

# Inhalt

<b>Vorwort</b> .....	<b>7</b>
<b>A Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1. Was ist Vererbung? .....	9
2. Anlage und Umwelt .....	10
2.1 Variabilität (Variationsbreite) .....	10
2.2 Modifikabilität (Modifikation) .....	11
3. Zusammenfassung .....	13
<b>B Klassische Genetik</b> .....	<b>14</b>
1. Die MENDEL'schen Regeln .....	14
1.1 Die erste MENDEL'sche Regel .....	14
1.2 Die zweite MENDEL'sche Regel .....	15
1.3 Genetische Deutung der MENDEL'schen Regeln .....	17
1.4 Rekombinationsquadrate .....	19
1.5 Die Rückkreuzung .....	20
1.6 Überlegungen zur Gültigkeit .....	21
2. Die MENDEL'schen Regeln beim Menschen .....	22
2.1 Das ABO-Blutgruppensystem .....	22
2.2 Die Vererbung des Rhesusfaktors .....	24
2.3 Schmecker .....	25
3. Die dritte MENDEL'sche Regel .....	27
4. Genkopplung .....	30
5. Abweichungen von den MENDEL'schen Regeln .....	31
5.1 Polygenie .....	32
5.2 Polyphänie (Pleiotropie) .....	33
6. Zusammenfassung .....	34
<b>C Chromosomen und Vererbung</b> .....	<b>35</b>
1. Die Bedeutung des Zellkerns .....	35
2. Zelldynamik und Zellteilung (Mitose) .....	37
2.1 Der Zellzyklus .....	37
2.2 Die Abschnitte der Interphase .....	38
2.3 Der Ablauf der Mitose .....	39
3. Geschlechtliche Vererbung .....	40
3.1 Die Reifeteilung (Meiose) .....	40
3.1.1 Der Ablauf der Meiose .....	40
3.1.2 Die Funktion von Shugoshin .....	43
3.1.3 Das Phänomen der Chiasmenbildung .....	43
3.2 Spermatogenese und Oogenese beim Menschen .....	45
3.2.1 Die Spermatogenese .....	45
3.2.2 Die Oogenese .....	45
3.3 Vererbung des Geschlechts beim Menschen .....	46
3.4 Geschlechtsdetermination .....	47
3.5 X-chromosomale Vererbung .....	48

4.	Die Chromosomentheorie der Vererbung .....	51
4.1	Genkopplung und Genaustausch .....	51
4.2	Genkartierung .....	53
5.	Chromosomenmutationen .....	56
6.	Genommutationen .....	58
6.1	Euploidie (Polyploidie) .....	58
6.2	Aneuploidie .....	58
6.2.1	Trisomie 21 .....	59
6.2.2	TURNER-Syndrom (XO) .....	60
6.2.3	KLINFELTER-Syndrom (XXY) .....	61
7.	Zusammenfassung .....	62
<b>D</b>	<b>Humangenetik .....</b>	<b>63</b>
1.	Stammbaumanalysen .....	66
2.	Genetische Beratung und pränatale Diagnose .....	74
3.	Populationsgenetischer Aspekt .....	77
3.1	HARDY-WEINBERG-Gesetz .....	77
3.2	Risiken für Nachkommen aus Verbindungen zwischen Verwandten .....	80
4.	Zusammenfassung .....	82
<b>E</b>	<b>Genetik der Bakterien und Viren .....</b>	<b>84</b>
1.	Bakterien und Viren als genetische Versuchsobjekte .....	84
2.	Konjugation und Rekombination bei Bakterien .....	85
3.	Bau und Vermehrung von Bakteriophagen .....	88
4.	Transduktion .....	90
5.	Transformation – DNA als stofflicher Träger der Erbinformation .....	91
6.	Zusammenfassung .....	94
<b>F</b>	<b>Molekulargenetik .....</b>	<b>95</b>
1.	Struktur von Nukleinsäuren .....	95
1.1	Die Bausteine der Nukleinsäuren .....	95
1.2	Das WATSON-CRICK-Modell der DNA .....	96
1.3	Die „Verpackung“ der DNA .....	98
2.	Die Replikation der Erbinformation .....	100
2.1	Das Grundprinzip der Replikation .....	100
2.2	Der Beweis für den semikonservativen Mechanismus der Replikation .....	101
2.3	Der Ablauf der DNA-Replikation im Detail .....	103
2.4	Schmelzen und Hybridisieren von DNA .....	105
3.	Die molekulare Wirkungsweise der Gene .....	106
3.1	Die Ein-Gen-ein-Enzym-Hypothese .....	106
3.2	Die Proteinbiosynthese bei Prokaryonten .....	108
3.2.1	Der genetische Code (Teil 1) .....	109
3.2.2	Die Transkription .....	110
3.2.3	Die Translation .....	112
3.2.4	Der genetische Code (Teil 2) .....	114
3.3	Die Proteinbiosynthese bei Eukaryonten .....	117
3.3.1	Mosaikgene .....	118
3.3.2	Die Prozessierung der m-RNA .....	119
3.3.3	Besonderheiten der Translation .....	120

