

Untersuchungen zum Zelltod in
eukaryotischen Zellpopulationen und Einzelzellen
mittels Videomikroskopie und digitaler Bildanalyse

Von der Fakultät Maschinenbau der Universität Stuttgart
zur Erlangung der Würde eines Doktors der
Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.) genehmigte Abhandlung

Vorgelegt von
Kerstin Falkner-Tränkle
aus Heilbronn am Neckar

Hauptberichter: Prof. Dr.-Ing. Dr. h.c. mult. E. D. Gilles

Mitberichter: Prof. Dr.-Ing. U. Reichl

Mitberichter: Prof. Dr. rer. nat. H. Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 21. März 2003

Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik der Universität Stuttgart

2001

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Systemdynamik und Regelungstechnik der Universität Stuttgart. Sie wurde im Rahmen des *Zentralen Schwerpunktprojektes (ZSP) Bioverfahrenstechnik* der Universität Stuttgart vom Land Baden-Württemberg und vom Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft, Forschung und Technologie gefördert.

Mein besonderer Dank gilt dem Institutsleiter Herrn Professor Gilles für die Ermöglichung dieser Arbeit sowie der Bereitstellung der experimentellen Einrichtungen. Herrn Professor Reichl danke ich für die freundliche Übernahme des ersten Mitberichts. Vor allen Dingen danke ich Heinz Wolf für seine Unterstützung in biologischen Fragen, die konstruktive Durchsicht meiner Arbeit und den freundschaftlichen Rückhalt.

Allen Kolleginnen und Kollegen des Institutes danke ich herzlich für das gute Arbeitsklima und die immer vorhandene Diskussions- und Hilfsbereitschaft. Im besonderen gebührt mein Dank der „Biogruppe“ des Instituts, vor allem Marion Fleischer, für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen.

Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Zellbiologie und Immunologie bedanken. Ohne ihre Einsatzbereitschaft bei der Kultivierung eukaryotischer Zellen wären die umfangreichen Experimente nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt gilt mein ganz besonderer Dank meinem Mann Frank und meinen Eltern sowie Schwiegereltern, die mich während der gesamten Zeit unterstützt und in meiner Arbeit bestärkt haben.

Für Frank
und
meine beiden Kinder Pia und Julian

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Kurzfassung	VII
Abstract	IX
1 EINFÜHRENDE ÜBERSICHT	1
1.1 Charakterisierung der Zellvitalität in Zellpopulationen.....	1
1.2 Zellvitalität und Signalübertragung in Einzelzellen bei der Apoptose	4
1.3 Zielsetzung	8
1.4 Kapitelübersicht	12
2 GRUNDLAGEN.....	13
2.1 Biologische Grundlagen	13
2.1.1 Das Zytokin “Tumor Nekrose Faktor”	13
2.1.2 Intrazelluläre Signalkaskaden der TNF-induzierten Apoptose	16
2.2 Videomikroskopie und bildanalytische Grundlagen	20
2.3 Fluoreszenz, Fluoreszenzmarkierung und Fluoreszenzmikroskopie	26
2.3.1 Fluoreszenzmarkierung	26
2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie	28
2.3.3 Quantitative Fluoreszenzmikroskopie.....	30
3 MATERIAL UND METHODEN	32
3.1 Chemikalien und Reagenzien	32
3.2 Antikörper und Zell-Linien	32
3.3 Experimentalmethoden	33
3.3.1 Kultivierung und Ernte eukaryotischer Zellen	33

3.3.2	Farbstoffe und Färbetechniken für die Hellfeldmikroskopie	33
3.3.3	Färbetechniken und Fluorochrome bei Fluoreszenzmarkierung	35
3.3.4	Langzeitversuche unter physiologischen Bedingungen	36
3.4	Digitale Bildanalyse	38
3.4.1	Hard- und Softwarekomponenten	38
3.4.2	Mikroskopische Einstellungen	39
3.5	Statistische Auswertung	40
4	ERGEBNISSE	41
4.1	Automatische Bestimmung der Zellzahl, -form und -vitalität in Zellpopulationen	41
4.1.1	Erkennung toter Zellen	41
4.1.2	Erkennung aller Zellen	44
4.1.3	Vergleich der Methoden	46
4.1.4	Prüfung des experimentellen Vorgehens	50
4.1.5	Zellmorphologie	51
4.1.6	Erweiterung des Systems auf Hybridoma-Zellen	52
4.2	Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung von Signalkomponenten bei der TNF-induzierten Apoptose	53
4.2.1	Bildung von rezeptor-assoziierten Signalkomplexen	53
4.2.2	Quantifizierung der Fluoreszenzsignale	66
4.2.3	Mitochondriale Veränderungen	76
5	DISKUSSION	87
5.1	Videomikroskopische Charakterisierung der Zellvitalität in eukaryotischen Zellpopulationen	90
5.1.1	Bildanalyse	90
5.1.2	Experimentelles Vorgehen	91
5.1.3	Methodenvergleich	91
5.1.4	Morphologie der Zellen	92
5.2	Nachweis intrazellulärer Moleküle und Zellkompartimente bei der Apoptose mittels Fluoreszenz-Videomikroskopie	93
5.2.1	Apparative Ausstattung und Bildanalyse	93
5.2.2	Fluoreszenzmikroskopie allgemein	95
5.2.3	Apoptotische Signalwege	102

6	ZUSAMMENFASSUNG	110
7	LITERATUR.....	112

Abkürzungsverzeichnis

A/D	Analog/Digital
Apaf	apoptosis protease activating factor
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-tri-phosphat
CCD	Charged-Coupled-Device
cIAP	cellular inhibitor of apoptosis
CHO	Chinese Hamster Ovary
DD	Death domain
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra-Essigsäure
Em	Emission
Em _{max}	Emissionsmaximum
Ex	Extinktion
FADD	FAS-associating protein with a novel death domain (= MORT)
FCS	Fetales Kälberserum
FLIP	FLICE inhibitory protein (= Casper, I-FLICE, FLAME)
FLIM	Fluorescence lifetime imaging
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GFP	Green fluorescent protein
h	Stunden
HeLa	humane Epithel-Zellen
Hg	Quecksilber
IKK α,β	I κ B Kinase α,β (= IKK-1, IKK-2)
I κ B	inhibitor of κ B
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'- tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Jodid, T-3168
KDa	Kilo Dalton

Kym	humane Rhabdomyosarcoma-Zellen
LSM	Laser Scanning Mikroskop
LUT	Look-up-Tabelle
min	Minuten
NADH	Nicotinamid-adenosin-dinucleotid
NF κ B	nuclear factor κ B
NIK	NF κ B inducing kinase
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCD	Programmed cell death
PSF	Point-Spread-Function
RIP	Receptor interacting protein
RISC	Receptor induced signaling complex
RNA	Ribonucleinsäure
Rpm	rounds per minute
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNF-R	Tumor Nekrose Faktor receptor
TRADD	TNF-R1-associated death domain
TRAF	TNF receptor associated factor
UV	Ultraviolett
Xe	Xenon

Kurzfassung

Die stetig zunehmende Zahl der biotechnologischen Produktionsprozesse, bei denen eukaryotische Zellen zur großtechnischen Produktion von hochspezifischen pharmazeutischen Substanzen wie z.B. monoklonalen Antikörpern und anderen rekombinanten Wirkstoffen eingesetzt werden, macht eine intensive Prozeßentwicklung bzw. Prozeßoptimierung erforderlich, um sowohl die Qualität als auch die Quantität der Produkte zu verbessern. Weiterhin eröffnen eukaryotische Zellen unter anderem ein enormes Potential in der Grundlagenforschung u.a. zur Aufklärung bisher unverstandener zellulärer Signaltransduktionsvorgänge beim Absterben von einzelnen Zellen. Dieser aktive Sterbeprozess, die sogenannte Apoptose, spielt eine zentrale Rolle bei zahlreichen schweren Erkrankungen wie z.B. Krebs oder der Immunschwächekrankheit AIDS. In beiden Bereichen kommen, wenn auch mit deutlich unterschiedlicher Zielrichtung, neueste computergestützte Analysetechniken zum Einsatz. Eine dieser Techniken stellt die computergesteuerte Videomikroskopie in Verbindung mit der digitalen Bildanalyse dar. Im Hinblick auf die beiden oben beschriebenen, unterschiedlichen Fragestellungen wird die Leistungsfähigkeit eines solchen Systems untersucht.

Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Bildanalyzesystem ist aus Standardkomponenten (Mikroskop, Videokamera, Framegrabber und Personalcomputer) aufgebaut und gewährleistet ein breites Einsatzspektrum bei der visuellen Charakterisierung von Zellen. Um die Vitalität von Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen in Fermentationsprozessen schnell und reproduzierbar quantitativ zu bestimmen, wird ein automatisierter Bildanalyseprozess entwickelt. CHO Zellen kommen in großtechnischem Maßstab bei der Produktion von monoklonalen Antikörpern zum Einsatz. Hier müssen zu einer optimierten Prozeßführung während des Prozesses zahlreiche routinemäßige Bestimmungen der Zellvitalität vorgenommen werden. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die lebenden und toten Zellen

bei der verwendeten CHO-Kultur an Hand einer Vitalfärbung bestimmt werden können. Ein Vergleich zwischen der manuellen Bestimmungsmethode mittels mikroskopischer Auszählung der Zellen und der bildanalytischen Methode zeigt, neben dem enormen Vorteil der raschen Auswertung vieler Proben, unter Einsatz der Bildanalyse auch eindeutig eine bessere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Da das aufgebaute Bildanalyse-System mittels Programm-Makro automatisiert arbeitet, ist eine computergesteuerte on-line Anbindung an Prozeßleitsysteme von Fermentern möglich.

