

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.

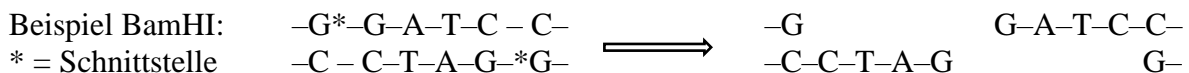
Die Reverse Transcriptase ist ein Enzym, das nach der Vorlage einer RNA einen DNA-Strang herstellt (= c-DNA = complementary oder copy DNA).

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.



=> 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 weit von der idealen Schnittstelle entfernt.

(Herkunft: aus verschiedenen Bakterien, die mit Hilfe dieser Endonucleasen die DNA eingeprägter 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 Endonucleasen). Die charakteristischen Nucleotidsequenzen 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 (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: $2^{30} = \text{etwa } 10^9$)

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 krankheits-erregende (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.