

Licht als Werkzeug in der Zell- und Molekularbiologie

Anwendungen in der Herzforschung

Ein beliebtes Motiv in manchen TV-Serien ist der Notarzt, der den Brustkorb eines Bewusstlosen mit Elektroschocks behandelt, um dessen Herz wieder zu kraftvollen Pump-Schlägen anzuregen. Was geschieht hier? Die pumpenden Kontraktionen des Herzens sind in zuckende Mikrokontraktionen (Fibrillationen) übergegangen. Molekular bedeutet dies, dass Calcium-Wellen, welche unkorrelierte Kontraktionen einzelner Herzmuskelzellen zum Schlagen des ganzen Herzens koordinieren, in Partialwellen zerfallen. Es entstehen autonome Zentren, die unabhängig von Nachbarzentren agieren. Ursache hierfür ist u.a., dass sich die geordneten Calcium-Wellen, welche in einem gesunden Herzen über alle Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) laufen, an Fibroblasten-Narben eines früheren, vielleicht sogar nie erkannten, Herzinfarkts brechen und so zerfallen.

Laser-Mikrostrahl: Von der Mikroinjektion zur Zellfusion

Für das Studium von Details dieser Vorgänge haben sich zwei mikroskopische Techniken als hilfreich erwiesen: der (Laser-) Mikrostrahl und die optische Pinzette. Der Mikrostrahl mit einer scharf in ein Mikroskop fokussierten klassischen Lichtquelle wurde bereits 1912 von einer deutschen Arbeitsgruppe [1] vorgestellt. Heute wird als Lichtquelle oft ein UV (337 nm) Stickstofflaser (Kosten ca. 7.000 €) verwendet, der ultraviolette Pulse von wenigen Nanosekunden Dauer liefert. In letzter Zeit gibt es auch Vorschläge, einen Titan Saphir-Femtosekunden Laser einzusetzen (siehe z.B. [2]), der allerdings um einen Faktor 10–20 teurer ist, wobei der Mehrpreis aber nur in einigen speziellen Anwendungen gerechtfertigt ist. Ein breites Feld von biologischen Anwendungen, die an Schneiden, Schweißen und Bohren in industriellen Prozessen erinnern, wurde vor allem von der US Arbeitsgruppe Berns [3] und von unserer Arbeitsgruppe (siehe z.B. [4]) aufgezeigt. Hierzu gehören u.a. die Mikrodissektion von Chromosomen [5], das Isolieren von Einzelzellen aus Gewebsschnitten (siehe z.B. [6]) die Mikroinjektion von Makromolekülen, u.a. auch von funktionellen Genen, in Zellen [7] und die Fusion von Zellen unter kompletter Sichtkontrolle [8].

Die optische Pinzette und die EMFA Technik

Zu dem Laser Mikrostrahl ist 1987 die optische Pinzette hinzugekommen [9].

Hier wird ein Infrarot Laser (oft ein im nahen Infrarot bei 1064 nm arbeitender Nd:YAG Laser mit einer mittleren Leistung von einigen 100 Milliwatt, Preis ab 15.000 €) ebenfalls durch das Mikroskop-Objektiv mit hoher numerischer Apertur fokussiert. Lichtdruck und optische Gradientenkräfte wirken dann so, dass ein Mikrometer großes Objekt im Fokus dieses Lasers festgehalten wird. Durch Bewegen des Fokus kann man dann Objekte gegenüber ihrer Umgebung bewegen, z.B. auch im Inneren lebender Zellen. Beide Techniken wurden erstmalig 1989 in einer einheitlichen Mikroskop-Apparatur kombiniert [10], so dass komplette Mikromanipulation von mikroskopischen Objekten, insbesondere von Zellen [11] und Molekülen [12] möglich wurde. Die technische Durchführung ist, zumindest im Prinzip, überraschend einfach. Es werden in den Fluoreszenz-Beleuchtungsgang eines kommerziell erhältlichen Mikroskops zwei halb durchlässige Spiegel eingebaut, über die je einer der Laser der Fluoreszenz-Beleuchtung überlagert wird. Das Mikroskop-Objektiv fokussiert die beiden Laser in die Brennebene.