Durch entsprechende Erweiterungen des Bildanalyse-Systems ist es möglich, mit Hilfe fluoreszenzmikroskopischer Methoden hochspezifische Fragestellungen intrazellulärer Signaltransduktionsvorgänge bei der Apoptose in Einzelzellen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen und so die weitere Aufklärung dieser Vorgänge voran zu bringen. Durch die hohe Sensitivität dieser Methoden können sehr geringe Mengen fluoreszierender Moleküle erfaßt und auch quantitative Bestimmungen durchgeführt werden. Da fluoreszenzmikroskopische Messungen sehr schnell erfolgen können, ist es auch möglich, sehr rasche intrazelluläre chemische bzw. strukturelle Änderungen zu verfolgen. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stehen die Lokalisierung und Quantifizierung einzelner Signalmoleküle bei der Bildung von membran-assoziierten Signalkomplexen unter physiologischen Bedingungen sowie die Charakterisierung apoptose-induzierter mitochondrialer Funktionsänderungen. So zeigen die Untersuchungen die Auswirkungen verschiedener Stimulantien und unterschiedlicher Mutanten auf die Bildung der Signalkomplexe und die zeitlichen Abläufe der Translokationsvorgänge. Für den Nachweis der Translokation von TRAF-Molekülen vom Cytoplasma an die Plasmamembran und die Quantifizierung des Signalmoleküls TRAF2 in den Signalkomplexen mit TNF-R2, wird eine temperierbare Zellkammer konstruiert und eingesetzt. Die erhaltenen Daten können in mathematische Modelle für den ersten Teil der apoptotischen Signalkaskade, nämlich die Bindung des Rezeptors an den Liganden und die anschließende Bildung der intrazellulären membran-assoziierten Signalkomplexe, eingebracht werden.

Abstract

The continuously increasing number of biotechnological production processes, for which eucaryotic cells for large-scale production of highly specific pharmaceutical substances such as monoclonal antibodies and other recombinant active substances are applied, requires intensive process development and optimization for improving both the quality and quantity of the products. Eucaryotic cells further enable a tremendous potential in basic research for the investigation of previously unknown cellular signal transduction phenomena during the death of individual cells. This active dying process, the so-called apoptosis, plays a significant role in numerous heavy diseases such as cancer or the immune deficiency disease AIDS. In both areas state-of-the-art computer-aided analysis methods are applied, though with distinctly different objectives. One of these methods is represented by the computer-aided video microscopy in connection with digital image analysis. With regard to both afore-mentioned different areas of interest, the performance of such a video microscopy system is investigated.

The image analysis system developed in this thesis is constituted from standard components (microscope, video camera, frame grabber, and personal computer) and thus guarantees a broad application area to the visual characterization of cells. In order to determine the vitality of Chinese Hamster Ovary (CHO) cells in fermentation processes fast and quantitatively, an automated image analysis process is developed. CHO cells are applied to the production of monoclonal antibodies in large scale. For this, numerous routine determinations of the cell vitality during the process have to be made for an optimal process control. The undertaken investigations show that alive and dead cells of the CHO culture taken can be determined by vitality coloring. The comparison of the manual determination method by microscopic counting of the cells and of the image analysis method shows next to the tremendous advantage of the fast analysis of many probes clearly a better reproducibility of the results when applying the image analysis. Since the assembled image analysis system is automated by program

macros, a PC controlled on-line connection to process control systems of fermentors is possible.

With appropriate extensions to the image analysis system highly specific areas of interest of intracellular signal transduction processes during apoptosis of individual cells can be investigated by fluorescence microscopic methods. Due to the high sensitivity of these methods very small amounts of fluorescing molecules can be detected and quantitative determinations can be made. Since fluorescence microscopic measurements are processed very fast, very rapid chemical or structural changes can be tracked. In the center of investigations is the localization and quantification of individual signal molecules during production of membrane-associated signal complexes under physiological conditions as well as the characterization of mitochondrial function changes. Thus, the investigations show the effects of several stimuli and different mutants on the generation of signal complexes as well as the dynamic behavior of transduction processes. For the proof of the translocation of the signal molecule TRAF2 from cytoplasm to the plasma membrane and the quantification of TRAF2 in the signal complexes, a temperature controlled cell chamber is constructed and applied. The resulting data can be used in mathematical models for the first part of the apoptotic signal cascade, namely the binding of the receptor to the ligand and the subsequent generation of the intracellular membrane-associated signal complex.

Kapitel 1

1 Einführende Übersicht

Die Nutzung von Säugerzellen im großtechnischen Maßstab begann Mitte des 20. Jahrhunderts mit der Entwicklung von Virusimpfstoffen. In den letzten Jahrzehnten haben Säugerzellkulturen mit der Produktion monoklonaler Antikörper und rekombinanter Wirkstoffe wie Interferone stetig an Bedeutung gewonnen. Aufgrund der Vielzahl an potentiellen Produkten, die sich momentan in der präklinischen und klinischen Forschung befinden, wird angenommen, daß rekombinante Proteine bis zum Jahr 2003 zehn Prozent des vorhergesehenen pharmazeutischen Weltmarktes ausmachen werden. Aufgrund dieser Kapazitäten gehen beträchtliche Anstrengungen in die Entwicklung und Optimierung von Zellkulturprozessen, um sowohl die Quantität als auch die Qualität der Proteine zu steigern. Bei den unterschiedlichen kontinuierlichen Zelllinien, die in speziellen Zellkultur-Bioreaktoren fermentiert werden, stehen dabei Untersuchungen im Vordergrund, die die Interaktion der Zellen mit den chemischen, biochemischen und physikalischen Komponenten der Zellumgebung näher aufklären. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse verdeutlichen den Einfluß dieser Faktoren auf die Produktivität, die Zellteilung und insbesondere die Zellvitalität bzw. den Zelltod in Fermentationsprozessen.

1.1 Charakterisierung der Zellvitalität in Zellpopulationen

Die Kultivierung eukaryotischer Zellen stellt an die großtechnische Produktion ganz besondere technische Herausforderungen. So müssen neben der Einstellung der optimalen Kultivierungsbedingungen (Nährmedium, Begasung, Temperatur, pH-Wert, Druck usw.) sowohl die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber hydrodynamischem Streß als auch die Notwendigkeit des adhärenen Wachstums berücksichtigt werden. In

der Regel kommt es bei diesen Fermentationsprozessen nur zu niedrigen Zelldichten und damit zu geringen spezifischen Produktivitäten. Um die Produktionskosten so gering wie möglich zu halten, besteht damit die Notwendigkeit, kontinuierlich während der Fermentationen neben der Einhaltung der Standard-Kultivierungsbedingungen sowohl eine Zelldichtemessung als auch eine Vitalitätsbestimmung der Zellen schnell und reproduzierbar durchzuführen.

Die verschiedenen Methoden zur Erfassung der Zelldichte lassen sich in zwei Kategorien einteilen (Konstantinov et al., 1994). Die erste Kategorie umfaßt Verfahren der direkten Bestimmung. Hier werden Meßinstrumente verwendet, die die Zelldichte auf direktem Weg spektroskopisch, akustisch oder unter Verwendung der elektrischen oder optischen Eigenschaften erfassen. Die zweite Kategorie beinhaltet indirekte Bestimmungsmethoden. Diese kommen immer dann zum Einsatz, wenn es keine Möglichkeit gibt, direkte Sensoren zu verwenden, wie z.B. in Carrier- und adhären wachsenden Kulturen. Hier werden spezifische metabolische Raten wie die Sauerstoffaufnahme verwendet, um die Zellkonzentration zu berechnen. Die Stärke dieser Methoden liegt darin, daß keine zusätzlichen Sensoren notwendig sind, sondern die herkömmliche Instrumentierung des Fermenters ausreicht. Des Weiteren haben die indirekten Methoden den Vorteil, daß die berechnete Größe die Anzahl lebender Zellen wiedergibt und nicht die Gesamtzellzahl, wie sie normalerweise bei den direkten Meßmethoden bestimmt wird. Allerdings beruhen Berechnungen zur Konzentrationsbestimmung immer auf Annahmen, die nur in einem bestimmten Zeitraum des Kultivierungsprozesses zutreffen und somit stets auch fehlerbehaftet sind. Herkömmlicherweise werden bisher direkte Zelldichtemessungen entweder manuell mikroskopisch mit Hilfe verschiedener Zählkammern (Anfärben der Zellen in z.B. Neubauer- oder Thoma-Zählkammer), durch die Messung der Leitfähigkeit von Zellsuspensionen in Coulter Countern oder aber durch Fluoreszenzmarkierung und Leitfähigkeitsmessung der Zellen mittels Flowzytometer durchgeführt. Das manuelle Auszählen unter Verwendung von Zählkammern erfordert mit Sicherheit den geringsten apparativen Aufwand, da außer einem Mikroskop und der Zählkammer keine zusätzlichen Geräte benötigt werden. Jedoch ist diese Methode sehr zeitaufwendig und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse nur gering. Die Ergebnisse variieren sowohl

stark zwischen den verschiedenen durchführenden Personen, als auch bei Mehrfachbestimmungen durch eine Person (Tucker et al., 1994). Außerdem können keine weiteren Merkmale der Zellen, wie ihre Größe oder Form, quantitativ erfaßt werden. Im Gegensatz zur manuellen Auswertung ermöglicht die Verwendung von Coulter Countern und Flowzytometer die schnelle Analyse einer großen Anzahl von Zellen in kurzer Zeit und zeigt somit eine geringere Streuung statistischer Daten. Außerdem erlauben diese Methoden die Bestimmung der Zellvitalität und eine Charakterisierung der Zellmorphologie. Problematisch bei Messungen der Leitfähigkeit von Zellsuspensionen sind in der Suspension vorhandene Elektrolyte. Diese können die erhaltenen Ergebnisse stark verfälschen. Da tierische Zellen bevorzugt im Verband wachsen, kommt es außerdem oft zu großen technischen Problemen, da die Kapillaren des Flowzytometers durch Zellklumpen blockiert werden.

Gegenüber diesen Methoden bietet die direkte Methode der digitalen Bildverarbeitung einige Vorteile. Sie kann aus Standardkomponenten wie Mikroskop, Aufnahmemodul und Personalcomputer apparativ einfach aufgebaut werden und ist damit relativ kostengünstig und unproblematisch zu bedienen. Das Einsatzspektrum der Bildverarbeitung in vielen verschiedenen wissenschaftlichen Bereichen wie der Materialforschung, Klimaforschung, Medizin, Biotechnologie und vielen mehr hat dazu geführt, daß inzwischen eine Vielzahl verschiedener Bildanalyzesysteme auf dem Markt verfügbar sind, die sowohl in ihrem Funktionsumfang als auch in ihrer Spezifität nahezu jeder gewünschten Anforderung entsprechen bzw. nach eigenen Vorstellungen erweitert werden können.

