

Kapitel 2 – Intro

2.1 og 2.2) Lysmikroskopi (s. 26)

- Resolutionen (evnen til at skelne mellem to nærliggende objekter som separate) er afgørende for, hvad man kan se med lysmikroskop og ikke forstørrelsen
- Lysmikroskop-resolution er 0,2 μm
- Lysmikroskop, der bruger synligt lys, findes i flere typer:
 - **Lysfeltmikroskopi:** her ses forskelle i absorption, objekter visualiseres grundet kontrastforskelle (densitet), der eksisterer mellem dem og det omgivende medium. Bakterieceller er svære at se i lysfeltmikroskopi grundet manglende kontrast med omgivende medium (farvestoffer kan dog bruges til at farve cellerne, hvormed kontrasten øges, men dog dræbes cellerne)
 - **Fase-kontrast mikroskopi:** her ses forskelle i brydningsindex og bruges, når levende ufarvede bakterier skal undersøges, fx for egentbevægelighed.
 - **Mørkfeltmikroskopi:** lysmikroskop, hvor lys når objektet fra siderne kun. Det eneste lys, der når linsen, er spredt af objektet, hvorfor man ser objektet lys på en mørk baggrund
- Neddypning i olie øger lysintensiteten af linsen

2.2 og 4.7) Gram-farvning (s. 27 og s. 84)

- **Krystal-violet-iod-kompleks:** bakterierne optager farven
- **Affarvning med ethanol:** gram-positive beholder farven grundet deres tykke peptidoglykan-lag, der dehydreres med alkohol, så porerne i væggen lukker og indkapsler farvekomplekset i bakterien. Gram-negative med deres meget tynde peptidoglykan-lag affarves ved, at ethanolen trænger ind igennem den lipidrige ydre membran og ekstraherer farvekomplekset ud af cellen.
- **Farvning af gram-negative:** med fx safranin

Gram-positive: violette/blå	Gram-negativ: røde
Bacillus, Clostridium, Carynebakterium diphteriae, Lactobacillus, Staphylococcus aureus/epidermidis, Streptococcus	E. Coli, Pseudomonas aerugionosa, Salmonella, Vibrio cholerae

Kapitel 4 – Cellestrukturer

4.5) Transportsystemer (s. 75)

- Der findes mindst 3 transportsystemer i bakterier: simpel transport, gruppe translokation og ABC-systemet.
- 3 transportudfald:
 - **Uniport:** proteiner, der transporterer et molekyle envejs gennem membranen
 - **Symporter:** proteiner der transporterer et molekyle med anden substans, typisk proton
 - **Antiporter:** proteiner, der transporterer to molekyler gennem membranen i hver deres retning

Simpel transport: fx Lac Permease hos Escherichia Coli

- Simpel-transporteren, **Lac permease**, er en symporter, der transporterer laktose ind i E. Coli.
 - Energiforbrug gennem proton-drivkraft med cotransport af proton til cytoplasma (positiv ladning uden for membran og negativ i cytoplasma)

Gruppe-translokation: fx Phosphotransferase systemet

- Glukose, mannose og fruktose modificeres ved phosphorylation ved transport med phosphotransferase systemet i E. coli.

Periplasmisk-bindeproteiner og ABC-system

- I gram-negative bakterier:
 - **Periplasmisk-bindeproteiner:** transportproteiner i periplasma
 - **ABC-transport system:** transportsystem bestående af periplasmisk bindeproteiner koblet med en membrantransporter og ATP-hydrolyserende protein. De har høj substrataffinitet
- I gram-positive bakterier:
 - **ABC-transport systemet:** ingen periplasmisk bindeproteiner og i stedet specifik substrat-bindeproteiner bundet til det ydre lag af cytoplasmamembranen

Protein-eksport

- Transport af store molekyler som fx proteiner hos bakterier foregår vha. proteiner kaldet **translocaser**.
- **Sec-systemet:** (sec fra secretory=sekretion) et væsentligt translocase
- Protein-eksport er essentiel, idet mange bakterielle enzymer virker uden for cellen, **exoenzymer**, fx amylase eller cellulase der spalter hhv. stivelse eller cellulose til glukose, uden for cellen

4.6) Cellevægge hos bakterier (s. 78)

- Cellevægges funktion:
 - giver form og stivhed til bakterier
 - forhindrer **lysis**, ødelæggelsen af cellemembran grundet det osmotiske tryk inde i cellen fra den høje koncentration af opløste stoffer i cellen.

Peptidoglycan

- Bakteriers cellevæg er peptidoglycan (hos gram-negative er der ekstra lag)
- **Peptidoglycan:** polysakkarid bestående af to sukkerderivater, N-acetylglucosamine og N-acetylmuraminsyre og nogle aminosyrer, fx L-alanin, D-alanin. Bestandsdelene forbinder sig til en gentagende struktur, glycan-tetrapeptid.

Cellevægge hos gram-positive bakterier

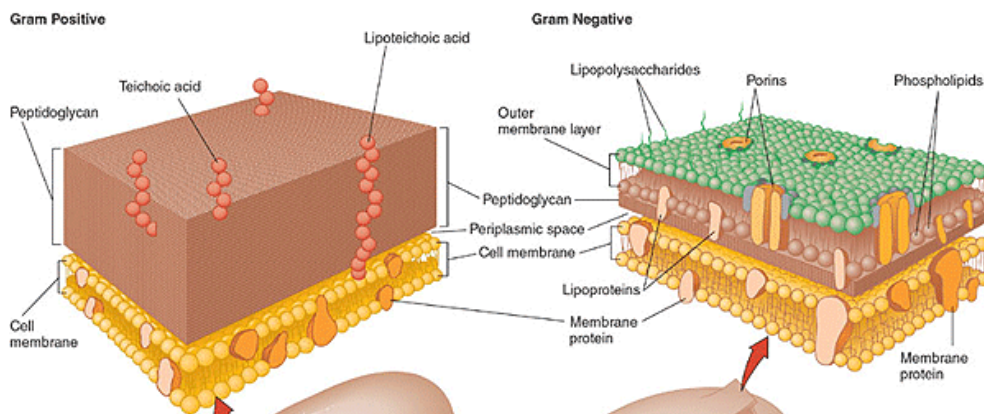
- 90% af cellevæggen består af flere lag peptidoglycan
- Mange gram-positive har **teichoinsyre** indlejret i cellevæggen, der grundet dens negative ladning er delvis ansvarlig for celleoverfladens negative ladning (nogle teichoinsyrer er kovalent bundet til membranlipidet, hvorfor de kaldes lipoteichoinsyrer)

Lysozyme og protoplast

- Enzymet, **lysozyme** kan ødelægge peptidoglycan ved at bryde β -1,4-glykosidbindingen mellem N-acetylglucosamin og N-acetylmuraminsyre, hvorved vand kan trænge igennem og lysere cellen
- **Protoplast:** en bakterie, der har mistet dens cellevæg uden at lysere (under isotoniske forhold hvor lysozyme bruges til at nedbryde peptidoglycanlaget uden at vand trænger igennem til cellen)
 - Nogle protoplaster kan overleve i naturen, fx **mycoplasmas** (gruppe patogene bakterier), fordi de enten har en ualmindelig stærk cytoplasmamembran eller lever i osmotisk beskyttet miljø.

4.7) Gram-negatives ydre membran (s. 82)

- 10% af cellevæggen består af peptidoglycan
- Resten er **lipopolysakkarid-lag (LPS)**, der er et ekstra dobbelt lipidlag, der udover phospholipid og proteiner også indeholder polysakkarid.
 - Polysakkarid-delen består af: core(=kerne) polysakkarid og O-polysakkarid
 - Lipid-delen af LPS, kaldes **lipid A**
 - LPS erstatter det meste af phospholipiderne i den ydre halvdel af den ydre membran, mens strukturen af den indre halvdel minder mere om den cytoplasmatiske membran, dog indeholder den stadig lidt lipoprotein



Endotoxiner

- Den ydre membran er toksisk/giftig for dyr, og de toksiske egenskaber stammer fra lipid A
- **Endotoxin:** refererer til denne toksiske del af LPS, dvs. lipid A

Poriner

- Modsat plasmamembranen, er den ydre membran hos gram-negative, gennemtrængelig for små molekyler grundet tilstedeværelsen af proteinerne, **poriner**, men er dog ikke gennemtrængelig for enzymer eller andre store molekyler
- **Poriner** fungerer som kanal for ind- og udgang for hydrofile, lav-molekylære stoffer
 - **Ikke-specifikke poriner:** vandfyldte kanaler, hvorigennem ethvert lille stof kan passere
 - **Specifikke poriner:** indeholder et bindingssted for strukturrelaterede stoffer

Periplasma

- **Periplasma:** området mellem den ydre membran og plasmamembranen, hvor der er flere typer proteiner, der holdes tilbage af den ydre membran. De fleste af disse proteiner kommer til periplasmaet via Sec-protein-eksport-systemet.

