

Kapitel 08.17: Gentechnik



Bakterien wachsen auf einer Agarplatte - bebrütet 3 Tage im Brutschrank bei 26°C.
Jeder Punkt entspricht dabei einer Kultur, die in der Regel auf eine einzige Bakterie zurückgeht!

Inhalt

Kapitel 08.17: Gentechnik.....	1
Inhalt.....	2
Was ist Gentechnik?.....	4
Aspekte der Gentechnologie.....	5
Die „Farbenlehre“ der Gentechnik:.....	5
Werkzeuge der Genetiker I: Bakterien.....	6
Aufbau eines Bakteriums (=Procyte).....	6
Kultur von Bakterien.....	7
Ansetzen einer Bakterienkultur von Escherichia coli:.....	7
Vorteile der Bakterien als gentechnisches Werkzeug:.....	8
Berechnung der Bakterienzahl.....	8
Wachstumskurve von Bakterien.....	9
Folie: Vermehrung der Bakterien.....	10
Antibiotika.....	11
Werkzeuge der Genetiker II: Viren.....	12
Kennzeichen von Viren.....	12
Bau eines Bakteriophagen.....	12
Nachweis von Phagen:.....	13
Weitere Informationen:.....	13
Bestimmung des Titers durch eine Verdünnungsreihe.....	13
Was sind Viren?.....	14
Aufbau der Viren.....	14
Beim Menschen kennt man bisher fünf Retroviren:.....	15
Vermehrung der Viren:.....	15
Systematik der häufigsten Viren.....	16
Entwicklung und Vermehrung von Bakteriophagen.....	17
a) Lytischer Vermehrungszyklus.....	17
Die lytische Vermehrung im Detail:.....	17
b) Lysogener Vermehrungszyklus.....	19
Ablauf des lysogenen Zyklus' im Detail:.....	19
Zur Geschichte der Gentechnik und der Entdeckung der DNA.....	20
1928 - Erste Versuche von Frederick Griffith:.....	20
Streptococcus pneumoniae - ein Erreger der Lungenentzündung.....	21
Entdeckung des Genaustausches: 1944 - Die Transformationsversuche von Avery.....	22
Übersicht: Averys Transformationsversuche.....	23
Genaustausch durch parasexuelle Vorgänge bei Bakterien.....	24
Informationen zum Thema Penicillin.....	24
Parasexualität.....	25
Austausch von Erbgut bei Mikroorganismen I: Konjugation.....	26
Konjugation (1946 Lederberg/Tatum).....	26
Voraussetzung für die Konjugation.....	27
1. Plasmidübertragung in einer Konjugation.....	28
Hfr-Konjugation.....	29
Konjugation mit hfr-Stämmen.....	30
Übungsaufgabe: Konjugation mit hfr-Stämmen.....	31
Bakterienresistenz und die Weitergabe der Resistenzgene.....	32
Austausch von Erbgut bei Mikroorganismen II: Transduktion (Viren übertragen bakterielles Erbgut).....	33
1. Allgemeine Transduktion - bei virulenten Viren (lytisch).....	33
2. Spezielle Transduktion – bei temeperenten Viren (lysogen).....	34
Austausch von Erbgut bei Mikroorganismen III: Genaustausch zwischen Viren.....	35
Bedeutung des Genaustausches bei Viren.....	36
2. Schematische Übersicht zur Bedeutung von parasexuellen Vorgängen.....	37
Zwei Arten des Einbaus von Plasmidgenen.....	38
Transduktion: Gentransfer durch Bakteriophagen.....	39
Einsatz von Phagen:.....	39
Angriff der Bakteriophagen.....	41

Werkzeuge der Gentechnik: Restriktionsenzyme als „genetische Scheren“.....	42
Wichtige Eigenschaften von Restriktionsenzymen.....	42
Benennung von Restriktionsenzymen am Beispiel von EcoR1:.....	43
Werkzeuge der Gentechnik: DNA-Methylasen - wichtige Schutzenzyme.....	44
Exkurs: Was ist ein Palindrom?.....	45
Wortpalindrome:.....	45
Sätze:.....	45
Palindrome dienen der Gentechnik als Erkennungsstellen.....	46
Werkzeuge der Gentechnik: Vektoren.....	47
Biologische Bedeutung von Plasmid-Vektoren:.....	48
Gen austausch bei Bakterien und Viren.....	49
Herstellung rekombinanter DNA.....	50
Zusammenfassung: Herstellung rekombinanter DNA.....	51
Selektion und Klonierung biochemisch rekombinanter DNA.....	52
Die Transformationsversuche von Avery.....	52
Das Problem bei der Transformation:.....	53
Vermehrung und Selektion der Bakterien auf Nährböden.....	53
Antibiotikaresistenz durch Mutation.....	54
Antibiotikaresistenzen.....	55
Beschleunigung Zunahme der Resistenzen durch vermehrten Antibiotika-Einsatz.....	55
Gentechnik in der Medizin: Selektion von Bakterien.....	56
Selektion von Antibiotika-Resistenzmutanten:.....	56
Stempeltechnik bei Mangelmutanten.....	57
Selektion von Aminosäure-Mangelmutanten.....	58
Wiederholung: Transformation (<i>Griffith / Avery</i>).....	59
Molekulargenetische Deutung der Transformation:.....	59
Anwendung der Gentechnik: 1. Gentechnisch erzeugte Herbizidresistenz bei Mais und Raps.....	60
a) Streptomyceten schützen sich vor Konkurrenz:.....	60
b) Wie schützen sich Streptomyceten vor Selbstvergiftung?.....	61
Anwendung der Gentechnik: 2. Wie bekommt man Gene in Pflanzen oder Tiere?.....	62
Arbeitsschritte zur Fremdgenübertragung und Genproduktgewinnung.....	63
1. Gewinnung von normalen Plasmiden.....	63
2. Genbereitstellung.....	63
3. Anfügen von Verbindungsstücken ans Fremdgen.....	63
4. Integration des Fremdgens in einem Hybridplasmid.....	63
5. Transformierung von Bakterien durch Einschleusen des Hybrid-Plasmids.....	63
6. Genklonierung.....	63
7. Analyse: Auffinden der plasmidhaltigen Bakterien mit Fremdgen.....	63
8. Gen-Expression.....	63

Was ist Gentechnik?

Gentechnik hat einen schlechten Ruf. Kürzlich erreichte mich erst wieder eine Mail, ob ich nicht gegen Gentechnik eine Unterschrift leisten wolle, denn die sei ja böse.

Leider gibt es bei vielen Menschen (oft mit Halbwissen ausgestattet) keine klare Abgrenzung des Begriffes „Gentechnik“. Während für einige Gentechnik gleich PID oder Clonebabys bedeutet, so sieht ein Lebensmittelkonsument vielleicht eher Genmais oder Genraps als Gentechnik an.

Tatsächlich gibt es viele Bereiche der Gentechnik, welche für Menschen eine unterschiedliche Bedeutung haben. In der Medizin ist sie sehr nützlich, da durch sie z.B. Medikamente wie Insulin hergestellt werden, Antibiotika getestet und verbessert werden, Impfstoffe produziert werden, virale Seuchen wie Ebola verstanden und bekämpft werden können, Erdöl nach Katastrophen bakteriell abgebaut werden kann, usw.

Eine etwas differenziertere Sichtweise wäre also bei einem solch umstrittenem Thema angebracht:

Durch Gentechnik werden mithilfe biotechnologischer Verfahren gezielte Eingriffe in das Erbgut vorgenommen. Ziel ist, so die biochemischen Steuerungsvorgänge von Lebewesen bzw. viraler Genome zu verändern.

Unter Gentechnik versteht man die gezielte Neukombination von DNA und somit gezielte Eingriffe in das Erbgut und damit in die biochemischen Steuerungsvorgänge von Lebewesen.

Das Grundprinzip dabei ist, zellfremde Erbinformationen in eine Zelle einzuschleusen und diese in den Zellkern und somit in die DNA einzubauen. Als Folge wird die Zelle durch ihre eigene Proteinbiosynthese einen ihr fremden Stoff, entsprechend der eingefügten Erbinformationen, produzieren.

Diese Aufnahme von genetischem Material durch eine Zelle nennt man Transformation.

Zellen und Organismen, welche auf diese Weise artfremdes Erbgut erhalten haben, nennt man transgene Organismen.

Für die Bildung transgener Organismen braucht man:

- molekulare „Scheren“, welche den DNA-Doppelstrang spezifisch (an vorher festgelegten Stellen) schneiden können (=Restriktionsenzyme)
- ein Transportmittel zur Übertragung der Spender-DNA in die neue Zelle (=Vektoren)
- ein genaues Wissen über die verwendete und bearbeitete DNA (=> Sequenzanalyse der DNA bzw. RNA)

Aspekte der Gentechnologie

Alle heutigen grundlegenden Erkenntnisse wurden an Bakterien und Viren gewonnen. Da dies nur einen kleinen Teil des biologischen Genpools darstellt, ist es ein „genetisch“ überschaubarer Bereich.

Bei höheren Organismen gilt:

- Sie sind viel komplexer gebaut.
- Ihre Zellen sind differenzierter (auf spezielle Aufgaben hin spezialisierter ausgebildet).
- Die DNA von höheren Organismen ist komplexer und länger (meterlang!).
=> Chromatin im Interphasenkern, Chromosomen in Teilungsform.
- Sie haben eine lange Generationsdauer (z.B. Mensch 30 Jahre).
- Sie haben im Vergleich zu Bakterien eine geringere Nachkommenzahl!
Das erklärt z.B. (die bei nur 2-4 Nachkommen) geringe Aussagekraft für Auftreten einer Mutation.

=> Bei höheren Organismen ist die Analyse des genetischen Materials schwieriger!

Ab den 1970er Jahren fand man viele neue genetische Arbeitsmethoden und Untersuchungsverfahren. Erst von da an sprach man von Gentechnik!

Die „Farbenlehre“ der Gentechnik:

- rote Gentechnik => Schwerpunkt Medizin/Humanmedizin
- blaue Gentechnik => Schwerpunkt Meeresbiologie und Fischzucht
- grüne Gentechnik => Schwerpunkt Landwirtschaft und die Nahrungsmittel
- graue Gentechnik => umweltrelevante Gentechnik

Aufgaben:

1. Wo findet im biologischen Organismus die eigentliche Neukombination von DNA statt?
=> Rekombination bei Eukaryonten in der Meiose, Befruchtung => rekombinante DNA

Zusatzinformationen:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Gentechnik>

Werkzeuge der Genetiker I: Bakterien

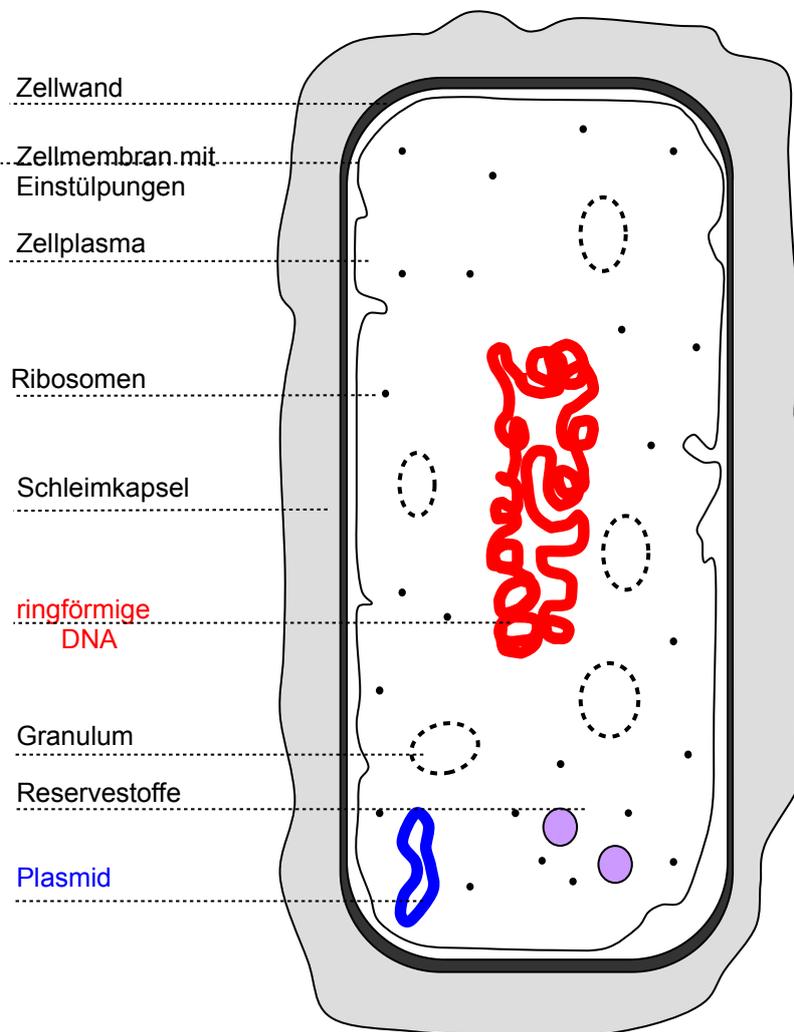
Bitte lese zuerst das Kapitel: **7.01 Bakterien und Milchprodukte**.

Es gibt viele Typen von Mikroorganismen. Die bekanntesten sind Bakterien (Zellwand u.a. aus Murein) und Viren (keine Lebewesen, Erbgut mit Capsid als Hülle).

Weiterhin gibt es noch:

- ein- und mehrzellige Pilze (Merkmal: Zellwand aus Chitin, mehrere Zellkerne pro Zelle!)
- Verwandt mit den Bakterien sind die stammesgeschichtlich älteren Cyanobakterien.
- die vermutlich ältesten Einzeller: Archaeen (wurden früher auch Archaeobakterien oder Urbakterien genannt).

Aufbau eines Bakteriums (=Protocyte)



Kultur von Bakterien

- häufig verwendetes Bakterium: Escherichia coli (oft E. Coli abgekürzt)
- fester Nährboden (Agar-Agar): kleine häufchenförmige Kolonien
- flüssige Nährlösung: Trübung
- jeweils enthalten: Nährstoffe + Mineralsalze + Wasser

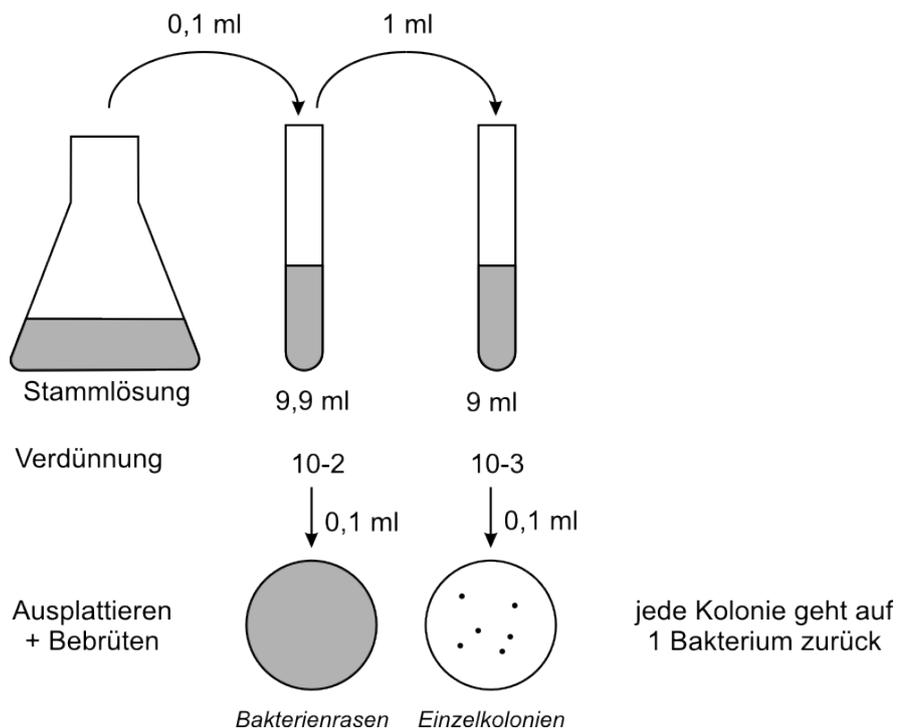
Ansetzen einer Bakterienkultur von Escherichia coli:

Eine einfache Möglichkeit ist die sogenannte Übernachtskultur: Dazu wird eine Nährlösung (z.B. Milch oder auch eine einfache Nährlösung, welche Zucker, Wasser, eine Stickstoffquelle wie Ammonium (NH_4^+) und Mineralsalze enthält) bzw. eine Agarplatte mit Bakterien angeimpft (also Bakterien werden in kleiner Anzahl zugefügt) und dann ca. 12 Stunden bei 37°C im Brutschrank vermehrt. Da dies in Laboren oft nachts geschieht, schließlich braucht beim Wachsen der Bakterien niemand anwesend sein, hat sich der Begriff „Übernachtskultur“ etabliert. Am nächsten Morgen hat man dann eine Stammlösung in der sich Bakterien in Suspension im flüssigen Nährmedium befinden.

Damit nicht ein durchgängiger (unkontrollierbarer) Bakterienrasen entsteht, wird für alle folgenden Versuche immer eine Verdünnungsreihe der Bakterien-Stammlösung verwendet. Übliche Verdünnungsreihen sind:

Stammlösung einer Übernachtskultur \rightarrow 1:100 \rightarrow 1:100 (bei Bedarf: \rightarrow 1:100). Die jeweiligen entnommenen Lösungen kann man dann auf neuen Agarplatten erneut bebrüten, bis man einzelne Kolonien als Ergebnis hat. Jede Kolonie geht dabei auf ein Gründerbakterium zurück.

Bakterienkultur - Bakterientiter



Möchte man nun die Anzahl der Bakterien bestimmen, kann man dies durch eine Hochrechnung erreichen. Dabei gibt der **Bakterientiter** die Bakterienzahl / ml Nährlösung an. Der Bakterientiter gibt dabei die Anzahl an Bakterien pro cm^3 an. Die Verdünnung muss dabei aber berücksichtigt werden.

Vorteile der Bakterien als gentechnisches Werkzeug:

- einfache Organisation
- hohe Vermehrungsrate
- große Individuenzahl
- überschaubares Genom (+ Plasmide = extrachromosomale DNA)
- haploid => ein neues Gen ist sofort im Phänotyp erkennbar!

Nachteile:

- sehr klein
- Phänotyp nicht direkt zu ermitteln

Berechnung der Bakterienzahl

Möchte man nun die Anzahl der Bakterien bestimmen, kann man dies durch eine Hochrechnung erreichen. Dabei gibt der **Bakterientiter** die Bakterienzahl / ml Nährlösung an. Der Bakterientiter gibt dabei die Anzahl an Bakterien pro cm^3 an. Die Verdünnung muss dabei aber berücksichtigt werden.

Bei z.B. 6 Kolonien pro cm^3 :

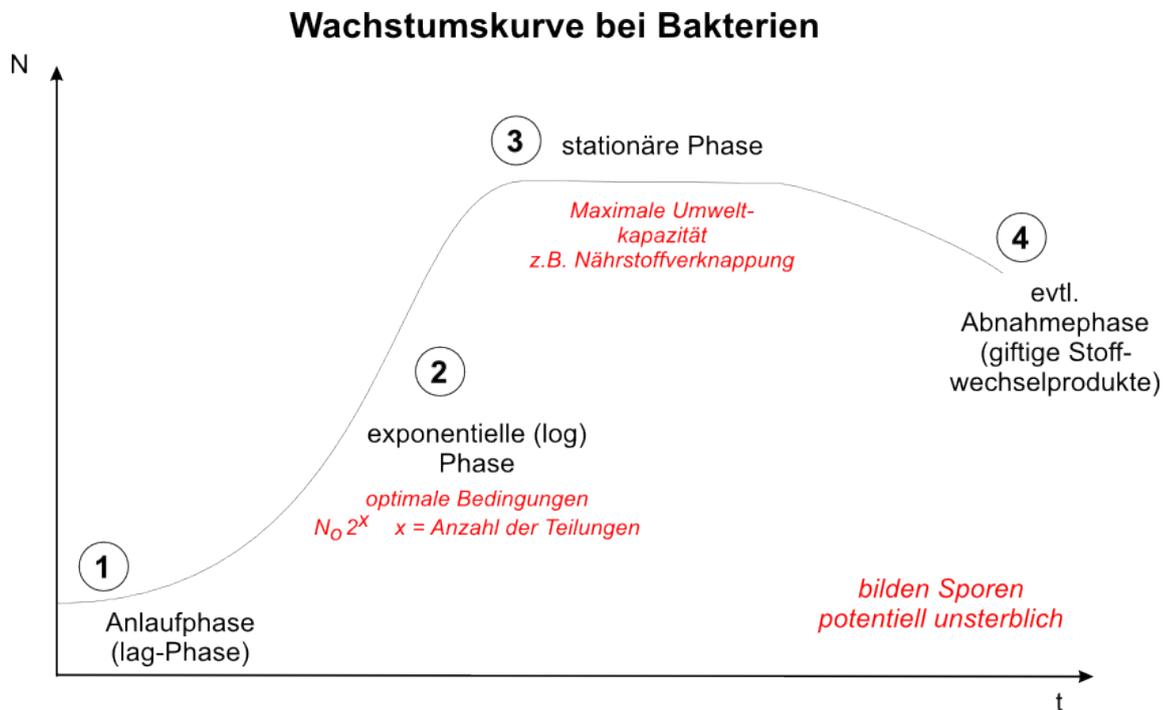
$$6 \cdot 10^3 \text{ (da Verdünnung } 1:10^3) \cdot 10 \text{ (da Entnahme } 0,1\text{ml)} = \underline{\underline{6 \cdot 10^4 \text{ Bakterien/ml}}}$$

In Nährlösungen kann der Titer aber auch durchaus bei Werten um $1 \cdot 10^9$ Bakterien/ml liegen. Das entspricht dann ca. 1/8 der menschlichen Erdbevölkerung!

Lebendzahl: Verdünnungsreihe mit Übernachtkultur => Plattentest (Kolonienzähltest)

Wachstumskurve von Bakterien

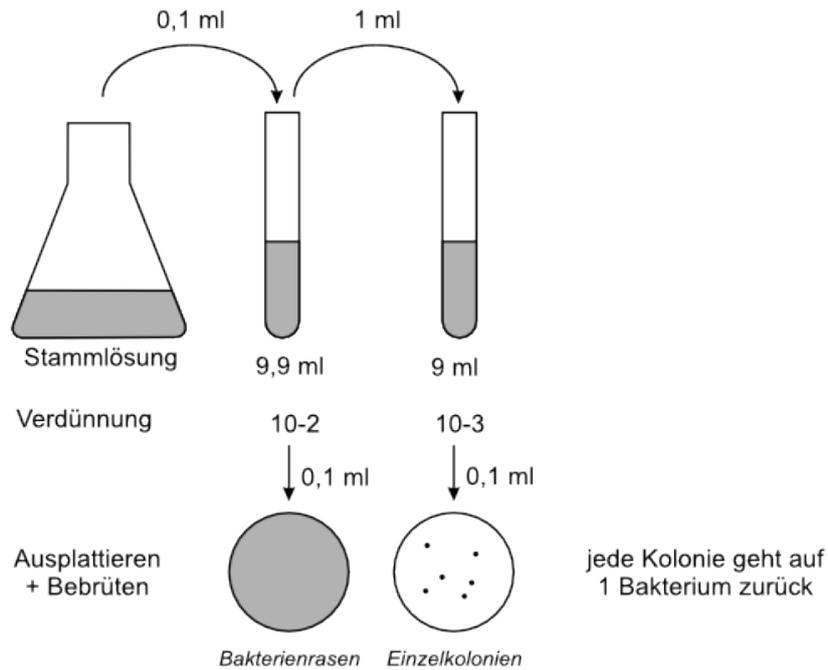
Unter optimalen Bedingungen, also mit ausreichend Wasser, Nährstoffen, Mineralstoffen, evtl. Sauerstoff und der geeigneten Temperatur, erfolgt alle 20 min. eine Zellteilung der Bakterien (bei E. coli sind es 30min!). Es liegt anfangs ein exponentielles Wachstum vor (vergleiche Kapitel 04.08 Biotische Umweltfaktoren!).



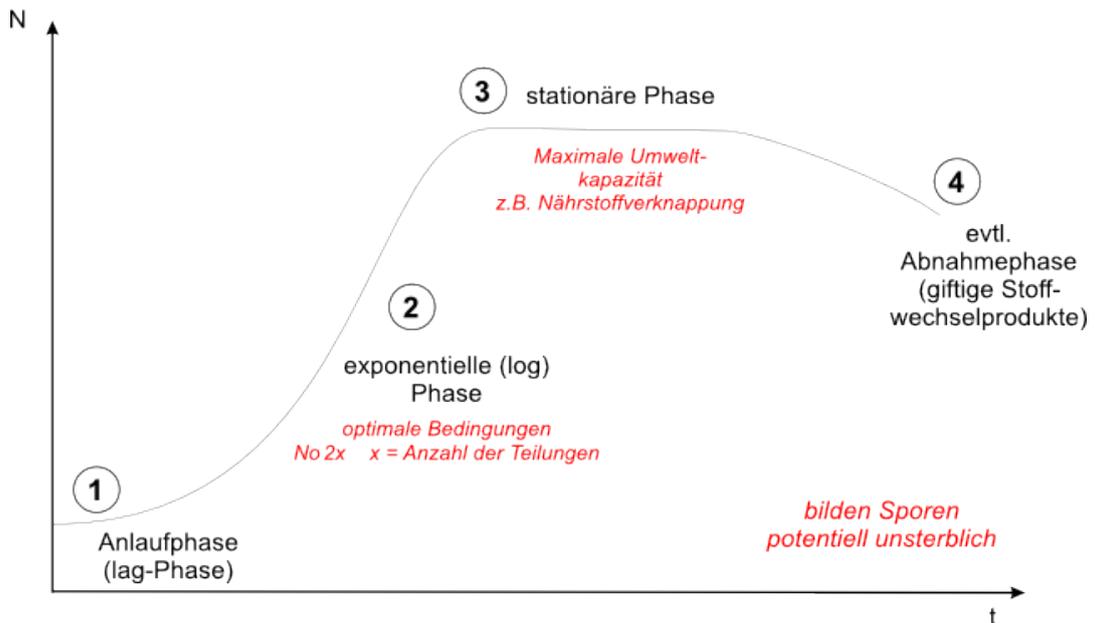
- Die stationäre Phase ist der Zustand in dem sich stabile Ökosysteme befinden. Es kommt hier zwar zu Schwankungen, aber der Mittelwert (=biologisches Gleichgewicht) bleibt ziemlich konstant.
- Einige Bücher geben zwischen der exponentiellen Phase und der stationären Phase noch eine weitere an, dies ist dann die sogenannte Übergangsphase.
- Die Abnahmephase wird auch als Absterbephase bezeichnet. Sie tritt bei Nahrungsmangel oder dem Auftreten von Giften ein!
- Eine bei Bakterien übliche Größe für eine stationäre Phase kann bei einem Titer von $2 \cdot 10^9$ Bakterien/ cm^3 liegen.

Folie: Vermehrung der Bakterien

Bakterienkultur - Bakterientiter



Wachstumskurve bei Bakterien



Antibiotika

Hildegard von Bingen (1098-1179) verwendete schon Erlenwurzeln als Medizin für Entzündungswunden. Was sie nicht wusste, dass Bodenbakterien (*Streptomyces griseus*) der Gattung *Streptomyces* in Symbiose mit den Erlen leben. Diese scheiden den Stoff Streptomycin aus, der antibakteriell wirkt.

Der französische Militärarzt Ernest Duchesne schrieb seine Doktorarbeit 1893 die Bakterien abtötende Wirkung von Schimmelpilzen. Er beobachtete dazu, dass die im Militärhospital beschäftigten arabischen Stallknechte die Sättel für die Pferde in einem dunklen, feuchten Raum aufbewahrten, um die Bildung von Schimmelpilzen der Gattung *Penicillium glaucum* zu fördern. Auf diese Art und Weise heilten Scheuerwunden schneller, da sie sich nicht durch Bakterien entzündeten.

Duchesne stellte daraufhin 1896 eine Lösung aus Schimmelpilzkulturen her und injizierte sie erkrankten Meerschweinchen, welche nun schneller wieder gesund wurden.

1928 entdeckte Alexander Fleming ein weiteres Antibiotikum, welches Brotschimmel (*Penicillium natatum*) produzierte. Fleming benannte danach den Stoff „Penicillin“. Es halft gegen einen Großteil der Bakterien, aber nicht gegen alle, da es verschiedene Typen gibt.

Penicillin löst die Murein-Zellwand von Bakterien auf, sodass sie nicht mehr weiterleben oder sich vermehren können. Da nur Bakterien den Stoff Murein verwenden, hat Penicillin keine solche Wirkung auf Menschen.

1943 entdeckte man das Streptomycin (es wurde am 19. Oktober 1943 von Selman Waksman, Albert Schatz und Elizabeth Bugie an der Rutgers University isoliert). Es wirkt vor allem bei gram-negativen Erregern auf die nur bei Bakterien vorkommenden 70s Ribosomen und sorgt für Ablesefehler bei der Translation.

In den folgenden Jahren wurde weitere bakterienabtötende Substanzen gefunden. Man fasste sie mit dem Begriff „Antibiotika“ zusammen.

Die Menschheit hatte nun erstmals eine Waffe gegen die durch Bakterien ausgelösten Seuchen.

Ab den 1950 Jahren beobachteten Ärzte aber, dass immer mehr Bakterien gegen die Antibiotika resistent wurden (lat.: resistere - widerstehen, Widerstand leisten).

Zusatzinformationen:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Antibiotikum>

Werkzeuge der Genetiker II: Viren

Virus (lat.): Gift, chem. Substanz: Viren sind viel kleiner als Bakterien und im Grunde nur Erbgut, was von einer Proteinhülle umgeben ist. Sie sind keine Lebewesen und können sich nicht selbstständig vermehren. Dies muss eine von Ihnen befallene Wirtszelle erledigen, die dabei zugrunde geht. Sie können innerhalb von Zellen existieren und auch Zeiten außerhalb von Zellen überdauern.

Während nur ca. 10% aller Bakterien Krankheitserreger sind, so sind es bei Viren 100% die Krankheiten auslösen können. Allerdings sind Viren streng auf ihre Wirtszellen spezialisiert. Viren können aufgrund ihrer geringen Größe Bakterienfilter durchdringen.

Kennzeichen von Viren

- sind keine selbstständigen Lebewesen,
 - denn sie haben kein Stoffwechsel
 - sie zeigen kein Wachstum
 - sie zeigen keine aktive Bewegung
 - sie haben keine Reizbarkeit
 - sie zeigen Vererbung, aber nicht durch selbstständige Vorgänge (Vermehrung nur in Wirtszelle)
=> Viren sind schwer zu bekämpfen!
- haben einen einfachen Bau: DNA (oder RNA) + Proteinhülle
- Viren sind streng wirtsspezifisch!

Es gibt spezielle Viren für

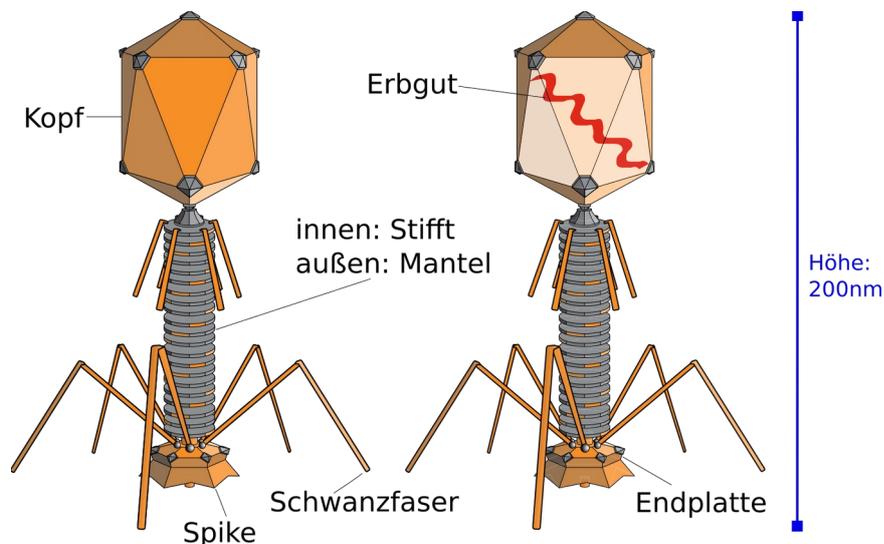
- Menschen (HIV, Grippe, Hepatitis, Röteln, Warzen uvm.)
- Tiere (Maul und Klauenseuche, Vogelgrippe, Schweinepest, Schweinegrippe, Tollwut uvm.)
- Pflanzen (Tabak-Mosaikkrankheit, Blattrollkrankheit, Vergilbungskrankheit)
- Bakterien (Bakteriophagen)

Bau eines Bakteriophagen

Phagen sind bakterienbefallende Viren. Sie sind wirtsspezifisch (so befällt die E. Coli-Phage T2 nur E. Coli-Bakterien).

Bakteriophagen (auch oft einfach nur Phagen genannt, Singular der Phage)

Es gibt verschiedene Typen von Phagen: T-Phagen (virulent), λ -Phagen (sprich: Lambda-Phagen) sind temperent.



Quelle Bild: GNU Free Documentation License, Version 1.2 & Creative Commons Attribution-Share Alike 3.0 Unported by Wikicommonsuser Adenosine (Mike Jones) - thank you. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PhageExterior.svg>; https://commons.wikimedia.org/wiki/Commons:GNU_Free_Documentation_License_1.2; <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>

Nachweis von Phagen:

Der Nachweis von Phagen gelingt mit der sogenannten Plaque-Technik:

- zunächst Vermehrung der Bakterien => eine trübe Bakteriensuspension entsteht
- Zugabe von 1 Tropfen Phagensuspension

=> Nach einigen Stunden wird die Lösung immer klarer, da eine Lyse der Bakterien durch die Phagen stattfindet! Durch die Auflösung und Zerstörung der Bakterien entsteht das Phagenlysat!

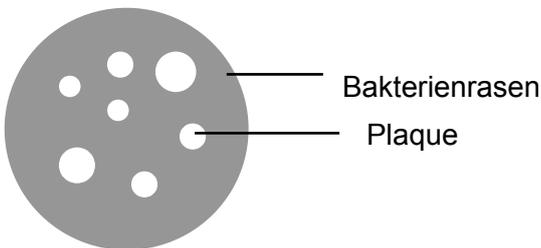
Bakteriophagen (auch oft einfach nur Phagen genannt, **Achtung: Artikel im Singular: der Phage**)

Weitere Informationen:

Als Phage bezeichnet man verschiedene Gruppen von Viren, die auf Bakterien und Archaeen als Wirtszellen spezialisiert sind. Diese Wirtsspezifität wird bei der taxonomischen Einordnung der Phagen zu Rate gezogen. Man unterscheidet also zum Beispiel Coli-, Staphylokokken-, Diphtherie- oder Salmonella-Bakteriophagen. Mit einer geschätzten Anzahl von 1030 Virionen im gesamten Meerwasser sind Phagen häufiger als jede Art von Lebewesen (Viren werden nicht zu den Lebewesen gezählt) und bilden das sogenannte Virioplankton.

Bestimmung des Titers durch eine Verdünnungsreihe

0,1 ml Phagensuspension + 0,2 ml ÜK ausplattieren und bebrüten => dichter Bakterienrasen
Gibt man nun die Phagen hinzu, entstehen durch diese „Löcher“, sogenannte „Plaques“.



Jeder Phage erzeugt aufgrund Bakterienlyse ein Loch im Bakterienrasen = Plaque

Pro Plaque war eine Bakteriophage verantwortlich:

- 7 Phagen / 0,1 ml
- Phagentiter kann mithilfe einer Verdünnungsreihe der Phagen berechnet werden.

Infektion einer Bakterienzelle

Klärung: Hershey und Chase (1952)

Versuch:

(a) Markierung der Phagen-DNA mit radioaktivem Phosphor ³²P und im Gegenversuch,

(b) Markierung der Proteinhülle mit radioaktivem Schwefel ³⁵S.

Beobachtung: Nur bei (a) „radioaktive“ Bakterien

Schlussfolgerung: Ausschließen der These, dass der ganze Phage eindringt. Nur die Phagen-DNA wird eingeschleust! Die Proteinhülle bleibt draußen!

Was sind Viren?

Für weitere Informationen bitte auch Kapitel „**07.02 Feinde des Körpers**“ lesen.

1883 fand Adolf Mayer, dass die Tabakmosaikkrankheit, eine Krankheit, bei der Tabakblätter an der lebenden Pflanze Flecken bekommen und dann oft absterben auf äußere Erreger zurückgeht. 1897 isolierte dann aus dem Pflanzensaft Martinus Beijerinck eine Flüssigkeit, die gesunde Tabakpflanzen ebenfalls erkranken ließ. Er ging von einem Gift aus und nannte es somit „Virus“.

Da Viren sehr klein sind, dauerte es nochmal weitere 38 Jahre, bis das Tabakmosaikvirus 1935 dann von Wendell Stanley isoliert wurde. Stanley fand in den 300nm langen Stäbchen nur zwei Bestandteile: eine einsträngige RNA aus ca. 6400 Nukleotiden und Proteine. Heute weiß man, dass die Hülle von Viren, das Capsid aus Proteinen besteht. Weiterhin befinden sich auch Enzyme in Viren.

Virus [lat.: Gift, Schleim]: kleinste Erreger (0,01-0,1 µm entspricht 10-100nm), bestehend aus genetischem Material (RNA oder DNA), welches von einem Capsid als Schutzhülle umgeben ist. Viren können sich nicht selbstständig vermehren, da sie keine Lebewesen sind, keinen Stoffwechsel haben und auch nicht die zur Reproduktion notwendigen Enzyme vorliegen.

Aufbau der Viren

- Viren sind sehr klein. Sie sind ca. 20-100 Mal kleiner als Bakterien und nochmal ein Vielfaches kleiner als eukaryotische Zellen.
- Vermutlich sind Viren keine Vorfahren von Bakterien, sondern aus Genen entstanden, welche sich von entwickelteren Lebewesen lösten.
- Das Erbgut der Viren ist in einem Capsid verpackt. Bei einigen Viren ist das Capsid noch von einer Hülle umgeben. Demzufolge unterscheidet man behüllte und unbehüllte Viren. Die unbehüllten Viren haben als äußerste Struktur das Capsid. Es heftet an die Wirtszelle an und infiziert diese.
- Bei behüllten Viren umgibt eine Hülle das Capsid. Beide geben zusammen dem Virus viel Stabilität.
- Das Capsid ist oft aus dreieckigen Proteinen (den Capsomeren) aufgebaut, welche einen Ikosaeder (Zwanzigflächner) bilden, welcher im Mikroskop aber oft als Kugel erscheint.
- Auf ihrer Oberfläche tragen Viren sogenannte Hüllproteine (Eiweiße), diese verändern sich in ihrer dreidimensionalen Form meist geringfügig von Generation zu Generation.
- Bei vielen Viren wird das Capsid von Glycoproteinen umgeben. Sie können dem Immunsystem der Wirbeltiere als Oberflächenproteine als Erkennungsmerkmal dienen.
- Bild: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Kapsid_Schema-01.png
- Viren können je nach Typ ein oder doppelsträngige RNA, doppelsträngige DNA oder einsträngige DNA enthalten. Meist kodiert das Erbgut nur für bis zu 20 Proteinen. Ein vergleichsweise geringes Genom.
- Viren die RNA enthalten, müssen dafür sorgen, dass ihre RNA bei der Infektion im neuen Lebewesen, der Wirtszelle, wieder zu DNA umgeschrieben wird. Dazu liegt dann das Enzym „reverse Transkriptase“ vor, welches im Grunde einen zur Transkription umgekehrten Vorgang durchführt. Deshalb werden diese Viren auch Retroviren genannt. Zu den Retroviren gehört u.a. HIV.

Beim Menschen kennt man bisher fünf Retroviren:

- HTLV: humane T-lymphotropes Virus 1 (HTLV-1) und HTLV-2
- HIV: Humanes Immundefizienz-Virus-1 (HIV-1) und HIV-2
- beide Typen der Lentiviren
- Xenotropic murine leukemia virus-related virus (XMRV)

Diese Retroviren sind zwar auf Menschen angepasst, aber denen der Affen und der Menschenaffen sehr ähnlich. Man fasst sie deshalb in der Gruppe der Primaten-Retroviren zusammen.

Aktuelle Theorien gehen auch vom Ursprung dieser Viren bei Primaten aus und das sie anschließend durch Wirtswechsel auf Menschen gewechselt sind.

Die Übertragung von Affen-Retroviren auf den Menschen fand bei HTLV schon vor Jahrtausenden, bei HIV vermutlich Anfang des 20. Jahrhunderts statt.

Zusatzinformationen:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Retroviren>

<https://de.wikipedia.org/wiki/Viren>

Vermehrung der Viren:

Viren dringen in den Körper ein, befallen Zellen und programmieren diese, neue Viren zu produzieren, d.h. Viren können sich nicht selbst vermehren, da sie keinen eigenen Stoffwechsel haben und auch keine Lebewesen sind¹.

Viren dringen in eine Wirtszelle (z.B. eine Muskelzelle) ein, schleusen ihr Viruserbgut ein und „programmieren“ das Erbgut der Wirtszelle um. So bringen sie die Wirtszelle dazu, neue Viren zu produzieren. Viren können sich ohne Wirtszelle nicht vermehren².

Die Wirtszellen sind oft spezifisch, d.h. sie können meist nur eine Art befallen. So kann ein Pflanzenvirus nicht auf Menschen übergehen.

Selbst der Wechsel zwischen recht verwandten Arten ist oft nicht möglich (z.B. Schimpansen/ Gorillas). Ausnahmen sind die oben genannten HIV und HTLV.

