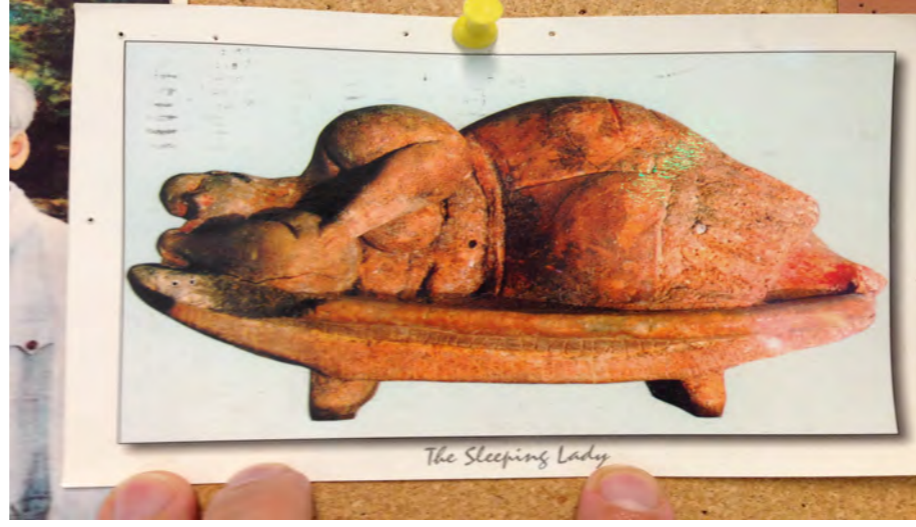


Mobile DNA / Transposition Group



Frank Schillings, betreut von Malgorzata Anna Dalda

Intro

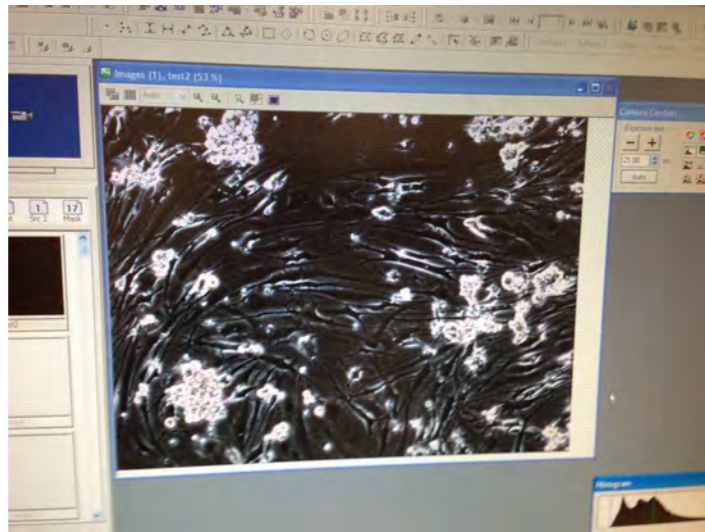
Die Arbeitsgruppe beschäftigt sich mit der Transfektion (Einbringen von Fremd-DNA oder RNA in eukaryotische Zellen) und Transformation. Hierbei bedient sich die Gruppe eines künstlich modifizierten Transposons, welches vor über 14 Jahren von Dr. Ivics und Dr. Izsvak aus seinem „Dornrösschenschlaf“ erweckt wurde und in Anlehnung an Grimms Märchen auf „sleeping beauty“ getauft wurde. Sie isolierten dieses Molekül aus Fischtransposons, die vermutlich vor über 20 Millionen Jahren aktiv gewesen waren. Die Einsatzmöglichkeiten sind revolutionär, da sich mit Hilfe des Moleküls große Chancen bezüglich der Gentherapie eröffnen. Es können hiermit Gene sogar in Stammzellen und Vorläuferzellen eingebracht werden, die dann stabil in die DNA eingebaut werden und dies wesentlich sicherer als bei viralen Vektoren. Aus diesem Grund wurde „sleeping beauty“ im Jahre 2009 von der ISMCBBPR (International Society for Molecular and Cell Biology and Biotechnology Protocols and Researches) zum Molekül des Jahres gekürt.

Methoden

Hierbei wurde mir die Gelegenheit eröffnet, die Versuchsansätze einer Ligation vorzubereiten (siehe Abb.1) bei der ein Transposon tragendes Plasmid mit einem Gen verbunden wurde, welches für die Expression einer shRNA (small hairpin RNA) sorgt, deren Name in der ausgebildeten Haarnadelstruktur begründet liegt.



(Abb.1: Vorbereiten einer Ligation)



(Abb.2: Fluoreszenzmikroskopieaufnahme von Spermatozoen in einem Nährmedium mit Fibroblasten, welche einen positiven Einfluss auf das Wachstum der Zellkulturen haben)

shRNA ist ein hervorragender Vermittler einer RNA-Interferenz (RNAi), bei der Gene künstlich stillgelegt werden können. Die pre-shRNA wird aus dem Kern ins Cytoplasma transportiert, vom Enzym Dicer weiterprozessiert und auf den RNA-induzierten Silencing-Komplex (RISC) geladen. Im Falle einer perfekten Komplementarität zur mRNA schneidet RISC die mRNA, im Falle unvollständiger Komplementarität verhindert RISC die Translation der mRNA. In beiden Fällen wird das Gen durch Verhinderung seiner Expression stillgelegt.

In der vorliegenden Versuchsreihe durfte ich den geplanten Versuchsansatz mit vorher berechneten Volumina mischen und konnte meine Erfahrungen im Umgang mit Mikropipetten erweitern.

Bei gelungener Ligation schließlich sollen die resultierenden Genotypen in E.coli kloniert werden und auf phänotypische Auswirkungen untersucht werden. Langfristig sollen die Chancen des Einsatzes derartiger „gene knockdowns“ in der Gentherapie untersucht werden. Andere Mitglieder der Arbeitsgruppe beschäftigen sich daher mit dem Ausschalten von Genen in Stammzellen, so z.B. in Spermatozoen von Ratten. Die resultierenden Phänotypen können nach Befruchtung und Geburt auf entsprechende Auswirkungen untersucht werden, welche gegebenenfalls Rückschlüsse auf die Funktion des veränderten Gens ermöglichen.

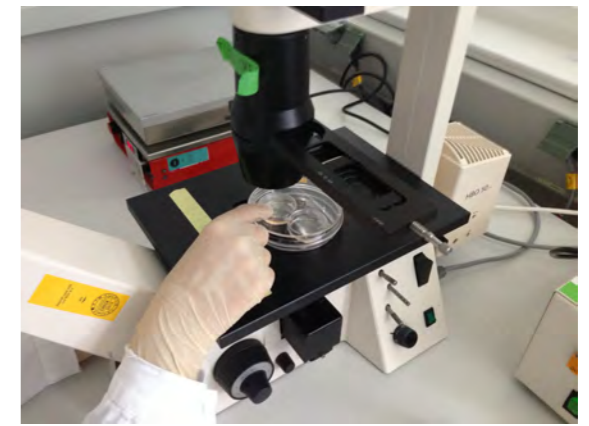
Weitere Forschungsschwerpunkte liegen in dieser Gruppe auf induzierten pluripotenten Stammzellen und dem Umprogrammieren von Leberzellen in Beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse. Diese produzieren in den Langerhans-Inseln der Bauchspeicheldrüse das lebenswichtige Hormon Insulin. Die Chancen für Diabetespatienten bei erfolgreicher Forschung wären verlockend. Chancen für eine Gentherapie tödlicher Erkrankungen wie Muskeldystrophie oder Herzmuskelinsuffizienz werden ebenfalls untersucht.

Ergebnisse/Diskussion

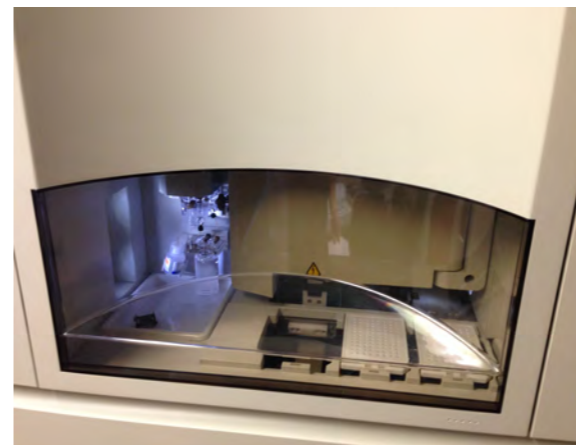
Während der beiden Tage im MDC hatte ich die Möglichkeit, aktuelle Forschungsschwerpunkte der Molekularmedizin kennen zu lernen.

