

Versuch Immunfluoreszenz

1. Methodischer Hintergrund des Versuchs
 - 1.1 Immunfluoreszenz – Einsatzbereiche
 - 1.2 Immunfluoreszenz – Durchführung
 - 1.3 Fluoreszenzmikroskop – Wie funktioniert es?
 - 1.4 Wie funktioniert ein Konfokalmikroskop?
 - 1.5 Grundregeln für das Mikroskop
2. Wissenschaftlicher Hintergrund des Versuchs
 - 2.1 Mikrotubuli und pflanzliche Abwehr
 - 2.2 Mechanosensoren und Osmoregulation
 - 2.3 Das *Vitis / Plasmopara viticola* Wirt-Pathogen-System
 - 2.4 Fragestellung des Versuchs
3. Organisation des Versuchs
4. Arbeitsanweisungen und Protokolle

1. Methodischer Hintergrund des Versuchs

1.1. Immunfluoreszenz - Einsatzbereiche

Die Verbindung von Fluoreszenzmikroskopie mit der praktisch unbegrenzten Spezifität von Antikörpern erlaubt es, im Grunde (!) jedes beliebige Biomolekül in der Zelle nachzuweisen. Das zugehörige Verfahren heißt Immunfluoreszenz und hat sich seit seinen Anfängen vor knapp 30 Jahren zu einer der Schlüsseltechnologien der modernen Zellbiologie, aber auch der medizinischen Diagnostik gemauert. An einem Beispiel (Darstellung der Mikrotubuli) soll diese Methode vorgestellt und zur Klärung einer biologischen Fragestellung eingesetzt werden.

Was bringt Immunfluoreszenz? Mikroskopie wird in der Regel als rein morphologische Methode mißverstanden – man versucht, die Form, den Aufbau, die Struktur eines Gewebes oder einer Zelle sichtbar zu machen. Darüberhinaus gibt es jedoch auch die Möglichkeit, Aufschluß über die molekulare Natur des Präparats zu erhalten. Klassischerweise bedient man sich dazu der spezifischen Anfärbung bestimmter Zellbestandteile – beispielsweise lassen sich Zellkerne mit Giemsa oder Methylenblau sichtbar machen, oder die Vakuole mit Neutralrot.

Dieser Ansatz wird sehr wirksam, wenn man Antikörper als spezifische Sonden benutzt. Damit ist es möglich, ganz bestimmte Proteine in der Zelle zu markieren. Der Antikörper muß dann nur noch in irgendeiner Weise sichtbar gemacht werden. Seit Beginn der 80er Jahre verwendet man dazu immer häufiger fluoreszierende Substanzen (sogenannte Fluorochrome), die an Antikörper gekoppelt werden können. Diese Methode wird daher Immunfluoreszenz genannt. Der Erfolg steht und fällt natürlich mit der Güte des Antikörpers – ist dieser unspezifisch, bindet also nicht nur das Molekül, das man beobachten will, entstehen oft bizarre Artefakte. Deshalb müssen die Untersuchungen durch recht umfangreiche Negativkontrollen begleitet werden, will man zu glaubwürdigen Aussagen gelangen.

1.2 Immunfluoreszenz - Durchführung

Die Immunfluoreszenz gibt es prinzipiell in zwei Ausführungen: als direkte und als indirekte Immunfluoreszenz. Bei der direkten Immunfluoreszenz ist das Fluorochrom unmittelbar an den Antikörper gekoppelt. Bei der viel häufiger eingesetzten indirekten Immunfluoreszenz benutzt man zwei Antikörper, einen primären Antikörper, der das gewünschte Molekül im Präparat erkennt und daran bindet und einen sekundären Antikörper, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist und die Fluoreszenz trägt. Im Folgenden sei die indirekte Immunfluoreszenz beschrieben.

(i) Zunächst einmal muß man die Zelle in möglichst gut in dem Zustand erhalten – so wie sie in dem Moment war, als man mit der Präparation anfangt. Dazu werden die Zellen fixiert. Als Fixans benutzt man in der Regel Aldehyde (Formaldehyd oder Paraformaldehyd für eine milde Fixierung, Glutaraldehyd für starke Fixierung). Diese vernetzen die Zellproteine und stabilisieren sie dadurch. Außerdem wird die Zelle abgetötet und kann sich während der Färbeprozedur nicht mehr verändern. Um die Fixierung zu verbessern, werden oft Detergentien wie DMSO, Triton oder Nonidet dem Puffer zugesetzt.

(ii) Nachdem das Fixans ausgewaschen wurde, wird das Gewebe geschnitten, um das Zellinnere freizulegen. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten, die vom geschickten Freihandschnitt mit einer Rasierklinge über Vibratomschnitte bis zur Einbettung und Mikrotomie oder Kryotomie reichen. Im Falle von Zellkulturen muß natürlich nicht geschnitten werden – hier hat man dafür mit dem Problem zu kämpfen, daß die Zellen bei der ganzen Prozedur nicht verloren gehen.

