

Versuch Immunfluoreszenz

Darstellung des Mikrotubuli-Zytoskeletts

(N. Zekert, E. Poth, N. Requena, J. Kämper
und R. Fischer)

1. Worum geht es bei diesem Versuch?

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 gemausert. An einem Beispiel (Darstellung der Mikrotubuli) soll diese Methode vorgestellt und zur Klärung einer biologischen Fragestellung eingesetzt werden. Als Organismus verwenden wir den filamentösen Ascomyceten *Aspergillus nidulans*.

Die Mikrotubuli sind ein zentrales Element des pilzlichen Zellskeletts und üben vielfältige Funktionen aus. Cytoplasmatische Mikrotubuli sind in den extrem polarisierten Pilzhypen in Längsrichtung ausgerichtet und erscheinen als lange Fasern in den Kompartimenten. Sie dienen dem Langstreckentransport von Vesikeln, Organellen, RNA und Proteinen. Während der Mitose werden die cytoplasmatischen Mikrotubuli disassembliert und die Tubulindimere zum Aufbau der Mitosespindeln verwendet. Die Mitose ist bei den Ascomyceten „geschlossen“, d.h. die Zellkernmembran wird nicht wie bei höheren Eukaryoten abgebaut, sondern bleibt erhalten. Die Mikrotubuli der Mitosespindel erscheinen als ein Stäbchen, was sich während der Anaphase stark verlängert. Das wachsende vorderste Hyphenkompartiment enthält mehrere Zellkerne, die sich synchron teilen.

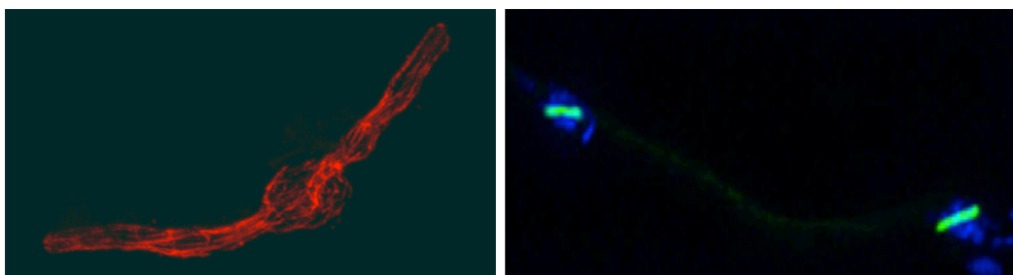


Abbildung: Darstellung der Mikrotubuli im filamentösen Pilz *A. nidulans*. Links: Die Spore hat zwei Keimschläuche gebildet. Die Mikrotubuli der Interphase sind dargestellt. Die Färbung erfolgt mit Cy3-markierten Zweitantikörpern. Rechts: Zwei synchron ablaufende Mitosen in einem Hyphenkompartiment. Die DNA wurde mittels DAPI sichtbar gemacht, die Mikrotubuli mit FITC-markierten Zweitantikörpern. (Bilder: Nadine Zekert, Natalia Requena)

2. Wie ist der Versuch aufgebaut?

Ausgangspunkt ist der *A. nidulans* Stamm FGSC26. In den Hyphen, werden die Mikrotubuli über Immunfluoreszenz visualisiert und fluoreszenzoptisch untersucht. Zur Analyse von vegetativen Hyphen und Keimlingen, werden Sporen des Pilzes auf sterilen Deckgläsern angeimpft und einige Stunden ausgekeimt. Die gekeimten Hyphen werden mit Formaldehyd fixiert und anschliessend die chitinhaltigen Zellwände enzymatisch abgebaut, so dass die Antikörper penetrieren können. Jetzt werden die Hyphen mit dem anti-alpha-Tubulin Primärantikörper inkubiert. Nach dem Auswaschen der nichtgebundenen Antikörper werden die Hyphen mit einem geeigneten fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper inkubiert, nach einiger Zeit wieder die nichtgebundenen Antikörper entfernt und schliesslich mikroskopiert.

Zeitplan:

- 1. Tag:** Herstellen von Puffern.
Animpfen von Deckgläsern zur GFP Beobachtung (GFP-markierten Stämme).
Animpfen von Deckgläsern für Immunfluoreszenz Experiment (FGSC26).
- 2. Tag:** Fixierung der Keimlinge.
Enzymatischer Verdau der Zellwände.
Inkubation mit dem Primärantikörper über Nacht.
Fluoreszenzmikroskopie für die Lebendbeobachtung von GFP-markierten Stämme.
- 3. Tag:** Inkubation mit dem Sekundärantikörper.
Einbetten der Proben und Fluoreszenzmikroskopie.

