

Kapitel 08.17: Gentechnik

Inhalt

Kapitel 08.17: Gentechnik.....	1
Inhalt.....	2
Was ist Gentechnik?.....	3
Aspekte der Gentechnologie.....	4
Biologisches Material als Werkzeuge der Gentechnik.....	5
Restriktionsenzyme als „genetische Scheren“.....	5
Benennung von Restriktionsenzymen am Beispiel von Eco R1:.....	6
Biologischer Sinn der Restriktionsenzyme.....	6
Zusatzinformationen:.....	6
http://de.wikipedia.org/wiki/Restriktionsenzyme	6
DNS-Methylasen - wichtige Schutzenzyme.....	7
Vektoren.....	8
Biologische Bedeutung von Vektoren:.....	9
Herstellung rekombinanter DNA.....	10
Selektion und Klonierung biochemisch rekombinanter DNA.....	11
Das Problem bei der Transformation:.....	11
Vermehrung und Selektion der Bakterien auf Nährböden!.....	12
Kultur von Bakterien:.....	12
Anwendung der Gentechnik.....	15
1. Gentechnik in der Landwirtschaft.....	15
2. Gentechnik in der Medizin: Selektion von Bakterien.....	16
Selektion von Antibiotika-Resistenzmutanten:.....	16
3. Selektion von Aminosäure-Mangelmutanten.....	17
Wiederholung: Transformation (Griffith / Avery).....	18
Molekulargenetische Deutung der Transformation:.....	18
Wiederholung: Konjugation (1946 Lederberg/Tatum).....	19
Hfr-Zellen.....	19
Viren als Forschungsobjekte.....	20
Entwicklung und Vermehrung von Bakteriophagen:.....	22
Lytische und Lysogene Vermehrung bei Viren.....	23
Transduktion.....	24

Was ist Gentechnik?

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

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!

Aufgaben:

1. Wo findet im biologischen Organismus die eigentliche Neukombination von DNA statt?

⇒ Rekombination bei Eukaryonten Meiose, Befruchtung → rekombinante DNA

Zusatzinformationen:

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

Biologisches Material als Werkzeuge der Gentechnik

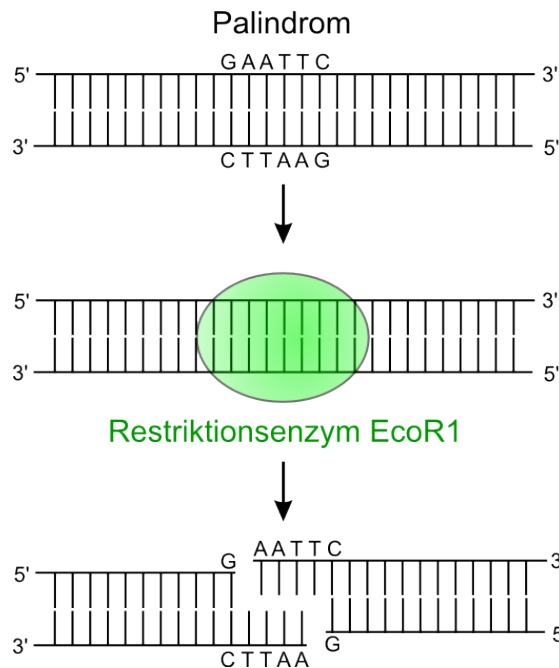
Restriktionsenzyme als „genetische Scheren“

Restriktionsenzyme:

- erkennen eine spezifische Nukleotidfolge (4-6 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.

Restriktionsenzyme, (auch Restriktionsendonukleasen), sind aus Bakterien gewonnene Enzyme, welche DNA an bestimmten Positionen schneiden können.

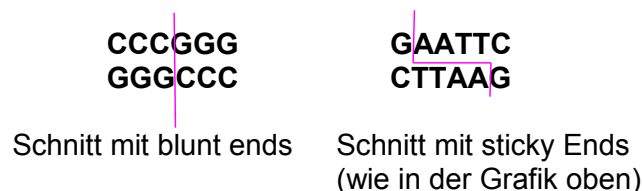
Jedes Restriktionsenzym erkennt dabei eine spezifische DNA-Basensequenz. **(durch meist 6 Basen (=Basenpaar-Palindrom).)**



