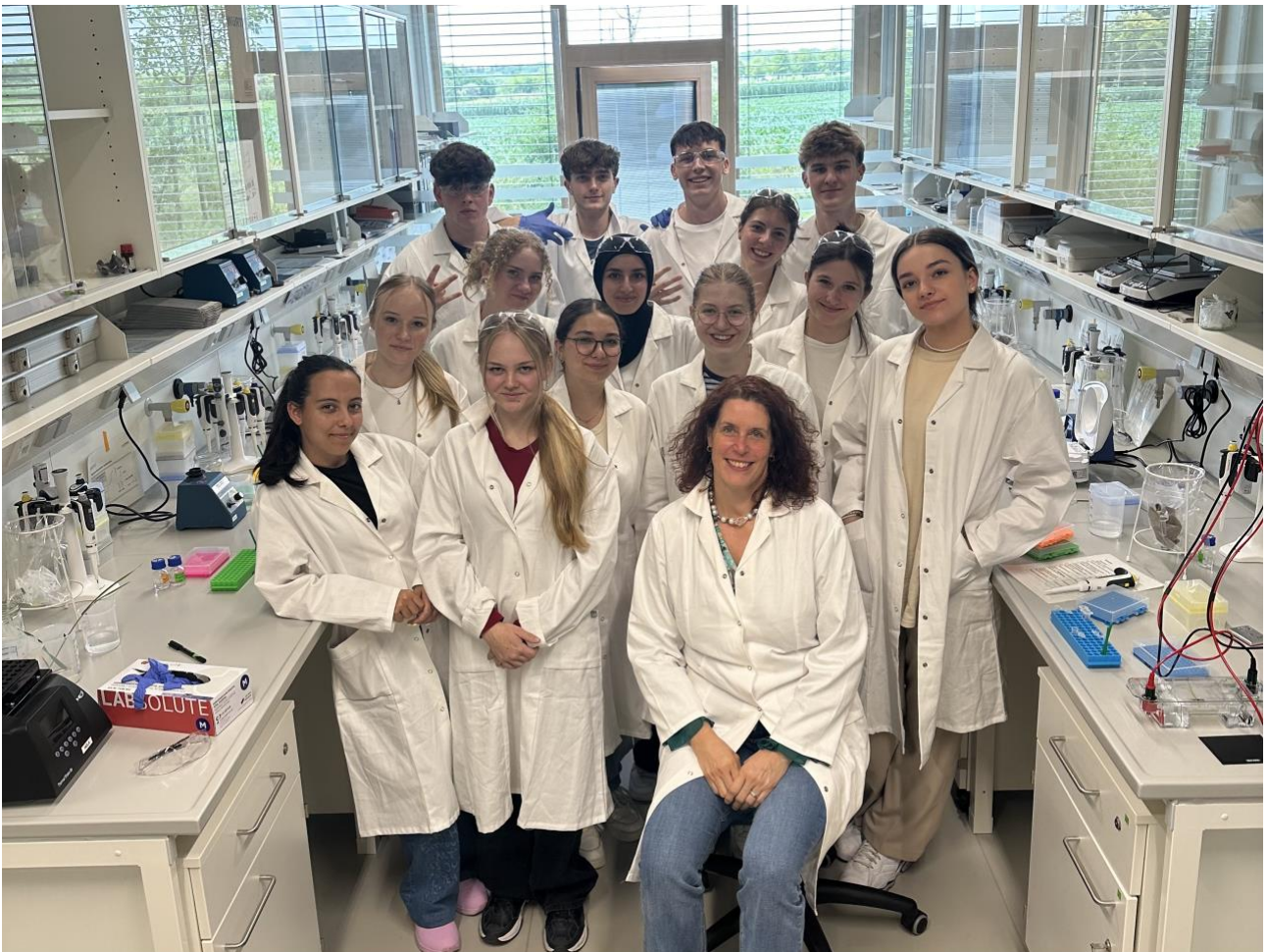


Eintägige Fachexkursion am 24.6.24 nach Hohenheim ins Schülerlabor HoLaScience

Wir, der Biologie Leistungskurs vom Limes Gymnasium Welzheim sind am 24.06.2024 für ein Praktikum an die Universität Hohenheim gefahren, um die praktische Durchführung und die Laborarbeit in der Genetik und der Gentechnik zu erlernen. Dies haben wir dort am Beispiel der Gerste durchgeführt.

