# Stammzüchtung

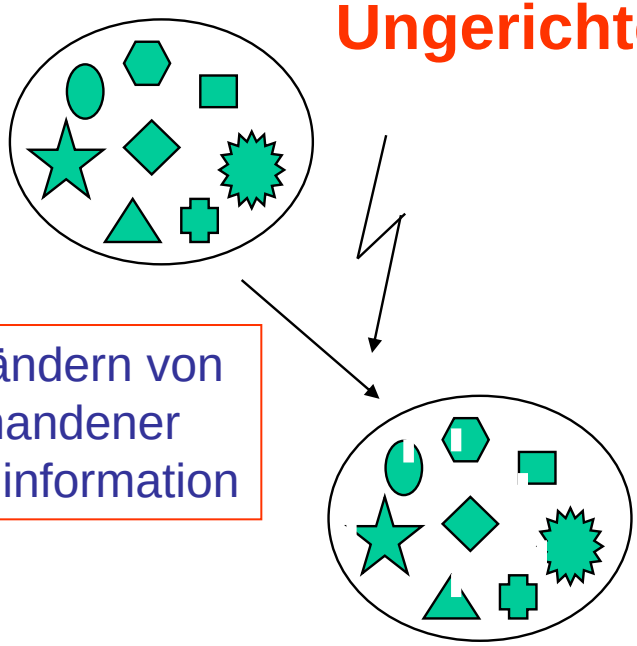
**Selektion von natürlichen Varianten**

**Ungerichtete genetische Veränderungen**
zufallsverteilte induzierte Mutagenese

**Kreuzungen – genetische Rekombination**
Sexuelle Kreuzungen
Induzierte Zellfusion
parasexuelle Systeme (Konjugation, Transduktion, Transformation)

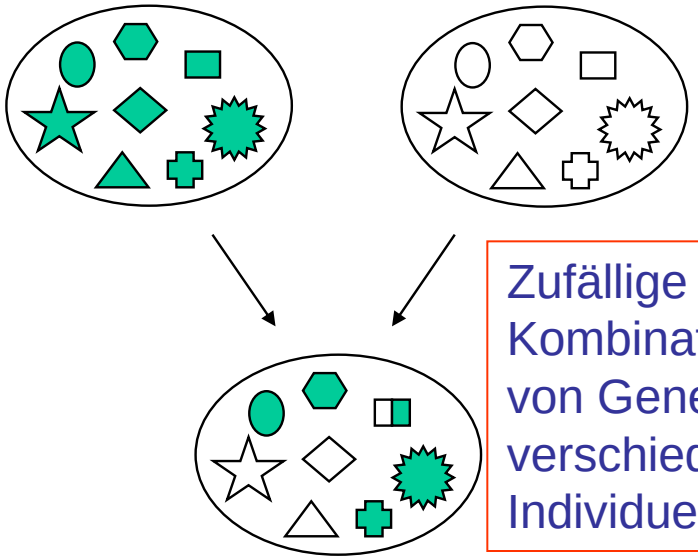
**(Gezielte) Genmanipulationen – Gentechnik**
*in vitro* Rekombination von DNA-Fragmenten
Einbau und funktionelle Expression von zusätzlicher DNA in Organismen
eigenständig replizierende Vektoren – Integration in Chromosomen
Entfernen/Ausschalten von Geninformation
*in vitro* Mutagenese (Gene für spezifische Proteine / Enzyme)
stellenspezifisch - random („directed evolution“)

## Ungerichtete Mutation



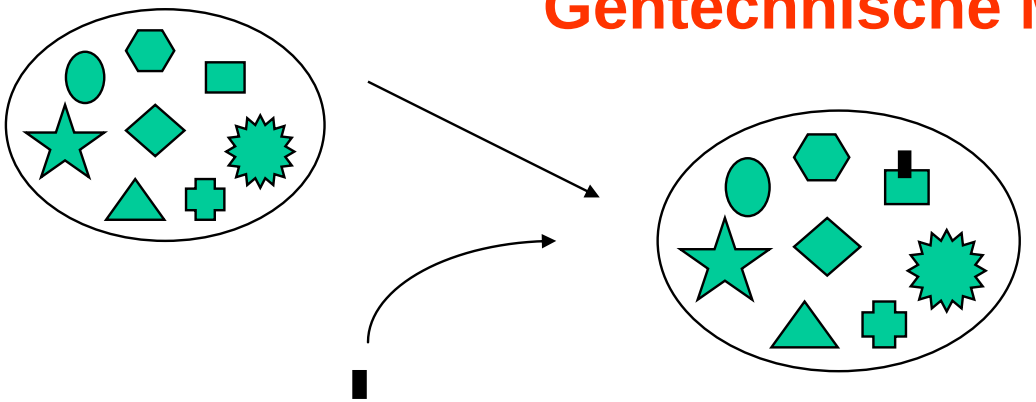
Verändern von vorhandener Geninformation

## Kreuzung



Zufällige Kombination von Genen aus verschiedenen Individuen

## Gentechnische Modifikation



Gerichteter Transfer von zusätzlicher Geninformation

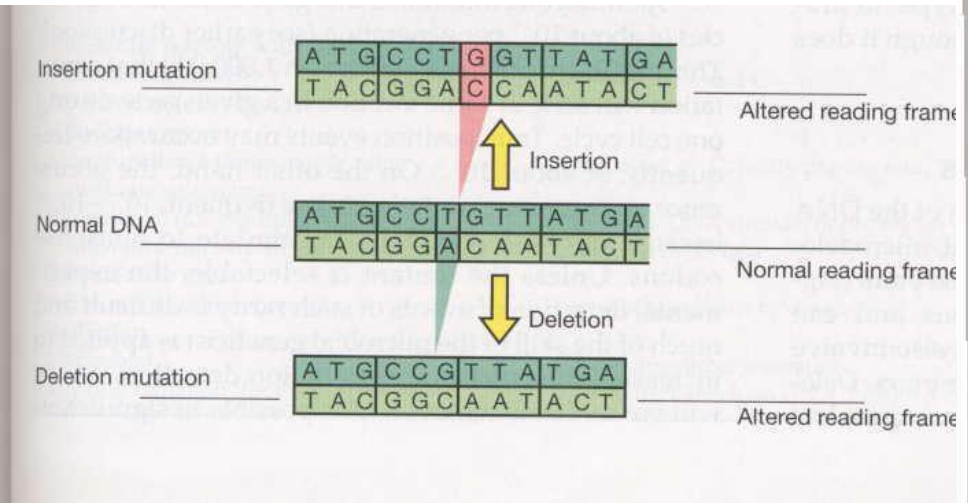
# Zufallsverteile Mutationen

Basensubstitutionen
Deletionen
Insertionen

## Induzierte Mutagenese

- ***Behandlung mit Chemikalien***
  Alkylierende Substanzen
  Basenanaloge

- ***Einsatz von energiereicher Strahlung***
  UV
  Ionisierende Stahlung (Röntgen, $\gamma$)



