



Methoden zur Klonierung eines Gens aus höheren Eukaryoten

Eine selbständige Arbeit von Jakob Lindenmeyer unter Betreuung von Dr. Hans-Martin Fischer und Dr. Ned Mantei (beide sind Dozenten der Vorlesung Biotechnologie III: Gentechnologie an der ETH Zürich).

*

Methoden zur Klonierung eines GENS aus höheren Eukaryoten

JAKOB LINDENMEYER

EINE SELBSTÄNDIGE ARBEIT AN DER
ABTEILUNG FÜR BIOLOGIE, ETH ZÜRICH

26. SEPTEMBER 1995

*

Methoden zur Klonierung eines Gens aus höheren Eukaryoten

INHALT

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

Teil I: Allgemeines

Teil II: Methoden

Teil III: Verwendungen

Teil IV: Schlussbetrachtungen

Literaturverzeichnis

*

Methoden zur Klonierung eines Gens aus höheren Eukaryoten

Eine selbständige Arbeit von Jakob Lindenmeyer unter Betreuung von Dr. Hans-Martin Fischer und Dr. Ned Mantei (beide sind Dozenten der Vorlesung Biotechnologie B III: Gentechnologie an der ETH Zürich).

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung	4
Teil I. Allgemeines	6
A. Einleitung	6
1. Zu dieser Arbeit	6
2. Fragestellung	6
3. Zielsetzung	6
4. Vorgehen	6
B. Gentechnologie und die Klonierung von Genen	7
1. Definitionen	7
2. Ausgangslage	7
3. Die Komplexität des menschlichen Genoms	7
4. Zusätzliche Schwierigkeiten bei Eukaryoten	8
C. Wozu kloniert man überhaupt Gene?	8
1. Grundlagenforschung	9
2. Landwirtschaft	9
3. Medizin	10
a. Prävention	10
b. Diagnose	10
c. Therapie	11
Teil II: Methoden	12
A. Funktionelles und positionelles Klonieren	12
B. Wegleitung zum Methodenteil	13
1. Funktionelles Klonieren	14
A. Klonierung über die in vitro Transkription von cDNA	14
1. Das IgG-Induktions-Faktor-Gen (4)	14
2. Das Phosphat-Transporter-Gen(5)	14
3. Das α -Interferon-Gen(6)	15

B. Klonierung durch Komplementation	15
1. Das Xeroderma Pigmentosa-Gen(7).....	15
C. Substraktionsklonierung	16
1. Das T-Zell-Rezeptor-Gen(8)	16
2. Differential Display(9)	16
D. Klonierung über das Substrat	17
1. Das Erythropoietin-Gen(10).....	17
E. Klonierung über Peptidsequenzen	17
1. Das Signal Recognition Particle-Gen(11)	18
F. Klonierung anhand des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens	19
1. Das ras-Gen(12).....	19
G. Panning: Klonierung mit Antikörpern.....	20
1. Das CD 28 Gen(13)	20
2. Positionelles Klonieren	21
A. Klonierung der Grobregion	21
1. Kopplung an einen Marker	21
2. RFLP's	21
a. Das CF-Gen(18), (19), (20).....	22
3. Mikrosatelliten.....	23
a. Die Dickdarmkrebsgene (HNPCC) (16), (17)	23
4. Groblokalisierung	24
5. Positionsvergleich mit Datenbanken	25
6. Klonieren	25
B. Isolierung des Gens aus der Grobregion.....	26
1. Zoo-Blot	26
2. Exon-trapping	27
3. Screening von cDNA-Genbanken	27
4. Analyse CG-reicher Sequenzen.....	28
5. Weitere Methoden zur Isolierung und Charakterisierung eines Gens aus der Grobregion	28
Teil III: Anwendungen	29
A. Grundlagenforschung	29
1. HUGO und weitere Projekte zur Sequenzierung von andern Organismen (21).....	29
2. Transgene Tiere	30
3. Knock-Out-Tiere	30
4. Genregulation: Gezielte Kontrolle von Genen	30

5. Bisher unerklärbare oder sehr komplexe Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Herzinfarkt oder Krebs	30
B. Landwirtschaft.....	31
1. Tierproduktion.....	31
1.a. Wachstumshormon	31
1.b. Impfstoffe	31
1.c. Erbfehlerdiagnose	32
1.d. Stressresistenz.....	32
2. Pflanzenproduktion.....	32
2.a. Schutz vor Insektenschäden.....	32
2.b. Virus-Resistenz.....	32
2.c. Herbizid-Resistenz	32
2.d. Nährwerterhöhung	32
2.e. Stickstoff-Fixierung	33
C. Medizin.....	33
1. Die HNPCC-Gene	33
D. Prävention.....	34
1. Produktion von Impfstoffen	34
1.a. Malaria-Schutzimpfung	34
1.b. Universalimpfung	35
E. Diagnose	35
1. Diagnose somatischer Krankheiten	35
1.a. Infektionskrankheiten	35
1.b. AIDS	36
1.c. Krebs	36
2. Diagnose von Erbkrankheiten	36
2.a. Gendiagnose.....	36
2.b. Pränatale Diagnose	37
F. Therapie.....	37
1. Medikamente (Pharmazeutika).....	37
1.a. Humaninsulin	37
1.b. Erythropoietin	38
1.c. Weitere auf der Klonierung von Genen basierendeMedikamente	38
2. Die somatische Gentherapie	38
2.a. Das SCID-Syndrom	39
2.b. Krebs.....	39
2.c. Hypercholesterinämie	39
2.d. Cystische Fibrose.....	39
2.e. Duchenne Muskeldystrophie	40
Teil IV: Schlussbetrachtung.....	41

A. Neue Erkenntnisse bewirken eine Informationsflut	41
B. Das zukünftige Schicksal dieser Arbeit	41
C. Auswirkungen der Gentechnologie auf die Gesellschaft.....	41
Literaturverzeichnis	43

I. Danksagung

Die nachfolgenden Personen haben entscheidend zur Ermöglichung dieser selbständigen Bearbeitung des Themas "Methoden zur Klonierung eines Gens aus höheren Eukaryoten" (aus dem Wahlfach Biotechnologie B III: Gentechnologie) beigetragen:

Dr. Hans-Martin Fischer danke ich für sein mehrmaliges Durcharbeiten meiner Vorentwürfe und seine konstruktive Kritik dazu.

Dr. Ned Mantei danke ich für seine umfangreiche Literaturbeschaffung, für sein Durcharbeiten und seine konstruktive Kritik zum Entwurf dieser Arbeit.

Andrea Hutab und Antje Lösche danke ich für das Korrigieren der meisten Darstellungs-, Rechtschreibe- und Kommafehler in dieser Arbeit. (Leider wurden nicht alle eliminiert, denn einige haben sich so gut versteckt, dass wir sie auch zu dritt nicht finden konnten.)

Dem Abteilungsvorsteher Prof. Dr. Nikolaus Amrhein und Frau Carla Blum vom Abteilungssekretariat danke ich für die freundliche, aufmunternde und speditive Genehmigung dieser selbständigen Arbeit.

Allen zusammen nochmals herzlichsten Dank!

*

II. Allgemeines

A. Einleitung

1. Zu dieser Arbeit

In der Vorlesung Biotechnologie B III: Gentechnologie, welche Hans-Martin Fischer, Ned Mantei und Charles Weissmann 1994/95 an der ETH Zürich hielten, wurde im mittleren Teil "Werkzeuge der Gentechnologie" anhand des Beispiels der Cystischen Fibrose kurz auf die Klonierung von gesuchten Genen eingegangen. Da mich das dort besprochene Vorgehen faszinierte, wollte ich mehr darüber erfahren und untersuchen, ob es auch andere, ähnlich elegante Methoden zur Klonierung von anderen Genen gibt.

2. Fragestellung

Das Vorgehen in dieser Arbeit orientiert sich an den folgenden Fragen:

Im Methodenteil: Wie kann man ein gesuchtes Gen klonieren? Welche Methoden gibt es dazu? Gibt es bekannte Beispiele zu diesen Methoden? Wie sind die Forschungsgruppen vorgegangen?

Im Anwendungsteil: Wozu kloniert man überhaupt Gene? Was sind deren Anwendungen? Sind diese Anwendungen in der heutigen Gesellschaft berechtigt, sinnvoll oder sogar notwendig?

3. Zielsetzung

In dieser Arbeit will ich mich auf Ebene der Primärliteratur mit den verschiedensten Methoden zur Klonierung von Genen auseinandersetzen. Davon erhoffe ich, einen tieferen und genaueren Einblick in die heutigen Möglichkeiten der Genklonierung zu bekommen. Um auch den Praxisbezug dieser Methoden zu kennen und um für die heute in der Bevölkerung stattfindende Diskussion über die Gentechnologie besser informiert zu sein, will ich zum Abschluss einige der heutigen und in naher Zukunft zu erwartenden Anwendungen der klonierten Gene diskutieren.

Aufgrund der enormen Informationsmenge in der heute über dieses breitgefächerte Thema existierenden Literatur musste ich mich im Rahmen dieser selbständigen Arbeit auf wenige Beispiele einschränken. Diese Arbeit hat also keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Auch konnte ich die einzelnen Beispiele nur verkürzt wiedergeben. Für genauere Informationen sei auf die im Literaturverzeichnis angegebene Primärliteratur verwiesen.

4. Vorgehen

Im ersten, allgemeinen Teil werden die Ausgangslage, Definitionen, einige Grundlagen und eine Zusammenfassung der Anwendungen der Gentechnologie dargestellt. Im nachfolgenden zweiten und eigentlichen Hauptteil dieser Arbeit werden einzelne Methoden zur Klonierung von Genen anhand von Beispielen dargestellt. Im dritten und letzten Teil schliesslich werden die fünf Hauptanwendungsgebiete der klonierten Gene besprochen und zum Teil auch kritisch hinterfragt.

B. Gentechnologie und die Klonierung von Genen

1. Definitionen

Die Gentechnologie umfasst die Methoden zur Charakterisierung, Isolation und zur Veränderung von genetischem Material, zur Bildung neuer Kombinationen dieses genetischen Materials *in vitro* und zur Vermehrung und Wiedereinführung dieses neu kombinierten Erbmaterials in einen anderen Organismus.

Klonieren von DNA bedeutet eine Vermehrung individueller DNA-Sequenzen, die man in einen Träger (Vektor) eingebaut hat.

Ein Gen ist ein Abschnitt auf der Erbinformation eines Organismus (DNA oder RNA), der die Information für ein Protein oder eine funktionelle RNA, also Information zum Aufbau und zur Funktion eines Organismus, enthält. Diese Information ist chemisch in einer spezifischen Nucleotidsequenz niedergelegt.

2. Ausgangslage

Die Molekularbiologie versucht, mit den Methoden der Gentechnologie die molekularen Vorgänge und Phänomene der Vererbung und der Lebensprozesse mit Gesetzen der Physik und der Chemie zu erklären. Dabei entdeckte sie etwas grundsätzlich neues: Die DNA-Sequenz ist ein von der Natur selbst angelegtes und auf einem materiellen Träger gespeichertes Informationsarchiv. Mit den Werkzeugen der Gentechnologie können die Genforscher heute diese unschätzbare Kostbarkeit ergründen, welche aus einer riesigen Bibliothek von Büchern über die Vererbung und über die Steuerung der Lebensprozesse besteht und in jedem Organismus festgehalten ist. Durch die Klonierung von Genen werden nun einzelne Kapitel dieser Bücher zugänglich gemacht. Sie können gelesen und eingeordnet und mit zunehmendem Verständnis der Zusammenhänge auch interpretiert und gezielt angewendet werden.

Diese Anwendung einer neuen Technologie stösst aber in Teilen der Bevölkerung auf Misstrauen. Kritiker stören sich z. B. an der molekularbiologischen Reduktion des Lebens auf ein komplexes Zusammenwirken von Molekülen, wodurch Lebewesen zu molekularbiologischen Maschinen würden. Patente auf Leben bezeichnen sie als Kontroll- und Herrschaftsinstrumente der Grosskonzerne zur Kontrolle der Bevölkerung, besonders in der dritten Welt. Es wird kritisiert, dass mit Hilfe der Gentechnologie die heutige Ungleichverteilung des Wissens und des Wohlstandes auf der Welt noch verschärft würde. ⁽¹⁾

3. Die Komplexität des menschlichen Genoms

Das Problem bei der Klonierung von Genen besteht darin, dass die Genom-Grösse, also die Grösse dieser ganzen Bibliothek, welche die Gesamtheit der Erbinformation beinhaltet, beim Menschen eine Abfolge von etwa 3'000'000'000 Nukleotiden umfasst. Darin ein Gen von wenigen tausend Basenpaaren Länge zu finden erfordert spezielle Methoden der Gentechnologie. Beim Menschen müssen nicht nur die Gene, welche dort nur einen kleinen Bruchteil des Erbgutes ausmachen aus der grossen Masse der nicht codierenden DNA-Sequenzen isoliert werden, sondern aus den ungefähr 100'000 verschiedenen menschlichen Genen muss anschliessend noch das Gesuchte ausgewählt und, da es in Introns und Exons zerstückelt ist, noch richtig zusammengesetzt werden. All dies wird erreicht durch spezielle Tricks und Methoden der Gentechnologie, wovon einige in dieser Arbeit vorgestellt werden.

4. Zusätzliche Schwierigkeiten bei Eukaryoten

Die Eukaryoten besitzen einen echten Zellkern. Zu den Eukaryoten gehören die Protisten (Einzeller), die Pilze, die Pflanzen und die Tiere. Aufgrund der zellulären Organisation grenzt man die Eukaryoten von Prokaryoten ab, welche keinen Zellkern besitzen und zu welchen die Bakterien gehören. Da die meisten Bakterien anders aufgebaut und die meisten haploid sind, gibt es einige Vorteile, um aus ihnen bestimmte Gene zu isolieren. Da die Prokaryoten ein viel kleineres Genom besitzen, ist es auch nicht verwunderlich, dass es sich bei den ersten zwei Lebewesen, deren Genome vollständig sequenziert sind, um zwei Bakterien handelt, nämlich um *Haemophilus influenzae* und *Mycoplasma genitalium*.⁽²⁾

Bei der Klonierung von Genen aus Eukaryoten ergeben sich gegenüber den Prokaryoten gewisse Schwierigkeiten. Dies hat verschiedene Gründe:

Allein die Grössenunterschiede des Erbgutes zwischen den einfacheren Bakterien und den höheren Tieren und Pflanzen umfassen mehrere Zehnerpotenzen. Diese Riesengenome und somit auch die höhere Anzahl von verschiedenen Genen bei Eukaryoten erschweren die Genklonierung natürlich beträchtlich. Des weiteren besteht vor allem bei höheren Eukaryoten das Genom nur zu einem sehr kleinen Anteil (ca 3%) aus Genen. Der Rest enthält nicht codierende Sequenzen. In diesem kleinen Anteil an Genen liegen diese nun aber nicht wie bei den Bakterien zusammen und aneinander, sondern das einzelne Gen ist wiederum zerstückelt und aufgeteilt in Exons und Introns.

Weitere Nachteile bei der Klonierung von Eukaryoten-Genen ergeben sich durch die unterschiedliche Genetik und die Lebensweise der Tiere und Pflanzen. Bei den Bakterien sind viel mehr Mutationen bekannt und neue Mutationen können viel leichter eingeführt werden, was die Klonierung von Genen natürlich erleichtert. Auch die Selektionsverfahren sind bei den Prokaryoten dank ihres schnellen Wachstums, ihrer kurzen Generationszeit und dank ihrer geringen Grösse von nur etwa einem Mikrometer viel besser kontrollierbar und um einiges leichter, billiger und schneller durchführbar als dies bei Eukaryoten der Fall ist.

Gründe dafür, warum sich die Genforscher für die Klonierung von Genen höherer Eukaryoten interessieren, liegen sicher bei den erhofften Erkenntnissen über die Funktionsweise der eukaryotischen Gene und der davon codierten Proteine. Es besteht aber auch ein wirtschaftliches Interesse an den zahlreichen Verwendungen der klonierten Gene, von denen

im anschliessenden Teil C eine Übersicht und im III. Teil dieser Arbeit eine ausführlichere Besprechung folgen.

C. Wozu kloniert man überhaupt Gene?

Dieses Kapitel C. ist eigentlich eine kurze Zusammenfassung des Teiles III über Anwendungen. Um Repetitionen zu vermeiden sei deshalb je nach verfügbarer Zeit entweder auf die hier folgende Zusammenfassung oder auf die im III. Teil viel ausführlicher beschriebenen Anwendungen hingewiesen.