Im Vergleich zur manuellen Auswertung mikroskopischer Bilder ist die bildanalytische Auswertung unabhängig vom Mitarbeiter und ermöglicht auch die Quantifizierung schwer bestimmbarer morphologischer Merkmale der Zellen. Leistungsfähige Rechner und weitentwickelte bildanalytische Algorithmen beschleunigen die Auswertung, so daß eine reproduzierbare Klassifizierung der Zellen in vital und nicht-vital im Vergleich zur manuellen Auswertung deutlich weniger Zeit beansprucht und on-line in Fermentationsprozessen durchgeführt werden kann. Damit stehen die so erhaltenen Populationsdaten direkt der Prozeßführung zur Verfügung.

1.2 Zellvitalität und Signalübertragung in Einzelzellen bei der Apoptose

Die gängige Methode zur Bestimmung der Zellvitalität mittels Anfärben der Zellen mit einem Vitalfarbstoff und anschließendem Auszählen basiert auf zwei Mechanismen. Die Färbung toter Zellen beruht auf der Tatsache, daß die Zytoplasmamembran defekt ist und somit geladene Farbstoffe ungehindert schon nach kurzer Zeit in die Zellen eindringen können. Diese geladenen Farbstoffe (z.B. Trypan Blau, Erythrosin B, Propidiumjodid) werden von lebenden Zellen nicht aufgenommen. Lebende Zellen werden angefärbt, indem ein entsprechender Farbstoff (z.B. Neutralrot, Fluorescein Diacetat) aktiv durch die noch intakte Zytoplasmamembran ins Zellinnere transportiert und dort nachgewiesen wird.

Der eigentliche Zelltod der Zellen kann, wie in Abbildung 1 dargestellt, auf zwei Arten erfolgen. Werden Zellen massiven hydrodynamischen Kräften ausgesetzt, verursacht zum Beispiel durch hohe Rührerdrehzahlen, großen Temperaturschwankungen unterworfen oder stark mit UV Licht bestrahlt, so wird Nekrose induziert. Diese nekrotischen Zellen sind durch die starken physikalischen bzw. chemischen Einflüsse metabolisch nicht mehr intakt. Sie schwellen an, die Mitochondrien verändern sich und schließlich kommt es zum Zusammenbruch der Zytoplasmamembran, so daß das Zellinnere in das umliegende Gewebe bzw. Medium gelangt. Die Folge hiervon ist ein akuter Entzündungsprozeß im Gewebe. Durch die Degeneration der Zytoplasmamembran können diese Zellen mit Vitalfarbstoffen identifiziert werden.

Im Gegensatz zu diesen extremen, zur Nekrose führenden Schädigungen der Zellen, existieren aber auch zelluläre Antworten auf nicht-physiologische Stimuli, die eine Schadensbegrenzung und Selbsthilfe ermöglichen oder aber auch zum Zelltod führen. Dieser Vorgang wird als Apoptose oder kontrollierter Zelltod bezeichnet und kann unter anderem durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone induziert werden. Apoptotische Zellen zeigen charakteristische morphologische Veränderungen, anhand derer sie von vitalen bzw. nekrotischen Zellen unterschieden werden können. Arends und Mitarbeiter (Arends et al., 1990) unterteilen die morphologischen Veränderungen in drei Phasen. In der ersten Phase schrumpfen die Zellen zunächst und das Chromatin kondensiert am Rand des Zellkerns. Während dieser frühen Phase zeigen die Mitochondrien noch keine morphologischen Veränderungen. In der zweiten Phase fragmentiert der Zellkern. Die Zellmembran zeigt kleine Vesikel. Es kommt zur

Bildung von sogenannten „Apoptotic Bodies“. In-vivo werden diese Apoptotic Bodies von Makrophagen durch Phagozytose aufgenommen, so daß es zu keinem Entzündungsvorgang im umliegenden Gewebe kommt. In der dritten Phase kommt es zunehmend zur Degeneration der verbliebenen Kern- und zytoplasmatischen Strukturen sowie zum Ablösen der adhären wachsenden Zellen von der Oberfläche. Da dies ähnlich der Nekrose verläuft, spricht man in dieser Phase auch von der „Sekundären Nekrose“. Das morphologische Kennzeichen der Apoptose ist eindeutig die Kondensation des Zellkerns, während die restlichen Organellen relativ intakt bleiben. Da die Zellmembran während der frühen Apoptose nicht degeneriert ist, können Vitalfarbstoffe hier nicht eingesetzt werden. Sie färben die Zellen erst während der sekundären Nekrose.

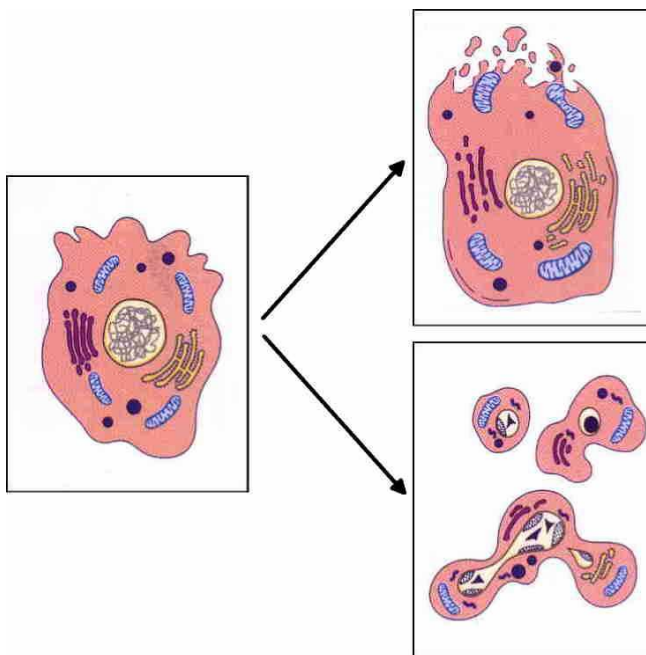


Abbildung 1: Unterschiedliche Charakteristika der Zellen bei der Nekrose (oben) und bei der Apoptose (unten). Links ist eine vitale Zelle dargestellt (http://biochem.roche.com/prodinfo_fst.htm?/apoptosis/).

Neben den morphologischen Merkmalen der Apoptose existieren eine Reihe biochemischer Charakteristika. Sehr früh in der Apoptose kommt es zur strukturellen Veränderung der Plasmamembran durch Umlagerung der Phospholipide. Hierbei wird Phosphatidylserin von der Membraninnenseite nach außen verlagert. Diese

Umverlagerung läßt sich sehr gut durch die Fluoreszenzfärbung mit Annexin V nachweisen. Ferner kommt es zum Verlust des Membranpotentials der Mitochondrien und zur Ausschüttung von Cytochrom C und Calcium in das Zytoplasma. Der Verlust des Membranpotentials läßt sich ebenfalls mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen wie z.B. Rhodamin 123 und JC-1 nachweisen. Im weiteren Verlauf der Apoptose werden schließlich verschiedene Proteasen, sogenannte Caspasen, kaskadenartig aktiviert. Die Kondensation des Chromatins schließlich und die Fragmentierung der DNA in 180-200 bp Oligonucleotide durch Endonucleasen wird als „DNA-Ladder“ bezeichnet, welche in der Regel mittels Ethidiumbromidfärbung und Gelelektrophorese oder immunochemisch nachgewiesen wird.

Die Bestimmung apoptotischer Zellen kann mittels der Lichtmikroskopie durch Charakterisierung der Zellmorphologie oder durch den Einsatz anderer Mikroskopietechniken wie Fluoreszenzmikroskopie oder Elektronenmikroskopie erfolgen. Licht- bzw. fluoreszenzmikroskopische Analysen durch Färbung mit Hämatoxilin, Acridin Orange, DAPI oder Hoechst sind einfach und kostengünstig durchzuführen, wohingegen der Einsatz von (Scanning-) Elektronenmikroskopen zum Nachweis ultrastruktureller Veränderungen sehr zeit- und apparateaufwendig ist und daher selten zum Einsatz kommt. Die Verwendung fluoreszierender Substanzen in der Mikroskopie bietet zudem weitere Vorteile. Zum einen sind die Extinktions- und Emissionsspektren charakteristisch für die einzelnen Moleküle und für ihre Struktur. Damit ist diese Methode hoch spezifisch. Zum anderen ermöglicht es die hohe Sensitivität dieser Technik, geringste Mengen fluoreszierender Moleküle zu erfassen und auch quantitative Bestimmungen durchzuführen. Da fluoreszenzmikroskopische Messungen sehr schnell erfolgen können (wenige Millisekunden), können sehr rasche chemische bzw. strukturelle Änderungen verfolgt werden. Die Entwicklung neuartiger fluoreszenzmikroskopischer Methoden wie z.B. die “fluorescence lifetime imaging” (FLIM) (Bastiaens and Squire, 1999) und “fluorescence resonance energy transfer” (FRET) (Pollok and Heim, 1999) verbesserte die ohnehin große räumliche Auflösung noch, so daß es möglich ist, Protein-Protein-Interaktionen intrazellulär zu untersuchen.

Der Vorteil sämtlicher Mikroskopietechniken besteht darin, daß die Identifikation apoptotischer Zellen auf den klassischen Apoptosekriterien basiert. Wird Apoptose durch Substrate hervorgerufen, die die Zellstruktur oder –funktion beeinflussen bzw. mehrere Pathways gleichzeitig betreffen, können verschiedene der vorher beschriebenen biochemischen Merkmale ausbleiben, so daß stets eine parallele Charakterisierung der Zellen anhand ihrer morphologischen Charakteristika für eine eindeutige Klassifizierung durchgeführt werden sollte.

