

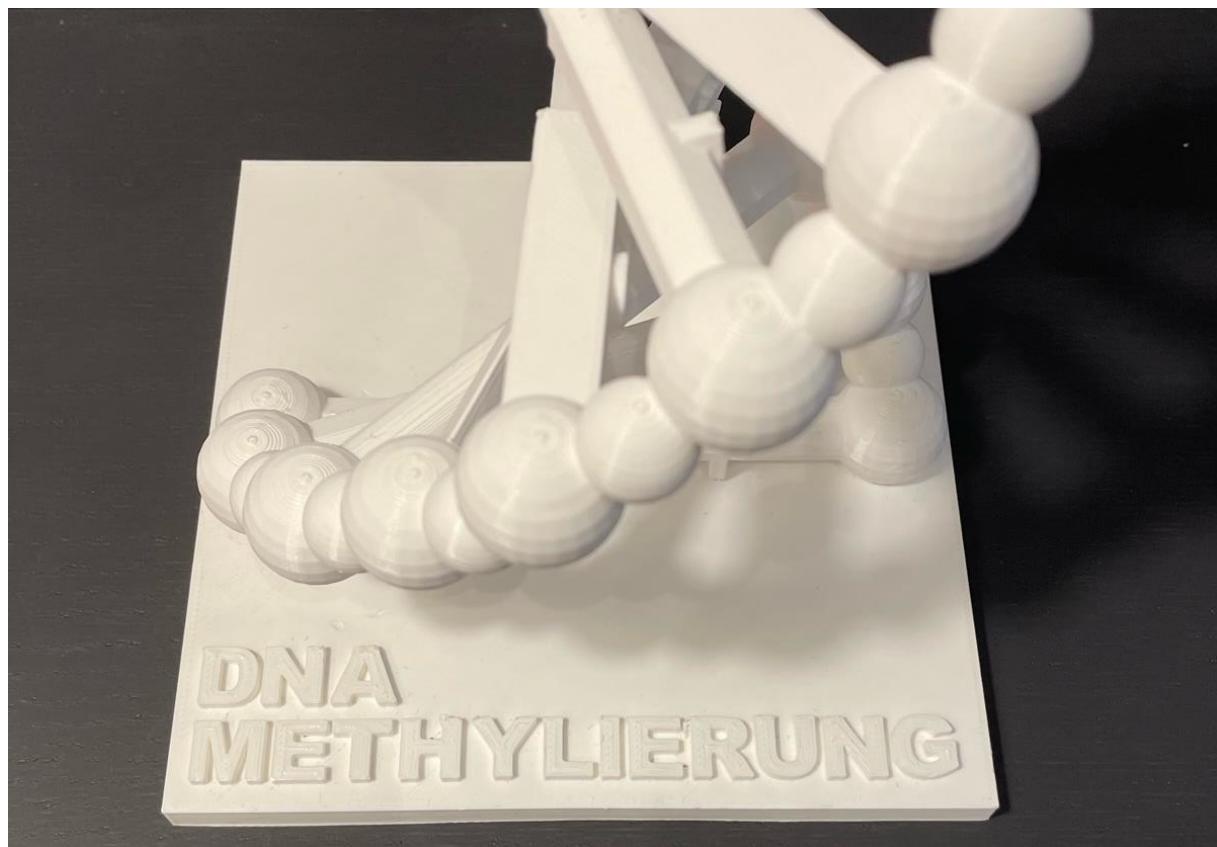
Lorenz Kovsca
8b



Reifeprüfung zum Haupttermin 2022

Vorwissenschaftliche Arbeit

Methylierung von DNA



Betreuerin
MMag. Regina Robanser

Abstract

In dieser vorwissenschaftlichen Arbeit wird die Epigenetik der Genetik gegenübergestellt, und dargelegt, wie diese gemeinsam die Regulation der Genexpression beeinflussen. Genauer beleuchtet wird dabei die biochemische Funktionsweise der verschiedenen Arten der Methylierung von DNA. Auch die Setzung und Entfernung dieser epigenetischen Markierungen im Erbgut stellen einen zentralen thematischen Punkt dar.

Der Recherche, die im Rahmen meiner Arbeit getätigt worden ist, liegt hauptsächlich wissenschaftliche Fachliteratur zugrunde. Hier ist anzumerken, dass aufgrund jüngerer und neuer Entdeckungen auf dem Gebiet der Epigenetik auch Fakten sehr aktueller wissenschaftlicher Artikel in meine Arbeit eingeflossen sind. Von der Idee einer Analyse epigenetischer Markierungen im Labor ist aufgrund der Covid-19-Pandemie und aus Kostengründen Abstand genommen worden.

Der praktische Teil dieser Arbeit setzt sich mit der Frage auseinander, wie Schülerinnen und Schülern der Oberstufe Vorgänge, die mit der Methylierung von DNA verbundenen sind, mithilfe eines Modells nähergebracht werden können. Auch die grundlegende Funktionsweise des 3D-Drucks, der gewählten Produktionsmethode, wird erläutert. Meine gesammelten Erfahrungen im Zuge der Umsetzung des Projekts haben diesen Teil meiner Arbeit maßgeblich beeinflusst. Dadurch ist es möglich gewesen, die größte Herausforderung, nämlich ein intuitives Zusammenfügen der einzelnen Bauteile durch den Anwender, erfolgreich zu meistern.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
2	Biologische Grundlagen	6
2.1	Enzyme.....	6
2.2	Grundlagen der Genetik	6
2.3	Zelldifferenzierung	7
3	Epigenetik und Genetik im Vergleich	8
3.1	Wirkungsweise der Epigenetik.....	8
3.2	Wirkungsweise der Genetik	10
3.3	Unterschiede der Genetik und der Epigenetik	12
4	Biochemischer Hintergrund der Methylierung von DNA	13
4.1	Übersicht.....	13
4.2	Arten der Methylierung von DNA	13
4.2.1	C5-Methylcytosin	14
4.2.2	N6-Methyladenin	14
4.2.3	N1-Methyladenosin.....	15
4.2.4	N4-Methylcytosin	15
4.3	Das Substrat – SAM	15
4.4	Schreiber – DNA-Methyltransferasen	17
4.4.1	Arten von DNA-Methyltransferasen	17
4.4.2	DNA-Methyltransferase 1.....	18
4.4.3	DNA-Methyltransferase 2	18
4.4.4	DNA-Methyltransferase 3A und 3B	19
4.4.5	DNA-Methyltransferase 3L	19
4.5	Leser – Beispiel Clal	20
4.6	Radierer von Methylierungen	22

5	Veranschaulichung epigenetischer Prozesse durch 3D-gedruckte Modelle	23
5.1	Hintergründe	23
5.2	Auswahlvorgang der dargestellten chemischen Prozesse	24
5.2.1	Die Methylierung eines CpG-Dinukleotids mittels einer DNA-Methyltransferase	24
5.2.2	Die Interpretation einer DNA-Methylierung durch das Schneideenzym Clal	25
5.3	Gründe für die Wahl der Methode des 3D-Drucks	25
5.4	Hintergründe des 3D-Drucks	27
5.5	Entwicklung der Modelle	31
5.5.1	Entwicklung des ersten Modells	31
5.5.2	Entwicklung des zweiten Modells	35
5.6	Probleme, Grenzen der Detailtreue und Verbesserungsansätze der Modelle	39
5.6.1	Modell 1	39
5.6.2	Modell 2	39
6	Zusammenfassung	40
	Literaturverzeichnis	41
	Abbildungsverzeichnis	43

1 Einleitung

Die Methylierung von DNA ist ein zentraler epigenetischer Mechanismus, der sich maßgeblich auf die Genexpression auswirkt. Dieser spielt eine tragende Rolle bei der Zelldifferenzierung und ermöglicht es Organismen, sich durch Genregulation an Umwelteinflüsse anzupassen. Trotz der großen Wichtigkeit der Methylierung von DNA birgt deren exakte Wirkungsweise immer noch Geheimnisse, die Gegenstand aktueller Forschungen auf dem Gebiet der Epigenetik sind.

Da ein tieferes Verständnis epigenetischer Mechanismen ein gewisses Basiswissen in verschiedenen Bereichen der Biochemie und Biologie erfordert, werden diese Grundlagen im ersten Abschnitt der Arbeit erläutert. Schließlich werden auf der Basis dieses Grundwissens die Wechselwirkungen der Genetik und der Epigenetik diskutiert.

Die zentrale Fragestellung dieser Arbeit behandelt die biochemischen Prozesse rund um die Methylierung von DNA sowie die verschiedenen Arten dieser. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei darauf, wie die Methylgruppe im Erbgut angebracht und wieder entfernt werden kann, da diese Reversibilität ein charakteristisches Kernelement epigenetischer Modifikationen darstellt. Wissenschaftliche Quellen und Abbildungen selbstangefertigter Modelle bilden dabei die Basis, auf der dem Leser die behandelten Themen erläutert werden.

Der praktische Abschnitt dieser Arbeit beschäftigt sich abschließend damit, wie die beschriebenen Prozesse durch Modelle für den Unterricht aufbereitet werden können. Der Gedankengang zur Auswahl der veranschaulichten Prozesse und die praktische Umsetzung liegen genau dokumentiert vor.

2 Biologische Grundlagen

2.1 Enzyme

Enzyme sind Proteine, die als Biokatalysatoren fungieren.¹ Sie weisen substratspezifische aktive Zentren auf, an denen die katalysierte Reaktion stattfindet.² Aus diesem Grund wird bezüglich der Anheftung des Substrats an das Enzym oft von einem Schlüssel-Schloss-Prinzip gesprochen. Als Katalysator verändert sich das Enzym im Zuge der Reaktion nicht.

2.2 Grundlagen der Genetik

Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) sind Polymere, die aus aneinander gereihten Nukleotiden bestehen.³ Ein Nukleotid besteht aus einer Purin- oder Pyrimidinbase, einem Zucker und einer Phosphatgruppe.⁴ Zwei aufeinander folgende Nukleotide werden Dinukleotid genannt. DNA und RNA unterscheiden sich durch den im Zucker-Phosphat-Rückgrat vorkommenden Zucker, da DNA Desoxyribose und RNA Ribose enthält. In der DNA kommen die Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin vor, während die RNA statt Thymin Uracil aufweist.

Bei Lebewesen verschlüsselt die Abfolge der Basen der DNA die Informationen zur Synthese von Proteinen. Ein DNA-Abschnitt für je ein Protein wird Gen genannt. Die Summe aller in einer DNA enthaltenen Gene wird als Genom bezeichnet.⁵

Die RNA hat verschiedene Aufgaben und kann zum Beispiel als messenger-RNA (mRNA) agieren. Diese enthält die Abschrift eines Gens der DNA und bringt die codierten Informationen zu den Ribosomen, die den Ort der Proteinsynthese darstellen.⁶ Die dort stattfindende Umsetzung des Codes heißt Translation.

¹ vgl. Puvanakrishnan / Sivasubramanian u.a., 2019, S. 53.

² vgl. ebd., S. 53.

³ vgl. Kornberg / Baker, 2005, S. 4.

⁴ vgl. ebd., S. 4.

⁵ vgl. Bresch, 1964, S. 6.

⁶ vgl. National Human Genome Research Institute, Messenger RNA (mRNA) [Zugriff: 28.12.2021].

In Zellkernen ist die DNA in einer komprimierten Form vorzufinden. Um diese zu erreichen, muss die DNA auf Histone und andere Proteine aufgewickelt vorliegen.⁷ Der gesamte Komplex, den die DNA mit diesen Stützproteinen bildet, wird Chromatin genannt.

2.3 Zelldifferenzierung

Die Zellen multizellulärer Organismen müssen verschiedensten Anforderungen entsprechen und vielseitige Aufgaben erfüllen können. Aus diesem Grund wird der Prozess der Zelldifferenzierung durchlaufen, der die Zelle an einen bestimmten Aufgabenbereich anpasst und zur Folge hat, dass in einem Organismus unterschiedliche Zell- und Gewebetypen existieren.⁸ Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, aus denen sich noch verschiedene Zellarten entwickeln können.

