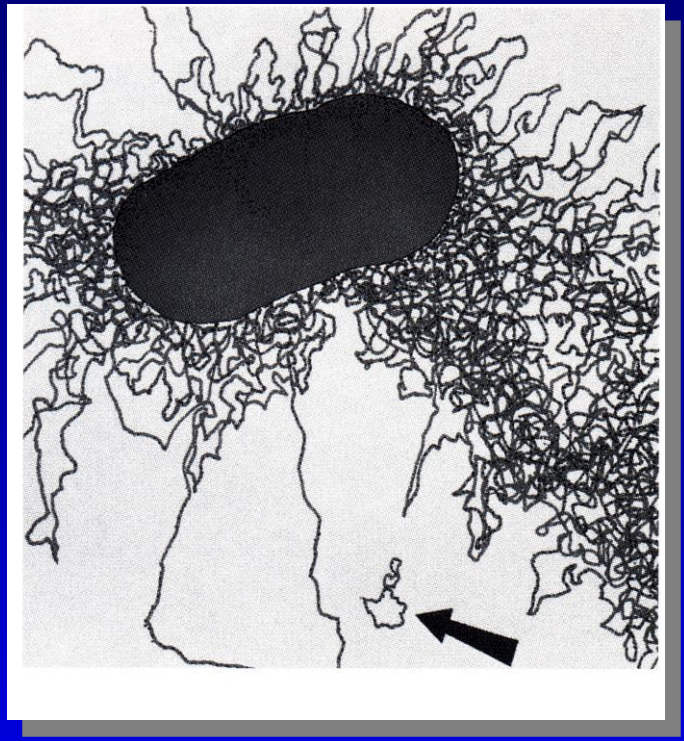
Gentechnologie

Vektorkunde I: Plasmide

Plasmide



- meistens zirkuläre, doppelsträngige, extrachromosomale DNA-Moleküle

(Ausnahme: lineare Plasmide z.B. bei *Streptomyces rochei*, *Borrelia* und *Thiobacillus versutus*)

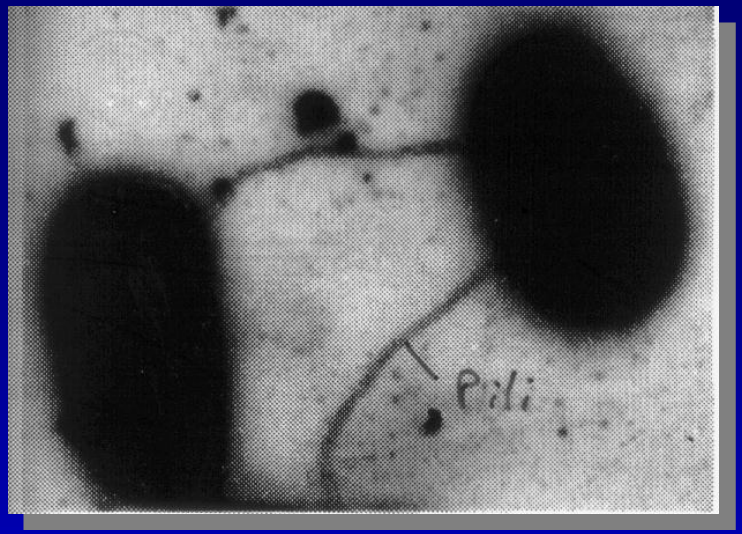
- Plasmide sind Replikons
- Plasmide tragen nicht-essentielle, aber manchmal vorteilhafte Gene (z.B. Antibiotika-Resistenzgene)

