

Bericht zum Praktikum der Biologieolympiade 2003

von Marika Busse

Allgemein:

Einrichtung: Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie

Ort: Golm bei Potsdam

Arbeitsgruppe: AG Zrenner „Nukleotide und Zucker“

Betreuung: Silke Koslowsky und Dr. Rita Zrenner

Thema: „*Arabidopsis thaliana*“

Zeitraum: 1. bis 26. September 2003 (4 Wochen)

Aufgabenfeld:

Meine Betreuerin Silke arbeitet derzeit an ihrer Promotion mit dem Ziel, über genetische Veränderungen eine Erhöhung des Fettgehalts in den Samen der Pflanze Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) zu erreichen.

Ein Teilprojekt der Promotion umfasst die Erhöhung des Phosphoribosylpyrophosphatgehalts (PRPP). Dieses Molekül ist das Grundgerüst für alle Nukleotide und hat somit eine wichtige Aufgabe im Stoffwechsel der Zellen. Es wird mit Hilfe des Enzyms PRPP-Synthase aus Ribulose-5-Phosphat (R5P) synthetisiert. Die Aktivität des Enzyms wird durch den ATP/AMP-Gehalt reguliert.

Um eine Erhöhung des Lipidgehaltes zu erzielen, wurde aus einem Pilz-Genom ein Gen (Fragment) isoliert und in einem Bakterienvektor „gespeichert“. (Ein Vektor enthält die Information für eine Antibiotikaresistenz zur späteren Selektion, eine Vermehrungssequenz und eine sogenannte Multiple Cloning Site, in welche neue Gen-Fragmente cloniert werden können.)

Das Gen aus dem Pilz codiert PRS, welches PRPP aus R5P synthetisiert und durch ATP/AMP kontrolliert wird (Wildtyp [Pc]). Zusätzlich wurde eine mutierte Form dieses Gens genutzt, welche zwar das Enzym codiert, dessen Aktivität aber nicht durch ATP/AMP reguliert werden kann, da die

entsprechenden Bindungsstellen dafür fehlen. Demzufolge wird hier ständig PRPP synthetisiert (Mutante [Mc]). Die zwei Fragmente wurden anschließend in je einen neuen Vektor cloniert, der für die Transformation von *A. thaliana* genutzt werden kann. Beide neuen Plasmide, sowie ein Leervektor zur Kontrolle [Empty Vector Control], wurden dann über das Agrobakterium in Arabidopsis eingeschleust, deren transformierte Samen zu gentechnisch veränderten Pflanzen gezogen wurden (in mehreren Generationen). Bei diesen Pflanzen wird das Enzym im Zellplasma exprimiert.

Ich habe einerseits verschiedene Versuche durchgeführt, um die Vitalität der bereits transformierten Samen zu testen (Projekt A), andererseits habe ich selbst molekularbiologisch gearbeitet und ein neues Plasmid in E.coli cloniert (Projekt B), welches später auch über Agrobakterien in Arabidopsis transformiert werden soll.

Projekt A:

Um zu überprüfen, welche der Samen am besten unter verschiedenen Wachstumsbedingungen lebensfähig sind, habe ich einen *Keimungstest* und einen *Wurzelwachstumstest* angesetzt, kontrolliert und ausgewertet. Dazu musste ich zunächst die sterile Arbeitsweise erlernen.

Für den Keimungstest brachte ich von 7 verschiedenen Linien (1 Empty Vector Control, 3 Pc's und 3Mc's) Samen (steril) auf Platten (steril) mit Filterpapier (ohne Nährstoffe) aus. Diese Samen konnten 2 Wochen in einer Wachstumskammer (Percival) bei 20°C und 24 Stunden Licht am Tag keimen. Zum Vergleich haben wir die 7 Linien außerdem nicht steril auf den Platten ausgebracht. Zur Auswertung bestimmten wir die durchschnittliche Masse eines Keimlings von jeder Linie. Leider ergab unsere Auswertung, dass der Versuch wiederholt werden muss, da beim Ernten unterschiedliche Wassermengen mitgewogen wurden und somit die Auswertung keine sinnvollen Daten lieferte.

