

Von der Genetik zur Gentechnik

Gernot Walzl

(Technische Universität Graz, Österreich
gernot.walzl@student.tugraz.at)

Kurzfassung: Dieser Artikel beschäftigt sich mit der historischen Entwicklung, von den Anfängen der Genetik bis zur heutigen Gentechnik. Über diesen geschichtlichen Verlauf werden die gewonnenen Erkenntnisse anhand durchgeführter Experimente näher gebracht und erklärt. Komplexere Prozesse der Gentechnik sollen somit in ihren Grundlagen nachvollziehbar verstanden werden können.

Schlüsselworte: Genetik, Gentechnik, Genomik, Evolution, Vererbungslehre, DNS, RNS, Protein, Chromosom, Nuklein, Mendelsche Gesetze, Darwin, Boyer-Cohen-Prozess, PCR-Prozess, Enzym, Transkription, Translation, Plasmid

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	2
2 Genetik	2
2.1 Vererbungslehre im Kloster	2
2.2 Mendelsche Gesetze	3
2.2.1 Uniformitätsgesetz	3
2.2.2 Spaltungsgesetz	3
2.2.3 Freie Kombinierbarkeit der Gene	3
2.3 Evolutionstheorie von Charles Darwin	5
2.4 Weitere Erkenntnisse	5
2.5 Das Chromosom	6
3 Gentechnik	8
3.1 Die Anfänge	8
3.2 Boyer-Cohen-Prozess	10
3.3 Umgang mit der Gefahr	12
4 Gentechnik - Heute	13
4.1 Polymerase-Kettenreaktion	13
4.2 DNS-Sequenzierung	14
4.2.1 Maxam-Gilbert Methode	14
4.2.2 Didesoxymethode nach Sanger	14

4.2.3 Pyrosequenzierung	15
4.3 DNS-Sequenzanalyse	15
4.3.1 BLAST-Algorithmus	16
4.4 Anwendungsgebiete im Alltag	16
5 Zusammenfassung und Ausblick	17

1 Einleitung

Laut [Heberle-Bors 96] besteht das Wesen der Genetik in der einfachen Frage: “Was vererbt wie?” Diese zu früheren Zeiten noch ungelöste Frage inspirierte viele Denker und Analytiker des 19. und 20. Jahrhunderts. Ob es darum geht die Züchtung einer Pflanzenart effizienter und gezielter zu gestalten, oder die eigene Evolution zu verstehen, die Genetik ist in vielen Bereichen, vielleicht auch unbewusst, präsent. Die rasante Entwicklung in unserer, nach Erkenntnissen strebenden Gesellschaft, ermöglichte es uns, die Frage nach dem “Was vererbt wie?” selbst zu beantworten. Mit der Gentechnik ist es möglich Organismen und Pflanzen zu schaffen, welche eine nahezu beliebige Kombination aus schon Vorhandenem ist.

2 Genetik

2.1 Vererbungslehre im Kloster

Die Anfänge der Genetik sind dem Augustinermönch Gregor Mendel zuzuschreiben (nach [Mendel 01]). Er studierte im Jahre 1851 in Wien Physik. Sein erstes Semester an der Universität absolvierte er bei Christian Doppler. Doppler schrieb neben dem bekannten Doppler-Effekt auch Arbeiten über Statistik und Wahrscheinlichkeitstheorie, welche zu dieser Zeit noch in den Kinderschuhen steckte. Diese Theorien waren später für Mendels Betrachtungen hilfreich. Nach Beendigung des Studiums fand er seine Berufung als Oberrealschullehrer für Physik, Biologie und Geowissenschaften im Kloster in Brünn. Den größten Teil seiner Freizeit verbrachte Mendel im Garten, der hauptsächlich aus Erbsen bestand. Inspiriert von den Zahlen (aus der Physik) katalogisierte er pedantisch seine Züchtungsversuche der Erbsen. Die daraus resultierenden Erkenntnisse machten Mendel zum Vater der Genetik.

2.2 Mendelsche Gesetze

Zu dieser Zeit (ca. 1860) existierte das Wort “Gen” noch nicht. Mendel sprach von Elementen des Lebens. Der Einfachheit halber werde ich hier den Begriff “Gen” verwenden.

Um die Mendelschen Gesetze zu begreifen, muss man zuerst verstehen, was mit rezessiven und dominanten Genen gemeint ist. Dominante Gene überwiegen bei der Vererbung, bei der Ausprägung einer Eigenschaft. Einfach erklärt ist das anhand eines Beispiels: Notationshalber definieren wir Großbuchstaben als dominant und Kleinbuchstaben als rezessiv. Nehmen wir an, Gen a beschreibt die Erbsenblüte als weiß. Weiters steht das Gen A für rot. Angenommen eine reinrassige, weiße Erbsensorte mit den Genen aa wird mit einer reinrassigen, roten mit den Genen AA gekreuzt. Die Nachkommen bestehen nur aus Aa Genen. Die Dominanz wirkt sich dahin gehend aus, dass alle Nachkommen erster Generation (F_1) rot sind (A ist stärker als a). Diese Tatsache führt uns zum ersten der drei Gesetze: (nach [Mendel 01], [Mendel 06])

2.2.1 Uniformitätsgesetz

Dieses Gesetz beschreibt den Zusammenhang zwischen den Nachkommen der ersten Generation (F_1) und ihren Eltern. Wie im obigen Beispiel beschrieben, setzt sich F_1 nur aus einer Kombination beider Elternteile zusammen. Diese Erkenntnis bildet das 1. Mendel'sche Gesetz

2.2.2 Spaltungsgesetz

Wird die Generation F_1 , welche sich in unserem Beispiel nur aus “ Aa ”-Erbsen besteht untereinander gekreuzt, ergibt sich Generation 2 (F_2) zu: aa , aA , Aa , AA . Dies entspricht einer Aufteilung zu einem Teil weiß blühender Erbsen und drei Teilen rot blühender Erbsen. Genetisch gesehen zu: 1:2:1 (aA und Aa ist äquivalent) Wie man aus dieser Regel erkennen kann, ist es möglich durch gezielte Züchtung Reinrassigkeit zu erreichen.