4. Genmutationen .....	121
4.1 Punktmutationen beim Menschen .....	123
4.1.1 Albinismus .....	123
4.1.2 Phenylketonurie (PKU) .....	123
4.1.3 Mukoviszidose .....	125
4.2 Ursachen und Häufigkeit von Mutationen .....	127
4.3 DNA-Reparatur .....	128
5. Regulation der Genaktivität .....	129
5.1 Modelle der Genregulation bei Prokaryonten .....	129
5.1.1 Anschalten der Enzymproduktion (Substratinduktion) .....	130
5.1.2 Abschalten der Enzymproduktion (Endproduktrepression) .....	132
5.1.3 Anschalten der Enzymproduktion mithilfe eines Aktivators .....	133
5.2 Modelle der Genregulation bei Eukaryonten .....	134
6. Krebs .....	135
6.1 Kontrollmechanismen der Zellteilung .....	136
6.2 Unkontrollierte Zellteilung bei Krebs .....	137
7. Zusammenfassung .....	140
<b>G Gen- und Reproduktionstechnik .....</b>	<b>142</b>
1. Grundlagen der Gentechnik .....	142
1.1 Restriktionsenzyme .....	144
1.2 Plasmide als Vektoren .....	146
1.3 Transformation und Selektion .....	148
1.4 Methoden der Gen-Gewinnung .....	149
1.5 Die Analyse von DNA .....	150
1.5.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	150
1.5.2 Methoden der Sequenzanalyse .....	152
1.5.3 Genomanalyse .....	154
2. Anwendungsbereiche der Gentechnik .....	156
2.1 Arzneimittelherstellung: Insulin aus Bakterien .....	156
2.1.1 Insulin-Herstellung in der Bauchspeicheldrüse .....	156
2.1.2 Insulin-Herstellung in umprogrammierten Bakterien .....	158
2.2 Medizin: Gendiagnose und Gentherapie .....	160
2.3 Tierzucht: Einsatz von Wachstumshormonen .....	164
2.4 Pflanzenzucht: Transgene Kulturpflanzen .....	165
2.4.1 Natürlicher Gentransfer durch Agrobakterien .....	166
2.4.2 Gentransfer mit und ohne Vektoren .....	167
3. Reproduktionstechnik .....	168
3.1 Methoden der künstlichen Befruchtung .....	168
3.2 Klonen mit Stammzellen .....	169
4. Zusammenfassung .....	170
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>172</b>
<b>Lösungsteil .....</b>	<b>173</b>
<b>Glossar .....</b>	<b>195</b>
<b>Register .....</b>	<b>202</b>



# Gen- und Reproduktionstechnik

Die Erkenntnisse der Molekulargenetik beruhten in der Anfangszeit ausschließlich auf der Analyse des genetischen Materials von Bakterien und Viren (besonders Bakteriophagen, *vgl. Kap. E*). Seit Anfang der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts haben sich die Methoden zur Untersuchung von Genen dramatisch verändert: DNA kann nunmehr gezielt **zerlegt, vermehrt, neu kombiniert** und in Empfängerzellen **exprimiert\*** werden. Diese Methoden werden in ihrer Gesamtheit als **Gentechnik** bezeichnet. Durch die neuartigen biochemischen sowie zell- und molekularbiologischen Verfahren lassen sich nun auch die Gene von Pflanzen, Tieren und Menschen analysieren.

