

FOCUS

Einblick in die Gentechnik

Christoph HALLER

ZUSAMMENFASSUNG

Seit ihrer Begründung in den frühen 70er Jahren erlebte die Gentechnik eine stürmische Entwicklung und gewinnt in vielen Bereichen der Wissenschaft und Wirtschaft zunehmend an Bedeutung. Die Voraussetzung für einen Einblick in die Gentechnik bildet die grundlegende Kenntnis des zentralen Begriffs in der Genetik – der genetischen Information (DNA). Das Wissen um die Struktur und die Funktion der DNA sowie der prinzipiellen Mechanismen in der Genetik ermöglicht die Anwendung dieser Prinzipien in der wichtigsten Methode der Gentechnik – der DNA-Klonierung. Diese Arbeitstechnik begründete neue weitreichende Fortschritte in der biologischen Grundlagenforschung, wohingegen die Anwendung in der Biotechnologie noch in ihren Anfängen steckt. Nur die Ideen der Wissenschaftler lassen erahnen, wie beinahe grenzenlos die Möglichkeiten der Gentechnik sind; aber gerade diese Grenzenlosigkeit wirft für uns heute große, vor allem ethische Probleme auf.

Stichwörter: DNA, Genexpression, Genregulation, Genübertragung, DNA-Klonierung, Anwendung der Gentechnik in der Medizin

ABSTRACT

Since the beginning of Gene Engineering in the early 1970s it has gone through a rather stormy development and has gained great importance in many fields of science and business. The prerequisite for an insight into Gene Engineering is the basic understanding of its central functional idea – Genetic Information (DNA). The knowledge of the structure and the function of DNA as well as the principal mechanisms of Gene Engineering makes the use of these principals possible in the most important method of gene technology DNA-Cloning. This cloning technique caused new wide reaching progress in fundamental biological research although its use in Bio-technology is still in the process of development. The many ideas of the scientists alone let us imagine the almost boundless possibilities that Gene Engineering presents. It is exactly this boundlessness which brings up so many great problems for us today; especially those of ethical nature.

keywords: DNA, gene expression, gene regulation, gene transfer, DNA-kloning, use of gene engineering in medicin

ALLE Organismen haben Eigenschaften, die von Generation zu Generation weitergegeben werden: Jede Sonnenblume zum Beispiel hat den für ihre Art charakteristischen Blütenstand aus vielen Einzelblüten, eine relativ hohe Wachstumsgeschwindigkeit des Sprosses, eine bestimmte Anordnung und Form der Blätter, die Fähigkeit zur Photosynthese und viele Eigenschaften in der Struktur und Funktion der Zelle, die nicht nur für Sonnenblumen, sondern für alle grünen Pflanzen oder alle höheren Organismen charakteristisch sind.

Zur Ausbildung all dieser vererbten Eigenschaften werden, von einer Generation zur nächsten, Informationen weitergegeben, die in einer einzigen Ei- oder Spermienzelle lokalisiert sein müssen. Wie diese Informationen beschaffen sind, wie sie vervielfältigt und weitergegeben werden und wie sie Eigenschaften bestimmen, wird von einem Teilgebiet der Biologie, der **Genetik**, analysiert und ein zentraler Begriff in der Genetik ist daher der der *genetischen Information*.

Das Verständnis der Mechanismen in der Genetik bildet die Voraussetzung für das Begreifen der Prinzipien der Gentechnik. Daher sind die beiden ersten Kapitel überblicksmäßig einer Einführung in die Genetik gewidmet, wobei sich diese auf eine kurze Erklärung der wichtigsten Begriffe und Konzepte beschränkt.

1. Der Begriff der genetischen Information, deren stoffliche Grundlage in den Nukleinsäuren sowie deren Konformation in der Zelle.
 2. Die Voraussetzung für die Umsetzung dieser genetischen Information in charakteristische Merkmale für die Zelle sowie die Umsetzung oder Genexpression selbst. Stichworte: Replikation, Transkription, Translation, Genregulation...
- Die weiteren Kapitel beschäftigen sich dann mit dem noch jungen Arbeitsgebiet der Gentechnik, in das im Rahmen dieses Artikels ein Einblick gegeben werden soll.
3. Die theoretischen Vorbedingungen der Gen- oder DNA-Rekombinationstechnik und die Be-

sprechung einer wichtigen Arbeitsmethode dieser Technik, die DNA-Klonierung.

4. Derzeitige Anwendungsgebiete der Gentechnik in Forschung und Biotechnologie mit einem kurzen Ausblick in die Zukunft.

Weiters befindet sich im Anhang ein Glossar der wichtigsten Begriffe in alphabetischer Reihenfolge.

1. Die genetische Information

Ein wichtiger Schritt hin zur Entdeckung der chemischen Grundlage des Trägers der genetischen Information waren Beobachtungen von F. GRIFFITH im Jahre 1928, die er an pathogenen und nicht-pathogenen Stämmen des Bakteriums *Diplococcus pneumoniae*, dem Erreger der Lungenentzündung, gemacht hatte.

Die beiden Stämme unterscheiden sich darin, daß die Zellen des *pathogenen* Stammes eine *schützende Polysaccharidkapsel* besitzen und dadurch vor dem Abbau durch körpereigene Enzyme des Wirtes geschützt sind. Daher sind sie im Gegensatz zum nicht-pathogenen Stamm, dem dieser Schutz fehlt, infektiös und verursachen bei Injektion in Mäusen den Tod durch Blutvergiftung.

Wenn man nun pathogene Bakterien durch Kochen abtötet und sie gemeinsam mit lebenden Bakterien des harmlosen, nicht-pathogenen Stammes in Mäuse injiziert, dann sterben einige der Tiere an Blutvergiftung, obwohl keine der beiden Komponenten allein bei Mäusen zum Tod führen kann. Aus dem Blut der toten Tiere kann man dann Bakterien mit den Eigenschaften des pathogenen Stammes isolieren.

Es mußten also, so schloß GRIFFITH, die lebenden Bakterien des harmlosen Stammes Moleküle der abgetöteten pathogenen Bakterien aufgenommen haben, die gleichzeitig die genetische Information zur Ausbildung der schützenden Polysaccharidhülle beinhalten. Der Vorgang der Übertragung von genetischer Information wird heute allgemein als **Transformation** bezeichnet.

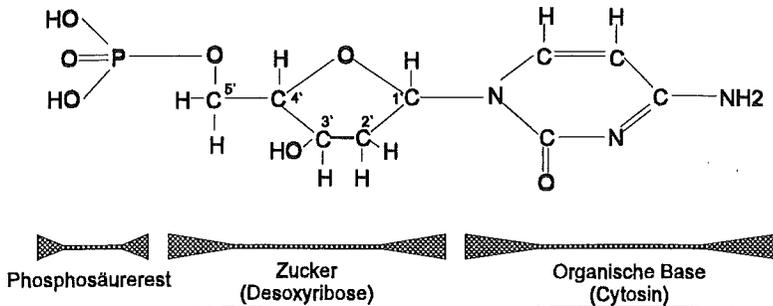


Abb.1: Chemische Struktur eines Nucleotids

Erst im Jahr 1944 gelang es O. T. AVERY et al. dieses Phänomen durch systematische Versuche mit verschiedenen isolierten Zellbestandteilen zu klären und die **Desoxyribonukleinsäure** (internationale Abkürzung **DNA** für **Desoxyribonucleidacid**) als Überträgermoleküle im Transformationsversuch zu identifizieren.

Dieses und viele andere Ergebnisse verschiedenster Untersuchungen haben uns heute zur Erkenntnis geführt, daß die *DNA allgemein als Träger der genetischen Information* gelten kann.

Ausnahmen bilden nur einige wenige Viren (sogenannte Retroviren), die RNA als Erbsubstanz enthalten.

1.1 Das genetische Material

Die stoffliche Grundlage der genetischen Information aller Zellen sind die **Nukleinsäuren**. Man unterscheidet die Desoxyribonukleinsäure (**DNA**) und die Ribonukleinsäure (**RNA**).

Die biologische Bedeutung der Nukleinsäuren liegt vor allem in der Fähigkeit, die genetische Information zu speichern und zu vervielfältigen (vorwiegend durch DNA) sowie die Übertragung der Information von der DNA zu den Orten der Proteinsynthese (durch verschiedene Typen von RNA).

Die Nukleinsäuren sind lineare Ketten, die durch ein Aufeinanderreihen von gleichartig zusammengesetzten Bauelementen, den (**Mono**)**Nukleotiden**, entstehen. Diese Nukleotide sind polymere Makromoleküle,

das bedeutet, daß sie aus verschiedenen Molekülkomponenten zusammengesetzt sind:

- * einer organischen *Base* - *A*(denin), *G*(uanin), *T*(hymin) oder *C*(ytosin)
- * einem ringförmigen Zuckermolekül aus 5 Kohlenstoff(=C)-Atomen, der *Pentose* (Desoxyribose in der DNA oder Ribose in der RNA)
- * einem *Phosphor*(=P)*säurerest*

Hauptbestandteile der DNA sind vier verschiedene Nucleotide, die sich durch ihre Stickstoffbasen unterscheiden. Diese Basen lassen sich von zwei ringförmigen Molekülen mit einem Gerüst aus Kohlenstoff und Stickstoff(=N) (Beispiel für eine Base in Abb.1), dem Purin, wie **A** und **G**, und dem Pyrimidin, wie **T** und **C**, ableiten.

Dementsprechend ist die *RNA* aus vier Nucleotiden zusammengesetzt, welche denen der DNA entsprechen, nur findet man anstelle des Thymins in der RNA das Pyrimidinderivat *U(racil)*, das in seinen chemischen und physikalischen Eigenschaften dem Thymin ähnlich ist.

Die Verknüpfung der einzelnen Nucleotide im linearen **Polynucleotidstrang** erfolgt, wie in Abb.2 schematisch gezeigt, zwischen der Phosphatgruppe in der 5' -Position des einen Nucleotids und der Hydroxyl(=OH)-Gruppe am 3' C-Atom (siehe auch Abb.1) des zweiten Nucleotids.

Durch diesen Bau der Nucleotide und durch ihre Verknüpfung weist die entstandene Polynucleotidkette, deren Rückgrat aus einer alternierenden Folge von Phosphorsäureresten und Zuckermolekülen besteht, während die

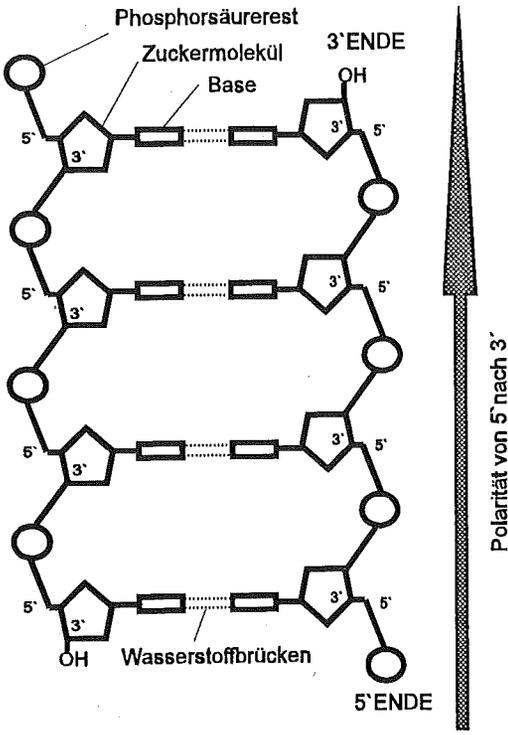


Abb.2: Struktur eines Polynukleotidstranges und komplementäre Anordnung in einer DNA-Doppelhelix

organischen Basen die genetisch informativen, variierenden Elemente darstellen, eine 5'-3'-Polarität (vom 5'Ende zum 3'Ende) auf.

1.2 Konfrontation der genetischen Information in der Zelle

Die Zellen sind die Bausteine allen Lebens und stellen deren kleinste Einheit dar. Im allgemeinen sind Zellen sehr klein und mit weit weniger als einem Millimeter Durchmesser für das bloße Auge unsichtbar.

Jede Zelle besteht aus dem **Kernmaterial**, das in einem Zellkern organisiert sein kann, und dem **Zytoplasma**, einer nicht-homogenen, proteinhaltigen Substanz, in der die Zellbestandteile, auch das Kernmaterial, eingelagert sind. Das Zytoplasma ist nach außen durch

eine **Zellmembran** abgeschlossen und wird als **Protoplast** bezeichnet. Dieser Protoplast kann zusätzlich von einer **Zellwand**, die vorwiegend eine mechanische Funktion erfüllt, umhüllt sein, was bei den Pflanzenzellen, aber auch bei den meisten Bakterienzellen der Fall ist.

Das Kernmaterial (= das genetische Material), die Nukleinsäuren, haben eine höchst regelmäßige Gestalt. Die lineare Abfolge der einzelnen Nukleotide in der Polynukleotidkette der DNA und der RNA, die **Nukleotidsequenz**, wird als **Primärstruktur** bezeichnet.

