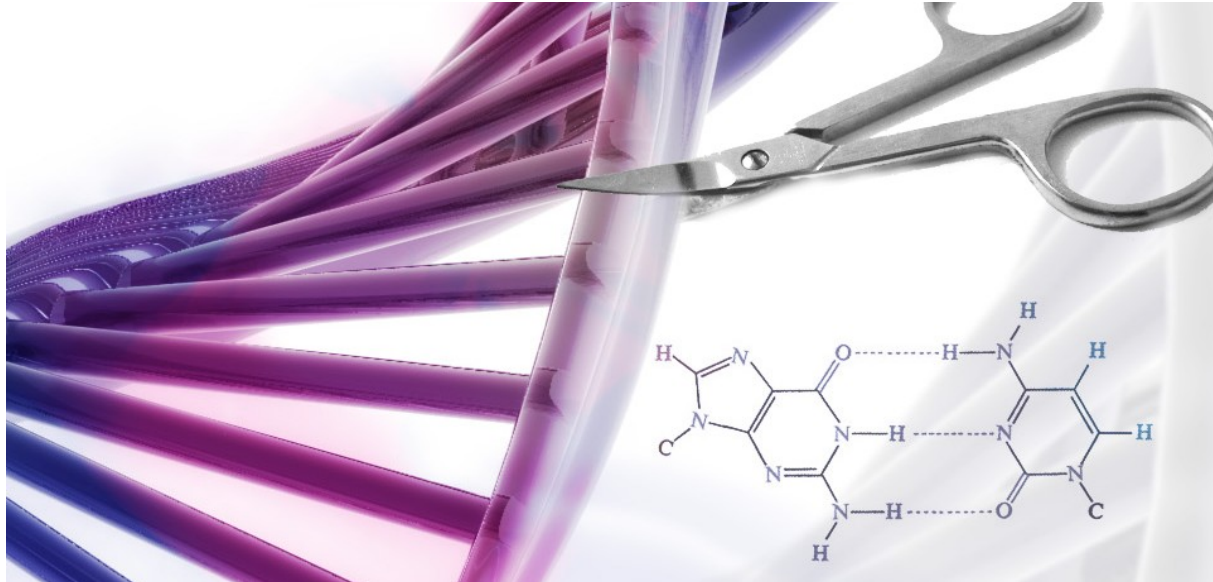


„Restriktionsenzyme“



Von Magnus Mauer

Inhaltsverzeichnis

II	Zielsetzung	Seite	02
III	Hintergrundinformationen	Seite	02
IV	Restriktionsenzyme in der Gentechnik (Kopiervorlage für Schüler)	Seite	06
IV	Übungen (Kopiervorlage für Schüler)	Seite	07
V	Arbeitsmaterialien (Kopiervorlage für Schüler)	Seite	09
VI	Lösungen	Seite	10

II ZIELSETZUNG

Mit der vorliegenden handlungsorientierten Einheit erhalten Schülerinnen und Schüler eine Einführung in die Bedeutung und Funktionsweise von Restriktionsenzymen und stellen deren Wirkung mit Hilfe von Scheren nach.

Außerdem werden sie mit Restriktionskarten vertraut gemacht und aufgefordert, einfache, auf solche Karten zurückgreifende Vorhersagen zu treffen. Diese Kenntnisse erleichtern schließlich auch eine Einarbeitung in die Grundlagen der Gelelektrophorese, da die Schülerinnen und Schüler qualifizierte Betrachtungen zu Restriktionsverfahren anstellen können:

Sie beschreiben 4- oder 6-Basenpaar-Palindrome als typische Restriktionsstellen, die ein Restriktionsenzym erkennt und schneidet. Ausgehend von einer einfachen Restriktionskarte und unter Kenntnis der entsprechenden Wirkung der jeweiligen Restriktionsenzyme sagen sie die Anzahl der Fragmente nach dem Restriktionsverdau voraus. Außerdem bestimmen sie die Anordnung der Banden in einem Agarosegel vor der Gelelektrophorese und erläutern, weshalb es überhaupt möglich ist, DNA-Fragmente verschiedener Größen voneinander zu trennen.