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

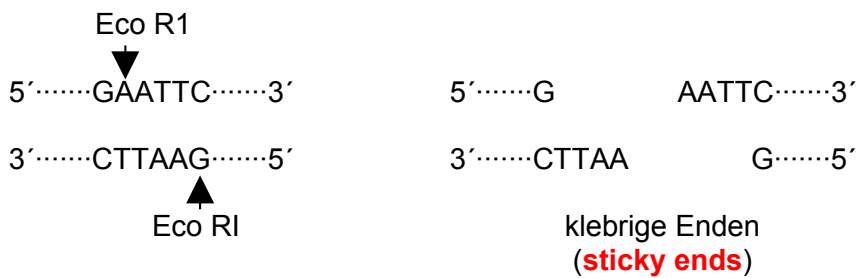
z.B. 5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'

Der Trennungsschnitt des Restriktionsenzym kann sowohl gerade (=> blunt ends), als auch versetzt (=> sticky ends) sein:



Sticky ends (=klebrige Enden) ziehen sich durch Wechselwirkungen wie Vand-der Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen gegenseitig an, da die Basen komplementär zueinander sind. Ein Verbinden nach einfügen von neuer DNA kann leicht mithilfe von Ligasen geschehen.

Glatte Enden hingegen können nur langsam mithilfe von speziellen Ligasen zusammengefügt werden.

Benennung von Restriktionsenzymen am Beispiel von Eco R1:**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 Subtypen.

Biologischer Sinn der Restriktionsenzyme

Abwehrsystem bei Tieren und Menschen:

- Abwehrzellen im Blut

Abwehrsystem bei Bakterien:

- Restriktionsenzym dienen der Zerstörung von Phagen-DNA

Wichtige Eigenschaften von Restriktionsenzyme

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

Will man die klebrigen Enden wieder fest verknüpfen, so benötigt man dazu das Enzym Ligase.

Zusatzinformationen:

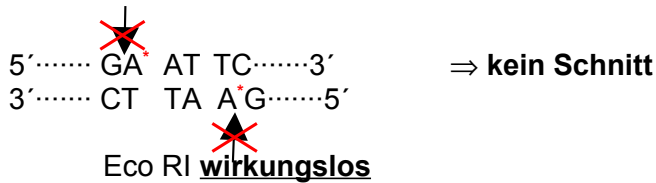
<http://de.wikipedia.org/wiki/Restriktionsenzyme>

DNA-Methylasen - wichtige Schutzenzyme

Wie wird von Bakterien verhindert, dass die Restriktionsenzyme die eigene DNA angreifen?

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

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:

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

Vektoren

Vektoren transportieren Fremd-DNA in die Zielzellen. Es entsteht also ein rekombinanter Organismus. Es können Plasmide sowie Viren sein, welche als ein solches Vehikel für den Gentransfer dienen (= „Gentaxis“). (Rekombinate DNA = künstlich erzeugte DNA)

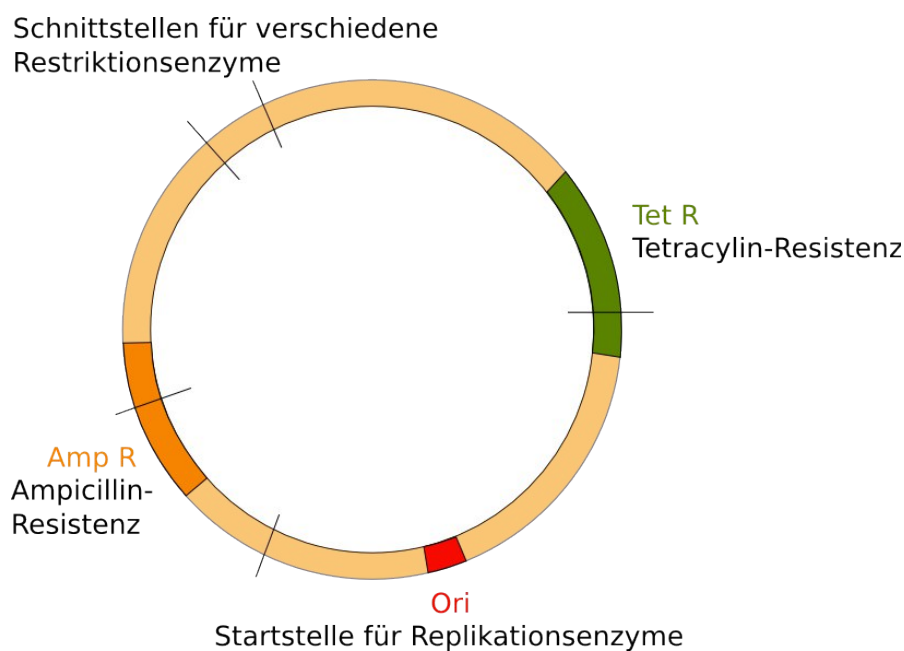
Dafür benötigen Vektoren folgende Eigenschaften:

- 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 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.