(iii) Nun wird mithilfe einer milden Cellulasebehandlung die Zellwand etwas anverdaut, damit die Antikörper besser eindringen können. Danach wird mit Serumalbumin geblockt – damit sollen „klebrige“ Stellen im Präparat (z.B. Pectine in der Zellwand oder Stärke) mit Protein abgesättigt werden, damit der primäre Antikörper nicht unspezifisch an diesen Stellen hängen bleibt.

(iv) Danach wird mit dem primären Antikörper inkubiert – dieser bindet an das gesuchte Protein. Ungebundener Antikörper wird im Anschluß an die Inkubation abgewaschen.

(v) Um den primären Antikörper sichtbar zu machen, wird das Präparat nun mit dem sekundären Antikörper inkubiert, der gegen den primären Antikörper gerichtet ist. Der sekundäre Antikörper trägt das Fluorochrom. An den Stellen, wo sich das gesuchte Protein befindet und also der primäre Antikörper gebunden hat, wird nun über den sekundären Antikörper das Fluorochrom angeheftet.

(vi) Mithilfe eines Epifluoreszenzmikroskops oder des Apotoms kann nun das Fluorochrom sichtbar gemacht werden (siehe unten).

In fortgeschritteneren Varianten dieser Methode lassen sich auch verschiedene Proteine gleichzeitig mit verschiedenen primären Antikörpern inkubieren. Wenn man sekundäre Antikörper zur Verfügung hat, die zwischen diesen primären Antikörpern zu unterscheiden vermögen und an verschiedene Fluorochrome gekoppelt sind, kann man dann in ein- und derselben Zelle verschiedene Proteine mit verschiedenen Farben sichtbar machen (Doppel- oder Polychrom-Immunfluoreszenz).

Trotz dieser Problematik (die übrigens für fast alle modernen und häufig recht komplexen Methoden vorhanden ist...) hat sich die Immunfluoreszenz zu einem der wichtigsten zellbiologischen Methoden entwickelt. Der Witz dabei: man kann

sozusagen Biochemie auf dem Objektträger betreiben, also die räumliche Verteilung von ganz bestimmten Molekülen untersuchen.

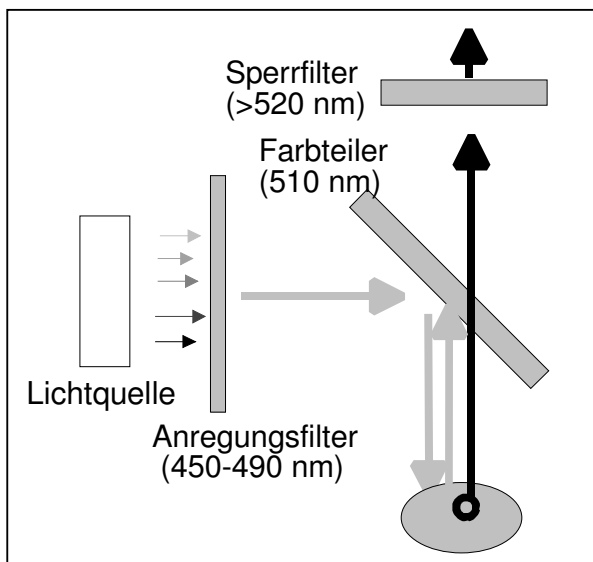
Zum Nachdenken und Nachlesen

- A. Wieso wird Immunfluoreszenz vor allem als indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt?
- B. Wie kann man überprüfen, ob das beobachtete Signal tatsächlich die Verteilung des untersuchten Proteins widerspiegelt und nicht durch unspezifische Bindung verursacht ist?
- C. Was ist die Voraussetzung, daß man mit einem bestimmten Antikörper Immunfluoreszenz durchführen kann? Wie können Sie das überprüfen?
- D. Sie haben bei einer Ihrer Proben vergessen, den primären Antikörper zuzufügen, bemerken jedoch beim Mikroskopieren, dass das Muster zwar von den Proben mit Antikörpern abweicht, aber dass es dennoch leuchtet. Wie erklären Sie sich das?
- Lloyd, CW (1987) The plant cytoskeleton: the impact of fluorescence microscopy. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 119-139

1.3 Fluoreszenzmikroskop – Wie funktioniert es?

Die Lichtquelle (zumeist eine Quecksilber-Hochdruckdampfampe) erzeugt einen möglichst großen Bereich von Anregungswellenlängen. Daraus wird mithilfe des *Anregungsfilters* eine einzige Wellenlänge isoliert (in **Abb. 1** beispielsweise Blaulicht). Diese trifft nun auf einen sogenannten *Farbteiler*. Der Farbteiler ist ein halbdurchlässiger Spiegel, der kurzwelliges Licht reflektiert, langwelliges Licht jedoch durchläßt (er teilt das Licht also in zwei verschiedenfarbige Strahlen auf, daher der Name). Das kurzwellige Anregungslicht wird also reflektiert und durch das Objektiv (das hier gleichzeitig als Kondensor dient) auf das Präparat eingestrahlt.

