

- Leucinmethylester in die beiden Enantiomere gespaltenen Dicarbonsäure mit LiAlH_4 und Pd/C zugänglich [94]; siehe auch R. C. Helgeson, J. M. Timko, P. Moreau, S. C. Peacock, J. M. Mayer, D. Cram, *J. Am. Chem. Soc.* 96 (1974) 6763.
- [98] D. Seebach, E. Hungerbühler in R. Scheffold: *Modern Synthetic Methods 1980*, Salle/Sauerländer, Aarau 1980.
- [99] K. Tomioka, K. Koya, *Kagaku No Ryoiki* 34 (1980) 762.
- [100] Allgemeinere Übersichten über enantioselektive Reaktionen siehe z. B. J. W. ApSimon, R. P. Seguin, *Tetrahedron* 35 (1979) 2797; D. Valentine, Jr., J. W. Scott, *Synthesis* 1978, 329.
- [101] J. Chatt, G. L. M. daCâmara Pina, R. L. Richards: *New Trends in the Chemistry of Nitrogen Fixation*, Academic Press, New York 1981.
- [102] E. Thorn-Csányi, *Nachr. Chem. Tech. Lab.* 29 (1981) 700, zit. Lit.
- [103] D. Seebach, E. Hungerbühler, R. Naef, P. Schnurrenberger, B. Weidmann, M. F. Züger, *Synthesis* 1982, 138.
- [104] H. Rehwinkel, W. Steglich, *Synthesis* 1982, 826.
- [105] P. Schnurrenberger, M. F. Züger, D. Seebach, *Helv. Chim. Acta* 65 (1982) 1197.
- [106] M. F. Züger, unveröffentlichte Resultate, ETH Zürich 1981.
- [107] Vergleiche auch neuere Verfahren zur C-Metallierung mit Ti- und Zr-Derivaten: E. I. Negishi, *Pure Appl. Chem.* 53 (1981) 2333.
- [108] T. Mukaiyama, *Angew. Chem.* 89 (1977) 858; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 16 (1977) 817; siehe auch J. Fleming, *Chem. Soc. Rev.* 10 (1981) 83; T. H. Chan, J. Fleming, *Synthesis* 1979, 761.
- [109] Siehe auch J. E. McMurry, *Acc. Chem. Res.* 7 (1974) 281; E. J. Corey, R. L. Danheiser, S. Chandrasekaran, *J. Org. Chem.* 41 (1976) 260; B. P. Mundy, R. Srinivasa, Y. Kim, T. Dolph, *ibid.* 47 (1982) 1657.
- [110] D. A. Evans, L. R. McGee, *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 3975; Y. Yamamoto, K. Maruyama, *ibid.* 21 (1980) 4607.
- [111] M. T. Reetz, R. Peter, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 4691.
- [112] J. Schartz, Y. Hayasi, *Tetrahedron Lett.* 21 (1980) 1497.
- [113] S. H. Pine, R. Zahler, D. A. Evans, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 3270.
- [114] J. W. S. Stevenson, T. A. Bryson, *Tetrahedron Lett.* 23 (1982) 3143.
- [115] F. N. Tebbe, G. W. Parshall, G. S. Reddy, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 3611.
- [116] T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 5974.
- [117] B. E. Rossiter, T. Katsuki, K. B. Sharpless, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 464.
- [118] E. J. Corey, S. I. Hashimoto, A. E. Barton, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 721.
- [119] K. Mori, T. Ebata, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 4281.
- [120] T. Katsuki, A. W. M. Lee, P. Ma, V. S. Martin, S. Masamune, K. B. Sharpless, D. Tuddenham, F. J. Walker, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 1373; P. Ma, V. S. Martin, S. Masamune, K. B. Sharpless, S. M. Viti, *ibid.* 47 (1982) 1378; A. W. M. Lee, V. S. Martin, S. Masamune, K. B. Sharpless, F. J. Walker, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 3515.
- [121] W. R. Roush, R. J. Brown, *J. Org. Chem.* 47 (1982) 1371.
- [122] K. B. Sharpless, C. H. Behrens, T. Katsuki, A. W. M. Lee, V. S. Martin, M. Takatani, S. M. Viti, F. J. Walker, S. S. Woodard, *Pure Appl. Chem.*, in Druck.
- [123] K. Ziegler, *Naturwiss. Rundsch.* 18 (1965) 1.
- [124] M. T. Reetz, *Top. Curr. Chem.* 106 (1982) 1.
- [125] M. T. Reetz, R. Steinbach, K. Keßler, *Angew. Chem.* 94 (1982) 872; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 864; *Angew. Chem. Suppl.* 1982, 1899.

Synthetische Genfragmente in der Gentechnik – Die Renaissance der Chemie in der Molekularbiologie**

Von Julian E. Davies und Hans Günter Gassen*

Die Chemie und die Biologie waren die gemeinsamen Wegbereiter der molekularen Genetik. Die sensationellen Fortschritte in der Entschlüsselung des genetischen Apparates in den letzten zwanzig Jahren sind aber fast ausschließlich den Molekularbiologen zu danken. Die Chemiker haben sich anderen Fragestellungen zugewandt. Anhand der Entwicklungen auf dem Gebiet der Gentechnik lassen sich die neuen Anforderungen an die Chemie verdeutlichen. Nach einer kurzen Einführung in die Genetik von Bakterien werden die molekularen Grundlagen der Gentechnik behandelt, untergliedert in in-vitro-Rekombination und in-vivo-Transformation. Die Wahlmöglichkeiten bei Passagier-DNA, bei Vektoren und Wirtszellen werden erörtert. Während die in-vitro-Rekombination von DNA und die in-vivo-Transformation von Zellen leicht erlernbar sind, erfordert die Suche nach dem richtigen Klon detaillierte mikrobiologische Kenntnisse und das Beherrschen eines breiten Spektrums analytischer Methoden. Anhand der automatisierbaren chemischen Synthese von Genfragmenten nach dem Merrifield-Prinzip wird schließlich dargelegt, daß sich die Chemie wieder mit Erfolg biologisch ausgerichteten Fragestellungen zuwendet.

1. Einführung^{***}

Heute sind etwa 6 Millionen chemische Verbindungen bekannt, viele sind Naturstoffe, die meisten aber haben zu-

vor nie auf unserer Erde existiert. Voller Bewunderung stehen wir vor dieser synthetischen Welt, die wir vorrangig den Organikern verdanken.

Ein Bakterium, z. B. *Escherichia coli*, verdoppelt oder teilt sich unter optimalen Wachstumsbedingungen in etwa 20 Minuten; in dieser kurzen Spanne wird ein neues Lebewesen konstruiert. Tabelle 1 führt die Biomoleküle auf, die während dieser Zeit von einem Bakterium synthetisiert werden müssen. Richten wir unser Augenmerk nur auf die Desoxyribonucleinsäure (DNA) und die Proteine, so werden schon anhand dieser Makromoleküle die genialen Fähigkeiten einer lebenden Zelle überzeugend dokumentiert. Gestreckt ist die DNA ein Faden von etwa 1–2 mm mit einem Molekulargewicht von $2.4 \cdot 10^9$. Dieses Molekül besteht aus ca. 4 Millionen Nucleotidpaaren, die über ein Ri-

[*] Prof. Dr. H. G. Gassen
Institut für Organische Chemie und Biochemie
der Technischen Hochschule
Petersenstraße 22, D-6100 Darmstadt
Prof. Dr. J. E. Davies
Biogen S. A.
Route de Troinex 3, CH-1227 Carouge/Genève (Schweiz)

[**] Nach einem einleitenden Vortrag von J. E. Davies beim EMBO-Workshop „Prospects of Automation in Gene Synthesis“ am 27. März 1982 in Darmstadt (siehe auch [100]).

[***] Glossare genetischer und gentechnischer Ausdrücke: *Science* 209 (1980) 1435; A. L. Lehninger: *Principles of Biochemistry*, Worth Publishers, New York 1982, S. 969; R. C. King: *A Dictionary of Genetics*, Oxford University Press, London 1974.

bose-Phosphat-Rückgrat miteinander verknüpft sind. Bei jeder neuen Zelle muß das Erbmaterial oder Genom eine exakte Kopie der elterlichen DNA sein; schon ein falsch positioniertes Nucleotidpaar kann für die Zelle tödlich sein. Der Einzeller *E. coli* produziert innerhalb von 20 Minuten 3000 verschiedene Proteine. Die größten Proteine, wie der Fettsäuresynthetase-Komplex, haben ein Molekulargewicht von ca. 3 Millionen, und sie setzen sich aus 25000 Aminosäuren zusammen. Deren Reihenfolge im Protein wird von der Nucleotidsequenz der DNA bestimmt. Bevor Proteine in der Zelle ihre Rolle als Katalysator oder Strukturprotein übernehmen können, müssen sie oft noch chemisch modifiziert werden und eine bestimmte, durch die Aminosäuresequenz festgelegte Konformation einnehmen. Zellen haben nicht nur die Fähigkeit, die in Tabelle 1 aufgeführten Substanzen zu synthetisieren, sie regeln auch die Menge der Produkte nach einem genauen Zeitplan.

Tabelle 1. Molekulare Komponenten eines *E.-coli*-Bakteriums. Das Kulturmedium enthält als Kohlenstoff- und Energiequelle nur Glucose. Alle übrigen Bestandteile sind anorganische Salze; Sauerstoff wird durch eine intensive Belüftung der Kultur zugeführt.

| Komponente | Gewichtsprozent | ungefähre Zahl der Molekülspezies |
|--------------------|-----------------|-----------------------------------|
| Wasser | 70 | 1 |
| Proteine | 15 | 3500 |
| DNA | 1 | 1 |
| RNA | 6 | 1000 |
| Kohlenhydrate | 3 | 50 |
| Lipide | 2 | 40 |
| Bausteine [a] | 2 | 500 |
| anorganische Ionen | 1 | 12 |

[a] Bausteine bedeutet hier Verbindungen wie Coenzyme oder Dicarbonsäuren.

Verglichen mit den Synthesefähigkeiten eines primitiven Mikroorganismus befindet sich unsere heutige Organische Chemie noch in der Steinzeit. Bei dieser etwas lapidaren Feststellung sollte jedoch nicht unberücksichtigt bleiben, daß Bakterien ca. 3.5 Milliarden Jahre Zeit hatten, ihre Synthesestrategien zu optimieren. Vielleicht können Chemiker von dem Stoffwechsel der lebenden Zelle lernen, ihre Reaktionen so durchzuführen, daß die Anwendung hoher Temperaturen und Drücke vermieden und die Produktion toxischer Abfälle minimiert werden kann. Die Verwendung Enzym-ähnlicher Katalysatoren mit großen Turnover-Zahlen und hochreaktiver, aber selektiver Substrate analog den Coenzymen könnte uns diesem Ziel näher bringen. Bei der Synthese von Substanzen mit mehreren chiralen Zentren lassen sich bereits ermutigende Ansätze einer kombinierten biochemisch-organischen Synthesestrategie erkennen. Bisher hat sich die Organische Chemie vorwiegend mit der Synthese von Naturstoffen beschäftigt; für die nähere Zukunft scheint es naheliegend, die Synthesefähigkeiten der Lebewesen zu nutzen, aber das Syntheseprogramm, d. h. ihren genetischen Apparat, zu kontrollieren und zu modifizieren. Dieses Verfahren kennen wir unter der Bezeichnung in-vitro-Rekombination von Nucleinsäuren oder allgemeiner formuliert als Gentechnik, Gentechnologie oder Genmanipulation. Mit diesem Aufsatz soll anhand der Entwicklung der Gentechnik

der Beitrag der Chemie zur Molekularbiologie beispielhaft erläutert werden.

2. Chemie und Biologie, Wegbereiter der Molekularbiologie

Die Beiträge zur Aufklärung der Konstitution der Nucleinsäuren waren wohl der erste Schritt bei der Entzifferung der genetischen Botschaft der Lebewesen. *Friedrich Miescher* begann 1859 mit der Isolierung und Charakterisierung der Nucleinsäuren oder des Nucleins, wie er es nannte^[1]. Nur sechs Jahre später berichtete *Gregor Mendel* vor dem Naturforschenden Verein in Brünn über seine Versuche mit Pflanzenhybriden und begründete so die genetische Richtung der Molekularbiologie^[2]. Während der folgenden 50 Jahre waren es außer *Miescher* vor allem die Chemiker *Alfred Kössel*, *Emil Fischer* und *Wilhelm Traube*, welche zuerst die Struktur der vier Nucleobasen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin aufklärten^[3]. Um 1930 wurde erkannt, wie sich DNA enzymatisch abbauen läßt, und es gelang *Levene* et al., die Desoxyribose als Baustein der DNA zu identifizieren^[4]. Nach 1950 kamen die wichtigsten Beiträge zur Nucleinsäurechemie von *Todd*, *Fox*, *Griffith* und *Chargaff*^[5]. Als krönenden Abschluß dieser fast 100 Jahre währenden Forschung am „Nuclein“ formulierten *Watson* und *Crick* ihr Konzept der DNA-Konformation: eine doppelsträngige, rechtsgängige Doppelhelix, wobei die komplementären Basenpaare das Innere der Helix bilden, während die Ribose-Phosphodiesterkette nach außen gerichtet ist (siehe auch Fig. 2)^[6,7]. Dabei bleibt der Durchmesser der Helix konstant, da ein Basenpaar immer aus einer kleinen Pyrimidin- und einer großen Purinbase besteht. Stabilisiert werden die Basenpaare durch die Bildung von zwei oder drei Wasserstoffbrückenbindungen. Molekularbiologen geben das Molekulargewicht der DNA zumeist in Basenpaaren (bp) oder Kilobasenpaaren (kbp) an. Korrekt ausgedrückt sind dies Nucleotidpaare, etwa G:C oder A:U, mit einem Molekulargewicht von je 660 und einer „DNA-Länge“ von 0.34 nm. Da das Manipulieren der DNA fast ausschließlich Nucleotidpaare betrifft, und sich Nucleotidpaare nur in den heterocyclischen Basen unterscheiden, soll auch hier der Term Basenpaare benutzt werden.

In den folgenden Jahren konzentrierte man sich in der Nucleinsäurechemie auf die Methodenentwicklung^[8]. Aus der Vielzahl seien erwähnt: Papier- und Ionenaustauschchromatographie, UV-Absorptionsspektroskopie, Elektrophorese, Sedimentationsanalyse, Lichtstreuung, Viscosimetrie, Elektronenmikroskopie, Röntgenbeugung und die Verwendung von Radioisotopen. Mit fast jeder damals neuen Technik ließen sich detaillierte Einblicke in die Konformation und Reaktivität von Nucleinsäuren gewinnen. Allmählich entwickelte sich die Nucleinsäurechemie zu einem der Eckpfeiler der neuen Molekularbiologie.

Das große Interesse an der Chemie der Nucleinsäuren hat natürlich seine Ursache darin, daß sie als Träger und Übermittler der Erbinformation dienen. Trotz der Pionierarbeiten von *Miescher* und seinen Kollegen in der Chemie und in der Physiologie dauerte es etwa 80 Jahre, bis 1944 *Avery*, *MacLeod* und *McCarthy* als erste ein schlüssiges Experiment durchführten, das die Rolle der Nucleinsäuren

als Träger der Erbinformation bewies^[9]. In ihren klassischen Experimenten mit Pneumococcen zeigten sie, daß eine Nucleinsäure vom Thymus-Typ das „transformierende Prinzip“ ist.

In der Rückschau fällt auf, daß bereits *Hartwig* und *Fol*, als sie Struktur und Funktion der Chromosomen untersuchten, fast prophetisch die Funktion des „Nucleins“ beschrieben^[10,11]. *Hartwig* formulierte: „Wir glauben aus unseren Versuchen ableiten zu können, daß die Substanz Nuclein nicht nur verantwortlich für den Befruchtungsvorgang ist, sondern auch für die Weitergabe der Erbmerkmale“. Aber weder die vorausschauende Vermutung von *Hartwig* noch das beweiskräftige Experiment von *Avery* et al. vermochten es, ihre jeweiligen Zeitgenossen von der Rolle der DNA als Erbmaterial zu überzeugen. Erst das genial einfache Experiment von *Hershey* und *Chase*, die nachwiesen, daß ³²P-markierte DNA und nicht ³⁵S-markiertes Protein das Erbmaterial von Bakteriophagen ist, machte die biologische Funktion der DNA klar^[12]. Zu diesem Zeitpunkt etwa trafen sich die Wege der Chemie und der Biologie der Nucleinsäuren, und ein neues Arbeitsgebiet etablierte sich, die molekulare Genetik.

In den letzten 20 Jahren sind die Fortschritte auf diesem Gebiet atemberaubend gewesen. Erwähnt werden sollte die Aufklärung des Mechanismus der DNA-Replikation, die Entschlüsselung des genetischen Codes und der Funktion von mRNA, tRNA und Ribosomen bei der Proteinbiosynthese sowie die chemische Synthese des Gens für die Tyrosin-tRNA^[13]. Ohne die Leistung der Chemiker herabzusetzen, muß man doch einräumen, daß Biologen den weitaus größeren Beitrag zur Entschlüsselung der Erbvorgänge leisteten. Nach großartigen Beiträgen zur Nucleinsäurestruktur bis etwa 1960 verloren die meisten Chemiker das Interesse an biologischen Vorgängen. Chemiker waren z. B. so wenig an der DNA-Struktur interessiert, daß sie sich nicht mit der Sequenzierung der DNA befaßten. So war es einem von der Physik kommenden Mediziner überlassen, die lange bekannte Chemie der DNA, wie Methylierung und Hydrazinolyse, in eine wohl als genial zu bezeichnende Sequenzierungsmethode umzusetzen^[14]. *Walter Gilbert* erhielt für diese Pioniertat den Nobelpreis; die Sequenzanalyse von DNA ist heute einer der Eckpfeiler der Gentechnik^[15].

