

Inhaltsverzeichnis

I	Grundprinzipien der Klonierung und DNA-Analyse	1
1	Warum sind Klonierung und DNA-Analyse so wichtig?	3
1.1	Frühe Entwicklungen in der Genetik.....	4
1.2	Die Entwicklung der DNA-Klonierung und die Polymerasekettenreaktion	4
1.3	Was ist DNA-Klonierung?.....	5
1.4	Was ist PCR?.....	5
1.5	Warum sind DNA-Klonierung und PCR so wichtig?	6
1.5.1	Isolierung eines Gens in Reinform durch Klonierung.....	7
1.5.2	Auch mit PCR kann man Gene reinigen	8
1.6	Ein Wegweiser durch dieses Buch	9
	Weiterführende Literatur	10
2	Klonierungsvektoren: Plasmide und Bakteriophagen	11
2.1	Plasmide	12
2.1.1	Größe und Kopienzahl	13
2.1.2	Konjugation und Kompatibilität	14
2.1.3	Klassifikation von Plasmiden	14
2.1.4	Plasmide in anderen Organismen als Bakterien.....	15
2.2	Bakteriophagen	15
2.2.1	Der Phagen-Infektionszyklus.....	15
2.2.2	Lysogene Phagen	15
2.2.3	Viren als Klonierungsvektoren für andere Organismen.....	21
	Weiterführende Literatur	21
3	Die Reinigung von DNA aus lebenden Zellen	23
3.1	Die Präparation der gesamten Zell-DNA	24
3.1.1	Zucht und Ernte einer Bakterienkultur	24
3.1.2	Die Präparation von Zellextrakten	26
3.1.3	Die Reinigung der DNA aus dem Zellextrakt	27
3.1.4	Das Anreichern der DNA-Proben	28
3.1.5	Die Messung der DNA-Konzentration.....	29
3.1.6	Andere Methoden zur Präparation der gesamten Zell-DNA	29
3.2	Die Präparation von Plasmid-DNA	30
3.2.1	Trennung aufgrund der Größe	31
3.2.2	Trennung aufgrund der Konformation.....	32
3.2.3	Plasmidamplifikation	34
3.3	Die Präparation von Bakteriophagen-DNA	35
3.3.1	Die Zucht von Kulturen mit hohem λ -Titer	36
3.3.2	Präparation nichtlysogener λ -Phagen.....	37
3.3.3	Die Ernte der Phagen aus einer infizierten Kultur	37
3.3.4	Die Reinigung von DNA aus λ -Phagenpartikeln	38
3.3.5	M13-DNA lässt sich leicht reinigen	38
	Weiterführende Literatur	39

4	Die Manipulation der gereinigten DNA	41
4.1	Das Spektrum der Enzyme zur DNA-Manipulation	42
4.1.1	Nucleasen	43
4.1.2	Ligasen	44
4.1.3	Polymerasen	44
4.1.4	DNA-Modifikationsenzyme	45
4.2	Enzyme zum Schneiden der DNA: Restriktionsendonucleasen	46
4.2.1	Entdeckung und Wirkungsweise der Restriktionsendonucleasen	47
4.2.2	Die Restriktionsendonucleasen des Typs II schneiden die DNA an ganz bestimmten Nucleotidsequenzen	48
4.2.3	Glatte Enden und klebrige Enden	49
4.2.4	Die Zahl der Restriktionserkennungsstellen in einem DNA-Molekül	49
4.2.5	Der Ablauf einer Restriktionsspaltung im Labor	50
4.2.6	Die Analyse des Ergebnisses einer Restriktionsspaltung	52
4.2.7	Größenabschätzung bei DNA-Molekülen	53
4.2.8	Die Kartierung der Restriktionsschnittstellen auf einem DNA-Molekül	54
4.2.9	Besondere Elektrophoreseverfahren zur Trennung größerer Moleküle	56
4.3	Ligation: Das Verbinden von DNA-Molekülen	57
4.3.1	Die Wirkungsweise der DNA-Ligase	57
4.3.2	Klebrige Enden erhöhen die Effizienz der Ligation	57
4.3.3	Das Anfügen klebriger Enden an ein Molekül mit glatten Enden	58
4.3.4	Ligation glatter Enden mit einer DNA-Topoisomerase	62
	Weiterführende Literatur	63
5	Das Einführen von DNA in lebende Zellen	65
5.1	Transformation: Die Aufnahme von DNA durch Bakterienzellen	67
5.1.1	Nicht alle Bakterienarten nehmen DNA mit der gleichen Effizienz auf	67
5.1.2	Die Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	68
5.1.3	Die Selektion transformierter Zellen	68
5.2	Die Identifizierung von Rekombinanten	69
5.2.1	Selektion von Rekombinanten mit pBR322: Inaktivierung durch Einbau eines Antibiotika-Resistenzgens	70
5.2.2	Die Inaktivierung durch Einbau von DNA betrifft nicht immer Antibiotikaresistenzen	71
5.3	Das Einführen von Phagen-DNA in Bakterienzellen	72
5.3.1	Transfektion	72
5.3.2	<i>In vitro</i> -Verpackung	72
5.3.3	Die Phageninfektion wird in Form von Plaques auf einem Agarmedium sichtbar	74
5.4	Die Identifizierung rekombinierter Phagen	75
5.4.1	Inaktivierung eines <i>lacZ</i> -Gens im Phagenvektor durch die eingebaute DNA	75
5.4.2	Inaktivierung des <i>ci</i> -Gens von λ	75
5.4.3	Selektion mit Hilfe des Phänotyps Spi	75
5.4.4	Selektion anhand der Genomgröße von λ	76
5.5	Einschleusen von DNA in eukaryotische Zellen	76
5.5.1	Transformation einzelner Zellen	77
5.5.2	Transformation ganzer Organismen	78
	Weiterführende Literatur	78