Arbeitsanweisungen und Protokolle

Immunfärbung

Needed

Pasteur pipettes, Pasteur pipette bulb, forceps, Bunsen-burner, cover slips and microscope slides, Petri dishes, sterile Minimal medium.

Solutions

Fixative (92.6 ml)

200mM	PIPES	PH6.7 with 10N NaOH	50ml (prepare under exhaust hood!)
500mM	EGTA	PH8.5 with 10N NaOH	10ml (prepare under exhaust hood!)
1 M	MgSO ₄		1 ml
	DMSO		10 ml
	Formaldehyde (37%)		21.6 ml

10X Phosphate buffered saline (PBS) (1L),

80 g NaCl, 2 g KCl, 14.4 g Na₂HPO₄, 2.4 g KH₂PO₄
 With 800ml H₂O, PH 7.4, then fill up to 1000ml, autoclave.
 Prepare (1L) **1X PBS**

NaCitrat (50mM, pH 5.8), prepare 50 ml

NaCitrat (100mM, pH 4.5), prepare 50 ml

Digestion solution (5 ml)

Driselase	100 mg	(solved in 600µl 50 mM sodium citrate pH 5.8)
Zymolyase	20 µl	(5U/µl)
GlucanX	800 mg	(solved in 1 ml 50 mM sodium citrate pH 5.8)
β-D Glucanase	40 mg	(solved in 400 µl 100 mM sodium citrate pH 4.5), heating at 55°C for 5min, then incubating on ice 30min to reduce protease activity).

Collect all enzymes together and fill with 50 mM sodium citrate pH 5.8 to 2,5 ml. Add 2,5 ml egg white and vortex (**egg white** could be aliquoted and frozen at -20°C).

10X TBS (1L),

20mM Tris/HCl, pH 7.6	(24.2 g/l)
137mM NaCl	(80 g/l)

1X TBST (1L)

1XTBS + 0.1% Tween 20 (1 ml/l)

Blocking solution (100 ml)

1XTBST + 5% skim milk (5 g/100 ml)

Mounting media with DAPI from VECTASHIELD.

3l ddH₂O autoklavieren

Minimal medium for *A. nidulans* growth

50 ml Salt stock solution; 1 ml Microelement stock solution; 20 g Glucose; adjust to

pH 6.5 using 10 N NaOH (plus the auxotroph markers).

Antibodies

Antibody dilutions: First antibody: anti alpha tubulin (DM1A + TUB-1A2, 1:1). Second antibody: anti mouse IgG-FITC (Sigma).

Toxicology

Formaldehyde 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!

Methanol is extremely toxic. If ingested, as little as 10 ml can cause permanent blindness and as little as 60 ml can result in death.

Procedure for germlings

- place flamed and sterile cover slips on bottom of petri dish
- add 450 µl microscope medium (with glucose as C-source)
- Inoculate with 10^3 spore/ml, let it grow for 12-24 hours at RT (prepare therefore a 10µl spore suspension, add one drop of the suspension on each coverslip).
- Remove media and add **immediately** fixation solution, incubate at RT for **30 min** (not longer!)
- Three 10min washes in 1XPBS. In the last washing step the coverslip should be carefully dipped into the buffer, hanging buffer dripped into towels. Switch to a new petri dish.
- Incubate with 200 µl digestion solution for 1h at RT (Driselase is insoluble that's why you have to mix the digestion solution permanently before using. If necessary cover with parafilm on top of the cover slips).
- Three 10 min washes in 1XPBS at RT. In the last washing step the coverslip should be carefully dipped into the buffer, hanging buffer dripped into towels. Switch to a new petri dish.
- 10 min (**exactly**) incubation at -20°C in -20°C **precooled** methanol.
- Two 5 min washes in 1XPBS. In the last washing step the coverslip should be carefully dipped into the buffer. Switch to a new petri dish.
- 15 min incubation in blocking solution (1XTBST + 5% skim milk). Switch to a new petri dish.
- First antibody over night at 4°C , anti-tubulin 1:500 in (1XTBST + 5% skim milk), cover with parafilm on top of the cover slips.
- Four 10 min washes with 1XTBST. In the last washing step the coverslip should be carefully dipped into the buffer, hanging buffer dripped into towels.

Switch to a new petri dish.

- Second antibody at RT for 1 h. FITC antimouse 1:100 in TBST.
- Four 10 min washes with 1XTBST. In the last washing step the coverslip should be carefully dipped into the buffer, hanging buffer dripped into towels.
- Mount on microscope slide above a drop of mounting media (about 10 μ l).
- Seal with nail polish, it has to be completely sealed up! store at 4°C until viewing.

Reference

Zekert, N. & Fischer, R. (2009) The *Aspergillus nidulans* kinesin-3 UncA motor moves vesicles along a subpopulation of microtubules. *Mol. Biol. Cell*, 20:673-684.

Versuch Fluoreszente Proteine

1. Worum geht es bei diesem Versuch?

Nachdem inzwischen die Genome wichtiger Modellorganismen (Hefe, *Aspergillus*, *Arabidopsis*, Reis, *Drosophila*, *Caenorhabditis*, Maus, Mensch) 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 sollen in dem Versuch exemplarisch vorgestellt werden.

Bevor man die fluoreszenten Proteine beobachten kann, müssen die entsprechenden DNA-Konstrukte in die Zellen eingeführt werden. Dies kann entweder stabil erfolgen oder aber nur vorübergehend (*transient*). In dem filamentösen Pilz *Aspergillus nidulans* wird die Protoplastentransformation verwendet, um stabile Transformaten herzustellen. Dazu werden die Zellwände verdaut, die Protoplasten isoliert und mit der zu transformierenden DNA inkubiert. Die DNA wird in Gegenwart von Polyethylenglycol in die Zellen aufgenommen, gelangt in den Zellkern und wird dort meistens nicht-homolog in das Genom integriert. Dadurch wird die Fremd-DNA bei jeder DNA-Replikation mit dupliziert und damit weitervererbt.

Um die Frage nach der Expression eines Genes zu lösen, wird dessen Promotor mit GFP fusioniert. Das lernen wir am Beispiel einer alpha-Glucanase, die spezifisch während der sexuellen Entwicklung des Pilzes nur in den „Hüllezellen“ exprimiert wird.

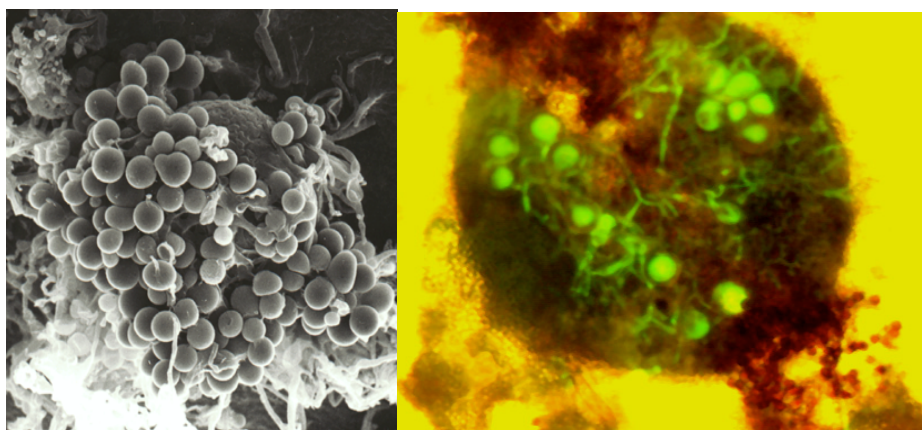


Abbildung 1: links: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines jungen Cleistotheciums von *A. nidulans*. Das Cleistothecium ist von dickwandigen Hüllezellen umgeben **rechts:** Promotorfusion einer 1,3 alpha-Glucanase (Mutanase) mit GFP. Das Gen wird nur in den Hüllezellen und den sie verbindenden Hyphen exprimiert.

Um die Frage der subzellulären Lokalisierung eines Proteins zu klären, wird alpha-Tubulin (pNZ64) und der C-Terminus eines Transkriptionsfaktors (*A. nidulans* StuA) (pRS31) mit GFP fusioniert.



Abbildung 2: oben: Ausgekeimte Spore mit GFP-markierten Mikrotubuli. Unten: Hyphenkompartiment mit GFP-gefärbten Zellkernen. Bilder: Nadine Zekert

2. Wie ist der Versuch aufgebaut? (nur die Mikroskopie wird durchgeführt)

GFP wird als Reporter für Proteinlokalisierung eingesetzt. Alpha Tubulin und StuA wurden mit GFP N-terminal getaggt. Die entsprechenden DNA-Konstrukte liegen vor und müssen in *A. nidulans* transformiert werden.

Zeitplan:

1. Tag: Protoplastentransformation mit beiden Plasmiden.
2. Tag: Animpfen von Medium auf Deckgläschen mit den Sporen der Transformanten.
3. Tag: Fluoreszenzmikroskopie.

