

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

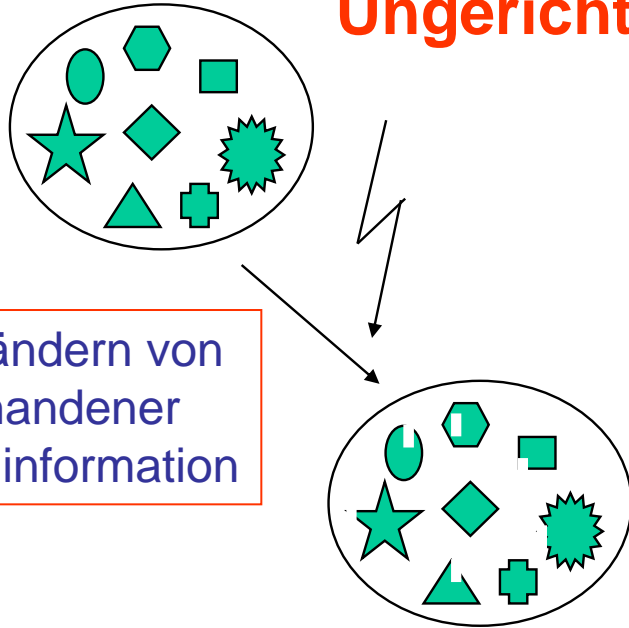
eigenständig replizierende Vektoren – Integration in Chromosomen

Entfernen/Ausschalten von Geninformation

in vitro Mutagenese (Gene für spezifische Proteine / Enzyme)

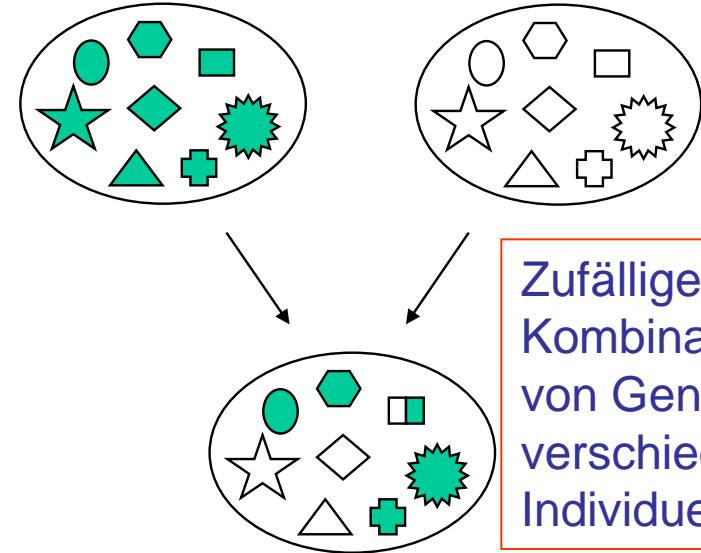
stellenspezifisch - random („directed evolution“)

Ungerichtete Mutation



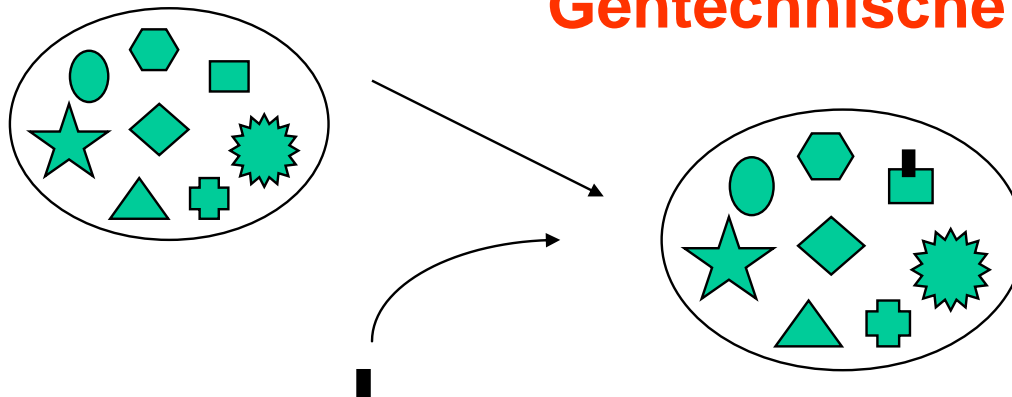
Verändern von vorhandener Geninformation

Kreuzung



Zufällige Kombination von Genen aus verschiedenen Individuen

Gentechnische Modifikation



Gerichteter Transfer von zusätzlicher Geninformation

Zufallsverteilte Mutationen

Basensubstitutionen
Deletionen
Insertionen

Induzierte Mutagenese

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

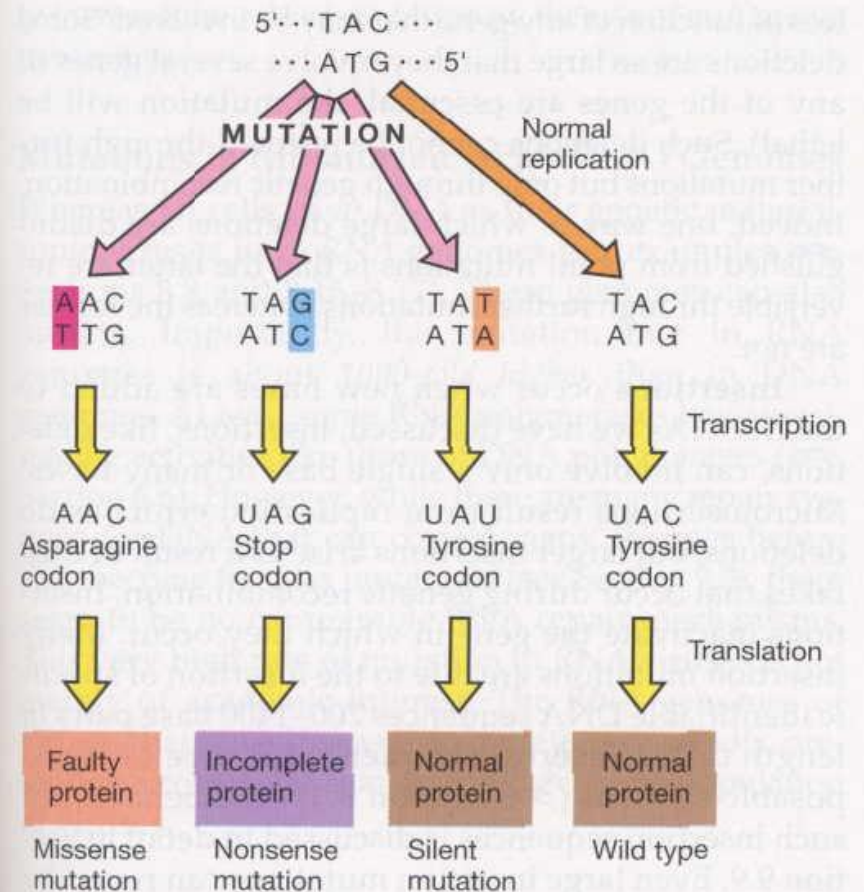
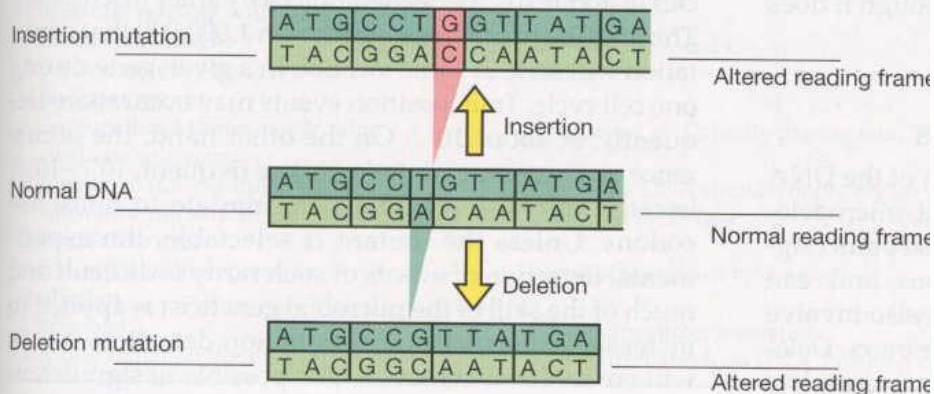


