

NUKLEINSÄUREN UND GENTECHNOLOGIE

Beispiele für Stoffinhalte aus der Chemie als Grundlage für das Verständnis dieses Teiles: nicht-kovalente chemische Bindungen, Koordinationsbindungen, funktionelle Gruppen und deren Reaktivität (z. B. Diesterbindungen und Spaltung, Mechanismus der nukleophilen Substitution).

Schlüsselwörter:

Ribonukleotid-Reduktase, Bedeutung der Desoxyribose für DNA-Stabilität und ihre Synthese durch Ribonukleotid-Reduktase, Thymidylatsynthase und Dihydrofolat-reduktase.

DNA: Basenpaarung, Strukturen der DNA wie DNA-Doppelhelix (A-, B- und Z-Formen) und Superhelix (supercoil), Topoisomerasen, Gyrasehemmer als Antibiotika, Replikation, DNA-Polymerasen (Anzahl und Funktionen), DNA-Schäden und Mechanismen der DNA-Reparatur, Telomerase, Wirkprinzip antiviraler Medikamente, Aufbau der Nukleosomen, Histonmodifikationen, Epigenetik.

RNA: Aufbau und Arten der RNA (hnRNA, snRNA, mRNA, tRNA, rRNA), CAP-Struktur, Polyadenylierung, RNA-Polymerasen, Promotoren (Struktur und Funktion), Transkription und Transkriptionsfaktoren, Antibiotika und Gifte (Knollenblätterpilz), Spleißen (Spleißstellen, Spleißosomen, Transesterifizierung, alternatives Spleißen, Ribozyme und Selbstspleißen), Editing.

Von RNA zum Protein: Kontrolle der Genexpression in Eubakterien und Eukaryonten, Aminosäureaktivierung, Translation (ribosomale Proteinbiosynthese), Antibiotika und Gifte (Rizin), genetischer Kode und seine Entschlüsselung.

Biotechnologische Aspekte: Endo- und Exonukleasen (u. a. Restriktionsendonukleasen), Southern- und Northern- (auch Western) blotting, DNA-Sequenzierung, Polymerasekettenreaktion (PCR), Plasmidvektoren, ortsspezifische Mutagenese, rekombinante Proteinexpression und Fusionsproteine, Diagnostik mit DNA-Chip, Gentherapie.

Literatur:

relevante Abschnitte der empfohlenen Lehrbücher in der jeweils aktuellsten Auflage: LEHNINGER/NELSON/COX „Biochemie“; STRYER „Biochemie“, KNIPPERS „Molekulare Genetik“.

A. Allgemeiner Teil

Der Inhalt des Übungsseminars soll einen Einblick in die grundlegenden Methoden der Molekularbiologie vermitteln. Zu diesem Zweck wird zunächst genomische DNA aus Hühnerleber isoliert (Versuch 1.1.). Ihre Konzentration wird photometrisch gemessen (Versuch 1.2.) und die Qualität mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Versuch 2.3.). Mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) wird dann ein Abschnitt des *gapdh*- (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) Gens vervielfältigt (Versuch 2.1.). Anschließend wird durch Agarose-Gelelektrophorese (Versuch 2.3.) kontrolliert, ob das erhaltene Produkt die erwartete Länge besitzt. Ist dies der Fall, so kann es kloniert werden (Prozessübersicht in Abb. 1). Die Klonierung beinhaltet insbesondere die Integration in einen Plasmidvektor und Vermehrung in *E. coli*. Plasmide sind zirkuläre, extrachromosomale DNA-Moleküle, die sich in der Zelle unabhängig vom Wirtsgenom vermehren. Die zur Aufnahme des DNA-Fragmentes verwendeten Plasmidvektoren leiten sich von natürlich vorkommenden Plasmiden ab. Für den gentechnologischen Einsatz wurden optimierte Plasmidvektoren entwickelt. Sie sind auf die Vermehrung von DNA, effektive Transkription und Selektion aufgrund von Antibiotikaresistenz reduziert. Ihre geringe Größe ermöglicht eine hohe Transformationsrate und Kopienzahl in der Zelle. Sie verfügen ferner über das für die Selektion notwendige Antibiotika-Resistenzgen sowie über einen Replikationsursprung (*origin of replication, ori*) zur Vermehrung des Plasmidvektors.

