

Bernard R. Glick und  
Jack J. Pasternak

# Molekulare Biotechnologie

Mit einem Vorwort von Albert Hinnen

Aus dem Englischen übersetzt von Kurt Beginnen,  
Beate Bettenhausen, Renate Pollwein, Ina Raschke,  
Sigrid Schneider und Lothar Seidler

Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin · Oxford

E 16 d/8



95/360

**Originaltitel:**

Molecular Biotechnology. Principles & Applications of Recombinant DNA.  
Aus dem Englischen übersetzt von Kurt Beginnen, Beate Bettenhausen,  
Renate Pollwein, Ina Raschke, Sigrid Schneider und Lothar Seidler.

Der Text wurde aus der englischen Originalversion übersetzt von Spektrum Akademischer Verlag.  
Die alleinige Verantwortung für die Genauigkeit der Übersetzung des Textes in die deutsche Sprache  
liegt bei Spektrum Akademischer Verlag und nicht bei der American Society for Microbiology.

Originalausgabe bei ASM Press, Washington, D.C.

© 1994 American Society for Microbiology.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced or transmitted in any form or by any  
means, electronic or mechanical, including photocopying, recording or by any information storage and  
retrieval system, without permission from the American Society for Microbiology.

**Glick, Bernhard R.:**

Molekulare Biotechnologie / Bernhard R. Glick ; Jack J. Pasternack. Mit einem Vorw. von  
Albert Hinne. Aus dem Engl. übers. von Kurt Beginnen ... - Heidelberg; Berlin ; Oxford :  
Spektrum, Akad. Verl., 1995  
Einheitssacht.: Molecular biotechnology <dt.>  
ISBN 3-86025-378-6 kart.  
ISBN 3-86025-383-2 Gb.  
NE: Pasternak, Jack J.:

© 1995 Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg . Berlin . Oxford

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Buches darf ohne schriftliche Genehmigung der Verlages und  
der American Society for Microbiology photokopiert oder in irgendeine von Maschinen verwendbare  
Sprache übertragen oder übersetzt werden.

Es konnten nicht sämtliche Rechteinhaber von Abbildungen ermittelt werden. Sollte dem Verlag  
gegenüber der Nachweis der Rechtsinhaberschaft geführt  
werden, wird das branchenübliche Honorar nachträglich gezahlt.

Lektorat: Ursula Loos / Marion Handgrätinger (Ass.)  
Redaktion: Kurt Beginnen, Beate Bettenhausen, Ina Raschke.  
Produktion: PRODUserv., Springer Produktionsgesellschaft, Berlin  
Umschlaggestaltung: Kurt Bitsch, Birkenau  
Satzarbeiten: Saladruck, Berlin  
Druck- und Bindearbeiten: Appl, Wemding

# Inhaltsverzeichnis

Vorwort zur deutschen Auflage xiii

Vorwort der Autoren xv

## I. GRUNDLAGEN DER MOLEKULAREN BIOTECHNOLOGIE 3

### 1. Die Revolution der molekularen Biotechnologie 5

- 1.1 Die DNA-Rekombinationstechnik 5
- 1.2 Die Entstehung der molekularen Biotechnologie 7
- 1.3 Die wirtschaftliche Nutzung der molekularen Biotechnologie 11
- 1.4 Vorbehalte und Konsequenzen 13
- 1.5 Zusammenfassung 15
- 1.6 Aufgaben 16
- 1.7 Literatur 16

### 2. DNA-Rekombinationstechnik 19

- 2.1 DNA: Struktur und Funktion 21
- 2.2 Restriktionsendonucleasen 25
- 2.3 Plasmidklonierungsvektoren 31
  - 2.3.1 Der Plasmidvektor pBR322 32
  - 2.3.2 Transformation und Selektion 34
  - 2.3.3 Weitere Plasmidklonierungsvektoren 36
- 2.4 Herstellung und Durchmustern von DNA-Banken 38
  - 2.4.1 Herstellung einer genomischen Bank 38
  - 2.4.2 Durchmustern mittels DNA-Hybridisierung 39
  - 2.4.3 Durchmustern mittels immunologischer Nachweisverfahren 44
  - 2.4.4 Durchmustern auf Proteinaktivität 46
- 2.5 Klonierung von codierenden DNA-Sequenzen aus Eukaryoten 46
- 2.6 Vektoren zur Klonierung großer DNA-Fragmente 49
  - 2.6.1 Lambda-Vektoren 49
  - 2.6.2 Cosmide 52
- 2.7 Genetische Transformation von Prokaryoten 54
  - 2.7.1 Einschleusen von DNA in *E. coli* 54
  - 2.7.2 Elektroporation 55
  - 2.7.3 Konjugation 56
- 2.8 Zusammenfassung 57
- 2.9 Aufgaben 58
- 2.10 Literatur 59