6	Klonierungsvektoren für <i>E. coli</i>	79
6.1	Klonierungsvektoren auf der Grundlage von <i>E. coli</i>-Plasmiden	80
6.1.1	Die Nomenklatur von Plasmid-Klonierungsvektoren.....	80
6.1.2	Die nützlichen Eigenschaften von pBR322.....	81
6.1.3	Der Stammbaum von pBR322	81
6.1.4	Weiterentwickelte <i>E. coli</i> -Plasmid-Klonierungsvektoren.....	82
6.2	Klonierungsvektoren auf der Grundlage des Bakteriophagen M13	85
6.2.1	Die Konstruktion eines Phagen-Klonierungsvektors	85
6.2.2	Hybridvektoren aus Plasmiden und M13	86
6.3	Klonierungsvektoren auf der Grundlage des Bakteriophagen λ	87
6.3.1	Aus dem λ -Genom kann man Stücke entfernen, ohne die Funktionsfähigkeit zu beeinträchtigen	88
6.3.2	Durch natürliche Selektion kann man λ -Phagen isolieren, denen bestimmte Restriktionsstellen fehlen	88
6.3.3	Insertions- und Substitutionsvektoren.....	89
6.3.4	Klonierungsexperimente mit λ -Insertions- oder λ -Substitutionsvektoren	90
6.3.5	Sehr große DNA-Fragmente kann man in Cosmiden klonieren	91
6.4	Mit λ- und anderen Vektoren mit hoher Kapazität kann man genomische Bibliotheken konstruieren	92
6.5	Vektoren für andere Bakterien	93
	Weiterführende Literatur	94
7	Klonierungsvektoren für Eukaryoten	95
7.1	Vektoren für Hefe und andere Pilze	96
7.1.1	Selektierbare Marker für das 2-Mikron-Plasmid.....	96
7.1.2	Vektoren auf der Grundlage des 2-Mikron-Ringes: Episomale Plasmide der Hefe	97
7.1.3	Ein YE _p kann sich in die chromosomale DNA der Hefe integrieren.....	98
7.1.4	Andere Hefe-Klonierungsvektoren	98
7.1.5	Mit künstlichen Chromosomen kann man riesige DNA-Stücke in Hefe klonieren	99
7.1.6	Vektoren für weitere Hefearten und andere Pilze	101
7.2	Klonierungsvektoren für höhere Pflanzen	102
7.2.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> : Der kleinste »natürliche Gentechniker«	102
7.2.2	DNA-Klonierung in Pflanzen durch direkte Genübertragung	106
7.2.3	Versuche zum Einsatz von Pflanzenviren als Vektoren.....	108
7.3	Klonierungsvektoren für Tiere	109
7.3.1	Klonierungsvektoren für Insekten	109
7.3.2	Klonierung in Säugetieren	110
	Weiterführende Literatur	112
8	Die Gewinnung eines Klons von einem bestimmten Gen	115
8.1	Das Problem der Selektion	116
8.1.1	Es gibt zwei grundlegende Wege, den gesuchten Klon ausfindig zu machen.....	117
8.2	Direkte Selektion	117
8.2.1	<i>Marker rescue</i> erweitert die Anwendungsmöglichkeiten der direkten Selektion	118
8.2.2	Anwendungsbereich und Grenzen des <i>marker rescue</i> -Verfahrens.....	118
8.3	Die Suche nach Klonen in einer Genbibliothek	119
8.3.1	Genbibliotheken	120
8.3.2	Nicht alle Gene werden zur gleichen Zeit exprimiert.....	120

8.3.3	mRNA lässt sich als komplementäre DNA klonieren	121
8.4	Methoden zur Identifizierung von Klonen	122
8.4.1	Komplementäre Nucleinsäurestränge hybridisieren untereinander	122
8.4.2	Kolonie- und Plaquehybridisierung	122
8.4.3	Beispiele für den praktischen Einsatz der Nucleinsäurehybridisierung	124
8.4.4	Methoden zur Identifizierung eines klonierten Gens durch den Nachweis seines Genprodukts	130
	Weiterführende Literatur	131
9	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	133
9.1	Die Polymerasekettenreaktion im Überblick	134
9.2	Die PCR: einige Einzelheiten	136
9.2.1	Die Konstruktion der Oligonucleotidprimer für die PCR	136
9.2.2	Die richtige Reaktionstemperatur	137
9.3	Nach der PCR: Die Analyse der Produkte	138
9.3.1	Gelelektrophorese der PCR-Produkte	139
9.3.2	Klonierung von PCR-Produkten	140
9.3.3	Probleme mit der Fehlerhäufigkeit der <i>Taq</i> -Polymerase	141
9.4	Mit der Realtime-PCR kann man die Menge des Ausgangsmaterials quantitativ erfassen	142
9.4.1	Der Ablauf eines Experiments mit quantitativer PCR	143
9.4.2	Mit Realtime-PCR kann man auch RNA quantitativ erfassen	144
	Weiterführende Literatur	145
II	Die Anwendung von Klonierung und DNA-Analyse in der Forschung	147
10	Die Sequenzierung von Genen und Genomen	149
10.1	Methoden zur DNA-Sequenzierung	150
10.1.1	DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren	150
10.1.2	Pyrosequenzierung	154
10.2	Die Sequenzierung eines Genoms	156
10.2.1	Das Schrotschussverfahren zur Genomsequenzierung	157
10.2.2	Das Klon-Contig-Verfahren	160
10.2.3	Karten als Hilfsmittel zum Sequenzaufbau	162
	Weiterführende Literatur	165
11	Die Untersuchung der Genexpression und Genfunktion	167
11.1	Die Analyse der Transkripte von Genen	168
11.1.1	Nachweis eines Transkripts und Aufklärung seiner Nucleotidsequenz	169
11.1.2	Transkriptkartierung durch Hybridisierung zwischen Gen und RNA	170
11.1.3	Transkriptanalyse durch Primerverlängerung	171
11.1.4	Transkriptanalyse mit PCR	171
11.2	Die Untersuchung der Expressionsregulation von Genen	172
11.2.1	Der Nachweis von Proteinbindungsstellen an einem DNA-Molekül	174
11.2.2	Der Nachweis von Regulatorsequenzen durch Deletionsanalyse	177
11.3	Nachweis und Untersuchung des Translationsprodukts eines klonierten Gens	179