Die genannten Kompetenzen können durch adäquate praktische Schülerübungen erweitert werden. Als vertiefende Versuche stehen der [„DNA-Elektrophoresekit-Kit“](#), [„Einführung in die Gel-Elektrophorese“](#), [„DNA-Restriktions-Analyse Kit Ethidiumbromid“](#) bzw. [„CarolinaBLU™“](#) und [„DNA-Identifikation durch Vergleich von Restriktionsprofilen“](#) zur Verfügung.

III HINTERGRUNDINFORMATIONEN

Restriktionsenzyme wurden ursprünglich entdeckt durch ihre Fähigkeit, fremde DNA aufzubrechen oder zu beschneiden. Solche Restriktionsenzyme unterscheiden dabei zwischen der DNA, die einer Zelle eigen ist, und der, die der Zelle fremd ist, so z.B. die infizierende DNA eines Bakteriophagen.

Derartige Enzyme bewahren die Zelle vor dem Eindringen fremder DNA, indem sie die fremden Fragmente zerschneiden und damit funktionsunfähig machen.

Nach derzeitigem Kenntnisstand scheinen Restriktionsenzyme ausschließlich von Prokaryoten produziert zu werden.

Die Restriktionsenzyme, die üblicherweise in Laboratorien verwendet werden, erkennen allgemein spezifische DNA-Sequenzen von 4 bis 6 Basenpaaren in einer Anordnung als Palindrom. Ein DNA-Palindrom ist eine Sequenz, die im oberen Strang von 5' zu 3' gleich lautet wie im unteren Strang in gleicher Leserichtung von 5'

zu 3' – bzw. „rückwärts“ lautet bei umgekehrter Leserichtung. Die meisten dieser Enzyme schneiden im Phosphodiester-Rückgrat der DNA. Es handelt sich somit um Endonucleasen, die innerhalb des Strangs schneiden (Exonucleasen greifen DNA von freien Enden her an). Die Erkennungs- bzw. Auftrennungsstellen werden als Restriktionsstellen bezeichnet.

Im Folgenden sind einige Restriktionsenzyme mit entsprechenden Erkennungssequenzen aufgeführt. Auffällig ist hierbei, dass manche Enzyme an gegenüberliegenden Stellen Schnitte erzeugen (blunt-end), andere schneiden versetzt – man spricht von „klebrigen“ Enden (sticky-end).

EcoRI (Organismus: *Escherischia coli*)

Erkennungssequenz: 5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

Erzeugter Schnitt: 5'-G AATTC-3' (sticky-end)
3'-CTTAA G-5'

PvuI (Organismus: *Proteus vulgaris*)

Erkennungssequenz: 5'-CGATCG-3'
3'-GCTAGC-5'

Erzeugter Schnitt: 5'-CGAT CG-3' (sticky-end)
3'-GC TAGC-5'

SmaI (Organismus: *Serratia marcescens*)

Erkennungssequenz: 5'-CCCGGG-3'
3'-GGGCCC-5'

Erzeugter Schnitt: 5'-CCC GGG-3' (blunt-end)
3'-GGG CCC-5'

SphI (Organismus: *Streptomyces phaeochromogenes*)

Erkennungssequenz: 5'-GCATGC-3'
3'-CGTACG-5'

Erzeugter Schnitt: 5'-GCATG C-3' (sticky-end)
3'-C GTACG-5'

HindIII (Organismus: *Haemophilus influenzae*)

Erkennungssequenz: 5'-AAGCTT-3'
3'-TTCGAA-5'

Erzeugter Schnitt: 5'-A AGCTT-3'
3'-TTCGA A-5' (sticky-end)

BamHI (Organismus: *Bacillus amyloliquefaciens*)

Erkennungssequenz: 5'-GGATCC-3'
3'-CCTAGG-5'

Erzeugter Schnitt: 5'-G GATCC-3'
3'-CCTAG G-5' (sticky-end)

Unter passenden Bedingungen (Salzkonzentration, pH-Wert, Temperatur) wird ein zugeführtes Restriktionsenzym eine DNA in eine Serie von Fragmenten zerschneiden. Die Anzahl der Einzelstücke hängt ab von der Anzahl und Lage der Restriktionsstellen in der DNA für das Enzym.