Um Fremd-DNA integrieren zu können, besitzen Vektoren einen künstlich eingefügten DNA-Abschnitt (*multiple cloning site, MCS*) mit mehreren Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen (siehe Abb. 4). Sie schneiden den Plasmidvektor ausschließlich an dieser Stelle. Das DNA-Fragment wird dann mithilfe der T4 DNA-Ligase in Gegenwart von Mg^{2+} und ATP in den Vektor eingefügt (Ligation). Der daran anschließende Transformationsschritt ermöglicht die direkte Aufnahme ringförmig geschlossener Plasmidvektoren und somit ihre stabile Weitergabe in den Bakterien. Im durchgeführten Versuch wird der Vektor pETBlue-1 (Fa. Novagen, Darmstadt, siehe Abb. 3), welcher über ein Ampicillin-Resistenzgen (*Amp^r*) verfügt, verwendet. Bakterien, die diesen Plasmidvektor aufgenommen haben, produzieren das Enzym β -Lactamase, welches den β -Lactamring von Ampicillin spaltet. Somit ist das Wachstum von Bakterien in Nährmedien (z. B.

Agarplatten) mit Ampicillin möglich (Selektion). Auf Agarplatten wachsen daher nur Bakterien-Kolonien, die das Plasmid enthalten. Jede dieser Kolonien stellt einen Klon dar, d.h. die Bakterien dieser Kolonie enthalten identische genetische Information. Um zu überprüfen, ob die Klone das Konstrukt aus Plasmidvektor und *gapdh*-Gen oder lediglich den religierten¹ Vektor aufgenommen haben, wird im Anschluss die gereinigte Plasmidvektor-DNA mit Restriktionsendonukleasen (Versuch 2.2.) gespalten und mittels Gelelektrophorese analysiert.

Die im Übungsseminar erarbeiteten gentechnologischen Methoden werden routinemäßig in der molekularen Medizin (z. B. in der molekularen Diagnostik viraler Erkrankungen, *single-nucleotide polymorphism* oder *SNP*, Detektion von Mutationen), in der pharmazeutischen Biotechnologie (z. B. gentechnisch hergestellte Proteine als Arzneistoffe), bei Vaterschaftstests und in der Forensik (z. B. genetischer Fingerabdruck in der Kriminalistik) angewendet.

¹ im Rahmen des Ligationsschritts kann es auch zum Ringschluß linearisierter Plasmidvektor-Moleküle kommen, ohne dass Fremd-DNA integriert wurde.

