

# Merksätze Kapitel 39

## Gentechnik

### 39.1 Werkzeuge der Gentechnik: Restriktionsenzyme und andere Nucleasen; Ligasen, DNA-Polymerasen und Rekombinationsenzyme

Restriktionsenzyme schneiden DNA an bestimmten Stellen. Dabei entstehen definierte Enden, welche mit anderen passenden Enden rekombiniert werden können. Ligasen verbinden solche Fragmente kovalent; Rekombinasen schneiden und ligieren über Kreuz.

### 39.2 Plasmide als Vektoren (Genfähren)

Die Transfektion und molekulare Klonierung von Plasmid-DNA mit eingefügter Fremd-DNA in Wirtszellen, meist *E. coli*, erlaubt die beliebige Vermehrung und Manipulation der Fremd-DNA.

### 39.3 Viren als Vektoren; Gentherapieversuche

Bakteriophagen mit raschem Wachstum sind beliebte Vektoren für die molekulare Klonierung von Fremd-DNA bis zu 100 kb Länge. Sie werden auch zur Massenproduktion bestimmter Zielproteine in Bakterien verwendet. Viren eukaryontischer Zellen sind unter Laborbedingungen schwieriger zu vermehren, erlauben aber die Produktion von Proteinen höherer Organismen mit ihren posttranslationalen Modifikationen.

Die somatische Gentherapie versucht, Gendefekte durch Einführen intakter Gene in Körperzellen zu heilen.

### 39.4 Künstliche Chromosomen als Vektoren

Die gebräuchlichsten Vektoren zur Vermehrung von Fremd-DNA in Bakterien und Hefen:

Vektor	Insertgröße	Organismus
Plasmide	≤10 kb	<i>E. coli</i>
M13-Viren	≤8 kb	<i>E. coli</i>
Lambda-Viren	12-25kb	<i>E. coli</i>
Cosmide (Lambda-Viren)	≤45 kb	<i>E. coli</i>
BACs	≤1000 kb	<i>E. coli</i>
YACs	≤1000 kb	<i>S. cerevisiae</i>

### 39.5 Polymerase chain reaction PCR

Die PCR ist eine der gebräuchlichsten gentechnischen Methoden. Sie erlaubt die kopientreue *in-vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten. Mittels PCR und DNA-Hybridisierung können DNA-Fragmente gespleißt oder mit langen einzelsträngigen Enden versehen und danach rekombiniert werden. Gekoppelte Transkription-Translation setzt PCR-Fragmente in mRNA und Protein um.

### 39.6 Genbanken: cDNA und genomische DNA

Gen- und cDNA-Bibliotheken mit Millionen von Klonen werden mittels Kolonie-Hybridisierung oder PCR nach bestimmten Sequenzen durchsucht.

### 39.7 Bestimmung der Nucleotidsequenz von DNA

Die Methode von Sanger basiert auf 2',3'-Dideoxyribonucleotid-induzierten Kettenabbrüchen und wird häufig zur Bestimmung kurzer Sequenzen wie cDNA-Sequenzen verwendet. Die Nucleotidsequenz genomischer DNA wird heute durch Hochdurchsatz-Automaten mit neueren Methoden bestimmt und liefert den Großteil der Sequenzdaten auch für Proteine. Die cDNA- und Gensequenzen der meisten für biomedizinische Studien verwendeten Organismen sind in öffentlichen Datenbanken zugänglich.

### 39.8 Southern-, Northern- und Western Blots

Die drei häufig verwendeten Blottingverfahren des *Southern* (DNA), *Northern* (RNA) und *Western Blots* (Protein) überführen in Gelen aufgetrennte DNA-Fragmente, RNAs und Proteine auf die Oberfläche von Trägerfolien, wo die Moleküle besser differenziert und nachgewiesen werden können als in der Gelmatrix.

### 39.9 Expression rekombinanter Proteine und RNAs

Die gekoppelte *in-vitro* Transkription-Translation eines isolierten Gens produziert nahezu reines Protein in einer Menge, die für die meisten biochemischen Experimente ausreicht. Die selektive Hemmung der Expression eines Gens kann durch Transfektion von *Antisense*-RNA oder dsRNA (RNA-Interferenz RNA<sub>i</sub>) in die Zielzellen erreicht werden. Zur Expression grösserer Mengen von Proteinen für medizinische und industrielle Zwecke werden meist schnellwachsende Mikroorganismen eingesetzt.

### 39.10 Gezielte und zufällige Mutagenese

Die durch gezielte Mutagenese erhaltenen Proteine sind wichtig für das Studium von Struktur-Funktionsbeziehungen. Der Einsatz der Mutagenese als Mittel zum Ausschalten (*Knock-out*) von Genen ermöglicht den Weg der *Reverse genetics*, d. h. einen raschen Weg vom Phän zum Gen.

### 39.11 Präsentation von Genprodukten auf Bakteriophagen (*Phage display*) oder Ribosomen (*Ribosome display*); gerichtete molekulare Evolution

Bei den *Display*-Techniken wird der Phänotyp (das Protein) mit dem zugehörigen Genotyp gekoppelt. Das Gen (bzw. die mRNA) der Proteinvariante, welche durch spezifische Bindung an einen Liganden angereichert worden ist, wird dadurch gleichermassen angereichert und kann amplifiziert werden. Durch wiederholte Anwendung des Zyklus von Zufallsmutagenese, *Panning* und Amplifikation können *in vitro* neue vorgegebene Eigenschaften eines Proteins entwickelt werden (gerichtete molekulare Evolution).

### 39.12 Klonierung von Zellen und Organismen; transgene Organismen

Eine fehlerfreie experimentelle Klonierung ganzer Organismen ist derzeit nicht möglich. Klonierte Organismen weisen ausnahmslos vielfältige genetische Schäden auf. Transgene Mäuse sind zu einem wichtigen Mittel des Studiums der Genfunktion geworden. Bei *Knock-out*-Versuchen fällt auf, dass die meisten Gene nicht absolut lebensnotwendig sind; ihre Funktion kann (unter Laborbedingungen) durch andere Genprodukte übernommen werden (Redundanz).