Anwendungsmöglichkeiten klonierter Gene:

1. Grundlagenforschung

Neu klonierte und sequenzierte Gene lassen sich mit allen schon bekannten Sequenzen vergleichen, um möglicherweise eine Genfunktion zu erkennen. Das Ziel des Human Genom Project (= HUGO) ist es, das gesamte menschliche Genom zu sequenzieren. Damit werden vor allem in der Medizin und in der Biologie neue Erkenntnisse möglich, z. B. in der Diagnostik und Therapie bei der Bekämpfung von Erbkrankheiten. Heute gibt es aber nicht nur das HUGO, sondern noch weitere Projekte zur vollständigen Sequenzierung der Genome anderer Organismen wie *E. coli*, Hefe, Arabidopsis, Drosophila, Xenopus und der Maus. Von diesen Organismen wird das Hefe Genom als Erstes vollständig sequenziert sein. Dass dieses über drei mal grössere Genom des Eukaryoten *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) vor dem prokaryotischen *E. coli* Genom sequenziert sein wird, hängt unter anderem mit dem grösseren wirtschaftlichen Interesse an Eukaryoten und mit der besseren Organisation der Hefe-Sequenzierung zusammen.

Wenn man ein bestimmtes Gen kloniert hat und von ihm die Sequenz kennt, so kann man durch Ausschalten seiner Expression auch seine Funktion ausschalten und dann den Phänotyp der entsprechenden Mutante untersuchen, um somit etwas über die Funktion des klonierten Gens zu erfahren. Die Möglichkeiten dazu sind: 1. Durch eine doppelte homologe Rekombination das gewünschte Gen aus dem Genom entfernen wie man dies bei sogenannten "knock-out" Mutanten von Tieren tut. 2. Mit "antisense"-RNA, welche die Translation von mRNA bestimmter Gene gezielt blockieren. 3. Mit Ribozymen gezielt die mRNA's von bestimmten Genen zerstören. 4. Spezifische Genregulationsproteine wie Transkriptionsfaktoren oder Repressorproteine künstlich herstellen.

Durch "knock out" kann man in einer einzelnen Zelle oder in einem ganzen transgenen Tier ein spezifisches Gen und somit seine Funktion ausschalten. Der veränderte Phänotyp kann einem dann Anhaltspunkte über die Funktion dieses Genes liefern. Eine Verwendung dieser transgenen Tiere in der Medizin sind die Tiermodelle für menschliche Krankheiten. Im Anwendungsteil wird als Beispiel die Harvard-Krebsmaus näher vorgestellt. Um bei einem solchen "knock out"-Tier ein spezifisches Gen auszuschalten, braucht man aber Teile seiner Sequenzinformation und dazu muss zuerst das Gen kloniert werden.

Bei vielen der häufigen Zivilisationskrankheiten sowie durch die höhere Lebenserwartung im Alter vermehrt auftretenden Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Herzinfarkt oder Krebs sind zwar einige der beteiligten Gene kloniert, aber das heutige Wissen reicht noch nicht aus, um eine vollständige molekulare Erklärung für diese sehr komplexen Krankheiten zu liefern und somit die klonierten Gene schon heute als Basis zur Medikamententwicklung oder für eine Gentherapie anzuwenden. Es braucht in diesen Gebieten noch viel Grundlagenforschung, um die noch offenen Wissenslücken zu füllen.

2. Landwirtschaft

In der Landwirtschaft kann man klonierte Gene einerseits in der Tierproduktion, und andererseits in der Pflanzenproduktion verwenden. Der Sinn dieser transgenen Landwirtschaft kann für Entwicklungsländer in der Schädlingsbekämpfung und in der Ertragssteigerung liegen, um die dort herrschenden Hungersnöte zu bekämpfen. Im Westen dagegen, wo schon heute eine Überproduktion an Nahrungsmitteln besteht, kann man die klonierten Gene zur Qualitätsverbesserung oder zur Schonung der Umwelt z. B. vor Pestiziden einsetzen. Einige Verwendungen von klonierten Genen in transgenen Nutztieren sind: Wachstumshormone, Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten, Erbfehlerdiagnose und Stressresistenz. Einige Verwendungen von klonierten Genen in transgenen Pflanzen sind: Schutz vor Insektenschäden, Virus-Resistenz, Herbizid-Resistenz, Nährwerterhöhung und Stickstoff-Fixierung.

3. Medizin

Man kennt heute zahlreiche Krankheiten, die durch Gendefekte verursacht werden. Durch die Klonierung einzelner dieser Gene konnte einerseits mehr über die molekularen Mechanismen, die zur Krankheit führen, erfahren werden, und andererseits ergibt sich damit eine wirkungsvolle Methode zur Bekämpfung oder zur Therapie dieser Krankheiten: Man kann nun entweder neue Medikamente entwickeln, welche mit den Enzymen oder Proteinen interagieren, wenn der molekulare Proteinddefekt bekannt ist. Oder man kann über eine somatische Gentherapie direkt auf Genebene das defekte Gen durch eine intakte Kopie ersetzen.

Die heutige Hauptanwendung der klonierten Gene in der Medizin umfasst die Diagnostik. Die Klonierung von einigen wichtigen Genen, die Erbkrankheiten verursachen können, hat aber in der Medizin oft gleichzeitige Anwendungen im präventiven, diagnostischen und therapeutischen Bereich. Als Beispiel eines Gens, das in allen drei dieser Bereiche verwendet werden kann, wird im Kapitel III.C. die Anwendung des HNPCC-Genes eingehend besprochen.

Die weiteren Verwendungen der klonierten Gene in der Medizin werden wegen ihrer grossen Vielfalt weiter unterteilt in die Bereiche Prävention, Diagnostik und Therapie:

a. Prävention

Die Produktion von Impfstoffen ist eines der Hauptverwendungsgebiete von klonierten Genen zur Prävention von Infektionskrankheiten. Der Vorgang der Impfung ist eigentlich eine Immunisierung mit einem abgeschwächten Erreger oder nur einem Teil desselben. Dabei wird

eine Immunantwort ausgelöst, welche im geimpften Organismus einerseits einen kurzfristigen Schutz gegen den infektiösen Erreger, andererseits aber auch Gedächtniszellen produziert, welche einen längerfristigen oder sogar lebenslänglichen Schutz gegen den Erreger gewährleisten.

Bei den herkömmlichen Impfungen kommt zum Risiko der Toleranzbildung durch falsche Erregerkonzentrationen oder falsche Applikationswege noch eine zusätzliche Gefahr dazu: die abgetöteten oder abgeschwächten Erreger können immer noch zu einer Erkrankung oder zu schweren Nebenwirkungen führen. Durch die Klonierung von Oberflächenprotein-Genen von Erregern kann man mit der Gentechnologie heute in Bakterien und auch in Hefe sowie in anderen eukaryotischen Zellen rekombinante Impfstoffe produzieren, welche nur noch Teile des Erregers enthalten und somit nicht mehr infektiös sein können. Eine ausführlichere Besprechung der gentechnischen Impfstoffproduktion mit klonierten Genen anhand des Beispiels Malaria folgt im Anwendungsteil unter III. D.

b. Diagnose

Die heutige Hauptanwendung klonierter Gene in der Medizin umfasst die Diagnostik. Gentechnische Methoden wie PCR erlauben die Amplifikation kleinster DNA-Mengen. Danach kann gegebenenfalls eine anschließende Identifizierung durch die Sequenzierung des DNA-Stückes durchgeführt werden. Dies ermöglicht einerseits die herkömmliche Diagnose von Krankheiten wie Infektionen und Krebs genauerer, sicherer und schneller zu machen. Andererseits ermöglichen diese Methoden auch neue Verfahren wie die pränatale Diagnostik und die Gendiagnose zu entwickeln. Die Aufgabe der Diagnostik ist ein möglichst frühzeitiges Erkennen einer Krankheit, sodass die geeignetste Therapie raschmöglichst eingeleitet werden kann. Anhand der Krankheiten AIDS und Krebs werden die Verbesserungen der Diagnostik dank der klonierten Gene aufgezeigt. Bei der Diskussion der Gendiagnose von Erbkrankheiten wird noch auf sich aufdrängende ethische und politische Fragen eingegangen.

c. Therapie

Mögliche therapeutische Anwendungen der Gentechnologie in der Medizin sind einerseits die Medikamente (Pharmazeutika), und andererseits ergeben sich heute die Möglichkeiten einer somatischen Gentherapie an Körperzellen.

Eine grosse Gruppe von gentechnisch hergestellten Pharmazeutika sind menschliche Peptidhormone, von denen wiederum das wichtigste sicher das Humaninsulin ist. Neben dem Insulin-Gen und dem Erythropoietin-Gen, deren Verwendungen im Teil III.F.1.a. und b. ausführlich besprochen werden, gibt es noch sehr viele weitere Gene, dank deren Klonierung man auf molekularem Niveau spezifische Arzneimittel gegen verbreitete Krankheiten konstruieren konnte oder zur Zeit daran forscht. Die Pharmafirmen erklären sogar, dass ab dem Jahr 2000 nur noch Medikamente zugelassen werden, bei denen die Gentechnik im Spiel war. Dies ist zu einem Teil natürlich auch Propaganda für die Notwendigkeit der Gentechnologie. ⁽³⁾

Die somatische Gentherapie wird nur bei wenigen Erkrankungen angewendet werden können. Dazu muss das die Krankheit verursachende Gen kloniert sein. Des weiteren können nur

solche Erbkrankheiten, die durch ein einzelnes defektes Gen verursacht werden, so behandelt werden. Heute sind etwa 4000 solche monogen vererbte Erbkrankheiten bekannt. Eine weitere Einschränkung stellt die Tatsache dar, dass typischerweise die defekten Zellen einfach aus dem Körper entnommen, in Kultur vermehrt und dann wieder in ihren ursprünglichen Gewebeverband integriert werden müssen. Dies ist bis heute nur bei Knochenmarks-, Blut- und Hautzellen in Zukunft aber auch bei Muskel- und Leberzellen möglich.

Es ist jedoch auch möglich, dass man die defekten Zellen direkt im Körper drin mit dem intakten Gen transfektiert. Bei löslichen und sezernierten Produkten ist es zusätzlich möglich andere Zellen einzuschleusen, die das betreffende Produkt exprimieren. Ein Beispiel dafür ist die Einschleusung von Dopamin produzierenden Zellen aus abgetriebenen menschlichen Föten in Parkinson-Patienten. Im Teil III.F.2. erfolgt eine genaue Besprechung der Verwendungen der klonierten Gene in der Gentherapie bei folgenden Krankheiten: SCID-Syndrom, Krebs, Hypercholesterinämie, Cystische Fibrose und Duchenne Muskeldystrophie.

*

Teil II: Methoden

Anhand bekannter Beispiele werden neun verschiedene Strategien aufgezeigt, wie man ein gesuchtes Gen isolieren kann:

1. Funktionelles Klonieren:

- A. Klonierung über die Enzymaktivität
- B. Klonierung durch Komplementation
- C. Substraktionsklonierung
- D. Klonierung über das Substrat
- E. Klonierung über Peptidsequenzen
- F. Klonierung anhand des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens
- G. "Panning": Klonierung mit Antikörpern

2. Positionelles Klonieren:

- A. Klonierung über Mikrosatelliten-Kopplungsstudien
- B. Klonierung anhand des Vererbungsmusters von RFLP's

A. Funktionelles und positionelles Klonieren

Diese neun Strategien können in die beiden grundsätzlich unterschiedlichen Vorgehen funktionelles und positionelles Klonieren eingeteilt werden. Der Unterschied besteht darin, dass man beim funktionellen Klonieren einen biochemischen Anhaltspunkt kennt, beim positionellen Klonieren dagegen nicht. Solche Anhaltspunkte wären z. B. Expressionsort, Antikörper gegen das vom gesuchten Gen codierte Protein, gereinigtes Protein, Enzymaktivität oder Substrat, an welches das Genprodukt bindet. Somit ist ein Isolieren des Gens durch Selektion und Screening nach dieser bekannten biochemischen Funktion des Genproduktes oder Analyse seiner Struktur (Sequenz) möglich.

Leider ist in vielen Fällen über das gesuchte Gen aber kein biochemischer Anhaltspunkt bekannt. In dieser Situation kann dann ein bestimmtes Gen nur durch positionelles Klonieren, also schrittweises Einkreisen der Lage des Gens im Genom, kloniert werden. Dieses Einkreisen der Genposition geschieht z. B. durch Kopplungsstudien mit familiären Vererbungsmustern von Mikrosatelliten und anderen DNA-Markern wie RFLP's, von denen man diejenigen sucht, welche gleich vererbt werden wie ein Allel des gesuchten Gens.

Obwohl über das positionelle Klonieren viele krankheitsassoziierte Gene isoliert wurden, ist es natürlich viel einfacher und eleganter, in einer funktionellen Klonierung das gesuchte Gen zu selektionieren oder nach ihm zu suchen. Je mehr Gene in Zukunft aber kloniert sein werden, desto eher wird man die Position teilweise einengen, und dann die Datenbanken nach bereits klonierten Genen in dieser Region absuchen. Verdächtige Gene kann man dann bei Kranken sequenzieren und untersuchen, ob sie verglichen mit der Sequenz aus gesunden

Menschen, eine Mutation tragen. Während das positionelle Klonieren prinzipiell für alle Gene möglich ist, deren unterschiedliche Allele man im Phänotyp des Organismus feststellen kann, ist dagegen das funktionelle Klonieren nur in den Fällen möglich, wo man einen biochemischen Anhaltspunkt über das gesuchte Genprodukt kennt. Dafür wird beim funktionellen Klonieren eine viel grössere Vielfalt an verschiedenen Strategien angewendet, um ein bestimmtes Gen zu isolieren. Entsprechend enthält der erste Methodenteil, das funktionelle Klonieren, auch viel mehr Beispiele an unterschiedlichen Klonierungsstrategien.

B. Wegleitung zum Methodenteil

Die Beschreibung der einzelnen Beispiele ist ohne das dazugehörige Hintergrundwissen zum Teil sehr schwer verständlich. Um den Zugang zu diesem Hintergrundwissen zu erleichtern, sei auf die in der Literaturliste angegebenen Quellen verwiesen, wo sich dazu mehr Information und vor allem erklärende Schematas und Skizzen befinden. Auch ist das ganze durch eine schnelle persönliche Skizze während des Lesens schon viel besser verständlich.

Dem weniger interessierten oder in Gentechnologie-Methoden weniger bewandten Leser seien primär die Teile I, II und IV empfohlen. Diese dienen nämlich dazu, die wissenschaftliche Konzentration der nachfolgenden Methoden durch den Alltagsbezug etwas aufzulockern.

*

1. Funktionelles Klonieren

A. Klonierung über die in vitro Transkription von cDNA

Bei einer bekannten Funktion eines Gens prüft man z. B. die Enzymaktivität von verschiedenen Klonen, welche eine Genbank in einem Expressionsvektor enthalten oder welche zur Expression in eine *Xenopus*-Oocyte mikroinjiziert werden. Misst man in einem bestimmten Klon eine solche Enzymaktivität, so ist vermutlich das gesuchte Gen im Expressionsvektor dieses Klons.

1. Das IgG-Induktions-Faktor-Gen⁽⁴⁾

Noma et al. haben mRNA aus einer T-Zell-Linie einer Maus isoliert. Als Quelle für die eingesetzte mRNA diente eine von Sideras entwickelte T-Zell-Linie, die den IgG 1 Induktions-Faktor in grossen Mengen sezerniert und darum eine Anreicherung der gesuchten IgG 1 Induktions-Faktor mRNA besitzt. Diese Gesamtzell-mRNA wurde in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde dann in einen Vektor eingebaut und kloniert. Dadurch, dass der in den Vektor hineinklonierten cDNA der starke SP-6-Promotor vorgeschaltet wurde, konnte eine starke in vitro Transkription der cDNA im entstandenen Expressionsplasmid stattfinden.

Die aus dieser Expressionsbank produzierten mRNA's wurden anschliessend in verschiedene *Xenopus*-Oocyten mikroinjiziert, worin dann eine effiziente Translation stattfand. Die das richtige Gen enthaltende Oocyte sezernierte nun IgG 1 Induktions-Faktor ins Medium. Der aufgrund der gesuchten mRNA exprimierte Lymphokin IgG 1 Induktions-Faktor bewirkte viele messbare biologische Effekte. So z. B. erhöhte es zusammen mit LPS (= Lipopolysaccharid) in Milzzellen die exprimierte und ins Medium sezernierte IgG 1-Konzentration um das sechsfache verglichen mit LPS allein. Durch Messung dieser Konzentrationsunterschiede konnte in diesem Ansatz durch funktionelles Klonieren das gesuchte Gen isoliert werden.

Dazu mass man Gruppen von 100 oder 1000 Klonen. Ergab eine Gruppe ein positives Resultat, so musste sie in weitere kleinere Gruppen unterteilt werden, die dann einzeln auf ein positives Resultat getestet wurden. Dies wurde solange fortgesetzt, bis nur noch ein einziger Klon in einer Gruppe enthalten war und ein positives Resultat lieferte. Dieses Einkreisen von positiven Klongruppen nennt man "Pooling".

