

# Isolierung von ARF8-GFP markierten vesikelähnlichen Partikeln mittels MAOS (magnetisch aktivierte Organellen-Sortierung)

Torsten Barth, Natalie Leiprecht, Martin Thunemann, Matthias Beer

## Zusammenfassung

Es wird eine Methode untersucht, mit der durch magnetische Immunopräzipitation vesikelähnliche Partikel aus Pflanzenzellen isoliert werden. Wir stellen durch Crosslinking Magnetobeads her, die einen Antikörper gegen GFP tragen. Mit diesen isolieren wir aus aufgeschlossenem Blattmaterial einer transgenen ARF8-GFP *Arabidopsis thaliana* Zelllinie ARF8-GFP-markierte, vesikelähnliche Partikel. Diese spielen bei der pathogen-induzierten Zellpolarisation eine wichtige Rolle. Im sich anschließenden Western-Blot weisen wir nach, dass die Isolierung erfolgreich ist. Diese Methode steht damit als Ausgangspunkt zur Verfügung, um, etwa mithilfe der Massenspektrometrie, den Inhalt und die Funktion der Vesikel aufzuklären.

## Einleitung

Man beobachtet bei Pflanzen mit Nicht-Wirts-Resistenz, wie bei dem Modellsystem *Gerstenmehltau* - *Arabidopsis thaliana*, zwei Ebenen der inkompatiblen Immunreaktion. In der ersten Ebene wird das Pathogen beim Eindringen in die Zellwand gehindert. Sie zeichnet sich durch eine pathogen-induzierte Zellpolarisation aus, z.B. wird Zellwandmaterial wie Callose am Ort der versuchten Invasion akkumuliert. Zudem wandern Vesikel mit noch unbekanntem Inhalt zur Angriffsstelle. Bei der Fusion mit der Plasmamembran spielen Syntaxine, wie PEN1, eine wesentliche Rolle.<sup>1</sup> Die zweite Ebene der Immunabwehr kommt zum tragen, wenn das Pathogen die Barrikaden der ersten Ebene überwinden konnte. Hier vollziehen die Zellen, die den Infektionsherd umgeben, einen programmierten Zelltod (hypersensitive response), um das Pathogen an der Ausbreitung zu hindern und die Pflanze zu schützen.

Ein Teil der Vesikel, die im Rahmen der Immunreaktion erster Ebene zum Infektionsherd transportiert werden, tragen auf ihrer Oberfläche das Protein ARF8 (~~auxin-related factor #8~~). Um Inhalt und Funktion dieser Vesikel aufzuklären, ist es notwendig, diese zuerst zu isolieren, dazu wollen wir die magnetisch aktivierte Organellen-Sortierung (MAOS) benutzen.

Die Immunopräzipitation mittels Magnetobeads ist im Gegensatz zur differentiellen Dichtegradientenzentrifugation oder Phasenpartitionierung, die ansonsten häufig zur Trennung von Plasmamembranfragment-Vesikeln und „coated vesicles“ Anwendung finden, eine sehr schnelle und effiziente Methode. Mithilfe von MAOS reinigt man nicht nur Mischpopulationen mit gleicher Dichte oder Hydrophobizität, sondern isoliert charakteristische Vesikel mit hoher Spezifität.

Um den Magnetobeads ihre Spezifität zu verleihen, müssen sie den Anforderungen entsprechend hergestellt werden. In unserem Fall stellen wir spezifische Magnetobeads aus den kommerziell erhältlichen *Dynabead Sheep anti-Rabbit IgG M-280* durch Crosslinking mit einem Kaninchen-Antikörper gegen das Green-Fluorescent-Protein (GFP) her. Beim Crosslinking werden kovalente Bindungen zwischen dem anti-Rabbit IgG der Dynabeads und dem anti-GFP Antikörper gebildet, ohne dass die Spezifität des anti-GFP Antikörpers verloren geht. Dadurch ist gewährleistet, dass wir bei der Ablösung der Beads vom gereinigten Vesikel nur an der Stelle der Bindung des anti-GFP Antikörpers zum GFP-Fusionsprotein trennen.

