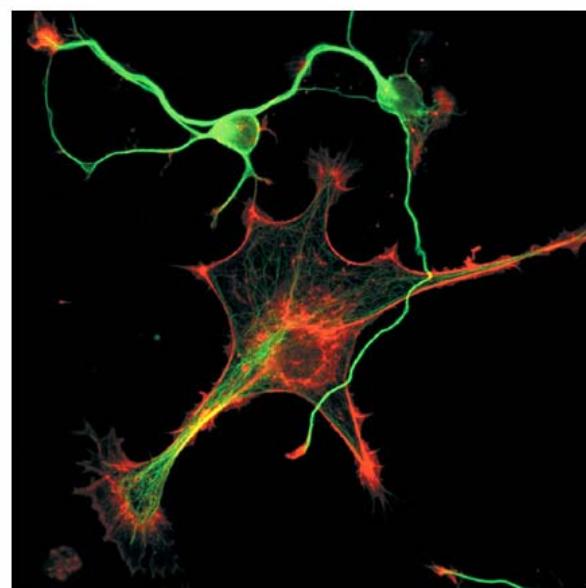


Praktikum Biologie für Mediziner

Methoden der Zellbiologie: Lichtmikroskopie von Zellstruktur und Zellfunktion



Prof. Dr. Jürgen Klingauf, Dr. Martin Kahms, Dr. Cora Thiel
Institut für Medizinische Physik und Biophysik /CeNTech

Heisenbergstr.11
klingauf@uni-muenster.de, kahms@uni-muenster.de, cthiel@uni-muenster.de
Tel. 83-56933 o. 83-63827

Ort des Praktikums:

**Lehrgebäude, IFAS
Raum L40-L42**

Gruppeneinteilung und Zeiten: siehe Semesterplan

Teil I

Lichtmikroskopie

Einführung

Seit seiner Erfindung im 17. Jahrhundert ist das Lichtmikroskop einer der Schlüssel zu neuen biologischen und medizinischen Erkenntnissen. Die Entwicklung der Zellbiologie verlief nahezu parallel zur Verbesserung mikroskopischer Methoden.

Doch Licht unterliegt als Welle der Beugung, deren auflösungsbegrenzende Wirkung von Ernst Abbe bereits 1873 erkannt wurde. Laut Abbe können Strukturen, die enger als 200 Nanometer beieinander liegen, nicht scharf voneinander getrennt werden. Sie erscheinen im Lichtmikroskop lediglich als verschwommenes Ganzes.

Die Elektronenmikroskopie dagegen liefert eine höhere Auflösung bis zu 0.1 nm, da sich Elektronen schärfer bündeln lassen als Licht. Da aber elektronenmikroskopische Messungen im Vakuum durchgeführt werden müssen, ist es notwendig, das Präparat zu fixieren, so dass keine Messungen an lebenden Zellen durchgeführt werden können. Darüber hinaus ist es schwierig, spezifisch Proteine in einer Zelle elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen und Elektronenstrahlen können auch nur wenige Mikrometer in eine Probe eindringen. Unter anderem deshalb hat die Elektronenmikroskopie trotz höherer Auflösung bisher viele Fragen im biologischen Mikrokosmos offen gelassen.

Mit fluoreszierenden Markermolekülen dagegen kann man einzelne Proteine spezifisch und effizient markieren und im optischen Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen. Neuere Entwicklungen erlauben sogar, die klassische Auflösungsgrenze im Lichtmikroskop zu durchbrechen und zelluläre Strukturen mit einer Auflösung von bis zu 10 nm zu detektieren. Verbunden mit der Möglichkeit, Messungen an lebenden Zellen durchzuführen (live cell imaging), ist die Lichtmikroskopie nach wie vor eines der wichtigsten Werkzeuge in der Zellbiologie.

Die Bedeutung insbesondere fluoreszenzmikroskopischer Methoden für die Zellbiologie wurde vor kurzem noch einmal durch die Vergabe des Nobelpreises für Chemie im Jahre 2008 unterstrichen. Die Preisträger wurden für ihre Forschungsarbeiten zum Grün Fluoreszierenden Protein (GFP) aus einer Meeresquelle ausgezeichnet, das als leuchtender Marker ein unverzichtbares Werkzeug von Zellbiologen, Genetikern und Medizinern, geworden ist.

Titelbild: fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Neuronen und Gliazellen, deren Cytoskelett mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurde (grün: Mikrotubuli, rot: Aktinfilamente)
Quelle: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Image-Gallery.html>

1. Fluoreszenzmikroskopie

In der Fluoreszenzmikroskopie können Strukturen oder Proteine spezifisch durch Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen sichtbar gemacht werden. Fluoreszierende Farbstoffmoleküle absorbieren Licht bei bestimmten Wellenlängen und emittieren längerwelliges, charakteristisches Fluoreszenzlicht, wie in Abbildung I.1 erläutert.

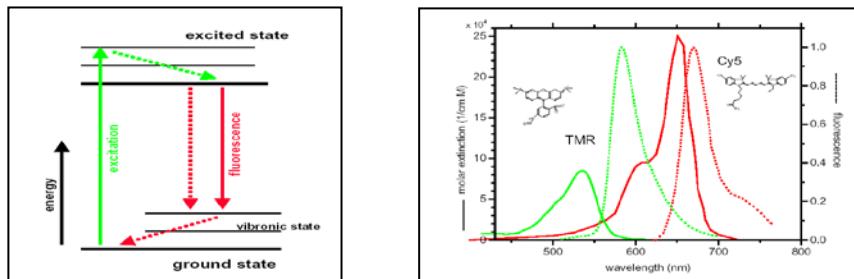


Abbildung I.1: Prinzip der Fluoreszenz. Licht hebt ein Elektron in ein energetisch höheres Niveau an. Durch Stöße mit anderen Molekülen verliert das Elektron einen kleinen Teil seiner Anregungsenergie, bevor es unter Aussendung eines Photons wieder in den elektronischen Grundzustand zurückkehrt (links). Dies führt dazu, dass das emitierte Licht in der Regel eine längere Wellenlänge (weniger Energie) besitzt als das absorbierte. Beispielhaft sind Absorptions- und Emissionsspektren für zwei synthetische Farbstoffe (Tetramethylrhodamin und Cy5) rechts gezeigt (durchgezogene Linie: Absorptionsspektrum, gepunktete Linie: Emissionsspektrum)

Das klassische Einsatzgebiet der Fluoreszenzmikroskopie ist die Immunhistochemie. In der Immunhistochemie nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen an fixierten Zellen oder histologischen Schnitt sichtbar zu machen.

Wenn man einen fixierten histologischen Gewebschnitt oder fixierte Zellen mit Antikörpern inkubiert, werden diese Antikörper dort binden, wo sich das passende Antigen befindet. Um diese Bindung nachzuweisen, muss man die Antikörper sichtbar machen. Im Prinzip geht das dadurch, dass man die verwendeten "primären" Antikörper markiert, etwa indem man einen fluoreszierenden Farbstoff daran bindet. Dieses Verfahren ist aber aufwendig, deshalb verwendet man besser fluoreszenz-markierte "sekundäre" Antikörper. Das sind Antikörper, deren Antigene Immunglobuline einer bestimmten Tierart sind. Wenn man nun die gesuchten Antigene im Schnitt oder der Zelle mit einem primären Antikörper aus z.B. dem Kaninchen inkubiert hat, kann man diese mit farbstoff-markierten Anti-Kaninchen Ig-Antikörpern sichtbar machen. Der sekundäre Antikörper kann für alle primären Antikörper aus dem Kaninchen verwendet werden. Solche Antikörper sind in der Regel kommerziell erhältlich.