⁷ vgl. Wolffe, 2000, S. 1.

⁸ vgl. Maclean, 1980, S. 3.

3 Epigenetik und Genetik im Vergleich

3.1 Wirkungsweise der Epigenetik

„Epigenetik bedeutet so viel wie „oberhalb der Genetik“ mit dem Unterton „zusätzlich zum Genom“.“⁹

Als Phänotyp werden die durch die Umsetzung der genetischen Informationen entstehenden Merkmale eines Lebewesens bezeichnet. Epigenetische Modifikationen sind Vorgänge, die zusammen mit dem Genom den Phänotypen eines Organismus beeinflussen.¹⁰ Dies geschieht jedoch ohne eine Veränderung der Basensequenz in der DNA.¹¹ Stattdessen werden epigenetische Modifikationen mit Hilfe von Enzymen direkt am Chromatin befestigt, wo sie zum Beispiel die Ablesbarkeit bestimmter Gene unterdrücken können. Somit regulieren sie, welche Teile der codierenden DNA tatsächlich ausgedrückt werden.

Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass epigenetische Markierungen ebenfalls durch Enzyme kontrolliert reversiert werden können.

Epigenetische Veränderungen sind nicht wie die Basensequenz der DNA von der Entstehung eines Organismus an festgeschrieben, sondern ändern sich im Laufe der weiteren Entwicklung und Lebensspanne ständig. Aus diesem Grund können auch Umwelteinflüsse, wie Stress, Klima und Ernährung, Auswirkungen in Form epigenetischer Modifikationen haben.

Dies erklärt unter anderem, warum eineiige Zwillinge mit demselben Genom unterschiedliche Phänotypen ausbilden. Ein weiteres Paradebeispiel für die epigenetische Umsetzung äußerer Einwirkungen ist das sogenannte „Gelee Royale“ bei Honigbienen. Durch diese Spezialnahrung bilden Bienenlarven mit den gleichen genetischen Informationen wie Arbeiterbienen den Phänotypen der Bienenkönigin aus.¹²

⁹ Hümpel / Jörn, 2017, S. 41.

¹⁰ vgl. Krall, 2018, S. 2.

¹¹ vgl. Binder, 2019, S. 107.

¹² vgl. Hümpel / Jörn, 2017, S. 45.

Da die Epigenetik die Kontrolle über den Ausdruck von Genen hat, spielt sie auch in der Zelldifferenzierung, dem Weg einer Zelle von einer undifferenzierten Stammzelle zu einer Zelle eines bestimmten Gewebes mit spezifischen Aufgaben, eine große Rolle.¹³

Konkret wird zwischen drei Arten von epigenetischen Modifikationen unterschieden.

Als DNA-Methylierung wird die Modifikation eines Nukleotids der DNA durch das Hinzufügen einer Methylgruppe bezeichnet. Diese kann den Ausdruck der Erbinformationen eines DNA-Abschnitts verhindern oder fördern.¹⁴ Dabei verändert sie nicht die Eigenschaft der Base mit ihrer komplementären Base Wasserstoffbrücken auszubilden, sondern setzt eine Markierung für Ableseenzyme, die diese deuten.¹⁵

Histonmodifikationen hingegen bewirken, dass sich bestimmte DNA-Stränge enger um ein Histon wickeln, wodurch das Ablesen verhindert wird, oder lockern, wodurch DNA-Stränge für Enzyme besser erreichbar sind. Die Enzyme, welche die Histonmodifikationen an den Histonen vornehmen, werden von Proteinen an die richtigen Histone geleitet.

Weiters gibt es nicht codierende RNA, die vielseitige epigenetische Veränderungen auslösen kann. Deren genaue Aufgaben und Funktionsweisen sind erst vage bekannt, fest steht jedoch, dass sie in der Ergänzung anderer epigenetischer Modifikationen an die mRNA eine Rolle spielen.

Modifikationen an Histonen und mittels Methylgruppen bleiben teilweise über den Verlauf der Zellteilung hinweg erhalten und finden sich schließlich auch in der kopierten DNA wieder.¹⁶ Die Vererbbarkeit epigenetischen Materials an die Keimzelle ist allerdings erst in einigen Organismen bewiesen. Beim Menschen wird angenommen, dass epigenetische Markierungen in den Geschlechtszellen entfernt werden.¹⁷

¹³ vgl. Hümpel / Jörn, 2017, S. 44.

¹⁴ vgl. Binder, 2019, S. 108.

¹⁵ vgl. Hümpel / Jörn, 2017, S. 44.

¹⁶ vgl. ebd., S. 64.

¹⁷ vgl. ebd., S. 25.

3.2 Wirkungsweise der Genetik

Im Zentrum der Genetik stehen die DNA und die genetischen Informationen, die sie speichert. Diese Erbinformationen, welche genutzt werden, um Proteine zu synthetisieren, sind durch die Sequenz der Basen Thymin, Cytosin, Adenin und Guanin in der DNA kodiert.

Jedes Gen kodiert dabei ein bestimmtes Protein. Weiters lässt sich ein Gen in Abschnitte aus je drei aufeinanderfolgenden Basen, welche als Codon bezeichnet werden, unterteilen.¹⁸ Allen Codons, abgesehen von denen, die das Ende eines Gens markieren, kann eine Aminosäure im fertig synthetisierten Protein zugeordnet werden.

Obwohl in den Zellen der verschiedenen Gewebe eines multizellulären Organismus verschiedene Gene aktiv ausgedrückt werden, enthalten sie immer das gesamte Genom und damit alle genetischen Informationen, die den Organismus ausmachen. Diese werden in der Zellteilung durch Mitose vollständig an die Tochterzellen weitervererbt.¹⁹ Die Ausnahme dazu stellt die Bildung haploider Geschlechtszellen durch Meiose in Organismen, die sich sexueller Fortpflanzung bedienen, dar. Hier wird nur jeweils das halbe Genom an die Tochterzellen weitervererbt. Durch das Verschmelzen der weiblichen und der männlichen Geschlechtszellen wird schließlich eine Zygote mit einem neuen, einzigartigen und vollständigen Genom gebildet, aus der durch Mitose ein neuer Organismus hervorgeht.

Doch auch hier gilt, dass der Organismus sein eigenes Genom nicht aktiv verändern kann. Allerdings können bei der Vervielfältigung der DNA während der Zellteilung Fehler passieren, die Mutationen, Veränderungen der Basensequenz, zur Folge haben. Hierbei wird zwischen zwei Haupttypen von Punktmutationen unterschieden.

Bei einer Missense-Mutation kommt es durch eine fehlerhafte Abschrift der DNA zum Austausch einer Base in der Basenabfolge eines Gens.²⁰ Diese veränderte Base wandelt das Codon, welchem sie angehört, um, sodass es für eine andere Aminosäure kodiert. Dies wirkt sich auf die Struktur des gesamten Proteins, dass dem Gen zugeordneten ist, aus. In den meisten Fällen führt das dazu, dass das Protein seine Aufgabe nicht mehr erfüllen kann.

¹⁸ vgl. Fletcher / Hickey u.a., 2013, S. 17.

¹⁹ vgl. Bresch, 1964, S. 24.

²⁰ vgl. Wiechers / Samanta u.a., 2017, S. 217.

Eine Nonsense-Mutation hingegen involviert die Umwandlung eines Codons, welches für eine Aminosäure kodiert, in ein Codon, das den Abschluss des Gens markiert.²¹ Aus diesem Grund enthält das Gen nun Informationen für ein verkürztes Protein, welches ebenfalls oftmals nicht die gewünschten Eigenschaften der ursprünglichen Version besitzt.

Jedoch ist eine Mutation nicht immer zwangsläufig mit negativen Auswirkungen für einen Organismus und dessen Nachkommen verbunden. So gibt es beispielsweise auch neutrale Mutationen, die die Proteinstruktur nur so minimal verändern, dass sie weiterhin ihren Zweck erfüllt. In seltenen Fällen kann es auch zu Mutationen kommen, die die Proteinstruktur verbessern, indem sie sie besser an ihre Aufgabe anpassen. Diese spielen in der Evolution eine große Rolle, da die betroffenen Gene aufgrund von natürlicher Selektion häufiger weitervererbt werden, weil sie den Individuen, die sie besitzen, einen Überlebensvorteil verschaffen. So entstehen im Laufe der Evolution neue Gene, andere hingegen verschwinden. Ein gutes Beispiel dafür sind inaktive Pseudogene.²² Diese gleichen den gewöhnlichen Genen eines Organismus, enthalten aber signifikante Fehler, die sie unbrauchbar machen. Als evolutionsbiologische Überreste bleiben sie jedoch trotzdem in der DNA gespeichert.²³

²¹ vgl. Wiechers / Samanta u.a., 2017, S. 217.

²² vgl. Fletcher / Hickey u.a., 2013, S. 14.

²³ vgl. ebd., S. 14.

3.3 Unterschiede der Genetik und der Epigenetik

Die Speicherung der gesamten Erbinformationen eines Organismus durch die Basensequenz der DNA, die Proteine kodiert, ist der Gegenstand der Genetik. Allerdings kann die Genetik nicht erklären, warum sich die Zellen verschiedener Gewebe unterschiedlicher Gene bedienen oder die ausgedrückten Gene sich durch äußere Einflüsse verändern. Hier kommen epigenetische Mechanismen ins Spiel. Diese enthalten selbst keine Informationen über die Baupläne von Proteinen, regulieren aber, welche Gene aus der kompletten Bibliothek des Genoms durch Ableseenzyme verwendet werden.

Die Epigenetik ist das variable Element, welches mit Hilfe desselben Genoms unterschiedlichste Zelltypen erzeugen kann und dafür sorgt, dass diese sich der Umwelt anpassen können. Das Genom selbst kann sich hingegen über die Lebensspanne eines Organismus nicht aktiv anpassen.

In der Vererbung von Informationen von einer Zelle zur anderen innerhalb eines Organismus spielen sowohl das Genom als auch epigenetische Modifikationen eine große Rolle. Während das Genom die Baupläne für alle benötigten Proteine in allen Zelltypen eines Organismus weitergibt, werden auch epigenetische Parameter weitervererbt, die bestimmen, in welchem Ausmaß die Gesamtheit der Gene genutzt wird.

Im Bereich der Informationsweitergabe im Zuge der sexuellen Reproduktion gibt es in der Wissenschaft bis heute Unstimmigkeiten. Klar ist, dass sich aus den zwei haploiden Geschlechtszellen eine Zygote mit einem neuen und kompletten Genom bildet. Die Vererbung epigenetischer Modifikationen ist allerdings nicht bei allen Organismen nachgewiesen.

4 Biochemischer Hintergrund der Methylierung von DNA

4.1 Übersicht

Als epigenetische Markierung kann die Methylierung in der DNA an eine Base gesetzt und auch wieder entfernt werden. Solange sie sich dort befindet, kann sie von Enzymen als epigenetische Information abgelesen werden.

Für die Prozesse, die dies ermöglichen, sind Enzyme notwendig, welche aufgrund ihrer Aufgabe als Schreiber, Leser oder Radierer in drei Gruppen eingeteilt werden können.²⁴ Schreiberenzyme befestigen die Methylierung an der DNA und bestimmen außerdem, wo dies geschieht. Die Enzyme, die der Gruppe der Leser angehören, verändern den Zustand der Methylierung nicht, sondern erkennen sie als Signal, um einen genregulatorischen Vorgang auszulösen. Epigenetische Radierer können eine bereits vorhandene Methylierung löschen.

Eine weitere wichtige Rolle spielt außerdem das Substrat, welches die Methylgruppe für die Methylierung liefert.

4.2 Arten der Methylierung von DNA

Für alle Prokaryonten und Eukaryonten gibt es vier bekannte Formen der Methylierung von DNA, die sich durch die chemische Position der Methylgruppe unterscheiden.²⁵ Allerdings kommen Methylierungen nur an zwei der vier Basen der DNA, nämlich Cytosin und Adenin vor. Sie werden verschieden erkannt, wodurch sich ihre jeweiligen Aufgaben unterscheiden. Die Bezeichnung der methylierten Base ändert sich, indem ihrem ursprünglichen Namen als Zusatz ein Buchstabe und eine Zahl beigefügt werden. Während die Zahl auf die Position der Methylgruppe in Beziehung zu dem sechseckigen Kohlenstoffring der DNA-Base verweist, gibt der Buchstabe das Atom der Base an, an dem die Methylgruppe angebracht ist. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es weitere Formen der Methylierung von DNA gibt, die noch nie wissenschaftlich erfasst worden sind.

²⁴ vgl. Könneker / Reichert u.a., 2018, S. 20.

²⁵ vgl. Turek-Plewa / Jagodziński, The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression [Zugriff: 20.8.2021].

4.2.1 C5-Methylcytosin

C5-Methylcytosin ist die einzige beim Menschen nachgewiesene Variante einer methylierten DNA-Base. Weil die Methylgruppe hier direkt an den sechseckigen Kohlenstoffring des Cytosins gebunden ist, findet die abgekürzte Bezeichnung, 5-Methylcytosin, ebenfalls Verwendung. Lange Zeit ist sie von Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen für die einzige Form der Methylierung bei Säugetieren gehalten worden, da sie im Vergleich zu anderen Typen ungemein häufig vorgefunden werden kann. C5-Methylcytosin kann in CpG-Dinukleotiden auftreten. CpG-Dinukleotide liegen genau dann vor, wenn in der Basensequenz der DNA ein Guanin auf ein Cytosin folgt. Auffällig sind dabei in der DNA sogenannte „CpG-Inseln“, Abschnitte der DNA, die besonders viele CpG-Dinukleotide enthalten. Ihnen wird aufgrund ihres hohen Methylierungspotenzials eine große genregulatorische Wichtigkeit zugeschrieben. In der DNA von Säugetieren weisen sechzig bis neunzig Prozent der Cytosinbasen in allen vorhandenen CpG-Dinukleotiden eine Methylierung der Art C5 auf.²⁶

„Die unter Säugern am weitesten verbreitete Modifikation, das 5-Methylcytosin oder 5mC, ist von derartiger Bedeutung, dass es neben Adenin (A), Cytosin (C), Thymin (T) und Guanin (G) häufig als »fünfte Base« bezeichnet wird.“²⁷

Die Hauptaufgabe des C5-Methylcytosins ist es, als Markierung zur Aktivierung oder Deaktivierung von Genen zu fungieren.

4.2.2 N6-Methyladenin

Erst 2015 ist N6-Methyladenin in der DNA eines Säugetieres entdeckt worden.²⁸ Davor ist die Base bei einigen Bakterien, Würmern und der Taufliege bekannt gewesen. Im Vergleich zu C5-Methylcytosin ist sie jedoch bei Säugetieren viel seltener anzutreffen. N6-Methyladenin wirkt sich auf die Translation aus und könnte außerdem dazu dienen, in einem Gen mehrere Varianten eines Proteins zu speichern. Bakterien können zudem N6-Methyladenin verwenden, um ihre eigene DNA von fremder DNA zu unterscheiden.²⁹

²⁶ vgl. Turek-Plewa / Jagodziński, The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression [Zugriff: 20.8.2021].

²⁷ Könneker / Reichert u.a., 2018, S. 21.

²⁸ vgl. ebd., S. 23.

²⁹ vgl. ebd., S. 21.

4.2.3 N1-Methyladenosin

N1-Methyladenosin, das seit 2016 bekannt ist, ist noch nicht ausführlich erforscht und bisher nur an der RNA nachgewiesen worden. Klar ist, dass es ähnliche Aufgaben bezüglich der Translation wie N6-Methyladenin erfüllt, jedoch unterscheiden sich die zugehörigen Prozesse chemisch.³⁰

4.2.4 N4-Methylcytosin

In der DNA von Prokaryonten ist N4-Methylcytosin zusammen mit N6-Methylcytosin die häufigste Form der Methylierung. Da noch keine effiziente Methode, N4-Methylcytosin in der DNA aufzuspüren, entwickelt worden ist, sind die genauen Auswirkungen der methylierten Base unklar.³¹

4.3 Das Substrat – SAM

Die DNA-Methyltransferasen selbst sind Enzyme, die als Katalysatoren die Methylierung von DNA kontrollieren und beschleunigen. Da aber Enzyme vor und nach Ablauf der katalysierten Reaktion strukturell ident sind, spenden nicht die DNA-Methyltransferasen die für die Methylierung benötigte Methylgruppe. Stattdessen dient ein anderer Stoff, nämlich S-Adenosyl-L-Methionin, kurz SAM oder auch AdoMet genannt, als Träger der verwendeten Methylgruppe. Dieser verändert sich im Laufe der Methylierung der DNA und wird aufgrund seiner Funktion im Reaktionsablauf Cofaktor genannt.

Doch nicht nur bei der Methylierung von DNA spielt SAM eine wichtige Rolle. Im menschlichen Körper findet SAM einerseits als Cofaktor zur Methylierung verschiedenster Stoffe, aber auch in anderen chemischen Abläufen, Anwendung. Da SAM seine Methylgruppe sehr bereitwillig abgibt, ist der Stoff der bei Menschen am häufigsten vorkommende Methylspender.³² So existieren rund einhundertzwanzig Methylasen, die als Cofaktor SAM benutzen.³³ Viele dieser Enzyme sind für die Methylierung an Sauerstoff oder Stickstoff in Molekülen zuständig, einige wenige auch für die Methylierung an Kohlenstoff.

³⁰ vgl. Könneker / Reichert u.a., 2018, S. 24.

³¹ vgl. Zhao / Zhang u.a., Accurate prediction of N4-methylcytosine sites via boost-learning various types of sequence features [Zugriff: 23.8.2021].

³² vgl. Blumenthal / Cheng, 1999, S. 1.

³³ vgl. ebd., S. 3.

Beim Vorgang der Methylierung von DNA gibt SAM seine Methylgruppe an eine der methylierbaren DNA-Basen, Adenin oder Cytosin, ab und nimmt dafür an der Abgabestelle ein Wasserstoff-Ion auf. Dieses Wasserstoff-Ion wiederum kommt von der Stelle an der DNA-Base, an die die Methylgruppe bindet. Der Cofaktor und die DNA-Base tauschen sozusagen eine Methylgruppe und ein Wasserstoff-Ion aus. Dadurch wird die Base zur methylierten Base, das S-Adenosyl-L-Methionin wiederum wird zu S-Adenosyl-L-Homocystein, abgekürzt SAH oder AdoHcy.

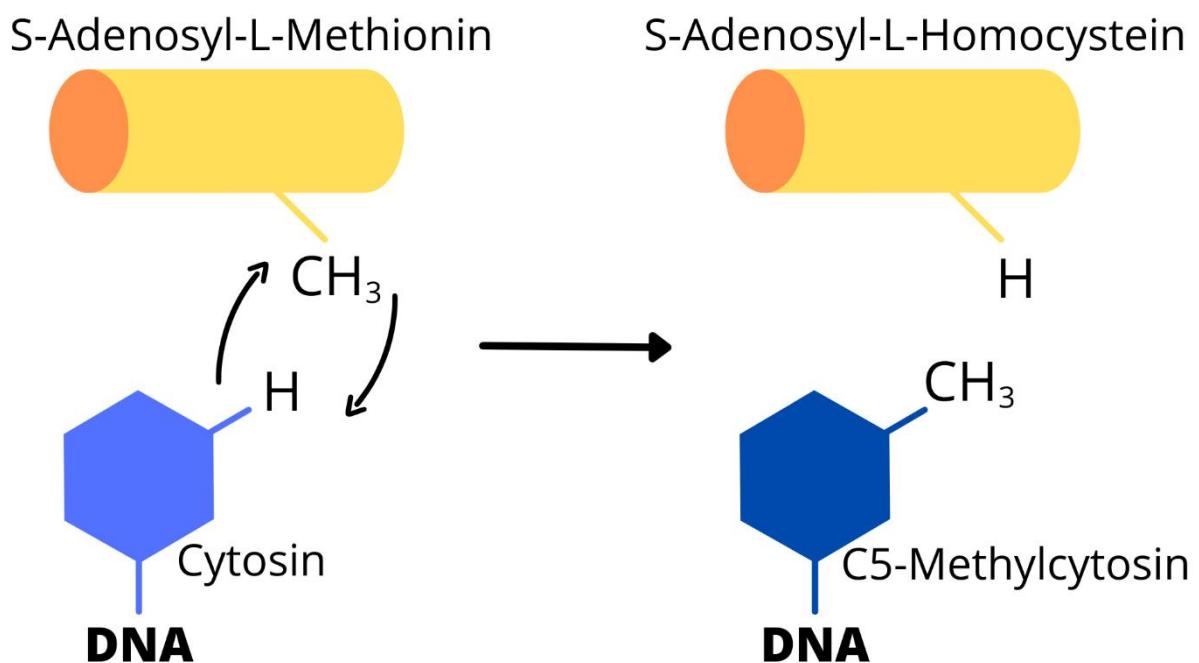


Abb. 1: Austausch der Methylgruppe zwischen Cytosin und SAM

4.4 Schreiber – DNA-Methyltransferasen

4.4.1 Arten von DNA-Methyltransferasen

DNA-Methyltransferasen, kurz DNMTs, sind die Enzyme, die es ermöglichen, die Methylgruppen des S-Adenosyl-L-Methionin präzise an die richtigen Basen in der Basensequenz der DNA zu befestigen.

Es existieren mehrere Typen von DNMTs. Dies hat allerdings nicht nur damit zu tun, dass es verschiedene Typen der Methylierung von DNA gibt. In der Tat sind sogar einige DNMTs dazu in der Lage, Methylgruppen an beiden methylierbaren DNA-Basen anzubringen. Ein Beispiel dafür ist eine DNA-Methyltransferase, die sowohl Cytosin an der N4 Position als auch Adenin an der N6 Position methylieren kann.³⁴ Es sind die unterschiedlichen charakteristischen Merkmale, die die Methylierung von DNA als epigenetische Markierung besitzt, die verschiedene DNMTs im jeweiligen Bereich notwendig machen. So kann im Wesentlichen zwischen sog. „de novo“ DNMTs, welche neue Methylierungen in eine DNA einbringen, und DNMTs zur Erhaltung der Methylierungen beim Kopieren der DNA unterschieden werden.³⁵

Die Struktur von DNMTs verfügt über zwei aktive Zentren. Eines wird für den Transport des S-Adenosyl-L-Methionin benötigt, während das andere dem Enzym als Negativabdruck der zugehörigen Erkennungssequenz in der DNA dazu dient, die richtige Einsatzstelle in der Basensequenz der DNA zu finden.

Das in den nächsten Unterkapiteln beschriebene System von DNMTs dient der Erzeugung und Erhaltung von C5-Methylcytosin. Da diese Form der Methylierung beim Menschen und Säugetieren dominant ist, zählen die zugehörigen DNMTs zu den am besten erforschten.

³⁴ vgl. Jeltsch / Jurkowska, 2016, S. 7.

³⁵ vgl. Turek-Plewa / Jagodziński, The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression [Zugriff: 20.8.2021].

4.4.2 DNA-Methyltransferase 1

DNMT1 ist die erste DNA-Methyltransferase eines Säugetiers, die entdeckt worden ist.

Dieses Enzym hat die Aufmerksamkeit der Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen auf sich gezogen, da eine Deaktivierung von DNMT1 in Mäuseembryonen dazu geführt hat, dass die Mäuse sich nicht über ein Embryonalstadium hinaus entwickelt haben und noch vor der Geburt gestorben sind.³⁶ Daraufhin ist es eindeutig gewesen, dass DNMT1 in der Entwicklungsphase eine immense Rolle spielen muss.