Dankenswerterweise konnte wir mit Hilfe der finanziellen Unterstützung durch die Kurt-und-Eva-Schneider-Stiftung und der Elternkasse mit einem Kleinbus direkt am Limes-Gymnasium starten.



Grüne Gentechnik - was ist das?

Unter dem Begriff Grüne Gentechnik versteht man Verfahren, mit denen man gezielt Gene in das Erbgut von Pflanzen übertragen kann. Mit gentechnischen Verfahren war erstmals ein Transfer von Genen einer Art auf eine andere Art machbar. Wie das möglich ist, erläutern wir hier:

In der Pflanzenzüchtung versucht man auf verschiedenen Wegen, Nutzpflanzen mit neuen und nützlichen Eigenschaften auszustatten. Die Entschlüsselung der genetischen Grundlagen – man spricht vom Genotyp einer Pflanze – und die Aufklärung der Funktion

der einzelnen Gene eröffnete neue Perspektiven: Eine Pflanze kann durch gezielte Übertragung eines oder mehrerer Gene aus einem anderen Organismus mit neuen Eigenschaften ausgestattet werden. Durch gentechnische Verfahren war dies Ende des 20. Jahrhunderts erstmals möglich.

Nutzt man gentechnische Verfahren bei Pflanzen bzw. in der Landwirtschaft, so wird dies als Grüne Gentechnik bezeichnet. Entsprechend spricht man von Roter Gentechnik im medizinisch-pharmazeutischen Bereich oder von Weißer Gentechnik bei industriellen Anwendungen (z. B. zur Herstellung von Feinchemikalien).

Transgene Organismen sind Lebewesen, deren Erbgut durch gentechnische Methoden gezielt verändert wurde, indem Gene einer anderen Art in ihr Genom eingefügt wurden. Dies wird durch die Gentechnik ermöglicht, welche dafür sorgt, dass ein Transfer von Genen zwischen Arten stattfindet, die auf natürliche Weise nicht kreuzbar sind. Diese Organismen erhalten dadurch neue Eigenschaften, die sie auf natürlichem Wege nicht entwickelt hätten. Bei Pflanzen zielen die Veränderungen meist auf verbesserte Resistenzen gegen Schädlinge oder auch Umwelteinflüsse ab. Das übertragene Gen wird als Transgen bzw. Fremdgen bezeichnet.

Um einen transgenen Organismus zu erstellen, identifiziert und isoliert man zuerst das gewünschte Gen aus dem Donor-Organismus. Dieses Gen wird dann in einen Vektor, wie ein Plasmid oder Virus, eingefügt, der als Transportmittel bzw. Gefährte dient.

Anschließend wird der Vektor mittels verschiedener Methoden wie Mikroinjektion, Elektroporation, Biolistik oder der Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* in die Zielzellen eingeführt.

Die Zellen, die erfolgreich transformiert wurden, werden selektiert, oft durch Markergene, die eine Antibiotikaresistenz verleihen. Diese selektierten Zellen werden dann kultiviert und vermehrt, um einen vollständigen Organismus zu regenerieren.

Schließlich wird der transgene Organismus auf die Anwesenheit und Funktion des eingeführten Gens getestet, um sicherzustellen, dass die gewünschten Eigenschaften vorhanden sind.

Werden nach der Genübertragung die Zellen mit Antibiotika behandelt, können nur diejenigen überleben, die das Antibiotikaresistenzgen enthalten. Aus diesen erfolgreich transformierten Zellen können im Labor wieder vollständige Pflanzen herangezogen werden (Regeneration). Diese Pflanzen enthalten die neu übertragenen Gene in allen Zellen.

