

Vorbereitung – Replikation von Genomen II

Wie Sie in der vorherigen Lektion erfahren haben, läuft die Replikation der DNA in jeder Zelle vor der Zellteilung ab. In der Forschung können Kenntnisse dieses Vorgangs genutzt werden, um mithilfe einer Methode, die man Polymerasekettenreaktion nennt, nach Bedarf DNA-Moleküle im Labor zu vervielfältigen. Doch nicht nur die künstliche Vervielfältigung von DNA, sondern vor allem die Möglichkeit, deren Sequenz neu zusammenzusetzen, ist die Basis vieler Erkenntnisse und Fortschritte in der biochemischen Forschung. Die Herstellung solcher rekombinanter DNA nennt man Klonierung. Die wichtigsten Techniken zur Herstellung rekombinanter DNA werden in dieser Lektion erläutert. Weiterhin werden Sie lernen, dass rekombinante DNA in andere Organismen eingebracht werden und dort zur Expression von Proteinen dienen kann.

Lernziele der Lektion

- Sie können die Polymerasekettenreaktion (PCR) beschreiben und den Nutzen dieser Methode erklären.
- Sie können beschreiben, wie eukaryotische Gene in ein bakterielles Plasmid kloniert werden können.
- Sie kennen die natürliche Funktion der Restriktionsenzyme und können beschreiben, wie sie in der rekombinanten DNA-Technologie eingesetzt werden.
- Sie können erklären, wie die Funktion eines Gens bestimmt werden kann.

Vervielfältigung von DNA mithilfe der Polymerasekettenreaktion

Alle Methoden, die DNA zu verändern, werden unter dem Begriff Gentechnologie zusammengefasst. Dazu gehört auch die Herstellung rekombinanter DNA, also künstlicher DNA-Moleküle. Die Herstellung und Vervielfältigung solcher rekombinanter DNA nennt man Klonierung.

Sie kennen den Begriff „Klonen“ vielleicht bereits als die Erzeugung genetisch identischer Individuen. Das berühmteste Beispiel ist das Schaf Dolly, das 1996 als erstes geklontes Säugetier geboren wurde. Analog bezeichnet man in der Molekularbiologie die Herstellung identischer Kopien einer DNA als Klonieren. Ziel einer Klonierung ist es, ein bestimmtes DNA-Fragment (z. B. ein Gen) zu vermehren. Die Genklonierung eröffnet viele Möglichkeiten: Zum einen kann die vervielfältigte DNA-Sequenz analysiert werden. Ausserdem kann das durch die DNA-Sequenz codierte Protein exprimiert und erforscht werden.

Zunächst braucht man zur Klonierung also das gewünschte DNA-Fragment. Wie aber erhält man dieses? Wie kann man aus dem gesamten Genom einer Zelle ein bestimmtes DNA-Stück „herausholen“? Dazu benutzt man die sogenannte Polymerasekettenreaktion (*engl.* polymerase chain reaction, PCR). Die PCR erlaubt die schnelle, selektive und automatisierte Amplifikation eines DNA-Fragments. Sie kommt zum Einsatz, wenn die gewünschte DNA-Sequenz in kleinen Mengen vorhanden ist und ermöglicht die Vervielfältigung eines bestimmten Gens aus der chromosomalen DNA.

Die Methode basiert auf den Grundlagen der DNA-Replikation. Mithilfe einer Polymerase wird ein zu einer Vorlage komplementäres DNA-Molekül synthetisiert. Weiterhin werden Primer, also kurze, zur Matrizen-DNA komplementäre, einzelsträngige Nucleotidsequenzen als Startmoleküle für die Polymerase benötigt. Betrachten Sie hierzu die Abbildung 12.13mod. Der

Forward-Primer ist komplementär zum Beginn der Zielsequenz auf dem dunkelblauen, von 3' nach 5' verlaufenden Strang, während der Reverse-Primer komplementär zum Ende der Zielsequenz auf dem hellblauen, von 5' nach 3' verlaufenden Strang ist. Beachten Sie, dass Primer, die man für die PCR verwendet, DNA-Primer sind und nicht RNA-Primer, wie sie bei der DNA-Replikation in der Zelle synthetisiert werden. Die gewünschten Primer können bei einer auf DNA-Synthese spezialisierten Firma bestellt werden. Eine PCR besteht aus drei Schritten, die nachfolgend erklärt werden. Das Wiederholen dieser drei Schritte führt zu einer exponentiellen Vervielfältigung der gewünschten DNA-Sequenz.

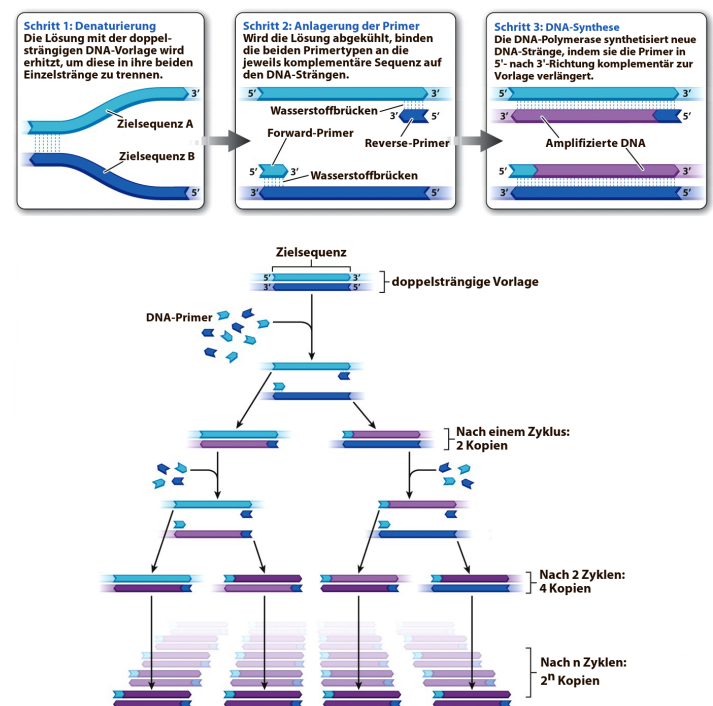


Abbildung 12.13mod: Polymerasekettenreaktion (PCR). (adaptiert von Abbildung 12.13, How LifeWorks, Freeman and Company)

1. Die Reaktionsmischung wird erhitzt, dabei denaturiert die DNA, das heisst die Doppelhelix dissoziiert in ihre Einzelstränge.
2. Schnelles Abkühlen führt dazu, dass sequenzspezifische DNA-Primer mit den Einzelsträngen hybridisieren. Die Primer binden an die beiden Enden des zu amplifizierenden DNA-Segments.
3. Eine thermostabile DNA-Polymerase (die *Taq*-Polymerase) synthetisiert vom 3'-Ende der Primer ausgehend das komplementäre DNA-Segment von 5' nach 3'.

Der Trick dieser Reaktion ist das Verwenden einer hitzestabilen Polymerase. Im Gegensatz zu den meisten Enzymen denaturiert sie nicht bei erhöhten Temperaturen.

Die Genklonierung ist nur ein Beispiel einer Anwendung der PCR; sie wird auch benutzt, um bei Vaterschaftstests oder bei der Überführung von Tätern die DNA einer bestimmten Person nachzuweisen. Auch bei der Sequenzierung, die Sie bereits im Abschnitt „Struktur und Analyse von Genomen“ kennengelernt haben, nutzt man das Prinzip der PCR, um DNA-Sequenzen zu analysieren. Im kurzen Video im Online-Kurs wird die PCR noch einmal zusammengefasst.

