

Genmanipulation : Grundlagen, Methoden, Anwendung

Autor(en): **Zeyer, Josef**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Schule**

Band (Jahr): **71 (1984)**

Heft 13: **Genmanipulation : Grundlagen, Methoden, Anwendung**

PDF erstellt am: **12.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-532708>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Genmanipulation:

Grundlagen, Methoden, Anwendung

Josef Zeyer

Vorbemerkungen

Die Biologie erfährt heute eine grosse Publizität. Während sich die klassische Biologie darauf beschränkte, lebende Systeme zu beschreiben, wird heute in der Molekularbiologie versucht, mit genetischen Methoden Funktionsabläufe in lebenden Systemen gezielt zu beeinflussen. Die erstaunlichen Ergebnisse dieser Arbeiten machen häufig Schlagzeilen und beflügeln die Phantasie vieler Leute. Hin und wieder werden aber auch Gefühle der Ohnmacht genährt. Man befürchtet, nicht verstehen zu können, was vor sich geht und den sogenannten Experten völlig ausgeliefert zu sein. So wie die Nuklearphysik ist auch die molekulare Genetik eine umstrittene Wissenschaft mit einem sehr grossen Potential zu positiven und negativen Entwicklungen.

Es ist nicht das Ziel des vorliegenden Artikels, weitere Schlagzeilen zu verbreiten und noch mehr Utopien oder Ängste zu nähren. Es geht auch nicht darum, Vor- und Nachteile der molekularen Genetik gegeneinander abzuwägen und Werturteile zu fällen. Vielmehr soll versucht werden, in drei Kapiteln die biologischen Grundlagen, die verwendeten Methoden und die praktischen Anwendungen der molekularen Genetik sachlich darzustellen.

Dabei wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Kapitel im wesentlichen unabhängig voneinander gelesen werden können. Kommt also jemandem das Kapitel «Biologische Grundlagen» etwas «spanisch» vor, soll er sich nicht entmutigen lassen. Spätestens der Beitrag «Anwendung der molekularen Genetik in der Praxis» ist wieder auf deutsch abgefasst. Insbesondere die Abschnitte 1.5. und 2.6. sind etwas schwierig zu verstehen. Der Text wurde bewusst nur mit einem Minimum von chemischen Begriffen belastet. Obwohl die molekulare Genetik eine sehr junge Wissenschaft ist, füllt die einschlägige Literatur bereits Bibliotheken. Eine knappe Darstellung des Themas auf zwei Dutzend Seiten ist somit notgedrungen sehr lückenhaft und stark vereinfachend. Viele Teilgebiete wie Virologie und Zellfusionen konnten aus Platzgründen nicht erwähnt werden.

Im Zusammenhang mit der heutigen Genetik tauchen sehr viele neue Worte auf und nur wenige sind genau definiert. «Genmanipulation» ist wohl der bekannteste Begriff und er wurde deshalb im Titel dieses Beitrages verwendet. In der Bezeichnung «Genmanipulation» schwingt aber viel Frankenstein-Atmosphäre mit und das Wort ist etwas in Verruf geraten.

Der Begriff «Biotechnologie» ist sehr umfassend. Er beschreibt Prozesse, bei denen Genetik, Mikrobiologie, Biochemie und Verfahrenstechnik zusammen eingesetzt werden, um das Potential der Biologie industriell verwerten zu können. Penicillin und Interferon sind typische biotechnologische Produkte. Da der vorliegende Beitrag im wesentlichen den Verlauf und die gezielte Beeinflussung der Vererbung auf der Ebene der Moleküle beschreibt, wurde meistens der Begriff «Molekulare Genetik» verwendet. Biotechnologische Prozesse wurden nur am Schlusse zur Illustration erwähnt.

In diesem Artikel werden Experimente an Mikroorganismen recht häufig, Arbeiten mit Pflanzen und Tieren jedoch nur am Rande erwähnt. Der Grund liegt darin, dass die meisten Erkenntnisse in der molekularen Genetik an Hand von Mikroorganismen gewonnen wurden. Da der Aufbau von Mikroorganismen im Vergleich zu pflanzlichen und tierischen Zellen relativ einfach ist, eignen sie sich sehr gut als Studienobjekte. Auch in der Praxis werden bevorzugt Mikroorganismen zur Produktion von Stoffen eingesetzt. Genetische Arbeiten mit Pflanzen und Tieren stehen noch weitgehend am Anfang – ganz zu schweigen von Experimenten mit Menschen. Beim Menschen können einige genetische Defekte mit Hilfe des Amniozentestests diagnostiziert werden, von einer Behebung dieser Defekte in der Erbanlage ist man aber noch weit entfernt. Es gelingt auch, menschliche oder tierische Ei- und Samenzellen im Reagenzglas zu verschmelzen und Embryos zu transferieren. In Experimenten dieser Art wird aber das Erbgut nicht verändert, und sie haben mit Genetik sehr wenig zu tun. Wohl finden sich in der Natur viele Konstruktionsprinzipien und chemisch-physikalische Prozesse, die allen Lebewesen gemeinsam sind. Die höheren vielzelligen Organismen sind aber dermassen kompliziert aufgebaut, dass sie experimentell nur sehr schwer oder überhaupt nicht erfasst werden können. Diese Tatsache wird oft vergessen und Ergebnisse von Mikroorganismen werden voreilig auf Menschen übertragen. So gelangt man sehr schnell in Huxley's «Schöne Neue Welt», in der «Supermenschen» gezüchtet werden. An diesem Punkt beginnt dann auch das Unbehagen der molekularen Genetik gegenüber.

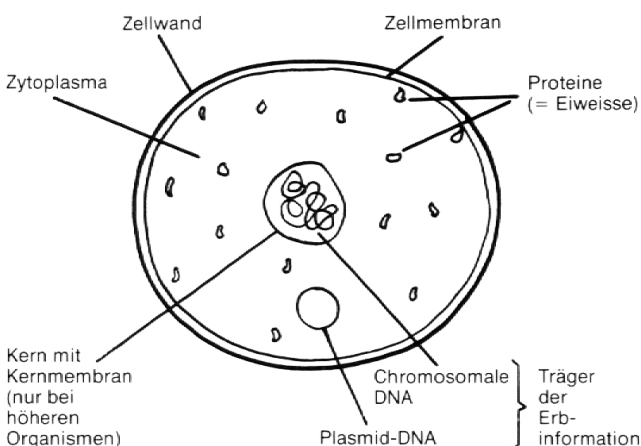
Das Stichwort «Supermensch» ist gefallen. «Supermenschen» und durchgebrannte «Killer-Organismen» sind offensichtlich einträgliche Filmthemen. Aus den soeben besprochenen Gründen ist es aber äusserst schwierig, sie im Labor zu produzieren. Gelänge es dennoch, so würden sie wohl von der Natur schnell eliminiert, wie kurz dargelegt werden soll. Laut der darwinistischen Evolutionstheorie produziert die Natur fortwährend neue genetische Variationen und prüft sie auf ihre Tauglichkeit. In der molekularen Genetik wird das ähnlich gemacht, nur werden dort die Neukombinationen etwas zielgerichteter konstruiert. Es darf aber angenommen werden, dass praktisch jede im Labor erzeugte Neukonstruktion in der Natur im Verlaufe der Jahrmilliarden auch längst mehrfach erzeugt und auf ihre Tauglichkeit geprüft wurde. Beispielsweise wurde der oft zitierte Mikroorganismus, der von Erdöl leben kann, im Labor tatsächlich gezüchtet. Man beabsichtigte, diesen Organismus bei Öltanker-Unfällen zur Beseitigung der Verschmutzung einzusetzen. Damit wurden aber auch Befürchtungen geweckt, der Organismus könnte ausser Kontrolle geraten und weltweit alle Erdölvorräte zerstören. Wäre aber dieser Organismus fähig, ganze Erdölfelder «aufzufressen», so hätte er einen gewaltigen Selektionsvorteil. Er wäre somit im Verlaufe der Evolution längst entstanden und hätte sich erfolgreich vermehrt. Die Tatsache, dass es diesen Organismus in der Natur praktisch nicht gibt, belegt, dass er unter natürlichen Bedingungen nicht lebensfähig ist. Es zeigte sich, dass die mit den Methoden der molekularen Genetik gezüchteten Organismen sehr anspruchsvoll sind und eine genau definierte und konstante (in Hinsicht auf Temperatur, pH-Wert, Nährstoffe, Belüftung usw.) Umgebung erfordern. Einzuwenden ist allerdings, dass man auch für einen «Supermenschen» eine genau definierte Umgebung schaffen könnte, die ihm einen selektiven Vorteil gibt. Die «Supermenschen» würden sich nicht mehr nach der Umgebung richten, sondern die Umgebung würde auf die Bedürfnisse der «Supermenschen» zugeschnitten. Das wäre die Umkehrung des Prinzips der Evolution. Die Natur selektioniert nicht mehr die Lebewesen, sondern die Lebewesen selektionieren die Natur. Ist diese Idee eigentlich so sehr utopisch...?

1. Biologische Grundlagen

1.1. Aufbau einer Zelle

Die äussere Erscheinungsform von Lebewesen ist sehr vielfältig, und auf den ersten Blick hat ein Mensch mit einem Bakterium so wenig zu tun wie eine Pflanze mit einer Hefezelle. Untersucht man aber die einzelnen Lebewesen genauer, so findet man, dass alle Organismen aus Zellen aufgebaut sind. Viele Organismen (z.B. Bakterien, Hefen, Pantoffeltierchen) bestehen nur aus einer einzigen Zelle und sie werden deshalb Einzeller genannt. Im Verlaufe der Evolution haben sich aus Einzelzellen aber auch sehr komplexe Zellverbände gebildet, die sich im Zeitraum von rund einer Milliarde Jahren zu Pflanzen, Tieren und Menschen entwickelten. Die Gestalt der einzelnen Zellen hat sich dabei natürlich auch leicht verändert, und neue Elemente sind im Verlaufe der Zeit dazugekommen. Viele Konstruktionsprinzipien und vor allem die chemisch-physikalischen Prozesse, die in den einzelnen Zellen ablaufen, sind sich jedoch im wesentlichen gleich geblieben und weisen auf einen gemeinsamen Ursprung hin. Weil Bakterien den «Urtypus» eines Organismus darstellen, wurde zur Illustration einer Zelle eine Bakterienzelle gewählt (Figur 1). Bakterien besitzen noch keine spezialisierten Zellkomponenten wie Mitochondrien, Chloroplasten, Vakuolen und Lysosomen. Ein Bakterium ist ungefähr ein bis zwei Tausendstel Millimeter lang und