2.2.3 Freie Kombinierbarkeit der Gene

Für diese Betrachtung ist eine weitere Eigenschaft notwendig. Fügen wir hierzu unserem Beispiel zur Farbe noch die Größe hinzu. B repräsentiert

ein Gen für dominantem Großwuchs und b entspricht rezessiven Kleinwuchs. Angenommen, ein Elternteil besteht aus aabb Genen und der zweite aus AABB Genen. Die resultierende Generation F1 besteht laut dem Uniformitätsgesetz nur zu AaBb (rot, groß). Weiters ergibt sich laut Spaltungsgesetz Generation F2 zu 9 Teilen aus großen, roten -, zu 3 Teilen aus kleinen, roten -, zu 3 Teilen aus großen, weißen - und zu einem Teil aus kleinen, weißen Erbsenpflanzen.

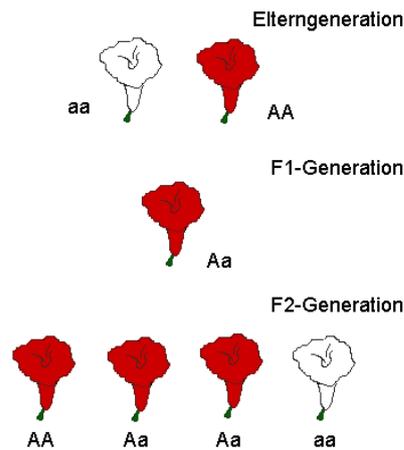


Abbildung 1: 2. Mendel'sches Gesetz [Mendel 06]

Mendel leitete diese Gesetzmäßigkeiten aus dem Resultat seiner Züchtungsversuche ab. Wie wir heute wissen, stimmen diese Regeln (neben anderen) angewandt auf Chromosome. Mendel hatte das Glück, dass jede der Eigenschaften (Farbe, Größe, ...) in einer der 7 Chromosome der Erbsenpflanze saß. Dies trifft nicht auf jeden Organismus zu.

Diese Vererbungstheorien legten den Grundstein der Genetik, jedoch erklären sie die Artenvielfalt nicht. Wenn man nur durch Rekombination der Samen einer Pflanze, wieder eine Pflanze der gleichen Art bekommt, ist der Anfang dieser Entwicklung nicht definiert und kann deshalb göttlichen Ursprungs sein.

2.3 Evolutionstheorie von Charles Darwin

Charles Darwin war eines von sechs Kindern einer Familie, die größtenteils aus Naturwissenschaftlern bestand. Nach der Schule studierte er 1825 Medizin in Edinburgh, jedoch brach er sein Studium 1827 ab. Aus Angst, aus ihm könnte nichts werden, schrieb ihm sein Vater an der Universität Cambridge für Theologie ein. Nach erfolgreichem Abschluss segelte er mit seinen Kommilitonen innerhalb von fünf Jahren mit der HMS Beagle um die Welt. Zwischen 1842 und 1859 entwickelte Darwin seine Theorien, die unter dem Namen “Ursprung der Arten durch Mittel der natürlichen Selektion” [Darwin 04] veröffentlicht wurden. In diesem Buch vertritt er vier grundlegende Hypothesen:

1. Veränderlichkeit: Die Welt unterliegt einem kontinuierlichen Veränderungsprozess.
2. Gemeinsame Abstammung: Alle Organismen stammen durch den Veränderungsprozess von gemeinsamen Vorfahren ab.
3. Allmählichkeit der Evolution: Die Evolution erfolgt stets allmählich und nicht in Sprüngen
4. Natürliche Auslese: Die am besten angepassten Individuen überleben und zeugen am meisten Nachkommen.

Dem zufolge werden irgendwann “durch Zufall” Elefanten mit größeren Ohren geboren, die besser an die klimatischen Bedingungen der Umgebung angepasst sind. Da sich das als zufälliger Vorteil ergibt, überleben diese und drängen somit schlechter angepasste Individuen zurück.

2.4 Weitere Erkenntnisse

Friedrich Miescher entdeckte 1869 eine neue Substanz in den Eiern der Lachse, die zu dieser Zeit noch scharrenweise rheinaufwärts nach Basel schwammen. Er nannte seine neue Substanz “Nuclein” [Wikipedia 06]. Der Name war abgeleitet vom lateinischen nucleus (Kern). Heute ist diese Substanz als Nukleinsäure bekannt.

Zu dieser Zeit gab es mehrere Theorien darüber, dass Dinge wie “Erfahrungspartikel” von einer Generation zur nächsten übertragen werden.

