

Zellen besitzen Strukturproteine, die sowohl bei Aufrechterhaltung als auch Veränderung der Zellform, bei Fortbewegung und Teilung eine wichtige Rolle spielen. Dieses sogenannte Zytoskelett besteht bei eukaryotischen Zellen aus drei Filamentsystemen: Mikrotubuli, Aktin- und Intermediärfilamente. Obwohl der Begriff „Zellskelett“ eigentlich an statisch-mechanische Verstrebnungen denken läßt, handelt es sich hierbei um ein hochdynamisches Netzwerk, das ständigem Auf- und Abbau unterworfen ist.



Katharina Hüfner, cand. med., studiert Medizin in München und arbeitet derzeit als Doktorandin am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München.

katharina.huefner@klp.med.uni-muenchen.de

In besonders beeindruckender Weise lassen sich verschiedene Zytoskelett-Elemente und ihre Dynamik bei primären humanen Makrophagen nachweisen (Abb. 1A-C). Als spezialisierte Zellen der Immunantwort sind Makrophagen auf ein gut funktionierendes Zytoskelett angewiesen, wenn sie ihrer Funktion bei der Bekämpfung von Pathogenen nachkommen sollen. Vorgänge wie Adhäsion, Migration und Phagozytose erfordern z.B. eine grundlegende Umstrukturierung des Aktin- und/oder Mikrotubuli-Zytosketts. Dies läßt sich durch Fluoreszenz-Färbetechniken darstellen und durch verschiedene Substanzen beeinflussen (Abb. 1D-G).

● Fluoreszenz-Färbungen des Zytosketts

a) praktisches Vorgehen

Zellen werden auf Coverslips (Glas oder Aceton-stabiles Plastik) ausgesät. Monozyten werden 5-8 Tage in Kultur gehalten (1), damit sie zu Makrophagen ausdifferenzieren. Die Coverslips sollte man immer vorsichtig am

Abkürzungen

BSA: Bovines Serum-Albumin

DMSO: Dimethylsulfoxid

EtOH: Ethanol

PBS: Phosphate-buffered saline solution

Leuchtende Skelette

Fluoreszenz-Färbung und Manipulation des Zytosketts primärer humaner Makrophagen

Katharina Hüfner und Stefan Linder

Institut für Kreislaufkrankheiten, Pettenkoferstr. 9, D-80336 München

Rand mit einer Pinzette hochheben, um die Zellen nicht zu beschädigen!

Prinzip der Detektion: Nach Lyse und Fixierung werden die Zellen mit dem primären Antikörper inkubiert (z.B. ein monoklonaler Maus-Antikörper), der gegen das Zielprotein gerichtet ist. In einem zweiten Schritt wird ein Sekundär-Antikörper gebunden, der gegen die schwere Kette des Primär-Antikörpers gerichtet ist (z.B. ein Kaninchen-anti-Maus Antikörper). Er ist mit einem Chromophor (z.B. Alexa-488 oder -568; Molecular Probes) gekoppelt und erlaubt damit die indirekte Detektion des Zielproteins im Fluoreszenz-Mikroskop (Abb. 2).

Der Färbevorgang (Abb. 3A) wird in einer feuchten Kammer (bedeckte Zellkulturschale mit feuchtem Tuch) durchgeführt: Von der Block- oder Färbelösung wird jeweils ein Tropfen auf ein Stück Parafilm gegeben und die Coverslips umgekehrt darauf gelegt, d.h. die Seite, auf der die Zellen wachsen, nach unten. Vor dem Wiederaufnehmen werden die Coverslips mit etwas Flüssigkeit unterspült, um die Zellen nicht abzureißen. Zum Einbetten (Abb. 3B) werden die Coverslips mit der Zellseite nach unten auf einen Tropfen Moviol (Calbiochem) gegeben, das *p*-Phenylendiamin (Sigma) als anti-fading Substanz enthält. Zur Versiegelung der Proben hat sich Nagellack bewährt. Er sollte allerdings vorher im „Trockenversuch“ ausgetestet werden, da manche Marken Autofluoreszenz zeigen.

b) Aktin-Färbung (Protokoll 1)

Hintergrund: Aktin-Filamente (F-Aktin) spielen u.a. eine wichtige Rolle bei Bewegungsvorgängen, sowohl innerhalb der Zelle als auch bei Bewegungen der Zelle selbst (bekanntes Beispiel sind Muskelfasern). Ein Aktin-Filament

entsteht durch Zusammenlagerung von Aktin-Monomeren (G-Aktin) zu zwei umeinander gewundenen Ketten.