Dort wird nun das Fluorochrom (beispielsweise das Fluorescein-Isothiocyanat) angeregt und fluoresziert nun längerwellig. Das Fluoreszenzlicht kommt nun wieder zurück zum Farbteiler wird aber, da es längerwellig ist, durchgelassen. Daneben gibt es (viel mehr) blaues Licht, das auf kein Fluorochrom-Molekül getroffen ist und einfach reflektiert wurde. Dieses Licht wird vom *Farbteiler* jedoch nicht durchgelassen, da es kürzerwellig ist und läuft sich tot. Das Fluoreszenzlicht wird dann noch über einen Sperrfilter weiter gefiltert. Das ist vor allem dann wichtig, wenn man das Präparat mit verschiedenen Fluorochromen angefärbt hat und diese unterscheiden will. Man erhält ein lichtschwaches, aber spezifisches Signal.



Das Fluoreszenzlicht wird dann noch über einen Sperrfilter weiter gefiltert. Das ist vor allem dann wichtig, wenn man das Präparat mit verschiedenen Fluorochromen angefärbt hat und diese unterscheiden will. Man erhält ein lichtschwaches, aber spezifisches Signal.

Abb. 1: Aufbau eines Epifluoreszenzmikroskops

Das Signal, das man am Ende erhält, ist sehr spezifisch (nur das Licht aus der Fluoreszenz kommt an), aber oft auch sehr lichtschwach.

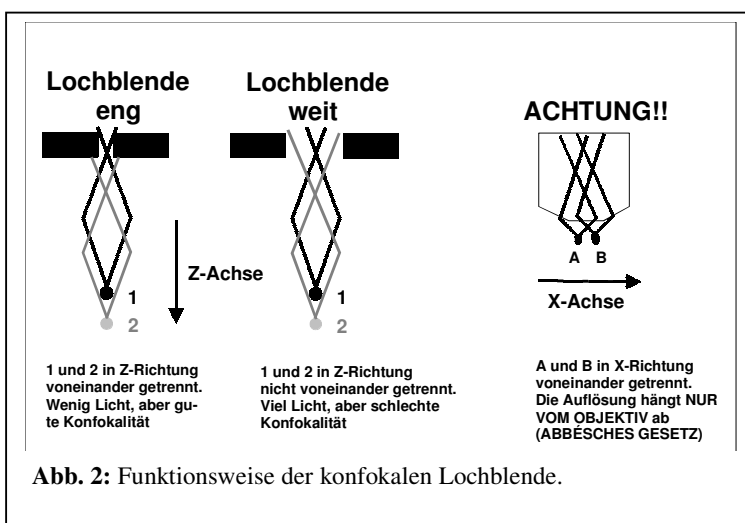
Zum Nachdenken

- Notorsche Fluoreszenzmikroskopiker lassen sich daran erkennen, daß sie oft nicht mehr wissen, wie man ein Mikroskop kühlt. Warum?
- Fluoreszenzobjektive sind sehr teuer, da die Linsen nicht aus Glas, sondern aus Flußspat gefertigt sind. Wozu der Aufwand?
- Warum sind Fluoreszenzobjektive viel „dicker“ als gewöhnliche Objektive (und haben sehr große numerische Aperturen)?
- Warum benötigen die meisten Fluoreszenzobjektive Ölimmersion?
- Warum wird Fluoreszenzmikroskopie als Epi- (=Auflicht) und nicht als Durchlicht-Fluoreszenzmikroskopie betrieben?

1.4 Wie funktioniert ein Konfokalmikroskop?

Im Grunde so wie ein gewöhnliches Fluoreszenzmikroskop auch. Der Unterschied besteht vor allem darin, daß das Bild nicht mehr in unserem Auge entsteht, sondern Pixel für Pixel von einem Bildverarbeitungsprogramm aufgebaut wird. Als Lichtquelle dient ein Argon-Krypton-Laser, der drei Anregungswellenlängen (Blau, Grün, Rot) zur Verfügung hat und mithilfe zweier rotierender Spiegel die Oberfläche des Präparats Punkt für Punkt abtastet. Farbteiler und Sperrfilter unterscheiden sich nicht von denen in einem konventionellen Fluoreszenzmikroskop.

