

Versuch Quantitative Genetik

Herstellung von *Aspergillus nidulans* Entwicklungsmutanten durch Mutagenese

(Nikola Kellner, Kai Hofmann, David Schuler, Elisabeth Poth, Reinhard Fischer, Natalia Requena, Jörg Kämper)

1. Worum es geht bei diesem Versuch?

Der Ascomycet *Aspergillus nidulans* wurde in den 40er Jahren durch G. Pontecorvo in Glasgow als Modellorganismus für die biologische Grundlagenforschung etabliert. Der Pilz ist auf künstlichen Nährmedien im Labor leicht kultivierbar und wächst, ausgehend von einer Spore (Konidie), innerhalb von 48 Stunden zu einer centgroßen Kolonie heran. Während dieser Zeit ist auch schon die Bildung von Tausenden neuer, grüner Konidien erfolgt, welche die gesamte Kolonie grün färben. Die gebildeten Konidiosporen können leicht mit Wasser von der Agarplatte ab gespült und als Inokulum für Flüssigkulturen verwendet werden. Die Konidien sind einzellig, einkernig und haploid. Sie sind hervorragend für Mutageneseexperimente geeignet, da Effekte einer Mutation oft direkt bei den aus den Konidien auswachsenden Kolonien sichtbar sind.



Abb.1. Entwicklungsmutanten von *A. nidulans*.

2. Wie ist der Versuch aufgebaut?

UV-Licht schädigt die DNA und kann so Mutationen erzeugen. Zur Erzeugung von Mutanten werden Konidien mit UV-Licht bestrahlt; anschließend können die auswachsenden Kolonien untersucht werden. Veränderungen in der Konidienfarbe oder der Konidienträger-Morphologie lassen sich leicht makros- oder mikroskopisch erkennen (Abb. 1).

1. Tag: Als Ausgangspunkt wird eine Sporensuspension von einem Wildtypstamm verwendet. Am ersten Versuchstag wird die Gesamtzellzahl (GZZ) mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt und verschiedene Verdünnungen zur Bestimmung der Lebendzellzahl ausplattiert.

2. Tag: Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ). Berechnung der Lebendzellzahl in %. Die Sporensuspension wird auf 300 lebensfähige Sporen / 100 μ l verdünnt und ausplattiert (6 Agarplatten). Die Platten werden mit unterschiedlichen UV-Intensitäten bestrahlt und zwei Tage inkubiert. Doppelbestimmung durch eine zweite Reihe von 6 Platten.

3. Tag: Auszählen der überlebenden Kolonien und Zeichnen einer Absterbekurve (Balkendiagramm). Mutagenese im grossen Stil mit einer UV Intensität, die einer Überlebensrate von etwa 20% entspricht. Für das Ausplattieren in mehreren großen Petrischalen werden je 1 ml Sporensuspension benötigt. Die Sporenkonzentration soll hierbei so gewählt werden, dass nach Bestrahlung (20% Überlebensrate) noch ca. 1000 Kolonien auf einer großen Platte wachsen.

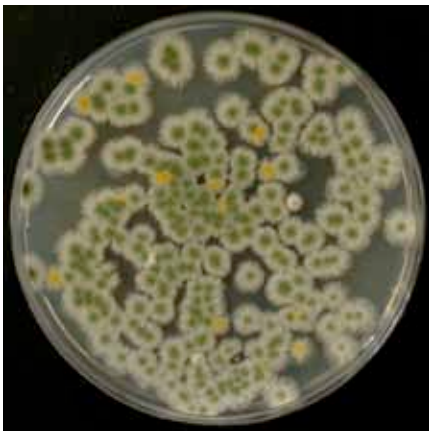


Abb. 2. Mutagenese im großen Stil. Der grüne Stamm wurde mutagenisiert und einige Pigmentmutanten (gelb) bzw. Entwicklungsmutanten (braun oder kompaktes Wachstum) wurden erhalten.