August Weismann vertrat die Ansicht, dass sich die Eigenschaften eines Organismus nicht nach Gebrauch oder Nichtgebrauch vererben. Dies demonstrierte er, indem er über 22 Generationen von Labormäusen den Schwanz abschnitt (laut [Heberle-Bors 96]). Die 23. Generation hatte keinen verkümmerten, sondern den gleichen Schwanz wie die erste. Damit widerlegte er die Theorie der Erfahrungspartikel und bewies, dass es sich bei Evolution nur um günstige Zufälle handelt.

2.5 Das Chromosom

Die Chromosomen wurden ursprünglich 1843 von Carl Wilhelm von Nägeli entdeckt, jedoch klassifizierte er sie fälschlicherweise als “transitorische Zellkerne”. Bei der Zellteilung kann man die Chromosome unter einem Mikroskop erkennen. Es sieht so aus, als würden die “Fäden” links und rechts zu einem Punkt auseinandergezogen werden. Die wahre Bedeutung der Chromosome erkannte allerdings erst 1910 Thomas Morgan (nach [Wikipedia 06]).

Er unternahm unzählige Kreuzungsversuche mit Taufliegen. Dabei entdeckte er, dass es viele Eigenschaften gibt, die sich im Allgemeinen nur zusammen vererben ließen. Dazu zählt die Zusammengehörigkeit von Schädl- und Flügelform, das Geschlecht und die Augenfarbe, et cetera. Morgan schließt daraus, dass der Grund für diesen Zusammenhang in den Chromosomen begründet war.

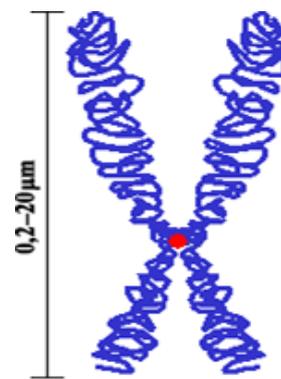


Abbildung 2: Ein Chromosom

Die Zeit des 1. und 2. Weltkrieges waren auch für die Genetik eine magere Zeit. Erst gegen Ende des 2. Weltkrieges schritt die Entwicklung voran.

1944 verfasste Erwin Schrödinger, ein Wiener Physiker, eine inspirierende Arbeit mit dem Titel “Was ist Leben?” [Schrödinger 99]. Darin vertrat er die Einstellung, dass der freie Wille des Menschen nur eine Anwendung der erkannten Gesetzmäßigkeiten widerspiegelt. Er behauptete somit, dass der freie Wille durch unsere Gene vorbestimmt sei. Dieses Schriftstück inspirierte unter anderem die Amerikaner Oswald

T. Avery, Colin MacLeod und Maclyn McCarty. Sie zerlegten die Nukleinsäure Mischers in Desoxyribonukleinsäure (DNS), Ribonukleinsäure (RNS) und Proteine. Weiters zeigten sie auch, dass die DNS der Träger der Erbinformationen war. Dies gelang ihnen durch Einbringen fremder DNS in Pneumokokken (Bakterium), die daraufhin eine schützende Schleimkapsel bildeten.

Erwin Chargaff (siehe [Wikipedia 06]), ein emigrierter Alt-Österreicher zeigte, dass die DNS ein Makromolekül ist. Weiters erkannte er, dass die Anzahl der vier Nukleobasen in verschiedenen Organismen verschieden, jedoch in verschiedenen Organen des selben Organismus gleich sind. Einer seiner Mitarbeiter stellte fest, dass die Anzahl von Adenin und Thymin gleich der Anzahl von Cytosin und Guanin entsprach. Was dies zu bedeuten hatte und wie die Nukleobasen im Raum angeordnet sind, blieb vorerst noch unklar.

Diese Frage wurde 1953 von James Watson und Francis Crick beantwortet. Ihnen gelang es, mit Hilfe der Röntgen-Kristallographie die dreidimensionale Struktur der DNS abzubilden. Es liegen immer zwei Basen gegenüber und bilden somit einen Spross der Leiter. Durch zwei Wasserstoffbrücken ist Adenin (A) mit Thymin (T) und durch drei Wasserstoffbrücken ist Cytosin (C) mit Guanin (G) verbunden. Crick erkannte 1956 den Zusammenhang von DNS, RNS und Protein. Je drei Nukleotide bilden ein Codon und codieren somit eine Aminosäure, welche Bestandteil eines Protein ist. Der Fluss der genetischen Information in einer Zelle ist von der DNA zur RNS zum Protein. Anschaulicher ist dies anhand eines Beispiels (aus [Heberle-Bors 96]):
Ausgehend von der DNS:

... ATG GTG CAC CTG ACT ...

Die Transkription zur RNS erledigen Enzyme:

AUG GUG CAC CUG ACU

Für die Translation zu den Aminosäuren sind ebenfalls Enzyme zuständig:

Met Val His Leu Thr

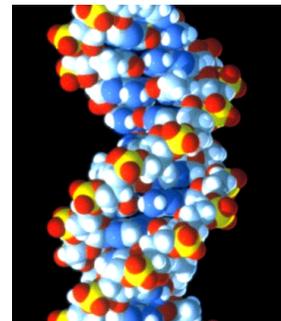


Abbildung 3: Struktur der DNS [Wikipedia 06]

