

Praktikumsbericht

[REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED] [REDACTED]
[REDACTED] [REDACTED]

Studienfach: Biochemie

Institut: Berlin-Brandenburg Center of Regenerative Therapies (BCRT)

Arbeitsgruppe: Genetic Engineering (Gossen)

Dauer: 06.08.12 – 28.09.12 (7 Wochen)

Das Berlin-Brandenburg Center of Regenerative Therapies (kurz: BCRT) liegt in Berlin-Wedding in direkter Nähe zum Universitätskrankenhaus Charité. Es ist ein von der Charité unabhängiges Forschungszentrum, das sich in 26 Arbeitsgruppen interdisziplinär mit regenerativen Therapien befasst. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf dem Bewegungsapparat und der immunologischen Antwort des Menschen sowie der regenerativen Therapie im Bereich des kardiovaskulären, muskuloskeletalen und des Immunsystems. Ziel des BCRT ist es Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung für die Entwicklung von Produkten und Therapien zu nutzen. Um diese Ziele zu erreichen, setzt das BCRT auf die Zusammenarbeit mit zahlreichen anderen Forschungseinrichtungen und Firmen. So unterhält es beispielsweise über 15 verschiedene Partnerschaften mit anderen Forschungsinstitutionen der Region. Im Jahr stehen dem BCRT eine Millionen Euro an flexiblen finanziellen Mitteln zur Verfügung, um ihre Forschung zu finanzieren.

Die Forschung am BCRT ist in fünf Felder unterteilt: Molekulare Zelldifferenzierung und -charakterisierung (Feld A), polymer-basierte Biomaterialien (Feld B), Translatorische Technologien (Feld C), Immunsystem (Feld D), Bewegungsapparat (Feld E) und Kardiovaskuläres System (Feld F). Den einzelnen Feldern sind nochmal mehrere Arbeitsgruppen mit spezifischen Forschungsthemen zugeordnet. Es ist schwer zu sagen, wie viele Mitarbeiter insgesamt am BCRT arbeiten, da in den einzelnen Arbeitsgruppen viele Doktoranden und Diplomanden arbeiten, deren Anzahl ständig variiert.

Die Arbeitsgruppe Genetic Engineering (Gentechnik), in der ich gearbeitet habe, ist der Feld A zugeordnet. Sie besteht momentan aus 6 Mitglieder, die sich vor allem mit der Verbesserung der Möglichkeiten Gene in einen Organismus einzuschleußen, befassen. Dazu versucht sie Transkriptionseinheiten zu entwerfen, die nicht durch ihre Umgebung auf dem Chromosom beeinflusst werden. Ein weiteres Ziel ist der Entwurf von regulierbaren Systemen der Genexpression. Diese sollen es einerseits ermöglichen die Expression des eingeschleußten Gens anzupassen und damit das Level des dadurch exprimierten Proteins zu kontrollieren und andererseits könnte so die Expression eingeschleußter Gene gestoppt werden, was einen zusätzlichen Sicherheitsmechanismus bieten würde. Außerdem versucht die Arbeitsgruppe Gene an ganz bestimmte Stellen eines Chromosoms zu integrieren, um so eine therapeutische Wirkung zu erzielen.

In der Arbeitsgruppe bekam ich mein eigenes Projekt zugeteilt. Das Thema meines Projektes waren Transposons und die dazugehörigen Transposasen. Ein Transposon ist ein DNA-Abschnitt, der seine Position im Genom verändern kann. Dazu benötigt es jedoch

ein bestimmtes, dazugehöriges Enzym, die Transposase. Ein Transposon ist immer aus einer mittig gelegenden, austauschbaren DNA-Sequenz aufgebaut, die von zwei definierten DNA-Sequenzen, den sogenannten Inverted Repeats, flankiert wird. Transposons können genutzt werden, um DNA-Stücke in das Genom einer Zelle zu übertragen. Dazu wird die Ziel-DNA im Transposonkontext in ein Plasmid (ein ringförmiges DNA-Molekül) kopiert und zusammen mit einem Expressionsvektor mit der Transposasensequenz in eine Zelle übertragen. In der Zelle wird dann die Transposase exprimiert, diese schneidet das Transposon mit der Ziel-DNA heraus und fügt sie in die DNA der Zelle ein. Dieser Mechanismus wird als Cut & Paste bezeichnet. Im alternativen Copy & Paste-Mechanismus kopiert die Transposase die Transposonsequenz und fügt sie dann in die DNA der Zelle ein. In meiner Arbeitsgruppe stellte sich bei der Arbeit mit Transposons heraus, dass verschiedenen Typen von Transposons in verschiedenen Zelltypen, besonders in Stammzellen, unterschiedlich gut funktionieren. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob dies durch die DNA, die die Transposons im Plasmid umgibt oder durch die Transposons selbst verursacht wird. Um den Einfluss der die Transposons umgebenden DNA auszuschließen, müssen die beiden Transposons in dergleichen DNA-Umgebung verwendet werden. Daher war es das Ziel meines Projektes, die beiden am häufigsten genutzten Transposons, Sleeping beauty und Piggy bac, in dasselbe Plasmid zu kopieren. Außer den inverted repeats der Transposons, sollte das Plasmid jedoch noch verschiedene andere DNA-Sequenzen enthalten. Dazu gehörte unter anderem ein sogenanntes Reportergen, das es ermöglicht zu erkennen, ob die Übertragung der DNA in die Zelle (die Transfektion) funktioniert hat und ob die DNA funktionstüchtig ist. In meinem Versuch haben wir dazu GFP (grün fluoreszierendes Protein) gewählt. Wenn GFP in der Zelle gebildet wird, dann ist dies deutlich unter dem Mikroskop erkennbar, da GFP bei Anregung mit blauem Licht grün fluoresziert. Zusätzlich benötigten wir noch eine Promotersequenz, eine DNA-Sequenz, die die Expression von GFP reguliert und ein Resistenzgen. Dieses macht die Zellen, in die die DNA übertragen wurde, resistent gegen ein bestimmtes Antibiotikum, so dass bei einer Behandlung mit dem Antibiotikum nur die Zellen überleben, in die die DNA erfolgreich übertragen wurde. Diesen Auswahlmechanismus bezeichnet man als Selektion. Der zweite Teil meines Projektes umfasste die beiden Transposasen jeweils in das gleiche Plasmid einzusetzen. Das Einfügen verschiedener DNA-Fragmente in ein Plasmid und die anschließende Vervielfältigung des so veränderten Plasmids bezeichnet man als Klonierung. Zum Gewinnen der benötigten DNA-Fragmente habe ich verschiedene Methoden angewandt. Die vielleicht simpelste ist die Restriktion, dabei wird die Ziel-DNA mithilfe bestimmter

Enzyme, sogenannter Restriktionsendonucleasen oder auch einfach Restriktionsenzyme, aus einem bereits vorhandenen Plasmid herausgeschnitten. Hierzu ist jedoch wichtig, dass die Ziel-DNA von passenden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme eingegrenzt ist. Ist dies nicht der Fall, kann der DNA-Abschnitt auch mittels einer PCR (Polymerase chain reaction) erhalten werden. Bei einer PCR wird ein DNA-Abschnitt der durch zwei spezifisch angepasste DNA-Stücke (die Primer) begrenzt ist, exponentiell vervielfältigt. Wenn kein Plasmid vorhanden ist, dass die Ziel-DNA bereits enthält, dann können kurze DNA-Sequenzen auch neu synthetisiert werden. Dies wurde jedoch nicht in der Arbeitsgruppe selber durchgeführt, sondern die DNA wurde bei einer Firma bestellt. Dabei bestellt man jeweils zwei DNA-Einzelstränge, die man dann wieder zusammensetzen kann (Oligomerisierung). Nachdem die ersten DNA-Fragmente in das Plasmid eingesetzt wurden, die nicht aus einer Restriktion stammen, mussten sie durch die Übertragung in eine Zelle auf ihre Funktion getestet werden. Zu meiner Freude war der erste Funktionstest der ersten DNA-Abschnitte positiv (GFP wurde exprimiert und fluoreszierte) und auch die Sequenzierung der DNA entsprach den Erwartungen. Die ersten Schritte der Klonierung hatten also funktioniert. Nachdem die Klonierung vollständig ist, muss abermals ein Funktionstest und eine Sequenzierung der DNA zur Kontrolle durchgeführt werden. Wenn diese erfolgreich sind, hat man sowohl Sleeping Beauty- als auch Piggy Bac-Transposon und die entsprechenden Transposase in jeweils identischen Plasmiden. Damit können dann die eigentlichen Versuche in Stammzellen durchgeführt werden, in denen der Einfluss der Plasmid-DNA untersucht wird. Leider reichte die Zeit meines Praktikums beweiten nicht aus, um den letzten Funktionstest oder die Versuche zum Einfluss der Plasmid-DNA durchzuführen. Zumal der letzte Schritt der Klonierung der Transposons auch nach mehrfachen Versuchen scheiterte.

Die Arbeit an meinem eigenen Projekt gab mir die Möglichkeit nicht nur praktische Methoden im Labor zu erlernen, sondern die einzelnen Schritte eines Experimentes kennenzulernen. So musste ich zunächst die theoretischen Grundlagen des Thema erlernen und herausfinden, ob die experimentellen Erkenntnisse und Vorgehensweisen anderer Versuche vielleicht auch in diesem Projekt von Nutzen sein könnten. Der nächste Schritt war es die Durchführung zu erarbeiten und sie am Computer zu simulieren ("in silico cloning"), um mögliche Denkfehler schon vor der praktischen Arbeit zu entdecken. Erst als die Simulation am Computer funktionierte, konnten die speziellen Materialien bestellt werden, mit deren Ankuft die eigentliche Arbeit im Labor begann.

Meine Betreuung während des Praktikums übernahm einerseits der Leiter der Arbeitsgruppe Manfred Gossen, der sich vor allem mit der Planung des Projekts beschäftigte, andererseits aber auch die ganze Arbeitsgruppe. Besonders in den ersten Tagen hätte ich mir vielleicht einen konkreten Ansprechpartner oder Betreuer gewünscht, aber sobald ich meine Aufgabe hatte und die Mitarbeiter ein bisschen besser kannte, war das kein Problem mehr.

Da mir viele der Methoden, die ich für die Durchführung meines Projektes brauchte, zu Beginn meines Praktikums noch nicht beherrschte, habe ich sie in der ersten Woche zunächst gemeinsam mit den Mitarbeitern durchgeführt. Ab der zweiten Woche konnte ich dann zunehmend selbstständig an meinem Projekt arbeiten, dabei konnte ich mich bei Fragen oder Problemen aber jederzeit an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe wenden. Sie alle waren geduldig, freundlich und bereit mir zu helfen, so dass ich mich schon bald gut in die Gruppe integriert fühlte. Dieses Gefühl wurde durch das tägliche gemeinsame Mittagessen, bei dem sowohl arbeitsrelevante Themen besprochen als auch Alltagsgeschichten ausgetauscht wurden, bestärkt. Zudem war sowohl im Labor als auch im Büro immer eine positive Arbeitsatmosphäre vorhanden, in der sich alle gut zu verstehen schienen und immer bereit waren sich gegenseitig zu helfen und zusammenzuarbeiten. So wurden die erzielten Ergebnisse häufig gemeinsam besprochen und bei Problemen gemeinsame Lösungsmöglichkeiten gesucht.

Das Praktikum hat mir einen besseren Einblick in Arbeitsweisen und Abläufe eines wissenschaftlichen Institutes vermittelt und mir gezeigt, dass ich mir auch längerfristig die Arbeit in einem Labor vorstellen kann.

Da ich im Studium schon mehrere Praktika in der Universität hatte, hat mir vor allem bei den allgemeinen Vorgehensweisen wie die Sicherheits- und Hygienevorschriften im Labor geholfen. Vor allem durch das Biochemie-Blockpraktikum beherrschte ich die grundlegenden Arbeitsschritte wie das Pipettieren oder das Arbeiten in der Zellkultur.

In meinem Praktikum habe ich viele molekularbiologische Methoden erlernt, die in meinem Studium, sowohl im Praktischen als auch im Theoretischen, eher vernachlässigt werden.

Dennoch glaube ich, dass der größte Gewinn, den ich aus meinem Praktikum gezogen habe, keineswegs darin lag, dass ich neue Methoden erlernt habe und ein neues Thema kennengelernt habe. Weitaus entscheidender ist, dass ich gelernt habe selbstständig zu arbeiten und mir meine Zeit selbst sinnvoll einzuteilen. Außerdem habe ich viel über die Schritte bei der Planung eines Experiments und seiner Durchführung erfahren, nicht nur an meinem eigenen Projekt, sondern auch über die Berichte der anderen im wöchentlichen Meeting, in dem die Ergebnisse der letzten und die Pläne für die nächsten

Woche besprochen wurden.

Alles in allem würde ich mein Praktikum auf jeden Fall weiterempfehlen. Besonders gut hat mir gefallen, dass ich an meinem eigenen Projekt arbeiten konnte und nicht für irgendwelche "Praktikantenaufgaben" abgestellt wurde, so dass ich mich wie ein vollwertiges Mitglied der Gruppe gefühlt habe. Außerdem waren meine Aufgaben dadurch abwechslungsreich und interessant. Zwar gab es auch den ein oder anderen langweiligen Moment, aber das lag vor allem daran, dass in der Molekularbiologie wie auch in der Biochemie immer mal wieder längere Wartezeiten auftreten. Entscheidend ist, dass ich von einem netten und hilfsbereiten Team umgeben war und eine Menge gelernt habe.