

Cytologie Praktikum

PD Dr. W. Bleiß
Humboldt-Universität zu Berlin
WS 1998/99

Mitschrift
© Till Biskup
1999

Inhaltsverzeichnis

1 Bau pflanzlicher Zellen	1
1.1 Grundlagen lichtmikroskopischer Arbeitstechniken	1
1.2 Grundbauplan pflanzlicher Zellen	1
1.3 Charakterisierung der selektiven Permeabilität von Biomembranen	2
1.4 Einführung in die Herstellung von Dauerpräparaten	2
2 Zellzyklus / Mitosestadien / Chromosomenbau	4
2.1 Chromatin	4
2.2 Chromosomen	5
2.3 Ablauf der Mitose	7
2.4 Aufbau des Spindelapparates	8
3 Bau tierischer Zellen	9
3.1 Übersicht über Zellen und Gewebe humanbiologischer und zoologischer Präparate	9
3.2 Sex Chromatin / BARR-Körperchen	10
3.3 Identifizierung von Blutzellen	11

1 Bau pflanzlicher Zellen

1.1 Einführung in die Grundlagen lichtmikroskopischer Arbeitstechniken

- Auflösungsvermögen
 - menschliches Auge: 0,1mm
 - Lichtmikroskop: 200-300 nm, mit UV-Lichtmikroskopie maximal 100 nm
 - Elektronenmikroskop: maximal 1 nm
- Gesamtvergrößerung
 - Objektiv x Okular x Tubusfaktor
 - Objektiv x Projektiv x Konusfaktor
- Berechnung des Auflösungsvermögens
 - α — Öffnungswinkel des Objektivs
 - n — Brechungsindex des Mediums
 - λ — Wellenlänge des verwendeten Lichtes

$$d = \frac{\lambda}{n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}}$$

$$\text{numerische Apertur n. A. (A)} = n \cdot \sin \frac{\alpha}{2}$$

$$\text{mit Kondensator} \quad d = \frac{\lambda}{2 \cdot A} = \frac{550nm}{2 \cdot 1,5 \cdot 0,9} \approx 200nm$$

- Faustregel für die förderliche Vergrößerung: 500-100fache n. A.
- Anforderungen an das mikroskopische Präparat
 - optimaler Erhaltungszustand
 - optimale Objektstärke (Schnittstärke)
 - Tiefenschärfe
 - optimaler Kontrast
- Köhlersches Beleuchtungsprinzip
 - optimale Justierung der Lampe
 - Justierung des Kondensators

1.2 Grundbauplan pflanzlicher Zellen

- Protoplasma
 - alle Zellbestandteile einschließlich der Zellorganellen und des Zellkerns
- Protoplast
 - Zelle ohne Zellwand
- Cytoplasma
 - kolloidales (feinstverteiltes) Medium, in dem sich die Membransysteme, Zellorganellen und der Zellkern befinden
- Zellwand
 - Primärwand
 - * bei allen wachstumsfähigen Zellen
 - * ca. 90% Polysaccharide

- Cellulose
- Hemicellulose
- Pektin
- * ca. 10% Proteine
 - Strukturproteine
 - Enzyme
- * Dicke während des Wachstums konstant ca. 0,3 μm
- Sekundärwand
 - * Dicke mehrere μm

1.3 Charakterisierung der selektiven Permeabilität von Biomembranen

- Plasmolyse
 - Abheben des Protoplasten von der Zellwand unter dem Einfluß osmotisch wirksamer (hypertonischer) Lösungen
 - osmotischer Wasserentzug aus einer Zelle
- Osmose
 - Diffusion durch eine selektiv permeable Membran
- Diffusion
 - Transport der Teilchen von Flüssigkeiten und Gasen durch thermische Eigenbewegung

1.4 Einführung in die Herstellung von Dauerpräparaten

Fixierung

- Aufgabe
 - Stabilisierung der Strukturen an ihrem Platz in naturgetreuem Zustand
 - Stoffwechselprozesse unterbrechen
- physikalische Fixierung
 - Kryofixierung
 - * schockartiges Abkühlen auf $-190 - -270^{\circ}\text{C}$
 - * Einschluß in flüssigen Stickstoff, Helium oder Propan
 - * Verhinderung von Zellschädigungen durch Phasentrennung und Eiskristallbildung durch
 - Durchtränkung der Proben mit Frostschutzmitteln (Glycerin)
 - Schockgefrieren auf Tiefsttemperaturen ($\geq 10.000^{\circ}\text{C/s}$)
- chemische Fixierung
 - besonders für Proteine und Lipide
 - Lipide: OsO_4 (*Osmiumsäure*)
- 1. Denaturierung
 - Wasserentzug (Alkohol, Aceton)
 - Ansäuern
- 2. Vernetzen durch Aldehyde
 - Formaldehyd
 - Glutaraldehyd
- Fixiergemische

1. formalinhaltige Gemische
 - Bouin
 - * 15 T. ges. Pikrinsäure : 5 T. Formalin : 1 T. Eisessig
 - AFE
 - * 19 T. Alkohol (50–70%) : 1 T. Formalin : 1 T. Eisessig
2. formalinfreie Gemische
 - Carnoy
 - * 6 T. Ethanol (100%) : 3 T. Chloroform : 1 T. Eisessig
- Fixierung (besonders tierischer) Präparate
 - Immersionsfixierung
 - * in Scheiben oder Blöcken direkt in Lösung fixieren
 - Perfusionsfixierung
 - * Injektion der Fixierlösung (?)
 - * gefolgt von Immersionsfixierung

Schnitte

- Paraffinmethode
 - Paraffinschnitte 5-10 μm
 - Mikrotomarten
 - * Rotationsmikrotom
 - * Schlittenmikrotom
- Kunststoffeinfettung
 - Kunststoff härter
 - dünnere Schnitte
 - * Semidünnschnitte (LM)
 - 1 μm
 - * Ultradünnschnitte (EM)
 - 50–100nm
 - Glasmesser / Diamantmesser
- Objektgröße
 - LM ca. 5mm
 - EM ca. 1mm³, Schnittflächen 0,3 x 0,2mm

Färbung

- Aufgabe
 - zur optischen Kontrastierung
 - konventionelle LM
 - * meist Schnitffärbungen
 - Fluoreszenzmikroskope
 - * mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen
 - * Immunfluoreszenz
- histologische Färbungen
 - Übersichtsfärbungen
 - Doppel-, Dreifach- oder Mehrfachfärbungen
 - * Bsp.: H. E.: **H**ämalaun (Kerne, blau), **E**osin (Cytoplasma, rot)

- histochemische Nachweisreaktionen
 - chemische Reaktionen
 - “physikalische” Färbungen
- PAS-Färbung
 - mit Hilfe von fuchsin-schwefeliger Säure (SCHIFFSches Reagenz)
 - bildet mit mindestens zwei Aldehydgruppen rot-violetten Farbkomplex
 - PAS-reaction = **p**eriodic **a**cid **S**chiff's reaction

2 Zellzyklus / Mitosestadien / Chromosomenbau

2.1 Chromatin

- [1, S. 154ff.]
- Gesamtheit des genetischen Materials in der Interphase des Zellzyklus
- filamentöser Komplex aus
 - DNA ca. 40%
 - Proteinen (Histone, chromosomale Nicht-Histon-Proteine) ca. 50%
 - RNA ca. 10%
- Organisationsformen des Chromatins
 1. Euchromatin
 - schwach kondensiert
 - transkriptionsaktiv
 2. Heterochromatin
 - stark kondensiert
 - transkriptionsinaktiv
 - zwei Formen:
 - * *konstitutives* Heterochromatin
 - in allen Zellen
 - * *fakultatives* Heterochromatin
 - in einigen Zelltypen
 - *Sex Chromatin*, refsex chromatin S. 10
- drei Strukturen von mit Histonen komplexierter DNA [1, S. 154ff.]
 1. Nucleosomenstruktur
 - “Perlenkette”
 2. Nucleofilament
 - \varnothing 10 nm
 3. Chromatinfibrille
 - \varnothing 30-45 nm
 - unterschiedliche Kondensationsgrade der Chromatinstränge
 - durch *Histone* bedingt
- Histone
 - fünf Klassen, die regelmäßig im Zellkern vorkommen
 - 120–150 AS-Bausteine
 - H2A, H2B, H3, H4

- * *core-Histone* [7] [3]
- * liegen in konstanten molaren Proportionen 1:1:1:1 vor
- * je zwei Moleküle H2–H4 lagern sich zu Oktamer zusammen
- * bilden *Nucleosomen*
- H1
 - * beteiligen sich nicht am Aufbau der Nucleosomen
 - * Mengenanteil an H1 unterliegt starken Schwankungen
 - * zieht die Nucleosomen zu *Nucleofilamenten* zusammen
- Nucleosomen
 - Histone (H2–H4) und umwickelnde DNA
 - Histon–Oktamere binden in Abständen von 200 Nucleotidpaaren an die Doppelstrang–DNA
 - DNA–Doppelhelix windet sich 1,75 mal um jedes Oktamer
 - Länge der umwickelnden DNA 147 bp
- Linker
 - DNA–Faden zwischen den einzelnen Nucleosomen
 - Länge 0–120 bp
- Nucleofilament
 - “Perlschnur–Form” [6]
 - 10–11 nm
 - besteht aus
 - * aufeinanderfolgenden Nucleosomen
 - * Linker
- *Chromatinfibrille*
 - Solenoid
 - * *Superspirale, super helix*
 - * schraubig angeordnete Nucleosomen
 - * 6 Nucleosomen pro Umlauf
 - Nucleomeren
 - * weniger geordnete, partikuläre Aggregate von Nucleosomen

2.2 Chromosomen

- [1, S. 155ff.]
- im ursprünglichen Sinn *hochkondensierte Chromatinportionen* bei den Eukaryoten
- v. a. bei der Kernteilung sichtbar
- den Chromosomen zugrundeliegende Chromatineinheiten bleiben zwischen den Kernteilungen erhalten
 - in aufgelockerter Form
 - können im Interphasekern nicht mehr erkannt werden
 - in neuerer Zeit Bezeichnung “Chromosom” wesentlich weiter gefaßt:
 - * allgemein Bezeichnung von DNA–Strängen
 - im folgenden Chromosomen–Begriff in seiner engen, ursprünglichen Fassung zu verstehen
- Chromosom in der Metaphase maximal kondensiert

- Chromatiden
 - * spätere Tochterchromosomen
 - * hängen an der Spindelansatzstelle noch zusammen
 - * Teilung an den beiden “Armen” schon vollzogen
- Einteilung der Chromosomen nach Verhältnis der Armlängen
 - *metazentrisch*
 - * Arme etwa gleich lang
 - *submetazentrisch*
 - * Arme ungleich lang
 - *akrozentrisch*
 - * Arme extrem ungleich lang
- SAT-Chromosomen
 - weisen neben dem Centromer noch sekundäre Einschnürung auf
 - * NOR — *Nucleolus Organisator Region*
 - * Ort der Nucleolusneubildung am Ende der Kernteilung
 - Satellit
 - * an das NOR anschließendes Reststück des Chromosomenarmes
 - * mitunter sehr kurz [1]
- Chromozentren
 - bleiben auch während der Interphase kondensiert
 - * *Heteropyknose*
 - häufig Satelliten und Regionen in unmittelbarer Nähe des Centromers
- Heterochromatin
 - von Heteropyknose betroffenes Chromatin
 - wird oft in der Interphase erst nach dem *Euchromatin* repliziert
 - transkriptionsinaktiv
 - Einteilung:
 1. konstitutiv
 - * betreffende Chromosomenabschnitte treten nur hochkondensiert auf
 2. fakultativ
 - * Chromosomen oder Chromosomenabschnitte, die unter anderen Umständen euchromatisch sind
 - * wichtiges Beispiel: *Sex Chromatin* weiblicher Säugetiere
- Euchromatin
 - lockert sich beim Übergang vom Teilungs- zum Arbeitskern auf
- in den Chromosomen des Teilungskerns weder Replikation noch Translation
 - DNA- und RNA-Polymerasen können aufgrund der dichten Packung der DNA und ihrer Maskierung durch Proteine nicht aktiv werden.
- Chromonema [1]
 - feine Fadenstruktur eines Chromosoms
- Chromomeren [1]
 - knotige Verdickungen des *Chromonemas*
 - unregelmäßig
 - für jedes Chromosom charakteristisch

2.3 Ablauf der Mitose

Prophase

- Beginn der Kondensation des Chromatins zu Chromosomen
 - Chromosomen haben sich in der vorausgegangenen S-Phase verdoppelt
 - zwei Schwesterchromatiden werden sichtbar (*Tochterchromosomen* [5])
 - * bestehen aus zwei identischen DNA-Strängen
 - * hängen am Centromer noch zusammen
- Nucleolus löst sich auf
- Beginn der Ausbildung der Mitosespindel außerhalb des Zellkerns [6]
- *Centriolen*
 - haben sich schon vor Beginn der S-Phase zu teilen begonnen
 - organisieren Teilungsspindel (Mitosespindel)
 - * cytoplasmatischen Mikrotubuli (MT) des Cytoskeletts werden depolymerisiert
 - Zelle rundet sich ab
 - * aus dem entstandenen Reservoir an Tubulinuntereinheiten Aufbau der MT der Spindel
 - zunächst sternförmig um die Centriolen angeordnet
 - *Astral-MT*, *Aster*
 - ein Centriolenpaar wandert auf die gegenüberliegende Seite des Zellkerns
 - zwei Aster sichtbar
 - Centriolen bilden nun die beiden Pole der Kernteilungsspindel
 - *Pol-MT*
 - * erstrecken sich von einem Pol bis über den Spindeläquator hinaus
 - * überlappen ein Stück weit mit den vom anderen Pol ausstrahlenden MT
- reife Kinetochoren (Proteinkomplexe) bilden sich an der Centromerregion jeder Schwesterchromatide

Prometaphase

- Auflösung der Kernhülle
 - Überreste unterscheiden sich morphologisch kaum vom ER
- Spindel dringt ins Nucleoplasma ein
- Ausbildung der *Kinetochore*
- Spindelmikrotubuli (*Kinetochor-Mikrotubuli*) setzen an den Kinetochoren an
 - stehen senkrecht zur Chromosomenachse
 - parallel zu den Polfasern
- gleitende Bewegung zwischen den MT bewegt die Chromosomen

Metaphase

- Chromosomen in der Metaphaseplatte angeordnet
 - unter dem Einfluß der Kinetochor-MT
 - senkrecht zur Spindel angeordnet
- Zugkräfte zu beiden Polen gleich

Anaphase

- plötzliche Trennung der Schwesterchromatiden
 - hingen bisher noch an den Centromeren zusammen
- Verkürzung der Kinetochor–Mikrotubuli
 - Chromosomen werden zu den Spindelpolen gezogen
 - Kinetochoren gehen voran
 - * ziehen die Arme der Chromosomen nach
 - Bewegungsgeschwindigkeit ca. 1 μm pro min.
- Pol–MT
 - werden länger
 - gleiten aneinander vorbei
 - * Pole werden voneinander weggestoßen

Telophase

- Tochterchromatiden an den Zellpolen angekommen
- Kinetochor–Mikrotubuli
 - werden zunehmend kürzer
 - depolymerisieren
- Pol–MT
 - verlängern sich zunächst weiter
 - Pole weichen noch weiter auseinander
 - werden dann bis auf einen Rest abgebaut
- Bildung der Kernhüllen
- Chromatin dekondensiert
- Nucleoli bilden sich

2.4 Aufbau des Spindelapparates

- bei Pflanzen keine Centriolen
 - keine notwendige Voraussetzung
- typisch bei Tieren:
 - Centriolen
 - Astral–MT
 - Kinetochor–MT
 - Pol–MT
- Astral–MT
 - Mikrotubuli der Spindel zu Beginn der Kernteilung
 - aus dem entstandenen Reservoir an Tubulineinheiten aufgebaut
 - stehen sternförmig um die Centriolen
- Kinetochor
 - Spindelanheftungsstelle am *Centromer*
 - spezielle, dreischichtige Struktur

- Kinetochor–MT
 - Mikrotubuli, die an den Kinetochoren der Chromatiden ansetzen
 - stehen senkrecht zur Chromosomenachse
 - parallel zu den Pol–MT
- Pol–MT
 - erstrecken sich von einem Pol (*Centriol*) bis über den Spindeläquator hinaus
 - überlappen ein Stück weit mit dem vom anderen Pol ausstrahlenden Pol–MT
- Kinesine
 - [5, S. 356f.]
 - [4, S. 48ff.]
 - MAP's (Microtubule Associated Proteins)
 - Motorproteine
 - verschieben Filamente gegeneinander
 - * *sliding-filament-model*, (Gleitfasermodell) [4]
- vgl auch 2.3, S. 7

3 Bau tierischer Zellen

3.1 Übersicht über Zellen und Gewebe humanbiologischer und zoologischer Präparate

Gewebetypen

- Epithelgewebe
 - geschlossene Zellverbände
 - Zwischenraum zwischen Zellen ca. 20 nm
 - immer mit Basalmembran
 - mehrschichtige Plattenepithelien:
 - * Apoptose
 - * zwei Formen:
 1. unverhornt (Bsp.: Mundschleimhaut)
 2. verhornt (*Cytokeratinfilamente*)
 - vier Gruppen
 1. Oberflächenepithelien
 2. Drüsenepithelien
 3. Myoepithelien
 - * Epithelzellen mit Muskelfunktion
 4. Sinnesepithelzellen
- Gewebe mit Interzellulärsubstanz
 - auch Blut
 - Interzellulärsubstanz beim Blut: Blutplasma
- Muskelgewebe
- Nervengewebe
- Bindegewebe
 - relativ wenige Zellen
 - Bsp.: Fibroblast
 - * bildet interzelluläre Matrix

Baubestandteile der Gewebe mit Interzellulärsubstanz

- Zellen
 - geringgradig differenzierte
 - * Mesenchymzellen
 - spezialisierte
 - * Fibroblasten
 - * Fibrocyten
 - * Chondoblasten
 - * Chondocyten
 - * ...
 - * *Monocyten*
 - * *Granulocyten*
 - * *Lymphocyten*
 - * *Erythrocyten*
 - * *Thrombocyten*
- Interzellulärsubstanzen
 - Flüssigkeiten
 - Grundsubstanzen
 - Fasern

3.2 Sex Chromatin / BARR-Körperchen

- fakultatives Heterochromatin
- nur bei weiblichen Säugetieren
 - Geschlechtsnachweis
- entspricht normalerweise einem der beiden X-Chromosomen
- zufällig, welches der X-Chromosomen aktiv bleibt
- einmal eingetretene Heterochromatisierung wird bei allen Abkömmlingen der einzelnen Embryonalzellen beibehalten
- Beispiele
 - Drumstick
 - * trommelschlegelartig geformter Anhang des Zellkerns von polymorphkernigen *neutrophilen Granulocyten*
 - * vgl. 3.3, S. 12
 - BARR-Körperchen
 - * 1949 von BARR und BERTRAM in den Nervenzellen von Katzen entdeckt
 - * liegt periphär im Zellkern
 - * Inaktivierung des zum Barr-Körperchen werdenden X-Chromosoms scheint zum Ausgleich der Gen-Dosis erforderlich zu sein
 - *Lyon-Hypothese*

3.3 Identifizierung von Blutzellen

- [1, S. 454, 526ff.]
- [5, S. 309ff., bes. 311f.]
- [2, S. 910ff., 934ff.]
- Übersicht
 - *Thrombocyten* (Blutplättchen)
 - *Erythrocyten*
 - *Leukocyten*
 - * Monocyten
 - * Granulocyten
 - eosinophile
 - neutrophile
 - basophile
 - * Lymphocyten

Thrombocyten

- Blutplättchen
- keine Zellen
- kernlose Abschnürungsprodukte von Knochenmarks-Riesenzellen (*Megakaryocyten*)
- am Gerinnungsprozeß maßgeblich beteiligt

Erythrocyten

- rote Blutkörperchen
- hämoglobinhaltig
- O₂-Transport
- Teil des CO₂-Transports
- zahlreichste Blutzellen
 - Mensch: ca. 25 Billionen [2]
- bikonkave Scheibe
- ca. 7,5 µm ø
- bei Säugetieren ohne Zellkern
- keine Mitochondrien
 - ATP-Gewinnung ausschließlich anaerob

Leukocyten

- Monocyten
 - ca 5% der Leukocyten
 - zirkulieren nach ihrer Reifung mehrere Stunden im Blut
 - wandern dann in die Gewebe
 - * Differenzierung zu Makrophagen
- Lymphocyten
 - Zellen des Immunsystems
 - B-Lymphocyt (Plasmazelle)
 - * Antikörperbildung, humorale Immunantwort
 - T-Lymphocyt
 - * zelluläre Immunantwort
 - * Helfer-T-Zelle
 - Initiierung/Verstärkung der Immunantwort
 - * Suppressor-T-Zelle
 - Beendigung/Abschwächung der Immunantwort
 - * Cytotoxische T-Zelle
 - Abtöten fremder/maligner/transformierter Zellen
- eosinophile Granulocyten
 - ca. 1,5% der Leukocyten
 - nur begrenzte Phagocytoseaktivität
 - enthalten große Mengen lytischer Enzyme
 - * in cytoplasmatischen Granula gespeichert
 - Aufgabe: Abwehr größerer Eindringlinge
 - * Bsp.: parasitische Würmer
 - lagern sich an die Außenhülle der Parasiten an
 - lassen dort lytische Enzyme frei
- neutrophile Granulocyten
 - 60–70% der Leukocyten
 - werden durch chemische Signale angelockt (*Chemotaxis*)
 - können die Blutbahn verlassen und durch amöboide Bewegungen in infizierte Gewebe einwandern
 - vernichten Erreger
 - neigen zur Selbstzerstörung bei Vernichtung von Keimen [2]
 - * Lebensdauer nur wenige Tage
 - Drumstick [3]
 - * trommelschlegelartig geformter Anhang des Zellkerns
 - * nur bei Frauen
 - auch hier nur bei kleinem Prozentsatz der Zellen
 - * repräsentiert wie das *Barr-Körperchen* ein X-Chromosom
 - * vgl. 3.2, S. 10
- basophile Granulocyten
 - enthalten Histamin
 - * *inflammatorischer* (entzündungsfördernder) Signalstoff

Literatur

- [1] Czihak, G., Langer, H. , Ziegler, H. (Hrsg.): Biologie. Ein Lehrbuch; Springer, Berlin Heidelberg ⁶1996
- [2] Campbell, Neil A.: Biologie; dt. Übers. hrsg. v. J. Markl; Spektrum Akad. Verl., Heidelberg 1997
- [3] Lexikon der Biologie; Herder, Freiburg 1983-92 u. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg 1994-95
- [4] Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F., Bresinsky, A. (Hrsg.): Strasburger. Lehrbuch der Botanik; Fischer, Stuttgart Jena ³⁴1998
- [5] Wehner, R., Gehring, W.: Zoologie; 23. überarb. Aufl.; Thieme, Stuttgart, New York, 1995
- [6] Bleiß, Dr. W.: Vorlesung Cytologie, HU Berlin, WS 1998/99
- [7] Saumweber, Prof. H.: Vorlesung Allgemeine Zoologie, HU Berlin 1999, WS 1998/99