FIGURE 9.3 Possible effects of base-pair substitution in a gene encoding a protein: three different protein products from changes in the DNA for a single codon.

Rekombinationsgenetik

Gezieltes Kreuzen von Organismen

Zellfusionen

Gentransfer durch parasexuelle Mechanismen

Immer notwendig:

Screening - Selektion

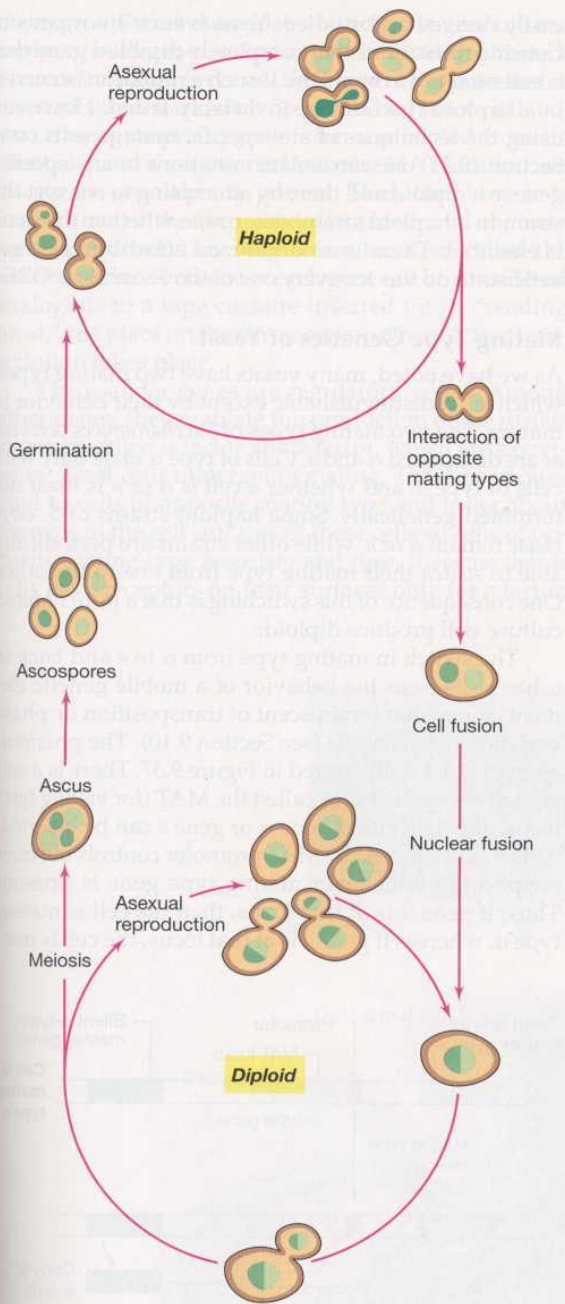


FIGURE 9.36 Life cycle of a typical yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. A haploid cell of *S. cerevisiae* contains 16 chromosomes.

Evolutionäre Stammentwicklung

Herstellung von Variantenpools

Ungerichtete induzierte Mutagenese

Kreuzungen von Varianten (Rekombination)