Genklonierung in der Übersicht

Zur Klonierung einer bestimmten DNA-Sequenz wird eine PCR mit der genomischen DNA (die man aus dem ursprünglichen Organismus isoliert hat und die das Zielgen enthält) und den Primern durchgeführt. So erhält man nach der PCR das Zielgen in Form einer linearen Sequenz. Das lineare DNA-Fragment kann aber nicht direkt benutzt werden. Möchte man das Gen exprimieren (d.h. zu einem Protein übersetzen), um so seine Funktion zu untersuchen, benötigt man geeignete Sequenzen, die das Ablesen des Gens erlauben (eine sogenannte Transkriptionsstartstelle oder auch Promoter). Andererseits möchte man das klonierte DNA-Stück nicht jedes Mal wieder neu mithilfe einer PCR herstellen, sobald man es verbraucht hat. Deshalb macht man sich eine zelluläre Replikationsmaschinerie zunutze, die dafür sorgt, dass die DNA bei jeder Zellteilung in die Tochterzellen weitergegeben wird. Dazu braucht man, wie Sie in der letzten Lektion gelernt haben, einen (oder mehrere) Replikationsursprünge.

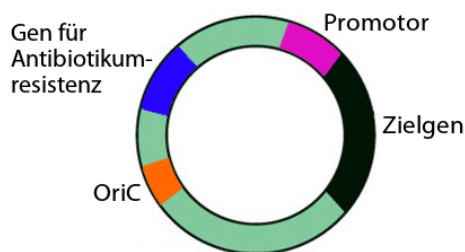


Abbildung 8: Ein Plasmid mit einem OriC (Replikationsursprung), einem Promotor zur Expression eines Zielgens und einem Gen für eine Antibiotikumresistenz.

Man muss also das mithilfe der PCR hergestellte DNA-Stück mit Sequenzen versehen, die diese Funktionen gewährleisten können. Wie kann man das bewerkstelligen? Hier macht man sich eine Besonderheit von prokaryotischen Zellen zunutze, die Sie bereits kennengelernt haben: die Plasmide. Plasmide sind kleine, zirkuläre DNA-Moleküle, die in vielen Bakterienarten zusätzlich zum Hauptgenom vorliegen. Auf solchen Plasmiden sind spezielle Gene lokalisiert, die für besondere Eigenschaften des Bakteriums codieren. Beispielsweise tragen viele der Bakterienplasmide Gene, die ihnen eine Resistenz gegenüber einem bestimmten Antibiotikum verschaffen. Plasmide besitzen Replikationsursprünge und können sich so autonom (unabhängig vom Hauptgenom) in der Zelle replizieren. Plasmide lassen sich ausserdem leicht in andere Bakterienzellen übertragen (Abb. 8).

Diese Plasmide kann man nun nutzen, um ein künstlich (z. B. mit PCR) hergestelltes DNA-Stück in Bakterienzellen zu vervielfältigen und später auch zu exprimieren. Doch dazu muss man das DNA-Stück zuerst in ein geeignetes Plasmid „einfügen“. Wie das geht, sehen Sie auf der nächsten Seite.

Genklonierung im Detail

Wie kann man nun ein lineares DNA-Stück, das das Zielgen enthält, in ein zirkuläres Plasmid einfügen? Dies geschieht in einem „Schneiden und Kleben“-Ansatz, bei dem beide Teile (das Plasmid und das zirkuläre DNA-Stück) so zurechtgeschnitten werden, dass sie danach wieder zusammengeklebt werden können. Dabei bedeutet Schneiden auf molekularer Ebene, das DNA-Rückgrat aufzutrennen, indem die Phosphodiesterbindung zwischen den Nucleotiden getrennt werden. Kleben andererseits bedeutet, die Phosphodiesterbindung zwischen den Nucleotiden wieder herzustellen.

Zum Schneiden bedient man sich wieder einer Eigenheit von Bakterienzellen: Diese besitzen spezielle Enzyme, die man Restriktionsenzyme nennt. Restriktionsenzyme haben eine spezifische DNA-Erkennungssequenz, innerhalb der sie die DNA in definierter Art und Weise schneiden, also das Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA gezielt hydrolysieren. Bakterien benutzen diese Enzyme zum Schutz vor viraler DNA, indem sie ins bakterielle DNA-Molekül integrierte virale DNA mithilfe von Restriktionsenzymen ausschneiden. Mithilfe solcher Restriktionsenzyme kann man also die DNA an bestimmten Stellen schneiden.