Zum Aufbau einer solchen Apparatur benötigt man also ein kommerziell erhältliches Fluoreszenzmikroskop, wobei für die Manipulation und Beobachtung nicht belebter Objekte oft ein aufrechtes Mikroskop, bei dem das Objektiv von oben auf die Probe schaut, vorzuziehen ist. Dagegen ist für Anwendungen in der Biologie meist ein inverses Mikroskop besser geeignet. Prinzipiell ist der Aufbau also sehr einfach. Allerdings liegen,

wie so oft, die Schwierigkeiten im Detail: Zum Beispiel muss die Apparatur für jeden Experiment-Typ leicht modifiziert werden.

Beide Werkzeuge, Laser-Mikrostrahl und optische Pinzette, können zur Klärung interessanter Teilaspekte der oben beschriebenen Herzprobleme eingesetzt werden. Wie oben schon bemerkt, spielen bei der Koordination des Schlagens eines Herzens Calcium-Wellen eine wichtige Rolle, und dies kann man an Herzgewebe *in vitro* studieren [13].

Calcium-Wellen können mit der optischen Pinzette induziert werden – in Monolagen von Herzmuskelzellen, aber auch von Fibroblasten

Hierzu wurden Herzen von Hühnerembryonen verwendet, die man relativ einfach aus angebrüteten Hühnereiern isolieren kann. Besser wäre natürlich menschliches Herzgewebe, das aber praktisch lebend für solche Experimente nicht verfügbar ist, oder Gewebe aus Mäuseherzen. Die unten beschriebenen Experimente stellen daher einen Kompromiss dar, mit dem Vorteil der leichten Verfügbarkeit und dem Nachteil, dass dies nur begrenzt als Modell für menschliche Herzinfarkte verwendbar ist.

Wenn man Kardiomyozyten von Hühnerembryonen zu einem Zellverband rekonstituiert und eine dieser Zellen mechanisch stimuliert, wird Calcium freigesetzt, das durch geeignete, Calcium-empfindliche Fluoreszenzfarbstoffe (Orange Green 488, BAPTA-1, AM) sichtbar gemacht werden kann. Der Anstieg

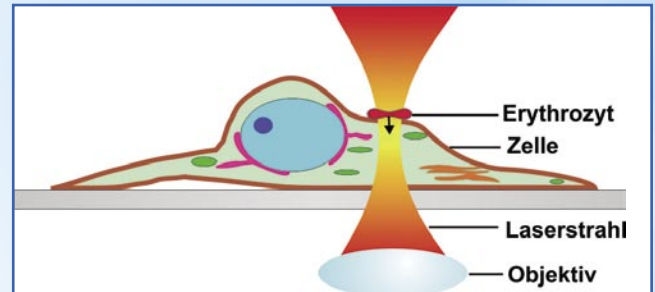


Abb. 1: Prinzip der EMFA Technik: Ein Erythrozyt wird mit der optischen Pinzette erfasst und auf die zu vermessende oder zu stimulierende Zelle gedrückt. Da der chemisch behandelte Erythrozyt sehr viel härter ist als die Zielzelle (hier ein Fibroblast), wird die Kraft quantitativ übertragen.

der Calcium-Konzentration koppelt dann auf Nachbarzellen über, so dass sich innerhalb von wenigen Sekunden eine Calcium-Welle über das gesamte Gewebe ausbreitet. Diese reguläre Welle bringt das Gesamtgewebe zum koordinierten „Schlagen“. Die mechanische Stimulation wird mit der optischen Pinzette erzeugt, allerdings nicht direkt, sondern mit einem entsprechend präparierten Erythrozyten als „Griff“ zur Übertragung der Kraft. Die Technik haben wir als „Erythrocyte Mediated Force Application“ (EMFA) bezeichnet (13). Details der EMFA Technik sind in Abbildung 1 dargestellt.

