

**Fluoreszenzfarbstoffe und
optische Mikromanipulation
für Anwendungen vom
Einzelmolekül bis zum Zellaggregat**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Diplom-Biologin Gabriele Meyer zu Hörste

geboren am 26.07.1970 in Kassel

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| <i>Abkürzungsverzeichnis</i> | 4 |
| <i>Zusammenfassung</i> | 5 |
| 1. Einleitung | 6 |
| 2. Material und Methoden | 10 |
| 2. 1. Wahl der optischen Pinzette | 10 |
| 2. 2. Einkopplung der optischen Pinzette durch das bildgebende Objektiv eines konfokalen Laser-Raster-Mikroskops | 13 |
| 2. 3. Rekonstitution eines Systems aus Mikrotubuli und Kinesin | 18 |
| Puffersysteme | 18 |
| Präparation von Tubulin | 19 |
| Präparation von Kinesin | 21 |
| Beladung von Mikrokugeln mit Kinesin | 25 |
| Rekonstitution von parallel ausgerichteten Mikrotubuli | 26 |
| 2. 4. Präparation lebender Zellen | 28 |
| Egeria densa | 28 |
| Präparation von Einzelzellen aus Schweinepankreas | 29 |
| Kultivierung von AR42J-Zellen | 31 |
| Kultivierung von NK92-Zellen | 33 |
| 2. 5. Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe | 34 |

| | |
|---|----|
| 3. Ergebnisse | 39 |
| 3. 1. Einkopplung einer optischen Pinzette in ein Laser-Raster-Mikroskop LSM 510 | 39 |
| 3. 1. 1. <i>Kompensation der z-Bewegung</i> | 42 |
| Die Eichung der Fokusposition erfolgt mit einem Spiegel | 43 |
| Der Qualitätsfaktor Q | 45 |
| Die Eichung wird an Mikrokugeln überprüft | 47 |
| 3. 1. 2. <i>Einsatz der kompensierten optischen Pinzette in intakten Zellen</i> | 49 |
| 3. 2. Versuche an pankreatischen Zellen | 51 |
| 3. 2. 1. <i>Vergleich der Anfärbung von intakten Zellen</i> | 52 |
| Kriterien für den Zellzustand | 52 |
| Zellschäden von AR42J-Zellen vor der Anfärbung | 52 |
| Zellschäden durch das Lösungsmittel für Farbstoffe | 53 |
| Zellschäden durch Stimulation mit Dexmethason | 55 |
| Anfärbung mit Fluorescein-Diacetat | 57 |
| Anfärbung mit LysoSensor Green | 58 |
| Anfärbung mit BCECF-AM | 61 |
| Anfärbung mit cSNARF-AM | 67 |
| 3. 2. 3. <i>Einfluß der optischen Pinzette auf AR42J-Zellen</i> | 72 |
| Zunahme von Zellschäden im Beobachtungsverlauf | 72 |
| Zellschäden durch die Bewegung eines zymogenen Granulums | 74 |
| Bewegung zymogener Granula ohne Zellschäden | 76 |
| 4. Diskussion | 80 |
| 5. Literaturverzeichnis | 84 |
| 6. Anhang | 91 |
| Rot-Grün-Brille | 91 |
| Publikationen und Tagungsbeiträge | 92 |
| Wissenschaftlicher Werdegang | 93 |
| Ehrenwörtliche Erklärung | 94 |
| Thesen zur Dissertation | 95 |
| Danksagungen | 96 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| AR42J | Zelllinie pankreatischer Azinuszellen |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| AM | Azetoxy-methylester |
| AMPPNP | Adenylylimidodiphosphat |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCECF | Farbstoff (s. Tabelle 2) |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cSNARF | Farbstoff (s. Tabelle 2) |
| DEAE-C | Diethylaminoethyl-Cellulose |
| DDT | Dichlordiphenyltrichlorethan |
| DMS | Dexamethason |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ECACC | European Collection of Cell Cultures |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGF | Epithelialer Wachstumsfaktor |
| EGTA | Ethylenbis (oxyethylenitrilo)-tetraessigsäure |
| FDA | Farbstoff (s. Tabelle 2) |
| FKS | Fötale Kälberserum |
| FPLC | <i>Fast Performance Liquid Chromatography</i> |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HEPES | <i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid</i> |
| IR | Infrarot-Licht |
| LB | Polystyrol-Mikrokugel (<i>Latex-Beads</i>) |
| LSM | Laser-Raster-Mikroskop |
| MB | Magnetische Mikrokugel |
| MAP | Mikrotubulus-assoziierte Proteine |
| MT | Mikrotubuli |
| MTOC | Mikrotubulus-organisierendes Zentrum |
| MTP | Mikrotubuläres Protein |
| Nd:YAG | Neodym:Yttrium-Aluminum-Granat |
| NK92 | Zelllinie humaner Killerzellen |
| PBS | Phosphat-gepufferte Salzlösung |
| PC | Phosphocellulose |
| PC-Tub | Phosphocellulose-gereinigtes Tubulin |
| PMSF | Phenylmethansulfonsäurefluorid |
| PIPES | Piperazin-1,4-bis (2-ethansulphonsäure) |
| ROI | <i>region of interest</i> |
| rpm | Umdrehungen je Minute |
| RPMI | Zellkulturmedium |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| UV | Ultraviolett-Licht |
| VE-DIC | Videoverstärkte differentielle Interferenzkontrast-Mikroskopie |

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit werden zwei Techniken, die sich bei mikroskopischen Studien einzelner lebender Zellen bewährt haben, so weiterentwickelt, daß sie sich auf Zellaggregate anwenden lassen: Zum einen ist dies die Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen, zum anderen die Mikromanipulation mit der optischen Pinzette, die ein geeigneteres Instrument als mechanische Mikromanipulatoren darstellt. Die optische Pinzette hat sich seit ihrer Erfindung 1987 als Werkzeug in der konventionellen Fernfeldmikroskopie in zahlreichen Einzelzell-Studien bewährt. Für vielzellige, räumlich ausgedehntere intakte Präparate wie Zellaggregate, für die konventionelle Mikroskopie nur begrenzt geeignet ist, wird Laser-Raster-Mikroskopie benötigt. In der abrasternden Mikroskopie ist der Einsatz der optischen Pinzette gerade auch deswegen sehr interessant, weil bewegte Objekte nicht schnell genug aufgenommen werden können und ein Festhalten über die Bildaufnahmezeit hin erforderlich ist. Ungelöst war dabei jedoch bislang das Problem, wie die für den Bildaufnahmeprozess notwendige Bewegung der abbildenden Optik auszugleichen wäre. Die vorliegende Arbeit stellt eine solche Kompensationsvorrichtung vor und zeigt, daß es möglich ist, intrazellulär bewegte Objekte für die Dauer einer Bildaufnahme zu stoppen oder zu manipulieren: Chloroplasten der Wasserpflanze *Egeria densa*, die in einer Zytoplasmaströmung mitgeführt werden, können in den Bereich der zentralen Vakuole bewegt und dort Ebene für Ebene aufgenommen werden. Auch aktiv durch Motorproteine (z. B. Kinesin) bewegte Organellen können mit der optischen Pinzette verlegt werden.

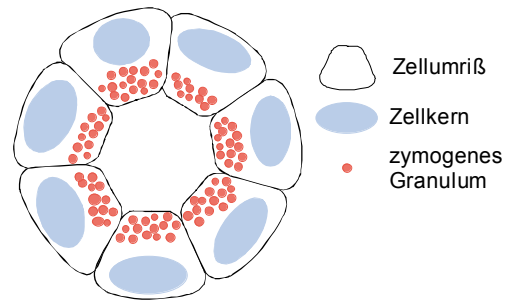
Als zellbiologisches Anwendungsbeispiel wurde untersucht, inwieweit die subzelluläre Position zymogener Granula mit dem pH-Wert in ihrem Inneren korreliert und ob ein Verlegen zymogener Granula von AR42J-Zellen in Zellaggregaten einen Einfluß auf den pH-Wert des Granulums und der zytoplasmatischen Umgebung hat. Die Beschreibung der *European Collection of Cell Cultures* gibt an, daß AR42J-Aggregate Hohlkörper seien, und so stellen sie sich bei der Anfärbung mit bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen auch dar; durch die Wahl geeigneter Farbstoffe ist es jedoch möglich zu belegen, daß die Aggregate im Inneren aus Zellen bestehen. Die gelegentlich getroffene Annahme, daß AR42J-Aggregate Hohlkörperstrukturen seien und als Modell pankreatischer Azini dienen könnten, ist also nicht richtig. Die Sensitivität der Zellen gegenüber optischer Manipulation wird durch die Anfärbung mit pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen gesteigert, wie besonders bei der Anfärbung mit BCECF-AM beobachtet wurde. Die wechselseitige Beeinflussung von granulärem und zytoplasmatischem pH-Wert stellte sich als gering heraus, womit die Hypothese, daß der granuläre pH-Wert als ortsdeterminierender Faktor dienen könnte, widerlegt wurde. Eine zufällige Dislokation als Ursache für Pankreatitis kann damit ausgeschlossen werden.

1. Einleitung

Zur Zeit beginnt die Biologie, die vielfältigen intermolekularen und subzellulären, beispielsweise zwischen den Organellen auftretenden, Wechselwirkungen innerhalb einer Zelle zu verstehen. Noch werden überwiegend Techniken verwendet, bei denen die Zelle geöffnet und deren Zellkomponenten mit biochemischen Methoden studiert werden. Die weite Verfügbarkeit neuer Vitalfluoreszenzfarbstoffe macht es heute möglich, Lebensvorgänge direkt im Mikroskop zu studieren, und es ist unbestritten, daß man, um ein vollständiges Bild zellulärer Funktionen zu erhalten, *lebende* Zellen untersuchen muß. Es ist allerdings auch offensichtlich, daß das Studium individueller Zellen erst ein Anfang sein kann, denn viele Zellen entwickeln ihre volle Funktionalität erst im Zellverband. Besonders ausgeprägt ist dies für Hepatozyten, bei denen Einzelzellen nicht die volle Funktionalität eines Hepatozyten in der Leber entwickeln, und die im Moment im Mittelpunkt einer großen, auf 5 bis 10 Jahre angelegten Initiative, unter dem Aspekt der Systembiologie sind. Hier ist bereits jetzt klar, daß lebende Zellverbände studiert werden müssen. Die Techniken zur Untersuchung solcher Zellverbände sind aber nur teilweise vorhanden, und es wird eine Zielsetzung der vorliegenden Arbeit sein, zwei Detailtechniken hin zur Anwendungsreife zu entwickeln. Die Untersuchungen konnten nicht an Hepatozyten durchgeführt werden, da dort einige zellbiologische Details noch nicht bekannt sind. Statt dessen werden in der vorliegenden Arbeit pankreatische Zellen verwendet, die im Organ mit anderen Zellen kooperieren.

Das Pankreas besteht zu mehr als 90 % aus exokrinen Azinuszellen. Jeweils eine kleine Gruppe dieser Zellen umgibt einen zentralen Hohlraum, in den die Verdauungsenzyme abgegeben werden. Diese Hohlräume münden in Gänge, die sich zum gemeinsamen Ausführgang in den Darm vereinigen. Die Azinuszellen sind strikt polar: Zu dem zentralen Hohlraum hin befindet sich die Masse des Zytoplasmas und darin auch die zymogenen Granula, jene Organelle, in denen die Verdauungsenzyme gebildet und gespeichert werden (Abb. 1). Vom zentralen Hohlraum entfernt liegen die Zellkerne, die zur „Außen“-Seite hin nur durch einen schmalen Zytoplasmasaum umgeben sind (Motta et al. 1997).

Abb. 1: Stark vereinfachte Schemazeichnung zur Lage von Zellkernen und zymogenen Granula im pankreatischen Azinus. Die Zellen sind polar, die zymogenen Granula sind um den Beginn des Ausführgangs angeordnet.



Die zymogenen Granula durchlaufen einen Entstehungs- und Reifungsprozeß, der im zellkernnahen endoplasmatischen Retikulum beginnt und in dem eine starke Ansäuerung stattfindet (Hand 1990). Diese Ansäuerung bewirkt, daß die Verdauungsenzyme inaktiv bleiben, um ein Zersetzen des zymogenen Granulums und daran anschließend der Zelle durch aktive Enzyme zu verhindern. Ein solcher Selbstverdau des Pankreas (Bauchspeicheldrüsenentzündung oder Pankreatitis) kann dadurch ausgelöst werden, daß bereits freigesetzte Enzyme nicht abfließen können, weil beispielsweise ein Gallenstein den gemeinsamen Ausführungsgang verschließt, oder das gebildete Sekret nicht dünnflüssig genug ist wie im Fall von Mukoviszidose-Kranken (Silbernagl und Lang 1998). Da die Ansäuerung der zymogenen Granula einen Schutz vor der Aktivierung der gebildeten Enzyme darstellt und zugleich mit einer Ortsveränderung der reifenden zymogenen Granula einhergeht, wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, ob eine Dislokation eines zymogenen Granulums möglicherweise eine Disregulation des internen pH-Wertes zur Folge haben könnte, und somit ein Versagen des zelleigenen Schutzmechanismus darstellt.

Zur Beantwortung dieser Frage ist es nötig, im Inneren einer Zelle eine Manipulation vorzunehmen. Gerade für Zellen in Zellverbänden bieten sich die *optischen* Mikromanipulationstechniken eher an als *mechanische* Mikromanipulation, die beim Einsatz im Inneren von Zellverbänden immer die äußeren Zellschichten mit beeinflusst. Fokussierte Laser als optische Mikromanipulatoren üben ihren Einfluß nur an ihrem Fokuspunkt aus und eignen sich daher besonders für den Einsatz an Zellaggregaten.

Abhängig davon, ob das Laserlicht von der Materie vor allem absorbiert wird oder sie durchdringt, kann man zwischen dem Einsatz als Mikrostrahl (oder Laserskalpell, engl. *laser scissors*) und als optischer Pinzette (engl. *laser tweezers*) unterscheiden. Letztere stellt bei richtiger Wahl des verwendeten Lasers ein sehr schonendes Verfahren zur Manipulation im Inneren unverletzter Zellen dar, da das Licht die Zelle größtenteils ohne Wechselwirkung durchdringt. Nur im Fokuspunkt ist die Photonendichte so hoch, daß eine merkliche Beeinflussung stattfindet: Richtet man die optische Pinzette auf ein Vesikel, wird es in der Nähe des Fokus festgehalten und kann relativ zur Zelle bewegt werden. Mit

geeigneten mikroskopischen Techniken kann somit die Reaktion der Zelle auf die Ortsveränderung untersucht werden, in Zellverbänden auch der Einfluß auf Nachbarzellen.

Zum Studium der Sekretion exokriner Pankreaszellen wird auch die Zelllinie AR42J herangezogen (Logsdon et al. 1985), die zymogene Granula bildet und Enzyme abgibt, wenn die genaue Zusammensetzung sich auch von der menschlicher Pankreaszellen unterscheidet. Nach Angabe der *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Abb. 2) wachsen diese Zellen darüber hinaus als Hohlkörper, wie sie auch die Azini des Pankreas darstellen; allerdings fehlt den einzelnen AR42J-Zellen die strikte Polarität pankreatischer Azinuszellen.

The screenshot shows a Netscape browser window displaying the ECACC website. The address bar shows the URL <http://www.ecacc.org.uk>. The page content includes a search bar with 'AR42J' entered, a navigation menu with 'HOME', 'CATALOGUE', 'SERVICES', 'DEPOSITS', 'CUSTOMER SERVICE', and 'CONTACTS', and a detailed data sheet for the cell line AR42J.

| General Cell Collection | |
|-------------------------|--|
| ECACC No. | 93100618 |
| Cell Line Name | AR42J |
| Keywords | Rat exocrine pancreatic tumour |
| Cell Line Description | Derived from a transplantable tumour of a rat exocrine pancreas. The line is tumourigenic in nude mice, and shows significant secretion of amylase and other exocrine enzymes. |
| Species | Rat |
| Tissue | pancreas |
| Morphology | Pancreas cells |
| Passage Number | 8-13 |
| Sub Culture Routine | Cells grow in hollow spheroid colonies that can attach loosely. Split cultures 1:2 every 48 hours into fresh flasks, maintain cultures between 1-9x10 ⁶ cells/ml. Adherent cells should be dislodged using 0.2% EDTA. N.B. High cell viability cannot be expected during culture. |
| Culture Medium | RPMI 1640 + 2mM Glutamine + 10% Foetal Bovine Serum (FBS). |
| Karyotype | Not Specified |
| Products | Amylase and exocrine enzymes |
| Receptors | Gastrin/CCKB, Epidermal growth factor (EGF), Somatostatin |
| Depositor | Dr S Watson, Department of Surgery, Queens Medica |
| Originator | No |
| Country | UK |

Enquiries call +44 (0)1980 612512 · © 2001 ECACC

Abb. 2: Auszug aus dem Datenblatt von ECACC zur Zelllinie AR42J. Bildschirmaufnahme vom 27.09.2002.

In der vorliegenden Arbeit wird die Fluoreszenzfärbung der AR42J-Aggregate systematisch erforscht. Durch den Vergleich der Anfärbung mit Farbstoffen, die sich in ihren biochemischen Eigenschaften unterscheiden, konnten Färbeartefakte gezeigt werden, die als Hohlkörperstrukturen interpretiert werden können. Die hier untersuchten Zellaggregate sind allerdings nicht hohl, sondern mit nicht angefärbten Zellen gefüllt.

Für solche Untersuchungen an Zellaggregaten würde die konventionelle Mikroskopie nur unzureichende Möglichkeiten bieten, da sich die exakte Lage von Zellbestandteilen oder ganzen Zellen senkrecht zum Objektträger oder Deckglas nur sehr ungenau bestimmen läßt. Diese Richtung, die parallel zur Ausbreitungsrichtung des Anregungslichtes ist, wird als z-Richtung bezeichnet. Die Laser-Raster-Mikroskopie (engl. *laser scanning microscopy*) erlaubt auch in z-Richtung eine höhere Auflösung und eine dreidimensionale Rekonstruktion von Zellaggregaten. So können einerseits auch im Inneren von Zellverbänden einzelne Zellen gezielt untersucht werden. Allerdings muß bei solchen Untersuchungen sehr sorgfältig geprüft werden, wie sich die Farbstoffe in Aggregaten verhalten. Dies trifft in besonderer Weise für die Anfärbung für Gewebe aus verschiedenen Zelltypen zu, aber schon in Aggregaten aus nur *einem* Zelltyp können unterschiedliche Farbstoffkonzentrationen in den Zellen zu Fehlinterpretationen führen. Andererseits erlaubt die höhere Auflösung in z-Richtung, subzelluläre Reaktionen genauer zu lokalisieren. Es bietet sich die Möglichkeit, neben einer dreidimensionalen Abbildung einer Zelle oder eines Aggregates Aufnahmen aus einer bestimmten, genau eingegrenzten Region der Zelle zu machen, die weniger durch Streulicht überdeckt werden, als dies in konventioneller Mikroskopie möglich ist. Damit läßt sich beispielsweise die Reaktion der Zelle auf einen Eingriff durch Mikromanipulation genauer bestimmen.

In der vorliegenden Arbeit werden Techniken zur Anfärbung und Mikromanipulation von Zellaggregaten entwickelt und ein breites Feld von Anwendungsbeispielen aufgezeigt. Es werden bewußt auch Beispiele gezeigt, die mit konventioneller Mikroskopie ebenfalls bearbeitet werden können, um die Vielseitigkeit des Systems zu demonstrieren.

2. Material und Methoden

2.1. Wahl der optischen Pinzette

Die Entwicklung der Einstrahl-Gradientenfalle oder "optischen Pinzette" geht auf die Physiker Ashkin und Letokhov zurück, die die dieser Technik zugrundeliegende Theorie um 1968 bis 1970 entwickelten und veröffentlichten (Ashkin 1970) und in der Folge in Zusammenarbeit mit Dziedzic auch im Inneren von Zellen eingesetzt (Ashkin und Dziedzic 1987). Die Kraft der optischen Pinzette beruht auf einer Impulsübertragung von einem Lichtstrahl auf eine Grenzfläche. Dabei werden zwei Kräfte wirksam: Streukraft und Brechkraft. Die Streukraft wirkt in Richtung der Ausbreitung des Lichts. Für die Bestimmung der durch Brechung ausgeübten Gesamtkraft muß die Photonendichte im Lichtstrahl und die Form der Grenzfläche betrachtet werden.

Je nach Mode des Lasers ergeben sich unterschiedliche Intensitätsprofile des Laserstrahls. Der Strahl eines TEM_{00} -Moden-Lasers hat ein Intensitätsprofil, das im Querschnitt einer Gaußverteilung entspricht, die Photonendichte ist entlang der optischen Achse am höchsten und nimmt mit der Entfernung zur optischen Achse hin ab (Abb. 3).

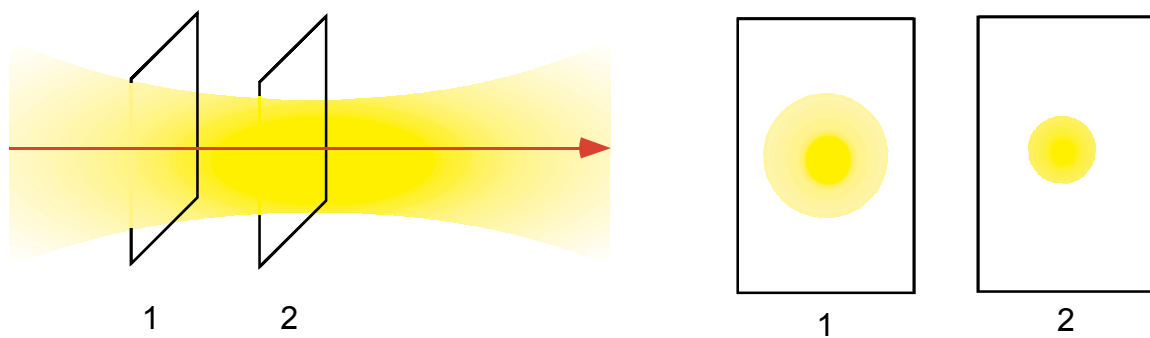


Abb. 3: Intensitätsprofil eines fokussierten TEM_{00} -Lasers.

Die Intensität im Strahlprofil ist nicht homogen, sondern entlang der optischen Achse am höchsten und nimmt nach außen hin ab. Roter Pfeil: Richtung der optischen Achse.

Andere Laserstrahl-Intensitätsprofile, zum Beispiel Ringe (engl. *doughnut mode*) oder regelmäßige Muster von Maxima und Minima sind ebenfalls möglich, werden aber nur in speziellen Anwendungen eingesetzt (Ashkin 1992).

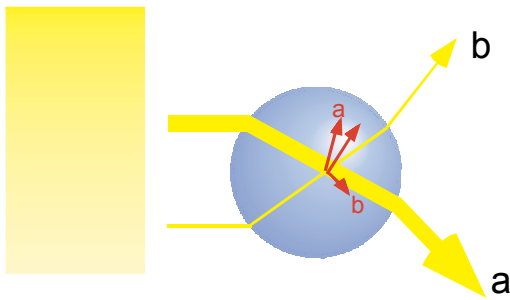


Abb. 4: Transparentes Objekt in inhomogenem Lichtstrahl.

Licht, das durch ein transparentes Objekt abgelenkt wird, überträgt einen Impuls auf das Objekt. Hat das Objekt einen höheren Brechungsindex als das umgebende Medium, wird der Teilstrahl a zur Richtung geringerer Lichtintensität abgelenkt, und der daraus resultierende Impuls bewegt das Objekt in Richtung höherer Lichtintensität (roter Pfeil a). Teilstrahl b wird zur Richtung höherer Lichtintensität hin abgelenkt und überträgt dem Objekt einen Impuls in Richtung geringerer Lichtintensität. Da Teilstrahl a stärker ist als Teilstrahl b, bewegt das Teilchen sich insgesamt in Richtung höherer Lichtintensität. (nach Greulich 1999)

Ein Objekt, das einen höheren Brechungsindex als das umgebende Medium hat, erfährt in einem inhomogenen Strahl einen Gesamtimpuls, der es in Richtung der höheren Strahldichte bewegt (Abb. 4). Für Objekte mit einem gegenüber der Umgebung höheren Brechungsindex in einem Laserstrahl wirkt der Gesamtimpuls durch Brechung immer in Richtung des Fokus (Abb. 5).

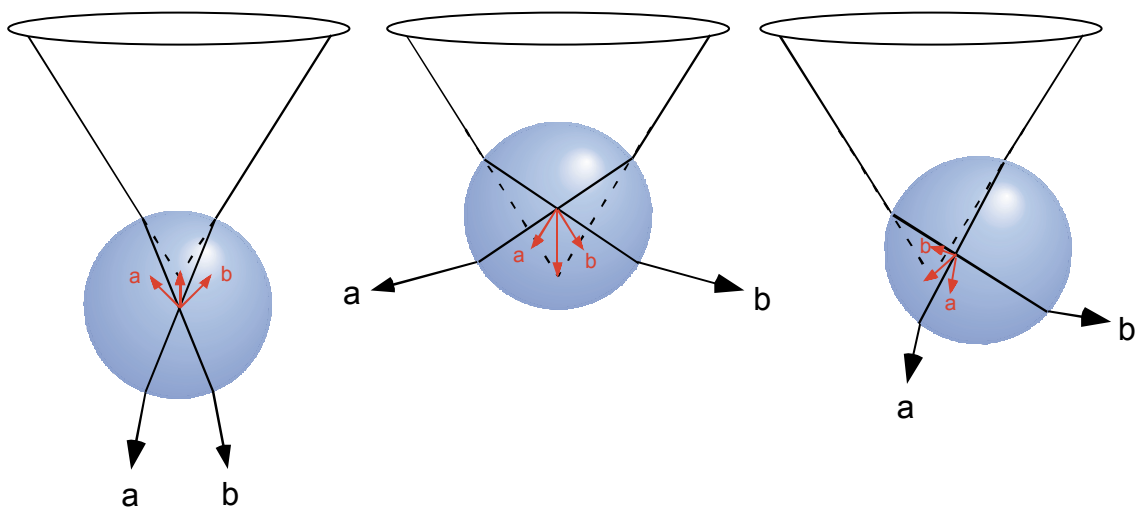


Abb. 5: Mikrokugeln im Laserfokus.

Mikrokugeln werden durch Streukräfte in den Laserfokus bewegt, wenn ihr Brechungsindex höher ist als der des umgebenden Mediums. Eingezeichnet sind jeweils zwei beispielhafte Teilstrahlen (a, b) sowie die durch sie ausgeübten Brechungskräfte und die resultierende Gesamtkraft. (Nach Ashkin 1992)

Da auf das Objekt auch konventioneller Lichtdruck einwirkt, wird es in der Praxis an einer Position festgehalten, die von der Linse aus gesehen hinter dem Fokuspunkt liegt. Einer ausreichend langsamen Bewegung des Laserstrahls folgt das Objekt, da mit der Bewegung des Fokus die angreifenden Kräfte wieder ungleich werden und das Objekt erneut in seine stabile Lage ziehen.

Der Durchmesser eines Laserfokus kann geringer sein als die Wellenlänge des verwendeten Lichtes (Greulich 1999). Da der Laserfokus damit mikroskopische Dimensionen hat, bietet es sich an, die Mikromanipulationswerkzeuge im Mikroskop einzusetzen. Die Einkopplung in ein konventionelles Mikroskop erfolgt normalerweise durch das bildgebende Objektiv.

Für die Arbeit in lebenden Zellen ist zu beachten, daß Gewebe Licht absorbiert und darauf reagiert. Bereits Ashkin hat festgestellt, daß als optische Pinzette IR-Laser besser geeignet sind, da sie weniger Schäden verursachen. Als gut geeignet haben sich Nd:YAG-Laser erwiesen, deren Emissionswellenlänge 1064 nm ist, auch wenn es dabei zu einer Absorption durch Wasser kommen kann (Schneckenburger 2000).

Dazu kommen Mehrphotoneneffekte, die auftreten, wenn ein Molekül zwei oder drei Photonen zur gleichen Zeit absorbiert. Der Effekt entspricht dem, den ein einzelnes Photon der doppelten oder dreifachen Wellenlänge erzeugen würde. Für die Arbeit mit einem gut fokussierten Nd:YAG-Laser bedeutet das, daß man mit Effekten rechnen muß, die durch Licht der Wellenlänge 532 nm (Zweiphotonen-Anregung) und 355 nm (Dreiphotonen-Anregung) ausgelöst werden.

2. 2. Einkopplung der optischen Pinzette in ein Laser-Raster-Mikroskop

Laser-Raster-Mikroskopie ist eine Form der Fluoreszenz-Mikroskopie. Das Prinzip der konfokalen Abbildung im Mikroskop wurde 1953 von M. Minsky entwickelt (Paddock 1994). Kern des Prinzips ist eine Lochblende, die alles nicht aus dem Fokus ausgestrahlte Licht vor dem Detektor weitestgehend abfängt. Die Lochblende muß so justiert werden, daß sie genau auf Höhe des Brennpunktes des aus der Fokusebene abgestrahlten Lichts liegt. Das bedeutet zugleich, daß das nicht aus der Fokusebene stammende Licht an dieser Stelle keinen Brennpunkt aufweist, sondern aufgeweitet ist. Von dem Licht aus der Fokusebene geht damit nur jener Anteil verloren, der durch darunterliegende Präparatbereiche gestreut wird, während der größte Teil des Lichts aus Nichtfokusebenen abgefangen wird (Abb. 6). Die Nichtfokusebenen werden damit "unsichtbar", und auch in einer dicken Probe können einzelne Ebenen betrachtet werden. Man bezeichnet dies auch als "optisches Schneiden". Auf diese Art ermöglicht Laser-Raster-Mikroskopie eine Auflösung von Strukturen auch im Inneren dicker Präparate, bei der die nicht-abrasternde Lichtmikroskopie Feinstrukturen nicht mehr auflösen kann.

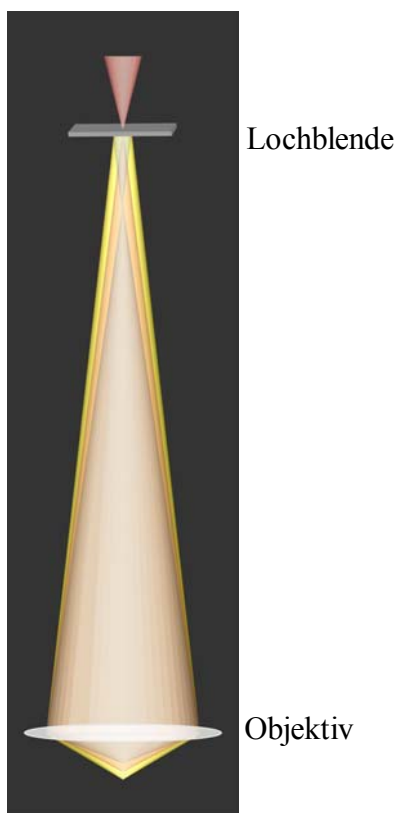


Abb. 6: Effekt einer Lochblende auf Licht, das aus unterschiedlichen Fokusebenen stammt. Das Licht aus der Ebene, deren Zwischenbild genau in der Lochblenden-Ebene liegt, wird auf den Detektor abgebildet, während Licht aus anderen Ebenen von der Lochblende abgefangen wird. (Schemazeichnung, stark überzeichnet!)

Die z-Ausdehnung der Fokusebene oder Schnittdicke wird dabei von einer Kombination verschiedener Faktoren vorgegeben: Vom verwendeten Objektiv, von der Wellenlänge des Lichtes sowie vom Durchmesser der Lochblende. Dabei ist der Einfluß des verwendeten Objektivs der stärkste, der der Wellenlänge der geringste (Abb. 7). Bei gleichem Durchmesser der Lochblende ist die z-Ausdehnung der Fokusebene bei niedrig vergrößernden Objektiven höher als bei hoch vergrößernden Objektiven.

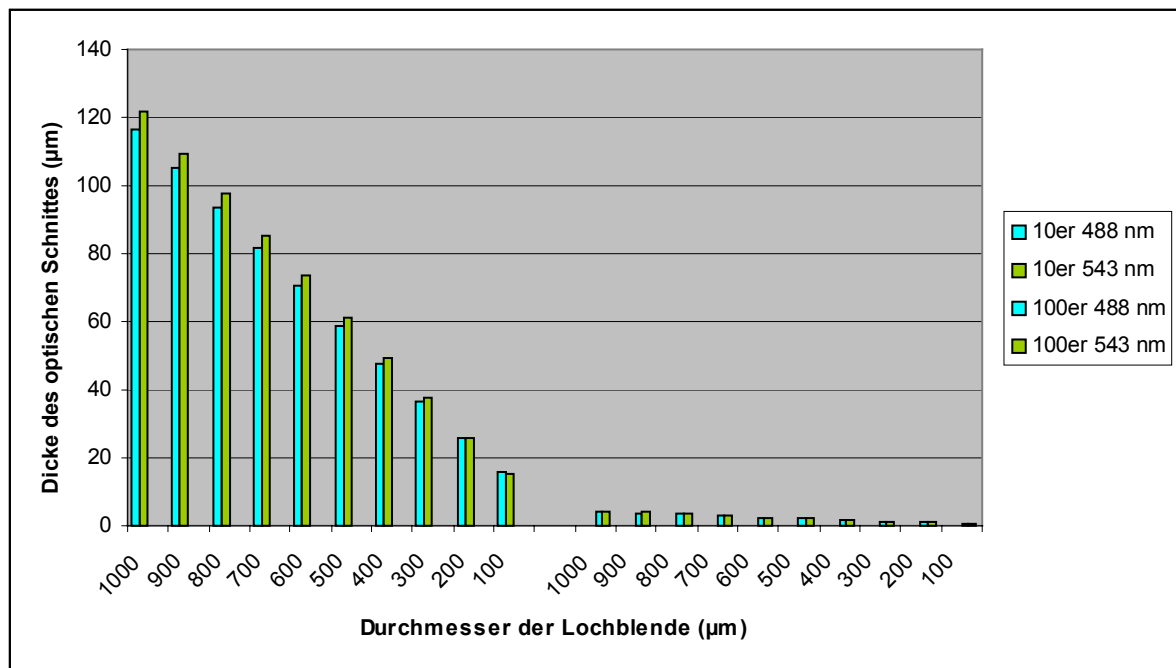


Abb. 7: Abhängigkeit der Dicke des optischen Schnittes vom verwendeten Objektiv (links 10fach vergrößernd, rechts 100fach vergrößernd), von der Wellenlänge des verwendeten Lichtes (488 nm: blau, 543 nm: grün) und dem Durchmesser der Lochblende (x-Achse).

