

Konstruktion einer Plasmid-DNA zur Gentherapie

Das folgende Handout fasst die wesentlichen Punkte des Pro-Scientia-Vortrages vom 21.03.2017 für fachfremde Stipendiaten einfach zusammen und soll bei Interesse zum weiteren Verständnis beitragen - stellt aber keine wissenschaftliche Arbeit dar.

Was sind Plasmide?

- zirkuläre, doppelsträngige DNA Sequenzen
- natürliches Vorkommen in Bakterien, Archaeen, selten in Eukaryoten
- Replikation autonom bzw. nicht mit Zellzyklus koordiniert (Unterschied zum ebenfalls zirkulären Bakterienchromosom)
- meist kürzere DNA-Sequenz als Bakterienchromosom
- Essentielle Gene liegen auf Bakterienchromosom, Plasmidgene können aber Überlebensvorteil bringen

Was sind Beispiele für Gene auf Plasmiden?

- F-Gen zum horizontalen Gentransfer durch Übertragung des Plasmids über Sexpilus
- Resistenzgene
- Degradationsgene
- Virulenzfaktoren

Wozu kann man Plasmide verwenden?

- Plasmide relativ früh als Expressionsvektoren verwendet
- Produktion rekombinanter Proteine in Zellkultur - machte Isolation aus Leichen oder Tierkadavern obsolet (z.B. vorher Insulin aus Schweinepankreas, HGH aus Hypophyse von Leichen)
- Einfachste Form eines Vektors zur Gentherapie
- Grundlage zur Konstruktion vieler komplexerer Vektoren (z.B. Viren)

Wie kann man Plasmide gentechnisch verändern?

- Plasmide wurden zu verschiedensten Zwecken modifiziert und weiterentwickelt: heute viele verschiedene Plasmidgrundgerüste kommerziell erhältlich, die man selbst dem Forschungsziel entsprechend weiterverändern kann.

Vereinfachtes Beispiel:

-Ausschneiden von Gen A aus Plasmid A und Einfügen des Gens A in Plasmid B:

-Erster Schritt beginnt mithilfe eines Computerprogramms: Sequenzanalyse + Erstellung genetischer Karte zur Planung des Experiments (Abb. 1). Computergestützte Suche passender Schnittstellen auf Plasmid A zum Ausschneiden von Gen A (Schnittstellen stellen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme dar, welche DNA genau in diesem Sequenzbereich schneiden). Suche einer passenden Insertionsstelle auf Plasmid B für Gen A.

-Durchführung des Experiments, bei dem Restriktionsenzyme die DNA am gewünschten Ort schneiden. Beim Schneiden des Plasmids A entstehen daraufhin 2 DNA-Fragmente: das Gen A (kleineres Fragment) sowie die restliche Sequenz des Plasmids (größeres Fragment). Um das richtige Fragment (Gen A = kleineres Fragment) zu isolieren, behilft man sich einer sog. Gelelektrophorese. Dabei werden DNA-Fragmente in einem unter Strom gesetzten Gel horizontal laufend ihrer Größe nach aufgetrennt. Das passende Fragment lässt sich dann aufreinigen und kann in einer zweiten Reaktion mit dem an der Insertionsstelle eröffneten Plasmid B verbunden werden.

-Will man das Plasmid in Zellen einschleusen, muss man die Zellmembran entweder chemisch (chemische Transfektion) oder durch kurze Applikation eines elektrischen Feldes (Elektroporation) kurzzeitig permeabel machen. Zur größeren Produktion des Plasmids wird letzteres in Bakterienkulturen vermehrt.

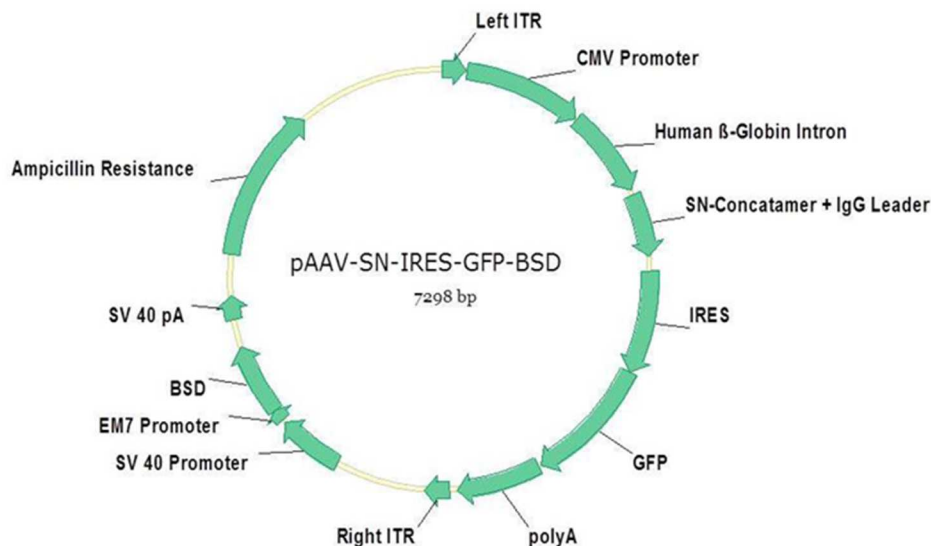


Abbildung 1: Sequenzmappe des pAAV-SN-IRES-GFP-BSD Plasmids. Das Plasmid wurde mittels Vector NTI Advance® *in silico* designed, mittels Restriktionsverdau und Ligation kloniert und mittels Plasmidaufreinigung isoliert. Die Expression von Secretoneurin (SN) wird von einem CMV Promoter gesteuert, während die simultane Expression von GFP durch ein IRES-Element ermöglicht wird. SN wird durch das Signalpeptid IgG Leader in den Extrazellularraum sezerniert, während GFP im Cytoplasma verbleibt. Das eingezeichnete Blastocidinresistenzgen (BSD) ermöglicht eine Selektion in Eucyten, während das Ampicillinresistenzgen zur Selektion in Bakterienzellen verwendet werden kann. Quelle: Eigene Darstellung.