

Gentechnologie: Prinzip und Medizinische Bedeutung

Hubert E. Blum, Universitätsspital Zürich

Für die Medizin der neunziger Jahre ist die Gentechnologie von besonderer Aktualität. Mit der raschen Entwicklung molekularbiologischer Verfahren finden die diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten der Gentechnologie zunehmend Eingang in die Humanmedizin. Das Prinzip der Gentechnologie wird aufgezeigt. Die medizinischen Applikationen für die Diagnostik, Therapie und für Prävention von Erkrankungen werden dargestellt. Bei der raschen naturwissenschaftlich-medizinischen Entwicklung der Gentechnologie ist die Lösung der damit verbundenen rechtlichen und ethischen Probleme von besonderer Bedeutung.

Recombinant DNA Technology: Principle and Medical Applications

Recombinant DNA technology is of increasing significance for the diagnosis, therapy and prevention of human diseases. The principle of recombinant DNA technology is demonstrated and the medical applications are discussed. Apart from unanswered scientific and medical questions, legal and ethical issues have to be solved.

1 Einleitung

Wenig mehr als eine Generation nachdem die Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger der genetischen Information identifiziert und die Doppelhelixstruktur der DNA aufgeklärt waren, ist es mit molekularbiologischen Methoden möglich geworden, Gene zu isolieren, ihre Struktur und Funktion zu charakterisieren, sie *in vitro* zu multiplizieren und in nahezu unbegrenzten Mengen zu exprimieren (Tab. 1). Die *Gentechnologie* hat damit zum einen unser Verständnis der Genetik und Molekularbiologie von Viren, Bakterien und eukaryonten Zellen revolutioniert. Zum anderen haben sich für nahezu alle Bereiche der klinischen Medizin Anwendungen ergeben, die zunehmend von Bedeutung sind für die Diagnostik, Therapie und Prävention von Erkrankungen.

Das genetische Material aller lebenden Organismen und Basis aller gentechnologischen Manipulationen ist die DNA (Bild 1). Diese ist aus vier verschiedenen Basen oder Nukleotiden aufgebaut: den Purinbasen Adenin und Guanin sowie den Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin. Diese sind durch Zuckerreste miteinander zu einer Polynukleotidkette verbunden. Durch *komplementäre Basenpaarung* von zwei Polynukleotidketten zwischen Adenin und Thymin ($A = T$) bzw. Cytosin und Guanin ($C \equiv G$) entsteht die bekannte Doppelhelixstruktur der DNA.

Das menschliche Genom besteht aus ca. 3×10^9 Basenpaaren, ist im Zellkern lokalisiert und dort strukturell als Chromosomen organisiert. Die Chromosomen sind DNA-Moleküle von etwa 80×10^6 Basenpaaren Länge. Jede Körperzelle des Menschen enthält 46 Chromosomen (2 x 22 Autosomen und 2 x 1 Geschlechtschromosom), wobei ein Chromosomen-Satz (22 Autosomen +

Tabelle 1 Gentechnologie: Bedeutsame Entdeckungen und Entwicklungen

1896	Erste DNA-Isolierung (Miescher)
1944	Identifikation der DNA als <i>Träger der genetischen Information</i> (Avery, MacLeod, McCarty)
1953	Entdeckung der <i>Doppelhelixstruktur</i> der DNA (Watson, Crick)
1960	Entdeckung der Denaturierung und Renaturierung von Nucleinsäuren und damit des <i>Prinzips der Nucleinsäurehybridisierung</i> (Marmur, Doty)
1961–65	Entdeckung des <i>genetischen Code</i> (Nirenberg, Khorana)
1967	Entdeckung der <i>DNA-Ligase</i> (Gellert)
1968	Entdeckung der <i>Restriktionsenzymen</i> (Arber); nachfolgend deren Reinigung und Anwendung (Nathans, Smith)
1970	Entdeckung der <i>Reverse-Transkriptase</i> (Baltimore, Temin)
1972–73	Entwicklung von <i>DNA-Klonierungstechniken</i> (Boyer, Cohen, Berg)
1975–77	Entwicklung von <i>DNA-Sequenzanalysen</i> (Sanger; Maxam, Gilbert)
1976–81	Entwicklung von <i>Oligonukleotid-IGensynthesen</i> (Khorana; Riggs, Itakura; Caruthers, Ogilvie)
1986	Entwicklung der <i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Amplifikation</i> (Mullins)

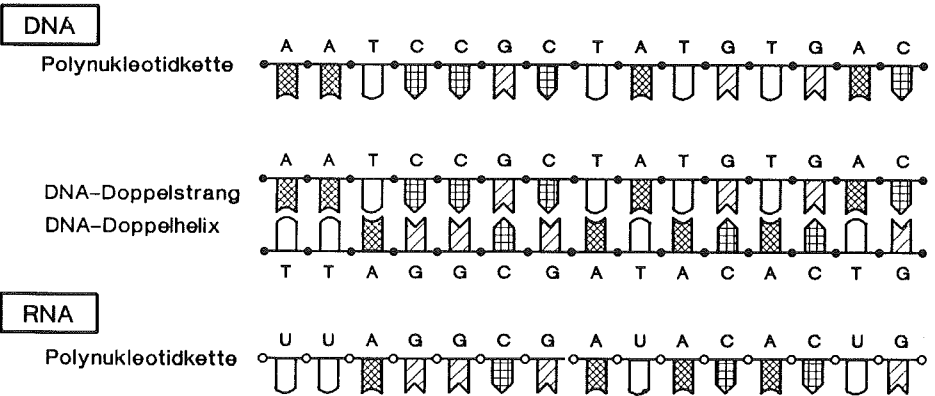
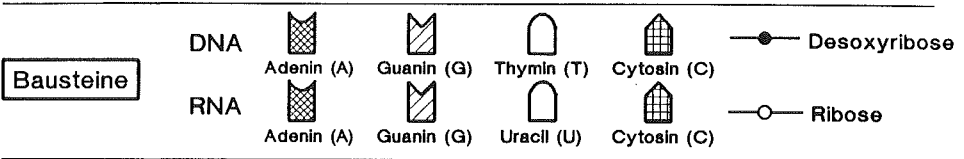