Calcium-Wellen lassen sich auch bei Maus-Fibroblasten erzeugen (Abb. 2)

Dieses Experiment ist aus folgendem Grund besonders interessant: Hier handelt es sich um eine Monolage von Fibroblasten, von denen generell angenommen wird, dass sie, im Gegensatz zu den Kardiomyozyten, nicht erregbar sind und daher keine Calcium-Wellen auslösen. In Abbildung 2 ist aber deutlich erkennbar, dass bei Stimulation mit Hilfe der EMFA Technik in der Tat Calcium-Wellen über den gesamte Zellrasen laufen. Offensichtlich liegt hier eine physikalisch-chemische Randbedingung vor, bei der auch „Narbgewebe“ für Calcium-Wellen transparent ist. Aufgrund dieser Beobachtung kann man nun eine Serie von Experimenten vorschlagen, welche die Erhöhung der Transparenz von Fibroblasten-Narben durch (potentielle) Medikamente zum Inhalt haben. Wenn man hierbei zunächst bei dem Hühnerembryo-Modell und der vergleichsweise einfachen EMFA Technik bleibt, lassen sich in einer Art „High Throughput“ Verfah-

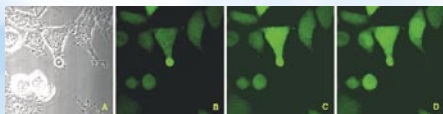


Abb. 2: Ausbreitung des Calcium Signals nach Druck auf einen der Fibroblasten im Zellrasen. Ganz links: Durchlichtaufnahme. Dann von links nach rechts drei verschiedene Stadien der Entwicklung der Calcium-Welle, Gesamtzeit ca. 5 Sekunden.

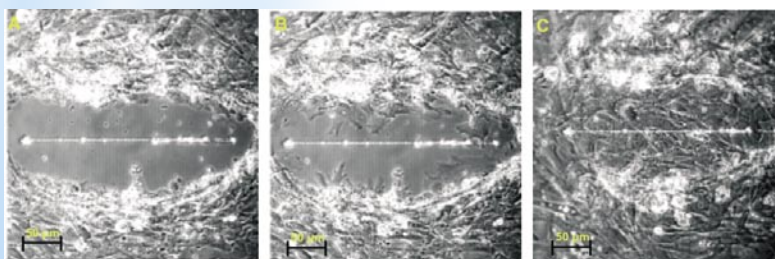
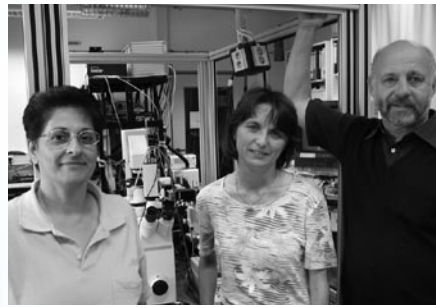


Abb. 3: Laserinduzierte Verletzung in rekonstituiertem Herzgewebe von Hühnerembryonen. Links: Unmittelbar nach der Verletzung. Mitte: Nach 5 Stunden. Rechts: nach 18 Stunden. Die jeweils sichtbare Linie in der Bildmitte ist eine Beschädigung des Objektträgers durch den Laser-Mikrostrahl und damit für das Experiment uninteressant.



Shamci Monajembashi, Birgit Perner, Karl Otto Greulich. Im Hintergrund : die Laser Mikrostrahl / Optische Pinzette – Gesamtapparatur.

ren eine Reihe geeigneter Substanzen ermitteln, die dann am Maus-Modell und später in klinischen Tests perfektioniert werden könnten. Am Ende stünde ein Medikament, welches das Risiko tödlicher Fibrillationen reduziert.

