

# Laborpraktikum

Namen: Sven Thierbach  
Christian Gruchow  
Peter Schön

Betreuerin: Jonas Ries

Datum: 20.5.05

## Laser scanning microscopy am Beispiel subzellulärer Strukturen

Ziel: Es soll die Bindung des Replikationsproteins A (RPA) an M13 ssDNA beobachtet werden. Des Weiteren soll ein prinzipielles Verständnis eines biochemischen Bindungsassays im Vergleich zu physikalischen Versuchsanordnungen erreicht werden.

### Theoretischer Hintergrund:

#### *Konfokales Prinzip:*

Die besonderen Vorteile der konfokalen Lichtmikroskopie bestehen darin, dass das von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene gesammelt werden kann. Eine zur Fokusebene konjugiert angeordnete Lochblende (Pinhole) sorgt dafür, dass sämtliches nicht aus dieser Ebene stammende Licht vom Detektor nicht erfasst wird. Der durch punkt- und zeilenweises Abtasten mit einem Laserstrahl erzeugte optische Schnitt ist ein kontrastreiches, in x, y und z hochaufgelöstes Abbild der Probe.

#### *Spezifität der eingesetzten Farbstoffe:*

*DAPI* (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) bindet bevorzugt in der kleinen Furche doppelsträngiger DNA (dsDNA). Durch die Bindung an DNA wird die Fluoreszenz des Farbstoffs um ca. 20% verstärkt. Das Absorptionsmaximum von DNA-gebundenem DAPI ist 358nm und das Emissionsmaximum liegt bei 461nm.

*Alexa Fluor 546 phalloidin* ist ein Derivat des Phalloidins und bindet spezifisch an F-Actin. Phalloidin gehört zu den Phallotoxinen und wurde aus dem Pilz *Amanita phalloides* isoliert. Es handelt sich um ein bicyclisches Peptid welches durch eine Thioetherbrücke aus den Aminosäuren Cystein und Tryptophan gebildet wird. Phallotoxine binden stöchiometrisch an F-Actinfilamente und verschieben das Gleichgewicht zwischen freien Monomeren und Actin-Polymeren zugunsten der Polymere. Phallotoxine zeigen kaum unspezifische Bindungen und sind sehr gut wasserlöslich.

Neben Mikrotubuli und Intermediär-Filamenten gehören Actinfilamente zu den Komponenten, die das Zytoskelett einer Zelle bilden. Es übernimmt die Strukturierung des Zellinneren, ermöglicht die Bewegung von Zellkompartimenten (z.B. bei der Zellteilung), die Ausübung von mechanischer Spannung auf die Umgebung und die (Fort-) Bewegung von Zellen. Wachsen Zellen auf einer Oberfläche, wie es „adhärente“ Zellen tun, verändern sie bei der Anheftung an die Oberfläche ihre Morphologie. Die Zellen breiten sich auf der Oberfläche aus, flachen sich dabei ab und setzen sich selbst unter eine gewisse Spannung. Beginnend in den Anheftungspunkten der Zelle („focal adhesion plaques“) bilden sich aus Actin-Monomeren charakteristische cytoskeletale Elemente die sogenannten „stress fibers“. Das Absorptionsmaximum von Alexa Fluor 546 liegt bei 556nm und das Emissionsmaximum liegt bei 573nm.

### Durchführung:

*Färbung adhärenter HeLa-Zellen*

Die Zellen befinden sich auf einem Glasplättchen, das in einer Nährlösung liegt. Diese muss zunächst mit einer Pipette entfernt werden. Anschließend werden die Zellen noch zweimal gewaschen, um auch wirklich alle Reste der Nährlösung zu beseitigen. Dazu werden in jedes Kompartiment, in dem sich jeweils ein Plättchen befindet, 500 µl PBS gegeben und anschließend wieder entfernt. Dabei ist einerseits darauf zu achten, dass das Glasplättchen mit den Zellen nicht berührt wird, da dies die Zellen beschädigen oder zerstören würde und andererseits sollten die Zeiten ohne Flüssigkeit für die Zellen so kurz wie möglich gehalten werden, damit sie nicht austrocknen. PBS (phosphate buffered saline) enthält folgende Komponenten:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	13 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2 mM
KCl	5 mM
NaCl	150 mM
	pH 7,4 mit HCl

Anschließend werden die Zellen fixiert, und zwar durch je 200 µl 3.7% Formaldehydlösung in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Die Formaldehydlösung tötet die Zellen ab, ohne dass sie dabei ihre Form ändern. Beim Arbeiten mit Formaldehyd ist auf die Verwendung von Handschuhen zu achten. Anschließend muss die Lösung wieder ausgewaschen werden. Dazu werden drei Waschgänge wieder mit PBS durchgeführt (jeweils wie bei allen noch folgenden Waschgängen mit 500 µl). Danach werden die Zellen für 5min mit je 200µl 0.5% TRITON® X-100 in PBS (10% in PBS bei 4°C) inkubiert. Dies macht die Zellmembran durchlässig für die Farbstoffe. Selbstverständlich werden die Zellen wieder gewaschen, diesmal zweimal. Jetzt werden die Färbelösungen hergestellt. Wieder ist auf die Verwendung von Handschuhen zu achten. Es werden pro Deckglas je 5µl Alexa Fluor 546 Phalloidin (Molecular probes A-22283) Stammlösung in 200µl PBS/1% BSA verdünnt, sowie für die DAPI-Gegenfärbung je 4µl DAPI Stammlösung zu je 200µl Phalloidin Färbelösung (Endkonzentration 1µg/ml DAPI) dazugegeben. (Die DAPI Stammlösung enthält 50µg/ml DAPI in H<sub>2</sub>O; die Phalloidin stock solution 0,2U/µl in MeOH und die Färbelösung 1% BSA (Rinderserumalbumin) in PBS) Die Deckgläser werden jetzt 20 Minuten lang bei Raumtemperatur mit je 200 µl der Färbelösung inkubiert. Anschließend folgen wieder drei Waschgänge, um übriggebliebene Farblösung zu entfernen. Zur Auswertung werden die Deckgläser mit je 5 µl PBS auf einen Objektträger gebracht, wobei darauf zu achten ist, dass keine Luftblasen zwischen Deckglas und Träger verbleiben. Ebenso muss der Verdunstung vorgebeugt werden, indem die Ränder der Deckgläschen mit Nagellack verschlossen werden. Diesen lässt man dann einige Minuten antrocknen.