Eine Sequenz mit einer bestimmten Kombination von 4 Basen wird zufälligerweise einmal alle paar hundert Basen vorkommen; besteht die Kombination aus 6 Basen wird sie zufälligerweise einmal alle paar Tausend Basen vorkommen. Es ist demnach auch möglich, dass eine DNA keine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym hat: So enthalten die etwa 40000 Basenpaare des Bakteriophagen T7 keine Schnittstelle für *EcoRI*.

Restriktionsenzyme sind bedeutsame Instrumente der Gentechnik. Durch diese Enzyme wurde die aktuelle Gentechnik regelrecht erst ermöglicht, da durch sie die Arbeit mit kleinen, klar definierten Stücken DNA erreichbar wurde.

Chromosomen sind riesige Moleküle, die eine Vielzahl an Genen enthalten. Die Lage dieser Gene und Genfragmente zueinander wurde erst durch den Einsatz von Restriktionsanalysen ermöglicht. Werden die Chromosomen lediglich aufgebrochen, so entstehen zufällige Fragmente, die – in die Zelle eingebracht – von ihr schnell abgebaut werden. Um eine gerichtete Klonierung zu erreichen, bedarf es eines Vektors, um die entsprechende DNA in die Zelle einzuführen und so in ihre Strukturen einzugliedern, dass die fremde DNA dort verbleibt.

Mit Hilfe der Restriktionsenzyme wurde eine gezielte Manipulation von DNA möglich, die das Auftrennen von DNA in definierte Stücke und ein beliebiges Zusammensetzen und Einfügen dieser definierten Sequenzen erlaubt. Ein DNA-Molekül, das ausgehend von verschiedenen Startmolekülen zusammengesetzt worden ist, nennt man: rekombinante DNA.

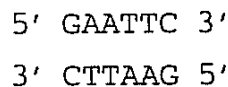
Nunmehr konnten Wissenschaftler kleine und überschaubare spezifische Chromosomregionen untersuchen, DNA-Segmente in Plasmide und Viren klonen sowie andererseits bestimmte Stücke von DNA manipulieren. Die Erkenntnisse der Molekularbiologie vervielfachten sich in enormem Ausmaß. Ebenso wurde Gentechnik ermöglicht, die ja wesentlich auf die gezielte Manipulation von bestimmten DNA-Stücken angewiesen ist.

Da die Schülerinnen und Schüler an Papier-Modellen arbeiten erscheint es hilfreich sie daran zu erinnern, dass DNA in Wirklichkeit dreidimensional ist und keine Vorder- und Rückseiten hat. Somit spielt es auch keine Rolle, ob die den Basen zugeordneten Buchstaben kopfüber stehen.

(die folgenden Abschnitte können als Kopiervorlage für Schüler verwendet werden)

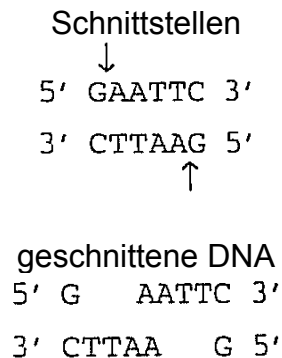
VI RESTRIKTIONSENZYME IN DER GENTECHNIK

Restriktionsenzyme oder Restriktions-Endonucleasen sind in der Regel bakterielle Proteine, die das Eindringen fremder DNA verhindern bzw. diese beschneiden sollen. Ihre enzymatische Funktion entspricht der einer DNA-Schere, die fremde DNA unschädlich macht, indem sie sie in funktionslose Bruchstücke zerlegt. Jedes einzelne Restriktionsenzym – es gibt hunderte, die von verschiedensten Bakterien produziert werden – hat dabei seinen eigenen Abschnitt palindromischer DNA als charakteristische Restriktionsstelle. Beispiel:



Diese Sequenz ist eine Restriktionsstelle für das Restriktionsenzym *EcoRI*. Der Name leitet sich ab von dem Bakterium, in dem es gefunden wurde: *Escherichia coli* Stamm RY13 (*EcoR*); „I“, da es sich um das erste in diesem Organismus gefundene Restriktionsenzym ist.

