

Versuch - Fluoreszente Proteine

Worum geht es bei diesem Versuch?

Fluoreszenz ist die kurzzeitige, spontane Emission von Licht beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie. Generell wird ein Fluorophor (physikalisches System, bei dem Fluoreszenz auftritt) optisch durch die Absorption eines Photons angeregt, verweilt eine bestimmte Zeit im angeregten Zustand und kehrt schließlich unter Aussenden von Licht in seinen Grundzustand zurück.

Fluorophore werden in biologischen Experimenten (Zellbiologie) zur Untersuchung von Aktivität, Bewegung, subzellulärer Lokalisation und Quantifizierung sowie zur Interaktionsanalyse von Zielmolekülen eingesetzt.

Während chemische Fluorophore mittels einer Kopplungsreaktion oder eines Verbindungsglieds an das Zielmolekül gebunden werden, lassen sich fluoreszierende Proteine (FP) wie beispielsweise das grün fluoreszierende Protein (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* durch rekombinante Techniken mit dem Zielprotein fusionieren und *in vivo* exprimieren. Dadurch kann nicht nur die Lokalisation des Zielproteins innerhalb einer Zelle sondern auch die Expression des Zielgens in lebenden Zellen räumlich und zeitlich analysiert werden.

Die Klonierung und Weiterentwicklung des GFP war ein Meilenstein der biologischen Forschung und wurde 2008 mit der Verleihung des Nobelpreises für Chemie an Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Tsien honoriert. Das Original-GFP fluoresziert bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün. Mittlerweile gibt es jedoch diverse modifizierte Versionen des Original-GFP, die andere Fluoreszenzspektren und verbesserte Eigenschaften aufweisen. Entsprechend der Farbe heißen diese zum Beispiel CFP (*cyan fluorescent protein*) oder YFP (*yellow fluorescent protein*). Immer größere Bedeutung bekommen auch fluoreszierende Proteine aus Korallen wie beispielsweise das rot fluoreszierende monomere Cherry, das von DsRed (aus *Discosoma*) abgeleitet wurde. Durch deren Entdeckung und Optimierung konnte die Palette der verfügbaren Farben weit in den roten Spektralbereich ausgedehnt werden. So wird mit Hilfe einer geeigneten Kombination fluoreszierender Proteine die Anfärbung verschiedener Strukturen und Proteine in einer lebenden Zelle möglich, wodurch deren gegenseitige räumliche Beziehung (Co-Lokalisation) analysiert werden kann.

Eine interessante Untergruppe der fluoreszierenden Proteine bilden die photoaktivierbaren Proteine, die eine Schlüsselrolle bei der höchstauflösenden Fluoreszenzmikroskopie spielen und deren Fluoreszenzeigenschaften (Intensität, Wellenlänge) gezielt durch Einstrahlung von Licht bestimmter Wellenlänge gesteuert werden können. Man unterscheidet dabei zwei verschiedene Spezies: Photoschaltbare Proteine können durch Licht bestimmter Wellenlänge reversibel zwischen einem stark fluoreszierenden und einem nicht (oder nur gering) fluoreszierenden Zustand hin und her geschaltet werden. Photokonvertierbare Proteine werden durch lichtinduzierte kovalente Modifikationen irreversibel aktiviert, entweder von einem dunklen zu einem fluoreszierenden Zustand oder durch Veränderung der Emissionswellenlänge des fluoreszierenden Proteins. Beispielsweise verändert das photokonvertierbare Protein EosFP (aus Koralle *Lobophyllia*) bei Anregung mit violett-blauem Licht die Farbe seiner Fluoreszenz von grün nach rot.

Im Rahmen dieses Versuches sollen drei Einsatzmöglichkeiten von FPs in der Zellbiologie exemplarisch vorgestellt werden:

1. FP als Reporter für Promotoraktivität: Wodurch wird ein bestimmtes Gen aktiviert/deaktiviert?
2. FP als Reporter für die subzelluläre Lokalisation: Wo ist ein bestimmtes Protein innerhalb der Zelle lokalisiert?
3. FP als Reporter für Interaktionen: Interagieren bestimmte Proteine miteinander?