2. Das Phosphat-Transporter-Gen⁽⁵⁾

Es wurde mRNA aus der Nierenrinde eines Hasen isoliert, weil sich dort der proximale Tubulus des Harnkonzentrierungssystems der Niere befindet, in dem viele

Ionenaustauschprozesse stattfinden und somit eine grosse Menge Ionenkanäle vorhanden ist. Diese aus den Nierenrindenzellen isolierte mRNA wurde in cDNA überschrieben (cDNA-library) und in *Xenopus* Oocyten, als Expressionssystem, injiziert. Dem Medium der *Xenopus* Oocyten wurde radioaktives ^{32}P Phosphat als Substrat für den gesuchten Na/P_i-Cotransporter zugegeben. Dieses zugegebene radioaktive ^{32}P Phosphat wurde nun nur von jenen Oocyten, welche das gesuchte Gen enthielten und somit Na/P_i-Cotransporter-Protein exprimierten ins Zellinnere transportiert. Die Oocyte mit dem richtigen Gen zeigte in der anschliessenden Autoradiographie viel mehr Radioaktivität. Die Analyse des aus dieser Oocyte klonierten Hasengens ergab, dass das davon codierte Genprodukt, das Na/P_i-Cotransporter Protein, ein 52 kD-Protein mit 6-8 Transmembran-Domänen und einem Na-abhängigen Transportmotiv ist. Weitere biochemische Analysen über Glykosylierung und Kinetik erhärteten die Entdeckung eines Na/P_i-Cotransporters. Ein Northern Blot zeigte, dass das klonierte Na/P_i-Cotransporter-Gen in Leber und Niere exprimiert wird.

3. Das α -Interferon-Gen⁽⁶⁾

mRNA aus aktivierten Leukocyten enthält viel α -Interferon-mRNA. Zur Klonierung des α -Interferon-Gens wurde mRNA aus aktivierten Leukocyten isoliert und mit den zu testenden Plasmiden hybridisiert, welche in cDNA überschriebene mRNA aus der 12 S Fraktion von aktivierten Leukozyten enthielten und auf einen Filter gebunden wurden. Die hybridisierende mRNA wurde gereinigt und in eine *Xenopus* Oocyte injiziert. Aus dem Inkubationsmedium wurde Interferon angereichert. Dann wurde die biologische Interferon-Aktivität gemessen, indem die Plaque-Reduktion von vesikulären Stomatitis Viren-Plaques bestimmt wurde, denn Interferon fördert eine antivirale Aktivität in den Zellen. Aus 512 untersuchten Klonen ergaben 12 positive Resultate und einer enthielt das gesuchte Interferon-Gen.

Das klonierte α -Interferon-Gen kann heute in der Medizin in zahlreichen Therapien als Medikament gegen Krebs- und Viruserkrankungen eingesetzt werden. Eine genaue Besprechung folgt im Anwendungsteil.

B. Klonierung durch Komplementation

Aus bestimmten Zellen kann man Gene isolieren, welche das Wachstum verbessern oder überhaupt erst möglich machen, indem man Zellen, welche diese komplementierenden Gene selbst nicht besitzen, diese Gene zugeibt und somit deren Wachstum verstärkt. Diejenigen Zellen mit dem komplementierenden Gen überwachsen nun die Zellen, welche andere oder keine Gene aufnahmen. So kann man positiv auf Klone mit dem gesuchten komplementierenden Gen selektionieren. So kann z. B. durch Komplementation einer geeigneten Mutante das Gen für die essentielle TK (=Thymin Kinase) aus einer cDNA-Bank isoliert werden. Dazu muss man die TK-Mutante unter solchen Bedingungen halten, dass sie nur mit Hilfe des komplementierenden TK-Wildtypgens überlebt. Dann transfiziert man die zu komplementierende TK-Zelle mit der abzusuchenden cDNA-Bank. Aus den überlebenden Mutanten können dann die Plasmide mit der gesuchten komplementierenden TK-cDNA isoliert werden.

Durch Komplementation können nur Gene isoliert werden, auf die man selektionieren bzw. "screenen" kann. Dies sind meist Gene für Biosynthese-Enzyme wie bei TK, APRT (=Adenin Phospho-Ribosyl-Transferase) und HGPRT (=Hypoxanthin-Guanin Phospho-Ribosyl-Transferase), für die Nukleotid- oder die Aminosäure-Synthese.

1. Das Xeroderma Pigmentosa-Gen⁽⁷⁾

Es wurde eine Zelllinie von Xeroderma Pigmentosa Zellen hergestellt. Diese Xeroderma Pigmentosa Zellen wurden dann mit Genen aus dem Epstein Bar Virus transfektiert, sodass sie das nukleäre Antigen vom Epstein Bar Virus exprimierten, das für die Replikation des EBV (=Epstein Bar Virus) notwendig ist. Die Xeroderma Pigmentosa Zellen sind UV-sensitiv. Nun werden diese Xeroderma Pigmentosa Zellen mit einem extrachromosomalen Epstein Bar Virus-Expressions-Vektor transfektiert, dem als Insert die zu untersuchende cDNA aus einer cDNA-Bank aus einer Wildtyp-Zelle hineinkloniert wurde. Der Vektor ist extrachromosomal, damit man ihn nachher leichter wieder aus den selektionierten Zellen isolieren kann. Dann werden die Xeroderma Pigmentosa Zellen mit UV bestrahlt. Nur diejenigen Xeroderma Pigmentosa Zellen, welche mit einer cDNA des Xeroderma Pigmentosa Wildtyp Gens transfektiert wurden, überlebten die UV-Bestrahlung. Danach konnte aus den überlebenden Zellen das komplementierende Plasmid gereinigt werden. Damit wurde anschliessend E. coli transformiert. Aus den E. coli Zellen wurde die komplementierende Xeroderma Pigmentosa cDNA isoliert und charakterisiert.

C. Substraktionsklonierung

Die Substraktionsklonierung dient zur Isolation sehr seltener RNA, die nur in einer von zwei sehr nahe verwandten Zelllinien transkribiert wird. Von der einen Zelllinie wird mit trägergebundenen oligo-dT's die mRNA isoliert und der dazu komplementäre cDNA-Strang synthetisiert. Dann wird die RNA durch Alkali-Behandlung abgebaut. Jetzt wird die mRNA der nahe verwandten Zelllinie zu dieser komplementären cDNA gegeben worauf die meisten mRNA's hybridisieren werden. Diese Hybride werden in einer Hydroxylapatit-Säule abgefangen und nur die für die erste Zelllinie spezifische cDNA kann aus dem Eluat der Säule isoliert werden.

1. Das T-Zell-Rezeptor-Gen⁽⁸⁾

mRNA, die in T-Zellen aber nicht in B-Zellen exprimiert wird, wurde durch Subtraktion isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die gewünschte mRNA wurde dank des Wissens über mehrere biochemische Eigenschaften des gesuchten T-Zell-Rezeptors nach der folgenden funktionellen Klonierung isoliert. Aus Antigen-spezifischen T-Helfer Zellen wurde nur die membrangebundene polysomale mRNA isoliert, denn der gesuchte T-Zell-Rezeptor wird ja an die Zellaussenseite transportiert und muss darum ins ER (=Endoplasmatisches Reticulum) hineintranslatiert werden, weshalb auch die entsprechende mRNA membrangebunden ist. Diese membrangebundene polysomale mRNA wurde dann in radioaktiv markierte cDNA umgeschrieben. Sodann wurden mit mRNA aus einer B-Zell-Linie die der T- und B-Zelle

gemeinsamen mRNA's heraussubtrahiert. Die übrigbleibenden und für die T-Zelle spezifischen, markierten cDNA's wurden nun als Sonden verwendet, um in einer ähnlichen Subtraktions-Bibliothek aus cytoplasmatischer mRNA von T-Zellen diejenigen cDNA's herauszusuchen, die als mRNA's später an die ER-Membran andocken. Davon resultierten 10 positive Klone. Danach wurde untersucht, welcher dieser Klone an eine somatisch rearrangierte Region des T-Zell-Genoms hybridisierte, denn die T-Zell-Rezeptor-Gene werden zur Produktion einer möglichst grossen Variabilität rearrangiert. Daraus resultierte schliesslich nur noch ein positiver Klon, der das gesuchte T-Zell-Rezeptor-Gen enthielt.

2. Differential Display⁽⁹⁾

Neben der oben beschriebenen Subtraktionsklonierung gibt es noch eine weitere Methode, um diejenigen Gene zu klonieren, welche in verschiedenen Zellen oder unter unterschiedlichen Umweltbedingungen exprimiert werden: "differential display". Dazu werden die zu vergleichenden mRNA-Populationen isoliert und mit PCR amplifiziert. Auf der 3'-Seite wird ein zum poly-A-Schwanz komplementärer oligo-dT-Primer verwendet, und weiter 5' in der mRNA-Sequenz hybridisiert man einen definierten Cocktail aus vielen verschiedenen Primern an. Die durch diese Primer-Mischung definierte mRNA-Subpopulation wird mit PCR amplifiziert, in cDNA umgeschrieben und auf einem Sequenzigel analysiert. Mit spezifischen Primer-Cocktails lassen sich reproduzierbare Muster der aufgetrennten cDNA-Fragmente erhalten.

Durch vergleichen von zwei verschiedenen Auftrennungen nebeneinander kann man Gene, welche nur in einer von zwei nahe verwandten Zelllinien oder bei einer von zwei Umweltbedingungen exprimiert werden als zusätzliche oder fehlende Banden erkennen.

Diese Bande kann aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert werden. So sollte die Sequenz des 3'-Endes des gesuchten Gens gefunden werden. Durch Plaque-Hybridisierung auf einer cDNA-Bank kann man dann die gesuchte cDNA isolieren.

D. Klonierung über das Substrat

Sind von einem bekannten Substrat ein daran bindendes Enzym und dessen Gen gesucht, so gibt es zwei Ansätze diese zu finden: Erstens kann man das ans Substrat bindende Protein anreichern, z. B. über eine Affinitätssäule mit gebundenem Substrat. Danach wird das Protein gereinigt und über Aminosäure-Sequenzierung, genetischen Code und DNA-Sonden das gesuchte Gen aus einer genomischen oder cDNA-Library isoliert. Zweitens kann man direkt den das gesuchte Gen enthaltenden Klon aus einer Expressionsbank heraussuchen, wenn das an das markierte Substrat bindende Protein an der Zelloberfläche liegt, wie dies bei der Klonierung des Erythropoietin-Gens der Fall war. Oder drittens kann man direkt den das gesuchte Gen enthaltenden Klon aus einer Expressionsbank herausselektionieren, indem man durch Waschen in einer mit Substrat beschichteten Schale diejenigen Zellen, welche das Protein auf ihrer Zelloberfläche präsentieren von den Anderen trennt.

1. Das Erythropoietin-Gen⁽¹⁰⁾

Aus nicht-induzierten MEL-Zellen (= Maus Erythro Leukämie) wurde eine cDNA-Bank hergestellt, die dann in einen pXM-Expressionsvektor kloniert wurde. Mit diesen Klonen transfizierte man sodann COS-Zellen. Der Klon mit dem gesuchten klonierten Gen wurde dadurch identifiziert, indem man menschliches, radioaktives ¹²⁵I-Erythropoietin zum COS-Zellmedium zugab. Menschliches, radioaktives ¹²⁵I-Erythropoietin wurde von COS-Zellen gebunden, die mit dem Erythropoietin-Rezeptor-Gen transfiziert wurden. über Szintillationszählung erkannte man die das gewünschte Gen enthaltenden Zellen. Dies erreichte man durch "poolen" von ganzen Gruppen von Zellklonen: Proben von vielleicht 1000 Klonen werden nach Radioaktivität abgesucht. Ist eine dieser Gruppen positiv, so wird sie weiter unterteilt in 10 Proben à 100 Klone, die wieder nach Radioaktivität abgesucht werden. Die Sequenzierung des isolierten Gens und das anschliessende Ableiten der Aminosäuresequenz ergaben, dass der Erythropoietin-Rezeptor ein 507-Aminosäure-Protein mit einer Transmembran-Domäne ist.

Nach der Klonierung entwickelte man einige therapeutische Anwendungen des klonierten Erythropoietin-Gens in der Medizin: Im Anwendungsteil erfolgt unter III.F.1.b. eine Besprechung dieser Anwendungen.

E. Klonierung über Peptidsequenzen

Wenn man ein Gen, welches für ein spezifisches Protein kodiert, klonieren will, dessen Expressionsort oder sonst eine zur Proteinisolation hilfreiche Information man kennt, so kann man biochemisch dieses Protein reinigen. Danach kann man mittels Edman-Abbau Teile der Aminosäure-Sequenz vom N-Terminus her, oder nach vorhergehendem Protease-Verdau auch interne Sequenzen bestimmen.

Von dieser Aminosäure-Sequenz-Information kann man mit Hilfe des genetischen Codes alle möglichen Nukleotidsequenzen ableiten, welche für ein solches Peptid codieren. Mit Hilfe der automatisierten DNA-Synthese lassen sich nun alle diese möglichen Oligonukleotide synthetisieren und als PCR-Primer benützen. Dazu benützt man z. B. die automatisierte DNA-Synthese nach der Phosphoramidit-Methode, wobei man das erste Nukleotid an einen Träger bindet und dann schrittweise verlängert durch Detrytlieren, Verknüpfen und dann Oxidieren und und zuletzt eine Schutzgruppe anhängt. Wegen der Degeneration des genetischen Codes gibt man nun je nach Position z. T. nicht nur ein, sondern zwei, drei oder vier Nukleotide zur Verknüpfungsreaktion zu, sodass jetzt eben alle möglichen PCR-Primer entstehen.

Wenn man 25 oder mehr Aminosäuren sequenzieren kann, so ist man in der glücklichen Lage daraus an beiden Enden der davon abgeleiteten Nukleotidsequenz zwei gegenläufige PCR-Primer zu synthetisieren. Hat man aber nur ein kürzeres Peptid sequenziert wo zwei Primer zu nahe zu liegen kämen, so muss man eine andere Methode anwenden: Da man zur PCR-Amplifikation zwei Primer braucht, genügt es nicht, nur ein N-terminales kurzes Peptid zu sequenzieren, sondern es müssen weitere interne Sequenzen bekannt sein. Diese Sequenzen bekommt man dadurch, dass man das zu untersuchende Protein mit einer Protease z. B. Trypsin in einzelne Peptide spaltet, und diese dann sequenziert.

Mit PCR-Primern, die man von einer oder verschiedenen Peptid-Sequenzen abgeleitet hat, kann man nun mit Hilfe einer cDNA-Bank versuchen, die dazwischenliegende gesuchte DNA-Sequenz durch PCR zu amplifizieren. Wenn wegen des degenerierten genetischen Codes zuviele unspezifische Sequenzen amplifiziert werden, so kann man die gesuchte Fragment dadurch herausselektionieren, indem die PCR-Produkte von verschiedenen Primerkombinationen miteinander hybridisiert werden, wie dies bei der SRP-Klonierung der Fall war (im nächsten Kapitel). Auch kann man als Kontrolle das PCR-Produkt sequenzieren, um zu überprüfen, ob man mit dem genetischen Code wieder auf dieselbe Aminosäuresequenz kommt, von der man ausgegangen ist. Wenn man beim PCR radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierte Nukleotide einsetzt, so erhält man eine markierte Gensonde, die man z. B. in einem Southern Blot, einer in situ Hybridisierung oder einer Kolonie- oder Plaques-Hybridisierung dazu benutzen kann, den gesuchten Klon herauszusuchen.

1. Die Signal Recognition Particle-cDNA⁽¹¹⁾

Aus Hunde-Pankreas wurden über SDS-PAGE sechs SRP (= Signal Recognition Particle)-Peptidsequenzen isoliert und durch Edman-Abbau vom N-Terminus her ansequenziert. Aus den isolierten SRP-Peptid-Sequenzen wurden über den genetischen Code Oligonucleotide abgeleitet und dazu verwendet, 5 verschiedene PCR-Primer zu synthetisieren. Die Autoren machten mehrere PCR's mit jeweils einem Primerpaar, das je von einem in Richtung C-Terminus und einem am N-Terminus liegenden Peptid-Sequenzstück abgeleitet wurde. Diese PCR's ergaben mehrere Banden von verschiedenen PCR-Produkten, wegen der Degeneration des genetischen Codes.

Um daraus die SRP-Sequenz zu isolieren wurde ein Komplementaritätstest mit den Produkten von zwei verschiedenen PCR-Amplifikationen mit jeweils verschiedenen Primern durchgeführt. Die partielle SRP-cDNA sollte das einzige Produkt sein, das den beiden PCR-Amplifikationen gemeinsam ist. So konnte ein Hunde-SRP-14 PCR-Produkt isoliert werden, das nun wiederum als Sonde eingesetzt wurde, um die komplette murine SRP-14-cDNA aus einer embryonalen Maus-cDNA-Bibliothek in λ -Phagen zu isolieren.