### **3. Verfahren in der molekularbiologischen Forschung 61**

- 3.1 Chemische DNA-Synthese 61
  - 3.1.1 Phosphoramiditverfahren 63
  - 3.1.2 Anwendung synthetischer Oligonucleotide 67
  - 3.1.3 Synthese von Genen 68
- 3.2 DNA-Sequenzierungstechniken 70
  - 3.2.1 Didesoxynucleotidverfahren 71
  - 3.2.2 Einsatz des Bakteriophagen M13 zur Herstellung einzelsträngiger DNA 74
  - 3.2.3 *Primer Walking* 76
- 3.3 Polymerasekettenreaktion 78
- 3.4 Monoklonale Antikörper 83
  - 3.4.1 Herstellung und Selektion von Hybridzellen 84
  - 3.4.2 Identifizierung spezifischer antikörperproduzierender Hybridzelllinien 85
- 3.5 Zusammenfassung 87
- 3.6 Aufgaben 88
- 3.7 Literatur 89

### **4. Manipulation der Genexpression in Prokaryoten 91**

- 4.1 Genexpression bei Prokaryoten 92
- 4.2 Isolierung funktioneller Promotoren 94
  - 4.2.1 Promotorselektion mit dem *E. coli*-Plasmid pBR316 95
  - 4.2.2 Promotorselektion mit dem Plasmid pKO1 96
- 4.3 Genexpression mit starken und regulierbaren Promotoren 98
  - 4.3.1 Regulierbare Promotoren 99
  - 4.3.2 Steigerung der Proteinproduktion 100
  - 4.3.3 Systeme für die großtechnische Produktion 101
  - 4.3.4 Expression in anderen Mikroorganismen 103
- 4.4 Fusionsproteine 104
  - 4.4.1 Spaltung von Fusionsproteinen 105
  - 4.4.2 Einsatzmöglichkeiten von Fusionsproteinen 106
- 4.5 Gleichorientierte Tandemgenanordnungen 109
- 4.6 Translationsexpressionsvektoren 110
- 4.7 Erhöhung der Proteinstabilität 113
- 4.8 DNA-Integration in das Wirtschromosom 114
- 4.9 Sekretion von Genprodukten 117
- 4.10 Zusammenfassung 118
- 4.11 Aufgaben 119
- 4.12 Literatur 120

### **5. Herstellung heterologer Proteine in eukaryotischen Zellen 123**

- 5.1 Expressionssysteme für *Saccharomyces cerevisiae* 125
  - 5.1.1 Vektoren für *S. cerevisiae* 126
  - 5.1.2 Direkte Expression in *S. cerevisiae* 127
  - 5.1.3 Sekretion heterologer Proteine aus *S. cerevisiae* 129

- 5.2 Andere Hefe-Expressionssysteme 130
  - 5.2.1 Expression des Oberflächenantigens des Hepatitis-B-Virus 130
  - 5.2.2 Expression des Lysozyms C2 aus Rind 132
- 5.3 Expressionssysteme für Insektenzellkulturen 134
  - 5.3.1 Baculovirus-Transfervektoren 134
  - 5.3.2 Probleme mit Baculovirus-Systemen bei der Maßstabsvergrößerung 137
- 5.4 Expressionssysteme für Säugerzellen 138
  - 5.4.1 Das menschliche BK-Virus als *Shuttle*-Vektor 138
  - 5.4.2 Herstellung von Medikamenten auf Proteinbasis für klinische Versuche 140
- 5.5 Zusammenfassung 142
- 5.6 Aufgaben 143
- 5.7 Literatur 143