Die Aufklärung der molekularen Vorgänge apoptotischer Signalwege ist Ziel intensiver Untersuchungen. Dabei kommt sowohl der Bildungsdynamik als auch der Lokalisation von entstehenden Signalkomplexen eine besondere Bedeutung zu. Im wesentlichen werden für molekularbiologische Untersuchungen Methoden wie Western Blot-Analyse, Koimmunopräzipitation und 2D-Elektrophorese eingesetzt. Der Nachteil dieser Methoden ist, daß für jeweilige Bestimmungen sehr große Zellmengen eingesetzt werden müssen, so daß nur über Mittelwerte der Population Aussagen gemacht werden können, während die zellulären Antworten einzelner Zellen nicht erfaßt werden. Außerdem erlauben diese Methoden keine intrazellulären Bestimmungen der zeitlichen und räumlichen Verteilung von Molekülen bzw. Signalkomplexen, was für die Aufklärung der Signalnetzwerke jedoch von essentieller Bedeutung ist. Weitere Einschränkungen ergeben sich bei diesen Methoden auch bei Untersuchungen besonders schneller zellulärer Antworten (kleiner eine Sekunde), welche unter physiologischen Bedingungen gemessen werden sollen.

Inzwischen stehen verschiedene Mikroskopietechniken zur Verfügung, bei denen diese Nachteile vermindert werden bzw. ganz entfallen und die es somit ermöglichen, intrazelluläre Signalübertragung in Einzelzellen quantitativ zu erfassen, so daß der Ablauf und die Kinetiken der Signalwege aufgeklärt werden können. Unter Einsatz der Fluoreszenzmarkierung von Molekülen und Kompartimenten werden z.B. konfokale Laser Scanning Mikroskope (LSM) verwendet. Bei dieser Technik tastet ein Laserstrahl (eine Anregungswellenlänge) punktweise eine Focusebene im Objekt ab. Durch die anschließende Verwendung von Pinholes wird nur die Fluoreszenzemission dieser Schicht mit definierter Dicke erfaßt. Das Ergebnis sind scharfe Bilder, bei denen Streulicht aus anderen Schichten nicht mitdetektiert wird. Diese Mikroskopiertechnik ist

heute weit verbreitet und kommt beim Nachweis vieler verschiedener Moleküle und Kompartimente zum Einsatz. So wurde z.B. von Goldstein (Goldstein et al., 2000) die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien untersucht.

Eine Alternative zur Laser Scanning Mikroskopie stellt die Videomikroskopie dar. Die Aufnahme der emittierten Signale erfolgt hier mittels einer Videokamera und Computer. Die Anregung der Fluorophore wird nicht durch einen aufwendigen Laser durchgeführt, sondern mit Quecksilberdampflampen bzw. Xenonlampen. Derartige Mikroskoplampen regen mit wesentlich niedrigeren Energiemengen an. Hieraus ergibt sich zwar eine geringere Signalintensität, jedoch wird sowohl das biologische Material deutlich weniger geschädigt, als auch der Farbstoff weniger ausgebleicht. Dies spielt eine besondere Rolle bei den Untersuchungen zeitlich ausgedehnter zellulärer Antworten unter physiologischen Bedingungen, bei denen ein und dasselbe biologische Material über einen längeren Zeitraum (mehrere Minuten bis einige Stunden) beobachtet werden soll. Ein weiterer Vorteil von Videosystemen ist die schnelle Aufnahme der Bilder mit einer maximal möglichen Aufnahmerate von 40 Millisekunden pro Bild. Damit ist es auch möglich, sehr schnelle zelluläre Vorgänge zu erfassen. Die aufgenommenen Bilder sind im Vergleich zu LSM-Aufnahmen unschärfer, da auch Streulicht außerhalb der Focusebene mitdetektiert wird. Leistungsfähige Rechner und neu entwickelte Deconvolution-Algorithmen ermöglichen es jedoch, diese Störungen rechnerisch aus den Bildern zu eliminieren. In den letzten Jahren hat sich somit das Einsatzspektrum der Videomikroskopie auch im Bereich der Molekularbiologie vor allem durch die Entwicklung hoch sensitiver Kameras und spezieller Bildverarbeitungssoftware stark erweitert. Auf diese Weise wurde zum Beispiel die Translokation von NF- κ B in den Zellkern durch Stimulierung mit dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) charakterisiert und quantifiziert (Ding et al., 1998).

1.3 Zielsetzung

Die Komplexität biologischer Systeme ist enorm und meist ist es aus biologischer Sicht zwar möglich, kleine und detaillierte Einzelaspekte des Systems zu erfassen, aber die ganzheitliche Betrachtung sämtlicher intra- und extrazellulärer Signalprozesse ist in der Regel nur schwer durchführbar. Mathematische Modelle liefern hier einen wichtigen

Beitrag zu einem besseren Systemverständnis (Wenig et al., 1999; Bhalla and Iyengar, 1999; Stokes, 2000). Im Wesentlichen können zwei Einsatzgebiete mathematischer Modelle in biologischen Systemen genannt werden. Zum einen steht die technische Nutzung des verfügbaren biologischen Wissens im Vordergrund. Hier können mathematische Modelle dazu verwendet werden, um mit Hilfe modellgestützter Verfahren der Prozeßführung und Prozeßüberwachung Fermentationsprozesse optimal zu betreiben (Biener et al. 1996; Kendlbacher et al., 1998). Moderne Optimierungsverfahren, wie sie z.B. in der modellprädiktiven Regelung eingesetzt werden, benötigen zur Umsetzung eine schnelle on-line Bestimmung der relevanten Fermentationsparameter. Durch den Einsatz der Videomikroskopie, gekoppelt mit der digitalen Bildanalyse, ist es möglich, Daten zur Zellmorphologie und Zellvitalität schnell und reproduzierbar der modellgestützten Prozeßführung zur Verfügung zu stellen (Reichl and Gilles, 1992; Treskatis et al. 1997).

Zum anderen können Modelle wesentlich dazu beitragen, das grundsätzliche mechanistische Verständnis der biologischen Systeme zu verbessern und weiter zu entwickeln (Callard et al., 1999). Sie liefern wichtige Ansätze zur Experimentplanung und zum Hypothesentest. Zur Beschreibung und Analyse komplexer intrazellulärer Signaltransduktionswege in eukaryotischen Zellen wurden bislang nur wenige mathematische Modelle entwickelt. So sollen apoptotische Signaltransduktionsvorgänge nun nicht nur zur weiteren biologischen Aufklärung experimentell untersucht werden, sondern auch beispielhaft durch systematische mathematische Modellbildung beschrieben werden. Eine adäquate Modellierung ist jedoch nur durch die quantitative Erfassung der örtlichen Verteilung von Signalmolekülen möglich und auch die Erfassung der Dynamik dieser Moleküle ist essentiell. Da unter anderem aufgrund von fehlenden experimentellen Methoden in diesem Bereich bislang keine komplexen Modellierungsstrategien verfolgt wurden, kann dieses Defizit durch den Einsatz der Videomikroskopie und der digitalen Bildanalyse behoben werden.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit besteht in der Entwicklung eines Bildanalysesystems zur Charakterisierung von tierischen Einzelzellen und Zellpopulationen für die modellgestützte Prozeßführung und –überwachung sowie für die mathematische Modellierung intrazellulärer Signaltransduktionsvorgänge in

eukaryotischen Zellen. Das zu entwickelnde Bildanalyse-System soll einerseits aus Standardkomponenten einfach aufgebaut sein, um ein möglichst breites Einsatzspektrum bei der visuellen Charakterisierung von Zellen zu gewährleisten. Andererseits soll das System die Spezialisierung hin zu hoch spezifischen Fragestellungen unter Einsatz der Fluoreszenzmikroskopie ermöglichen, indem einzelne Komponenten leicht ausgetauscht werden können.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines automatisierten Bildanalyseprozesses, mit dem die Vitalität von Chinese Hamster Ovary (CHO-) Zellen quantitativ bestimmt werden kann. Diese Zelllinie wird häufig im großtechnischen Maßstab in Produktionsprozessen pharmazeutischer Substanzen eingesetzt, bei denen zahlreiche routinemäßige Bestimmungen der Zellvitalität zur Führung des Prozesses unerlässlich sind. So nutzt auch die Boehringer Ingelheim AG in Biberach CHO-Zellen für die Produktion von Antikörpern. Innerhalb einer Kooperation mit Boehringer war ein wichtiges Ziel der Arbeit, ein Videomikroskopie-System aufzubauen, mit dessen Hilfe die automatisierte Bestimmung der Zellvitalität in CHO-Zellkulturen durchgeführt werden kann. Der zu entwerfende Algorithmus zur Aufnahme und Auswertung der Populationsbilder soll dabei eine Automatisierung ermöglichen, so daß auf einfache Art und Weise durch beliebige Personen die schnelle Auswertung einer hohen Anzahl von Bildern erfolgen kann. Die aus der Bildanalyse erhaltenen Daten können damit in die Prozeßführung zur Optimierung von Fermentationsprozessen eingebracht werden. Hierzu sollen verschiedene Vitalfärbetechniken getestet werden. Im Anschluß daran ist weitergehend zu prüfen, ob eine Klassifizierung der Zellen auch allein aufgrund morphologischer Charakteristika, ohne Färbung, möglich ist. Diese Untersuchungen beruhen auf der Analyse von lichtmikroskopischen farbigen Aufnahmen.

Auf diesen Experimenten aufbauend soll im zweiten Teil der Arbeit das Bildanalyse-System derart erweitert werden, daß auch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von intrazellulären Signalmolekülen durchgeführt und analysiert werden können. Diese fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen sollen dazu verwendet werden, die örtliche Verteilung der Moleküle und deren Translokation in Einzelzellen aufzuzeigen, um spezielle zelluläre Antworten des Tumor Nekrose Faktor (TNF-) induzierten apoptotischen Signalweges näher zu untersuchen und, mit Hilfe der

gewonnenen quantitativen Daten, die mathematische Modellierung zu unterstützen. Dazu sollen verschiedene Fluoreszenzmarkierungstechniken, wie die Verwendung von GFP-Fusionsproteinen und unterschiedlicher Fluorochrome, vor allem im Hinblick auf die besondere Problematik ihrer quantitativen bildanalytischen Erfassung untersucht werden. Dies umfaßt zum einen die Charakterisierung der dynamischen Komplexbildung intrazellulärer membrangebundener Komplexe mit dem Signalmolekül TRAF-2 und zum anderen die funktionellen Änderungen der Mitochondrienmembran durch quantitativen Nachweis des Verlustes des Membranpotentials. Da der Zeitraum der zellulären Vorgänge bei der Apoptose bis zu mehreren Stunden betragen kann und eine Untersuchung der Zellen unter physiologischen Bedingungen vorgesehen ist, soll in dieser Arbeit eine entsprechende Inkubationskammer entwickelt und getestet werden.