3. Der genetische Apparat einer Bakterienzelle

Um die Grundlagen der Gentechnik zu verstehen, ist die Kenntnis der genetischen Abläufe in einer einfach gebauten Zelle unumgänglich^[16]. Da die prinzipiellen Schritte in Pro- und Eukaryonten gleich verlaufen, höhere Zellen aber komplexer gebaut sind, werden wir uns hier auf die Prokaryonten beschränken. Bei den Mikroorganismen beziehen wir uns meist auf das Bakterium *Escherichia coli*, das ursprünglich von dem deutschen Mikrobiologen *Escherich* aus dem Darmtrakt von Warmblütern isoliert wurde. In der Zwischenzeit hat sich die Situation etwas verändert, denn heute sind E.-coli-Bakterien am häufigsten in molekularbiologischen Laboratorien anzutreffen. Dieses Bakterium ist zwar nur 1 × 2 µm groß, seine Bedeutung für die Entwicklung der Molekularbiologie ist aber außerordentlich.

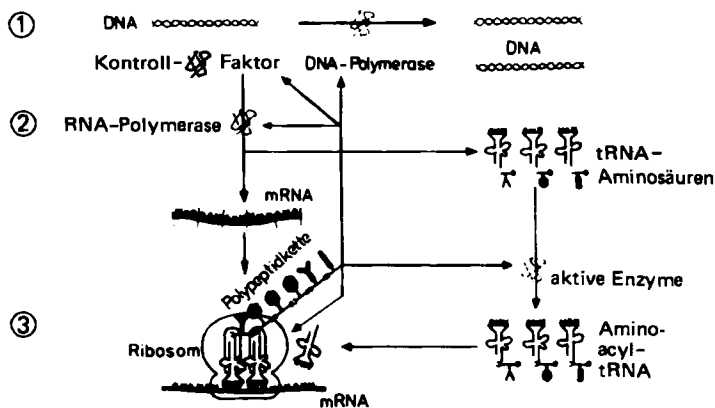


Fig. 1. Fluß der Information von der Desoxyribonucleinsäure (DNA) zur Polypeptidkette. Die Figur zeigt ein stark vereinfachtes Schema der DNA-codierten, Ribosomen-abhängigen Proteinbiosynthese mit den drei Schritten Replikation ①, Transkription ② und Translation ③. Bei der Replikation, zu meist während der Zellteilung, wird die DNA mit der DNA-Polymerase, vielen Hilfsenzymen und Kontrollfaktoren verdoppelt. Bei der Transkription wird die DNA in drei Typen einzelsträngiger RNA „umgeschrieben“. Es entsteht die Boten-RNA (mRNA) als Matrice der genetischen Information, die ribosomale RNA (rRNA) als Baustein der Ribosomen und die Transfer-RNA (tRNA) als Überträgermolekül für die Aminosäuren. Diese werden unter Beteiligung von Aminoacyl-Synthetasen mit ihren tRNA-Molekülen kovalent verknüpft. An den Ribosomen werden schließlich die Proteine unter Verwendung der mRNA als Matrice und der Aminoacyl-tRNA als Substrate synthetisiert.

Der Fluß der genetischen Information in einem Prokaryonten von der DNA zu dem Protein ist in Figur 1 dargestellt. Als Speicher für die genetische Information dient ein zirkuläres DNA-Molekül, das man als das Genom oder Chromosom bezeichnet. Eine Informationseinheit auf der DNA, ein Operon^[17], untergliedert sich in einen regulativen Teil, den Promotor und den Operator, und in ein oder mehrere Strukturgene. Ein Strukturgen ist ein DNA-Abschnitt, der die Information zur Synthese einer RNA oder eines Proteins enthält (Fig. 2). Als RNA-Transkripte sind zu nennen: die Boten-RNA (mRNA), die ribosomale RNA (rRNA) und die Transfer-RNA (tRNA).

Sehr oft sind die Enzyme eines Syntheseweges, wie die vier Enzyme für die Tryptophansynthese, auf einem Operon zusammengefaßt, um eine koordinierte Regulation der Katalysatormengen zu ermöglichen^[18]. Der Promotor ist die Bindestelle für die DNA-abhängige RNA-Polymerase, während der Operator den „an-aus“-Schalter für ein oder

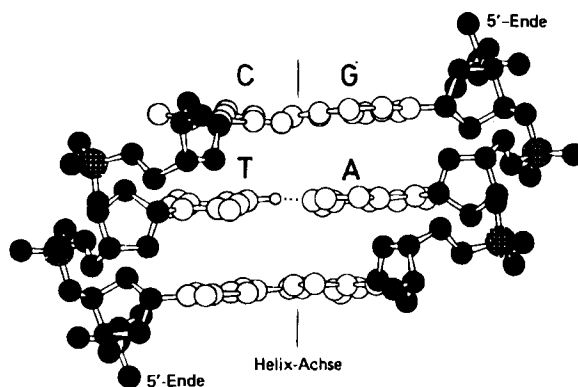


Fig. 2. Ein drei Basenpaare enthaltender Ausschnitt aus der DNA. Mit dunklen Kugeln sind die beiden gegenläufigen (3'→5' und 5'→3') Ribose-Phosphat-Ketten gezeichnet; das P-Atom ist schraffiert. Die Heterocyclen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin stehen fast rechtwinklig zur Helixachse. A und T sowie G und C bilden je ein durch zwei bzw. drei Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiertes Basenpaar.

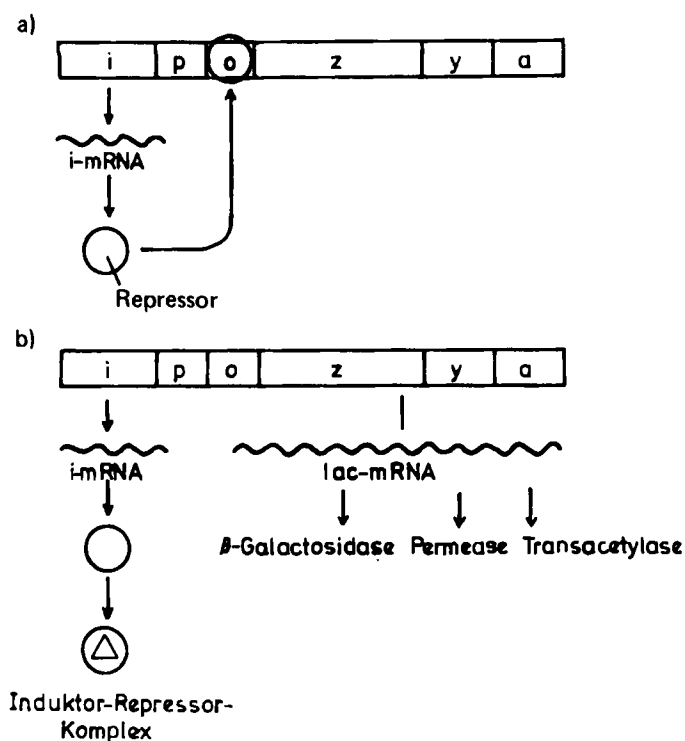


Fig. 3. Das Diagramm zeigt schematisch die Organisation des Lactose-Operons (Lac-Operon). Die Expression der drei Enzyme β -Galactosidase, Permease und Transacetylase, die für den Abbau von Lactose benötigt werden, wird von dem regulativen Teil des Operons gesteuert. Der Promotor (P) ist die Bindestelle für die DNA-abhängige RNA-Polymerase. Die Affinität eines Promotors zur Polymerase wird durch die Nucleotidsequenz bestimmt. Im Lac-Operon enthält der Promotor 40 bp, und er zeigt eine zweifache Symmetrie. Der Operator (O) ist der „an-aus“-Schalter für die Genexpression. Das Repressorprotein, codiert von dem „i“-Gen, bindet an den Operator und schaltet das Gen ab. Beim Lac-Operon besteht der Operator aus 28 bp. Der Induktor, z. B. Allolactose, inaktiviert den Repressor. a) Es wird ein Repressor synthetisiert, der den Operator blockiert und damit die Transkription der Strukturgene (z, y, a) verhindert. b) Der Repressor wird von einem Induktor unter Bildung eines Induktor-Repressor-Komplexes inaktiviert; die Synthese der drei Enzyme verläuft ungehindert.

mehrere Strukturgene repräsentiert (Fig. 3). Bindet ein Repressor-Protein an den Operator, so sind die nachfolgenden Gene eines Operons abgeschaltet. Nur ein spezifischer Induktor – z. B. ein Metabolit – kann den Repressor von der DNA verdrängen. Von dem Strukturteil des Ope-

rons wird von einem der beiden DNA-Stränge, dem codogenen Strang, die mRNA als exakt basenkomplementäres Replikon kopiert. Als „kurzlebige“ einzelsträngige Ribonucleinsäure liefert die mRNA das Programm, das im Translationsschritt von den Ribosomen entziffert und in eine Aminosäuresequenz, ein Protein, umgesetzt wird^[19]. Auch bei der Translation kann die Proteinmenge reguliert werden. Die mRNA hat an ihrem 5'-Ende eine Bindestelle für Ribosomen, die man als Shine-Dalgarno-Sequenz bezeichnet^[20]. Die Affinität dieser Sequenz für die Ribosomen entscheidet, wie oft eine bestimmte mRNA als Programm für die Proteinsynthese genutzt wird. Dieser Informationsfluß von der DNA zu den Proteinen ist im Prinzip in allen Lebewesen identisch. Bei Eukaryonten laufen Replikation, d. h. die Verdoppelung der DNA vor einer Zellteilung, und Transkription im Zellkern ab. Die Synthese der mRNA ist ein sehr komplexer Vorgang^[21].

Erst 1944 stellte sich heraus, daß auch Bakterien sexuelle Organismen sind^[22]. Als die Sexualität der E.-coli-Bakterien im Detail untersucht wurde, fand man, daß die Mikroorganismen außer ihrem zentralen Genom extrachromosomale, bezüglich Replikation und Transkription autonome genetische Elemente enthalten^[23,24]. Die Entdeckung dieser als Fertilitätsfaktor F („Sexfaktor“) bezeichneten autonomen DNA-Moleküle war von vorrangiger Bedeutung für die Entwicklung der Gentechnik.

Zwar können Bakterien Teile ihres genetischen Materials austauschen, sie bilden aber nicht, wie bei Eukaryonten üblich, echte Zygoten. Während der Paarung, bei Bakterien als Konjugation bezeichnet, werden DNA-Stücke von der Spenderzelle auf eine Empfängerzelle übertragen (Fig. 4). Dabei enthalten die Spender-Bakterien eine kleine ringförmige und doppelsträngige DNA (F-Faktor), die etwa 2% der gesamten DNA der Bakterienzelle ausmacht. Ein ähnliches DNA-Molekül, der sogenannte Hfr-Faktor („high frequency of recombination“), ermöglicht die Integration des F-Faktors in das Genom und damit die Übertragung eines DNA-Stranges vom Spender-Genom auf das Empfänger-Genom.

Bald nach der Entdeckung der F-Faktoren wurden die Resistenzfaktoren (R-Faktoren), ebenfalls kleine zirkuläre

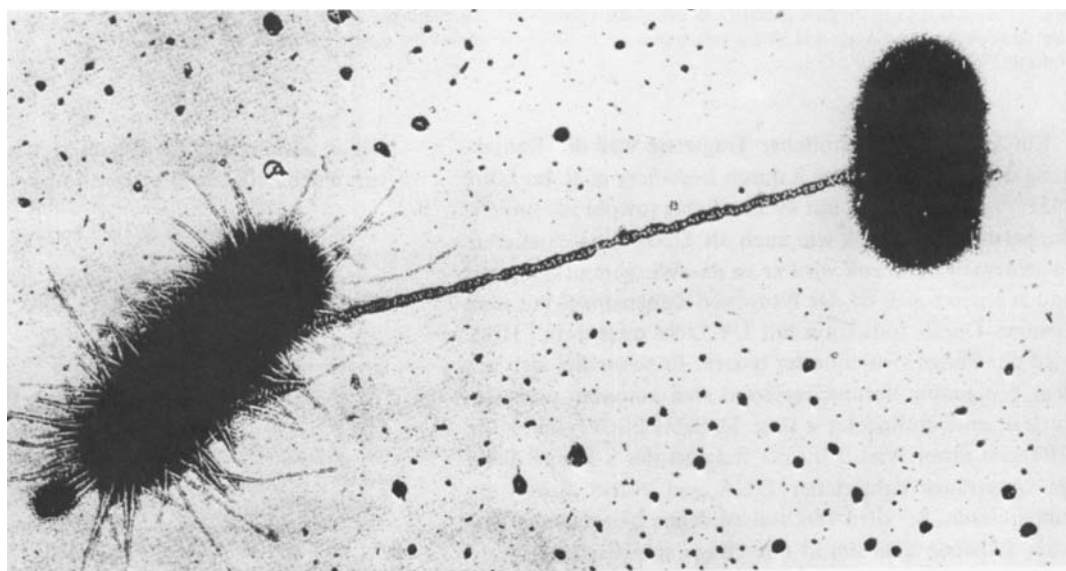


Fig. 4. Konjugation bei Bakterien. Zwischen F^+ - und F^- -Bakterien (Spender bzw. Empfänger) kann sich während der Konjugation eine Brücke bilden, durch die DNA vom Spender zum Empfänger transportiert wird.

DNA-Moleküle, isoliert; sie verleihen ihrem Wirt Antibiotica- oder Colicin-Resistenz^[25]. Die R-Faktoren wurden zuerst aus *Shigella dysenteria* während einer Ruhrepidemie 1959 in Japan gewonnen. Von Patienten, die mit Antibiotica behandelt wurden, isolierte man einen Shigella-Typ, der gegen die Antibiotica Streptomycin, Chloramphenicol und Tetracyclin sowie gegen Sulfonamide resistent war^[26]. Als man Zellen mit dieser Multiantibiotica-Resistenz mit Wildtypzellen mischte, wurde die Antibiotica-Resistenz mit großer Häufigkeit auf den Wildtyp übertragen. Später konnte gezeigt werden, daß alle vier Antibiotica-Resistenzgene auf einer ringförmigen DNA lokalisiert sind, die als autotransferierbares Plasmid bezeichnet wird. Anhand dieser Plasmide ließ sich beweisen, daß Bakterien extrachromosomale Elemente enthalten, die Proteine codieren, sich selbständig, d. h. unabhängig vom zentralen Genom replizieren und zwischen den Bakterien ausgetauscht werden. Die Entdeckung der Plasmide war ohne Zweifel von enormer Bedeutung für die Entwicklung der Gentechnik^[27].

gung bezeichnet man als Transduktion. Der Phage λ inseriert seine DNA in eine spezifische Position des Wirtgenoms, während Phagen, wie P22, unspezifisch inserieren. Gerade der Phage λ diente den Molekularbiologen lange als Werkzeug, um genetische Experimente durchzuführen. Als es noch keine in-vitro-Rekombination gab, wurde er für die in-vivo-Rekombination benutzt. Die Aufklärung des Lebenszyklus des Phagen λ , die Möglichkeit, die Wirtgene durch spezifische Insertion zu inaktivieren und spezifische Gene durch Transduktion zu übertragen, haben die Ära der Kloniertechniken eingeleitet.

Wenn wir das Molekulargewicht des zentralen Genoms mit dem von F-Faktoren, Plasmiden und Phagen vergleichen, so repräsentieren diese DNA-Zwerge nur einen winzigen Bruchteil der Erbinformation (Tabelle 2). Sie beeinflussen jedoch entscheidend Genotyp und Phänotyp einer Zelle, und für die Gentechnik und Biotechnologie sind sie unentbehrlich geworden. Tabelle 3 faßt die bekannten Methoden zum Austausch von genetischem Material zwischen

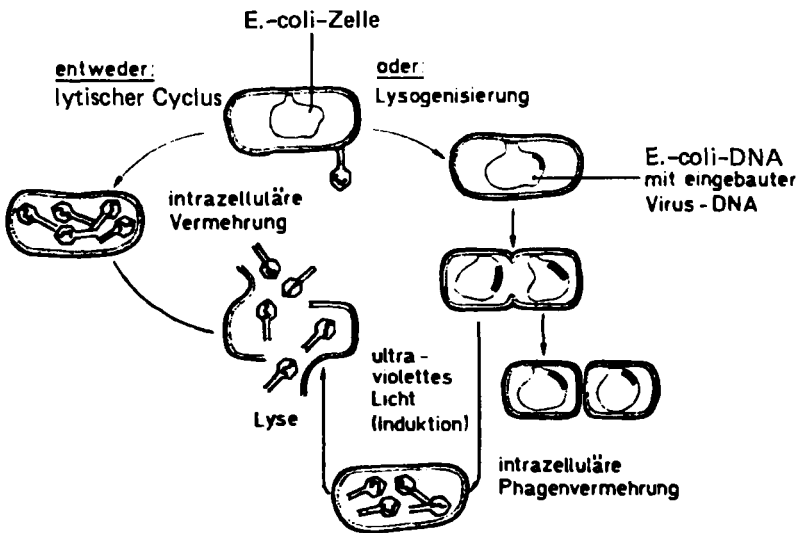


Fig. 5. Lytischer und lysogener Lebensweg eines λ -Phagen in einer E.-coli-Zelle. Beim Übergang von der Lysogenisierung zur Virulenz können λ -Phagen Teile des bakteriellen Genoms auf andere Bakterien übertragen; Viren vom Infektionstyp des λ -Phagen sind temperente Phagen, die nach Infektion in der Wirtszelle den Weg der Virulenz und der Temperenz einschlagen können. Die in Wirt-DNA inkorporierte λ -DNA nennt man Prophage. Zellen mit Prophagen in ihrem Genom heißen lysogene Bakterien. λ -Phagen inserieren ihr Gen spezifisch zwischen das Lactose- und das Biotingen. Mit freundlicher Genehmigung von Autor und Verlag entnommen aus P. Knippers: *Molekulare Genetik*, Thieme, Stuttgart 1981.