Figur 1:
Schematischer Aufbau einer Zelle



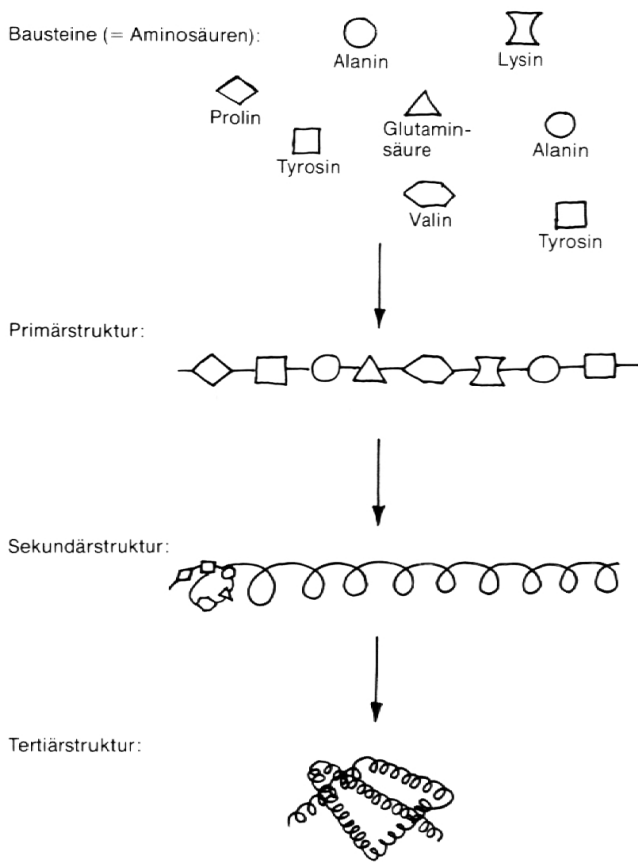
kann somit im Lichtmikroskop knapp gesehen werden. Das Elektronenmikroskop macht sogar einzelne Strukturen sichtbar:

- Zellwand: Verleiht der Zelle mechanische Festigkeit und besteht aus untereinander vernetzten Zuckermolekülen.
- Zellmembran (auch Zytoplasmamembran oder Plasmalemma genannt): Verleiht der Zelle «chemische» Festigkeit und kontrolliert den Austausch von Stoffen mit der Umgebung (z.B. Aufnahme von Nährstoffen). Besteht aus Lagen von Fetten und Proteinen (=Eiweissen).
- Zytoplasma: Zellflüssigkeit, in der einzelne Zellkomponenten eingebettet sind.
- Kern und Kernmembran: Die Existenz eines Kerns (griech. = karyon) ist das grundlegendste Unterscheidungsmerkmal zwischen «niederem» (= prokaryontischen, z.B. Bakterien) und «höherem» (= eukaryontischen, z.B. Pilzen, Pflanzen, Tieren) Zellen. Bei «niederen» Organismen «schwimmt» die fadenförmige DNA (= Träger der Erbinformation) mehr oder weniger frei im Zytoplasma, ohne von einer Kernmembran umschlossen zu sein. «Höhere» Organismen hingegen besitzen einen Zellkern, das heisst, die DNA ist von einer Kernmembran umgeben. Diese Unterscheidung ist aber für den vorliegenden Artikel nicht von Bedeutung. Wesentlich ist lediglich, dass bei allen Organismen die DNA die gesamte Erbinformation trägt.
- DNA (= Träger der Erbinformation), Proteine (= Eiweisse): Diese beiden Zellkomponenten stehen im Zentrum der molekularen Genetik, und sie werden in den folgenden Kapiteln detailliert besprochen.

1.2. Struktur und Funktion der Proteine

Alle Proteine (= Eiweisse) bestehen aus langen Ketten von nur 20 verschiedenen Bausteinen, den sogenannten Aminosäuren (Figur 2). Die Aminosäuren können in beliebiger Reihenfolge (einschliesslich Wiederholungen) zu beliebig langen Ketten verbunden werden. Die einzelnen Aminosäuren haben individuelle

Figur 2:
Schematische Struktur der Proteine



Namen (Prolin, Tyrosin, Alanin, Glutaminsäure, Valin, Lysin usw.) und sehr unterschiedliche chemisch-physikalische Eigenschaften. Einige sind fett-, andere hingegen wasserlöslich, einige sind sauer, andere sind basisch, einige sind chemisch sehr reaktiv, andere sind reaktionsträge. Wie erwähnt, verbinden sich diese Aminosäuren zu Ketten (man spricht von Primärstruktur), die die Tendenz haben, sich zu Spiralen zu verdrehen (Sekundärstruktur). Die Spiralen wiederum bilden spontan einen «Knäuel» (Tertiärstruktur), der aber nicht wahllos, sondern wohlgeordnet und ganz präzise gefaltet ist. Obwohl Proteine zu den grössten Zellkomponenten gehören, entziehen sich ihre Dimensionen unserer Vorstellungskraft. Ein Protein mittlerer Grösse (= 300 Aminosäuren lang) in Spiralform ist lediglich 0,05 Tausendstel Millimeter lang.

Welche Funktion haben die Proteine? Auf Grund der Verschiedenartigkeit der Aminosäuren weisen auch die daraus gebildeten Proteine sehr vielfältige Eigenschaften auf. Je nachdem wieviele und welche Aminosäuren wir verknüpfen, erhalten wir andere Proteine.

Die Anzahl der möglichen Proteine lässt sich berechnen: Um ein Protein, bestehend aus 4 Aminosäuren, zu bilden, haben wir $20 \times 20 \times 20 \times 20 = 160'000$ Möglichkeiten. Bei Ketten von 10 Aminosäuren haben wir bereits $20^{10} = 10$ Billionen Möglichkeiten. Die mittlere Länge von Proteinen in der Zelle beträgt rund 300 Aminosäuren, was praktisch unendlich viele Kombinationsmöglichkeiten ergibt. In der Tat bildet eine Zelle Tausende von verschiedenen Proteinen für alle möglichen Aufgaben. Eine kleine Auswahl:

- Kollagen: Langgestrecktes Protein (ca. 1000 Aminosäuren), das als faseriger Baustoff dient. In Wirbeltieren kann der Kollagenanteil 30% der gesamten Proteinmenge erreichen.
- Antikörper: Proteine, die eindringende Fremdstoffe binden und ausfällen. Antikörper bestehen aus einem Komplex von 4 Untereinheiten, die je rund 200 bis 450 Aminosäuren lang sind.
- Insulin: Protein (51 Aminosäuren), das als Hormon wirkt und die Konzentration des Blutzuckers reguliert.
- Toxine: Proteine, die Zellen zerstören, indem sie sich an die Zellmembranen anlagern und diese auflösen (z.B. Toxine von *Shigella*) oder andere Proteine zerstören (z.B. Schlangengift).
- Hämoglobin: Protein, das Sauerstoff bindet und von den Lungen zu den einzelnen Körperzellen transportiert. Das Hämoglobin besteht aus einem Komplex von 4 Untereinheiten, die je 141 bis 146 Aminosäuren lang sind.
- Enzyme: Proteine, die als Katalysatoren wirken, das heisst, sie beschleunigen bestimmte chemische Reaktionen an Molekülen, ohne sich selbst zu verbrauchen. So wie das Platin im momentan viel diskutierten Abgaskatalysator Kohlenmonoxid und Stickoxide zu Kohlendioxid und Stickstoff umwandelt, setzen Enzyme bestimmte Moleküle in der Zelle um. Praktisch alle chemischen Reaktionen in der Zelle sind enzymatisch gesteuert, handle es sich um den Aufbau von Zellbausteinen oder den Abbau von Nährstoffen. Dabei katalysiert jedes Enzym nur einen ganz bestimmten Schritt, das heisst, für längere Reaktionsfolgen braucht es mehrere Enzyme. Am Umsatz von Zucker

zu Alkohol in den Hefezellen sind beispielsweise rund ein Dutzend Enzyme beteiligt. Der Abbau von Fett in menschlichen Zellen wird ebenfalls von rund einem Dutzend Enzymen gesteuert. Erwähnenswert ist, dass viele Enzyme aus dem Zytoplasma isoliert und in reiner Form dargestellt werden können, ohne ihre Aktivität zu verlieren. Wie wir später sehen werden, beruhen viele Schritte in der molekularen Genetik auf der Zugabe von gereinigten und im Handel erhältlichen Enzymen.

1.3. Struktur und Funktion der DNA

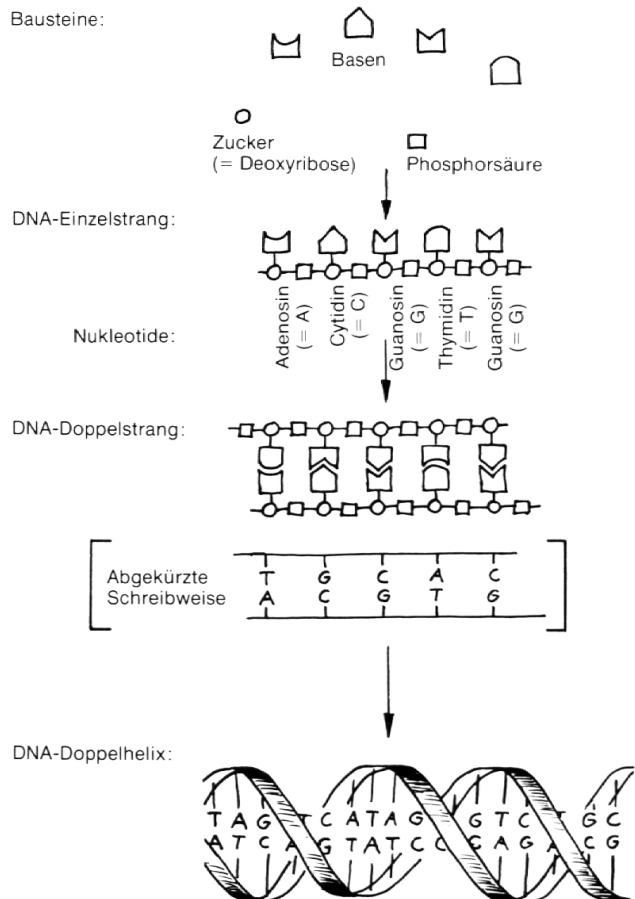
Dass Lebewesen bestimmte Eigenschaften über Generationen vererben, ist offensichtlich und seit jeher bekannt. Jedoch erst der Brünner Augustinermönch Gregor Johann Mendel machte Mitte des 19. Jahrhunderts systematische Vererbungsexperimente mit Bohnen und vermochte die gefundenen Gesetzmäßigkeiten erstmals wissenschaftlich zu formulieren. Mendel begründete damit die klassische Vererbungslehre. Seine genialen Leistungen stiessen aber bei seinen Zeitgenossen auf Ablehnung und wurden erst um die Jahrhundertwende wiederentdeckt und gewürdigt. Doch trotz den von Mendel erkannten Gesetzen blieb es unklar, was der eigentliche Träger der Information ist, die von Generation zu Generation weitergegeben wird. Obwohl die Existenz der DNA bekannt war und diese Substanz auch bereits aus Zellen extrahiert werden konnte, galten Proteine als Hauptträger der Erbinformation. Erst um 1940 wies der Amerikaner Avery nach, dass die DNA die genetische Information trägt. Avery zeigte experimentell, dass sich bestimmte Eigenschaften von einem Bakterium auf ein anderes übertragen lassen, indem man reine DNA «überimpft». Damit begann die Aera der molekularen Genetik, das heisst, das Wesen der Vererbung konnte nun auf der Stufe des DNA-Moleküls studiert werden.

