

✓
Ernst-L. Winnacker
Ludwig

✓
Gene und Klone

Eine Einführung
in die Gentechnologie



Inhaltsverzeichnis

1	<i>Grundlagen der Gentechnologie</i>	1	2.3.2	Oligonukleotidsynthese	47
			2.3.3	Festphasenmethoden	52
2	<i>Isolierung, Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Fragmenten</i>	3	2.3.4	Phosphitriester-Methode	55
			2.3.5	Anwendungen der Oligonukleotidsynthese	58
2.1	Restriktionsendonukleasen	3		Literatur	59
2.1.1	Typ-I-Endonukleasen	4	2.4	Die Sequenzierung von DNA	61
2.1.2	Typ-II-Endonukleasen	5	2.4.1	Die Sequenzierung endmarkierter DNA durch basenspezifische chemische Spaltung	61
2.1.2.1	Erkennungssequenzen	6	2.4.1.1	Isolierung eines definierten DNA-Fragmentes	62
2.1.2.2	Reinigungs- und Testverfahren	9	2.4.1.2	Endmarkierung der DNA-Fragmente	63
2.1.2.3	Spezifitäten	14	2.4.1.3	Trennung der beiden markierten Enden eines DNA-Fragmentes	65
2.1.2.4	Modifizierung von DNA-Enden	17	2.4.1.4	Basenspezifische chemische Spaltungen	66
2.1.2.5	Physikalische Kartierungen	17	2.4.2	DNA-Sequenzierung durch enzymatische Synthese	69
2.1.3	Typ-III-Endonukleasen	21	2.4.2.1	Prinzip des Verfahrens	69
	Literatur	22	2.4.2.2	Wachstumszyklus der einzelsträngigen DNA-Phagen	73
2.2	Herstellung und Klonierung von cDNA	24	2.4.2.3	Filamentöse Phagen als Vektoren	76
2.2.1	Definition und Struktur	24	2.4.2.4	Filamentöse Phagen in der DNA-Sequenzierung	80
2.2.2	Isolierung, Identifizierung und Reinigung von mRNA	25	2.4.2.5	Plasmide in der DNA-Sequenzierung	81
2.2.3	Synthese von cDNA	30	2.4.2.6	DNA-Sequenzierung auf der Basis von Exonuklease-III-Verdauungen	82
2.2.3.1	Reaktionsbedingungen der „reversen Transkriptase“ und Synthese des ersten Stranges	30		Literatur	85
2.2.3.2	Synthese doppelsträngiger cDNA	33			
2.2.4	Klonierung von cDNA	34			
2.2.5	cDNA-Genbanken	36			
	Literatur	41			
2.3	Die chemische Synthese von DNA	44			
2.3.1	Herstellung der 5'- und N-geschützten 2'-Desoxyribonukleosid-Bausteine	46			