Beispiel für ein passendes Plasmid mit zwei Antibiotikaresistenzgenen (mit Ampicillin- und Tetracyclin-Resistenz):



Biologische Bedeutung von 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 Artgrenzen
- Plasmide können ohne Selektionsdruck (z.B. Antibiotikastress) verlorengehen
Plasmide können ihren autonomen Status durch Integration in das Hauptchromosom verlieren

Plasmid: pBR322

mit:

- Replikationsstartpunkt (ori (von Origin))
- Resistenz gegen Antibiotikum Tetracyclin (Tet^r)
- Resistenz gegen Antibiotikum Ampicillin (Amp^r)
- Schnittstellen für eine Vielzahl von Restriktionsenzymen

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?

Zusatzinformationen:

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

Herstellung rekombinanter DNA

Gentechnischen Veränderungen von Lebewesen basieren meist auf folgendem Prinzip:

1. Die DNA des Spenderorganismus wird isoliert und zerlegt 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. 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 haben das neue Gen!). Wenn nur eine Zelle das neue Gen aufgenommen hat, sind alle Nachfahren identisch! Man spricht daher von DNA-Klonierung.

Selektion und Klonierung biochemisch rekombinanter DNA

Einschleusen des Hybridvektors in eine Bakterienzelle und Vermehrung \Rightarrow Klonierung der DNA

Def.: rekombinate Zelle = transgene Zelle \Rightarrow Zelle mit künstlich eingeschleuster DNA

Einschleusung geschieht durch:

- Transformation (=Übertragung „nackter“ DNA)
- Transformation (Versuche von Avery)
- Viren = Transduktion:
Die transformierten eukaryontischen Zellen enthalten durch Viren DNA, welche ins Genom eingebaut wird. Diese virale DNA ist dort über sehr lange Zeiträume vorhanden und wird zum Teil auch transkribiert.
Typen:
 - Retroviren (z.B. HIV ist ein Retrovirus)
 - eukaryotische Viren mit genomischer Einzelstrang-RNA
 - Adenoviren (animale Viren mit linearer, doppelsträngiger DNA)
- Konjugation
- Mikroinjektion: Bei Eukaryontenzellen kann Erbgut injiziert werden. Bei der künstliche Befruchtung wird auch mit Mikroinjektion gearbeitet.

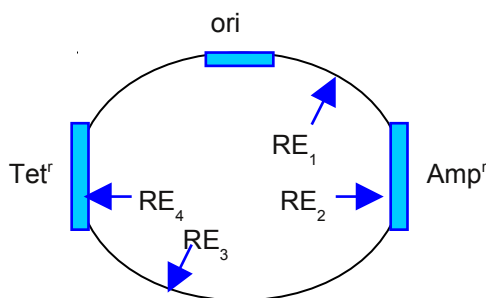
Das Problem bei der Transformation:

Nur bei 1 : 10^7 Bakterien wird der Vektor wirklich eingeschleust. Wie finde ich die Bakterien heraus, die ein Plasmid erhalten haben?

Eine Lösung:

Der Plasmid-Vektor pBR 322 enthält:

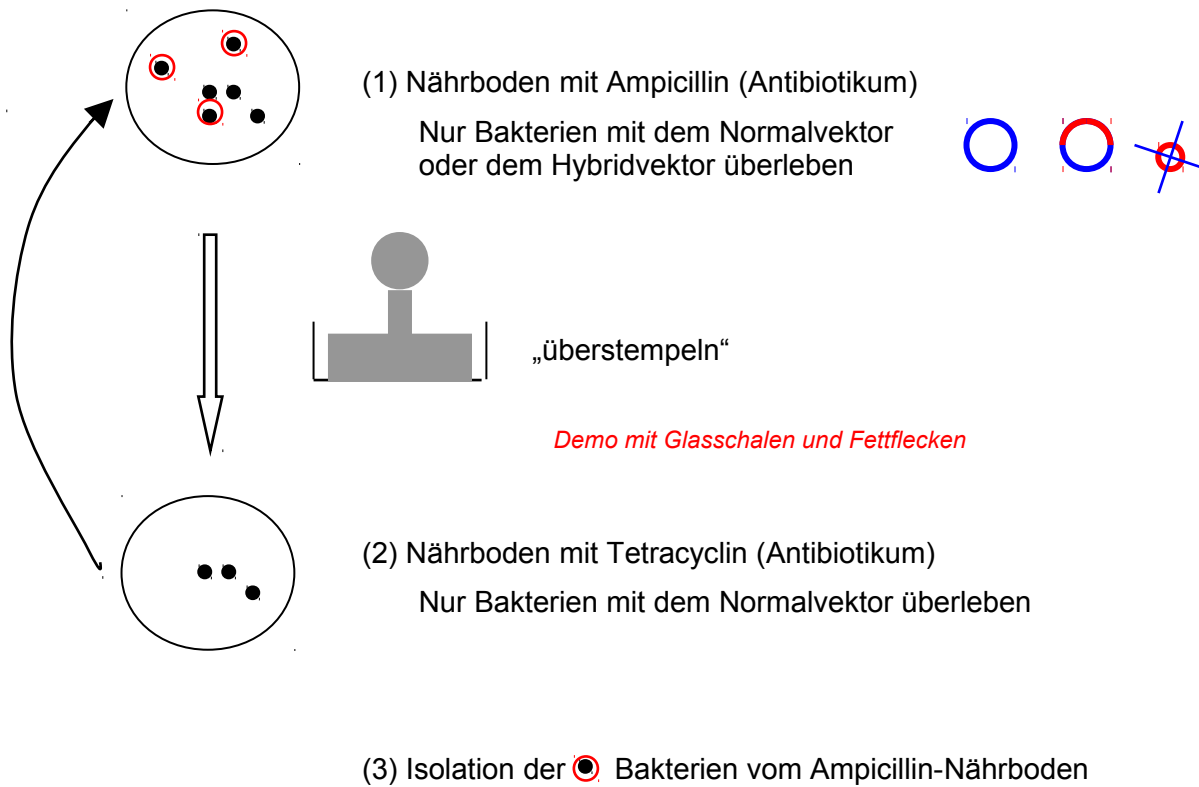
- Replikationsstart (ori)
- 2 Bereiche mit Antibiotika Resistenzgenen (Ampicillin, Tetracylin)
- Es sind 4 verschiedene RE-Schnittstellen vorhanden für vier unterschiedliche RE.



Einbau unter Verwendung des Restriktionsenzym Eco RI (=RE₄)

\Rightarrow Nur ringförmige DNA wird bei der Teilung mitverdoppelt!

Dann folgt die Vermehrung und Selektion der Bakterien auf Nährböden!

Vermehrung und Selektion der Bakterien auf Nährböden!**Kultur von Bakterien:**

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

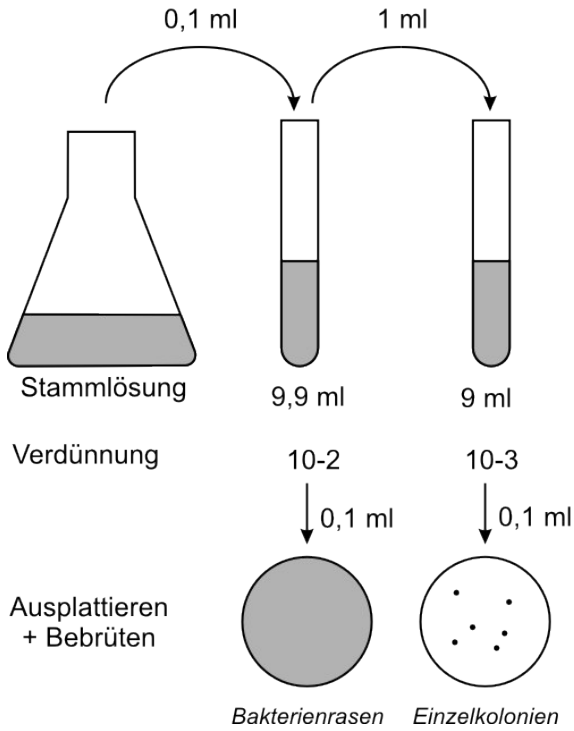
- Nachteile:**
- sehr klein
 - Phänotyp nicht direkt zu ermitteln

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

Ansetzen einer Bakterienkultur

Eine einfache Möglichkeit ist die sogenannte Übernachtkultur =(ÜK). Dazu wird eine Nährlösung mit Bakterien angeimpft und dann bei 37°C im Brutschrank vermehrt.

Bakterienkultur - Bakterientiter



Bakterientiter = Bakterienzahl / ml Nährlösung

jede Kolonie geht auf 1 Bakterium zurück

Lebendzahl: Verdünnungsreihe mit ÜK → Plattentest (Kolonienzähltest)

z.B. 6 Kolonien

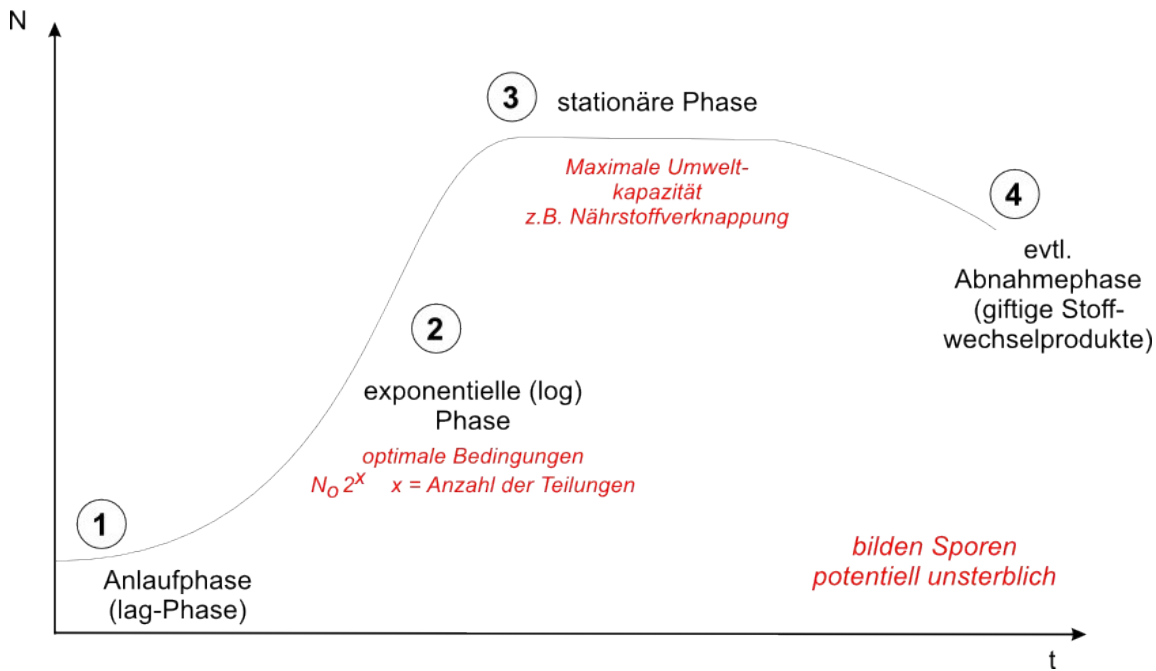
Berechnung:

$$= \frac{6 \text{ Kolonien}}{10^{-3} \text{ ml}} = 6000 \text{ Bakterien / ml}$$

Wachstumskurve

Unter optimalen Bedingungen, also ausreichend Wasser, Nährstoffe, Mineralstoffe, evtl. Sauerstoff und der geeigneten Temperatur, erfolgt alle 20 min. eine Teilung der Bakterien! Es liegt anfangs ein exponentielles Wachstum vor (vergleiche Kapitel 04.08 Biotische Umweltfaktoren!)

Wachstumskurve bei Bakterien



Anwendung der 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

1. Gentechnik in der Landwirtschaft

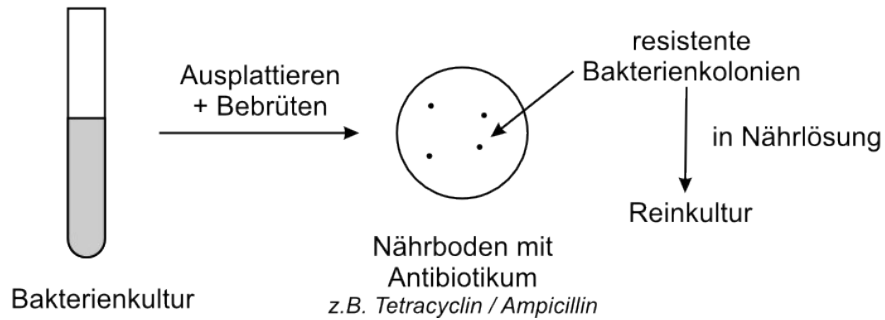
Folgt frühestens 2013

2. 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!

3. Selektion von Aminosäure-Mangelmutanten

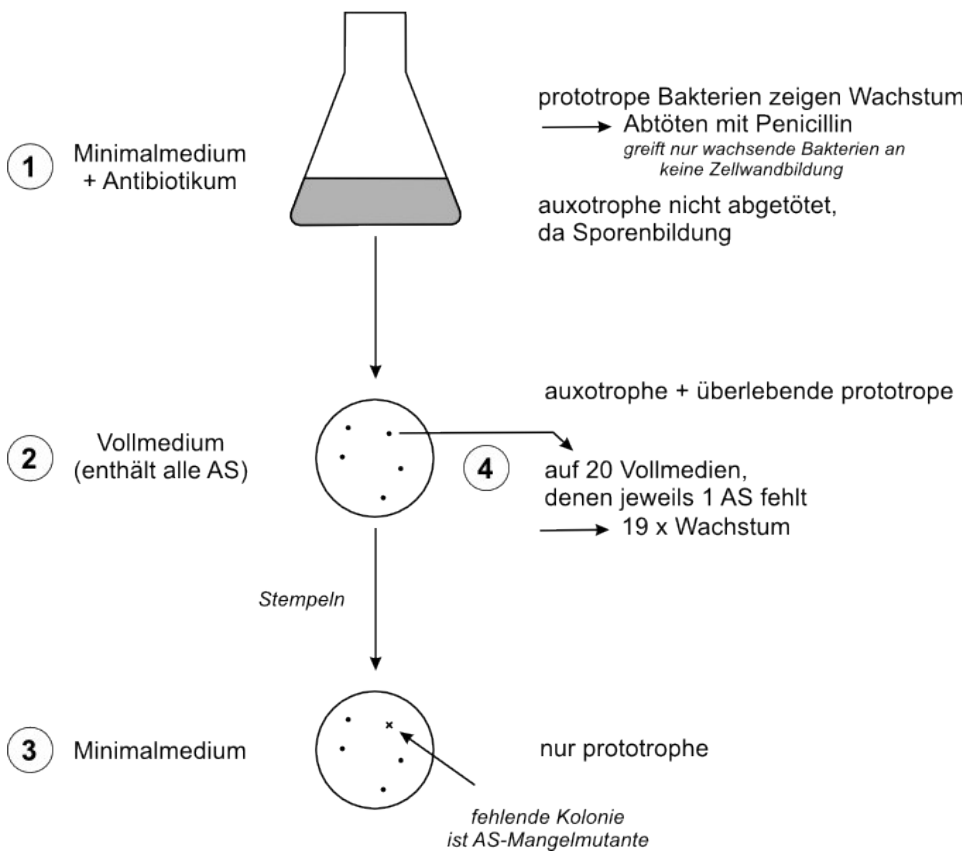
Wildtypbakterien sind **prototroph**

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

Selektion von Aminosäure-Mangelmutanten



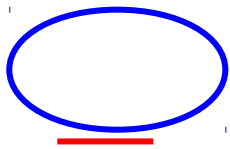
Wiederholung: Transformation (Griffith / Avery)**Molekulargenetische Deutung der Transformation:**

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

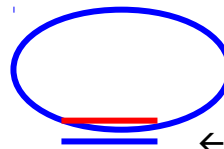
- Transformation
- Transduktion
- Konjugation

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.

Wiederholung: Konjugation (1946 Lederberg/Tatum)

Versuch mit 2 Doppelmangelmutanten: **Stamm A** : Phe⁻, Cys⁻ **Stamm B**: Thr, Leu
 die jeweils anderen AS können die Stämme selbst herstellen.
 Beide Stämme werden für einige Stunden gemischt, dann auf ein Minimalmedium gebracht, welchem die AS Phe, Cys, Thr und Leu fehlen.

Beobachtung: Es bilden sich einige Kolonien (für alle 4 AS) 1:10⁶
 Elektronenmikroskop-Aufnahmen zeigen Bakterien-Kontakte!
 ⇒ Übertragung von Genen zwischen Bakterien sind möglich!

Schlussfolgerung: Da die Wahrscheinlichkeit für eine doppelte Rückmutation bei 1:10¹⁴ liegt, und dies somit ausgeschlossen werden kann, muss von einem Austausch von Erbgut ausgegangen werden. Es ist ein neuer Stamm entstanden, welcher alle 4 AS herstellen kann.
 Bestimmte Bakterien besitzen den F-Faktor (=Fertilitätsfaktor) als Plasmid oder in das Chromosom integriert: F⁺-Zellen (Spenderzellen / Donorzellen).

F-Faktor: Enthält vor allem genetische Info für Sex-Pil (F-Pili)
 → Kontaktaufnahme mit F⁻-Zelle/Rezeptor-Zelle (Empfängerzelle / Akzeptorzelle)

F-Plasmide

1) Kontaktaufnahme über Sex-Pili

2) Übertragung des replizierten F-Plasmids

→ F⁻ → F⁺

falls auf Plasmid weitere Gene Bildung von AS, so werden diese Eigenschaften mit dem F-Faktor übertragen.

Hinweis: F-Plasmid repliziert autonom ⇒ F-Faktor geht verloren falls Zellteilung nicht repliziert

Hfr-Zellen

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

1) Kontaktaufnahme

2) F bricht in Mitte auf
 Übertragung auf F⁻ zusammen mit angrenzenden Genen

3) Rekombination in Rezeptorzelle (bleibt F⁻)

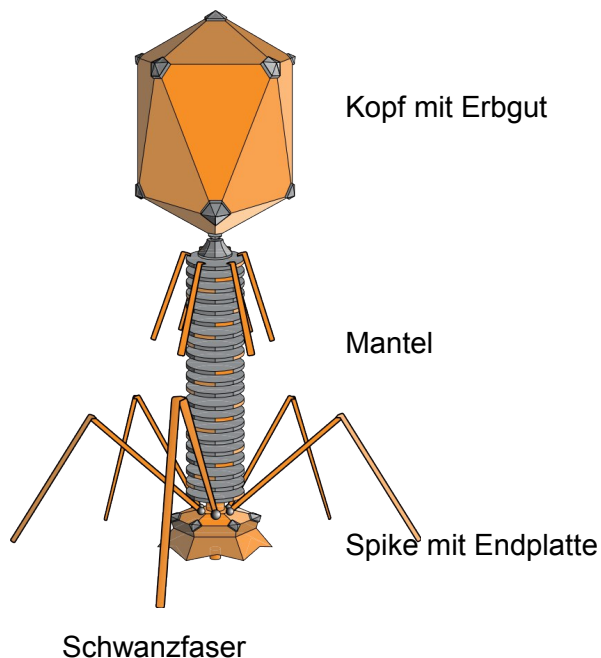
Plasmabrücke reißt relativ leicht ab
 → Gene nahe F häufiger übertragen
 entferntere Gene seltener
 → DNA-Kartierung

Viren als Forschungsobjekte

Kennzeichen: virus (lat.): Gift, chem. Substanz

- Sind keine selbständigen Lebewesen
 - haben kein Stoffwechsel
 - zeigen kein Wachstum
 - zeigen keine aktive Bewegung
 - haben keine Reizbarkeit
 - zeigen Vererbung, aber nicht durch selbständige Vorgänge (Vermehrung nur in Wirtszelle)
⇒ schwer zu bekämpfen!
- haben einen einfacher Bau: DNA (oder RNA) + Proteinhülle
- sind streng wirtsspezifisch!
auf einen Wirt spezialisiert (Bakterien-, Pflanzen- und Tierviren)

Bau eines Bakteriophagen (Coliphage T2 befällt nur ColiBakterien)
Phagen sind bakterienbefallende Viren



Länge: ca. 200nm

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

Nachweis von Phagen:

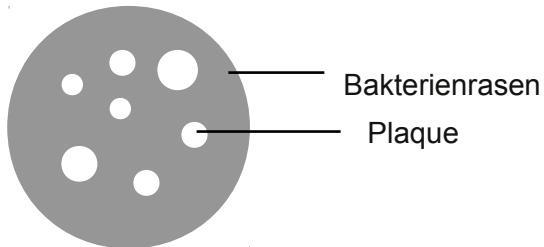
Der Nachweis von Phagen gelingt mit der so genannten Plaque-Technik:

- zunächst Vermehrung der Bakterien \Rightarrow eine trübe Bakteriensuspension entsteht
- Zugabe von 1 Tropfen Phagensuspension

\Rightarrow 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!

Bestimmung des Titers: Verdünnungsreihe

0,1 ml Phagensuspension + 0,2 ml ÜK ausplattieren und bebrüten
dichter Bakterienrasen



Jeder Phage erzeugt aufgrund Bakterienlyse ein Loch im Rasen = Plaque

pro Plaque ein Bakteriophage

\rightarrow 7 Phagen / 0,1 ml

\rightarrow Phagentiter kann mit Hilfe einer Verdünnungsreihe der Phagen berechnet werden

Infektion einer Bakterienzelle

Klärung: Hershey und Chase (1952)

Versuch:

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

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

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!

Entwicklung und Vermehrung von Bakteriophagen:

1. **Adsorption (=„Andocken“)** an Bakterienzellwand: Die Phage setzt sich mit ihrer Endplatte auf Rezeptor der Bakterienwand
2. **Injektion der Phagen-DNA in das Bakterium:** Das bakterienwandauflösende Enzym „Lysozym“ zerstört Zellmembran. Die Phagen-DNA gelangt ins Innere.
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. **DNA-Replikation: Bildung von Phagen-DNA durch das Bakterium**
Die Phagen-DNA schließt sich zu einer Ringform zusammen. Die Vermehrung geschieht aus den Nukleotiden des Bakteriums heraus.
5. **Proteinbiosynthese: Bildung von Phageneiweißen 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, so dass die gebildeten Phagen austreten können.

Lytische und Lysogene Vermehrung bei Viren

1. Lytischer Vermehrungszyklus:

- zerstört Wirtszelle
- virulent (giftig) genannt
- Bei der Transduktion kann nun Bakterien-DNA „ausversehen“ von Phagen aufgenommen und so an die nächste Bakterie weitergegeben werden, wenn diese befallen wird.

2. Lysogener Zyklus:

- DNA wird in die DNA des Wirts eingebaut (von nun an auch Prophage genannt)
- Begriffsklärung: eine Prophage ist eine Bakterienzelle in deren DNA Phagen-DNA integriert wurde.
- Die Bakterie wird durch Injektion der Phagen DNA zur Prophage.
Also, die Bakterien-Prophage vermehrt sich weiter, weil das Bakterien nunmal tun. Wenn nun einer die vielen neuen Bakterien „Pech hat“ und sich deren Lebensbedingungen ändern, dann wird das Phagengenom aktiv (also lytisch), und diese Bakterie hat echt Pech... ;-)
Das heißt, die Phagen beginnen sich zu vermehren, die Bakterien 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 rausgeschnitten werden.
Das geht aber nicht so schnittgenau! Deswegen wird auch immer ein wenig Bakterien-DNA „mitgenommen“. Befallen nun die neuen Phagen wieder eine andere Bakterie, so bekommt diese auch Bakterien-DNA, und zwar welche, die sie vorher nicht hatte.
⇒ die neu befallene Bakterie hat ja 100% eigenes Erbgut, dazu kommt die Phagen-DNA und nur ein minimaler Rest vom der alten Bakterien-DNA
- ⇒ der lysogener Zyklus kann lytisch werden!
- Dieser Zyklus wird auch „temperent“ (=enthaltssam) genannt.

Zusatzinformationen:

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

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

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

Transduktion

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

2 Arten der Transduktion durch Bakteriophagen:

1. Allgemeine Transduktion

Die Phage befindet sich im **lytischen** Zyklus! Iniziert ihre DNA in Bakterien und wird von diesen vermehrt. Sind die neuen Phagen fertig, platzt das Bakterium auf und setzt die Phagen frei.

Für die Transduktion kann man sich dies nun zunutze machen, indem in eine leere Proteinhülle z.T. Bakterien-DNA eingepackt wird. Die Phage überträgt nun diese bestimmten Bakteriengene (dies erfolgt rein zufällig) ⇒ Rekombination.

Der lytische Vermehrungszyklus:

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

2. Spezielle Transduktion

Wenn die Phage im lysogenen Zyklus ist und letztlich aktiviert wird, so wird beim Übergang in den lytischen Zyklus die Phagen-DNA falsch ausgeschnitten und so enthält die neue DNA auch Bruchstücke/ Reste der ursprünglichen (benachbarten) Bakterien-DNA!

⇒ Bakterien-DNA wird bei Injektion auf andere Bakterien von Phagen übertragen!

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!

Im lysogenen Zyklus:

- DNA wird in die DNA des Wirts eingebaut (Prophage genannt)
- Begriffsklärung: eine Prophage ist eine Bakterienzelle in deren DNA Phagen-DNA integriert ist
- Die Bakterie wird durch Injektion der Phagen DNA zur Prophage.
Die Bakterien-Prophage vermehrt sich weiter, weil das Bakterien ja sowieso tun. Wenn nun einer die vielen neuen Bakterien „Pech“ hat und sich deren Lebensbedingungen ändern, dann wird das Phagengenom aktiv (lytisch), und diese Bakterie hat jetzt „Pech“. Das heißt, die Phagen beginnen sich zu vermehren, die Bakterien 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 rausgeschnitten werden.
Das geht aber nicht so genau, deswegen wird auch immer ein wenig Bakterien DNA „mitgenommen“. Befallen nun die neuen Phagen wieder eine andere Bakterie, so bekommt diese auch Bakterien DNA, und zwar welche, die sie vorher nicht hatte.
⇒ die neu befallene Bakterie hat ja ihr eigenes Erbgut, dazu kommt nun die neue Phagen-DNA und noch zusätzlich ein minimaler Rest vom der alten Bakterien-DNA
- lysogener Vermehrungszyklus (bei temperenter Phage)
- kann lytisch werden
- temperent (enthaltssam) genannt

Zusatzinformationen:

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

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

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