Das zentrale Problem, das sich nach Avery's Experimenten stellte, war die Frage nach dem Wesen und dem Aussehen der DNA. Einige chemische und physikalische Experimente lieferten Hinweise, dass die DNA aus langen, spiraligen Strängen besteht und Phosphorsäure, Zucker und sogenannte Basen enthält.

Die genaue Struktur der DNA blieb jedoch ein Rätsel. Erst 1953 kam der Durchbruch, als Watson und Crick (USA und GB) die dreidimensionale Anordnung der einzelnen DNA-Bausteine erfolgreich aufklären konnten. Die Entdeckung der DNA-Struktur gilt als Meilenstein in der Geschichte der molekularen Genetik. Watson selbst hat die eher menschlichen Aspekte dieses Erfolgs in einem sehr amüsanten Taschenbuch beschrieben («Die Doppelhelix», Rowohlt).

Wie sieht diese dreidimensionale DNA-Struktur aus? Die DNA besteht aus einer langen Kette von nur vier verschiedenen Komponenten, die Nukleotide genannt werden (Figur 3). Die Nukleotide können beliebig oft und in beliebiger Folge miteinander verknüpft werden. Sie heissen Thymidin (abgekürzt T), Cytidin (C), Adenosin (A) und Guanosen (G). Jedes einzelne Nukleotid besteht aus 3 Bausteinen: einem Phosphorsäuremolekül, einem Zuckermolekül (chemisch: eine Deoxyribose) und

Figur 3: Schematische Struktur der DNA



einem stickstoffhaltigen Molekül mit basischen Eigenschaften (Base genannt). Daher kommt auch der deutsche Name Deoxyribonukleinsäure (abgekürzt: DNS). Eingebürgert hat sich nun die englische Bezeichnung Deoxyribonucleic acid (DNA). Zucker und Phosphorsäure der DNA sind immer gleich und bilden das Rückgrat der DNA-Kette. Von den Basen hingegen, die an den Zucker gebunden sind, gibt es 4 verschiedene Moleküle. Die Strukturen und die chemischen Eigenschaften der 4 Basen sind aber nicht völlig verschieden voneinander. Vielmehr ist es so, dass je 2 Basen eine grosse Affinität zueinander haben und sich gerne paaren. Adenosin paart sich mit Thymin, und Cytidin paart sich mit Guanin. Diese Paarung führt dazu, dass die DNA als Doppelstrang vorliegt. Diese Paarung beruht aber nur auf elektrostatischen Kräften und nicht auf einer chemischen Bindung. Der Doppelstrang kann schon durch Erwärmen in Einzelstränge aufgetrennt werden. Er steht unter einer gewissen «Spannung» und hat die Tendenz, sich zu einer sogenannten Doppelhelix zu verdrehen, so, wie sich ein Faden zu einer Kordel verdrehen kann. Bildlich gesprochen gleicht die Doppelhelix einer verdrehten Strickleiter. Die Seile werden durch den Zucker-Phosphorsäure-Strang und die Sprossen durch die Basen-Paare gebildet. Eine volle Windung dieser Doppelhelix enthält rund 10 Nukleotid-Paare. Experimentell konnte bestätigt werden, dass die DNA aller Lebewesen in der Doppelhelix-Struktur vorliegt.

1.4. Mechanismus der DNA-Replikation

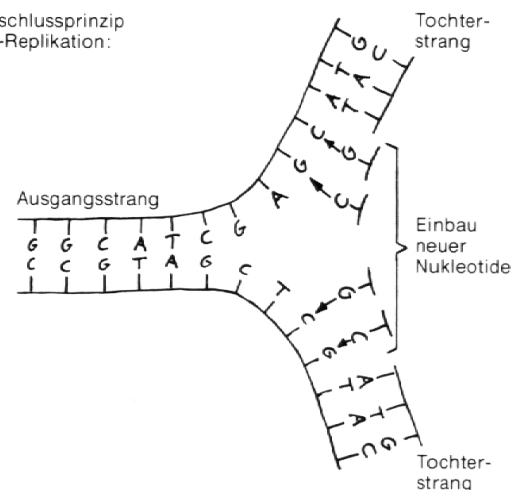
Bei der Zellteilung ist es von vitaler Wichtigkeit, die in der DNA enthaltenen Erbinformationen zu verdoppeln und fehlerfrei auf die beiden Tochterzellen zu verteilen. Die Verdoppelung des DNA-Strangs (man spricht von DNA-Replikation) erfolgt nach einer Art Reissverschlussprinzip (Figur 4). Die Adenosin-Thymin- und Guanin-Cytidin-Paarungen des Doppelstranges werden aufgetrennt und der «alte» Affinitätspartner wird durch einen «neuen» ersetzt, der von der Zelle zugeliefert wird. Die «neuen» Nukleotide werden wiederum über ein Zucker-Phosphorsäure-Rückgrat miteinander verknüpft. Die beiden DNA-Stränge werden anschliessend auf die Toch-

terzellen verteilt. Alle Reaktionen sind enzymatisch gesteuert und der Replikationsmechanismus ist äusserst zuverlässig. Nur durchschnittlich einmal pro 100 Millionen Replikationen wird ein falsches Nukleotid eingesetzt. Erwähnenswert ist aber, dass diese Fehler rate laut der Lehre des Darwinismus die treibende Kraft der Evolution darstellt. Damit können nämlich die Organismen hin und wieder «Neukonstruktionen» produzieren, die dann im Selektionskampf der Natur auf ihre Tauglichkeit hin geprüft werden.

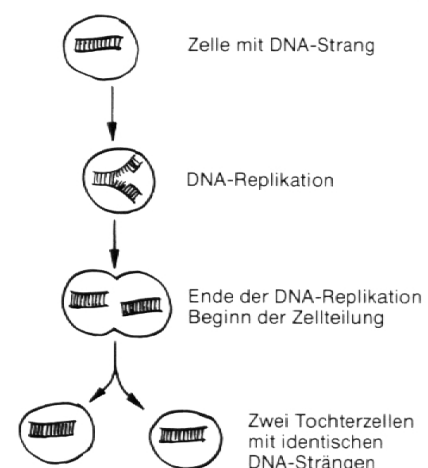
Das Modell dieses Replikationsmechanismus gilt für alle Lebewesen, das heisst für Mikroorganismen, Pflanzen, Tiere und Menschen. Es ist eines jener chemisch-physikalischen Prinzipien, die sich im Verlaufe der Evolution nicht veränderten. Bei «höheren» (eukaryontischen) Organismen ist lediglich der Verlauf etwas komplizierter.

Figur 4:
DNA-Replikation

Reissverschlussprinzip
der DNA-Replikation:



Verlauf der
Zellteilung:



1.5. Mechanismus der Proteinsynthese. Der genetische Code

Vorbemerkung: In diesem Kapitel wird erklärt, wie die Erbinformation auf dem DNA-Strang gespeichert wird. Es wird auch gezeigt, wie die Zelle diese Information dazu benützt, bestimmte Proteine zu synthetisieren. Das ganze Thema ist sehr komplex. Sollte sich jemand im Wirrwarr der einzelnen Erklärungen verlieren, so kann er dieses und das übernächste Kapitel (1.5. und 1.7.) überspringen, ohne den Zusammenhang völlig zu verlieren.

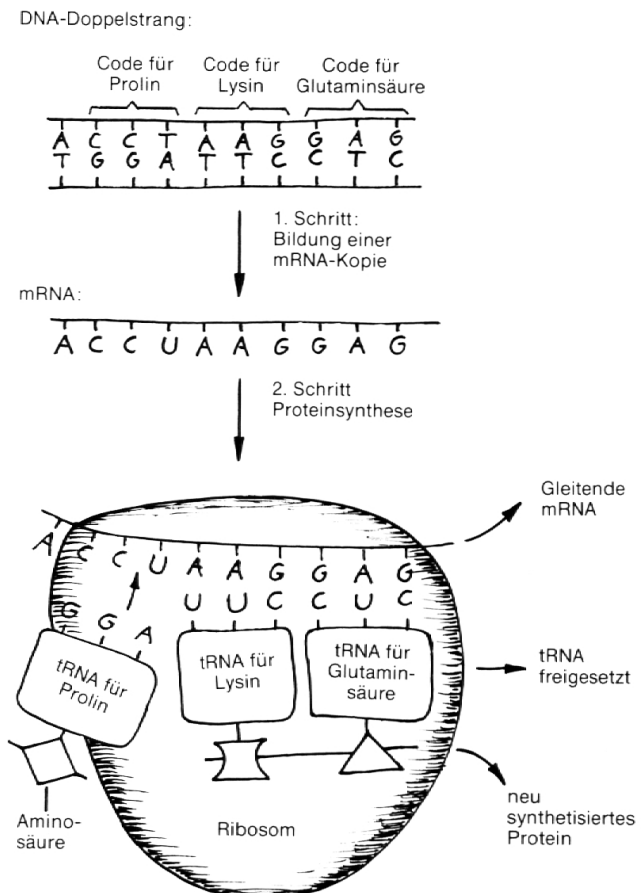
Im Verlaufe der vorangehenden Ausführungen wurde klar, dass die Proteine für den Aufbau und die Funktion der Zelle von grösster Bedeutung sind. Es wurde aber auch betont, dass die DNA die Information enthält, wie die Zelle gebaut sein und wie sie funktionieren soll. Bildlich ausgedrückt könnte man sagen, die DNA sei das Gehirn oder die Zentrale der Zellfabrik, während die Proteine das Gebäude und die Maschinen bilden. Die DNA ist das befehlende, und die Proteine sind die ausführenden Organe. Eine Frage drängt sich nun auf: Wie kontrolliert die DNA die Bildung von Proteinen? Wie wird die DNA-Sprache in die Protein-Sprache übersetzt? Oder nochmals anders gefragt: Wie kann eine Kette von 4 verschiedenen Nukleotiden die Information zur Bildung einer Kette von 20 verschiedenen Aminosäuren speichern? Eine theoretische Überlegung: Logischerweise kann nicht je ein Nukleotid je eine Aminosäure bestimmen, das ergäbe nur 4 Möglichkeiten. Mit Gruppen von 2 Nukleotiden ergäben sich $4 \times 4 = 16$ Möglichkeiten, was für 20 Aminosäuren auch noch nicht ausreicht. Erst Gruppen von 3 Nukleotiden ergeben $4 \times 4 \times 4 = 64$ Möglichkeiten, was nun mehr als genügend ist. Jede Aminosäure liesse sich damit auf durchschnittlich etwa 3 verschiedene Arten codieren. Der Begriff «codieren» bedeutet in diesem Zusammenhang «verschlüsseln» oder «chiffrieren».

Mitte der sechziger Jahre gelang es, experimentell nachzuweisen, dass die Natur tatsächlich den 3 Nukleotid-Code benützt, das heisst, je ein Triplet der Nukleotide bestimmt eine Aminosäure. So wie in der Morseschrift mit 1-4 Punkten oder Strichen je ein Buchstabe codiert wird, codiert die Natur mit 3 Nukleotiden je eine Aminosäure. Das Nukleotid-

Triplet GTG codiert beispielsweise die Aminosäure Valin, CCT codiert Prolin, GAG codiert Glutaminsäure, AAG codiert Lysin usw. Der biochemische Mechanismus der Übersetzung des Codes ist recht kompliziert und schematisch in Figur 5 dargestellt. Die Übersetzung erfolgt in zwei Schritten:

1. Schritt: Von einem Strang (in Figur 5 ist es der obere Strang) des DNA-Doppelstrangs wird eine Kopie gemacht. Dies geschieht nach einem ähnlichen Mechanismus wie die in Figur 4 beschriebenen Replikation. Die Kopie bleibt aber einsträngig und ist auch sonst von der DNA leicht verschieden. Beispielsweise wird an Stelle von Thymin ein anderes Nukleotid, Uridin (U) verwendet, das sich aber auch mit Adenosin paart. Diese Kopie nennt man mRNA (engl.: messenger-ribonucleic acid, messenger = Bote)
2. Schritt: Die mRNA gleitet anschliessend wie ein Tonband über einen sehr grossen Komplex, der Ribosom genannt wird. Gleichzeitig liefert die Zelle auch sogenannte tRNA (engl.: transfer-ribonucleic acid) zu den Ribosomen.

Figur 5: Proteinsynthese



tRNA's sind Moleküle, die auf der einen Seite ein bestimmtes Triplet von 3 Nukleotiden und auf der anderen Seite eine bestimmte Aminosäure tragen. Es gibt rund 60 verschiedene tRNA-Moleküle, für jede Aminosäure somit durchschnittlich drei. Mit Hilfe dieser tRNA wird die Information auf dem mRNA-Strang in eine Proteinkette umgesetzt. Jedes Triplet der mRNA paart sich auf Grund der Nukleotid-Affinität mit einer bestimmten tRNA, die ihrerseits eine bestimmte Aminosäure trägt. Die angelieferten Aminosäuren werden streng in der Reihenfolge ihrer Ankunft zu Ketten verknüpft und von der tRNA abgelöst. Sowie die DNA-Replikation ist auch die Proteinsynthese in der Natur universell, das heisst, vom Bakterium bis zum Menschen wird derselbe Code und derselbe Übersetzungsmechanismus gebraucht.

900 Nukleotide sind notwendig, um die Information für ein Protein mittlerer Grösse (300 Aminosäuren) zu speichern. Die Abschnitte auf der DNA, die einzelne Proteine codieren, werden Gene genannt. Die gesamte genetische Information eines Bakteriums liegt auf einem einzigen DNA-Strang, der in sich geschlossen ist und aus einer Kette von rund fünf Millionen Nukleotid-Paaren besteht. Dieser Strang bietet somit Platz für 5000 Gene und er liegt eng in sich verwunden im Bakterium vor. Zur Doppelhelix ausgestreckt hätte er eine Länge von rund 1,5 Millimetern. Da «höhere» Organismen wesentlich komplexer sind, muss natürlich auch mehr Information gespeichert werden. Die DNA einer Säugerzelle bietet Platz für fünf Millionen Gene und liegt nicht in einem einzigen Strang vor, sondern ist in verschiedene Chromosomen unterteilt.

1.6. Chromosomale DNA. Plasmid-DNA

Ende der sechziger Jahre wurde bei Bakterien eine überraschende Entdeckung gemacht. Man fand, dass einige Bakterien neben dem «normalen» 5000 Gene umfassenden DNA-Strang noch kurze, in sich geschlossene DNA-Stränge aufweisen. Diese Stränge waren oft nur einige Zehntausend Nukleotid-Paare lang und man nannte sie Plasmide (siehe Figur 1). Diese Plasmide werden ebenfalls repliziert und auf Tochterzellen verteilt. Die «normale»

DNA wurde von nun an «chromosomale» DNA genannt, um eine Verwechslung mit der Plasmid-DNA auszuschliessen. Plasmide haben die Fähigkeit, durch die Zellmembranen hindurch in andere Zellen einzudringen. Mit anderen Worten, Plasmide erlauben den Austausch von Information in horizontaler Richtung, von Nachbar zu Nachbar. Die klassische Vererbung durch die chromosomale DNA erlaubt die Übergabe von Information in vorwiegend vertikaler Richtung, von Mutterzelle zu Tochterzelle. Plasmide enthalten nur wenige Gene, die beispielsweise Proteine zur Inaktivierung von Antibiotika oder Schwermetallen codieren. Wie wir später sehen werden, wird heute in der Genetik von den Plasmiden ausgiebig Gebrauch gemacht. Die Plasmide lassen sich nämlich vorzüglich dazu verwenden, fremde DNA-Fragmente aufzunehmen und in andere Zellen zu übertragen.

1.7. Regulation der Proteinsynthese

Der DNA-Code wird via mRNA in Proteine umgesetzt, die dann eine bestimmte Funktion haben. Nun ist es aber unzweckmässig, alle Gene ununterbrochen abzulesen. Das wäre eine Verschwendung an Energie und Bausteinen, die sich keine Zelle leisten könnte. Vielmehr muss die Zelle die Möglichkeit haben, Proteine nach Bedarf zu produzieren. Wird beispielsweise einem Bakterium Laktose als Nährstoff angeboten, so muss es die Laktose spaltenden Enzyme bilden können. Wird später von Laktose zu Fruktose gewechselt, müssen auch sofort andere Enzyme gebildet werden können.

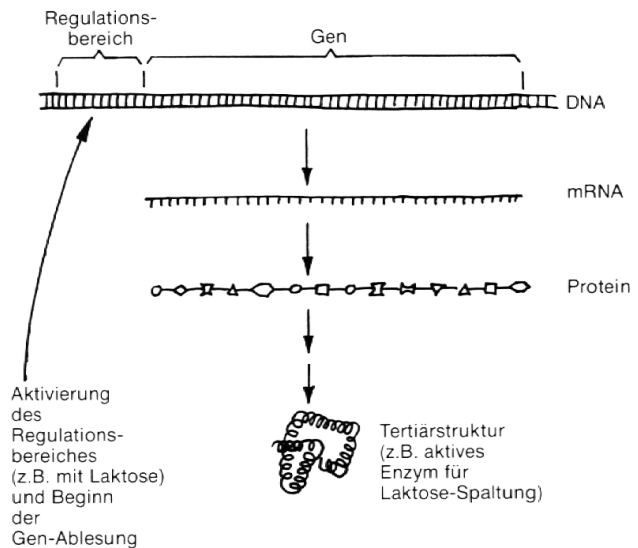
Die individuelle Proteinproduktion wird mit einem raffinierten Regulationsmechanismus erreicht, der jedoch hier nicht im Detail diskutiert werden kann. Der Mechanismus beruht darauf, dass praktisch jedem Gen ein Regulationsbereich vorgeschaltet ist (Figur 6). Dieser Bereich ist nur einige Dutzend Nukleotid-Paare lang. Einzelne Stoffe (z.B. Laktose) können mit diesem Bereich chemisch in Interaktion treten und bewirken, dass das folgende Gen abgelesen und ein bestimmtes Protein (z.B. Laktose spaltendes Enzym) gebildet wird. In der molekularen Genetik wird dieser Regulationsbereich oftmals gezielt verändert, um die Synthese eines Proteins zu steuern. Das


heisst, der Bereich kann so modifiziert werden, dass die Zelle ununterbrochen möglichst viel von einem gewünschten Protein synthetisiert.

Insbesondere bei hochdifferenzierten Organismen wie Wirbeltieren ist die Regulation der Genablesung von grosser Bedeutung. Eine Leberzelle soll nur die für die Funktion der Leber unerlässlichen Informationen ablesen und nicht irgendwelche Muskelproteine oder Augenpigmente bilden, obwohl sie ja die Information dafür besitzt. Krebszellen sind Zellen, die die zugewiesene Aufgabe in einem Organ nicht mehr erfüllen und die nun wild wuchern. Das Studium der Regulationsmechanismen ist ein wichtiges Gebiet der heutigen Krebsforschung. Die Bedeutung der Regulation kann auch in der Umwelt leicht beobachtet werden. Jedes Lebewesen reguliert seine Funktionen und seine Entwicklung nach Be-

darf, sei es nun eine Pflanze im Verlaufe der Jahreszeiten oder ein Insekt über die verschiedenen Stadien der Metamorphose.

Figur 6:
Regulation der Proteinsynthese






Kümmerly+Frey
Lehrmittelzentrum
Hallerstrasse 6
Postfach
3001 Bern

Hellraum-Projektor

Von Schulen getestet – mit Erfolg bestanden

Ecolux, Schweizer Fabrikat und Schweizer Qualität, in attraktivem Design. Robuste und langlebige Konstruktion (5 Jahre Garantie), mit bestechenden Merkmalen, ausgeklügelter Sicherheit, Bedienungskomfort. Jetzt selber testen, jetzt bestellen!
(Info-Prospekt ist abrufbereit)
Einführungsrabatt und Geschenk.

Coupon sofort einsenden an:
Kümmerly + Frey, Lehrmittel,
3001 Bern
oder Telefon 031/ 24 06 66/ 67



Bestell- und Info-Coupon Hellraum-Projektor Ecolux

Von Schulen getestet – mit Erfolg bestanden

Ja, senden Sie uns den Hellraum-Projektor Ecolux zu Fr. 1178. – abzüglich 10% Schulrabatt, mit dem Geschenk «Referentenset».

Ja, wir sind an einer Demonstration interessiert. Bitte Ihr Telefon an _____ für einen Termin.

Ja, Ihr Ecolux interessiert uns. Senden Sie uns Unterlagen.