4.9) Celleoverfladelag (s. 86)

- Mange prokaryote organismer udskiller slimet materiale på deres celleoverflade, der består af polysakkarid/protein. De kaldes "kapsler" og "slim-lag" og har til funktion at hjælpe til at binde mikroorganismene til faste overflader, fx overfladen af værtvæv.
 - **Kapsler:** hvis materialet er tykt og bundet sikkert til cellevæggen
 - **Slim-lag:** hvis materialet er mere let-formet og er bundet mere løs til cellevæggen

Fimbriae og Pili (ental: pilus)

- De er trådformede strukturer af protein, der strækker ud fra overfladen af celler
- **Fimbriae:** gør det muligt at klæbe ved overflader, fx dyrevæv, fx hos Salmonella
- **Pilus:** ligesom fimbriae men er længere og kan være receptor for bestemte vira

4.12) Endosporer (s. 91)

- Nogle bakterier producerer strukturer kaldet endosporer gennem sporulation-processen.
- **Endosporer** virker som en overlevelsesstruktur i hårde tider, fx ved høje temperaturer, tørke eller næringsmangel.
 - Bacillus og Clostridium er de bedst studerede endospore-formerende bakterier
 - Evnen til at producere endosporer er kun fundet hos en bestemt slægt af grampositive bakterier

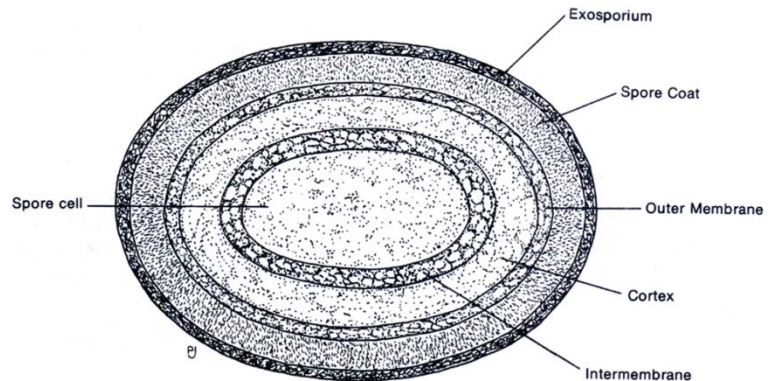
Endospore-formering

- Sporulation finder sted, når cellen er stoppet med vækst, når fx et essentielt næringsstof som carbon er begrænset

- Endosporer kan relativt hurtigt vende tilbage til en vegetativ celle igen og processen består af tre trin:
 - **Aktivering:** at varme nylig formede endosporer i få minutter
 - **Spiring:** ved tilstedeværelse af specifikke næringsstoffer (bestemte aminosyrer, fx alanin)
 - **Udvækst:** synlig svulmen grundet vandindtagelse og syntese af ny RNA, protein og DNA, og cellen begynder nu med vegetativ vækst igen

Spore-struktur

- Endosporer er strukturmæssigt mere komplekse end vegetative celler
- Yderste lag er **exosporium**, tyndt protein lag, hvorunder er **sporekappen** med flere lag spore-specifikke proteiner, hvorunder er **cortex** (bark) med løstsiddende peptidoglykan, og inden i cortex er kernen med kernevæg, plasmamembran, cytoplasma, nucleoid, ribosomer m.m.
- **Dipicolinsyre** er karakteristisk hos endosporer og mangler hos vegetative celler



Endosporekernen og SASP'er

- Spore-kernen er meget forskellig fra den vegetative celle, den var formet af
- Kernen dehydreres gennem sporulation, hvilket øger varmemodstanden af makromolekylerne i sporen (nogle sporer kan modstå varme op til 150 grader) og kan give modstand til kemikalier som hydrogenperoxid, H₂O₂
- Spore-kernen indeholder høj koncentration af **small-acid-soluble-proteins (SASP)**, som har 2 funktioner:
 - Binder sig tæt til DNA og beskytter den mod skade fra ultraviolet stråling, udtørring og tør varme.
 - Fremstår som carbon- og energikilde ved udvæksten af nye vegetative celler i spiringsprocessen

Sporulationsprocessen

- Bacillus subtilis sporulationsproces:
 - Processen tager ca. 8 timer
 - Begynder med assymetrisk celledeling
 - Mere end 200 gener er specifikke til processen
 - Syntesen af proteiner nødvendige for funktionen af vegetative celler skal stoppes
 - Specifikke endospore-proteiner skal fremstilles

Kapitel 5 – Næring

5.1-5.3) Mikrobiel næring (s. 108)

- **Heterotrofe:** organismer, der bruger organiske forbindelser for carbon og energi
- **Autotrofe:** organismer, der er i stand til at bygge alle deres cellulære strukturer fra CO₂
- Ved tørvægt: bakterie indeholder 50% carbon og 12% nitrogen

- E. coli kan vokse i et simpelt defineret medium, dvs. at det kan syntetisere alle dets organiske bestandsdele fra en enkel carbonkilde.

Kapitel 6 – Mikrobiel vækst

6.1) Cellevækst og binær fission (s. 142)

- Mikrobiologisk vækst: forøgelse af celleantal
- **Binær fission:** når en celle deles i to nye celler
- **Septum:** skillevæg, når en celle som fx E. coli bliver ca. dobbelt så lang og deles derefter i to nye celler ved septum
- **Generationstid:** tiden, der går, for at en celle deles i to
- **Balanceret vækst:** når de cellulære bestandsdele vokser proportional i perioden af en generation
- Generationstiden for en kultur af E. coli er ca. 20 min.

6.2) Fts proteiner og celledeling (s. 142)

- **Fts** (filamentous (=trådformede) temperature sensitive) proteiner er essentielle for celledeling hos prokaryote
- **FtsZ** er et vigtigt Fts protein, der har været studeret grundigt hos E. coli og hos andre bakterier

Fts-proteiner og celledeling

- Fts proteiner interagerer og danner et "celle-delings-apparat" kaldet **divisom**
 - Hos stav bakterier begynder divisom-dannelsen med, at **FtsZ** forbinder sig i en ring præcis rundt om centret af cellen og definerer derved celledelingsplanen
 - Ringen tiltrækker andre divisom-proteiner, inkl. **FtsA** (hjælper til at forbinde ringen til plasmamembranen og rekrutterer andre divisom proteiner) og **ZipA** (et anker, der forbinder ringen til plasmamembranen og stabiliserer den)



- Divisom dannes et godt stykke efter, at forlængelsen af cellen er startet (hos E. coli fx dannes den $\frac{3}{4}$ inde efter celledelingsbegyndelsen)
- Divisomet indeholder også Fts proteiner nødvendige for peptidoglykan-syntesen, fx **FtsI**, som er et af flere **penicillin-bindeproteiner** (dvs. de blokeres af penicillin)
- Hos kokker vokser cellevæggen i modsat vej ud fra FtsZ-ringen, mens den vokser flere steder langs cellen hos stav-bakterier.

DNA replikation, Min-proteiner og celledeling

- DNA replikeres før FtsZ-ringen dannes
 - Ringen dannes i rummet mellem de dupliserede nukleoider, idet de før isoleringen blokerer for dannelsen af ringen
- **Min-proteiner** letter dannelsen af ringen i det ønskede sted
 - **MinD** findes som en spiral-struktur på plasmamembranen og svinger frem og tilbage fra pol til pol
 - **MinC** og **MinD** forhindrer dannelsen af ringen, og fordi de befinder sig mest ved polerne, er der i cellemidten lav koncentration af disse proteiner, hvorfor cellecentret er stedet, hvor FtsZ-ringen dannes

6.4) Peptidoglykan syntese og celledeling (s. 145)

- **Autolysiner**: enzymer, der virker som lysozymer, laver små huller i FtsZ-ringen
- Nye cellevægsmateriale er derefter tilføjet henover hullerne
 - Vigtigt at nye cellevægs precursors (fx muraminsyre, glucosamin) splittes på eksisterende peptidoglykan på en koordineret måde, så der ikke opstår brud ved splejningsstedet, hvormed autolysis (spontan celle lysis) hindres

Biosyntese af peptidoglykan

- Lipid-carrier molekylet **bactoprenol** transporterer peptidoglykan precursors over plasmamembranen til periplasmaet, hvor de interagerer med enzymer kaldet **glykolaser**, der indfører precursors i den voksende ende af cellevæggen og katalyserer glykosidbindingsdannelsen.

