

# Gentechnologie und Veterinärmedizin

Autor(en): **Hübscher, Ulrich**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires**

Band (Jahr): **129 (1987)**

PDF erstellt am: **21.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-593200>

## **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

## **Haftungsausschluss**

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

## Gentechnologie und Veterinärmedizin

### I. Generelles Prinzip und praktische Anwendungsbeispiele

Ulrich Hübscher<sup>1</sup>

#### Einführung

Die Gentechnologie wurde in dieser Zeitschrift vor fünf Jahren prinzipiell [1], im Zusammenhang mit der Grundlagenforschung [2] und in bezug auf Anwendungsmöglichkeiten für die praktische Veterinärmedizin und die Agrarwirtschaft [3] vorgestellt. Die letzte halbe Dekade hat uns eine Flut neuer gentechnologischer Techniken gebracht. Im weitem wird sich auch die Öffentlichkeit schon bald im Rahmen einer Initiative (sogenannte «Beobachter-Initiative») der Diskussion über Gentechnologie annehmen.

Was hat nun aber die Gentechnologie in praktischer Hinsicht für die Veterinärmedizin gebracht? Es soll versucht werden, einige ausgewählte Gebiete – vom potentiell praktischen Standpunkt aus – etwas auszuleuchten. In einem ersten Artikel wird nochmals in geraffter Form auf das generelle Prinzip der Gentechnologie sowie auf praktische Anwendungsmöglichkeiten eingegangen. Ein zweiter Artikel soll Vor- und Nachteile gentechnologisch hergestellter Vakzinen aufzeigen und geht auf die Möglichkeit der Analyse variabler DNA-Abschnitte von Nutz- und Haustieren näher ein. Der dritte Teil wird schliesslich den transgenen Tieren gewidmet sein.

#### Biologische Voraussetzungen für die Gentechnologie

Der Begriff der Gentechnologie versteht sich als Methodik zur Testglaskombination des genetischen Materials (der Desoxyribonukleinsäuren, abgekürzt DNA), zur Wiedereinführung der Rekombinanten DNA in Bakterien (Prokaryoten) oder kernhaltige Zellen (Eukaryoten) und zur Vermehrung der rekombinierten DNA-Moleküle in neuer Umgebung. Aus einer einzelnen Stammzelle, Ausgangspunkt dessen, was man als Klon bezeichnet, entstehen riesige Mengen identischer Nachkommen, die alle die genau gleichen Eigenschaften aufweisen.

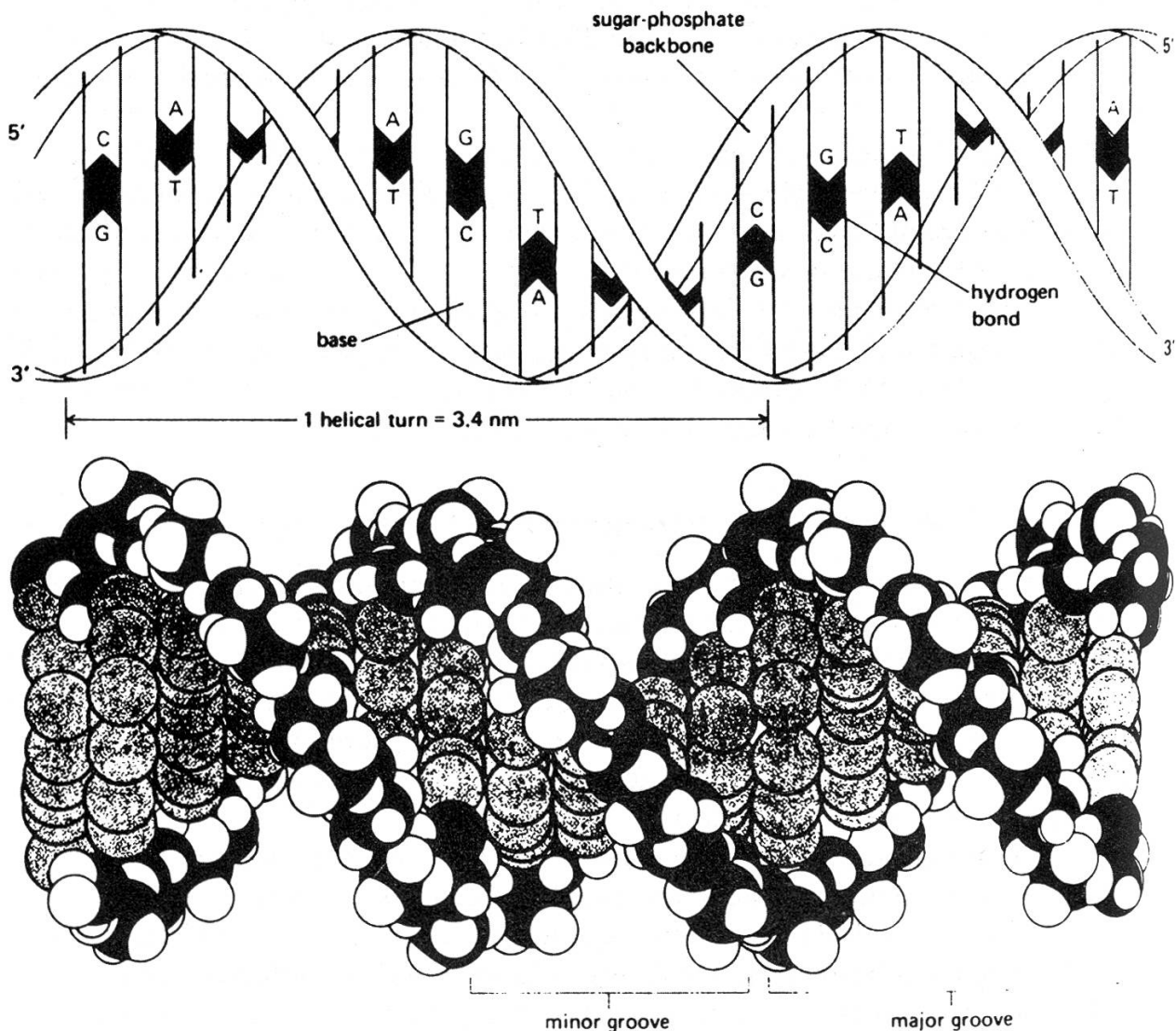
Die DNA ist bei sämtlichen Lebewesen dieser Erde aus den gleichen Bausteinen aufgebaut. Die Grundeinheit besteht aus einer Phosphorsäure, einem Zucker (Desoxyribose) sowie einer der vier Basen Adenin (A), Guanin (G), Cytosin (C) und Thymin (T) (Fig. 1). Bei Bakterien besteht die DNA aus Millionen und bei höheren Tieren sowie beim Menschen aus einigen Milliarden solcher Baueinheiten. Sie sind untereinander

---

<sup>1</sup> Adresse: Dr. U. Hübscher, Universität Zürich-Irchel, Winterthurerstrasse 190, 8057 Zürich

verknüpft und bilden einen langen Faden, der in einer kernhaltigen Zelle ungefähr zwei Meter lang ist. Die DNA existiert in der Natur meistens als verdrehter Doppelfaden (Helixstruktur). Die Doppelsträngigkeit hat eine einfache Regel, nämlich Adenin paart sich mit Thymin und Guanin mit Cytosin (Fig. 1). Die lineare Reihenfolge dieser Basen im DNA-Faden bildet den Kodierungsschlüssel für die Proteine. Man kann somit die DNA sozusagen als «Software» der Zellen bezeichnen. Je drei aufeinanderfolgende Basen bilden die Kodierungseinheit für eine der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren. Diese wiederum sind die Bausteine der Proteine. Die vier Basen (A,G,C,T) ergeben eine Anzahl von 64 theoretisch möglichen Basentriplets ( $4^3$ ); davon kodieren 61 für die 20 Aminosäuren, während drei Triplets als Stoppsignale beim Überschreiben der DNA in die Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) benützt werden. Die Proteine ihrerseits sind für Struktur und Funktion der Zelle verantwortlich.

