

Bakterielle Genetik

Einleitung

Ziel dieses Kursabschnitts ist es, Ihnen eine Einführung in das Feld der bakteriellen Genetik zu geben. Aus der Perspektive der Genetik und der Gentechnik betrachtet sind Bakterien relativ einfache Lebewesen. Es gibt ausserdem einige Bakterienstämme, die sich im Labor besonders einfach handhaben, manipulieren und vermehren lassen und sich somit besonders gut als Modellsysteme für die biologische Forschung eignen.

Aus diesem Grund wurden die meisten der heute gängigen molekularbiologischen Methoden, sowie die auf rekombinanter DNA basierenden Labortechniken, ursprünglich an Bakterien entwickelt. Darüber hinaus dienen Bakterien als Modellsysteme, die helfen, zelluläre und entwicklungsbiologische Prozesse in komplexeren Organismen zu verstehen. Dies ist möglich, weil die zentralen molekularen Funktionen von Zellen während der Evolution weitestgehend unverändert beibehalten wurden und deshalb in Bakterien und höheren Organismen sehr ähnlich sind.

- Unser Wissen über viele der fundamentalen molekularen und zellulären Prozesse auf denen alles Leben beruht (z.B. Translation und Replikation), stammt zu einem sehr grossen Teil aus Studien an Bakterien.
- Ribosomen haben in allen Organismen eine ähnliche Struktur und auch viele der an der Translation beteiligten Faktoren sind stark konserviert. Studien an bakteriellen Ribosomen waren entscheidend für die Aufklärung der fundamentalen Mechanismen der Translation.
- Die an der DNA-Replikation beteiligten molekularen Maschinen sind in allen Organismen sehr ähnlich. Wieder waren Studien an Bakterien entscheidend für das Verständnis dieser Prozesse.
- Chaperone, welche die Proteinfaltung unterstützen und Topoisomerasen, welche die Topologie der DNA beeinflussen, wurden zuerst in Bakterien entdeckt und untersucht und sind jetzt in allen untersuchten Organismen bekannt.
- Studien zu den molekularen Mechanismen der Mutagenese und der DNA Reparatur in Bakterien haben den Weg für die Aufklärung dieser Prozesse in Eukaryoten geebnet.

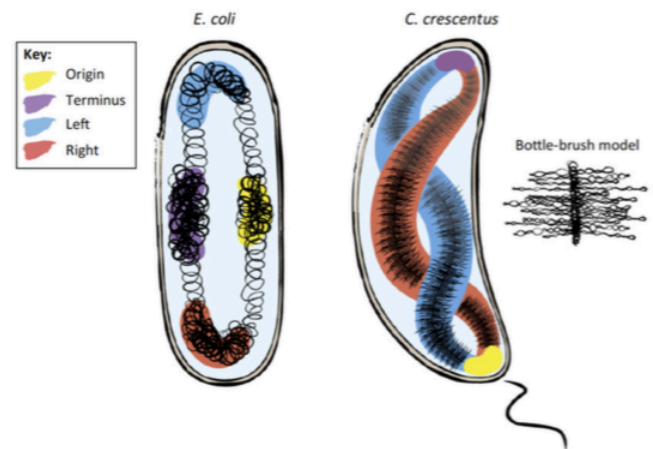


Abbildung 1 Räumliche Organisation des Chromosoms in bakteriellen Zellen (Weng, et al. 2014)

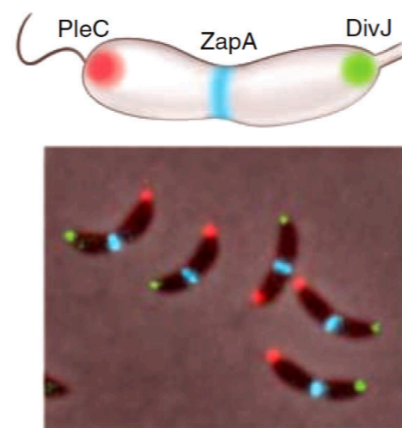


Abbildung 2 Verteilung von zellulären Proteinen entlang der Längsachse in *Caulobacter crescentus* (Shapiro et al. 2009)

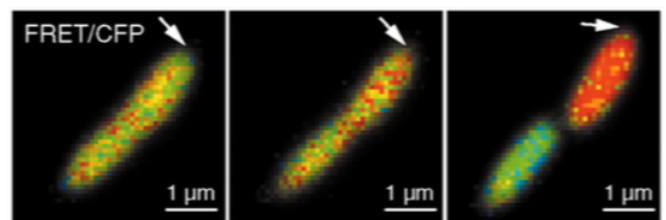


Abbildung 3 Kompartimentierung von second-messenger Molekülen in einer bakteriellen Zelle. (Christen et al. 2010, *Science*, 328(5983), 1295-1297.)

Mit den sich ständig verbessernden experimentellen Methoden zeigt sich immer mehr, dass die zelluläre Struktur der oft kleinen Bakterien weitaus differenzierter und komplexer ist als lange angenommen wurde. Die lange ver-

breitete Vorstellung einer bakteriellen Zelle als unstrukturierter „bag of enzymes“ ist also ein zu stark vereinfachendes Model welches wir aus unseren Köpfen verbannen sollten. Zum Beispiel ist die Verteilung von vielen Enzymen innerhalb der Zelle sehr genau kontrolliert. Auch ist die DNA des bakteriellen Genoms trotz der Abwesenheit eines durch eine Membran abgegrenzten Zellkerns präzise strukturiert und ermöglicht so die DNA-Reparatur und Genexpression während der Replikation. Technische Fortschritte in der molekularen Genetik und der Mikroskopie machen es inzwischen möglich diesen hohen Grad der räumlichen Organisation der bakteriellen Zelle in funktional unterschiedliche Subkompartimente direkt sichtbar zu machen. (Abbildung 1, Abbildung 2 und Abbildung 3).

Nachdem klar wurde, dass bakterielles Leben auf denselben genetischen und molekularen Mechanismen basiert wie das Leben aller anderen Organismen, ermöglichte die relative Einfachheit und genetische Adaptabilität der Bakterien viele Schlüsselexperimente, die an höheren Organismen nicht möglich gewesen wären. Als Resultat haben Bakterien bei vielen der grossen wissenschaftlichen Durchbrüche der letzten 50 Jahre eine ganz zentrale Rolle gespielt.

Dieselben Vorteile, die Bakterien in der Vergangenheit zu so aussergewöhnlich erfolgreichen Modellsystemen gemacht haben, bestehen weiter fort und werden auch in der Zukunft fundamentale Einblicke in neue zellbiologische Prinzipien ermöglichen. Die Rolle der Bakterien in den Biowissenschaften ist aber nicht auf die Funktion als Modellsystem beschränkt. Neueste Forschung zeigt, dass bakterielles Leben eine ungeahnte Vielfalt aufweist. Die zentrale Rolle von Bakterien in vielen ökologischen Systemen und in der menschlichen Gesundheit wird immer deutlicher.

