

Eine typische Bakterienzelle mit ihren äußeren Schichten (1 nm = 1 millionstel mm)

DNA

Desoxyribonucleinsäure (engl. *Deoxyribonucleic acid*)

Transformation

Übertragung von DNA in eine beliebige lebende Zelle

Träger der Erbinformation – experimentelle Beweise

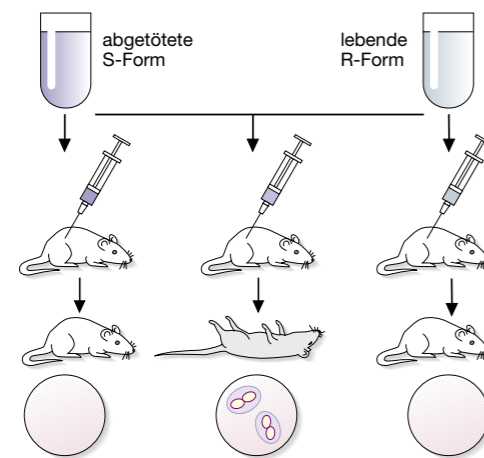
In den 30er-Jahren des letzten Jahrhunderts stand man vor der ungeklärten Frage, ob Proteine oder Nucleinsäuren die Träger der Gene sind. Beide Stoffklassen liegen als langkettige, unverzweigte Moleküle vor, die eine beinahe unbegrenzte Anzahl verschiedener Varianten bilden können.

Experimentell wurde die chemische Natur der Erbsubstanz erstmals an Bakterien untersucht. FREDERICK GRIFFITH experimentierte 1928 mit dem Bakterium *Streptococcus pneumoniae*, das in zwei Varianten vorkommt. S-Zellen sind in der Lage, Schleimkapseln zu bilden. Ihre Kolonien sind glatt (engl. *smooth*). S-Zellen sind virulent, d. h. sie rufen bei Mäusen eine tödliche Form der Lungenentzündung hervor. Werden sie durch Hitze abgetötet, verlieren sie ihre Virulenz. R-Zellen hingegen bilden aufgrund genetischer Unterschiede keine Schleimkapseln aus. Ihre Kolonien erscheinen in der Bakterienkultur rau (engl. *rough*), auch lebend sind sie nicht virulent.

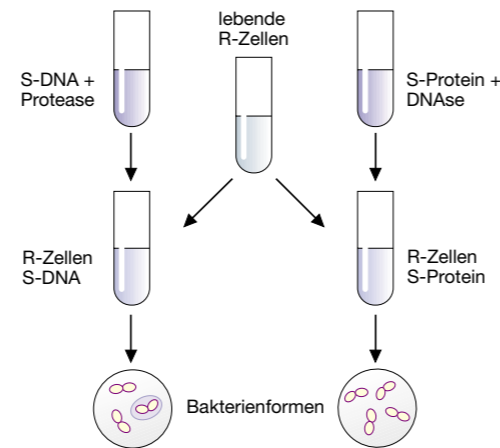
GRIFFITH vermischte abgetötete S- und lebende R-Zellen. Überraschenderweise konnte dieses Gemisch bei Mäusen die Lungenentzündung hervorrufen. Aus den erkrankten Tieren ließen sich sogar lebende S-Zellen isolieren. Die Fähigkeit zur Kapselbildung war von den abgetöteten S- auf die lebenden R-Zellen übertragen worden. Die Erbinformation hat also eine stoffliche Basis.



Oswald Avery (1877–1955)



1 Die Versuche von Griffith

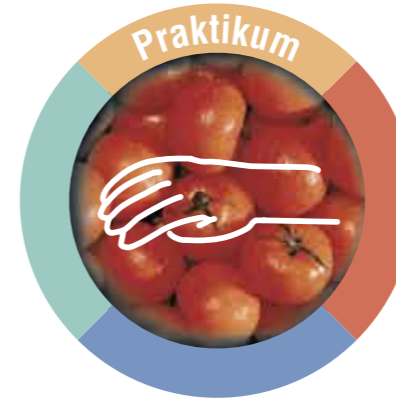


2 Avery: Die DNA ist das transformierende Prinzip

Der Bakteriologe OSWALD AVERY nahm die Versuche von GRIFFITH 1944 wieder auf, um die Substanz, die von S- auf R-Zellen übertragen worden sein musste, zu identifizieren. Er trennte DNA und Proteine abgetöteter S-Zellen voneinander ab und mischte anschließend lebende R-Zellen entweder mit der DNA oder mit den Proteinen. Die Proteine der S-Zellen lösten bei R-Zellen keine Kapselbildung aus. Die DNA der S-Zellen hingegen übertrug die Fähigkeit zur Kapselbildung auf R-Zellen. AVERY hatte mit diesem Versuch bewiesen, dass DNA der stoffliche Träger der Erbinformation ist. Die Übertragung von DNA in lebende Zellen wird *Transformation* genannt.

Aufgaben

- OSWALD AVERY führte eine Reihe von Kontrollexperimenten durch. Beispielsweise behandelte er die abgetrennte DNA zusätzlich mit Protein spaltenden Enzymen (*Proteasen*) und die Proteine mit DNA spaltenden Enzymen (*DNAsen*). Begründen Sie.
- AVERY gab seinen Bakterienkulturen Serum zu. Hitzebehandeltes Serum beeinträchtigte seine Versuche nicht. Unbehandeltes Serum hingegen verhinderte oftmals eine Transformation von R-Zellen durch isoliertes Material aus S-Zellen. Serum enthält eine Reihe verschiedener Enzyme. Erklären Sie.



Experimente mit DNA

DNA gewinnen

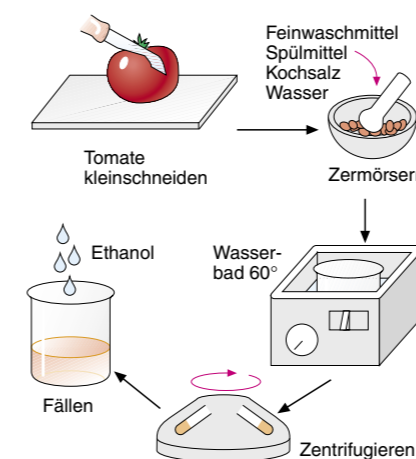
In molekularbiologischen Labors ist die Fällung von Nucleinsäuren eine Standardmethode. Oftmals ist das Abtrennen von DNA aus homogenisierten Geweben Ausgangspunkt für weiterführende genetische Untersuchungen. Die Erbsubstanz DNA kann mit einfachen chemischen Methoden aus Zellen isoliert und von anderen Zellinhaltsstoffen abgetrennt werden.

Materialien:

Ethanol (tiefgekühlt), Natriumchlorid, Tomate, Spülmittel, Zentrifuge, Glasstab, Feinwaschmittel mit Proteasen

Durchführung:

Zerkleinern Sie eine halbe Tomate grob mit einem Messer. Die Gewebestücke werden zusammen mit 40 ml Wasser, 5 ml Spülmittel, einigen Krümeln Feinwaschmittel sowie $\frac{1}{2}$ Teelöffel Kochsalz in einen Mörser gegeben und püriert (*homogenisiert*). Geben Sie den Tomatenbrei in ein Becherglas, das 15 min bei 60 °C in einem Wasserbad gehalten wird.



Der zellfreie Extrakt wird dann in ein Reagenzglas gegeben und zur Entfernung der Zelltrümmer zentrifugiert. Die Zelltrümmer bilden ein Sediment am Reagenzglasboden. Ist der Überstand nach der Zentrifugation nicht durchscheinend klar, kann er zusätzlich durch einen Kaffeefilter gegeben werden.

Zur Fällung der DNA überschichten Sie vorsichtig mit Ethanol. An der Phasengrenzfläche der beiden Flüssigkeiten sammelt sich eine geleeartige Masse, die ausgefällte DNA. Die Substanz lässt sich an einem Glasstab aufwickeln.

Fragmente erzeugen

Die fädigen DNA-Moleküle sind oftmals zu lang und sperrig, um damit weiter experimentieren zu können. Isolierte DNA wird deswegen für weiterführende Versuche in kleinere Bruchstücke gespalten (*fragmentiert*). Dazu stehen heute eine Reihe von DNA schneidenden Enzymen zur Verfügung. Diese *Restriktionsenzyme* erkennen bestimmte Basenabfolgen innerhalb der DNA-Stränge und schneiden diese an den so definierten Stellen. Man erhält kürzere Bruchstücke bestimmter Länge. Unspezifische DNAsen hingegen haben die Fähigkeit, DNA-Stränge von den Enden her vollständig in ihre Bausteine, die *Nucleotide*, zu zerlegen. DNA kann aber auch durch saure Hydrolyse chemisch zu Nucleotiden abgebaut werden.

Durchführung:

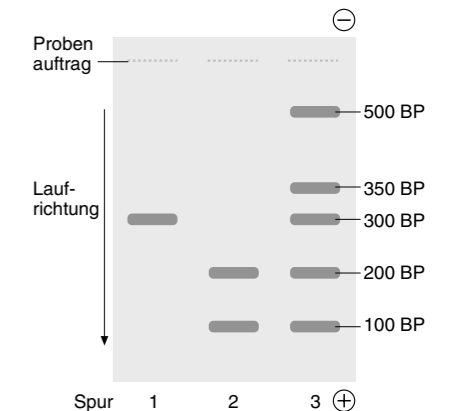
Die aus Tomaten isolierte DNA wird zur chemischen Fragmentation zusammen mit 10 ml Schwefelsäure (1 mol/l) in ein Reagenzglas gegeben [C] (Schutzbrille tragen!). Das Reagenzglas wird locker mit Aluminiumfolie verschlossen und 15 min in siedendes Wasser gehalten. Dadurch wird die DNA in ihre Bestandteile, die Nucleotide gespalten. Sie löst sich auf.

Aufgaben

- Wie könnten Sie experimentell den Einwand entkräften, bei der Behandlung der isolierten DNA mit Säure sei keine Hydrolyse eingetreten, vielmehr sei die DNA wieder in ihre lösliche Form übergegangen?
- Im DNA-Fällungsversuch wird Feinwaschmittel, das *Proteasen* enthält, zugesetzt. Proteasen sind Protein spaltende Enzyme. Mit welchen Proteinen ist das DNA-Molekül assoziiert? Schlagen Sie in diesem Buch nach.

Fragmente trennen: Elektrophorese

Wird DNA mithilfe von Restriktionsenzymen geschnitten, ist es häufig für das weitere experimentelle Vorgehen notwendig, die Bruchstücke sichtbar zu machen. Dazu werden die Fragmentationsansätze elektrophoretisch in einem Stärke-Gel aufgetrennt. Die geladenen DNA-Fragmente wandern im elektrischen Feld, kleinere Stücke schneller als größere. Gleichartige Stücke konzentrieren sich dabei zu Banden. Diese können mithilfe von Farbstoffen sichtbar gemacht werden.



Die Abbildung oben zeigt die Auftrennung eines Fragmentationsansatzes (Spur 2). Um die Größe der DNA-Fragmente abschätzen zu können, wurde ein sog. Molekulargewichtsstandard (Spur 3) verwendet. Dieser enthält DNA-Fragmente bekannter Größe, angegeben als Basenpaare (BP).

Aufgaben

- Welche Ladung haben die aufgetrennten DNA-Fragmente? Welche Größe haben sie?
- Wie oft hat das verwendete Restriktionsenzym die Proben-DNA (Spur 1) in Spur 2 geschnitten?

Fragmente isolieren: Blotting

Um die aufgetrennten DNA-Fragmente einer weiteren Analyse zugänglich zu machen (s. Seite 138), werden sie aus dem Elektrophorese-Gel isoliert (Southern Blot). Auf das Gel wird eine Nylonmembran gelegt, darauf eine Lage Papiertücher und darauf ein Gewicht. Das Sandwich wird in einen Puffer gestellt, der von den Papiertüchern „angesaugt“ wird. Der Puffer durchströmt das Gel, reißt die DNA-Banden mit, die von der Membran fest gebunden werden.