

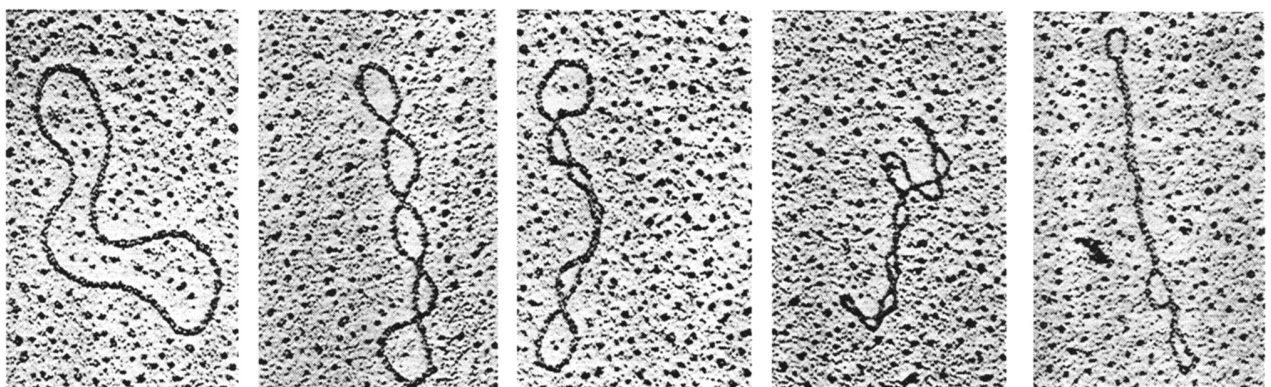
MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Die Technik der DNA-Rekombination, auch als Gentechnik bezeichnet, erlaubt die Isolierung von DNA-Abschnitten (genomische oder cDNA), deren Sequenzbestimmung, Modifikation und Expression. Zu diesem Zweck gelangen einige grundlegende Schritte immer wieder zur Anwendung, nämlich gezielte Verdauung von DNA mit Restriktionsendonucleasen, Verknüpfen von DNA-Molekülen mittels Ligase, Einfügen von DNA in Plasmide (oder andere geeignete Träger-DNA-Moleküle, sog. Vektoren), Einschleusen und Expression rekombinierter DNA in Bakterien oder eukaryotische Zellen, Selektion transfizierter Zellen und Isolierung klonierter Plasmid-DNA.

Plasmide

Bakterien verfügen häufig über sogenannte Plasmide. In Wildtypbakterien tragen Plasmide die Gene für die Konjugation von Bakterienzellen und gelegentlich auch für Antibiotikaresistenz (Resistenzplasmide). Plasmide, die Gene für die Inaktivierung von Antibiotika tragen, vermitteln dem Wirtsbakterium die Fähigkeit der Antibiotika-Resistenz. Durch den als Konjugation bezeichneten Vorgang, bei dem eine kurzfristige Zell-Zell Verbindung geschaffen wird, können Plasmide unter Bakterienzellen verbreitet werden. Plasmide sind ringförmige doppelsträngige DNA-Moleküle, die aus einigen tausend Basenpaaren bestehen. Unter Nutzung der Wirtsmaschinerie replizieren sich Plasmide unabhängig von chromosomaler DNA und exprimieren ihre Gene. Eine Bakterienzelle kann bis zu einigen hundert Kopien eines Plasmids enthalten, die nach Lyse der Bakterien relativ einfach isoliert werden können (Ausfällung von Proteinen und chromosomaler DNA, Fällung von Plasmid-DNA mit Alkohol). Andererseits können intakte Bakterien DNA aufnehmen, wenn sie durch geeignete Vorbehandlung (Erhöhung der extrazellulären Calcium-Konzentration, Erhöhung der Temperatur) "kompetent" gemacht werden. Dieser Vorgang wird als Transfektion bezeichnet (gelegentlich auch als Transformation von Bakterien).

Fig. 7 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Plasmiden. Die Plasmide in den Abbildungen 2-5 sind unterschiedlich überspiralisiert.



Restriktionsenzyme

Restriktionsenzyme sind bakterielle Endonucleasen mit hoher Spaltungsspezifität, die bestimmte Stellen in einem DNA-Doppelstrang erkennen und durchtrennen. Die Enzyme erkennen Sequenzen von 4 bis 8 Basen, die meist ein Palindrom darstellen, d.h. beide Stränge vom 5'-Ende gelesen haben

die gleiche Sequenz (= punktsymmetrisch). An den Spaltstellen entstehen je nach Restriktionsenzym stumpfe oder versetzte DNA-Enden. Durch ein bestimmtes Restriktionsenzym gebildete DNA-Enden können durch DNA-Ligase verknüpft werden. Überlappend komplementäre DNA-Enden, sog. "sticky ends", eignen sich dazu besonders gut, weil sie Basenpaarungen bilden können. Definiertes Durchtrennen und Zusammenfügen von DNA bildet die Grundlage zur Klonierung von DNA.