3	<i>Das Verknüpfen von DNA-Fragmenten</i>	87	4.2.2.5	In-vitro-Verpackung von Lambda-DNA	144
3.1	Verknüpfung durch DNA-Ligasen	87	4.2.3	Cosmide	146
3.1.1	Eigenschaften der DNA-Ligasen	87		Literatur	151
3.1.1.1	Gewinnung und Reaktionsmechanismus	87	5	<i>Klonieren in Hefen</i>	153
3.1.1.2	Substratspezifität	90	5.1	Der Lebenszyklus von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	153
3.1.1.3	Temperaturabhängigkeit	92	5.2	Genetik von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	155
3.1.1.4	Konzentrationsabhängigkeit	92	5.3	Identifizierung von Hefe-Genen	155
3.1.2	Strategien der Verknüpfung	94	5.4	Genetische Marker und Selektionssysteme	157
3.1.2.1	Die Rekonstitution von Schnittstellen	94	5.5	Vektoren	157
3.1.2.2	Linker-Technologie	96	5.5.1	Integrierende Vektoren	158
3.2	In-vivo-Verknüpfung	102	5.5.2	Replizierende Vektoren	161
	Literatur	106	5.5.3	Episomale Vektoren	162
4	<i>Vektoren in Escherichia coli</i>	109	5.6	Genexpression in Eukaryoten	165
4.1	Plasmide	110	5.6.1	Die eukaryotische Transkriptionseinheit	165
4.1.1	Eigenschaften der Plasmide	110	5.6.2	Signale für die Translation	166
4.1.2	Plasmide in der Gentechnologie	115	5.7	Expressionsvektoren in Hefe	168
4.1.3	Das Plasmid pBR322 und seine Derivate	115		Literatur	172
4.1.3.1	Das β -Lactamase-Gen in pBR322	121	6	<i>Klonieren in Gram-positiven Bakterien</i>	175
4.1.3.2	Die Tetracyclinresistenz-Gene	122	6.1	Transformationsverfahren	176
4.1.4	Plasmide mit breiter Wirtsspezifität	122	6.2	Plasmide und Vektoren	179
4.1.5	Transformationsmethoden	125	6.3	Expressionsvektoren	181
	Literatur	126	6.3.1	Transkriptionsmechanismen in <i>Bacillus subtilis</i>	182
4.2	Der Bakteriophage Lambda als Klonierungsvehikel	128	6.3.2	Translationsvorgänge	183
4.2.1	Molekulare Biologie des Lambda-Genoms	129	6.3.3	Transportphänomene	184
4.2.2	Lambda-Vektoren	134	6.3.4	Induzierbare Promotoren	185
4.2.2.1	Generelle Struktur von Lambda-Vektoren	134		Literatur	187
4.2.2.2	Grundlagen der Vektor-Konstruktionen	136	7	<i>Expressionsvektoren in Prokaryoten</i>	191
4.2.2.3	Struktur ausgewählter Vektoren	138	7.1	Bakterielle Promotoren	191
4.2.2.4	Selektionsverfahren	141			

7.1.1	Der lac-Promotor	194	8.1.3	Adenin-Phosphoribosyl-Transferase (APRT)	266
7.1.2	Der trp-Promotor	199	8.1.4	Dihydrofolat-Reduktase (DHFR)	267
7.1.3	Der Lambda-P _L -Promotor	205	8.1.5	Bakterielle Antibiotikaresistenz-Gene	268
7.1.4	Hybride Promotoren	213	8.2	Das Affenvirus 40 (SV40)	270
7.2	Ribosomale Bindungsstellen	217	8.2.1	Struktur der DNA	270
7.3	Codonauswahl	224	8.2.2	Der lytische Vermehrungszyklus von SV40	272
7.4	Konstruktion von Expressionsvektoren	227	8.2.2.1	„Frühe“ mRNA-Synthese	272
7.4.1	Die Synthese von Fusionsproteinen	228	8.2.2.2	„Späte“ mRNA-Synthese	274
7.4.1.1	Expression von Ratteninsulin	228	8.3	SV40-Vektoren	276
7.4.1.2	Expression des Rattenwachstumshormons und des Strukturproteins VP1 des Virus der Maul- und Klauenseuche	228	8.3.1	Vektoren des lytischen Zyklus	276
7.4.1.3	Expression des menschlichen Wachstumshormons	229	8.3.1.1	Deletionen der „späten“ Region	277
7.4.1.4	Expression von Somatostatin	232	8.3.1.2	Deletionen der „frühen“ Region	277
7.4.1.5	Konstruktion eines Expressionsplamids für Influenza-Virus spezifische Sequenzen	236	8.3.1.3	Expressionsvektoren	279
7.4.1.6	Allgemeines Verfahren zur Konstruktion von Expressionsvektoren für Fusionsproteine	237	8.3.2	Plasmid-Vektoren	285
7.4.2	Die Synthese einheitlicher Proteine in Bakterien	241	8.3.3	Anwendungen von SV40-Vektoren	291
7.4.2.1	Das lac-System	241	8.4	Stimulierende und hemmende DNA-Sequenzen	297
7.4.2.2	Das trp-System	247	8.5	Transfektionstechniken für virale DNA	300
7.4.2.3	Synthetische ribosomale Bindungsstellen	250	8.6	Papillom-Viren als Vektoren	303
7.5	Reifung, Transport und Stabilität eukaryotischer Proteine in Bakterien	254	8.7	Retroviren als Vektoren	304
7.6	Schlußfolgerungen	257		Literatur	308
	Literatur	258	9	<i>Genbanken</i>	313
8	<i>Eukaryotische Vektoren</i>	261	9.1	Isolierung genomischer DNA-Fragmente	313
8.1	Genetische Marker für die Selektion eukaryotischer Zellen	261	9.2	Vektoren	315
8.1.1	Thymidin-Kinase (TK)	261	9.3	Verknüpfungsmethoden	315
8.1.2	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT)	264	9.4	Selektionsverfahren	317
			9.4.1	Selektion für rekombinante DNA-Moleküle	317
			9.4.2	Bestimmung der Komplexität der insertierten DNA	318
			9.4.3	„Screening“ durch Nukleinsäurehybridisierung	318