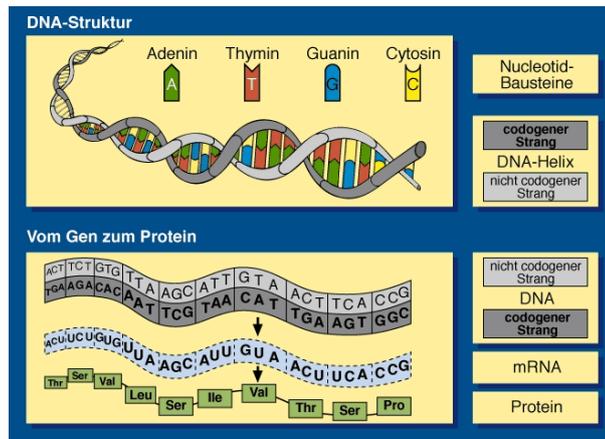


Abbildung 4: Der genetische Code: Alphabet des Lebens [Roche 06a]

Das Ergebnis ist also ein Protein mit diesen Aminosäuren. Hier kommt der Biochemiker Frederick Sanger (nach [Wikipedia 06]) ins Spiel. Er publizierte 1958 die Struktur des Insulins. Durch ihm wurde klar, dass das Wesen eines Proteins durch die Abfolge seiner Aminosäuren definiert wird. Dafür erhielt er seinen ersten Nobelpreis für Chemie.

3 Gentechnik

3.1 Die Anfänge

Paul Berg beschäftigte sich mit der Frage: “Wie Viren Krebs auslösen?” (nach [Heberle-Bors 96]) Um diese Frage zu beantworten, wollte er den Affenvirus SV40 dem bakteriphagen Lambda-Virus “aufpfropfen” und anschließend mit diesem Hybridvirus Bakterien des menschlichen Darms infizieren. Dabei handelte es sich um den Bakterius Escherichia coli (E.-coli), die nach dem Grazer Arzt Theodor Escherich benannt wurden. Das Tumovirus sollte in E.coli milliardenfach vermehrt werden, sodass genügend Viren zu Verfügung stehen, um tierische Zellen zu infizieren und den Vorgang der Krebsbildung genauer zu untersuchen. Dieser Virus wäre in der Lage gewesen, sich in tierischen Zellen, aber auch in menschlichen Darmbakterien zu vermehren. Damit wäre es eventuell möglich gewesen, einen Impfstoff gegen SV40 herzustellen.

In Impfstoffen findet sich eine große Anzahl des gleichen Virustyps wieder. Der Unterschied hierbei besteht, dass der Virus im Impfstoff inaktiviert wurde.

Jetzt stand eine Methode zur Verfügung, diesen Virus einfach in Massen herzustellen. Der Virus SV40 an sich ist für Menschen, so wie er ist, ungefährlich. Man fürchtete sich vor etwaigen Mutationen, die dann doch auch beim Menschen Krebs hervorrufen könnten. Paul Berg führte auf Grund Interventionen seiner Kollegen dieses Experiment nie durch. 1972 publizierte er seine Arbeiten am SV40 und Lambda-Virus, jedoch hatten sie nie eine E.coli-Bakterie infiziert.

In darauf folgenden Studien fand Paul Berg eine Möglichkeit, wie man die DNS mit Hilfe von Restriktionsenzyme in Teile schneiden konnte. Restriktionsenzyme sind Werkzeuge von Bakterien um fremde DNS der Umgebung zerstückeln und verdauen zu können. Ein bestimmtes Restriktionsenzym durchtrennt den DNS Strang an ganz bestimmten Stellen. Das Enzym EcoR1 (gefunden in E.coli) durchtrennt die DNS nur bei einer Nukleotidfolge von AATT. Um zu verhindern, dass die eigene DNS des Bakteriums durchtrennt wird, wird genau an diesen Stellen (AATT) von einem anderen Enzym eine Methylierung angebracht. Somit zersetzt ein solches Restriktionsenzym nur die DNS fremder Zellen. Diese Methode schützt Bakterien auch vor eindringenden Viren. Viren haben im Allgemeinen eine kreisförmige DNS Struktur (Plasmid). Wenn ein Virus an einer Stelle durchtrennt wird, erhält man einen offenen, gestreckten Strang mit zwei "sticky ends". Es ist möglich diese klebrigen Enden anschließend mit anderen Enzymen wieder zu einem funktionierenden Virus zu verbinden. Dies funktioniert auch mit der DNS von verschiedenen Viren. Paul Berg extrahierte DNS-Fragmente aus dem SV40 und verknüpfte diese mit der Plasmid-DNS von E.coli. Dazu verwendete er die DNS-Ligase, ein weiteres Enzym, welches aus einem Bakterium gewonnen wurde. In diesem Experiment war es zum ersten mal gelungen, ein neues DNS-Molekül im Reagenzglas zu erschaffen.

Durch die Entdeckung des Penicillins fanden Antibiotika in den 60er und 70er Jahren massenhaften Einsatz bei der Bekämpfung von Infektionen. Bei häufiger Anwendung von Antibiotika musste die Dosis stetig weiter erhöht oder die Art des Mittels gewechselt werden, um den glei-

chen Effekt zu erzielen. Grund dafür war die Anpassungsfähigkeit der Bakterien, die Resistenzen gegen diese Behandlungen entwickelten. Die Ausbildung dieser Resistenzen beschäftigte Personen wie Herbert Boyer und Stanley Cohen.

