

Das Geheimnis fluoreszierender Fische

In einigen Aquarien schwimmen besondere Fische: Sie leuchten farbig, wenn sie mit blauem Licht bestrahlt werden. Warum?

Sie enthalten zum Beispiel das *gfp*-Gen der Qualle *Aequorea victoria*, das für ein grün fluoreszierendes Protein codiert. Dieses Gen wurde künstlich in das Genom der Fische übertragen – damit handelt es sich bei diesen Tieren um genetisch veränderte Lebewesen.



Was ist Gentechnik?

Unter dem Begriff Gentechnik werden Methoden zusammengefasst, mit denen die Erbsubstanz von lebenden Organismen gezielt verändert werden kann. Dies ermöglicht die Übertragung und den Einbau artfremder DNA in ein Lebewesen, das dann als gentechnisch verändert oder **transgen** bezeichnet wird.

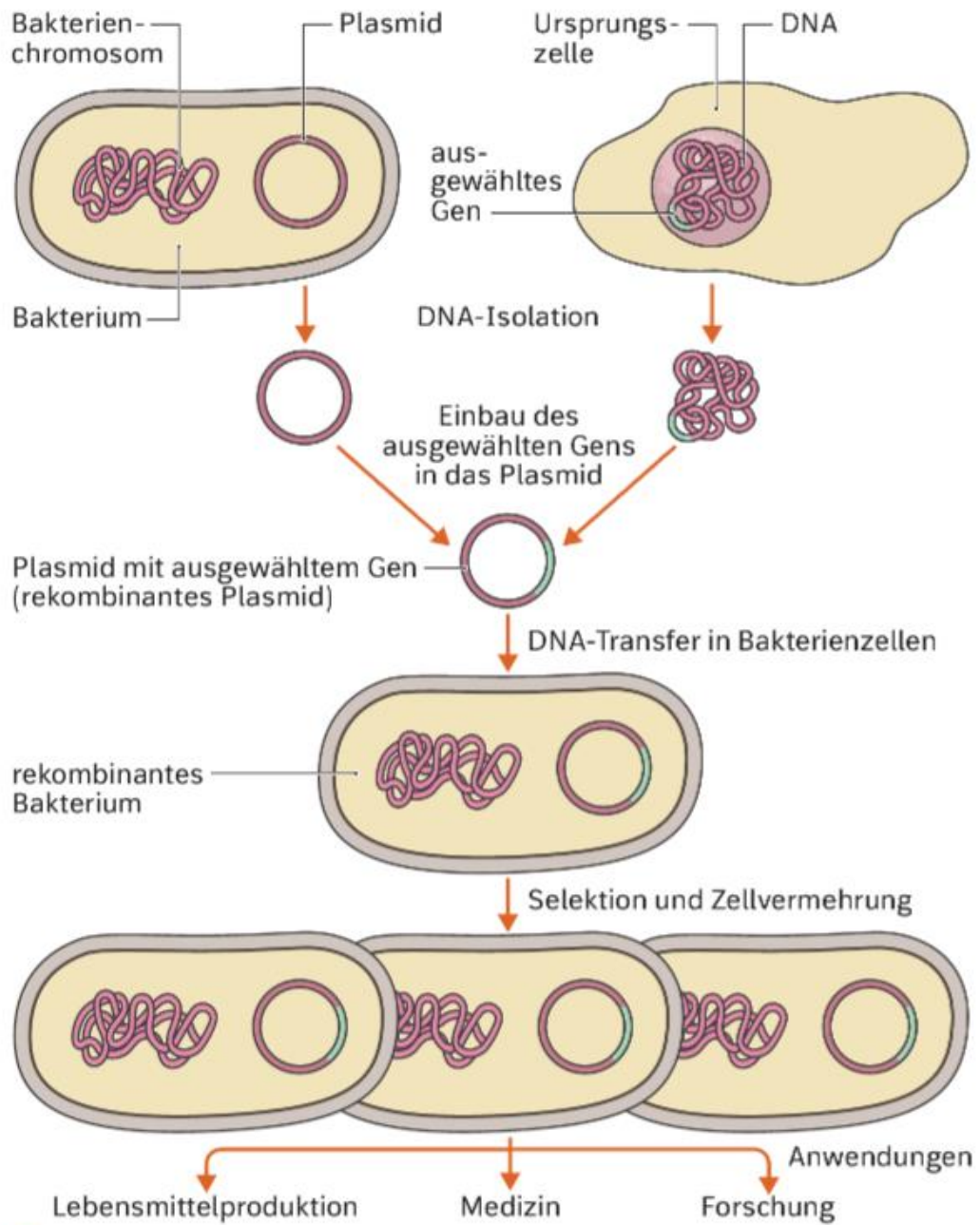
Welche molekularen Werkzeuge und Methoden werden hierfür verwendet?

