

## Praktikumsbericht

**Zum Praktikum in der  
AG Neumann im  
Institut für Rekonstruktive Neurobiologie im  
Life&Brain Center der  
Universität Bonn im  
Zeitraum vom 01.08 bis zum 26.08.2005**

**Erstellt von: Stefan Milde**

## Einleitung

Dieser Bericht soll eine Reflexion meines vierwöchigen Praktikums in der AG Neumann der Universität Bonn liefern. Dabei werde ich neben der eigentlichen praktischen Arbeit auch auf persönliche Eindrücke und Erfahrungen während meiner Tätigkeit eingehen

Während der ersten Woche des Praktikums bestand die Aufgabe für mich darin, die wesentlichen Grundlagen der Arbeit im Labor kennenzulernen. Dazu zählte neben dem Einarbeiten in verschiedene Protokolle und Arbeitstechniken auch das Verstehen der theoretischen Hintergründe derselben. So wurde ich einerseits mit Methoden aus der Molekularbiologie vertraut gemacht, andererseits musste ich die Erfahrung machen, dass die Zellen für die neurobiologischen Experimente aus Gehirnen von Mäusen gewonnen werden müssen.

Diese Woche erlaubte mir außerdem einen ersten Einblick in die Projekte und Zielstellungen der Wissenschaftler der Arbeitsgruppe. Denn ich durfte verschiedensten Experimenten aller Wissenschaftler der AG beiwohnen. Die praktische Tätigkeit meinerseits blieb in dieser Woche relativ beschränkt, so dass sich langsam eine gewisse Enttäuschung diesbezüglich in mir aufbaute.

Nach dieser einwöchigen Einarbeitungsphase erhielt ich jedoch glücklicherweise die Möglichkeit, ein „eigenes“ Projekt zu verfolgen und so meinen Wunsch nach praktischer Tätigkeit umzusetzen. Das mir übergebene Projekt war von einem der Wissenschaftler der AG einst erdacht und begonnen, allerdings nie fertiggestellt worden. Auf die Arbeit an diesem Projekt soll im Folgenden etwas genauer eingegangen werden.

## Grundlagen und Ziele der Arbeit

Die Arbeit der AG Neumann befasst sich im Wesentlichen mit neuronalen Krankheiten und deren molekularen Ursachen in den Lebensprozessen neuronaler Zellen.

Dabei geht es unter anderem auch darum, die Anzeichen solcher Krankheiten möglichst früh zu erkennen um den Krankheitsverlauf vollständig erfassen und verstehen zu können.

Eine Möglichkeit der Früherkennung auf zellulärer Ebene wird durch die Mitochondrien möglich. Denn oftmals ist der Energiestoffwechsel sehr früh im Krankheitsverlauf von Unregelmäßigkeiten betroffen. Das hier vorzustellende Projekt hat diese Früherkennung eines abnormen Energiestoffwechsels zum Ziel.

Um dies zu realisieren muss der Zustand der ATP-Gewinnung in den Mitochondrien messbar gemacht werden. Dies wird durch eine mutierte Form des GFP (green fluorescent protein) möglich. Die Fluoreszenzaktivität dieses sogenannten GFPredox ist abhängig vom Redoxpotential der Membran in die dieses Protein integriert ist.

Die grundlegende Idee besteht also darin, von der Fluoreszenzaktivität des GFPredox auf den Zustand des Stoffwechsels in den Mitochondrien zu schließen.

Dazu müssen aber zwei weitere Probleme gelöst werden:

Zum Einen muss das GFPredox irgendwie in die innere Mitochondrienmembran integriert werden.

Zweitens muss zur Messung der Fluoreszenzaktivität dieses Proteins eine Basis geschaffen werden auf der vergleichbare Messungen möglich sind.

Um diese beiden Ziele zu erreichen soll das GFPredox mit zwei weiteren Proteinen „in fusion“ gebracht, d.h. als eine Aminosäurekette und damit faktisch als ein Molekül exprimiert werden, ohne dass Struktur und Aktivität der drei ursprünglichen Proteine negativ beeinträchtigt werden.

Das erste dieser Proteine (mito) wird nach erfolgter Translation im Cytoplasma in die innere Mitochondrienmembran transportiert. Durch die Verbindung der Proteine zu einem Molekül wird damit auch das GFPredox mit in die innere Membran der Mitochondrien integriert.

Um eine vergleichbare Messung zu ermöglichen wird ein weiteres Fluoreszenzprotein (mRFP – monomeric red fluorescent protein) integriert, welches unabhängig vom Redoxpotential der Mitochondrienmembran stets die gleiche Fluoreszenzaktivität zeigt. Damit fungiert dieses Protein als Kontrollmöglichkeit. Denn ein Vergleich der Fluoreszenzintensität ist nur zwischen GFPredox und GFPredox, nicht aber zwischen GFPredox und mRFP möglich. Somit muss die Fluoreszenzaktivität des GFPredox der zu untersuchenden Zelle mit dem einer „gesunden“ verglichen werden. Dabei darf sich die Intensität der Fluoreszenz des mRFP zwischen den beiden Zellen nicht unterscheiden. Ist dies dennoch der Fall, liegt ein Fehler im Messsystem vor. Im fertiggestellten System lässt demnach der Vergleich der Fluoreszenzintensität von GFPredox zwischen gesunden und erkrankten Zellen einen Rückschluss auf die, eventuell durch die Krankheit ausgelösten, Störungen im Energiestoffwechsel zu.

### Arbeitsweise- und techniken

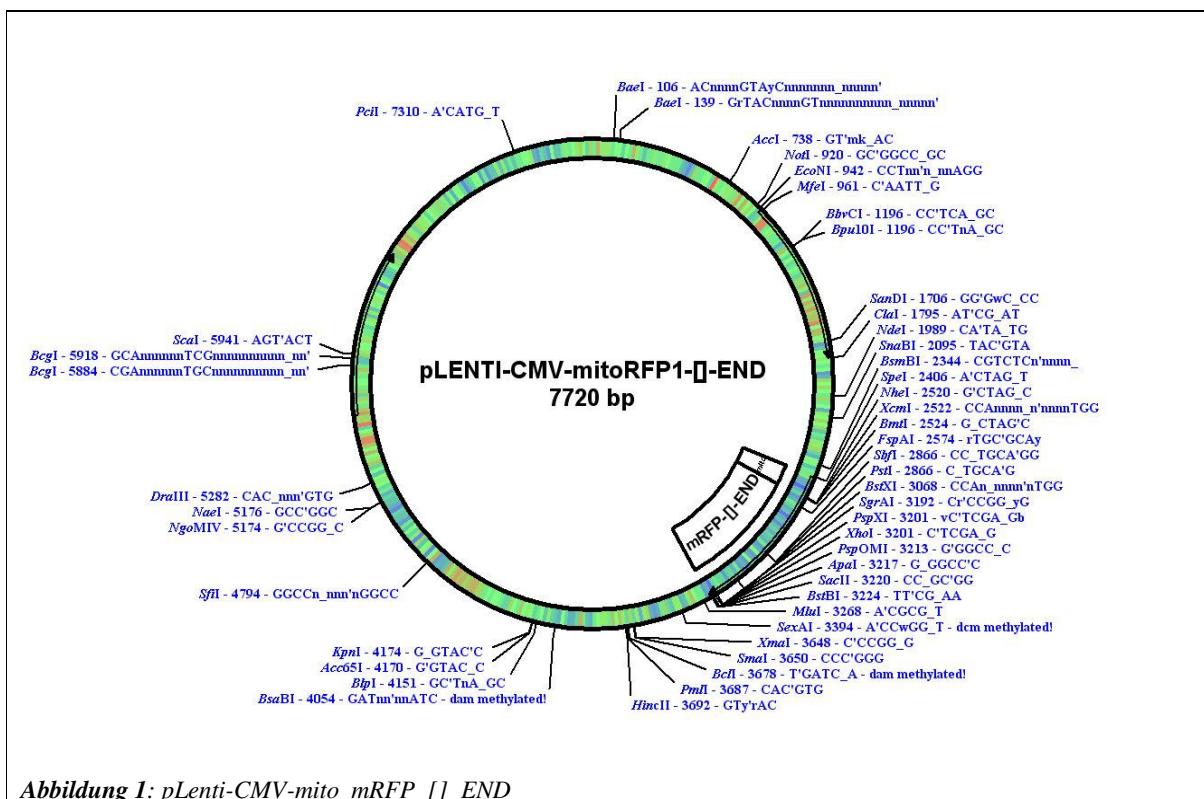
Die Realisierung des Projekts sollte in drei prinzipiellen Schritten erfolgen:

1. Das Fertigstellen und Vermehren des entsprechenden Plasmiden (Cloning)
2. Einbringung des Plasmiden in neuronale Zellen (Transfektion)
3. Messung der Fluoreszenzaktivitäten und Vergleichsmessungen (Prüfen des Systems)

Auf die praktische Umsetzung dieser Schritte soll im Folgenden etwas näher eingegangen werden. Zu Allen genannten Arbeitstechniken findet sich ein Protokoll im Anhang.

### 1. Cloning

Wie bereits erwähnt handelt es sich um die Fortsetzung eines bereits begonnen Projektes. Daher verfügte ich zu Beginn der Arbeit bereits über einen viralen Plasmiden (pLenti-CMV-mito-mRFP) in dem sich die Proteine mito und mRFP „in fusion“ befanden.



Die Aufgabe bestand nun darin, auch GFPredox, welches sich ebenfalls innerhalb eines Plasmids befand, in dieses Konstrukt einzufügen und zwar so, dass sich auch dieses Protein „in fusion“ mit den anderen beiden befand.

Um die ersten Arbeitsschritte ausführen zu können, wurden die Sequenzen von GFPredox und des pLenti benötigt:

Ausschnitt aus pLenti-CMV-mito-mRFP:

```

ATG TCC GTC CTG ACG CCG CTG CTG CTG CGG GGC TTG ACA GGC TCG
GCC CGG CGG CTC CCA GTG CCG CGC GCC AAG ATC CAT TCG TTG GGG
GAT CCA CCG GTC GCC ACC GCT AGC
ATG GCC TCC TCC GAG GAC GTCATCAAGGAGTTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACC
GCCACGAGTTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAA
GGTGACCAAGGGCGGGCCCTGCCCCTTCGCCCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTCCAGTACGGCTCCAAG
GCCTACGTGAAGCACCCCGCCGACATCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCCCGAGGGGCTTCAAGTGGG
AGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGA
GTTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACC
ATGGGCTGGGAGGCCCTCCACCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGATGA
GGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCCGAGGTCAAGACCACCTACATGGCCAAGAAGCCCGT
GCAGCTGCCCGGCGCTACAAGACCGACATCAAGCTGGACATCACCTCCACAACGAGGACTACACCATC
GTGGAACAGTACGAGCGCGCCGAGGGC CGC CAC TCC ACC GGC GCC
CTC GAG TCT AGA GGG CCC GCG GTT CGA AGG TAA

```

Der graue Bereich des pLenti ist die Sequenz des Proteins mito. Grün markiert folgen sechs Nukleotide, welche die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *NheI* darstellen. Der rot markierte Bereich ist die Sequenz des mRFP. Die nachfolgende, gelb markierte Sequenz ist die Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym *XhoI*. Türkis markiert ist die Erkennungssequenz für *ApaI*, ein weiteres Restriktionsenzym. Der rot markierte Codon am Ende ist der Stopcodon. Die Erkennungssequenzen für *XhoI* und *ApaI* treten im gesamten pLenti nur an der hier gezeigten Stelle auf, so dass eine Verwendung dieser Enzyme zur Integration des GFPredox passend schien.

GFPredox:

```

ATG GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCA
CAAGTTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTCCACCACCG
GCAAGCTGCCCGTGCCTTGGCCACCCTCGTGACCACCTGTCTACGGCGTGCAGTGCTTACGCCGTACCCCGAC
CACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA
CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA
TCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACTGCCACAACGTCTATATCATG
GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCGAGTCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGC
CGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCTGCT
CCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGCATCACATGGTCTGCTGAGTTTCGTGACCGCCCGGGATCACT
CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

```

Die Sequenz des GFPredox unterscheidet sich durch vier Punktmutationen von der des Wildtyp - GFP. Rot markiert sind Start- und Stopcodon.

Wird nun der oben gezeigte pLenti mit *XhoI* und *ApaI* verdaut eröffnet sich die Möglichkeit, die Sequenz des GFPredox zu integrieren. Dafür müsste diese aber über die gleichen

Erkennungssequenzen verfügen, um eine Ligation mit Hilfe der „klebrigen Enden“ zu ermöglichen. Dies war nicht der Fall.

Und an dieser Stelle war ich das erste (aber garantiert nicht das letzte) Mal während des Praktikums richtig überrascht:

In der Schule hatte sich mir die ganze Sache so dargestellt:

Wenn das zu integrierende Gen und der Plasmid zufällig an einer Stelle die gleichen Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme aufweisen, kann sich der Forscher freuen und weiterarbeiten. Ist dies nicht so, hat er Pech gehabt und macht sich auf die Suche nach einem neuen Plasmiden.

Die Lösung ist dahingehend verblüffend einfach: Das Zauberwort heißt „Primer“. Genauer gesagt: die Primer, die für eine PCR (Polymerasekettenreaktion – Protokoll im Anhang) benötigt werden.:

Um das GFPredox aus dem Plasmiden herauszulösen wurde eine PCR angesetzt, die die Sequenz des GFPredox als Zielsequenz hatte. Aber nicht nur das:

Durch das Design der Primer war es möglich, vor bzw. hinter die Sequenz des eigentlichen GFPredox die Erkennungssequenzen von Restriktionsenzymen zu platzieren. So wurden an den „forward“-Primer des GFP (rosa markiert) die Erkennungssequenzen für XhoI (gelb markiert) und Bgl II (grün markiert) vorn angefügt:

```
CCCTCGAGAGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAG
```

Die zusätzlich eingefügte Erkennungssequenz für Bgl II dient als „Platzhalter“. Denn wie gesagt befinden sich die drei Proteine „in fusion“, d.h. sie sind verbunden. Je weiter sie jedoch innerhalb dieser Fusion räumlich voneinander entfernt sind umso wahrscheinlicher ist es, dass sie ihre ursprüngliche Konformation und damit eine nicht beeinträchtigte Aktivität aufweisen.

Ebenso wurde mit dem „reverse“-Primer verfahren; hier wurde die Erkennungssequenz für ApaI (türkis markiert) angefügt (ein Platzhalter wird hier nicht benötigt, da das Ende der Sequenz erreicht ist):

```
GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGGCC
```

Da es sich hier um den reverse-Primer, also den rückwärts gerichteten Primer handelt musste die gezeigte Sequenz noch umgekehrt und komplementiert werden, um an die entsprechende DNA-Sequenz binden zu können:

```
GGGCCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC
```

Nach erfolgreicher PCR erhielt ich somit die vervielfältigte Sequenz des GFPredox, die nun über die entsprechenden Erkennungssequenzen für XhoI und ApaI verfügte.

Die Analyse des fertigen PCR-Gemisches mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels zeigte, dass eine Sequenz von ca. 700bp Länge vervielfältigt worden war: mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit handelte es sich um die DNA-Sequenz des GFPredox.

Als nächster Schritt wurde eine sogenannte Gel-Extraktion durchgeführt. Dabei wurde die Bande des Gels in welcher sich die DNA des GFPredox befand entnommen und die DNA wurde isoliert und gereinigt.

Im nächsten Schritt wurde die aufbereitete GFPredox – DNA mit den Restriktionsenzymen ApaI und XhoI geschnitten („Restriction Digestion“). Damit wurden die benötigten klebrigen Enden für die spätere Ligation erzeugt. Nach einem weiteren Reinigungsschritt (Clean-up) war die

GFPretox – DNA fertig für die Ligation mit dem pLenti. Dieser wurde parallel zu den beschriebenen Schritten ebenfalls für die Ligation vorbereitet.

Dazu wurde auch hier eine Restriktionsverdauung mit XhoI und ApaI vorgenommen. Nachfolgend wurde eine Gel-Analyse verbunden mit einer Gel-Extraktion durchgeführt um zum Einen das kurze herausgeschnittene Stück DNA, aber auch Puffer und Proteine der Restriktion zu beseitigen und die DNA somit zu reinigen.

Nun wurde die Ligation angesetzt, d.h. pLenti und GFPretox-Sequenz sollten mit Hilfe einer DNA – Ligase zu einem Plasmiden verschmolzen werden.

Als Nächstes musste ein Selektionsprozess folgen, denn im DNA-Gemisch befanden sich neben dem gewünschten Plasmiden eine große Zahl ungewollter DNA-Verbindungen. (z.B. der unveränderte pLenti oder die GFPretox-Sequenz).

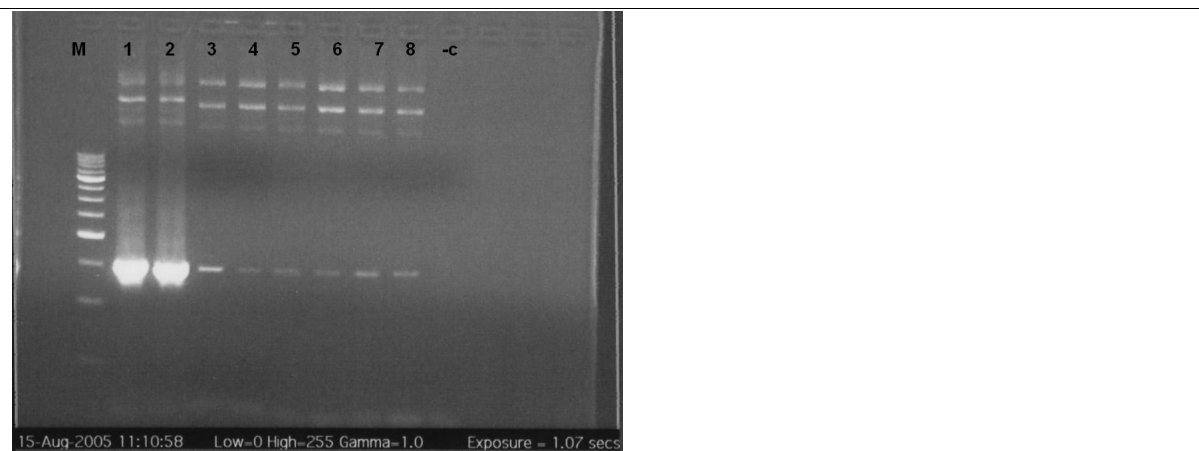
Hierfür wurde eine Transformation durchgeführt, d.h. die DNA wurde durch Hitzeschock in E.coli – Bakterien eingeschleust.

Die Inkubation dieser E.coli auf einer Agarplatte mit dem Antibiotikum Ampicillin stellte den ersten Selektionsschritt dar. Denn der pLenti enthielt neben den bereits angesprochenen Genen auch die Sequenz für eine Resistenz gegen Ampicillin. Somit konnten nur solche Bakterien Kolonien bilden, die den Plasmiden (und damit faktisch die „Resistenz“) aufgenommen hatten.

Ein zweiter Selektionsschritt wurde auf zwei Wegen abgesichert:

Von den sich entwickelnden Klonen wurden acht mit Hilfe einer Impfschlinge aufgenommen und je in ein separates Flüssigmedium überführt. Nach 8h Inkubationszeit wurde eine sogenannte Minipreparation von DNA durchgeführt. Dabei wurden die Plasmide aus den Bakterien der acht Klone einzeln isoliert und gereinigt.

Ein erster Weg zur Überprüfung, ob einer oder mehrere der Klone „positiv“ waren, d.h. den Plasmiden mit dem GFPretox aufgenommen hatten, stellte wiederum eine PCR dar. Mit den bereits vorgestellten Primern wurde eine solche PCR angesetzt. Befand sich GFPretox im Plasmiden, so wurde es vermehrt. Sichtbar wurde das Ergebnis dieser PCR wiederum durch Analyse in einem Agarosegel.



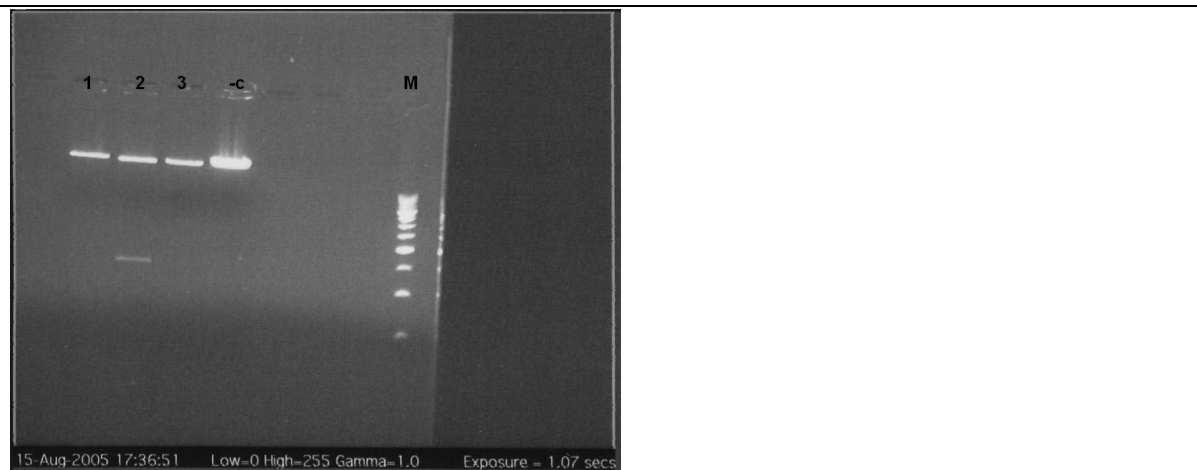
**Abbildung 2:** Gelanalyse der Plasmid-DNA von Kolonien von E.coli nach Transfektion mit pLenti mito-mRFP-GFPretox Plasmid und nachfolgender PCR mit GFPretox-Primern.

M: Marker; 1-8: zu untersuchende Klone; -c: Negativkontrolle (kein Zusatz von DNA bei der PCR)

Hier sind bei den Klonen 1 und 2 deutlich Banden von DNA der Länge 700bp zu erkennen. Dies lässt auf positive Klone schließen. Die Länge der DNA der Banden lässt sich anhand des

Markers (hier ganz links, mit „M“ bezeichnet) ablesen. Jede Bande auf der Linie der Marker-DNA entspricht, von unten beginnend, 250bp. Die deutlich sichtbaren Banden der Klone 1 und 2 befinden sich knapp unter der 750bp-Bande des Markers und haben somit eine Länge von ca. 700bp.

Um das Ergebnis der Klone 1 und 2 zu überprüfen wurde die restliche DNA der dieser Klone nochmals einer Restriktion mit XhoI und ApaI unterzogen. Die nachfolgende Gel-Analyse sollte für einen positiven Klon wiederum eine Bande DNA der Länge 700bp liefern, da GFPredox aus dem Plasmiden herausgeschnitten wird:



**Abbildung 3:** Gelanalyse der Plasmid-DNA von Kolonien von *E.coli* nach Transfektion mit pLenti mito-mRFP-GFPredox Plasmid und nachfolgender Restriktion mit XhoI und ApaI..  
M: Marker; 1-3: zu untersuchende Klone; -c: Negativkontrolle (Restriktion eines Plasmiden ohne Erkennungssequenzen von XhoI und ApaI)

Wie zu erkennen ist, zeigt sich jedoch nur bei Klon 2 eine solche Bande. Dies lässt darauf schließen, dass das scheinbar positive Resultat von Klon 1 im ersten Überprüfungsschritt auf eine Kontamination zurückzuführen ist. Denn schon eine minimale, ungewollte Verunreinigung des PCR-Gemisches mit der GFP-Sequenz genügt, um das oben gezeigte „positive“ Resultat der PCR hervorzurufen.

Aber Klon 2 war auch dieser Analyse zufolge positiv, so dass mit diesem weitergearbeitet werden konnte. Die verbliebenen Bakterien wurden wiederum in Flüssigmedium überführt und vermehrt. Eine Maxipreparation von DNA lieferte eine ausreichend große Menge des Plasmiden für die weitere Arbeit.

Damit war die Prozedur des Klonens abgeschlossen. Die entsprechende Sequenz des pLenti sah nun wie folgt aus:

```

ATG TCC GTC CTG ACG CCG CTG CTG CTG CGG GGC TTG ACA GGC TCG
GCC CGG CGG CTC CCA GTG CCG CGC GCC AAG ATC CAT TCG TTG GGG
GAT CCA CCG GTC GCC ACC GCT AGC
ATG GCC TCC TCC GAG GAC GTCATCAAGGAGTTTCATGCGCTTCAAGGTGCGCATGGAGGGCTCCGTGAACG
GCCACGAGTTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCGCCAAGCTGAA
GGTGACCAAGGGCGGCCCCCTGCCCTTCGCCITGGGACATCCTGTCCCCCAGTTCAGTACGGCTCCAAG
GCCTACGTGAAGCACCCCGCGACATCCCGACTACTTGAAGCTGTCCCTCCCGAGGGGCTTCAAGTGGG
AGCGCGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGCGTGGTGACCGTGACCCAGGACTCCTCCCTGCAGGACGGCGA
GTTTCATCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGCACCAACTTCCCCTCCGACGGCCCCGTAATGCAGAAGAAGACC

```

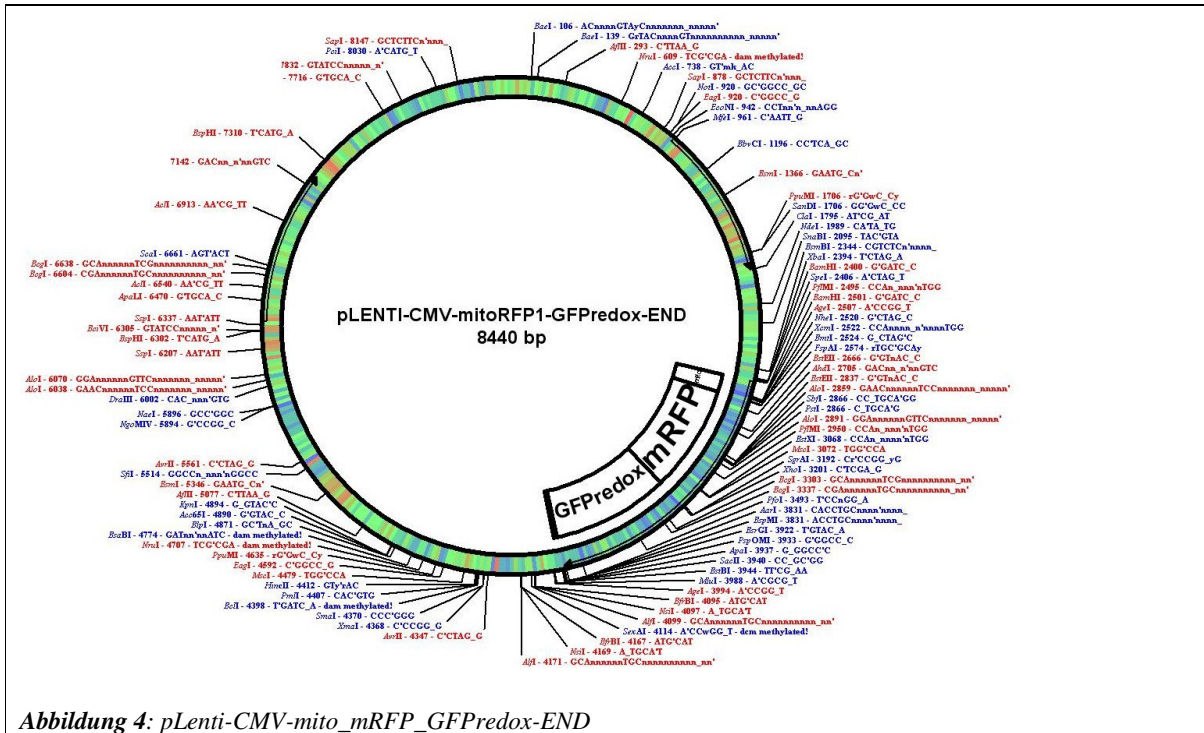
ATGGGCTGGGAGGCCCTCCACCGAGCGGATGTACCCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGATGA  
GGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACCGCGAGGTCAAGACCACCTACATGGCCAAGAAGCCCGT  
GCAGTGCCTCCGGCCCTACAAGACCCGACATCAAGCTGGACATCACCTCCCACAACGAGGACTACACCATC  
GTGGAACAGTACGAGCGCGCCGAGGGC CGC CAC TCC ACC GGC GCC

CTCGAGAGATC

ATGGTGAAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGAGTAAACGGCCA  
CAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTCCACCACCG  
GCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTACCACCTGTCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGAC  
CACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGA  
CGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCA  
TCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGCGACAAGCTGGAGTACAACATAACTGCCACAACGCTCTATATCATG  
GCCCACTAAGAGAAGACGGCATCAAGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGC  
CGACCACTACCAGAGAACCACCCCATCGGCCAGTGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCCTACCTGAGCAGCTGCT  
CCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTTCGTGACCGCGCCGGGATCACT  
CTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA

GGG CCC GCG GTT CGA AGG TAA

Hier befinden sich nun im sonst unveränderten pLenti zwischen den Erkennungssequenzen von XhoI (gelb) und ApaI (türkis) die Erkennungssequenz von Bgl II (dunkelgrün) und die Sequenz des GFPredox (rosa). Demzufolge befanden sich nun alle drei gewünschten Proteine „in fusion“ im pLenti.



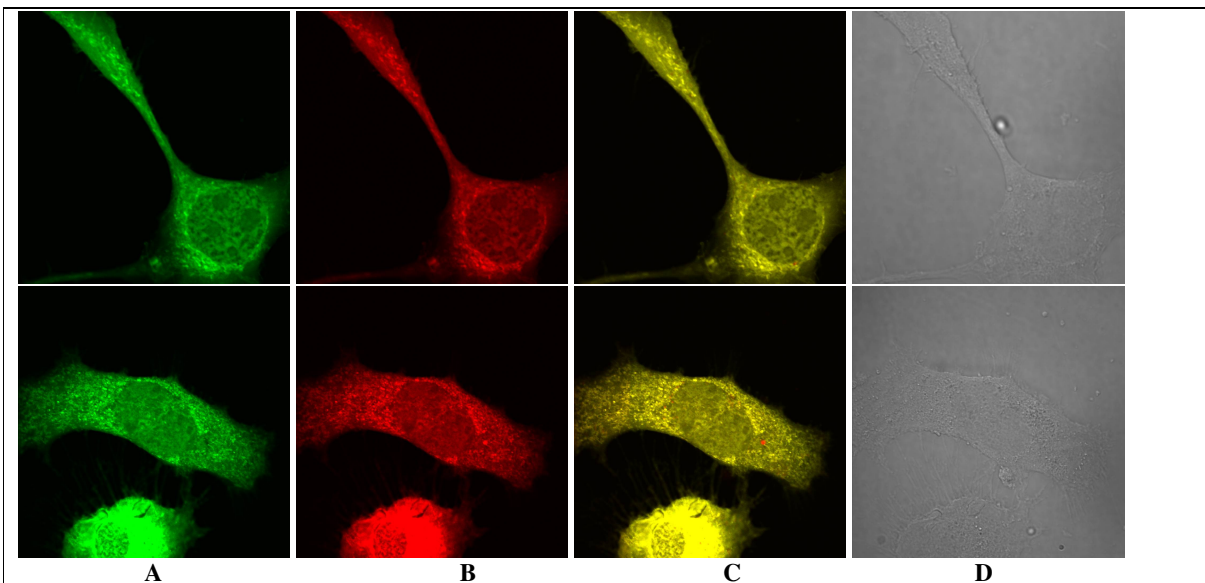


## 2. Transfektion von neuronalen Zellen

Im zweiten Abschnitt der Arbeit bestand das Ziel nun darin, den erzeugten und vermehrten Plasmiden in neuronale Zellen einzubringen.

Hierbei wurden prinzipiell drei Transfektionsexperimente durchgeführt<sup>1</sup>:

Im ersten dieser Experimente wurden Neuroblastomazellen (Zellen eines Gehirntumors bei Mäusen) mit dem geklonten Plasmiden (pLenti-CMV-mito-mRFP-GFPredox-END) transfiziert. Damit sollte zunächst Gewissheit über die Expression der Gene des Plasmiden gewonnen werden. Nach einer Inkubationsphase von drei Tagen und nach erfolgter Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd waren mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes tatsächlich eine große Anzahl transfizierter Zellen zu erkennen, welche die Fluoreszenzmuster von GFPredox und mRFP wie erwartet in den Mitochondrien zeigten.



**Abbildung 5:**

Neuroblastomazellen der Zelllinie N1E drei Tage nach Transfektion mit pLenti-CMV- mito\_mRFP\_GFPredox-END Plasmid. Fixiert mit 4% Paraformaldehyd. Aufnahmen durch konfokales Mikroskop.

A: GFP – Signal; B: RFP-Signal; C: Kokoloration von GFP und RFP Signal D: Transmissionslichtbild der untersuchten Zellen.

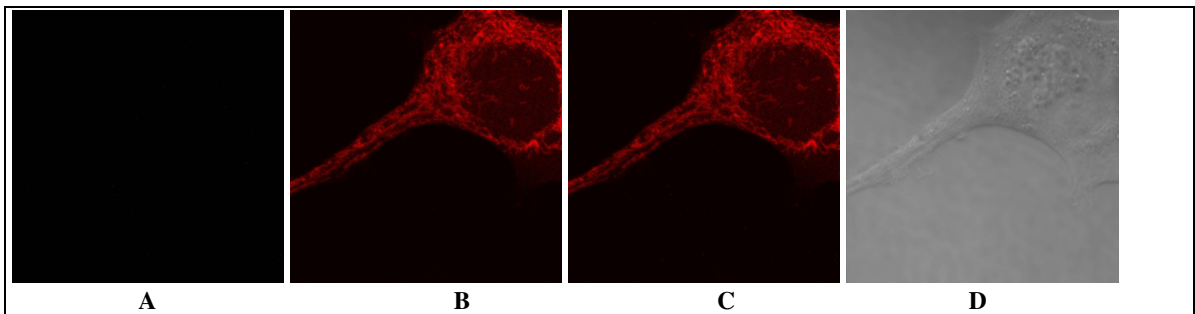
Das zweite Experiment wurde ebenfalls mit den angesprochenen Neuroblastomazellen durchgeführt. Allerdings wurden diese nicht mit dem neu erzeugten Plasmiden (pLenti-CMV-mito-mRFP-GFPredox-END) sondern mit dem, zu Beginn der Arbeit vorhandenen Plasmiden, ohne integriertes GFPredox (pLenti-CMV-mito-mRFP-[]-END) transfiziert. Dies war notwendig um eine Negativkontrolle zu erzeugen.

Denn bei diesen Zellen sollte zwar eine rote Fluoreszenz (durch das vorhandene mRFP), nicht aber eine grüne (denn GFPredox war nicht im Plasmiden integriert) zu erkennen sein. Diese Kontrolle sollte ausschließen, dass die rote Fluoreszenz des mRFP durch die entsprechenden

<sup>1</sup> Dazu wurde eine Form der Transfektion (effectene - transfection) genutzt, die den Plasmiden in die Zellen einschleust, aber nicht ins Genom integriert. Im Gegensatz dazu steht die stabile Transfektion die durch die Verwendung von Viren das gewünschte genetische Material ins Genom der Zelle einfügt. Die stabile Transfektion, die eine längerfristige Fluoreszenzaktivität der Zellen zur Folge gehabt hätte, wäre in diesem Fall durch die Verwendung des viralen pLenti – Plasmiden möglich gewesen. Unter Beachtung des zeitlichen Rahmens sowie der Ziele der Arbeit schien dies jedoch nicht sinnvoll.

Filter des Mikroskops auch als grüne sichtbar wurde und somit fälschlicherweise auf GFPredox geschlossen wurde.

Nach drei Tagen wurden die so transfizierten Zellen fixiert und auf ihre Fluoreszenz geprüft. Wie erwartet wurde, war lediglich eine rote, nicht aber eine grüne Fluoreszenz innerhalb der Mitochondrien zu erkennen. Demnach beruht die grüne Fluoreszenz der Zellen des ersten Experiments *nicht* auf fehlerhafter Interpretation oder Kontamination der Filter des Mikroskops, sondern tatsächlich auf der Aktivität des integrierten GFPredox.



**Abbildung 6:**

*Neuroblastomazelle der Zelllinie N1E drei Tage nach Transfektion mit pLenti-CMV- mito\_mRFP\_[]-END Plasmid. Fixiert mit 4% Paraformaldehyd. Aufnahmen durch konfokales Mikroskop.*

*A: GFP – Signal; B: RFP-Signal; C: Kokoloration von GFP und RFP Signal D: Transmissionslichtbild der untersuchten Zelle.*

Im dritten Experiment wurden schließlich Neuronen mit dem gewonnenen Plasmiden transfiziert. Denn Neuroblastomazellen eignen sich aufgrund ihrer hohen Transfektionsrate und ihrer relativen Unempfindlichkeit gegenüber verschiedenen Umwelteinflüssen zwar sehr gut für erste Kontrollen nach einem Cloning, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten ist es aber generell notwendig, sich „gesunder“ Neuronen zu bedienen. Denn schließlich handelt es sich bei Neuroblastomazellen um Tumorzellen. In diesen Zellen sind auf Grund verschiedener Mutationen nahezu alle Lebensprozesse in irgendeiner Art und Weise abnorm, so dass allgemeingültige Aussagen nahezu unmöglich sind.

Die Transfektion der Neuronen verlief leider nicht erfolgreich. Der Grund hierfür lag in einer Kontamination der entsprechenden Petrischale mit Bakterien, so dass die transfizierten Neuronen abstarben bevor eine Untersuchung der Fluoreszenzaktivitäten möglich wurde. Eine erneute Transfektion ließ der begrenzte zeitliche Rahmen des Praktikums leider nicht zu, da eine Transfektion von Neuronen nur einmal wöchentlich möglich war, wenn die Zellen aus Mausembryos gewonnen wurden.

### **3. Ausblick: Entwickeln eines Arbeitsablaufes zu Messung und Eichen des Systems**

Die bisherigen Ergebnisse lieferten nur die Grundlage für die eigentliche Arbeit bei der Entwicklung des gewünschten Messsystems. Denn in weiteren Schritten müssten transfizierte Neuronen bestimmten Umwelteinflüssen ausgesetzt werden, um die Sensitivität und Funktionalität des Messsystems zu prüfen, da bisher die Reaktion des GFPredox auf veränderte Redoxpotentiale der inneren Mitochondrienmembran nicht erprobt werden konnte. Weiterhin müssten quantitative Messungen bezüglich der Fluoreszenzintensität von gesunden und erkrankten Neuronen durchgeführt werden, um eine Art Eichung des Systems vorzunehmen, d.h. um herauszufinden in welchem Maße sich die Fluoreszenzintensität des GFPredox unter bestimmten Umwelteinflüssen ändert.

Für diese Schritte blieb im vierwöchigen Praktikum verständlicherweise nicht ausreichend Zeit. Dennoch wurden durch die Arbeiten des Cloning und der ersten Transfektionen die Grundlagen für die beschriebenen weiteren Schritte gelegt, die in der Arbeit der AG Neumann auf Grund der wichtigen Rolle der Mitochondrien in Stoffwechsel und Transportvorgängen der Neuronen durchaus Teil eines Projektes werden können.

## **Schluss**

Zum Abschluss dieses Berichtes werde ich nun versuchen, meine persönlichen Eindrücke noch einmal zu sammeln und kurz festzuhalten.

Ich durfte vier Wochen lang die Arbeitsatmosphäre einer wissenschaftlichen Arbeitsgruppe auf dem Feld der Neurobiologie verfolgen. Dies allein sollte schon für sich sprechen. Denn diese Zeit hielt für mich viele neuartige Erfahrungen bereit, die mich in vielerlei Hinsicht beeindruckt haben. Die neuen, ungewohnten Problemstellungen der praktischen Anwendung der, in der Schule vermittelten, Theorie und deren anschauliche Umsetzung waren spannende und sehr interessante Erfahrungen.

Weiterhin musste ich jedoch auch die Erfahrung machen, dass Geduld eine der wichtigsten Tugenden eines Wissenschaftlers ist. Denn oftmals schrieb das entsprechende Protokoll lange Wartezeiten vor, die mit dem Wissen um die zeitliche Begrenztheit des Praktikums und dem Zweifel bezüglich des Erfolges der Experimente oftmals nur schwer zu ertragen waren.

Dies mindert jedoch keineswegs den absolut positiven Eindruck, den ich während des Praktikums gewonnen habe. Diese vier Wochen waren unglaublich interessant und äußerst beeindruckend. Neben der spannenden Tätigkeit in einer sehr angenehmen Atmosphäre durfte ich auch viele aufgeschlossene, freundliche Menschen aus aller Welt kennenlernen, die mir auch außerhalb des Instituts das Gefühl gaben, für vier Wochen ein Teil ihrer Gruppe zu sein.

Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle nochmals bei allen Mitgliedern der AG Neumann, besonders natürlich bei Philipp, meinem Betreuer, recht herzlich für ihre Offenheit und ihre Anstrengungen bezüglich meines Praktikums bedanken. Dies gilt ebenso für den IBO – Verein und insbesondere für Dennis, welcher sich um die Organisation des Praktikums kümmerte.

## Anhang

### Protokolle

#### **PCR (Polymerase Chain Reaction)**

Place clean paper on bench surface.

Take aliquot of H<sub>2</sub>O.

Take 10xPCR Buffer, dNTPs, Primers, cDNA from freezer and place on ice.

Label PCR tubes and stack in 96-well plate (eg. 4 for sample, 4 for control)

Prepare master mix:

	<b>1 Tube</b>	<b>2 Tubes</b>	<b>3 Tubes</b>	<b>5 Tubes</b>
<b>H<sub>2</sub>O (µl)</b>	41	82	123	205
<b>10x Buffer (µl)</b>	5	10	15	25
<b>dNTPs (µl)</b>	1	2	3	5
<b>Polymerase (µl)</b>	0.5	1	1.5	2.5
<b>Total (µl)</b>	47.5	95	142.5	237.5

Add 47.5µl master mix to each tube.

Add 1µl of appropriate cDNA (nothing to negative control).

Mix forward and reverse primers in the ratio 0,5 µl of each primer for each tube.

Put reaction tubes into PCR machine, choose program, run.

#### **Gel analysis**

Dilute 0,5g of **agarose** in 50ml of 1x **TBE Buffer**. Add 1,25µl of **Ethidium Bromide** (should be 5 µl/ 100µl of solution). Set in gel apparatus with comb(s).

Remove comb(s), add **TBE Buffer** to cover surface of gel.

For each sample take an **ependorf tube**. Add 3µl **loading dye** and 6µl sample to each. Load into gel.

For ladder - mix 2µl loading dye with 1µl ladder DNA and make up to 9µl with **TBE Buffer**.

Connect to power supply (black:-ive, red:+ive, black at start of DNA). Set to 120V, 110mA for 30min. Run.

Place gel onto white tray and bring to camera. Remove gel and place on photo-tray. Adjust zoom, print.

#### **Gel extraction**

**For DNA range 70 bp to 10000 bp. Maximum amount of gel slice is 400 mg.**

Make a Gel with **Gel Star** (4 µl for 50 ml of 1% agarose). Run the gel.

Cut the DNA fragment from the agarose gel with a clean sharp scalpel. Minimize the size of gel slice by removing extra agarose. Weight the gel slice in a colorless tube.

Add 3 volumes of **Buffer QG** (from **Qiagen**) to 1 volume of gel (100 mg of gel – 100 µl) (or usually you can put 450 µl). Incubate and increase to 50 °C for 10 min while the gel is completely dissolved, vortexing the tube every 2 min to help gel get dissolved. Check that the color of the mixture is yellow, approximately like the Buffer QG. Add 150µl of **isopropanol** to the sample mix.

Replace mix to the **QIAquick spin column** in a provided collection tube<sub>2 ml</sub>. Centrifuge for 1 min 13000 rpm. Discard flow-through.

Add 0,5 ml of **Buffer QG**. Centrifuge for 1 min.  
To wash, add 750 µl of **Buffer PE**, centrifuge for 1 min. Discard flow-through and centrifuge empty spin column for an additional 1 min.

Replace spin column into a **clean microfuge tube<sub>1,5ml</sub>**.  
To elute DNA, add 10 to 20 µl of **H<sub>2</sub>O (Aqua purificata)** to the center of spin membrane, wait 1-3 minutes and centrifuge the column for 1 min.

In some cases you can make Clean up instead of Gel extraction.

### **Restriction digestion**

Mix:

2 - 2,5 µg Plasmid	17 µl PCR product (after Gel extraction)
2 µl Buffer	2 µl Buffer
0,5 µl Enzyme 1	0,5 µl Enzyme 1
0,5 µl Enzyme 2	0,5 µl Enzyme 2
<u>16 µl H<sub>2</sub>O (Aqua purificata)</u>	
$\Sigma = 20 \mu l$	<hr/> $\Sigma = 20 \mu l$

Leave at 37<sup>0</sup>C in water bath for 2 - 2,5 hours. Use later or store samples at -20<sup>0</sup>C.

### **Clean up**

Add 300 µl of **Buffer ERC** in each sample. Put a new mixture in 2 different kinds of centrifuge tubes. Centrifuge 1 min 13000 rpm. Discard the flow-through. Add 750 µl of **Buffer PE**. Centrifuge 1 min. Discard the flow-through. Centrifuge 1 min again with empty columns. Replace spin column into a **clean microfuge tube<sub>1,5ml</sub>**. Add 10 µl **H<sub>2</sub>O (Aqua purificata)**. Stand 2-5 min. Centrifuge 1 min. Use the sample or keep it at the 4<sup>0</sup>C.

## Ligation

Mix:

10  $\mu$ l cDNA

5  $\mu$ l plasmid

2  $\mu$ l Ligation Buffer

3  $\mu$ l T4 ligase

$\Sigma$  = 20  $\mu$ l

Leave at 13-15<sup>0</sup>C overnight

## Transformation

Thaw chemical competent cells on ice. Add in eppendorf cup 100  $\mu$ l of **chemical competent cells** and 5-20  $\mu$ l of **ligation mixture**. Incubate for 30 min on ice. Heat shock at 42 <sup>0</sup>C for 45 sec (water bath 42,8 <sup>0</sup>). Cool on ice for 2-3 min.

Add **LB-medium** up to 1 ml/ tube. Transfer to culture tube. Shake for 1 h at 250 rpm at 37<sup>0</sup>C. Transfer in 2ml - eppendorf tube. Spin at 5000 rpm for 3 min. Remove 900  $\mu$ l of supernatant. Resuspend and transfer 100  $\mu$ l on **LB-Agar plate** with the **antibiotic**. Incubate at 37<sup>0</sup> C, overnight.

## Minipreparation of DNA

Put each clone into the tube with 5 ml of **LB medium** with the **antibiotic** (33  $\mu$ g/ $\mu$ l). Put the tube into the incubator 37<sup>0</sup> C, 250 rpm for growing for at least **8 hours** (but not more than 18 h).

Put **2 ml of culture** solution into the tube<sub>2 ml</sub>. Centrifuge for 1 min, 13000 rpm. Discard flow-through. Add another 1-2 ml of the culture solution. Centrifuge and discard flow-through.

**Remained 1-2 ml** of the culture put into the refrigerator on +4<sup>0</sup> C.

Add to the cells 250  $\mu$ l of **Buffer P1** (resuspension Buffer) (ensure that RNase A has been added to Buffer P1). Add 250  $\mu$ l of **Buffer P2** (lysis Buffer) and gently invert the tube 4-6 times to mix (do not vortex). Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min.

Add 350  $\mu$ l of **Buffer P3** (N3) (neutralization Buffer) and invert the tube immediately but gently 4-6 times. The solution should become cloudy.

Centrifuge 10 min, 13000 rpm. During centrifugation, prepare **QIAprep spin columns** and labeled it. Apply the **supernatants** to the QIAprep column. Centrifuge 1 min. Discard the flow-through. Add 750  $\mu$ l of **Buffer PE** (wash Buffer) for washing the columns. Centrifuge 1 min. Discard flow-through and centrifuge **empty spin column** for an additional 1 min.

Put the columns into the new tubes<sub>1,5 ml</sub>. Add 30-50  $\mu$ l of **H<sub>2</sub>O** (aqua purificata), and leave minimum 5-10 min. After, centrifuge 1 min for elution of DNA. Use the samples or store at -20<sup>0</sup>C.

## **Maxi prep**

### **Day1**

Take a conical **500-ml flask** and put inside 250 ml of **LB medium** and 0,5 ml of **antibiotics**. Put 30  $\mu$ l of **cell solution** from 10-ml tube. Mix. Incubate flask 37<sup>0</sup> C, 250 rpm, 12-16 hour (overnight).

### **Day2**

Put the cell solution into four **50-ml tubes**. Harvest the bacterial cells by centrifugation at 5000 rpm for 15 min, 4<sup>0</sup> C. Resuspend the pellet in one tube with 10 ml of **Buffer P1**. Then take this solution and put into the second tube, resuspend. And do so, until the fourth.

Add 10 ml of **Buffer P2**, mix gently but thoroughly by inverting 4-6 times. Leave for 5 min (not more), room temperature.

Meanwhile, prepare the **QIAfilter Cartridge**: screw the cup onto the outlet nozzle of the **QIAfilter Maxi Cartridge**. Put it into the new 50-ml tube.

Add 10 ml of chilled **Buffer P3** to the lysate, and mix immediately but gently by inverting 4-6 times. Immediately after put the solution into the barrel of the **QIAfilter Cartridge**. Incubate 10 min at room temperature (do not insert the plunger).

**Remove the cup** from the QIAfilter outlet nozzle. Gently insert the **plunger** into the QIAfilter Maxi Cartridge and filter the cell lysate into a 50-ml tube.

Add 2,5 ml of **Buffer ER** to the filtered lysate, mix by inverting the tube approximately 10 times, and **incubate on ice** for 30 min. The solution becomes clear. Meanwhile prepare the **QIAGEN-tip 500**: Equilibrate it by applying 10 ml **Buffer QBT**, and allow the column to empty by **gravity flow**.

Put the filtered lysate to the **QIAGEN-tip** and allow it to enter the resin by gravity flow. Discard the flow-through. Wash QIAGEN-tip two times with 30 ml of **Buffer QC**.

Put the QIAGEN-tip into the **new 50-ml tube**. Elute the DNA with 15 ml of **Buffer QN** (collect the solution). Add 10,5 ml (0,7 volumes) of **room-temperature isopropanol (2-propanol)** for precipitate DNA. Mix and centrifuge immediately at 5000 rpm, 8<sup>0</sup> C, 60 min.

Carefully decant the supernatant. Wash DNA pellet with 5 ml of **endotoxin-free, room-temperature 70% ethanol**. Centrifuge at 5000 rpm, 8<sup>0</sup> C, 15 min. Carefully decant the supernatant without disturbing the pellet.

**Air-dry** the pellet for 5-10 min, and redissolve the DNA in a 100  $\mu$ l of **endotoxin-free Buffer TE**. Wait 2-3 min. Replace the solution into the **new 1,5-ml eppendorf tube**. Measure the concentration. Put it on -20<sup>0</sup>C.

## Effectene-Transfection of neuroblastoma cells

### Day 1

**Aspirate the medium** from the flask. Take 10 ml of the **culture medium** and resuspend cells fast up and down several times (about 7-10) using 10 ml pipette – to separate, to get away cells from the plastic. Then put this **cell solution** into the 15 ml tube. Take **one drop** for counting the cells. Meanwhile **centrifuge cells** 7 min, 2500 rpm, 4°C. **Aspirate** the medium. Dilute in the new medium.

Take a **new dish**. Put **0,2-0,5 million neuroblastoma cells** in 4 ml of **culture medium** into the dish. Put in incubator (37°C, 10% CO<sub>2</sub>) for **one day**. Put the rest cells with a 10 ml of culture medium into the new flask.

### Day2

Put 85 µl of **EC-Buffer** into an eppendorf-cup.

Add 0,5 µg of **plasmid**.

Add 4 µl of **Enhancer** (ratio 4:1 Enh:DNA), vortex 1 sec. Leave for 2-5 min at room temperature.

Add 10 µl of **Effectine**, vortex 10 sec, leave for 5-10 min at room temperature.

Add 100 µl of **culture medium**, mix (shake).

Drop carefully the Effectine reaction mixture on the **Neuroblastoma cell culture** (cultured for one day), shake carefully.

Put into incubator (37°C, 10% CO<sub>2</sub>).