Ein Ereignis von ähnlicher Tragweite war die Entdeckung des Bakteriophagen λ durch Lederberg et al. im Jahre 1951^[28]. Dieser Phage mit 49 kbp kann sowohl als lineare, doppelsträngige DNA wie auch als DNA-Ring existieren. In seinem Wirt *E. coli* wird er in das Wirtgenom integriert und repliziert sich in der lysogenen Lebensform mit dem Genom. Durch Induktion mit UV-Licht oder durch Hitze wird der Phage virulent oder lytisch. Er schneidet sich aus dem Wirtgenom heraus, repliziert sich autonom und produziert seine Hüllproteine (Fig. 5). Schließlich lysieren die λ -Phagen ihren Wirt. Sehr oft fungiert der λ -Phage dabei als Überträger bakterieller DNA von einem Bakterium zum anderen. Bei dem Wechsel zwischen lysogener zu lytischer Existenz übernimmt der Phage spezifische Gensegmente seines Wirts und überträgt sie bei der Infektion auf die nächste Zelle^[29]. Die Phagen-abhängige DNA-Übertra-

Zellen zusammen; mit diesen Methoden können wir DNA von einer Zelle zur anderen transferieren; sie ermöglichen

Tabelle 2. Molekulargewicht *MG* und Konturlänge *l* des Genoms einiger Organismen.

| Organismus | <i>MG</i> [kbp] [a] | <i>l</i> [μ m] |
|--------------------------|------------------------|------------------------|
| Polyoma- oder SV40-Virus | 5.1 | 1.8 |
| λ -Phage | 48.6 | 17 |
| <i>E. coli</i> | 4 000 | 1360 |
| Hefe | 13 500 | 4 600 |
| <i>Drosophila</i> [b] | 165 000 | 56 000 |
| Mensch | 2 900 000 | 990 000 |
| Plasmid pBR322 | 4.361 | 1.4 |

[a] 1 kbp \approx 1000 · 660 Da = 660 000 Da. 1 kbp repräsentiert $2.5 \cdot 10^{-4}$ des E.-coli-Genoms, aber nur $3.4 \cdot 10^{-7}$ des Humangenoms. *MG* und *l* des Humangenoms umfassen die 23 Chromosomen; beides sind natürlich nur rechnerische Größen. [b] *Drosophila* = Taufliege.

Tabelle 3. Gebräuchliche Methoden zum Austausch von genetischem Material zwischen Zellen.

| Methode | Prinzip |
|----------------|--|
| Transformation | Aufnahme freier DNA, führt zu neuem Phänotyp der Zelle |
| Transduktion | Transfer von DNA mit einem Virus als Vektor |
| Transfektion | Infektion von Zellen mit isolierter Virus-DNA |
| Konjugation | Sexueller Transfer von DNA von einem F ⁺ - zu einem F ⁻ -Bakterium |
| Zellfusion | Integration von Zellkernen |

auch den Wechsel zwischen Plasmid und Genom und umgekehrt (Fig. 6).

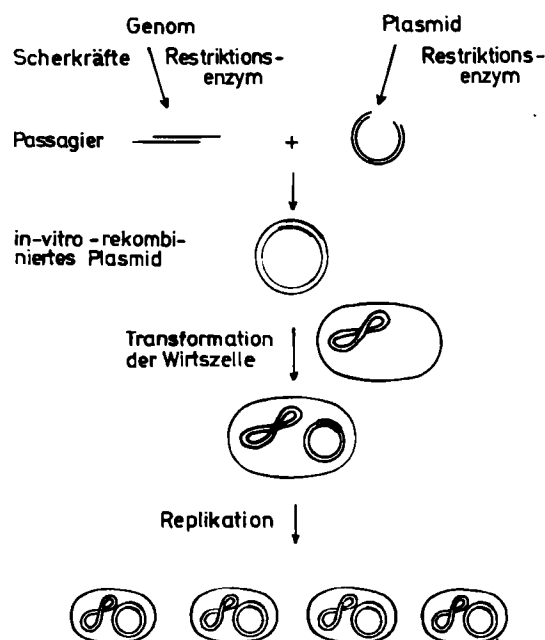


Fig. 6. Insertion von Passagier-DNA in einen Vektor. Der Passagier kann entweder in den linearisierten Vektor eingesetzt werden, oder ein „stuffer“-Fragment wird durch zwei Restriktionsschnitte entfernt, und der Passagier wird eingesetzt. Auf diese Weise ändert sich die Größe des Vektors nicht.

Die kleinen ringförmigen DNA-Moleküle, wie F- und R-Faktoren sowie Phagen, haben es uns gestattet, die Grundlagen der Genstruktur, der Genregulation und der Genexpression aufzuklären. Die durch diese Kenntnisse möglich gewordene Gentechnik ist aber keine Erfindung der Molekularbiologen. Gentechnische Prozesse laufen in der Natur ständig ab, und dabei wendet sie auch Methoden an, die uns die gegenwärtigen Richtlinien für das Arbeiten mit in vitro rekombinierten Nucleinsäuren verbieten^[60].

4. Prinzipien der Gentechnik

Das Faszinierende an der Gentechnik liegt in der Möglichkeit, durch Transformieren und Klonieren von Zellen, z. B. Bakterien, Reinigung und Selbstvermehrung einer Substanz zu erreichen^[30-37]. Aus einer Lösung, die ein fmol eines DNA-Fragments als 0.01‰ einer Population enthält – ein Gemisch, das für Chemiker absolut unbrauchbar erscheint –, kann unter Anwendung der Gentechnik dieses

Fragment einheitlich und in mg-Mengen isoliert werden. So kann das „Umprogrammieren“ von Lebewesen als eine Art neuer Chemie betrachtet werden, mit der die Selbstvermehrung von Substanzen möglich ist. Etwas vereinfacht läßt sich die Gentechnik in folgende Schritte unterteilen: 1. Isolierung oder Synthese eines Gens oder eines DNA-Fragments; 2. Inserieren des Fragments in einen Vektor, meist ein Plasmid; 3. Einschleusen des Vektors in eine Zelle, die ihn als zusätzliches Informationselement akzeptiert; 4. Autonome Replikation oder Integration in das Wirtgenom; 5. Ablesen (Expression) der Fremdgene durch die Maschinerie des Wirts und damit Synthese der entsprechenden RNA und der Proteine. Zur Vereinfachung fassen wir im folgenden die beiden ersten Schritte als in-vitro-Rekombination – im Deutschen auch oft als Neukombination bezeichnet – und alle folgenden als in-vivo-Transformation zusammen.

Schließlich müssen die transformierten Zellen auf Kosten der Wildtypzellen vermehrt werden; dafür sind Wachstumsbedingungen notwendig, die es nur den transformierten Zellen ermöglichen, sich durch Teilung zu vermehren. Nachdem sich in einer Petrischale eine Kolonie oder ein Klon gebildet hat, werden sie in einer zweiten Petrischale vereinzelt, so daß man etwa 50 Kolonien pro Platte erhält. In einem „Screening“ muß jeder Klon getestet werden, ob er das gesuchte DNA-Fragment oder das Protein als Genprodukt enthält. Oft müssen 20 000 Kolonien untersucht werden, bevor man einen positiven Klon findet. Mit diesem Klon wird dann zuerst eine 1 mL-Flüssigkultur geimpft, und durch stufenweises „scale up“ erhält man etwa 10 L einer Kultur mit dem transformierten Bakterium. Entscheidend beim Klonieren ist der Screening-Schritt, das richtige Verfahren, möglichst schnell unter 20 000 Kolonien den positiven Klon zu finden, und diesen dann selektiv zu vermehren.

Rekombination und Transformation gemeinsam werden in salopper Ausdrucksweise oft als „Klonieren“ bezeichnet. Klonieren ist aber eigentlich die Vermehrung von Zellen durch Teilung aus ursprünglich einer Stammzelle; der entstehende Zellhaufen (Klon) enthält deshalb nur genotypisch und phänotypisch identische Zellen. Die Klonierung diploider Eukaryonten ist komplizierter.

Befassen wir uns zuerst mit einem einfachen Experiment. Wir schneiden ein definiertes Gen aus dem zentralen Genom heraus, inserieren es in ein Plasmid und bringen das modifizierte Plasmid in die Zelle zurück. Welchen Vorteil bringt diese Operation? Das E.-coli-Genom enthält etwa $4 \cdot 10^6$ bp, dabei entfallen im Mittel 1150 bp auf ein Gen. So besteht das Genom aus 3500 Genen, und ein Gen repräsentiert 0.3‰ des Genoms. Ein Plasmid umfaßt rund 10^4 bp, d. h. ein einziges Gen macht schon ca. 10% der Plasmid-DNA aus. Das Gen läßt sich mehrfach in ein Plasmid inserieren („gene amplification“), und Zellen können bis zu 200 Plasmide enthalten („high copy number plasmid“). Behandelt man Bakterien mit Chloramphenicol, so werden die Replikation des Genoms und die Proteinbiosynthese inhibiert, während sich sogenannte Col-E1-Plasmide (diese Plasmide tragen das Colicin-Resistenzgen) normal replizieren. Die Zelle wird zu einem „Sack voller Plasmide“, und man kann durch diesen experimentellen Trick DNA-Fragmente oder Gene aus einer 1 L-Kultur in mg-Mengen isolieren.

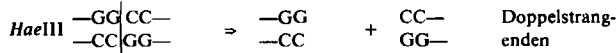
5. Die in-vitro-Rekombination von Nucleinsäuren

Reaktionen an der DNA in Lösung können vereinfacht als Schneiden und Spleißen bezeichnet werden. Läßt man auf das bakterielle Genom Scherkräfte einwirken, etwa durch Pressen der DNA durch eine feine Düse, so wird der nur 2 nm breite, aber 1.2 mm lange DNA-Faden in Fragmente von etwa 20 kbp zerlegt. Diese Fragmentierung kann auch enzymatisch mit Restriktionsendonucleasen erfolgen (Tabelle 4)^[38-40]. Dies sind DNA-spaltende Enzyme,

Tabelle 4. Herkunft, Spalttyp [a], Erkennungssequenz und durchschnittliche Zahl der Spaltstellen bei einem Vektor für Prokaryonten, pBR322, und für Eukaryonten, SV40, einiger der etwa 200 bekannten Restriktionsendonucleasen (Restriktionsenzyme); etwa 50 dieser Enzyme sind kommerziell erhältlich. Nicht bei allen Restriktionsendonucleasen sind Erkennungssequenzen und Spaltstellen identisch.

| Restriktionsendonuclease | Herkunft | Erkennungssequenz | Spalttyp [a] | Zahl der Spaltstellen | |
|--------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------|-----------------------|------|
| | | | | pBR322 | SV40 |
| <i>EcoRI</i> | <i>Escherichia coli</i> RY13 | GAATTC | II | 1 | 1 |
| <i>HindIII</i> | <i>Haemophilus influenzae</i> | AAGCTT | II | 1 | 6 |
| <i>HpaII</i> | <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | CCGG | II | 26 | 1 |
| <i>PstI</i> | <i>Providencia stuartii</i> | CTGCAG | II | 1 | 2 |
| <i>HaeIII</i> | <i>Haemophilus aegyptius</i> | GGCC | I | 22 | 19 |
| <i>HpaI</i> | <i>Haemophilus parainfluenzae</i> | GTTAAC | I | | 4 |

[a] Spalttyp I, z. B.



Spalttyp II, z. B.



die vier, fünf oder sechs Basenpaare erkennen, die als Doppelstrang eine symmetrische Sequenzanordnung (Palindrom) aufweisen. Eine Restriktionsendonuclease, die vier Basenpaare erkennt, spaltet rein statistisch nach 256 bp (4⁴). Bei sechs Basenpaaren erhöht sich die durchschnittliche Fragmentlänge auf 4096 bp (4⁶). Dabei schneidet eine Gruppe Restriktionsendonucleasen die DNA glatt, d. h. es entstehen doppelsträngige Enden; die zweite Gruppe dieser Enzyme schneidet die DNA „versetzt“, d. h. es entstehen Einzelstrangenden von zwei, drei oder vier Nucleotiden. Die perfekte Handhabung der bis jetzt bekannten ca. 200 Restriktionsendonucleasen zur Präparation von DNA-Fragmenten überschaubarer Kettenlänge ist eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Anwendung der Gentechnik (Fig. 7).

Ein DNA-Fragment, das aus einem Genom oder auch aus einem Plasmid herausgeschnitten wurde, bezeichnet man als Passagier-DNA („passenger-DNA“) oder vereinfacht oft als Passagier. Damit diese Passagier-DNA in einer Zelle als Programm fungieren kann, muß sie zuvor in vitro in ein Plasmid oder in einen Phagen eingebaut werden, denn diese sind die Carrier für den Transport der Passagier-DNA in die Zelle. Diese Carrier werden nach ihrer Funktion als Vektoren bezeichnet. Aus dem Passagier und

dem Vektor erhält man die rekombinierte DNA. Da Plasmide und Phagen DNA-Ringe sind, müssen sie zuerst durch einen Restriktionsendonucleaseschnitt linearisiert

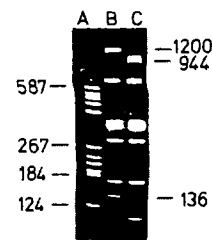


Fig. 7. Die Erstellung einer Restriktionskarte von Vektor und Passagier ist immer die Voraussetzung für eine Rekombination. Das jeweilige Fragment wird in mehreren Ansätzen mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, und je ein Ansatz wird in eine „Tasche“ eines Acrylamidgels gegeben. Nach der elektrophoretischen Trennung wird das Gel mit einer Ethidiumbromidlösung getränkt. Da an DNA gebundenes Ethidiumbromid stark fluoresziert, lassen sich die DNA-Banden im UV-Licht erkennen. Die Figur zeigt die elektrophoretisch getrennten Hydrolyseprodukte von Plasmiden. In Spur A sind die *HaeIII*-Hydrolyseprodukte von pBR322 als Größenstandard aufgetragen. Die Zahlen geben das Molekulargewicht in bp an. Spur B und C zeigen die Hydrolyseprodukte von pWH233 bzw. pVH51, wobei als Restriktionsenzym jeweils *HinfI* verwendet wurde.

werden. Durch nur einen Schnitt entsteht ein Insertionsvektor; schneidet man dagegen durch zwei Schnitte ein DNA-Fragment aus einem Plasmid heraus, so resultiert ein Austauschvektor („replacement vector“). Das herausgeschnittene Vektorfragment („stuffer fragment“) läßt sich dann gegen den Passagier austauschen, ohne daß die Plasmidgröße verändert wird. Passagier-DNA und linearisierte oder zirkuläre Vektoren lassen sich wie andere Makromoleküle trennen und reinigen. Dazu benutzt man vor allem „Reversed-Phase“-Chromatographie (RPC-5)^[41-43], Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) mit Ionenaustauschern oder „Reversed-Phase“-Material oder Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Für die in-vitro-Rekombination der DNA durch Spleißen werden hauptsächlich zwei Enzyme benötigt, die Oligonucleotid-Kinase^[44] und die DNA-Ligase^[45]. Ein erweitertes Enzymrepertoire zur Gentechnik ist in Tabelle 5 aufgelistet. Die Kinase benutzt ATP als Cosubstrat und phosphoryliert die 5'-Hydroxygruppe eines jeden DNA-Stranges. Zumeist wird dazu [³²P]ATP verwendet, um die DNA vor der eventuellen Reinigung radioaktiv zu markieren und somit fmol-Konzentrationen erfassen zu können. Die DNA-Ligase katalysiert dann eine Kondensationsreaktion, die zur Bildung der beiden Phosphodiesterbindungen zwischen der Phosphatgruppe des einen Fragments und der 3'-Hydroxygruppe des anderen Fragments führt (Fig. 8).

Benutzt man zur Fragmentierung des Genoms und zur Linearisierung des Plasmids das gleiche Restriktionsenzym, etwa *EcoRI*, so erhält man in beiden Fragmenten Einzelstrangenden, die basenkomplementär zueinander sind. Passagier und Vektor können einen Komplex bilden, der durch die Bildung von Basenpaaren, d. h. durch Wasserstoffbrückenbindungen, stabilisiert wird. Dieser Komplex erleichtert die Knüpfung der beiden Diesterbrücken zwischen den DNA-Fragmenten. Ein solches Spleißen oder Ligieren bezeichnet man als „sticky-end“-Ligation. Werden DNA-Fragmente mit Doppelstrangenden verknüpft – dies erfordert größere DNA-Ligase-Konzentrationen –, so

bezeichnet man dies als „blunt-end“-Ligation (Fig. 9). Zwar ist das Ligieren von DNA-Fragmenten eine Standardoperation im molekularbiologischen Laboratorium, die Methode ist aber trotzdem mit drei Problemen belastet. Der Vektor kann recyclieren, die Passagier-DNA kann oligomerisieren und der Passagier kann in zwei Orientierungen in den Vektor eingebaut werden. Das Auftreten der beiden zuerst genannten Probleme ist einfach festzustel-

Tabelle 5. Eine Auswahl von Enzymen, die bei der in-vitro-Rekombination von Nucleinsäuren benötigt werden.

| Enzym | Funktion |
|--|--|
| Restriktionsendonucleasen (EC 3.1.23) | Sequenz-spezifisches Schneiden der DNA |
| Polynucleotid-Kinase (EC 2.7.1.78) | 5'-Phosphorylierung von DNA- und RNA-Fragmenten Markierung mit [³² P]Phosphat |
| DNA-Ligase (EC 6.5.1.1) | Kondensation (Ligieren oder Spleißen) von DNA-Fragmenten |
| DNA-Polymerase (EC 2.7.7.7) | Polymerisiert Desoxynucleotidtriphosphate, benötigt eine einzelsträngige DNA-Matrize, aber ein doppelsträngiges DNA-Startstück |
| Desoxynucleotidyl-Transferase reverse Transkriptase | Verlängerung von 3'-Einzelstrangenden mit einem Nucleotid Synthese von DNA an einer RNA |
| S1-Nuclease | spezifische Hydrolyse einzelsträngiger DNA (DNA-Schleifen) |
| Desoxyribonuclease (EC 3.1.21.1) | unspezifische Hydrolyse von DNA |
| Ribonuclease A (EC 3.1.27.5) | Hydrolyse von RNA nach (3'→5')-Pyrimidin-nucleotiden |
| alkalische Phosphatase (EC 3.1.3.1) | Dephosphorylierung von RNA und DNA, d.h. Hydrolyse von Phosphomonoestern |

len: Die rekombinierte DNA wird mit dem ursprünglich benutzten Restriktionsenzym gespalten, und die rekombinierte DNA selbst sowie ihre Spaltprodukte werden durch eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach dem Moleku-

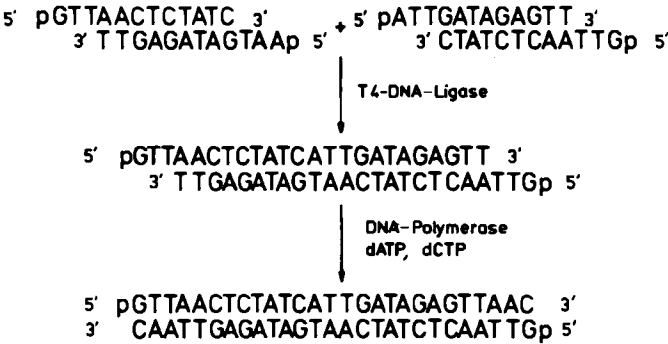


Fig. 8. Mechanismus der Ligation von DNA-Fragmenten mit DNA-Ligase. Freie 5'-Hydroxyenden müssen zuerst mit ATP und Oligonucleotid-Ligase phosphoryliert werden. Die einzelsträngigen Enden werden dann unter Verwendung von DNA-Polymerase mit den komplementären Nucleotiden verlängert.

largewicht getrennt (Fig. 7). Die korrekte Orientierung (Polarität) des Passagiers im Plasmid kann nur anhand seiner biochemischen Funktion überprüft werden. Die Insertion wird aber bezüglich der Polarität eindeutig, wenn man den Vektor an einer Stelle glatt und an der zweiten Stelle versetzt schneidet. Ein analog behandelter Passagier kann dann nur in eine Richtung inseriert werden (Fig. 9, ⑥).

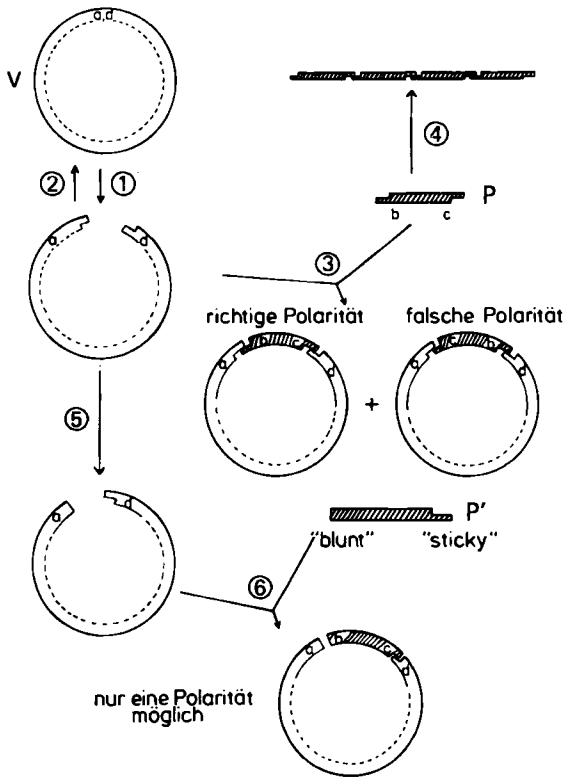


Fig. 9. Gewinnung rekombinierter DNA aus einem Passagier P und einem Vektor V (Plasmid). ① Linearisieren eines Plasmids mit einem Restriktionsenzym. ② Recyclisierung des linearisierten Plasmids mit einer Ligase. ③ Rekombination des Vektors V und des Passagiers P; die Produkte können je nachdem, ob „passende“ Enden oder nicht zusammengefügt werden, eine richtige oder falsche Polarität aufweisen. ④ Die Passagiere P können auch oligomerisieren. ⑤ Der linearisierte Vektor V erhält durch einen „Schnitt“ mit einem zweiten Restriktionsenzym ein „blunt-end“. ⑥ Rekombination des so gewonnenen Vektors mit einem passenden Passagier P'; dabei kann nur ein Produkt mit der richtigen Polarität entstehen.

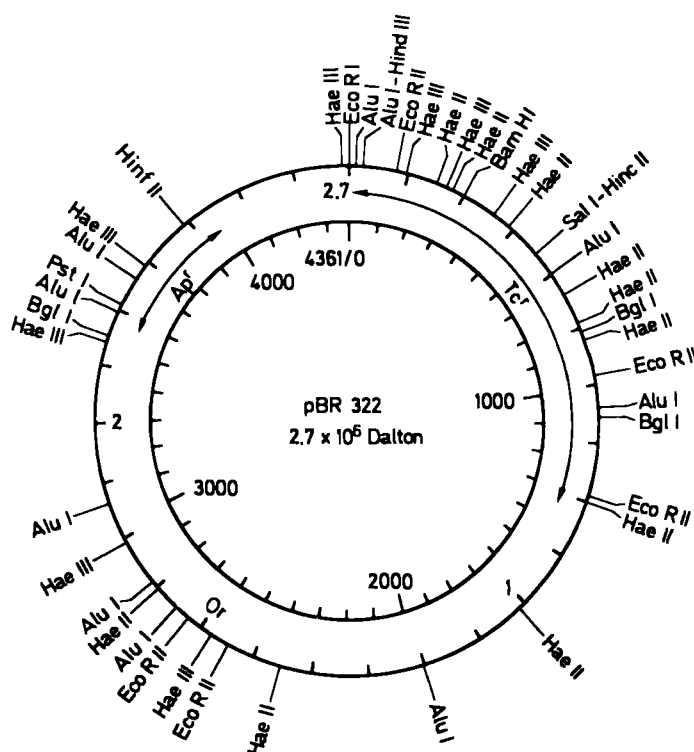
6. Die in-vivo-Transformation von Zellen

Im nächsten Teilschritt muß die rekombinierte DNA entweder als lineares oder als zirkuläres Molekül in eine Zelle, etwa ein Bakterium, eingebracht werden. Das Einschleusen eines Makromoleküls in eine Zelle ist problematisch, da Zellwand und Zellmembran solide Barrieren gegen Fremdstoffen sind. Das Eindringen freier DNA in die Zelle bezeichnet man als Transformation. Die Transformationshäufigkeit ist jedoch verschwindend gering: Etwa eine von 10^6 Zellen nimmt die Fremd-DNA auf^[46a]. Behandelt man jedoch Bakterien mit einer CaCl_2 -Lösung (10 mM), so werden Zellwand und Zellmembran durchlässiger, die Transformationshäufigkeit wird auf 10^{-3} erhöht. So veränderte Zellen bezeichnet man deshalb als kompetente Zellen^[46b]. Bakteriophagen wie λ oder P22 injizieren ihre DNA in ihre Wirtszelle, ein Verfahren, das als Transduktion bezeichnet wird. In einer Art Mimikry kann man die rekombinierte DNA aus Passagier- und λ -DNA in die Proteinhülle des Phagenkopfes verpacken^[47]. Dann dient der Phage als Transportvehikel und injiziert die rekombinierte DNA mit hoher Effizienz in das Bakterium. Da diese Methode nur funktioniert, wenn die Passagier- und Vektor-DNA etwa die Größe der λ -DNA (49 kbp) haben, kann das Verfahren gleichzeitig zur Größenselektion der Passagier-DNA genutzt werden.

Nur wenn das Plasmid auch alle Regulationssignale der Transkription und der Translation enthält, und wenn die letzteren im richtigen Leseraster zum Startcodon AUG stehen, kann eine rekombinierte DNA als Matrize für die Synthese eines Proteins dienen.

Die Wahl des Vektors wird von vielen Faktoren beeinflusst, von der Art der zu inserierenden Passagier-DNA, von der Restriktionsendonuclease, die benutzt werden soll, davon, ob die inserierte DNA exprimiert werden soll und ob die Wirtszelle ein Prokaryont oder ein Eukaryont ist. Üblicherweise haben gute Vektoren eine Reihe von Schnittstellen (genetische Marker) für Restriktionsenzyme; die Schnittstellen dienen auch der Identifizierung. Nach

[a] Nur bei Vorliegen eines Replikationsstartpunkts, der sich von der Colicin-Resistenz ableitet, können Plasmide amplifiziert werden. [b] Cosmide sind Plasmide, die die cos-Region des λ -Phagen enthalten. Unter cos-Region versteht man ein DNA-Segment des λ -Phagen, der das „Packen“ des Genoms in den Phagenkopf reguliert (siehe auch Fig. 13). Somit werden Plasmide, die die cos-Region enthalten, in λ -Phagen verpackt.



Figur 10 zeigt den großen Favoriten unter allen Plasmiden, das Plasmid pBR322 (p steht für Plasmid, BR sind die Initialen des Konstrukteurs, und die Zahl deutet auf die weniger erfolgreichen Vorläufer hin)^[57]. Wir demonstrieren anhand von pBR322 die funktionellen Elemente eines Plasmids. Dies sind der Replikationsstart (Or), zwei Antibiotica-Resistenzgene (Tc^r und Ap^r) und Spaltstellen für

Restriktionsendonucleasen. Nur wenn der Replikationsstart vorhanden ist, können sich Plasmide autonom vermehren. Eine Antibiotica-Resistenz ist nötig, damit man gezielt nach transformierten Bakterien, d. h. solchen, die das Plasmid enthalten, suchen kann. Trägt das Plasmid das Gen für Tetracyclin-Resistenz, so kann man dem Kulturmedium Tetracyclin zusetzen und damit einen Selektionsdruck ausüben. Nur Bakterien, die das richtige Plasmid enthalten, bilden in einer Petrischale eine Kolonie. Durch Vereinzeln auf eine zweite Platte lassen sich die transformierten Bakterien dann klonieren^[58].

Die zweite Antibiotica-Resistenz, etwa gegen Ampicillin, wird zur Insertionsinaktivierung benutzt. Nach einem Restriktionsschnitt setzt man den Passagier in dieses Resistenzgen ein und erreicht damit durch Insertion seine Inaktivierung. Zellen mit Plasmiden, die den Passagier enthalten, sind dann zwar noch resistent gegen Tetracyclin, aber nicht mehr gegen Ampicillin (Fig. 11).

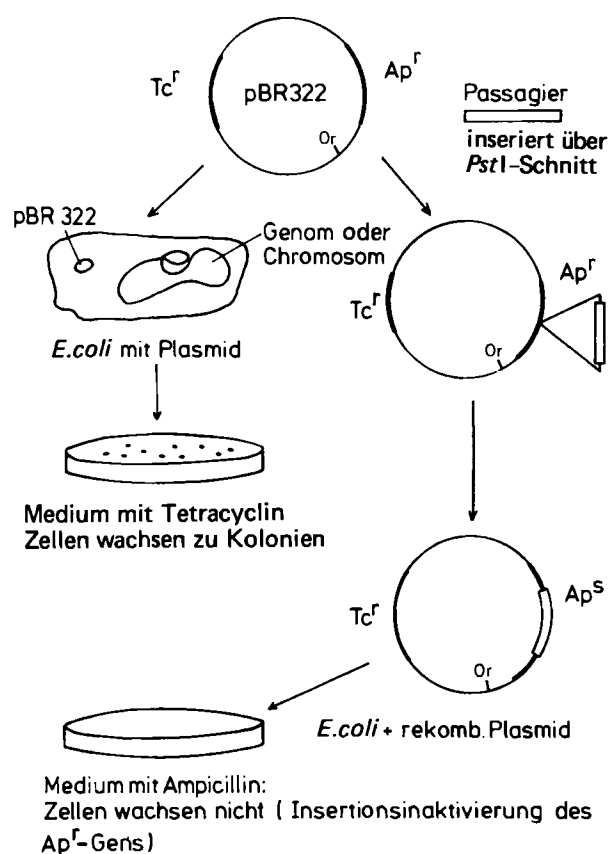


Fig. 11. Funktion der beiden Antibiotica-Resistenzgene für Selektion und Screening. Das Tc^r -Gen bewirkt, daß Bakterien mit einem Plasmid auf einem tetracyclinhaltigen Medium wachsen können, während der Wildtyp sich nicht vermehrt. Durch Insertion eines Passagiers in das Ap^r -Gen werden Zellen mit einem rekombinierten Plasmid sensitiv gegen Ampicillin, sie enthalten dann ein Ap^s -Gen.

Plasmide oder auch Phagen können durch Insertionen und Deletionen von DNA-Fragmenten fast beliebig umgebaut werden. Der Umbau hat das Ziel, effektive Promotoren vor das Strukturgen zu setzen, das Plasmid den Wirtsbedingungen anzupassen, genetische Marker einzuführen und die experimentelle Sicherheit zu erhöhen (Tabelle 7)^[59,60]. Viele dieser idealen Vektoren sind heute patentiert und kommerziell erhältlich.

Tabelle 7. Beispiel für eine Wirtszelle der B2-Sicherheitsstufe [a], geeignet für Klonierexperimente mit Plasmiden am Beispiel des *E. coli*-Plasmids $\chi 1776$.

| Genotypische Veränderung [b] | Wirkung |
|------------------------------|--|
| dap D8 | Abhängigkeit von Diaminopimelinsäure im Medium |
| min A1 | Neigung zur Bildung von Minizellen |
| min B2 | |
| sup E42 | Suppression von Amber-Mutanten |
| nal A25 | Resistenz gegen Nalidixinsäure |
| $\Delta 29$ (bio H-asd) | Deletion führt zur Abhängigkeit von Diaminopimelinsäure und Threonin |
| hsd R2 | Inaktives Restriktionssystem, erleichtert die Transformation |
| F ⁻ | Wirtszelle enthält keinen F-Faktor |

[a] Es werden verschiedene Stufen von Laboratoriumssicherheitsmaßnahmen (L1–L4) und drei biologische Sicherheitsstufen (B0, B1, B2) angewendet; somit reicht die Skala der Sicherheitsmaßnahmen von L1B0 bis L4B2 (die höchste Sicherheitsstufe L4B2 gilt z. B. bei Arbeiten mit onkogenen Viren in Humanzellen). Ein oft gebrauchter Vektor für Klonierexperimente mit Sicherheitsauflagen ist Charon 4A. Es ist ein umkonstruierter λ -Phage, der aus Sicherheitsgründen „Amber“-Mutationen in den Genen für die Phagenreifung, den Aufbau der Phagenhüllen und die Lyse des Wirts enthält. Charon 4A kann deshalb zum Klonieren eukaryontischer DNA verwendet werden. [b] Die Mutationen sind so ausgewählt, daß der Phage sich nicht selbständig machen kann, d. h. er kann nur in einem Labor als Teil des Bakteriums *E. coli* $\chi 1776$ existieren (biologische Sicherheitsstufe B2).