Gentechnische Methoden lassen sich aber auch **anwenden, um Lebewesen gezielt genetisch umzuprogrammieren**, d. h., ihnen „fremde“ Gene einzupflanzen und ihnen damit neue, vom Menschen gewünschte Eigenschaften zu verleihen. So wird heute bei der Behandlung der „Zuckerkrankheit“ (Diabetes mellitus) Insulin eingesetzt, das mit dem

menschlichen Insulin absolut identisch ist (Humaninsulin), aber in großtechnischem Maßstab von Bakterien hergestellt wird (*vgl. Kap. G.2.1*).

Der Begriff „Gentechnik“ wird also in zwei verschiedenen Bedeutungen verwendet; er bezeichnet:

- Methoden und Verfahren, mit denen Struktur und Funktion des genetischen Materials der Organismen analysiert werden (**Grundlagenforschung**);
- Methoden und Verfahren zur gezielten Neuprogrammierung von Lebewesen zum Zwecke der industriellen Nutzung (**Anwendung der Gentechnik**).

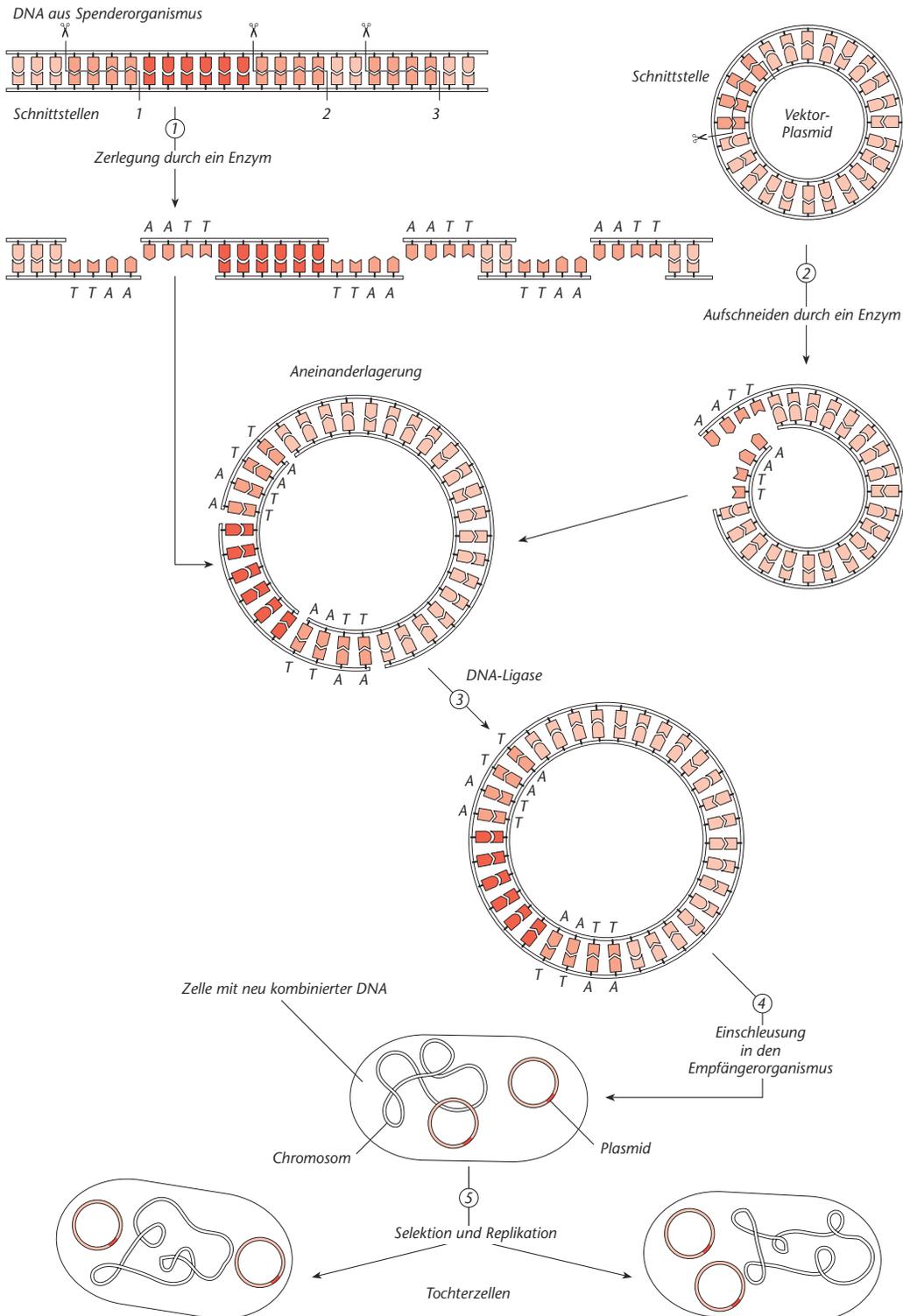
In der öffentlichen Diskussion ist auch immer wieder von „Gentechnologie“ die Rede. Sprachlich korrekt ist mit „Gentechnologie“ nur die Erforschung der Methoden zur Neukombination von DNA, mit „Gentechnik“ aber die Anwendung dieser Methoden in Forschung und Technik gemeint. In diesem Sinne verwenden wir hier nur den Begriff Gentechnik.