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

Ablauf eines evolutionären Stammentwicklungsprogramms

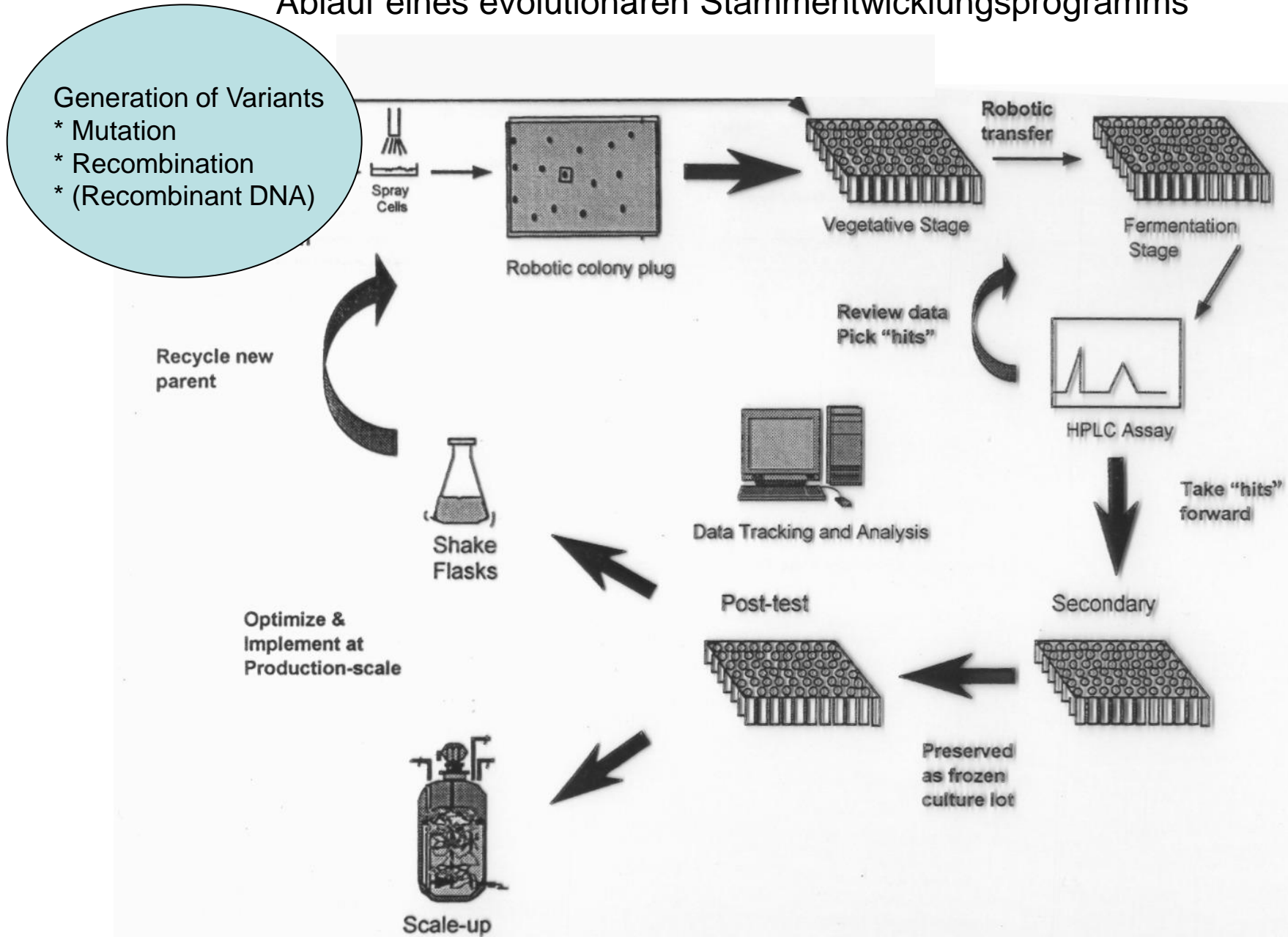


FIGURE 1 Schematic representation of an automated screening system.

20.4.16

Rationale Ansätze für Stammverbesserung

Wissen um Zusammenhänge
Im Stoffwechsel

Regulation

Regulation der Genexpression

Regulation der Enzymaktivität

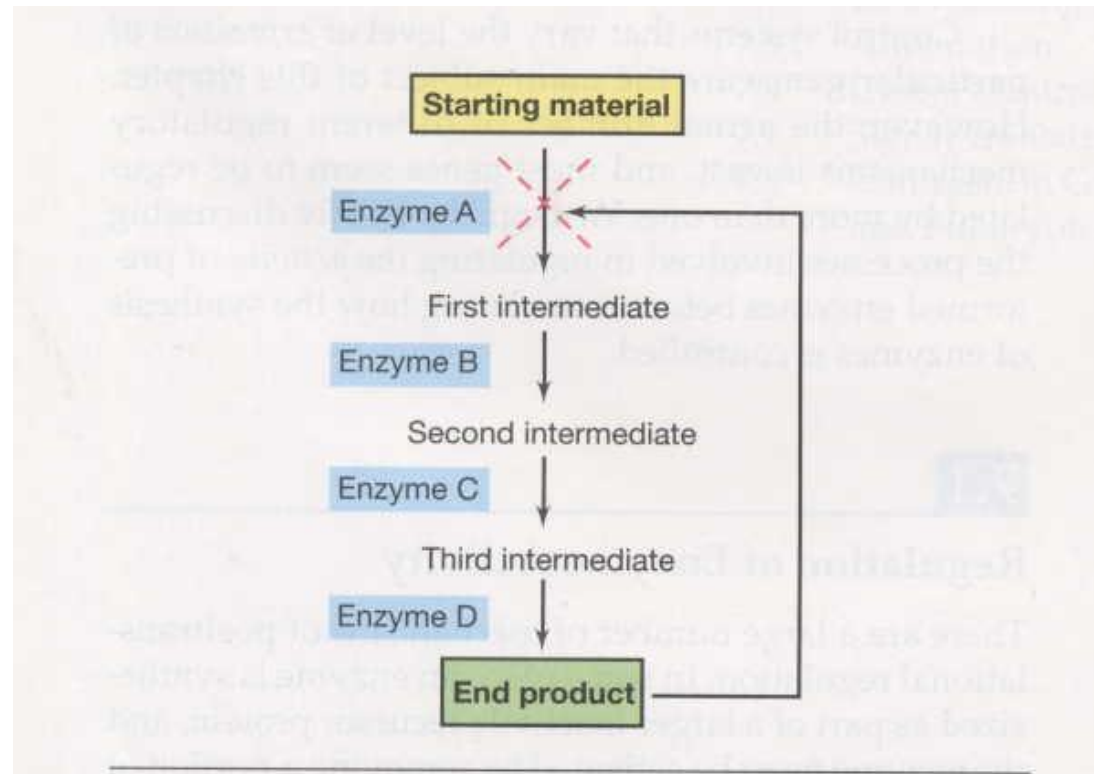


FIGURE 7.2 Feedback inhibition of enzyme activity. The activity of the first enzyme of the pathway is inhibited by the end product, thus controlling production of end product.

