

ZMG Kurs für Bioinformatiker

# Genetik – Protokolle

Stephan Körner, Thomas Holder (Gruppe 13)

07.–28. November 2005

Kursbetreuung: Priv. - Doz. Dr. Ulrike Zentgraf, Daniel Slane (Bremsler)



Erstellt mit L<sup>A</sup>T<sub>E</sub>X 2<sub>ε</sub> und GNUPlot

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Mutagenese</b>	<b>4</b>
1.1	UV-Mutagenese von <i>E. coli</i>	4
1.1.1	Einleitung	4
1.1.2	Durchführung	4
1.1.3	Ergebnis	4
1.1.4	Diskussion	4
1.2	Transposon-Mutagenese in <i>E. coli</i>	6
1.2.1	Einführung	6
1.2.2	Durchführung	6
1.2.3	Ergebnis	7
1.2.4	Diskussion	8
1.3	Pflanzentransformation durch <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	8
1.3.1	Einleitung	8
1.3.2	Durchführung	8
1.3.3	Ergebnis	8
1.3.4	Diskussion	9
<b>2</b>	<b>Mutantenanalyse, Klassische Genetik, Genkartierung</b>	<b>10</b>
2.1	Einleitung	10
2.2	Kreuzungsexperimente mit <i>Drosophila</i> -Mutanten	11
2.2.1	Einleitung	11
2.2.2	Durchführung	11
2.2.3	Ergebnis	11
2.2.4	Diskussion	12
2.3	Auswertung menschlicher Stammbäume	12
2.3.1	Einleitung	12
2.3.2	Baum 1	12
2.3.3	Baum 2	13
2.3.4	Baum 3	13
2.4	Rekombination und Genkartierung bei <i>Drosophila</i>	13
2.4.1	Einleitung	13
2.4.2	Durchführung	13
2.4.3	Ergebnis	13
2.4.4	Diskussion	13
<b>3</b>	<b>Austausch genetischer Information bei Prokaryoten</b>	<b>15</b>
3.1	<i>E. coli</i> Konjugation	15
3.1.1	Einleitung	15
3.1.2	Durchführung	15
3.1.3	Ergebnis	15
3.1.4	Diskussion	15
3.2	Plasmidtransformation bei <i>E. coli</i>	16

---

3.2.1	Einführung . . . . .	16
3.2.2	Durchführung . . . . .	16
3.2.3	Ergebnis . . . . .	17
3.2.4	Diskussion . . . . .	17
<b>4</b>	<b>Gentherapie bei <i>Matthiola incana</i></b>	<b>18</b>
4.1	Therapie eines Gendefektes bei <i>Matthiola incana</i> . . . . .	18
4.1.1	Einleitung . . . . .	18
4.1.2	Durchführung . . . . .	18
4.1.3	Ergebnis . . . . .	18
4.1.4	Diskussion . . . . .	18

# 1 Mutagenese

## 1.1 UV-Mutagenese von *E. coli*

### 1.1.1 Einleitung

Wenn *E. coli* UV-Licht ausgesetzt wird, kommt es zu Schäden in seinem Genom. Aus diesem Grund hat der Organismus verschiedene Reparaturmechanismen entwickelt, um die Schädigung wieder zu reparieren. Ein solches System ist das sogenannte *RecA* Enzym. Dieses Enzym erkennt die fehlerhafte Sequenz und aktiviert ein SOS-System zur Reparatur. Unser Versuch soll zum einen zeigen, wie gut das *RecA*-Enzym und das aktivierte SOS-System arbeitet nach einer gewissen Bestrahlungsdauer. Des Weiteren soll untersucht werden, da das SOS-System fehleranfällig ist und Mutationen auslösen kann, ob und in welchem Maße Mutationen durch das SOS-System ausgelöst werden. Die Mutationen werden am Beispiel der Gene des Lactose-Operons überprüft. Die Mutanten können keine Lactose mehr verwerten und deshalb färben sich die Kolonien auf Indikatormedien (McConkey) nicht an.

### 1.1.2 Durchführung

Wir bestrahlen zwei verschiedene *E. coli*-Stämme unterschiedlich lang mit UV-Licht. Dabei hat der *CSH 52*-Stamm ein Defekt im *RecA* System, ist deshalb *recA*<sup>-</sup>, der andere Stamm hat ein komplett funktionierendes *RecA*-System und ist deshalb *recA*<sup>+</sup>.

### 1.1.3 Ergebnis

Tabelle 1 zeigt die semiquantitative Auswertung der Bestrahlung. Tabelle 2 listet unsere relative Abschätzung der Rot/Weiß Verhältnisse. Die Abbildungen 1 bis 3 zeigen einige Fotografien der ausgewerteten Agarschalen.

