

T. A. Brown

# Gentechnologie für Einsteiger

6. Auflage

aus dem Englischen übersetzt von Sebastian Vogel

11009872

# Inhaltsverzeichnis

---

1	<b>Grundprinzipien der Klonierung und DNA-Analyse</b> .....	1
1	<b>Warum sind Klonierung und DNA-Analyse so wichtig?</b> .....	3
1.1	<b>Frühe Entwicklungen in der Genetik</b> .....	4
1.2	<b>Die Entwicklung der DNA-Klonierung und die Polymerasekettenreaktion</b> .....	4
1.3	<b>Was ist DNA-Klonierung?</b> .....	5
1.4	<b>Was ist PCR?</b> .....	5
1.5	<b>Warum sind DNA-Klonierung und PCR so wichtig?</b> .....	6
1.5.1	Isolierung eines Gens in Reinform durch Klonierung.....	7
1.5.2	Auch mit PCR kann man Gene reinigen.....	8
1.6	<b>Ein Wegweiser durch dieses Buch</b> .....	9
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	10
2	<b>Klonierungsvektoren: Plasmide und Bakteriophagen</b> .....	11
2.1	<b>Plasmide</b> .....	12
2.1.1	Größe und Kopienzahl.....	13
2.1.2	Konjugation und Kompatibilität.....	14
2.1.3	Klassifikation von Plasmiden.....	14
2.1.4	Plasmide in anderen Organismen als Bakterien.....	15
2.2	<b>Bakteriophagen</b> .....	15
2.2.1	Der Phagen-Infektionszyklus.....	15
2.2.2	Lysogene Phagen.....	15
2.2.3	Viren als Klonierungsvektoren für andere Organismen.....	21
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	21
3	<b>Die Reinigung von DNA aus lebenden Zellen</b> .....	23
3.1	<b>Die Präparation der gesamten Zell-DNA</b> .....	24
3.1.1	Zucht und Ernte einer Bakterienkultur.....	24
3.1.2	Die Präparation von Zellextrakten.....	26
3.1.3	Die Reinigung der DNA aus dem Zellextrakt.....	27
3.1.4	Das Anreichern der DNA-Proben.....	28
3.1.5	Die Messung der DNA-Konzentration.....	29
3.1.6	Andere Methoden zur Präparation der gesamten Zell-DNA.....	29
3.2	<b>Die Präparation von Plasmid-DNA</b> .....	30
3.2.1	Trennung aufgrund der Größe.....	31
3.2.2	Trennung aufgrund der Konformation.....	32
3.2.3	Plasmidamplifikation.....	34
3.3	<b>Die Präparation von Bakteriophagen-DNA</b> .....	35
3.3.1	Die Zucht von Kulturen mit hohem $\lambda$ -Titer.....	36
3.3.2	Präparation nichtlysogener $\lambda$ -Phagen.....	37
3.3.3	Die Ernte der Phagen aus einer infizierten Kultur.....	37
3.3.4	Die Reinigung von DNA aus $\lambda$ -Phagenpartikeln.....	38
3.3.5	M13-DNA lässt sich leicht reinigen.....	38
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	39