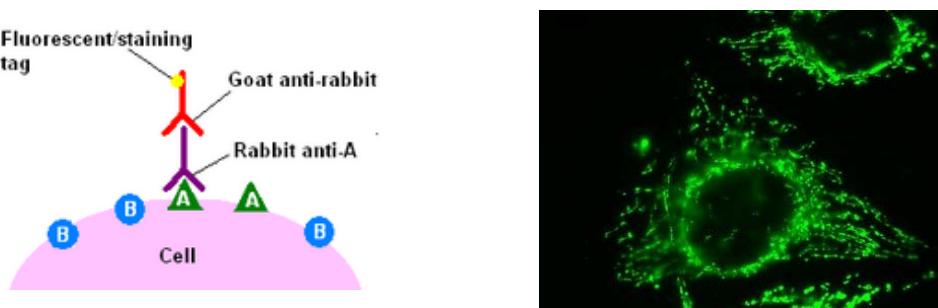


Abbildung I.2: Prinzip der Immunohistochemie. Ein Antikörper, der die Struktur A erkennt und in einem Kaninchen (rabbit) hergestellt wurde, wird mit dem fixierten Gewebe oder den fixierten Zellen inkubiert und bindet an sein Antigen (primärer Antikörper). Daraufhin wird ein zweiter Antikörper hinzugegeben, der z.B. in der Ziege (goat) hergestellt wurde und Antikörper aus dem Kaninchen erkennt (sekundärer Antikörper). Dieser zweite Antikörper trägt einen Fluoreszenzfarbstoff, so dass die Lokalisation des Zielproteins A unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. Ein Beispiel ist rechts gezeigt, in dem mittels Immunhistochemie ein Protein in den Mitochondrien angefärbt wurde.

Quelle: <http://www.answers.com/> <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Image-Gallery.html>

Damit die Antikörper in die Zelle gelangen können, müssen die Strukturen der Zelle vorher chemisch fixiert werden und die äußere Membran muss „durchlöchert“ (permeabilisiert) werden. Aus diesem Grunde kann diese Technik nicht an lebenden Zellen angewandt werden, d.h. sogenanntes „live cell imaging“ ist hiermit nicht möglich.

Für die spezifische Beobachtung von Proteinen in der lebenden Zelle bieten sich fluoreszente Proteine als Marker der Wahl an, deren prominentester Vertreter das grün-fluoreszierende Protein (GFP) ist. Das GFP bringt in der Natur die Pazifik-Qualle *Aequorea victoria* zum Leuchten. Wozu das Tier leuchtet, ist unklar: Ob diese und andere Leuchtkalmen mit ihrem Blinken Beute anlocken oder im Gegensatz Feinde abschrecken wollen, konnten Forscher noch nicht klären. GFP ist ein kleines, zylinderförmiges Proteinmolekül aus 238 Bausteinen - sogenannten Aminosäuren - mit einer Licht emittierenden Gruppe in der Mitte. Das Protein fluoresziert bei Bestrahlung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün. Die Erbsubstanz für das Leuchtprotein kann gezielt mit der eines beliebigen anderen Proteins verknüpft und in Organismen eingeschleust werden. Mit einem Lichtmikroskop kann dann die Aktivität des Zielproteins in lebenden Zellen live beobachtet werden. Die Verwendung fluoreszierender Proteine ist eine beliebte Standardmethode der Zellbiologie geworden. Mittlerweile gibt es auch gelbe, rote und blaue Varianten fluoreszierender Proteine für die Forschung. Auch komplett leuchtende Organismen wurden geschaffen, wie z.B. Mäuse, Kaninchen und Fische.

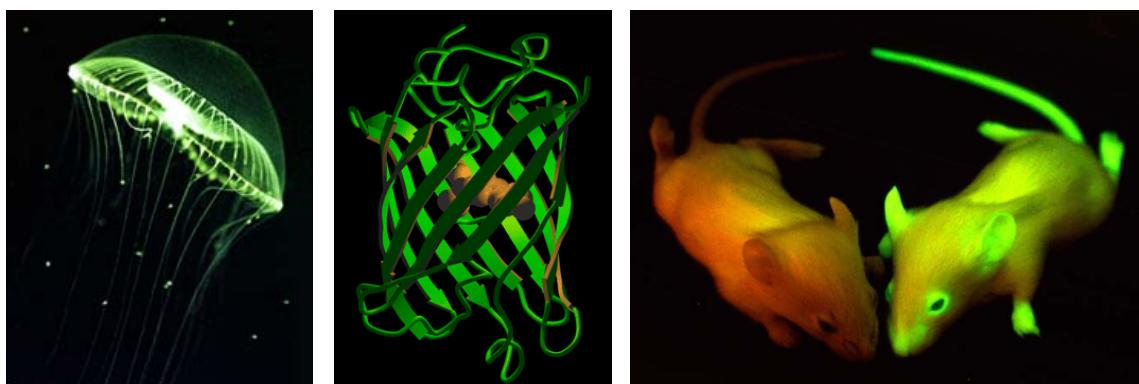


Abbildung I.3: Die Pazifikquelle *Aequorea victoria*, in der das grün fluoreszierende Protein entdeckt wurde (links). Die molekulare Struktur des GFP-Proteins (mitte). Die Aminosäuren bilden eine zylinderförmige Struktur aus, in deren Mitte sich die Licht-emittierende Gruppe befindet. Mit GFP genetisch manipulierte Maus, die unter Bestrahlung mit blauem Licht grün leuchtet (rechts). Quelle: <http://www.tsienlab.ucsd.edu/> <http://www.mshri.on.ca>

Der große Vorteil der fluoreszenten Proteine im Gegensatz zu kleinen synthetischen Farbstoffen ist, dass sie einen Farbstoff darstellen, der genetisch codiert ist und sich über molekularbiologische Manipulationen, die mittlerweile zum Standardrepertoire von Zellbiologen gehören, direkt in das Genom des Zielorganismus einbauen lassen, z.B. als Fusionspartner des Proteins, dessen Funktion studiert werden soll. Der gentechnisch veränderte Organismus erzeugt nun selbst das Zielprotein mit dem genetisch codierten Farbstoffmolekül.

Die mit fluoreszenten Farbstoffen markierten Zellen oder Gewebeabschnitte können dann unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Der schematische Aufbau eines einfachen Fluoreszenzmikroskopes ist in Abbildung 12 gezeigt und entspricht in der Regel dem eines Auflichtmikroskopes (Epifluoreszenzmikroskop). Das zu beobachtende Objekt wird dabei nicht durchstrahlt, sondern gleichzeitig durch dasselbe Objektiv beleuchtet und beobachtet.

Als Lichtquellen werden in der Regel Quecksilberdampflampen oder bei moderneren Mikroskopen Laser eingesetzt. Quecksilberdampflampen emittieren Licht über das gesamte sichtbare Spektrum sowie im ultravioletten Bereich. Die für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes notwendige Wellenlänge wird mit Hilfe optischer Bandpassfilter aus dem Lampenspektrum selektiert und über einen strahlteilenden Spiegel (dichroischer Spiegel) auf das Objekt geleitet. Dieser dichroische Spiegel hat die Eigenschaft, das kürzerwellige Anregungslicht auf die Probe zu reflektieren, Licht längerer Wellenlänge aber zu transmittieren. Die Farbstoffe in der Probe werden zur Fluoreszenz angeregt und emittieren ihr

charakteristisches längerwelliges Fluoreszenzlicht. Dieses Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gesammelt und kann den strahlteilenden Spiegel ohne Reflexion passieren. Durch einen weiteren optischen Sperrfilter kann Licht ausgeblendet werden, dass aufgrund seiner Wellenlänge nicht von den fluoreszierenden Molekülen stammen kann. Das mikroskopische Bild kann sowohl durch das Okular als auch mit einer Kamera beobachtet werden.

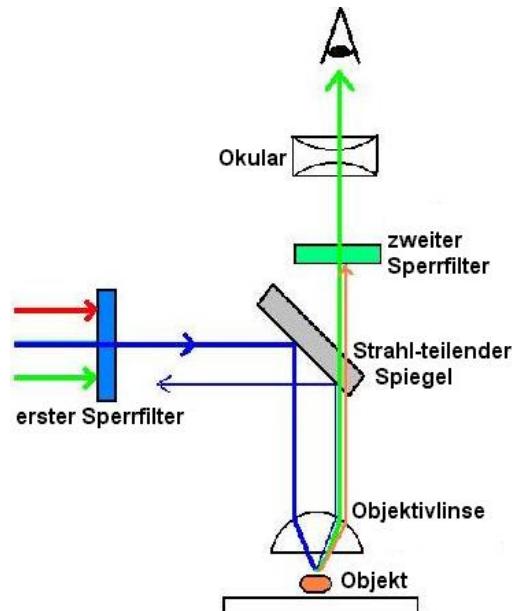


Abbildung I.4: Schematischer Aufbau eines Fluoreszenzmikroskopes. Aus dem Licht der Anregungslampe wird mit Hilfe von optischen Filtern die gewünschte Farbe selektiert und über einen dichroischen Spiegel durch das Objektiv auf die Probe gelenkt. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird durch das gleiche Objektiv gesammelt und passiert den dichroischen Spiegel ohne Reflexion. Durch einen weiteren optischen Filter kann die Emissionswellenlänge des Farbstoffes ausgewählt und zum Detektor geleitet werden (Auge oder Kamera).

Quelle: <http://www.bphys.uni-linz.ac.at/bioph/dipl/Fluoreszenzmikroskopie>

Teil II

Isolierte Cardiomyocyten als Modellsystem zum Studium von Zellstruktur, -funktion und -kommunikation

Stichworte (cf. Vorlesung Zellbiologie I SS09; Klingauf):

- 1.3.12 Membrantransport
- 1.3.13 Erregungsleitung
- 1.3.14 Zell-Zell-Kontakt
- 1.7 Endoplasmatisches Retikulum
- 1.14.1 Zytoskelett
- 1.18.1 Zellkommunikation
- 1.18.4 elektrische Kommunikation
- 1.18.5 Membranrezeptoren
- 1.18.6 Acetylcholin
- 1.18.7 Signalkaskaden
- 1.18.8 Second messenger

Aufbau und Strukturen des Herzens werden von ihrer überragenden Hauptaufgabe bestimmt, die darin besteht, das Blut ständig durch die beiden Kreisläufe (Lungen- und Körperkreislauf) zu pumpen. Somit bildet der Herzmuskel (Myocard) den größten Teil der Wand des Herzens aus. Die entsprechenden Herzmuskelzellen (Cardiomyocyten) sind einkernige und benachbarte Zellen und stehen über Poren (gap-junctions) in elektrischer Verbindung. Somit bilden sie einen funktionellen Verband (funktionelles Synzytium). Die Frequenz, mit der Cardiomyocyten kontrahieren, liegt bei einem Erwachsenen in Ruhe bei etwa 70 Schlägen, kann aber bei körperlicher Belastung bis auf 180-200 Schläge pro Minute ansteigen. Die Erregungsausbreitung am Herzen, die in letzter Konsequenz zur Kontraktion der Cardiomyocyten führt, beginnt am Sinusknoten. Der Sinusknoten ist automatisch tätig und durch eine spontane diastolische Depolarisation charakterisiert. Ausgehend von diesem primären Schrittmacher, breitet sich das elektrische Signal über Vorhof, AV-Knoten, His-Bündel, Kammerschenkel und Purkinjefasern aus und erreicht letztendlich das Ventrikelmyocard (Abbildung II.1).

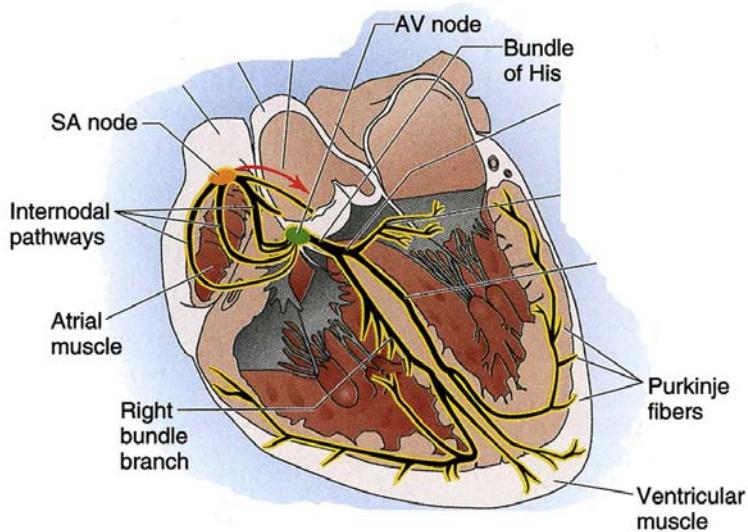


Abbildung II.1 : Schematische Übersicht des Herzens

Diese Erregungsweiterleitung über Aktionspotentiale (APs) ist ein rein elektrisches Signal und muss nun in den Zielzellen, den Cardiomyozyten, in eine Kontraktion, d.h. einen mechanischen Vorgang, umgewandelt werden. Bei diesem Prozess, der elektromechanischen Kopplung, spielen Calcium-Ionen eine Schlüsselrolle. So kann z.B. im Experiment gezeigt werden, dass in einer Calcium-freien Lösung noch Aktionspotentiale entstehen und weitergeleitet werden können, aber keine Kontraktion mehr erfolgen kann. Die Kontraktion der Cardiomyozyten wird hauptsächlich durch Ca^{2+} -Ionen als „second messenger“ bestimmt. In ruhenden Cardiomyozyten liegt eine sehr niedrige Ca^{2+} -Konzentration ($< 100 \text{ nM}$) vor, diese steigt aber bei Erregung kurzzeitig um den Faktor 15 an. Die Veränderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in Abhängigkeit des Erregungszyklus kann z.B. durch Calcium-sensitiv Fluoreszenzindikatoren gemessen werden (Abbildung II.2). Die für die cyclische Veränderung der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration verantwortlichen Mechanismen sind auf zellulärer Ebene recht gut charakterisiert. Während der Plateauphase des Aktionspotentials strömen Ca^{2+} -Ionen entlang ihres elektrochemischen Gradienten durch spannungsgesteuerte L-Typ Ca^{2+} -Kanäle in die Zelle ein (diese Kanäle werden durch den Wirkstoff Verapamil inhibiert, Präparat: z.B. Verapamil acis, Verapamil-ratiopharm, Verapamil Verla; Anwendungsgebiete: Angina pectoris, Hypertonie, Herzrhythmusstörungen). Dieser initiale Ca^{2+} -Einstrom triggert zusätzlich die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern des sarkoplasmatischen Retikulums. Das freigesetzte Ca^{2+} bindet, ähnlich dem Skelettmuskel, an Troponin C und leitet die Verschiebung der Aktin- und Myosinfilamente relativ zueinander ein. Damit der Herzmuskel wieder relaxieren kann, muss die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration absinken. Dies geschieht zum einen durch die aktive, ATP-abhängige Wiederaufnahme von Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum mittels einer Calcium-ATPase (SERCA; Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium-Transporting ATPase). Zum anderen wird Ca^{2+} durch Ca^{2+} -ATPasen über die Membran sowie durch einen $3 \text{ Na}^+ / 1 \text{ Ca}^{2+}$ Austauschcarrier nach aussen transportiert. Somit stehen 3 Mechanismen zur Verfügung, um die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration zu verringern (Abbildung II.2).

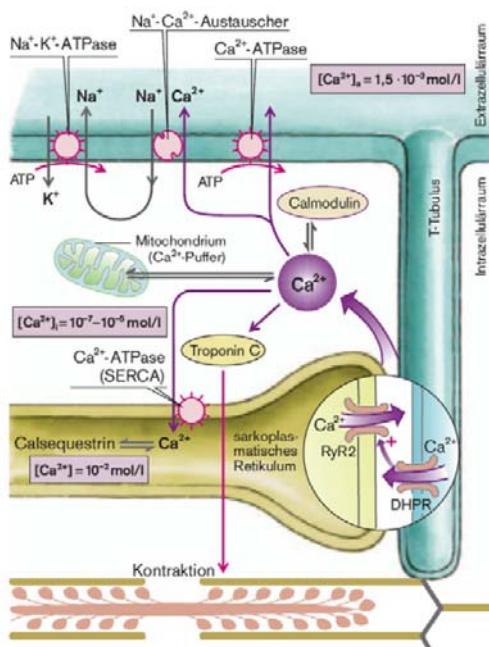


Abbildung II.2: Ca^{2+} als second messenger

Der Ca^{2+} -Spiegel im Cytosol steigt vor der Kontraktion durch den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen (L-Typ- Ca^{2+} -Kanal, Dihydropyridin-Rezeptor, DHPR) aus dem Extrazellulärraum sowie aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (Ryanodinrezeptor, RyR2) an. Für die Relaxation des Herzmuskels muss die Ca^{2+} -Konzentration gesenkt werden. Dies geschieht durch den Rücktransport von Ca^{2+} -Ionen in das sarkoplasmatische Retikulum und über die Zellmembran nach außen (Ca^{2+} -ATPasen) sowie durch einen 3 Na^+ /1 Ca^{2+} -Austauschcarrier, der von einer Na^+ - K^+ -ATPase getrieben wird. (Aus: Klinke, Pape, Silbernagl, Lehrbuch Physiologie, Thieme Verlag)

Die Modulation der Herzkraft im Körper erfolgt unter anderem hormonell durch Noradrenalin (sympathischer Überträgerstoff) oder Adrenalin (Nebennierenmarkhormon), die eine Steigerung der Öffnungswahrscheinlichkeit der L-Typ Ca^{2+} -Kanäle bewirken. Adrenalin/Noradrenalin binden an den $\beta 1$ -Adrenorezeptor in der Zellmembran, wodurch es zu einer G-Protein vermittelten

Aktivierung der membrangebundenen Adenylatcyclase und somit zur Steigerung des cAMP-Spiegels in der Zelle kommt. cAMP bewirkt als second messenger die Aktivierung einer Proteinkinase, welche ihrerseits Membranproteine des Ca^{2+} -Kanals phosphoryliert, wodurch sich dieser Kanal häufiger öffnet und mehr Ca^{2+} -Ionen in das Zellinnere gelangen können. Die erhöhte Ca^{2+} -Konzentration erhöht die Kontraktion der Cardiomyozyten, was zu einer Steigerung der Herzfrequenz und einem Anstieg des Blutdrucks führt. Die Wirkung von Adrenalin/Noradrenalin kann durch sogenannte Betablocker gehemmt werden. Dies sind Substanzen (z.B. Propranolol; enthalten in: Propranolol 10, Inderal, Propranolol AL 40; Anwendungsgebiete: Angina pectoris, Hypertonie, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen), welche an die β -adrenergen Rezeptoren binden, ihre Aktivität herabsetzen und den Ca^{2+} -Einstrom vermindern, so dass die Basalaktivität des Herzens herabgesetzt wird, was zu einer Senkung von Pulsfrequenz und Blutdruck sowie zu einer verminderten Schlagkraft und Erregbarkeit des Herzens führt (Abbildung II.3).

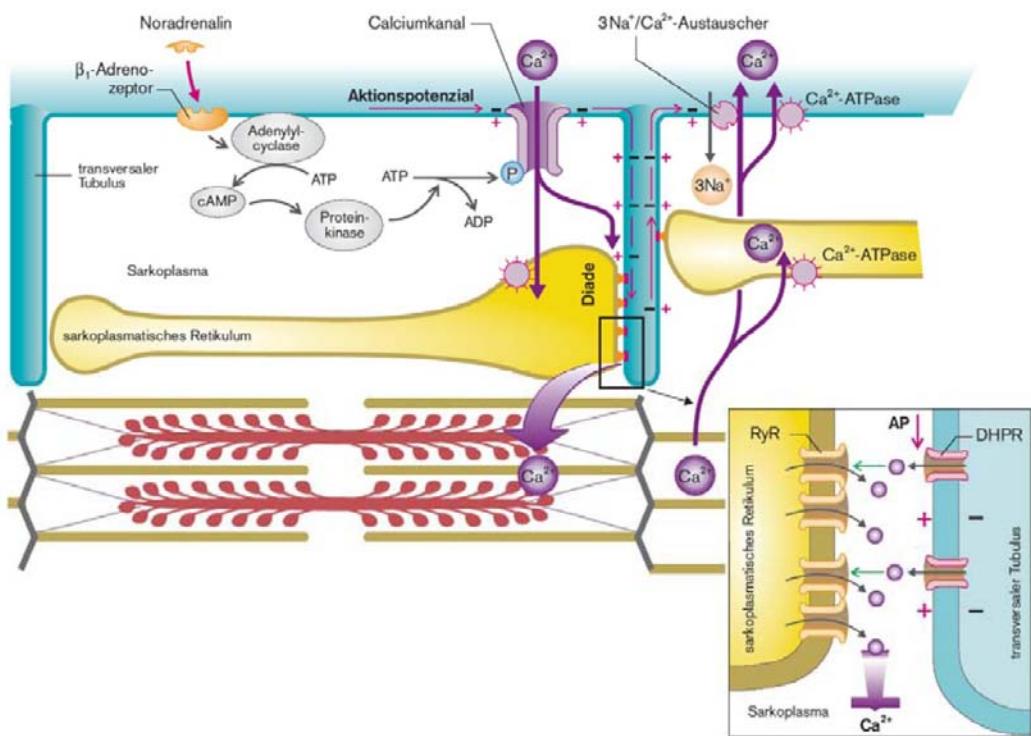


Abbildung II.3: Modulation der Herzkraft

Noradrenalin/Adrenalin binden an den β_1 -Adrenorezeptor, die Adenylylcyclase wird aktiviert und der cAMP-Spiegel in der Zelle steigt, wodurch wiederum die Aktivierung einer Proteinkinase erfolgt, die Membranproteine des L-Typ-Ca²⁺-Kanals phosphoryliert, so dass sich die Öffnungswahrscheinlichkeit für diesen Kanal erhöht. Die daraus resultierende erhöhte Ca²⁺-Konzentration bewirkt eine Erhöhung der Kontraktion und führt zu einer gesteigerten Herzfrequenz sowie einem erhöhten Blutdruck. Betablocker hemmen die Wirkung von Adrenalin/Noradrenalin. Sie verringern den Ca²⁺-Einstrom, indem sie an die β -Adrenorezeptoren binden und ihre Aktivität herabsetzen. Der resultierende geringere Ca²⁺-Einstrom hat eine verminderte Schlagkraft sowie die Sekung von Blutdruck und Pulsfrequenz zur Folge. (Aus: Klinke, Pape, Silbernagl, Lehrbuch Physiologie, Thieme Verlag)

Ein hierzu antagonistisches (parasympathisches) System wird vom Nervus Vagus gesteuert. Der Überträgerstoff Acetylcholin hat eine inhibitorische Wirkung auf das Adenylylcyclasesystem, die über einen muskarinischen Acetylcholinrezeptor (cholinriger M2, inhibiert durch Agonisten Muscarin aus dem Fliegenpilz) sowie ein hemmendes G-Protein vermittelt wird. Der cAMP-Spiegel wird gesenkt, was einen hemmenden Einfluss auf einen unspezifischen Kationenkanal (HCN-Kanal) hat. Dieser Kanal wird durch Hyperpolarisation am Ende des APs aktiviert (daher auch Hyperpolarisation-aktivierter Strom Ih genannt) und führt durch Kationeneinstrom langsam zu einer Selbstdepolarisation, wodurch wieder ein AP ausgelöst wird, d.h. er hat Schrittmacher-Funktion und bewirkt die spontane rhythmische Kontraktion. Durch die Hemmung wird die Selbstdepolarisation der Zelle verzögert. Zusätzlich aktiviert Acetylcholin über den M2-Rezeptor ein G-Protein welches wiederum einen rezeptorgesteuerten Kaliumkanal (GIRK) aktiviert. Durch die erhöhte Kaliumleitfähigkeit wird die Zelle hyperpolarisiert, so dass das Ruhepotential negativer und stabiler, und die Zelle dementsprechend schwerer depolarisierbar wird (Abbildung II.4).

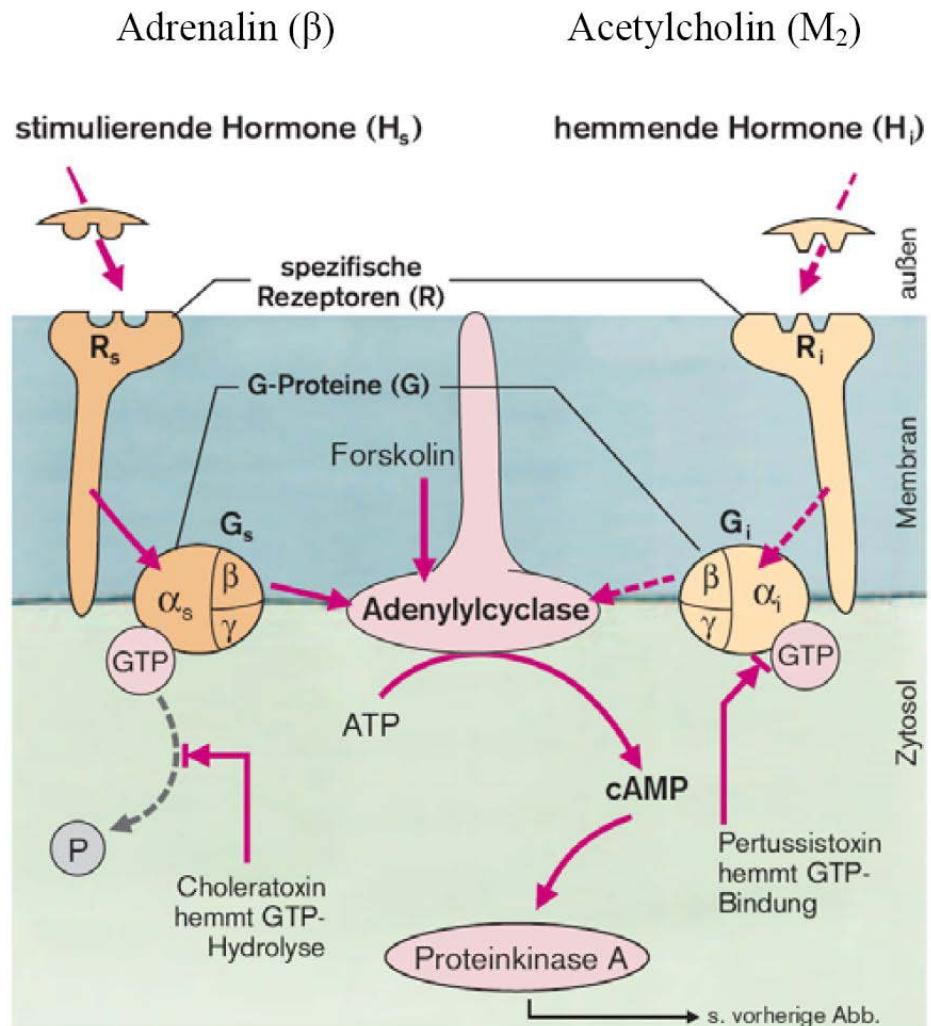
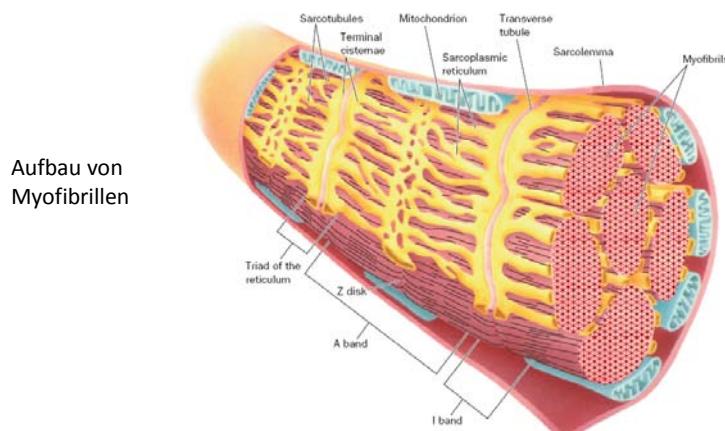


Abbildung II.4: Auswirkung stimulierender und hemmender Hormone auf die Adenylylcyclase. Stimulierendes bzw. inhibitorisches Hormon (H_s , H_i) wirkt über den entsprechenden Rezeptor (R_s , R_i) aktivierend auf ein stimulierendes bzw. inhibitorisches G-Protein (G_s , G_i). Das jeweilige G-Protein wirkt auf die katalytische Untereinheit der Adenylylcyclase. Im oberen Teil sind zwei bekannte stimulierende und hemmende Hormone dargestellt, die über Erhöhung bzw. Erniedrigung von cAMP wirken. (verändert nach: Klinke, Pape, Silbernagl, Lehrbuch Physiologie, Thieme Verlag)

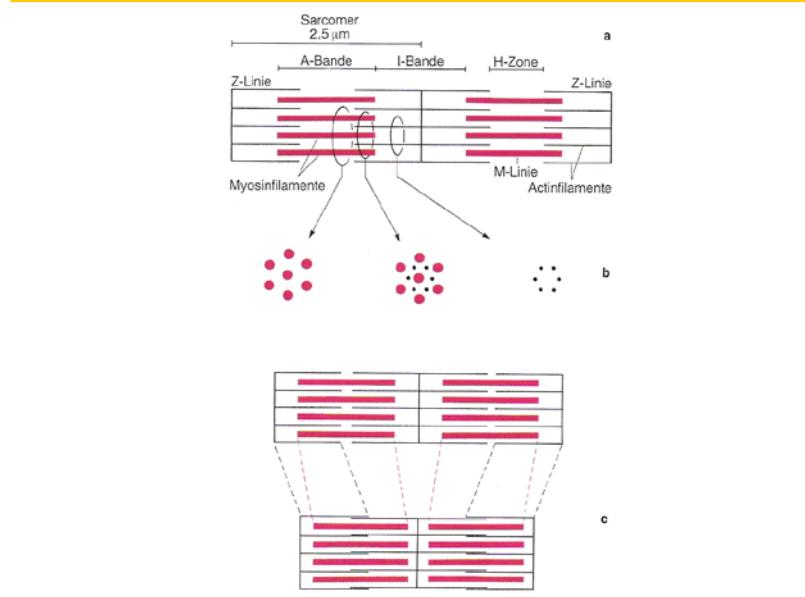
Folien aus der Vorlesung Zellbiologie I (SS09 Klingauf)

Aktin/Myosin: Quergestreifter Muskel

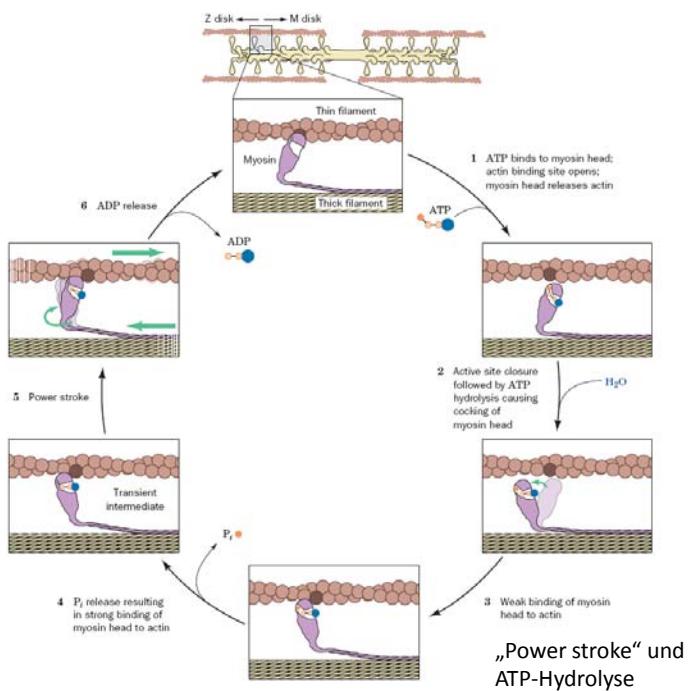
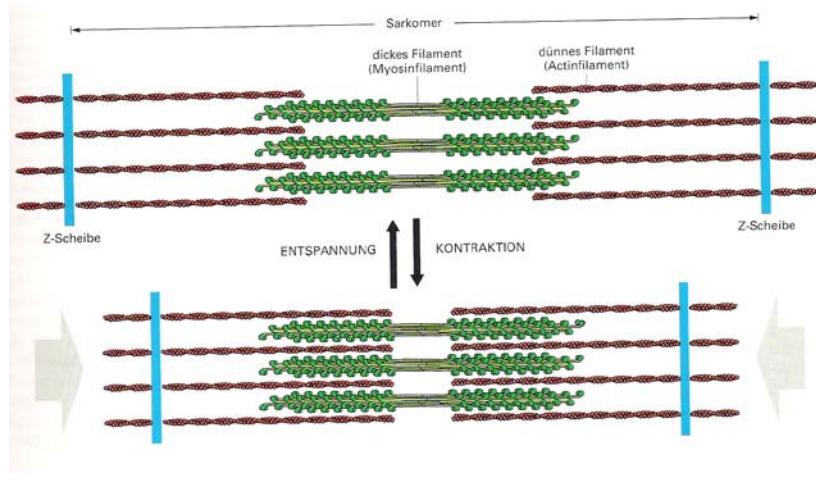


Sarkoplasmatisches Retikulum:
ER der Muskelzellen, Calciumspeicher

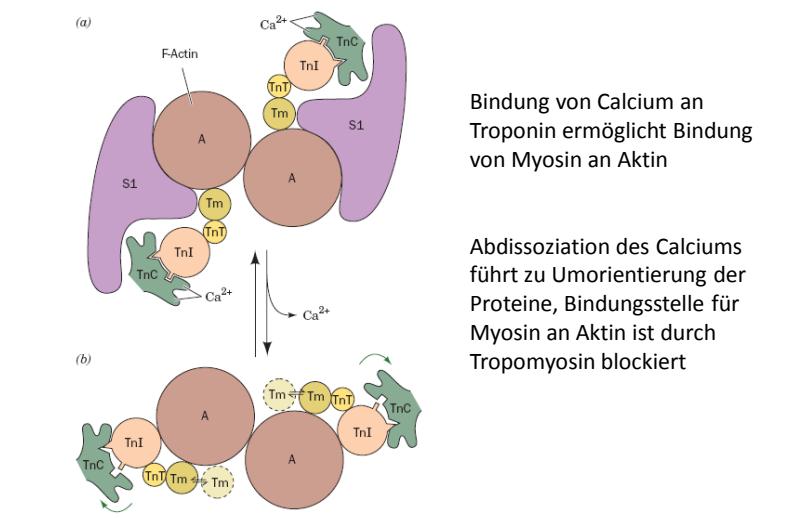
Charakteristische Struktur des Sarkomers



Kontraktion des Sarkomers



Calcium-Abhängigkeit der Interaktion vermittelt über Troponin und Tropomyosin

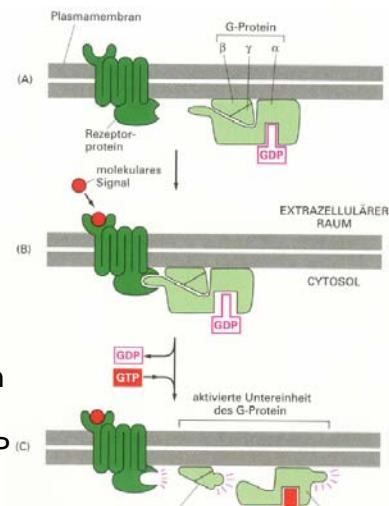


Acetylcholin: ein Signalmolekül, verschiedene Wirkungen

Muskarinischer Acetylcholinrezeptor:

G-Protein-gekoppelter Rezeptor im parasympathischen Nervensystem

Bindung von Acetylcholin führt zur Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen (Austausch von gebundenem GDP durch GTP)



Pilzgift Muscarin

Pilzgift, zuerst entdeckt im Fliegenpilz (*Amanita muscaria*)

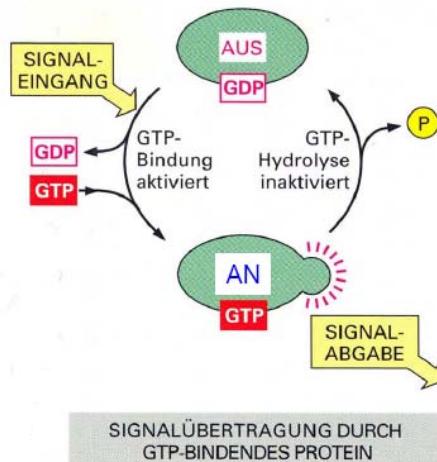
wirkt an den muscarinergen Acetylcholinrezeptoren wie Acetylcholin, wird aber nicht von Acetylcholinesterase abgebaut

→ konstante Erregung



Physiologische Wirkung:
Sehstörungen, starke Produktion von Schweiß, Speichel- und Tränenflüssigkeit, Hypotonie, Bradykardie

1.18.7 G-Proteine: molekulare Schalter



SIGNALÜBERTRAGUNG DURCH
GTP-BINDENDES PROTEIN

G-Proteine und Enzymaktivierung

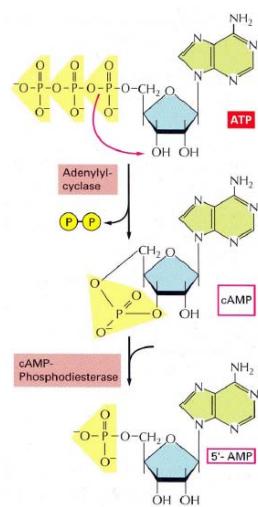
α -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen aktivieren

Adenylatzyklase

Bildung von cAMP

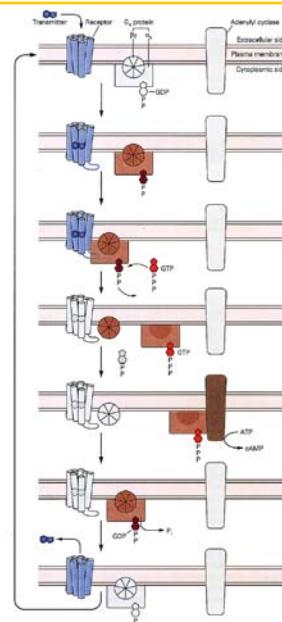
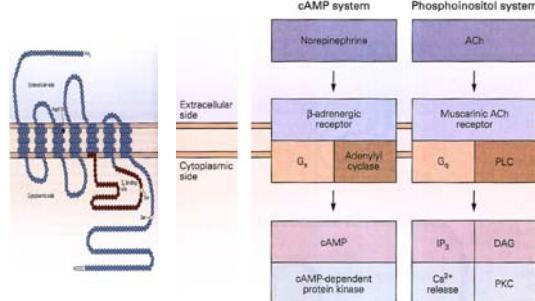
Phospholipase C

Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerol



G-Proteine und Enzymaktivierung: cAMP

GPCR (7 helix receptor)



(Kandel, Figs. 13-2, 13-3, 13-4)

1.18.8 Second messenger

kleine Moleküle, die intrazellulär zur Weiterleitung von Signalen genutzt werden

cAMP

z.B. Wirkung von Adrenalin
(Steigerung der Herzfrequenz, Glycogenabbau...)

cGMP

z.B. Entspannung der glatten Muskulatur

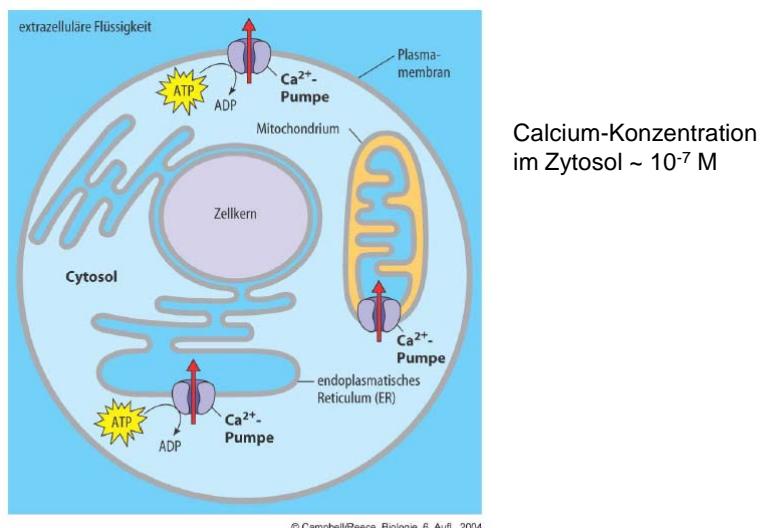
Inositoltriphosphat (IP₃)/ Diacylglycerol

z.B. Glycogenabbau vermittelt über Vasopressin

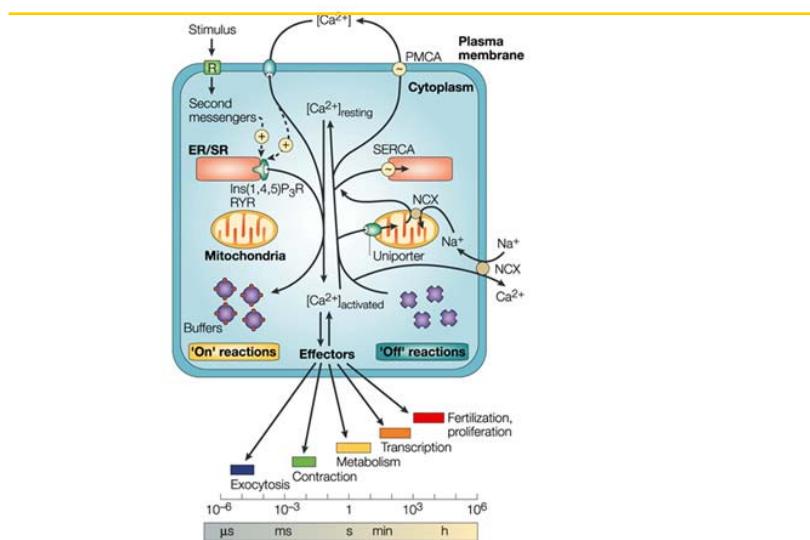
Calcium

z.B. Kontraktion des Skelettmuskels

Calcium als Signalmolekül



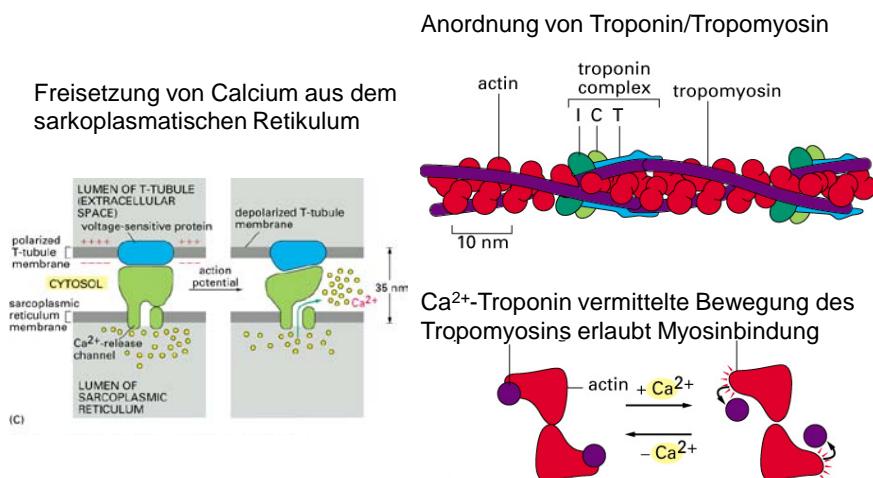
Ca^{2+} Ionen als universelle intrazelluläre „second messenger“



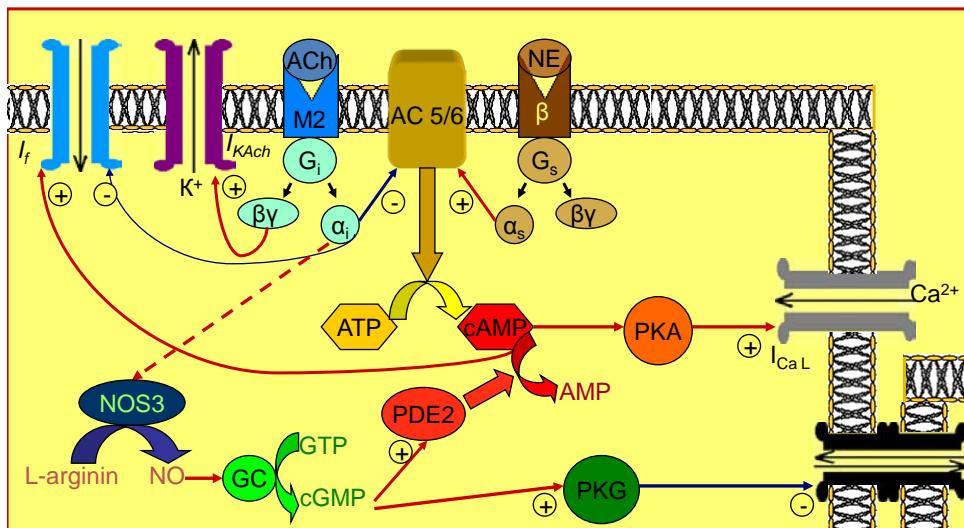
Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Berridge et al., 2003

Calcium und Muskelkontraktion



Acetylcholine action via M2 receptors



According to: S.Dhein et al.; Pharmacol. Res.; 2001; and R.D.Harvey & A.E.Belevych, British J. Of Pharmacol.; 2001.

Versuchsdurchführung

1. Präparation der Kardiomyocyten

Für die Präparation neonataler Kardiomyocyten werden 1-2 Tage alte Mäuse verwendet (P1-P2). Nach Dekapitierung werden die Herzen in eisgekühlte Pufferlösung überführt (HBSS, 5.33 mM KCl, 137.93 mM NaCl, 4.17 mM NaHCO₃, 0.441 mM KH₂PO₄, Na₂HPO₄, 5.56 mM D-Glukose). Der bindegewebige Herzbeutel (*Pericardium fibrosum*) sowie die Vorhöfe (*Atria*) werden entfernt. Das restliche überwiegend ventrikulare Gewebe wird mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in Enzymlösung bei 37°C für 40-50 min inkubiert (7.5 mg Collagenase Typ I, 3 mg BSA, 74 U DNase I auf 1 ml HBSS). Hierbei werden Strukturproteine der extrazellulären Matrix verdaut, die den Zellverband zusammenhalten. Anschließend erfolgt eine mechanische Vereinzelung der Zellen des Gewebes mit einer Glaspipette (Trituierung).

Die vereinzelten Zellen werden abzentrifugiert und in Nährmedium resuspendiert (MEM-Medium mit 5 g/l Glukose, 200 mg/l NaHCO₃, 100 mg/l Transferrin, 10% fötales Kälberserum, 1 mM L-Glutamin, 25 mg/l Insulin). Um die Enzymreste herauszuwaschen, werden die Zellen erneut abzentrifugiert und wiederum in Nährmedium resuspendiert.

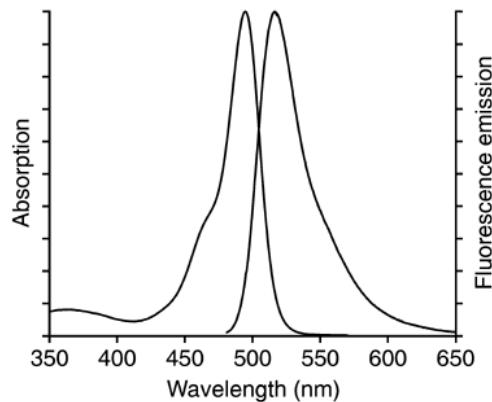
Die isolierten und gewaschenen Kardiomyocyten werden anschließend auf Deckgläschen ausgesät, die zuvor mit einer Proteinmischung bestehend aus Bestandteilen der extrazellulären Matrix (Matrigel), beschichtet wurden. Die Kultivierung erfolgt im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂.

Nach Tag 1-3 in Kultur kann beobachtet werden, dass die isolierten Zellen wieder zu Kardiomyocyten ausdifferenzieren und mit der Kontraktion beginnen. Um die Teilung der ebenfalls in der Präparation vorhandenen Fibroblasten zu unterbinden, wird an Tag zwei AraC (Cytarabin) in einer Konzentration von 4 µM hinzugefügt (Isomer des Nukleotids Cytidin, das früher in der Chemotherapie zum Einsatz kam).

2. Versuchsaufbau

Um den Einfluss verschiedener pharmakologisch wirksamer Substanzen auf das Kontraktionsverhalten isolierter Kardiomyocyten zu untersuchen, werden auf Deckgläschen wachsende Kardiomyocyten unter dem Mikroskop untersucht.

Die Betrachtung erfolgt einerseits im Hellfeld (Phasenkontrastmodus), andererseits in der Fluoreszenz. Für die Fluoreszenzbetrachtung werden die Zellen zuvor für etwa eine Stunde im Inkubator mit einem Fluoreszenzfarbstoff inkubiert (Fluo5-AM). Dieser Farbstoff ist zellpermeabel, d.h. er kann durch die Plasmamembran der Zellen in das Zytosol diffundieren. Dort angelangt, wird er durch zelleigene Enzyme in der Art modifiziert, dass er nicht mehr membrangängig ist und somit beim Waschen des Farbstoffs aus dem extrazellulären Medium in der Zelle „gefangen“ bleibt. Der Farbstoff Fluo5-AM ist ein Calciumindikator mit geringer Bindungsaffinität zu Calcium (Bindungskonstante 2,3 µM). Er emittiert nach Bestrahlung mit blauem Licht in Abwesenheit von Calcium schwache grüne Fluoreszenz. Nach Bindung von Calcium nimmt die Intensität des Fluoreszenzlichtes um den Faktor 100 zu.



Absorption- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes Fluo5-AM (Ca-gebunden)

Für die Betrachtung des Fluoreszenzfarbstoffes wird aus dem weißen Licht einer Anregungslampe Xenonlampe mit einem Bandpassfilter das gewünschte Lichtspektrum selektiert (450-490 nm) und über einen dichromatischen Spiegel in das Objektiv reflektiert. Der dichromatische Spiegel ist in der Art gebaut, dass er Licht unterhalb einer Wellenlänge von 495 nm reflektiert, Licht höherer Wellenlänge dagegen transmittiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht wird nun durch das Objektiv gesammelt und passiert den dichromatischen Spiegel. Somit erfolgt eine Trennung von Anregungs- und Emissionslicht. Nachgeschaltet ist ein weiterer optischer Filter, der aus dem Licht das gewünschte Beobachtungsspektrum isoliert (500-550 nm).

Mit diesem Versuchsaufbau und des fluoreszenden Calcium-Indikators wird die Abhängigkeit der Kontraktion von der extrazellulären Calcium-Konzentration analysiert.

Des Weiteren wird der Einfluss folgender pharmakologisch wirksamer Substanzen in den aufgelisteten Konzentrationen auf das Kontraktionsverhalten isolierter Kardiomyozyten untersucht:

- Ephinephrin (Adrenalin, Nebennierenhormon) 1 μ M
- Propranolol (β -Blocker) 25 nM
- Verapamil (L-Typ Calciumkanal-Blocker) 5 μ M
- Carbachol (Parasympathomimetikum, Acetylcholin-Analogon) 1 und 50 μ M
- TTX (Tetrodotoxin, Na-Kanal-Blocker) 1 μ M