## **6. Gezielte Mutagenese und Proteindesign 145**

- 6.1 Methoden für die gezielte Mutagenese 147
  - 6.1.1 Oligonucleotidgesteuerte Mutagenese mit Hilfe von M13-DNA 147
  - 6.1.2 PCR-Mutagenese 150
  - 6.1.3 Degenerierte Oligonucleotidprimer 152
  - 6.1.4 Zufallsmutagenese 154
- 6.2 Protein-Design 154
  - 6.2.1 Einführung von Disulfidbrücken 155
  - 6.2.2 Austausch von Asparagin gegen andere Aminosäuren 157
  - 6.2.3 Reduzierung der Anzahl freier Sulfhydrylgruppen 157
  - 6.2.4 Erhöhung der Enzymaktivität 159
  - 6.2.5 Veränderung der Enzymspezifität 160
- 6.3 Zusammenfassung 162
- 6.4 Aufgaben 163
- 6.5 Literatur 163

## **II. MIKROBIOLOGISCHE SYSTEME 167**

### **7. Mikrobiologische Syntheseverfahren in der Industrie 169**

- 7.1 Pharmazeutisch wirksame Proteine 169
  - 7.1.1 Isolierung von cDNAs 171
  - 7.1.2 Gentechnische Veränderung der menschlichen Interferone 172
  - 7.1.3 Gentechnische Veränderung des menschlichen Wachstumshormons 173
  - 7.1.4 Optimierung der Genexpression 173
- 7.2 Restriktionsendonucleasen 174
- 7.3 Kleine biologisch aktive Moleküle 177
  - 7.3.1 Synthese von L-Ascorbinsäure 178
  - 7.3.2 Synthese von Indigoblau durch Mikroorganismen 181
  - 7.3.3 Aminosäuren 183
- 7.4 Antibiotika 185

- 7.4.1 Klonierung von Genen der Antibiotikabiosynthese durch Komplementation. 186
- 7.4.2 Klonierung von Genen der Antibiotikabiosynthese durch andere Methoden 187
- 7.4.3 Synthese neuartiger Antibiotika 188
- 7.4.4 Verbesserungen bei der Antibiotikaproduktion 190
- 7.5 Biopolymere 192
- 7.5.1 Gentechnische Veränderung von *Xanthomonas campestris* für die kostengünstige Produktion von Xanthan 192
- 7.5.2 Isolierung der Gene für die Melaninsynthese 194
- 7.5.3 Synthese von adhäsiven Biopolymeren in Hefezellen 195
- 7.5.4 Mikrobiologische Synthese eines pflanzlichen Biopolymers 196
- 7.6 Zusammenfassung 197
- 7.7 Aufgaben 198
- 7.8 Literatur 198

## **8. Molekulare Diagnostik 201**

- 8.1 Immunologische Diagnoseverfahren 202
- 8.1.1 ELISA 202
- 8.1.2 Struktur und Funktion von Antikörpern 205
- 8.1.3 Herstellung von Antikörpern in *E. coli* 205
- 8.2 DNA-Diagnostik 208
- 8.2.1 Hybridisierungssonden 209
- 8.2.2 Diagnose von Malaria 210
- 8.2.3 Nichtradioaktive Hybridisierungsverfahren 211
- 8.3 Molekulare Diagnose von genetisch bedingten Erkrankungen 213
- 8.3.1 Das PCR/OLA-Verfahren 214
- 8.3.2 Mutationen an verschiedenen Positionen innerhalb eines Gens 217
- 8.4 Ausblick 219
- 8.5 Zusammenfassung 219
- 8.6 Aufgaben 220
- 8.7 Literatur 221

## **9. Impfstoffe und Therapeutika 223**

- 9.1 Komponentenimpfstoffe 225
- 9.1.1 Komponentenimpfstoffe gegen das Herpes-simplex-Virus 227
- 9.1.2 Komponentenimpfstoffe gegen die Maul- und Klauenseuche 228
- 9.1.3 Peptidimpfstoffe 229
- 9.1.4 Genetische Immunisierung 231
- 9.2 Gentechnisch veränderte Lebendimpfstoffe 231
- 9.3 Attenuierte Impfstoffe 231
- 9.3.1 Cholera 231
- 9.3.2 *Salmonella*-Arten 234
- 9.4 Vektorimpfstoffe 234
- 9.4.1 Impfstoffe gegen Viren 234
- 9.4.2 Impfstoffe gegen Bakterien 237
- 9.5 Anti-Idiotyp-Impfstoffe 238
- 9.6 Therapeutisch wirksame monoklonale Antikörper 238
- 9.6.1 Hemmung der Abstoßungsreaktion nach Transplantationen 239