So wird's gemacht: Aktin kann mit Hilfe des Pilzgiftes Phalloidin (aus *Amanita phalloides*, dem Grünen Knollenblätterpilz), das mit einem Farbstoff gekoppelt ist (z.B. Alexa-488 oder -568), dargestellt werden. Phalloidin interkaliert in Aktin-Filamente, daher wird mit dieser Substanz nur F-Aktin dargestellt. Zur Detektion aller Aktin-Moleküle einer Zelle (also G- und F-Aktin) kommt die Färbetechnik mit Antikörpern zum Einsatz. Das Vorgehen bei der Färbung von Aktin mit Antikörpern (Protokoll 1) eignet sich auch für die Darstellung der meisten anderen Zytoskelettproteine wie Vinculin oder Talin. Für eine Kofärbung mit Tubulin kann die Aktinfärbung aber auch nach



Stefan Linder, Dr. rer. nat., ist Diplom-Biologe und derzeit Assistent am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München.

stefan.linder@klp.med.uni-muenchen.de

PHEM-Protokoll (Protokoll 2) durchgeführt werden.

c) Tubulin-Färbung (Protokoll 2)

Hintergrund: Mikrotubuli stellen eines der Haupttransportsysteme der Zelle dar. Sie sind Hohlzylinder, die aus Untereinheiten von α - und β -Tubulin Heterodimeren aufgebaut sind. GTP-gebundene Untereinheiten an den freien Enden verhindern dabei die spontane Depolymerisation (2).