Bild 1 Bausteine und Struktur der Desoxyribonucleinsäure (DNA) bzw. der Ribonucleinsäure (RNA)

Fig. 1 Pyrimine/Pyrimidine bases and structure of DNA or RNA

1 X-Geschlechtschromosom von der Mutter und ein Chromosomen-Satz (22 Autosomen + 1 X- oder Y-Chromosom) vom Vater stammt. Auf den Chromosomen sind die insgesamt etwa 130 000 Gene des Menschen als DNA-Abschnitte arrangiert, die als Funktionseinheit die Information für je eines der etwa 130 000 Proteine tragen.

Die biologische Bedeutung der DNA liegt in ihrer Funktion als Träger der genetischen Information. Die Expression der Gene verläuft im wesentlichen in zwei Schritten (Bild 2): zunächst wird die DNA-Sequenz in eine komplementäre messenger RNA (mRNA)-Sequenz überschrieben (Transkription); nachfolgend wird die mRNA-Sequenz in eine Aminosäure-Sequenz = Protein übersetzt (Translation). Dabei kodiert immer ein Basentriplet (Codon) der mRNA für eine bestimmte Aminosäure (genetischer Code). So kodiert z. B. das Basentriplet AAA für die Aminosäure Lysin, das Basentriplet AAC für Asparagin (Bild 3). Damit bestimmt die DNA-Sequenz über die komplementäre mRNA-Sequenz die Aminosäuresequenz und somit Struktur und Funktion des synthetisierten Proteins.

Im folgenden sollen die prinzipiellen Strategien der Gentechnologie dargestellt und das Spektrum der medizinischen Applikationen in Diagnostik, Therapie und Prävention von Erkrankungen aufgezeigt werden.

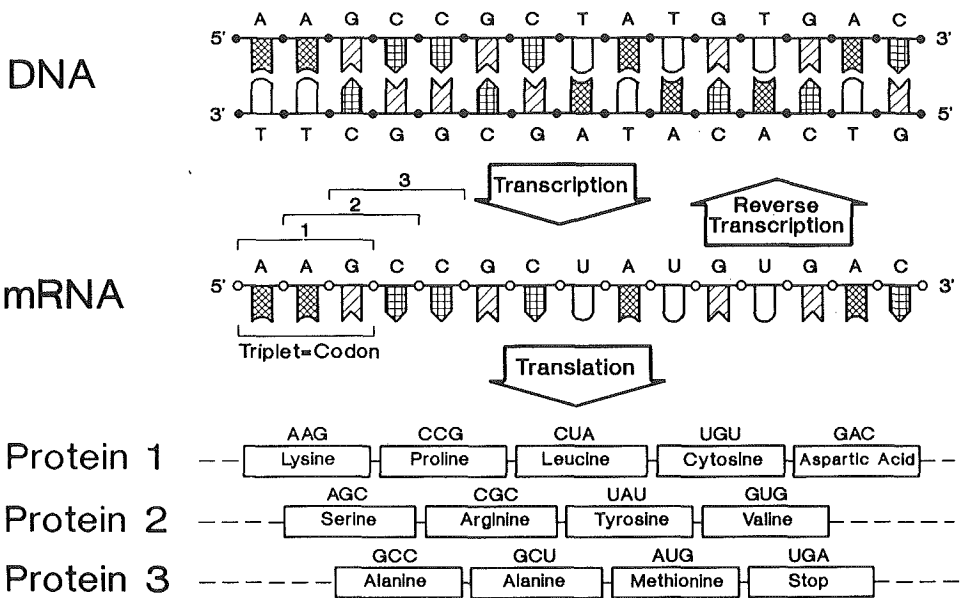


Bild 2 Prinzip der Genexpression und der drei möglichen Leseraster (Protein 1-3)

Fig. 2 Principle of gene expression and of the three reading frames (Protein 1-3)

1. Position (5' Ende)	2. Position				3. Position (3' Ende)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop	Stop	A
	Leu	Ser	Stop	Trp	G
C	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Bild 3 Der genetische Code

Fig. 3 Genetic Code

2 Prinzipielle Strategien der Gentechnologie

Die Gentechnologie umfasst im wesentlichen drei Aspekte (Bild 4):

- *DNA-Rekombination*: Bildung eines rekombinanten DNA-Moleküls;
- *DNA-Multiplikation*: Einschleusung des rekombinanten DNA-Moleküls in geeignete Zellen (z. B. Bakterien oder Hefezellen) und Replikation der DNA;
- *DNA-Expression*: Einschleusung des rekombinanten DNA-Moleküls in geeignete Zellen und Synthese von Proteinen.

Durch *DNA-Rekombination* wird *in vitro* ein rekombinantes DNA-Molekül (rDNA-Molekül) konstruiert aus Vektor-DNA und zu klonierendem DNA-Fragment. *Vektoren* oder Vehikel sind Plasmide (kleine, zirkuläre, extrachromosomale DNA-Moleküle, die in Bakterien vorkommen und häufig ein Antibiotikumresistenzgen tragen), Cosmide (Plasmide, die in Bakteriophagen integriert sind) oder Viren, die sich in geeigneten Zellen autonom replizieren.