1.4 Kapitelübersicht

In Kapitel 2 werden zunächst die detaillierten biologischen Grundlagen der TNF-induzierten Apoptose dargestellt und eine Übersicht aus der Literatur über den aktuellen Stand der Forschung in diesem Bereich gegeben. Weiterhin wird in Kapitel 2 beschrieben, wie grundsätzlich der elementare Ablauf bei der digitalen Bildanalyse erfolgt. Dabei wird auch auf eine Auswahl an bildanalytischen Algorithmen, die im Verlauf der Versuche zum Einsatz kommen, eingegangen und deren theoretischer Hintergrund kurz erläutert.

Kapitel 3 stellt die materialtechnischen Punkte vor und beschreibt die eingesetzten Methoden. In diesem Kapitel werden die Kultivierungsbedingungen der tierischen Zellen näher erläutert. Außerdem werden hier ausführlich die Techniken zur Färbung und Fluoreszenzmarkierung der Zellen vorgestellt, sowie die profunden mikroskopischen Aspekte besprochen. Ebenfalls in Kapitel 3 wird der Aufbau des entwickelten Bildanalyzesystems beschrieben.

Die Darstellung der Ergebnisse ist Gegenstand von Kapitel 4. Hier werden die Daten präsentiert, die bei der automatischen Bestimmung der Zellzahl, Zellform und Zellvitalität in Zellpopulationen mittels digitaler Bildanalyse erhalten werden. Ferner wird das für die Fluoreszenzmikroskopie erweiterte Bildanalyzesystem vorgestellt. Außerdem werden die erhaltenen Resultate bei der Charakterisierung und Quantifizierung intrazellulärer Signalkomponenten und zellulärer Strukturen in diesem Kapitel detailliert dargestellt.

Kapitel 5 beinhaltet eine ausgiebige Diskussion der Ergebnisse aus Kapitel 4. Hier werden sowohl die videomikroskopischen Aspekte betreffend den Aufbau des Systems und die verwendeten bildanalytischen Algorithmen, als auch die biologischen Folgerungen aus den Ergebnisdaten umfassend diskutiert.

Kapitel 6 schließt die vorliegende Arbeit mit einer Zusammenfassung ab.

Kapitel 2

2 Grundlagen

2.1 Biologische Grundlagen

2.1.1 Das Zytokin "Tumor Nekrose Faktor"

Die physiologische Induktion des Zelltodes wurde von der Embryoforschung zu Beginn des 19. Jahrhunderts entdeckt (McKenna et al., 1998). Die Bildung komplexer Organe wie Gliedmaßen, das Verschwinden evolutionär rudimentär vorhandener Strukturen oder die Differenzierung des Geschlechtes mußten konkrete zelluläre Zerstörungen mit sich bringen. 1964 wurde der Begriff des programmierten Zelltodes (PCD) eingeführt, um die Zerstörung von Zellen nach einer vordefinierten Sequenz an Ereignissen in der Entwicklung zu beschreiben. Weitere Studien zeigten, daß der Zelltod hierbei nicht ein unabwendbares Ereignis war, sondern daß dieser durchaus von physiologischen Signalen benachbarter Zellen, wie z.B. Hormonen, abhing. Experimente, in denen die RNA- und Proteinbiosynthese gehemmt wurden, machten deutlich, wie wichtig die Makromolekülsynthese beim PCD ist (Saunders, 1966). Die Einführung einer bestimmten, morphologisch ausgeprägten Form des programmierten Zelltodes kam 1972 von Kerr und Mitarbeitern (Kerr et al., 1972) unter dem Begriff Apoptose auf. Das Vorhandensein apoptotischer Zellen in ausgewachsenen Organismen stellt dabei, so Kerr, einen natürlichen Gegenpart zur Zellteilung dar und ermöglicht so eine effiziente Regulation der Zellpopulation. Inzwischen geht man davon aus, daß jede Zelle außer Zygoten und Blastomeren das Zelltod-Programm besitzt und dabei von Überlebenssignalen benachbarter Zellen abhängt (Raff, 1992). Dieser Mechanismus gewährleistet, daß ein spezieller Zelltyp auf das Gewebe beschränkt bleibt, das den erforderlichen Satz an Überlebensfaktoren produziert und dessen Populationsgröße eben

entsprechend der zur Verfügung stehenden Menge dieser Faktoren festgelegt wird. Dabei bestimmen sowohl interne Faktoren, wie zum Beispiel der Differenzierungsstatus der Zelle, als auch externe Faktoren, wie Hormone und Zytokine, den kontrollierten Zelltod.

Das Zytokin *Tumor Nekrose Faktor* (TNF) spielt eine wichtige Rolle im komplexen Netzwerk von Immunreaktionen. Gemeinsam mit den Interleukinen (IL)-1 α und - β sowie Interferon γ ist TNF ein zentraler Mediator der nicht-adaptiven Immunantwort. Daneben werden TNF eine Vielzahl weiterer immunregulatorischer, proinflammatorischer und pathologischer Wirkungen zugeschrieben. Generell kann TNF als proinfektiöses Molekül verstanden werden. Im Falle der Fehlregulation der TNF-Expression kann es zur Entstehung einer Reihe von Krankheiten kommen. So wurde beispielsweise bei akuter Meningitis und Sepsis-Syndrom ein erhöhter TNF-Plasmaspiegel nachgewiesen. Auch scheint TNF bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten (z.B. Multiple Sklerose und rheumatische Arthritis) beteiligt zu sein. Auf Tumorzellen kann TNF apoptotisch wirken (Sugarman et al., 1985). Auf viele Tumor-Zelllinien wirkt TNF jedoch nur dann zytotoxisch, wenn durch Zugabe von Transkriptions- bzw. Translationsinhibitoren die Proteinbiosynthese blockiert oder reduziert wird. Es wurde eine Reihe von Proteinen beschrieben, die die Zellen vor TNF-induzierter Apoptose schützen können, wie z.B. *cellular inhibitor of apoptosis* (cIAP) 1, cIAP2 (Roy et al., 1997), *TNF receptor associated factor* (TRAF) 1 und TRAF2 (Wang et al., 1998).

In vivo wird TNF hauptsächlich von aktivierten Makrophagen und Monozyten produziert (Männel et al., 1980; Higuchi et al., 1990), wobei viele andere Zellarten TNF unter besonderen Bedingungen ebenfalls produzieren können. Das Wirkspektrum von TNF umfaßt eine ganze Reihe verschiedener zellulärer Antworten, die je nach Zelltyp, Aktivierungsstatus der Zelle und der Form des TNF, löslich oder membrangebunden, variieren (Vassalli, 1992; Grell and Scheurich, 1997). Die membranständige Form des TNF ist dabei nicht nur als Proform des löslichen Liganden zu sehen, sondern als biologisch aktiver Ligand, der seine Antworten im Zell-Zell-Kontakt vermittelt. Inzwischen sind einige Antworten, die durch membranständiges TNF vermittelt werden, beschrieben worden, z.B. Zytotoxizität und B-Zellaktivierung (Del Prete et al., 1994). Weiterhin haben Studien an transgenen Tieren gezeigt, daß die Expression von

membranständigem TNF ausreicht, um entzündliche Gelenkerkrankungen, vergleichbar der rheumatoiden Arthritis beim Menschen, auszulösen.

Entsprechend der Vielzahl an TNF-Funktionen existieren TNF-Rezeptoren auf nahezu allen kernenthaltenden Zellen. Es wurden zwei verschiedene Membranrezeptoren, TNF-R1 und TNF-R2, identifiziert und kloniert (Goodwin et al., 1991). Beide Rezeptoren sind typische Transmembranproteine, deren extra- und intrazelluläre Bestandteile in etwa gleich groß sind. TNF-R1 besitzt im Gegensatz zu TNF-R2 eine intrazelluläre Sequenz von etwa 70 Aminosäuren, die sogenannte *death domain* (DD). Das DD-Motiv wurde erstmals bei der Analyse von Fas-Mutanten, einem anderen Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie, als eine intrazelluläre Region, die für die Induktion der Apoptose essentiell ist, beschrieben (Itoh and Nagata, 1993). Eine Gemeinsamkeit beider Rezeptoren ist das Fehlen einer enzymatischen Aktivität, so daß die zellulären Signale über die Assoziation und Dissoziation von speziellen Adaptermolekülen, wie z.B. den TRAF-Proteinen (Arch et al., 1998; Wajant et al., 1999) weitergeleitet werden. Beide Rezeptoren binden sowohl die lösliche als auch die membrangebundene Form des TNF, zeigen aber sehr deutliche Unterschiede in ihren Aktivitäten. Die meisten zellulären Antworten auf lösliches TNF werden durch TNF-R1 vermittelt, während bei Zell-Zell-Kontakten die membrangebundene Form beide Rezeptoren stark aktiviert (Grell et al., 1998a). Einige zelluläre Antworten können jedoch durch TNF-R2 alleine vermittelt werden, so die Induktion der Thymozyten- und T-Zellproliferation (Grell et al., 1998b), die Aktivierung von NF- κ B (Rothe et al., 1995), sowie in manchen Systemen überraschenderweise auch die Induktion der Apoptose (Heller et al., 1992; Grell et al., 1994). Vercammen und Mitarbeiter konnten zeigen, daß die Stimulation des TNF-R2 zur Bildung und Freisetzung von endogenem TNF führt, welches zytotoxische Signale vermitteln kann (Vercammen et al., 1995). Ob es sich bei dem endogenen TNF um die lösliche oder membrangebundene Form des Moleküls handelt, konnte nicht geklärt werden.