Ein Beispiel für ein Restriktionsenzym ist *HindIII*, dessen spezifische Erkennungsstelle 5'-TGGCCA-3' ist (Abb. 9). Die erzeugten Fragmente nennt man Restriktionsfragmente.



Abbildung 9: Eine DNA, die mit dem Restriktionsenzym Hind III geschnitten wurde.

Ein Plasmid kann man mithilfe von Restriktionsenzymen spezifisch aufschneiden (linearisieren). So erzeugt man „offene“ Enden, also freie 3'- und 5'-Enden. Wie können jetzt die beiden Stücke – das Plasmid und das Zielgen – wieder zusammengefügt (geklebt) werden? Denken Sie daran, wie in der Replikation die Okazaki-Fragmente, die am Folgestrang entstehen, miteinander verbunden werden. Dabei wird ein zelleigenes Enzym, die Ligase, verwendet, die die OH-Gruppe am 3'-Ende mit dem Phosphatrest am 5'-Ende zu einer Esterbindung verbindet. Dieses Prinzip nutzt man auch bei der Klonierung (Abb. 10).

Nach dem Schneiden der DNA-Fragmente durch Restriktionsenzyme werden diese von Ligasen verbunden. So werden das geschnittene Plasmid und das Zielgen wieder zu einem zirkulären, intakten Plasmid zusammengefügt. Dieses Plasmid liegt an diesem Punkt noch in einem Reagenzglas vor. Nun möchte man das Plasmid vermehren und gegebenenfalls auch das durch die DNA-Sequenz codierte Protein herstellen und erforschen. Dazu überträgt man das Plasmid in Bakterienzellen, die man dann ver-

mehrt. Aus den Bakterienzellen kann dann das Plasmid wieder isoliert werden, wenn man es weiter gentechnologisch bearbeiten möchte.

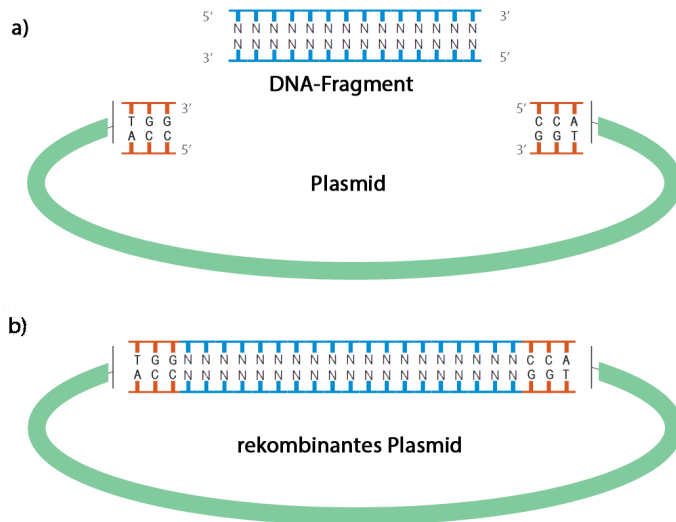


Abbildung 10: Ligation eines DNA-Fragments mit einem Plasmid. a) Das Plasmid wird mithilfe eines Restriktionsenzym aufgeschnitten. Danach wird das DNA-Fragment, das das Zielgen enthält, zusammen mit dem Enzym Ligase zugegeben. b) Nach der Ligation entsteht wieder ein zirkuläres Plasmid, welches das DNA-Fragment enthält.

Die Expression eines Zielgens

In vielen Fällen möchte man die rekombinante DNA nicht nur vervielfältigen, sondern auch das auf der DNA codierte Protein herstellen. Das bedeutet, dass das Gen in einen Organismus eingeführt werden muss, der anschließend das Genprodukt herstellt, also das Protein exprimiert (Abb. 20.2.1). Einen solchen Organismus nennt man auch ein „Expressionssystem“. Es gibt bakterielle und eukaryotische Expressionssysteme. In beiden Fällen verwendet man spezifische Plasmide, die Sequenzen zur Expression der rekombinanten DNA enthalten. Diese Sequenzen müssen mit dem Expressionssystem kompatibel sein, sodass das eingeschleuste Gen im jeweiligen Organismus auch exprimiert wird.