Der Witz des Konfokalmikroskops liegt in einem winzigen Loch, der konfokalen Lochblende, die alles Licht, was nicht ganz genau aus der Brennebene stammt, rigoros ausblendet (dieses wird ja unter einem leicht verschiedenen Winkel gebrochen als das Licht aus der Brennebene). Das Prinzip dieser Lochblende ist in **Abb. 2** gezeigt. Damit wird also alle diffuse Hintergrundfluoreszenz ausgefiltert und es wird möglich, ein Präparat optisch in Scheiben zu „schneiden“. Diese Scheiben können sehr dünn sein. Nachteil dabei: das ohnehin schon schwache Fluoreszenzlicht wird noch weiter geschwächt (dafür gewinnt man eine weitere Ebene der Spezifität,



nämlich die Auflösung in der Z-Achse). Darum muß das menschliche Auge durch einen Photomultiplikator ersetzt werden, der dann für jeden Rasterpunkt das Signal mißt und hochverstärkt. Über Bildverarbeitung wird das Bild dann punktweise zusammengesetzt. Man kann nun in der Z-Achse durch das Präparat hindurchfahren und für jede Ebene ein Bild aufnehmen und diese

dann vom Computer wieder auf-einanderlagern lassen. Durch das Wegfiltern des Hintergrunds werden zelluläre Details sichtbar, die sonst nicht zu sehen wären. Die Deutung solcher Bilder erfordert jedoch sehr viel Erfahrung und hier gibt es leider viel Stümperei. Konfokalmikroskopie erlaubt also ein Vordringen in die dritte Dimension. Begrenzender Faktor ist vor allem die Rechenleistung. ABER: nur eine gute Optik liefert gute Bilder, daran ändern die schnellsten Rechner nichts.

Zum Nachdenken

- A. Was begrenzt die „Auflösung“ zweier Punkte in der z-Achse (also, wie nahe können 1 und 2 sein, damit sie noch als getrennt wahrgenommen werden können)?
- B. Gibt es auch Nachteile gegenüber konventionellen Fluoreszenzmikroskopen?
- C. Gewöhnlich wird ein Bild nicht nur einmal, sondern mehrfach abgerastert und die (an sich identischen) Bilder werden dann überlagert (sogenanntes *averaging*). Warum wohl?

Zum Nachlesen

Hepler, P.K., Gunning, B.E.S. (1998) Confocal fluorescence microscopy of plant cells. *Protoplasma* 201, 121-157

1.5 Grundregeln für das Mikroskop

Was nicht passieren sollte:

1. Scharfstellen: vor allem bei höheren Objektiven: seitlich schauen und das Objektiv dem Deckglas nähern. Dann Hineinschauen und den Fokus vom Deckglas weg drehen, bis man scharf sieht. **NIE UMGEKEHRT!!!** Ein vom Deckglas zerkratztes Fluoreszenzobjektiv kostet zwischen 3000 und 6000 €!!!
2. Immersionsöl: nach Gebrauch die Frontlinse des Objektivs mit einem Linsentuch säubern. Vergessenes Immersionsöl verharzt nach wenigen Tagen und zerfrißt bewegliche Teile.
3. Objektivwechsel: nicht mit den Fingern in die Frontlinse, beim Wechsel zu höheren Objektiven darauf achten, daß die Frontlinse beim Eindrehen nicht am Objektträger scheuert, am besten den Arbeitsabstand vergrößern und neu fokussieren.

Womit man sich viel Ärger sparen kann:

1. Okulare mit Isopropanol vom Wimpernfett reinigen (hilft gegen „neblige“ Bilder).
2. Darauf achten, daß der Polarisationsfilter nicht eingeschoben ist – das gibt sehr dunkle Bilder...

WICHTIG: Richtig „KÖHLERN“ – So wird es gemacht

Objekt scharfstellen, Leuchtfeldblende (im Mikroskopfuß) schließen, den Kondensor mit dem Kondensortrieb nach oben drehen, bis das Bild der Leuchtfeldblende scharf ist, dann mit den schräg stehenden Zentrierschraube dieses Abbild ins Zentrum rücken, Leuchtfeldblende bis zum Bildrand öffnen, Kondensorblende bis auf 1/3 schließen. Nun sollte man ein gleichmäßig aus-geleuchtetes, scharfes Bild sehen. Wenn nicht, unbedingt Hilfe holen.

