

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>cl</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 |