Das bakterielle Genom

Durch die Einführung neuer Techniken hat die Geschwindigkeit der DNA-Sequenzierung in den letzten Jahren um mehrere Grössenordnungen zugenommen. Parallel dazu sind die Kosten der Sequenzierung eben so dramatisch gesunken. Diese Entwicklung hat die Rolle von Genomsequenzen in der biologischen Forschung grundlegend verändert. Vor nicht allzu langer Zeit war die Sequenzierung des Genoms der krönende Abschluss der langjährigen Erforschung eines Organismus. In naher Zu-

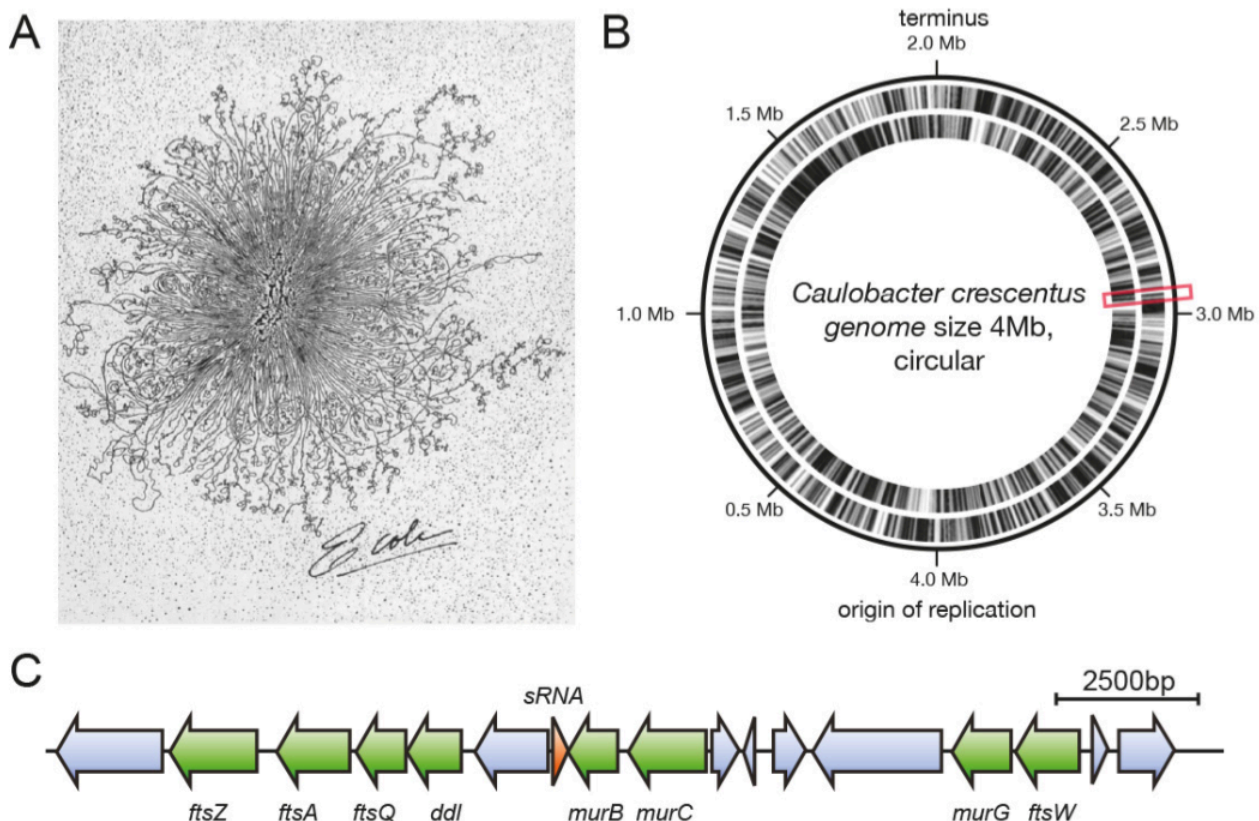


Abbildung 4 Genom- und Genorganisation in Bakterien. A) Elektronen Mikroskopische Aufnahme des *E.coli* Chromosoms nach der Auflösung der Zellwand (Kavenoff, Nature.com). B) Das Zell-zyklus Modelbakterium *Caulobacter crescentus* besitzt ein zirkuläres Chromosom mit 4 Millionen Basenpaaren. Die Beiden Inneren Kreise markieren die Positionen der annotierten Proteine auf dem plus und minus DNA Strang. C) Vergrösserter Ausschnitt des Genoms (rote Box in Panel. B) zeigt die dichte Anordnung von protein- und RNA-codierenden Sequenzen (grün bekannte Funktionen, blau hypothetische Proteine) und nicht-protein kodierender sRNA (orange).

Organismus	Genom [bp]	ORFs	Kurzbeschreibung
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	6691694	6292	Stickstoff fixierender Pflanzensymbiont, besitzt zusätzlich zum Chromosom zwei Mega-plasmide
<i>Escherichia coli</i>	4639221	4288	Modelorganismus, Nutzung in der Gentechnologie
<i>Bacillus subtilis</i>	4214810	4100	Modelorganismus der Genetik, gram-positiv
<i>Caulobacter crescentus</i>	4016942	3767	Zellzyklus Modelorganismus, Süsswasserbakterium
<i>Helicobacter pylori</i>	1667867	1590	Pathogen, erzeugt Magengeschwüre
<i>Phelagibacter ubique</i>	1308759	1354	Kleinstes Genom eines frei lebenden Bakteriums
<i>Borrelia burgdorferi</i>	910725	853	Lineares Chromosom, verursacht Lyme -Disease
<i>Mycoplasma JCVI-syn1.0</i>	1078809	828	Erstes Bakterium mit synthetischem Genom
<i>Carsonella ruddii</i>	159662	182	Besitzt eines der kleinsten bekannten bakteriellen Genome, obligater Symbiont

Abbildung 5 Verschiedene Modellorganismen der bakteriellen Genetik und Genomik.

kunft wird die Sequenzierung eines neu entdeckten Bakteriums wahrscheinlich eines der ersten Experimente sein, die an diesem Bakterium durchgeführt werden.

Die Sequenzierung des Genoms wird also zum Startpunkt von dem ausgehend man die Funktionen der neu entdeckten Spezies untersucht. Es gibt ausserdem schon eine Reihe von Beispielen, wo genetische Analysen nicht mehr an reinen Kulturen einzelner Bakterienarten durchgeführt werden. Stattdessen wird die gesamte DNA aller Mikroorganismen, die in einer Boden- oder Wasserprobe oder auch in einer Lebensgemeinschaft aus mehreren Bakterien enthalten sind, simultan untersucht. Dabei hat die Untersuchung dieser DNA-Sequenzen zur Entdeckung vieler neuer Bakterienarten geführt, die nicht in Reinkultur gezüchtet werden können.

Bakterielle Genome sind relativ klein und dadurch vergleichbar leicht zu analysieren. Ihre Grösse reicht von nur 0.5 Megabasen (1Mb = 1 Million Basen) und ca. 500 Genen für einige obligate Parasiten bis zu 10 Mb und ca. 10'000 Genen für einige freilebenden Bakterien. Damit sind selbst die grössten bakteriellen Genome noch einige hundertmal kompakter als z.B. das 3'000 Mb lange menschliche Genom.

Die Analyse von bakteriellen Genomsequenzen zeigt, dass die protein-codierende Information dort besonders dicht gepackt vorliegt. Introns und repetitive DNA-Sequenzen die in eukaryotischen Genomen viel Platz einnehmen sind in bakteriellen Genomen kaum zu finden. In Zahlen ausgedrückt beträgt die Gendichte eines typischen bakteriellen Genoms 1,1 kb. Das bedeutet, dass man in einem bakteriellen Genom im Durchschnitt alle 1,1 kb ein Gen findet. Zum Vergleich ist beim Menschen und der Maus die Gendichte 100-mal geringer.

Die kodierenden Sequenzen in bakteriellen Genomen kodieren hauptsächlich für Protein-, rRNA- und tRNA-Sequenzen aber zunehmend werden auch Regionen gefunden, die für kurze Peptide und regulatorische RNAs kodieren.

Plasmide

Neben einem Chromosom enthalten Bakterien auch sogenannte Plasmide. Diese zirkulären doppelsträngigen DNA-Moleküle finden sich in praktisch allen Bakterienarten und spielen eine signifikante Rolle in der bakteriellen Adaptation und Evolution. In der Molekularbiologie stellen Plasmide darüber hinaus ein wichtiges Werkzeug dar.