2. Wissenschaftlicher Hintergrund des Versuchs

2.1. Mikrotubuli und pflanzliche Abwehr

Die Mikrotubuli sind ein zentrales Element des pflanzlichen Zellskeletts und üben vielfältige Funktionen aus: Sie steuern die Achse von Zellwachstum und Zellteilung, reagieren auf zahlreiche Signale aus der Umwelt und scheinen auch direkt an der Wahrnehmung und Verarbeitung von Signalen teilzunehmen. Dies soll beispielhaft für die pflanzliche Abwehr untersucht werden. Die Mikrotubuli sind in der Lage, eine Attacke durch Pilze wahrzunehmen und dann Vesikel mit Abwehrstoffen an die Stelle zu transportieren, wo der Pilz einzudringen versucht. Auslöser sind sogenannte Elicitoren, Fragmente der Außenhülle des Schädlings, die beim Eindringen versehentlich abschilfern und von noch unbekanntem pflanzlichen Rezeptoren erkannt werden.

Es gibt Hinweise darauf, dass diese Rezeptoren auch eine Rolle bei der Wahrnehmung von mechanischen Reizen spielen. So kann etwa die Umstrukturierung des Zellskeletts, die durch Pilzbefall ausgelöst wird, auch durch eine mechanische Reizung mit einer Mikronadel ausgelöst werden, was sogar manche der durch Elicitorbehandlung angeschalteten Abwehrgene anschaltet.

2.2. Mechanosensoren und Osmoregulation

Die Wahrnehmung und Verarbeitung mechanischer Reize ist evolutionär sehr alt – schon Bakterien besitzen mechanosensitive Ionenkanäle, um auf Veränderungen des osmotischen Potentials ihrer Umgebung reagieren zu können. Sonst würden sie ja platzen, wenn es mal regnet... Osmoregulation ist auch für Pflanzen wichtig – obwohl sie ja eine Zellwand besitzen, die das Platzen in hypotonischer Umgebung (Wasser) verhindert. Bei der Steuerung des Wachstums wird der osmotische Druck jedoch genau reguliert – beispielsweise hält ein Maiskeimling relativ genau einen Unterschied von 5 Bar zwischen Epidermis und darunterliegendem Parenchym aufrecht, obwohl sich die Druckverhältnisse während des Wachstums dramatisch ändern.

Die Osmoregulation pflanzlicher Zellen wird jedoch durch den Gegendruck der Zellwand etwas versteckt. Um sie sichtbar machen zu können, muss man also die Zellwand entfernen. Dies lässt sich relativ einfach durch Verdauung mit Cellulase erzielen (übrigens wird die Cellulase aus Mikroorganismen gereinigt, die Pflanzen befallen). Natürlich muss man die entstehenden Protoplasten dann in ein mehr oder minder isotones Medium überführen, damit nicht zu viel Wasser einfließt und sie zum Platzen bringt. Kleinere Unterschiede im osmotischen Potential des Cytoplasmas gegenüber dem Außenmedium können durch aktive Osmoregulation ausgeglichen werden. Durch mechanosensitive Ionenkanäle können die Kräfte auf die Membran wahrgenommen und durch Ein- oder Ausfluss von Ionen ausgeglichen werden. Setzt man die Protoplasten jedoch einem hypotonischen Schock aus indem man sie beispielsweise in destilliertes Wasser überführt, ist diese Osmoregulation auf Dauer überfordert, der Protoplast schwillt an und platzt schließlich. Allerdings gibt es hier Unterschiede: je aktiver die Osmoregulation arbeitet, umso länger kann der Protoplast dem Platzen widerstehen. Die Zeit zwischen Einsetzen des hypotonischen Schocks und dem Platzen des Protoplasten ist also ein Maß für die Aktivität seiner

Osmoregulation (und damit natürlich auch für die Aktivität der mechanosensitiven Kanäle).

2.3. Das *Vitis* / *Plasmopara viticola* Wirt-Pathogensystem

Im Versuch werden zwei Zellkulturen aus Weinrebe untersucht. Die eine Kultur entstammt der Kultursorte cv ‚Pinot Noir‘ und ist, wie alle Kulturreben, die sich ja von der Europäischen Wildrebe ableiten, gegenüber dem Falschen Mehltau der Weinrebe (*Plasmopara viticola*, ein sogenannter Algen“pilz“ oder Oomycet, eigentlich eine parasitisch gewordene Gruppe von Braunalgen-Verwandten) sensitiv. Als der Falsche Mehltau um 1860 von Nordamerika nach Bordeaux eingeschleppt wurde und sich in den Folgejahren rasant in Europa verbreitete, kam es zu dramatischen Einbrüchen im Weinbau. Die Rebflächen gingen hier in Baden auf die Hälfte zurück, Verarmung und Massenauswanderungen waren die Folge. Der Falsche Mehltau ist auch der Hauptgrund, warum im Weinbau so viele Fungizide gespritzt werden müssen (etwa 80 % des Fungizidverbrauchs in Deutschland geht auf das Konto des Weinbaus!). In Nordamerika, wo der Falsche Mehltau herkommt gibt es zahlreiche Wildarten, die sich gemeinsam mit diesem Pathogen entwickelt haben und daher resistent sind. Zurückgehend auf den Badischen Revolutionär Friedrich Hecker, der nach seinem Scheitern 1848 nach USA emigrierte und dort Winzer wurde, versucht man daher seit über hundert Jahren, durch Kreuzung solcher resistenter Wildreben mit Kulturreben sogenannte pilzresistente Sorten zu züchten. Die Felsenrebe, *Vitis rupestris*, ist eine dieser resistenten Arten aus Nordamerika.