Am Anfang eines solchen Versuchs steht prinzipiell die Klonierung des Fusionskonstruktes in einen geeigneten Expressionsvektor. Das Fusionskonstrukt wird schließlich entweder vorübergehend (transient) oder dauerhaft (stabil) durch Einbau in das Genom in die Zelle eingeführt, wo es mit Hilfe der zellulären Proteinmaschinerie hergestellt wird. Für Reporterexperimente werden bevorzugt stabil transfizierte Zellen eingesetzt. Da deren Herstellung ein zeitaufwendiger Prozess ist, werden die in diesem Versuch stabil transfizierten Reporterzellen gestellt. Die transiente Transfektion der Zellen ist nicht so aufwendig, die Transfektionseffizienz variiert aber von Experiment zu Experiment. Es existieren verschiedene Transfektionsverfahren: Calcium-Phosphat-Präzipitation, Lipofektion, Mikroinjektion, Elektroporation usw. In diesem Versuch werden die Fusionskonstrukte mit Hilfe von kationischen Polymeren in die Zelle eingeführt. Dabei interagieren die DNA-Moleküle mit den kationischen Polymeren und bilden positiv geladene Polyplexe, welche mit der negativ geladenen Zellmembran interagieren und vermutlich über Endocytose in die Zelle aufgenommen werden. Im Cytoplasma werden die Polyplexe durch lytische Substanzen freigesetzt und die DNA in den Zellkern transportiert.

1. FP als Reporter für Promotoraktivität

Um die Regulation der räumlichen und zeitlichen Expression eines interessierenden Gens genauer zu untersuchen, werden häufig die regulatorischen Elemente (Promotoren, Enhancer-Elemente) des Gens mit einem Reporter gen (GFP, β -Galactosidase, Luciferase) gekoppelt. Das Reporter gen produziert im Gegensatz zum eigentlichen Gen ein leicht zu messendes optisches Signal, so dass über die Produktion und Lokalisation des Reporters eine Aussage über die Genaktivität getroffen werden kann. Des Weiteren sind Reporterexperimente sehr wichtige Werkzeuge bei der Analyse von Signaltransduktionskaskaden. Viele Signalkaskaden beeinflussen die Genexpression in der Zelle durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche direkt an regulatorische Elemente im Promotor eines Zielgenes binden und dessen Expression induzieren. Wird nun der Promotor eines Zielgenes der interessierenden Signalkaskade mit einem Reporter gen fusioniert, so kann über die Produktion des Reporters die Aktivierung der Signalkaskade nachgewiesen werden (Abb. 1).