Rationale Ansätze für Stammverbesserung

Wissen um Zusammenhänge bei der Funktion von im Stoffwechsel beteiligten Enzymen

Regulation der Enzymaktivität

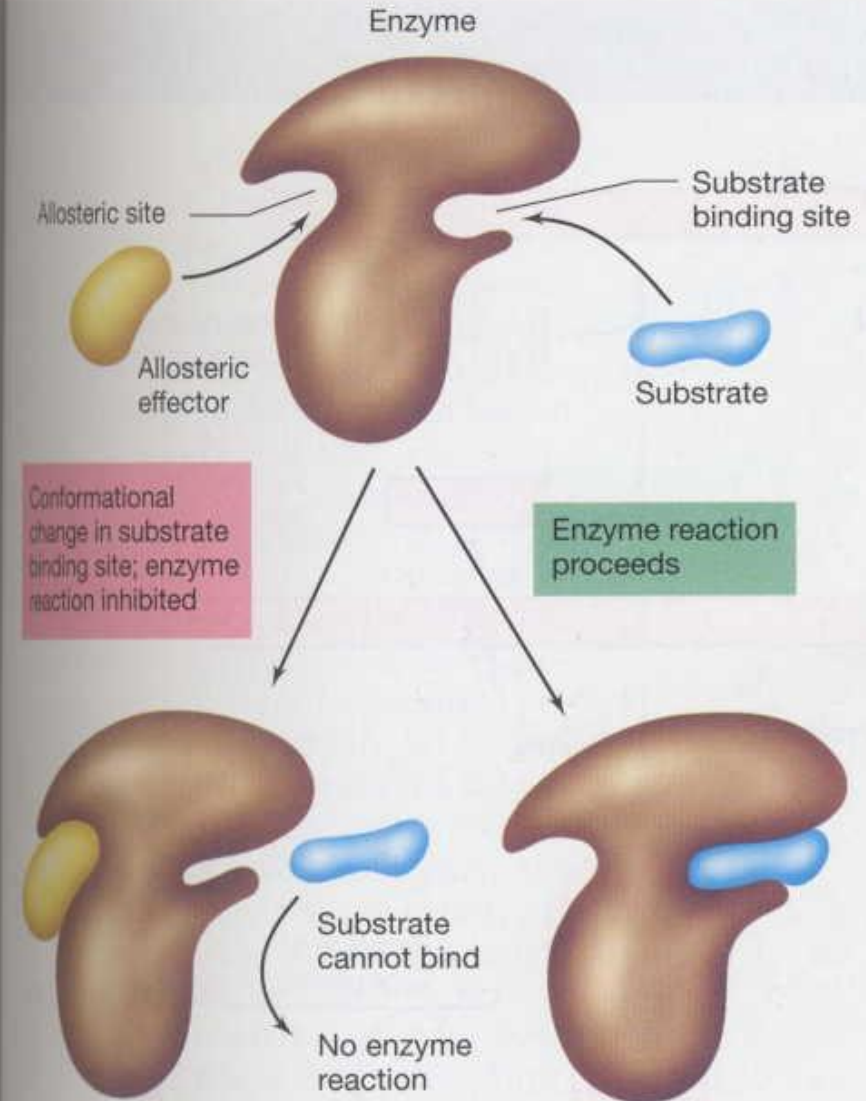
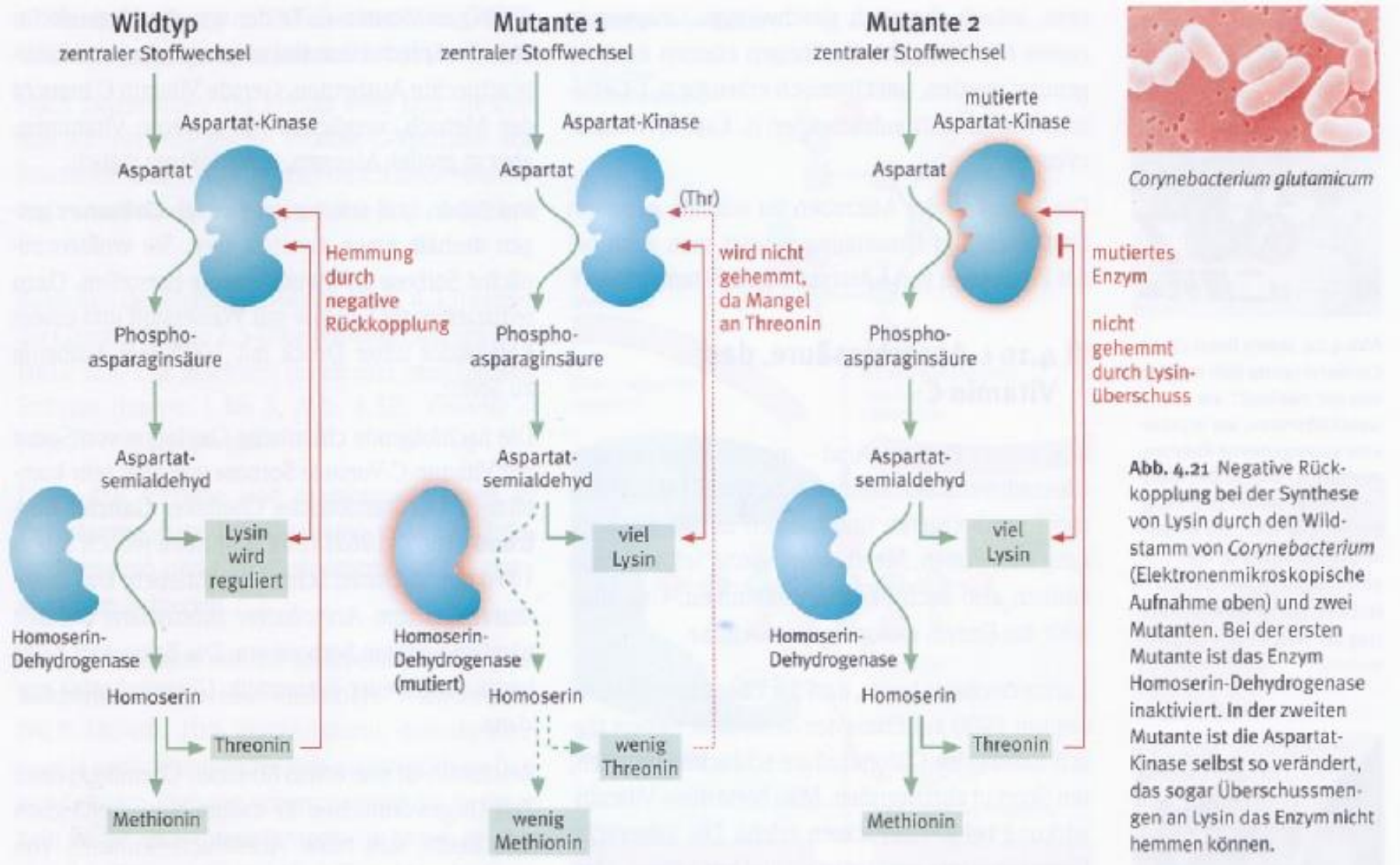


FIGURE 7.3 Mechanism of enzyme inhibition by an allosteric effector. When the effector combines with the allosteric site, the conformation of the enzyme is altered so that the substrate can no longer bind.

Ausschalten der Feedback-Regulation



Screening - Rationale Elemente

Tabelle 16.3. Ausscheidung von Aminosäuren durch auxotrophe Mutanten

| Mutanten (Phänotyp) | Produzierte Aminosäure |
|-------------------------------------|------------------------|
| Tyrosin ⁻ | Phenylalanin |
| Phenylalanin ⁻ | Tyrosin |
| Phe ⁻ , Tyr ⁻ | Tryptophan |
| Homoserin ⁻ | Lysin |
| Leucin ⁻ | 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 | α -Amino- β -hydroxyvaleriansäure | 5-Methyltryptophan |
| 4-Oxalysin | β -Hydroxyleucin | 4-Methyltryptophan |
| l-Lysin-hydroxamat | Norleucin | 6-Methyltryptophan |
| 2,6-Diamino-4-hexensäure | Aminohydroxyvaleriansäure | 5-Fluortryptophan |
| δ -Hydroxylysin | Norvalin | 6-Fluortryptophan |
| α -Chlorcaprolactam | N-2-Thienylmethionin | DL-7-Azatryptophan |
| Trans-4,5-dehydrolysin | 2-Amino-3-methylthiobuttersäure | 2-Azatryptophan |
| | 2-Amino-3-hydroxyhexensäure | |

Antimetabolit-resistente Mutanten

Rekombinante DNA Technologie

Gezielte Handhabung von Geninformation

→ **GVO / GVM**

Risikogruppen

Zuordnung von **GVM** zu einer Risikogruppe

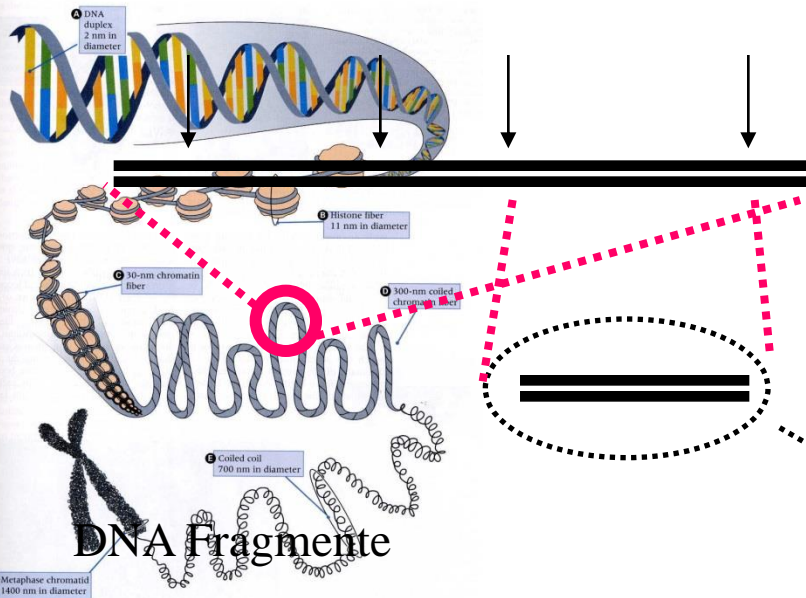
Transgene Mikroorganismen
Transgene Pflanzen
Transgene Tiere
Gentherapie am Menschen