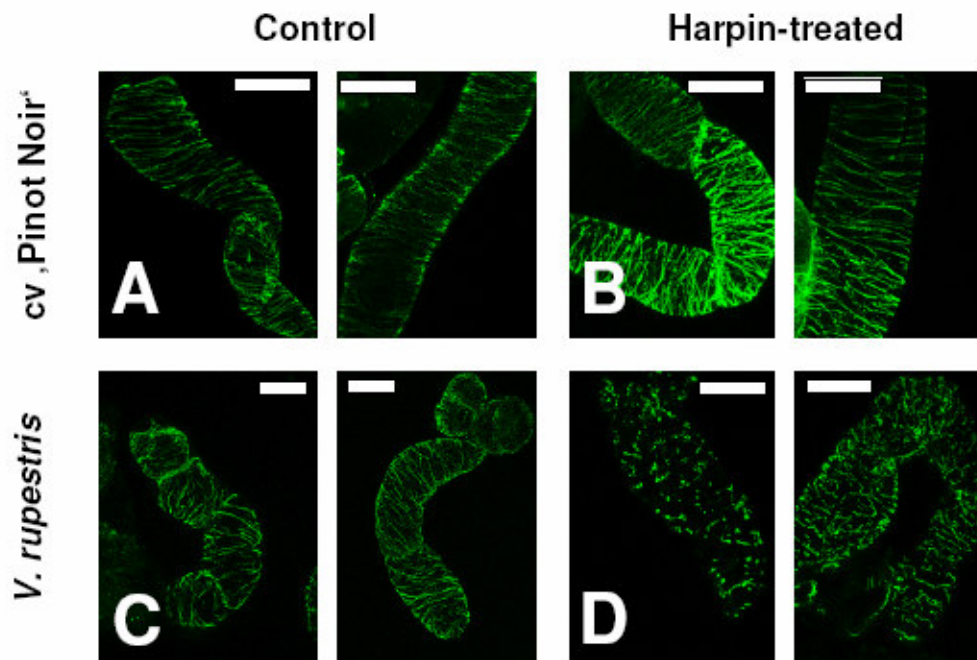


Abb. 3: Reaktion der corticalen Mikrotubuli auf den starken Elicitor Harpin (Handelsprodukt *Messenger*) im sensitiven cv. ‚Pinot Noir‘ versus der resistenten Wildart *Vitis rupestris*. Die Mikrotubuli sind durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Maßstab 25 μ m. (Aus Qiao, Chang und Nick, J. Exp. Bot., eingereicht)

Da Pflanzenpathogene oft schwer handzuhaben sind, werden im Labor häufig Elicitoren eingesetzt, um pflanzliche Abwehr auszulösen und zu untersuchen. Hierbei

gibt es sehr spezifische Elicitoren, die aus evolutionär abgeleiteten Wirt-Pathogen-Interaktionen stammen und daher nur bei bestimmten Arten eine Abwehr auslösen können. Daneben gibt es evolutionär sehr alte sogenannte Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs), die für eine ganze Gruppe von Mikroorganismen typisch sind und zumeist sehr breit wirksam sind. Ein solches PAMP ist beispielsweise das Flagellin der Bakterien – es ist evolutionär so alt, dass es nicht nur von Pflanzen- sondern auch von Tierzellen als Auslöser für Abwehrreaktionen fungieren kann. Im Versuch verwenden wir den Elicitor Harpin (bzw. das entsprechende Handelsprodukt *Messenger*), der aus pflanzenpathogenen Bakterien stammt und bei einer Vielzahl von Pflanzenarten die Abwehr auslösen kann.

