

## Versuch Fluoreszente Proteine

1. Methodischer Hintergrund des Versuchs
  - 1.1 Fluoreszente Proteine – Einsatzbereiche
  - 1.2 Fluoreszente Proteine als Reporter für Promotoraktivität
  - 1.3 Fluoreszente Proteine als Reporter für innerzelluläre Lokalisierung
2. Wissenschaftlicher Hintergrund des Versuchs
  - 2.1 Ein pflanzlicher Minimalorganismus – Musterbildung und Zellpolarität
  - 2.2 Zellpolarität und Kernpositionierung
3. Organisation des Versuchs
4. Arbeitsanweisungen und Protokolle

### 1. Methodischer Hintergrund des Versuchs

#### 1.1. Fluoreszente Proteine - Einsatzbereiche

Nachdem inzwischen die Genome wichtiger Modellorganismen (Maus, Hefe, *Drosophila*, *Caenorhabditis*, *Arabidopsis*, Reis...) durchsequenziert wurden, geht es im inzwischen angebrochenen „postgenomischen Zeitalter“ darum, die Funktion all dieser unzähligen Gene zu verstehen. Hierbei sind zwei Fragestellungen wichtig:

1. Wo wird ein bestimmtes Gen exprimiert (also in welchen Zellen?)
2. Wo ist ein bestimmtes Protein in der Zelle lokalisiert?

Fluoreszente Proteine sind für beide Fragestellungen sehr wichtige Werkzeuge und es sollen in dem Versuch exemplarisch beide Ansätze vorgestellt werden.

Vor allem in Verbindung mit dreidimensionalen Mikroskopietechniken (konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie, Apotom) können auch dicke Präparate (beispielsweise intakte Organe) beobachtet werden.

Bevor man die fluoreszenten Proteine beobachten kann, müssen die entsprechenden Konstrukte erst in die Zelle eingeführt werden. Dies kann entweder stabil erfolgen oder aber nur vorübergehend (*transient*) Für die stabile Transformation wird bei Pflanzen häufig *Agrobacterium* als Vehikel verwendet. Alternativ kann die DNS über Partikelbombardement eingebracht werden (sogenannte Biolistik).

## 1.2. Fluoreszente Proteine als Reporter für Promotoraktivität

Hierfür muss man stabil transformierte Zell-Linien einsetzen. Die Herstellung solcher Linien ist sehr zeitaufwendig. Dabei wird der Promotor, dessen Aktivität man verfolgen möchte, vor GFP kloniert und dieses Konstrukt dann stabil in den Zielorganismus eintransformieren. Immer dann, wenn der Promotor angeschaltet

wird, entsteht also GFP. Die Stärke der GFP-Fluoreszenz zeigt also die Aktivität des Promotors an.



**Abb. 1:** Zweizellige Fäden der transgenen Tabakzell-Linie BY-2 DR5::GFP. Die Intensität des GFP-Signal korreliert mit der lokalen Menge an Auxin. Es scheint also einen Gradienten in der Menge von Auxin zu geben mit einem Maximum in der basalen Zelle (Bild Bea Zaban, Laura Köhler, Viktoria Tröster – F2 Modul Plant Cell Biology SS 2008)

In unserem Versuch nutzen wir den auxininduzierten Promotor DR5, der abhängig vom Pflanzenhormon Auxin aktiviert wird. Mit dem DR5::GFP Konstrukt kann man also sichtbar machen, wie viel Auxin in einer Zelle vorliegt. Offengestanden stimmt das nicht ganz – wenn nämlich die Signalproteine, die nötig sind, um das Auxinsignal zu verarbeiten und in Promotoraktivierung zu übersetzen, fehlen wird selbst in Gegenwart von Auxin kein GFP erzeugt. Dieser Ansatz beruht also auf der (zumeist nicht ausgesprochenen) Voraussetzung, dass die Menge dieser Signalproteine nicht limitierend ist.

## 1.3. Fluoreszente Proteine als Reporter für innerzelluläre Lokalisierung

Hierbei wird für das Protein, dessen Lokalisierung man untersuchen möchte ein cDNS-Fusionskonstrukt mit GFP erzeugt und hinter einen starken, immer aktiven Promotor kloniert. Bei Pflanzenzellen wird in der Regel der 35S-Promotor des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV-35S) benutzt. Natürlich kann man auch hier wieder stabil transformierte Zellen herstellen. Für viele Fragestellung genügt es jedoch, wenn die eintransformierte DNS nur für eine gewisse Zeit aktiv ist. Man kann daher auch mit *transienter* Transformation arbeiten).