Transpeptidation

- **Transpeptidation**: sidste trin i cellevægssyntesen, der danner peptid-kryds-bindinger mellem muraminsyrerester på nærliggende glykan-kæder
- I E. coli er FtsI hovedproteinet i transpeptidationen
- Penicillin hindrer transpeptidationsreaktionen ved at binde sig til penicillin-bindeproteiner, der mister deres katalytiske aktivitet, og ny cellevægssyntese ophører samtidigt med fortsat autolysin-aktivitet, der svækker cellen og leder til lysis.
 - Mennesker er eukarya og har derfor ikke peptidoglykan, hvorfor penicillin normalt er ikke-toksisk.
 - Alle patogene bakterier har peptidoglykan og er derfor potentielle mål for penicillin

6.6) Ekspotentiell vækst (s. 148)

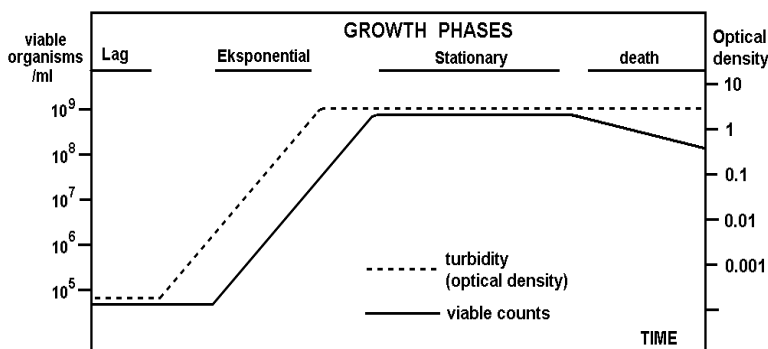
- Ekspotentiell vækst: antallet af celler fordobles i et konstant tidsinterval (1 bliver til 2 og hver af de 2 bliver til nye 2 osv.)
- Efter en periode med ekspotentiell vækst gælder følgende sammenhæng for antal celler: $N = N_0 2^n$
 - $n = \frac{\log N - \log N_0}{0,301} = 3,3(\log N - \log N_0)$
 - N = endeligt antal celler, N_0 = initial celletal og n er antal generationer i løbet af den ekspotentielle vækst
- Generationstiden (g) for en ekspotentiell voksende population er t/n , hvor t er varigheden af væksten i dage/timer/minutter.

Andre vækstudtryk

- På semilogaritmisk plot af en ekspotentiell vækst kan generationstiden bestemmes ved $\frac{0,301}{g} = \text{specifik vækstrate} = k$
- **Divisionsraten v = 1/g** og udtryk for antal generationer pr. tidsenhed i en ekspotentiell voksende kultur

6.7) Vækstcyklus (s. 149)

- En kultur voksende i en lukket beholder kaldes en **batch kultur** og her fortsætter den ekspotentielle vækst ikke uendeligt. I stedet tegner man en vækstkurve med flere faser af vækstcyklussen:
 - **Lagfase:** den periode, der går før vækst begynder, fx grundet at celler er udtømt for essentielle bestandsdele, der kræver tid for at blive biosyntetiseret
 - **Ekspotentielle fase:** celler i ekspotentiell vækst er typisk i deres bedste tilstand
 - **Stationære fase:** Når den ekspotentielle vækst ophører og der ikke er noget netto forøgelse/mindskelse af celleantallet. Mange cellulære funktioner kan dog fortsætte. Kryptisk vækst: når nogle celler vokser, mens andre dør, så ingen netto forøgelse/mindskelse af antallet i den stationære fase.
En af disse to faktorer eller begge begrænser væksten, hvormed den stationære fase indtræder:
 - Et essentielt næringsstof er opbrugt
 - Et affaldsprodukt af organismen hober sig op og hæmmer væksten
 - **Dødsfasen:** når cellerne begynder at dø, nogle ved cellelysis. Dødsfasen er også en ekspotentiell funktion men dog meget langsommere end vækstfasen.



6.10) Vitaltælling (s. 153)

- **Viable celle** = levende celle, der er i stand til deles og give et afkom
- Vi tæller prøven, der er i stand til at danne kolonier på en passende agarplade med antagelse om, at hver celle kan vokse og deles til at give en koloni, så koloni- og celleantal er proportionale

Fortynding af celle-suspension før udpladning

- Nødvendigt at koloniantal på pladen ikke er for stor eller for lille (på overfyldte plader nogle celler vil ikke danne kolonier, og hvis man har for få kolonier, vil man have en lav statistisk sikkerhed)
 - Derfor bør koloniantal være mellem 30 og 300
- Svært at estimere celleantal og derfor nødvendigt at lave en serie fortyndinger

Fejlkilder ved vitaltælling

- Antal kolonier afhænger af udpladningsvolumen, levedygtigheden af kulturen, kulturmediet, inkubationslængde.
- Hvis to eller flere celler klumper sammen, så vil de kun danne én koloni, og derfor er data udtrykt som **colony-forming units (cfu)** i stedet for antallet af levedygtige celler, idet en cfu kan indeholde flere celler
- Direkte mikroskopi-tælling på naturlige prøver viser typisk flere organismer end talt på en plade, hvilket kan skyldes:
 - Mikroskopiske metoder tæller døde celler også
 - Forskellige organismer kan have forskellige næringsbehov og vækstbetingelser end laboratoriekulturer

6.11) Turbiditetsmåling (s. 156)

- Her måles totale cellemasse, som er proportional med celleantal og dermed kan man med **turbiditetsmåling** bestemme celleantallet i en voksende kultur
- Afhænger af, hvordan cellerne spreder lys, der sendes igennem en cellesuspension
- Følsomheden er bedst ved korte bølgelængder, men ved tætte cellesuspensioner er længere bølgelængder bedst
- Enheden for turbiditet er **optical density (OD)**

Relatere OD til celleantal

- Turbiditetsmålinger kan bruges som erstatning for vitaltælling, men kræver dog brugen af en standardkurve med fx vitaltælling sammenholdt med turbiditet
- Proportionaliteten med celleantal og turbiditet holder dog til en vis grænse, for ved høje cellekoncentrationer, kan celleoverlappinger påvirke lysspredningen og give fejlresultater (dvs. linearitets-afvigelse i standardkurve)

6.12-6.14) Temperatureffekt på vækst (s. 157)

- **Kardinal (=hoved-) temperaturer** for en mikroorganisme er min., optimum og maks. temperaturerne.
- Fire grupper mikroorganismer i relation til deres væksttemperaturoptimum:
 - **Psykrofile:** lav temp. optimum (optimum 15°C eller lavere, maks. <20°C, min. 0°C eller lavere)
 - **Psykrotolerante:** vokser ved 0°C, men har optimum mellem 20-40°C
 - Der er påvist vækst ved -12°C men ikke derunder. Selvom frysning stopper vækst, forårsager det ikke nødvendigvis celledød, idet enzymer fortsat kan virke ved under væksttemp.
 - **Mesofile:** midt temp. optimum, udbredt i naturen, fx E. coli (optimum 39°C, maks. 48°C og min. 8°C)
 - **Thermofile:** høj temp. optimum (over 45 °C)
 - **Hypertermofile:** meget høj temp. optimum (over 80 °C)

6.15) Vækst ved lav eller høj pH (s. 165)