Die DNA aber liegt, mit wenigen Ausnahmen, in ihrer natürlichen Form als **doppelsträngiges Molekül** vor. Zwei lange Polynukleotidketten winden sich wendeltreppenförmig in Form einer Doppelschraube umeinander und bilden die sogenannte **Doppelhelix** (Modell nach Watson und Crick, 1953). Die beiden Ketten sind durch Wasserstoffbrücken zwischen den Basen miteinander verbunden (siehe Abb. 2). Diese Bindung, die **Basenpaarung**, ist sehr spezifisch und das wichtigste Postulat des Modells der Doppelhelix. Denn nur zwei entsprechende Basenpaare, nämlich **A-T** und **G-C** können stabile Bindungen über Wasserstoffbrücken eingehen. Wegen dieser spezifischen Basenpaarung liegt mit der Nukleotidsequenz der einen Kette zugleich die der Partnerkette fest. Man bezeichnet die beiden sich ergänzenden Nukleotidstränge als einander **komplementär**. Diese regelmäßige Anordnung der DNA in der Doppelhelix nennt man **Sekundärstruktur**.

Die RNA besteht in der Regel aus nur einer Polynukleotidkette und diese hat keine einheitliche Sekundärstruktur. Sie ist stark abhängig von der Funktion der RNA in der Zelle.

Im einfachsten Fall, bei niederen, einzelligen Organismen wie **Prokaryoten** (Bakterien) und Viren, besteht die gesamte genetische Information (= das **Genom**) aus einer einzigen linearen, „nackten“, das heißt ohne Proteine besetzten DNA-Doppelhelix, die oft zu einem Ring geschlossen ist.

Obwohl Prokaryoten im Gegensatz zu den höheren, vielzelligen Organismen, keinen echten Zellkern besitzen, so ist ihre DNA doch auf einen bestimmten Bereich der Zelle, der Nukleoid-Region, konzentriert.

Das Darmbakterium *Escherichia Coli* zum Beispiel besitzt eine solche ringförmige DNA aus circa 4 Millionen Basenpaaren, was einem Umfang von etwa 1,4 Millimetern entspricht. Damit ein so langes, dimeres (doppelsträngiges) Polynukleotidmolekül in einem nur 0,001 Millimeter großen Bakterium untergebracht werden kann, muß der Ordnungszustand der DNA in der Zelle extrem hoch sein.

Für die Ausbildung der Eigenschaften von höheren Organismen, den *Eukaryoten*, ist eine noch größere Menge an genetischer Information notwendig. Die Hauptmenge der DNA, die im Gegensatz zu den Prokaryoten nicht „nackt“ ist, sondern aus einem Komplex mit Proteinen besteht, liegt auf einer Anzahl von Untereinheiten im Zellkern. Diese Untereinheiten bilden die stoffliche Manifestation des extrem hohen Ordnungszustandes der DNA und werden als **Chromosomen** bezeichnet. In dieser strukturellen Untereinheit ist die DNA nochmals ineinander aufgewunden und gefaltet.

Auf dem Chromosom liegen funktionelle Einheiten, die **Gene**, jene Abschnitte der DNA, die die Information für die bestimmten Eigenschaften bzw. Merkmale der Zelle beinhalten, oder, anders ausgedrückt, jene Abschnitte, die bestimmte Eigenschaften bzw. Merkmale der Zelle **codieren**.

Beim *E.Coli*-Bakterium sind es ungefähr 3.000 Gene, die hintereinander über sein Ringchromosom angeordnet sind.

Bei den Eukaryoten ist es komplizierter. Man erkannte, daß auf der DNA höherer Organismen die informationshaltigen Abschnitte der Gene von DNA-Abschnitten ohne Information unterbrochen werden. Diese informationslosen oder nichtcodierenden Abschnitte werden als intervenierende Sequenzen oder **Introns** bezeichnet, im Gegensatz zu den codierenden Genabschnitten, den **Exons**.

Diese Tatsache erklärt auch, warum die Anzahl der Gene in Eukaryotenzellen gegenüber einem Bakterium nicht in demselben Faktor anwächst wie die DNA-Menge selbst. Während die DNA-Menge jeder Zelle des Menschen etwa das 1000fache der eines *E.Coli*-Bakteriums beträgt, rechnet man beim Menschen mit „nur“ 100.000 Genen (etwa das 30fache einer *E. Coli*-Zelle), wobei viele auch mehrmals im Genom vorkommen können.

2. Die Verwirklichung der genetischen Information

Das Modell der DNA-Doppelhelixstruktur brachte die Gewißheit, daß das genetische Programm durch die Nukleotidsequenz in einer der beiden Ketten der DNA bestimmt ist. Diese Information wird von Zelle zu Zelle, von Generation zu Generation weitergegeben. Damit bei der Vererbung alle charakteristischen Eigenschaften erhalten bleiben, muß es zuerst zu einer exakten, originalgetreuen Verdopplung der DNA, der *Replikation*, kommen.

Die genetische Information der DNA wird dann ganz oder nur teilweise in den einzelnen Zellen in Form von bestimmten Eigenschaften und Merkmalen verwirklicht. Diese Verwirklichung der Gene in charakteristische Merkmale, die *Genexpression*, basiert auf dem **Prozeß der Proteinbiosynthese**, in dem Proteine, die für die Ausprägung der Merkmale verantwortlich sind, synthetisiert werden. In diesen Prozeß, der in zwei Teilschritten abläuft, ist die andere Art der Nukleinsäure, die RNA, eingeschaltet.

1. Die Herstellung von RNA-Arbeitskopien der DNA, die *Transkription*, wobei der Begriff der Transkription selbst schon auf die Erhaltung der richtigen Nukleotidsequenz hinweist.
2. Die Entschlüsselung der genetischen Information, bei der die Nukleotidsequenz der RNA-Arbeitskopie mittels des genetischen Codes in eine Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt wird. Diesen Vorgang bezeichnet

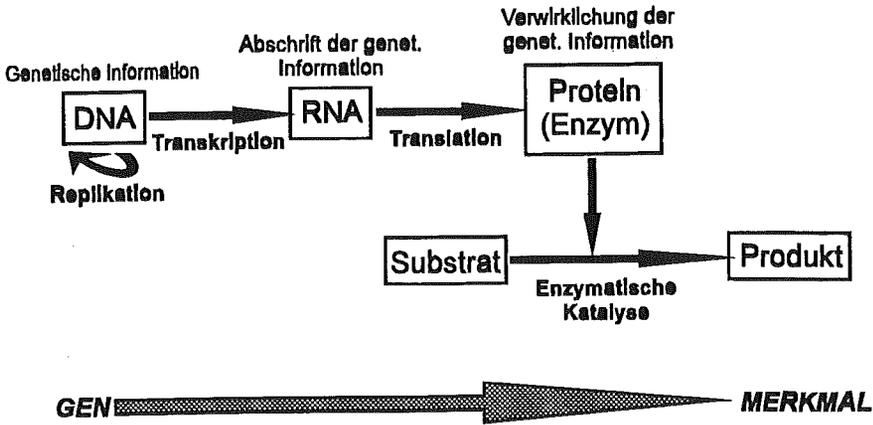


Abb.3: Zentrales Dogma der Genetik (Informationsfluß vom Gen zum Merkmal)

man als *Translation*, welche die eigentliche Proteinsynthese darstellt.

2.1 Die Replikation

Bei jeder Zellteilung erhalten die Tochterzellen eine vollständige Ausstattung an genetischem Material. Damit die genetische Information auch über Generationen hinweg erhalten bleibt, muß es zuvor in der Mutterzelle zu einer Verdopplung der DNA kommen. Die Fähigkeit der DNA zur Selbstverdopplung gründet sich auf die komplementäre Struktur. Die beiden Stränge der elterlichen Doppelhelix entwinden sich und dienen – gemäß den Basenpaarregeln, daß sich nur A mit T und G mit C paaren kann – als *Matrize* für die Synthese neuer Tochterstränge. Dieser Vorgang wird durch mehrere Enzyme katalysiert und wird als **Replikation** bezeichnet.

Bei Eukaryoten gibt es einen in sehr genaue Phasen eingeteilten Zellzyklus (= Zeitraum zwischen zwei Zellteilungen), wobei eine Phase der DNA-Synthese und Replikation vorbehalten ist.

In Prokaryoten ist der Prozeß der DNA-Replikation sehr schwer einzugrenzen. Bakterien beispielsweise scheinen im flüssigen Nährmedium während des gesamten Zellzyklus DNA zu synthetisieren; neueste Erkenntnisse weisen aber ebenfalls auf einen phasigen, allerdings sehr viel flexibleren Zellzyklus hin.

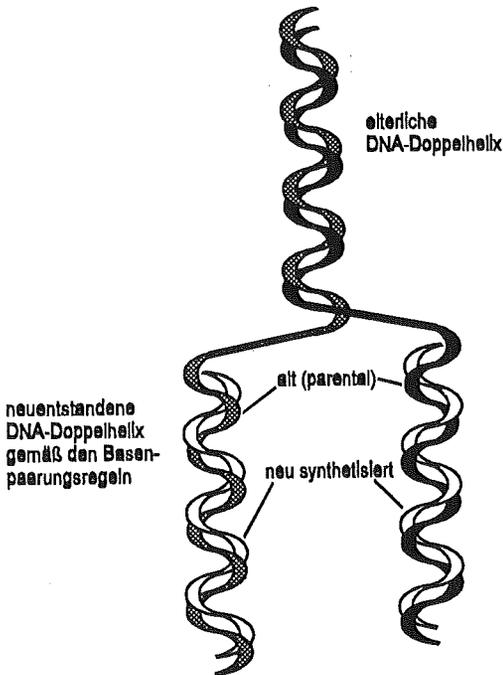


Abb.4: DNA-Replikation

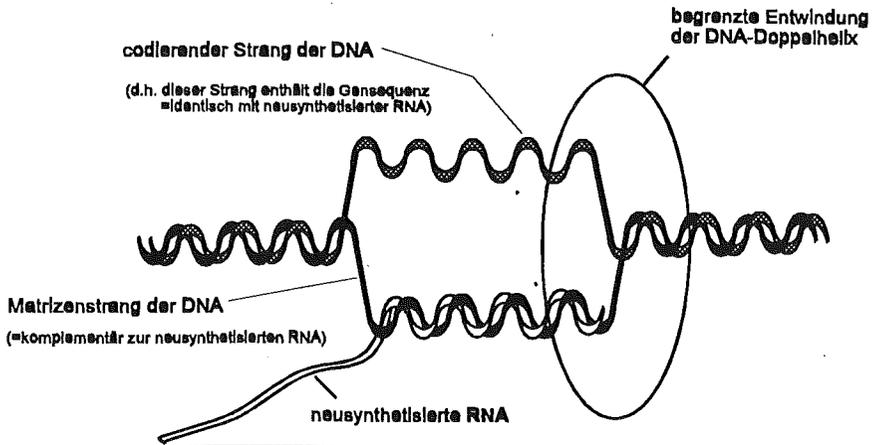


Abb.5: Transkription

Der Vorgang der Replikation muß verständlicherweise sehr exakt ablaufen. Darum besitzt jede Zelle Mechanismen, die es ihr erlauben, Fehler in der Basenpaarung, die während der Synthese passieren, zu reparieren. Diese **Reparaturmechanismen** beinhalten eine ganze Reihe von Enzymen, die die falsch gepaarten Basen erkennen. Eine solche Stelle wird dadurch repariert, daß ein Teil der bereits gebildeten Polynukleotidkette wieder in ihre Bestandteile zerlegt und an der vorgegebenen Stelle eine korrekte Basenpaarung durchgeführt wird. Aufgrund dieser Reparatursysteme ist es sehr selten, daß eine falsche Basenpaarung bei der DNA-Replikation erhalten bleibt. Sollte dies doch der Fall sein, so spricht man von einem genetischen Fehler oder einer **Mutation**. Die Folgen eines solchen Irrtums sind zweifach: erstens wird der Fehler an alle zukünftigen Generationen weitergegeben und zweitens kann er wichtige Auswirkungen auf die Zelle haben, je nachdem, wo die Mutation erfolgt ist.

2.2 Die Transkription

Mit der Transkription beginnt die Umsetzung, die Expression der genetischen Information.

Die DNA selbst kann nicht als Matrize dienen, an der die Aminosäuren zu Proteinen aneinan-

dergereiht werden. Denn einerseits ist die DNA viel zu kostbar, um direkt am Prozeß der Proteinbiosynthese beteiligt zu sein, da schon eine winzige Beschädigung genügt, und ein Fehler würde an alle nachfolgenden Zellgenerationen weitergegeben werden. Andererseits ist die DNA bei höheren Organismen fast ausschließlich im Zellkern lokalisiert, während die zelluläre Synthese der Proteine meist im Zytoplasma stattfindet.