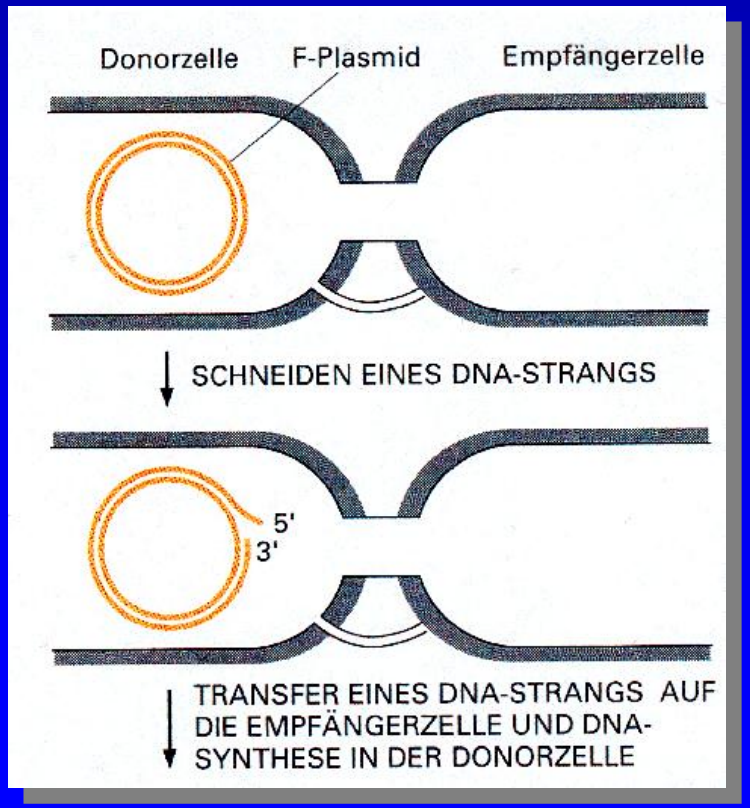
Klassifikation von Plasmiden

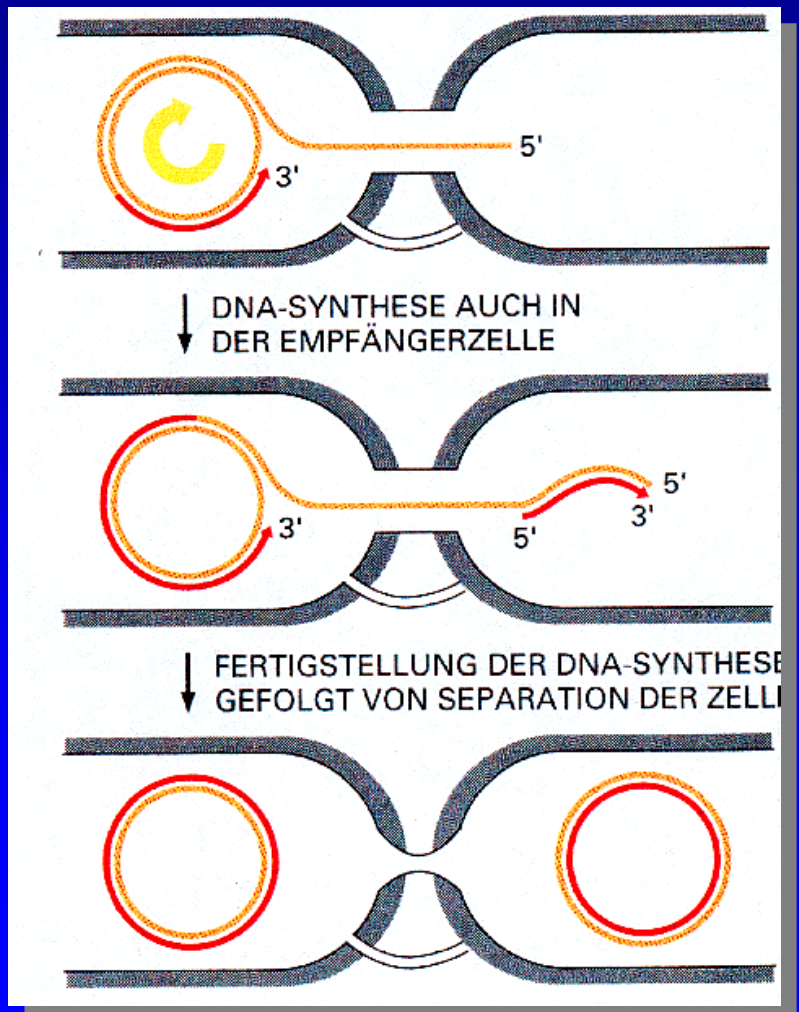
- F-Plasmide (Fertilitätsfaktor)
- RTF (Antibiotikaresistenzen)
- Col-Plasmide (Colicine)
- Degradative Plasmide (Schwermetallresistenz, Toluolabbau)
- Nif-Gene (Nitrogenase, N2-Fixierung)
- Virulenzplasmide (Ti-Plasmid)

Man unterscheidet konjugative und nicht-konjugative Plasmide!!!

Konjugation







Genregionen für den konjugativen Plasmidtransfer

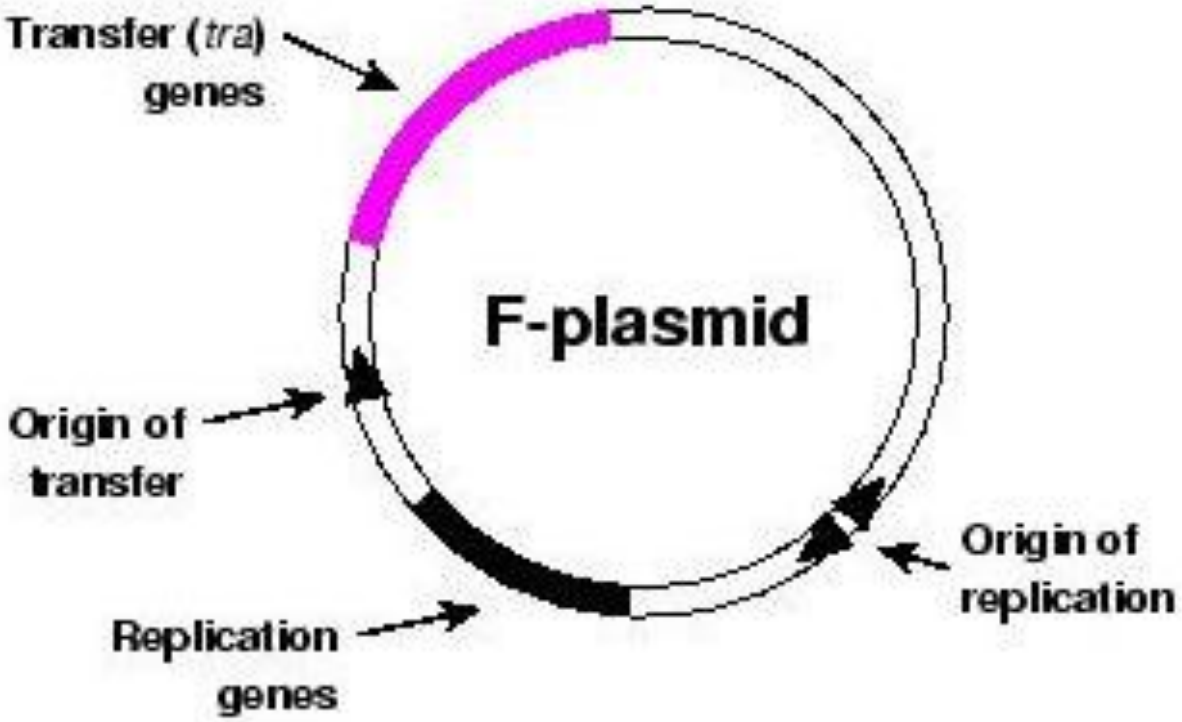
- Tra Gene
  - > ca. 25 Gene, ein Operon (ca. 33 kb)
  - > kodieren Sex-Pili

