

# Stammzuchtung

## Selektion von natürlichen Varianten

## Ungerichtete genetische Veränderungen

zufallsverteilte induzierte Mutagenese

## Kreuzungen – genetische Rekombination

Sexuelle Kreuzungen

Induzierte Zellfusion

parasexuelle Systeme (Konjugation, Transduktion, Transformation)

## (Gezielte) Genmanipulationen – Gentechnik

*in vitro* Rekombination von DNA-Fragmenten

Einbau und funktionelle Expression von zusätzlicher DNA in Organismen

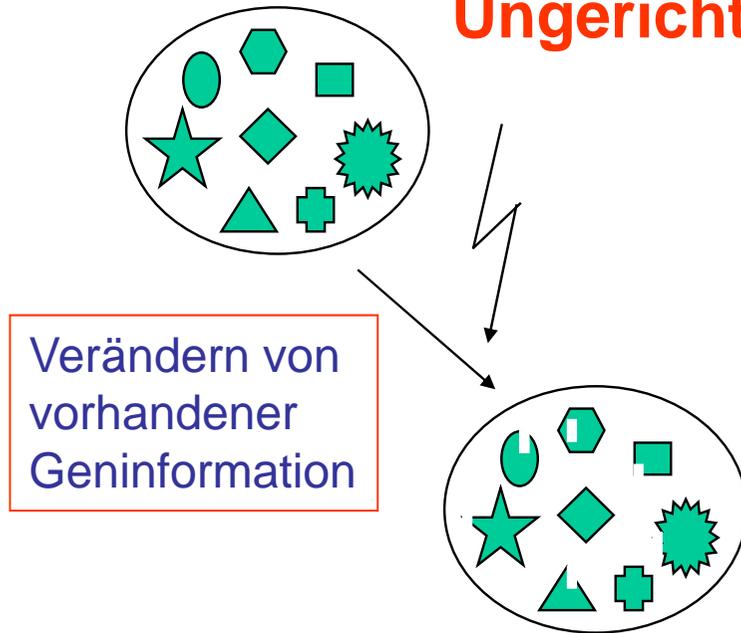
eigenständig replizierende Vektoren – Integration in Chromosomen

Entfernen/Ausschalten von Geninformation

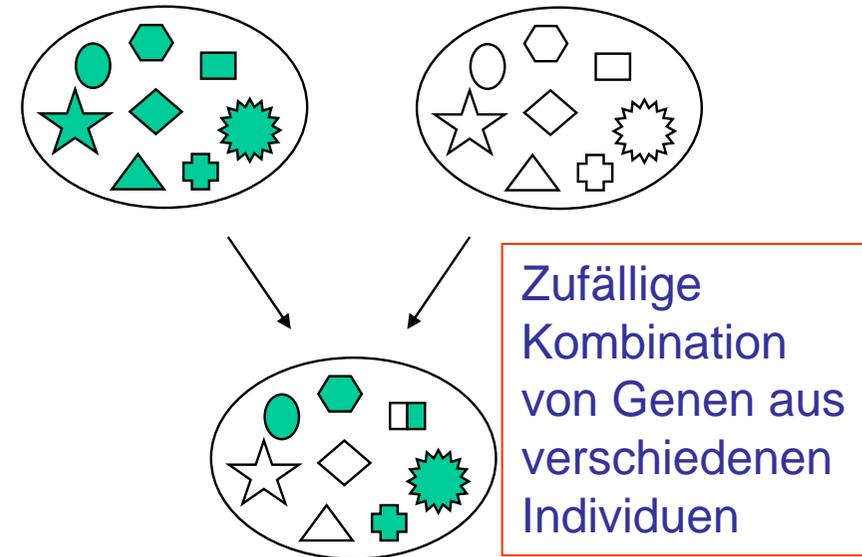
*in vitro* Mutagenese (Gene für spezifische Proteine / Enzyme)

stellenspezifisch - random („directed evolution“)

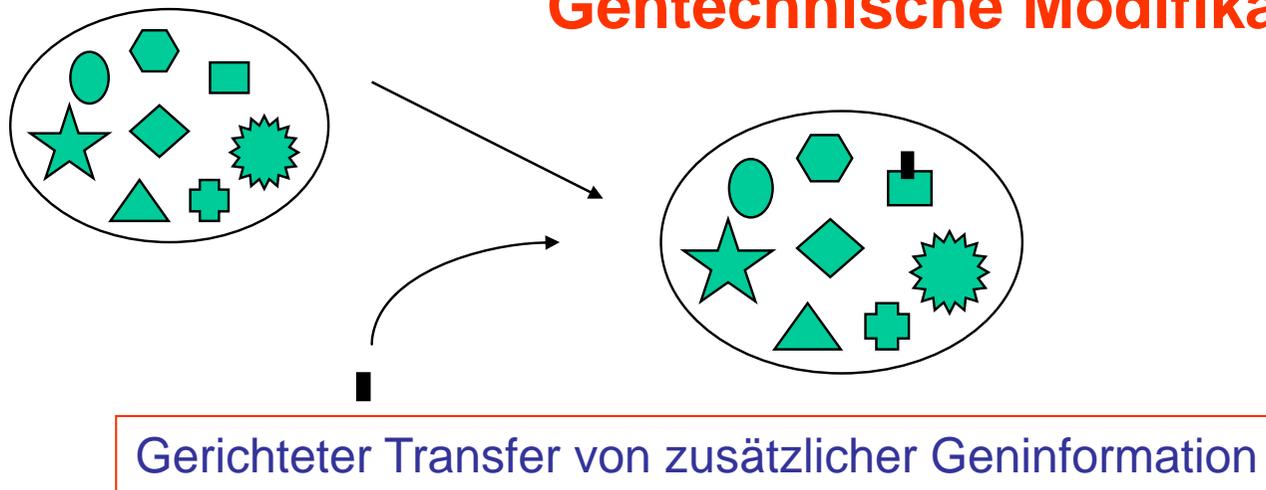
## Ungerichtete Mutation



## Kreuzung



## Gentechnische Modifikation



# Zufallsverteilte Mutationen

## Induzierte Mutagenese

- **Behandlung mit Chemikalien**  
Alkylierende Substanzen  
Basenanaloge
- **Einsatz von energiereicher Strahlung**  
UV  
Ionisierende Strahlung (Röntgen,  $\gamma$ )