11.3.1	Mit HRT und HART kann man das Translationsprodukt eines klonierten Gens nachweisen.	179
11.3.2	Analyse der Proteine durch <i>in vitro</i> -Mutagenese.	181
	Weiterführende Literatur	185
12	Genomanalyse	187
12.1	Annotation von Genomen	188
12.1.1	Identifizierung von Genen in einer Genomsequenz.....	188
12.1.2	Aufklärung der Funktion eines unbekanntes Gens	192
12.2	Analyse von Transkriptom und Proteom	194
12.2.1	Transkriptomanalyse	194
12.2.2	Untersuchungen am Proteom.....	197
12.2.3	Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen	199
	Weiterführende Literatur	201
III	Anwendungen der Klonierung und DNA-Analyse in der Biotechnologie	203
13	Die Proteinproduktion mit klonierten Genen	205
13.1	Spezielle Vektoren für die Expression fremder Gene in <i>E. coli</i>	207
13.1.1	Der Promotor ist der entscheidende Bestandteil eines Expressionsvektors.....	208
13.1.2	Kassetten und Fusionsgene	211
13.2	Allgemeine Probleme mit der gentechnischen Proteinproduktion in <i>E. coli</i>	212
13.2.1	Probleme durch die Sequenz des Fremdgens	212
13.2.2	Probleme durch <i>E. coli</i>	214
13.3	Gentechnische Proteinproduktion mit Eukaryotenzellen	215
13.3.1	Gentechnische Proteinherstellung mit Hefe und Fadenpilzen	215
13.3.2	Gentechnische Proteinproduktion mit Tierzellen	217
13.3.3	Pharming: rekombinante Proteine aus lebenden Tieren und Pflanzen	218
	Weiterführende Literatur	220
14	Klonierung und DNA-Analyse in der Medizin	223
14.1	Gentechnische Arzneimittelproduktion	224
14.1.1	Gentechnisch hergestelltes Insulin	224
14.1.2	Synthese menschlicher Wachstumshormone in <i>E. coli</i>	226
14.1.3	Gentechnisch hergestellter Faktor VIII	227
14.1.4	Gentechnische Herstellung anderer menschlicher Proteine	228
14.1.5	Gentechnisch hergestellte Impfstoffe.....	229
14.2	Identifizierung krankheitserzeugender Gene beim Menschen	232
14.2.1	Die Identifizierung eines krankheitserzeugenden Gens	234
14.3	Gentherapie	236
14.3.1	Gentherapie genetisch bedingter Krankheiten	236
14.3.2	Gentherapie und Krebs	237
14.3.3	Ethische Aspekte der Gentherapie.....	238
	Weiterführende Literatur	239

15	Klonierung und DNA-Analyse in der Landwirtschaft	241
15.1	Das Hinzufügen von Genen bei Pflanzen	242
15.1.1	Pflanzen, die eigene Insektizide produzieren	242
15.1.2	Herbizidresistente Nutzpflanzen	248
15.1.3	Andere Projekte, bei denen Gene hinzugefügt wurden	250
15.2	Inaktivierung von Genen	250
15.2.1	Antisense-RNA und die gentechnische Veränderung der Reifung von Tomaten	250
15.2.2	Weitere Beispiele für den Einsatz der Antisense-RNA in der Pflanzengentechnik	253
15.3	Probleme mit gentechnisch veränderten Pflanzen	253
15.3.1	Sicherheitsüberlegungen im Zusammenhang mit selektierbaren Markern	254
15.3.2	Das Terminatorverfahren	255
15.3.3	Die Frage nach schädlichen Auswirkungen auf die Umwelt	256
	Weiterführende Literatur	257
16	Klonierung und DNA-Analyse in Kriminalistik, Gerichtsmedizin und Archäologie	259
16.1	DNA-Analyse zur Identifizierung Tatverdächtiger	260
16.1.1	Herstellung genetischer Fingerabdrücke durch Hybridisierung	260
16.1.2	DNA-Typisierung durch PCR kurzer Tandemwiederholungen	261
16.2	Verwandtschaftsnachweis durch DNA-Typisierung	262
16.2.1	Verwandte haben ähnliche DNA-Profile	262
16.2.2	DNA-Typisierung und die sterblichen Überreste der Romanows	263
16.3	Geschlechtsbestimmung durch DNA-Analyse	265
16.3.1	PCR spezifischer Sequenzen aus dem Y-Chromosom	266
16.3.2	PCR des Amelogenin-Gens	266
16.4	Archäogenetik: DNA-Analysen bei der Erforschung der menschlichen Vorgeschichte	267
16.4.1	Die Entstehung der Jetztmenschen	267
16.4.2	Anhand der DNA kann man auch prähistorische Wanderungsbewegungen nachzeichnen	270
	Weiterführende Literatur	272
	Glossar	275
	Stichwortverzeichnis	289