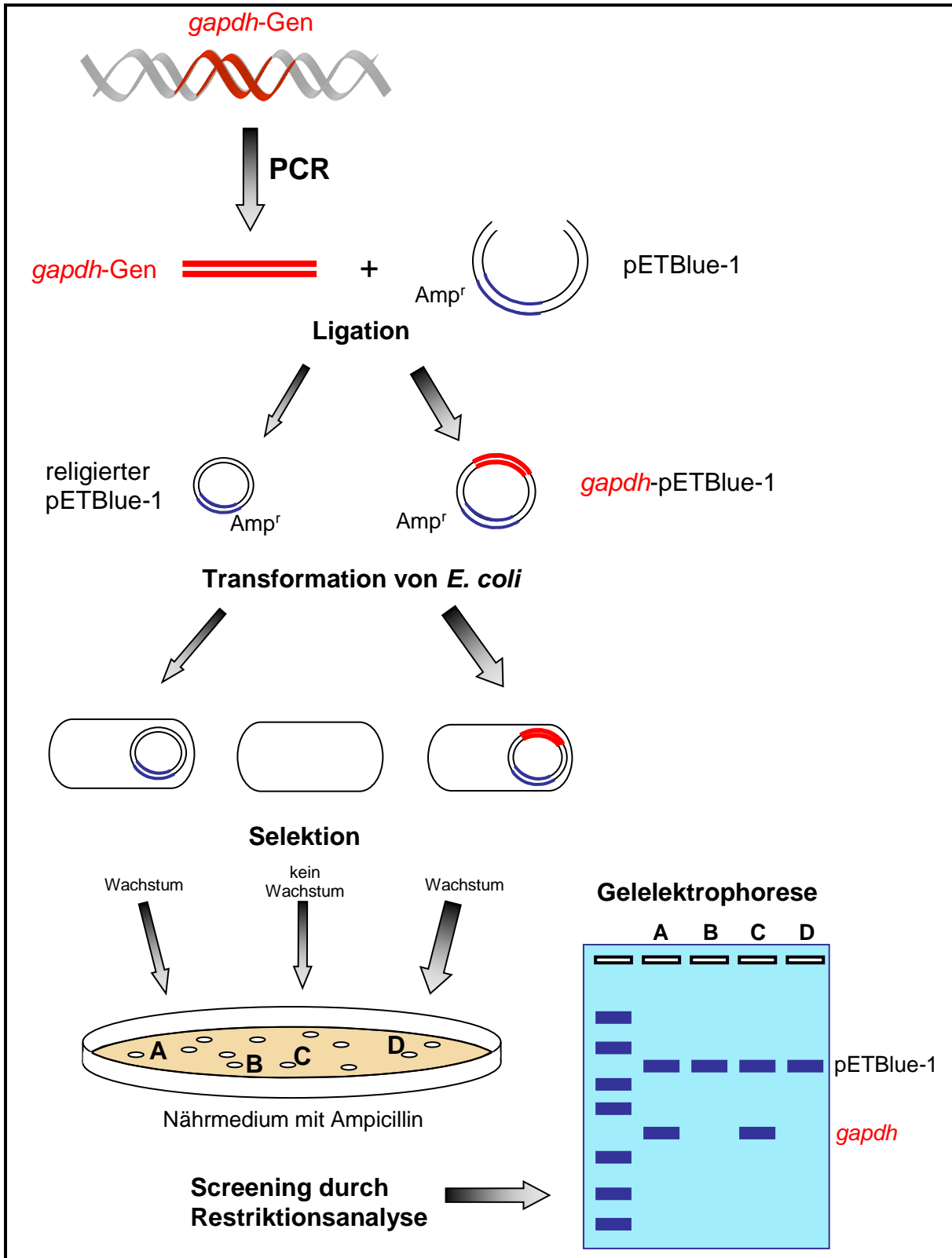


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Klonierungsvorgangs. Amplifikation eines Abschnitts des *gapdh*-Gens mittels PCR, Ligation des DNA-Fragments in einen Vektor (pETBlue-1), Transformation des Vektors mit eingebautem *gapdh*-Genabschnitt in *E. coli*, Selektion auf Platten mit Ampicillin und anschließendes Screening durch Restriktionsanalyse.

B. Experimenteller Teil

1. Isolierung von Nukleinsäuren

1.1. Präparation genomischer DNA aus Hühnerleber

Prinzip:

Um genomische DNA aus einer Gewebeprobe zu isolieren, muss das Gewebe zuerst schonend homogenisiert werden. Anschließend werden die Zellen aufgebrochen und die Zellkerne freigesetzt. Hohe Temperatur (65 °C) und der Einsatz des Detergens Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecylsulfate*, SDS) lysieren die Zellkerne und denaturieren Proteine. Die Protein-SDS-Komplexe werden mit Kaliumazetat gefällt und abzentrifugiert. Die in Lösung verbliebene DNA wird mit Alkohol präzipitiert und in einem Niedrigsalzpuffer (TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA², pH 8,0) wieder gelöst. Das im Puffer enthaltene EDTA komplexiert zweiwertige Metall-Ionen, wie z. B. Mg²⁺. Da DNasen (DNA-abbauende Enzyme) zweiwertige Ionen als Kofaktoren benötigen, werden unerwünschte Enzymaktivitäten durch EDTA gehemmt.

Durchführung:

Hinweis! Da hochmolekulare DNA sehr anfällig für Fragmentierung durch Scherkräfte ist, wird im nachfolgenden Experiment das Mischen der Probe sehr vorsichtig durchgeführt.

- 100 mg Hühnerleber in 500 µl eiskaltem Homogenisierungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100, 350 mM Saccharose) mit Hilfe eines Gewebehomogenisators nach Potter-Elvehjem auf Eis zerreiben.
- weitere 500 µl des Homogenisierungspuffers hinzufügen. Die Probe in ein Reaktionsgefäß überführen.
- die Suspension 5 min bei ca. 2000 x g zentrifugieren, den Überstand verwerfen, das Sediment erneut in 2 x 500 µl des Homogenisierungspuffers resuspendieren und wiederum 5 min bei ca. 2000 x g zentrifugieren.

² Ethylendiamintetraazetat ist ein Komplexbildner.