EcoRI setzt einen Schnitt zwischen G und A in beiden DNA-Strängen. Nach dem Schneiden wird der DNA-Doppelstrang noch von den Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den vier mittleren Basen zusammen gehalten. Diese sind jedoch zu schwach, die Stränge länger aneinander zu binden, und sie trennen sich voneinander.

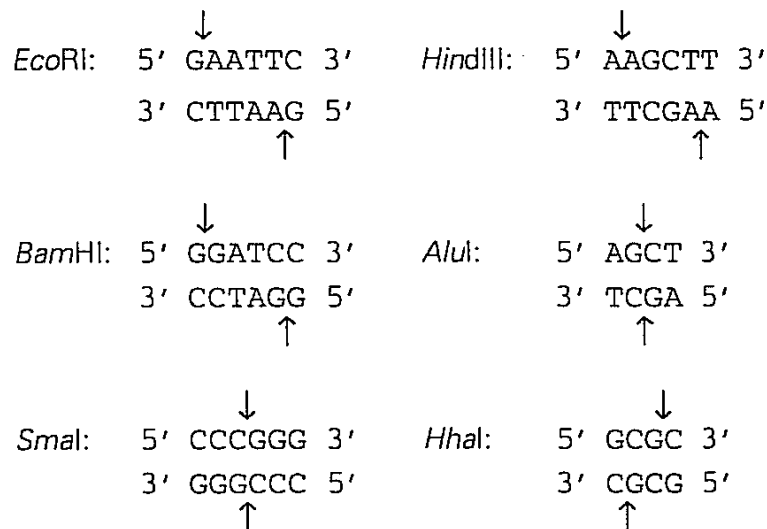


Die *EcoRI*-Schnittstellen in den Einzelsträngen liegen einander im DNA-Molekül nicht unmittelbar gegenüber. Daher bleiben nach dem Schnitt mit *EcoRI* einzelsträngige „Anhänge“, die an den neuen Enden überstehen. Diese „klebrigen Enden“ lagern sich leicht mit anderen komplementären klebrigen Enden wieder zusammen.

Nicht alle Restriktionsenzyme schneiden DNA zu klebrigen Enden: Schneidet das Enzym die Stränge des DNA-Moleküls an geradlinig gegenüberliegenden Stellen, entstehen glatte Enden.

Zur wissenschaftlichen Erkundung eines DNA-Moleküls gehört zu den ersten Schritten, die Anzahl der Restriktionsstellen festzustellen. Auf Grundlage dessen werden Restriktionskarten angelegt, die die Lage der Trennstellen für viele verschiedene Enzyme anzeigen. Solche Karten werden wie Straßenkarten für die DNA verwendet.

Unten sind die Schnittstellen und die Schnittpositionen für verschiedene Restriktionsenzyme aufgelistet:



Verwende diese Liste von Restriktionsenzym-Schnittstellen zur weiteren Arbeit.

Kläre, welche dieser Enzyme glatte, welche klebrige Enden liefern.

V ÜBUNGEN

Schneide die Abbildung der DNA-Sequenz-Streifen entlang der Ränder aus. Diese Streifen stellen doppelsträngige DNA-Moleküle dar. Jede Buchstabenkette steht für das Phosphodiester-Rückgrat, die vertikalen Linien zwischen den Basenpaaren für die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen.

1. Stelle die Aktivität von *EcoRI* nach. Finde dazu in der DNA-Sequenz im Streifen 1 die *EcoRI* –Restriktionsstelle auf (nimm die oben vorliegende Liste zur Hilfe). Füge in die Phosphodiester-Rückgrate an den Restriktionsstellen an beiden Strängen genau zwischen dem G und dem ersten A Schnitte ein. Zerschneide

