

Praktikumsbericht

**zum Praktikum am Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung
und Populationsgenetik an der Universität Hohenheim in der
Fachgruppe für Nutzpflanzenbiodiversität und Züchtungsinformatik**

Anna Laura Wittek

26. Juli bis 17. August 2012

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Projektinformationen	4
2.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
2.2. Epigenetik	4
2.3. Keimruhe	5
2.4. Vorrangegangene Experimente	6
3. Material und Methoden	7
3.1. Wirkung von 5-Azacytidin	7
3.2. Keimungsexperiment	8
3.3. Wiederholung des Keimungsexperiments	9
3.4. DNA-Extraktion	10
3.5. Gelelektrophorese	11
4. Ergebnisse	11
4.1. Keimungsexperiment 1	11
4.2. Keimungsexperiment 2	11
4.3. Gelelektrophorese	11
5. Diskussion	11
5.1. Keimungsexperiment 1	12
5.2. Keimungsexperiment 2	12
5.3. DNA-Extraktion und Gelelektrophorese	14
6. Fazit	14
A. Anhang	16

1. Einleitung

Momentan besuche ich das Friedrichs-Gymnasium in Herford. Nach den Sommerferien werde ich dort in die 12. Klasse gehen. Ich interessiere mich sehr für die Biologie, insbesondere Molekularbiologie und Genetik.

Dieses Praktikum wurde mir durch die Teilnahme am Auswahlwettbewerb zur internationalen BiologieOlympiade durch den Förderverein der Biologieolympiade e.V. vermittelt. Über die Möglichkeit, ein solches Praktikum in einer Forschungsgruppe machen zu können bin ich sehr glücklich, da ich auf diese Weise Einblicke in den wissenschaftlichen Alltag sowie Themengebiete erlangen konnte, wie sie Schüler normalerweise nicht erhalten.

Das Institut für Pflanzenzüchtung, Saatgutforschung und Populationsgenetik arbeitet schwerpunktmäßig an der Optimierung konventioneller Zuchtmethoden, Qualitäts- und Inhaltsstoffzüchtung sowie die Anpassung von Nutzpflanzen an neue Einsatzmöglichkeiten. Die Fachgruppe für Nutzpflanzenbiodiversität und Züchtungsinformatik hat das Hauptziel, zu verstehen, wie Pflanzen sich an ihre Umwelt anpassen und die entsprechenden Gene zu identifizieren, die für Anpassung verantwortlich sind.



Abbildung 1: Das Gebäude, in dem die Gruppe untergebracht ist

Während meines Praktikums bestand meine Hauptaufgabe in der Durchführung eines Experiments zur epigenetischen Vererbung bei *Arabidopsis thaliana*. Dazu untersuchte ich die Keimungsrate von Samen, deren Mutterpflanzen aus verschiedenen Anbauten stammten und jeweils entweder in einer kalten oder warmen künstlichen Umgebung aufgewachsen waren. Aus vorhergehenden Experimenten war hervorgegangen, dass Samen von in Wärme aufgewachsenen Individuen eine stärkere Dormanz zeigten als Samen von im Kalten gewachsenen Eltern. In meinem Experiment sollte ich herausfinden, ob die Dormanz auf DNA-Methylierung zurückgeht, was eine epigenetische Modifikation darstellen würde und durch die Zugabe einer Demethylierungsreagenz aufzuheben wäre. Weiterhin habe ich bei anderen Experimenten zugesehen oder geholfen und das Statistikprogramm R kennen gelernt, mit dem ich die Diagramme erstellt habe, sowie das Textverarbeitungsprogramm \LaTeX , womit ich diesen Bericht verfasst habe.

2. Projektinformationen

Mein Projekt lässt sich dem Gebiet der Evolutionsforschung/Epigenetik zuordnen.

2.1. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand) ist eine weit verbreitete Pflanzenart der Familie der Kreuzblütler (Brassicaceae), der auch viele für den Menschen wichtige Nutzpflanzen (beispielsweise Kohl, Brokkoli und Raps) angehören. Auf Grund ihrer Eigenschaften eignet sie sich gut als Modellorganismus.

Ihr Genom ist vollständig sequenziert und besteht aus 120.000 kbp, die etwa 20.000 Gene bilden und auf 5 Chromosomen verteilt sind. Aus ihrer weiträumigen Verbreitung resultiert die Verfügbarkeit vieler verschiedener Ökotypen (=Akzessionen), die zur Forschung genutzt werden können. In der Praxis sehr vorteilhaft ist die Tatsache, dass *Arabidopsis* einen relativ kurzen Lebenszyklus von 6 Wochen hat, was die Wartezeiten gegenüber der Forschung an anderen Pflanzen verkürzt.