- „ori T"
  - > umfasst nic/bom-Region und mob-Gene:
  - > mob-Gene kodieren für ein Mobilisierungsprotein, das den Strangbruch („nick") in der DNA erzeugt
  - > nic/bom („basis-of-mobility") ist eine Region auf der DNA, an der der Einzelstrangbruch erfolgt und von dem der Strangtransfer ausgeht

Klassifikation von Plasmiden:

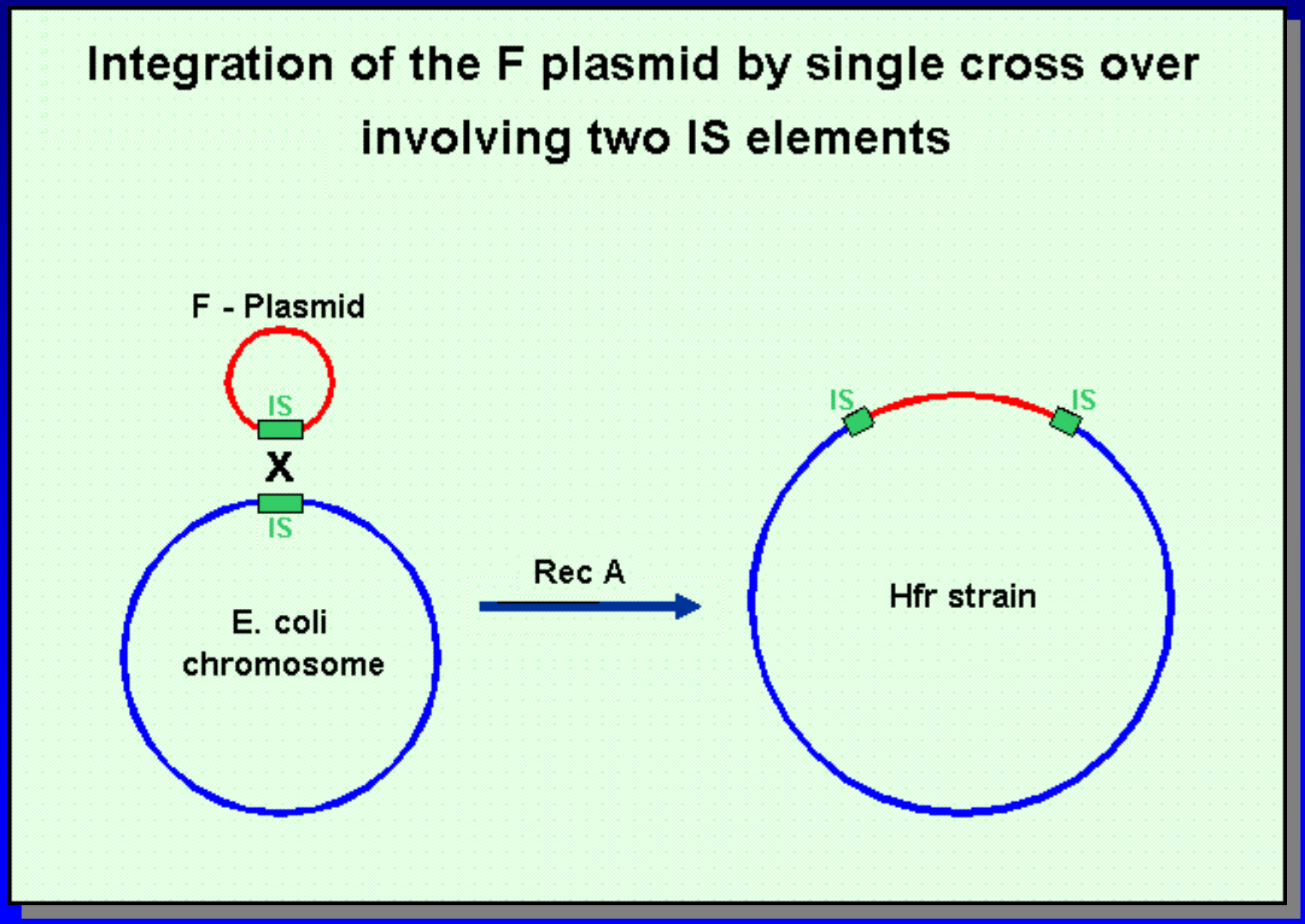
- Tra$^+$Mob$^+$: konjugativ und mobilisierbar
- Tra$^-$Mob$^+$: nicht-konjugativ
  mobilisierbar
  (durch Tra-Gene eines zweiten Plasmids)
  (intakte nic/bom-Region)
- Tra$^-$Mob$^-$: nicht-konjugativ und nicht-mobilisierbar
  (nic/bom-Region muss deletiert sein!)