- **Syrefile bakterier** vokser optimalt ved lav pH, typisk pH under 6. Nogle prokaryote er **obligat syrefiler** = ikke i stand til at vokse ved neutral pH
 - Høje koncentrationer af hydrogenioner ved lav pH er essentiel for membranstabilitet for syrefile bakterier, hvis plasmamembran ellers ville ødelægges ved højere pH
- **Basefile bakterier:** optimal vækst ved pH 9 eller derover.
 - Bacillus-slægten er et eksempel på basefile bakterier. **Bacillus firmus** har et utypisk vækstinterval, pH 7,5-11.
 - Den ydre membranoverflade af basefile bakterier er omgivet af hydroxidioner, hvormed proton drivkraften normalt ikke ville fungere (bioenergetisk problem for fx ATP-syntese). B. firmus løser problemet med at have en Na⁺-drivkraft, der fx driver transportreaktioner.
- **Neutrofile bakterier:** optimal vækst ved pH mellem 6 og 8
- **Intraceullulære pH** skal være relativt tæt på neutralitet for at undgå ødelæggelse af cellens makromolekyler, fx er DNA syrelabil og RNA baselabil
- **Buffere** bruges i batch-kulturer for at holde pH relativt konstant, idet pH kan variere ved vækst, når der bruges eller produceres syre- eller basesubstanser. For neutrale pH-områder bruges potasiumfosfat, KH₂PO₄ og calciumcarbonat CaCO₃

6.16) Osmotisk effekt på vækst (s. 166)

- **Positiv vand balance:** når en celle har højere solute-koncentrationer end miljøet, så vandet diffunderer til cellen
- **Halofile:** kræver NaCl i det ydre miljø for at vokse
- **Ikke-halofile:** fx E. coli, hvis vækst stopper brat ved selv lave NaCl-koncentrationer
- **Halotolerante:** vokser bedst ved fravær af opløste stoffer, men kan tolerere miljøer med lav vandaktivitet
 - Gram-positive kokker af stammen Staphylokokker er halotolerante
- **Osmofile:** i stand til at vokse i miljøer med høj koncentration af sukker
- **Xerofile:** i stand til at vokse i meget tørre miljøer

- **Kompatible solutes:** solutes, der bruges inden i cellen for at regulere vandaktivitet og er ikke hæmmende på biokemiske processer i cellen, fx vandopløselig suktermolekyler eller aminosyrer

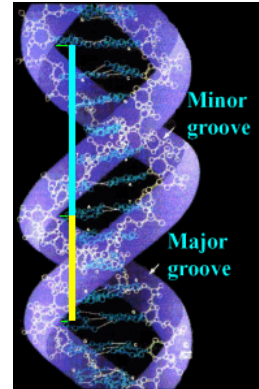
6.17) Oxygen og vækst (s. 168)

- **Aerobe:** kan vokse ved fuld oxygen-spænding og også ved høje koncentrationer af oxygen
 - **Mikroaerofile:** aerobe, der kan bruge oxygen kun når det er tilstede i lavere mængde end i luften
 - Nogle aerobe er **fakultative**, dvs. under passede nærings- og kulturbetingelser kan de vokse med ilttilstedeværelse eller –mangel men dog bedst med oxygentilstedeværelse, fx E. coli
- **Anerobe** kan ikke respirere oxygen
 - **Aerotolerante anaerobe** kan tolerere oxygen og vokse ved dets tilstedeværelse men dog uden at bruge det
 - **Obligat anaerobe** hæmmes eller dræbes af oxygen, fx bakterier fra Clostridium-stammen
- **Reducerende agenter** bruges til et kulturmedium af en anaerob bakterie, så at de kan reducere oxygen til H₂O, fx thioglycolat

Kapitel 7 – Transkription, translation m.m.

7.2) Double-helixen (s. 177)

- Adenin med Thymin (*Uracil i RNA*) og Guanin med Cytosin med hhv. 2 og 3 hydrogenbindinger mellem de tilsvarende baser
 - DNA med højere procentdel GC-bp smelter ved højere temperaturer i forhold til molekyle med samme størrelse men mere AT-bp.
- I double-helixen er der to **render (grooves)**, den store rende, hvor mange proteiner, der interagerer specifikt til DNA, normalt binder grundet større plads
- Mange mulige double-spiral-strukturer er mulige for DNA
- DNA molekyle med fx 1000 basepar er 1 kilobase (kb) af DNA, og hvis DNA er double-helix og har 5000 basepar, så er den 5 kilobase-par (kbp).
 - E. coli har ca. 4640 kbp af DNA i dets kromosom, dvs. 4,64 Mbp
- Lange DNA-molekyler er fleksible men på under 100bp bliver de mere rigide



7.5) Templates (skabeloner) og enzymer (s. 182)

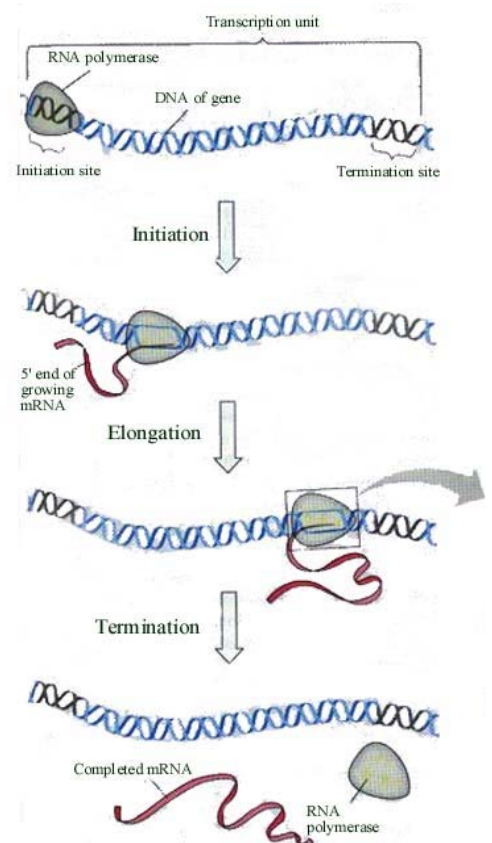
- DNA-replikation er **semikonservativ**, dvs. når DNA-double-helixen åbnes op, vil en ny streng syntetiseres ud fra en template-streng, så man ender med to double-helixer hver med en template og ny tilhørende streng
- DNA-replikation foregår altid fra 5'-enden til 3'-enden
 - Precursoren til hver ny nukleotid er deoxynukleosid-5'-triphosphat, som sættes på en 3'-OH. De to yderste fosfatgrupper fjernes og den interne fosfatgruppe bindes til kæden

DNA polymerase og primase

- **DNA polymeraser:** enzymer, der katalyserer tilføjelsen af deoxynukleotiderne
 - I E. coli er der 5 forskellige polymeraser, DNA polymerase I, II, III, IV og V
 - **DNA polymerase III (Pol III):** primærenzymet for kromosom-DNA-replikation
 - **Pol I:** også involveret i replikation men i mindre grad
 - **De resterende** hjælper med reparation af beskadiget DNA
 - Disse enzymer kan kun tilføje en nukleotid til en allerede eksisterende 3'-OH-gruppe
- **Primer:** en nukleinsyre, typisk et kort stykke af RNA, bruges for at starte en ny kæde, hvortil DNA polymerase kan fastgøre den første nukleotid
 - **Primase:** et enzym, der syntetiserer RNA-primeren=11-12 nukleotider, der er komplementære til DNA-templaten

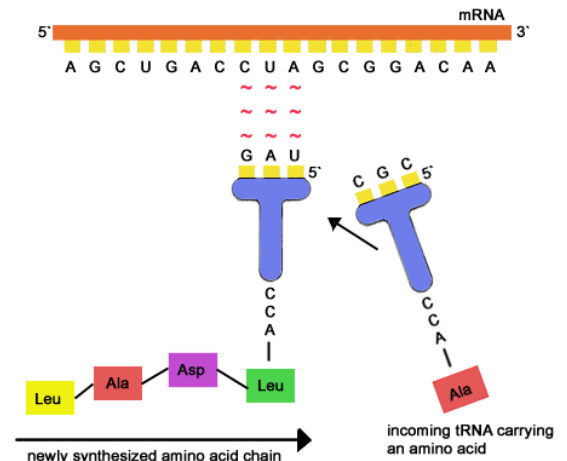
7.9) Oversigt over transkription (s. 189)