4	<b>Die Manipulation der gereinigten DNA</b> .....	41
4.1	<b>Das Spektrum der Enzyme zur DNA-Manipulation</b> .....	42
4.1.1	Nucleasen .....	43
4.1.2	Ligasen .....	44
4.1.3	Polymerasen .....	44
4.1.4	DNA-Modifikationsenzyme .....	45
4.2	<b>Enzyme zum Schneiden der DNA: Restriktionsendonucleasen</b> .....	46
4.2.1	Entdeckung und Wirkungsweise der Restriktionsendonucleasen .....	47
4.2.2	Die Restriktionsendonucleasen des Typs II schneiden die DNA an ganz bestimmten Nucleotidsequenzen .....	48
4.2.3	Glatte Enden und klebrige Enden .....	49
4.2.4	Die Zahl der Restriktionserkennungsstellen in einem DNA-Molekül .....	49
4.2.5	Der Ablauf einer Restriktionsspaltung im Labor .....	50
4.2.6	Die Analyse des Ergebnisses einer Restriktionsspaltung .....	52
4.2.7	Größenabschätzung bei DNA-Molekülen .....	53
4.2.8	Die Kartierung der Restriktionsschnittstellen auf einem DNA-Molekül .....	54
4.2.9	Besondere Elektrophoreseverfahren zur Trennung größerer Moleküle .....	56
4.3	<b>Ligation: Das Verbinden von DNA-Molekülen</b> .....	57
4.3.1	Die Wirkungsweise der DNA-Ligase .....	57
4.3.2	Klebrige Enden erhöhen die Effizienz der Ligation .....	57
4.3.3	Das Anfügen klebriger Enden an ein Molekül mit glatten Enden .....	58
4.3.4	Ligation glatter Enden mit einer DNA-Topoisomerase .....	62
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	63
5	<b>Das Einführen von DNA in lebende Zellen</b> .....	65
5.1	<b>Transformation: Die Aufnahme von DNA durch Bakterienzellen</b> .....	67
5.1.1	Nicht alle Bakterienarten nehmen DNA mit der gleichen Effizienz auf .....	67
5.1.2	Die Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	68
5.1.3	Die Selektion transformierter Zellen .....	68
5.2	<b>Die Identifizierung von Rekombinanten</b> .....	69
5.2.1	Selektion von Rekombinanten mit pBR322: Inaktivierung durch Einbau eines Antibiotika-Resistenzgens .....	70
5.2.2	Die Inaktivierung durch Einbau von DNA betrifft nicht immer Antibiotikaresistenzen .....	71
5.3	<b>Das Einführen von Phagen-DNA in Bakterienzellen</b> .....	72
5.3.1	Transfektion .....	72
5.3.2	<i>In vitro</i> -Verpackung .....	72
5.3.3	Die Phageninfektion wird in Form von Plaques auf einem Agarmedium sichtbar .....	74
5.4	<b>Die Identifizierung rekombinierter Phagen</b> .....	75
5.4.1	Inaktivierung eines <i>lacZ'</i> -Gens im Phagenvektor durch die eingebaute DNA .....	75
5.4.2	Inaktivierung des <i>ci</i> -Gens von $\lambda$ .....	75
5.4.3	Selektion mit Hilfe des Phänotyps Spi .....	75
5.4.4	Selektion anhand der Genomgröße von $\lambda$ .....	76
5.5	<b>Einschleusen von DNA in eukaryotische Zellen</b> .....	76
5.5.1	Transformation einzelner Zellen .....	77
5.5.2	Transformation ganzer Organismen .....	78
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	78