So wird's gemacht: Um eine gute Dar-

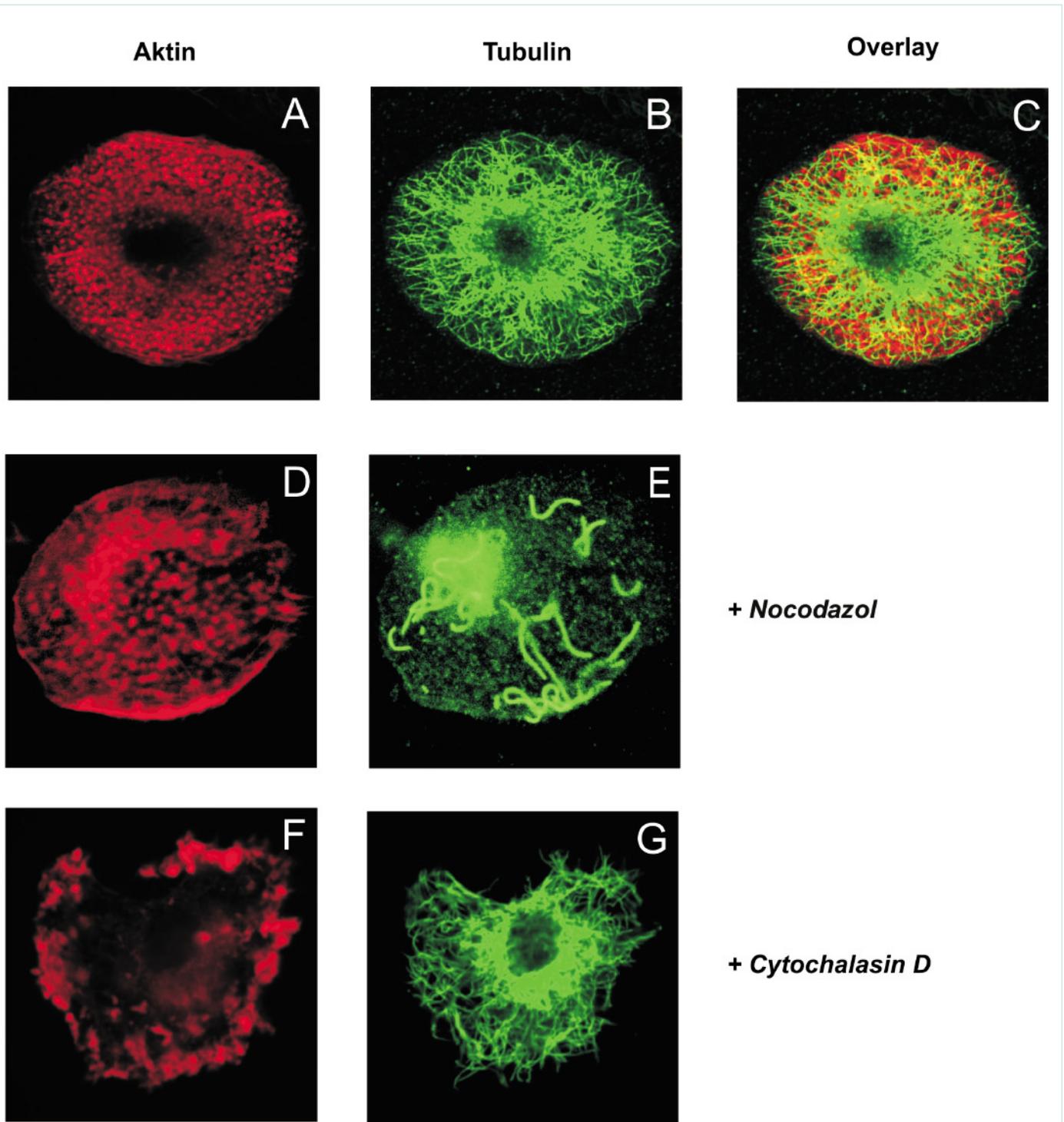


Abbildung 1: Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett eines primären humanen Makrophagen, konfokalmikroskopische Aufnahmen; nach PHEM Fixierung (s. Protokoll 2) wurde mit Rhodamin-Phalloidin das Aktin-Zytoskelett gefärbt (A, D, F). Das Mikrotubuli-Zytoskelett wurde mit einem monoklonalen anti- β -Tubulin Antikörper dargestellt (B, E, G). Ruhender, unbehandelter Makrophage (A, B, C). In der Aktinfärbung erscheinen prominent die punktförmigen, aktinreichen Adhäsionsstrukturen primärer humaner Makrophagen, die Podosomen (A). Die Mikrotubuli erstrecken sich vom kernnahen Organisationszentrum bis in die Peripherie (B). Überlagerung von A und B (C). Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett können primär unabhängig voneinander beeinflusst werden (D, E, F, G): Zerstörung des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch Nocodazol (1 μ M; E) ohne direkte Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts (D). Die umgekehrte Situation: Beeinflussung des Aktin-Zytoskeletts durch Cytochalasin D (2 μ M; F), die Mikrotubuli sind intakt (G). Seitenlänge der Bilder: 50 μ m (A-C) bzw. 30 μ m (D-G).

stellung von Mikrotubuli zu erreichen, ist es essentiell, Zellen sowie Reagenzien bis zur Fixierung bei 25-37 °C zu halten. Lösungen also vor dem Gebrauch anwärmen! Der Fixierungsprozess wird am besten in 24 Well-plates (Nunc)

durchgeführt.

d) Kofärbungen

Hintergrund: Kofärbungen dienen zur gleichzeitigen Lokalisierung verschiedener Proteine in der Zelle. Dazu braucht

man Antikörper aus verschiedenen Spezies, z.B. anti-Tubulin Antikörper aus Maus und anti-Vinculin Antikörper aus Kaninchen. Nur so ist es möglich, die verschiedenen Proteine selektiv mit sekundären Antikörpern und einem ent-