- Transkription fra DNA til RNA foregår vha. **RNA polymerase**, der katalyserer dannelsen af phosphodiester-binding mellem ribonukleotider
 - Forudsætter DNA som template
 - RNA polymeraser hos bakterier har 5 dele, der interagerer for at danne det aktive enzym, RNA polymerase holoenzymet.
 - **β og β'** (beta prime) ligner hinanden
 - **α** findes i to kopier
 - **σ** (sigma): er ikke stærkt bundet som de andre og spaltes nemt for at danne **RNA polymerase kerneenzymet**, der kan syntetisere RNA alene, mens sigma-faktoren genkender det passende sted på DNA for RNA-syntese-start, kaldet **promoter**
 - RNA polymerasen binder til promoteren og DNA-double-helixen åbnes op
 - Promoterne retter polymerasen i enten den ene eller anden retning langs DNA'en
 - Når et kort stykke RNA er dannet, spaltes sigma-faktoren og forlængelsen af RNA molekylet sker vha. kerneenzymet alene
 - Transkriptionen slutter ved **transkription terminators**
 - Når det nye RNA spaltes fra DNA-molekylet, vender det åbne DNA tilbage til double-helix-strukturen
 - **ω** (omega): bruges til at samle kerneenzymet og ikke til RNA-syntesen
- **RNA-syntesen**: en ribonukleoside-trifosfat bindes til 3'-OH af en ribose af en nukleotid.
 - Energi fra de to energirige fosfatbindinger fra trifosfaten
 - RNA polymerasen kan i modsætning til DNA polymerase påbegynde en ny streng selv og derfor intet brug for en primer



7.13) Den genetiske kode (s. 194)

- **Translation:** syntese af en nukleinsyre-templete med et protein som produkt
- **Den genetiske kode:** overensstemmelsen mellem nukleinsyre-templete og aminosyre-sekvens af polypeptid-produktet
- **Codons:** en kombination af 3 baser, der koder for en specifik aminosyre
 - Codons skrives som mRNA (fx UUU/UUC, der koder for phenylalanin)
 - 64 mulige codons (4^3)
- Mange aminosyrer er kodet af flere codons
- En codon er genkendt ved specifikke base-pair-dannelser med en komplementær sekvens af tre baser, kaldet **anticodon**, fundet på tRNA,
 - Fx dannes der basepar mellem de tre baser fundet i codons GCU og baserne i anticodons CGA
- **Wobble(=vaklen)-fænomen:** Ved specielle tilfælde kan et tRNA genkende flere codons, hvor den så danner standard basepar ved de første to positioner på codons kun.



Stop- og startcodons

- Få codons koder ikke for en aminosyre, **UAA, UAG og UGA**, og kaldes **stopcodons/non-sense-codons** og signalerer for slutning på translation af en protein-kodende sekvens på mRNA'en
- **Start-codon, AUG**, begynder translation ved at indkode en kemisk modificeret methionin, N-formylmethionin
 - Inden for en kode-region vil AUG dog kode for aminosyren, methionin, men to forskellige tRNA er dog involveret, en tRNA til start og en tRNA til methionin
- Det er essentielt, at ribosomet finder den korrekte start-codon og bagefter bevæger sig tre baser pr. gang langs mRNA, idet det ønskede protein ellers ikke vil blive syntetiseret. **0-rammen** er den korrekte læse-ramme, der translateres til proteinet, der er kodet af genen.
 - rRNA (ribosomal RNA) genkender en specifik AUG på mRNA'en som startcodon med hjælp af en mod-strømmen-sekvens i mRNA, kaldet **Shine Dalgarno sekvens**

Open Reading Frames (ORF)

- En anvendt metode for at identificere protein-kodende gener er ved at finde **ORF**, som er start codon (typisk AUG), efterfulgt af et antal codons og så en stop-codon (typisk 100 aminosyrer i længden)

Codon-bias

- **Codon-bias:** nogle codons er foretrukket over andre, selvom de koder for den samme aminosyre
 - fx i E. coli er kun 1 ud af 20 isoleucin-rester i proteiner kodet af isoleucin-codon, AUA
 - Afhænger af tRNA-koncentrationer; en tRNA korresponderende til en sjælden brugt codon vil findes i lav koncentration

7.14) Transport-RNA (s. 196)

- **Aminoacyl-tRNA syntetaser:** enzymer, der bringer tRNA med dens specifikke korrekte aminosyre
 - Reaktionen mellem aminosyren og tRNA begynder med aktivering af aminosyren ved reaktion med ATP:
$$\text{Aminosyre} + \text{ATP} \leftrightarrow \text{aminoacyl-AMP} + \text{P-P}$$
 - Aminoacyl-AMP forbliver normalt siddende på enzymet indtil kollision med tRNA, hvorefter den bindes til tRNA og danner en ladet tRNA:
$$\text{Aminoacyl-AMP} + \text{tRNA} \leftrightarrow \text{aminoacyl-tRNA} + \text{AMP}$$
- tRNA indeholder nogle puriner og pyrimidiner, der er lidt forskellige fra de normale baser fundet hos RNA
- tRNA indeholder også nogle double-strengede områder, som dannes ved intern base-parring, når det single-strengede molekyle folder om sig selv
- Ved 3'-enden findes tre uparrede nukleotider, der er essentielle for funktion, **CCA**
 - De er ikke indkodet af tRNA-gener på kromosomet men tilføjet en efter en af **CCA-adding-enzyme**

Kapitel 8 – Eukaryotisk mikrobiologi

8.5) Gener og kromosomer i eukaryote (s. 213)

- Protein-kodende gener er spaltet i to eller flere kodende regioner, **exoner**, med ikke-kodende regioner, **introner**, der separerer dem
 - Eukaryote indeholder typisk meget mere DNA end nødvendig til indkodning af proteiner (hos mennesker indkoder kun 3% af DNA'et proteiner), og det ekstra DNA er enten tilstede som introner eller som gentagne sekvenser
- Eukaryote har flere lineære kromosomer i nukleos, og fordi ribosomerne er i cytoplasmaet, er transkription og translation separate processer
- Det lineære DNA-molekyle er viklet omkring proteiner kaldet **histoner**, der danner strukturer kaldet **nukleosomer**. DNA-komplekset plus histoner kaldes **kromatin**.

8.9) Transkription og translation i eukaryote (s. 220)

- Eukaryote har flere forskellige RNA-polymeraser:
 - **RNA polymerase I**: transkriberer gener for to store rRNA molekyler
 - **RNA polymerase III**: transkriberer gener for tRNA og andre små rRNA molekyler
 - **RNA polymerase II**: transkriberer protein-indkodende gener
- Cytoplasmiske ribosomer af eukaryote (80S ribosomer) er større end bakterielle ribosomer (70S ribosomer) og indeholder mere rRNA og proteiner
- Eukaryotisk mRNA er **monocistronisk**, dvs. den bærer kun et gen der giver et enkelt protein (i modsætning til prokaryote, hvis mRNA er **polycistronisk** og kan give flere proteiner)

Kapitel 9 – Regulering af genekspression

9.1) Major modes of regulation (s. 225)

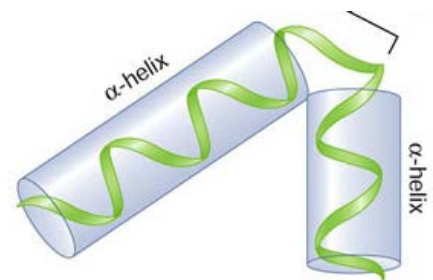
- **Genekspression:** transkription og translation til et specifikt polypeptid
- To niveauer af regulering i celler:
 - **Regulering af proteinaktivitet** (hurtig, sekunder eller mindre) efter at det er blevet syntetiseret, fx at enzymet (som de fleste proteiner jo er) hæmmes og ikke katalyserer den ønskede reaktion
 - **Regulering af proteinmængde syntetiseret** (langsom, flere minutter), der kan forekomme ved enten:
 - Regulering af transkription: ved at tilpasse mængden af dannet mRNA, mest væsentlige regulering i prokaryote
 - Regulering af translation: ved enten at oversætte eller ikke oversætte mRNA'et

9.2) DNA-bindingsproteiner (s. 226)

- Regulering af fx transkription sker vha. **protein-nukleinsyre interaktioner**, der enten kan være:
 - Ikke-specifikke: histoner er et eksempel på ikke-specifik bindingsprotein hos eukaryote, idet de er positivt ladede og bindes derfor til det negativt ladet DNA (negative fosfatgrp). Når DNA'et er dækket med histoner, kan RNA polymerase ikke bindes, hvormed transkription ikke kan forekomme
 - Specifikke: de fleste DNA-bindingsproteiner interagerer med DNA på en sekvens-specifik måde, dvs. de binder sig kun til DNA indeholdende en specifik base-sekvens. De er ofte **homodimere**, dvs. indeholdende to identiske polypeptider, som hver binder sig til hver af de to DNA-streng

Strukturen af DNA-bindingsproteiner

- DNA-bindingsproteiner indeholder flere domæner, der er nødvendige for korrekt binding til DNA:
 - **Helix-turn-helix motiv:** med to polypeptidkæder, alpha-helixer:
 - Genkendeshelix, der interagerer specifikt med DNA'et
 - Stabiliseringshelix, der stabiliserer den første helix
 - **Zink-finger:** fundet hos regulerende proteiner hos eukaryote
 - **Leucin-zipper:** proteiner, der indeholder leucin-rester, der er placeret så de minder om et lynlås



9.3) Negativ kontrol af transkription: repression og induktion (s. 228)

- **Enzym repression (undertrykkelse)** forekommer når et specifikt enzym ikke syntetiseres, idet produktet, som enzymet ellers ville katalysere syntesen af, er tilstede i rigelige mængder
 - Dette sikrer, at organismen ikke spilder energi og næring ved at syntetisere unødvendige enzymer
 - Substanser, der undertrykker enzymsyntese kaldes **corepressor**
- I **enzym induktion** syntetiseres et enzym kun, hvis dets substrat er tilstede, fx beta-galaktosidase, der kløver laktose til glukose og galaktose i fx E. coli, syntetiseres omgående, når laktose er tilføjet til et medium, hvor E. coli vokser
 - Substanser, der inducerer enzymsyntese kaldes **inducere**

Mekanismen af repression og induktion

- **Effektorerne** (corepressor og inducere) virker ved at binde sig til specifikke DNA-bindeproteiner, som så påvirker transkriptionen.
 - **Repression:** Fx bindes effektoren til et specifikt repressor-protein, som så aktiveres og bindes til et specifikt område på DNA tæt på promoteren af genet, **operatoren** (generne, der er kontrolleret af operatoren, kaldes **operon**)
 - Når repressoren bindes til operatoren, er transkriptionen fysisk blokeret, idet RNA polymerasen ikke kan binde eller fortsætte
 - **Induktion:** Kan også kontrolleres af et repressor-protein, som så er aktiveret ved fravær af inducenen, hvorved transkriptionen er blokeret. Når inducenen er tilføjet, kombineres den med repressoren, som deaktiveres, og transkriptionen kan fortsætte

9.4) Positiv kontrol af transkription (s. 230)

- I **positiv kontrol** af transkription aktiverer et regulator-protein for bindingen af RNA-polymerasen til DNA.
 - Et eksempel er maltose-katabolismen i E. coli:
 - Enzymet for maltose-katabolismen i E. coli syntetiseres kun efter, at maltose er tilføjet mediet
 - Transkriptionen kræver bindingen til DNA med en **aktivator-protein**, som forudsætter at det selv er bundet til inducenen, maltose
 - Området på DNA hvor aktivatoren virker, kaldes ikke operator, men **aktivator-bindingssted**
 - Når maltose-aktivator-proteinet bindes til DNA, vil RNA polymerasen få lov til at begynde transkriptionen

Binding af aktivator-proteiner

- Promoterne af positivt kontrollerede operons har nukleotidsekvenser, der binder RNA-polymerasen svagt, hvorfor den har svært ved at binde sig til disse promoters trods tilstedeværelsen af sigmafaktoren
- Aktivator-proteinet hjælper RNA-polymerasen til at genkende promoteren og begynder transkriptionen ved fx at lave de rigtige kontakter med promoteren

Operons versus regulons

- I *E. coli* er generne, der er nødvendige for maltoseudnyttelse spredt over kromosomet i flere operons, maltose-aktivator-proteinet kontrollerer derfor transkriptionen af flere operons
- Operons, der kontrolleres af et enkelt regulerende protein, kaldes **regulon**

Kapitel 10 – Virologi

10.1) Generelle egenskaber af virus (s. 252)

- Virus er ikke celler og derfor ikke-levende. De er obligat intracellulære parasitter, der er afhængige af at komme ind i en passende værtselle for at gennemføre deres replikationscyklus (infektionsprocess)
 - Virus har dog deres egne genetiske information og er derfor uafhængige af værtscellens genom
 - Virus kan overdrage vigtige nye egenskaber til værtscellen, som vil arves, når cellen deler sig, hvis hver ny celle også arver den virale genom (kan både være skadelig og gavnlig)
- Virus kan eksistere i både en ekstracellulær eller intracellulær form:
 - I dens **ekstracellulære form** er virus en mikroskopisk partikel, kaldet **virion**, indeholdende nukleinsyre omringet af protein og nogen gange andre makromolekyler
 - Virioner er metabolisk inaktive og gennemfører hverken respiration/biosyntese
 - Når en virus er kommet ind i en celle, træder den **intracellulære fase** med at virus replikeres
 - Nye kopier af virus genomet er produceret og bestanddelene, der udgør viruskappen er syntetiseret
- Virus genomer kan klassificeres i forhold til, hvad enten nukleinsyren i virionen er DNA eller RNA og yderligere hvad enten den er single- eller double-strengt, lineær eller cirkulær.

10.2) Naturen af virioner (s. 253)

- Nukleinsyren i virionen er altid placeret i partiklen og omringet af en proteinkappe, kaldet **kapsid**, der består af flere **kapsomers**, en subenhed bestående af kemisk forskellige proteiner.
- **Nukleinkapsid** er den komplette kompleks af nukleinsyre og proteinpakningen

Indhylstrede (enveloped) virus

- **Indhylstrede virus** indeholder en membran, der omringer nukleinkapsidet og består af et lipid-dobbeltlag (kommer fra værtscellens membran) med proteiner (indkodet af viral genomet), typisk glykoproteiner, indlejret i den.
 - Proteinerne er vigtige for vedhæftning af virionen til værtscellen ved fx infektion

Enzymer i virioner

- Nogle virioner indeholder enzymer, der er vigtige ved infektion
 - Fx indeholder nogle bakteriofager (bakterielle virus) enzymet, lysozyme, som de bruger til at lave små huller i bakteriens cellevæg for at kunne komme ind. Lysozyme produceres også senere for at forårsage lysis
- Nogle virus indeholder deres egne nukleinsyre polymeraser for replikation af viral genomet og for transkription af virus-specifik RNA.
- Nogle virus indeholder enzymer, der hjælper til med frigørelsen fra værten, fx **neuraminadaser** hos dyrevirus

10.4) Kvantificering af virus (s. 257)

- Når en virion begynder en infektion på et lag af værtsceller, der vokser på en flad overflade, vil man se et tomt område, **plaque**, på den voksende værtscelle som indikation på lysis.
 - Det antages, at hvert plaque kommer fra replikationen af en enkelt virion
 - Antal plaque-forming units er altid mindre end antallet fundet ved elektronmikroskop, hvilket kan betyde, at nogle virus ikke var succesfulde med inficering af celler

10.5) Virus replikation (s. 258)

- Virus replikation kan inddeles i fem faser:
 - **Vedhæftning** (adsorption) af virionen til et modtagelig værtscelle
 - **Penetrering** (injektion) af virionen eller dens nukleinsyre i cellen (proteinkappe forbliver udenfor)
 - **Syntese** af virus nukleinsyre og protein af cellemetabolismen dirigeret af virus
 - **Samling** af kapsider (og membranbestandsdele i indhyllede virus) og pakning af viral genomer til nye virioner. Hele processen kaldes **modning**
 - **Frigørelse** af modne virioner fra cellen under lysis af værtscellen
- I de første få minutter efter infektion vil virus gennemgå en **eclipse** (formørkelse), dvs. at de smittende partikler ikke kan ses i kulturmediet
 - Eclipse og modnings perioderne kaldes tilsammen den **latente periode**

10.7) Produktion af virus nukleinsyre og protein (s. 261)

- **Baltimore klassifikationskema**
 - Klasse I: double-strengt DNA virus
 - Klasse II: enstrengt DNA virus, som bliver til en double-strengt DNA i replikationen
 - Klasse III-VII er RNA virus
 - Klasse IV: **Positiv-strengt RNA virus**: en virus hvis enkelt-strengt RNA genom har samme retning som dets mRNA
 - I det RNA-polymerase normalt ikke katalyserer dannelsen af RNA fra RNA-template, fungerer genomet her direkte som mRNA
 - mRNA indkoder et virus-specifikt RNA-polymerase, kaldet **RNA-replikase**, der danner komplementære minus-strengte af RNA og bruger dem derefter som template til at lave flere plus-strengte med
 - Klasse V: **Negativ-strengt RNA virus**: en virus hvis enkelt-streng RNA genom er komplementær til dets mRNA
 - RNA'et her kan ikke fungere som mRNA pga. forkert retning, og derfor bærer disse virus på RNA-polymeraser i deres virioner. RNA-polymerasen syntetiserer plus-strengte, som bruges som mRNA og template til at lave flere negativ-strengte med.

Retrovirus

- **Retrovirus** er dyrevirus, der forårsager cancer og AIDS.
 - De har enkeltstrengede RNA i deres virioner
 - De laver **omvendt transkription (RNA til DNA)** og bruger derfor enzymet **reverse-transkriptase**, som de har i deres virioner

Virus proteiner

- Når mRNA er lavet, syntetiseres nu virale proteiner:
 - Tidlige proteiner, lige efter infektion
 - Sene proteiner

Kapitel 11 – Genetik

11.2) Plasmider (s. 282)

- Mange prokaryote indeholder **plasmider**, genetiske elementer, der replikerer uafhængigt af cellens kromosom og eksisterer i cellen som frie og typisk cirkulære DNA
 - Plasmider indeholder kun ikke-essentielle, men ofte meget gavnlige, gener
 - De består af double-strengt DNA og er mindre end 5% i størrelsen af kromosomet
 - Forskellige plasmider er tilstede i celler i forskellige antal, kaldet **kopiantal**
- To plasmider kan være uforenlige (incompatible, **Inc**), hvis fx et plasmid overføres til en celle, der allerede har et plasmid, så vil sidstnævnte plasmid ikke ses efter replikation
- **Episomer**, plasmider, der kan integreres sig i kromosomet, hvormed deres replikation styres af kromosomet
- Eksempler på phenotyper givet af plasmider i prokaryote:
 - Pseudomonas: nedbrydelse af bl.a. oktan, naphthalene
 - Clostridium: dannelsen af acetone og butanol
 - Staphylococcus: pigmentproduktion
 - Salmonella, Shigella: dyrecelleindtrængen
 - Bacillus anthracis: toxiner og kapsler
 - Escherichia: **enterotoxin** (proteintoksin frigivet af mikroorganismen i tarm), K antigen

Celle-til-celle-overførsel af plasmider

- Plasmider, der frigøres ved død og lysning af deres tidligere værtsceller, kan blive taget af en vært
- Hovedmekanismen bag celle-til-celle plasmidoverførsel er **konjugation**, som kontrolleres af et sæt gener på plasmidet, kaldet **tra (transfer)-regionen**

11.3) Plasmidtyper (s. 283)

- **R plasmider**, resistente plasmider kan give resistens til antibiotika og andre væksthæmmere
 - **Plasmid R100** bærer på gener, der indkoder resistens til bl.a. streptomycin (inhibiterer ribosomtransport), tetracyclin (inhibiterer binding af aminoacyl-tRNA til ribosomet)
 - Plasmid R100 kan overføres mellem tarmbakterier af stammen, Escherichia, Klebsiella, Proteus, Salmonella og Shigella

Plasmider, der indkoder toxiner og andre virulenskarakteristik

- **Virulens:** 1) evnen af patogenet til at vedhæfte og kolonisere specifikke værtsvæv og 2) produktion af substanser (bl.a. toxiner, enzymer), der medfører skade til værten
 - I mange patogene bakterier er virulens-egenskaber indkodet af plasmidgener, mens andre virulensfaktorer kan være indkodet af andre mobile genetiske elementer som transposons og bakteriofager.
 - Fx kan enteropatoogene stammer af E. coli kolonisere lilletarmen og danne toksiner, der giver diarre
 - Mindst to toksiner er kendt hos disse stammer af E. coli:

- **Hemolysin:** lyserer røde blodceller
- **Enterotoksin:** inducerer overdrevet udskillelse af vand og salte
- Kolonisation forudsætter et celleoverfladsprotein kaldet **colonization factor antigen** indkodet af et plasmid og giver evnen til at vedhæfte sig epitheliale celler af tarmen

Bakteriociner

- **Bakteriociner:** proteiner produceret af bakterier, der kan hæmme og dræbe nærbeslægtede stammer og også andre stammer af samme art
 - De er ofte nævnt efter stammen af organismen, der producerer dem, fx coliciner fra E. coli (indkodet af Col plasmider)
 - Coliciner bindes til receptorer på overfladen af modtagelige celler og dræber cellerne ved at forstyrre nogle vigtige celfunktioner, fx ved at lave kanaler i membranen, så kaliumioner og protoner siver ud, og cellen mister evnen til at genere energi

11.4) Mutationer og mutanter (s. 285)

- En **mutation** er en arvelig ændring i basesekvensen af genomet
- En **mutant** er en celle- eller virusstamme, der bærer på en ændring i nukleotidsekvensen

Genotype vs. Phenotype

- I bakteriegenetik angives **genotypen** af en organisme med tre små bogstaver efter et stort bogstav indikerende et bestemt gen, fx **hisC** genet af E. coli indkoder et protein kaldet HisC, der medvirker i biosyntesen af histidin.
 - Mutationer i hisC genet angives som hisC1, hisC2 osv.
- **Phenotypen** angives med et stort bogstav efterfulgt af to små med enten et plus eller minus efter for at indikere tilstedeværelsen eller fraværet af den pågældende egenskab, fx en **His⁺** stamme af E. coli er i stand til at lave dens eget histidin modsat **His⁻**

Selektive og ikke-selektive mutationer

- **Selektive mutationer** giver klare fordele til mutantstammen under bestemte miljømæssige forhold, fx antibiotiskresistente mutanter, der er i stand til at vokse ved tilstedeværelsen af antibiotika
- Et eksempel på en **ikke-selektiv mutation** er farvetab hos en ellers pigmenteret organisme.

Isolering af auxotrofe og penicillin-selektion

- Næringsdefektive mutanter kan påvises ved **replica-plating-teknik** (kopi-beklædningsteknik)
 - Et aftryk af kolonier fra en plade afsættes på en agarplade, der mangler næringsstoffet
 - De originale kolonier vil vokse normalt modsat mutanterne, hvormed kolonien på originalpladen korresponderende til det tomme område på kopi-pladen, nu kan isoleres og karakteriseres
- **Auxotrofe** er mutanter med næringsstofsbehov for vækst (forældreorganismen kaldes **prototrof**)
- **Penicillin-selektionsmetoden:** Penicillin dræber kun voksende celler, og hvis den derfor tilføjes en population med celler, der vokser i et medium, der mangler det næringsstof, som den ønskede mutant kræver, vil forældrecellerne blive dræbt, mens mutanterne forbliver upåvirkede

11.5) Molekylær grundlag for mutation (s. 287)

- **Inducerede mutationer** laves med vilje.
- **Spontane mutationer** kommer uden menneskelig intervention fra fx bestråling
- **Punktmutationer:** mutationer, der ændrer kun et basepar og stammer fra basepar-substitution i DNA'et eller fra tab eller tilføjelsen af et enkelt basepar.

Basepar-substitution

- Idet at flere aminosyrer kodes af samme codons, er det ikke alle mutationer i basesekvensen, der indkoder et polypeptid, der ændrer polypeptidproduktet. Denne mutationstype kaldes **stille-mutation**, der altså ikke påvirker cellens phenotype
 - Stillemutation er næsten altid i den tredje base af codon, mens ændringer i første eller anden base af codon giver typisk ændringer i polypeptidet
- **Missense mutation:** ændret aminosyre-codon, der giver et ændret protein
- **Nonsense mutation:** et codon ændres til stopcodon og leder til et ufuldstændigt og ufunktionelt protein
- **Transitioner** er mutationer, som leder til at en purinbase (A eller G) substitueres med en anden purin, eller en pyrimidin (C eller T) substitueres med en anden pyrimidin
- **Transversion** er punktmutationer, som leder til at en purin substitueres med en pyrimidin eller omvendt

Tilbagemutationer og reversion (tilbagevenden)

- Punktmutationer er typisk reversible, en proces kaldet **reversion**, og revertanterne kan være af to typer:
 - **Same-site revertants:** mutationen, der restaurerer aktiviteten er på samme side som den originale mutation. Mutationer, der restaurerer originalsekvensen kaldes **true revertant**
 - **Second-site revertants:** mutationen er et andet sted i DNA'et og kan resultere i 1) mutation i samme eller andet gen, der genetablerer enzymfunktionen 2) mutation i et andet gen, der resultere i et nyt enzym, der erstatter det første

11.9) Genetisk rekombination (s. 295)