Das F-Plasmid

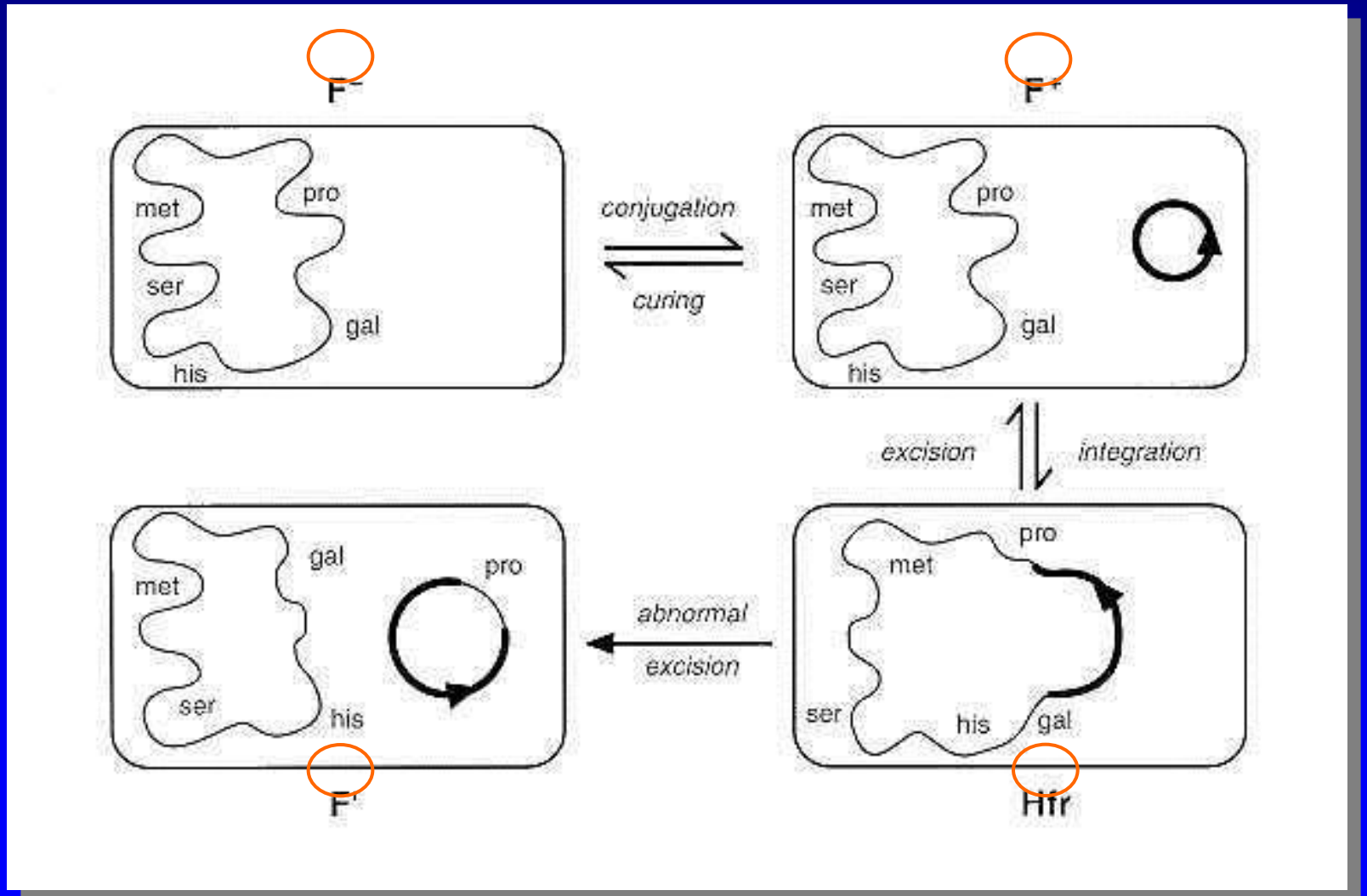


ca. 100 kb
1-2 Kop./Zelle

Das F-Plasmid kann ins Genom integrieren



Zustandsformen von Bakterienzellen in Abhängigkeit vom F-Plasmid



Warum ist die Genkarte von *E.coli* in Minuten eingeteilt?