6	<b>Klonierungsvektoren für <i>E. coli</i></b> .....	79
6.1	<b>Klonierungsvektoren auf der Grundlage von <i>E. coli</i>-Plasmiden</b> .....	80
6.1.1	Die Nomenklatur von Plasmid-Klonierungsvektoren .....	80
6.1.2	Die nützlichen Eigenschaften von pBR322 .....	81
6.1.3	Der Stammbaum von pBR322 .....	81
6.1.4	Weiterentwickelte <i>E. coli</i> -Plasmid-Klonierungsvektoren .....	82
6.2	<b>Klonierungsvektoren auf der Grundlage des Bakteriophagen M13</b> .....	85
6.2.1	Die Konstruktion eines Phagen-Klonierungsvektors .....	85
6.2.2	Hybridvektoren aus Plasmiden und M13 .....	86
6.3	<b>Klonierungsvektoren auf der Grundlage des Bakteriophagen <math>\lambda</math></b> .....	87
6.3.1	Aus dem $\lambda$ -Genom kann man Stücke entfernen, ohne die Funktionsfähigkeit zu beeinträchtigen .....	88
6.3.2	Durch natürliche Selektion kann man $\lambda$ -Phagen isolieren, denen bestimmte Restriktionsstellen fehlen .....	88
6.3.3	Insertions- und Substitutionsvektoren .....	89
6.3.4	Klonierungsexperimente mit $\lambda$ -Insertions- oder $\lambda$ -Substitutionsvektoren .....	90
6.3.5	Sehr große DNA-Fragmente kann man in Cosmiden klonieren .....	91
6.4	<b>Mit <math>\lambda</math>- und anderen Vektoren mit hoher Kapazität kann man genomische Bibliotheken konstruieren.</b> .....	92
6.5	<b>Vektoren für andere Bakterien</b> .....	93
	<b>Weiterführende Literatur.</b> .....	94
7	<b>Klonierungsvektoren für Eukaryoten</b> .....	95
7.1	<b>Vektoren für Hefe und andere Pilze</b> .....	96
7.1.1	Selektierbare Marker für das 2-Mikron-Plasmid .....	96
7.1.2	Vektoren auf der Grundlage des 2-Mikron-Ringes: Episomale Plasmide der Hefe .....	97
7.1.3	Ein YE <sub>p</sub> kann sich in die chromosomale DNA der Hefe integrieren .....	98
7.1.4	Andere Hefe-Klonierungsvektoren .....	98
7.1.5	Mit künstlichen Chromosomen kann man riesige DNA-Stücke in Hefe klonieren .....	99
7.1.6	Vektoren für weitere Hefearten und andere Pilze .....	101
7.2	<b>Klonierungsvektoren für höhere Pflanzen</b> .....	102
7.2.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> : Der kleinste »natürliche Gentechniker« .....	102
7.2.2	DNA-Klonierung in Pflanzen durch direkte Genübertragung .....	106
7.2.3	Versuche zum Einsatz von Pflanzenviren als Vektoren .....	108
7.3	<b>Klonierungsvektoren für Tiere</b> .....	109
7.3.1	Klonierungsvektoren für Insekten .....	109
7.3.2	Klonierung in Säugetieren .....	110
	<b>Weiterführende Literatur.</b> .....	112
8	<b>Die Gewinnung eines Klons von einem bestimmten Gen</b> .....	115
8.1	<b>Das Problem der Selektion</b> .....	116
8.1.1	Es gibt zwei grundlegende Wege, den gesuchten Klon ausfindig zu machen .....	117
8.2	<b>Direkte Selektion</b> .....	117
8.2.1	<i>Marker rescue</i> erweitert die Anwendungsmöglichkeiten der direkten Selektion .....	118
8.2.2	Anwendungsbereich und Grenzen des <i>marker rescue</i> -Verfahrens .....	118
8.3	<b>Die Suche nach Klonen in einer Genbibliothek</b> .....	119
8.3.1	Genbibliotheken .....	120
8.3.2	Nicht alle Gene werden zur gleichen Zeit exprimiert .....	120