Der Wurzelwachstumstest war erfolgreicher. Für diesen Versuch habe ich vier verschiedene Agar-Medien angesetzt:

Medium 1: Vollmedium mit Saccharose

Medium 2: Vollmedium ohne Saccharose

Medium 3: Mangelmedium ohne organischen Stickstoff mit Saccharose

Medium 4: Mangelmedium ohne organischen Stickstoff ohne Saccharose

Die Medien habe ich auf 56 (pro Linie 8) Platten gegossen. Darauf habe ich anschließend jeweils zwei Reihen mit je 10 vereinzelt (sterilen) Samen ausgebracht. Diese Platten wurden je zwei Tage dunkel und kalt (4°C) aufbewahrt und danach im Percival (24-Stunden-Tag) senkrecht aufgestellt, damit die Wurzeln dem Gravitropismus folgend nach unten wachsen konnten. Ich habe alle zwei Tage die Wurzellänge markiert und nach 12 Tagen ausgemessen.

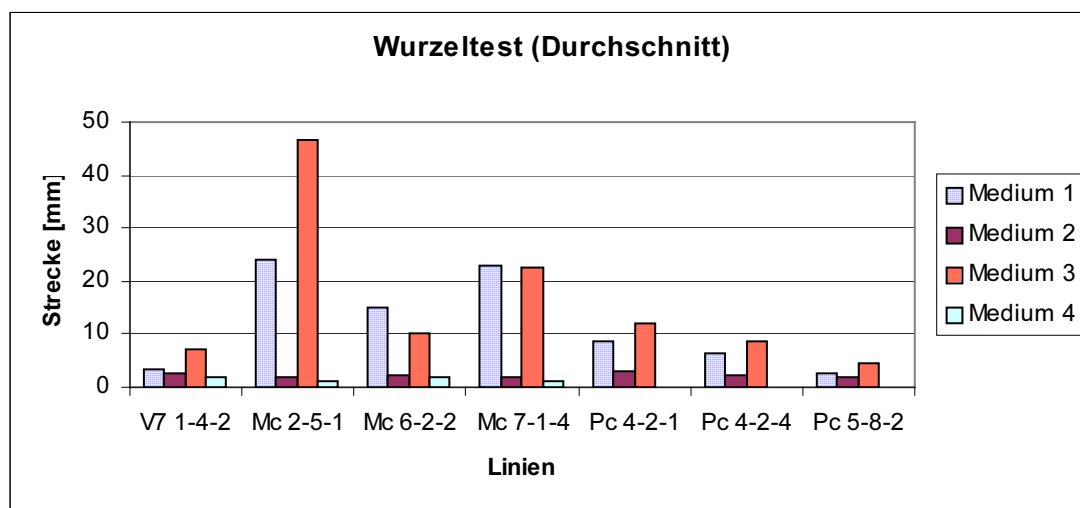


Abb.:1 Wurzeltest (Durchschnittswerte) mit den von Silke transformierten Arabidopsis Samen [V: Empty Vector Control, Mc: Mutante, Pc: Wildtyp]

In Abb.: 1 ist die durchschnittliche Wurzellänge der Linien nach 12 Tagen dargestellt. Die Wurzeln der Samen, denen Saccharose zur Verfügung stand, wuchsen schneller, besonders die mutierte Form bildete lange Wurzeln aus. Diese Pflanzen konnten die Energie aus dem Zucker sofort nutzen, während die Pflanzen ohne Saccharose erst durch Photosynthese energiereichen Zucker produzieren mussten.

Außerdem fällt auf, dass die Pflanzen in Medium 3 (Sac +, org. N -) häufig das stärkste Wurzelwachstum der Linie zeigten. Diese Pflanzen versuchten durch intensives Ausbilden der Wurzel Bereiche mit mehr Stickstoff zu finden.

Weiterhin stellten wir fest, dass die Pflanzen mit Zucker mehr Blätter und Nebenwurzeln ausbildeten.