Deshalb wird die *genetische Information* der DNA zuerst *auf ein zwischengeschaltetes Molekül übertragen (transkribiert)*, das dann ins Zytoplasma zu den Orten der Proteinbiosynthese wandert. Dieses intermediäre Molekül ist ein RNA-Polynukleotid, das als „**Boten oder messenger**“-RNA (**m-RNA**) bezeichnet wird. Die m-RNA stellt die komplementäre Abschrift des Matrizen-DNA-Stranges dar, was bedeutet, daß sie mit der Gensequenz des codierenden DNA-Stranges identisch ist. Ihre Synthese verläuft, durch ein Enzym katalysiert, ähnlich der der DNA-Replikation, wobei sich allerdings anstelle von T die Base U(racil) mit A paart.

Während bei den Prokaryoten die entstandene m-RNA durch das Fehlen eines Zellkerns sofort für den Prozeß der Proteinsynthese herangezogen werden kann, muß sie bei den Eukaryoten zuerst durch die Zellkernmembran geschleust werden.

Bei der Transkription der eukaryotischen Gene im Zellkern wird von der DNA eine m-RNA Kopie gemacht, die die Gene samt allen Introns enthält. Auf dem Weg ins Zytoplasma zu den Ribosomen, den Orten der Proteinsynthese, wird diese m-RNA gespleißt. **Spleißen** ist der Vorgang, bei dem alle Introns entfernt werden und nur die Exons zu einem funktionstüchtigen Gen zusammengeschlossen werden.

2.3 Die Translation

Als Translation bezeichnet man die Übersetzung der Nukleotidsequenz der m-RNA in die Aminosäuresequenz der Proteine. Der Schlüssel für die Übersetzung der Erbinformation ist der Genetische Code.

2.3.1 Der Genetische Code

Der Genetische Code stellt die gesetzmäßige Beziehung zwischen der Reihenfolge der Nukleotide in der m-RNA und der der Aminosäuren in einem Protein dar. Er erklärt das Prinzip der Verschlüsselung und die Art der Umsetzung der genetischen Information.

Aufgrund genetischer Experimente lag die Vermutung nahe, daß die codierende Einheit

für eine Aminosäure mindestens aus einer Dreiergruppe aufeinanderfolgender Nukleotide der DNA, sie werden als **Triplet** oder **Codon** bezeichnet, besteht. Denn ein Code aus nur einem oder auch zwei Nukleotiden würde nicht ausreichen, um die zwanzig in den Proteinen vorkommenden Aminosäuren zu codieren. Ein Dreiercode aus den vier verschiedenen Nukleotiden A, T, C, G hingegen ermöglicht $4 \times 4 \times 4 = 64$ Codewörter, genug Kombinationen zur Codierung von zwanzig Aminosäuren.

Dieser Code wird als *degeneriert* bezeichnet, weil manche Aminosäuren durch mehrere der 64 möglichen Codons festgelegt sind. Aber, und das ist entscheidend, es gibt kein Codon, das mehr als eine Aminosäure festlegt.

In der genetischen Information ist durch den Tripletcode und durch die Festlegung der Leserichtung vom 5' zum 3'-Ende sowohl die Art der jeweiligen Aminosäure als auch die genaue Reihenfolge der Aminosäuresequenz im Protein definiert.

2.3.2 Die Proteine und ihre Bausteine

Die Grundbausteine der Proteine oder Polypeptide sind **Aminosäuren**. Es gibt 20 natürliche Aminosäuren, die mit Ausnahme von

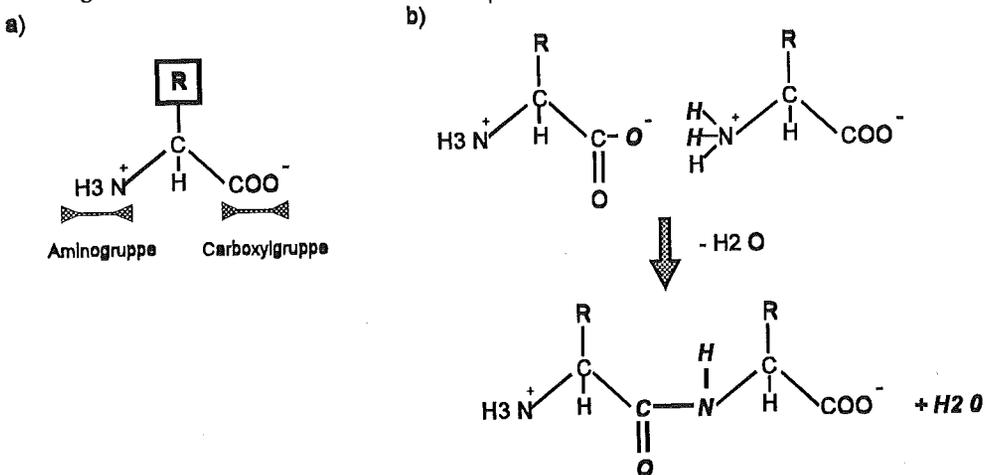


Abb.6: a) Grundstruktur einer Aminosäure

b) Peptidbindung

Prolin alle dieselbe Grundstruktur aufweisen (siehe Abb. 6 a), bestehend aus einem zentralen Kohlenstoffatom, an welches eine Amino(=NH₃)gruppe, eine Carboxyl(=COO)gruppe und ein Wasserstoff(=H)atom gebunden sind. Der andere Teil der Aminosäure wird mit R für Rest bezeichnet. Dieser Rest ist bei allen Aminosäuren der variierende Teil, der die Aminosäuren voneinander unterscheidet.

Er verleiht der Aminosäure ihre chemischen Eigenschaften, und die Sequenz der Aminosäuren verleiht dem Protein letztendlich seine enzymatischen, also stoffwechselaktiven Merkmale. Die Aminosäuren sind miteinander über **Peptidbindungen** zu einer Polypeptidkette verbunden (siehe Abb. 6 b). Sie werden zwischen der Carboxylgruppe einer Aminosäure und der Aminogruppe der anderen Aminosäure unter Abspaltung eines Moleküls Wasser geknüpft.

Die Orte der Proteinsynthese sind die *Ribosomen*, die Eiweißfabriken im Zytoplasma der Zelle. Die Ribosomen sind komplex strukturierte Partikel, die etwa zu 50% aus Proteinen und zu 50% aus einer weiteren Art von Ribonukleinsäure, der „ribosomalen“-RNA (*r*-RNA) aufgebaut sind. Die m-RNA, welche für ein bestimmtes Protein codiert, wird vom 5'-Ende aus

durch das Ribosom gezogen. Die Nukleotidsequenz wird in Codons abgelesen, sodaß jeweils eine Aminosäure pro m-RNA-Codon in die Polypeptidkette eingebaut wird. Um diese sehr spezifische Beziehung zwischen den Codons der m-RNA und der passenden Aminosäure herzustellen, ist wieder ein zwischengeschaltetes Verbindungsmolekül notwendig.

Dieses *Verbindungsmolekül* ist die dritte Art von Ribonukleinsäure, die „Überbringer oder transfer“-RNA (*t*-RNA). Jede t-RNA besitzt ein Nukleotidtriplett, das **Anticodon**. Es ist zu dem Triplett der m-RNA, das die jeweilige Aminosäure codiert, komplementär. Eine Aminosäure kann nur an die t-RNA gekoppelt werden, welche eine für sie charakteristische Anticodonsequenz aufweist. Zur Beladung der t-RNA mit einer ihr entsprechenden Aminosäure sind spezifische Enzyme vorhanden, die die geringen Unterschiede zwischen den verschiedenen t-RNA Arten erkennen müssen. Die so entstandenen, beladenen t-RNA-Moleküle können dann ihre Aminosäuren an den Ort der Proteinsynthese für den Syntheseprozess der Proteine zur Verfügung stellen. Für jedes translatierte Codon wird die Aminosäure an die wachsende Molekülkette angefügt. Dieser Vorgang wie-

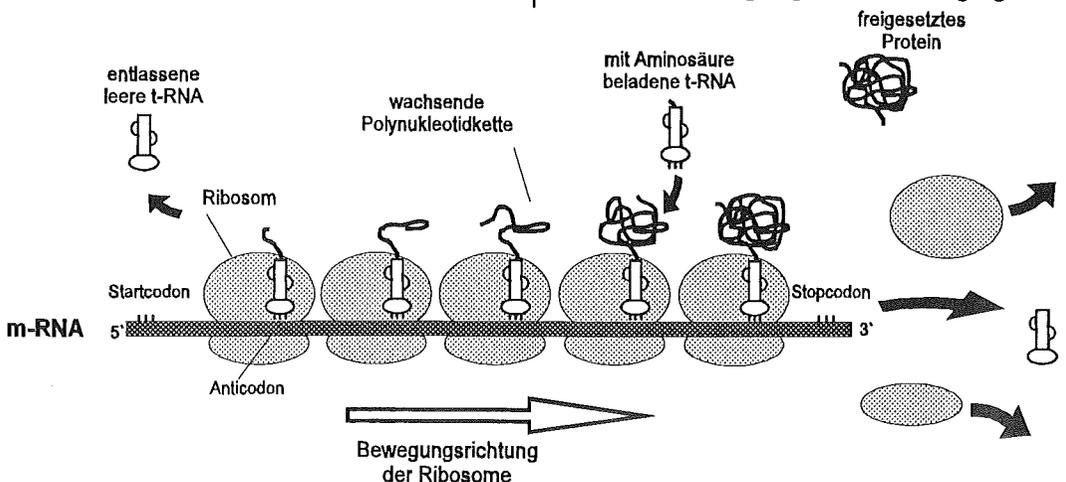


Abb.7: Translation

derholt sich solange, bis alle Codons der m-RNA translatiert sind.

Erreicht der Translationsapparat schließlich das **Terminationssignal in Form eines Stop-Codons**, wird die fertige Polypeptidkette freigesetzt.

Wenn dieses Protein ein Enzym ist, kann es, wie in Abb. 3 dargestellt, eine bestimmte Reaktion katalysieren, deren Endprodukt das letzte Glied der Umsetzung der genetischen Information in eine Wirkung darstellt.

2.4 Die Genregulation

Das Wissen, wie sich der Informationsfluß von einem Gen über Transkription und Translation hin zum Protein abspielt, ist nur ein Aspekt bei den Untersuchungen zur Genexpression. Ein anderer ist die Frage nach *Regulation der Genexpression*.

Noch bevor der Genetische Code überhaupt entschlüsselt war, stand fest, daß es ausgeklügelte molekulare Mechanismen in der Zelle geben muß, welche die Anzahl und den Umfang der jeweiligen Proteine steuern.

Bakterien beispielsweise leben gewöhnlich in Umgebungsbedingungen, die sich schnell ändern können. Ein Protein oder ein Enzym, das in einem Moment noch dringend gebraucht wurde, kann im anderen Moment schon nutzlos oder gar hinderlich sein. Umgekehrt brauchen sie plötzlich Enzyme, die vorher unnötig waren.

Eine Möglichkeit für die Bakterien, mit solchen Situationen fertig zu werden, wäre, alle Enzyme und Proteine gleichzeitig herzustellen, ohne Rücksicht darauf, ob sie gebraucht werden oder nicht. Da eine solche Vorgehensweise reinste Verschwendung wäre, machen es die Bakterien anders.

Viele der bakteriellen Gene sind darauf ausgelegt, unterschiedlich stark zu arbeiten. Sie stellen nur dann m-RNA in nennenswerter Menge her, wenn diese Gene durch irgendwelche äußeren Signale dazu animiert werden. Die Substanzen, die solche Signale für eine differenzierte Proteinsynthese vermitteln, nennt man *Induktoren*.

2.4.1 Welche Substanzen können als Induktor wirken?

Beim Abbau von Substraten als Energiequelle für Bakterien ist es ökonomisch, daß die abbauenden Enzyme nur dann gebildet werden, wenn das Substrat vorliegt, d.h. das Substrat induziert die Transkription der Gene für die Enzyme, die das Substrat abbauen sollen – **die Substratinduktion**.

In manchen Fällen wirkt auch das Endprodukt einer Proteinsynthese selbst als Induktor für die Transkriptionsregulation, indem es selbst seine weitere Synthese hemmt, wenn bereits genügend gebildet wurde – die sogenannte **Endproduktrepression**.

Bis etwa 1970 hatten sich die bisher behandelten Erkenntnisse über die grundlegenden Eigenschaften genetischer Systeme allgemein durchgesetzt. Trotz des Einvernehmens darüber, daß alle genetischen Systeme in ihren grundlegenden Eigenschaften übereinstimmen, wußte man über die der prokaryotischen Organismen wesentlich mehr als über die der Eukaryoten, was auch verständlich war, denn durch die einfache Handhabung und Kultivierbarkeit der Bakterien war die genetische Analyse der kleineren und weniger komplexen Bakteriengenome um vieles leichter.