Basensubstitutionen  
Deletionen  
Insertionen

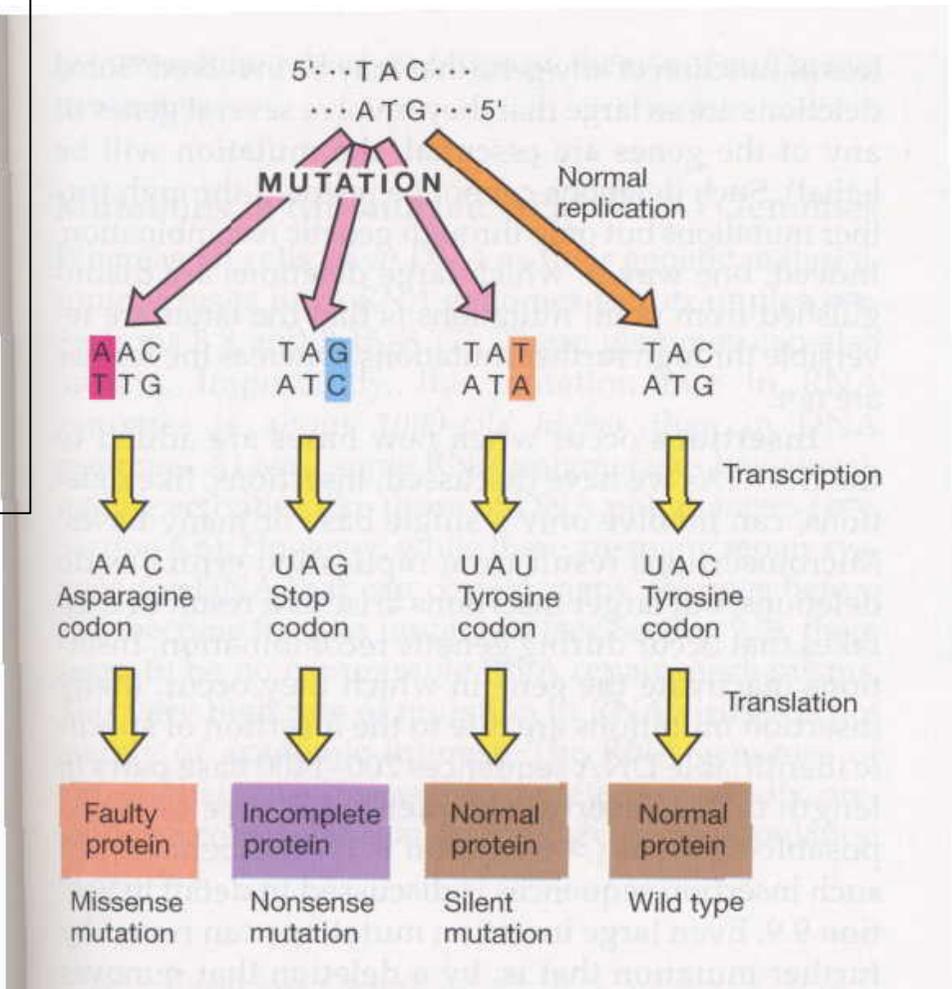
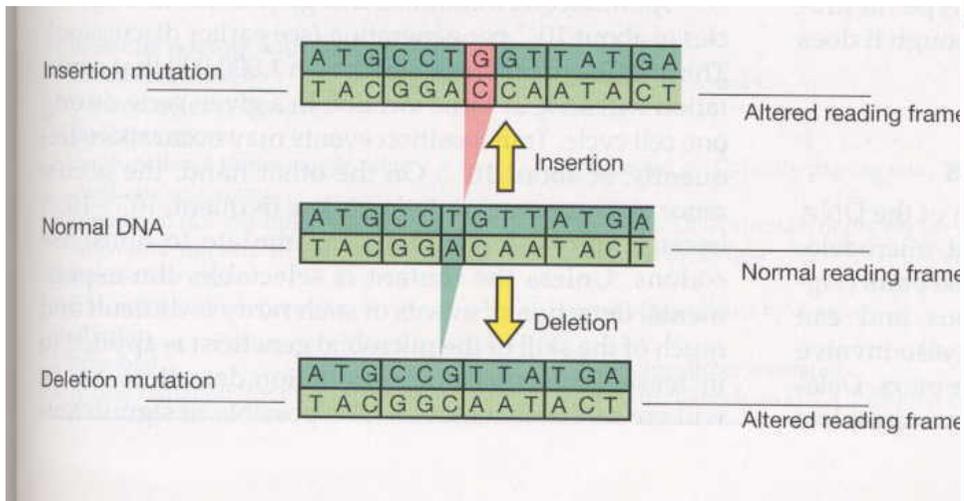


FIGURE 9.3 Possible effects of base-pair substitution in a gene encoding a protein: three different protein products from changes in the DNA for a single codon.

# Evolutionäre Stammentwicklung

Herstellung von Variantenpools

Analyse einer geeigneten Anzahl von Klonen auf gewünschte Eigenschaft

Selektionsverfahren

Screeningverfahren

Auswahl von "Hits"

Re-screening – Bestätigung der verbesserten Eigenschaft

Weitere Runden

Einsatz in Laborprozess

Scale-up

# Screening – Selektion

## Erkennen/Analyse – Wachstumsvorteil

### Individuelle Auslese

#### Hoher Durchsatz – high throughput

- Hoher Durchsatz an Klonen
- geeignete analytische Verfahren
- Automatisierung

#### Methoden:

Schüttelkolbenverfahren

Plattentests auf Einzelkolonieebene

Mikrotiterplattenverfahren

Verfahren auf Einzelzellebene - FACS

### Rationales Screening und Selektionsverfahren

#### Gezielte, auf biochemischem/genetischem Wissen basierende Verfahren

- Isolierung gezielter Stoffwechselmutanten
- Reportersysteme
- Wachstumsvorteil von gesuchten Mutanten
- Genomics – Proteomics – Metabolomics

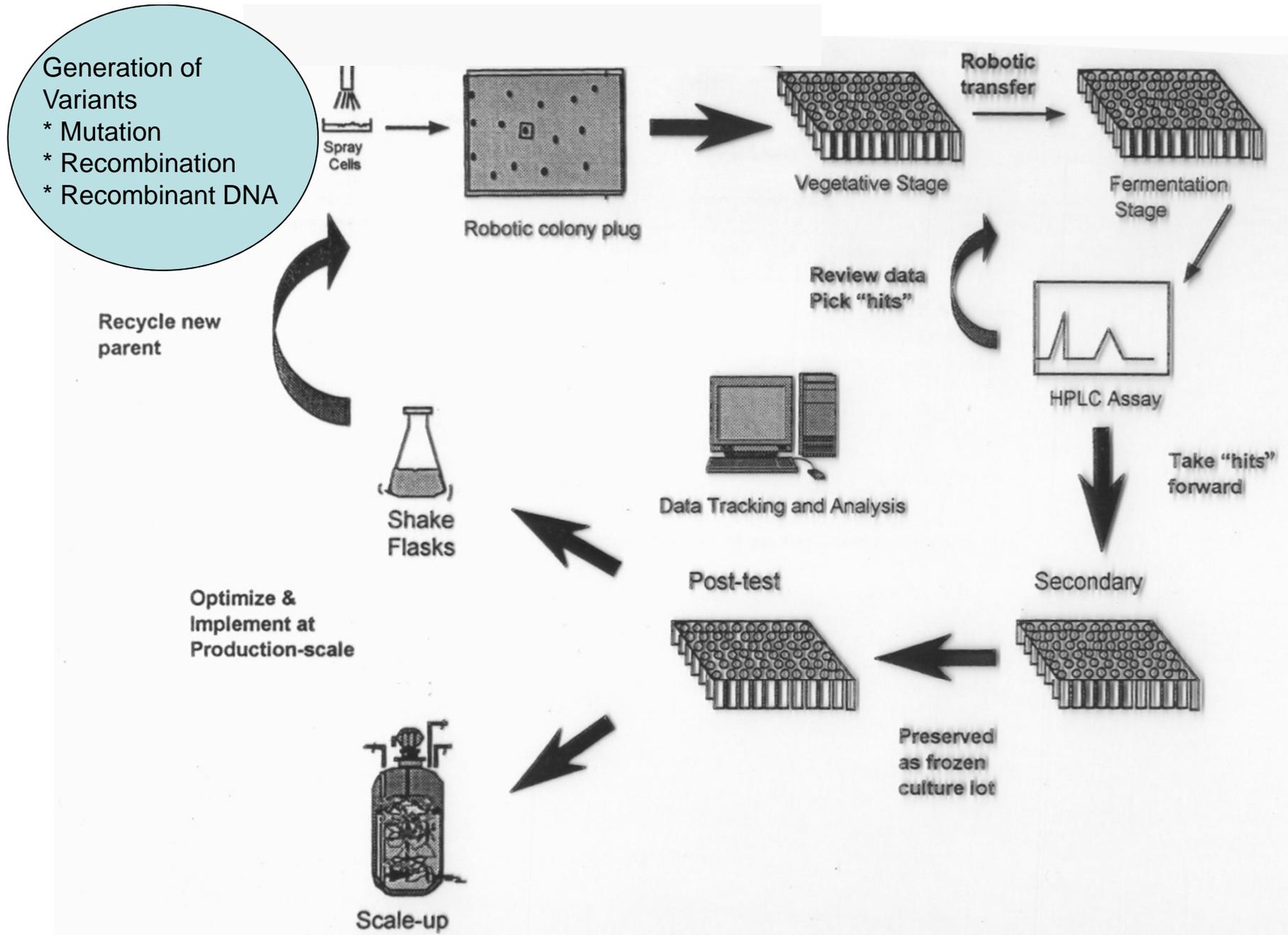


FIGURE 1 Schematic representation of an automated screening system.