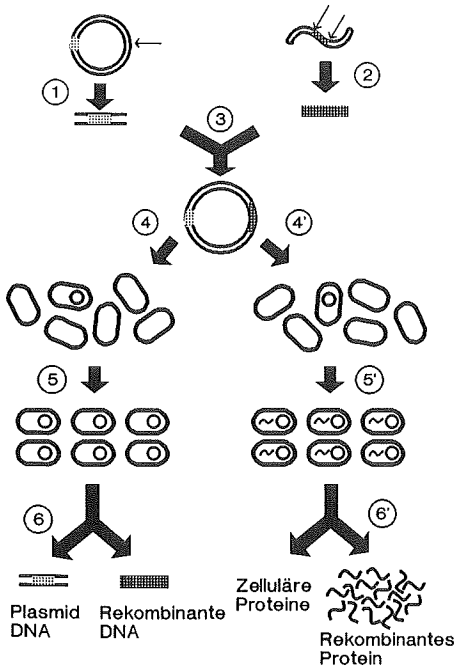


Bild 4 Prinzip der Gentechnologie: 1 Linearisierung des Plasmid-Vektormoleküls, 2 Präparation des DNA-Fragmentes/Gens, 3 Ligation von Plasmid und DNA-Fragment mit Bildung des rekombinanten DNA-Moleküls, 4/4' Einführung des rekombinanten DNA-Moleküls in z. B. Bakterien (Transformation), 5/5' Selektion der Bakterien in Gegenwart eines Antibiotikums und DNA-Multiplikation (5) bzw. DNA-Expression (5'), 6/6' Isolierung des gentechnologischen Produktes: klonierte DNA (6) bzw. rekombinantes Protein (6')

Fig. 4 Principle of recombinant DNA technology: 1 Linearization of plasmid-vector DNA, 2 Preparation of DNA fragment/gene, 3 Ligation of plasmid and DNA fragment resulting in the recombinant DNA molecule, 4/4' Transfer of the recombinant DNA molecule into bacteria, for example (Transformation), 5/5' Selection of bacteria in the presence of an antibiotic and DNA multiplication (5) or DNA expression (5'), 6/6' Isolation of the recombinant product: cloned DNA (6) or recombinant protein (6')

Zur Konstruktion des rDNA-Moleküls wird durch eine Restriktionsendonuklease die Vektor-DNA linearisiert und das zu klonierende DNA-Fragment aus z. B. menschlichen Zellen isoliert (Bild 4, Schritte 1 bzw. 2). *Restriktionsendonucleasen* sind bakterielle Enzyme, von denen bisher mehr als 200 verschiedene bekannt und charakterisiert sind. Sie spalten nukleotidsequenz-spezifisch doppelsträngige DNA. Durch die Aktion der Restriktionsendonucleasen entstehen entweder kohäsive («sticky») oder nicht-kohäsive («blunt») DNA-Fragmentenden. Bei Verwendung derselben Restriktionsendonuklease für die Linearisierung des Klonierungsvektors und für die Präparation des zu klonierenden DNA-Fragmentes haben beide DNAs identische/kompatible Enden. Vektor-DNA und zu klonierendes DNA-Fragment werden dann durch das Enzym DNA-Ligase kovalent miteinander verbunden (Bild 4, Schritt 3). Das damit konstruierte rDNA-Molekül besteht somit aus dem zu klonierenden DNA-Fragment und der Vektor-DNA, wie z. B. einem Antibiotikumresistenzgen-tragenden Plasmid.

Nach der DNA-Rekombination wird das rDNA-Molekül entweder multipliziert oder exprimiert. Zur *DNA-Multiplikation* wird das rDNA-Molekül in geeignete Zellen, wie z. B. Bakterien, eingeschleust. Der Prozess der Einschleusung wird als *Transformation* bezeichnet (Bild 4, Schritt 4). In den Zellen kommt es dann zur autonomen Replikation des rDNA-Moleküls. Transformierte Zellen werden durch Antibiotika selektiert: Da die Vektor-DNA ein

Antibiotikumresistenzgen (z. B. Ampicillinresistenzgen) enthält, werden transformierte Zellen im Unterschied zu nicht-transformierten Zellen Antibiotikaresistent (z. B. ampicillinresistent). Dadurch kommt es in Gegenwart des Antibiotikums zum Wachstum eines Klon, definiert als eine Population von Zellen mit den gleichen rekombinanten DNA-Molekülen (Bild 4, Schritt 5). Der DNA-Multiplikation folgt dann in der Regel die DNA-Präparation (z. B. Plasmidpräparation): Die rDNA-Moleküle werden aus den Zellen isoliert und durch Inkubation mit der initial verwendeten Restriktionsendonuklease in Vektor-DNA und gewünschtes kloniertes DNA-Fragment gespalten. Das DNA-Fragment kann dann durch geeignete Verfahren in reiner Form dargestellt werden (Bild 4, Schritt 6). Das so multiplizierte/klonierte DNA-Fragment steht in reiner Form und praktisch unbegrenzter Menge z. B. für molekulare Hybridisierungsanalysen und gentherapeutische Strategien zur Verfügung (siehe unten).