Bakterien sind einfach zu kultivierende Expressionssysteme. Jedoch ist es oft schwierig, eukaryotische Proteine in Bakterien zu produzieren. Dies liegt daran, dass eukaryotische Gene nicht-codierende Sequenzen (Introns) enthalten, die vor der Übersetzung der RNA zu einem Protein herausgeschnitten werden müssen, was in Bakterien nicht möglich ist.

Ein oft verwendetes eukaryotisches Expressionssystem sind Hefezellen. Gewisse Hefezellen können Plasmide aufnehmen, was

für Eukaryoten ungewöhnlich ist. Eukaryotische Expressionssysteme sind von Vorteil, weil eukaryotische Zellen die Maschinerie zur Entfernung der Introns aus der mRNA besitzen. Generell ist aber die Kultivierung komplexer als bei Bakterien.

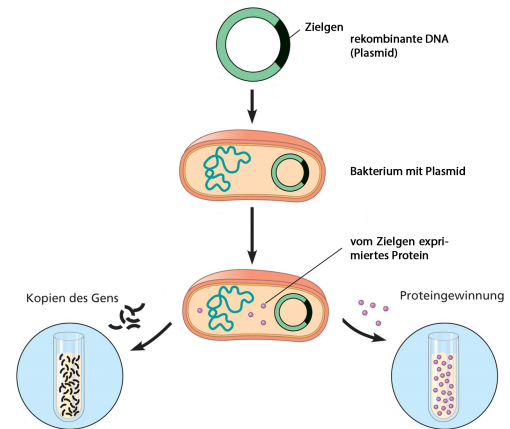


Abbildung 20.2.1: Überblick über die Genklonierung. Nachdem das Zielgen in das Plasmid integriert wurde, wird das Plasmid in geeignete Bakterienzellen eingebracht. Dort kann das Plasmid vervielfältigt und so Kopien des Gens hergestellt werden (links). Andererseits können die Bakterienzellen auch benutzt werden, um das vom Zielgen codierte Protein herzustellen.

Methoden zur Entschlüsselung der Genfunktion

Das Klonieren erlaubt es, ein Gen in einem anderen Organismus zu exprimieren. Dies kann dazu dienen, ein bestimmtes Protein herzustellen, wie z. B. Insulin zur Behandlung von Diabetes. Kloniert man jedoch ein Gen mit bisher unbekannter Funktion, so kann die Expression dieses Gens in einem Organismus auch Informationen über die Funktion des Gens geben. Führt z. B. die Expression eines Gens zum übermäßigen Wachstum einer Zelle, so wird dieses Gen sehr wahrscheinlich bei der Wachstumskontrolle eine Rolle spielen. Ausserdem ermöglicht die Expression eines Gens die Bestimmung der Merkmale des Proteins, z. B. kann man so seine kinetischen Eigenschaften bestimmen oder dessen 3D-Struktur aufklären.

Oftmals hat die Expression eines Gens in einem Organismus keinen leicht ersichtlichen Phänotyp zur Folge. Deshalb untersuchen Genetiker häufig den Organismus ohne das untersuchte Gen. Bei dieser Methode wird das Gen im Organismus ausgeschaltet („Gen-Knockout“) bzw. modifiziert. Dabei lässt sich untersuchen, was passiert, wenn der Organismus ohne das untersuchte Gen und dessen Genprodukt auskommen muss. Eine ganz neue Entwicklung hat das Entschlüsseln von Genfunktionen revolutioniert. Mithilfe des CRISPR-Systems können gezielt Gene verändert werden, indem das „normale“ Gen im Genom durch eine klonierte, mutierte Version ausgetauscht wird. Dieses System hat man bereits erfolgreich in Mäusen und kürzlich auch in menschlichen Zellen angewandt.