## 1. Grundlagen der Gentechnik

1973 erschien in einem amerikanischen Wissenschaftsmagazin ein Artikel von STANLEY COHEN und Mitarbeitern über ein Experiment, das als die Geburtsstunde der Gentechnik angesehen wird: Es war ihnen gelungen, **im Reagenzglas (in vitro\*) DNA-Fragmente aus zwei verschiedenen Bakterienarten neu miteinander zu kombinieren** und in *E. coli* ein-

zuschleusen. Die DNA-Fragmente enthielten die Gene für die Resistenz gegenüber zwei verschiedenen Antibiotika. Nach der „Operation“ waren die **transgenen\*** Coli-Bakterien gegen beide Antibiotika resistent.

Es sind immer fünf grundlegende Schritte, die durchgeführt werden, damit fremde DNA in eine Zelle eingeschleust werden kann.



Grundoperationen beim Einschleusen fremder DNA (Plasmide bestehen in Wirklichkeit aus sehr viel mehr Basenpaaren.)

Die Abbildung auf der letzten Seite zeigt:

- ① Die DNA aus dem Spenderorganismus wird isoliert und mithilfe eines Enzyms in kleinere Fragmente zerlegt.
- ② Ein geeignetes Transportmolekül (ein **Vektor\***) wird isoliert und mithilfe des gleichen Enzyms für den Einbau der Spender-DNA aufgeschnitten.
- ③ Spender-DNA und Vektor-DNA werden mithilfe von DNA-Ligase (vgl. Kap. F.2.3) **verbunden**.
- ④ Die neu kombinierte DNA wird mit einem geeigneten Verfahren in die Zellen eines Empfängerorganismus **eingeschleust**.
- ⑤ Die Zellen, die die neu kombinierte DNA aufgenommen haben, werden **ausgelesen** (selektiert) und **vermehrt**.

Was dann mit den transgenen Zellen weiter passiert, hängt von der Zielsetzung des Experiments ab:

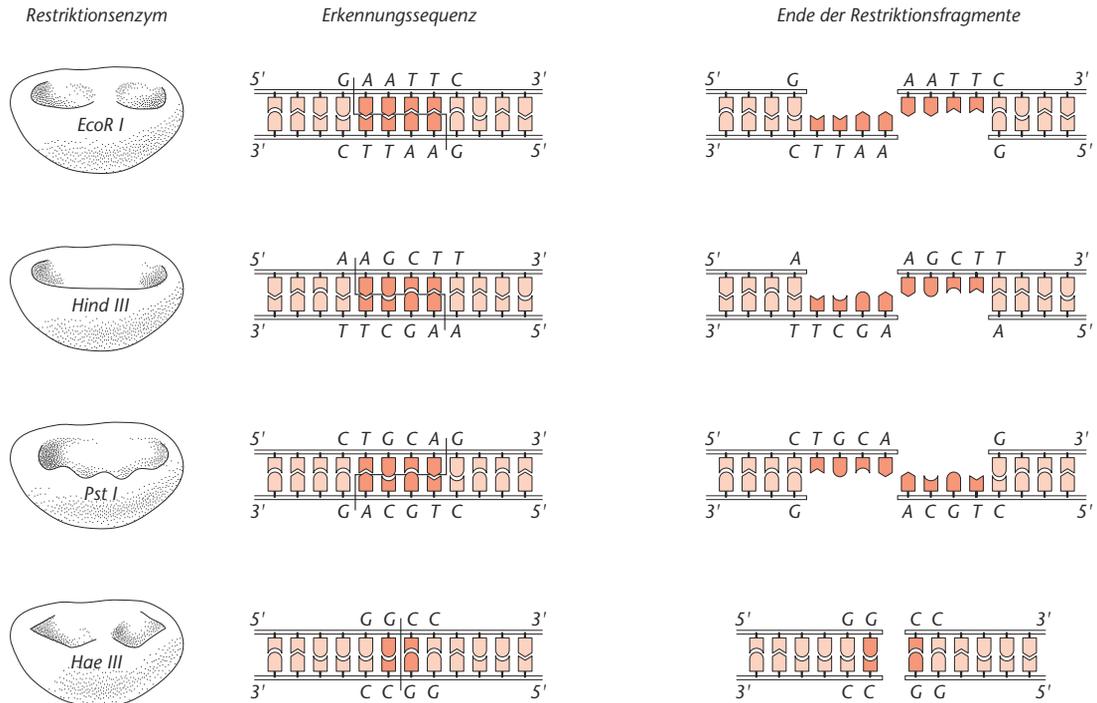
- Ist das Ziel, größere Mengen der eingeführten Fremd-DNA zu gewinnen, müssen die Einzelzellen vermehrt werden; die Fremd-DNA wird anschließend daraus isoliert.
- Geht es um die Gewinnung einer größeren Menge des Proteins, das von der Fremd-DNA kodiert wird, müssen ebenfalls die Einzelzellen vermehrt und zur Genexpression angeregt werden (vgl. Kap. G.2.1).
- Ist das Ziel, einem höheren Lebewesen (z. B. einer Pflanze) eine neue Eigenschaft zu verleihen, werden aus den einzelnen transgenen Zellen mehrzellige Organismen regeneriert (vgl. Kap. G.2.4).

In allen Fällen entstehen Zellen mit identischer Erbinformation, die als **Klone\*** bezeichnet werden. Dementsprechend wird dieses Verfahren auch als **Genklonierung** bezeichnet.

## 1.1 Restriktionsenzyme

Sowohl das **Zerlegen der Fremd-DNA** aus dem Spenderorganismus in Fragmente geeigneter Größe (Schritt ①) als auch das **Aufschneiden der Transport-DNA** zum Einfügen des Spender-DNA-Fragments (Schritt ②) erfolgt durch ein spezielles Enzym, das aus Bakterien gewonnen werden kann. Die Bakterien schützen sich mithilfe dieses Enzyms vor eingedrungener Fremd-DNA, z. B. der DNA von Bakteriophagen (vgl. Kap. E.4). Dazu wird die Phagen-DNA durch das Enzym in Bruchstücke zerlegt („zerschnitten“); die betroffenen Bakteriophagen können sich in diesen Bakterien in der Regel nicht vermehren. Nur einem von 10 000 Phagen gelingt die Vermehrung. Wegen dieser Einschränkung (**Restriktion\***) der Phagenvermehrung werden die entsprechenden Enzyme als **Restriktionsenzyme\*** bezeichnet. (Exakt heißen sie Restriktionsendonukleasen, weil sie DNA nicht vom Ende her, sondern von innen abbauen.)

Die **Schnittstellen**, die von den Restriktionsenzymen erkannt und „angegriffen“ werden, sind bei jeder Enzymart **hochspezifisch**; die Erkennungssequenzen einiger Restriktionsenzyme sind in der Abbildung auf S. 145 dargestellt. Das Besondere der **Erkennungssequenzen** besteht darin, dass sie eine spezielle Form der **Symmetrie** zeigen: Wird die Sequenz um 180° gedreht, hat man wieder die gleiche Basenfolge vor Augen. (Sie können das selbst durch Drehen des Buches ausprobieren.) Ähnliche Strukturen sind aus unserer Sprache bekannt: Wörter, die rückwärts gelesen denselben Sinn ergeben (z. B. stets, Regallager, Reliefpfeiler); sie werden als **Palindrom\*** bezeichnet. Bei den Erkennungssequenzen der DNA besteht das Palindrom darin, dass vom 5'-Ende des einen Strangs die gleiche Basensequenz existiert wie vom 5'-Ende des komplementären Strangs.