Tabelle 1: Auswertung der Bestrahlung (semiquantitativ)

Bestrahlungsdauer	<i>CSH 51 recA</i> <sup>+</sup>	<i>CSH 52 recA</i> <sup>-</sup>
keine Bestrahlung	+++	+++
5 sec	+++	-
10 sec	++	-
15 sec	++	-
20 sec	+	-
30 sec	+	-

### 1.1.4 Diskussion

Es zeigt sich deutlich, dass der *CSH 52 recA*<sup>-</sup> Stamm keinerlei Bestrahlung toleriert. Durch die sofortige Dunkelstellung nach der UV-Bestrahlung kann die Photoreaktivie-

Tabelle 2: Farbe der Kolonien

Bestrahlungsdauer	<i>CSH 51 recA<sup>+</sup></i>	<i>CSH 52 recA<sup>-</sup></i>
keine Bestrahlung	rot	rot
5 sec	rot, vereinzelt weiß	—
10 sec	rot, etwas weiß	—
15 sec	rot, etwas mehr weiß	—
20 sec	in etwa ausgeglichen	—
30 sec	in etwa ausgeglichen	—

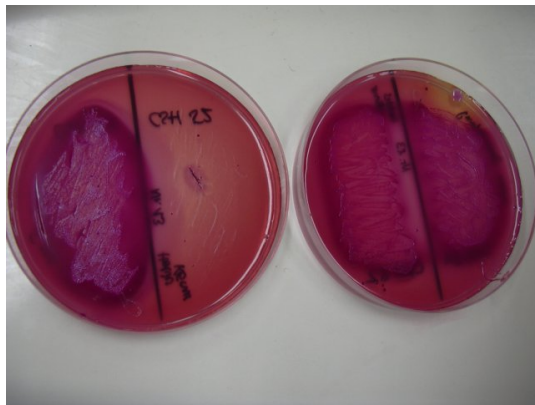


Abbildung 1: Rechts ohne Bestrahlung, links 5 Sekunden

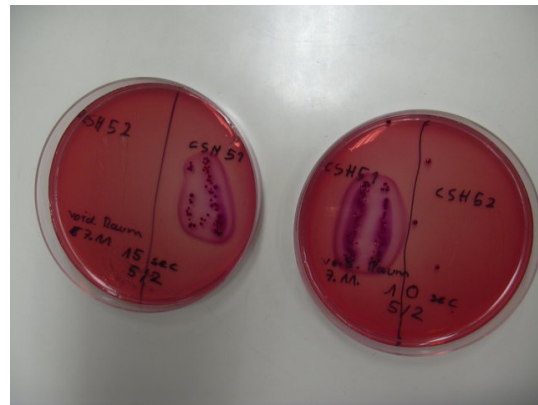


Abbildung 2: Links 10, rechts 15 Sekunden Bestrahlung



Abbildung 3: Links 20, rechts 30 Sekunden Bestrahlung

nung nicht mehr aktiviert werden und so bleibt zur Korrektur nur noch das *RecA* Enzym, dass bei diesem Stamm aber beschädigt ist. Somit gehen die Kolonien schon nach kurzer Bestrahlungsdauer kaputt, da durch die Veränderung der DNA durch die UV-Bestrahlung keine Replikation mehr möglich ist. Bei dem anderen Stamm *CSH 51 recA<sup>+</sup>* sind sogar noch nach 30 Sekunden langer Bestrahlung einzelne, wenn auch wenige Kolonien sichtbar. Hier hatte das RecA Enzym die Möglichkeit die Schädigungen zu reparieren und konnte somit ein Überleben der Kolonien sichern.

Rote und weiße Kolonien zeigen an, ob der Stamm Lactose verwertet oder nicht. Wenn der Stamm Lactose verwertet baut er diese zu anderen Stoffen ab, welche wiederum die Umgebung ansäuern und somit den Indikator bzw. die Kolonie rot färben. Ist die Kolonie weiß, hat sie nicht die Möglichkeit Lactose als Energiequelle zu verwenden, sondern somit auch keine Stoffe ab, welche die Umgebung ansäuern könnten. Bei zunehmender Bestrahlungsdauer nimmt die Anzahl der weißen Kolonien zunächst zu, was an der ungenauen Reparatur des SOS-Systems (vor allem die Aktivierung der *umu*-Gene) und damit verbundenen Mutationen im *Lac*-Operon liegt. Bei zu langer Bestrahlung kann keine Reparatur mehr stattfinden, weshalb auch die Zahl der Mutationen zurückgeht. Sektorierte Kolonien konnten bei unserer Auswertung leider nicht gefunden werden. Was aber nicht daran liegt, dass nie welche entstanden sind, sondern vielmehr an der Tatsache, dass die Kolonien zu lange im Kühlschrank lagen und somit die Färbung mehr schlecht als recht zu erkennen war. Prinzipiell entstehen sektorierte Kolonien dadurch, dass bei der Teilung einer geschädigten Zelle ein Strang korrekt repliziert werden kann, der andere jedoch mit der error-prone-Replikation verdoppelt wird und möglicherweise, durch einsetzen falscher Basen, Mutationen auslöst. Die Nachkommen dieses Stammes färben sich nun weiß, während die korrekt replizierten sich rot anfärben. Somit kann es sein dass durch weitere Teilung eine Kolonie mit weißen sowie roten Zellen entsteht, die man dann als sektoriert bezeichnet.