Sämtliche gentechnische Methoden, die im Schulalltag leider häufig nur modellhaft besprochen werden können, konnte ich bei der Anwendung im Zuge der erwähnten Projekte hautnah miterleben.

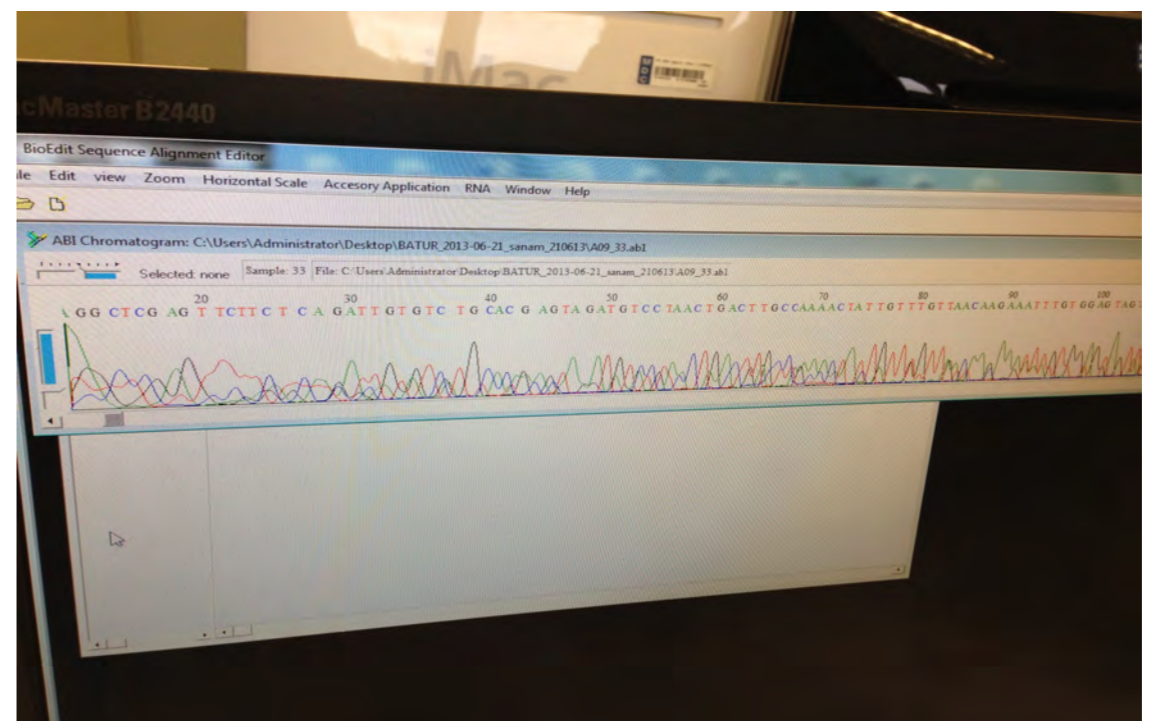
So kamen typische, im Unterricht obligatorisch zu besprechende, Methoden nahezu täglich zur Anwendung wie Gelelektrophorese, Southern blotting, Western Blotting, PCR, Ligation, Klonierung, Transfektion, Transformation, Sequenzierung, Kultivierung von Stammzelllinien. Besonders interessant war hierbei deren praktische Anwendung und mögliche Variationen der Versuchsmethodik, aufgrund höherer Effizienz, kennenzulernen.



(Abb.3 + 4: Kultivierung von Zellkulturen unter sterilen Bedingungen)



(Abb.5: Sequenzierer)



(Abb.6: Ergebnis einer Sequenzanalyse)