

Histologi@

Einführung in die
Zytologie und Histologie

Begleitskript zum Kursus
Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie

Anatomische Anstalt der LMU München
Wintersemester 2015/16

Histologi@: Einführung in die Zytologie und Histologie

**Begleitskript zum Kursus
Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie**



München, WS 2015/2016

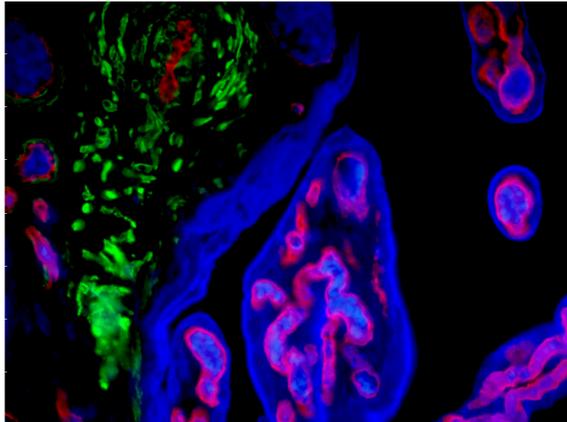
Histologi@: Einführung in die Zytologie und Histologie

**Begleitskript zum Kursus
Zytologie, Histologie und Mikroskopische Anatomie**

Histologi@:
Einführung in die Zytologie und Histologie
Begleitskript zu Lehrveranstaltungen der Lehrstühle II und III
an der Anatomischen Anstalt der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Federführend erstellt von:
Prof. Dr. H.-G. Frank

München, den 29. September 2015



Histologi@: Einführung in die Zytologie und Histologie

© 2015 Hans-Georg Frank, Anatomische Anstalt der LMU München, Lehrstuhl II

Verlagshaus Monsenstein und Vannerdat OHG Münster, 2015

www.mv-wissenschaft.com

in Zusammenarbeit mit der Universitätsbibliothek der Ludwig-Maximilians-Universität München

Open-Access-Version dieser Publikation verfügbar unter:

<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:19-epub-25350-9>

ISBN: 978-3-95925-007-8 (Druckausgabe)

ISBN: 978-3-95925-008-5 (elektronische Version)

Vorwort

Die Zytologie, die direkt am Anfang des Studiums der Humanmedizin in München steht, hat eine Reihe besonderer Herausforderungen zu meistern:

- Sie muss Studierende abholen und zusammenführen, deren Vorkenntnisse in den Lebenswissenschaften in der Regel sehr heterogen sind.
- Sie muss ein Verständnis der Zellarchitektur erreichen, das in der Histologie und der mikroskopischen Anatomie systematisch weiterentwickelt und verwendet werden kann.
- Sie muss ausserdem ein Verständnis der Zellarchitektur liefern, das als Propädeutik für die Biochemie und Physiologie sinnvoll ist. Ein gewisser Überlapp mit Grundlagen dieser Fächer ist dabei nicht ganz zu vermeiden.

Die Flexibilität des Unterrichtes in der Zytologie wurde durch die Einführung der digitalen Mikroskopie (Projekt: Histologi@) in München wesentlich verbessert. Damit ist die Bindung an Präparate, die nur mit Kursmikroskopen mikroskopiert werden können entfallen. Nunmehr können Präparate, die an Hochleistungsmikroskopen erstellt wurden in uneingeschränkter Qualität digital in der Lehre eingesetzt werden. Das bedeutet auch, dass die Studierenden mehr über die Möglichkeiten der modernen histologischen Technik erfahren müssen. Sie nutzen deren Produkte (Fluoreszenzpräparate, Immunhistochemie) jetzt auch im Kurs.

Lehrende und Studierende in den Vorlesungen und Kursen des ersten Studienseesters müssen diese ehrgeizigen Ziele gemeinsam innerhalb nur weniger Wochen nach Studienstart erreicht haben.

Das hier jetzt vorliegende Skript versucht, die Möglichkeiten der histologischen Technik umfassender zu beschreiben. In den Lehrbüchern ist das häufig kurz abgehandelt.

Es wird ein Zugang zur Zellarchitektur beschritten, der einerseits von viel Stoff entlastet ist, den die Biochemie und Physiologie später besser unterrichten können, andererseits aber trotzdem die oben umschriebenen Ziele erreichen kann.

Dazu wird hier der Stoff der Zellenlehre so zusammengestellt, daß er sich an primär „anatomischen“ Ansätzen ausrichtet: Die Zelle wird anhand von Grenzen, Räumen und Transportwegen beschrieben. Anhand dieser Schemata wird eine funktionell anatomische Beschreibung der Zellarchitektur als eine Art zellulärer Landkarte versucht. Diese Betrachtungsweise ist aus Lehrbüchern der Zellbiologie in verkürzter Form übernommen (z.B. Alberts, Molekularbiologie der Zelle); sie wird aber in den Histologielehrbüchern i.d.R. nicht verwendet und ist daher ergänzend zur Standard-Lehrbuchlektüre.

In die so umrissene zelluläre Landkarte mit Grenzen, Räumen und Transportwegen können dann später biochemische und physiologische Inhalte einsortiert werden. Von hier aus kann auch die Histologie und die mikroskopische Anatomie entwickelt werden.

Das Skript konzentriert sich außerdem auf die Beschreibung einer virtuellen Einzelzelle. Daher werden Zellkontakte z.B. in der gegenwärtigen Fassung nicht erwähnt. Sie sind natürlich wichtig, werden aber sinnvollerweise direkt in Vorbereitung der Gewebe der Histologie vorgestellt. In der gegenwärtigen Fassung des Skriptes bleibt das noch außen vor.

Dieses Skript wurde für den Gebrauch in der universitären Lehre der LMU erstellt. Es wird primär den Lehrenden und Studierenden der LMU für Arbeit bzw. Studium als lehr- und lernunterstützende Leistung zur Verfügung gestellt.

Prof. Dr. Hans-Georg Frank

Inhaltsverzeichnis

I. Prinzipien der Mikroskopie und Histologischen Technik	1
1. Mikroskopie: Ein bildgebendes Verfahren	2
1.1. Herkunft, Vorbereitung und Verarbeitung von Proben	3
1.2. Optische Prinzipien und Verfahren der Lichtmikroskopie	8
1.3. Grundprinzipien der Elektronenmikroskopie	14
2. Darstellung von Strukturen in Histologischen Präparaten	15
2.1. Histologische Färbungen	15
2.2. (Bio-)chemie am Gewebeschnitt: Histochemie	17
2.3. Hochspezifische Nachweisverfahren	19
3. In den Kurspräparaten mehrfach eingesetzte Routinetechniken	22
3.1. Färbungen	22
3.2. Immunhistochemische Nachweisreaktionen	25
II. Einführung in die Zytologie und Medizinische Zellbiologie	27
4. Grundstrukturen von Zellen und Geweben	28
4.1. „Leben“ und „Struktur“ hängen zusammen	28
4.2. Kompartimentierende Grenzflächen als Grundstruktur	29
4.3. Grenzflächen definieren Räume und Richtungen	30
4.4. Die polaren Grenzflächen verändern angrenzende Räume aktiv	31
5. Die Biomembran: Archetyp einer aktiven polaren Grenzfläche	32
5.1. Phospholipid: Grundbaustein der Membran	32
5.2. Beispiel einer typischen Biomembran: Das Plasmalemm	33
6. Topologie der Membransysteme und Kompartimente eukaryotischer Zellen	39
6.1. Zelluläre Grundbaupläne: Prokaryoten versus Eukaryoten	39
6.2. Ein hypothetischer Weg vom Prokaryoten zum Eukaryoten	41
6.3. Topologische Beziehungen der Zellkompartimente	44
7. Topologischer Äquivalenzraum: Zytosol und Zellkern	46
7.1. Das Zytosol	46
7.2. Der Zellkern	47
8. Topologischer Äquivalenzraum: Die Membransysteme	51
8.1. Endoplasmatisches Retikulum	51
8.2. Der Golgi-Apparat	57
9. Das Zytoskelett: „Puppenspieler“ im Hintergrund	62
9.1. Actine	63
9.2. Tubuline und Microtubuli	65
9.3. Intermediärfilamente	67

10. Topologische “Eremiten”: Mitochondrien und Peroxisomen	69
10.1. Mitochondrien und Peroxisomen haben Gemeinsamkeiten	69
10.2. Spezifika der Mitochondrien	70
10.3. Spezifika der Peroxisomen	71
11. Integration zu: Mitose und Zellzyklus	72
11.1. Die Mitose	72
11.2. Der Zellzyklus	75
12. Integration zu: Exozytose und Endozytose	80
12.1. Wege aus der Zelle: Exozytose und Modi der Sekretion	80
12.2. Wege in die Zelle: Endozytose und der lysosomale Weg	83

Teil I.

**Prinzipien der Mikroskopie und
Histologischen Technik**

1. Mikroskopie: Ein bildgebendes Verfahren

In der Mikroskopie werden Licht- oder Elektronenstrahlen kombiniert mit Linsensystemen eingesetzt, um hohe Vergrößerungen zu erzielen. Ganze Organe und Organteile sind i.d.R. zu groß, um in einem Stück mikroskopisch untersucht zu werden. Die Vergrößerung, die das Instrument "Mikroskop" erzielen kann, bedeutet darum auch, dass nur kleine "Proben" eines Organs für die Untersuchung präpariert werden; von diesen Ergebnissen muss dann auf das ganze Organ geschlossen werden.

Lichtstrahlen (noch mehr: Elektronenstrahlen) haben nur eine sehr geringe Durchdringungsfähigkeit für Gewebe. Daher muss die durchstrahlte Schichtdicke dünn genug gehalten werden, um den Durchtritt der Licht- oder Elektronenstrahlen zu erlauben.

- In der Lichtmikroskopie werden meist dünne Gewebescheiben mit einer Schichtdicke im ein- bis zweistelligen μm -Bereich (1-15 μm) eingesetzt. Die Gewebescheiben haben einen Durchmesser von ein bis zwei cm und sind auf Glas (Objekträger) aufgezogen.
- In der Elektronenmikroskopie werden sehr dünne Gewebescheiben mit einer Schichtdicke im zweistelligen nm-Bereich (20-100nm) eingesetzt. Die Gewebescheiben haben einen Durchmesser im Bereich von 1-2mm und sind auf folienbeschichtete Metallgitter (Grids, max. 2x2mm) aufgezogen.

Die Mikroskopie dringt also mit hochwertigen bildgebenden Instrumenten in „abstrakte“ Dimensionen vor, die mit bloßem Auge nicht wahrgenommen werden können. Sie ist damit das, was in der Medizin generell als "bildgebendes Verfahren" bezeichnet wird. Die Mikroskopie ist das älteste bildgebende Verfahren in der Medizin und nach wie vor ein Schlüsselverfahren der medizinischen Diagnostik. Sie hat im Rahmen ihrer Einführung in die Medizin eine Revolution der diagnostischen Konzepte ausgelöst (Virchow'sche "Zellulärpathologie") und wird bis heute kontinuierlich weiterentwickelt und verbessert ¹.

Folgende Elemente kennzeichnen bildgebende Verfahren der Medizin allgemein:

- Generierung optischer Bilder von Strukturen, die eigentlich außerhalb der Möglichkeiten der menschlichen Sinnesorgane sind (Histologie, Ultraschall, Röntgen, CT, MR, ...)
- Aufwändige technische Apparate und Einrichtungen zur Bildgebung (Mikroskopie, Schallgebung, Schallrezeption, Strahlengenerierung, Strahlenrezeption, Algorithmen der Bildgenerierung bei tomographischen Verfahren, ...)
- Bildgebende Verfahren generieren technisch sogenannte abstrahierte "Äquivalentbilder"². Die Interpretation setzt Kenntnis des technischen Vorgangs der Bildentstehung voraus.

Die histologische Technik enthält folgende basale Verfahrenselemente:

- Die mikroskopische Struktur entnommener Proben muss rasch und effizient vor Verfall geschützt und möglichst lebensnah erhalten werden (*Fixierung*).
- Um ausreichend dünne Gewebescheiben herzustellen, müssen technische Schneidverfahren angewandt werden. Dafür muss das Gewebe in spezielle schneidbare Medien eingeschlossen werden (*Einbetten und Schneiden*).
- Ausreichend dünne durchstrahlbare Gewebescheiben (Schnitte) sind zunächst einfach nur durchsichtig. Diagnostisch bedeutsame Strukturen müssen erst noch dargestellt werden. (*Färben, Kontrastieren*).

¹ Es wurden mehrere Nobelpreise für Physik/Chemie oder Physiologie/Medizin für Entdeckungen mit Bezug zur Mikroskopie vergeben. Der letzte davon erst 2014 (u.a. an Stefan Hell für "Ultrahochauflösende Fluoreszenzmikroskopie")

² Röntgenbilder zeigen nur röntgendichte Strukturen, nicht die ganze Wirklichkeit, die sie zum Beispiel im Präparierkurs sehen. Am bildgebenden Punkt sind sie der Wirklichkeit aber „äquivalent“. Gut, wenn Sie den bildgebenden Punkt verstehen können; schlecht, wenn nicht...

1.1. Herkunft, Vorbereitung und Verarbeitung von Proben

1.1.1. Herkunft von Proben

Post mortem Untersuchungen in der Anatomie, Pathologie oder der Rechtsmedizin sind nur eine mögliche Quelle von Proben. Die meisten Proben für die Histologie werden aus größeren Organen intra vitam entnommen (s. Abb. 1.1). In der Klinik sind Proben hauptsächlich Biopsien (Stanzbiopsien, Nadelbiopsien, Biopsien mittels Biopsiezangen z.B. bei der Endoskopie). Dazu kommen Organe oder Organteile, die im Rahmen von Operationen (z.B. Tumorchirurgie, aber auch die einfache Appendektomie, Tonsillektomie, oder Amputation von Körperteilen, etc.) entnommen wurden. Flüssige Proben (Blut, Knochenmark, Harn) oder Abstriche (z.B. Cervix uteri) können als Ausstrichpräparate für die Beurteilung von Einzelzellen verwendet werden. Der rein zahlenmäßige Umfang solcher Untersuchungen in der Medizin ist erheblich. Die allermeisten Diagnosen von Karzinomen und malignen Tumoren, aber auch viele Diagnosen von chronischen entzündlichen Veränderungen werden durch histologische Untersuchung gestellt. In einem größeren Zentrum für Routinepathologie mit breit gefächertem Spektrum können ohne weiteres hunderte solche Proben pro Tag verarbeitet werden. In vielen klinischen Abläufen sind histologische Befunde zentrale Entscheidungskriterien.

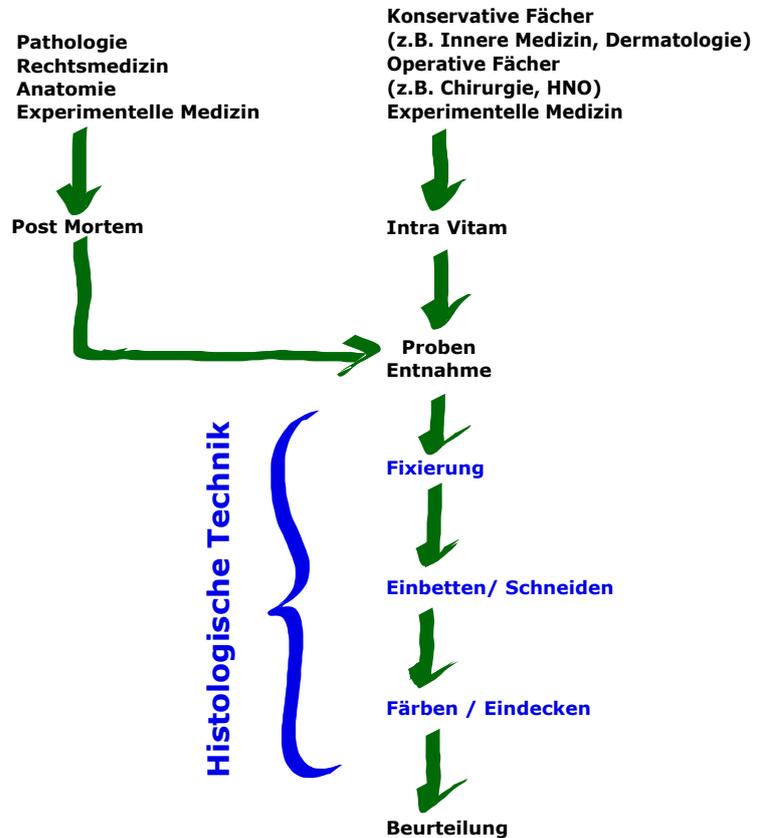


Abbildung 1.1.: Im Flußschema wird der Prozess der Bilderzeugung in der Histologie zusammengefaßt. Proben stammen aus vielen medizinischen Fächern. Die zentrale Stellung der histologischen Technik bei der Produktion von Präparaten (blau hervorgehoben) und damit letztlich bei der Interpretation der zu beurteilenden Bilder wird deutlich. Im „Histokurs“ wird besonderer Wert darauf gelegt, die Beurteilung histologischer Präparate zu vermitteln und zu üben. Ein Grundverständnis der Prinzipien der Präparateherstellung ist dafür erforderlich.

1.1.2. Vorbereitung von Proben

1.1.3. Probenentnahme und initiale Verarbeitung

Proben werden entweder möglichst rasch post mortem gewonnen oder vom lebenden Körper getrennt. Die nachfolgenden Verarbeitungsschritte erfordern Zeit. Daher muss die Struktur der Proben möglichst gut erhalten werden, indem der autolytische Zerfallsprozess nach Trennung von der Zirkulation rasch gestoppt wird. Dafür gibt es verschiedene Prinzipien:

Fixierung mit chemischen Mitteln: Diese Form der Fixierung ist der Regelfall. Die Probe wird mit einer Mischung durchtränkt, die eine reaktive Substanz - meist Formaldehyd, bei der Elektronenmikroskopie oft auch Glutardialdehyd - enthält. Die Aldehydfunktion dieser Substanzen reagiert

in komplexer Weise mit den Seitenketten und den ϵ -Aminogruppen der Proteine. Die Fixierung stoppt den Zerfall und vernetzt die Proteine dreidimensional sowie weitgehend ortsrichtig. Das erlaubt die zeitaufwändigen nachfolgenden Schritte ohne weiteren Strukturverlust durch Autolyse.

Einfrieren: Einfrieren ist ein probates Mittel, um die Autolyse zu stoppen. Allerdings kann gefrorenes Wasser später nicht ideal geschnitten werden und einfaches Einfrieren führt zur Kristallbildung und Ausdehnung des Wassers. Durch diesen Vorgang werden viele Strukturen auf der mikroskopischen Ebene beschädigt. Die Strukturhaltung in gefrorenen Geweben ist im Regelfall deutlich schlechter als in fixierten Geweben.

Wasserentzug durch Alkohol: Sehr viel seltener als die Formaldehydfixierung werden Alkohole oder Alkoholmischungen (z.B. 70% Ethanol) als Fixantien eingesetzt. Solche Mischungen wirken fixierend, weil sie die Wasser-Konzentration deutlich absenken und Biomoleküle, vor allem Proteine, ausfällen. Wasser ist das essentielle Lösemittel und Reaktionsmedium für alle Lebensvorgänge, auch die Autolyse.

Wasserentzug durch Trocknung: Die Trocknung kann erfolgreich zum Beispiel bei Ausstrichpräparaten eingesetzt werden. Im Kurs ist das Präparat des Blutausstriches nach initialer Lufttrocknung weiterverarbeitet worden.

In manchen Fällen werden die oben genannten Prinzipien miteinander kombiniert (z.B. Lufttrocknung von Ausstrichpräparaten und anschließende Fixierung in Methanol). Ziel aller dieser Verfahren ist es aber, die nachfolgenden Schritte der Histotechnik ohne Zeitdruck bei grundsätzlicher Stabilität der wichtigsten Strukturen durchführen zu können.

1.1.4. Verarbeitung von Proben

Um die Durchdringung des Gewebes mit Licht (LM) oder Elektronenstrahlen (Transmissions-EM) zu ermöglichen, müssen sehr dünne, strahlendurchlässige Gewebescheiben hergestellt werden. Dazu muss das Gewebe aus seiner weichen und heterogenen Beschaffenheit in einen homogenen, mit technischen Mitteln bearbeitbaren Block verwandelt werden. Die Herstellung solcher Blöcke (Einbetten) und das nachfolgende technische Abheben dünner Scheiben (Schneiden) sind aufeinander bezogene Schritte. *Man bettet ein, um schneiden zu können.*

1.1.4.1. Einbetten

Wie oben ausgeführt, ist die Einbettung im Grunde nichts anderes als die technische Vorbereitung des Schneidens, weil Gewebe in natürlicher Konsistenz in der Regel nicht reproduzierbar genau und dünn genug geschnitten werden kann. Ziel ist es dabei, eine gleichmäßige Härte des Materials zu erreichen, die die Schneidbarkeit mit technischen Vorrichtungen garantiert. In der Regel wird zu diesem Zweck die Härte deutlich über die Ursprungshärte des Gewebes erhöht. Wird das Wasser nicht aus der Probe entfernt, wird diese Härtung durch Einfrieren erreicht. Einfrieren ist damit ein Vorgang, der Fixierung und Einbettung in einem Schritt ermöglicht, allerdings wegen der schlechten Schneideigenschaften von Eis und der Kristallisation von Wasser auf Kosten der Strukturqualität. Im Regelfall wird allerdings in der Histologie und Elektronenmikroskopie das Gewebewasser gegen ein geeignetes - härteres - Einbettmittel ausgetauscht. Die Wahl der Einbettmittel ist grundsätzlich groß; allerdings folgen Einbettungsverfahren allgemeinen Regeln:

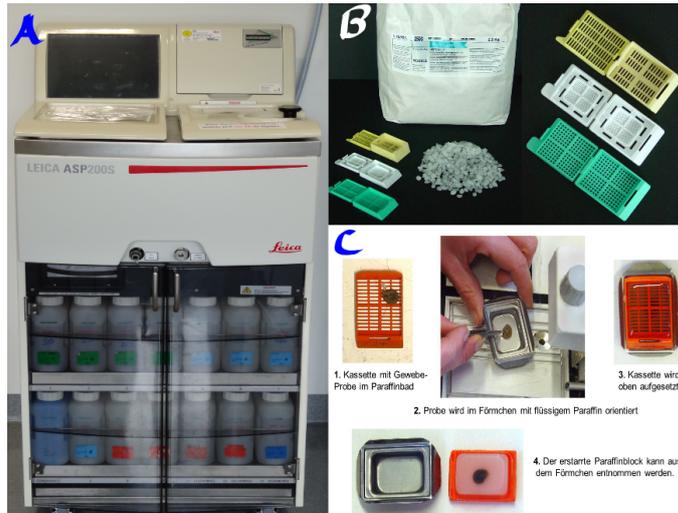


Abbildung 1.2: Die Abbildung zeigt typische Geräte und Hilfsmittel für die Einbettung in Paraffin. **A:** Ein handelsüblicher Einbettautomat der den Austausch von Wasser gegen zunächst Alkohol und danach bis in Paraffin vollautomatisch durchführen kann. **B:** Paraffin für die Histologie als Granulat sowie verschiedene Kassetten für die Einbettung von Material. **C:** Der Prozess des Ausgießens, durch den das bereits in heißem Paraffin befindliche Gewebe in ein schneidbares Blockchen eingeschlossen wird.

Allgemeine Regeln für die Einbettungen:

Prinzip 1: Das Einbettmedium muss härter sein als die härteste Stelle des eingebetteten Gewebes.

Prinzip 2: Je härter das Einbettmedium, desto dünner können die Schnitte werden.

Prinzip 3: Je dünner die Schnitte werden sollen, desto kleiner wird die Anschnittsfläche (um den Anpressdruck beherrschbar zu halten).

Prinzip 4: Je dünner die Schnitte und je kleiner die Anschnittsfläche, desto höher sind die Ansprüche an die (Fein-)Mechanik der Schneidgeräte (sogenannte Mikrotome).

Prinzip 5 : Das Messer muss **viel** härter sein als das Einbettmedium, um gute Schnitte machen zu können (*Edelstahlmesser* in der Lichtmikroskopie, (sehr teure) *Diamantmesser* in der Elektronenmikroskopie).

Prinzip 6: Bei Ausnahmepräparaten und sehr harten Medien/Objekten mit großen Anschnittsflächen (z.B. bei nicht entkalkten Knochen in Methylmethacrylat (Plexiglas)) oder keramik- bzw. metallhaltigen Implantaten), kann nicht mehr geschnitten werden, es kommen alternative Verfahren, z.B. Diamantsägen, zum Einsatz.

In der *Lichtmikroskopie* ist das gebräuchlichste Einbettmittel Paraffin mit einer Schmelztemperatur nahe 60°C. Dafür muss zunächst das Wasser in der Probe vollständig gegen Alkohol (Ethanol) ausgetauscht werden, anschließend wird Ethanol gegen ein Lösemittel ausgetauscht, das sowohl mit Ethanol wie mit Paraffin mischbar ist (i.d.R. Xylol). Am Ende wird dann bei Temperaturen über 60°C das Xylol durch flüssiges Paraffin ersetzt. Dieser Vorgang findet häufig in Prozessautomaten statt (s. ABB. 1.2 A) Der Block erstarrt dann, sobald das Paraffin abkühlt. Die größten Vorteile der Paraffin-Einbettung sind

- der pragmatische Kompromiss zwischen Strukturhaltung und billigem Verfahren
- nahezu unbegrenzte Lagerfähigkeit eingebetteter Proben bei Raumtemperatur
- die Umkehrbarkeit (d.h. das Paraffin kann nach dem Schneiden wieder herausgelöst werden)
- die breite Einsetzbarkeit (nahezu alle Standardfärbungen können an Schnitten von Paraffinmaterial angewandt werden)

In der *Elektronenmikroskopie*, aber auch in der hochauflösenden Lichtmikroskopie, werden gerne auch Polymere als Einbettmedien eingesetzt. Auch dabei wird meist das Wasser teilweise oder ganz durch monomerhaltige Lösungen ersetzt. Sobald das Gewebe mit ausreichenden Konzentrationen des Monomers durchtränkt ist, wird dann die Polymerisation ausgelöst. So können z.B. sehr harte Einbettungen in Kunstharze erreicht werden, die Voraussetzung für die Herstellung sehr dünner Schnitte für die Elektronenmikroskopie sind. Polymere können allerdings nach dem Schneiden i.d.R. nicht mehr

		Alkoholgehalt des Ausgangsgemisches													
		Vol.%	95	90	85	80	75	70	65	60	55	50	45	40	35
Alkoholgehalt Endgemisch	90	6,5													
	85	13	6,5												
	80	21	14	6,8											
	75	30	22	14,5	7,2										
	70	38	31	23	15	7,6									
	65	50	42	33	25	16	8								
	60	63	54	44,5	35	26,5	18	8,8							
	55	78	68	58	48	35	29	19	9,5						
	50	96	85	74	63	48	42	31	20,5	10					
	45	118	105	93	81	69,5	58	46	34,5	23	11,5				
	40	145	131	117	104	91	77,5	64,5	51,5	39	25,5	12			
	35	179	164	148	133	118	103	88	73	58	43,5	28	14		
30	224	206	189	171	154	136	119	102	84,5	68	51	33	18		
		Volumen (ml) Wasser zu 100ml Ausgangsgemisch													

Tabelle 1.1.: Tabelle zur Verdünnung von Alkohol (auf 100ml-Basis): 100ml einer Ausgangsmischung mit einem bekannten Alkoholgehalt wird mit Wasser durch Zugabe des angegebenen Volumens verdünnt, um ein Endgemisch mit dem links angegebenen Alkoholgehalt zu erhalten. Modifiziert nach Romeis Romeis und Mulisch 2010

depolymerisiert und entfernt werden, was dann ganz andere Färbe- und Kontrastierungsverfahren als in der Paraffintechnik erfordert.

Die Entwässerung ist also eine besonders häufig vorkommende Prozedur in der Histologie. Die Entwässerung setzt die Herstellung sogenannter Alkoholreihen voraus. Ein Beispiel, wie solche Reihen angesetzt werden können, ist in Tabelle 1.1 gegeben.

1.1.4.2. Schneiden

Das „Schneiden“ in der Histologie hat wenig zu tun mit dem Brotmesser, das durch Brot gezogen wird. Technisch sind diejenigen Vorgänge am ähnlichsten, die als „spanabhebende“ Bearbeitung bekannt sind. Beispiele für spanabhebende Bearbeitungsmethoden sind z.B. Hobeln und Drehen beim Bearbeiten von Holz oder Metall. In der Technik kommt es beim Hobeln oder auch beim Drehen in der Regel darauf an, eine glatte Oberfläche bestimmter Gestalt (oder eines bestimmten Maßes) zu erstellen. Die abgehobenen Bestandteile (Späne) sind nicht primär Ziel der Technik, sondern ein Abfallprodukt der spanabhebenden Bearbeitung und werden weggeworfen.

Das ist bei der Histologie anders. *Histologische Schnitte sind technisch nichts anderes als „Späne“ definierter und gleichmäßiger Dicke und Beschaffenheit.* Histologische Messer werden ganz analog zu Hobelmessern leicht schräg angesetzt (Anstellwinkel). In der Histologie sollen allerdings Späne definierter reproduzierbarer Dicke (oder eher: Dünne) entstehen. Darum sind die Anforderungen an die technischen Apparaturen viel höher als beim Hobeln. Hobelspäne am Holz sind nicht gleichmäßig dick; ihre Dicke liegt im Bereich von mehreren Millimetern. In der Histologie ist gleichmäßige Dünne von wenigen Mikrometern gefragt. Der Genauigkeitsunterschied in den Anforderungen hat Konsequenzen für Apparaturen und Schneidetechniken sowie für die eingesetzten Geräte.

Um die Dicke der Schnitte gering und gleichzeitig reproduzierbar zu halten müssen Voraussetzungen gegeben sein:

- Auf Seiten des Materials muss die Einbettung folgende Ergebnisse geliefert haben:
 - Homogene Materialeigenschaften, die ausschließen, dass es beim Voranschreiten des Messers zu großen Spannungen zwischen weichen und harten Zonen im Material kommt. Diese würden den entstehenden Schnitt zerreißen.
 - Für Schnitte im μm -Bereich sind bestimmte minimale Härten erforderlich, damit die beim Durchziehen des Messers entstehenden Scherkräfte einen Hobelspan freisetzen und nicht

etwa nur das Material unter dem Messerdruck zusammenpressen.

- Auf Seiten der Schneideapparatur muss die Technik gewährleisten, dass
 - Messerhalterung und Messer- sowie Blockführung exakt und genau im μm -Bereich arbeiten. Dafür sind mikromechanische Anforderungen zu erfüllen.
 - Messerhalterung und Messer- sowie Blockführung großen Anpressdrücken gegen das zu schneidende Material gewachsen sind; dabei muss die Qualität der Mikromechanik stets erhalten bleiben.
 - das Spiel der Mikromechanik (in Gewinden, Führungen, etc) und in der gesamten Apparatur muss so klein und kontrollierbar sein, dass beim Durchziehen des Messers durch das Objekt keine Schwingungen beim Vorschub auftreten. Diese würden zu einer rhythmischen Schwankung der Schnittdicke (Shatter) führen, der gut sichtbar ist und ein unerwünschtes Artefakt darstellt.

Eine Übersicht zu häufigen Kombinationen von Einbettungsmedium, Schneideapparatur, Messertyp und erzielter Schnittdicke ist in Tabelle 1.2 gegeben.

	Gefrierschnitte	Paraffinschnitte	Semidünnschnitte	Ultradünnschnitte
Schnittdicken	8-100 μm	4-6 μm	0,5-1,5 μm	0,04-0,06 μm
Schneidgerät	Kryostat	Schlittenmikrotom	Rotationsmikrotom	Ultramikrotom
Messertyp	Stahl	Stahl	Stahl, Glas	Diamant (Glas)
Einbettmedium	Eis	Paraffin	Kunstharz	Kunstharz

Tabelle 1.2.: Übersicht zu häufigen Kombinationen von Schneidgeräten, Messertypen und Einbettungen sowie der damit üblicherweise erzielten Schnittdicken.

1.1.4.3. Färben (LM) bzw. Kontrastieren (EM)

Sobald - nach dem oben erläuterten erheblichen technischen Aufwand - durchstrahlbare Präparate entstanden sind, ist ein weiteres Problem zu lösen. Die dünnen histologischen Schnitte haben zunächst keinerlei Kontrast und es sind keine Strukturen in ihnen zu erkennen.

Die Schnitte sind durchstrahlbar, aber eben auch einfach kontrastlos „durchsichtig“.

Um jetzt also einzelne Zellen, Zellbestandteile, extrazelluläres Material etc. erkennen und unterscheiden zu können, müssen optische Kunstgriffe eingesetzt oder/und diese Bestandteile besonders angefärbt oder kontrastiert werden.

Was nicht optisch oder färberisch markiert wird, ist im Mikroskop unsichtbar!

Die Abhängigkeit von Kontrastierung ist auch in anderen bildgebenden Verfahren wohl bekannt. Wenn Sie in einem Röntgenbild Arterien oder Darmlumen darstellen möchten, müssen Sie Kontrastmittel einsetzen, die diese Gebilde röntgendicht machen. Auch hier gilt: Wo kein Kontrastmittel hinkommt, sehen Sie kein Gefäß oder kein Darmlumen. *Sie sehen immer nur das Kontrastmittel an bzw. in der Zielstruktur: Das ist in der Histologie nicht anders.*

Die größte Stärke der histologischen Technik ist, daß eine ungeheure Vielzahl von Färbe- und Nachweismethoden existieren, mit denen Gruppen von Molekülen, Eigenschaften von Molekülen, und sogar einzelne, spezifische definierte Moleküle nachgewiesen und im Strahlengang sichtbar gemacht werden können. Viele dieser Methoden können auch miteinander kombiniert werden. In der Histologie ist es bevorzugt - wo immer das geht - die Präparate anzufärben. Aber auch über die optischen Systeme können Strukturen schon ohne vorhergehende Bearbeitung des Präparates sichtbar gemacht werden. Beide Themen werden hier im Skript kurz angerissen, nämlich:

- Manipulationen an der optischen Ausstattung, an der Beleuchtung und dem Strahlengang des Mikroskops (s. Kap. 1.2).
- Färbung oder Kontrastierung von Strukturen im Schnitt bei "normalem" Strahlengang des Mikroskops (s. Kap. 2).

1.2. Optische Prinzipien und Verfahren der Lichtmikroskopie

1.2.1. Kontrast und Beleuchtung in der Lichtmikroskopie: Durchlicht oder Auflicht?

Das Grundproblem durchstrahlbarer dünner Präparate ist der zunächst geringe Kontrast. Auch wenn Mikroskope mit höchster Korrektur und optischer Auflösung verwendet werden, ist ohne Kontrast nichts zu erkennen. Kontrast kann man beschreiben als die Differenz des Lichtsignals, das aus dem Präparat beim Betrachter ankommt, zum Hintergrundsignal. Die Stärke des Hintergrundsignals wird wesentlich vom Beleuchtungsmodus beeinflusst:

Durchlicht, Hellfeldmikroskopie Bei Durchlichtverfahren wird das Licht der Beleuchtungsquelle durch das Präparat hindurch über das optische System in das Auge des Untersuchers gelenkt. Bei diesen Verfahren ist also grundsätzlich das Hintergrundsignal sehr stark (daher auch die Bezeichnung "Hellfeld"-mikroskopie). Das Präparat muss beim Durchtritt des Lichts starke Veränderungen des Signals im Vergleich zum sehr hellen Hintergrund verursachen, um kontrastreich wahrgenommen zu werden. Die Mikroskopie im Durchlicht ist das klassische mikroskopische Standardverfahren und die meisten optischen Kontrastverfahren (Phasenkontrast, Interferenzkontrast, Polarisationsverfahren) wurden auf Basis der Durchlichtmikroskopie entwickelt.

Durchlicht, Dunkelfeldmikroskopie Eine Variante der Durchlichtmikroskopie ist die Dunkelfeldmikroskopie. Bei diesem Durchlichtverfahren wird das Licht so (schräg am Objektiv vorbei) durch das Präparat geleitet, dass der Betrachter nur das im Präparat selbst in die optische Achse gebeugte Licht wahrnimmt. Ohne Präparat ist das Gesichtsfeld dunkel.

Auflicht Bei der Auflicht-Mikroskopie wird das Licht der Leuchtquelle aus Sicht des Betrachters auf das Präparat aufgebracht, wird also in einem speziellen Strahlengang durch das Objektiv hindurch auf das Präparat und von ihm weggerichtet. Ohne Präparat ist das Gesichtsfeld dann dunkel. Nur Licht, das vom Präparat reflektiert wird oder im Präparat als Folge der Beleuchtung entsteht (z.B. bei Fluoreszenz), kann - dann sehr kontrastreich - wahrgenommen werden. Die Fluoreszenzmikroskopie ist das wichtigste Teilverfahren der Auflichtmikroskopie.

Grundsätzlich gilt, dass die im Kurs zur Verfügung stehenden Kursmikroskope nur die einfachste Variante des Durchlicht- bzw. Hellfeldverfahren zulassen. Optische Kontrastierungsverfahren oder gar umgekehrte Beleuchtungsrichtung wie bei der Auflichtmikroskopie sind nicht möglich. Für die Erstellung der digitalen Präparate werden aber Hochleistungsmikroskope mit vielen technischen Möglichkeiten eingesetzt. Daher sollten die Grundprinzipien der optischen Kontrastierung und Mikroskop-Technik verstanden sein. Sie sind hilfreich, um Fluoreszenzpräparate oder Phasenkontrast-Präparate zu interpretieren; die Zahl hochwertiger digitaler Präparate, die mit den Kursmikroskopen nicht mehr betrachtet werden können, wird im Kurs mit der Zeit stetig zunehmen.

1.2.2. Durchlichtverfahren

Das normale Durchlichtverfahren kann in seiner primitivsten Form (ohne "Köhlerung" der Beleuchtung) mit festem Kondensator auch an den Kursmikroskopen durchgeführt werden (s. ABB. 1.3). Von der Leuchtquelle wird über ein Linsensystem ("Kondensator") unter dem Präparat ein Lichtkegel gebildet, mit dem das Präparat durchleuchtet wird. Ohne Präparat wird bei optimaler Einstellung ein gleichmäßig

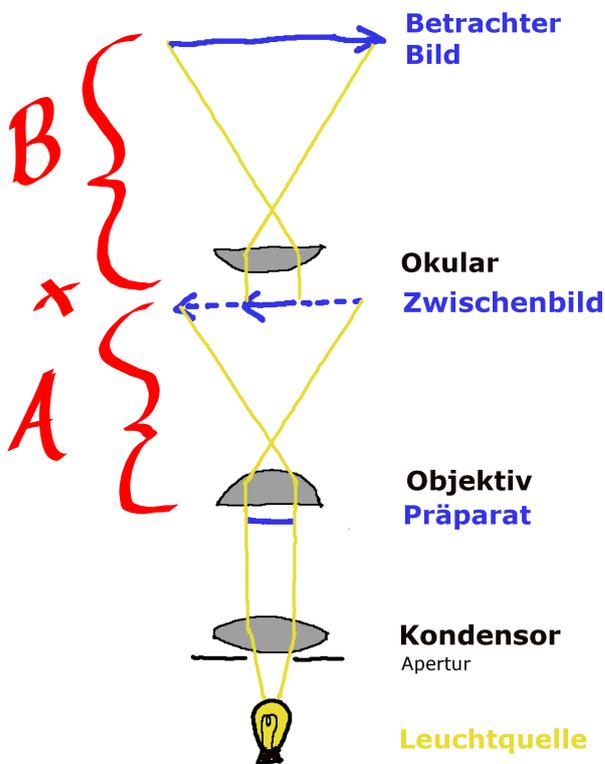


Abbildung 1.3: Schema des Strahlengangs eines einfachen Durchlichtmikroskopes, wie es auch die im Kurs verwendeten Mikroskope sind. Die Leuchtquelle ist so angeordnet, dass das Licht zunächst über das Linsensystem des Kondensors gebündelt wird und als konzentrierter Lichtstrahl zum Präparat gelangt. Mit einer Blende, der Aperturblende des Kondensors, kann die Lichtmenge reguliert werden. Sie beeinflusst auch die Auflösung und den Kontrast des mikroskopischen Bildes. Das Linsensystem des Objektivs erzeugt ein bereits vergrößertes virtuelles Zwischenbild. Dies ist die erste Stufe der Gesamtvergrößerung, die vom Objektiv erzielt wird (rote Klammer und Kennzeichnung mit A). Das Zwischenbild wird mit einem Okular (letztlich nichts anderes als ein kleines Fernglas) angeschaut, das eine zweite Vergrößerungsstufe hat (rote Klammer und Kennzeichnung mit B). Die Gesamtvergrößerung des Mikroskops errechnet sich durch Multiplikation der Objektivvergrößerung A mit der Okularvergrößerung B.

helles, weißes Gesichtsfeld sichtbar sein (s. ABB. 1.3). Kommt ein (farbiges) Präparat in den Strahlengang, wird Licht verschiedener Wellenlängen absorbiert und durch die Dicke des Präparat auch die Lichtstärke insgesamt reduziert. Man erhält ein farbiges und etwas dunkleres Bild (s. ABB. 1.3).

Das Durchlichtverfahren ist das Standardverfahren der Lichtmikroskopie schlechthin. Die Kontrastierung wird hier nicht primär durch Eingriff in das optische System erzeugt, sondern durch die Färbung und Vorbehandlung des Präparates. Die Farbe ist das wichtigste Kontrastmittel³(s. Kap. 2). Die optische Auflösung in der Durchlichtmikroskopie wird physikalisch durch das Abbe'sche Prinzip limitiert. Demnach können Strukturen, die kleiner sind als die Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes nicht mehr aufgelöst werden.

Als Faustregel kann gelten, dass die Durchlichtmikroskopie Strukturen, die kleiner als $1\mu\text{m}$ sind, nicht mehr einzeln auflösen kann.

Dunkelfeldmikroskopie und auch die Auflichtmikroskopie arbeiten mit „Lichtpunkten“ vor dunklem Hintergrund. Dabei kann das Abbe'sche Limit im Einzelfall unterschritten werden.

Allerdings wollte man schon früh auch ungefärbte Präparate und/oder lebende Zellen in Kulturschalen mikroskopisch untersuchen. Daher wurden auch verschiedene Verfahren der optischen Kontrastierung eingeführt, die auch ohne Farbstoffe optische Kontrastierung in Grenzen erlauben.

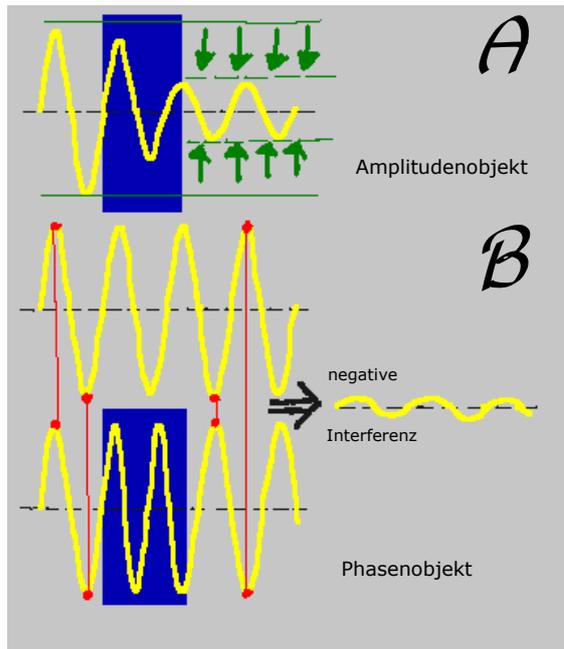


Abbildung 1.4: Die Abbildung zeigt wie verschiedene Objekte prinzipiell auf Amplitude oder Phase des Licht einwirken können. Das menschliche Auge kann stets nur Helligkeitsunterschiede (d.h. Unterschiede in der Amplitude des Lichts) wahrnehmen. Alle Objekte im Strahlengang müssen daher letztendlich die Helligkeit beeinflussen, um sichtbar zu sein. Beim Amplitudenobjekt (**A**), dem Standardfall beim Durchlichtmikroskop wird einfach ein Teil der Lichtenergie absorbiert. Dadurch wird die Amplitude kleiner und das Bild wird dunkler wahrgenommen. Geschieht diese Lichtabsorption bezogen nur auf Teile des Lichtspektrums, wird durchtretendes Licht farbig wahrgenommen. Phasenobjekte (**B**) führen nicht direkt zu einer wahrnehmbaren Verkleinerung der Amplitude oder einer Verschiebung des Farbspektrums. Sie führen aber zu einer Phasenverschiebung, die nur durch den optischen Trick der Überlagerung verschobener Phasen (Interferenz) sichtbar gemacht werden kann. Negative Interferenz führt dabei zu einer Verkleinerung der Amplitude, während positive Interferenz (im Bild nicht gezeigt), die Amplitude erhöhen kann.

1.2.2.1. Phasenkontrast

Die Abschwächung (entspricht: Verkleinerung der Lichtamplitude, entspricht auch: dunklere Wahrnehmung) des durch ein ungefärbtes Präparat durchtretenden Lichtes ist zu schwach, um vom Auge oder einer Kamera wahrgenommen werden zu können. Allerdings wird das Licht beim Durchtritt durch solche Strukturen trotzdem und unabhängig von der Amplitude (Helligkeit) verändert. Licht wird beim Durchtritt an Dichtegrenzen "abgebremst" (d.h. in der Phase verschoben) und leicht gebeugt. In den 1930er Jahren hat Frits Zernike durch seine Arbeiten⁴ die Möglichkeit geschaffen, diese diskreten Veränderungen für das menschliche Auge sichtbar zu machen, indem die Phasenverschiebung durch das Phänomen der "Interferenz" in eine Helligkeitsveränderung umgesetzt wird. Man redet von "negativer bzw. destruktiver Interferenz", wenn das Bild an Strukturen dunkler wird und von "positiver bzw. konstruktiver Interferenz", wenn das Bild an Strukturen heller wird. Dichte Strukturen haben üblicherweise eine negative Interferenz. Damit wurde es zum ersten mal möglich, auch lebende Zellen mit ihren intrazellulären Organellen ohne Färbung im Mikroskop zu beobachten.

1.2.2.2. Polarisationsmikroskopie und Interferenzkontrast

Kristalle und viele hoch geordnete biologische Strukturen (Zellulose, Fasern in Sehnen, ...) haben die Eigenschaft der Doppelbrechung des Lichtes. Die Doppelbrechung führt zu einer Drehung der Schwingungsebene des Lichtes und wird durch Kontrolle der Schwingungsebene des Lichtes vor und nach dem Präparat im Strahlengang sichtbar gemacht. Dazu wird das Präparat mit linear polarisiertem Licht beleuchtet (über einen Polarisation-Filter, der als Polarisator bezeichnet wird). Im Strahlengang nach dem Objekt befindet sich ein zweiter Polarisations-Filter (der Analysator), in der Regel so positioniert, dass er genau um 90° zum Polarisator gedreht steht. Das Licht des Polarisators kann dann den Analysator nicht passieren und das Bild bleibt dunkel. Befinden sich im Präparat aber doppelbrechende Strukturen, so leuchten diese im Bild hell auf.

³Die Entwicklung der "färberischen Lichtmikroskopie" fällt nicht von ungefähr mit der Hochzeit der aufblühenden chemischen (Farbstoff-) Industrie (Ende des 19. und Beginn des 20. Jahrhunderts) zusammen. In Zusammenarbeit mit der Industrie wurden neusynthetisierte Farbstoffe systematisch unter dem Mikroskop ausprobiert.

⁴Nobelpreis für Physik 1953 für die Entwicklung des Phasenkontrasts

Auf Basis der Polarisationsmikroskopie wurde durch den Physiker G. Normarski Mitte des 20. Jahrhunderts dann der Differentielle Interferenzkontrast (DIC) etabliert. Beim DIC wird das Objekt mit 2 sehr eng benachbarten Lichtstrahlen durchstrahlt, deren Schwingungsebenen genau senkrecht aufeinander stehen. Bei der Passage durch das Gewebe werden dann - bevorzugt an Kanten - die beiden Strahlen unterschiedlich in der Phase verschoben. Über die Einstellung des nachgeschalteten Prismas kann dann eine Interferenz erzeugt werden, die diese Information in Helligkeitsunterschiede umsetzt. Die Kantenbetonung beim DIC erzeugt für das Auge eine Art "Pseudo-Relief" effekt. Noch sensitiver als beim Phasenkontrast können auch minimale Dichteunterschiede als Helligkeitsunterschiede sichtbar gemacht werden. Der Kontrast kann stufenlos verstellt werden und die Anwendbarkeit des DIC umfasst auch Präparate, die dem Phasenkontrast nicht zugänglich sind. DIC ist neben dem Phasenkontrast heute das am weitesten verbreitete optische Kontrastierungsverfahren.