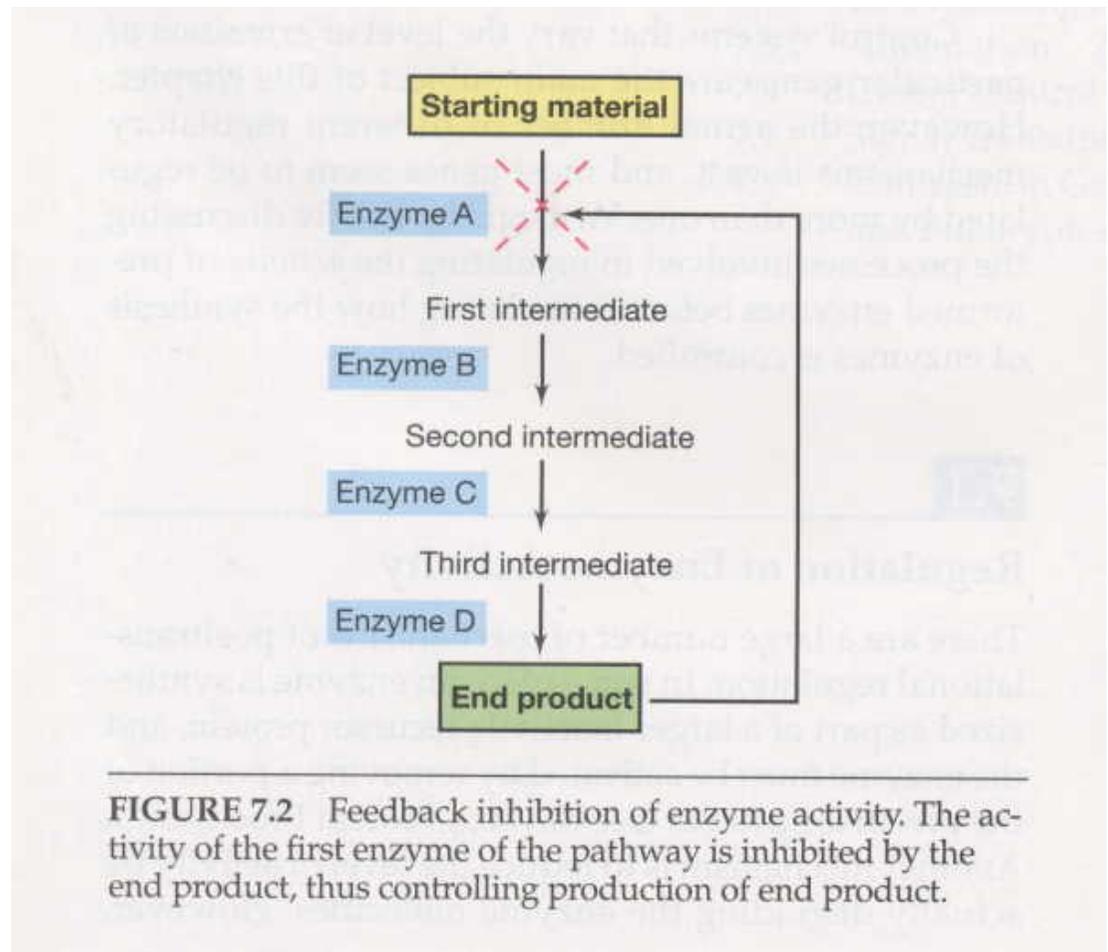
# Rationale Ansätze für Stammverbesserung