Da die Lochblende nur Licht aus einem bestimmten Volumenelement im Präparat durchläßt, ist es nicht notwendig und oft auch nicht sinnvoll, die ganze Probe dauerhaft zu beleuchten. Fokussierte Laser bieten die Möglichkeit, jeweils nur eben jenen Bereich zu beleuchten, dessen Zwischenbild exakt die Position der Lochblende hat. Die Bewegung der Laser wird also mit der der Lochblende gekoppelt. Auf diese Weise wird die Probenbelastung durch Photonen und das Ausbleichen verringert, ohne daß Bildinformation verlorengeht.

Allerdings stehen den Vorteilen des LSM auch entsprechende Nachteile gegenüber. Ein Nachteil ist, daß durch den Einsatz einer Lochblende ein erheblicher Teil des aus dem Präparat stammenden Lichtes abgefangen wird. Der Einsatz eines Laserfokus als

Beleuchtung nur des Fokusbereiches reduziert den Anteil des Lichtes, der sowieso nicht auf den Detektor abgebildet werden würde; dennoch ist auch hier der Lichtverlust bei konfokaler Abbildung noch sehr hoch und steigt mit zunehmender Eindringtiefe ins Präparat. Da sowohl das Anregungslicht wie das entstehende Fluoreszenzlicht durch das Gewebe gestreut werden, erscheinen Bereiche, die nicht nah am Deckglas sind, weniger detailreich und lichtstark als Bereiche unmittelbar am Deckglas. Dies ist an großen Bildstapeln zu sehen, die im deckglasnahen Bereich hell wirken und mit zunehmender Entfernung vom Deckglas an Lichtstärke abnehmen. Besonders bei schwachen Anfärbungen kann es dazu kommen, daß aus weit vom Deckglas entfernten Bereichen fast kein Signal mehr zu erkennen ist.

Ein zweiter Nachteil liegt in der begrenzten Bildaufnahmegeschwindigkeit von Laser und Lochblende. Während bei konventioneller Mikroskopie die gesamte Bildfläche gleichzeitig aufgenommen werden kann, baut das Laser-Raster-Mikroskop jede Bildebene aus einer bestimmten Zahl von Bildpunkten (Pixeln) auf, die es jeweils einzeln aufnimmt. Jeder Bildpunkt enthält die Information über die Intensität des Fluoreszenzlichtes aus dem Volumenelement, das der Laser beleuchtet.

| Verstellbarer Wert | Optimiert auf | Vorteile | Nachteile |
|---|---------------|---|--|
| Durchmesser der Lochblende | Sehr klein | Kleine Strukturen werden sichtbar, genaue z-Information | Fast das gesamte Anregungslicht geht verloren: Hohe Anregungsintensität erforderlich, daher hohe Probenbelastung; verstärktes Rauschen |
| Bildaufnahmezeit (Verweildauer bei einzelnen Pixeln sowie wiederholte Aufnahme einer Linie) | Sehr kurz | Rascher Bildaufbau, bei aufeinanderfolgenden Aufnahme können Veränderungen in der Zelle über die Zeit hin verfolgt werden | Detektionsgenauigkeit sinkt, höherer Einfluß von Rauschen |
| Pixelzahl des Bildes | Sehr hoch | Detaillierteres Bild | Bildaufnahmezeit steigt; hohe Probenbelastung |
| Detektor-Empfindlichkeit | Sehr hoch | Schwache Signale werden noch empfangen | Rauschen nimmt zu |
| Laser-Leistung | Sehr hoch | Hohe Emission, schwache Signale sind erkennbar | Hohe Probenbelastung |

Tabelle 1: Parameter der LSM-Aufnahmen

Die Steuerungssoftware des LSM 510 erlaubt dabei unter anderem eine Einstellung folgender Parameter: Größe des abzurasternden Bereichs, Anzahl der aufgenommenen Bildpunkte, Verweildauer bei jedem Pixel, Leistung des Anregungslasers, Detektorempfindlichkeit und Durchmesser der Lochblende.

In der Praxis muß für jedes Präparat festgestellt werden, welche Kombination aus veränderbaren Bildaufnahme-Werten zu guten Ergebnissen führt, wobei immer ein Kompromiß zwischen Probenbelastung, Bildaufnahmezeit und erkennbaren Details geschlossen werden muß (Tabelle 1).

Die Einkopplung einer optischen Pinzette in ein abrasterndes Mikroskop durch das bildgebende Objektiv bringt eine spezielle Anforderung mit sich: Da die Rasterbewegung in z-Richtung durch eine Bewegung des bildgebenden Objektivs erreicht wird, bewegt sich ein in der optischen Pinzette gehaltenes Organell mit der Bildaufnahme und wird also über die gesamte Aufnahmehöhe mitgeführt. Das schränkt die Anwendung einer optischen Pinzette bei der üblichen Methode der Einkopplung im LSM 510 dahingehend ein, daß man entweder ein Teilchen festhalten oder eine dreidimensionale Aufnahme erstellen kann, nicht jedoch beides zugleich erreichen kann. Das optische Schneiden ist dennoch auch für Aufnahmen eines einzelnen optischen Schnittes sinnvoll, da auf diese Weise nur der unmittelbar interessierende Bereich der Zelle betrachtet werden kann und nicht Streulicht aus weiter entfernt liegenden Zellregionen Effekte überdeckt. Allerdings kann Streulicht aus den direkt darunter- und darüberliegenden Ebenen nicht ausgeblendet werden.

Es fehlte jedoch eine effiziente technische Lösung zur Trennung der Pinzettenbewegung von der Bildaufnahmebewegung, wenn sowohl Anregungslicht wie Pinzettenlaser durch dasselbe Objektiv in die Probe fokussiert werden. Dies könnte durch zwei Techniken erreicht werden: Entweder verwendet man für den Mikroskopstrahlengang und die Pinzette zwei sich gegenüberstehende Objektive. Dies hat jedoch mehrere Nachteile: Einerseits ist es notwendig, die beiden Objektive exakt aufeinander zu justieren, damit die beiden Objektebenen exakt übereinstimmen, und muß beide Objektive so fixieren, daß sie sich anschließend nicht gegeneinander verschieben können; außerdem ist die zulässige Präparatdicke dadurch begrenzt, daß die gleiche Objektebene von beiden Seiten erreichbar sein muß, was wiederum vom maximalen Arbeitsabstand der Objektive abhängt. Für Zellaggregate, deren Dicke den Arbeitsabstand hochvergrößernder Objektive zumeist übersteigt, ist diese Anordnung daher nicht sinnvoll.

Oder man koppelt die optische Pinzette, wie üblich, durch das bildgebende Objektiv ein und kompensiert die Bewegung des Objektivs. In den beiden Richtungen der Objektebene wird die Bewegung des Anregungslichts durch einen beweglichen Spiegel erreicht, während das Objektiv in seiner Position verharrt; hier kann die Einkopplung also wie bei einem normalen Mikroskop vorgenommen werden. Anders sieht es in der z-Richtung aus: Die z-Abrasterung des Präparats erfolgt durch eine Höhenbewegung des Objektivs. Die Einkopplung des Lasers muß also so erfolgen, daß der Laserstrahl, der durch das Objektiv fällt, eine eigene Bewegung ausführt, die der Objektivbewegung genau entgegengesetzt ist. Dies erfordert wiederum ein bewegliches optisches Element im Strahlengang der optischen Pinzette: Das Ende des Glasfaserkabels, welches das Licht des Nd:YAG-Lasers zum LSM leitet. Dieses Ende wurde in eine Fassung montiert, die durch einen motorisierten Tisch bewegt werden kann.

2. 3. Rekonstitution eines Systems aus Mikrotubuli und Kinesin

Diese Arbeiten wurden gemeinsam mit J. Beeg durchgeführt. Die grau unterlegten Protokolle wurden der Arbeit „Vektorielle Bewegung des Motorproteins Kinesin und richtungsorientierter Transport artifiziieller Lasten“ entnommen.

Puffersysteme

| Puffersysteme | Konzentration/ Volumen | Substanz |
|---|--|--|
| Puffer A (PuA) pH=6,8 bzw. pH=7,2 | 0,5 mM 0,1 mM 0,5 mM 50 mM 0,5 mM | DDT EDTA EGTA Imidazol MgCl ₂ |
| Puffer A + 1 M KCl pH=6,8 | 0,5 mM 0,1 mM 0,5 mM 50 mM 1 M 0,5 mM | DDT EDTA EGTA Imidazol KCl MgCl ₂ |
| Puffer A + 150 mM KCl pH 6,8 | 750 ml 4250 ml | PuA + 1 M KCl , pH 6,8 PuA, pH 6,8 |
| Puffer B (PuB) pH 6,8 | 0,5 mM 0,1 mM 50 mM 50 mM 0,5 mM | DDT EGTA Imidazol KCl MgCl ₂ |
| Puffer C (PuC) pH 6,8 | 1 mM 1 mM 0,5 mM 80 mM 20 mM | DDT EGTA MgCl ₂ NaCl PIPES |
| Phosphatpuffer (PBS) pH 7,2 | 2,68 mM 1,76 mM 135 mM 10 mM | KCl KH ₂ PO ₄ NaCl Na ₂ HPO ₂ x 2H ₂ O |

Puffersysteme. In der Tabelle sind sowohl die für die MT- und Kinesin-Isolation verwendeten Arbeitspuffer als auch die in den Motilitäts-Tests eingesetzten Puffersysteme eingetragen. Die Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: Fa. Fluka (MgCl₂, Na₂HPO₂ x 2H₂O); Fa. Merck (DMSO, EDTA, KCl, KH₂PO₄), Fa. Roth (DDT, NaCl, PIPES), Fa. Roche (Pefabloc), Fa. Serva (Glutaraldehyd, Imidazol, PMSF), Fa. Sigma (ATP, BSA, EGTA, Glycin, GTP, Taxol)

(aus: Vektorielle Bewegung des Motorproteins Kinesin und richtungsorientierter Transport artifiziieller Lasten, mit freundlicher Genehmigung von J. Beeg)

Präparation von Tubulin

Mikrotubuli sind Aggregate von Tubulindimeren, die aus jeweils einem α - und einem β - Tubulin bestehen. α - und β -Tubulin sind kleine Proteine (um 25 kD, 4 nm in Durchmesser). Aus diesen Dimeren sind die Protofilamente der Mikrotubuli zusammengesetzt. Alle Dimere sind dabei stets gleich ausgerichtet: Das α -Tubulin eines Dimers bindet an ein β -Tubulin des nächsten; entlang des Protofilaments wechseln also α - und β -Tubulin regelmäßig ab; der gesamte Tubulus ist damit polar. *In vivo* bilden 13 Protofilamente gemeinsam einen Mikrotubulus, wobei die Dimere benachbarter Protofilamente leicht gegeneinander versetzt sind. Es ergibt sich also um den Mikrotubulus eine Helix.. Die *in vitro* gebildeten Mikrotubuli bestehen meist aus 14 Protofilamenten; die Zahl der Protofilamente kann jedoch zwischen 9 und 16 schwanken.

Mikrotubuli sind keine starren Gebilde, sondern einem stetigen Umbau unterworfen. Durch die Polarität ihres Aufbaus haben sie zwei Enden, die sich in ihrer Charakteristik deutlich unterscheiden. Sie werden als plus- und minus-Ende bezeichnet. An beiden Enden findet ein stetiger Ein- und Ausbau von Tubulin-Dimeren statt; am plus-Ende überwiegt der Einbau und am minus-Ende der Abbau. Die notwendigen Voraussetzungen dafür, daß Tubulindimere sich zu Mikrotubuli zusammenlagern, sind bekannt: Als Kofaktoren müssen GTP und Mg^{2+} -Ionen anwesend sein, die Ionenstärke und die Temperatur müssen im physiologischen Bereich liegen. Durch den Einsatz geeigneter Puffer kann man das Wachstum von Mikrotubuli in einem Kanal anregen, wobei ein stetiger Pufferstrom eine parallele Ausrichtung der Mikrotubuli herbeiführt (Stracke 2000).

Präparation der Mikrotubuli

Mikrotubuläres Protein (MTP) wird bevorzugt aus dem Großhirn von Säugetieren isoliert (im Rahmen der Arbeit vom Schwein), da dieses mit bis zu 20 % MTP (bezogen auf den Gesamtproteingehalt) sehr reichhaltig an MTP ist. Die Präparation des MTPs für die isopolare Ausrichtung der MTs im Versuchskanal unterscheidet sich in einigen Schritten von der, die für die Isolation des Motorproteins Kinesin angewandt wird, z. B. in der Wahl des Arbeitspuffers. Im folgenden wird auf beide Prozeduren eingegangen.

Mikrotubuläres Protein für Bewegungstests

Die Isolierung des mikrotubulären Proteins (MTP) erfolgte im wesentlichen nach der Prozedur von Shelanski *et al.* (Shelanski 1973). Sie ist gekennzeichnet durch zwei Zyklen temperaturabhängiger Desassemblierung/Reassemblierung (Polymerisation von Tubulin).

- Frisches Schweinehirn von Kleinhirn, Hirnhaut, überfetteten Gewebepartien und größeren Blutgefäßen befreien und mit gekühltem PuC pH 6,8 spülen.
- Homogenisierung von 950 g Hirn in 650 ml vorgekühltem (0 °C) PuC pH 6,8. (Diese Arbeiten wurden im Kühlraum durchgeführt.)
- Zentrifugation in der Kühlzentrifuge mit dem GSA-Rotor (Sorvall) über 25 min bei 13000 rpm (*rotation per minute*) und einer Temperatur von 2 °C.
- 450 ml des Überstandes durch Mull filtrieren und ultrazentrifugieren mit TI45-Rotor (Beckman, 6 x 85 ml, 45 min, 20000 rpm und einer Temperatur von 2 °C).
- Den durch den Mull gefilterten Überstand (320 ml) mit 0,5 mM GTP und 2 M Glycerin in PuC versetzen und im Wasserbad bei 37 °C für 45 min inkubieren (erste Tubulin-Assemblierung).
- Ultrazentrifugation im TI45-Rotor (Beckman, 30 min, 42000 rpm, 30 °C) und Resuspension des Sediments in 40 ml 0 °C kaltem PuC eines Glashomogenisators mit Teflonstempel (Potter).
- Desassemblierung der MTs über 25 min im Eiswasser.
- Zentrifugation im TFT55.38-Rotor (Kontron, 45 min, 50000 rpm, 5 °C).
- Dem gewonnenen Überstand 1 mM GTP und 2 M Glycerin in PuC zugeben und Durchführung der 2. Assemblierung im 37 °C warmen Wasserbad.
- In Analogie zum ersten Zyklus Sedimente mit 10 ml kaltem PuC im Potter-Homogenisator resuspendieren und für 20 min im Eiswasser desassemblieren.
- Zentrifugation mit dem TFT70.13-Rotor (Kontron, 45 min, 55000 rpm, 5 °C).
- Überstand aliquotieren und für die Untersuchungen einsetzen oder mit Trockeneis einfrieren und bei - 80 °C in Stickstoff lagern.

Mit dieser Prozedur wird mikrotubuläres Protein gewonnen, das neben Tubulin (ca. 80 %) auch Mikrotubulus-assoziierte Proteine (MAP) enthält. Die Abtrennung der MAP vom Tubulin erfolgt mittels FPLC (fast performance liquid chromatography) mit Phosphocellulose (Whatman P11) als stationäre Phase (Weingarten *et al.*, 1973). Aufgrund seiner Struktur (viele saure Aminosäuren) wird das Tubulin von der Phosphocellulose nicht gebunden, wohingegen die MAP adsorbieren und erst mit 0,8 M NaCl zu eluieren sind.

- 40 g Phosphocellulose P11 (Fa. Whatman) aktivieren und in eine Glassäule XK 50 x 200 mm² füllen (Säule am Vortag packen und mit PuC pH 6,8 äquilibrieren).
- Überstand (aus Zentrifugation) über die Schlauchpumpe (Durchflußrate: 0,5 ml/min) aufgeben und eluieren.
Elutionsbedingungen: Eluent: PuC pH 6,8
 Durchflußrate: 3 ml/min
 Fraktionsmenge: 2 ml
- Fraktionen des Peakmaximums werden zusammengegeben.
- Zusetzen eines Stabilisators (5 M Glycerin; 2,5 mM GTP), damit Assemblierungspotenz des Tubulins nicht verloren geht.
- Nach dem Portionieren des Tubulins Einfrieren der Proben in Stickstoff.

Mikrotubuli für Kinesin-Aufreinigung

- Vorbehandlung des Hirns (s. vorn) und Spülen mit PuA pH 7,2
- Homogenisieren von 750 g Hirn mit 750 ml in 0 °C kaltem PuA pH 7,2 und 0,5 mM PMSF/DMSO. (Arbeiten im Kühlraum durchführen.)
- Zentrifugation in Kühlzentrifuge GSA-Rotor (Sorvall, 25 min, 13000 rpm, 2 °C)
- Überstand über Mull filtern und 0,5 mM PMSF/DMSO, 0,5 mM ATP und 0,5 mM GTP zusetzen.
- Ultrazentrifugation des Überstandes mit TI45-Rotor (Beckman, 45 min, 40000 rpm, 2 °C).
- Den durch Mull gefilterten Überstand (300 ml) mit 2 M Glycerin versetzen.
- Tubulinassemblierung in 37 °C Wasserbad für 45 min.
- Ultrazentrifugation im TI45-Rotor (Beckman, 75 min, 43000 rpm, 20 °C) und Resuspension des Sediments mittels Potter-Homogenisierer mit 4 M Glycerin in PuB.
- Zentrifugation in Kontron, TFT55.38-Rotor (4 x 30 ml, 60 min, 50000 rpm, 15 °C) und Resuspension des Sediments in kaltem PuB.
- Desassemblierung in Eiswasser für 60 min und anschließende Zentrifugation im TI50.2-Rotor (Beckman, 45 min, 45000 rpm, 2 °C).
- Auftrennung von MAP und Tubulin mittels FPLC:
- 20 g Phosphocellulose P11 (Fa. Whatman) aktivieren und in eine Glassäule XK 26 x 200 mm² füllen (Äquilibrierung einen Tag vorher mit PuB pH 6,8 [Leitfähigkeit von 1 mS/cm]).
- Probenaufgabe auf die Säule über eine Schlauchpumpe mit einem Durchflußrate von 0,5 ml/min.
Elutionsbedingungen: Eluent: PuB pH 6,8
Durchflußrate: 1 ml/min
Fraktionsmenge: 5 ml
- Fraktion nach dem Peakmaximum zusammengenommen und 20 µM Taxol zusetzen.
- Erforderliche Menge für die Affinitätschromatographie bei der Kinesin-Präparation im Wasserbad bei 37 °C für 35 min inkubieren.
- Rest portionieren und in flüssigem Stickstoff einfrieren.

(aus: Vektorielle Bewegung des Motorproteins Kinesin und richtungsorientierter Transport artifizieller Lasten, mit freundlicher Genehmigung von J. Beeg)

Präparation von Kinesin

Die Superfamilie der Kinesine besteht aus mehreren hundert verschiedenen Proteinen, die bestimmte Charakteristika teilen. Das wichtigste Mitglied ist das sogenannte "konventionelle" Kinesin. Es besteht aus zwei globulären Motordomänen, einem Zwischenstück und einer Bindungsdomäne, an die eine "Last" gekoppelt werden kann. In jeder Motordomäne findet sich sowohl eine Bindungsstelle für Mikrotubuli wie auch eine aktive Stelle, an der ATP gebunden und gespalten werden kann, also die "Energiezufuhr".

Nicht alle Kinesine wandern in derselben Richtung am Mikrotubulus entlang; die meisten können sich nur vom minus-Ende zum plus-Ende bewegen. Es gibt jedoch auch Kinesine, die die andere Richtung nehmen, und sogar Mutanten, die keine Richtungspräferenz haben (Badoual 2002). Das Steuerelement für die Richtung befindet sich nicht an der Motordomäne (Duke 2002).

Die Präparation des Kinesin erfolgt nach einem Protokoll von Kusnetzov und Gelfand (Kusnetzov 1986) und ist gekennzeichnet durch Ionenaustauschchromatographie, Mikrotubuli-Affinitätsbindung und Gelfiltration.

1. Tag

- Von Kleinhirn, Hirnhaut, überfetteten Gewebepartien und größeren Blutgefäßen befreites frisches Schweinehirn mit gekühltem PuA pH 7,2 waschen.
- Homogenisieren von 1,5 kg Hirn in 1,5 l PuA pH 7,2 und 0,5 mM PMSF/DMSO.
- Zentrifugation GS3-Rotor (Sorvall) für 40 min bei 11000 rpm und 2 °C.
- Gewonnenen Überstand mit 0,75 mM PMSF/DMSO versetzen und Zentrifugation in TFA20-Rotor (Kontron) für 45 min bei 19500 rpm und 2 °C
- Überstand mit Ionenaustauscher DEAE-Cellulose DE52 (Fa. Whatman) von ca. 780 ml (340 g) mischen.
- Äquilibrierung der Cellulose einen Tag vorher mit 50 mM Imidazol, pH Kontrolle: Anstieg von 2,5 auf pH 7).
- Vor Verwendung Cellulose mit G1-Fritte mit PuA pH 6,8 zweimal spülen.
- Ungebundene Bestandteile über eine G1-Fritte mit 2,5 l kaltem PuA pH 6,8 entfernen, wobei die Flüssigkeitssäule auf Fritte nicht abbrechen darf, um eine Austrocknung und damit verbundene Zerstörung des Kinesins zu vermeiden. Puffer über die Fritte gießen, ohne Trichterbildung und Aufwirbelungen im Gel zu erzeugen und entstehenden Schaum entfernen.
- Elution des Kinesins mit PuA pH 6,8, 150 mM KCl und 0,1 mM PMSF (Kationenaustauscher) und anschließend in 200 ml (40 g) Phosphocellulose P 11 (Fa. Whatman) für 45 min mittels langsamen Rührens aufnehmen.
- Cellulose ebenfalls mit 50 mM Imidazol pH 2,5 auf pH 7,2 voräquilibrieren und mit PuA auf pH 6,8 einstellen.
- Cellulose über eine G1-Fritte absaugen und mit 1 l PuA + 150 mM KCl pH 6,8 waschen.
- In einem weiteren Schritt Filterkuchen mit ca. 200 ml PuA + 150 mM KCl pH 6,8 aufrühren und in eine Pharmacia-Glassäule 200 x 50 mm² füllen. (Adapter aufsetzen und Puffer mit einer Durchflußrate von 4 ml/min für 10 min laufen lassen.)
- Kinesin-Elution mittels FPLC (Kühlraum).
Elutionsbedingungen: Pumpe A: Waschpuffer 1 l PuA + 150 mM KCl pH 6,8
 Pumpe B: Elutionspuffer 500 ml PuA + 700 mM KCl pH 6,8
 + 1 mM PEFABLOC
 Fraktionsmenge: 7 ml (3,5 min)
 Durchflußrate: 2 ml/min
- Kinesin eluiert nach ca. 60 min.
- Zur Weiterverarbeitung stehen nach dem Zusammengeben der relevanten Fraktionen (Peak) ca. 126 ml Kinesin zur Verfügung.

2.Tag

- Eluat in 2 Dialyseschläuche (Dialyseschlauch mit 16 mm Durchmesser, Fa. Serva) füllen und für ca. 40 min gegen PuA pH 6,8 + 0,1 mM PMSF dialysieren, damit Absenkung von 700 mM auf ca. 150 mM Kaliumchlorid erreicht.
- Das Verhältnis Eluat zu Dialysepuffer beträgt 1:10. Die Leitfähigkeit der Probe muß zwischen 240-260 $\mu\text{S}/\text{cm}$ liegen, dies entspricht der Leitfähigkeit von 150 mM KCl in PuA.
- Zentrifugation der Präzipitate im Rotor TFT50.2 (Beckman, 45 min, 45000 rpm, 2 °C), damit es zu keiner Verstopfung des Chromatographie-Systems kommt.
- Überstand an 30 ml (15 g) DEAE-Cellulose DE52 (Fa. Whatman), Säule Pharmacia 200 x 26 mm², binden, Säule mit 150 mM KCl in PuA pH 6,8 voräquilibrieren.
Elutionsbedingungen: Eluent: 150 mM KCl in PuA pH 6,8.
Durchflußrate: 1-1,5 ml/min
Fraktionsmenge: 7 ml

- Zweite Dialyse (Dialyseschlauch mit 16 mm Durchmesser, Fa. Serva) gegen PuB für 2 x 45 min.
- Probenlösung für 45 min mit 45000 rpm bei 2 °C im TI50.2 Rotor (Beckman) zentrifugieren, ca. 138 ml Überstand werden gewonnen, der in der MT-Affinitätsbindung¹ weiterbearbeitet wird.
- Stabilisierung des Überstandes (138 ml) mit 1,55 M Glycerin in PuB, bevor 65 ml MT-Suspension zugegeben werden, außerdem Zugabe von 5,42 μM Taxol sowie 2,5 mM TPP in PuB (Affinitätsmix).
- Gemisch (240 ml) für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubieren.
- Reinigung durch Co-Sedimentation von Kinesin und MTs im Schwerfeld. Dazu Schichtung der Substanzen im Zentrifugenröhrchen. Erste Schicht mit einem Volumen von 20 ml bestehend aus 4 M Glycerin, 1,2 mM TPP und 5 μM Taxol in PuB 20 ml mit Proteinschaum bedecken und ca. 60 ml des Affinitätsmixes mit einer 5 ml Pipette aufgeben.
- Zentrifugation im TFT 45-Rotor (Kontron, 70 min, 43000 rpm, 20 °C), Überstand vorsichtig abgießen.
- Sedimente mit 5 mM Mg-ATP und 20 μl Taxol in PuA/250 mM KCl pH 6,8 aufnehmen und in einem Potter homogenisieren, so dass ein Endvolumen der Probe von maximal 8 ml erhalten wird.
- Inhalt bleibt für 10 min stehen, bevor eine weitere Zentrifugation (Rotor TFT 80.49, Kontron, 30 min, 52000 rpm, 20 °C) die Trennung des Kinesins (Überstand) von den MTs bewirkt.
- Letzter Aufreinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie.
- Sephacryl S-300 (Fa. Pharmacia) in eine 26 x 950 mm² Säule (Gelbett ca. 530 ml) geben und mit PuA pH 6,8 äquilibrieren. Die Durchflußrate sollte maximal 2 ml/min betragen.
- Überstand (ca. 5-5,3 ml) mittels Peristaltikpumpe auf das Gel auftragen.
- Die Elution (FPLC) erfolgt über Nacht.
Elutionsbedingungen: Eluent: PuA pH 6,8
Durchflußrate: 0,42 ml/min
Fraktionsmenge: 3 ml (7,1 min)

¹ Die Affinitätsmethodik nutzt die nach vorherrschender Meinung komplexbildende Wirkung von Tripolyphosphat (TPP) gegenüber Mg^{2+} -Ionen aus, die dem Kinesin als notwendige Kofaktoren zur ATP-Hydrolyse dann fehlen und das Kinesin somit an den MTs gebunden bleibt. Denkbar ist auch die Besetzung der ATP-Bindungsstelle im Kinesin durch das Triphosphat, womit die für die Kraftgeneration des Kinesins erforderliche ATP-Hydrolyse nicht mehr möglich wäre. Der gleiche Effekt wird durch Zugabe des nicht hydrolysierbaren ATP-Analogons AMPPNP erreicht, das in einer Reihe von Reinigungsprotokollen für Kinesin verwendet wird. (Vale *et al.*, 1985b).

3. Tag

- Messung der UV-Absorption der einzelnen Fraktionen bei 280 nm. Durch Schneiden in der aufsteigenden Flanke des Kinesin-Peaks Vermeidung von Verunreinigungen, welche die Beweglichkeit des Kinesins negativ beeinflussen
- Konzentrierung des Kinesins (ca. 10 μ l) mit DEAE-Cellulose DE 52 (1,5 g), Fa. Whatman, als stationäre Phase in einer Glassäule C10/10, Säule mit PuA pH 6,8 äquilibrieren.
Elutionsbedingungen: Eluent: PuA + 170 mM KCl pH 6,8.
Durchflußrate: 0,5 ml/min
- Anschließende Entsalzung mit Hi TrapTM-Desalinkartusche, Fa. Pharmacia (mit PuA pH 6,8 äquilibriert).
- Zugabe von 1 M Glycerin und Portionieren des Kinesins in 30 μ l Tubes (Gesamtvolumen ca. 2,1-2,7 ml).
- Lagerung in Stickstoff (-80 °C).

Für die Elektrophorese, die der Reinheitsbestimmung des Proteins dient, und für die Proteinkonzentrationsbestimmung nach Lowry werden jeweils 10 μ l bzw. 25 μ l der Probe entnommen und mit Hilfe des Gleit-Tests die Aktivität des Kinesin ermittelt.

*Reinheitsprüfung und Proteinkonzentrationsbestimmung***SDS-PAGE Gelelektrophorese Phast-SystemTM**

Die SDS-PAGE wurde mit dem Phast-SystemTM (Fa. Pharmacia) durchgeführt. Es wurden Fertiggele mit einer Acrylamidkonzentration von 7,5 % (PhastGel homogeneous media) verwendet.

Konzentrationsbestimmung des Kinesins

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wird die von Lowry *et al.* (1951) entwickelte Methode genutzt. Als Standard wird BSA verwendet.

Die Kinesin-Konzentrationen der aus den drei Isolationen gewonnen Stammlösungen betragen zwischen 0,5 und 1,08 mg/ml. In Abhängigkeit von der Versuchsanordnung und dem Versuchsziel wurden Verdünnungen vorgenommen. Es wurde mit Konzentration zwischen 0,0012 μ g/ μ l und 1,9 μ g/ μ l gearbeitet.

Funktionsprüfung mittels des Gleittests

Der Gleittest dient der Aktivitätsbestimmung des isolierten Kinesins. Kinesin wird an der Oberfläche eines Objektträgers gebunden. In Gegenwart der erforderlichen Kofaktoren und chemisch-physikalischen Zustandsgrößen werden MTs auf solchen Kinesin-bedeckten Flächen aktiv bewegt.

Vor Anbindung des Kinesins muß der Objektträger mit 5 mg/ml BSA/PuA abgesättigt werden. Dazu wird das auf einen Objektträger pipettierte BSA mit einem 24 x 24 mm² Deckglas für 5 min abgedeckt. Danach wird das Deckglas entfernt und der Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet. Kinesin (Stammlösungen verdünnt zu Konzentrationen zwischen 0,095 und 0,2 μ g/ μ l) wird in PuA mit 20 μ M Taxol/DMSO, 100 mM NaCl gemischt. Nach 5 min Inkubation des Motorproteins in einem Eppendorf-Tube werden 42 ng/ μ l Taxol-stabilisierte MTs und 0,5 mM Mg²⁺-ATP zugegeben, auf den präparierten Objektträger pipettiert und mit einem 18 x 18 mm² Deckglas abgedeckt. Die Bewegungsaktivität kann nun mikroskopisch bestimmt werden. Unter den gewählten Standardbedingungen sollte die Geschwindigkeit mindestens 800 nm/s betragen. Bei einer Kinesin-Konzentration von ca. 0,15 μ g/ μ l und einer Raumtemperatur zwischen 20° und 22 °C konnte diese Geschwindigkeit gemessen werden.

(aus: Vektorielle Bewegung des Motorproteins Kinesin und richtungsorientierter Transport artifiziieller Lasten, mit freundlicher Genehmigung von J. Beeg)

Beladung von Mikrokugeln mit Kinesin

Es ist möglich, Mikrotubuli auf Glas zu fixieren und Kinesinmoleküle darauf entlangwandern zu lassen. Das funktioniert auch, wenn die Kinesinmoleküle nicht frei vorliegen, sondern an eine „Last“, beispielsweise eine Mikrokugel, gebunden sind. Mit steigender Last sinkt die Durchschnittsgeschwindigkeit der Bewegung (Block 1990).

Versuche an kinesinbeladenen Mikrokugeln wurden bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen durchgeführt. Svoboda und Block (1994) haben gezeigt, daß es möglich ist, Mikrokugeln mit der optischen Pinzette auf Mikrotubuli zu setzen, um eine Bewegung in Gang zu bringen.

Das Kinesin/Bead-Gemisch wird folgendermaßen präpariert:

4 mg/ml BSA und Kinesin (Konzentration zwischen 0,0012 und 1,9 µg/µl in Abhängigkeit vom Untersuchungsziel) werden für 3 min in PuA inkubiert. Danach erfolgt die Zugabe einer definierten Bead-Konzentration. Die Bead-Stammlösung muss dafür gründlich gemischt werden (in Vortex-Homogenisator).

(aus: Vektorielle Bewegung des Motorproteins Kinesin und richtungsorientierter Transport artifizierlicher Lasten, mit freundlicher Genehmigung von J. Beeg)

Allerdings bindet gerade bei hohen Kinesinkonzentrationen nicht das gesamte eingesetzte Kinesin an die Mikrokugeln.

Rekonstitution von parallel ausgerichteten Mikrotubuli

Mit Kinesin beladene Mikrokugeln können von einem Mikrotubulus auf einen anderen überwechseln, wenn die Mikrotubuli ausreichend dicht liegen. Wenn man sie darüber hinaus isopolar und parallel ausrichtet, ist es möglich, daß Mikrokugeln über eine große Distanz wandern. Ihre Gesamtgeschwindigkeit liegt dabei unter der auf kurzen Strecken ermittelten Durchschnittsgeschwindigkeit, was durch Zeitverluste beim Überwechseln von einem Mikrotubulus auf den anderen sowie auf Verzögerungen an Verunreinigungen im Kanal liegen kann.

Die Glasoberfläche wird mit 5 mg/ml BSA/PuA für 3 min vorbehandelt, um unspezifische Bindungen des Kinesins zu vermindern (Absättigung der Proteinbindungsstellen an Glasflächen im Untersuchungskanal). Danach wird der Kanal mit dem Arbeitspuffer PuA pH 6,8 gespült. Nach der Trocknung (Trockenluft) wird Kinesin mit 100 mM NaCl in PuA 5 min bei Raumtemperatur vorinkubiert, danach in den Kanal eingeführt und weitere 5 min im Kanal inkubiert. In dieser Zeit erfolgt zugleich die Bindung an die BSA-Glasoberfläche. Die hohen Salzkonzentrationen (aus Vorversuchen als optimal gefunden: 100 mM) sind notwendig, um die volle Funktionsfähigkeit des Kinesins zu erhalten.

Die Stammlösungen des Kinesins werden verdünnt in PuA und eine Konzentration von 0,25 µg/µl eingesetzt, um eine stabile Bindung der MTs an diesen am Glassupport gebundenen Kinesin-Molekülen zu erreichen.

Um einerseits ungebundene Kinesin-Moleküle auszuspülen und andererseits ein geeignetes Milieu für die MT-Stabilität zu schaffen, wird der Kanal anschließend mit 10 µM Taxol/DMSO in PuA gespült. 0,63 mg/ml Taxol-stabilisierte MTs werden mit 20 µM Taxol, gelöst in DMSO, in PuA suspendiert und an Kinesin gebunden. Danach wird die Motor-betriebene Spritze mit Zugrichtung über ein Schlauchsystem an den Pufferbehälter angeschlossen (Verschlusskappe des Reaktionsbehälters mit eingeführtem Schlauch), eine Begrenzung mittels Fettstift an der entgegengesetzten Seite des Kanals verhindert das Wegfließen der Flüssigkeiten.

Die isopolare Ausrichtung der MTs erfolgt mit Zugabe von 10 mM GTP, 100 mM NaCl, 0,5 mM Mg-ATP in PuA. Anschließend werden die MTs 15 min mit 0,1 %iger Glutaraldehydlösung in PBS immobilisiert. Ungebundenes Glutaraldehyd wird mit PBS ausgespült und freie Aldehyd-Gruppen mit 0,1 M Glycin in PBS für ca. 15 min abgesättigt. Danach erfolgt ein Ausspülen der ungebundenen Glycin-Moleküle mit dem Arbeitspuffer PuA, bevor die Spritze und der Pufferbehälter entfernt werden. Sind im Mikroskop-Bild Kanalflächen ohne gebundene MTs zu sehen, wird der Versuchskanal nochmals mit 10 mg/ml BSA/PuA abgesättigt.

Die Kanäle werden mit definierten Konzentrationen Kinesin und LB bzw. MB beladen und die Bewegung der Kinesin-beschichteten Beads beobachtet.

Nach erneuten 3 min wird 5 mM Mg²⁺-ATP zugegeben und das Gemisch mit Hilfe des Filterpapiers durch den Kanal gezogen. Beide Seiten des Kanals werden mit Gummi-Klebstoff (Fa. Marabu) verschlossen, um bei den Untersuchungen Kapillarströme zu vermeiden.

(aus: Vektorielle Bewegung des Motorproteins Kinesin und richtungsorientierter Transport artifizierter Lasten, mit freundlicher Genehmigung von J. Beeg)

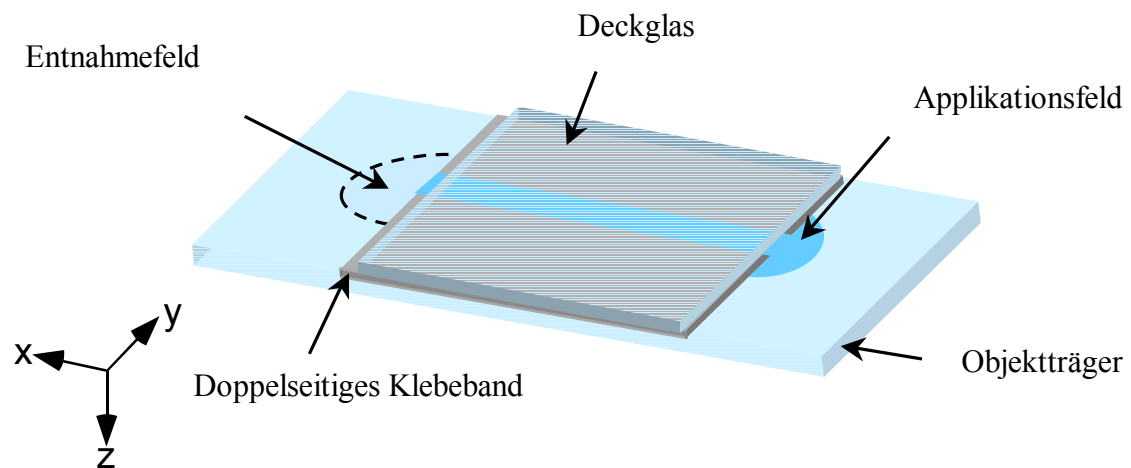


Abb. 8: Kammer zur parallelen Ausrichtung von Mikrotubuli

Der Kanal ist im Querschnitt rechteckig mit einer Breite von 2,2 mm und einer Höhe von 0,05 mm. Die Länge kann 30 bis 50 mm betragen. Mit freundlicher Genehmigung von J.Beeg, aus: Vektorielle Bewegung des Motorproteins Kinesin und richtungsorientierter Transport artifiziieller Lasten

Die auf diese Weise im Kanal fixierten Mikrotubuli haben eine durchschnittliche Länge von einigen μm .

2. 4. Präparation lebender Zellen

Egeria densa

Die Blätter der Wasserpflanze *Egeria densa* (Wasserpest) bestehen aus nur zwei Zellschichten. Bei starker Belichtung kann in den Zellen eine rasche Zytoplasmaströmung beobachtet werden, die die Chloroplasten entlang der Zellwand rund um die Vakuole bewegt.

Egeria densa wurde aus dem Aquaristik-Handel bezogen (Zoo Schwatzkopff, Jena) und in Leitungswasser kultiviert. Einzelne Blätter wurden mit der Pinzette abgezupft und in einen Tropfen Leitungswasser auf einem Objektträger gelegt und mit Deckglas abgedeckt. Zur Beschleunigung der Zytoplasmaströmung wurde die Durchlichtlampe des LSM 510 auf maximale Helligkeit justiert und das Blatt 2 bis 5 min beleuchtet.

Ein Anfärbung wurde nicht vorgenommen, da Chlorophyll bei Anregung mit 488 nm eine ausreichend starke Autofluoreszenz für Fluoreszenzaufnahmen zeigt.

Präparation von Einzelzellen aus Schweinepankreas

Das Pankreas ist eine seröse, zusammengesetzte Drüse (Lippert 1996) mit mehreren, sehr verschiedenen Funktionen im Verdauungssystem der Säugetiere. Hier finden sich zentrale Teile der Regulation des Blutzuckerspiegels sowie die Bildungsstätte der Verdauungsenzyme. Entsprechend besteht es aus endokrinen und exokrinen Zellen (Czihak et al. 1992). Das menschliche Pankreas ist eine große Drüse, insgesamt etwa 15 cm lang, 3 bis 4 cm breit und 1 bis 2 cm dick und wiegt 70 bis 100 g; ihre Produktion kann 2 l Bauchspeichel je Tag betragen (Lippert 1996). Man unterteilt das Pankreas weiter in drei Bereiche, die als Kopf, Körper und Schwanz (lat. *caput, corpus, cauda*) bezeichnet werden. Alle drei Teile werden von dem *Ductus pancreaticus* (auch Wirsung-Gang, nach dem Entdecker Georg Wirsung) durchzogen, der sich gewöhnlich mit dem *Ductus choledochus* (Gallengang) vereinigt und in den *Duodenum* (Zwölffingerdarm) mündet. Ein zweiter Gang, der *Ductus pancreaticus assessorius*, durchzieht ebenfalls Teile des Pankreas und mündet in unmittelbarer Nachbarschaft des *Ductus pancreaticus*.

Die endokrinen Zellen (in ihrer Gesamtzahl etwa 0,5 bis 2 Millionen, das ist etwa 2 - 3 % des Pankreas) liegen einzeln im Pankreasgewebe oder bilden Langerhans-Inseln, die sich vor allem im kaudalen Teil des Pankreas finden (Lippert 1996). Das Pankreas wird besonders im Bereich der Langerhans-Inseln mit Blut versorgt. Zusammen mit den Arteriolen laufen Nerven des autonomen Nervensystems in den Pankreas, die an verschiedenen Stellen dünne, fein verästelte Netzwerke bilden: um die Arteriolen, im Bereich der Langerhans-Inseln, um die weitlumigen Duktuli und zwischen den Azini (Ushiki und Watanabe 1997).

Das Pankreas verfügt zumindest teilweise über regenerative Fähigkeiten, d. h. abgestorbene oder entfernte Bereiche werden partiell ersetzt; eine Stammzellpopulation sitzt in den Dukt-Bereichen (Suzuki et al. 2000).

Der exokrine Teil des Pankreas besteht zum größten Teil aus Azinuszellen. (Die Azini haben ihren Namen von ihrem mikroskopischen Aussehen her erhalten: *acinus* ist der lateinische Begriff für Beere und wird in der Zoologie vor allem für beerenförmige Endstücke seröser Drüsen verwendet (Hentschel und Wagner 1986).) Daneben zählen zum exokrinen Teil auch die zentroazinaren Zellen sowie die Dukt-Zellen, also jene Zellen, welche die Wände des Pankreasgangs auskleiden. Die zentroazinaren Zellen (Lippert, 1996) stellen den Anfang des Duktsystems im Azinus dar (Egerbacher und Böck 1997). Die Duktzellen haben die Funktion, das Ambiente des *Ductus pancreaticus* und die Zusammensetzung des Pankreassaftes zu regulieren. Sie sind kleiner als die Azinuszellen

und sind in ihrem Zytoplasma organell-arm. Sie weisen Kinozilien auf, die vermutlich dazu helfen, das Sekret in Richtung Dukt bzw. Darm zu bewegen. Das Pankreassekret ist alkalisch (Czihak et al. 1992) und dient u.a. dazu, den pH-Wert der Nahrung (die im Magen auf pH 3 gebracht wurde) wieder in den neutralen bis leicht alkalischen Bereich (ca. pH 8) zu heben (Egerbacher 1997).

Die Polarität der einzelnen Azinuszelle, deren Zellkern leicht zum basalen Zellpol hin verschoben ist und die im basalen Teil mit rauhen endoplasmatischen Retikulum, im apikalen Teil mit zymogenen Granula gefüllt ist, wird durch das Zytoskelett vorgegeben. Die Azinuszellen bilden die Vorstufen von Verdauungsenzyme, vor allem Trypsinogen, Chymotrypsinogen, Procarboxypeptidasen A und B und Proelastase, aber auch Amylase, Cholesterinesterase, Desoxyribonuklease und Ribonuklease. Diese Enzymvorstufen werden im rauhen endoplasmatischen Retikulum gebildet, an den Golgi-Apparat weitergeleitet und dort als zymogene Granula (ZG) abgeschnürt. Der pH-Wert dieser Granula sinkt während eines Reifungsprozesses vom neutralen in den sauren Bereich. Mit dem Reifungsprozeß ist eine gerichtete Bewegung von der Zellmitte zum Zellrand hin verbunden. Die zymogenen Granula wandern dabei am Zytoskelett entlang. Auf hormonelle und nervöse Reize hin werden die Vorstufen der Verdauungsenzyme aus den Zellen freigesetzt und durch die Pankreasgänge in den Darm geleitet. Die hormonellen Signale sind vor allem Sekretin und Cholecystokinin.

Der pH-Wert der entstehenden zymogenen Granula ist niedriger als jener der "reifen" zymogenen Granula (Orci et al. 1987). Eine Exozytose ist auch möglich, wenn der pH-Wert der zymogenen Granula durch Chemikalien in den neutralen Bereich gehoben wird (De Lisle und Williams 1987).

Die Exozytose ist unter anderem durch SNARE-Proteine vermittelt. Nemoto et al. haben Hinweise dafür gefunden, daß die Exozytose sequentiell erfolgt: Zunächst verschmelzen zellmembrannahe Vesikel mit der Zellmembran; 13 Sekunden später verschmelzen Vesikel, die in der Nähe der mit der Zellmembran verschmolzenen Vesikel liegen, mit diesen, wiederum 13 Sekunden später folgt eine Verschmelzung mit noch weiter innen liegenden Vesikeln, und eventuell kann nach nochmals 13 Sekunden ein viertes Fusionsereignis stattfinden. Auf diese Weise müssen die Vesikel nicht einzeln zur Zellmembran transportiert werden (Nemoto et al. 2001).

Meistens werden die zymogenen Granula als einheitliche Population betrachtet, es gibt aber mehrere Publikationen, die über Unterschiede zwischen Subpopulationen berichten. So enthalten möglicherweise zymogenen Granula in Zellen, die den Langerhans-Inseln

benachbart sind, mehr Chymotrypsinogen und weniger Amylase als solche, die sich in größerer Entfernung von Langerhans-Inseln befinden (Bendayan 1985, Badoual et al. 2002).

Die Bauchspeicheldrüsen von frisch geschlachteten Schweinen wurden vom Schlachthof Jena bezogen. Der Transport erfolgte auf Eis.

Die Bauchspeicheldrüse wurde bei 4 °C unter Puffer (RPMI 1640, 50 mM HEPES, 10 mM Aprotinin) mit einer Rasierklinge in möglichst kleine Stücke zerlegt und durch ein Sieb (100 µm * 100 µm) gefiltert, um einzelne Zellen und kleine Zellgruppen zu erhalten.

Das Filtrat wurde bei Raumtemperatur unter dem Mikroskop angesehen.

Kultivierung von AR42J-Zellen

Vom Rattenpankreas gibt es verschiedene Tumor-Zelllinien; die am meisten genutzte ist AR42J. Diese Zelllinie wurde 1979 isoliert (Longnecker et al. 1979) und stellt eine Linie mit amphikrinen Eigenschaften dar (Rosecwitz et al. 1992). Zur Induktion der AR42J-Zellen, wenn es um sekretorisches Verhalten vergleichbar mit Azinuszellen geht, wird Dexamethason (DMS) verwendet (Logsdon et al. 1985; Guthrie et al. 1991). Dexamethason (und in geringerem Maße Corticosteron und Aldosteron) inhibiert die Zellteilung in AR42J-Kulturen und fördert die Differenzierung der Zellen, üblicherweise durch einen c(Amylase)-Test nachgewiesen, da mit der Differenzierung die Enzymsekretion steigt (Guthrie et al. 1991). Diese beiden Effekte sind voneinander unabhängig. Eine Inhibition des Wachstums ohne Sekretionssteigerung kann durch eine verringerte Serumkonzentration erreicht werden. Bei gleichzeitiger Gabe von DMS und epithelialer Wachstumsfaktor (EGF) oder Insulin wird die Sekretion angeregt, ohne daß die Zellteilung eingestellt wird (Guthrie et al. 1991). Tumorzellen zeigen gegenüber normalen Zellen eine abweichende Zusammensetzung der sekretierten Enzyme (Iwanji und Jamieson 1982).

In der Zellbeschreibung der *European Collection of Cell Cultures* (ECACC) wird in der Beschreibung der Kultivierung erwähnt, daß die Zellen als Hohlkörper-Kolonien wüchsen (siehe Einleitung); das Datenblatt der *American Type Culture Collection* (ATCC) beschreibt die Wachstumsform als „clusters“. (ECACC: www.ecacc.org.uk; ATCC: www.atcc.org)

AR42J-Zellen wurden von ATCC, Manasses, VA 20108 USA, bezogen.

Kulturbedingungen für AR42J-Zellen:

RPMI 1640, 2 mM Glutamin, 3 mM NaHCO₃ (Fa. Sigma), 10 % FKS (Fa. Biochrom, Berlin); 0,1 mg/ml Streptomycin (Fa. Biochrom, Berlin), 100 IE/ml Penicillin (Fa. Biochrom, Berlin) bei 37 °C, 5 % CO₂.

Umsetzen einmal pro Woche: Ablösen der Zellen mit 2 ml 0,25 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ (Fa. Biochrom, Berlin); Inkubation 1 min bei Raumtemperatur und 5 bis 8 min bei 37 °C, 5 % CO₂. Aufnehmen von 0,25 ml Zellen in 5 ml frischem Medium.

3 bis 4 Tage nach dem Umsetzen wird das Medium durch frisches Medium ersetzt.

Für die Versuche wurden die Zellen auf Deckgläsern angezogen. Hierzu wurden die gereinigten Deckgläser in Petrischalen gelegt und mit 5 ml Zellsuspension bedeckt.

Kulturbedingungen für AR42J-Zellen auf Deckglas:

RPMI 1640, 25 mM HEPES, 2 mM Glutamin, 3 mM NaHCO₃ (Fa. Sigma), 10 % FKS (Fa. Biochrom, Berlin); 0,1 mg/ml Streptomycin (Fa. Biochrom, Berlin), 100 IE/ml Penicillin (Fa. Biochrom, Berlin).

Eingesetzt wurden 0,05 bis 0,25 ml Suspension abgelöster Zellen in 5 ml Medium.

Betrug die Wachstumszeit der Aggregate auf Deckgläsern mehr als 5 Tage, wurde das Medium nach 5 bis 7 Tagen gewechselt; ein weiterer Mediumwechsel erfolgte nach Notwendigkeit.

Ein Teil der Zellen setzte sich auf dem Glas ab und wuchs adhärent und ausgebreitet; es wurden jedoch auch mittlere und große Aggregate beobachtet, die vollständig abgerundet waren und nur aufgrund der Schwerkraft auf dem Glas auflagen.

Die Anfärbung erfolgte in RPMI 1640 mit 25 mM HEPES ohne Zusatz von fetalem Kälberserum, um die Spaltung des Farbstoffs im Medium zu verhindern.

Kultivierung von NK92-Zellen

NK92 ist eine Zelllinie humaner Killerzellen. NK92-Zellen wachsen in Suspension und bilden lockere Aggregate. NK92 wurde bezogen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig.

Kulturbedingungen für NK92-Zellen:

RPMI 1640, 2 mM Glutamin, 3 mM NaHCO₃ (Fa. Sigma), 12,5 % FKS (Fa. Biochrom, Berlin); 12,5 % Pferdeserum (Fa. Biochrom, Berlin); Interleukin 2 (Seromed) bei 37 °C, 5 % CO₂.

2. 5. Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Für die Anfärbung von Zellen wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.

Die Unterschiede betreffen sowohl die biochemischen wie die mikroskopischen Eigenschaften.

| Farbstoff, Kurzbezeichnung | Abgekürzt von | Fluoreszenz maximal | ratiometrisch auswertbar | λ_{ex} | λ_{em} |
|-------------------------------|---|------------------------|-----------------------------|-----------------------|-----------------------|
| FDA | Fluorescein-Diacetat | basisch | nein | 488 nm | 514 nm |
| BCECF | 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein | basisch | bedingt | 488 nm | 505 nm / 530 nm |
| cSNARF | 5'(and 6')-carboxy-SNARF | basisch | ja | 488 nm | 585 nm / 635 nm |
| LysoSensor Green | | sauer | nein | 442 nm | 505 nm |

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Farbstoffe (Fa. Molecular Probes).

λ_{ex} – Excitationswellenlänge; λ_{em} – Emissionswellenlänge der maximalem Emission

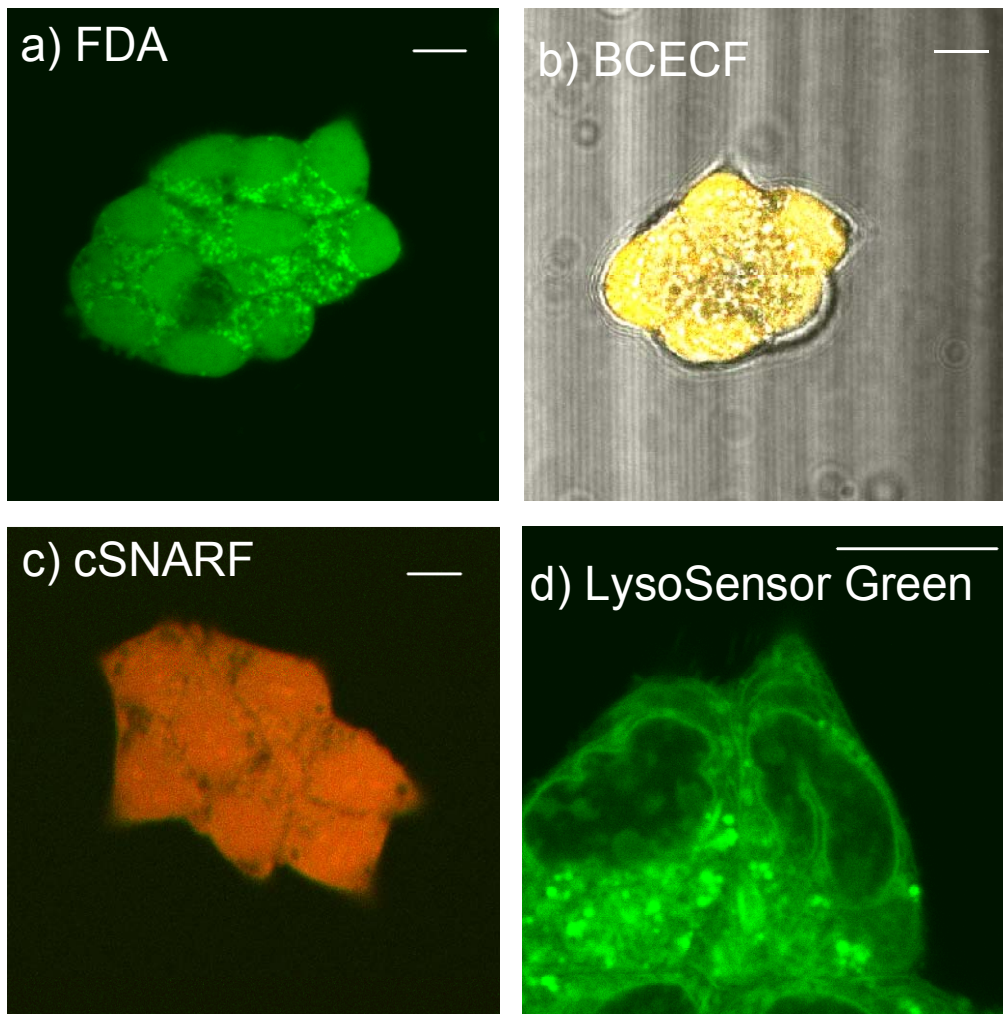


Abb. 9 : a) – d): Gruppen von AR42J-Zellen, gefärbt mit FDA, BCECF-AM, cSNARF-AM und LysoSensor Green.

AR42J-Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen und zum Versuch in eine Temperierkammer, die eine Temperatur von 37 °C aufrechterhielt, überführt. Die Anfärbung erfolgte in HEPES-gepuffertem RPMI1640 mit den angegebenen Farbstoffen. Balken: 10 µm

Eine genaue Beschreibung der Anfärbung erfolgt in Kapitel 3.

Fluorescein-Diacetat (FDA) ist eine nicht fluoreszierende, unpolare Verbindung, die durch Zellmembranen dringen kann. Im Inneren der Zelle wird die Verbindung durch im Zytoplasma befindliche unspezifische Esterasen gespalten. Dabei entsteht Fluorescein, welches bei Anregung mit 488 nm in basischer Umgebung fluoresziert, sowie zwei Moleküle Essigsäure (Abb. 10).

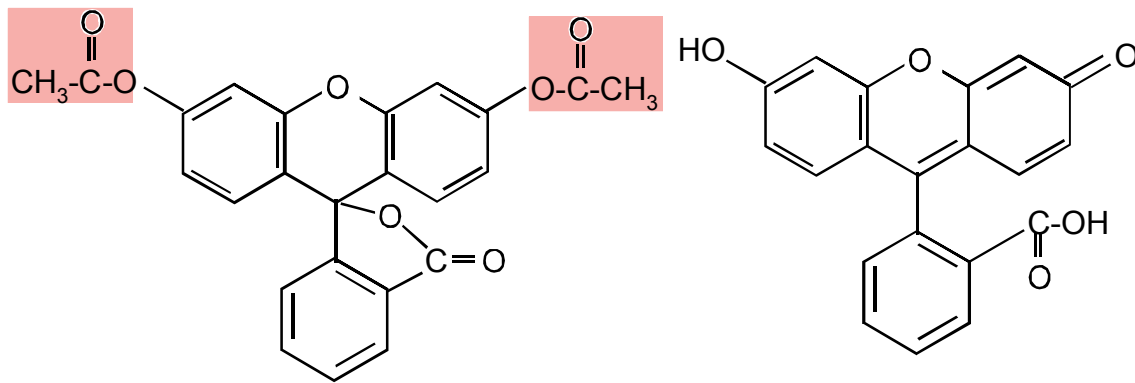


Abb. 10: Struktur von FDA und Fluorescein. Rot unterlegt sind die Seitengruppen, die durch zelleigene Esterasen abgespalten werden.

BCECF steht für 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxy-Fluorescein (Abb. 11).

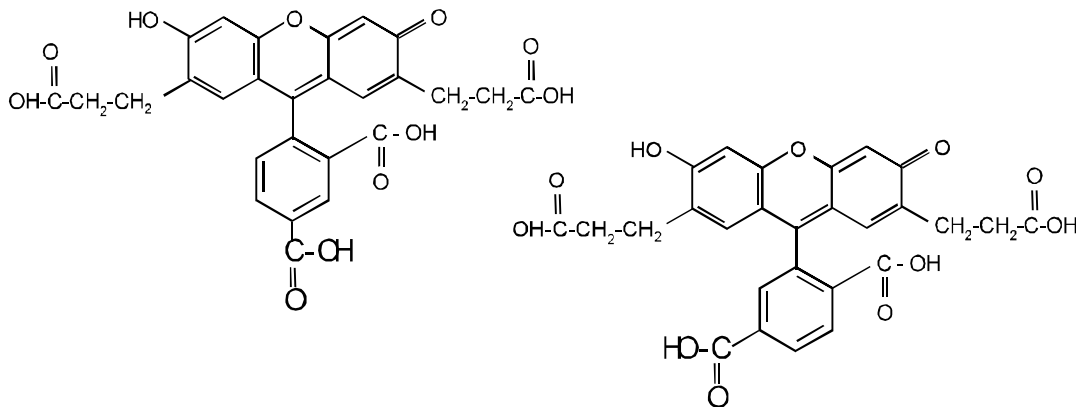


Abb. 11: Struktur von BCECF (freie Säure); links: 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-carboxyfluorescein; rechts: 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-6-carboxyfluorescein.

BCECF liegt je nach pH-Wert der Umgebung in einer von zwei möglichen Molekülformen vor: protoniert oder deprotoniert. Die protonierte Form (in saurer Umgebung) absorbiert bei 505 nm stärker als die deprotonierte. (Unter Verwendung unterschiedlicher Anregungswellenlängen, nämlich bei 490 nm und 440 nm oder 450 nm kann BCECF als ratiometrischer Farbstoff verwendet werden, allerdings hat das verwendete LSM 510 keine entsprechenden Laserlinien.) Der isosbestische Punkt liegt bei pH 7,0. Da BCECF annähernd zellmembran-impermeabel ist, wird es als Azetoxymethylester (BCECF-AM) in das Medium gegeben.

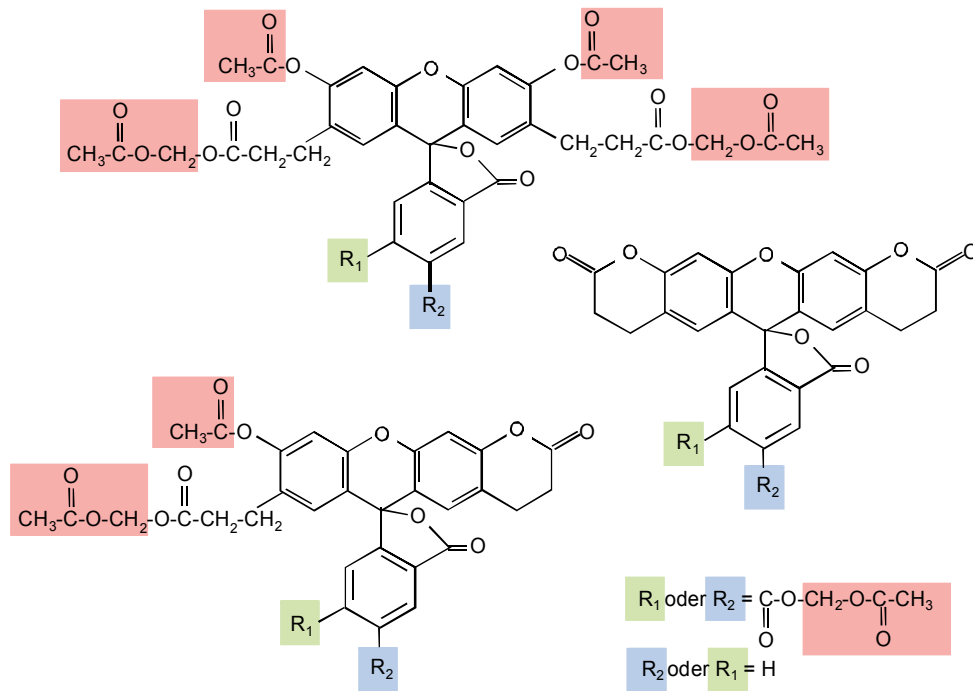


Abb. 12: Struktur der Azetoxymylester von BCECF; BCECF-AM ist eine Mischung der gezeigten Molekülspezies. Ebenso wie bei BCECF kann sich der Rest (R1 oder R2) an der 5'- oder der 6'-Position befinden. Rot unterlegt sind jene Gruppen, die bei der Umwandlung zu BCECF durch zelleigene Esterasen abgespalten werden.

BCECF-AM (Abb. 12) zeigt keine Fluoreszenz, durchdringt aber aufgrund der unpolaren Gruppen die Zellmembran und wird im Zytoplasma von zelleigenen Esterasen gespalten. Dabei entstehen das fluoreszierende BCECF (Abb. 11) und Abbauprodukte. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete BCECF-AM ist eine Mischung aus drei Molekülspezies, und die Abbauprodukte sind je nach Spezies unterschiedlich, maximal können neben einem Molekül BCECF 5 Moleküle Essigsäure und 3 Moleküle Formaldehyd entstehen. Das bedeutet auch, daß die intrazelluläre Konzentration der Abbauprodukte schneller ansteigt als die von BCECF!

5- (und 6-)carboxySNARF 1 wird in der vorliegenden Arbeit zu cSNARF verkürzt.

Der isosbestische Punkt liegt bei 7,5.

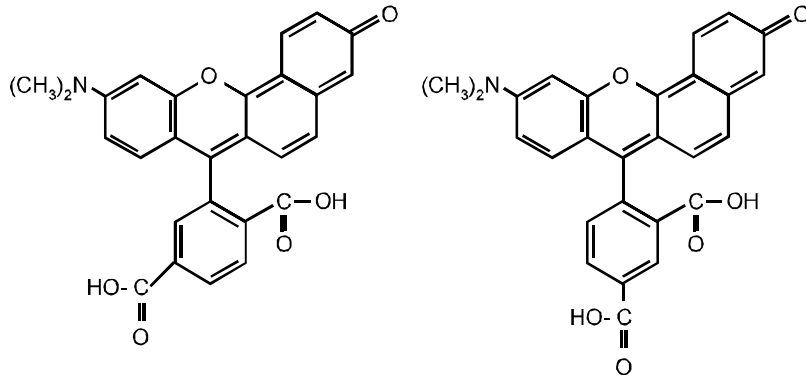


Abb. 13: Struktur von cSNARF; rechts: 5-carboxySNARF 1; links: 6-carboxySNARF 1.

Wie BCECF, wird auch cSNARF (Abb. 13) als Azetoxymethylester (Abb. 14) ins Kulturmedium gegeben. Die Spaltung des Azetoxymethylesters ergibt in diesem Fall cSNARF und je zwei Moleküle Essigsäure sowie ein Molekül Formaldehyd.

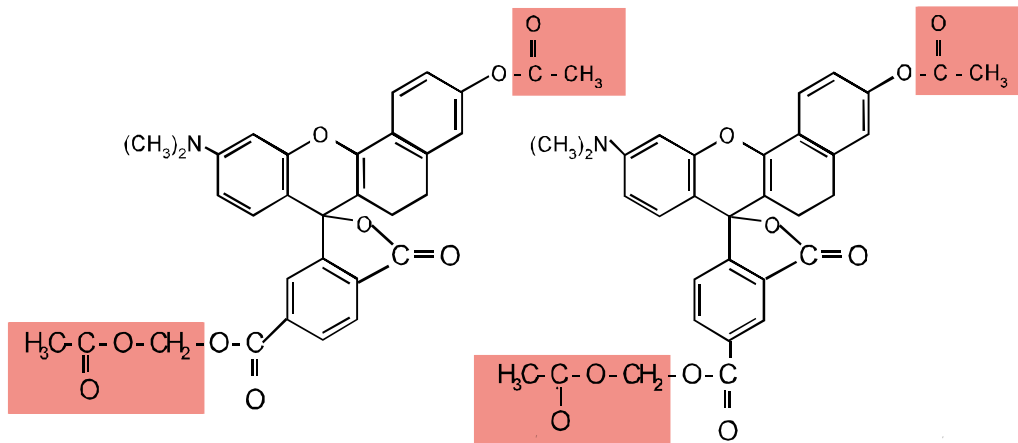


Abb. 14: Struktur der Azetoxymethylester von cSNARF; rechts: 5-carboxySNARF 1-AM; links: 6-carboxySNARF 1-AM. Rot unterlegt sind die Seitengruppen, die durch zelleigene Esterasen bei der Spaltung zu cSNARF abgespalten werden.

3. Ergebnisse

3. 1. Einkopplung einer optischen Pinzette in ein Laser-Raster-Mikroskop LSM 510

Die Einkopplung einer optischen Pinzette in ein Laser-Raster-Mikroskop LSM 510 (Fa. Zeiss, Jena) kann die Vorteile beider Techniken kombinieren: Die Verringerung des Streulichtanteils an der Bildentstehung durch Laser-Raster-Mikroskopie ist für die Betrachtung lokaler Effekte hilfreich. Darüber hinaus erlaubt konfokales Arbeiten eine dreidimensionale Rekonstruktion lebender Zellen und Zellaggregaten, indem die Probe Ebene für Ebene aufgenommen und die Bilder anschließend zu einer Darstellung zusammengefaßt werden.

Seit vor 138 Jahren W. Kühne mit einem Myosin-Aktin-Komplex die ersten Zytoskelettbestandteile isoliert und charakterisiert hat, stellte sich das intrazelluläre Transportwesen Schritt für Schritt als sehr komplexes und präzise steuerbares Gesamtsystem dar. Die Kenntnisse darüber sind inzwischen so umfassend, daß erste Ansätze zur Verwendung in der Nanotechnologie unternommen werden. Wie insbesondere am Kinesin gezeigt, kann es *in vitro* mit Lasten beladen und auf Mikrotubuli zum Laufen gebracht werden. Damit wird ein Materialtransport über die Distanz von Mikrometern durchführbar. Zur Steuerung *in vitro* kann man entweder Faktoren verwenden, die auch *in vivo* Einfluß auf das Bewegungssystem nehmen, oder durch externe Einflußnahme. So läßt sich die Geschwindigkeit des Transports mittels der Konzentration von ATP oder dem Verhältnis von ATP zu ADP steuern (Beeg 2002). Zum Stoppen einer einzelnen Last kann man in transparenten Objekten die optische Pinzette einsetzen, die als schonende Variante der Mikromanipulation in lebenden Zellen etabliert ist.

Die Mikrotubuli können durch VE-DIC-Mikroskopie visualisiert werden und der Transportvorgang beobachtet werden; jedoch fehlen dem LSM 510 die entsprechenden Prismen. Durch die Verwendung von auf Objektträger aufgebrachten parallel angeordneten und isopolar ausgerichteten Mikrotubuli konnte die aktive Bewegung von Mikrokugeln, deren Oberfläche mit Kinesinmolekülen besetzt worden war, von einer gleichmäßig erfolgenden, zufälligen Bewegung unterschieden werden.

Frei schwimmende Mikrokugeln kamen sehr leicht in den Pinzettenfokus; bei höherer Leistung der Pinzette war es teilweise nicht möglich, nur eine einzige Mikrokugel in den Fokus zu nehmen, da frei schwimmende Kugeln aus größerer Distanz ebenfalls zum Fokus gezogen wurden. Darüber hinaus gab es Mikrokugeln, die durch eine schwache

Adhäsionskraft mit einer anderen Mikrokugel verbunden waren, ohne selbst Kontakt mit der Unterlage zu haben. Auch diese Mikrokugeln konnten in den meisten Fällen mit der optischen Pinzette gegriffen werden und auf die Unterlage gebracht werden.

Die Geschwindigkeit von Mikrokugeln, die durch Kinesinmoleküle bewegt werden, betrug (im Rahmen dieser Versuche) $0,7 \mu\text{m/s}$ bis $0,9 \mu\text{m/s}$. Sich bereits entlang von Mikrotubuli bewegend Mikrokugeln konnten teilweise abgelöst und auf einen anderen Mikrotubulus versetzt werden. Nach dem Lösen der Pinzette wurde beobachtet, daß die Mikrokugel zunächst eine freie Bewegung im Puffer ausführte, die in den als erfolgreich gewerteten Fällen nach 1 bis 3 s in eine gleichmäßige, für mehrere Sekunden anhaltende Wanderungsbewegung überging (Abb. 16). Die verlegten Mikrokugeln bewegen sich nach dem Lösen der optischen Pinzette im Durchschnitt mit etwa der gleichen Bewegungsgeschwindigkeit weiter wie zuvor. Abb. 15 zeigt den Verlegungsvorgang schematisch.

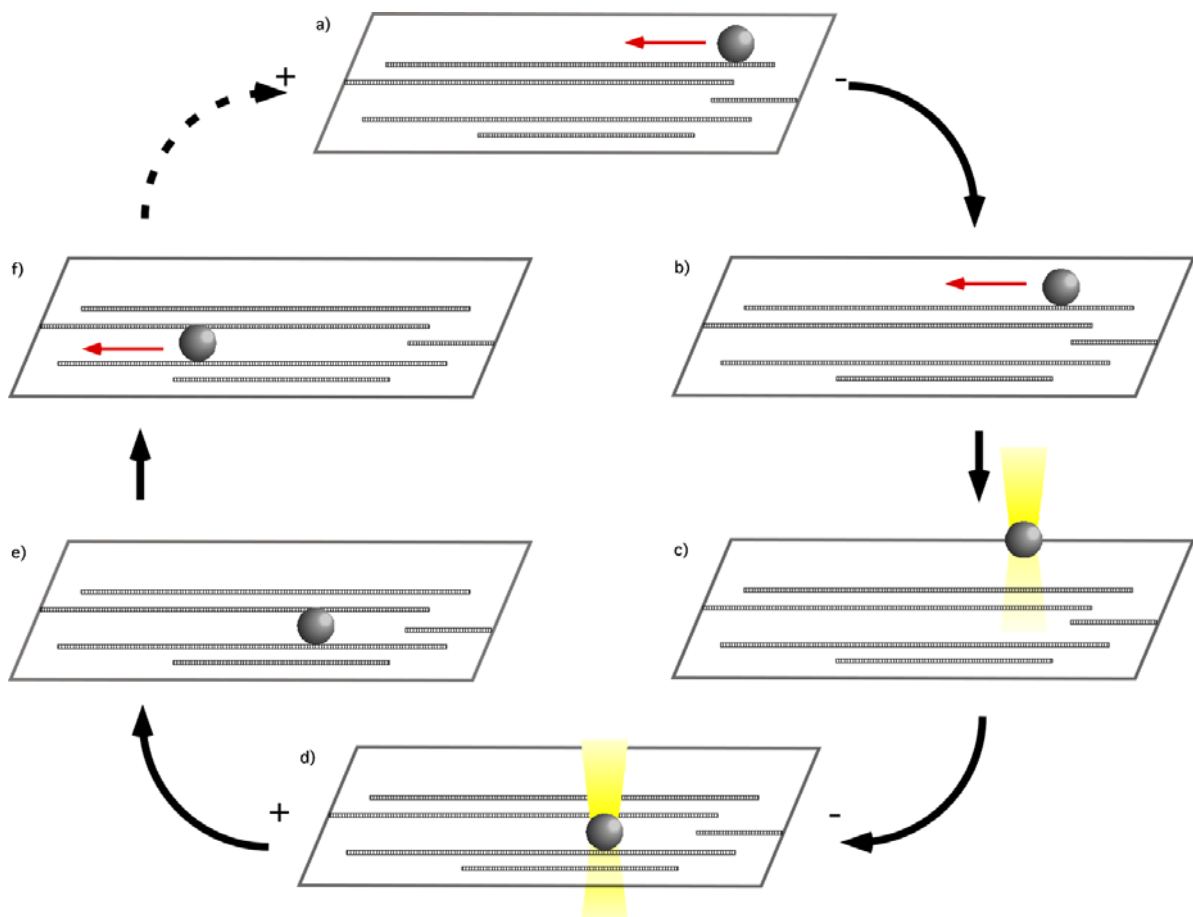


Abb. 15: Schematische Darstellung des Versetzens von Mikrokugeln mit der optischen Pinzette. Eine Mikrokugel wird von ihrer vorherigen Position (a) gegriffen (b) und auf eine Position versetzt, an der ein Mikrotubulus angeheftet ist (c). Nach dem Lösen der Pinzette (d) beginnt die Kugel, sich auf dem Mikrotubulus zu bewegen (e).

Die Mikrokugeln konnten mit einer Laserausgangsleistung von 0,1 W bis 0,15 W angehalten werden, während eine Leistung von weniger als 0,1 W nicht ausreichend war, um sie zu stoppen; das entspricht nach Messung mit einem Leistungsmeßgerät hinter dem Objektiv einer Pinzettenkraft von 26 pN bis 40 pN. Dieser Wert liegt deutlich über den für Kinesin angegebenen Werten, was darauf zurückzuführen sein kann, daß die Bestimmung der Pinzettenkraft durch ein Leistungsmeßgerät unzureichend ist. Eine Eichung der optischen Pinzette auf das verwendete System konnte im Rahmen der Arbeit aus Zeitgründen nicht durchgeführt werden.

Etwas geringere Laserleistungen führten nur zu einer Verringerung der Geschwindigkeit der Mikrokugel sowie, wenn es nicht geradewegs auf das Zentrum der optischen Falle zulief, zu einer leichten Seitwärtsbewegung. Es ist mit dem LSM 510 nicht möglich festzustellen, ob eine Mikrokugel in solchen Fällen auf einen anderen Mikrotubulus wechselt.

Die Verschiebung von Polystyrol-Mikrokugeln im rekonstituierten System ist ohne Auslösen der Bewegungsaktivität möglich. Bis zu drei Greif- und Lösebewegungen in Folge sind erfolgreich an einzelnen Mikrokugeln durchgeführt worden. Dabei war es auch mit der höchsten Pinzettenkraft nicht möglich, fest angeheftete Mikrokugeln von der Glasoberfläche zu lösen (wie es auch in der Literatur beschrieben ist (Block et al. 1990)).

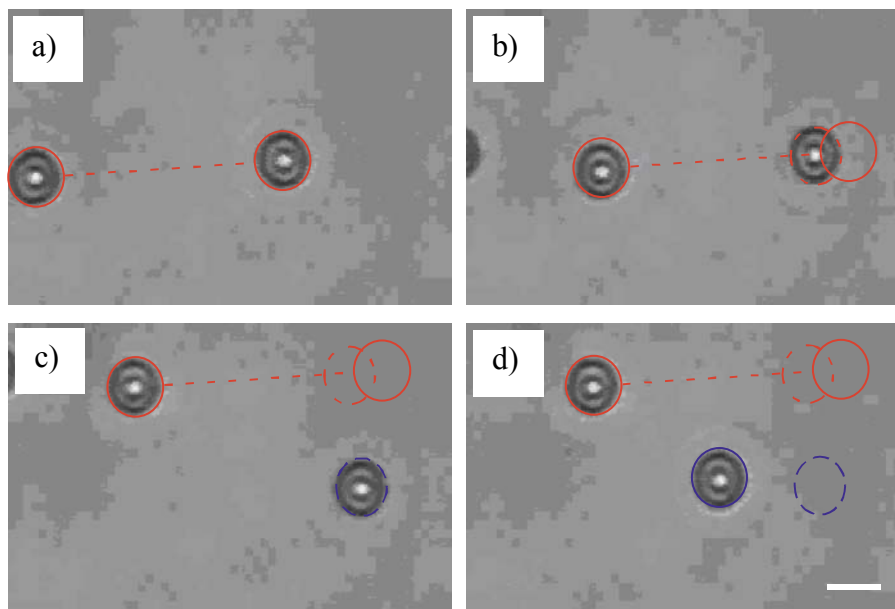


Abb. 16: Verschiebung von kinesinbeladenen Polystyrol-Mikrokugeln auf einem Objektträger mit immobilisierten Mikrotubuli. Die Kugel wandert zu Versuchsbeginn (a) entlang eines Mikrotubulus von ihrer mit einem roten, durchgezogenen Kreis markierten Position zu der mit einer rot gestrichelt bezeichneten Stelle (b). Dort wird sie gegriffen und zu der blau gestrichelt markierten Position verlegt (c), von der sie weiterläuft zu der Endposition, durch einen blau durchgezogenen Kreis gekennzeichnet (d). Balken = 2 μm .

Kinesinbeladene Polystyrol-Mikrokugeln, die aufgrund eines Eisenanteils magnetisch sind, konnten mit der optischen Pinzette nur über kurze Distanzen verlegt werden, jedoch war im Anschluß an die Verlegung keine gerichtete Bewegung mehr zu beobachten. Bei längerem Einsatz der optischen Pinzette wurde beobachtet, daß die Mikrokugeln regelrecht explodierten, woraus zu folgern ist, daß die Kugeln einen hohen Anteil der Energie der Pinzette absorbieren. Vermutlich führt die Pinzette aufgrund von Absorption bei 1064 nm bereits bei kurzem Einsatz zu einer so starken Erwärmung der Mikrokugel, daß das daran gebundene Kinesin denaturiert, weswegen schon nach kurzen Greifvorgängen keine Bewegung mehr erfolgen kann.

Die an Polystyrol-Kugeln gebundenen Proteine werden demzufolge beim Einsatz einer optischen Pinzette nicht denaturiert.

3. 1. 1. Kompensation der z-Bewegung

Die Einkopplung der optischen Pinzette durch das bildgebende Objektiv in ein Laser-Raster-Mikroskop ist ebenso möglich wie bei einem konventionellen Mikroskop; allerdings ist damit zunächst nur der Einsatz bei Aufnahmen einer Ebene sinnvoll, da das bildgebende Objektiv für dreidimensionale Aufnahmen bewegt wird und sich der Fokus der optischen Pinzette mitsamt dem festgehaltenen Objekt somit auch bewegt. Das Problem ist technisch lösbar, indem man in den Lichtweg der optischen Pinzette ein verstellbares Element einbaut, dessen Bewegung die Bewegung des Objektivs im Effekt ausgleicht. Dies kann, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, das Ende einer Glasfaser sein; bei einer Einkopplung ohne Glasfaser kann eine bewegliche Linse verwendet werden. Der Aufbau einer solchen Apparatur erlaubt eine präzise Manipulation von Zellen in drei Dimensionen: Durch das Verfahren des optischen Schneidens kann die Lage eines Zellorganells sowie die Fokusposition der optischen Pinzette auch in der z-Richtung exakt bestimmt werden.

Die technischen Arbeiten wurden in Kooperation mit Dipl.-Phys. Anja Hoffmann (jetzt Carl Zeiss, Jena) durchgeführt.

Die Eichung der Fokusposition erfolgt mit einem Spiegel

Für die Eichung der Fokusposition war es erforderlich, den Fokus der optischen Pinzette zu bestimmen, indem man das LSM 510 so konfiguriert, daß man von einem Spiegelpräparat reflektiertes Licht auf einen der Detektoren durchläßt. Entsprechen sich Fokusebene des Mikroskops und Fokusebene der optischen Pinzette, ist das empfangene Signal maximal (Abb. 17).

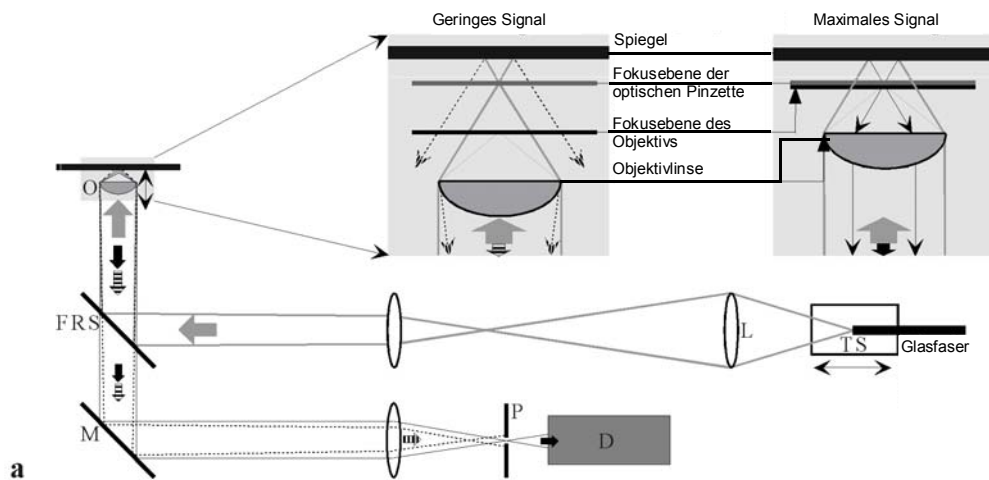


Abb. 17: Schematische Darstellung der Bestimmung des Pinzettenfokus im LSM 510.

TS = verstellbarer Tisch; L = Linse; D = Detektor; P = Lochblende; M = Spiegel; FRS = teildurchlässiger Spiegel; O = Objektiv.

Eine Glasfaser wird auf einem motorisierten Tisch angebracht, der in Abhängigkeit von der gemessenen Objektivbewegung gesteuert wird. Das Licht wird durch den Mikroskop-Strahlengang ins Objektiv geleitet. Als Präparat wird ein Spiegel verwendet, aufgenommen wird das reflektierte Licht. Vergrößertes Teilbild: Stimmen Spiegelebene und Fokusebene nicht überein, wird ein Teil des Lichtes nicht in die Öffnung des Objektivs gespiegelt, sondern geht verloren; daher empfängt der Detektor ein geringeres Signal. Das maximale Signal wird erreicht, wenn der Fokus der Pinzette genau auf der Spiegelebene liegt.

Für relative Objektivbewegungen wurde die jeweilige Fokuslage gemessen, um daraus zu berechnen, wie weit sich das Glasfaserende bewegen muß. Dazu mußte die zu kompensierende Objektivbewegung bestimmt werden (Abb. 18).

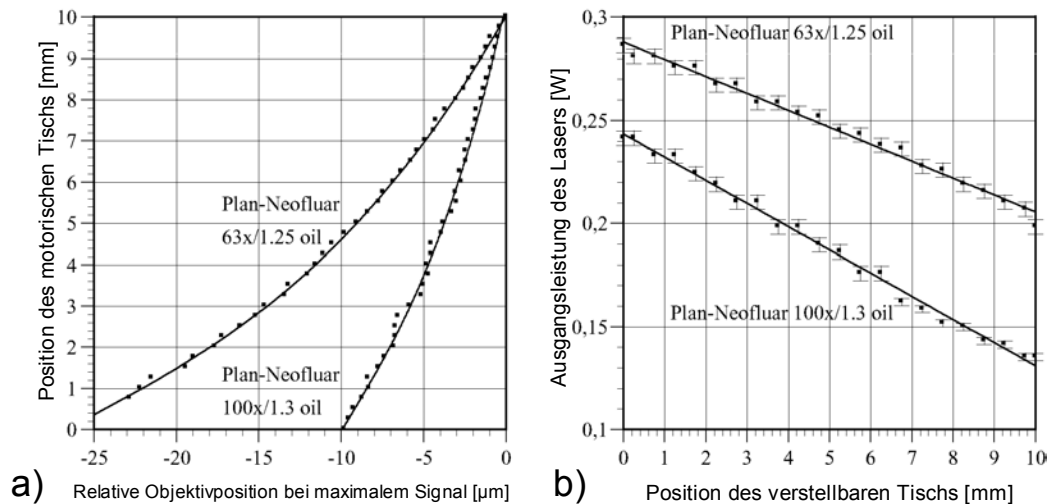


Abb. 18: a) Abhängigkeit der Position der beiden verstellbaren Elemente (motorischer Tisch mit Glasfaser, Objektiv) voneinander. Aufgrund der zwischenliegenden Optik ist die Beziehung nicht linear und von dem verwendeten Objektiv abhängig. b) Die Kraft der optischen Pinzette ändert sich mit der Position des motorischen Tisches, da bei einer höheren Distanz zwischen dem Ende der Glasfaser und der Sammellinse im Mikroskopstrahlengang mehr Photonen verlorengehen.

Die Objektivbewegung wird beim Axiovert 100 durch ein elektrisches Signal ausgelöst, das von einer entsprechenden Software abgegriffen und ausgewertet werden kann. Über eine empirische Bestimmung der notwendigen Konstanten konnte dann eine Umrechnung auf die notwendige Bewegung der Glasfaserfassung erfolgen.

Hierzu wurden jeweils Eichkurven erstellt, aus denen die Parameter abgelesen werden können (Abb. 19).

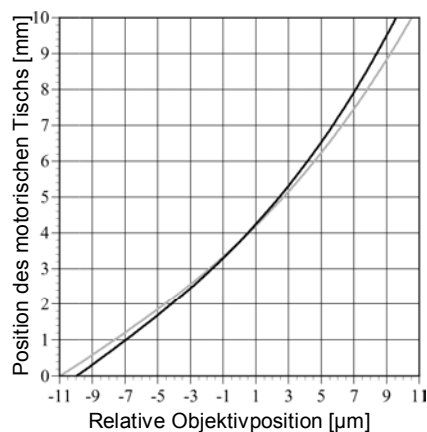


Abb. 19: Eichkurve zur Kompensation der relativen Objektivposition durch den motorischen Tisch mit dem Glasfaserende. Dünne graue Kurve: Objektiv 63fach; schwarze Kurve: Objektiv 100fach.

Die für das Steuern des beweglichen Elementes notwendigen Signale mußten der Steuerung des Mikroskops entnommen werden. Das Signal direkt aus der Software des LSM 510 in die Software zur Berechnung der notwendigen Bewegung zu übertragen, verringert Signalverlust und Meßfehler. Eine Möglichkeit, das Signal der von Zeiss gelieferten Software zu entnehmen, bestand im Rahmen dieser Arbeit nicht; für einen Routineeinsatz sollte sie aber angestrebt werden.

Der Qualitätsfaktor Q

Die Ausgangsleistung des Lasers kann durch die Änderung der Stromstärke an den Laserdioden geändert werden; normalerweise bewegte sich die Ausgangsleistung zwischen 0,1 W und 2,1 W (Parameter-Einstellungen 20 bis 30). Die Pinzettenleistung hinter dem Objektiv war jedoch geringer, weil optische Elemente, insbesondere Kette im Objektiv, das Laserlicht teilweise absorbierten und streuten, und weil der Laserstrahl vor dem Objektiv aufgeweitet werden mußte, um einen guten Pinzettenfokus zu ergeben. Dabei wurde nicht nur die Öffnung des Objektivs ausgeleuchtet, sondern auch sein Rand; die dorthin fallenden Photonen gingen verloren. Die Kraft hinter dem Objektiv war daher vom verwendeten Objektiv und der Distanz der Beobachtungsposition von der Pinzettenposition abhängig.

Der konventionelle Lichtdruck auf ein Objekt in Ausbreitungsrichtung des Lichtes kann nach der Formel

$$F = \frac{W}{c}$$

F = Kraft
W = Leistung
c = Lichtgeschwindigkeit

bestimmt werden.

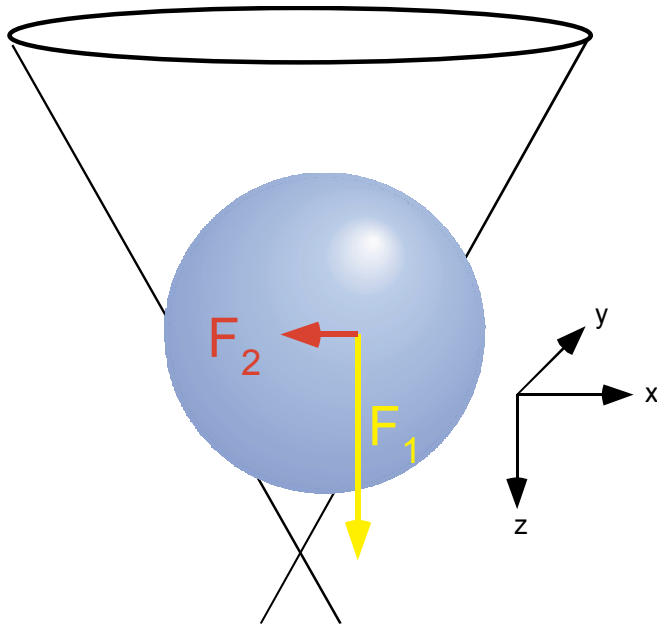


Abb. 20: Lichtdruckkraft und Gradientenkraft für ein rundes Objekt in einem fokussierten Laserstrahl. Der Lichtdruck auf ein transparentes Objekt in Lichtausbreitungsrichtung (F_1) beträgt $F=W/c$; die Gradientenkraft (F_2) beträgt $F=QW/c$ (weitere Erläuterung siehe Text).

Für Kräfte, die senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des Lichtes wirken, muß ein weiterer Faktor in die Berechnung der ausgeübten Kraft mit einbezogen werden:

$$F = \frac{Q \cdot W}{c}$$

F = Kraft
 Q = Q-Faktor
 W = Leistung
 c = Lichtgeschwindigkeit

Der Q-Faktor ist für reinen Lichtdruck in z -Richtung $Q = 1$. In der xy -Ebene ist er vom Material und der Form des Objektes abhängig und beträgt 0,05 bis 0,35 (Greulich 1999). Der genaue Wert kann im Einzelfall nur durch eine Eichung bestimmt werden.

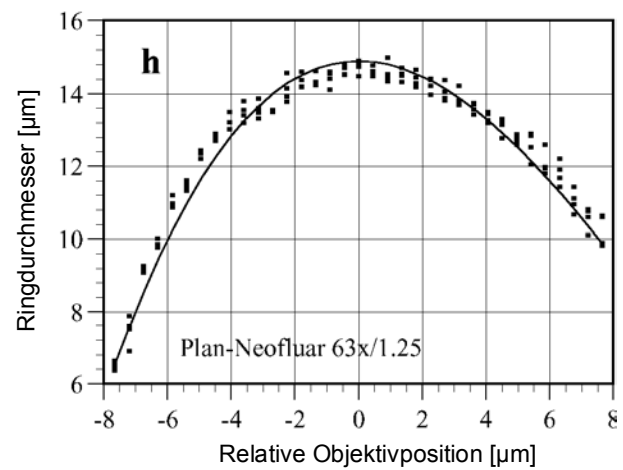
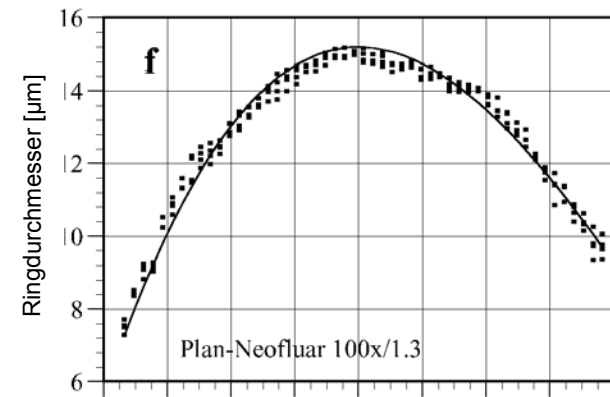
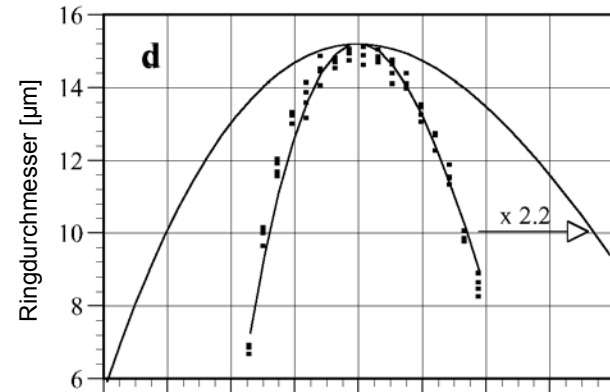
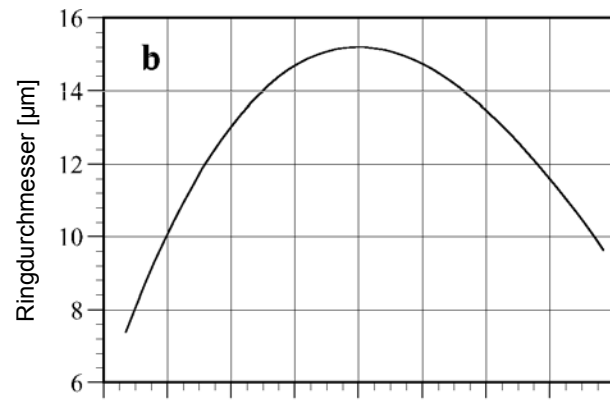
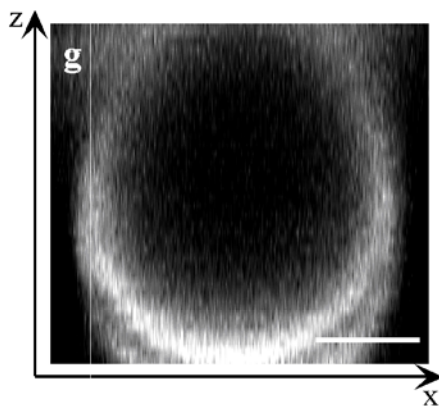
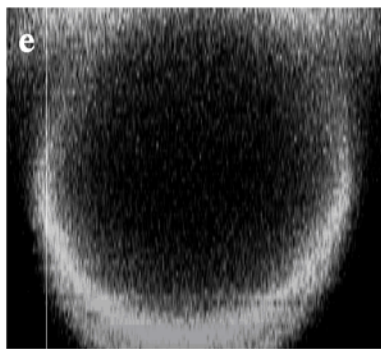
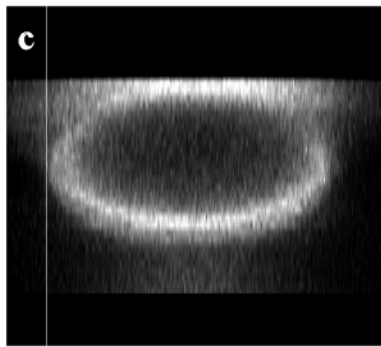
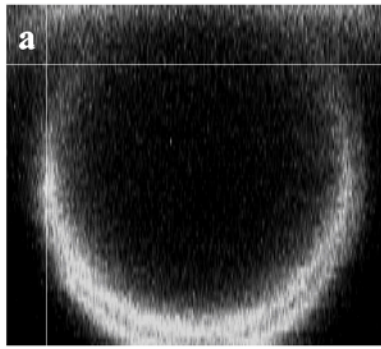
Die Eichung wird an Mikrokugeln überprüft

Die Kompensation der Bewegung der optischen Pinzette wurde kontrolliert, indem fluoreszierende Mikrokugeln (Fa. Molecular Probes) mit der Pinzette gegriffen und ebenenweise aufgenommen wurden. Dies wurde ebenfalls in Kooperation mit Frau A. Hoffmann durchgeführt.

Die fluoreszierenden Mikrokugeln sind an der Außenseite mit einem vom Hersteller nicht näher bezeichneten Farbstoff beschichtet, der bei 488 nm angeregt werden kann und dann grün (505 - 530 nm) fluoresziert. An Mikrokugeln, die sich am Boden abgesetzt haben, wurden Vergleichsaufnahmen gemacht, die zeigen, wie eine im Verhältnis zur Aufnahme stillstehende Mikrokugel aussieht. Entsprechend sollte eine Mikrokugel erscheinen, die während der Bildaufnahme durch die optische Pinzette festgehalten wird. Dies konnte auch erreicht werden (Abb. 21).

Abb. 21 (folgende Seite): Bestimmung der Konstanten zur Berechnung des Verschiebewegs des Faserendes. a) Ruhende Kugel als Vergleich; c), e), g) Schnitte durch in der optischen Pinzette gehaltene Mikrokugeln; b), d), f), h) Durchmesser der Mikrokugel in Abhängigkeit von der Objektivposition. Das Abbild der Mikrokugel in c) wirkt verzerrt, da der Korrekturfaktor nicht stimmt; für die Aufnahmen e) und g) wurden die korrekten Faktoren verwendet.

Material und Methoden: Fluoreszierende Polystyrol-Mikrokugeln (Molecular Probes) wurden in Wasser aufgenommen. Die Referenzaufnahme wurde an einer auf dem Glasträger ruhenden Kugel erstellt. Für die Diagramme wurde der Durchmesser der Kugel in vier verschiedenen Winkeln gemessen.



3. 1. 2. Einsatz der kompensierten optischen Pinzette in intakten Zellen

Die Kompensationsbewegung erfolgt leicht zeitversetzt gegenüber der Objektivbewegung, da die Kompensationsbewegung der optischen Pinzette erst ausgeführt werden kann, wenn das Signal, welches die Steuersoftware des LSM 510 an das Objektiv sendet, ausgewertet und in die erforderliche Tischbewegung umgerechnet worden ist. Um festzustellen, ob dies die Funktion der optischen Pinzette bei dreidimensionalen Aufnahmen beeinflusst, wurden Chloroplasten der Wasserpflanze *Egeria densa* mit der Pinzette gegriffen und aus der Zytoplasmaströmung in den Bereich der Vakuole gezogen (Abb. 22 a). Sie blieben jedoch durch einen schmalen Zytoplasmasaum und den Tonoplasten von der Vakuole getrennt. Beim Lösen der optischen Pinzette wurde der Chloroplast zurück in die Strömung gezogen.

Der Chloroplast konnte mithilfe der kompensierten optischen Pinzette Ebene für Ebene aufgenommen werden (Abb. 22 b). Es war keine Beeinflussung der Aufnahme durch die zusätzlich wirkende Kraft zu beobachten.

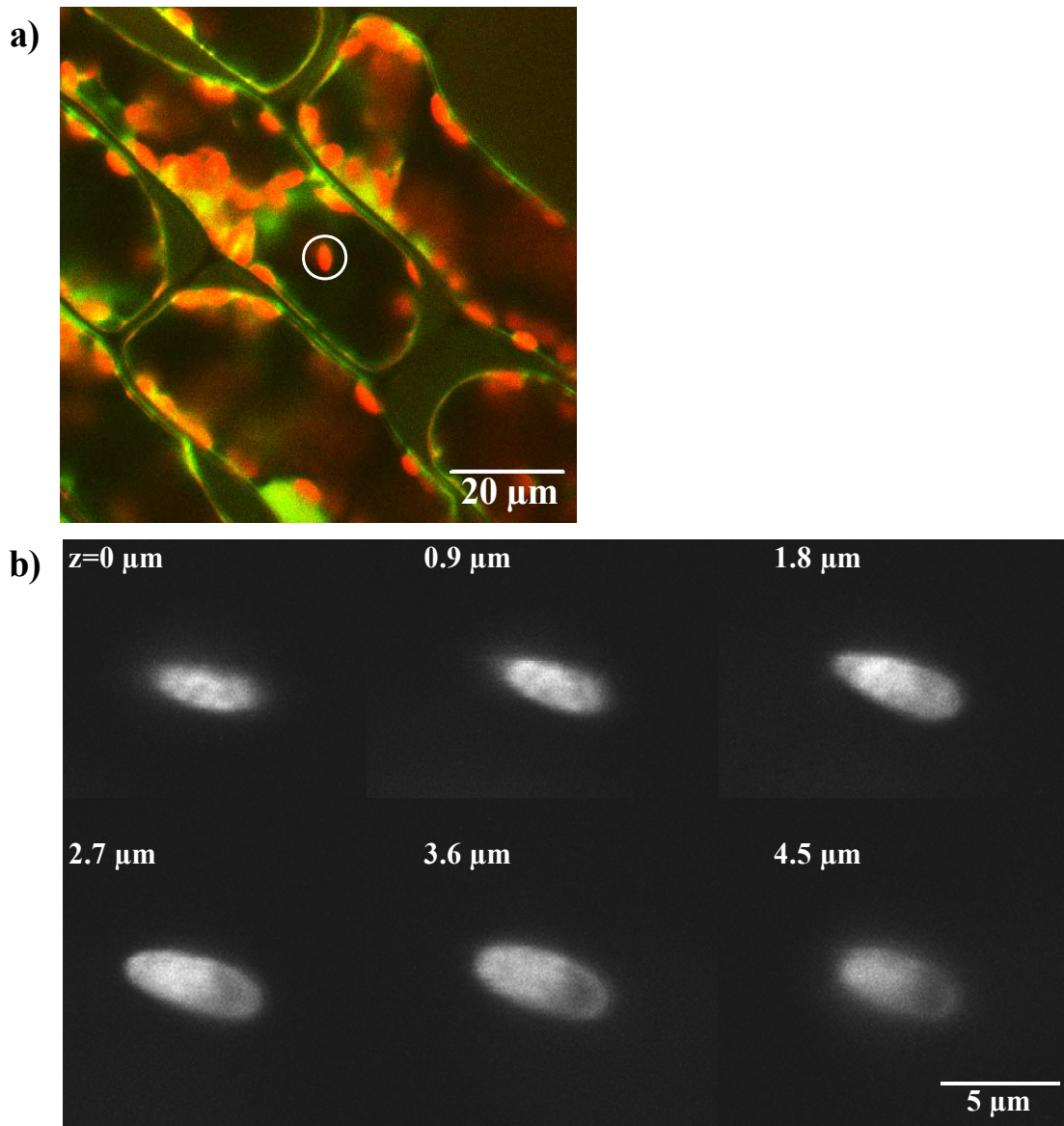


Abb. 22: a) Zellen von *Egeria densa*. Ein Chloroplast (weißer Kreis) wurde in die zentrale Vakuole der Zelle bewegt. Darstellung in der Fluoreszenz entsprechenden Falschfarben. b) Aufnahmen eines Chloroplasten, der mit der optischen Pinzette festgehalten wird.

Die Kompensation der optischen Pinzette erlaubt somit ein Arbeiten in geschlossenen Zellen auch im Rahmen von dreidimensionalen Aufnahmen. Im Folgenden wurde der Einfluß einer mit der optischen Pinzette hervorgerufenen Bewegung auf den pH-Wert in AR42J-Zellen untersucht. Dies erfordert eine Anfärbung mit pH-Wert-sensitiven Farbstoffen.

3. 2. Versuche an pankreatischen Zellen

Eine mechanische Zerlegung von Pankreasgewebe erbrachte Einzelzellen sowie kleine Zellgruppen. Bei der Isolierung läßt sich eine mechanische Beschädigung eines Teils der Zellen nicht vermeiden, die mit einer Freisetzung von Enzymvorstufen, die in zymogenen Granula gespeichert sind, verbunden ist. Um die Aktivierung dieser Enzyme zu vermeiden, wurde dem Medium Aprotinin zugesetzt. Eine Anfärbung dieser Zellen ergab jedoch keine zufriedenstellenden Resultate; vermutlich wurden die zugesetzten Farbstoffe durch freigewordene und nicht durch Aprotinin inhibierte Enzyme zersetzt, ehe sie in ausreichender Konzentration in die Zellen eindringen konnten.

Als Zellmodell für die eigentlichen Versuche dienten daher AR42J-Zellen. Nach Angabe der ECACC wachsen AR42J-Zellen in Form von hohlen Sphäroiden (siehe Einleitung), womit der Vergleich zu Azini *in vivo* nahelag. AR42J wurde daher auf seine Eignung als Modell für pankreatische Azinusstrukturen untersucht.

Im Gewebeverband der pankreatischen Azini sind die Azinuszellen strikt polar. Der Vergleich zwischen einer isolierten Zelle aus Schweinepankreas und einer AR42J-Zelle zeigt ihre morphologische Ähnlichkeit in bezug auf diese Polarität: Der Zellkern liegt an der rechten Seite dicht an der Zellmembran an; an der linken Seite folgt ein zytoplasmatischer Raum, in dem sich zahlreiche Vesikel befinden (Abb. 23).

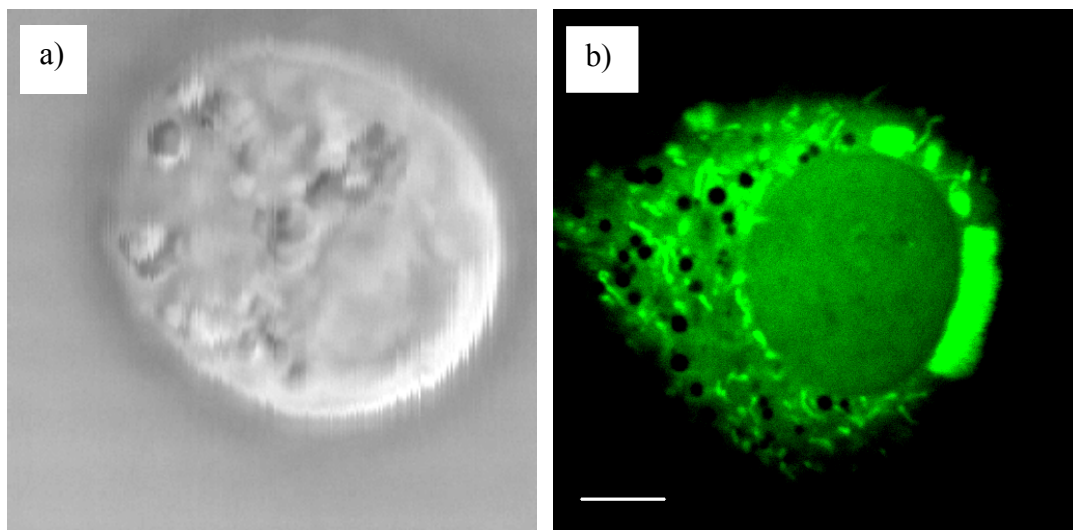


Abb. 23: Morphologische Ähnlichkeit einer isolierten Pankreaszelle und einer AR42J-Zelle. Linke Seite: Aus Schweinepankreas isolierte Einzelzelle, Aufnahme im Durchlicht. Rechte Seite: AR42J-Zelle, mit FDA angefärbt; konfokale Aufnahme. Balken: 5 μm .

a) Isolierte Zelle: Schweinepankreas wurde in HEPES-gepuffertem RPMI1640 mit 10 mM Aprotinin zerlegt und Zellen herausgefiltert; b) AR42J-Zelle: AR42J-Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen und zum Versuch in eine Temperierkammer, die eine Temperatur von 37 °C aufrechterhielt, überführt. Die Anfärbung erfolgte in HEPES-gepuffertem RPMI1640 mit Fluorescein-Diacetat.

3. 2. 1. Vergleich der Anfärbung von intakten Zellen

Vier Farbstoffe wurden getestet: FDA wurde in Vorversuchen eingesetzt, da die Anfärbung kontrastreich ist. BCECF-AM und cSNARF-AM sind ratiometrisch auswertbar und wurden daher genauer auf ihre Eignung für Manipulationsversuche im Inneren von Zellaggregaten untersucht. Anders als diese drei Farbstoffe, deren Fluoreszenz bei basischem pH maximal wird, fluoresziert LysoSensor Green in saurer Umgebung und wurde als Gegenfärbung für die sauren Kompartimente verwendet.

Da in Vorversuche starke Zellschäden an angefärbten Zellen beobachten ließen, wurden der mikroskopische Prozeß sowie die Zugabe von Lösungsvermittler und Farbstoffen auf ihre zellschädigende Wirkung hin untersucht.

Kriterien für den Zellzustand

Der Zustand der Zellen wurde in vier Kategorien eingeteilt:

- gesund: Keine Schäden erkennbar.
- unklar: Es gibt Zellbereiche, die geschädigt sein könnten, es ist jedoch keine sichere Diagnose möglich.
- geschädigt: Die Zellen zeigen Schäden, z. B. kleine Blasen an der Zellaußenseite (beispielsweise Abb. 26, Zellen ohne Stimulation mit Dexamethason und Anfärbung mit cSNARF-AM).
- schwer geschädigt: Die Zelle weist an vielen Stellen Schäden auf (beispielsweise Abb. 26, Zellen nach 6 Stunden Stimulation mit Dexamethason und Anfärbung mit cSNARF-AM).

Zellschäden von AR42J-Zellen vor der Anfärbung

Das Auftreten von Zellschäden im Rahmen mikroskopischer Tätigkeiten läßt sich nicht vollständig vermeiden. Um zu überprüfen, ob die Rahmenbedingungen für die Zellen geeignet waren, wurden Zellen zunächst ohne Anfärbung für längere Zeit den entsprechenden Bedingungen unterworfen, indem ungefärbte Zellen über einen längeren Zeitraum mit dem LSM 510 beobachtet wurden. Wurde keine andere Substanz zugegeben, sondern nur eine Zeit von 120 min abgewartet, die auch bei Versuchen nicht überschritten wurde, änderte sich der Zustand der Zellen nicht (Abb. 24).

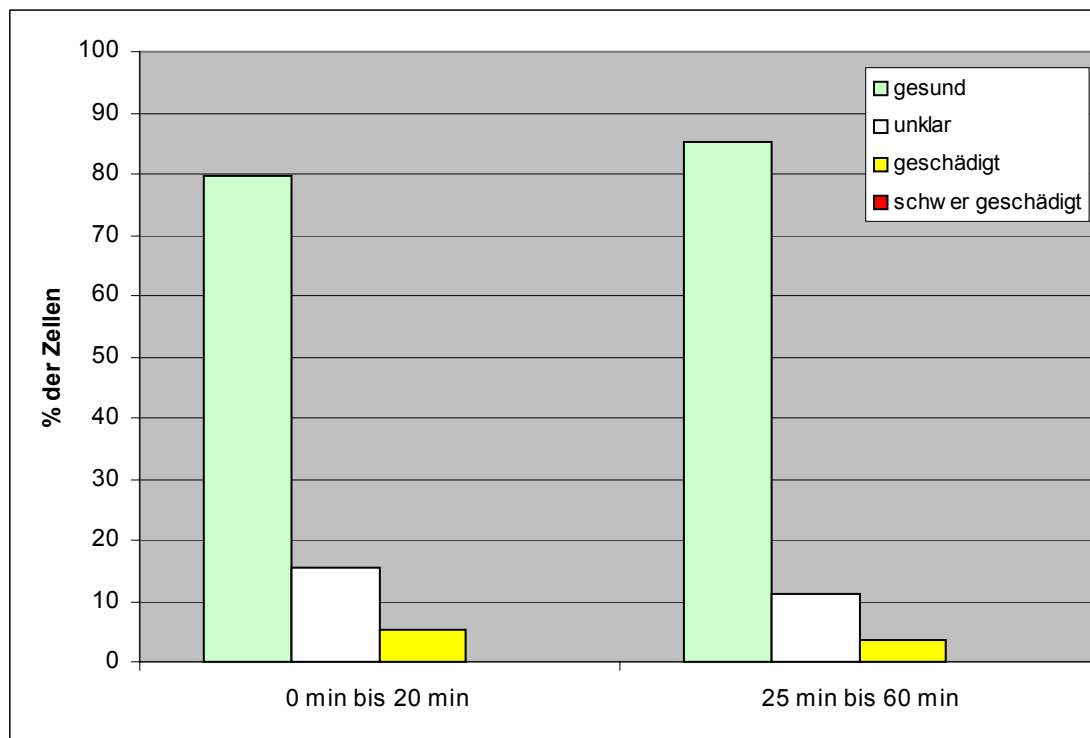


Abb. 24: Der Zustand von Zellen, die nicht angefärbt werden, ändert sich nicht im Laufe der Zeit. Zu den Kriterien für den Zellzustand siehe S. 52. n = 113 Zellen.

Zellschäden durch das Lösungsmittel für Farbstoffe

Um einen möglichen schädigenden Einfluß sicher auszuschließen, wurden AR42J-Zellen mit 100 µl/ml eines Gemischs aus 90 % DMSO und 10 % Pluronic getestet, einer Konzentration, die der zehnfachen der in Färbeversuchen maximal eingesetzten Konzentration entsprach. Die Zugabe des Gemischs führte auch in dieser Konzentration nicht zu eindeutig feststellbaren Schäden (Abb. 25).

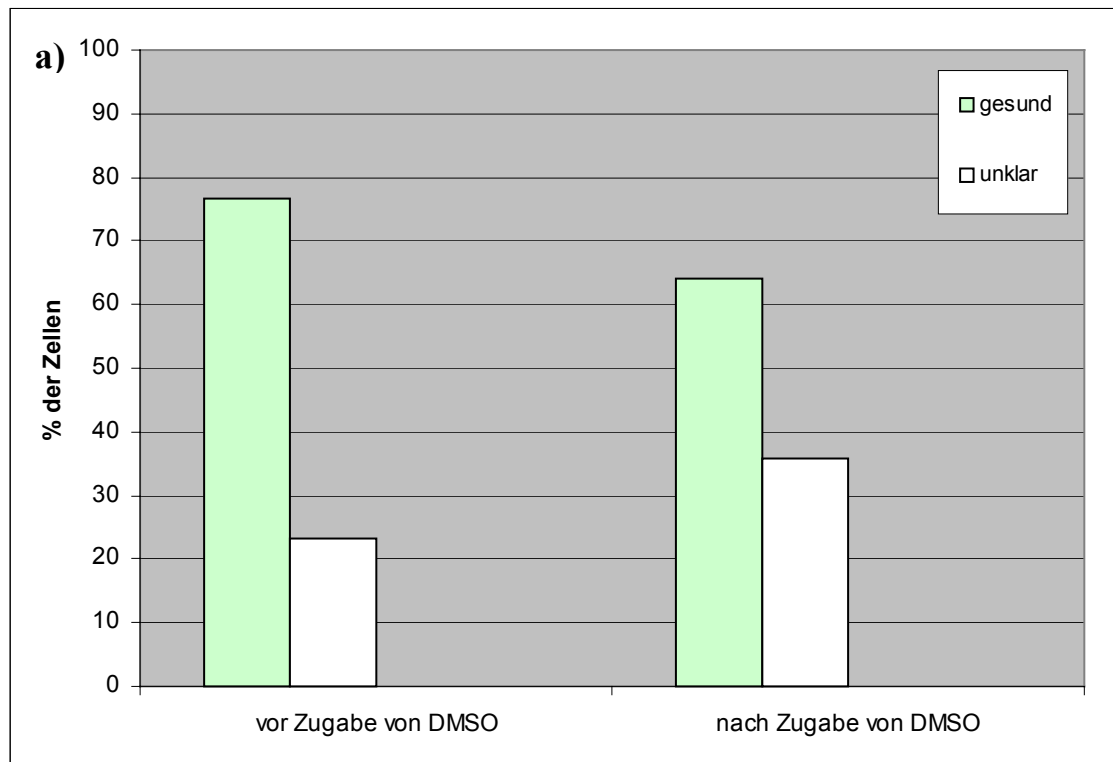
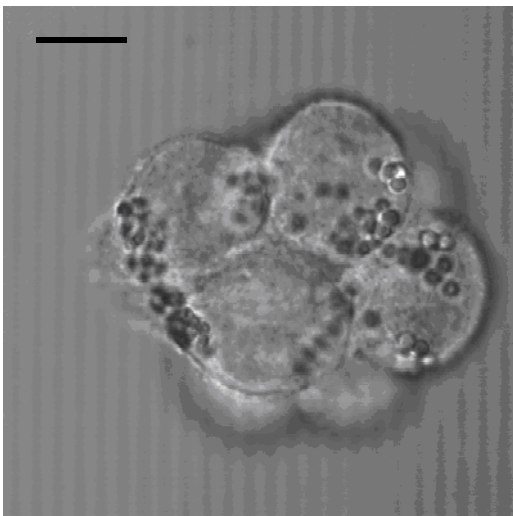
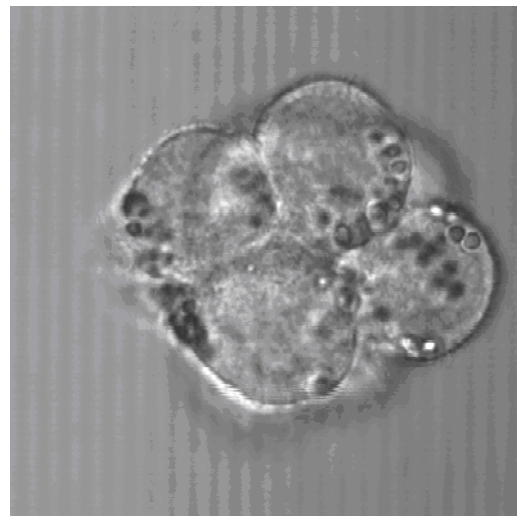
**b)****c)**

Abb. 25: Zellen, deren Medium das Lösungsmittel für die Fluoreszenzfarbstoffe zugegeben wird, erleiden keine sichtbaren Schäden.

a) Die Zugabe von DMSO/Pluronic allein führt nicht zu einer Veränderung des Zellzustands von AR42J-Zellen. Zu den Kriterien für den Zellzustand siehe S. 52. b) direkt nach Zugabe von DMSO, c) 14 min nach Zugabe von DMSO. Balken: 10 μm .

AR42J-Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen und zum Versuch in eine Temperierkammer überführt. Die Zugabe von 100 $\mu\text{l/ml}$ DMSO/Pluronic erfolgte in HEPES-gepuffertem RPMI1640. $n = 116$ Zellen.

Eventuell auftretende Zellschäden werden also nicht durch den Lösungsvermittler verursacht.

Zellschäden durch Stimulation mit Dexamethason

Da AR42J-Zellen nicht vollständig ausdifferenzierte Zellen sind, wurde versucht, die Differenzierung in azinöse Zellen durch Dexamethason zu verstärken. Dexamethason wirkt als Steroidhormon, das heißt, es entfaltet seine Wirkung durch Beeinflussung der Genexpression der Zellen. Nach einer Stimulation von AR42J-Zellen mit Dexamethason findet man eine auf das 2,6fache erhöhte Konzentrationen der Amylase-mRNA, und damit einhergehend eine Vergrößerung des rauhen endoplasmatischen Retikulums und eine verstärkte Basissekretion an Amylase (Logdson et al. 1985). Dexamethason verstärkt also das den Azinuszellen vergleichbare Verhalten der AR42J-Zellen, das diese ständig zeigen. Allerdings wirkte sich die Behandlung mit Dexamethason nachteilig auf die Vitalität der Zellen während des Mikroskopierens aus; insbesondere nach der Anfärbung mit cSNARF zeigten sich schwere Zellschäden (Abb. 26). Da die Zellen auch in ihrem teilungsfähigen Zustand die Eigenschaften von Azinuszellen zeigen, wurde für die Versuche auf eine Stimulation mit Dexamethason verzichtet.

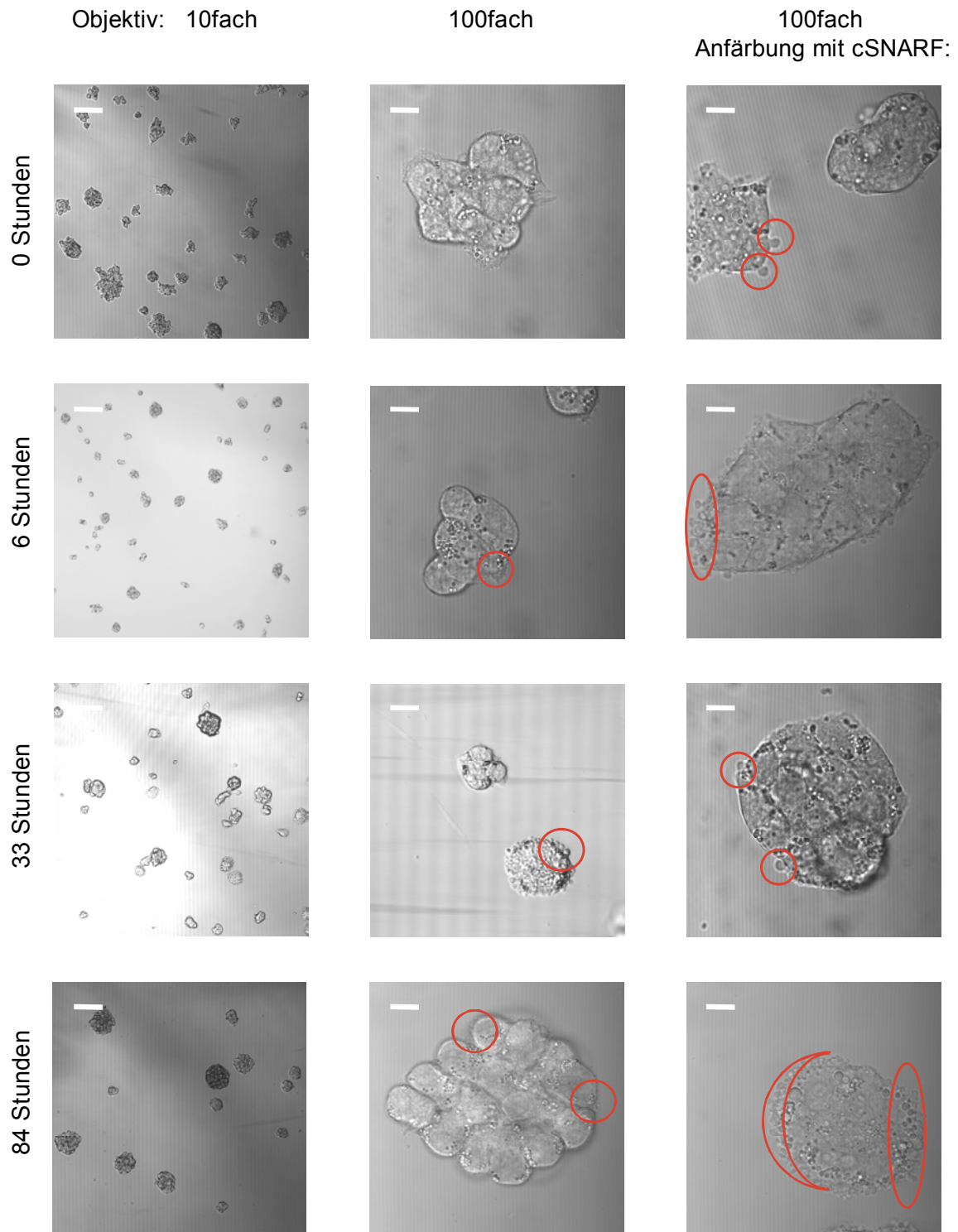


Abb. 26: Reaktion der AR42J-Zellen auf Gabe von Dexamethason. AR42J-Zellen wurden auf Deckglas kultiviert und für verschiedene Zeitdauer mit Dexamethason stimuliert. Nach einer ersten mikroskopischen Prüfung wurden die Zellen mit cSNARF-AM angefärbt, dargestellt ist zur besseren Vergleichbarkeit jedoch nur die Aufnahme des Durchlichtkanals.

Mit zunehmender Dauer der Stimulation nimmt die Vitalität der Zellen beim Färbe- und Mikroskopierprozeß ab, wie Zellschäden (rote Markierungen) zeigen.

Balkenlänge: Erste Spalte 100 µm; 2. und 3. Spalte 10 µm.

Anfärbung mit Fluorescein-Diacetat

FDA wird von zelleigenen Esterasen in Fluorescein umgesetzt, dessen Fluoreszenzintensität vom pH-Wert der Umgebung abhängt. Da Fluorescein nicht ratiometrisch auswertbar ist, wurde es nur für erste Untersuchungen zum Zellaufbau verwendet. Bei der Anfärbung von AR42J-Zellen mit FDA ist zu sehen, daß ein Teil der Vesikel basisch und ein Teil entweder sauer oder nicht angefärbt ist. Fluorescein zeigt bei Anregung mit 488 nm ab pH 5 eine Fluoreszenz bei 510 nm, die bis pH 9 an Intensität zunimmt. Saure Vesikel (wie z. B. zymogene Granula) erscheinen daher dunkel, basische hell (z. B. Mitochondrien); der Kern tritt als großer, diffus gefärbter Bereich in Erscheinung (Abb. 23b). Mit FDA angefärbte Aggregate erscheinen innen hohl, da nur der äußere Zellsaum angefärbt wird (Abb. 27).

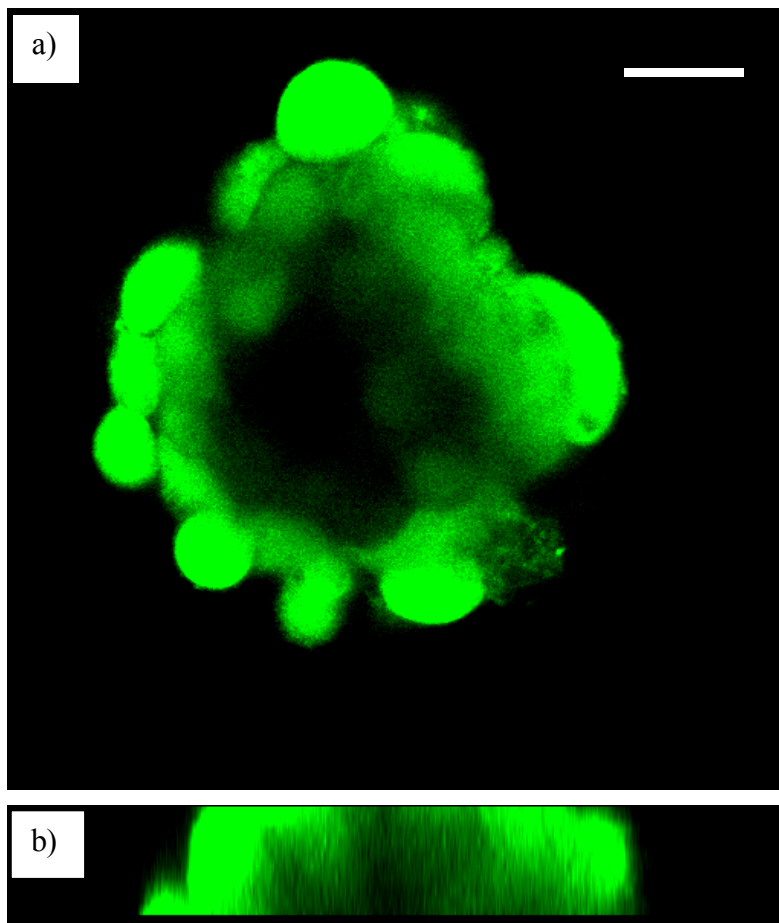


Abb. 27: Aggregat von AR42J-Zellen, angefärbt mit FDA.

a) xy-Bildaufnahme durch die unterste Schicht eines Aggregats, b) xz-Schnitt durch das Aggregat. Da nur die äußere Zellschicht angefärbt wird, scheinen die Zellen einen inneren Hohlraum zu umgeben, der nach unten durch das Deckglas abgeschlossen ist.

Balken: 20 μm .

Anfärbung mit LysoSensor Green

LysoSensor Green fluoresziert im Gegensatz zu den anderen Farbstoffen im sauren Bereich, die maximale Fluoreszenz wird bei einem pH-Wert niedriger als 4,5 erreicht, bei pH-Werten über 6 verschwindet die Fluoreszenz.

Das Zytoplasma fluoreszierte bei Anfärbung mit LysoSensor Green stärker als der Zellkern, der teilweise strukturiert erschien; Vesikel bildeten hell fluoreszierende Bereiche. Einzeln liegende Zellen nahmen den Farbstoff rascher auf als Zellen eines Aggregates. Der Farbstoff erreichte zunächst in den direkt an das Medium angrenzenden Bereichen der Zellen solche Konzentrationen, daß die Anfärbung sich deutlich vom Hintergrundrauschen abhebt. Die Färbung setzte sich bis ins Innere der Aggregate fort, auch wenn die Aggregate sehr groß waren (Abb. 28).

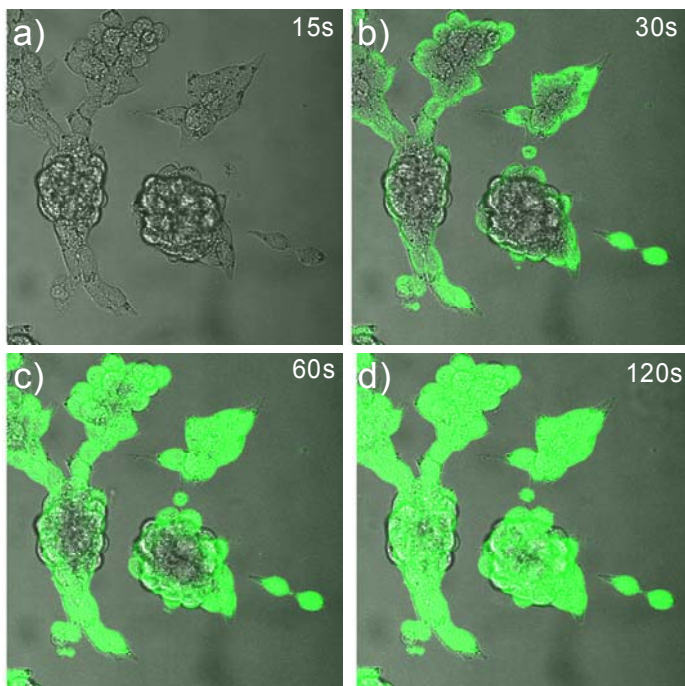


Abb. 28: Verlauf der Anfärbung von AR42J-Aggregaten mit LysoSensor Green

Die Anfärbung erfolgte bei 5 bis 7 s nach Versuchsbeginn; a) Zeit: 15 s.; der Farbstoff ist noch nicht von den Zellen akkumuliert worden; b) Zeit: 30 s; einzeln liegende Zellen sind bereits vollständig angefärbt; c) Zeit: 60 s; Aggregate, in denen jede Zelle Kontakt zum Medium hat, sind vollständig angefärbt; d) Zeit: 120 s; auch Zellen im Innern von Aggregaten haben begonnen, Farbstoff zu akkumulieren.

AR42J-Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen und zum Versuch in eine Temperierkammer überführt. Die Anfärbung erfolgte in HEPES-gepuffertem RPMI1640 mit LysoSensor Green (Endkonz. 3 µg/ml).

Trägt man die mittlere Pixelintensität der Fluoreszenz in definierten Bereichen (engl. *region of interest*, kurz ROI) gegen die Zeit auf, ergibt sich folgendes Bild (Abb. 29): In der einzeln liegenden Zelle (ROI 1) akkumuliert bereits in der ersten halben Minute so viel Farbstoff, daß der Detektor maximale Fluoreszenz mißt. Eine Zelle, die zu einem Aggregat gehört, jedoch direkten Kontakt zum Medium hat, akkumuliert eine entsprechende Menge

Farbstoff innerhalb der ersten zwei Minuten (ROI 2, 3 und 4). Die Anfärbung der Zellen im Inneren ist eine Minute nach der Farbstoffzugabe bereits nachweisbar (ROI 5, 6 und 7); die Zunahme der Anfärbung ist jedoch langsamer als in den randnahen Zellen.

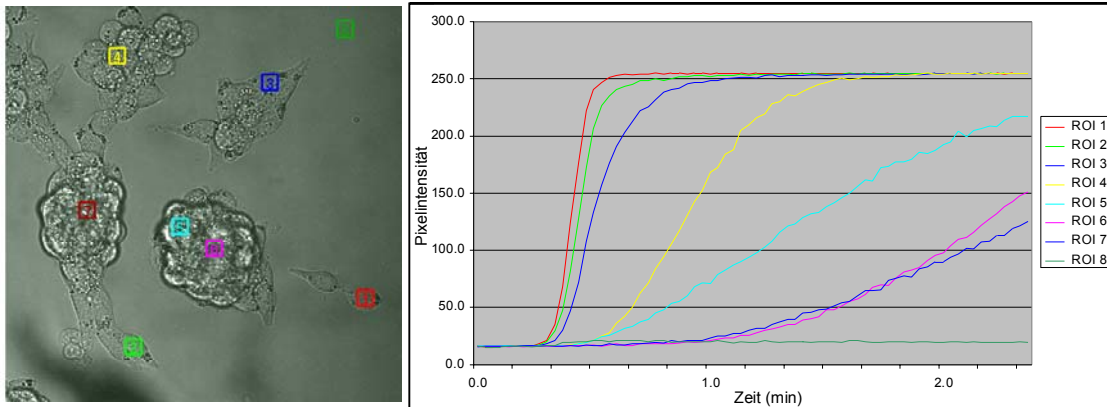


Abb. 29: Verlauf der Anfärbung von AR42J-Aggregaten mit LysoSensor Green; . Links: Anfärbung der Zellen vor der Zugabe des Farbstoffes; rechts: Diagramm der Intensitätszunahme (in Pixelintensität) während der Farbstoffakkumulation in den Zellen an verschiedenen Stellen des Präparats Farbstoffzugabe. Intensitätszunahme an verschiedenen Stellen des Präparats; ROI 8: Hintergrund. ROI ca 4 μm x 4 μm .

Auch sehr große Aggregate wurden bis in den zentralen Bereich durchgefärbt (Abb. 30).

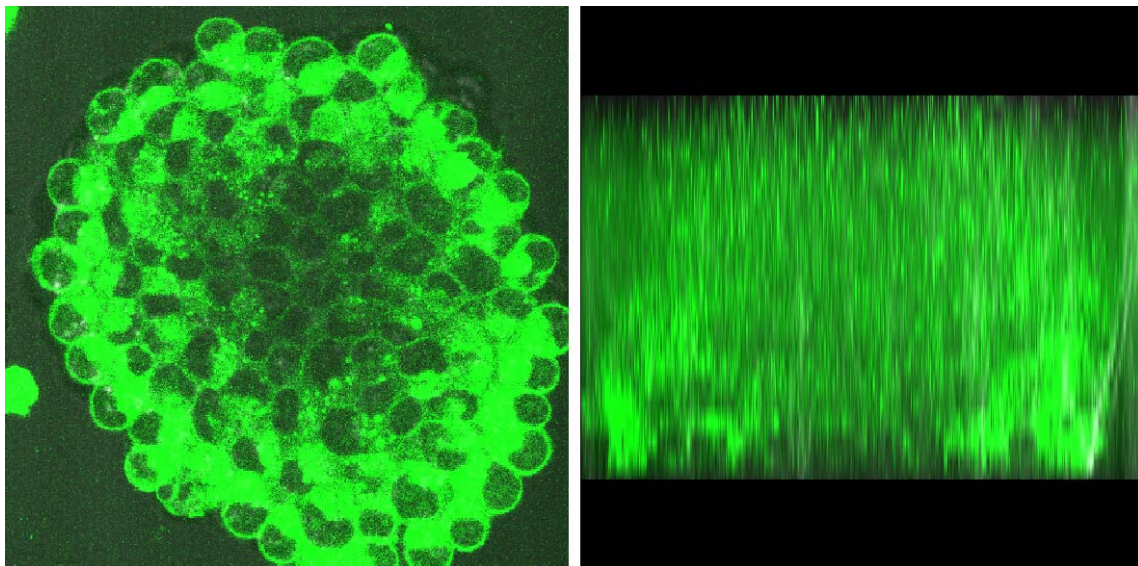


Abb. 30: Großes Zellaggregat von AR42J-Zellen, angefärbt mit LysoSensor Green. Das Aggregat besteht aus über 200 Zellen. Der zentrale Bereich ist schwächer angefärbt als der Randbereich, es gibt jedoch auch im Inneren des Aggregates angefärbte Strukturen. Links: xy-Schnitt, rechts: xz-Schnitt. Balken: 20 μm .

LysoSensor Green ist ratiometrisch nicht auswertbar, hat aber den Vorteil, im sauren Bereich zu fluoreszieren. Auf diese Weise konnte festgestellt werden, daß zymogenen Granula in AR42J-Zellen tatsächlich sauer sind, den zymogenen Granula in pankreatischen Azinuszellen also insoweit entsprechen.

LysoSensor Green ruft nur in sehr geringem Maße Schäden an den Zellen hervor. Sehr große Aggregate aus mehreren hundert Zellen können mit LysoSensor Green vollständig angefärbt werden, wobei der Unterschied zwischen außen- und innenliegenden Zellen nicht so groß ist wie bei cSNARF-AM. LysoSensor Green hat keine Azetoxymethylgruppen und zeigt auch die geringste zellschädigende Wirkung im Vergleich zu FDA, BCECF-AM und cSNARF-AM.

Anfärbung mit BCECF-AM

Da BCECF als freie Säure die Zellmembran nicht passieren kann, erfolgte die Anfärbung der Zellen mit Azetoxymethylestern (AM) der Substanz. Die Anfärbung mit BCECF-AM war sehr effizient; bereits eine Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ Zellkulturmedium führt zu einer hohen Fluoreszenz.

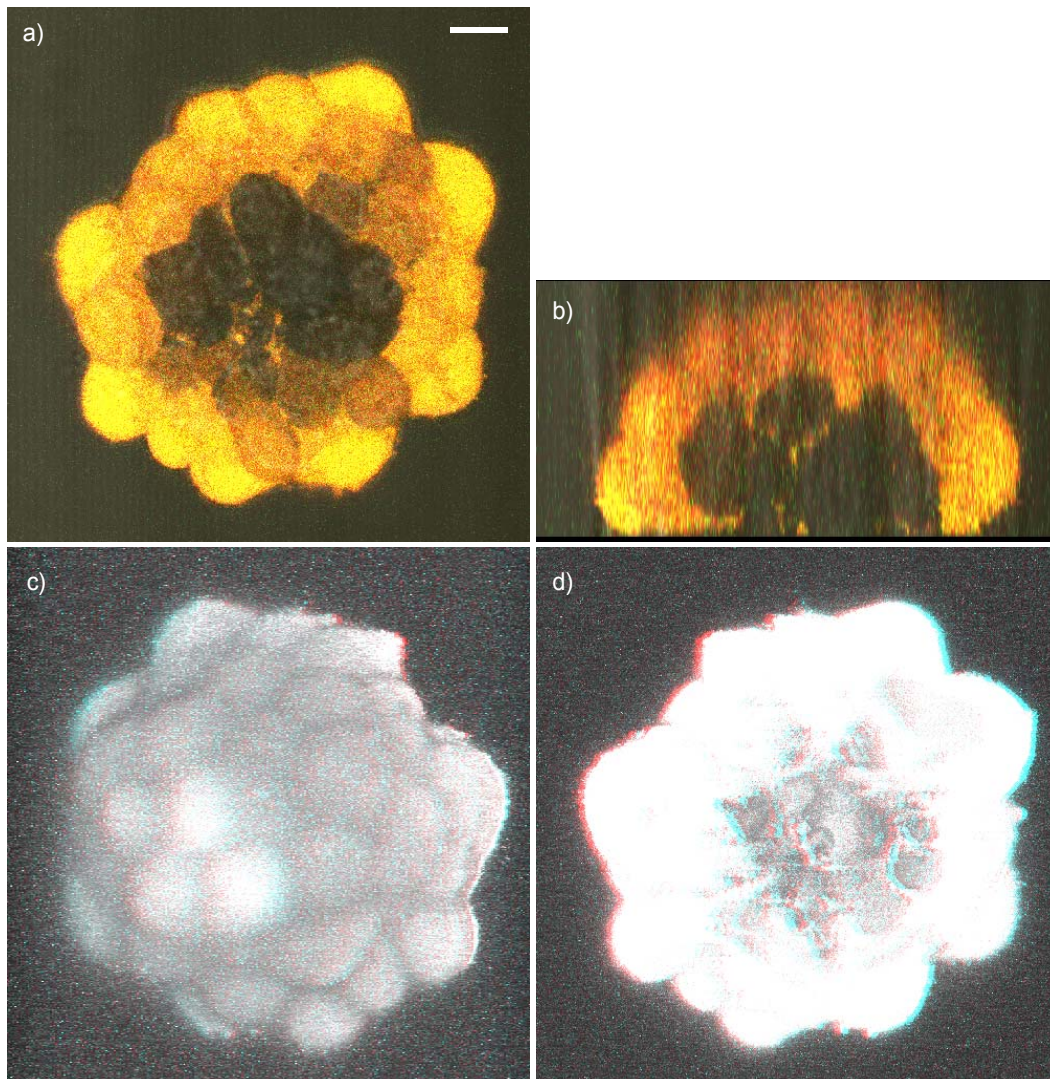


Abb. 31: Aggregat von AR42J-Zellen, angefärbt mit BCECF-AM.

a) xy-Bildaufnahme durch die unterste Schicht eines Aggregats, b) xz-Schnitt durch das Aggregat. Da nur die äußere Zellschicht angefärbt wird, scheinen die Zellen einen inneren Hohlraum zu umgeben, der nach unten durch das Deckglas abgeschlossen ist. c) Dreidimensionale Darstellung der Außenseite des Aggregates. d) Dreidimensionale Darstellung des scheinbaren Hohlraums im Aggregatsinneren. Balken: 20 μm .

Die Anfärbung erfolgte in HEPES-gepuffertem RPMI1640 mit BCECF-AM (Endkonz. 3 $\mu\text{g/ml}$ Puffer). (Eine Brille zum Betrachten der dreidimensionalen Bilder befindet sich auf S. 91.)

BCECF-AM färbt in Aggregaten aber nur die äußeren Zellschichten (Abb. 31). Die Farbstoffkonzentration im Aggregatsinneren bleibt stets so weit unter der in den äußeren Zellen, daß die Zellen nicht angefärbt erscheinen (Abb. 32).

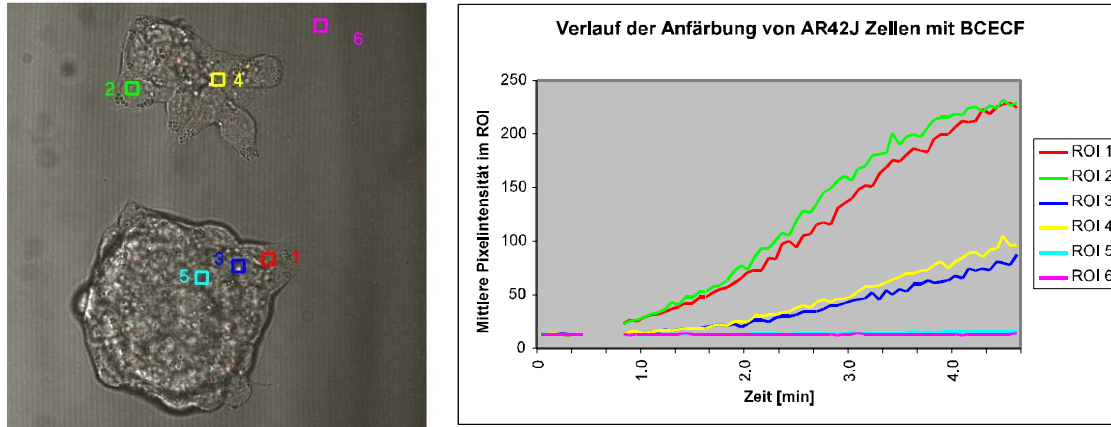


Abb. 32: Verlauf der Anfärbung von AR42J-Aggregaten mit BCECF-AM. Links: Anfärbung der Zellen vor der Zugabe des Farbstoffes; rechts: Diagramm der Intensitätszunahme (in Pixelintensität) während der Farbstoffakkumulation in den Zellen an verschiedenen Stellen des Präparats: ROI (*region of interest*) 1: Randzelle einer mittleren Zellgruppe; ROI 2: Randzelle einer kleinen Zellgruppe; ROI 3: randnahe Zelle in einer mittleren Zellgruppe; ROI 4: Zelle im Inneren einer mittleren Zellgruppe; ROI 5: Zelle im Inneren einer großen Zellgruppe; ROI 6: Hintergrund. ROI ca 3µm x 3µm.

Trägt man die mittlere Pixelintensität der Fluoreszenz in bestimmten Bereichen (als "*region of interest*" oder kurz ROI bezeichnet) gegen die Zeit auf, ergibt sich folgendes Bild: Nach der Farbstoffzugabe akkumulieren die randständigen Zellen sehr rasch meßbare Mengen an Farbstoff (ROI 1 und 3). Auch die daran angrenzenden Zellen (ROI 2 und 4) werden vom Farbstoff erreicht, jedoch steigt die Konzentration sehr viel langsamer. Zellen im Inneren mittlerer Aggregate werden gar nicht angefärbt (ROI 5).

BCECF-AM verursacht bereits in geringen Konzentrationen Schäden an den AR42J-Zellen, was vermutlich auf die abgespaltenen Moleküle zurückzuführen ist. Daher ist BCECF-AM nicht gut geeignet für Versuche zur Beeinflussung des Zellzustands beim Einsatz der optischen Pinzette, da eine Verschlechterung des Zellzustands bereits durch den Farbstoff verursacht wird (Abb. 33).

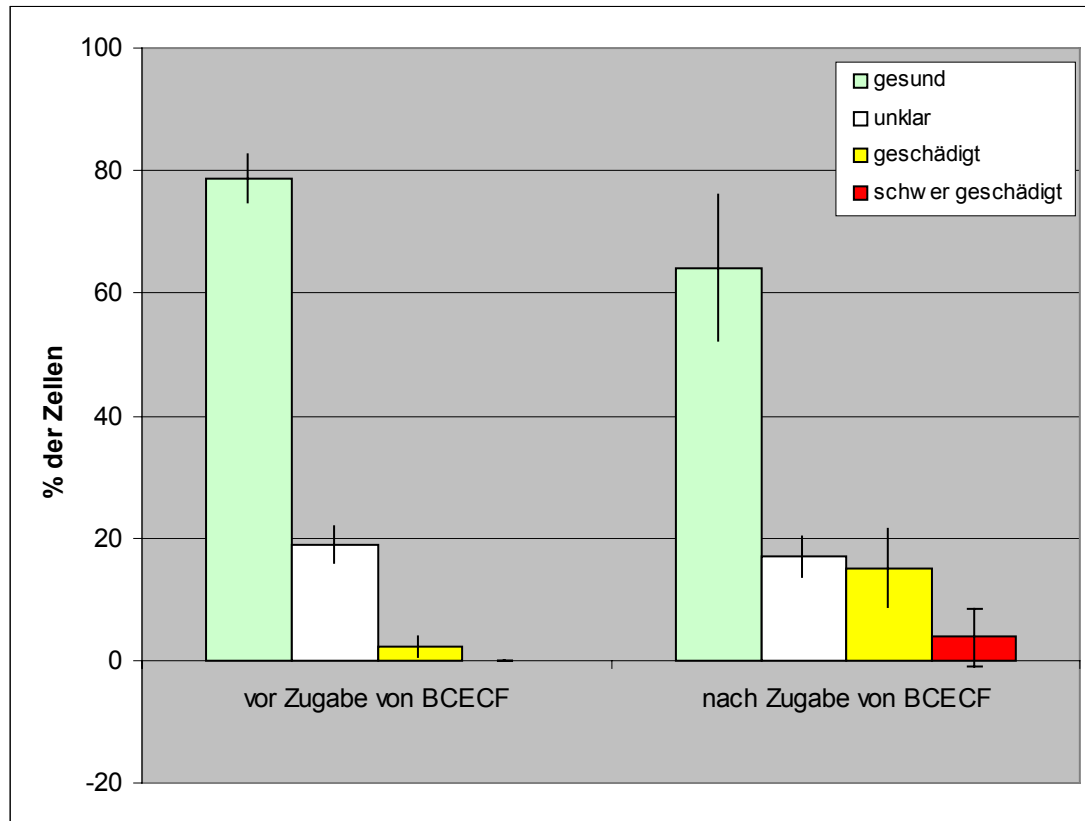


Abb. 33: Die Anfärbung mit BCECF-AM (3µg/ml) verursacht teilweise schwere Schäden an den gefärbten Zellen.

Nach der Anfärbung (ab 20 min nach Versuchsbeginn) zeigt ein höherer Anteil der Zellen Schädigungen oder schwere Zellschäden. Zu den Kriterien für den Zellzustand siehe S. 52. n = 825 Zellen.

BCECF bleicht sehr schnell aus. Das erschwert Langzeitbeobachtungen, da eine ausreichende Fluoreszenzintensität nur durch kontinuierliches Erhöhen der Laserleistung während der Aufnahme gewährleistet werden könnte. Außerdem reagieren Zellen, die mit BCECF-AM gefärbt sind, besonders empfindlich auf hohe Laserintensitäten. Bei hohen Farbstoffkonzentrationen (5 µg/ml Puffer) treten erste Schäden bereits direkt nach der Anfärbung auf, und zwar sowohl bei Aufnahmen mit abrasternder Mikroskopie wie auch bei Betrachtung mit Durchlicht. Niedrigere Farbstoffkonzentrationen (0,6 µl/ml Puffer) erlauben eine längere Beobachtung, bis sichtbare Zellschäden auftreten. Allerdings ist bei diesen Farbstoffkonzentrationen die Beladung der Zellen recht unterschiedlich, und nach mehr als 30 min nach der Anfärbung zeigen viele Zellen ebenfalls Schäden, auch wenn keine Bewegungsversuche in den Zellen durchgeführt wurden.

Vergleichende Studien zur Anfärbung von AR42J-Aggregaten

Bei der Anfärbung mit BCECF-AM sieht man nur eine Zellschicht, und die Aggregate erwecken damit den Eindruck, hohl zu sein. Dagegen wurde bei der Anfärbung von AR42J-Aggregaten mit LysoSensor Green festgestellt, daß die Aggregate vollständig durchgefärbt werden (Abb. 30). Um festzustellen, ob BCECF-AM Zellaggregate stets nur am äußeren Rand färbt, wurde eine vergleichende Anfärbung von Aggregaten aus NK92-Zellen mit BCECF-AM durchgeführt (Abb. 34). Die zentralen Zellen waren nicht ganz so stark angefärbt wie die peripheren Zellen; es wurden jedoch alle Zellen angefärbt. Eine Verlaufsstudie war nicht möglich, da es sich um Suspensionszellen handelt, die durch leichte Flüssigkeitsströmungen aus dem Bildfeld getrieben werden.

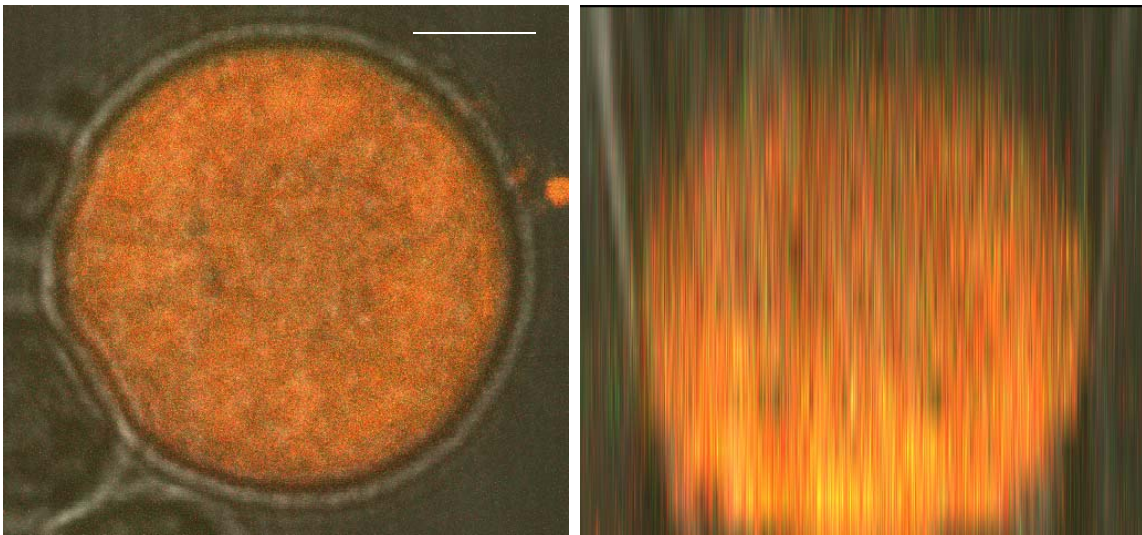


Abb. 34: Aggregat von NK92-Zellen, angefärbt mit BCECF-AM. Links: xy-Schnitt, rechts: xz-Schnitt. BCECF-AM färbt auch die inneren Zellen des Aggregates an, nicht nur den äußeren Zellsaum. Balken: 20 μm .

NK92-Aggregate sind lockere Zellhaufen, die bereits durch Schütteln voneinander zu trennen sind. Zellkulturmedium und darin gelöster Farbstoff können zwischen die Zellen eines NK92-Aggregats dringen und alle Zellen anfärben. Der geringere Färbungsgrad im Inneren des NK92-Aggregats beruhte demzufolge auf einer geringeren Konzentration von BCECF-AM im Bereich der zentralen Zellen, weil der Farbstoff teilweise von den peripheren Zellen aufgenommen wurde.

Im Unterschied dazu könnten die Zellkontakte von AR42J-Zellen so dicht sein, daß kein Farbstoff die zentralen Zellen erreicht. Der einzige Weg wäre dann eine Diffusion durch die äußeren Zellschichten hindurch. Um festzustellen, ob sie so kompakt sind, daß kein Medium die inneren Zellen erreicht, wurde dem Medium ungefärbter Zellen Fluorescein

zugesetzt. Fluorescein ist annähernd zellmembran-impermeabel und dringt daher, wenn es dem Medium zugegeben wird, nicht in die Zellen ein. Man sieht also die Zellen als dunkle Körper in einer fluoreszierenden Umgebung (Abb. 35). In sehr großen Aggregaten waren nahe des Zentrums teilweise größeren fluoreszierende Bereiche zu sehen, bei denen es sich vermutlich um Zellen handelt, deren Zellmembran nicht mehr in der Lage ist, Fluorescein auszuschließen, also um vermutlich tote Zellen.

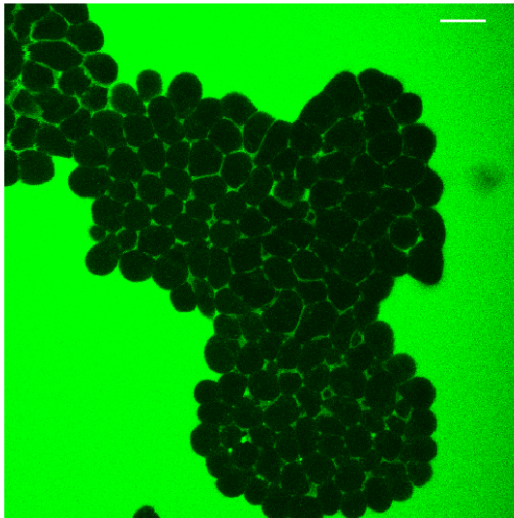


Abb. 35: Aggregat von AR42J-Zellen, deren Medium Fluorescein zugegeben wurde. Die Zellen schließen den Farbstoff aus und erscheinen daher als dunkle Bereiche vor fluoreszierendem Hintergrund.

AR42J-Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen und zum Versuch in eine Temperierkammer überführt. Die Anfärbung erfolgte durch Zugabe von 5 μ l Fluorescein (2,5 mg/ml in H₂O).

Balken: 20 μ m

Die Umrisse der Zellen im Inneren von Aggregaten erschienen als dünne Fluoreszenzlinien. Es stellt sich die Frage, wie Fluorescein zwischen die Zellen der Aggregate gelangt, während Fluorescein-Diacetat und BCECF-AM nur den äußeren Zellsaum anfärben können. Eine mögliche Erklärung wäre, daß die Zellen der Aggregate nicht vollständig fest aneinander angewachsen sind, sondern entlang der Zellgrenzen sehr dünne Kanäle existieren, die in der Fluoresceinanfärbung des Mediums als dünne Linien auch sichtbar gemacht werden können. Wenn diese Kanäle äußerst dünn wären, kann möglicherweise ein Farbstoff, der sehr effizient in Zellen hineindiffundiert, den äußeren Zellring nicht passieren; er wird sozusagen aus dem Medium ausgefiltert.

Um zu zeigen, daß BCECF-AM nur die äußere Zellschicht färbt, jedoch im Inneren der Aggregate Zellen vorhanden sind, wurde BCECF-AM zu Zellen gegeben, deren Medium Fluorescein enthält (Abb. 36). Auch hier sind im Inneren des Aggregates die Zellmembranen zu erkennen. BCECF erreicht jedoch nur in den äußeren Zellen in detektierbarer Konzentration.

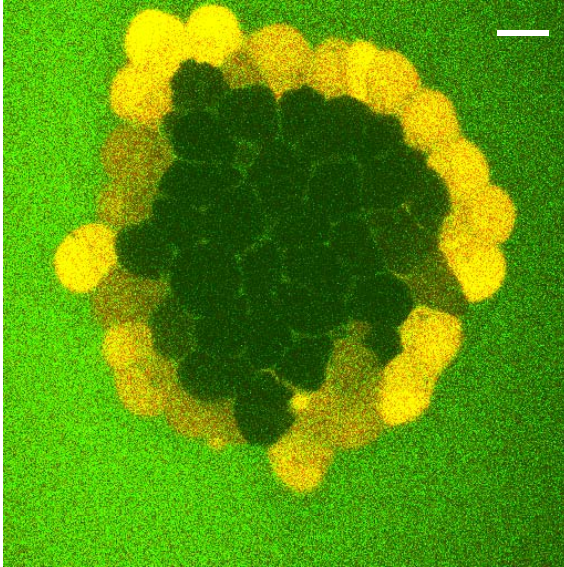


Abb. 36: Aggregat von AR42J-Zellen, deren Medium 5 μ l Fluorescein (2,5 mg/ml Wasser) zugegeben wurde; anschließend wurden die Zellen mit 5 μ l/ml BCECF-AM gefärbt. Während BCECF-AM nur den äußeren Zellsaum färbt, dringt Fluorescein auch in das Innere des Aggregates und zeigt dort Zellgrenzen.

AR42J-Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen und zum Versuch in eine Temperierkammer überführt.

Balken: 10 μ m

Bei einer Anfärbung mit Hoechst 33342 oder Syto 83 (Fa. Molecular Probes) wurden zunächst nur die Kerne der Zellen in der äußersten Zellschicht stark angefärbt, die Farbstoffe drangen im Laufe mehrerer Stunden jedoch auch weiter in die Aggregate hinein. DNA-Farbstoffe werden nicht umgesetzt, sondern binden an die DNA. Offenbar ist hier nur die Geschwindigkeit der Diffusion zu den Kernen hin im Aggregat langsamer, und es dauert insofern länger, bis große Aggregate vollständig durchgefärbt sind.

Anfärbung mit cSNARF-AM

cSNARF-AM färbte Zytoplasma und Zellkerne gleichmäßig an. Das ist insofern von Nachteil, da die Zellstruktur mit diesem Farbstoff weniger klar hervortritt. Auch die Färbung von Zellgruppen ist gleichmäßiger: Erst bei größeren Aggregaten blieben die zentralen Bereiche ungefärbt. Vesikel erscheinen als schwächer gefärbte Bereiche.

Die Anfärbung von Zellen mit cSNARF findet sehr gleichmäßig statt (Abb. 37). Die Anfärbung erfolgt in allen Zellen parallel, wobei manche randnahen Zellen nicht so viel Farbstoff akkumulieren wie manche Zellen im Inneren des Aggregates (Abb. 37, ROI 3 und ROI 4). Sehr große Aggregate aus mehreren hundert Zellen werden nicht bis in den zentralen Bereich durchgefärbt.

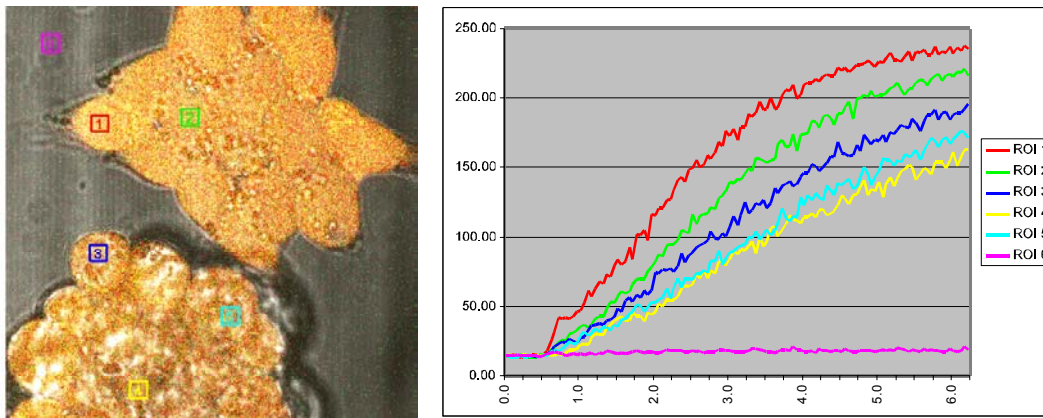


Abb. 37: Verlauf der Anfärbung von AR42J-Aggregaten mit cSNARF-AM (3 µg/ml). Links: Anfärbung der Zellen 6 min nach der Zugabe des Farbstoffes; rechts: Diagramm der Intensitätszunahme (in Pixelintensität) während der Farbstoffakkumulation in den Zellen an verschiedenen Stellen des Präparats: ROI 1, 2 und 5: Zelle am Rand des Aggregats; ROI 3 und 4: Zellen im Inneren des Aggregats, ROI 6: Hintergrund. ROI ca. 3 µm x 3 µm.

Die Anfärbekinetiken (BCECF-AM: Abb. 32, cSNARF-AM: Abb. 37) belegen, daß BCECF-AM rascher in den Zellen umgesetzt wird als cSNARF-AM. Ungespaltenes cSNARF-AM kann daher die äußeren Zellen eines Aggregates passieren (sei es entlang von schmalen Mediumkanälen zwischen den Zellen, sei es durch das Zytoplasma), ohne sofort zur Säure umgewandelt zu werden, und auf diese Weise bis ins Zentrum kleiner Aggregate gelangen.

Die Zellschäden, die cSNARF-AM verursachte, waren geringer als die von BCECF-AM, was auf die geringere Zahl an Azetoxymethylgruppen zurückzuführen sein dürfte, weswegen die Konzentration an Essigsäure und Formaldehyd nicht ganz so stark ansteigt. Auch cSNARF-AM konnte in hohen Konzentrationen zu einer erhöhten Sensitivität der

AR42J-Zellen führen, so daß bereits bei kurzen Aufnahmen erste Zellschäden sichtbar wurden (Abb. 38).

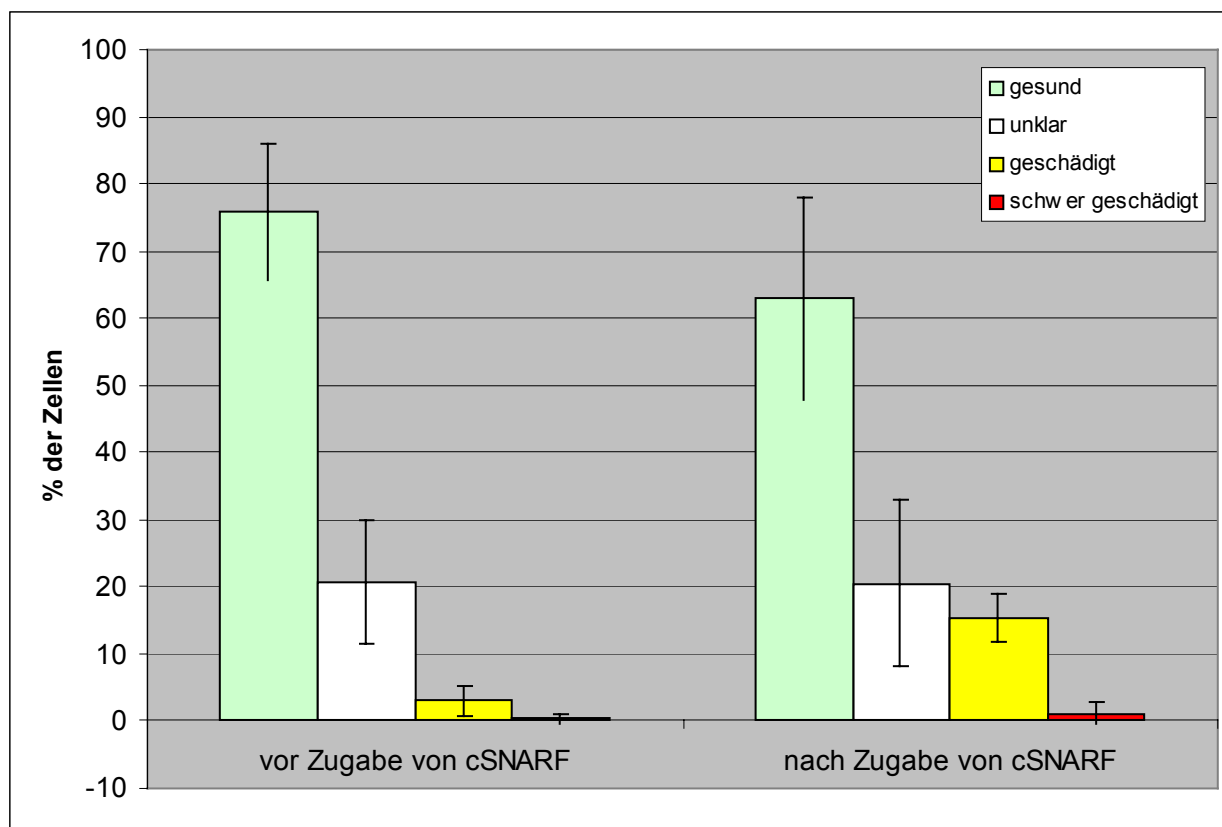


Abb. 38: Zellschäden infolge der Anfärbung mit cSNARF-AM (5 µg/ml). Nach der Anfärbung (ab 20 min nach Versuchsbeginn) zeigt ein höherer Anteil der Zellen Schädigungen oder schwere Zellschäden. Zu den Kriterien für den Zellzustand siehe S. 52. n = 554 Zellen.

cSNARF erweist sich damit gegenüber BCECF als besser geeignet für pH-Wert-Messungen in AR42J-Aggregaten, da sowohl die durch die Anfärbung verursachte Zellbelastung geringer ist wie auch die Durchfärbung von Aggregaten. BCECF wurde dennoch auch in Manipulationsversuchen eingesetzt, um festzustellen, ob pH-Wert-Veränderungen erkennbar sind, die aufgrund des höheren isoelektrischen Punktes mit cSNARF nicht sichtbar sind.

Die Darstellung der pH-Werte erfolgt der besseren Erkennbarkeit halber in einer Falschfarbendarstellung. Dazu wurde der Farbstoff als freie Säure in Puffer mit verschiedenen pH-Werten aufgenommen (Abb. 39). Aus den Werten ergab sich für jeden pH-Wert zwischen 6,0 und 8,0 ein spezifischer "Grauwert". Nimmt man ein Bild mit den beiden Kanälen auf und teilt Pixel für Pixel die beiden aufgenommenen Intensitäten, erhält man ein Graubild, in dem für jedes Pixel der Grauwert den pH-Wert an ebendieser Stelle

des Originalbildes anzeigt. Um diese Bilder leichter deuten zu können, wurden sie weichgezeichnet (Gaußfilter) und den Grauwerten Farbwerte zugewiesen. Hierzu wurde eine *Lookup*-Table für die Graubilder erstellt, in der niedrige pH-Werte mit roter Farbe, neutrale pH-Werte in grün und hohe pH-Werte in blau dargestellt wurden.

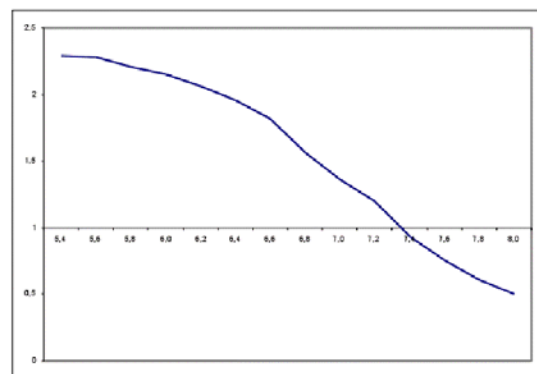
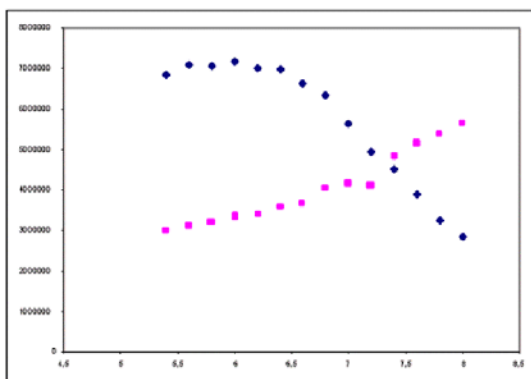
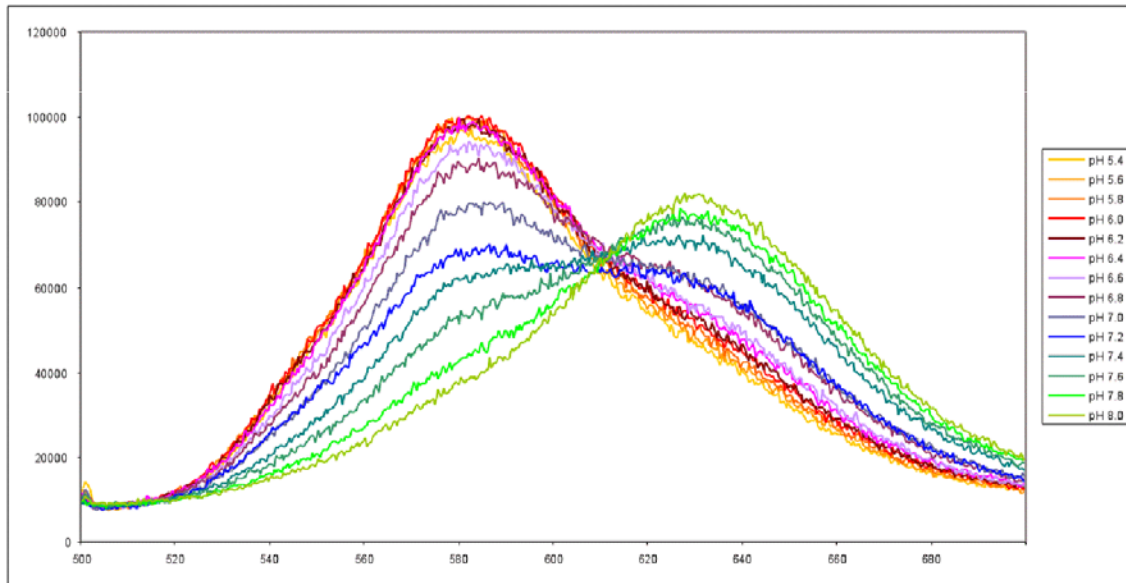


Abb. 39: cSNARF. a) Emissionsspektren, Anregung 488 nm; b) relative Emission bei 510 nm und 625 nm; c) Verhältnis der relativen Emissionen zueinander.

cSNARF (freie Säure, Molecular Probes) wurde in Phosphat-Puffern mit verschiedenen pH-Werten aufgenommen und im Spektralphotometer (48000 MHF, Fa. SLM Instruments, Inc.) die Fluoreszenz bei 488nm Anregung vermessen.

Jedes für die ratiometrische Auswertung aufgenommene Bild bestand aus zwei bzw. drei Kanälen, d. h. Datensätzen zur Intensität über den einzelnen Pixeln. Dabei enthielt ein Kanal (a) die Intensitätswerte der Fluoreszenzemission zwischen 565 nm und 595 nm, einer (b) die Intensitätswerte der Fluoreszenzemission zwischen 605 nm und 625 nm, und der dritte (c), sofern mit aufgenommen, ein nicht-konfokales Transmissionsbild. Bei der

Wahl der Einstellungen war darauf zu achten, daß die Schnittdicke der beiden Bilder übereinstimmt, damit die zur Ratiometrie beitragenden Photonen aus dem gleichen Zellvolumen verwendet werden (Abb. 40).

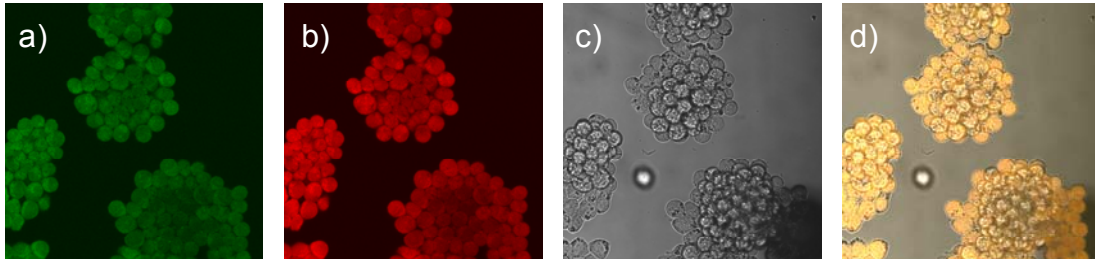


Abb. 40: Beispiel einer Aufnahme von Zellaggregaten zur ratiometrischen Auswertung.

a) Intensitätswerte der Fluoreszenzemission zwischen 565 nm und 595 nm, in der Falschfarbe grün; b) Intensitätswerte der Fluoreszenzemission zwischen 605 nm und 625 nm, in der Falschfarbe rot, c) Transmissionsbild (nicht konfokal), d) Überlagerung der drei Kanäle zu einem Gesamtbild. AR42J-Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen und zum Versuch in eine Temperierkammer überführt. Die Anfärbung erfolgte in HEPES-gepuffertem RPMI1640 mit cSNARF-AM (5 µg/ml).

Zunächst wurde die Hintergrundfluoreszenz für die Fluoreszenzkanäle bestimmt und von jedem Pixel abgezogen. Wenn die Bilder ein hohes Rauschen aufwiesen, d. h. direkt benachbarte Pixel sich in ihrer Intensität stark voneinander unterschieden, wurde ein Datenfilter eingesetzt, um die Intensitätsverteilung auszugleichen (Abb. 41). Das Rauschen läßt sich prinzipiell durch eine Erhöhung der Bildaufnahmezeit ausgleichen, was jedoch einerseits den Bildaufbau verlangsamt und andererseits zu einer höheren Belastung der Zellen führt, weswegen eine kurze Bildaufnahmezeit trotz der damit verbundenen Nachteile anzustreben ist.

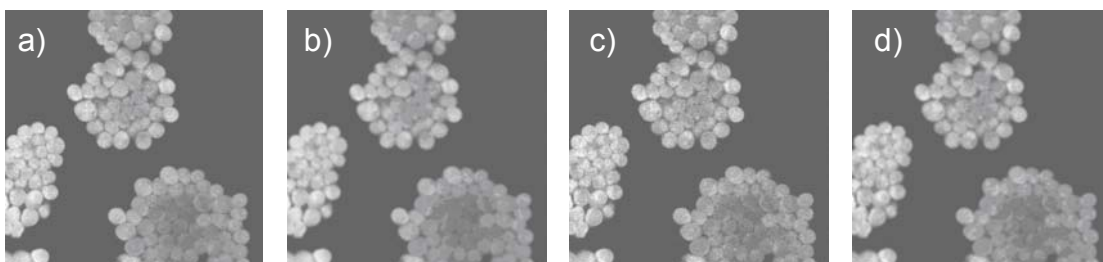


Abb. 41: Beispiel für ungefilterte und gefilterte Fluoreszenzdarstellung. a) und c) ungefilterte Intensitätsverteilung, b) und d) gefilterte Intensitätsverteilung. a) und b) Intensitätswerte der Fluoreszenzemission zwischen 565 nm und 595 nm; c) und d) Intensitätswerte der Fluoreszenzemission zwischen 605 nm und 625 nm.

Anschließend wurde für jedes Pixel das Verhältnis der Intensitäten ermittelt (Abb. 42).

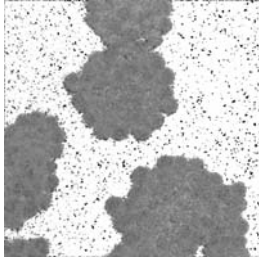


Abb. 42: Beispiel für das Verhältnis der Intensitäten der Fluoreszenzkanäle. Die verwendete Formel:

$$I = \frac{I_{565-595}}{I_{605-625}} * 255$$

mit $I_{565-595}$ = Intensitätswerte der Fluoreszenz-emission zwischen 565 nm und 595 nm; $I_{605-625}$ = Intensitätswerte der Fluoreszenzemission zwischen 605 nm und 625 nm; der Multiplikationsfaktor dient der Darstellung des Ergebnisses im Zahlenraum von 0 bis 255.

Damit die Unterschiede deutlicher sichtbar wurden, wurden den einzelnen pH-Werten nun Farbwerte zugeordnet (Abb. 43). Im folgenden Text werden nur die Überlagerungsbilder, die Fluoreszenzkanäle und die farblich nachbearbeitete pH-Darstellung gezeigt.

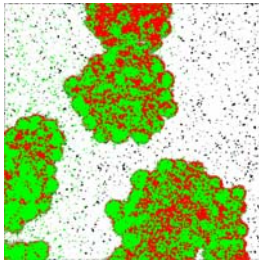


Abb. 43: Beispiel für eine relative pH-Wert-Darstellung. Den gemäß Abb. 42 errechneten Intensitätswerten werden Farbwerte zugeordnet; hierzu wurde eine *Lookup*-Tabelle für die Graubilder erstellt, in der niedrige pH-Werte mit roter Farbe, neutrale pH-Werte in grün und hohe pH-Werte in blau dargestellt werden.

3. 2. 3. Einfluß der optischen Pinzette auf AR42J-Zellen

Zunahme von Zellschäden im Beobachtungsverlauf

Dazu wurde zunächst geprüft, wie die Zellen auf den notwendigen Aufnahme-prozeß reagieren, der aus einer Übersichtsaufnahme vor Beginn der Verschiebung, einer Zeitserie mit dem eigentlichen Eingriff sowie einer Übersichtsaufnahme nach Beendigung der Zeitserie bestand. Dabei konnte eine leichte Veränderung der Zellgestalt während der Zeitserie beobachtet werden. Die Verformung der Zellgestalt geht dabei einher mit einer Verschiebung der subzellulären Bestandteile, weswegen letztere im Lauf der Zeitserie teilweise aus der sichtbaren Ebene verschwinden oder neu auftauchen. Diese Bewegungen werden nicht von pH-Wert-Reaktionen im Zytoplasma begleitet.

Im Lauf der Aufnahme einer Zeitserie, wie sie für Beobachtungen eingesetzt wurde, kam es zu weiteren Zellschäden (Abb. 44). Von den mit BCECF-AM gefärbten Zellen traten bei 24 % im Verlauf der Zeitserie Zellschäden auf. Nach einer Anfärbung mit cSNARF-AM wurde eine Schädigung bei 8 % der Zellen beobachtet; allerdings war für 12 % der Zellen der Zellzustand nicht eindeutig.

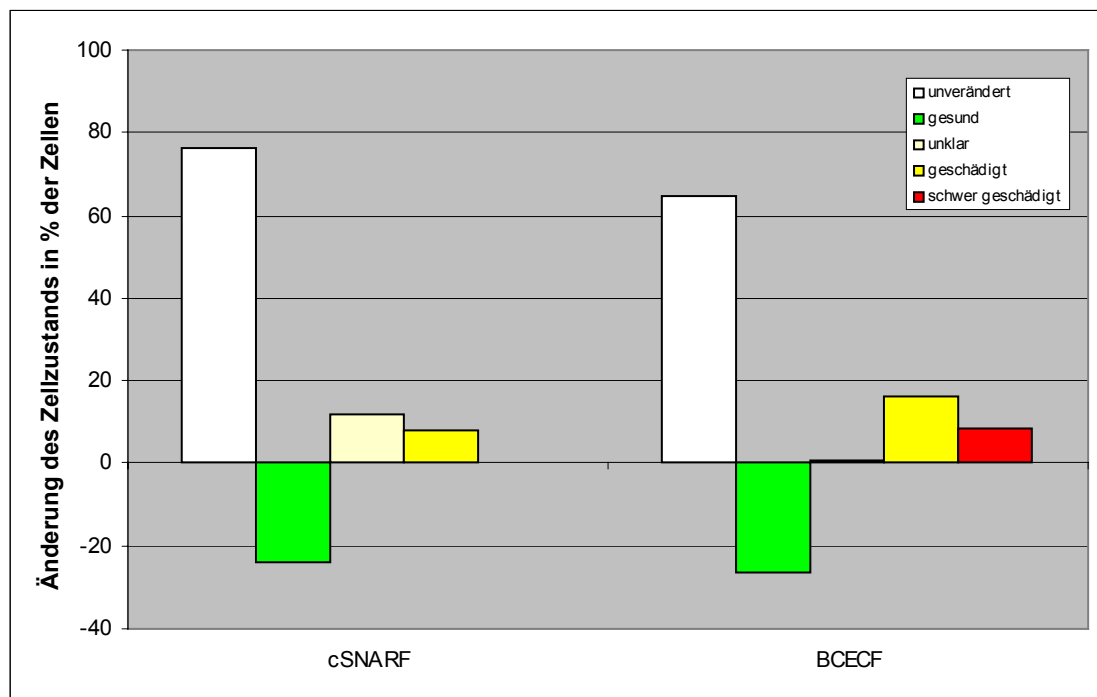


Abb. 44: Zellschäden durch den Aufnahme-prozeß während der Mikromanipulation.

Die relative Zunahme geschädigter Zellen ist mit positiven Werten, die relative Abnahme gesunder Zellen mit negativen Werten dargestellt. Die Zahl gesunder Zellen nimmt auch ohne Belastung durch die optische Pinzette während der Aufnahme ab, die Zahl geschädigter Zellen zu. Zu den Kriterien für den Zellzustand siehe S. 52.

Wurde die optische Pinzette zugeschaltet, jedoch kein Vesikel in der Zelle bewegt, nahm die Zahl der Zellschäden deutlich zu (Abb. 45). Wiederum war zu beobachten, daß mit BCECF-AM gefärbte Zellen empfindlicher reagierten als solche, die mit cSNARF-AM gefärbt waren. Sowohl bei geringer (135 pN) wie bei höherer (484 pN) Pinzettenkraft blieb nur ein Drittel der mit BCECF-AM gefärbten Zellen in bezug auf den Zellzustand unverändert.

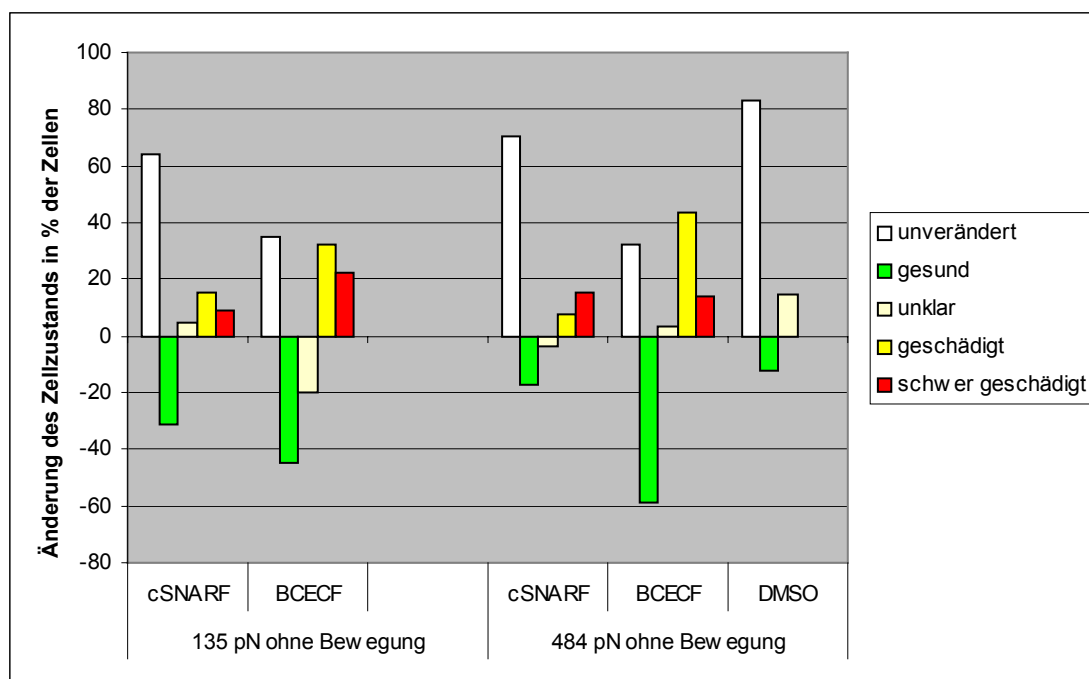


Abb. 45: Zellschäden durch die Bestrahlung mit der optischen Pinzette.

Die relative Zunahme geschädigter Zellen ist mit positiven Werten, die relative Abnahme gesunder Zellen mit negativen Werten dargestellt. Die Zahl gesunder Zellen nimmt während der Aufnahme ab, die Zahl geschädigter Zellen zu. Zu den Kriterien für den Zellzustand siehe S. 52.

Zellschäden durch die Bewegung eines zymogenen Granulums

Wurde ein Vesikel in der Zelle bewegt, nahmen die Zellschäden auch bei den mit cSNARF-AM gefärbten Zellen zu (Abb. 46). Dabei war eine Bewegung mit geringerer Pinzettenkraft (135 pN) für den Zellzustand schädlicher als der Einsatz einer höheren Pinzettenkraft (484 pN).

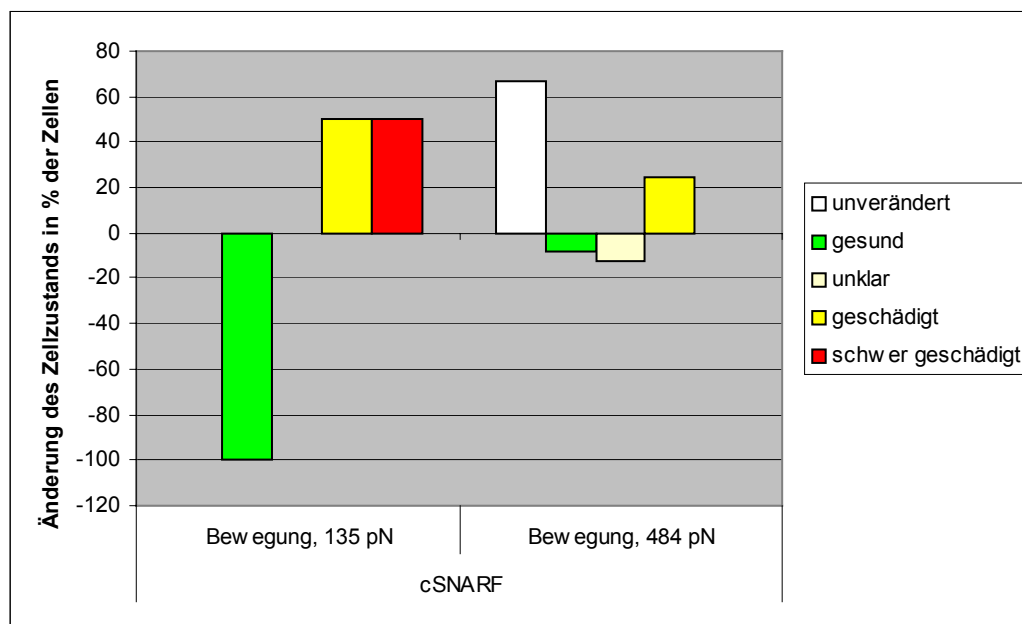


Abb. 46: Zunahme der Zellschäden bei der Bewegung von zymogenen Granula durch die optische Pinzette. Die relative Zunahme geschädigter Zellen ist mit positiven Werten, die relative Abnahme gesunder Zellen mit negativen Werten dargestellt. Zu den Kriterien für den Zellzustand siehe S. 52.

AR42J-Zellen zeigten auf die Bestrahlung mit der optischen Pinzette teilweise kaum, teilweise sehr deutliche Reaktionen.

Bei längerdauernder und intensiver Bestrahlung mit der optischen Pinzette (Pinzettenkraft 1200 pN) kann der pH-Wert des unmittelbar an das bewegte Granulum angrenzende Zytoplasma in bestimmten Regionen eine heftige Reaktion auf den Eingriff mit der optischen Pinzette zeigen; jedoch findet sich eine solche Reaktion auch in fern von dem Granulum liegenden Bereichen.

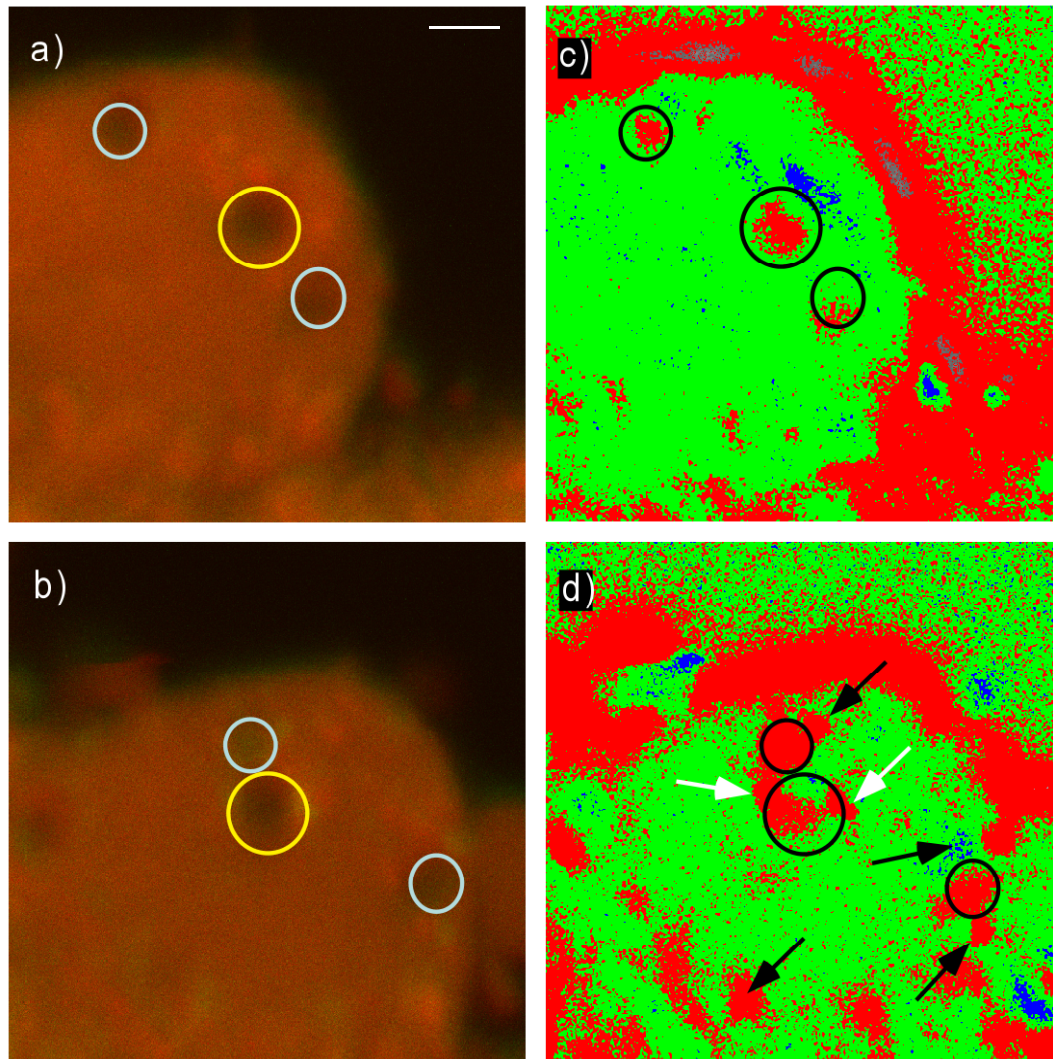


Abb. 47: pH-Wert-Veränderungen in einer AR42J-Zelle nach Verschiebung eines Vesikels mit der optischen Pinzette. a) Zelle vor der Verschiebung des Vesikels (großer weißer Kreis); b) Zelle nach der Verschiebung; c) pH-Wert-Verhältnisse vor der Verschiebung des Vesikels; d) pH-Wert-Verhältnisse nach der Verschiebung; das Zytoplasma in der Nähe des Vesikels (weißer Kreis) zeigt ebenso eine Reaktion (weißer Pfeil) wie das zellmembrannähe Zytoplasma (schwarze Pfeile).

AR42J-Zellen wurden auf Deckgläschen angezogen und zum Versuch in eine Temperierkammer überführt. Die Anfärbung erfolgte in HEPES-gepuffertem RPMI1640 mit cSNARF-AM (Endkonz. 5µg/ml).

Balken: 2 µm

Die Stärke der Reaktion war unterschiedlich ausgeprägt; Abb. 47 zeigt eine Zelle mit einer sehr starken Reaktion. In anderen Fällen waren die beobachteten pH-Wert-Veränderungen geringer.

In der Nähe der Membran des zymogenen Granulums fand eine Ansäuerung des Zytoplasmas statt. Dies kann theoretisch sowohl an einer Beschädigung der Membran liegen, so daß Protonen ihrem Konzentrationsgradienten folgend ausströmen, oder auf eine Aktivierung von Protonenpumpen hindeuten. Das Vesikel ändert seinen pH-Wert jedoch nicht, wie bei einer Membranbeschädigung zu erwarten wäre. Im Bereich der Zellmembran findet ebenfalls eine Ansäuerung statt; da dieses jedoch ebenso wie das Zellkulturmedium

einen pH-Wert von etwa 7,2 hat, kann hier kein Konzentrationsgradient die treibende Kraft sein. Die Zellreaktionen, die bei der Verlegung von Vesikeln über größere Distanzen beobachtet wurden, sind als unspezifische Reaktionen einzustufen, da sie nicht nur in der Nähe des bewegten Vesikels eintreten. Bei hoher Pinzettenkraft kann aufgrund der Absorption des Lasers eine Erhitzung des Zytoplasmas eintreten, die solche unspezifischen Schäden hervorruft.

Bewegung zymogener Granula ohne Zellschäden

Eine Reduktion der Photonenbelastung führt dazu, daß die Verlegung eines zymogenen Granulums keine Veränderung des zytoplasmatischen pH-Wertes zur Folge hat.

Die auf den beiden folgenden Seiten gezeigten Aufnahmen (Abb. 48 und Abb. 49) zeigen in der linken Spalte sechs Einzelbilder aus einer Serie von jeweils 60 Bildern, die über einen Zeitraum von einer Minute aufgenommen wurden. Die optische Pinzette war für etwa 30 s zugeschaltet. Das bewegte zymogene Granulum ist mit einem gelben Kreis markiert, die türkisfarbenen Kreise markieren andere Granula als örtliche Bezugspunkte; die roten Linien im jeweils ersten Einzelbild markieren Zellgrenzen. Zur Orientierung in der pH-Wert-Darstellung wurden die Markierungen in schwarz über die pH-Wert-Darstellung gelegt. In der rechten Spalte ist oben jeweils eine dreidimensionale Darstellung zu Beginn, unten eine entsprechende nach Ende des Bewegungsversuchs gezeigt.

In beiden Fällen ist es im Rahmen der Verlegung nicht zu deutlichen pH-Wert-Veränderungen gekommen, und es waren keine Schäden an den betroffenen Zellen oder Nachbarzellen sichtbar.

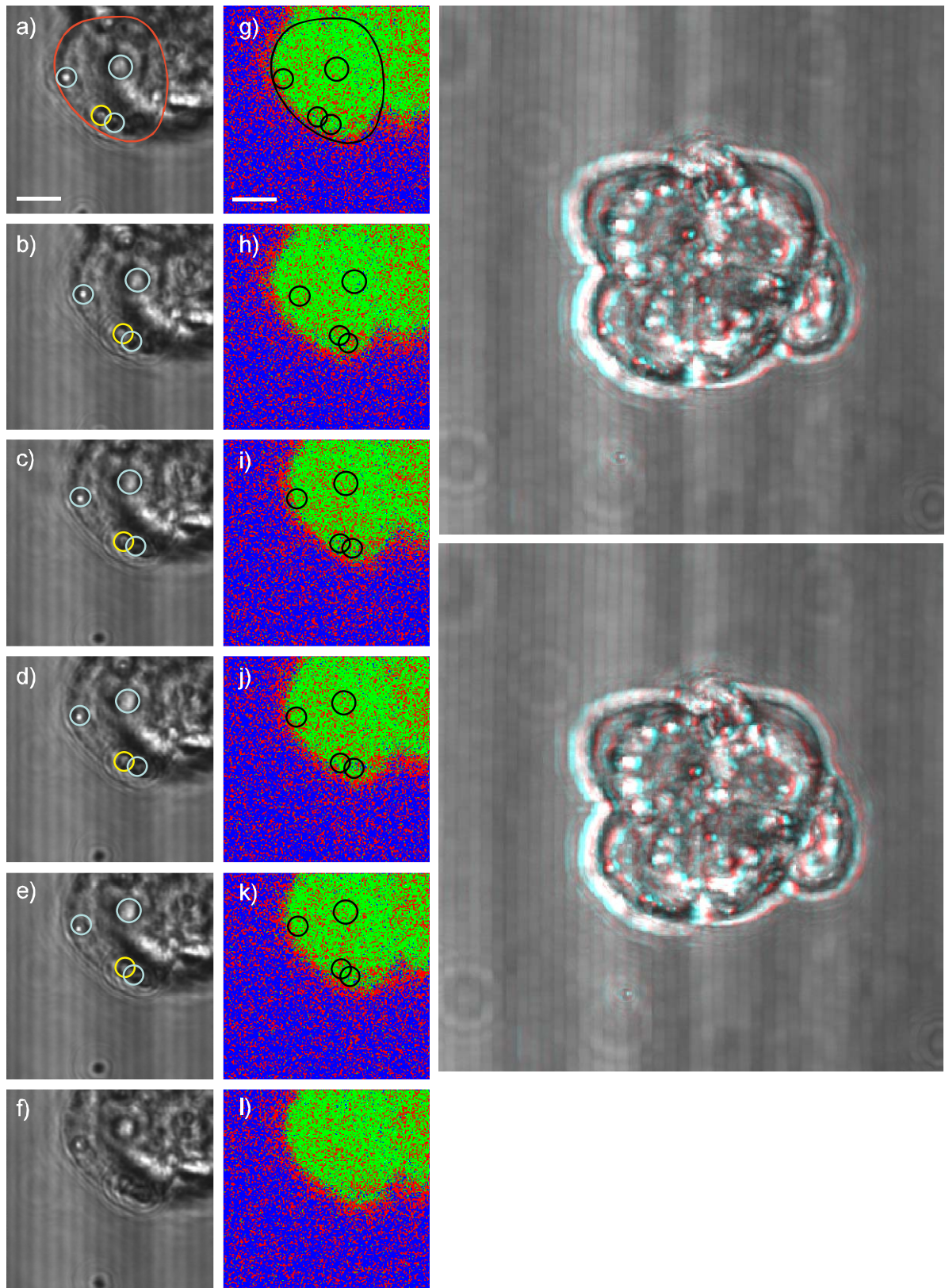


Abb. 48: Verlegen zymogener Granula in AR42J-Zellen.

a) – f) Transmissionaufnahmen, h) – l) pH-Wert-Darstellung, m) dreidimensionale Darstellung der Zellgruppe vor Beginn des Versuchs, n) dreidimensionale Darstellung der Zellgruppe nach Beginn des Versuchs. Balken: 5 μm .

Die Lage der betroffenen Zelle ist in Bild a) mit einer roten Linie gekennzeichnet, die Position des verlegten Granulums ist in der Transmissiondarstellung gelb markiert, weitere zymogene Granula in türkis. In der pH-Wert-Darstellung sind die Umrisse in schwarz wiedergegeben.

(Eine Brille zum Betrachten der dreidimensionalen Bilder befindet sich auf S. 91.)

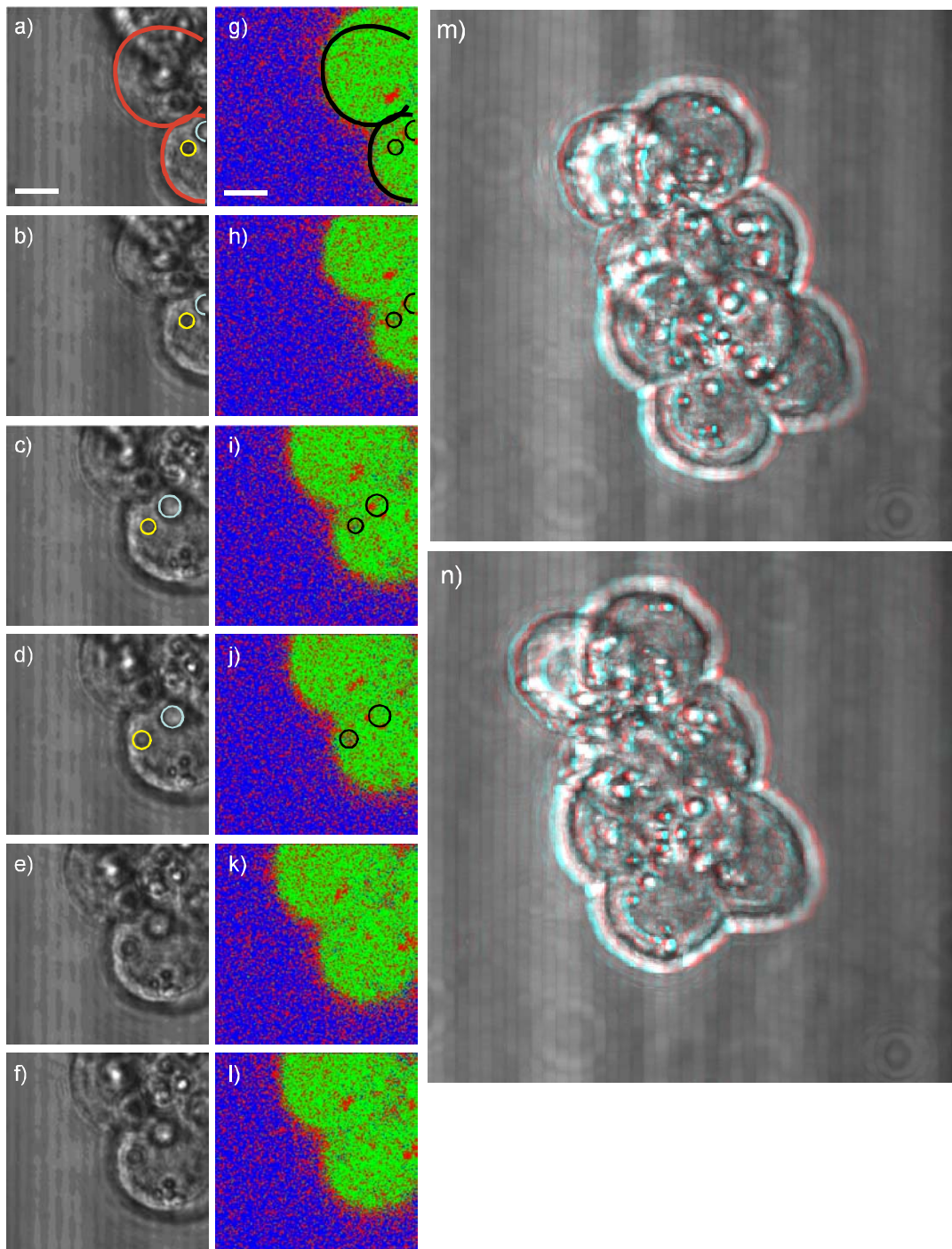


Abb. 49: Verlegen zymogener Granula in AR42J-Zellen.

a) – f) Transmissionsaufnahmen, h) – l) pH-Wert-Darstellung, m) dreidimensionale Darstellung der Zellgruppe vor Beginn des Versuchs, n) dreidimensionale Darstellung der Zellgruppe nach Beginn des Versuchs. Balken: 5 μ m.

Die Lage der betroffenen Zelle ist in Bild a) mit einer roten Linie gekennzeichnet, die Position des verlegten Granulums ist in der Transmissionsdarstellung gelb markiert, weitere zymogene Granula in türkis. In der pH-Wert-Darstellung sind die Umrisse in schwarz wiedergegeben.

(Eine Brille zum Betrachten der dreidimensionalen Bilder befindet sich auf S. 91.)

Die pH-Wert-Effekte im Zytoplasma gingen mit Zellschäden einher, während bei einer Bewegung ohne zellschädigende Wirkung auch keine pH-Wert-Veränderungen im Zytoplasma oder dem bewegten Granulum festgestellt werden konnte. Die Dislokation selbst hat also keine Auswirkung auf den pH-Wert des zymogenen Granulums, und eine Dislokation führt nicht zu einem Verlust der Membranintegrität, auf die eine vorzeitige Umsetzung der gespeicherten Enzymvorstufen in aktive Enzyme folgen könnte.

4. Diskussion

Mit der hier vorgestellten Apparatur besteht nunmehr die Möglichkeit, optische Mikromanipulation vom Einzelmolekül bis hin zu dicken Zellaggregaten an ein und demselben Mikroskop zu betreiben. Das könnte sich bei zukünftigen Experimenten als vorteilhaft erweisen: Es ermöglicht vergleichende Untersuchungen an zellulären und gleichermaßen an rekonstituierten Systemen. Diese Vergleiche sind notwendig, da das rekonstituierte System sich wegen seiner Reduktion auf die wichtigsten Elemente durch bessere Beherrschbarkeit von Einflußfaktoren auszeichnet. Andererseits ist aber eben in dieser Reduktion die Situation in der lebenden Zelle nur unzureichend wiedergegeben. Wenn die zu untersuchende Zelle ihre volle Funktionalität erst im Zellverband erreicht, ist der Rückgriff auf eine Apparatur, die sowohl Informationen über „flache“ (der normalen Mikroskopie zugängliche) wie auch „dicke“ (und für normale Mikroskopie damit ungeeignete) Präparate erlaubt, unumgänglich. Um Sicherheit zu haben, daß nicht Unterschiede in der fokussierenden oder der abbildenden Optik die Meßergebnisse beeinflussen, sollten die für die „flachen“ Präparate möglichen Techniken auch in genau dieser Apparatur verwendbar sein. Müssen zwei verschiedene Mikroskope verwendet werden, können die Ergebnisse nur durch sorgfältige Eichung der verwendeten Optiken gut vergleichbar gemacht und in die Interpretation mit einbezogen werden. Definitiv effizienter ist die Verwendung desselben Geräts in verschiedenen Betriebsarten. Im Rahmen dieser Arbeit wäre zum Beispiel bei den Experimenten zum kinesingetriebenen Transport im rekonstituierten System auch die Verwendung eines konventionellen Mikroskops möglich gewesen, da dort die Objekte „flach“ sind. Der Vergleich zwischen rekonstituiertem und zellulärem System bezüglich der Beeinträchtigung des Kinesins durch den Einsatz der optischen Pinzette sowie der qualitative Vergleich der zur Bewegung benötigten Kräfte konnte durch den Einsatz derselben Apparatur qualitativ geführt werden. Zu einem quantitativen Vergleich durch Eichung der optischen Werkzeuge, der bei einer Verwendung zweier Mikroskope notwendig gewesen wäre, fehlte im Rahmen dieser Arbeit die Zeit. Ein direkter Vergleich der Effekte von anderen Einflußfaktoren wie Pharmazeutika auf das rekonstituierte und das zelluläre System wäre in einer Apparatur wie der vorgestellten ebenfalls möglich, ebenso wie Versuche mit der optischen Pinzette an einzelnen Molekülen, beispielsweise DNA (Greulich 1999).

Da Laser-Raster-Mikroskopie neben ihren speziellen Vorteilen auch den Nachteil hat, langsam zu sein, ist die Verwendung einer optischen Pinzette beim Abbilden bewegter

Proben unerlässlich, wie an den Chloroplasten von *Egeria densa* gezeigt werden konnte. Die automatisierte Bewegung der Einkopplung kann sogar in den Fällen eingesetzt werden, in denen keine Kompensation der Objektivbewegung notwendig ist, sondern lediglich eine Trennung zwischen der Manipulations- und der Aufnahmeebene erwünscht ist, wenn also gezielt nach ausgelösten Effekten in einer bestimmten Distanz zum Beeinflussungspunkt gesucht wird. Eine solche Trennung ist durch manuelles Bewegen eines Bauteils der Einkopplung jederzeit machbar, aber durch Software-Steuerung bequemer und reproduzierbar möglich.

Die untersuchten Pflanzenzellen wurden durch den Einsatz der optischen Pinzette nicht sichtbar geschädigt und eine Anfärbung war nicht erforderlich, da Chlorophyll bei der Anregung mit 488 nm eine starke Autofluoreszenz zeigt. Für die Untersuchung der pH-Wert-Reaktion in AR42J-Zellen dagegen war eine Anfärbung mit einem pH-sensitiven Farbstoff erforderlich. Im Rahmen der Untersuchung stellte sich heraus, daß die Sensitivität von AR42J-Zellen gegenüber einer Photonenbelastung teilweise vom Farbstoff abhängig ist. Bei der Wahl eines wenig zellbelastenden Farbstoffs führt erst ein sehr langer und „kraftvoller“ Einsatz zu erkennbaren Zellschäden und meßbaren pH-Wert-Veränderungen im Zytoplasma. Dieser Befund ist konsistent mit der bekannten Tatsache, daß Nd:YAG-Laser geringe Wechselwirkung mit biologischer Materie zeigen und daher auch eine vergleichsweise hohe Eindringtiefe in Gewebe haben (Greulich 1999).

Wenn die Zelle zugleich durch das Verlegen eines zymogenen Granulums belastet wird, nimmt die Wahrscheinlichkeit für Zellschäden zu, aber das bewegte Granulum verliert nicht seine Membranintegrität. Die Vermutung, daß zymogene Granula, die an eine falsche subzelluläre Position geraten sind, aufgrund eines Versagens zelleigener Schutzmechanismen einen Selbstverdau der Zelle auslösen könnten, ist also falsch: AR42J-Zellen tolerieren die Dislokation von zymogenen Granula.

AR42J-Zellen wachsen als Aggregate, die nach längerer Wachstumszeit aus mehreren hundert Zellen bestehen können. Der Verband ist dabei sehr viel dichter als beispielsweise bei den (vergleichend bezüglich ihrer Anfärbung mit BCECF-AM untersuchten) NK92-Zellen, deren Aggregate bereits bei leichtem mechanischen Streß zerfallen. AR42J-Aggregate ähneln darin mehr „richtigen“ Geweben, bei denen der Zell-Zell-Kontakt ja oft sehr fest ist. Aus diesem festen Kontakt und der Dreidimensionalität der Aggregate erwächst ein Problem, das sich bei lockeren Aggregaten einerseits und bei in nur einer Schicht wachsenden Zellen mit engen Zell-Zell-Kontakten andererseits nicht stellt: Bei der Anfärbung der Zellen durch einen Farbstoff, der dem Medium zugegeben wird, ist die

Farbstoffaufnahme sehr unterschiedlich, je nach Kontakt der Zellen zum Medium. So erweckt die Anfärbung mit BCECF-AM zwar den Eindruck von hohlen Strukturen, dies beruht aber nur auf einer ungleichmäßigen Anfärbung: Aufgrund der effizienten Aufnahme und Umsetzung in den direkt ans Medium angrenzenden Zellen bleibt die Konzentration in den inneren Zellen unterhalb der detektierbaren Grenze. Farbstoffe, die frei diffundieren können oder langsamer umgesetzt werden und daher gleichmäßiger in das Gewebe eindringen, färben auch innenliegende Zellen detektierbar an, wobei je nach Farbstoff die Anfärbung nur sehr langsam erfolgt. Nach den vorliegenden Untersuchungen kann aber beispielsweise ein Wachstum von AR42J als Hohlkörper, wie im Datenblatt von ECACC angegeben, nicht belegt werden, wenngleich nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Angaben der ECACC für bestimmte Wachstumsbedingungen zutreffen.

Bei assemblierten Geweben aus mehreren Zelltypen kann dieses Problem noch gravierender als bei den AR42J-Aggregaten werden, da die unterschiedlichen Zelltypen einen Farbstoff eventuell unterschiedlich aufnehmen oder umsetzen. Dieser Effekt ist erwünscht, wenn es darum geht, den Zelltyp individueller Zellen zu ermitteln. Wenn aber eine gleichmäßige Anfärbung für den Versuch notwendig ist und die Zugänglichkeit der Zellen zum Medium bereits einen Einfluß auf die Anfärbung hat, können leicht Interpretationsartefakte auftreten.

Die Auswahl der Farbstoffe für eine Gewebeanfärbung kann daher nicht einfach nach denselben Kriterien vorgenommen werden wie für Untersuchungen an lockeren Aggregaten oder an Zellen, die als einzellige Schicht (Monolayer) wachsen. Was für letztere von Vorteil ist, beispielsweise eine effiziente Aufnahme und eine rasche Umsetzung von z. B. Azetoxymethylestern, kann für Aggregate und Gewebe nachteilig sein, da der Farbstoff einen Teil der Zellen nicht erreicht. Zu solchen Anfärbungsstudien, die zum Beispiel auch in den in der Einleitung dieser Arbeit genannten Studien zur Systembiologie hilfreich sein können, müßten entweder Zellkulturlinien gefunden werden, die als Mischkultur untereinander enge Zell-Zell-Kontakte ausbilden und dreidimensional wachsen, oder *in vivo* gewachsene Gewebe verwendet werden. Mit geeigneten Farbstoffen ist es dann möglich, Reaktionen entfernt liegender Zellen auf eine punktuelle Mikromanipulation zu studieren.

Dabei ist die Mikromanipulation nicht auf das Bewegen von Organellen eingeschränkt. Fokussierte Laser bieten vielfältige Möglichkeiten: Sei es das optische Skalpell, das einzelne Zellbestandteile eliminieren kann, sei es das photolytische Spalten von photosensitiven Käfigverbindungen, um Zellreaktionen auszulösen. Soweit keine

Trennung von Bildaufnahmebewegung und Bearbeitungslaser notwendig ist, genügt die Einkopplung dieser optischen Werkzeuge in ein Laser-Raster-Mikroskop wie in ein konventionelles Mikroskop; andernfalls läßt sich eine Kompensation einrichten, wie in dieser Arbeit gezeigt. Die Kombination von Laser-Raster-Mikroskopen mit optischen Werkzeugen kann somit helfen, Mikromanipulation und Systembiologie zu verbinden.

5. Literaturverzeichnis

American Type Cell Collection (ATCC): www.atcc.org

Ashkin, A.: Acceleration and trapping of particles by radiation pressure.
Phys. Rev. Lett. 24: 156 – 159 (1970)

Ashkin, A.: Forces of a Single-Beam Gradient Trap on a Dielectric Sphere in the Ray Optics Regime.
Biophys. J. 61: 569-582 (1992)

Ashkin, A., Dziedzic, J. M.: Internal cell manipulation using infrared laser traps.
Proc. Natl. Acad. Sci. : 7914 – 7918 (1987)

Ashkin, A., Dziedzic, J. M., Bjorkholm, J. E., Chu, S.: Observation of a single beam gradient trap for dielectric particles.
Science 235, 1517 – 1520 (1986)

Ashkin, A., Schütze, K., Dziedzic, J. M, Euteneuer, U., Schliwa, M.: Force generation of organelle transport measured in vivo by an infrared laser trap.
Nature 348: 346 – 348 (1990)

Ayyapan, K.R. et al: Structural reorganization of the rough endoplasmic reticulum without size expansion accounts for dexamethasone-induced secretory activity in AR42J cells.
J. Cell Sci. 105: 333 - 345 (1993)

Badoual, M., Jülicher, F., Prost, J.: Bidirectional cooperative motion of molecular motors.
Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 6696 - 6701 (2002)

Beeg, J.: Vektorielle Bewegung des Motorproteins Kinesin und richtungsorientierter Transport artifizieller Lasten
Diplomarbeit, FH Jena. (2002)

Bendayan M.: Morphometrical and immunozytochemical characterization of peri-insular and tele-insular acinar cells in the rat pancreas.

Eur. J. Cell Biol. 36: 263 - 268 (1985)

Block, S. M., Goldstein L. S., Schnapp, B. J.: Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers.

Nature 348: 348 – 352 (1990)

Campos-Toimil, M., Edwardson, J. M., Thomas, P.: Real-time studies of zymogen granule exocytosis in intact rat pancreatic acinar cells.

J. Physiol. 582: 371 – 3236 (2000)

Case, R. B., Pierce, D. W., Hom-Booher, N., Hart, C.L., Vale, R.D.:

Cell 90: 959 - 966 (1997)

Christophe, J.: Pancreatic tumoral cell line AR42J: an amphicine model.

Am. J. Physiol. 266: G963 - G971 (1994)

Chu, S.: Laser manipulation of atoms and particles.

Science 253: 861 – 866. (1991)

Czihak, G., Langer, H., Ziegler, H.: Biologie.

Springer Lehrbuch (1992)

De Lisle, R.C., Williams, J.A.: Zymogen granule acidity is not required for stimulated pancreatic protein secretion.

Am. J. Physiol. 253: G711 - G719 (1987)

Duke, T.: Push or pull? Teams of motor proteins have it both ways.

Proc. Natl. Acad. Sci. 99: 6521-6523. (2002)

Egerbacher, M., Böck, P.: Morphology of the pancreatic duct system in mammals

Microsc. Res. Techn. 37: 407 - 417 (1997)

European Collection of Cell Cultures (ECACC): www.ecacc.org.uk

Freedman, S. D., Kern, H. F., Scheele, G. A.: Acinar lumen pH regulates endocytosis, but not exocytosis, at the apical plasma membrane of pancreatic acinar cells.

Eur. J. Cell Biol. 75: 153-162 (1998)

Greulich, K. O.: *Micromanipulation by Light in Biology and Medicine.*

Birkhäuser Verlag, Basel (1999)

Greulich, K. O., Pilarczyk, G., Meyer zu Hörste, G., Schäfer, B., Uhl, V., Monajembashi, S.: Micromanipulation by laser microbeam and optical tweezers: from plant to cell biology

J. Microscopy 198: 182 – 187 (2000)

Gross, S. P., Welte, M. A., Block, S. M., Wieschaus, E. F.: Coordination of opposite-polarity microtubule motors.

J. Cell Biol. 156: 715 - 724 (2002)

Guthrie, J., Williams, J.A., Logsdon, C.D.: Growth and Differentiation of Pancreatic Acinar Cells: Independent Effects of Glucocorticoids on AR42J cells.

Pancreas 6: 506 - 513 (1991)

Hand, A. R.: The secretory process of salivary glands and pancreas.

In: Riva, A., Motta, P.M. (Eds.): *Ultrastructure of the Extraparietal Glands of the Digestive Tract.* Kluwer Academic Publishers (1990)

Hoffmann, A., Meyer zu Hörste, G., Pilarczyk, G., Monajembashi, S., Uhl, V., Greulich, K. O.: Optical tweezers for confocal microscopy.

Appl. Phys. B 71: 747 – 753 (2000)

Hentschel, E., Wagner, G.: *Zoologisches Wörterbuch.*

Gustav Fischer Verlag (1986)

Howard, J.: *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton.*

Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. (2001)

Iwanij, V., Jamieson, J. D.: Biochemical Analysis of Secretory Proteins Synthesized by Normal Rat Pancreas and by Pancreatic Acinar Tumor Cells.

J. Cell Biol. 95: 734 – 741 (1982)

Jamieson, J. D., Palade, G. E.: Synthesis, intracellular transport, and discharge of secretory proteins in stimulated pancreatic acinar cells.

J. Cell Biol. 50: 135 – 158 (1971)

Kuo, S. C, Gelles, J., Steuer, E., Sheetz, M. P.: A model for kinesin movement from nanometer-level movements of kinesin and cytoplasmatic dynein and force measurements.

J. Cell Sci. Supp. 14: 135 – 138 (1991)

Kusnetsov, S. A., Gelfand, V. I.: Bovine brain kinesin is a microtubule-activated ATPase.

Proc. Natl. Acad. Sci. 83: 8530 - 8534 (1986)

Lippert, Lehrbuch der Anatomie.

Urban und Schwarzenberg Verlag München, Wien, Baltimore (1996)

Lippincot-Schwartz, J.: Cytoskeletal proteins and Golgi dynamics.

Curr. Opin. Cell Biol. 10: 52 – 59 (1998)

Logdson, C.D., Moessner, J., Williams, J.A., Goldfine, I.D.: Glucocorticoids increase amylase mRNA levels, sretory granules, and sretion in pancreatic acinar AR42J cells.

J. Cell. Biol 100: 1200-1208 (1985)

Longnecker, D.S. et al: Transplantation of azaserine-induced carcinomas of pancreas in rats. Cancer Letters 7: 197 - 202 (1979)

Loo, B.W. jr., Meyer-Ilse, W., Rothman, S.S.: Automatic image acquisition, calibration and montage assembly for biological X-ray microscopy.

J. Microsc. 197 Pt 2: 185 - 201 (2000)

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.

J. Biol. Chem. 193:265-275 (1951)

Monajembashi, S., Hoyer, C., Greulich, K.O.: Laser microbeams and optical tweezers convert the microscope into a versatile microtool

Microscopy and Analysis 97: 7 - 9 (1997)

Motta, P.M, Macchiarelli, G., Nottola, S.A., Correr, S.: Histology of the exocrine pancreas

Microsc. Res. Techn. 37: 384 - 398 (1997)

Muallem, S., Loessberg, P.A.: Intracellular pH-regulatory mechanisms in pancreatic acinar cells.

J. Biol. Chem. 265: 12806-12819 (1990)

Nemoto T, Kimura R, Ito K, Tachikawa A, Miyashita Y, Iino M, Kasai H.: Sequential-replenishment mechanism of exocytosis in pancreatic Azini.

Nat. Cell Biol.3: 253-258. (2001)

Orci, L., Ravazzola, M., Anderson, R. G. W.: The condensing vacuole is more acidic than the mature vesicle

Nature 326: 77-79 (1987)

Paddock, S. W.: Confocal Laser Scanning Microscopy.

Biotechniques 27: 992 - 1004 (1994)

Palade, G: Intracellular aspects of process of protein synthesis.

Science 198: 347 - 358 (1975)

Parekh, A. B.: Calcium signaling and acute pancreatitis: Specific response to a promiscuous messenger.

Proc. Natl. Acad. Sci 97: 12933 -12934 (2000)

Posthuma, G, Slot, J. W., Geuze, H. J.: A quantitative immuno-electronmicroscopic study of amylase and chymotrypsinogen in peri- and tele-insular cells of the rat exocrine pancreas.

J Histochem. Zytochem. 34: 203-207 (1986)

Rosewicz, S., Vogt, D., Harth, N., Grund, C., Franke, W. W., Ruppert, S., Schweitzer, E., Riecken, E. O., Wiedenmann, B.: An amphicrine pancreatic cell line: AR42J cells combine exocrine and neuroendocrine properties.

Eur. J. Cell Biol. 59: 80 – 91 (1992)

Schneckenburger, H., Hendinger, A., Sailer, R., Gschwend, M. H., Strauss, W. S., Bauer, M., Schütze, K.: Cell viability in optical tweezers: high power red laser diode versus Nd:YAG laser.

J. Biomed. Opt. 5: 40 - 44 (2000)

Silbernagl, S., Lang, F.: Taschenatlas der Pathophysiologie.

Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1998)

Shelanski, M. L., Gaskin, F., Cantor, C. R.: Microtubule assembly in the absence of added nucleotides.

Proc. Natl. Acad. Sci. 70: 756 - 786 (1973)

Stracke, R., Böhm, K. J., Burgold, J., Schacht, H.-J., Unger, E.: Physical and technical parameters determining the function of a kinesin-based cell-free motor system.

Nanotechnology 11: 52 - 56. (2000)

Svoboda, K., Block, S. M.: Biological applications of optical forces.

Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 247 – 285 (1994 *a*)

Svoboda, K., Block, S. M.: Force and velocity measured for single kinesin molecules.

Cell. 77: 773 - 784. (1994 *b*)

Suzuki, S., Kanai, S., Miyasaka, K., Jimi, A., Funakoshi, A.: Regulation of pancreatic secretion by vagal nerve during short-term duct occlusion in conscious rats.

Pancreas. 20: 94-101. (2000)

Titievsky, A.V., Takeo, T., Tepikin, A. V., Petersen, O. H.: Decrease of acidity inside zymogen granules inhibits acetylcholine- or inositol triphosphate-evoked Zytosolic Ca^{2+} spiking in pancreatic acinar cells.

Pflugers Arch. 432:938-40. 1996

Ushiki, T., Watanabe, S.: Distribution and ultrastructure of the autonomic nerves in the mouse pancreas

Microsc. Res. Techn. 37: 399 - 406 (1997)

Wallrapp, C., Hähnel, S., Sorio, C., Scarpa, A., Gress, T. M.: Genomic RDA for the identification of chromosomal aberrations in pancreatic cancer: merits and drawbacks.

Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S.-Y., Kirschner M. W.: A protein factor essential for microtubule assembly.

Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 1858-1862 (1975)

6. Anhang

Rot-Grün-Brille

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen in referierten Fachzeitschriften

Optical tweezers for confocal microscopy

A. Hoffmann, G. Meyer zu Hörste, G. Pilarczyk, S. Monajembashi, V. Uhl, K. O. Greulich
Appl. Phys. B 71, 747 – 753 (2000)

Micromanipulation by laser microbeam and optical tweezers: from plant to cell biology

K. O. Greulich, G. Pilarczyk, G. Meyer zu Hörste, B. Schäfer, V. Uhl, S. Monajembashi
J. Microscopy 198, 182 – 187 (2000)

Tagungsbeiträge

Optical Tweezers in Laser Scanning Microscopy of the cell line AR42J.

G. Meyer zu Hörste, A. Hoffmann, S. Monajembashi, L. Wollweber, G. Pilarczyk, K.O. Greulich

Poster: 24th Annual Meeting of the German Society for Cell Biology, 26. - 30. March 2000, Karlsruhe, Germany

Optical Micromanipulation for Scanning Microscopy of Transparent Mammalian Cells.

G. Meyer zu Hörste, A. Hoffmann, S. Monajembashi, L. Wollweber, G. Pilarczyk, K.O. Greulich

Poster und Kurzvortrag: Annual Fall Meeting of the German Society for Molecular Biology, 1999, Hamburg, Germany

A Single Objective CLSM with Optical Tweezers: Development and Application with Pancreatic Acinar Cells.

A. Hoffmann, G. Meyer zu Hörste, G. Pilarczyk, S. Monajembashi, V. Uhl, L. Wollweber, K.O. Greulich

Poster: 3rd World Congress on Cellular and Molecular Biology, 8. - 13. Oct. 2000, Jena, Germany.

Wissenschaftlicher Werdegang

Persönliche Daten:

Name: Gabriele Meyer zu Hörste
Geburtsdatum und -ort: 26.07.1970, Kassel
Eltern: Fritz und Sabine Meyer zu Hörste
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung:

1976 – 1980: Meinhard-Grundschule Grebendorf (Hessen)
1980 – 1981: Steinhammer-Grundschule, Dortmund
1981 - 1989: Reinoldus-Gymnasium in Dortmund, Abschluß der Schule mit Abitur
1989 - 1992: Ruhr-Universität Bochum, Fach Biologie
1992 – 1998: Karl-Ruprechts-Universität Heidelberg, Fach Biologie
Abschluß des Studiums mit Diplom
(Diplomarbeit zum Thema: Einfluß von Aminosäuren auf das Wachstum
und die Physiologie von *Arabidopsis thaliana*)
seit 1998: Institut für molekulare Biotechnologie, Jena

Ehrenwörtliche Erklärung

Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.

Ich habe die vorliegende Dissertation selbst angefertigt und die von mir benutzten Hilfsmittel und Quellen in der Arbeit angegeben. Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten von mir erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Dissertation habe ich nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Ich habe weder diese noch eine andere Arbeit an einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Die Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, sind in der Danksagung aufgeführt.

Thesen zur Dissertation

- 1.) Mit der Kombination der Laser-Raster-Mikroskopie und der optischen Pinzette ist es möglich, die Auswirkungen einer berührungslosen Manipulation im Zellinnern sowohl in der Nähe wie in Distanz vom Manipulationsort zu untersuchen.
- 2.) Wenn die Rasterbewegung des Mikroskopobjektivs entlang der z-Achse durch ein verschiebbares optisches Element im Lichtweg der optischen Pinzette kompensiert wird, erlaubt die optische Pinzette, bewegte Objekte während der Aufnahmezeit festzuhalten, und erweitert damit die Möglichkeiten der Laser-Raster-Mikroskopie.
- 3.) Bei der Anfärbung von Zellaggregaten oder Geweben müssen die Farbstoffe auf ihre Eindringtiefe hin untersucht werden. Um Aussagen über die Morphologie von AR42J-Aggregaten treffen zu können, müssen die Ergebnisse verschiedener Farbstoffe verglichen werden.
- 4.) Bestimmte Farbstoffe färben nur den äußeren Zellsaum von AR42J-Aggregaten und erwecken damit den Eindruck, die Aggregate seien innen hohl; geeignete Färbemethoden beweisen die Existenz von Zellen im Inneren dieser Aggregate.
- 5.) Die Angabe der *European Collection of Cell Cultures* über die Wuchsform von AR42J-Zellen kann nicht bestätigt werden. AR42J-Aggregate wachsen unter den in der Arbeit vorliegenden Bedingungen nicht als Hohlkörper.
- 6.) AR42J-Aggregate eignen sich daher nicht als Modell für pankreatische Azini, können aber als Modell für feste Zellverbände dienen.
- 7.) Die Bewegung mit der optischen Pinzette führt nicht zu Schäden an einem zymogenen Granulum in einer AR42J-Zelle. Die pH-Werte des bewegten zymogenen Granulums und des umgebenden Zytoplasmas ändern sich nicht.

Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Karl Otto Greulich für die Unterstützung und Hilfestellungen sowie die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können,

Frau Dr. Shamci Monajembashi, Herrn Dr. Leo Wollweber und Herrn Dr. Götz Pilarczyk für ihre fachliche Beratung,

Frau Dipl.-Phys. Anja Hoffmann für gute Zusammenarbeit und Hilfe bei der technischen Realisierung der Kompensationsvorrichtung;

Frau Dipl.-Ing. (FH) Janina Beeg für den regen Gedankenaustausch und die Hilfe bei den Versuchen an kinesinbeschichteten Mikrokugeln auf Mikrotubuli,

Frau Bianca Lanick, Frau Sabine Hoffmann und Frau Helgard Gemeinhardt für die Unterstützung bei der Kultur von AR42J-Zellen,

allen Mitgliedern der Abteilungen *Einzelzell- und Einzelmolekültechniken* und *Molekulare Zytologie* des IMB Jena für eine erfreuliche Zusammenarbeit,

meinen Bekannten und Freunden für die vielen kleinen Hilfestellungen,

und meiner Familie.