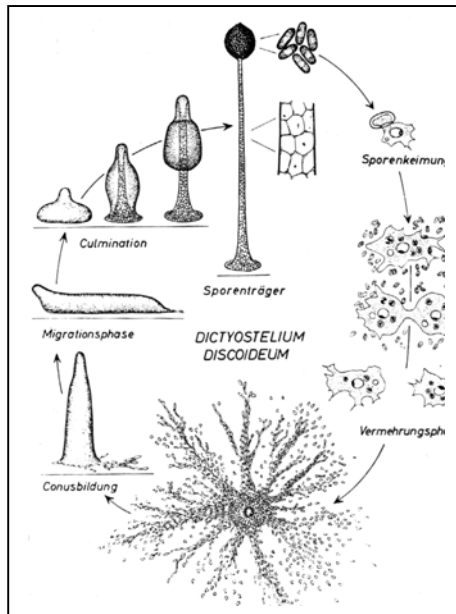


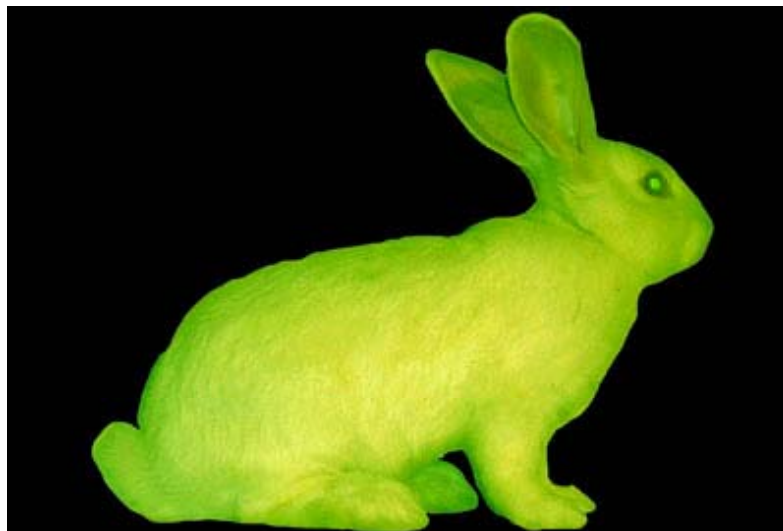
Science Bridge

Zelldifferenzierung in einem einfachen Organismus



G. Gerisch, MPI Martinsried

Grün fluoreszierendes Protein:
Anwendungen und Aufreinigung von GFP



Eduardo Kac

Inhalt

- Allgemeines
- Sicherheitsbelehrung
- Theorie: Modellorganismus *Dictyostelium*, Lebenszyklus, Entwicklung, Forschung
- Theorie: Biochemie von GFP
- Praxis: *Dictyostelium* Entwicklung (auch für Schulen ohne S1 Labor geeignet)
- Praxis: Untersuchung GFP-transformierter *Dictyostelium*zellen
- Praxis: Untersuchung β -Gal transformierter *Dictyostelium*zellen (auch für Schulen ohne S1 Labor geeignet)
- Praxis: Isolierung von GFP aus rekombinanten *E. coli* (nur für S1)
- Theorie: weitere GFP-Anwendungen

Kursbetreuer und Mitarbeiter bei der Vorbereitung:

Violetta Schäfer
Carlo Klein
Alexander Bruch
Sarah Schüßler
Anna Felicia Lopez
Doreen Meier
Sonja Kasten
Sonja Fuhrmann

Hinweis:

Weitere Materialien wie Arbeitsblätter und erläuternde Skripten stehen teilweise frei auf der Science Bridge Webseite (www.sciencebridge.net) zur Verfügung. Einige Materialien sind nur für Science Bridge Mitarbeiter freigeschaltet.

Allgemeines

Science Bridge ist ein gemeinnütziger eingetragener Verein, der sich aus Mitgliedsbeiträgen und Kursgebühren finanziert. Wir bitten Sie deshalb um Verständnis, das Science Bridge Angebote Geld kosten! Nur so konnten wir seit mehr als 15 Jahren unsere Leistungen erhalten und weiterentwickeln. Sie können Science Bridge durch Ihre Mitgliedschaft (30€/Jahr) unterstützen. Sie erhalten dafür Ermäßigungen für Kits der Firma Febikon, für Kursen und andere Veranstaltungen sowie freien Zugang zu allen Lehrmaterialien über die Webseite. Nichtmitglieder können sich im Forum auf der Science Bridge Webseite registrieren. Sie erhalten Zugang zu einem Teil der Lehrmaterialien und werden durch unseren Newsletter informiert. Das Forum steht Ihnen zum Austausch von Ideen und für eigene Ankündigungen zur Verfügung.

Dieser Kurs gibt Ihnen Einblicke und Anregungen in die Entwicklung von *Dictyostelium discoideum*, einem einfachen, fakultativ vielzelligen Organismus. *Dictyostelium* ist mit etwas Übung leicht zu kultivieren und kann für viele Schulexperimente eingesetzt werden: im Mikroskop können amöboide Zellen beobachtet werden, die durch Hunger induzierte Entwicklung zum Vielzeller ist innerhalb von 24 Stunden abgeschlossen und verschiedene Entwicklungsstadien können im Binokular untersucht werden. Bei der Entwicklung findet eine Zelldifferenzierung statt, die ebenfalls mikroskopisch untersucht werden kann. Für Arbeiten mit lebendigen transgenen *Dictyostelium*zellen (z.B. GFP-Zellen) ist ein S1 Labor erforderlich. Wir versuchen zurzeit beim Regierungspräsidium die Freigabe von bestimmten Stämmen für die Schule zu erreichen. Alternativ zu GFP kann jedoch auch β -Galactosidase als Marker verwendet werden. Dazu haben wir fixierte Dauerpräparate, die auch in der Schule verwendet werden dürfen. Auch für eine Einführung in die Bioinformatik ist *Dictyostelium* sehr gut geeignet: das gesamte Genom ist bekannt (www.dictybase.org) und kann mit frei zugänglichen Programmen bearbeitet werden (siehe auch Science Bridge Kursmaterial Bioinformatik).

Sicherheitsbelehrung

Sicherheit beim Umgang mit Organismen der Gentechnik-Sicherheitsstufe 1

Die Gentechnik-Sicherheitsstufe 1 ist dadurch definiert, dass gentechnisch veränderte Organismen dieser Stufe keine Gefahr für Mensch und Umwelt darstellen. Die Tatsache, dass es dennoch ein umfassendes Regelwerk gibt, wird sehr kontrovers diskutiert. Für den heutigen Kurs gelten die folgenden Regeln:



- Fenster und Türen während der Experimente geschlossen halten
- nicht essen, trinken, rauchen, schminken, schnupfen
- vor dem Verlassen des Labors Hände waschen
- alle S1 Organismen müssen inaktiviert werden
- alle Materialien, die mit S1 Organismen in Berührung gekommen sind, müssen inaktiviert werden, dazu stehen Abfallbehälter bereit, die mit „S1“ beschriftet sind
- wenn während der Versuche Zellmaterial auf der Arbeitsfläche verschüttet wird, hilft Ihnen ein Betreuer bei der Dekontamination

Wenn Sie an Ihrer Schule ein S1 Labor einrichten wollen, sind umfangreiche Anmeldeformalitäten sowie der Nachweis langjähriger Erfahrung in Molekularbiologie erforderlich. Wir beraten Sie gerne!