Eine weitere Tatsache, die *A. thaliana* so geeignet macht, ist ihre geringe Größe: Die Blattrosette erreicht einen Durchmesser von 2 bis 10 Zentimetern, reife Pflanzen werden 15 bis 20 Zentimeter groß. Die Blüten sind 2 mm lang und produzieren oft mehrere hundert Schoten mit insgesamt über 5000 Samen von je 0,5 mm Durchmesser. Sie können in Petrischalen oder Töpfen im Gewächshaus oder Labor angezogen werden, wodurch sie platzsparend zur Forschung verwendet werden können. Außerdem ist *A. thaliana* zur Selbstbestäubung fähig, wodurch sich leicht rezessive Individuen züchten lassen. Es sind weiterhin viele Mutanten verfügbar (Meinke et al., 1998)

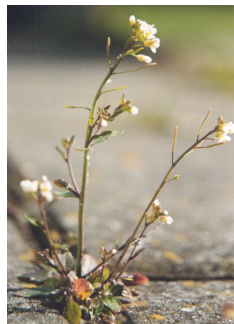


Abbildung 2: *A. thaliana*, die Pflanze, deren Samen als Versuchsobjekt dienen
Quelle: http://en.wikipedia.org/wiki/Arabidopsis_thaliana

2.2. Epigenetik

Epigenetik ist die Erforschung erblicher Unterschiede der Genexpression und -funktion, die nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz erklärt werden können (Richards, 2006; Bird, 2007). Diese Veränderungen werden durch verschiedene molekulare Mechanismen bewirkt:

- DNA-Methylierung
- Veränderung der Chromatinstruktur, v.a. durch acetylierung oder methylierung von Histonproteinen
- nicht-codierende RNAs, besonders siRNAs und miRNAs (Rival et al., 2010)

In meinem Experiment habe ich mich mit DNA-Methylierung befasst, daher werde ich nur diese hier genauer erläutern.

Das Enzym DNA-Methyltransferase ist in der Lage, Methylreste auf Cytidine in der DNA zu übertragen; diese werden dann zu Methylcytidin (Siehe Abbildung 3). Besonders häufig werden Cytidine methyliert, auf die an nächster Stelle ein Guanin-Nucleotid folgt. Durch die Symmetrie dieser Stellen kann die Methylierung bei der Replikation leicht auf den Tochterstrang kopiert werden. Solche Stellen werden CpG (Cytosin-phosphatidyl-Guanin) genannt, und Bereiche, in denen sich besonders viele CpGs finden, heißen CpG-Inseln. Diese finden sich oft in Promotorregionen.

Die starke Methylierung eines Promotors ist häufig mit reduzierter Aktivität des betreffenden Gens verbunden, beispielsweise durch die Bindung von Proteinen an die methylierten Stellen, wodurch sie den Promotor für Transkriptionsfaktoren blockieren (Siehe Abbildung 4).

Der Grad der Methylierung ist Art- und Gewebespezifisch, und Methylierung spielt eine große Rolle bei der Differenzierung von Zellen im Laufe der Embryonalentwicklung. Krebszellen haben oft ein verändertes Methylierungsmuster (Fenaux, 2005).

Was die epigenetische Vererbung grundlegend von genetischen Prozessen unterscheidet, ist, dass durch Umwelteinflüsse verursachte Veränderungen vererbt werden können; dies stellt einen zusätzlichen, sehr direkten Weg für evolutive Veränderungen dar.

(Richards (2006), Whitelaw and Whitelaw (2006), Kass et al. (1997), Graw (2010) und Klug et al. (2007))

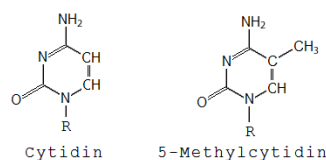


Abbildung 3: 5-Methylcytidin unterscheidet sich von normalem Cytidin durch das Ersetzen eines Wasserstoffatoms durch eine Methylgruppe am 5. Kohlenstoffatom

2.3. Keimruhe

Die Keimruhe (Samenruhe, Dormanz) ist ein Zustand der Samen, in dem Wachstum und Entwicklung eingestellt sind und die Stoffwechselrate sehr gering ist. Sie können auf diese Weise lange Zeiten mit schlechten Umweltbedingungen überdauern, wie beispielsweise

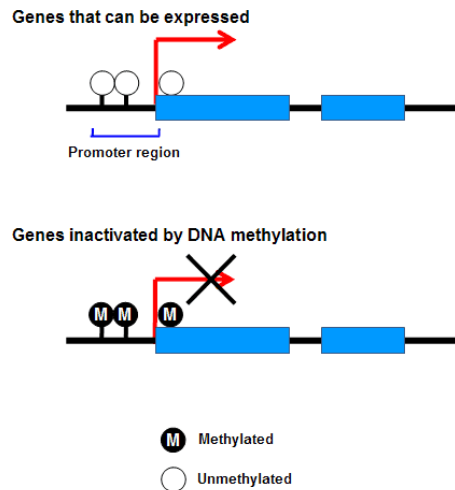


Abbildung 4: Die Genexpression wird durch die Methylierung der DNA in einer Promotorregion verhindert

Quelle: http://www.ncc.go.jp/en/nccri/divisions/14carc/14carc01_1.html

lange Trockenperioden in der Wüste. Die Dormanz wird durch von Art zu Art variierende Lebensbedingungen beendet, manche Arten behalten die Dormanz sogar bei günstiger Umgebung bei und brechen sie erst bei bestimmten Umweltreizen. Dadurch erhöhen sich für den Samen die Chancen, dass die Keimung unter Bedingungen stattfindet, die ein Überleben der Pflanze wahrscheinlich machen. Beispielsweise keimen Samen in der Wüste nicht bereits bei kleinen Schauern, sondern nur nach starkem Regen aus. Außerdem wird ein Keimen der Samen noch in der Frucht verhindert. (Neil A. Campbell, 2009)

2.4. Vorrangegangene Experimente

In einem vorausgehenden Versuch wurden Pflanzensamen aus 3 verschiedenen Akzessionen unter unterschiedlichen Bedingungen aufgezogen: Entweder in der Kühlkammer bei 4°C und Kurztagsbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit) oder im Gewächshaus bei einem Temperaturzyklus von 21°C/ 16°C und Langtagsbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkelheit). Bei der anschließenden Aussaat der Samen dieser Pflanzen fiel auf, dass die Samen, deren Eltern im kalten aufgewachsen waren, stärker keimten als jene von Elternpflanzen aus dem Gewächshaus (Siehe Abbildung 5). Da dieser Unterschied innerhalb nur einer Generation entstand, ist es nicht möglich, dass er durch Mutation und Selektion hervorgerufen wurde. Aus diesem Grund ist eine epigenetische Ursache wahrscheinlich.