Die Grösse von Plasmiden reicht von einigen tausend bis zu einigen hunderttausend Basenpaaren. Genau wie die DNA auf bakteriellen Chromosomen kodieren auch Plasmid-Sequenzen für Proteine und RNAs.

Plasmide enthalten jedoch selten Gene, die für das bakterielle Wachstum unter allen Bedingungen essentiell sind. Stattdessen tragen Plasmide oft solche Gene, die einem Bakterium unter ganz bestimmten Bedingungen einen selektiven Vorteil geben (z.B. Gene für Antibiotikaresistenzen). Plasmide besitzen ausserdem die aussergewöhnliche Eigenschaft, dass sie in einem „Konjugation“ genannten Prozess von einer Bakterienzelle in eine andere übertragen werden können. Dieser Plasmidtransfer findet nicht nur zwischen Bakterienzellen derselben Spezies statt, sondern kann auch zwischen unterschiedlichen Bakterienarten, sogar zwischen Bakterien und eukaryotischen Zellen ablaufen.

Daher eignen sich Plasmide ganz hervorragend als Werkzeuge in der Molekularbiologie (z.B. für die Klonierung und den Transfer von genetischem Material von einem Organismus zu einem anderen).

Was ist Genetik?

Genetik kann als die Untersuchung von zellulären und organismalen Funktionen durch Veränderung von DNA definiert werden. Weil die DNA eines Organismus die gesamte Information enthält, die für die Entwicklung und Funktion dieses Organismus nötig ist, kann man durch die Veränderung der DNA auch Einblicke in den gesamten Entwicklungsprozess und die diversen Funktionen dieses Organismus erhalten.

Bevor es möglich wurde, die DNA eines Organismus gezielt „im Reagenzglas“ zu verändern, waren die Methoden der klassischen Genetik die einzige Möglichkeit, Zusammenhänge zwischen DNA-Sequenz und zellulären, sowie organismalen Funktionen zu untersuchen.

In diesem klassischen genetischen Ansatz sucht und isoliert man zuerst Mutanten, also Individuen, die sich in einer, mit dem untersuchten Prozess verknüpften, beobachtbaren und erblichen Eigenschaft (dem Phänotyp) von den anderen Mitgliedern derselben Spezies unterscheiden.

Durch genetische Kartierungsmethoden ist es dann möglich, diejenige Stelle auf dem Chromosom zu finden, an der die Mutation stattgefunden hat, die für diesen Phänotyp verantwortlich ist. Die Art und Weise in der die Mutation eines Gens den Phänotyp beeinflusst, lässt in einigen Fällen ausserdem Rückschlüsse auf die spezifische Funktion dieses Gens zu. Der Genetiker untersucht also wie Mutationen die Funktion eines biologischen Systems verändern und lernt anhand dieser Veränderungen wie dieses System insgesamt funktioniert.

Die Vorteile der bakteriellen Genetik

In der bakteriellen Genetik werden, wie der Name vermuten lässt, genetische Ansätze benutzt, um Bakterien zu untersuchen. In der grundsätzlichen Strategie (siehe vorheriger Absatz) unterscheiden sich genetische Studien an Bakterien nicht von den genetischen Studien an anderen Organismen. Die zu Verfügung stehenden experimentellen Methoden unterscheiden sich jedoch deutlich. Bestimmte Bakterienarten (z.B. *E. coli*) können relativ einfach genetisch manipuliert werden und erlauben so sehr detaillierte genetische Untersuchungen. Deshalb verstehen wir heute diese Bakterienstämme besser als fast alle anderen Organismen. Die Eigenschaften, durch die Bakterien so besonders gut für genetische Untersuchungen geeignet sind, werden in den nächsten Abschnitt besprochen.

Bakterien sind haploid

Einer der zentralen Vorteile von Bakterien für genetische Studien ist ihr haploides Genom. Bakterien tragen also

von jedem Gen jeweils nur eine Kopie bzw. ein Allel. Dies macht es wesentlich einfacher Zellen zu identifizieren die eine bestimmte Mutation tragen.

Dieser Vorteil wird deutlich, wenn wir uns die Situation in einem diploiden eukaryotischen Organismus mit seinen homologen Chromosomenpaaren vor Augen führen: Diploide Organismen haben für jedes Gen zwei Allele und da die meisten Mutationen rezessiv sind, also keinen Phänotyp erzeugen, wenn die andere Kopie des Gens nicht mutiert ist, führen die meisten Mutationen nicht zu einem sichtbaren Phänotyp. Um den Phänotyp sichtbar zu machen, müssen also erst durch Rückkreuzungen homozygote Individuen erzeugt werden, bei denen dasselbe Gen auf beiden der homologen Chromosomen mutiert ist.

Bei einem haploiden Organismus, wie beispielsweise einem Bakterium, besteht dieses Problem nicht, denn die meisten Mutationen zeigen ihren Effekt sofort und machen dadurch komplizierte Rückkreuzungen unnötig.

Kurze Generationsdauer

Ein anderer Vorteil für genetische Studien ist die relative kurze Generationsdauer vieler Bakterienarten. Die Generationsdauer ist die Zeit, die ein Organismus benötigt um heranzuwachsen und selbst Nachwuchs zu generieren. Je kürzer die Generationsdauer, desto schneller lassen sich Kreuzungs- oder Komplementationsexperimente durchführen. Einige Stämme des Bakteriums *E. coli* haben, ideale Wachstumsbedingungen vorausgesetzt, eine Generationsdauer von nur 20 Minuten. Durch diese rasche Vermehrung kann man bakterielle Kulturen am Morgen ansetzen und den Nachwuchs bereits am Nachmittag desselben Tages analysieren. Bei höheren Organismen kann der vergleichbare Prozess Wochen, Monate oder gar Jahre dauern. Konkret wächst eine einzelne *E. coli* Zelle in einem Milliliter Nährlösung innerhalb von 10-15 Stunden zu Zelldichten von bis zu 10^9 Zellen pro ml heran.

Asexuelle Reproduktion

Anders als die meisten höheren Eukaryoten vermehren sich Bakterien durch Zellteilung, also asexuell. Diese asexuelle Fortpflanzung ist für genetische Experimente ein grosser Vorteil. Bei sich sexuell reproduzierenden Organismen sind die Nachfahren nämlich mit ihren Eltern nicht genetisch identisch, sondern repräsentieren jeweils eine neue Mischung der von den Eltern geerbten genetischen Anlagen. Will man dennoch Zuchtlinien mit genetisch annähernd identischen Individuen erzeugen, ist dazu ein langwieriger Züchtungsprozess nötig, in dem Individuen immer wieder mit ihren Verwandten gekreuzt werden müssen.

Ver mehrt sich ein Organismus hingegen asexuell, sind alle Nachfahren eines Individuums genetisch identisch. Solche genetisch identischen Organismen nennt man

Klone. Klonale Vermehrung findet sich aber nicht ausschliesslich bei Bakterien. Einige einfache Eukaryoten wie z.B. Hefen, aber auch einige Pflanzen, wie z.B. Wasserhyazinthen (*Eichhornia*), können sich asexuell fortpflanzen und so Klone formen. Zudem sind eineiige Zwillinge, die ja aus derselben befruchteten Eizelle entstehen, auch Klone voneinander.

Inzwischen ist es auch technisch möglich, Säugetiere experimentell zu klonen. Dabei wird der Zellkern einer Eizelle entfernt und durch den Zellkern einer somatischen Zelle des zu klonenden Tiers ersetzt. Dieser Prozess bleibt aber sehr aufwendig und ist nur selten erfolgreich. Bakterielle Zellen hingegen generieren Klone ihrer selbst bei jeder Zellteilung.

Wachstum in Kolonien auf Agarplatten

In genetischen Experimenten ist es oft nötig, viele Individuen auf eine bestimmte Eigenschaft hin zu screenen (siehe unten). Es ist deshalb sehr hilfreich, wenn eine grosse Anzahl von Individuen einer Spezies auf kleinem Raum gehalten werden können. Bei einigen Bakterienarten ist es möglich Tausende, Millionen oder sogar Milliarden von Individuen auf einer einzigen, Nähragar enthaltenden Petrischale wachsen zu lassen und zu screenen. Nachdem die Bakterien auf die Agarplatte aufgebracht wurden, bewegen sie sich nicht mehr fort. Die vielen Nachfahren einer ursprünglichen Zelle, die durch wiederholte Zellteilungen entstehen, wachsen so zu einem sichtbaren Zellklumpen, einer sogenannten Kolonie, heran. Jede Kolonie besteht aus Millionen einzelner Zellen, aber alle Zellen innerhalb einer Kolonie stammen direkt von einer einzelnen Vorgängerzelle ab. Die Zellen innerhalb einer Kolonie sind also alle Klone der einen bakteriellen Zelle, aus der diese Kolonie herangewachsen ist.

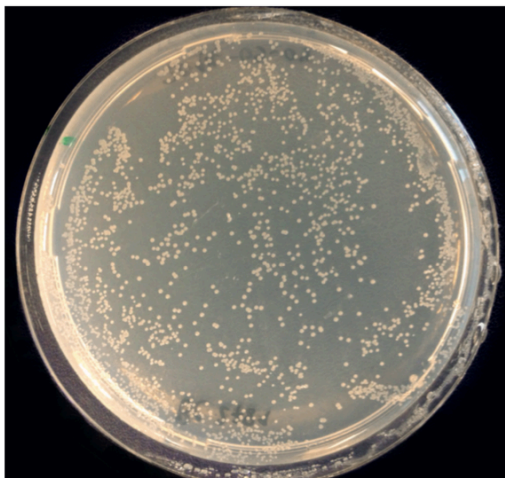


Abbildung 6 Kolonien auf Agarplatten. Eine verdünnte Zellsuspension wurde auf eine Agarplatte aufgetragen. Dadurch werden einzelne Bakterienzellen räumlich separiert und wachsen zu Kolonien heran, die aus bis zu 10^8 klonalen Zellen bestehen.

Selektion

Der wohl grösste Vorteil der bakteriellen Genetik ist die Möglichkeit von Selektionsexperimenten. Durch eine Selektion können sehr seltene Mutationen oder **Bakterienstämme** mit ganz bestimmten Eigenschaften aus einem grossen Pool anderer Bakterien isoliert werden. Um einen solchen seltenen Bakterienstamm zu isolieren, werden Milliarden von individuellen Bakterienzellen auf eine Agarplatte aufgebracht. Durch Auswahl der Wachstumsbedingungen erreicht man nun, dass nur die wenigen Bakterien, welche die gewünschte Eigenschaft aufweisen, zu Kolonien heranwachsen, während alle anderen Zellen absterben. Diese Art von Wachstumsbedingungen nennt man selektive Bedingungen. Als Beispiel stelle man sich eine Bakterienkultur vor, in der fast alle der Bakterien für ihr Wachstum einen bestimmten Nährstoff benötigen. Ganz wenige Bakterien in dieser Kultur haben aber die Fähigkeit auch ohne diesen Nährstoff zu wachsen. Bringt man nun diese Bakterienkultur auf eine Agarplatte auf, in der dieser Nährstoff nicht enthalten ist, erzeugt man eine selektive Bedingung für diejenigen Bakterien, die auch ohne den Nährstoff wachsen können. Diese weiterhin wachstumsfähigen Bakterien wachsen zu Kolonien heran und können so leicht identifiziert und isoliert werden. Ein anderes Beispiel ist die Selektion für Bakterien, die bei einer erhöhten Temperatur wachsen können bei der die meisten anderen Bakterien absterben. Agarplatten, die bei dieser erhöhten Temperatur inkubiert werden, stellen dann selektive Bedingungen für diese temperaturresistenten Bakterien dar. Die durch Wachstum unter selektiven Bedingungen entstandenen Kolonien können dann einzeln ausgewählt werden und durch weitere Selektionsrunden von allen kontaminierenden Zellen befreit werden. Man erhält so einen klonalen Bakterienstamm mit den selektionierten Eigenschaften.

Selektion bietet also gewaltige experimentelle Möglichkeiten. Durch clever ausgewählte Selektionsbedingungen,

Bacterial Genetics in the Post Genome Era:

"Advances in DNA-sequencing technologies are drastically reducing both the time it takes to sequence DNA and the cost of DNA sequencing. We are quickly approaching a time when determining the sequences of a newly discovered bacterium might be one of the earliest experiments one does to more fully characterize the functions of a new species. In addition, there are also a number of examples where DNA from a particular environment or a consortium of organisms is chosen for DNA sequencing instead of that of a single organism derived from pure culture."

L. Snyder, *Molecular Genetics of Bacteria*

kann man auf einer einzigen Agarplatte aus einer Population von Milliarden bakterieller Zellen eine einzelne Zelle isolieren, welche die gewünschte Eigenschaft hat. Dies wäre vergleichbar mit der Fähigkeit innerhalb der gesamten Weltbevölkerung einige wenige Menschen ausfindig zu machen, die ein bestimmtes Merkmal besitzen.

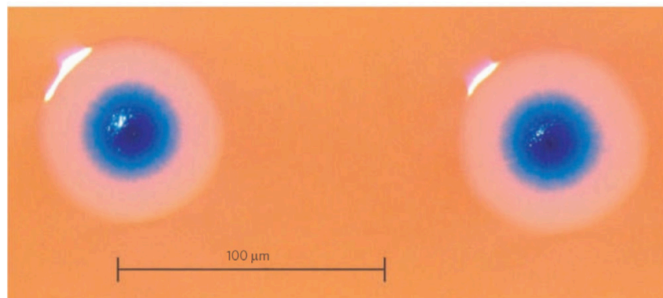


Abbildung 7 Ein blauer Farbstoff markiert bakterielle Kolonien die aus einer einzelnen, ein künstliches Genom enthaltenden Zelle herangewachsen sind. (Gibson et al. *Nature* 465, 2010)

Synthetische Genomik

Fortschritte in der DNA-Synthese und DNA-Rekombination ermöglichen die Herstellung von immer längeren DNA-Molekülen, für die der Forscher die Sequenz auf der Ebene der einzelnen Basenpaare frei bestimmen kann. Inzwischen ist es dadurch möglich, gesamte bakterielle Genome synthetisch herzustellen und nach Belieben zu verändern. Das so entstandene Feld der synthetischen Genomik (engl. synthetic genomics) erlebte seinen Durchbruch im Jahr 2010. In diesem Jahr gelang es Forschern eine Variante des gesamten Genoms von *Mycoplasma mycoides* in Teilstücken zu synthetisieren, diese Teilstücke durch Rekombination zusammenzusetzen und das natürliche Genom einer *Mycoplasma mycoides* Zelle durch dieses synthetische Genom zu ersetzen. (Der entsprechende Artikel Gibson et al. befindet sich auf Moodle im Abschnitt „weiterführende Literatur“ zum Download.) Weitere Fortschritte in der synthetischen Genomik sollten es in der Zukunft möglich machen, Bakterien von Grund auf neu zu entwerfen und für bestimmte Anwendungen masszuschneiden. Die Entwicklung solcher komplett neu entwickelten Bakterien wird besondere Sicherheitsmechanismen beinhalten müssen und wirft ethische Fragen auf, welche die gesamte Gesellschaft betreffen. Bakterien mit synthetischen Genomen bieten aber auch ungeahnte Möglichkeiten für sowohl industrielle, als auch medizinische Anwendungen. Auch in grundlegenden biologischen Fragen, wie z.B. der Frage nach den minimalen genetischen Anforderungen, die für einen freilebenden Organismus nötig sind, bieten solche Bakterien neue Möglichkeiten.