Erkennungssequenzen und „Schnittmuster“ einiger gebräuchlicher Restriktionsenzyme

Die **Benennung** eines Restriktionsenzym richtet sich nach den Bakterien, aus denen es isoliert wurde: Eco steht für *Escherichia coli*, Hae für *Haemophilus aegypticus*, Hin für *Haemophilus influenzae*. Der Buchstabe R hinter Eco bezeichnet den Bakterienstamm RY 13, das d hinter Hin den Stamm Rd und die römische Ziffer kennzeichnet die zeitliche Reihenfolge ihrer Entdeckung.

Alle Restriktionsenzyme greifen die Zucker-Phosphat-Verbindungen der DNA an und spalten beide Stränge. Die beiden Schnitte erfolgen hochspezifisch zwischen den gleichen Nukleotiden (z. B. bei HaeIII zwischen G und C) und liegen bei manchen Enzymen (z.B. wiederum bei HaeIII) so genau gegenüber, dass „**glatte**“ **Enden** entstehen (vgl. *Abb. oben*). Bei den meisten Enzymen sind allerdings die Einzelstrangsnitte um einige Basenpaare versetzt (z. B. bei EcoRI um vier Basenpaare), sodass nach dem Schnitt ein-

zelsträngige Enden stehen bleiben. Da diese Einzelstrangenden zueinander komplementär sind, d. h. sich wegen der Basenpaarung wieder zusammenfinden können, werden sie als „**klebrige**“ **Enden** bezeichnet.

Inzwischen sind mehr als 300 verschiedene Restriktionsenzyme aus über 200 verschiedenen Bakterienstämmen bekannt. Damit steht für die Gentechnik ein breites Repertoire an Enzymen zum **Zerschneiden von DNA beliebiger Herkunft in Fragmente beliebiger Größe** zur Verfügung.

Die Bakterien **schützen ihre eigene DNA** vor dem „Angriff“ durch die Restriktionsenzyme, indem die Erkennungsstellen durch eine chemische Veränderung (Methylierung) „getarnt“ werden. Da die Methylierung „versehentlich“ auch an der DNA einiger weniger Phagen vorgenommen wird, entgehen diese dem Angriff des Restriktionsenzym und können sich vermehren.

## 1.2 Plasmide als Vektoren

Bis vor kurzem waren Gentechniker davon überzeugt, dass fremde DNA nicht ohne Transportmittel (sozusagen „nackt“) in einen Empfängerorganismus einzubringen sei, da sie sonst nicht repliziert und auch nicht exprimiert werden könne. Deshalb suchten sie nach geeigneten Methoden, Fremd-DNA einzuschleusen. Jahrelang verwendeten sie bestimmte DNA-Moleküle als **Vektoren**. Inzwischen wird Fremd-DNA auch ohne Vektoren erfolgreich in Empfängerorganismen verfrachtet.

Ein Vektor eignet sich als Transportmittel (als „Genfähre“), wenn er folgende **Eigenschaften** erfüllt:

- Er muss sich möglichst einfach mittels Dichtegradientenzentrifugation **isolieren** lassen.
- Er muss eine Replikations-Startstelle (*ori* von „*origin of replication*“) besitzen, um sich **eigenständig zu replizieren**.
- Er sollte **nicht zu groß** sein (weniger als 10 000 Basenpaare).
- Er muss geeignete **Schnittstellen für Restriktionsenzyme** besitzen, um den Einbau von Fremd-DNA zu ermöglichen.
- Er muss der Empfängerzelle einen selektiven Vorteil verschaffen; damit können die Zellen, die den Vektor aufgenommen haben, **ausgelesen** und **gezielt vermehrt** werden.

Diese Voraussetzungen gelten für **Klonierungsvektoren**, mit deren Hilfe Fremd-DNA eingeschleust und vermehrt werden kann.

### Aufgabe

Go1

Soll die eingeschleuste Fremd-DNA exprimiert, d.h. zur Herstellung des kodierten Proteins veranlasst werden, muss die Transkription der Fremd-DNA angeschaltet werden. Über welche zusätzlichen DNA-Sequenzen muss ein solcher Expressionsvektor verfügen?

