

## Vorbereitung – Replikation von Genomen III

In der vorigen Lektion haben Sie eine Einführung in die Herstellung rekombinanter DNA (Klonierung) erhalten. Die Genklonierung ist in zweifacher Hinsicht nützlich: Einerseits dient sie der Vervielfältigung eines Gens, andererseits kann das klonierte Gen auch benutzt werden, um das Genprodukt (Protein) herzustellen. Dazu muss die rekombinante DNA in einen Organismus gebracht werden, der das Gen exprimiert. Die dabei entstehenden Organismen nennt man gentechnisch modifizierte Organismen (GMO). GMOs und gentechnologische Methoden finden ihre Anwendung in der Medizin, der Kriminalistik und der Landwirtschaft, wie Sie in dieser Lektion erfahren werden.

### Lernziele der Lektion

- Sie können den Begriff GMO erklären.
- Sie können die medizinischen Anwendungen von DNA-Technologien in der Diagnose von genetisch bedingten Krankheiten und in der Entwicklung von Therapien, Medikamenten und Impfungen erklären.
- Sie können erklären, wie DNA-Technologien benutzt werden, um den Nährwert von Pflanzen zu erhöhen oder Pflanzen zu entwickeln, die pharmazeutische Wirkstoffe produzieren.
- Sie können erklären, wie die Gelelektrophorese zur Analyse von DNA und zur Unterscheidung zweier Allele eines Gens benutzt werden kann.
- Sie können erklären, wie DNA-Technologien in kriminaltechnischen Untersuchungen (Forensik) angewendet werden.

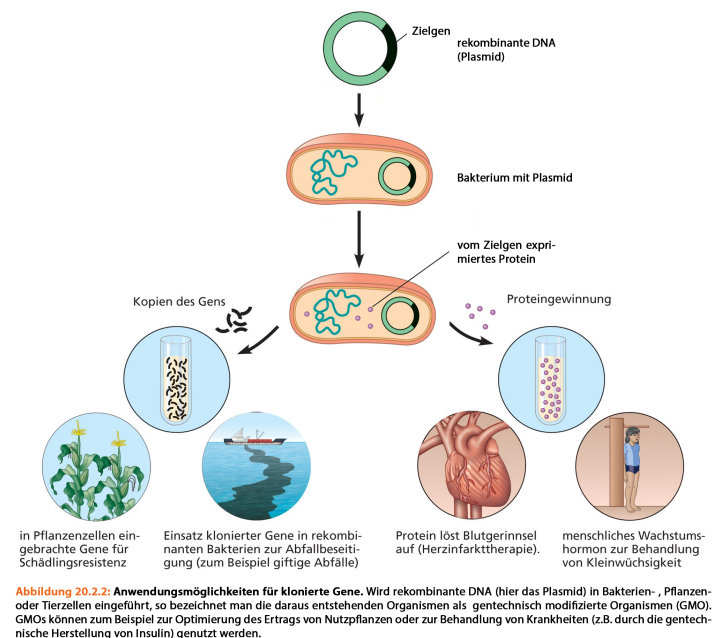
### Der Einsatz genetisch modifizierter Organismen

Rekombinante DNA dient in vielen Fällen dazu, das auf der DNA codierte Protein herstellen. Das bedeutet, dass die rekombinante DNA in einen Organismus eingeführt werden muss, der anschließend das Genprodukt herstellt. Durch gezieltes Einführen von rekombinanter DNA entstehen gentechnisch modifizierte Organismen (GMO), die in der Grundlagenforschung, der Herstellung biologischer Pharmazeutika, der Modifikation von Nutzpflanzen und zur Therapie von Krankheiten eingesetzt werden können. Die Anwendungen von GMOs werden in dieser Lektion genauer besprochen.

### GMOs zur Gewinnung pharmazeutisch interessanter Proteine

Pharmazeutisch interessante Proteine können durch geeignete Expressionssysteme gewonnen werden, ebenso wie Impfstoffe für die aktive Immunisierung. Alternativ dazu können auch ganze Tiere oder Pflanzen für die Proteinherstellung genutzt werden. Bei Tieren greift man auf die Reagenzglasbefruchtung zurück. Eine Eizelle wird künstlich befruchtet, woraufhin die Fremd-DNA in die Zygote injiziert wird. In einigen Fällen wird das fremde Gen tatsächlich ins Genom eingebaut und exprimiert. Der Embryo wird einer Leihmutter eingepflanzt und am Ende der Schwangerschaft erhält man ein transgenes Tier. Wenn dem Transgen eine Transkriptionsstartsequenz vorgeschaltet ist,

so erhält man „lebende Proteinfabriken“ also Tiere, die das gewünschte Protein ständig exprimieren. Ein Beispiel dafür ist die Produktion von Antithrombin. Das Zielgen wurde als Teil eines Konstruktes eingesetzt, das bewirkte, dass das Protein direkt in die Milch sezerniert wird. Durch simples Melken der Ziege konnte Antithrombin gewonnen werden. Die Aufreinigung aus der Milch war wesentlich einfacher als die Extraktion von Antithrombin aus Zellkulturen.