Arbeitsanweisungen und Protokolle

Kultivierung der Pilzstämmen, Herstellung der Agarplatten

Benötigtes Material

- *Aspergillus nidulans* Wildtyp FGSC26 (grüne Sporen)
- 10 Agarplatten (ø 90 mm) mit Minimalmedium (MM, siehe Quantitative Genetik II) plus Biotin (1 ml/L Vitaminstocklösung)
- Sterile Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) für die Sporensuspension und zusätzliche Verdünnungen.
- Zählkammer
- UV- crosslinker (Stratalinker)
- Sonstiges: Pipetboy, Glaspipetten, Bunsenbrenner, Mikroskop

Vorgehen

Bestimmung der Lebendzellzahl (LZZ)

In eine Petrischale dem mit *A. nidulans* Wildtypstamm (2-3 Tage inkubiert) werden 10 ml 0.9% NaCl Lösung gegeben und die Sporen werden vorsichtig mit einer Pipettierhilfe resuspendiert. Die Sporensuspension wird in ein 12 ml Röhrchen übertragen, und man lässt die grobe Reste (Konidiophoren, Agar, etc.) absinken. Die Suspension wird dann in frische Röhrchen übertragen. Die Sporenkonzentration wird mit Hilfe der Zählkammer bestimmt und eine Verdünnungsreihe in 0,9% NaCl angesetzt. Je 100 µl von der Verdünnung mit etwa 300 Sporen/100 µl, sowie einer Verdünnungsstufe darüber und darunter, werden auf Agarplatten (MM plus Biotin) aufgetragen und zwei Tage bei 37°C inkubiert. Die Kolonien werden zur Bestimmung der Lebendzellzahl gezählt.

Diese ursprüngliche Sporensuspension, mit nun bekannter LZZ, wird im Kühlschrank steril aufbewahrt und für die weiteren Experimente verwendet!

Bestimmung der Überlebensrate

Für die Absterbekurve werden 100 µl mit ca. 300 keimfähigen Sporen auf insgesamt 12 Platten mit MM plus Biotin ausplattiert und im Stratalinker mit steigenden UV-Dosen bestrahlt (es können mehrere Platten gleichzeitig bestrahlt werden): je zwei Platten mit: 5 mJ, 10 mJ, 15 mJ 20 mJ, 25 mJ. Zwei Platten bleiben unbestrahlt und dienen als Kontrolle.

Nach zwei Tagen Inkubation bei 37°C werden die Kolonien ausgezählt und die Überlebensrate berechnet. Tragen Sie dazu die UV-Dosis gegen % Überlebensrate in einem Balkendiagramm auf.

Mutagenese im großen Stil

Auf fünf großen Petrischalen (je Student) werden 1 ml einer geeigneten Verdünnung der Sporensuspension, die aus der ursprünglichen Sporensuspension (im Kühlschrank aufbewahrt!) hergestellt wurde, ausplattiert. Verdünnen Sie die Sporensuspension, so dass unter Berücksichtigung der Lebendzellzahl nach der Bestrahlung (20% Überlebensrate) insgesamt ca. 1000 Kolonien wachsen. Nach Inkubation der Platten für 2 Tage bei 37°C werden Kolonien mit veränderter Morphologie oder Farbe ausgezählt. Braune Kolonien werden mikroskopiert, um die Morphologie der Konidiophore zu beschreiben.

Versuch Quantitative Genetik (II)