Herstellung genetisch veränderter Organismen (GVOs)

Für die Herstellung gentechnisch veränderter Lebewesen muss das ausgewählte Gen, das übertragen werden soll, aus dem Ursprungorganismus isoliert werden, zum Beispiel das *gfp*-Gen aus der Qualle. Außerdem wird ein bakterielles Plasmid benötigt. Das ausgewählte Gen wird in das Plasmid eingebaut. Dieser Schritt wird **Rekombination** genannt. Das dabei entstandene rekombinante Plasmid wird in Empfängerzellen übertragen, wie etwa in

E.-coli-Zellen. Künstliche Selektion gewährleistet, dass nur Zellen, die das rekombinante Plasmid aufgenommen haben, weiter vermehrt werden. Diese gentechnisch veränderten Organismen können etwa in der Forschung, in der Medizin oder der Lebensmittelproduktion eingesetzt werden.

Die Werkzeuge, die in der Gentechnik verwendet werden, basieren auf natürlich vorkommenden DNA-Molekülen und Enzymen. Sie werden gezielt für die Genklonierung eingesetzt.



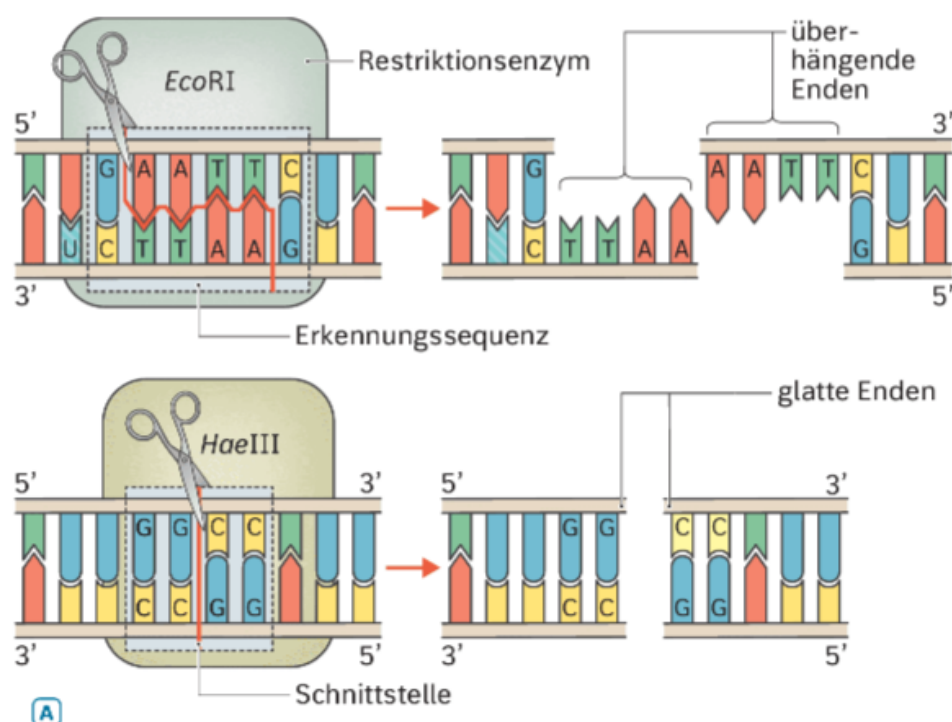
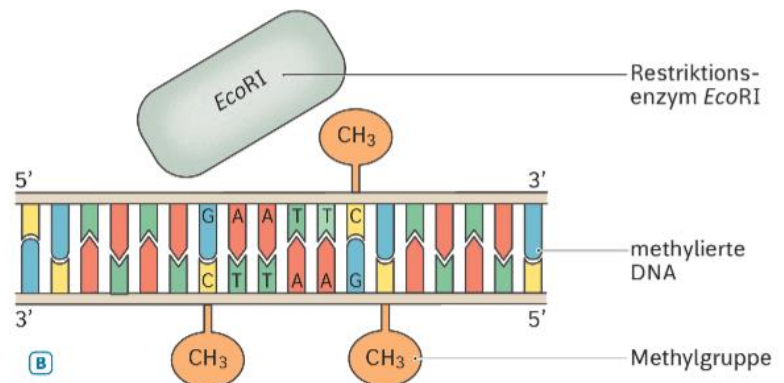
2 Herstellung gentechnisch veränderter Organismen