Für die Rezeptorinteraktion zwischen den beiden TNF-Rezeptoren werden verschiedene Modelle vorgeschlagen. Von Grell (Grell et al., 1999) wurde eine Erklärung vorgelegt, nach der durch Stimulation beider Rezeptoren die Expression von membranständigem TNF induziert wird, das wiederum durch Interaktion mit TNF-R1 Apoptose auslösen kann. Für TNF-R2 konnte ebenfalls gezeigt werden, daß dieser Rezeptor die Expression

von membranständigem TNF und damit Apoptose induziert. Ein weiteres Modell ist das „ligand passing“ Modell, nach dem der TNF-R2 als TNF-Fänger auf der Zelloberfläche dient und dadurch die TNF-R1 Antwort verstärkt (Tartaglia et al., 1993). Denkbar wäre auch, daß TNF-R1 mit TNF-R2 um die Bindung des zentralen Regulators TRAF2 kompetiert und dadurch die TRAF2-Bindung an TNF-R2 und damit die Verfügbarkeit der TRAF2-assoziierten Schutzfaktoren verringert. Dadurch würde die apoptotische Antwort ebenfalls verstärkt werden (Weiss et al., 1997).

2.1.2 Intrazelluläre Signalkaskaden der TNF-induzierten Apoptose

Zentraler apoptotischer Signalweg

Eine Schlüsselrolle in der Induktion der Apoptose kommt der Aktivierung spezieller Cystein-Proteasen zu, den sogenannten Caspasen. Diese Caspasen werden als Proenzyme synthetisiert und durch die proteolytische Spaltung zwischen zwei Domänen aktiviert. Der genaue Ablauf der kaskadenartigen Aktivierung der verschiedenen Caspasen ist noch nicht geklärt (Enari et al., 1996). Es konnte jedoch für einige Caspasen gezeigt werden, daß sie direkt an der Ausführung des apoptotischen Signals beteiligt sind, indem sie spezifische „Todessubstrate“ spalten. Die Proteolyse dieser Proteine ist direkt für die charakteristischen morphologischen Veränderungen der Apoptose verantwortlich und somit auch für den Zelltod.

Nach der Stimulation des TNF-R1 wird die Initiator-Caspase Caspase 8¹ über die zwei DD-enhaltenden Adapterproteine TRADD (*TNF-R1-associated death domain*) und FADD (*FAS-associated death domain*) in den TNF-R1 DISC (*death inducing signalling complex*) Rezeptorsignalkomplex rekrutiert. TRADD dient als Adaptermolekül für zahlreiche intrazelluläre Signalmoleküle, so daß man dieses Molekül als Adapterplattform bezeichnen kann. Die Einbindung der Caspase 8 bewirkt ihre Autoaktivierung, wobei Caspase 3 in der nachfolgenden Kaskade als zentraler Mediator der TNF-R1 vermittelten Apoptose gesehen wird. Ein weiteres wichtiges Protein für die

¹ FLICE (*FADD-like ICE*)

Regulierung der Caspase-8-induzierten Kaskade ist das Molekül FLIP², welches durch Bindung an Caspase 8 anti-apoptotisch wirkt.

Für einige Zelllinien wurde allerdings gezeigt, daß die Fas/Apo1-induzierte Aktivierung von Caspase 8 nicht direkt zur Aktivierung weiterer Caspasen führt, sondern zur Folge hat, daß die Apoptose sekundär über die Depolarisierung der Mitochondrienmembran vermittelt wird. Dieser Mitochondrien-abhängige Weg der Apoptoseinduktion wurde auch für eine Reihe anderer apoptotischer Induktoren gezeigt. Zusätzlich zur Depolarisierung der Mitochondrienmembran kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C und ATP, die beide an Apaf-1 (*apoptosis protease activating factor*), ein pro-apoptotisches Molekül, binden können (Li et al., 1997). Nach Assoziation mit Cytochrom C und ATP ist Apaf-1 in der Lage, Caspase 9 zu binden und zu aktivieren. Caspase 9 wiederum führt zur Aktivierung weiterer Caspasen, insbesondere Caspase 3.

Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Eine Reihe aktueller Untersuchungen hat gezeigt, daß die Verhinderung der NF- κ B-Aktivierung zu einer Verstärkung der TNF-induzierten Apoptose führt (Beg and Baltimore, 1997). Auch für die Aktivierung von NF- κ B fungiert TRADD als Adapterplattform. Das DD-Protein RIP (*receptor interacting protein*) wird nach Rezeptorstimulation über TRADD ligandenabhängig in den TNF-R1 RISC (*receptor induced signaling complex*) rekrutiert, wobei die Bindung an TRADD über seine DD erfolgt und die Bindung der intermediären Region von RIP an das Molekül TRAF2 (Hsu et al., 1996). TRAF2 bindet dabei ebenfalls an die N-terminale Region von TRADD. Die Familie der TRAF-Moleküle ist durch eine konservierte C-terminale, ca. 230 Aminosäuren umfassende Domäne gekennzeichnet, die als TRAF-Domäne bezeichnet wird. Diese besteht aus der hochkonservierten C-TRAF-Domäne und der N-TRAF-Domäne. Wie die DD ist auch die TRAF-Domäne vor allem ein Protein-Protein-Interaktionsmodul. Sie vermittelt die Assoziation der TRAF-Moleküle an die Rezeptoren, Homo- und Multimerisierung mit anderen TRAF-Molekülen und die Bindung einer Vielzahl anderer regulatorischer Proteine. TRAF2 bindet nach

² Casper, I-FLICE, FLAME

Rekrutierung in den Rezeptorsignalkomplex NIK (*NF- κ B inducing kinase*), wobei für diese Bindung nicht nur die TRAF-Domäne, sondern auch weitere N-terminale Regionen von TRAF2 notwendig sind. NIK wiederum bindet die IKK Kinasen α und β , welche Bestandteile des IKK-Komplexes sind, die dann durch Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitor-Proteins I κ B dessen Degradation induzieren. Das freigesetzte NF- κ B transloziert anschließend in den Zellkern und bindet an die DNA. Dieser Signalweg scheint zwar ausreichend, aber nicht essentiell für die TNF-induzierte NF- κ B-Aktivierung zu sein, da in TRAF2-defizienten Mäusen noch TNF-induzierte NF- κ B-Kerntranslokation nachgewiesen werden kann (Yeh et al., 1997). Es wird spekuliert, daß ein weiteres Mitglied der TRAF-Familie (TRAF5) TRAF2 in der NF- κ B-Aktivierung substituieren könnte. In Abbildung 2 sind die oben beschriebenen zentralen Signalwege zur Zellaktivierung und Apoptose schematisch vereinfacht dargestellt.

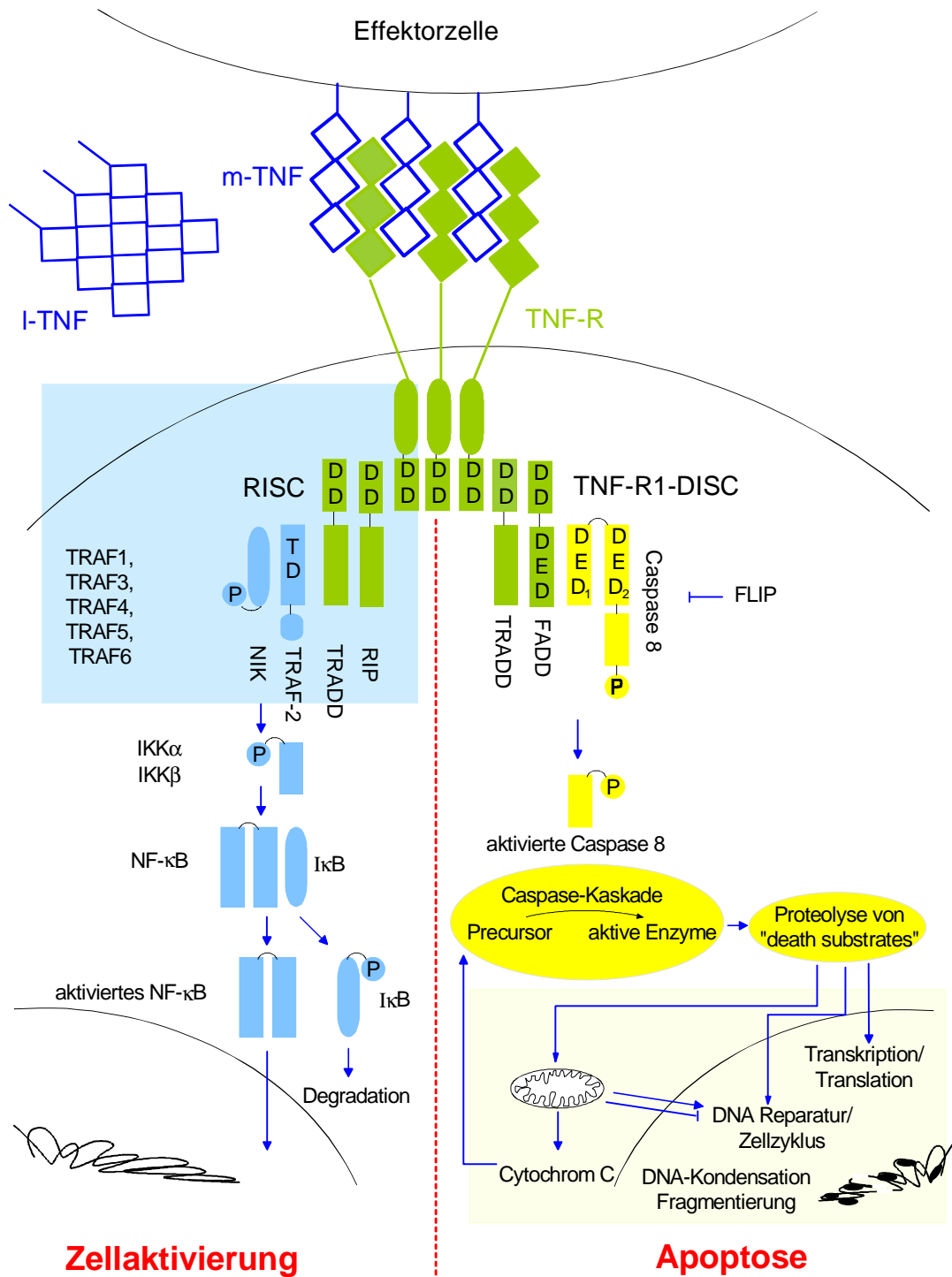


Abbildung 2: Darstellung unterschiedlicher zellulärer Antworten nach der Stimulation mit TNF.