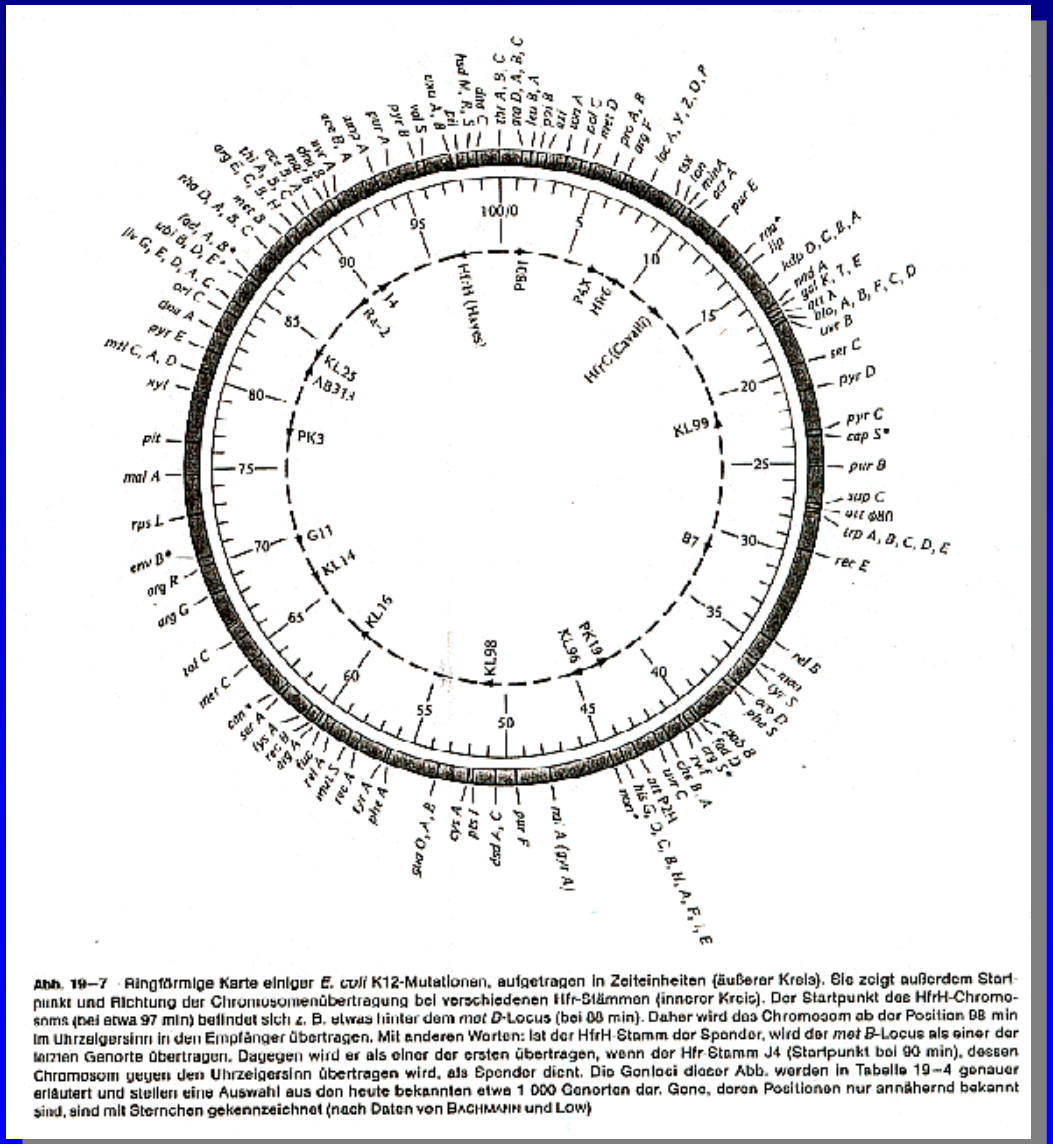


Abb. 19–7 Ringförmige Karte einiger *E. coli* K12-Mutationen, aufgetragen in Zeiteinheiten (äußerer Kreis). Sie zeigt außerdem Startpunkt und Richtung der Chromosomenübertragung bei verschiedenen Hfr-Stämmen (innerer Kreis). Der Startpunkt des HfrH-Chromosoms (bei etwa 97 min) befindet sich z. B. etwas hinter dem *met B*-Locus (bei 98 min). Daher wird das Chromosom ab der Position 98 min im Uhrzeigersinn in den Empfänger übertragen. Mit anderen Worten: Ist der HfrH-Stamm der Spender, wird der *met B*-Locus als einer der letzten Genorte übertragen. Dagegen wird er als einer der ersten übertragen, wenn der Hfr Stamm J4 (Startpunkt bei 90 min), dessen Chromosom gegen den Uhrzeigersinn übertragen wird, als Spender dient. Die Genloci dieser Abb. werden in Tabelle 19–4 genauer erläutert und stellen eine Auswahl aus den heute bekannten etwa 1 000 Genorten dar. Gene, deren Positionen nur annähernd bekannt sind, sind mit Sternchen gekennzeichnet (nach Daten von BACHMANN und LOW)

Wollman, Jacob 1955: „interrupted mating"-Experiment

Hfr (A^+, B^+, C^+, D^+) X F^- (A^-, B^-, C^-, D^-)

Nach 10 min	>	F^- (A^+, B^-, C^-, D^-)
Nach 15 min	>	F^- (A^+, B^+, C^-, D^-)
Nach 20 min	>	F^- (A^+, B^+, C^-, D^+)
Nach 25 min	>	F^- (A^+, B^+, C^+, D^+)

Resultierende Genkarte: A - B - D - C

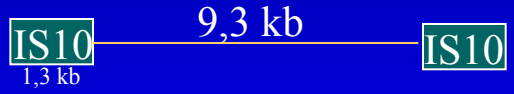
Pro 1 min = 30 000 bp übertragen

Resistenztransferfaktoren (RTF, R-Plasmide)

- konjugativ
- Resistenzgene auf Transposons liegend:

> Amp^r Tn3

> Tet^r Tn10



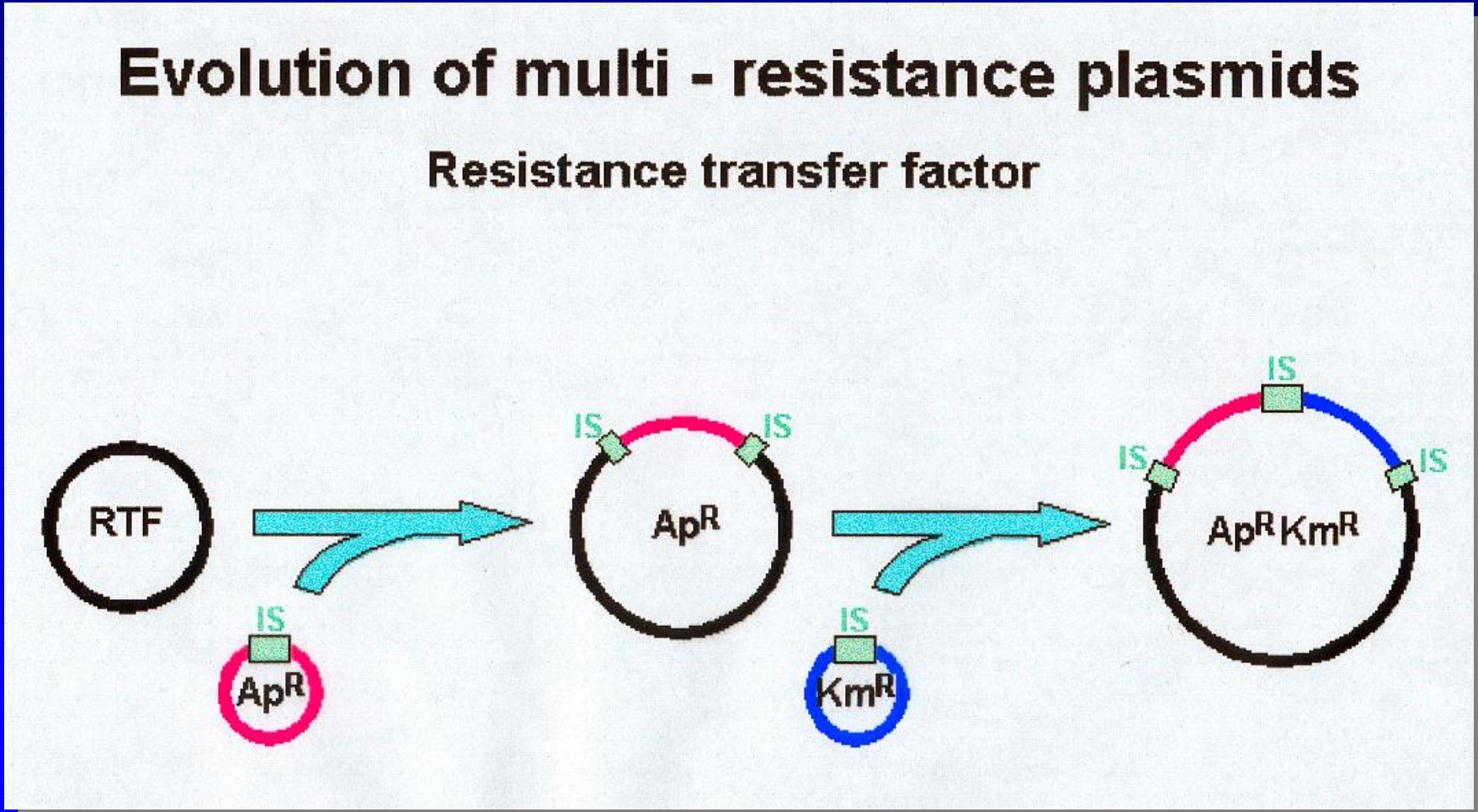
> Kan^r Tn5

Resistenzen können auf andere Plasmide und ins Wirtsgenom springen, sowie konjugativ weitergegeben werden.

TABLE 2.1 Antibiotics and antibiotic-resistance genes are important tools in applied Molecular Genetics

Antibiotic	Mode of action	Resistance gene	Application
Ampicillin	Inhibits cell wall synthesis by disrupting peptidoglycan cross-linking	β-Lactamase (*amp*^{r}) gene product is secreted and hydrolyzes ampicillin	*amp*^{r} gene is included on plasmid vectors as a positive selection marker
Tetracycline	Inhibits binding of aminoacyl tRNA to the 30S ribosomal subunit	*tet*^{r} gene product is membrane bound and prevents tetracycline accumulation by an efflux mechanism	*tet*^{r} gene is a positive selection marker on some plasmids (e.g., pBR322, F′ derivatives)
Kanamycin	Inactivates translation by interfering with ribosome function	Neomycin or aminoglycoside phosphotransferase (*neo*^{r}) gene product inactivates kanamycin by phosphorylation	*neo*^{r} gene is a positive selection marker on plasmids commonly used in eukaryotic molecular genetics
Bleomycin	Inhibits DNA and RNA synthesis by binding to DNA	The *bla*^{r} gene product binds to bleomycin and prevents it from binding to DNA	*bla*^{r} gene is a positive selection marker on plasmids and also used as a marker in eukaryotic cells (*zeo*)
Hygromycin B	Inhibits translation in prokaryotes and eukaryotes by interfering with ribosome translocation	Hygromycin-B-phosphotransferase (*hph* or *hyg*^{r}) gene product inactivates hygromycin B by phosphorylation	*hyg*^{r} gene is used as a positive selection marker in eukaryotic cells that are sensitive to hygromycin B
Chloramphenicol	Binds to the 50S ribosomal subunit and inhibits translation	Chloramphenicol acetyl transferase (*CAT* or *CM*^{r}) gene product metabolizes chloramphenicol in the presence of acetyl CoA	*CAT/CM*^{r} gene is used as a selectable marker, and as transcriptional reporter gene of promoter activity in eukaryotic cells