Ob jedoch die Temperatur alleine für die Unterschiede in der Keimungsrate verantwortlich war, ist nicht zu sagen, da sich die beiden Standorte noch durch weitere Faktoren voneinander unterschieden. Dies beeinträchtigt die weiteren Untersuchungen jedoch nicht.

In einem anderen Versuch wurden dormante Samen mit verschiedenen Konzentrationen

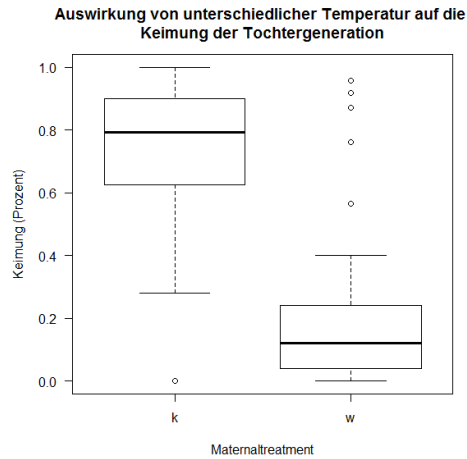


Abbildung 5: Samen mit im kalten aufgewachsenen Eltern (k) keimten stärker als Samen von Elternpflanzen, die im warmen aufwuchsen (w)

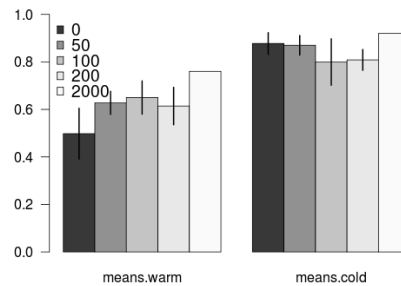


Abbildung 6: Auswirkung von 5-Azacytidin auf die Keimungsrate

von 5-Azacytidin behandelt. Auf Basis der Ergebnisse ließ sich ein Einfluss von Azacytidin auf die Keimung der Nachkommen von in Kälte aufgewachsenen Pflanzen vermuten (S. Abbildung 6). Ob dieses Ergebnis reproduzierbar ist habe ich in meinem Experiment überprüft.

3. Material und Methoden

3.1. Wirkung von 5-Azacytidin

5-Azacytidin (S. Abbildung 7) ist ein Basenanalogon, welches anstelle von Cytidin in die DNA eingebaut werden kann (Klug et al., 2007).

Dadurch wird die DNA-Methyltransferase irreversibel gehemmt: Bindet sie an eine CpG-

Region um das unmethylierte 5-Azacytidin entsprechend dem methylierten Cytidin des Mutterstrangs zu methylieren, so wird sie irreversibel gebunden und somit der Zelle entzogen. Auf diese Weise wird schon bei geringer Konzentration von eingebautem Azacytidin nahezu der gesamte Gehalt der Zelle an DNA-Methyltransferase inaktiviert, und es kann keine Methylierung mehr stattfinden. Dadurch kommt es in der Zelle zu Hypomethylierung (Creusot et al., 1982), was zu gesteigerter Transkription führt. Dieser Effekt tritt jedoch nur nach mehreren Replikationen der DNA auf, da nur durch den Einbau von Azacytidin in DNA-Stränge während der Replikation eine Hemmung der Methyltransferase stattfinden kann.

Da Azacytidin in Wasser gelöst instabil ist wird es gefroren aufbewahrt.

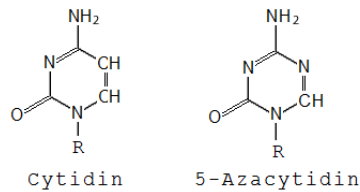


Abbildung 7: Bei 5-Azacytidin ist das 5. Kohlenstoffatom des Cytidins durch ein Stickstoffatom ersetzt

3.2. Keimungsexperiment

Um herauszufinden, ob 5-Azacytidin in der Lage ist, durch Demethylierung der Samen-DNA die Dormanz zu beenden, haben wir Samen der drei verschiedenen Akzessionen ausgesät, die bereits im vorhergehenden Versuch verwendeten wurden (36 („dog-4“, Türkei, 38. Breitengrad, 1475m über Normalhöhenull), 61 („xan1“, Aserbaidschan, 38. Breitengrad, 7m ü. NHN) und 67 („bur-0“ aus Schottland, 58. Breitengrad, 7m ü. NHN)). Ihre Elternpflanzen sind zum einen Teil unter Kälte-, zum anderen unter Wärmebehandlung gewachsen.

Die Samen wurden zu je 25 in Petrischalen auf Filterpapier in Anzuchtschränken (genannt „GroBanks“) inkubiert, welche eine möglichst konstante Umgebung schufen, die den Einfluss von Umweltfaktoren auf das Ergebnis gering halten sollte. Sie wurden auf Langtagsbedingungen (16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit), einen Temperaturzyklus von 21 °C/ 19 °C sowie 100% Leuchtkraft der Fluoreszenzlampen und Rotlichtlampen eingestellt. Neben den Petrischalen haben wir auch noch Schalen mit Wasser in die Schränke gestellt, um die Luftfeuchtigkeit zu erhöhen. Desweiteren wurden die Petrischalen zusätzlich in den drei Schränken zufällig platziert, um noch mögliche kleinste Umweltunterschiede, die das Ergebnis beeinflussen könnten, zu vermeiden.

