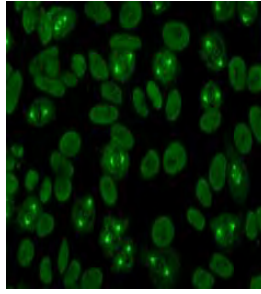


# Dynamik der Signaltransduktion in Zellen

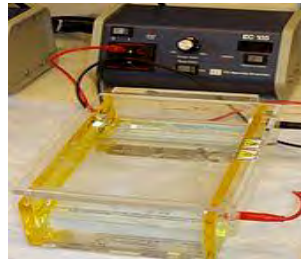
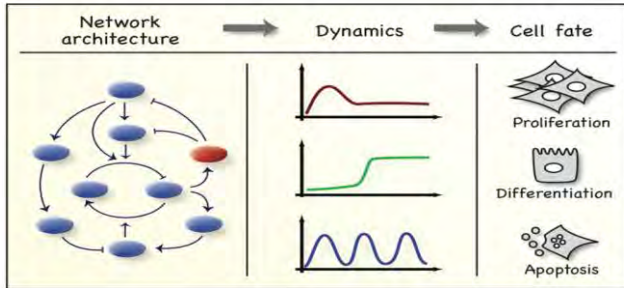
Ann-Kathrin Köther

## Arbeitsgruppe Löwer

Das Zellschicksal wird fest von äußeren und inneren Signalen beeinflusst. Früher hat man sich mit den einzelnen Komponenten des Netzwerkes der Signalübertragung in Zellen beschäftigt. Die Arbeitsgruppe Löwer beschäftigt sich heute jedoch mit der Dynamik bei der Signalübertragung und wie diese eine Auswirkung auf das Zellschicksal hat. Um dies zu erforschen, nutzt die Arbeitsgruppe zeitgeraffte Mikroskopien von lebenden Zellen mit einem Fluoreszenz Reporter.



Fluoreszenzmikroskopie



Gelelektrophoreseapparatur

## III. Gelelektrophorese

Das Ziel der Gelelektrophorese ist es, verschieden große Moleküle voneinander zu trennen. Eine Mischung der zu trennenden Moleküle wandert unter elekt. Einfluss durch ein Gel. Je nach Größe und Ladung der Moleküle bewegen diese sich unterschiedlich schnell zur Anode bzw. Kathode.

**Auswertung**

Durch die Zugabe von Ethidiumbromid im Gel kann man beim Auswerten die sog. DNA Banden (diskrete Zonen, in denen gleiche Moleküle laufen) unter UV Licht sichtbar machen und so mit Hilfe eines Markers die Größe der Moleküle bestimmen.

## Eigene Aktivitäten am MDC

- DNA isoliert (I)
  - Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (II)
  - Gelelektrophorese (III)
  - Transformation (IV)
  - Blau-Weiß-Selektion (V)
- Ziel: Klonierung eines Fluoreszenz Reporter-Konstruktes

## IV. Transformation

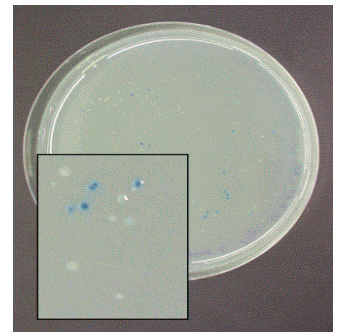
(nicht-virale Übertragung von freier DNA in Bakterienzellen)  
 Verwendete Bakterien: Escherichia coli  
 Verwendete Methode: Elektroporation  
 Durch einen elektrischen Schock öffnen die Bakterien ihre Membran und nehmen die DNA auf.

## I. Isolation genomischer DNA

Zellyse mit Proteinase K (Aufbrechen der Zellwand)  
 Adsorption der genomischen DNA an eine Silica Membran  
 Entfernen zurückbleibender Kontaminationen durch zwei Waschschritte  
 Elution der aufgereinigten Nucleinsäure (Ablösen der Nucleinsäure von der DNA)

## V. Blau-Weiß-Selektion

Aufgrund des Bestreichens der Agarplatten, auf denen die Bakterien wachsen sollen, mit bestimmten Chemikalien kann bei der Auswertung zwischen positiven und negativen Klonen unterschieden werden. Durch die Insertion von Fremd-DNA wird das lacZ-Gen (ein Gen der  $\beta$ -Galaktosidase) unterbrochen. Wenn IPTG zugegeben wird, wird das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase produziert und durch den Indikator X-Gal wird dieses Enzym unter Freisetzung von blauem Farbstoff gespalten. Die weißen Kolonien haben die DNA wahrscheinlich erfolgreich aufgenommen, die blauen nicht.

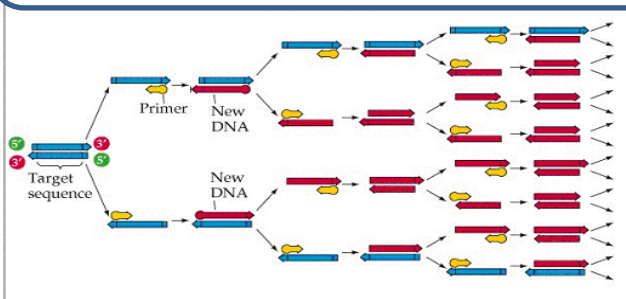


Blaue und weiße Bakterienkolonien

## II. Polymerase-Kettenreaktion

(engl. Polymerase Chain Reaction, PCR)

Das Ziel der Polymerase-Kettenreaktion ist die Vervielfältigung eines kurzen, genau definierten Teils eines DNA-Strangs.



© 2001 Sinauer Associates, Inc.

## Diskussion

Die PCR musste zwei Mal durchgeführt werden, da beim ersten Mal kein Produkt vorhanden war. Durch das Verändern der Reaktionsbedingungen erhielten wir das gewünschte Produkt.

## Fazit

Durch die Arbeit am MDC habe ich einen äußerst breit gefächerten Einblick in das Alltagsleben im Labor bekommen. Ich habe viele Arbeitsmethoden kennengelernt und durch den Aufenthalt hier wurde mein Wissen über Signaltransduktionen in Zellen und über die DNA bereichert.