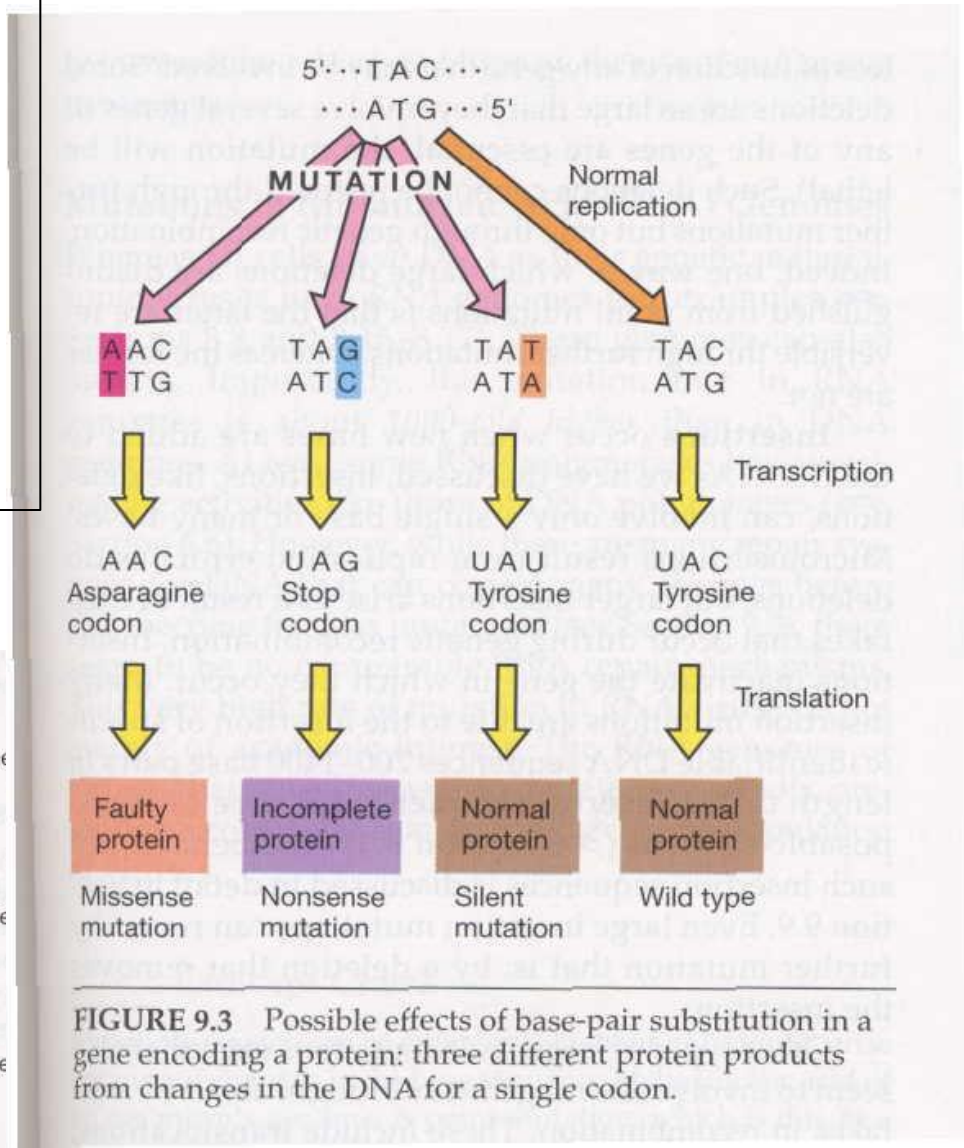




FIGURE 9.3 Possible effects of base-pair substitution in a gene encoding a protein: three different protein products from changes in the DNA for a single codon.

# 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

Generation of Variants
* Mutation
* Recombination
* Recombinant DNA

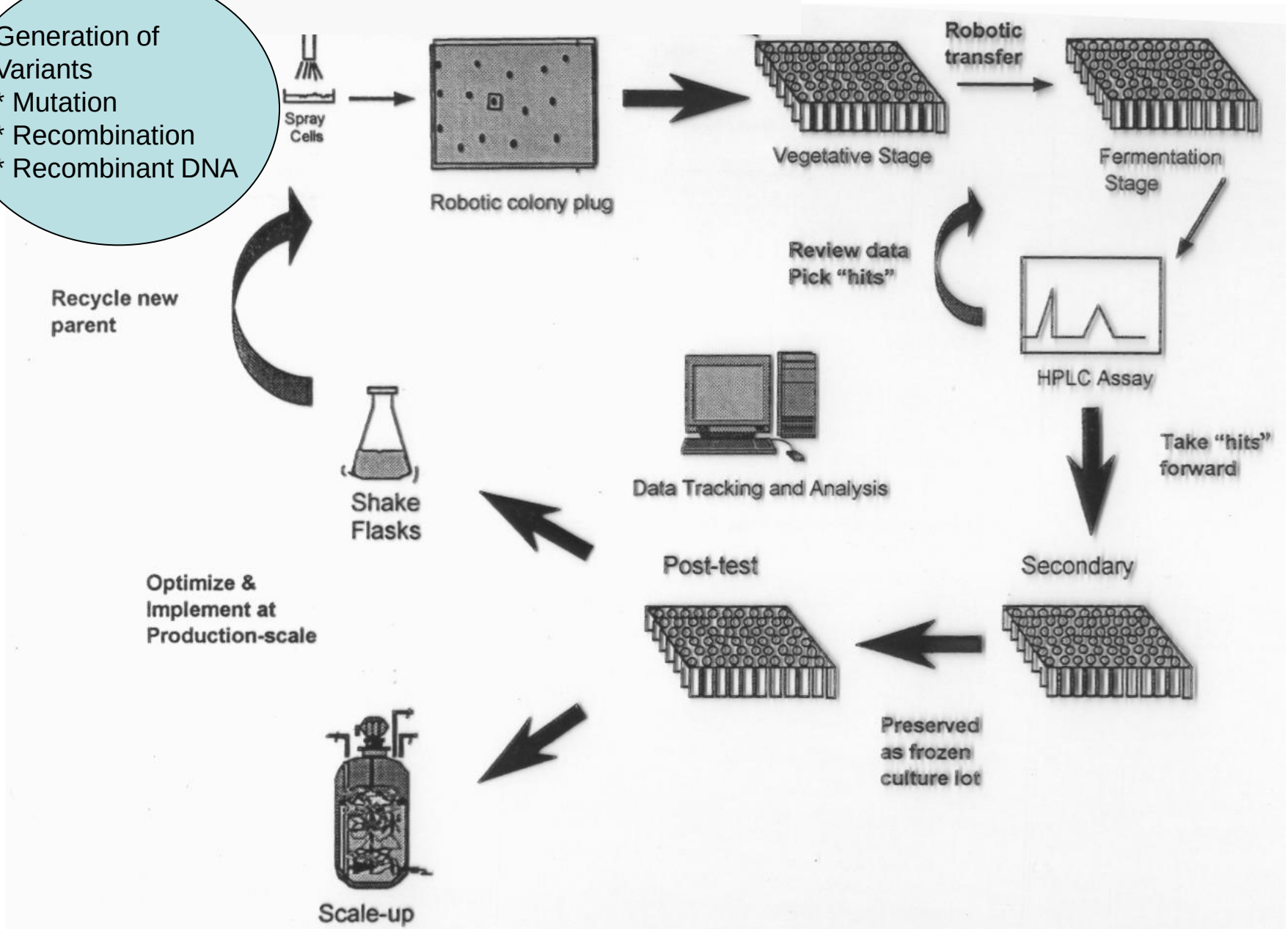



FIGURE 1 Schematic representation of an automated screening system.