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie besagt, dass die Information der DNA auf die mRNA überschrieben wird (= Transkription) und dass der in der mRNA im-

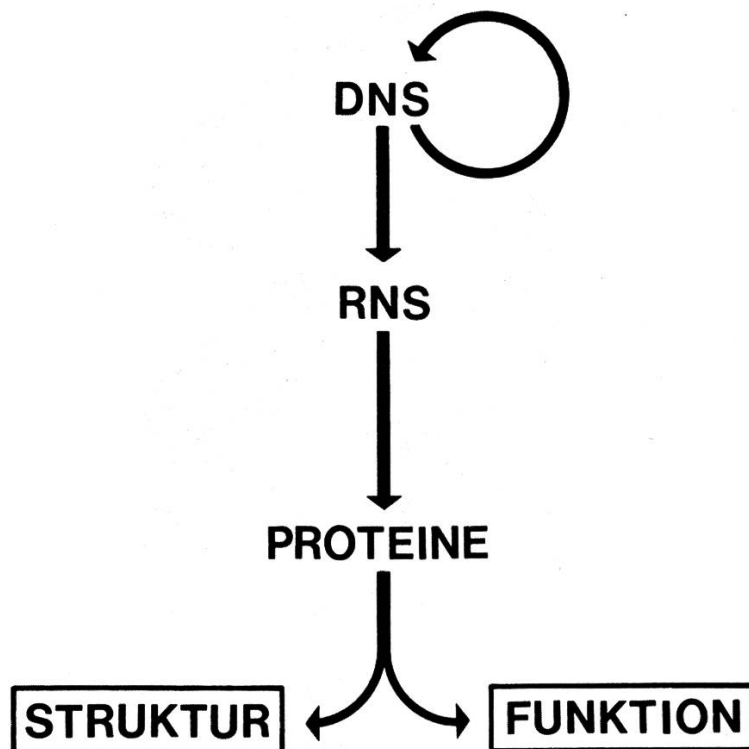


Figur 1: Kurzer schematischer Ausschnitt aus einem DNA-Molekül. Die Wellenlinie stellt das Phosphat-Desoxyribose-Rückgrat dar. A: Adenin; G: Guanin; C: Cytosin; T: Thymin.

mer noch kodierte Inhalt schliesslich am Ribosom in ein funktionsfähiges Eiweiss übersetzt wird (= Translation). Die Vorgänge der Transkription und der Translation müssen sehr genau ablaufen, damit Proteine synthetisiert werden, welche die ihnen zugeordnete Funktion übernehmen können.

Im weiteren hat die DNA in der Zelle eine Doppelrolle (Fig. 2). Wie oben erwähnt, beinhaltet sie dank der Reihenfolge der Basen den Bauplan für die Proteine. Im weiteren muss sie ihre Information genau an die Tochterzellen weitergeben. Diesen Prozess der DNA-Verdoppelung bezeichnet man als die DNA-Replikation. Er dient zur Hauptsache der Kontinuität der Zelle und somit letztlich des ganzen Organismus. Die DNA-Replikation ist ein semikonservativer Prozess, wobei je eine Hälfte des Doppelstranges als Muttermatrize dient, an welche die neusynthetisierte DNA nach den oben erwähnten Basenpaarungsregeln (A gegenüber T und G gegenüber C) synthetisiert wird (Fig. 3). Der Ablauf der *DNA-Replikation* ist ebenfalls universell, das heisst, er wickelt sich in allen Lebewesen auf ähnliche Weise ab. Dies gilt allerdings nicht für die *Regulation*, die in jedem Organismus anders abläuft.

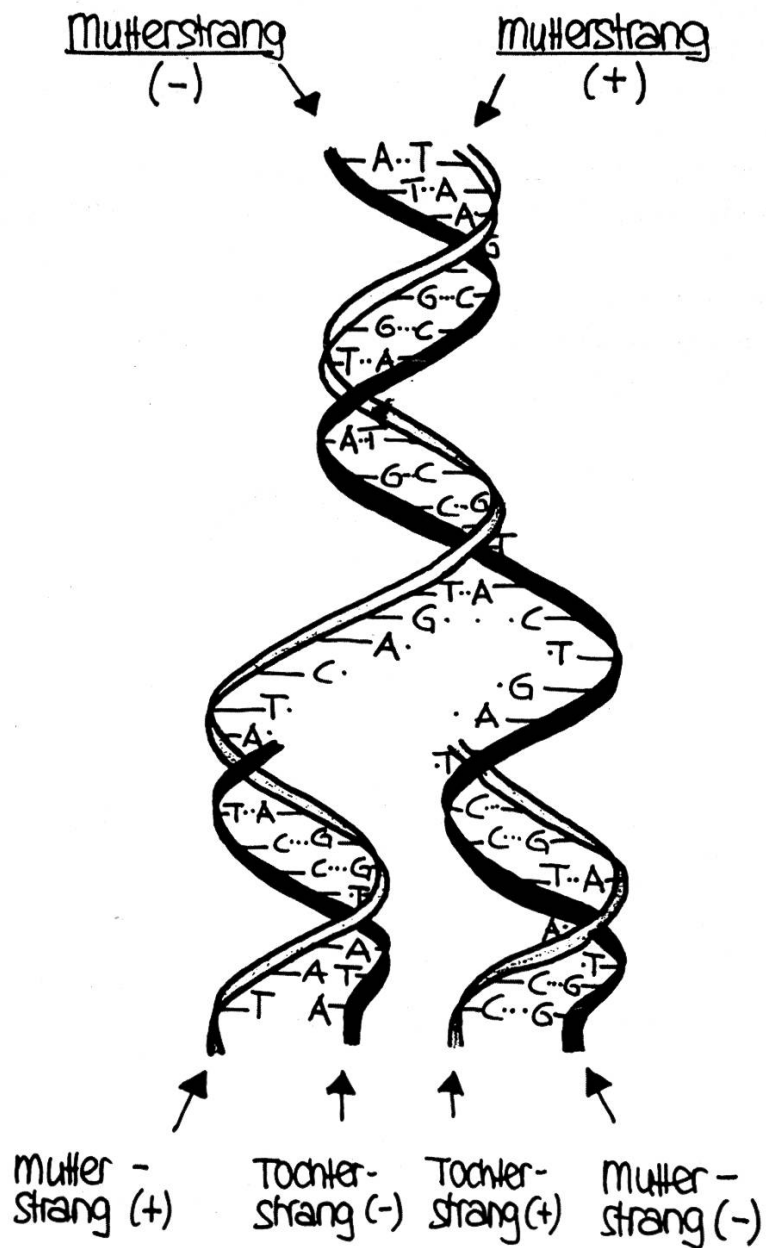
Viele Bakterien enthalten zusätzlich zu ihrem Chromosom noch extrachromosomale DNA-Moleküle. Man bezeichnet sie als *Plasmide*. Diese können sich *unabhängig* vom Wirtszellgenom replizieren. Sie sind klinisch von grosser Bedeutung, da sie unter anderem die Resistenzgene (Gen = Abschnitt auf der DNA, der auf eine mRNA übersrieben und schliesslich in ein Protein übersetzt wird) gegen viele Antibiotika tragen.



Figur 2: Die Doppelrolle der DNA. Die DNA kodiert einerseits für den Bauplan der Proteine und garantiert andererseits durch absolut genaue Replikation für eine identische Kopie in der Tochterzelle (runder Pfeil). DNA = DNS (Desoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure).

Folgende vier Eigenschaften im Zusammenspiel der Plasmide mit dem Wirt bilden die biologische und rationelle Grundlage der Gentechnologie:

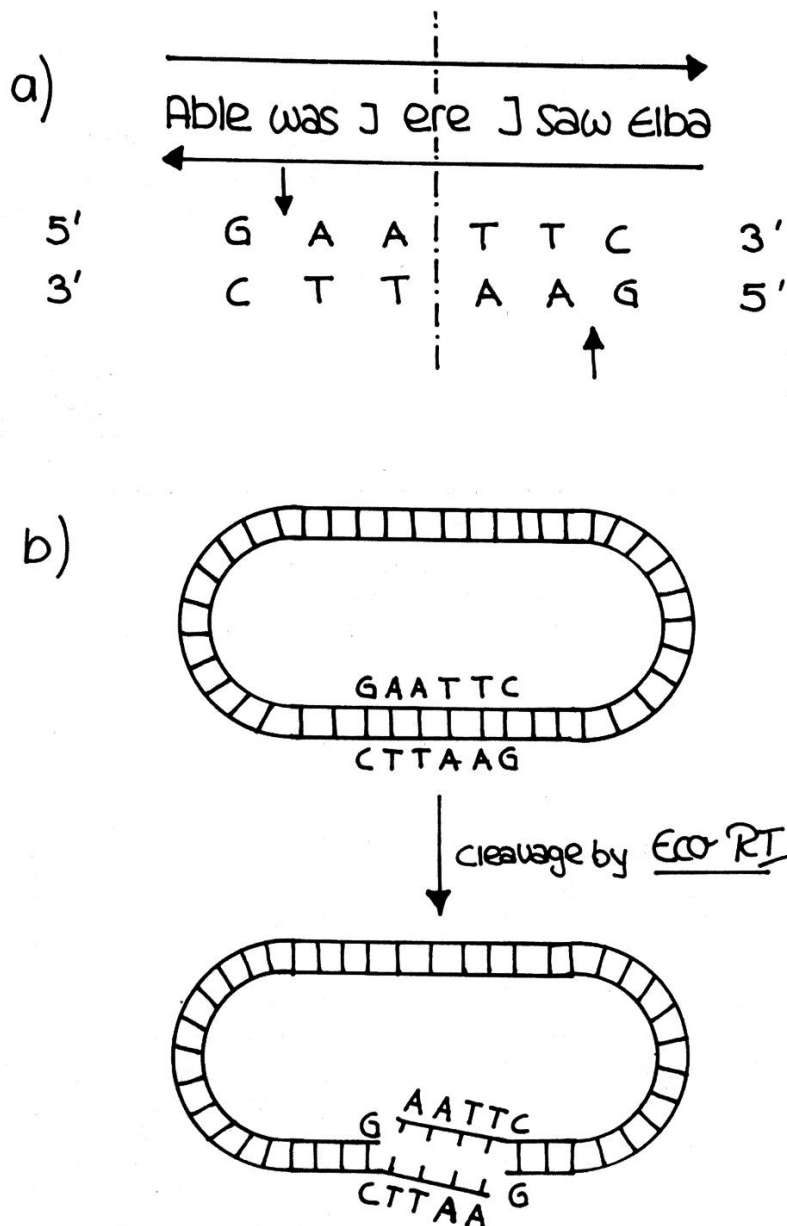
1. Trotz Vorhandensein von extrachromosomalen Plasmiden behalten alle Bakterien ihre artspezifischen Eigenschaften.
2. Plasmide haben eine eigene Regulation ihrer DNA-Replikation.
3. Plasmide haben die Fähigkeit, fremde DNA in ihre eigene einzubauen, unter Umständen unter Verlust eines Teils ihrer ursprünglichen DNA.
4. Fremde DNA wird sozusagen als «blinder Passagier» bei der Replikation der Plasmid-DNA verdoppelt.