### GMOs in der Landwirtschaft

Das rasante Wachstum der Menschheit stellt neue Anforderungen an die Ernährung. Es ist von immer größerer Bedeutung, Nutztiere und Nutzpflanzen gentechnisch zu verändern, um die landwirtschaftliche Produktion zu verbessern.

Schon seit Jahrhunderten haben Bauern Nutztiere gezüchtet, indem sie Tiere miteinander kreuzten, die besonders nützliche Eigenschaften aufwiesen. Dieser Prozess ist erfolgreich, aber langwierig. Mit dem Erschaffen transgener Organismen können dieselben Ziele innerhalb kürzerer Zeit erreicht werden. So kann z. B. der Fettgehalt in Schweinefleisch gesenkt oder die Qualität der Schafswolle gesteigert werden. Zur Zeit zeigen transgene Tiere aber noch Probleme wie verringerte Fruchtbarkeit oder höhere Krankheitsanfälligkeit.

Bei Pflanzen werden ähnliche Bestrebungen unternommen. Krankheitsresistenzen, Herbizidresistenzen, höhere Salztoleranz, höherer Nährstoffgehalt etc. sind dank Gentechnik möglich.

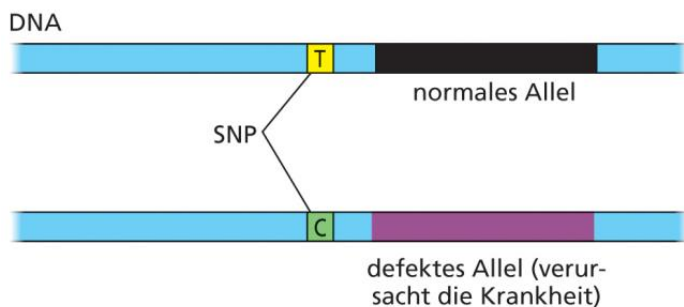
## GMOs und Nachhaltigkeit

Mikroorganismen werden vermehrt bei der Bekämpfung von Umweltverschmutzungen eingesetzt. Einige Bakterien sind in der Lage, Schwermetalle wie Kupfer oder Blei anzureichern und als Sulfate zu speichern. Aus diesen Sulfaten wiederum können die Metalle leicht zurückgewonnen werden. Da die Bakterien oft nicht an das Umfeld angepasst sind, in dem sie benötigt werden, kann man ihre Stoffwechseleigenschaften gentechnisch verändern und dadurch eine bessere Anpassung bewirken. Heute werden solche modifizierten Bakterien in Kläranlagen verwendet.

Eine weitere Anwendung von gentechnisch modifizierten Organismen ist die Produktion von Treibstoffen. Dabei werden Bakterien verwendet, um stärkehaltige Pflanzenabfälle in ihre Mono- und Oligosaccharide abzubauen. Diese können im Anschluss durch Hefe zu Bioethanol vergoren werden.

## Gentechnik in der Medizin I – Genetische Marker und Restriktionsfragmentanalyse

Gentechnologische Methoden sind auch aus der Medizin nicht mehr wegzudenken. Die Diagnostik vieler Krankheiten ist einfacher geworden. Infektions- oder Erbkrankheiten können mithilfe von PCR und Sequenzierung zuverlässig nachgewiesen werden. Dies geschieht inzwischen routinemässig zum Nachweis von HIV, Chorea Huntington oder Sichelzellenanämie. Gewisse Allele, die mit Krankheiten assoziiert sind, werden indirekt über sogenannte genetische Marker nachgewiesen. Der genetische Marker ist nicht für die Krankheit verantwortlich, aber er tritt häufig mit ihr auf. Genetische Marker sind allgemein als DNA-Variationen bekannt, die man auch Polymorphismen nennt.

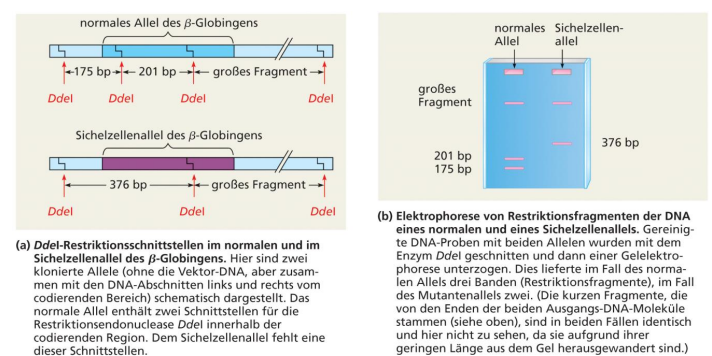


**Abbildung 20.21: Einzelnucleotidpolymorphismen (SNPs) als genetische Marker für Krankheiten verursachende Allele.** Diese Schemazeichnung stellt homologe DNA-Abschnitte von Vertretern einer fiktiven Familie dar, in der einige Mitglieder an einer Erbkrankheit leiden. Familienmitglieder, die nicht von der Krankheit betroffen sind, tragen an einem bestimmten SNP-Locus ein T. Ist an dieser Stelle stattdessen ein C vorhanden, so ist damit ein hohes Risiko verbunden, dass die betreffende Person auch das defekte Allel in sich trägt, das die Krankheit verursacht. Ist die entsprechende Sequenz Teil einer Erkennungsstelle für eine Restriktionsendonuclease, so kann der Austausch zum Verlust der Restriktion an dieser Stelle führen. (Wir stellen hier nur jeweils einen der beiden DNA-Stränge dar.)

Einzelnucleotid-Polymorphismen (*engl.* single nucleotide polymorphisms, SNP) sind dabei die bekanntesten Polymorphismen.

men. Sie bezeichnen die Variation eines Basenpaares, die bei mindestens zwei Prozent der gesamten Bevölkerung auftritt (Abb. 10.21). Eine ausführliche Besprechung von SNPs folgt im Kapitel "Variabilität von Genomen".

SNPs können überall im Genom auftreten. Man kann sie effizient über eine PCR nachweisen. Falls ein SNP zufällig in der Schnittstelle eines Restriktionsenzym auftritt, beeinflusst das die Länge der Restriktionsfragmente, da durch den SNP die Erkennungsstelle des Restriktionsenzym verloren geht. Dieses Phänomen bezeichnet man als Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP). RFLPs können leicht durch eine Gelelektrophorese nachgewiesen werden, da die Fragmente der Grösse nach aufgetrennt werden. Machen Sie sich mithilfe von Abbildung 20.10 am Beispiel des  $\beta$ -Globingens mit der Unterscheidung von Allelen durch die Restriktionsfragmentanalyse vertraut.



**Abbildung 20.10:** Die Verwendung der Restriktionsfragmentanalyse zur Unterscheidung zwischen dem normalen  $\beta$ -Globin und dem Sichelzellenanämieallel des Menschen. (a) Die Sichelzellenmutation führt zum Verlust einer der *DdeI*-Restriktionsschnittstellen innerhalb des Gens. (b) Als Folge davon führt die Restriktionsfragmentanalyse mit *DdeI* beim normalen und beim Sichelzellenallel zu unterschiedlichen Fragmenten (abweichenden Bandenmustern).

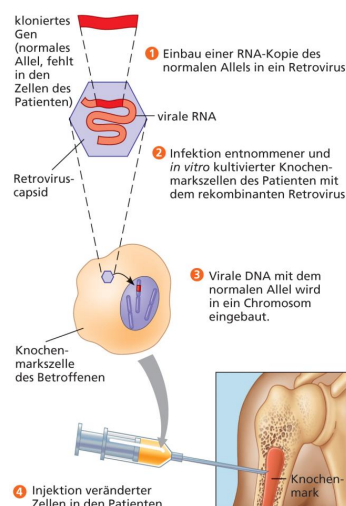
## Gentechnik in der Medizin II – Gentherapie

Eine vielversprechende Anwendung der Gentechnik ist die Gentherapie, bei der Gene zur Behandlung von Erbkrankheiten in Patienten eingeführt werden. Hierzu wird ein Allel, das das normale Genprodukt codiert, in das RNA-Genom eines harmlosen Retrovirus eingebaut. Dann werden körpereigene Zellen, die sich noch häufig teilen (z. B. Knochenmarkszellen), mit dem Virus infiziert (Abb. 20.22). Dabei soll das Retrovirus das Allel in die chromosomale DNA des Patienten einbauen. Nach einiger Zeit haben sich die reparierten Zellen genügend geteilt und das fehlende Genprodukt ist ausreichend vorhanden, sodass der Patient geheilt ist. Diese Idee klingt einfach, aber es gibt viele Schwierigkeiten: Man kann nicht steuern, an welcher Stelle des Genoms das Retrovirus eingebaut wird. Auch kann man die Aktivität des eingebauten Gens nicht kontrollieren, da es nicht die regulatorischen Elemente des nativen Gens besitzt. Als therapeutische Alternative kann man Keimbahnzellen behandeln, was beim Menschen aber aus ethischen Gründen nicht verfolgt wird.