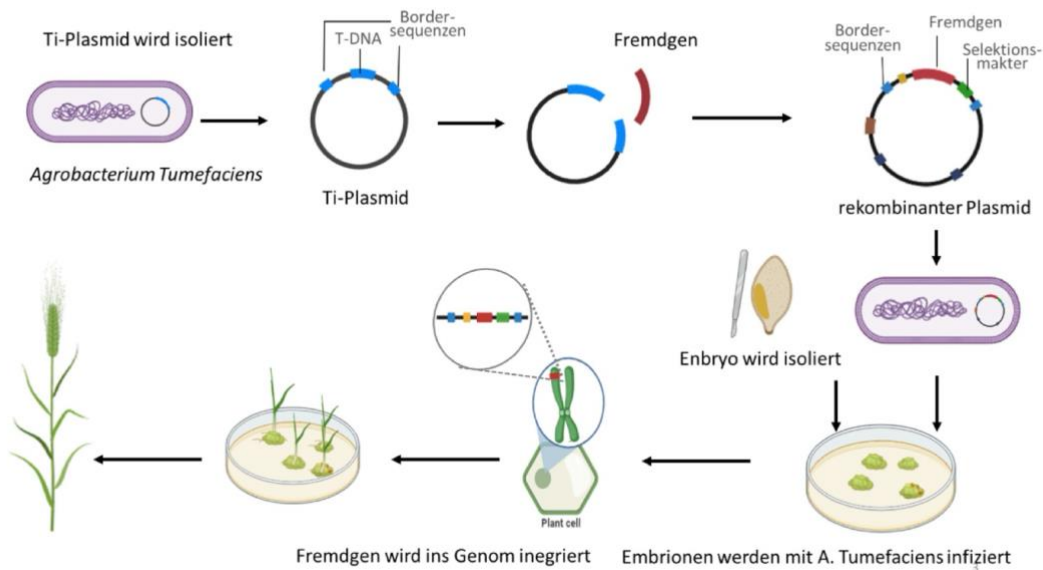
Ein prominentes Beispiel für transgene Pflanzen sind die Nutzpflanzen, da sie die Welternährung sichern, hier in Europa unter anderem Getreide. In unserem Versuch ging es um die Gerste.

Gerste ist eines der ältesten und wichtigsten Kulturpflanzen, die weltweit angebaut wird, insbesondere für die Nahrungsmittelproduktion, die Viehfütterung und die Bierherstellung. Die genetische Modifikation von Gerste hat in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte gemacht.

Die Modifikation erfolgt typischerweise durch das *Agrobacterium* vermittelte Transformation.

Hierbei wird das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* verwendet, das natürliche Gene in Pflanzenzellen einbringt. Die zu transferierende Gene werden in das Plasmid des Bakteriums eingebaut, das dann die Gene in die Pflanze überträgt.

Das Bakterium trägt ein Plasmid (DNA-Ring), das wegen seiner tumorinduzierenden Wirkung als Ti-Plasmid (tumor inducing) bezeichnet wird. Substanzen, die von der verletzten Pflanze ausgeschieden werden, locken das Bakterium an und aktivieren die Virulenzgene (vir) auf dem Ti-Plasmid. Die dadurch gebildeten Enzyme bewirken, dass ein Einzelstrang der T-DNA, ein spezieller Abschnitt des Ti-Plasmids, abgeschnitten und in die Pflanzenzelle eingeschleust wird. Dort wird der Einzelstrang zu einem Doppelstrang ergänzt und in ein Chromosom eingebaut. Dadurch wird die Pflanzenzelle reprogrammiert: Die auf der T-DNA kodierten Enzyme synthetisieren Wachstumshormone, die das Gewebe wachsen lassen. Diese Methode wurde genutzt, sodass neue Gene auf Pflanzen übertragen werden.