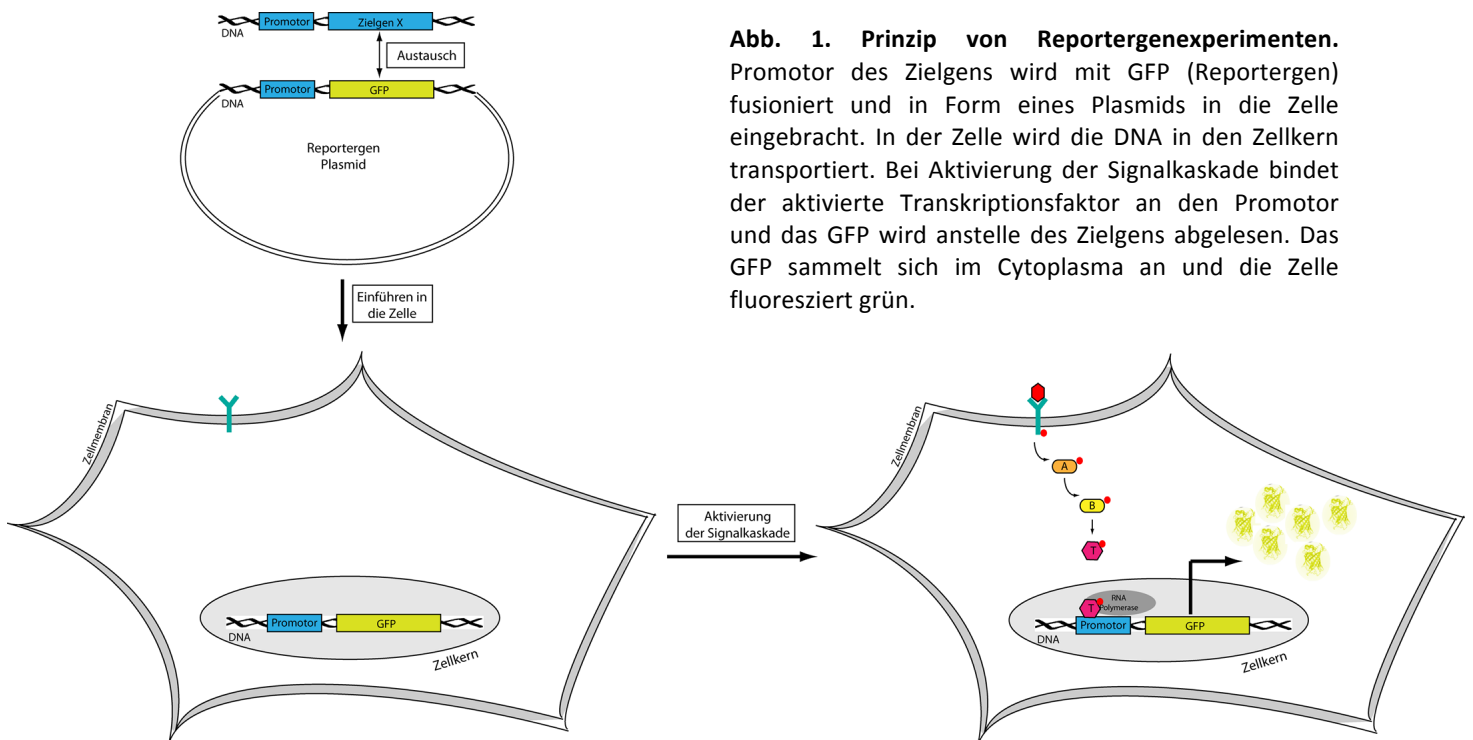


Abb. 1. Prinzip von Reporterexperimenten.

Promotor des Zielgens wird mit GFP (Reporter gen) fusioniert und in Form eines Plasmids in die Zelle eingebracht. In der Zelle wird die DNA in den Zellkern transportiert. Bei Aktivierung der Signalkaskade bindet der aktivierte Transkriptionsfaktor an den Promotor und das GFP wird anstelle des Zielgens abgelesen. Das GFP sammelt sich im Cytoplasma an und die Zelle fluoresziert grün.

Im Rahmen des Versuches werden verschiedene Reporter-genexperimente durchgeführt:

(a) SuperTOPFlash – Wnt-Reportersystem:

Mit Hilfe des SuperTOPFlash wird die Stimulation des Wnt/ β -Catenin-Signalweges nachgewiesen. In diesem Wnt-Reportersystem wird das Reporter-gen mCherry unter der Kontrolle eines für die Bindung des HMG-Box Transkriptionsfaktors Tcf4 optimierten Promotors exprimiert.

Die Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade wird durch Bindung des Liganden (z.B. Wnt3a) an einen Transmembranrezeptor der Frizzled-Familie aktiviert. Dadurch wird im Cytoplasma Dishevelled aktiviert, dass via Phosphorylierung die Glykogen-Synthetase-Kinase-3 β (GSK-3 β) inhibiert. Die Inaktivierung der GSK-3 β beendet die Degradation von ungebundenem β -Catenin im Cytoplasma, so dass β -Catenin in den Zellkern transloziert und durch Bindung an Transkriptionsfaktoren der Lef/Tcf-Familie die Expression der Zielgene aktiviert. Die Lef/Tcfs stellen dabei die DNA-Bindungsdomäne, β -Catenin die Transaktivierungsdomäne. Nur in aktiviertem Zustand der Signalkaskade wird damit das Reporter-gen mCherry exprimiert.

Im Versuch soll die Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade durch die Co-Expression von Dishevelled-GFP aktiviert werden.

(b) Oct4 Stammzellmarker:

Als Model wird die induzierte pluripotente Stamm (iPS) Zelllinie 2F-OK verwendet (siehe Kim et al., *Nature*, 2008). Für die Reprogrammierung wurden cDNAs der Transkriptionsfaktoren Oct4 und Klf4 mit Hilfe eines retroviralen Transfermechanismus in adulte neurale Stammzellen der Maus geschleust (Abb. 2). Die Kopplung von Oct4 an GFP dient als visueller Nachweis (Grünfluoreszenz) des Vorhandenseins von Oct4.