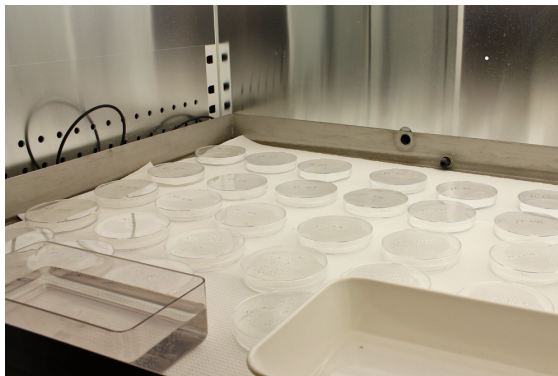
Zur Herstellung der Azacytidinlösung wurde zuerst eine kleine Menge der Stammlösung aufgetaut. Um 230 ml einer 2mM Lösung zu erhalten haben wir auf 230 ml dest. Wasser 460 µl Azacytidin-Stammlösung gegeben. Jeder Ansatz wurde anschließend mit entweder 5 ml Azacytidinlösung oder 5 ml destiliertem Wasser befeuchtet. Immer, wenn wir mit

Azacytidin gearbeitet haben, haben wir dies mit Handschuhen und unter dem Abzug gemacht, da es giftig ist. Da wir von jeder Behandlungskombination 7 Replikate gemacht haben, wurden insgesamt 84 Ansätze benötigt (siehe Tabelle 1).

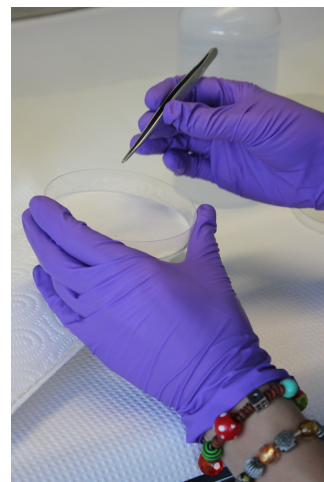
Accessions	Maternal Treatments	Treatments	Replicats	All
3	2	2	7	84

Tabelle 1

Das Sammeln von Ergebnisdaten begann am 3. Tag nach dem Aussähen der Samen. Es wurde jeden Tag in jedem Ansatz gezählt, wie viele der Samen gekeimt waren; dabei habe ich mir als Kriterium gesetzt, dass grüne Teile sichtbar sein müssen. Ab dem 2. Tag habe ich die ausgetrockneten Petrischalen wieder mit dest. Wasser befeuchtet. Als jedoch die Trockenheit das Ergebnis des Experiments bereits absehbar verfälscht hatte (vgl. Ergebnisse und Diskussion) haben wir nicht weiter gemessen und beschlossen, den Versuch noch einmal zu starten.



(a) Die Petrischalen im Anzuchtschrank



(b) Auszählen der gekeimten Samen

Abbildung 8

3.3. Wiederholung des Keimungsexperiments

Da der erste Versuch keine brauchbaren Daten geliefert hat, haben wir ihn noch einmal durchgeführt, diesmal jedoch einige Verbesserungen vorgenommen.

Da kein anderer Raum verfügbar war, haben wir die Pflanzen wieder in die Anzuchtschränke gestellt, jedoch die Lichtstärke auf 50% der Fluoreszenzlampen reduziert und

die Rotlichtlampen ganz ausgeschaltet. Die Temperaturen wurden leicht auf 20 °C/ 19 °C gesenkt und die Tag- und Nachtlänge auf je 12 Stunden angepasst. Diese Bedingungen entsprechen eher der natürlichen Keimungszeit von *A. thaliana*, dem Frühling.

Die Veränderungen dienen alle zur Senkung der Verdunstung, die zum einen durch die Wärme der Lampen bewirkt wird, als auch die starke Luftzirkulation, welche die Anzuchtschränke zur Abführung der produzierten Wärme durchführen. Außerdem haben wir alle Petrischalen mit Parafilm versiegelt, um ein Entweichen der Feuchtigkeit zu verhindern.

Aus Gründen der Sparsamkeit haben pro Petrischale nur noch 20 Samen gesät, ansonsten sind wir vorgegangen wie bei der ersten Versuchsdurchführung.

Am 3. Tag nach der Aussaat haben wir die erste Zählung durchgeführt und die Behandlung mit Azacytidin wiederholt. Dazu haben wir zuerst die alte Flüssigkeit abgesaugt, und dann wieder 5 ml der gleichen Azacytidin-Konzentration hinzugefügt, wie am Anfang. Bei den Kontrollen haben wir je 1 ml Wasser nachgefüllt, um den Verlust auszugleichen und einem erneuten Austrocknen vorzubeugen, da wir die Petrischalen zwischen den Messungen nicht erneut mit Parafilm verschlossen haben.

Die zweite Zählung haben wir am 6. Tag nach der Aussaat durchgeführt. Außerdem haben wir diesmal die Zahl der nicht gekeimten Samen ermittelt, damit die Keimung in Prozent angegeben werden konnte.