Entstehung von Multiresistenzen



Der Replikationsursprung bestimmt die intrazelluläre Kopienzahl

TABLE 1-1 Replicons Carried by Plasmid Vectors

PLASMID	REPLICON	COPY NUMBER	REFERENCES
pBR322	pMB1	15–20	Bolivar et al. (1977b)
pUC	modified form of pMB1	500–700	Vieira and Messing (1982, 1987); Messing (1983); Lin-Chao et al. (1992)
pMOB45	pKN402	15–118	Bittner and Vapnek (1981)
pACYC	p15A	18–22	Chang and Cohen (1978)
pSC101	pSC101	~5	Stoker et al. (1982)
colE1	colE1	15–20	Kahn et al. (1979)

Stringente Kontrolle > niedrige Kopiezahl
Relaxierte Kontrolle > hohe Kopiezahl

Klassifikation von Plasmiden

• hohes MW *z. B. F, RTF*	konjugativ	stringente Kontrolle
• niedriges MW *z. B. ColE1*	nicht-konjugativ	relaxierte Kontrolle

Table 4.1–1. Properties of some naturally occurring plasmids.

Plasmid	Size (Dalton)	Size (kb)	Conjugative	Copy-number	Amplifiable	Selectable markers	References
ColE1	4.2×10^6	7	–	10–15	+	$E1^{imm*}$	1
RSF1030	5.6×10^6	9.3	–	20–40	+	Ap^r	2,3
CloDF13	6.0×10^6	10	–	10	+	$DF13^{imm*}$	3
pSC101	5.8×10^6	9.7	–	1– 2	–	Tc^r	3
R6K	25×10^6	42	+	10–40	–	Ap^rSm^r	1
F	62×10^6	103	+	1– 2	–	–	1
R1	65×10^6	108	+	1– 2	–	$Ap^rCm^rSn^r$ $Sn^rSm^rKm^r$	3
RK2 (RP4; RP1)	38×10^6	56.4	+	3– 5	–	$Ap^rKm^rTc^r$	1,2

* Cells containing plasmids ColE1 or CloDF13 produce so-called immunity proteins (imm) which protect agai lethal effects of the homologous but not the heterologous colicin. Plasmids pSC101 and R6K represent exceptio from the rule according to which plasmids with high copy numbers are non-conjugative and of low molecul weight while low copy number plasmids are conjugative and of high molecular weight. Abbreviations: Ap ampicillin; Sm = streptomycin; Tc = tetracyclin; Cm = chloramphenicol; Sn = sulfonamide; Km = kanamyci

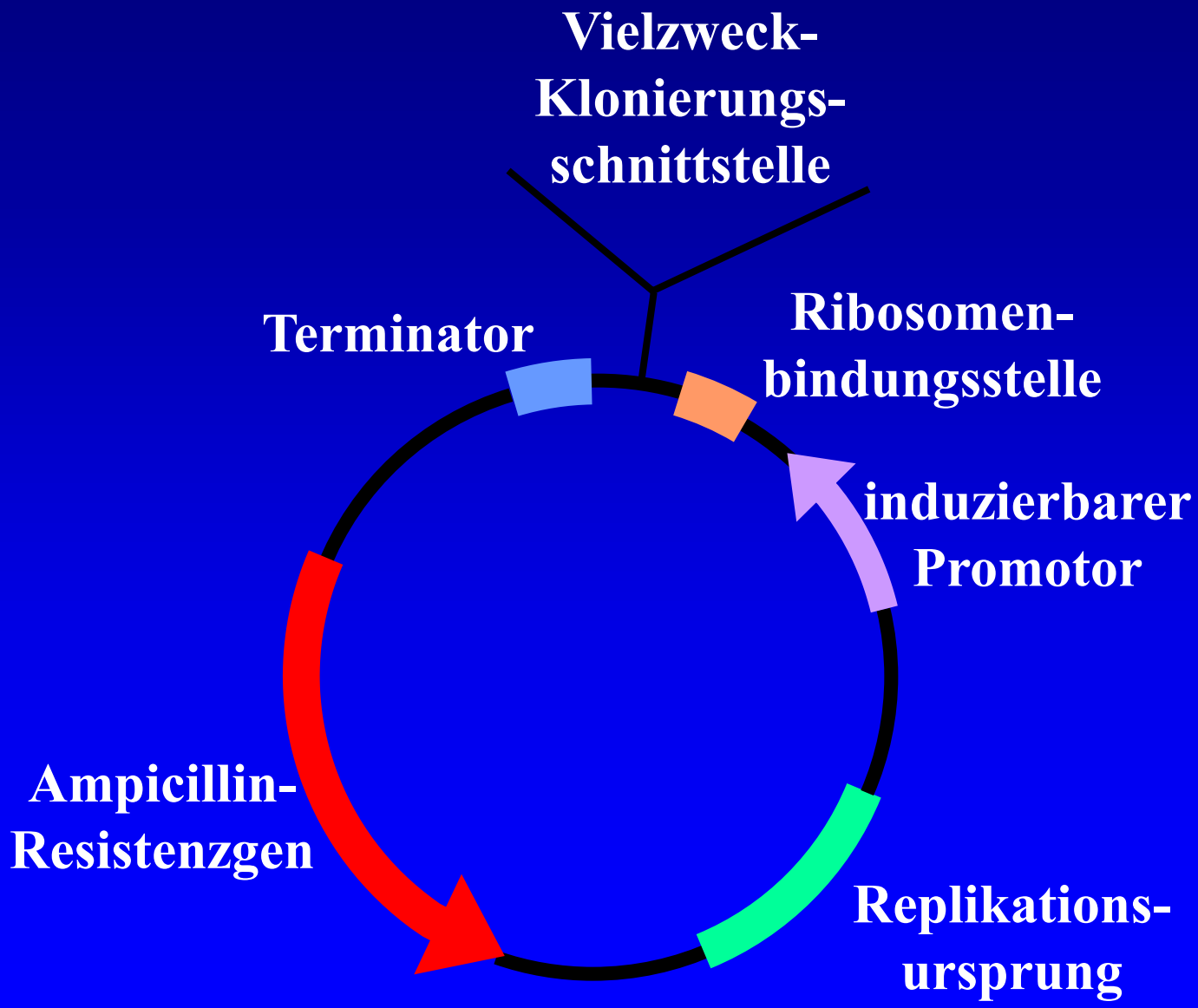
References: 1 = Kahn *et al.* 1979; 2 = Thomas, 1981; 3 = Helinski, 1979.