Erkennungssequenz einiger Restriktionsendonucleasen:

Restriktions- enzym	Erkennungssequenz *) (= Spaltstelle)
EcoRI	5' G AATTC 3'
Bgl I	5' GCCNNNN NGGC 3'
BamHI	5' G GATCC 3'
Sma I ¹⁾	5' CCC GGG 3'
Xma I ¹⁾	5' C CCGGG 3'
Pst I	5'-CTGCA G-5'

*) üblicherweise wird nur einer der DNA-Stränge angegeben

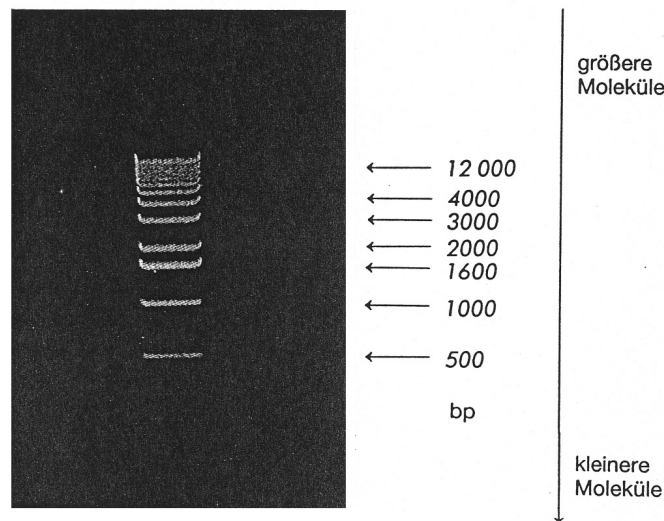
1) Beispiel für Enzyme, welche die gleiche Sequenz erkennen aber nicht notwendigerweise am gleichen Ort spalten

Es sind heute über 2'000 Restriktionsenzyme mit nahezu 200 verschiedenen Sequenzspezifitäten bekannt (verschiedene Restriktionsenzyme, aber gleiche Erkennungssequenz!). Die Bezeichnung der Restriktionsenzyme setzt sich aus dem ersten Buchstaben der Bakteriengattung und den zwei Buchstaben der Spezies, gefolgt vom Serotyp oder Stamm und ev. einer römischen Zahl (falls ein Bakterium mehr als ein Restriktionsenzym bildet) zusammen. So wird z.B. EcoRI von *Escherichia coli* des Stammes **RY13** gebildet (dieser *E. coli* Stamm bildet 4 weitere Restriktionsenzyme). *Bacillus globigii* bildet Bgl I und Bgl II.

Agarosegel-Elektrophorese

Bei neutralem pH-Wert wandert die durch die Phosphatgruppen negativ geladene DNA im elektrischen Feld gegen die Anode. Im Gelzustand bildet Agarose (aus Algen isoliertes, unter Erwärmung lösliches Polysaccharid) ein räumliches Netzwerk. Im Agarosegel wird DNA unterschiedlicher Länge und Form getrennt. Kurze DNA wandert schnell, lange DNA langsam. Zirkuläre DNA (Plasmid, Fig. 7) wandert anders als lineare DNA gleicher Länge. Die zirkuläre Plasmid-DNA ist u.a. überspiralisiert (Superhelix, engl. supercoiled) und dadurch sehr kompakt. Durch unterschiedliche Superspiralisierung der Plasmid-DNA (Fig. 7, 2-5) entstehen bei der Elektrophorese verschiedene Banden. Ethidiumionen, die im Agarosegel enthalten sind, lagern sich zwischen benachbarten Basenpaaren in DNA ein. DNA mit gebundenem Ethidium fluoresziert unter UV-Licht (Fig. 8) und kann dadurch im Agarosegel sichtbar gemacht werden.

Fig. 8



Es besteht eine lineare Beziehung zwischen der Wanderungsdistanz und dem Logarithmus der Anzahl DNA-Basenpaare. Wird die Wanderungsdistanz von DNA bekannter Länge gegen $\log(\text{DNA-Länge})$ graphisch als Eichgerade aufgezeichnet, kann daran die Länge von DNA-Proben abgelesen werden (Fig. 8).