- den Streifen nicht komplett durch. Beachte, dass *EcoRI* die Rückgrate jedes DNA-Strangs gesondert schneidet.
2. Löse nun die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Schnittstellen, indem du die vertikalen Striche durchschneidest. Trenne die zwei DNA-Stücke voneinander und betrachte die beiden durch *EcoRI* neu entstandenen DNA-Enden: Sind sie glatt, sind sie klebrig? Schreibe *EcoRI* an die Enden und bewahre die Schnittfragmente auf dem Tisch.
 3. Wiederhole das Verfahren mit Streifen 2, diesmal zur Simulation der Aktivität von *SmaI*. Finde die *SmaI*-Restriktionsstelle und trenne die Phosphodiester-Rückgrate an den oben dargestellten Schnittstellen. Gibt es Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Schnittstellen? Sind die neu entstandenen DNA-Enden glatt oder klebrig? Beschrifte die Enden mit *SmaI* und bewahre die DNA-Stücke auf dem Tisch.
 4. Stelle die Aktivität von *HindIII* am Streifen 3 nach. Sind die neu entstandenen DNA-Enden glatt oder klebrig? Beschrifte die Enden mit *HindIII* und bewahre die DNA-Stücke auf dem Tisch.
 5. Wiederhole das gleiche Verfahren mit Streifen 4, erneut zur Simulation der Aktivität von *EcoRI*.
 6. Nimm das „Vorderende“-DNA-Stück von Streifen 4 (ein *EcoRI*-Fragment) und das *HindIII*-„Hinterende“-Stück von Streifen 3. Beide Fragmente haben Einzelstrang-DNA-Anhänge von 4 Basen. Schreibe die Basensequenz der beiden Schwänze auf und beschrifte sie mit „*EcoRI*“ und „*HindIII*“. Markiere die 5'- und 3'-Enden. Sind die Basenfolgen von *EcoRI* und *HindIII* komplementär?
 7. Lege das *HindIII*-Fragment zur Seite und nimm das „Hinterende“-Stück von Streifen 1 (geschnitten mit *EcoRI*). Vergleiche das Einzelstrang-Stück des *EcoRI*-Fragments von Streifen 1 mit dem von Streifen 4. Markiere die 5'- und 3'-Enden. Sind die Basenfolgen von *EcoRI* und *HindIII* komplementär?
 8. Stelle dir vor, du schneidest ein vollkommen unbekanntes DNA-Stück mit *EcoRI*. Sind die Einzelstrang-Anhänge dieser Schnittstücke komplementär zu den Einzelstrang-Stücken der Fragmente von Streifen 1 und 4?
 9. Es gibt ein Enzym namens DNA-Ligase, das Phosphodiester-Bindungen zwischen Nukleotiden wiederherstellt. Damit DNA-Ligasen arbeiten und Bindungen vermitteln, müssen zwei Nukleotide in der passenden Ausrichtung nahe zueinander kommen (das 5'-Ende des einen Nukleotids muss nahe dem 3'-Ende des anderen sein). Ist es leichter, dass DNA-Ligase zwei Fragmente wieder

verknüpft, die mit *EcoRI* geschnitten wurden, oder eines, das mit *EcoRI* geschnitten wurde mit einem, das mit *HindIII* geschnitten wurde? Begründe.