## Gentechnik in der Forensik

Auch in der Forensik werden gentechnische Verfahren eingesetzt, um genetische Profile von potentiellen Verdächtigen zu erstellen. Dieses genetische Profil basiert auf genetischen Markern, die in einer Population variieren. Nur eineiige Zwillinge besitzen

die exakt gleichen genetischen Marker.

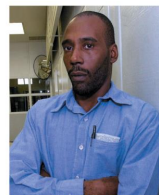


**Abbildung 20.22: Gentherapie mit einem Retrovirus als Vektor.** Ein „entschärftes“ Retrovirus ohne gefährliche Eigenschaften dient bei diesem Verfahren als Vektor. Dabei nutzt man die Fähigkeit von Retroviren, ihr RNA-Genom in DNA umzuschreiben und diese in die chromosomale DNA der Wirtszelle einzubauen (siehe Abbildung 19.8). Falls das Fremdgen, das der retrovirale Vektor mit sich führt, exprimiert wird, werden die infizierte Empfängerzelle und die durch Teilung aus ihr hervorgehenden Zellen das Protein herstellen, was zur Heilung führt. Zellen, die sich lebenslang vermehren, so wie Knochenmarkszellen, sind ideale Zielzellen für die Gentherapie.

Eine beliebte und sehr sensitive Methode basiert auf der Analyse von Short Tandem Repeats (STRs). Diese STRs sind zwei bis fünf Basenpaare lang und kommen mit einer unterschiedlichen Anzahl Wiederholungen vor. Auf STRs wird noch genauer im Kapitel „Variabilität von Genomen“ eingegangen. Die Anzahl der Wiederholungen der STRs unterscheiden sich zwischen Individuen stark. Deshalb eignen sich STRs sehr gut zur Erstellung eines

genetischen Profils. Die Stellen, die STRs enthalten, werden mithilfe der PCR amplifiziert und die Produkte gelelektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Dadurch kann man auf die Anzahl der Wiederholungen der STRs schließen (Abb. 20.24).

(a) Im Jahr 1984 wurde der US-Amerikaner Earl Washington wegen Vergewaltigung und Mordes an Rebecca Williams für schuldig befunden und zum Tode verurteilt. Sein Urteil wurde 1993 aufgrund neuer Zweifel an der Beweisführung in eine lebenslange Haft umgewandelt. Im Jahr 2000 konnten Gerichtsmediziner durch STR-Analysen schlüssig seine Unschuld beweisen. Dieses Foto zeigt Earl Washington kurz vor seiner Freilassung im Jahr 2001 – nach 17 Jahren im Gefängnis.



Quelle des Probenmaterials	STR-Marker Nr. 1	STR-Marker Nr. 2	STR-Marker Nr. 3
Sperma vom Körper des Opfers	17, 19	13, 16	12, 12
Earl Washington	16, 18	14, 15	11, 12
Kenneth Tinsley	17, 19	13, 16	12, 12

(b) Bei der STR-Analyse (*small tandem repeats*) werden ausgewählte STR-Marker einer DNA-Probe mithilfe der PCR amplifiziert und die erhaltenen Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Prozedur enthüllt, wie viele Wiederholungen an jedem STR-Locus im Probenmaterial vorhanden sind. Ein diploides Individuum (wie der Mensch) trägt für jeden STR-Locus zwei Allele, jeder davon mit einer bestimmten Zahl von Wiederholungen. Die Tabelle gibt die Anzahl der Wiederholungen für bestimmte STR-Marker in drei untersuchten Proben an. Das Probenmaterial entstammt Spermaesten, die am Opfer gefunden wurden, dem Verurteilten E. Washington sowie einem weiteren Mann namens K. Tinsley, der aufgrund einer Verurteilung in einem anderen Strafverfahren ebenfalls einsaß. Diese und weitere STR-Daten (hier nicht aufgeführt) führten dazu, dass Washington entlastet wurde und Tinsley den Mord schließlich gestand.

**Abbildung 20.24: STR-Analysen zur Entlastung eines unschuldig Verurteilten.**

Dasselbe Verfahren kann abgeändert auch für Vaterschaftstests verwendet werden. Ein Kind besitzt jeweils zwei Varianten eines STRs; diese STRs können mit den Allelen von der Mutter und denen der möglichen Väter verglichen werden.

Das genetische Profil eines Menschen bezeichnet man auch als „genetischen Fingerabdruck“ (*engl.* fingerprint).