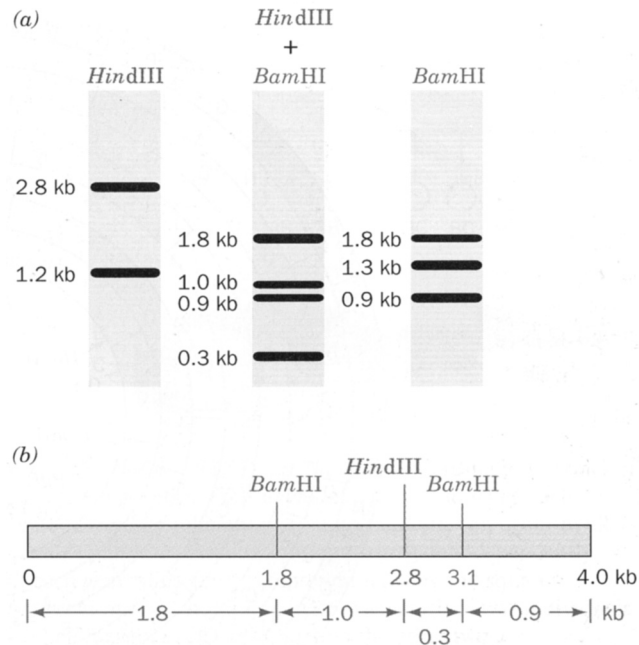
Restriktionskarten

Bei der Verdauung von DNA mit einem Restriktionsenzym entstehen genau definierte Fragmente, die in einem Agarosegel entsprechend der Größe getrennt werden können und ein bestimmtes Muster bilden. Verschiedene Restriktionsenzyme führen aus derselben DNA zu unterschiedlichen Mustern von Fragmenten. Aus der relativen Anordnung von Restriktionsfragmenten können sogenannte Restriktionskarten gezeichnet werden. Restriktionsstellen bilden dabei "Landmarken" und die lineare Folge von Restriktionsstellen bildet eine "Landkarte von DNA". Solche "Landkarten" werden u.a. häufig benutzt, um nach der Sequenzierung von größeren Restriktionsfragmenten die komplette Sequenz anhand überlappender Teilsequenzen zu ermitteln (Fig. 9).

Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus

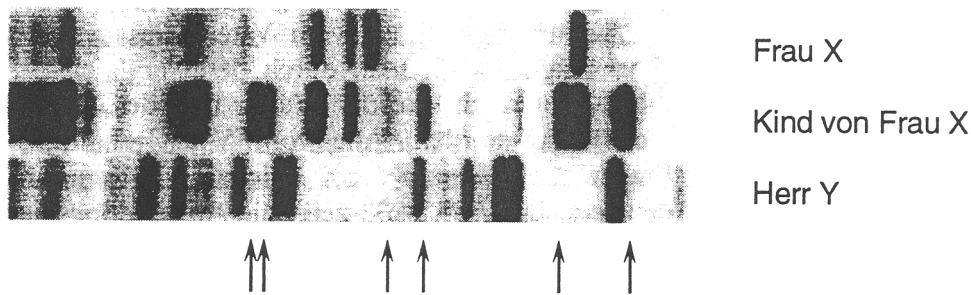
In der medizinischen Diagnostik und Grundlagenforschung haben Restriktionsmuster eine wichtige Bedeutung. Auf Grund von grösstenteils stummen Mutationen in kodierenden und nicht-kodierenden Regionen unterscheidet sich das menschliche Genom von zwei nicht nahe verwandten Individuen in ca. 0.2% aller Basen ($\approx 1:500$). Durch solche Variationen kann eine Erkennungsstelle für ein Restriktionsenzym so verändert werden, dass die DNA dort nicht mehr geschnitten wird. Wenn die Restriktionserkennungsstelle im DNA-Molekül des einen Chromosoms vorhanden ist, während sie auf dem anderen Chromosom fehlt, entsteht aus dem Chromosom mit der Schnittstelle ein kürzeres Fragment und aus dem anderen Chromosom ein längeres. Damit kann man die beiden Chromosomen einer Person aufgrund dieses **Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)** unterscheiden. Die betreffende Person ist heterozygot für diesen RFLP. Ein weiterer Längen-Polymorphismus beruht

Fig. 9 Muster der elektrophoretischen Trennung von DNA-Fragmenten nach der Verdauung eines DNA-Moleküls mit den Restriktionsenzymen Hind III, BamH I oder mit beiden Enzymen. b) Die Restriktionskarte aufgrund des elektrophoretischen Fragmentmusters aus obiger Abbildung (bis auf die rechts/links Seitenorientierung ist die gewonnene Information ausreichend, um eine eindeutige Abfolge der Restriktionsstellen festzulegen).