Übung II

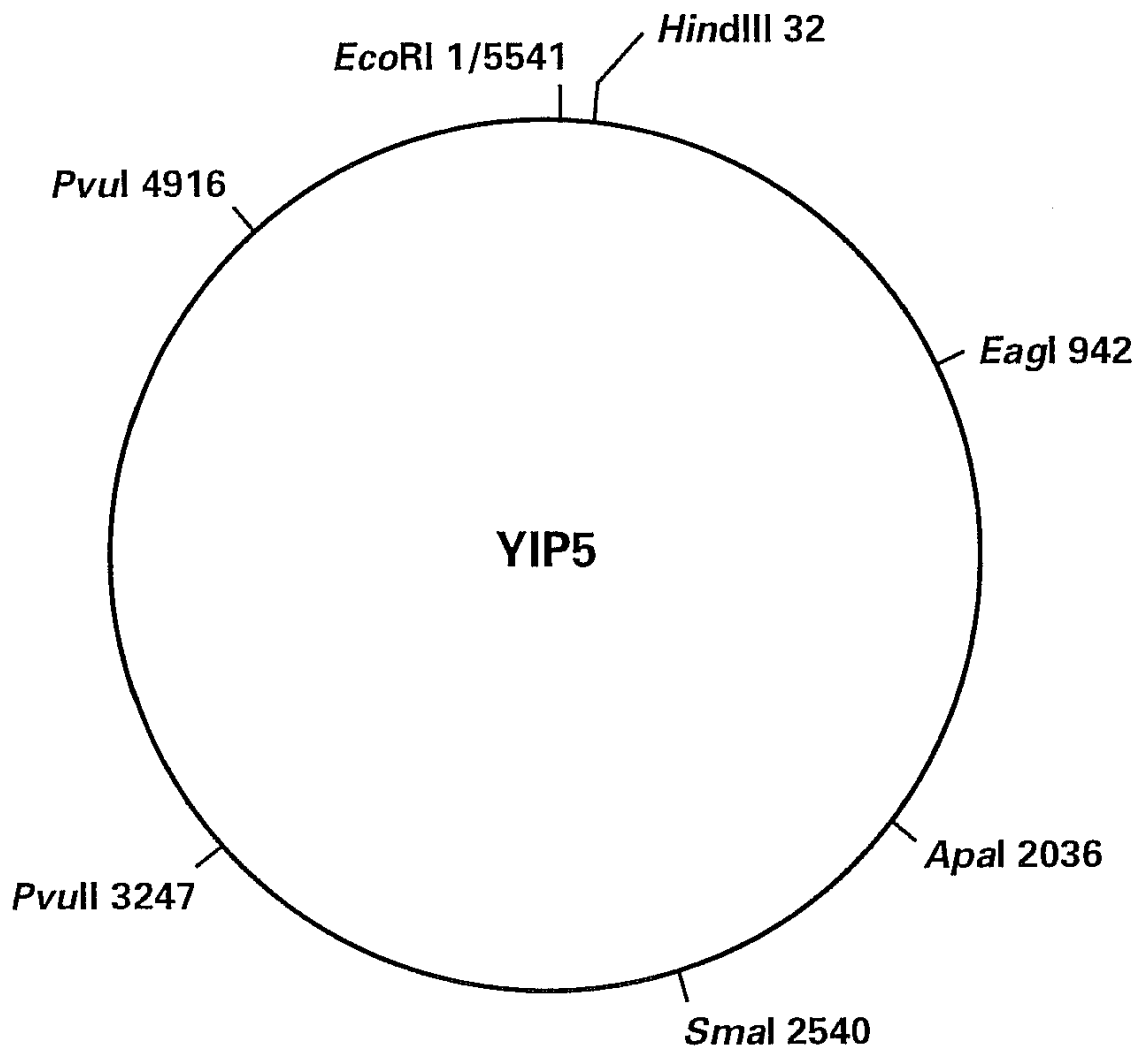
Untersuche die Abbildung der Restriktionskarte des Ringplasmids YIP5. Dieses Plasmid enthält 5541 Basenpaare. Es gibt eine Schnittstelle für *EcoRI* bei Basenpaar 1. Die Lage der anderen Restriktionsstellen werden in der Karte angezeigt. Die Zahlen hinter den Enzymnamen besagen, bei welchen Basenpaaren das entsprechende Enzym schneidet. Wenn YIP5 mit *EcoRI* verdaut wird, erhält man ein lineares DNA-Stück mit einer Länge von 5541 Basenpaaren.

1. Welche Produkte wird ein Verdau mit den beiden Enzymen *EcoRI* und *EagI* ergeben?
2. Welches Ergebnis wird der Verdau mit den Enzymen *HindIII* und *Apal* bringen?
3. Beschreibe das Ergebnis eines Verdaus mit den drei Enzymen *HindIII*, *Apal* und *PvuI*.
4. Welche Produkte sind zu erwarten beim Verdau des Ergebnisses aus Frage 1 mit dem Enzym *PvuII*?