Heute ist klar, dass DNMT1, da sie eine Erhaltungs-DNMT ist, tatsächlich eine essenzielle Aufgabe in der Zellteilung hat. Im Zuge jeder DNA-Replikation werden methylierte Basen in ihrer unmethylierten Form abgeschrieben, wodurch das nachträgliche Ergänzen der Methylgruppen durch DNMT1 erforderlich wird. Direkt an der Gabelung der zu replizierenden DNA in ihre beiden Tochterstränge sorgt DNMT1 für die vollständige Abschrift aller Methylgruppen. Nur so kann gewährleistet werden, dass die beiden Tochterzellen epigenetisch ident sind und somit zum Beispiel denselben Grad an Differenzierung aufweisen.

Zudem interagiert DNMT1 mit einigen anderen Enzymen, die, beispielsweise in der Modifikation von Histonen, eine tragende Rolle innehaben.

4.4.3 DNA-Methyltransferase 2

Als einzige der DNMTs bei Säugetieren fehlt DNMT2 das aktive Zentrum für den Transport des S-Adenosyl-L-Methionins. Deshalb führt DNMT2 keine Methylierungen aus. Wegen der Form des Enzyms wird angenommen, dass DNMT2 beim Aufspüren von Schäden und Mutationen in der DNA und dem Reparaturprozess beschädigter DNA zum Einsatz kommt.³⁷

³⁶ vgl. Jeltsch / Jurkowska, 2016, S. 9.

³⁷ vgl. Turek-Plewa / Jagodziński, The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression [Zugriff: 20.8.2021].

4.4.4 DNA-Methyltransferase 3A und 3B

Anders als DNMT1 sind DNMT3A und DNMT3B „de novo“ DNA-Methyltransferasen. Diese DNMTs können neue Methylgruppen in eine DNA einfügen und damit deren Epigenom³⁸ verändern. Aus diesem Grund spielen diese beiden DNMTs vor allem während der Entwicklung eines Embryos zu einem Organismus mit zahlreichen differenzierten Geweben eine große Rolle. Im Kontrast zu DNMT1 können DNMT3A und DNMT3B auch am Epigenom der DNA Veränderungen vornehmen, wenn diese gerade keine Replikation durchläuft.

Jedoch nimmt die Menge der produzierten DNMT3A und DNMT3B Enzyme im Laufe der Zelldifferenzierung ab, bis sie sich auf einem konstant niedrigen Level befindet. Obwohl im Erwachsenenstadium eines Organismus nur noch wenige „de novo“ DNMTs vorhanden sind, können sie dennoch Auswirkungen auf das Epigenom haben, wodurch dieses über die gesamte Lebensspanne eines Lebewesens variabel bleibt.

Auch wenn die Struktur von DNMT3A und DNMT3B sehr ähnlich ist, tragen sie an unterschiedlichen Stellen der DNA zur Methylierung von Cytosin bei. DNMT3A methyliert hauptsächlich CpG-Dinukleotide, kann aber seltener auch Cytosin vor den Basen Adenin oder Thymin, also CpA oder CpT Dinukleotide, methylieren.³⁹ DNMT3B hingegen methyliert nur CpG-Dinukleotide in ausgewählten Bereichen der Chromosomen.

Gleich wie DNMT1 wechselwirken DNMT3A und DNMT3B mit anderen Enzymen, die in die Histonmodifikation verwickelt sind.

4.4.5 DNA-Methyltransferase 3L

Bei der Methylierung von DNA wird S-Adenosyl-L-Methionin in S-Adenosyl-L-Homocystein umgewandelt. Dadurch, dass die Strukturen der beiden Stoffe einander sehr ähnlich sind, nehmen DNMTs mit aktiven Zentren für SAM auch SAH auf, welches nicht mehr für die Methylierung verwendet werden kann, da es keine verwendbare Methylgruppe mehr besitzt. Um diese Blockaden von DNMTs zu reduzieren, steht DNMT3L bereit, welche die Substrate austauscht, sodass möglichst wenig SAH von den anderen DNMTs aufgenommen wird. DNMT3L selbst methyliert keine Basen der DNA.

³⁸ vgl. Zeschnigk / Horsthemke, 2019, S. 205.

³⁹ vgl. Turek-Plewa / Jagodziński, The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression [Zugriff: 20.8.2021].

4.5 Leser – Beispiel Clal

Methylierungen an DNA-Basen liefern dadurch epigenetische Informationen, dass sie Enzymen, die den in der Basensequenz der DNA verschlüsselten Code ablesen, als Merkmal dienen. Hierbei interagieren die methylierten Basen mit einer Vielzahl von Enzymen mit unterschiedlich komplexen Aufgaben. Eine der einfacheren und gut untersuchten Gruppen ist dabei die der Restriktionsenzyme.

Restriktionsenzyme suchen in einer DNA eine enzymespezifische Abfolge in der Basensequenz, an der sie die DNA in zwei Teile teilen können. Diese Basenabfolge wird als Erkennungssequenz bezeichnet. Zu unterscheiden sind hier Restriktionsenzyme, die sog. „glatte“ Enden an der DNA schneiden, also beide Stränge der DNA an derselben Höhe durchtrennen und Restriktionsenzyme, die sog. „klebrig“ Enden schneiden, bei denen dies nicht der Fall ist. „Klebrig“ ist die Bezeichnung für jenen Typ des Schnitts, da sich die DNA-Schnittprodukte leichter wieder zusammenfügen lassen, weil ihre versetzt abgetrennten Enden wie Puzzlesteine ineinandergreifen. Die meisten Restriktionsenzyme dienen Mikroorganismen wie Bakterien dazu, fremde DNA, die in das Zytoplasma des Organismus eindringt, zu zerkleinern. Einige dieser Restriktionsenzyme werden künstlich vervielfältigt, da sie für Experimente in der Genetik und Epigenetik von großem Nutzen sind.

Ein Vertreter dieser Gruppe ist das Enzym Clal, das im Bakterium *Caryophanon latum L* vorkommt, welches unter anderem in Kuhdung gefunden werden kann.⁴⁰ Da die Erkennungssequenz dieses Enzyms ein CpG-Dinukleotid aufweist, das sehr häufig in methylierter Form vorliegt, eignet es sich besonders gut, um die Auswirkungen methylierter Basen auf DNA-Leseenzyme zu beobachten. Genauer handelt es sich bei der Erkennungssequenz um die sechs Basen lange Abfolge „ATCGAT“, die auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang als das Palindrom „TAGCTA“ vorliegt.⁴¹ Clal schneidet beim Auffinden dieser Sequenz die DNA, wie in der untenstehenden Abbildung dargestellt, mit „klebrigen“ Enden. Weist jedoch ein CpG-Dinukleotid eine methylierte Base der Form C5-Methylcytosin auf, so wird Clal am Zerteilen der DNA gehindert.⁴²

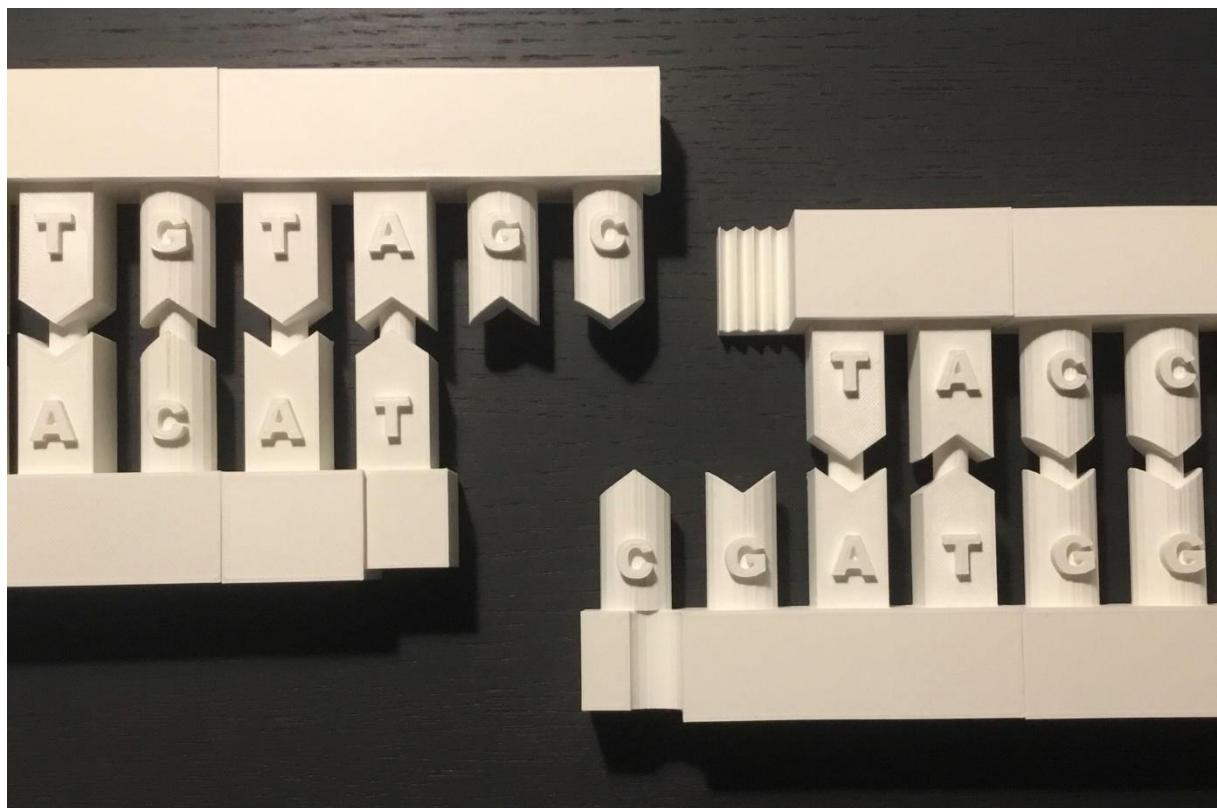


Abb. 2: Erkennungssequenz mit „klebrigen“ Enden geschnitten

Eine weitaus komplexere Regulation von Leseenzymen, so wird vermutet, wirken die CpG-Inseln aus, die aufgrund ihrer hohen Methylierungsdichte eine Vielzahl epigenetischer Informationen kodieren können.

⁴⁰ vgl. Mayer / Grosschedl u.a., Nucleic Acids Research [Zugriff: 27.8.2021].

⁴¹ vgl. ebd. [Zugriff: 27.8.2021].

⁴² vgl. New England Biolabs, Dam-Dcm and CpG Methylation [Zugriff: 27.8.2021].

4.6 Radierer von Methylierungen

Während DNA-Methyltransferasen, die die Methylgruppe an die DNA anbringen, vergleichsweise gut untersucht sind, ist über Radiererenzyme nur wenig bekannt. Deren Aufgabe ist es, die Methylierung, die ja als epigenetische Markierung reversibel sein muss, wieder aus der DNA zu entfernen.

FTO, ein Enzym von dem bereits bekannt gewesen ist, dass es dazu in der Lage ist, Methylgruppen zu entfernen, ist als erster möglicher Radierer von DNA-Methylierungen ins Visier von Wissenschaftlern und Wissenschaftlerinnen geraten. Tatsächlich ist so 2010 das erste Mal gezeigt worden, dass der Vorgang der Methylierung von DNA umkehrbar ist, als ein Forschungsteam mittels FTO erfolgreich eine Methylierung aus der Base N6-Methyladenin entfernt hat.⁴³

Dass sich allerdings die Einsatzstellen der Radierer an den methylierten DNA-Basen oft strukturell ähneln, führt dazu, dass Radiererenzyme oft verschiedene Methylierungen entfernen können, wenn auch unterschiedlich gut. So hat sich auch bei FTO nach weiteren Jahren der Forschung herausgestellt, dass die eigentliche Zielbase des Enzyms eine andere ist.⁴⁴ Dies führt vor Augen, wie wenig der Wissenschaft bis heute über Radierer von DNA-Methylierungen bekannt ist.

Neben Radiererenzymen gibt es eine weitere, passive Möglichkeit DNA-Methylierungen zu entfernen. Durch das Unterdrücken von Erhaltungs-DNA-Methyltransferasen während der DNA-Replikation werden Methylierungen nicht in die DNA der Tochterzelle übernommen.

⁴³ vgl. Könneker / Reichert u.a., 2018, S. 19.

⁴⁴ vgl. ebd., S. 24.

5 Veranschaulichung epigenetischer Prozesse durch 3D-gedruckte Modelle

5.1 Hintergründe

Das Ziel des praktischen Teils dieser Arbeit ist es, Schülern und Schülerinnen der Oberstufe die Methylierung von DNA und verwandte Vorgänge näherzubringen und zu erklären. Dabei sollen sie die chemischen Details und Abläufe nicht nur kennenlernen, sondern auch tiefer verstehen und visualisieren können. Dem Verfasser der Arbeit erscheint, der Umsetzung dieses Vorhabens seien jedoch bei der Verwendung herkömmlicher Lehrmethoden, wie etwa dem Ausfüllen von Arbeitsblättern, einem Vortrag oder einer PowerPoint-Präsentation, Grenzen gesetzt. Dies liegt daran, dass ein hoher Grad an Abstraktion angewandt werden müsse, um Prozesse, in denen komplex aufgebaute Enzyme mitwirken, zu erklären.

Der Lösungsansatz des Autors ist das Anfertigen von Modellen, da diese sich hervorragend zu einer zusätzlichen Veranschaulichung des bearbeiteten Themengebiets und der Festigung des Gelernten eignen. Weiters sollen diese nicht nur optisch den Unterricht unterstützen, sondern auch durch möglichst einfach bedienbare Mechanismen die Schüler und Schülerinnen zum Ausprobieren und Nachdenken anregen. Dieser mechanische Aspekt soll helfen, die chemischen Prozesse der Methylierung von DNA räumlich nachvollziehbar zu machen.

Hierbei muss erwähnt werden, dass es nach Ermessen des Verfassers nicht die Aufgabe der Modelle für den Schulgebrauch ist, ein vollkommenes räumliches Abbild der involvierten Moleküle darzustellen. Diese Genauigkeit wirke nämlich dem eigentlichen Zweck der Modelle, Klarheit zu schaffen, entgegen, da sie nicht von Notwendigkeit sei, um die grundlegenden Vorgänge besser zu beleuchten. Stattdessen sei es sinnvoller, diese vereinfacht darzustellen und unwichtige Details auszulassen. Das Augenmerk des Autors liegt auf die eindeutige Implikation der Aufgabe eines chemischen Bausteins durch seine Form und die Art und Weise, wie mehrere Teile miteinander interagieren können.

5.2 Auswahlvorgang der dargestellten chemischen Prozesse

Die chemischen Abläufe, die den Modellen zugrunde liegen, müssen bestimmte Anforderungen erfüllen, damit eine Umsetzung sinnvoll ist. Dafür sind dem Autor der Arbeit drei Kriterien als ausschlaggebend erschienen.

Erstens muss der veranschaulichte Prozess ein gewisses Maß an Komplexität aufweisen.

Wenn dieser nämlich zu einfach ist, bietet das Modell nur begrenzten Nutzen beim Lernen, da der Sachverhalt auch ohne den Einsatz zusätzlicher Mittel verständlich unterrichtet werden kann.

Zweitens sollte der Ablauf eine zentrale Rolle in Verbindung zu der Methylierung von DNA spielen. So wird sichergestellt, dass im Unterricht die wichtigsten Aspekte priorisiert werden und alle Schülerinnen und Schüler sich ein Bild von dem eigentlichen Kernthema machen können.

Drittens ist erforderlich, dass in den ausgewählten Prozess gut abbildbare chemische Stoffe, wie zum Beispiel Enzyme, andere Proteine und Substrate verwickelt sind. Diese Voraussetzung macht das Erstellen eines Modells erst möglich, da mit Formen gearbeitet werden kann.

Unter Berücksichtigung der oben angeführten Maßstäbe sind zwei chemische Prozesse schlussendlich als passend ausgewählt worden.

5.2.1 Die Methylierung eines CpG-Dinukleotids mittels einer DNA-Methyltransferase

Durch diesen Vorgang wird die Methylgruppe an einer DNA-Base befestigt. Er hat zentrale Wichtigkeit im Themengebiet der Methylierung von DNA, ist jedoch, da komplexe DNA-Methyltransferasen in dessen Ablauf involviert sind, nicht einfach zu verstehen. Deshalb besteht hier die Notwendigkeit, Gebrauch von einem Modell zu machen. Sowohl beteiligte Enzyme als auch das Substrat und die DNA selbst haben charakteristische Formen, die während dem Prozess eine tragende Rolle spielen. Weiters kann die Übertragung der Methylgruppe im Modell umgesetzt werden.

5.2.2 Die Interpretation einer DNA-Methylierung durch das Schneideenzym Clal

Das Schneideenzym Clal wird durch eine Cytosinmethylierung am Zerteilen der DNA gehindert. Um die Methylierung von DNA zu verstehen, ist es zwar nicht notwendig diesen speziellen Ablauf zu kennen, allerdings ist er ein Paradebeispiel der Auswirkungen von DNA-Methylierungen. Aus diesem Grund stellt er eine wertvolle Bereicherung des Unterrichts dar. Obwohl dieser Vorgang nicht so komplex ist, wie andere Prozesse, die von DNA-Methylierungen beeinflusst werden, lohnt es sich dennoch, diesen durch ein Modell noch zugänglicher zu machen. Hierbei lassen sich die Suche des Enzyms nach der Erkennungssequenz in der DNA und das Zerschneiden dieser durch einen Mechanismus zeigen.

5.3 Gründe für die Wahl der Methode des 3D-Drucks

Die Auswahl der Konstruktionsmethode der Modelle ist durch mehrere Faktoren bestimmt worden.

Da die Arbeitsweise von Enzymen erläutert werden soll, ist es wichtig, dass auch einzelne Teile des Modells eindeutig nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zusammengefügt werden können. Damit dies gelingt, müssen die Formen der Einzelteile sich so weit unterscheiden, dass Schüler und Schülerinnen problemlos das richtige Gegenstück zu einem Bauelement identifizieren können. Es ist daher erforderlich, eine Vielzahl an unterschiedlichen Formen mit der gewählten Methode erzeugen zu können.

Außerdem ist zu beachten, dass jedes Gegenstück das exakte Negativ der Form des ursprünglichen Elements ist, um ein optimales Zusammenfügen zu ermöglichen. Wiederum ist dies wichtig, damit Schüler und Schülerinnen eindeutig ein Teilepaar bestimmen können. Aus diesem Grund muss die gewählte Bauweise einen hohen Grad an Genauigkeit zulassen.

Während die einzelnen Elemente zwar keine naturgetreuen Abbilder der echten Proteine und Substrate sein sollen, erscheint es für den Unterricht dennoch förderlich, wenn diese nicht vollständig schematisch aufgebaut sind. Werden nämlich einige Details beibehalten, lassen sich die Modelle auch zur Erklärung anderer verwandter Themen heranziehen. Dies setzt allerdings voraus, dass die verwendete Konstruktionsmethode eine gewisse Komplexität ermöglicht.

Weiters ist zu bedenken, dass die Modelle genug Stabilität aufweisen müssen, um einem wiederholten Gebrauch im Unterricht standzuhalten. Dabei spielen Parameter wie Druckfestigkeit und Elastizität eine große Rolle.

Die Größe der Modelle ist ergonomisch sinnvoll zu wählen. Das heißt, dass die Modelle weder unhandlich klein noch überflüssig groß sein sollten.

Diese recht umfangreiche Menge an Anforderungen schließt einige Methoden von vornherein aus oder stellt die Sinnhaftigkeit von deren Verwendung in Frage.

Zum Beispiel erweist sich ein Modell aus Papier oder Karton nicht als ausreichend, da dreidimensionale Formen nur schwer verwirklicht werden können. Zusätzlich nutzen diese Materialien sich durch den Unterrichtsgebrauch schnell ab, wodurch sich die genauen Passformen verformen oder sogar das ganze Modell kaputt wird. Holz hingegen ist sehr stabil. Allerdings sind viele komplizierte Bearbeitungsschritte notwendig, um die benötigten Formen zu schaffen. Aus diesem Grund scheint auch Holz ungeeignet für das Modell. Eine weitere Überlegung des Autors sind Bausteine, wie sie oft im Chemieunterricht verwendet werden, gewesen. Durch diese werden die Atome der organischen Chemie durch kugelförmige Bauteile dargestellt, die durch Verbindungsteile, die chemische Bindungen andeuten, verbunden werden können. Hier ist eine zu große Komplexität der Ausschlussgrund. Die Darstellung der involvierten Moleküle auf einer atomaren Ebene führt zu sehr komplizierten Strukturen, anstelle der gewünschten vereinfachten Formen, deren Aufgabe klar ersichtlich ist. Zudem wäre das Modell sehr groß, da die einzelnen Bausteine bereits eine Größe von einigen Zentimetern aufweisen.

So ist schlussendlich der 3D-Druck als Methode der Konstruktion eines Modells ausgewählt worden, da dieser alle gestellten Ansprüche mehr als ausreichend erfüllt. Mit Computerprogrammen kann jede noch so komplexe Form erstellt werden, die der 3D-Drucker schließlich problemlos drucken kann. Außerdem gibt es die Möglichkeit, mit diesen Applikationen dreidimensionale Objekte zu schneiden, wodurch perfekte Negative für die Passformen der Enzyme erstellt werden können. Zusätzlich werden diese mit einem sehr hohen Grad an Genauigkeit gedruckt, sodass Bauteile eindeutig zusammenpassen.

Die Stabilität von 3D-gedruckten Modellen hängt von den inneren Strukturen der Formen ab, die ebenfalls am Computer angepasst werden können. Sollte ein solches Modell im Unterricht dennoch Schaden nehmen, kann es problemlos erneut gedruckt werden, da keine Arbeitsschritte mehr erforderlich sind, wenn der benötigte Teil des Modells bereits als Datei vorhanden ist. Die Größe des Modells ist von dem Druckvolumen des verwendeten Druckers abhängig. Dieses ist bei Druckern für den hobbymäßigen Gebrauch im Regelfall ungefähr als Würfel mit einer Seitenlänge von zwanzig Zentimetern definiert, was für ein Modell ausreicht. Weiters besteht die Möglichkeit, das Modell in mehreren Teilen zu drucken, die erst später zusammengefügt werden.

Die einzigen Nachteile der Verwendung dieser Methode liegen im Kostenaufwand. Während die Kosten des verwendeten Materials kaum ins Gewicht fallen, sind die Anschaffungskosten für einen 3D-Drucker sehr hoch. Diese können jedoch durch die Verwendung von Druckern in Gemeinschaftswerkstätten gegen eine Mitgliedschaftsgebühr vermieden werden.

5.4 Hintergründe des 3D-Drucks

Der 3D-Druck ist ein generatives Fertigungsverfahren.⁴⁵ Dies bedeutet, dass ein Objekt nicht durch die Bearbeitung eines Rohlings, von welchem Stücke subtrahiert werden, entsteht, sondern durch fortlaufende Zugabe von Material aufgebaut wird. Diese Art der Produktion zeichnet sich durch ein fertiges Produkt aus einem Stück und die Möglichkeit der kompletten Formfreiheit aus.⁴⁶

⁴⁵ vgl. Komorowsky, 2014, S. 1.

⁴⁶ vgl. ebd., S. 7.

Am Anfang eines 3D-Drucks steht die Erstellung eines Entwurfs in einer CAD-Software. CAD ist die Abkürzung von „Computer Aided Design“.⁴⁷ Im CAD-Programm kann mithilfe von geometrischen Grundformen, Funktionen und vorgefertigten Elementen eine virtuelle Version des Endprodukts geplant werden. Es gibt eine Vielzahl an CAD-Softwares, die sich durch unterschiedliche technische Möglichkeiten und Schwierigkeit der Verwendung auszeichnen. Anzumerken ist zudem, dass viele Programme unterschiedliche Schwerpunkte haben, weshalb sie sich verschieden gut für bestimmte Zwecke eignen. Deshalb sollte die Wahl der passenden CAD-Software aufgrund der Ansprüche des jeweiligen Projekts erwogen werden.

Alle CAD-Softwares exportieren für den 3D-Druck den fertigen Entwurf in einem standardisierten Dateiformat, namens STL, was für „Surface Tesselation Language“ steht.⁴⁸ Dies verschafft generativen Fertigungsverfahren den großen Vorteil der bauteilorientierten und maschinenunabhängigen Programmierung.⁴⁹ Das heißt für den 3D-Druck, dass STL-Dateien unabhängig vom Druckertyp im Fertigungsprozess eines Produkts vorkommen und somit Projekte unverändert mit verschiedenen Druckern verwirklicht werden können.

Beschriebene STL-Dateien werden in ein Slicer-Programm eingespeist.⁵⁰ Das wohl meistverwendete Slicer-Programm ist „Ultimaker Cura“ des Herstellers „Ultimaker“, da es eine Vielzahl an Druckern unterschiedlichster Marken unterstützt. Durch den Prozess des „Slicing“ soll die STL-Datei in ein für den Drucker lesbares Format umgewandelt werden. Außerdem können hier einige Anpassungen bezüglich des eigentlichen Druckvorgangs vorgenommen werden. Die wichtigsten Einstellungen sind dabei die innere Struktur und Füllungsdichte dreidimensionaler Objekte, die maßgeblich zu Stabilität und Materialverbrauch beitragen. Ebenfalls können Abstützungen dort eingeplant werden, wo das zu druckende Objekt überhängende Stellen aufweist. Diese sind essenziell, da der 3D-Drucker Objekte schichtweise von unten nach oben aufbaut und aus diesem Grund keine stark überhängenden Abschnitte drucken kann.

⁴⁷ vgl. Dilling / Marx u.a., 2021, S. 14.

⁴⁸ vgl. Komorowsky, 2014, S. 11.

⁴⁹ vgl. ebd., S. 11

⁵⁰ vgl. Dilling / Marx u.a., 2021, S. 22.

Eine weitere nützliche Anwendung des Slicer-Programms stellt eine Vorschau des eigentlichen Druckvorgangs dar. Dadurch kann vorab überprüft werden, ob alle gewünschten Informationen korrekt an die Software übergeben wurden. Nach Vollendung der letzten Feinabstimmungen wird der entstandene Entwurf in eine gcode-Datei umgewandelt, die das fertige Objekt in Steueranweisungen für den 3D-Drucker codiert.⁵¹ Diese wird auf einem externen Speicherchip gesichert, der später an den 3D-Drucker angeschlossen werden kann.

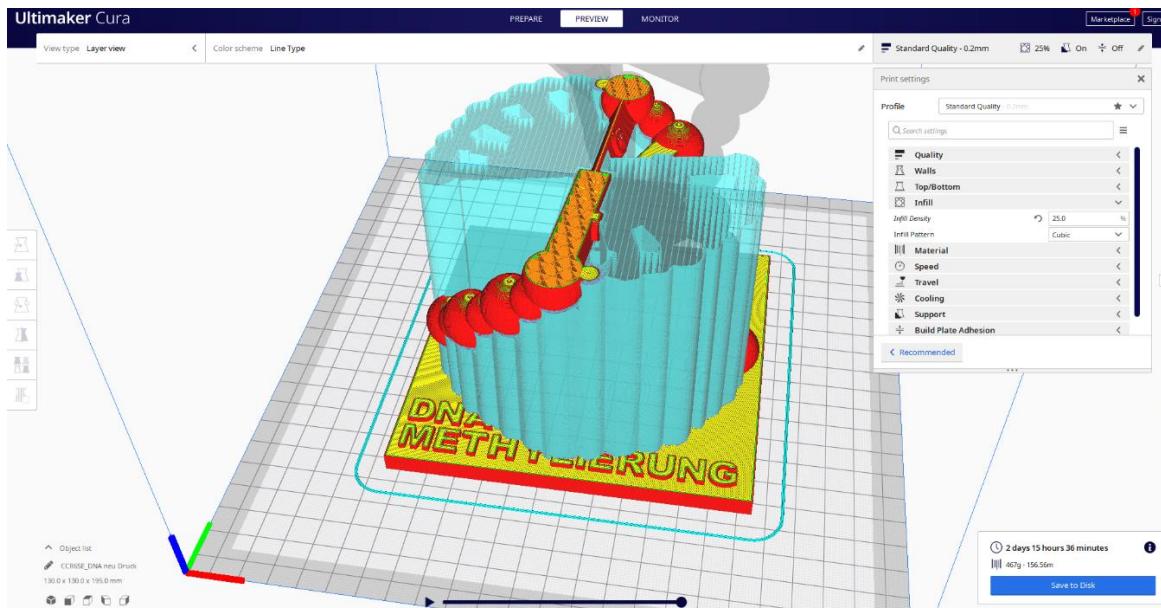


Abb. 3: Bauteil des ersten Modells in der Slicer-Vorschau

Damit beginnt schlussendlich der Druckprozess. Zum Drucken werden Filamente, auf Spulen aufgewickelte Kunststofffäden, verwendet.⁵² Diese unterscheiden sich im Materialtyp, von dem die Eigenschaften des fertigen Drucks abhängen. Die zwei am meisten gebrauchten Kunststoffe sind ABS, acrylonitrile butadiene styrene, und PLA, polylactic acid.⁵³ ABS findet im gewerblichen Bereich häufig Anwendung, da es sehr stabil ist. Allerdings entstehen beim Druck gesundheitsgefährdende Dämpfe, die über einen Abzug abgeführt werden müssen. Bei PLA ist dies nicht der Fall, jedoch ist es weniger robust. Daher eignet sich dieses Material besser für den hobbymäßigen Gebrauch.

⁵¹ vgl. Dilling / Marx u.a., 2021, S. 23.

⁵² vgl. ebd., S. 10.

⁵³ vgl. ebd., S. 10.

Beim Drucken wird das Filament durch eine Transporteinheit in den Extruder geschoben.⁵⁴ Dieser erhitzt das Filament, bis es zum Schmelzpunkt gebracht wird. Durch das ständige Nachschieben von Filament wird das verflüssigte Material durch die Düse des Extruders gedrückt und auf dem Druckbett aufgebracht. Standardisiert ist der Durchlassdurchmesser der Düse 0,4 Millimeter, jedoch können auch akkurate Düsen montiert werden.⁵⁵ Bei manchen Druckermodellen ist das Druckbett ebenfalls beheizt, um eine gute Haftung des Modells zu garantieren. Da der Extruder sich entlang einer x-Achse und einer y-Achse frei bewegen kann, und das Druckbett entlang der z-Achse verschiebbar ist, kann bis zur Maximalhöhe jeder Punkt über der Fläche des Druckbetts erreicht werden. So baut der Drucker gesteuert vom gcode das programmierte Objekt schichtweise von unten nach oben auf.



Abb. 4: Teil des ersten Modells während dem Druck

Das fertige Objekt muss schließlich von der Druckplatte abgelöst werden. Dazu ist es ratsam, zu warten, bis diese ausköhlt, da sich das Endprodukt dann oft von selbst ablöst. Eingebaute Abstützungen müssen händisch entfernt werden.

⁵⁴ vgl. Dilling / Marx u.a., 2021, S. 9.

⁵⁵ vgl. ebd., S. 9.

5.5 Entwicklung der Modelle

Die Entwürfe beider Modelle sind mit der CAD-Software „TinkerCAD“ geplant, mittels des Slicer-Programms „Ultimaker Cura“ finalisiert und mit einem Drucker des Typs „Creality CR-6 SE“ gedruckt worden. Als Material ist aufgrund dessen unkomplizierter Verwendung PLA-Filament benutzt worden.

5.5.1 Entwicklung des ersten Modells

Bei diesem Modell handelt es sich um den beschriebenen Entwurf zur Veranschaulichung der Methylierung eines CpG-Dinukleotids durch eine DNA-Methyltransferase.



Abb. 5: Einzelteile des ersten Modells

Anfangs ist geplant worden, dass die einzelnen Teile des Modells einen DNA-Abschnitt, eine DNA-Methyltransferase, den Cofaktor SAM und eine Methylgruppe darstellen sollen. Es ist entschieden worden, dass bezüglich der DNA das Detail der Form einer Doppelhelix beibehalten wird. Da es dieser komplexen Form nicht möglich gewesen ist, frei zu stehen, ist sie mit einer Grundplatte versehen worden. Aufgrund der dadurch entstehenden Fläche hat sich das Einfügen eines Schriftzuges angeboten, der das Modell mit „DNA Methylierung“ beschriftet.

Um ein gutes Verhältnis der Breite des DNA-Modells zur Höhe zu erreichen, hat die Helix des DNA-Abschnitts nur eine Windung mit zehn Basenpaaren. Zwei dieser Basenpaare sollen ein CpG-Dinukleotid darstellen. Es ist beschlossen worden, die unterschiedlichen Basen nachträglich durch verschiedene Farben zu kennzeichnen. Das Phosphat-Desoxyribose-Rückgrat der DNA besteht aus verschiedenen Abschnitten, die jeweils ein Phosphat oder eine Desoxyribose andeuten. Um die Desoxyribose darzustellen, ist die Form einer Kugel gewählt worden, für das Phosphat die einer Kugel mit geringerem Durchmesser.

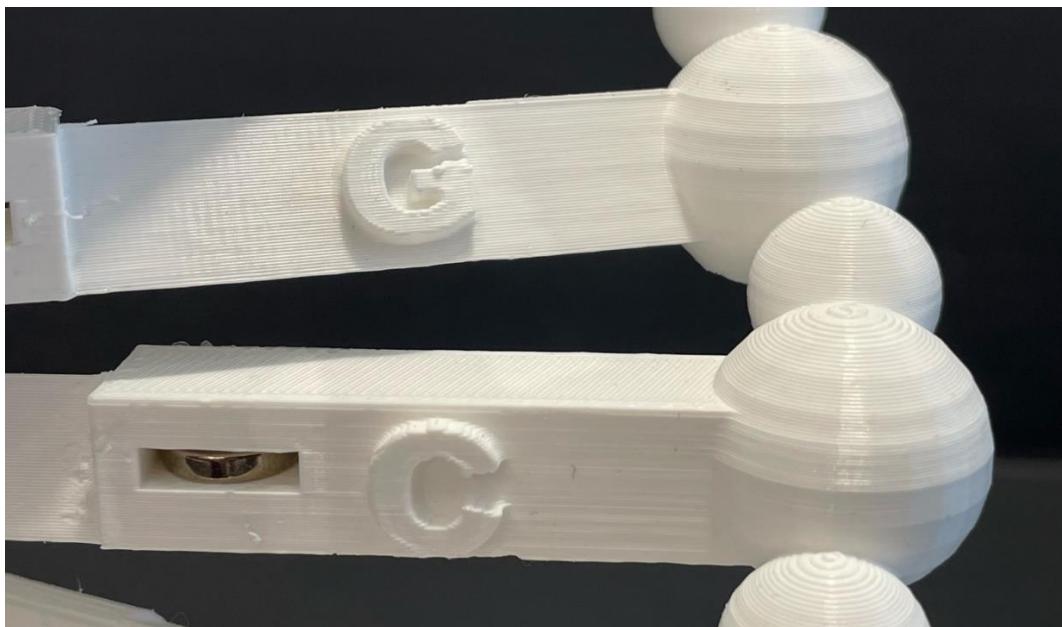


Abb. 6: CpG-Dinukleotid im Modell

Nach einigen Testdrucken kleinerer Objekte ist gegen ein Färben des Modells entschieden worden, da es einerseits viel Feinarbeit benötigt und andererseits unklar gewesen ist, wie lange sich Farbe auf dem Modell halten würde. Somit ist das Kennzeichnen der Basen durch charakteristische Formen notwendig geworden. Den Basen sind Prismen mit unterschiedlichen Grundflächen zugeordnet worden. Adenin hat eine sechseckige Grundfläche erhalten, Cytosin eine quadratische, Guanin eine dreieckige und Thymin eine kreisförmige. Zusätzlich ist jede Base mit ihrem Anfangsbuchstaben versehen worden.

Durch diese sehr spezifische Formgebung ist es ebenfalls möglich geworden, der DNA-Methyltransferase eine eindeutig zu den Basen des CpG-Dinukleotids komplementäre Passform zu geben. Weiters verfügt die DNA-Methyltransferase über eine Passform für den Cofaktor SAM, für den die Form einer gestreckten Kugel gewählt worden ist. Beide Negative sind durch das virtuelle Schneiden der DNA-Methyltransferase mit den anderen Teilen entstanden.

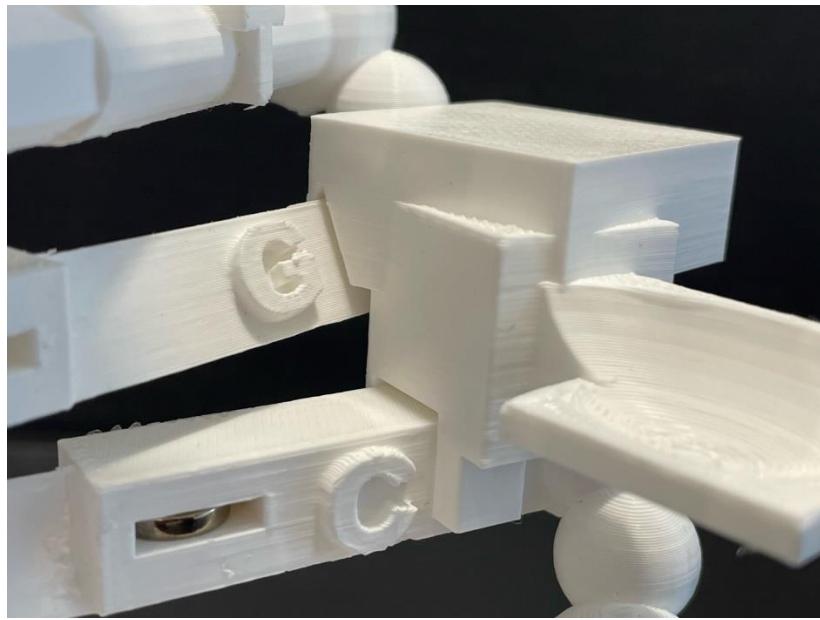


Abb. 7: DNA-Methyltransferase am CpG-Dinukleotid

Schließlich ist überlegt worden, wie es möglich ist, die Methylgruppe, die durch eine kleine Kugel repräsentiert worden ist, von dem Substrat abzunehmen und an der DNA zu befestigen. Es ist entschieden worden, Magnete in die Methylgruppe, das Substrat und in die Cytosin-Base des CpG-Dinukleotids einzubauen. Zudem unterscheidet sich die magnetische Befestigung der Methylgruppe von der Befestigung durch eine Passform des Enzyms. Dies macht das Modell detailgetreuer, da es sich im echten Vorgang ebenfalls um unterschiedliche Anbindungen handelt.



Abb. 8: Magnete im Substrat, im Wasserstoff und der Methylgruppe

Abschließend ist ein Wasserstoff ergänzt worden, der ebenfalls durch eine Kugel dargestellt wird. Um Verwechslungen zu vermeiden, sind der Form der Methylgruppe drei halbkugelförmige Fortsätze angefügt worden, die die Wasserstoffatome der Methylgruppe andeuten sollen.

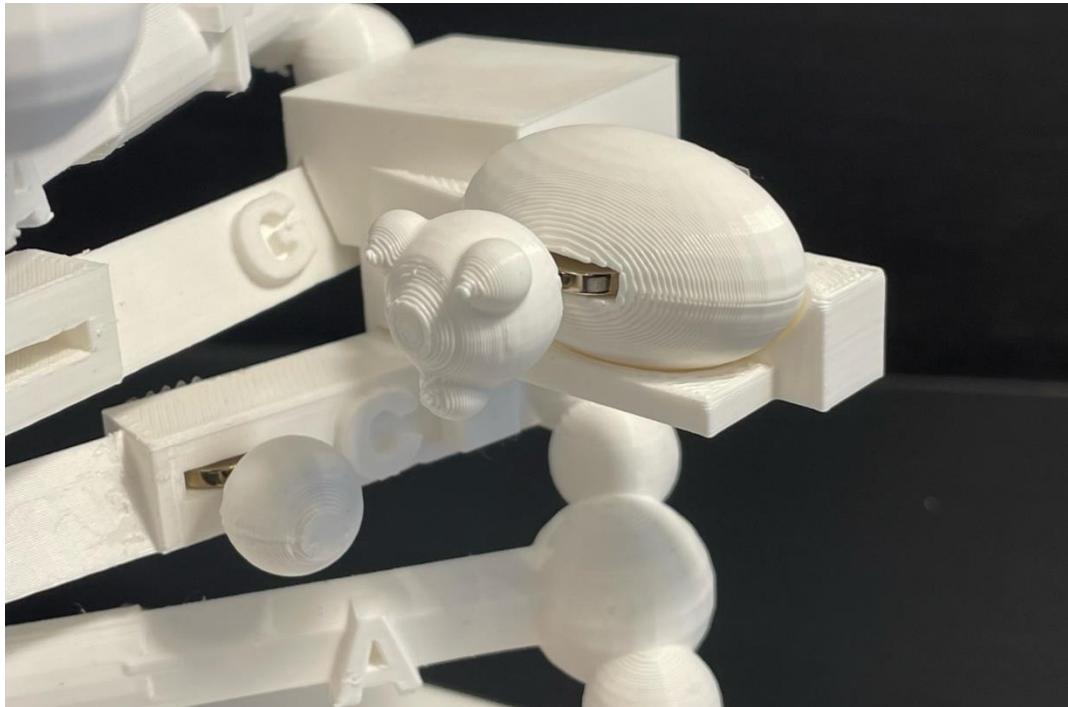


Abb. 9: Die Teile des Modells in Position

5.5.2 Entwicklung des zweiten Modells

Dieses Modell zeigt die Interaktion von Clal mit einem methylierten DNA-Abschnitt.

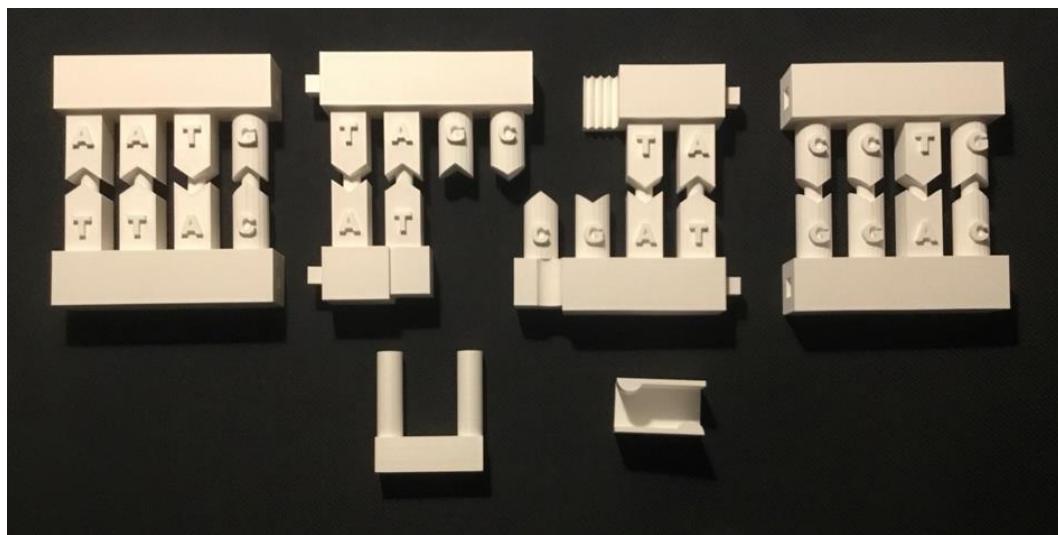


Abb. 10: Einzelteile des zweiten Modells

Auch bei diesem Modell ist ein notwendiger Teil ein DNA-Abschnitt, der sich allerdings in zwei Teile spalten lassen kann. Weitere Teile stellen eine DNA-Methylierung und das Schneideenzym Clal dar. Diese drei Bauteile müssen einen Mechanismus enthalten, der dem Schneideenzym erlaubt, die unmethylierte DNA zu teilen, die methylierte jedoch nicht.

Für die Umsetzung dieses Mechanismus ist die Form einer Doppelhelix recht unpraktisch, weshalb die Phosphat-Desoxyribose-Rückgrate parallel zueinander geplant worden sind. Zwischen diesen verlaufen sechs Basenpaare, deren Basen mit ihren Anfangsbuchstaben beschriftet sind und die Erkennungssequenz von Clal enthalten.



Abb. 11: Erkennungssequenz von Clal im Modell

Der DNA-Abschnitt lässt sich so teilen, dass dessen „klebrige“ Enden sichtbar sind. Die beiden Hälften sind an einem Rückgrat durch verkeilte Zacken verbunden, am anderen werden sie von einem Magneten zusammengehalten.



Abb. 12: Verbindung des Zucker-Phosphat-Rückgrats durch Zacken

Zwei halbkreisförmige Einkerbungen sind einem Rückgrat hinzugefügt worden.

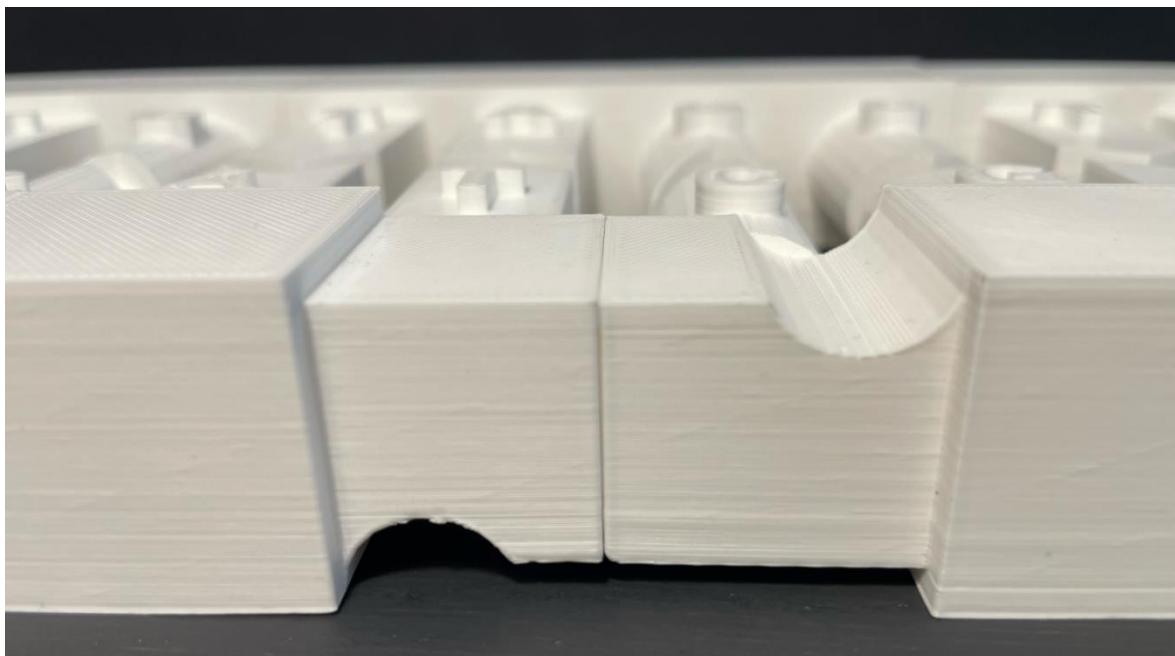


Abb. 13: Einkerbungen als Andockstelle des Clai

Hier rastet die Form des Clal beim Abtasten des Stranges ein und kann die beiden Hälften auseinanderhebeln.



