

## **$\beta$ -Galaktosidase als Indikator für differentielle Genexpression**

Dieses Experiment ist unter mehreren Aspekten einsetzbar. Es kann im Zusammenhang mit Entwicklung und Zelldifferenzierung verwendet werden, als weitere Anwendung der  $\beta$ -Galactosidase (als Markergen) benutzt werden und eventuell als Methodik der Zellfärbung entwickelt werden. Weiterhin kann die Funktion zelltyp-spezifischer Promotoren mit diesem Experiment erläutert werden. Zur Färbung von Zellen mit  $\beta$ -Galactosidaseaktivität im Unterricht steht das Protokoll aus rechtlichen Gründen noch nicht zur Verfügung.

### **Zelltyp-Identifizierung in Dictyostelium durch Markergene**

*Im Experiment „vom Einzeller zum Vielzeller“ wurden die Entwicklung von Dictyostelium und die verschiedenen Zelltypen beobachtet. Hier wird eine Fortführung des Experiments beschrieben, die sich allerdings nur auf mikroskopische Untersuchungen beschränkt. Die Präparate sind von transgenen Dictyosteliumzellen hergestellt, die der Sicherheitsstufe 1 unterliegen und nicht lebend in der Schule bearbeitet werden dürfen. Die Präparate enthalten fixierte, tote Zellen, die durch die Aktivität des Transgens ( $\beta$ -Galaktosidase) gefärbt wurden.*

Nach der Aggregation beginnen die ursprünglich gleichartigen *Dictyostelium*-Zellen zu differenzieren und unterschiedliche Zelltypen auszubilden. Dazu müssen verschiedene Gene genutzt werden, die die speziellen Eigenschaften der Zelltypen bestimmen. Im fertigen Fruchtkörper können wir die Stiel- und Sporenzellen an ihrem äußeren Erscheinungsbild (Morphologie) unterscheiden. Die Differenzierung beginnt jedoch zu einer Zeit, wenn die Zellen im mikroskopischen Bild noch gleich aussehen.

Die Entscheidung einer Zelle, Stiel oder Spore zu werden, wird durch verschiedene Faktoren wie zum Beispiel die Zellgröße und die Position im Zellzyklus bestimmt. Wenn die Entscheidung einmal gefallen ist, wird eine große Anzahl von Genen aktiviert, die für die Funktion dieses einen Zelltyps nötig ist.

Diese Aktivierung erfolgt über zelltyp-spezifische Promotoren, genetische Steuerelemente, die nur in den Vorläufern des einen, aber nicht des anderen Zelltyps funktionieren. Die Vorläufer nennt man Präsporen- und Prästielzellen, weil sie noch nicht das Aussehen und die volle Funktion der reifen Sporen und des reifen Stiels haben.

Zelltyp-spezifische Promotoren können gentechnisch benutzt werden, um einen Zelltyp sichtbar zu machen, den man mikroskopisch (noch) nicht von anderen Zellen unterscheiden kann. Setzt man z.B. das grün fluoreszierende Protein (GFP, Nobelpreis 2008) unter die Kontrolle eines Sporenpromotors, so wird dieses Gen nur in den Präsporenzellen benutzt (exprimiert) und diese Zellen leuchten grün.

In den vorliegenden Präparaten wurde das  $\beta$ -Galaktosidasegen (*lacZ*) aus *E. coli* unter die Kontrolle eines bestimmten Promotors gesetzt und diese Genkonstruktion wurde in *Dictyostelium*zellen eingebracht. Während der Entwicklung wurden die Zellen abgetötet und fixiert. Dabei wird die  $\beta$ -Galaktosidase aus dem Zellinneren frei und kann zugegebene Laktose spalten. Statt der Laktose gibt man jedoch eine chemische Substanz (X-Gal), die ähnlich wie Laktose aufgebaut ist, nach der Spaltung aber einen blauen Farbstoff freisetzt. Der Farbstoff wird also nur in den Zellen entstehen, die zuvor  $\beta$ -Galaktosidase produziert haben.

Die Schüler sollen verschiedene Entwicklungsstadien, die sie unter dem Mikroskop erkennen, aufzeichnen und die Teile des Organismus, die blau erscheinen markieren. Die verschiedenen Stadien in den Zeichnungen können nach der Entwicklungszeit sortiert und dem Schemabild der *Dictyostelium*entwicklung zugeordnet werden (Abb. 1) Aus den Präparaten und den Zeichnungen soll bestimmt werden, für welchen Zelltyp der Promotor, der die  $\beta$ -Galaktosidase reguliert, spezifisch ist.

Es soll versucht werden, aus den Zeichnungen zu rekonstruieren, wie dieser Zelltyp während der Entwicklung seine Position in dem entstehenden Fruchtkörper verändert.

### Anmerkungen für Lehrer

Dieses Experiment sollte nach der mikroskopischen Untersuchung von Wildtypzellen durchgeführt werden. Zu diesem Zeitpunkt sind die Schüler mit den Entwicklungsstadien und der Zellmorphologie schon etwas vertraut. Der verwendete Promotor treibt normalerweise das *ecmA* Gen an. *Ecma* codiert für ein extrazelluläres Matrixprotein, das typisch für Prästiel- und Stielzellen ist. Die Schüler können dies recht leicht an fast fertigen Fruchtkörpern erkennen.

In früheren Stadien (besonders gut in Slugs zu erkennen), befinden sich die Prästielzellen an der Spitze, sie bilden also die „Nase“ des Slugs. Auch dies sollte zumindest in einigen Präparaten gut zu erkennen sein.

Wenn sich der Slug zum Fruchtkörper entwickelt, sind die Prästielzellen folglich oben, also in einer Position, wo man sie nicht erwartet. Sie wandern dann durch die Sporenmasse nach unten, was durch den blauen Streifen in dem Ball oder Konus ungefärbter Zellen zu erkennen ist.

Fast fertige Fruchtkörper haben einen blauen Stiel, einen farblosen Sporenkopf und oft noch eine kleine blaue Spitze von Prästielzellen, die noch nicht nach unten gewandert sind.

Anmerkung, die für den Unterricht nicht unbedingt erforderlich ist: die endgültige Differenzierung zu vakuolisierten Stielzellen mit Zellulosewand beginnt erst, während die Zellen durch die Sporenmasse durchwandern.

Schüler werden vielleicht vereinzelt blaue Zellen im hinteren Teil des Slugs, also in den zukünftigen Sporenzellen entdecken. Dabei handelt es sich um stielähnliche Zellen, die als Reserve gehalten werden, wenn Stielzellen in der „Nase“ verloren gehen.

### Beispielbilder aus den Präparaten:

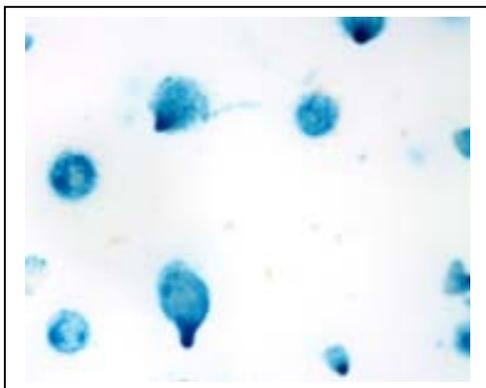


Abb. 1: In dem Präparat sind späte Aggregate zu sehen. Die Spitze mit den blauen Prästielzellen ist deutlich zu erkennen. Die gleichmäßig blauen Flecken sind frühe Aggregate, in denen sich die Präsporenzellen noch nicht aussortiert haben. Das Präparat ist etwas überfärbt, sodass auch Präsporenzellen hellblau sichtbar sind.

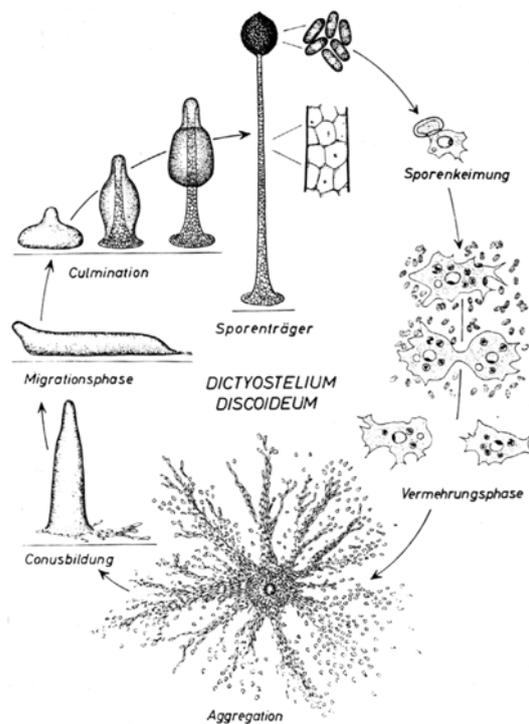


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Entwicklungszyklus von *Dictyostelium discoideum*.

(Abb. G. Gerisch, MPI Biochemie, Martinsried)

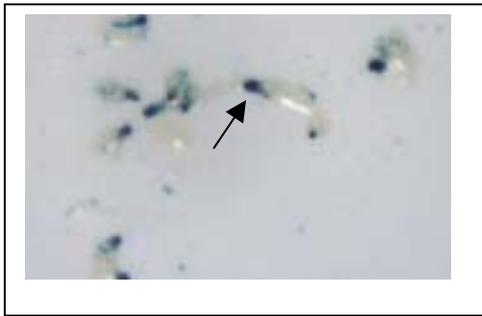


Abb. 2  
In diesem Präparat sind Slugs zu sehen. Ein besonders gutes Exemplar ist mit dem Pfeil gekennzeichnet. Die Prästielzellen sitzen in der „Nase“.

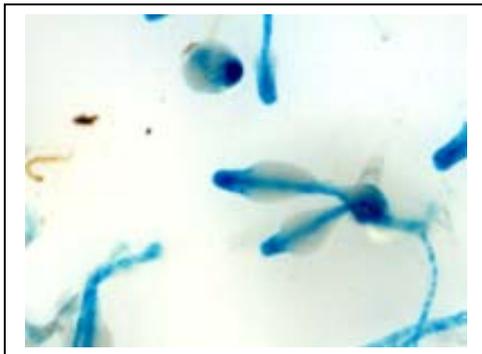


Abb. 3:  
Dieses Präparat zeigt Culminanten. Die Prästielzellen wandern durch die Sporenmasse und bilden den Stiel. Unten rechts ist ein fast reifer Stiel zu sehen. Weil die Zellen bereits große Vakuolen haben, ist die blaue Färbung, die nur im Cytoplasma auftritt, nicht gleichmäßig verteilt.

### Anknüpfung an andere Experimente und Anwendungen:

1. Vielseitige Verwendung von  $\beta$ -Galaktosidase, hier als Markergen zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.
2. In *Dictyostelium* und anderen Modellorganismen werden Markergene in Mutanten eingebracht, um zu sehen, ob bzw. wann eine Mutation die Zelldifferenzierung stört. Bildmaterial (zurzeit in Vorbereitung) zeigt Mutanten, bei denen das Zahlenverhältnis von Prästiel- und Präsporencellen gestört ist: die Prästielzone reicht im Slugstadium ungewöhnlich weit nach hinten. Die Slugs sehen ohne Färbung normal aus. Die fertigen Fruchtkörper sind abnormal und haben kleinere Sporenköpfe.
3. Mit Markergenen kann die Differenzierung von Stammzellen untersucht werden, um festzustellen, welche Faktoren erforderlich sind, damit eine Zelle eine bestimmte Funktion übernimmt.

### Materialien:

Die Fertigpräparate können unter dem Binokular betrachtet werden. Durchlichtmikroskope sind nur sehr eingeschränkt verwendbar, weil die Filter, auf denen die Zellen sitzen wenig Licht durchlassen und weil die Vergrößerung meist zu stark ist, um mehrere Entwicklungsstadien gleichzeitig zu sehen.

Sie können über uns Fertigpräparate beziehen, bei denen ein kleiner Filter mit gefärbten Entwicklungsstadien auf einen Objektträger geklebt ist. Das Objekt ist mit einem Deckglas abgedeckt, aber nicht eingebettet. Die Präparate sind bei trockener Lagerung mehrere Jahre haltbar. Wir empfehlen zur Aufbewahrung eine Präparatemappe. Vor dem Mikroskopieren kann der Filter mit einem Tropfen Wasser angefeuchtet werden um die Abbildung zu verbessern. Die Präparate sind nicht unbedingt einheitlich und können mehr oder weniger Formen eines bestimmten Stadiums enthalten. Deshalb lohnt es sich, wenn die Schüler auch die Präparate austauschen.

Für ein Fertigpräparat berechnen wir 2,50€