Projekt B:

Während die Samen keimten und die Wurzeln gewachsen sind, habe ich im Labor mit E.coli Bakterien weiter gearbeitet. Meine Aufgabe bestand darin, die beiden Fragmente (Wildtyp/Mutante) in einen neuen Vektor einzubauen, der die Codierung für ein Transpeptid enthält. Dieses Transpeptid hat die Funktion, dass das exprimierte Protein (PRS) in die Plastiden exportiert wird.

Ich habe dazu den Vektor und die Fragmente mit Restriktionsendonukleasen auf- bzw. ausgeschnitten. Anschließend wurden die Fragmente durch eine Ligation in den Vektor cloniert. Beide Schritte wurden mittels Restriktionsverdau und Gelelektrophorese kontrolliert. Diese Arbeit hätte also theoretisch ca. 2 Wochen in Anspruch genommen. Zuerst konnten jedoch die Fragmente nicht sauber ausschnitten werden (3 Versuche). Im Anschluss konnte nicht sicher festgestellt werden, ob die Ligation korrekt erfolgt ist, da bei den Testrestriktionen immer zu viele Fragmente entstanden. So zog sich der Prozess über 3 Wochen hin, in denen ich hoffnungsvoll meine Versuche wiederholt habe- leider ohne Erfolg. Aber auch das ist Forschung.

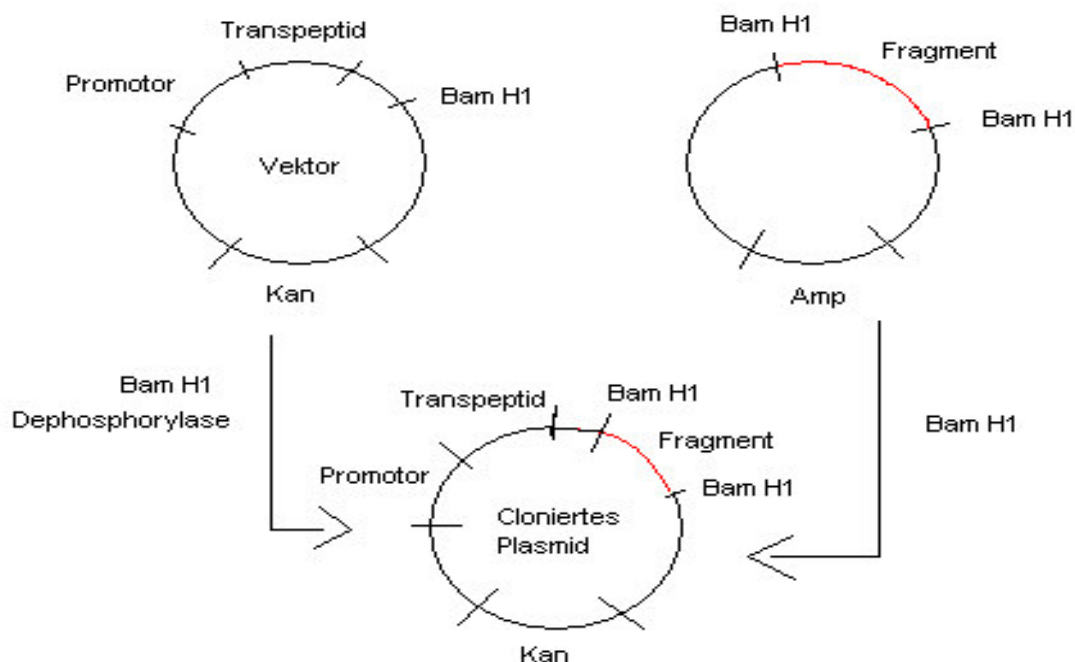


Abb.: 2 Klonierungsschema

Methoden/ Arbeitsbereich:

Allgemein: Führung eines Laborjournals

Projekt A: Sterile Arbeitsweise

Medienansetzung

Plattenvorbereitung

Projekt B: Transformation in E.coli

Vermehrung von E.coli

Isolation von Plasmid-DNA aus E.coli

Restriktionen

Ligation

Gelelektrophorese

Ergebnisauswertung