Figur 3: Die DNA-Replikation ist semikonservativ. Je ein Mutterstrang dient als Vorlage für je einen Tochterstrang.

### Generelles Prinzip der Gentechnologie

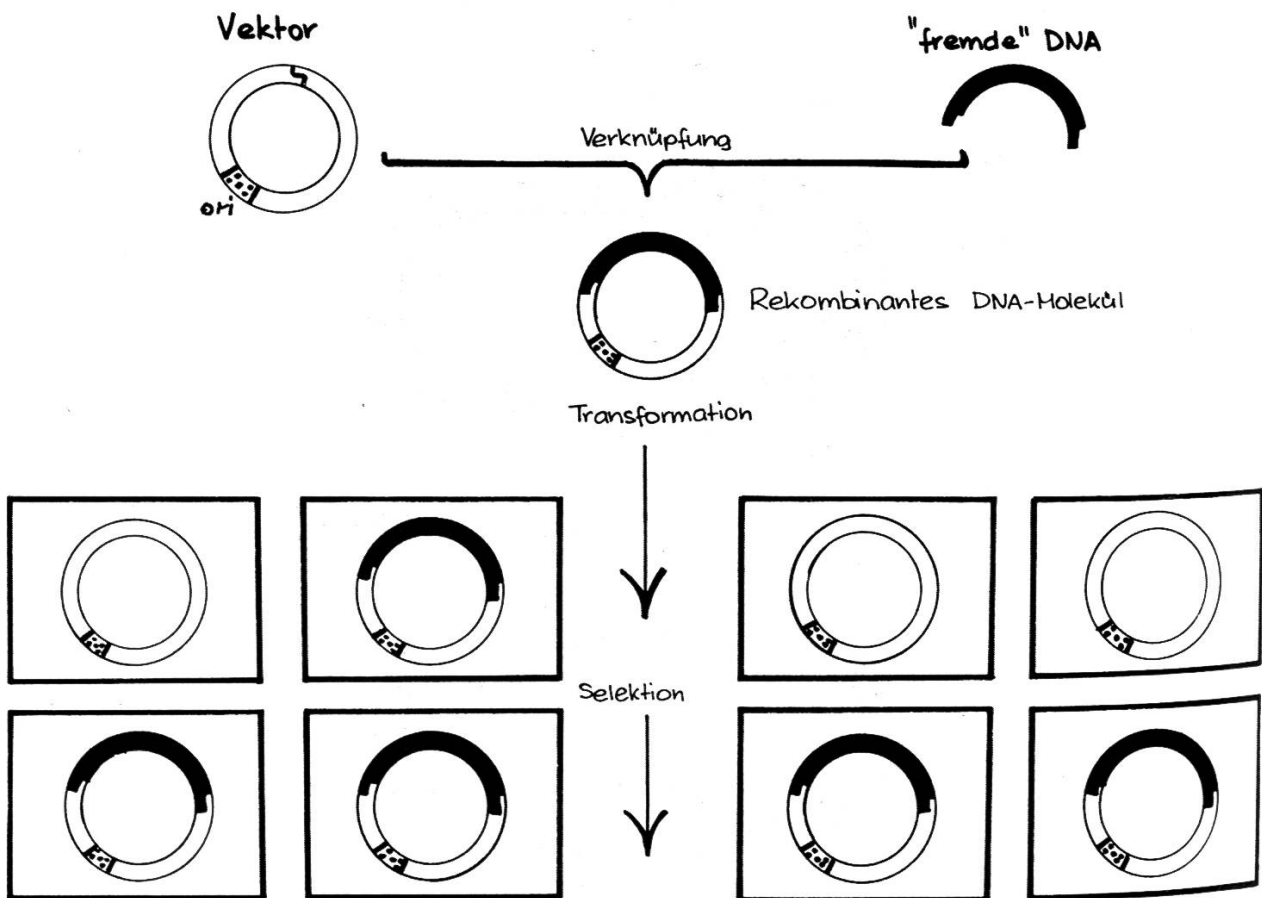
Die Methoden der Gentechnologie wurden in den letzten Jahren mehr und mehr verfeinert und in vielen Fällen sehr vereinfacht (siehe Literaturzitate 4–6 als Beispiele deutschsprachiger Einführungswerke). Es existieren viele «Kochbücher», die es ermöglichen, dass viele Techniken standardisiert durchgeführt werden können [7–10]. Ein Gesamtüberblick über die vorhandenen Möglichkeiten würde den Rahmen dieser Übersichtsarbeit sprengen. Ich beschränke mich deshalb auf eine generelle Erklärung der Gentechnologie und werde in einem separaten Abschnitt einige Techniken, die zum Verständnis der nachfolgenden Artikel notwendig sind, näher erläutern.



Figur 4: Erkennungssequenz und endonukleolytischer Spaltungsschritt der Restriktionsendonuklease I aus *Escherichia coli* (*EcoRI*). Das Enzym erkennt eine spiegelbildliche Sequenz (a) und schneidet zwischen den gleichen zwei Basen auf beiden DNA-Strängen. Es entstehen einzelsträngige Bereiche (TTAA), die man als «klebrige» Enden bezeichnet (b).

Als eines der wichtigsten Werkzeuge für die Gentechnologie haben sich die sogenannten *Restriktionsendonukleasen* erwiesen, die Ende der sechziger Jahre unabhängig von Arber postuliert, von *Smith* entdeckt und von *Nathans* angewendet wurden (zusammengefasst in 12). Diese Enzyme, die ausschliesslich in Bakterien gefunden werden, können DNA an ganz spezifischen Sequenzen schneiden, die meistens eine spiegelbildliche Basenreihenfolge aufweisen (Fig. 4). Bis heute kennt man mindestens 670 Restriktionsendonukleasen vom Typ II [13].