Biochemische Experimente zur eukaryotischen Genexpression und Genregulation wurden dadurch erschwert, daß die Eukaryoten bezüglich der Organisation ihrer Zellen viel komplizierter gebaut sind. Ihre Zellen sind durch viele Membransysteme in verschiedene Kompartimente unterteilt, wobei die Genexpression an mehreren Orten der Zelle, dem Kern und Zytoplasma, stattfindet. Auch die Größe und Struktur eukaryotischer Gene und ihrer durch Introns und Exons aufgebaute mosaikartige Anordnung in der DNA der Chromosomen bedingten viele Probleme. Außerdem konnte und kann man noch immer keine Kulturen wachsender höherer Zellen auf die selbe konventionelle Art wie bei Bakterien miteinander genetisch kreuzen. Selbst wenn die gleichen Mechanismen der Genregulation

lation der Bakterien auch in höheren Zellen vorgekommen wären, war damals die Chance, sie genetisch nachzuweisen aus den oben genannten Gründen sehr gering gewesen. Solange es unmöglich war, aus dem großen Chromosom höherer Organismen die spezifischen DNA-Abschnitte zu isolieren, die für bestimmte Proteine codieren, ließen sich auch keine Regulationsmodelle aufzeigen.

Was fehlte, war ein *neuer experimenteller Ansatz*, der die molekulare Analyse eukaryotischer Zellgenome erleichtert hätte. Dieser Ansatz wurde mit der Entwicklung der **DNA-Rekombinationstechnik** in der ersten Hälfte der 70er Jahre gefunden.

Heute, um das begonnene Kapitel abzuschließen, kann man sagen, daß die Regulation der Genwirkung bei Eukaryoten eine wesentlich größere Vielfalt an Mechanismen aufweist als bei den Bakterien.

3. DNA-Rekombinationstechnik- Das Prinzip der Klonierung

Bevor auf die Entwicklung der rekombinanten DNA-Technik eingegangen wird, sollten einige praktische und theoretische Voraussetzungen für diese Technik näher erläutert werden.

3.1 Genübertragung zwischen Zellen

Eine Methode, um die genetischen Informationen zweier Individuen zu mischen, ist die *sexuelle Fortpflanzung*. Bei **Tieren** geschieht dies im Zuge der Befruchtung, bei der die elterlichen Chromosomensätze der Ei- bzw. der Spermienzelle zusammengeführt und in der Zygote vereinigt werden. Dabei kommt es zu einer *Rekombination (Neuordnung) der Chromosome*. Der entsprechende Vorgang bei **Pflanzen** ist die Bestäubung.

Dieser sexuellen Neuordnung des genetischen Materials stehen *parasexuelle Vorgänge* gegenüber, zu denen auch die Rekombination

der Merkmale bei Prokaryoten gehört. **Bakterien** können eine neue genetische Information über mehrere Wege aufnehmen, die Vorgänge unterscheiden sich in der Art des Transfers der DNA in die Zelle. Man kennt die *Transformation, Konjugation und Transduktion*.

Jedoch egal wie die Fremd-DNA in die Empfängerzelle (Rezipienten) gelangt, sie kann den Genotyp verändern, wenn sie

- a) sich mit homologen Sequenzen im Genom des Empfängerorganismus paart und neu re-kombiniert
- b) als autonomes DNA-Stück außerhalb des Chromosoms bestehen bleibt.

3.1.1 Transformation

bezeichnet die Veränderung des Genotypen einer Zelle durch Aufnahme von freien, löslichen DNA-Molekülen *aus einem Kulturmedium*. Diese natürliche Aufnahmebereitschaft für DNA bei Bakterien wird als **Kompetenz** bezeichnet.

Da sich die Spender- oder Donor-DNA meistens mit dem Genom des Empfängers rekombiniert, ist eine solche Transformation gewöhnlich stabil und erblich.

3.1.2 Konjugation

ist der DNA-Transfer zwischen zwei Bakterienzellen, die miteinander über eine **Konjugationsbrücke** aus Proteinen in *unmittelbarem Kontakt* treten. An einer besonderen Stelle im Chromosom der Spenderzelle beginnt die DNA-Replikation, und ein Exemplar der gerade verdoppelten DNA wird in die Empfängerzelle geschleust. Diese gerichtete Übertragung bricht ab, wenn die Brücke zerstört wird.

3.1.3 Transduktion

bezeichnet die Übertragung von DNA in eine Empfängerzelle durch **Bakteriophagen**. Bakteriophagen sind Viren, die Bakterien infizieren,

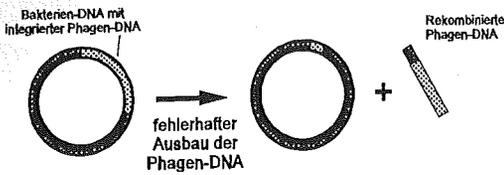


Abb.8: Fehlerhafte Excision

sich in diesen vermehren und sie dann – manchmal erst nach einer längeren Stillhalteperiode – bei der Freisetzung der neu gebildeten Viruspartikel durch Lyse der Zellwand zerstören.

Es lassen sich *zwei Arten* unterscheiden: die *allgemeine* Transduktion sowie die *spezielle* oder spezifische Transduktion.

3.1.4 Spezielle oder spezifische Transduktion

Sie tritt bei Bakteriophagen auf, deren Infektionszyklus durch den *Einbau des Virusgenoms ins Chromosom* der infizierten Zelle unterbrochen wird. Dieser Einbau erfolgt an ganz bestimmten, spezifischen Stellen.

Wenn das Phagen genom, nachdem es gemeinsam mit dem Chromosom der Wirtszelle repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben wurde, wieder herausgeschnitten wird, verläuft dies normalerweise sehr präzise und das freigesetzte Phagen genom entspricht genau der ursprünglich eingebauten DNA. Gelegentlich kommt es jedoch zu Fehlern. Es werden Bakteriengene, die auf einer Seite direkt an das integrierte Phagen genom angrenzen, anstelle der eigenen Virusgene auf der anderen Seite herausgeschnitten und in das Genom der nachkommenden Phagen eingebaut.

Beim nächsten Infektionszyklus wird diese rekombinierte Phagen-DNA wieder in eine Bakterienzelle eingeschleust, in deren Chromosom integriert, und so erhält die Empfängerzelle neben dem Phagen genom auch genetische Information, die vom vorigen Wirt des Phagen stammt. Ein *Phage* wirkt so als Transportmittel oder *Vektor bei der Genübertragung* von einer Zelle auf eine andere.

Auf diese Weise lassen sich aber nur Gene übertragen, die direkt an der Integrationsstelle des Phagen genom anschließen. Da sich aber verschiedene Phagen an unterschiedlichen Stellen im Wirtsgenom integrieren, können jedesmal andere Gene übertragen werden.

Heute jedoch ist man in der Lage, Phagen durch verschiedene Manipulationen zu veranlassen, auch Fremd-DNA aufzunehmen, die nicht direkt an einer Integrationsstelle angrenzt. Eine solche Bakterien-DNA kann an jeder beliebigen Stelle des Phagen genom eingebaut werden.

Durch einen solchen Einbau von fremder DNA in das Chromosom eines transduzierenden Phagen lassen sich diese fremden Bakteriengene gewaltig anreichern, da sie als integrierter Bestandteil des Virusgenoms gemeinsam mit diesem repliziert werden. Diese Tatsache wird bei der DNA-Klonierung ausgenutzt.

Durch die DNA-Rekombinationstechnik oder Gentechnik entstand eine völlig neue Methode, mit der man Experimente planen und ausführen konnte, etwas, was bis dahin unmöglich erschien. Auch wenn sich das Experimentieren nicht einfach gestaltete, so war es doch erfolgreich.

Als wichtigste Methode dieser neuen Technik erwies sich das *Verfahren der DNA-Klonierung*. Um nun besser verstehen zu können, wie die besprochenen Prinzipien der Genübertragung zwischen Zellen in der DNA-Rekombinationstechnik abgewandelt werden, muß man den Begriff des Klonierens näher erklären.

3.2 DNA-Klonierung

Ein *Zellklon* stellt eine genetisch *identische Zellpopulation* dar, die *aus nur einer Stammzelle* abgeleitet ist. Analog bezeichnet „klonierte DNA“ die durch Replikation hergestellte identische Kopie einer Ausgangs-DNA. Wenn nun in eine Stammzelle fremde DNA eingebracht wird, dann muß jede der Zellen eines Klons diese fremde, klonierte DNA enthalten.

3.2.1 Strategie eines Klonierungsexperiments

Diese besteht aus mehreren grundlegenden Schritten:

- * Ein DNA-Fragment, das das zu klonierende Gen enthält, wird mit dem DNA-Molekül eines Vektors rekombiniert.
- * Der Vektor dient als Vehikel und transportiert das fremde Gen in die Wirtszelle.
- * In der Wirtszelle wird der Vektor repliziert, sodaß viele identische Kopien der Vektor-DNA mit dem fremden Gen entstehen.
- * Wenn sich die Wirtszelle teilt, werden die Kopien des rekombinierten DNA-Moleküls auf die Tochterzellen weitergegeben, in denen sich der Vektor erneut vermehrt.
- * Durch viele weitere Zellteilungen entsteht eine ganze Kolonie, ein Klon gleichartiger Wirtszellen. Jede Zelle des Klons enthält das rekombinierte DNA-Molekül in einer oder mehreren Kopien. Man spricht nun davon, daß *das fremde Gen in dem rekombinierten Molekül kloniert* wurde.

Für jeden einzelnen Teilschritt zur DNA-Klonierung sind mehrere spezielle Hilfsmittel und Methoden erforderlich.

3.2.2 Die Reinigung von DNA aus lebenden Zellen

Eine dergenannten Voraussetzungen für ein Experiment mit rekombinierter DNA ist die *Verfügbarkeit von DNA-Fragmenten aus einem Genom*, welche die Gene, die kloniert werden sollen, enthalten.

Um DNA aus einer lebenden Zelle zu isolieren, war und ist ein enormer chemisch-präparativer Aufwand notwendig. Es gibt heute zwar schon sehr vereinfachte Möglichkeiten, aber die verschiedenen Methoden zu derartigen Verfahren sollen nicht Bestandteil dieser Betrachtung sein. Wir wollen uns mit der Tatsache begnügen, daß die Isolierung möglich ist.

3.2.3 Die Manipulation der gereinigten DNA

Nachdem die gesamte DNA aus der Zelle in gereinigter Form vorliegt, folgt der zweite Schritt

des Klonierungsexperiments: die *Konstruktion eines rekombinierten DNA-Moleküls* durch Verknüpfung der zu klonierenden **Fremd-DNA mit einer Vektor-DNA**. Damit dieses zusammengesetzte Molekül entstehen kann, müssen sowohl der Vektor als auch die DNA, die man klonieren möchte, an bestimmten Stellen geschnitten und dann in vorbestimmter Weise verbunden werden. Die Manipulation des Schneidens und Verknüpfens der DNA bildet das Kernstück der Klonierung.

Man kann die DNA-Moleküle aber nicht nur schneiden und verknüpfen, sondern auch verkürzen und verlängern, replizieren oder transkribieren und sie durch Anfügen oder Entfernen bestimmter chemischer Gruppen abwandeln. Alle diese *Möglichkeiten der DNA-Manipulation* können *im Reagenzglas* ausgeführt werden und man bedient sich dabei **gereinigter Enzyme**. Enzyme sind Proteine, die in der Zelle an lebenswichtigen Vorgängen katalytisch beteiligt sind. Viele derartige Enzyme kann man auch dann unter künstlichen Bedingungen, wenn sie in isolierter und gereinigter Form vorliegen, dazu bringen, ihre natürliche Funktion auszuführen.

3.2.3.1 Das Enzymerepertoire zur DNA-Manipulation

Dem Gentechnologen steht heute eine Auswahl von Enzymen zur Verfügung, die es ihm erlaubt, jedes beliebige DNA-Fragment in ein Replikon, d.h. in ein selbstvermehrungsfähiges System zu verwandeln. Nur mit enzymatischen Methoden lassen sich kleinste Mengen von DNA so handhaben, wie es der Gentechnologe braucht, und nur Enzyme arbeiten so selektiv, wie es die Gentechnik erfordert.

Man kann diese Enzyme nach den Reaktionen, die sie katalysieren, in mehrere große Klassen einteilen: die wichtigsten davon sind Nukleasen, Ligasen, und Polymerasen.

- * *Nukleasen* sind Enzyme, die Nukleinsäuremoleküle schneiden, verkürzen oder abbauen, indem sie die Phosphodiesterbindung zwi-

schen den Nukleotiden eines DNA- oder RNA-Stranges spalten.

Von besonderer Bedeutung sind die **Restriktionsendonukleasen**. Sie schneiden doppelsträngige DNA nur an einer bestimmten Anzahl von Stellen, da sie ganz spezifische Nukleotidsequenzen öffnen. Beim Klonieren ist es unabdingbar, daß man die DNA-Moleküle sehr genau und immer in gleicher Weise schneiden kann. Nur mit den gereinigten Restriktionsendonukleasen kann man DNA-Moleküle so präzise und reproduzierbar schneiden, wie es für diese Technik erforderlich ist.

* **Ligasen** dienen zum Verknüpfen von DNA-Molekülen. Sie schließen die Phosphodiesterbindungen zwischen den Nukleotidmolekülen. Der Vorgang der Ligation, welche diese Enzyme katalysieren, ist der letzte Schritt bei der Konstruktion eines rekombinanten DNA-Moleküls.

* **Polymerasen** sind Enzyme, die einen neuen Nucleinsäurestrang anhand einer komplementären DNA- oder RNA-Matrize synthetisieren, wie es aus den Abschnitten über die Replikation und Transkription bereits bekannt ist.

Wir waren damit beschäftigt, ein rekombinantes DNA-Molekül aus Fremd-DNA und Vek-

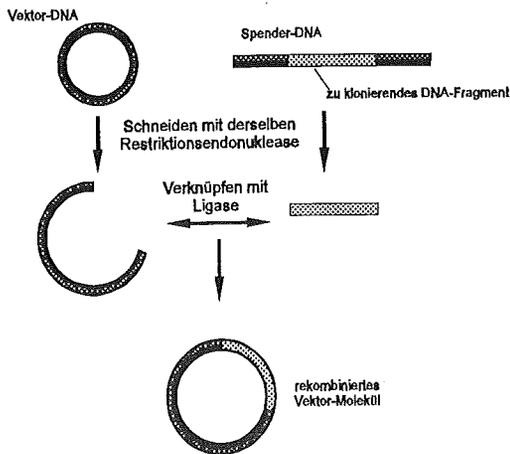


Abb.9: Herstellung eines rekombinierten DNA-Vektormoleküls

tor-DNA herzustellen. Das Genom, das die zu klonierenden Gene enthält, und das DNA-Vektor-Molekül werden mit derselben Restriktionsendonuklease geschnitten, damit bei allen DNA-Stücken dieselbe Schnittstelle entsteht. Diese machen es leicht, DNA-Fragmente verschiedener Herkunft zu verbinden und damit rekombinierte DNA-Moleküle herzustellen.

Wie sieht das nun in der Praxis aus? Die aus dem Genom einer Zelle entstandene DNA-Fragmentensammlung, von der ein Fragment auch das Gen, das kloniert werden soll, enthält, mischt man mit einer Anzahl von gleichartigen Vektormolekülen, die alle mit derselben Nuklease an einer Stelle gespalten wurden. Die Enden der Vektormoleküle und der einzubauenden Fragmente lagern sich aneinander und werden durch Ligation zu einem rekombinierten DNA-Molekül verknüpft.

3.2.4 Das Einführen von DNA in lebende Zellen und die Selektion der rekombinanten Zellen

Ein nächster Schritt besteht darin, die **rekombinierten Moleküle in lebende Zellen einzuschleusen**. Meist handelt es sich bei den Zellen um Bakterien, die auch nach dem DNA-Transfer wachsen und sich teilen sollen, so daß Klone entstehen können.

Ein wesentliches Element in der Klonierung ist der sogenannte **Vektor**, der als Teil des rekombinierten DNA-Moleküls das fremde Gen in die Wirtszelle transportieren und dort für seine Vermehrung sorgen soll.

3.2.4.1 Vektoren – Plasmide und Bakteriophagenchromosome

Zu dem Zweck des Gentransfers in eine Empfängerzelle muß ein **Vektor folgende Merkmale** besitzen:

* Das Vektor-DNA-Molekül sollte ein **Replikon** tragen, d.h. einen Abschnitt von Genen auf seiner DNA, die es ihm erlauben, sich in seinem Wirt zu vermehren.

- * Der Vektor sollte **relativ klein** sein und nur jeweils eine Schnittstelle für möglichst viele Restriktionsendonukleasen enthalten, in die hinein dann kloniert werden kann. Dies bedingt, daß nicht mehr als ein DNA-Fragment aufgenommen werden kann.
- * Der Vektor sollte Information (**selektierbare Marker**) tragen, auf deren Anwesenheit oder Verlust ein Selektionsverfahren für den Vektor bzw. das rekombinierte DNA-Molekül aufgebaut werden kann.
- * Es ist außerordentlich hilfreich, wenn die Struktur des Vektors, d.h. seine **Nukleotidsequenz bekannt** ist. Nur so können Marker, Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen usw. genau identifiziert und gezielt eingesetzt werden.

In Bakterienzellen findet man *zwei Arten von DNA-Molekülen*, die diese Anforderung erfüllen: **Plasmide und Bakteriophagenchromosome**

3.2.4.2 Plasmide

Plasmide sind *ringförmige DNA-Moleküle*, die sich in einer Bakterienzelle *unabhängig* von Chromosomen der Wirtszelle vermehren können. Oft *enthalten* sie *Gene*, die für eine nützliche Eigenschaft der betreffenden Bakterienzelle verantwortlich sind. So geht die Fähigkeit von Bakterien, gegen Antibiotika resistent zu sein, häufig auf ein Plasmid zurück, welches das Gen für die Antibiotikaresistenz trägt. Manche Plasmide vermehren sich aber auch, indem sie sich in das Bakterienchromosom *integrieren*. Diese sogenannten **Episome** können in dieser Form stabil über viele Zellteilungen erhalten bleiben.

Wie wird nun die rekombinierte DNA in das Bakterium transportiert und wie erfolgt die Selektion der Rekombinanten?

Bei *Plasmiden* erfolgt die Aufnahme über *zwei Wege*: der **Transformation und der Konjugation**

- * *Transformation*: Wie bereits bekannt, können die meisten Bakterienarten freie, lösli-

che DNA-Moleküle aus einem Kulturmedium aufnehmen. Meist werden diese fremden Moleküle von zell-eigenen Enzymen der Bakterien abgebaut, manchmal aber bleiben sie in der Wirtszelle erhalten und können sich replizieren. Das geschieht dann, wenn es sich bei dem DNA-Molekül um ein Plasmid handelt, dessen Replikationsstartpunkt von den Enzymen der Wirtszelle erkannt wird.

Nicht alle Bakterien sind in der Lage, DNA mit der gleichen Effizienz aufzunehmen. Die meisten Bakterienarten nehmen sie unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang auf. Um Bakterien wirksam zu transformieren, muß man die Zellen einer physikalischen und/oder chemischen Behandlung unterziehen, welche ihre Fähigkeit, DNA aufzunehmen verstärkt. Solche Zellen werden dann als **kompetent** bezeichnet.

Trotzdem: Die Transformation kompetenter Zellen bleibt ein ineffizienter Vorgang.

- * *Konjugation*: Charakteristisch für konjugative Plasmide ist ihre Fähigkeit, den Konjugationsvorgang bei Bakterien in Gang zu setzen. Gesteuert werden Konjugation und Plasmidübertragung durch einer Gruppe von Genen, die konjugative Plasmide von nichtkonjugativen unterscheidet.

Nun muß ein Weg gefunden werden, die (wenigen) Zellen, die ein Plasmid aufgenommen haben, von den vielen nicht transformierten bzw. konjugierten Zellen zu unterscheiden.

Dies geschieht mit Hilfe von **selektierbaren Markern**, die auf dem Plasmid enthalten sind.

3.2.4.3 Bakteriophagenchromosome

Bakteriophagen sind Viren, die spezifisch Bakterien infizieren. Wie alle Viren haben auch die Phagen eine sehr einfache Bauweise: sie bestehen aus einem *DNA-(oder gelegentlich RNA-Molekül)*, das verschiedene Gene trägt (zum Beispiel für die Infektion einer Zelle, für die eigene Replikation oder für die Synthese der Virus-

bausteine u.s.w.) und einer Schutzhülle aus Proteinen, dem *Capsid*, das die Nukleinsäure umhüllt. Diese Struktur wird als **Phagenkopf** bezeichnet.

Der **Schwanz des Phagen** kann sehr kompliziert gebaut sein. Er ist wesentlich an der Anheftung des Phagen an das Bakterium beteiligt.

Für das *Einführen von Phagen-DNA* in Bakterienzellen gibt es grundsätzlich *zwei* verschiedenen *Möglichkeiten*: **Transfektion und in vitro-Verpackung**.

* Die *Transfektion* entspricht dem Verfahren der Transformation, allerdings mit dem Unterschied, daß dabei keine Plasmide, sondern gereinigte Phagen-DNA oder rekombinierte Phagenmoleküle von kompetenten Zellen direkt aus einer Zellsuspension aufgenommen werden. Die Transfektion der Phagen-DNA ist, ähnlich der Transformation mit Plasmiden, nicht sehr ergiebig.

Viel effizienter wäre es, wenn man die Phagen-DNA, ob mit einem DNA-Fragment rekombiniert oder nicht, im Reagenzglas in die Kopf-Schwanz-Struktur des Phagen verpacken könnte.

* Genau diese Konstruktion eines Bakteriophagen wird bei der Methode der *in vitro-Verpackung* angewandt.

Ein solcher Phage überträgt dann *nach dem Prinzip der Transduktion* seine DNA in Bakterien. Das letzte Stadium im Zyklus der Phagen ist die Lyse der Wirtszelle und die Freisetzung der reifen Viren. Wenn nun die infizierten Zellen unmittelbar nach Zusetzen der Phagen oder nach Transfektion mit Phagen-DNA auf ein festes Nährmedium verteilt werden, kann man die *Lyse der Zellen in Form von Plaques* (das sind runde Löcher in einem Bakterienrasen auf einer Agarplatte) durch das Auflösen der Bakterienzellwände *sichtbar machen*.

Auch hier stellt sich die Frage nach der *Selektion der Plaques, die von rekombinanten Phagen verursacht wurden*.

Und auch hier bedient man sich wieder **selektierbarer Marker**.

Durch solche und ähnliche, oft komplexere Versuchsanordnungen, die aber alle demselben *Prinzip* entsprechen, kann man schlußendlich alle die Zellen, die rekombinante DNA-Moleküle enthalten, identifizieren. Diese Zellen können dann isoliert und gesondert vermehrt werden, sodaß *Kolonien gleichartiger Wirtszellen*, die **Klone** entstehen.

Jeder Klon enthält einen einzigartigen DNA-Abschnitt eines Genoms, das zu Anfang des Klonierungsexperiments aus einer lebenden Zelle isoliert wurde. Eine solche Sammlung von geklonten DNA-Fragmenten, deren Zahl so groß ist, daß in ihnen wahrscheinlich jedes Gen einer Ausgangszelle vorhanden ist, nennt man **DNA-Bibliothek**. Man spricht auch von *Gen- oder Genombibliotheken oder von Genbanken*.

3.2.5 Selektion des gewünschten Klons

Erfolg oder Mißerfolg eines Klonierungsexperiments hängen davon ab, ob ein Verfahren gefunden wird, das klonierte DNA-Fragment mit *dem Gen* zu selektionieren, für welches man sich interessiert. Das Kriterium für diese Suche nach dem gewünschten Klon muß ein spezifisches, eindeutig nachweisbares Merkmal der integrierten Fremd-DNA sein.

Es gibt nur zwei derartige Merkmale: Zum einen die Struktur der betreffenden DNA-Sequenz, d.h. die Nukleotidsequenz des Gens (*Selektion nach dem Gen*), zum anderen das Genprodukt des geklonten Gens (*Selektion nach dem Genprodukt*). Diese beiden Eigenschaften macht man sich in unterschiedlicher Weise zunutze, um viele Klone zu untersuchen und den gewünschten zu identifizieren.

3.2.5.1 Selektion nach dem Gen

Zu diesem Zweck kann man ein wichtiges Verfahren der molekularen Genetik einsetzen, das auf Auflösung (*Denaturierung*) bzw. Aneinanderlagern (*Renaturierung*) komplementärer DNA-Stränge beruht: die *Nukleinsäurehybridisierung*

Zwei einzelsträngige Nukleinsäuremoleküle tragen immer das Bestreben in sich, Basenpaarungen miteinander auszubilden. Solche Hybridstrukturen sind in den meisten Fällen sehr instabil, weil zwischen den beiden Molekülen nur wenige Bindungen entstehen. Sind die Polynukleotide jedoch zueinander komplementär, so kommt es aufgrund der Basenpaarungsregeln zu umfangreichen Basenpaarungen und es entsteht ein stabiler Doppelstrang.

Mit der Nukleinsäurenhybridisierung kann man einen bestimmten rekombinierten Klon identifizieren, wenn man eine in der Regel **radioaktiv markierte RNA- oder DNA-Sonde** besitzt, die zu dem gesuchten Gen komplementär ist. Um allerdings eine solche Sonde herstellen zu können, muß das *Gen* in seiner ganzen, oder zumindest in einem Teil seiner *Nukleotidsequenz* bekannt sein.

3.2.5.2 Selektion nach dem Genprodukt

Eine Alternative zum Verfahren der Nukleinsäurenhybridisierung, wenn man die Nukleotidsequenz des gewünschten Gens nicht kennt und deshalb keine Sonde herstellen kann, ist der Nachweis des Genprodukts, zum Beispiel durch seine Enzymaktivität oder durch seine immunologischen Reaktionen mit seinen Antikörpern.

Diese Methoden *setzen* einerseits *voraus*, daß das *geklonte Gen in der Wirtszelle exprimiert* wird, um das dazugehörige Protein zu produzieren, andererseits darf dieses Protein nicht von Natur aus in der Wirtszelle vorkommen.

Hat man den gewünschten Klon identifiziert, kann man diesen isolieren und ihn vielfältigen Analysen und Manipulationen unterziehen, um weitere Aufschlüsse über das Gen und/oder sein Genprodukt zu bekommen.

Zur **Aufbewahrung** klonierter Zellen und Viren in einer DNA-Bibliothek gibt es *einfache*, verlässliche Kulturbedingungen. Man braucht dann theoretisch nur eine einzige Zelle oder ein einziges Phagenpartikel aus einem Klon, um neuerlich Wachstum oder Vermehrung in Gang zu setzen.

3.3 Klonierung von eukaryotischen Genen in Bakterien

Was zunächst wie eine recht einfache Vorgangsweise aussah, erwies sich jedoch bei genauerer Betrachtung als äußerst kompliziert. Die Probleme, die auftraten, zeigten deutlich die *Unterschiede zwischen pro- und eukaryotischen Genen*.

a) Gene aus höheren Organismen werden in Bakterien normalerweise nicht exprimiert, weil die **Signale zur Genregulierung** für die Transkription und Translation verschieden sind.

Ein Ausweg liegt hier im Einbau der Fremd-DNA in einen Vektor, der unter dem Einfluß der Bakterienexpressionssignale steht. Klonierungsvektoren, die Signale enthalten, die Expression des klonierten eukaryotischen Fremdgens in der Bakterienzelle in Gang setzen, bezeichnet man als *Expressionsvektoren*.

b) Bei der Transkription der eukaryotischen Gene im Zellkern wird von der DNA eine m-RNA Kopie gemacht, die die Sequenz des Gens samt allen Introns und sich wiederholenden Genomabschnitten enthält. Auf dem Weg ins Zytoplasma zu den Ribosomen wird die m-RNA gespleißt und diese gespleißte m-RNA enthält dann nur noch die für das Genprodukt codierenden Genomsequenzen.

Bei Bakterien fehlen solche Spleißmechanismen, und sie sind deshalb nicht in der Lage, eine richtige m-RNA für eukaryotische Genprodukte herzustellen.

Das Problem konnte man lösen, indem man eine Methode verwendete, die auch zur Klonierung von RNA dient. Bei Klonierungsexperimenten von eukaryotischen Genen in Bakterien nimmt man nicht direkt das Gen mit all seinen Introns, sondern fertigt eine komplementäre DNA (c-DNA) seines gespleißten m-RNA-Transkripts an. Durch Enzyme, die von der Replikation her bekannt sind, die DNA-Polymerasen, und den c-DNA-Strang als Matrize kann man ein dop-

pelsträngiges DNA-Molekül aufbauen, welches nach dem behandelten Schema kloniert werden kann.

c) Bei Eukaryoten werden die Genprodukte bei der Translation oft nur als Vorstufe zum Protein synthetisiert und erst später chemisch so verändert, daß sie ihre enzymatischen Aufgaben erfüllen können. Das ist wieder ein Vorgang, der von Bakterienzellen nicht ausgeführt werden kann.

Die Schwierigkeit bei der Weiterverarbeitung des unvollständigen Genprodukts aus der Translation wird umgangen, indem man das Bakterium veranlaßt, unmittelbar das aktive Protein herzustellen. Dabei wird in das rekombinierte Plasmid nicht die ganze c-DNA der gespleißten mRNA eingefügt, sondern nur der DNA-Abschnitt, der das aktive Endprodukt codiert.

Diese Vorgangsweise wird später im Kapitel 4.1.2.1 über die Arzneiproduktion bei der die Herstellung von Insulin noch genauer behandelt werden.

d) Ein Hindernis ganz anderer Art ist die Tatsache, daß viele der eukaryotischen Genprodukte auf ein Bakterium, vor allem auf sein Wachstum, toxisch wirken, von bakteriellen Enzymen abgebaut werden oder sich zu funktionsunfähigen Aggregaten in der Bakterienzelle zusammenlagern.

Das Problem, daß fremde Proteine für Bakterien vielfach toxisch wirken, läßt sich auf der Ebene der Genregulation umgehen. Man kann die Bakterienzelle veranlassen, die Transkription der mRNA für das gewünschte Protein solange hinauszuzögern, bis die Zellen fast vollständig gewachsen sind und so das Wachstum und die Vermehrung nicht mehr gestört werden.

Angesichts dieser vielen Schwierigkeiten hat es sich *in vielen Fällen*, vor allem dann, wenn es nicht um die Untersuchung von Genen geht, sondern um die Synthese wichtiger Stoffwechselprodukte, als *günstiger* erwiesen, das rekombinierte Gen nicht in Bakterien, sondern **in eukaryotischen Zellen (z.B. Hefezellen oder Kulturen aus Säugerzellen) zu exprimieren.**

4. Anwendungsgebiete der DNA-Rekombination in Forschung und Biotechnologie

Durch die Forschung mit den neuen Methoden der molekularen Genetik wurde viel zum Verständnis der biologischen Strukturen, Systeme, und deren Funktion beigetragen.

Aber die Fortschritte der Gentechnik können nur dann von allgemeinem Nutzen sein, wenn es auch gelingt, ihre Arbeitsmethoden in Produktionsverfahren umzusetzen. Das führt zu einer wichtigen Wachstumsindustrie unserer Zeit – der Biotechnologie.

4.1 Angewandte oder industrielle Mikrobiologie

Die Biotechnik ist, wie in der Öffentlichkeit oft falsch gedeutet, kein neues Verfahren der industriellen Produktion, aber sie hat in den letzten Jahren durch ihre Fortschritte mehr Aufmerksamkeit auf sich gezogen.

Als *Biotechnologie* wird der Einsatz lebender Organismen in industriellen oder ähnlichen Prozessen verstanden. Schon die Babylonier und Sumerer nutzten Hefe, um Bier zu brauen, und die alten Ägypter wußten bereits, daß die Hefe im Teig Kohlendioxid produziert, wodurch das Brot lockerer wurde.

4.1.1 Gentechnische Proteinproduktion

Nachdem 1929 entdeckt wurde, daß der Pilz *Penicillium* einen wirksamen antibakteriellen Wirkstoff produziert, begann man, Pilze und Bakterien in großem Umfang für die Herstellung von Antibiotika zu verwenden. Die Perfektion der dafür notwendigen *Fermentations- und Aufarbeitungstechnik* sorgte dafür, daß Mikroorganismen verschiedene Verbindungen in großen Mengen erzeugten. Aber nicht nur die Technik, sondern auch die Selektion neuer Mikroorganismen zur Stammverbesserung nach den klassischen Methoden sorgten für Optimierung der Produktion.

Viele wichtige Proteine werden aber nicht von Mikroorganismen, sondern von höheren Organismen produziert, die man aber nach diesem Verfahren nicht gewinnen konnte.

Erst die Methoden der DNA-Klonierung machten es möglich, daß eukaryotische Gene aus ihrer natürlichen Umgebung heraus in Bakterien kloniert werden können. Daß dieser Sprung über die Artgrenzen hinweg nicht so einfach ist, wie er auf den ersten Blick erscheinen mag, ist aus dem letzten Kapitel hinlänglich bekannt.

Die großen kommerziellen Erfolge hat die Gentechnik auf dem Gebiet der Pharmazeutika. Deshalb eignet sich z.B. das Insulin aus dem Bereich der Arzneimittelproduktion zur Erläuterung gentechnisch hergestellter Proteine.

4.1.2 Gentechnik und Medizin

4.1.2.1 Gentechnische Arzneimittelproduktion

Viele Erkrankungen des Menschen haben die Ursache im Fehlen oder in mangelhafter Funktion eines Proteins, das im gesunden Körper synthetisiert wird. So wird bei *Diabetes mellitus* das Hormon **Insulin** von der Bauchspeicheldrüse nicht in ausreichender Menge produziert. Da das Hormon die wichtige Aufgabe der Steuerung der Blutzuckerkonzentration hat, äußert sich ein Mangel in einem Komplex von Symptomen, welcher ohne Behandlung tödlich sein kann. Der Patient kann viele Formen der Zuckerkrankheit durch ständige Insulininjektionen abschwächen. Das Insulin, das bei dieser Art von Behandlung eingesetzt wird, stammt aus den Bauchspeicheldrüsen von Schweinen und Rindern. Durch geringfügige Unterschiede zwischen dem tierischen und menschlichen Protein kommt es bei manchen Patienten zu unerwünschten Nebenwirkungen. Außerdem gestaltet sich das Reinigungsverfahren als äußerst schwierig, sodaß gefährliche Verunreinigungen nicht vollständig ausgeschlossen werden können.

Aller dieser Probleme hätte man sich mit einem Schlag entledigt, wenn es gelänge, menschliches In-

sulin auf gentechnischem Wege herzustellen.

Insulin hat zwei Eigenschaften, die seine Produktion mit der DNA-Rekombinationstechnik erleichtern. Einerseits muß das Protein nach der Translation nicht chemisch modifiziert werden, weil das geklonte Gen bereits das aktive Genprodukt codiert. Andererseits ist Insulin ein relativ kleines Molekül. Es setzt sich aus zwei Polypeptidketten zusammen, der A- und B-Kette. In den Zellen des Pankreas werden beide gemeinsam als Vorläufermolekül Präproinsulin synthetisiert, welches nach der Translation noch einmal geschnitten wird, bis schließlich die beiden Polypeptidketten A und B entstehen, die durch zwei Disulfidbrücken verbunden sind.

Zur gentechnischen Herstellung von Insulin verwendet man zwei Plasmide, die jeweils den DNA-Abschnitt für eine Kette enthalten. Die beiden Polypeptidketten entstehen in verschiedenen Bakterienkulturen und werden erst nach ihrer Reinigung gemischt, sodaß das fertige Insulinmolekül entsteht.

Mit ähnlichen Vorgehensweisen gelang auch die Synthese anderer tierischer Proteine in Bakterien, z.B. **Somatostatin**, ein Antiwachstumshormon, das zur Behandlung mehrerer menschlicher Wachstumsstörungen dient. Oder **Somatotropin**, das menschliche Wachstumshormon, das als Gegenspieler des Somatostatin ebenfalls in der Behandlung von Wachstumsstörungen von Bedeutung ist. Weiters **Interferone**, eine Gruppe von regulatorischen Proteinen der Zellphysiologie mit antiviralen, immunstimulierenden und tumorhemmenden Eigenschaften.

Trotz der angeführten Beispiele für die Erfolge der gentechnischen Proteinherstellung bzw. Arzneimittelproduktion in Bakterien, die verdeutlichen, daß diese trotz aller Schwierigkeiten in der Genexpression von allgemeinem Nutzen sein kann, haben *Eukaryoten die Bakterien als Wirtszellen für diese Produktionstechnik fast völlig verdrängt*, denn bei vielen tierischen Produkten gibt es gar keine andere Möglichkeit, als eukaryotische Wirte zu verwenden, wenn man sie mit klonierten Genen herstellen will.

Der menschliche **Blutgerinnungsfaktor VIII**, zum Beispiel, der von zentraler Bedeutung für die lebenswichtige Blutgerinnung ist, kann nur über die DNA-Klonierung völlig frei von jeder Verunreinigung gewonnen werden. Dies gelang bei der früheren Gewinnung durch Reinigung aus dem Spenderblut nicht.

Da das Gen für die Codierung dieses Proteins sehr groß ist und da viele Modifikationen nach der Translation zur Herstellung des aktiven Genprodukts, die in der Bakterienzelle unmöglich sind, durchgeführt werden müssen, war der Umstieg auf Eukaryotenzellen als Wirtsorganismus zwingend.

4.1.2.2 Gentechnische Impfstoffherstellung

Impfstoffe sind Antigenpräparate. **Antigene (oder Immunogene)** sind körperfremde Substanzen, die ins Blut injiziert, eine Antwort des menschlichen Immunsystems anregen. Als Antwort auf diese antigene Stimulation produziert der Körper Proteine, die sogenannten **Antikörper oder Immunglobuline**, die dann, einfach ausgedrückt, sehr spezifisch mit dem Antigen reagieren und diese unschädlich machen. Aufgrund der verwendeten Antigenmaterialien unterscheidet man bei den verfügbaren Impfstoffen zwischen **Lebend- und Totimpfstoff**. Totimpfstoffe enthalten entweder inaktivierte (abgetötete), aber komplette Erreger oder aber nur das immunologisch relevante, aus dem Erreger gereinigte Antigenprotein. Demgegenüber bestehen Lebendimpfstoffe aus vermehrungsfähigen, abgeschwächten und daher nicht krankmachenden Infektionskeimen. Die Produktion von Impfstoffen barg bisher einige Probleme in sich, wie z.B. die reine Gewinnung der Antigenproteine aus einem Erreger sowie die vollständige Inaktivierung oder die ausreichende Abschwächung.

Durch die Gentechnik ist man heute in der Lage, *gereinigte Antigenproteine* herzustellen. Dabei werden die Gene, die für diesen Teil des Erregers codieren, in Expressionsvektoren eingebaut und vermehrt.

Außerdem besteht die Möglichkeit, einen *Lebendimpfstoff aus rekombinierten Vacciniaviren* her-

zustellen. Der Einsatz lebender Vacciniaviren als Impfstoff geht bis ins Ende des 18. Jahrhunderts zurück, als man erkannte, daß dieser Virus, der für Menschen unschädlich ist, Immunität gegenüber Pocken verleiht.

Die Idee, die nun dahinter steht, ist folgende: Man rekombiniert das Genom des Virus mit fremden Genen, die für die Antigene bestimmter Krankheiten codieren. Wird das fremde Gen im Virus mit den eigenen Genen exprimiert, werden erhebliche Mengen des Antigens produziert, die eine Immunantwort (= Produktion von Antikörpern) des Körpers bedingen und so eine Immunität gegen diese Krankheit erzeugen.

Das Problem dabei ist, ob die Forschung genug über solche Erregersysteme weiß, um sie ohne Gefahr für das Ökosystem freizusetzen.

4.1.2.3 Genomanalyse

Humanes Genom Projekt: Die Sequenzierung von Genomen sind für die Klärung der Funktion von Genen und zur Gewinnung von Einblicken in die Funktionsweise der Organismen von größter Bedeutung.

Dieses Projekt eröffnet den biologischen und medizinischen Wissenschaften noch nie dagewesene Forschungsperspektiven:

- * Grundlagenforschung der Erbkrankheiten
- * Pränatale Diagnose
- * mögliche Anwendungsgebiete in AIDS- und Krebsforschung sowie Erforschung polygenischer Krankheiten, die auf dem Zusammenspiel mehrerer Genprodukte beruhen.

4.1.2.4 Erforschung von Erbkrankheiten

Wir kennen heute über 4000 Krankheiten, die jeweils durch den Ausfall eines einzelnen Gens verursacht werden, davon etwa 1000 Erbkrankheiten. Mit Hilfe der Gentechnik lassen sich die Lage der betreffenden Strukturgene auf dem Chromosom lokalisieren und ihre Funktionsweise untersuchen.

Von Bedeutung sind daher diagnostische Untersuchungsmethoden, die zeigen können, ob die Krankheit von erkrankten Eltern an ihre Kinder weitergegeben worden ist. Es gibt auch bereits Möglichkeiten, die im *pränatalen Stadium überprüfen* können, ob das Gen aktiv oder defekt ist.

Die Kenntnis der Sequenz des Gens ermöglicht nicht nur die Herstellung von Sonden zur Identifizierung des Gendefekts, sondern liefert in naher Zukunft vielleicht auch Hinweise auf die biochemische Natur des Defekts, anhand welcher man dann eine mögliche Behandlung oder sogar Heilung ableiten kann.

Ein Begriff dazu ist der der *Genherapie*, bei der man durch gezielte Eingriffe ins Erbgut des Organismus die Mutationen, welche die Krankheit bedingen, beheben kann.

4.1.2.5 Der Kampf gegen AIDS

Die DNA-Rekombinationstechnik ist der Schlüssel zur Bekämpfung von HIV und der AIDS-Epidemie. In den wenigen Jahren seit Isolierung von HIV haben sich mit immenser Geschwindigkeit Erkenntnisse über das Virus und die Erkrankung selbst angesammelt. Die Schwierigkeiten, dieses Wissen nun klinisch umzusetzen, sei es in Arznei- oder Impfstoffen, dürfen aber nicht unterschätzt werden. Ein Ende dieser Schwierigkeiten ist leider noch nicht in Sicht.

4.1.2.6 Andere Anwendungsbereiche

- * Wahrscheinlich werden zukünftig in der Medizin bei der Therapie mehr und mehr **körper-eigene Substanzen** eingesetzt, z.B. Enkephaline als natürliche Schmerzstiller oder körpereigene Peptide als Blutdruckregler.
- * Weitere Bedeutung wird die Gentechnik auf dem Gebiet der **Diagnostik** erhalten. Es geht hier um die Herstellung diagnostischer Enzyme, wie z.B. die Glucose-Dehydrogenase zur Blutzuckerbestimmung oder monoklonaler Antikörper zur Diagnose von tumorartigen Erkrankungen.

4.2 Gentechnik bei Pflanzen und Tieren

Die DNA-Rekombinationstechnik bedeutet nicht nur im medizinischen Bereich einen Fortschritt; auch in der landwirtschaftlichen Biotechnologie gab sie den Anstoß zu vielen Entwicklungen bei Pflanzen und Tieren.

4.2.1 Pflanzen

Bei Pflanzen ist das Klonen für Züchter bereits eine alltägliche Methode. Aus einer manipulierten Pflanzenzelle kann man über den Kallus ohne weiteres die gesamte Pflanze regenerieren. Solcherart genetisch veränderte Pflanzen werden als *transgene Pflanzen* bezeichnet.

4.2.1.1 Infektionresistenz für Pflanzen

Für viele wichtige Nutzpflanzen stellen Pflanzenviren ein ernsthaftes Problem dar, weil die Infektionen Wachstum, Ertrag und Qualität der Nutzpflanzen beeinträchtigen.

Pflanzen, die man mit einem kaum schädlichen Virusstamm infiziert, lassen sich vor einer Infektion durch schädlichere Stämme schützen. Der Mechanismus dieses genetischen Tricks, der sogenannte **Kreuzschutz** (cross-protection) war lange nicht völlig geklärt. Man vermutete aber besondere Virusproteine, die für die schützende Wirkung verantwortlich sind. Mittels Klonierung viraler Nukleinsäuren, die für verschiedene Pflanzenvirusproteine codieren, konnte gezeigt werden, daß das schützende Agens das *Virushüllprotein* ist, das durch seine Expressierung eine Virusresistenz gegenüber anderen verwandten Viren bewirkt.

4.2.1.2 Pflanzenschutz vor Insektenbefall durch Bakterientoxine

Pflanzen können durch Insektenbefall von Schädigungen, die oft enorme Kosten verursachen, bedroht sein. Gegenwärtig sind chemi-

sche Insektizide die wichtigste Waffe gegen Schädlinge. Durch den Willen, den Einsatz der chemischen Pestizide zu verringern, und die Kenntnis von natürlichen Systemen pestizidproduzierender Mikroorganismen (z.B. verschiedene Stämme von *Bacillus thuringiensis Bt*) kamen die Gentechniker auf die Idee, Pflanzen zu züchten, die dieses Toxin der Mikroorganismen in ihren Zellen selbst bilden.

Das Bt-Toxin entfaltet seine Wirkung erst durch Bindung an die Oberflächenrezeptoren von Darmzellen der toxinempfindlichen Insektenlarven. Durch verschiedene Modifikationen des Gens und seinen Einbau in starke Expressionsvektoren gelang bis heute der Schutz gegen mehrere Schädlinge von Pflanzen. Gegenwärtig versucht man das Toxinprotein so zu verändern, daß es gegen ein breiteres Spektrum von Insektenarten wirksam ist.

Solcherart resistente Pflanzen könnten, wenn sie die strengen Sicherheitsanforderungen an die Freilandtests erfüllen, zum Einsatz kommen.

4.2.1.3 Pflanzen mit neuen Blütenfarben und -formen

Auch die Blumenindustrie hat es nicht verabsäumt, mit der DNA-Rekombinationstechnik zu experimentieren, um Pflanzen mit neuen Eigenschaften zu erzeugen. Mit der Möglichkeit, Gene in Pflanzen einzuschleusen und daraus Pflanzen zu regenerieren, kann man heute Blumen mit neuen Blütenfarben, Formen und Wachstumseigenschaften „erzeugen“.

4.2.1.4 Pflanzen als Proteinproduzenten

Durch die Entwicklung von Gentransfermethoden für Pflanzen stieg das Interesse, Pflanzen als Produzenten von Fremdproteinen zu verwenden. Bislang hat man nur Laborexperimente durchgeführt, um zu untersuchen, welche Pflanzenarten überhaupt in der Lage sind, Fremdproteine zu exprimieren. Es konnten bisher beispielsweise das menschliche Neuropeptid Enkephalin und menschliches Serumalbumin in Pflanzen exprimiert werden.

Bevor aber Pflanzen als Bioreaktoren mit den derzeit gebräuchlichen Systemen konkurrieren können, muß die Expressionsrate der Fremdproteine noch stark gesteigert werden.

4.2.2 Tiere

Im Gegensatz zu Pflanzen wird bei Wirbeltieren zwar die Zell- und Gewebezüchtung in vitro gut beherrscht, aber die Aufzucht vollständiger **transgener Tiere** durch Klonieren einer einzigen somatischen Zelle ist *nicht möglich*. Selbst eine Differenzierung solcher Zellen wird nur selten erreicht.

Dagegen ist die *Aufzucht von manipulierten Eizellen*, deren Genom durch eine Kerntransplantation verändert wurde, schon gelungen.

Auch das *Inserieren von neuen Genen in die Keimbahn* wurde bereits an Mäusen demonstriert. Einer Maus wurde das Gen für das Ratten-Wuchshormon stabil in die Chromosomen eingebaut. Als Folge davon wurde die transgene Maus doppelt so groß.

Bei Rindern kann man durch Behandlung mit gentechnisch hergestellten Rinderwachstumshormonen die Milchproduktion stimulieren, die Futtermittelverwertung verbessern sowie mageres Fleisch produzieren. Ähnliches gilt für Schweine.

Einem transgenen Tier, das natürlicherweise dieses Protein in großen Mengen produziert, braucht man diese Substanz nicht injizieren, wie man es beispielsweise heute bei Rindern noch tut. Daher ist man heute bestrebt, Methoden und Verfahren zu entwickeln, um *Transgene Nutztiere zu erzeugen*.

Wie bereits bekannt, gibt es zum Beispiel therapeutisch einsetzbare Proteine, die nicht aus Bakterienkulturen, sondern nur aus Kulturen mit Säugerzellen gewonnen werden können, da nur in ihnen das richtige, aktive Genprodukt entstehen kann. Die *Produktion von solchen Proteinen in Transgenen Tieren* könnte eine Alternative zu den teuren Zellkulturen sein.

4.2.3 Infektionsschutz für Tiere

Eine weitere Möglichkeit der Gentechnik wäre, ähnlich zu den Pflanzen, Nutztiere durch die transgene Expression viraler Hüllproteine vor Virusinfektionen zu schützen.

Die bislang beschriebenen Beispiele zeigen nur den Anfang dessen, was überhaupt möglich ist. Auch in Zukunft werden in der Grundlagenforschung neue molekulare Feinheiten enthüllt werden, die biologischen Prozessen zugrundeliegen. Und die Ergebnisse mancher dieser Versuche werden dann in der Praxis zur Anwendung kommen.

4.3 Ausblick in die Zukunft

Seit jeher befindet sich der Mensch auf der Suche nach dem Ursprung des Lebens. Die Genetik hat ihm ein probates Mittel für diese Suche in die Hand gegeben – die genetische Information. Die Gene enthalten die Information über ihre eigene Evolution, eine Evolution, die in strukturellen und organisatorischen Ähnlichkeiten zwischen Genen und in der Erhaltung funktionstragender Sequenzen mit ähnlichen Aufgaben zu finden ist.

Mit Hilfe der Gentechnik kann man die genetische Information der verschiedenen Organismen analysieren und feststellen, wie sich die Genome im Laufe der Evolution gewandelt haben. Dadurch lassen sich die verwandtschaftlichen Verhältnisse klären.

Daneben trug die Grundlagenforschung der Gentechnik sehr viel zum Verständnis der komplexen biologischen Systeme bei, wobei aber die große Fülle an Einzelheiten noch kein umfassendes Wissen darstellt. Im Gegenteil, die Unkenntnis überwiegt heute noch bei weitem das Wissen.

Auch die Anwendung der Gentechnik in der Biotechnologie steckt noch in ihren Anfängen. Die derzeitigen Erfolge knüpfen unmittelbar an den Fortschritt in der Grundlagenforschung an. Die bislang in diesem Kapitel beschriebenen Beispiele sind erst der Beginn dessen, was überhaupt einmal möglich sein wird, denn nur die Ideen der Wissen-

schafter lassen erahnen, wie beinahe grenzenlos die Möglichkeiten der Biotechnologie sind.

