

# GentechnoLOGISCH - Arbeitsblatt Nr. 3

## LÖSUNGEN

Fragen zu

Kapitel "Bakterien - die Nutztiere der Gentechnologie"

Kapitel "Kettenreaktion"

3.1) Folgende Aussagen sind falsch:

- *Das Bakterium E.coli lebt natürlicherweise in unserem Verdauungstrakt als bösartiger Parasit. Es ernährt sich von unserer Nahrung, wir selber profitieren nicht von dem winzigen Gast.*

E.coli lebt mit uns normalerweise in unproblematischer, friedlicher Symbiose. Der Mensch profitiert auch - das Bakterium hilft uns beim Abbau gewisser Nahrungsstoffe. (Es gibt jedoch etliche pathogene E.coli-Stämme, die gesundheitliche Probleme hervorrufen können)

- *A propos winzig - der Einzeller hat ungefähr die Länge von einem Mikrometer. Das ist ein Zehntel eines Millimeters.*

Ein Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) ist ein Tausendstel eines Millimeters.

- *Die Abkürzung E.coli steht übrigens für den wissenschaftlichen Namen "Exkrementum coli" des Bakteriums.*

Das ist Blödsinn - E.coli steht für Escherichia coli. Das Bakterium trägt den Namen seines Entdeckers, des deutschen Kinderarztes Theodor Escherich (1857-1911)

- *Die im Labor verwendeten Bakterien haben alle exakt identische Eigenschaften unterschieden sich auch von ihren Kollegen im menschlichen Verdauungstrakt in keiner Weise.*

Richtig ist, dass es eine grosse Anzahl verschiedenster, auf unterschiedlichste Laboranwendungen spezialisierte Stämme von E.coli gibt. Es gibt somit einen ziemlichen Unterschied zwischen Laborbakterien und den Bewohnern der menschlichen Darmflora.

- *E.coli lässt sich ausschliesslich auf festem Medium - so genannten Agarplatten züchten.*

E.coli lässt sich auch in Flüssigkultur züchten.

3.2) a) Transformation nennt man den Vorgang, DNA in Bakterienzellen einzubringen. Es gibt verschiedene Methoden, um Bakterien zu transformieren.

- b) Aus der Broschüre bekannt ist die Hitzeschock-Methode: Zuerst gelöste DNA im einen und Bakterien in flüssigem Nährmedium im anderen Reagenzglas. Dann werden Bakterien und DNA zusammengegeben. Bakterien eine halbe Stunde auf Eis stellen - dann Hitzeschock: Das eisgekühlte Reagenzglas wird für 2 Minuten in  $42^{\circ}\text{C}$  warmes Wasser gestellt. Die Bakterien werden dabei so geschockt, dass sie die DNA aufnehmen. Nachher ist eine Erholungsphase nötig - behutsamer Umgang mit den Zellen, möglichst eine Temperatur von  $37^{\circ}\text{C}$ , genug Nährmedium.

3.3) a) Bei der Transformation hat sich nur ein kleiner Prozentsatz aller Bakterien kooperativ gezeigt und Plasmidringe aufgenommen. Nur diese Bakterien sind von Wert, nur diese sollen weitergezogen und vermehrt werden. Man muss sie folglich selektionieren.

- b) Der Selektionsvorgang funktioniert folgendermassen: Die frisch transformierten Bakterien werden nach der Erholungsphase auf Agarplatten verteilt und bei  $37^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Agarplatten enthalten ein Antibiotikum. Die Arbeitsplasmide, mit denen man die Bakterien transformiert hat, tragen die Bauanweisung - also einen DNA-Abschnitt - für ein Protein, das den Bakterien eine Resistenz gegen das für sie normalerweise tödliche Antibiotikum vermittelt. Man spricht von einem "Antibiotikumresistenz-Gen".

Auf diese Weise werden nur die Bakterien auf den Platten überleben, die das Plasmid aufgenommen haben, die anderen gehen zu Grunde. Die so *selektierten* Bakterienzellen vermehren sich. Nach einiger Zeit bilden sie auf dem Agar kleine, ungefähr nadelkopfgroße Kolonien von Tausenden von Zellen. Diese Kolonien kann man dann einzeln mit einem feinen Instrument abkratzen und die Bakterien in Flüssigkultur weiter vermehren.

3.4) Fieber hat diverse physiologische Gründe. Grundsätzlich werden durch die Temperaturerhöhung die Abwehrmechanismen des Körpers gesteigert.