Weitere Maßnahmen zur Laborsicherheit

Die als Futterquelle verwendeten Bakterien (ein Stamm von *Klebsiella aerogenes*) unterliegen mikrobiologischen Sicherheitsbestimmungen. Platten sind, wenn immer möglich, geschlossen zu halten. Wenn sie nicht mehr benötigt werden, sind sie durch Autoklavieren zu entsorgen.

Beachten Sie beim Ausziehen von Glaspipetten, dass das Glas einige Zeit sehr heiß bleibt. Objektträger sind mitunter scharfkantig. Arbeiten Sie vorsichtig und vermeiden Sie Schnittverletzungen. Entsorgen Sie Glasabfälle in den entsprechenden Abfallbehältern. In Fluoreszenzmikroskopen wird UV Licht verwendet. Schauen Sie nicht mit ungeschützten Augen in die Lichtquelle!

Im Kurs werden keine Chemikalien verwendet, die unter Normalumständen gesundheitsgefährlich sind. Befolgen Sie die Anweisungen der Betreuer.

Benutzen Sie Geräte nur nach den Anweisungen der Betreuer. Fehlbedienung kann zu kostspieligen Schäden und zu Verletzungsgefahr führen.

Theorie: Modellorganismus *Dictyostelium*, Lebenszyklus und Entwicklung

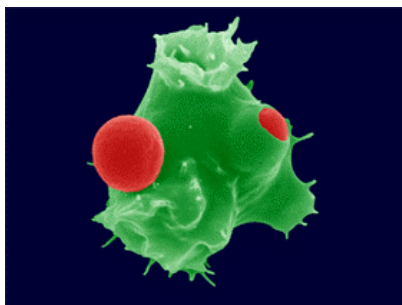
Allgemeines

Dictyostelium discoideum ist ein einzelliger amöboider Bodenbewohner der sich von Bakterien und anderen Mikroorganismen, z.B. Hefen ernährt (vegetatives Stadium, Wachstumsstadium). Wenn die Nahrungsquelle erschöpft ist (Hungersignal), bilden die ursprünglich gleichartigen, individuellen Zellen ein multizelluläres Aggregat, in dem Zelldifferenzierung, biologische Musterbildung, differentielle Genexpression und etliche andere Charakteristika vielzelliger Organismen verwirklicht werden (Entwicklungsstadium).

Im Laufe von 24 Stunden differenziert das Aggregat über eine Reihe morphologisch gut definierter Zwischenstadien zu einem Fruchtkörper, der im wesentlichen aus zwei Zelltypen besteht: den absterbenden, vakuolisierten Stielzellen und den Sporen, die Dauerformen (keine meiotischen Produkte!) darstellen. Bei günstigen Umweltbedingungen keimen die Sporen aus und entlassen vegetative Amöben.

Wachstum und Entwicklung auf Bakterienrasen

*Dictyostelium*zellen werden im Labor auf Agarplatten (SM-Agar) mit einem Bakterienrasen (*Klebsiella aerogenes*) gehalten. Die Zellen fressen die Bakterien und vermehren sich mit einer Verdoppelungsrate von ca. 3 Stunden. Sie bilden dabei einen bakterienfreien Hof, in dem die Entwicklung beginnt. Am Rande der Kolonie steht aber noch Nahrung zur Verfügung. Die Kolonien zeigen demnach von außen nach innen fortschreitende Entwicklungsstadien.



Dictyosteliumzelle, die zwei rot gefärbte Hefezellen phagozytiert (Photo: Maniak, Abt. Zellbiologie, Univ. Kassel)

Die Laborstämme (Ax2 und Derivate davon) sind nicht mehr auf „feste“ Nahrung angewiesen, sondern können auch in einem „axenischen“ (bakterienfreien) Nährmedium (HL5-Medium) wachsen. Die Zellen werden entweder in einem Erlenmeyerkolben geschüttelt (220rpm) um sie mit ausreichend Sauerstoff zu versorgen, oder sie wachsen angeheftet auf Petrischalen unter 3 bis 5mm Flüssigmedium. Die Oberfläche ist ausreichend groß um über Diffusion genügend Sauerstoff im Medium zu haben. Zellen nehmen die Flüssignahrung durch Pinozytose auf. In

axenischem Medium haben die Zellen eine Verdopplungszeit von ca. 8 Stunden. In einer Schüttelkultur wachsen die Zellen bis zu einer Dichte von $2 - 4 \times 10^6$ Zellen pro Milliliter. Danach sterben sie wegen zu hoher Dichte und zu hoher Konzentration an Abfallstoffen ab.

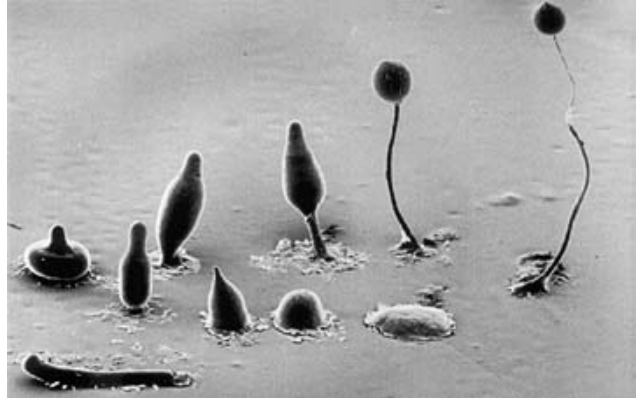
Synchrone Entwicklung auf Filtern

Der Entwicklungszyklus kann bei allen Zellen synchron initiiert werden, indem die Nahrungsquelle entzogen wird. Eine axenische Kultur wird bis zu einer Dichte von ca. 2×10^6 Zellen pro Milliliter angewachsen. Der Zelltiter wird mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauerzählkammer oder mit einem Coulter-Counter bestimmt. Die Zellen werden durch Zentrifugation konzentriert und in Phosphatpuffer (ohne Nährstoffe) resuspendiert. Diese Zellsuspension wird auf einen Nährstoff-freien Agar oder auf schwarze Nitrozellulosefilter aufgebracht. Dabei ist die Zelldichte und der richtige Feuchtigkeitsgehalt wichtig damit die Entwicklung richtig abläuft. Optimal sind 2×10^7 Zellen für einen schwarzen Filter (ca. 18 cm^2)

In der Abbildung ist eine raster-elektronenmikroskopische Aufnahme von zehn Entwicklungsstadien gezeigt:

1. loose aggregate, 2. tight aggregate, 3. tipped aggregate, 4. first finger, 5. mexican hat, 6. second finger (early culminant), 7. culminant, 8. early, 9. mature fruiting body, 10. slug

(Stadium, zwischen first finger und mexican hat. Der slug wandert, je nach Umweltbedingungen für verschiedene Zeiten wie eine kleine Schnecke und bildet dann den mexican hat.



Aufnahme verschiedener Entwicklungsstadien im Raster-Elektronen-mikroskop (von der Markierung im Uhrzeigersinn). Foto: Grimson und Blanton, Texas Tech Univ.

Zellströme

Unter Nahrungsmangel aggregieren *Dictyostelium*zellen, indem einige Zellen beginnen, Signale von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) auszusenden. Nachbarzellen wandern chemotaktisch auf das Signal zu und geben es dann ebenfalls ab. Die Zellen synchronisieren die Signale, sodass nach kurzer Zeit in einer Kultur Signalwellen entstehen. Das folgende Experiment braucht etwas Geduld, liefert dann aber eindrucksvolle Ergebnisse. Die Vorgehensweise wird hier für diejenigen beschrieben, die es mit Zeit und Geduld ausprobieren wollen. Im Kurs reicht die Zeit dafür nicht aus.