Was sind Restriktionsenzyme und welche Bedeutung kommt ihnen in der Gentechnik zu?

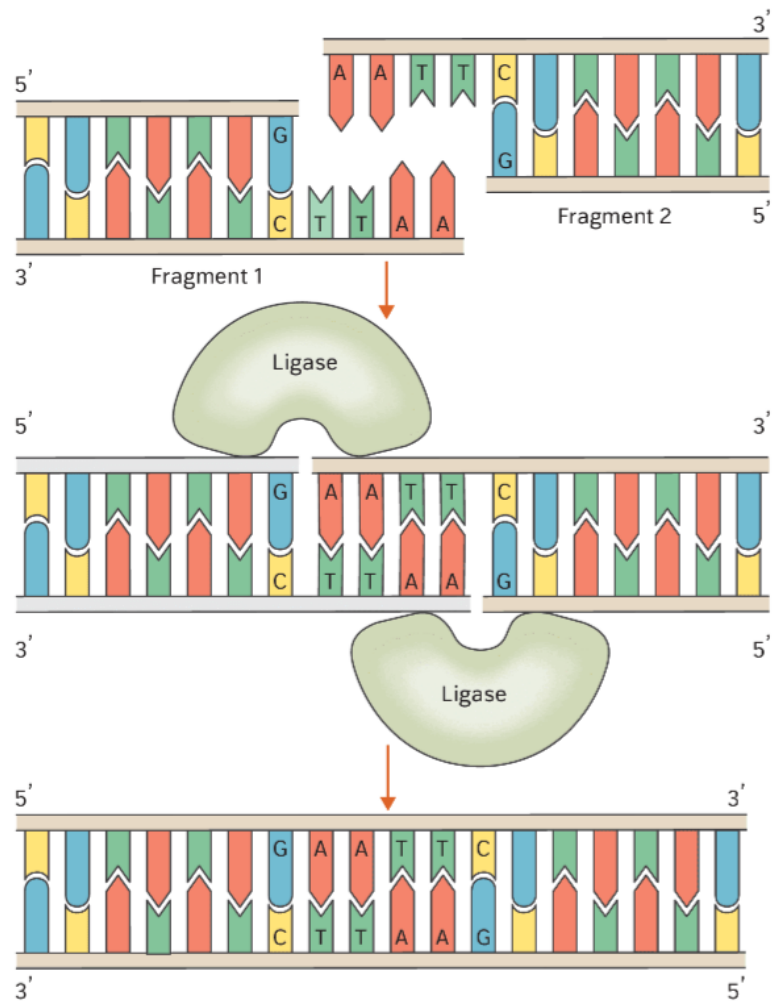
Restriktionsenzyme – Phagen können Bakterien infizieren. Einige Bakterien besitzen jedoch ein Abwehrsystem aus **Restriktionsenzymen**. Diese schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen, sodass die Phagen-DNA zerstört wird. Restriktionsenzyme werden nach der Bakterienart benannt, aus der sie isoliert wurden. So ist das Enzym EcoRI das erste aus dem Stamm R von *E. coli* isolierte Restriktionsenzym.

Jedes Restriktionsenzym erkennt eine bestimmte Basenabfolge von vier bis acht Basenpaaren Länge. Die Erkennungssequenz von EcoRI lautet 5'-GAATTC-3'. Die Sequenz liest sich in beiden Strängen in 5'-3'-Richtung gleich. Wie der Name „Otto“ ist sie ein Palindrom. Innerhalb der Erkennungssequenz liegt die Restriktionsschnittstelle des Enzyms. Die meisten Restriktionsenzyme schneiden die DNA-Stränge versetzt und hinterlassen überhängende Einzelstränge, die auch Sticky Ends oder klebrige Enden genannt werden. Einige Restriktionsenzyme, wie etwa HaeIII aus *Haemophilus aegypticus*, schneiden beide DNA-Stränge an der gleichen Stelle. Dadurch

entstehen glatte DNA-Enden, Blunt Ends genannt. Die DNA der Bakterienzelle ist durch die Methylierung von Basen vor dem Angriff der eigenen Restriktionsenzyme geschützt. Denn das Restriktionsenzym kann methylierte Erkennungssequenzen nicht erkennen oder sie zumindest nicht schneiden.

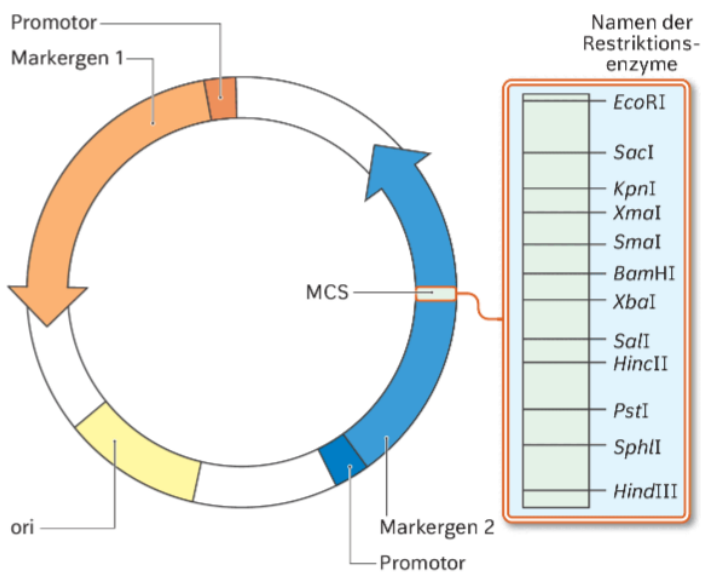


Ligase – Werden DNA-Moleküle mit einem Restriktionsenzym geschnitten, das überhängende Enden erzeugt, so sind diese Enden komplementär zueinander. Sie lagern sich leicht über Wasserstoffbrücken zwischen den Basen zusammen. Das Enzym **Ligase** verknüpft die Nukleotide der Einzelstränge zu einer Zucker-Phosphat-Kette, wodurch die DNA-Fragmente stabil miteinander verbunden werden. Fragmente mit glatten Enden können ebenfalls mithilfe der Ligase verbunden werden. Da hier die beiden Fragmente nicht über Wasserstoffbrücken zwischen den Basen zusammengehalten werden, gelingt die Verknüpfung seltener.



4 Wirkungsweise der Ligase

Vektoren – Um ein fremdes Gen in eine Zelle zu übertragen, wird dieses in einen **Vektor** eingebaut. Ein Vektor ist ein gentechnisch verändertes DNA-Element, das den Transfer des Fremdgens in die Empfängerzelle ermöglicht. Vektoren können zum Beispiel gentechnisch veränderte Plasmide oder Viren sein. Am häufigsten werden Plasmide verwendet, denn diese können leicht in Bakterien vermehrt, daraus isoliert, rekombiniert und wieder in Bakterienzellen übertragen werden.



5 Aufbau eines Vektors

Innerhalb eines Markergens liegt die **multiple Klonierungsstelle**, kurz **MCS**. Im Bereich der MCS befinden sich Schnittstellen für viele verschiedene Restriktionsenzyme, von denen jedes nur einmal im Vektor vorkommt.

Zur Klonierung wird der Vektor mit einem Restriktionsenzym innerhalb der MCS geschnitten. Die Fremd-DNA wird mit dem gleichen Enzym geschnitten und mithilfe der Ligase in die Schnittstelle eingebaut. Das Genprodukt des Markergens verliert dabei seine Funktion, wodurch eine Selektion möglich ist.

Plasmidvektoren – Plasmide, die als Vektoren verwendet werden, sind relativ klein, denn sie enthalten nur die für ihre Funktion notwendigen genetischen Informationen. Dazu gehört der **Replikationsursprung ori**, der nach dem englischen Begriff *origin of replication* benannt ist. Dieser ermöglicht unabhängig vom Bakterienchromosom die Replikation des Plasmidvektors in der Bakterienzelle.

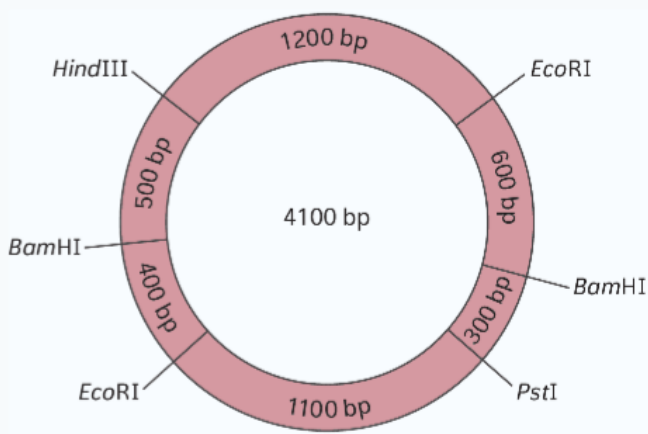
Außerdem enthalten Plasmidvektoren zwei **Markergene** für die später folgende Selektion der transgenen Zellen. Dies sind zum Beispiel Gene, die eine Resistenz gegen Antibiotika verleihen oder für Enzyme kodieren, die einen leicht erkennbaren Farbstoff produzieren. Bakterielle Promotoren sorgen für die Expression der Marker Gene in Bakterien. Auch das *gfp*-Gen eignet sich als Marker gen.

Transformation – Zur Herstellung eines transgenen Organismus muss die Fremd-DNA in die Empfängerzellen eingeschleust werden. Dieser Prozess heißt **Gentransfer** oder **Transformation**.

Für Bakterien gibt es dazu verschiedene Methoden. Bei der Elektroporation erzeugen elektrische Impulse kurzzeitig Löcher in der Zellmembran der Bakterien. Durch diese können die rekombinanten Plasmide aufgenommen werden. Auch durch die Behandlung der Bakterienzellen mit Calciumchlorid bei Temperaturen nahe 0 Grad Celsius kann die Aufnahme von DNA gefördert werden. Für die Transformation von Bakterien können auch Vektoren verwendet werden, die auf Phagen basieren. Diese werden durch Infektion der Wirtszellen übertragen. Für alle Transformationsmethoden gilt, dass nur ein sehr kleiner Teil der behandelten Zellen die Vektoren aufnimmt.



Restriktionsanalysen von Vektoren



Die Abbildung zeigt eine Plasmidkarte. Sie gibt die Lage verschiedener Restriktionsschnittstellen und deren Abstände zueinander in Basenpaaren an, abgekürzt bp. Das dargestellte Plasmid wurde mit den in der Tabelle A angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten.

Werden Plasmidvektoren mithilfe von Restriktionsenzymen geschnitten, kann aus der Größe der entstandenen Fragmente der Aufbau des Plasmids abgeleitet werden. So kann auch die Lage der Schnittstellen relativ zu einander angegeben werden. Ein Plasmidvektor von 4500 Basenpaaren Länge wurde mit mehreren Restriktionsenzymen geschnitten. Die dabei entstandenen Fragmentgrößen wurden bestimmt. Tabelle B zeigt die Ergebnisse.

Versuchsansatz	Restriktionsenzyme
1	<i>EcoRI</i>
2	<i>BamHI</i>
3	<i>PstI</i>
4	<i>EcoRI</i> und <i>BamHI</i>
5	<i>EcoRI</i> , <i>BamHI</i> und <i>PstI</i>

A Versuchsansätze

Restriktionsenzyme	Fragmentgrößen
<i>EcoRI</i>	3800 bp, 700 bp
<i>EcoRI</i> und <i>PstI</i>	2400 bp, 1400 bp, 700 bp
<i>EcoRI</i> und <i>HaeIII</i>	3500 bp, 700 bp, 300 bp
<i>EcoRI</i> , <i>PstI</i> und <i>HaeIII</i>	2100 bp, 1400 bp, 700 bp, 300 bp