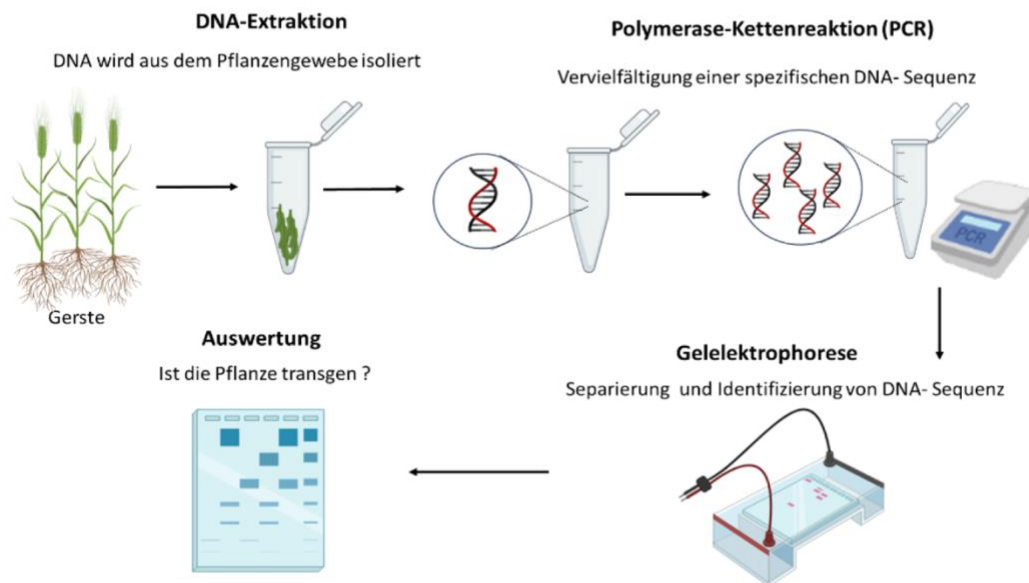


Unser Versuch

In einem Experiment zur Untersuchung der Integration eines Fremdgens in das Gerstengenom wurde DNA aus Pflanzenmaterial, in diesem Fall Gerste, extrahiert. Die extrahierte DNA wurde dann mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt, um eine spezifische DNA-Sequenz zu amplifizieren. Anschließend wurden die resultierenden DNA-Fragmente mittels Gelelektrophorese sichtbar gemacht.

Wir konnten anhand der Ergebnisse der Gelelektrophorese beurteilen, ob eine Integration eines Fremdgens in das Gerstengenom stattgefunden hat. Durch den Vergleich der Größe und des Musters der DNA-Fragmente konnten wir feststellen, ob das Fremdgen in das Genom der Gerste eingefügt wurde. Abweichungen von den erwarteten Ergebnissen könnten auf eine erfolgreiche Integration des Fremdgens hinweisen, während keine Veränderungen auf eine fehlende Integration hindeuten würden.

Dieses Experiment ermöglichte uns, die Techniken der DNA-Extraktion, PCR und Gelelektrophorese anzuwenden und ihre Fähigkeiten zur Bewertung genetischer Veränderungen in Pflanzen zu verbessern. Es zeigte auch, wie molekulargenetische Methoden eingesetzt werden können, um Veränderungen im Genom von Pflanzen zu untersuchen und zu analysieren.



DNA Extraktion: Erster Schritt

DNA (Deoxyribonucleicacid) ist heutzutage in aller Munde - nicht nur sprichwörtlich, sondern tatsächlich, denn DNA ist ein wertvoller Bestandteil unserer Nahrung! Egal, ob jemand lieber Schnitzel, Tofu, Reis, Nudeln, Äpfel, Gugelhupf oder Schokolade isst – überall ist DNA drin. Denn unsere Lebensmittel stammen aus der Natur, von Pflanzen, Tieren und Pilzen. Und alles, was lebt, besteht aus Zellen, deren Zellkerne als Erbmaterial DNA enthalten, auf der wie aufgefädelt die Gene liegen. Täglich nehmen wir mit der Nahrung ca. 1 g DNA auf, die im Magen in einzelne, winzige Bausteine zerlegt wird.

Mit folgendem, einfachen Experiment kann eindrucksvoll DNA aus verschiedenen Obst- und Gemüsesorten gewonnen werden:



Sie brauchen

- Salz
- Destilliertes Wasser
- Spülmittel
- Messer und Schneidebrett
- 2 Marmeladegläser, Plastikbehälter
- Stabmixer oder Mixer
- Isopropanol
- Trichter
- Kaffeefilter oder Küchenrolle

(Quelle: <https://www.openscience.or.at/de/schulcorner/genetik-und-zellbiologie/2013-11-21-wie-man-dna-aus-obst-und-gemuese-isoliert/>)

Mit dieser sprichwörtlich in jeder Küche durchführbaren Experiment ist unser Laborergebnis nicht vergleichbar: Wir erhielten hochreine DNA, die dann weiterbearbeitet und untersucht werden konnte.

Zweiter Schritt: PCR – Vervielfältigung der extrahierten DNA



Die Abkürzung PCR steht für „Polymerase Chain Reaction“ (Polymerase-Kettenreaktion). Es handelt sich um eine enzymatische Methode, mit der im Reaktionsgefäß (in vitro) milliardenfach Kopien einer spezifischen DNA- Sequenz erzeugt werden können.

Dritter Schritt: Gelelektrophorese

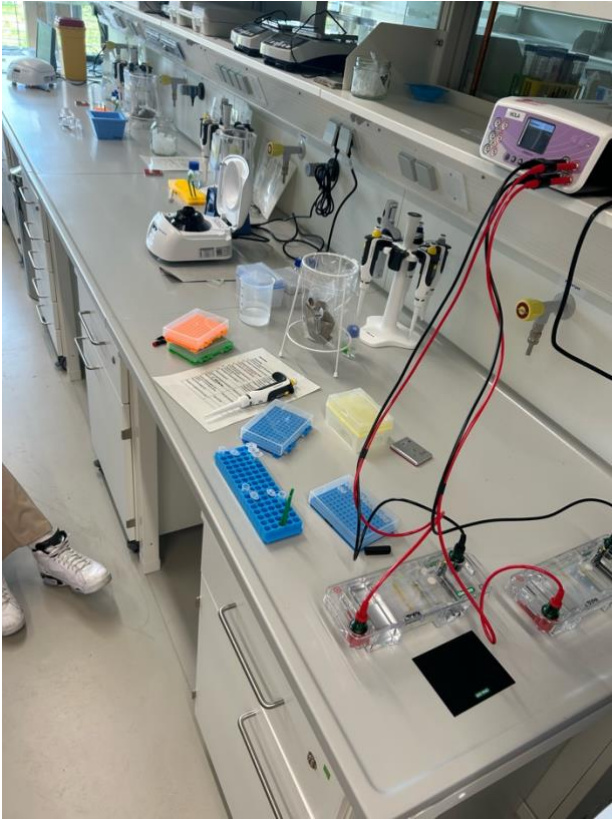
Die Gelelektrophorese ist eine zentrale Labortechnik in der Biologie und Biochemie, die verwendet wird, um Moleküle wie die DANN, aber auch Proteine und RNA nach ihrer Größe und Ladung zu trennen. Die Technik wird in Bereichen wie der Genetik, Gentechnik und Molekularbiologie angewendet. Die einzelnen Schritte der Gelelektrophorese lauten wie folgt:

1. Probenvorbereitung

Zu Beginn der Gelelektrophorese werden die zu trennende Moleküle in eine Pufferlösung gegeben. Diese Pufferlösung stabilisiert die Proben und erhöht die elektrische Leitfähigkeit. Dadurch wird gewährleistet, dass die Moleküle während des Elektrophoreseprozesses stabil bleiben und sich gleichmäßig bewegen können.

2. Gelvorbereitung

Ein Gel, aus Agarose, wird hergestellt und in eine Formgegossen. Das Gel bildet eine poröse Matrix, wie ein engmaschiges Netz, durch die sich die Moleküle bewegen können. Agarosegele werden typischerweise für die Trennung von DNA verwendet. Die Porengröße des Gels kann durch die Konzentration des verwendeten Materials angepasst werden, um verschiedene Molekülgrößen effizient zu trennen.



3. Auftragen der Proben

Die Proben werden in kleine Vertiefungen, sogenannte Wells, in das Gel aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wird oft ein "Marker" verwendet, der Moleküle bekannter Größen enthält. Dieser Marker dient als Referenz, um die Größe der getrennten Moleküle später kalibrieren zu können. Das Gel wird in eine Elektrophoresekammer gelegt, die mit einem Puffer gefüllt ist. Elektrische Spannung wird angelegt, wobei das Ende mit den Wells negativ (Kathode) und das gegenüberliegende Ende positiv (Anode) ist. Da DNA und RNA negativ geladen sind (aufgrund ihrer Phosphatgruppen), bewegen sie sich zur Anode (positiven Pol).

Je nach Länge werden die PCR-Produkte im Netzwerk des Agarosegels in ihrer Wanderung unterschiedlich stark behindert, so dass die kürzeren PCR-Produkte schneller wandern als die längeren. Gleichzeitig befindet sich in dem Agarosegel ein spezieller Farbstoff, der sich in DNA-Doppelstränge einlagert. Wird dieser DNA-Farbstoff Komplex mit kurzwelligem Licht bestrahlt, sendet er Licht in einem längeren Wellenbereich aus (er "fluoresziert").