Herbert Boyer schleuderte die DNS von drei verschiedenen Bakterienkulturen des gleichen Typs, die jeweils gegen drei unterschiedlichen Antibiotika resistent waren, in einem Mixer. Er bekam somit kurze Bruchstücke dieser DNS. Diese Bruchstücke wurden in E.coli-Bakterien übertragen, die keine Resistenz besaßen. Das Ergebnis waren Kolonien, die gegen einzelnen Antibiotika resistent waren. Um die Ausbeute dieses Verfahrens zu erhöhen, war Boyer bestrebt seinen Mixer durch Restriktionsenzyme zu ersetzen. Die gemeinsame Forschung mit Stanley Cohen brachte die entscheidende Entdeckung.

Stanley Cohen versuchte das Problem von einer anderen Seite zu analysieren. Er nahm ein Bakterium, welches gegen vier verschiedene Antibiotika resistent war. Diese Resistenzen versuchte er aus dem Bakterium heraus, in jeweils vier einzelne Resistenzen aufzuteilen. Es gelang ihm mittels Konjugation (quasi sexuellen Prozess) die DNS zwischen diesen Bakterien und E.coli Zellen auszutauschen.

3.2 Boyer-Cohen-Prozess

Wie schon vorher erwähnt, gelang es Paul Berg ein neues DNS-Molekül aus einer Kombination schon vorhandener zu erstellen. Der Transfer und die Expression in einer Zelle gelang erst ein Jahr später (1973) Herbert Boyer und Stanley Cohen an der Stanford Universität von Kalifornien (nach [Regenass-Klotz 04]). Dies war sozusagen die Geburtsstunde von dem, was wir heute Gentechnik nennen: die rekombinante DNS Technologie.

In ihrem Experiment benutzten sie ein Plasmid (ringförmiges DNS Molekül) aus E.coli. Der Name des Plasmids war pSC101, wobei hier das SC für Stanley Cohen steht. Dieses Plasmid wies folgende Eigenschaften auf: (nach [Roche 06a])

1. eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoR1
2. einen Replikationsursprung, der die Replikation in der Wirtszelle ermöglichte

- ein Gen für die Tetracyclinresistenz, die Voraussetzung für die Selektion der Plasmid tragenden Bakterien

Ziel dieses Experiments war, die Antibiotikaresistenz für Kanamycin aus pSC102 zu pSC101 und weiters in die E.coli Bakterie zu übertragen. Um das zu erreichen, wurden beide Plasmide mit dem Enzym EcoR1 zerteilt und anschließend wieder zusammengefügt. Diese Rekombination basiert, mehr oder weniger, auf Zufall, anstatt gezielt. Anschließend wurde diese beliebige Kombination verschiedener Plasmide zurück in die Zelle transferiert. Die Selektion der gewünschten E.colis erfolgte durch die Antibiotika Tetracyclin und Kanamycin. Dadurch überlebten nur die Zellen, die aus den gewünschten Genen bestanden. Damit war das Ziel des Experiments erreicht. Die Vorgehensweise der heutigen Gentechnik ähnelt diesem ersten Versuch sehr. Auch heute wird die DNS zuerst mit Restriktionsenzyme zurecht geschnitten, damit sie auf einen Vektor (Träger) passen. Der Träger, meist ein Plasmid, wird dann mit den neukombinierten DNS Molekülen in die lebende Zelle eingeschleust.

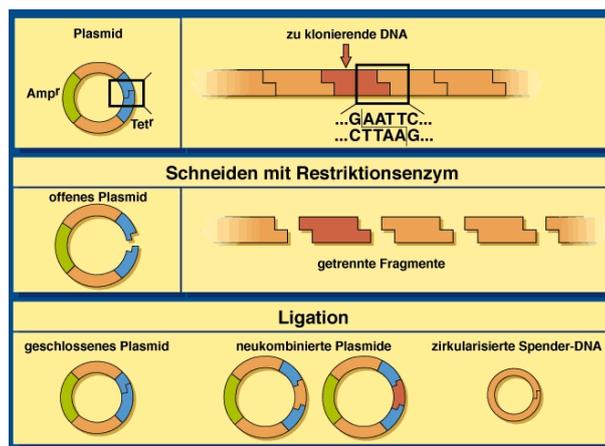


Abbildung 5: Klonierung von DNS-Fragmenten [Roche 06a]

Dieses Verfahren ermöglichte es, beliebige Kombinationen aus schon vorhandener DNS zu erstellen. Es ist natürlich mit großen Risiken für die menschliche Gesundheit verbunden, da man auch jede beliebige Art von Virus erschaffen könnte.

3.3 Umgang mit der Gefahr

Diese Technologie wurde auf der Gordon Konferenz erstmals genauer vorgestellt. Das Ergebnis der Konferenz war ein Brief an die Zeitschrift SCIENCE, den Präsidenten der nationalen Akademie der Wissenschaften in den USA und den Präsidenten des nationalen Medizinischen Instituts. In diesem Brief wurde die Technologie genauer vorgestellt, die Bedenken geäußert und eine Bitte an die nationale Akademie der Wissenschaften diese Technik genauer zu untersuchen. Es sollten Richtlinien zum sicheren Umgang ausgearbeitet werden.

Paul Berg war Vorsitzender dieser Kommission, die 1974 einen Bericht mit dem Titel "Potential Biohazards of Recombinant DNA Molecules" [PNAS 06] veröffentlichte. Die Unterzeichner forderten die Wissenschaftler der ganzen Welt auf, bestimmte Experimente, die in zwei Klassen unterteilt waren, gar nicht erst zu beginnen.