- **Gruppe 1:**
 - vom Empfängerorganismus nicht zu erwarten, dass er Krankheiten verursacht (Mensch, Tier, Pflanze)
 - Vektor und Insert nicht zu einem GVM führt, der Krankheiten verursacht (Mensch, Tier, Pflanze, Umwelt)
- **Gruppe 2-4:**
 - GVM stellt geringes, mäßiges bzw. hohes Risiko für die Sicherheit dar

Sicherheitseinstufung von Arbeiten mit GVO:

- S1: kein oder vernachlässigbares Risiko
- S2: geringes Risiko
- S3: mäßiges Risiko
- S4: hohes Risiko

Herstellen von rekombinanten DNA Molekülen (Klonieren)



Schneiden mit Restriktionsenzym

Ligation mit DNA Ligase

Einbringen in lebende Zellen

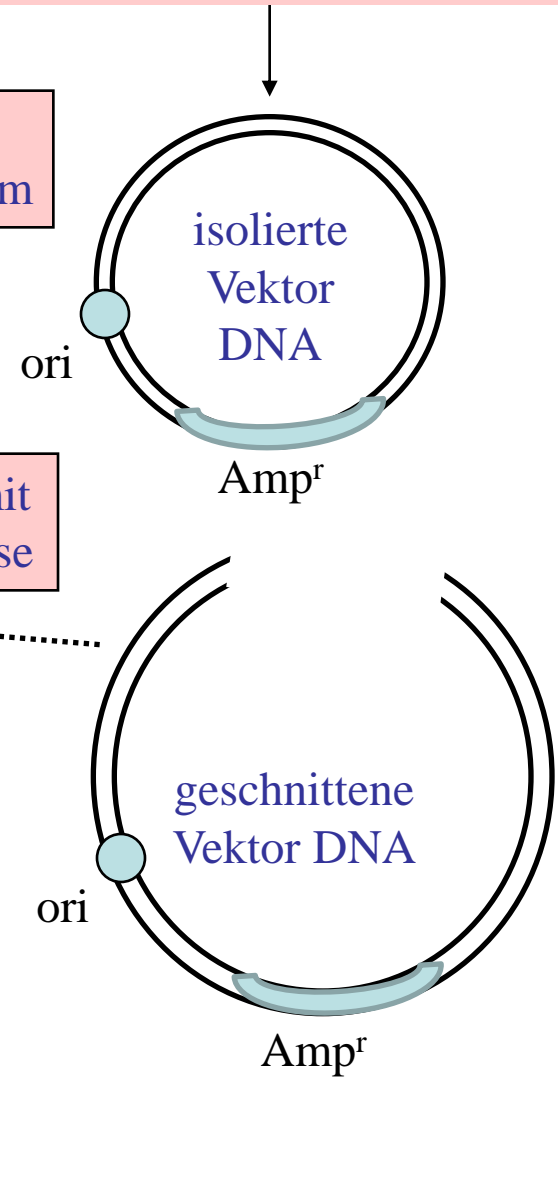
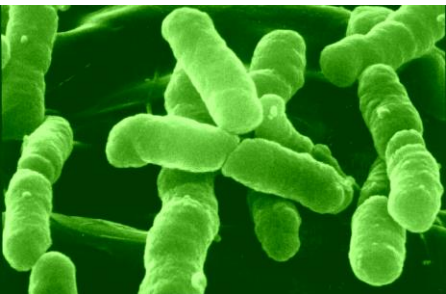
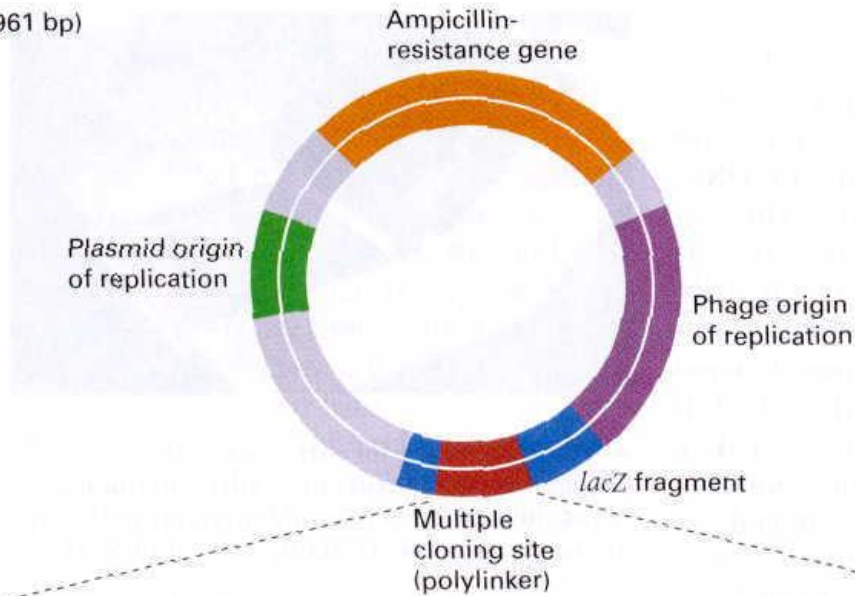


Figure 8.9 Various stages in the condensation of DNA (A) and chromatin (B through E) in forming a metaphase chromosome (F). The dimensions indicate known sizes of intermediates, but the detailed structures are hypothetical.



(A) pBluescript plasmid (2961 bp)



(B)

