus der Vermehrung von beispielsweise zwei Erbsenpflanzen mit den Genotypen Rr (heterozygot) und rr (homozygot-rezessiv) können mithilfe eines Punnett-Quadrats verfolgt werden (Abb. 1.4a). Die Nachkommen der ersten Generation haben die Genotypen Rr und rr im Verhältnis 1:1 und die Phänotypen runder Samen bzw. faltiger Samen.

Das Beispiel der runden/faltigen Form von Erbsensamen ist typisch für ein Gen, das ein einzelnes Merkmal kontrolliert. In den meisten Fällen ist die Situation komplexer, da viele Merkmale polygen bestimmt werden. Die Augen-

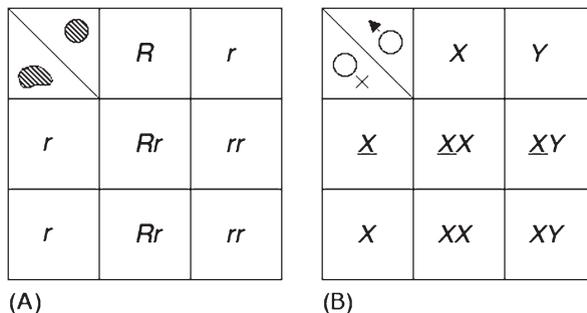


Abb. 1.4 Kreuzung zwischen (a) Rr - und rr -Erbsenpflanzen und (b) Trägerweibchen und normalem Männchen

farbe zum Beispiel wird durch das Vorhandensein mehrerer Gene gesteuert. In einigen Fällen kann ein Gen in mehr als zwei allelischen Formen vorliegen. Die menschliche ABO-Blutgruppe wird von einem Gen mit drei Allelen gesteuert – I^A und I^B sind kodominant und I^0 ist rezessiv. Zusätzliche Variationen werden durch ein Phänomen namens Crossing-over (oder Rekombination) eingeführt, bei dem ein genetisches Segment eines Chromosoms mit dem entsprechenden Segment des homologen Chromosoms während der Meiose (einem Zellteilungsprozess, siehe Abschn. 1.5 und 18.1) ausgetauscht wird.

Eine weitere Komplikation ergibt sich aus geschlechtsgebundenen Merkmalen. Der Mensch hat 23 Chromosomenpaare. Die Chromosomenpaare 1–22 sind homologe Paare und das letzte Paar enthält die Geschlechtschromosomen. Der Mann hat ein XY-Paar und die Frau hat XX-Chromosomen. Die Gene, die das Y-Chromosom trägt, bestimmen die Entwicklung des Mannes; das Fehlen des Y-Chromosoms führt zu einer Frau. Ein geschlechtsgebundenes Gen ist ein Gen, das sich auf einem Geschlechtschromosom befindet. Die meisten bekannten menschlichen geschlechtsgebundenen Gene befinden sich auf dem X-Chromosom und werden daher als X-gebunden bezeichnet. Ein Beispiel für ein geschlechtsgebundenes Merkmal ist Farbenblindheit, die durch ein rezessives Allel auf dem X-Chromosom verursacht wird (Abb. 1.4b). Wenn eine weibliche Trägerin mit einem normalen Mann verheiratet ist, haben die Kinder die folgenden Genotypen und Phänotypen: Söhne $\underline{X}Y$ (farbenblind) und XY (normal), und Töchter: $\underline{X}X$ (normal, Träger) und XX (normal, Nichtträger).

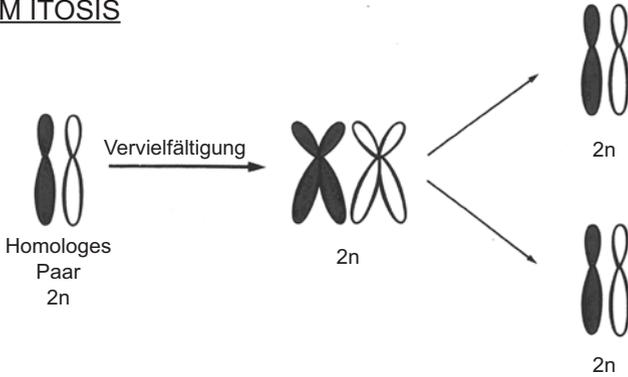
1.5 Mitose und Meiose

Das Vorhandensein homologer Chromosomenpaare ist das Ergebnis der sexuellen Fortpflanzung. Ein Teil jedes Chromosomenpaares wird von jedem Elternteil vererbt. Beim Menschen und anderen höheren Organismen enthalten autosomale Zellen (alle Zellen mit Ausnahme der Keimzellen, Spermien und Eizellen) einen vollständigen Satz homologer Chromosomen, jeweils ein Paar von einem Elternteil. Diese Zellen werden als diploide Zellen ($2n$) bezeichnet. Keimzellen enthalten nur ein homologes Chromosomenpaar und werden als haploid (n) bezeichnet.