Klasse 1 beschrieb Experimente, die die Antibiotikaresistenz der Bakterien betraf. Es sollte niemandem erlaubt sein, Bakterien zu erschaffen, die beispielsweise gegen jede Art von Antibiotikum resistent wären. Diese Bakterien würden die Menschheit gesundheitlich gesehen vor die Zeit des Penicillins katapultieren.

Klasse 2 verbot Experimente bezüglich einer Erhöhung des Krebsrisikos bei Menschen. Da die Anfänge dieser Technik auf dem SV40 Virus beruhen, der so wie er ist, nur bei Affen Krebs auslöst, ist es nahe liegend, dass vielleicht doch jemand in Versuchung gerät, Paul Bergs nicht durchgeführtes Experiment schließlich doch durchzuführen.

Weiters wurde in diesem Bericht das National Institute of Health (NHI) aufgefordert, die obigen genannten Punkte zu überwachen. Zusätzlich sollen Richtlinien entwickelt werden, die Forscher befolgen müssen, wenn sie mit potentiell gefährlichen DNS-Molekülen arbeiten.

Im Jahr darauf fand eine erneute Konferenz in Asilomar (Kalifornien) statt, um die Forderungen dieses Berichts rechtlich durchzusetzen. Es gab eine Reihe von Auseinandersetzungen zwischen Juristen, Rechtsanwälten und Wissenschaftler. Die daraus folgenden Richtlinien, die "NIH-guidelines" [NIH 06] wurden 1976 veröffentlicht und wurden die Grundlage der gesetzlichen Regelung der Gentechnik, nicht nur in den USA.

Etwa zur gleichen Zeit wurde in England versucht einen E.coli Stamm

zu entwickeln, welcher nur im Labor überlebensfähig ist. Sydney Brenner gelang dies. Er entwickelte das K12 Bakterium, welches ein E.coli Stamm ist, der außerhalb des Labors eine äußerst kurze Lebenserwartung hat.

4 Gentechnik - Heute

4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Seit 1983 gibt es zum DNS-Klonierungsprozess von Boyer und Cohen eine weit elegantere Alternative: die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Laut [Müller 01] wurde diese Methode von Kary Banks Mullis entwickelt. Es war seine Idee, die DNS durch wiederholte Verdoppelung mit Hilfe eines Enzyms, der Polymerase, künstlich zu vervielfältigen. Die Polymerase kommt in jeder Zelle vor. Sie kopiert alle DNS-Moleküle vor der Zellteilung.

Bei einer Temperatur von ca. 95°C trennen sich die Wasserstoffverbindungen, die Adenin mit Thymin und Cytosin mit Guanin verbinden. Es entstehen zwei halbierte DNS-Stränge. Durch zwei Primer wird der Ausschnitt des Strangs markiert, der kopiert (geklont) werden soll. Ein Primer ist, im Großen und Ganzen, nur eine Negativkopie der Start- und Endposition. Ein temperaturunempfindliches Polymerase-Enzym wird nun eingesetzt, um den markierten Bereich zu kopieren. Dieser Vorgang wird ca. 20 mal wiederholt, damit eine große Anzahl von geklonten DNS-Stücken entsteht.

Um die gewünschte DNS zu identifizieren, findet die Agarose-Gelelektrophorese Einsatz. Hierbei befinden sich die DNS-Stränge im Gelbad. An dieses Gelbad wird eine Spannung angelegt. Die längeren DNS-Stücke bewegen sich langsamer auf den Pluspol zu, als die kürzeren. Zum anschaulichen Vergleich laufen nebenbei DNS-Stücke vordefinierter Größe mit.

Anwendung findet das PCR-Verfahren beim genetischen Fingerabdruck, Vaterschaftstests, Erbkrankheiten, aber auch bei Krankheiten wie HIV oder Hepatitis, da hier das diagnostische Fenster nahezu ausgeschlossen werden kann. Diese Anwendungsgebiete sind fast vollständig automatisiert. (Durch Knopfdruck einfach zu bedienen.)

4.2 DNS-Sequenzierung

Die DNS-Sequenzierung führt uns ins Zeitalter der Genomik (laut [Wikipedia 06]). Im Jahr 1995 wurde mit der Sequenzierung, der auf der Erde lebenden Organismen begonnen. Seitdem wurden bis 2006 ca. 330 Spezies vollständig erfasst. Darunter ist auch der komplette Bauplan des Menschen.

Es gibt mehrere Ansätze die DNS-Moleküle zu sequenzieren, jedoch sind die Sequenzlängen bei allen Verfahren derzeit auf ca. 1000 Basenpaare (bp) pro Durchgang limitiert. Zum Vergleich: Die Anzahl der Basenpaare des Menschen beläuft sich auf ein wenig mehr als 3 Milliarden. Dies stellt für die heutige Informationstechnologie einen kleinen, jedoch für die Genomik einen sehr großen Aufwand dar. Eine einfache DVD reicht aus um den kompletten genetischen Bauplan eines Menschen zu speichern. Durch optimale Kodierung würde sogar eine CD genug Speicherplatz bieten. Im übrigen bekommt man das komplette menschliche Genom bei [NCBI 06] zum Download. Auf [Roche 06b] ist ein Sequenzanalysegerät in Aktion zu sehen.