Aber gerade diese Grenzenlosigkeit der Möglichkeiten löst in großen Teilen der Öffentlichkeit, die der raschen Entwicklung der Gentechnik in der Biotechnologie, nicht zuletzt durch ihre Unwissenheit, mit einer gewissen Hilflosigkeit gegenübersteht, diverse Ängste und emotionale Ablehnung aus. Diese Ängste dürfen auf keinen Fall mißachtet werden, denn obwohl ich persönlich der Meinung bin, daß der Nutzen des neuen genetischen Wissens nicht geleugnet werden kann, wird dieser durch andere Bedenken oft relativiert:

- * Die natürliche Evolution der Arten hat weder Nützlinge noch Schädlinge definiert. Erst der Mensch hat zu seinem eigenen Vorteil die Lebewesen in oft zweifelhafte Kategorien eingeteilt. Die pränatale Diagnostik gibt ihm nun ein Mittel in die Hand, Fehlentwicklungen bereits am Embryo zu erkennen, die dann in einem Schwangerschaftsabbruch enden können. Aber egal, wie man zum Thema der Schwangerschaftsunterbrechung allgemein steht, muß man sich die Frage stellen, *was* die Normen für „krank oder lebenswert“ sind und vor allem *wer* diese Richtlinien, nach denen selektioniert werden soll, definieren kann oder darf. Ähnliches gilt für die Genthherapie in der Keimbahn, bei der die Veränderungen des Erbguts auf die folgenden Generationen weitergegeben werden.
- * Durch die Genomanalyse des Menschen im Humanen Genomprojekt wächst die Angst vor dem „gläsernen Menschen“. Die genetische Privatsphäre muß zu einem wichtigen Thema werden, um jedwede Art der Diskriminierung zu verhindern.
- * Die Unkenntnis überwiegt noch das Wissen. Dies gilt es zu bedenken, wenn es darum geht, ob das heutige Wissen über die Manipulationen in transgenen Pflanzen oder Tieren sowie über die verschiedensten Erregersysteme und deren Interaktionen in der neuen Umgebung ausreicht, um eine gefahrlose Freisetzung in der Umwelt garantieren zu können.

Die meisten dieser Ängste sind allerdings erst Probleme der vielleicht nahen Zukunft, da die Verwirklichung heute noch an der Begrenztheit der technischen Möglichkeiten scheitert.

Die Gentechnik birgt aber ein gewisses Risikopotential in sich, auf das die Wissenschaftler selbst gleich nach Bekanntwerden der neuen Möglichkeiten in der DNA-Rekombinationstechnik hingewiesen haben, und dem durch Beachtung von vorgeschriebenen Sicherheitsrichtlinien und Gentechnikgesetzen begegnet wird.

Obwohl nach fast zwanzigjähriger Erfahrung mit gentechnischen Experimenten festgestellt werden kann, daß von Trägern rekombinierter Nucleinsäuren kein nachweislich größeres Gefahrenpotential ausgeht, als dies durch die Eigenschaften des Empfängerorganismus, des Klonierungsvektors und der Spender-DNA angezeigt ist, muß der freiwillige Weg der Selbstkontrolle konsequent weitergegangen werden.

Es bedarf auch weiterhin einer *aktiven* Diskussion der ganzen Gesellschaft, um nicht in Zukunft von bereits bekannten oder heute noch unbekanntenen Problemen überrascht zu werden.

Glossar

Aminosäure, Baustein eines Proteins.

Anticodon, zum Codon komplementäres Nucleotidtriplet.

Antigen, ein Molekül, das, wenn es in den Organismus gelangt, zur Synthese eines Antikörpers führt.

Antikörper, ein vom Immunsystem gebildetes Protein, das ein bestimmtes fremdes Antigen erkennt und damit eine Immunantwort auslöst.

Bakteriophage, Virus, das Bakterien infiziert. Die DNA-Moleküle mancher Bakteriophagen dienen als Klonierungsvektoren.

Base, der variierende Teil eines Nucleotids. Man unterscheidet fünf Basen: Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin, Uracil

Basenpaarung, ein A-T oder G-C-Paar in einer DNA-Doppelhelix.

Biotechnologie, der Einsatz lebender Organismen in industriellen Prozessen.

cDNA, ein zu einer RNA komplementärer DNA-Einzelstrang, durch reverse Transkription entstanden.

Chromosom, abgegrenzter Teil des Genoms mit vielen Genen. Besteht aus nur einem DNA-Molekül und kann sich selbst unter bestimmten Umständen replizieren.

Codon, Nucleotidtriplett, das eine Aminosäure oder ein Terminationssignal codiert.

DNA-Klonierung, Einbau eines DNA-Fragments in einen Klonierungsvektor mit anschließender Vermehrung des rekombinierten DNA-Moleküls in einem Wirtsorganismus.

3'-Ende, jenes Ende der Polynucleotidkette, welches durch eine Hydroxylgruppe am 3'-C-Atom des Zuckermoleküls gebildet wird.

5'-Ende, jenes Ende der Polynucleotidkette, welches durch eine Phosphatgruppe am 5'-C-Atom des Zuckermoleküls gebildet wird.

Enzyme, Proteine, die als Katalysatoren stoffliche Umsetzungen in der Zelle beschleunigen.

Eukaryoten, höhere Organismen mit einem echten Zellkern.

Exon, genetisch aktiver DNA-Abschnitt der Gene von Eukaryoten, der in dem gespleißten m-RNA-Transkript noch vorhanden ist.

Expressionsvektor, Klonierungsvektor, der so gestaltet ist, daß ein eingebautes Fremdgen in dem Wirtsorganismus exprimiert wird.

Gen, DNA-Abschnitt, der eine RNA und/oder ein Proteinmolekül codiert.

Genetischer Code, beschreibt die Beziehung zwischen der Nucleotidsequenz der m-RNA und der Aminosäuresequenz des Proteins.

Genexpression, Umsetzung der genetischen Information in eine RNA oder ein Protein, das für eine bestimmte Eigenschaft verantwortlich ist; Transkription und Translation.

Genom, die gesamte Genausstattung eines Organismus.

- Genombibliothek**, eine Sammlung von klonierten DNA-Fragmenten, die zusammen alle Gene eines Organismus enthalten.
- Genprodukt**, umgesetzte Information eines Gens in Form einer funktionellen RNA-Sequenz oder eines fertig synthetisierten Proteins.
- Genregulation**, Steuerung der Genexpression.
- Gentechnik**, Experimentelle Verfahren zur Herstellung von DNA-Molekülen, die neue Gene oder Genkombinationen enthalten.
- Gentransfer, Genübertragung**, Einbringung von DNA in Zellen auf verschiedene Arten: Transformation, Transfektion, Transduktion, Konjugation, in vitro-Verpackung.
- Genotyp**, genetische Konstitution = Gesamtheit aller Erbfaktoren eines Organismus.
- Homologe Sequenzen**, Sequenzen mit einer ähnlichen (mindestens 85% Übereinstimmung) oder gleichen Nukleotidreihenfolge in ihrer Polynukleotidkette. Homologe Gene oder Chromosomen können miteinander rekombinieren.
- Induktoren**, kleine Moleküle, die, als äußeres Signal, an einen Repressor binden und die Transkription eines Gens vom Promotor aus in Gang setzen.
- Intron**, genetisch inaktiver DNA-Abschnitt in Genen von Eukaryoten, der transkribiert wird, der aber aus dem Transkript durch Speißen der angrenzenden Exons entfernt wird.
- In vitro-Verpackung**, Verpackung einer Fremd-DNA in Bakteriophagenpartikel und Einführung in eine Wirtszelle über den Weg der Transduktion.
- Kallus**, Zellhaufen, der sich in einer Kultur aus einer Pflanzenzelle entwickelt.
- Klon**, Population gleichartiger Zellen oder Moleküle, die mit einem gemeinsamen Vorläufer identisch sind.
- Klonierungsvektor**, Plasmid oder Bakteriophage, benutzt für Einbau von Fremd-DNA zum Zweck der Vermehrung oder der Produktion eines Proteins.
- Kompetent**, Eigenschaft einer Bakterienkultur, die so behandelt wurde, daß die Zellen freie DNA leichter aufnehmen können.
- Komplementär**, Eigenschaft zweier Polynukleotidketten, die sich durch Basenpaarung zu einem doppelsträngigen Molekül verbinden können.
- Konjugation**, „Paarung“ zwischen zwei Bakterien über eine vorübergehende Verbindung (Konjugationsbrücke), wobei es zu einem Austausch genetischen Materials von einer Zelle zur anderen kommt.
- Ligase**, Enzym, das in der Zelle zum Verknüpfen von DNA-Einzelstrangbrüchen durch die Bildung einer Phosphorsäurerest-Zuckerbindung zwischen den Nukleotiden dient.
- Lyse**, Tod eines Bakteriums durch Auflösung der Zellwand am Ende des Bakteriophagenzyklus.
- Mutation**, Änderung der Nukleotidsequenz eines Gens.
- Nuklease**, Enzym, das Nukleinsäuremoleküle schneiden kann.
- Nukleinsäuren**, aus Nukleotiden zusammengesetzte lineare Polynukleotidketten, die Träger der Erbinformation sind; DNA und RNA.
- Nukleinsäurehybridisierung**, Bildung eines doppelsträngigen Polynukleotidketten-Moleküls durch Basenpaarungen zwischen homologen oder komplementären Polynukleotiden.
- Nukleotid**, Bausteine einer Nukleinsäure; besteht aus mehreren Komponenten.
- Plaque**, durchsichtiger Bereich in einem trüben Bakterienrasen, der entsteht, weil die Zellen durch infektiöse Phagen lysiert werden.
- Plasmid**, autonomes, selbstreplizierendes, ringförmiges DNA-Molekül außerhalb des Chromosoms in einer Bakterienzelle.
- 5'-3'-Polarität**, in einer Polynukleotidkette, bedingt durch den Bau und die Verknüpfung der Nukleotide in der Kette.

Polymerase, Enzym, das einen neuen DNA- oder RNA-Strang anhand einer komplementären Nukleinsäuren-Matrize hinzusynthetisieren kann.

Polynukleotidkette oder -strang, kettenförmiges Verknüpfungsprodukt der Nukleotide.

Prokaryoten, niedere Organismen ohne echten Zellkern, z.B. Bakterien.

Protein oder Polypeptid, aus Aminosäuren aufgebaute polymere Moleküle, die vielfältige Funktionen in den Organismen übernehmen.

Proteinbiosynthese, Translation der Proteine an den Ribosomen.

Rekombination, Verbindung von DNA-Molekülen aus verschiedenen Quellen.

Replikation, identische Verdopplung der DNA.

Replikon, ein Nukleinsäuremolekül mit der Fähigkeit, sich selbst identisch zu vermehren.

Restriktionsendonuklease, Enzyme, die DNA-Moleküle sehr spezifisch immer an derselben Stelle schneiden können.

Ribosome, Orte der Proteinsynthese, Komplexe im Zytoplasma, die die Information der m-RNA in Proteine übersetzen.

Selektierbarer Marker, Gen in einem Klonierungsvektor, das einer Zelle, die dem Vektor oder ein von ihm abgeleitetes rekombiniertes DNA-Molekül enthält, eine erkennbare und selektierbare Eigenschaft verleiht.

Spleißen, Entfernen von Introns und Verbinden der Exons in der zu translatierende m-RNA von eukaryotischen Genen.

Transduktion, Übertragung eines Bakteriengens durch einen Phagen von einem Bakterium zum anderen.

Transfektion, Aufnahme von gereinigter Phagen-DNA durch kompetente Bakterienzellen.

Transformation, Aufnahme von freier, gelöster DNA durch kompetente Zellen einer Zellsuspension.

Transgen, Eigenschaft von vollständig transformierten höheren Organismen.

Transkription, Umschreibung der DNA in eine RNA-Arbeitskopie.

Translation, Übersetzung der Information der m-RNA in eine Aminosäuresequenz der Proteine an den Ribosomen.

Triplet, siehe Codon.

Vektor, siehe Klonierungsvektor.

Wirtszelle, Zelle als selbstständiger Organismus, die eine Wirtsfunktion für eine subzelluläre Struktur übernimmt, z.B. ein Virus oder Plasmid.

Zellzyklus, Zeitraum zwischen zwei Zellteilungen

Verwendete Literatur

1. BERG, Paul; 1993 *Die Sprache der Gene*, Spektrum, Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford
2. BROWN, Therenca A.; 1993 *Gentechnologie für Einsteiger*, Spektrum, Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford
3. GASSEN, Hans Günter; 1988 *Gentechnik*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York
4. HAHN, Helmut, Falke, Dietrich
5. KLEIN, Paul; 1994 *Medizinische Mikrobiologie*, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York
6. KAUEWITZ, Fritz; 1992 *Genetik*, Eugen Ulmer GmbH & Co, Stuttgart
7. KNIPPERS, Rolf; 1990 *Molekulare Genetik*, Georg Thieme-Verlag, Stuttgart
8. LEWIN, Benjamin; 1994 *Genes V*, Oxford University Press, Walton Street, Oxford
9. RENSING, Ludger; 1984 *Allgemeine Biologie*, Eugen Ulmer GmbH & Co, Stuttgart
10. RUSSEL, Peter J.; 1992 *Genetics*, Harper Collins Publishers, New York
11. SCHLEGEL, Hans G.; 1992 *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, SINGER, Maxine
12. BERG, Paul; 1991 *Genes & Genomes*, University Science Books, Mill Valley, California
13. WATSON, James D.; 1992 *Recombinant DNA*, W.H. Freeman and Company, New York and Oxford
14. WINNACKER, Ernst Ludwig; 1990 *Gene und Klone*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim