

BIG B4NG challenge, 17. Wettbewerb Aufgabe 2

Exzellenz mit Interdisziplinarität: Was uns Physik und Biologie über regenerative Mechanismen lehren können

REBIRTH (Von REgenerativer Biologie zu Rekonstruktiver Therapie) ist ein durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen der Exzellenzinitiative seit 2006 geförderter Exzellenzcluster. Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler aus unterschiedlichen Partnerorganisationen (u. a. Medizinische Hochschule Hannover und Leibniz Universität Hannover) beschäftigen sich in REBIRTH mit der Entwicklung neuer Therapieansätze im Bereich der regenerativen Medizin. Dabei werden verschiedene Disziplinen wie Medizin, Chemie, Biologie, Ingenieurwissenschaften und Physik verknüpft, um die Stärken aller Bereiche zu kombinieren. Erkenntnisgewinne im Bereich der Grundlagenforschung in REBIRTH sollen dabei in klinische Anwendung überführt werden.



Um Krankheitsprozesse und regenerative Mechanismen in der Grundlagenforschung zu verstehen, sind einerseits Beobachtungen der jeweiligen Zellen und Gewebe in einem adäquaten isolierten Zustand, wie zum Beispiel in einer Zellkultur, nötig. Andererseits kommen auch molekularbiologische Techniken zum Einsatz, die auf genetischer Ebene zum Beispiel Krankheitsprofile deuten können. In dieser Aufgabe werden wir ein Verständnis beider Herangehensweisen erarbeiten und im letzten Teil lernen, dass es auch erforderlich sein kann, beide Ansätze zu kombinieren.

1. Grundlagen

Zum besseren Verständnis von Regenerationsprozessen wie z. B. der Neubildung von Zellen werden isolierte Zellen häufig mikroskopisch visualisiert. Unter einem normalen Durchlichtmikroskop, wie es z. B. auch in der Schule zum Einsatz kommt, können nur wenige Strukturen identifiziert werden (siehe Abb. 1 links). Deshalb wird häufig die Fluoreszenzmikroskopie genutzt (siehe Abb. 1 rechts). Hiermit lassen sich Zellstrukturen, wie z. B. der Zellkern, gut visualisieren.

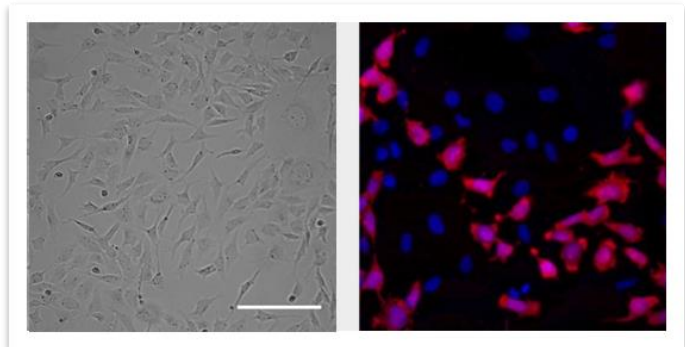


Abbildung 1: Links: Durchlichtmikroskopische Aufnahme von lebenden Säugetierzellen. Rechts: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Färbung mit zwei verschiedenen Farbstoffen (blau: Zellkern, rot: Zellmarker für Zelltod)

1.1) Wie funktioniert ein Mikroskop? Nutzt ein in eurer Schule vorhandenes Mikroskop und experimentiert mit der Durchlichtbeleuchtung. Macht jeweils eine Durchlichtaufnahme mit zwei verschiedenen Objektiven, am besten von einer Zellstruktur wie in einem Zwiebeldünnchnitt. Ihr könnt dabei die Kamera (z. B. Handykamera) ins Okular halten.

Was bestimmt am Mikroskop die Vergrößerung? Auch mit hohen Vergrößerungen sind Strukturen innerhalb einer Zelle teilweise nicht sichtbar. Was limitiert den Kontrast und die Auflösung eines Mikroskops? **(3 Punkte)**

- 1.2) Fluoreszenzmikroskopie.** Verglichen mit der Durchlichtmikroskopie bietet ein Fluoreszenzmikroskop den Vorteil, dass zelluläre Strukturen mit einem Fluoreszenzfarbstoff als helle Objekte bei einem dunklen Hintergrund dargestellt werden können. Erläutert kurz in eigenen Worten die Prinzipien von Fluoreszenz, den Aufbau eines Fluoreszenz-Mikroskops und das Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie. **(3 Punkte)**

Im Bereich der Molekularbiologie ist das Zellmaterial, d. h. die DNA der Zellen, von hoher Bedeutung. Auf dieser sind unsere Erbinformationen gespeichert. Fehler oder genetische Defekte innerhalb der DNA können diverse Krankheitstypen hervorrufen, für die im Exzellenzcluster REBIRTH Therapien erforscht werden.

- 1.3) Was ist die DNA?** Beschreibt kurz den Aufbau der DNA; was sind Nukleotide (ATCG)? **(2 Punkte)**
- 1.4) Wie viel Speicherkapazität hat die DNA?** Vergleicht die Speicherkapazität der DNA einer einzelnen Zelle mit einer Computerfestplatte. **(2 Punkte). Tipps:**
- *Ein Genom einer menschlichen Zelle hat etwa $3,3 \cdot 10^9$ Basenpaare.*
 - *Welchen Informationsgehalt in Bit hat ein Basenpaar?*

2. Bildauswertung und DNA-Isolation

Mit der Fluoreszenzmikroskopie habt ihr ein wichtiges Verfahren der Zellanalyse kennengelernt. Um die mittels Fluoreszenzmikroskop aufgenommenen Bilder besser zu verstehen, sind jedoch häufig spezifische Auswertungen nötig, die über eine einfache Beobachtung der Zellen hinausgehen. So können bestimmte Krankheitsbilder, die innerhalb von REBIRTH untersucht werden, mit einer Größenzunahme von Zellen („*Hypertrophie*“) assoziiert sein. Andere Krankheiten können zum Beispiel dazu führen, dass bestimmte Proteine in einer Zelle nicht mehr hergestellt werden. In dem ersten Teil dieser Aufgabe wollen wir uns mit der Auswertung von Fluoreszenzbildern beschäftigen.

- 2.1) Bildauswertung.** Zu dieser Aufgabe gehören zwei Fluoreszenzmikroskopbilder von Zellen (Bild1.tif, Bild2.tif). Um diese besser auswerten zu können, werden Bildbearbeitungsprogramme wie *ImageJ* (frei verfügbar) genutzt. Insbesondere sind dabei zelluläre Parameter wie die Zellgröße von Interesse.

Nutzt die Software *ImageJ* (<https://imagej.nih.gov/ij/>) zur Auswertung der beiden Fluoreszenzmikroskopbilder.

- Bild 1:** Bestimmt die Anzahl der sichtbaren Zellkerne. Wie seid ihr dabei vorgegangen? **(2 Punkte). Tipps:**

- *In diesem Bild sind nur Zellkerne, nicht aber Zellen sichtbar, weil nur die Zellkerne mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt wurden.*
- *Ihr müsst in ImageJ zunächst einen Threshold (Schwellwert) definieren, der es euch ermöglicht, alle Kerne in einem Binärbild (nur Schwarz und Weiß) zu erhalten. Nutzt dafür die Funktion „Auto Threshold“.*
- *Ihr könnt die Funktion „Analyze Particles“ von ImageJ zum Zählen verwenden.*

- Fälschlich verbundene Objekte im Binärbild können mittels des „Watershed“-Algorithmus (Segmentierungsverfahren) getrennt werden.

Bild 2: Bestimmt die Anzahl der Zellkerne sowie der toten Zellen. Bestimmt außerdem die durchschnittliche Zellfläche der toten Zellen (in Pixeln, eigentlich in Mikrometer; für die Aufgabe nehmen wir zur Vereinfachung aber Pixel). Beschreibt euer Vorgehen in wenigen Sätzen. **(3 Punkte). Tipp:**

- In diesem Bild sind die Zellkerne blau gefärbt und einige Zellen rot (bei den roten Zellen handelt es sich um „tote/sterbende“ Zellen). Ihr müsst diese Farbkanäle zunächst trennen.

Ein wichtiger Schritt zur Analyse genetischer Defekte ist die DNA-Isolation aus Gewebe. Diese kann dann mit verschiedenen Methoden wie zum Beispiel der *Polymerasen-Ketten-Reaktion* (PCR) untersucht werden. Sie kann auch verwendet werden, um zum Beispiel neue spezifische DNA, die in Zellen eingebracht werden soll, zu generieren. Dies kann unter anderem genutzt werden, um ein Gen in Zellen ein- oder auszuschalten oder um die Herstellung bestimmter Proteine zu ermöglichen bzw. zu verstärken. In diesem Teil der Aufgabe soll zunächst versucht werden, DNA zu isolieren. Im Prinzip müssen dafür zunächst die Zellen *lysiert* werden (d. h. die Membran wird geschädigt bzw. aufgelöst), sodass die DNA in der Lyseflüssigkeit gelöst ist. Diese wird dann im Folgenden ausgefällt, so dass sie sichtbar wird.

2.2) DNA-Isolation. Auch mit Hausmitteln kann DNA relativ einfach isoliert werden. Diese wäre zwar für labortechnische Anwendungen nicht von ausreichender Qualität; um das Prinzip zu verstehen, ist die Qualität aber ausreichend. Nehmt dazu entweder eine Zwiebel oder eine Tomate und zeigt, dass ihr DNA isolieren könnt, indem ihr die Zellen lysiert und die DNA identifiziert. Als Hilfsmittel dürfen Spülmittel, Zitronensaft, Kochsalz, Waschmittel, etwas Alkohol, heißes und kaltes Wasser sowie ein Kaffeefilter verwendet werden. Dokumentiert die Schritte mit Bildern und kurzen Stichpunkten. Erläutert, was in den einzelnen Schritten passiert: Welche Funktion hat zum Beispiel das Spülmittel? **(5 Punkte)**

3. Arbeiten mit DNA-Sequenzen

Um ein Krankheitsbild besser verstehen zu können, müssen häufig auch bestimmte Proteine innerhalb einer Zelle analysiert werden. Die Proteinstruktur sowie deren Funktion wird durch die Gene auf der DNA definiert. Mit molekularbiologischen Techniken kann die Proteinherstellung einer Zelle untersucht werden. Es ist jedoch häufig nötig, auch die Proteine und ihre Lokalisation in einer Zelle zu visualisieren. Allerdings gibt es nur wenige Möglichkeiten, Proteine mittels Fluoreszenz zu detektieren. Dabei kommen häufig *Antikörperfärbungen* zum Einsatz, die jedoch nur sehr eingeschränkt in lebenden Zellen verwendet werden können.

3.1) Antikörperfärbung. Wie funktioniert die Antikörperfärbung (3-5 Sätze) und warum kann man sie in lebenden Zellen nur bedingt einsetzen? **(3 Punkte)**

Alternativ ist die Nutzung von *Fusionsproteinen* möglich, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff genetisch markiert sind. Das sind Proteine, die hintereinander auf der DNA liegen und gemeinsam abgelesen werden. Die Idee basiert auf fluoreszierenden Proteinen, wie zum Beispiel dem „Grün Fluoreszierenden Protein“ (GFP), das erstmals in der Qualle *Aequorea victoria* nachgewiesen wurde. In diesem Aufgabenteil sollt ihr die theoretische Herstellung eines fluoreszierenden Fusionsproteins diskutieren.



Abbildung 2: Fluoreszente Qualle: *Aequorea victoria* mit Grün Fluoreszierenden Proteinen. Bildquelle: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Aequorea4.jpg> by Sierra Blakely

3.2) Fluoreszierendes Protein. Nun wollen wir in der Theorie die Schritte planen, die nötig sind, um ein fluoreszentes Fusionsprotein herzustellen. Zur Vereinfachung werden wir in dieser Aufgabe das Grün Fluoreszierende Protein aus einem fertigen Vektor, d. h. aus einer zirkulären DNA-Sequenz, die zum Einbringen von „fremder“ DNA in Zellen gebraucht wird, nutzen und müssen nur unsere codierende DNA-zu-Protein-Sequenz darin platzieren.

Von einem befreundeten Labor haben wir etwas DNA in ausreichender Menge erhalten, die unser Protein codiert (siehe unten, rot markiert, nur eine Seite des Strangs ist angegeben).

```
gagagaaagcttgcatggatgttcaaatcgatgtattcaaatctacgcgtcgtgctctccccg
taggcacctccgcatgtctttcagttcctcatgctcgtgctatcgaatcaaagcctcaatca
gttcagggcaatccagcaacatatcatagcactcctatggatccgagaga
```

Diesen DNA-Abschnitt wollen wir nun in den Vektor *pEGFP-C1* (Firma Clontech) einbringen, da dieser schon ein GFP enthält. Mehr Informationen zu diesem Vektor und die komplette Sequenz gibt es z. B. hier: <https://www.addgene.org/vector-database/2487/> (ihr müsst dazu auf „Sequence“ neben „Analyze“ klicken und dann nochmals auf „Sequence“, dann einfach die Sequenz als neue DNA in das Programm „Serial Cloner“ kopieren; ggf. Popup-Blocker im Browser deaktivieren). Der Vektor enthält einen *Promoter*, der zum Ablesen des codierten Proteins dient (CMV Promoter) und den Startpunkt darstellt, sowie das GFP. Wir möchten das DNA-Fragment hinter dem *Promoter* und hinter dem GFP platzieren. Um das Experiment zu planen, kann z. B. die freie Software **Serial Cloner** (http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html) eingesetzt werden.

Nach der Planung sollte das fertige Ergebnis wie in Abbildung 3 aussehen. Die Sequenz wurde hinter dem GFP platziert und wird zusammen mit diesem in einer Zelle hergestellt. Der gesamte Kreis stellt den fertigen Vektor dar, der zur Proteinherstellung in die Zelle eingebracht wird. Die Elemente auf der linken Seite können wir für diese Aufgabe ignorieren, uns interessieren lediglich das GFP und die sogenannte *Multiple Cloning Site* (diese befindet sich im Bild dort, wo die Sequenz eingebaut ist). In diese können Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler Sequenzen wie die oben angegebene einbauen.

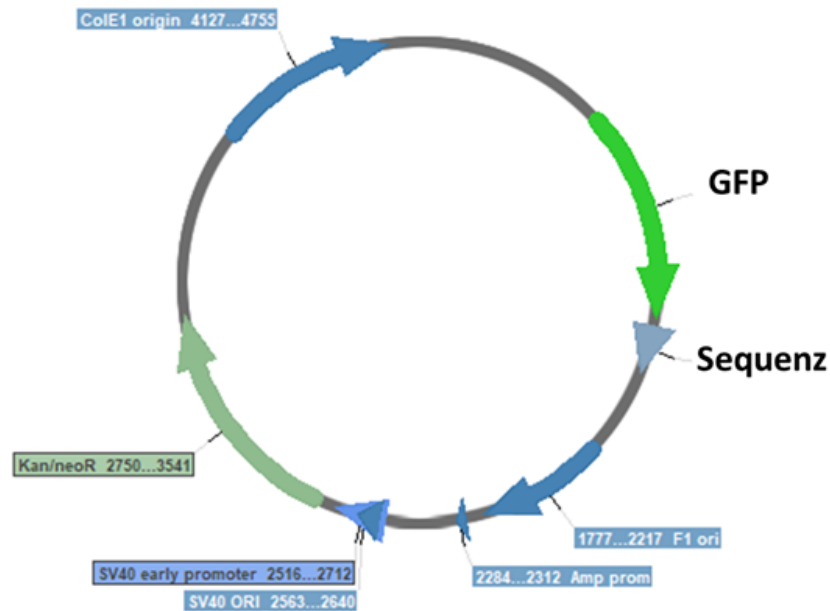


Abbildung 3: DNA-Strang aus Vektor (pEGF-C1) und GFP Konstrukt) mit eingebauter Sequenz (Bild erstellt mit Serial Cloner)

Hierfür werden sogenannte *Restriktionsenzyme* verwendet. Mit diesen lassen sich gezielte Schnitte in einer DNA Sequenz durchführen. Verwendet man zum Beispiel das Restriktionsenzym *HindIII*, wird ein DNA-Doppelstrang wie folgt geschnitten:



Später lassen sich geschnittene DNA-Stücke dann wieder zusammenkleben (wir nennen dies „*Ligation*“). Wir werden *Restriktionsenzyme* verwenden, um die obere Sequenz hinter dem GFP zu platzieren. Dazu werden wir sowohl die obere Sequenz als auch den Vektor schneiden müssen. Wichtig ist dabei, dass wir den Vektor nicht an anderen Stellen schneiden und dass wir gleiche *Restriktionsenzyme* für beide Sequenzen, der des Vektors und der oberen Sequenz, finden. Wie kann dieser gesamte Prozess funktionieren?

- Sucht im Vektor und in dem oberen DNA-Stück Schnittstellen und geeignete Restriktionsenzyme, die in der *Multiple Cloning Site* des Vektors (nach dem GFP) und in dem DNA-Stück vorkommen. Mit diesen solltet ihr insbesondere das rote Stück von oben in den Vektor bringen können. Welche Restriktionsenzyme sind verwendbar?
- Wie sieht die oben angegebene DNA nach einem Restriktionsverdau mit diesen Enzymen aus?

Hinweise:

- Nutzt für die Aufgabe das Programm Serial Cloner mit der Funktion „Construct“, um den pEGFP-C1-Vektor sowie die oben angegebene DNA zu kombinieren. Beschreibt die einzelnen Schritte eures Vorgehens, inklusive Bilder.
- Bei YouTube gibt es einige Videoanleitungen, wie ihr eine solche Subklonierung („sub cloning“) mit Serial Cloner durchführen könnt.
- Tipp: Vergleicht doch die Schnittsequenz von *HindIII* einmal mit der obigen Sequenz

Insgesamt gibt es für diesen Aufgabenteil 7 Punkte.

Wir haben euer Interesse an interdisziplinärer Forschung wie in REBIRTH geweckt? Dann besucht uns doch auf der Homepage www.rebirth-hannover.de, das nächste Mal auf der IdeenExpo, oder bewirbt euch für ein freiwilliges wissenschaftliches Jahr nach dem Abitur. Habt ihr Fragen zu REBIRTH, dann wendet euch bitte an Rebirth.Sekretariat@mh-hannover.de.

Viel Erfolg!

Allgemeine Hinweise

Einsendeschluss: Sonntag, 19. November 2017, 19:59 Uhr.

Gebt eure Lösungen über unser Portal ab: <https://portal.studienberatung.uni-hannover.de/>

Zulässige Dateiformate sind: PDF für die zusammengeschriebene Lösung (mit eingebetteten Bildern) sowie unter Windows gängige Videoformate, die sich ohne Installation von zusätzlicher Software abspielen lassen, z. B. mp4.

Die Dateien sollten nicht größer als 7,5 MB sein (die Dateien können gezippt sein)! Bitte gebt auch euren Teamnamen, die Namen der Gruppenmitglieder sowie deren Schulen an. Bitte benennt eure hochgeladenen Dateien nach dem Gruppennamen.

ACHTUNG bei Zip-Dateien! Um sicherzugehen, dass eure Dateien wirklich fehlerfrei und für die Korrektoren/-innen zu öffnen sind, solltet ihr eure Zip-Dateien etc. noch mal von eurem Account herunterladen und öffnen. Dateien, die sich nicht öffnen lassen, können nicht bewertet werden!

Gebt eure Lösungen auch dann ab, wenn ihr nicht alle Fragen beantworten konntet! Vielleicht gelingt euch das ja bei den kommenden Aufgaben.

Die Teilnahmebedingungen und weitere Informationen findet ihr unter: <https://www.studienberatung.uni-hannover.de/bigbangchallenge.html>

Der Rechtsweg ist ausgeschlossen.