**Informationsblatt: Werkzeuge der 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 Transcriptase**

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 m-RNA wird eine DNA erzeugt, die direkt in die DNA eines Prokaryoten eingebaut werden kann.

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

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

(Herkunft der Reversen Transcriptase: aus RNA-Viren, deren RNA als c-DNA kopiert und in die Wirts-DNA eingebaut wird.)

**3 Restriktions-Enzyme (= Endonucleasen)**

Zweck: Gewinnung von (ungespleißten) Genen durch Zerstückeln von Genspender-DNA. Der Schnitt erfolgt an genau definierten Schnittstellen an der DNA (bei bestimmter Basense­quenz, meist an sog. Palin­dromen, die vorwärts und rückwärts gelesen gleich lauten). Die Schnitte sind meist versetzt, so dass Sticky Ends (= ein Strang ist etwas länger als der an­de­re) 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 Nucleotide lang.

Nachteil: Die Schnittstellen liegen irgendwo auf der DNA, ohne Bezug zu funktionalen Einhei­ten, manchmal mitten in einem Gen, manchmal seit weit von der idealen Schnittstelle entfernt.

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

**4 Gensonden**

einsträngige kleine Stücke DNA (seltener RNA) zum „Angeln“ größerer DNA-Einzelstränge mit der komplementären Nucleotid-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 (das mit der komplementären Nukleotid-Sequenz) bleibt an der Sonde kleben, alle anderen wandern an ihr vorbei.

**5 Die Polymerase-Ketten-Reaktion PCR**

Zweck: Vervielfältigung von wertvollen DNA-Stücken (= Amplifikation), die z. B. zuvor unter enormem Aufwand durch Reverse Transkriptase bzw. durch Endonukleasen hergestellt wurden oder die am Tatort eines Verbrechens nur in winzigsten Mengen gefunden wurden.

Abfolge:

* DNA-Doppelstrang (im Extremfall nur 1 Exemplar!) „schmelzen“, d. h. Einzelstränge bei 96°C voneinander trennen.
* Primer auf beiden Seiten anfügen und abkühlen (Primer = kurzes Stück 1-strängige DNA, das den Anfang des neuen Einzelstrangs bildet und der DNA-Polymerase als Ansatz­stelle dient).
* Eine hitzeresistente DNA-Polymerase (aus einem Prokaryoten) fügt isolierte Nukleoti­de zum neuen Einzelstrang zusammen, so dass eine 2-strängige DNA entsteht.
* ... und wieder vorn vorne => immer wieder neuer Zyklus (exponentielle Zunahme der DNA-Menge, z. B. nach 30 Zyklen: 230 = etwa 109)

**6 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 Resistenzgen, 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 und 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 als Marker verwendeten Anti­biotikum nicht mehr bekämpfbar.

**b) Der Marker ist 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.