- 9.6.2 Behandlung von bakteriellen Infektionen im Blut 240
- 9.7 Gentechnisch erzeugte Immuntherapeutika 241
- 9.7.1 Chemisch gekoppelte monoklonale Antikörper 241
- 9.7.2 Menschliche monoklonale Antikörper 241
- 9.7.3 Monoklonale Mensch-Maus-Antikörper 243
- 9.7.4 HIV-Therapeutika 245
- 9.8 Zusammenfassung 247
- 9.9 Aufgaben 248
- 9.10 Literatur 249

## **10. Biologische Dekontaminierung und Verwertung von Biomasse 253**

- 10.1 Abbau synthetischer Verbindungen durch Mikroorganismen 254
- 10.2 Gentechnische Eingriffe in biologische Abbaewege 258
  - 10.2.1 Transfer von Plasmiden 259
  - 10.2.2 Veränderung der Gene 261
- 10.3 Verwertung von Stärke und Zucker 265
  - 10.3.1 Industrielle Produktion von Fructose und Alkohol 265
  - 10.3.2 Verbesserung der Fructose- und Alkoholproduktion 268
- 10.4 Verwertung von Cellulose 273
  - 10.4.1 Bestandteile der Lignocellulose 273
  - 10.4.2 Isolierung prokaryotischer Cellulasegene 275
  - 10.4.3 Isolierung eukaryotischer Cellulasegene 278
  - 10.4.4 Gentechnische Veränderung der Cellulasegene 279
- 10.5 Produktion von Einzellerprotein 281
- 10.6 Zusammenfassung 282
- 10.7 Aufgaben 283
- 10.8 Literatur 284

## **11. Förderung des Pflanzenwachstums durch Bakterien 287**

- 11.1 Stickstofffixierung 288
- 11.2 Nitrogenase 290
  - 11.2.1 Bestandteile der Nitrogenase 291
  - 11.2.2 Gentechnische Veränderungen im Nitrogenase-Cluster 292
- 11.3 Hydrogenase 296
  - 11.3.1 Wasserstoffmetabolismus 297
  - 11.3.2 Gentechnische Veränderung der Hydrogenasegene 298
- 11.4 Knöllchenbildung 300
  - 11.4.1 Knöllchenbildende Bakterien im Wettstreit 300
  - 11.4.2 Gentechnische Veränderung der Nodulationsgene 301
- 11.5 Siderophore 304
- 11.6 Phytohormone 305
- 11.7 Zusammenfassung 306
- 11.8 Aufgaben 307
- 11.9 Literatur 308

## **12. Mikrobielle Insektizide 311**

- 12.1 Insektengifte aus *Bacillus thuringiensis* 312
  - 12.1.1 Wirkungsweise und Einsatzmöglichkeiten 312

- 12.1.2 Isolierung der Toxingene 316
- 12.1.3 Gentechnische Veränderung von *B. thuringiensis* 318
- 12.2 Baculoviren als biologische Schädlingsbekämpfungsmittel 322
- 12.3 Zusammenfassung 324
- 12.4 Aufgaben 325
- 12.5 Literatur 326

### **13. Großtechnische Proteinproduktion mit gentechnisch veränderten Mikroorganismen 329**

- 13.1 Mikrobielle Wachstumskinetiken 331
  - 13.1.1 Batch-Fermentation 331
  - 13.1.2 Fed-Batch-Fermentation 333
  - 13.1.3 Kontinuierliche Kultur 334
- 13.2 Optimierung des Fermentationsprozesses 336
- 13.3 Bioreaktoren 337
- 13.4 Industrielle Fermentationssysteme 341
  - 13.4.1 Zweistufige Fermentation in Tandem-Airlift-Reaktoren 342
  - 13.4.2 Zweistufige Fermentation in einem einzelnen Rührkesselreaktor 344
- 13.5 Ernte mikrobieller Zellen 345
- 13.6 Aufschluß mikrobieller Zellen 346
- 13.7 Produktaufarbeitung 350
- 13.8 Zusammenfassung 350
- 13.9 Aufgaben 351
- 13.10 Literatur 352