4.2.1 Maxam-Gilbert Methode

Die 1977 entwickelte Methode ermöglichte es Allan Maxam und Walter Gilbert die Bestimmung der Opteron-Sequenz des Bakteriumgenoms. Sie verwendeten bestimmte Reagenzien, die einzelne Basen aus dem DNS-Molekül abspaltet. So wie Dimethylsulfat die Base Guanin aus dem DNS-Strang entfernt, gibt es andere Stoffe, die dies bei den anderen Nukleobasen erledigen. Danach wird der Strang an diesen basenlosen Stellen komplett durchtrennt. Durch die Gelelektrophorese wird anschließend die Länge der DNS-Stücke bestimmt. So wird dieses Verfahren für jede der vier Basen angewandt. Am Ende kann man auf die Nukleotidfolge schließen. Heute wird dieses Verfahren aufgrund seiner schweren Automatisierbarkeit kaum eingesetzt.

4.2.2 Didesoxymethode nach Sanger

Ebenfalls 1977 gelang es Frederick Sanger (der schon die Struktur des Insulins erforscht hatte) die vollständige Sequenzierung eines Bakteriums. Die Methode hat Ähnlichkeit mit der PCR: Der DNS-Strang wird erhitzt

und teilt sich somit in zwei Hälften auf. Danach wird ein Primer an einer Hälfte angebracht. Anschließend werden veränderte Basen, die Nukleotidtriphosphaten (NTPs) der Lösung hinzugefügt. Diesen NTPs fehlt eine OH-Gruppe am C-Atom. Dadurch bricht die Polymerase an diesen Stellen ab den DNS-Strang zu kopieren. Es entstehen kurze Bruchstücke der DNS, die mit Hilfe der Gelelektrophorese vermessen werden. Das Ganze wird für jede der vier Basen wiederholt. Damit kann man wiederum auf die Sequenz des Genoms rückschließen. Vorteil bei diesem Verfahren ist, dass es einfach automatisierbar ist. Die NTPs werden mit einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Sie leuchten dadurch in vier unterschiedlichen Farben und können so mit einem Detektor erkannt werden.

4.2.3 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung nutzt ebenfalls die Polymerase. Jedoch wird diese von einem Enzym, der Luziferase, beobachtet. Ausgehend von einem Primer erfolgt durch die Polymerase die komplementäre Ergänzung des DNS-Strangs. Sobald die Nukleotide verbunden werden, sendet die Luziferase einen Lichtblitz aus. Diese Lichtblitze werden beobachtet. Dieses Verfahren ist gut automatisierbar und findet heute z.B. Anwendung bei der Untersuchung von Erbkrankheiten.

Es gibt noch eine Reihe anderer Verfahren, wie die Sequenzierung durch Hybridisierung, die Shotgun-Sequenzierung und die Sequenzierung durch "Chromosomal walks". Alle haben sie gemeinsam, dass eine informationstechnische Anhäufung von TACGs die biologischen Auswirkungen nicht erklärt. Den Zusammenhang zwischen den TACGs und der Biologie übernimmt die DNS-Sequenzanalyse.

4.3 DNS-Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse gibt der Sequenzierung erst ihre Form. Bei der Sequenzierung fallen Daten in Form kleiner Bruchstücke der gesamten DNS an. Eines der Aufgabengebiete der Sequenzanalyse ist es, diese Bruchstücke korrekt zusammen zu setzen. (nach [Wikipedia 06])

Die Sequenzanalyse beantwortet auch Fragen wie: "Wieviel Jahre Evolution liegt zwischen Menschen und Mäusen?" Wenn man weiß, mit welcher durchschnittlichen Geschwindigkeit sich Gene sinnvoll verändern,

kann man durch die Anzahl der Unterschiede auf den benötigten Zeitraum schließen.

Eine weitere Aufgabe ist die Bestimmung von codierenden - (Exons) und nicht codierenden Genen (Introns). Exons haben, verglichen mit den Introns, unterschiedliche Muster in der Struktur. Somit kann man Introns erkennen und für weitere Betrachtungen vernachlässigen.

Ein weiteres Anwendungsgebiet der Sequenzanalyse ist das Vergleichen der zu analysierenden DNS mit ähnlicher, katalogisierter und gut erforschter DNS. Da sich die Sequenz nicht in jedem Basenpaar gleicht, sondern nur in vielen, sind spezielle Algorithmen notwendig um Datenbanken nach Ähnlichkeiten zu untersuchen.

4.3.1 BLAST-Algorithmus

Der BLAST-Algorithmus durchsucht eine Datenbank nach bestimmten Teilsequenzen. Die Suche kann nach exakt dem gleichen Muster erfolgen, oder nach gewissen Ähnlichkeiten. Bei den in den Datenbanken erfassten Gene ist die Auswirkung und die Funktionsweise meist besser erforscht. Durch Vergleich der Teilsequenzen lassen sich dadurch ähnliche Funktionsweisen erahnen.

4.4 Anwendungsgebiete im Alltag

Das wohl umstrittenste Anwendungsgebiet findet die Gentechnik in transgenem Mais. Das Erbgut dieser Maissorten ist mit einem Gen der Bakterie "Bacillus thuringiensis" erweitert worden (nach [Wikipedia 06]). Somit ist der Mais in der Lage ein Gift namens Bt-Toxin selbstständig herzustellen. Das Bt-Toxin ist ein übliches Schädlingsbekämpfungsmittel, welches vor allem gegen die Larven des Maiszünslers und des Maiswurzelbohrers wirkt (beides Insekten). In den Mägen von Wirbeltieren wird das Gift vollständig abgebaut. Durch die Implementierung der Giftproduktion in die Maispflanze erspart man sich die nachträgliche Behandlung durch Spritzmittel.