auf repetitiven DNA-Sequenzen, die im Genom verstreut und in variabler Anzahl von Tandem-Wiederholungen vorkommen. Restriktionsfragmente, die solche Tandem-Wiederholungen enthalten, können sich deshalb in ihrer Länge unterscheiden. Da der RFLP wie ein Gen vererbt wird, kann man die einzelnen Chromosomen von Generation zu Generation verfolgen, indem man die Vererbung des Markerfragments nachweist. Für die praktische Durchführung benötigt man allerdings sogenannte DNA-Sonden, welche die gewünschten Markerfragmente aus den tausenden von Restriktionsfragmenten durch ein als Hybridisierung bezeichnetes Verfahren gezielt sichtbar machen können. Zu diesem Zweck werden die Restriktionsfragmente nach der Elektrophorese denaturiert (=Trennung der beiden Stränge der DNA-Doppelhelix) und auf eine Membran transferiert (=Southern Blot). Unter geeigneten Bedingungen lagert sich die DNA-Sonde an die Stelle mit komplementärer Basen-sequenz. Am häufigsten werden Sonden verwendet, die repetitive DNA-Abschnitte erkennen. RFLP und weitere DNA-Polymorphismen gelangen u.a. in der Rechtsmedizin zur Anwendung. Mit solchen auch als "DNA-Fingerabdruck" (Fingerprint) bezeichneten Verfahren kann die genetische Verwandtschaft von Menschen untersucht werden (Figur 10).

Fig. 10 Entlastende DNA-Fingerprint-Analyse bei einem Vaterschaftsprozess:



Die Pfeile zeigen Restriktionsbanden beim Kind, die nicht bei der Mutter X, aber auch nicht beim Probanden Y vorkommen.

Wenn man vermutet oder durch genetische Analysen nachweisen kann, dass ein RFLP relativ nahe beim postulierten Gen einer Erbkrankheit lokalisiert ist, kann man ihn als Marker benützen. Je kürzer ein RFLP vom gesuchten Gen entfernt ist, desto geringer ist die Chance, dass bei der Meiose eine Rekombination zwischen Gen und RFLP stattfindet. Bei einer sog. Kopplungsanalyse verfolgt man die gemeinsame Vererbung eines Markers und eines Gens in einer Familie. Mit aufwendigen Untersuchungen an vielen Stammbäumen und mit einer grossen Zahl von RFLP-Markern kann es manchmal gelingen, Gene für eine bestimmte Erbkrankheit zu isolieren, deren Ursache bisher unbekannt war. Diese Art der Genisolierung wird auch als positionelle Klonierung bezeichnet. Beispiele und Meilensteine für dieses Verfahren sind die Entdeckung der Gene für Mukoviszidose und schwerwiegende neurologische Erkrankungen wie die Duchenne-Muskeldystrophie (vom Neurologen Duchenne beschrieben) oder die sog. Chorea Huntington oder Huntington'sche Krankheit (schwere Bewegungsstörung; im deutschsprachigen Raum auch als Veitstanz bezeichnet wegen Muskelzuckungen und unwillkürlichen, fahrigten Bewegungen). Dieser Untersuchungsablauf direkt von der Gensequenz zur Genfunktion wird auch als reverse Genetik bezeichnet.

Polymerase-Kettenreaktion

Mit PCR (engl. **p**olymerase **c**hain **r**eaction) können spezifische DNA-Abschnitte in einigen Stunden millionenfach vervielfältigt werden (Figur 11). Voraussetzung ist, dass ein Teil der Nukleotidsequenz bekannt ist, um synthetische Oligonukleotid-Primer herstellen zu können. Ebenso wird die Tatsache ausgenützt, dass die DNA-Stränge gegenläufig sind und die Synthese durch DNA-Polymerase nur am 3'-DNA-Ende stattfindet (Fig 11 B, Pfeile). Die Proben-DNA wird durch Erhöhung der Temperatur auf 94°C denaturiert (A, 1). Bei Abkühlung auf 55-60 °C binden die im Überschuss zugesetzten Oligonukleotide (=Primer) durch Basenpaarung an die DNA-Stränge, nämlich an der Stelle, zu welcher sie komplementär zur DNA sind (B). Die zugesetzte DNA-Polymerase ergänzt beide Stränge zum jeweiligen DNA-Doppelstrang (C). Bei Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus thermophilen Bakterien (z.B aus Geisiren) kann der Reaktionszyklus von Denaturierung, Anhaften der Oligonukleotide und Extension zu den Doppelsträngen wiederholt werden (D-F). Ab dem 3. Zyklus (F) werden DNA-Moleküle der gewünschten Länge gebildet und exponentiell amplifiziert (F-G). Die Synthesereaktion der thermostabilen DNA-Polymerase läuft bei 72°C optimal ab.

Fig. 11