Wissen um Zusammenhänge  
Im Stoffwechsel

## Regulation

Regulation der Genexpression

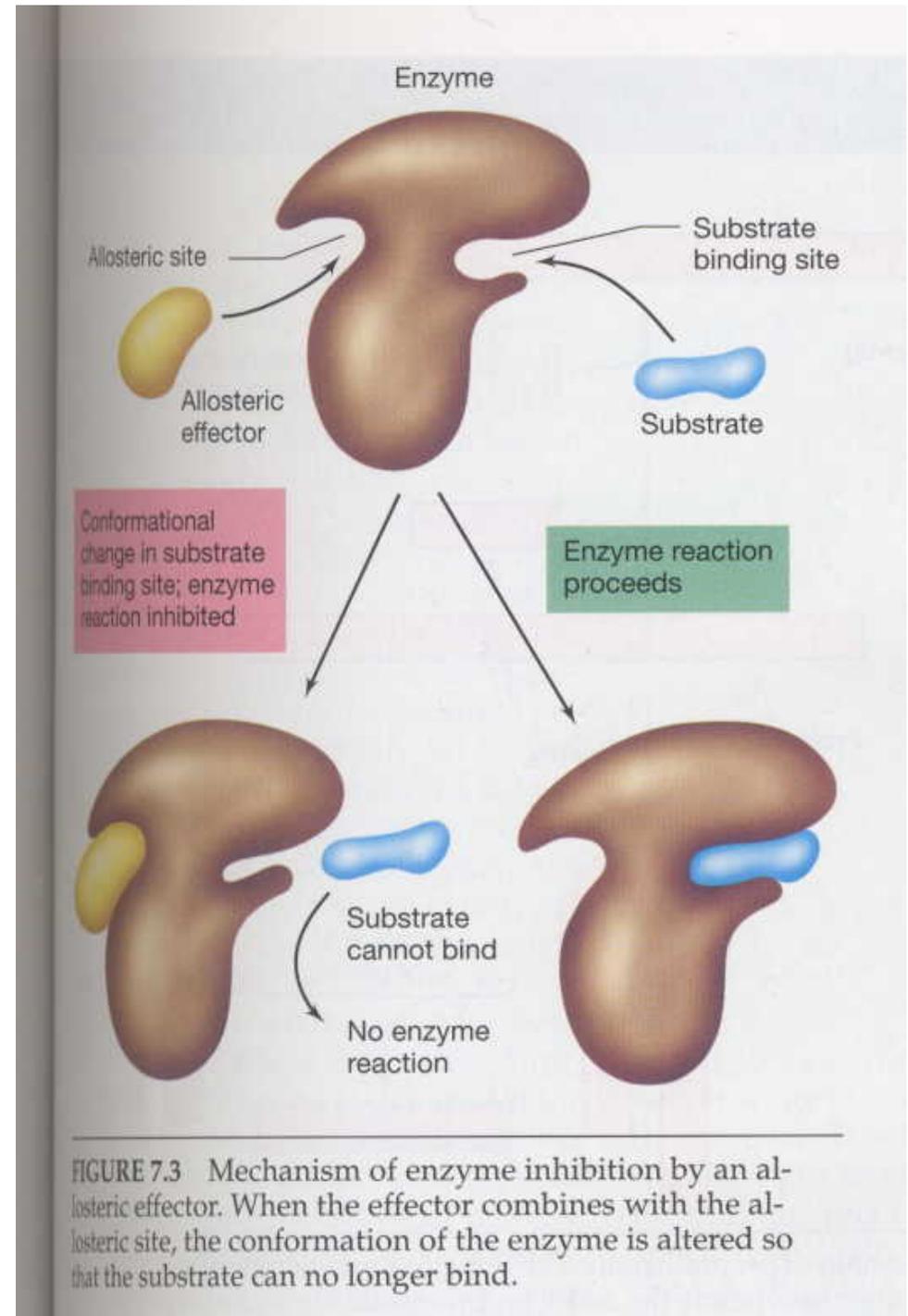
Regulation der Enzymaktivität



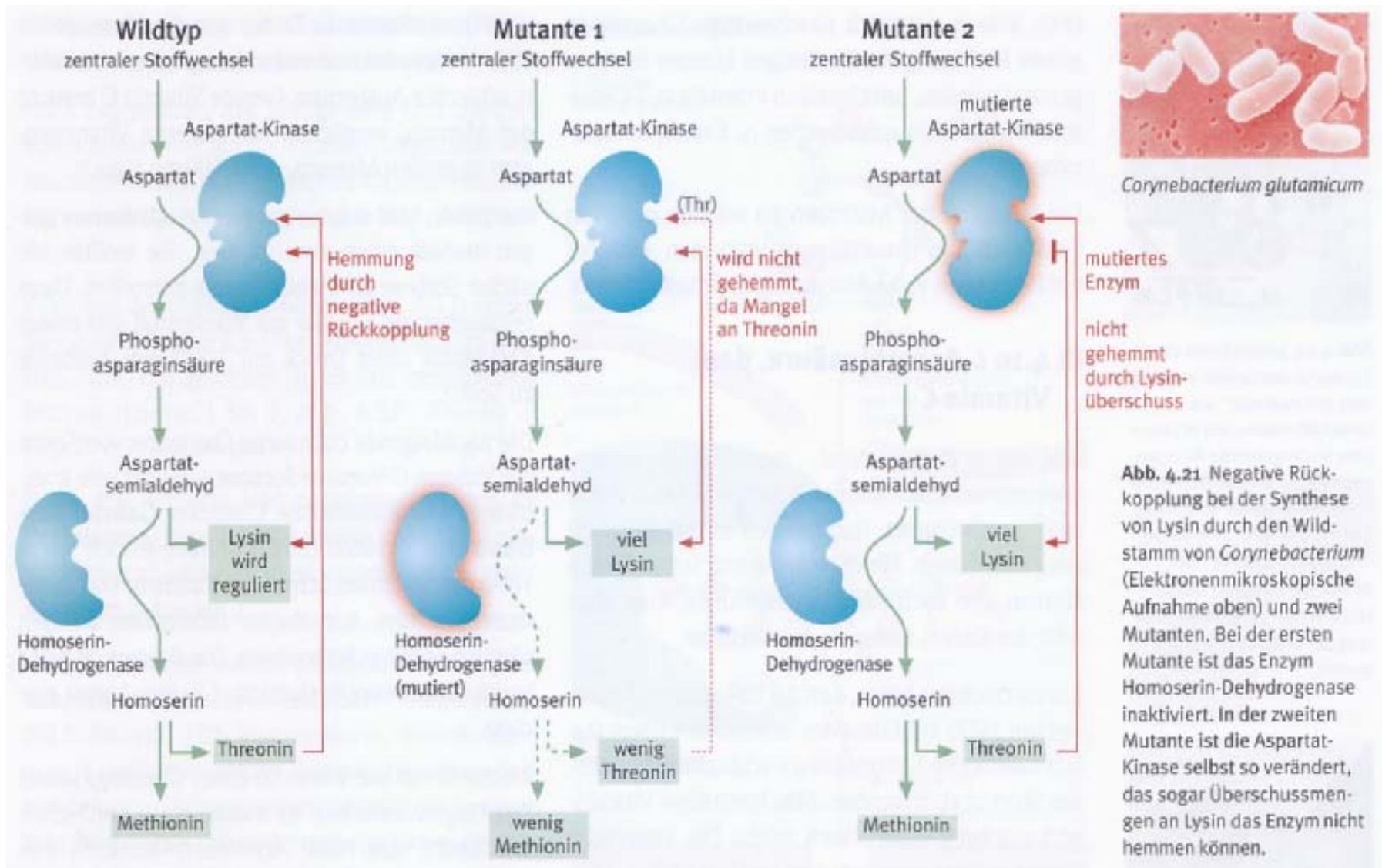
## Rationale Ansätze für Stammverbesserung

Wissen um Zusammenhänge bei der Funktion von im Stoffwechsel beteiligten Enzymen

## Regulation der Enzymaktivität



# Ausschalten der Feedback-Regulation



## Screening - Rationale Elemente

**Tabelle 16.3.** Ausscheidung von Aminosäuren durch auxotrophe Mutanten

Mutanten (Phänotyp)	Produzierte Aminosäure
Tyrosin <sup>-</sup>	Phenylalanin
Phenylalanin <sup>-</sup>	Tyrosin
Phe <sup>-</sup> , Tyr <sup>-</sup>	Tryptophan
Homoserin <sup>-</sup>	Lysin
Leucin <sup>-</sup>	Valin

Auxotrophe Mutanten

**Tabelle 16.2.** Aminosäure-Antimetabolite zur Selektion von Lysin-, Threonin- oder Tryptophan-Überproduzenten

Lysin-Antimetabolite	Threonin-Antimetabolite	Tryptophan-Antimetabolite