Vitamine, Süßstoffe, Geschmacksverstärker, usw. werden heutzutage biotechnologisch aus Mikroorganismen gewonnen (aus [BioLab 06]). Ascorbinsäure (Vitamin C) wird durch genetisch veränderte Bakterien hergestellt. Durch mehrere Modifikationen an der DNS dieses Bakteriums

stellt es die Ascorbinsäure aus Glucose her. Dies ist einfach und in großen Mengen durchzuführen, da im Großen und Ganzen nicht mehr als dieses Bakterium erforderlich ist. Vitamin C dient bei der Herstellung von Brotteig zur Erhöhung der Wasseraufnahme. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Haltbarkeit von Getränken. Die Ascorbinsäure verzögert auch das Braunwerden diverser Früchte.

In der Medizin wird die Gentechnik eingesetzt um Erbkrankheiten, sowie Erkrankungen wie HIV oder Hepatitis frühzeitig zu erkennen. Um dies bei Routineblutuntersuchungen effizient zu gestalten, werden 96 Proben (öfters durch 2 teilbar) zusammengefasst und mit der PCR-Methode analysiert. Ist eine der Proben positiv, wird die Probenanzahl halbiert und erneut geprüft, bis der Auslöser gefunden ist. Durch die genetische Suche nach viraler DNS kann das diagnostische Fenster (von der Infektion zur Diagnose) nahezu ausgeschlossen werden. Weiters findet die Gentechnologie Einsatz bei der Herstellung von Medikamenten. Der Blutbildner Erythropoietin, das Krebsmedikament Interferon, aber auch Insulin wird mittels der Hilfe von Gentechnik erzeugt.

Auch in der chemischen Industrie spielt der Einsatz von Gentechnik eine große Rolle. Ein gutes Beispiel ist die Waschmittelindustrie. Bis jetzt haben chemische Reinigungsmittel heiklen Abfall und dadurch große Entsorgungskosten verursacht. Durch die Anwendung von genetisch veränderten Enzymen im Waschmittel, wird die benötigte Menge deutlich reduziert. Es fällt weniger Müll an, der teuer zu entsorgen ist.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Was in Zukunft kommen wird, weiß niemand. Ein Traum der DNS-Sequenzanalyse ist sicherlich, das komplette Leben eines Organismus zu simulieren. Und das, wenn möglich als 3D-Objekt und Zeitraffer am Computer. Vielleicht werden sich, unsere Kinder, in Zukunft ihre Haustiere im Selbstbaukasten zusammenstoppeln. Zur Sicherheit sollten diese Geschöpfe nur mit bestimmter Nahrung überleben können. Die Lebenszeit ist natürlich eher kurz, damit die Verkaufszahlen erhöht werden.

Durch die Arbeiten zur Vererbungslehre von Mendel bis zur Polymerase-Kettenreaktion von Mallis liegt der Menschheit jetzt ein Werkzeug zur Verfügung, selbst Gott zu spielen.

Die Technologie zur Veränderung der Gene muss sehr aufmerksam und vorsichtig angewandt werden, da wir ansonst unserer Umwelt, ja sogar uns selbst schaden könnten.

Literaturverzeichnis

- [Mendel 01] Henig, Robin M.: "Der Mönch im Garten. Die Geschichte des Gregor Mendel und die Entdeckung der Genetik"; Argon, Berlin (2001), ISBN 3-87024-528-X
- [Darwin 04] Darwin, Charles und Neumann, Carl W.: "Die Entstehung der Arten. Geschichtlicher Überblick über die Entstehung der Arten"; Nikol, Hamburg (2004), ISBN 3-933203-82-1
- [Heberle-Bors 96] Heberle-Bors, Erwin: "Herausforderung Gentechnik"; Holzhausen, Wien (1996), ISBN 3-900518-14-9
- [Schrödinger 99] Schrödinger, Erwin: "Was ist Leben?"; Piper, München/Zürich (1999), ISBN 3-492-21134-8
- [Regenass-Klotz 04] Regenass-Klotz, Mechthild: "Grundzüge der Gentechnik"; Birkhäuser, Basel (2004), ISBN 3-7643-2421-X
- [Müller 01] Müller, Hans-Joachim: "PCR - Polymerase-Kettenreaktion"; Spektrum, Heidelberg/Berlin (2001), ISBN 3-8274-1058-4
- [BioLab 06] Das Land Baden-Württemberg: "BioLab on Tour"; 67-68
- [Mendel 06] <http://www.mendel-regeln.de/> (09.06.2006, Mendelsche Gesetze)
- [PNAS 06] <http://www.pnas.org/cgi/reprint/71/7/2593> (09.06.2006, Proceedings of the National Academy of Sciences)
- [NIH 06] <http://www4.od.nih.gov/oba/rac/guidelines/guidelines.html> (09.06.2006, National Institutes of Health)
- [NCBI 06] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map_search.cgi?taxid=9606 (09.06.2006, National Center for Biotechnology Information)
- [Roche 06a] <http://www.roche.de/diagnostics/biochemica/bluegenes/> (09.06.2006, Blue Genes)
- [Roche 06b] <http://www.roche-applied-science.com/sis/sequencing/genome/> (09.06.2006, Gnome Sequencer 20)
- [Wikipedia 06] <http://de.wikipedia.org/> (09.06.2006, Wikipedia), Stichworte: Nuklein, Chromosom, Erwin Chargaff, Frederick Sanger, DNS-Sequenzierung, DNS-Sequenzanalyse, Transgener Mais