F. Klonierung anhand des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens

Diese Methode zeigt Ähnlichkeiten auf zur Klonierung durch Komplementation (Kapitel II.1.B.). Der Unterschied besteht darin, dass bei der Komplementationsmethode einer Mutante durch Zugabe des ihr fehlenden Wildtyp-Genes das Wachstum im Selektivmedium überhaupt erst möglich gemacht wird. Dagegen wird hier bei der Klonierung anhand des Wachstums- und Differenzierungsverhaltens eine normale Wildtypzelle durch Zugabe eines mutierten Gens zu schnellerem Wachstum umprogrammiert. Wenn eine Wildtyp-Zelle durch Transfektion mit einem bestimmten Gen dazu programmiert werden kann, sich ganz spezifisch zu verhalten z. B. die anderen Zellen zu überwachsen nach Transfektion mit dem ras-Gen, so können Zellen, die dieses Gen enthalten, möglicherweise direkt angereichert werden. Nach Anreicherung kann dann das in ihnen klonierte Gen isoliert und charakterisiert werden.

1. Das ras-Gen⁽¹²⁾

DNA wurde aus menschlichen Tumorzellen isoliert, und damit wurde eine embryonale Mauszellkultur transfektiert (über Calcium-Phosphat-Präzipitations-Methode). Diese embryonalen Mauszellen bilden in der Kulturschale einen Monolayer, weil sie kontakt-inhibiert sind. Diejenigen Mauszellen, die nun das menschliche Tumorgen aufnehmen, werden genetisch verändert und sind nun nicht mehr kontakt-inhibiert, sondern bilden einen Focus: einen Haufen von rasch und ungehemmt wachsenden Zellen. Zur Reinigung der Tumorgen-DNA von den übrigen menschlichen Sequenzen wird die DNA aus den Focus-Zellen nochmals zur Transfektion einer embryonalen Mauszellkultur eingesetzt. Aus den nun entstehenden Focussen wird die DNA isoliert und in λ -Phagen kloniert. In der λ -Genbank ist nun die menschliche Tumorgen-DNA und auch noch die gesamte Mauszell-DNA enthalten, aber nur Erstere besitzt in ihren Introns *Alu*-Sequenzen. Diese Eigenschaft wurde durch Weinberg ausgenutzt, um das menschliche Tumorgen zu isolieren. Dazu wurde die in λ klonierte DNA auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert ("plaque lift") und mit einer *Alu*-Sequenz, die ja nur in menschlicher, nicht aber in muriner DNA vorkommt, als Sonde abgesucht. Die einzige menschliche DNA, die die zweite Transfektion "überlebte", war diejenige, welche das Focus-Wachstum bewirkte, also die menschliche Tumorgen-DNA. Aus positiven Klonen isolierten sie das Oncogen Ras. Die Kontrolle bestand darin, mit dieser Ras-DNA wiederum Mauszellen zu transfektieren, was wie erwartet zu einem Tumor führte.

G. Klonierung mit Antikörpern

Ist von einem gesuchten Gen ein an das entsprechende Genprodukt bindender Antikörper vorhanden, so gibt es mehrere Methoden, um das gesuchte Gen zu klonieren:

1. kann man direkt den das gesuchte Gen enthaltenden Klon aus einer Expressionsbank herausselektionieren, indem man durch Waschen in einer mit Antikörpern beschichteten Schale diejenigen Zellen, welche das Antigen auf ihrer Zelloberfläche präsentieren von den anderen trennt. Dies wurde im nachfolgenden Beispiel bei der Klonierung der CD 28 cDNA so durchgeführt. Alternativ dazu könnte man fluoreszenz-markierte Antikörper verwenden und die gesuchten Zellen anschliessend mit einem FACS-Gerät (fluorescent activated cell sorter) aussortieren.

2. kann man entweder das an den Antikörper bindende Protein anreichern, z. B. über eine Affinitätssäule mit gebundenem Antikörper. Danach wird man das Protein reinigen und über Aminosäure-Sequenzierung, genetischen Code und DNA-Sonden das gesuchte Gen aus einer genomischen oder cDNA-Library isolieren. (Siehe die Klonierung über Peptidsequenzen im Kapitel E. oben.)

3. kann man von einer Expressionsbank in Bakteriophagen (z. B. λ gt 11) einen "Plaque-lift" durchführen. Den so erhaltenen Filter mit gebundenen Proteinen sucht man dann wie in einem "Western-blot" mit Antikörpern ab und kann bei positiven Resultaten auf den gesuchten Klon zurückschliessen.

1. Das CD 28 Gen⁽¹³⁾

CD 28 ist ein menschliches T-Zell Oberflächenprotein das in der T-Zell-Aktivierung eine Rolle spielt. Über Immunisierung einer Maus mit menschlichen T-Zellen wurden monoklonale Antikörper unter anderem gegen CD 28 produziert. COS-Zellen wurden mit in Plasmiden klonierten cDNA-Banken aus menschlichen T-Zellen (eventuell durch Substraktion angereichert) transfiziert. In den COS-Zellen fand nun eine transiente Expression der auf der cDNA codierten Gene, z. B. des T-Zell Oberflächenproteins CD 28, statt. Die das richtige Gen enthaltenden Zellen wurden nun isoliert mittels Waschen in einer Schale, die mit monoklonalen AK gegen CD 28 beschichtet war, sodass nur Zellen, die das CD 28 T-Zell Oberflächenprotein exprimierten, haften blieben. Aus diesen gebundenen Zellen konnte nun das gesuchte Plasmid isoliert werden. Es codiert für ein homodimeres Protein, das einen hohen Glycosylierungsgrad und eine Homologie zur Immunoglobulin-Superfamilie aufweist.

*

2. Positionelles Klonieren

Ist über ein Gen bzw. dessen Produkt kein weiterer Anhaltspunkt wie Expressionsort, Antikörper, gereinigtes Protein, Enzymaktivität oder Substrat bekannt, so kann ein bestimmtes Gen nur durch positionelles Klonieren, also schrittweises Einkreisen, kloniert werden. Dieses sukzessive Einkreisen der Genposition geschieht z. B. durch Kopplungsstudien mit familiären Vererbungsmustern von Mikrosatelliten und anderen Markern aus der CEPH-Datenbank (CEPH = Centre d'Education du Polymorphisme Humain). In dem hier folgenden zweiten Methodenteil werden nur noch Beispiele mit menschlichen Genen besprochen. Die hier besprochenen Methoden könnten aber eventuell auch auf andere Organismen übertragen werden.

A. Klonierung der Grobregion

Unter Grobregion ist ein DNA-Abschnitt in der Grössenordnung von einem bis mehreren Megabasenpaaren zu verstehen, in dem sich das gesuchte Gen befindet. Nachfolgend wird beschrieben wie man diese Grobregion im Genom findet, sie abgrenzt und sie dann in einen Vektor kloniert.

1. Kopplung an einen Marker

Tritt ein Allel oder ein abstrakter Marker in einer von einem Erbkrankheits betroffenen Familie immer gemeinsam mit der Krankheit auf, dann ist ein krankheitsauslösendes Gen wahrscheinlich mit dem Marker gekoppelt, liegt also in dessen Nähe auf demselben Chromosom. Ähnlich wie bei Testkreuzungen mit Drosophila-Fliegen kann man über mehrere Generationen die Anzahl der Rekombinationen, entstanden über ein Crossover zwischen homologen Chromosomen, als Mass für die Kopplung von zwei Markern und somit als Mass für die Distanz auf demselben Chromosom annehmen. Durch die Analyse vieler Marker kann man so eine Genkarte erstellen, die umso genauer ist, je mehr Marker auf ihr kartiert sind. In der klassischen Genetik, z. B. bei den Drosophila-Testkreuzungen, zählt man die mutierten Phänotypen als Marker aus. Beim Menschen ergaben sich so aber nur etwa 30 Marker; also nur 30 kennzeichnende DNA-Abschnitte, deren Erbgang sich über Generationen verfolgen lässt. Darum half man sich mit abstrakten Genen aus. Statt der selten vorkommenden mutierten Phänotypen analysierte man die DNA selbst. Es gibt zwei Typen von abstrakten Genen:

2. RFLP's

Bei den RFLP's (=Restriction Fragment Length Polymorphism) kommt der Polymorphismus durch das Neuauftreten oder den Wegfall von Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme oder

von DNA-Sequenzen zwischen Restriktionsschnittstellen zustande. Somit ist nach Restriktionsverdau die Länge eines bestimmten Restriktionsfragmentes je nach Allel in einer Population variabel und eignet sich darum als polymorpher DNA-Marker zur Erstellung einer Genkarte. Die RFLP's lassen sich über einen Southern Blot nachweisen.

a. Das CF-Gen(18), (19), (20)

Cystische Fibrose (im folgenden CF genannt) ist eine der häufigsten Erbkrankheiten in Nordeuropa: Dort kommt jedes 2000. Kind mit CF auf die Welt. Jeder 20.-25. Nordeuropäer ist heterozygoter Träger dieses Erbfehlers.

Homozygote CF-Patienten zeigen folgendes Krankheitsbild: Eine Drüsenfunktionsstörung bewirkt einen dicken, zähflüssigen Schleim in der Lunge und im Pankreas. Letzteres hat eine Pankreasinsuffizienz und somit eine ungenügende Resorption von Nährstoffen zur Folge. Weiters leiden die CF-Patienten an chronischen Atemwegsinfektionen. Zusammen hat dies zur Folge, dass die Lebenserwartung für CF-Patienten nur 25 Jahre beträgt. Auch sind 85% von ihnen unfruchtbar.

Um die Ursache für diese Beschwerden zu finden und um eine Therapie dagegen zu entwickeln, musste das CF-Gen kloniert und das davon codierte Protein identifiziert werden. Man wusste nur, dass die Chloridionen-Leitfähigkeit in der Lungenmembran gestört ist bei CF. Sonst hatte man keine biochemischen Anhaltspunkte, welche ein funktionelles Klonieren erlaubt hätten. Darum musste man mit dem positionellen Klonieren nach dem Gen suchen.

In den betroffenen Familien suchte man eine Co-Segregation von RFLP-Mustern im Erbgut und dem CF-Phänotyp, um so an einen möglichst nahe am CF-Gen liegenden RFLP-Marker heranzukommen. Durch familiäre Vererbungsmuster von RFLP's konnte Knowlton das gesuchte Gen innerhalb 1Mb auf Chromosom Nr. 7 in der Nähe des RFLP-Markers DOCRI-917 einkreisen.

Durch "chromosome walking" und "jumping" sowie durch cDNA-Hybridisierung konnten Rommens et al. auf Chromosom 7 liegende DNA-Sequenzen isolieren, die über 500'000 Basenpaare umfassten und die das CF-Gen enthalten mussten. Diese klonierte Region wurde dann nach folgenden Kriterien auf das CF-Gen überprüft:

1. Zoo-Blot: Diejenigen DNA-Sequenzen, welche für ein Gen codieren, bleiben in der Evolution und über Artgrenzen hinweg konserviert und können so mit Southern Blots identifiziert werden.
2. Northern Blot: Das CF-Gen sollte nur in den von CF betroffenen Geweben Lunge, Pankreas, Darm, Leber und Speicheldrüse exprimiert werden.
3. CpG-Inseln: liegen am 5'-Ende vieler Gene.
4. Offenes Leseraster: Statistisch ist jedes 21. Codon ein Stoppcodon. In Genen jedoch findet man über hunderte von Codons kein Stoppcodon.
5. Chromosomen-Deletionen oder Insertionen: Nur bei Betroffenen vorkommend, könnten sie ein Hinweis auf das CF-Gen sein (wurden dort aber nicht beobachtet).

Durch Verwendung der transkribierten Region als Sonde bei der Hybridisierung einer cDNA-Bank konnte eine cDNA isoliert werden und mit dieser wiederum das Exon 1 und weitere Exons enthaltende genomische Klone des CF-Gens. So wurde das CF-Gen nach und nach aus

der 0,5 Megabasenpaar grossen Region isoliert. Es besteht aus 27 Exons, welche sich über 250'000 Basenpaare erstrecken.

Mit dem genomischen Klon als Sonde konnten überlappende cDNA-Klone isoliert werden, die das gesamte CF-Gen enthielten. Das CF-Gen codiert für eine 6500 Nukleotide lange mRNA, welche auch in CF-Patienten nachgewiesen werden konnte. Aus der Gensequenz lässt sich ein 1480 Aminosäure langes Protein ableiten. Aus dieser Aminosäuresequenz erkennt man sowohl eine Membranbindungsdomäne, als auch eine ATP-Bindungsdomäne. Heute gibt es experimentelle Hinweise, dass das CF-Gen für einen Chloridkanal codiert.

In 70 % der CF-Patienten konnte man eine Trinukleotiddeletion im CF-Gen nachweisen. Das Fehlen der 508. Aminosäure Phenylalanin führt anscheinend zum oben beschriebenen Krankheitsbild.

Eine Anwendung des klonierten CF-Gens ist die Diagnose. Früher musste man den Schweiß von Patienten auf einen erhöhten Chloridgehalt testen. Dank der Genklonierung kann man heute die $\Delta F508$ -Mutation mit PCR nachweisen. So lassen sich auch heterozygote Träger ermitteln. Auch eine pränatale Diagnose auf CF ist heute möglich, was betroffene Eltern im Falle eines positiven Resultates zu einer schwierigen Entscheidung zwingt. Auch ein Massenscreening der Bevölkerung auf die $\Delta F508$ -Mutation wäre heute technisch möglich, ist aber wegen der nur 70 prozentigen Ursache dieser Mutation für die Krankheit wenig sinnvoll.

Durch homologe Rekombination konnte ein Tiermodell hergestellt werden: die CF-Maus. Dieses Tiermodell ist sehr hilfreich für die Entwicklung einer Gentherapie gegen CF. Eine nähere Beschreibung dieser Gentherapie erfolgt im Verwendungsteil im Kapitel II.F.2.d.

3. Mikrosatelliten

Da bei den RFLP's der Grad der Heterozygotie und somit deren Variabilität viel geringer ist, als bei den STRP's, wird in zunehmendem Masse der zweite Typ von abstrakten Genen eingesetzt: die Mikrosatelliten oder auch STRP (=Short Tandem Repeat Polymorphism) oder auch VNTR (= Variable Number of Tandem Repeats).

Im Eukaryoten-Genom gibt es häufige Wiederholungen von kurzen DNA-Sequenzen: z. B. Dinukleotid-Repeats, also eine identische Abfolge von zwei Nukleotiden, die sich unterschiedlich oft wiederholt. Die Anzahl dieser Sequenzwiederholungen und somit die totale Länge des Mikrosatelliten ist je nach Allel variabel in der Population und eignet sich darum als polymorpher DNA-Marker zur Erstellung einer Genkarte.

Der Vorteil von Mikrosatelliten gegenüber RFLP's liegt einerseits in der grösseren Variabilität und somit einem höheren Anteil von Heterozygoten in einer Population, und andererseits bei der leichteren Nachweismethode: Anstatt einen Southern Blot machen zu müssen, erhält man die Länge der Mikrosatelliten durch eine einfache PCR-Amplifikation mit zwei den Repeat flankierenden Primern und anschliessender Grössenbestimmung des PCR-Produktes durch Polyacrylamid- oder Agarose-Gelelektrophorese. Es ist keine Sonde mehr nötig, die man eventuell bei einem anderen Labor bestellen muss, sondern wie bei den STS (=Sequence Tagged Sites) ist nur die Information über die Primersequenzen und die PCR-Bedingungen

nötig, und diese kann problemlos elektronisch (oder telefonisch) übermittelt werden und erfordert kein biologisches Material. Darum nennt man die Mikrosatelliten auch polymorphe STS-Marker.

Als Beispiel eines Gens, das man mit Hilfe von Mikrosatelliten kloniert hat, folgen anschliessend die Dickdarmkrebsgene.

a. Die Dickdarmkrebsgene (HNPCC) ^{(16), (17)}

Ist Dickdarmkrebs HCC (= Human Colorectal Cancer) überhaupt erblich? Dass die Prädisposition zu Dickdarmkrebs mindestens teilweise vererbt wird, wurde bewiesen durch Kopplungsstudien mit dem familiären Vererbungsmuster von Mikrosatelliten und anderen Markern aus der CEPH-Datenbank anhand der Studien mit den beiden Grossfamilien C und J über bis zu sieben Generationen. Es konnte in diesen Kopplungsstudien eine Kopplung der Prädisposition für Dickdarmkrebs und dem Marker D2S123 festgestellt werden. Das HNPCC-Gen wurde auf dem Chromosom 2 lokalisiert.