B Fragmentgrößen

- 1 Geben Sie die Fragmentgrößen an, die durch die Restriktion des Plasmids in den Ansätzen 1 bis 5 entstanden sind. ●○○
- 2 Skizzieren Sie eine Plasmidkarte mit den Schnittstellen von *EcoRI*, *HaeIII* und *PstI*. Geben Sie jeweils die Größen der Fragmente zwischen den einzelnen Restriktionsschnittstellen an. ●●○
- 3 Begründen Sie, welche der Schnittstellen in der MCS des Vektors lokalisiert sein können. ●●●

Herstellung genetisch veränderter *E.coli*-Zellen und deren Selektion

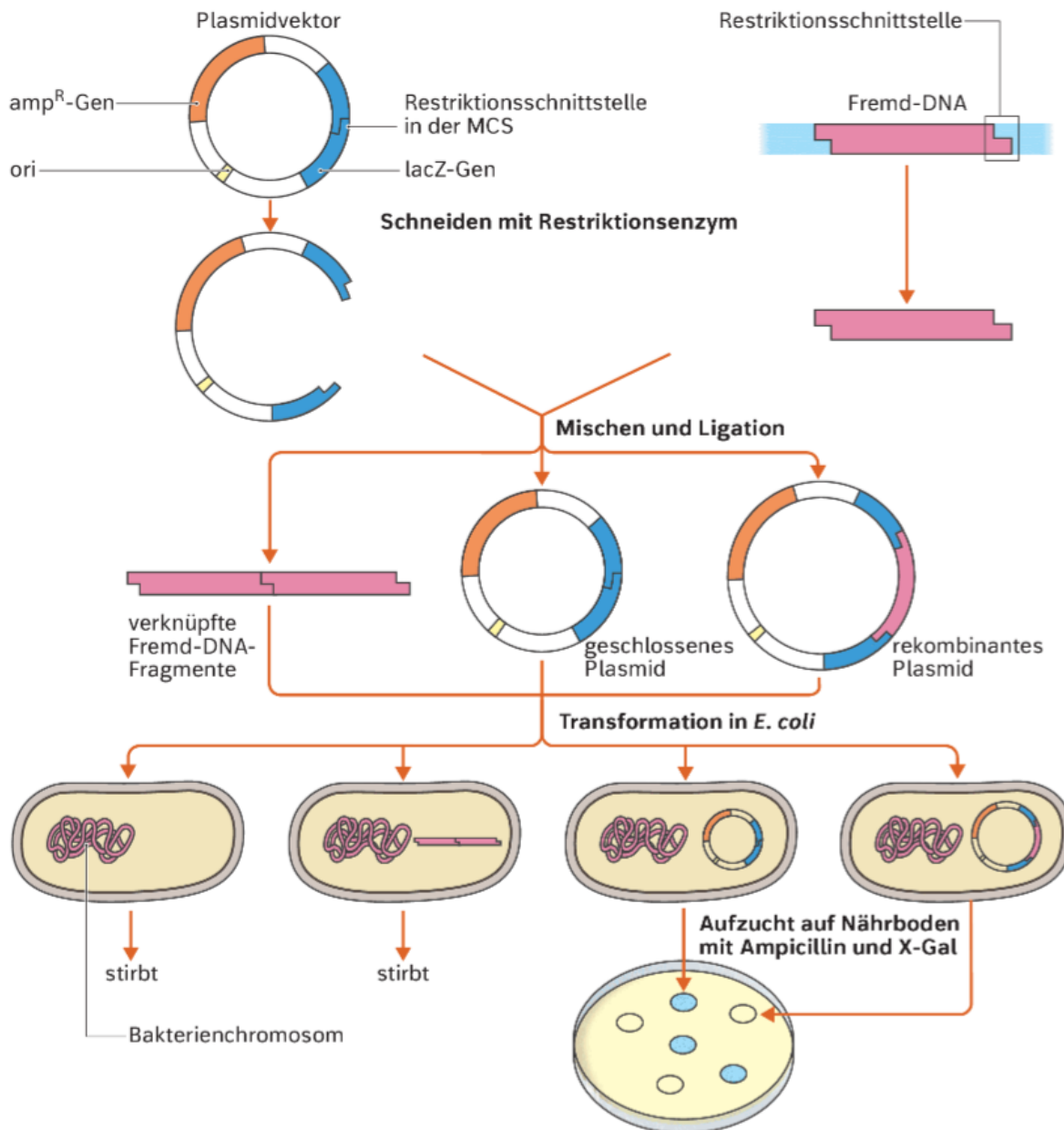
Rekombination ➡ Soll fremde DNA in Bakterien wie etwa *Escherichia coli* übertragen werden, muss diese zunächst aus dem Ursprungsorganismus isoliert werden. Außerdem wird ein Vektor für den Transfer dieser DNA in die Bakterienzellen benötigt. Häufig wird ein Plasmid verwendet, das als Markergen ein Antibiotikum-Resistenzgen enthält, etwa das *amp^R*-Gen. Bakterienzellen, die das *amp^R*-Gen besitzen, sind resistent gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin. Ein anderes Markergen ist das β -Galactosidase-Gen, das *lacZ*-Gen. Es codiert für das Enzym β -Galactosidase, das den Zellen ermöglicht, den Zucker Lactose als Kohlenhydratquelle zu nutzen. Innerhalb des *lacZ*-Gens liegt die multiple Klonierungsstelle MCS.