Abb. 14: Clal schneidet an der Andockstelle die DNA

Ebenfalls kann an diesen die Methylierung befestigt werden, deren Form die Einkerbungen so abdeckt, dass das Schneideenzym nicht mehr einrasten kann. Somit kann auch der DNA-Abschnitt nicht geteilt werden.



Abb. 15: Die DNA-Methylierung als Bauteil



Abb. 16: Die DNA-Methylierung verdeckt die Andockstelle des Clal

Da sonst das gesamte Modell der DNA nur aus der Erkennungssequenz bestehen würde, sind an beiden Enden zwei weitere Abschnitte mit je vier zufällig gewählten komplementären Basenpaaren angefügt worden. Diese besitzen keinen Teilungsmechanismus.

5.6 Probleme, Grenzen der Detailtreue und Verbesserungsansätze der Modelle

5.6.1 Modell 1

Da die sich windende Doppelhelix viele überhängende Bereiche besitzt, werden für den Druck auch viele zusätzliche Abstützungen unerlässlich. Diese werden so großflächig benötigt, dass fast die gesamte Doppelhelix in einen Zylinder aus Stützmaterial eingeschlossen ist. Das Entfernen dieser, ohne das eigentliche Modell zu beschädigen, ist sehr schwierig und zeitaufwändig. Rückblickend hätte die Menge an Stützmaterial durch ein Kippen des Modells im Slicer und das Drucken in der Seitenlage verringert werden können.

Der DNA-Abschnitt selbst ist sehr detailgetreu gestaltet. Vom realen Vorbild weicht jedoch die Zahl der Basenpaare pro Windung ab, die für die Zwecke des Modells frei gewählt worden ist. Zudem laufen die Basen der Basenpaare direkt ineinander über und sind nicht bloß durch symbolisierte Wasserstoffbrücken verbunden.

Bei den anderen Bauteilen steht ihre Funktion im vollständigen Modell im Vordergrund, die eine gewisse Form vorgibt. Auch die Größenverhältnisse der Teile in Relation zum DNA-Strang sind unrealistisch. So wäre zum Beispiel die DNA-Methyltransferase in der Realität um ein Vielfaches größer und komplexer.

5.6.2 Modell 2

Wie bereits erwähnt, besitzt der DNA-Abschnitt dieses Modells aus praktischen Gründen nicht die Form einer Doppelhelix. Weiters sind die Details der Phosphate und Desoxyribosen ausgespart worden.

Auch hier ist die Form der anderen Elemente maßgeblich von deren Funktion im Teilungsmechanismus beeinflusst worden.

6 Zusammenfassung

Sowohl genetische als auch epigenetische Faktoren beeinflussen die Genexpression. Das Genom speichert in einer Bibliothek aus Genen sämtliche Baupläne für alle körpereigenen Proteine eines Organismus. Jedoch kann es nicht aktiv verändert werden, weshalb es nicht dazu fähig ist, auf Umwelteinflüsse zu reagieren, und enthält keinerlei Informationen darüber, wann welches Gen ausgedrückt werden soll. Diese genregulatorischen Aspekte werden durch epigenetische Mechanismen geregelt. Epigenetische Markierungen zeichnen sich dadurch aus, dass sie reversibel sind und mit der Umwelt interagieren können.

In der Epigenetik kommt der Methylierung von DNA eine tragende Rolle zu. Durch das Modifizieren bestimmter Basen in Genabschnitten können ganze Gene stillgelegt oder in anderen Versionen ausgedrückt werden. Weitere Aufgabengebiete sind Gegenstand aktueller Forschungen. Durch die Fähigkeit der Methylierung von DNA, Gene abzuschalten, ist diese Modifikation bei der Zelldifferenzierung von großer Bedeutung. Sie wird von Schreiberenzymen gesetzt, von Leseenzymen interpretiert und kann durch epigenetische Radierer wieder aus dem Erbgut entfernt werden.

Epigenetische Vorgänge sind für Schülerinnen und Schüler oft aufgrund komplexer enzymatischer Vorgänge schwer nachvollziehbar. Die primären Hindernisse stellen dabei Probleme bei der Visualisierung der Abläufe dar. Aus diesem Grund ist im Zuge dieser Arbeit versucht worden, Modelle für den Unterrichtsgebrauch anzufertigen, die als Verständnishilfe dienen sollen. Um das Arbeiten mit komplexen Formen zu ermöglichen, ist der 3D-Druck als Fertigungsmethode verwendet worden.

Das Wissen um epigenetische Vorgänge, wie die Methylierung von DNA, ist für die gesamte Bevölkerung relevant. Das Epigenom verändert sich durch Wechselwirkungen mit der Umwelt ständig und wirkt sich auf die Expression der Erbinformationen jedes einzelnen aus. Demnach sind die im Genom enthaltenen Informationen nichts Starres, sondern etwas, auf das jeder aktiv durch die eigene Lebensweise Einfluss nehmen kann.

Literaturverzeichnis

Beiträge in Fachzeitschriften, Zeitungen:

Binder, Elisabeth B.: Umwelt und Epigenetik. In: Der Nervenarzt. 14.1.2019, S. 107-113.

Krall, Lisa: Natur-Kultur-Verschränkungen und die Materie der Epigenetik. In: Open Gender Journal. 11.4.2018, S. 1-21.

Wiechers, Lisa / Samanta, Ananya u.a.: Das Überlesen von Nonsense-Mutationen. Ein pharmakogenetischer Ansatz zur Therapie von Netzhauterkrankungen. In: medgen. 30.6.2017, S. 217-224.

Zeschnigk, Michael / Horsthemke, Bernhard: Next-Generation-Sequencing in der Epigenetik. In: medgen. 8.7.2019, S. 205-211.

Bücher:

Blumenthal, Robert M / Cheng, Xiaodong: S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferases: Structures and Functions. Singapur: World Scientific, 1999.

Bresch, Carsten: Klassische und molekulare Genetik. Ein Lehrbuch. Berlin: Springer-Verlag, 1964.

Dilling, Frederik / Marx, Birgitta u.a.: Praxishandbuch 3D-Druck im Mathematikunterricht. Einführung und Unterrichtsentwürfe für die Sekundarstufen I und II. Münster: Waxmann Verlag, 2021.

Fletcher, Hugh / Hickey, Ivor u.a.: Genetik. für Biologen, Biochemiker, Pharmazeuten und Mediziner. Weinheim: Wiley-VCH, 2013.

Hümpel, Anja / Walter, Jörn: Epigenetik. Implikationen für Lebens- und Geisteswissenschaften. Baden-Baden: Nomos Verlagsgesellschaft, 2017.

Jeltsch, Albert / Jurkowska, Renata Z.: DNA Methyltransferases – Role and Function. Cham: Springer Nature, 2016.

Komorowsky, Robert: Generative Fertigungsverfahren. Untersuchung zur Auswahl eines 3D-Druck-Systems für die Herstellung kunststoffbasierter Prototypen. Hamburg: Diplomica Verlag, 2014.

Könneker, Carsten / Reichert, Uwe u.a.: EPIGENETIK. Prägende Eindrücke im Erbgut.

Heidelberg: Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, 2018.

Kornberg, Arthur / Baker, Tania A.: DNA Replication. 2. Aufl. Sausalito: University Science Books, 2005.

Maclean, Norman: Zell-Differenzierung. Genetik- Grundlagen und Perspektiven. Darmstadt: Dr. Dietrich Steinkopf Verlag, 1980.

Puvanakrishnan, R. / Sivasubramanian S. u.a.: MICROBES AND ENZYMES. Basics and Applied. Chennai: MJP Publishers, 2019.

Wolffe, Alan P.: chromatin. structure & function. 2. Aufl. London: Academic Press, 2000.

Internet:

Mayer, H. / Grosschedl, R. u.a.: Nucleic Acids Research. Clal, a new restriction endonuclease from Caryophanon latum L. 27.7.1981. Online unter:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC327483/pdf/nar00412-0040.pdf>
[Zugriff: 27.8.2021].

National Human Genome Research Institute: Messenger RNA (mRNA). Online unter:
<https://www.genome.gov/genetics-glossary/messenger-rna> [Zugriff: 28.12.2021].

New England Biolabs: Dam-Dcm and CpG Methylation. Online unter:
<https://international.neb.com/tools-and-resources/selection-charts/dam-dcm-and-cpg-methylation> [27.8.2021].

Turek-Plewa / Jagodziński, Paweł P., Justyna: The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. Poznań, 2005. Online unter:
www.cmbl.org.pl/vol10_nr4.php [Zugriff: 20.8.2021].

Zhao, Zhixun / Zhang, Xiaocai u.a.: Accurate prediction of N⁴-methylcytosine sites via boost-learning various types of sequence features. 11.9.2020. Online unter:
<https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-020-07033-8>
[Zugriff: 23.8.2021].

Abbildungsverzeichnis

Titelbild: Erstes Modell

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 13.2.2022.

Abb. 1: Austausch der Methylgruppe zwischen Cytosin und SAM16

Erstellt von: Lorenz Kovsca. vgl. Turek-Plewa, Justyna / Jagodziński, Paweł P.: The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. Poznań, 2005. Online unter: www.cmbl.org.pl/vol10_nr4.php [Zugriff: 20.8.2021].

Abb. 2: Erkennungssequenz mit „klebrigen“ Enden geschnitten21

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 26.1.2022.

Abb. 3: Bauteil des ersten Modells in der Slicer-Vorschau29

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 26.1.2022.

Abb. 4: Teil des ersten Modells während dem Druck30

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 1.9.2021.

Abb. 5: Einzelteile des ersten Modells31

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 26.1.2022.

Abb. 6: CpG-Dinukleotid im Modell32

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 11.2.2022.

Abb. 7: DNA-Methyltransferase am CpG-Dinukleotid33

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 11.2.2022.

Abb. 8: Magnete im Substrat, im Wasserstoff und der Methylgruppe33

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 11.2.2022.

Abb. 9: Die Teile des Modells in Position34

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 11.2.2022.

Abb. 10: Einzelteile des zweiten Modells35

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 11.2.2022.

Abb. 11: Erkennungssequenz von Clal im Modell35

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 11.2.2022.

Abb. 12: Verbindung des Zucker-Phosphat-Rückgrats durch Zacken36

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 11.2.2022.

Abb. 13: Einkerbungen als Andockstelle des Clal36

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 11.2.2022.

Abb. 14: Clal schneidet an der Andockstelle die DNA.....37

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 11.2.2022.

Abb. 15: Die DNA-Methylierung als Bauteil.....37

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 11.2.2022.

Abb. 16: Die DNA-Methylierung verdeckt die Andockstelle des Clal.....38

Erstellt von: Lorenz Kovsca. Mödling 2340, am 11.2.2022.

EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Ich erkläre mit meiner Unterschrift, dass ich diese Vorwissenschaftliche Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen benutzt habe. Alle Stellen dieser Arbeit, die dem Wortlaut, dem Sinn oder der Argumentation nach anderen Werken entnommen sind (einschließlich des World Wide Web und anderer elektronischer Text- und Datensammlungen), habe ich unter Angabe der Quellen vollständig kenntlich gemacht.

Lorenz Fousca

Unterschrift der Kandidatin / des Kandidaten

Mödling, 13.2.2022

Ort, Datum