- **Rekombination** er den fysiske udveksling af DNA mellem genetiske elementer
 - **Homolog rekombination** resulterer i genetisk udveksling mellem homologe DNA-sekvenser (næsten samme sekvenser) fra to forskellige kilder og foregår over følgende trin:
 - En endonuklease skærer hak i en streng af det ene af DNA-molekylerne
 - Strengen med hakket fjernes fra den anden streng vha. proteiner, der har helikase-aktivitet (i E. coli er det RecBCD enzym, der har både helikase og endonuklease aktivitet)
 - Single-strengens bindingsproteiner binder derefter til enkeltstrengssegmentet
 - RecA proteinet danner et kompleks med strengsegmentet og parrer sig med den komplementære strengsekvens på det andet DNA ved **streng invasion** og danner strukturer kaldet **Holliday junctions**
 - De sammenkædede molekyler separeres af **resolvaser** og igen bringes sammen med de originale strenge (i E. coli fungerer RecG og RuvC proteiner som resolvaser)

11.10) Transformation (s. 297)

- **Transformation** er genetisk overførselsproces hvormed fri DNA er indføjet i en modtager celle og bringer genetisk ændring
- Hvis en prokaryot lyseres mildt, vil det lange DNA molekyle sive ud og deles i flere fragmenter (fx i Bacillus subtilis er det fragmenter á 10 kbp hver svarende til 10 typiske gener á størrelsen 1000 nukleotider)

Dygtighed til transformation

- Kun nogle stammer er kvalificerede til at modtage DNA og blive transformeret
- Dygtigheden i de fleste naturlige transformerende bakterier kan reguleres af specifikke proteiner
 - 20% af Bacillus celler i en kultur efter regulering blive transformationsdygtige
 - 100% i streptokokker
- E. coli er dårlig til at blive transformeret, men ved behandling med kalsiumioner bliver E. coli bedre egnet til transformation
- **Electroporation** er en fysisk teknik, der bruges til at lade DNA komme i organismer, der er svære at transformere, fx E. coli og fleste andre bakterier
 - Celler blandes med DNA og udsættes for kortvarig høj spændings elektriske pulser, der tillader DNA-indtrængen

Integrering af transformeret DNA

- Transformeret DNA bindes til celleoverfladen af DNA-bindingsproteiner
- Enten hele double-strengen trænger ind eller kun en enkelt streng efter, at nuklease nedbryder den anden streng
- Efter at DNA'et er kommet i cellen, bindes det til en **competence-specifik protein**, der beskytter DNA'et fra nuklease angreb indtil det når kromosomet, hvor recA tager over

Transfektion

- **Transfektion** er processen hvori bakterier transformeres med DNA ekstraheret fra bakterievirus

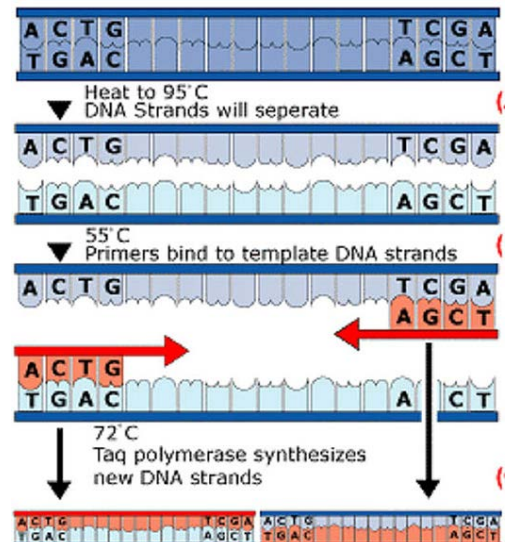
Kapitel 12 – Genmodulering

12.4) Plasmider som kloningsvektorer (s. 318)

- **pUC19** er et vidt brugt kloningsvektor
 - Et segment af kunstigt DNA med snitsteder for flere restriktionsenzymer, kaldes en **polylinker** eller **multiple cloning site**, indsættes i **lacZ genet**, der indkoder laktosenedbrydende enzym, beta-galaktosidase
 - Et passende restriktionsenzym med et snitsted inden for polylinkeren vælges
 - Både vektoren og det fremmede DNA klippes med enzym
 - Segmenter af det fremmede DNA indsættes i det åbne snit i vektoren og liggeres med DNA ligase. Dette påvirker lacZ genet, kaldet **insertional inactivation**
 - En farveløs reagent, **Xgal** er tilføjet og kløves af beta-galaktosidase, hvorved celler med vektor men uden klonet DNA bliver blå, mens celler med vektor og klonet DNA er hvide (ingen beta-galaktosidase)

12.8) Polymerasekædereaktion (s. 324)

- **Polymerasekædereaktion (PCR)** er metoden, hvormed kopier af specifikke DNA-sekvenser laves in vitro (uden for levende organisme)
 - Reaktionen kan kopiere op til milliarder af DNA-segmenter, kaldet **amplifikation**
- PCR's forløb:
 - To DNA oligonukleotid primers er tilføjet til en varmedenatureret DNA
 - Efter afkøling vedhæfter de to primers til hhv. target-strengen og komplementærstrengen
 - DNA polymeraser (typisk **Taq polymeraser** eller **Pfu polymeraser**, der er varrestabile) forlænger den nye kæde startende fra primers
 - Blandingen opvarmes og afkøles, og hele processen gentages
 - Efter hver runde fordobles produkterne og man får en eksponential vækst
- I **reverse transcriptase PCR** bruges reverse transcriptase til at lave komplementære DNA (cDNA) kopier fra RNA



12.12) At finde den rette klon (s. 332)

- Flere metoder kan bruges til at finde og isolere den ønskede klon, hvis man som i et gen bibliotek har mange tusinde kloner, bl.a.:
 - Proteinet, der indkodet af det klonede gen, kan betragtes som antigen og derfor bruges til at danne et tilhørende antistof hos et dyr. Lokationen af de ønskede kolonier kan derefter bestemmes ved at observere bindingen af antistoffet.

12.13) Shuttle vektorer og ekspressionsvektorer (s. 334)

- **Shuttle vektorer:** vektorer, der kan replikere og er stabile i to eller flere ubeslægtede værtsorganismer
 - Shuttle vektorer kan derfor overføres fra organisme til organisme
 - Shuttle vektorer er udviklet i E. coli, Bacillus subtilis m.m.
- Organismer har komplekse regulatoriske systemer, og klonede gener er ofte dårligt udtrykt (expressed) eller slet ikke i fremmede værtsceller. Problemet løses dog ved brug af **ekspressionsvektorer**, der gør det muligt at kontrollere ekspressionen af klonede gener
 - Ekspressionsvektorer indeholder stærke promoters, der fungerer effektivt i værten
 - I E. coli bruges promoters som lac, trp, tac, trc operon promoters m.m

Regulering af ekspression med bakteriofag T7

- Når bakteriofagen T7 inficerer E. coli, indkoder den dens eget RNA polymerase, der kun genkender T7 promoters og derfor lukker for alt andet transkription i værten
- I T7 ekspressionsvektorer er klonede gener under kontrol af T7 promoteren. For at opnå dette er T7 RNA polymerasen tilstede i cellen og kontrolleres af fx lac ved at integrere genet for T7 RNA polymerase med lac promoter i kromosomet af værtscellen
- De klonede gener er udtrykt (expressed) kort efter at T7 RNA polymerasen er transkriberet af en lac inducer, fx IPTG.
- Idet T7 RNA polymerasen kun genkender T7 promoteren, er det kun de klonede gener, der transkriberes.

Kapitel 26 – Bioteknologi

26.2) Ekspresion af pattedyrsgener i bakterier (s. 762)

- Ekspresionsvektorer er nødvendige for at udtrykke eukaryotiske gener i bakterier
 - Først skal introner fjernes, og dette gøres i kloningsprocessen, før generne er indsat i værten og bruges til produktion

Genkloning via mRNA

- Standardmetoden til at få intronfrie eukaryote gener er ved at kloner dem via deres mRNA
- mRNA'et bruges til at lave komplementær DNA (cDNA) ved brug af reverse transkriptase
 - Eukaryotisk mRNA er unik med dets **poly(A)-ende**
 - En primer bruges, der er komplementær til poly(A)-enden
- Det syntetiserede DNA har et hårnållignende ende, der fungerer som primer til syntesen af det komplementære streng vha. DNA polymerase I og som bagefter fjernes, så man ender med et double-strengt DNA molekyle.