- die abzentrifugierten Zellkerne in 1 ml hypotonischer Lösung (75 mM NaCl, 24 mM EDTA, pH 8,0) wieder aufnehmen und 5 min bei 65 °C im Wasserbad inkubieren.
- schrittweise Zugabe von 100 µl einer 0,5 molaren EDTA-, 20 µl einer 2 molaren Tris- und 50 µl einer 10%igen SDS-Lösung.
- den Ansatz 5 min bei 65 °C inkubieren, dann das Reaktionsgefäß auf Eis stellen, mit 250 µl einer Kaliumazetatlösung (5 mol/L) versetzen, kurz mischen und 5 min auf Eis inkubieren.
- den weißen Niederschlag 5 min bei 10000 x g abzentrifugieren und danach 500 µl des DNA-haltigen Überstandes mit 1 ml kaltem 96%igen Ethanol mischen. Das Reaktionsgefäß mehrmals invertieren, bis ein „DNA-Faden“ sichtbar wird.
- die DNA 5 min bei 10000 x g abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Zugabe von 1 ml 70%igen Ethanol, erneut zentrifugieren, Überstand verwerfen, das Zentrifugat an der Luft trocknen lassen und dann in 200 µl TE-Puffer lösen.

Die erhaltene DNA-Menge wird photometrisch (Versuch 1.2.) bestimmt und die Qualität der Präparation im Agarosegel (Versuch 2.3.) überprüft.

1.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Prinzip:

Der Konzentrationsbestimmung von DNA liegen die Absorptionsmaxima der aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen bei einer Wellenlänge von 260 nm zugrunde. Eine Lösung, die 50 ng doppelsträngige DNA pro µl enthält, hat einen Absorptionswert von 1,0. Die Konzentration einer DNA-Lösung kann mit Hilfe des gemessenen Absorptionswertes berechnet werden. Das Absorptionsmaximum für Proteine (bedingt durch die Absorption aromatischer Seitenketten von Aminosäuren) hingegen liegt bei einer Wellenlänge von 280 nm. Als Parameter für die Reinheit der Nukleinsäurepräparation gilt das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und bei 280 nm. Bei DNA wird ein Wert von 1,8 als Richtwert angesehen. Dieser Wert wird deutlich kleiner, wenn die Nukleinsäurelösung mit Proteinen kontaminiert ist.

Durchführung:

- 100 µl der DNA-Lösung werden zu 900 µl H₂O dest. pipettiert (1:10-Verdünnung) und in eine UV-Küvette überführt.
- Lösungsmittelabgleich mit 1000 µl H₂O dest.
- Messung der Absorption bei 260 nm und 280 nm.

Die DNA-Konzentration (1) und die Reinheit (2) der DNA-Lösung werden wie folgt berechnet:

$$(1) \quad c_{\text{DNA}} \text{ [ng/}\mu\text{l]} = A_{260\text{nm}} * 50 \text{ [ng/}\mu\text{l]} * 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

$$(2) \quad \text{Berechnung von } A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$$

2. Gentechnologie

2.1. Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Fragments: Polymerasekettenreaktion

Prinzip:

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann ein frei gewählter DNA-Abschnitt *in vitro* vervielfältigt werden. Voraussetzung hierfür ist, dass gen-spezifische Oligonukleotide aus 20-30 Nukleotiden, auch Primer genannt, zur Verfügung stehen. Damit diese an DNA binden können, muss die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge getrennt werden. Eine Temperaturerhöhung des Ansatzes auf 95 °C führt zur gewünschten Auftrennung einer doppelsträngigen DNA in ihre Einzelstränge. Befinden sich in einem solchen PCR-Ansatz zwei Primer (häufig als *forward* Primer und *reverse* Primer bezeichnet), so werden diese von einer Polymerase am freien 3'-OH Ende durch den Einbau der im Ansatz vorhandenen Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) verlängert. Mit jedem Zyklus von Neusynthese und Denaturierung erhält man eine Verdopplung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts. Die PCR führt also zu einer exponentiellen Vervielfältigung, da auch die jeweils gebildeten Strangstücke wiederum als Matrize zur Verfügung stehen. Verwendet man eine thermostabile DNA-Polymerase (aus Bakterien isoliert, die in

heißen Quellen leben), dann ist es möglich, die Reaktion ohne Unterbrechung als Kette oder Zyklus laufen zu lassen.