8. Die Wahl der Passagier-DNA

Die Wahl des Passagiers wird natürlich von dem Forschungsziel bestimmt. Man kann ein Gen präparativ isolieren, um die DNA-Sequenz zu bestimmen, einen Regler deletieren, um die Zelldifferenzierung zu untersuchen, ein Gen aus dem Genom in ein Plasmid transferieren, um einen Protein-Überproduzenten zu erzeugen, ein Gen für

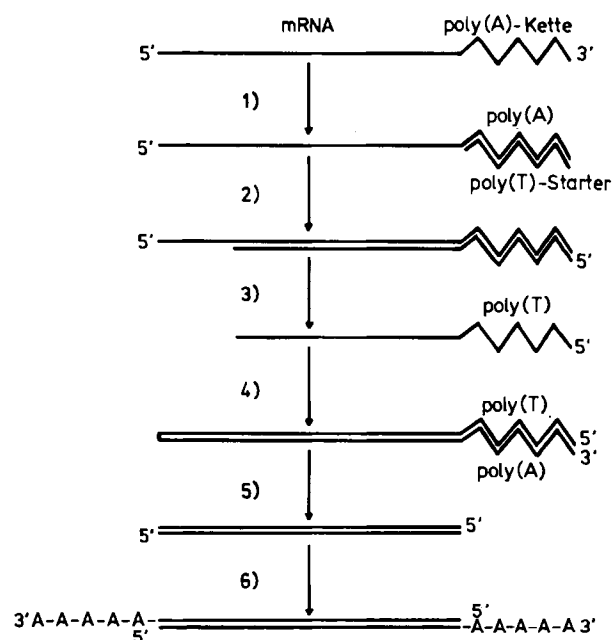


Fig. 12. Sechsstufige Synthese der doppelsträngigen Copy-DNA (cDNA), ausgehend von der mRNA. Eukaryontische mRNA kann durch Affinitätschromatographie an poly(dT)-Cellulose isoliert werden, da die mRNA am 3'-Ende ein poly(A)-Segment enthält. Die einzelnen Stufen sind: 1) Affinitätschromatographie an poly(dT)-Cellulose. 2) Synthese des komplementären Stranges mit der reversen Transkriptase und den vier Desoxynucleosidtriphosphaten. d) Hydrolyse des mRNA-Matrizenstranges mit Ribonuclease A. 4) Verdopplung des DNA-Stranges mit DNA-Polymerase. 5) Abspaltung der Schleife mit Einzelstrang-spezifischer S1-Nuclease. 6) Anfügen von Einzelstrangenden mit der Desoxynucleotidyl-Transferase zur Erzielung von „sticky ends“ zur Ligation. Der Vektor wird ähnlich behandelt, aber dann mit oligo(T) verlängert.

eine pränatale Diagnostik zu analysieren oder Humanproteine in Bakterien zu produzieren^[61]. Passagier-DNA kann man durch Fragmentierung des Genoms gewinnen, durch Rückübersetzung isolierter mRNA oder durch kombinierte chemisch-enzymatische Synthese. Schließlich wird die DNA durch Klonieren gereinigt und in präparativen Mengen hergestellt.

Um eine Genbibliothek anzulegen, muß man das Ge-

nom zuerst in etwa 20 kbp große Fragmente zerlegen. Jedes Fragment wird in ein Plasmid inseriert, und der Vektor wird dann in das Bakterium eingeschleust. Nach dem Klonieren der transformierten Bakterien verfügt man über eine Sammlung aller Gene, kloniert in Bakterien: eine Genbibliothek^[62,63]. Da der Schnitt auch innerhalb eines Gens erfolgen kann, wird man die Fragmentierungsmethode, etwa den Typ des Restriktionsenzym, ändern, um mög-

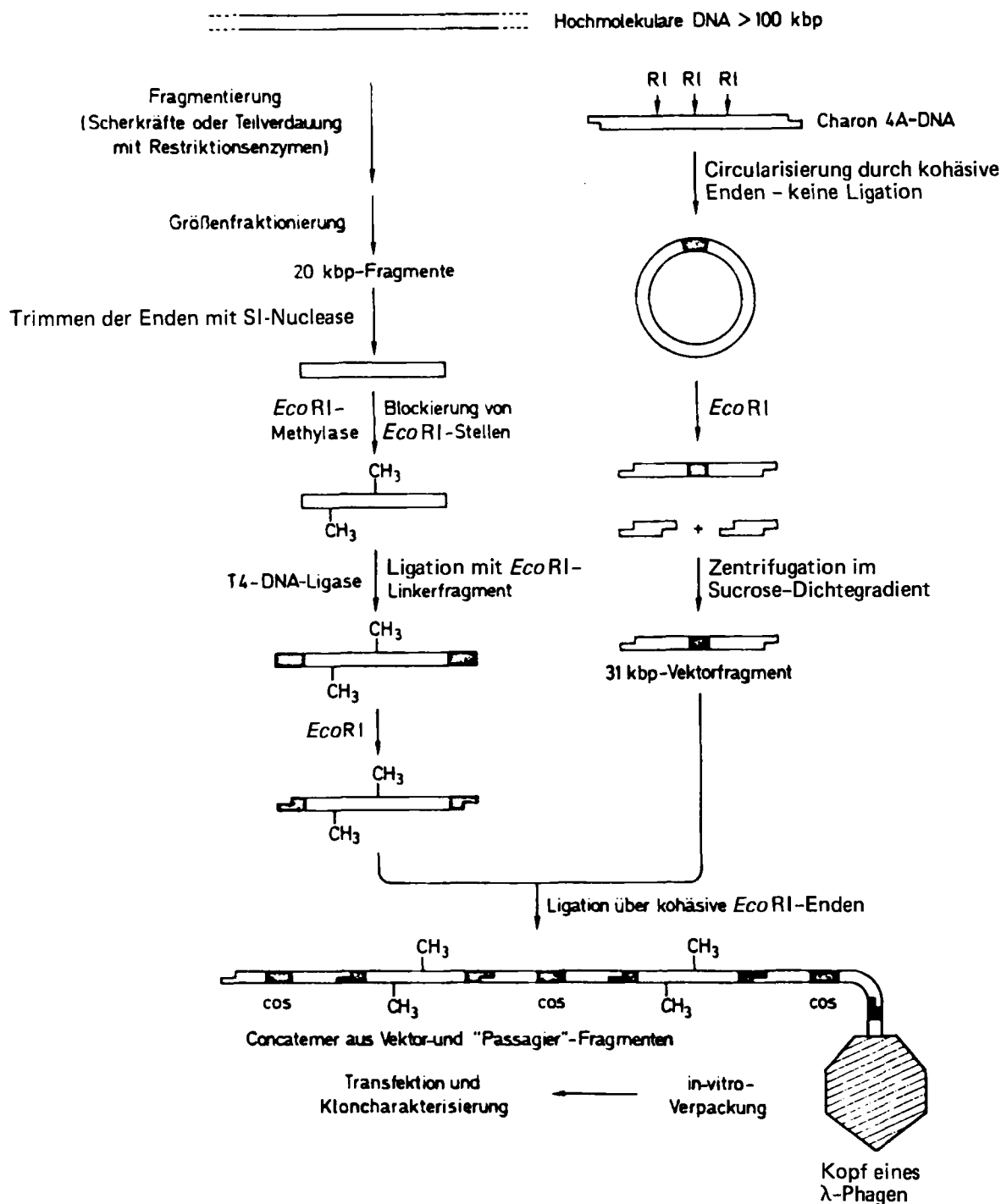


Fig. 13. Herstellung einer Genbibliothek aus *Drosophila*-DNA nach *Maniatis et al.* (*Cell* 15 (1978) 687). Mit freundlicher Genehmigung von Autor und Verlag entnommen aus R. Knippers: *Molekulare Genetik*, Thieme, Stuttgart 1981. Bei der Herstellung z. B. einer Bibliothek eukaryontischer Gene muß man aufgrund der immensen Zahl der Basenpaare eine Reihe experimenteller Tricks anwenden. Um die Genfragmente auch nach Größe zu sortieren (ca. 20 kbp), „verpackt“ man die Vektoren (modifizierte λ-Phagen oder Cosmide); in den Kopf des λ-Phagen (rechts) Charon 4A (siehe Tabelle 6) werden sogenannte cos-loci eingesetzt, die das Verpacken ermöglichen. Aus der Vektor-DNA wird durch Oligomerisieren ein „Concatemer“ gebildet, das in den Phagenkopf eingefädelt werden kann. Die Oligomere werden dann am cos-locus geschnitten und in λ-Länge (38–53 kbp) in den Phagenkopf verpackt. Somit kann Charon 4A (31 kbp) maximal 22 kbp an Passagier-DNA aufnehmen. Beim Umkonstruieren des Passagiers (links) kann man störende interne Restriktionsstellen durch enzymatische Methylierung von Adenin und Cytosin blockieren (Restriktion). Nach „blunt-end“-Ligation mit EcoRI-Linkerfragmenten (Fig. 22a) können EcoRI-„sticky-ends“ produziert werden, die ein Oligomerisieren des Passagiers ermöglichen.

lichst mehrere DNA-Fragmente aus einem Genom-Bereich zu erhalten. Nur so wird sichergestellt, daß alle Gene eines Organismus intakt in der Bibliothek vorhanden sind.

In Eukaryonten läuft die Genexpression komplexer ab als in Prokaryonten. Nur Teile der DNA, sogenannte Exons, erscheinen als mRNA, während große Bereiche der DNA (Introns) während der Nachbehandlung („Prozessierung“) der RNA als Information verloren gehen^[64]. Benötigt man eine Genbibliothek eines Eukaryonten, welche nur die codogenen Teile der DNA enthalten soll, so muß man einen anderen Weg wählen. Alle mRNAs werden mit der reversen Transkriptase in ihre komplementären DNA-Moleküle umgeschrieben. Folglich bezeichnet man diese Sammlung als cDNA-Bibliothek, wobei cDNA die Abkürzung für copy- oder complementary-DNA ist. Die prinzipiellen Reaktionsschritte für das Anlegen von Genbibliotheken sind in den Figuren 12 und 13 gezeigt^[65].

9. Die Wahl der Wirtszellen

In den meisten Forschungslaboratorien werden *E.-coli*-Bakterien als Wirtszellen für Transformationsexperimente benutzt. Die Genetik und der Stoffwechsel von *E. coli* sind gut bekannt, und es existieren zahlreiche Mutanten, die das Experimentieren mit diesem Mikroorganismus sehr erleichtern. *E. coli* kann auch in einem Chemielaboratorium ohne Schwierigkeiten gezogen werden. Aus 1 L Kulturmedium erhält man ca. 50 g Bakterien. *E. coli* ist zwar kein pathogener Organismus, jedoch sollte er im Laboratorium mit Vorsicht gehandhabt werden. Für die industrielle Produktion von Proteinen ist *E. coli* ungeeignet, zum einen weil es ein menschlicher „Commensale“ ist, zum anderen weil *E. coli* als gram-negatives Bakterium praktisch keine Proteine in das Kulturmedium ausscheidet. Hefen dagegen sind für alle Arten industrieller Fermentation äußerst nützliche Mikroorganismen. Da man über das großtechnische Züchten von Hefen bereits über viel Erfahrung verfügt, versucht man jetzt, Plasmide zu konstruieren, die ihre Passagier-Gene in Hefe exprimieren. Auch für die Expression eukaryontischer Vektoren kann Hefe der Wirt der Wahl sein, da Hefen als Eukaryonten in der Lage sind, Proteine bis zur Endstufe zu „prozessieren“. *Bacillus subtilis*, ein gram-positives Bakterium, das in der industriellen Enzymproduktion eingesetzt wird, hat zwar den Vorteil, daß eine Reihe von Proteinen in das Medium sezerniert werden, doch sind leider viele Plasmide in *B. subtilis* instabil^[66].

Für den Gentransfer zwischen eukaryontischen Zellen werden als Wirt oft embryonale Zellen verwendet, z. B. BHK-Zellen („baby hamster kidney cells“), die leicht in Kultur zu züchten sind. Als Vektor werden das Affenvirus SV40 („simian virus“) und seine „Derivate“ benutzt. Virale Vektoren haben hier den Vorteil, daß sie Zellen mit hoher Effizienz infizieren und sich sehr rasch vermehren^[67–69]. Perfekte Wirtszellen gibt es nicht; noch immer treten viele Schwierigkeiten auf, wenn ein im Laboratorium transformierter Stamm sich als Produktionsstamm in der Massenzüchtung bewähren soll.

10. Die Suche nach dem richtigen Klon

Die analytischen Probleme, die mit Rekombination und Transformation einhergehen, lassen sich anhand des fol-

genden Rechenbeispiels dokumentieren. Etwa eine von 1000 Zellen übernimmt die rekombinierte DNA. Wiederum nur ein Promille davon enthält die DNA in der korrekten Richtung oder Polarität und in dem richtigen Leserahmen. Diese ppm-Ausbeute wird nur dadurch experimentell sinnvoll, daß sich Bakterien in einem optimierten Medium etwa alle 20 Minuten teilen. Wie bei der bekannten Geschichte vom Schachbrett und den Reiskörnern entstehen so innerhalb 24 Stunden theoretisch $2^{72} = 4,7 \cdot 10^{21}$ Zellen. Wird ein Selektionsdruck angewendet, z. B. ein Antibiotikum im Medium, so vermehren sich nur Bakterien, die ein Plasmid enthalten. Theoretisch sollten alle Nachkommen der Stammzelle einen Klon bilden, d. h. in Genotyp und Phänotyp identisch sein. Bakterien mutieren aber mit großer Frequenz, sie verlieren und importieren Plasmide, und sie modifizieren die Plasmide in vivo durch Schneiden und Spleißen. So wird die genetische Stabilität des Wirts und des Plasmids zu einem kritischen Faktor, besonders bei der Massenzüchtung rekombinierter Bakterien^[66].

Wie bereits beschrieben, lassen sich die Präsenz des Plasmids in einem Bakterium und die Insertion des Passagiers in das Plasmid durch die Ausnutzung der Kombination der Antibiotica-Resistenzen schnell, d. h. mit etwa 300 Petrischalen pro Arbeitstag, testen. Die Inaktivierung einer Antibiotica-Resistenz durch Passagier-Insertion stellt aber nur einen negativen Test dar. In einem sehr eleganten optischen Verfahren kann man die Aktivität des Enzyms β -Galactosidase nutzen, das aus zwei Domänen besteht, die beide für das Funktionieren des Enzyms nötig sind^[70]. Die α -Domäne der β -Galactosidase wird von dem Plasmid codiert, während die β -Domäne auf dem Genom einer Bakterienmutante lokalisiert ist. Wenn die Zellen das native Plasmid enthalten, so bilden sie das aktive Enzym, und zugesetztes (5-Brom-4-chlor-3-indolyl)- β -D-galactosid wird zum Indolderivat hydrolysiert. Durch Luftoxidation entsteht ein Indigofarbstoff, d. h. ein Zellklon mit intaktem Plasmid erscheint auf der Petrischale blau. Wird ein Passagier in das Plasmid inseriert, so entsteht keine aktive β -Galactosidase, die Zellen bleiben weiß. In einem anderen Test, den man als „colony hybridisation test“ bezeichnet, läßt man Bakterien auf Nitrocellulosefiltern wachsen, die Zellwände werden anschließend hydrolysiert, und die DNA wird auf dem Filter fixiert. Mit einer radioaktiv markierten, einzelsträngigen DNA, die basenkomplementär zu dem Passagier ist, untersucht man, ob sich ein Doppelstrang zwischen Test-DNA und Passagier bildet, d. h. ob beide Nucleinsäuren hybridisieren^[71,72]. Ein anderes Verfahren bezeichnet man als „arrested translation“, da die Plasmidgene als kompetitive Inhibitoren bei der Translation der mRNA fungieren können. Empfindlicher, aber auch aufwendiger ist ein Radioimmunoassay mit radioaktiv markierten Antikörpern gegen das gesuchte Protein^[73].

Es ist naheliegend zu prüfen, ob ein bakterieller Klon das gesuchte Protein synthetisiert. Dazu muß man über eine Wirtszelle verfügen, die das gesuchte Enzym nicht produzieren kann. Erst Plasmid und Wirtszelle bilden ein komplementäres System, welches zur Enzymproduktion befähigt ist (Komplementationstest). Prüft man auf Enzymaktivität, so muß die Reaktion so empfindlich sein, daß man ein pmol Substanz nachweisen kann. In jüngster Zeit sind auch sogenannte Mini- und Maxizell-Systeme entwickelt

worden, die selektiv nur Plasmid-codierte Proteine exprimieren^[74]. Der Minizell-Stamm, ein Abkömmling von *E. coli* K12, teilt sich so, daß Minizellen entstehen, die aus Raumgründen kein Genom mehr enthalten. Diese Minizellen kann man durch Zentrifugation im Saccharose-Dichtegradienten von intakten Zellen abtrennen. Die Minizellen enthalten noch Plasmide und den Proteinsyntheseapparat. Nach Zugabe von [³⁵S]Methionin werden die Plasmid-codierten, radioaktiven Proteine synthetisiert, die mit einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt und analysiert werden können. Maxizellen funktionieren im Prinzip ähnlich, jedoch wird das Genom mit einer Dosis UV-Strahlen zerstört, die die Plasmide intakt läßt^[75].