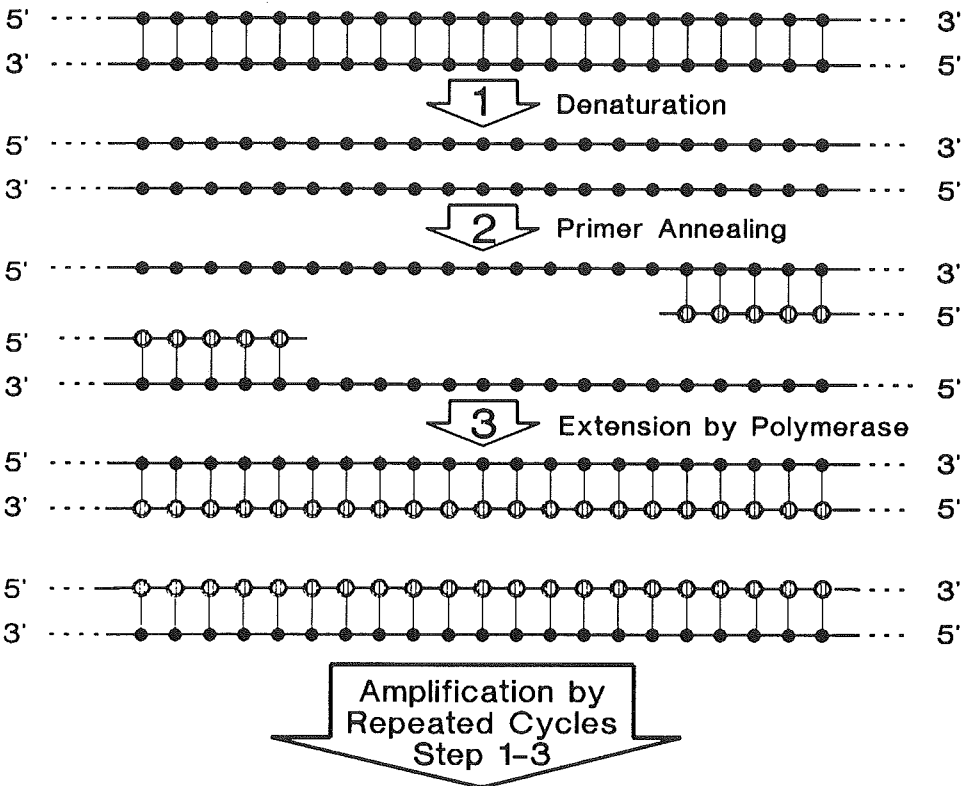


Bild 5 Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion («polymerase chain reaction», PCR), Amplifikation von DNA (DNA-PCR)

Fig. 5 Principle of polymerase chain reaction amplification of DNA (DNA-PCR)

Über die Multiplikation mit Vermehrung eines bestimmten DNA-Fragmentes hinaus können DNA-Fragmente in sog. Expressionsvektoren in geeigneten Zellsystemen zur *Expression* gebracht werden (Bild 4, Schritte 4' und 5'): Die in den Vektor ligierte DNA-Sequenz wird nach Transformation von z. B. Bakterien transkribiert und translatiert. Das auf diese Weise gentechnologisch synthetisierte Protein steht dann nach entsprechender Präparation in reiner Form und in nahezu unbegrenzter Menge für Diagnose, Therapie und Prophylaxe von Erkrankungen zur Verfügung (Bild 4, Schritt 6').

Die Gentechnologie ermöglicht somit die *Multiplikation* eines bestimmten DNA-Fragmentes, z. B. eines Gens, sowie die *Expression* von spezifischen DNA-Sequenzen/Genen mit Synthese der gewünschten Proteine.

Die konventionelle Klonierung durch Transformation von geeigneten Zellen mit einem rDNA-Molekül wurde revolutioniert durch die Entdeckung der Polymerase-Ketten-Reaktion («polymerase chain reaction», PCR) Amplifikation. Diese Methode, auch «cell free cloning» genannt, basiert auf der in vitro Amplifikation eines DNA-Fragmentes/Gens. Das Prinzip der PCR ist die in-vitro-Vermehrung (Amplifikation) von viraler DNA (Bild 5) oder, nach reverser Transkription in cDNA, die Amplifikation von RNA (Bild 6). Die Amplifikation umfasst drei Schritte: erstens die Denaturierung der DNA oder cDNA durch Erhitzen, zweitens Bindung von Oligonukleotiden an die einsträngig gemachte DNA oder cDNA («primer annealing») und drittens Polymerase-reaktion mit Extension der Oligonukleotide in 5'-3'-Richtung. Das Nettoresultat eines solchen Dreierzyklus ist die Verdoppelung der DNA oder cDNA. Durch 30- bis 40fache Wiederholung dieses Dreierzyklus wird ein Molekül ein-

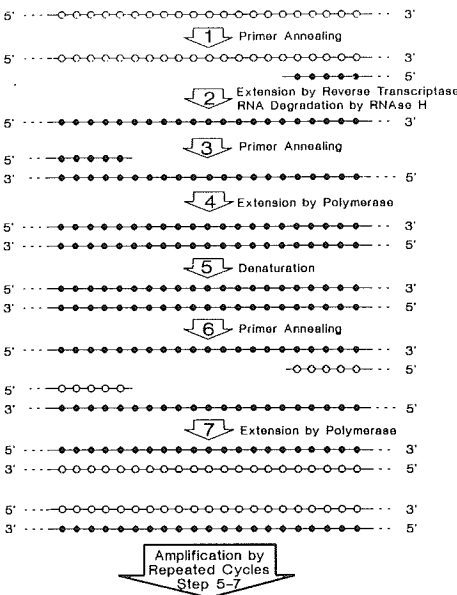


Bild 6 Prinzip der Polymerase-Ketten-Reaktion («polymerase chain reaction», PCR), Amplifikation von RNA (RNA-PCR)

Fig. 6 Principle of polymerase chain reaction amplification of RNA (RNA-PCR)

bis zehnmillionenfach vermehrt. Die PCR stellt damit eine exquisit empfindliche Methode zum spezifischen Nachweis von DNA (DNA-PCR) oder RNA (RNA-PCR) dar.