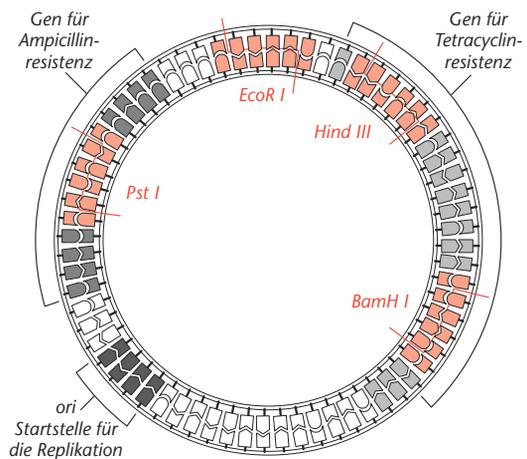
Die gebräuchlichsten Vektoren können (wie die Restriktionsenzyme) aus Bakterien gewonnen werden. Es handelt sich um kleine, ringförmige DNA-Moleküle, die neben dem Hauptchromosom vorkommen. Sie werden als **Plasmide\*** bezeichnet (vgl. Kap. E.2). Die Gene, die auf Plasmiden lokalisiert sind, kodieren niemals für wesentliche Zellfunktionen, sondern verleihen den Bakterien **zusätzliche Eigenschaften**, die die Bakterien zu ungewöhnlichen Stoffwechselleistungen befähigen. Sie ermöglichen ihnen dadurch das Überleben unter besonderen Umweltbedingungen:

- Eine dieser Eigenschaften ist die Fähigkeit, **Laktose statt Glukose** zu verwerten (vgl. Kap. F.5.1). Die Gene für die Laktose-Verwertung (das *lac*-Operon) befinden sich nicht auf dem Hauptchromosom, sondern auf einem Plasmid.
- Eine weitere in der Humanmedizin gefürchtete Eigenschaft ist die **Antibiotika-Resistenz**. Bakterien, die solche Resistenzgene besitzen, überleben eine Behandlung, indem sie das Antibiotikum entweder abbauen oder dessen Aufnahme verhindern.

- Einige Plasmide besitzen Gene, die dafür sorgen, dass eine Kopie der Plasmid-DNA in eine andere Bakterienzelle eingeschleust wird, die dann die übertragene Information nutzen kann. Diese Transfergene steuern die Kontaktaufnahme und die Ausbildung einer Plasmabrücke mit der Partnerzelle (Konjugation, vgl. Kap. E.2) sowie die Herstellung und Übertragung einer einsträngigen Kopie der Plasmid-DNA. (Das bekannteste Plasmid dieser Art haben wir in Kap. E.2 vorgestellt, den F-Faktor.) Auf diese Weise können auch Antibiotika-Resistenzgene zwischen Bakterien ausgetauscht werden (**horizontaler Gentransfer\***), sodass es zu Mehrfach-Resistenzen kommen kann. Durch dieses Phänomen werden viele gebräuchliche Antibiotika immer unwirksamer; leider wird diese Entwicklung durch den unkritischen Gebrauch von Antibiotika (z. B. bei leichten Infekten, Erkältungen und Virusinfektionen) begünstigt.

In der Gentechnik werden entweder **natürliche** Plasmide verwendet, wie sie „in der Natur“ vorkommen, oder **konstruierte** Plasmide, die aus natürlichen hervorgehen, indem man ihnen einige gewünschte Gene einbaut, z. B. eine Replikationsstartstelle, Antibiotika-Resistenzgene oder Schnittstellen für mehrere Restriktionsenzyme (ein so genannter „polylinker“). Solche Plasmide werden dann nach ihrem Hersteller bezeichnet: pSC101 ist das Plasmid, das STANLEY COHEN bei seinem historischen Experiment benutzte (vgl. Kap. G.1).

Ein häufig benutztes konstruiertes Plasmid (**pBR 322**) zeigt die folgende Abbildung: Es handelt sich dabei um ein **Konstrukt** aus einem Plasmid von *E. coli*, das die **Replikationsstartstelle** (*ori*) enthält, ergänzt um ein **Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Tetracyclin** (*Tc<sup>r</sup>*) aus dem Plasmid pSC101 und ein weiteres **Gen für die Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin** (*Ap<sup>r</sup>*). Beide Resistenzgene enthalten mehrere Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme. Durch Behandlung mit einem bestimmten Restriktionsenzym wird das ringförmige Plasmid geöffnet (linearisiert) und die zu klonierende Fremd-DNA kann sich einfügen.



Das Plasmid pBR 322

### Aufgabe

G02

Weshalb sollte ein Plasmid nicht mehr als eine Schnittstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym besitzen?