1.2.3. Auflichtverfahren

Auflichtverfahren sind generell durch einen anderen Lichtweg als die Durchlichtverfahren gekennzeichnet: Das Licht wird über Prismen zwischen Betrachter und Präparat in das optische System eingespiegelt und in Betrachtungsrichtung durch das Objektiv hindurch auf das Objekt aufgebracht. Der Betrachter sieht also grundsätzlich kein helles, sondern ein dunkles Bild, solange nicht Teile des aufgestrahlten Lichtes reflektiert werden und so über die optische Achse sichtbar werden. In der Histologie spielen nur die Epipolarisation und - besonders wichtig - die Fluoreszenzmikroskopie eine Rolle. In den Ingenieurwissenschaften werden bei Materialuntersuchungen auch echte Reflexionsbilder genutzt.

1.2.3.1. Epipolarisation

Epipolarisation nutzt polarisiertes Licht im Auflichtmodus. Dabei werden gekreuzte Polfilter genutzt, so dass eigentlich keinerlei Licht im Bild sichtbar werden kann. Wird aber an reflektionsfähigen Partikeln Licht reflektiert (Nanopartikel in der Medizintechnik und Pharmakologie oder auch Abrieb metallischer Gelenkimplantate im Gewebe, Mikrokristalle, etc.), so wird auch die Schwingungsebene des Lichtes etwas gedreht. Daher leuchten solche Partikel im Auflichtbild hell auf. Die Epipolarisation kann auch Partikel, die deutlich kleiner als $1\mu\text{m}$ sind, sichtbar machen.

1.2.3.2. Fluoreszenz-Mikroskopie

In den Lebenswissenschaften ist die Fluoreszenzmikroskopie (in der Biochemie auch Fluoreszenzspektroskopie) ein besonders wichtiges und häufig eingesetztes Verfahren zur sensitiven Detektion definierter Moleküle. Fluoreszierende Moleküle sind komplexe organische Moleküle mit der besonderen Eigenschaft, Licht einer bestimmten Wellenlänge (Exzitationsmaximum) zu absorbieren und einen Teil der aufgenommenen Energie als Licht höherer Wellenlänge (Emissionsmaximum) wieder abzugeben. Die Differenz zwischen Exzitationsmaximum und Emissionsmaximum wird als "Stokes-Shift" bezeichnet und ist eine wichtige Kenngröße fluoreszierender Moleküle. Fluoreszenzmikroskope haben einen Auflicht-Strahlengang, bei dem Licht der Wellenlänge des Exzitationsmaximums auf das Objekt gestrahlt wird, während die (kürzere) Exzitationswellenlänge im Strahlengang nach dem Objekt durch Filter eliminiert wird. Bloße Reflexionen (Wellenlängen dann unverändert) können also nicht gesehen werden, während die bei niedrigerer Wellenlänge auftretenden Fluoreszenzsignale vor dunklem Hintergrund sehr sensitiv wahrgenommen werden können. Der für die Fluoreszenz typische "Negativkontrast" vor dunklem Hintergrund erlaubt die Darstellung von Strukturen, die kleiner als $1\mu\text{m}$ sind; das Abbe'sche Limit der Auflösungsgrenze gilt damit in der Fluoreszenzmikroskopie (gilt auch in der Epipolarisation und in der Dunkelfeldmikroskopie) nicht.

Fluoreszierende Moleküle kommen bereits natürlicherweise im Körper vor. Die aromatischen Aminosäuren in Proteinen haben beispielsweise fluoreszierende Eigenschaften, die aber insgesamt für den

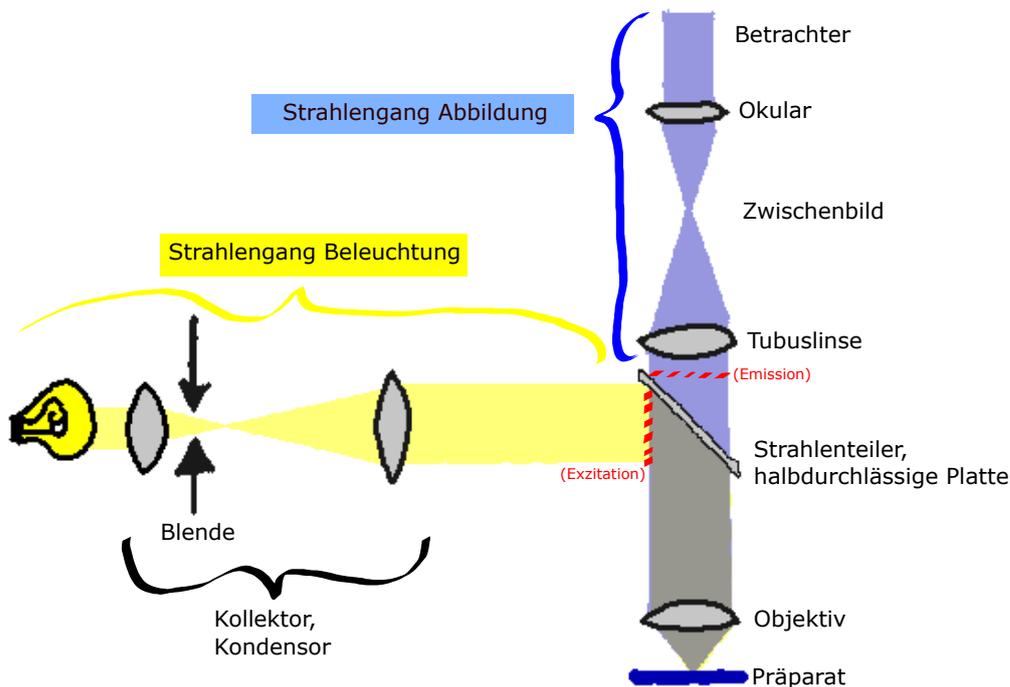


Abbildung 1.5.: Der Strahlengang beim Auflichtverfahren beginnt mit dem von der Leuchtquelle gespeisten Beleuchtungsabschnitt (Strahlengang Beleuchtung). Das Licht wird über eine halbdurchlässige Platte (Prisma, Strahlenteiler) durch das Objektiv hindurch auf das Präparat aufgestrahlt. Nur Licht, das vom Präparat zurückgeworfen wird, wird über den Strahlenteiler und die Tubuslinsen zum Okular geleitet und damit sichtbar. Ohne Präparat oder Licht vom Präparat bleibt das Bild dunkel. Am häufigsten wird das Auflichtverfahren für die Fluoreszenzmikroskopie genutzt. Dann befindet sich im Beleuchtungsstrahlengang vor dem Strahlenteiler das Filter für die Wellenlänge der Exzitation (Exzitation), im Abbildungsstrahlengang nach dem Strahlenteiler das Filter für die Wellenlänge der Emission des Fluoreszenzfarbstoffes, der sichtbar gemacht werden soll. Soll Epipolarisation durchgeführt werden, befinden sich vor (Exzitation) und nach dem Strahlenteiler (Emission) Polarisationsfilter im Strahlengang, die typischerweise gekreuzt stehen. Sie lassen dann nur solches Licht durch, dessen Schwingungsebene im Rahmen der Reflexion vom Präparat verändert wurde.

mikroskopischen Nachweis noch zu schwach sind. Da im Körper komplexe Mischungen solcher bei unterschiedlichen Wellenlängen fluoreszierender Moleküle vorliegen, ist Gewebe üblicherweise nicht völlig frei von Fluoreszenz, sondern zeigt - abhängig von Wellenlänge und Gewebe - unterschiedliche Grade an Autofluoreszenz (manchmal auch als Primärfluoreszenz bezeichnet). Auf Fluoreszenz optimierte Proteinsequenzen kommen natürlicherweise in bestimmten Quallen vor⁵. Deren genetischer Code ist bekannt und sie werden als fluoreszierende Markierungsmoleküle in der rekombinanten Technologie verwendet.

Am weitesten verbreitet sind Technologien, bei denen hochspezifische Sonden (DNA-Moleküle, RNA-Moleküle, Antikörper) mit speziell entwickelten, stark leuchtkräftigen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert wurden. Werden solche Sonden an Schnitten eingesetzt, wird die Leuchtkraft der Fluoreszenzfarbstoffe über die Sonde an die spezifischen Bindungspartner der Sonde gebunden. Gebräuchliche Sonden sind z.B. Antikörper gegen definierte Proteine oder auch DNA-Sequenzen, die mit genau passenden RNA- oder auch DNA-Sequenzen hybridisiert werden können. Damit können dann definierte Proteine in der Immunhistochemie (z.B. Nachweis von Zytoskelet-Proteinen in Zellen oder Oberflächenrezeptoren auf der Außenseite z.B. von Lymphozyten) oder definierte DNA-Sequenzen in der in-situ-Hybridisierung (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)-Technologie bei der Erstellung von Karyotypen) genau lokalisiert werden.

In einigen Bereichen der experimentellen Medizin werden fluoreszierende Farbstoffe als Lebendfarbstoffe im Tierexperiment eingesetzt. Eine dieser Anwendungen ist die Darstellung des Knochenwachstums

⁵z.B. Green Fluorescent Protein (GFP, Entdeckung ausgezeichnet mit einem Nobelpreis) und seine Modifikationen wie Yellow Fluorescent Protein (YFP) oder Blue Fluorescent Protein (BFP), alles Standardwerkzeuge in den Lebenswissenschaften

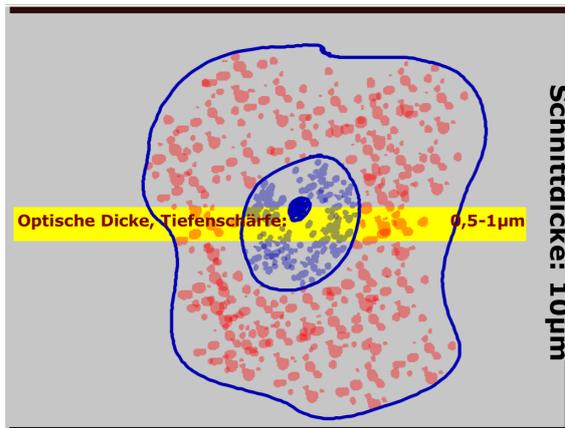


Abbildung 1.6: Viele Schnitte in der Histologie für die Lichtmikroskopie sind mehrere μm dick. Gefrierschnitte, die an Kryomikrotomen (Kryostaten) hergestellt werden, haben häufig Schnittstärken von 10-20 μm . Bei hohen Objektivvergrößerungen ist die Tiefenschärfe jedoch auf 0,5-1 μm begrenzt. Vor allem bei Fluoreszenzverfahren ist dieser Dickenunterschied sehr störend, weil Licht aus den „unscharfen“ Zonen ausserhalb der optischen Dicke das scharfe Bild stets überlagert. Bei konfokalen Mikroskopen wird nur Licht zum Beobachter (hier meist eine Kamera oder Photomultiplier) gelassen, das exakt aus der Ebene der Tiefenschärfe stammt. Damit wird eine Art „optischer Schnitt“ aus einem Präparat erstellt, der Überlagerungsfreie Beobachtung erlaubt.

nach z.B. experimentellen Frakturen und Einbringen von Osteosynthesematerialien (Schrauben, Nägel, Platten). Die Farbstoffe werden in Intervallen zeitlich gestaffelt appliziert und in den Knochen bleibend eingebaut. Dadurch lässt sich nach Entnahme die Entstehung neuer Knochensubstanz und die Heilung rekonstruieren.

1.2.4. Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wird nahezu ausschliesslich im Modus der Fluoreszenzmikroskopie betrieben. Sie eliminiert Störlicht aus den Ebenen ausserhalb der aktuellen Fokusebene des Mikroskops. Dieses Störlicht ist tatsächlich ein wesentliches Problem in der Mikroskopie. Bei höheren Vergrößerungen hat die Ebene, die im Bild scharf erscheint, häufig nur eine Dicke von 0,5 bis 1 μm . Die Schnittstärke ist schon im Regelfall jedoch ein mehrfaches dieser Tiefenschärfe. Das scharfe Bild wird also stets von Licht aus „unscharfen“ Regionen überlagert und daher erheblich verschlechtert (s. ABB. 1.6). Bei der Fluoreszenzmikroskopie ist dieser Effekt besonders störend. In vielen Anwendungen ist es jedoch hilfreich, sogar dickere Schnitte als die üblichen maximalen Schnittstärken von ca. 10 μm zu verwenden. Besonders in der Neuroanatomie, bei der Kultur von dicken Scheiben neuronalen Gewebes und auch ausserhalb der Neuroanatomie sind solche Anwendungen sinnvoll. De facto ermöglicht die konfokale Mikroskopie ein „optisches Schneiden“ von Präparaten, so daß nur Licht aus der aktuellen Fokusebene auch wirklich zum Betrachter oder der Kamera gelangen kann. Mikroskope für die konfokale Mikroskopie sind in der Regel vollständig durch Rechner gesteuert und haben neben einer exzellenten optischen Ausstattung auch andere aufwändige apparative Kontroll- und Steuerelemente. Dazu gehören regelhaft Module, mit denen aus den einzelnen Fokusebenen wieder dreidimensionale Ansichten erstellt werden können. Konfokale Mikroskope sind Großgeräte der Forschung und Diagnostik, deren Preis hohe sechsstelligen Summen erreichen kann. Es gibt zwei unterschiedliche Konstruktionsarten, mit denen das Prinzip der Konfokalität in der Mikroskop-Konstruktion eingeführt werden kann.

Confocal Laser Scanning Microscopy: Der am weitesten verbreitete Bautyp nutzt Laser als Lichtquellen. Diese sind auf die wichtigsten Wellenlängen der gebräuchlichen Fluoreszenz-Farbstoffe eingestellt (eigentlich eher: die Fluoreszenzfarbstoffe wurden nach den verfügbaren Lasern ausgewählt). Die dreidimensionale Probe wird dabei zunächst in Schichten aufgeteilt und in jeder Schicht die dort liegenden Bildpunkte mit dem Laser exakt angesteuert und punktuell beleuchtet; die von diesem Punkt kommende Fluoreszenz wird in Photomultiplier-Tubes registriert. Das emittierte Licht kommt dann jeweils nur von dem einen im Fokus liegenden Bildpunkt. Das Gesamtbild entsteht durch ein „Abrastern“ des gesamten Probenraumes mit dem Laserstrahl. Dieser Vorgang wird über ein rechnergesteuertes System von Spiegeln und Blenden erreicht. Es ist also zu keinem Zeitpunkt wirklich ein echtes sichtbares Mikroskop-Bild vorhanden. Die Bilder entstehen aus den Einzelpunkten in der rechnergestützten Verarbeitung. Eine Mikroskopie in „Echtzeit“, wie Sie beim normalen Durchlicht- oder Fluoreszenzmikroskop üblich ist, ist hier nicht möglich. Die Laserbeleuchtung und das aufwändige Spiegelsystem verursachen die Kosten für

diese Mikroskope. Dieses Verfahren wird üblicherweise als "confocal laser scanning microscopy" (CLSM) bezeichnet.

Spinning Disc Confocal Microscopy: Konfokalität kann auch erreicht werden, wenn eine lichtstarke Hellfeld-Beleuchtungsquelle eingesetzt wird und kein "Rasterbild" im Rechner zusammengesetzt werden muss. Dabei ist dann auch eine konfokale Echtzeit-Mikroskopie möglich. Das Prinzip dieses Verfahrens stützt sich auf eine rotierende Scheibe im Strahlengang, die ein komplexes, mathematisch abgeleitetes Lochmuster aufweist (Nipkow-Scheibe). Ohne auf die Details hier einzugehen, hat dieses Vorgehen zwei wesentliche Effekte:

- Licht, das aus Bereichen oberhalb und unterhalb der Fokusebene des Objektivs kommt, wird mit Hilfe der bei definierter Geschwindigkeit rotierenden Nipkow-Scheibe aus dem Strahlengang entfernt (Konfokalität)
- Der Großteil des eingestrahlen Lichtes und auch des emittierten Lichtes (Fluoreszenz) wird mit entfernt. Um das Bild auf der Kamera zu erzeugen, sind dann Hochleistungskameras mit extremer Empfindlichkeit notwendig.

Dieses Verfahren erlaubt auch Fluoreszenzfarbstoffe ausserhalb der üblichen Laser-Wellenlängen und kann theoretisch sogar im Durchlicht angewandt werden. Die Option der Mikroskopie in Echtzeit erlaubt zum Beispiel die kontinuierliche Verfolgung von Bewegungen innerhalb lebender Zellen.

1.3. Grundprinzipien der Elektronenmikroskopie

Transmissions-Elektronen-Mikroskopie (TEM): Es handelt sich hier um ein Verfahren, das dem Durchlicht-Prinzip bei der Lichtmikroskopie analog ist. Allerdings wird kein Licht benutzt, um die Probe zu durchstrahlen, sondern Elektronenstrahlen. Diese müssen im Hochvakuum bei sehr hohen Spannungen (viele kV) in speziellen Kathoden erzeugt werden. Alle Elemente des Strahlengangs befinden sich im Hochvakuum, die Linsensysteme bestehen nicht aus Glas sondern sind elektromagnetische Felder, die über Spulenringe gesteuert und im Hochvakuum positioniert werden. Nach Durchtritt durch die Probe treffen die Elektronenstrahlen auf einen Rezeptor, der im konventionellen Elektronenmikroskop eine Phosphoreszenzscheibe ist, die bei Auftreffen von Elektronen leuchtet. Alternativ gibt es für denselben Zweck heute digitale Kameravorrichtungen. Die Bilder sind grundsätzlich schwarz-weiss. Beim Durchtritt durch die Probe wird ein Teil der Strahlen durch schwere, bzw. hochdichte Zonen im Präparat abgelenkt und trifft den Rezeptor nicht. An diesen Stellen bleibt der Detektor dann dunkel. Da die Wellenlänge der Elektronenstrahlen um ein vielfaches kürzer ist als die Wellenlänge sichtbaren Lichtes, können extrem hohe Auflösungen, im Extremfall bis hinein in den Grenzbereich einzelmolekularer Auflösung, erreicht werden.

Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM, engl. SEM): Bei der REM wird ein fokussierter Elektronenstrahl auf die Oberfläche eines dreidimensionalen Objektes aufgestrahlt. Die Präparate sind keine Schnitte und können sogar relativ groß sein (z.B. ganze Insekten, etc.). Allerdings müssen die Oberflächen der Präparate leitend sein und zur Reflexion/Ablenkung der Elektronenstrahlen führen. In der Regel sind diese Präparate daher im Hochvakuum mit Gold bedampft worden, das als dünne metallische Lage diese Eigenschaften vermittelt. Das Präparat wird mit dem Elektronenstrahl abgerastert (scanning) und an jedem Punkt der Winkel der Reflexion und die Laufzeit erfasst. Damit entstehen dann in der nachgelagerten Verarbeitung im Rechner perspektivische Bilder mit dreidimensionaler Anmutung und sehr hoher Auflösung.

2. Darstellung von Strukturen in Histologischen Präparaten

Für die Darstellung biologischer Strukturen in Gewebeschnitten gibt es eine Vielzahl von Methoden. Es würde zu weit führen, diese hier erschöpfend abzuhandeln. Dafür sei auf entsprechende Referenzwerke verwiesen (Romeis und Mulisch 2010; Horobin und Kiernan 2002). Diese Kurzdarstellung folgt einer Gliederung nach zunehmender molekularer Spezifität der Nachweisverfahren. Dabei folgt die Darstellung auch weitgehend der historischen Entwicklung von Nachweisverfahren in der Histologie, denn die Färbeverfahren standen am Anfang der Entwicklung, sind aber gleichzeitig auch die am wenigsten auf Einzelmoleküle ausgerichteten Methoden. Diese einfachen und preiswerten Verfahren sind bis heute das Rückgrat der histopathologischen Diagnostik. Nur bei Bedarf werden dort auch spezifischere (und teurere) Methoden eingesetzt. Auf den parallelen Linien des Zeitstrahles und der zunehmenden Spezifität und Sensitivität finden sich als nächstes die sogenannten histochemischen Methoden (untergliedert nach Substrat- und Enzymhistochemie), die (bio-)chemische Nachweisreaktionen in der komplexen Umgebung eines Schnittes durchführen. Modern sind schliesslich die immunhistochemischen Verfahren und die molekularbiologischen Nachweise, die tatsächlich imstande sind, die ortsrichtige Verteilung einzelner Proteine/Moleküle/Nukleinsäuresequenzen in der heterogenen Molekülmischung eines Gewebeschnittes abzubilden.

2.1. Histologische Färbungen

Zweck einer Färbung ist es, intensiven und dauerhaften farblichen Kontrast in einem Gewebeschnitt zu erzeugen. Dabei werden bei einem klassischen chemischen Farbstoff bestimmte Teile des weißen Spektrallichtes absorbiert, andere durchgelassen. Der nicht-absorbierte Teil des weißen Spektrums tritt dann durch den Schnitt hindurch und ist für den Betrachter farbig. Wegen der geringen Lichtwege durch einen Schnitt (in der Regel wenige μm) und der Tatsache, dass in der Histologie große Lichtstärken im Durchlicht eingesetzt werden, müssen die Farbstoffe für die Histologie sehr intensiv absorbieren, lichtecht (d.h. lichtbeständig) sein und Farbverschiebungen im sichtbaren Bereich des Lichtes auslösen.

Viele Färbungen wurden in der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts und auch noch in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts entwickelt. Die Histologie entwickelte sich dabei parallel zur Industrialisierung und zum Aufblühen der chemischen Industrie, die sich ebenfalls intensiv mit der Färbung von Stoffen und Oberflächen beschäftigte und in großem Maßstab an Farbstoffen forschte. Viele Begriffe, die bis heute in der Histologie gebräuchlich sind, stammen aus der chemischen Industrie und wurden von dort geprägt. Dazu zählen z.B. Begriffe wie „Farblacke“, Beizen, Farbpigmente, etc. Auch die Abkürzungen, die bei vielen Farbstoffen bis heute in Gebrauch sind, wurden in der chemischen Industrie eingeführt, um die Anwendungsbereiche von Farbstoffen zu kennzeichnen. Die dazu benutzten Großbuchstaben stellen eine Möglichkeit der anwendungsorientierten Systematisierung (allerdings leider nicht für die Histologie) dar: Die Buchstaben nach Farbstoffnamen nach diesem System haben folgende Bedeutung: **A**: für Acetatseide, **B**: blaustichig, **C**: chlorecht, **D**: zum Drucken, **F**: klare Töne, **G**: grünstichig, **H**: hitzebeständig, **J**: gelblich (jaunâtre), **L**: lichtecht, **M**: Mischung, **N**: neu, **R**: rotstichig, **RR**: stark rotstichig, **S**: löslich (soluble), **T**: tiefer Farbton, **W**: wasserlöslich, **Y**: gelblich (yellowish). Um die Intensität dieser Eigenschaften hervorzuheben werden die Symbole doppelt genannt (z. B. RR) oder mit Ziffern verwendet (z.B. 6R). Häufig werden Farbstoffe mit Trivialnamen benannt, da chemische Bezeichnungen zu kompliziert wären. Eine für die Färbungen in der Histologie in besonderer Weise relevante Klassifizierung von Farbstoffen wurde durch die Biological Stain Commission (USA) vorgenommen, die Farbstoffe in einem Colour Index (abgekürzt mit C.I.) erfasst hat und auch die Qualität von Produkten für die Histologie kontrolliert (Horobin.2002). In Klammern gesetzte Zahlen nach dem Namen eines Farbstoffes verweisen auf die Nummer in diesem Colour Index: z.B. Gallocyanin (C.I. 51030) oder kurz Gallocyanin (51030).

2.1.1. Prinzipien der Färbung

2.1.1.1. Charakteristika von Farbstoffen

Die allermeisten Farbstoffe sind letztlich Derivate von Substanzen der aromatischen Reihen und in diesem Sinne mit Benzol (C₆H₆) oder Analoga von Benzol mit größeren aromatischen Ringsystemen verwandt. Im Benzol formen die sechs beteiligten Kohlenstoffatome einen Ring, in dem die π -Elektronen der C-C Bindungen über das gesamte Kohlenstoffsystem delokalisiert, d.h. annähernd gleich verteilt sind. Die so entstandene „Elektronenwolke“, ein konjugiertes π -Elektronensystem, ist die Basis für die Farbigekeit von Substanzen, weil diese Systeme mit Photonen, d.h. mit Licht, interagieren können. Farbstoffe enthalten ein oder mehrere solcher konjugierten π -Elektronensysteme. Häufig werden in Abwandlung des Grundprinzips auch sogenannte heterozyklische Ringe eingesetzt, in denen ein oder mehrere Kohlenstoffatome des Systems gegen ein anderes Atom (z.B. häufig Stickstoff) ausgetauscht sind.

Homozyklische oder heterozyklische Ringsysteme absorbieren Licht i.d.R. zunächst nur im UV-Bereich, d.h. außerhalb des sichtbaren Teils des Spektrums. Darum ist Benzol zum Beispiel für das menschliche Auge nicht farbig, bestenfalls gelblich. Um das Absorptionsspektrum von Farbstoffen in den sichtbaren Bereich zu verschieben, müssen in die Ringe sogenannte chromophore Gruppen eingeführt werden. Chromophore Gruppen führen Asymmetrien in die konjugierten π -Elektronensysteme ein und führen zur gewünschten Verschiebung der Farbe aus dem ultravioletten in den sichtbaren Bereich des Lichts. Einige grundlegende chromophore Gruppen sind zum Beispiel: C=C Ethylen, C=O Carbonyl, C=S Sulfin, C=N Carbimin, N=N Azo, N=O Nitroso, NO₂ Nitro.

Auf diesem Weg können also Substanzen erhalten werden, die selbst farbig sind. Diese Substanzen sind aber - von wenigen Ausnahmen (Lipidfarbstoffe) abgesehen - nicht wirklich in der Lage, stabile Anlagerungen an Stoffe im Sinne einer Färbung einzugehen. Um dies zu ermöglichen, werden sogenannte „auxochrome“ Gruppen eingeführt, die häufig entweder Säuren oder Basen sind und/oder koordinativ bzw. kovalent mit funktionellen Gruppen des Gewebes reagieren können. Auxochrome Gruppen können über elektrostatische Interaktionen an geladene Gruppen von Gewebebestandteilen binden, können über koordinative Bindungen häufig unter Einbeziehung von Metallionen an funktionelle Gruppen des Gewebes binden oder auch kovalent gebunden werden. Ein Sonderfall ist die Inklusion von Farbstoffen in besondere Strukturen von großen Biomolekülen. Dies ist zum Beispiel bei den interkalierenden Farbstoffen (Ethidiumbromid, Propidiumjodid, Bisbenzimid) für die Färbung von DNA oder bei der Einbindung von Jod in Stärke der Fall.

In einem histologisch brauchbaren Farbstoff sind also in der Regel aromatische Kerne, chromophore Gruppen und auxochrome Gruppen enthalten. Für die färberischen Eigenschaften sind Anordnung und Eigenheiten der auxochromen Gruppen die wichtigsten Determinanten.

2.1.2. Mechanismen der Färbung

Die meisten Färbungen waren empirisch bestimmte und optimierte Verfahren. Die entwickelnden Histologen haben in der Blütezeit der Farbenindustrie die neuen Farbstoffe einfach systematisch an Geweben ausprobiert und dabei die zuverlässigsten und bis heute erprobten Verfahren entwickelt. Trotzdem lassen sich aus den verschiedenen etablierten Verfahren, den chemischen Eigenschaften der Farbstoffe und den im Gewebe erzielten Färbungen einige Zusammenhänge ableiten.

Elektrostatische Färbungen: beruhen auf der Bindung stark geladener Farbstoffe an gegensätzliche Ladungen im Gewebe. Solche Färbungen sind immer stark abhängig von der Fixierung (Veränderung der Ladung z. B. durch Addition von Formaldehyd an Aminofunktionen) und von der Einbettung (Epoxid-Harze überlagern die Ladungsverteilungen sehr stark) und von den Bedingungen (vor allem dem pH) der Färbelösung. Auf Basis dieser Betrachtungen wurden die bis heute benutzten Begriffe „basophil“ (für Gewebekompartimente, die basische Farbstoffe binden) und eosinophil (auch: azidophil, für Gewebekompartimente, die saure Farbstoffe wie Eosin binden) geprägt. Gute Kontraste erreichen Färbungen nach diesem Prinzip zum Beispiel bei der Unterscheidung von

nukleinsäurereichen Arealen (Zellkern, rER) von proteinreichen Arealen (Zytosol, Mitochondrien), sowie etwas weniger gut von kohlehydratreichen Arealen (Mucus, keine Färbung).

Indirekte Färbungen: Solche Färbungen sind eigentlich Zweischrittverfahren, bei denen eine sogenannte Beize mit einem Farbstoff zu einem Farblack kombiniert wird. Der Begriff des Beizens stammt aus der Textilchemie, nicht aus der Histochemie. Meist enthalten Beizen Metallionen, die dem Gewebe angeboten werden und koordinative (komplexchemische) Bindungen an verschiedene Gewebebestandteile eingehen. Dabei bleiben koordinative Valenzen noch frei (de facto vorübergehend mit dem schwachen Liganden Wasser besetzt) und können anschließend mit einem Farbstoff zum sogenannten Farblack weiter reagieren. Kennzeichnend ist, dass die resultierenden Farblacke chemisch recht stabil im Gewebe verankert sind, weil sie die Metallionen als Brückenkopf zur Bindung an Gewebe benutzen. Obwohl diese Zweischrittigkeit eines der Grundprinzipien der indirekten Färbungen ist, wird nicht immer tatsächlich in zwei Schritten gefärbt. Häufig wird der Farblack bereits in Lösung hergestellt und dann mit einer solchen Färbelösung inkubiert. Das klassische Beispiel einer solchen einschrittigen Farblackmethode ist die Hämatoxylinfärbung. Das Hämatoxylin wird in leicht saurer Lösung als Farblack angeboten, bindet an die basophilen Strukturen des Gewebes (Zellkerne) und anschließend wird durch Spülen (entfernen überschüssiger Farbe im ebenfalls leicht sauren Milieu) und „Bläuen“ die feste Verbindung des Farblackes mit der Struktur etabliert. Bläuen erfolgt bei leicht alkalischem pH, meist ausreichend durch Leitungswasser, das leicht alkalisch ist. Aufgrund der komplexchemischen Grundnatur der indirekten Farbstoffchemie sind praktisch alle Farblacke Substanzen, die für die Färbung basophiler Zonen hervorragend geeignet sind. Durch Behandlung mit Säuren können diese Färbungen häufig wieder abgeschwächt (differenziert) werden, wenn dies notwendig sein sollte.

Physikalisch-Chemische Verteilung: Verteilungskoeffizienten über Grenzflächen hinweg bilden die Grundlage für physikalisch-chemische Verfahren. Hier wird häufig mit nicht entwässertem Material und zum Beispiel an Schnitten von eingefrorenem Gewebe gearbeitet, weil die Entwässerung in der Alkoholreihe Grenzflächen zerstört, Lipide extrahiert und viele dieser Färbungen unmöglich macht. Fettfärbungen mit Sudan-Farbstoffen sind sicherlich die besten Beispiele für diese Gruppe von Färbungen.

2.1.3. Gebräuchliche Standardfärbungen

Hier wird auf die für diesen Kurs besonders relevanten Färbungen in Kapitel 3 verwiesen.

2.2. (Bio-)chemie am Gewebeschnitt: Histochemie

Ein Sonderfall der Färbungen stellen Versilberungen dar, die in der Mikroskopie schon früh eingesetzt wurden und in verschiedenen Bereichen der mikroskopischen Anatomie bis heute eine wichtige Stellung einnehmen. Die Golgi-Färbung z.B. ist eine selektive Versilberung einzelner Neurone, die diese bis in die kleinsten Verästelungen darstellt und sie ist bis heute ein wichtiges Verfahren zur Kartierung der neuronalen Gestalt. Auch der Golgi-Apparat kann mit Hilfe von Versilberungen (s. ABB. 3.5) dargestellt werden. Die durch Versilberungen darstellbaren sogenannten „Retikulinfasern“ (s. ABB. 3.5) sind - wie inzwischen klar ist - tatsächlich Fibrillen des Kollagens Typ III. Versilberungen sind eher als „Histochemie“, denn als Färbung einzustufen, weil es - nach chemischer Vorbehandlung des Schnittes - an bestimmten Stellen zur Ausfällung kolloidalen metallischen Silbers kommt. Die nur wenige nm großen kolloidalen Silberpartikel streuen das eingestrahlte Licht und erscheinen im Lichtmikroskop deswegen kontrastreich schwarz vor weißem Hintergrund.

2.2.1. Substrathistochemie

Zu den klassischen substrathistochemischen Reaktionen gehören zum Beispiel

- der Nachweis von Glykogen oder anderen Kohlehydraten, die sogenannte vicinale Diole enthalten, mittels der PJS oder PAS (Perjodsäure-Schiff) Reaktion,
- der qualitative oder quantitative spezifische Nachweis von DNA mit Hilfe der Feulgen-Reaktion
- der Nachweis von Metallionen mit Hilfe farbiger Chelatbildner (z.B. Berliner Blau-Reaktion zum Nachweis von Eisen).

Davon abzugrenzen sind die oben schon erwähnten Möglichkeiten, Fette mit fettlöslichen Farbstoffen in Lipidtröpfchen nachzuweisen. Dabei findet nur eine Partitionierung über eine Phasengrenze hinweg statt, bei der sich ein Farbstoff in der fettigen Phase anreichert.

Substrathistochemische Verfahren hängen sehr stark von Fixation und Einbettung ab. Glykogen zum Beispiel wird bei der Entwässerung nicht nur weitgehend herausgelöst, sondern teilweise auch delokalisiert (Phänomen der „Substanzflucht“).

2.2.1.1. Prinzip der PJS-Reaktion

Bei dieser Reaktion wird ein Schnitt zunächst mit Perjodsäure oxydiert. Dabei werden sehr selektiv sogenannte vicinalen Diole in polymeren Zuckern oxydiert. Vicinale Diole sind direkt benachbart stehende Hydroxylfunktionen. Es entstehen durch die Oxydation vicinale Carbonylfunktionen. Solche vicinalen Carbonylfunktionen können sehr selektiv mit dem Schiff'schen Reagenz nachgewiesen werden das mit den Carbonylen zu intensiv roten Schiff'schen Basen reagiert¹. Die in der Histologie üblichen Mischungen basieren auf Neufuchsin oder Pararosanilin zur Bildung der Schiff'schen Basen. Die Farbstoffe sind auch in Spuren zu detektieren, weil sie in hoher Verdünnung schon stark fluoreszieren, lange bevor sie im Durchlicht sichtbar werden.

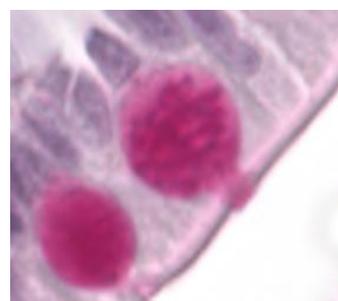


Abbildung 2.1.: Kurspräparat: Darstellung von Kohlehydraten in Mucus. Die rot gefärbten Areale sind die Mucus-haltigen Areale von Becherzellen im Epithel des Dünndarms. Die Kerne sind mit Hämatoxylin blau gegengefärbt.

Die Perjodsäure-Oxidation ist spezifisch für vicinale Diole, die allerdings nicht nur in Glykogen vorkommen können, sondern auch in vielen anderen makromolekularen Kohlehydraten auftreten. Die Spezifität der Reaktion ist also immer nur indirekt und muss durch geeignete Kontrollreaktionen demonstriert werden. Neben Schiff'schem Reagenz können auch andere chemische Reaktionsmechanismen zum Nachweis von Aldehyden eingesetzt werden. Am weitesten verbreitet sind hier Versilberungen.

2.2.1.2. Prinzip der Feulgen-Reaktion

Bei der Feulgen Reaktion werden ebenfalls zunächst Aldehyde erzeugt, die anschließend mit Schiff'schem Reagenz nachgewiesen werden. Diese Reaktion ist DNA-spezifisch; RNA wird nicht erfasst. Außerdem wird sie von den üblichen histologischen Einbettungsprozeduren nicht behindert, und DNA wird - im Unterschied zu verschiedenen Formen der RNA - nicht bei der Einbettung extrahiert. Die Feulgen-Reaktion ist nicht nur als qualitativer Nachweis der DNA zu verwenden, sondern auch als quantitatives Nachweisverfahren geeignet. Mit Hilfe der Feulgen-Reaktion können unter gut standardisierten und kontrollierten Bedingungen auch am Gewebeschnitt DNA-Mengen in Zellkernen vergleichend quantifiziert werden. Folgende Schritte werden durchgeführt:

1. Durch milde saure Hydrolyse lösen sich die Purinbasen von der DNA ab, und es entstehen freie Aldehydgruppen (meistens wird dazu 1 N HCl bei erhöhter Temperatur verwendet).
2. Reaktion der freien Aldehydgruppen der depurinierten DNA mit dem Schiff-Reagenz.

¹Das Schiff-Reagenz enthält in schwefliger Säure gelöstes - eigentlich tiefrotes - Neufuchsin oder Pararosanilin. In dem mit der schwefligen Säure gebildeten Komplex werden Doppelbindungen umgeordnet, und dadurch wird das Molekül farblos (dann als Leukofuchsin bezeichnet). Eine chemische Reaktion zwischen Leukofuchsin und den freien Aldehydgruppen ergibt die Wiederherstellung der Doppelbindungen und der roten Farbe

2.2.2. Enzymhistochemie

In der Enzymhistochemie wird die Aktivität eines Enzyms² im Gewebe nachgewiesen. Enzymhistochemische Verfahren werden darum auch häufig als aktivitätshistochemische Verfahren - in Abgrenzung zu den substrathistochemischen Verfahren - bezeichnet. Letztlich wird durch das aktive Enzym ein Farbstoff³ am Ort des Enzymproteins produziert und so die Aktivität des Enzyms nachgewiesen. Diese Art des Nachweises eines endogenen Enzyms wird heute zum Zweck der biochemischen Analyse der Enzymaktivität nur noch sehr selten angewandt, weil nur in wenigen Fällen tatsächlich die Notwendigkeit besteht, z.B. die Enzymkinetik im originalen Gewebeumfeld genau und ortsrichtig zu bestimmen. Enzyme werden durch die Fixierung und Einbettung i.d.R. stark gehemmt oder sogar inaktiviert. Nimmt man Schnitte von gefrorenem Material so ist die Aktivitätserhaltung meist besser, aber leider die Strukturhaltung dann schlechter.

Trotzdem spielt die Enzymhistochemie bis heute eine große Rolle in der praktischen Histologie, weil einige wenige Enzyme (alkalische Phosphatase, Galactosidase, Peroxidasen) bei hochspezifischen Nachweisverfahren als Signalverstärker („Lampe“) eingesetzt werden. Dabei wird ihr erheblicher Verstärkungsfaktor zur Produktion ausreichender Mengen lichtmikroskopisch sichtbaren Farbstoffs eingesetzt (s. ABB. 3.6, Nachweis von Cytokeratin).

2.3. Hochspezifische Nachweisverfahren

Die modernen Verfahren der Histologie weisen einzelne und genau definierte Moleküle oder Epitope ortsrichtig im Gewebe nach. Solche Präzision ist mit den färberischen Methoden gar nicht und mit der Substrat- oder Enzymhistochemie bestenfalls in Ausnahmefällen erreichbar. Die modernen hochspezifischen Nachweisverfahren hängen von zwei wesentlichen Grundvoraussetzungen ab:

Spezifische und Sensitive „Sonden“: Die nachzuweisenden Moleküle oder Epitope (Membranrezeptoren, Zytoskelettmoleküle, Transkriptionsfaktoren, etc.) liegen in einem dünnen Schnitt in sehr geringer Konzentration vor, die i.d.R. bestenfalls im femto- oder attomolaren Bereich liegt. Die Sonden⁴ müssen in diesen niedrigen Konzentrationsbereichen hochaffin und spezifisch binden. Wo solche Sonden nicht vorliegen, sind hochspezifische Nachweise nicht durchführbar.

Signalverstärkung: Auch wenn eine Sonde hochspezifisch und hochaffin an ihr Zielmolekül gebunden hat, ist zunächst noch nicht viel gewonnen: Die Sondenmoleküle selbst sind in der Regel mikroskopisch nicht sichtbar und ihre Konzentration auch nicht primär höher als die der nachzuweisenden Zielmoleküle. Allerdings sind die Sonden so konstruiert, dass Sie den Ausgangspunkt einer histochemischen Signalverstärkungskaskade darstellen können. Über die Signalverstärkungskaskade wird dann sekundär die Lokalisation der Sonde im Gewebeschnitt sichtbar gemacht.

Im Folgenden wird zunächst auf einige wichtige Möglichkeiten der Histologie eingegangen, histochemische Signalverstärkungskaskaden zu implementieren. Anschließend werden einige typische SONDENSYSTEME dargestellt und in einem dritten Kapitel die im Kurs verwendeten hochspezifischen Nachweise dargestellt. SONDENSYSTEME und Signalverstärkungskaskaden sind als eine Art Werkzeugkasten der Histologie anzusehen, aus dem die für die jeweilige Fragestellung geeignetsten Methoden ausgewählt und umgesetzt werden können. Die benötigten Reagenzien sind vielfach kommerziell verfügbar.

²Enzyme sind biochemisch meist Proteine, die sich durch die Eigenschaft auszeichnen, biochemische Reaktionsschritte zu erleichtern und zu ermöglichen. Sie wirken dabei sehr spezifisch auf einzelne Reaktionsschritte. Enzyme sind also hochspezifische Katalysatoren und ermöglichen - pro Enzymmolekül - viele Umsetzungen pro Zeiteinheit. Dieser Multiplikationsfaktor macht Enzymnachweise oft sehr sensitiv.

³Die speziellen Substrate für die Enzymhistochemie werden daher oft auch als „chromogene“ Substrate bezeichnet. Sie werden speziell für diesen Zweck synthetisiert.

⁴Typische Sonden sind z. B. Antikörper oder kurze DNA- oder RNA-Sequenzen

2.3.1. Möglichkeiten der Signalverstärkung

2.3.2. "Lampen", oder: Wie sieht man einen Antikörper?

Unabhängig von ihrer stofflichen Natur werden die in der Histologie eingesetzten hochspezifischen Nachweismoleküle im Folgenden zusammenfassend als Sonden bezeichnet. Sonden sind selbst nicht gefärbt und in der Regel nicht ohne weiteres nach Bindung im Schnitt oder an anderen Präparaten sichtbar. Biochemisch sind solche Sonden

- *Proteine*, z. B. Antikörper, die häufig an andere Proteine binden oder auch Lektine, die durch spezifische Zuckerbindung charakterisiert sind;
- *Nukleinsäuren (RNA oder DNA)*, deren Spezifität über die Abfolge der Nukleotide in den meist synthetisch hergestellten kurzen Sondensequenzen gewährleistet wird,
- *Naturstoffe*, z.B. hochspezifisch bindende Toxine wie das Phalloidin, das an Actin bindet.

Sonden sind ohne besondere Vorkehrungen bzw. Veränderungen zunächst nicht im Schnitt sichtbar weil sie in der Regel weder ausreichend farbig noch fluoreszierend sind. Zwei wesentliche Strategien werden genutzt, um Sonden sichtbar zu machen:

Direkte Markierung der Sonde mit Fluorochromen (Direkte Fluoreszenz) Wie oben ausgeführt, wird bei der Fluoreszenzmikroskopie der Bildhintergrund insgesamt schwarz. Nur die fluoreszierenden Moleküle leuchten vor dem schwarzem Hintergrund auf und können dann sehr sensitiv wahrgenommen werden. Ein Beispiel für ein solches Fluoreszenzbild ist das Kurspräparat zum Tubulin-Nachweis (s. ABB. 3.6, rechte Seite). Die Reduktion der Hintergrundhelligkeit ist bei der direkten Fluoreszenzdetektion im Mikroskop der effektivste - häufig auch der einzige - Verstärkungsmechanismus. Die Sonden wurden für das direkte Verfahren vor ihrem Gebrauch mit fluoreszierenden Farbstoffen kovalent verknüpft (markiert). Meist können dabei aber nicht mehr als ein bis höchstens vier Fluorophor-moleküle an eine Sonde gebunden werden. Nach der spezifischen Bindung der Sonde im Schnitt leuchten die durch die Bindung der Sonden markierten Regionen im Fluoreszenzbild ohne weitere Reaktionsschritte auf. Da bei der direkten Markierung die Verstärkungskaskade noch fehlt, ist die Schwärzung des Hintergrunds zur Kontraststeigerung unbedingt notwendig. In vielen Fällen reicht die Sensitivität, die mit diesen Schritten erreicht werden kann, aber noch nicht aus. Ausserdem müssen hier häufig hohe Antikörperkonzentrationen eingesetzt werden, um ein ausreichendes Signal im Mikroskop zu erhalten. Die Verfügbarkeit hochspezifischer Antikörper ist aber häufig limitiert oder sehr kostspielig. Nach Anwendung der direkten Technik wird im Präparat ein Komplex sichtbar, wie er in ABB. 2.2 im linken Teil dargestellt ist.

Indirekte Markierung im Zweischrittverfahren (Indirekte Fluoreszenz und Lichtmikroskopie) Das Zweischrittverfahren macht sich die Tatsache zunutze, dass Antikörper zum Gebrauch als Sonde üblicherweise nach Immunisierung von Tieren (Mäuse: monoklonale Antikörper⁵; andere Tierarten wie Schaf, Rind, Ziege, Huhn, etc. polyklonale Antikörper⁶) entstehen. Das heisst, dass diese Sonden letztlich Immunglobuline einer bestimmten und bekannten Tierart sind. Meist werden monoklonale Antikörper der Maus als Sonden eingesetzt, die in vitro produziert werden können. Beim Zweischrittverfahren bezeichnet man diese Antikörper als Primärantikörper; diese sind die eigentliche Sonde.

Werden Tiere (Ziegen, Schafe, Esel, Pferde, Hühner, etc.) mit unspezifischen Antikörpern aus dem Serum von Mäusen immunisiert, so entwickeln sie selbst Antikörper, die hochspezifisch an Maus-Antikörper binden. Solche Antikörper können an Schnitten von z.B. menschlichem Material eingesetzt werden, um dort spezifisch gebundene Primärantikörper der Maus zu detektieren. Sie können dann als Universal-Sekundärantikörper gegen jeden beliebigen Primärantikörper aus der Maus eingesetzt werden. Solche Sekundärantikörper sind kommerziell als Konjugate mit Fluorochromen oder Enzymen (z.B. Peroxidase) erhältlich. Weil diese Konjugate bereits einen optimierten und sehr hohen

⁵Nobelpreis für Köhler und Milstein für die Technik der Klonierung von Antikörpern aus der Maus, die sogenannte Hybridoma-Technik

⁶Polyklonale Antikörper sind im Serum der immunisierten Tiere vorhanden und werden entweder direkt als Serum eingesetzt oder aber aus dem Serum vor der histochemischen Verwendung extrahiert.

Gehalt an Signalgebern pro Antikörper aufweisen und gleichzeitig mehrere dieser Antikörper an einen Primärantikörper binden können, wird mit dem Zweischrittverfahren bereits eine erhebliche Verstärkung erreicht (s. Abb. 2.2).

Indirekte Markierung im Mehrschrittverfahren (Indirekte Fluoreszenz und Lichtmikroskopie)

Bei diesen Verfahren wird der Sekundärantikörper nicht mit einem fluoreszierenden Molekül konjugiert, sondern mit einem Brückenmolekül, das als Beginn einer technisch implementierten Signalverstärkung wirken kann. Moleküle, die zu diesem Zweck häufig an Sekundärantikörpern verwendet werden sind zum Beispiel Biotin (bei Proteinen) oder Digoxigenin (bei Nukleinsäuren). Gemeinsam ist allen diesen Molekülen, dass es spezifische Bindungspartner für diese Brückenmoleküle gibt (Streptavidin als Bindungspartner für Biotin oder Antikörper als Bindungspartner für Digoxigenin). Diese Bindungspartner für die Brückenmoleküle sind dann möglichst optimiert mit Fluoreszenzfarbstoffen oder Enzymen gekoppelt (s. Abb. 2.2).