Schule _____

zuständig _____

Adresse _____

PLZ/Ort _____

Datum _____ Unterschrift _____

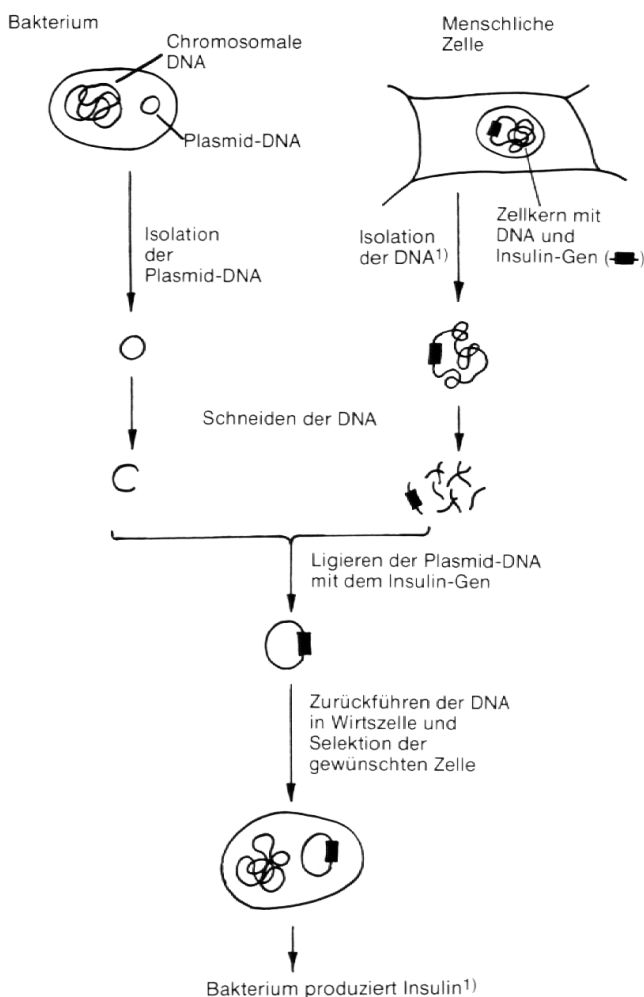
Einsenden an Kümmerly + Frey, Lehrmittel, 3001 Bern.
Oder Telefon 031/ 24 06 66/ 67.

2. Methoden der molekularen Genetik

2.1. Klonieren des Insulin-Gens

In den bisherigen Ausführungen wurden die biologischen Grundlagen der molekularen Genetik beschrieben. Nun werden einige Methoden vorgestellt, die die gezielte Veränderung der genetischen Information und damit der Zellfunktion erlauben. Zur Illustration wird der Ablauf eines genetischen Experimentes kurz skizziert (Figur 7). Beim Experiment geht es darum, das Gen für menschliches Insulin in die Plasmid-DNA eines Bakteriums einzubauen. Da nach dem Einbau alle Tochterzellen dieses Bakteriums eine identische genetische Information tragen (nämlich die Fähigkeit, Insulin zu produzieren), spricht man von einem Klon. Man sagt, das Insulin-Gen sei geklont.

Figur 7:
Klonieren des Insulin-Gens



¹⁾ Starke Vereinfachungen, die im Text beschrieben werden.

Experimente dieser Art wurden Ende der siebziger Jahre im Laboratorium erstmals erfolgreich durchgeführt und von Bakterien produziertes menschliches Insulin wurde 1982 von der amerikanischen Firma Ely Lilly relativ billig auf den Markt gebracht. Bis dahin wurde Insulin aus tierischen Bauchspeicheldrüsen gewonnen, was sehr aufwendig und dementsprechend teuer war.

Nun werden die einzelnen Schritte dieses Klonierungsexperimentes detailliert beschrieben:

2.2. Isolation der DNA aus Zellen

Die DNA muss möglichst schonend aus der Bakterienzelle herausgelöst werden, damit der DNA-Strang nicht reißt. Plasmide von Bakterien lassen sich relativ leicht isolieren. Die Isolation beruht auf einer Reihe von chemischen und physikalischen Methoden:

- Die Zellwand wird aufgelöst, indem man die Bakterien mit dem Enzym «Lysozym» behandelt, das die vernetzten Zuckermoleküle auftrennt.
- Die Fett-Protein-Lagen der Zellmembran werden mit Chemikalien (ähnlich einem Abwaschmittel) aufgelöst.
- Der freigesetzte Zellinhalt wird einer Serie von Zentrifugationen unterworfen, im Verlaufe derer die Plasmid-DNA auf Grund ihrer Dichte angereichert wird.

Eine vorsichtige Präparation führt leicht zu reinen Lösungen von DNA-Strängen mit einer Länge von mehr als 100'000 Nukleotid-Paaren. Die Methodik, DNA aus menschlichen Zellen heranzulösen, ist wesentlich komplizierter und kann hier nicht beschrieben werden. Der Ehrlichkeit halber soll nur erwähnt sein, dass die Isolation des Insulin-Gens nicht so geradlinig verläuft, wie das in Figur 7 dargestellt wurde. Man muss einen Umweg über mRNA wählen oder das Gen rein synthetisch herstellen.

2.3. Schneiden der DNA

Das gezielte Schneiden und Wiederausfügen von isolierten DNA-Strängen ist eine der wesentlichsten Techniken der mole-

kularen Genetik. Die Grundlagen zu diesen Methoden wurden zu einem grossen Teil von Werner Arber (Professor am Biozentrum, Basel) erforscht, der 1978 für diese Arbeiten den Nobelpreis erhielt. Arber fand, dass viele Zellen über eine Art Selbstschutz verfügen und eindringende fremde DNA vernichten können. Das eigene Erbmateriale wird dadurch von «Verfälschung» bewahrt. Wie wird die fremde DNA zerstört? Arber konnte experimentell zeigen, dass die Zellen über Enzyme verfügen, die die fremde DNA in Stücke schneiden und somit inaktivieren. Man nannte diese Enzyme Restriktionsenzyme. Interessant ist, dass die Restriktionsenzyme die DNA nicht wahllos zerstückeln, sondern nur bei ganz bestimmten Folgen von Nukleotiden in charakteristischer Weise (meistens treppenförmig überlappend) schneiden (Figur 8). Die Nukleotidfolge, die vom Restriktionsenzym erkannt wird, besteht meistens aus einer Sequenz von 6 Nukleotid-Paaren, die im Doppelstrang punktsymmetrisch angeordnet sind. Das Bakterium *Escherichia coli* verfügt beispielsweise über ein Restriktionsenzym (nach seiner Herkunft *Eco* RI genannt), das stets nur bei der Sequenz GAATTC schneidet. Das Bakterium *Bacillus amylolyticus* verfügt über ein anderes Restriktionsenzym (*Bam* HI), das bei der Sequenz GGATCC schneidet. Heute sind über hundert Restriktionsenzyme aus verschiedenen Organismen bekannt und im Handel erhältlich. Die mittlere Länge der entstehenden DNA-Bruchstücke lässt sich grob abschätzen: Die Chance, dass eine bestimmte Sequenz von 6 Nukleotid-Paaren im DNA-Strang erscheint, beträgt $1/4^6 = 1/4096$. Das heisst, nach dem Schneiden der DNA mit *Eco* RI oder

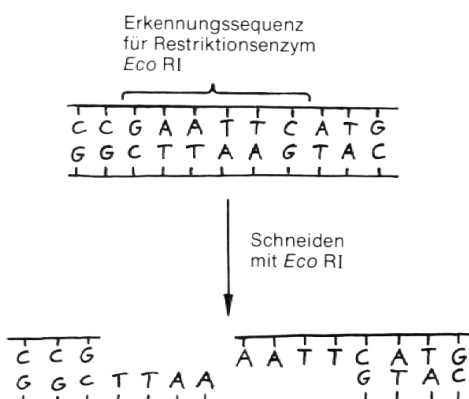
Bam HI beträgt die durchschnittliche Länge der Bruchstücke 4096 Nukleotid-Paare, das entspricht etwa 4 Genen. Es gibt auch Restriktionsenzyme, die Sequenzen von nur 4 Nukleotid-Paaren erkennen und somit Bruchstücke mit einer mittleren Länge von $4^4 = 256$ Nukleotid-Paaren produzieren. In der molekularen Genetik werden diese Enzyme dazu eingesetzt, einen DNA-Strang an einer bestimmten Stelle aufzutrennen oder bestimmte Gene aus dem Strang herauszuschneiden.

Eine Frage drängt sich aber auf: Warum zerschneidet *Escherichia coli* mit *Eco* RI nur fremde und nicht auch seine eigene DNA? Der Grund liegt darin, dass *Escherichia coli* seine eigene DNA an der Sequenz GAATTC chemisch etwas modifiziert. Die modifizierte Sequenz ist für *Eco* RI nicht mehr zu erkennen und somit vor dem Schneiden geschützt. Der Schutzmechanismus gegen eindringende DNA ist also nur wirksam, wenn es der Zelle gelingt, die fremde DNA zu zerschneiden, bevor sie modifiziert wird.

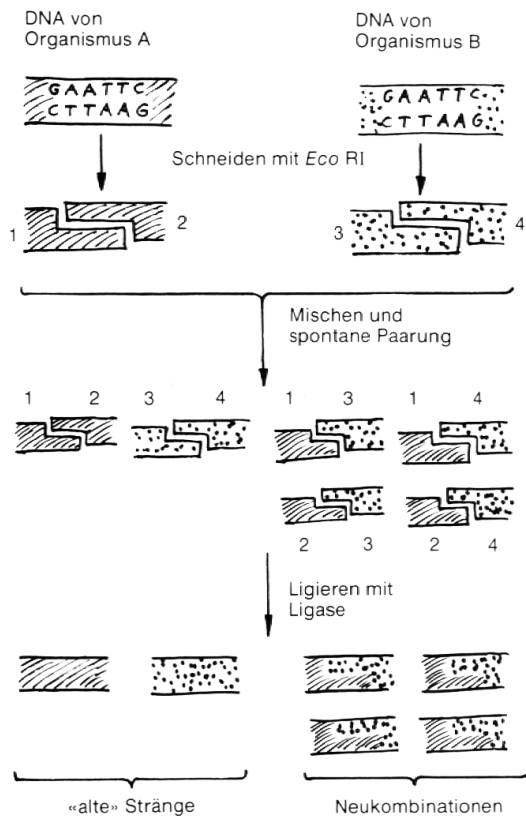
2.4. Ligieren der geschnittenen DNA

Der in Figur 8 dargestellte Schnitt legt einen Einzelstrang mit einer Länge von 4 Nukleotiden frei. Dieser Einzelstrang hat eine natürliche Tendenz, sich wiederum mit einem analogen Partner (A zu T, G zu C) zu paaren, unabhängig von dessen Herkunft. Das heisst, wird die DNA von 2 verschiedenen Organismen mit *Eco* RI geschnitten und werden alle Bruchstücke (1, 2, 3, 4, in Figur 9) gemischt, sind verschiedene spontane Paarungen möglich (1-2, 1-3, 1-4, 2-3, 2-4, 3-4). Es gilt nun lediglich noch, die Phosphorsäure-Zucker-Bindung neu zu knüpfen, oder in der Fachsprache ausgedrückt, die Bruchstücke zu ligieren. Das wird mit einem natürlich vorkommenden und im Handel erhältlichen Enzym, der Ligase, gemacht. Bildlich gesprochen könnte man sagen, die spontane Paarung gleicht der Anziehung zweier Magnete und die Ligation gleicht dem Verschweissen der beiden Magnete. Nach der Ligation erhalten wir wiederum völlig «normale» DNA-Stränge, wobei aber vier der entstandenen Stränge Neukombinationen darstellen. Das heisst, ein DNA-Stück des einen Organismus wurde mit einem DNA-Stück des anderen Organismus stabil verknüpft.

Figur 8:
Schneiden von DNA



Figur 9:
Ligieren von DNA



Die soeben beschriebene Rekombination funktioniert natürlich nur, wenn die DNA vorgängig mit einem Restriktionsenzym geschnitten wird (wie das in Figur 9 mit *Eco RI* gemacht wurde), so dass die entstehenden Enden eine Affinität zueinander haben. Das wahllose (z.B. mechanische) Zerhacken von DNA produziert normalerweise keine Bruchstücke mit Enden, die zueinander passen. Auch Schnitte von zwei verschiedenen Restriktionsenzymen wie *Eco RI* und *Bam HI* passen normalerweise nicht zueinander.

2.5. Zurückführen der DNA in Zellen

Nach dem Schneiden und der Ligation (beide Prozesse erfolgen im Reagenzglas), muss die DNA in Zellen zurückgebracht werden. Man nennt Zellen, die DNA aufnehmen, Wirtszellen. Bei Bakterien bildet aber die Zellmembran eine Barriere für die Aufnahme von DNA, und dennoch aufgenommene DNA unterliegt normalerweise der Inaktivierung durch Restriktionsenzyme. Es wurden aber Methoden entwickelt, die erlauben, diese beiden Schutzsysteme der Zellen zu umgehen. Die Zellmem-

bran wird für DNA durchlässig, indem die Zellen in eiskalter Calcium-Lösung suspendiert und dann plötzlich erwärmt werden. Das Restriktionssystem kann umgangen werden, indem man bei den Wirtszellen das Gen für das Restriktionsenzym vorgängig inaktiviert. Eine elegante Lösung zur Überlistung beider Schutzsysteme beruht darauf, die DNA via einen Virus in die Wirtszellen einzuführen. Diese Methoden können hier jedoch nicht im Detail erklärt werden.

2.6. Selektion der gewünschten Zellen mit Antibiotika

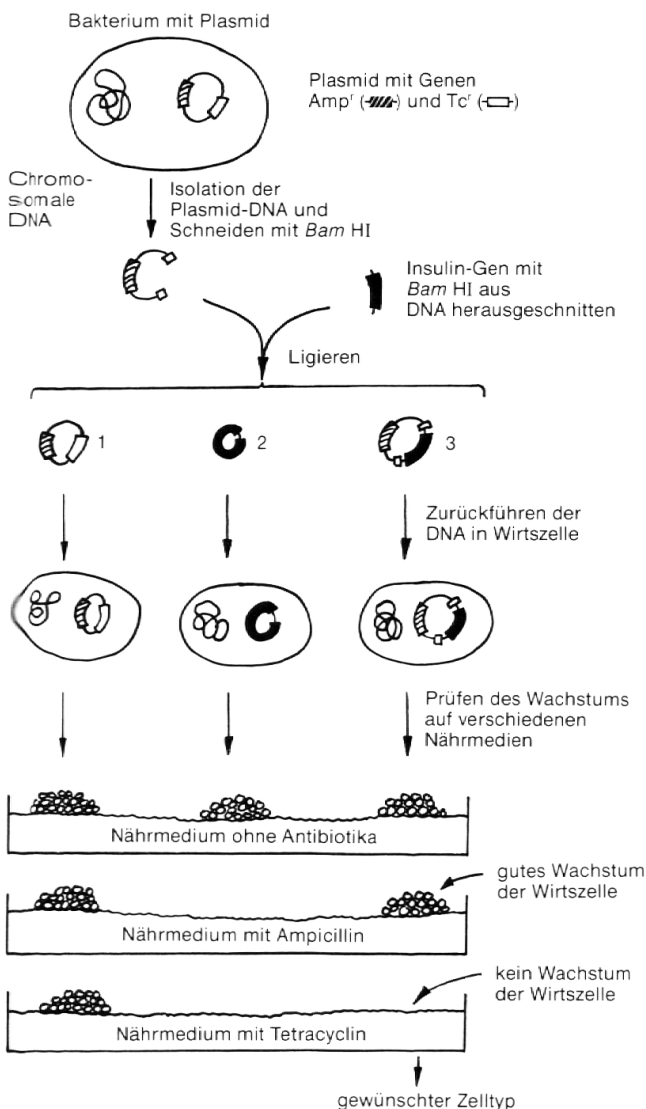
Vorbemerkung: In diesem Kapitel wird erklärt, wie man unter vielen möglichen Neukombinationen den gewünschten DNA-Strang finden kann. Die Methode ist relativ einfach, aber die Grundlagen dazu, nämlich die Funktionsweise und die Genetik der Antibiotika, sind etwas schwieriger zu erklären. Das Kapitel kann übersprungen werden, ohne dass man den Zusammenhang verliert.

Wie die Figuren 9 und 10 zeigen, ergeben sich bei einer Ligation von DNA-Bruchstücken verschiedene Kombinationen, die alle von Wirtszellen aufgenommen werden. Das Problem besteht nun darin, unter diesen Zellen diejenigen Wirtszellen zu finden, die die ursprünglich angestrebte DNA-Rekombination enthält. Das kann zum Teil mit Hilfe von Antibiotika gemacht werden.

Was sind Antibiotika? Antibiotika sind natürliche (meist von Pilzen ausgeschiedene) oder künstliche (chemisch synthetisierte) Substanzen, die bestimmte Lebensabläufe der Zelle stören können. Diese Störung führt dazu, dass die Zelle nicht mehr wächst und möglicherweise sogar abstirbt. Allgemein bekannt ist das Abtöten einer mikrobiellen Infektion im Menschen mit Hilfe des Antibiotikums Penicillin. In der Natur werden Antibiotika von gewissen Mikroorganismen ausgeschieden, um andere Organismen zu eliminieren und sich dabei einen Selektionsvorteil zu verschaffen. Tausende von Antibiotika sind heute bekannt und Dutzende davon werden industriell in grossen Quantitäten hergestellt. Betrachten wir die zwei Antibiotika Ampicillin und Tetracyclin, die in der molekularen Genetik häufig verwendet werden, etwas genauer. Ampicillin wirkt ähnlich wie Penicillin und stört bei Bak-

terien den Aufbau der Zellwand, indem es sich zwischen die vernetzten Zuckermoleküle einlagert. Die Zellwand wird funktionsuntüchtig und das Bakterium stirbt. Tetracyclin lagert sich im Zellinnern an die Ribosomen an und verhindert die Ablesung der mRNA, was auch zum Tode der Zelle führt. Viele Bakterien haben gegen die Antibiotika Schutzmechanismen entwickelt – in der Medizin ein gefürchtetes Phänomen. Der Schutz gegen Ampicillin besteht darin, dass das Ampicillin-Molekül von einem speziell gebildeten Enzym gespalten und somit inaktiviert wird. Das Gen, das dieses Enzym codiert, wird Amp^r -Gen genannt («r» = Resistenz). Der Schutz gegen Tetracyclin besteht darin, dass die Zellmembran durch ein speziell gebildetes Protein so verändert wird, dass Tetracyclin nicht mehr in die

Figur 10:
Selektion von Organismen mit Hilfe von Antibiotika



Zelle eindringen kann. Das Gen, das dieses Protein codiert, wird Tc^r -Gen genannt. Das heisst also, ein Bakterium, das in seiner Erbanlage das Amp^r - und Tc^r -Gen trägt, wird weder durch Ampicillin noch durch Tetracyclin abgetötet.

Wie werden nun Antibiotika zum Auffinden von gewünschten DNA-Kombinationen eingesetzt? Nehmen wir an, sowohl das Amp^r - als auch das Tc^r -Gen seien auf einem Plasmid und dieses Plasmid hätte eine einzige Nukleotidsequenz von GGATCC innerhalb des Tc^r -Gens. Mit dem Restriktionsenzym *Bam* HI, das ja die GGATCC-Sequenz erkennt (analog Figur 8), liesse sich somit dieses Plasmid innerhalb des Tc^r -Gens zerschneiden. Zerschneiden des Tc^r -Gens bedeutet natürlich Verlust der Tetracyclin-Resistenz. Diese Situation ist in Figur 10 dargestellt. Nehmen wir weiter an, ein fremdes Gen (beispielsweise das Insulin-Gen) sei ebenfalls mit *Bam* HI aus einem DNA-Strang herausgeschnitten worden und werde nun zusammen mit dem geschnittenen Plasmid ligiert. Auf Grund der bereits dargestellten Überlegungen ergeben sich mindestens 3 mögliche Kombinationen: 1) das Plasmid ligiert mit sich selbst und geht somit in die ursprüngliche Form zurück; 2) das Insulin-Gen ligiert mit sich selbst und 3) das Insulin-Gen ligiert mit dem Plasmid, das heisst, das Gen wird in das Plasmid integriert und dies ist meistens die angestrebte Kombination (Figur 10). Weitere Kombinationsmöglichkeiten sollen hier nicht berücksichtigt werden.

Nach dem Zurückführen der 3 verschiedenen Rekombinationen in Wirtsbakterien ergeben sich 3 verschiedene Zelltypen. Auf einem Nährmedium ohne Antibiotika wachsen alle 3 Typen. Auf Nährmedien, die Antibiotika enthalten, verhalten sie sich jedoch unterschiedlich:

1) Zellen, die das ursprüngliche Plasmid enthalten, wachsen in Gegenwart von Ampicillin und Tetracyclin;

2) Zellen, die nur das Insulin-Gen enthalten, werden durch Ampicillin und Tetracyclin abgetötet;

3) Zellen, die das Plasmid und das darin integrierte Insulin-Gen enthalten, wachsen in Gegenwart von Ampicillin. Diese Zellen werden aber durch Tetracyclin abgetötet, da ja das Tc^r -Gen durch das dazwischengeschobene Insulin-Gen funktionsunfähig ist.



Neuer Firmensitz!
 Wir sind von Basel nach Luzern umgezogen.
 Bitte notieren Sie sich die Adresse unseres neuen Firmensitzes, gültig ab 1. September 1984.

Schroedel Schroedel Schulbuchverlag
 Stiftstrasse 1 (bei der Hofkirche)
 6006 Luzern Telefon 041/513395

Diese Wachstumseigenschaften sind auf Petrischalen (= Glas- oder Plastikschalen, siehe Figur 10), die die entsprechenden Nährmedien enthalten, leicht zu prüfen.

Nachdem die gewünschten Zellen auf Grund dieser Wachstumstests isoliert wurden, muss noch mit Hilfe von vielen anderen Methoden (immunologische Tests, chemische Analysen, Aktivitätstests usw.) geprüft werden, ob das gewünschte Produkt vom Bakterium tatsächlich produziert wird. Im Falle von Insulin bedurfte es am Schluss eines geringfügigen chemischen Schrittes (Kopplung von 2 Unter-einheiten), um das aktive Hormon zu erhalten.

Erwähnenswert ist, dass das hier erwähnte Plasmid mit den Amp^r - und Tc^r -Genen nicht ein Phantasieprodukt ist. Dieses Plasmid wurde Ende der siebziger Jahre an der Stanford Universität (Kalifornien) konstruiert und erlaubte erstmals die gezielte Selektion eines geklonten Gens. Das Plasmid ist rund 4400 Nukleotid-Paare lang und bis heute eines der meistgebrauchten Plasmide für Experimente der beschriebenen Art.

Eine entscheidende Frage soll hier zum Schluss erläutert werden. Wieso wurde das Insulin-Gen zuerst in ein Plasmid inkorporiert und nicht direkt in die Wirtszelle übertragen?

Der Grund liegt darin, dass das Plasmid bei Zellteilungen repliziert und auf Tochterzellen verteilt wird. Ein darin inkorporiertes Gen wird somit ebenfalls stabil über Generationen hinweg vererbt. Ein einzelnes freies DNA-Fragment (wie das Insulin-Gen) kann wohl auch von Wirtszellen aufgenommen werden, es wird aber bei Zellteilungen nicht repliziert und bald wiederum ausgeschieden. Natürlich könnte man auch ein Fragment in die 5000 Gene umfassende chromosomale DNA des Bakteriums stabil inkorporieren und über Generationen hinweg vererben. Kurze Plasmide sind aber experimentell viel leichter zu erfassen und sie bieten zudem die Möglichkeit der beschriebenen Antibiotika-Selektion. Auch die Regulation der Proteinsynthese ist bei Plasmiden leicht beeinflussbar. Das bedeutet, dass man den Plasmid tragenden Mikroorganismus zur Überproduktion eines auf dem Plasmid codierten Proteins anregen kann. Im Verlaufe der letzten Jahre wurden sehr viele verschiedene Plasmide entdeckt. Viele davon lassen sich als Vehikel benützen, um DNA-Fragmente von einem Organismus in einen anderen zu übertragen, sei es nun von menschlichen Zellen zu Bakterien (wie in Figur 7), von Tieren zu Hefen oder von Bakterien zu Pflanzen.

3. Anwendung der molekularen Genetik in der Praxis

3.1. Historischer Rückblick

Ohne zu wissen, dass es lebende Zellen gibt, wurden biologische Prozesse seit jeher ausgenutzt. Bereits die Sumerer und Babylonier verstanden, Zucker zu Alkohol umzusetzen und eine Art Bier zu brauen. Die Ägypter nützten die CO_2 -Produktion der Hefen für das Brotbacken aus. Später kamen die Essigproduktion mit Essigsäure-Bakterien, die Yogurtproduktion mit Milchsäure-Bakterien und vieles mehr dazu. Die eingesetzten Prozesse beruhten auf reiner Erfahrung.

Die Geburtsstunde der Mikrobiologie schlug im 19. Jh. mit Louis Pasteur. Er bemerkte, dass die Alkoholgärung durch lebende Zellen, nämlich durch Mikroorganismen, gemacht wird. Er erkannte auch, dass sich Mikroorganismen nicht spontan aus toter Materie bilden, sondern durch Teilung aus anderen Zellen entstehen. Um die Jahrhundertwende wurde entdeckt, dass nicht nur ganze Zellen, sondern auch Zellextrakte bestimmte chemische Schritte machen können, und das war der Beginn der Biochemie mit dem Konzept der Enzyme. Damit waren die Voraussetzungen für die Verbesserung biologischer Prozesse gegeben.

Im Verlaufe des 1. Weltkrieges wurden mikrobielle Vergärungen im industriellen Rahmen durchgeführt. Weil die Deutschen wegen der englischen Blockade kein Pflanzenöl (= Rohstoff für Glycerin- und damit Sprengstoff-Produktion) mehr einführen konnten, waren sie gezwungen, Glycerin mikrobiell herzustellen. Glycerin ist ein natürliches Nebenprodukt der alkoholischen Gärung und es gelang, diese Gärung zugunsten von Glycerin zu modifizieren. Bis zu 1000 Tonnen Glycerin wurden pro Monat produziert. In England wurde gleichzeitig ebenfalls für die Kriegsindustrie die Vergärung von Zucker zu Aceton und Butanol im grossen Massstab betrieben. Die wissenschaftlichen Grundlagen dazu wurden übrigens vom Chemiker Chaim Weizmann erarbeitet, der später erster Staatspräsident von Israel wurde. Die aufkommende Erdölindustrie und damit die drastische Verbilligung pe-

trochemischer Produkte drängte nach dem Kriege die Aceton-Butanol-Gärung ins Abseits.

Im Verlaufe des 2. Weltkrieges erlebte die mikrobielle Antibiotika-Produktion einen gewaltigen Aufschwung. Das von Fleming bereits 1928 entdeckte, aber in seiner Bedeutung jahrelang unterschätzte Penicillin wurde nun in Amerika grosstechnisch produziert. Der Penicillin ausscheidende Mikroorganismus (*Penicillium chrysogenum*) und die Verfahren zu dessen Züchtung wurden systematisch entwickelt. Man könnte das als den Beginn der Biotechnologie bezeichnen. Heutige *Penicillium*-Stämme (Stamm = Unterart) produzieren 10'000 mal mehr Penicillin als Flemings Stämme.

Bis vor wenigen Jahren war aber die Stammentwicklung eine Sache des Zufalls. Die Organismen wurden so lange bestrahlt oder mit Chemikalien behandelt, bis das Erbut verändert war. Die Veränderung war nicht zielgerichtet und glich einer Lotterie. Man hoffte einfach, unter Millionen von veränderten Organismen einen Stamm zu finden, der vom gewünschten Produkt (z.B. Penicillin) mehr produzierte. Dieser Stamm wurde dann weiter behandelt.

Die Stammentwicklung wurde dank den Methoden der molekularen Genetik revolutioniert. Es gelingt jetzt, Stämme zielgerichtet zu verändern, indem man einzelne Gene zufügt oder inaktiviert (siehe Figur 7), oder indem man deren Regulation beeinflusst (siehe Figur 6). Die Methoden der molekularen Genetik werden aber heute nicht nur für die mikrobielle Produktion von Stoffen eingesetzt. Vielmehr finden sie auch in der Medizin, in der Landwirtschaft, im Umweltschutz (mikrobieller Abbau von «Problemsubstanzen» wie chlorierten Verbindungen und Erdöl), im Bergbau (Herauslösen von Mineralien aus Gestein mit Hilfe von Mikroorganismen), in der Ernährungsindustrie (Produktion von wertvollen Proteinen aus billigen Rohstoffen) und in vielen anderen Gebieten immer breitere Anwendung. Im folgenden sollen einige Beispiele die Bedeutung der Mikroorganismen und der Genetik in der Praxis illustrieren.

3.2. Produktion von Stoffen durch Mikroorganismen

In der chemischen Industrie werden immer mehr Stoffe nicht mehr rein synthetisch, sondern biologisch produziert. Dabei werden meistens Mikroorganismen oder deren Enzyme als Produzenten eingesetzt. Folgende Vorteile von Mikroorganismen werden dabei ausgenutzt:

- Mikroorganismen lassen sich leicht und schnell in grosser Zahl züchten. Das Bakterium *Escherichia coli* beispielsweise verdoppelt sich bei Wachstum in einer flüssigen Nährbrühe alle 20 Minuten. Über Nacht (12 Stunden) entstehen somit aus einer einzigen Zelle 70 Milliarden (2^{36}) Tochterzellen. Dichten von einer Milliarde Zellen pro Milliliter Nährbrühe werden leicht erreicht. Die Forschung geht auch dahin, mit möglichst billigen Nährbrühen (unter anderem Abfällen der Zuckerproduktion) möglichst gutes Wachstum zu erreichen.
- Mikroorganismen können in Form von ganzen Zellen zur Produktion eingesetzt werden. Oft werden aber auch nur einzelne Enzyme aus den Zellen isoliert und eingesetzt. Im Prinzip sind es natürlich immer die Enzyme, ob im Organismus oder in reiner Form, die einen chemischen Umsatz bewirken. Enzymatisch gesteuerte Schritte sind einem rein chemischen Schritt oft überlegen, weil
 - 1) enzymatische Schritte sehr spezifisch sind und praktisch keine Nebenprodukte entstehen,
 - 2) die Reaktionen unter sehr milden Bedingungen (Raumtemperatur, Normaldruck) ablaufen,
 - 3) die Reaktionen im wässrigen Milieu ablaufen und keine organischen Lösungsmittel erfordern und
 - 4) komplizierte Reaktionstypen oft in einem Schritt durchgeführt werden können.
 Es ist leicht einzusehen, dass diese Vorteile im «Zeitalter des Umweltschutzes» und der Energiekrise schwer wiegen.
- Mikroorganismen können genetisch relativ gut und zielgerichtet verändert werden, wie das beschrieben wurde.

Einige mikrobiologisch produzierte Stoffgruppen werden im folgenden kurz beschrie-

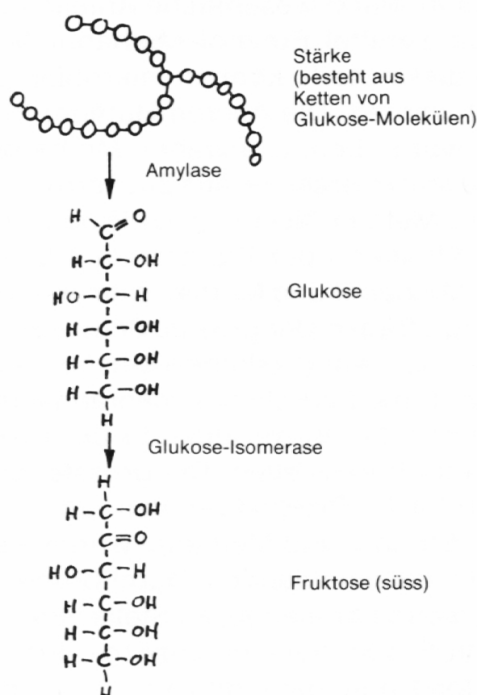
ben. Dabei wird auch die ökonomische Bedeutung dieser Stoffe erwähnt.