Verletzungen durch den Laser-Mikrostrahl heilen in 18 Stunden aus, bilden aber Narben

Nicht nur die optische Pinzette und die auf ihr aufgebaute EMFA Technik können dazu beitragen, Probleme im Zusammenhang mit Herzinfarkten besser zu verstehen. Der Laser Mikrostrahl kann wie ein extrem feines Skalpell eingesetzt werden, um gezielt Läsionen in Herzgeweben anzubringen und den darauf folgenden Heilungsprozess zu studieren.

Abbildung 3 A (links) zeigt das Gewebe unmittelbar nach der Verletzung, Abbildung 3 B (Mitte) die Situation nach 5 Stunden. Man sieht deutlich wie erste Zellen in den leeren Bereich einwachsen und beginnen, die Lücke zu schließen. Nach 18 Stunden ist die Lücke geschlossen (Abb. 3 C). Allerdings handelt es sich überwiegend um dunkle, spindelförmige Fibroblasten. Es ist also eine der gefürchteten Narben entstanden. Besser wäre es, wenn der Anteil der im Mikroskopbild hell erscheinenden Kardiomyozyten sehr viel höher, idealerweise 100%, wäre. Dann wäre die Lücke komplett mit Herzmuskelgewebe ausgefüllt worden, d.h. eine Narbe wäre gar nicht erst entstanden. Da unser Modellsystem wie-

derum, wie oben, für „High Throughput“ geeignet ist, bietet es sich an, Substanzen zu suchen, die das Einwachsen von Kardiomyozyten fördern. Überraschenderweise gibt es bereits ein solches Molekül: der „Insulin Like Growth Factor“, IGF 1. Mäuse oder Schweine, denen man das Gen für IGF 1 (14) ins Genom eingebaut hat, bekommen nach Herzverletzungen keine Narben und werden auch viel älter als entsprechende Kontrolltiere. Natürlich ist eine solche Strategie beim Menschen nicht anwendbar. Daher steht hier noch eine lange systematische Suche nach geeigneten Substanzen aus.

Insgesamt zeigt sich, dass eine Kombination von Laser Mikrostrahl und optischer Pinzette ein Instrument darstellt, das in der Biologie und Biomedizin vielseitig einsetzbar ist und als Mikroskopie-Variante auch leicht erlernbar ist.

Referenzen

- [1] Tschachotin S.: Biol.Zentralblatt 32, 623–630 (1912)
- [2] König K. und Tirlapur U.: Nature 418, 290 (2002)
- [3] Berns M.w. *et al.*: Science 213, 505–513 (1981)
- [4] Greulich K.O.: Micromanipulation by Light : The Laser Microbeam and Optical Tweezers, Birkhäuser Basel, 1999
- [5] Monajembashi S. *et al.*: Exp.Cell Res. 167,262–268 (1986)
- [6] Schütze K. *et al.*: Laser Pressure Catapulting. In: DNA Microarrays ed. Bowtell D. and Sambrook J., CSHL Press NewYork, 331–356 (2002)
- [7] Weber G. *et al.*: Naturwissenschaften 75, 36–38 (1988)
- [8] Wiegand R. *et al.*: J. Cell Sci 88, 145–153 (1987)
- [9] Ashkin A. *et al.*: Optics Letters 11, 288–290 (1986)
- [10] Greulich K.O. *et al.*: Labor 2000, 36–42, (1989)
- [11] Seeger S. *et al.*: Cytometry 12, 497–504 (1991)
- [12] Schäfer B. *et al.*: Angew. Chem. Int. Ed., 4663–4666 (2001)
- [13] Perner B. *et al.*: Proceedings of SPIE 5514, 179–188 (2004)
- [14] Kotlyar A-A. *et al.*: Heart 86, 693–700 (2001)

Dr. Shamci Monajembashi
Dr. Birgit Perner
Prof. Dr. Karl Otto Greulich
 Institut für Molekulare Biotechnologie
 Beutenbergstr. 11
 07745 Jena
 kog@imb-jena.de
<http://imb-jena.de/greulich>