Auch Vogelgrippe und Schweinegrippe und Tollwut können auf Menschen übergehen

Typische Virenkrankheiten bei Menschen: Erkältungen, Grippe (=Influenza), Pocken & Windpocken, Masern, Herpes, Kinderlähmung (=Polio), AIDS, Röteln, Ebola, Tollwut, Mumps, Warzen, Hepatitis, Enzephalitis.

Virenerkrankungen bei Tieren: Maul- und Klauenseuche, Tollwut, Kuhpocken

Viren bei Pflanzen: Tabakmosaikkrankheit

Zusatzinformationen: <https://de.wikipedia.org/wiki/Kapsid>

1 Eigentlich bestehen sie nur aus Erbgut, welches in einer Hülle verpackt ist

2 Durch diese Form von Parasitismus könnte man Viren auch als Zellpiraten bezeichnen.

Systematik der häufigsten Viren

Nukleinsäure	Nucleo-Kapsid-symmetrie	Größe (Durchschnittswerte)	Virenfamilie	Beispiele
Doppelsträngige DNA	kubisch & nackt	55nm	Papovaviridae	Warzen
Doppelsträngige DNA	kubisch & nackt	70-90nm	Adenoviridae	Erkältungen
Einzelstrang DNA	kubisch mit Hülle	30nm	Hepadnaviridae	Hepatitis B
Doppelsträngige DNA	kubisch mit Hülle	100nm	Herpesviridae	Herpes, Zoster, Warzen
Doppelsträngige DNA	Komplex mit Hülle	250nm	Poxviridae	Variola
RNA	kubisch & nackt	25nm	Picornaviridae	Polio, Hepatitis A, Rhinovirus (u.a. Erkältungen)
RNA	kubisch & nackt	33nm	Caliciviridae	Hepatitis E
RNA	kubisch mit Hülle	65nm	Togaviridae	Röteln
RNA	helical mit Hülle	100nm	Othomyxoviridae	Grippe (Influenza!)
RNA	helical mit Hülle	225nm	Paramyxo	Mumps, Masern
RNA	helical mit Hülle	120nm	Rhabdoviridae	Tollwut
RNA	Hülle	100nm	Retroviridae	HIV
Einzelstrang RNA	Helikal mit Hülle	60 - 160 nm	Coronaviridae	SARS-CoV-1 MERS-CoV SARS-CoV-2

Beachte: Es gibt noch weitere Virenarten.

Zusatzinformationen: <https://de.wikipedia.org/wiki/Coronaviridae>

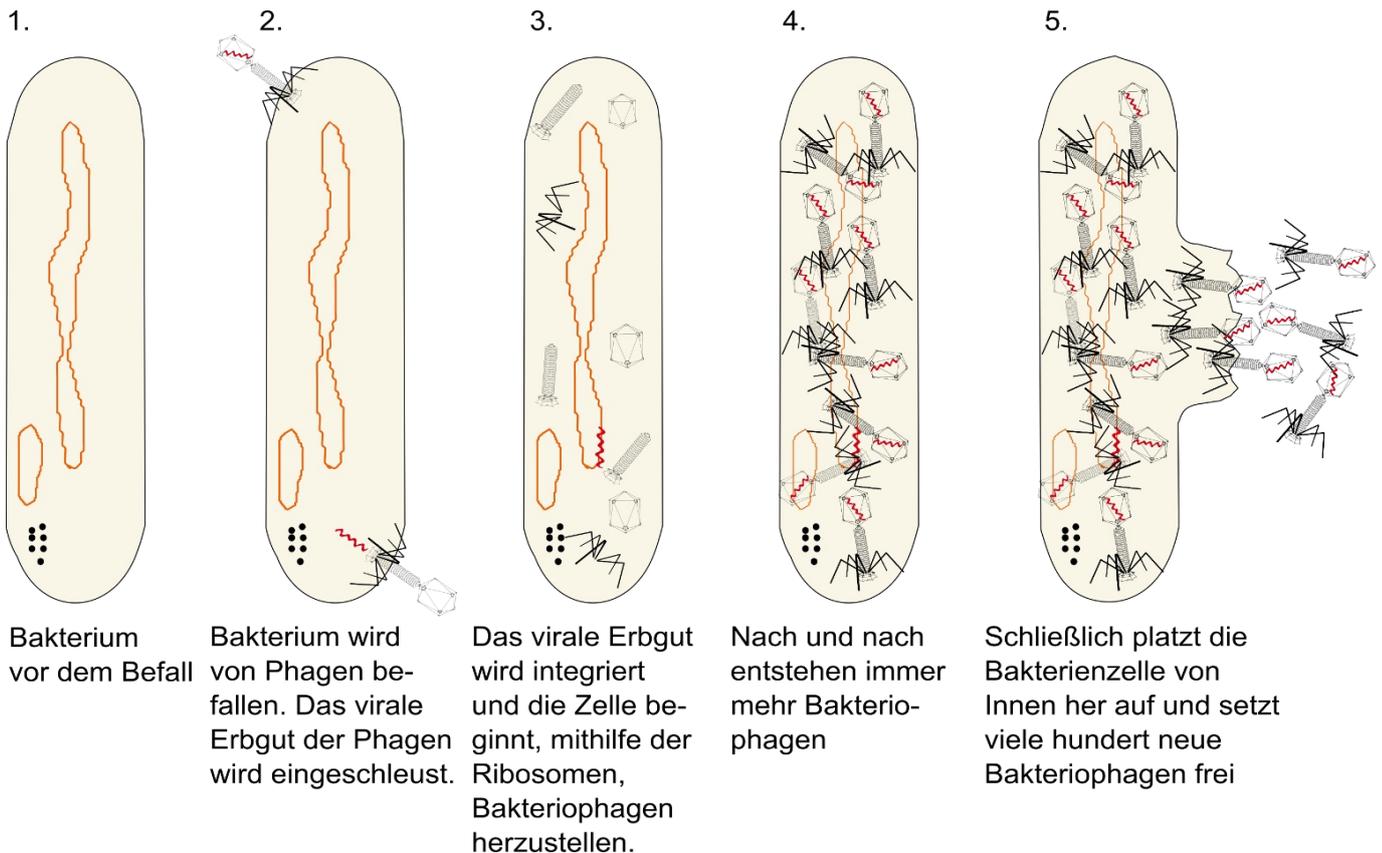
Entwicklung und Vermehrung von Bakteriophagen

a) Lytischer Vermehrungszyklus

Werden Bakterien z.B. durch T-Phagen befallen, so führt dies immer innerhalb kurzer Zeit zur Auflösung der Bakterien. Man spricht auch von einer Lyse (Griech.: Lysein = lösen). T-Phagen sind also virulent.

Auch viele andere Viren, die z.B. den Menschen befallen sind virulent.

Die lytische Vermehrung im Detail:



Lytische Vermehrung von Bakteriophagen

- 1. Adsorption (= „Andocken“) an Bakterienzellwand:** Die Phage setzt sich mit ihrer Endplatte auf den Rezeptor der Bakterienwand
- 2. Injektion der Phagen-DNA in das Bakterium:** Das bakterienwandauflösende Enzym „Lysozym“ zerstört die Zellmembran. Die Phagen-DNA gelangt ins Innere der Bakterienzelle.
- 3. Enzymsynthese: Spaltung des Bakterienchromosoms und Einbau der Phagen-DNA:** Auf Befehl der Phagen-DNA bauen Enzyme die Bakterien-DNA ab und replizieren Phagen.
- 4. Latenzphase: DNA-Replikation - Bildung von Phagen-DNA durch das Bakterium**
Die Phagen-DNA schließt sich zu einer Ringform zusammen. Die Vermehrung dieser DNA geschieht nun aus den bereits in den Bakterien vorhandenen Nukleotiden.
- 5. Produktionsphase: Proteinbiosynthese - Bildung von Phageproteinen durch das Bakterium:**

Die unterschiedlichen Proteine des Phagen werden an verschiedenen Orten gebildet.

6. Reifungsphase:

Phagenköpfe werden mit neuer DNA gefüllt. Anschließend findet die Anlagerung des Schwanzes statt. Durch zwischenmolekulare Kräfte setzen sich die Moleküle zur neuen Bakteriophage zusammen.

7. Lyse/ Freisetzung - Lyse (= Auflösen der Bakterienzellwand) und Ausschleusen der neuen Phagen: das Lysosom (auf Befehl des Phagen von Bakterium gebildet) setzt Lysozym frei, welches die Zellmembran auflöst, sodass die gebildeten Phagen austreten können.

Ein befallenes Bakterium setzt zwischen 100 - 200 neue Phagen frei.

Zusammenfassung: lytische Vermehrungszyklus:

- zerstört Wirtszelle, virulent (lat: giftig) genannt.
- Bei der Transduktion kann nun Bakterien-DNA „ausversehen“ von Phagen aufgenommen und so an das nächste Bakterium weitergegeben werden, wenn diese befallen wird.
- lytischer Vermehrungszyklus (bei virulenter Phage) => Dauer (ca. 30 min)
- Umschaltung auf lysogenen Zyklus bei Nahrungsmangel („Virus wartet auf bessere Zeiten“)

b) Lysogener Vermehrungszyklus

- Neben der lytischen Vermehrung gibt es auch noch eine zweite Möglichkeit, wie Viren sich vermehren können. Man nennt dies den „lysogenen Zyklus“. Ein Beispiel hierfür sind die λ -Phagen, welche ebenfalls Bakterien befallen. Aber auch bei Menschen kommen lysogene Viren vor.
- Das Besondere an diesem Vermehrungszyklus ist, dass die virale DNA komplett in das Bakterienchromosom eingebaut wird und bei Zellteilung der Zellen dieses virale Erbgut mitrepliziert wird. So wird das virale Erbgut schon vermehrt, bevor das Virus aktiv ist.
- Die befallene Bakterienzelle und ihre Nachkommen sind somit potentielle Virenvermehrungsorte und werden deshalb auch als Prophage oder Provirus bezeichnet.
- Das virale Erbgut ist nun auf unbestimmte Zeit in der Wirtszelle integriert, wird bei Zellteilung der Zelle an Tochterzellen weitergegeben und irgendwann aktiviert, oder auch nicht.
- Wird eine solche Bakterienzelle aktiv, wird sie lytisch (man spricht auch vom Übergang in den lytischen Zyklus und setzt neue Viren frei).
- Bei Eukaryoten wie den Menschen, kann das virale Erbgut bis zu mehreren Jahrzehnten im lysogenen Zyklus bleiben, bevor die Zellen lytisch werden.
- Man vermutet, dass auf diesem Wege ein Teil der menschlichen Junk-DNA entstanden ist.

Ablauf des lysogenen Zyklus' im Detail:

- Virale DNA wird in die DNA des Wirts injiziert und integriert (=eingebaut). Die Wirtszelle wird von nun an auch Prophage genannt, da sie das virale Erbgut enthält, welches jederzeit aktiv werden kann. **Ein Prophage ist eine Bakterienzelle, in deren DNA virale DNA integriert wurde.**
- Die Bakterien-Prophage (bzw. eukaryotische Prophage) vermehrt sich weiter durch Zellteilung, weil Zellen das ja sowieso tun.
- Nach längerer Zeit (u.U. nach Jahren!) wird der Prophage aktiv (z.B. wenn sich deren Lebensbedingungen ändern oder das Immunsystem schwächtelt).
- Das Phagengenom wird aktiv (lytisch), neue Viren entstehen, die Wirtszelle platzt auf, setzt neue Viren frei und stirbt.

Der lysogene Zyklus:

- DNA wird in die DNA des Wirts eingebaut (von nun an auch Prophage genannt)
- Begriffsklärung: Ein Prophage ist eine Bakterienzelle, in deren DNA Phagen-DNA integriert wurde.
- Das Bakterium wird durch Injektion der Phagen DNA zum Prophagen.
- Der Bakterien-Prophage vermehrt sich weiter, weil Bakterien das ja sowieso tun. Wenn nun eine der vielen neuen Bakterien „Pech“ hat und sich deren Lebensbedingungen ändern, dann wird das Phagengenom aktiv (lytisch) und dieses Bakterium hat jetzt ein besonderes Schicksal! Das heißt, die Phagen beginnen sich zu vermehren. Das Bakterium platzt auf und setzt Phagen frei.
- Beim Übergang in den lytischen Zyklus, muss natürlich die vorher mühsam integrierte Phagen-DNA wieder aus der Bakterien-DNA herausgeschnitten werden.
- Das geht aber nicht so schnittgenau! Deswegen wird auch immer ein wenig Bakterien-DNA „mitgenommen“. Befallen nun die neuen Phagen wieder ein anderes Bakterium, so bekommt dieses auch Bakterien-DNA, und zwar welche, die sie vorher nicht hatte.
=> Das neu befallene Bakterium hat ja 100% eigenes Erbgut, dazu kommt die Phagen-DNA und nur ein minimaler Rest vom der alten Bakterien-DNA (=Transduktion).
- lysogener Vermehrungszyklus (bei temperenter Phage)
- => Der lysogene Zyklus kann lytisch werden!
- Dieser Zyklus wird auch „temperent“ (=enthaltssam) genannt.

Zur Geschichte der Gentechnik und der Entdeckung der DNA

1928 - Erste Versuche von Frederick Griffith:

Der britische Mediziner und Bakteriologe führte Versuche mit Pneumokokken durch. Diese Bakterien bestehen aus zwei Zellen (Doppelkokken). Es gibt sie in zwei verschiedenen Formen, mit und ohne Schleimkapsel.

Die S-Form verfügt über eine intakte Schleimkapsel (=Polysaccharidkapsel). Ihre Oberfläche ist glatt (deshalb **smooth** - **S**-Form). Diese hochinfektiösen Bakterien lösen bei Mäusen eine Form der Lungenentzündung aus, welche in der Regel tödlich endet. Das Immunsystem der Mäuse kann die bakteriellen Erreger nicht erkennen, da diese durch ihre Schleimkapsel gut vor dem Erkennen durch die Immunabwehrzellen geschützt sind.

=> **Die S-Form der Pneumokokken ist infektiös.**

Durch eine Mutation ist ein weiterer Stamm entstanden, der die Polysaccharidkapsel nicht bildet. Die Oberfläche der Bakterien ist rauer (**rough** - **R**-Form). Diese Bakterien werden leicht vom Immunsystem identifiziert, da ihre Oberflächeneiweiße gut erkannt werden können. Einmal erkannt, werden sie von Makrophagen (=Fresszellen) gefressen. Es kommt nicht zum Ausbruch einer Krankheit.

=> **Die R-Form der Pneumokokken ist nicht infektiös.**

S-Form (*smooth*): infektiös (=pathogen)

R-Form (*rough*): nicht infektiös

V1: Griffith injizierte lebenden Mäusen nun beide Bakterienstämme.

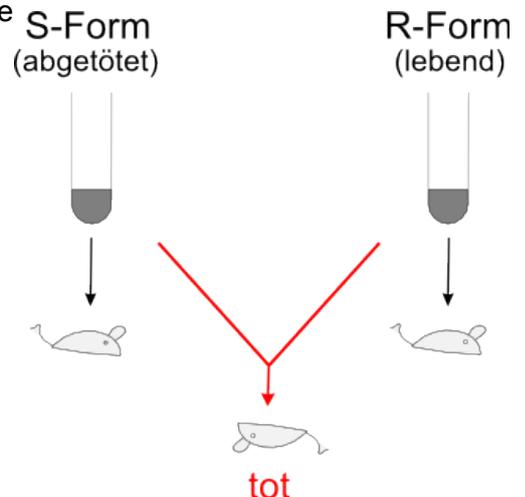
B1: Er stellte fest, dass die Impfung mit dem S-Stamm eine tödliche Lungenentzündung auslöste.

Die R-Form löst keine Krankheit aus.

V2: Griffith impfte nun eine Mischung aus lebenden R-Stamm und (durch Hitze) abgetöteten S-Bakterien lebenden Mäusen. Er vermutete, dass es zu keiner Infektion kommt, da ja keine lebenden pathogenen Keime geimpft wurden.

B2: Er beobachtete nun, dass die Gabe von einem abgetötetem S-Stamm und dem lebenden R-Stamm sehr wohl die Versuchsmäuse auch tötet!

Die gemeinsame Gabe brachte die Versuchstiere schnell um.



Schlussfolgerung:

Zuerst wunderte sich Griffith sehr. Er folgerte dann aber, dass etwas von der S-Form auf die R-Form übertragen worden sein muss, was die Ausbildung einer Schleimkapsel, bei der noch lebenden r-Form ermöglicht haben muss und was so die R-Form nun auch infektiös macht.

Er fand aber darauf keine schlüssige Antwort, was das sein könnte. Er vermutete, dass entweder **DNA** oder **Proteine** zwischen den Bakterien übertragen wurden.

Es fand ein Austausch von Erbgut statt. Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie Mikroorganismen Erbgut austauschen können. Diese Rekombination von Erbgut wird auch als „Parasexualität“ bezeichnet.

Zusatzinformationen:

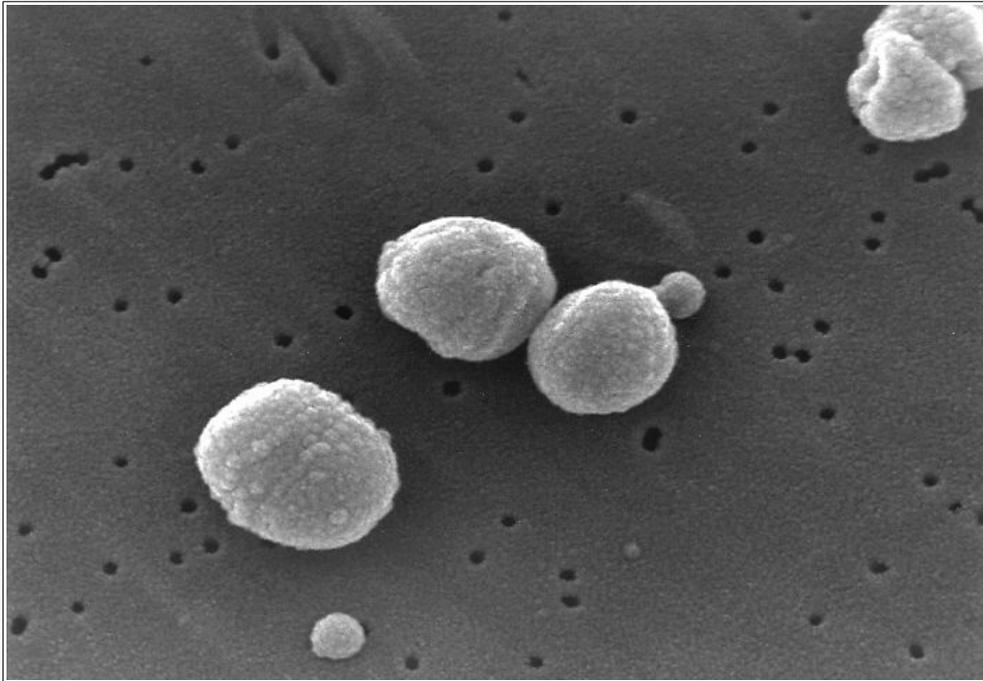
<https://de.wikipedia.org/wiki/Pneumokokken>

<https://de.wikipedia.org/wiki/Streptokokken>

https://de.wikipedia.org/wiki/Frederick_Griffith

https://commons.wikimedia.org/wiki/Streptococcus_pneumoniae

Streptococcus pneumoniae - ein Erreger der Lungenentzündung



Quelle Bild: public domain by Wikicomonsuser Encephalon & Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library - Photo Credit: Janice Carr, Content Provider Dr. Richard Facklam, CDC image no 262 - Thank you;
https://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Streptococcus_pneumoniae.jpg

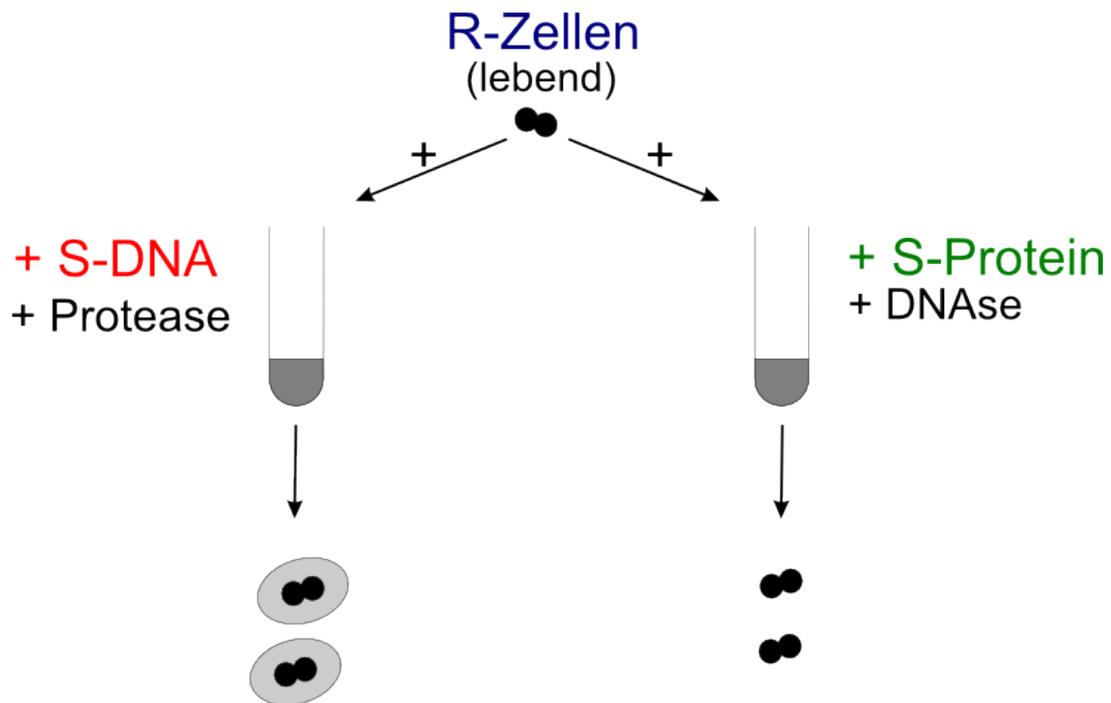
Entdeckung des Genaustausches: 1944 - Die Transformationsversuche von Avery

Der amerikanische Arzt Oswald Avery überprüfte 1944 das Experiment von Griffith und wandelte es ab.