3 Medizinische Applikationen der Gentechnologie

Die medizinischen Applikationen der Gentechnologie liegen zum einen in der Verwendung der multiplizierten/klonierten DNA oder cDNA für molekulare Hybridisierungsanalysen bzw. für Gentherapie; zum anderen in der Verwendung der gentechnologisch synthetisierten Proteine für Diagnostik, Therapie und Prävention von Erkrankungen (Bild 7).

3.1 Molekulare Hybridisierungsanalysen und PCR

Das Prinzip der molekularen Hybridisierungsanalysen ist die Bildung eines Hybridmoleküls durch komplementäre Basenpaarung zwischen immobilisierter, einsträngiger DNA oder RNA (auf Membranen, in Zellen oder Geweben) und klonierter, markierter und einsträngiger DNA oder RNA, die als sog. *Gensonde* bezeichnet wird. Durch Hybridisierung entsteht so nukleotidsequenz-spezifisch ein markiertes Hybridmolekül, das sich bei radioaktiv-markierter Gensonde autoradiographisch, bei biotin-markierter Gensonde enzymatisch-colorimetrisch nachweisen lässt (Bild 8). Durch Verwendung von markierten Oligonukleotiden als Gensonde, die sich nur in einer einzigen Base unterscheiden, lassen sich spezifisch Punktmutationen in der DNA nachweisen (Bild 9). Diese Methode ist bedeutend für den z. T. pränatalen Nachweis von

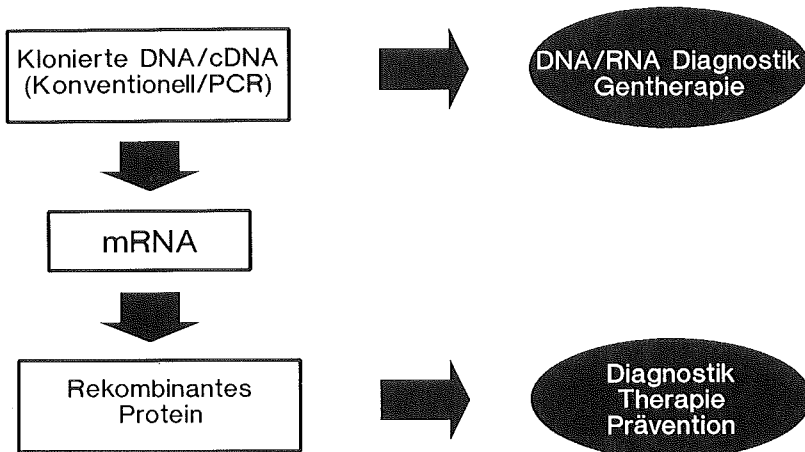
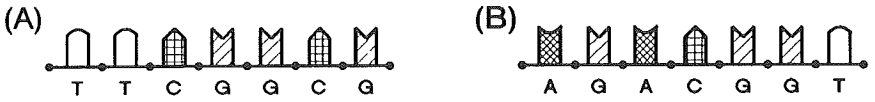


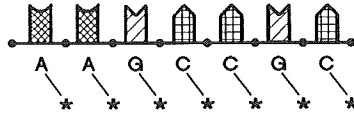
Bild 7 Medizinische Applikationen der Gentechnologie

Fig. 7 Medical applications of recombinant DNA technology

① Single-Stranded DNA or RNA



② Labeled Probe



③ Hybridization

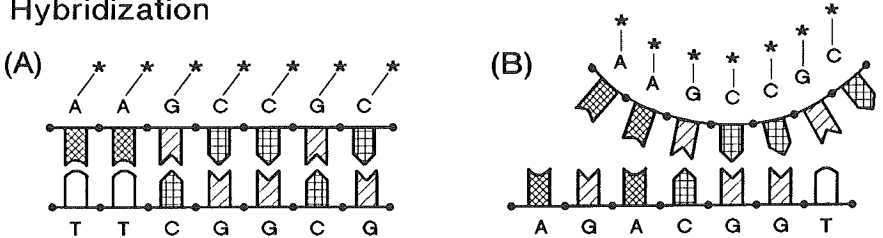


Bild 8 Prinzip der molekularen Hybridisierungsanalysen

Fig. 8 Principle of molecular hybridization analyses

Mutationen, die Ursache von zahlreichen genetisch bedingten Erkrankungen sind (siehe unten).

Wir unterscheiden im wesentlichen drei verschiedene Hybridisierungsverfahren: Spot Blot Hybridisierung (Dot Blot oder Slot Blot), Transfer Blot Hybridisierung (Southern Blot für die Analyse von DNA, Northern Blot für die Analyse von RNA) und *in situ* Hybridisierung.

Bei der *Spot Blot Hybridisierung* wird z. B. klonierte DNA oder Serum (Bild 10) auf eine Membran, einen sog. Blot, aufgetragen und mit einer markierten Gensonde, wie z. B. radioaktiv-markierter HBV DNA hybridisiert. Wo immer eine komplementäre Basenpaarung stattfindet, entsteht ein radio-markiertes Hybridmolekül, das sich autoradiographisch darstellen lässt. So können wir z. B. das Hepatitis-B-Virus spezifisch in Patientenserum nachweisen und durch Vergleich mit bekannten Mengen klonierter Virus DNA auch quantifizieren.