In der Durchlichtmikroskopie werden im letzten Schritt enzymhistochemische Reaktionen genutzt, um die Bindungsstelle der primären Sonden sichtbar zu machen. Das Prinzip, dass zunächst eine primäre Sonde bindet, an die dann eine sekundäre oder sogar noch eine tertiäre Sonden gebunden wird, bleibt für die Verstärkungskaskade hier erhalten. Diese mehrschrittigen Reaktionen werden auch häufig in der Durchlicht-Visualisierung primärer Antikörper oder anderer Sonden eingesetzt. Dann wird die Signalverstärkung noch einmal wesentlich effizienter gemacht, indem Enzyme mit einer hohen Wechselzahl und guter Farbdetektion im letzten Schritt als „Lampe“ bzw. Signalgeber eingesetzt werden. Die Enzyme (meist Peroxidase, aber auch alkalische Phosphatase oder Galactosidasen) werden durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Die enorme Signalverstärkung durch Enzyme ist wegen der hohen Umsetzungszahl der Enzyme auch im normalen Durchlichtmikroskop sichtbar und mit vielen Standardfärbungen der Histologie kombinierbar (s. auch linker Teil der Abb. 3.6). Ein Enzym kann eine ungeheure Anzahl an Farbstoffmolekülen aus farblosen Vorläufern erzeugen.

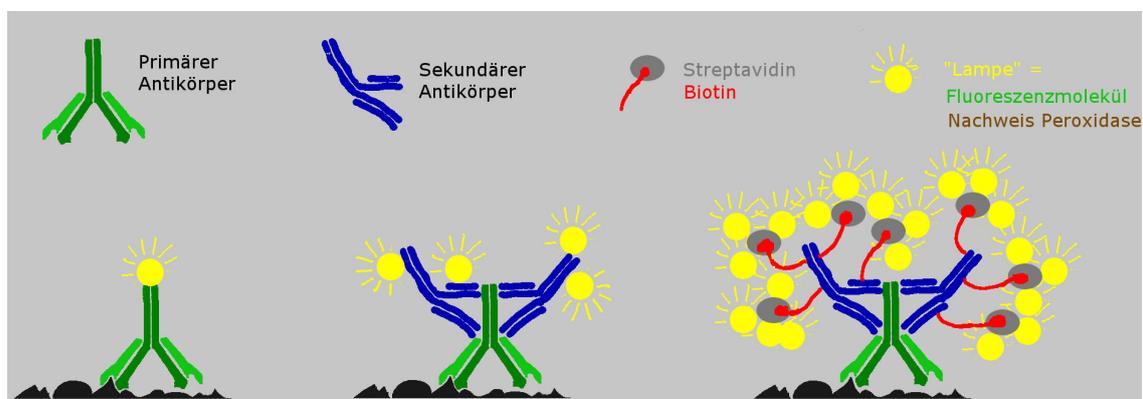


Abbildung 2.2.: Die Abbildung zeigt drei verschiedene Eskalationsstufen (in punkto Komplexität der Reaktion und Verstärkungsfaktor) von Signalamplifikationen bei hochspezifischen Nachweisverfahren am Beispiel einer Antikörperreaktion. Links ist ein für das Antigen spezifischer Primär-Antikörper gezeigt, der direkt mit einer „Lampe“, d.h. einem optischen Signalgeber, konjugiert ist. Im mittleren Bereich ist gezeigt, wie sogenannte Sekundärantikörper, die gegen den Primärantikörper gerichtet sind, mit dem Signalgeber konjugiert sind. Hier ist der Verstärkungsfaktor bereits deutlich höher. Rechts im Bild ist gezeigt, wie nach dem Primär- und Sekundärantikörper (letzterer war dann bereits mit Biotin konjugiert), durch spezifische Bindung von Streptavidin (dieses ist dann bereits mit dem Signalgeber konjugiert) eine nochmals um vieles höhere Signalamplifikation erreicht werden kann.

3. In den Kurspräparaten mehrfach eingesetzte Routinetechniken

3.1. Färbungen

3.1.1. Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)

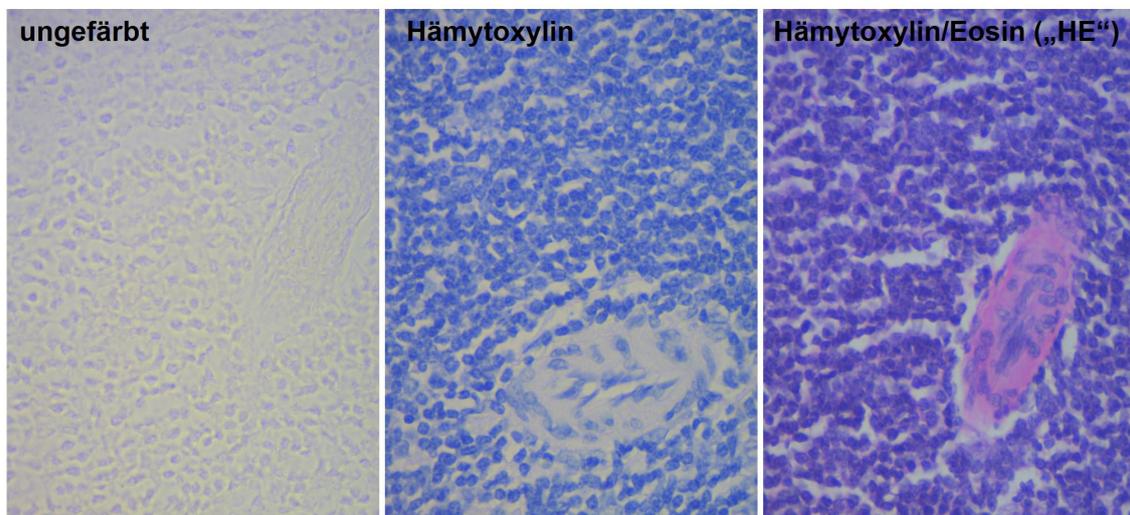


Abbildung 3.1.: Die Abbildung zeigt vergleichbare Zonen aus der menschlichen Milz (Zentralarterie mit periarterieller Lymphozytenscheide (PALS)). Von links nach rechts wird der Färbefortschritt und der Effekt auf das histologische Bild gezeigt. Hämatoxylin färbt die basophilen Zellkerne der Zellen (Runde kleine Zellkerne der Lymphozyten sowie die Zellen der Gefäßwand), Eosin färbt zusätzlich die intra- und extrazellulären Proteine, was an den zytoplasmareichen Zellen der arteriellen Wand deutlich wird. Auch um die blauen runden Kerne der Lymphozyten herum wird der schmale rötliche Plasmasaum sichtbar.)

Die HE Färbung (s. ABB. 3.1 und 3.2) ist die histologische Standardfärbung schlechthin und wird auch bei nahezu allen histopathologischen Untersuchungen als Routinefärbung mitgeführt. Sie besteht aus zwei Komponenten:

- *Hämatoxylin*, einem Farblack, der bevorzugt an Strukturen im Gewebe bindet, die durch einen Reichtum an sauren Endgruppen gekennzeichnet sind. Diese sauren Regionen werden auch als „basophil“ bezeichnet, weil sie besonders gut durch basische Farbstoffe wie Hämatoxalin gefärbt werden können.
- *Azidophiler Farbstoff Eosin*, eine Substanz, die die neutral bis basisch vorliegenden Proteine und Zellorganellen wie Mitochondrien tief orange/rot färbt und darstellt. Strukturen, die Eosin binden werden gerne auch als „eosinophil“ bezeichnet. Nicht ganz synonym ist der Begriff „azidophil“, der aber häufig auch im selben Sinn wie eosinophil gebraucht wird.

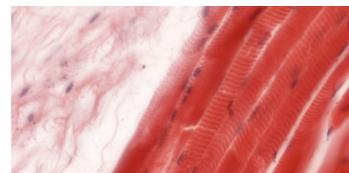


Abbildung 3.2.: Kurspräparat: Färberegebnis einer typischen HE-Färbung, dargestellt an der Skelettmuskulatur. Proteine im Bindegewebe (leicht rosa) und die dicht liegenden kontraktilen Filamente (tiefrot); dazwischen die vom Hämatoxylin in blau gegengefärbten Zellkerne.

Im Schnitt werden als basophile Regionen in der Regel vor allem die Regionen gefärbt, die viele Nukleinsäuren enthalten. Dazu gehören besonders der Zellkern und das raue endoplasmatische Retikulum im Zelleib. Die Färbung der basophilen Regionen mit Hämatoxylin ist intensiv und kontrastreich. Auch in den sauren Regionen der Biomembran - vor allem des Plasmalemm - kann Hämatoxylin eine schwache Färbung auslösen. Diese hilft, Zellgrenzen zu erkennen. Eosin färbt eher diffus und ohne spezifische Betonung primär nach der Menge und Dichte von Proteinen und Zellorganellen, insbesondere Mitochondrien. Insgesamt ergibt sich als Färbeergebnis bei der HE Färbung ein nuancenreiches, vor allem auf der Verteilung von Proteinen und Nukleinsäuren beruhendes Färbeergebnis.

3.1.2. Trichromfärbungen (AZAN-Färbung und Masson-Goldner Färbung)

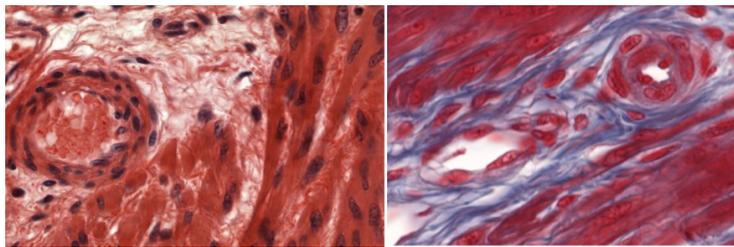


Abbildung 3.3: Kurspräparate: Myometrium in der HE-Färbung (links) und der AZAN-Färbung (rechts). Die AZAN-Färbung hebt die Kollagenfasern im Bindegewebe blau hervor, intrazelluläre Proteine und Zellkerne sind rötlich gefärbt.

Die Trichromfärbungen (s. ABB. 3.3) enthalten ähnlich wie die HE Färbung einen basophilen Farbstoff, der vor allem die Regionen färbt, die reich an Nukleinsäuren sind sowie einen azidophilen Farbstoff, der vorwiegend Proteine und Mitochondrien darstellt. Die dritte Farbstoffkomponente (daher der Begriff „Trichrom.“) färbt ein nur extrazellulär vorkommendes Faserprotein, nämlich fibrilläres Kollagen. Dazu werden die Farbstoffe Anilinblau (AZAN-Färbung) und Lichtgrün (Goldner-Färbung) verwendet.

Diese beiden Farbstoffe integrieren sich in kleine regelhaft auftretende Lücken der hochorganisierten Kollagenfasern und stellen diese sehr spezifisch dar. Solche genau definierten „Hohlräume“, die zur Bindung von Anilinblau oder Lichtgrün taugen, treten in anderen Proteinen oder Protein-Aggregaten nicht auf. Blaue Farbstoffe für den Zellkern werden bei diesen Farbkombinationen dann nicht eingesetzt. Insgesamt wird bei den Trichromfärbungen der Farbkontrast zwischen basophil und acidophil schwächer herausgearbeitet. Dafür werden aber intrazelluläre Proteine von extrazellulär vorkommenden, kollagenreichen Regionen deutlich unterschieden. Hilfreich sind Trichromfärbungen daher an allen Stellen, wo Bindegewebe und glatte Muskulatur sicher unterschieden werden sollen. Muskelgewebe sind reich an intrazellulärem Protein, den kontraktilen Proteinfilamenten. Bindegewebe sind reich an extrazellulärem Fasermaterial.

3.1.3. Elastica Färbung

Eine weitere spezielle Färbung zur Darstellung von extrazellulärem Fasermaterial ist die Gruppe der „Elastica“-Färbungen (s. ABB. 3.4). Dabei zielt die Färbung auf das extrazellulär in manchen Bindegeweben vorkommende Molekül Elastin ab, das Bestandteil elastischer Fasern ist.

Elastische Fasern kommen in vielen Organen in kleinen Mengen vor. Sie sind aber essentieller funktioneller Bestandteil des elastischen Knorpels, der Gefäßwand der herznahen Gefäße und der Lunge, um die wichtigsten Vorkommen zu nennen. Elastische Fasern können durch Orcein oder Resorcin-Fuchsin in einer dunkelbraun bis violetten Farbe dargestellt werden. Diese Farbstoffe binden sehr spezifisch an elastische Fasern und färben keine anderen extrazellulären Faserelemente. Meist werden solche Färbungen einfach mit einer Hämatoxylin-Färbung kombiniert, um auch die Zellkerne gut erkennen zu können. Ähnlich wie bei den Färbungen mit Anilinblau und Lichtgrün werden die Elastica-Farbstoffe sehr spezifisch in die elastischen Fasern eingelagert, während sie im restlichen Bindegewebe wenig gebunden werden.



Abbildung 3.4: Kurspräparate: Elastisches Bindegewebe in der Wand der Aorta. Links ist die HE Färbung, rechts treten die braun-violett gefärbten elastischen Faserbündel hervor. In der Elastica Färbung sind die Zellkerne durch Hämatoxylin hervorgehoben.

3.1.4. Versilberungen

Bei Versilberungen wird Silbersalz, das als Silber-Komplex (entweder mit Wasser als schwachem Liganden oder aber mit Aminen (Ammoniak, Hexamethylentetramin, Glycin, etc.)) in Lösung vorliegt, als Metallkolloid im Gewebe ausgefällt. Die versilberten Stellen wirken im Durchlichtbild schwarz, weil kolloidales metallisches Silber im Schnitt an diesen Stellen abgelagert wurde. Die Silberkolloide brechen das Licht aus dem Strahlengang und „schwärzen“ das mikroskopische Bild. Letztlich sind solche Silberfällungsreaktionen nur eine Form der lichtmikroskopischen Visualisierung, die man - je nach Vorbehandlung des Gewebes und der Zusammensetzung der Silberlösung - für verschiedene Zwecke nutzen kann. Sehr viel mit Versilberungen gearbeitet hat der Nobelpreisträger Camillo Golgi; nach ihm ist z.B. der Golgi-Apparat und eine bis heute zentrale Versilberung in der Neurohistologie benannt. Wichtige Beispiele im Kurs für Versilberungen sind:

- Die Versilberung sogenannter retikulärer Fasern (Retikulinfasern sind biochemisch Fasern aus Kollagen III). Diese Reaktion wird zur Darstellung retikulären Bindegewebes (z.B. Lymphknoten) oder aber auch zur Darstellung einzelner verstreut vorkommender retikulärer Fasern (z.B. Leber) eingesetzt (Beispiel in ABB 3.5, linke Seite).
- Die Darstellung der besonderen reduktiven Fähigkeiten des Golgi-Apparates mit speziellen Versilberungen (Beispiel in ABB 3.5, rechte Seite).
- Die Darstellung vollständiger einzelner Neurone mit allen Fortsätzen und Verästelungen bis ins kleinste Detail (Golgi-Färbung in der Neurohistologie); diese Färbung liegt nahezu allen klassischen Hirnkartierungen und Schaltschemata (Kleinhirnrinde, Hippocampus, Hirnrinde, etc.) zugrunde.

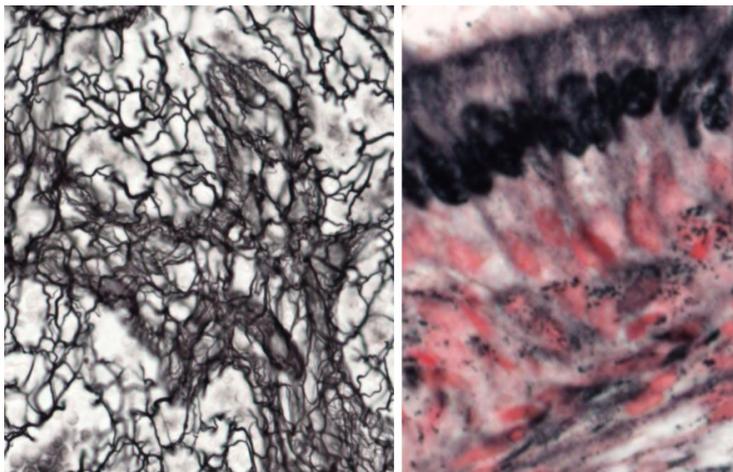


Abbildung 3.5: Kurspräparate: Versilberungen mit verschiedenen Versilberungsprotokollen, die auf der linken Seite retikuläre Fasern im Lymphknoten zeigen, auf der rechten Seite eine Versilberung des Golgi-Apparates im Epithel des Nebenhodens.

3.2. Immunhistochemische Nachweisreaktionen

Die im Kurs enthaltenen Präparate mit hochspezifischen Nachweisreaktionen sind alle auf Antikörper-Reaktionen (Immunhistochemie) aufgebaut. Die typische Sequenz für die immunhistochemischen Nachweise im Kurs beginnt mit einem monoklonalen Antikörper (in der Regel ist das ein Antikörper der Maus), der an ein kursrelevantes menschliches Antigen (Insulin, Proliferationsmarker, Zytoskelettmolekül, etc.) bindet.

- Durch Inkubation mit einer Lösung, die diesen monoklonalen Maus-Antikörper enthält, wird im ersten Schritt der spezifische Antikörper an das Zielmolekül im Schnitt gebunden.
- Im nächsten Schritt wurde dieser Antikörper mit einem zweiten Antikörper (sekundäre Sonde, aus einer anderen Tierart und polyclonal: z.B. polyclonaler Ziege anti-Maus Antikörper) detektiert. Dieser Zweitantikörper war zuvor mit dem organischen Molekül Biotin konjugiert worden. Nach diesem Schritt liegt also - gebunden an das nachzuweisende Zielmolekül - ein Komplex aus zwei Antikörper vor: dem Primärantikörper und einem dazu passenden Zweitantikörper, letzter mit Biotin konjugiert.
- Im nächsten Schritt nutzt man die Tatsache, dass Biotin sehr hochaffin und spezifisch an das Protein Streptavidin bindet. Der Schnitt wird also mit einer Streptavidin-haltigen Lösung inkubiert. Dafür wird aber modifiziertes Streptavidin verwendet, das vor der Inkubation am Schnitt biochemisch mit der „Lampe“ konjugiert worden war. Damit wird über Streptavidin das Werkzeug eingeführt, das genutzt werden kann, um die ganze mehrschrittige Bindungskaskade im Mikroskop sichtbar zu machen. Streptavidin kann mit einem Fluoreszenzmolekül (z.B. Streptavidin-Alexa488) oder aber einem der gut nachweisbaren Enzyme (z.B. als Streptavidin- Peroxidase) konjugiert sein.
- Im Falle der Fluoreszenzdarstellung kann direkt nach der Streptavidin-Inkubation mikroskopiert werden. Im Falle des Nachweises über ein Enzym wie Peroxidase muss zunächst noch die Farbstoffreaktion durchgeführt werden, mit der dann (bei Peroxidase in der Regel als brauner Farbstoff) die Sichtbarkeit im Durchlichtmikroskop erreicht werden kann.

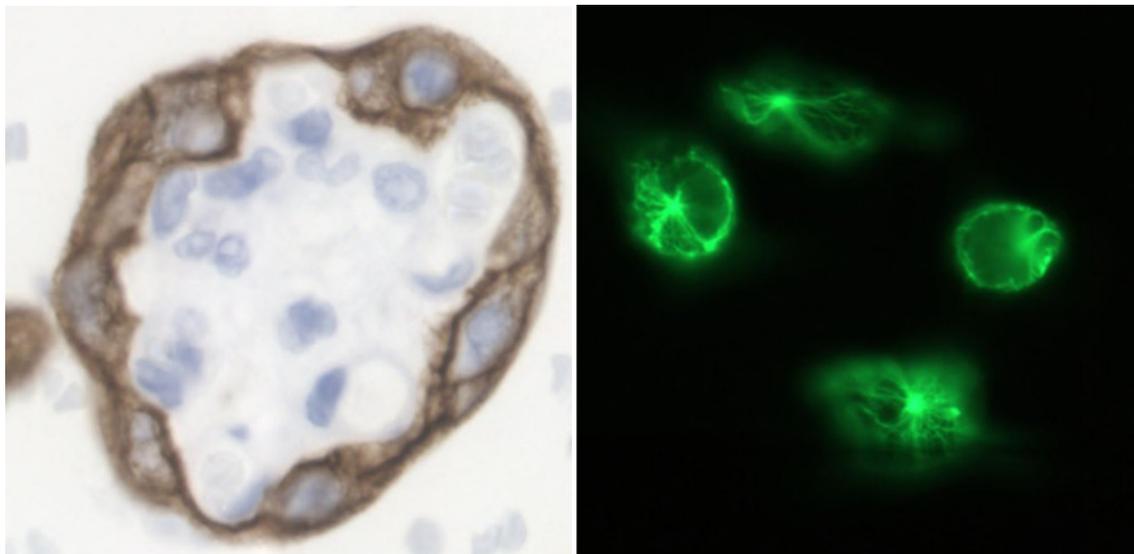


Abbildung 3.6.: Kurspräparate: Beide Nachweisreaktionen wurden mit Hilfe von Antikörpern gegen Zytoskelettproteine menschlicher Zellen durchgeführt. Auf der linken Seite wurde das Intermediärfilament Cytokeratin in einem Gewebeschnitt nachgewiesen. Die Darstellung der gebundenen Antikörper erfolgt hier mit Sekundärreagentien, die mit dem Enzym Peroxidase konjugiert waren. Die Farbreaktion liefert dann ein braunes Reaktionsprodukt an der Stelle der Antikörperbindung. Auf der rechten Seite wurden Tubuline in einzelnen Zellen in Kultur nachgewiesen. Hier wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte Sekundärreagentien eingesetzt, so dass die Stellen, an denen die Antikörper gebunden haben, grün vor dunklem Hintergrund aufleuchten.

Weiterlesen, Schmökern, Keine Pflicht. . .

Celis, J E. u. a. (2005). *Cell biology: a laboratory handbook*. 3. Aufl. San Diego: Academic Press.

Chalfie, M. u. a. (1994). "Green fluorescent protein as a marker for gene expression." In: *Science* 263, S. 802–805.

Frank, J. (2003). "Electron microscopy of functional ribosome complexes." In: *Biopolymers* 68.2, S. 223–233.

Giepmans, B. u. a. (2006). "The fluorescent toolbox for assessing protein location and function." In: *Science* 312, S. 217–224.

Miyawaki, A., A. Sawano und T. Kogure (2003). "Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores." In: *Nat Cell Biol* Suppl, S1–S7.

Tsien, R Y. (2003). "Imagining imaging's future." In: *Nat Rev Mol Cell Biol* Suppl, SS16–SS21.

Zernike, F. (1955). "How I discovered phase contrast." In: *Science* 121, S. 345–349.

Teil II.

**Einführung in die Zytologie und
Medizinische Zellbiologie**

4. Grundstrukturen von Zellen und Geweben

4.1. „Leben“ und „Struktur“ hängen zusammen

Zellen und Gewebe sind lebendig. Sie erinnern noch aus der Schule, dass die Gesetze der Chemie und Physik universell sowohl für die lebende wie die tote Materie gelten. Für die Medizin als ein Unterteil der „Lebens“-wissenschaften ist es also nicht nebensächlich, etwas genauer zu sagen, was denn eine Ansammlung von komplexen organischen Molekülen in Raum und Zeit als „lebendig“ erkennen lässt. Wesentliche Unterschiede zu „unlebendiger“ Materie sind z.B. klassisch biologische Kriterien wie Fortbewegung, Fortpflanzung, etc. Im Folgenden gehen wir aber zunächst noch eine Stufe basaler vor und betrachten eine Besonderheit, die allen Lebensformen eigen ist:

Das Entropieprinzip der unbelebten Natur: In der unbelebten Natur (s. ABB. 4.1) streben alle natürlichen Vorgänge zu einem Zustand minimaler Energie, der häufig auch als ein Zustand minimaler Struktur verstanden werden kann. Eine Substanz beispielsweise, die in einen zu füllenden Raum eindringt, wird sich in diesem Umfeld immer einer möglichst gleichmäßigen, d.h. energiearmen, Verteilung annähern.

Das Neg-Entropieprinzip der belebten Natur: Lebewesen stemmen sich dem Entropieprinzip aktiv entgegen (s. ABB. 4.2). Sie sind durch einen hohen Energiegehalt, einen hohen Energiewechsel (Aufnahme von Energie bzw. Energieäquivalenten und Verbrauch von Energie) sowie korrespondierend dazu durch eine sehr hohe innere Strukturierung bzw. Ordnung gekennzeichnet. Lebewesen haben Wege gefunden, sich - in Raum und Zeit begrenzt - aus dem allgemeinen Entropieniveau hervorzuheben.

- Für die Anatomie ist dabei grundlegend, dass mit Leben das Phänomen der „Ordnung“, d.h. der biologischen Struktur, verbunden ist.
- Für die Medizin insgesamt ist eines der grundlegenden diagnostischen Prinzipien, dass Störungen dieser Struktur und Ordnung auf allen Ebenen mit Krankheit und im äussersten Fall mit dem Tod verbunden sind.

Aus diesen Vorbemerkungen ergibt sich zwangsläufig, daß die Medizin in vielen Bereich sehr auf Bildgebung und Interpretation von Strukturen ausgerichtet ist. Nicht nur die operativen Fächer der Medizin beschäftigen sich mit Anatomie. Überall, wo Bildgebung eingesetzt wird (Röntgenverfahren, Ultraschall, tomographische Verfahren (CT, MRT)), ist Medizin strukturorientiert und letztlich anatomisch. Es ist eine Grunderfahrung der Medizin, dass viele Erkrankungen sich anhand veränderter Strukturen

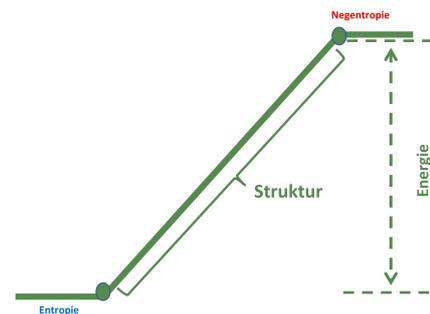


Abbildung 4.1.: Entropieniveau in belebten (rot: Negentropie) und unbelebten (blau: Entropie) Systemen

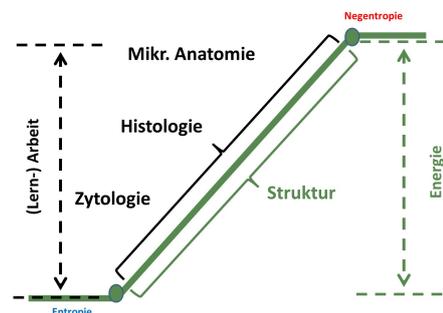


Abbildung 4.2.: Entropieniveau und Lernarbeit: Lernarbeit ist das, woran ein Student wirklich merkt, dass auch die Struktur selbst schon Energie enthält. (☺) Das gilt für alle Skalen-Niveaus der Mikroskopie, also Zytologie, Histologie, und mikroskopische Anatomie der Organe.

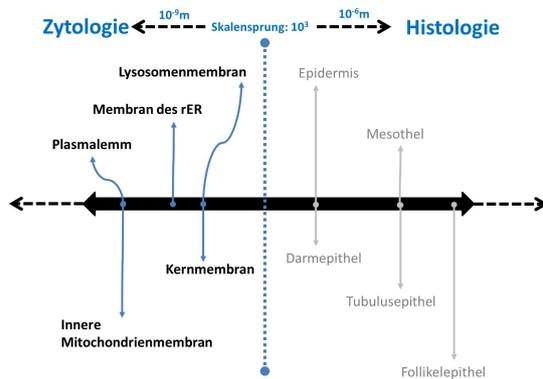


Abbildung 4.3: Das Schema zeigt eine kompartimentierende Grenzfläche als schwarze Linie. Beispiele für Kompartimente, die durch solche Grenzfläche voneinander getrennt werden, sind aufgeführt. Auf der linken Seite sind es Grenzflächen auf zellulärem Niveau, deren Dicke nur wenige nm beträgt. Auf der rechten Seite sind Grenzflächen aufgeführt, die in Organen oder im Körperinnern auf dem Skalenniveau der Histologie (d.h. mehrere μm Dicke) vorkommen. Im Rahmen diese Kapitels zur Zytologie konzentrieren wir uns zunächst auf die linke Seite dieser Graphik; die rechte Seite wird zu Beginn der Histologie wieder aufgenommen. Die Epithelgewebe als erstes Kapitel in der Histologie werden sich erneut mit der Bildung von Grenzflächen beschäftigen.

verraten; sehr viele Diagnosen sind primär strukturbasiert. Das ist ein wesentlicher Grund dafür, warum Sie ihr Studium mit den Grundlagen der Anatomie beginnen.

4.2. Kompartimentierende Grenzflächen als Grundstruktur

Aus den eben gemachten Betrachtungen ergibt sich, dass Lebewesen eine grundlegende Ordnung aufweisen. Solche biologische Ordnung ist wissenschaftlicher Erfassung zugänglich und wird in der Wissenschaft in entsprechende Namensordnungen¹ umgesetzt. Es gibt verschiedene essentielle Elemente der Lebensordnung, die man als die entscheidende Grundlegung betrachten könnte, z.B.:

- Die Informationsspeicherung in DNA oder RNA könnte als grundlegende Lebensordnung herangezogen werden.
- Die Struktur von Proteinen könnte als grundlegende Lebensordnung beschrieben werden.

Tatsächlich entfalten diese beiden Vorgänge ihre volle Funktionalität aber erst, wenn sie in einem lebenden, organisierten Gesamtsystem vorkommen. Beide sind sicher essentielle Lebensvorgänge, aber sie stellen die Lebensordnung nicht selbst dar, sondern sind funktionell in diese eingebettet. Als vielleicht allgemeinstes und gleichzeitig auch „primitivstes“ Merkmal zellulärer Lebensordnung kann gelten, daß der von der Lebensordnung erfasste Bereich stets räumlich von der unbelebten Materie abgegrenzt ist. Es gibt eine scharfe und definierbare Grenze, an der unbelebte Materie in den Bereich des Lebens (der Zelle, des Organismus) übergeht. Verwischen diese Grenzen, ist die zugehörige Zelle oder Organismus auch nicht mehr „lebend“. Analoge scharfe und definierbare Grenzen existieren auch oft innerhalb von Lebewesen und kompartimentieren diese weiter in Unterteile. Beispiele für solche trennenden und kompartimentierenden Grenzflächen sind in Abb. 4.3 aufgezeigt. Dieses Prinzip der Kompartimentierung gilt dabei auf verschiedenen Skalenniveaus der mikroskopischen Anatomie. Es gilt für die einzelne Zelle selbst, die sich von der Umgebung (im Organismus dann auch *extrazelluläre Matrix* genannt), abgrenzt (Dicke der Grenzschicht im nm-Bereich). Es gilt auch für die Oberflächen ganzer Organismen. Das funktionelle Hauptelement der Haut als Außengrenze unseres Körpers beispielsweise ist ein sogenanntes Epithelgewebe (Dicke der Grenzschicht viele μm). Das gleiche kompartimentierende Organisationsprinzip wird also auf unterschiedlichen - um den Skalenfaktor 1000 verschiedenen - Größenskalen verwendet.

- Lebewesen sind von unbelebter Materie durch Grenzschichten vollständig abgetrennt
- Solche Grenzschichten umgrenzen den „Lebensinnenraum“ gegenüber dem unbelebten Außenraum und sind die Voraussetzung für zelluläres Leben jeder Art
- Grenzschichten derselben Art können auch den Lebensinnenraum selbst weiter in Subkompartimente aufteilen.

¹ das zur wissenschaftlichen Namensordnung gehörige, Studenten regelmäßig schreckende Folterinstrument: *Nomenklatur*

4.3. Grenzflächen definieren Räume und Richtungen

Grenzflächen sind zunächst einmal vom Verständnis her nur „Wände“, die zunächst nur logisch voneinander getrennte Räume definieren. Bei näherer Betrachtung wird durch die Grenze allerdings wesentlich mehr als nur der Raum selbst definiert. Wenn man die Grenzfläche betrachtet, so lassen sich an ihr nun auch zwei logisch unterschiedliche Seiten definieren, die an unterschiedliche Räume grenzen (s. ABB. 4.4). Über die Grenzfläche hinweg können grundsätzlich Richtungen (von Raum A nach Raum B und umgekehrt) definiert werden. Als dritte Raumrichtung kommt hinzu, dass die Grenzfläche auch als eine Art flächige „Schiene“ die Ebene der Grenzfläche selbst definiert. Damit wird klar, dass die Grenzflächen neben Räumen auch Vektoren (x: von A nach B; y: von B nach A; z: entlang der Grenze) definiert haben, die ebenfalls als essentielle Elemente lebendiger Struktur von Bedeutung sind (s. ABB. 4.5). Beispiele für durch solche Grenzflächen getrennte Räume auf den Skalen der Zytologie und der Histologie sind in ABB. 4.6 zusammengestellt.

Biologische Grenzflächen haben tatsächlich alle Eigenschaften, die eben postuliert wurden. Sie grenzen nicht nur Räume ab, sondern kontrollieren den Stoffaustausch zwischen den Räumen (in beide Richtungen). Die den beiden Räumen zugewandten Seiten der Grenzflächen sind tatsächlich auch jeweils anders zusammengesetzt: Biologische Grenzflächen sind polarisierte Strukturen. Entlang biologischer Grenzflächen (Biomembranen) können daran angebundene oder auch eingebettete Moleküle wie auf Schienen in festgelegter räumlicher Ausrichtung diffundieren; das hat weitreichende Konsequenzen.²

Eine wichtige Ergänzung der reinen Kompartimentierungsfunktion ist daher die polare Grundstruktur biologischer Grenzflächen (gilt für Biomembranen und für Epithelgewebe): Die äußeren Grenzflächen (Membranen) von Zellen besitzen eine der unbelebten Seite zu-

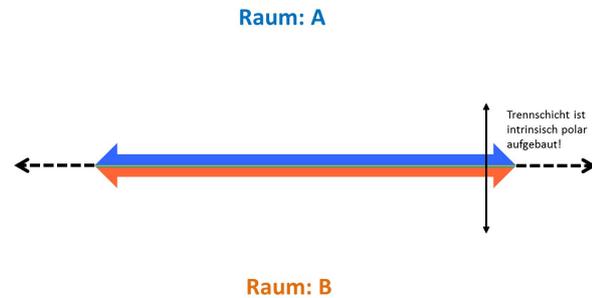


Abbildung 4.4.: Polare Grenzschicht mit den beiden an die Räume A und B angrenzenden Oberflächen.

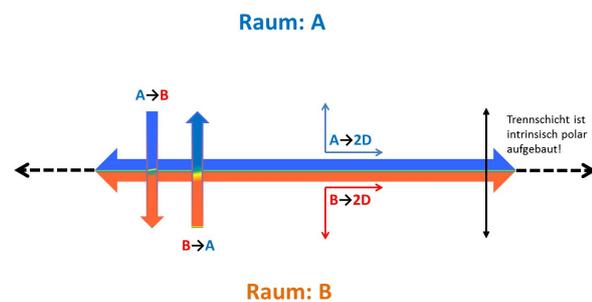


Abbildung 4.5.: Polare Grenzschicht mit den an ihr definierbaren Vektoren.

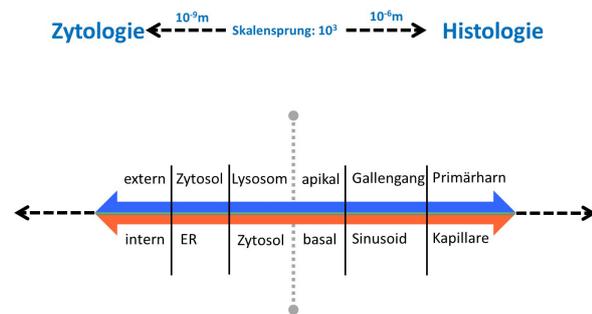


Abbildung 4.6.: Polare Grenzschicht mit Beispielen für Räume, die durch polare Grenzschichten in der Zelle (linke Seite) oder im Organismus (rechte Seite) auf unterschiedlichen Skalenniveaus definiert werden.

²In Biomembranen eingebettete Moleküle diffundieren nicht mehr frei im dreidimensionalen Raum, sondern nur noch in der Fläche der Membran. Der Verteilungsraum ist sehr klein, weil er aus der Membranfläche und höchstens der Dicke der Biomembran (wenige nm) besteht. Wegen des kleinen Verteilungsraumes können schon sehr wenige membrangebundene Moleküle in diesem Raum ausserordentlich hohe Konzentrationen erreichen. Ausserdem sind Moleküle in/an den Membranen in definierter Orientierung assoziiert; das erleichtert viele biochemische Reaktionen sterisch und erlaubt es, Membranen als fließbandähnlich funktionierende „Werkbänke“ für Stoffwechselprozesse (Bsp. Phospholipidsynthese) zu organisieren.

gewandte Oberfläche und eine dem Lebens-(Zell-)innenraum zugewandte Seite. Die Polarität ist dabei nicht primär durch die Räume aufgezwungen, sondern sie ist eine Eigenschaft der Grenzflächen selbst. Die „Außen“seite einer zellbegrenzenden Membran hat eine andere Oberfläche und andere Eigenschaften als die „Innen“seite einer zellbegrenzenden Membran. Innerhalb der Zellen werden durch weitere Grenzflächen wiederum Räume voneinander abgetrennt, und auch hier gilt, dass die beiden Oberflächen solcher Grenzschichten unterschiedlich sind, d.h. auch diese Grenzflächen sind polar aufgebaut.

- Membranen kompartimentieren Räume und definieren Vektoren im „Lebensraum“
- Membranen sind intrinsisch polar organisiert; ihre beiden Seiten sind unterschiedlich zusammengesetzt und unterschiedlich funktionalisiert.

4.4. Die polaren Grenzflächen verändern angrenzende Räume aktiv

Tatsächlich ist es nicht so, dass die Unterschiede in den beiden Membranoberflächen von den angrenzenden Räumen - sozusagen als „Abdruck“ passiv übernommen würden. Die polaren Grenzflächen sind selbst aktive Spieler und haben mannigfache Möglichkeiten, die angrenzenden Räume aktiv zu verändern. Dabei können die Konzentrationen von Ionen, der pH-Wert, metabolisch wichtige Moleküle wie Glucose oder Aminosäuren und viele andere Eigenschaften bzw. Konzentrationen von Membranen oder auch von membran-assoziierten Molekülen über die Membran hinweg aktiv verändert werden. Weil viele dieser Vorgänge Energie verbrauchen, sind solche Grenzflächen auch ein wichtiger Ort, an dem zelluläre Energie verbraucht wird. Es war oben ja erwähnt worden, dass Zellen einen hohen Energieumsatz aufweisen. Es ist nicht überraschend, dass ein guter Teil dieser Energie dann folgerichtig auch an Membranen und in membran-assoziierten Prozessen verbraucht wird. Ausserdem werden über Membranen hinweg aufgebaute Konzentrationsgradienten in z.B. der Atmungskette, auch instrumentalisiert, um Energie für die Zelle verfügbar zu machen. Sowohl bei der Energiegewinnung (ATP-Synthese) wie auch beim Verbrauch dieser zellulären Energie (z.B. bei aktiven Transportvorgängen) spielen also aktive Grenzflächen und die von ihnen aufgebauten transmembranären Gradienten eine wichtige Rolle.

5. Die Biomembran: Archetyp einer aktiven polaren Grenzfläche

Die im vorigen Abschnitt ausgeführten grundlegenden Eigenschaften biologischer Grenzflächen werden in geradezu idealer Weise von den Bauprinzipien der Biomembran umgesetzt. Das Bauprinzip der Biomembran ermöglicht:

- äußerst dünne (im Kern bimolekulare) flächige Schichten in wässriger Umgebung
- unterschiedlich zusammengesetzte Seiten der dünnen Schicht als Grundlage der Polarität
- Barrierefunktion durch einen hydrophoben („öiligen“) flächigen Innenbereich der Schicht.
- „fluiden“ Charakter des hydrophoben flächigen Innenbereichs: Voraussetzung für die Diffusion in/entlang der Membranfläche und gleichzeitig Voraussetzung für die Verankerung großer Moleküle in der Membran
- zahlreiche Möglichkeiten, an den basalen Membranbausteinen Veränderungen vorzunehmen
- spontane Assoziation der Membran unter geeigneten Bedingungen

5.1. Phospholipide sind die Grundbausteine der Biomembran und Basis für ihre Polarität

Phospholipide (s. ABB. 5.1) bestehen aus unterschiedlichen Grundelementen, die kovalent miteinander kombiniert sind:

- einem *hydrophilen* Bestandteil, der polar strukturiert ist und Ladungen enthalten kann. In diesem Bereich können auch größere Moleküle wie z.B. Kohlehydrate angeknüpft sein.
- einem als Brücke fungierenden Bestandteil, oft ein mehrwertiger Alkohol, z.B. Glycerin
- mehreren *hydrophoben* und langkettigen Bestandteilen, sogenannte Fettsäuren

Wenn man Phospholipide in das relativ polar gebaute Wasser als Lösemittel einbringt, so versuchen die Phospholipidmoleküle, sich spontan so zu orientieren, dass die langkettigen hydrophoben Bestandteile der Moleküle möglichst wenig in Kontakt mit Wasser kommen. Verschiedene Varianten, wie sich diese Orientierung in Wasser ausbilden kann, sind in ABB. 5.2 dargestellt. Im Bereich der Luft-Wasser Grenze orientieren sich die hydrophoben Schwänze in Richtung Gasphase. Im Wasser selbst können rundliche oder ovoide Körper aus einer einzigen Lage Phospholipide entstehen, sogenannte Micellen. In Micellen bilden die hydrophoben Schwänze einen Kernbereich. Micellen können daher nicht unendlich groß werden. Schließlich können sich Blasen bilden, deren Wand aus einer bimolekulare Phospholipidschicht besteht (so etwas wird auch *Vesikel* genannt). Die Wand solcher Vesikel enthält eine dünne hydrophobe Zone, in der sich die hydrophoben Anteile der Phospholipide befinden. Diese hauchdünne hydrophobe Schicht trennt einen inneren Bereich, den Inhalt des Vesikels, von der Umgebung. Sowohl der Inhalt des Vesikels wie auch seine Umgebung sind

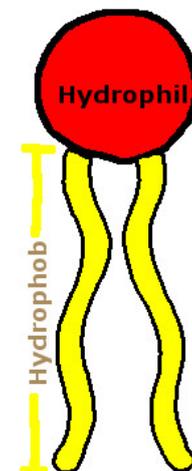


Abbildung 5.1.: Phospholipide bestehen aus einem wassermischbaren (hydrophilen) Kopfteil und einem nicht wassermischbaren (hydrophoben), langkettigen Schwanz, i.d.R. zwei Fettsäuren

hydrophil, d.h. in Zellen wässrig. Einfache Vesikel haben bereits die Eigenschaft der Kompartimentierung. Auch Richtungen sind definierbar. Technisch hergestellte Vesikel werden in der Pharmakologie zum Beispiel eingesetzt, um Arzneimittel einzuschließen und im Körper als Verschlußsack zu transportieren, bis diese unter bestimmten Bedingungen und an definierten Orten durch Fusion der Vesikel mit Zielstrukturen in die Umgebung freigesetzt werden. Allerdings ist die Membran einfacher technischer Vesikel noch nicht selbst aktiv. Es fehlen ihr noch wesentliche Parameter, die man bei einer Membran in lebenden Systemen erwarten muss.

Eine wesentliche Grundeigenschaft biologischer Membranen ist die intrinsische Polarität, die unter Verwendung von Energie aufrechterhalten werden muss. Diese Polarität beruht auf der Tatsache, daß verschiedene Phospholipide nicht gleichmäßig über die beiden monomolekularen Lagen verteilt sind. In der Plasmamembran (Plasmalemm), der äußeren Membran einer Zelle ist z.B. im Regelfall das Phospholipid Phosphatidylethanolamin nur auf der Innenseite enthalten. Taucht es doch auf der Außenseite in der äußeren Lage der Doppelmembran auf, ist das ein Zeichen für den beginnenden Zelltod (Apoptose). Ohne aktive Gegenmaßnahmen mit Hilfe von Hilfsmolekülen (Floppasen und Flippasen¹) wäre also die Asymetrie der Lipidverteilung als Basis der Polarität der Biomembran nicht aufrechtzuerhalten. Solche enzymatischen Hilfssysteme fehlen einem einfachen Phospholipidvesikel noch.

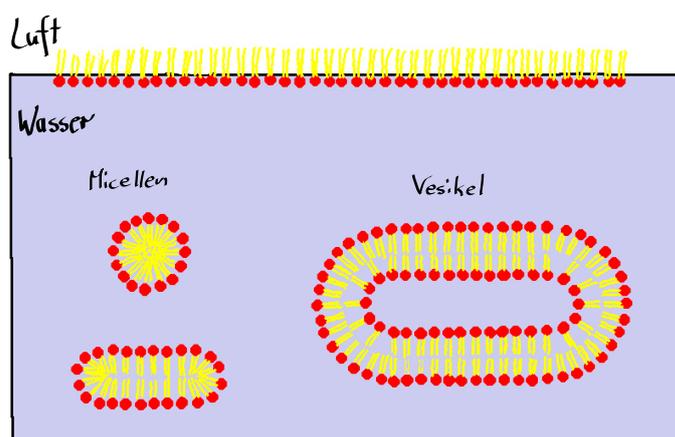


Abbildung 5.2: Die Abbildung illustriert das Verhalten von Phospholipiden in Kontakt mit Wasser. Sie schieben die hydrophoben Anteile dabei stets vom Wasser weg, weil diese Anordnung energieärmer ist, indem sie die Oberflächenspannung an der Grenze zum Wasser minimiert. Zur Luft hin werden die hydrophoben Schwänze ganz aus dem Wasser herausgestreckt. In Micellen, die nur eine Lage Phospholipide aufweisen, werden die hydrophoben Schwänze zu globulären oder auch elliptoiden Bereichen angeordnet, aus deren hydrophobem Kernbereich Wasser dann ausgeschlossen ist. In Vesikeln wird Wasser von einer bimolekularen Phospholipidschicht eingeschlossen. Solche Vesikel können sehr groß werden und haben bereits die kompartimentierende Grundeigenschaft der Biomembran.

5.2. Beispiel einer typischen Biomembran: Das Plasmalemm

Als Plasmalemm bezeichnet man die äußere Membran einer Zelle, die sie von Ihrer Umgebung abgrenzt. Diese Membran ist sehr gut untersucht und dient hier jetzt als Beispiel für die grundsätzliche Konstruktion von Biomembranen. Andere Membranen hängen eng mit dem Plasmalemm zusammen und weisen analoge Verteilungsunterschiede auf. Die Herkunft des Plasmalemm und sein Zusammenhang mit anderen Membranen sind Gegenstand des nächsten Kapitels (Kapitel 6) in diesem Skript. Abbildung 5.3 zeigt, dass bereits der Grundbau des Plasmalemm der Vorgabe einer polaren Verteilung der Phospholipide auf die beiden Blätter der Membran voll und ganz entspricht. Nur auf der Außenseite des Plasmalemm finden sich z.B. Phospholipide, die in ihrem hydrophoben Molekülbereich mit vielgliedrigen Zuckerketten verbunden sind. Auf der zum Zytosol (dem Zellinnern) liegenden Seite der Membran finden sich keine solchen Zuckerreste (Glykosylierung). Bestimmte Phospholipide (Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin) kommen praktisch nur auf der zytosolischen Seite der Plasmamembran vor, während andere (Phosphatidylcholin und Sphingosin-haltige Phospholipide)

¹kein Witz ☺: Eine Floppase ist ein Protein, das den „outward“ flip eines Phospholipids bewirkt, während eine Flippase den „Inward“ flip bewirkt.

ganz überwiegend auf der Außenseite vorkommen. Das hydrophobe Innere dieser Doppelmembran ist bei Körpertemperatur fluide (d.h. ölig); aus diesem Flüssigkeitscharakter ergibt sich, dass Moleküle, die in die Membran eingebettet sind, in diesem zentralen Öl-„film“ geradezu schwimmen und in der Ebene der Membran diffundieren können. Zuerst gilt das natürlich für die Phospholipide selbst, die in ihrer jeweiligen monomolekularen Hälfte der Doppelschicht jederzeit lateral diffundieren können. Die hohe Oberflächenspannung des Wassers und die Hydrathülle, die an den hydrophilen Köpfen in der Interaktion mit Wasser entsteht, verhindern allerdings, dass Phospholipid oder auch andere Moleküle einfach und in großer Zahl von einer Seite der Membran auf die andere wechseln können. Dieser Prozess ist zwar nicht unmöglich, läuft aber relativ langsam ab.

