**Werkzeuge der klassischen Gentechnik**

**1 Die Ligase**

Problem: Es liegt ein DNA-Doppelstrang vor; auf einem der Einzelstränge sind zwei benach­bar­te Nukleotide nicht miteinander verbunden.

Lösung: Das Enzym Ligase verknüpft diese beiden Nukleotide über eine Atombin­dung.

**2 Die Reverse Transkriptase**

Problem: Eukaryoten-Gene enthalten Introns, die vor der Translation entfernt werden müssen. Prokaryoten haben dieses System nicht. Deshalb kann Eukaryoten-DNA nicht direkt in Pro­kary­oten übertragen werden.

Lösung: Nach der Vorlage einer fertig gespleißten eukaryotischen mRNA wird eine DNA erzeugt, die direkt in die DNA eines Prokaryoten eingebaut werden kann.

Die Reverse Transkriptase ist ein Enzym, das nach der Vorlage einer RNA einen DNA-Strang herstellt (= cDNA = complementary oder copy DNA).

Beispiel: Aus gesunden menschlichen Bauchspeicheldrüsen-Zellen wird die fertig pro­zes­sierte m-RNA für Insulin isoliert und daraus eine cDNA mit dem (für Bakte­ri­en lesbaren, weil intronfreien) Gen für Insulin hergestellt. Bakterien erzeugen damit Hu­man­insulin, das von allen Patienten gut ver­tragen wird.

(Herkunft Reverser Transkriptasen: aus RNA-Viren, deren Erbgut als RNA vorliegt, von der eine cDNA-Kopie hergestellt und in die Wirts-DNA eingebaut wird.)

**3 Das Restriktions-Enzym (= Endonuclease)**

Zweck: Gewinnung von Genen durch Zerstückeln von Genspender-DNA. Der Schnitt erfolgt an genau definierten Schnittstellen der DNA (bei einer bestimmter Basense­quenz, meist an einem sogenannten Palin­drom, das vorwärts und rückwärts gelesen gleich lautet). Die Schnitte sind meist versetzt, so dass Sticky Ends (= überstehende Einzelstrang-Enden) entstehen.

Beispiel BamHI: –G\*–G–A–T–C – C– –G G–A–T–C–C–

\* = Schnittstelle –C – C–T–A–G–\*G– –C–C–T–A–G G–

 => Die Sticky Ends sind in diesem Beispiel 4 Nukleotide lang.

(Herkunft: aus verschiedenen Bakterien, die mit Hilfe dieser Endonukleasen die DNA einge­drungener Viren zer­stückeln und damit unbrauchbar machen.)

**4 Die Gensonde**

einsträngige kleine Stücke DNA (seltener RNA) zum „Angeln“ größerer DNA-Einzel­stränge mit der komplementären Nukleotid-Sequenz; die Gensonde wird an ein Träger-Molekül ange­heftet.

Zweck: Identifizierung und Isolierung des gewünschten DNA-Stücks aus sehr vielen DNA-Bruch­stücken (erzeugt durch Endonukleasen). Die charakteristischen Nukleo­tidsequenzen können dabei sehr kurz sein.

Sonde: **C-A-G-A-C-G-T**

DNA-Bruchstück: -A-A-C-G-A-T-G-**G-T-C-T-G-C-A**-A-G-C-T-T-C-A-G-

Die Suspension mit den vielen DNA-Bruchstücken wird an der Sonde vorbeigeführt. Nur ein bestimmtes DNA-Bruchstück (nämlich das mit der komplementären Nukleotid-Se­quenz) bleibt an der Sonde kleben, alle anderen wandern an ihr vorbei.

**5 Der genetische Marker**

Zweck: Man will feststellen, ob die Spender-DNA in die DNA des Zielorganismus kor­rekt ein­ge­baut wurde. Weil es oft sehr schwierig und langwierig ist, die Aktivität des eigentlichen Spendergens zu erfassen (Beispiel: die Herstellung von Insulin durch ein Bakterium), koppelt man ein zweites Gen daran, ein Marker-Gen, dessen Aktivität sehr leicht und schnell nach­weisbar ist.

**a) Der Marker ist ein Gen für Antibiotika-Resistenz.**

Antibiotika (Sing.: das Antibiotikum) verhindern das Wachstum von Bakterien. Resis­ten­te Bak­te­rien besitzen ein Protein, das die Wirkung des Antibiotikums aufhebt.

Die Spender-DNA wird, gekoppelt an das Resistenz-Gen, in die Bakterien eingebracht. Die Bak­terien vermehren sich und werden anschließend mit dem Antibiotikum versetzt. Alle Bak­terien, die die Spender-DNA erfolgreich aufgenommen haben, überleben, alle anderen nicht. Die über­lebenden Bakterien werden direkt weiter vermehrt.

Vorteil: Kontrolle über den Gen-Einbau sowie Auslese der erwünschten Bakterien im selben Schritt.

Problem: Schwer kontrollierbare Verbreitung von Resistenzgenen (v. a. weil Bakterien unter­einander relativ häufig ihre Gene austauschen). Wenn solche Resistenzgene in krankheits­erregende (pathogene) Bakterien gelangen, sind diese mit dem bei der Aus­lese verwendeten Anti­biotikum nicht mehr bekämpfbar.

**b) Der Marker ist ein Gen für Enzyme, die einen Farbstoff herstellen,** der unter be­stimm­­ten Bedingungen leuchtet (z. B. bei UV-Bestrahlung).

Vorteil: keine Gefahr der Verbreitung von Resistenzen

Problem: Die Auslese der Bakterien, bei denen der Gentransfer geglückt ist, ist aufwen­di­ger und damit teurer.

**6 Die Polymerase-Kettenreaktion PCR**

Wenn von einem DNA-Abschnitt nur eine sehr geringe Menge vorliegt (beispielsweise cDNA), kann er mit Hilfe der PCR beliebig vermehrt werden.

**7 Das Plasmid**

Ein kleiner Teil der Erbinformation von Bakterien liegt in Form kleiner DNA-Ringe vor, die Plasmid genannt werden. Bakterien tauschen gelegentlich Kopien ihrer Plasmide untereinander aus. Plasmide besitzen oft DNA-Abschnitte, die für den Einbau des Plasmids in das ringförmige Bakterienchromosom wesentlich sind bzw. die das Ein­dringen des Plasmids in die Bakterienzelle ermöglichen.

**Hinweise für die Lehrkraft:**

*Dieses Informationsblatt fasst die wesentlichen Werkzeuge der klassischen Gentechnik zusam­men. Einige davon sollten den Schülern bereits bekannt sein:*

* Ligase (Jgst. 12: Vervielfältigung genetischer Information)
* PCR (Jgst. 12: Vervielfältigung genetischer Information)
* Plasmid (Jgst. 9: Mikroorganismen)

Thomas Nickl, Januar 2023