- Menschliche Proteine: Die Produktion des Hormons Insulin wurde bereits in Figur 7 illustriert. In ähnlicher Weise werden auch das Hormon Somatostatin und das menschliche Wachstumshormon mikrobiell produziert. Sehr grosse Publizität erfährt heute die Produktion von Interferon, die unter anderem von Hoffmann-La Roche AG und Biogen (Genf) betrieben wird. Interferon ist ein natürliches Protein, das möglicherweise bei Infektionen und Immunkrankheiten (und Krebs?) heilende Wirkung hat. Die Interferon-Forschung steht allerdings weitgehend am Anfang. Während früher aus über hundert Litern Blut nur 1 Milligramm Interferon zu einem Preise von rund Hunderttausend Franken isoliert werden konnte (ein Preis, der die Interferonforschung praktisch lahmlegte), werden dank mikrobieller Produktion Preise im Bereiche von einigen Franken pro Milligramm angestrebt.
- Vitamine, Antibiotika, Impfstoffe: Die 4 verbreitetsten Antibiotika (darunter Penicillin) erreichen weltweit einen jährlichen Verkaufswert von 10 Milliarden Franken und die 6 verbreitetsten Vitamine erreichen 1,5 Milliarden Franken. Beide Stoffklassen werden vorwiegend mikrobiell produziert, wobei die Ciba-Geigy AG am Antibiotika-Markt und die Hoffmann-La Roche AG am Vitamin-Markt wesentliche Anteile haben.
- Lösungsmittel, Ethanol, Methanol, Methan: Alle diese Stoffe können mikrobiell produziert werden. Die Aceton-Butanol-Produktion wurde bereits erwähnt. Methanol wird vor allem in Brasilien aus Zuckerrohr hergestellt. Methan lässt sich in Biogasanlagen aus Abfällen oder Klärschlamm produzieren. Methanol und Methan sind erstklassige Energieträger. Der grösste Schweizer Ethanol-Produzent (Cellulose Attisholz AG) benützt ausschliesslich zuckerähnliche Abfallstoffe der Holzproduktion, um mikrobiell Ethanol herzustellen. Die grosstechnische mikrobielle Produktion von Lösungsmitteln, Ethanol und Methanol würde weltweit einen entscheidenden Durchbruch erfahren, wenn es gelänge, an Stelle von zuckerähnlichen Stoffen Zellulose (ca. 40 % Anteil im Holz), oder gar Lignin (ca. 20 % Anteil im

Holz) effizient als Nährbrühe einzusetzen. Bedeutende Forschungsanstrengungen werden in dieser Richtung unternommen. Die enzymatische Holzverzuckerung ist ein Aspekt dieser Arbeiten. Zellulose ist auf dem Weltmarkt rund fünfmal billiger als Zucker, und man könnte damit die Produktionskosten senken. Dies wäre vor allem in Hinsicht auf die fortwährend steigenden Preise petrochemischer Produkte bedeutungsvoll.

- Enzyme: Hunderte von Enzymen werden heute kommerziell eingesetzt. Zwei Enzyme, die Amylase und die Glukose-Isomerase dienen für einen Prozess, der vor allem in den USA grosse Bedeutung erlangte. In den USA erlauben die klimatischen Verhältnisse gute Getreideernten, aber kaum einen nennenswerten Zuckerrohr- oder Zuckerrübenanbau. Folglich ist die Stärke (aus Getreide) billig und der Zucker teuer. Stärke lässt sich mit der Amylase in Glukose-Moleküle aufspalten und diese wiederum lassen sich mit der Glukose-Isomerase in Fruktose-Moleküle umsetzen (Figur 11). Fruktose ist dasjenige Molekül, das dem Zucker die Süßigkeit gibt. Die enzymatisch hergestellte Fruktose hat innerhalb weniger Jahre 20 % des amerikanischen Süßstoffmarktes erobert.

Figur 11:
Enzymatische Produktion von Fruktose aus Stärke



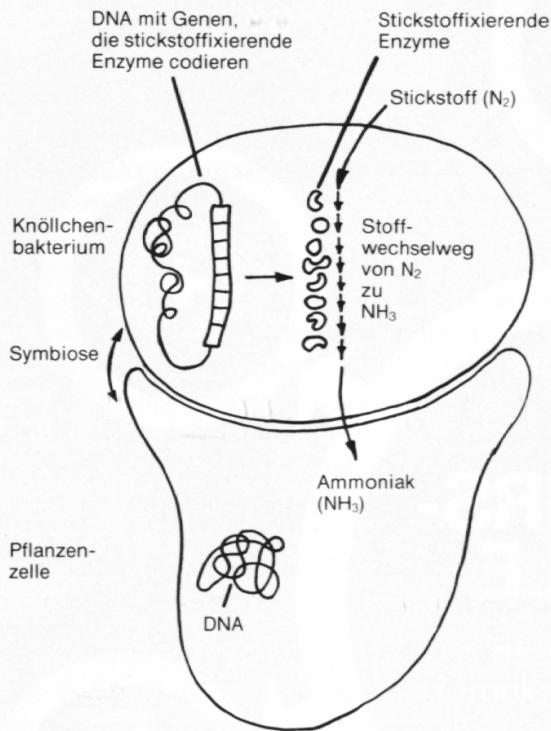
3.3. Ertragssteigerung in der Landwirtschaft

Die molekulare Genetik bietet viele Möglichkeiten, die landwirtschaftlichen Erträge zu steigern. Obwohl diese Arbeiten bisher noch keine entscheidenden Resultate zeitigten und momentan eher unter «Science Fiction» klassiert werden müssen, soll eine kurze Aufstellung der möglichen Ansatzpunkte präsentiert werden:

- Hebung der Anteile essentieller Aminosäuren in den Speicher-Proteinen des Getreides und damit Erhöhung des Nährwertes.
- Verbesserung der Effizienz der Photosynthese und damit schnellere Bildung von Biomasse.
- Einbau von Genen, die natürliche Insektizide codieren, in die DNA der Pflanzen. Die Pflanzen würden dann Insektizide produzieren und sich selbst gegen Insekten schützen.
- Kreuzungen von Nutzpflanzen mit Pflanzen, die salzhaltige Böden tolerieren. Möglicherweise liessen sich Nutzpflanzen züchten, die mit Meerwasser bewässert werden könnten.
- Ertragssteigerung durch Stickstofffixierung: Bekanntlich leben die sogenannten Knöllchenbakterien in Symbiose mit Leguminosen (= Hülsenfrüchten, z.B. Bohnen). Diese Bakterien vermögen molekularen Stickstoff (N_2) aus der Luft zu fixieren, das heisst zu Ammoniak (NH_3) umzusetzen (Figur 12). Diese Form von Stickstoff kann von der Pflanze aufgenommen werden, und sie ist somit nicht auf Stickstoffdüngung angewiesen. Die Enzyme, die Stickstoff zu Ammoniak umsetzen, werden von einer Reihe von rund 15 Genen codiert. Die Forschung zielt in zwei Richtungen: 1) die Regulation dieser Gene so zu verändern, dass die Knöllchenbakterien effizienter Stickstoff fixieren oder 2) diese Gene direkt ins Genmaterial von Pflanzen (z.B. Getreide) zu übertragen, so dass diese selbst Stickstoff fixieren können.

Man darf nicht vergessen, dass Ertragssteigerungen meistens auch ihre Kehrseiten haben. Bereits heute gibt es viele landwirtschaftliche Produkte, bei denen die Qualität der Quantität geopfert wurde.

Figur 12:
Stickstofffixierung



3.4. Amniozentese-Test in der Medizin

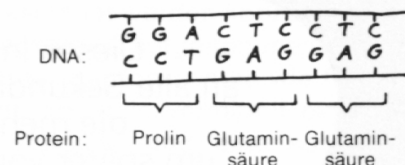
Viele erblich bedingte Krankheiten lassen sich schon während der Schwangerschaft feststellen. Dazu werden fötale Zellen aus der Fruchtblase entnommen und deren DNA wird untersucht. Dieser Vorgang wird Amniozentese genannt. Seit langem bekannt ist beispielsweise, dass die dreifache Anwesenheit des 21. Chromosoms Mongoloismus bewirkt. Die molekulare Genetik erlaubt heute die Früherkennung von über hundert genetischen Defekten. Das Auffinden eines Defekts, nämlich der Sichelzellenanämie (einer Krankheit, die sichelförmige rote Blutkörperchen bewirkt), soll hier kurz beschrieben werden. Hämoglobin besteht aus einem Komplex von 4 ähnlichen Proteinen, die alle 141 bis 146 Aminosäuren gross sind. Eine genaue Analyse der Aminosäurezusammensetzung ergab, dass die Hämoglobin-Proteine von normalen und von Sichelzellen-Blutkörperchen erstaunlicherweise nur in einer einzigen Aminosäure voneinander abweichen (Figur 13). Auf der Ebene der DNA wurde dieser Befund bestätigt. Ein Thymin-Nukleotid steht an Stelle eines Adenosin-Nukleotids, und das hat den Ersatz der

Aminosäure Glutaminsäure (Code: GAG) durch die Aminosäure Valin (Code: GTG) zur Folge. Dieser Ersatz bewirkt ein verändertes Hämoglobin-Protein und in letzter Konsequenz die Sichelzellenanämie.

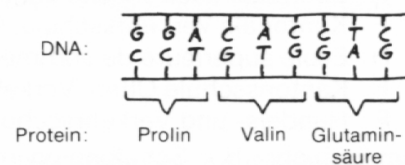
Bei der Früherkennung geht es darum, das fehlerhaft eingebaute Thymin nachzuweisen. Dies wird mit einer kurzen, einsträngigen, synthetisch hergestellten DNA-Sequenz gemacht. Diese Sequenz paart sich auf Grund der Nukleotid-Affinität vollständig mit der fehlerhaften, jedoch nur unvollständig mit der korrekten Hämoglobin-DNA. Die synthetische DNA-Sequenz trägt noch zusätzlich eine radioaktive Markierung, so dass sie leicht nachgewiesen werden kann. Die DNA des Fötus wird nun in Einzelstränge aufgetrennt und mit der markierten, synthetischen Sequenz vermischt. Bleibt diese Mischung radioaktiv, so hat sich offensichtlich die synthetische Sequenz mit der DNA des Fötus vollständig gepaart, was anzeigt, dass der Fötus eine Anlage zu Sichelzellenanämie trägt.

Figur 13:
DNA, die Hämoglobin-Proteine codiert

Ausschnitt aus normalen Hämoglobin:



Ausschnitt aus Sichelzellen Hämoglobin:



DNA-Sequenz für Nachweis:



paart sich unvollständig

paart sich vollständig