Neben diesen zellulären oder in-vivo-Systemen für die Genexpression existieren auch zellfreie oder in-vitro-Expressionssysteme, wie z. B. Weizenkeime, *E. coli*-Extrakte und Reticulocyten-Lysate^[76-78]. Neuerdings injiziert man die DNA auch in den Zellkern von Frosch-Oozyten oder in Embryonalzellen^[79,80]. Der Erfolg eines Transformations- und Klonierexperimentes muß aber zum Schluß immer durch die DNA-Sequenz bewiesen werden. Dazu isoliert man die Plasmide nach einem Amplifikationsschritt präparativ und trennt sie durch Zentrifugation in einem Caesiumchlorid-Gradienten in Gegenwart von Ethidiumbromid. Von dem Plasmid wird eine Restriktionskarte angelegt, und die Passagier-DNA mit flankierenden Bereichen wird nach *Maxam* und *Gilbert* oder nach *Sanger* sequenziert^[81-83]. Erst DNA-Sequenz und Genexpression beweisen den Erfolg eines Klonierexperimentes.

11. Aufbereitung der Proteine

Bisher haben wir über die Proteinbiosynthese sehr vereinfacht gesprochen: Die Nucleotidschrift der DNA oder RNA wird in die Aminosäurefolge eines Proteins übersetzt. Besonders im Stoffwechsel höherer Organismen sind diese Vorgänge sehr viel komplexer. Von Ribosomen produzierte Peptidketten werden noch glykosidiert, phosphoryliert und an vielen Stellen und mit vielen Reagentien kovalent modifiziert. Diese Aufbereitung nennt man zusammenfassend „posttranslationale Modifikation“^[84,85]. Oft werden Proteine als überlange Vorläufermoleküle synthetisiert, sogenannte Präproproteine. Insulin aus Rinderpankreas z. B. wird von den Ribosomen als Präproinsulin mit 104 Aminosäuren translatiert^[86]. Die Prä- oder Signalsequenz, die 23 Aminosäuren umfaßt, dirigiert die Ribosomen zum endoplasmatischen Reticulum und bewirkt, daß diese Proteine in den Innenraum des Reticulums geschleust werden. Danach wird die Signalsequenz abgespalten. Proinsulin, der inaktive Vorläufer des Insulins, enthält noch 81 Aminosäuren. Erst durch Entfernung des mittleren C-Peptids entsteht das aktive Hormon mit 51 Aminosäuren. Bei vielen katabolischen Enzymen dirigieren Signalsequenzen die Proteine in das endoplasmatische Reticulum, in den periplasmatischen Raum oder sogar durch die Zellwand in das Kulturmedium. Um diese natürlichen Vorgänge für die Gentechnik, d. h. die Gewinnung eukaryontischer Proteine, nutzen zu können, mußten wir die chemischen Prinzipien der Proteinbiosynthese^[19], die Chemie der Membranen^[87,88] und den Effekt chemischer Modifikationen auf die Konformation und Aktivität von Prote-

inen verstehen^[89]. In der Molekularbiologie gibt es viele faszinierende Fragen, aber die Chemiker scheinen an ihrer Lösung nicht interessiert zu sein.

12. Was in der Chemie die Mechanismen, sind in der Molekularbiologie die Modelle

Figur 1 zeigt die gegenwärtige Lehrbuchvorstellung über den Ablauf der Proteinbiosynthese. Über viele Einzelheiten ist erst wenig bekannt, z. B. über die regulativen Signale auf der mRNA, über die Selektion der Aminoacyl-tRNA durch das mRNA-Codon und über die Funktion von GTP zur Bewegung der mRNA.

Noch weniger wissen wir über Struktur und Funktion von Membranen. Wir kennen Plasmamembranen, Kernmembranen und Membranen von Organellen, wie die innere mitochondriale Membran. Sie alle haben genau festgelegte Funktionen im Stofftransport, als Bindestellen für Multienzymsysteme, bei der Umsetzung eines Protonengradienten in ATP und bei der Erzeugung elektrischer Potentiale. Vieles wissen wir über Proteine und Phospholipide als Membranbestandteile, und es gibt gar viele Modelle, welche die Membranfunktionen beschreiben. Bezeichnungen wie „fluid mosaic model“ demonstrieren überzeugend den chemischen Kenntnisstand über Membranfunktionen^[90].

Warum ist die Plasmamembran für das eine Protein durchlässig, während ein ähnlich großes Protein im Cytoplasma zurückgehalten wird? Die Beantwortung dieser Fragen ist für die gentechnische Produktion von Enzymen von größter Bedeutung. Wir wissen, daß sekretorische Proteine eine Signalsequenz aus 30 Aminosäuren enthalten, daß hydrophobe Aminosäuren gehäuft auftreten und daß ein Prolin in definierter Position für das Ausschleusen wichtig ist; dieser Kenntnisstand reicht nicht aus, um Signalsequenzen zum Ausschleusen von Proteinen in das Kulturmedium zu konstruieren^[91,92]. Auch hier helfen die Chemiker gegenwärtig nicht weiter. Heute fällt es nicht schwer, die Struktur eines Steroids durch Röntgenbeugung zu ermitteln. Um jedoch mit Erfolg die Chemie von Membranen zu untersuchen, braucht es neben einem breiten Methodenspektrum ein gerüttelt Maß an Phantasie.

13. Chemische Synthese von Genfragmenten am Träger: Synthese mit Injektionsspritze und Serumkappe

Mit der Synthese von Nucleinsäuren im Laboratorium begann man sich vor etwa 30 Jahren zu beschäftigen. Zuerst wurden Schutzgruppen für die heterocyclischen Basen und die Desoxyribose sowie Kondensationsmittel für die Knüpfung der Phosphorsäurediesterbindung gesucht^[93]. Die dabei entwickelte Phosphodiester-Methode ermöglichte die Synthese von Oligonucleotiden der Kettenlänge 10–20, allerdings nur mit sehr großem experimentellen Aufwand. Gerade rechtzeitig wurden von den Biochemikern die Oligonucleotid-Kinase und die DNA-Ligase isoliert, so daß die Oligonucleotidblöcke enzymatisch zu doppelsträngigen DNA-Fragmenten kondensiert werden konnten. Ohne Zweifel war die Synthese des Gens für die Tyrosin-tRNA, ein DNA-Segment mit 200 bp, durch *Kho-*

rana et al. ein erster Höhepunkt auf diesem Arbeitsgebiet^[94].

Die Phosphodiester-Methode ist jedoch für eine effiziente Synthese von Genfragmenten ungeeignet, da die Ausbeuten niedrig und die Reaktionszeiten lang sind, und da alle Zwischenprodukte mühselig und verlustreich säulenchromatographisch gereinigt werden müssen. Auch das Interesse an der Synthese von DNA-Fragmenten war gering, da man DNA nicht sequenzieren konnte und somit nicht wußte, was synthetisiert werden sollte. *Khorana* et al. hatten die DNA-Sequenz, die sie synthetisierten, aus der Primärstruktur der Tyrosin-tRNA abgeleitet.

Mit der Entdeckung der Restriktionsendonucleasen und somit der Möglichkeit, DNA in experimentell handhabbare Fragmente zu zerlegen, und mit der schnellen und von jedermann durchführbaren DNA-Sequenzierung änderte sich die Situation fast schlagartig. Dennoch setzten die Experten vorrangig auf genetische Methoden zur Gewinnung von DNA-Fragmenten.

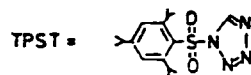
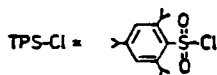
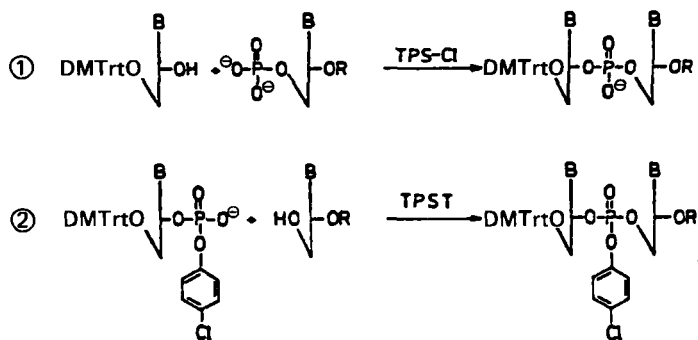


Fig. 15. Vergleich der Phosphodiester- ① mit der Phosphotriester-Methode ②. Der wesentliche Unterschied beider Methoden besteht darin, daß Triester wegen der fehlenden Ladung nicht mehr polar sind und sich somit gut in unpolaren Solventien lösen. DMTrt = Dimethoxytrityl.

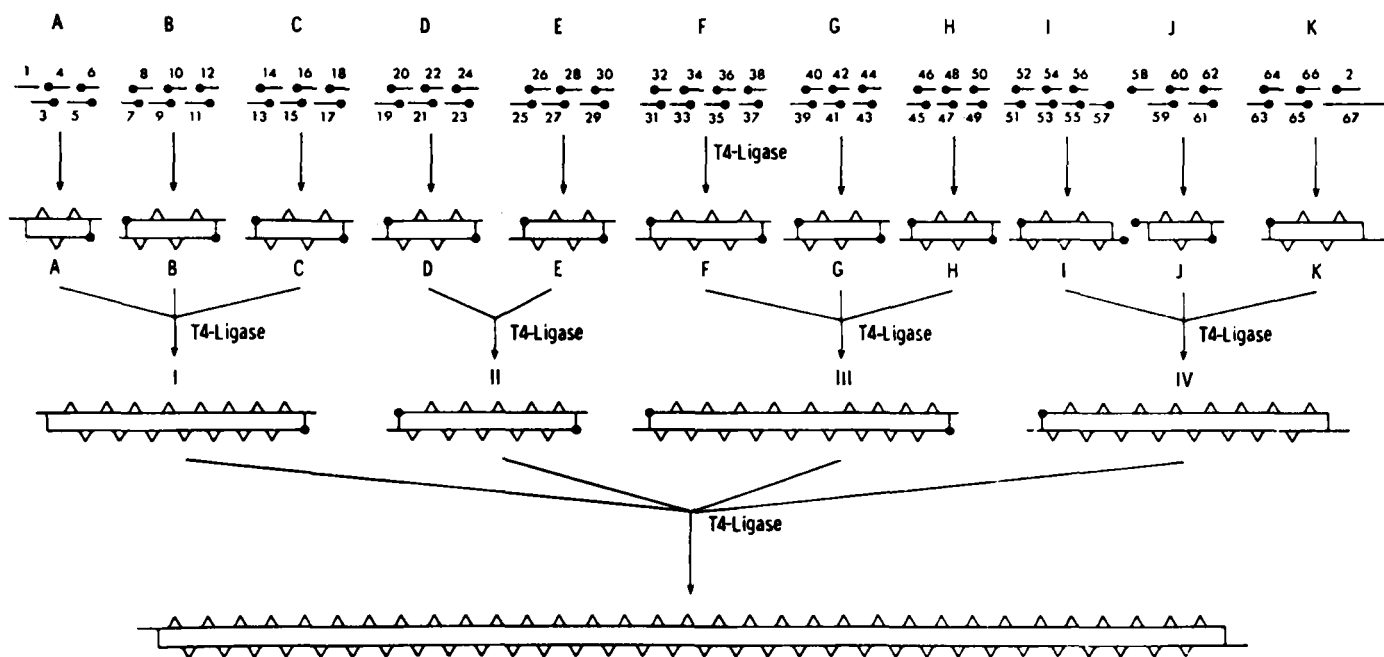


Fig. 14. Strategie für die Synthese des Gens für das humane Interferon. Die chemisch synthetisierten 67 Oligonucleotide werden zuerst mit Oligonucleotid-Kinase phosphoryliert und dann mit T4-Ligase zu größeren Fragmenten ligiert. Obwohl das Produkt, ein 517bp-Fragment, nur einen geringen Reinheitsgrad aufwies, konnte das Interferon-Gen durch Klonierung angereichert und isoliert werden.

Erst die chemisch-enzymatische Synthese des Gens für das humane Leukocyten-Interferon, eines DNA-Doppelstrangs mit 517 bp, demonstrierte überzeugend die neuen Möglichkeiten der Synthesechemie in der Molekularbiologie (Fig. 14)^[95].

Der ungewöhnliche Erfolg in der chemischen DNA-Synthese läßt sich auf zwei Neuerungen zurückführen, die Einführung der Phosphotriester-Methode (Fig. 15)^[96] und die der Merrifield-analogen Polymersynthese am Träger^[97]. Erwähnt werden sollten auch die Entwicklung besserer Kondensationsmittel und die neuen analytischen und präparativen Trennmethode wie HPLC und Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Mit einem „Peptid-Synthesizer“ präparierten *Merrifield* und *Gutte* 1970 die Ribonuclease an einem polymeren Träger. Für die Kondensation der 124 Aminosäuren waren

369 Reaktionsschritte nötig, was 11391 mechanischen Operationen entsprach^[98]. Ähnliche Erfolge blieben der Nucleinsäurechemie lange Zeit versagt, obwohl zahllose Versuche zur Trägersynthese von Oligonucleotiden durchgeführt wurden^[99]. Für die Mißerfolge waren wohl zwei Gründe ausschlaggebend. Die polymeren Träger waren nicht den Erfordernissen der DNA-Synthese angepaßt, und die chemischen Reaktionen waren bezüglich Selektivität und Ausbeute nicht effektiv genug, um die speziellen Kriterien einer stufenweisen Polykondensation am Träger zu erfüllen. Die Phosphodiester-Methode erwies sich für die Trägersynthesen als ungeeignet, da sich die wachsende Nucleotidkette als Oligoanion schlecht in organischen Lösungsmitteln löst und von dem hydrophoben Träger abgestoßen wird. Vollständiger Ausschluß von Wasser und hohe Konzentration an Reaktanden sind aber eine condi-

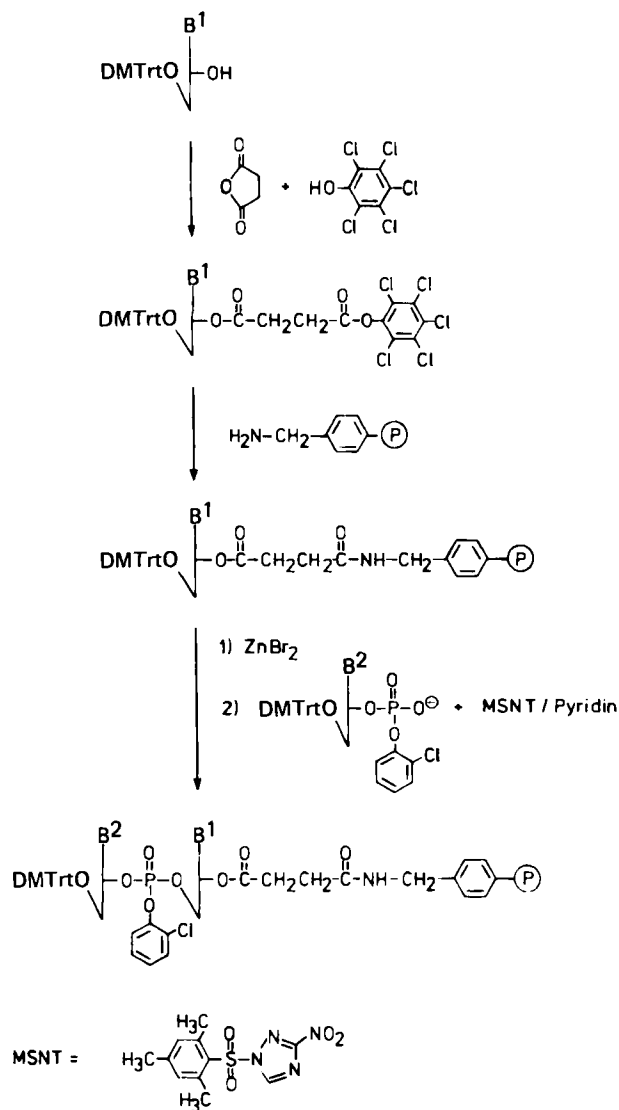


Fig. 16. Funktionalisierung eines Polystyrolträgers mit einem geschützten Nucleosid und Synthese eines Dinucleotids. Die 5'-Dimethoxytritylgruppe des ersten Nucleosids wird mit ZnBr_2 entfernt. Danach erfolgt der Kondensationsschritt nach der „charged-compound-coupling“-Methode mit 1-(Mesitylsulfonyl)-3-nitrotriazol (MSNT) als Kondensationsmittel. DMTTrt = Dimethoxytrityl.

tio sine qua non für schnelle und quantitative Kondensationsreaktionen. Erst die von *Letsinger* et al. entwickelte und von *Itakura* et al. sowie *Gait* et al. verbesserte Phosphotriester-Methode verhalf der Trägersynthese zum Durchbruch. Bei dieser Methode ist die wachsende Nucleinsäurekette ungeladen, so daß eine Vielzahl von Trägern wie Polyamide, Polystyrole und Silicagel verwendet werden können^[100].