Durch *Southern Blot Hybridisierung* lassen sich Nukleinsäuren nicht nur nachweisen, sondern auch in ihrer Größe, Konformation, Relation zum zellulären Genom usw. charakterisieren. Hierbei werden DNA-Moleküle elektrophoretisch entsprechend ihrer Länge in einem Agarosegel getrennt, auf eine Membran transferiert (daher der Ausdruck Transfer-Blot) und wie die Spot Blots mit einer markierten Gensonde hybridisiert. So können wir z. B. in der

Leber eines Patienten mit chronischer Hepatitis B extrachromosomal frei replizierende HBV DNA demonstrieren (Bild 11, links); oder wir können z. B. in einem Patienten mit hepatozellulärem Karzinom die Integration viraler DNA in das Genom der maligne transformierten Hepatozyten dokumentieren (Bild 11, rechts).

Bei der *in situ* Hybridisierung schliesslich werden Zellen oder Gewebeschnitte direkt auf dem Objektträger mit einer markierten Sonden hybridisiert. So können wir z. B. virale DNA direkt in der Leber eines Patienten mit chronischer Hepatitis B nachweisen.

Die molekularen Hybridisierungsanalysen ermöglichen damit den *Nachweis* spezifischer DNA/RNA, deren *strukturelle Charakterisierung* sowie *Lokalisa-*

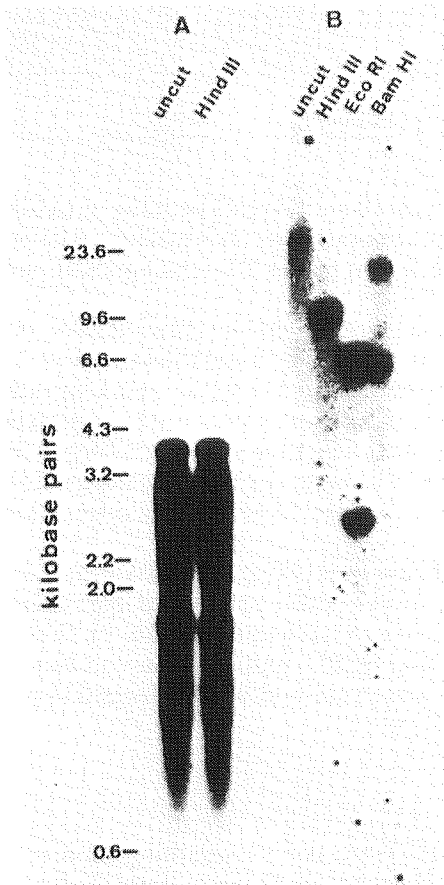


Bild 11 Southern Blot Hybridisierung von DNA aus der Leber eines Patienten mit freier episomaler Hepatitis B Virus DNA bei aktiver Replikation (links) und aus der Leber eines Patienten mit integrierter Hepatitis B Virus DNA aus einem Leberkarzinom (rechts)

Fig. 11 Southern blot hybridization of DNA from the liver of a patient with free episomal hepatitis B virus DNA (left) and from the liver of a patient with integrated hepatitis B virus DNA from liver cancer tissue (right)

Tabelle 2 Gentechnologie: *Nachweis von Infektionskrankheiten* des Menschen durch molekulare Hybridisierungsanalysen bzw. PCR-Amplifikation

1. Bakterien

Bordetella, Legionella, *M. leprae*, *M. tuberculosis*, Mykoplasma, Chlamydien, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, Treponemen, Hämophilus, Helicobacter, Salmonellen, Shigellen, Borrelien, enterotox. *E. coli*

2. Viren

Adenoviren, Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus
 Hepatitis B Virus, Hepatitis C Virus, Hepatitis D Virus
 Herpes simplex Viren
 Humanes T-Zell-Leukämie-Virus 1 und 2
 Humanes Immundefizienzvirus 1 und 2
 Humane Papillomviren

3. Parasiten-Einzeller

Plasmodien
 Entamoeba histolytica
 Giardia lamblia
 Pneumocystis carinii
 Toxoplasma gondii

4. Pilze

Candida albicans, Coccidioides immitis, Cryptococcus neoformans

tion auf Chromosomen, in Zellen oder Geweben. Durch spezielle Gensonden/Oligonukleotide lassen sich ferner Punktmutationen nachweisen (Bild 9), die bei genetisch-bedingten Erkrankungen sowie in der Tumordiagnostik und -entstehung bedeutsam sind.

Mit der PCR-Amplifikation können spezifische DNAs bzw. RNAs mit exquisiter Sensitivität nachgewiesen werden. Das PCR-Produkt kann entweder direkt nach Gelelektrophorese durch Ethidiumbromid sichtbar gemacht oder nach Transfer auf einen Blot (Southern-Blot, siehe oben) durch eine spezifische Gensonde nachgewiesen werden. Die PCR-Amplifikation von HBV DNA z. B. erlaubt den spezifischen Nachweis von <10 Virionen; im Vergleich dazu liegt die Nachweisgrenze von HBV DNA für molekulare Hybridisierungsanalysen bei >10 000 Virionen.

Durch molekulare Hybridisierungsanalysen bzw. PCR-Amplifikation können wir heute eine zunehmende Anzahl viraler, bakterieller und parasitärer Erkrankungen in Serum oder Geweben spezifisch nachweisen (Tab. 2). Ferner sind molekulare Hybridisierungsanalysen und PCR-Amplifikation von zunehmender Bedeutung für die Diagnostik genetisch-bedingter Erkrankungen (Tab. 3).