Die gesammelten Daten, ebenfalls die von der ersten Durchführung, habe ich anschließend mit R analysiert.

3.4. DNA-Extraktion

Um die DNA-Methylierung von bereits gewachsenen Pflanzen der gleichen Samen, mit denen auch ich gearbeitet habe, genauer zu analysieren, sollte noch eine HPLC durchgeführt werden. Dafür musste DNA aus den betreffenden Pflanzen extrahiert werden.

Die HPLC haben wir am Ende nicht durchgeführt, da dies nun doch in Zusammenarbeit mit einem Professor aus Nimwegen geschehen soll. Trotzdem haben wir DNA aus den Pflanzen isoliert und in einem Gel laufen lassen.

Wir haben dafür das „ISOLATE Plant DNA Mini Kit“ von Bioline verwendet.

Zuerst müssen 120 -180 mg Blattmaterial homogenisiert und mit Lysepuffer versetzt werden, um die Zellen zu zerstören und an die DNA zu gelangen. Anschließend wird eine RNase zugegeben, um die im Ergebnis unerwünschte RNA zu zerkleinern und die Probe kurze Zeit bei 65 °C inkubiert. Danach wird ein anderer Puffer zur Ausfällung der DNA hinzugegeben, die Probe 5 Minuten auf Eis inkubiert und danach zentrifugiert, um das Pflanzenmaterial von der Flüssigkeit zu trennen. Diese wird auf eine Filtersäule gegeben, die zum „Sieben“ der Probe dient; daher wird sie verworfen und das Filtrat, welches die DNA enthält, weiterverwendet. Es wird ein weiterer Puffer („binding buffer“) hinzugegeben und die Mischung auf eine weitere Säule pipettiert, deren Membran Nucleinsäuren auf Grund ihrer Ladung bindet. Es wird erneut zentrifugiert, das Filtrat verworfen, da die DNA ja in der Säule ist, und noch zwei mal unter Zugabe eines Waschpuffers zentrifugiert und jeweils das Filtrat verworfen. Im folgenden wird die DNA durch Zugabe eines Elutionspuffers von der Membran gelöst und findet sich nach dem

abzentrifugieren folglich im Überstand.

3.5. Gelelektrophorese

Die aus den Pflanzen gewonnene DNA haben wir in einem Gel laufen lassen um zu überprüfen, ob die Extraktion erfolgreich war.

Dazu wurde zunächst ein Gel gegossen, wofür wir 0,56g Agarose in 70 ml TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer) gelöst haben. Diese geringe Konzentration wurde gewählt, da es sich um große DNA-Moleküle handelte, die ein weiches Gel erfordern.

Die 4 DNA-Proben wurden je zwei mal verwendet, da wir ein mal 5 und ein mal 10 μ l DNA aufgetragen haben, so dass insgesamt 8 Proben ins Gel geladen wurden und zusätzlich 2 DNA-Leitern als Marker. Zu der DNA wurden 2 μ l Ladepuffer gegeben und die Proben mit Wasser auf 20 μ l aufgefüllt. Der Ladepuffer enthält GelRed zum anfärben der DNA. Dies ist eine Alternative zu Ethidiumbromid; es ist ungiftig, macht die DNA aber genau so gut unter UV-Licht sichtbar.

4. Ergebnisse

4.1. Keimungsexperiment 1

Die Anzahl der gekeimten Samen ist in Abbildung 9 in absoluten Zahlen dargestellt. Dies ist nicht optimal, da sich auf Grund kleiner Fehler, die bei der geringen Samengröße unvermeidbar waren, nicht immer gleich viele Samen in jeder Petrischale befanden. Da das Experiment jedoch abgebrochen wurde, haben wir die restlichen Samen nicht mehr gezählt, weswegen keine prozentualen Angaben möglich sind.

Die Striche zeigen den Standardfehler an. Der Buchstabe hinter der Nummer der Akzession steht für das Maternaltreatment. Im Anhang sind die detaillierten Messergebnisse in einer Tabelle aufgeführt.

4.2. Keimungsexperiment 2

Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse der zweiten Durchführung des Experiments. Die genauen Zahlen finden sich im Anhang.

4.3. Gelelektrophorese

Abbildung 11 zeigt das entstandene Bild des Gels. Der Buchstabe steht für die Probe und die Zahl für entweder 5 oder 10 μ l eingesetzter DNA-Probe.

5. Diskussion

Die Hypothese zum Versuchsergebnis war, dass durch die Demethylierung durch das Azacytidin die Keimungsrate der Pflanzen mit warmer Maternalbehandlung steigt; dies

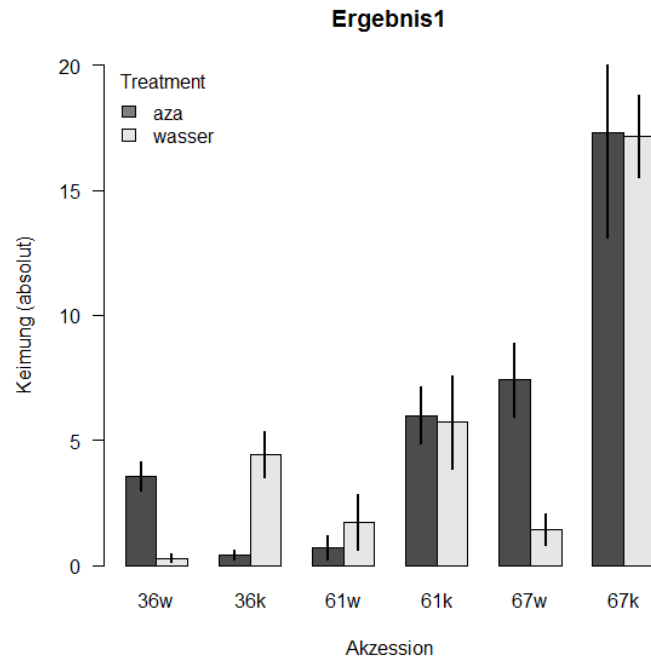


Abbildung 9: Ergebnis der ersten Versuchsdurchführung

spräche dafür, dass die Dormanz der Samen auf stärkere Methylierung zurück geht und 5-Azacytidin in der Lage ist, diese aufzulösen.