Ein Zyklus der PCR (siehe Abb. 2) gliedert sich in drei Schritte:

1. Hitzedenaturierung der DNA: Um die DNA vollständig in Einzelstränge zu zerlegen, wählt man hier eine Zeit von 2-5 min und eine Temperatur von 95 °C.
2. Anlagerung („Annealing“) der Primer: Der Reaktionsansatz muss dazu auf eine Temperatur abgesenkt werden, bei der sich stabile Doppelstrangbereiche zwischen Primer und DNA bilden (in der Regel zwischen 45-65 °C).
3. Verlängerung („Elongation“) der angelagerten Primer durch DNA-Neusynthese: Die Temperatur wird hierfür auf 72 °C erhöht. Bei dieser Temperatur ist die in der PCR verwendete *Taq*-DNA-Polymerase optimal aktiv und gewährleistet die schnelle Verlängerung der Primer.

Im folgenden Versuch soll ein Abschnitt des *gapdh*-Gens mittels PCR vervielfältigt und die Größe des entstandenen DNA-Fragments (1163 Basenpaare) durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden. *gapdh* kodiert für das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, das in der Glykolyse die Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat in 1,3-Biphosphoglycerat katalysiert (siehe Kurs Kohlenhydrate im Wintersemester).

Durchführung:

PCR-Ansatz

18,0 µl H₂O
2,5 µl 10 x PCR Puffer
1,0 µl 10 mM dNTPs
1,0 µl 10 µM *forward* Primer
1,0 µl 10 µM *reverse* Primer
1,0 µl DNA-Matrize
0,5 µl Perfect Taq-Polymerase

25 µl

PCR-Programm

94 °C 3 min
94 °C 30 sec }
51 °C 30 sec } 30 Zyklen
72 °C 90 sec }
72 °C 10 min
4 °C ∞