Sollen Oligonucleotide mit einer Kettenlänge bis 20 synthetisiert werden, so kondensiert man Mononucleotide nach der „charged-compound-coupling“-Methode^[101–103]. Die geschützten Monomere werden als Triethylammoniumsalze der Phosphodiester eingesetzt, da diese gut in Pyridin löslich sind. Mit 1-(Mesitylsulfonyl)-3-nitrotriazol als Kondensationsmittel betragen die Reaktionszeiten pro Kupplungsschritt 45 Minuten bei 45 °C; die Ausbeuten sind besser als 90%. Sollen Oligonucleotide mit einer Kettenlänge von 20 und 40 Nucleotiden synthetisiert werden, so werden am besten Dimere und Trimere als Kupplungseinheiten verwendet (Fig. 16). Für diese Synthesen stehen

bereits halbautomatische wie auch Programm-gesteuerte „DNA-Synthesizer“ zur Verfügung (Fig. 17)^[104].

Eine chemisch noch elegantere Methode ist in den letzten Jahren von *Caruthers* et al. entwickelt worden, die „Phosphit-Methode“^[105, 106]. Sie umgeht das Problem der negativen Ladung, indem zuerst der Nucleotidphosphitester gebildet wird, der dann im zweiten Schritt mit Iod zum Phosphodiester oxidiert wird. Die Herstellung des monomeren Desoxynucleosid-Phosphoramidits aus dem geschützten Nucleosid und Chloro(*N,N*-dimethylamino)-methoxyphosphan ist ein einfaches und schnelles Verfahren (Fig. 18)^[107]. Die Synthese des trisubstituierten Phosphans ist nicht ohne Probleme. Es entzündet sich sofort, wenn es mit Wasser in Kontakt kommt, und auch während der Herstellung des Dichloro(methoxy)phosphans kann das Reaktionsgemisch spontan entflammen. Nur mit einem dreimal destillierten, hochreinen Phosphorylierungsreagens, dessen Reinheit ^{31}P -NMR-spektroskopisch geprüft wurde, verlaufen die Kupplungsschritte mit guten Ausbeuten. Mit diesem Typ hochreaktiver Reagentien, von *van Boom* et al. als „Reaktionsbomben“ bezeichnet, begann eine neue Ära in der Nucleinsäurechemie^[108]. Das Handwerkzeug sind Injektionsspritze und Serumkanne, die Erfolge Kupplungszeiten von 5 Minuten bei Raumtemperatur und fast quantitative Ausbeuten (Fig. 19)^[100].

Da selbst bei 90% Ausbeute eine stufenweise Heteropolymersynthese ein Produktgemisch aus unvollständigen Ketten liefern würde, benutzt man für beide Synthesewege einen „capping“-Schritt: 5'-Hydroxygruppen von Oligonucleotidketten, die nicht reagiert haben, werden durch Acetylierung blockiert. So wird die Ausbeute zwar reduziert, es entstehen aber keine falschen Sequenzen. Nach der Synthese werden zuerst die Schutzgruppen entfernt, und dann wird das Oligonucleotid vom Träger abgespalten (Fig. 20). Die Ausbeute beträgt für ein Oligomer mit 20 Gliedern etwa 5–10%, bezogen auf den Nucleosid-aktivierten Träger^[109]. Gegenüber der Peptid- weist die Oligonucleotidsynthese einen großen Vorteil auf: Selbst aus einem Gemisch von Oligonucleotiden kann durch Rekombination und Transformation das Bakterium mit dem „richtigen Oligonucleotid“ selektioniert und dann die DNA-Sequenz durch Klonierung der Transformanten beliebig vermehrt werden.

Für die Reinigung der Oligonucleotide werden vorwiegend drei Techniken benutzt: 1. „Reversed-Phase“-Chromatographie und Gelchromatographie; 2. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Ionenaustauscher- und mit hydrophoben Säulenmaterialien und 3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Fig. 21). Um die Nachweisgrenze zu erhöhen, werden die Oligonucleotide zuvor meist mit ^{32}P Phosphat markiert. Nach der Reinigung muß die Identität der Oligonucleotide durch Sequenzanalyse nach *Maxam* und *Gilbert* oder durch einen zweidimensionalen „Fingerprint“ bestätigt werden^[100].

Die Synthese des Interferon-Gens stimulierte andere Arbeitsgruppen, sich mit der chemischen Synthese von Nucleinsäuren zu beschäftigen. Jedoch ist die Synthese von Strukturgenen keine Aufgabe für die Nucleotidchemie, denn intakte Gene sind effektiver aus dem Genom oder aus Plasmiden herauszuschneiden. Die Isolierung eines 20bp-Fragmentes ist jedoch schwierig, da man die gesuchte Sequenz, flankiert von zwei Restriktionsstellen, fin-

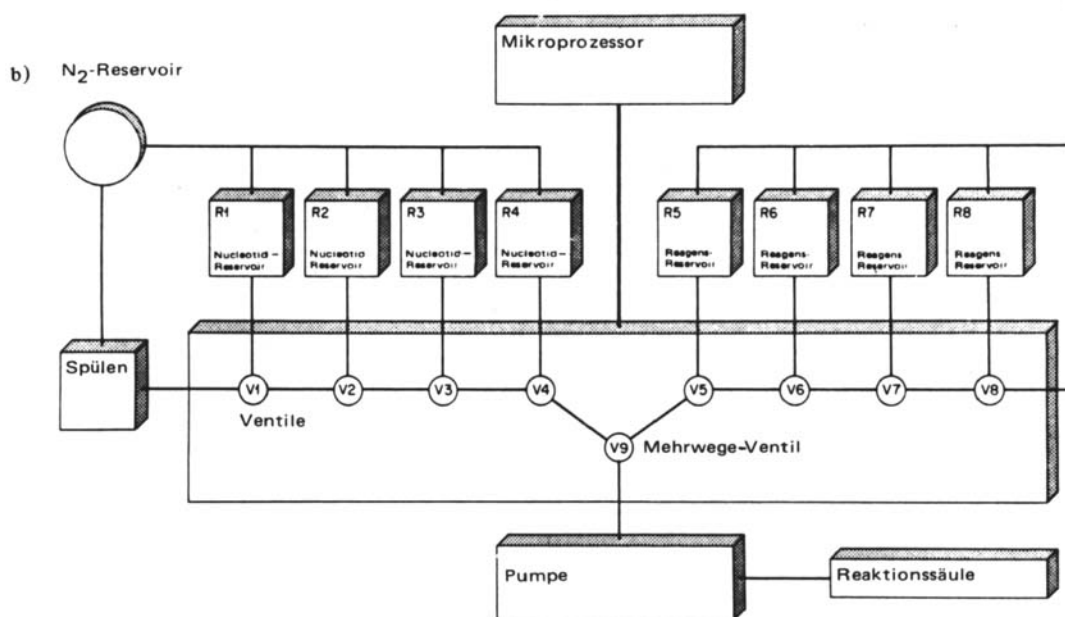
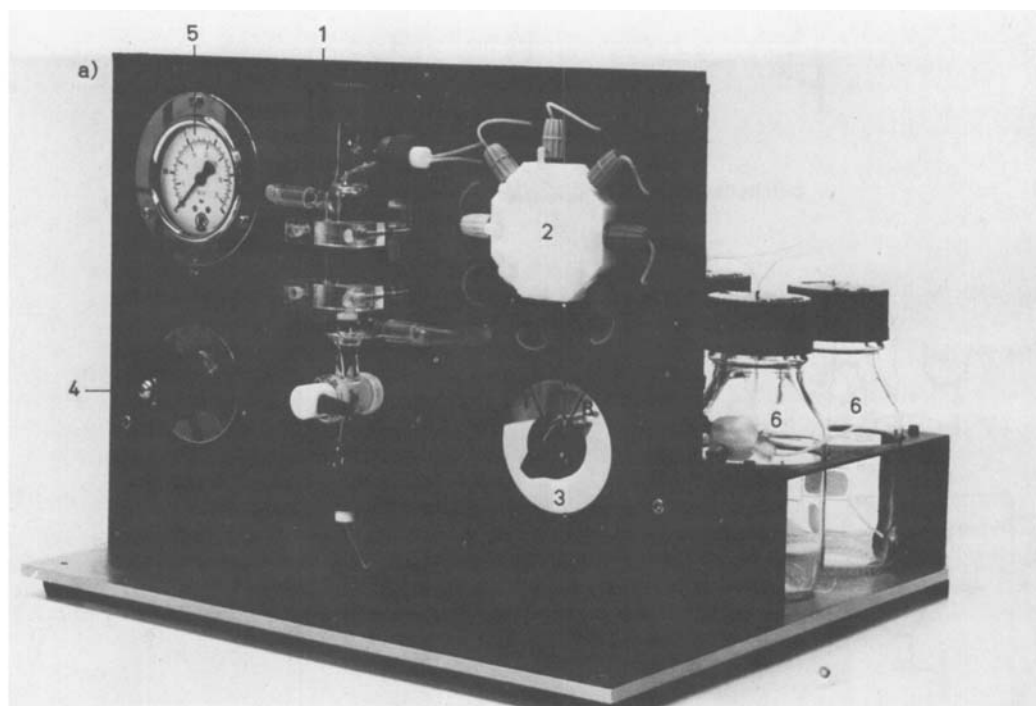


Fig. 17. a) Halbautomatischer „DNA-Synthesizer“: 1) Reaktionsgefäß, 2) Achtweg-Ventil, 3) Dreiweg-Ventil, 4) Druckverteiler, 5) Manometer, 6) Reagentienflaschen. Das Photo wurde von der Firma Labor-Service, Darmstadt, zur Verfügung gestellt. b) Schalt-schema für einen Mikroprozessor-gesteuerten automatischen „Gene-Fragment-Synthesizer“. Das Schema wurde von R. M. Cook, Firma Biosearch, San Rafael, CA, USA, zur Verfügung gestellt.

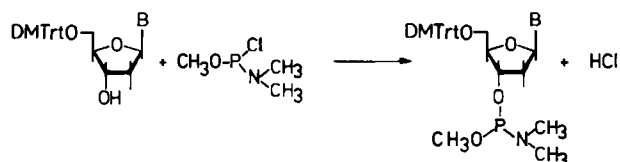
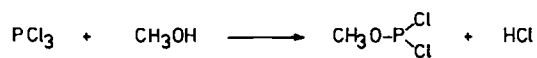


Fig. 18. Synthese der Desoxynucleosid-Phosphoramidite. DMTrt = Dimethoxytrityl, B = Thymin oder die geschützten Basen *N*⁶-Benzoyladenin, *N*⁴-Benzoylcytosin und *N*²-Isobutrylguanin.

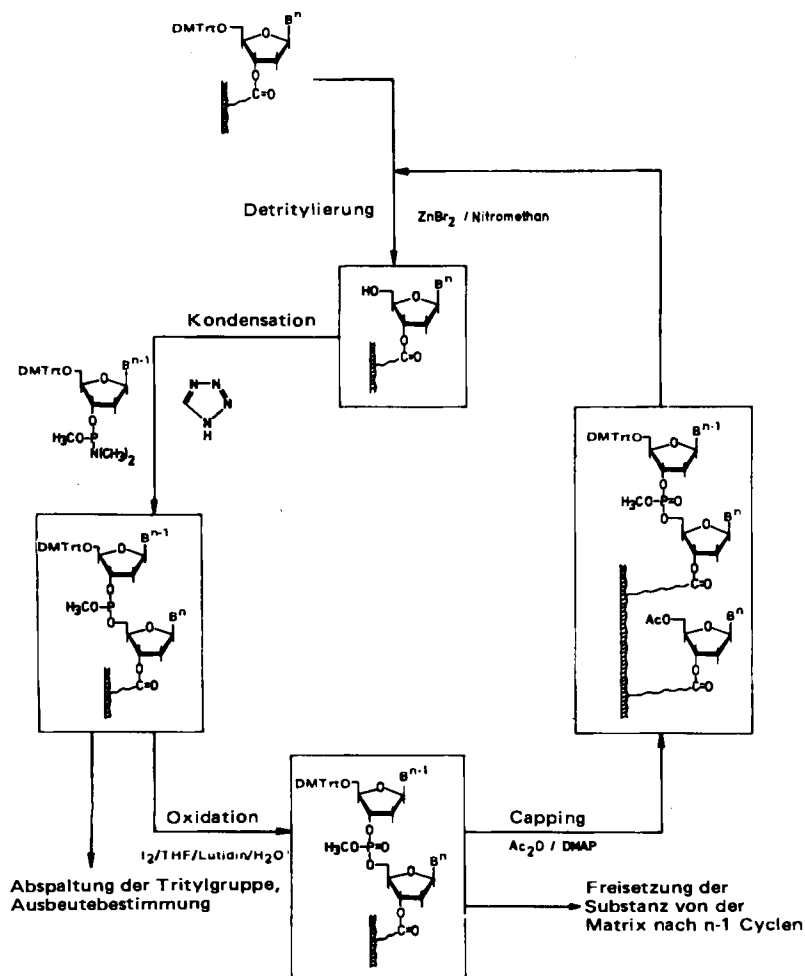


Fig. 19. Synthese von DNA-Fragmenten am Träger nach der Phosphit-Methode.

den muß. Selbst bei einem Plasmid als Startmaterial wird die Ausbeute bei 20 bp aus 10^4 bp immer verschwindend gering sein. So ergänzen sich Genisolierung und chemische Oligonucleotidsynthese auf ideale Weise.

Chemisch synthetisierte DNA-Fragmente werden als „Linker“ und „Adapter“ zur Einführung zusätzlicher Restriktionsstellen in Passagier und Vektor benötigt (Fig. 22). Die chemische Synthese ermöglicht es ferner, maßgeschneiderte Operatoren und Promotoren in den Regelteil eines Operons einzubauen. Man kann Oligonucleotide mit Einzelstrang-DNA hybridisieren, um DNA zu sequenzieren oder durch einen „fill in“ den cDNA-Strang zu synthetisieren^[110]. Oligonucleotide, deren Nucleotidsequenz von der Aminosäuresequenz eines Proteins abgeleitet wurde, dienen zur Affinitätschromatographie von mRNA aus Pro- und Eukaryonten. Chemisch lassen sich seltene Nucleoside wie 5-Methyldeoxycytidin in die DNA einbauen^[111]; dies ermöglicht es, den Effekt der Methylierung auf die Zelldifferenzierung zu untersuchen. Vielversprechend sind auch die Möglichkeiten bei der chemischen Mutagenese^[112]. Durch einen „Ein-Nucleotid-Austausch“ in der DNA kann in dem codierten Protein gezielt eine Aminosäure ersetzt werden, so daß sich die Funktion definierter Aminosäuren im aktiven Zentrum von Enzymen untersuchen läßt. Schließlich können Genfragmente in mg-Mengen gewonnen werden, was die Untersuchung der Spezifität der Protein-DNA-Wechselwirkung mit physikalisch-chemischen Methoden gestattet.

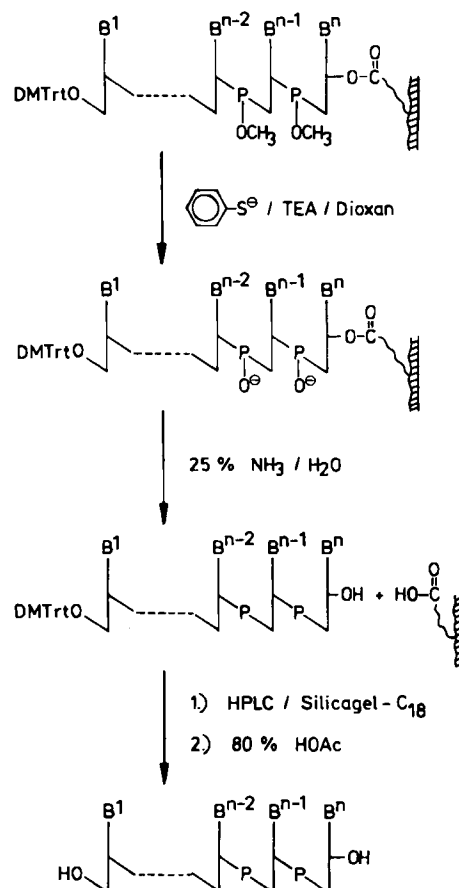


Fig. 20. Einzelschritte bei der Freisetzung des Oligonucleotids vom Träger. TEA = Triethylamin; Silicagel- C_{18} = „Reversed-Phase“-Material mit C_{18} -Alkylresten. Die Dimethoxytritylgruppe wird oft erst nach einer Trennung auf einer „Reversed-Phase“-Säule abgespalten, da nur das komplette Oligonucleotid diese Gruppe enthält, und somit die Trennung des Produkts von kürzeren Ketten über ein hydrophobes Säulenmaterial erleichtert wird.

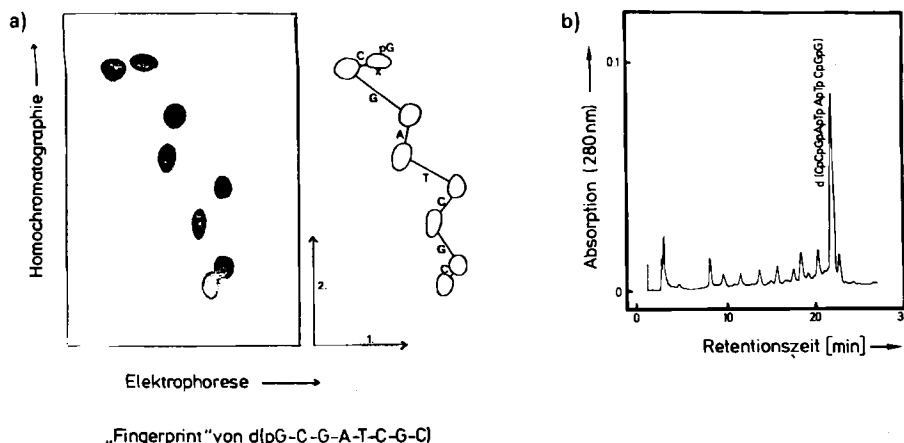


Fig. 21. Analytik von chemisch synthetisierter DNA. a) Zweidimensionale Trennung der DNA-Fragmente nach Hydrolyse mit Schlangengift-Diesterase („Fingerprint“- oder „wandering-spot“-Methode, nach A. R. Frank, H. Blöcker in [100], S. 225). b) Trennung von Oligodesoxynucleotiden durch HPLC an einer Anionenaustauschersäule (nach B. L. W. McLaughlin, J. U. Krusche in [100], S. 177).