Hierfür gibt es im Wesentlichen zwei Techniken – entweder werden Agrobacterien, die mit dem entsprechenden Konstrukt transformiert wurden, in Blätter infiltriert oder mithilfe einer sogenannten Partikelkanone eingeschossen (sogenannte Bio-Ballistik oder *Biolistik*). Dabei wird die cDNS elektrostatisch auf schwere Partikel (Gold oder Wolfram) „geklebt“ und mittels Druckluft in die Zielzelle eingeschossen. Als molekularen „Klebstoff“ benutzt man Spermidin (positiv geladen), dass die negativ geladene cDNS auf der Goldoberfläche fixiert. In der Zielzelle verdrängen dann andere Anionen die cDNS vom Spermidin, so dass die cDNS in den Kern gelangen und dort transkribiert werden kann.

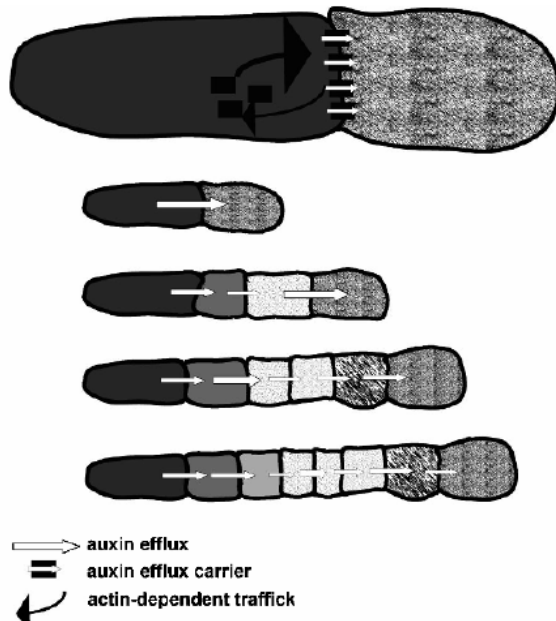
Achtung Mißverständnis: Es wird oft angenommen, dass die Einbringung über Biolistik automatisch nur zu einer vorübergehenden (transienten, von *lat. trans-ire* „vorüber-gehen“) Expression des Transgens führe. Das ist falsch – man kann über Biolistik genauso gut stabil transformieren wie mit *Agrobacterium*, und viele Jahre war Biolistik der einzige Weg, um Getreide wie Reis oder Mais zu transformieren,

weil *Agrobacterium tumefaciens* Einkeimblättrige nicht infiziert (inzwischen gibt es allerdings *Agrobacterium*-Stämme wie LB4404, die auch Reis infizieren und effizient transformieren können). Ob eine Transformation stabil bleibt oder nicht, hat vor allem damit zu tun, ob das Konstrukt auf einem *high-copy vector* (kein pflanzlicher Selektionsmarker, dafür hohes Expressionsniveau) oder auf einem *binary vector* (pflanzlicher Selektionsmarker, dafür niedriges Expressionsniveau) eingebracht wird.

## 2. Wissenschaftlicher Hintergrund des Versuchs

### 2.1. Ein pflanzlicher Minimalorganismus – Muster der Zellteilung

Objekt des Versuches ist die Tabakzell-Linie BY-2. Bei dieser Linie entstehen aus einer Einzelzelle durch gerichtete Zellteilung Zellfäden, die eine Art Minimalorganismus darstellen. Die Einzelzellen eines Fadens teilen sich nicht zufällig, sondern stimmen ihre Zellteilungen aufeinander ab (Synchronisierung), bilden also ein Ganzes, das mehr ist als die Summe seiner Teile. Diese Synchronisierung beruht auf dem gerichteten Transport des Pflanzenhormons Auxin. Die Richtung und Intensität des Auxintransports beruht wiederum auf der Organisation des Actinskeletts. Die Organisation des Actinskeletts wiederum wird durch Auxin gesteuert, so dass hier ein Rückkopplungssystem entsteht.