Kreuzung von zwei *Aspergillus nidulans* Stämmen

1. Worum geht es bei diesem Versuch?

In diesem Versuch soll anhand eines Kreuzungsexperiments die Verteilung genetischer Anlagen sowie deren Neu- und Rekombination durch sexuelle Fortpflanzung quantitativ untersucht werden. Als Modellorganismus wird der filamentöse Schlauchpilz *Aspergillus nidulans* verwendet. Dieser ist im Boden ubiquitär verbreitet, kann aber auch im Labor sehr leicht kultiviert werden. *A. nidulans* eignet sich sehr gut für genetische Untersuchungen, weil er sich sowohl asexuell durch Konidiosporen als auch sexuell durch Ascosporen vermehren kann. Der sexuellen Sporenbildung kann eine Paarung unterschiedlicher Stämme mit leicht unterscheidbaren Merkmalen vorausgehen, welche dann in der Kreuzung neu verteilt werden. In diesem Versuch werden zum Beispiel Mutanten verwendet, die Defekte in der Biosynthese des Sporen-Pigments aufweisen (Abb. 1). Da es sich bei *A. nidulans* um einen haploiden Organismus handelt, treten die unterschiedlichen Phänotypen direkt wieder bei den Nachkommen der Kreuzung auf und können so leicht quantitativ erfasst werden. Neben Mutationen in Genen der Pigmentbiosynthese gibt es eine Reihe von *A. nidulans* Mutanten, bei denen bestimmte Enzyme von Stoffwechselwegen defekt sind (Auxotrophiemarker). Diese Merkmale können durch Kultivierung der Stämme auf entsprechenden Selektivmedien festgestellt werden.



Abb. 1: Die *A. nidulans*-Stämme SMI45 und SSNI6 auf einer Agarplatte. Die Farbe des grünen Stammes entspricht dem Wildtyp-Phänotyp. Der weiße Stamm hat einen Defekt in der Pigmentbiosynthese der Konidiosporen.

2. Wie ist der Versuch aufgebaut?

Ausgangspunkt sind die *A. nidulans* Stämme SMI45 und SSNI6, die jeweils einen Defekt in der Biosynthese von Pyridoxalphosphat (*pyro*⁻) oder von Folsäure (*paba*⁻) aufweisen.

Zusätzlich zu diesen Auxotrophiemarkern zeichnen sich die beiden Stämme durch unterschiedliche Sporenfarben aus:

- SSNI6-Genotyp: *pyroA4*
Phänotyp: grün, kann nicht auf Selektionsmedien ohne Pyridoxalphosphat (kurz: *pyro*) wachsen.
- SMI45-Genotyp: *pabaA1*, *yA2* (*yellow*), *wA3* (*white*)
Phänotyp: weiß, kann nicht auf Medien ohne *p*-Aminobenzoesäure (kurz: *paba*) wachsen.

Zur Einleitung einer erfolgreichen Kreuzung müssen zunächst die Hyphenzellen der beiden Stämme miteinander fusionieren. Dazu werden die Stämme SSNI6 und SMI45 alternierend auf einer Agarplatte mit Nährmedium angeimpft, auf dem beide wachsen können (also mit Pyridoxalphosphat und *p*-Aminobenzoesäure). Berührt sich nach etwa 2 Tagen Inkubation das junge Hyphenmyzel, kann sich ein Heterokaryon bilden. Hierbei gelangt der haploide Zellkern eines Partners in die Hyphe des anderen Partners, ohne dass die beiden unterschiedlichen Zellkerne miteinander verschmelzen. Aus dem Kontaktbereich werden dann Agarblöckchen ausgeschnitten und auf Medium übertragen, auf dem keiner der beiden Partner aufgrund seiner Auxotrophie alleine wachsen kann. Die heterokaryotischen Hyphen wachsen zu einem Myzel aus und bilden auch asexuelle Sporen. Wenn zwei Stämme mit unterschiedlichen Sporenfarbe das Heterokaryon bilden, können auch die Konidiophoren verschiedene Farben aufweisen. Man beobachtet sowohl Konidiophoren mit der jeweiligen Sporenfarbe der Eltern als auch gemischtfarbige. Da die Konidiosporen jeweils einkernig sind, können sie nur die Farbe von einem Elternteil annehmen. Wenn in einem Konidiophor Kerne beider Elternstämme zur Sporenbildung führen werden verschiedenfarbige Sporenketten gebildet.

Zusätzlich kommt es in einigen Hyphen zu einer Verschmelzung der beiden Kerne (Karyogamie) und es bildet sich ein diploider Zellkern. Diese diploide Phase ist allerdings nur von kurzer Dauer und auf die reproduktiven Zellen beschränkt. Aus den diploiden Zellen entwickeln sich Asci, die zu einem Fruchtkörper, dem Kleistothecium, vereinigt werden, welche man als schwarzglänzende kugelförmige Gebilde gut im Mikroskop bzw. Binokular erkennen kann (Abb. 2D). In den Asci entstehen durch meiotische und eine anschließende mitotische Teilung der diploiden Zellkerne wieder haploide Ascosporen. Dabei kommt es zu einer Neuverteilung und Rekombination der genetischen Merkmale. Werden die Ascosporen auf geeignete Nährmedien übertragen, keimen sie aus und bilden Kolonien. Die unterschiedlichen Phänotypen können dann anhand der Sporenfarbe (weiß, grün oder gelb) und entsprechender Selektionsmedien (Wachstum auf Medium mit *paba*- oder *pyro*-Zugabe) quantitativ erfasst werden (siehe auch unter „Auswertung“).

WICHTIG: für eine detaillierte Beschreibung mit Abbildungen bitte den beigefügten BIUZ-Artikel: „Kreuzung von *Aspergillus nidulans*“ lesen!

1. Tag:

- Animpfen der beiden Kreuzungsstämme SSNI6 und SMI45.
- Ernten bereits reifer Kleisthotecien aus einer vorbereiteten Kreuzung (jedes Kleisthotecium in separates Gefäß!). Je 30 µl der Ascosporensuspension werden auf Agarplatten (MM paba/pyro) ausgestrichen, um zu testen, ob es sich um echte Kreuzungsprodukte handelt.
- Herstellen der am 2. Versuchstag benötigten Selektivplatten: MM ohne Vitamine, MM/pyro, MM/paba, MM/pyro/paba.

2. Tag:

- Ausschneiden von Agarblöckchen aus dem Kontaktbereich der am 1. Versuchstag angeimpften Stämme SSNI6 und SMI45. Übertragung auf MM-Platten ohne Vitamine. Die Platten werden mit Klebeband umklebt und bei 37°C inkubiert. (Kleisthotecien-Bildung erfolgt nach 7-14 Tagen Inkubation.)
 - Auswertung der Ascosporen: Die Suspensionen, aus denen weiße, grüne und gelbe Kolonien im Verhältnis 2:1:1 hervorgehen, können für die weitere Analyse verwendet werden.
- Ausplattieren verschiedener Ascosporen-Verdünnungen auf MM/pyro/paba-Platten.

3. Tag:

- Überimpfen der aus den ausplattierten Ascosporen ausgewachsenen Kolonien mit unterschiedlichen Sporenfarben auf Selektivplatten (MM/pyro, MM/paba und MM/pyr,paba als Kontrolle) .

4. Tag:

- Quantitative Auswertung durch Auszählen der auf den unterschiedlichen Selektivplatten gewachsenen Kolonien, Analyse der Kreuzungsereignisse und Bestimmung der Rekombinationsfrequenz.

Arbeitsanweisungen und Protokolle

Kultivierung der Pilzstämmen, Herstellung der Agarplatten

Benötigtes Material

Pipetboy, sterile 10-ml Glaspipetten, sterile Plastik-Petrischalen, Bunsen-Brenner, durch Ausglühen sterilisierte Impföse bzw. sterile Holz-Zahnstocher, 37°C Inkubator, Salz- Vitamin- und Spurenelement-Stammlösungen (werden zur Verfügung gestellt).

Vorgehen

Das Nährmedium besteht aus einem Minimalmedium (MM), ggfs. supplementiert mit den Vitaminen Pyridoxin-HCl (pyro) und *p*-Aminobenzoessäure (paba).