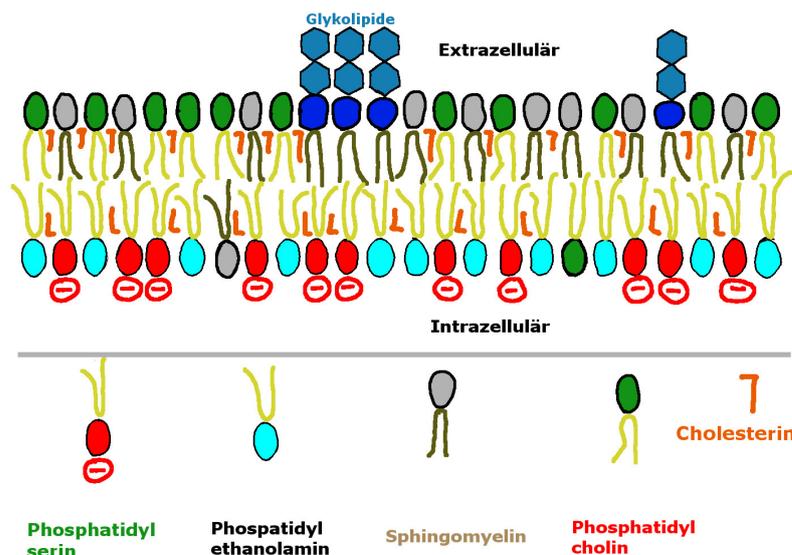


Abbildung 5.3: Die Abbildung zeigt am Beispiel des Plasmalemm die asymmetrische Phospholipid-Verteilung von Biomembranen. Im Plasmalemm kommen Phosphatidylcholin, Sphingosin-haltige Phospholipide und glykosylierte Phospholipide besonders im äußeren Blatt der Membran vor. Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin kommen nur im inneren Blatt vor. Indirekt steuern die Phospholipide damit bereits eine asymmetrische Verteilung von Ladungen und Zuckerresten (viele von diesen sind ebenfalls geladen) über die Membran hinweg. Die Asymmetrie der Verteilung gilt allerdings nicht für alle Membranlipide: Cholesterin ist nicht asymmetrisch verteilt.

Damit ist auch klar, dass der Fluid-charakter des Plasmalemm eine wichtige Voraussetzung für die Membranfunktion überhaupt ist. Gleichzeitig soll diese Lipidschicht aber auch kohärent und geschlossen bleiben, um die Integrität des Zellinnenraumes zu gewährleisten. Bei der Sicherung und Kontrolle der Fluidität/Stabilität spielen die Fettsäuren der Phospholipide und das Cholesterin eine wesentliche Rolle. Cholesterin ist ein essentieller Bestandteil vieler Biomembranen, jedenfalls tierischer und menschlicher Biomembranen (nicht bei Pflanzenzellen). Cholesterin hat ein Sterol-Grundgerüst, das auch als Ausgangspunkt für die Biosynthese der Steroidhormone dient. Sein Hauptvorkommen im Körper aber sind die Biomembranen, wo es mit dem hydrophoben und sperrigen Sterolkern in die zentrale hydrophobe Schicht der Doppelmembran hineinragt (s. ABB. 5.4). Im hydrophoben Inneren der Membran grenzen also nicht nur Fettsäuren an Fettsäuren, sondern es ist Cholesterin in erheblichem Ausmaß eingestreut und bewirkt letztlich zwei scheinbar gegensätzliche Effekte:

- Der sehr hydrophobe Sterolkern des Cholesterins verstärkt den hydrophoben Charakter vor allem in den äußeren Randzonen des hydrophoben Membranbereichs.
- Cholesterin wirkt wie eine Art Lösemittel für die Fettsäurenreste und erleichtert die laterale Beweglichkeit der Phospholipide

Zusammengenommen wird die hydrophobe Wechselwirkung im Außenbereich der hydrophoben Zone verstärkt und damit die Stabilität erhöht, während gleichzeitig durch den „Lösemittel-Effekt“ des Cholesterins die laterale Mobilität der Phospholipide - die Fluidität - verbessert wird.

Auch die Fettsäuren leisten einen Beitrag zur Kontrolle der Fluidität des Plasmalemm. Die meisten Fettsäuren sind 18 Kohlenstoffatome lang und gesättigt. Gesättigt bedeutet hier, dass zwischen den C-Atomen der Fettsäurekette keine Doppelbindungen vorliegen. Wo solche Doppelbindungen auftreten, verursacht die andere Bindungsgeometrie der Doppelbindungen einen Knick im Kettenverlauf, der die Wechselwirkung mit benachbarten (gesättigten) verschlechtert und damit die Fluidität erhöht. Am häufigsten liegen solche Doppelbindung ca. in der Mitte der Kohlenstoffkette, im Bereich der

Kohlenstoffatome 8-15. Damit treten diese Knickpunkte unterhalb der Region auf, in die das Cholesterin integriert wird (s. ABB. 5.4).

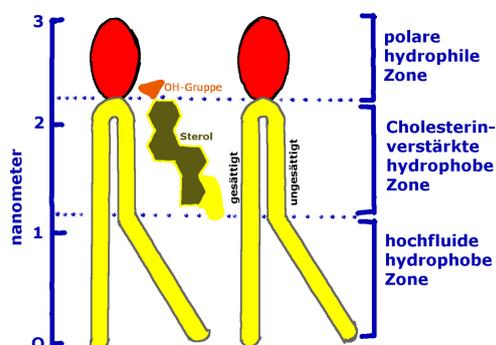


Abbildung 5.4: Die Abbildung zeigt auf der linken Seite in nm die ungefähre Dicke eines Blattes einer Biomembran an. Innerhalb eines solchen Blattes lassen sich die rechts aufgeführten Unterabschnitte als Zonen beschreiben. Im Außenbereich dominieren hydrophile Köpfe, danach eine durch Cholesterin in der Hydrophobizität verstärkte Zone (Barrierefunktion, hydrophobe Wechselwirkung, Fluidität), danach ein Bereich, in dem der Anteil der ungesättigten (geknickten) Fettsäuren über die dort in der Regel höhere Fluidität mitentscheidet. Cholesterin hat eine einzige OH-Gruppe, die als polare Moleküleinheit dazu führt, dass es sich selbsttätig gerichtet in die Membran einfügt. Das hydrophobe und starre Skelett des Cholesterins ragt in die hydrophobe Schicht mit hinein. Dort verstärkt es hydrophobe Wechselwirkungen insgesamt, verhindert aber auch, daß Phospholipide in der Membran aggregieren.

5.2.1. Barrierencharakter der Biomembran: Durchlässigkeit für Biomoleküle

Die hydrophobe Kernzone der Biomembranen ist Hauptgrundlage ihrer physikalisch-chemischen Barrierewirkung. Diesen „öiligen“ Film können viele Moleküle nicht durchdringen (s. ABB. 5.5). Dabei sind vor allem physikalisch-chemische Voraussetzungen für die mögliche Penetration der hydrophoben Barriere von Bedeutung². Wichtige physikalisch-chemische Parameter, die die Penetration einer Biomembran beeinflussen, sind:

Größe des Moleküls Große Moleküle wie ganze Proteine, die meist in Wasser löslich, also lediglich hydrophil sind, können nicht als Ganzes in die hydrophobe Zwischenschicht partitionieren und die Membran nicht durchdringen. Bei kleineren Molekülen hängt die Penetration vor allem von der Hydrophobizität ab.

Hydrophobizität Diese Eigenschaft ist vor allem bei Gasen und bei kleineren organischen Molekülen von Bedeutung. Gase wie Sauerstoff und Stickstoff können die Membranen gut per Diffusion durchdringen. Sie lösen sich auch in der hydrophoben Mittelphase. Ähnliches gilt auch für die Steroidhormone, die mit dem Membranbestandteil Cholesterin biochemisch verwandt sind. Organische Moleküle wie Glucose (Kohlehydrate generell) sind aber polar aufgebaut und gut wasserlöslich. Solche Substanzen können die Membran nicht durchdringen, weil in der hydrophoben Innenschicht keine ausreichende Löslichkeit erreicht wird.

Ladung, Polarität Teilweise findet dieser Parameter schon bei der Hydrophobizität Berücksichtigung. Ein wichtiges Molekül, das Biomembranen nur sehr schlecht durchdringen kann, ist das Wasser. Wasser ist

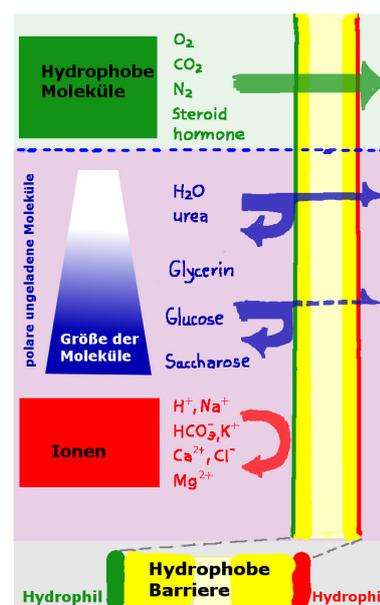


Abbildung 5.5.: Die Abbildung illustriert die Grundpermeabilität, die die Phospholipidbilayer einer Biomembran für verschiedene biologisch wichtige Moleküle hat.

²Diese Themen werden hier nur zur Vollständigkeit angerissen, aber nicht erschöpfend behandelt: Sie sind ein Kernthema der Physiologie und Biochemie. Gleiches gilt für die weiter unten besprochenen Funktionen vor allen Dingen integraler Membranproteine als Carrier, Transporter, Kanäle, etc.. Die Erwähnung in diesem Skript ist Propädeutik für diese Fächer. Es wird von den Kollegen in diesen Fächern aber erwartet, daß Sie mindestens über die basalen Grundgegebenheiten schon Bescheid wissen. Darum werden wir diese Themen bis zu dem hier umrissenen Detailgrad auch in der Anatomie schon prüfen.

grundsätzlich ein recht polar gebautes Molekül, das kaum Möglichkeiten für hydrophobe Interaktionen bietet. Mit Ölen bildet es üblicherweise zweiphasige Systeme und mischt sich nicht. Obwohl es also sicher klein genug für eine Penetration durch die Membran wäre, kann es faktisch nicht durch Biomembranen diffundieren. Wasser ist selbst nur polar gebaut, aber nicht geladen. Bei geladenen Molekülen treten diese Zusammenhänge noch deutlicher hervor. Auch sehr kleine geladene Moleküle (Natriumionen, Kaliumionen, geladene organische Moleküle) können Biomembranen ohne Hilfestellung praktisch nicht durchdringen. Hilfestellung erfolgt durch gezielte Interaktionen mit Transportproteinen, die die Querung der Membran (aktiv oder auch passiv) dann je nach Membran und Gewebe unterschiedlich ermöglichen können. Diese organ- und gewebespezifischen Transportmechanismen sind Hauptthemen der Physiologie, teilweise auch der Biochemie. Sie machen dort einen nicht unerheblichen Teil des Lernstoffes aus.

5.2.2. Proteine des Plasmalemm und die Glykokalyx

Die Membranen - auch das Plasmalemm - sind noch über die Phospholipide hinaus funktionalisiert. Auch hier gilt, dass die Vektoren, die an der Membran definiert werden können, eine wesentliche Rolle für die Anordnung bzw. Ausrichtung zusätzlicher Funktionalisierungen spielen. Die wichtigste Gruppe von Molekülen sind dabei Membranproteine. Membranproteine können z.B. mit nur einem Blatt einer Membran verbunden (verankert) sein; in diesem Fall können sie mit einem Phospholipid kovalent verbunden sein, dessen Fettsäuren in den hydrophoben Bereich eines Membranblattes hineinreichen. In einem solchen Fall ist das ganze Protein nur entweder an der Außenseite oder an der Innenseite der Membran präsent. Komplexer ist das Ganze, wenn es um sogenannte integrale Membranproteine geht. Diese Proteine reichen durch die Membran - teilweise auch mehrfach, im Sinne einer Art „Naht“ - hindurch. Ein Teil des Proteins liegt dann auf der Außenseite, ein anderer auf der Innenseite. Diejenigen Teile des Proteins, die in der hydrophoben Zone der Membran sind, bestehen aus sehr hydrophoben Aminosäuren. Damit sind auch diese Proteine über hydrophobe Wechselwirkung in der hydrophoben Zone der Membran verankert. Integrale Membranproteine können ebenfalls lateral in der Membran diffundieren und sind außerdem stets gerichtet eingebaut: Außen liegt immer derselbe Teil eines Proteins, innen dann entsprechend ein anderer Teil, den man beim Plasmalemm auch als zytosolische Domäne bezeichnen kann. Neben den Phospholipiden gilt auch für die Membranproteine, daß sie mit Zuckerresten verbunden (glykosyliert) sein können. Auch dabei gibt es wieder eine polare Dominanz: Die Glykosylierung von Membranproteinen bezieht sich praktisch ausschliesslich auf die Domänen und Proteine, die auf der Außenseite des Plasmalemm vorkommen. Auf der zytosolischen Seite kommt Glykosylierung nicht oder bestenfalls als extreme Ausnahme vor. Die Glykosylierung der Proteine auf der Außenseite mit - häufig länger-kettigen und verzweigten Zuckerketten führt dazu, dass diese Zuckerketten (Kohlehydrate) auf der Außenseite einen viele nm hohen dichten „Zuckerwald“ aufbauen, der als Glykokalyx bezeichnet wird. Solche rasenartigen und dichten Kohlehydratketten findet man nicht nur auf der Außenseite des Plasmalemm, sondern auch auf der Innenseite vieler Vesikel und Organellen, z.B. auch der Lysosomen.

5.2.3. Pumpen, Kanäle, Cotransporter, etc. machen Membranen zu selektiven und aktiven Grenzflächen

Das wichtigste Funktionsprinzip biologischer Membranen ist, dass die grundsätzliche Barrierefunktion gezielt durch - meist integrale - Membranproteine durchbrochen und abgeändert werden kann. Dies erfolgt sehr variabel und unterscheidet sich von Gewebe zu Gewebe und Organ zu Organ. Membranproteine können dabei in vielen verschiedenen Funktionen auftreten (s. ABB. 5.6):

Kanäle Kanäle sind integrale Membranproteine, die sich teilweise öffnen oder schliessen können. Sie sind integrale Tunnelproteine und so gebaut, dass bestimmte, definierte Moleküle oder Ionen durch sie in geöffnetem Zustand hindurchtreten und dabei die Membran ohne Kontakt mit der hydrophoben Innenschicht der Biomembran passieren können. Typische Kanäle sind zum Beispiel die Aquaporine, die Wasserdurchtritt durch Membranen ermöglichen. Andere Kanäle

sind selektiv für definierte Ionen. Kanäle sind nur Öffnungen. Der Übertritt von Substanzen durch Kanäle folgt bestehenden Konzentrationsgradienten.

Transporter Diese Proteine ermöglichen oder erleichtern den Transport meist kleiner organischer Moleküle, z.B. von Glucose oder von Aminosäuren.

Pumpen Pumpen sind i.d.R. ebenfalls integrale Membranproteine, die aber unter Verbrauch von ATP (d.h. von zellulären Energieäquivalenten) Stoffe selektiv und gerichtet über eine Biomembran transportieren. Dies erfolgt meist gegen Konzentrationsgradienten. Damit sind Pumpen ein wesentlicher aktiver Mechanismus, mit dem Biomembranen die angrenzenden Räume gegen reine Verteilungsgleichgewichte verändern können. Typische Pumpen sind zum Beispiel die Na/K ATPasen, die sich in der basolateren Membran von Nierentubuluszellen oder in Streifenstücken der Mundspeicheldrüsen finden. Auch Protonenpumpen, die z.B. den pH-Wert in Lysosomen oder Endosomen absenken, fallen in diese Gruppe von Membranfunktionalisierungen.

Cotransporter, etc. Sind - z.B. von Pumpen - Konzentrationsgradienten über die Membran aufgebaut worden, so können diese Konzentrationsgradienten wiederum genutzt werden, um weitere Moleküle, sozusagen „huckepack“, zu transportieren.

Neben diesen Proteinen, deren Funktion im Wesentlichen eine kontrollierte und teilweise aktive Veränderung der Membranpermeabilität ist, sind noch weitere wichtige Funktionen mit den Membranproteinen assoziiert. Dazu gehören die Rezeptorfunktionen, die von integralen Membranrezeptoren ausgeübt werden. Membranrezeptoren fallen i.d.R. ebenfalls in die Gruppe der integralen Membranproteine und binden an ihrer Außenseite an Botensubstanzen, die selbst in der Regel auch Proteine sind. Das Ereignis der „Bindung“ des Botenproteins (Zytokine, Hormone wie Insulin, etc.) an den Membranrezeptor löst eine Konfigurationsänderung des Gesamtproteins aus, die auch innen auftritt und biochemisch Folgen hat. Damit fungieren Membranrezeptoren als eine Art „Sinnesorgan“ der Zelle, mit dem die Gegenwart oder Abwesenheit wichtiger Botenstoffen wahrgenommen werden kann.

Einige Membranproteine fungieren primär als Strukturproteine, die über die Membran hinweg Verbindungen zwischen extrazellulären und intrazellulären Proteinen des Zytoskeletts ermöglichen. Eine solche Rolle spielen zum Beispiel die Glycophorine in der Membran der Erythrozyten oder auch die Integrine in der Membran vieler Epithelzellen.

- Die Biomembran ist eine polare Grenzfläche: Ihre beiden Seiten enthalten unterschiedliche Moleküle und Funktionen.
- Die Polarität wird aktiv aufrechterhalten.
- Die an diese Oberflächen grenzenden Räume sind ebenfalls unterschiedlich.
- Die Biomembran ist das fundamentale Substrat zellulärer Ordnung (Struktur) und Funktion.
- Biologische Membranen bestehen aus einem Phospholipid-Bilayer, der Cholesterol zur Optimierung der Fluidität enthält (Fluid-mosaic membrane). Die Fettsäuren der Phospholipide sind partiell ungesättigt.
- Integriert in oder auf verschiedene Weise assoziiert an diese Doppelschicht kommen Proteine und Kohlehydratketten vor. Letztere können kovalent mit Lipiden verbunden sein (Glykolipide) oder aber kovalent an Membranproteine gebunden sein (glykosylierte Membranproteine).
- Diese Molekülgruppen sind ungleich über die beiden Lagen der Membran verteilt, so dass die Membran zwei funktionell unterschiedliche Seiten aufweist.
- Die Membran ist für kleine lipophile Substanzen und Gase gut durchlässig.
- Polare Substanzen (Wasser und höher polar) brauchen zum Durchtritt die funktionelle Assistenz von speziellen Proteinen, die diesen Übertritt katalysieren oder auch aktiv bewirken können.

Weiterlesen, Schmökern, Keine Pflicht. . .

Bretscher, M S. (1973). "Membrane structure: some general principles." In: *Science* 181, S. 622–629.

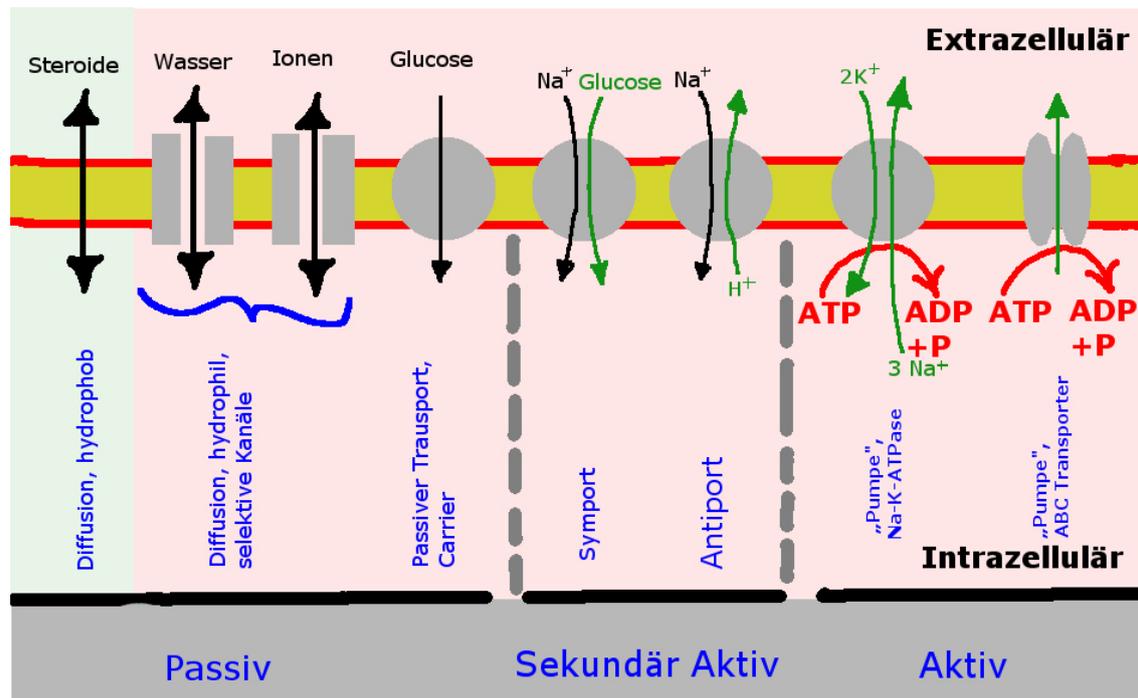


Abbildung 5.6.: Um die Barriere der Membran zu überwinden, werden verschiedene Mechanismen genutzt. In der Abbildung sind oberhalb der Membran typische Beispielsubstanzen für einzelne dieser Wege erwähnt. Links, im grün unterlegten Bereich der Abbildung sind Substanzen, die ohne Assistenz durch die Membran diffundieren können (s. auch der grün unterlegte Bereich in ABB. 5.5). Die Querungsvorgänge über die Membran sind in der Abbildung mit schwarzen Pfeilen dargestellt, wenn es sich um passive, diffusionsgetriebene Querungen handelt, die bereits bestehenden Konzentrationsgradienten folgen. Wenn Substanzen gegen Konzentrationsgradienten über die Membran transportiert werden (grüne Pfeile), kann dies entweder unter Ausnutzen anderer, bestehender Konzentrationsgradienten (Symport, Antiport; hier dann ein indirekter Einsatz von Energie, die zuvor in den Aufbau der Konzentrationsgradienten gesteckt werden mußte und nun aus dem bestehenden Konzentrationsgradienten wieder mobilisiert wird) oder aber unter direkter Aufwendung von Energie (als zelluläre Energie in Form von ATP-Verbrauch, s. rote Beschriftung) bewerkstelligt werden.

Die Darstellungen in dieser Abbildung sind nur beispielhaft und propädeutisch für die Möglichkeiten des Membrantransports überhaupt. Vor allem in der Physiologie, aber auch in der Biochemie und später in der Pharmakologie werden Sie dazu in vielen Organen Beispiele bis hin zu quantitativen Abschätzungen von Transportkapazitäten vorgestellt bekommen.

Haberkant, P. und G. van Meer (2009). "Protein-lipid interactions: paparazzi hunting for snap-shots." In: *Biol Chem* 390.8, S. 795–803.

Jacobson, K., E D. Sheets und R. Simson (1995). "Revisiting the fluid mosaic model of membranes." In: *Science* 268.5216, S. 1441–1442.

Rothman, J E. und J. Lenard (1977). "Membrane asymmetry." In: *Science* 195, S. 743–753.

van Meer, G. (2005). "Cellular lipidomics." In: *EMBO J* 24.18, S. 3159–3165.

6. Topologie der Membransysteme und Kompartimente eukaryotischer Zellen

6.1. Zelluläre Grundbaupläne: Prokaryoten versus Eukaryoten

6.1.1. Einfach, erfolgreich und „individualistisch“: Prokaryoten

Das einfachste denkbare Organisationsmodell zellulären Lebens ist das eines membranumgrenzten Innenraumes, in dem alle Lebensvorgänge ablaufen. Dieses einfache Organisationsprinzip findet sich bis heute in vielen einzelligen Organismen. Alle diese Zellen sind vollständig und lebensfähig, obwohl sie zum Beispiel keinen Zellkern haben. Tatsächlich sind Zellen mit diesem Grundbauplan bis heute die mit Abstand am häufigsten vorkommenden und am weitesten verbreiteten Lebewesen überhaupt. Das Grundprinzip ist also keineswegs ein Auslaufmodell: Der Charme der „einfachen“ Organisation verleiht auch Robustheit und Anpassungsfähigkeit. Typische Beispiele für solche Organismen sind Bakterien, die in mannigfaltiger Form mit der Medizin in Berührung kommen: Positiv als Darmbakterien, die als „Verdauungsassistenten“ wirken, als Wirtsorganismen für die gentechnische Produktion von Arzneimitteln, aber auch negativ als Träger von Infektionskrankheiten. Wenn man beim Beispiel eines Bakteriums bleibt, so sind die Grundelemente der zellulären Organisation relativ einfach: Aussen herum eine Membran¹, innen das Zytosol: ein Raum, in dem alle Lebensvorgänge des Bakteriums - sozusagen im Eintopf - stattfinden. Diese Lebensvorgänge umfassen dann z.B. die Produktion und den Verbrauch von Energie, die Unterhaltung der Membransysteme, die Synthese von Enzymproteinen für den Stoffwechsel, die Reproduktion, etc.. Auch die Erbinformation liegt einfach frei als zyklisches Molekül in diesem Innenraum. Einen Zellkern zur „Aufbewahrung“ und Verpackung gibt es nicht. Dieses Organisationsprinzip ist in der Evolution nach wie vor ungeheuer erfolgreich; es ist schlank, robust, anpassungsfähig und effizient. Prokaryoten haben aber in der Evolution nicht die Fähigkeit hervorgebracht, sich in arbeitsteilig organisierten und differenzierten vielzelligen Strukturen zu organisieren. Alle Zellen sehen so aus wie die Vorgängerzellen, aus denen sie mitotisch hervorgegangen sind. Prokaryoten bleiben allein und bilden keine vielzelligen Organismen. Das gibt ihr simplizistischer Grundbauplan nicht her.

6.1.2. Komplex, vielseitig, leistungsstark, „organismenbildend“: Eukaryoten

In praktisch allen arbeitsteilig organisierten vielzelligen Lebewesen (Pflanzen, Tiere) weisen die Zellen, die solche Organismen² bilden einen wesentlich komplexeren Grundbauplan als den prokaryotischen auf. Das archaische Organisationsprinzip der Prokaryoten findet sich noch in der äußeren Zellmembran (hier auch als Plasmalemm bezeichnet), und im Zytosol, das nach wie vor der zentrale Stoffwechselraum der Zelle ist. Innerhalb der Zelle finden sich aber bei Eukaryoten vielfältige membranumgrenzte intrazelluläre Kompartimente, die vollständig in das Zytosol eingebettet sind und keineswegs nur Einstülpungen oder Einbuchtungen des Plasmalemm sind. Die Umgrenzung durch Membranen schafft intrazelluläre Unterräume, die spezifischen Teilfunktionen gewidmet werden können. Diese Teilfunktionen greifen ineinander, teilweise werden Prozesse kettenartig über verschiedene Kompartments hinweg organisiert. Die Vielzahl membranumgrenzter Räume entspricht großen - jeweils spezifisch funktionalisierten - Membranflächen, an denen sehr komplexe Vorgänge koordiniert werden. Eukaryotische Zellen können

¹Die Existenz einer äußeren Wand bei manchen Bakterien interessiert für den eigentlichen Grundbauplan hier nicht.

²Organismus hier verstanden als arbeitsteiliger, durch Differenzierung von Zellgestalt und Zellfunktion konstruierter „Zellstaat“

Leistungen vollbringen, zu denen Prokaryoten prinzipiell nicht imstande sind³. Nur auf Basis eukaryotischer Zellen sind bisher in der Evolution hochkomplexe, arbeitsteilige Organismen entstanden, in denen Zellen mit der gleichen Erbinformation ganz unterschiedliches Aussehen erlangen und ganz unterschiedliche Funktionen übernehmen können. Die Differenzierung von Gestalt und Funktion auf Basis eines einheitlichen Genoms (innerhalb eines „Zellstaats“= individueller Organismus) setzt eine enorm wandlungsfähige und gleichzeitig kontrollierte Maschinerie in den Zellen voraus, die tatsächlich nur auf Basis eukaryotischer Zellen gegeben ist. Angesichts des bis hier Gesagten ist auch nicht überraschend, daß eukaryotische Zellen um ein Vielfaches größer sind als typische prokaryotische Zellen. In der Medizin geht es um den Menschen und in der aktuellen Phase ihres Studiums um den Aufbau des menschlichen Körpers. Menschliche Zellen sind eukaryotische Zellen. Es geht also kein Weg daran vorbei, sich mit den Organisationsprinzipien eukaryotischer Zellen vertraut zu machen.

Vieles, wovon der eine oder andere schon im Vorfeld, z.B. in der Schule gehört hat, bezieht sich eigentlich nur auf eukaryotische Zellen und ihre intrazellulären Membransysteme und ist für die prokaryotische Minimalform zellulären Lebens sogar entbehrlich:

- der Zellkern (genauer eigentlich: die Kernmembran, die den Zellkern definiert)
- das endoplasmatische Retikulum mit seinen Unterabschnitten:
 - glattes endoplasmatisches Retikulum
 - raues endoplasmatisches Retikulum
- der Golgi Apparat mit seinen Unterabschnitten:
 - cis-Golgi
 - Golgi-Zisternen
 - trans-Golgi
- Sekretvesikel
- Endosomen
- Lysosomen

Die Fähigkeit zur Differenzierung der Zellgestalt und Zellfunktion hängt mit diesen eukaryotischen Membran-Organellen zusammen. Störungen dieser Grundfähigkeit führen zu Erkrankungen. Wie kann man den Zusammenhängen und Funktionen dieser Organellen näherkommen? Um einen ersten Blick auf die Zusammenhänge zwischen diesen verschiedenen Organellen zu werfen, gehen wir noch einmal zu den Prokaryoten zurück und betrachten hypothetische Konzepte, wie man sich den Übergang von prokaryotischen zu eukaryotischen Zellen vorstellt.

Dieser hypothetische Weg vom Pro- zum Eukaryoten wird hier im Skript verfolgt, weil er ein grundlegendes Verständnis der Beziehungen aller oben genannter Organellen ermöglicht. Für die anatomisch orientierte Zellbiologie stehen hier Räume und Oberflächen im Mittelpunkt. Sie brauchen dieses Grundverständnis aber auch in der Biochemie und der Physiologie.

- Der Begriff „eukaryot“ (kernhaltig) bedeutet mehr als nur die Anwesenheit eines Zellkerns. Wo der Zellkern vorhanden ist, sind auch die anderen intrazellulären Membransysteme (eR, Golgi, etc.) vorhanden.
- Mit den Begriffen prokaryot und eukaryot werden sehr unterschiedlich komplexe zelluläre Organisationsformen unterschieden.
- Prokaryotische Zellen konstituieren keine vielzelligen, differenziert strukturierten und arbeitsteilig funktionalisierten Organismen. Sie sind typische „Einzelgänger“.
- Eukaryotische Zellen können als Einzeller vorkommen, aber vor allem sind sie flexibelst differenzierbare und funktionalisierbare Grundelemente praktisch aller hochkomplexer, arbeitsteilig organisierter Lebewesen. Sie sind also „staatenbildend“ und äußerst flexibel einsetzbare Mannschaftsspieler.

³Beispiel: Komplexe Glykosylierungsmuster

6.2. Ein hypothetischer Weg vom Prokaryoten zum Eukaryoten

Die Ausgangslage: Zunächst betrachten wir drei Grundfunktionen einer prokaryotischen Zelle (s. ABB. 6.1, A), die mit ihrer Außenmembran verbunden wurden und nun an drei spezifisch funktionalisierten Regionen dieser Außenmembran konzentriert werden (s. ABB. 6.1, B). Dabei handelt es sich um:

Bindung von DNA Eigentlich liegt die DNA in Prokaryoten frei im Zytosol. Die Anbindung an bestimmte zytosolische Domänen von Proteinen der Außenmembran führt zu einer primitiven räumlichen Organisation der DNA. Das erlaubt es, DNA effizienter in räumlich organisierter Sequenz zu transkribieren und ggf. auch, die Transkription bestimmter DNA-Abschnitte durch Membranbindung oder räumlich-sterische Effekte zu kontrollieren.

Synthese der Membranphospholipide Die Membranphospholipide müssen regelmäßig ausgetauscht und zu diesem Zweck nachsynthetisiert werden. Dies erfolgt in darauf spezialisierten Membranabschnitten und zwar in dem Blatt der Lipid-Bilayer, das dem Zytosol zugewandt ist.

Synthese von Protein und Ausschleusung in den Extrazellulär-Raum Viele Prokaryoten haben um die äußere Membran herum eine versteifende Hülle, die Zellwand, in der auch Proteine eingelagert sind, die aus dem Zytosol (wo sie hergestellt werden) nach draußen kommen müssen. Hier stellt man sich vor, dass sich membrangebundene Mechanismen entwickelt haben, mit denen die Translation dann durch die Membran hindurch erfolgen konnte. Die für diese Vorgänge wichtigsten Enzymkomplexe der Zelle sind die Ribosomen. Für diese Art von Proteinsynthese müssen die Ribosomen dann in dafür geeigneten Regionen der Zellmembran an der zytosolischen Seite der Außenmembran (d.h. an der Innenseite der Bilayer) gebunden sein.

Verlagerung nach innen: Effizienzsteigerung: In einem ersten Schritt könnten sich die drei oben erwähnten Regionen durch Einstülpung der Außenmembran in den Innenraum verlagert haben (s. ABB. 6.1, C). Die mit der DNA verbundenen Regionen dienen häufig auch rein endogenen, lebenserhaltenden Funktionen und würden dabei am weitesten eingestülpt, die DNA würde teilweise, aber nicht vollständig, von diesen Membranteilen eingeschlossen (s. ABB. 6.1, C). Durch die Einstülpung ist die Membran jetzt an vielen Stellen doppellagig oder bildet Röhren; zwischen den beiden Lagen und in den Röhren befindet sich ein ins Innere verlagertes Raum. Dieser Raum bildet ein von Membran umgrenztes Tunnelsystem, bleibt dabei aber über diese Tunnel auch in offener Verbindung zum Extrazellulärraum (s. ABB. 6.1, C). Die Regionen, an denen die Phospholipidsynthese für den Membranunterhalt und Proteinsynthese für „Exportproteine“ stattfinden, sind ebenfalls eingestülpt worden und sind nun wandbildender Teil des Tunnelsystems, das in die Zelle hineinreicht (s. ABB. 6.1, C).

Schon diese räumliche Organisation muss große Vorteile für die Zelle gehabt haben. Einer der Vorteile ist zum Beispiel, dass Proteine, die in das Tunnelsystem statt direkt in den Extrazellulärraum sezerniert werden, nur wenig verdünnt werden und dann noch in hoher Konzentration in dem kleinen Volumen des Tunnelsystems vorliegen: Sie können dort also zum Beispiel nach der Synthese der Aminosäuresequenz noch nachverarbeitet werden. Wären sie direkt im Extrazellulärraum, wären sie für die Zelle unerreichbar und im - potenziell sehr großen - extrazellulären Volumen stark verdünnt. Der sensible Prozess der DNA-Organisation durch räumliche Konzentrierung kann nun unter kontrollierten Bedingungen stattfinden; die Phospholipidsynthese findet fernab von möglichen Störungen durch extrazelluläre Einflüsse statt. Neusynthetisierte Phospholipide können im Tunnelsystem ggf. noch nachprozessiert werden, ähnlich wie Proteine.

Der Schritt zum Eukaryoten: Vesikuläre Shuttle als Transportprozesse Mit dem oben beschriebenen Schritt ist allerdings auch über das Tunnelsystem nach wie vor eine offene (d.h. nicht durch Membranen kontrollierte) Verbindung von extrazellulär in topographisch tief innerhalb der Zelle liegende Regionen möglich: Möglicherweise ist dies ein Nachteil. Das Tunnelsystem ist stets gleichermaßen „Außenwelt“ (extrazellulär) wie auch „Innenwelt“ (topographisch tief intrazellulär; metabolischer „Vorhof“) der Zelle.

Diese Situation wird durch den letzten Schritt geändert:

Das röhrenförmige, kontinuierliche Tunnelsystem zerfällt (s. ABB. 6.1, D):

- Anstatt des „Tunnelsystems“ findet sich ein diskontinuierliches System, in dem Bläschen (Vesikel) die nunmehr gänzlich in der Zelle liegenden Membrangebilde über eine Art „Shuttlesystem“ miteinander, mit der Außenmembran und auch mit der Außenwelt verbinden.
- Die Funktionen der DNA-Bindung und Unterstützung der räumlichen Organisation der DNA (Kernmembran), der Phospholipid-Synthese (glattes ER) und der Proteinsynthese für den Weg nach draußen (raues ER) sind nunmehr ganz ins Zellinnere verlagert und ohne direkte morphologische Verbindung zur Außenwelt. Sie bleiben aber allesamt mit dem intrazellulären Membransystem assoziiert.
- Die DNA wird zwar von den nach innen verlagerten Membransystemen vielfach gebunden, organisiert und in ein kleines Kompartiment der Zelle zusammengedrängt (Zellkern); dieser DNA-haltige Raum bleibt aber über Poren der umschliessenden Membransysteme in offener Verbindung zum Rest des Zytosols (Kernporen).
- So wie der Inhalt der Vesikel letztlich als auf dem Weg zum (oder: vom) Außenraum gesehen werden kann, so kann analog auch die Seite der vesikel-begrenzenden Bilayer, die auf der Innenseite der Vesikel liegt als auf dem Weg zur (oder: von der) Außenseite des Plasmalemm interpretiert werden.
- Diese kleinen Bläschen (Vesikel) enthalten Produkte, die während des Transports von Enzymen der umgrenzenden Membran noch ungestört von äußeren Einflüssen und vollständig endogen kontrolliert weiterprozessiert werden können.
- In den Vesikelmembranen selbst können neusynthetisierte Phospholipide metabolisch ausgereift und als Teil der Vesikelmembran zur Außenmembran gebracht werden.
- Umgekehrt können gealterte Teile der Membran und auch Substanzen aus der Außenwelt zunächst in solche Vesikel einbezogen oder eingeschlossen werden. Dort können sie nachbearbeitet und beispielsweise zerstört oder „verdaut“ werden.

Die Etablierung des vesikulären Shuttlesystems in eukaryotischen Zellen ist ein großer Sprung weg vom prokaryotischen System hin zur Effizienzsteigerung und Funktionsvielfalt eukaryotischer Zellen. Um das Tunnelsystem mit einem vesikulären Shuttlesystem zu ersetzen, müssen in der Zelle Voraussetzungen gegeben sein:

- Vesikel müssen transportiert werden können
- Vesikeltransport muss gerichtet sein
- Vesikel müssen sich kontrolliert aus (Ursprungs-)Membranen abschnüren können
- Vesikel müssen genauso kontrolliert mit (Ziel-)Membranen verschmelzen können
- Zur Koordination der ganzen vesikulären Systeme muss es eine Art Adreßsystem in der Zelle geben.
- Es muss Möglichkeiten geben, den Inhalt der Vesikel zu kontrollieren und zu modifizieren

Die Vorgänge des Vesikeltransports, der Generierung und Verschmelzung von Vesikeln mit Membranen sind essentielle Lebensvorgänge (in Eukaryoten), die in vielen Zusammenhängen im Organismus eine Rolle spielen:

- Bei nahezu allen proteinergeren exokrinen oder endokrinen *Sekretionsvorgängen*, sei es die Becherzelle im Darmepithel, die endokrine Zelle in der Schilddrüse, der Zytokine produzierende Leukozyt, etc.
- Bei *retrogradem und anterogradem axonalen Transport* in den Axonen der Nervenzellen
- Bei *synaptischer Übertragung* in allen Varianten, die vorkommen, d.h. bei der neuro-neuronalen Synapse, in der motorischen Endplatte bei der neuromuskulären Übertragung, etc.
- Bei *Resorptionsvorgängen*, wie sie zum Beispiel im Epithel der Nierentubuli vorkommen.

- Bei *physiologischen Um- und Abbauvorgängen*, wie sie beispielsweise bei der Mauserung gealterter Erythrozyten in der Milz vorkommen.
- Bei *Abwehrvorgängen*, die die Zerstörung und Entfernung in den Organismus eingedrungener Mikroorganismen zum Ziel haben, beispielsweise bei der Phagozytose von Bakterien durch körpereigene Makrophagen.
- Bei *Pinozytose* und der Aufnahme von Substanzen aus dem Extrazellulärraum.
- Beim *Signalling*, seien es die sezernierten Botenproteine selbst oder aber die für die Erkennung benötigten Membranrezeptoren im Plasmalemm.
- Bei praktisch *allen Differenzierungsvorgängen* in Zellen/Geweben z.B. im Rahmen der Gestaltung der Außenseite einer Zelle, die je nach Zelltyp oder Gewebe ganz unterschiedliche Membranproteine aufweist.

Störungen der intrazellulären vesikulären Systeme haben schwerste Erkrankungen zur Folge. Als ein Beispiel dafür mag der Wundstarrkrampf (Tetanus) dienen: Tetanustoxin und Botulinustoxin (Botox) hemmen⁴ Vesikelfusionen; mehr dazu in der Physiologie und Biochemie.

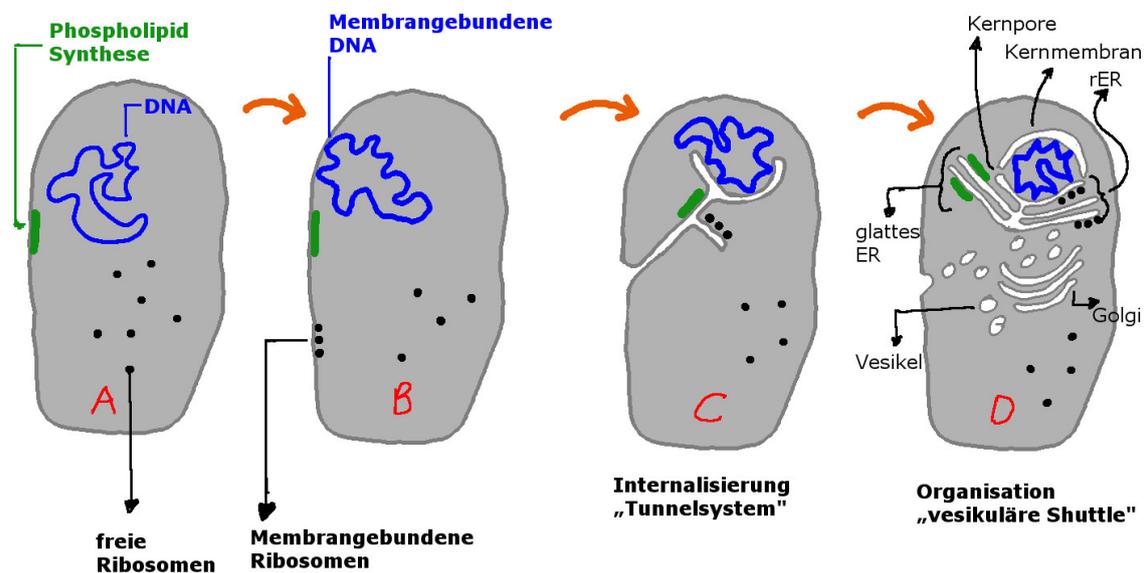


Abbildung 6.1.: Die Abbildung erläutert Prinzipien der Veränderungen der Zellorganisation beim Übergang von pro- zu eukaryotischen Zellen, wie sie auch der menschliche Organismus aufweist. Der prokaryotische Urtyp ist in Teilbild A zu sehen: Nur die Membransynthese ist zwingend an die Außenmembran gebunden. Sowohl die DNA wie auch die Ribosomen, an denen die Proteinsynthese stattfindet, liegen frei im Zytosol. Teilbild B zeigt, wie - hypothetisch - auch DNA-bindende Regionen der Außenmembran bei der Organisation der DNA zu assistieren beginnen. Auch Ribosomen können jetzt membrangebunden vorkommen und dienen dann dazu, das synthetisierte Protein direkt durch die Membran hindurch in den Extrazellulärraum auszu"füdeln". Teilbild C zeigt, wie die an diese Funktionen gebundenen Membranregionen in das Zellinnere eingestülpt werden. Die DNA-Bindung und auch die anderen Bereiche spezialisieren sich weiter. In der Zelle entsteht - hypothetisch - ein Tunnelsystem, das noch eine offene Verbindung zur Außenwelt hat. Teilbild D zeigt bereits das Grundprinzip der Organisation einer eukaryotischen Zelle. Aus den inneren Membranen gibt es keine direkte Verbindung nach außen mehr: Alle internen Abschnitte des Membransystems sind über vesikuläre Shuttlesysteme verbunden. Wichtige Stationen in diesem internen System sind die Kernmembran (wegen der Einstülpung doppelagig, das endoplasmatische Retikulum (eR, in glatter und rauher (rER) Variante vorhanden) und in Stapeln konzentrierte Membran, die man als Golgi-Apparat bezeichnet. Das glatte ER ist zum Ort der Membranbildung geworden, das raue ER trägt membrangebundene Ribosomen, die ihr Produkt ins Innere des Membransystems einbringen. Vesikuläre Shuttle verbinden ER, Golgi-Apparat und das Plasmalemm miteinander. Der Golgi Apparat ist für viele Produkte der intrazellulären Membransysteme eine wichtige Zwischenstation und dient der biochemischen Maturierung und der Sortierung von Molekülen in andere Abschnitte des Membransystems.

⁴über Wechselwirkungen mit SNARE Komplexen

6.3. Die topologischen Beziehungen der Zellkompartimente zueinander und die Transportwege zwischen Zellkompartimenten bedingen einander

Mehrere wesentliche Punkte werden durch den im vorigen Kapitel durchgespielten evolutiven Übergang von der prokaryotischen zur eukaryotischen Zellorganisation deutlich:

- Das Zytosol bleibt der zentrale Stoffwechselraum der Zelle. Als eine Art „Sonderwirtschaftszone“ bleibt der neu definierte Kerninnenraum mit der DNA darin über die Kernporen ohne Membranbarriere an das Zytosol angebunden.
- Es entstehen große, in das Zytosol eingebettete, aber durch Membranen von ihm getrennte Kompartimente, deren Inhalt als Material betrachtet werden kann, das vom extrazellulären Raum kommt oder auf dem Weg zu ihm ist. Das gilt auch, wenn einige der Inhaltsstoffe letztlich immer in diesen Kompartimenten verbleiben und den Extrazellulärraum nie erreichen.
- Die Innenseite der Membranen dieses Systems kann als auf dem Weg zur (bzw. von der) Außenseite des Plasmalemmas interpretiert werden, selbst wenn einige Teile des Systems nie direkt mit dem Plasmalemm fusionieren.
- Die komplexen vesikulären Knospungs- und Verschmelzungsvorgänge werden von zytosolischen Molekülen, d.h. aus dem zytosolischen Kompartiment der Zelle heraus gesteuert. Die Membransysteme hängen an zytosolischen Zytoskelettelementen und an zytosolischen Assistenzproteinen für Knospung und Fusion von Vesikeln wie eine Marionette an Fäden hängt: Das Zytosol bleibt also der „Puppenspieler“ im Hintergrund.

Damit wird es jetzt möglich, die Prinzipien der topologischen Äquivalenz⁵ zellulärer Kompartimente zu definieren:

Topologisch Äquivalente Kompartimente: *Zelluläre Kompartimente sind dann zueinander oder auch zum Extrazellulärraum topologisch äquivalent, wenn Inhaltsstoffe von einem Kompartiment zum anderen gelangen können, ohne eine Membran durchqueren zu müssen.*

Zur topologischen Äquivalenz gehörige Transportwege sind:

- Diffusion in durchgehender wässriger Phase, auch im Falle der eingeschränkten Diffusion (Kernporen)
- Knospung von Vesikeln aus einem Donorkompartiment, Transport und anschließende Fusion des Vesikels mit einem Akzeptorkompartiment.

Topologisch NICHT Äquivalente Kompartimente: *Zelluläre Kompartimente sind nicht topologisch äquivalent zueinander oder auch zum Extrazellulärraum, wenn Inhaltsstoffe von einem Kompartiment zum anderen nur dann gelangen können, wenn eine begrenzende Membran überwunden (d.h. durchdrungen) wird.*

Für Transporte zwischen Kompartimenten, die nicht topologisch äquivalent zueinander sind, dürfen Sie eine jeweils spezifische, meist sehr aufwändige Maschinerie zur Bewerkstelligung des Transportes erwarten⁶, z.B.:

- Mitochondrien und ihr Innenraum sind nicht topologisch äquivalent zum Zytosol oder zum intrazellulären Membransystem. Hier gibt es spezifische Transportmoleküle (z.B. TIM und TOM⁷)
- Die membrandurchquerende Proteinsynthese⁸, bei der die Synthese von Proteinen gerichtet aus dem zytosolischen Kompartiment über eine Membran hinweg in das Innere des endoplasmatischen Retikulums erfolgt.

⁵s. auch Kapitel 12.1 in Alberts u. a. 2011; die Darstellung in dem Buch von Alberts ist für Medizinstudierende im ersten Semester deutlich zu umfangreich. Für den, der nur mal schmökern möchte, gerne...

⁶Viele Details dazu werden in der Biochemie und Physiologie besprochen. Die topologischen Beziehungen selbst sind aber bereits ein anatomisch/strukturelles Thema.

