

Biologie I – Mikrobiologie

Genetisch-mikrobiologisches Laborpraktikum

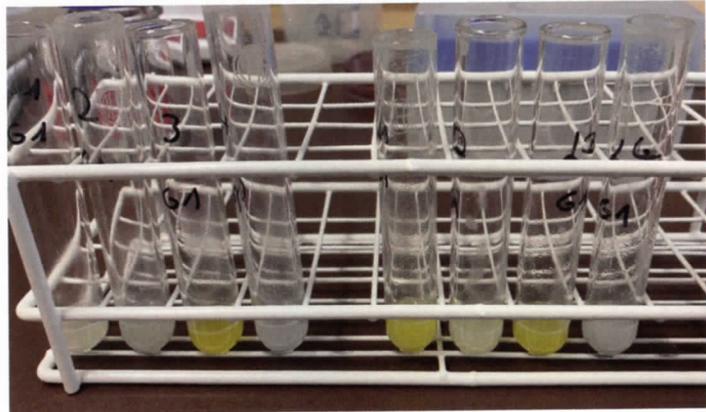
Kursleitung: PD Dr. Knut Jahreis, Universität Osnabrück, Marie Derkes, Gymnasium „In der Wüste“

Versuch 1 – Genetische Schalter

Wir haben genetische Schalter als Grundlage der Genetik untersucht. Diese ermöglichen es nach dem Operon-Modell bestimmte Gene in einer Zelle zu aktivieren oder zu deaktivieren, sodass sich verschiedene Zelltypen bilden können. Das Prinzip dieser Genregulation lässt sich auf die Zellen der Menschen übertragen. Mithilfe unserer Versuchsergebnisse kann das lac-Operon-Regulationsmodell, also der genetische Schalter für die Verstoffwechslung von Laktose (Milchzucker), veranschaulicht werden. Es beschreibt die Schalter und Wirkungen verschiedener Enzyme und Moleküle in einer Zelle, die zur Transkription und Translation der DNA führen.

Dafür haben wir die Enzymaktivität verschiedener Mutationen harmloser *E. coli* Bakterien mit und ohne Zugabe von Laktose untersucht. Zur Verstoffwechslung von Laktose bei *E. coli* sind ein Laktosetransporter und β -Galaktosidase (ein Laktose spaltendes Enzym) notwendig. Die Bildung dieser Enzyme kann durch den Laktose-Repressor *lacI* reguliert werden. Durch unterschiedlich starke Gelbfärbungen der Lösungen am Ende des Versuches (Abb. unten) konnte die Konzentration von Laktosetransportern und β -Galaktosidase sowie der mögliche lac-Genotyp bestimmt werden. Dabei war zu beobachten, dass *E. coli* K-12 Bakterien ohne Laktose wenige Laktosetransporter und β -Galaktosidase enthielten, auf einem Nährboden mit Laktose jedoch deutlich mehr.

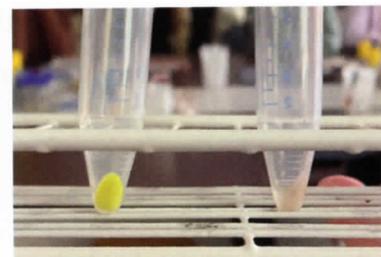
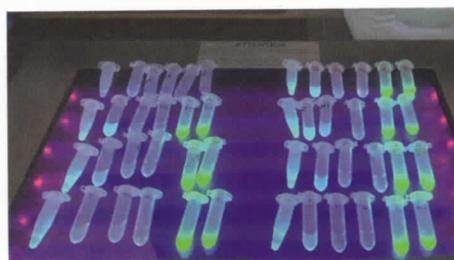
Mithilfe einer Indikator-Platte konnten wir im Anschluss durch Verfärbungen feststellen, welche Mutanten von *E. coli* Laktose verstoffwechseln. Mit dem lac-Operon-Modell konnte dadurch gedeutet werden, welche Defekte in den Mutanten vorliegen.



Versuch 2 – GFP Reinigung

In diesem Versuch widmeten wir uns dem Grün-fluoreszierenden Protein (kurz GFP), welches ursprünglich aus der Tiefseequalle *Aequorea victoria* stammt und im Jahr 1962 durch den japanischen Forscher Osamu Shimomura entdeckt wurde. Mit dieser Entdeckung gewann er 2008 den Nobelpreis und revolutionierte die zellbiologische Forschung, da jegliche Zellbestandteile durch dieses Protein markiert werden können.

Im ersten Schritt des Experiments brachten wir *E. coli* dazu, das Protein selbst in großer Menge herzustellen. Nachdem das Bakterium über Nacht das Protein bei Idealbedingungen hergestellt hatte, konnten wir die Zellwände durch eine Ultraschallbehandlung brechen und einen Rohextrakt herstellen. Durch Nutzung von Zentrifugalkraft haben wir nun GFP über mehrere Teilschritte von den restlichen Zellbestandteilen isoliert. Anschließend konnten wir die Proben mithilfe einer UV-Leuchte bestrahlen, um die Ergebnisse unserer Reinigung zu begutachten.



Versuch 3 – Bakterielle Konjugation und Wirkung von Antibiotika

Im dritten Versuch haben wir zuerst den sog. Plättchentest durchgeführt. Dabei soll gezeigt werden, dass verschiedene Antibiotika Auswirkungen auf einen Bakterienstamm haben. Diese töten die Bakterien ab. Das Antibiotikum Ampicillin zeigte von den vier verwendeten Antibiotika die stärkste Wirkung, was am größten Hemmhof erkennbar ist (s. Abb. 1).

In einem weiteren Experiment analysierten wir verschiedene Resistenzmechanismen von Bakterien gegen Antibiotika. Die E. coli Mutante LJ130 wirft das Antibiotikum sozusagen aus der Bakterienzelle heraus, sodass nur noch der eigene Bakterienstamm wachsen kann. Bei einer anderen E. coli Mutante wurde das Antibiotikum abgebaut, sodass auch andere Bakterien, wie z. B. E. coli K-12 auf dem Nährmedium, in der Nähe der Ampicillin-Resistenten Mutante wachsen konnten.

Im letzten Experiment zur Erzeugung von multiresistenten Bakterien wurden Bakterienstämme mit unterschiedlichen Eigenschaften auf einem Nährboden gekreuzt. An der Kreuzungsstelle bildete sich ein multiresistenter Keim (s. Abb. 3), weil durch den direkten Zell-Zell-Kontakt die Information auf einem Erbträger (Plasmid) der Bakterien für die Antibiotikaresistenz übertragen wurde. Dabei werden die Gene über sog. Konjugationsbrücken weitergegeben. Dies ist einer der Hauptgründe für multiresistente Keime.

Dieses Gesamtexperiment ermöglichte es, die Entstehung von Multiresistenzen besser zu verstehen. In Deutschland nimmt die Resistenzentwicklung von Bakterien gegen Antibiotika durch übermäßige Verschreibung und unsachgemäße Anwendung besorgniserregend zu. Durch die Thematisierung wurden wir über den verantwortungsvollen Umgang und die Risiken mit der Antibiotikaeinnahme sensibilisiert.

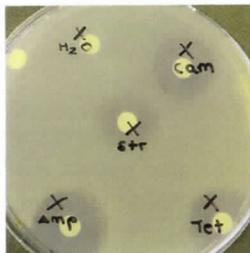


Abb. 1: Plättchentest

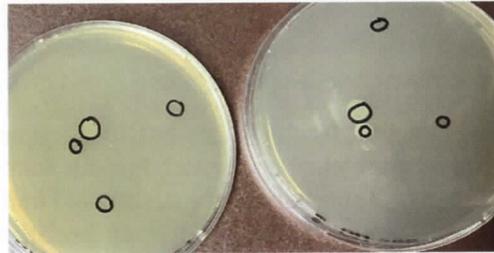


Abb. 2: Wirkweise von resistenten Bakterien (links: Tet, rechts: Amp)

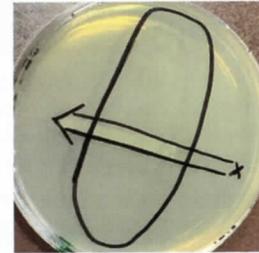


Abb. 3: Konjugation multiresistenter Gene



Versuch 4 – Genetischer Fingerabdruck: Wie viel Neandertaler steckt in uns?

Vor ca. 45.000 Jahren sind sich der Neandertaler und der moderne Mensch in Europa begegnet. Durch gemeinsame Nachfahren kann man bis heute Überbleibsel der DNA eines Neandertalers im Genom von vielen europäischen Menschen nachweisen. Deshalb haben wir uns gefragt, ob auch wir in unserer eigenen DNA einen bestimmten Abschnitt der Neandertaler DNA wiederfinden.

Um das herauszufinden, hat jeder von uns eine DNA-Probe aus der eigenen Mundschleimhaut entnommen und isoliert. Mit Hilfe der PCR-Methode wurde der Abschnitt unserer DNA, welcher die Neandertaler DNA enthält, vervielfältigt. Anschließend wurde die DNA mithilfe spezifischer Restriktionsenzyme an der Stelle, die die Neandertaler DNA enthält, geschnitten. Durch die Gelelektrophorese wurde die DNA sichtbar gemacht, wodurch wir das Ergebnis interpretieren konnten. Dabei haben wir festgestellt, dass in unserem Kurs nur eine Person homozygot moderner Mensch ist und alle anderen mindestens heterozygot oder sogar homozygot bezüglich dieses Neandertaler-Markers sind.