2.4. Fragestellung des Versuchs

In vorangegangenen Untersuchungen zeigte sich, dass Harpin bei *Vitis* eine Fragmentierung der Mikrotubuli auslöst, wobei sich die beiden Zellkulturen hier stark unterscheiden. Entgegen der Intuition ist die Fragmentierung bei der resistenten Zell-Linie aus *V. rupestris* besonders stark, bei der sensitiven Linie cv ‚Pinot Noir‘ dagegen nur schwach ausgeprägt. Dies legt nahe, dass die Fragmentierung der Mikrotubuli nicht nur eine stromab gelegene Antwort der Zelle auf den Elicitor ist, sondern etwas mit der Verarbeitung des Reizes zu tun hat, also recht nahe am Anfang der Reaktion liegt. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass eine künstlich ausgelöste Fragmentierung der Mikrotubuli dazu führt, dass Abwehrgene angeschaltet werden. Es gibt nun zahlreiche Hinweise, dass Mikrotubuli neben ihren gut bekannten Funktionen noch an der Steuerung von mechanosensitiven Kanälen beteiligt sind. Um dies zu prüfen, soll nun die Osmoregulation in den beiden Zellkulturen näher untersucht werden. Durch Behandlung mit dem Mikrotubuli-Destabilisator Oryzalin und dem Mikrotubuli-Stabilisator Taxol soll ausserdem untersucht werden, inwieweit Mikrotubuli hier eine Rolle spielen. Parallel dazu werden die Mikrotubuli in diesen Zellen über Immunfluoreszenz sichtbar gemacht.

3. Organisation des Versuchs

Betreuung: Peter Nick, Fei Qiao, Xiaoli Chang

Zeit 1: Di, 13.04.2010-Fr, 16.04.2010, Gruppe 9

Zeit 2: Di, 26.04.2010-Fr, 08.05.2010, Gruppe 1

Zeit 3: Di, 10.05.2010-Fr, 22.05.2010, Gruppe 3

Zeit 4: Di, 25.05.2010-Fr, 28.06.2010, Gruppe 5

Zeit 5: Di, 14.06.2010-Fr, 26.06.2010, Gruppe 7

Ablauf:

Di, 14:00-18:00 – Vorbereitungen (Seminarraum Botanisches Institut), Ansetzen von Puffern und Lösungen, Herstellung der Protoplasten aus den Wein-Zellkulturen ‚Pinot Noir‘ und *Vitis rupestris* (Inkubation über Nacht)

Mi, 14:00-18:00 – Behandlung der Protoplasten (osmotischer Schock, Mikrotubuli-Wirkstoffe), Fixierung und Immunfluoreszenzfärbung bis zur Inkubation im primären Antikörper

Do, 14:00-18:00 – Abschluss der Immunfluoreszenzfärbung,
Fluoreszenzmikroskopische Auswertung (in Gruppen zu 2)

Fr, 14:00-18:00 – Fluoreszenzmikroskopische Auswertung (in Gruppen zu 2)

4. Arbeitsanweisungen und Protokolle

Sterile Entnahme der Zellen

Needed

Pipetboy, sterile 10-ml serological pipettes, tobacco cell line BY2-WT a (provided) at day 4 after inoculation (logarithmic phase), spatula, Bunsen-burner, clean bench, sterile red-cap tubes, sterile MS medium (provided).

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 spatula.

Transfer 10 ml MS medium to a sterile red-cap tube.

Flame-sterilize the spatula.

Open the Petri dish with the cells. Take care that the air flow cannot carry contaminations into the open dish. Transfer about 1 ml of callus to the red-cap tube (gently top over directly to mix cells).

Steriles Arbeiten mit pflanzlichen Zellkulturen:

Pflanzliche Zellkulturen sind sehr empfindlich gegen Befall mit Pilzen (Hefen) oder Bakterien. Darum muss hier steril gearbeitet werden. Durch Kontamination werden oft innerhalb von Tagen die Ergebnisse von Jahren Arbeit zerstört. Grundwerkzeug sind sogenannte *Laminar-Flow*-Sterilbänke: Durch einen Filter werden alle Keime herausgefiltert und die sterile Luft wird von der Rückseite der Arbeitsfläche her nach vorne, wo die experimentierende Person sitzt, geblasen. Beim sterilen Arbeiten ist wichtig, dass man sich jeden Schritt vorher überlegt - z.B. sollte man vermeiden, dass unsterile Gegenstände hinter den steril zu haltenden Zellen stehen (weil dann die Keime direkt in die Zellen geblasen würden), man sollte natürlich auch nicht mit unsterilen Gegenständen die Zellen berühren, etc. Dies ist mühevoll aber notwendig - die Herstellung der in diesem Versuch verwendeten Zell-Linien hat etwas mehr als ein Jahr gedauert. Wenn man mit Flüssigkulturen arbeitet, immer die Flaschenhalse gut abflammen – dort sitzen die Keime.

Generation and treatment of protoplasts

Principle

The cell wall is digested using cellulases (purified from phytopathogenic fungi). In order to avoid bursting of the resulting protoplasts, the osmotic potential of the solution has to be adjusted by addition of mannitol.