3.2 Gentransfer/Gentherapie

Experimentelle Studien während der letzten Jahre zur Verwendung klonierter DNA/cDNA für die Gentherapie durch Gentransfer in die Keimbahn (befrucht-

Tabelle 3 Gentechnologie: *Nachweis genetisch-bedingter Erkrankungen* des Menschen durch molekulare Hybridisierungsanalysen bzw. PCR-Amplifikation

1. Hämoglobinopathien

Sichelzellanämie

Beta-Thalassämie

2. Enzymopathien

Kohlenstoffhydratstoffwechsel (z. B. Galaktosämie)

Aminosäurestoffwechsel (z. B. Citrullinämie, Phenylketonurie)

Lipidstoffwechsel (z. B. Gaucher-Erkrankung, Tay-Sachs-Erkrankung)

Mucopolysaccharidstoffwechsel (z. B. Hunter-Syndrom, Hurler-Syndrom)

3. Andere metabolische Erkrankungen

Alpha-1-Antitrypsin-Mangel

Lesch-Nyhan-Syndrom

Xeroderma pigmentosum

Düchenne Muskeldystrophie

Zystische Fibrose

4. Onkologische und andere Erkrankungen

Retinoblastom

Leukämien, Lymphome

Andere z. T. virus-assoziierte Malignome (z. B. Burkitt's Lymphom, Nasopharynx-Karzinom,

Penis-Karzinom, Zervix-Karzinom, Leberzellkarzinom)

Huntington-Erkrankung

Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankung

X-linked Retinitis pigmentosa

Adrenoleukodystrophie

Neurofibromatose von Recklinghausen

Friedreich'sche Ataxie

Hämophilie A und B

Familiäre Alzheimer-Erkrankung

tete Eizelle der Taufliede, des Krallenfrosches bzw. der Maus) oder z. B. in Stammzellen des hämatopoietischen Systems waren zum Teil erfolgreich mit spezifischer Expression des gewünschten transferierten Gens. Vor dem Einsatz im Menschen, wo genetische Manipulationen mit Zellen der Keimbahn (Keimbahn-Gentherapie) bzw. Embryonen ethisch nicht vertretbar und nicht erlaubt sind, sind noch zahlreiche mit dem Gentransfer und der Expression transferierter Gene in der neuen Umgebung (z. B. Stammzelle des hämatopoietischen Systems) assoziierte Probleme zu lösen: Kontrolle des Integrationsortes in der Empfängerzelle, Kontrolle der Anzahl der integrierten Kopien des transferierten DNA-Fragmentes/Gens pro Zelle, Kontrolle der Expression des transferierten DNA-Fragmentes/Gens entsprechend der biochemisch-physiologischen Spezifität der Zellen/Gewebe sowie Kontrolle von Aktivität, Zeitpunkt und Dauer der Genexpression in der Empfängerzelle. Beispiele für eine klinische Anwendung der somatischen Gentherapie sind der Ersatz eines fehlenden oder abnormalen Gens (z. B. Einschleusung des Hämoglobingens in Knochenmarkszellen bei Thalassämie-Patienten oder Einschleusung eines normalen Faktor

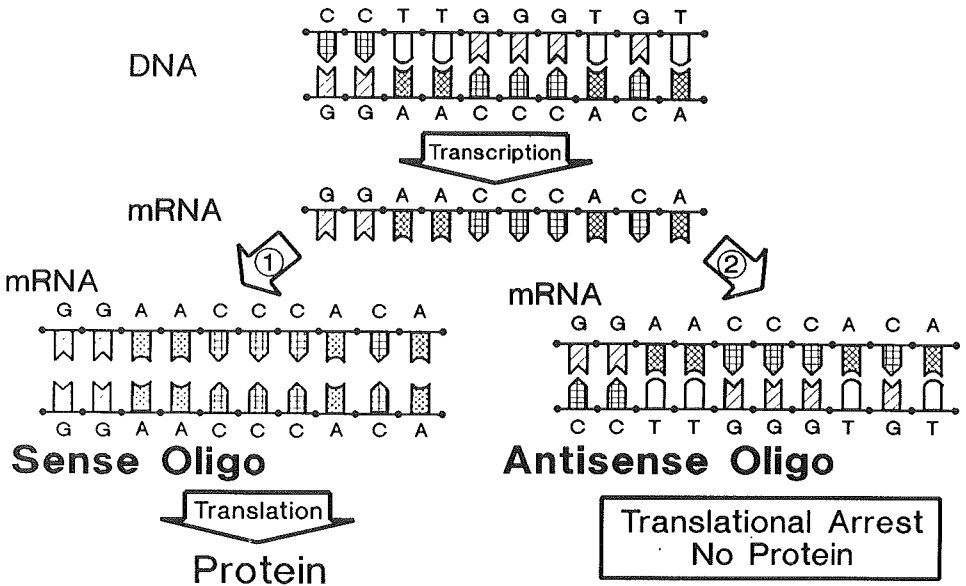


Bild 12 Prinzip der Gentherapie mit Antisense-Oligonukleotiden

Fig. 12 Principle of gene therapy with antisense oligonucleotides

VIII- oder IX-Gens in Knochenmarkszellen bei Patienten mit Hämophilie A oder B); oder die Einschleusung von spezifischen Genen zur Therapie von z. B. Tumorerkrankungen (z. B. Tumor-Nekrose-Faktor Gen); oder die Blockade eines überaktiven oder pathologischen Gens durch Antisense Oligodeoxynukleotide (Bild 12) bei viralen oder onkologischen Erkrankungen.

Zweifellos erfordert dieser Anwendungsbereich der Gentechnologie nicht nur in der Humanmedizin, sondern auch z. B. im Tier- und Pflanzenbereich eine besondere kritische Bewertung und Überwachung. Gleichzeitig eröffnet die Gentherapie neue Perspektiven für die Behandlung von Erb- und Infektionskrankheiten sowie von Tumorerkrankungen des Menschen.

3.3 Gentechnologische Synthese und Proteinen

Ein weiterer Schwerpunkt medizinischer Applikationen der Gentechnologie liegt in der Synthese grosser Mengen biologisch aktiver Proteine, die zum grossen Teil durch konventionelle biochemische Verfahren nicht oder in nicht ausreichender Qualität oder Quantität gewonnen werden können. So sind heute zahlreiche gentechnologisch hergestellte Proteine für die *Diagnostik*, *Therapie* und *Prävention* menschlicher Erkrankungen verfügbar (Tab. 4): Enzyme und andere Proteine, Hormone und eine Vielzahl zellulärer Effektoren sowie virale Antigene.

Tabelle 4 Gentechnologie: *gentechnologisch synthetisierte Proteine* für Diagnostik, Therapie und Prävention von Erkrankungen

1. Enzyme und andere Proteine

Albumin, Alpha-1-Antitrypsin

Faktor VIII, Faktor IX

Plasminogen-Aktivatoren (Urokinase, tissue Plasminogen-Aktivator u.a.)

2. Hormone und zelluläre Effektoren

Calcitonin, Parathormon

Erythropoietin, Epidermaler Wachstumsfaktor, Nervenwachstumsfaktor

Follikelstimulierendes Hormon, Luteinisierendes Hormon

Colony-Stimulating Factors (G-CSF, GM-CSF, M-CSF)

Insulin, Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF)

Interferone

Lymphokine (z. B. Interleukin-2)

Gastrin, Sekretin, Somatomedin, Somatostatin

Thymosin-Alpha

Tumor-Nekrose-Faktor

Wachstumshormon, Wachstumshormon Releasing Faktor

3. Virale Antigene

Hepatitis B surface Antigen, Hepatitis B core Antigen, Hepatitis B e Antigen

Herpes SV-Antigen 1 und 2

HIV Hüllproteine

Tollwut SV-Antigen

So sind zurzeit zahlreiche gentechnologisch synthetisierte Proteine in klinischer Prüfung bzw. haben bereits Eingang in die klinische Praxis gefunden: Gerinnungsfaktoren, Plasminogenaktivatoren, Erythropoietin, Insulin, Interferone, Interleukin-2, Tumor-Nekrose-Faktor, Wachstumshormon, Granulozyten-Colony Stimulating Factor (G-CSF), Granulozyten-Makrophagen-Colony Stimulating Factor (GM-CSF), Makrophagen-Colony Stimulating Factor (M-CSF) sowie der Hepatitis-B- bzw. Keuchhusten-Impfstoff.

4 Perspektiven

Durch das zunehmende Spektrum der z.T. pränatal durchführbaren Genomanalysen, den Gentransfer und die ständige Erweiterung der Palette gentechnologisch synthetisierbarer Proteine trägt die Gentechnologie in einzigartiger Weise zu den Fortschritten der Medizin in Diagnostik, Therapie und Prävention von Erkrankungen bei.

Mit der Klonierung weiterer menschlicher Gene bzw. des gesamten menschlichen Genoms werden neue Gensonden für molekulare Hybridisierungsanalysen verfügbar, mit denen sich Struktur und Regulation der Gene in gesunden und kranken Zellen und Geweben charakterisieren lassen. Dadurch sollten sich weitere Krankheitsbilder pathogenetisch als Defekte der Genstruktur und/oder -expression definieren und möglicherweise durch gezielten Gentransfer therapieren lassen. Ferner werden gen-spezifische Proben des menschlichen Ge-

noms entscheidend sein für das Verständnis des Beitrages genetischer Faktoren zu verschiedenen Erkrankungen (z. B. Typ-I-Diabetes-mellitus, kardiovaskuläre Erkrankungen, psychiatrische Erkrankungen, onkologische Krankheitsbilder, Autoimmunerkrankungen u.a.m.), bei denen Mutationen (Punktmutationen, Deletionen, Insertionen), chromosomale Translokationen und andere genetische Rearrangements (Inversionen, Duplikationen), eventuell in Kooperation mit anderen Faktoren (Virusinfektionen, Umweltfaktoren), eine Rolle spielen.

Durch die *in vitro* Expression weiterer viraler, bakterieller, parasitärer und menschlicher Gene wird sich das Spektrum der gentechnologisch synthetisierten Proteine ständig erweitern mit unmittelbaren Anwendungsmöglichkeiten für die Diagnostik, Therapie und Prävention von Erkrankungen. Insgesamt sind die Gentechnologie und ihre medizinischen Anwendungen damit exemplarisch für die Fortschritte und Bedeutung molekularbiologischer Grundlagenforschung für die moderne klinische Medizin.

5 Literatur

- Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J.D. (1983): *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, New York, London.
- Darnell J., Lodish H. and Baltimore D. (1986): *Molecular Cell Biology*. Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, New York.
- Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J. and White T.J. (1990): *PCR protocols. A guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto.
- Kornberg A. and Baker T.A. (1992): *DNA Replication*. W.H. Freeman and Company, New York.
- Watson J.D., Tooze J. and Kurtz D.T. (1983): *Recombinant DNA. A short course*. Scientific American Books, W.H. Freeman and Company, New York.