Diese Beispiele zeigen wie Bakterien durch ihre besonderen experimentellen Eigenschaften eine zentrale Rolle in

der Entwicklung der molekularen Genetik und der rekombinanten DNA-Technologie spielen konnten. Die Entwicklungen im Bereich der molekularen Genetik, die zurzeit stattfinden, sind nur vergleichbar mit den dramatischen Umwälzungen in der Chemie im frühen 19. Jahrhundert und in der Physik in den 20er und 30er Jahren des letzten Jahrhunderts und werden unsere Welt ebenso nachhaltig verwandeln.

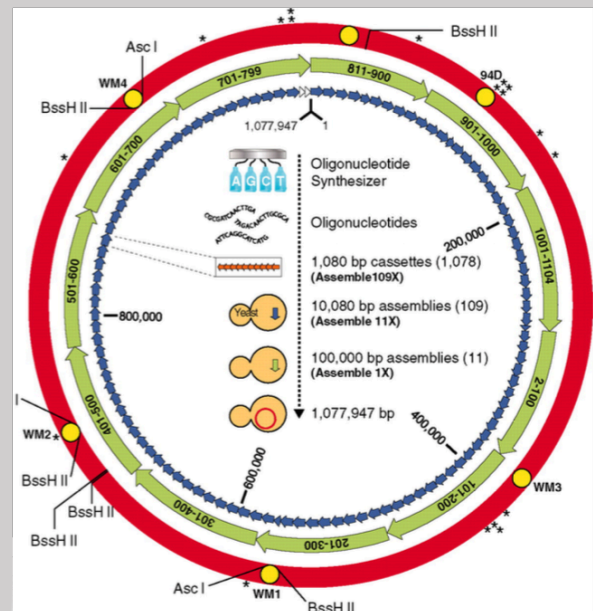


Abbildung 8 Strategie zur Herstellung des ersten synthetischen Genoms von *M. mycoides* durch Rekombination synthetischer DNA Elemente in Hefe (aus Gibson et al. *Science* 329, 2010)

Das erste synthetische Bakterien-Genom

Im Jahr 2010 haben Forscher aus dem Craig Venter Institut in einem mehrstufigen Prozess das erste synthetische Genom erstellt. Im ersten Schritt wurden chemisch synthetisierte Oligonukleotide zu 1080 bp langen DNA-Abschnitten zusammengesetzt. Jeweils 10 dieser Abschnitte wurden miteinander verknüpft, um insgesamt 109 ca. 10 kb lange DNA Abschnitte (blaue Pfeile) zu produzieren. Jeweils 10 dieser Abschnitte wurden wiederum zu insgesamt 11 ca. 100 kb Abschnitten verknüpft (grüne Pfeile). Im letzten Schritt wurden diese 11 Abschnitte rekombiniert und so erhielt man das komplette Genom (roter Kreis). Mit Ausnahme von zwei Abschnitten (weisse Pfeile) wurden alle Abschnitte durch in vivo homologe Rekombination miteinander verbunden. Die wichtigsten Änderungen relativ zum natürlichen *M. mycoides* Genom sind als gelbe Kreise angezeigt. Diese beinhalten vier Regionen, die als „molekulare Wasserzeichen“ (engl. water mark) dienen (WM1 – WM4), eine 4 kb lange Region, die absichtlich entfernt wurde (94D), sowie genetische Elemente, die DNA-Replikation in Hefe und die Genom Transplantation in *M. mycoides* ermöglichen.

Genetische Variabilität in Bakterien

Eine der Schlüsseigenschaften alles Lebens ist, dass durch genetische Variationen neue Eigenschaften entstehen können. In eukaryotischen Zellen ist die Hauptquelle der genetischen Variabilität der Prozess der Meiose, in dem das genetische Material der Eltern miteinander vermischt und neu kombiniert wird. Wie erzeugen Bakterien diese Variabilität, wo sie sich doch asexuell, also ohne Meiose, fortpflanzen? Die drei Hauptquellen genetischer Variationen in Bakterien sind Mutation, Rekombination und der Austausch genetischer Information. In folgenden Abschnitt werden wir betrachten wie durch Mutationen genetische Variation entsteht und wie wir Mutationsanalysen benutzen können, um zu verstehen, wie zelluläre Funktionen in bakteriellen Genomen programmiert sind.

Physiologische Variation

Bevor wir jedoch genetische Variationen besprechen sei hier noch darauf hingewiesen, dass zwischen bakteriellen Zellen auch physiologische Unterschiede bestehen können, selbst wenn die Zellen genetisch identisch sind. Solche physiologischen Variationen sind Veränderungen, die dadurch entstehen, dass jede Zelle eine leicht unterschiedliche Umgebung und auch eine leicht unterschiedliche Wachstumsgeschichte hat und sich vielleicht in einer anderen Phase des Zellzyklus beendet. Durch diese physiologischen Unterschiede reagieren zwei Zellen möglicherweise unterschiedlich auf denselben externen Stimulus, selbst wenn sie genetisch identisch sind. Im Gegensatz zu genetischen Variationen werden diese physiologischen Variationen aber nicht vererbt.

Genetische Variation

Populationen von Bakterien sind niemals wirklich 100% genetisch homogen. Lässt man eine einzelne Bakterienzelle in einer 1 ml Wachstumslösung bis zur maximalen Zelldichte von 10^9 Bakterien heranwachsen so entspricht dies ca. 30 Generationen. Angesichts der Häufigkeit vieler Mutationstypen (siehe Abbildung 9) und der Grösse der bakteriellen Genome, kann man sich klarmachen, dass während dem Heranwachsen einer solchen Kultur ständig Zellen mit neuen Mutationen entstehen. Die Zellen in einer Kultur unterscheiden sich also nicht nur auf der physiologischen Ebene, sondern auch auf der genetischen Ebene – selbst wenn sie alle aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen sind.

Mutationsraten

Der Begriff der Mutationsrate wird in der genetischen Fachliteratur für zwei miteinander verknüpfte aber separate Konzepte verwendet. Dies kann leicht zu Verwirrungen führen, weshalb hier die beiden Konzepte kurz einander gegenübergestellt sind. Zum einen gibt es die molekulare Mutationsrate, welche beschreibt wie häufig eine bestimmte molekulare Mutation pro DNA-Replikationszyklus auftritt. Ein Beispiel für eine solche Mutationsrate ist die Häufigkeit mit der bei der DNA-Replikation eine Basenpaarmutation auftritt (z.B. 1 Austausch pro 2×10^{10} replizierte Basenpaare). In Abbildung 9 sind einige dieser molekularen Mutationsraten aufgelistet.

Daneben gibt es auch eine vom Phänotyp her definierte „phänotypische“ Mutationsrate, die im folgenden Abschnitt genauer besprochen und hier einfach als „Mutationsrate“ bezeichnet wird. Diese Mutationsrate kann man als die Wahrscheinlichkeit definieren, dass innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls eine Mutation zu einem bestimmten Phänotyp auftritt. Mutationsraten für unterschiedliche Phänotypen können sich voneinander unterscheiden, weil Mutationen zu bestimmten Phänotypen viel häufiger auftreten, als Mutationen zu anderen Phänotypen. Die Gesamtmutationsrate ergibt sich dabei aus der Summe der Mutationsraten für all diejenigen Mutationsprozesse, die zu einem bestimmten Phänotyp führen können. Daraus ergibt sich, dass die Mutationsrate dann besonders hoch ist, wenn viele unterschiedliche molekulare Mutationen in der DNA den gleichen Phänotyp hervorrufen. Dieser Effekt lässt sich am Beispiel der Gesamtmutationsraten für die Entstehung der Histidin-Auxotrophie- und Streptomycin-Resistenz (abgekürzt His- bzw. Str^R) erklären.

An der Biosynthese der Aminosäure Histidin sind 11 Enzyme beteiligt, die von 11 unterschiedlichen Genen kodiert werden. Jedes dieser Enzyme hat einige hundert Aminosäuren und die Änderung vieler dieser Aminosäuren, oder die Deletion eines der vielen Basenpaare in diesen Genen (Inaktivierung durch frame shift Mutation siehe unten) oder jede andere Mutation, die auch nur ein einziges dieser 11 Gene inaktiviert, führt dazu, dass die Histidinsynthese unterbrochen wird. Mit anderen Worten es gibt sehr viele unterschiedliche Mutationen von denen jede alleine die Histidinsynthese unterbrechen kann. Trägt eine Bakterienzelle auch nur eine dieser vielen Mutationen, so kann sie nur noch wachsen, wenn dem Wachstumsmedium Histidin zugesetzt ist (His-Phänotyp).

Im Gegensatz dazu stehen Mutationen zum Streptomycin-Resistenz-Phänotypen. Streptomycin ist ein Antibiotikum, welches an einer spezifischen Stelle an das bakterielle Ribosom bindet und es dadurch blockiert. Streptomycinresistenz entsteht durch Mutationen, die das Ribosom so verändern, dass dieses Antibiotikum nicht mehr an das

Mutationstyp	Mutationsrate pro Nukleotid und Generation	Mutationsrate pro Genom und Generation
Basenpaarsubstitution	2×10^{-10}	0.92×10^{-3}
Stille Mutationen	5×10^{-11}	2.3×10^{-4}
Missense-Mutationen	$1,5 \times 10^{-10}$	6.9×10^{-4}
Nonsense-Mutationen	6×10^{-12}	2.76×10^{-5}
Indels (<4 bp)	2×10^{-11}	0.92×10^{-4}

Abbildung 9 Häufigkeit von spontanen molekularen Mutationsraten aufgeschlüsselt nach Mutationstypen basierend auf einer Genomgröße von 5 Millionen Basenpaaren.

Ribosom binden kann. Die Proteinsynthese-Funktion des Ribosoms darf dabei aber nicht beeinträchtigt werden, denn ein Ausfall der Proteinsynthese wäre natürlich letal. Es stellt sich heraus, dass es nur ganz wenige Mutationen gibt, welche die Streptomycin Bindung verhindern, aber gleichzeitig die Proteinsynthese-Funktion des Ribosoms erhalten. Diese Mutationen bewirken spezifische Aminosäuren-Änderungen an ganz bestimmten Positionen in einem einzigen ribosomalen Protein.

Im Gegensatz zu den vielen unterschiedlichen Mutationen in vielen unterschiedlichen Genen die alle einen His-Phänotyp hervorrufen, gibt es also nur ganz wenige spezifische Mutationen welche den Streptomycin-Resistenz-Phänotyp verursachen. Die Gesamtmutationsrate für den StrR-Phänotyp ist also viel geringer, als die für den His-Phänotyp. In Zahlen ausgedrückt tritt eine Zufallsmutation zum StrR-Phänotyp in nur einer von 10^{10} bis 10^{11} Zellen auf, wohingegen der His-Phänotyp in einer aus 10^6 bis 10^7 Zellen also 1000 Mal häufiger auftritt.

Die Mutationsrate mit der ein bestimmter Phänotyp auftritt, gibt uns also einen frühen Hinweis darauf, wie viele Gene an einem bestimmten biologischen Prozess beteiligt sind und ob diese Gene essentiell sind oder nicht. Fällt die Mutationsrate für einen bestimmten Phänotyp aber besonders hoch aus, kann dies ein Indiz dafür sein, dass es sich bei der zugrundeliegenden genetischen Veränderung nicht um eine Mutation im klassischen Sinne handelt. Stattdessen kann es sein, dass der neue Phänotyp durch den Verlust eines Plasmids oder durch einen vorprogrammierten Rekombinationsevent ausgelöst wird.

Eine extrem niedrige Mutationsrate ist hingegen oft ein Indiz dafür, dass für die Entstehung des neuen Phänotyps zwei oder mehr voneinander unabhängige Mutationen notwendig sind.

Arten von Mutation

Basenpaarsubstitution

Eine Basenpaarsubstitution ist eine Mutation bei der ein Basenpaar in der DNA durch ein anderes ersetzt wird z.B. die Substitution eines GC-Paars durch ein AT-Paar (aber auch die Umkehrung eines GC-Basenpaars in ein CG-Paar). Basenpaarsubstitutionsmutationen können spontan entstehen oder durch externe Faktoren (z.B. Bestrahlung oder chemische Stoffe) ausgelöst werden.

Wenn Mutationen ohne die Einwirkung von externen Faktoren auftreten, so bezeichnet man sie als spontane Mutation. Gründe für solche Mutationen sind bspw. das Einbauen einer falschen Base während der Replikation oder Reparatur der DNA. Mutationen, die durch die absichtliche Anwendung ionisierender Strahlung oder mutagener Chemikalien ausgelöst werden, werden als induzierte Mutationen bezeichnet.

Ob eine Basenpaarsubstitution einen detektierbaren Phänotyp auslöst, hängt natürlich davon ab, wo in der DNA-Sequenz diese Substitution stattfindet und durch welches neue Basenpaar das bestehende Basenpaar ausgetauscht wurde.

Selbst wenn die Basenpaarsubstitution in einen open reading frame (ORF) fällt, kann es sein, dass diese Substitution die Sequenz des dort kodierten Proteins nicht beeinflusst. Wenn z.B. die mutierte Base die dritte Position eines Codons betrifft, kann es sein, dass das resultierende Codon weiterhin für dieselbe Aminosäure kodiert. In einem solchen Fall bleibt die Sequenz des, von diesem ORF kodierten, Proteins trotz der Mutation unverändert. Der Grund dafür liegt in der Natur des genetischen Codes,

bei dem mehrere Codon-Sequenzen für dieselbe Aminosäure kodieren. Solche Mutationen, die in die protein-kodierende Sequenz eines Gens fallen, aber die Sequenz des kodierten Proteins nicht verändern, nennt man stille Mutationen (engl. silent mutations).

Es ist dabei wichtig eine solche stille Mutation von einer neutralen Mutation (engl. neutral mutation) zu unterscheiden. Der Begriff stille Mutation bezieht sich ausschliesslich auf Mutationen, welche zwar die Sequenz einer kodierenden DNA, nicht aber die Sequenz des kodierten Proteins verändert. Der Begriff neutrale Mutation ist hingegen sehr viel weiter gefasst und umschliesst alle jene Mutationen die irgendwo im Genom auftreten aber keine beobachtbaren phänotypischen Folgen haben.

In den folgenden Abschnitten besprechen wir nun Mutationen welche die Sequenz eines kodierten Proteins beeinflussen.

Missense-Mutationen

Wie oben beschrieben, bestehen bakterielle Genome zum grössten Teil aus proteincodierenden Sequenzen. Die meisten Basenpaarsubstitutionsmutationen in bakterieller DNA führen also dazu, dass in der Sequenz eines Proteins eine Aminosäure durch eine andere ausgetauscht wird. Eine solche Mutation wird als Missense-Mutation bezeichnet. Aber nicht jede Missense-Mutation führt automatisch zur Inaktivierung des betroffenen Proteins. Wenn die ursprüngliche und die neue Aminosäure ähnliche Eigenschaften haben, kann es durchaus sein, dass die Mutation die Funktion des betroffenen Proteins nicht verändert. Zum Beispiel würde eine Basenpaarsubstitutionsmutation, die eine Glutaminsäure durch eine andere Aminosäure mit Säurefunktion (z.B. Asparaginsäure) ersetzt, wahrscheinlich einen geringeren Einfluss auf die Funktion des Proteins haben, als eine Basenpaarsubstitutionsmutation, in der diese Glutaminsäure durch eine basische Aminosäure (z.B. Arginin) ersetzt wird. Es macht auch einen Unterschied, wo in einer Proteinstruktur die Substitution einer Aminosäure stattfindet. Einige Aminosäuren sind absolut essentiell für die Funktion oder Struktur eines Proteins. Eine Basenpaarsubstitutionsmutation die zum Austausch einer solchen Aminosäure führt, würde also die Funktion des betroffenen Proteins komplett zerstören. Dahingegen gibt es in fast allen Proteinen auch eine ganze Reihe von Aminosäurepositionen, an denen das Auswechseln einer Aminosäure keinen oder nur einen minimalen Effekt auf die Funktion hat. Forscher benutzen diese Tatsache oft um herauszufinden welche Aminosäuren essentiell für die Funktion eines Proteins sind.