8.3.3	mRNA lässt sich als komplementäre DNA klonieren .....	121
8.4	<b>Methoden zur Identifizierung von Klonen</b> .....	122
8.4.1	Komplementäre Nucleinsäurestränge hybridisieren untereinander.....	122
8.4.2	Kolonie- und Plaquehybridisierung.....	122
8.4.3	Beispiele für den praktischen Einsatz der Nucleinsäurehybridisierung .....	124
8.4.4	Methoden zur Identifizierung eines klonierten Gens durch den Nachweis seines Genprodukts .....	130
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	131
9	<b>Die Polymerasekettenreaktion (PCR)</b> .....	133
9.1	<b>Die Polymerasekettenreaktion im Überblick</b> .....	134
9.2	<b>Die PCR: einige Einzelheiten</b> .....	136
9.2.1	Die Konstruktion der Oligonucleotidprimer für die PCR.....	136
9.2.2	Die richtige Reaktionstemperatur .....	137
9.3	<b>Nach der PCR: Die Analyse der Produkte</b> .....	138
9.3.1	Gelelektrophorese der PCR-Produkte .....	139
9.3.2	Klonierung von PCR-Produkten .....	140
9.3.3	Probleme mit der Fehlerhäufigkeit der <i>Taq</i> -Polymerase.....	141
9.4	<b>Mit der Realtime-PCR kann man die Menge des Ausgangsmaterials quantitativ erfassen</b> .....	142
9.4.1	Der Ablauf eines Experiments mit quantitativer PCR.....	143
9.4.2	Mit Realtime-PCR kann man auch RNA quantitativ erfassen.....	144
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	145
II	<b>Die Anwendung von Klonierung und DNA-Analyse in der Forschung</b> .....	147
10	<b>Die Sequenzierung von Genen und Genomen</b> .....	149
10.1	<b>Methoden zur DNA-Sequenzierung</b> .....	150
10.1.1	DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren .....	150
10.1.2	Pyrosequenzierung.....	154
10.2	<b>Die Sequenzierung eines Genoms</b> .....	156
10.2.1	Das Schrotschussverfahren zur Genomsequenzierung.....	157
10.2.2	Das Klon-Contig-Verfahren.....	160
10.2.3	Karten als Hilfsmittel zum Sequenzaufbau .....	162
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	165
11	<b>Die Untersuchung der Genexpression und Genfunktion</b> .....	167
11.1	<b>Die Analyse der Transkripte von Genen</b> .....	168
11.1.1	Nachweis eines Transkripts und Aufklärung seiner Nucleotidsequenz .....	169
11.1.2	Transkriptkartierung durch Hybridisierung zwischen Gen und RNA .....	170
11.1.3	Transkriptanalyse durch Primerverlängerung .....	171
11.1.4	Transkriptanalyse mit PCR .....	171
11.2	<b>Die Untersuchung der Expressionsregulation von Genen</b> .....	172
11.2.1	Der Nachweis von Proteinbindungsstellen an einem DNA-Molekül .....	174
11.2.2	Der Nachweis von Regulatorsequenzen durch Deletionsanalyse .....	177
11.3	<b>Nachweis und Untersuchung des Translationsprodukts eines klonierten Gens</b> .....	179

11.3.1	Mit HRT und HART kann man das Translationsprodukt eines klonierten Gens nachweisen. ....	179
11.3.2	Analyse der Proteine durch <i>in vitro</i> -Mutagenese. ....	181
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	185
12	<b>Genomanalyse</b> .....	187
12.1	<b>Annotation von Genomen</b> .....	188
12.1.1	Identifizierung von Genen in einer Genomsequenz. ....	188
12.1.2	Aufklärung der Funktion eines unbekanntes Gens .....	192
12.2	<b>Analyse von Transkriptom und Proteom</b> .....	194
12.2.1	Transkriptomanalyse .....	194
12.2.2	Untersuchungen am Proteom .....	197
12.2.3	Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen .....	199
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	201
III	<b>Anwendungen der Klonierung und DNA-Analyse in der Biotechnologie</b> .....	203
13	<b>Die Proteinproduktion mit klonierten Genen</b> .....	205
13.1	<b>Spezielle Vektoren für die Expression fremder Gene in <i>E. coli</i></b> .....	207
13.1.1	Der Promotor ist der entscheidende Bestandteil eines Expressionsvektors .....	208
13.1.2	Kassetten und Fusionsgene .....	211
13.2	<b>Allgemeine Probleme mit der gentechnischen Proteinproduktion in <i>E. coli</i></b> .....	212
13.2.1	Probleme durch die Sequenz des Fremdgens .....	212
13.2.2	Probleme durch <i>E. coli</i> .....	214
13.3	<b>Gentechnische Proteinproduktion mit Eukaryotenzellen</b> .....	215
13.3.1	Gentechnische Proteinherstellung mit Hefe und Fadenpilzen .....	215
13.3.2	Gentechnische Proteinproduktion mit Tierzellen .....	217
13.3.3	Pharming: rekombinante Proteine aus lebenden Tieren und Pflanzen .....	218
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	220
14	<b>Klonierung und DNA-Analyse in der Medizin</b> .....	223
14.1	<b>Gentechnische Arzneimittelproduktion</b> .....	224
14.1.1	Gentechnisch hergestelltes Insulin .....	224
14.1.2	Synthese menschlicher Wachstumshormone in <i>E. coli</i> .....	226
14.1.3	Gentechnisch hergestellter Faktor VIII .....	227
14.1.4	Gentechnische Herstellung anderer menschlicher Proteine .....	228
14.1.5	Gentechnisch hergestellte Impfstoffe .....	229
14.2	<b>Identifizierung krankheitserzeugender Gene beim Menschen</b> .....	232
14.2.1	Die Identifizierung eines krankheitserzeugenden Gens .....	234
14.3	<b>Gentherapie</b> .....	236
14.3.1	Gentherapie genetisch bedingter Krankheiten .....	236
14.3.2	Gentherapie und Krebs .....	237
14.3.3	Ethische Aspekte der Gentherapie .....	238
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	239