Man hat es hier also mit sogenannter Musterbildung zu tun. Muster entstehen durch die Ordnung von Teilen (hier also Zellen) innerhalb eines Ganzen (des Zellfadens, also des Organismus). Diese Ordnung beruht auf einer Kommunikation der Zellen untereinander, die „Sprache“ dieser Kommunikation ist der Auxintransport. Dessen Richtung gründet wiederum auf einer ausgerichteten inneren Struktur der Zellen, der sogenannten Zellpolarität.

**Abb. 2:** Integration von Einzelzellen zu einem Minimalorganismus über einen gerichteten Transport von Auxin. Auxin wird durch einen Auxin-Efflux-Carrier aus der Zelle hinausgepumpt. Dieser Carrier wird abhängig von Actin am Zellpol der Zelle lokalisiert.

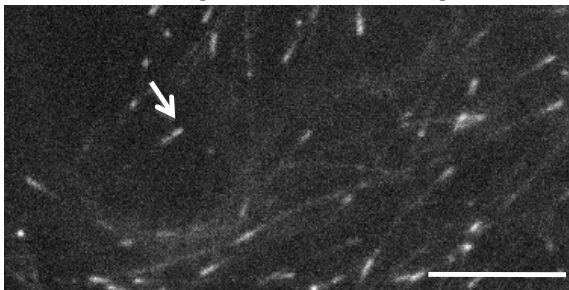
Um diese Synchronisierung verstehen zu können, müsste man eigentlich wissen, wie Auxin in diesem Zellfaden verteilt ist und wie es wandert. Das ist aber nicht so einfach, weil man Auxin nicht auf Einzelzellniveau messen kann. Hier bedient man sich nun der Zell-Linie DR5::GFP. Mit dieser Linie lässt sich also feststellen, ob und wie sich die Auxinverteilung während der Zellteilung verändert, ob Auxin in allen Zellen hergestellt wird oder nur in manchen und in welchem Ausmass es durch den Faden transportiert wird (wie ändert sich zum Beispiel das Muster der GFP-Fluoreszenz, wenn man die Zellkultur mit Hemmstoffen des Auxin-Transports behandelt?).

## 2.2. Zellpolarität und Kernpositionierung

Wie im vorigen Abschnitt ausgeführt, beruht die Musterbildung in unserem Minimalorganismus auf der Polarität der einzelnen Zellen, die dann über gerichteten Transport von Auxin in eine Richtung des gesamten Zellfadens übersetzt wird. Diese Polarisierung wird aber auch bei der Zellteilung sichtbar. Da Pflanzenzellen aufgrund ihrer starren Zellwand nicht zu Bewegungen befähigt sind, ist die Zellteilung einer der wenigen Gelegenheiten, wo eine pflanzliche Zelle ihre Form grundsätzlich verändern kann.

Die Symmetrie der pflanzlichen Zellteilung wird durch die Position des Zellkerns bestimmt. Während der Interphase sitzt dieser zumeist am Rand der Zelle, wandert dann jedoch unmittelbar vor der Mitose an die Position, wo danach dann die Teilungsspindel organisiert und nach der Teilung die neue Querwand eingezogen werden wird. Diese Kernpositionierung wird durch das Cytoskelett in Verbindung mit molekularen Motoren eingestellt. Nicht begriffen ist dabei jedoch, woher der Zellkern „weiss“, an welcher Stelle er mit seiner Wanderung aufhören muss. Die Bewegung molekularer Motoren wird durch die Wachstumsrichtung des Cytoskeletts vorgegeben: Kinesine wandern in der Regel zum wachsenden (Plus-)Ende der Mikrotubuli, Dyneine in Gegenrichtung, Myosine zum Plus-Ende der Actinfilamente. Es steht zu vermuten, dass die Kernpositionierung eng mit der Ausrichtung des Cytoskeletts zusammenhängt. Um die für die Zellpolarität wichtige Kernwanderung verstehen zu können, muss man die Ausrichtung des Cytoskeletts und dessen Veränderungen untersuchen.