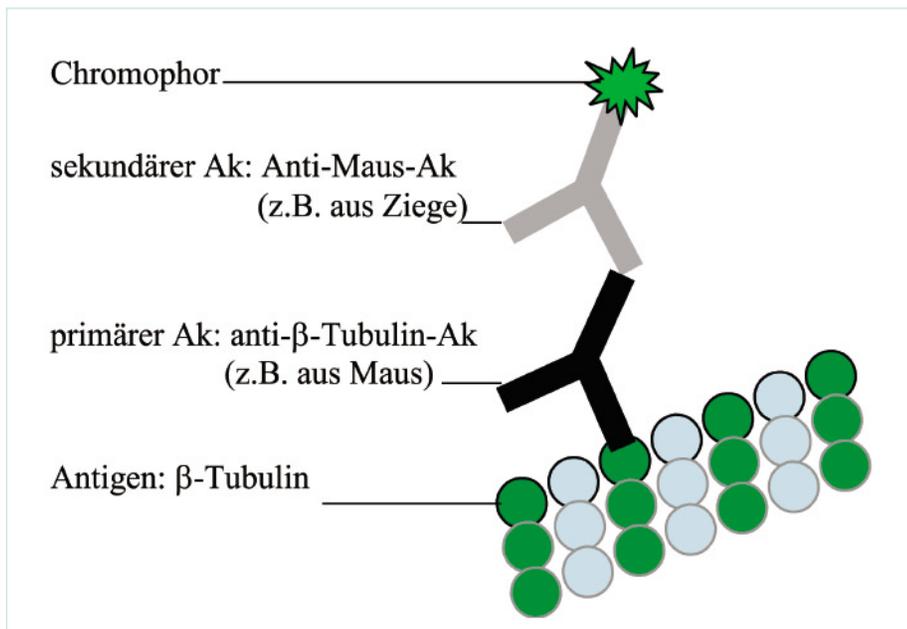


Abbildung 2: Prinzip der Immunfluoreszenzfärbung mit primärem und sekundärem Antikörper am Beispiel des β -Tubulins. Der primäre Antikörper erkennt das spezifische Antigen, der sekundäre ist gegen die schwere Kette des ersten gerichtet und mit einem Chromophor gekoppelt. Das Lichtsignal des Chromophors wird im Mikroskop detektiert.

So wird's gemacht: Das Aktin-Zytoskelett von Makrophagen kann durch Zugabe von Substanzen wie Cytochalasin D (2 μ M, Stocklösung in EtOH oder DMSO) oder Tyrosinkinase-Inhibitoren wie PP2 oder PP3 (25 μ M, Stocklösung in DMSO; alle Sigma) zum Medium mit anschließender Inkubation von 1 h zerstört werden. Bisweilen treten dabei irreguläre Aktinverklumpungen auf (Abb. 1F). Man sollte unbedingt darauf achten, daß die DMSO-Endkonzentration unter 0,5% liegt, da es auf Zellen toxisch wirkt.

b) Mikrotubuli

Hintergrund: Das Gleichgewicht zwi-

sprechenden Chromophor zu markieren (Abb. 2; z.B. Tubulin grün mit Alexa-488-markiertem sekundärem Kaninchen-anti-Maus Antikörper und Vinculin rot mit Alexa-568-markiertem sekundärem Ziege-anti-Kaninchen Antikörper). Die digitale Überlagerung der Einzel-färbungen erlaubt die gleichzeitige Lokalisation der Proteine. Das Auftreten einer Mischfarbe (z.B. gelb aus rot und grün; Abb. 1C) zeigt eine Überlagerung der Signale an. Achtung: Eine tatsächliche Kolokalisation kann nur im Konfokalmikroskop überzeugend nachgewiesen werden. Eine Kolokalisation allein sagt auch nichts über eine mögliche Interaktion der detektierten Proteine aus. Sie stellt aber zumindest ein wertvolles Indiz dar.

So wird's gemacht: Die Präparate werden nacheinander mit den jeweiligen primären Antikörpern (mit dazwischengeschalteten Waschschrritten) inkubiert. Sekundäre Antikörper (oder auch Phalloidin zur F-Aktin Färbung), die jeweils mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt sind, kann man in einem abschließenden gemeinsamen Schritt zugeben. Die Färbungen können nun unter Verwendung verschiedener Filter unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

● Manipulation von Zytoskelett-Elementen

a) F-Aktin

Hintergrund: Die Stabilität von Aktin-Filamenten läßt sich durch eine Reihe von Substanzen beeinflussen, die zu meist zum Abbau der Filamente führen. So verursacht z.B. Cytochalasin D über

eine Bindung an G-Aktin sowie über ein Abstoppen des Filamentwachstums („Capping“) eine langsame Depolymerisierung des F-Aktins. Auch eine Hemmung von Tyrosinkinasen, z.B. durch den Inhibitor PP2, führt zur Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts (1).