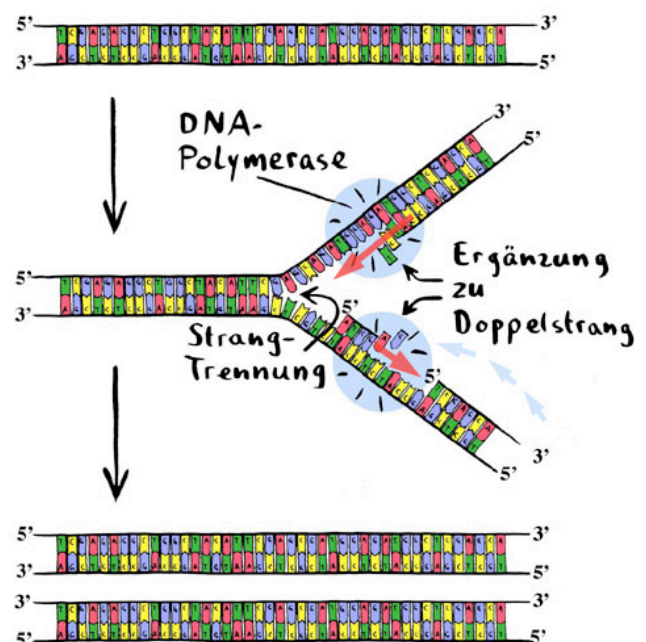
Eine Theorie ist - und sie ist hier gesucht - dass der Körper versucht, die eingedrungenen, krankheitsverursachenden Bakterien abzuwehren, indem er für sie suboptimale Wachstumsbedingungen schafft. Diese Keime haben ihr Temperaturoptimum auf die Körpertemperatur ihres Wirtes eingestellt - auf ca. 37° C also. Bei einer Temperatur um 40° C sind die Umstände für sie ungünstig, sie sind geschwächt - das Immunsystem hat so unter Umständen ein leichteres Spiel mit ihnen.

3.5) Bei einem Einsatz von Antibiotika werden resistente Bakterien automatisch selektiert und können sich bei geschwächten oder immunsupprimierten Patienten (z.B. nach Transplantationen) vermehren und verbreiten. Antibiotikaresistenzen können auch von einem Bakterienstamm zu anderen weitergegeben werden (Austausch von DNA) - so können auch mehrfachresistente Stämme entstehen.

Dem Problem begegnen kann man durch den bedachten Einsatz von Antibiotika. Eine unnötige Abgabe von Antibiotika fördert die Selektion und Vermehrung resistenter Bakterien. Wichtig ist es auch, vom Arzt verordnete Antibiotika-Kuren zu Ende zu führen. Oftmals fühlt man sich bereits nach den ersten Dosen wieder gesund, man sollte aber das Antibiotikum wie verordnet noch länger einnehmen. Sonst besteht die Gefahr, dass "halbresistente" Bakterien überleben (sie sprechen auf das Medikament nur noch schwach an) und sich wieder etablieren können. Sehr wichtig ist auch die stetige Entwicklung neuer Antibiotika um in dem Wettlauf gegen resistente Mikroorganismen immer einen Schritt voraus zu sein.

3.6) Trägt man sich die Orientierungen der einzelnen Stränge in die Skizze ein, so stellt man fest, dass die Polymerase am unteren Ast der so genannten "Replikationsgabel" in die falsche Richtung laufen würde: Sie arbeitet in die 3'-5'-Richtung, was nicht der natürlichen Gegebenheit entspricht. In Wirklichkeit verhält sich die Situation wie auf der korrekten Skizze nebenan gezeigt: Die Polymerase am unteren Ast der Replikationsgabel springt immer wieder nach vorne (Richtung Strangtrennungsort) um dann "rückwärts" in 5'-3'-Richtung zu synthetisieren bis sie am vorhergehenden 5'-Ende anstößt.

Wie man aus dem Kapitel "Kettenreaktion" weiss, braucht die Polymerase ein kurzes DNA-Stück, einen sogenannten "Primer", um mit der Synthese zu beginnen. In der Zelle gibt es deshalb ein Enzym - die so genannte Primase - die jene kurzen DNA-Stücke setzt. Am oberen Arm der Gabel muss sie das genau ein Mal machen, am unteren ist sie dauernd im Einsatz.



3.7) Der Kreisprozess besteht aus drei Schritten:

- 1) Zuerst wird die Reaktionsmischung für ca. eine halbe Minute auf über 90°C erhitzt. Dabei trennen sich die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge.
- 2) Dann folgt Schritt zwei: Die Temperatur wird für wiederum ca. eine halbe Minute relativ tief abgesenkt (ca. 30-60°C), abhängig von Länge und Sequenz der verwendeten Primer. Während diesem Schritt nun finden die relativ kurzen Primer genug Zeit, um ihre komplementären Bindungsstellen zu finden.
- 3) Beim dritten Schritt des Kreisprozesses wird die Temperatur für etwas länger (2-5 Minuten) wieder leicht erhöht (65-75°C). Nun findet die eigentliche Kopierarbeit statt - und das braucht etwas Zeit: Die Polymerasen setzen an den Primern an und ergänzen die Einzelstränge zu Doppelsträngen. Danach beginnt der Prozess wieder von neuem bei Schritt eins. Die Zunahme der DNA-Moleküle verläuft fast exponentiell - eine Kettenreaktion eben.

