Ber. Naturwiss. Verein Bielefeld u. Umgegend **31** (1990), S. 271-288

Zur Anlage einer Genbank: Einbringung von Maus-Genen in Bakterien für molekulargenetische Untersuchungen

Martin SCHLEEF, Bielefeld

Mit 9 Abbildungen

Inhalt Seite

1.	Zusammenfassung	272
2.	Einleitung	272
3.	Material und Methoden	277
4.	Konstruktion einer Genbank	278
5.	Beurteilung zur Qualität der Genbank	284
6.	Literatur	288

Verfasser:
Martin Schleef, Universität Bielefeld, Fakultät für Biologie, Lehrstuhl für Genetik/SFB 223, Postfach 8640, D-4800 Bielefeld 1

Verwendete Abkürzungen:
bp = Basenpaare, Einheit für die Länge von DNA-Molekülen;
DNA = Desoxyribonukleinsäure, das Erbmaterial;
kb = Kilo Basenpaare, 1 kb = 1000 bp.

1. Zusammenfassung

Die Gentechnologie, Molekularbiologie, Genetik und Mikrobiologie haben in zunehmender Weise Einfluß auf alle Gebiete der Biologie und Medizin genommen. Das Interesse an den damit verbundenen Ergebnissen und Techniken ist nicht nur auf Fachleute begrenzt. Die interessierte Öffentlichkeit begegnet immer häufiger Begriffen wie z.B. "Genbank", "Klonierung von DNA", "rekombinant", "Genom" oder *"in vitro"*. Am Beispiel einer Klonierung der genetischen Information von erblich kranken Mäusen, also der Konstruktion einer Genbank einer solchen Maus, sollen diese Begriffe der Molekularbiologie erklärt und exemplarisch genetische Vorgehensweisen beschrieben werden.

Die untersuchte Maus (ADR) hat eine vererbte Muskelkrankheit. Um spezifisch vom Defekt betroffene Gene isolieren zu können, wurde eine Genbank angelegt. Sie bestand aus 600.000 unterschiedlichen Klonen und repräsentiert mit hoher Wahrscheinlichkeit das gesamte Genom der Maus. Ihre Eignung für die Isolierung von gesuchten Genen wurde durch die Bestimmung der Rate an neukombinierten Bakteriophagen, Überprüfung ihrer Vielfältigkeit und Stichproben-Analysen gezeigt.

2. Einleitung

Ein in letzter Zeit ebenso umstrittenes wie erfolgreiches Teilgebiet der Biologie ist die Genetik. Ihre klassische Bedeutung lag seit der Anerkennung von Gregor Mendel entwickelter Regeln zur Vererbung, in der Interpretation und Nutzung von auffälligen Merkmalen (Phänotypen) bei Tieren oder Pflanzen. Dabei war die Züchtung besonders ertragreicher Milchkühe ebenso angestrebt worden, wie die Kultivierung von vielleicht außergewöhnlich schmackhaften oder großen Speisepilzen bzw. Nutzpflanzen.

Die Suche nach den Grundlagen solcher "Leistungen" der Natur führte zur molekularen Genetik, die sich mit der Informationserhaltung, -veränderung und -verarbeitung beschäftigt. Dabei sind die Informationen für die letztendliche Erscheinungsform eines Organismus in der Summe aller seiner Gene festgelegt. Sie bilden die Gesamtinformation (das Genom) der Zelle (ob tierisch, pflanzlich oder bakteriell, und sogar bei Viren) und sind auf einem Stück des "Erbmoleküls" DNA

(engl. 'deoxyribonucleic acid') untergebracht. Auf einem solchen Fadenförmigen DNA-Molekül, welches in den Zellen/Zellkernen das oder die Chromosomen bildet, liegen viele verschiedene Gene, die unterschiedlich lang und unterschiedlich wichtig sind. Ihre Information ist verschlüsselt (Genetischer Kode).

Dieses Molekül besteht aus nur vier verschiedenen Bausteinen (Nukleotide), welche das Alphabet des Kodes bilden, und ihre Reihenfolge (Sequenz) bestimmt bei der Entschlüsselung (Translation, Proteinbiosynthese) die Reihenfolge der Bausteine (Aminosäuren) ihrer Genprodukte (Proteine). Die Aminosäure-Reihenfolge wiederum legt die Protein-Form und letztendlich damit die Funktion des Proteins fest. Die DNA-Bausteine sind nach festen Regeln gepaart in einer Doppelhelix organisiert (es handelt sich also um zwei umeinander verwundene "Fäden") und ihre Länge wird in Basenpaaren (bp) gemessen (WATSON & CRICK 1953).

Neben den Abschnitten des DNA-Moleküls, auf dem Informationen für Proteine liegen, gibt es noch solche, die z.B. das Lesen der Information regulieren. Weite Bereiche sind noch völlig unbekannt.

Gerade in relativ komplexen Organismen wie Säugetieren, hat das Genom eine Größe, die Analysen erschwert. Die Genomgröße eines Säugetiers beträgt z.B. ca. 2x10 bp. Die Zahl der darin enthaltenen Genfunktionen wird auf 30.000 bis 40.000 geschätzt (LEWIN 1988). Vereinfacht wird die Untersuchung einzelner Teile der genetischen Information solch großer Genome in Organismen mit überschaubarem genetischem Hintergrund. Das Darmbakterium und vorwiegender Labor-Organismus der Molekular-Genetik *Escherichia coli (E. coli)* hat z.B. eine Gesamtlänge seines Genoms von $4.2x10^6$ bp (LEWIN 1988). Es sind bisher mehr als 1000 verschiedene *E. coli*-Gene gefunden und einer definierten Position im Bakteriengenom zugeordnet worden (BACHMANN 1983).

Alle Gene haben Funktionen bei der Festlegung von Eigenschaften "ihres" Organismus. Diese können durch Kreuzung und Neuvermischung bei geschlechtlicher Fortpflanzung variiert werden, was der Grund für die Individualität von Lebewesen ist.

Besonders auffällige Merkmale, wie erbliche Krankheiten, sind schon früh als Stamm- oder Familien-spezifisch erkannt worden. Der molekulare Mechanismus von Vererbung war zu der Zeit noch völlig unbekannt. Das grundlegende Prinzip ist die Speicherung erblicher Information in der DNA (übrigens bei allen bisher bekannten Organismen). Durch die Ablesung und Übersetzung der Information in Proteine werden Strukturmerkmale geschaffen, die äußerlich erkennbar sein können (Phän, z.B. Hautfarbe).