s-(2-Aminoethyl)-l-cystein	$\alpha$ -Amino- $\beta$ -hydroxyvaleriansäure	5-Methyltryptophan
4-Oxalysin	$\beta$ -Hydroxyleucin	4-Methyltryptophan
l-Lysin-hydroxamat	Norleucin	6-Methyltryptophan
2,6-Diamino-4-hexensäure	Aminohydroxyvaleriansäure	5-Fluortryptophan
$\delta$ -Hydroxylysin	Norvalin	6-Fluortryptophan
$\alpha$ -Chlorcaprolactam	N-2-Thienylmethionin	DL-7-Azatryptophan
Trans-4,5-dehydrolysin	2-Amino-3-methylthiobuttersäure	2-Azatryptophan
	2-Amino-3-hydroxyhexensäure	

Antimetabolit-resistente Mutanten

# Rekombinationsgenetik

Gezieltes Kreuzen von Organismen

Zellfusionen

Gentransfer durch parasexuelle Mechanismen

Immer notwendig:

Screening - Selektion

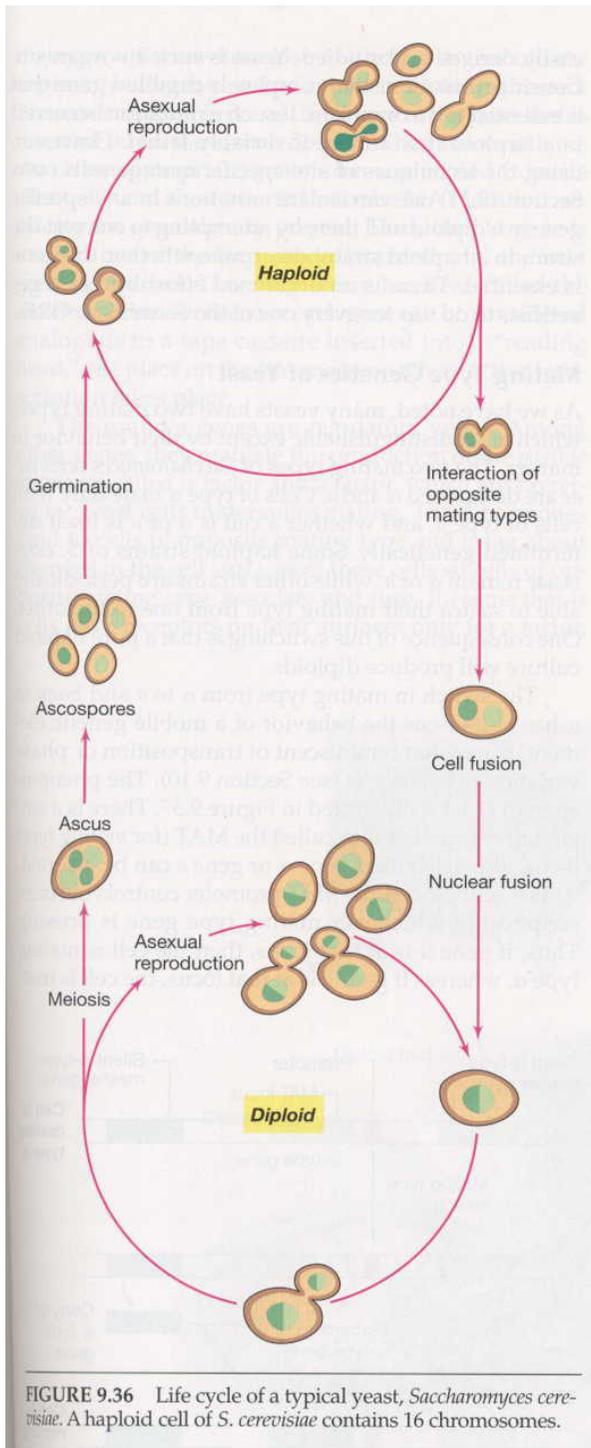


FIGURE 9.36 Life cycle of a typical yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. A haploid cell of *S. cerevisiae* contains 16 chromosomes.