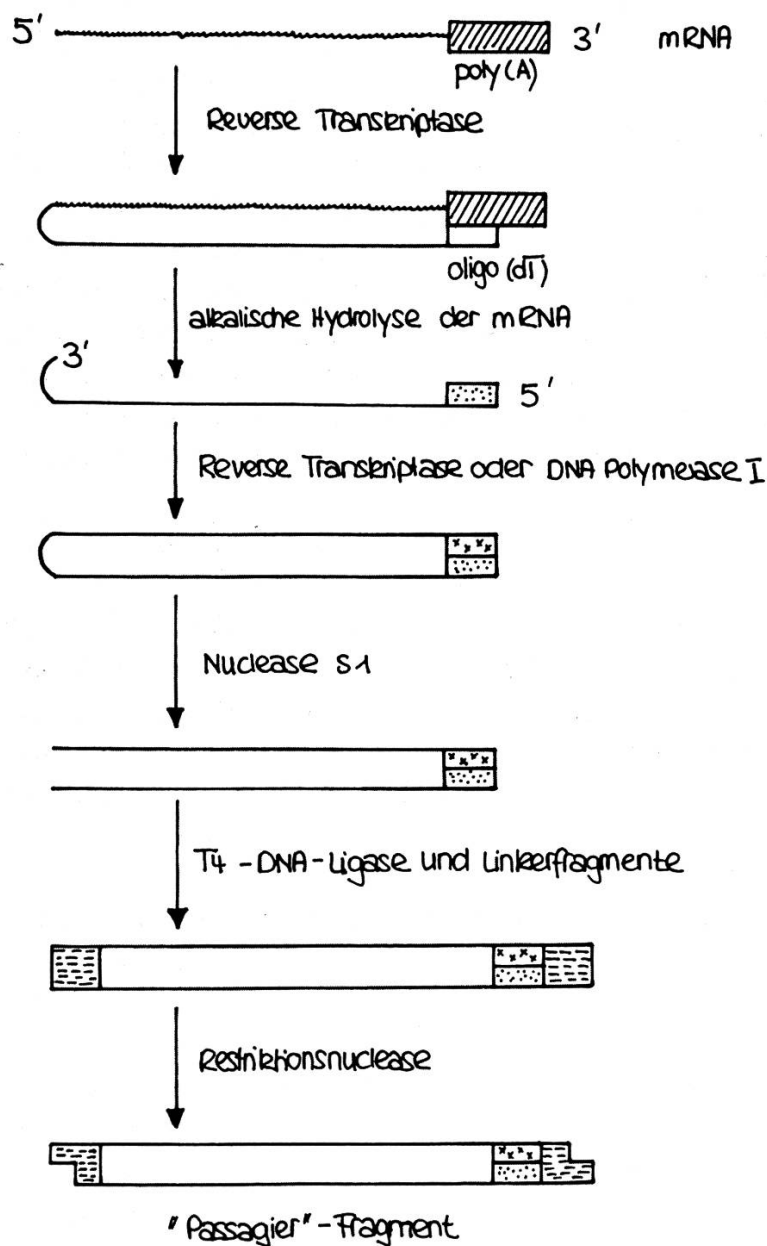
Die Gentechnologie benötigt DNA verschiedener Provenienz. Zum einen brauchen wir eine Vektor-DNA (auch als «Träger»-DNA bezeichnet) und zum anderen eine Passagier-DNA (auch als «Fremd»-DNA bezeichnet). Die Passagier-DNA ist diejenige, die der Experimentator klonieren will. In einer ersten Stufe wird die zu klonierende DNA im Reagenzglas mit einem sogenannten Vektor verknüpft. Dies kann geschehen, weil viele Restriktionsendonukleasen beim endonukleolytischen Schneiden überhängende einzelsträngige Enden (sogenannte klebrige Enden) produzieren. Die Passagier- und die Vektor-DNA werden zuerst getrennt mit *derselben* Restriktionsendonuklease geschnitten und anschliessend vereinigt (Fig. 5). Die klebrigen Enden pas-



Figur 5: Einfaches Prinzip der Gentechnologie. Vektor- und Passagier-DNA besitzen die gleichen «klebrigen» Enden und werden im Reagenzglas verknüpft. Das rekombinierte DNA-Molekül wird in eine Wirtszelle eingeschleust (Transformation). Schliesslich wird durch Selektion derjenige Stamm (= Klon) herangezuchtet, der die gewünschte Passagier-DNA (= Gen) enthält.

sen zusammen und können mittels eines Enzyms – der DNA-Ligase – verknüpft werden. Das Vektor-Molekül seinerseits hat die besondere Eigenschaft, sich in bestimmten Wirtszellen (z.B. Bakterien) vermehren zu können. Dazu benötigt es eine besondere DNA-Sequenz, den sogenannten Ursprungspunkt (*ori*) der DNA-Replikation, dessen Anwesenheit zur Replikation im Wirt befähigt.

Das im Reagenzglas rekombinierte DNA-Molekül wird anschliessend in die Wirtszellen eingeführt. Man bezeichnet diesen Vorgang als Transfektion oder Transformation. Bei der Replikation des Vektors wird der Passagier ebenfalls mitrepliziert. Als nächstes müssen durch Selektion diejenigen Zellen erkannt werden, die das rekombi-



Figur 6: Herstellung einer doppelsträngigen komplementären DNA (cDNA) aus einer mRNA. Details siehe Text.



nierte DNA-Molekül enthalten. Einzelne positive Stämme, die man als Klone bezeichnet, können dann aufgezüchtet und die «fremde» DNA in ihrer neuen Umgebung in beliebig grosser Menge herangezüchtet werden. Im weiteren ist dann vor allem für die Medizin von Interesse, dass die «fremde» DNA in ihrem neuen Wirt «dechiffriert» wird, das heisst, im Sinne des zentralen Dogmas der Molekularbiologie (siehe Fig. 2) in das entsprechende Protein übersetzt wird.

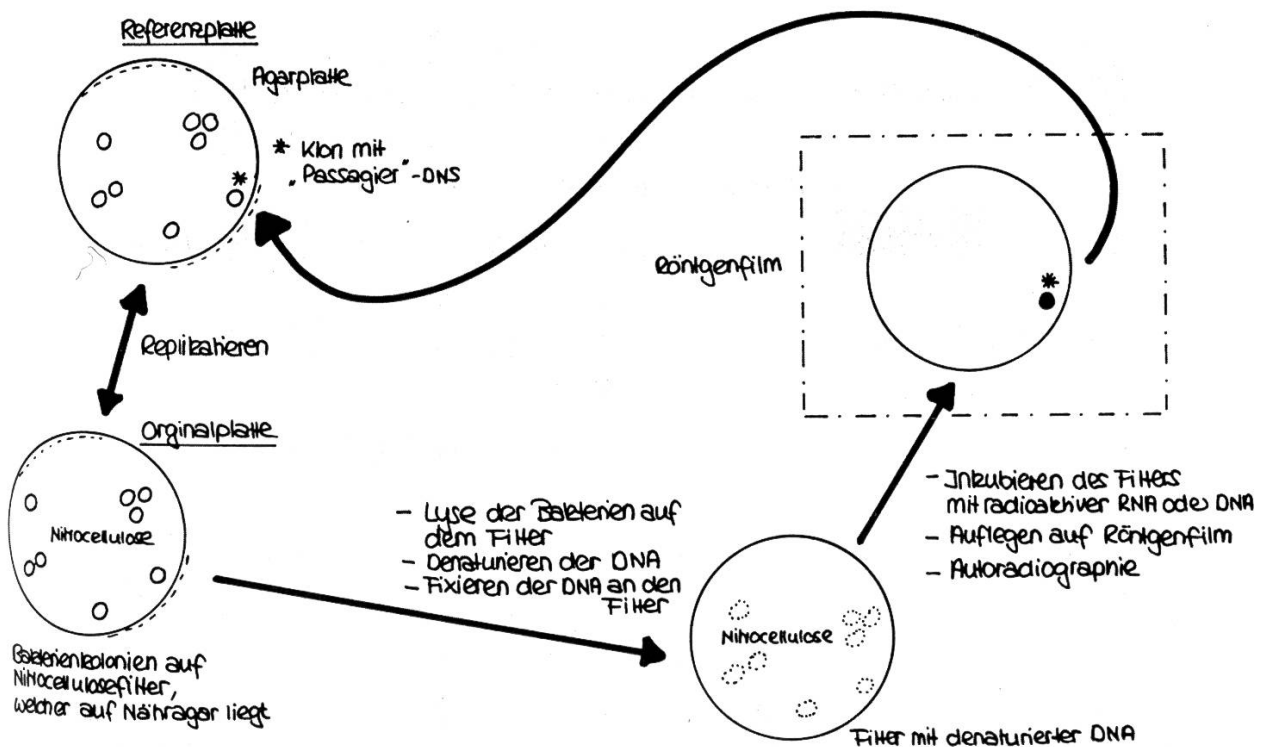
Wie gelangen wir nun zu unserer gewünschten Passagier-DNA? Dazu isoliert man zuerst die mRNA mittels biochemischer Methoden aus dem Gewebe der Wahl. Daraus stellt man in mehreren Schritten komplementäre DNA (sogenannte cDNA) her. Figur 6 illustriert die einzelnen Schritte. Die mRNA besitzen an einem Ende, das in der Figur 6 mit 3' bezeichnet ist, eine Sequenz von Polyadenylatresten (poly A). Daran wird ein chemisch hergestelltes oligo-dT-Fragment hybridisiert. Dieses dient als Verankerungspunkt für das Enzym Reverse Transkriptase, das an der mRNA-Matrize eine komplementäre DNA (cDNA) herstellt. Anschliessend wird die mRNA mittels Hydrolyse (z.B. durch Lauge) entfernt und die zurückbleibende einzelsträngige DNA mit dem Enzym DNA-Polymerase in die Doppelstrangform überführt. Das partiell einzelsträngige Ende wird mit einer einzelstrangspezifischen Endonuklease (S1 Nuklease) in die lineare Form überführt. Nun hängt man mittels des Enzyms DNA-Ligase chemisch synthetisierte Bindungsstücke (sogenannte Linkerfragmente) an beide Enden. Diese enthalten Schnittstellen für eine bestimmte Restriktionsendonuklease (z.B. Eco RI, siehe Fig. 4). Schliesslich wird die cDNA mit dem Restriktionsenzym geschnitten, damit die «klebrigen» Enden entstehen. Die so künstlich hergestellte cDNA ist als Passagier nun in der Lage, mit einem Vektor, der dieselbe Restriktionsschnittstelle aufweist, zu rekombinieren.

Als nächstes fragen wir uns, wie wir denjenigen Klon identifizieren können, der die gewünschte Passagier-DNA enthält. Die Selektion erfolgt in zwei Schritten: erstens nach denjenigen Bakterien, die einen Vektor aufgenommen haben. Diese wachsen auf antibiotikahaltigen Platten, da Klonierungsvektoren Gene für Antibiotikaresistenzen tragen, und zweitens nach denjenigen, die die gewünschte Passagier-DNA enthalten. In Figur 7 ist das Prinzip des Nachweises aufgezeigt. Zuerst wird auf einer antibiotikahaltigen Agarplatte, auf der Bakterien wachsen, ein Nitrozellulosefilter aufgelegt. Durch Abklatsch haften Bakterien auf dem Filter, sie werden lysiert, die DNA in die einzelsträngige Form überführt und am Filter fixiert. Der Filter wird danach mit radioaktiver mRNA des klonischen Genes inkubiert, die nun wegen der Basenpaarung an die komplementäre DNA hybridisiert. Die mRNA diente ja ursprünglich zur Konstruktion der cDNA (siehe oben) und kann so wieder als Erkennungsprobe eingesetzt werden. Der Filter wird anschliessend gewaschen, damit die nicht hybridisierte mRNA entfernt wird. Schliesslich wird er auf einen Röntgenfilm gebracht, wo an Orten der Hybridisierung (= Radioaktivität) ein schwarzer Fleck entsteht. Durch Vergleich mit der ursprünglichen Agarplatte kann der (die) positive(n) Klon(e) identifiziert und in grossen Mengen herangezüchtet werden. Eine analoge Nachweismethode wird heute vielfach verwendet, indem man direkt das im Klon gebildete Protein mit Hilfe eines Antikörpers gegen das gewünschte, zu klonierende Protein nachweist (siehe Literaturzitat 9 für Details).

## Gezielte Funktionsweise von Genen

Wie erwähnt sollen die Bakterien vom gewünschten Gen das entsprechende Protein synthetisieren. Die Gene von Bakterien und von kernhaltigen Zellen besitzen ausserhalb der DNA-Sequenzen, die für Proteine kodieren, Abschnitte, die ausschliesslich der *Regulation* dienen. Einen dieser Abschnitte bezeichnet man als Promotor. Er ist die Bindungsstelle für den Enzymkomplex, der die Transkription ausführt. Die Promotoren vieler Gene sind bei Bakterien genauestens bekannt. Das Beispiel der Regulation des Laktoseabbaus ist in Figur 8 dargestellt. Befindet sich das Bakterium auf einer

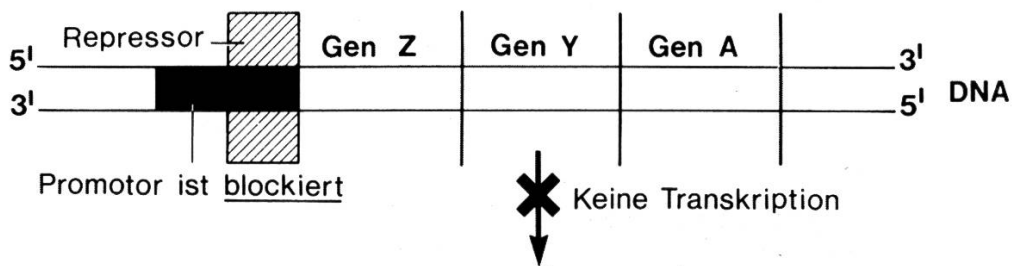
### Nachweis eines klonierten Genes



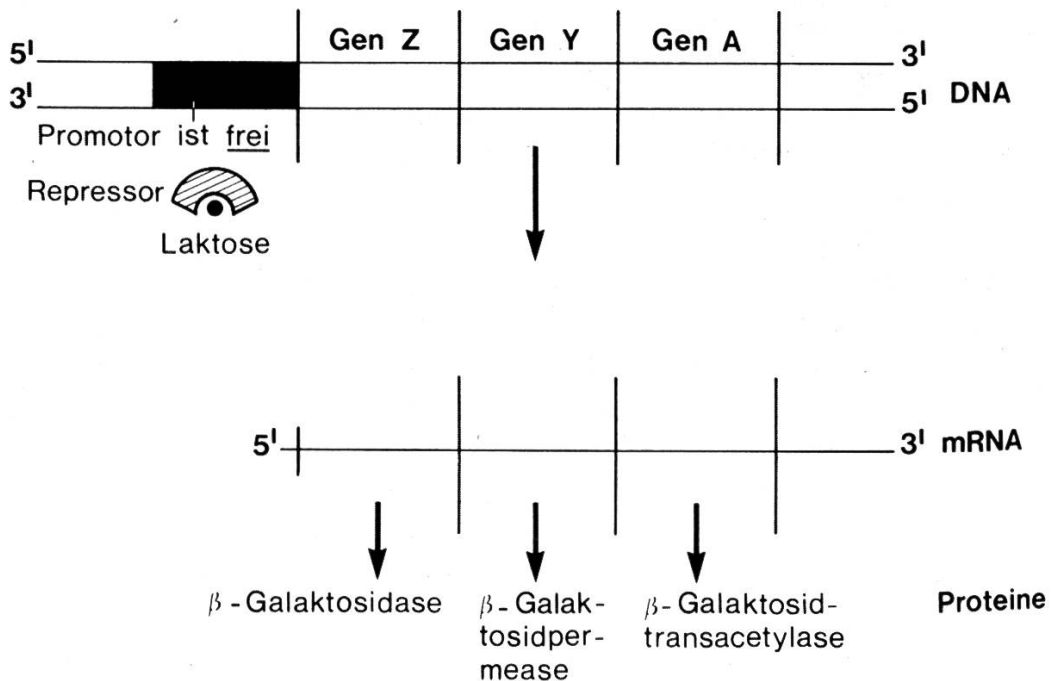
Figur 7: Das Prinzip der Kolonienhybridisierung zur Identifikation gesuchter «Passagier»-DNA. Auf die Originalagarplatte wird zuerst ein Nitrozellulosefilter aufgelegt, auf dem sich ein Bakterienabklatsch bildet. Durch Replikation wird zuerst mit diesem Filter eine Referenzplatte hergestellt. Danach wird durch Kolonienhybridisierung derjenige Klon identifiziert, der die gesuchte «Passagier»-DNA enthält. Details siehe Text.

Agarplatte oder in einem Nährmedium, das wenig oder keine Laktose enthält, werden die Gene für den Laktoseabbau abgeschaltet. Die Inaktivierung erfolgt durch ein Protein, das man als Repressor bezeichnet. Er bindet an den Promotor der drei Gene für die Laktoseverwertung ( $\beta$ -Galaktosidase,  $\beta$ -Galaktosidpermease und  $\beta$ -Galaktosidtransazetylase). Der Transkriptionsenzymkomplex kann daher nicht an den Promotor binden und somit die Gene nicht überschreiben; es entsteht keine mRNA (Fig. 8A). Ent-

**(A) Wenig Laktose: Gene für Laktose-Abbau abgeschaltet**



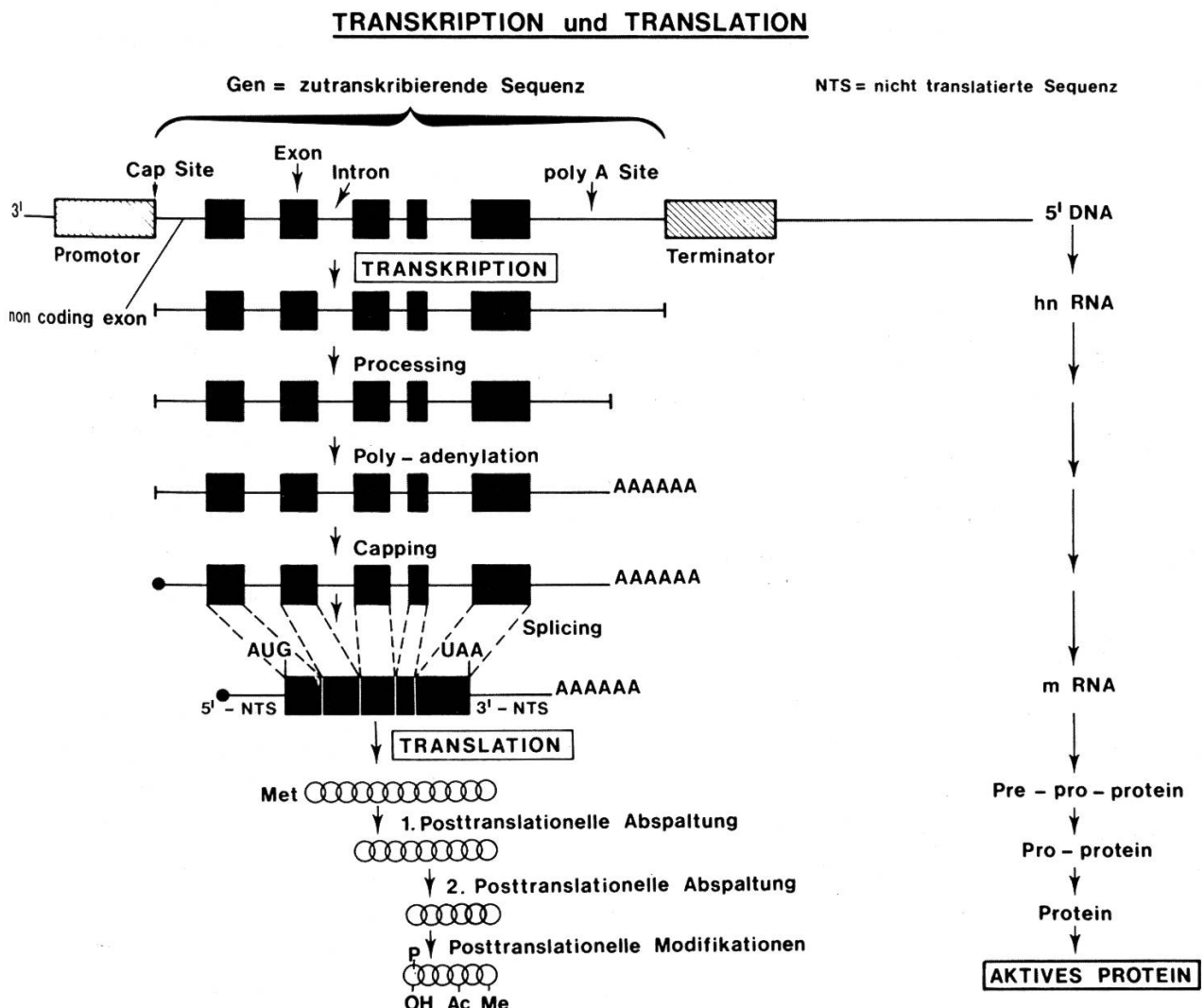
**(B) Viel Laktose: Gene für Laktose-Abbau angeschaltet**



Figur 8: Gezielte Genregulation beim Bakterium *Escherichia coli* zum Laktose-(Milchzucker-)abbau. Ein Ausschnitt aus dem Bakterienchromosom ist schematisch dargestellt und enthält die drei Gene Z für  $\beta$ -Galaktosidase, Y für  $\beta$ -Galaktosidpermease sowie A für  $\beta$ -Galaktosidtransazetylase. Details des Regulationsmechanismus siehe Text.

hält die Nährlösung hingegen Laktose, bindet sie an den Repressor und verändert dessen dreidimensionale Struktur so, dass er nicht mehr an den Promotor binden kann (Fig. 8B). Der Transkriptionenzymkomplex bindet an den freien Promotor, es wird mRNA überschrieben und diese am Ribosom in die drei Enzyme übersetzt. Diese verwenden die Laktose für die Energiegewinnung. Nach Absinken des Laktosespiegels kehren die Repressormoleküle in ihre ursprüngliche Form zurück und binden wieder an den Promotor. Die Gene sind wieder inaktiv. Durch Laktose kann dieses An- und Abschalten des Genes nach Belieben von aussen gesteuert werden.

Die Transkription eines Säugetiergenes ist komplexer als diejenige von Bakterien (Fig. 9). Ein Gen besteht aus Nukleotid (= Basen)sequenzen, die für ein Protein kodieren (Exons) und solchen, die nicht für ein Protein kodieren (Introns und nicht transla-



Figur 9: *Translation und Transkription eines Säugetiergenes*. Erklärungen siehe Text und für weitere Details [14]. Abkürzungen: AUG: Startkodon bestehend aus den Basen Adenin, Urazil und Guanin; 5' beziehungsweise 3' NTS: 5' beziehungsweise 3' nicht translatierte Sequenz auf der reifen mRNA; hnRNA: hochmolekulare Kern-RNA; Met: Methionin auf dem aminoterminalen Ende des Pre-pro-Proteins; P: Phosphorylierung eines Proteins; OH: Hydroxylierung eines Proteins; Ac: Azetylierung eines Proteins; Me: Methylierung eines Proteins.

tierte Sequenzen). Das ganze Gen besteht also aus Exons, Introns und endständigen, nicht translatierten Sequenzen. Flankiert wird das Gen auf der 3' Seite (links) durch den Promotor und auf der 5' Seite (rechts) durch den Terminator. Es wird zuerst in eine hochmolekulare Kern-RNA überschrieben (hnRNA). Anschliessend wird diese Vorläufer-RNA in mehreren Schritten zu einer funktionstüchtigen mRNA (= messenger RNA) veredelt. Veredelungsschritte beinhalten das Zurechtstutzen des 3' Endes der mRNA (Prozessierung), Anhängen eines (polyA)-Schwanzes (Polyadenylation), das Ansynthetisieren einer «Kappe» (Capping) sowie das Herausschneiden der Introns mit anschliessendem Zusammenspleissen der Exons (Splicing). Diese komplexen Schritte dienen der Regulation der genetischen Aktivität und enden in einer funktionstüchtigen mRNA, die am Ribosom in ein Protein übersetzt werden kann.

Am Ribosom werden ebenfalls zuerst Vorläuferproteine synthetisiert, die anschliessend durch posttranslationelle, proteolytische Abspaltungen und verschiedene Modifikationen (Phosphorylierung, Hydroxylierung, Azetylierung, Methylierung) in funktionsfähige, aktive Proteine veredelt werden.

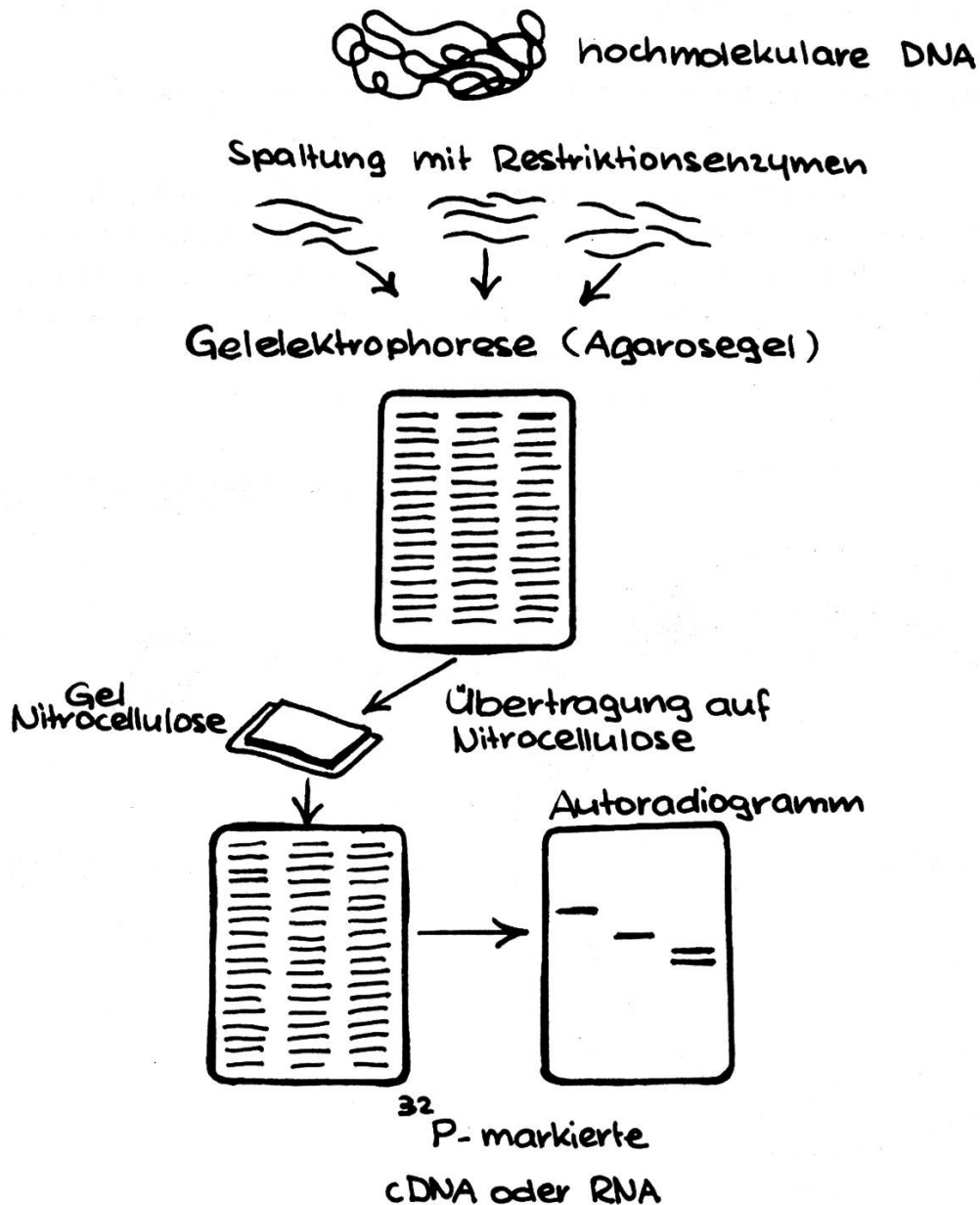
### Zwei wichtige Techniken

Zwei häufig verwendete Techniken sollen nun noch genauer vorgestellt werden. Sie sind wichtig zum Verständnis der nachfolgenden Ausführungen.

a) *Das «Southern-Blotting»-Verfahren.* Dieses wichtige Verfahren, 1975 von E. Southern entwickelt [15], erlaubt einerseits den Nachweis klonierter DNA und andererseits die Lokalisierung spezifischer Sequenzen aus Gemischen von eukaryotischer DNA (Fig. 10). Dazu werden DNA-Stücke, nach Verdauung mit Restriktionsendonukleasen, ihrer Grösse nach auf Agarose-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Anschliessend werden die DNA-Stücke mittels Diffusion und Kapillarkraft in Pufferlösungen vom Agarose-Gel auf einen Nitrozellulosefilter transferiert («geblottet»). Das ursprüngliche Trennmuster der DNA-Fragmente bleibt erhalten. Der Nitrozellulosefilter kann anschliessend mit radioaktiv markierten DNA-Proben bekannter Provenienz inkubiert und die entsprechenden Banden durch Schwärzung eines Röntgenfilmes (Autoradiographie) identifiziert werden. Aufgrund der Basenpaarung (Fig. 1) hybridisieren die radioaktiven DNA-Fragmente an diejenigen geblotteten DNA-Banden, die eine komplementäre Sequenz aufweisen (Fig. 10). Später wurden analoge Verfahren zum Transfer von RNA («Northern-Blotting» [16]) und Transfer von Proteinen («Western-Blotting» [17]) entwickelt, die heute ebenfalls für viele praktische Nachweise verwendet werden. Die Identifizierung der RNA-Banden erfolgt ebenfalls mit radioaktiv markierter DNA, während die Proteine mit Hilfe von Antikörpernachweismethoden, wie beispielsweise des sogenannten ELISA-Testes (Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay [18]), identifiziert werden können.

b) *Die Konstruktion von Baukastenvektoren.* Das Wissen über den Regulationsmechanismus von bakteriellen Genen (Fig. 8) und den Aufbau eines Säugetiergenes (Fig. 9) kann nun gebraucht werden, um sog. Baukastenvektoren zu konstruieren. Diese Vektoren sind fähig, in *E. coli* als sogenannte «Proteinfabriken» zu arbeiten. Figur 11 stellt ein Beispiel eines solchen Vektors dar. Einerseits wird eine regulatorische Stelle,

ein Promotor, hineinkloniert. Als Beispiel sei hier der Promotor für die Laktoseverwertung (Fig. 8) erwähnt. Dahinter kann nun ein Gen X angehängt werden. Nach erfolgter Transformation und Selektion des *E.-coli*-Bakteriums wird der Bakterienkultur Laktose oder noch besser ein nicht abbaubares Laktose-Analogon angeboten. Als Folge davon wird der Repressor vom Promotor abgetrennt und macht diesen für die Synthese

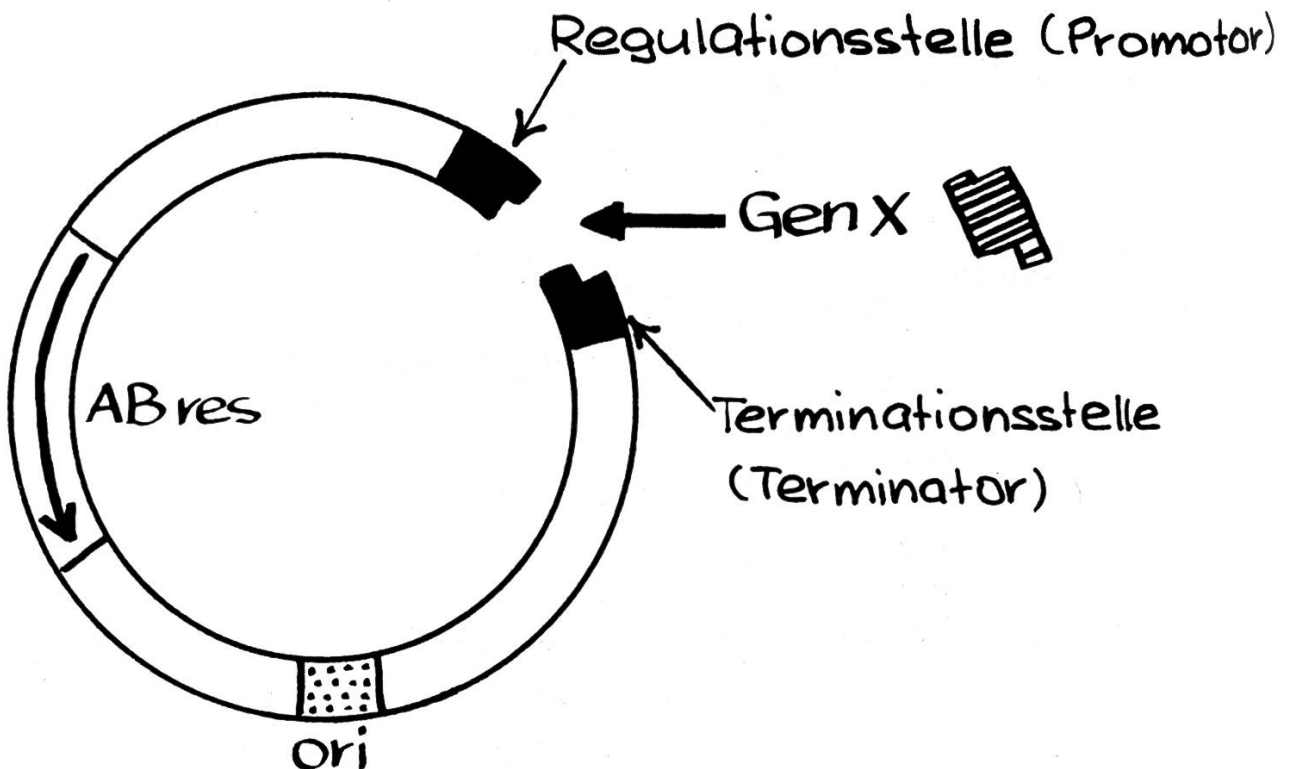


Figur 10: Das «Southern-Blotting»-Verfahren. Tierische DNA wird mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gespalten und in einem Agarosegel aufgrund der Grösse aufgetrennt. Anschliessend wird das Gel auf einen Nitrocellulosefilter gelegt und in Richtung des letzteren eine Pufferlösung durchgeleitet. Die DNA-Stücke werden auf den Filter geleitet und bilden eine originalgetreue Kopie des DNA-Bandenmusters. Anschliessend wird der Filter mit einer radioaktiv markierten Probe inkubiert, damit sie mit den komplementären Banden hybridisieren kann. Die radioaktiven, positiven Banden sind nach Autoradiographie an Hand der Röntgenfilmschwärzung sichtbar.

des Genes X frei. Das Bakterium ist sozusagen dazu überlistet worden, das Fremdprotein zu synthetisieren. Als drittes Element befindet sich am Ende des Genes ein Terminator, der dem Transkriptionenzym des Bakteriums zeigt, wo es die Synthese abbrechen soll. Beispiele dazu (Insulin, Somatostatin und MKS-Vakzine-Produkte) wurden früher bereits im Detail beschrieben [2, 3]. Auf diesem Prinzip basierende Baukastenvektoren, auch als Expressionsvektoren bezeichnet, sind heute sehr zahlreich und basieren auf vielen möglichen Regulationsprinzipien, die leicht von aussen gesteuert werden können (z. B. Temperatur, Salzgehalt, Licht, Abwesenheit von Aminosäuren [6]).

### Praktische Anwendungsmöglichkeiten der Gentechnologie für die Veterinärmedizin, Landwirtschaft und die Umwelt

Tabelle 1 zeigt einige praktische Anwendungsmöglichkeiten für die Veterinärmedizin und zwei mit ihr verbundene Gebiete. In zwei Folgeartikeln soll nun einigen für die Veterinärmedizin wichtigen Fragen nachgegangen werden. Erstens, haben sich gentechnologisch hergestellte Vakzinen für die Tiermedizin günstig ausgewirkt? Zweitens,



Figur 11: *Beispiel eines Baukastenvektors.* Der Baukastenvektor enthält die Startstelle für die DNA-Replikationskontrolle (ori) und ein oder zwei Gene für Antibiotikaresistenz (ABres). Zusätzlich wird in die Stelle, in die kloniert werden soll, eine Regulationsstelle (Promotor) für leicht von aussen steuerbare Gene angefügt (z.B. Steuerung via Laktose, Temperatur, Salzgehalt, Licht). Anschliessend wird das Gen X (z.B. Hormongen, Virus- oder Bakterienantigen) hineinkloniert. Der Terminator schliesslich zeigt dem Transkriptionenzym des Bakteriums, wo es die Synthese des Genes abbrechen soll. Für weitere Erklärungen siehe Text.

Tabelle 1: Einige Anwendungsmöglichkeiten der Gentechnologie für die Veterinärmedizin, die Landwirtschaft und die Umwelt

Veterinärmedizin	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Billigherstellung von:               <ul style="list-style-type: none"> <li>– Vakzinen</li> <li>– Eiweissen, Hormonen, Enzymen</li> <li>– Klinischer Diagnostika</li> </ul> </li> <li>– Individualisierung von Tieren mittels polymorpher DNA-Sequenzen</li> <li>– Früherkennung genetischer Krankheiten</li> <li>– Herstellen transgener Tiere</li> </ul>
Landwirtschaft	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Einschleusen stickstofffixierender Gene in Nutzpflanzen</li> <li>– Labfermentherstellung</li> <li>– «Veredlung» von Nahrungseiweissen</li> <li>– Produktion billiger Eiweisse für die Tierernährung</li> <li>– gezieltere Tierzucht durch Analyse polymorpher DNA-Sequenzen</li> </ul>
Umwelt	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Biotechnologie</li> <li>– Biologischer Abbau von Material, das heute verbrannt wird, unter Ausnützung der entstehenden Energie</li> <li>– Effizientere Energieausnutzung unseres Abfalles</li> <li>– Reduktion der Stickstoffdüngung</li> <li>– Konstruktion «biologischer Katalysatoren»</li> </ul>

für welche praktischen Zwecke eignet sich die Analyse von variablen (= polymorphen) DNA-Sequenzen? Drittens, wie kann man transgene Tiere herstellen und welche potentiellen Möglichkeiten stellen sie dar?

### Zusammenfassung

Die Gentechnologie hat sich in den letzten fünf Jahren stark entwickelt und deren Techniken sind sehr verfeinert worden. Die Gentechnologie wird durch einfache physiologische Grundprinzipien der Bakterien ermöglicht. Die Kenntnisse der gezielten Funktionsweise von bakteriellen sowie von tierischen Genen erlaubt es, «Baukastenvektoren» zu konstruieren, die in *Escherichia coli*-Bakterien als «Eiweissfabriken» arbeiten können. Molekularbiologische Techniken wurden standardisiert und stark vereinfacht, so dass ihre Anwendung im praktischen Labor oder sogar in der Praxis in Reichweite des Möglichen rückt. Schliesslich werden einige praktische Anwendungsmöglichkeiten der Gentechnologie für die Veterinärmedizin, Landwirtschaft und die Umwelt aufgeführt.

### Résumé

Le génie génétique s'est fortement développé ces 5 dernières années et les méthodes sont devenues très raffinées. Le génie génétique a été rendu possible grâce aux principes physiologiques fondamentaux simples des bactéries. Les connaissances du fonctionnement dirigé des gènes bactériens et animaux permettent d'établir des «vecteurs d'un jeu de construction», qui peuvent travailler comme des «fabriques de protéines» dans les *E. coli*. Des techniques de biologie moléculaire ont été standardisées et fortement simplifiées afin de pouvoir les utiliser dans les laboratoires et même dans la pratique. Dans ce travail, quelques possibilités d'utilisation pratique du génie génétique en médecine vétérinaire, en agriculture et dans l'environnement sont citées.



### Riassunto

La tecnologia genetica nel corso degli ultimi 5 anni si è di molto sviluppata ed i metodi si sono considerevolmente raffinati. La tecnologia genetica è resa possibile grazie a principi fisiologici semplici e basilari. La conoscenza delle funzionalità dei geni batterici ed animali permette di costruire «vettori strutturati», che possono agire da fabbricatori di proteine nell'*Escherichia coli*. Le tecniche della biologia molecolare sono state ora standardizzate e di molto semplificate, di modo che il loro impiego entra nel campo delle possibilità non solo nei laboratori scientifici, ma anche nelle applicazioni pratiche. Infine vengono indicate alcune possibilità pratiche della tecnologia genetica nella medicina veterinaria, in agricoltura e nell'ambiente.

### Summary

In the past five years there has been a great development in genetic engineering and its techniques have been very much refined. Genetic engineering is made possible by the application of the simple physiological basic principles of bacteria. When it is known how both bacterial and animal genes specifically function, it is possible to construct «brick vectors» which are able to act as «protein factories» in *Escherichia coli* bacteria. Molecular biological techniques have been standardised and greatly simplified, to the extent that their application has reached the bounds of possibility, not only in the practical laboratory but even in the practice field itself. Finally some possible ways of applying genetic engineering are mentioned, for veterinary medicine, agriculture and the environment.

### Literatur

- [1] Hübscher U.: Gentechnologie im Dienste der Veterinärmedizin. I Einführung und generelles Prinzip. Schweiz. Arch. Tierheilk. 124, 481–492 (1982). – [2] Hübscher U.: Gentechnologie im Dienste der Veterinärmedizin. II Die Grundlagenforschung als erste Nutzniesserin. Schweiz. Arch. Tierheilk. 124, 567–576 (1982). – [3] Hübscher U.: Gentechnologie im Dienste der Veterinärmedizin. III Anwendungsmöglichkeiten für die praktische Veterinärmedizin und die Agrarwirtschaft. Schweiz. Arch. Tierheilk. 124, 613–623 (1982). – [4] Knippers R.: Molekulare Genetik. G. Thieme Verlag, Stuttgart und New York (1982). – [5] Watson J.D., Tooze J. and Kurtz D.T.: Rekombinierte DNA: Eine Einführung. Spektrum der Wissenschaft, Verlagsgesellschaft mbH + Co, Heidelberg (1985). – [6] Winnacker E.L.: Gene und Klone: Eine Einführung in die Gentechnologie. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1985). – [7] Maniatis T., Fritsch E.F. and Sambrook J.: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory (1982). – [8] Silhavy T.J., Bermann M.L., Enquist L.W.: Experiments with Gene Fusions. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1984). – [9] Glover D.M.: DNA cloning: a practical approach. IRL Press Oxford-Washington DC, Vol I and II (1985). – [10] Slater R.J.: Experiments in Molecular Biology. Humana Press, Clifton, New Jersey (1986). – [11] Bulnois G.J.: Gene Cloning and Analysis. Blackwell Scientific Publication Ltd, Oxford (1987). – [12] Arber W.: Restriktionsendonukleasen. Angewandte Chemie 2, 79–85 (1978). – [13] Roberts R.J.: Restriction enzymes and their isoschizomers. Nucl. Acids Res. 15 (supplement), M187–M217 (1987). – [14] Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson, J.D.: The molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc., New York and London (1983). – [15] Southern E.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503–517 (1975). – [16] Alwine J.C., Kemp D.J. and Stark G.R.: Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxy-methyl paper and hybridization with DNA probes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5350–5354 (1977). – [17] Towbin H., Stehelin T. and Gordon J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350–4354 (1979). – [18] Engvall E. and Perlmann P.: Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III quantitation of specific antibodies by enzyme-labelled antiimmunoglobulin in antigen coated tubes. J. Immunol. 109, 129–135 (1972).