Protokoll 1:

AKTIN-FÄRBUNG

- > **Fixierung** (10 min): 3,7 % Formaldehyd in PBS
- > **Lyse** (5 min): Aceton (-20 °C)
- > **Waschen** (5 min): PBS/1% BSA
- > **Färbung mit Phalloidin** (20 min):
Phalloidin (z.B. Alexa 568-markiertes Phalloidin; Molecular Probes), 1:200 in PBS (s. Abb. 3A)
- > **Waschen:** (3x5 min) in PBS
- > **Einbetten:** Coverslips in Moviol (Calbiochem) einbetten, das *p*-Phenylendiamin (Sigma) als anti-fading Substanz enthält. Versiegeln der Proben mit Nagellack (s. Abb. 3B).
Die Präparate sind bei 4°C einige Monate haltbar.
- > **Färbung mit anti-Aktin Antikörper**
(auch zur Darstellung anderer Zytoskelettkomponenten durch entsprechende Antikörper)
- > **Blocken** (15 min): 5% Human-Serum und 5% normal goat Serum in PBS/1% BSA
- > **Waschen:** (3x5 min): in PBS/1%BSA
- > **Färbung 1. Ak** (s. Abb. 3A; 45 min):
anti-Aktin Ak: MAB 1501 (Sigma), 1:200 in PBS
- > **Waschen:** (3x5 min) in PBS
- > **Färbung 2. Ak** (s. Abb. 3A, 30 min):
Sekundär-Antikörper, mit Chromophor gekoppelt (z.B. Alexa 568-markierter Ziege anti-Maus AK; Molecular Probes, s. Abb. 3A), 1:200 in PBS
- > **Waschen** (3 x 5 min): in PBS
- > **Einbetten** (s. Abb. 3B):
Coverslips in Moviol mit *p*-Phenylendiamin einbetten. Präparate mit Nagellack versiegeln (testen: manche Marken zeigen Autofluoreszenz !).

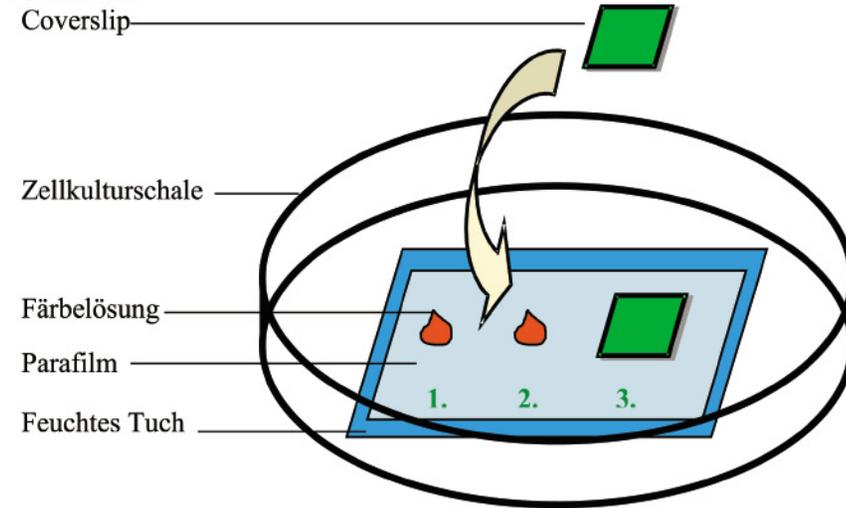
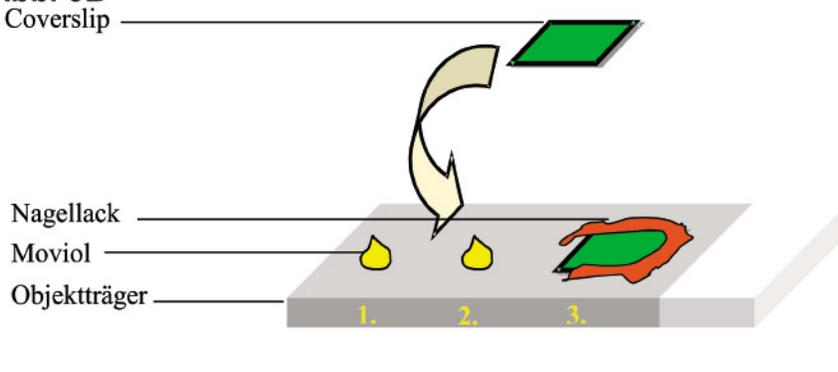
Abb. 3A

Abb. 3B


Abbildung 3A: Schematische Darstellung des Block- bzw. Färbevorgangs bei der Herstellung von fluoreszenzmarkierten Präparaten. Makrophagen wurden für 5 Tage auf Coverslips kultiviert und anschließend fixiert. Die Coverslips werden mit den Zellen nach unten auf einen Tropfen Färbelösung (ca. 30 µl) auf Parafilm gelegt und in einer feuchten Kammer inkubiert (Einzelheiten s. Text).