# Rekombinante DNA Technologie

→ GVO

Transgene Mikroorganismen

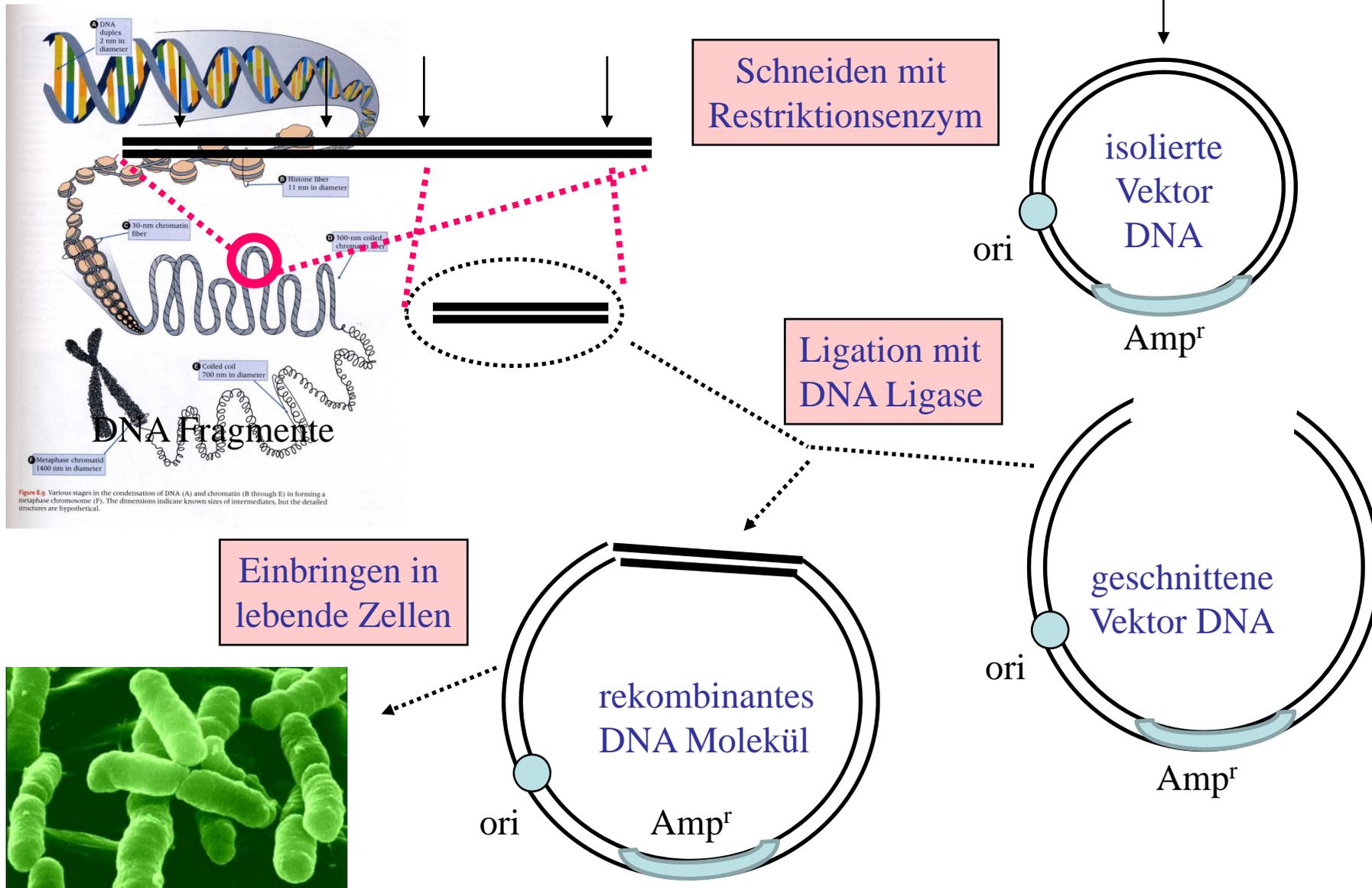
Transgene Pflanzen

Transgene Tiere

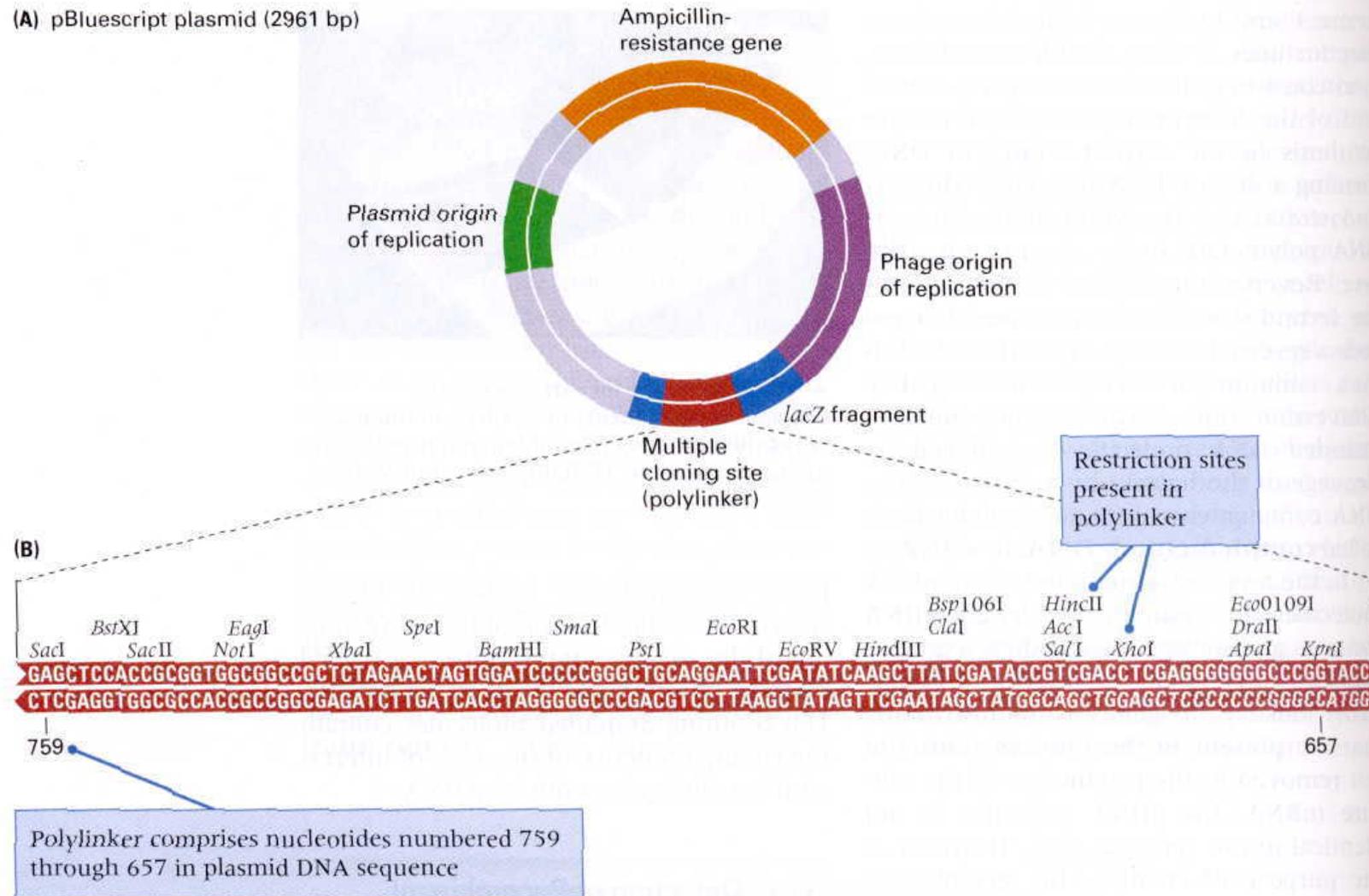
Gentherapie am Menschen

Gezielte Handhabung  
von Geninformation

# Herstellen von rekombinanten DNA Molekülen (Klonieren)

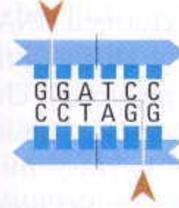
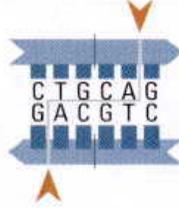


(A) pBluescript plasmid (2961 bp)



**Figure 13.9** (A) Diagram of the cloning vector pBluescript II. It contains a plasmid origin of replication, an ampicillin-resistance gene, a multiple cloning site (polylinker) within a fragment of the *lacZ* gene from *E. coli*, and a bacteriophage origin of replication. (B) Sequence of the multiple cloning site showing the unique restriction sites at which the vector can be opened for the insertion of DNA fragments. The numbers 657 and 759 refer to the position of the base pairs in the complete sequence of pBluescript. [Courtesy of Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA.]

**Table 2.3** Some restriction endonucleases, their sources, and their cleavage sites

Enzyme (Microorganism)	Enzyme (Microorganism)	Enzyme (Microorganism)
<p><i>EcoRI</i> (<i>Escherichia coli</i>)</p>  <p>Target sequence and cleavage site; sticky ends</p>	<p><i>HindIII</i> (<i>Haemophilus influenzae</i>)</p>  <p>Target sequence and cleavage site; blunt ends</p>	<p><i>AluI</i> (<i>Arthrobacter luteus</i>)</p> 
<p><i>BamHI</i> (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H)</p> 	<p><i>PstI</i> (<i>Providencia stuartii</i>)</p> 	<p><i>RsaI</i> (<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>)</p> 
<p><i>HaeII</i> (<i>Haemophilus aegyptus</i>)</p> 	<p><i>TaqI</i> (<i>Thermus aquaticus</i>)</p> 	<p><i>PvuII</i> (<i>Proteus vulgaris</i>)</p> 

Note: The vertical dashed line indicates the axis of symmetry in each sequence. Red arrows indicate the sites of cutting. The enzyme *TaqI* yields cohesive ends consisting of two nucleotides, whereas the cohesive ends produced by the other enzymes contain four nucleotides. Pu and Py refer to any purine and pyrimidine, respectively.

# Gewinnung von DNA Fragmenten

## Isolierung aus Organismen

gesamte genomische DNA

DNA aus Organellen

Metagenomische DNA

cDNA (über RNA)

## PCR – Polymerase Kettenreaktion

spezifische Gene

homologe Familien (degenerierte Primer)

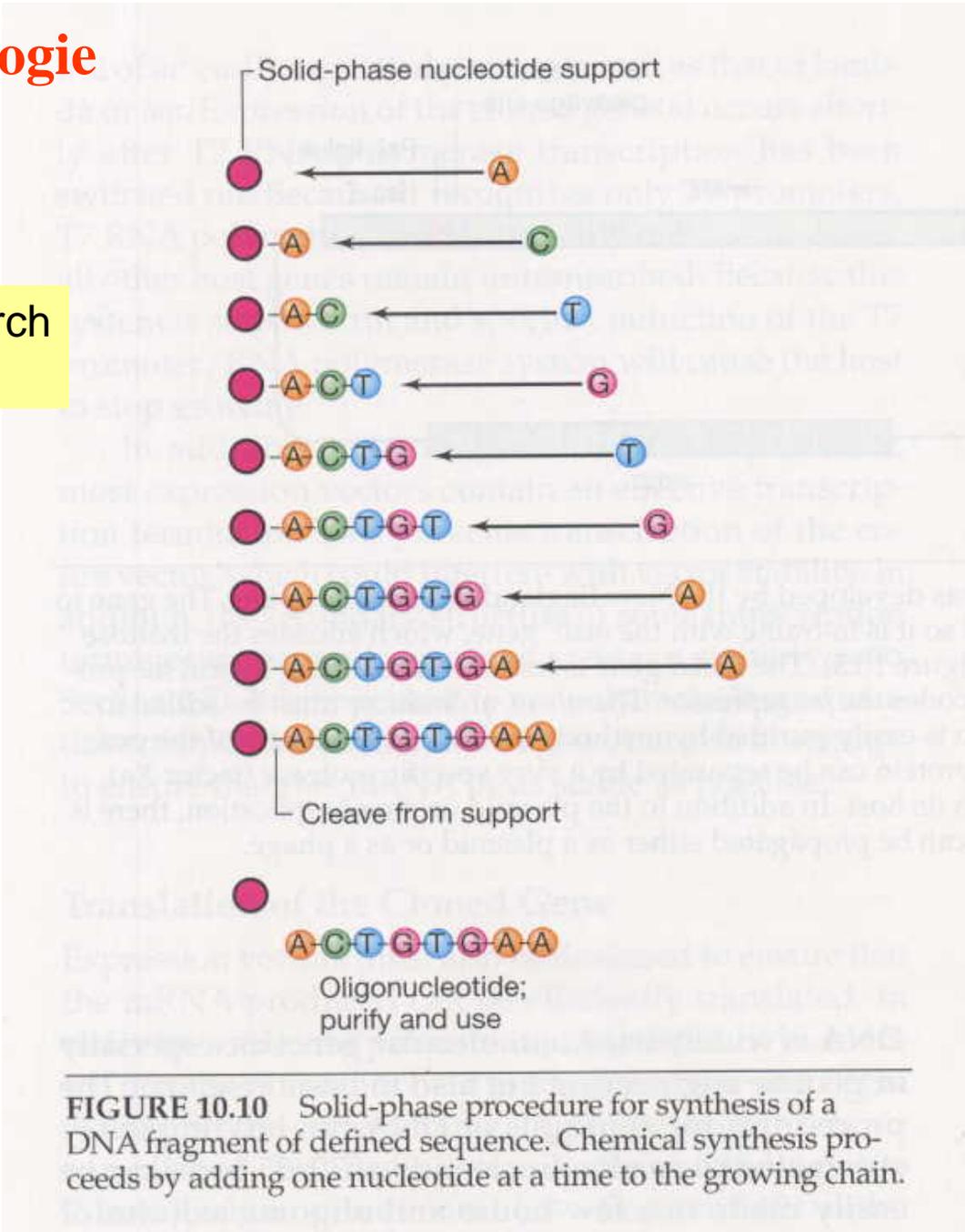
## Gensynthese

Oligonukleotide

synthetische Gene

# Gentechnik – DNA Technologie

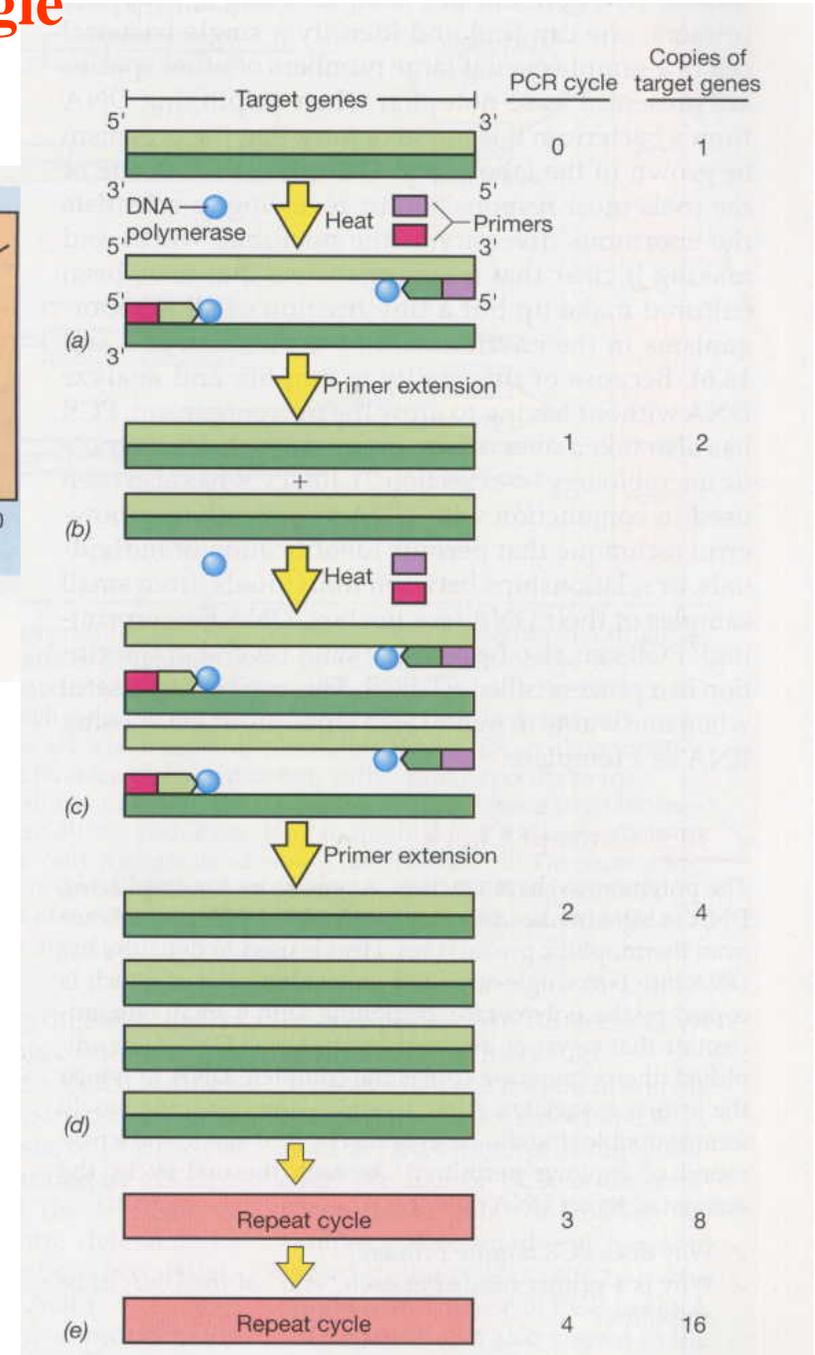
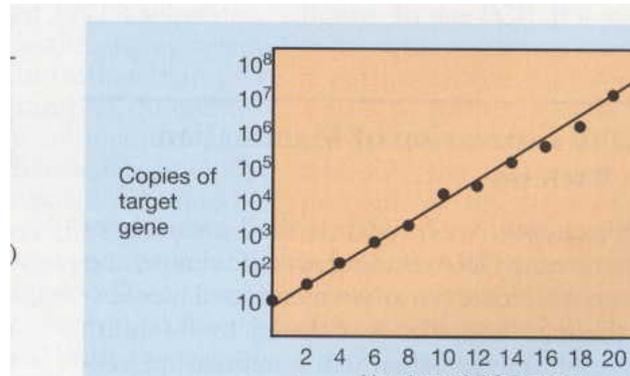
Jede mögliche Sequenzstruktur durch chemische de novo DNA Synthese



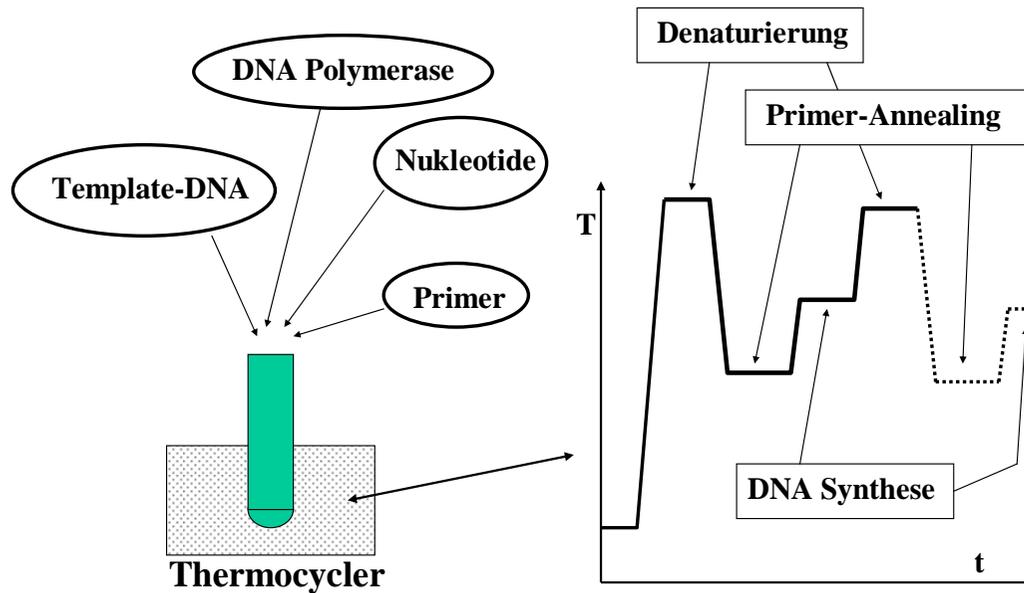
# Gentechnik – DNA Technologie

## Polymerase Chain Reaction

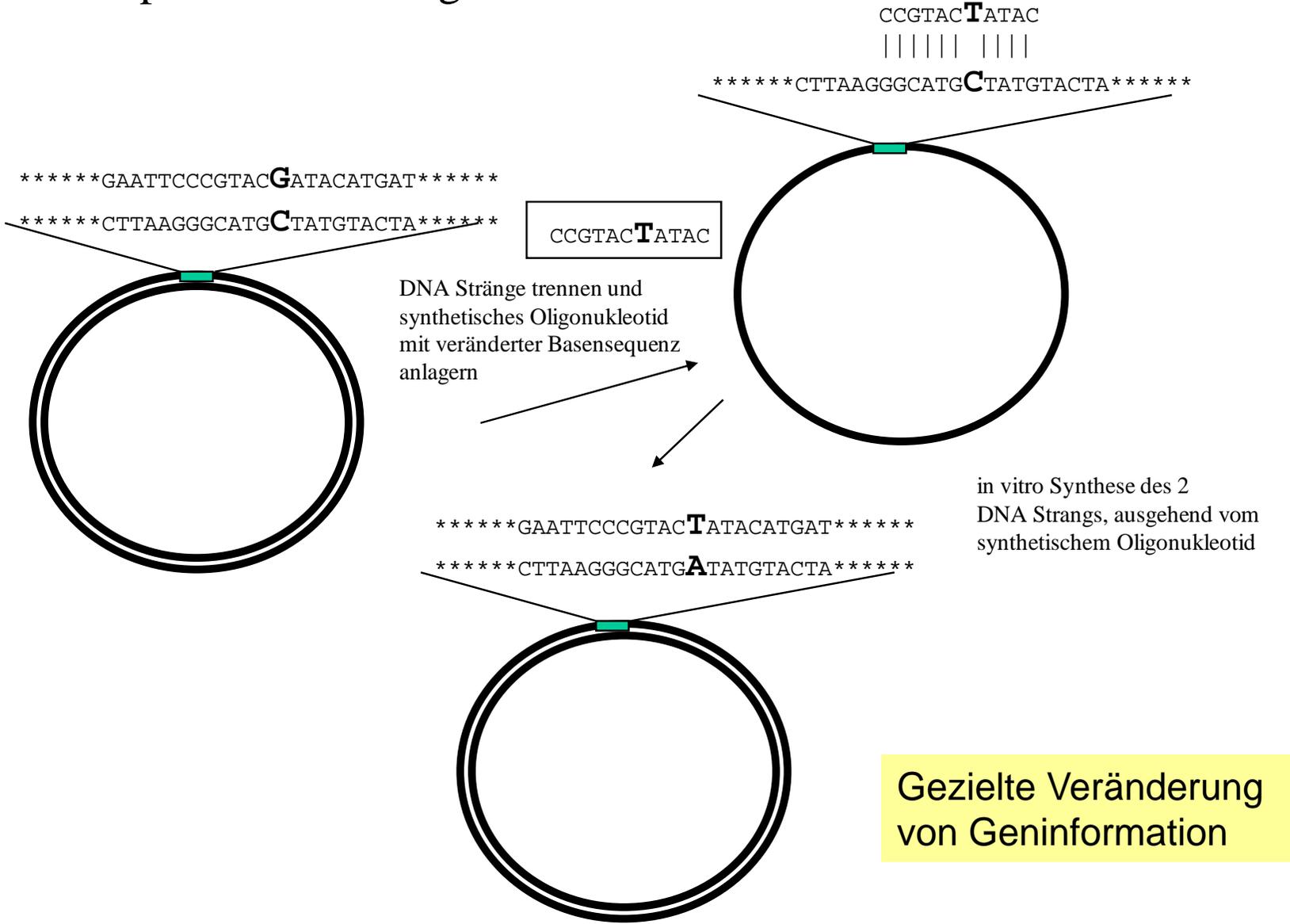
Leichter Zugang  
zu Genmaterial



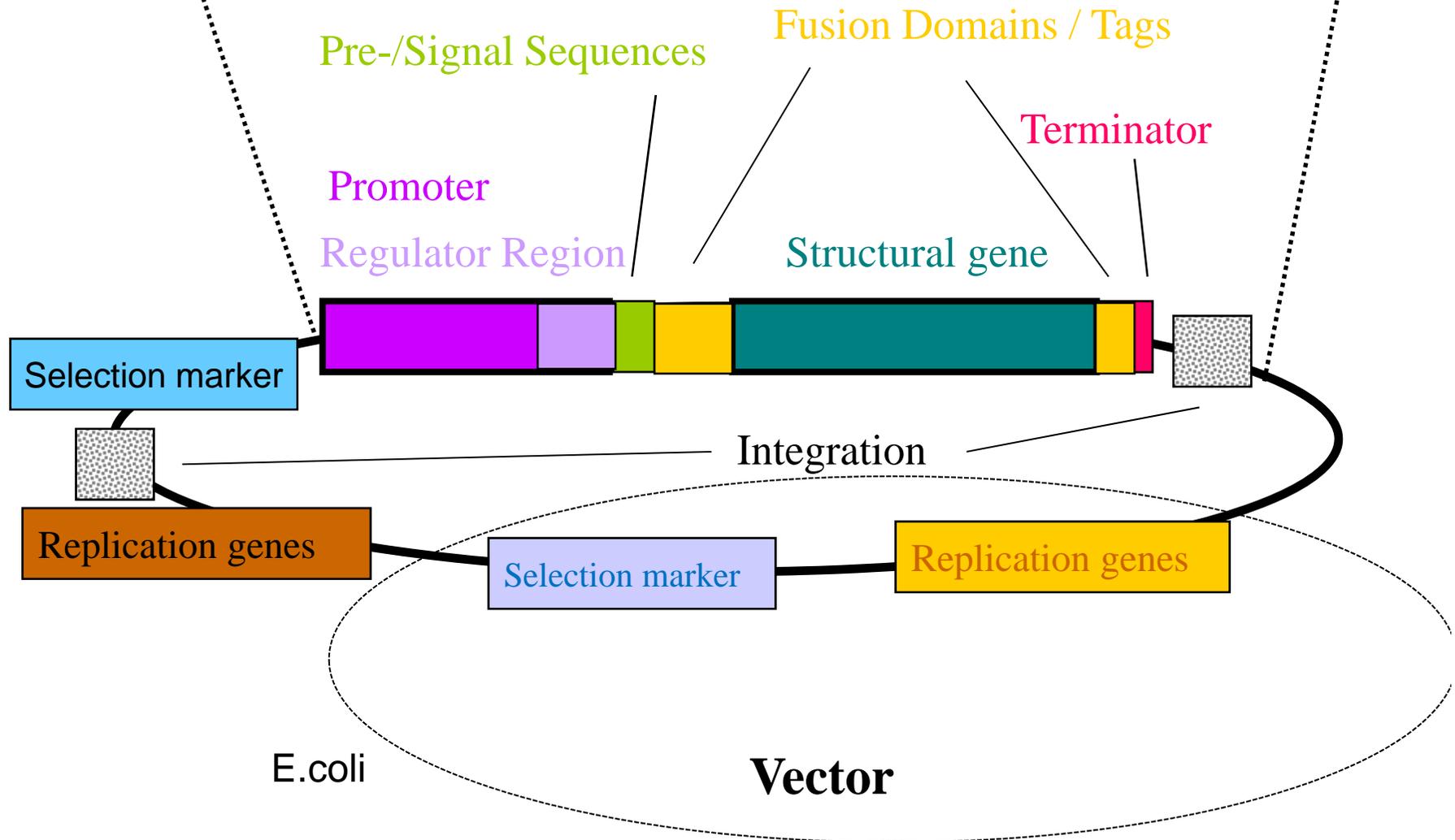
## PCR



# Stellenspezifische Mutagenese



# Expression Cassette



# Stammkonservierung

## Serieller Transfer

## Luftabschluss

- Lagerung unter Mineralöl

Erhalt der Leistungen von Biosystemen

## Trocknungsverfahren

- Trocknen an festen Trägern (Glaskugeln, Silicagel, Papier, Porcellan, Erde, etc)
- **Gefriertrocknen mit Schutzmedien** (Milchpulver, etc)

## Kryoverfahren

- einfache gekühlte Lagerung (0 – 4 °C)
- Einfrieren mit Schutzmedien (DMSO, Glycerin)
  - **schockgefrieren**
  - **einfrieren bei kontrollierten Raten**
  - Tiefkühlschranklagerung (-20°C, **-70°C**)
  - **Lagerung in flüssigem Stickstoff**)

Geeignete Verfahren

**TABLE 11.1** Culture collections that supply cultures of industrial microorganisms<sup>a</sup>

Abbreviation	Name	Location
ATCC	American Type Culture Collection	Manassas, VA, United States
CBS	Centraalbureau voor Schimmelculturen	Baarn, The Netherlands
CCM	Czechoslovak Collection of Microorganisms	J. E. Purkyně University, Brno, Czech Republic
CDDA	Canadian Department of Agriculture	Ottawa, Canada
CMI	Commonwealth Mycological Institute	Kew, United Kingdom
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	Braunschweig, Germany
IAM	Institute of Applied Microbiology	University of Tokyo, Japan
NCIB	National Collection of Industrial Bacteria	Aberdeen, Scotland
NCTC	National Collection of Type Cultures	London, England
NRRL	Northern Regional Research Laboratory	Peoria, IL, United States
PCC	Pasteur Culture Collection	Paris, France

<sup>a</sup> Listed here are just a few of the general culture collections. Many universities and research laboratories maintain collections of specific microbial groups.