Plasmide als Vektoren in der Gentechnologie

Ein Plasmid-Vektor in der Gentechnologie braucht:

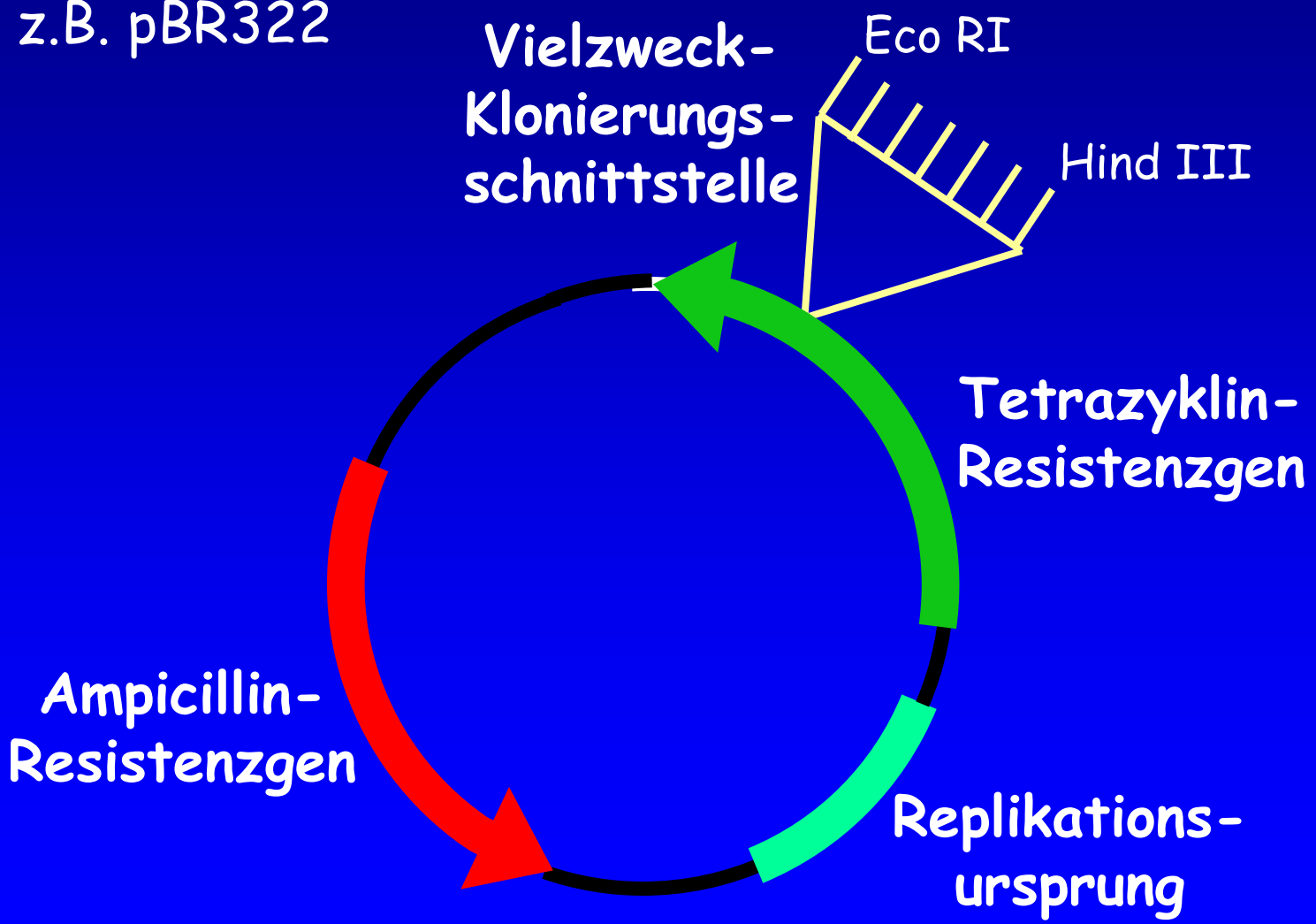
- einen „high copy number"-Replikations-Origin
- nur einmal pro Vektor vorhandene Restriktions-schnittstellen zum Einfügen der Fremd-DNA
- Markergene zum Erkennen,
  (1) ob der Vektor in die Bakterienzelle aufgenommen ist
  (2) ob der Vektor eine Fremd-DNA trägt
  („Doppelselektion")
- möglichst geringes Molekulargewicht

E. coli-Expressionsvektor



Beispiel eines Plasmidvektors mit 2 Antibiotikaresistenz-Markergenen

z.B. pBR322



Neukombination und Klonierung von DNA