Arbeitsanweisungen und Protokolle

(Transformation wird aus Zeitgründen nicht selbst durchgeführt)

Protoplastentransformation
by Fischer & Liese, adapted by Requena

Medien und Medienzusätze

Minimal medium (MM)

50 ml Salt stock solution; 1 ml Microelement stock solution; 20 g Glucose; (for Protoplast add 0.6M KCl) adjust to pH 6.5 using 10 N NaOH.

20 x Salt stock solution

120 g NaNO₃; 10.4 g KCl; 10.4 g MgSO₄ x 7H₂O; 30.4 g KH₂PO₄.

1000 x Microelement stock solution:

22 g ZnSO₄ x 7H₂O; 11 g H₃BO₃; 5 g MnCl₂ x 4H₂O; 5 g FeSO₄ x 7H₂O; 1.6 g CoCl₂ x 5H₂O; 1.6 g CuSO₄ x 5H₂O; 1.1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄ x 4H₂O; 50 g Na₄EDTA; adjust to pH 6.5-6.8 using KOH

Table 3.6 Vitamins, amino acids and medium components

Component	Stock Concentration	Volume per liter
Pyridoxin-hydrochloride	0.1 %	1 ml
Uracil		1 g
Uridine		1.2 g

Microscopy Minimal medium (MM)

50 ml Salt stock solution; 1 ml Microelement stock solution; 20 ml Glycerol; adjust to pH 6.5 using 10 N NaOH.

Puffer und Lösungen für die Protoplastentransformation

Mycelium wash	0.6 M MgSO ₄
Osmotic medium	1.2 M MgSO ₄ , 10 mM Na-P-buffer pH5.8
Trapping buffer	0.6 M Sorbitol, 0.1M TrisCl pH 7.0
STC (1x)	1.2 M Sorbitol, 10 mM CaCl ₂ , 10 mM TrisCl pH 7.5
PEG	60% PEG4000, 10 mM CaCl ₂ , 10 mM TrisCL pH 7.5

Durchführung

Everything under sterile conditions.

Clean the bench with 70 % ethanol, as well as your hands.

To open the flask: flame the neck and top of the closed flask, then open the lid and flame once more the opening of the flask.

Herstellung der Protoplasten

- Pre-culture from plate or conidiophore suspension (strain TN02A3)
- Inoculate liquid medium (500 ml) and incubate O/N (12-16 h) 30°C in the waterbath
- Filter the culture through sterile miracloth using the porcelain funnel. Wash with wash solution. Collect with a little spoon (steril!)
- Set 1g mycelium in a 100 ml sterile Erlenmeyer flask with 5 ml of osmotic medium (careful not to overexces the volume because then it is difficult that protoplasts can migrate through upwards)
- Add GlucanX, 180 mg dissolved in 1 ml ddH₂O and incubate on ice for 5 minutes.
- Add BSA (10 mg dissolved in 0.5 ml of sterile water), swirl and incubate in shacker for 1 (-2)h @30°C with gentle shaking 70 rpm. Check at the microscope
- Transfer to a sterile 50 ml falcon and overlay with 10 ml trapping buffer carefully and slowly close to the surface of the liquid
- Centrifuge 15 minute @ 5000 rpm, 4°C in HP-6 rotor (free swing), (be careful: slow accelerations!!)
- If you see a band of protoplast collect it with a sterile pasteur pipette and transfer to a sterile 15 ml corex tube and add STC (fill the whole tube up to 12 ml)
- Centrifuge @ 7000 rpm, 4°C for 10 minutes
- Remove the supernatant, add gently 2 ml of STC without resuspending the pellet and remove it again
- Resuspend the pellet in the remaining drop (ca. 100-200 µl). Take 10 µl and count the cells in the counting camera
- Dilute the protoplast to an appropriate concentration of 10⁶ prot/100 µl

Transformation

- 100 μ l pf protoplast (10^6)
- 100 μ l of DNA (approx. 10 μ g of DNA filled with 1x STC*)
* If vol of DNA > 10 μ l add same volume of 2x STC and fill up to 100 μ l with 1xSTC
- 25 minutes incubation at RT (in a falcon tube)
- Add 2 ml of PEG and roll the tube until it looks homogenous
- 20 minutes incubation @ RT
- Add 8 ml of STC and roll it again until total homogenization
- Spread different volumes on appropriate plates (MM+KCl) + appropriate markers (in our case no marker is needed), Incubate 3 days @37°C and then pick for the microscopy.

Microscopy

- Flamed and sterile cover slips on bottom of petri dish, add 0.4 ml MM glycerol on top
- With sterile toothpicks pick the colonies, and put some spores into media, another copy will be taken on small minimal media plate (after making marks with raster plate) grow for 12-24 hours at RT before microscopy

Karten der verwendeten Plasmide