⁷Nicht zu verwechseln mit TIM und STRUPPI (©); TIM steht tatsächlich für Translocator Internal Membrane und TOM für Translocator Outer Membrane.

⁸häufig auch als cotranslationale vektorielle Translation bezeichnet

Damit ergeben sich zwei große, voneinander getrennte Äquivalenzräume. Diese sind in der ABB. 6.2 farbig codiert. Die Innenräume der gesamten intrazellulären Membransysteme, beginnend tief in der Zelle mit dem Raum zwischen den beiden Lagen der Kernmembran, dann ER, Golgi, Vesikel und Lysosomen, etc. sind mit dem extrazellulären Raum topologisch äquivalent. Alle diese Räume sind blau dargestellt. Der wesentliche Modus des Stoffflusses hier ist das vesikuläre Shuttlesystem. Der grüne Bereich umfaßt den zweiten großen Äquivalenzraum in eukaryotischen Zellen, das Zytosol und der über die Kernporen angebundene Kerninnenraum. Zwischen Zytosol und Kerninnenraum findet Diffusion statt, auch wenn diese über Kernporen sekundär modifiziert werden kann und der Kerninnenraum funktionell vom Zytosol verschiedene Aufgaben hat. Löst sich die Kernhülle während der Mitose auf, wird die grundsätzliche Einheit von Zytosol und Kerninnenraum wieder offensichtlicher; dann dehnt sich das Zytosol auch auf den vorherigen Kerninnenraum aus. Alle Transporte von „blauen“ in „grüne“ Bereiche oder umgekehrt, d.h. über die trennenden Membranen zwischen den beiden Äquivalenzräumen hinweg sind für die Zelle mit besonderen Schwierigkeiten verbunden und brauchen „Spezialwerkzeug“.

Im Abseits dieser beiden summarischen Raumkomplexe finden sich einzelne Organellen, die keinem dieser beiden topologischen Äquivalenzräume zugehörig sind und dann jeweils mit speziellen Mechanismen in die intrazellulären Stofftransfers eingebunden sind. Die wichtigsten Zellorganellen in solcher „Eremiten“position sind Mitochondrien und Peroxisomen (s. Kap. 10). Beide stehen außerhalb der großen Äquivalenzzusammenhänge der Zellen und sind folgerichtig auch über ganz spezielle Transportwege in den Stoffwechsel eingebunden.

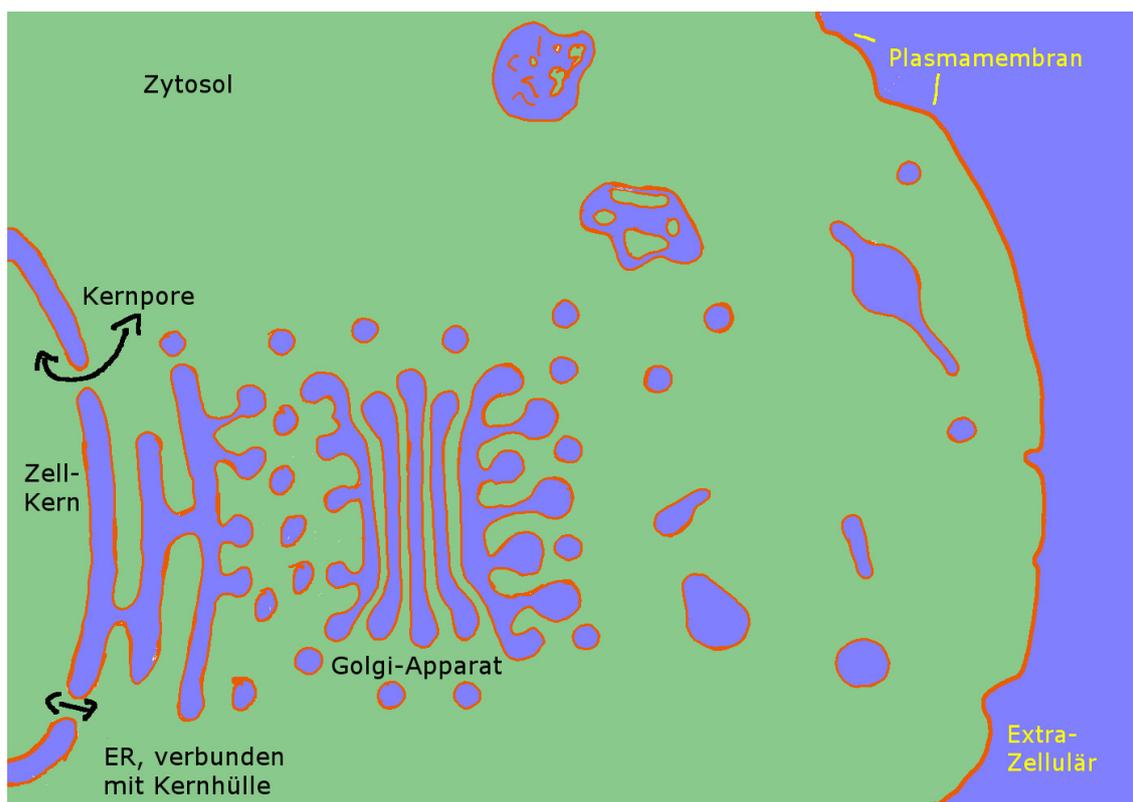


Abbildung 6.2.: Die Abbildung zeigt ein Grundschemata einer eukaryotischen Zelle mit den Organellen in schematisierter Anordnung. Die Membranen sind als orange Linien dargestellt. Die Farben blau und grün verdeutlichen die beiden großen, jeweils zusammenhängenden topologischen Äquivalenzräume:

Äquivalenzraum I (in blau) umschließt auch den Extrazellulärraum und beinhaltet die intrazellulären Membransysteme mit ihren wichtigsten Teilkompartimenten, wie Kernhülle, ER, Golgi, Vesikel, Lysosomen, etc.

Äquivalenzraum II (in grün) beinhaltet das Zytosol, den nach wie vor entscheidenden Stoffwechselraum der Zelle sowie den über Poren in der Kernhülle daran angebundene Kerninnenraum.

7. Topologischer Äquivalenzraum: Zytosol und Zellkern

7.1. Das Zytosol

Grundfunktionen des Zytosols: Das Zytosol entspricht in seiner Funktion nach wie vor dem archaischen universellen Stoffwechselraum des Prokaryoten. Basale Stoffwechselwege, die im Zytosol ablaufen, sind, z.B.

- die Synthese von Aminosäuren
- die Synthese von Monosacchariden (monomere Zucker/Kohlehydrate)
- der Abbau von Glucose (die sogenannte Glykolyse)
- die Synthese von Fettsäuren (hieran sind hochkomplexe Multienzymkomplexe beteiligt)
- der Abbau gealterter Proteine über das im Zytosol liegende Proteasom¹
- die Synthese von Proteinen mit Hilfe sogenannter Ribosomen (die *Translation*. Ribosomen sind große aus RNA und Proteinen bestehende Enzymkomplexe an denen die aus dem Zellkern stammenden RNA-Matrizen (messenger RNA, kurz mRNA) in die Proteinsequenz übersetzt werden. mRNA, Ribosomen und alle notwendigen Reagentien für diesen Prozess liegen im Zytosol vor.
- Zellgestalt, Organellentransport und vieles mehr wird vom Zytoskelett im Zytosol bestimmt.

Zelleinschlüsse sind im wässrigen Milieu des Zytosols nicht mehr gelöst: Im Zytosol befinden sich auch die sogenannten Zelleinschlüsse. Zelleinschlüsse sind nicht mehr in wässriger Lösung, sondern kolloidal, in anderem Aggregatzustand oder in anderer Phase - jedenfalls nicht wässrig gelöst - im Zytosol vorhanden. Wichtige Zelleinschlüsse sind das *Glykogen*² und Lipide, hier im wesentlichen als *Lipidtröpfchen*. Auch kristalline Einschlüsse kann es im Zytosol geben.

Glykogen wird in der Histologie teilweise bei der histotechnischen Verarbeitung extrahiert und verlagert; Glykogen ist mit den histologischen Routinefärbungen nicht färbbar und glykogenhaltige Zonen erscheinen daher in der Histologie schwach gefärbt oder ungefärbt. Die sogenannte PAS-Reaktion kann genutzt werden, um Glykogen oder andere hochpolymere Zucker substrathistochemisch darzustellen. Ein Beispiel für einen solchen Nachweis aus einem Kurspräparat ist in ABB. 2.1 zu sehen.

Die Lipide sind nicht wassermischbar und aggregieren in der Phase getrennt als ölige Tröpfchen im Zytosol. An der Oberfläche sind solche Lipidtröpfchen nicht von einer klassischen Bilayer umkleidet, sondern es lagern sich einzelne Phospholipide und auch einige spezialisierte Proteine in die Außenschicht der Fettröpfchen ein. Lipide werden regelmäßig bei Paraffineinbettungen vollständig herausgelöst und erscheinen dann hinterher als unfärbbare „Löcher“ in den Schnitten. Lipidfärbungen müssen also an Präparaten durchgeführt werden, die nicht über eine Alkoholreihe geführt wurden.

Das Zytoskelett: Durch die hohe Protein- und Metabolitkonzentration im Zytosol hat dieses eher eine gelartige Konsistenz. Die Viskosität des Zytosols ist aber nicht überall gleich, sondern hängt vor allem auch von der Menge der polymeren und funktionsbereiten Zytoskelettelemente ab. Das Zytoskelett ist tatsächlich einer der wichtigsten funktionellen Beiträge des Zytosols zur Zellfunktion überhaupt und wird darum in diesem Skript in einem separaten Kapitel behandelt (Kapitel 9).

¹Das Proteasom ist kein Vesikel, sondern ein Multienzymkomplex; Stoff der Biochemie

²ein hochpolymerer und als partikuläres Aggregat vorliegender Speicherzucker, auf der Basis von Glucose.

7.2. Der Zellkern

7.2.1. Ein paar essentielle Informationen vorab

Der Zellkern ist kein extra Körperchen, das in die Zelle eingestreut ist. Trotz des Wortes „Kern“, das in ihm vorkommt, ist er in keiner Weise vergleichbar mit Kernen von Früchten. Sein zellbiologisch-histologisches Verständnis wird von folgenden Faktoren bestimmt:

Der Zellkern ist ein Produkt der Membransysteme: Die dopellagige Hülle des Zellkernes ist gleichzeitig der innerste Abschnitt des endoplasmatischen Retikulums. Vorhandensein oder Fehlen des Zellkerns signalisieren also nicht unbedingt die An- oder Abwesenheit seines wesentlichen Inhaltsmoleküls DNA, sondern vor allem die An- bzw. Abwesenheit der Membransysteme.

Die perinukleäre Zisterne ist ein Teil der Zisterne des ER: Der membranumschlossene Innenraum wird auch als „Zisterne“ des ER bezeichnet. Ganz analog zum ER wird der Raum zwischen den beiden Lagen der Kernmembran als perinukleäre „Zisterne“ bezeichnet. Die perinukleäre Zisterne ist nicht nur analog zur Zisterne des ER benannt, sie ist ein Teil von ihr.

Poren in der Kernhülle halten die Verbindung zum Zytosol offen: Die Kernhülle hat Poren, die durch Membranproteine offengehalten werden, die an diesen Stellen die Porenstruktur gezielt stabilisieren. Diese Poren halten die Verbindung zum Zytosol offen; kleine Moleküle können frei durch die Poren zwischen Zytosol und Kerninnenraum diffundieren. Die am Porenrand sitzenden Proteine verhindern aber den Zutritt (bzw. Austritt) aller größeren Moleküle aus dem Kerninnenraum bzw. dem Zytosol, die nicht für den jeweiligen Raum vorgesehen sind.

Der Zellkern ist nicht immer im Zellzyklus vorhanden: Zellen, die sich teilen, treten aus der Interphase in die Mitose ein (mehr dazu in Kapitel 11). Während der Mitose verschwindet der Zellkern und es tritt die in Chromosomen verpackte DNA in Erscheinung. Während dieser kernlosen Phase der Zellexistenz sind die Membransysteme also dysfunktional (nicht nur die Kernhülle, auch das ER und der Golgi zerfallen in viele kleine Vesikel) und die Zelle verliert passager Merkmale der Differenzierung.

Voll ausdifferenzierte Zellen ausserhalb der Mitose haben einen Zellkern: Umgekehrt gilt die Regel, daß ausdifferenzierte Zellen einen Zellkern und die zugehörigen Membransysteme haben. Sie sind voll leistungsfähig gemäß ihres jeweiligen Differenzierungs- und Funktionsprogramms.

Die DNA im Zellkern ist komprimiert und organisiert: Verdichtete DNA stellt sich histologisch oder auch elektronenmikroskopisch als stark färbare basophile Struktur dar. Solche schollig dunklen Bereiche werden als Heterochromatin bezeichnet. Die helleren Zonen des Zellkerns sind nicht frei von DNA, sondern die DNA ist hier dekomprimiert und der Transkription zugänglich (wird als Euchromatin bezeichnet).

Der Nucleolus ist „das Kernchen im Kern“: Neben der scholligen Verteilung der DNA fallen in vielen Zellkernen runde, extrem dunkle (d.h. nukleinsäurereiche) Bereiche auf, die Nucleoli. Sie enthalten auch hochverdichtete Proteine. Ihre Anzahl und Erscheinungsbild ist ein enorm wichtiges histologisches Kriterium: In den Nucleoli wird RNA aus DNA transkribiert und werden Ribosomenuntereinheiten produziert. Die Färbung wird hauptsächlich durch die hohe RNA- und Proteindichte an diesen „hot spots“ verursacht. Ribosomenuntereinheiten in großer Zahl brauchen nur solche Zellen, die auch im Rahmen der Proteinsynthese aktiv sind.

7.2.2. Kernhülle und Kernporen

Die Kernmembran stellt sich elektronenmikroskopisch als zweilagige (zwei benachbarte schwarze Zonen mit hellem Inneren) Struktur dar, die von den Kernporen unterbrochen wird (s. Abb. 7.1). Die Kernporen öffnen sich zwischen Kerninnenraum und Zytosol. Das im Kerninnenraum befindliche Erbmaterial ist in der Nähe der Kernhülle häufig stark verdichtet; die DNA wird über verschiedene Brückenmoleküle an die Kernhülle angebunden und hier mit fixiert. Die Zone direkt unter der inneren Lage der Kernmembran ist reich an Lamin, einem im Kern lokalisierten Zytoskelettmolekül aus der

Gruppe der Intermediärfilamente (s. Kapitel 9), das im Zellkern mit für die Erhaltung der Zellkerngestalt und der DNA Anbindung zuständig ist. Wo Kernporen sind, fallen solche Anheftungsmöglichkeiten weg und es entstehen hellere, chromatinarme Zonen. Auf der Außenseite der Kernhülle sind der äußeren Membran bereits im Regelfall Ribosomen aufgelagert. Dieser Bereich ist also auch funktionell bereits Teil des rauen endoplasmatischen Retikulums.

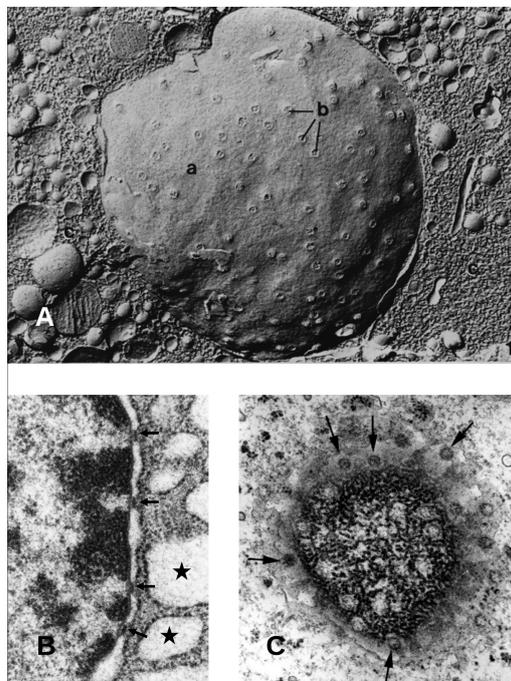


Abbildung 7.1 : Kurspräparat: **A** zeigt eine elektronenmikroskopische Ansicht einer Kernhülle (der kugelige Bereich in der Mitte von **A**). Das Gewebe wurde tiefgefroren und in Tiefkälte gebrochen; die Bruchflächen wurden mit Metall beschichtet und im Rasterelektronenmikroskop untersucht (eine sogenannte Gefrierbruchansicht). **a** flächiger Abschnitt der inneren Kernmembran, **b** Die Pfeile zeigen auf Kernporen.

B und **C** sind transmissions-elektronenmikroskopische Bilder.

B Ausschnitt aus der Kernhülle einer exokrinen Pankreaszelle (Schwein) mit kleinen **Pfeilen**, die die Kernporen markieren. Die Kernporen unterbrechen auch die Kontinuität der dünnen, hell erscheinenden perinukleären Zisternen, die an ihren Längsseiten von der inneren und äußeren Lage der Kernmembran eingfasst ist. Die **Sterne** markieren die Zisterne des endoplasmatischen Retikulums (ähnlich hell wie die perinukleäre Zisterne). Kernporen öffnen sich in das dunklere Zytosol zwischen den Zisternen des endoplasmatischen Retikulums. Gut zu sehen ist auch, dass im Bereich der Kernporen die dunklen, komprimierte DNA enthaltenden Chromatinstrukturen aufgelockert sind. Ribosomen befinden sich auf der zytosolischen Oberfläche der äußeren Kernmembran. (x 40000)

C Im Flachschnitt (Tangentialschnitt entlang der kugeligen Oberfläche) durch die Kernhülle sind die Kernporen (**Pfeile**) in der Aufsicht sichtbar. Der dunkle, schwarz granulierte Bereich in der Mitte zeigt bereits intranukleäre DNA (Chromatin). Hier ist die Kernhülle im Schnitt schon durchdrungen. Im Übergangsbereich nach außen sind die Kernporen zu sehen. (x 34000)

7.2.3. Der Kerninnenraum

Im Kerninnenraum ist die DNA der Zelle auf sehr engem Raum konzentriert und in hochverdichteter Weise ganz überwiegend im sogenannten Heterochromatin verpackt. Weniger stark färbbare, aufgelockerte Zonen werden als Euchromatin bezeichnet; DNA kommt praktisch überall im Zellkern vor. Chromosomen sind zwar natürlich ebenfalls im Kern enthalten, aber nicht einfach identisch mit dem Begriff Heterochromatin, weil sie in der Interphase (d.h. in den Phasen des Zellzyklus, in denen ein Zellkern sichtbar ist) mikroskopisch nicht voneinander unterscheidbar sind; Abschnitte verschiedenster Chromosomen sind während der Interphase auch als Euchromatin vorhanden. Erst, wenn die Kernstruktur sich auflöst und die Chromosomen als einzelne große Verpackungseinheiten separiert werden, sind sie auch lichtmikroskopisch sichtbar. Auch wenn die färbereiche Lichtmikroskopie Chromosomen in der Interphase nicht sichtbar machen kann, ist die DNA aber nicht irgendwie chaotisch im Zellkern einsortiert. Mit speziellen Verfahren (chromosome painting, Fluoreszenz in situ Hybridisierung) kann man zeigen, dass auch im Interphasekern die Chromosomen in abgrenzbaren Bezirken des Zellkerns auftreten, den sogenannten chromosomalen Territorien. Für die einfache färbereiche Histologie ist aber im Interphasekern mehr als die Unterscheidung in Hetero- und Euchromatin nicht möglich.

Neben dem Heterochromatin sind auch sogenannte Nucleoli als intensiv färbbare Strukturen im Zellkern zu sehen. Die starke Färbung der Nucleoli ist nicht auf einen höheren Verdichtungsgrad der DNA zurückzuführen: Im Gegenteil, sie lokalisieren in Bereichen, an denen Transkription von DNA in RNA stattfindet, also Euchromatin vorliegt. Es werden hier aber ungeheure Mengen an RNA produziert, die für Ribosomen-untereinheiten benötigt und vor Ort auch zu diesen zusammengebaut werden. Neben großen Mengen RNA treten hier auch Proteine konzentriert auf, die an dem Prozess der Bildung von Ribosomen-untereinheiten beteiligt sind bzw. mit in diese integriert werden. Die extrem hohe Moleküldichte verursacht in diesen Bereichen eine entsprechend intensive Farbstoffbindung, die

zu auffälligen, rundlichen und dunklen Zonen im Zellkern führt. Ribosomen, die aus den im Nucleolus zusammengebauten Untereinheiten dann entstehen, sind Fabriken für die Proteinsynthese. Solche Synthesemaschinen bauen die Zellen nur dann in großer Zahl, wenn auch viele Proteine hergestellt werden müssen. Intensive Proteinsynthese geht also u.a. mit prominenten Nucleoli einher.

- Nucleoli sind kein eigenes, membranumgrenztes Kompartiment. Sie sind eine funktionelle Verdichtungszone im Kerninnenraum
- Nucleoli sind kein Heterochromatin, sondern primär eine RNA-Struktur mit hohem Proteingehalt!

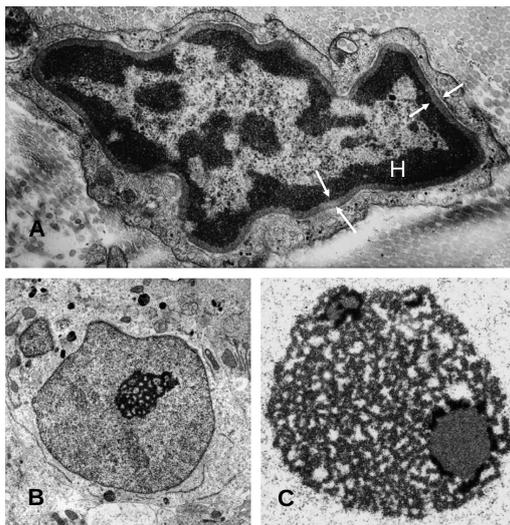


Abbildung 7.2: Kurspräparat: **A** Kern eines Fibroblasten. E, Euchromatin; H, Heterochromatin; Der Raum zwischen den Pfeilen wird als Lamina fibrosa bezeichnet; dieser - hier sehr dicke - Bereich enthält als eines der Hauptstrukturproteine Laminin^a. (x 32000) **B** Euchromatinreicher Kern einer Darmepithelzelle in Kultur mit prominentem Nucleolus. Im Lichtmikroskop wäre nur ein dunkler Punkt erkennbar; die hier sichtbare Binnenstruktur des Nucleolus ist im Lichtmikroskop normalerweise nicht zu erkennen. (x 6200)

C Nucleolus mit hellen fibrillären Zentren (Transkription DNS in prae-rRNS), schwarzen dichten Fibrillen (Splicing der prae-rRNS) und grauen granulären Anteilen (Ribosomen-Untereinheiten aus rRNS und Protein). (x 16000)

^anicht zu verwechseln mit Laminin, einem extrazellulären Glykoprotein, das im Zellkern nicht vorkommt

7.2.4. Stoffaustausch zwischen Zytosol und Zellkern-Innenraum

Zytosol und der Innenraum des Zellkern gehören zu einem einheitlichen Äquivalenzraum, in dem Moleküle im Grundsatz frei diffundieren können. Die Kernporen sind tatsächlich nicht durch Membranen verschlossen sondern - im Prinzip - frei durch Diffusion passierbar. Freie Diffusion ist gegeben für alle kleinen Moleküle (Ionen, Salze, Aminosäuren, Nucleotide, etc.). Die Passage von Makromolekülen der Zelle, v.a. Proteine und DNA bzw. RNA wird aber kontrolliert. Ein Beispiel für die durch die Kernporen bedingte Raumpräferenz ist, dass Ribosomen als RNA-Protein-Komplexe zu groß sind, um die Kernporen passieren zu können. Ihre Untereinheiten können daher zwar im Kern hergestellt werden und über die Kernporen ins Zytosol gelangen, die Ribosomen nach Zusammenbau aus den Untereinheiten aber nicht mehr zurück. Auf diese Weise kommt es zu Funktionsteilungen zwischen Zytosol und Kern-Innenraum: Proteinsynthese (braucht Ribosomen) kann nur im Zytosol stattfinden und zwar auch für solche Proteine, die später wieder im Kern-Innenraum gebraucht werden.

Nicht nur für Ribosomenuntereinheiten und Ribosomen, auch für Proteine gilt, daß ihre Verteilung über Zytosol und Kern-Innenraum genau kontrolliert wird. Eine komplizierte Proteinmaschinerie kontrolliert den Durchtritt durch die Kernporen, die oft auch als „Nuclear Pore Complex“ (NPC) bezeichnet werden. Diese Protein-Interaktionen im Bereich der Kernporen sind ein Thema der Biochemie.

7.2.5. Der Zellkern ist eine essentielle histologische Leitstruktur

Der Zellkern ist in der Histologie die am einfachsten und deutlichsten färbare Struktur und ist in der Standardfärbung HE stets sehr gut sichtbar. Seine Struktur spielt in der histologischen Analyse von Gewebe eine bedeutende Rolle; er wird nach Kriterien wie Größe, Gestalt (rund, längs, gelappt,

segmentiert), Anordnung des Heterochromatins (schollig, „Radspeichenkern“ bei Plasmazellen), Anzahl und Färbbarkeit der Nucleoli beurteilt. Die Diagnose maligner Tumoren in der Histopathologie stützt sich u.a. auf sogenannte Kernatypien³. Auch Sie werden bei Ihrer Arbeit an den Kurspräparaten bald feststellen, daß Sie schon allein anhand der Kernverteilung und der Kerngestalt viele Gewebe treffsicher erkennen können. Kerngrößenvariabilität durch unterschiedlichen DNA-Gehalt bei gleichartig differenzierten Zellen wird im Kurs am Beispiel der Hepatozyten der Leber gezeigt. Die Variabilität der Kerngestalt erschließt sich beim Vergleich der Zellkerne von Hepatozyten mit den Zellkernen nicht-hepatozytärer Zellen der Leber (s. ABB. 7.3).

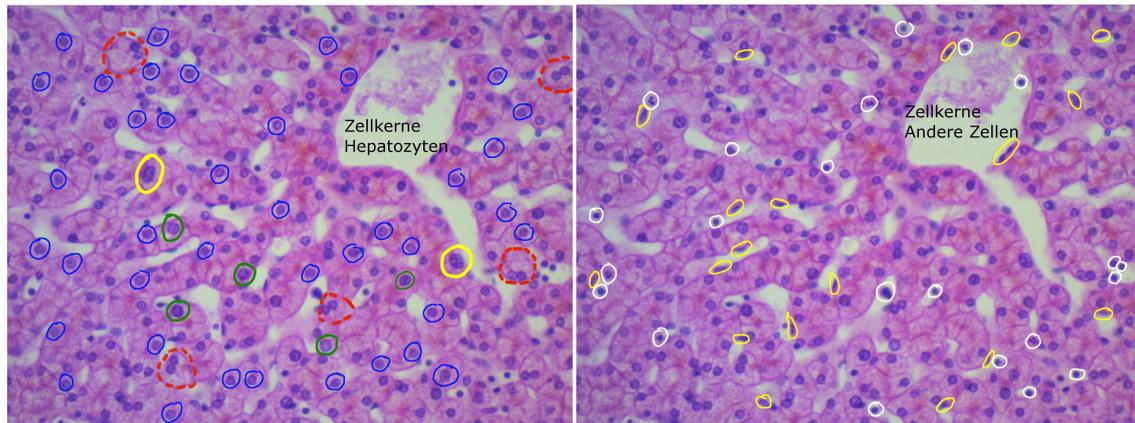


Abbildung 7.3.: Kurspräparat: Die Abbildung zeigt die Größen- und Gestaltvariabilität von Zellkernen in der Leber. Die auffälligsten Zellen der Leber sind die Leberepithelzellen, sogenannte Hepatozyten, die recht groß sind und sehr gleichmäßig differenziert. Zellkerne dieser Hepatozyten sind im linken Bild blau eingekreist. Hepatozyten können aber polyploidisieren (bis zu 16n), dann enthalten sie mehr DNA: die Zellkerne werden auch größer (grün: mittelgroß, gelb: groß); manche sind auch doppelkernig (rot gestrichelt).

Dieser Vergleich ist nur möglich, weil Sie Hepatozyten untereinander vergleichen. Vergleichen Sie verschiedene Zelltypen miteinander (Hepatozyten mit Endothelzellen der Leber), können Sie aus der Kerngröße nicht mehr auf unterschiedlichen DNA-Gehalt schließen.

Das rechte Bild hebt nicht-hepatozytäre Zellkerne in der Leber hervor. Zum Einen sind dies (gelb eingekreist) die Zellkerne von Leberendothelzellen, zum Anderen sind dies noch in den sogenannten Sinusoide verbleibene kernhaltige Blutzellen (Granulozyten und Lymphozyten, weiss eingekreist).

³ *Hyperchromasie*: Eine vermehrte und heterogene Anfärbbarkeit der Zellkerne. *Anisonukleose*: Hohe Variabilität der Kerngrößen. *Pleiomorphie*: Hohe Variabilität der Kerngestalt.

8. Topologischer Äquivalenzraum: Die Membransysteme

8.1. Endoplasmatisches Retikulum

Das endoplasmatische Retikulum (ER) besteht aus tubulären oder auch plattenartig angeordneten, membranumgrenzten Räumen (diese Innenräume des ER werden auch als „Zisterne“), die in unmittelbarer Kernnähe beginnen, sich aber durch weite Teile der Zelle erstrecken können. Der innerste dieser Räume ist die sogenannte perinukleäre Zisterne; die Kernhülle ist damit ebenfalls ein Unterbestandteil des ER. Grundsätzlich kann man diese - insgesamt eher labyrinthartige - Struktur in zwei morphologisch und biochemisch unterscheidbare Hauptabschnitte unterteilen:

Glattes ER: Das glatte endoplasmatische Retikulum ist eher ein *tubuläres* (d.h. aus Röhren bestehendes) Netzwerk, auf dessen zytosolischer Seite sich *keine Ribosomen* anlagern.

Raues ER: Das raue endoplasmatische Retikulum besteht aus plattenartig übereinander gelagerten und miteinander verbundenen *Membranstapeln*, auf deren zytosolischer Seite *viele Ribosomen* aufgelagert sind¹.

Grundsätzlich gilt, dass raues und glattes endoplasmatisches Retikulum in einem dynamischen Gleichgewicht miteinander stehen und ineinander übergehend können. Der Anteil dieser beiden Unterabschnitte am gesamten endoplasmatischen Retikulum ist funktionsabhängig. Eine schematische Darstellung derjenigen Anteile der Membransysteme, die man zum endoplasmatischen Retikulum zählt, zeigt ABB. 8.1, eine dreidimensionale Darstellung dieser intrazellulären Membran-Organellen findet sich in ABB. 8.2.

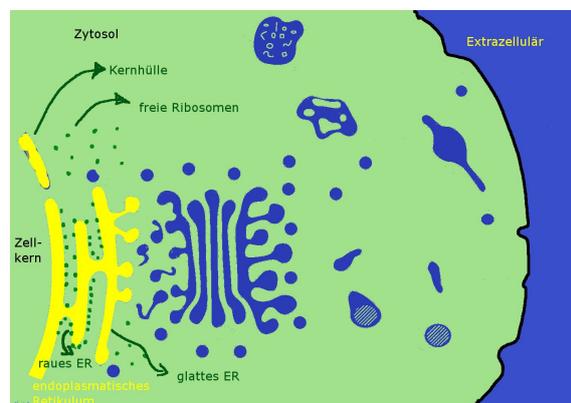


Abbildung 8.1.: Schematische Darstellung, die die beiden Hauptkomponenten des endoplasmatischen Retikulum (ER, in gelb hervorgehoben) im Zusammenhang mit den anderen intrazellulären Membransystemen zeigt. Die Beteiligung des ER an der Kernhülle und auch die Unterteilung in glattes und raues ER sind dargestellt. Ribosomen kommen grundsätzlich im Zytosol vor und müssen nicht an das ER gebunden sein. Sie liegen auch als freie Ribosomen vor, an denen dann die Proteine des Zytosols synthetisiert werden. Das ganze System ist dynamisch: Die Menge des gesamten ER und die Anteile an rauem und glattem ER können funktionsabhängig variieren.

8.1.1. Glattes endoplasmatisches Retikulum

Wie oben in Abschnitt 6.2 ausgeführt und in den Abbildungen 5.6 und 8.2 dargestellt, ist im glatten endoplasmatischen Retikulum die Synthese neuer Membranbestandteile, vor allem der Phospholipide, lokalisiert. Diese müssen regelmäßig erneuert werden; ihre Nachsynthese ist unverzichtbar für das Überleben der Zellen. Die Teilschritte dieses Prozesses sind Thema der Biochemie. Die gesamte Synthese neuer Phospholipid findet jedoch in der dem Zytosol zugewandten Hälfte der ER-Membran

¹ Im elektronenmikroskopischen Bild erscheinen die vielen Ribosomen als kleine schwarze „Punkte“ auf der zytosolischen Seite; daher der Begriff *raues ER*.

statt². Nur im Zytosol sind die Edukte, Enzyme und Hilfsreagentien für die Synthese vorhanden. Am Ende der Synthese werden die neusynthetisierten Phospholipide auf beide Seiten der ER-Membran verteilt. Neben diesem essentiellen Prozess sind auch viele andere metabolische Vorgänge, die mit Lipiden oder mit hydrophoben Substanzen zu tun haben, im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Der für die Medizin möglicherweise wichtigste Prozess aus diesem Spektrum ist die Metabolisierung vieler Arzneimittel. Werden Medikamente (z.B. bestimmte Psychopharmaka) chronisch eingenommen kann dies zu einer reaktiven „Induktion“ der Leberenzyme führen, die diese Medikamente metabolisieren. Morphologisch fällt dabei eine Vermehrung des glatten endoplasmatischen Retikulums in den Leberepithelzellen auf.

Neben diesen auf den Lipidmetabolismus bezogenen Funktionskreis beim glatten ER gibt es auch noch eine Spezialfunktion, die in vielen Zusammenhängen im Körper eine große Rolle spielt: Die Fähigkeit des glatten ER, Calcium anzureichern. Für diesen Zweck gibt es die Möglichkeit Calcium aktiv über die Membran des ER hinweg in der Zisterne des ER an- und parallel im Zytosol abzureichern. Diese asymmetrische Verteilung von Calcium wird genutzt um z.B. den raschen Calcium-Einstrom in das Zytosol zu bewerkstelligen, der bei der Kontraktion von Muskelgeweben benötigt wird. Aber auch in vielen anderen Zusammenhängen, können solche Calciumverschiebungen genutzt werden³.

- Im glatten ER werden Membranlipide (Phospholipide und Cholesterol) synthetisiert.
- Das glatte ER ist auch in die Synthese der Speicherlipide einbezogen.
- Das glatte ER stellt die Lipidkomponenten für Lipoproteine her.
- Im glatten ER werden Steroidhormone aus Cholesterol als Edukt hergestellt.
- Im glatten ER werden lipophile Substanzen wasserlöslicher gemacht, damit diese dann ausgeschieden werden können (Arzneimittelmetabolismus, Cytochrom P450)
- In der Zisterne des glatten ER können Ca^{2+} Ionen angereichert werden. Diese werden von dort - z.B. bei der Initiierung von Kontraktionsvorgängen - in das Zytosol freigesetzt.

8.1.2. Raues endoplasmatisches Retikulum

Im rauhen ER werden die beiden großen Äquivalenzräume (Kern und Zytosol auf der einen Seite; Membransysteme und extrazellulärer Raum auf der anderen Seite) über einen sehr komplexen und gerichteten (vom Zytosol in die Zisterne des rER führenden) Vorgang miteinander verbunden. Dieser Vorgang ist eine Proteinsynthese (biochemisch: Translation⁴), bei der die Edukte, Enzyme und Hilfsreagentien im Zytosol vorliegen, die synthetisierten Proteine aber in der Zisterne des ER zu liegen kommen bzw. in die Membran des ER - natürlich „richtigrum“ orientiert - eingebaut sind.

Um den bei der Translation ggf. mißverständlichen Begriff der „vektoriellen“ Translation zu umgehen, wird in diesem Skript sehr beschreibend von der „membrandurchquerenden“ Translation geredet.

Proteinsynthese ist generell ein zytosolischer Vorgang, einer der essentiellen Lebensvorgänge in Zellen überhaupt. Alle benötigten Ausgangssubstanzen (Ribosomen, Aminosäurebausteine, mRNA, tRNA, Hilfsreagentien, etc.) liegen im Zytosol vor. Im Inneren der Membransysteme, z.B. im endoplasmatischen Retikulum, fehlen alle diese Voraussetzungen für die Translation. Wenn die Proteinsynthese im Zytosol stattfindet, liegt auch das synthetisierte Protein im Zytosol.

Wie aber kommen Proteine in das Innere der Membransysteme, also zum Beispiel in die Zisterne des endoplasmatischen Retikulums? Diese Frage muß beantwortet werden, denn die mit dem endoplasmatischen Retikulum beginnenden Membransysteme sorgen für:

²Genau genommen, finden die Reaktionen tatsächlich am Phasenübergang von hydrophober Innenschicht der Membran und der hydrophilen Außenzone der Membran - aber auf der zytosolischen Seite - statt. Während der Synthese sind die Fettsäuren, an denen die Syntheseschritte erfolgen, in der hydrophoben Innenschicht über Wechselwirkungen mit ihren hydrophoben Ketten verankert.

³Es führt hier zu weit, dieses Thema zu vertiefen. Aber sowohl in der Histologie der Muskelgewebe und vielfach in der Physiologie wird darauf Bezug genommen werden.

⁴Details zur Translation sind Gegenstand der Biochemie.

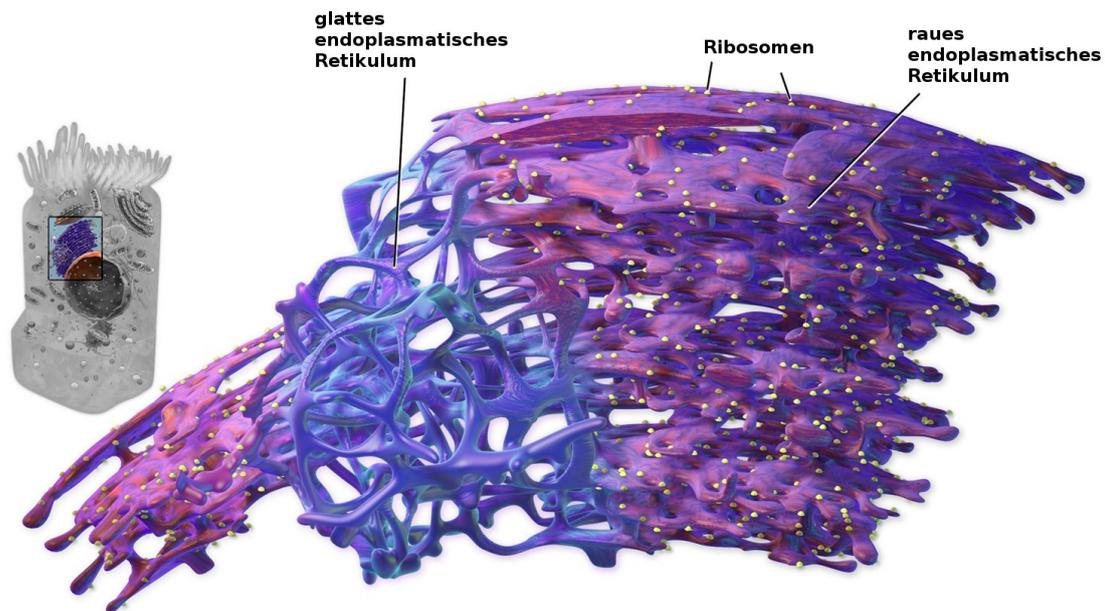


Abbildung 8.2.: Die Abbildung zeigt eine dreidimensionale Sicht der Netzwerke des endoplasmatischen Retikulums. Diese liegen häufig in unmittelbarer Nachbarschaft zum Zellkern (s. Zellschema als Insert). Der Binnenraum dieses Netzwerkes steht über das ganze endoplasmatische Retikulum miteinander in Verbindung und wird als Zisterne des endoplasmatischen Retikulums bezeichnet. Die kernnächste Lamelle dieses Netzwerkes ist die Kernhülle, deren Innenraum als perinukleäre Zisterne bezeichnet wird. Die perinukleäre Zisterne ist ein Teilabschnitt der Zisterne des endoplasmatischen Retikulums. Die Kernhülle ist also nicht nur doppellagige Kernmembran, sondern auch ein Teil des endoplasmatischen Retikulums.

Im **rauen endoplasmatischen Retikulum** überwiegen flächig ausgeprägte Bereiche, die häufig in Lagen dicht an dicht übereinander gestapelt sind. Das **glatte endoplasmatische Retikulum** ist nicht nur frei von Ribosomen, sondern weist auch eine überwiegend tubuläre (d.h. röhrenförmige) Grundstruktur auf. Abbildung modifiziert aus Wikimedia Commons Blausen.com staff. "Blausen gallery 2014". Wikiversity Journal of Medicine. DOI:10.15347/wjm/2014.010. ISSN 20018762.

- Lösliche Proteine, die sezerniert werden: Hormone, Bindegewebsfasern, Zytokine, etc..
- Lösliche Proteine, die in den dem endoplasmatischen Retikulum nachgelagerten Abschnitten der Membransysteme als Funktionsproteine verbleiben, also im Golgi Apparat, in den Endosomen und Lysosomen.
- Membranproteine, die später im Plasmalemm auftauchen und z.B. als Rezeptoren für Hormone, oder Bindegewebsfasern, etc. benötigt werden.
- Membranproteine, die in den Membranen der Membransysteme als Funktionsproteine resident sind.

Der einzige Weg, wie Proteine aus dem Zytosol in die Membransysteme geschickt werden können, ist die membrandurchquerende Translation. Es handelt sich um den zentralen Weg, über den alle Teilkompartimente der Membransysteme mit Proteinen bestückt und funktionalisiert werden.

Folgende Teilschritte (s. ABB. 8.3) gehören dazu⁵:

Start: Die Translation beginnt im Zytosol. Dort tritt die ganze Synthesemaschine zu einem großen Komplex mit dem Ribosom zusammen.

Kettenverlängerung und Membrandurchquerung: Handelt es sich um ein Protein für die Membransysteme oder den Extrazellulärraum (dafür gibt es Signale), dockt die ganze Synthesemaschine an die Membran des ER an und beginnt damit, das wachsende Protein durch einen sogenannten

⁵Details sind Thema der Biochemie. In diesem Skript wird die membrandurchquerende Translation am ER nur als Beispiel für Prozesse angeführt, die Äquivalenzräume verbinden. ABB. 8.3 enthält ein stark vereinfachtes Schema; andere komplexe Transporte wie die zwischen Zytosol und mitochondrialem Matrixraum und Zytosol und Peroxisom werden in diesem Skript nicht dargestellt. Diese sind - genau wie die Details der membrandurchquerenden Translation - Gegenstand der Biochemie, auch wenn Sie schon um die besondere topologische Thematik bei diesen Organellen wissen sollten.

Translokator durch die Membran zu fädeln. Während das passiert, werden im Inneren erste synthesebegleitende Modifikationen (z.B. Glykosylierungen) angebracht.

Freisetzung des Produktes im Zielkompartiment Wenn die mRNA abgelesen und das Protein fertig ist, werden die Produkte in der Zisterne und die Synthesekomponenten auf der zytosolischen Seite freigesetzt. Das Produkt ist im Zielkompartiment; das Ribosom kann im Zytosol mit der nächsten Translation beginnen.

Dass bei der membrandurchquerenden Translation die beiden großen Äquivalenzräume durch die Membran des ER hindurch funktionell miteinander verbunden werden, sollten sie wissen. Die Details dazu sind aber ein Schwerpunktthema der Biochemie und werden dort vertieft. Ein Schema zu den Grundgegebenheiten der cotranslationalen membrandurchquerenden Translation eines löslichen Glykoproteins ist in ABB. 8.3 wiedergegeben

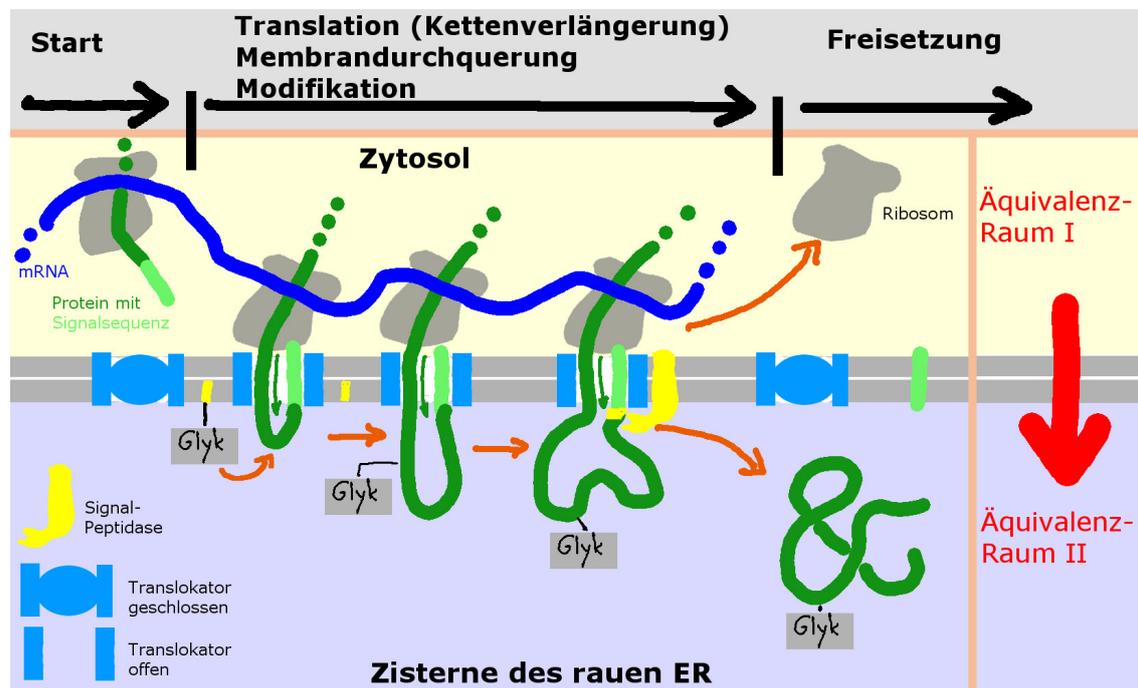


Abbildung 8.3.: Das Schema der membrandurchquerenden Translation soll beispielhaft den Aufwand erläutern, den eukaryotischen Zellen treiben, um Membranen zu überwinden, die Äquivalenzräume trennen. Die Abbildung zeigt ein vereinfachtes Flußschema der membrandurchquerenden Translation, bei dem zur Vereinfachung z.B. Strangorientierungen für mRNA (blau) und Protein (grün) weggelassen wurden. Alle für die Translation benötigten Edukte und das Ribosom liegen auf der zytosolischen Seite vor. An einem Ribosom im Zytosol beginnt auch die Translation der mRNA in die Proteinsequenz. Wenn eine auf das ER verweisende Signalsequenz (hier: hellgrün) im Protein synthetisiert wurde, bindet der ganze Synthesekomplex über diese Signalsequenz an einen dazu passenden Translokator der ER-Membran. Ab diesem Moment ist die Synthesemaschine mit der zytosolischen Seite der ER-Membran assoziiert. Der Translokator öffnet sich und die wachsende Peptidkette wird Glied (Aminosäure) um Glied während der fortschreitenden Translation durch den Translokator in die Zisterne des ER gefädelt. Nur auf der Zisternenseite der ER-Membran finden - direkt begleitend zur Synthese - Faltungs- und Glykosylierungsvorgänge (Glyk) statt. Am Ende wird durch enzymatische Spaltung des Signalpeptids (Signalpeptidase, gelb) das Produkt in die Zisterne des ER freigesetzt. Ribosom und andere Hilfsreagentien bleiben frei im Zytosol. Genau wie im Schema dargestellt, werden an dem langen Faden einer einzigen mRNA viele Ribosomen sequentiell angeordnet, die jeweils in kurzem Abstand nacheinander die mRNA in das Protein translatieren. So kommt es zustande, daß Ribosomen in elektronenmikroskopischen Bildern an der zytosolischen Seite der ER-membran wie an einer Perlschnur aufgereiht aussehen und in regelmäßigen Abständen - meist in spiraler Anordnung - vorkommen. Diese Perlschnur ist tatsächlich vorhanden: Es ist die mRNA. Häufig lesen nicht nur 3 Ribosomen (wie in der Abbildung oben) eine mRNA ab, sondern 30-40. So werden also in hoher Geschwindigkeit aus einer einzigen mRNA viele Proteine hergestellt. Die Membran fungiert dabei als Werkbank, entlang der der mRNA Faden über eine Serie von Translations-Komplexen geführt wird.

- Sezernierte Proteine menschlicher Zellen werden durch membrandurchquerende Translation im rauen ER auf den Weg gebracht.
- Integrale Membranproteine des Plasmalemm und der Membransysteme werden durch membrandurchquerende Translation im rauen ER auf den Weg gebracht.
- Was eine menschliche Zelle an Signal- und Botenproteinen in die Umgebung, Nachbarzellen, den Körper abgibt, wird durch die membrandurchquerende Translation auf den Weg gebracht.
- Welche Membranrezeptoren in der Membran einer menschlichen Zelle vorkommen und damit, welche Signal- und Botenproteine bei der Zelle eine Wirkung auslösen, wird durch die membrandurchquerende Translation bestimmt.
- Das gilt auch, wenn viele der im rauen ER über die membrandurchquerende Translation synthetisierten Proteine nicht den ganzen Weg bis zum Plasmalemm oder zum Extrazellulärraum gehen. Sie bleiben als residente Funktionsproteine im ER oder den nachgelagerten Kompartimenten der Membransysteme.
- Im Rahmen der membrandurchquerenden Translation beginnen bereits erste Modifikationen der Proteine, z.B. Verbindungen mit Zuckern, sogenannte Glykosylierungen.
- Umgekehrt gilt daher auch: Typische Glykoproteine (z.B. das Hormon hCG oder auch Antikörper und viele, viele andere wichtige Proteine) sind über die membrandurchquerende Translation und die nachfolgenden Wege produziert und sezerniert worden.

Das ER in verschiedenen Kurspräparaten Das glatte ER trägt keine Besonderheiten, die die Färbbarkeit oder auch andere einfache lichtmikroskopische Visualisierungsmethoden direkt unterstützen. Beim rauen ER ist das anders: Es ist mit vielen Ribosomen für die membrandurchquerende Translation besetzt. Diese bestehen aus gut färbbarer RNA (s. oben beim Nucleolus). Wenn Zellen also in großen Mengen Proteine für den Eigenbedarf (z.B. große Nervenzellen) herstellen oder aber für den Export (z.B. Drüsenzellen der Bauchspeicheldrüse), dann kann das färberisch sichtbar werden. In der alten histologischen Literatur gibt es für diese durch das rER verursachte Basophilie verschiedene Namen, die bis heute üblich sind. Die Beispiele im Kurs sind (i) Nervenzellen: Hier redet man von sogenannten Nissl-Schollen (s. ABB. 8.4) und (ii) Zellen des exokrinen Pankreas (Bauchspeicheldrüse); hier benutzt man eher den allgemeineren histologischen Begriff des „Ergastoplasmas“ für die durch das rER bedingte zytoplasmatische Basophilie (s. ABB.8.5). Ergastoplasma und Nissl-Schollen sind also stark basophile Bereiche, die nicht im Zellkern, sondern im Zelleib liegen.

Im Elektronenmikroskop (ABB. 8.6) zeigt sich das raue ER als dichter Stapel von Membranen, zwischen denen sich zwei deutlich unterscheidbare Räume finden. Die Ribosomen liegen immer im zytosolischen Kompartiment; sie verraten also, auf welcher Seite der Membranstapel das Zytosol zu suchen ist.

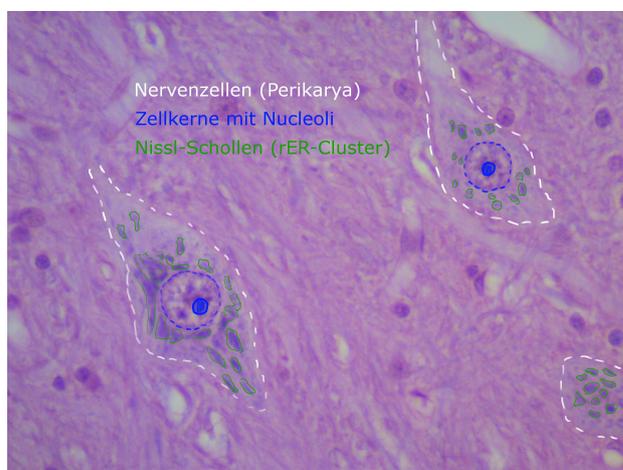


Abbildung 8.4: Kurspräparat: Die Abbildung zeigt zytoplasmatische Basophilie ausserhalb des Zellkernes: Nissl-Schollen.

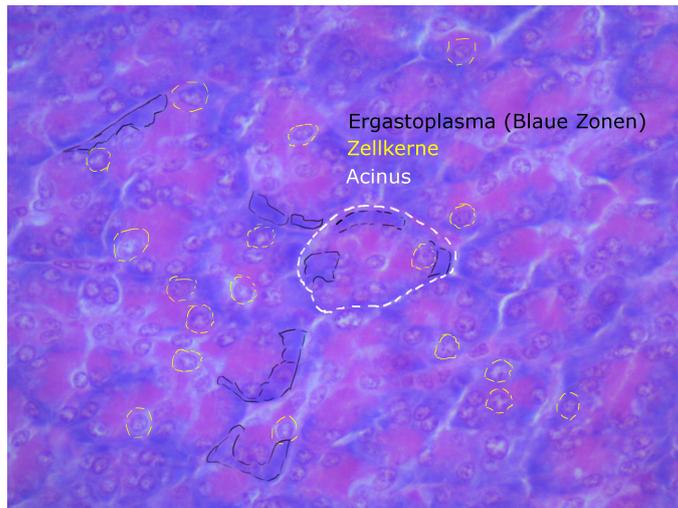


Abbildung 8.5: Kurspräparat: Die Abbildung zeigt basophil (blau) gefärbtes Ergastoplasma (lichtmikroskopisches Äquivalent des rER) in Drüsenzellen der Bauchspeicheldrüse. Der Vergleich mit den Zellkernen zeigt, dass die zytoplasmatische Basophilie hier sogar fast ausgeprägter ist als die Kern-Basophilie.

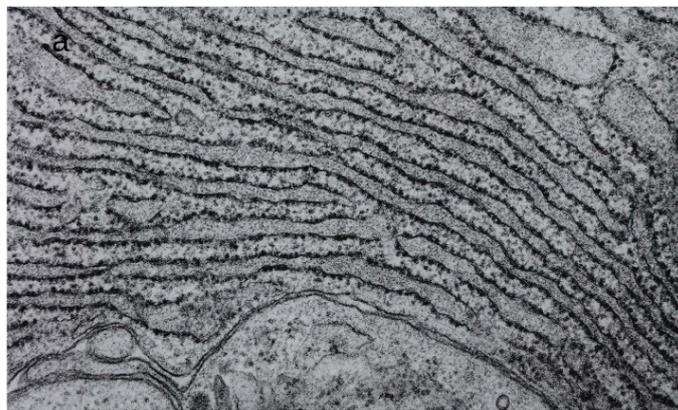


Abbildung 8.6: Kurspräparat: Die Abbildung zeigt dichte Membranstapel, zwischen denen sich zwei deutlich unterscheidbare Räume erkennen lassen. Ein etwas hellerer Raum, in dem aber membranassoziiert schwarz Granula (Ribosomen) vorkommen. Dieser Raum ist das Zytosol, der andere, etwas gleichmäßiger grau kontrastierte Raum ist die Zisterne des rauen ER.

- Funktioneller Hauptvorgang am rauen ER ist die membrandurchquerende Translation.
- Durch membrandurchquerende Translation am rauen ER werden lösliche Proteine und die Membranproteine für alle zur Zisterne des ER topoäquivalenten Räume und Membranen hergestellt, d.h. für
 - Sekretion (extrazellulärer Raum)
 - Plasmamembran
 - Golgi-Apparat
 - Endosomen, Lysosomen
 - ER
- In der Zisterne des rauen ER werden Glykosylierungsmotive angefügt, die für die Faltungunterstützung von Bedeutung sind.
- In der Zisterne des rauen ER werden Disulfidbrücken geschlossen.
- Signalsequenzen steuern die Zuordnung der Produkte der membrandurchquerenden Translation zu den verschiedenen nachgelagerten topoäquivalenten Räumen.

8.2. Der Golgi-Apparat

8.2.1. Der Golgi-Apparat ist polar organisiert

Der Golgi Apparat besteht aus 3-5 ausgehenden flachen Membranräumen (Golgi-Zisternen), die zwischen ER und Plasmalemm - meist in der Nähe des Zellkerns - in der Zelle liegen (s. ABB. 8.7). In Schnitten hat er meist eine leicht gebogene Grundanordnung, deren konkave Seite dem ER zugewandt ist. Die konvexe Seite ist dem Plasmalemm zugewandt. In der Umgebung des Golgi Apparates finden sich zahlreiche Vesikel; bei sekretorisch aktiven Zellen sind einige davon mit konzentriertem Sekret gefüllt. Wenn in sekretorisch oder bei der Proteinproduktion besonders aktiven Zellen mehrere Golgi-Apparate vorkommen, so bezeichnet man diese als Golgi-Felder. Auch der Begriff Dictyosom wird für Golgi-Felder verwendet.

Der Golgi Apparat mit seinen Zisternen und Vesikeln ist ein metabolischer Reifungsraum, in dem auch Sortierungsleistungen für die nachgelagerten und umgebenden Zellkompartimente erbracht werden. Seine Ausstattung mit in den Zisternen und Vesikeln gelösten Proteinen sowie mit Membranproteinen der Golgi-Grenzmembranen stammt aus der membrandurchquerenden Translation im ER. ER und Golgi Apparat stehen also miteinander in Verbindung. Diese Verbindung folgt dem allgemeinen zellulären Prinzip des vesikulären Shuttles: Vesikel aus dem ER schnüren sich ab, werden zum Golgi transportiert und verschmelzen mit den zum ER hin gelegenen Zisternen des Golgi-Apparates. Sowohl Membranen als auch Inhaltsstoffe werden so transportiert. Diese auf der konkaven Seite des Golgi Apparates liegende „Input“-region wird als cis-Golgi bezeichnet. Von der konvexen Seite des Golgi Apparates (auch „transGolgi bezeichnet) schnüren sich ebenfalls Vesikel ab, die dann zum Beispiel das Plasmalemm, Endosomen oder in Golgi-Nachbarschaft liegende und mit Sekret zu „betankende“ Sekretvesikel erreichen können.

Der Golgi Apparat weist metabolische und strukturelle Gradienten auf, die für seine Funktion essentiell sind. Das favorisierte Modell zur Erklärung dieses Phänomens basiert auf den vesikulären Shuttlesystemen im und entlang des Golgi-Apparates.



Abbildung 8.7.: Schematische Darstellung, die das ER mit dem Golgi Apparat als Funktionseinheit zeigt. Der Golgi Apparat ist unterteilt in die drei Hauptabschnitte cis-Golgi, Golgi-Zisternen und trans-Golgi. Die Maturationsrichtung von Produkten, die für den konstitutiven Erhalt von Plasmalemm, Lysosomen, Endosomen sowie ggf. auch für die Anreicherung von Sekreten in Sekretvesikeln erforderlich ist, wurde mit einem Pfeil markiert.

8.2.2. ER und Golgi Apparat sortieren Proteine für Zielkompartimente

Proteine, die im rauen ER auf dem Weg der membrandurchquerenden Translation in das Innere oder die Membran des ER gelangen, werden im „default“ nach draußen oder zum Plasmalemm transportiert. Die Sortierung zielt also vor allem auf Proteine, die als interne Funktionsproteine an bestimmten Stellen innerhalb des Membranapparates bleiben sollen (s. ABB. 8.8). Die Sortierung basiert auf Signalsequenzen in Proteinen, aber auch auf bestimmten Glykosylierungen. Signalsequenzen sind ein Teil der biochemischen Diskussion und werden dort detaillierter besprochen. Sie können hier im Umfeld des topologischen Konzeptes im Skript einfach als so etwas ähnliches wie Postleitzahlen begriffen werden.

Hat man erst einmal Adressinformationen, muss man aber auch die Päckchen transportieren und den zur Verteilung nötigen Transportaufwand leisten. Der Golgi Apparat ist die Stelle, an der das geschieht.

Die im nächsten Abschnitt vorgestellte dynamische Lokalisation von Molekülen beschreibt Grundprinzip, wie über Signalsequenzen und zugehörige Rezeptoren und Transportprozesse eine im Fließgleichgewicht stabilisierte Verteilung von Molekülen und Funktionen entlang des Golgi Apparates zustande kommt.

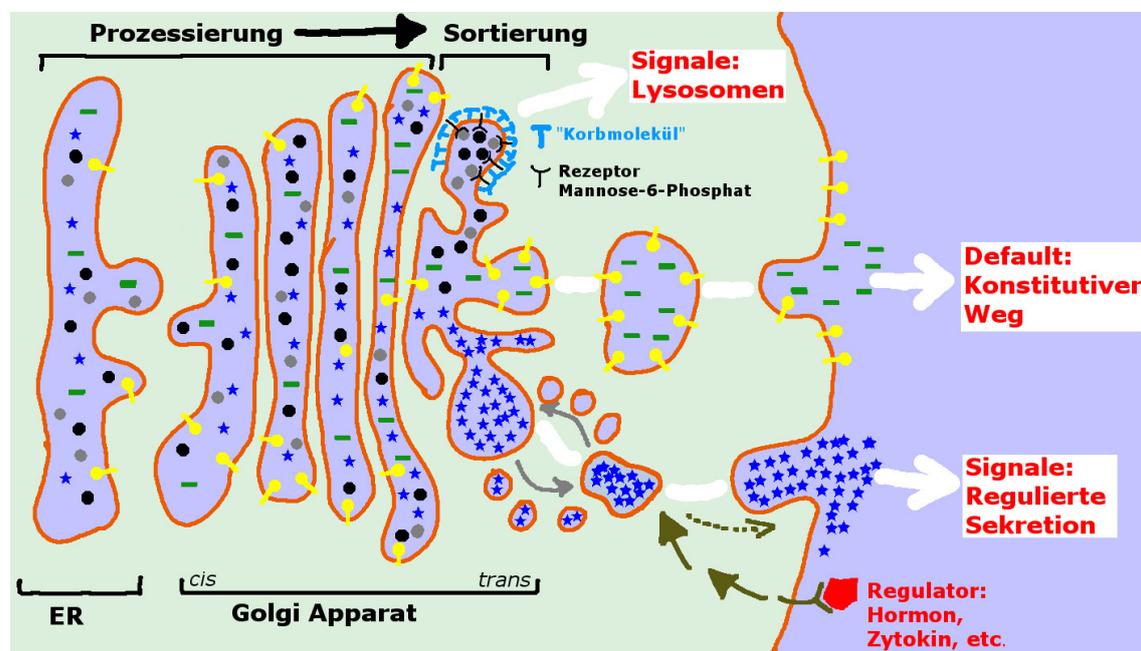


Abbildung 8.8.: Die Abbildung stellt im Schema die Sortierung von Molekülen aus dem Golgi Apparat (dem trans-Golgi) auf wichtige nachgelagerte zelluläre Kompartimente dar. Der Weg in die Lysosomen und die regulierte Sekretion wird über Signalsequenzen angesteuert. Ohne Signalsequenzen (Default:) geht es in das Plasmalemm bzw. den Extrazellulärraum. Signalsequenzen steuern aber nicht nur die dem Golgi nachgelagerten Kompartimente an. Es gibt Signale (in diesem Schema nicht gezeigt und vertieft), die eine ER-Lokalisation kodieren oder für bestimmte Golgi Abschnitte kodieren.

8.2.3. Vesikuläre Transportsysteme als Basis der Gradientenbildung im Golgi-Apparat

Das sogenannte vesikuläre Transportmodell⁶ geht davon aus, dass Vesikel vom ER zum cis-Golgi, zwischen den Zisternen des Golgi und den dem Golgi nachgelagerten Zellkompartimenten mit Hilfe des Zytoskeletts transportiert werden. Dabei werden Vesikel in Richtung vom ER zum trans-Golgi genauso gebildet und transportiert wie in Gegenrichtung, d.h. vom trans-Golgi in Richtung ER.

Vom ER über den Golgi hinweg entstehen auf Basis dieser Mechanismen gegenläufige Substanz- und Membranflüsse, die zur dynamischen Partitionierung von Membranbestandteilen und löslichen Inhaltsstoffen über das ganze ER-Golgi System hinweg führen (s. ABB. 8.9). Für jedes Membran- oder lösliche Protein im System ergeben sich - abhängig von Produktionsmengen, Rezeptoren für den Transport, etc. - unterschiedlichen Vorwärts- und Rückwärtsgeschwindigkeiten dieser Transporte. Ist das ganze System dann im dynamischen Fließgleichgewicht, können so die für bestimmte metabolische Schritte (im Golgi häufig: Glykosylierungen) notwendigen Werkzeuge (Enzyme) auf definierte Bereiche des ER-Golgi Systems konzentriert werden. Diese Sichtweise bedeutet aber auch, dass ein Versiegen der gegenläufigen Transportflüsse zum Zusammenbruch der Golgi-Gradienten und der ganzen Golgi-Organisation führt.

Vesikuläre Shuttlesysteme werden letztlich vom Zytosol aus gesteuert und kontrolliert. In diesem Sinn hat das Zytosol durch die Entstehung der Membransysteme bei Eukaryoten nicht an Bedeutung

⁶Alternativ gib es das auf der Maturierung von Zisternen basierende Transportmodell, auf das hier nicht eingegangen wird.

verloren, sondern an Bedeutung zugenommen. Um die komplexen vesikulären Shuttlesysteme zu steuern, müssen elementare Voraussetzungen für die vom Zytosol ausgehende Steuerung gegeben sein:

- Vesikel müssen gezielt und kontrolliert aus Membrankompartimenten abgeschnürt werden können.
- Vesikel müssen mit definierbarer Fracht beladen werden können.
- Vesikel müssen gezielt und gerichtet zwischen den Kompartimenten transportiert werden können.

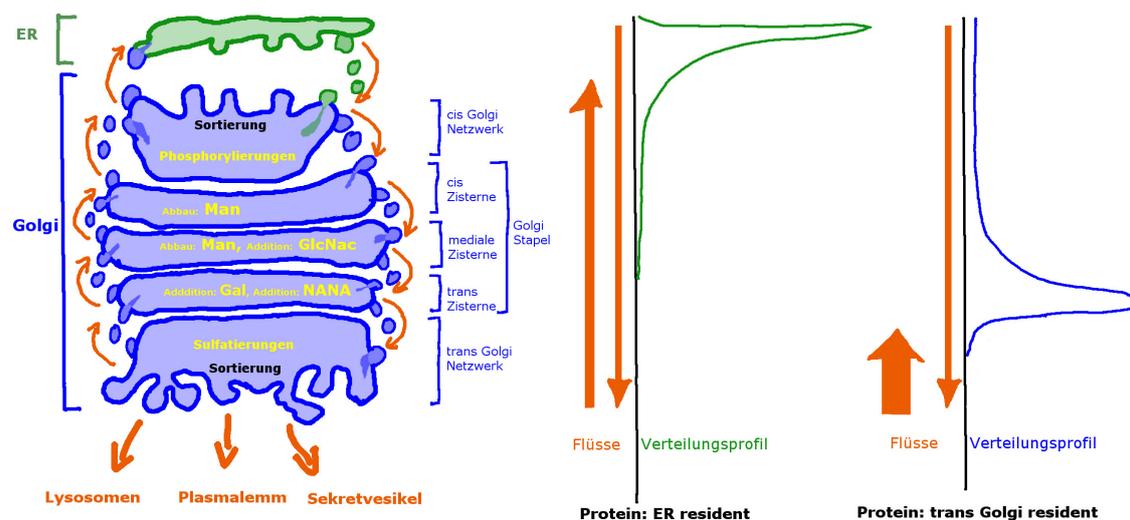


Abbildung 8.9.: Die Abbildung zeigt im linken Bereich ein Schema von ER und Golgi-Apparat. Zur Vereinfachung sind die Vesikelflüsse im Membransystem rechts und links in gegenläufiger Richtung dargestellt. Im Inneren der Golgi-Netzwerke und Golgi-Räume sind Beispiele für typische strukturierende (Sortierung) bzw. metabolische Schritte in den betreffenden Kompartimenten genannt (gelb). Man steht dabei für Mannose, GlcNac für N-Acetylglucosamin, Gal für Galactose und NANA für N-Acetyl-Neuraminsäure. Vom trans-Golgi Netzwerk aus erfolgt die Adressierung der nachgelagerten Zellkompartimente und des Plasmalemm. Auf der rechten Seite ist beispielhaft für ein im ER vorkommendes Protein und ein in der trans-Golgi Zisterne vorkommendes Protein dargestellt, wie die ortstypische Verteilung von Molekülen über die Inhalte und Membranen des Golgi Apparates von den Vesikeltransporten mit sichergestellt wird. Die Material- und Membranflüsse der vesikulären Shuttlesysteme sind eine wesentliche Grundlage inhomogener Verteilung von z.B. Enzymen innerhalb des Golgi Komplexes.

Vesikuläre Knospung aus Zellkompartimenten wird durch Hilfsproteine erleichtert: Zytosolische Hilfsproteine, die bei der Knospung von Vesikeln aus Membrankompartimenten assistieren sind z.B. Clathrin und die Coat-Proteine COPI und COPII. Diese Moleküle haben die Fähigkeit, die Abknospung von Membranen und die Bildung von Vesikeln zu katalysieren. Sie können über Adaptoren eine Vielzahl von Frachtmolekülen binden, die dann spezifisch zum Vesikelinhalt werden. Diese Vorgänge sind sehr komplex und Gegenstand der Biochemie. In der Elektronenmikroskopie werden solche sich bildenden Vesikel, die eine verdickte, proteinhaltige Hülle haben, auch als „coated vesicles“ bezeichnet. Handelt es sich z.B. um Clathrin, dann auch genauer als „Clathrin-coated vesicles“. Die „Korbmoleküle“ Clathrin, COPI und COPII, wie sie hier im Skript genannt werden, sind also Werkzeuge zur Katalyse vesikulärer Knospung aus Biomembranen.

Vesikel können spezifisch beladen werden: Die vesikuläre Knospung selbst ist über Adaptormoleküle⁷ bereits mit der spezifischen Beladung assoziiert. Die Kombination von Coat-Proteinen mit Adaptoren erlaubt den Transport und die Lokalisation vieler löslicher Proteine und auch Membranproteine.

⁷Adaptor heißt hier: Gleichzeitige Bindung an Coat-Protein und Bindung an „Frachtmolekül“

Vesikel werden vom Zytoskelett bewegt: In der Wand der Membransysteme und vor allem der Vesikel selbst finden sich nicht nur Proteine, die der Knospung oder dem selektiven Fracht-Transport dienen. Es gibt hier auch Proteine, die - i.d.R. wieder über Adaptormoleküle - Kontakt aufnehmen zum Zytoskelet. Das Zytoskelett (s. Kapitel 9) ist genau wie die Coat-Proteine im Zytosol lokalisiert. Zytoskelettelemente bestehen aus Filamenten und aus sogenannten Motorproteinen, die sich unter Energieverbrauch entlang der Filamente bewegen können. Von diesem Traktionssystem im Zytosol können also Vesikel von zwischengeschalteten Adaptorproteinen „huckepack“ genommen und im wahrsten Sinne des Wortes durch die Zelle geschleppt werden. Beide Zytoskelettsysteme, die über Motorproteine verfügen, beteiligen sich in unterschiedlicher Weise am Transport von Vesikeln:

- Das Tubulinsystem ist für die Transporte vom ER zum Golgi und zurück von besonderer Bedeutung. Die Tubuline sind aber nur unzureichend an das Plasmalemm angebunden; es gibt wenig Moleküle, die Tubuline direkt am Plasmalemm verankern.
- Das ist anders für das Actin-System. Dieses kontraktile System ist besonders ausgeprägt in der äußeren Zone der Zellen, wo es besonders stark verdichtet ist. Sollen Vesikel also durch diese Zone hindurch zum Plasmalemm (kommt häufig vor. . .), muss das Actin-System die letzten Schritte übernehmen.

Der Golgi-Apparat in verschiedenen Kurspräparaten: Die färberische Lichtmikroskopie hat vergleichsweise wenig Möglichkeiten, den Golgi Apparat selektiv anzufärben oder darzustellen. Die Fülle an Enzymen der Proteinglykosylierung⁸, die im Golgi Apparat vorkommen, haben es aber möglich gemacht, diese Region mit speziellen Versilberungen darzustellen. Im Kurs werden Sie dazu ein Präparat einer Versilberung des Golgi Apparates in Epithelzellen des Nebenhodens (Ductus epididymidis) mikroskopieren (s. ABB. 8.10). Lichtmikroskopisch gibt es noch die Option, spezifisch im Golgi-Apparat lokalisierende Proteine in der Immunhistochemie nachzuweisen. Im Transmissions-Elektronenmikroskop treten die Membranräume des Golgi Apparates auch ohne besondere Färbung hervor und können sichtbar gemacht werden (s. ABB. 8.11). Besonders deutlich ist der Golgi Apparat häufig in Zellen, die glykosylierte Sekretproteine herstellen.

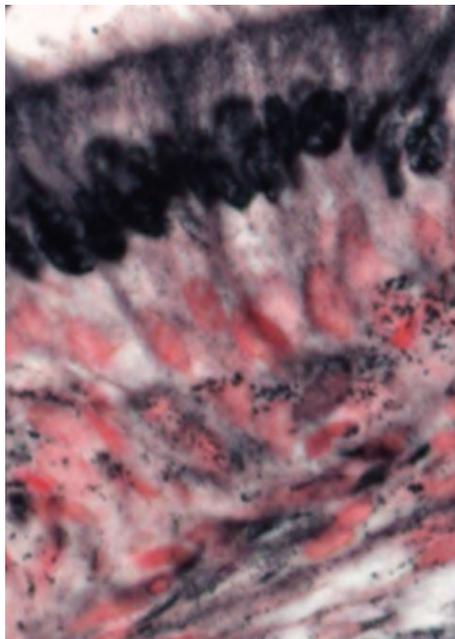


Abbildung 8.10: Kurspräparat: Versilberung des Golgi Apparates nach Lascano; Kerngegenfärbung mit Kernechtrot. Die schwach roten runden Bereiche im Bild sind Zellkerne der Zellen. In den stäbchenförmigen Epithelzellen sind diese längsoval, im darunterliegenden Bindegewebe unregelmässiger geformt. Die Silberniederschläge über den Golgi-Komplexen führen zu Schwärzungen. In den Epithelzellen liegen die großen Golgi-Komplexe oberhalb der Zellkerne in Richtung Lumen. Die Nebenhodenzellen stellen u.a. stark glykosylierte Proteine her. Die kleinen schwarzen Granula über dem Bindegewebe zeigen an, dass auch dort Golgi-Apparate sind. Diese sind aber viel kleiner und dienen funktionell nur dem Selbsterhalt der Zellapparate.

⁸viele davon katalysieren Redoxreaktionen



Abbildung 8.11: Kurspräparat: Die elektronenmikroskopische Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einer Zelle des Trachealepithels des Hundes. (1) bezeichnet das raue endoplasmatische Retikulum, (2) bezeichnet einen Abschnitt des Golgi Apparates mit den Zisternen des Golgi, (3) bezeichnet ein Prosekretgranulum, in dem bereits Sekret vorhanden ist, allerdings noch nicht in hoher Konzentration, (4) zeigt ein Sekretgranulum, das hoch konzentriert mit Sekret beladen wurde.

Weiterlesen, Schmökern, Keine Pflicht. . .

- Blobel, G. (1980). "Intracellular protein topogenesis." In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 77, S. 1496–1500.
- Bonifacino, J S. und B S. Glick (2004). "The mechanisms of vesicle budding and fusion." In: *Cell* 116.2, S. 153–166.
- de Duve, Christian (2007). "The origin of eukaryotes: a reappraisal." In: *Nat Rev Genet* 8, S. 395–403.
- Mellman, I. und G. Warren (2000). "The road taken: past and future foundations of membrane traffic." In: *Cell* 100.1, S. 99–112.
- Shibata, Y., G K. Voeltz und T A. Rapoport (2006). "Rough sheets and smooth tubules." In: *Cell* 126.3, S. 435–439.
- Tran, E J. und S R. Wente (2006). "Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge." In: *Cell* 125.6, S. 1041–1053.

9. Das Zytoskelett: „Puppenspieler“ im Hintergrund

Das Zytoskelett wurde bereits mehrfach als wichtiger Spieler im Zellgeschehen erwähnt. Der Begriff „Skelett“ führt allerdings bei Studierenden, die gleichzeitig am Knochenskelett im Präpariersaal lernen, zu einem Mißverständnis: Was man in der Zelle als „Skelett“ bezeichnet ist alles andere als ein statisches Gebilde, das sich nur langsam umformen kann. Das Zytoskelett ist Skelett und Muskulatur in einem: Es ist für die Form der Zelle verantwortlich, aber gleichzeitig auch für zelluläre Bewegungen. Einige wesentliche Baumerkmale lassen sich jedoch zusammenfassen und als allgemeine Kennzeichen des Zytoskeletts definieren:

- Die Proteine des Zytoskelettsystems sind zytosolische Proteine.
- Die verschiedenen Bestandteile des Zytoskelettsystems funktionieren nach dem Prinzip der Selbstorganisation: Kleinere Bausteine werden rasch und nicht-kovalent zu tubulären oder fädigen Filamenten zusammengebaut.
- Es ist ein rascher Auf- und Abbau dieser Filamente aus den Untereinheiten möglich (Prinzip der „Ameisenstraße“ oder auch „Tretmühle“).
- Es gibt 3 Subtypen von Zytoskelettelementen, jeweils mit spezifischem Aufbau und Funktion in der Zelle; zwei davon sind kontraktile Systeme.
- Neben den zentralen filamentbildenden Proteinen gibt es eine Unzahl an assoziierten Proteinen (Hilfsproteine), die für die Funktion des Zytoskeletts, seine Form, Verankerung und Beweglichkeit mitverantwortlich sind.
- Die wichtigsten Hilfsproteine der beiden kontraktilen Zytoskelettsysteme (Tubulinsystem und Actinsystem) sind die sogenannten Motorproteine.
- Motorproteine sind ATPasen, über die die Energie für Kontraktionen und Gestaltänderungen aufgebracht wird.

In der Elektronenmikroskopie wurden die Filamentsysteme des Zytoskeletts zuerst im Detail untersucht. Dabei fielen die Unterschiede in den Durchmessern der Filamentsysteme auf. Die aus Tubulin-Untereinheiten bestehenden Mikrotubuli haben sehr große Durchmesser, Actinfilamente sehr kleine Durchmesser. Das dritte - nicht kontraktile - Filamentsystem hat dazwischen liegende Kaliber und wurde in dieser Zeit beschreibend als „Intermediärfilamente“ bezeichnet.

Unter dieser Bezeichnung verbirgt sich allerdings das stofflich heterogenste, mehr als 40 Subgruppen umfassende zytoskeletale Filamentsystem in menschlichen Zellen. Eine tabellarische Zusammenfassung zu wesentlichen Eigenschaften der drei großen Zytoskelettsysteme ist in Tab. 9.1 zu finden.

Die zentralen Aufgaben des Zytoskelettsystems werden meist nicht nur von einem der drei großen Systeme wahrgenommen, sondern sind häufig auf mehrere dieser Systeme verteilt:

- **Mechanische Stabilisierung der Zelle selbst und ihrer Ausläufer:**
 - Alle drei Zytoskelettsysteme auf je eigene Art, v.a. Actine und Intermediärfilamente
- **Bewegungen der ganzen Zelle oder von Zellverbänden:**
 - Vorwiegend das Actinsystem, aber auch Tubuline (Geißeln)
- **Bewegungen und vesikuläre Transporte innerhalb der Zelle:**
 - Im Zellinneren vorwiegend die Tubuline, im unmittelbaren Randbereich der Zellen vorwiegend das Actinsystem

Familie	∅	Form	Lokalisation
Actine	7nm	(verzweigte) Einzelfilamente, Filamentbündel, Netzwerke	Kortikales Zytoplasma, Mikrovilli, Adhaerens-Zellkontakte
Mikrotubuli	25nm	unverzweigte tubuläre Einzelfilamente	Zytoplasma, Kinozilien
Intermediärfilamente	±10nm	Einzelfilamente, Filamentbündel	Zytoplasma, Desmosomen
Lamin	±10nm	Netzwerk	innere Kernmembran

Tabelle 9.1.: Tabellarische Zusammenfassung einiger wesentlicher Merkmale der drei großen Hauptgruppen von Molekülen des Zytoskeletts. Lamin ist vom Durchmesser her auch in Intermediärfilament und wird in dieser Gruppe häufig mit eingeschlossen. Es ist hier wegen seiner besonderen Rolle bei der Stabilisierung der Chromatin- und Kernstruktur separat aufgeführt.

9.1. Actine

Actine sind eine große Familie von globulären zytosolischen Proteinen. In allen menschlichen Zellen kommen Varianten (Isoformen) der Actine vor. In den Zellen der kontraktiven Gewebe (Herzmuskelzelle, glatte Muskelzelle, Skelettmuskelfaser) kann mehr als die Hälfte des intrazellulären Proteins aus Actinen bestehen. In den kontraktiven Geweben dominieren α -Actine. In muskulären und auch nicht-muskulären Zellen kommen auch verschiedene β - bzw. γ -Actine vor. Über spezifische Antikörper gegen einzelne dieser Isoformen können Differenzierungsvorgänge von Fibroblasten über Myofibroblasten hin zu glatten Muskelzellen in Geweben verfolgt und untersucht werden.

Im Zytosol liegen die monomeren Actine als globuläre Proteine (**G-Actin**) vor. G-Actin kann sich in einem ATP-abhängigen Vorgang zu filamentären Strängen zusammenlagern (**F-Actin**). Die neuen G-Actine werden dabei an einem schnellwachsenden Ende des Filamentes angelagert, das man auch als (+)-Ende bezeichnet; analog wird das gegensätzliche Ende des Filamentes als (-)-Ende bezeichnet. Am (+)-Ende des F-Actins ist ein besonders schneller Auf- und Abbau des Filamentes möglich. Allerdings können Zellen auch am (-)-Ende auf- und abbauen, wenn auch langsamer. Der Auf- und Abbau von Actinfilamenten findet vor allem in nicht-muskulären Zellen statt, wo z.B. zelluläre Bewegungen (amöboide Bewegung von Makrophagen im Gewebe) erforderlich ist. Dabei können (-)-Ende freigesetzte G-Actine am (+)-Ende direkt wieder angebaut werden, wodurch sich eine Art „Tretmühlenmechanismus“ ergibt. In den muskulären Zellen sind die F-Actine von Hilfsproteinen stabilisiert und werden nur bei Regenerationsvorgängen nach z.B. Verletzungen netto um- und aufgebaut.

Das Actinsystem zeichnet die große Flexibilität aus, die es beim Aufbau kontraktiver Systeme aus seinen Filamenten entwickelt. Diese Flexibilität wird von Hilfsproteinen erreicht, die verschiedene Grundformen des intrazellulären Arrangements von F-Actin ermöglichen:

- Die Bündelung von vielen F-Actinen zu größeren, parallel ausgerichteten Strukturen wird von Proteinen wie Fimbrin, Villin oder Espin unterstützt. Je nach Hilfsprotein werden dabei die Abstände zwischen den Einzelfilamenten genau eingestellt, was z.B. in Muskelgeweben für die genau dazwischen eingepassten Motorproteine von Bedeutung ist.
- Netzartige Strukturen (rechtwinklig aufeinander stehende F-Actin Filamente) können z.B. mit Hilfe des Proteins Filamin erzielt werden.
- Verzweigte Anordnungen von F-Actinen (spitzwinklig auseinander hervorgehende F-Actine) werden von Arp-Hilfsproteinen ermöglicht.

Eine Zone, die in besonderer Weise in nicht-muskulären Zellen mit dem Vorkommen von Actinen assoziiert ist, ist der äußere, direkt sub-plasmalemmale Bereich der Zellen. In dieser Zone ist der Nukleationsbereich (d.h. das (-)Ende) der meisten Actin Filamente. Dieser kortikale Rand enthält eine Verdichtung von Actin-Filamenten die als kortikales Netz bezeichnet wird. Filamin ist eines der

Hilfsproteine, die hier bei der Ausbildung der Verflechtungen assistieren. Das kortikale Actinnetz ist über jeweils gewebespezifische Moleküle mit der Plasmamembran und über integrale Membranproteine des Plasmalemmes hinweg auch mit der extrazellulären Umgebung (extrazelluläre Matrix) verbunden. Die hohe Konzentration von F-Actin im kortikalen Bereich verursacht eine erhöhte Viskosität des Zytosols unterhalb des Plasmalemmes; in Verbindung mit den Proteinbrücken ins Plasmalemm wird die äußere Zellgestalt ganz wesentlich vom kortikalen Actinnetz geprägt.

Myosine sind die Motorproteine des Actin-Systems: Myosine sind nichts anderes als F-Actin assoziierte ATPasen. Sie haben die Eigenschaft, sich unter ATP-Verbrauch an F-Actin entlang zu „hangeln“; diese Bewegung erfolgt stets in Richtung auf das (+)-Ende. Letztlich wird die Energie aus dem ATP in Konformationsänderungen der Myosine umgewandelt; die Entspannung dieser energiegeladenen Konformationen löst dann Bewegung im molekularen Maßstab aus. Weil solche Vorgänge - wie bei Enzymen ja sonst auch der Fall - rasch und häufig wiederholt werden, kommen Bewegungen entlang der F-Actin Filamente zustande.

Die an F-Actinen wandernden Myosine existieren in verschiedenen Subklassen, die mit römischen Buchstaben unterschieden werden. Je nach Anordnung der F-Actine in Bezug zu den zugehörigen Myosinen können sehr unterschiedliche Funktionen der Actin-Myosin Interaktionen ermöglicht werden:

Verspannung der äußeren Zellgestalt: Solche Verspannung sind zum Beispiel erforderlich bei der Bildung von Microvilli, die ein Actin-Skelett aufweisen und eine zylindrische Grundgestalt wahren müssen. In solchen Verspannungen im Bereich des kortikalen Actinnetzes wird häufig *Myosin I* beobachtet.

Transport von Vesikeln auf den letzten nm zum/vom Plasmalemm: Auf den letzten nm unterhalb des Plasmalemmes muss das kortikale Actinnetz bei allen Transporten von Vesikeln von oder zum Plasmalemm durchquert werden. In dieser Region sind die Tubuline nicht mehr zuständig, Actin-Myosin Komplexe übernehmen den Vesikeltransport. *Myosin V* ist ein Myosin, das hier typischerweise zum Einsatz kommt. Über verschiedene Adaptorproteine (binden an Myosin V und gleichzeitig an Signalmoleküle auf der zytosolischen Seite der zu transportierenden Vesikel) können mit demselben Schlepptau-System ganz unterschiedliche Vesikel transportiert werden.

Kontraktion in hochdifferenzierten Muskelgeweben: In Skelettmuskelfasern passen *Myosin II* Moleküle exakt in die Lücken zwischen gegenläufig ausgerichteten F-Actinen. Diese Anordnung ist extrem effizient auf die Entwicklung großer Kontraktionskraft ausgerichtet.

Histologische Strukturen, die mit Actinen assoziiert sind: Im Wesentlichen werden zwei immer wiederkehrende Merkmale bzw. Eigenschaften mit dem Actin-Zytoskelett assoziiert:

Microvilli: In typischen Microvilli, die ca. 1µm lang sind, findet sich ein innenliegendes coaxial ausgerichtetes, meist aus 10-100 F-Actin Filamenten bestehendes Actin-Innengerüst. Dieses ist über verspannende Brückenmoleküle mit dem Plasmalemm verspannt und garantiert die Gestalt des Microvillus. Microvilli können sich in ihrer Längsachse kontrahieren.

Kurzlebige „Podien“: Pseudopodien werden von amöboid wandernden Zellen (z.B. bei Makrophagen, die durch ein Gewebe wandern) im Rahmen der Fortbewegung ausgebildet und im Zellinnern von „Actin-Tretmühlen“, also durch gerichteten gleichzeitigen Ab- und Aufbau von F-Actinen im Bereich des kortikalen Actinnetzes vorangetrieben.

- Actine kommen in verschiedenen Isoformen in allen menschlichen Zellen vor
- Die Motorproteine der Actine sind Myosine
- Das Actinsystem ist die funktionelle Basis der kontraktilen Gewebe (Herzmuskulatur, Skelettmuskulatur, Glatte Muskulatur)
- Das Actinsystem ist wesentlich an der Stabilisierung von Mikrovilli z.B. in resorbierenden Epithelien beteiligt
- Das Actinsystem ist für die amöboide Fortbewegung von Zellen mit verantwortlich
- In vielen Zelltypen (ausserhalb der kontraktilen Gewebe) kommen Actine vor allem im plasmalemnahen Bereich (kortikales Actinnetz) vor und bestimmen die äußere Zellgestalt mit.

9.2. Tubuline und Microtubuli

Tubuline assoziieren im Zellinneren zu röhrenförmigen Gebilden, den Mikrotubuli. Die Wandung von Mikrotubuli besteht aus spiral angeordneten Tubulinen, Innenraum und Wandung addieren sich zu einem Gesamtdurchmesser der Mikrotubuli von rund 25nm. Ähnlich wie bei den Actinen werden die Mikrotubuli rasch aus ihren Tubulin-Untereinheiten auf- und abgebaut und können „tretmühlenartig“ organisiert werden. Die α - und β - Varianten der Tubuline werden alternierend in die Mikrotubuli eingebaut. Ihre spezielle räumliche Struktur erzwingt die Röhrenform der Mikrotubuli. Mikrotubuli sind stets unverzweigt und bilden keine Netzwerke. Ähnlich wie bei F-Actin werden Mikrotubuli von einem (-)-Ende aus in Richtung auf das (+)-Ende aufgebaut. Der Aufbau von Mikrotubuli aus den Tubulin-Untereinheiten beginnt an Ringkomplexen aus γ -Tubulin¹, die sich stets an einer Stelle befinden, die dann als Mikrotubulus-Organisations-Zentrum (MTOC) bezeichnet wird. Im MTOC befindet sich dann auch im Regelfall das (-)-Ende der Mikrotubuli. In vielen Zelltypen ist das MTOC identisch mit dem Zentrosom. Als morphologisch auffällige Struktur findet sich im MTOC/Zentrosom auch das Zentriol, ein spezielles Arrangement präformierter Mikrotubuli. Ein Zentriol besteht aus 9 Mikrotubulus-Tripletten in einer streng geometrischen Anordnung. Jede dieser Tripletten enthält ein rundes (vollständiges) und zwei damit assoziierte, nicht ganz vollständige Mikrotubuli. Zentriolen sind im Rahmen der Mitose verdoppelungsfähig, können dann als neue Zentrosomen zu den beiden Zellpolen wandern und von dort die Mikrotubuli der Mitosespindel aufbauen.

Das Tubulinsystem kann nicht so universell adaptiert und aufgebaut werden wie die Actinsysteme. Es verfügt auch nicht über die reichhaltigen Möglichkeiten der Actine, sich am Plasmalemm zu verankern. Der Funktionsraum der Mikrotubuli ist das Zellinnere, wo sie von besonderer Bedeutung für zwei Kernfunktionen der Zellen sind:

Vesikeltransport zwischen Organellen: Das System der Tubuline ist in der Interphase hauptsächlich für den Transport von Organellen, Vesikeln, etc. innerhalb durch das Zytosol zuständig. Es existieren viele Brückenmoleküle, die die Motorproteine des Tubuline binden und gleichzeitig die zytosolische Seite integraler Membranproteine der betroffenen Vesikel erkennen. Auf diese Weise kann das Tubulinsystem vielfältige Aufgaben beim Vesikeltransport bewältigen. In Nervenzellen ist der sogenannte anterograde und retrograde Transport von Vesikeln entlang der Axone (Verkehr zwischen Synapsen und dem Zelleib) nichts anderes als ein Spezialfall dieser Funktion der Mikrotubuli.

Aufbau der Mitosespindel: Während der Mitose zerfallen die intrazellulären Membransysteme in viele isolierte kleine Vesikelchen; dementsprechend verschwindet auch die Kernmembran und die Chromosomen liegen im Zytosol. Hier übernimmt die Mitosespindel, die ausschließlich aus Mikrotubuli besteht, die Verteilung des Erbmateriale auf die beiden Tochterzellen.

Dyneine und Kinesine sind die Motorproteine der Tubuline: Beide Motorproteine haben die Eigenschaft, an den Mikrotubuli entlang zu wandern. Dabei wird ATP verbraucht. Dyneine wandern

¹Der γ -Tubulinringkomplex, abgekürzt γ -TuRC

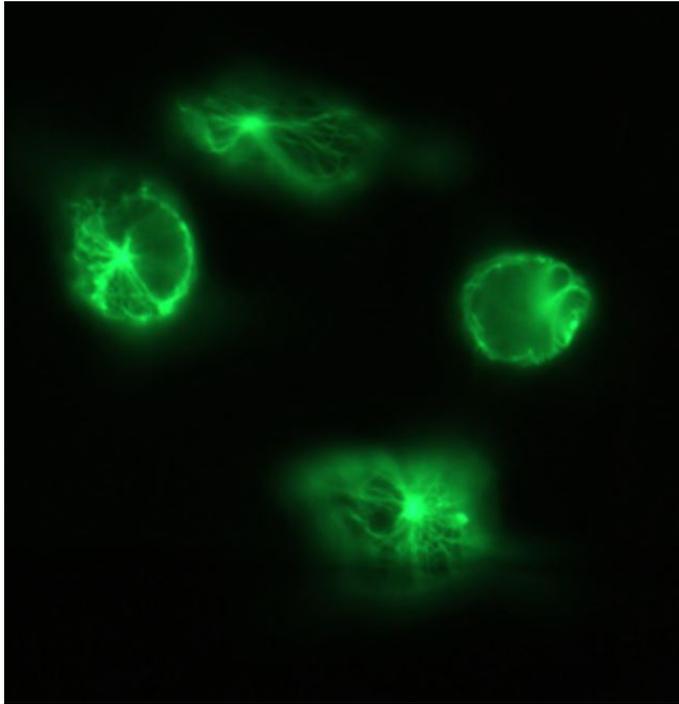


Abbildung 9.1: Kurspräparat: Die Abbildung zeigt den immunhistochemischen Nachweis (Fluoreszenzmikroskopie) von Tubulinen in menschlichen HL-60 Zellen in Kultur. HL-60 Zellen sind mit kernhaltigen Blutzellen verwandt. In den Zellen sind die grünen Mikrotubuli zu erkennen; auch das Zentrosom als Ursprungspunkt der Mikrotubuli ist zu erkennen.

zum (-)Ende, die Kinesine zum (+)-Ende der Mikrotubuli. Verschiedenste Vesikel und Organellen können über adaptierende Brückenmoleküle an diese Schleppevorrichtung angekoppelt werden. Wie bedeutsam die Option des gegenläufigen Transports für die Zellfunktion ist, wurde oben im Kapitel über die intrazellulären Membransysteme, speziell über den Golgi-Apparat, ausgeführt.

Histologische Strukturen, die mit Tubulin assoziiert sind: Die in der Histologie der Epithelien bedeutsamste Mikrotubuli-assoziierte Struktur an der Oberfläche von Epithelzellen ist die Kinozilie. Kinozilien sind Oberflächendifferenzierungen von Zellen, die primär nicht der Vergrößerung der resorbierenden Oberfläche, sondern der Bewegung von Material entlang der Oberfläche von Epithelzellen dienen. Jede Kinozilie hat an ihrer oberflächennahen Ursprungsstelle in der Zelle ein sogenanntes Kinetosom, das wie ein Zentrosom gebaut ist (9x3-Struktur). Von dort nehmen die coaxial verlaufenden Mikrotubuli ihren Ursprung (in einer strengen Anordnung aus 9 Mikrotubulus-Dubletten (9x2) außen und zwei zentralen Mikrotubuli, die sich mittig innerhalb der 9x2 Struktur befinden (9x2+2)). Mit dem kontraktilen Apparat dieser Anordnung (Dyneine) können Verbiegungen der Kinozilie erreicht werden, die sich aus einem sogenannten Förderschlag und einer langsamen Rückholbewegung zusammensetzen.

- Tubuline kommen in allen menschlichen Zellen vor
- Tubuline lagern sich zu linearen, unverzweigten, hochmolekularen Aggregaten von ca. 25nm Durchmesser - den Mikrotubuli - zusammen
- Die Bildung der Mikrotubuli wird vom MTOC aus kontrolliert. Dieses befindet sich am minus-Ende des Mikrotubulus
- In den meisten Zellen sind Zentrosomen das MTOC
- Die Motorproteine der Mikrotubuli sind Dyneine und Kinesine, die sich gegenläufig am Mikrotubulus bewegen
- Der Mikrotubulusapparat wird für gerichteten Organellentransport, im Rahmen der Mitose und für den Aufbau von Zilien und Flagellen eingesetzt

9.3. Intermediärfilamente

Die Intermediärfilamente sind die größte und von der Mitgliederzahl umfangreichste Gruppe der Zytoskelett-Moleküle. Vereinfachend ist eigentlich nur, dass keine Motorproteine bekannt sind und die Eigenschaft der Kontraktilität entfällt. Auch die Intermediärfilamente entstehen aus monomeren Unter-einheiten, die sich in einer komplexen Geometrie zu den Filamenten zusammenlagern. Sie können nicht so rasch auf- und abgebaut werden wie die Actine und die Tubuline und sind in differenzierten Zellen jeweils in typischer Zusammensetzung vorhanden. Es gibt ca. 40 beschriebene Filamenttypen, die man in sechs größeren Familien ordnen kann. Die Zytokeratine sind die mitgliederstärkste dieser Familien (mit allein bei den Zytokeratinen mehr als 20 Mitgliedern). Intermediärfilamente sind primär zugstabil und stellen eine Grundverspannung des Zellinneren zur Verfügung. In die netz- oder gitterartigen Grundstrukturen der Intermediärfilamente werden andere zytosolische Komponenten eingebunden.

Die für die Medizin bedeutendste Eigenheit von Intermediärfilamenten ist, daß sie sehr zellartspezifisch sind (s. ABB. 9.2). So treten z.B. die Desmin-Intermediärfilamente nur in Zellen auf, in denen große Mengen Actin vorkommen; Desmin organisiert die Anordnung der Actin-Filamente in Muskelgeweben. Auch in Nervenzellen, in Gliazellen, in Zellen des Bindegewebes oder Derivaten bestimmter Epithelien treten jeweils typische Muster an Intermediärfilamenten auf. Im Folgenden einige Beispiele für Zuordnungen der Familien der Intermediärfilamente zu bestimmten Zelltypen im menschlichen Organismus:

- *Zytokeratine* → Epithelien
- *Vimentin* → Nicht-epitheliale und nicht-neuronale Zellen, v.a. Bindegewebszellen, Endothel; generell in Zellen mesenchymaler Herkunft.
- *Desmin* → Glatte Muskulatur, quergestreifte Muskulatur
- *Neurofilamente (NF)* → Zentrale und periphere Nervenzellen, incl. Fortsätze
- *Saures Glia-Fibrillenprotein (GFAP)* → Glia, Astrozyten

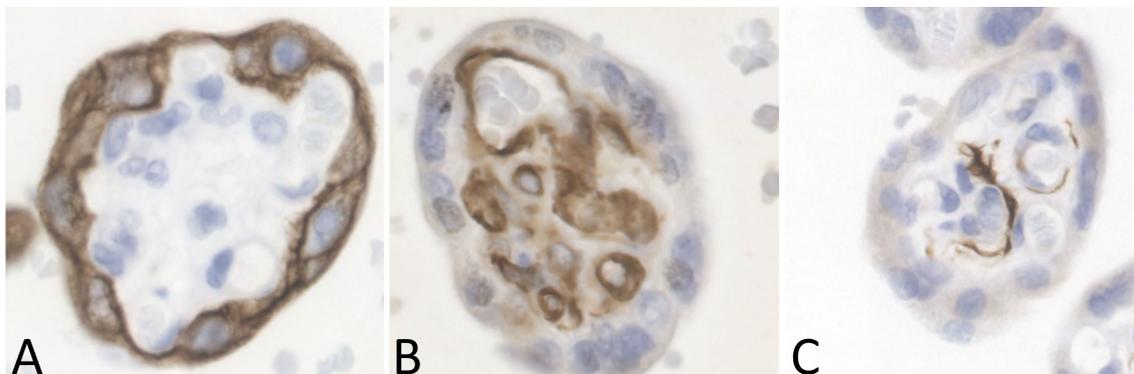


Abbildung 9.2.: Kurspräparate: Die Abbildung zeigt den immunohistochemische Nachweise (Peroxidase mit braunem Reaktionsprodukt) verschiedener Intermediärfilamente in Schnitten menschlicher Plazentazotten. In den Bildern A bis C wurde jeweils eine Zotte nahezu bildfüllend fotografiert. Die Oberfläche der Zotten enthält das plazentare Epithel, im Inneren finden sich Bindegewebsderivate und einige kontraktile Zellen in der Umgebung der Gefäße. Diese Gewebekompartimente weisen jeweils unterschiedliche Intermediärfilamente auf. In Bild A wurde Zytokeratin nachgewiesen, das nur im Epithel vorkommt, aber nicht im Innern der Zotte. In Bild B wurde Vimentin nachgewiesen, das nicht im Epithel, dafür aber in nahezu allen Zellen im Inneren der Zotte vorkommt. In Bild C wurde Desmin nachgewiesen, das nur in solchen Zellen vorkommt, die auf Kontraktion spezialisiert sind. Davon gibt es hier nur wenige, die direkt um die Blutgefäße in der Zotte herum vorkommen. Die Abbildung zeigt, dass der Nachweis von Intermediärfilamenten Zellen verschiedener Herkunft und Funktion einfach aufgrund eines bekannten Musters an Intermediärfilamenten gut unterscheiden kann. Diese Unterscheidungsfähigkeit geht weit über die bloße Unterscheidung mittels histologischer Färbung hinaus.

Diese - für jede Zellart recht spezifische Zusammenstellung von Intermediärfilamenten - bleibt oft auch bei pathologischen Veränderungen der Differenzierung (besonders wichtig: bei Karzinomen) noch lange konstant. Viele andere Erkennungszeichen der Herkunft von Zellen gehen bei malignen Zellen aber rasch verloren. Kliniker und Pathologen stehen immer wieder vor dem Problem, dass

eine Malignomdiagnose des Pathologen zunächst nur auf einer symptomatisch gewordenen und entnommenen Metastase beruht. Bei der Suche nach dem Ursprung des Malignoms - dem Primärtumor - kann der immunhistochemische Nachweis von Intermediärfilamenten diagnostisch wegweisend sein.

- Intermediärfilamente kommen zellartspezifisch vor.
- Es gibt rund 40 beschriebene Filamenttypen, die in sechs Familien geordnet werden.
- Sie sind zugfest, aber nicht kontraktile. Motorproteine sind nicht bekannt.
- Intermediärfilamente interagieren z.B. mit interzellulären Kontakten und werden für die Stabilisierung von Zellform und Zellgestalt verantwortlich gemacht.
- In der Pathohistologie macht man sich vor allem ihr zellartspezifisches Vorkommen zunutze, um z.B. Tumoren unbekannter Herkunft einzuordnen.

Weiterlesen, Schmökern, Keine Pflicht. . .

- Helfand, Brian T., L. Chang und R D. Goldman (2008/2003). "The dynamic and motile properties of intermediate filaments." In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, S. 445–467.
- Kerssemakers, J W J. u. a. (2006). "Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution." In: *Nature* 442.7103, S. 709–712.
- Luby-Phelps, K. (1999). "Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area". In: *International review of cytology* 192, S. 189–221.
- Pollard, T D. und G G Borisy (2003). "Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments". In: *Cell* 112.4, S. 453–465.
- Wiese, C. und Y. Zheng (2006). "Microtubule nucleation: γ -tubulin and beyond". In: *Journal of cell science* 119.20, S. 4143–4153.
- Wittmann, T., A. Hyman und A. Desai (2001). "The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors". In: *Nature cell biology* 3.1, E28–E34.
- Zigmond, S H (2004). "Formin-induced nucleation of actin filaments". In: *Current opinion in cell biology* 16.1, S. 99–105.

10. Topologische “Eremiten”: Mitochondrien und Peroxisomen

10.1. Mitochondrien und Peroxisomen haben Gemeinsamkeiten

Mitochondrien und Peroxisomen sind topologische „Eremiten“ Beide Organellen sind nicht Bestandteil der Vesikeltransportprozesse, die kontinuierlich über ER und Golgi zum und vom Plasmalemm laufen. Sie liegen neben diesen Transportwegen. Das bedeutet auch, dass sowohl Peroxisomen als auch Mitochondrien aus dem Zytosol nur über jeweils spezifische - und von allen anderen vesikulären Strukturen im Zellinneren verschiedene - Transportwege erreicht werden können. Diese Transportmechanismen sind in der Regel komplex und Thema der Biochemie. Vesikuläre Fusionen spielen keine Rolle.

Transport in Mitochondrien Die Mitochondrien können nur einen kleinen Teil der von ihnen benötigten Proteine selbst aus dem mitochondrialen Genom transkribieren und translatieren. Der größte Teil der mitochondrialen Funktionsproteine wird im Zytosol hergestellt und muss in die Mitochondrien transferiert werden. Aufgrund ihrer Entstehungsgeschichte haben die Mitochondrien eine Doppelmembran (Erklärung: sog. Endosymbiontenhypothese), über die hinweg kooperierende Translokatoren den Transport ermöglichen. Diese werden als TIM und TOM¹ bezeichnet. Details zu diesen Vorgängen werden in der Biochemie besprochen.

Transport in Peroxisomen Die Signalsequenz für die Translokation von Proteinen aus dem Zytosol in die Peroxisomen ist die relativ kurze Aminosäuresequenz **Ser-Lys-Leu**. Der Protein- und Lipidimport aus dem Zytosol ist für die normale Funktion der Peroxisomen essentiell, Defekte führen zu schweren Erkrankungen². Mehr als 25 sogenannte Peroxine, die sich an diesen Transportvorgängen beteiligen, sind bekannt. Allerdings sind viele Details beim Proteinimport in die Peroxisomen noch immer Gegenstand der Forschung. Details zu diesen Vorgängen werden in der Biochemie besprochen.

Sowohl Peroxisomen als auch Mitochondrien haben einen Bezug zum Sauerstoff Sauerstoff ist in menschlichen Zellen - und eukaryotischen Zellen im Allgemeinen - ein wichtiges Substrat der Energiegewinnung. Die Verwertung von Sauerstoff im Rahmen der Atmungskette ist an die Mitochondrien gebunden, die diese Fähigkeit haben. Die Gegenwart von Sauerstoff und seine Verarbeitung bedingen auch Risiken für Zellen. Sauerstoff ist nicht nur nützlich, sondern auch toxisch, weil er potenziell als hoch-reaktionsfähiges Radikal vorliegen kann und dann diffusen Schaden durch Reaktionen mit zellulären Molekülen anrichten kann. Dieses Phänomen wird auch gerne als „oxidativer Stress“ bezeichnet. Reaktive Sauerstoffspezies können gezielt verarbeitet und kontrolliert in oxidative Prozesse eingeschleust werden. Diese Art der Elimination von Sauerstoff kann gleichzeitig benutzt werden, um potentiell ebenfalls schädliche organische Moleküle zu metabolisieren. Diese Art von kombinierter „Entgiftung“ ist eine wichtige Aufgabe der Peroxisomen.

Mitochondrien und Peroxisomen sind die Orte der β -Oxidation von Fettsäuren Die Verwertung von Fettsäuren findet über die sogenannten β -Oxidation von Fettsäuren statt. Diese kann nur in

¹TIM: Translocator Internal Membrane; TOM: Translocator Outer Membrane

²Zum Beispiel: Beim Zellweger-Syndrom ist Pex2 defekt. Dieses peroxisomale Membranprotein ist am Import von Proteinen aus dem Zytosol beteiligt. Die Betroffenen haben schwersten Gehirn- Leber- und Nierenstörungen; sie sterben meist kurz nach der Geburt

Mitochondrien und Peroxisomen erfolgen. Die beiden Organellen kooperieren bei diesem Prozess: Die Peroxisomen können ungeradzahlige (hier möglich: α -Oxidation) und/oder sehr langkettige (z.B. 22 C-Atome) Fettsäuren verarbeiten und geben dann die auf das ideale mitochondriale Maß verkürzten Fettsäuren zur weiteren β -Oxidation an die Mitochondrien ab. Details zur β -Oxidation sind Gegenstand der Biochemie.

10.2. Spezifika der Mitochondrien

Die Mitochondrien (Bauschema s. ABB. 10.1) haben eine - von der Zelle getrennte - DNA und können selbst transkribieren und translatieren. Allerdings ist diese Fähigkeit nur noch residual und nur wenige der von Mitochondrien benötigten Proteine werden noch von ihnen selbst hergestellt. Die im Inneren der Mitochondrien liegenden Ribosomen weisen einen anderen Bau auf als die zytosolischen Ribosomen der eukaryotischen Zellen. Das hat zur sogenannten „Endosymbiontenhypothese“ geführt, mit der man die Herkunft dieses Organells mit seiner vielfältigen Sonderstellung erklärt. Danach wurden archaische Prokaryoten von eukaryotischen Zellen - diese haben ohne Mitochondrien keine Möglichkeit der effizienten Sauerstoffverwertung - als Symbionten in das Zytoplasma integriert („Endosymbiont“). Neben der Gegenwart des mitochondrialen Genoms erklärt das auch die mitochondriale Doppelmembran: Die äußere Membran des Mitochondriums wäre danach ursprünglich eine zelluläre Biomembran - ein Vesikel - gewesen. Die innere Membran des Mitochondriums entspräche der Plasmamembran des integrierten Prokaryoten. Der von der inneren mitochondrialen Membran umschlossene Raum, der sogenannte Matrixraum des Mitochondriums, entspräche dann dem ursprünglichen Zytoplasma des Prokaryoten. Die Endosymbiontenhypothese passt auch zu einer weiteren Eigenschaft der Mitochondrien: Sie können sich durch Sprossung und Teilung innerhalb von Zellen vermehren. Ihre äußere Gestalt kann sich in lebenden Zellen kontinuierlich und rasch ändern.

Sowohl die äußere als auch die innere Membran der Mitochondrien wie auch der Matrixraum weisen Besonderheiten auf:

äußere Mitochondrienmembran: Die äußere Mitochondrienmembran ist zwar von ihrer Herkunft gemäß Endosymbiontenhypothese eine vesikuläre Membran, aber sie nimmt an den vesikulären Materialtransferprozessen nicht mehr teil. Trotzdem ist inzwischen bekannt, dass es zwischen Membranen des ER und der äußeren Mitochondrienmembran räumlich enge Beziehungen gibt, möglicherweise mediiert durch interagierende Membranproteine der beiden Membranen. Diese Mitochondrium-assoziierten Membranen (MAM) sind Gegenstand aktiver Forschung und spielen möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Calcium- Homöostase im Mitochondrium und bei der Phospholipid-Erneuerung.

innere Mitochondrienmembran: Die innere Mitochondrienmembran enthält die ATP-Synthasen der Atmungskette und ist damit die wesentliche funktionale Membran des Mitochondriums. Die Fläche dieser Membran wird in den meisten Zellen des menschlichen Körpers durch faltenförmige Oberflächenvergrößerungen (Cristae in den Mitochondrien vom Crista-Typ) erhöht (s. ABB. 10.2). Nur in den Steroidhormon-produzierenden Zellen (z.B. Nebennieren, Hoden, Ovar) haben die Mitochondrien röhrenförmige (tubuläre) Oberflächenvergrößerungen (Tubuli in Mitochondrien vom Tubulus-Typ).

Matrixraum: Im Matrixraum befindet sich die ringförmige DNA der Mitochondrien, die hier auch repliziert und transkribiert werden kann. Für die Translation der wenigen im Mitochondrium

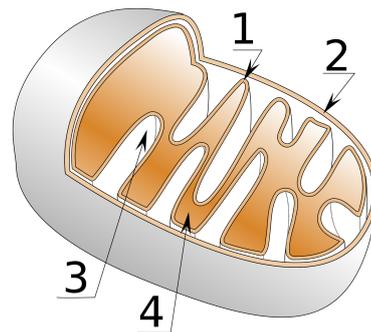


Abbildung 10.1.: Schematische Darstellung der Grundgliederung eines Mitochondriums vom Crista-Typ. (1): Innere Mitochondrienmembran, (2): äußere Mitochondrienmembran, (3): Crista, (4): Matrixraum, mitochondrialer Innenraum. Bild aus Wikimedia Commons

produzierten Proteine werden die hier liegenden Ribosomen prokaryotischen Bautyps eingesetzt. Im Matrixraum liegen auch die elektronenmikroskopisch sichtbaren sogenannten Matrixgranula.

Neben den essentiellen Rollen bei der Verwertung von Sauerstoff und Fettsäuren übernehmen die Mitochondrien auch regulatorische Aufgaben. Von großer Bedeutung sind die Mitochondrien zum Beispiel bei der Regulation des physiologischen Zelltodes, der sogenannten Apoptose.

10.3. Spezifika der Peroxisomen

Für die Peroxisomen gibt es keine Endosymbiontenhypothese. Sie entstehen ganz ursprünglich aus den intrazellulären Membransystemen, haben aber keine Rezeptoren und Signalmoleküle, die die Teilnahme am Vesikeltransfer erlauben. Genau wie normale Vesikel haben sie nur eine begrenzte Membran und meist einen elektronenmikroskopisch gleichmäßig fein granulierten Inhalt. Ähnlich wie bei Mitochondrien können sich Peroxisomen bei funktioneller Beanspruchung durch einfache Knospung vermehren. Allerdings muss das Material, das dafür vorher in den Peroxisomen angesammelt werden muss, im Zytosol hergestellt und in die Peroxisomen transferiert werden. Auf diesem Weg kontrollieren also die Zellen letztlich die Anzahl der Peroxisomen.

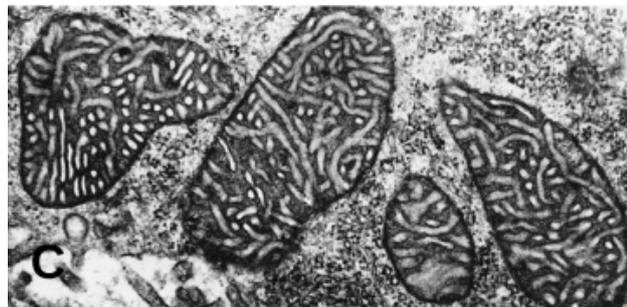
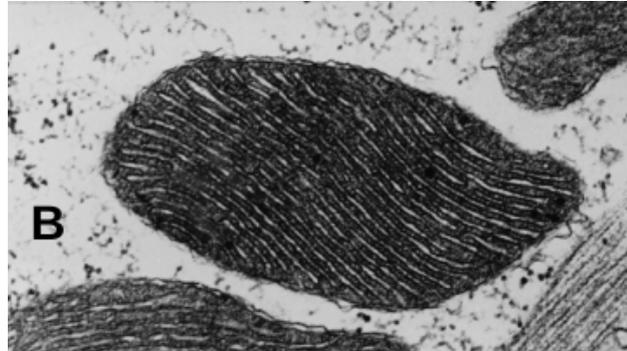


Abbildung 10.2.: Kurspräparat: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien des Crista-Typs (B) und des Tubulus-Typs (C)

Weiterlesen, Schmökern, Keine Pflicht...

- Mokranjac, D. und W. Neupert (2005). "Protein import into mitochondria." In: *Biochem Soc Trans* 33.Pt 5, S. 1019–1023.
- van der Zand, A. u. a. (2006). "The return of the peroxisome." In: *J Cell Sci* 119.Pt 6, S. 989–994.

11. Integration zu: Mitose und Zellzyklus

11.1. Die Mitose

Zellen können sich vermehren und dabei teilen. Der Vorgang der Zellteilung selbst wird als Mitose bezeichnet und ist morphologisch so auffällig, dass er schon sehr gut im Rahmen der färberischen Lichtmikroskopie gesehen und beobachtet werden kann. Die Mitose selbst wird auch im Kurs zunächst in Kurspräparaten studiert. Darum wird sie auch hier im Skript zunächst vorgezogen, obwohl sie natürlich nur ein kleiner Abschnitt des Zellzyklus ist. Sie kann in verschiedene Abschnitte mit morphologisch je spezifischen Erkennungszeichen unterteilt werden:



Abbildung 11.1.: Kurspräparat: In dem Präparat von der Zwiebelwurzel (gefärbt mit Eisenhämatoxylin, daher schwarzes Chromatin) sind typische Stadien der Mitose hervorgehoben. 1: typische Interphasekerne, mit dicker Umrandung hervorgehoben, 2-7: verschiedene Mitosestadien, mit Punktierung und Numerierung hervorgehoben. 2: ein Kern in der Prophase, 3-4: Zellkerne in der Prometaphase (3) bzw. Metaphase (4) mit den Chromosomen als Metaphasenplatte mittig angeordnet, 5-6: frühe (5) bzw. späte (6) Anaphase, 7: Telophase mit beginnender Rekonstituierung des Zellkernes.

- Trennung des zuvor bereits verdoppelten genetischen Materials auf 2 Tochterkerne (**Karyokinese**)
 - Prophase
 - Prometaphase

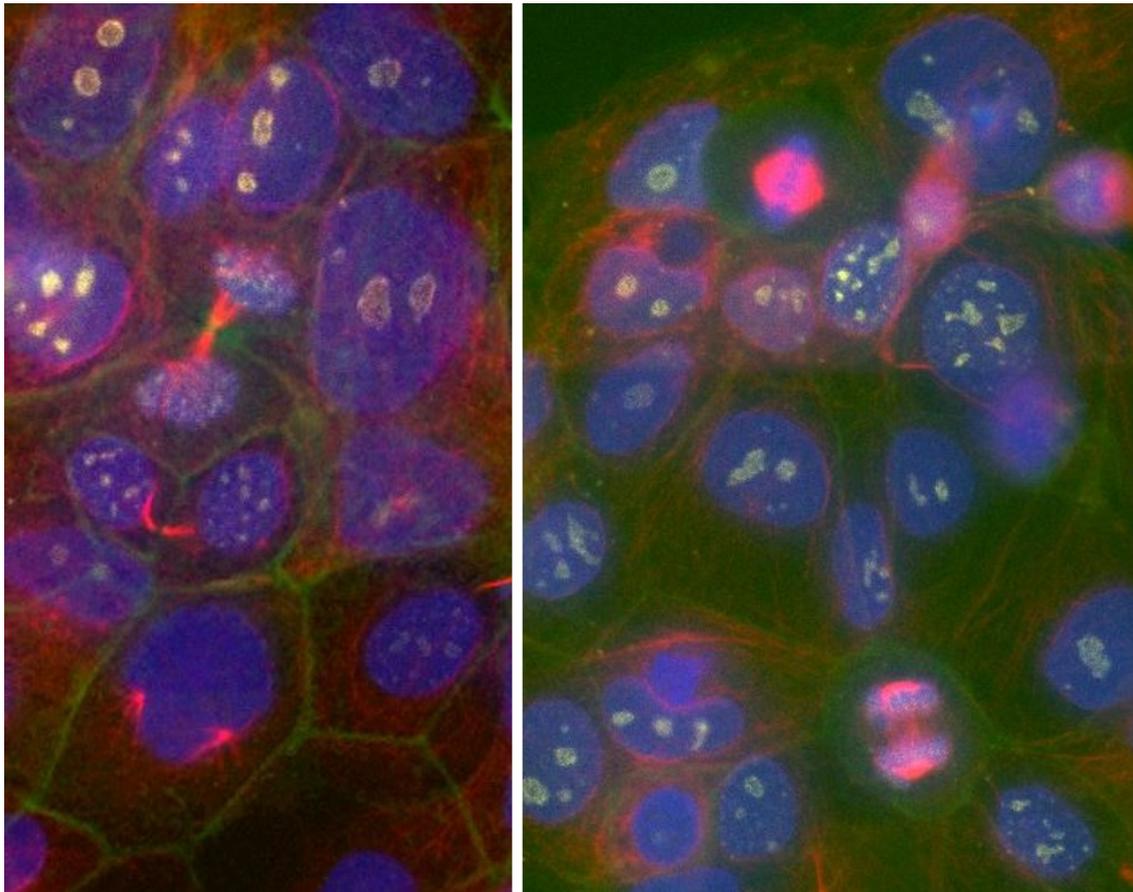


Abbildung 11.2.: Ausschnitte aus Kurspräparat: 4-Kanal Fluoreszenzpräparat, konfokal von einer Monolayer-Kultur der Chorionkarzinom-Zelllinie Jeg3. Rot: Tubuline (Antikörper-Nachweis), Grün: Actine (Phalloidin-Nachweis), Gelb: Proliferationsmarker ki67 (Antikörper-Nachweis), Blau: Färbung der DNA mit DAPI. Aufgabe: Suchen Sie die Mitosestadien und beobachten Sie das Zytoskelett während der Mitose.

- Metaphase
- Anaphase
- Telophase
- Teilung des Zytoplasmas, wobei die beiden Kerne und die in intrazellulären Membransystem auf die 2 Tochterzellen verteilt werden (**Zytokinese**)

Weil Chromatin sich i.d.R. sehr gut färben lässt und während der Phasen der Karyokinese deutliche Veränderungen in der Verteilung und Struktur des Chromatins auftreten, nehmen die morphologischen Merkmale der einzelnen Phasen in der Regel Bezug auf die Stadien der Karyokinese.

Die Zytokinese ist histologisch nicht so gut sichtbar, was sie aber biologisch nicht unwichtiger macht. Es soll hier noch einmal hervorgehoben werden, dass die Karyokinese wesentlich durch den Tubulinapparat vorangetrieben wird, während die Zytokinese von Actinen abhängt. Daher treffen Störungen dieser beiden kontraktile Systeme je unterschiedliche Abschnitte der Mitose.

Die einzelnen Phasen der Karyokinese können gut morphologisch unterschieden werden (s. auch ABB. 11.1, 11.2):

- **Prophase**
 - Die in der S-Phase des Zellzyklus (s.u.) verdoppelten Chromosomen (2 Chromatiden) kondensieren zu fädigen Strukturen im Zellkern
 - Die Kerngestalt ist noch erkennbar; die Kernhülle ist intakt

- Die Mitosespindel bildet sich im Zytoplasma zwischen den beiden Zentrosomen (Zentriolenpaar), können aber die noch im Kern liegenden Chromatiden nicht erreichen.
- **Prometaphase**
 - Die Kernhülle und mit ihr die intrazellulären Membransysteme zerfallen in viele Vesikel
 - Die Mikrotubuli der Mitosespindel setzen an den Chromosomen (am Kinetochor) an
 - Die Chromosomen beginnen sich zu bewegen und suchen ihren Platz
- **Metaphase**
 - Die Chromosomen sind in der Äquatorialebene angeordnet (in der Mitte zwischen den Spindelpolen)
 - Damit ist die Metaphasenplatte sichtbar geworden
 - Kinetochor-Mikrotubuli setzen jeweils an dem Chromatid an, das dem Pol zugewandt ist
- **Anaphase**
 - Die Chromatiden eines Chromosoms werden voneinander getrennt, wobei
 - jedes Chromatid (Tochterchromosom) langsam zu dem jeweiligen Pol gezogen wird
 - Kinetochor-Mikrotubuli verkürzen sich, die Pole wandern auseinander
- **Telophase**
 - Die Tochterchromosomen sind an den Spindelpolen angekommen
 - Dekondensation der Chromosomen
 - Neubildung der Kernhülle
 - Ende der Kernteilung
 - Teilung des Zytoplasmas beginnt mit Kontraktion des kontraktiven Schnürrings

Mitosefiguren sind auffällig, vor allem die Metaphasenplatten stellen eine deutlich sichtbare und gut - z. B. mit Hämytoxylin - färbbare Struktur dar. Mitosen können daher auch in Schnitten von Paraffinpräparaten noch gut beurteilt werden und wurden viele Jahrzehnte als einzige Möglichkeit genutzt, um das Vermehrungs- (= Proliferations-) Verhalten bestimmter Zellen und Gewebe zu beurteilen. Bis heute ist die Auszählung von Mitosen in Schnitten (Wie viel Prozent der Zellen sind in Mitose? - sogenannter **Mitoseindex** -) ein einfaches aber ziemlich unelegantes¹ und vergleichsweise unsensitives Mittel der Proliferationsanalytik. Beispiele für Metaphasenfiguren (sog. Mitosefiguren) in menschlichem Dünndarmepithel finden sie in ABB. 11.3.

Die Beurteilung der Proliferation in Geweben des Menschen ist aber eine häufige medizinische Fragestellung. Nahezu in allen Tumoren (benigne, maligne, durch Infektionen (Viren) verursacht, etc.) kommt es zu Störungen der Kontrolle des Organismus über die Proliferation. Neben der reinen Massenzunahme durch vermehrte Zellzahl² ist der Kontrollverlust über die Zellteilung das wesentlich bedrohlichere Phänomen bei vielen Erkrankungen; bei bösartigen Tumoren gehört der Verlust der Proliferationskontrolle zu den Kernkomponenten der Erkrankung. Viele Arzneimittel zur Behandlung maligner Tumoren haben die erhöhte Proliferation in malignen Tumorzellen als Angriffspunkt. Das Thema der Proliferation ist also wichtig.

Darum ist in das Verständnis der Regulation der Proliferation in Zellen und Geweben viel Arbeit investiert worden, auch um neue Therapiemöglichkeiten für maligne Tumoren identifizieren zu können. Die Bestimmung des Mitoseindex ist tatsächlich nur eine Notfall-Lösung und wird heute von der histologischen Proliferations- und Zellzyklus-Analytik übernommen. Die Mitose ist nämlich nur ein kurzer Ausschnitt aus dem Gesamtgeschehen der Proliferation, das man auch als zyklisch betrachten kann, weil Tochterzellen erneut in die Mitose eintreten können.

¹Auszählen macht Arbeit; Mediziner sparen Arbeit, wo sie können. . . ©, übt man schon im Studium

²sogenannte Hypertrophie: eher ein funktionelles Problem denn ein zellbiologischer Kontrollverlust

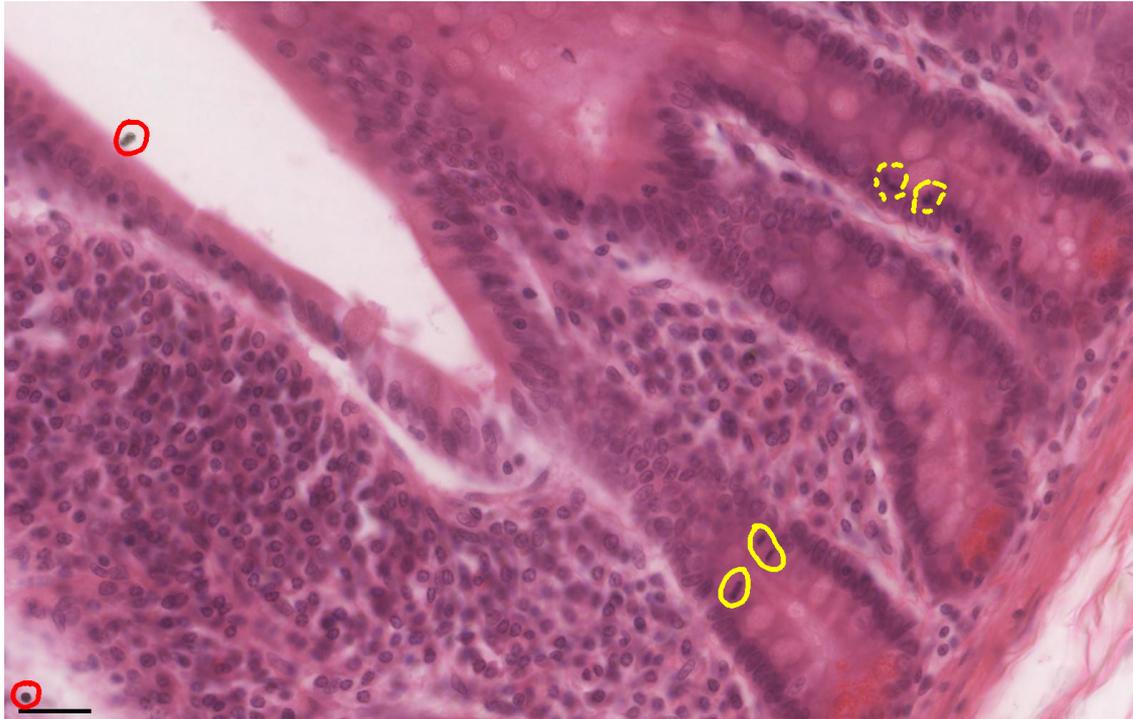


Abbildung 11.3.: Kurspräparat: Eine HE-Färbung vom menschlichen Dünndarm. In den Epithelien des Dünndarmes können Sie mit gelb hervorgehobene Metaphasenplatten (Mitosefiguren) erkennen. Es sind nicht alle Mitosefiguren markiert, die sichtbar sind (selber suchen, wie im Kurs...). Die roten Kreise markieren Staubpartikel oder andere Artefakte.

11.2. Der Zellzyklus

11.2.1. Die Mitose ist nur eine kurze Phase des ganzen Zellzyklus

Die eben vorgestellte, der Morphologie einfach zugängliche Mitose ist nur ein kurzer Abschnitt des zyklisch sich wiederholenden Vermehrungsgeschehens, des sogenannten Zellzyklus. Die meisten anderen Abschnitte des Zellzyklus dauern wesentlich länger als die Mitose selbst: Die nicht-mitotischen Phasen des Zellzyklus sind vor- oder nachbereitend für die eigentliche Zellteilung.

Vor der Zellteilung muss nicht nur das genetische Material kopiert und bereitgestellt werden. Es müssen auch Zellorganellen und Membransysteme zumindest in einem Ausmaß vermehrt werden, daß die Tochterzellen eine entwicklungsfähige Mitgift erhalten. Um also eine Mitose durchführen zu können, muss eine Zelle einen langen und komplexen Anlauf unternehmen. Unmittelbar nach einer Mitose folgt in der Regel eine Phase, in der die neu gebildeten Tochterzellen sich zunächst organisieren und in die Umgebung des Gewebes einordnen. Erst wenn das erfolgreich abgeschlossen ist, kann die Zelle erneut in die Vorbereitung einer neuen Mitose eintreten und DNA und Organellen vermehren. Treten Zellen immer wieder in neue Mitosen ein, so redet man davon, daß sie „im Zellzyklus“ sind.

Der Zellzyklus wird in die folgenden Phasen (s. ABB. 11.4) unterschieden:

M: Die M-Phase ist nichts anderes als die eigentliche **Mitose**.

G1: Als G1 Phase wird die unmittelbar auf die Mitose folgende Phase bezeichnet. Die Abkürzung G steht für **Gap**, weil in einer solchen Phase von aussen keine wirklich auf den Zellzyklus bezogene Aktivität der Zelle beobachtbar ist.

S: Der Buchstabe S steht hier für **Synthese**; mit diesem Kürzel wird diejenige Phase bezeichnet, in der sich die DNA exakt verdoppelt und auch die restlichen Zellbestandteile in Vorbereitung der Mitose vermehrt werden.

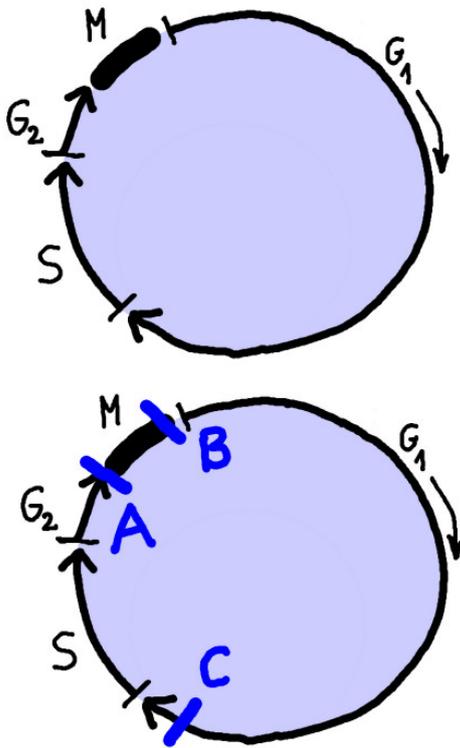


Abbildung 11.4: Das Schema illustriert im oberen Teil die zyklische Abfolge der Phasen des Zellzyklus. Im unteren Abschnitt sind die drei wichtigsten Kontrollpunkte für den Weitergang des Zellzyklus markiert. A: An dieser Stelle ist der Übergang von G₂ in M. Hier wird überprüft, ob die DNA wirklich repliziert wurde und ob die (z.B. nutritive Umgebung) günstig ist. B: In der späten Metaphase wird überprüft, ob wirklich alle Chromosomen mit der Spindel verbunden sind. Erst dann kann die Anaphase beginnen. C: Vor Beginn der S-Phase, am Ende von G₁ wird die Entscheidung für den grundsätzlich Eintritt in eine neue Runde des Zellzyklus getroffen.

G₂: Auf die S-Phase folgt die Mitose nicht unmittelbar, sondern eine Zeit der scheinbaren Inaktivität, eine neue G-Phase, die als G₂ Phase bezeichnet wird. In dieser Zeit fällt die Entscheidung, endgültig in die Mitose einzutreten.

In Zellen die im Zellzyklus sind, folgen diese Phasen für die Ursprungs- und die Tochterzellen theoretisch in vielen Zyklen aufeinander.

Kontrollpunkte im Zellzyklus überprüfen die Voraussetzungen für die folgende(n) Phase(n):

Die Zelle passiert während des Ablaufes des Zellzyklus „checkpoints“. Der Eintritt in den Zellzyklus und wichtige Abschnitte seiner verschiedenen Phasen werden durch solche Kontrollpunkte überwacht. Meist wird an solchen Kontrollpunkten sichergestellt, dass die Voraussetzungen für die Passage der folgenden Schritte vorliegen. Erst dann werden diese auch ausgelöst. Die drei wichtigsten Kontrollpunkte sind in ABB 11.4 dargestellt.

- **G₂/M:** Hier wird am Übergang in die eigentliche Mitose sichergestellt, dass die Synthese von DNA und Organellen abgeschlossen ist.
- **Mitose, Übergang von Meta- zu Anaphase:** Hier wird sichergestellt, dass alle Chromosomen mit der Spindel verbunden wurden.
- **G₁/S:** Vor dem Eintritt in die S-phase wird hier die Entscheidung über eine neue Runde getroffen.

11.2.2. Proliferation und Terminale Differenzierung sind getrennt

Im menschlichen Organismus sind aber keineswegs alle Zellen im Zellzyklus. Viele Zellen sind aus dem Zellzyklus ausgeschieden und haben sich stattdessen morphologisch und funktionell differenziert, d.h. sie haben gewebetypisches Aussehen und Funktion übernommen (s. ABB. 11.5). Solche Zellen treten - als Regel - nicht mehr in den Zellzyklus ein und werden auch als „No-Growth-Fraction (NGF)“ bezeichnet. Oft bleiben sie eine Zeit lang (Wochen, Monate, Jahre, bei Nervenzellen ein Leben lang) noch funktional und gehen dann in den regulierten Zelltod, die Apoptose, über. Aus Sicht der Systematik

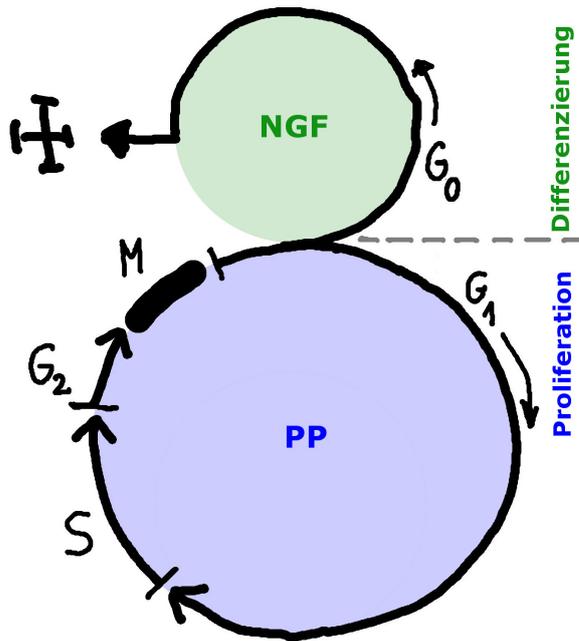


Abbildung 11.5: Das Schema zeigt den Proliferating Pool (PP, blau unterlegt) und die Non-Growth-Fraction (NGF, grün unterlegt) eines Beispielgewebes. Der relative Anteil von PP und NGF am Gesamtpool einer bestimmten Zellpopulation kann je nach Gewebe sehr unterschiedlich sein. Für Nervenzellen beispielsweise gilt, dass der PP gleich null ist. Bei Erythroblasten im Knochenmark ist der PP viel größer als die NGF. Als eine Regel gilt, dass vollständig differenzierte und voll funktionale Zellen in G₀ sind, d.h. Teil der NGF. Zellen in G₀ können nur noch aus dem PP erneuert werden, so es einen solchen für die betreffende Zellpopulation überhaupt noch gibt. Die Entscheidung, ob eine Zelle in G₀ oder wieder in G₁ eintritt, ist also sehr grundsätzlicher Art.

des Zellzyklus werden solche nicht mehr proliferierenden Zellen als Zellen in G₀ bezeichnet. Zellen in G₀ sind per definitionem aus dem Zellzyklus ausgeschieden; sie haben den „Proliferating Pool (PP)“ in Richtung „No-Growth-Fraction (NGF)“ verlassen.

Proliferation und funktionelle Spezialisierung, die man auch als Maturation oder terminale Differenzierung bezeichnen könnte, schließen sich im Körper im Regelfall gegenseitig aus.

- Proliferierende Zellen sind nicht vollständig ausdifferenziert, weil sie noch Ressourcen für die Proliferation bereithalten müssen.
- Ausdifferenzierte, funktionell ausgereifte Zellen können sich in der Regel nicht mehr teilen. Sie haben den Zellzyklus verlassen.

In der Einhaltung dieser Trennung zwischen Differenzierung und Proliferation liegt offenbar eine Sicherheitsregel im Organismus verborgen. Eine der wichtigsten Ausnahmen von dieser gegenseitigen Ausschließung sind nämlich maligne Tumoren, bei denen Differenzierung (zumindestens eine partielle) und Proliferation in derselben Zelle kombiniert vorliegen können.

Viele hochspezialisierte Zellen in unserem Körper (Nervenzellen im Nervensystem, Sertoli-Zellen im Hoden, etc.) sind in G₀ (d.h. nicht mehr teilungsfähig; manchmal auch als postmitotisch bezeichnet). Die G₀ Phase kann lange dauern und ist in den meisten Fällen terminal, d.h. sie geht irgendwann in die Apoptose, den physiologischen Zelltod, über. Nur in solchen Geweben, in denen noch ein Pool proliferierender (oder zumindestens zur Proliferation reaktivierbarer Zellen) vorhanden ist, kann der Verlust von ausdifferenzierten Zellen durch Nachschub von Zellen im Zellzyklus ausgeglichen werden.

Das ist in menschlichen Geweben allerdings sehr unterschiedlich. Es gibt im menschlichen Körper Gewebe (Knochenmark, Blut; Darmepithel) in denen eine konstante und rege proliferierende Population vorhanden ist. Zellen in G₀, die ausscheiden, können dann ersetzt werden. In anderen Geweben (Nervenzellen, Sertoli-Zellen im Hoden) fehlt ein proliferierender Pool, der ausscheidende Zellen ersetzen könnte. Wenn diese Zellen zugrunde gehen, ist auch ihre Funktion unwiderbringlich verloren. Das Verhältnis von proliferierendem Pool (Zellen im Zellzyklus) zur No-Growth-Fraction (Zellen in G₀, terminal differenziert) ist also eine wichtiger Determinante der Zellzusammensetzung in Geweben. Sie bestimmt über die Regenerationsfähigkeit wesentlich mit.

Diese Zusammenhänge spielen nicht nur in der Diagnostik, sondern auch in der therapeutischen Forschung eine Rolle. Wenn nur noch Zellen in G₀, aber kein proliferierender Pool mehr vorhanden ist - wie bei Nervenzellen - limitiert das jede Form von Therapie mittels Zellrestitution aus einem internen

Reservepool. Die Stammzellforschung zielt genau auf dieses Defizit und versucht, therapeutisch nutzbare proliferierende Zellpools zu erzeugen, mit denen dann - nach erneuter Differenzierung - Zellverluste ersetzt werden können.

In den meisten Geweben des menschlichen Körpers kommen allerdings Mischungen proliferierender Zellen oder zur Proliferation noch aktivierbarer Zellen (proliferating pool (**PP**)) mit Zellen in G0 (No-Growth-Fraction, (**NGF**)) vor. Das gilt z.B. für praktische alle Epithelien und die meisten Bindegewebe.

11.2.3. Proliferation kann in der Histologie zellartspezifisch gemessen werden

In vielen Zusammenhängen der Medizin (Embryologie, Wachstumsstörungen, Tumordiagnostik und Tumorprognostik) ist die Frage nach der Proliferationsaktivität einzelner Zellen von Bedeutung. In der Histologie kann die Proliferation morphologisch einzelnen Zelltypen zugeordnet werden, was es erlaubt, eine nach Zelltyp spezifische Proliferationsdynamik in einem aus verschiedenen Zelltypen zusammengesetzten Gewebe bzw. Organ zu betrachten.

Die älteste Methode zur Abschätzung der Proliferation ist das Zählen von Mitosefiguren im Schnitt (s. Abb. 11.3) und die Bestimmung des Mitoseindex (Wie viel Prozent der Zellkerne sind in der Mitose?). Weil dabei nur Mitosen in den Epithelzellen, nicht aber im Bindegewebe gezählt werden können, kann man diese beiden Gewebe und ihre Zellen im Beispiel von Abb 11.3 getrennt (d.h. zellartspezifisch) bestimmen. Das Repertoire der Methoden zur Bestimmung der Proliferation in Zellen hat sich aber - als Resultat u.a. der Forschung am Zellzyklus - wesentlich erweitert. Im Rahmen der Zellzyklusforschung wurden viele Proteine beschrieben, die nur im Zellkern von Zellen exprimiert werden, die im Zellzyklus sind, also zum proliferierenden Pool (PP) gehören. Solche Proteine sind sogenannte „Proliferationsmarker“ und können mit Antikörpern im Schnitt nachgewiesen werden. Im Kurs werden Sie Beispiele des Nachweises der beiden Proliferationsmarker ki67 und PCNA (Kelman 1997; Scholzen und Gerdes 2000; Endl und Gerdes 2000) in rasch proliferierenden Zellpopulationen mikroskopieren, nämlich in der menschlichen Placenta und in Lymphfollikeln der Milz. ABB. 11.6 zeigt die Färbung mit diesen Proliferationsmarkern in Lymphfollikeln der Milz. Sie können unmittelbar erkennen, dass die beiden Marker unterschiedlich große Populationen markieren. Das liegt nicht etwa daran, dass die proliferierenden Pools in beiden Präparaten unterschiedlich wären (ganz im Gegenteil: sie sind identisch), sondern daran, daß die Abdeckung der verschiedenen Phasen des Zellzyklus bei den beiden Proliferationsmarkern sehr unterschiedlich ist. PCNA ist im Zellzyklus wegen seiner langen Halbwertszeit viel länger nachweisbar als ki67 und Mitosen sind nur ein ganz kurzer Ausschnitt des Zellzyklus. Diese Zusammenhänge sind auch graphisch in ABB. 11.7 erläutert.

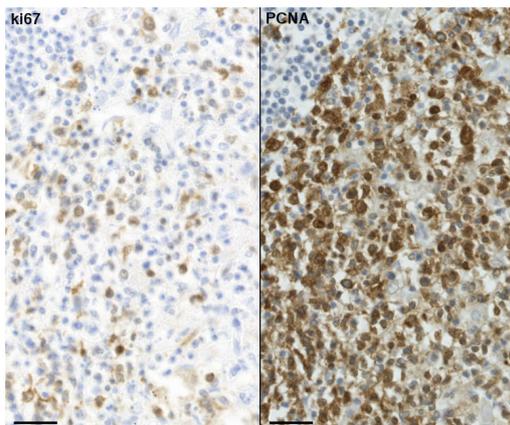


Abbildung 11.6: Kurspräparat: In der Abbildung sehen sie Ausschnitte aus Lymphfollikeln in der menschlichen Milz. Zellen des proliferierenden Pools wurden mit den beiden Proliferationsmarkern ki67 und PCNA (proliferating cell nuclear antigen) detektiert (braunes Reaktionsprodukt des immunohistochemischen Nachweises). Obwohl der nachzuweisende Zellpool sich nicht unterscheiden kann (die Schnitte stammen vom selben Block und auf beiden Schnitten ist derselbe Lymphfollikel abgebildet), sehen sie deutliche Unterschiede. PCNA ist häufiger positiv als der Nachweis von ki67. Würden sie Mitosen zählen, wäre es schwierig, in der Abbildung überhaupt eine verwertbare Anzahl zusammenzubekommen. Das liegt daran, dass die nachzuweisen Proteine unterschiedlich lang während des Zellzyklus exprimiert werden. Für eine praktische Bestimmung eines Indexes wäre hier ki67 zu empfehlen; PCNA erkennt zu viele Zellen für eine praktikable Indexbestimmung, Mitosen sind zu selten. Diese Zusammenhänge sind auch in ABB. 11.7 noch einmal erläutert.