5.1. Keimungsexperiment 1

Im Diagramm erkennbar sind die sich oft überschneidenden Fehler, und auch in der ausführlichen Tabelle kann man starke Unterschiede zwischen den Ansätzen mit gleichem Treatment sehen. Das zeigt, wie stark die Trockenheit einiger Petrischalen das Ergebnis beeinflusst hat, und lässt keine Rückschlüsse auf die Dormanz der Samen oder deren Aufhebung zu.

Jedoch ist tendenziell zu erkennen, dass die Samen der Akzession 67 am stärksten keimen, sowie diejenigen mit kaltem Maternaltreatment mehr als solche mit warmem Maternaltreatment. Dieses Ergebnis war nach den vorherigen Versuchen auch vorherzusehen.

5.2. Keimungsexperiment 2

In der Grafik ist erkennbar, dass der Fehler geringer ist als bei Versuch 1; dies ist auch an den Zahlen in Tabelle 3 ersichtlich. Außerdem ist der Unterschied zwischen kaltem und warmem Maternaltreatment sehr deutlich. Es zeigt sich jedoch kein Unterschied zwischen der Behandlung mit Azacytidin oder Wasser.

Das bedeutet, dass die Methylierung der Samen-DNA durch Azacytidin nicht aufgehoben

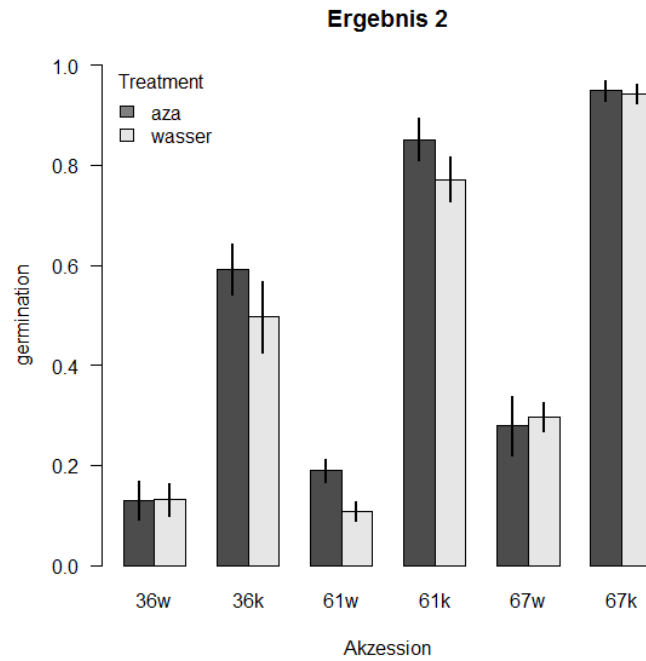


Abbildung 10: Ergebnis der zweiten Versuchsdurchführung

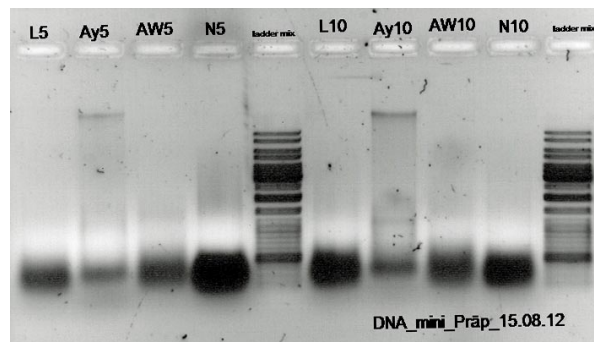


Abbildung 11

ben wird. Erklärbar ist dieses Ergebnis anhand der Eigenschaften von Azacytidin: es entfaltet seine hemmende Wirkung nur, wenn Replikation stattfindet. Dies ist in einem dormanten Samen jedoch nicht der Fall, daher bleibt die Behandlung ohne Wirkung. In dem vorhergegangenen Versuch war das Ergebnis also wahrscheinlich Zufall, der aus der geringen Probengröße resultierte. Für das Ergebnis des Experiments bedeutet das, dass wir herausgefunden haben, dass 5-Azacytidin keine Auswirkung hat, jedoch ist ein Rückschluss darauf, dass der Unterschied nicht durch Methylierung entsteht, nicht möglich. Um dennoch die Rolle der epigenetischen Modifikation durch Methylierung untersuchen zu können, sind weitere, aufwändigere Versuche notwendig, bei denen bereits die Mut-

terpflanze mit Azacytidin behandelt wird, so dass die Samen bereits demethyliert gebildet werden. Hierzu müsste man ähnlich wie bei unseren Versuchen Pflanzen (möglichst mehrere unterschiedliche Akzessionen) während ihres Wachstums und der Samenbildung entweder mit 5-Azacytidin oder als Vergleich mit Wasser behandeln und deren Samen anschließend auf ihr Keimverhalten untersuchen.

5.3. DNA-Extraktion und Gelelektrophorese

Offensichtlich ist nur in Ansatz „Ay“ überhaupt DNA mit großer Molekülgröße vorhanden, davon jedoch, der Dicke der Bande nach zu schließen, auch nur eine geringe Menge. Zu erklären ist dieses Ergebnis dadurch, dass die langen DNA-Fäden wahrscheinlich durch DNasen zerkleinert wurden. Diese sind vermutlich durch unsauberes und langsames Arbeiten in die Proben gelangt, außerdem haben wir frisches Pflanzenmaterial verwendet; normalerweise benutzt man für Extraktionen getrocknetes oder gefrorenes Material, damit die Enzyme zerstört werden. Auf Grund der geringen Größe der Pflanze stand weiterhin nur wenig Blattmaterial zur Verfügung. Die DNA wurde auch beim häufigen zentrifugieren, pipettieren und durch die Verwendung von Filtersäulen zusätzlich belastet.

Festzuhalten ist also, dass man bei der Extraktion von DNA sehr sauber und vorsichtig arbeiten muss, um hochmolekulare DNA zu gewinnen.

6. Fazit

Das Praktikum hat mir sehr gut gefallen, da ich auf diese Weise viele Einblicke in das Wissenschaftlerleben erlangen und Fachbereiche kennenlernen konnte, mit denen ich mich bislang kaum auseinandergesetzt hatte. Dass der Bereich der Epigenetik ein so aktuelles und neues Forschungsgebiet ist hat mich sehr fasziniert. Auch die Einführung in die Programme R und \LaTeX war für mich spannend, da ich bislang keinerlei Informatik-Kenntnisse hatte und somit in einen komplett neuen Bereich reinschnuppern konnte.

Neben all den fachlichen Erkenntnissen habe ich gelernt, dass man als Wissenschaftler viel Geduld haben muss, Experimente selten so laufen wie man sie geplant hat und dass man erstaunlich viel Zeit am Computer verbringt. Diese Erfahrungen werden mir bestimmt bei der Entscheidung über meine Zukunft helfen.

Die freundliche Atmosphäre in der Arbeitsgruppe war sehr angenehm und ich habe mich die meiste Zeit gut betreut gefühlt.

Daher möchte ich mich nochmals bei der ganzen Arbeitsgruppe unter der Leitung von Professor Karl Schmid bedanken, insbesondere bei meinem Betreuer Christian Lampei sowie bei Toni Goßmann, der das Praktikum organisiert hat. Dem Förderverein der Biologieolympiade e.V. danke ich für die Ermöglichung des Praktikums.

Literatur

- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature*, 447(7143):396–398.
- Creusot, F., Acs, G., and Christman, J. K. (1982). Inhibition of dna methyltransferase and induction of friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem*, 257(4):2041–2048.
- Fenaux, P. (2005). Inhibitors of dna methylation: beyond myelodysplastic syndromes. *Nat Clin Pract Oncol*, 2 Suppl 1:S36–S44.
- Graw, J. (2010). Was ist genetik? *Genetik*, pages 1–16.
- Kass, S. U., Pruss, D., and Wolffe, A. P. (1997). How does dna methylation repress transcription? *Trends Genet*, 13(11):444–449.
- Klug, W., Cummings, M., Spencer, C., Thomm-Reitz, F., and Thomm, M. (2007). *Genetik: mit über 560 Abbildungen*. Pearson Studium, an Imprint von Pearson Education.
- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, S. D., and Koornneef, M. (1998). Arabidopsis thaliana: a model plant for genome analysis. *Science*, 282(5389):662, 679–662, 682.
- Neil A. Campbell, J. B. R. (2009). *Biologie*. Pearson Studium, an Imprint von Pearson Education.
- Richards, E. (2006). Inherited epigenetic variation revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*, 7(5):395–401.
- Rival, A., Beulé, T., Aberlenc Bertrossi, F., Tregear, J., Jaligot, E., and Henry, Y. (2010). Plant epigenetics: From genomes to epigenomes. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(2):09–15.
- Whitelaw, N. C. and Whitelaw, E. (2006). How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Hum Mol Genet*, 15 Spec No 2:R131–R137.

A. Anhang

Akz,mattreat,treat	Name	Keimung
36,w,wasser	a1	1
36,w,wasser	a2	0
36,w,wasser	a3	0
36,w,wasser	a4	0
36,w,wasser	a5	1
36,w,wasser	a6	0
36,w,wasser	a7	0
36,k,wasser	b1	6
36,k,wasser	b2	6
36,k,wasser	b3	6
36,k,wasser	b4	0
36,k,wasser	b5	2
36,k,wasser	b6	5
36,k,wasser	b7	6
36,w,aza	c1	5
36,w,aza	c2	4
36,w,aza	c3	5
36,w,aza	c4	2
36,w,aza	c5	2
36,w,aza	c6	5
36,w,aza	c7	2
36,k,aza	d1	0
36,k,aza	d2	0
36,k,aza	d3	1
36,k,aza	d4	1
36,k,aza	d5	0
36,k,aza	d6	1
36,k,aza	d7	0
61,w,wasser	e1	2
61,w,wasser	e2	0
61,w,wasser	e3	2
61,w,wasser	e4	0
61,w,wasser	e5	0
61,w,wasser	e6	8
61,w,wasser	e7	0
61,k,wasser	f1	11
61,k,wasser	f2	0
61,k,wasser	f3	11
61,k,wasser	f4	10
61,k,wasser	f5	4
61,k,wasser	f6	0
61,k,wasser	f7	4

Akz,mattreat,treat	Name	Keimung
61,w,aza	g1	0
61,w,aza	g2	0
61,w,aza	g3	2
61,w,aza	g4	0
61,w,aza	g5	3
61,w,aza	g6	0
61,w,aza	g7	0
61,k,aza	h1	4
61,k,aza	h2	7
61,k,aza	h3	7
61,k,aza	h4	8
61,k,aza	h5	9
61,k,aza	h6	0
61,k,aza	h7	7
67,w,wasser	i1	0
67,w,wasser	i2	0
67,w,wasser	i3	0
67,w,wasser	i4	1
67,w,wasser	i5	2
67,w,wasser	i6	3
67,w,wasser	i7	4
67,k,wasser	j1	21
67,k,wasser	j2	22
67,k,wasser	j3	13
67,k,wasser	j4	19
67,k,wasser	j5	10
67,k,wasser	j6	16
67,k,wasser	j7	19
67,w,aza	k1	8
67,w,aza	k2	12
67,w,aza	k3	0
67,w,aza	k4	7
67,w,aza	k5	6
67,w,aza	k6	8
67,w,aza	k7	11
67,k,aza	l1	37
67,k,aza	l2	1
67,k,aza	l3	17
67,k,aza	l4	17
67,k,aza	l5	22
67,k,aza	l6	18
67,k,aza	l7	9

Tabelle 2: Ergebnis 1

Alk,mtreat,treat	Name	Keimung	Samen	%	Alk,mtreat,treat	Name	Keimung	Samen	%
36,w,wasser	a1	1	22	4,55	61,w,aza	g1	4	20	20
36,w,wasser	a2	3	22	13,6	61,w,aza	g2	4	22	18,18
36,w,wasser	a3	2	17	11,8	61,w,aza	g3	3	22	13,64
36,w,wasser	a4	5	20	25	61,w,aza	g4	3	18	16,67
36,w,wasser	a5	0	19	0	61,w,aza	g5	2	19	10,53
36,w,wasser	a6	4	22	18,2	61,w,aza	g6	6	21	28,57
36,w,wasser	a7	3	16	18,8	61,w,aza	g7	5	20	25
36,k,wasser	b1	8	19	42,1	61,k,aza	h1	13	18	72,22
36,k,wasser	b2	7	20	35	61,k,aza	h2	18	19	94,74
36,k,wasser	b3	5	20	25	61,k,aza	h3	14	17	82,35
36,k,wasser	b4	16	21	76,2	61,k,aza	h4	19	23	82,61
36,k,wasser	b5	13	18	72,2	61,k,aza	h5	20	20	100
36,k,wasser	b6	7	14	50	61,k,aza	h6	26	28	92,86
36,k,wasser	b7	8	17	47,1	61,k,aza	h7	15	21	71,43
36,w,aza	c1	4	23	17,4	67,w,wasser	i1	4	19	21,05
36,w,aza	c2	4	21	19	67,w,wasser	i2	7	19	36,84
36,w,aza	c3	2	20	10	67,w,wasser	i3	7	20	35
36,w,aza	c4	2	22	9,09	67,w,wasser	i4	3	16	18,75
36,w,aza	c5	6	20	30	67,w,wasser	i5	7	19	36,84
36,w,aza	c6	1	19	5,26	67,w,wasser	i6	7	21	33,33
36,w,aza	c7	0	20	0	67,w,wasser	i7	5	19	26,32
36,k,aza	d1	8	20	40	67,k,wasser	j1	18	19	94,74
36,k,aza	d2	13	21	61,9	67,k,wasser	j2	18	20	90
36,k,aza	d3	11	23	47,8	67,k,wasser	j3	17	18	94,44
36,k,aza	d4	11	19	57,9	67,k,wasser	j4	19	19	100
36,k,aza	d5	17	21	81	67,k,wasser	j5	10	10	100
36,k,aza	d6	13	19	68,4	67,k,wasser	j6	17	18	94,44
36,k,aza	d7	12	21	57,1	67,k,wasser	j7	18	21	85,71
61,w,wasser	e1	3	22	13,6	67,w,aza	k1	12	20	60
61,w,wasser	e2	1	18	5,56	67,w,aza	k2	3	18	16,67
61,w,wasser	e3	1	18	5,56	67,w,aza	k3	5	20	25
61,w,wasser	e4	3	19	15,8	67,w,aza	k4	6	20	30
61,w,wasser	e5	3	18	16,7	67,w,aza	k5	2	17	11,76
61,w,wasser	e6	1	20	5	67,w,aza	k6	6	19	31,58
61,w,wasser	e7	3	23	13	67,w,aza	k7	4	20	20
61,k,wasser	f1	17	21	81	67,k,aza	l1	20	21	95,24
61,k,wasser	f2	12	20	60	67,k,aza	l2	21	21	100
61,k,wasser	f3	18	21	85,7	67,k,aza	l3	16	16	100
61,k,wasser	f4	13	20	65	67,k,aza	l4	20	22	90,91
61,k,wasser	f5	15	21	71,4	67,k,aza	l5	13	14	92,86
61,k,wasser	f6	15	17	88,2	67,k,aza	l6	17	20	85
61,k,wasser	f7	16	18	88,9	67,k,aza	l7	19	19	100

Tabelle 3: Ergebnis 2