2.2 Videomikroskopie und bildanalytische Grundlagen

Zielsetzung der digitalen Bildverarbeitung ist die Extraktion von Information aus Bildern. Dabei kann das prinzipielle Vorgehen hierzu folgendermaßen beschrieben werden.

Bilddaufnahme

Der erste Schritt der digitalen Bildverarbeitung ist die Bilddaufnahme und anschließende Digitalisierung. Die Aufnahme der Bilder stellt dabei die Grundlage für den Erfolg aller weiteren Schritte und somit letztendlich für die Qualität und Quantität der gewonnenen Informationen dar. Die richtige Wahl des Aufnahmemoduls, der Beleuchtung und weiterer optischer Ausstattung spielt eine zentrale Rolle, denn die Vermeidung von Fehlern durch diese Parameter kann den nachfolgenden Aufwand an Hard- und Software zur Bildbearbeitung drastisch verringern.

Neben der erforderlichen räumlichen Auflösung muß die Kamera für die Auswertung von fluoreszenzmikroskopischen Bildern vor allem im Hinblick auf Sensitivität und Signal-Rauschverhältnis sorgfältig ausgewählt werden. Die Quanteneffizienz der Kamera hängt von der Wellenlänge ab, wobei mindestens 0,01 Lux zur Verfügung stehen müssen (Berland et al., 1998), um fluoreszierende Objekte erfassen zu können. Für die Bestimmung des Rauschlevels müssen die verschiedenen Rauschquellen getrennt erfaßt und bewertet werden. Das beim Auslesen der Bilder entstehende Rauschen wird durch die Ausleserate bestimmt. Das Belichtungsrauschen hängt von der Lichtintensität ab. Thermisches (temperaturabhängiges) Rauschen ist vor allem bei Langzeitintegrationen, zur Aufnahme sehr lichtschwacher Objekte, von Nachteil. Zur Verringerung von thermischem Rauschen ist bei fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen die Kühlung der Kamera unerläßlich. Für die quantitative Bildanalyse ist die Linearität der Kamera entscheidend. Es muß gewährleistet sein, daß die Input-Signalintensität über den gesamten Intensitätsbereich proportional zum Output-Signal ist. Das bedeutet, daß sowohl die automatische Helligkeitskontrolle als auch die Gamma-Korrektur deaktiviert sein muß.

Bildvorverarbeitung

Nach der Bildaufnahme und Digitalisierung erfolgt die Vorverarbeitung der Rohdaten zur Elimination von Aufzeichnungsfehlern, wie das zuvor erwähnte Rauschen, Verzerrungen durch das Linsensystem, Randabschattungen durch Beleuchtung oder Unschärfe durch Bewegung. Zum besseren Verständnis wird an dieser Stelle kurz auf die verwendeten Algorithmen eingegangen. Weiterführende Information kann der umfangreichen Literatur zur digitalen Bildverarbeitung (Jähne, 1991; Parker, 1997) entnommen werden.

Eine einfache Methode, um die ungleichmäßige Ausleuchtung des Hintergrundes und fehlerhafte Pixel zu eliminieren, ist die Aufnahme eines Hintergrundbildes als Referenzbild und pixelweise Division des Originalbildes durch das Hintergrundbild. Durch die anschließende Multiplikation mit dem Maximalwert 255 werden die entstandenen Werte zwischen null und eins wieder auf den ursprünglichen Wertebereich von 0 bis 255 abgebildet. Dieses Vorgehen ermöglicht außerdem eine leichte Kontrastverbesserung.

Um den Kontrast weiter zu erhöhen, können sogenannte Look-Up-Tabellen (LUT) verwendet werden. Bei diesen histogrammbasierten Punktoperationen wird die Grauwertverteilung des ursprünglichen Bildes verändert. Die Funktionswerte einer homogenen Punktoperation werden für alle vorkommenden Grauwerte einmal berechnet und in einer Tabelle (LUT) abgelegt. Diese Operation ist sehr einfach und kann in Echtzeit ausgeführt werden. So kann zum Beispiel eine Rampenfunktion, wie in Abbildung 3 dargestellt, eine Kontrastspreizung der Grauwerte zwischen 80 und 130 bewirken, während alle Grauwerte unter 80 den Wert Null erhalten und alle über 130 den Wert 255.

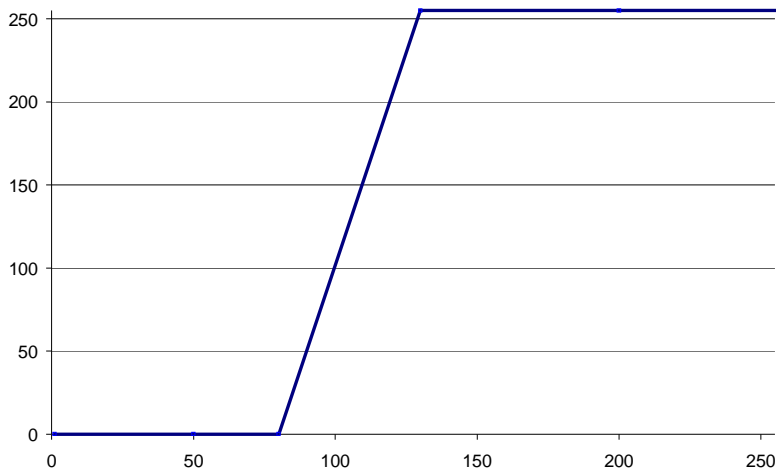


Abbildung 3: Verlauf einer rampenförmigen LUT-Transformation.

Die beschriebenen Punktoperationen können jedoch keine Strukturinformationen geben, wie z.B. die Kantendetektion. Hierzu müssen die Grauwertrelationen benachbarter Pixel betrachtet werden. Eine Operation, die solche Informationen aus dem Bild extrahiert und anschließend wieder als Bild darstellt, muß damit einen Bildbereich auf einen einzelnen Punkt abbilden und so über das gesamte Bild laufen. Ist eine derartige Operation linear, wird sie Faltung genannt. Mittels Faltungsmasken bzw. Filtern wird versucht, geforderte Strukturen zu verstärken oder unerwünschte Strukturen möglichst zu eliminieren. Die diskrete Faltung eines Bildes G mit der Faltungsmaske O mit der Dimension $(2r + 1) \times (2r + 1)$ wird durch

$$G'_{m,n} = \sum_{i=-r}^r \sum_{j=-r}^r O_{i,j} G_{m-i,n-j} \quad (\underline{G'} = \underline{O} \otimes \underline{G}) \quad (2.1)$$

beschrieben.

Um Rauschen aus den Bildern zu beseitigen, wird als Glättungsfilter der sogenannte Medianfilter verwendet. Dieser nichtlineare Rangordnungsfiler berechnet nicht den Mittelwert aus einer Umgebung, sondern sortiert die Grauwerte innerhalb der Filtermaske der Größe nach und gibt anschließend den Grauwert zurück, der in der Mitte der Anordnung steht. Dieses nichtlineare Filter ist nicht in der Form (2.1) darstellbar. Der Vorteil dieses Filters ist, daß monoton ansteigende Rampen und Kanten zwischen Bereichen konstanter Grauwerte beibehalten werden, während einzelne „Störungen“ (Impulsrauschen) eliminiert werden. Eine detaillierte Beschreibung der

Eigenschaften von Medianfiltern findet sich bei Huang (Huang, 1981) und Arce (Arce et al., 1986).

Zur Detektion von Kanten werden unter anderem Ableitungsoperatoren verwendet.

Ableitungen erster Ordnung $\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}$ haben an einer Kante betragsmäßig ein Maximum.

Bei Ableitungen zweiter Ordnung $\frac{\partial^2}{\partial x^2}, \frac{\partial^2}{\partial y^2}$ tritt an einer Kante ein Nulldurchgang auf.

Die Summe der partiellen zweiten Ableitungen wird als Laplaceoperator Δ bezeichnet.

$$\Delta = \frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} \quad (2.2)$$

Auf dem diskreten Gitter wird Δ durch die Faltungsmaske O approximiert:

$$O = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & -4 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$$

Dieser lineare Ableitungsoperator zweiter Ordnung ist annähernd isotrop, detektiert also Kanten in sämtlichen Richtungen und ist damit den Ableitungsfiltren erster Ordnung, die immer nur in einer Richtung wirken, überlegen.

Segmentierung

Der nächste Schritt in der Bildverarbeitungsfolge ist häufig die Trennung der Objekte vom Hintergrund, eine Form der sogenannten Segmentierung, die aus einem Grauwertbild ein Binärbild erzeugt. Die einfachsten Operationen zur Segmentierung sind feste Schwellenwertoperationen. Dabei wird ein bestimmter Grauwert als Referenzwert T festgelegt. Liegt der Grauwert eines Pixels $g(x, y)$ darüber, so wird dieser als Objektpixel gewertet und er erhält den Wert 1, ansonsten erhält er als Hintergrundpixel den Wert 0.

$$b(x, y) = \begin{cases} 1, & g(x, y) > T \\ 0, & g(x, y) \leq T \end{cases} \quad (2.3)$$

Um einen festen Schwellenwert zu finden, ist es ideal, wenn das Histogramm in einem bestimmten Merkmal (z.B. dem Grauwert) eine bimodale Verteilung aufweist. Meist überlappen sich die Verteilungen jedoch, so daß es immer zu Fehlzuordnungen kommen kann. Die zuvor beschriebenen Schritte der Bildvorverarbeitung wie Filterung und LUT-Operation dienen dazu, diese Fehlzuordnungen zu minimieren. In dem entstandenen Binärbild werden dann Objektpixel weiß und Hintergrundpixel schwarz dargestellt. Dabei werden diejenigen Pixel zu einem Objekt gehörig angenommen, die in direkter [8er]-Nachbarschaft zueinander stehen. Auf diese Weise werden die einzelnen Objekte identifiziert.