Zur Klonierung werden die Fremd-DNA und der Vektor mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten. Eine Schnittstelle liegt innerhalb der MCS des Vektors. Außerdem schneidet das Restriktionsenzym vor und nach der ausgewählten Fremd-DNA. Die geschnittenen DNA-Fragmente werden gemischt und durch das Enzym Ligase miteinander verbunden. Dieser Vorgang heißt **Ligation**. Dabei können unterschiedliche Produkte entstehen. So können etwa mehrere Fremd-DNA-Fragmente verknüpft werden. Oder es werden die beiden Enden eines Vektormoleküls miteinander verbunden, sodass wieder ein geschlossenes Plasmid entsteht. In einigen Fällen entsteht ein rekombinantes Plasmid, bei dem die Fremd-DNA in die MCS des Vektors eingebaut wurde.

Wie findet man *E.coli*-Zellen, die das rekombinante Plasmid aufgenommen haben?

Selektion ➡ Die bei der Ligation entstandene Mischung aus DNA-Molekülen wird zur Transformation einer *E.-coli*-Kultur eingesetzt. Die meisten Zellen bleiben dabei unverändert. Einige wenige Zellen nehmen aber DNA auf und enthalten durch die Transformation Fragmente der Fremd-DNA, einen Vektor oder ein rekombinantes Plasmid.

Durch **Selektion** können die Zellen, die das rekombinante Plasmid aufgenommen haben, von den anderen unterschieden werden. Dazu wird nach der Transformation die gesamte Bakterien-Kultur auf einen speziellen Nährboden verteilt. Dieser enthält das Antibiotikum Ampicillin. Alle Zellen, die entweder keine DNA oder



6 Herstellung gentechnisch veränderter *E.-coli*-Zellen

nur Fremd-DNA aufgenommen haben, sterben ab, weil ihnen das *amp^R*-Resistenzgen fehlt. Zellen, die den Vektor oder das rekombinante Plasmid enthalten, sind resistent gegenüber Ampicillin und wachsen auf dem Nährboden zu sichtbaren Kolonien heran.

Der Nährboden enthält außerdem den Indikator X-Gal. X-Gal ist ein farbloser Stoff, der durch das Enzym β -Galactosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird. *E.-coli*-Zellen, die den Vektor ohne die eingebaute Fremd-DNA enthalten, besitzen ein intaktes *lacZ*-Gen. Sie stellen die β -Galactosidase her und bilden daher auf diesem Nährboden blaue Kolonien.

Die MCS des Vektors liegt innerhalb des *lacZ*-Gens. Durch den Einbau der Ziel-DNA in die MCS wird das *lacZ*-Gen verändert. Zellen mit rekombinantem Plasmid können daher keine funktionierende β -Galactosidase bilden. Ihre Kolonien bleiben farblos.

Die gewünschten, transgenen Bakterien sind somit gegen Ampicillin resistent und bilden auf diesem Nährboden farblose Kolonien. Sie werden für die weitere Verwendung vermehrt. Die Bakterien vermehren sich durch Zweiteilung. Dadurch entstehen identische Klone der transgenen Bakterien. Der gesamte Prozess wird auch als Genklonierung bezeichnet.