Abbildung 3B: Schematische Darstellung der Einbettung nach abgeschlossener Färbung. Die Coverslips werden mit der Zellschicht nach unten auf den Objektträger gelegt, und die Zellen damit im Moviol eingebettet. Die Abdichtung erfolgt mit Nagellack (Einzelheiten s. Text).

GTPase Rho) zu einem Zusammenkrampfen der Zellen. Durch niedrigere Dosierungen und längere Einwirkzeiten kann dieser Effekt reduziert werden. Nocodazol-/Vinblastin-Effekte sind zudem reversibel: nach 20 minütigem Auswaschen der Substanzen beginnen die Mikrotubuli, sich wieder neu zu formieren. Dabei mehrfach das Medium wechseln.

Zur Stabilisierung der Mikrotubuli eignet sich Paclitaxel (100 µM in DMSO; Sigma). Die Mikrotubuli sind dann auch bei weiteren Manipulationen nicht mehr so empfindlich, z.B. bei Kälteschock. Auch dieser Effekt ist durch Auswaschen umkehrbar.

schen ständigem Auf- und Abbau der Mikrotubuli lässt sich durch mehrere Substanzen beeinflussen, die nicht nur in der Zellkultur, sondern zum Teil auch für die Therapie am Menschen von Bedeutung sind (z.B. Taxol in der Tumorthherapie). Destabilisierung der Mikrotubuli lässt sich durch Substanzen wie Nocodazol oder Vinblastin erreichen, wobei die jeweiligen Mechanismen unterschiedlich sind: Vinblastin führt zur Ausbildung von Parakristallen im Zytoplasma (3,4), während Nocodazol durch eine Konformationsänderung im Tubulinmolekül die Polymerisierung verhindert (5). Eine Stabilisierung der Mikrotubuli lässt sich durch Substanzen wie Taxol oder sein Derivat Paclitaxel erreichen (6).

So wird's gemacht: Zur Depolymerisierung der Mikrotubuli können z.B. Nocodazol (1 µM in DMSO) oder Vinblastin (1 µM in DMSO; beide Sigma; Abb. 1E) dem Medium zugegeben werden (1 h einwirken lassen). Auch Kälte führt zur Depolymerisierung der Mikrotubuli, allerdings ist dieser Stimulus sehr schlecht dosierbar.

Eine zu hohe Dosis von Mi-

krotubuli-destabilisierenden Substanzen führt (über Aktivierung der kleinen

Protokoll 2:
TUBULIN-FÄRBUNG

- > Lyse (1 min):
in 50% PHEM-Puffer (25 mM HEPES, 20 mM PIPES, pH 6,1; 4 mM EGTA, 1 mM MgCl₂) + 1 mM Vanadat/5% Hexylenglycol/1% Brij 58
- > Waschen (1 min): in 50% PHEM
- > Fixierung (10 min): in 50% PHEM/1% Glutaraldehyd
- > Waschen (5 min): in PBS/1%BSA
- > Blocken (15 min): in 5% Human-Serum und 5% normal goat Serum in PBS/1% BSA.
- > Waschen (3x5 min): in PBS/1%BSA
- > Färbung 1. Ak (s. Abb. 3A; 45 min):
Viele kommerzielle anti-Tubulin Ak sind verfügbar, z.B. "monoclonal mouse anti-α-tubulin clone B 512" oder "monoclonal mouse anti-β-tubulin clone 2.1." (beide Sigma), Antikörper in PBS verdünnen, diese beiden ca. 1:100.
- > Waschen: (3x5 min) in PBS
- > Färbung 2. Ak (s. Abb. 3A, 30 min):
Sekundär-Antikörper, mit Chromophor gekoppelt (s. Abb. 2; z.B. Alexa 488- oder 568-markiertes Ziege anti-Maus; Molecular Probes), 1:200 in PBS
- > Waschen: (3x5 min) in PBS
- > Einbetten (s. Abb. 3B): s. Protokoll 1
Die Präparate sind bei 4°C einige Tage/Wochen haltbar (Tubulin-Präparate sind instabil!).