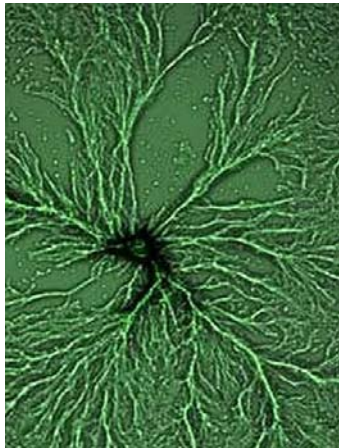
Auf eine kleine Petrischale (6cm Durchmesser) werden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen mit Flüssigmedium aufgebracht. Die Zellen werden durch leichtes Schwenken der Platte gleichmäßig verteilt. Die Schüler können ihre Platten klein auf dem Rand des Deckels mit Namen beschriften. Danach bleibt die Platte für 10 bis 15 Minuten ruhig stehen, sie kann in dieser Zeit auch mit dem Binokular oder Inversmikroskop betrachtet werden, um die amöboiden Zellen zu beobachten. Bei guter Optik und 40 bis 100facher Vergrößerung sieht man, wie die runden Zellen sich auf den Boden der Schale absenken, dort anhaften und eine ungleichmäßige amöboide Form annehmen.

Nach der 10 Minuten haben sich die Zellen relativ fest auf dem Plastikboden verankert. Das Medium wird in ein Abfallgefäß abgegossen und die Platten werden mit 5ml Phosphatpuffer aufgefüllt. Den Puffer langsam am Rand in die Schale laufen lassen, sonst löst der Pufferstrom zu viele Zellen ab! Platte wieder 5 Minuten stehen lassen, den Puffer abgießen und erneut mit 5ml auffüllen. Durch diesen Vorgang wird das Nährmedium vollständig abgewaschen, die Zellen befinden sich in Hungermedium und beginnen mit dem Entwicklungszyklus.

Mit bloßem Auge sieht man, dass der Boden der Platte einen trüben Film von Zellen enthält. Mit einem Binokular oder Inversmikroskop prüfen, ob die Platten einen gleichmäßigen dichten Rasen an Zellen enthalten. Platten auf einen Tisch oder in

ein Regal stellen. Sie sollten möglichst erschütterungsfrei im Licht stehen aber nicht der direkten Sonne ausgesetzt sein.

Nach etwa 5 Stunden haben sich (unter Normalbedingungen) Areale gebildet. Der gleichmäßige Zellrasen hat Strukturen angenommen, die man mit bloßem Auge erkennen kann: zwischen trüben Flecken von Zellen sind hellere Streifen zu sehen, in denen keine oder nur wenige Zellen zu finden sind. Beachte, dass die Areale alle eine ähnliche Größe haben! Die Zellen können „zählen“ und beginnen Gruppen mit etwa gleicher Zellzahl (ca. 100.000 Zellen) zu bilden. Im Mikroskop ist zu sehen, dass die Zellen ihre Form verändert haben: viele von ihnen sind jetzt lang gestreckt und meist in eine Richtung ausgerichtet.



Nancy Houser, Rice University,
<http://www.media.rice.edu/media/NewsBot.asp?MODE=VIEW&ID=10577>

Nach 6 bis 8 Stunden sind weitere Bereiche der Platte klar geworden. Mit bloßem Auge sieht man sternförmige Gebilde, Ströme von Zellen, die auf ein Zentrum zulaufen. Das Strömen kann über etwa 3 bis 4 Stunden beobachtet werden. Danach haben sich die meisten Zellen in Aggregaten angesammelt.

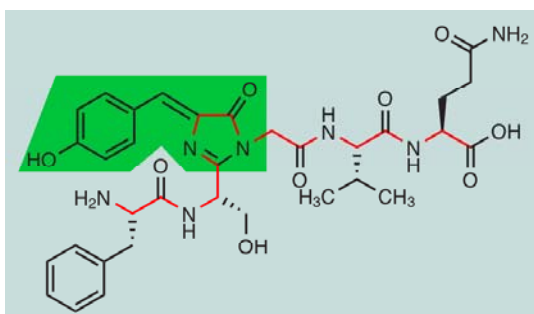
Unter Flüssigkeit entwickeln sich die Zellen nicht weiter als bis zum Stadium der Aggregate. Die weitere Entwicklung wird erlaubt, wenn man den Puffer abgießt, aber einen dünnen Flüssigkeitsfilm auf der Platte lässt. Platten wieder verschließen (mit Parafilm abdichten oder in einer feuchten Kammer lagern). Zumindest einige der Aggregate werden sich weiter entwickeln und im Laufe der nächsten 8 bis 16 Stunden Fruchtkörper bilden. Wenn Zeit ist, können die Platten zwischendurch unter dem Binokular beobachtet werden und man findet verschiedene Entwicklungsstadien. Weil trotz aller Vorsichtsmaßnahmen die Platten doch immer etwas austrocknen, werden einige Aggregate nie das Endstadium der Entwicklung erreichen. Durch die

Ungenauigkeit des Experiments hat man den Vorteil, dass man zum Schluss meist verschiedene Zwischenstadien sieht, die zu unterschiedlichen Zeiten in der Entwicklung gestoppt wurden. Spätestens am nächsten Tag sollten fertige Fruchtkörper auf der Platte zu finden sein. Diese können wie oben angegeben mikroskopiert werden, um Sporen und Stielzellen zu sehen. Im Kühlschrank sind die Platten auch mehrere Tage haltbar.

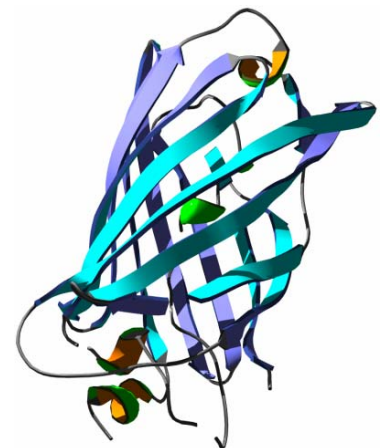
(siehe auch Science Bridge Webseite: Experimente mit *Dictyostelium*)

Theorie: Biochemie von GFP

GFP ist ein kleines (27kD), einfach gebautes fluoreszierendes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria*. Es besteht aus einer „Tonne“, die aus 11 β -Faltblättern zusammengesetzt ist, im Innern der Tonne befindet sich eine Alpha-Helix und das



Chromophor aus dem Tripeptid Serin – Threonin – Glycin, das bei Anregung mit ultraviolettem Licht von 395 nm und 475 nm eine Wellenlänge von 509 nm (grün) emittiert. Die



Struktur von GFP.
<http://www.rcsb.org/pdb>
 Alexander Brandt

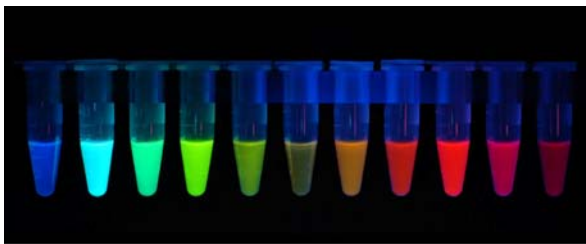
Emission entsteht dadurch, dass sich das Tripeptid autokatalytisch zu einem System konjugierter Doppelbindungen anordnet. In der Qualle kommt das Anregungslicht von einem weiteren Protein, dem Aequorin, im Labor wird das Objekt mit ultraviolettem Licht bestrahlt.

GFP faltet sich leicht zum funktionellen, leuchtenden Protein.

Es ist relativ inert und interagiert kaum mit anderen Proteinstrukturen. Deshalb kann man es meistens an andere Proteine fusionieren, ohne deren Funktion zu stören. Die Fusion ist einfach dadurch zu bewerkstelligen, dass die codierende Region von GFP N-terminal oder C-terminal an eine andere codierende Region ligiert wird. Das Fusionsgen kann dann in den entsprechenden Organismus eingebracht (transformiert) werden.

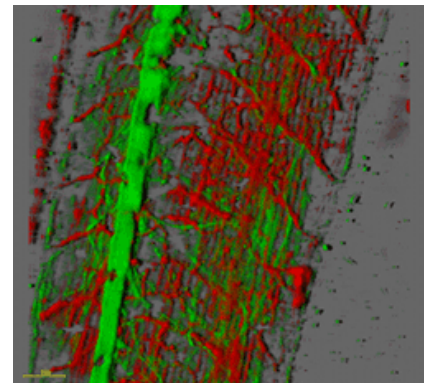
Beachte: In manchen Fällen liefern N- und C-terminale Fusionen unterschiedliche Ergebnisse. Das liegt oft daran, dass durch das GFP Signalsequenzen verdeckt werden, die die Lokalisation eines Proteins in der Zelle bestimmen.

Die genaue Kenntnis der Biochemie von GFP hat die Konstruktion von künstlichen Varianten des Proteins ermöglicht, die in verschiedenen Farben fluoreszieren. Damit war es auch möglich, mehrere Proteine gleichzeitig in einer Zelle anzufärben und so in lebenden Organismen das Zusammenspiel verschiedener Proteine zu untersuchen.



Fluoreszierende Proteine aus dem Labor von Roger Tsien, Nobelpreis 2008.

Lebender *Xenopus* Embryo mit GFP (Nervensystem) und roter Fluoreszenz (Blutgefäße).
Ariel Levine, Alison North and Ali Hemmati-Brivanlou (Rockefeller University)



Praxis: *Dictyostelium* Entwicklung (auch für Schulen ohne S1 Labor geeignet)

In diesem Kursteil wird der Umgang mit *Dictyostelium* geübt. Obwohl viele Kleinigkeiten zu beachten sind, ist die Kultur des Organismus recht einfach und es werden nicht unbedingt teure Geräte benötigt. Eine Zentrifuge und ein Rotationsschüttler für Erlenmeyerkolben reichen für viele Experimente aus. Steriles Arbeiten ist auch neben einem Bunsenbrenner möglich.

Es ist jedoch zu beachten, dass HL5 Medium ein reiches Medium ist, in dem fast alle Mikroorganismen sehr gut wachsen. Die Kontaminationsgefahr ist groß!

Arbeiten in der sterilen Werkbank („Dicty-Hood“):

- Lüftung einschalten, Licht einschalten
- Fläche mit 70 % Ethanol reinigen
- Hände mit 70% Ethanol abwischen
- Gaszufuhr einschalten sobald Belüftungsanlage vollständig arbeitet
- auf steriles, berührungsfreies Arbeiten achten

Schritt 1: Zellzählung der Suspension

100 μ L der Zellkultur werden in 20 mL 0,1-fach Isoton (Puffer-Lösung) überführt. Das Becherglas auf das Tischen des Counters aufsetzen und vorsichtig hochfahren bis es einrastet. Über die Bedienfelder „Function“ wird das Programm Flushing gestartet. Danach erfolgt die Zellzählung durch Betätigung der „Output“-Bedienfeldes (vgl. nebenliegende Anleitung)

Die angegebene Zahl des Counters muss mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, um die entsprechende Zellzahl zu ermitteln. Dies ergibt beispielsweise bei 0,1 mL, die der Suspension entnommen werden und auf 20 mL Puffer-Lösung überführt werden, einen Verdünnungsfaktor von 200. Geräte bedingt muss mit einem Verdünnungsfaktor von 400 gerechnet werden.

Die Zellzahl sollte um 2×10^6 Zellen pro mL liegen. (ggf. muss auf diese Zellzahl mit 1x Phosphatpuffer oder HL-Medium verdünnt werden.)

Ermittelte Zellzahl pro mL: _____

In der Schule kann die Zellzählung auch mit einer Neubauer-Zählkammer (ca. 50€) im Mikroskop erfolgen.

Schritt 2: Konzentrierung der Dictyostelium-Zellen

Von der Zellkultur je 40 mL in ein 50 mL Falcon überführen und bei ~ 800 rpm 2-3 Minuten zentrifugieren. Den Überstand verwerfen (S1-Abfall), das erhaltene Pellet in 4mL 1x Phosphatpuffer resuspendieren und nochmals bei ~ 800 rpm 2-3 Minuten zentrifugieren. Den Überstand verwerfen und das Pellet in 1x Phosphatpuffer resuspendieren.

Stellen Sie Zellsuspensionen und Zellpellets immer auf Eis!

Berechnen Sie die Menge des Phosphatpuffers so, dass die Zellkonzentration bei 4×10^7 pro mL liegt.

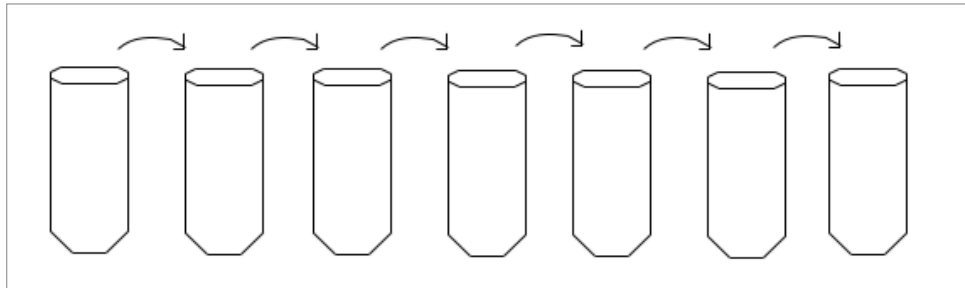
Beispiel: Sie haben in Schritt 1 eine Zelldichte von 2×10^6 pro mL gemessen. Sie haben 40 mL der Zellkultur abzentrifugiert, das sind 8×10^7 Zellen. Wenn Sie das Pellet in 2 mL aufnehmen, haben Sie eine Konzentration von 4×10^7 Zellen/mL

Berechnung der Phosphatpuffermenge zur Verdünnung:

Schritt 3: Anlegen der Verdünnungsreihe

Von den resuspendierten Zellen wird in einem Verhältnis von 1:1 eine Verdünnungsreihe in 6 Stufen erstellt. Dazu werden in sechs 1,5 mL Eppendorfgefäße 100 μ L des 1x Phosphatpuffers vorgelegt. Aus dem Falconröhrchen (Zellsuspension mit 4×10^7 Zellen/mL) werden 100 μ L in „Eppi 1“ überführt und gut gemischt. Aus „Eppi 1“ werden 100 μ L der Suspension in „Eppi 2“ überführt usw.

Bei einer Ausgangs-Zellzahl von 4×10^7 Zellen pro mL entspricht dies der folgenden Verdünnungsreihe.