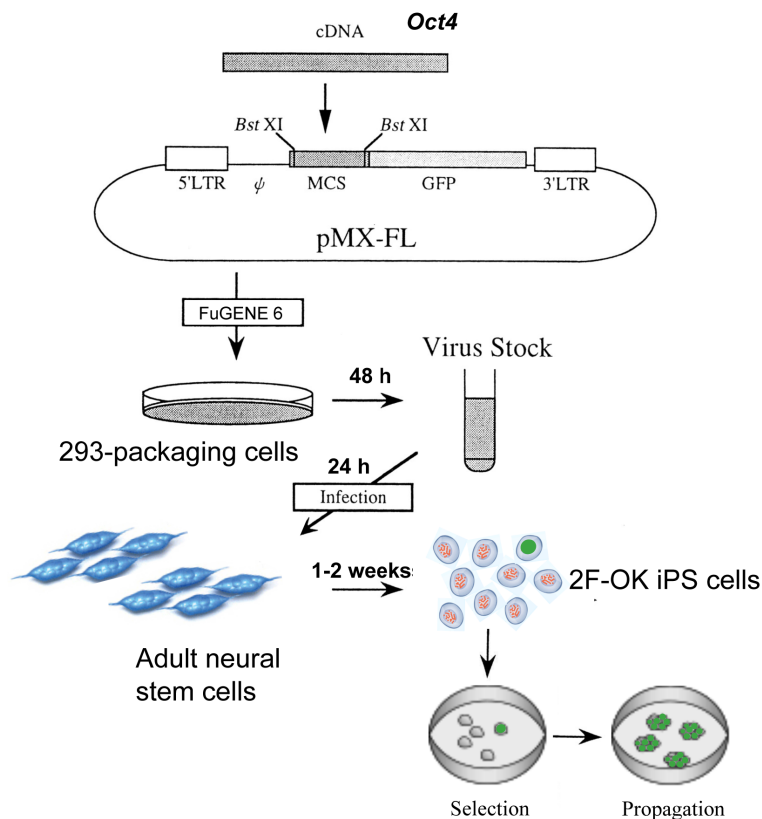


Abb. 2 Prinzip der Reprogrammierung adulter neuraler Stammzellen der Maus am Beispiel von Oct4-GFP.
[Abbildung modifiziert nach Misawa et al., *PNAS*, 2000; Kim et al., *Nature*, 2008]

(b) Herzmuskel-spezifischer Marker

Als Model wird die transgene embryonale Stammzell (ESZ)-linie α -myosin heavy chain (MHC)-eGFP verwendet (siehe Doss et al., *Genome Biology*, 2007). Es wird gezeigt, dass ESZ in Herzmuskelzellen differenzieren. Dabei bilden sie das Sarkomerprotein α MHC aus. Diese Expression wird durch die Kopplung an GFP als Reporter als grüne Fluoreszenz sichtbar. Wildtypzellen differenzieren ebenfalls in Herzmuskelzellen, fluoreszieren jedoch nicht.

2. FP als Reporter für subzelluläre Lokalisation

Eukaryotische Zellen zeichnen sich durch eine höhere Komplexität aus. Sie enthalten ausgedehnte innere Membransysteme, die bestimmte Zellbereiche umschließen und diese vom Rest des Cytoplasmas abtrennen. So entsteht neben einer Vielzahl von Organellen wie Zellkern und Mitochondrien auch ein intrazelluläres Membransystem, an dem die Kernmembran, das ER, der Golgi-Apparat sowie die Plasmamembran beteiligt sind. In diesen Kompartimenten laufen unterschiedliche Prozesse ab (Zellkern: Transkription; Mitochondrien: Energiehaushalt; Lysosomen: Proteinabbau). Deshalb ist die Kontrolle der subzellulären Proteinlokalisierung für die Zelle essentiell. Häufig hängt die Proteinfunktion von der subzellulären Lokalisation ab, denn nur in bestimmten Kompartimenten kommt das Protein mit Interaktionspartnern zusammen und kann mit diesen gemeinsam eine oder mehrere Funktionen erfüllen. Hocheffiziente zelluläre Steuerungs- und Signalprozesse regulieren den gerichteten Proteintransport innerhalb der Zelle. Der Transport und Zugang zu den einzelnen Kompartimenten wird über spezifische Signalsequenzen innerhalb der Polypeptidkette gesteuert. Transportproteine und -rezeptoren erkennen diese Sequenzen und vermitteln die Translokation. Mit Hilfe von fluoreszierenden Proteinen, welche an die zu untersuchenden Proteine gekoppelt sind, kann der Transport und die subzelluläre Lokalisation sichtbar gemacht werden. Die subzelluläre Lokalisation eines Proteins gibt auch Auskunft über die mögliche Proteinfunktion (Abb. 3).

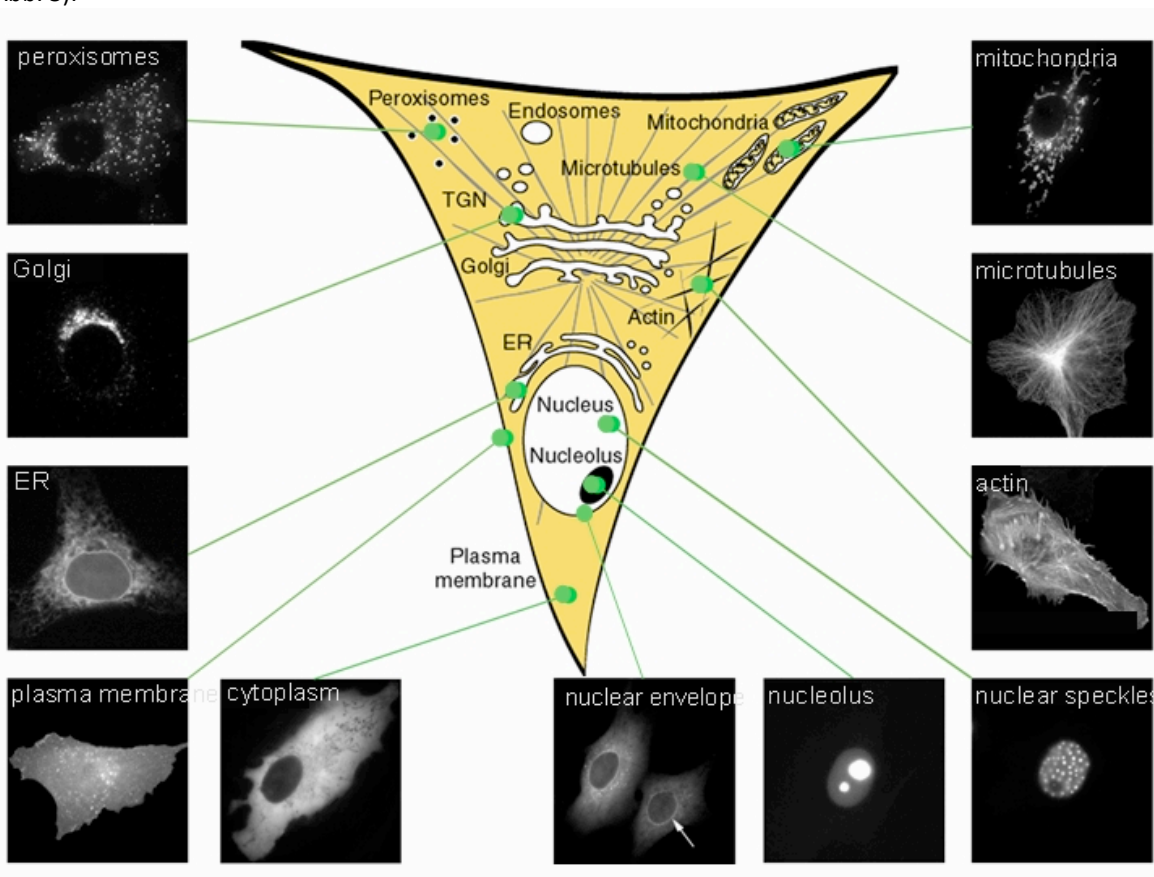


Abb. 3. Die subzelluläre Lokalisation der Proteine gibt Auskunft über die mögliche Proteinfunktion.

[Quelle: <http://www.smp-cell.de/smp-cell/cell.de/pubImages/Localisations.jpeg>; © Jeremy C.Simpson (EMBL)]

Im Rahmen des Versuches wird das unter der Kontrolle des SuperTOPFlash-Promotors stehende mCherry in Form verschiedener Fusionsproteine exprimiert: GAP43-mCherry (Zellmembran), H2B-mCherry (Zellkern) und mCherry (Cytoplasma). Des Weiteren wird ein EosGFP-Konstrukt transfiziert, mit dessen Hilfe der Transport des Proteins innerhalb der Zelle sichtbar gemacht werden kann.

3. FP als Reporter für Proteininteraktionen

Fluoreszierende Proteine werden vermehrt zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt. Die Methode der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) beruht auf der Komplementation zweier Fragmente eines fluoreszierenden Proteins.

Dabei werden die verschiedenen Fragmente des fluoreszierenden Proteins an die zwei zu untersuchenden Proteine mit Hilfe molekularbiologischer Methoden angefügt. Eingesetzt werden üblicherweise Fragmente des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP), welche aus dem N-terminalen bzw. C-terminalen Teil von YFP bestehen (Split-YFP Konstrukte). Kommt es zur Interaktion zwischen den beiden Proteinen, lagern sich die Fragmente des fluoreszierenden Proteins zu einem intakten Gesamtrohprotein zusammen, welches nach Reifung zur Fluoreszenz befähigt ist (Abb. 4). Ein limitierender Faktor der Anwendung ist, dass es trotz der Protein-Protein-Interaktion aus sterischen Gründen zu keiner Komplementation zwischen den Fragmenten kommen kann.

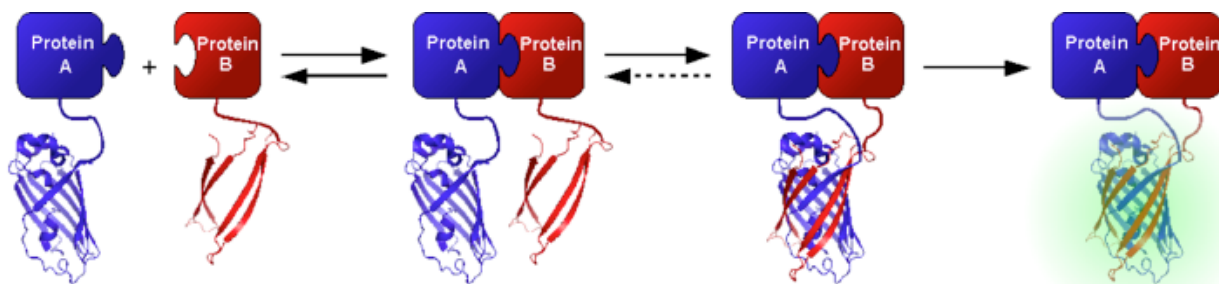


Abb. 4. Prinzip der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC).

[Quelle: http://de.wikipedia.org/wiki/Bimolekulare_Fluoreszenzkomplementation; © S. Jähnichen]

Im Versuch soll die Interaktion zweier Transmembranproteine (xFrizzled7 und xPAPC) nachgewiesen werden. Co-Immunopräzipitationsexperimente haben bereits gezeigt, dass diese über ihre extrazellulären Domänen miteinander interagieren.

Literatur

- Doss MX, Winkler J, Chen S, Hippler-Altenburg R, Sotiriadou I, Halbach M, Pfannkuche K, Liang H, Schulz H, Hummel O, Hubner N, Rottscheidt R, Hescheler J, Sachinidis A (2007) Global transcriptome analysis of murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Genome Biol* **8**(4): R56
- Kerppola TK (2008) Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells. *Annu Rev Biophys* **37**: 465-487
- Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Arauzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M, Scholer HR (2008) Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* **454**(7204): 646-650
- Medina A, Swain RK, Kuerner KM, Steinbeisser H (2004) Xenopus paraxial protocadherin has signaling functions and is involved in tissue separation. *Embo J* **23**(16): 3249-3258
- Misawa K, Nosaka T, Morita S, Kaneko A, Nakahata T, Asano S, Kitamura T (2000) A method to identify cDNAs based on localization of green fluorescent protein fusion products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(7): 3062-3066
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**(12): 1567-1572
- Wiedenmann J, Ivanchenko S, Oswald F, Schmitt F, Rocker C, Salih A, Spindler KD, Nienhaus GU (2004) EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(45): 15905-15910

Versuchsaufbau:

Der Versuch besteht aus drei Teilen, die exemplarisch den Einsatz fluoreszenter Proteine in der Forschung zeigen:

Im ersten Teil wird mCherry/GFP als Reporter für Promotoraktivitäten eingesetzt, welche durch eine intrazelluläre Signalkaskade reguliert werden. Einerseits wird mit Hilfe von Promotoren die Erhaltung bzw. Differenzierung von pluripotenten Stammzellen aufgezeigt. Andererseits wird durch den eingesetzten SuperTOPFlash-Promotor die Aktivierung der Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionskaskade nachgewiesen.

Mit Hilfe des SuperTOPFlash-Promotors wird im zweiten Teil des Versuchs die Möglichkeiten der Kontrolle der subzellulären Proteinlokalisierung vorgeführt. Außerdem wird in diesem Zusammenhang exemplarisch ein EosGFP-Konstrukt transfiziert, welches zur Analyse des Proteintransports herangezogen werden kann.

Im dritten Teil des Versuchs wird YFP als Reporter für Protein-Protein-Interaktionen eingesetzt. Zur Transfektionskontrolle wird zusätzlich eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt.

Zeitplan

Am ersten Tag:

(1) Reporteraktivität und (2) subzelluläre Lokalisationsanalyse:

- Humane HeLa Zellen werden transient mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und auf Deckgläschen ausplattiert.
- Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von iPS Zellen.

(3) Interaktionsanalyse:

- Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von bereits transfizierte XTC Zellen (Froschzellen). (1. Tag)

Am zweiten Tag:

(1) Reporteraktivität und (2) subzelluläre Lokalisationsanalyse:

- Die Zellen werden am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert und ausgewertet.
- Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von differenzierten ES Zellen (Herzmuskelzellen).

(3) Interaktionsanalyse:

- Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von bereits transfizierten XTC Zellen. (2. Tag)

Am dritten Tag:

- Die Zellen werden am Fluoreszenzmikroskop dokumentiert und ausgewertet.

2. Versuchsdurchführung

Lösungen

- Alcianblau-Lösung
1% (w/v) Alcianblau, 1% (v/v) Essigsäure
- APBS
2.7 mM KCl, 0.15 mM KH_2PO_4 , 103 mM NaCl, 0.7 mM $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH mit 10 M NaOH auf 7.5 einstellen
- APBS-T
APBS, 0.1% (v/v) TritonX-100
- DAPI-Stocklösung
1 mg/ml in DMF
- DMEM-Komplettlösung
DMEM (4.5 g/l Glucose), 10% (v/v) FCS, 1% Penicillin/Streptomycin
- Mowiol/DABCO
0.6 g Glycin und 2.4 g Mowiol in 6 ml sterilen H_2O und 12 ml Tris/HCl (pH 7.8) gemäß Herstellerangaben lösen; 25 mg/ml DABCO hinzugeben
- 4% Paraformaldehyd/APBS
4 g Paraformaldehyd bei ca. 55°C (darf 60°C nicht überschreiten!) in 60 ml Aqua bidest. und 200 μl 1 M NaOH lösen und filtrieren, dann 10 ml 10x APBS hinzugeben und mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen; pH mit 1 M NaOH oder HCl auf 7.4 einstellen
- 4% Paraformaldehyd/PBS
4 g Paraformaldehyd bei ca. 55°C (darf 60°C nicht überschreiten!) in 60 ml Aqua bidest. und 200 μl 1 M NaOH lösen und filtrieren, dann 10 ml 10x PBS hinzugeben und mit Aqua bidest. auf 100 ml auffüllen; pH mit 1 M NaOH oder HCl auf 7.4 einstellen
- PBS
137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na_2HPO_4 , 1.5 mM KH_2PO_4 , pH 7.5
- serumfreies DMEM

Arbeitsanweisung

1. GFP als Reporter für Promotoraktivität - embryonale Stammzellen

Es werden stabil transfizierte Zelllinien (2F-OK iPS Zellen bzw. α -MHC-eGFP ES Zellen), Wildtyp ES Zellen sowie murine embryonale Fibroblasten verwendet. Bei den iPS Zellen erfolgt durch IF eine Co-Färbung mit einem weiteren Marker für undifferenzierte Stammzellen (SSEA1). Bereits in Herzmuskelzellen vordifferenzierte α -MHC-eGFP und Wildtyp ES Zellen werden durch IF Färbungen mit weiteren kardialen Markern (Sarkomerproteine Troponin und α -Aktinin; Gap junction Protein Connexin43) charakterisiert.

Fixierung

- Zunächst wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen.
- Anschließend erfolgt die Fixierung mit **4% PFA** für 20min. bei RT.
- Die Zellen müssen mit dem Fixanz nur bedeckt sein.

Waschen

- Nach der Inkubation erfolgt das Spülen mit PBS (3x).

Block

- Geblockt wird mit 1% BSA in PBS für 45min. bei RT. Deckgläschen (DG) müssen nur bedeckt sein.
- Während dieser Zeit werden die 1. Antikörper verdünnt.
- Nach der Inkubationszeit werden die DG vorsichtig abgetupft.

Inkubation 1. AK

- Die 1. AK werden in 1% BSA/PBS verdünnt (=Blocklösung). Nun wird der 1. AK (μ l pro DG) auf die DG pipettiert.
- Inkubiert wird bei 37°C oder RT für ca. 1h.
- Während dieser Zeit werden die Verdünnungen der 2. AK hergestellt.

Waschen

- Nach der Inkubation werden die DG 3x mit PBS gewaschen und abgetupft.

Inkubation 2. AK

- Die 2. AK (Cy3) werden ebenfalls in 1% BSA/PBS verdünnt.
- Nun wird der 2. AK (μ l pro DG) auf die DG pipettiert.
- Inkubiert wird bei RT für ca. 1h in Dunkelheit.
- Währenddessen müssen die Objektträger vorbereitet werden. Diese werden zunächst in einem Ether/Ethanol (1:1) Gemisch dann mit A. bidest. gewaschen. Nun werden sie möglichst fusselfrei abgetrocknet und beschriftet.
- Nach der Inkubation werden die DG abgetupft und mit einem Tropfen DAPI-Lösung versetzt. Inkubation erfolgt ebenfalls in Dunkelheit für 5min. bei RT.

Waschen und Einbettung

- Anschließend werden die DG zuerst 2x mit PBS danach 2x mit A. bidest. gewaschen, abgetupft und mit der Zellseite nach unten auf einen Objektträger mit Mounting Medium (Vectashield) platziert. Nach dem Trocknen wird der Rand des DG noch mit Nagellack abgedichtet. Aufbewahrung der Objektträger erfolgt bei 4°C bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop.

2. mCherry als Reporter für Promotoraktivität und subzelluläre Lokalisation – humane Zellen

Es werden humane HeLa Zellen transient mit verschiedenen SuperTOPFlash-Promotorkonstrukten (Wnt-Reporter) transfiziert. Die Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade erfolgt durch die Co-Transfektion von Dishevelled-GFP. Des Weiteren wird exemplarisch ein photokonvertierbares Dishevelled-EosGFP Konstrukt transient transfiziert.