9.4.4	Direkter Nachweis des gesuchten Phänotyps	319	12	<i>Gezielte Mutagenese</i>	359
9.4.5	Selektion durch genetische Rekombination	320	12.1	Deletionen	360
	Literatur	323	12.2	Insertionen	364
10	<i>Klonieren in Pflanzen</i>	325	12.3	Punktmutationen in lokalisierten Bereichen	366
10.1	Fusion somatischer Zellen	326	12.3.1	Bisulfit-Mutagenese	366
10.2	DNA-Übertragungen	327	12.3.2	Einbau von Nukleotid-Analoga	370
10.2.1	Die Ti-Plasmide der Agrobakterien	327	12.4	Gezielte Mutationen über synthetische Oligonukleotide	373
10.2.1.1	Das Prinzip der genetischen Kolonisierung	327	12.4.1	Die Länge des Primers	374
10.2.1.2	Struktur und Funktion der T-DNA	329	12.4.2	Mutationsfrequenzen	375
10.2.1.3	Ti-Plasmide als Vektoren	331	12.4.3	Selektionsverfahren	377
10.2.2	DNA-Viren als Vektoren	333	12.4.4	Anwendungen	380
10.2.2.1	Caulimoviren	333		Literatur	381
10.2.2.2	Gemini-Viren	334	13	<i>Sicherheitsaspekte</i>	385
	Literatur	334	13.1	Das Klonieren in Mikroorganismen	385
11	<i>Identifizierung rekombinanter DNA</i>	337	13.2	Gentherapie	389
11.1	Direkte Methoden	337	13.3	Klonierung von Organismen	391
11.1.1	Selektion durch Komplementation oder Suppression	337		Literatur	394
11.1.2	Marker-Inaktivierung	338		<i>Appendix</i>	
11.2	Indirekte Methoden	342	A:	DNA-Sequenz des Plasmids pBR322	397
11.2.1	Restriktionsmuster	342	B:	DNA-Sequenz des Affenvirus SV40	399
11.2.2	Hybridisierungsverfahren	342	C:	Glossar der Gentechnologie	402
11.2.2.1	Kolonie- oder Plaque-Hybridisierung	342	D:	Wichtige Lambda-Gene	407
11.2.2.2	Blotting-Verfahren	346	E:	Eigenschaften häufig verwendeter E.coli-Stämme	410
11.2.3	Nachweis spezifischer Proteine	350	F:	Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in-vitro neukombinierte Nukleinsäuren	413
11.2.3.1	In-vitro-Translationsverfahren	350		<i>Register</i>	431
11.2.3.2	Immunologische Verfahren	353			
11.2.3.3	Proteinsynthese in Minizellen	355			
11.2.3.4	Exon-Klonierung	355			
	Literatur	357			