

Die rekombinante DNA-Technologie 9

cDNA-Bibliotheken – Lesestoff für Leseratten

Barbara C. Biedermann Da man aus einem Gewebe totale RNA – damit auch sämtliche mRNA – einfach isolieren kann, steht in einem einzigen, relativ einfachen Arbeitsschritt das Transkriptom dieses Gewebes im Reagenzglas zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung. Um dieses Transkriptom nun in eine elegant bearbeitbare Form zu bringen, wird die labile RNA zunächst in DNA zurückübersetzt. Ein Vorgang, den einem wieder ein natürlich vorkommendes Enzym abnimmt: die sogenannte Umkehr-Transkriptase (engl. «reverse transcriptase», kurz RT). Die «reverse»-Transkriptase steht den Retroviren (berühmtester Vertreter dieser Virenfamilie ist das HI-Virus) zur Verfügung, um ihr genetisches Material in DNA rückzuübersetzen – Grundvoraussetzung für die In-

tegration ins Wirtsgenom. Retroviren brechen den sonst ausschliesslich unidirektionalen Fluss der genetischen Information: DNA → RNA → Protein. Die gebräuchlichste Methode, um aus mRNA DNA herzustellen, nutzt das polyadenylierte mRNA-Ende: ein Primer, der nur aus Thyminbasen besteht («Oligo-T»), lagert sich an das Polyadenylierungsende der mRNA an und wird von der reversen Transkriptase verlängert. DNA, die aus der «messenger»-RNA einer Zelle rückübersetzt wurde, nennt man komplementäre DNA oder cDNA (c steht für engl. «complementary»). cDNA enthält – im Gegensatz zur genomischen DNA – nur die kodierenden Sequenzen des Gens, d.h. nur die Exonsequenzen. Die Intronsequenzen wurden ja bei der mRNA-Spleissung bereits entfernt. Die reverse Transkriptase (RT) produziert also zunächst eine einkettige DNA-Abschrift der mRNA. Wenn man nun die mRNA (z.B. durch eine RNase) entfernt, wird die cDNA-Kette frei für die Synthese eines doppelsträngigen cDNA-Moleküls durch eine DNA-Polymerase. Diese kann beispielsweise sogenannte Haarnadel-Enden des 3'-cDNA-Endes verlängern. Wenn die ungepaarte Haarnadel-Sequenz durch eine spezialisierte DNA-Nuklease entfernt wird, liegt die cDNA als vollständig komplementärer Doppelstrang vor. Liegt die Gesamtheit der Genabschriften eines Gewebes oder einer Zellpopulation nun in dieser Form vor, lässt sie sich in «Buchform» bringen – wir stehen vor einer cDNA-Bibliothek (engl. «cDNA-library»). Die fleissigen Buchbinder und Buchdrucker der Genbibliotheken sind wiederum Plasmide und E. coli.

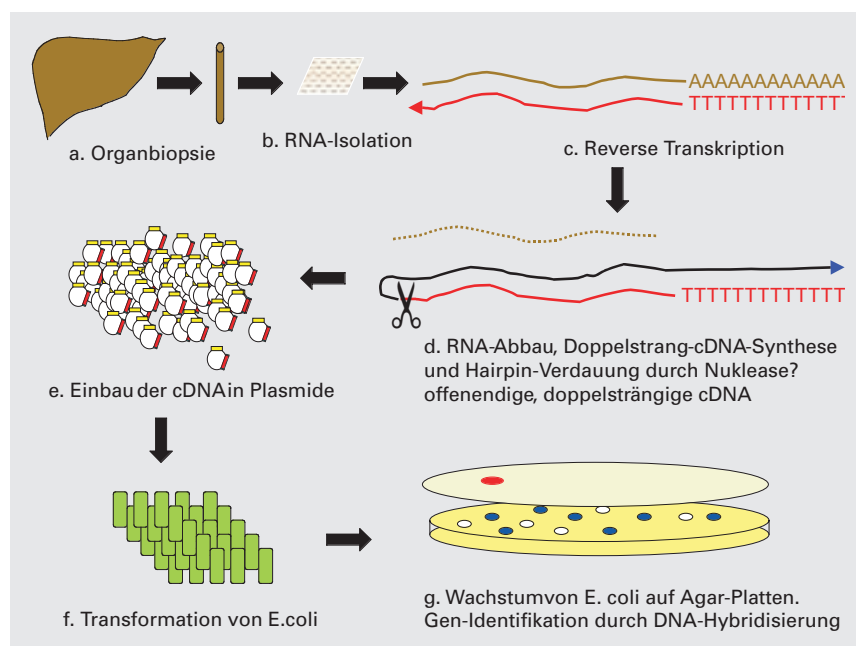


Abbildung 1. Die Herstellung einer cDNA-Bibliothek mit Hilfe von Plasmiden und E. coli.

Korrespondenz:
 PD Dr. med. Barbara C. Biedermann
 Medizinische Universitätsklinik
 Kantonsspital
 CH-4101 Bruderholz
barbara.biedermann@unibas.ch