13% aller Dickdarmkrebsarten, der nach Lungenkrebs häufigsten Krebsart im Westen, sind erblich und heissen HNPCC (= Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer). Kopplungsstudien mit familiären Vererbungsmuster von 345 Mikrosatelliten als Marker ergaben eine Kopplung von HNPCC mit dem Marker D2S123 auf dem Chromosom Nr. 2. Zur genauen Identifikation des gesuchten Gens hat man Datenbanken nach allen bis zu diesem Zeitpunkt kartierten Gene in dieser Region abgesucht. Ein Gen in dieser Region, hMSH2, zeigte hohe Sequenzhomologie zum bakteriellen mutS-Gen, welches in der mismatch-DNA-Reparatur involviert ist, wo es die Fehlpaarungen erkennt und an die betreffende DNA-Region bindet. Durch Sequenzierung der Gene von einzelnen betroffenen Familienangehörigen konnte bewiesen werden, dass das mutS homologe Gen teilweise tatsächlich defekt war, während es bei allen Gesunden intakt ist. Mit den andern bakteriellen DNA-Reparaturgenen der methylabhängigen mismatch-Reparatur, mutH und mutL, als Sonde konnten anschliessend drei weitere HNPCC-Gene kloniert werden.

Eine durch einen ständig wieder auftretenden und reproduzierbaren "Artefakt" entdeckte Mikrosatelliten-Destabilisierung in Tumorgewebe von HNPCC-Patienten zeigte einen molekularen Mechanismus für die Krebsentstehung auf: Wenn durch toxische Stoffe aus der Nahrung, spontane Neumutationen, bakterielle Abfallstoffe, Medikamente oder Strahlenschäden das im heterozygoten HNPCC-Patienten einzige noch intakte DNA-Reparaturgen mutiert, sodass es inaktiv wird, so können spontane Mismatches nicht mehr repariert werden. Sekundäre Mutationen in Tumorsuppressorgenen oder Protoonkogenen können dann zu Krebs führen.

Dieses Beispiel eignet sich besonders gut, um den Nutzen der klonierten Gene zu beschreiben. Darum folgen im III. Teil im Kapitel C einige Anwendungen der klonierten Dickdarmkrebsgene in der Medizin.

4. Groblokalisierung

Wenn man eine Kopplung des gesuchten Gens mit einem Marker gefunden hat, so lässt sich aus der bekannten Lage des Markers im Genom die ungefähre Position des gesuchten Gens im Bereich von einem Megabasenpaar ermitteln. Diese Groblokalisierung geht umso schneller und genauer, je mehr DNA-Marker bekannt sind und je mehr Daten aus stattgefundenen Kreuzungen zur Verfügung stehen. Dieser Aufgabe, der Kartierung von möglichst vielen DNA-Markern (vor allem STRP's), widmet sich das CEPH (=Centre d'Education du Polymorphisme Humain) sowie weitere Genomkartierungszentren.

Das CEPH organisiert einerseits DNA-Material von jedem Mitglied von möglichst vielen kinderreichen Familien über mehrere Generationen und andererseits versucht es in diesem menschlichen Erbgut immer mehr DNA-Marker zu kartieren, um so die Genkarte immer genauer zu machen. So braucht man bei der Suche eines neuen Krankheitsgens nur noch zu ermitteln, welcher kartierte Marker in den schon stattgefundenen Testkreuzungen der Familien, in denen die untersuchte Krankheit auftrat, möglichst gleich vererbt wurde, wie der Phänotyp (die Krankheit) des gesuchten Gens. Bis heute besitzt das CEPH Blutproben von 40 kinderreichen Familien über 3 Generationen mit total 800 Leuten. Von diesen wurden bis jetzt über 5000 abstrakte DNA-Marker kartiert. In der Genome Data Base sind heute über 60'000 DNA-Marker bekannt. ⁽¹⁴⁾

In seltenen Fällen ist es auch möglich, die ungefähre Genposition durch cytogenetische Analysen von Chromosomen im Lichtmikroskop abzuschätzen. Die Veränderungen oder Verluste von Chromosomenteilen im Genom von betroffenen Geweben (z. B. von Tumorgewebe bei der Suche nach einem Krebsgen) ergeben erste Hinweise über die grobe Position des gesuchten Gens.

5. Positionsvergleich mit Datenbanken

Wenn diese Groblokalisierung des Gens stattgefunden hat und zudem noch eine mögliche Funktion des Genproduktes bekannt ist, so kann man die Datenbanken nach allen schon kartierten Genen in dieser Region absuchen. In den Sequenzdatenbanken ist zu den meisten Genen noch gar keine Funktion bekannt. So sind alle sequenzierten Gene, die sich in der gesuchten Region befinden und deren Funktion unbekannt ist Kandidaten für das gesuchte Gen.

Aus der vorhandenen Sequenzinformation eines Gens kann man eine mögliche Funktion des Genproduktes annehmen, weil je nach Funktion Proteindomänen ganz bestimmte Motive von Sequenzen haben: So hat z. B. ein DNA-bindendes Zink-Finger-Protein ein Sequenzmotiv, wo an spezifischen Positionen in bestimmten Abständen Cystein und Histidin-Aminosäuren vorhanden sind. Auf diese Weise kann man überprüfen, ob das gesuchte Gen in dieser Region möglicherweise bereits kartiert und sequenziert ist, aber bis jetzt noch keiner Funktion zugeordnet werden konnte.

6. Klonieren

Falls die Suche in Datenbanken keine brauchbaren Resultate liefert, muss man alle in dieser Grobregion liegenden Gene klonieren und anschliessend einzeln charakterisieren.

Zuerst muss man die ganze durch Kopplungsstudien ermittelte Grobregion von möglicherweise einigen Millionen Basenpaaren Länge in Vektoren klonieren. Am besten eignen sich dazu YAC-Vektoren (= Yeast Artificial Chromosom), weil sie "Inserts" bis zu einer Megabase aufnehmen können. Um wirklich die ganze Region kontinuierlich zu klonieren, ist es am sichersten, nach dem "chromosom walking" vorzugehen: Man "spaziert" dabei entlang dem Chromosom, indem man immer das endständige Fragment eines isolierten Klons als Sonde einsetzt, um weitere, überlappende Klone zu identifizieren. Das Chromosom walking hat einige Nachteile: Falls man repetitive Sequenzen oder eine Alu-Sequenz als Sonde erwischt, dann bekommt man viele unspezifische, nicht unbedingt benachbarte, hybridisierende Klone. Des Weiteren ist dieses Vorgehen sehr langsam und dauert zu lange, vor allem wenn man nicht mit YAC-Klonen, sondern mit wesentlich kleineren Cosmid-Klonen arbeitet.

Als YAC's noch nicht bekannt waren erfand man deshalb das "chromosom jumping", um mit Cosmiden DNA-Abschnitte, die hunderte von Kilobasen voneinander entfernt sind, zu klonieren. Dabei zirkularisiert man genomische Restriktionsfragmente von ca. 100 kbp Grösse und schliesst noch das supF-Gen zur Selektion mit ein. Dann zerschneidet man das Ganze mit einem oft schneidenden Restriktionsenzym und erhält so viele Fragmente, wovon eines das supF-Gen und zu beiden Seiten die ursprünglich ca. 100 kbp entfernten Enden trägt. Dieses selektioniert man nun, indem man alle Fragmente in einen λ -Vektor kloniert, der nur in Anwesenheit von supF überleben kann. Dann sucht man den die beiden Enden enthaltenden Phagen, indem man mit der bekannten Sequenz vom einen Ende als Sonde eine Plaque-Hybridisierung durchführt. Man hat so in dem isolierten Phagen die Sequenz des 100 kbp entfernten Endes kloniert und kann sie als Sonde zur Suche weiterer Klone aus einer genomischen Genbank einsetzen.

Der Nachteil am "chromosom jumping" liegt bei den vielen Artefakten, die sich ergeben, wenn zwei im Genom nicht benachbarte Fragmente mit einander ligiert werden. Darum macht man heute zur Klonierung grosser Regionen statt eines "chromosom jumpings" mit vielen Cosmiden oder Phagen eher ein "chromosom walking" mit wenigen, grossen YAC-Klonen.

Man muss die Grobregion nicht unbedingt klonieren, sondern über die Mikrodissektion ist es möglich, DNA direkt aus einer Chromosomenregion zu isolieren und für weitere Einkreisungsmethoden wie Zoo-Blots (vergleiche dazu Kapitel II.2.B.1.) zu verwenden. Allerdings sind solche isolierten DNA-Regionen dann mehrere Megabasenpaare lang und ergeben so ihrerseits wieder Probleme bei der weiteren Klonierung und Charakterisierung.

Seit neuerdings das ganze menschliche Genom in klonierter Form auf genomischen YAC-Genbanken (z. B. die CEPH-Genbanken 1, 2 und 3) zur Verfügung steht, wird man in Zukunft die oben erwähnten, sehr aufwendigen Klonierungstechniken dadurch ersetzen, dass man die Klone, welche die ermittelte Grobregion tragen, von zentralen Service-Labors beziehen wird. Da die Arbeiten mit YAC's sehr aufwendig und schwierig sind, wird wohl das menschliche Genom auch bald einmal in einfacher zu handhabenden Cosmiden oder in Form künstlicher Bakterienchromosomen kloniert zur Verfügung stehen.

B. Isolierung des Gens aus der Grobregion

Um nun in der klonierten Grobregion, welche man in den Kopplungsstudien einkreiste innerhalb von einigen Megabasenpaaren ein bestimmtes Gen von vielleicht 3000 bp Länge zu isolieren, braucht es wiederum spezielle Techniken wie "Zoo-Blots", "Exon-trapping", Screening von cDNA-Genbanken oder Analyse von CG-reichen Sequenzen.

1. Zoo-Blot

Das Grundprinzip des Zoo-Blots beruht auf der Beobachtung, dass die DNA-Sequenzen in Exons von Genen innerhalb verschiedener Spezies viel konservierter geblieben sind, als in Introns oder zwischen den Genen. Diese hohe Exon-Homologie kommt durch den funktionellen Selektionsdruck zustande, der auf die kodierenden Abschnitte von Genen, nicht aber auf die nicht-codierenden Intron-Sequenzen wirkt. Das Ziel des Zoo-Blots ist also die Erkennung von Exons innerhalb von langen DNA-Abschnitten.

Der Zoo-Blot ist eine Art Southern Blot, bei dem aber genomische DNA von verschiedenen Tierspezies aufgetrennt und geblottet wird. Als Sonde werden die zu überprüfenden DNA-Fragmente aus der menschlichen Grobregion eingesetzt. Kann nun eine Hybridisierung der menschlichen Sonde mit verschiedenen Tierarten festgestellt werden, so handelt es sich bei der als Sonde eingesetzten DNA sehr wahrscheinlich um ein Exon, also um einen Teil eines Gens. Introns hybridisieren nicht, weil sie nicht unter einem Selektionsdruck auf eine optimale Sequenz stehen und somit keine Konservierung aufzeigen. Der endgültige Beweis, dass es sich tatsächlich um die codierende Region eines Gens handelt, erfolgt durch einen Northern Blot, denn eine transkribierte Region ist immer Teil eines Gens.

Jetzt hat man zwar mindestens einen Teil des Gens, also ein Exon, isoliert, aber um das ganze Gen zu klonieren, muss man mit dem gefundenen Exon anschliessend eine cDNA-Bank absuchen (siehe II.2.B.3.). So kann die DNA der gesamten Grobregion mit einzelnen Sonden überprüft werden, wo die Gene liegen. Zwei Nachteile des Zoo-Blots sind einerseits der grosse Aufwand, um die vielen Hybridisierungen für eine grosse Grobregion durchzuführen, und andererseits auch die grosse Zahl von Hybridisierungssignalen, die sich bei repetitiven Sequenzen ergeben können.

Wegen diesen Nachteilen prüft man heute durch Kopplungsstudien eingekreiste Grobregionen nicht mehr mit Zoo-Blots nach vorhandenen Genen, wie man dies noch bei der Klonierung des Gens für die Cystische Fibrose tat, sondern benützt effizientere Methoden zur Prüfung der genauen Lokalisation von Genen: z. B. das "exon-trapping", das bei der Klonierung des Chorea Huntington-Gens verwendet wurde.

2. Exon-trapping

"Exon-trapping" ermöglicht, DNA-Fragmente mit Exons von solchen ohne Exons zu unterscheiden und erlaubt so, aus einer klonierten genomischen Grobregion die Exons zu isolieren. Das Grundprinzip des "exon-trapping" ist das Herausspleissen von Introns aus der hnRNA bei deren Reifung zur mRNA im Zellkern.

Dieser natürliche Prozessierungsvorgang wird ausgenutzt, um die Exons mit Hilfe eines speziellen Exon-trapping-Expressionsvektors in eine "Falle" zu locken. Dort wird das auf Exons zu untersuchende DNA-Fragment zwischen zwei Introns hineinkloniert, die wiederum von zwei Exons umrahmt werden. Dann werden COS-Zellen mit diesem rekombinanten "exon-trapping"-plasmid transfektiert. Darauf wird die klonierte DNA, ausgehend von einem Vektorpromotor, transkribiert. Beim Spleissen der entstehenden hnRNA wird dann das zwischen die Introns klonierte Test-Fragment je nachdem, ob es ein Exon enthält oder nicht, nur zum Teil oder eben ganz herausgespleisst. Mit PCR-Primern komplementär zu den beiden Vektor-Exons lässt sich in einer PCR-Amplifikation der aus den COS-Zellen isolierten und in cDNA umgeschriebenen RNA dann entweder ein kurzes oder ein langes PCR-Produkt nachweisen.

Eine Verbesserung des "exon-trapping" ergibt sich durch die Möglichkeit, nicht alle Exons der Gene in einer Grobregion, sondern spezifisch nur die 3'-terminalen Exons zu isolieren und zu kartieren. Nur das 3'-terminale Exon besitzt ein Signal für die Polyadenylierung. Durch die Verwendung eines oligo-dT-Primers auf der 3'-Seite zur PCR-Amplifikation der zu cDNA umgeschriebenen total-RNA einer transfektierten COS-Zelle und eines spezifischen Vektorprimers auf der 5'-Seite werden spezifisch nur die 3'-terminalen Exons amplifiziert und isoliert. Alle weiteren Exons dieses Gens müssen weiter "upstream" in 5' Richtung liegen.

3. Screening von cDNA-Genbanken

Um in der klonierten, durch Kopplungsstudien eingekreisten Grobregion innerhalb von einigen Megabasenpaaren ein bestimmtes Gen von vielleicht 3000 bp Länge zu isolieren, kann man die einzelnen klonierten DNA-Fragmente radioaktiv markieren und als Sonden für eine Plaque-Hybridisierung auf einer cDNA-Bank einsetzen. Die cDNA-Bank müsste aus einer Gewebszelle erstellt werden, in der das gesuchte Gen höchstwahrscheinlich exprimiert wird. Eine Schwärzung des Röntgenfilms bei einer bestimmten genomischen Sonde auf einem bestimmten cDNA-Plaque würde sowohl den möglichen Genort im Genom, als auch die mögliche cDNA des gesuchten Gens identifizieren.

Da die zu untersuchende genomische Region durch Kopplungsstudien oft nur sehr grob eingekreist werden kann, umfasst sie unter Umständen mehrere Megabasenpaare. Dies ergäbe zu viele Klone, die man als Sonden testen müsste. Darum wurden effizientere Methoden entwickelt, in denen man keinen Blot macht, sondern die Hybridisierung der komplementären Stränge in Lösung stattfinden lässt. Man kann alle zu untersuchenden Fragmente zusammen mit der cDNA-Bank in ein einziges Reaktionsgefäß geben. Auf diese Weise erspart man sich das zeitraubende Testen jeder einzelnen Sonde. Mit PCR werden dann spezifisch nur diejenigen cDNA's amplifiziert, welche an komplementäre genomische Sequenzen binden. So kann man alle exprimierten Gene in einer Grobregion identifizieren. Für eine detailliertere Beschreibung dieser Methode sei auf die entsprechende Literatur im Teil IV verwiesen. ⁽¹⁵⁾

4. Analyse CG-reicher Sequenzen

Eine weitere Methode, um die innerhalb einer durch Kopplungsstudien eingekreisten Grobregion liegenden Gene zu lokalisieren, ist die Analyse von CG-reichen Sequenzen. Das

Grundprinzip dieser Methode liegt in der Beobachtung, dass 60% der menschlichen Gene (vor allem die sogenannten "house-keeping"-Gene) an ihrem 5'-Ende eine CG-reiche Sequenz besitzen. Mit einer solchen CG-reichen Sequenz als Sonde kann man nun eine in Bakterien hergestellte Genbank von zu untersuchenden genomischen DNA-Fragmenten aus einer eingekreisten Grobregion in einer Kolonie-Hybridisierung auf CG-reiche Sequenzen und somit auf möglicherweise Gene enthaltende Klone absuchen.