## 1.2 Transposon–Mutagenese in *E. coli*

### 1.2.1 Einführung

Transposons sind genetische Elemente, die sich selbst aus dem Genom ausschneiden und an einer anderen beliebigen Stelle wieder einfügen können. Sie werden auch „springende Gene“ genannt. Sie kodieren also zum einen die *Transposonase*, zum anderen enthalten sie noch mindestens ein weiteres Gen, meist eine Antibiotikum–Resistenz. Bei diesem Versuch soll untersucht werden, mit welcher Häufigkeit solche Transpositionen ablaufen können.

### 1.2.2 Durchführung

Mit Hilfe von konditional letalen Phagenmutanten wird kanamycinsensitiven *E. coli* Bakterien das Transposon Tn5, welches eine Kanamycinresistenz enthält, ins Genom transponiert. Bei dem Phagen handelt es sich um  $\lambda$ ::Tn5, welcher unter geeigneten Temperaturverhältnissen zwar noch in der Lage ist, seine DNA in das Bakterium zu übertragen, aber nicht mehr diese dort zu replizieren und die Zelle zu lysieren.

In definierten Zeitfenstern werden die einzelnen Schritte jeweils unter optimalen Temperaturverhältnissen durchgeführt (dazwischen wird abzentrifugiert, Details siehe Versuchsanleitung):

- bei 30°C 30min mit  $\lambda$ ::Tn5 inkubieren (moi zwischen 1 und 50)
- bei 30°C 1h Zeit zur Transposition
- auf kanamycinhaltigem Minimalmedium ausplattieren
- bei 37°C eine Nacht Zeit zum Kolonienwachstum

Zur Kontrolle wird das selbe noch einmal ohne Phagen gemacht.

Um das genaue Phagen/Bakterien-Verhältnis bestimmen zu können, wird eine Verdünnungsreihe der Phagenlösung erstellt, und 4 verschiedene Konzentrationen ( $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  und  $10^{-8}$ ) auf einen Bakterienrasen gegeben. Die Titerplatte wird unter Bedingungen, bei denen unsere  $\lambda$ -Mutante das Bakterium lysieren kann, inkubiert (bei 37°C auf einer  $LB_{MgMal}$ - Platte).



Abbildung 4: Zentrifuge zum absedimentieren der Bakterien



Abbildung 5: Titerplatte nach der Inkubation

### 1.2.3 Ergebnis

Da der Weichagar vermutlich zu heiß war hat der ganze Kurs nur 2 Ergebnisse, die wir dann gemittelt haben:

- 20 Phagen bei Verdünnung  $10^{-6} \cong 2 \cdot 10 \cdot 10^6 \cdot 10^2 = 2 \cdot 10^9$
- 10 Phagen bei Verdünnung  $10^{-8} \cong 1 \cdot 10 \cdot 10^8 \cdot 10^2 = 1 \cdot 10^{11}$
- Mittelwert  $\cong 1 \cdot 10^{10}$
- $\frac{\text{Transpositionereignisse/ml}}{\text{Phagen/ml}} = \frac{250 \cdot 2.5}{1 \cdot 10^{10}} = 6.25 \cdot 10^{-7}$

Die von uns gepickten Kolonien wuchsen alle sowohl auf Voll- als auch auf Minimalmedium. Im ganzen Kurs wuchs nur eine von ca. 400 gepickten Kolonien nicht auf dem Minimalmedium aber auf dem Vollmedium.

### 1.2.4 Diskussion

Da das Selektionsmedium im ersten Teil des Versuches Kanamycin enthält, wachsen nur Kolonien bei denen das Tn5 Gen in das Phagenom integriert wurde. Die Kontrolle ergab keine natürliche Resistenz. Die Frequenz dieses Ereignisses ergibt sich aus der Rechnung im Ergebnisteil, und betrug bei in unserem Kurs  $6.25 \cdot 10^{-7}$ .

Da im zweiten Versuchsteil leider alle Kolonien sowohl auf Minimal- als auch Vollmedium wuchsen, können wir daraus schließen, dass das Tn5-Transposon nie in ein lebensnotwendiges Gen gesprungen ist und wir somit keine Mutante erzeugen konnten.

## 1.3 Pflanzentransformation durch *Agrobacterium tumefaciens*

### 1.3.1 Einleitung

*Agrobacterium tumefaciens* benutzt Pflanzen zur Herstellung von Opinen, die die Pflanzen nicht verwerten können. Dieses Bakterium schleust zu diesem Zweck ein Ti-Plasmid in die T-DNA, das Pflanzengenom, ein. Dieses regt die Zelle zum Tumorzustand an, was dann beobachtet bzw. ausgewertet werden kann. Ziel dieses Versuches ist es, dies bei Sonnenblumenkeimen durchzuführen und zu überprüfen, ob dieses Wachstum tatsächlich von diesem Bakterium ausgelöst wird, oder um es sich bei der Tumorbildung um eine normale Reaktion eines Keimlings handelt. Die Kontrolle wurde mit einem gesunden *E. coli* Wildtyp Stamm durchgeführt.