Ein grundlegendes Merkmal von Zellen ist ihre Fähigkeit, sich durch Zellteilung zu reproduzieren – ein Verdopplungsprozess, bei dem zwei neue (Tochter-)Zellen aus der Teilung einer bestehenden (Mutter-)Zelle hervorgehen. Bakterienzellen nutzen die Zellteilung als Mittel der ungeschlechtlichen Fortpflanzung und erzeugen Tochterzellen durch binäre Spaltung. Das Chromosom einer Mutterzelle wird dupliziert und geteilt, sodass jede der beiden Tochterzellen das gleiche Chromosom wie die Mutterzelle erhält.

Bei Eukaryoten ist der Prozess nicht so einfach. Es lassen sich zwei Arten der Zellteilung unterscheiden, die Mitose und die Meiose. Bei der Mitose wird jedes Chromosom in Duplikate (sogenannte Chromatiden) kopiert,

MITOSIS



MEIOSIS

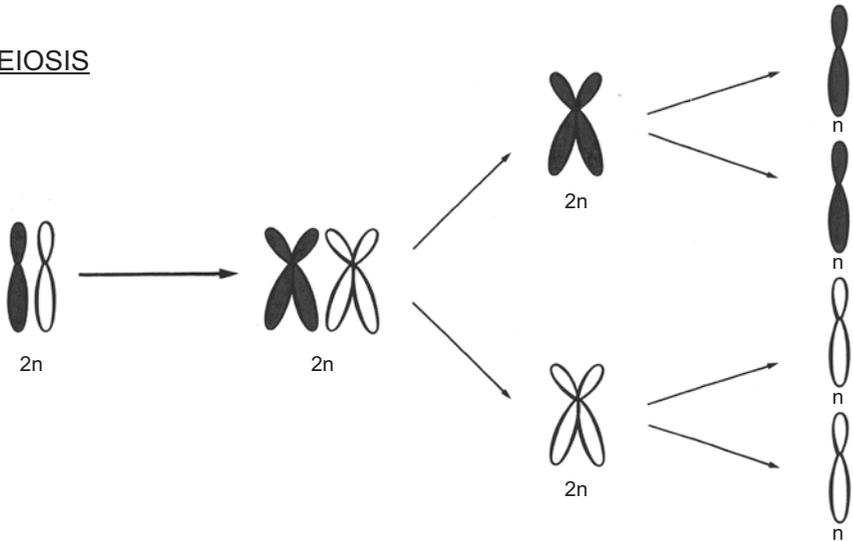


Abb. 1.5 Schematischer Vergleich zwischen Mitose und Meiose

die getrennt und auf zwei Tochterzellen aufgeteilt werden. Somit erhält jede der beiden Tochterzellen eine exakte Kopie der genetischen Information der Mutterzelle (Abb. 1.5). Die Mitose ermöglicht es neuen Zellen, alte Zellen zu ersetzen – ein Prozess, der für Wachstum und Erhaltung unerlässlich ist. Bei der Meiose bleiben die beiden Chromatiden jedes Chromosoms verbunden und die Chromosomenpaare werden stattdessen getrennt, sodass jede Tochterzelle die Hälfte der Chromosomenzahl der Mutterzelle trägt (Abb. 1.5). Man beachte, dass in diesem Stadium jedes Chromosom in den Tochterzellen aus zwei Chromatiden besteht. In einem zweiten Teilungsschritt teilen sich die Chromatiden, sodass vier Tochterzellen entstehen, die jeweils eine haploide Anzahl von Chromosomen enthalten, d. h. nur ein Teil jedes homologen

Chromosomenpaars. Die Meiose ist der Prozess, durch den die Keimzellen entstehen. Nach der Befruchtung einer Eizelle mit einem Spermium verfügt der Embryo über vollständige Paare homologer Chromosomen.

1.6 Zusammenhang zwischen Genen und vererbten Merkmalen

Die vorangegangenen Erörterungen über dominante und rezessive Formen sowie Genotypen und Phänotypen können auf molekularer Ebene interpretiert werden, indem man sie darauf bezieht, wie Gene vererbte Merkmale bestimmen. Vereinfacht ausgedrückt kann ein Gen in einer funktionellen Form vorliegen, sodass es durch Transkription und Translation exprimiert wird und ein Genprodukt (ein bestimmtes Protein) hervorbringt, das seine normale Funktion erfüllt. Ein Gen kann jedoch auch nicht funktionsfähig sein, z. B. durch eine Mutation, die dazu führt, dass entweder kein Genprodukt vorhanden ist oder ein Genprodukt nicht richtig funktioniert. Ein homozygot-dominanter Genotyp wie AA bedeutet daher, dass beide Allele in dem Chromosomenpaar funktionsfähig sind. Bei einem Genotyp Aa ist immer noch eine funktionelle Kopie des Gens vorhanden, die die Synthese des funktionellen Proteins ermöglicht. Ein homozygot rezessives (aa) Individuum produziert das Genprodukt nicht oder ein nicht funktionales Genprodukt. Ein Gen steuert ein vererbtes Merkmal durch seine Ausprägung, indem das Genprodukt das zugehörige vererbte Merkmal bestimmt. Gene mit mehreren Allelen lassen sich durch die unterschiedliche Effizienz der Funktionen der Genprodukte erklären. Eine andere Erklärung ist, dass eine Kopie des Gens eine geringere Menge des Genprodukts produziert als das entsprechende normale (funktionelle) Gen.