Da wir eine transgenen ARF8-GFP *Arabidopsis thaliana* Zelllinie verwenden, können wir Vesikel isolieren, die an ihrer Oberfläche das ARF8-GFP-Fusionsprotein ~~exprimieren~~. Zudem können wir durch Fluoreszenzmikroskopie die Expression von ARF8-GFP verifizieren und die Lokalisation der Vesikel in der Zelle ausmachen.

Im Western Blot können wir nach der SDS-PAGE durch Immunodetektion mit GFP-Antikörpern das gereinigte Protein nachweisen.

## Methoden

### Präparation der Magnetobeads

Der Überstand von 100  $\mu$ l *Dynabead Sheep anti-Rabbit IgG M-280* - Suspension wird nach zwei Minuten im Magnetfeld abpipetiert. Die Beads werden mit 0.1 M Phosphatpuffer, pH 0.8, zwei mal gewaschen (Beads im Puffer resuspendieren und den Überstand nach zwei Minuten im Magnetfeld abpipetieren). Nach dem Waschen werden die Beads 95  $\mu$ l des gleichen Puffers aufgenommen. Dann werden 5  $\mu$ l des Rabbit Anti-GFP Antikörpers (1  $\mu$ g/ml) hinzugegeben und zur Antikörperbindung für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Rotationsmixer geschüttelt. Die Beads werden wieder mit 0.1 M Phosphatpuffer, pH 0.8, zweimal gewaschen. Danach folgt eine dreimalige Waschung mit 0.2 M Triethanolamin, pH 8.2. Zum Crosslinking resuspendieren wir die Beads in 0.2 M Triethanolamin mit 20 mM Dimethyl Pimelimidate Dihydrochlorid (DMA) und lassen die Suspension für 30 min bei Raumtemperatur auf dem Rotationsmixer inkubieren. Danach wird nach zwei Minuten im Magnetfeld der Überstand entfernt und für 15 min in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 auf dem Rotationsmixer bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Anschluss werden die präparierten Magnetobeads dreimal in PBS/BSA (0.1% BSA, 0.02 %  $\text{NaN}_3$ ) gewaschen.

### Gewebeaufschluß

Von fünf *Arabidopsis thaliana* Pflanzen werden die Blätter geerntet und sofort in flüssigen Stickstoff transferiert. Nach etwa fünf Minuten gibt man das geerntete Material in ein 50 ml Falcon-Tube, das drei Schredderkugeln ( $d=0.5$  cm) enthält, und gibt dieses Tube ebenfalls in flüssigen Stickstoff. Zum Gewebeaufschluß schüttelt man das Falcon-Tube bei höchster Stufe auf dem Vortex solange, bis man kaum noch intakte Mittelstreben des Blatts sehen kann. Zwischendurch kühlt man in flüssigem Stickstoff ab. Danach nimmt man das Blattmaterial in 5 ml Extraktionspuffer (0.1 M MES-NaOH, pH 6.5; 0.3 M Sucrose; 1 mM EGTA, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0.02%  $\text{NaN}_3$ ; 1 mM DTT; 1 Tablette Roche Complete Proteinase-Inhibitor pro 50 ml) auf. Den Blattrohextrakt gewinnt man aus dem Filtrieren der Blattsuspension über einen Stofffilter.

### Immunopräzipitation mit Magnetobeads

Zu 50  $\mu$ l der präparierten Magnetobeadsuspension geben wir 1 ml des Rohextrakts und lassen auf dem Rotationsmixer bei 4°C für 30 min inkubieren. Nach 2 min im Magnetfeld nehmen wir den Überstand ab und waschen dreimal mit PBS.

### Elution des Präzipitats

Die Elution der Vesikel vom Magnetobead erfolgt mit 0.1 M Citrat, pH 2-3. Wir mischen auf dem Rotationsmixer nach Zugabe von 30  $\mu$ l Citrat für 2 min bei Raumtemperatur. Nach zwei Minuten im Magnetfeld pipetieren wir den Überstand, das erste Eluat, ab. Wir eluieren ein zweites Mal mit 30  $\mu$ l Citrat und erhalten das zweite Eluat. Wir lagern die Eluate bei -20°C.

### SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

In eine Gelapparatur wird zunächst das Trenngel gegossen. Sobald dieses auspolymerisiert ist, wird

darauf das Sammelgel gegossen und mit den Kämmen für die Geltaschen bestückt. Sobald auch dies auspolymerisiert ist, kann das Gel mit den jeweiligen Proteinproben, die zuvor für 5 min bei 95 °C erhitzt werden, beladen und die Elektrophorese gestartet werden. Als Laufpuffer verwenden wir 25 mM Tris, pH 8.8; 0.19 M Glycin und 0.1% (w/v) SDS. Das Trenngel besteht aus 3.3 ml 30% (v/v) Acrylamid/Bis-acrylamid-Mix 34.5:1; 2.5 ml Tris/HCl, 1.5 M, pH 8.8; 100 µl 10% SDS; 4 ml H<sub>2</sub>O; 100 µl 10% APS und 4 µl TEMED. Das Sammelgel besteht aus 830 µl 30% (v/v) Acrylamid/Bis-acrylamid-Mix 34.5:1; 630 µl Tris/HCl, 1 M, pH 6.8; 50 µl 10% SDS; 3.4 ml H<sub>2</sub>O; 50 µl 10% APS und 5 µl TEMED. Das Gel läuft bei 130 V für 10 min, dann bei 200 V für weitere 50 min.

### Elektrotransfer auf Membran

Der Elektrotransfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran erfolgt in einer „Semi-dry“-Apparatur. Als Pufferreservoir dienen in Transferpuffer (25 mM Tris, pH 8.8; 0.19 M Glycin; 20% (v/v) Methanol) getränkte Filterpapiere. Der Aufbau ist folgender: auf der Anode liegt eine Lage getränktes Filterpapier, darauf liegt die Nitrocellulosemembran, direkt auf der Membran kommt das Gel zu liegen, gefolgt von drei Lagen getränktem Filterpapier und der abschliessenden Kathode. Der Transfer findet für eine Stunde statt, bei einem Strom pro Fläche von 0.8 bis 1.0 mA/cm<sup>2</sup>.

### Ponceau S Färbung

Mit Panceau S Red-Färbelösung färben wir die Proteine auf der Nitrocellulosemembran für etwa 2 min an. Die Färbelösung wird entfernt und mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

### Coomassie Färbung

Mit Coomassie-Färbelösung färben wir die Proteine auf dem Polyacrylamidgel für etwa 30 min an. Danach spülen wir mit 5%-iger Essigsäure, bis die Banden klar erkennbar sind.

### Western Blot

Als erstes blocken wir unspezifische Bindungsstellen der Nitrocellulosemembran durch Inkubation mit 3% (w/v) Trockenmilchpulver in TBST (20 mM Tris/HCl pH 7.5; 0.15 M NaCl; 0.1% (v/v) Tween 20) für eine Stunde. Dann inkubieren wir für eine weitere Stunde mit dem primären Antikörper Kaninchen anti-GFP. Dieser wird zur Inkubation der Membran 1:5000 in TBST verdünnt. Anschließend waschen wir vier mal für fünf Minuten in TBST und inkubieren dann mit dem sekundären Antikörper, der für Kaninchen IgG spezifisch ist und mit dem Enzym Alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt ist, wieder für eine Stunde. Dieser Antikörper wird zur Inkubation 1:3000 in TBST verdünnt. Nach der Inkubation waschen wir wieder vier mal für fünf Minuten in TBST und äquilibrieren anschließend die Membran in Tris pH 9.5-Puffer (Tris/HCl, pH 9.5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl) für zwei Minuten. Die durch die AP katalysierte Farbreaktion erfolgt in Tris pH 9.5-Puffer mit BCIP/NBT (0.5 g/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indoylphosphat in Dimethylformamid und 0.5 mg/ml Nitrobluetetrazoliumchlorid in 70% Dimethylformamid).

### Versuchsdurchführung

Zu Beginn präparieren wir die Magnetobeads durch Antikörperbindung und dann durch Crosslinking so, dass sie spezifisch GFP binden. Im Fluoreszenzmikroskop werden Durchlicht- und Fluoreszenzaufnahmen der gecoateten Dynabeads gemacht.