### 1.3.2 Durchführung

Um unser Ziel zu erreichen, ritzen wir die Pflanzen einige Zentimeter über dem Boden an und bestreichen sie mit drei verschiedenen Stämmen. Zum einen *E. coli* als Kontrolle, sowie mit dem Bakterienstamm *A281* und *C58*. Bei *A281* handelt es sich um einen supervirulenten Stamm mit einer Mutation im *virG*. *VirG* ist der positive Regulator der anderen *vir* Gene.

### 1.3.3 Ergebnis

Tabelle 3 zeigt die semiquantitative Auswertung des Tumorzustands bei den einzelnen Pflanzen. Abbildung 7 zeigt eine Detailaufnahme der mit *A281* infizierten Pflanze.

Tabelle 3: Tumorzustand (semiquantitativ)

Pflanze	<i>A281</i>	<i>C58</i>	<i>E. coli</i>
1	++	+	-
2	+++	+	-
3	++	-	-

### 1.3.4 Diskussion

Bei unseren Pflanzen war deutlich zu sehen, dass die Tumorbildung keine normale Reaktion der Pflanze ist, sondern eine explizite Antwort auf die Anwesenheit der Agrobakterien. Denn die *E. coli* negativ Kontrolle zeigte keinerlei Tumorbildung. Dagegen beim C58 Stamm konnte man schon recht deutlich eine Tumorbildung erkennen. Bei dem Supervirulenten A281 Stamm war die Ausprägung am Stärksten. Somit entsprach das Ergebnis unserer Erwartungen vor dem Versuch.



Abbildung 6: Sonnenblumenkeimlinge



Abbildung 7: Detailaufnahme eines Tumors, drei Wochen nach der Infektion

## 2 Mutantanalyse, Klassische Genetik, Genkartierung

### 2.1 Einleitung

In der folgenden Versuchsreihe war unser Ziel die Mendelschen Regeln zu beweisen bzw. zu widerlegen. Diese Regeln wurden in den 60er Jahren des 19. Jahrhunderts von Georg Mendel postuliert:

- **1. Mendel'sche Regel:** Bei Kreuzung zweier Pflanzen, die sich in nur einem Merkmal unterscheiden, erhält man bezüglich diesen Merkmals gleichförmig aussehende Hybride in der  $F_1$  Generation. Dabei ist es unwichtig ob das Merkmal vom Vater oder von der Mutter eingebracht wird.
- **2. Mendel'sche Regel:**  $F_2$  Individuen sind nicht gleich sondern es treten Merkmalsunterschiede auf. Es treten die Merkmalsunterschiede der Parentalgeneration auf und zwar im Verhältnis 3:1 für dominant/rezessive Merkmale oder 1:2:1 für intermediäre Merkmale.
- **3. Mendel'sche Regel:** Die Merkmale werden unabhängig voneinander vererbt. Dies führt in der  $F_2$  Generation zu einem Zahlenverhältnis von 9:3:3:1

Zu diesem Versuchsziel benutzen wir *Drosophila*-Mutanten. Dabei benutzen wir Mutanten die sich in der Augenfarbe unterscheiden. Zum einen den Wildtyp mit roter Augenfarbe zum anderen eine Mutante mit weißen Augenfarben. Der erste Versuch dient vor allem dazu die erste Mendel'sche Regel zu überprüfen. Im zweiten Teil dienen Mutanten mit mehreren Abweichungen vom Wildtyp als Grundlage. Diese unterscheiden sich in Augenfarbe, Augenform, und dem Aussehen ihrer Borsten auf dem Rückenteil.



Abbildung 8: *Drosophila* Wildtyp mit roten Augen, und eine *white*-Mutante

## 2.2 Kreuzungsexperimente mit *Drosophila*-Mutanten

### 2.2.1 Einleitung

Im folgenden Versuchsteil wird die *white*-Mutante betrachtet, welcher der rote Augenfarbstoff fehlt und die somit ein weißes Auge hat.

Ziel dieses Versuches ist es herauszufinden, ob dieses Merkmal eine rezessiv – dominant Mutation ist, und ob es autosomal oder X-chromosomal vererbt wird.

### 2.2.2 Durchführung

Es werden die Nachkommen der Kreuzung

(a) Wildtyp ♀ × *white* ♂

(b) *white* ♀ × Wildtyp ♂

ausgezählt. Zudem wird die  $F_2$  Generation beider Kreuzungen ausgezählt!

### 2.2.3 Ergebnis

Siehe Tabelle 4 bis 7.

Tabelle 4: Analyse der  $F_1$  Kreuzung (a) [Gruppe/Kurs]

	Wildtyp	<i>white</i>
Weibchen ♀	10/101	0/0
Männchen ♂	6/111	0/0

Tabelle 5: Analyse der  $F_1$  Kreuzung (b)

	Wildtyp	<i>white</i>
Weibchen ♀	10/112	0/0
Männchen ♂	0/22	4/70

Tabelle 6: Analyse der  $F_2$  Kreuzung (a)

	Wildtyp	<i>white</i>
Weibchen ♀	19/253	0/0
Männchen ♂	1/148	6/88

Tabelle 7: Analyse der  $F_2$  Kreuzung (b)

	Wildtyp <i>white</i> <sup>+</sup>	<i>white</i>
Weibchen ♀	5/103	6/84
Männchen ♂	3/80	3/77

### 2.2.4 Diskussion

Auf Grund der Zahlenverhältnisse kann man davon ausgehen, dass ein rezessiver, X-chromosomaler Erbgang zugrunde liegt. Dies kann durch die oben ausgezählten Ergebnisse begründet werden: In fast allen Kreuzungen findet man überwiegend männliche Mutanten, des weiteren — im Vergleich zur Mendelschen Regel — findet man in der  $F_1$  Generation keine uniformen Nachkommen: Sondern in Kreuzung (b) findet man ein Verhältnis von nahezu 1:1, was der 1. Mendel'schen Regel widerspricht. Die hier gezählten Wildtyp Männchen sind vermutlich auf Unterscheidungsfehler zurückzuführen. Auch in der  $F_2$  Generation der Kreuzung (b) erwartet man ein Verhältnis von 3:1 nach der 2. Mendel'schen Regel aber auch hier tritt ein 1:1 Verhältnis auf, was dieser deutlich widerspricht. Hinzu kommt, dass beide Ergebnisse der Reziprozitätsforderung der 1. Mendel'schen Regel widersprechen. Diese Ergebnisse lassen sich nur mit einem X-Chromosomalen Erbgang erklären.

Des weiteren kann an diesen Ergebnissen überprüft werden, ob es sich bei der *white*-Mutation um einen dominanten oder rezessiven Erbgang handelt. Angenommen es handelt sich um eine dominante Mutation, so müssten beide  $F_1$  Kreuzungen ausschließlich Mutante Tiere haben, was aber nicht der Fall ist. Auch die vergleichsmäßig hohe Anzahl der Männchen gegenüber der Weibchen spricht für einen rezessiven Erbgang, da die Weibchen auf Grund ihrer beiden X-Chromosome rezessive Mutationen unterdrücken können.

Im gesamten betrachtet kann man sagen, dass die Mendel'schen Regeln nur eingeschränkte Gültigkeit besitzen für X-Chromosale Erbgänge.

## 2.3 Auswertung menschlicher Stammbäume

### 2.3.1 Einleitung

Da der Genetische Code und die Prinzipien der Vererbung bei allen Lebewesen gleich funktionieren, gilt dies natürlich auch für den Menschen. In der Humangenetik sind die Erbgänge bestimmter Krankheiten und Mißbildungen relativ gut untersucht. In den folgenden Aufgaben sollen anhand von Stammbäumen Rückschlüsse auf die Genotypen einzelner Individuen im Baum gezogen werden.

### 2.3.2 Baum 1

- Da die Person 1 sowohl Kinder mit Blutgruppe  $A$  als auch  $B$  hat, muss sie selbst Genotyp  $B0$  sein.
- Auch Person 3 muss  $B0$  sein, da sie Kinder mit allen möglichen Genotypen hat.
- Person 2 hat nur Kinder mit Blutgruppe  $B$ , könnte selbst also sowohl  $BB$  als auch  $B0$  sein.

### 2.3.3 Baum 2

Der Stammbaum ist nicht eindeutig. Möglich wäre z.B. der gleiche Vererbungsmodus wie im dritten Stammbaum, also ein autosomal rezessiver Erbgang. Somit wäre die Wahrscheinlichkeit für die beiden Fragezeichen (Nachkommen) im linken Teilbaum zu erkranken  $0,5^3 = 0,125$ . Das Fragezeichen im rechten Teilbaum hätte eine Wahrscheinlichkeit von  $0,5^2 = 0,25$  zu erkranken.

### 2.3.4 Baum 3

- Person 1: Genotyp  $Pp$ . Begründung: Mit  $pp$  wäre die Person selbst erkrankt, mit  $PP$  könnte sie keinen nachkommen mit  $Pp$  haben.
- Person 2:  $P(Pp) = 0,5$
- Person 3:  $P(Pp) = 0,25$ . Das Allel  $p$  muss über zwei Generationen mit je 50% Wahrscheinlichkeit weitervererbt werden.
- Person 4:  $P(pp) = 0,75 \cdot 0,5 \cdot 0,25 \cdot 0,5 = 0,046875 = \frac{3}{64}$

## 2.4 Rekombination und Genkartierung bei *Drosophila*

### 2.4.1 Einleitung

Mit Hilfe des folgenden Experimentes wollen wir den Abstand dreier Gene zueinander abschätzen. Um den Abstand zweier Gene zu bestimmen, wird als Maß die Häufigkeit der Rekombinationsereignisse gewertet, die während der Meiose im Weibchen auftreten. Je weiter zwei Gene auseinander liegen, desto häufiger werden sie in der Meiose getrennt: Somit ist der Abstand der Gene proportional zur Rekombinationsfrequenz. Ziel ist es die Gene *white*, *singed* und *Bar*, welche alle auf dem X-Chromosom liegen, zu kartieren.

### 2.4.2 Durchführung

Es wird die männliche  $F_2$ -Nachkommenschaft von heterozygoten mutanten Weibchen und Wildtyp Männchen ausgezählt. Zunächst wird dann die Entfernung der zwei am weitesten auseinander liegenden Gene berechnet, und dann das dritte Gen eingefügt.

### 2.4.3 Ergebnis

Siehe Tabelle 8.

### 2.4.4 Diskussion

Je weiter zwei Gene auf einem Chromosom auseinander liegen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass mindestens eines von beiden durch Rekombination ausgetauscht wird. Zur Auswertung der statistisch ermittelten Daten müssen zuerst für jeden der drei Marker die Gesamtzahl bzw. die relative Häufigkeit der Rekombinaten errechnet werden, und dann diese Werte paarweise addiert und verglichen werden.

Tabelle 8: Analyse *Mutante Weibchen*  $\times$  *Wildtyp Männchen*

Klasse	Genotyp	Gruppe	Kurs	Kurs %
1	sn, w, B	2	53	14,3 %
2	+, +, +	8	130	35,0 %
3	sn, w, +	2	45	12,1 %
4	+, +, B	5	80	21,6 %
5	sn, +, B	2	33	8,9 %
6	+, w, +	2	14	3,7 %
7	+, w, B	0	5	1,3 %
8	sn, +, +	0	11	3,0 %
Summe:		21	371	

Auf diese Weise ergaben sich für  $B$  33,7%, für  $w$  12,7% und für  $sn$  4,3% Rekombinationswahrscheinlichkeit (Werte des gesamten Kurses). Diese Werte paarweise addiert:

- $B + w = 46,4\%$
- $w + sn = 17,0\%$
- $B + sn = 38,0\%$

Es ist deutlich zu sehen, dass die Marker  $w$  und  $sn$  am nächsten beieinander liegen, dagegen haben  $B$  und  $w$  den größten Abstand. Wenn man nun noch die Möglichkeit einer Doppel-Rekombination (double cross-over) von  $B$  und  $sn$  berücksichtigt, kann man folgende Genabstände in centiMorgen angeben:

- Abstand  $B - w$ : 55,0 cM (Literaturwert: 55,5 cM)
- Abstand  $w - sn$ : 17,0 cM (Literaturwert: 19,5 cM)
- Abstand  $B - sn$ : 38,0 cM (Literaturwert: 36,0 cM)

Da die Gene auf einem linearen DNA-Strang liegen, müssen die zwei kürzeren Abstände in der Summe genau dem langen Abstand entsprechen. Dieses Kriterium erfüllen unsere Ergebnisse ohne Abweichung:

$$17 + 38 = 55$$

Der Vergleich unserer Ergebnisse mit Literaturwerten zeigt, dass wir offensichtlich alles richtig gemacht haben, denn die Abweichungen sind minimal :-)

**Schematische Darstellung einer Genkarte:** 

## 3 Austausch genetischer Information bei Prokaryoten

### 3.1 E. coli Konjugation

#### 3.1.1 Einleitung

Bei Prokaryonten gibt es im wesentlichen drei verschiedene Arten des Genaustausches. Im folgenden Versuch betrachten wir den Genaustausch durch Konjugation. Beim *E. coli* Stamm kommt es eine so genanntes Fertilitäts-Plasimid, im folgenden als F-Plasimid bezeichnet, vor. Dieses wird von einem Donor (eine Zelle mit F-Plasmid,  $F^+$ ) auf einen Rezipienten (eine Zelle ohne F-Plasmid,  $F^-$ ) übertragen. Dabei bildet der Donor einen Pilius aus, der eine  $F^-$  Zelle erkennt, und überträgt das F-Plasmid auf einen Rezipienten, mit Hilfe einer unidirektionalen Replikation in der Donor Zelle durch den Pilius. Die Rezipienten Zelle ist jetzt auch eine Donor Zelle.

Liegt solch ein F-Plasmid in einer Zelle vor, ist es möglich dass sich dieses durch eine homologe Rekombination ins Genom einbaut (Hfr Zelle). Dann wird bei der Replikation des F-Plasmides, welche immer noch gleich oft stattfindet, das F-Plasmid in einen Rezipienten übertragen, und unter Umständen noch teile des *E. coli* Genoms. Somit kann es nach der Rekombination im Rezipienten zu einem Genaustausch kommen. Der Rezipient ist jetzt aber keine Donorzelle. Durch eine illegitime Rekombination einer Hfr Zelle kann das F-Plasmid wieder aus dem Genom heraus Rekombinieren. Nimmt nun aber unter Umständen Teile des Genoms mit in das Plasmid mit auf. Eine solche Zelle bezeichnet man dann als  $F'$  Zelle. Diese Plasmid wird jetzt bei der Replikation in einen Rezipienten übertragen und mit ihm Teile des Genoms. Weshalb der Rezipient jetzt ein merodiploider Donor  $F'$  ist.

#### 3.1.2 Durchführung

Zur Durchführung benutzen wir verschieden Stämme zum einen einen  $F'$  Donor *CSH23 F' lac pro* und einen Hfr Donor *CSH62 HfrH*. Beide Stämme sind *Streptomycin* sensitiv. Als Rezipienten dienen *CSH51 F<sup>-</sup> Pro<sup>-</sup> StrR RecA<sup>+</sup>* und *CSH52 F<sup>-</sup> Pro<sup>-</sup> StrR RecA<sup>-</sup>*. Als Medium verwenden wir Minimalmedium Thiamin und Streptomycin. Eine Kolonie kann sich also nur ausbilden nach einer Konjugation zwischen Donor und Rezipient, da sonst entweder dem Donor das *Streptomycin* zum Verhängnis wird und den Rezipienten das fehlende Prolin. Die Stämme werden mittels Strichkreuzung auf das Medium aufgetragen.

#### 3.1.3 Ergebnis

Siehe Tabelle 9.

#### 3.1.4 Diskussion

Die Tabelle zeigt, dass sich unsere Vermutungen bestätigen. Zum einen kann festgestellt werden das ein Wachstum, zumindest teilweise, auftritt was beweist, dass eine Konjugation stattgefunden hat. Nun sind aber die Kolonien nicht in allen Bereichen zu finden.

Tabelle 9: Strickkreuzung (semiquantitativ)

	<i>CSH23 F' lac pro</i>	<i>CSH62 HfrH</i>
<i>CSH51 F<sup>-</sup> Pro<sup>-</sup> StrR RecA<sup>+</sup></i>	+++	+
<i>CSH52 F<sup>-</sup> Pro<sup>-</sup> StrR RecA<sup>-</sup></i>	-	+

Beim F' Donor wachsen beide Kolonien, sowohl die Kreuzung zwischen *CSH23 F' lac pro* und *CSH51 F<sup>-</sup> Pro<sup>-</sup> StrR RecA<sup>+</sup>* als auch *CSH23 F' lac pro* und *CSH52 F<sup>-</sup> Pro<sup>-</sup> StrR RecA<sup>-</sup>*. Dies zeigt, dass ein funktionierendes *RecA* Enzym nicht vorliegen muss, sondern dass es ausreicht wenn ein F-Plasmid in der Zelle vorliegt und nicht mit dem Genom rekombiniert werden muss. Die Kreuzung von *CSH62 HfrH* und *CSH51 F<sup>-</sup> Pro<sup>-</sup> StrR RecA<sup>+</sup>* sowie *CSH62 HfrH* und *CSH52 F<sup>-</sup> Pro<sup>-</sup> StrR RecA<sup>-</sup>* zeigt, dass bei einem Hfr eine Rekombination notwendig ist. Denn hier bildet nur der *CSH51 F<sup>-</sup> Pro<sup>-</sup> StrR RecA<sup>+</sup>* -Stamm Kolonien aus welcher ein funktionierendes RecA Enzym besitzt.

## 3.2 Plasmidtransformation bei *E. coli*

### 3.2.1 Einführung

Transformation ist die Aufnahme freier Plasmide oder Genomstücke in eine Bakterienzelle (oder eine eukaryotische Zelle). Nur manche Bakterien besitzen die Fähigkeit zur Transformation, was als „Kompetenz“ bezeichnet wird. Die Kompetenz kann auch auf unnatürliche Weise, z.B. durch Inkubation in *CaCl<sub>2</sub>*, erlangt werden.

Ziel dieses Versuchs ist es, die Transformationsrate eines *JM103* Stamms mit *pUC*-Plasmiden zu bestimmen. Das *pUC*-Plasmid enthält eine Ampicillinresistenz, außerdem eine im *lacZ*-Gen liegende *Multiple Cloning Site* (MCS oder auch Polylinker). Wird in diese MCS ein Gen (welches man klonieren will) inseriert, so wird das *lacZ* Gen, welches sonst das *lacZ*  $\alpha$ -Peptid kodiert, inaktiviert. Unser *JM103* Stamm hat eine *M15* Deletion, kann somit zwar das *lacZ*  $\beta$ -, aber kein  $\alpha$ -Peptid herstellen. In der Zelle wird also nur eine funktionierende Galaktosidase (bestehend aus dem  $\alpha$ - und dem  $\beta$ -Peptid, welche sich spontan zusammenlagern/komplementieren) produziert, wenn das *lacZ* Gen im Plasmid keine Insertion enthält. Die Galaktosidaseaktivität kann durch X-Gal sichtbar gemacht werden (Blaufärbung), somit dient X-Gal als Indikator dafür, ob ein Plasmid mit oder ohne Insertion von der Zelle aufgenommen wurde.

### 3.2.2 Durchführung

50  $\mu$ l kompetente Zellen wurden mit 50 ng Plasmid-DNA gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch 2 Minuten lang auf 42°C erwärmt (Hitzechock). Anschließend hatten die Zellen, welche DNA aufgenommen hatten, 30 Minuten Zeit, in 1 ml LB-Medium bei 37°C die Expression der Ampicillinresistenz durchzuführen. 150  $\mu$ l dieser Lösung wurden dann auf LB-Platten mit Ampicillin, X-Gal und IPTG ausplattiert (Details siehe Versuchsanleitung).

### 3.2.3 Ergebnis

Auf unseren Agar-Platten färbten sich die Kolonien in blau und weiß. Es entstanden in etwa doppelt so viele weiße Zellen wie blaue Zellen. Die Auszählung der Kontrollplatten ergibt eine Lebendzahl von  $2,8 \cdot 10^8$  Zellen pro ml. Wir zählten 242 blaue Kolonien und errechneten daraus 484 weiße Kolonien. Das ergab folgende Transformationszahlen:

- $T_{blau} = \frac{242}{42 \cdot 10^6} = 5,76 \cdot 10^{-6}$
- $T_{weiss} = \frac{484}{42 \cdot 10^6} = 1,25 \cdot 10^{-5}$
- $T_{ges} = \frac{726}{42 \cdot 10^6} = 1,73 \cdot 10^{-6}$

### 3.2.4 Diskussion

Anhand des Vorhandenseins blauer Kolonien war zu erkennen, dass ein  $\alpha$ -Komplementation stattgefunden hat. Jedoch haben die einzelnen Gruppen teilweise sehr unterschiedlich stark ausgeprägte Ergebnisse erhalten, was durch die hohe Empfindlichkeit der kompetenten Zellen bei der Transformation zu erklären ist. Auch ist die Transformationseffizienz stark abhängig davon, ob das DNS-Aufnahmeoptimum gut oder weniger gut getroffen wurde, da es sehr leicht zu verpassen ist.

Da die Zell-Zell Verbindung während der Konjugation nur metastabil ist, wird das Transposon oft nicht vollständig übertragen. Insbesondere liegt das Gen  $Amp^r$  vor dem  $lacZ$ , hat also eine größere Wahrscheinlichkeit komplett übertragen zu werden. Ist nun von einem Plasmid ohne Insertion das  $Amp^r$  komplett übertragen, und das  $lacZ$  aber nicht oder nur teilweise, so ist das infizierte Bakterium resistent gegen Ampicilin, kann aber trotzdem kein  $lacZ$   $\alpha$ -Peptid exprimieren. Wir bekommen also eine lebensfähige, aber trotzdem weiße Kolonie, obwohl das Plasmid keine Insertion hatte.

## 4 Gentherapie bei *Matthiola incana*

### 4.1 Therapie eines Gendefektes bei *Matthiola incana*

#### 4.1.1 Einleitung

Die meisten Gene kodieren für Enzyme die für die Ausbildung von Stoffwechselprodukten nötig sind. So auch bei unserem Beispiel *Matthiola incana* welches eine Levkoje ist. Bei dieser Pflanze sind mindesten vier Enzyme an der Produktion von *Anthocyan* beteiligt, welcher wesentlich zu der roten Blütenfarbe der Levkoje beiträgt. Ist nun eines dieser Enzyme defekt hat die Pflanze weiße Blüten. Uns liegen jetzt zwei verschiedene Mutanten, eigentlich drei aber die Jahreszeit machte uns einen Strich durch die Rechnung vor die alle weiße Blüten haben. Wir versuchen nun herauszufinden, welcher Stamm, wo ein Defekt hat.

#### 4.1.2 Durchführung

Umd Herauszufinden welches der vier Enzyme defekt ist, stellen wir Blütenblätter in eine 1%-Dihydroflavonol-Lösung welches ein Zwischenprodukt der *Anthocyan*-Synthese ist. Aufgrund einer Färbung bzw. einer nicht Färbung kann man dann erkennen ob der Defekt in einem Enzym vor oder nach dem Zwischenprodukt besteht.

#### 4.1.3 Ergebnis

Die Blüte der 18b+ Mutante färbt sich leicht rot. Bei der anderen Blüte ist keine Färbung ersichtlich.

#### 4.1.4 Diskussion

Aufgrund der leichten Rotfärbung der Blüten der 18b+ Mutante, kann man schließen, das hier der Defekt vor der Synthese des Zwischenproduktes Dihydroflavonol liegt. Also im ersten oder/und zweitem Enzym bzw. bei dessen Transskription. Bei dem anderen Stamm lässt sich keine Rotfärbung erkennen. Dies lässt den Schluß zu, dass hier das Problem nach der Synthese von Dihydroflavonol liegt. Also im dritten und/oder vierten Enzym bzw. bei dessen Transskription.

Die vorliegende Situation, also dass augenscheinlich identische Phänotypen durch Mutationen in verschiedenen Genen hervorgerufen werden, nennt man Heterogenität.

Würde man zwei verschiedene der monohybriden Mutanten kreuzen, so bekäme man heterozygote Genotypen bezüglich der betrachteten mutierten Gene. Die Pflanzen dieser uniformen  $F_1$ -Generation wären somit in der Lage, alle vier notwendigen Enzyme zur Anthocyanherstellung zu exprimieren und hätten folglich eine rote Blütenfarbe wie der Wildtyp.

Auch beim Menschen werden manche durch Gendefekte verursachte Krankheiten mit Substitutionstherapie behandelt. Dazu gehören zum Beispiel die Phenylketonurie oder die Diabetes.