Transfektion der HeLa Zellen mittels TransPass Transfektionsreagenz

- zunächst folgende Transfektionsgemische in 2ml Reaktionsgefäße ansetzen – dabei die Reihenfolge beachten:

	1	2	3	4
serumfreies DMEM-Medium	500 µl	500 µl	500 µl	500µl
SuperTOPFlash-mCherry	3 µg	-	-	-
SuperTOPFlash-GAP43-mCherry	-	3 µg	--	-
SuperTOPFlash-H2B-mCherry	-	-	3 µg	-
Dishevelled-GFP	3 µg	3 µg	3 µg	-
Dishevelled-EosGFP	-	-	--	3 µg
TransPass Reagenz	12 µl	12 µl	12 µl	12 µl

- Transfektionsgemische 20-30 min. bei RT inkubieren
- transfiziert werden 60-75% konfluente HeLa Zellen
- kurz bevor das Transfektionsgemisch auf die Zellen gegeben wird, wird das alte Medium abgesaugt und mit 3 ml frischen DMEM-Komplettmedium ersetzt
- Transfektionsgemisch vorsichtig auf die Zellen geben
- 3 Std. bei 37°C und 7% (v/v) CO₂ inkubieren

Deckgläschen beschichten

- pro Kammer einer 6Well-Platte drei sterile Deckgläschen geben, kurz mit 1x PBS waschen und mit je einem Tropfen Alcianblau-Lösung 20 Minuten bei RT inkubieren
- Deckgläschen gründlich 2x mit 1x PBS waschen
- 2 ml DMEM-Komplettmedium pro Kammer vorlegen

Zellen splitten und ausplattieren

- DMEM-Komplettmedium aus der Kulturflasche der transfizierten HeLa Zellen absaugen
- Zellen einmal mit 1x PBS waschen
- 1x PBS absaugen und ca. 800 µl Trypsin/EDTA pro Flasche hinzugeben
- Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop verfolgen
- je 3 ml DMEM-Komplettmedium hinzugeben und 1 ml der Zellen in eine Kammer der 6Well-Platte geben
- 24 Std. bei 37°C und 7% (v/v) CO₂ inkubieren

Dokumentation

- Zellen am Fluoreszenzmikroskop dokumentieren und auswerten

3. YFP als Reporter für Protein-Protein-Interaktionen - Froschzellen

Die mit den entsprechenden Split-YFP Konstrukten transient transfizierte XTC Zellen (Fibroblastenzelllinien aus dem Krallenfrosch *Xenopus laevis*) müssen zur Transfektionskontrolle einer indirekten gegen das Myc-Epitop gerichteten Immunfluoreszenzfärbung unterzogen werden.

Vorbereitung

- XTC Froschzellen werden mit folgenden Konstrukten transient transfiziert und auf mit Alcianblau-beschichteten Deckgläschen ausgesät:
 - **xPAPC-myc-YC155 + xFz7-TM1-myc-YN155**
 - **xPAPC-myc-YC155 + fl-xFz7-myc-YN155**
- die transfizierten XTC Froschzellen werden vom Institut/Betreuer gestellt

Indirekte Immunfärbung gegen das Myc-Epitop – wichtig: erfolgt die ganze Zeit im Dunkeln!

- DMEM-Komplettmedium absaugen
- Zellen dreimal 5 min. mit 1x APBS/0.5mM CaCl₂ waschen
- Fixierung der Zellen 10 min. mit 4% Paraformaldehyd/APBS bei RT
- Zellen dreimal 5 min. mit 1x APBS waschen
- Deckgläschen einzeln in eine 24Well-Platte (feuchte Kammer) überführen
- Permeabilisierung der Zellen 5 min mit 1% TritonX/APBS bei RT
- Zellen zweimal 5 min. mit 1x APBS-T waschen
- Blockierung der Zellen 30 min mit 20% Pferdeserum/APBS-T bei RT
- Inkubation mit primären Antikörper (Zellkulturüberstand 9E10) über Nacht bei 4°C
- Zellen dreimal 5 min. mit 1x APBS-T waschen
- Blockierung der Zellen 30 min mit 20% Pferdeserum/APBS-T bei RT
- Inkubation mit sekundären Antikörper (Cy3-gekoppelter GαM 1:400 in 20% Pferdeserum/APBS-T verdünnt) 45-60 min bei 37°C
- Anfärben der Zellkerne mit DAPI-Färbelösung (Stocklösung 1:1000 in 1xAPBS-T verdünnt) max. 3-4 min. bei RT
- Zellen dreimal 5 min. mit 1x APBS waschen
- Zellen mit Mowiol/DABCO auf einem Objektträger eindeckeln und über Nacht bei 37°C trocknen

Dokumentation

- Zellen am Fluoreszenzmikroskop dokumentieren und auswerten