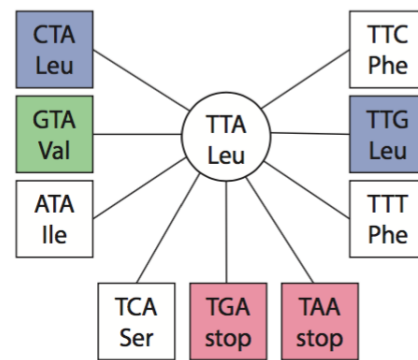


Abbildung 10 Die Konsequenzen von Basensubstitutionsmutationen auf das für Leucin codierende TTA Codon. In diesem Codon sind 9 unterschiedliche Basensubstitutionen möglich. Zwei der möglichen Substitutionen (blau) resultieren in Codons (TTG CTA) die weiterhin für Leucin codieren (synonyme Codons). Diese Mutationen haben also keinen Effekt auf die Sequenz des kodierten Proteins und werden deshalb als silent mutations bezeichnet. Zwei weitere der möglichen Substitutionen (ATA und GTA) verändern die kodierte Aminosäure. Aber die resultierende Aminosäure (Isoleucin bzw. Valin) ist in ihrer chemischen Struktur Leucin so ähnlich, dass diese Substitution die Struktur und Funktion des Proteins vermutlich kaum beeinflusst. Dies wäre dann ein Beispiel für eine neutrale Mutation. Die Codons TTC und TTT codieren jeweils für Phenylalanin und das Codon TCA für Serin. Phenylalanin und Serin sind Leucin schon weniger ähnlich. Diese Substitutionen könnten also die Faltung und Funktion des Proteins beeinflussen. Die zwei übrigen, in Rot angezeigten Codons (TGA und TAA) sind Nonsense Codons (auch Stop Codons genannt) welche die Synthese des Proteins terminieren. Das resultierende, verkürzte Protein ist wahrscheinlich nicht funktionsfähig.

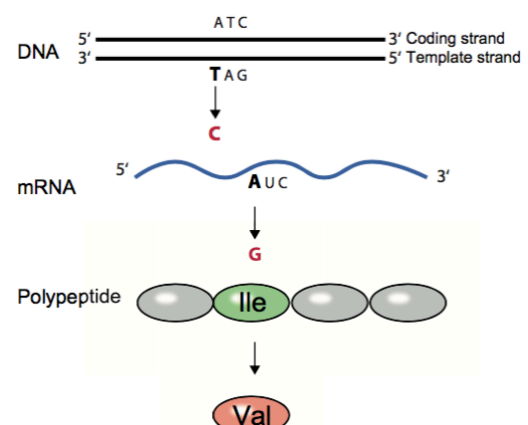


Abbildung 11 Missense-Mutationen: Eine Basenpaarsubstitution die das TA Basenpaar im DNA Doppelstrang durch ein GC Paar austauscht, resultiert in einer mRNA in der das ursprüngliche A durch ein G ausgetauscht ist. Durch diese Mutation entsteht aus dem für Isoleucin codierenden Codon AUC das für Valin codierende Codon GUC.

Nonsense-Mutationen

Anstatt ein Codon für eine bestimmte Aminosäure in ein Codon für eine andere Aminosäure zu verwandeln, können Basenpaarsubstitutionsmutationen auch ein für eine Aminosäure codierendes Codon in eines der drei Nonsense-Codons bzw. Stop-Codons (UAA, UAG oder UGA) verwandeln. Eine solche Mutation bezeichnet man als Nonsense-Mutation (Abbildung 12). Die molekularen Mechanismen, die zu einer solchen Nonsense-Mutation führen, unterscheiden sich nicht von denen, welche die anderen oben beschriebenen Basenpaarsubstitutionsmutation hervorrufen.

Die funktionalen Konsequenzen einer Nonsense-Mutation sind jedoch sehr verschieden. Nonsense-Codons zeigen normalerweise das Ende eines Gens an und werden von sogenannten release factors erkannt, welche die Ablösung der entstehenden Polypeptide vom Ribosom verursachen. Wenn also durch eine Basenpaarsubstitutionsmutation innerhalb eines ORFs ein Nonsense-Codon entsteht, führt dies zu einem verfrühten Abbruch der Proteinsynthese und es entsteht eine verkürzte Version des Proteins. Solche verkürzten Proteine sind nur sehr selten funktionstüchtig, insbesondere, wenn das Nonsense-Codon früh in der Sequenz auftritt.

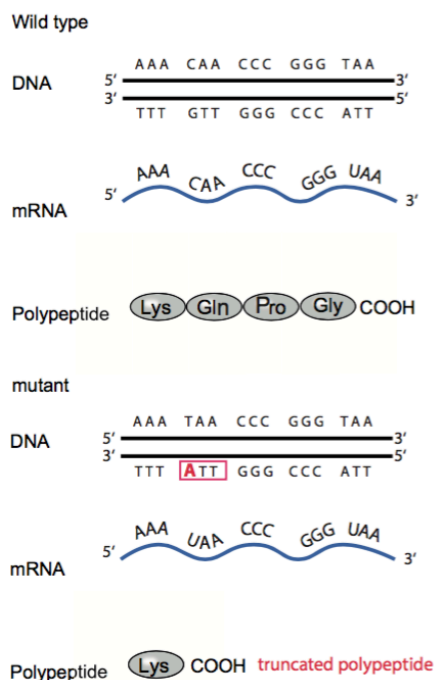


Abbildung 12 Nonsense-Mutation: Die durch eine Basenpaarsubstitution erzeugte Änderung des für Glutamin (Gln) codierenden CAA Codons in das UAA Nonsense Codon führt zu einem Abbruch der Translation und somit zu einem verkürzten Protein.

Frameshift-Mutationen

Eine weitere Klasse der spontan auftretenden Mutationen, sind sogenannte Frameshift-Mutationen (Abbildung 13). Diese Art von Mutation entsteht, wenn zu der DNA-Sequenz eines ORFs eine oder mehrere Basenpaare hinzugefügt oder aus ihr entfernt werden. Eine solche Mutation führt zu einer Verschiebung des Leserasters mit dem die proteincodierende Sequenz abgelesen wird und stellt so den gesamten Sinn der Sequenz. Die Ausnahme bilden Mutationen bei denen 3, 6, 9 usw. Basenpaare eingefügt oder entfernt werden. Diese Mutationen erhalten das Leseraster und führen „nur“ zu der Einfügung oder der Entfernung einer entsprechenden Anzahl von Aminosäuren. Je nachdem wo genau in der Proteinstruktur diese Aminosäuren eingefügt oder entfernt werden, kann die Funktion des Proteins entweder stark oder kaum beeinflusst werden.

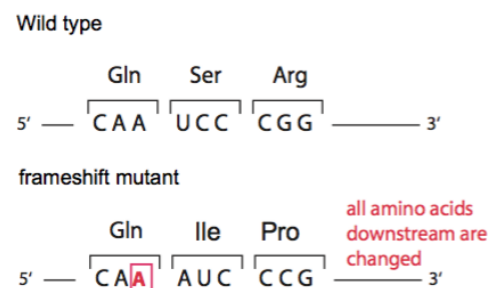


Abbildung 13 Frameshift-Mutation: Die wildtyp mRNA codiert für die Proteinsequenz Glutamin (Gln), Serin (Ser), Arginin (Arg) usw. Durch die Insertion eines zusätzlichen Adenins (rot) in die Gensequenz entsteht eine Frameshift-Mutation so dass die codierte Proteinsequenz zu Glutamin (Gln), Isoleucin (Ile), Prolin (Pro) usw. wechselt. Es werden dabei nicht nur die gezeigten Aminosäuren geändert, sondern alle nachfolgenden Aminosäuren auch, bis ein durch die Frameshift-Mutation entstandenes Nonsense Codon erreicht wird und die Synthese der Proteinkette abbricht.

Klassische genetische Analyse in Bakterien

Isolierung von Mutanten

Eine klassische genetische Analyse beginnt mit der Suche nach Mutanten, in denen die zu untersuchende Funktion verändert ist. Der Prozess eine solche Mutante in einem sehr grossen Pool aus nicht mutierten Organismen zu finden, nennt sich Isolierung. Die Entwicklung der Strategie, mit der man diese Isolierung erfolgreich durchführen kann, ist vermutlich der interessanteste Aspekt einer genetischen Studie. Man muss sich vorstellen können, in welchem Phänotyp sich Mutationen in dem, an einem bestimmten Prozess beteiligten Gen manifestieren könnten

und wie man Bakterien mit diesem Phänotyp durch Selektion oder Screening isolieren kann. In der Entwicklung dieser Strategie kann ein bakterieller Genetiker sein ganzes Können zeigen, denn hier sind sowohl Intuition und Kreativität, als auch konsequentes rationales Denken gefragt. Das Screenen nach mutierten Bakterien basiert meist auf der Auswahl von selektiven Wachstumsbedingungen unter denen die gesuchten Mutanten von nicht mutierten Wildtyp-Bakterien unterschieden werden können. Es handelt sich dabei meist um Bedingungen unter denen sich entweder die Mutanten oder die Wildtyp-Bakterien nicht vermehren und so keine Kolonien formen können. Man bezeichnet in diesem Zusammenhang die Agarplatten oder das Wachstumsmedium in dem die selektiven Bedingungen herrschen, als selektive Platten bzw. als selektives Medium.

Selektion von Mutanten



Abbildung 14 Selektion von Mutanten unter Bedingungen, unter denen nur die Mutanten, aber nicht die Wildtyp-Bakterien wachsen können. Die Mutanten sind in Gelb gezeigt.



Abbildung 15 Verfahren für genetische Screens mittels der Replikaplatting. Gezeigt ist ein Screen für Mutanten die nicht ampicillinresistent sind. Von Mutanten geformte Kolonien sind in Rot angezeigt.

Manchmal ist es möglich, Mutanten direkt aus einem grossen Pool von Wildtyp-Bakterien (Bakterien, die nicht mutiert sind) heraus zu selektieren. Diese Herangehensweise wird manchmal als positive Selektion bezeichnet. Dabei sind die Selektionsbedingungen so gewählt, dass

sich nur die gesuchten Mutanten, aber nicht die Wildtyp-Bakterien vermehren können. Dieser Ansatz fällt in die Kategorie der selektiven Genetik, die es erlaubt, selbst sehr seltene Mutanten mit grosser Effizienz zu identifizieren. Die selektive Genetik stellt daher ein sehr leistungsfähiges und wertvolles Werkzeug für die Untersuchung zellulärer Funktionen dar. (Abbildung 14) zeigt den Selektionsansatz am Beispiel eines Experiments, bei dem ein Antibiotikum die selektiven Bedingungen erzeugt.)

Screenen nach Mutanten ohne Selektion

Leider ist es für sehr viele Arten von Mutanten nicht möglich, Wachstumsbedingungen zu finden, unter denen nur diese Mutanten, aber nicht die Wildtyp-Bakterien wachsen. Eine Selektion, wie oben beschrieben, ist dann nicht möglich. Meist gibt es aber umgekehrt Wachstumsbedingungen unter denen die Wildtyp-Bakterien wachsen aber nicht die Mutanten. In solchen Fällen geht man folgendermassen vor:

Zunächst werden die Bakterien auf normalen, nicht selektiven Agarplatten „ausgesät“. Auf diesen Platten können sowohl der Wildtyp als auch die Mutanten wachsen. Nachdem sichtbare Kolonien entstanden sind, werden von jeder dieser Kolonien einige Bakterien auf Agarplatten transferiert auf denen selektive Bedingungen herrschen. Die Wildtyp-Bakterien können sich unter diesen selektiven Bedingungen weiterhin vermehren und werden also auch hier Kolonien formen. Die Mutanten hingegen können sich unter den selektiven Bedingungen nicht vermehren und formen daher keine Kolonien. Man weiss also nun welche, der unter den nicht selektiven Bedingungen gewachsenen Kolonien aus Wildtyp-Bakterien und welche aus Mutanten bestehen und kann so die Mutanten isolieren. Da Mutanten generell selten sind, muss man in der Regel sehr viele Kolonien screenen, bevor man eine Mutantenkolonie mit dem gesuchten Wachstumsphänotyp findet. Um diesen Screening-Prozess effizienter zu gestalten, wurde die Methode des replica plating entwickelt (Abbildung 15).

Die wichtigsten Unterschiede zwischen Selektion und Screening

Der entscheidende Unterschied zwischen den auf Selektion und auf Screening basierenden Methoden zur Isolierung von Mutanten liegt in der *power of resolution*, also der Fähigkeit, selbst selten auftretende Mutanten zu identifizieren. Eine gute Selektion kann Mutanten identifizieren, selbst wenn diese nur mit einer Wahrscheinlichkeit von weniger als 10^{-10} auftreten (d.h. nur eine in 10 Milliarden Zellen enthält eine entsprechende Mutation). Screens haben typischerweise eine wesentlich geringere *power of resolution* und können Mutanten in der Regel nur dann finden, wenn sie mit einer Wahrscheinlichkeit von

10^{-2} bis 10^{-4} auftreten. Ausgiebigere Screens zur Auffindung von selteneren Mutanten sind prinzipiell möglich, sind dann aber mit erheblichem experimentellem Aufwand verbunden. Der Unterschied in der *power of resolution* bestimmt also nicht nur wie selten eine Mutation sein kann um noch über einen bestimmten Ansatz isoliert zu werden, sondern beeinflusst auch den Arbeitsaufwand, der dazu nötig ist. Die Fähigkeit eine clevere Selektion zu entwerfen, mit der man Mutanten isolieren kann, wo andere glauben, dass dies nur durch einen aufwendigen Screen möglich sei, gilt daher als Zeichen eines wirklich brillanten Genetikers. Oder wie David Botstein sagt:

„Eine Selektion ist besser als tausend Screens.“

Die Zuordnung von Mutanten

Moderne Techniken haben die Art und Weise, in der genetische Analysen durchgeführt werden, grundlegend verändert. Heutzutage kann man innerhalb ca. einer Woche und für unter hundert Dollar die gesamte DNA eines bakteriellen Genoms sequenzieren und mit Hilfe von bestehenden Referenzgenomen zu einer kompletten Genomsequenz zusammensetzen. Dadurch ist es oft möglich, direkt den genauen Ort einer Mutation zu bestimmen, obwohl insgesamt vielleicht erst sehr wenig über dieses Bakterium bekannt ist. Durch Datenbanksuchen nach den die Mutation flankierenden Sequenzen, findet man ausserdem oft verwandte Gene, deren Funktion bereits bekannt ist und kann so auf eine mögliche Funktion des mutierten Gens schliessen.