

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Gearbeitet wurde mit der Tabakzelllinie BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Bright Yellow 2*, Nagata *et al.*, 1992). Die BY-2-Zelllinie wurde in 100 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml Medium, welches 4,3 g/l Murashige und Skoog Salze (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) (Murashige und Skoog, 1962), 30 g/l Saccharose, 200 mg/l KH_2PO_4 , 100 mg/l (myo)-Inositol, 1 mg/l Thiamin und 0,2 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure enthielt, kultiviert. Der *potentia Hydrogenii* (pH) wurde auf 5,8 mit KOH eingestellt. Zur gleichmäßigen Nährstoffverteilung im Medium und um ein Absetzen der Zellen zu vermeiden, wurde die Linie unter ständigem Schütteln mit Hilfe eines KS260 Orbitalschüttlers (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland) mit 150 rpm bei 27 °C im Dunkeln kultiviert. Alle sieben Tage wurden die Zellen unter der Laminar-Flow Sterilbank (Hera guard Thermo scientific, Heraeus, Hanau, Deutschland) in frisches Medium umgesetzt. Dafür wurde 1 ml der Wildtyp-Zellkultur beziehungsweise 1,5 ml der Lifeact::psRFP Kultur in einen 100 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml MS-Medium überführt. Zur BY-2 Lifeact::psRFP Zelllinie wurde als Selektionsmarker 30 µg/ml Hygromycin hinzugegeben. Beim Pipettieren der Zelllinien wurde ausschließlich mit geschnittenen Pipettenspitzen gearbeitet, um Scherkräfte zu vermeiden.

Zwecks Langzeitstudien und Momentaufnahmen wurde täglich 1 ml Zellsuspension der Lifeact::psRFP Kultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß steril überführt. Ab Tag drei des Kulturzyklus wurden auf Grund der hohen Zelldichte nur 200 µl Zellkultur in ein mit 800 µl MS-Medium beschicktes Reaktionsgefäß pipettiert (1:5 Verdünnung) und für die mikroskopische Analyse verwendet.

2.2 Transformation

Der Vektor pH7WG2-LA-psRFP wurde zu Beginn der Arbeit von Steffen Durst bereitgestellt. Zur Klonierung wurde die Gateway-Klonierungsmethode von Invitrogen (Paisley, UK) gewählt (siehe Durst, 2012).

2.2.1 Elektroporation

Es wurde der elektrokompetente *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GC3101::pM90 verwendet. Vor der Elektroporation wurden die in YEB-Medium (5 g/l Rinderextrakt, 1 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Peptone, 5 g/l Saccharose, 0,5 g/l $MgCl_2$) gewachsenen Agrobakterien mit einer $OD_{560} = 1$ in einem 50 ml Plastikgefäß mit 450 rpm bei 4 °C 10 min abzentrifugiert (Hermle Z383, Hermle LaborTechnik, Wehlingen, Deutschland). Anschließend wurde dreimal mit sterilem, kaltem Glycerin (10 %) gewaschen. In 8 ml 10 % Glycerin aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, konnten die Zellen bei -80 °C gelagert werden.

Zu 100 µl elektrokompetenten Zellen wurden 100 - 200 ng auf Eis aufgetautes Lifeact::psRFP Plasmid gegeben, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (2 mm) überführt. Der elektrische Schock zur Öffnung der Membran erfolgte mit dem Gene Pulser Xcell™ von Biorad (Hercules, Kalifornien, USA) mit einer Spannung von 2,5 kV und einem Widerstand von 200 Ω für 5 ms. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl SOC-Medium (5 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Trypton, 10 mM Natriumchlorid, 2,5 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Magnesiumsulfat, 20 mM Glucose) aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden danach 1,5 Stunden bei 28 °C mit 500-600 rpm inkubiert (Heraeus™ Pico™17, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.2.2 Kultivierung

2.2.2.1 Kultivierung der transformierten Agrobakterien

Nach 1,5 Stunden Inkubation der Agrobakterien mit dem Lifeact::psRFP Plasmid im SOC Medium wurden 100 µl des Transformationsansatzes auf selektive LB-Platten (1 % Trypton, 0,5 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 2 % Agar) mit Spectinomycin (100 µg/ml) ausplattiert, mit Folie (Parafilm®M, Bemis Company Inc., Neehna WI, USA) verschlossen und zwei Tage bei 28 °C inkubiert (Heraeus, Hanau, Deutschland). So konnten nur Bakterien wachsen, die das Plasmid mit dem Spectinomycinresistenzgen aufgenommen hatten. Nach zwei Tagen Bakterienwachstum wurde eine Kolonie gepickt, in 10 ml frisch angesetztes LB-Medium (LB-Medium ohne Glucose mit 100 µg/ml Spectinomycin) überführt und anschließend bei 28 °C und 140 rpm über Nacht inkubiert (G24 Environmental incubator shaker, New Brunswick, NJ, USA). Am nächsten Tag wurde zu 1 ml der Agrobakterienkultur 5 ml frisch angesetztes LB-Medium (ohne Glucose mit 100 µg/ml Spectinomycin) hinzugegeben. Nach weiteren vier Stunden Inkubation wurde 1

ml des Ansatzes in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 10 000 rpm zentrifugiert (Hermle Z383, Hermle LaborTechnik, Wehlingen, Deutschland). Anschließend wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag in 30 µl Paul's Medium (4,3 g/l MS-Salze mit 1 % Saccharose, pH 5,8 mit KOH) resuspendiert.

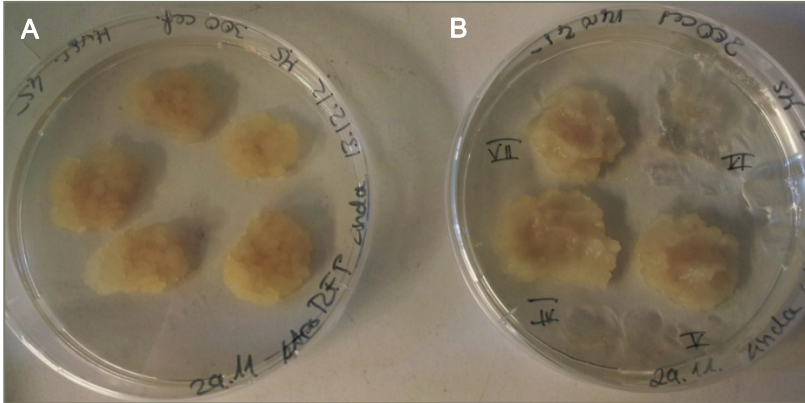
2.2.2.2 Kultivierung der Tabakzellen

Zunächst wurden 8 ml einer sieben Tage alten Tabak BY-2 Kultur in eine sterile 300 ml Flasche mit 92 ml MS-Medium umgesetzt. Nachdem die Zellen drei Tage wie unter 2.1 beschrieben gewachsen sind, wurden nach der TAMBY2-Methode von Buschmann *et al.*, (2010) 50 ml der Zellkultur mit 200 ml sterilem Paul's Medium zweimal gewaschen. Nach Absetzen der Zellen wurden diese anschließend in einem 10 ml Endvolumen mit Paul's Medium resuspendiert.

2.2.3 Kokultivierung, Selektion und Etablierung der transgenen Suspensionskultur

Um die Bakterien mit den Pflanzenzellen zu vermischen, wurden 1 ml der drei Tage alten Tabakkultur (aus 2.2.2.2) zu den Agrobakterien gegeben und 5 min bei 100 rpm gemischt (Infors HT, Bottmingen, Schweiz). Danach wurden 2 ml der Suspension kreisförmig in 100 µl Tropfen auf Filterpapier auf Paul's Agar-Platten (0,8 % Agar) ohne Antibiotika gebracht, mit Verschlussfolie (Parafilm®M, Bemis Company Inc., Neehna WI, USA) versehen und bei 22 °C im Dunkeln inkubiert. Drei Tage später wurde die Transformationsrate mikroskopisch untersucht und das Filterpapier mitsamt Suspension auf MS-Agar-Platten (0,8 % Agar) mit 300 µg/ml Cefotaxim und 45 µg/ml Hygromycin übertragen. Einzig die transformierten BY-2 Kalli, die resistent gegen Hygromycin sind, sind in der Lage zu wachsen. Nach zwei Wochen Inkubation bei 27 °C im Dunkeln wurden die Transformanten mikroskopisch überprüft (AxioObserver.Z1, Zeiss Jena, Deutschland), indem die Zellen von der Agarplatte abgekratzt und auf einem Objektträger mit wenigen Tropfen frischem Kulturmedium vermischt wurden. Die Kalli wurden anschließend mit einem sterilen Spatel auf neue Platten mit 300 µg/ml Cefotaxim und 45 µg/ml Hygromycin ohne Filterpapier übertragen (Abb. 2-1).

Abbildung 2-1 Kalli der transgenen Tabakkultur Lifeact::psRFP kultiviert auf MS-Platten (0,8 % Agar)



(A) 18 Tage alte Kalli, die noch zu klein sind, um in Flüssigmedium anzuwachsen. (B) 25 Tage alte Kalli, deren Oberfläche teilweise mit einem Spatel abgekratzt (IV, V, VII) oder die gänzlich zur Subkultivierung entfernt wurden (VI).

Nachdem die Kalli eine gewisse Größe ($>2,5$ cm) (siehe Abb. 2-1 B) erreicht hatten, wurde die Fluoreszenzintensität der transformierten Zellen abermals überprüft. Anschließend wurde die Oberfläche der Kalli mit einem sterilen Spatel abgekratzt (Abb. 2-1 B IV, V, VII), beziehungsweise der gesamte Kallus entfernt (Abb. 2.1 B VI) und in ein 100 ml Erlenmeyerkolben mit 30 ml MS-Medium, 30 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Cefotaxim überführt. Nach sieben Tagen wurde der Transformationserfolg hinsichtlich Transformationsrate und Zellviabilität untersucht.

Kalli, die noch zu klein waren (siehe Abb. 2-1 A), wurden zur Weiterkultivierung auf neue MS-Platten mit 300 $\mu\text{g/ml}$ Cefotaxim und 45 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin gesetzt, um Nährstoffmangel zu verhindern.

2.3 Manipulation des *nuclear baskets* anhand von Hemmstoffexperimenten

Die Hemmstoffe wurden jeweils am Tag des Umsetzens (Subkultivierung nach sieben Tagen) dem Kulturmedium zugegeben. Tabelle 2-1 zeigt die eingesetzten Hemmstoffe, deren verwendeten Stammlösungen und Endkonzentrationen. Die Hemmstoffe wurden in drei Hemmstoffgruppen unterteilt: die erste Hemmstoffgruppe stellen die Auxine und Phytotropine dar (Tab. 2-1 rot bis gelb markiert, schwarz hinterlegt), die zweite Gruppe beeinflusst die Aktindynamik (Tab.2-1 grün markiert, hellgrau hinterlegt), die letzte Gruppe bilden die Myosininhibitoren (Tab. 2-1 blau markiert, weiß hinterlegt). Alle Hemmstoffe wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

Tabelle 2-1 Übersicht der verwendeten Hemmstoffe

Hemmstoff- gruppe	Hemmstoff	Konzentration	Stammlösung
1 Auxine und Phytotropine	1-Naphtyhl- essigsäure (NAA)	10 µM	10 mg/ml in 70 % Ethanol
	2,4-Dichlor- phenoxy- essigsäure (2,4-D)	10 µM	10 mg/ml in 70 % EtOH
	Indol-3-Essigsäure (IAA)	10 µM	100 mM in 70 % EtOH
	2,3,5- Trijodbenzoesäure (TIBA)	10 µM	10 mM in DMSO

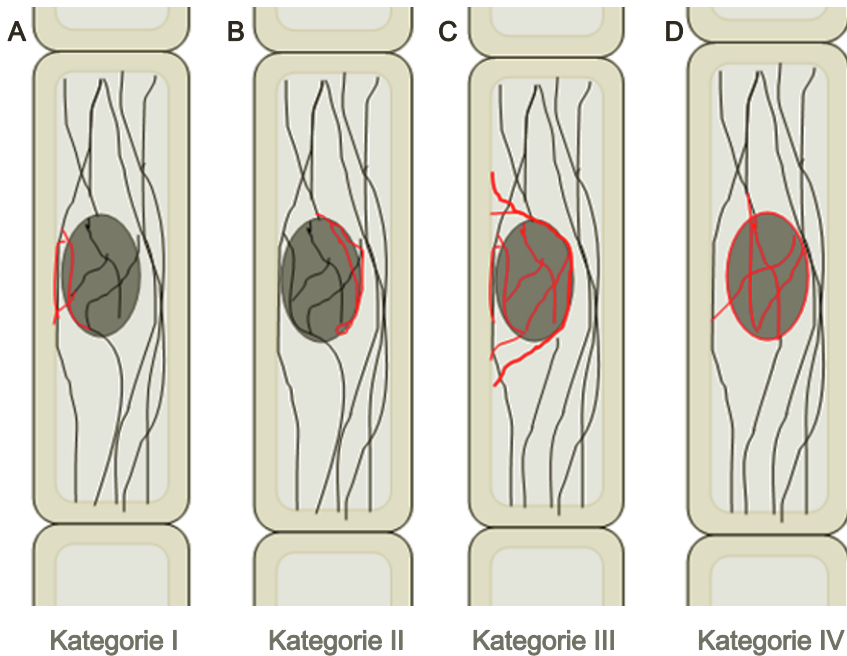
Hemmstoff-gruppe	Hemmstoff	Konzentration	Stammlösung
	1-N-Naphthyl-Phthalamidsäure (NPA)	10 µM	10 mM in DMSO
2 Aktindynamik	Phalloidin	1 µM	1 mM in 96 % (v/v) EtOH
3 Myosin-inhibitoren	2,3-Butandionmonoxim (BDM)	2,5 mM	0,5 M in d H ₂ O
	Blebbistatin	20 µM	10 mM in DMSO

2.4 Kategorisierung der Lokalisation des markierten perinukleären Aktinnetzwerks und Analyse der Kernposition

2.4.1 Ermittlung der Signalposition

Die Position des durch Lifeact::psRFP markierten, perinukleären Aktinnetzwerks, das entweder nur auf einer Seite des Kerns vorzufinden ist (Abb. 2-2 A und B) oder den Kern rundum umgibt (Abb. 2-2 C und D), wurde in vier Kategorien eingeteilt (siehe Abb. 2-2): In Kategorie I ist das Signal zwischen Zellwand und Zellkern lokalisiert (Abb.2-2 A), in Kategorie II hingegen zur Zellmitte orientiert (Abb.2-2 B). Umgibt das Signal des perinukleären Aktinskeletts zwar den Zellkern korbartig von allen Seiten, ist aber zusätzlich noch mit der Zellwand verankert, liegt Kategorie III vor (Abb. 2-2 C). In Kategorie IV umspannt das markierte Aktinnetzwerk den Kern von allen Seiten und ist von der Zellwand völlig losgelöst (Abb. 2-2 D).

Abbildung 2-2 Kategorisierung der verschiedenen Signalpositionen



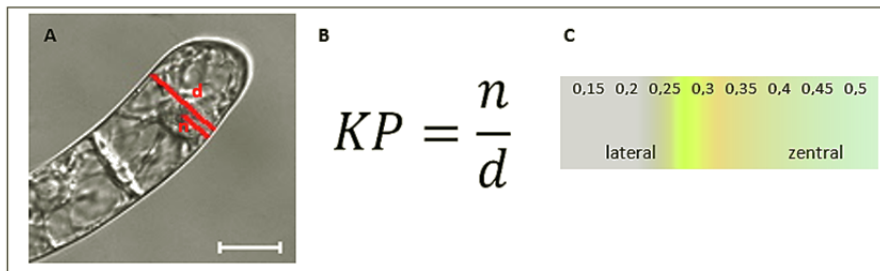
Von links nach rechts sind die vier Kategorien der unterschiedlichen Signalpositionen schematisch dargestellt. In rot (grau) ist das markierte Aktin zu sehen, der Kern ist oval in schwarz dargestellt.

Für die Bestimmung der Signalpositionen wurden jeweils 2000 Zellen der Lifeact::psRFP Kultur aus vier unabhängigen experimentellen Serien jeweils an den Tagen 1 bis 7 untersucht und den vier Kategorien zugeteilt. Diese Untersuchungen lieferten die Referenzwerte, mit denen die Ergebnisse der Hemmstoffexperimente verglichen wurden. Die Resultate der Hemmstoffexperimente ergaben sich durch die Auswertung von jeweils 1500 Zellen pro Tag aus drei unabhängigen Serien. Als Maß für die Streuung zwischen den drei bzw. vier Versuchsreihen (Stichproben) wurde der Standardfehler ermittelt, indem die Standardabweichung des Mittelwertes der drei bzw. vier Versuchsreihen durch die Quadratwurzel n , der Stichprobengröße (3 oder 4), geteilt wurde.

2.4.2 Ermittlung der Kernposition

Die Position des Kerns wurde anhand von Kachelbildern untersucht. Hierzu wurde, wie in Frey *et al.* (2010) beschrieben, zunächst die Zellbreite und dann der kleinste Abstand zwischen Zellwand und Zellkernmittelpunkt gemessen (Abb. 2-3 A). Anschließend wurde der Quotient aus beiden Werten gebildet (Abb. 2-3 B). Daraufhin wurden die berechneten Verhältnisse in acht Klassen zusammengefasst und in folgende Intervalle aufgeteilt: (0; 0,15], (0,15; 0,2], (0,2; 0,25], (0,25; 0,3], (0,3; 0,35], (0,35; 0,4], (0,4; 0,45], (0,45; 0,5]. Mittels dieser Klassifizierung wurde sichtbar, ob sich der Kern zentral oder lateral befindet (Abb. 2-3 C): Bei einem Verhältnis von 0,4 bis 0,5 liegt der Kern zentral (in der Skala grün/ hellgrau), bei Werten von 0,15 bis 0,25 liegt er lateral (in der Skala blau/ dunkelgrau), bei den Werten von 0,3 bis 0,4 liegt der Kern zwischen zentral und lateral (in der Skala gelb).

Abbildung 2-3 Bestimmung der Kernposition nach Frey *et al.* (2010)



(A) Messung der Zellbreite (d) und des Abstands von der Zellwand bis zum Kernmittelpunkt (n). (B) Formel zur Errechnung der Kernposition (KP). (C) Kategorisierung der Kernposition. Maßstabsbalken: 20 µm.

Für die Bestimmung der Kernposition wurden jeweils 100 Zellen der Lifeact::psRFP Kultur an den Tagen 1 und 5 ausgewertet und den acht Klassen zugeteilt. Diese Wahl des Zellalters resultiert aus den Ergebnissen der Signalposition (vgl. Abb. 3-2, S. 31). Die Untersuchungen der Lifeact::psRFP Kultur lieferten die Referenzwerte, mit denen die Ergebnisse der Hemmstoffexperimente verglichen wurden. In den Hemmstoffexperimenten wurde pro Hemmstoffgruppe die Kernposition jeweils eines Hemmstoffs ausgewertet: IAA wurde für die Auxine (Hemmstoffgruppe 1) ausgezählt; Phalloidin wurde für die Hemmstoffe der

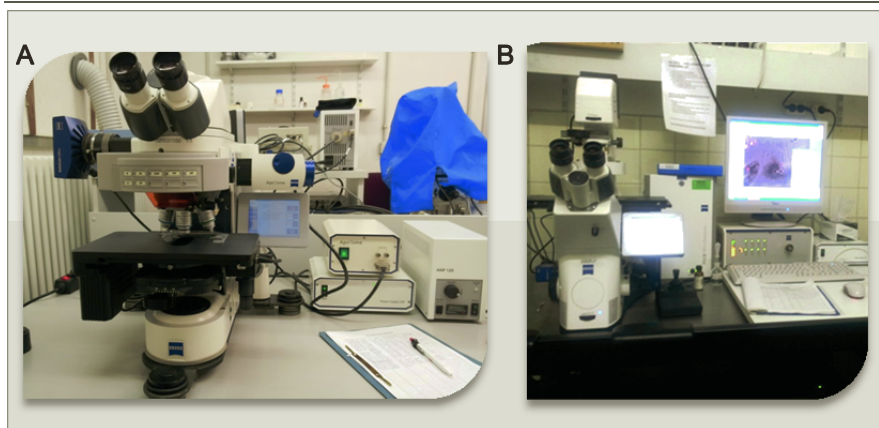
Aktindynamik (Hemmstoffgruppe 2) ausgewertet und Blebbistatin wurde für die Myosininhibitoren (Hemmstoffgruppe 3) untersucht.

2.5 Mikroskopie und Bildanalyse

2.5.1 Mikroskope

Mikroskopiert wurde mit dem AxioObserver.Z1 (Abb. 2-4 B) und dem AxioImager.Z1 (Abb.2-4 A) von Zeiss (Jena, Deutschland). Aufgenommen wurde mittels der AxioCamMR3 Kamera (Zeiss, Jena, Deutschland).

Abbildung 2-4 Verwendete Mikroskope



(A) AxioImager.Z1 zur Untersuchung der Transformanten. (B) AxioObserver.Z1 für Langzeitaufnahmen.

Zur Ermittlung der Signal- und Kernpositionen wurde die MosaiX-Funktion der AxioVision Software Rel. 4.8 (Zeiss, Jena, Deutschland) genutzt und einzelne Kachelbilder mit einer Fläche von $432 \times 324 \mu\text{m}$ erstellt. Die Kachelbildeinstellungen betrugen sieben Zeilen auf sieben Spalten im mäanderförmigen Aufnahme-modus. Die Gesamtfläche betrug $3029 \times 2269 \mu\text{m}$. Je nach Zellzahl auf einem Kachelbild wurden fünf bis sieben Groß-Kachelbilder erstellt um eine Gesamtzellzahl von jeweils 500 zu erreichen. Als Objektiv wurde das Plan-Apochromat

20x/0.75 gewählt. Die Hellfeldaufnahmen wurden im DIC-Modus erstellt, die rote psRFP-Fluoreszenz wurde mit dem Filtersatz 43 HE (Anregungswellenlänge bei 550 nm, Farbteiler bei 570 nm, Emission bei 605 nm) beobachtet.

2.5.2 Langzeitstudien

Um Langzeitstudien durchzuführen, wurden sowohl Cell view™ Zellkulturschalen (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit Glasboden und einem Durchmesser von 35 mm, als auch Lab-Tek™ Kammer-Systeme (Nunc GmbH & Co. KG Thermo Fischer Scientific, Langenselbold, Deutschland) mit einem Arbeitsvolumen von 0,5 bis 0,9 ml pro Kammer verwendet. Da beide einzig für die Verwendung an inversen Mikroskopen geeignet sind, wurde mit dem AxioObserver Z1 gearbeitet (Abb. 2-4 B, S.23). Ferner wurde das Kulturmedium mit 0,1 % Agarose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verfestigt, um die verwacklungsfreie Aufnahme während der Langzeitstudien zu gewährleisten.

In die Zellkulturschalen wurden zunächst 60 µl Zellsuspension pipettiert. Danach wurden 500 µl des leicht erwärmten Kulturmediums (einschließlich 0,1 % Agarose) in die Zellkulturschalen gegeben. Anschließend wurden die Schalen mit Folie (Parafilm®M, Bemis Company Inc., Neehna WI, USA) verschlossen, um das Austrocknen des Mediums zu vermeiden. Durch kurze Zentrifugation der Schalen konnte ein besseres Absetzen der Zellen erzielt werden.

In die Zellkammern wurden pro Kammer jeweils 45 µl der Zellsuspension und 400 µl verfestigtes Kulturmedium gegeben. Anschließend wurden die Kammern mit Parafilm®M (Bemis Company Inc., Neehna WI, USA) verschlossen und gegebenenfalls kurz zentrifugiert.

Pro Zellkulturschale oder Kammer wurden Zellen von drei verschiedenen Bereichen innerhalb der Schale beobachtet. Dabei wurde jeweils die genaue x-, y- und z-Position mit dem AxioVision Programm von Zeiss (Jena, Deutschland) abgespeichert. Alle 15 min wurde pro Ausschnitt eine Aufnahme mit dem DIC-Modus und dem Filtersatzes 43 HE erstellt. Als Objektiv wurde das Plan-Apochromat 20x/0.8 oder das LD Plan-Neofluar 40x/0.6 gewählt. Das Programm konnte jederzeit gestoppt werden, um die Fokusebene zu korrigieren. Bei einigen Aufnahmen wurden zusätzlich z-Schnitte erstellt, um das Driften aus der Fokusebene zu kompensieren. Dabei wurde ein Abstand von 1 µm gewählt und 10-20 Schnitte pro Aufnahme erstellt.

Insgesamt erstreckten sich die Langzeitstudien über sieben Tage. Pro Bereich wurden circa 600 Einzelbilder (ohne z-Schnitte) erstellt. Die einzelnen Aufnahmen konnten mit Hilfe des Programms ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA) zu einem .avi-Dokument zusammengefügt werden. Nachträglich wurden Kontrast- und Helligkeitsänderungen vorgenommen.

Die Aufprägung und Vererbung der Zellpolarität
Analyse der Kernmigration anhand der Aufdeckung
eines Kernkorbs aus Aktinfilamenten

Brochhausen, L.

2015, XVIII, 97 S. 27 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-08179-9