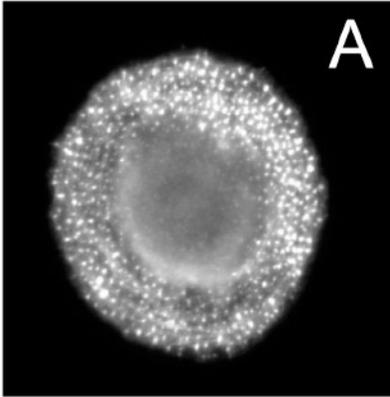
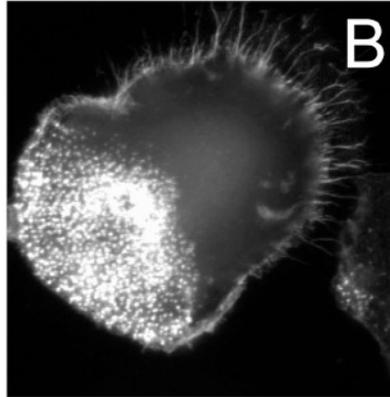
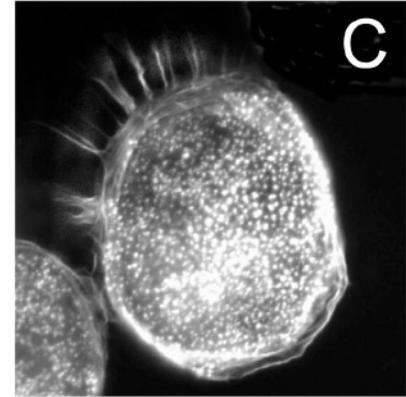
unbehandelt

stimuliert

stimuliert + Paclitaxel


Abbildung 4: Verhinderung der Mikrotubuli-Dynamik beeinträchtigt die Polarisation primärer Makrophagen. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines primären Makrophagen, Aktin-Zytoskelett mit Rhodamin-Phalloidin gefärbt (A, B, C). Ruhender Makrophage (A), nach Behandlung mit einem chemoattraktiven Stoff kommt es zur Polarisation der Zelle, gekennzeichnet u.a. durch Elongation und Ausbildung von fadenartigen, aktinreichen Strukturen, den Filopodien sowie Rekrutierung der Podosomen zum rückwärtigen Zellende (s. (7); B). Bei Zellen, die mit 100 μ M Paclitaxel vorbehandelt wurden, werden Mikrotubuli stabilisiert und ihre Dynamik somit verhindert. Eine vollständige Polarisation ist nicht mehr möglich: Filopodien werden teilweise ausgebildet, Elongation und Podosomen-Umorientierung sind jedoch verhindert (C). Seitenlänge der Bilder: 30 μ m.

c) Effekte auf Zellfunktionen

Die angeführten Substanzen ermöglichen es, Teile des Zytoskeletts gezielt zu beeinflussen und die Auswirkung dieser Manipulation auf bestimmte Zellfunktionen zu untersuchen (Abb. 4). Dabei werden Aktin-Filamente primär

nicht durch Mikrotubuli-stabilisierende oder -destabilisierende Substanzen beeinflusst. Dies gilt auch im umgekehrten Fall (Abb. 1D-G). Allerdings kommt es durch Störung der Transportfunktion der Mikrotubuli in Makrophagen sekundär zu Störungen im Aktin-Zytoskelett (1).

● LITERATUR

1. Linder S. et al. J Cell Sci 113, 4165, 2000
2. Mitchison T et al. Nature 312, 237, 1984
3. Takanari H et al. Biol Cell 70, 83, 1990
4. Rai SS et al. J. Biol Chem 271, 14707, 1996
5. Lee JC et al. Biochemistry 19, 6209, 1980
6. Nogales E et al. Cell 96, 79, 1999
7. Linder S et al. Immunol Aktuell, 1, 52, 2000