Von zwei angezogenen, transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzenlinien, wovon die eine ein ARF8-GFP-Fusionsprotein, die andere freies GFP exprimiert, wird das Blattmaterial geerntet und daraus die jeweiligen Rohextrakte gewonnen.

Vor der Immunopräzipitation mit den Magnetobeads werden im Fluoreszenzmikroskop Durchlicht-

und Fluoreszenzaufnahmen des ARF8-GFP-Rohextrakts und des GFP-Rohextrakts gemacht. Wir heben den Teil des Rohextrakts, der nicht für die Immunopräzipitation oder zum Mikroskopieren verwendet wird auf, um später einen Teil davon als Probe auf das SDS-Gel geben zu können (Rohextrakt vor Präzipitation).

Als nächstes geben wir die präparierten Magnetobeads zu den jeweiligen Rohextrakten und führen mithilfe des Magnetfeldes die Immunopräzipitation durch. Einen Teil des jeweiligen Überstands heben wir für die SDS-PAGE und den Western Blot auf (Rohextrakt nach Präzipitation). Aus der gewaschenen Suspension, die die GFP- bzw. ARF8-GFP-Fusions-Proteine gebunden an die Magnetobeads enthält, nehmen wir eine Probe zum Mikroskopieren ab.

Um die präzipitierten Proteine wieder von den Magnetobeads zu lösen, eluieren wir zweimal mit Citrat und erhalten so Eluat 1 bzw. Eluat 2 mit den jeweilig gereinigten Proteinen.

Nun können wir die Proben der verschiedenen Reinigungsschritte einer SDS-PAGE unterziehen. Neben dem Marker tragen wir Proben von Rohextrakt vor Präzipitation, von Rohextrakt nach Präzipitation, von Eluat 1 und von Eluat 2 jeweils mit freiem GFP bzw. ARF8-GFP-Fusions-Protein auf.

Wir stellen zwei Gele her, eines für den Western Blot und eines für eine Coomassie-Proteinfärbung. Nach erfolgter Gelelektrophorese transferieren wir die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Die Proteine auf der Membran färben wir mit Panceau S an und scannen die Membran ein. Im Anschluss daran identifizieren wir mit dem Western Blot die Banden, an die der GFP-Antikörper bindet.

## Ergebnisse

In Abbildung 1 und 2 sind die mikroskopischen Aufnahmen der Magnetobeads dargestellt. Sie sind in diesem Zustand schon präpariert, d.h. gecrosslinkt und spezifisch gegen GFP, aber noch unbeladen mit Protein.

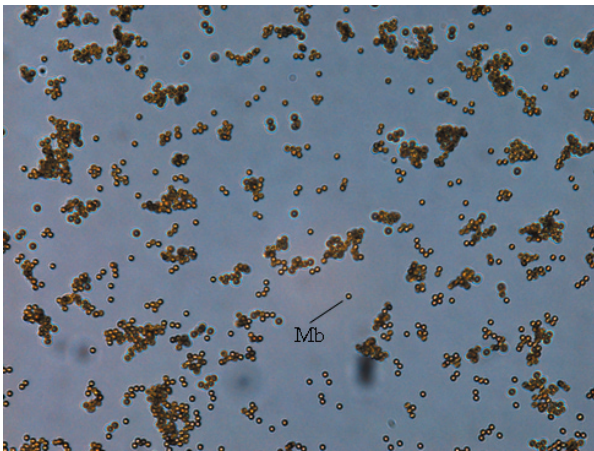


Abbildung 1: präparierte Magnetobeads (Mb) im Durchlichtmodus, 400x Vergrößerung

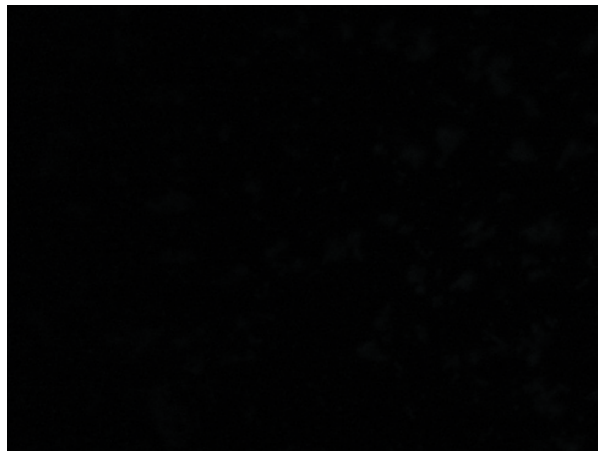


Abbildung 2: präparierte Magnetobeads im Fluoreszenzmodus, 400x Vergrößerung

Die sphärische Form der Magnetobeads ist in Abbildung 1 gut ersichtlich. Abbildung 2 zeigt, dass die präparierten Magnetobeads so gut wie keine Eigenfluoreszenz aufweisen.

Nach dem Gewebeaufschluß erhalten wir den Rohextrakt. In Abbildung 3 und 4 sind die mikroskopischen Aufnahmen der Rohextrakte von GFP und ARF8-GFP im Durchlichtmodus abgebildet. In Abbildung 5 und 6 sind die entsprechenden Aufnahmen im Fluoreszenzmodus dargestellt.

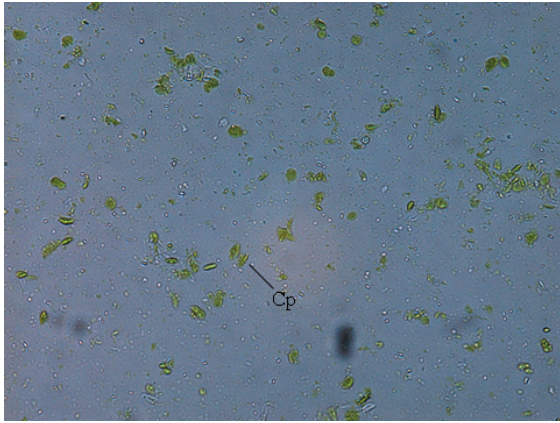


Abbildung 3: Rohextrakt aus GFP-Blattmaterial, Chloroplasten (Cp) und Zelltrümmer, Durchlichtmodus, 400x Vergrößerung

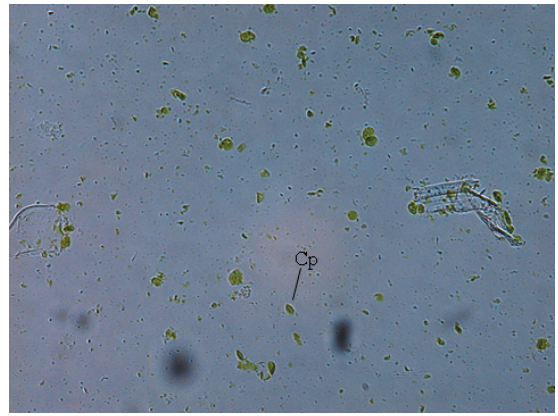


Abbildung 4: Rohextrakt aus ARF8-GFP-Blattmaterial, Chloroplasten (Cp) und Zelltrümmer, Durchlichtmodus, 400x Vergrößerung



Abbildung 5: Rohextrakt aus GFP-Blattmaterial, Fluoreszenzmodus, 400x Vergrößerung

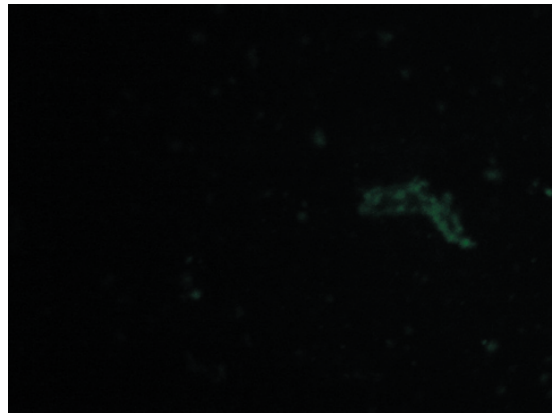


Abbildung 6: Rohextrakt aus ARF8-GFP-Blattmaterial, Fluoreszenzmodus, 400x Vergrößerung

Im Rohextrakt sind aufgrund des Aufschlusses viele unhomogene Zelltrümmer zu erkennen. Relativ deutlich kann man die grünen Chloroplasten wahrnehmen (Abbildung 3 und 4). In Abbildung 5 kann man erkennen, dass dort, wo freies GFP exprimiert wird, keine Fluoreszenz wahrnehmbar ist. Das GFP ist an keine Vesikel oder andere Strukturen gebunden und deswegen sehr homogen verteilt. Damit ist eine Fluoreszenz kaum detektierbar. In Abbildung 6 sind dagegen einige Spots mit Fluoreszenz auszumachen. Hier gehen wir davon aus, dass sich viele ARF8-GFP-Fusionsproteine auf engem Raum befinden, also an vesikelähnliche Partikel gebunden sein könnten. Aufgrund der hohen Dichte an GFP-Fusionsprotein ist eine Fluoreszenz detektierbar.

Nach der Immunpräzipitation nehmen wir wieder eine Probe, um diese im Mikroskop zu untersuchen. Abbildung 7 und 8 stellen die Aufnahmen im Fluoreszenzmodus dar.

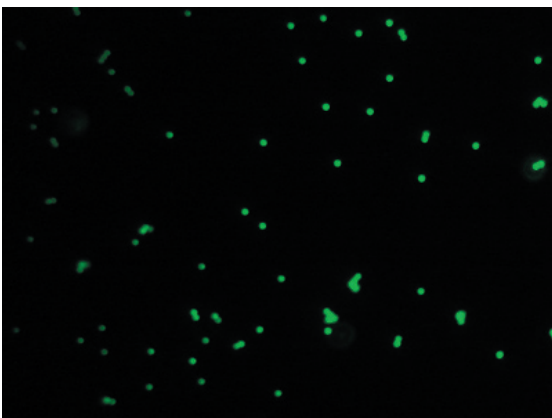


Abbildung 7: Magnetobeads beladen mit GFP, Fluoreszenzmodus, 400x Vergrößerung

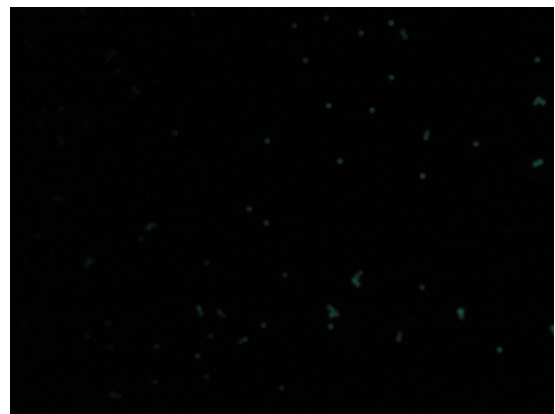


Abbildung 8: Magnetobeads beladen mit ARF8-GFP-Fusions-Protein, Fluoreszenzmodus, 400x Vergrößerung

Wir können feststellen, dass sowohl GFP als auch ARF8-GFP-Fusionsprotein an die Magnetobeads gebunden haben, da wir nun eine deutlich stärkere Fluoreszenz als bei den unbeladenen Magnetobeads (Abbildung 2) detektieren. In Abbildung 7 gibt es eine stärkere Fluoreszenz als in Abbildung 8, obwohl im Vergleich von Abbildung 5 zu 6 die Fluoreszenz der Probe mit ARF8-GFP-Fusionsprotein (Abbildung 6) stärker war. An dieser Stelle ist der Grund für die stärkere Fluoreszenz der mit GFP beladenen Magnetobeads gegenüber denen mit ARF8-GFP-Fusionsprotein beladenen vermutlich ein anderer. Zum einen könnte das freie GFP stärker exprimiert sein und in einer höheren Konzentration vorliegen. Es ist kleiner und deswegen beweglicher, so dass es eventuell leichter an die Magnetobeads binden könnte. Zudem könnten sterische Effekte die Bindung von freiem GFP gegenüber ARF8-GFP an die Magnetobeads bevorzugen.

Nach der SDS-PAGE haben wir eines der beiden Gele mit Coomassie gefärbt (Abbildung 9). Das andere Gel wurde für den Elektrottransfer der Proteine auf einen Membran genutzt. Auf dieser Membran haben wir die Proteine mit Ponceau S angefärbt (Abbildung 10).

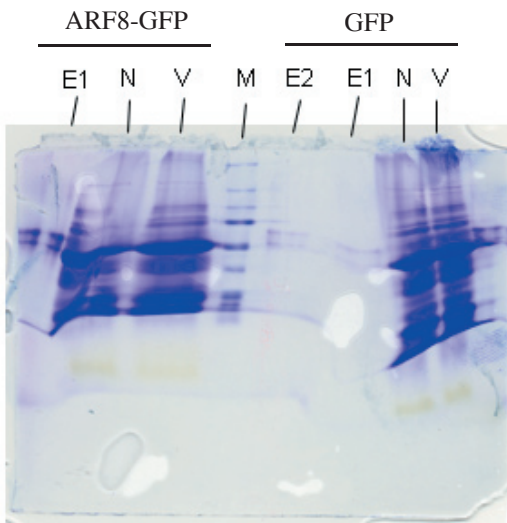


Abbildung 9: Coomassie-Färbung des Gels, der rechte Block steht für GFP-Material, der linke Block für ARF8-GFP-Material, in jedem Block sind von rechts nach links aufgetragen: vor (V) Präzipitation, nach (N) Präzipitation, Eluat 1 (E1), Eluat 2 (E2); Marker M

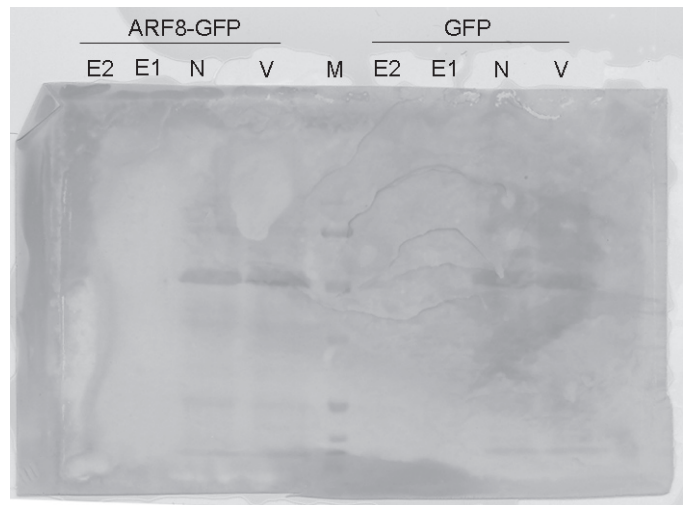


Abbildung 10: Ponceau S Färbung der Membrans, der rechte Block steht für GFP-Material, der linke Block für ARF8-GFP-Material, in jedem Block sind von rechts nach links aufgetragen: vor (V) Präzipitation, nach (N) Präzipitation, Eluat 1 (E1), Eluat 2 (E2); Marker M

Aus Abbildung 9 und 10 ist nicht viel Information zu ziehen. Beim Giessen des Gels für die Coomassie-Färbung hat die Apparatur nicht dicht abgeschlossen, zudem gab es eine Luftblase zwischen dem Gel und der Glasplatte, so ist das unbefriedigende Resultat zu erklären. Die Ponceau S Färbung ist getrübt aufgrund einer Unachtsamkeit: für den nachfolgenden Western Blot ist es notwendig, unspezifische Bindungsstellen der Membran zu blockieren, bevor man die Membran mit dem Anti-GFP Antikörper inkubiert, damit der Antikörper nicht unspezifisch gebunden wird. Dazu benutzen wir Proteine aus Trockenmilchpulver. Wir haben die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit Milchprotein vor der Ponceau S Färbung durchgeführt. Damit konnten wir nicht mehr die einzelnen Proteinbanden der Membran färben, sondern zwangsläufig auch alle Proteine aus der Milch.

Im Western Blot färben wir durch Immunodetektion direkt die GFP enthaltenden Banden (Abbildung 11).

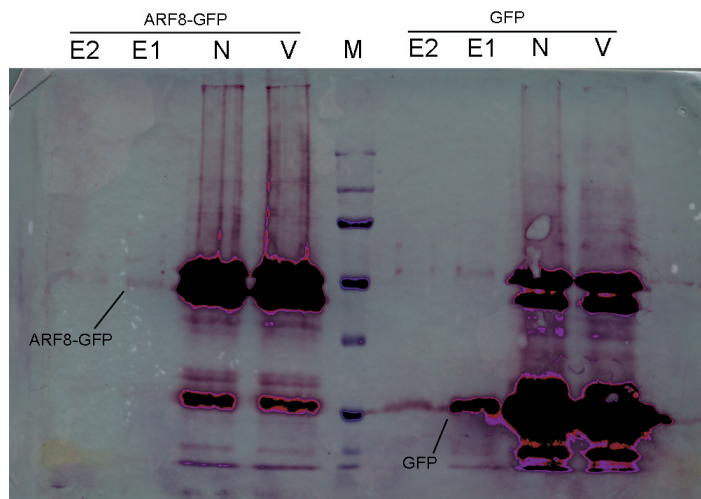


Abbildung 11: Western Blot, der rechte Block steht für GFP-Material, der linke Block für ARF8-GFP-Material, in jedem Block sind von rechts nach links aufgetragen: vor (V) Präzipitation, nach (N) Präzipitation, Eluat 1 (E1), Eluat 2 (E2); Marker M

Aus Abbildung 11 können wir erkennen, dass die Reinigung von GFP und von ARF8-GFP-Fusionsprotein mittels MAOS ordentlich funktioniert hat. Wie schon die stärkere Fluoreszenz in Abbildung 7 gegenüber Abbildung 8 vermuten lässt, liegt das freie GFP scheinbar in einer höheren Konzentration vor. Zwischen den jeweiligen Auftragsungen der Proben vor und nach Präzipitation ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen, da hier die Konzentration an Protein zu hoch ist. Das wir nicht nur zwei Banden bekommen, eine für ARF8-GFP und eine für GFP, liegt daran, dass zum einen der GFP-Antikörper nicht absolut spezifisch ist und zum anderen in den Rohextrakten eine Vielzahl an Proteinen vorhanden ist.

## Diskussion

Unser Versuch zeigt, dass MAOS eine potente Methode ist, auf verhältnismäßig schnellem und einfachem Weg vesikel-ähnliche Partikel zu isolieren. Damit hat man einen geeigneten Ausgangspunkt, um die Rolle der Vesikel und ihres Inhalts bei der Immunabwehr zu studieren, da man nach Präzipitation und Elution der Vesikel diese einer biochemischen Analyse unterziehen kann. Man kann auch andere transgene Pflanzen herstellen, die GFP-Fusionsproteine mit anderen Syntaxinen wie PEN1 oder VAMP722 (vesicle associated membrane protein 722) exprimieren, und auf gleiche Weise ihre Vesikel untersuchen und damit dazu beitragen, die erste Ebene der Immunreaktion weiter aufzuklären. Die Methode der Isolierung mittels Magnetobead-gekoppelter Präzipitation kann auf andere Proteine und Organellen ausgeweitet werden. Man benötigt Antikörper gegen das mit der zu untersuchenden Struktur verknüpfte Protein oder eine transgene Pflanze, die das target-Protein als Fusionsprotein exprimiert, so dass ein Standard-Antikörper gerichtet gegen den Standard-Teil des Fusionsprotein ausreicht, die gewünschte Struktur zu isolieren. In unserem Fall benutzen wir als Standard das Green Fluorescent Protein, welches zusätzlich den Vorteil bietet, dass die Struktur in der Zelle durch Fluoreszenzmikroskopie leicht lokalisierbar wird. Hat man zusätzlich ein geeignetes Aufschlußverfahren für die zu untersuchenden Strukturen, so steht der Isolierung mittels der Magnetobead-Immunopräzipitation nichts im Wege.

## Literatur

1. Nature, Vol 425, 30 October 2003; N. C. Collins, H. Thordal-Christensen, V. Lipka, P. Schulze-Lefert et al.: „SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall“