

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.

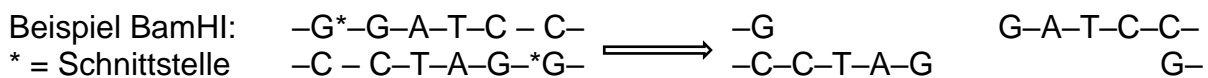
Die Reverse Transkriptase ist ein Enzym, das nach der Vorlage einer RNA einen DNA-Strang herstellt (= cDNA = complementary oder copy DNA).

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.



=> 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

Träger-
molekül

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