Wie in der Abbildung zu erkennen, wäre eine Indexbestimmung hier praktikabel auf der Basis von ki67. Bei PCNA sind nahezu alle Zellen positiv, während Mitosefiguren zu selten sind. PCNA-basierter Proliferationsindex und Mitoseindex sind also hier sozusagen „out of range“ für eine quantitative Bestimmung.

Für die Prognostik von malignen Tumoren sind solche Bestimmungen von großer Bedeutung. In der Forschung (als Beispiel sei hier die Embryologie mit ihren multipel ineinander verzahnten Proliferationsvorgängen genannt) ist dieses Werkzeug als Basis für das Verständnis der Gewebedynamik unverzichtbar.

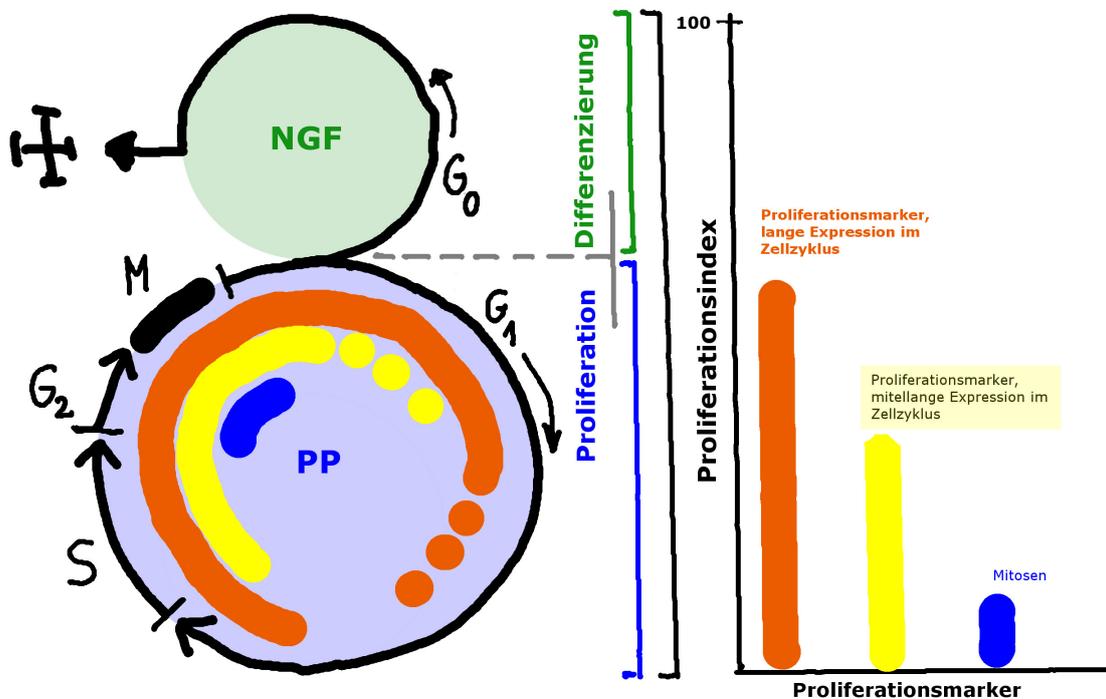


Abbildung 11.7.: Das Schema fasst die wichtigsten Grundlagen der Bestimmung proliferativer Gewebedynamik an histologischen Schnitten zusammen. Ein wichtiger gewebeeitig vorgegebener Parameter ist die Anteil des proliferierenden Pools (PP) relativ zur Non-Growth-Fraction (NGF) an der gesamten Zellpopulation. Dieses Verhältnis ist je nach Gewebe sehr unterschiedlich und muss nicht der in der Abbildung gezeigten Relation entsprechen. Prinzipiell kann zur Quantifizierung z.B. der Prozentsatz der mit einem Marker (Mitose oder jeweiliger Proliferationsmarker) positiven Zellkerne pro Zellart (von 100 Prozent, umschließt PP und NGF) bestimmt werden. Daraus ergibt sich ein für jeden dieser Marker unterschiedlicher Index, der nun von der Expressionsdauer (Mitosendauer bei der Mitose, Expressionsdauer bei einem Marker) relativ zur Gesamtzyklusdauer bestimmt wird.

Weiterlesen, Schmökern, Keine Pflicht...

- Albertson, R., B. Riggs und W. Sullivan (2005). "Membrane traffic: a driving force in cytokinesis". In: *Trends in cell biology* 15.2, S. 92–101.
- Campisi, J. (2005). "Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors". In: *Cell* 120.4, S. 513–522.
- Conlon, I. und M. Raff (1999). "Size control in animal development". In: *Cell* 96.2, S. 235–244.
- Green, D R. (2005). "Apoptotic pathways: ten minutes to dead". In: *Cell* 121.5, S. 671–674.
- Jorgensen, P. und M. Tyers (2004). "How cells coordinate growth and division". In: *Current Biology* 14.23, R1014–R1027.
- Mitchison, T J. und E D. Salmon (2001). "Mitosis: a history of division". In: *Nature cell biology* 3.1, E17–E21.
- Morgan, D O. (2007). *The Cell Cycle: Principles of Control*. London: New Science Press.
- Raff, M. (1998). "Cell suicide for beginners". In: *Nature* 396.6707, S. 119–119.

12. Integration zu: Exozytose und Endozytose

Wie bei der Vorstellung eines hypothetischen Weges vom Pro- zum Eukaryoten schon hervorgehoben, ermöglicht die Ausbildung der intrazellulären Membransysteme der Zelle,

- lösliche Proteine in den Extrazellulärraum abzugeben,
- die Außenseite des Plasmalemmes gezielt mit Proteinen und Kohlehydraten zu versehen, und
- Substanzen aus dem Extrazellulärraum in die intrazellulären Membransysteme zu transportieren.

Mit der Abgabe und der Aufnahme von Material über Vesikel ist stets auch ein Membranfluss verbunden. Die Substanz- und Membranflüsse der vesikulären Transportsysteme sind stets in einem delikaten Gleichgewicht zu halten und müssen bei allen Vorgängen der Exo- und Endozytose fein aufeinander abgestimmt werden.

12.1. Wege aus der Zelle: Exozytose und Modi der Sekretion

Sprachlich bezeichnet *Exozytose* zunächst jede Form des Transfers von Material/Stoffen aus dem Zellinneren nach draußen. Allerdings wird *Exozytose* in vielen Büchern explizit auf den sekretorischen Weg, d.h. auf den Weg über ER, Golgi und die Membransysteme nach draußen bezogen. Der gleiche Vorgang wird in der klassischen histologischen Nomenklatur aber auch als *merokrine Sekretion* bezeichnet. Davon abzugrenzen sind andere Modi der Sekretion, die durch spezielle Eigenheiten der Sekrete erforderlich werden. Beide nutzen den Weg über ER und Golgi nicht als primäre Sekretionsstraße und sind zurückzuführen auf:

- besondere biophysikalische Eigenschaften des Sekretes (Lipide, *apokrine oder holokrine Sekretion*)
- Wasser als Hauptinhaltsstoff der Sekretion (Kammerwasser, Schweiß, *ekkrine Sekretion*)

Bitte beachten Sie, daß die Begriffe ekkrine und merokrine Sekretion leider häufig nicht genau voneinander unterschieden werden. Meist wird vor allem der Begriff ekkrin der apokrinen/holokrinen Sekretion als Gegenpol entgegengestellt. Dann bedeutet ekkrin aber nur: nicht apokrin/holokrin. Im Folgenden werden zunächst die beiden wichtigsten Varianten des sekretorischen Weges über die Membransysteme beschrieben (ABB. 12.1).

12.1.1. Der konstitutive Modus der Sekretion

Die ständige Notwendigkeit, gealtertes Membranmaterial gegen neu synthetisiertes auszutauschen führt zu kontinuierlichen Vesikeltransporten aus dem trans-Golgi Bereich in Richtung Plasmalemm (und vom Plasmalemm in Richtung lysosomales System). Auf diesem Weg werden kontinuierlich auch Vesikelinhalte in den Extrazellulärraum freigesetzt und damit sezerniert. Dieser Weg ist deswegen konstitutiv, weil er bereits zum Selbsterhalt und zur Stabilisierung der Membranen einzelner Zellen funktionieren muss. Es handelt sich also nicht in erster Linie um einen spezifischen Sekretionsvorgang, der schon im Dienst des Gesamtorganismus steht. Diese Form der Sekretion wird aber trotzdem im Organismus instrumentalisiert um kontinuierliche Sekretion von Produkten der Zellen in den Extrazellulärraum zuwege zu bringen. Ein typisches Beispiel für Sekretionsvorgänge auf dem konstitutiven

Weg ist die Produktion von Bindegewebsfasern und anderen extrazellulären Komponenten des Bindegewebes durch die Bindegewebszellen (sog. Fibroblasten). Niemand wird diese Zellen später in der Histologie als typische „sezernierende“ Zellen ansprechen und doch werden die Materialien für Sehnen, Bänder und Faszien unter Inanspruchnahme des konstitutiven Weges von Fibroblasten produziert. Entscheidend ist hier, dass es zum Differenzierungsprogramm von Fibroblasten gehört, solche Matrix zu produzieren. Der konstitutive Weg wird häufig genutzt, wenn Sekretionsvorgänge nicht individuell reguliert werden, sondern quasi eingebettet in Differenzierungsvorgänge als Teilaspekte der Zellreifung in z.B. bestimmten Stadien der Differenzierung vorkommen. Hier bestimmt also letztlich die Anzahl der adäquat differenzierten Zellen über die Menge des kontinuierlich sezernierten Produktes.

Die konstitutive Sekretion wird indirekt über die Anzahl und die Aktivierung/Hemmung der Differenzierung der sezernierenden Zellen gesteuert. Der Sekretionsvorgang selbst wird nicht direkt modifiziert.

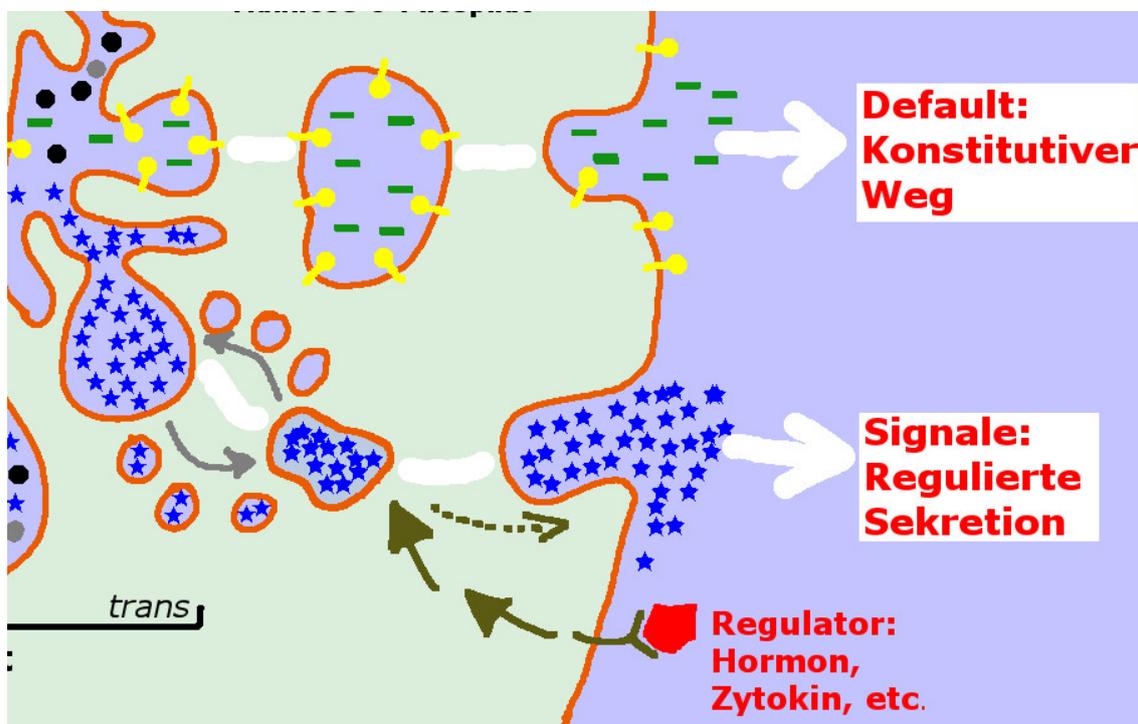


Abbildung 12.1.: Die Abbildung ist ein Teilausschnitt von Abb. 8.8 und zeigt die beiden mit den Membransystemen direkt in Verbindung stehenden Modi der Sekretion in einer schematischen Gegenüberstellung. Der konstitutive Weg ist ein Fluß von Vesikeln und Material, der primär der funktionsgerechten Verteilung von Proteinen und Membranbestandteilen über die Zelle gilt. Er kann aber als Sekretionsweg genutzt werden.

Der regulierte Weg ist in vielerlei Hinsicht optimiert. Er kann Produkte in Sekretvesikeln anreichern und bereithalten. Diese Sekretvesikel werden erst bei Vorliegen physiologischer Stimuli zum Plasmalemm gebracht und die Produkte durch Membranfusion freigesetzt. Der regulierte Weg ist also in höhere funktionelle Regelkreise einbezogen. Die Stations eines Proteins auf dem regulierten sekretorischen Weg sind auch in elektronenmikroskopischen Kurspräparaten abgebildet; hier im Skript in Abb. 8.11.

12.1.2. Regulierte Sekretion

Bei der regulierten Sekretion handelt es sich um einen Sekretionsvorgang, bei dem ein spezifisches Produkt (in der Regel einzelne lösliche Proteine oder eine Mischung löslicher Proteine) in großen Mengen und als Antwort auf einen physiologischen Stimulus freigesetzt werden soll. Die Produkte der intrazellulären Sekretion werden wie üblich über ER und Golgi-Apparat geführt und dann vom trans-Golgi aus nicht direkt zum Plasmalemm, sondern in spezifische Sekretvesikel überführt. Zwischen diesen im

Zytsol in der Nähe des Golgi Apparates liegenden Sekretvesikeln und dem Golgi Apparat findet ein reger Pendelverkehr statt, über den das Produkt in den Sekretvesikeln immer stärker aufkonzentriert wird (ABB. 12.1). Die Sekretvesikel werden durch den Pendelverkehr mit Produkt quasi repetitiv betankt. Sie wandern aber zunächst nicht zur Zellmembran und nehmen am kontinuierlichen Vesikel-Linienverkehr des konstitutiven Weges (vom Golgi zum Plasmalemm) nicht teil. Um die Aufkonzentrierung der Sekrete in den Vesikeln zu erreichen, müssen über die vesikulären Pendelverkehre die nicht zum späteren Sekret gehörenden „Nebentransporte“, die in jedem aus dem Golgi ankommenden Transportvesikel enthalten sind, auch wieder zum Golgi zurücktransportiert werden. Bei der regulierten Sekretion gibt es also im Regelfall Signalmoleküle und Rezeptoren zum spezifischen Transport, ähnlich wie zwischen den verschiedenen Bereichen des Golgi-Apparates. Diese Hintergründe begründen die gesonderte Stellung der regulierten Sekretion aus rein intrazellulärer Sicht heraus eigentlich schon ausreichend. Es kommt aber eine weitere Besonderheit, nämlich die Einbindung in übergeordnete physiologische Regelkreise hinzu.

Zwar tritt regulierte Sekretion nur in bestimmten Zelltypen - d.h. abhängig von der Differenzierung einer Zelle - auf, aber der Sekretionsvorgang selbst wird jetzt von außerhalb der sezernierenden Zelle ausgelöst. In vielen Fällen sind solche regulierenden Faktoren von außerhalb der Zelle Botenstoffe wie Hormone oder Zytokine (ABB. 12.1). Die Mechanismen regulierter Sekretion führen zu einer intrazellulären Bereithaltung von Sekreten, die dann ohne Produktionsvorlauf in wirklich großen Mengen und notfalls aus vielen Zellen gleichzeitig freigesetzt werden können. Die regulierte Sekretion ist also funktionell nicht primär dem Selbsterhalt der sezernierenden Zelle zuzuordnen. Sie ist in übergeordnete Funktionsbeziehungen eingebunden.

Die regulierte Sekretion setzt zwar ein bestimmtes Differenzierungsstadium der sezernierenden Zellen voraus, aber die Sekretion wird hier direkt in physiologischen Regelkreisen (z.B. über Hormone) kontrolliert, nicht indirekt über die Kontrolle der Differenzierung der sezernierenden Zellen.

12.1.3. Spezielle Modi der Sekretion

Das Problem der Sekretion von Lipiden: Apokrine und Holokrine Sekretion Ein besonderes Problem bei der Sekretion tritt auf, wenn große Mengen Lipide sezerniert werden müssen. Bei der Milchsekretion in der Brustdrüse oder auch in den Duftdrüsen der Haut (Duftstoffe sind hydrophob und müssen mit Lipiden gemeinsam abgegeben werden) taucht dieses Problem z.B. auf.

Lipide sind nicht wasserlöslich wie Proteine und können nicht einfach in das vesikuläre Shuttlesystem der Membransysteme eingebunden werden. Sie laufen im Zytsol zu Lipidtropfen zusammen, in deren Randbereich auch monomolekulare Schichten von Phospholipiden vorkommen können. Lipidtropfen sind aber nicht durch die typischen Bilayer der Biomembran vom Zytsol abgegrenzt.

Die Lipidtropfen können nicht in die Membransysteme einbezogen werden. Um diese Tropfen loszuwerden, muss die Zelle einen ganz anderen und recht radikalen Weg beschreiten. Das randständige (i.d.R. sehr actin-haltige) Zytsol mit den Lipidtropfen schnürt sich aktiv von der Zelle ab. Um den Lipidtropfen bildet sich bei der Abschnürung eine Plasmalemmhülle mit etwas Zytsol darunter. Plasmalemm und Zytsol werden also stets zwangsläufig mitsezerniert. Diese Form der Sekretion wird als apokrine Sekretion bezeichnet. Sie ist eine Art „Selbstamputation“ der Zelle, die einen Teil ihrer Hülle und ihres randständigen Zytsols opfern muss, um die hydrophoben Tropfen loszuwerden. Bleibt die Zelle dabei am Leben und kann neues Sekret bilden und abschnüren, redet man von einer apokrinen Sekretion (z.B. Brustdrüse, Duftdrüsen). Stapelt die Zelle so viele Lipidtropfen auf, daß sie am Ende zugrunde geht und mit den Lipiden gemeinsam als Sekret abgegeben wird, redet man von holokriner Sekretion (z.B. Talgdrüsen der Haut).

Das Problem der Sekretion von Wasser: Ekkrine Sekretion muss eine Zelle große Volumeneinheiten Wasser abgeben, entstehen andere Probleme. In den Schweißdrüsen der Haut z.B. muss viel Wasser (Protein ist nicht so entscheidend und niedrig konzentriert) mit etwas Elektrolyten abgegeben

werden. Die Produktion des Sekretes erfolgt über den regulierten Weg, aber nur, sofern es um den (niedrigen) Proteingehalt im Schweiß geht. Wasser und Elektrolyte sind Hauptkomponenten des Schweißes und werden über Membran-assoziierte Prozesse aus dem Extrazellulärraum in den Drüsenraum transferiert. Diese Form der Sekretion folgt in ihrem Grundmuster ebenfalls nicht dem Schema der Produktion des Sekretes im ER und Golgi Apparat. Die Produktion des Kammerwassers im Auge ist zum Beispiel ebenfalls ein solcher Sekretionsprozess. Für diese Form der Sekretion wurde ursprünglich die Bezeichnung der ekkrinen Sekretion geprägt, die sich mehr und mehr unter Einschließung der merokrinen Sekretion zu einem Überbegriff für alles entwickelt hat, das nicht dem apo- oder holokrinen Schema folgt.

12.2. Wege in die Zelle: Endozytose und der lysosomale Weg

Die Zelle nimmt Substanzen und Partikel aus ihrer Umgebung aus den verschiedensten Gründen auf. Vielfach aber geht es darum, Substanzen, Teile von Organismen oder ganze Organismen zu zerstören und dabei möglichst auch noch zu hydrolysieren, d.h. zu verwerten. Dieser Aufnahme- und Verdauungsapparat führt also zu Verwertungssystemen, die primär nicht für den Verdau externen Materials entstanden sind, sondern auch dafür zuständig sind, gealterte Zellbestandteile zu verdauen und ihre Bestandteile wieder zu verwerten.

Es gibt dabei zelluläre „Wertstoffhöfe“, die primär den jeweiligen Äquivalenzräumen zugeordnet sind:

Zytosol: Das *Proteasom* ist der zytosolische Multienzymkomplex der für die Entsorgung gealterter Proteine zuständig ist. Dafür werden bestimmte Markierungen an den Proteinen angebracht (Ubiquitinylierung, Thema der Biochemie).

Membransysteme: *Lysosomen* sind diejenigen Kompartimente der Membransysteme, die zur Zerstörung nahezu aller zellulären Stoffklassen befähigt sind. Lysosomen

- enthalten ca. 40-50 verschiedene lytische Enzyme (sog. saure Hydrolasen)
- weisen einen sauren (d.h. niedrigen) pH-Wert auf
- haben Membranproteine (Protonenpumpen), die die Erniedrigung des pH-Wertes bewirken
- verfügen über Transporter um Endprodukte der Lyse ins Zytosol zurückzutransferieren
- sind auf ihrer Innenseite dicht mit Zuckerketten besetzt, die u.a. dem Selbstverdau vorbeugen.
- werden aus dem trans-Golgi durch Transportvesikel mit Protein- und Membran-Nachschub versorgt.
- werden über Mannose-6-phosphat als Adreßsignal vom trans-Golgi aus angesteuert

Der Import von externem Material direkt in Vesikel der Membransysteme durch Abschnürung von Vesikeln des Plasmalemm nach innen ist der bevorzugte Weg der Endozytose bei eukaryotischen Zellen. Aber in besonderen Fällen (Immunsystem; Präsentation von Antigenen) übernimmt auch das Proteasom wichtige Aufgaben. Das Proteasom und seine Sonderaufgaben bleiben in diesem Skript aber unberücksichtigt. Diese Themen sind bevorzugt in der Biochemie angesiedelt.

12.2.1. Station 1: Von draußen in ein Vesikel

Die Aufnahme von Substanzen in das Membransystem funktioniert über die Abschnürung von Vesikeln ins Innere der Zelle. Dabei kann man verschiedene Wege unterscheiden:

(Mikro-)Pinozytose: Die Abschnürung kleiner Vesikel vom Plasmalemm ohne sichtbare Proteinhülle wird auch gerne als Pinozytose bezeichnet. Diese Form der Aufnahme von Material ist im Regelfalle als Teil der konstitutiven Endozytose zu interpretieren. Mindestens so wichtig wie die Aufnahme von Material aus dem Außenraum ist die Entfernung gealterten oder überschüssigen Membranmaterials aus dem Plasmalemm. Alle Zellen sind zur Pinozytose grundsätzlich befähigt.

Phagozytose: Am anderen Ende der Skala steht die sogenannte Phagozytose. Dabei handelt es um die Aufnahme großer Partikel oder ganzer Organismen (Bakterien) in Zellen. Solche Vorgänge finden auch im menschlichen Körper bei der Abwehr bakterieller Infektionen oder bei der Abräumung zerstörten Gewebes in Wundbereichen statt. Phagozytose ist keine generelle Fähigkeit aller Zellen des menschlichen Körpers, sondern ist auf bestimmte Zelltypen begrenzt. Diese Zelltypen (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, etc.) sind oft auch zur amöboiden Zellbewegung befähigt. Sie bilden große Pseudopodien, mit denen sie die aufzunehmende Partikel umschließen und dann als Vesikel ins Zellinnere abschnüren können.

Rezeptor-vermittelte Endozytose (abhängig von Clathrin): Neben Pinozytose und Phagozytose ist die Aufnahme definierter Moleküle eine Fähigkeit von Zellen. Werden Moleküle (z.B. Lipoproteine) gezielt aus einer die Zelle umgebenden Flüssigkeit herausgepickt, so geschieht dies über Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden im Wege der Rezeptor-vermittelten Endozytose über Clathrin und geeignete Adaptoren¹ in Clathrin-coated pits (Grübchen) konzentriert, die sich dann als Clathrin-coated vesicles von der Plasmamembran in Zellinnere abschnüren. Diese Mechanismen sind analog zu den Vesikelknospungsprozessen und den Aufreinigungsprozessen, die in den Membransystemen und speziell im Golgi ablaufen.

Clathrin unabhängige Endozytose: Vor allen Dingen in der glatten Muskulatur und in Endothelzellen, seltener auch in anderen Zelltypen des menschlichen Organismus, treten sogenannte Caveolae auf. Deren Funktion ist nicht wirklich ganz klar; sie werden auch im Zusammenhang mit z.B. der Calcium-homöostase von Zellen diskutiert. Diese kleinen Abschnürungen an Zelloberflächen treten häufig in girlandenartiger Anordnung direkt nebeneinander auf. Bei den Caveolae ist ein entscheidendes Protein der caveolären Wand das sog. Caveolin. Auf diesem Weg kann offensichtlich auch Endozytose erfolgen.

12.2.2. Station 2: Das endo-lysosomale Kompartiment

Nach ihrer Abschnürung ins Zellinnere und dem Verlust möglicher Coat-Proteine wie Clathrin verschmelzen die als endozytotische Vesikel bezeichneten Bläschen in der Regel mit etwas größeren, vielgestaltig geformten vesikulären Strukturen im Randbereich der Zellen, den sogenannten Endosomen (s. ABB. 12.2).

Endosomen stammen aus den intrazellulären Membransystemen und dienen ihrerseits auch als Wanderungsziel für sogenannte primäre Lysosomen. Primäre Lysosomen schnüren sich als coated vesicles aus dem trans-Golgi ab und enthalten lösliche und Membranproteine, die Mannose-6-phosphat, das Signal für die lysosomale Lokalisation, tragen (s. ABB. 8.8). Primäre Lysosomen werden zu Endosomen transportiert und verschmelzen mit Endosomen.

Die Endosomen erhalten also vesikuläre Zufuhr aus endozytotischen Vesikeln aus dem Plasmalemm mit extrazellulärem Inhalt und von primären Lysosomen aus dem trans-Golgi Bereich. Außerdem können auch alternde Zellorganellen, die zur Entsorgung anstehen, in die Endosomen einbezogen werden (s. ABB. 12.2). Die primären Lysosomen bringen die membranständigen Protonenpumpen und die lysosomalen Hydrolasen mit. Der pH in den Endo-Lysosomen erniedrigt sich durch die von den primären Lysosomen mitgebrachten Protonenpumpen und die Zersetzung des Inhaltes beginnt. Der Selbstverdau der Endosomen wird u.a. durch die spezielle Glykosylierung der lysosomalen Seite der lysosomalen Membran verhindert. Die Endosomen treten in eine Art Reifungsprozess ein, in dessen Verlauf sie sich durch mehrfache Abschnürung und durch Inkorporation von Zellorganellen (Autophagie) zwischenzeitlich in nur transient existierende multi-vesikuläre Körper (multi-vesicular bodies, s. ABB. 12.2) umformen. Die verdauten Inhaltsstoffe der Endosomen werden über spezielle Transportproteine in das Zytosol zur Wiederverwertung zurücktransportiert. Am Ende eines solchen Weges steht ein sekundäres Lysosom, das häufig auch einfach nur als Lysosom bezeichnet wird. Solche sekundären Lysosomen können wieder mit Endosomen fusionieren oder zunächst weitere primäre Lysosomen aufnehmen, bevor sie mit Endosomen fusionieren.

¹Die Adaptoren binden dann an Clathrin und den Rezeptor. Sie rekrutieren damit den Rezeptor und sein Cargo für Clathrin-coated vesicles.

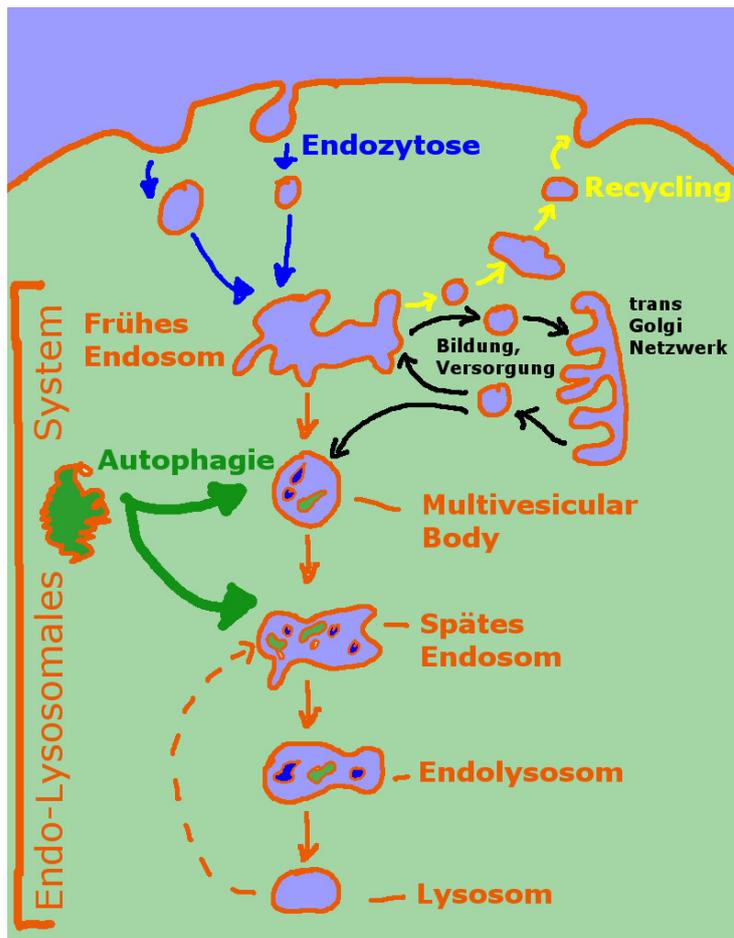


Abbildung 12.2: Das Schema fasst wesentliche Komponenten des endo-lysosomalen Systems zusammen. Die Farben der Pfeile trennen dabei einige wichtige Unterbereiche des Systems. Blaue Pfeile kennzeichnen die Entstehung endozytotischer Vesikel, hier nicht unterschieden nach Rezeptor-vermittelter oder anderer Endozytose. Die gelben Pfeile zeigen an, dass in verschiedenen Zusammenhängen (Bsp. Aufnahme von LDL über den LDL-Rezeptor) Membranbestandteile und Rezeptoren wieder an die Oberfläche zurückgebracht und wiederverwendet werden können. Schwarze Pfeile kennzeichnen die Verbindung zum trans-Golgi System. Hier besteht ein reger Austausch von Vesikeln. Die über den Mannose-6-phosphat für das endo-lysosomale System bestimmten Moleküle werden hier zum endo-lysosomalen System transportiert. Grüne Pfeile kennzeichnen die Möglichkeit der Autophagie, d.h. der Entsorgung gealterter und dysfunktionaler Zellorganellen. Die orangenen Pfeile stellen den Hauptweg des endo-lysosomalen Systems dar.

Darstellung des endolysosomalen Kompartiments in Kurspräparaten: Das endo-lysosomale System kann grundsätzlich durch verschiedene histologische Techniken dargestellt werden. Möglich wären vor allen Dingen natürlich Nachweise lysosomaler Enzyme oder anderer Inhaltsstoffe. Im Kurs wird die Darstellung u.a. durch zwei verschiedene Vitalfärbungen erreicht (s. ABB. 12.3). Zum einen wurde Trypanblau verwendet. Diese Substanz wurde Ratten injiziert, zirkuliert dann im Blut und wird über die Nieren ausgeschieden. Es wird allerdings in den Tubuli der Niere kräftig rückresorbiert und zwar in das endo-lysosomale Kompartiment. Dort sinkt der pH-Wert und der Farbstoff fällt aus. Er akkumuliert also in Lysosomen. In ähnlicher Weise wurde eine kleine Menge Tusche einem Versuchstier appliziert. Die Tusche besteht aus kleinen Partikeln, die z.B. in der Leber in phagozytierende Zellen (sog. v. Kupffersche Sternzellen) am Rand der Lebersinusoiden aufgenommen werden.

Im endo-lysosomalen Kompartiment kann die Zelle Material aus extra- und intrazellulären Quellen in seine Bestandteile zerlegen und diese dann wieder innerhalb der Zelle verwerten. Diese Funktion ist für den Selbsterhalt der Zelle wichtig, aber sie wird auch bei Abwehrvorgängen und für wichtige Transporte (Beispiel: Lipoproteine (LDL)) genutzt.

Weiterlesen, Schmökern, Keine Pflicht...

Bonifacino, J. S. und L. M. Traub (2003). "Signals for Sorting of Transmembrane Proteins to Endosomes and Lysosomes". In: *Annual review of biochemistry* 72.1, S. 395–447.

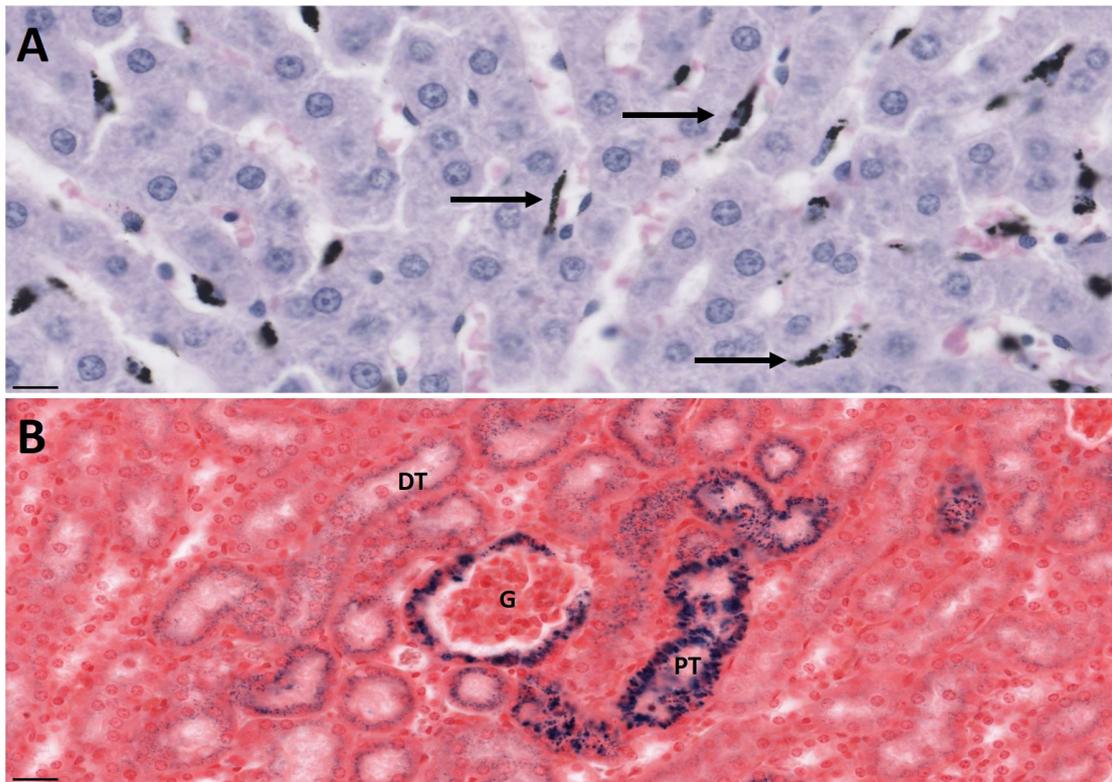


Abbildung 12.3.: Kurspräparate: **A** und **B** zeigen Lysosomen nach einer Vitalfärbung. Bei **A** handelt es sich um eine Leber (Ratte). Nach Injektion von Tusche werden die Tuscheartikel von phagozytierenden Zellen der Leber (sog. v. Kupffersche Sternzellen, mit Pfeilen gekennzeichnet) aufgenommen. Diese liegen am Rand der Blutgefäße der Leber, der sogenannten Lebersinusoiden. Bei **B** wurde einer Ratte der Vitalfarbstoff Trypanblau appliziert. Dieser Farbstoff zirkuliert im Blut, wird in der Niere filtriert und dann aus dem Tubulus in das endo-lysosomale System rückresorbiert. In dem sauren Milieu der Lysosomen fällt der Farbstoff aus und bleibt in den Lysosomen liegen. Lysosomen stellen sich dann als unterschiedlich intensiv blau gefärbte Punkte dar. Entlang des Tubulussystems nimmt die Farbstoffmenge ab. G: Glomerulum; hier findet die Filtration statt. PT: Proximaler Tubulus; hier wird die größte Menge an Farbstoff zurückresorbiert. DT: Distaler Tubulus; hier ist nur noch wenig Farbstoff zur Rückresorption im Lumen vorhanden gewesen. Die Lysosomen sind seltener und schwächer gefärbt.

Burgess, T L. und R B. Kelly (1987). "Constitutive and regulated secretion of proteins". In: *Annual review of cell biology* 3.1, S. 243–293.

Conner, S D. und S L. Schmid (2003). "Regulated portals of entry into the cell". In: *Nature* 422.6927, S. 37–44.

Martin, T F J. (1997). "Stages of regulated exocytosis". In: *Trends in cell biology* 7.7, S. 271–276.

Mellman, I. (1996). "Endocytosis and molecular sorting". In: *Annual review of cell and developmental biology* 12.1, S. 575–625.

Zitierte Literatur

- Alberts, B. u. a. (2011). *Molekularbiologie der Zelle* -. 5. vollständig überarbeitete Auflage. New York: John Wiley & Sons (siehe S. 44).
- Endl, Elmar und Johannes Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function". In: *Experimental cell research* 257.2, S. 231–237 (siehe S. 78).
- Horobin, R W. und J A. Kiernan (2002). *Conn's Biological Stains - A Handbook of Dyes, Stains and Fluorochromes for Use in Biology and Medicine*. 10. Aufl. London, New York: Taylor & Francis (siehe S. 15).
- Kelman, Zvi (1997). "PCNA: structure, functions and interactions." In: *Oncogene* 14.6, S. 629–640 (siehe S. 78).
- Romeis, B und M Mulisch, Hrsg. (2010). *Mikroskopische Technik*. 18. Aufl. Heidelberg: Spektrum, Akad. Verlag (siehe S. 6, 15).
- Scholzen, Thomas, Johannes Gerdes u. a. (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown". In: *Journal of cellular physiology* 182.3, S. 311–322 (siehe S. 78).

Stichwortverzeichnis

- Äquivalentbilder, 2
- Äquivalenzraum
 - Definition, 44
 - Transportwege, 44
- Actin, 20
- Antikörper, 20
- Apoptose, 76
- Bildgebung, 2
- Biomembran, 30, 32
 - Fluidität, 34
 - Permeabilität, 35
 - Plasmalemm, 33
 - Polarität, 33
- Cholesterin, 34
- Cotransporter, 36
- DNA
 - Feulgen Reaktion, 18
- Dunkelfeldmikroskopie, 8
- Einbettung, 5
 - für EM, 5
 - für LM, 5
- Eisen
 - Berliner Blau Reaktion, 18
- Elektronenmikroskopie
 - SEM, 14
 - TEM, 2, 14
- Endozytose, 83
- Eukaryot, 39
- Färbung
 - AZAN, 23
 - Elastica, 23
 - Elektrostatisch, 16
 - Fette, 18
 - HE, 22
 - indirekt, 17
 - Masson-Goldner, 23
 - Prinzipien, 16
 - Trichrom, 23
- Farbstoffe, 16
- Fettsäuren
 - gesättigt, 35
 - ungesättigt, 35
- Fluoreszenznachweis
 - Direkte Fluoreszenz, 20
 - Indirekte Fluoreszenz, 20
 - Mehrschrittverfahren, 21
- Galactosidasen, 19
- Glykogen
 - PJS Reaktion, 18
- Glykokalyx, 36
- Golgi Apparat
 - cis, 57
 - Fließgleichgewicht, 58
 - Lage, Bau, 57
 - Polarität, 57, 58
 - trans, 57
 - Zisternen, 57
- Immunhistochemie, 25
- Intermediärfilamente, 67
 - Familien, 67
 - Spezifität Zelltyp, 67
- Kanäle, 36
- Kinetosom, 66
- Kinozilien, 66
- Kompartiment, endo-lysosomales, 84
- Kompartimentierung, 29
- Lektine, 20
- Lichtmikroskopie, 2, 5, 8
 - Auflicht, 11
 - Durchlicht, 8
 - Epipolarisation, 11
 - Fluoreszenzmikroskopie, 11
 - Interferenzkontrast, 10
 - Konfokal, 13
 - Phasenkontrast, 10
 - Polarisationsmikroskopie, 10
- Lysosom, 83
- Mitochondrien, 69
- Mitose
 - Karyokinese, Phasen, 72
 - Mitosefiguren, 74
 - Mitoseindex, 74
 - Zellzyklus, 74
 - Zytokinese, 72

- Motorproteine
 - Dyneine, 65
 - Kinesine, 65
 - Myosine, 64
- MTOC, 66
- Myosine, 64
- Nukleinsäuren, 20
- Peroxidase, 19
- Peroxisomen, 69
- Phalloidin, 20
- Phosphatase, alkalisch, 19
- Phospholipide
 - Membranbaustein, 32
- Plasmalemm, 33
 - Glykokalyx, 36
- Proben
 - Einbetten, 4
 - Fixierung, 3
 - Herkunft, 3
- Prokaryot, 39
- Proliferation, Analyse
 - Markerindex, 78
 - Mitoseindex, 74
 - Proliferationsmarker, 78
- Proliferationsmarker
 - ki67, 78
 - PCNA, 78
- Proteasom, 83
- Pumpen, 36
- Retikulum, endoplasmatisches
 - Übersicht, 51
 - glattes, 51
 - raues, 52
- Schneiden, 6
- Sekretion
 - apokrin, holokrin, 80, 82
 - ekkrin, 80, 83
 - konstitutiver Modus, 80
 - merokrin, 80
 - regulierte Sekretion, 81
- Signalverstärkung, 19
- Sonden, 19, 20
- Topologie
 - Beziehungen, 44
 - Definition, 44
 - Herleitung, 41
- Transporter, 36
- Versilberungen
 - Golgi Apparat (Lascano), 24
 - Retikulinfasern, 24
- Vesikel
 - Beladung, 59
 - Bildung, 59
- Zelleinschlüsse
 - Glykogen, 46
 - kristallin, 46
 - Lipide, 46
- Zellkern, 47
 - Histolog. Leitstruktur, 49
 - Interphase, 48
 - Kernhülle, 47
 - Kerninnenraum, 48
 - Kernporen, 47
 - Nucleoli, 48
- Zellzyklus
 - checkpoints, 76
 - G0, 77
 - Mitose, 74
 - No Growth Fraction, 77
 - Phasen, 75
 - Proliferating Pool, 77
- Zentrosom, 66
- Zytoskelett, 46
 - Übersicht, 62
 - Actine, 63
 - Aufgaben, 62
 - Intermediärfilamente, 67
 - Mikrotubuli, 65
 - Tubuline, 65
- Zytosol, 46

Verzeichnis der Kurspräparate

EM 1a, Zellkern, [49](#)
EM 1b, Kernhülle, [48](#)
EM 1c, Mitochondrien, [71](#)
EM 2a, rER, [56](#)
EM 2b, sek. Weg, [61](#)

HL-60, IH beta-Tubulin, [25](#), [66](#)

II/05, Aorta, HE, [24](#)
II/07, Aorta, ELastica, [24](#)
II/33, Pankreas, HE, [56](#)
II/44, Duodenum, HE, [75](#)
II/50, Leber, HE, [50](#)
II/68, D.epididymidis, Versilberung, [24](#), [60](#)
II/70, Zwiebel, Eisenhämat., [72](#)
II/72, Duodenum, PAS, [18](#)
II/76, Lymphknoten, Versilberung, [24](#)

II/89, Zunge, HE, [22](#)
II/91, Uterus, HE, [23](#)
II/92, Uterus, AZAN, [23](#)
II/93, Rückenmark, HE, [55](#)

Jeg3, 4-Kanal-Fluoreszenz, [73](#)

Leber, Ratte, Vitalfärbung Tusche, [86](#)

Milz, IH ki67, [78](#)
Milz, IH PCNA, [78](#)

Niere, Ratte, Vitalfärbung Trypanblau, [86](#)

Plazenta, IH Cytokeratin, [25](#), [67](#)
Plazenta, IH sm-actin, [67](#)
Plazenta, IH Vimentin, [67](#)

Abbildungsverzeichnis

1.1. Flußschema zur Probenherkunft und zur Histologischen Technik	3
1.2. Geräte und Hilfsmittel zur Einbettung in Paraffin	5
1.3. Schema des Strahlengangs im Durchlicht	9
1.4. Phasenobjekte und Amplitudenobjekte	10
1.5. Strahlengang im Auflicht	12
1.6. Prinzip der konfokalen Mikroskopie	13
2.1. Perjodsäure-Schiff Reaktion	18
2.2. Möglichkeiten histologischer Signalamplifikation am Beispiel einer Immunreaktion	21
3.1. Immunhistochemische Nachweise im Fluoreszenzmodus und im Durchlichtmodus	22
3.2. Beispiel einer HE-Färbung: Skelettmuskulatur	22
3.3. Vergleich der HE mit der AZAN Färbung	23
3.4. Vergleich der HE mit der Elastica Färbung	24
3.5. Versilberungen des Golgi Apparates sowie retikulärer Fasern	24
3.6. Immunhistochemische Nachweise im Fluoreszenzmodus und im Durchlichtmodus	25
4.1. Entropie in belebten und unbelebten Systemen	28
4.2. Lernarbeit und Neg-Entropie	28
4.3. Grenzflächen, die kompartimentieren	29
4.4. Eine einfache polare Grenzschicht	30
4.5. Vektoren an einer einfachen polaren Grenzschichten	30
4.6. Beispiele für durch Grenzschichten definierte Räume	30
5.1. Grundbau der Phospholipide	32
5.2. Phospholipide in Wasser	33
5.3. Asymetrie von Biomembranen am Beispiel des Plasmalemm	34
5.4. Cholesterin und Fettsäuren kontrollieren Fluidität und hydrophobe Stabilität der Membran	35
5.5. Grundpermeabilität einer Biomembran	35
5.6. Möglichkeiten, die Membranbarriere zu überwinden	38
6.1. Veränderungen beim Übergang von der pro- zur eukaryotischen Zellorganisation	43
6.2. Farbschema zur Darstellung der beiden großen Äquivalenzraumssysteme eukaryotischer Zellen	45
7.1. Elektronenmikroskopie der Kernhüllstrukturen	48
7.2. Elektronenmikroskopie des Zellkern- Innenraumes	49
7.3. Zellkerne in der Leber	50
8.1. Schema skizze zum ER	51
8.2. 3D Übersicht zum Endoplasmatischen Retikulum	53
8.3. Schema zur cotranslationalen membrandurchquerenden Translation am rauhen ER	54
8.4. Nissl-Schollen in einem Motoneuron des Rückenmarks	55
8.5. Ergastoplasma in Zellen des exokrinen Pankreas:	56
8.6. Raues endoplasmatisches Retikulum im Elektronenmikroskop:	56
8.7. Schema skizze zum ER und zum Golgi Apparat	57
8.8. Schema wichtiger Sortierungswege vom trans-Golgi in nachgelagerte Kompartimente	58

8.9. Schema zum Zusammenhang zwischen vesikulärem Transport und Golgi-Funktion . . .	59
8.10. Versilberungen des Golgi Apparates im Epithel des Nebenhodens	60
8.11. Stationen eines Proteins auf dem sekretorischen Weg:	61
9.1. Immunfluoreszenz: Tubulin in menschlichen Zellen	66
9.2. Immunhistochemischer Nachweis verschiedener Intermediärfilamente	67
10.1. Schema skizze zum ER	70
10.2. Elektronenmikroskopische Bilder von Mitochondrien des Crista- und des Tubulustyps .	71
11.1. Mitosen in der Zwiebelwurzel	72
11.2. Zellzyklus, 4-Kanal Fluoreszenz, konfokal	73
11.3. Mitosefiguren im Dünndarmepithel	75
11.4. Die Phasen des Zellzyklus	76
11.5. Zellzyklus mit G0-Phase	77
11.6. Proliferationsmarker in Lymphfollikeln der Milz	78
11.7. Schema Prinzipien der Proliferationsanalyse mit Proliferationsmarkern	79
12.1. Gegenüberstellung des konstitutiven und des regulierten Modus der Sekretion	81
12.2. Schema zum endo-lysosomalen Weg	85
12.3. Lysosomen in Kurspräparaten	86

Tabellenverzeichnis

1.1. Verdünnungstabelle für Alkoholgemische	6
1.2. Typische Kombinationen technischer Hilfsmittel	7
9.1. Bestandteile des Zytoskeletts	63