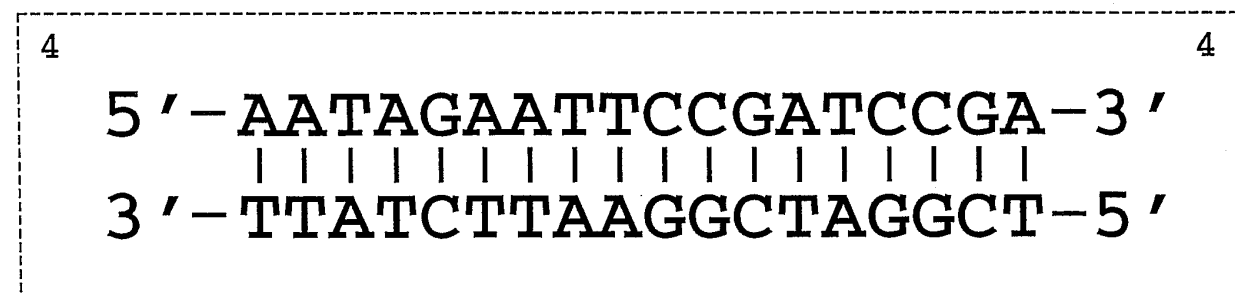
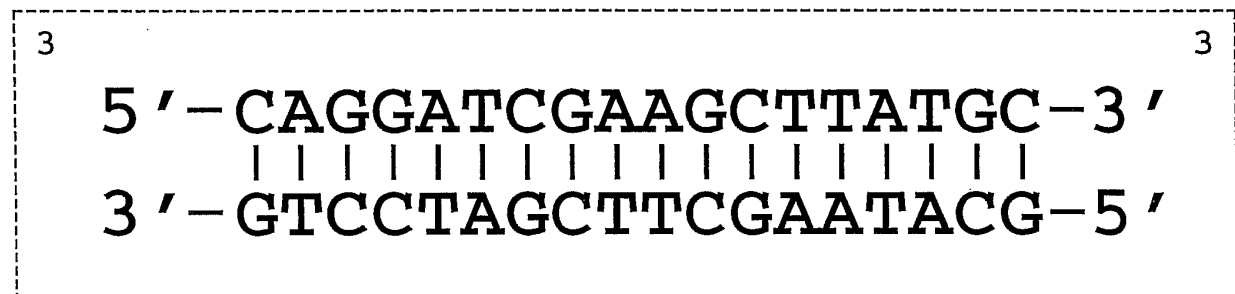
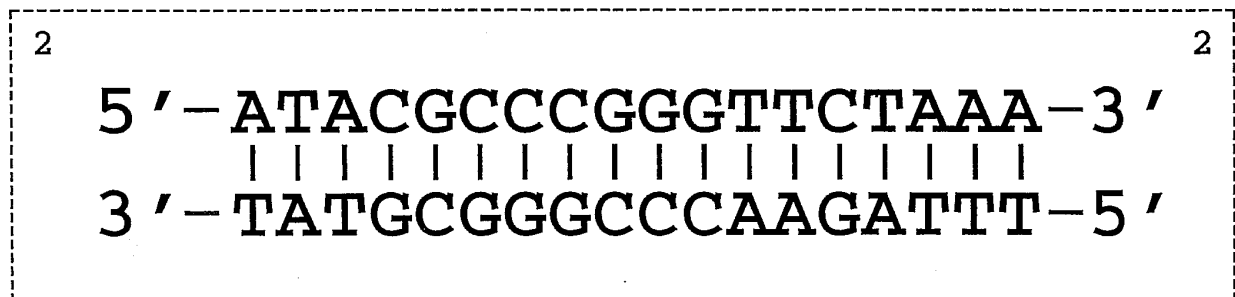
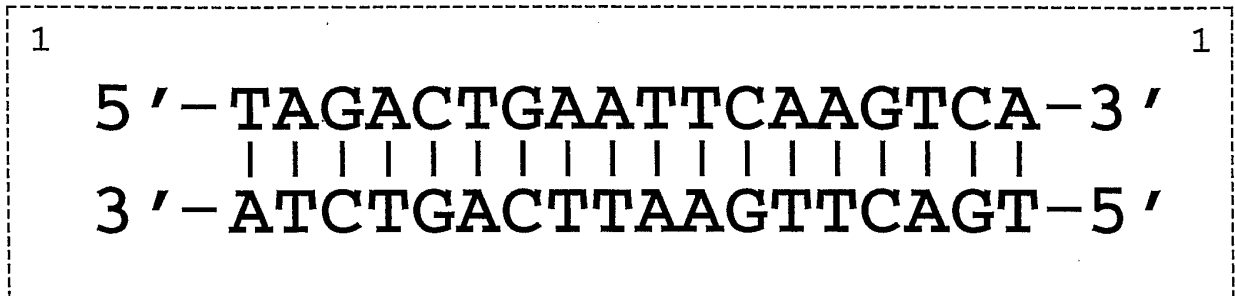
VI ARBEITSMATERIALIEN

Restriktionskarte der DNA des Ringplasmids YIP5

5541 Basenpaare



DNA-Sequenz-Streifen (für „DNA-Scheren“)



VII LÖSUNGEN !

Die Nummerierung entspricht der von „Arbeitsaufträge und Fragen“ auf den Schülerblättern. Die Aufgabenstellungen, zu denen keine Antworten gegeben werden können, werden hier nicht aufgeführt.

12. Die DNA sollte so geschnitten sein, dass 5' AATT an jedem Ende überstehen. Die Enden sind klebrig.
13. Die DNA sollte in der Mitte der *Sma*I-Restriktionsschnittstelle zwischen C und G gerade geschnitten sein. Die Enden sind glatt.
14. Die DNA sollte so geschnitten sein, dass 5' AGCT an jedem Ende überstehen. Die Enden sind klebrig.
16. Die zwei Fortsätze sind 5' AATT 3' (*Eco*RI) und 5' AGCT 3' (*Hind*III). Sie sind nicht (bzw. nur an zwei Stellen A/T) komplementär.
17. Beide Einzelstrang-Teile haben die Sequenz 5' AATT 3' und sind komplementär. Beachte, dass zur Überprüfung der Komplementarität die 5' zu 3' Sequenz des eines Strangs mit der 3' zu 5' Basenfolge des anderen abgeglichen werden muss.
18. Da die Fragmente mittels eines *Eco*RI-Verdau gebildet wurden, werden sie alle die 5' AATT 3' Erweiterungen an den Enden tragen. Alle Enden sind komplementär.
19. Die Antworten werden sich unterscheiden. DNA-Ligase verbindet die Phosphodiesterbrücken zwischen den zwei *Eco*RI-Fragmenten leichter aufgrund der Komplementarität der Einzelstrang-Fortsätze. Die Hybridisierung zwischen den Basen in den Fortsätzen bringt die Rückgrate in eine genau passende Position zur Wiederverknüpfung. Bei nicht-komplementären Fortsätzen (*Eco*RI und *Hind*III) verhindern die nicht-komplementären Basenpaare, dass die Nukleotid-Rückgrate zur Bindung die passende Stellung einnehmen. Es ist enorm schwierig, dass eine DNA-Ligase zwei Bruchteile mit nicht-komplementären klebrigen Enden verknüpft. Zwei Fragmente mit glatten Enden können durch die Ligase verbunden werden. Dabei ist jedoch weniger wahrscheinlich, dass Fragmente mit glatten Enden verbunden werden als solche mit klebrigen – allerdings wahrscheinlicher als Fragmente mit nicht-komplementären klebrigen Enden (dies kommt nahezu nie vor). Daher ist der Ausdruck „klebrige Enden“ in gewisser Weise irreführend, da er nur zutrifft auf solche überstehende Enden, die mit komplementären klebrige Enden zusammenkommen. Nicht-komplementäre überstehende Enden sind sozusagen sogar sehr „unklebrig“.
- II1. Zwei lineare Fragmente von 942 und $(5541 - 942 =) 4599$ Basenpaaren.
- II2. Zwei lineare Fragmente von $(2035 - 32 =) 2003$ und $(5541 - 2003 =) 3538$ Basenpaaren.
- II3. Drei lineare Fragmente von 2003, $(4916 - 2035 =) 2881$ und $(5541 - (2003 + 2881) =) 657$ Basenpaaren.

- II4. Das 942-Basenpaar-Fragment enthält keine *PvuII*-Restriktionsstellen und wird nicht geschnitten werden. Das 4599-Basenpaar-Fragment wird in zwei Teile getrennt, eines mit $(3247 - 942 =)$ 2305 und eines mit $(4599 - 2305 =)$ 2294 Basenpaaren. Es entstehen also drei Fragmente.