Mikroinjektion und "Live Cell Imaging"

Lebende menschliche Zellen vor der Kamera

Viele menschliche Zelltypen können sich bewegen: Abwehrzellen jagen nach Infektionserregern, um sie zu fressen und zu verdauen; bei der Wundheilung wandern Reparatur-Zellen zur verletzten Stelle und bilden neue Gefäße. Krebszellen teilen sich viel schneller als gesunde Zellen, bewegen sich, obwohl sie es gar nicht sollen, und können so fern von ihrem Entstehungsort Metastasen bilden. Wie Zellbewegung, Zellteilung aber auch Zellsterben (Apoptose) im Detail reguliert werden, ist noch weitgehend unbekannt, doch modernste Mikroskopie-Methoden können Licht ins Dunkel bringen: mit der Methode des so genannten "*Live Cell Imaging*" lassen sich mikroskopische Zeitraffer-Aufnahmen sich bewegender und sich teilender menschlicher Zellen anfertigen. All diese Prozesse sind meist langwierig und können sich über mehrere Tage hinziehen. Säugerzellen und vor allem menschliche Zellen jedoch sind wahre Mimosen und brauchen streng definierte Bedingungen: sie fühlen sich bei exakt 37,2 Grad besonders wohl und benötigen den exakten Kohlendioxid- und Sauerstoff-Gehalt der Umgebungsluft, da so auch der pH-Wert des umgebenden Mediums reguliert wird. So müssen die Zellkulturschalen während der Beobachtungsphase in einer speziellen Inkubationskammer begast und temperiert werden. Ein Computer steuert in dieser Zeit eine Digitalkamera, die in festen Intervallen eine Aufnahme macht. Eine Abfolge dieser Bilder ergibt einen Zeitrafferfilm, in dem die Zellbewegung sichtbar wird.

Mikroinjektion - Die Molekulare Spritze

Mit Hilfe dieser ausgesprochen eleganten Methode ist es möglich, Moleküle mit Hilfe feinster Kanülen, so genannter Glaskapillaren, direkt in lebende Zellen einzuschleusen.
1979 wurden die ersten menschlichen Zellen mit Glaskapillaren mikroinjiziert. Seitdem wurde die Methode stetig verbessert und verfeinert. Heute wird das Einführen der Kanüle über ein Computerprogramm gesteuert, und so die Probe direkt in das gewünschte Kompartiment der Zelle gespritzt.
Das Verfahren ist sowohl apparativ sehr aufwendig als auch manipulativ höchst anspruchsvoll. Benötigt werden neben einem (vom Klinikum finanzierten) hochwertigen Inversmikroskop zur visuellen Überwachung der Injektionen, ein Gerät zur Herstellung der fein ausgezogenen Mikrokapillaren (ein sog. "Kapillar-Puller"). Mikromanipulatoren dienen der Justierung und Steuerung der Injektionskapillare, während ein Mikroinjektor mittels eines präzisen Luftstoßes einige Femtoliter der Injektionslösung aus der Spitze der Kapillare presst.

Verwendet man zur Mikroinjektion fluoreszierende Moleküle, wie beispielsweise mit dem grün-fluoreszierenden Protein GFP markierte Eiweiße, kann so deren Wanderung durch die Zelle, z.B. vom Kern ins Zytoplasma oder umgekehrt, in Echtzeit unter dem Mikroskop verfolgt werden. Auch direkte Effekte von eingeschleuster Erbsubstanz (DNA in Plasmidform), RNA-Molekülen oder Krebstherapeutika können so direkt am Mikroskop visualisiert werden.

Durch diese hochmoderne und somit auch kostenintensive Technologie kann dazu beigetragen werden, den zumeist auf den menschlichen Organismus als Ganzes fixierten Blick auf die beeindruckenden Bausteine des Individuums zu lenken, die einzelnen Zellen. Eine solche Mikroskop-Anlage mit Mikroinjektionsvorrichtung und "*Live Cell Imaging*" ist bislang nicht nur an der Johannes-Gutenberg-Universität, sondern sogar in ganz Rheinland-Pfalz einmalig.

Mikroinjektion in lebende Zellen

Mikroinjektion - die molekulare Spritze
Mit Hilfe dieser ausgesprochen eleganten Methode ist es möglich, Moleküle mit Hilfe feinster Kanülen, sogenannter Glaskapillaren, direkt in lebende Zellen einzuschleusen. 1979 wurden die ersten menschlichen Zellen mit Glaskapillaren mikroinjiziert. Seitdem wurde die Methode stetig verbessert und verfeinert. Heute wird das Einführen der Kanüle über ein Computerprogramm gesteuert, und so die Probe direkt in das angesteuerte Kompartiment der Zelle gespritzt.

Methodik

Das Verfahren ist sowohl apparativ sehr aufwendig als auch manipulativ höchst anspruchsvoll. Benötigt werden neben einem hochwertigen Epifluoreszenz-Inversmikroskop zur visuellen Überwachung der Injektionen sog. Mikromanipulatoren zur Justierung der Injektions-kapillare sowie ein Mikroinjektor, der mittels eines präzisen Luftstosses einige Femtoliter der Injektionslösung aus der Spitze der Kapillare presst.

Abb. 1: Motorisiertes inverses Fluoreszenzmikroskop AxioVert 200M (Carl Zeiss) mit computergesteuerter Mikromanipulationseinheit (Fa. Cell Biology Trading). Oberer Bildausschnitt: Mikroinjektor (Fa. Eppendorf).

Verwendet man zur Mikroinjektion fluoreszierende Moleküle, wie beispielweise mit dem grün-fluoreszierenden Protein GFP markierte Eiweiße, kann so deren Weg durch die Zelle, z.B. vom Kern ins Zytoplasma oder umgekehrt, in Echtzeit unter dem Mikroskop verfolgt werden. Auch das direkte Einschleusen von Erbsubstanz (DNA in Plasmidform), RNA-Molekülen sowie von Krebstherapeutika ist mit dieser Methode möglich. Auch deren direkte Effekte auf lebende menschliche Zellen können so direkt am Mikroskop visualisiert werden.

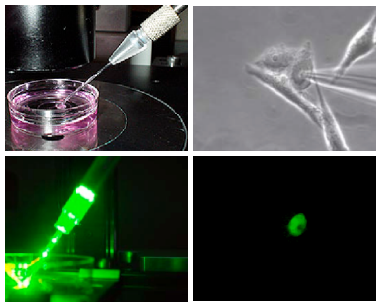

Abb. 2: Mikroinjektion lebender Zellen mit einer fluoreszierenden Substanz. Zellen in speziellen Kulturschälchen werden mit Hilfe einer fein ausgezogenen Glaskapillare injiziert Die Injektion erfolgte in den Zelkern wie unter Bestrahlung mit UV-Licht (untere Bildreihe) gut zu erkennen ist.

Literatur

Stauber, R. H., Krätzer, F., Schneider, G., Hirschmann, N., Hauber, J. & Rosorius, O. “Investigation of nucleo-cytoplasmic transport using UV-guided microinjection” (2001). J Cell Biochem. 80,388-396.

Auf Anfrage ist es möglich, diese Methode in der Arbeits-gruppe Molekulare & Zelluläre Onkologie zu erlernen.

Universitätsklinikum Mainz
HNO- und Poliklinik

Prof. Dr. Roland Stauber
Langenbeckstr. 1
55101 Mainz

Abteilung Molekulare und Zelluläre Onkologie

Kontakt

Dr. Shirley Knauer
Telefon +49 (0) 6131/17 6030
Fax +49 (0) 6131/17 6671
Email knauers@uni-mainz.de
Langenbeckstr. 1
55101 Mainz

“Live Cell Imaging”

Lebende menschliche Zellen vor der Kamera

Die Beobachtung biologischer Abläufe in lebenden Zellen, das sogenannte “Live Cell Imaging”, ist für viele Anwendungsfelder biomedizinischer Forschung zum zentralen Forschungsthema geworden.
Im Gegensatz zu den statischen Momentaufnahmen, die mit fixierten, das heißt toten Präparaten produziert werden, erlaubt es diese hochmoderne Fluoresenzmikroskopie-Methode, dynamische Prozesse unter realen Bedingungen zeitabhängig zu betrachten. Durch die gleichzeitige Visualisierung mehrerer Parameter im intakten nativen System der lebenden Zelle können verschiedenste zelluläre Abläufe noch umfassender und detaillierter untersucht werden.

Methodik

Zelluläre Prozesse sind meist langwierig und können sich über mehrere Tage hinziehen. Menschliche Zellen jedoch sind wahre Mimosen und brauchen streng definierte, konstante Kulturbedingungen: sie fühlen sich bei exakt 37,2° C besonders wohl, benötigen einen definierten Kohlendioxid- und Sauerstoff-Gehalt der Umgebungsluft, auch um den pH-Wert des umgebenden Mediums optimal zu halten. So müssen die Zellkulturschalen während der Beobachtungsphase in einer speziellen Inkubations-kammer begast und temperiert werden. Ein Computer steuert in dieser Zeit eine Digitalkamera, so dass sie in festen Intervallen ein Foto aufnimmt. Aus diesen qualitativ hochwertigen Einzelaufnahmen ergibt sich schließlich ein Langzeit-Zeitrafferfilm, in welchem das dynamische Zellverhalten sichtbar wird.

Die digitale Fluoreszenz-mikroskopie dient somit als automatisierbares Verfahren zur Beobachtung von Zellbewegung, -wachstum, -teilung, aber auch vom Zellsterben - visualisierbar durch charakteristische Veränderungen in der Zellmorphologie.

Abb. 1: “Live Cell Imaging” - Vorrichtung: Inkubator XL S1, integriert in das motorisierte inverse Fluoreszenzmikroskopsystem AxioVert 200M (Carl Zeiss, Jena)

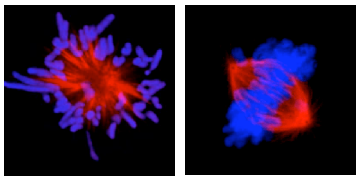

Abb. 2: Menschliche Zellen in unterschiedlichen Phasen der Zellteilung (Mitose). Die rote Fluoreszenzmarkierung der Teilungsspindel und die blau markierten Chromosomen erlauben eine Visualisierung des Teilungs-vorgangs der lebenden Zelle.

Auf Anfrage ist es möglich, diese Methode in der Arbeits-gruppe Molekulare & Zelluläre Onkologie zu erlernen.

Universitätsklinikum Mainz
HNO- und Poliklinik

Prof. Dr. Roland Stauber
Langenbeckstr. 1
55101 Mainz

Abteilung Molekulare und Zelluläre Onkologie

Kontakt

Dr. Shirley Knauer
Telefon +49 (0) 6131/17 6030
Fax +49 (0) 6131/17 6671
Email knauers@uni-mainz.de
Langenbeckstr. 1
55101 Mainz