Für eine Skizze des Vorgangs vergleiche Abbildung S. 25.

3.8) Es finden sich nicht die ursprünglichen, bis zu mehreren hundert Nucleotide langen Stränge wieder, sondern je ein langer Strang wird von einem kurzen, ca. 20 Nucleotide langen Primer besetzt, der auf eine bestimmte Stelle des langen Moleküls passt. Es ist eine thermische Gesetzmässigkeit, dass DNA-Stränge umso mehr Zeit benötigen um sich wieder aneinander zu lagern, je länger sie sind. Es stehen nur ca. 30 Sekunden zur Verfügung - verständlich also, dass sich nur gerade die kurzen Primer an die ihnen komplementären Stellen binden können - für die Langen ist das zu kurz.

Die Situation ist durchaus so gewollt - sie entspricht dem Konzept der PCR: Primerbindung ist beabsichtigt, nicht aber die Wiederherstellung der langen doppelsträngigen DNA-Abschnitte.

3.9)

Bestandteil	Funktion
Zu kopierende DNA	Dient als Kopiervorlage
DNA-Polymerase (hitzestabil)	DNA-Kopiermaschine, ergänzt die Einzelstränge zu Doppelsträngen. Übersteht die hohen Temperaturen des PCR-Zyklus
DNA-Primer (zwei verschiedene Varianten - je eine Variante für die beiden komplementären Einzelstränge)	Dienen der DNA-Polymerase als Ansatzpunkt. Dienen so zur Einschränkung des zu kopierenden Abschnittes auf der Kopiervorlage - sind entsprechend komplementär zu gewissen Sequenzen der zu kopierenden DNA.
Einzelne Nucleotide (A, C, G und T)	Werden von der DNA-Polymerase bei ihrer Kopierarbeit zu einer neuen Strangkopie verarbeitet.
Wasser, Puffer	Reaktionsflüssigkeit

3.10) a) Es ist wichtig, dass die Syntheserichtung der DNA-Polymerase berücksichtigt wird und die Primer für die richtige Seite geplant werden.

5' GCCACACTTTT**TAAGGAGCTT**AAATGACAGAAATCTTCTAGACGTGAGCAAGGGGCGAGGAGCTCTGATAGA3'  
 Primer 1      3' **TTCCCGCTC**5'

5' **TAAGGAGCTT**3'      Primer 2  
 3' CGGTGTGAAAAT**TCCTCGAATTTACTGTCTTTAGAAATCTGCACTCGTTCCCGCTC**CTCTAGACTATCT5'

Primer bestellt man übrigens heute ganz einfach über das Internet. Man tippt die gewünschte Sequenz auf einer Webpage ein und erhält ein paar Tage später ein kleines Paket mit Trockeneis. Schön gekühlt darin Eppendorfröhrchen mit den gewünschten DNA-Molekülen - bereit zum Einsatz.

- b) Überhängende Primer erlauben es, ein zu kopierendes DNA-Stück durch gewünschte, kurze DNA-Sequenzen zu ergänzen. Wie der Name sagt, erstellt man dazu Primer, die über den zu kopierenden Teil überhängen. Die Primer haben also einen Abschnitt, der nicht zur Kopiervorlage komplementär ist und so individuell gestaltet werden kann. So können beispielsweise Schnittstellen eingeführt werden. Unten ein Beispiel (eingeführt wird eine E.coli-Schnittstelle CTTAAG, eingerahmt von einigen extra Nucleotiden).

5' GCCACACTTTT**TAAGGAGCTTAAATGACAGAAATCTTCTAGACGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTCTGATAGA**3'  
 Primer 1+ 3' **TTCCCCGCTCCTTAAGCC** 5'

- c) Die Sache ist recht einfach: Man kreiert Primer, die möglichst spezifisch für die gesuchte Sequenz passend sind und gibt sie zum zu untersuchenden DNA-Gemisch dazu und führt eine PCR durch. Kommt es zu einer DNA-Vermehrung, ist die gesuchte DNA vorhanden, sonst nicht. Neueste Verfahren können auf die Weise sogar die Konzentration der gesuchten DNA bestimmen: Je rascher die DNA-Vermehrung stattfindet, desto mehr der gesuchten DNA-Stücke waren in der Ausgangslösung vorhanden. Man spricht hier von Realtime-PCR weil die PCR-Reaktion laufend verfolgt und aufgezeichnet wird. Natürlich benötigt es dazu aber spezielle PCR-Geräte, und Primer, die mit einer detektierbaren Markierung versehen sind.