5. Weitere Methoden zur Isolierung und Charakterisierung eines Gens aus der Grobregion

Die Charakterisierung der isolierten Gene in der durch abstrakte DNA-Marker eingekreisten Grobregion und die Identifikation des gesuchten Gens kann durch Sequenzierung und anschließende Funktionszuordnung der Gene erfolgen. Auch kann durch die Analyse der Promotoren und Lokalisationssequenzen etwas über Expressionsstärke und -Ort ermittelt werden. Ist das gesuchte Gen mutiert, handelt es sich z. B. um die Ursache für eine Erbkrankheit, so kann spezifisch nach einer Abnormalität in Expressionsstärke und -Ort gesucht werden.

Ist ein möglicher Kandidat isoliert, so kann, falls eine entsprechende Methode für den untersuchten Organismus zugänglich ist, als sehr aufwendiger Test der Funktion das Gen durch eine Knock-out Mutation oder mit Antisense DNA oder RNA ausgeschaltet werden und die Auswirkungen auf den Phänotypen an einzelnen Zellen oder am ganzen Organismus studiert werden.

*

Teil III: Anwendungen

Dieser Teil III zeigt die Anwendungen der klonierten Gene in der Grundlagenforschung, in der Landwirtschaft in der Tier- und Pflanzenzucht, und in der Medizin in Prävention, Diagnose und Therapie auf.

A. Grundlagenforschung

1. HUGO und weitere Projekte zur Sequenzierung von andern Organismen (21)

HUGO steht für Human Genom Organisation. Diese Organisation koordiniert das "Human Genom Project", dessen Aufgabe es ist das gesamte menschliche Genom zu sequenzieren. Damit werden vor allem in der Medizin und in der Biologie neue Erkenntnisse möglich, z. B. in der Bekämpfung von Erbkrankheiten und in der Diagnostik. Darüberhinaus werden aber auch neue molekularbiologische Techniken entwickelt, wie eine verbesserte Sequenzieretechnik, und es ergeben sich auch rechtliche Fragen über Datenschutz usw. Am HUGO beteiligen sich die USA, Japan, die EU-Länder und Russland. HUGO startete am 1. Oktober 1990 und wird nach optimistischen Schätzungen bis im Jahre 1999 abgeschlossen sein.

Die 7 Ziele des "Human Genom Project":

- 1. Kartierung und Sequenzierung des menschlichen Genoms
- 2. Kartierung und Sequenzierung der Genome von Modellorganismen
- 3. Informatik: Datensammlung und Analyse
- 4. Ethische, rechtliche und soziale Überlegungen
- 5. Forschungsausbildung
- 6. Technologieentwicklung
- 7. Technologietransfer

Beim "Human Genom Project" wird aber nicht nur das menschliche Genom, sondern auch die Genome von zahlreichen weiteren Modellorganismen wie *E. coli*, Hefe, *Arabidopsis*, *Drosophila*, *Xenopus* und der Maus. Von diesen Modellorganismen wird das Hefe Genom als Erstes vollständig sequenziert sein. Dass dieses über drei mal grössere eukaryotische Genom vor dem prokaryotischen *E. coli* Genom sequenziert sein wird, hängt unter anderem mit dem grösseren wirtschaftlichen Interesse an Eukaryoten und mit der besseren Organisation der Hefe-Sequenzierung zusammen. Die klonierten Gene können im "Human Genom Project" dazu verwendet werden, neu sequenzierte ORF's (= Open Reading Frame = Offenes Leseraster) bekannten homologen Genen aus andern Organismen zuzuordnen.

Das erste vollständig sequenzierte Lebewesen ist allerdings kein HUGO-Modellorganismus, sondern dabei handelt es sich um das Bakterium Haemophilus influenzae, welches ein sehr

kleines Genom besitzt (nur 1'830'137 Basenpaare) und darum als erstes fertigsequenziert wurde. ⁽²⁾ Dieser "Meilenstein in der Genforschung" (Hobom, 1995) ⁽²²⁾ wurde nur möglich durch die neue Sequenzieretechnik, welche die Gruppe um Venter und Smith benützte: Dabei wird das Genom mit Ultraschall in zufällige DNA-Fragmente zerstückelt, die dann einzeln kloniert und sequenziert werden. Danach werden die Einzelsequenzen mit Hilfe von Grosscomputern und der dafür entwickelten Software wieder zusammengefügt .

2. Transgene Tiere

Ein transgenes Tier ist ein Tier, welches ein fremdes Gen trägt. Heute werden die meisten transgenen Tiere noch in der Grundlagenforschung produziert. Meist haben sie die Aufgabe, den Forschern mehr über die Funktion eines Genes auszusagen. Eine Verwendung dieser transgenen Tiere in der Medizin sind die Tiermodelle für menschliche Krankheiten. Dies sind Tiere, in denen man durch Gentransfer eine bestimmte menschliche Krankheit ausgelöst hat, um nach einer Heilmethode gegen diese Krankheit zu forschen, wie z. B. neue Medikamente auf ihre Wirksamkeit zu prüfen. Das bekannteste transgene Tier ist sicher die Harvard-Krebsmaus. Diese besitzt ein menschliches Krebsgen und kann unter bestimmten Bedingungen besonders schnell bestimmte Krebstypen entwickeln. Sie dient somit als Tiermodell für die Krebsforschung. Die Harvard-Krebsmaus ist gleichzeitig auch das erste Tier, das patentiert wurde, was in Kontinental-Europa politisch sehr umstritten ist.

3. Knock-Out-Tiere

Knock-Out-Tiere sind eine spezielle Gruppe von transgenen Tieren. Ihnen wurde durch doppelte homologe Rekombination ein bestimmtes Gen aus dem Genom entfernt. Über den dadurch veränderten Phänotyp des Knock-Out-Tieres kann man Aussagen über die Funktion des ausgeschalteten Genes machen.

4. Genregulation: Gezielte Kontrolle von Genen

Um ein bestimmtes Gen gezielt auszuschalten und somit etwas über seine Funktion zu erfahren, muss man es nicht unbedingt durch doppelte homologe Rekombination aus dem Genom entfernen, wie man dies bei Knock-Out-Tieren tut. Es gibt auch noch andere Methoden: Mit einer Tripelhelix, einem dreifach-DNA-Strang, kann man GC-reiche Gene gegen die Transkription blockieren und so ihre Funktion ausschalten. Mit Antisense-RNA, einem zu einer mRNA komplementären DNA- oder RNA-Strang, kann man die mRNA von bestimmten Genen gezielt gegen die Translation blockieren und so die Genfunktion abschalten. Mit Ribozymen - das sind RNA's mit katalytischer Aktivität - kann man gezielt die mRNA's von bestimmten Genen zerstören und so deren Genfunktion abschalten. In Zukunft dürfte es auch möglich werden, spezifische Genregulationsproteine wie Transkriptionsfaktoren oder Repressorproteine durch Kombination funktioneller Proteindomänen oder gezielte Mutationen neu herzustellen. So ist es möglich, Strategien zu entwickeln, um Krebs und AIDS an ihren genetischen Wurzeln zu bekämpfen. Für alle diese Methoden braucht man aber die Gensequenz und dazu muss zuerst das Gen kloniert werden.

5. Bisher unerklärbare oder sehr komplexe Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Herzinfarkt oder Krebs

Bei vielen dieser häufigen Zivilisationskrankheiten sind zwar einige Gene kloniert, aber das heutige Wissen reicht noch nicht aus, um eine molekulare Erklärung für diese Krankheiten zu liefern und somit die klonierten Gene schon heute zur Medikamententwicklung oder für eine Gentherapie anzuwenden. Oft ist es bei solchen komplexeren Krankheiten so, dass nicht nur ein Gendefekt, sondern die Interaktion vieler veränderter Gene einen Effekt bewirkt. Oft sind die Krankheiten auch nicht die Folge von Gendefekten alleine, sondern meist spielen auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Krankheiten. Der Krankheitsphänotyp wird in den meisten Fällen bestimmt durch eine solche Kombination von Genotyp und Umweltfaktoren.

Bei Alzheimer weiss man bis heute nur, dass eine Punktmutation im APP-Gen (=Amyloid-Precursor Protein) oder eine Störung des Abbaus des AP-Proteines an der Krankheitsentstehung involviert sein könnte. Im Zusammenhang mit Herzinfarkt konnten die Gene für Gewebshormone kloniert werden, welche Arteriosklerose und somit Herzinfarkt bewirken. Durch die Klonierung der Gene der dazugehörigen Rezeptoren hat man heute ein elegantes Werkzeug zum Absuchen aller möglichen chemischen Substanzen nach einer möglichen antagonistischen Bindung an diesen Gewebshormonrezeptor, was in einem ELISA-Kompetitionsassay überprüft werden kann. Im Zusammenhang mit Krebs sind verschiedene Protoonkogene und Tumorsuppressorgene kloniert worden, die normalerweise die Zellteilung kontrollieren, nach einer Mutation aber zu Krebsgenen mutieren und das unkontrollierte Teilungswachstum der Tumor-Zelle bewirken können. Warum Krebs aber nicht in allen Zellen ausbricht, welche diese Gene tragen, ist molekulargenetisch noch nicht vollständig geklärt und bedarf weiterer Forschung.

B. Landwirtschaft

In der Landwirtschaft kann man die klonierten Gene einerseits in der Tierproduktion und andererseits in der Pflanzenproduktion anwenden. Der Sinn dieser transgenen Landwirtschaft kann für Entwicklungsländer in der Schädlingsbekämpfung und in der Ertragssteigerung liegen, um die dort herrschenden Hungersnöte zu bekämpfen. Im Westen dagegen, wo schon heute eine Überproduktion an Nahrungsmitteln besteht, kann man die klonierten Gene zur Qualitätsverbesserung oder zur Schonung der Umwelt z. B. vor Pestiziden einsetzen.

1. Tierproduktion

1.a. Wachstumshormon

Die Klonierung von Genen, die für Wachstumshormone codieren, war für die Nutztierhaltung von grosser Bedeutung. Entweder kann man diese Wachstumshormongene indirekt anwenden, indem man Bakterien damit transformiert und das in ihnen gentechnisch hergestellte Wachstumshormon in die Nutztiere injiziert, oder man kann direkt transgene Nutztiere halten, welche zusätzliche Wachstumshormongene eingebaut haben. Beide Methoden bewirken über einen höheren Hormonspiegel eine Zunahme der Körpergrösse oder

der Milchleistung. Das Resultat ist eine erhöhte Fleisch- und Milchproduktion, was aber angesichts der bereits heute existierenden Überproduktion an Fleisch und Milch ein fraglicher Erfolg ist.

1.b. Impfstoffe

Analog zur Humanmedizin kann man in der Veterinärmedizin mit Hilfe entsprechender, klonierter Gene Antigene der Erreger verschiedenster Infektionskrankheiten in Bakterien herstellen und damit die Nutztiere immunisieren. Auch wurden Gene für Oberflächenproteine von viralen Erregern in harmlose Vaccinia-Viren eingebaut, mit denen man dann die zu schützenden Tiere impfte. Beispiele dafür sind die Impfstoffe gegen die Rinderpest und gegen Tollwut. ⁽³⁾

1.c. Erbfehlerdiagnose

Analog zur Humanmedizin kann man auch in der Veterinärmedizin die klonierten Erbkrankheits-Gene, entweder zur pränatalen Gendiagnose von Erbkrankheiten einsetzen, oder aber als Test für die Prüfung und die Auswahl von Spender-Männchen bei der künstlichen Besamung zur Vermeidung der Ausbreitung einer Erbkrankheit in der Population. Heute forscht man z. B. an einem PCR-Test auf Spinnengliedrigkeit, der viel schneller und viel billiger als die heutige biotechnische Methode über Schlachtung und Analyse der Föten nachweisen könnte, ob das untersuchte Tier Träger dieser Erbkrankheit ist.

1.d. Stressresistenz

Eine Möglichkeit den stressbedingten Herzinfarkt bei Zuchtschweinen in Massentierhaltungen zu vermeiden, wäre die Einführung eines "Stressresistenzgenes". Allerdings wäre es mit etwas verhaltensbiologischem Wissen sicher möglich, sich eine den Schweinen angenehmere Tierhaltung auszudenken, die trotzdem konkurrenzfähig ist. Und wenn diese artgerechtere und stressfreie Tierhaltung Einbussen im Fleischertrag zur Folge hätte, so wäre dies angesichts der heutigen Überproduktion und dem jährlich abnehmenden Fleischkonsum der Bevölkerung auch nicht weiter schlimm. Eine weitere Kritik an diesem Vorhaben betrifft meine prinzipiellen Zweifel daran, dass der Stress durch ein einzelnes Gen ausgeschaltet werden könnte, wo doch sonst die meisten Verhalten und Gefühle bei Säugern von einem komplexen genetischen Netzwerk gesteuert werden.

2. Pflanzenproduktion

2.a. Schutz vor Insektenschäden

Ein wirksamer Schutz vor Schadinsekten wird durch die Einführung von bakteriellen Genen für Insekten-Toxine z. B. das Bacillus thuringensis Toxin-Gen in Reis oder Mais erreicht.

2.b. Virus-Resistenz

Mit Expression von Virus-Teilen kann man in transgenen Pflanzen eine Immunität gegen Krankheitserreger (z. B. Virus-Resistenz) bewirken. So hemmt Überexpression von TMV-

Hüllproteinen die Vermehrung des Tabakmosaikvirus, weil seine RNA damit abgedeckt wird. Ein anderer Ansatz zur Virusbekämpfung in transgenen Pflanzen wäre der Einsatz von inhibierenden Genprodukten gegen den Parasiten oder Antisense DNA gegen Parasiten-RNA.

2.c. Herbizid-Resistenz

Die Einführung von Genen für Herbizid-Resistenz in Kulturpflanzen erlaubt die Verwendung von Breitband-Herbiziden auch während der Wachstumsphase (z. B. das Herbizid Glyphosat). Glyphosat hemmt ein Enzym des Shikimisäure-Zyklus, nämlich die EPSP-Synthase (= 5-Enol-Pyruvat-Shikimat-3-Phosphat-Synthase) und verhindert so die Synthese von aromatischen Aminosäuren. Durch Transfektion von Kulturpflanzen mit diesem EPSP-Enzym, das einem starken Promotor vorgeschaltet ist, erreicht man eine Überexpression dieses Enzyms und somit eine Resistenz gegen das Herbizid Glyphosat.

2.d. Nährwerterhöhung

Eine Nährwerterhöhung von Mais kann durch Transfektion mit Soja-Genen erreicht werden, die für hochwertige Soja-Proteine codieren, welche einen viel höheren Gehalt an essentiellen Aminosäuren aufweisen als die ursprünglichen Maisproteine.

2.e. Stickstoff-Fixierung

Eine heute noch nicht, aber eventuell in ferner Zukunft durchführbare Anwendung der Gentechnologie wäre die Einführung von bakteriellen Stickstoff-Fixierungs-Genen aus Rhizobien in Kulturpflanzen. Dies verringerte die heutige massive und umweltbelastende Stickstoff-Düngung. Obwohl man noch weit von einer transgenen Pflanze entfernt ist, werden schon heute in zahlreichen Labors entsprechende Vorstudien und Forschungen betrieben.

C. Medizin

Es gibt bereits mit heutigem Wissen sehr viele Krankheiten, die durch einzelne Gendefekte verursacht werden. Zu den bekanntesten davon zählen: Die Sichelzellanämie, wo ein defektes β -Globin-Gen eine Blutarmut bewirkt, die Duchenne Muskeldystrophie, wo ein defektes Dystrophin-Gen den Gewebe- und Muskelschwund bewirkt, die Cystische Fibrose (siehe dazu II.2.D.1. und III.F.2.d.), die Hämophilie, wo ein defektes Faktor VII-Gen eine gestörte Blutgerinnung bewirkt, Diabetes wegen Insulininsuffizienz, das Lesch-Nyhan-Syndrom, wo ein defektes HGPRT-Gen Bewegungsstörungen und Schwachsinn zur Folge hat, die Phenylketonurie, wo ein defektes Phenylalaninhydroxylase-Gen eine geistige Behinderung bewirkt oder die ADA-Defizienz, wo ein defektes Adenosindesaminase-Gen eine Immunschwächung (das SCID-Syndrom) bewirkt.

Durch die Klonierung und Analyse einzelner dieser Gene konnte einerseits mehr über die molekularen Mechanismen, die zur Krankheit führen, erforscht werden, und andererseits ergeben sich damit wirkungsvolle Bekämpfungs- oder Therapiemethoden dieser Krankheiten: Man kann entweder neue Medikamente entwickeln, da der molekulare Proteinddefekt nun

bekannt ist, oder man kann über eine somatische Gentherapie direkt auf Genebene das defekte Gen durch eine intakte Kopie ersetzen.