V: Er gab zu kapsellosen R-Bakterien in zwei Versuchen einmal die DNA der S-Form und einmal die Proteine der S-Form. Er wollte so die Frage klären, ob nun die DNA oder die Proteine die Information zur Schleimkapselbildung an die R-Form weitergeben.

B: Die DNA der infektiösen S-Form in Kombination mit lebenden R-Form-Bakterien führte zur Bildung einer neuen Generation von Bakterien mit Schleimkapsel.

Die Zugabe von Zellproteinen zur R-Form brachte hingegen keine Änderung!



S: => Die DNA gibt die Informationen weiter, nicht die Proteine.

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung von DNA von einem Bakterienstamm auf den anderen und damit die Weitergabe vererbbarer Eigenschaften.

Zusatzinformationen

https://de.wikipedia.org/wiki/Frederick_Griffith

<https://de.wikipedia.org/wiki/Pneumokokken>

https://de.wikipedia.org/wiki/Oswald_Avery

https://de.wikipedia.org/wiki/Transformation_%28Genetik%29

Übersicht: Averys Transformationsversuche

S-Doppelkokken



- krankheitsauslösende Form/ Stamm (pathogen),
- verursacht Lungenentzündung!



**zufällige
Mutation**

R-Doppelkokken



- nicht pathogener Stamm
- Verursacht keine Lungenentzündung!



**Zugabe eines
abgetöteten S-Stamms**

Transformation



- Der R-Stamm wurde zu einem S-Stamm **transformiert.**
- Verursacht Lungenentzündung!

Genaustausch durch parasexuelle Vorgänge bei Bakterien

Informationen zum Thema Penicillin

1929 entdeckte Alexander Fleming das erste Antibiotikum. Es ist das ausgeschiedene Stoffwechselprodukt eines Schimmelpilzes der Gattung *Penicillium*. Fleming nannte dieses Stoffwechselprodukt Penicillin. Es verursacht Wachstumshemmungen bei vielen Bakterien, die eine große Zahl menschlicher Infektionskrankheiten wie Halsentzündungen, Lungenentzündungen, Haut- und Wundinfektionen, Scharlach usw. verursachen. Die genaue chemische Zusammensetzung konnte man allerdings erst 1945 bestimmen. 1945 erhielten Fleming, Chain und Florey dafür den Nobelpreis.

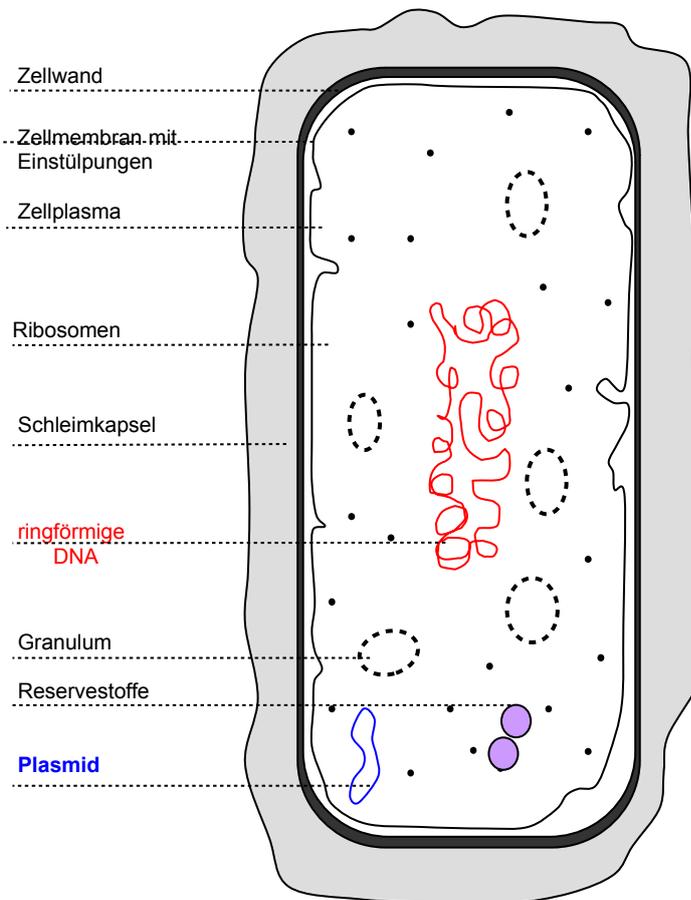
Was ist ein Plasmid?

In Bakterien gibt es nicht nur die ringförmige, kernlose DNA, sondern zusätzlich auch kleine, ebenfalls ringförmige DNA-Moleküle. Sie werden Plasmide genannt. Plasmide sind durch Zweiteilung in einer Region, die man Replikationsbereich nennt, selbstreplizierend.

Die DNA der Bakterien ist ringförmig geschlossen. In manchen Büchern steht, Bakterien hätten Chromosomen. Dies ist schlicht falsch, da sich die ringförmige DNA der Procyten nicht spiralisieren kann! Chromosomen kommen nur bei Eucyten vor.

Zur Verwirrung aller nennt man das Erbgut von Bakterien trotzdem oft „Bakterienchromosom“. Aber beachte, dass es nur im Singular verwendet wird. Und stell es Dir unspiralisiert vor!

Beachte die Plasmide! Sie enthalten mehrere Gene. Dies können z.B. Gene zum Genaustausch sein (der sogenannte F-Faktor) oder auch Antibiotikaresistenzgene uvm.



Parasexualität

Bei mehrzelligen Eukaryoten findet ungeschlechtliche Fortpflanzung in der Regel durch Mitose oder geschlechtlich durch Verschmelzung von Keimzellen (Eizellen, Spermien oder Pollen) statt, welche vorher durch Meiose gebildet wurden.

Bei Prokaryoten findet diese Rekombination durch einen einfachen Genaustausch statt. Man spricht dabei auch von Parasexualität. Man findet sie bei Bakterien, Cyanobakterien und Archaeen. Typisch für diesen Vorgang ist, dass Teile des Genoms von einer Spenderzelle auf eine Empfängerzelle übertragen und dort rekombiniert werden.

Man unterscheidet folgende verschiedene Möglichkeiten:

- Konjugation: Zellen nehmen über eine Plasmabrücke DNA-Fragmente auf.
- Transduktion: Übertragung von DNA durch Bakteriophagen.
- Transformation: Zellen nehmen aus der Umgebung freie DNA-Fragmente auf. Diese Genübertragung geschieht durch Aufnahme von freier (löslicher) DNA.
- Direkter Erbgutaustausch zwischen Viren.

Austausch von Erbgut bei Mikroorganismen I: Konjugation

Bei der Konjugation findet ein direkter Austausch von DNA zwischen zwei Bakterien statt.

Konjugation (1946 Lederberg/Tatum)

Lederberg/Tatum führten Versuche mit E. Coli durch. Der Wildstamm (das nicht durch Mutationen veränderte Bakterium) von E. Coli kann die Aminosäuren Phenylalanin, Cystein, Threonin und Leucin selbst herstellen. Sie kennzeichneten diesen Wildtyp nach diesen Eigenschaften:

Wildtyp: Phe⁺, Cys⁺, Thr⁺, Leu⁺

Durch UV-Strahlung stellten sie nun zwei Bakterienstämme mit jeweils zwei Mutationen her. Es entstanden sogenannte Doppelmutanten.

Stamm A : Phe⁻, Cys⁻, Thr⁺, Leu⁺

Stamm B: Phe⁺, Cys⁺, Thr⁻, Leu⁻

Jeder Stamm konnte also jeweils zwei Aminosäuren nicht selbst herstellen.

Beide Stämme werden für einige Stunden gemischt, dann auf ein Minimalmedium gebracht, welchem die Aminosäuren Phe, Cys, Thr und Leu fehlen.

Beobachtung:

- Es bilden sich einige wenige Kolonien mit Bakterien, welche alle 4 Aminosäuren bilden konnten
- Die Häufigkeit dieser Bakterien lag bei ca. $1:10^6$.
- Elektronenmikroskop-Aufnahmen zeigen Bakterien-Kontakte!
- => Übertragung von Genen zwischen Bakterien sind möglich!

Schlussfolgerung:

Wenn Bakterien auf dem Mangelnährboden wachsen, müssen sie wie der Wildtyp alle vier Aminosäuren selbst bilden können (Phe⁺, Cys⁺, Thr⁺, Leu⁺).

Da die Häufigkeit der Bakterien, welche alle 4 Aminosäuren bilden konnten, bei $1:10^6$ lag, kann ausgeschlossen werden, dass es sich um zwei zufällige „Rückmutationen“ handelte, welche für die Beobachtung verantwortlich sind.

Die Wahrscheinlichkeit für eine doppelte Rückmutation liegt bei $1:10^{14}$ (Mutationswahrscheinlichkeit für eine Punktmutation bei Prokaryoten $1:10^7$ => für zwei Punktmutationen bei $1:10^7 \cdot 1:10^7$).

Damit können Mutationen ausgeschlossen werden und folglich muss ein Genaustausch stattgefunden haben.

=> Es ist ein neuer Stamm entstanden, welcher alle 4 Aminosäuren herstellen kann.

=> Die Bakterien müssen über alle vier Gene zur Produktion der Aminosäuren verfügen.

Der Vorgang zum Austausch dieser Gene wird Konjugation genannt.

Voraussetzung für die Konjugation

Bald darauf entdeckte man einen Erbgutabschnitt, welcher für diesen Genaustausch verantwortlich ist. Er kann in Bakterien als Plasmid oder in das Bakterien-Chromosom integriert vorliegen. Man nennt diesen Erbgutabschnitt „F-Faktor“ (=Fertilitätsfaktor). Er ist aber nicht bei allen Bakterien zu finden.

Das F-Plasmid ist ein konjugatives Plasmid, das heißt, es trägt spezifischen Informationen des Konjugationsmechanismus.

Ein Bakterium welches nun dieses F-Plasmid hat, wird auch Donorzelle genannt. Es kann einen F-Pilus bilden, ein fadenförmiges Zellanhängsel, welches ebenfalls durch Gene auf dem Plasmid codiert wird. So kann dieses Bakterium Kontakt zu einer anderen Bakterienzelle aufnehmen.

F⁺-Zellen (können Erbgut „senden“ => Spenderzellen / Donorzellen).

F⁻-Zellen (können kein Erbgut „senden“)

F-Faktor: Enthält vor allem genetische Informationen für Sexual-Pili (F-Pili)
=> Kontaktaufnahme mit F⁻-Zelle/Rezeptor-Zelle (Empfängerzelle / Akzeptorzelle)

Nach der Kontaktaufnahme wird der F-Pilus abgebaut. Die sich berührenden Bakterien bilden an der Berührungsstelle eine Plasmabrücke.

Durch diese wird nun einer der beiden DNA-Stränge eines Plasmiden übertragen (rolling circle-Mechanismus). Dazu wird der Plasmid-DNA-Strang an einer spezifischen Stelle gebrochen, abgerollt und durch die Plasmabrücke übertragen.

Bereits während des Abrollens beginnt die Replikation, welche den verbleibenden Einzelstrang wieder vervollständigt.

Die Empfängerzelle führt die Replikation nach Erhalt der Einzelstrang-DNA durch.

F-Plasmide:

1) Kontaktaufnahme über Sexual-Pili => Ausbildung Plasmabrücke

2) Übertragung des replizierten F⁺-Plasmids

F⁻ -> F⁺

Falls auf dem Plasmid weitere Gene liegen, so werden diese mit dem F-Faktor übertragen.

Hinweis: Das F-Plasmid repliziert innerhalb des Bakteriums autonom vom Bakterienchromosom!
=> Der F-Faktor geht für eine Zelle verloren, falls er vor der Zellteilung nicht repliziert wurde.

1. Plasmidübertragung in einer Konjugation

Bei dem Darmbakterium *E. coli* kennt man viele verschiedene Plasmide (z.B. die F-Plasmide mit 25 Genen oder die R-Plasmide mit bis zu 10 Genen).

Das F⁺-Plasmid ist u.a. für die Ausbildung von Sexual-Pili verantwortlich. Durch ihre Hilfe entsteht eine Proteinröhre, welche auch Plasmabrücke genannt wird. Über diese Plasmabrücke kann bakterielle DNA von einer Zelle zu einer anderen übertragen werden.

Man unterscheidet zwischen Zellen, die kein F-Plasmid enthalten

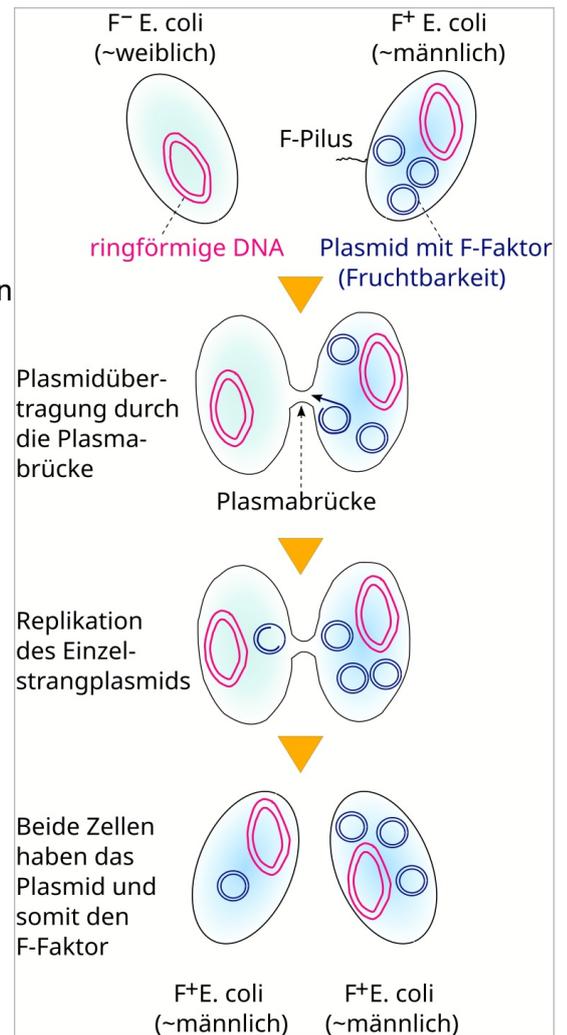
(F⁻) und solchen, die es enthalten (F⁺).

Die F⁺-Zellen (früher auch als „männlich“ bezeichnet) können nun durch Konjugation den F-Zellen („weiblich“) eine Kopie des F⁺-Plasmids übertragen.

=> nach der Konjugation sind beide Zellen F⁺.

Bei der üblichen Konjugation befindet sich der F⁺-Faktor im Plasmid, sodass Plasmide übertragen werden.

Anmerkung: Oft wird allerdings nicht die gesamte DNA übertragen, da es zu Brüchen der Plasmarröhre kommen kann. Ein Bruch der Proteinröhre sorgt dann nur für einen teilweisen Gentransfer.



Zusatzinformationen:

[https://de.wikipedia.org/wiki/Konjugation_\(Biologie\)](https://de.wikipedia.org/wiki/Konjugation_(Biologie))

Hfr-Konjugation

Neben der Konjugation mit Austausch von Plasmiden gibt es eine zweite Form, bei der der F⁺-Faktor sich nicht im Plasmid, sondern im Bakterienchromosom befindet.

Bei hfr-Zellen (high frequency of recombination = große Austauschfähigkeit) ist der F-Faktor ins Bakterienchromosom integriert.

- 1) Kontaktaufnahme
- 2) F bricht in Mitte auf. Übertragung auf F⁻ zusammen mit angrenzenden Genen
- 3) Rekombination in Rezeptorzelle (diese bleibt F⁻)

Plasmabrücke reißt relativ leicht ab
 → Gene nahe F häufiger übertragen
 entferntere Gene seltener
 → DNA-Kartierung möglich

Zur Erinnerung:

Was ist ein Vollmedium? Was ist ein Minimalnährboden?

Ein Vollmedium kann eine Aufzuchtflüssigkeit oder der Agar-Agar in einer Petrischale sein. Das Vollmedium enthält alles, was Bakterien zum Wachsen brauchen:

- Energiequelle (Glucose)
- Mineralsalze
- Flüssigkeit
- Alle Aminosäuren

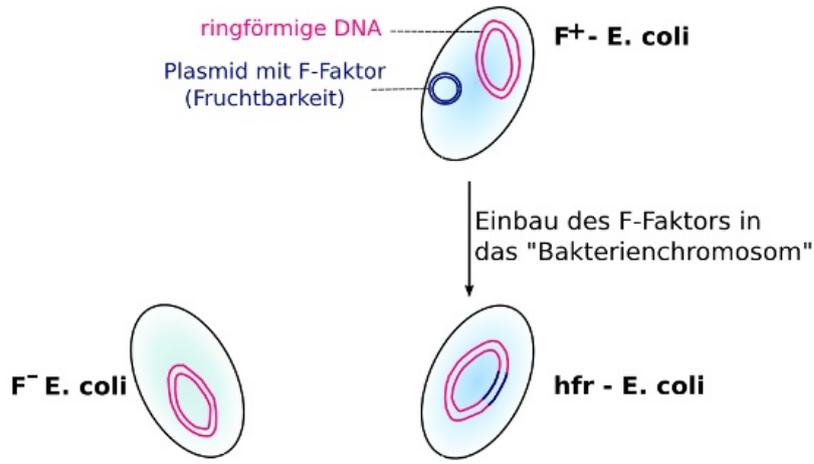
=> Wildtyp kann wachsen, Mangelmutanten können wachsen

Ein Minimalnährboden kann eine Aufzuchtflüssigkeit oder der Agar-Agar in einer Petrischale sein. Allerdings ist der Unterschied zum Vollmedium, dass wichtige Aminosäuren (je nach Experiment) fehlen.

- Energiequelle (Glucose)
- Mineralsalze
- Flüssigkeit

=> Wildtyp kann wachsen, Mangelmutanten können nicht wachsen (da z.B. best. Aminosäuren fehlen.)

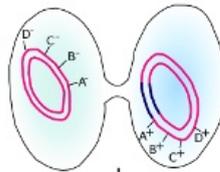
Konjugation mit hfr-Stämmen



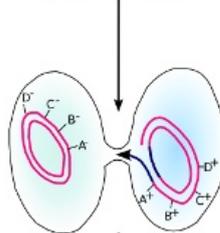
Konjugation

Das Bakterienchromosom der F⁻ - Zelle enthält die Gene A, B, C, D nicht! (Gekennzeichnet durch ein Minus)

Das Bakterienchromosom der hfr-Zelle enthält die Gene A, B, C, D! (Gekennzeichnet durch ein Plus)

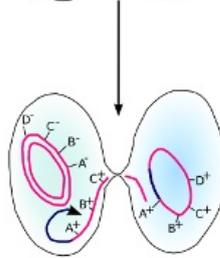


Bruch des Bakterienchromosoms an der Stelle des F-Faktors und anschließende Übertragung des F-Faktors sowie der dahinterliegenden Gene!



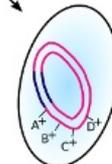
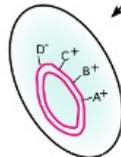
Dies geschieht solange bis es zum Bruch des Sex-Pilius kommt. In diesem Beispiel geschieht der Bruch nach Übertragung des Gens C⁺.

Es entsteht eine rekombinante Zelle, welche nun die Gene A⁺, B⁺ sowie C⁺ bekommen hat. Das übertragene DNA-Stück und die DNA der hfr-Zelle werden nun wieder zum Doppelstrang ergänzt.



Die neuen Gene können als Plasmid vorliegen oder in das Bakterienchromosom eingebaut werden.

Der F-Faktor muss nicht im Chromosom verbleiben. Er kann jederzeit wieder zum Plasmid werden.



Der F-Faktor wird übrigens nicht vollständig übertragen, d.h. die Zelle bleibt F⁻.

Nicht benötigte sowie unvollständige DNA, wird von der Zelle abgebaut!

Übungsaufgabe: Konjugation mit hfr-Stämmen

Für einen Versuch werden, ähnlich wie es 1946 der Genetiker Joshua Lederberg mit *E. coli* Doppelmutanten gemacht hatte, zwei Bakterienstämme (beide auf Vollmedien gewachsen!) zusammengegeben. Diese Stämme gehören zwar zur gleichen Art, unterscheiden sich in den Genen und somit in ihren Fähigkeiten. Jedes Bakterium kann zwei von ihm benötigte Aminosäuren selbst herstellen:

Stamm 1: : his⁻ thr⁻ trp⁺ val⁺

Stamm 2: F⁻: his⁺ thr⁺ trp⁻ val⁻

his = Histidin

thr = Threonin

trp = Tryptophan

val = Valin

Beide Stämme werden gemischt und dann eine Zeitlang in einem Vollmedium gehalten. Anschließend werden sie von diesem isoliert und gemeinsam auf Minimalnährböden ausgestrichen.

Ein Minimalnährboden enthält neben Nährstoffen auch Stickstoff als Element, aber keine Aminosäuren! Normalerweise dürfte keiner der beiden Stämme auf einem solchen Minimalnährboden wachsen, da sie alle vier Aminosäuren zum Wachstum brauchen.

Nach einiger Zeit kann man aber auf den Minimalnährböden einige wenige Bakterienkolonien beobachten.

Weitere Untersuchungen ergaben:

1. dass es sich dabei um F⁻-Zellen handelt.
2. dass der „neue“ Bakterientyp mit einer Häufigkeit von 10⁻⁶ auftritt
3. Viren zu keiner Zeit in an dem Prozess beteiligt waren!

Aufgaben:

- a) Definiere Wildtyp, Mangelmutante, Doppelmutante und Minimalnährboden?
- b) Wie kann man mithilfe von solchen Nährböden Doppelmutanten finden und identifizieren?
- c) Beschreibe die genauen zellulären Vorgänge, die abgelaufen sind, die die genannten Beobachtungen erklären.
- d) Deute die Aussagen zur „Bakterienresistenz und der Weitergabe der Resistenzgene“ der folgenden Seite.

Bakterienresistenz und die Weitergabe der Resistenzgene

Das R-Plasmid (=Resistenz-Plasmid) enthält bis zu 10 Resistenzgene. Sie sorgen für eine Resistenz gegenüber Penicillin.

Ebenfalls durch Konjugation kann sich so eine Antibiotikaresistenz auf verschiedene Bakterien übertragen, Artgrenzen spielen dabei keine Rolle!

So können antibiotikaresistente Darmbakterien diese Eigenschaft leicht an Krankheitserreger weitergeben. Genauso können Bakterien im Mund, welche resistent sind, diese Informationen weitergeben. Dies ist besonders wichtig, da im Mund Milliarden von Bakterien sind, welche durch gemeinsames Benutzen von Getränken sowie durch Küssen schnell ihre Resistenz weitergeben können.

Gründe für die Resistenz sind vielfältig. Es kommt zum Teil zu einer Ausbildung einer tarnenden Schleimkapsel. Manchmal finden Bakterien aber auch einen neuen Stoffwechselweg, der es ihnen erlaubt, mit dem für sie giftigen Penicillin zurechtzukommen.

Bedeutung erhält dieser Vorgang, da sonst harmlose Darmbakterien (wie E. coli) manchmal das R-Plasmid tragen, somit gegen Penicillin resistent sind und durch Konjugation diese Eigenschaft an krankheitserregende Bakterien weitergeben. Auch diese sind dann gegen das Antibiotikum immun!

Zum Beispiel gibt es in speziell in Krankenhäusern multiresistente Bakterienstämme, die manchmal schlimme Krankheiten wie Lungenentzündung auslösen können. Die Bekämpfung dieser Krankheiten ist dann sehr schwierig, da die Ärzte auch nicht sofort wissen, gegen welche Antibiotika ein Patient bereits resistent ist.

Austausch von Erbgut bei Mikroorganismen II: Transduktion (Viren übertragen bakterielles Erbgut)

Transduktion = Übertragung von DNA zwischen Bakterien mithilfe von Viren (z.B. Übertragung von Bakterien-DNA durch Phagen).

Wenn Bakterien von Bakteriophagen befallen werden, so kann durch diese Phagen bakterielles Erbgut zwischen Bakterien ausgetauscht werden. Dabei spielt es eine große Rolle, ob das Virus nur lytisch (wie die virulenten T-Phagen) oder lysogen (wie die temperenten λ -Phagen) vermehrt wird.

Zwei Arten der Transduktion durch Bakteriophagen:

1. Allgemeine Transduktion - bei virulenten Viren (lytisch)

Der Phage befindet sich im **lytischen** Zyklus, injiziert seine DNA in Bakterien und wird von diesen vermehrt. Dabei wird gegen Ende des Prozesses oft auch die bakterielle DNA zerstört.

Sind die neuen Phagen fertig, können sie zufällig bakterielle DNA enthalten, die in die Phagen aufgenommen wurde.

Platzt das Bakterium anschließend auf und setzt dann die neue Generation an Phagen frei, so enthalten wenige Phagen Stücke bakterieller DNA, die zwar defekt ist (da den Phagen oft ihr eigenes Erbgut fehlt!), aber sie können dennoch neue Bakterien befallen und dieses Erbgut injizieren.

Die Übertragung von zufällig ausgewähltem bakteriellem Erbgut durch virulente T-Phagen ist eine Genaustausch (=> Rekombination von bakteriellem Erbgut) und wird allgemeine Transduktion genannt.

Beispiel: L+ Bakterien können Leucin herstellen. Werden sie von Phagen befallen, so kann das Gen L+-Gen auf andere Bakterien (L-) übertragen werden. Die L- Bakterien bauen das Gen über einen dem Crossing-Over ähnlichen Vorgang in das Bakterienchromosom ein.

2. Spezielle Transduktion – bei temperenten Viren (lysogen)

Werden Bakterien von temperenten Phagen (z.B. den λ -Phagen) befallen, so wird das virale Erbgut immer an der gleichen Stelle im Bakterienchromosom eingebaut. In diesem Beispiel zwischen den Genen L+ und T+.

Das Bakterium wird durch Injektion der Phagen DNA zum Prophagen und vermehrt sich weiter, weil Bakterien das ja sowieso tun. Wenn nun eine der vielen neuen Bakterien „Pech“ hat und sich deren Lebensbedingungen ändern, dann wird das Phagengenom aktiv (lytisch) und dieses Bakterium hat jetzt ein besonderes Schicksal!

Beim Übergang in den lytischen Zyklus, muss natürlich die vorher mühsam integrierte Phagen-DNA wieder aus der Bakterien-DNA herausgeschnitten werden.

Das geht aber nicht so schnittgenau! Deswegen wird auch immer ein wenig Bakterien-DNA „mitgenommen“. Dies sind vor allem die in der Nachbarschaft liegenden Gene (in diesem Beispiel L+ und T+), welche in den Phagen integriert werden.

Befallen nun die neuen Phagen wieder ein anderes Bakterium, so bekommt dieses neben der Phagen-DNA auch etwas Bakterien-DNA, und zwar welche, die sie vorher nicht hatte.

=> Das neu befallene Bakterium hat ja 100% eigenes Erbgut, dazu kommt die Phagen-DNA und nun auch ein minimaler Rest der „alten“ Bakterien-DNA (=> spezielle Transduktion).

Logischerweise werden dabei nah benachbarte Gene häufiger als weiter entfernte Gene übertragen. Aus diesen Häufigkeitsverteilungen kann man dann Rückschlüsse über die Lage von Genen treffen
=> eine Genkartierung ist möglich!

Spezielle Transduktion: Bakterien-DNA aus der Nähe der Integrationsstelle (Einbaustelle) der viralen DNA wird von temperenten Viren (z.B. λ -Phagen) bei Injektion auf andere Bakterien von Phagen übertragen!

Zusatzinformationen:

https://de.wikipedia.org/wiki/Lytischer_Zyklus

https://de.wikipedia.org/wiki/Lysogener_Zyklus

https://de.wikipedia.org/wiki/Transduktion_%28Genetik%29

Austausch von Erbgut bei Mikroorganismen III: Genaustausch zwischen Viren

Viren können auch direkt Erbgut untereinander austauschen. Dies kann geschehen, wenn Wirtszellen gleichzeitig von zwei Viren befallen sind. Dabei kann es zur Vermischung von Erbgut kommen.

Das folgende Experiment zeigt dies:

Phagen kommen überall dort vor, wo es Bakterien gibt. Isoliert man Phagen und gibt sie zu einer mit Bakterien bewachsenen Agar-Platte (voll bewachsen, mit einem sogenannten „Bakterienrasen“), so entstehen durch die Phagen deutlich sichtbare Löcher. Man spricht auch von Lyselöchern bzw. Plaques.

Dort wo die Löcher sind, haben die Phagen die vorhandenen Bakterien befallen und die Bakterien sind nach der Phagenvermehrung aufgeplatzt.

Im Experiment hat man nun vier verschiedene Phagentypen isoliert:

1. Phagen, welche große (h+) oder kleine (h-) Lyselöcher erzeugen (h von „huge“)
2. Phagen welche klare (r+) oder trübe (r-) Lyselöcher herstellen (r von „real“)

Gibt man zu einem Bakterienrasen nun h+/r- Phagen sowie h-/r+ Phagen, so kann es bei einigen Bakterien zu Doppelinfektionen kommen.

Man beobachtet also dann insgesamt vier verschiedene Lyselöcher (klein-trüb, groß-trüb, klein-klar, groß-klar).

=> Es muss zu einem Genaustausch gekommen sein, sodass nun auch Phagen vom Typ h+/r+ sowie h-/r- vorliegen.

Viren können in bestimmten Fällen Erbgut tauschen (Rekombination), dazu ist aber immer eine lebende Zelle notwendig, die gleichzeitig von beiden Virentypen befallen sein muss.

Bedeutung des Genaustausches bei Viren

a) Beispiel: Grippeviren

Bei Grippeviren kommt es immer wieder zu Epidemien von für Menschen gefährlichen Viren, wie den Erregern der Vogelgrippe oder der Schweinegrippe.

Diese Erreger gehen von den Tieren auf Menschen in seltenen Fällen über und können, wenn dies gelungen ist, sich bei Menschen schnell verbreiten.

Zur Einteilung der Grippeerreger macht man sich deren Oberflächenstrukturen zunutze:

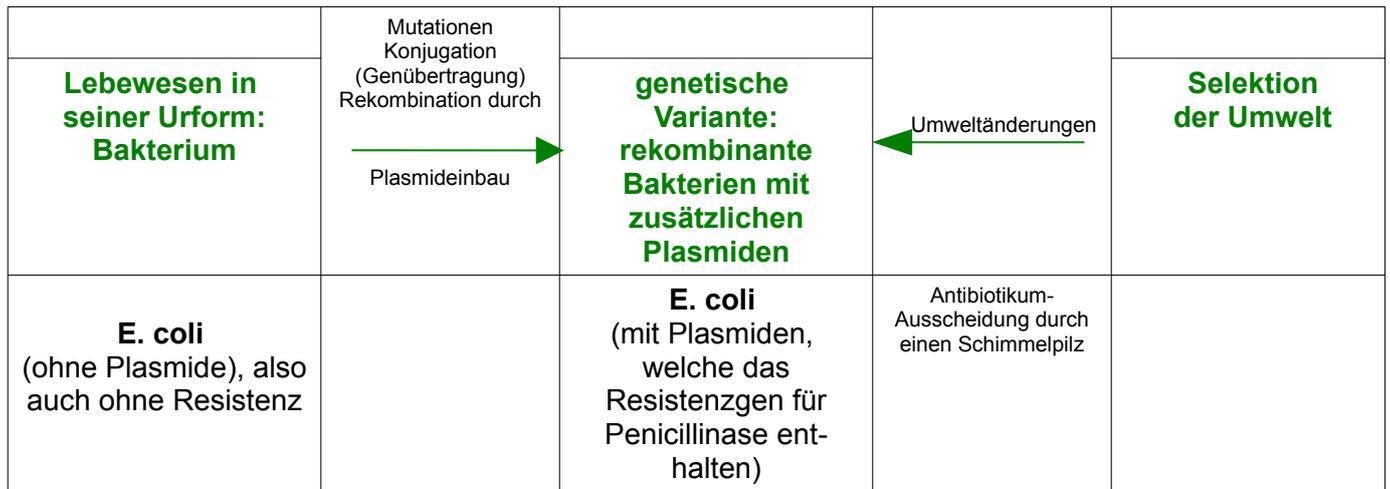
- Oberflächenstruktur „Hämagglutin“ ermöglicht das Andocken des Virus an die Wirtszelle => H
- Oberflächenstruktur „Neuroaminidase“ ermöglicht das Lösen von der Wirtszelle => N

Die Spanische Grippe war eine gefährliche Grippe, die 1918 ca. 20 Millionen Tote forderte. Sie gehörte zum Typ **H1N1**.

b) Beispiel: HIV & AIDS

Die Krankheit AIDS ist vermutlich durch zwei relativ harmlose Viren, welche bei Affen erkältungsähnliche Krankheiten hervorrufen. Vermutlich gelangten durch Verzehr von Affenfleisch beide Viren in Menschen, wo das neue Virus „HIV“ entstanden ist.

2. Schematische Übersicht zur Bedeutung von parasexuellen Vorgängen



=> Überleben der rekombinanten Bakterien mit Penicillinase.

Zusatzinformationen:

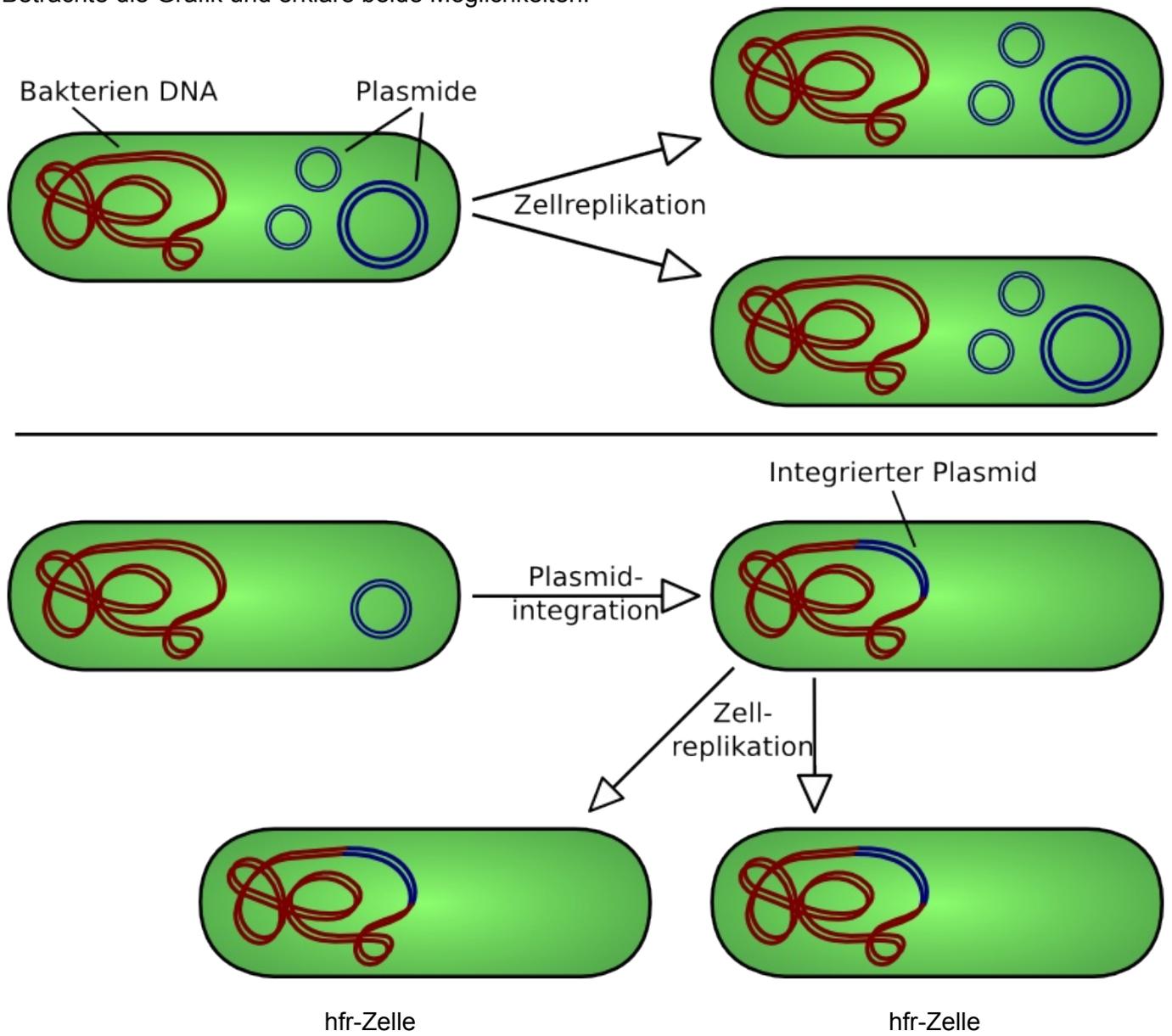
- <https://de.wikipedia.org/wiki/Plasmid>
- <https://de.wikipedia.org/wiki/Resistenz>
- <https://de.wikipedia.org/wiki/Antibiotikum-Resistenz>
- <https://de.wikipedia.org/wiki/Antibiotikum>
- <https://de.wikipedia.org/wiki/Bakterien>
- <https://de.wikipedia.org/wiki/Parasexualität>
- <https://de.wikipedia.org/wiki/Penicillin>

Aufgaben:

1. Was genau sind Plasmide? Welche biologische Bedeutung haben sie?
2. Beschreibe den Vorgang der Konjugation für beide Plasmide.
3. Warum kann man Konjugation als Gentauch bezeichnen? Begründe.
4. Die zufällige Ausbildung einer Antibiotikaresistenz beträgt ca. $1: 10^7$. Die Wahrscheinlichkeit für den Austausch einer Resistenz bei E. coli liegt bei ca. $1: 10^6$. Welche Konsequenzen ergeben sich daraus, wenn man bedenkt, dass Bakterien im Schnitt alle 20-40min. eine komplette Mitose durchlaufen?

Zwei Arten des Einbaus von Plasmidgenen

Betrachte die Grafik und erkläre beide Möglichkeiten:



Quelle Bild: Creative Commons Attribution ShareAlike 2.5 (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/2.5/>) by Wikicommonsuser Spaully; [https://en.wikipedia.org/wiki/Image:Plasmid_replication_\(english\).svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Image:Plasmid_replication_(english).svg)

Transduktion: Gentransfer durch Bakteriophagen

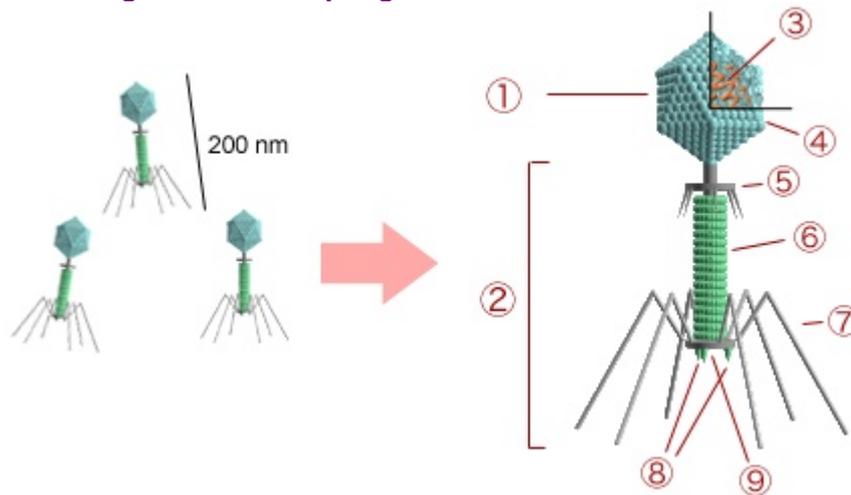
Viren können nicht nur Menschen, sondern auch Pflanzen und Bakterien befallen. Solche Viren, die Bakterien befallen, nennt man Bakteriophagen (griechisch phagein = fressen).

Bakteriophagen sind Viren, welche Bakterien als Wirt nutzen. Es gibt verschiedene Arten von Bakteriophagen. Alle „missbrauchen“ die Bakterien, welche sie zufällig durch die Brown'sche Molekularbewegung finden, um neue Phagen zu produzieren.

Sie sind keine Organismen, haben keinen Stoffwechsel und anstelle einer begrenzenden Membran verfügen sie nur über eine Proteinhülle. Ihre Größe beträgt ca. 20-300nm.

Im Unterschied zu anderen Viren dringen Phagen nicht ganz in ihre Wirtszellen ein. Stattdessen transferieren sie nur ihr Erbgut in den Wirt.

Die Vermehrung von Bakteriophagen findet in bakteriellen Wirtszellen statt.



Quelle Bild: GNU Free Documentation License, Version 1.2 & Creative Commons Attribution ShareAlike license versions 2.5 by Wikicommonsuser Y_tambe; Domo Arigato; https://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Bacteriophage_structure.png; <https://creativecommons.org/licenses/by/2.5/>

Einsatz von Phagen:

- Übertragung von DNA zwischen Bakterien.
- Einschleusen von DNA für Virenhüllprotein in Bakterien
=> Produktion von Impfstoffen

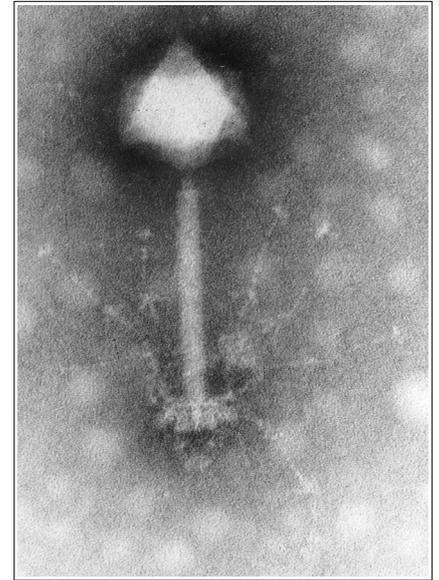
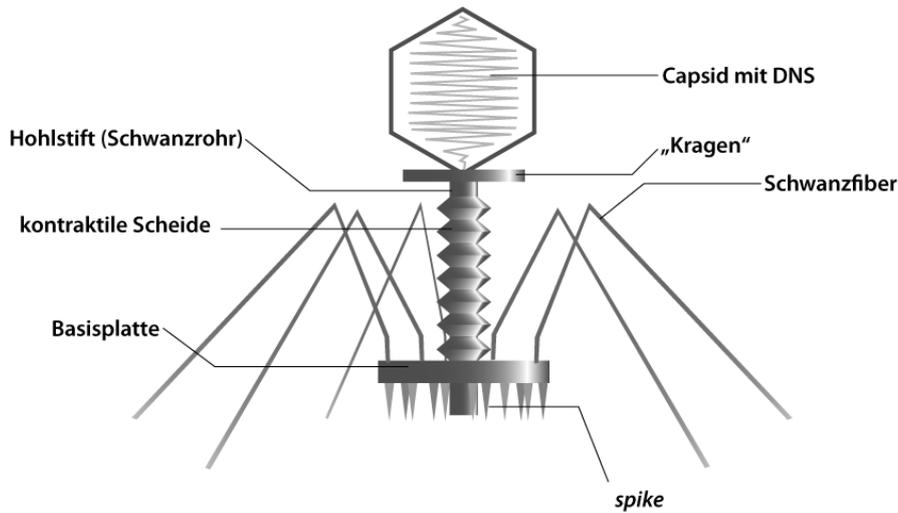


Bild 1:

Bild 2:

Quelle Bild1: GNU Free Documentation License by Lawrence paladine; thank you;
https://de.wikipedia.org/wiki/Bild:Bakteriophage_T2_geschnitten.png

Quelle Bild2: Creative Commons Attribution ShareAlike license versions 2.5 by Wikicommonsuser Ayacop & Hans-Wolfgang Ackermann;
<https://biology.plosjournals.org/perlserv/?request=get-document&doi=10.1371%2Fjournal.pbio.0030182&ct=1;>
[https://en.wikipedia.org/wiki/Public_Library_of_Science;](https://en.wikipedia.org/wiki/Public_Library_of_Science) [https://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Phage_S-PM2.png;](https://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Phage_S-PM2.png)
<https://creativecommons.org/licenses/by/2.5/>

Aufgaben:

1. Die Begriffe „Virus“ und „Bakteriophage“ sind eigentlich falsch gewählt. Begründe.
2. Vergleiche die Vermehrung der Bakteriophagen und der übrigen Viren miteinander. Nenne Gemeinsamkeiten und Unterschiede.
3. Erkläre, was mit dem Satz „Bakterien leben - Viren lassen leben“ ausgedrückt werden soll.
4. Weshalb benutzt man in der Informatik den Begriff „Computerviren“? Finde Gemeinsamkeiten und Unterschiede.

Zusatzinformationen:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Bakteriophagen>
<https://de.wikipedia.org/wiki/Lysosom>
<https://de.wikipedia.org/wiki/Lysozym>

Angriff der Bakteriophagen

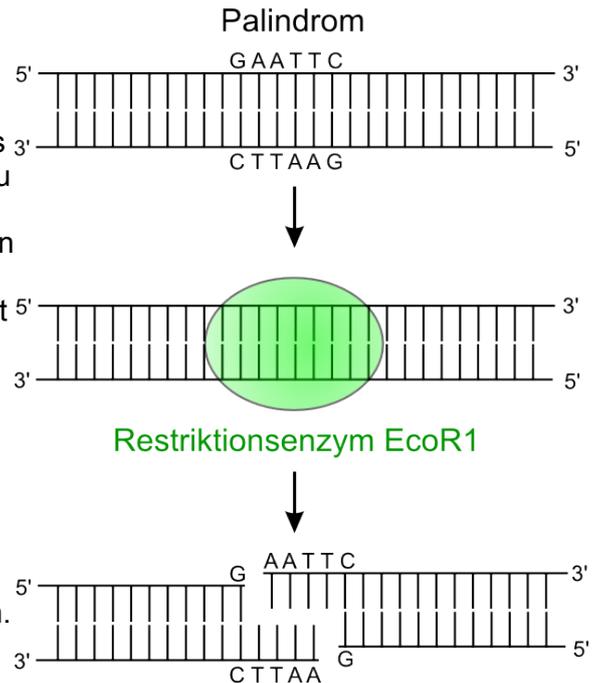


Quelle Bild: Public Domain by Wikicommonsuser Graham Colm - Thank you; <https://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Phage.jpg>

Werkzeuge der Gentechnik: Restriktionsenzyme als „genetische Scheren“

Restriktionsenzyme:

- Erkennen eine spezifische Nukleotidfolge (4-6 Basenpaare (=BP)).
- Schneiden um bis zu 4 Nukleotide versetzt.
- Haben normalerweise in Bakterien die Funktion, das Bakterium vor der Infektion durch Bakteriophagen zu schützen, indem sie die eindringende DNA des Phagen zerschneiden. In den Bakterien selbst haben die Restriktionsenzyme keine Wirkung, die die eigene Bakterien-DNA durch Methylierung geschützt ist.
Bedenke: Das Immunabwehrsystem bei Tieren und Menschen befindet sich in Form von Abwehrzellen im Blut. Bei Bakterien gibt es nichts Vergleichbares. Nur die Restriktionsenzyme dienen der Zerstörung von Phagen-DNA und somit der Virenabwehr.
- Das erste Restriktionsenzym, welches die Menschheit nutzte, war EcoR1. Es wird aus dem Darmbakterium **Escherichia coli** (E. Coli) gewonnen.



Wichtige Eigenschaften von Restriktionsenzymen

- Man kennt über 400 verschiedene Restriktionsenzyme. Im Grunde besitzt jeder Bakterienstamm nur 1 RE mit charakteristischem Erkennungsmuster!
- Bei versetztem Schnitt entstehen doppelsträngige Abschnitte mit überstehenden, einzelsträngigen Enden. Diese nennt man sticky ends.
- Die meisten Restriktionsenzym-Schnittstellen sind palindromisch

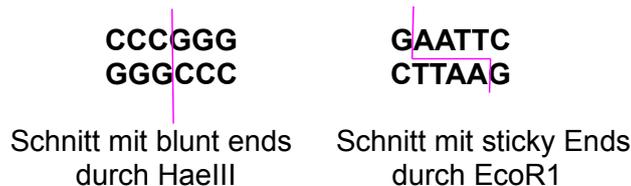
Restriktionsenzyme, (auch Restriktionsendonukleasen genannt), sind aus Bakterien gewonnene Enzyme, welche DNA an bestimmten Positionen schneiden können. Jedes Restriktionsenzym erkennt dabei eine spezifische DNA-Basensequenz (durch meist 6 Basen (=Basenpaar-Palindrom).)

Jedes Restriktionsenzym hat ein spezifisches Palindrom. Ein Palindrom ist eine punktsymmetrische Basenfolgen, welche in beiden Richtungen abgelesen denselben Sinn ergibt:

z.B. EcoR1: 5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

(siehe auch die folgende Seite)

Der Trennungsschnitt des Restriktionsenzym kann sowohl gerade (=> blunt ends bei HaellI (von dem Bakterium Haemophilus aegypticus)), als auch versetzt (=> sticky ends bei EcoR1) sein:



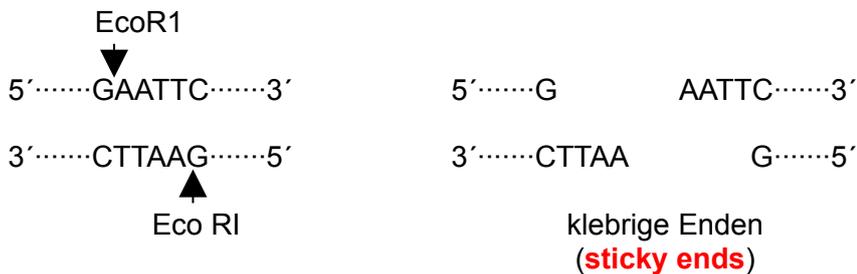
Sticky ends (=klebrige Enden) ziehen sich durch Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen gegenseitig an, da die Basen komplementär zueinander sind. Normalerweise passiert es also, dass sofort nach einem Schnitt, sich die „klebrigen“ Enden wieder zusammenfügen. Gibt man nun aber beispielsweise Fremd-DNA hinzu, die die gleichen „klebrigen“

Enden hat (also mit dem gleichen Restriktionsenzym geschnitten wurde) , so wird auch diese teilweise integriert. Das Verbinden nach Einfügen von neuer DNA kann leicht mithilfe von Ligasen unterstützt werden, da diese dann auch die Verbindung des Phosphat-Desoxyribose-Rückgrats wieder herstellt.

Glatte Enden (blunt ends) hingegen, können nur langsam, mithilfe von speziellen Ligasen zusammengefügt werden.

**Durch Restriktionsenzyme kann DNA neu kombiniert werden!
Will man die klebrigen Enden wieder fest verknüpfen, so benötigt man dazu das Enzym Ligase!**

Benennung von Restriktionsenzymen am Beispiel von EcoR1:



Nach ihren Eigenschaften unterscheidet man drei Typen:

- Typ I schneidet die DNA an einer beliebigen (zufälligen!) Stelle. Diese ist in der Regel weit von der eigentlichen Erkennungssequenz entfernt. Zum Schneiden wird ATP benötigt.
- Typ II schneidet die DNA innerhalb (!) oder in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz. Dieser Typ benötigt kein ATP.
- Typ III schneidet die DNA etwa 20 bis 25 Basenpaare von der Erkennungssequenz entfernt. Benötigt ebenfalls ATP.

Zu jedem Typ gibt es mehrere, hier nicht aufgeführte Subtypen.

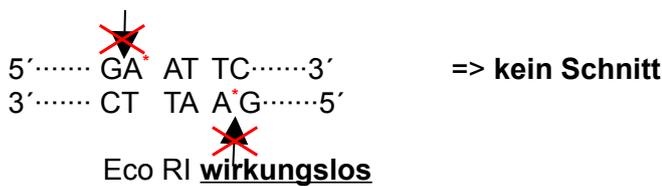
Werkzeuge der Gentechnik: DNA-Methylasen - wichtige Schutzenzyme

Wie wird von Bakterien verhindert, dass die Restriktionsenzyme die eigene DNA angreifen? Biologen haben auf der DNA Schutzgruppen gefunden. Sie leiten sich von dem organischen Rest „Methyl“ ab.

=> Restriktionsenzyme können dem eigenen Bakteriengenom nicht schaden, da deren Basen an den Schnittstellen durch Methylgruppen modifiziert sind. Diese Methylgruppen haben eine Schutzfunktion.

Wenn die Abwehr der Bakterien gegen Phagen nicht funktioniert, dann ist ein Bakterium befallen und wird neu programmiert.

Phagen, die in einem Bakterienstamm vermehrt werden, haben also logischerweise das Restriktionsenzym-Abwehrsystem unterlaufen. Dies kann man sich ein wenig wie ein Wettlauf zwischen Phagen und Bakterien vorstellen.



Restriktionsenzym-System und Methylase-Modifikationssystem gehören in einer Zelle eng zusammen!

Zusatzinformationen:

<https://de.wikipedia.org/wiki/Restriktionsenzyme>

Exkurs: Was ist ein Palindrom?

In der Genetik versteht man unter dem Begriff Palindrom einen DNA-Abschnitt, der in beide Richtungen gelesen, die gleiche Sequenzfolge ergibt. Diese sind im Genom von Lebewesen gar nicht mal so selten.

Um dies zu verdeutlichen, kann man sich ja mal die folgenden Sätze und Wörter anschauen:

Wortpalindrome:

- Anna
- Otto
- Relief
- Relieffeiler
- Rentner
- Rotor
- Reittier

- Eber - Rebe
- Nebel - Leben
- Sarg - Gras
- Lager - Regal

Sätze:

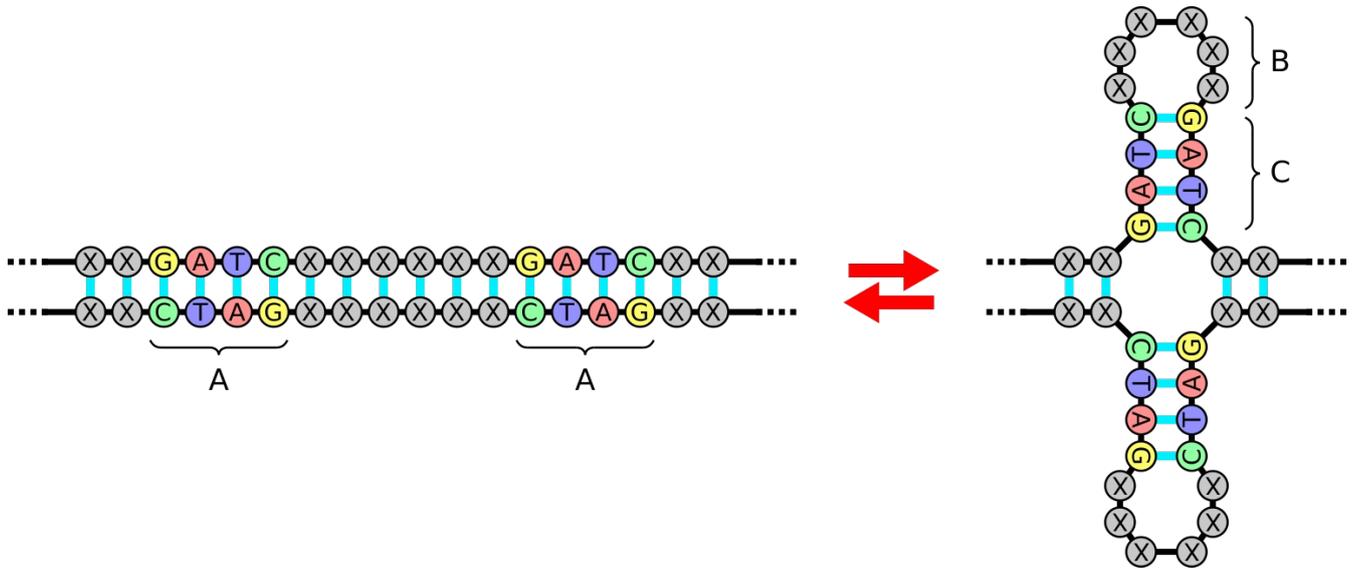
- Die Liebe ist Sieger; stets rege ist sie bei Leid.
- Eine güldne, gute Tugend: Lüge nie!
- Erika feuert nur untreue Fakire.
- Ein Esel lese nie.
- O Genie, der Herr ehre Dein Ego!
- Trug Tim eine so helle Hose nie mit Gurt?

Viele Beispiele unter:

https://de.wikipedia.org/wiki/Liste_deutscher_Palindrome#Satzpalindrome_und_Satzfragmentpalindrome

Palindrome dienen der Gentechnik als Erkennungsstellen

Eine weitere Folge der genetischen Palindrome ist, dass sich DNA Fäden nun anders falten können, als man es von der Doppelhelix gewohnt ist - eine Schlaufenbildung ist die Folge:



Quelle Bild: CC-by-sa 3. 0 by Wikicommonsuser acdx - Thank you;
https://commons.wikimedia.org/wiki/File:DNA_palindrome.svg; <https://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/deed.en>

Zusatzinformationen:
<https://de.wikipedia.org/wiki/Palindrom>

Werkzeuge der Gentechnik: Vektoren

Vektoren transportieren Fremd-DNA in die Zielzellen. Sie werden also verwendet, um einen rekombinanten Organismus herzustellen.

Vektoren können Plasmide sowie Viren sein, welche als ein solches „Vehikel“ für den Gentransfer dienen (= „Gentaxis“).

Def.: Eine rekombinante Zelle (= transgene Zelle) ist eine Zelle mit künstlich eingeschleuster DNA. (=> rekombinante DNA = künstlich erzeugte DNA).

Dafür benötigen Vektoren folgende Eigenschaften:

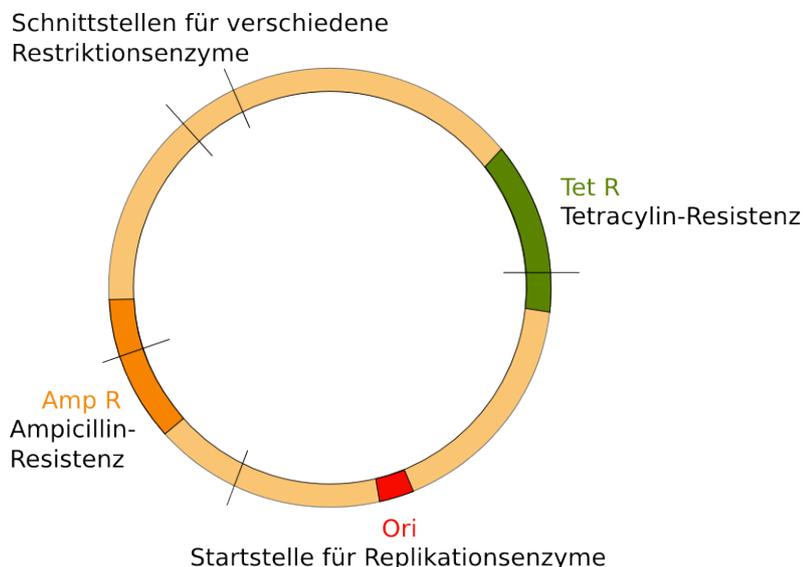
- Auf dem Vektor befindet sich ein Replikationsursprung
=> das Plasmid wird bei einer Fortpflanzung der Wirtszelle mit geteilt!
- Der Vektor sollten geeignete Schnittstellen für ein Restriktionsenzym haben.
=> Einbau der Spender-DNA darf keine wesentlichen Funktionen des Vektors stören.
- Die Vektoren müssen einfach (also preiswert) und in großen Mengen zu isolieren sein.
- Um die Zielzellen zu bestimmen, bei denen der Geneinbau erfolgreich war, müssen die Vektoren der Wirtszelle einen Selektionsvorteil bieten (z.B. Antibiotikaresistenz!)
=> Nach dem Einbau des Erbguts werden alle Bakterien des Experiments mit Antibiotika behandelt. => Nur die Zellen, welche erfolgreich die DNA integriert haben, überleben dies, da sie resistent sind!

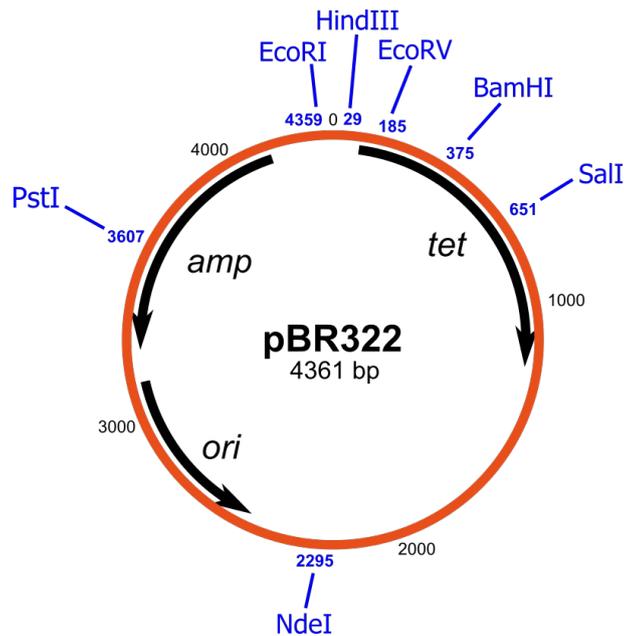
Je nach den Wirtszellen verwendet man spezifische Vektoren! Für die DNA-Übertragung auf Bakterien z.B. verwendet man vor allem Plasmide und Bakteriophagen als Vektor.

Zur Erinnerung: Plasmide sind kleine (<70 000 Basenpaare), ringförmige, doppelsträngige und sich autonom replizierende DNA-Elemente in Bakterien.

Ein Beispiel für ein passendes Plasmid mit zwei Antibiotikaresistenzgenen (mit Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz) ist das **Plasmid pBR322**. Es hat:

- Einen Replikationsstartpunkt Ori (von Origin)
- ein Resistenzgen gegen Antibiotikum Tetracyclin (Tet^r)
- ein Resistenzgen gegen Antibiotikum Ampicillin (Amp^r)
- Mehrere Schnittstellen für eine Vielzahl von Restriktionsenzymen





Quelle Bild: Public Domain by Wikicommonsusers Ayacop&Yikrazuul Thank You! <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:PBR322.svg>

Biologische Bedeutung von Plasmid-Vektoren:

- Nur die ringförmige DNA ist in Bakterienzellen überhaupt stabil!
- die Genübertragung ist möglich (Fruchtbarkeitsgene für Übertragungsröhren)
- Plasmide enthalten entbehrliche Zusatzinformation (z.B. Resistenzgene)
- Plasmide überspringen bakterielle Artgrenzen!
- Plasmide können ohne Selektionsdruck (z.B. Antibiotikastress) verlorengehen.
- Plasmide können ihren autonomen Status durch Integration in das Hauptchromosom verlieren.

Aufgaben:

1. Was versteht man unter rekombinanter DNA und wie kann man sie erzeugen?
2. Welche Aufgabe kommt den Restriktionsenzymen zu, welche dem Vektor? Wie hängen beide zusammen?
3. Wie lang muss durchschnittlich ein Fragment sein, um eine Schnittstelle mit 4 Basen zu enthalten?

Lösung 3:

Man benötigt eine 4 Basenpaar-Erkennungssequenz:

Geht man von der statistischen Wahrscheinlichkeit von A:T:C:G = 1:1:1:1 aus, so folgt:

=> 2^8 verschiedene Sequenzen möglich, d.h. nach jeder $1/2^8$ Base wird geschnitten!

- Ist die Erkennungssequenz hingegen z.B. 40 Basenpaare lang, so ergeben sich $40 - 3$ (also 37) 4er-Sequenzen!
(Bei 2 Bp-Erkennungssequenz $1/2^4$ (=1/16) hätte eine Sequenz mit 40 Basenpaaren bereits 2 Schnittstellen!!)
- Beim Polypeptid Insulin liegen 141 AS vor => 0,5 Schnittstellen bei 4 Basenpaar-Erkennungssequenz)

Zusatzinformationen:

https://de.wikipedia.org/wiki/Vektor_%28Gentechnik%29

Genaustausch bei Bakterien und Viren

Die Ursprünge der Gentechnik liegen in den Vierzigerjahren des vergangenen Jahrhunderts. In dieser Zeit begann man Bakterien und Viren zu verwenden, um Mutationen auszulösen und Gene zwischen Lebewesen auszutauschen (=Rekombination).

Sehr viel Forschung und viele moderne Methoden konzentrieren sich auf das harmlose Darmbakterium *Escherichia coli*. Diese einzellige Bakterie hat eine Größe von ca. 1/1000mm und ist leicht in Nährlösungen zu vermehren. Das enthaltene Bakterienchromosom ist fast 1mm lang. *E. coli* enthält zusätzlich Ribosomen, eine Zellmembran und eine Zellwand. In die Zellmembran sind Enzyme zur Zellatmung eingelagert.

Herstellung rekombinanter DNA

Gentechnischen Veränderungen von Lebewesen basieren meist auf folgendem grundlegenden Prinzip:

1. DNA-Isolierung: Die DNA des Spenderorganismus wird isoliert und in Fragmente brauchbarer Größe zerlegt:

Das Zerlegen erfolgt durch Restriktionsenzyme. Ein solches Fragment kann mehrere tausend Basenpaare lang sein.

2. Isolierung und Aufschneiden eines geeigneten Vektors, welcher dann für den Einbau in die Spender-DNA dient. Das Aufschneiden des Vektors wird vom selben Restriktionsenzym erledigt, welches zum Zerschneiden der Spender-DNA verwendet wurde.

3. Hybridisierung: Verknüpfen der Vektor-DNA mit der fragmentierten Spender-DNA durch Ligasen.

4. Transformation: Übertragung der rekombinierten Vektor-DNA in die Zellen des Empfängerorganismus (z.B. E. coli-Bakterien).

5. Selektion und Vermehrung: Auslese (Selektive Identifizierung) und anschließende Vermehrung der Wirtszellen, welche den rekombinierten Vektor aufgenommen haben. Dazu werden mit dem eigentlichen Gen auch sogenannte Marker- bzw. Selektionsgene übertragen (dazu eignen sich z.B. Antibiotika-Resistenzgene). Diese können nachträglich zur Identifikation einer erfolgreichen Übertragung genutzt werden.

(z.B. durch Antibiotikabehandlung - die überlebenden Bakterien haben das neue Gen!).

**Wenn nur eine Zelle das neue Gen aufgenommen hat, sind alle Nachfahren identisch!
Man spricht daher von DNA-Klonierung.**

Zusammenfassung: Herstellung rekombinanter DNA

1. DNA-Isolierung und DNA-Zerlegung des Spenderorganismus
2. Isolierung und Aufschneiden eines Vektors
3. Hybridisierung
4. Transformation
5. Selektion und Vermehrung

Selektion und Klonierung biochemisch rekombinanter DNA

Einschleusen des Hybridvektors in eine Bakterienzelle und Vermehrung => Klonierung der DNA!

Es gibt dabei mehrere Verfahren DNA zu übertragen, die bekanntesten sind Transformation (DNA-Übertragung mithilfe von Bakterien) und Transduktion (DNA-Übertragung mithilfe von Viren).

Die DNA-Einschleusung geschieht durch:

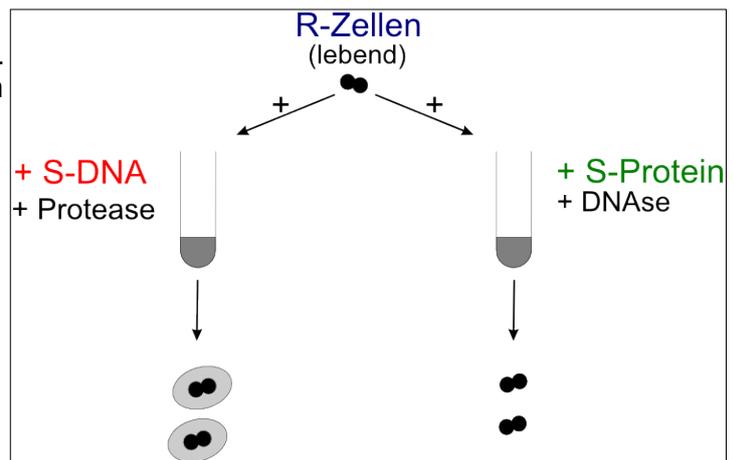
- Transformation (=Übertragung „nackter“ DNA durch Bakterien). Vergleiche: Versuche von Avery!
- Bakterielle Konjugation (Austausch von DNA zwischen Bakterien)
- Viren => Transduktion:
 Die eukaryotischen Zellen enthalten durch Viren neue DNA, welche ins Genom eingebaut wird. Diese virale DNA ist dort über sehr lange Zeiträume vorhanden und wird zum Teil auch transkribiert.
 Virentypen: - Retroviren (HIV ist zum Beispiel ein solcher Retrovirus)
 - eukaryotische Viren mit genomischer Einzelstrang-RNA
 - Adenoviren (animale Viren mit linearer, doppelsträngiger DNA)
- Mikroinjektion: Bei eukaryotischen Zellen kann Erbgut injiziert werden. Bei der künstlichen Befruchtung wird auch mit Mikroinjektion gearbeitet.

Die Transformationsversuche von Avery

Der amerikanische Arzt Oswald Avery überprüfte 1944 das Experiment von Griffith und wandelte es ab. Er gab zu kapsellosen R-Bakterien in zwei Versuchen einmal die DNA der S-Form und einmal die Proteine der S-Form. Er wollte so die Frage klären, ob nun die DNA oder die Proteine die Information zur Schleimkapselbildung an die R-Form weitergaben.

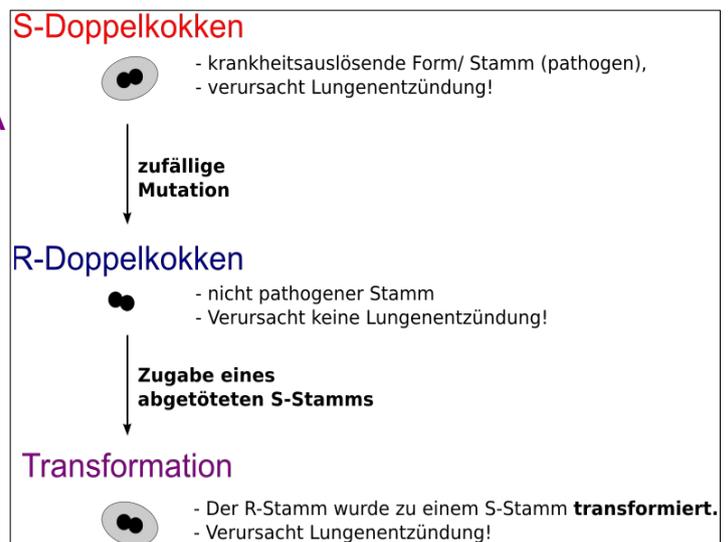
Die DNA der infektiösen S-Form in Kombination mit lebenden R-Form-Bakterien führte zur Bildung einer neuen Generation von Bakterien mit Schleimkapsel. Die Zugabe von Zellproteinen zur R-Form brachte hingegen keine Änderung!

Avery hat damit bewiesen, dass die DNA Informationen weitergibt, nicht die Proteine!



Als Transformation bezeichnet man die Einschleusung und Übertragung von nackter DNA in Zellen. Sie ist ein parasexueller Vorgang. In der Regel sind dabei Bakterien beteiligt, wobei DNA von einem Bakterienstamm auf einen anderen oder auf eine eukaryotische Zelle übertragen werden.

Die Transformation dient der Weitergabe vererbbarer Eigenschaften.



Zusatzinformationen

[https://de.wikipedia.org/wiki/Transformation_\(Genetik\)](https://de.wikipedia.org/wiki/Transformation_(Genetik))

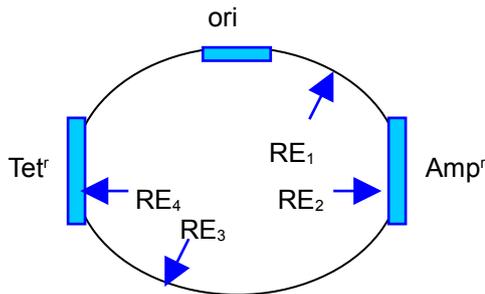
Das Problem bei der Transformation:

Nur bei 1 : 10⁷ Bakterien wird der Vektor wirklich eingeschleust. Wie findet man nun die Bakterien heraus, die ein neues Plasmid erhalten haben?

Eine Lösung:

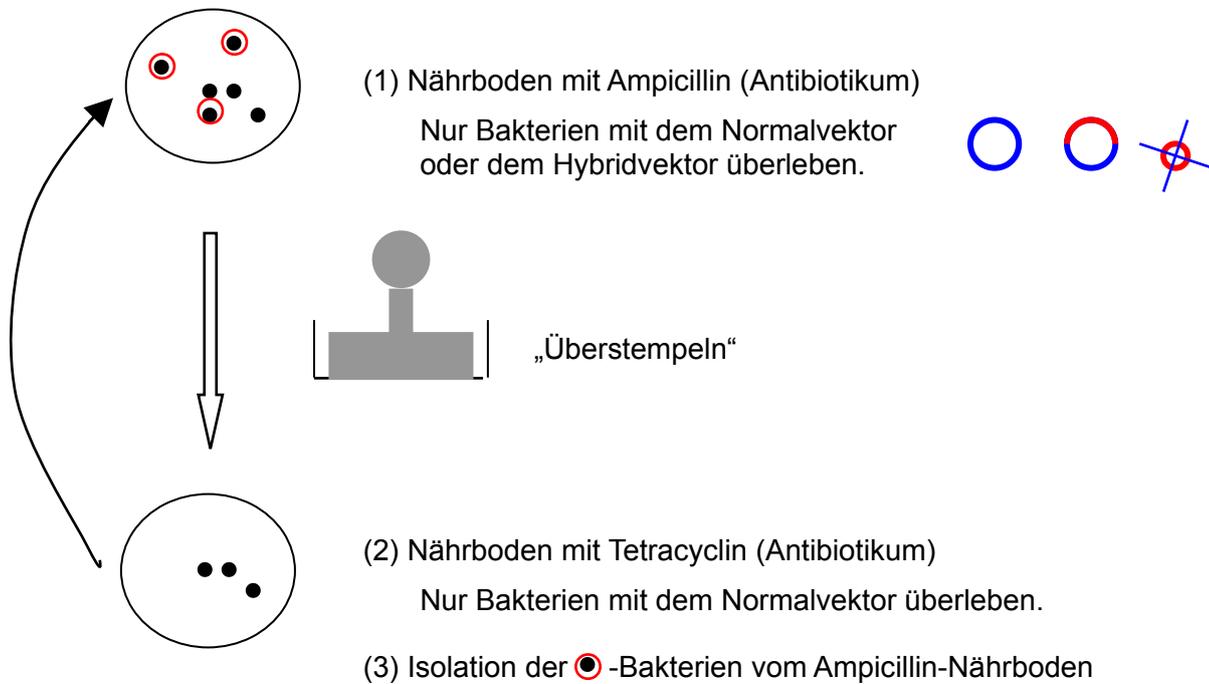
Der Plasmidvektor pBR 322 enthält:

- Replikationsstart (ori),
- 2 Bereiche mit Antibiotikaresistenzgenen (Ampicillin, Tetracyclin)
- Es sind 4 verschiedene Restriktionsenzym-Schnittstellen für vier unterschiedliche Restriktionsenzyme (=RE) vorhanden.



Einbau unter Verwendung des Restriktionsenzym Eco RI (=RE₄)
 => Nur ringförmige DNA wird bei der Teilung mit verdoppelt!
 Dann folgt die Vermehrung und Selektion der Bakterien auf Nährböden.

Vermehrung und Selektion der Bakterien auf Nährböden



Antibiotikaresistenz durch Mutation

Infektionen durch Bakterien plagten die Menschheit schon immer! Bekannte Vertreter für solche Infektionen sind Bakterien, welche Entzündungen (Mandeln, Bindehaut, Lunge, Hirnhaut, Blase usw.) oder Lebensmittelvergiftungen (z.B. Salmonellen) verursachen. Solche Infektionen lassen sich meist durch einen Abstrich der betroffenen Stelle (bei der Bakterien entnommen werden) bestimmen. Der Abstrich wird dann auf einer Agarplatte (Nährboden) aufgetragen und nach wenigen Tagen Bebrütung kann man die Bakterien identifizieren.

Als Gegenmaßnahme verschreiben Ärzte sogenannte Antibiotika. Das erste Antibiotikum wurde von Alexander Fleming entdeckt. Er stellte fest, dass auf Agar-Platten keine Bakterien wachsen, wenn sich gleichzeitig der Pilz „Penicillium“ (Pinselschimmel) auf dieser befindet.

Ein Antibiotikum muss Bakterien töten, aber darf für Menschen nicht gefährlich sein. Gut geeignet sind also Stoffe, welche die besonderen Charakteristika der Prokaryoten angreifen.

Zu diesen Besonderheiten der Prokaryoten zählt z.B. die Zellwand aus Murein. Diese ist bei keinem Eukaryoten zu finden. Pflanzen haben zwar Zellwände, aber diese enthalten Zellulose. Bei Pilzen ist in der Zellwand Chitin zu finden.

- Das von Alexander Fleming gefundene Penicillin, wird nun von den Bakterien anstelle von Murein in die Zellwand eingebaut. Allerdings ist es kein fester Stoff, sodass Löcher entstehen, welche letztlich das Bakterium töten.
- Eine weitere Klasse von Antibiotika sind die Sulfonamide. Sie verhindern in den Zellen die Synthese von Folsäure. Für Menschen hat dies ebenfalls keine Bedeutung, da wir die Folsäure als Vitamin B sowieso mit der Nahrung aufnehmen müssen. Einen Folsäuresynthesemechanismus haben wir nicht!
- Viele weitere Antibiotika stören einfach nur die Proteinbiosynthese. Eine Vermehrung der Erreger ist dann einfach nicht möglich. So kann z.B. ein Antibiotikum die Gyrase hemmen (sogenannte Gyrase-Hemmer), welche bei Eukaryoten nicht notwendig ist, da diese keine ringförmige DNA haben.

Weitere Antibiotika in der Übersicht:

- Actinomycin D bindet an Prokaryoten DNA und verhindert die Transkription
- Chloramphenicol: bindet ebenfalls an Bakterien-DNA
- Cycloheximid wirkt bei Eukaryoten, indem im Ribosom die Aminosäuren nicht verknüpft werden können.
- Kirromycin blockiert das Weiterrücken von der A- zur P-Stelle im Ribosom. Polypeptide können demnach nicht gebildet werden.
- Puromycin ähnelt einer beladenen tRNA und blockiert so die A-Stelle in Ribosomen.
- Rifampicin blockiert die RNA-Polymerasen bei Prokaryoten.
- Tetracycline sorgt dafür, dass die A-Stelle im Ribosom nicht für beladene tRNA erreichbar ist.

Antibiotikaresistenz wird oft auch Penicillinresistenz genannt.

<https://de.wikipedia.org/wiki/Antibiotika>

https://de.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus

Antibiotikaresistenzen

Problematisch wird es, wenn diese Antibiotika nicht mehr wirken! Wird ein neues Antibiotikum entwickelt, so ist dessen Wirksamkeit anfangs sehr hoch. Allerdings beobachteten Ärzte in der Vergangenheit immer nach solchen Neueinführungen, dass diese anfänglich hohe Wirksamkeit in den Folgejahren nachließ.

Wird ein Antibiotikum bei vielen Menschen wirkungslos, z.B. das Antibiotikum Kanamycin, spricht von einer Antibiotikumresistenz.

Der Grund ist in der hohen Mutationsrate und der schnellen Anpassungsfähigkeit der Bakterien zu finden. Bakterien tragen verschiedene Resistenzen auf Plasmidgenen. Diese Plasmide werden R-Plasmide genannt.

Verschiedene Mechanismen können hier wirksam sein:

- Das Bakterium stellt durch eine Information auf dem R-Plasmid ein Genprodukt her, welches das Antibiotikum enzymatisch unwirksam macht.
- Das Bakterium bildet durch eine Information auf dem R-Plasmid spezielle Kanäle, welche das Antibiotikum ausschleusen.
- Das Bakterium bildet durch eine Information auf dem R-Plasmid Ribosomen, welche in ihrer Form leicht verändert sind und so eine ribosomale Wirkung des Antibiotikums nicht zulassen.
- Das Bakterium verändert durch eine Information auf dem R-Plasmid die Carrierproteine des Bakteriums zur Stoffaufnahme so, dass diese kein Antibiotikum mehr hineinlassen.

Beschleunigung Zunahme der Resistenzen durch vermehrten Antibiotika-Einsatz

Wird ein neues Antibiotikum entwickelt, zuletzt geschah dies Anfang der 90er Jahre), so wirkt es zu 100%. In den folgenden Jahren nimmt diese Wirkung allerdings stark ab. Eine der Ursachen liegt in der hohen Mutationsrate der Bakterien. Eine weitere Ursache ist deren enorm große Anzahl!

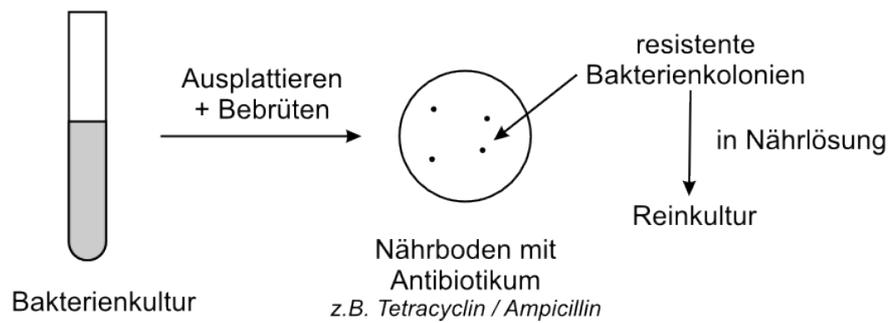
- a) Nenne Auswirkungen einer Antibiotikumresistenz. Was ist, wenn ein Patient auf mehrere Antibiotika nicht reagiert?
- b) Beschreibe, warum heute Ärzte befürchten, dass die Antibiotikumresistenzen weltweit stark zunehmen.
- c) Welche molekularbiologischen Ursachen sind für die auftretenden Resistenzen verantwortlich.

Gentechnik in der Medizin: Selektion von Bakterien

Selektion von Antibiotika-Resistenzmutanten:

Als Antibiotikum sind Stoffe definiert, welche Bakterien abtöten (bzw. deren Wachstum hemmen)
Resistenzmutanten sind Bakterien, welche gegen ein bestimmtes Antibiotikum immun sind.

Selektion von Antibiotika-Resistenzmutanten



Erinnere Dich: Mutationen erfolgen zufällig, spontan und ungerichtet!

Nicht der Kontakt mit Antibiotikum führt zur Mutation!

Eine Erhöhung der Mutationsrate ist durch Einwirkung von mutagenen Substanzen oder durch Strahlung möglich!

Stempeltechnik bei Mangelmutanten

Hin und wieder ist es gut bestimmte Bakterien einfach zu selektieren, auszuschließen, oder an Ihnen Genwirkketten zu untersuchen. Eine Methode dazu sind die sogenannten Mangelmutanten. Um sie herzustellen, muss man in drei Schritten vorgehen:

1. Zuerst werden bei einem Wildstamm (keine Mutante!) mit einem Mutagen (wie UV-Strahlung) Mutationen ausgelöst. Escherichia coli eignet sich gut für solche Versuche. Es kann normalerweise, sofern eine Stickstoffquelle vorhanden ist, seine benötigten AS selbst herstellen.
2. Dann werden diese mutierten Bakterien auf einen Mangelnährboden gebracht, dem ein Antibiotikum zugefügt wird, welches Bakterien tötet, sobald sie sich teilen. Die Mangelmutanten überleben auf diesem Boden, da sie aufgrund der fehlenden Aminosäuren nicht teilen können.

**Antibiotika wie Penicillin töten nur wachsende Bakterien vom Wildtyp!
Mangelmutanten überleben!**

3. Die Mangelmutanten bleiben übrig und können auf einem neuen Nährboden (dieses Mal mit den 20 benötigten AS!) wachsen und sich vermehren!
Zum Übertragen von einem Nährboden auf einen anderen wird ein steriler (keimfreier, autoklavierter) Stempel mit Samt-Überzug verwendet. Mit ihm werden die Bakterien von einem Nährboden auf den anderen getupft.
Der Vorteil ist, dass auf dem neuen Nährboden die Bakterien in identischer Kolonienform wachsen!

Allgemein dient die Stempeltechnik dazu, Bakterienkolonien von einem Nährmedium in ein anderes zu übertragen. Diese Technik geht auf Joshua Lederberg zurück.

Mangelmutanten sind nun Bakterienstämme, die im Gegensatz zu ihrem Wildtyp nicht in der Lage sind, alle Aminosäuren selbst synthetisieren. In der Regel fehlt ein Gen, sodass eine Aminosäure nicht hergestellt werden kann. Können zwei Aminosäuren nicht hergestellt werden, spricht man von Doppelmutanten.

Wenn man wissen möchte welche AS Mangelmutante man hergestellt hat, muss man 20 Nährböden herstellen, bei dem jeweils eine AS fehlt. Mit dem Stempel werden dann alle 20 Nährböden bestempelt. Dort, wo keine wächst, fehlt die entscheidende AS!
Dieses Verfahren nennt man Replika-Plattierung.

Selektion von Aminosäure-Mangelmutanten

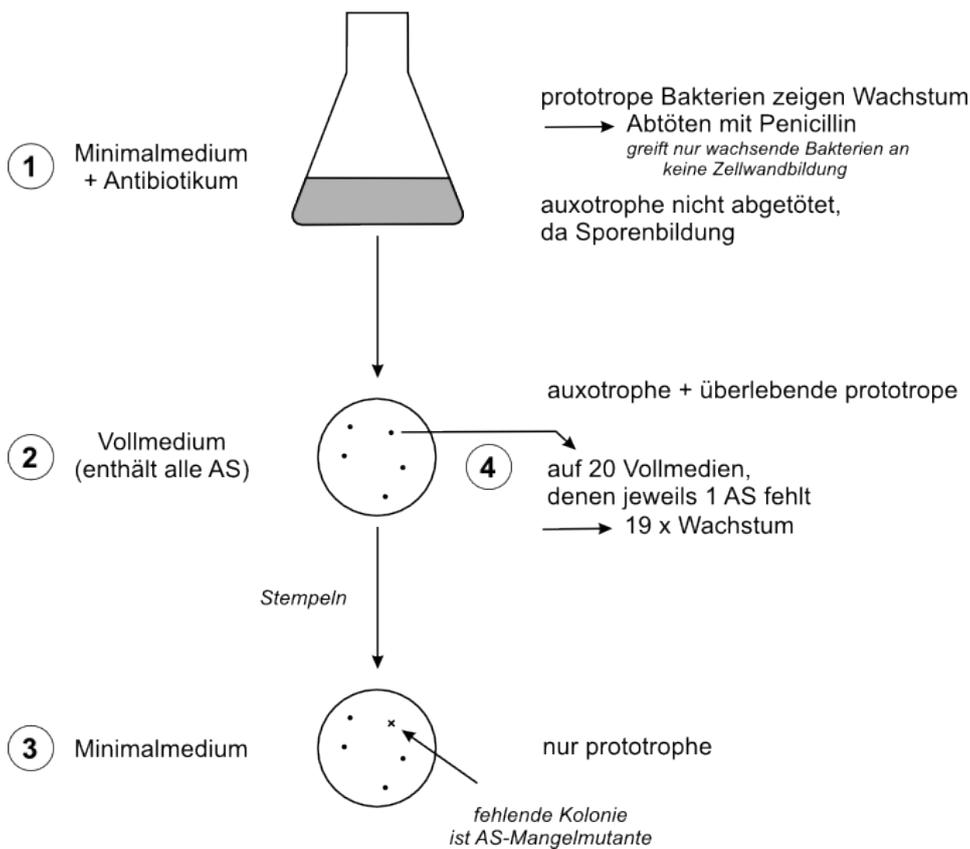
Wildtypbakterien sind **prototroph**

- benötigen nur eine organische Energiequelle (alle benötigten Aminosäuren werden aus diesem org. Molekül selbst synthetisiert)
- wachsen auf Minimalmedium (z.B. Glucose + Mineralstoffe)

Aminosäure-Mangelmutanten sind für bestimmte AS **auxotroph**.

- sie können diese Aminosäuren also nicht selbst herstellen
- sie wachsen nur auf einem Medium, das zusätzlich diese AS enthält!

Selektion von Aminosäure-Mangelmutanten



Wiederholung: Transformation (Griffith / Avery)

Molekulargenetische Deutung der Transformation:

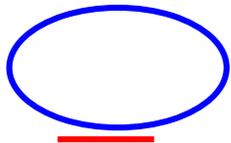
Bakterien zeigen normalerweise ungeschlechtliche Fortpflanzung. Dennoch sind parasexuelle Vorgänge (ohne Meiose und ohne Keimzellen!) möglich:

- Transformation
- Transduktion
- Konjugation

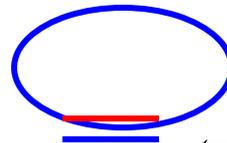
Transformation = Übertragung von isolierter DNA aus Spender-Bakterium oder von Plasmid-DNA (z.B. mit Antibiotika-Resistenz) auf Empfänger-Bakterium.

Es erfolgt jeweils Rekombination (vergleichbar mit Crossing-Over) falls homologe Abschnitte vorhanden sind.

Empfänger-DNA



Spender-DNA



Bakterienzelle mit neuen Eigenschaften

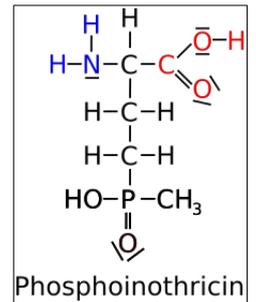
Plasmide existieren in Bakterien meist neben dem Bakteriumchromosom und verleihen so ebenso neue Eigenschaften.

Anwendung der Gentechnik: 1. Gentechnisch erzeugte Herbizidresistenz bei Mais und Raps

a) Streptomyceten schützen sich vor Konkurrenz:

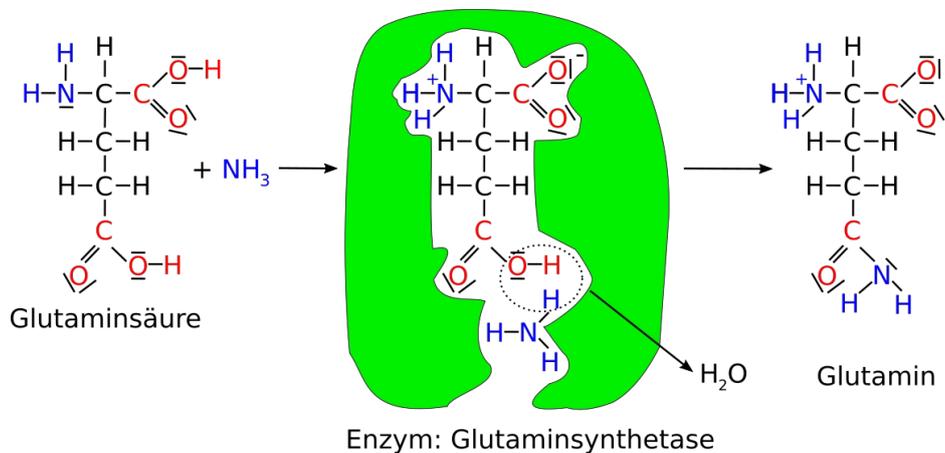
In bodenlebenden Streptomyceten (Bakterien) hat man einen Stoff gefunden, welcher Phosphinothricin genannt wird. Er ist eine Aminosäure, die nur bei diesen Bakterien auftritt. Diese Aminosäure ist der Glutaminsäure sehr ähnlich.

Mit Phosphinothricin wehren sich die im Boden lebenden Bakterien gegen andere Lebewesen im Boden (Ausschalten der Konkurrenz!).

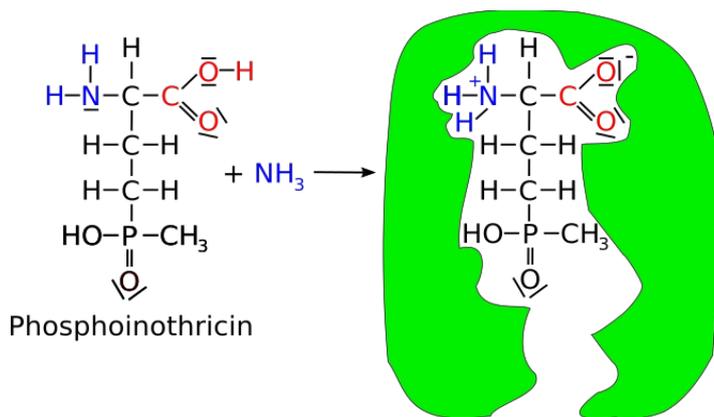


Doch wie genau funktioniert dies?

Alle Bakterien müssen die Aminosäure Glutamin bilden. Sie ist für den Stoffwechsel aller Lebewesen wichtig. Die Bildung von Glutamin geschieht durch enzymatische Umwandlung von Glutaminsäure mit Ammoniak:



Einige Streptomyceten haben nun die Fähigkeit, Phosphinothricin herzustellen. Dieser Stoff blockiert bei allen anderen Bakterien und Pilzen im Boden das aktive Zentrum des Enzyms Glutaminsynthetase, sodass diese kein Glutamin mehr bilden können. Es liegt eine kompetitive Hemmung vor:



Blokade des aktiven Zentrums des Enzyms Glutaminsynthetase
 => keine Reaktion mit NH₃
 => keine weitere Bildung von Glutamin
 => Zelltod

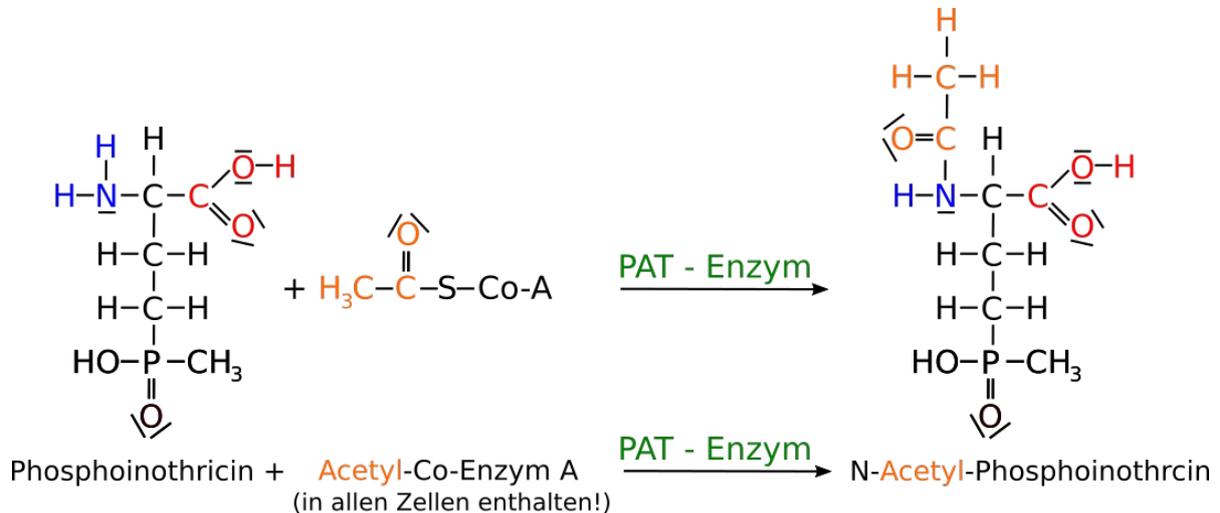
Aufgaben:

1. Fasse zusammen, wie Phosphinothricin wirkt.
2. Stelle Hypothesen auf, wie sich die Streptomyceten selbst vor Vergiftung schützen könnten.

b) Wie schützen sich Streptomyceten vor Selbstvergiftung?

Streptomyceten sind natürlich genauso auf Glutamin angewiesen, wie alle anderen Lebewesen auch. Da sie selbst einen kompetitiven Hemmstoff herstellen, dem sie ja auch ausgesetzt sind, müssen sie einen Mechanismus haben, der sie selbst schützt!

Dieser Mechanismus ist das sogenannte PAT-Enzym. Es wandelt mithilfe von aktivierter Essigsäure (die sowieso in jeder atmenden Zelle vorhanden ist) Phosphinothricin derart um, dass es nicht mehr in das aktive Zentrum der Glutaminsynthetase passt.

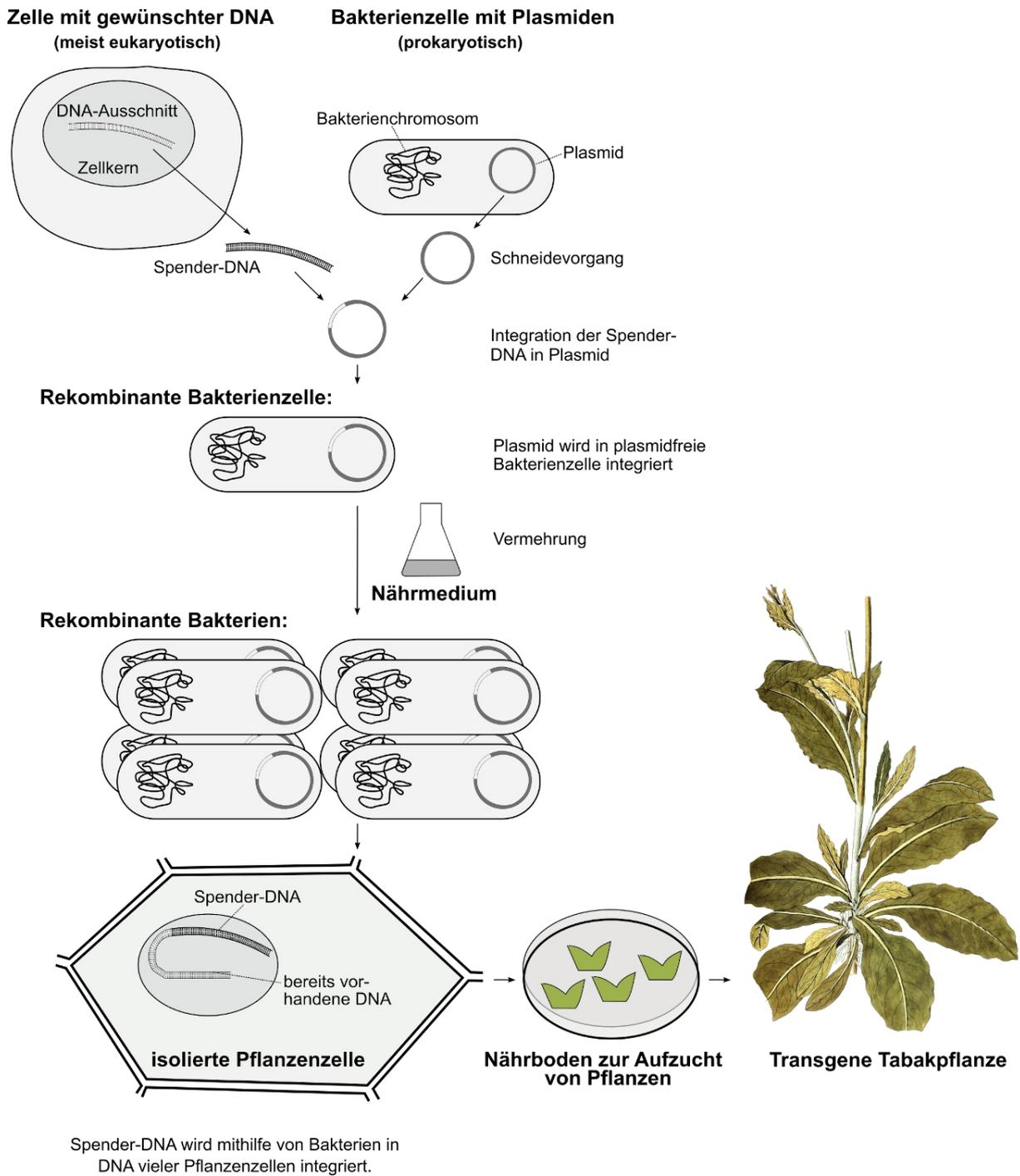


Aufgaben:

1. Erkläre mit eigenen Worten den ablaufenden Mechanismus und vergleiche die Lösung mit Deiner Hypothese.
2. Phosphinothricin hat die gleiche abtötende Wirkung auf Pflanzen! Gibt man auf ein Feld diesen Stoff, sterben alle Pflanzen! Welche Eigenschaften müsste nun eine Nutzpflanze wie z.B. Mais haben, damit sie nicht wie das Unkraut abstirbt?
3. Wie würde ein Maisbauer das Herbizid (welches übrigens unter dem Namen „Basta“ im Handel käuflich ist) anwenden?
4. Diskutiere mit Deinen Nachbarn, ob ein Landwirt mit anderen Auswirkungen als der Vernichtung des Unkrauts zu rechnen hat.

Anwendung der Gentechnik: 2. Wie bekommt man Gene in Pflanzen oder Tiere?

Wenn man nun eine Nutzpflanze wie Tabak, Mais oder Raps, mit dem vorher erwähnten PAT-Gen vor Herbiziden schützen möchte, dann muss dieses Bakteriengen nun in die Pflanze transportiert werden. Dazu eignen sich Viren oder Bakterien als Transportmittel (=Gentaxi, bzw. Genvektor genannt).



Beachte, dass die Größenverhältnisse nicht korrekt wiedergegeben werden können. Bakterienzellen sind sehr viel kleiner als Pflanzenzellen. Auch die Petrischale im vorletzten Bild ist natürlich um ein vielfaches größer, als eine Pflanzenzelle!

Arbeitsschritte zur Fremdgenübertragung und Genproduktgewinnung

1. Gewinnung von normalen Plasmiden

2. Genbereitstellung

Folgende Möglichkeiten gibt es dazu:

a) Maschinelle DNA-Synthese (aber nur kurze Stücke entstehen)

Dazu werden einsträngige Oligonukleotid-DNA-Stücke bis zu einer Länge von ca. 100 BP künstlich synthetisiert.

b) DNA-Isolierung aus dem Erbgut

Diese Methode funktioniert nur bei Bakterien und Viren, da diese keine Introns haben.

c) cDNA-Synthese auf der Grundlage von m-RNA-Vorlagen

Reverse Transkriptase notwendig (= Enzym, das an einer RNA-Vorlage einzelsträngige DNA synthetisiert)
cDNA = erst einzelsträngige, dann doppelsträngige DNA-Kopie eines RNA-Moleküls

3. Anfügen von Verbindungsstücken ans Fremdgen

Verbindungsstücke (auch engl. Linker genannt (= künstliche kurzkettige Doppelstränge [mit etwa 12 BP])), welche eine Erkennungssequenz für ein Restriktionsenzym enthalten, werden an das Fremdgen angefügt.

4. Integration des Fremdgens in einem Hybridplasmid

„Hybridplasmid“ = bakterielles Plasmid, das Fremd-DNA integriert trägt.

5. Transformierung von Bakterien durch Einschleusen des Hybrid-Plasmids

6. Genklonierung

Genklonierung = identische Replikation von DNA.

7. Analyse: Auffinden der plasmidhaltigen Bakterien mit Fremdgen

Durch Antibiotikaresistenzen wird mithilfe der Stempeltechnik die passende Bakterie gefunden.

8. Gen-Expression

Gen-Expression = Transkription und Translation des Fremdgens bis zum gewünschten Protein (Ausprägung des Gens)