

1 Genetische Manipulation

Unter genetischer Manipulation (engl. *genetic engineering*) versteht man molekularbiologische und genetische Methoden, bei denen gezielt defekte Gene ersetzt oder neue Gene in das Genom einer Zelle oder eines Organismus eingesetzt werden sollen.

1.1 Die Werkzeuge der Geningenieure

Restriktionsenzyme – die DNA-Scheren

Zum Öffnen einer DNA, an der man eine Manipulation vornehmen will, bedient man sich spezieller Enzyme, der sogenannten **Restriktions-Endonukleasen (Restriktions-Enzyme)**. Diese „Scheren-Enzyme“ werden natürlicherweise von Bakterien gebildet, die sich damit gegen eine Infektion mit fremder DNA, namentlich Phagen-DNA, schützen.

Die Restriktions-Endonukleasen lassen sich wegen ihrer hohen Spezifität im Experiment gezielt einsetzen. Die Restriktions-Endonuklease EcoRI (lies: Eco-er-eins) stammt aus dem Bakterium *E. coli*. EcoRI schneidet die fremde DNA an bestimmten Basensequenzen. Dabei öffnen die Endonukleasen die DNA immer an solchen Stellen, an denen die Basensequenzen in beiden Leserichtungen der DNA gleich sind (Palindromsequenz). EcoRI schneidet an der Palindromsequenz GAATTC jeweils zwischen G und A. Überstehende Einzelstrangenden haben dann die Basensequenz 3' TTAA 5'. Über Wasserstoffbrückenbindungen lassen sich die geöffneten Stellen wieder zusammenschließen, weshalb man sie als „klebrige Enden“ (*sticky ends*) bezeichnet.

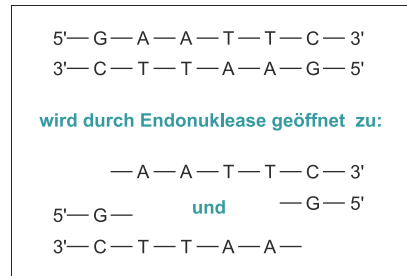


Abb. 103: Öffnung einer DNA durch eine Restriktions-Endonuklease

Restriktions-Endonuklease: Enzym, das in der Lage ist, ein DNA-Molekül an einer begrenzten Anzahl von spezifischen Nukleotidsequenzen zu schneiden

Palindrom: Wörter oder Sätze, die vorwärts und rückwärts gelesen denselben Sinn ergeben

Ligase: Enzym, das eine aufgetrennte Phosphodiesterbindung in Nucleinsäuren wieder schließen kann

Ligase – der DNA-Klebstoff

Ligasen sind Enzyme, die in allen Zellen bei der Replikation oder bei der Reparatur der DNA benötigt werden. Sie dienen dazu, benachbarte Nucleotide (durch Phosphodiesterbindungen) miteinander zu verknüpfen. Die gleiche Reaktion katalysieren sie an DNA-Fragmenten auch

im Reagenzglas. Auf diese Weise werden z. B. die klebrigen Enden von DNA-Stücken miteinander verbunden. Sogar DNA-Stücke, die aus sehr unterschiedlichen Organismen wie Bakterien, Mäusen oder Menschen stammen, können untereinander mithilfe von Ligasen zusammengefügt werden.

Vektoren – die DNA-Transportmittel

Ein weiteres Werkzeug der Geningenieure sind sogenannte **Vektoren**, die als „Transportmittel“ genutzt werden und dazu dienen, bestimmte Gene in die Wirtszellen zu übertragen. Als Vektoren eignen sich Viren, Phagen oder Plasmide. Am Beispiel eines Plasmidvektors wird das Vorgehen im Folgenden näher beschrieben.

1.2 Klonierung biochemisch rekombinierter DNA

Das grundsätzliche Vorgehen beim Klonieren von DNA läuft folgendermaßen ab (Abb. 104):

- Ein DNA-Stück, das zu klonierende Gen, wird in ein anderes DNA-Molekül, das Vektor-Molekül, eingebaut. Es entsteht ein rekombiniertes DNA-Molekül.
- Dieses rekombinierte DNA-Molekül wird in eine Wirtszelle eingeschleust.
- In der Wirtszelle veranlasst der Vektor die Vervielfältigung des rekombinierten DNA-Moleküls.
- Bei der Teilung der Wirtszelle werden Kopien des rekombinierten DNA-Moleküls an die Nachkommen weitergegeben.

Als **Vektor** für die Fremd-DNA verwendet man häufig das **Plasmid pBR322**. Dieses Plasmid ist replikationsfähig, es besitzt dafür einen Replikations-Startbereich, zusätzlich aber auch noch eine Erkennungs-marke (hier das **Marker-gen** „Ampicillin-Resistenz“) und eine weitere Erkennungsstelle, in der geschnitten werden kann (hier eine Tetracyclin-Resistenz). Das Zerschneiden der Spender-DNA (z. B. auch Säuger-DNA) und das Öffnen des Plasmid-Ringes geschieht durch dieselbe **Restriktions-Endonuklease**, z. B. EcoRI. Die Fremd-DNA lässt sich wegen der übereinstimmenden klebrigen Enden in den geöffneten Plasmid-Ring einfügen. Das geschieht im Reagenzglas durch Mischen und zufällige Rekombination. Nach dem Schließen des Vektor-Ringes durch das Enzym **Ligase** wird die eingeschlossene Fremd-DNA von nun an stets als „Passagier“ mitgenommen.

Einen solchen Vektor mit eingebauter Fremd-DNA nennt man auch

Hybrid-Vektor.