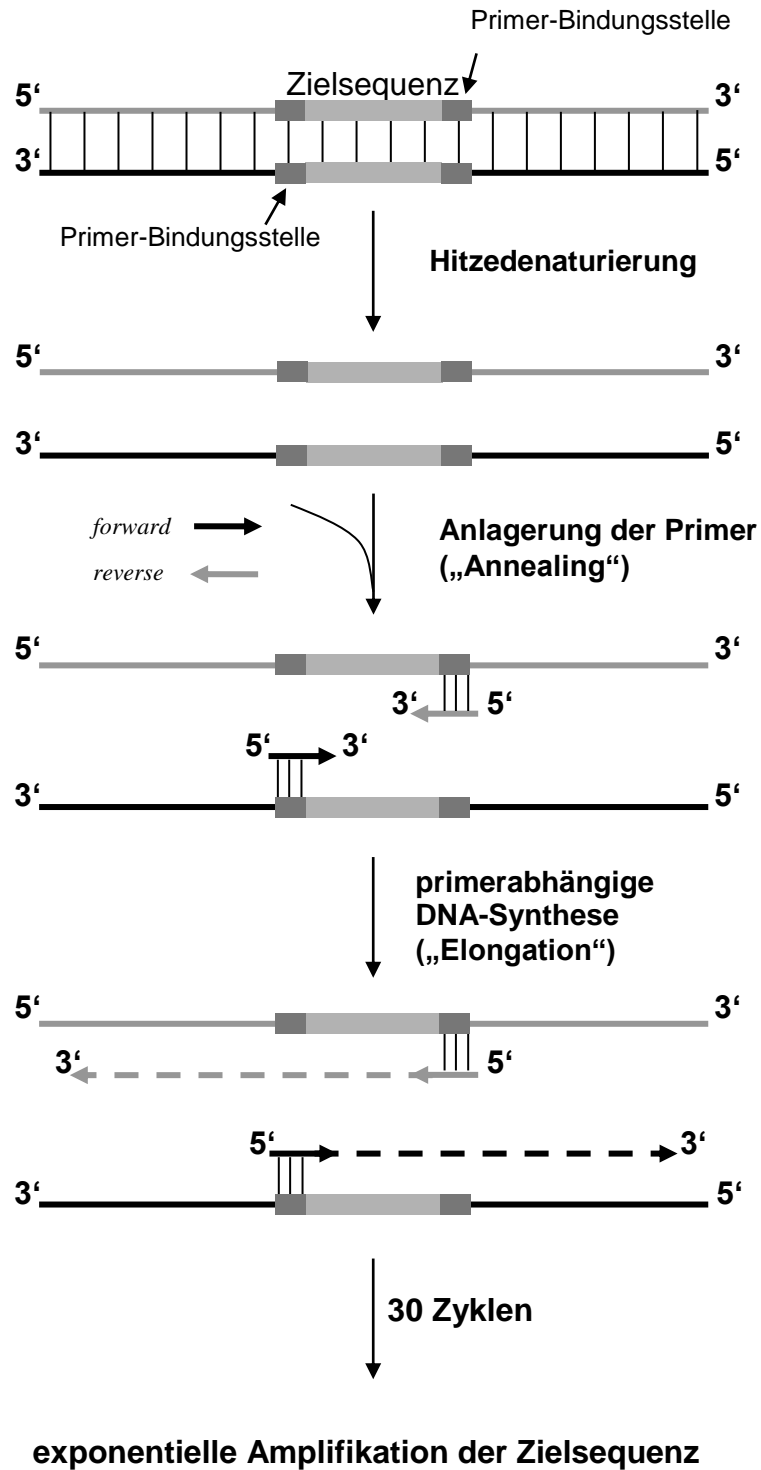


Abb. 2: Schematische Darstellung des ersten Zyklus einer Polymerasekettenreaktion (PCR).

Im Anschluss wird das erhaltene PCR-Produkt (Fragment des *gapdh*-Gens) in den Plasmidvektor pETBlue-1 (Abb. 3) ligiert und in *E. coli* vermehrt. Aus Übernachtskulturen von *E. coli*-Kolonien isolierte Plasmidvektor-DNA wird dann für die weiteren Experimente eingesetzt.

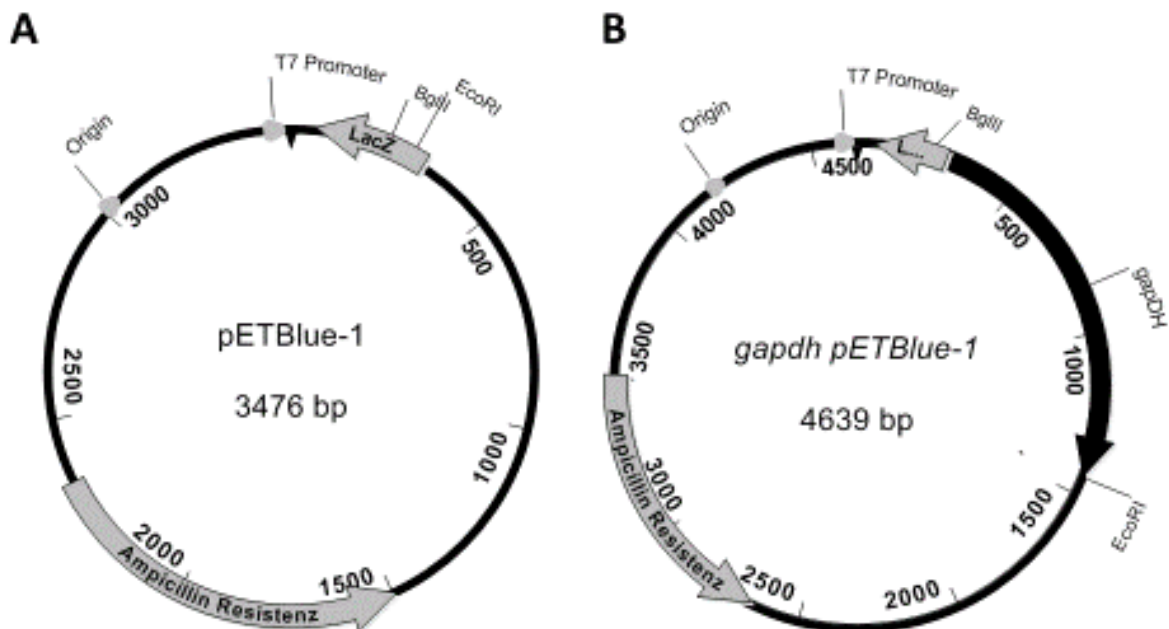


Abb. 3: Plasmidkarten. Dargestellt ist der Ausgangsvektor pETBlue-1 (a) und *gapdh*-pETBlue-1 nach erfolgreicher Integration des *gapdh*-Gens (b).

2.2. Restriktionsanalyse

Prinzip:

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen kann DNA an spezifischen Erkennungssequenzen gespalten werden. Wird die Erkennungssequenz symmetrisch gespalten, so entstehen Fragmente mit glatten Enden („blunt ends“), erfolgt die Spaltung hingegen versetzt, so werden Fragmente mit überhängenden Enden („sticky ends“) erzeugt (siehe Abb. 4). Die entstandenen definierten Spaltprodukte können im Anschluss durch Gelelektrophorese (siehe Abb. 5) voneinander getrennt werden.

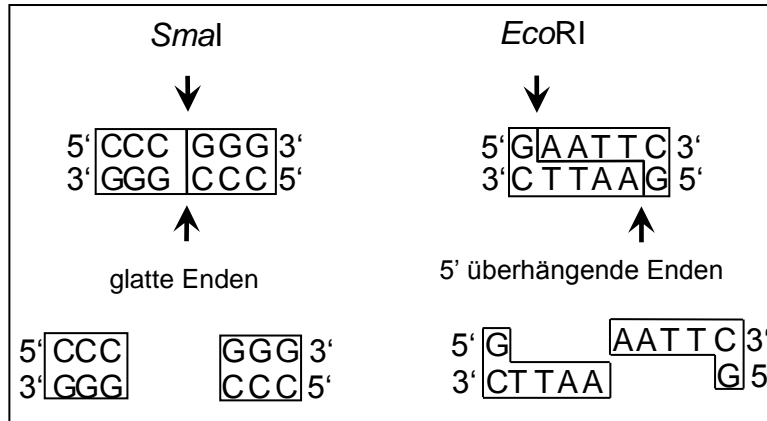


Abb. 4: Gezielte Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen. Die Erkennungssequenzen (jeweils sechs Basenpaare) stellen in diesen beiden Fällen sog. Palindrome (eine Zeichenkette, die von vorn und von hinten gelesen gleich bleibt) dar.

Im folgenden Versuch soll zur Kontrolle einer erfolgreichen Klonierung *gapdh*-pETBlue-1 mit Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Im ersten Ansatz (1) wird das Plasmid durch die Restriktionsendonuklease *EcoRI* einmal geschnitten (linearisiert). Um die erfolgreiche Aufnahme und Größe des *gapdh*-Gens zu kontrollieren, wird in einem zweiten Ansatz (2) *gapdh*-pETBlue-1 zusätzlich mit der Restriktionsendonuklease *BglII* gespalten.

Durchführung:

Die beiden Restriktionsansätze werden in der angegebenen Reihenfolge zusammen pipettiert, kurz abzentrifugiert und anschließend etwa 2 h bei 37 °C inkubiert.

gapdh-pETBlue-1 *EcoRI* (1)

7,0 µl H₂O
 + 1,0 µl Puffer O
 + 1,5 µl Plasmid-DNA
 + 0,5 µl *EcoRI*

10 µl

gapdh-pETBlue-1: *BglII* + *EcoRI* (2)

5,0 µl H₂O
 + 1,0 µl Puffer O
 + 3,0 µl Plasmid-DNA
 + 0,5 µl *BglII*
 + 0,5 µl *EcoRI*

10 µl

2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Prinzip:

Die Elektrophorese ist ein biochemisches Trennverfahren, das die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld ausnutzt (siehe Kurs Aminosäuren und Proteine). Zur Auftrennung von DNA (genomische DNA, Plasmid-DNA, PCR-Produkte etc.) werden routinemäßig Agarosegele verwendet. Sie erlauben eine Trennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 70 bp (Basenpaare) bis 50 kb (Kilobasenpaare). Agarosegele wirken aufgrund ihrer Porenstruktur wie Molekularsiebe. Die Wanderung von Makromolekülen durch Molekularsiebe ist abhängig von der Größe der zu trennenden Moleküle. Nukleinsäuren sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats (negativ geladenes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe) bei einem physiologischen pH-Wert negativ geladen. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt von der Länge der Nukleinsäuren und ihrer Konformation ab. Lineare DNA-Fragmente wandern in der Elektrophorese zur Anode, und zwar umso langsamer, je länger sie sind. Zirkuläre DNA-Moleküle hingegen weisen im Vergleich zu linearen zwei Formen auf: die schneller wandernde Form ist verdrillt (superspiralisiert), während die ringförmig geschlossene DNA-Doppelhelix ohne solche Verdrillung (relaxiert) eine relativ kürzere Wanderungsstrecke im Agarosegel zurücklegt (vgl. Wanderungsverhalten von Molekülen in der Gelfiltration, siehe Chemiekurs: Verteilung und Adsorption). Um die Größe der aufgetragenen DNA-Proben zu bestimmen, wird ein DNA-Marker mit genau definierten Fragmentlängen zusammen mit den zu untersuchenden Proben aufgetragen. Die Anfärbung der DNA erfolgt mit Methylblau. Dieser Farbstoff bindet durch ionische Wechselwirkungen an Nukleinsäuren.

Durchführung:

- 0,5 g Agarose zu 50 ml TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 1 mM EDTA pH 8,0) geben.
- Gemisch in der Mikrowelle solange erhitzen, bis eine klare Lösung vorliegt.

- Agaroselösung auf ca. 50 °C abkühlen lassen, in den vorbereiteten Gelträger gießen und einen achtzähligen Kamm einsetzen.
- Füllen der Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer.

Probenvorbereitung:

	DNA-Marker	genom. DNA	PCR	Plasmid	Restriktionsansatz (1)	Restriktionsansatz (2)
H ₂ O	7,5 µl	-	-	7,0 µl	-	-
Puffer	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl	2,0 µl
Probe	2,5 µl	10,0 µl	10,0 µl	3,0 µl	10,0 µl	10,0 µl

- nach ca. 30 min das erstarrte Gel mit dem Träger unter Beachtung der Polung in die Elektrophoresekammer einsetzen.
- Pipettieren der Proben in die durch den eingesetzten Kamm geformten Geltaschen.
- die Elektrophorese erfolgt bei 100 V (ca. 40 min).
- die Färbung erfolgt mit 100 ml 0,025% Methylenblaulösung (ca. 20 min).
- Entfärben mit Wasser (mehrmals wechseln).

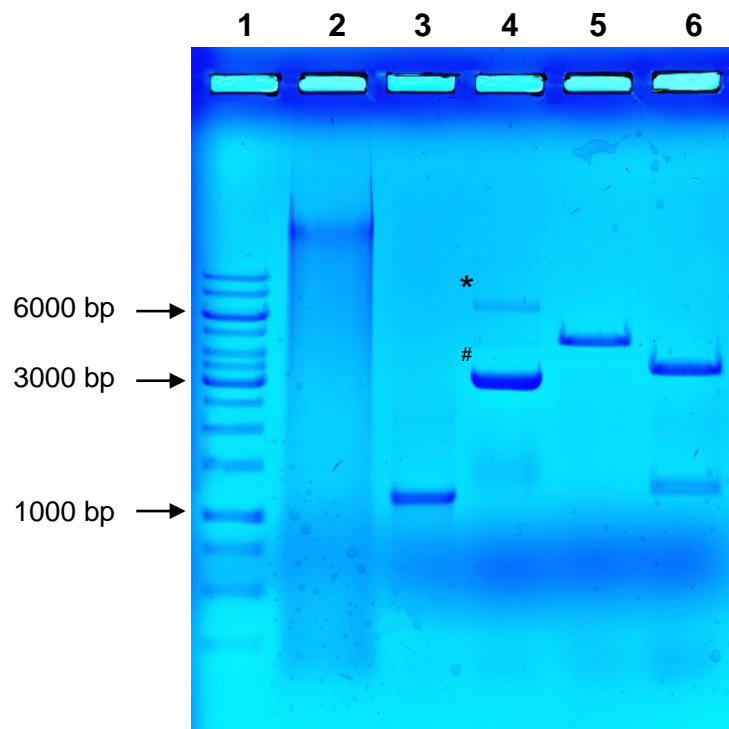


Abb. 5: Mit Methylenblau gefärbtes 1%iges Agarosegel. Die Abbildung zeigt einen DNA-Marker (1), isolierte genomische DNA (2), das mittels PCR amplifizierte *gapdh*-Genfragment (3), Plasmid-DNA (4), und das mittels *EcoRI* (5) und *BglII/EcoRI* (6) linearisierte *gapdh*-pETBlue-1 Plasmid. Im Gegensatz zu linearer DNA finden sich bei der Gelanalyse von ringförmig geschlossener Plasmid-DNA (4) zwei Banden, welche der relaxierten (*) und der superspiralisierten (#) Form entsprechen. Die Auftrennung des Ansatzes, der das mithilfe von *BglII* und *EcoRI* gespaltene *gapdh*-pETBlue-1 Plasmid enthält (6), erlaubt die Überprüfung der Größe des eingebrachten *gapdh*-Genfragments.