Generation of protoplasts

1. Fill 2 ml of a *Vitis* cell suspension (8-9 d after subcultivation) into a 2 ml centrifuge tube, let the cells settle for 5 min and carefully discard about 1 ml of supernatant.
2. Add 1 ml of digest solution (1 w/v % Cellulase and 0.3 w/v % Macerozyme in 0.45 Mannitol, pH 5.5), transfer the mixture to a 2.5-cm petridish and incubate overnight at 25°C at low speed shaking (100 rpm).
3. Filtrate the mixture using the self-made staining chamber (mesh-size 70 µm) and wash with 0.3 M mannitol.
4. Collect the protoplasts by low-speed centrifugation (300 rpm, 10 min, 25°C), discard supernatant.
5. repeat step 4 once. Store the protoplast at room temperature.

Measure the permeability coefficient

1. Mix 1 volume of the protoplast suspension with 1 volume of distilled water (**record the time point as t_0**), then transfer 20 µl of the mixture to a Rosenthal-Fuchs hematocytometer under bright-field illumination, focus and record an image (note the time point as t_1). Record a time series with frames every 10-30 s (t_2, t_3, \dots, t_n) until the protoplasts have bursted.
2. Measure protoplast diameters ($n \geq 50$) at the different time point (t_1, t_2, \dots), from the digital images using the ImageJ Software. The volume of protoplasts is calculated using the formula for a sphere ($V = 4/3 \times \pi r^3$).
3. Calculate the permeability coefficient:
$$P_f = \frac{V_0 (d [V_{t_n} / V_{t_1}] / dt)}{SV_w \Delta osm}$$

V_w : partial molar volume=18 cm³/mol;

V_{t_1} and V_{t_n} are the volume of protoplast at time point t_1 and t_n ;

S is the surface area of protoplast at t_1 .

Δosm is the difference of osmotic potential before and after addition of water.

(the osmotic potential of mannitol can be estimated from its concentration or, alternatively, be measured by an osmometer).

Reference

Zhang RB and Verkman AS. 1991 Water and urea permeability properties of *Xenopus oocytes*: expression of mRNA from toad urinary bladder. Am J Physiol Cell Physiol 260: C26-C34

Microtubule staining

Principle

The cells are incubated in a staining chamber (reaction tube with nylon mesh of 70 μm mesh width) to improve washing and prevent the loss of cells during the procedure.

Solutions

Microtubule-stabilizing buffer (MSB)

0.05 M PIPES [pH 6.9], supplemented with 2 mM MgSO_4 , and 2 mM EGTA, 0.1 % Triton X-100

PFA-stock

37 % w/v paraformaldehyde ($\approx 10 \times$) in MSB. Has to be made freshly (hot buffer), until the paraformaldehyde is dissolved. Then, the stock can be frozen in aliquots.

Fixative

3.7 % (w/v) paraformaldehyde (PFA) in MSB

Phosphate buffered saline (PBS)

8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 0.158 g/l KH_2PO_4 , and 2.31 g/l Na_2HPO_4 [pH 7.3-7.5]

Digestive

1 % macerozyme (Yakuruto), 0.2 % pectolyase (Serva) in MSB

Blocker

0.5 % w/v BSA in PBS

Staining chamber

An Eppendorf tube is sawn between the 0,5- and the 1-ml mark, the cut surface is polished and sealed with a nylon mesh (70 μm width) using Super-Glue. Then, the lid of the tube is cut off.

Antibodies

Antibody dilutions: anti α tubulin 1:100, anti β tubulin (Amersham) 1:100, anti mouse IgG-FITC (Sigma) anti rabbit IgG-FITC (Sigma) 1:15, anti mouse IgG TRITC (Sigma) 1:25, anti rabbit IgG TRITC (Sigma) 1:25.

Toxicology

Paraformaldehyde is irritant. When the stock solution is made, weighing, boiling and aliquotation have to be done under the fume hood. Wear glasses and gloves. It can etch your eyes and skin! To dispose of paraformaldehyde, mix it with 1 % of sodium bisulfite (1:1), which will reduce the paraformaldehyde to methanol, which can be swallowed in the sink.

Procedure

1. Transfer cells in staining basket and remove medium. Fix 30 min at 25°C.
2. Wash in MSB 3 x 5 min, digest 5 min at 20°C in digestive, wash in MSB (no Triton) 3 x 5 min.
3. Block 30 min at 20°C in blocker.
4. Incubate in primary antibody (45 min at 37°C or overnight at 4°C) use 40 μl /sample.
5. Wash 3 x 5 min in PBS.
6. Incubate in secondary antibody (as with the first), wash 3 x 5 min in PBS.
7. Seal with nail polish, store at 4°C until viewing.

Reference

Nick, P., Heuing, A., Ehmann, B. (2000) Plant chaperonins: a role in microtubule-dependent wall-formation? Protoplasma 211, 234-244