Wenn solche Merkmale ihre Ursache in der genetischen Information haben, müssen sie auch einer Analyse über das genetische Material (DNA) zugänglich sein.

Die analytischen Methoden der molekularen Genetik sind, wenn die DNA solcher Individuen erst einmal handhabbar ist, gleichartig. Dabei macht es keinen Unterschied, ob ein Defekt ein Bakterium, einen Pilz, eine Pflanze oder ein Tier betrifft. Schon ein einziger Fehler in der verschlüsselten Abfolge (Sequenz) der Basenpaare der DNA kann ausreichen, um die richtige Entschlüsselung für die Zelle unmöglich zu machen. Dann fällt das betroffene Gen aus, oder seine Information wird verfälscht.

Ein bekanntes Beispiel (INGRAM 1956, WINNACKER 1985) ist die Sichelzellanämie, deren molekulare Ursache ein einziger Basenaustausch in dem Gen ist, das die Information für die Struktur des Genproduktes (das Protein β-Hämoglobin) trägt. Die relativ geringe Veränderung zeigt große Wirkung: Eine andere Aminosäure (Baustein der Proteine) wird bei der Proteinsynthese in das β-Hämoglobin eingebaut, und das so gebildete "andere" Protein (Hämoglobin S) zeigt veränderte Eigenschaften. Schließlich führen diese zu deformierten (sichelförmigen) Blutplättchen und entsprechenden gesundheitlichen Folgen bei betroffenen Menschen.

Der direkte Zugriff auf ein bestimmtes Gen wird erreicht, indem dieses aus seinem natürlichen und im Falle von höher organisierten Lebewesen komplexen Gesamtorganismus herausgenommen und in einen einfacher zu handhabenden (wie z.B. Bakterien, Abb. 1) eingeführt, dort vermehrt (kloniert) und untersucht wird. Der diesbezügliche Vorteil von Bakterien beruht auf ihrer hohen Vermehrungsrate. Sie teilen sich unter geeigneten Bedingungen etwa alle 20 Minuten einmal. Dadurch entstehen sehr viele, völlig identische Tochterzellen (Klon), die auch jeweils eine Kopie des "fremden" Gens tragen. Die dazu notwendigen Methoden sind schon seit längerer Zeit bekannt. Ihre Anwendung wird allen Untersuchungen im Ursprungsorganismus vorgezogen.

Die Grundlage für die Einführung eines bestimmten Stückes DNA (welches ein Gen oder einen Teil davon enthalten kann) in ein Bakterium, ist die Integration in ein geeignetes Vehikel (Vektor). Solche können extrachromosomale DNA-Moleküle (Plasmide) oder Bakteriophagen-Genome sein. Beide sind zu analytischen Zwecken relativ leicht vom Bakterien-Genom abtrennbar und lassen sich in großen Mengen gewinnen. Die Bakteriophagen-Genome sind in der hier beschriebenen Arbeit benutzt worden.

Bakteriophagen sind Bakterien-Viren. Sie befallen spezifisch Bakterien und injizieren dabei ihre DNA in den betroffenen Wirt (Abb. 2). Dessen Ausprägung genetischer Information (Genexpression) wird zugunsten der Bakteriophagen-Gene ausgeschaltet und umorganisiert. Solche Bakteriophagen stehen der Molekulargenetik in modifizierter Form zur Verfügung.

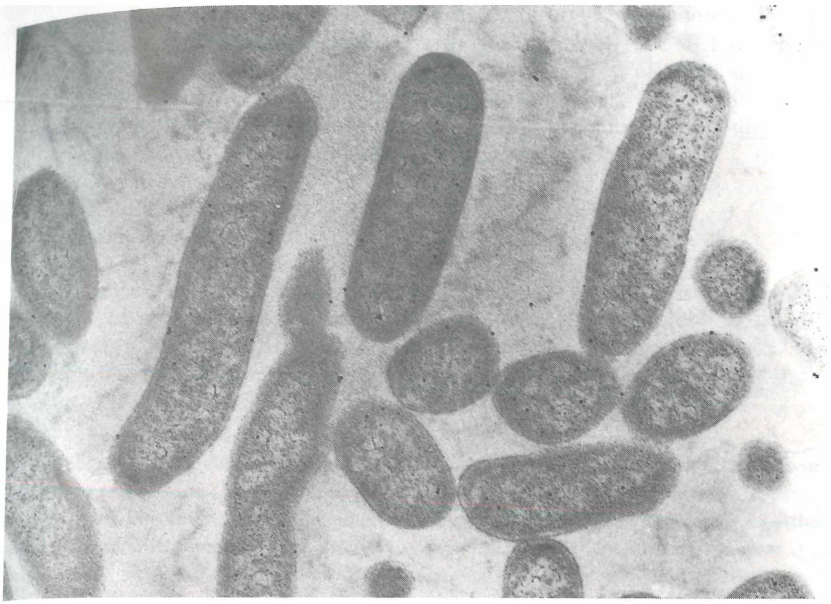


Abb. 1: Elektronenmikroskopische Aufnahme von Bakterien (Querschnitt).

Die Aufnahme zeigt *Escherichia coli* Bakterien (Stamm: MC 1000) in ca. 21000-facher Vergrößerung. Bei den hier gezeigten Objekten handelt es sich um Schnittpräparate.
(Aufnahme: D. KAPP, Bielefeld)

Mit diesen molekulargenetischen Methoden sollte die genetische Information der muskelkranken Maus-Mutante ADR (engl. 'arrested development of righting response', WATTS et al. 1978) zugänglich gemacht werden. Da die Krankheit dieser Maus erblich ist, wird erwartet, eine Veränderung (Mutation) ihrer genetischen Information zu finden. Dieser zugrundeliegende Defekt ist bisher unbekannt, konnte aber zumindest auf das Chromosom 6 der Maus eingegrenzt werden (JOCKUSCH *et al.* 1988). Die Krankheit der ADR-Maus wird rezessiv vererbt und ist ab Tag 9 nach der Geburt an steifen Hinterbeinen zu erkennen (FÜCHTBAUER et al. 1988). Diese Bewegungsunfähigkeit wird durch lang anhaltende Nachkontraktionen bestimmter Muskeln (schnell kontrahierende/relaxierende Skelettmuskeln) verursacht.

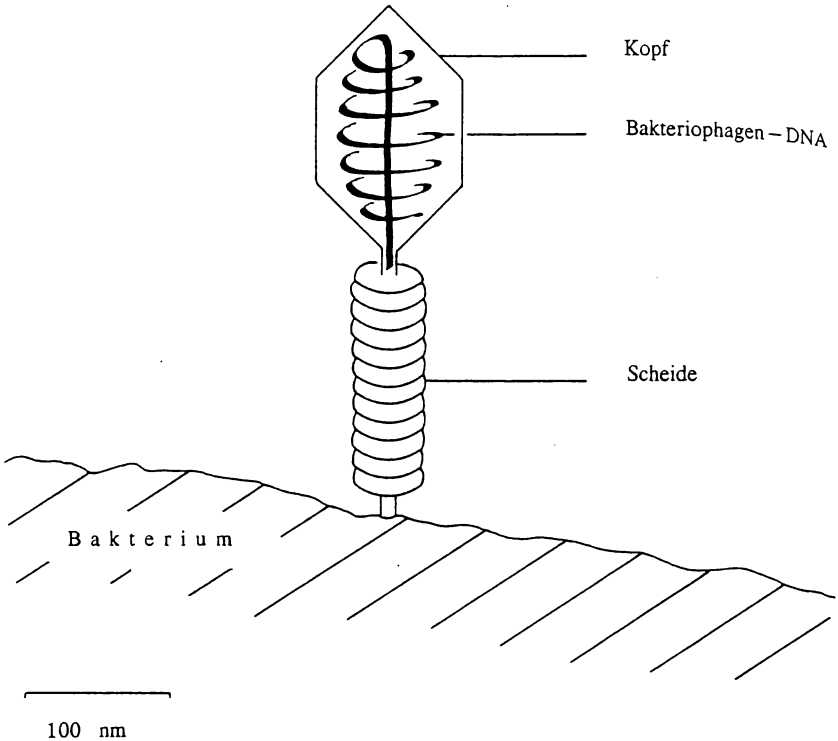


Abb. 2: Lambda-Bakteriophage.
Die Skizze stellt ein Modell des Lambda-Bakteriophagen dar. Solche Bakteriophagen befallen Bakterien und injizieren ihr Genom (DNA) in die Bakterienzelle. Die Bakteriophagen-Erbinformation koordiniert dort die Reproduktion von Bakteriophagen auf Kosten des Wirtes. Die Bakteriophagen bestehen aus Protein-Bausteinen, die Strukturen wie z.B. Kopf und Scheide aufbauen.

Neben weiteren Auffälligkeiten zeigt der Vergleich zwischen kranker (ADR) und gesunder (Wildtyp, hier A2G) Maus einen in betroffenen Muskelfasern drastisch verringerte Parvalbumin (Pv) Gehalt (KLUXEN *et al.* 1988). Die Funktion des Parvalbumins ist bis heute unbekannt (SCHÖFFL & JOCKUSCH 1990). Die Verwirklichung der im Parvalbumin-Gen (Pva) enthaltenen Information (nämlich die Synthese des Parvalbumin-Proteins am richtigen Ort zur richtigen Zeit in richtiger Menge) ist also irgendwo auf dem Weg vom Gen zum Phän behindert.

Weil das Parvalbumin-Gen auf einem anderen Chromosom als der ADR-Defekt liegt (nämlich auf Chromosom 15^{Maus}, ZÜHLKE *et al.* 1989), gilt es als nicht direkt betroffen. In diesem Falle ist also anders als bei der oben erwähnten Sichelzellanämie nicht ausschließlich ein Gen betroffen, sondern durch einen einzigen Fehler die Regulation mehrerer Gene beeinflußt (Pleiotroper Effekt).

3. Material und Methoden

Anmerkung: Dieser Teil soll Interessenten mit molekularbiologischen Kenntnissen notwendige Informationen für die Nachvollziehbarkeit der eingesetzten Techniken liefern. Er ist für die Klärung der in der Überschrift gestellten Frage und das Allgemeinverständnis nicht notwendig.

DNA-Isolierung aus Maus-Gewebe: 0.5 g Mausgewebe (hier Cerebellum) wurden unter flüssigem Stickstoff zermörsert, um die Zellen zu öffnen. Das so hergestellte Pulver wurde mit einer Lösung behandelt, die einerseits Zellbestandteile auflöst, andererseits die DNA der Zellen vor Zerstörung schützt (1% Sarkosyl/0.1 mM EDTA/Proteinase K/RNase A). Die Proteine und Zelltrümmer, sowie alle weiteren unerwünschten Substanzen wurden entfernt (Phenol) und die DNA gereinigt (Dialyse). (WEYDERT *et al.* 1983).

Restriktionsspaltung von DNA: Die DNA wurde mit sequenzspezifisch schneidenden Enzymen (Restriktionsenzymen, BRL) in vom Hersteller empfohlenen Reaktions-Puffern und mit vorgeschriebener Konzentration bei 37°C geschnitten. Solche Enzyme erkennen bestimmte Muster in der Abfolge der Bausteine der DNA und schneiden diese im allgemeinen an genau festgelegter Position.

Präparation des Klonier-Vektors λEMBL 3: DNA des Bakteriophagen wurde isoliert und mit Restriktionsenzymen so geschnitten, daß drei Abschnitte daraus entstanden: Der linke und der rechte Arm, sowie das 'stuffer'-Fragment. Durch eine hier nicht weiter beschriebene Behandlung wurde verhindert, daß das 'stuffer'-Fragment an der später beschriebenen Verknüpfung von Maus-DNA und Vektor-DNA teilnehmen konnte. (BOULNOIS 1987).

Klonierung: Die Vektor-DNA und Fragmente genomischer Maus-DNA wurden durch ein entsprechendes Enzym (T4-Ligase, BRL) verbunden (ligiert). Es entstand *in vitro* neukombinierte (rekombinante) DNA, die in einem *in vitro*-Verpackungssystem (nach HOHN 1979) zu Bakteriophagen zusammengebaut wurden, welche gegenüber Bakterien infektionsfähig waren.

Vermehrung von Bakteriophagen-Klonen: 100 µl einer über Nacht gewachsenen Flüssig-Kultur des Wirtsbakteriums *E. coli* LE 392 bzw. *E. coli* P2 392 wurden mit Bakteriophagen infiziert und auf Bakterien-Vollmedium über Nacht bei 37°C inkubiert. Der entstandene Bakterien-Rasen wies "Löcher" (Plaques) auf, die das Ergebnis einer erfolgreichen Infektion eines Bakteriophagen waren und eine großen Menge Bakteriophagen enthielten.

Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen in einzelnen Klonen (Plaque-Hybridisierung): Die Bakteriophagen-Plaques wurden auf Nitrocellulose-Membranen übertra-

gen. An dieser Membran "klebte" dann ein Abdruck der ursprünglichen Oberfläche einer Nährbodenplatte. In dem Abdruck waren sowohl Bakterien, als auch Bakteriophagen enthalten. So transferierte Bakteriophagen wurden aufgeschlossen und dabei freigelegte DNA an der Membran fixiert. Unter geeigneten Bedingungen (SOUTHERN 1975) wurde diese Membran mit einer spezifisch markierten DNA-Sonde überschichtet und gleichartige (genauer komplementäre) DNA-Sequenzen in der Bakteriophagen-DNA paarten mit solchen Sonden. So wurden Plaques identifiziert, welche von Bakteriophagen stammten, welche die gesuchte DNA mit sich führten. Die Markierung erfolgte radioaktiv, der Nachweis durch Auflegen eines Röntgenfilms.

Auftrennung von DNA-Fragmenten im Gel (Agarose-Gelelektrophorese): DNA-Moleküle sind aufgrund ihrer Ladung im elektrischen Feld beweglich und innerhalb einer Gel-Matrix in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht auftrennbar. Die Konzentration der Agarose wurde zwischen 0.8 und 2% variiert und die Elektrophorese bei Spannungen von ca. 100 V/cm durchgeführt. Die DNA wurde angefärbt und im UV-Durchlicht photographiert.

Plasmide:	pMR1300	(WIERINGA, persönliche Mitteilung)
Bakteriophagen:	λEMBL 3	(FRISCHAUF *et al.* 1983)
Bakterien:	*E. coli* LE 392	(MURRAY *et al.* 1977)
	E. coli P2 392	(KAISER & MURRAY 1985)

4. Konstruktion einer Maus-Genbank

Die DNA der Maus sollte stückweise in den Lambda-Vektor EMBL 3 eingefügt und in Bakterien vermehrt (kloniert) werden. Eine Übersichtszeichnung des gesamten Verfahrens zeigt Abb. 3.

Beim verwendeten Vektor handelte es sich um das Genom eines Bakteriophagen, der speziell das Bakterium *E. coli* befällt. Sein Genom ist ca. 45 kb lang und enthält alle Informationen für seine Vermehrung in dem befallenen Wirt. Das Bakterium stirbt dabei, und ca. 100 neue Bakteriophagen werden gebildet und freigesetzt. Diese infizieren erneut Bakterien, und der Vorgang wiederholt sich, solange in einer Bakterien-Population infizierbare Bakterien vorhanden sind. Findet dieser Vorgang in einer Population von gleichmäßig verteilten Bakterien statt (etwa in einer Petrischale mit Nährmedium), so entstehen an diesem Ort charakteristische Löcher (sogenannte "Plaques") in einem Bakterienrasen. Dort sind aus ursprünglich einem Bakteriophagen viele tausend neue gebildet worden. Wenn man ein Stück "fremder" DNA in das Bakteriophagen-Genom integriert, wird es automatisch mit vermehrt. Eine solche Integration erfolgt über den Ersatz des in Abb. 4 als 'stuffer' bezeichneten Bereiches. Dieser enthält nicht-essentielle Informationen. Er umfaßt 14 kb DNA und muß durch ein mindestens 8 kb - höchstens jedoch 23 kb - langes Stück Maus-DNA ersetzt werden. Ein zu großes Bakteriophagen-Genom fände keinen Platz in der Hülle des Bakterien-Virus und würde nicht vermehrt.

Auch zu kleine Bakteriophagengenome werden nicht in die Virus-Hüllen verpackt.

Die genomische DNA der Maus mußte also in Stücke von ca. 20 kb zerschnitten werden, um in den Vektor integriert werden zu können. Dieses wurde mit einem spezifisch schneidenden Enzym (Restriktionsenzym) durchgeführt. Das gewählte Enzym (*Mbo* I) erkennt spezifisch Stellen in der DNA, an denen es schneiden kann. Sie sind in unbekannter Weise verteilt, treten aber in Abständen von weniger als 20 kb auf (für *Mbo* I). Die Behandlung der DNA führte also zu einer Vielzahl unterschiedlich langer DNA-Fragmente. Diese waren besonders kurz, wenn das Restriktionsenzym in großen Mengen eingesetzt wurde und entsprechend länger, wenn weniger an der Spaltungsreaktion beteiligt war. Abb. 5 zeigt ein Experiment zur Bestimmung der dabei entstehenden Fragmentlängen, die durch die Enzymbehandlung erzeugt worden sind. Es handelt sich um Proben der unterschiedlichen Ansätze. Im ersten Ansatz (Spur 1) war viel, in den nachfolgenden (Spuren 2-9) immer um die Hälfte weniger des Enzyms eingesetzt worden. Spur K zeigt eine unbehandelte Kontrolle. Die DNA-Fragmentlängen variierten also zwischen wenigen Basenpaaren (bp) und unzerschnittener genomischer DNA von mehr als 100 kb (1 kb = 1000 bp) Länge (Trennbereich des gezeigten Gels ca. 0.5 bis 20 kb).

Die Ansätze 3 bis 8 sind zusammengefaßt und in einem Salzgradienten durch Ultrazentrifugation aufgetrennt worden. Dabei sedimentieren lange Fragmente schneller als kurze, und das Austropfen eines solchen Gradienten liefert Fraktionen, von denen einige die Fragmente gewünschter Länge enthalten. Das Gel-Bild in Abb. 6 zeigt, daß die geforderten Fragmentlängen in den Fraktionen 12 bis 18 enthalten sind. Die darin enthaltene DNA wurde für die Integration in die Bakteriophagen-Genome isoliert.

Das Prinzip einer Genbank-Klonierung ist der Austausch des 'stuffer'-Fragments gegen ein adäquates Stück Maus-DNA. Dieser Austausch ist nachweisbar und bietet die Möglichkeit zur Quantifizierung der Klonierung. Die Verbindung zwischen den Vektor-Armen (siehe Abb. 4) und dieser DNA wird von einem Enzym (Ligase) durchgeführt. Es verknüpfte in dem hier beschriebenen Fall Enden von geschnittener Maus-DNA mit denen, die durch Schneiden der Bakteriophagen-Vektor-DNA erzeugt worden waren. Das 'stuffer'-Fragment wurde zuvor entfernt.

Durch diese Verknüpfungen entstanden rekombinante Moleküle. Sie enthielten also ein Stück DNA der Maus, sind aber ansonsten Bakteriophagengenome mit allen notwendigen Informationen zur Vermehrung in *E. coli* LE 392 (Auf die Besonderheiten dieses *E. coli*-Stammes wird später eingegangen.). Das verknüpfende Enzym hatte nicht nur

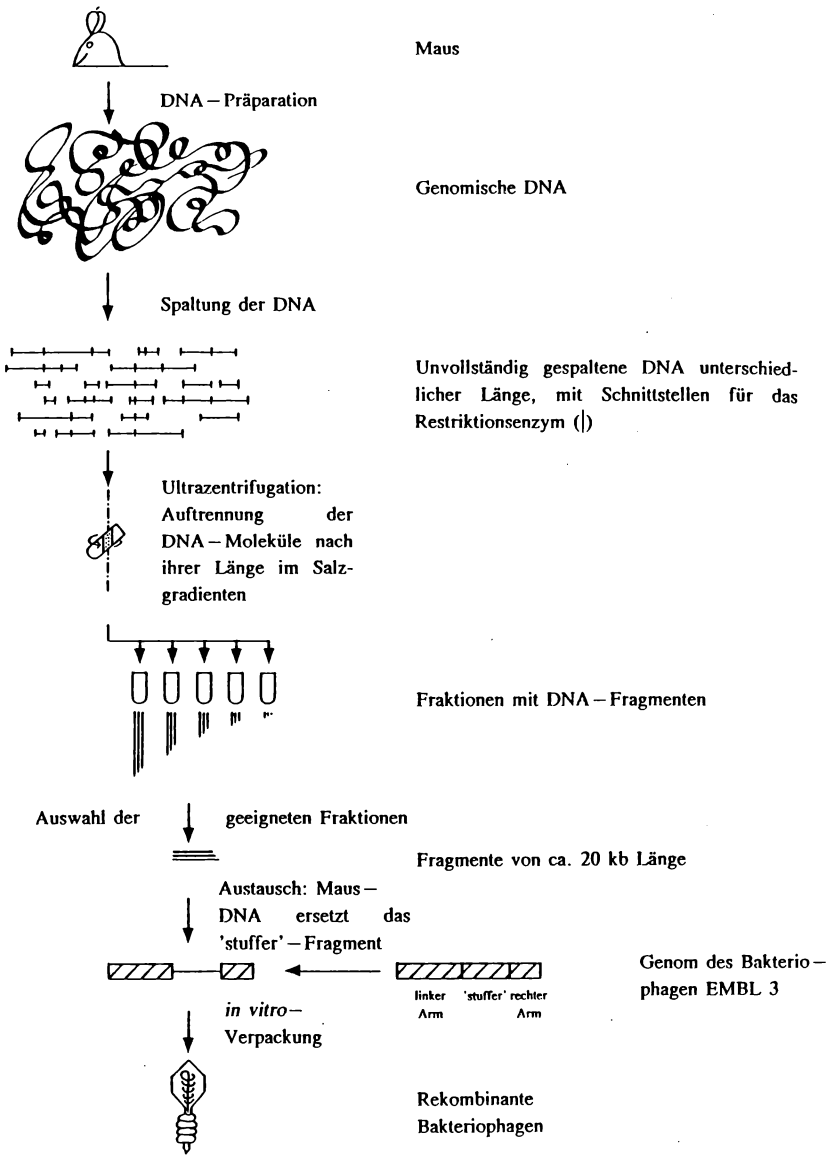


Abb. 3: Gesamtschema zur Herstellung einer Genbank.
Die Skizze beschreibt den Weg vom Ausgangsorganismus (hier Maus) zu den rekombinanten Bakteriophagen, die in ihrer Gesamtheit die Genbank darstellen.

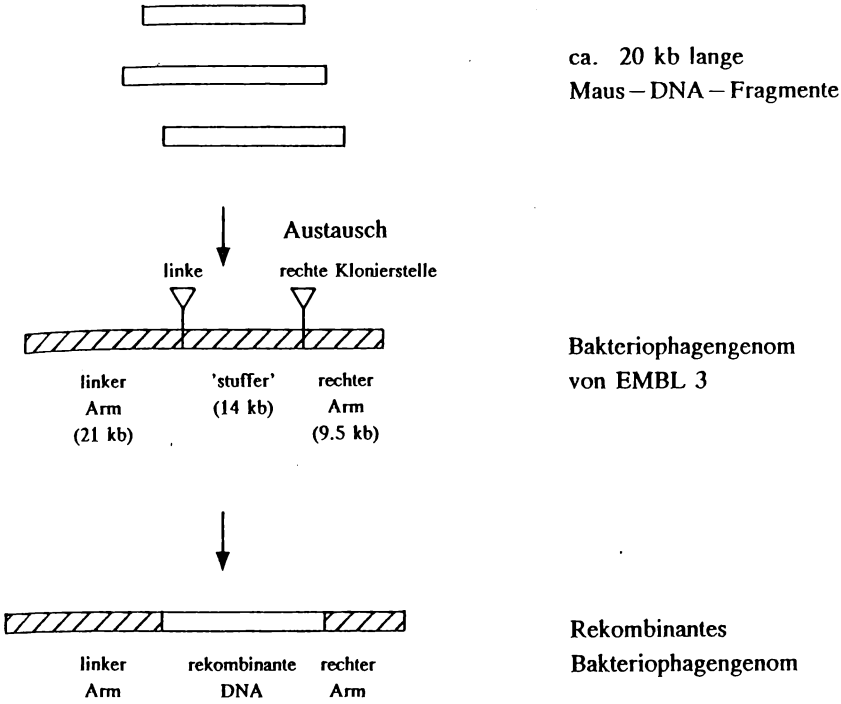


Abb. 4: Der Bakteriophagen-Vektor Lambda EMBL 3.
Das Bakteriophagengenom dieses Vektors wird in einen linken und rechten "Arm" unterteilt. Dazwischen befindet sich ein Bereich, den man als 'stuffer'-Fragment bezeichnet und der durch Integration geeigneter Maus-DNA ersetzt wird. Das 'stuffer'-Fragment enthält keine für den Bakteriophagen essentiellen Gene.

Vektor-DNA und Maus-DNA verbunden, sondern auch die rekombinanten Bakteriophagengenome untereinander. Es wurden lange Ketten von Bakteriophagen-Genomen gebildet.

Im folgenden Schritt der Klonierung mußte diese nackte DNA in Bakteriophagen-Hüllproteine gebracht werden. Diese Methode wird *in vitro* -Verpackung genannt, und sie besteht vereinfacht ausgedrückt in der Vermischung von zu verpackender DNA mit allen Bestandteilen der Bakteriophagen-Hülle außerhalb eines lebenden Organismus. Diese Bestandteile bauen sich unter geeigneten Bedingungen selbständig zu infektionsfähigen Bakteriophagen zusammen. Erst wenn sich die rekombinanten Bakteriophagengenome in der Hülle befinden, können

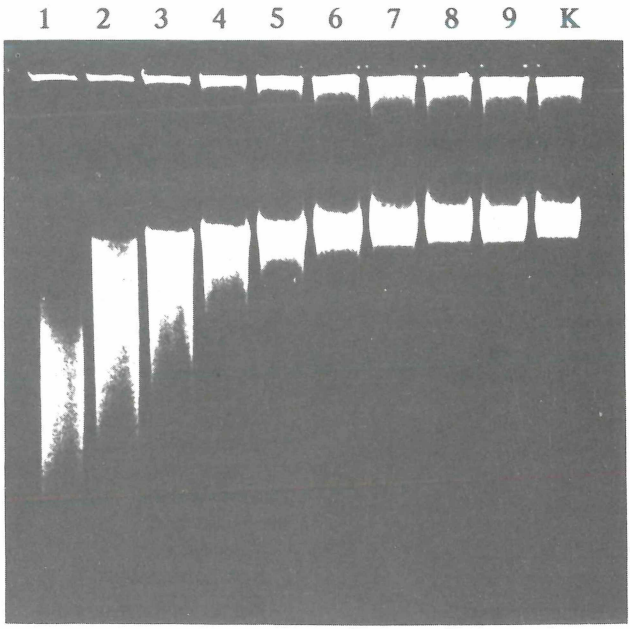


Abb. 5: Spaltung genomischer DNA der Maus.

In den Spuren 1 bis 9 des hier gezeigten Gels, wurde jeweils genomische DNA der Maus nach Länge aufgetrennt. Sie war mit Restriktionsenzymen geschnitten worden. Kurze Stücke werden schneller als lange durch das Gel bewegt. Die DNA-Moleküle waren in dieser und jeder folgenden Abbildung eines Gels von oben nach unten aufgetrennt worden. Die Spur 1 zeigt DNA, die mit einer bestimmten Menge Enzym behandelt wurde. Die DNA in den folgenden Spuren war mit weniger Enzym behandelt worden. Die Spur K zeigt eine unbehandelte Kontrolle.

phagen in ein Wirtsbakterium gelangen, um dort vermehrt zu werden.

Es ist anzumerken, daß die Genbank aus der Summe aller Bakteriophagen besteht, die in Bakterien lediglich vermehrt werden.

Sucht man nach einem bestimmten Gen eines Organismus und gibt es nur ein einziges davon pro Genom, so hängt der Erfolg davon ab, ob in der Population rekombinanter Bakteriophagen jede Sequenz des Ausgangsorganismus vertreten ist. Mit anderen Worten: Die Genbank sollte vollständig sein. Es gibt Möglichkeiten, sie daraufhin zu untersuchen.

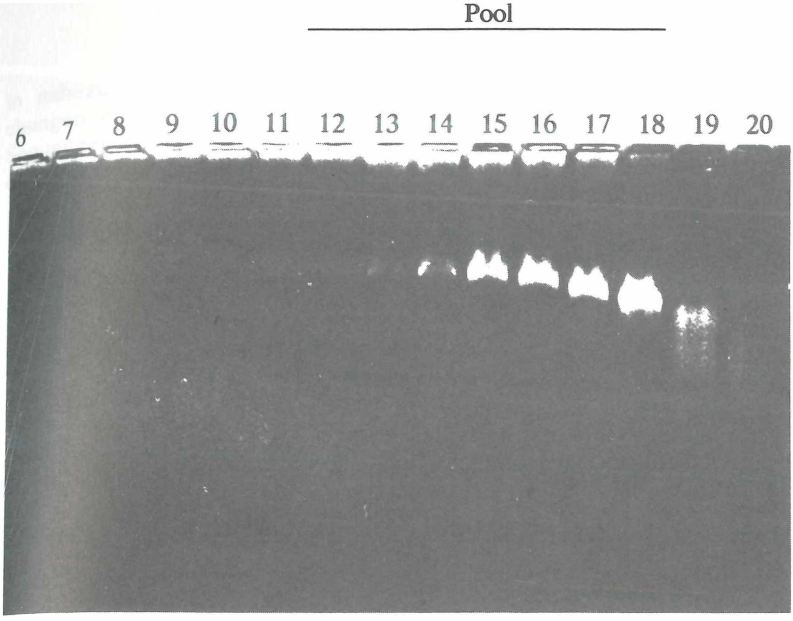


Abb. 6: Längenfraktionierte Maus-DNA aus dem Salzgradienten.
Die DNA der Fraktionen 6 bis 20 des Salzgradienten wurden im Gel aufgetrennt. Die Fragmente gewünschter Länge befanden sich in den Fraktionen 12 bis 18 und sind zusammengefaßt worden ("Pool").

5. Beurteilung der Qualität der Genbank

Eine Übersicht der im Folgenden beschriebenen Versuche zeigt die Abb. 7.

Weil beim Prozeß der Herstellung von Genbanken auch immer einige Bakteriophagen entstehen, die keine "fremde" DNA enthalten, ist die Zahl der rekombinanten Klone (Bakteriophagen mit Maus-DNA) gegenüber den nicht-rekombinanten (Bakteriophagen in ihrer ursprünglichen Form, also mit 'stuffer'-Fragment) ein wichtiges Kriterium. Beide Sorten bilden Plaques auf dem Wirtsbakterium *E. coli* LE 392. Der Wirt *E. coli* P2 392 unterscheidet jedoch zwischen solchen Bakteriophagen mit und ohne 'stuffer'-Fragment. Die Unterscheidung beruht darauf, daß das 'stuffer'-Fragment Gene enthält, die im Wirt abgelesen werden und deren Genprodukte die Proteinbiosynthese behindern. Es werden keine neuen Bakteriophagen gebildet, also entstehen keine Plaques. Durch den Vergleich der Plaque-Bildungsraten auf beiden Wirten, konnte der Anteil Nicht-rekombinanter als 5% berechnet werden. Diese Analysen ergaben eine Genbankgröße von ca. 600.000 rekombinanten Bakteriophagen. Damit dürfte das Genom der Maus rechnerisch etwa zweifach in der Bank repräsentiert sein.

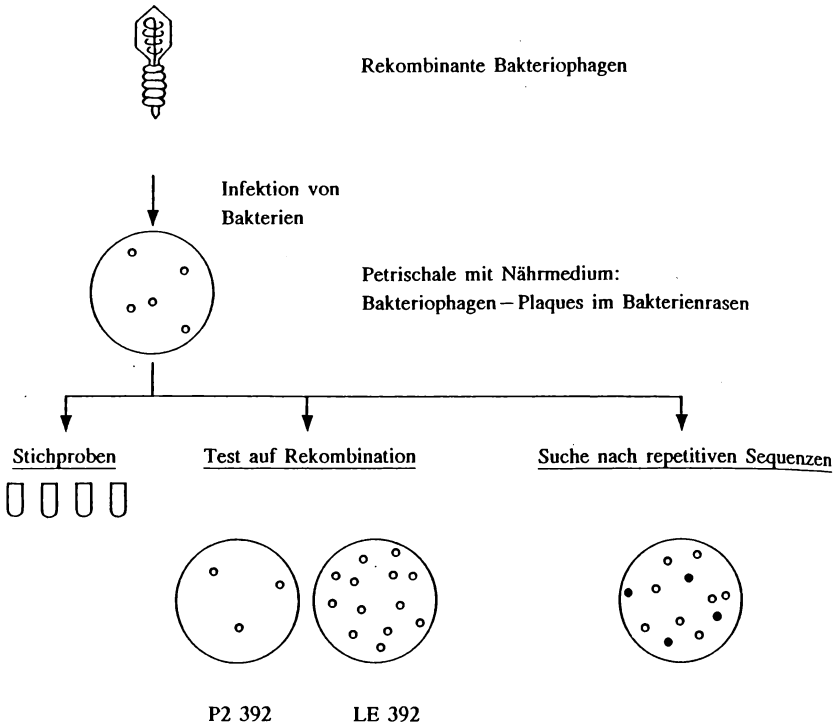


Abb. 7: Strategien zur Qualitäts-Kontrolle der Genbank.
Durch Infektion von Bakterien entstanden Plaques, die einzeln untersucht wurden (Stichproben). Der Vergleich der Plaquebildungsraten auf unterschiedlichen Wirten *(Escherichia coli* P2 392 und LE 392) ließ einen Rekombinantenanteil von 95% erkennen. Plaque-Hybridisierungen mit einer Sonde für repetitive Sequenzen des Mausgenoms zeigten, daß die Bakteriophagen der Genbank einen repräsentativen Querschnitt des Mausgenoms enthielten.

Der Vergleich zwischen der Zahl rekombinanter und nicht-rekombinanter Bakteriophagen belegt jedoch nicht deren Vielfältigkeit, bezogen auf ihren rekombinanten Inhalt. Das ist jedoch zu fordern, wenn man jedes beliebige Stück des Mausgenoms in der Bank vertreten wissen möchte.

Eine ca. 200.000 mal im Mausgenom auftretende immer gleiche (repetitive) DNA-Sequenz aus dem β-Globin-Gen der Maus (WIERINGA, persönliche Mitteilung), sollte unter der Annahme von Gleichverteilung

in nahezu jedem Stück rekombinanter DNA auftreten. Die Untersuchungen an 450 Bakteriophagen-Klonen zum Nachweis solcher DNA-Sequenzen (Plaque-Hybridisierung) belegten bei 50% das Vorhandensein der gesuchten Sequenz (Abb. 8). Das entsprach der Erwartung.



Abb. 8: Plaque-Hybridisierung.

Diese Abbildung zeigt das Ergebnis einer Plaque-Hybridisierung. Bakterien waren mit Bakteriophagen der Genbank infiziert und auf Nährböden in Petrischalen ausgebracht worden. Sie bildeten einen Bakterienrasen mit Bakteriophagen-Plaques. Von diesen wurde ein Abdruck genommen, und die darauf enthaltenen Bakteriophagen-Klone wurden mit einer Sonde nach einer repetitiven Sequenz des β-Globin-Gens durchgesucht. Schwarze Punkte markieren diejenigen Plaques, in denen die gesuchten Sequenzen nachgewiesen werden konnten.

Von einigen Bakteriophagen-Klonen wurde DNA isoliert und untersucht. Durch Herausschneiden (mit Restriktionsenzymen) des rekombinanten Anteils der DNAs und Auftrennung im Gel wurde jeweils die Länge der "klonierten" Maus-DNA durch Vergleich mit DNA-Fragmenten bekannter Länge bestimmt (Abb. 9). Sie betrug jeweils mehr als 14 kb in den getesteten Proben. Die Qualitätskontrollen der Bank zeigen deren Eignung zur Isolierung beliebiger Gene aus dem Ursprungsorganismus.

Das hier geschilderte Beispiel verdeutlicht, daß die gesamte genetische Information der Maus auf viele Bakteriophagen verteilt werden und bei Bedarf mit Hilfe von damit infizierten Bakterien vervielfacht werden kann. Jedes beliebige Stück wird so zugänglich und

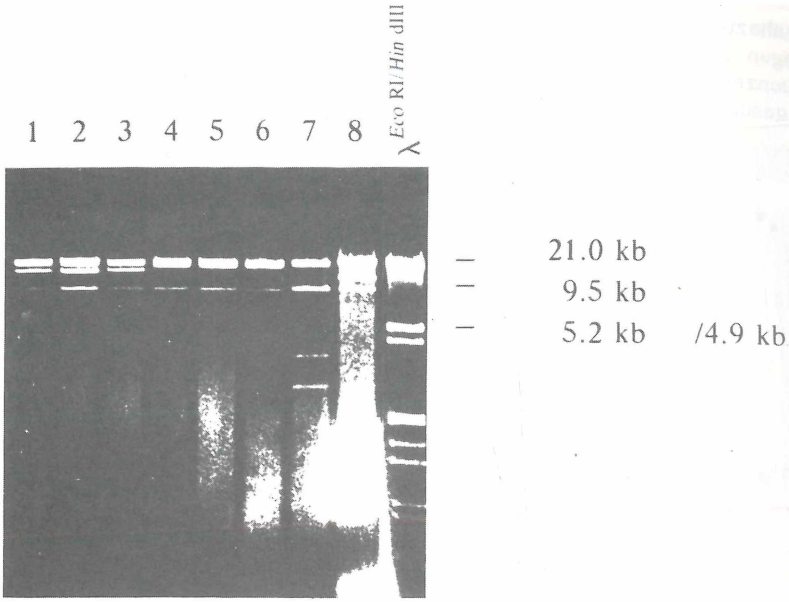


Abb. 9: Stichprobenanalyse der DNA von acht Bakteriophagen-Klonen der Bank.

Die DNA von acht Bakteriophagen wurde vermehrt und isoliert. Durch Spaltung mit Restriktionsenzymen, konnte jeweils das Stück rekombinanter DNA herausgeschnitten werden, welches sich im Bakteriophagen-Genom befand. Die Auftrennung im Gel zeigte ihre Größe. Es waren außer den beiden Armen des Bakteriophagen-Genoms (9.5 kb und 21.0 kb) ca. 15 kb lange Stücke in den Spuren 1,2,3 und 8 zu sehen. In den Spuren 4 bis 6 waren die herausgeschnittenen Fragmente genau so groß wie der linke Arm, was an breiteren Banden im Vergleich zu anderen Spuren zu erkennen war. In Spur 7 erkennt man, daß mehrere Fragmente rekombinanter DNA aus dem Bakteriophagen-Genom geschnitten werden konnten. In der Spur rechts war DNA bekannter Länge als Vergleichsmaßstab mit aufgetrennt worden.

steht einer Untersuchung in hinreichenden Mengen zur Verfügung, ohne daß erneut auf den Ursprungsorganismus zurückgegriffen werden muß.

Da die Genbank von einer Maus mit erblichem Defekt hergestellt wurde, sollte auch das direkt betroffene Gen in der Bank aufzufinden sein. Der Vergleich des beschädigten Gens mit dem gesunden Gen kann zur Erkennung der Veränderung (Mutation) im genetischen Mate-

rial führen. Das Auffinden der primären Ursache und Kenntnisse über deren Folgen werden es ermöglichen, die der Krankheit der Maus zugrundeliegenden Mechanismen zu verstehen. Auch die indirekt betroffenen Gene (wie z.B. das o.g. Parvalbumin-Gen) sind von Interesse, da sie Regulationsstudien ermöglichen. Diese Untersuchungen finden besondere Aufmerksamkeit, weil das Krankheitsbild der ADR-Mutante dem der menschlichen Muskelkrankheit "Myotonia congenita" in ihrer rezessiven Form (rezessive generalisierte Myotonie Typ Becker) (RICKER *et al.* 1986) vergleichbar ist (RÜDEL 1990).

Die hier beschriebenen Arbeiten wurden an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld, am Lehrstuhl für Genetik (Prof. Dr. A. PÜHLER), in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. SCHÖFFL durchgeführt. Sie wurden im Rahmen des SFB 223 "Pathomechanismen zellulärer Wechselwirkungen" von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziert. Für die kritische Durchsicht und Diskussion des Manuskriptes (A. PERLICK, Bielefeld), die zur Verfügung gestellten Plasmide und Vektoren (B. WIERINGA, Nijmegen; E. BECK, Heidelberg; CH. ZÜHLKE, Göttingen) und die Herstellung der Abb. 1 (D. KAPP, Bielefeld) bedanke ich mich recht herzlich.

6. Literatur

BACHMANN, B.J. (1983): Linkage map of *Escherichia coli* -K12, Edition 7.- Microbiological Reviews **47**: 180-230.

BOULNOIS, G.J. (1987): Gene cloning and analysis.- Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Palo Alto, Melbourne.

FRISCHAUF, A.M., LEHRACH, H., POUSTKA, A., MURRAY, N. (1983): Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences.- Journal of Molecular Biology **170**: 827-842.

FÜCHTBAUER, E.M., REININGHAUS, J., JOCKUSCH, H. (1988): Developmental control of the excitability of muscle: Transplantation experiments on a myotonic mouse mutant.- Proceedings of the National Academy of Sciences, USA **85**: 3880-3884.

HOHN, B. (1979): In vitro packaging of lambda and cosmid DNA.- Methods in Encymology **68**: 299-309.

INGRAM, V.M. (1956): A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin.- Nature **178**: 792-794.

JOCKUSCH, H., BERTRAM, K., SCHENK, S. (1988): The genes for two meuro-muscular deseases of the mouse, arrested development of righting response, adr, and myotonia, mto, are allelic.- Genetical Research, Cambridge **52**: 203-205.

KAISER, K. & MURRAY, N.E. (1985) in: GLOVER, D.M.: DNA cloning vol. I, IRL PRESS, Oxford, New York, Tokyo.

KLUXEN, F.W., SCHÖFFL, F., BERCHTOLD, M.W., JOCKUSCH, H. (1988): Opposite regulation of the mRNAs for parvalbumin and p19/6.8 in myotonic mouse muscle.- European Journal of Biochemistry **176**: 153-158.

LEWIN, B. (1988): Gene.- VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

MURRAY, N.E., BRAMMAR, W.J., MURRAY, K. (1977): Lambdoid phages that simplyfy the recovery of in vitro recombinants.- Molecular General Genetics **150**: 53-61.

RICKER, K., RÜDEL, R., LEHMANN-HORN, F., KUTHER, G. (1986): Muscle stiffnes and electrical activity in Paramyotonia Congenita.- Muscle & Nerve **9:** 299-305.

RÜDEL, R. (1990): The myotonic mouse-a realistic model for the study of human recessice generalized myotonia.- Trends in Neuro Science **13**: 1-3.

SCHÖFFL, F. & JOCKUSCH, H. (1990): Genetic mapping and physical characterisation of parvalbumin genes.- International Journal of Biochemistry **22**: 1211-1215.

SOUTHERN, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.- Journal of Molecular Biology **98**: 503-517.

WATSON, J.D. & CRICK, F.H. (1953): A structure for deoxyribose nucleic acid.- Nature **171**: 737-738.

WATTS, R.L. (1978): The A2G-adr mouse.- in: LUNT, G.G. & MARCHBANKS, R.M.: The biochemistry of myasthenia gravis and muscular dystrophy.- Academic Press, London.

WEYDERT, A., DAUBAS, P., CARAVATTI, M., MINTY, A., BUGAISKY, G., COHEN, A., ROBERT, B., BUCKINGHAM, M. (1983): Sequential accumulation of mRNAs encoding different myosin heavy chain isoforms during skeletal muscle development in vivo detected with a recombinant plasmid identified as coding for an adult fast myosin heavy chain from mouse sceletal muscle.- Journal of Biological Chemistry **258**: 13867-13874.

WINNACKER, E.L. (1985): Gene und Klone.- VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

ZÜHLKE, CH., SCHÖFFL, F., JOCKUSCH, H., SIMON, D., GUENET, J.L. (1988): cDNA sequence and chromosomal localization of the mouse parvalbumin gene, *Pva*.- Genetical Research, Cambridge **54**: 37-43.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Berichte des Naturwissenschaftlichen Verein für Bielefeld und Umgegend

Jahr/Year: 1990

Band/Volume: 31

Autor(en)/Author(s): Schleef Martin

Artikel/Article: Zur Anlage einer Genbank: Einbringung von Maus-Genen in Bakterien für molekulargenetische Untersuchungen 271-288