Ein Beispiel dafür ist die genetische Störung der Fettleibigkeit bei Mäusen. Obese (ob) ist eine autosomal-rezessive Mutation auf Chromosom 6 des Mausgenoms. Das normale Gen kodiert das Ob-Protein, das in einem Signalweg für die Anpassung des Energiestoffwechsels und der Fettansammlung im Körper fungiert (siehe Abschn. 18.4). Mäuse, die zwei mutierte Kopien (ob/ob) des Gens tragen, entwickeln eine fortschreitende Fettleibigkeit mit erhöhter Stoffwechseleffizienz (d. h. erhöhte Gewichtszunahme pro Kalorienaufnahme). Mäuse mit ob/ob -Genotyp produzieren das Genprodukt (Ob-Protein) nicht, da beide Kopien des ob -Gens nicht funktionsfähig sind.

1.7 Warum Genklonieren?

Das allgemeine Ziel des Klonierens von Genen besteht darin, die Proteinsynthese zu manipulieren. Es gibt mehrere Gründe, warum wir das tun wollen.

1. Herstellung eines Proteins in großen Mengen. Die Produktion von therapeutischen Proteinen in großem Maßstab ist ein Hauptschwerpunkt der Biotechnologie. Viele Proteine mit potenziell therapeutischem Wert kommen in biologischen Systemen oft in winzigen Mengen vor. Es ist wirtschaftlich nicht machbar, diese Proteine aus ihren natürlichen Quellen zu reinigen. Um dies zu umgehen, wird das Gen für ein bestimmtes Protein in ein geeignetes Wirtssystem eingefügt, das das Protein effizient in großen Mengen produzieren kann. Beispiele für Arzneimittel dieser Art sind Humaninsulin, menschliches Wachstumshormon, Interferon, Hepatitis-B-Impfstoff, Gewebefibrinogenaktivator, Interleukin-2 und Erythropoietin. Ein weiterer Bereich von großem Interesse ist die Entwicklung von sogenannten Transpharmern. Das Gen eines pharmazeutischen Proteins wird in Nutztiere kloniert und die daraus resultierenden transgenen Tiere können zum „Melken“ des Proteins gezüchtet werden.
2. Manipulation von biologischen Abläufen. Eines der häufigsten Ziele beim Klonieren von Genen ist die Verbesserung von Nutzpflanzen und Nutztieren. Dazu werden häufig biologische Stoffwechselwege verändert, indem entweder (A) die Produktion eines Enzyms blockiert wird oder (B) die Produktion eines exogenen (fremden) Enzyms durch die Manipulation von Genen eingeführt wird. Viele Anwendungen des Genklonierens in der Landwirtschaft gehören zur ersten Kategorie. Ein bekanntes Beispiel ist die Hemmung des Abbaus von Strukturpolymeren in der Zellwand von Tomatenpflanzen durch Blockierung der Expression des Gens für das am Abbau beteiligte Enzym (mithilfe der Antisense-Technik). Die manipulierten Tomaten, die weniger weich werden, können an der Rebe reifen, sodass sich Farbe und Geschmack voll entfalten können. Ein weiteres Beispiel ist die Steuerung der Reifung durch Blockierung der Expression des Enzyms, das den wichtigsten Schritt bei der Bildung des Reifungshormons Ethylen katalysiert.

Andererseits können neue Funktionen in Pflanzen und Tiere eingebracht werden, indem ein fremdes Gen für die Produktion neuer Proteine eingeführt wird, die vorher nicht in dem System vorhanden waren. Die Entwicklung von schädlingsresistenten Pflanzen wurde durch Klonieren eines bakteriellen Endotoxins erreicht. Weitere Beispiele sind salztolerante und krankheitsresistente Nutzpflanzen. Ähnliche Strategien können bei der Zucht von Nutztieren angewandt werden, die eine eingebaute Resistenz gegen bestimmte Krankheiten aufweisen. Bei Tieren, die mit Wachstumshormon-Genen kloniert wurden, wird die Wachstumsrate gesteigert, die Effizienz der Energieumwandlung erhöht und das Verhältnis von Eiweiß zu Fett verbessert. All dies führt zu niedrigeren Kosten für die Aufzucht von Nutztieren und zu einem niedrigeren Preis für hochwertiges Fleisch.

Eine Reihe von genetisch bedingten Krankheiten des Menschen, wie die schwere kombinierte Immunschwäche (SCID), wird durch das Fehlen eines funktionellen Proteins oder Enzyms verursacht, das auf ein einzelnes defektes