Minimalmedium (MM), Angabe für ein Liter:

- 50 ml 1x Salz-Stammlösung (120 g NaNO₃; 10,4 g KCl; 10,4 g MgSO₄ x 7 H₂O 30,4 g KH₂PO₄ in einem Liter H₂O gelöst)
- 1 ml Spurenelement-Lösung (2,2, g ZnSO₄ x 7H₂O; 1,1, g H₃BO₃; 0,5 g MnCl₂ x 4H₂O; 0,5 g FeSO₄ x 7H₂O; 0,16 g CoCl₂ x 6H₂O; 0,16 g CuSO₄ x 5H₂O; 0,11 g (NH₄)M₀7₀2₄ x 4H₂O; 5 g EDTA; ad 100 ml H₂O; Heat to boiling, cool to 60 °C, add KOH adjusting pH to 6.5-6.8. Solution goes to deep purple after standing for several days. If in titrating pH, pH exceeds 7.0 discard and start over)
- 20 g Glucose
- 1 ml der benötigten Vitamin-Stammlösungen (Pyridoxin-HCl, 0,1 g/100 ml H₂O; *p*-Aminobenzoessäure, 0,1 g/100 ml H₂O)

Der pH-Wert wird mit 5 N NaOH auf etwa 6,5 eingestellt. Dann erfolgt die Zugabe von 15 g Agar.

Folgende Platten werden benötigt:

MM / pyro

MM / paba

MM / pyro / paba

MM ohne Vitaminzusätze

Das Medium wird 10 min autoklaviert. Das sterile Medium wird in Petrischalen gegossen (bis etwa 4 mm unterhalb des Randes).

WICHTIG: Nach dem Autoklavieren müssen alle Arbeiten unter sterilen Bedingungen durchgeführt werden (Arbeitsplatz mit 70% Ethanol säubern, unter der Bunsenbrenner-Flamme arbeiten).

Zum Überimpfen der Pilze reichen **sehr wenig** Sporen aus. Es wird nur einmal mit der Impfnadel oder dem Zahnstocher leicht in das Myzel gestochen und dann einmal auf die zu beimpfende Platte getupft. Es ist empfehlenswert, die Agarplatten beim Beimpfen mit der offenen Seite nach unten zu halten, um die Verteilung der Sporen auf der ganzen Platte zu verhindern.

Ernten der Ascosporen

Benötigtes Material

Binokular, durch Ausglühen sterilisierte Impföse bzw. sterile Holz-Zahnstocher, Drigalskispatel, steriles Wasser, steriles Eppendorfgefäß, Agarplatten mit MM/pyro/paba

Vorgehen

Sind die Kleistothecien reif, ragen sie schwarz glänzend aus ihren „Nestern“, den Hüllezellen heraus. Unter dem Binokular werden sie mit einer sterilen Impfnadel entnommen und durch vorsichtiges Hin- und Herrollen auf einer Agarplatte von anhaftenden Konidien und Hülle-Zellen befreit. Dann wird je ein Kleistothecium in einem Eppendorfgefäß, das 500 µl steriles Wasser enthält, zerquetscht. Dies geschieht zunächst am besten in einem kleinen Tröpfchen am Gefäßrand bzw. im Deckel. Die austretenden Ascosporen färben das Flüssigkeitströpfchen leicht rot.

Kleistothecien können auch ohne vorangegangene Kreuzung entstehen und enthalten dann ausschließlich Ascosporen von einer Sorte. Daher muss zuerst getestet werden, ob es sich bei den geernteten Kleistothecien um echte Kreuzungsprodukte handelt. Je Gruppe werden mind. 8 möglichst große Kleistothecien geerntet und je 30 µl der Ascosporensuspension werden mit einer sterilen Impföse auf ein Viertel einer Agarplatte (MM paba/pyro) ausgestrichen und für zwei bis drei Tage bei 37°C inkubiert. Die Ascosporensuspensionen sollten gut beschriftet und im Kühlschrank aufbewahrt werden!