## Rationale Ansätze für Stammverbesserung

Wissen um Zusammenhänge
Im Stoffwechsel

**Regulation**

**Regulation der Genexpression**

**Regulation der Enzymaktivität**

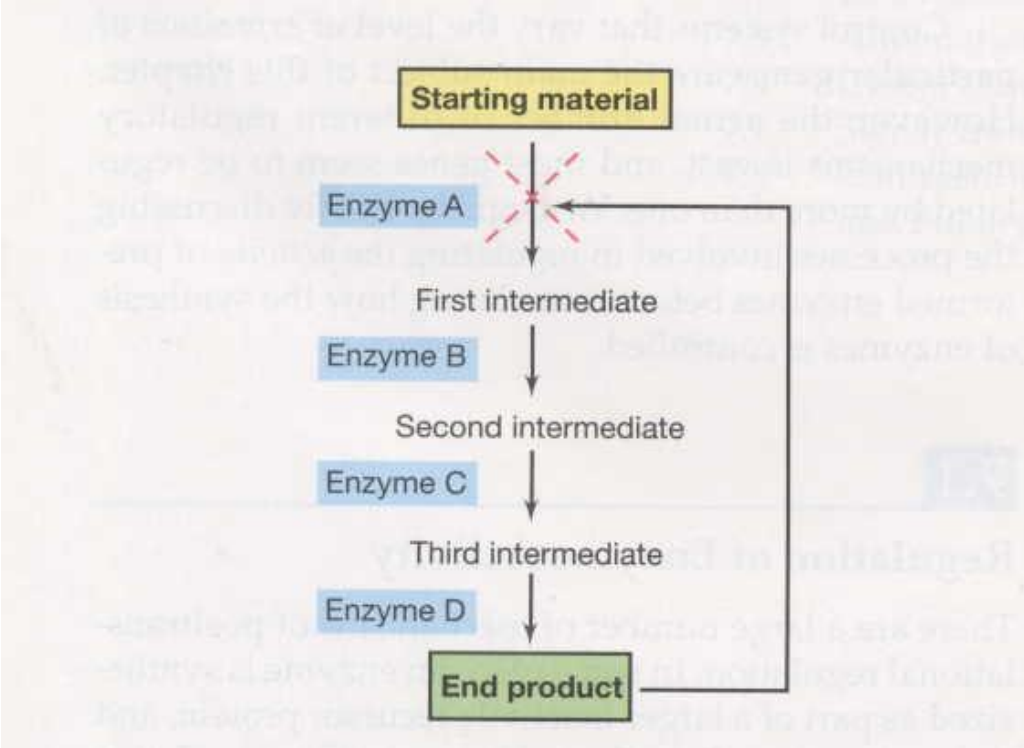



FIGURE 7.2 Feedback inhibition of enzyme activity. The activity of the first enzyme of the pathway is inhibited by the end product, thus controlling production of end product.

## Rationale Ansätze für Stammverbesserung

Wissen um Zusammenhänge
bei der Funktion von
im Stoffwechsel beteiligten
Enzymen

**Regulation der Enzymaktivität**

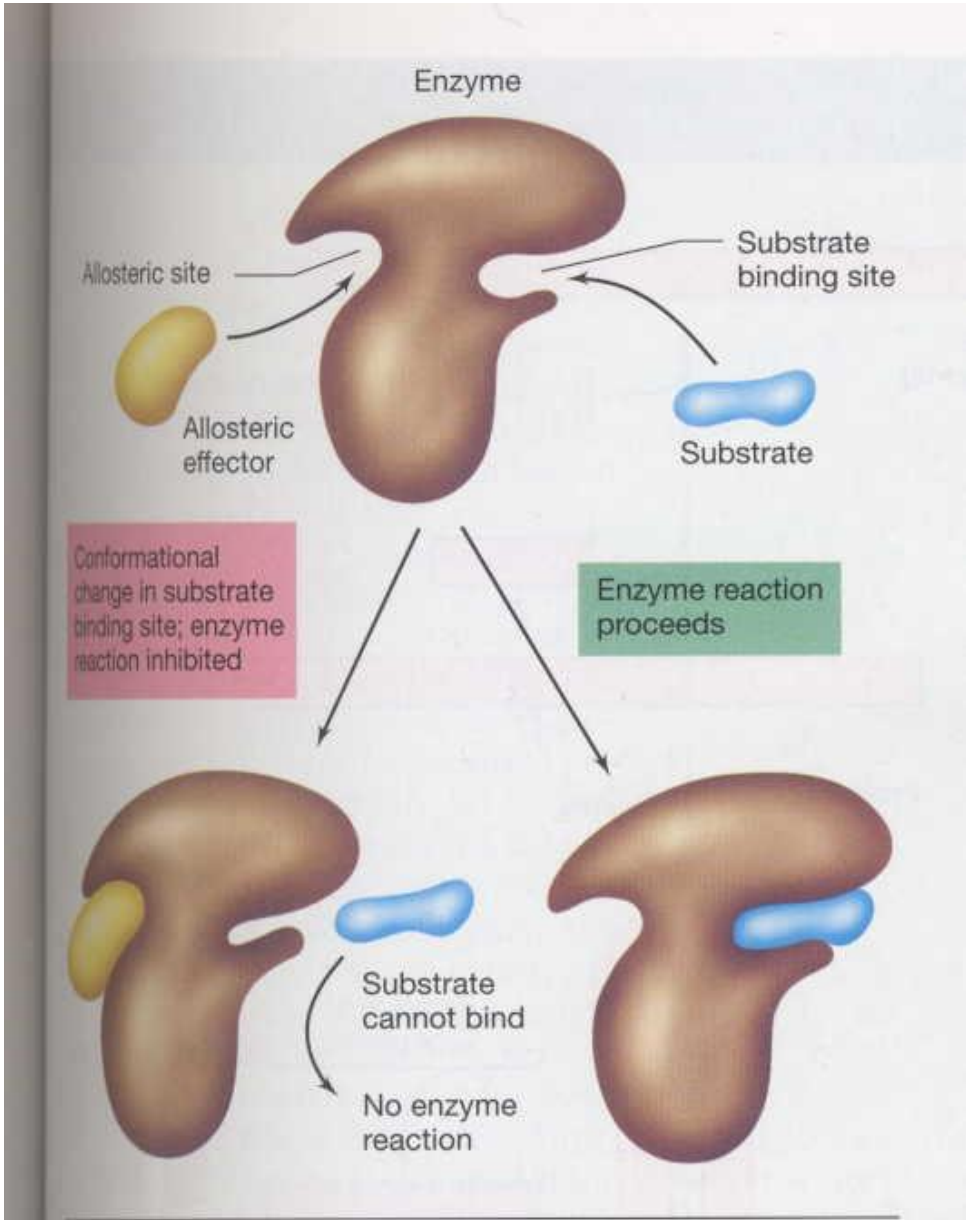



FIGURE 7.3 Mechanism of enzyme inhibition by an allosteric effector. When the effector combines with the allosteric site, the conformation of the enzyme is altered so that the substrate can no longer bind.

# Ausschalten der Feedback-Regulation

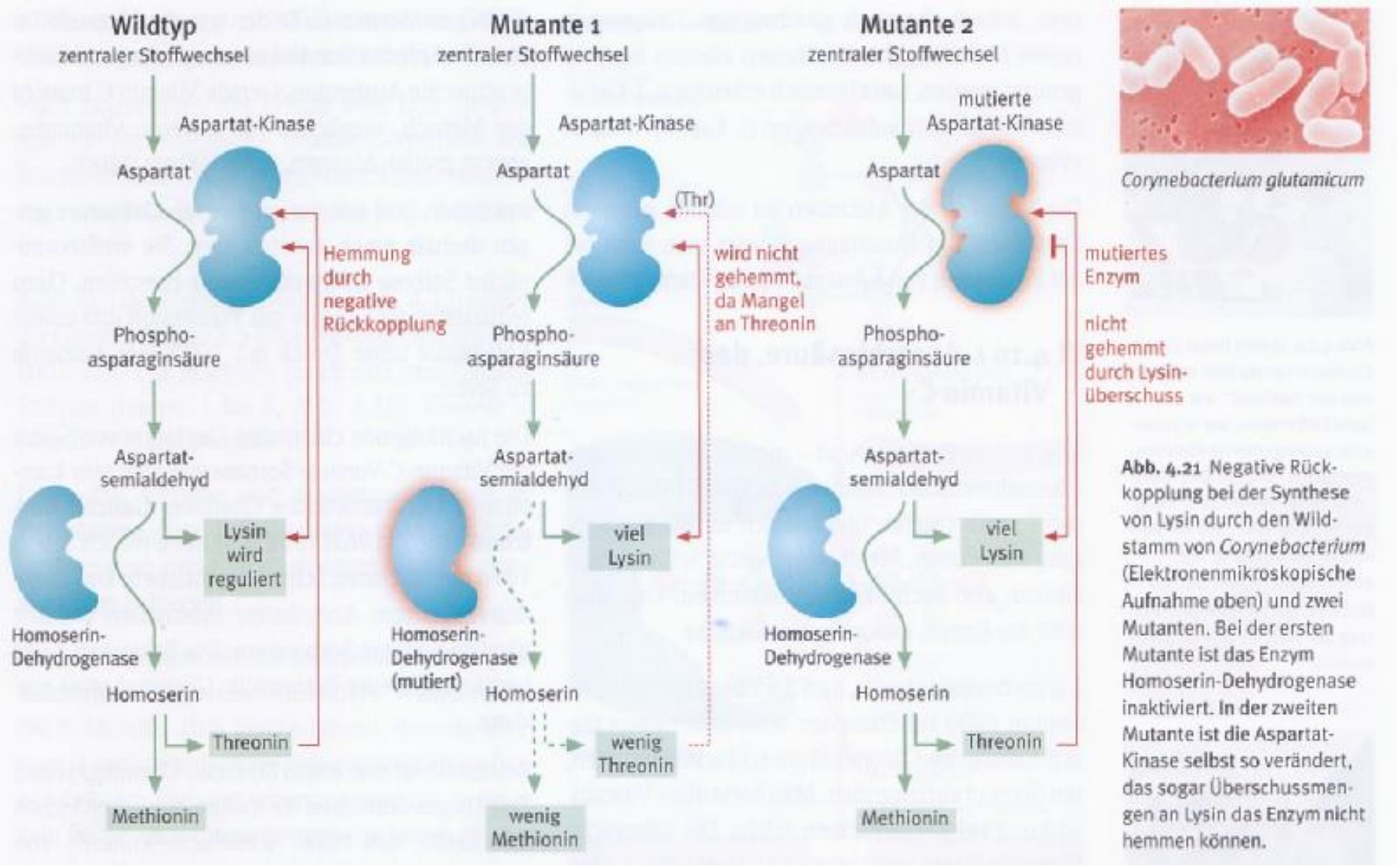



**Abb. 4.21** Negative Rückkopplung bei der Synthese von Lysin durch den Wildstamm von *Corynebacterium* (Elektronenmikroskopische Aufnahme oben) und zwei Mutanten. Bei der ersten Mutante ist das Enzym Homoserin-Dehydrogenase inaktiviert. In der zweiten Mutante ist die Aspartat-Kinase selbst so verändert, das sogar Überschussmengen an Lysin das Enzym nicht hemmen können.

Renneberg, Biotechnologie für Einsteiger
Elsevier Spektrum, 2006

# 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-hydroxy-valeriansäure | 5-Methyltryptophan |
| 4-Oxalysin | β-Hydroxyleucin | 4-Methyltryptophan |
| l-Lysin-hydroxamat | Norleucin | 6-Methyltryptophan |
| 2,6-Diamino-4-hexensäure | Aminohydroxyvalerian-säure | 5-Fluortryptophan |
| δ-Hydroxylysin | Norvalin | 6-Fluortryptophan |
| α-Chlorcaprolactam | N-2-Thienylmethionin | DL-7-Azatryptophan |
| Trans-4,5-dehydrolysin | 2-Amino-3-methyl-thiobuttersäure | 2-Azatryptophan |
| | 2-Amino-3-hydroxy-hexansäure | |

Antimetabolit-resistente Mutanten

Anthranikian, Angewandte Mikrobiologie Springer 2006

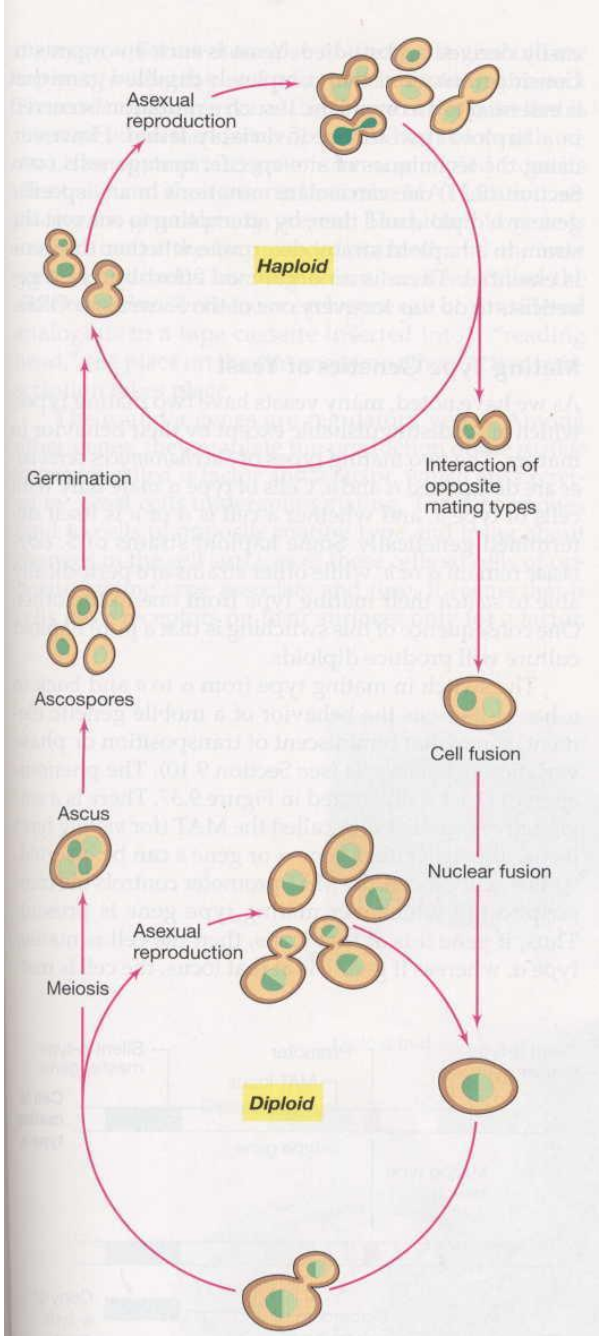



FIGURE 9.36 Life cycle of a typical yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. A haploid cell of *S. cerevisiae* contains 16 chromosomes.

# Rekombinationsgenetik

Gezieltes Kreuzen von Organismen

Zellfusionen

Gentransfer durch parasexuelle Mechanismen

Immer notwendig:

Screening - Selektion

# Rekombinante DNA Technologie

→ **GVO**

Transgene Mikroorganismen

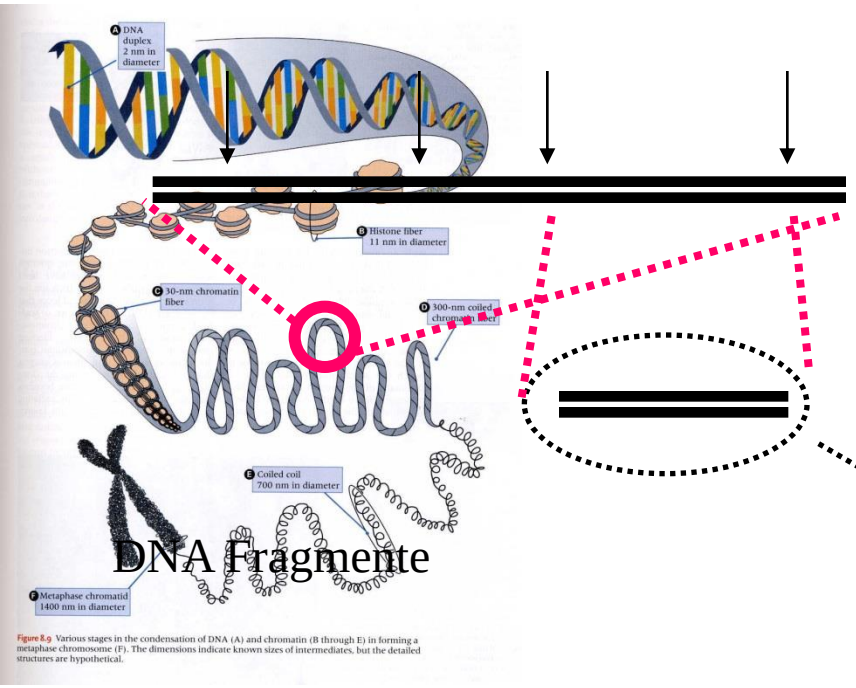
Transgene Pflanzen

Transgene Tiere

Gentherapie am Menschen

Gezielte Handhabung
von Geninformation

# Herstellen von rekombinanten DNA Molekülen (Klonieren)




DNA Fragmente

Schneiden mit Restriktionsenzym

isolierte Vektor DNA

ori

Amp$^r$

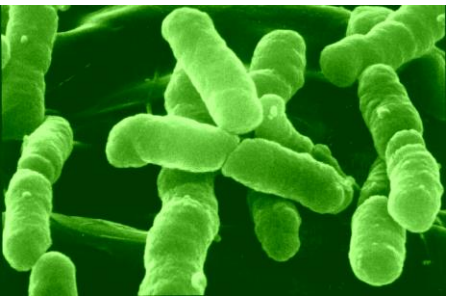
Ligation mit DNA Ligase

geschnittene Vektor DNA

ori

Amp$^r$

Einbringen in lebende Zellen



rekombinantes DNA Molekül

ori

Amp$^r$

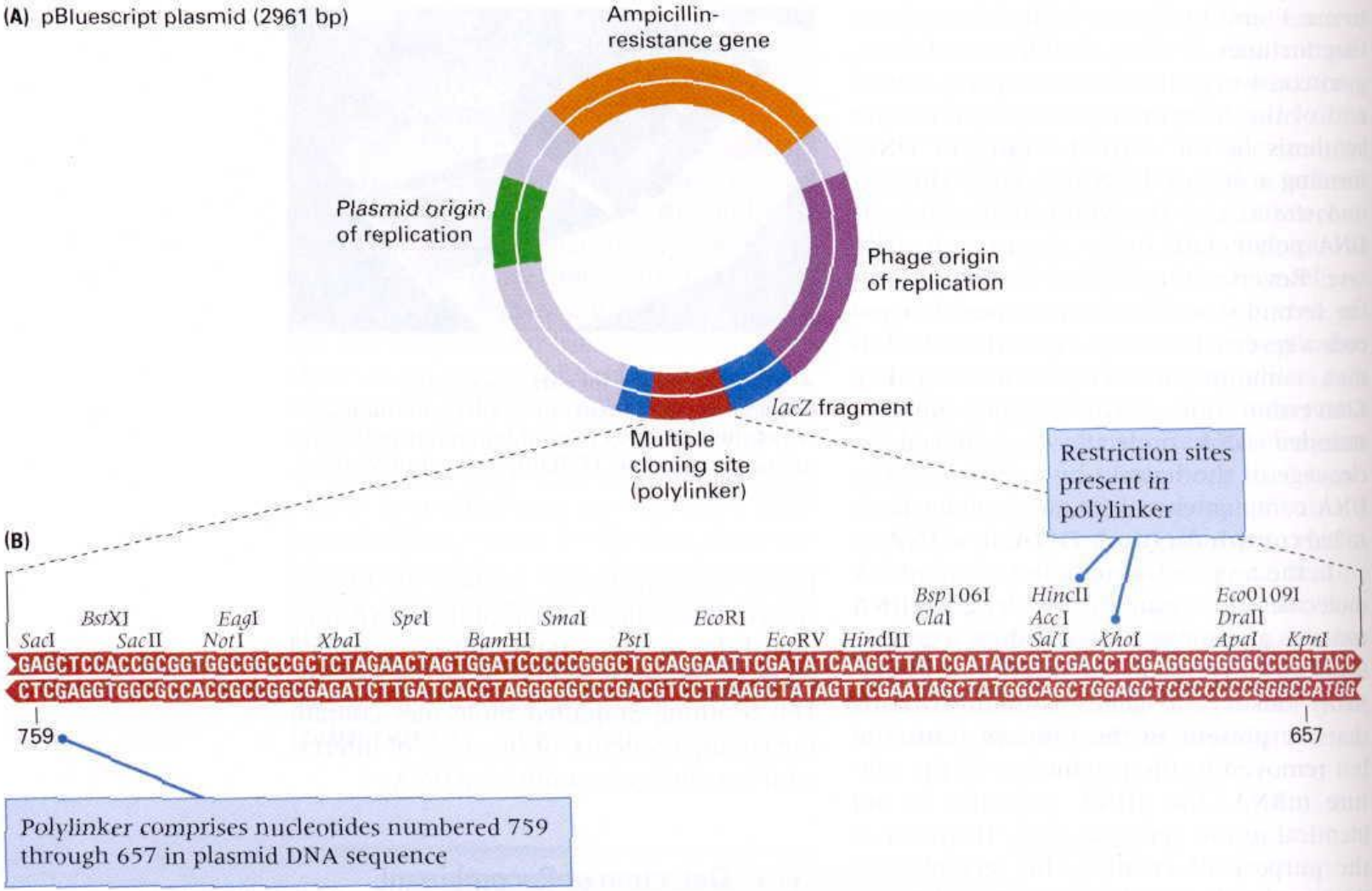
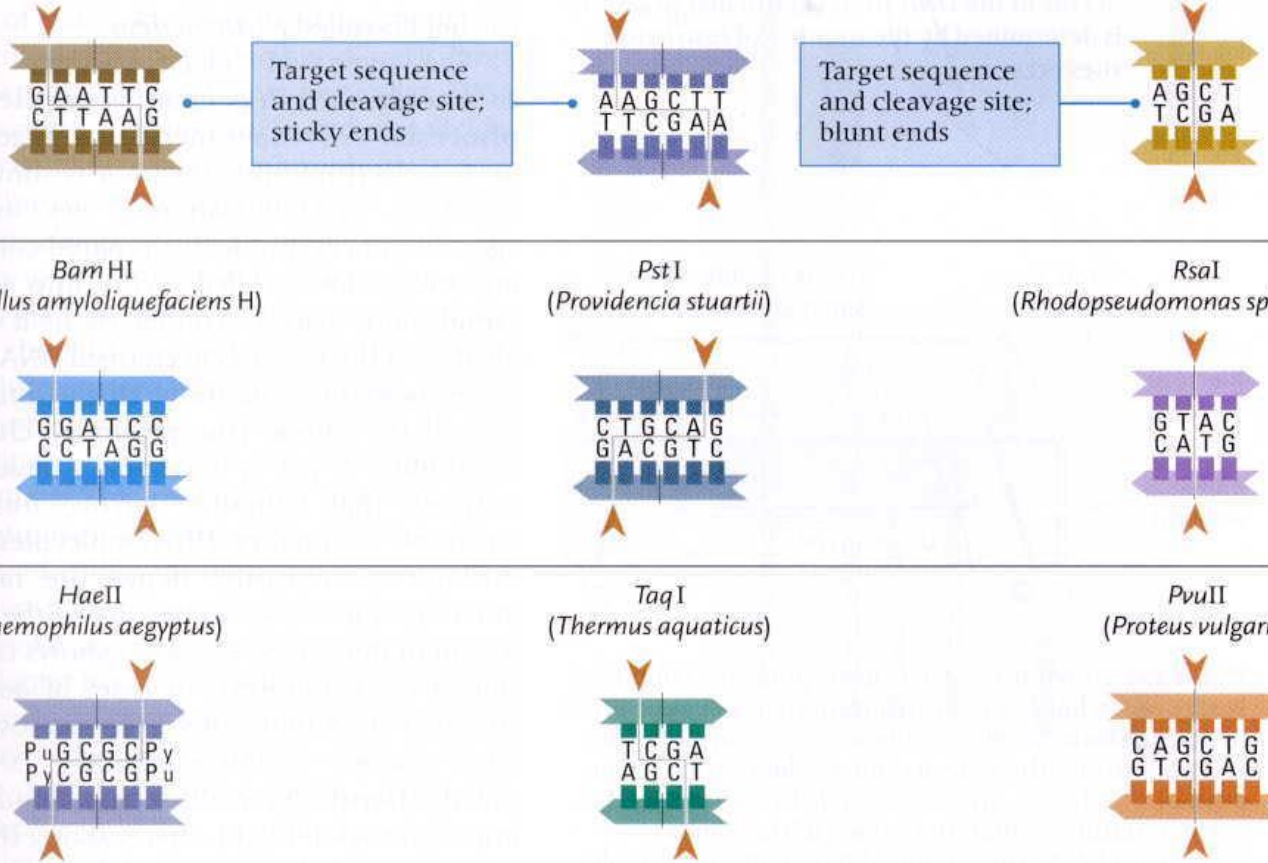



**Figure 13.9** (A) Diagram of the cloning vector pBluescript II. It contains a plasmid origin of replication, an ampicillin-resistance gene, a multiple cloning site (polylinker) within a fragment of the *lacZ* gene from *E. coli*, and a bacteriophage origin of replication. (B) Sequence of the multiple 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) |
|---|---|---|
| *Eco*RI (*Escherichia coli*) | *Hind* III (*Haemophilus influenzae*) | *Alu*I (*Arthrobacter luteus*) |
| *Bam* HI (*Bacillus amyloliquefaciens* H) | *Pst* I (*Providencia stuartii*) | *Rsa*I (*Rhodopseudomonas sphaeroides*) |
| *Hae*II (*Haemophilus aegyptus*) | *Taq* I (*Thermus aquaticus*) | *Pvu*II (*Proteus vulgaris*) |




*Note:* The vertical dashed line indicates the axis of symmetry in each sequence. Red arrows indicate the sites of cutting. The enzyme *Taq*I 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

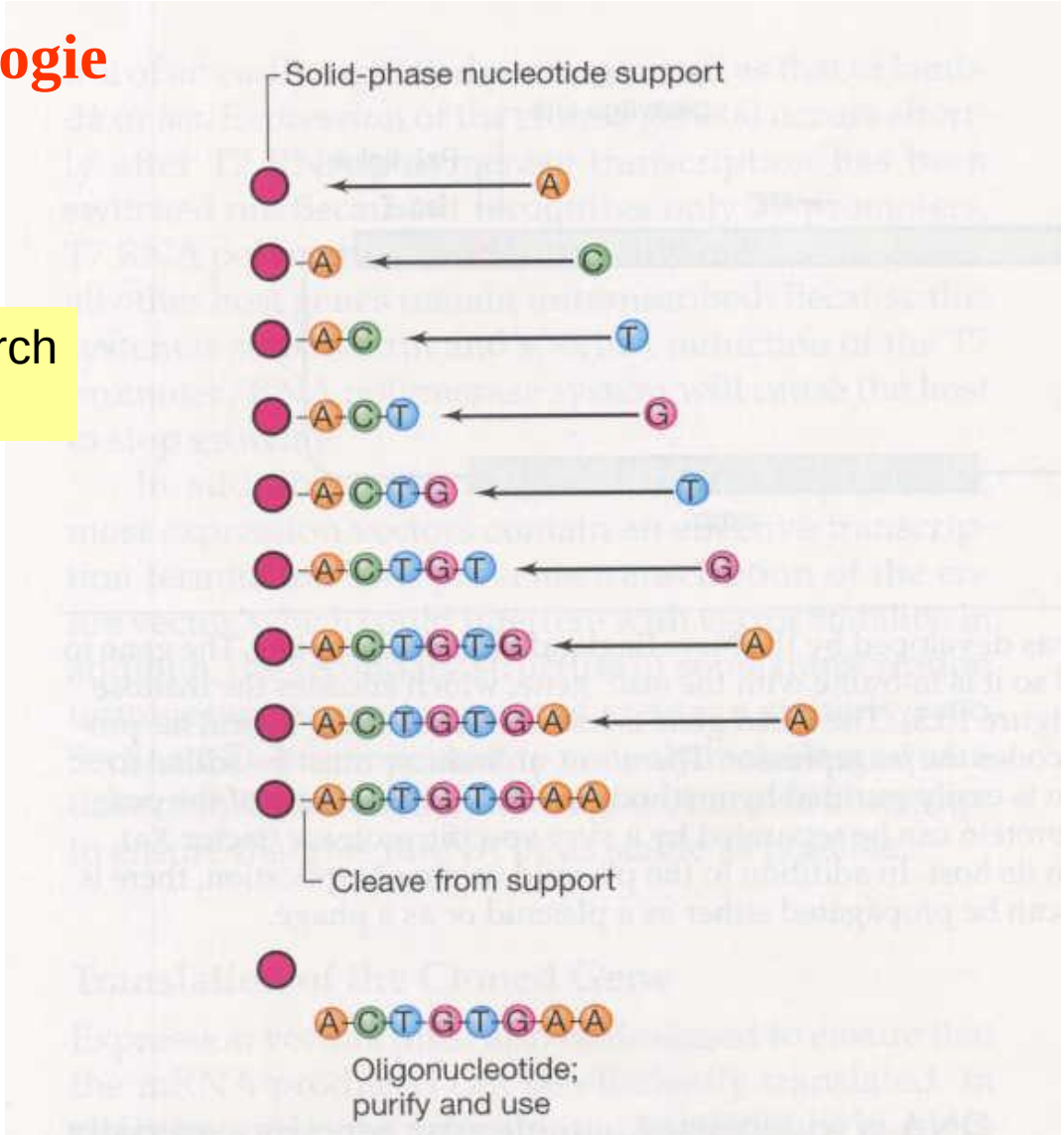
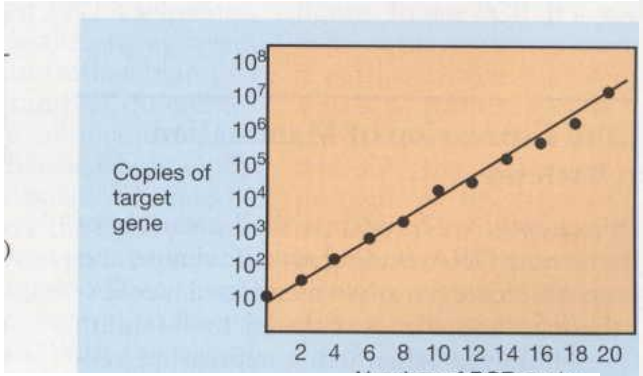



**FIGURE 10.10** Solid-phase procedure for synthesis of a DNA fragment of defined sequence. Chemical synthesis proceeds by adding one nucleotide at a time to the growing chain.

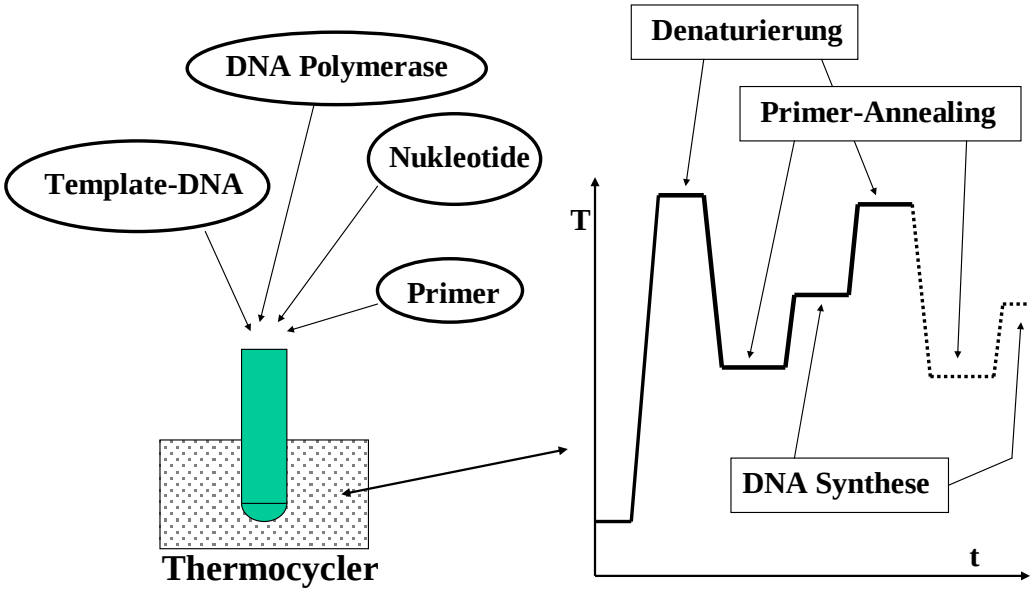
# Gentechnik – DNA Technologie

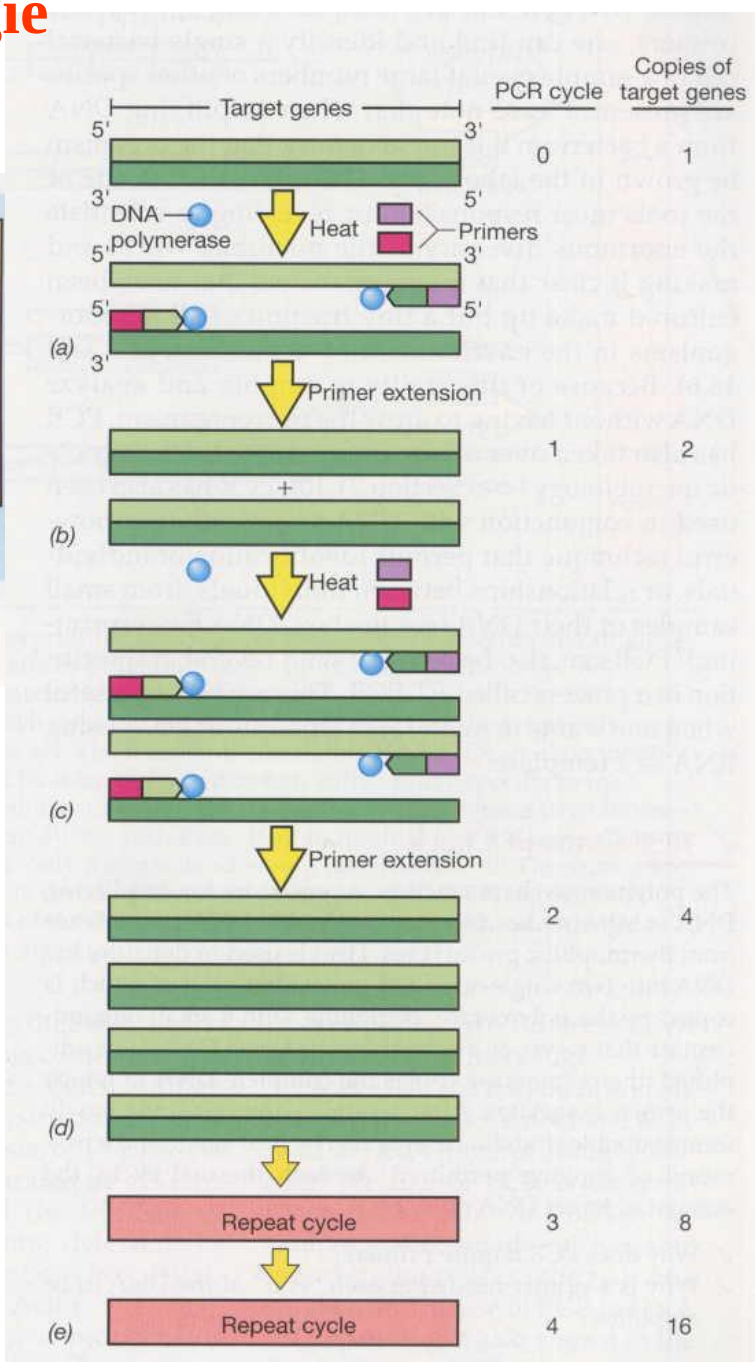
**P**olymerase
**C**hain
**R**eaction

Leichter Zugang zu Genmaterial

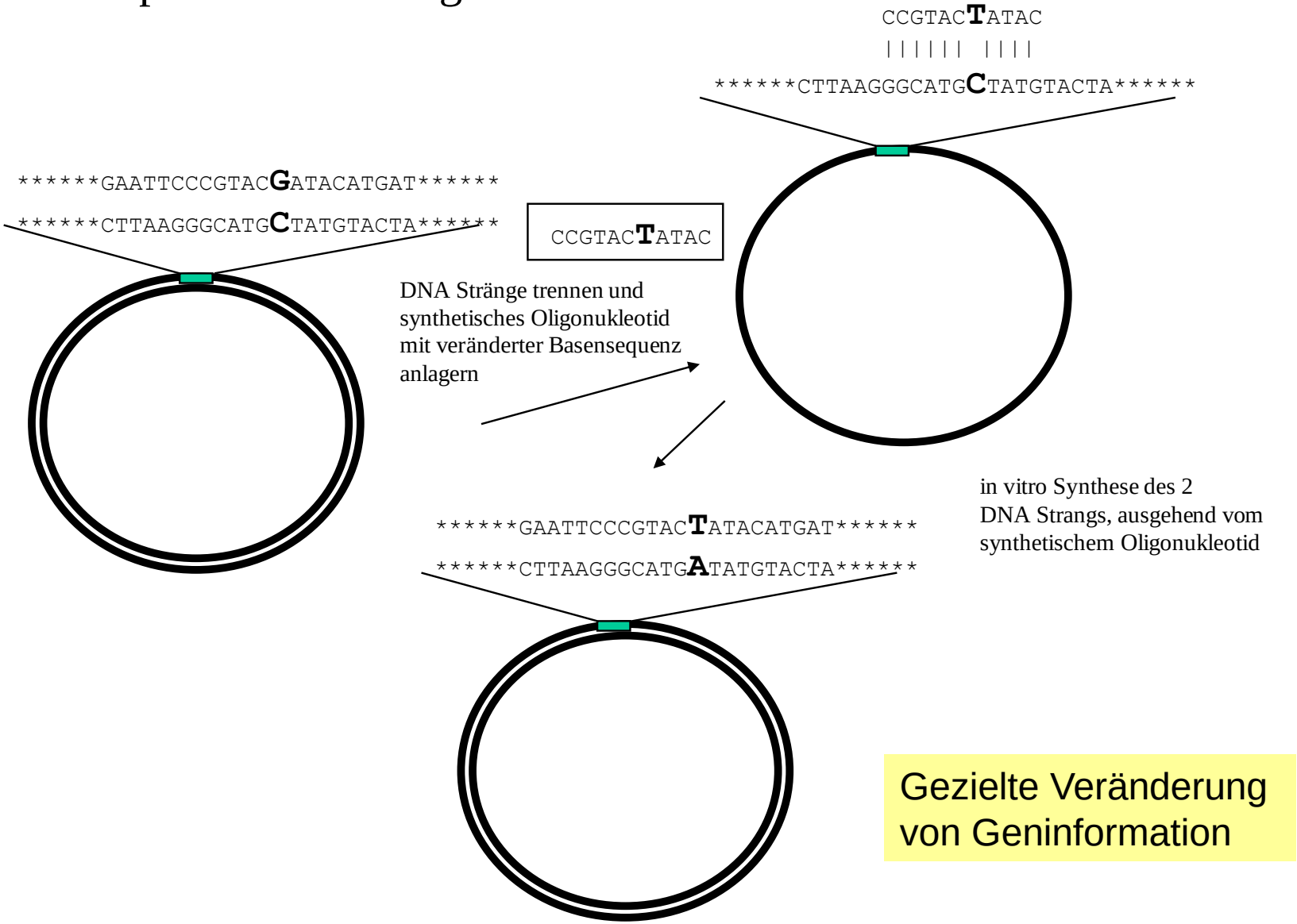



## PCR



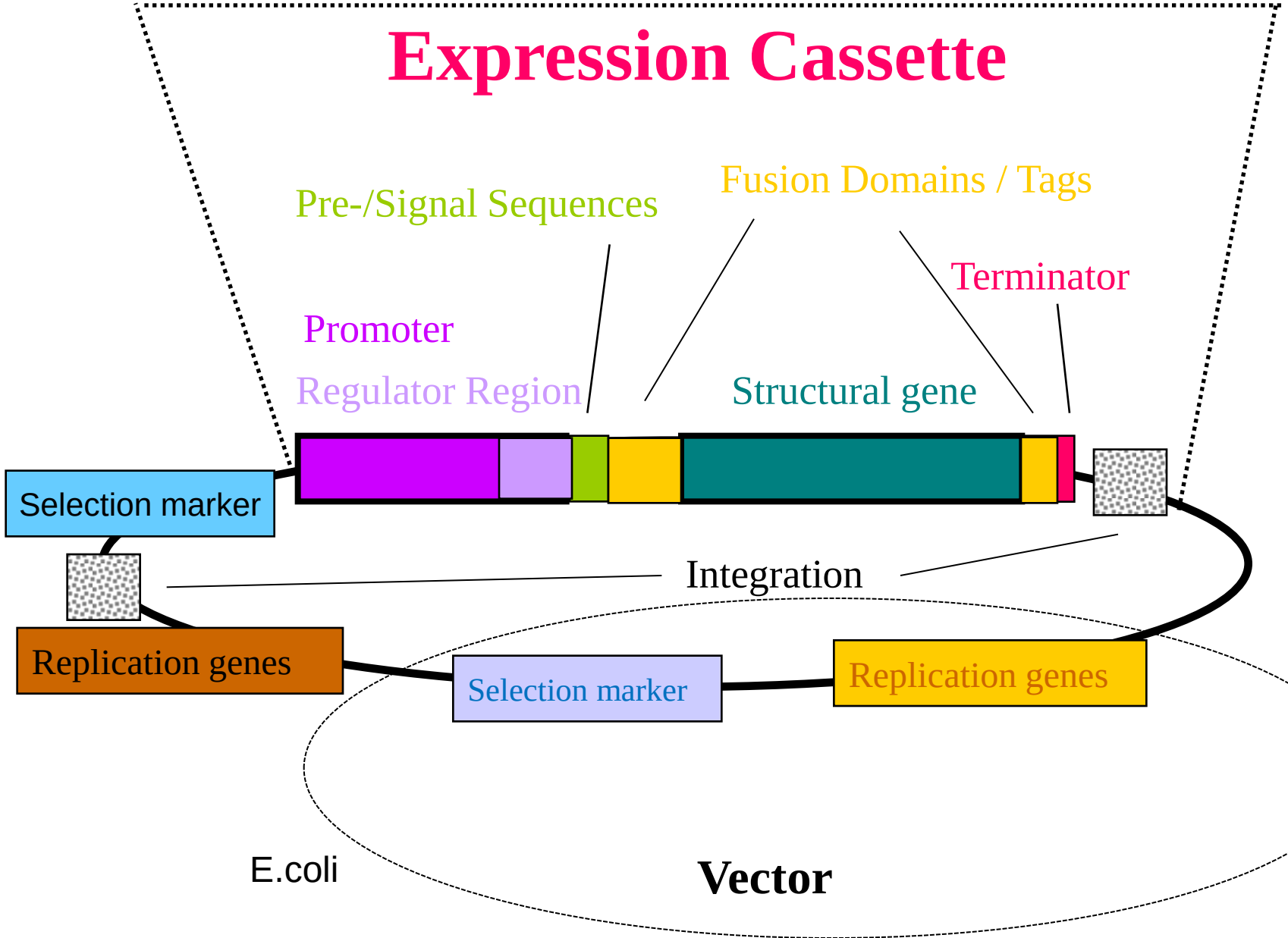



# Stellenspezifische Mutagenese




Gezielte Veränderung von Geninformation

# Expression Cassette



# Stammkonservierung

Serieller Transfer

Erhalt der Leistungen von Biosystemen

Luftabschluss
- Lagerung unter Mineralöl

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[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. Purkyne 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 GmbH | 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.

20.11.15