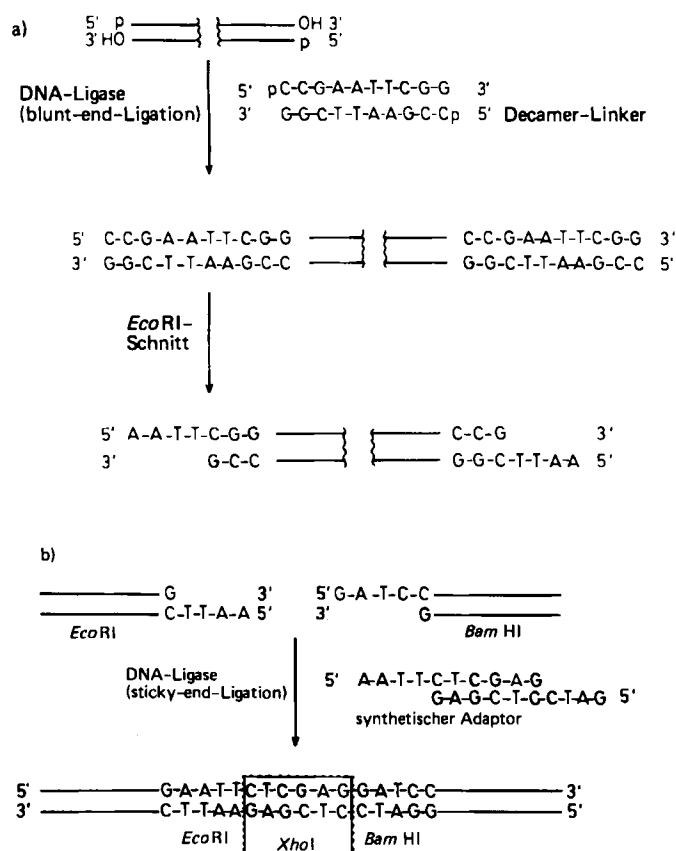


Fig. 22. a) Konstruktion von Einzelstrangenden durch „blunt-end“-Ligation eines chemisch synthetisierten Linkers mit nachfolgendem EcoRI-Schnitt. Ein solches Fragment läßt sich dann in ein EcoRI-linearisiertes Plasmid pBR322 einbauen. b) Konstruktion einer neuen Restriktionsstelle mit einem synthetischen Adaptor (Restriktionsendonuclease XhoI: C|TCGAG).

14. Die zukünftige Rolle der Chemie in der Molekularbiologie

In den letzten 20 Jahren haben die Genetiker die dominierende Rolle bei der Weiterentwicklung der Molekularbiologie gespielt. Nun scheint es aber, daß sich die Chemiker wieder verstärkt biologischen Fragen zuwenden. Die Chemiker haben gelernt, genetisches Material zu isolieren,

zu sequenzieren und zu synthetisieren. Die Genetik ist aber nur ein kleiner Ausschnitt aus dem weiten Gebiet der Molekularbiologie. Dem Zeitgeist folgend und nicht unbeeinflusst von wirtschaftlichen Bedingungen befassen sich Chemiker wieder mehr mit Naturstoffen im allgemeinen, mit Proteinen, mit Zellwänden und Membranen und in Zukunft hoffentlich auch mit der Zelldifferenzierung und der Informationsspeicherung. In Deutschland ist die Hinwendung der Chemie zu biologischen Problemen auch ein Rückbesinnen auf ihre Traditionen. Um sich mit solchen Fragen zu beschäftigen, sind solide chemische Kenntnisse, ein Verständnis der Prinzipien des Lebenden und die Bereitschaft, ständig zu lernen und Andere und Anderes zu akzeptieren, notwendig.

Dem Fonds der Chemischen Industrie und der Otto-Röhm-Stiftung danken wir für die Finanzierung eigener Forschungsarbeiten (HGG). Unser Dank gilt besonders Frau E. Rönfeldt für die Hilfe beim Schreiben des Manuskriptes.

Eingegangen am 23. September 1982 [A 438]

- [1] F. Miescher, *Hoppe-Seyler's Med. Chem. Unters.* 1871, 441.
- [2] C. Correns, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 18 (1900) 158.
- [3] P. O. P. Ts'o in P. O. P. Ts'o: *Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry*, Academic Press, New York 1974, S. 2ff.
- [4] P. A. Levene, L. A. Mikeska, T. Mori, *J. Biol. Chem.* 85 (1930) 785.
- [5] E. Chargaff, J. H. Davidson: *The Nucleic Acids, Vol. I-III*, Academic Press, New York 1955.
- [6] J. D. Watson, F. H. C. Crick, *Nature* 171 (1953) 737.
- [7] R. Olby: *The Path to the Double Helix*, University of Washington Press, Seattle, WA 1974.
- [8] V. A. Bloomfield, D. M. Crothers, I. Tinoco, Jr.: *Physical Chemistry of Nucleic Acids*, Harper and Row, Bussum 1974.
- [9] O. T. Avery, C. M. MacLeod, M. McCarty, *J. Exp. Med.* 79 (1944) 137.
- [10] O. Hartwig, *Morphol. Jahrb.* 1875, 1.
- [11] H. Fol, *Mem. Soc. Phys. Geneve* 1879, 26.
- [12] A. D. Hershey, M. Chase, *J. Gen. Physiol.* 36 (1953) 39.
- [13] J. D. Watson: *Molecular Biology of the Gene*, W. A. Benjamin, Menlo Park, CA 1970.
- [14] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 560.
- [15] a) W. Gilbert, *Angew. Chem.* 93 (1981) 1037; b) F. Sanger, *ibid.* 93 (1981) 937.
- [16] R. Knippers: *Molekulare Genetik*, Thieme, Stuttgart 1981.
- [17] F. Jacob, J. Monod, *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 318.
- [18] C. Janofsky in R. H. Hanes, P. C. Hanawald: *The Molecular Basis of Life*, Freeman, San Francisco 1968, S. 224ff.
- [19] H. G. Gassen, *Angew. Chem.* 94 (1982) 15; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 21 (1982) 23.

- [20] J. Shine, L. Dalgarno, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71 (1974) 1342.
- [21] P. Kourilsky, P. Chambon, *Trends Biochem. Sci.* 3 (1978) 244.
- [22] R. Y. Stanier, E. A. Adelberg, J. L. Ingraham: *The Microbial World*, 4. Aufl., Prentice-Hall, London 1976.
- [23] A. J. Bukhari, J. A. Shapiro, S. L. Adhya: *DNA: Insertion Elements, Plasmids and Episomes*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NJ 1977.
- [24] N. Willets, R. Skurray, *Annu. Rev. Genet.* 14 (1980) 41.
- [25] R. C. Clowes, *Sci. Am.* 228 (1973) Nr. 4, S. 18.
- [26] R. Watanabe, *Bacteriol. Rev.* 27 (1963) 87.
- [27] R. P. Novick, *Sci. Am.* 243 (1980) Nr. 6, S. 102.
- [28] N. D. Zinder, J. Lederberg, *J. Bacteriol.* 64 (1952) 679.
- [29] a) A. D. Hershey: *The Bacteriophage Lambda*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NJ 1971; b) H. A. Nash, *Annu. Rev. Genet.* 15 (1981) 143.
- [30] J. Abelson, E. Butz: *Science* 209 (1980) 1317.
- [31] W. Gilbert, L. Villa-Komaroff, *Sci. Am.* 242 (1980) 74.
- [32] J. K. Setlow, A. Hollaender: *Genetic Engineering, Principles and Methods*, Plenum Press, New York 1979.
- [33] P. Berg, *Angew. Chem.* 93 (1981) 885.
- [34] K. E. Davies, *Hum. Genet.* 58 (1981) 351.
- [35] A. E. H. Emery, *Lancet II* 1981, 1406.
- [36] R. Wu, *Methods Enzymol.* 68 (1979) 1.
- [37] Industrial Microbiology in *Sci. Am.* 245 (1981) Nr. 3, S. 42ff.
- [38] R. Yuan, *Annu. Rev. Biochem.* 50 (1981) 285.
- [39] W. Arber, *Mannheimer Forum* 81/82, Boehringer Mannheim 1982, S. 9ff.
- [40] H. Smith, *Science* 205 (1979) 455.
- [41] W. Hillen, R. D. Klein, R. D. Wells, *Biochemistry* 20 (1981) 3748.
- [42] R. Blain: *Analytische Elektrophorese-Verfahren*, Thieme, Stuttgart 1978.
- [43] T. G. Cooper: *Biochemische Arbeitsmethoden*, de Gruyter, Berlin 1981.
- [44] C. C. Richardson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54 (1965) 158.
- [45] B. Weis, A. J. Sablon, T. R. Live, G. C. Fareed, C. C. Richardson, *J. Biol. Chem.* 242 (1968) 4543.
- [46] a) S. H. Goodgal, R. M. Harriot, *J. Gen. Physiol.* 44 (1961) 1201; b) S. N. Cohen, A. C. V. Chang, L. Hsu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61 (1972) 2110.
- [47] J. Collins, B. Hon, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75 (1978) 4242.
- [48] P. Starlinger, *Annu. Rev. Genet.* 11 (1977) 103.
- [49] J. K. Davies, P. Reeves, *J. Bacteriol.* 123 (1975) 96.
- [50] A. Travers, *Nature* 263 (1976) 641.
- [51] R. Losick, M. Chamberlin: *RNA Polymerase*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NJ 1976.
- [52] W. S. Reznikoff, J. N. Abelson in J. H. Miller, W. S. Reznikoff: *The Operon*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NJ 1978, S. 221ff.
- [53] R. Dickson, J. Abelson, W. Barnes, W. Reznikoff, *Science* 187 (1975) 27.
- [54] S. N. Cohen, *Nature* 263 (1976) 731.
- [55] D. B. Clewell, *Microbiol. Rev.* 45 (1981) 409.
- [56] a) P. Brodo: *Plasmids*, W. H. Freeman, San Francisco 1979; b) D. R. Helinski, *Crit. Rev. Biochem.* 1979, 83.
- [57] J. G. Sutcliffe, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43 (1979) 77.
- [58] F. W. Stahl: *Genetic Recombination*, W. H. Freeman, San Francisco 1979.
- [59] E. L. Korvak, *Gene* 15 (1981) 1.
- [60] Bundesministerium für Forschung und Technologie (BMFT): *Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch in vitro neukombinierte Nukleinsäuren*, 3. Fassung, Bundesanzeiger-Verlagsgesellschaft, Köln 1980.
- [61] W. Klingmüller, *Naturwissenschaften* 66 (1979) 182.
- [62] T. Maniatis, R. C. Hardison, E. Lacy, J. Laver, C. O'Connell, D. Quon, G. K. Sim, A. Efstratiadis, *Cell* 15 (1978) 687.
- [63] W. B. Anderson, E. G. Diacumakos, *Sci. Am.* 245 (1981) 106.
- [64] J. Abelson, *Annu. Rev. Biochem.* 48 (1979) 1035.
- [65] R. Wu, C. P. Bahl, S. A. Narang, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 21 (1978) 101.
- [66] W. J. Whelan, S. Black: *From Genetic Experimentation to Biotechnology*, Wiley, Chichester 1982.
- [67] R. C. Mulligan, B. H. Howard, P. Berg, *Nature* 277 (1979) 108.
- [68] J. T. Elder, R. A. Spritz, *Annu. Rev. Genet.* 15 (1981) 295.
- [69] P. Berg, *Biosci. Rep.* 1 (1981) 269.
- [70] U. Rütther, M. Koenen, M. Otto, B. Müller-Hill, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 4087.
- [71] M. Grunstein, D. S. Hogness, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72 (1975) 3961.
- [72] E. M. Southern, *J. Mol. Biol.* 98 (1975) 503.
- [73] L. Grossman, K. Moldave, *Methods Enzymol.* 65 (1980) 705.
- [74] H. Hofmann, M. E. Frank, *J. Bacteriol.* 86 (1963) 1075.
- [75] Maxicell-System: A. Sanchor, A. M. Hack, D. D. Rupp, *J. Bacteriol.* 137 (1979) 692.
- [76] A. Marcus, D. Efron, D. P. Weeks, *Methods Enzymol.* 30 (1974) 49.
- [77] H. R. B. Pilham, R. J. Jackson, *Eur. J. Biochem.* 6 (1976) 247.
- [78] H. Schmitt, I. Gozes, U. Z. Littauer, *Brain Res.* 121 (1977) 327.
- [79] J. D. Richter, N. C. Jones, L. D. Smith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (1982) 3789.
- [80] A. Gräsmann, M. Gräsmann, C. Müller, *Methods Enzymol.* 65 (1980) 816.
- [81] W. Gilbert, *Biosci. Rep.* 1 (1981) 353.
- [82] A. M. Maxam, W. Gilbert, *Methods Enzymol.* 65 (1980) 499.
- [83] F. Sanger, *Biosci. Rep.* 1 (1981) 3.
- [84] G. Blobel, P. Walter, G. N. Chang, B. M. Goldmann, A. H. Erickson, U. R. Lingappa, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 33 (1979) 9.
- [85] J. E. Rothman, H. F. Lodish, *Nature* 269 (1977) 775.
- [86] M. P. Czech, *Annu. Rev. Biochem.* 46 (1977) 359.
- [87] R. Harrison, G. G. Lunt: *Biological Membranes. Their Structure and Function*, Halsted, New York 1980.
- [88] R. A. Capaldi, *Sci. Am.* 230 (1974) Nr. 3, S. 26.
- [89] H. D. Jakubke, H. Jeschkeit: *Aminosäuren, Peptide, Proteine*, Verlag Chemie, Weinheim 1982.
- [90] S. J. Singer, G. L. Nickolson, *Science* 175 (1972) 720.
- [91] R. Talmadge, H. Brosius, W. Gilbert, *Nature* 294 (1981) 176.
- [92] K. Neugebauer, R. Sprengel, H. Schaller, *Nucleic Acids Res.* 9 (1981) 2577.
- [93] H. Kössel, H. Seliger, *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 32 (1975) 297.
- [94] H. G. Khorana, *Science* 203 (1979) 614.
- [95] M. D. Edg, A. R. Greene, G. R. Heathcliffe, P. A. Meacock, W. Schuch, D. B. Scanlon, T. C. Atkinson, C. R. Newton, A. F. Markham, *Nature* 292 (1981) 756.
- [96] R. L. Letsinger, M. J. Kornet, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 4045.
- [97] R. B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 2149.
- [98] R. B. Merrifield, B. Gutte, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 1922.
- [99] K. Itakura, *Trends Biochem. Sci.* 5 (1980) 114.
- [100] H. G. Gassen, A. Lang: *Chemical and Enzymatic Synthesis of Gene Fragments: A Laboratory Manual*, Verlag Chemie, Weinheim 1982.
- [101] K. Migoshi, K. Itakura, *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 7 (1980) 281.
- [102] M. J. Gait, M. Singh, R. C. Sheppard, M. D. Edge, A. R. Greene, G. R. Heathcliffe, T. C. Atkinson, C. R. Newton, A. F. Markham, *Nucleic Acids Res.* 8 (1980) 1081.
- [103] M. J. Gait, H. W. D. Matthes, M. Singh, B. S. Sproat, R. C. Titmas: *Synthesis of Oligodeoxynucleotides by a Continuous Flow Phosphotriester Method on a Kieselguhr/Polyamide Support* in [100], S. 1.
- [104] R. M. Cook, D. Hudson, E. Mayran, J. Ott: *Principles of Automated Gene Fragment Synthesis* in [100], S. 111.
- [105] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 1859.
- [106] M. D. Matteucci, M. H. Caruthers, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 3185.
- [107] M. H. Caruthers: *Chemical Synthesis of Oligonucleotides Using the Phosphite Triester Intermediates* in [100], S. 71.
- [108] G. van der Marel, C. A. A. van Boeckel, G. Wille, J. H. van Boom, *Tetrahedron Lett.* 22 (1981) 3887.
- [109] H. Seliger, S. Klein, Ch. K. Narang, B. Seemann-Preisling, J. Eiband, H. Haeufel: *Solid-Phase Synthesis of Oligonucleotides Using the Phosphite Method* in [100], S. 81.
- [110] M. T. Pardue, J. G. Gall, *Methods Cell Biol.* 10 (1975) 1.
- [111] A. P. Bird, *J. Mol. Biol.* 118 (1978) 49.
- [112] H. Weber, T. Taniguchi, W. Müller, F. Meyer, C. Weissmann, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 43 (1978) 669.