15	<b>Klonierung und DNA-Analyse in der Landwirtschaft</b> .....	241
15.1	<b>Das Hinzufügen von Genen bei Pflanzen</b> .....	242
15.1.1	Pflanzen, die eigene Insektizide produzieren .....	242
15.1.2	Herbizidresistente Nutzpflanzen .....	248
15.1.3	Andere Projekte, bei denen Gene hinzugefügt wurden .....	250
15.2	<b>Inaktivierung von Genen</b> .....	250
15.2.1	Antisense-RNA und die gentechnische Veränderung der Reifung von Tomaten .....	250
15.2.2	Weitere Beispiele für den Einsatz der Antisense-RNA in der Pflanzengentechnik .....	253
15.3	<b>Probleme mit gentechnisch veränderten Pflanzen</b> .....	253
15.3.1	Sicherheitsüberlegungen im Zusammenhang mit selektierbaren Markern .....	254
15.3.2	Das Terminatorverfahren .....	255
15.3.3	Die Frage nach schädlichen Auswirkungen auf die Umwelt .....	256
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	257
16	<b>Klonierung und DNA-Analyse in Kriminalistik, Gerichtsmedizin und Archäologie</b> .....	259
16.1	<b>DNA-Analyse zur Identifizierung Tatverdächtiger</b> .....	260
16.1.1	Herstellung genetischer Fingerabdrücke durch Hybridisierung .....	260
16.1.2	DNA-Typisierung durch PCR kurzer Tandemwiederholungen .....	261
16.2	<b>Verwandtschaftsnachweis durch DNA-Typisierung</b> .....	262
16.2.1	Verwandte haben ähnliche DNA-Profile .....	262
16.2.2	DNA-Typisierung und die sterblichen Überreste der Romanows .....	263
16.3	<b>Geschlechtsbestimmung durch DNA-Analyse</b> .....	265
16.3.1	PCR spezifischer Sequenzen aus dem Y-Chromosom .....	266
16.3.2	PCR des Amelogenin-Gens .....	266
16.4	<b>Archäogenetik: DNA-Analysen bei der Erforschung der menschlichen Vorgeschichte</b> .....	267
16.4.1	Die Entstehung der Jetztmenschen .....	267
16.4.2	Anhand der DNA kann man auch prähistorische Wanderungsbewegungen nachzeichnen .....	270
	<b>Weiterführende Literatur</b> .....	272
	<b>Glossar</b> .....	275
	<b>Stichwortverzeichnis</b> .....	289