In einem Kleistothecium reifen mehrere zehntausend Ascosporen heran, aus jeder dieser Sporen kann eine neue Kolonie wachsen. Daher werden für die Auswertung der Kreuzung zwei bis drei unterschiedliche Verdünnungen der Ascosporensuspension, aus der weiße, grüne und gelbe Kolonien im Verhältnis 2:1:1 hervorgegangen ist, mit einem Drigalskispatel auf Agarplatten plattiert. Je nachdem wie dicht die Ascosporen ausgewachsen sind, können entweder 100 µl unverdünnt, oder einer 10^{-1} bzw. 10^{-2} Verdünnung ausplattiert werden (innerhalb einer Gruppe Doppelbestimmung!) Das verwendete Medium muss das Wachstum aller, auch durch Neu- und Rekombination entstandenen Stämme erlauben (MM/pyro/paba).

Auswertung der Kreuzung

Da die zur Kreuzung verwendeten Stämme verschiedene Sporenfarben aufweisen, ergeben sich bei den Nachkommen sowohl grüne als auch weiße Stämme. Zusätzlich ergibt sich in diesem Fall noch eine Besonderheit, es erscheinen nämlich auch gelbe Kolonien. Das lässt sich dadurch erklären, dass sich in dem weißen Stamm SMI45 zusätzlich zum Defekt des *white*-Gens (Chromosom II) noch eine Mutation des *yellow*-Gens (Chromosom I) verbirgt. Der Defekt des gelben Gens wird nur in Gegenwart eines intakten *white*-Gens sichtbar, da die Genprodukte in folgender Reihenfolge an der Synthese des grünen Konidiosporenpigments beteiligt sind:

weiß – *wA3* \longrightarrow gelb – *yA2* \longrightarrow grün

Ein Defekt in einem dieser Gene resultiert in der Farbe des jeweiligen Edukts in der Pigmentsynthese. Ein Defekt in **beiden** Gene führt zur weißen Koloniefarbe, da ein

gelbes Produkt gar nicht erst gebildet wird. Das Auftauchen von gelben Kolonien in unserem Kreuzungsexperiment kann durch Neuverteilung der Chromosomen erklärt werden.

Für eine weitere Charakterisierung werden die Kolonien auf Selektivmedien überimpft, um die Verteilung der Auxotrophiemarker zu analysieren. Hierbei sollte sich ein Gesamtbild der bei der Kreuzung stattgefundenen Neuverteilung der Chromosomen und der Rekombinationsereignisse ergeben (s. auch unten).

Benötigtes Material

durch Ausglühen sterilisierte Impföse bzw. sterile Holz-Zahnstocher, Agarplatten mit MM/pyro, MM/paba und MM/pyro/paba

Vorgehen

Die mit einem Raster versehenen Platten (Selektionsmedien) werden nacheinander mit einem sterilen Zahnstocher / Impfnadel beimpft, beispielsweise zuerst MM/paba (es wachsen keine Pyridoxin-auxotrophen Stämme), dann MM/pyro (es wachsen keine *p*-Aminobenzoesäure-auxotrophen Stämme) und dann zur Kontrolle wieder MM/pyro/paba. Es ist darauf zu achten, dass immer an einer bestimmten Position im Raster jeweils von der gleichen Ausgangskolonie angeimpft wird. Je Gruppe werden jeweils mind. 20 gelbe, grüne und weiße Kolonien auf die o.g. Selektionsmedien überimpft.

Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 37°C sind die Kolonien gewachsen und können anhand ihrer Sporenfarbe und Auxotrophiemarker ausgezählt werden.

Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

- Welche neuen Genotypen sind entstanden?
- Welche Merkmale werden unabhängig vererbt?
- Welche Merkmale werden abhängig vererbt (d. h. sie befinden sich auf dem gleichen Chromosom)?
- Gibt es Rekombinationsereignisse (d. h. durch ein "crossing over" homologer Chromosomen bei der Meiose können ursprünglich abhängig vererbte Merkmale entkoppelt werden)?
- Wie häufig haben Rekombinationen statt gefunden? Was lässt sich zum Abstand der Gene auf dem Chromosom sagen?