## **III. EUKARYOTISCHE SYSTEME 355**

### **14. Gentechnische Veränderungen an Pflanzen 357**

- 14.1 Transformation von Pflanzen mit Hilfe des Ti-Plasmids von *Agrobacterium tumefaciens* 358
- 14.2 Vektorsysteme, die sich vom Ti-Plasmid ableiten 361
- 14.3 Physikalische Methoden zur Genübertragung auf Pflanzen 364
- 14.4 Verwendung von Reportergenen in transformierten Pflanzenzellen 365
- 14.5 Gentechnische Herstellung neuer Pflanzensorten 367
  - 14.5.1 Entwicklung insektenresistenter Pflanzen 367
  - 14.5.2 Entwicklung virusresistenter Pflanzen 372
  - 14.5.3 Entwicklung herbizidresistenter Pflanzen 375
  - 14.5.4 Entwicklung von Pflanzen mit Streßtoleranz und verzögerter Seneszenz 377
  - 14.5.5 Genetische Veränderung der Blütenpigmentierung 379
  - 14.5.6 Veränderungen der Eigenschaften pflanzlicher Produkte 379
- 14.6 Pflanzen als Bioreaktoren 381
- 14.7 Zusammenfassung 381
- 14.8 Aufgaben 382
- 14.9 Literatur 383



**15. Entwicklung und Nutzung transgener Tiere 387**

- 15.1 Transgene Mäuse: Methoden 389
  - 15.1.1 Retrovirusvektoren 389
  - 15.1.2 DNA-Mikroinjektion 390
  - 15.1.3 Gentechnisch veränderte embryonale Stammzellen 393
- 15.2 Transgene Mäuse: Anwendungen 398
- 15.3 Transgene Rinder 401
- 15.4 Transgene Schafe, Ziegen und Schweine 403
- 15.5 Transgene Vögel 404
- 15.6 Transgene Fische 406
- 15.7 Zusammenfassung 407
- 15.8 Aufgaben 408
- 15.9 Literatur 408

**16. Die Isolierung menschlicher Gene 411**

- 16.1 Genkopplung und Genkartierung 415
  - 16.1.1 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen 420
  - 16.1.2 RFLP-Analyse 421
  - 16.1.3 Kartierung von Krankheitsgenen 424
- 16.2 Positionsklonierung 425
  - 16.2.1 Annäherung an ein krankheitsauslösendes Gen 425
  - 16.2.2 Identifikation des Zielgens 428
  - 16.2.3 Grenzen der Positionsklonierung 431
- 16.3 Zusammenfassung 433
- 16.4 Aufgaben 434
- 16.5 Literatur 434

**17. Somatische Gentherapie beim Menschen 437**

- 17.1 *Ex vivo*-Gentherapie 441
- 17.2 *In vivo*-Gentherapie 448
- 17.3 *Antisense*-Therapie 450
- 17.4 Zusammenfassung 452
- 17.5 Aufgaben 453
- 17.6 Literatur 453

**IV. REGELUNG UND PATENTIERUNG  
MOLEKULARER BIOTECHNOLOGIE 457****18. Regelung des Einsatzes der Biotechnologie 459**

- 18.1 Regelung der Gentechnik 460
- 18.2 Lebensmittel und Lebensmittelinhaltsstoffe 462
  - 18.2.1 Chymosin 463
  - 18.2.2 Tryptophan 463
  - 18.2.3 Rinder-Somatotropin 465
- 18.3 Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen 466
  - 18.3.1 *Pseudomonas syringae* („Eisbakterien“) 467
  - 18.3.2 Freilandversuche mit anderen gentechnisch veränderten Organismen 468

- 18.4 Gentherapie am Menschen 469
  - 18.4.1 Bedenken der Öffentlichkeit 469
  - 18.4.2 Ausarbeitung von Grundsätzen für die somatische Gentherapie 470
  - 18.4.3 Anhäufung defekter Gene in zukünftigen Generationen 472
  - 18.4.4 Die Zukunft der Gentherapie 472
- 18.5 Zusammenfassung 473
- 18.6 Aufgaben 474
- 18.7 Literatur 475

**19. Patentierung biotechnologischer Erfindungen 477**

- 19.1 Was macht ein Patent aus? 478
- 19.2 Patentierung vielzelliger Organismen 482
- 19.3 Patentierung und Grundlagenforschung 483
- 19.4 Zusammenfassung 484
- 19.5 Aufgaben 484
- 19.6 Literatur 485

**Glossar 487**

**Index 523**