Das ist alles andere als einfach, weil man im Mikroskop einem Actinkabel oder einem Mikrotubuli-Bündel nicht ansieht, wie es ausgerichtet wird. Nur wenn es wächst oder schrumpft kann man bei einem Cytoskelett-Element auch mikroskopisch leicht erkennen, wo das Plusende liegt. Die meisten Cytoskelett-Elemente befinden sich jedoch im Fließgleichgewicht, wo fortdauernd am Plusende Bausteine eingefügt werden, während am Minusende andere Bausteine abgegeben werden. Zwar gibt es Verfahren, wo man einzelne Regionen eines Mikrotubulus mit dem Laser ausbleicht und dann beobachtet, wie sich die gebleichte Stelle bewegt oder verändert (sogenanntes *Fluorescence Recovery After Photobleaching*, *FRAP*), aber die sind oft schwer durchführbar oder liefern keine eindeutigen Ergebnisse. Daher wurde nach anderen Wegen gesucht, um die Richtung des Cytoskeletts zu bestimmen. Für Actinfilamente gibt es noch keine gute Lösung, für Mikrotubuli jedoch schon. Man



**Abb. 3:** Markierung der Mikrotubuli-Richtung mit dem Plus-End-Marker EB1 (hier als Fusion mit GFP in transient transformierten Tabakblättern, Bild Maurice Ouko).

konnte nämlich Proteine isolieren, die am Plus-Ende der Mikrotubuli binden und die Stabilität eines Mikrotubulus steuern. Eines dieser Proteine, EB1b, wird in unserem Experiment dazu genutzt, die Plus-Enden der Mikrotubuli.

Im Versuch wird eine von Jan Klotz erzeugte Tabak-BY-2 Linie eingesetzt, die stabil mit einem Fusionskonstrukt aus EB1b und dem Rot Fluoreszierenden Protein (RFP) transformiert wurde. In dieser Zell-Linie kann man zwar nicht die Mikrotubuli als Ganzes sehen, aber ihre Plusenden wandern als sogenannte Kometen durch die Zelle

und zeigen damit die Wachstumsrichtung der jeweiligen Mikrotubuli an. Um den Kern sichtbar zu machen, wird ein Transkriptionsfaktor (*Common Plant Regulatory Factor 2*, CPRF2) eingesetzt, der mit dem blaugrün fluoreszierenden Cyan Fluoreszenten Protein (CFP) fusioniert ist. Dieser wird transient über Biolistik in die EB1b-RFP Zell-Linie eingebracht. In den doppelt transformierten Zellen sollte man dann also gleichzeitig den Zellkern und die Wachstumsrichtung der ihn verankernden Mikrotubuli beobachten können.

### 3. Organisation des Versuchs

Der Versuch besteht aus zwei Teilen, die exemplarisch ein Anwendungsfeld fluoreszenter Proteine behandeln:

Im ersten Teil wird GFP als Reporter für Promotoraktivität (hier als Anzeiger für die zelluläre Auxinkonzentration) eingesetzt, um zu analysieren, wie das Auxinmuster von der Zellteilung und vom Auxintransport abhängt.

Im zweiten Teil wird GFP als Reporter für Proteinlokalisierung eingesetzt, um zu untersuchen, wie sich Kernpositionierung und Mikrotubuli-Wachstum zueinander verhalten.

**Betreuung:** Dr. Jan Maisch

**Zeit 1:** Di, 13.04.2010-Fr, 16.04.2010, Gruppe 7

**Zeit 2:** Di, 26.04.2010-Fr, 29.05.2010, Gruppe 9

**Zeit 3:** Di, 10.05.2010-Fr, 13.05.2010, Gruppe 1

24.05. Pfingstmontag

**Zeit 4:** Di, 25.05.2010-Fr, 28.05.2010, Gruppe 3

**Zeit 5:** Di, 14.06.2010-Fr, 17.06.2010, Gruppe 5

**Ablauf:**

Di, 14:00-18:00 – Vorbesprechung (Gartenlabor), Behandlung der DR5-Promotor::GFP Linie und Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Mi, 14:00-18:00 – Biolistische Transformation mit dem 35S::Protein-GFP Fusionskonstrukt

Do, 14:00-18:00 – Fluoreszenzmikroskopische Auswertung der biolistischen Transformation mit dem 35S::Protein-GFP Fusionskonstrukt

Fr, 14:00-18:00 – Bildanalyse und statistische Behandlung der Ergebnisse für die DR5-Promotor::GFP Linien