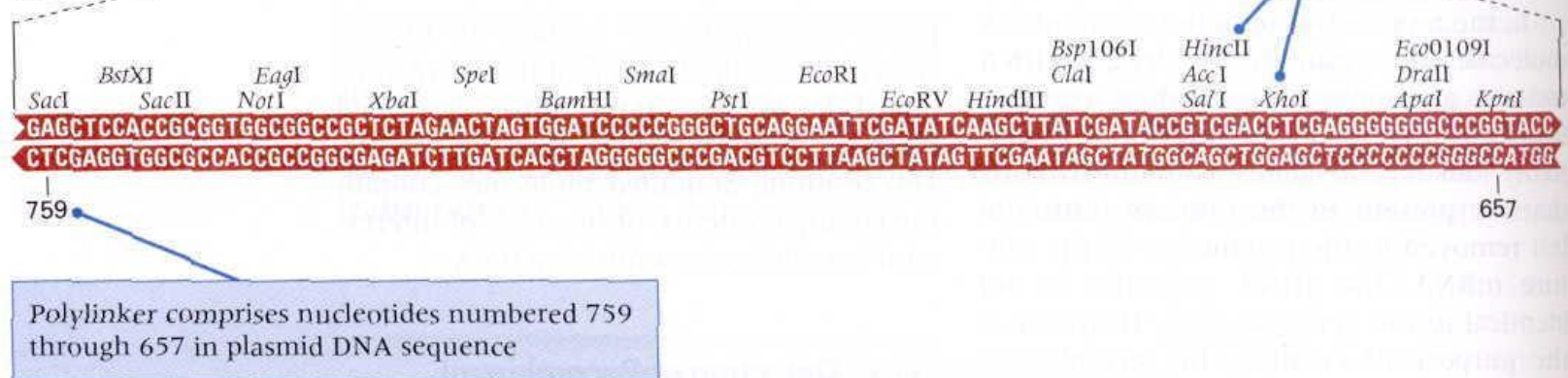

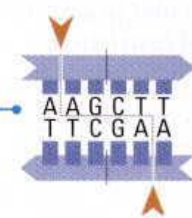

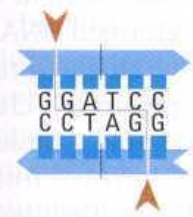
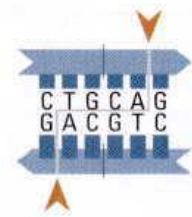






Figure 13.9 (A) Diagram of the cloning vector pBluescript II. It contains a plasmid origin of replication, an ampicillin-resistance gene, a multiple cloning site (polylinker) within a fragment of the *lacZ* gene from *E. coli*, and a bacteriophage origin of replication. (B) Sequence of the multiple cloning 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><i>HindIII</i> (<i>Haemophilus influenzae</i>)</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>Rhodospseudomonas 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

Direkte chemische Synthese:

Oligonukleotide:

bis zu 150 bp möglich

Ab 100 bp Fehler höher

Größere Genfragmente können biochemisch aus kleinen synthetischen Oligonukleotiden assembliert werden (PCR)

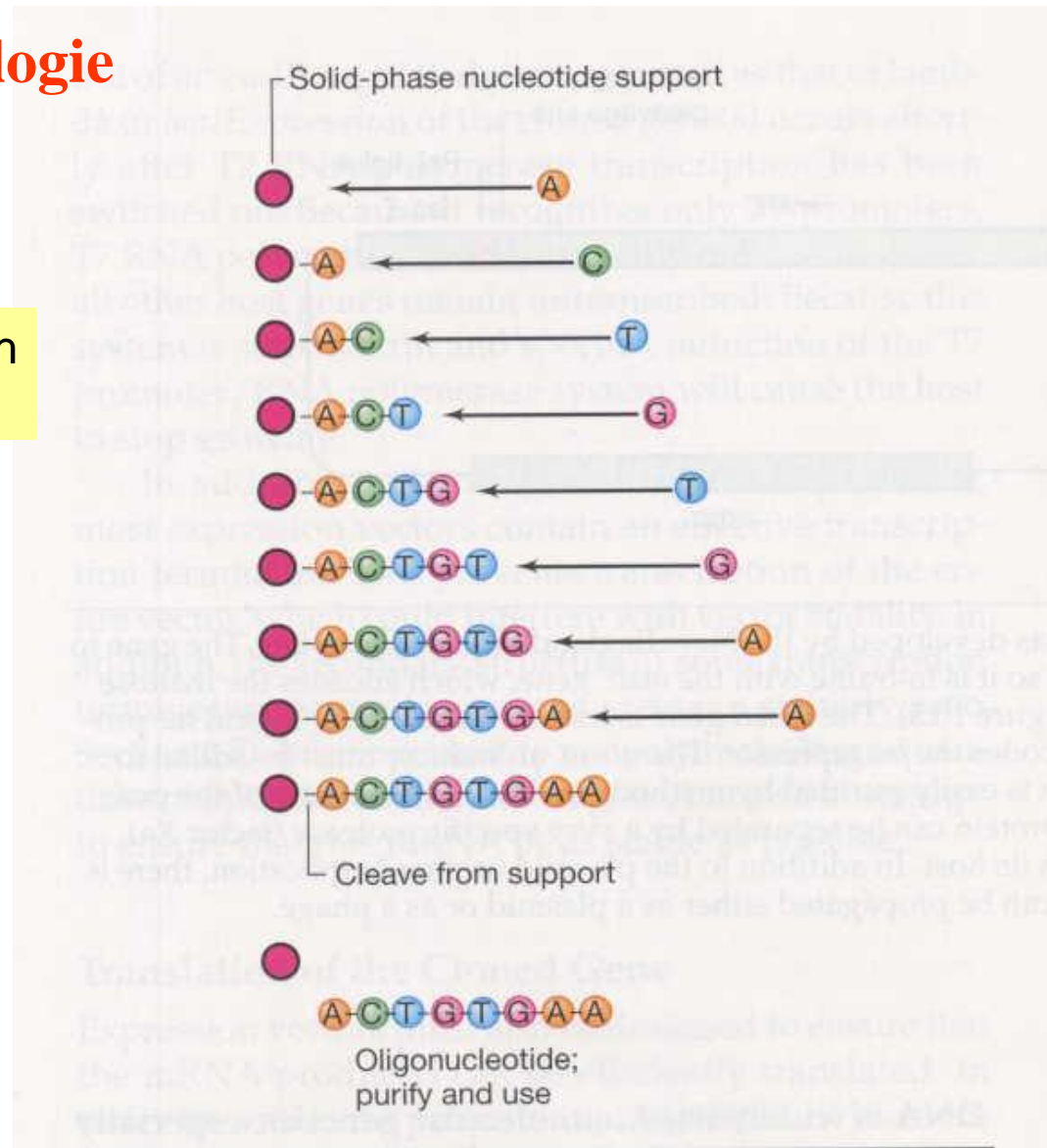


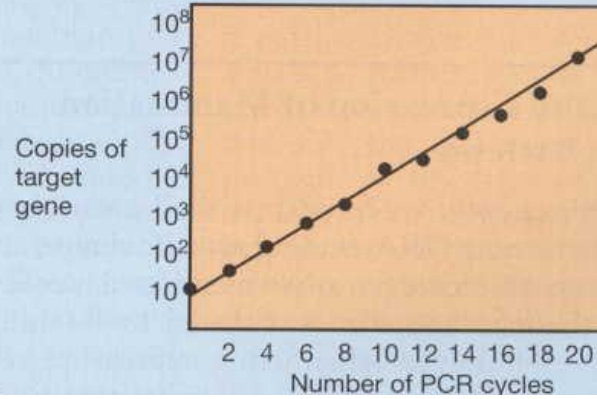
FIGURE 10.10 Solid-phase procedure for synthesis of a DNA fragment of defined sequence. Chemical synthesis proceeds by adding one nucleotide at a time to the growing chain.

Gentechnik – DNA Technologie

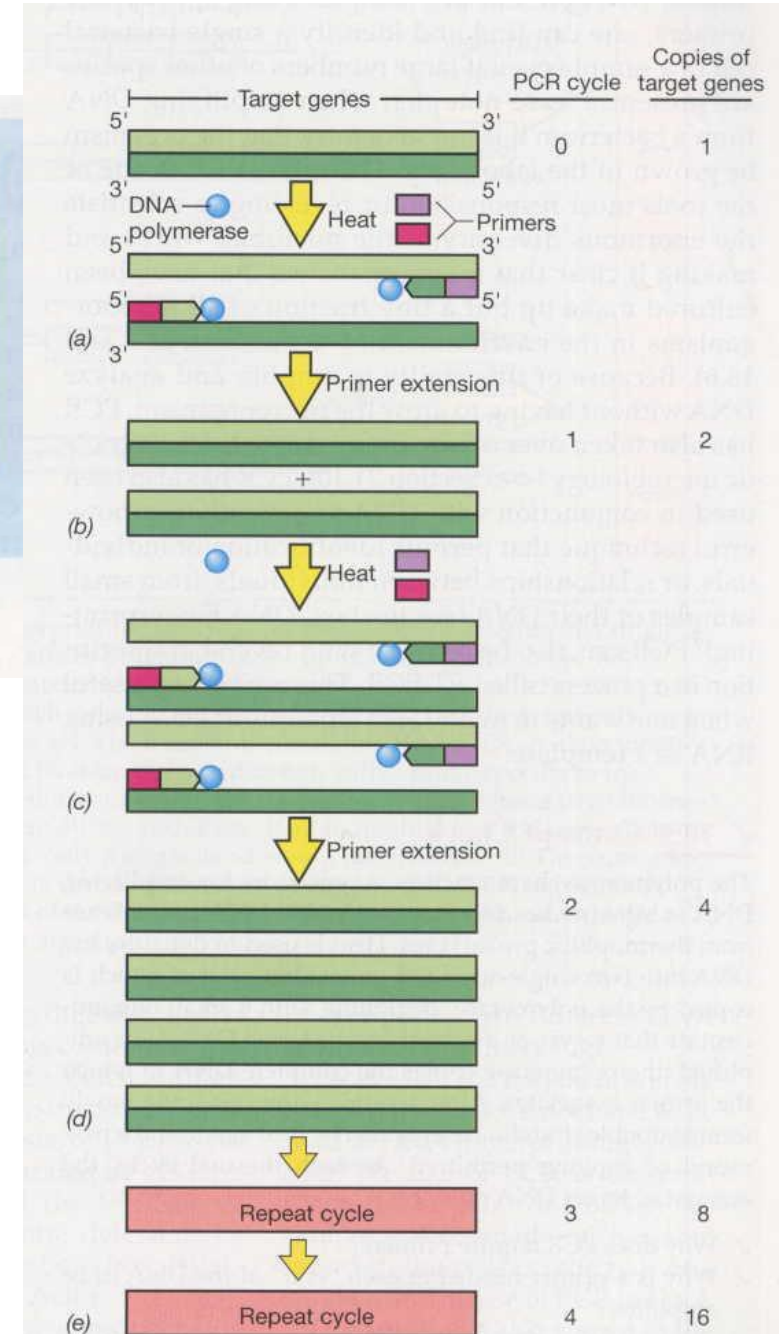
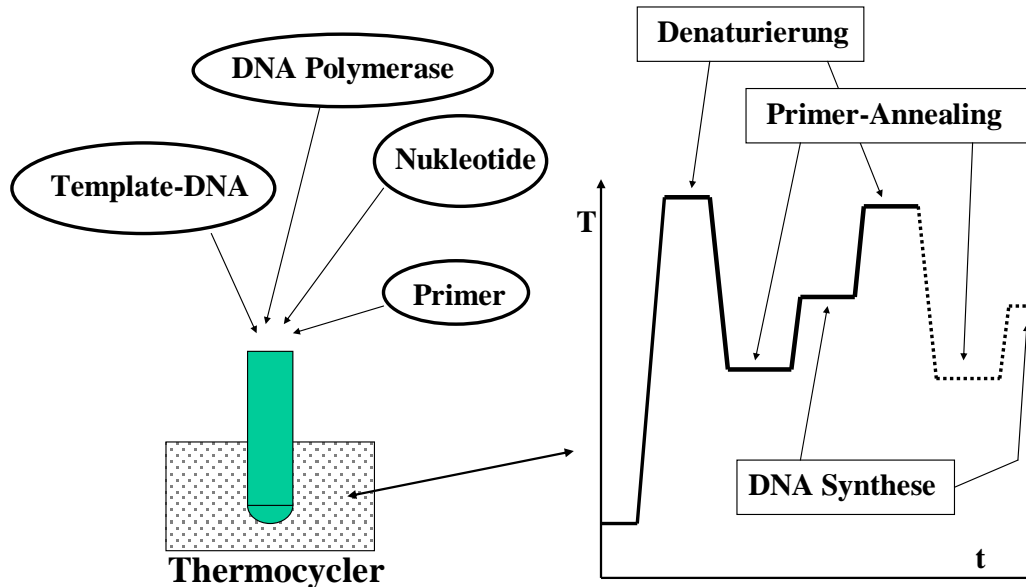
Polymerase Chain Reaction

Leichter Zugang zu Genmaterial

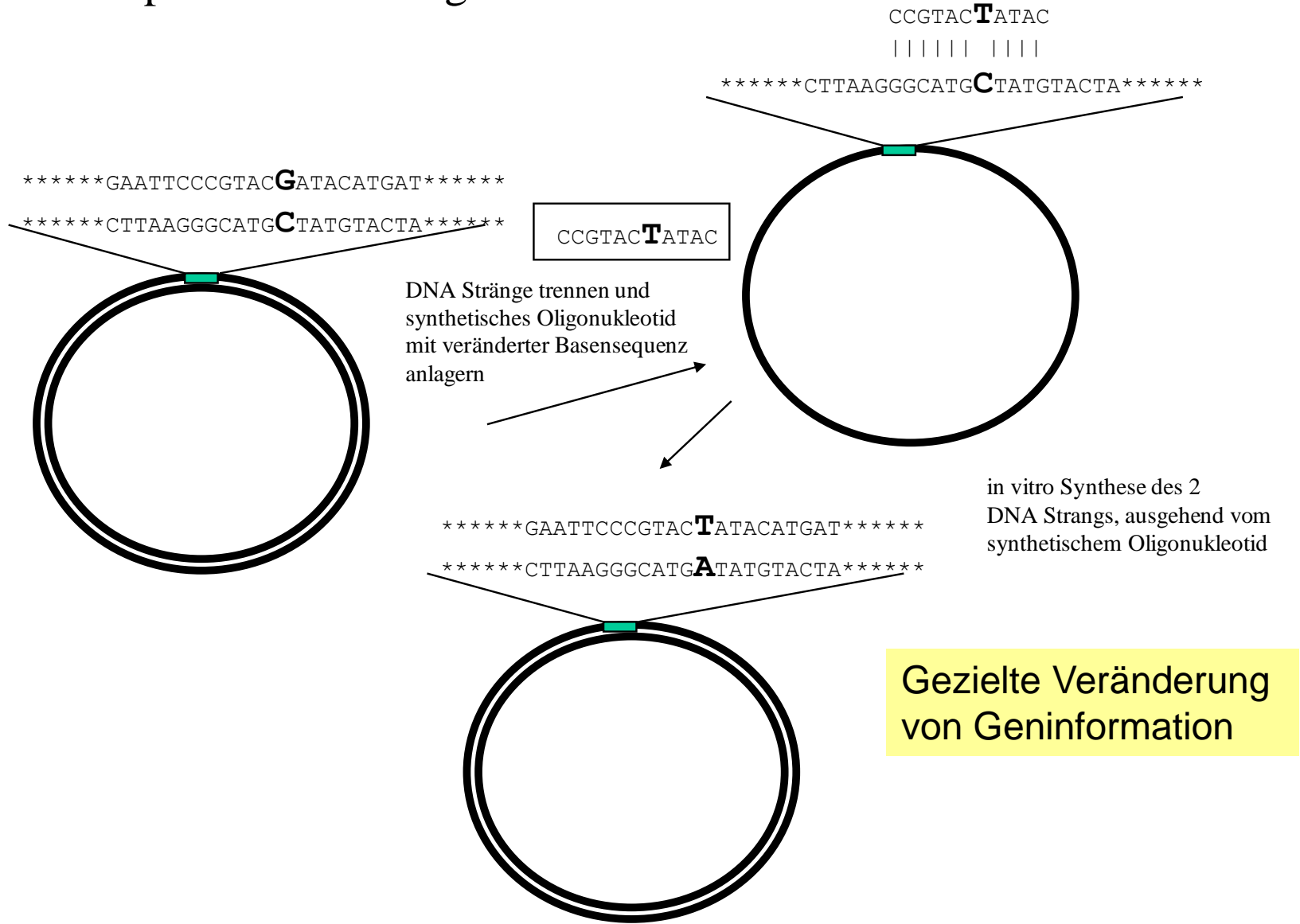
Exponential Amplification



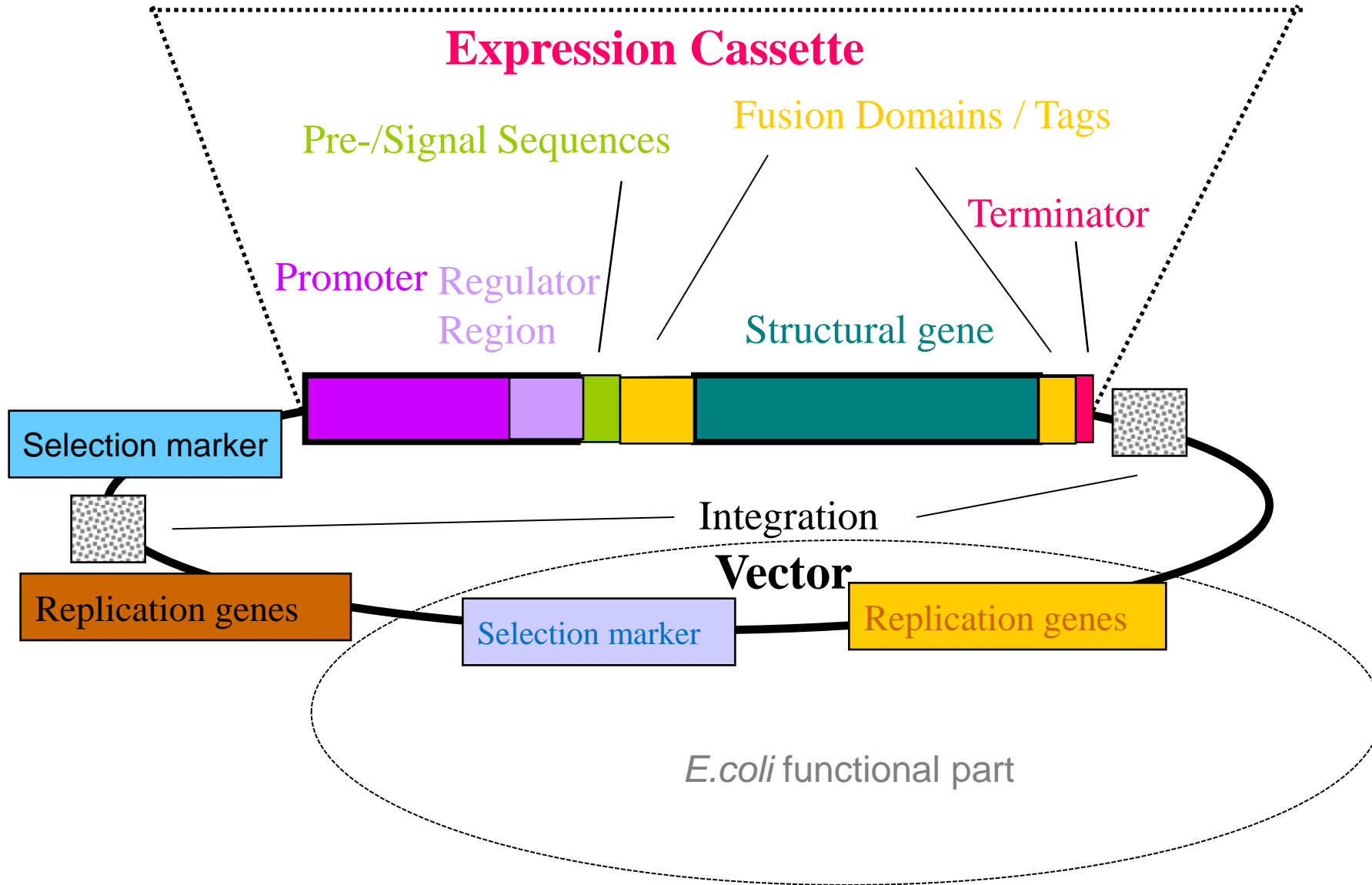
PCR



Stellenspezifische Mutagenese



Gezielte Expression von Genen in Wirtsorganismen



Stammkonservierung

Erhalt der Leistungen von Biosystemen
→ Möglichst keine genetischen Änderungen

Serieller Transfer

- Transfer auf frische Medien (Kultivierung, Lagerung → 4°C) in Zeitabständen
- Problem: Jeder Transfer bedeutet mehrere Replikationsrunden → genetische Änderungen

Luftabschluss

- Lagerung unter Mineralöl → nur sehr begrenzter Zeitraum

Trocknungsverfahren

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

Kryoverfahren

- einfache gekühlte Lagerung (0 – 4 °C) → in Kombination mit seriellem Transfer, Lagerung unter Luftabschluss, Trocknungsverfahren
- **Einfrieren mit Schutzmedien (DMSO, Glycerin)**
 - **schockgefrieren**
 - **einfrieren bei kontrollierten Raten**
 - Tiefkühlschranklagerung (-20°C, -70°C)
 - **Lagerung in flüssigem Stickstoff -180°C)**

Geeignete Verfahren

TABLE 11.1 Culture collections that supply cultures of industrial microorganisms^a

| 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 |

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

27.4.16