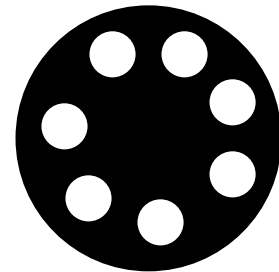


Falcon	Eppi 1	Eppi 2	Eppi 3	Eppi 4	Eppi 5	Eppi 6
$4 \times 10^7 / \text{mL}$	$2 \times 10^7 / \text{mL}$	$1 \times 10^7 / \text{mL}$	$5 \times 10^6 / \text{mL}$	$2,5 \times 10^6 / \text{mL}$	$1,2 \times 10^6 / \text{mL}$	$6 \times 10^5 / \text{mL}$

Die Zellzahl in jeder Verdünnung (s. oben) wird wie folgt ermittelt: Multiplizieren Sie die Zellzahl/mL der überführten Suspension (hier 4×10^7) mit dem Volumen (hier 0,1 mL) und dividieren Sie durch das Gesamtvolumen (hier 0,2 mL).

Schritt 4: Auftragung der Zellen auf schwarzen Filter

Der ausgekochte, feuchte schwarze Filter wird mittig auf eine Phosphatagarplatte aufgesetzt (schwarze Seite nach oben). Überschüssige Flüssigkeit ggf. mit einem Kleenex abtupfen. Markieren Sie im Agar neben dem Filter einen Orientierungspunkt (kleines Loch mit einem Zahnstocher). Geben Sie von dort im Uhrzeigersinn mit einer gelben Pipettenspitze vorsichtig 30 μL jeder Verdünnungsstufe nahe an den Rand des Filters, sodass jeder Tropfen einen Durchmesser von ca. 0,5 cm besitzt. Achten Sie darauf, dass der Tropfen nicht über den Filterrand in den Agar läuft! Die Flüssigkeit zieht durch den Filter in den Agar ein. Achten Sie darauf, dass die Tropfen nicht zusammenlaufen.



Anordnung der Zellsuspensionstropfen auf dem schwarzen Filter.

Die Zellen entwickeln sich auf dem Filter innerhalb von 24 Stunden zu reifen Fruchtkörpern. Wenn die Ausgangsdichte zu hoch oder zu gering ist, kann die Entwicklung nicht richtig ablaufen. Stellen Sie fest, bei welcher Zelldichte die Entwicklung optimal ist.

Der schwarze Filter besteht aus Nitrozellulose. Die Zellen können sich auf der glatten Oberfläche frei bewegen. Die schwarze Farbe erleichtert die Beobachtung der Entwicklung. Der Phosphatagar hält die Zellen feucht.

Berechnen Sie die Zellzahl in jedem Tropfen: Zellzahl/mL in der jeweiligen Verdünnungssuspension (siehe Tabelle oben) multipliziert mit dem aufgetragenen Volumen (30 μL = 0,03 mL).

Zellzahl der aufgetragenen Zellen pro Tropfen:

Zellzahl Tropfen 1: _____ Zellzahl Tropfen 2: _____
 Zellzahl Tropfen 3: _____ Zellzahl Tropfen 4: _____
 Zellzahl Tropfen 5: _____ Zellzahl Tropfen 6: _____
 Zellzahl Tropfen 7: _____

Berechnen Sie auch die Zahl der Zellen pro cm^2 in jedem Tropfen (ca. 0,5 cm Tropfendurchmesser, $r^2 \times \pi = 0,196 \text{cm}^2$)

Tropfen 1: _____ Tropfen 2: _____
 Tropfen 3: _____ Tropfen 4: _____
 Tropfen 5: _____ Tropfen 6: _____
 Tropfen 7: _____

Sie können die Platten mit nach Hause nehmen. Die Entwicklung ist auch mit bloßem Auge oder einer einfachen Lupe zu erkennen. Stellen Sie die Platte an einen kühlen Ort. Die Entwicklung ist bei 22°C optimal. Ab ca. 27°C vollzieht sie sich schlechter oder gar nicht!

Wir haben für Sie schwarze Filter vorbereitet, damit Sie sehen können was Sie zu erwarten haben.

Wachstum und Entwicklung von Dictyostelium auf Bakterienrasen

Sie erhalten von uns eine vorinkubierte KA-Platte mit einem Bakterienrasen. Tauchen Sie einen sterilen Zahnstocher in Eppi 1 aus dem vorherigen Versuch und stechen Sie den Zahnstocher ca. 1mm mittig in den Bakterienrasen. Sie können auch Zellen vom äußeren Rand eines Plaques (vegetativ wachsende Zellen!) einer Masterplatte umpicken.

KA-Platten enthalten die Bakterien Klebsiella aerogenes und dienen D. discoideum als Nahrungsquelle.

Sie können die Platte (mit Parafilm verschlossen) mit nach Hause nehmen und über mehrere Tage die Entstehung des Plaques beobachten (mit bloßem Auge, mit einer einfachen Lupe oder mit einem Binokular). In der Mitte des Plaques sind nach zwei bis drei Tagen Fruchtkörper zu erkennen. Die Fruchtkörper können auch für die Mikroskopie (siehe unten) verwendet werden.

Für $ecmA$ -GFP und $cotB$ -GFP Zellen gilt das gleiche Verfahren. Diese Zellen dürfen jedoch nur in einem S1 Labor gehalten werden.

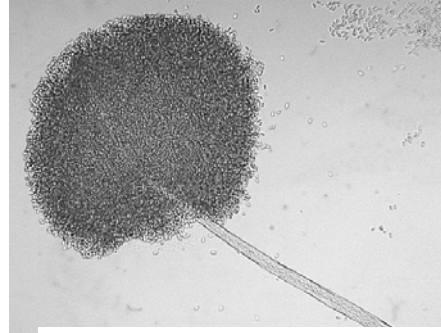
Mikroskopie von differenzierten Zellen

Fruchtkörper und andere Entwicklungsstadien von *Dictyostelium* können von den vorbereiteten KA Platten oder schwarzen Filtern auf einen Objektträger gepickt werden. Benutzen Sie dazu einen sterilen Zahnstocher oder besser eine Glasnadel. Glasnadeln können Sie sich selbst aus einer Pasteurpipette am Bunsenbrenner ziehen (Vorsicht! Heiß!).

Geben Sie einen Tropfen Wasser oder Phosphatpuffer auf einen Objektträger. Picken Sie dann mit Glasnadel oder Zahnstocher ein oder mehrere Fruchtkörper von einer KA Platte oder einem schwarzen Filter. Sie können das mit bloßem Auge tun

oder unter dem Binokular kontrollieren. Übertragen Sie das Material dann in den Tropfen auf dem Objektträger. Auch hier kann unter dem Binokular geprüft werden, ob die Fruchtkörper tatsächlich im Tropfen gelandet sind oder noch an der Nadel kleben.

Decken Sie das Präparat mit einem Deckglas ab und saugen Sie überschüssige Flüssigkeit mit einem Kleenex oder Papierhandtuch ab. Betrachten Sie das Präparat im Mikroskop. Es ist sehr schwierig, einen intakten Fruchtkörper auf einen Objektträger zu transferieren, weil der Sporenkopf sehr leicht aufplatzt. Aber auch Teile von Fruchtkörpern reichen aus, um die verschiedenen Zelltypen zu erkennen.



Dictyostelium Fruchtkörper. Links der Sporenkopf, am Rand sind einzelne ovale Sporen zu sehen. Die einzelnen Zellen des Stiels können nicht erkannt werden.

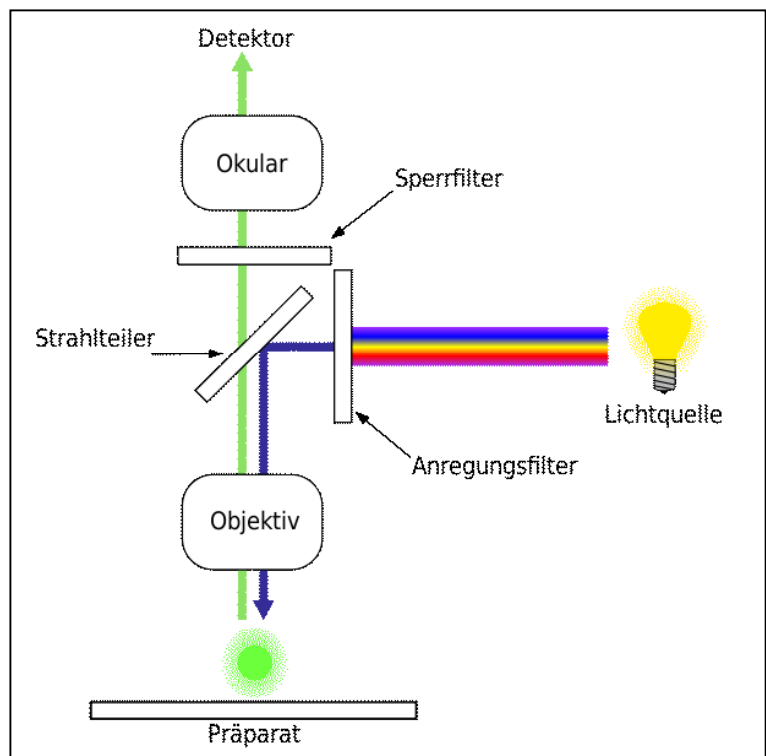
Beachte: die „antike“ Methode, beim Mikroskopieren zu zeichnen, ist noch immer aktuell und nützlich! Lassen Sie in der Schule unbedingt zeichnen!

Praxis: Untersuchung GFP-transformierter *Dictyostelium*zellen

Die mit *ecmA::GFP* und *cotB::GFP* transformierten Entwicklungsstadien werden wie oben erläutert präpariert. Die Qualität des Präparats kann zunächst im Lichtmikroskop überprüft werden. Für die Fluoreszenzmikroskopie stehen zwei Mikroskope zur Verfügung : ein sehr einfaches Partec CyScope und ein professionelles Leica DM IRB. Das Leica-Mikroskop darf nur mit einem Betreuer benutzt werden.

Achten Sie darauf, dass GFP bei längerer Beleuchtung mit UV Licht ausbleicht. Schalten Sie die Fluoreszenzbeleuchtung immer aus, wenn Sie nicht an dem Objekt arbeiten.

EcmA codiert für ein extrazelluläres Matrixprotein, das spezifisch in den Vorläufern von Stielzellen und in reifen Stielzellen exprimiert wird. *CotB* codiert für ein Protein der Sporenhülle. In beiden Fällen wurde nur der Promotor der Gene mit der codierenden Region des GFP Gens fusioniert. Damit wird GFP in dem einen Fall nur in Sporen (und deren Vorläufer während der Entwicklung), im anderen Fall nur in Stielzellen exprimiert. Wenn Sie frühe Entwicklungsstadien finden, sehen Sie manchmal, dass der Stiel sich durch die Sporenmasse



zieht. Das beruht darauf, dass die Stielzellen von oben durch die Sporenmasse wandern und dadurch die Sporen vom Boden nach oben heben („umgedrehter Springbrunnen“). Auch bei reifen Fruchtkörpern verläuft noch ein Stück Stiel durch den Sporenkopf.

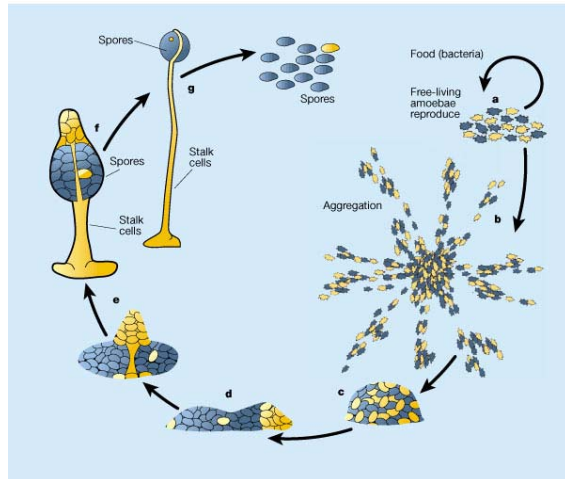
Praxis: Untersuchung β -Gal transformierter *Dictyostelium*zellen

(auch für Schulen ohne S1 Labor geeignet)

Eine Alternative zu GFP als Marker ist die Verwendung des bakteriellen β -Galaktosidasegens. Ähnlich wie beim blue-white screening bei Bakterien kann β -Galaktosidaseaktivität mit X-Gal als blaue Färbung sichtbar gemacht werden. Bei

Dictyostelium ist es jedoch erforderlich, die Zellen zu permeabilisieren und zu fixieren, um das Substrat zum Enzym zu bringen. Damit ist eine Beobachtung an lebenden Zellen nicht möglich. Fixierte Zellen unterliegen aber nicht dem Gentechnikgesetz und können deshalb in der Schule verwendet werden. Dafür stehen Dauerpräparate zur Verfügung (allerdings nur für *ecmA::\beta-gal*). Die Abbildung zeigt Culminanten, in denen der blau gefärbte Stiel durch die ungefärbte Sporenmasse wandert.

Beachten Sie: bei den Präparaten muss die Färbedauer sorgfältig kontrolliert werden: bei zu langer Färbung wird X-Gal auch von endogenen Enzymen aus *Dictyostelium* umgesetzt und letztlich sind alle Zellen blau gefärbt!



Stielzellen und ihre Vorläufer: gelb, Sporen und ihre Vorläufer: blau. Abb.: Richard Kessin. (Das Bild ist zur Erklärung eines anderen Phänomens gedacht, demonstriert die Verteilung der Zelltypen aber ausreichend.)

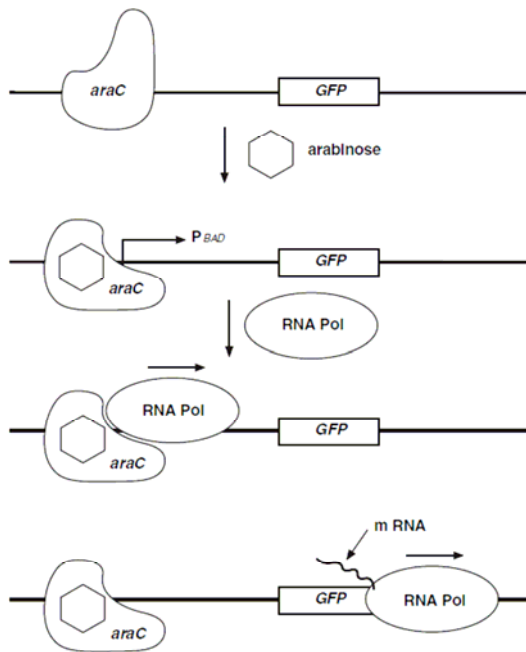


Praxis: Isolierung von GFP aus rekombinanten *E. coli* (nur für S1)

Die Firma Biorad hat freundlicherweise ihr pGLO Transformation Kit und das GFP-Purification Kit für diesen Kurs zur Verfügung gestellt (Catalog Number 166-0003EDU, explorer.bio-rad.com). Die GFP transformierten *E. coli* Zellen wurden vor dem Kurs von uns präpariert. Die Kits sind in England frei verkäuflich, in Deutschland unterliegen sie jedoch den strengen Auflagen des Gentechnikgesetzes und dürfen nur in S1 Laboren verwendet werden.

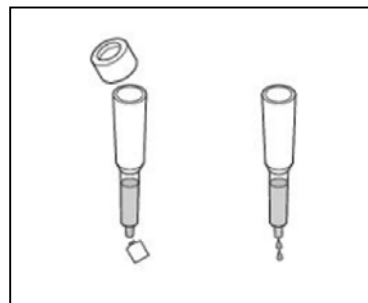
Im pGLO Plasmid steht GFP unter der Kontrolle des Arabinose-Promotors. Das Plasmid enthält zusätzlich das Gen *araC*, das für den Inductor codiert. In Gegenwart von Arabinose erlaubt AraC die Transcription des nachfolgenden Gens (hier GFP).

Zur Produktion von Proteinen werden die Zellen meist unter nicht-induzierenden Bedingungen angewachsen und dann für kurze Zeit induziert (hier mit Arabinose). Weil die Expression sehr stark ist, würde eine dauerhafte Induktion die Zellen schädigen.

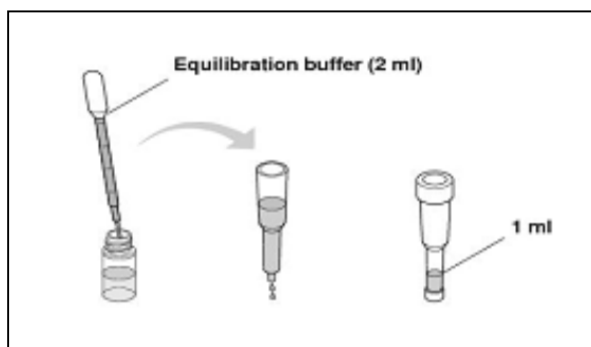


Die ausgegebenen Proben werden aufgetaut und für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.

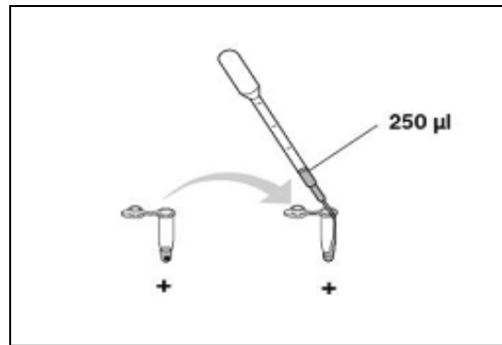
Während der Zentrifugation kann die HIC Chromatographiesäule vorbereitet werden. Dabei wird der obere Verschluss entfernt und der Plastikaufsatz am Ausfluss der Säule abgeklippt. Die Flüssigkeit, die sich bereits in der Säule befindet, kann in ein Eppi abfließen.



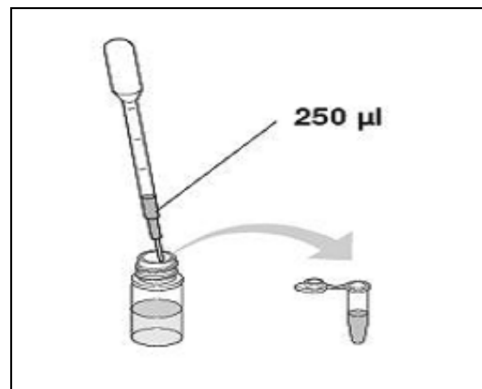
Nun werden in die Säule 2 ml Equilibrationpuffer pipettiert. Davon soll 1 ml in der Säule verbleiben, den Rest lassen Sie abfließen. Wenn die 1 ml - Markierung erreicht ist, wird die Chromatographiesäule sowohl oben als auch unten verschlossen.



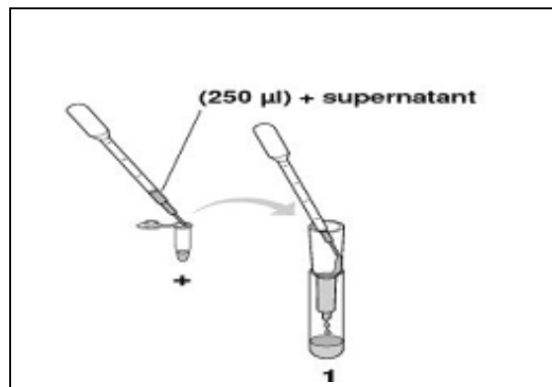
Nach der Zentrifugation der Proben werden vom Überstand 250 µl mit der Pipette abgenommen und in ein neues Eppendorfcup überführt. Dabei sollte das Pellet nicht mit der Spitze berührt werden und auch sonst nichts von dem Pellet in den Überstand gelangen. Ab diesem Schritt können die Proben und auch die HIC Säule immer wieder unter UV-Licht betrachtet werden



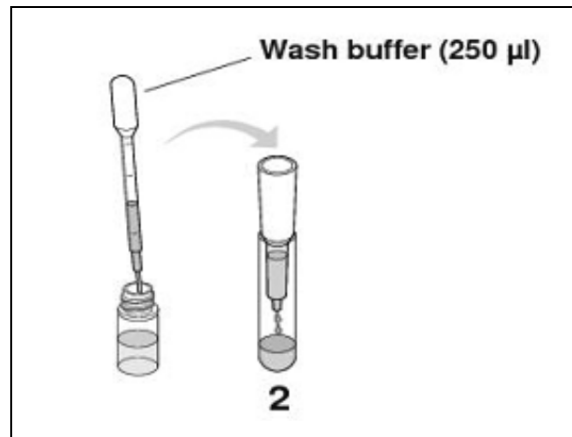
Zu dem Überstand werden 250 µl Bindungspuffer gegeben.



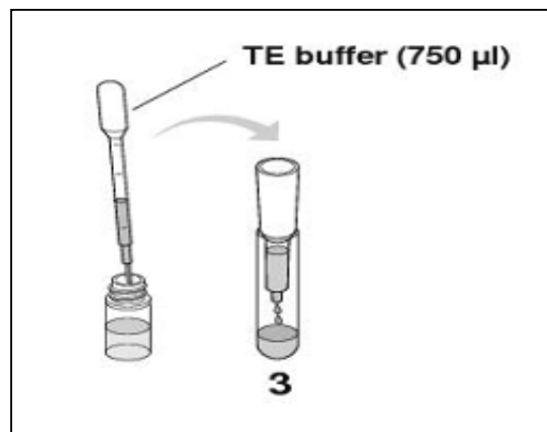
Der in der Chromatographiesäule verbliebene Equilibrierungspuffer (1ml) wird nun abgelassen. Danach werden 250 µl der Probe (welche nun auch mit dem Bindungspuffer versetzt ist) auf die Säule gegeben und in einem Eppi (mit einer 1 beschriftet) aufgefangen.



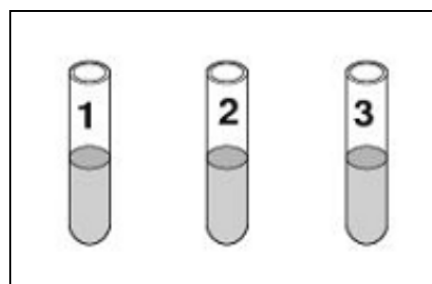
Sodann werden auf die Säule 250 µl Waschpuffer pipettiert, der Durchfluss wird in einem Eppi (mit 2 beschriftet) aufgefangen.



Zuletzt werden 750 µl des TE – Puffers auf die Säule gegeben und aufgefangen (Eppendorfcup mit der 3).



Unter UV Licht wird die Anreinigung ausgewertet.



Diese Aufreinigung gibt nur einen groben Anhaltspunkt für Menge und Reinheit der Präparation. Eine genauere Analyse, ob nach der Chromatographie noch Verunreinigungen in der Probe sind, kann durch SDS PAGE durchgeführt werden. Dabei sollte die Hauptbande bei 27kD liegen (siehe auch Science Bridge Skript zur Aufreinigung von β -Galaktosidase)

Quelle:

Bio – Rad, Biotechnology Explorer: Green Fluorescent Protein (GFP) Purification Kit, 4006099

http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_9563.pdf

<http://www.youtube.com/watch?v=yI9IXHw0j1U>

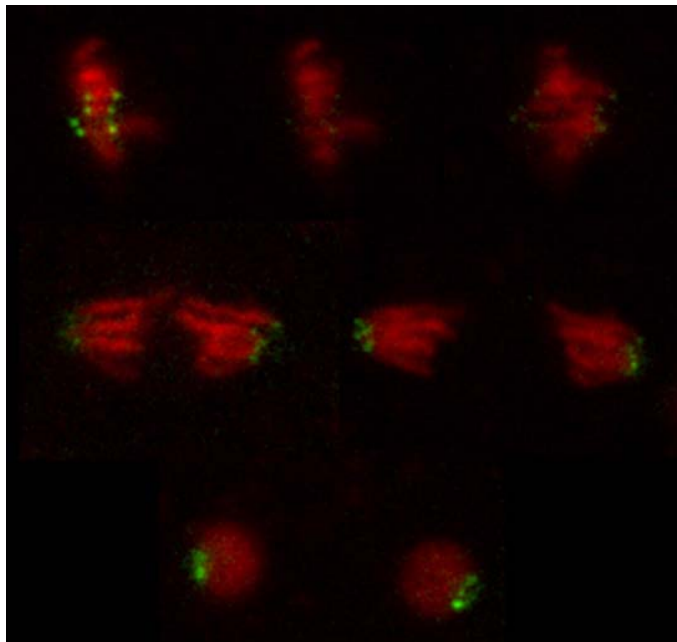
Theorie: weitere GFP-Anwendungen

GFP und seine Varianten haben in der Grundlagenforschung zu einem Durchbruch geführt: die Möglichkeit, die Dynamik von (mehreren!) Proteinen gleichzeitig in lebenden Zellen zu beobachten hat neue Möglichkeiten eröffnet.

Aber ständig werden neue Anwendungen entwickelt. Einige davon sollen genannt werden.

FRAP (Fluorescence recovery after photo bleaching)

Dabei wird in einer GFP gefärbten lebenden Zelle die Fluoreszenz an einem Punkt mit einem Laser ausgebleicht. Dann wird gemessen ob, bzw. in welcher Zeit die Fluoreszenz wieder in dem Punkt erscheint. Daraus können Schlüsse über die Mobilität von Proteinen in einer Zelle gezogen werden.

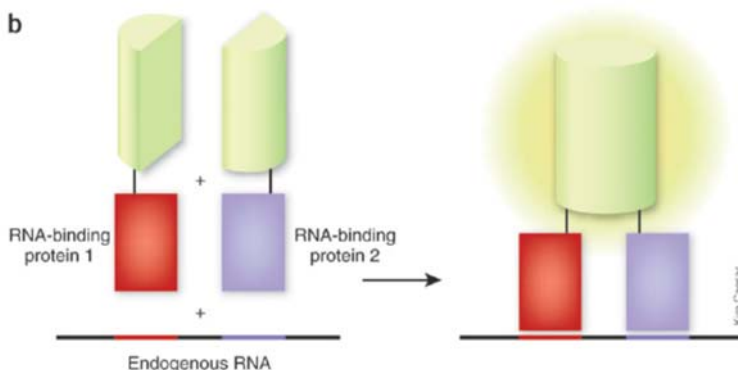


Das Beispiel zeigt eine Doppelfärbung mit RFP markiertem Histon2A (färbt alle Chromosomen) und GFP markiertem CenH2 (färbt nur Centromere). In der zweiten Aufnahme (Metaphase) wurde mit einem Laser die Fluoreszenz der Centromere ausgebleicht. Bereits in der Anaphase (3. Bild) findet man wieder grüne Punkte an den Centromeren. Das bedeutet, dass während der Mitose Proteine an den Centromeren ausgetauscht werden können.

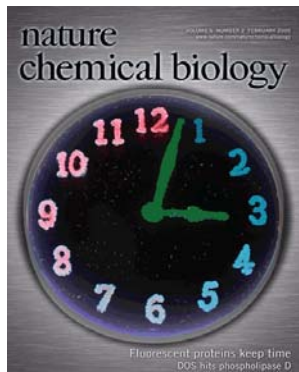
Mitose in embryonalen Drosophila Zellen. Die Chromosomen sind mit einem RFP-Histon gefärbt, die Zentromere mit GFP. Das zweite Bild zeigt das Präparat unmittelbar nach dem Ausbleichen. (Univ. Bayreuth, Labor Heidmann)

Split GFP

GFP ist ein Protein, das sich sehr leicht zur richtigen Struktur faltet. Man kann GFP auch in zwei Hälften exprimieren, die beide für sich inaktiv sind. Werden sie jedoch in enge Nähe gebracht, bildet sich daraus das fluoreszierende Protein.



Fusioniert man die beiden Hälften an Proteine, die in der Zelle miteinander interagieren, entsteht Fluoreszenz nur am Ort der Interaktion. Ebenso kann an unbekanntem Proteinen überprüft werden, ob sie interagieren.



Es wurden einmaliger verändern. in einer separat die solche, die wurden.

Fluorescent timers

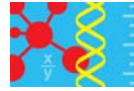
Varianten von GFP entwickelt, die nach Anregung mit der Zeit ihre Fluoreszenz Damit lässt sich das Schicksal eines Proteins lebenden Zelle verfolgen. Man beobachtet anfangs angeregten Moleküle und eventuell zu einem späteren Zeitpunkt angeregt

Glo-Fish

Ursprünglich war der Glo-Fish als Indikator für die Wasserqualität gedacht. GFP wurde unter der Kontrolle eines Stresspromotors exprimiert und die Fische sollten leuchten, wenn die Wasserqualität schlecht wurde. Das Konzept konnte sich nicht durchsetzen oder war nicht praktikabel.

Statt dessen ist der Glo-Fish in einigen Ländern zu einem beliebten Aquariumsbewohner geworden – und leuchtet nicht nur in schlechtem Wasser. In Deutschland sind die Fische wegen der strengen Gentechnikgesetze verboten.





Wir bedanken uns für die Unterstützung durch:

Robert Bosch **Stiftung**



Verband | Biologie, Biowissenschaften
& Biomedizin in Deutschland

U N I K A S S E L
V E R S I T Ä T