Die heutige Hauptanwendung der klonierten Gene in der Medizin umfasst die Diagnostik. Die Klonierung von einigen wichtigen Genen, die Erbkrankheiten verursachen, hat aber in der Medizin oft gleichzeitig Bedeutung im präventiven, diagnostischen und therapeutischen Bereich. Als Beispiel eines Gens, das in allen drei dieser Bereiche Verwendungen ermöglichte, werden hier Anwendungen der im Rahmen der Klonierung im Methodenteil unter II.2.A.1.a. besprochenen HNPCC-Gene erwähnt:

1. Die HNPCC-Gene

(Für die Klonierung vergleiche Kapitel II.2.A.1.a.)

Die Verwendungen der klonierten Dickdarmkrebsgene in der Medizin umfassen einerseits die Prävention: Ursache für HNPCC ist eine Prädisposition verursacht durch ein defektes DNA-Reparatur-Gen, aber die Auslösung erfolgt durch toxische Stoffe in der Nahrung. Eine wirksame Prävention gegen Darmkrebs und Magengeschwüre könnte darin bestehen, alle diese kanzerogenen Bestandteile und Gemische in der Nahrung zu identifizieren und sie den gefährdeten Patienten zur Vermeidung zu empfehlen oder versuchen sie generell in Lebensmitteln zu ersetzen und zu verbieten.

Andererseits werden die klonierten Gene auch Verwendung in der Diagnose finden: Mittels eines PCR-Nachweistests mit Primern von beiden Enden der DNA-Reparaturgene und anschliessenden Hybridisierungsexperimenten oder Sequenzierungen könnten Träger in betroffenen Familien identifiziert werden. So könnten Träger erkannt werden und sie könnten durch eine Diät oder regelmässige Untersuchungen ihr Krebsrisiko vermindern.

Für die Zukunft wird auch eine Verwendung in der Therapie möglich werden: Bei diagnostiziertem Darmkrebs und bei diagnostiziertem DNA-Reparaturgen-Defekt sollte man regelmässig zu Kontrollen gehen, damit eine Früherkennung und sodann eine allfällige operative Entfernung von Tumoren im noch unschädlichen Frühstadium möglich ist. Die Konstruktion von spezifischen Medikamenten wird durch die molekularen Kenntnisse des Defektes beim Genprodukt erleichtert. Sogar eine somatische Gentherapie wäre denkbar: Man könnte Darmzellen mit einer intakten 2. Kopie des DNA-Reparatur-Genes transfektieren und so das Krebsrisiko einer genetisch veranlagten Person auf das in der Durchschnittsbevölkerung herrschende Krebsrisiko reduzieren.

Die weiteren Verwendungen der klonierten Gene in der Medizin werden wegen ihrer grossen Vielfalt weiter unterteilt in die Bereiche Prävention, Diagnostik und Therapie:

D. Prävention

1. Produktion von Impfstoffen

Der Vorgang der Impfung ist eigentlich eine Immunisierung mit einem abgeschwächten Erreger oder nur einem Teil eines Erregers. Dabei wird eine Immunantwort ausgelöst, welche

in dem geimpften Organismus einerseits einen kurzfristigen Schutz gegen den eingeimpften Erreger, andererseits aber auch Gedächtniszellen produziert, welche einen längerfristigen oder sogar lebenslänglichen Schutz gegen den Erreger gewährleisten. Dabei ist die Grenze zwischen einer durch die Impfung bewirkten Resistenz und andererseits einer Toleranz gegenüber dem Erreger oft sehr schmal. Dies zeigt, dass eine Impfung nicht ohne Risiko ist, und dass man deshalb die Impfbedingungen sehr genau erforschen sollte, bevor man mit Massimpfungen beginnt.

Bei den herkömmlichen Impfungen kommt eine zusätzliche Gefahr dazu: Die abgetöteten oder abgeschwächten Erreger können immer noch zu einer Erkrankung oder sonst zu schweren Nebenwirkungen führen. Durch die Klonierung von Oberflächenprotein-Genen von Erregern kann man mit der Gentechnologie heute in Bakterien rekombinante Impfstoffe produzieren, welche nur noch Teile des Erregers enthalten und somit nicht mehr infektiös sein können.

1.a. Malaria-Schutzimpfung

Nebst einem immer noch in ferner Zukunft liegenden Impfstoff gegen AIDS wird heute von verschiedenen Seiten versucht, einen Impfstoff gegen Malaria zu entwickeln. Jährlich erkranken weltweit 500 Millionen Leute an dieser Krankheit und davon sterben jedes Jahr 2,3 Millionen Menschen, vor allem Kinder.

Die herkömmliche Impfung bestand darin, sich von bestrahlten Anopheles-Mücken mit abgeschwächten Erregern infizieren zu lassen. Dies hatte aber oft schwere Nebenwirkungen zur Folge. Darum versucht man heute, durch die Klonierung von Oberflächenproteinen des Malaria-Erregers einen rekombinanten Impfstoff aus einzelnen nicht-infektiösen Bestandteilen zu produzieren.

Dabei ergeben sich zwei Probleme: Erstens durchläuft der Malaria-Erreger in seinem Lebenszyklus verschiedene Stadien mit jeweils verschiedenen Oberflächenproteinen, und zweitens haben verschiedene Stämme des Malaria-Erregers eine grosse Variabilität dieser Oberflächenproteine. Die gentechnische Strategie sucht nun gezielt nach konstanten Bereichen dieser variablen Oberflächenproteine von allen möglichen Entwicklungsstadien, die zudem auch noch immunogen wirken. Mit einem solchen Gemisch von Antigenen und einem effizienten Adjuvans (= Impfsatzstoff) sollte ein wirksamer Impfschutz gegen Malaria ohne Nebenwirkungen erzeugt werden können.

1.b. Universalimpfung

Durch die Klonierung weiterer Oberflächenprotein-Gene von Mikroorganismen und Viren sollte die Herstellung rekombinanter Impfstoffe aus einzelnen Bestandteilen der Erreger gegen alle heute bekannten Infektionskrankheiten möglich sein. Dazu zählen: Cholera, Herpes, Hepatitis A und B, Malaria, Pertussis (Keuchhusten), Influenza, AIDS, Diphtherie, Tetanus, Masern, Mumps, Röteln, Typhus und Gonorrhoe.

Bereits 1985 wurde der erste gentechnisch hergestellte Impfstoff produziert: eine Impfung gegen Hepatitis B. In ferner Zukunft sollte es möglich sein, je nach Region schon im

Säuglingsalter eine einmalige Universalimpfung gegen die dort häufigsten Infektionskrankheiten durchzuführen.

E. Diagnose

Die heutige Hauptanwendung klonierter Gene in der Medizin umfasst die Diagnostik. Gentechnische Methoden wie PCR erlauben die Amplifikation kleinster DNA-Mengen. Danach kann gegebenenfalls eine anschliessende Identifikation mit DNA-Sonden durchgeführt werden. Dies ermöglicht einerseits die herkömmliche Diagnose von Krankheiten wie Infektionen und Krebs genauerer, sicherer und schneller zu machen. Andererseits ermöglichen diese Methoden auch neue Verfahren wie die pränatale Diagnostik und die Gendiagnose zu entwickeln. Die Aufgabe der Diagnostik ist ein möglichst frühzeitiges Erkennen einer Krankheit, sodass die geeignetste Therapie raschmöglichst eingeleitet werden kann. Anhand der Krankheiten AIDS und Krebs werden die Verbesserungen der Diagnostik dank der klonierten Gene aufgezeigt. Bei der Diskussion der Gendiagnose von Erbkrankheiten wird auf sich aufdrängende ethische und politische Fragen eingegangen.

1. Diagnose somatischer Krankheiten

Unter Diagnose somatischer Krankheiten sind alle diejenigen Diagnosemethoden zu verstehen, mit denen man eine im Laufe des Lebens durch äussere Einflüsse entstandene Krankheit, wie etwa eine Infektionskrankheit, detektieren kann.

1.a. Infektionskrankheiten

Durch die Klonierung vieler Gene von pathogenen Erregern und dank gentechnischer Methoden wie PCR wird es möglich sein, viel schnellere, sicherere und genauere Diagnosen zu machen, als mit den herkömmlichen Methoden mit Antikörpern heute durchführbar sind. Weil jede Art von pathogenen Erregern ein individuelles einmaliges Erbgut besitzt, kann man diese nach Amplifikation mit PCR mit einem für diesen pathogenen Erreger spezifischen klonierten Gen identifizieren. Man könnte sogar von allen möglichen pathogenen Erregern STS (=Sequence Tagged Sites) erstellen und mit den verschiedensten spezifischen PCR-Primern für alle pathogenen Erreger mit DNA aus lysierten Blutzellen der Patienten eine Amplifikation durchführen und je nach Länge des PCR-Produktes den Krankheitserreger identifizieren.

1.b. AIDS

Bei den Infektionskrankheiten im Westen ist die wichtigste Diagnose der Nachweis des AIDS-Virus. Früher verwendete man für den AIDS-Test HIV-Oberflächenproteine zur Gewinnung der HIV-Antikörper aus der zu untersuchenden Blutprobe. Dazu benötigte man infektiöse AIDS-Viren. Das Laborpersonal war ständig gefährdet, infiziert zu werden. Dank der Klonierung dieser HIV-Oberflächenprotein-Genen und deren Einbau in harmlose rekombinante Bakterien können heute diese für den noch gebräuchlichen Antikörpertest

benötigten HIV-Oberflächenproteine gefahrlos produziert werden. Dies gilt ebenfalls für alle weiteren Antikörpertests mit anderen infektiösen Erregern.

Bis heute besteht das Problem, dass man mit dem bis anhin verwendeten Antikörpertest nicht den Krankheitserreger selbst, sondern die Antwort des Immunsystems detektiert. Aber wenn das Immunsystem nicht reagiert, zuwenig Antikörper bildet oder die Antikörperbildung zu langsam anläuft, dann kann der Erreger nicht detektiert werden. Dies ist besonders gravierend, wenn ein Bluttransfusionspatient Blut von einem frisch mit AIDS infizierten Spender erhält, dessen Immunsystem noch keine detektierbare Menge Antikörper gebildet hat.

Mit einem PCR-Diagnosetest lässt sich der Erreger direkt nachweisen und man kann eine Infektion schon in einem viel früheren Stadium erkennen, weil nicht erst die Bildung von Antikörpern abgewartet werden muss. Diese frühzeitigere Diagnose mittels PCR-Nachweis kann auch alle weiteren Antikörpertests von anderen infektiösen Erregern ersetzen. Dazu braucht man aber klonierte, Erreger-spezifische Gene, um STS-Primer abzuleiten.

1.c. Krebs

Bei Krebs ist eine frühzeitige Diagnose besonders entscheidend, weil dort die Heilungschancen umso besser sind, je früher der Tumor lokalisiert und nachfolgend herausoperiert wird. Da heute schon bei einigen Krebsformen wie Lungen-, Brust- und Dickdarmkrebs (Klonierung des Dickdarmkrebsgens: siehe II. 2. A.) und bei Leukämie die genetischen Veränderungen bekannt und die Gene kloniert sind, die eine gesunde Zelle zur Krebszelle werden lässt, wird man in naher Zukunft einen Diagnosetest für diese Krebsarten entwickeln können.

2. Diagnose von Erbkrankheiten

2.a. Gendiagnose

Die Gendiagnose ist die Feststellung von Erbkrankheiten des Menschen. Dies ist besonders bei denjenigen Krankheiten lebensrettend, wo dank einer frühzeitigen Diagnose die Erbkrankheit durch rechtzeitige medizinischer Behandlung verhindert oder hinausgeschoben werden kann, wie dies bei vererbtem Brust- oder Dickdarmkrebs der Fall ist. Dank der Klonierung vieler Erbkrankheiten verursachender Gene, kann man mit einem Gentest heute schon sehr viele mutierte Gene, die zu Erbkrankheiten führen, diagnostizieren.

Gentests sind heute aber politisch sehr umstritten. Kritiker warnen vor einer genetischen Klassengesellschaft, wo die Menschen nach ihrem Erbgut eingestuft werden. Des weiteren befürchten sie, dass Arbeitgeber und Versicherungen die genetischen Daten zum Nachteil der Arbeitnehmer missbrauchen. Auch erfährt man durch seinen eigenen Gentest unfreiwillig vieles über die Gendefekte seiner Vorfahren, was deren berechnete Privatsphäre und Entscheidungsfreiheit beeinträchtigt.

2.b. Pränatale Diagnose

Die Methoden der pränatalen Diagnostik sind dieselben wie bei der Gendiagnose, aber mit dem Unterschied, dass man hier fötale Zellen aus dem Fruchtwasser oder den Chorionzotten des Embryos analysiert. Ethisch ist diese Form des Gentests noch viel umstrittener als beim erwachsenen Menschen und sie birgt neben dem medizinischen Nutzen auch grosse gesellschaftliche Gefahren, wie die Definition des lebenswerten Lebens oder die Selektion nach dem Wunschkind, wie sie heute in Indien und China durch die pränatale Abtreibung vieler Mädchen schon im grossen Stil stattfindet. Es ist daher unbedingt nötig, die Verwendung der Gendiagnostik an strenge gesetzliche Richtlinien zu knüpfen, die auch eingehalten werden. So sollte das Selbstbestimmungsrecht des Patienten oder, bei pränataler Diagnostik dasjenige der Eltern, unbedingt gewährleistet bleiben. Ebenfalls sollte vom Staat, von den Arbeitgebern und von den Versicherungen garantiert werden, dass Betroffene, welche sich gegen eine Gendiagnose entscheiden, nicht diskriminiert werden.

F. Therapie

Mögliche therapeutische Verwendungen der Gentechnologie in der Medizin sind einerseits die Medikamente (Pharmazeutika) und andererseits ergibt sich heute die Möglichkeit einer somatischen Gentherapie an Körperzellen. Keimbahntherapien beim Menschen oder Experimente an menschlichen Keimbahnzellen sind wegen des heute noch lückenhaften Wissens ethisch nicht verantwortbar und in vielen Ländern auch verboten.

1. Medikamente (Pharmazeutika)

Eine grosse Gruppe von gentechnisch hergestellten Pharmazeutika sind die menschlichen Peptidhormone, von denen wiederum das wichtigste sicher das Humaninsulin ist:

1.a. Humaninsulin

Die Zuckerkrankheit (Diabetes) ist eine meist unheilbare Krankheit, die durch den Mangel an Insulin oder die verminderte Wirkung von Insulin entsteht. Dies hat zur Folge, dass die Zellen keine Glucose aus dem Blut mehr aufnehmen können und führt zu Unterzuckerungen, die unbehandelt ein Coma Diabeticum zur Folge haben. Des weiteren führt die zu hohe Glucose-Konzentration im Blut zu Glucoseausscheidungen und somit auch zu einer verstärkten Diurese (= Wasserausscheidung). Darum sind viele Diabetiker auf regelmässige Injektionen von Insulin angewiesen. Früher verwendete man dazu tierisches Insulin aus Rinder- und Schweine-Bauchspeicheldrüsen, die man aus Millionen von Schlachttieren isolierte. Die Nachteile waren die durch den körperfremden Stoff hervorgerufenen Nebenwirkungen wie Allergien. Auch wurde der fremde Stoff durch das Immunsystem abgebaut und somit in seiner Wirkung beeinträchtigt. Zusätzlich wäre es theoretisch denkbar, dass sich Diabetiker über Rinderinsulin-Injektionen mit dem Rinderwahnsinn infizieren.

Durch die Klonierung des menschlichen Insulingens bereits im Jahre 1977 und dessen anschliessenden Einbau in rekombinante Bakterien zur Grossproduktion konnte schon 1982 das erste gentechnisch hergestellte Medikament, Huminsulin® von Elli Lilly, auf den Markt

gebracht werden. Da dieses rekombinante Insulin dem menschlichen Insulin aus der Bauchspeicheldrüse praktisch identisch ist, löst es nicht wie das tierische Insulin Allergien und sonstige Nebenwirkungen aus und man geht auch nicht das Risiko einer Infektion mit Rinderwahnsinn ein.

1.b. Erythropoietin

Erythropoietin ist ein Hormon, das von Nierenzellen produziert wird, wenn ein zu tiefer O₂-Partialdruck vorliegt (Höhenanpassung). Erythropoietin-Ausschüttung führt zur Erhöhung der Produktion von roten Blutzellen. Nierenpatienten mit Niereninsuffizienz produzieren kein oder zuwenig Erythropoietin. Um eine Anämie zu verhindern, muss man ihnen gentechnisch produziertes Erythropoietin injizieren. Da biologisch aktives Erythropoietin eine hohe Glykosylierung aufweist, kann es nicht in Prokaryoten produziert werden, sondern nur in Eukaryoten, z. B. in Hefe.

1.c. Weitere auf der Klonierung von Genen basierende Medikamente

Es gibt noch sehr viele weitere Gene, dank deren Klonierung man auf molekularem Niveau spezifische Arzneimittel gegen verbreitete Krankheiten konstruieren konnte oder zur Zeit daran forscht. Die Pharmafirmen erklären sogar, dass ab dem Jahr 2000 nur noch Medikamente zugelassen werden, bei denen die Gentechnik im Spiel war. Nachfolgend sind einige bekannte Beispiele von menschlichen Genen aufgeführt, dank deren Klonierung und Charakterisierung spezifische Pharmazeutika entwickelt oder entwickelt hat.

Man setzt rekombinanten menschlichen Gewebefibrinolyseaktivator tPA gegen Herzinfarkt und Thrombosen ein, Interleukin-2 gegen Nierenkrebs, AIDS und sonstige Virusinfektionen und gegen rheumatische Arthritis. Die gentechnisch hergestellten Gerinnungs-Faktoren VII und VIII benutzt man gegen Hämophilie und als physiologische Gegenreaktion Hirudin und Antithrombin gegen Thrombosen. Man setzt rekombinantes menschliches Gamma-Interferon gegen Nierenkrebs, AIDS, Hautkrebs, bakterielle Infektionen und gegen rheumatische Arthritis, humanes Wachstumshormon gegen Wachstumshormondefizienz, Osteoporose, und Wundheilung bei Verbrennungen ein. Calcitonin benutzt man gegen Osteoporose. Und als letztes Beispiel sei das schon unter II.1.A.3 besprochene alpha-Interferon als Medikament gegen Krebs- und Viruserkrankungen (z.B. gegen Nierenkrebs, Haarzell-Leukämie, Hepatitis B oder AIDS) genannt.

2. Die somatische Gentherapie

Unter somatischer Gentherapie versteht man die Behandlung von Krankheiten durch den Transfer von Genen in menschliche Zellen. Die somatische Gentherapie wird nur bei wenigen Erkrankungen angewendet werden können. Dazu muss das die Krankheit verursachende Gen in der Wildtyp-Form kloniert sein. Des weiteren können nur solche Erbkrankheiten oder spontane Neumutationen, die durch ein einzelnes defektes Gen verursacht werden, so behandelt werden. Heute sind 4000 solcher monogen vererbten Erbkrankheiten bekannt. Die spontanen Neumutationen, die z.B. zu Krebs führen können, sind meistens monogen.

Eine weitere Einschränkung stellt die Tatsache dar, dass die defekten Zellen einfach aus dem Körper entnommen, transfektiert, in Kultur vermehrt und dann wieder in ihren ursprünglichen Gewebeverband integriert werden müssen. Dies ist bis heute nur bei Knochenmarks-, Blut- und Hautzellen, in Zukunft aber auch bei Muskel- und Leberzellen möglich. Die Kritik an der somatischen Gentherapie betrifft einerseits die Ethik, andererseits aber die heute noch grosse Unkenntnis über das Verhalten von fremden Genen in Körperzellen. So könnten diese Onkogene induzieren oder Tumorsuppressorgene inaktivieren und so eine Tumorbildung statt eine Heilung bewirken.

2.a. Das SCID-Syndrom

Die erste somatische Gentherapie überhaupt fand 1990 in den USA statt. Das behandelte vierjährige Mädchen litt an einer angeborenen Immunschwäche, dem SCID-Syndrom. Dabei handelt es sich um einen Defekt im Adenosindesaminase-Gen, welcher bewirkt, dass die Giftstoffe, welche Leukocyten des Immunsystems angreifen, nicht mehr abgebaut werden können. Darum wird das Immunsystem geschädigt und das körperliche Abwehrsystem des Körpers degeneriert.

Dem vierjährigen Mädchen wurden Knochenmarkszellen entnommen und mit Hilfe eines Genvektors mit einer intakten Kopie des Adenosindesaminase-Gens transfektiert. Als Genvektor bezeichnet man einen Retro- oder Adenovirus, der nur noch einmal eine Zielzelle infizieren und dabei seine Gene in deren Genom einbauen kann, aber mangels einiger Verpackungs- oder Replikationsgene sich nicht mehr in ihr vermehren kann. Dann wurden diese rekombinanten Zellen in Kultur vermehrt und dem Mädchen in die Blutbahn zurückgegeben. Bereits nach drei Monaten zeigten die Blutwerte des Mädchens zum ersten Mal in seinem Leben normale Leukocyten-Werte an, und das reparierte Immunsystem war nun auch fähig, Infektionen zu bekämpfen. Nach dieser erfolgreichen ersten Gentherapie wurden in den USA und in Europa weitere Patienten mit dem SCID-Syndrom behandelt.

2.b. Krebs

Die somatische Gentherapie lässt sich nicht nur gegen Erbkrankheiten, sondern auch gegen somatische Defekte wie z. B. Krebs anwenden. Die Tumorzellen-spezifischen Tumorinfiltrierenden-Lymphozyten (=TIL) können nach Entnahme aus einem Tumor spezifisch wieder zu diesem Tumor zurückfinden und sich in ihm festsetzen. Eine mögliche Gentherapie hat nun zum Ziel, diese TIL mit Genen für Interleukin-2 und Tumor-Necrosis-Factor (TNF) zu transfektieren. Finden die TIL-Zellen nach Transfektion und Rück-injektion ins Blut zu ihrem ursprünglichen Tumor zurück, so zerstören sie diesen durch Ausschüttung von TNF.

2.c. Hypercholesterinämie

Die Erbkrankheit familiäre Hypercholesterinämie kommt durch ein defektes LDL (=Low Density Lipoprotein) - Rezeptor-Gen in den Leberzellen zustande. Dies hat einen erhöhten Cholesterin-Blutspiegel zur Folge. Das wiederum bewirkt eine Arteriosklerose und kann zu Infarkten führen. Nach dem Einsetzen eines intakten LDL-Rezeptor-Gens in die Leberzellen sollten sich diese, wenn wieder in den Körper eingeführt, normal teilen und das intakte Gen

ihren Nachkommen weitergeben und somit über vermehrte Cholesterinaufnahme zu normalen Blutwerten führen.

2.d. Cystische Fibrose

Angespornt durch die erfolgreiche SCID-Gentherapie werden heute für die verschiedensten Erbkrankheiten Gentherapien entwickelt, so auch gegen die Cystische Fibrose. Bei dieser Erbkrankheit wurde schon 1985 das defekte Gen nach einer sehr aufwendigen aber wegweisenden Suche mit dem positionellen Klonieren eingekreist und 1989 konnte das CF-Gen kloniert werden. Die Methoden dazu werden im Methodenteil des positionellen Klonierens II.2.A. und B. ausführlich dargestellt. Unter II.2.D.1 wird spezifisch auf die CF-Klonierung eingegangen.

Die Verwendung des intakten Gens in einer somatischen Gentherapie hängt jetzt vor allem von einem effizienten Weg zur Einbringung des Gens in die defekten Zellen ab. Eine Möglichkeit der Transfektion wäre die Lipofektion. Dabei werden intakte Kopien des einzuführenden Gens in kleine, Fettkügelchen, Liposomen, verpackt. Diese Liposomen können mit der Membran der Körperzellen fusionieren und dabei geben sie ihren Inhalt, das intakte Gen, ins Innere der Zielzelle ab. Durch Einbau von spezifischen Rezeptoren oder Oberflächenproteinen in die Membran des Transportvesikels kann das "coated vesicle" gezielt auf eine bestimmte Zielzelle gesteuert werden. In der Zielzelle würde das intakte Gen dann unspezifisch ins Genom eingebaut oder ersetzt sogar das defekte Gen durch homologe Rekombination.

Eine andere Möglichkeit zur Transfektion der Lungenzellen wäre der Gebrauch eines Gentaxis, wie oben erklärt oder abgeschwächter Erkältungsviren, welche besonders gut Lungenzellen infizieren. Die Verwendungsform könnte ein Spray sein, mit dem die Liposomen oder die Gentaxi-Viren eingeatmet werden.

2.e. Duchenne Muskeldystrophie

Bei den Knaben mit dem X-chromosomalen Gendefekt, welcher Muskeldystrophie bewirkt, ist das Gen für den Muskelbaustein Dystrophin mutiert. Dies hat einen Gewebe- und Muskelschwund zur Folge, der den Patienten schwächt und seine Muskeln verkümmern lässt. Da eine herkömmliche Muskeltransplantation nur eine Erfolgsquote von 30 % aufweist und zudem der Herzmuskel nicht transplantiert werden kann, forscht man heute nach einer geeigneten Gentherapie, um ein intaktes Dystrophin-Gen in die Muskelzellen einzuführen und dort exprimieren zu lassen.

*

Teil IV: Schlussbetrachtung

A. Neue Erkenntnisse bewirken eine Informationsflut

Heute schon sind die Genome von einigen Organismen vollständig oder fast vollständig sequenziert (siehe III.A.1.) und der relative Zeitaufwand wird immer geringer. Es geht nur noch etwa ein Jahrzehnt bis die vollständigen Sequenzen des Erbgutes des Menschen und vieler Modellorganismen bekannt sind. Das Wissen und die vorhandene Informationsmenge über die neuen Erkenntnisse wachsen exponentiell. In naher Zukunft müssten neue Methoden entwickelt werden, um diese Informationsflut zu bewältigen und der Gesellschaft zugänglich zu machen.

B. Das zukünftige Schicksal dieser Arbeit

Mit den nun bereits begonnenen Totalsequenzierungen wird auch die Zahl der klonierten Gene rapide zunehmen, denn dieses Verfahren wird höchstwahrscheinlich schneller als das positionelle oder funktionelle Klonieren. Allerdings hat man dann das Gen kloniert, aber nicht unbedingt erkannt, was das davon codierte Genprodukt für eine Funktion hat. Die anschließende Entschlüsselung der Genfunktion wird in vielen Fällen noch eine schwierige Arbeit werden.

Dennoch werden wahrscheinlich bei Bekanntsein der vollständigen Sequenz des menschlichen Genoms die meisten der in dieser Arbeit beschriebenen Methoden hoffnungslos veraltet sein. Diese Arbeit ist deshalb nur für den Sommer 1995, in dem sie geschrieben wurde, aktuell. Schon wenige Jahre danach wird sie zu einem winzigen Stück Molekularbiologie-Geschichte degradiert.

C. Auswirkungen der Gentechnologie auf die Gesellschaft

Was hingegen nicht zerfällt sind die Auswirkungen der Totalsequenzierungen und der damit verbundenen neuen Erkenntnissen und Techniken der Gentechnologie auf die Gesellschaft. Durch die Klonierung vieler neuer Gene wird sich mit zunehmender Kenntnis vieler biochemischer Abläufe, z. B. bei Erbkrankheiten, die Kluft zwischen dem Wissen und dessen therapeutischer Umsetzung weiter ausweiten. Schon heute sind zwar Diagnosen auf AIDS, Chorea Huntington und Krebs möglich; eine Therapie dieser Krankheiten existiert aber noch nicht. Dieses tragische Schicksal betrifft heute erst Einzelfälle, doch wenn erst die Mechanismen der multifaktoriell verursachten Erkrankungen wie Krebs, Herzerkrankungen und Demenzen bekannt sind, wird bald ein Grossteil der Gesellschaft vom Schicksal einer langen psychischen Leidenszeit betroffen sein. Dies könnte dazu führen, dass vorhandene

Diagnostetests ohne dazugehörige Therapie von den Betroffenen als ein "vorgezogenes Todesurteil" abgelehnt werden und, ausser in Ausnahmefällen, gar nicht mehr durchgeführt würden.

Ein weiteres Risiko, das sich aus den immer zahlreicheren Diagnostetests ergibt, ist der Missbrauch durch Arbeitgeber, Krankenkassen und Versicherungen. Mit dem Vorwand den Arbeitnehmer vor für ihn risikoreichen Arbeiten zu schützen oder beim Versicherten allfällige Probleme frühzeitig zu erkennen und so optimal zu behandeln, werden solche Tests gerechtfertigt. Durch dieses Wissen über den Verlauf der Gesundheit einer Person wird aber auch den Missbräuchen wie Verlust des Arbeitsplatzes, des Versicherungsschutzes oder der Privatsphäre oder weiteren Diskriminierungen allein aufgrund der genetischen Konstitution Tür und Tor geöffnet.

Dies sind nur zwei von vielen durch die Entwicklung der Gentechnologie auf uns zukommende gesellschaftliche Konflikte. Auf das Horrorszenario der Keimbahntherapie, durch die man Aussehen, Verhalten und Intelligenz "korrigieren" könnte, wenn die genetischen Grundlagen dazu bekannt wären, will ich hier gar nicht erst näher eingehen.

Daneben haben die Gentechnologie und die klonierten Gene aber auch ein grosses Potential an positiven Fortschritten: Therapien gegen viele Krankheiten, Ersatz vieler problematischer Pestizide und Nährwerterhöhung bei Pflanzen, sowie Impfstoffe gegen viele heute noch gefürchtete Erreger wie AIDS und Malaria werden durch die Fortschritte in der Gentechnologie in greifbare Nähe gebracht.

Ich beende diese Arbeit mit der Hoffnung, keine der hier gehegten Befürchtungen möge eintreten. Ich hoffe, die Gentechnologie der Zukunft werde sich zu einer sozial und ethisch gerechten, auch dem kleinen Menschen auf der Strasse und in der dritten Welt hilfreichen Wissenschaft entwickeln.

*

Literaturverzeichnis

- 1 Schulz, J. 1995. **Wem gehört das Universum? - Ein Streitgespräch.** MOMA 4-95: 7-12.
- 2 Fleischmann, R. D. et al. 1995. **Whole Genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd.** Science 269: 496-509.
- 3 Unternährer-Rosta, S. et al. 1994. **Gentechnik - worum geht es?** Editiones Roche, Basel.
- 4 Noma, Y. et al. 1986. **Cloning of cDNA encoding the murine IgG 1 induction factor by a novel strategy using SP 6 promotor.** Nature 319: 640- 646.
- 5 Werner, A. et al. 1991. **Cloning and expression of cDNA for a Na/Pi cotransport system of kidney cortex.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9608- 9612.
- 6 Nagata, S. et al. 1980. **Synthesis in E. coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity.** Nature 284: 316-320.
- 7 Legerski and Petersen. 1992. **DNA-repair-gene involved in Xeroderma Pigmentosum group C.** Nature 359: 70.
- 8 Hedrick, S. M. et al. 1984. **Isolation of cDNA clones encoding T cell specific membrane-associated proteins.** Nature 308: 149-153.
- 9 Liang, P., Pardee, A. B. 1992. **Differential display of eukaryotic mRNA by means of PCR.** Science 257: 967-971.
- 10 D'Andrea, A. D. 1989. **Expression cloning of the murine erythropoietin receptor.** Cell 57: 277-285.

- 11 Strub, K., Walter, P. 1989. **Isolation of a cDNA clone of the SRP by cross-hybridization of differently primed PCR's.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 9747-9751.
- 12 Parada, L. F., Weinberg, R. A. et al. 1982. **Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene.** Nature 297: 474-479.
- 13 Aruffo, A., Seed, B. 1987. **Molecular cloning of a CD 28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8573-8577.
- 14 Anonymous. 1995. **Genetic map goal met ahead of schedule.** Human Genome News. November 1994. P. 14
- 15 Meese, E., Menzel, A. 1995. **Genisolierung.** Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- 16 Peltomäki, P. 1993. **Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer.** Science 260: 810-812.
- 17 Sengstag, C. 1995. **Prädisposition für Dickdarmkrebs: Familiäre Vererbung mutierter DNS Reparaturgene.** Vierteljahresschrift der Naturforschenden Gesellschaft Zürich Nr. 140, 2. Quartal.
- 18 Knowlton R. G. 1985. **A polymorphic DNA marker linked to cystic fibrosis is located on chromosome 7.** Nature 318: 380-382.
- 19 Rommens, J. M. et al. 1989. **Identification of the cystic fibrosis gene: Chromosome walking and jumping.** Science 245: 1059-1065.
- 20 Riordan, J. R. et al. 1989. **Identification of the cystic fibrosis gene: Cloning and characterization of cDNA.** Science 245: 1066-1073.
- 21 Tent, R. J. 1994. **Molekulare Medizin.** Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

- 22** Hobom, B. 1995. **Das gläserne Bakterium.** Frankfurter Allgemeine Zeitung 16. 8. 95: S. N1
- 23** Fischer, H. M., Mantei, N., Weissmann, C. 1994. **Biotechnologie III (Gentechnologie).** Arbeitsblätter zur Vorlesung, gehalten im Wintersemester 1994/95 an der ETH Zürich.
- 24** Thoma, F. 1994. **Molekulare Genetik höherer Organismen.** Manuskript zur Vorlesung, gehalten im Wintersemester 1994/95 an der ETH Zürich.
- 25** Ryser, S., Weber, M. 1991. **Gentechnik - Was läuft bei Roche?** Editiones Roche, Basel.

*