## 4. Arbeitsanweisungen und Protokolle

### Murashige-Skoog medium (MS)

<b>Macroelements</b>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65 g/l
	KNO <sub>3</sub>	1.90 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17 g/l
	CaCl <sub>2</sub>	0.32 g/l
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.37 g/l
<b>Microelements</b>	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 mg/l
	KI	0.83 mg/l
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25 mg/l
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025 mg/l
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	24 mg/l
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8.6 mg/l
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025 mg/l
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8 mg/l
Na <sub>2</sub> EDTA	37.2 mg/l	
<b>Hormones</b>	2,4 D	0.2 mg/l (ppm)
<b>Vitamines</b>	Thiamine	1 mg/l
<b>Supplements</b>	Inositol	100 mg/l
	Sucrose	30 g/l of MS
	Water	ad 1 l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mg/l
<b>Solid medium</b>	Phytigel agar	0.6 % w/v
<b>For transgenics</b>	Kanamycin	50 µg/ml
	Cefotaxim	100 µg/ml
	Hygromycin	15 µg/ml
<b>pH</b>	5.8	

Remarks: For macro- and microelements, one can use the MS basal salt mixture (Sigma, M5224 - 4.3 g/l). Stock solution of hormones 5000 x (1 g/l in ethanol). Stock solution of vitamins 1000 x (1 g/l, sterile filtration). Antibiotics as stocks (1000 x) in DMSO, frozen in aliquots (100 mg/ml Kanamycin and 100 mg/ml Cefotaxim).

## Beimpfen der Kulturplatten

### Needed

Pipetboy, sterile 2-ml and 10-ml serological pipettes, exponential BY-2 cells (provided), tweezers, Bunsen-burner, clean bench, sterile red-cap tubes

### Procedure

Everything under tightly sterile conditions on a cleanbench that is only used for plant work!

Clean the bench with 70 % ethanol, as well as your gloves and the pipet.

To open the flask: flame the neck and top of the closed flask, then bend the aluminum out, **flame once more under the aluminum**, then open the lid and flame once more the opening of the flame.

To inoculate, shake the source culture a bit, take out 1 ml of suspension and transfer to the red-cap tube. Add 9 ml of MS-medium, mix gently.

Open the Petrislides, Take care that the air flow cannot carry contaminations into the fresh flask. Add 1ml of the suspension from the red-cap tube (gently top over directly before you take out the cells).

Drain off excess fluid.

## Partikelbombardement

### Needed

Sterile water, sterile glycerol (50 %), sterile calcium stock ( $\text{CaCl}_2$  2.5 M, steril filtration, frozen in 1-ml aliquots), sterile spermidin (0.1 M, steril filtration, frozen in 1-ml aliquots)

Gold particles; 1.5 – 3.0  $\mu\text{m}$ , Sigma-Aldrich (suspension provided):

60 mg in 1 ml 100 % EtOH, vortex, spin down, discard supernatant,  
wash twice with 1 ml sterile water  
resuspend in 1 ml 50 % sterile glycerol  
store suspension at room temperature.

BY-2 cells (one can use different stages, e.g. 3, 5 or 7 days after inoculation)  
Filter holders (13 mm, Plastic Swinney Filter Holder, Nr. 4317, Pall, Gelman Laboratory, German representative Pall Corporation Deutschland, Dreieich, 06103-307333.

### Loading of grids

12.5  $\mu\text{l}$  of freshly vortexed gold suspension  
Add 1  $\mu\text{g}$  of each plasmid – vortex  
Add 12.5  $\mu\text{l}$  of calcium stock – vortex  
Add 5  $\mu\text{l}$  of spermidin – vortex thoroughly 3 min  
Spin down briefly (max. 4000 rpm), discard supernatant  
Add 125  $\mu\text{l}$  of 100 % EtOH – vortex briefly, spin down, discard supernatant  
Add 40  $\mu\text{l}$  of 100 % EtOH, vortex, load onto the grid in 10  $\mu\text{l}$  steps  
Dry grids well (clean bench, 30 min) and use immediately

### Particle bombardment

Pressure 1.5 Bar, vacuum -0.9 Bar  
Open Petriplates and place them in the center.  
Shoot three times, each time slightly shifting the slide.  
Close lid, return cells to cultivation chamber till next day.