Merkmalsextraktion

Nun können verschiedene Merkmale wie z.B. Größe und Form dieser Objekte extrahiert werden, anhand derer sie dann in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden.

Bildnachbearbeitung

Es ist aber auch möglich, weitere bildanalytische Operatoren auf das Binärbild anzuwenden, um eventuelle Fehler bei der Segmentierung zu korrigieren. So können unter anderem unerwünschte "Löcher" in den Objekten eliminiert werden. Als Löcher werden Pixel angenommen, deren Wert Null (schwarz) beträgt und die keine benachbarten Kanten besitzen. Diese Pixel erhalten als Objektpixel den Wert 1.

Sollen die Kanten eines Objektes geglättet werden oder sich berührende Objekte getrennt werden, wird eine Opening Operation durchgeführt. Diese morphologische Binäroperation setzt sich aus einer sogenannten Erosion und anschließender Dilation zusammen. Bei der Durchführung einer Erosion oder Dilation wird ein Strukturelement pixelweise über das Bild geschoben und geprüft, ob dieses Element vollständig innerhalb des Objektes liegt (Erosion) oder ob mindestens ein Pixel des Elementes innerhalb des Objektes liegt (Dilation). Ist diese Anforderung erfüllt, so wird das zentrale Pixel des Strukturelementes als Objektpixel angegeben. Dabei fallen bei der Erosion Objekte vollständig aus dem Bild heraus, die kleiner oder etwa so groß sind wie

das Strukturelement. Abbildung 4 a) zeigt ein Binärbild nach der Segmentierung. Zwei der Objekte, die eigentlich getrennt erfaßt werden sollen, hängen noch zusammen. Nach einer Erosion mit einer 3×3 Matrix sind diese Objekte getrennt und auch störende kleine Pixel (Rauschen) sind eliminiert. Durch die anschließende Anwendung einer Dilation mit dem gleichen Strukturelement auf das erodierte Bild erhalten die verkleinerten Objekte wieder nahezu ihre ursprüngliche Größe zurück und ihre Kanten sind geglättet. Tabelle 1 zeigt die geometrischen Daten von Objekt 1 aus Abbildung 4 vor und nach einer 3×3 Opening-Operation. Die Zirkularität Z ist ein Maß für die Kreisform eines Flächenobjektes. Sie wird nach folgender Formel berechnet:

$$Z = \frac{U^2}{A} \quad (2.4)$$

mit:

U = Umfang

A = Fläche

Besitzt das Objekt eine Kreisform, so beträgt die Zirkularität den Wert $4\pi = 12,57$. Je mehr die Objektform hiervon abweicht, desto größer wird Z .



Abbildung 4: a) Binärbild nach fester Schwellenwertoperation. b) Ergebnisbild nach Erosion. c) auf Bild b) angewandte Dilation mit identischem Strukturelement wie bei der Erosion (Opening).

Tabelle 1: Morphologische Daten eines kreisähnlichen Objektes (Objekt 1) vor und nach einer Opening-Operation.

Objekt 1	Fläche	Zirkularität
Originalbild (Abbildung 4a)	22,07	14,60
Erosion (Abbildung 4b)	17,68	14,64
Dilation (Abbildung 4c)	22,03	14,34

2.3 Fluoreszenz, Fluoreszenzmarkierung und Fluoreszenzmikroskopie

Wird eine chemische Substanz mit energiereicher kurzwelliger Strahlung angeregt und emittiert als Folge hiervon Licht längerer Wellenlänge, so spricht man von Fluoreszenz. Charakteristisch für diese Substanzen sind ihre Anregungs- und Emissionsspektren, wobei jedoch beachtet werden muß, daß die Umgebungsbedingungen direkt den Verlauf der Spektren beeinflussen können. Primäre Fluoreszenz oder auch Autofluoreszenz tritt bei vielen natürlich vorkommenden Substanzen auf, die mit ultraviolettem Licht (ca. 365 nm) angeregt werden und kann z.T. erhebliche Störungen beim Nachweis anderer fluoreszierender Substanzen mit sich bringen. Betrachtet man eukaryotische Zellen, so tritt cytoplasmatische Autofluoreszenz durch proteingebundenes NADH (Ex 365 nm und Em 445 nm, blau) und Flavine (Ex₁ 390 nm, Ex₂ 440 nm und Em 520 nm, grün) auf. Die Fluoreszenzintensität von beiden Stoffen variiert dabei stark mit dem Redoxzustand der Zelle. Sollen also fluoreszierende zelluläre Substanzen oder Strukturen untersucht werden, so muß das Auftreten möglicher Autofluoreszenzen stets berücksichtigt und vor allem bei der quantitativen Bestimmung der Substanzen einkalkuliert werden.

2.3.1 Fluoreszenzmarkierung

Zeigen Substanzen keine Autofluoreszenz, die zur Bestimmung verwendet werden kann, so besteht eine Vielzahl an direkten und indirekten Möglichkeiten, diese zu fluoreszenzmarkieren und in sehr geringen Mengen mittels Fluoreszenzmikroskopie nachzuweisen. Im folgenden werden kurz diejenigen fluoreszierenden Farbstoffe, sogenannte Fluorochrome, und Markierungstechniken besprochen, die in der Arbeit verwendet wurden. Ein umfassender Überblick über die zahlreichen anderen Möglichkeiten kann der Literatur (Rost, 1995; Herman, 1998) entnommen werden.

Der grün/rot fluoreszierende Farbstoff JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetra-Ethylbenzimidazolylcarbocyaniniodid, T-3168) ist ein kationisches, lipophiles Molekül, das sich in stark negativ geladene Kompartimente eukaryotischer Zellen einlagert und das somit zur Charakterisierung des Mitochondrien-Membranpotentials verwendet werden kann. Bei aktiven Mitochondrien mit einem hohen Membranpotential formt JC-1 rot fluoreszierende Aggregate mit einem Emissionsmaximum (Em_{max}) bei ~590 nm.

Verlieren die Mitochondrien an Aktivität (durchlöcherte Membranen), so sinkt ihr Membranpotential und die JC-1-Aggregate zerfallen. Das JC-1-Monomer fluoresziert dann grün bei 527 nm. Bei Benutzung der entsprechenden mikroskopischen Ausstattung können beide Formen simultan beobachtet werden und erlauben somit die Untersuchung mitochondrialer Veränderungen bei Behandlung von eukaryotischen Zellen mit verschiedenen Stimulantien bzw. in verschiedenen Stadien der Apoptose.

Ein anderes Fluorochrom ist das Bisbenzimid Hoechst 33342. Es ist ein wasserlösliches, membrangängiges Fluorochrom, das die DNA eukaryotischer Zellen intensiv blau färbt ($E_{m_{max}} \sim 350/460$ nm). Damit ist es möglich, die Fragmentierung der DNA bei der Apoptose nachzuweisen und Zellzyklus-Untersuchungen durchzuführen, ohne die Zellen zu fixieren oder mit Detergentien zu behandeln.

Im Gegensatz zu der direkten Markierung zellulärer Strukturen und Substanzen mittels Fluorochromen wird seit Beginn der neunziger Jahre intensiv mit dem "green fluorescent protein" (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria* experimentiert (Chalfie and Kain, 1998). Dieses Molekül zeigt ähnliche spektroskopische Eigenschaften wie der Farbstoff Fluorescein und wird aufgrund seiner universellen Einsatzmöglichkeit ohne Kofaktoren zur Charakterisierung der Genexpression, bei Kreuzungsversuchen und als Fusionsprotein zur Lokalisation von Proteinen in lebenden Zellen verwendet. Die Möglichkeit, Zellen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen, ohne daß diese zuvor fixiert oder permeabilisiert werden müssen, stellt einen enormen Vorteil gegenüber den meisten Fluorochromen dar. Inzwischen stehen nun schon mehrere verschieden farbige Mutanten des grünen Wildtyp-GFP zur Verfügung (blaue, rote und gelbe Emission). Diese Mutanten (EBFP, CFP, EGFP und EYFP) sind im Vergleich zum Wildtyp deutlich intensiver, ihre Bildungskinetiken sind schneller und auch ihre Proteinlöslichkeit ist erhöht. Durch die unterschiedlichen Emissionsspektren ist es unter anderem möglich geworden, mehrere Parameter gleichzeitig zu bestimmen und Protein-Protein-Interaktionen mittels "Fluorescence resonance energy transfer" (FRET) zu untersuchen (Ellenberg et al., 1999; Pollok and Heim, 1999).

2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Für Fluoreszenzaufnahmen muß die optische Ausstattung eines Mikroskops sorgfältig ausgewählt werden. Die Objektive sollen eine hohe Numerische Apertur und Transmission besitzen. Die Numerische Apertur bestimmt die in das Objektiv einfallende Lichtmenge. Je größer die Numerische Apertur ist, desto größer ist die Auflösung und desto stärker ist das Fluoreszenz-Signal.

Die Lichtquellen für Epi-Fluoreszenzmikroskopie bestehen entweder aus einem Laser oder aus Quecksilber- (Hg) bzw. Xenon (Xe)-Dampflampen. Der Aufbau dieser Lampen ist identisch, bis auf das in ihnen enthaltene Gas. Hg-Lampen, wie die HBO 50, HBO 100 und HBO 103 von Zeiss, emittieren Licht nicht gleichmäßig über den gesamten Wellenlängenbereich, so wie die Xe-Lampen (z.B. XBO 75 von Zeiss). Sie weisen vielmehr Emissionsmaxima bei 365, 400, 440, 546 und 580 nm auf. Damit muß bei der Auswahl eines geeigneten Fluorochroms nicht nur auf das nachzuweisende Molekül eingegangen werden, sondern auch auf die spektralen Eigenschaften der verwendeten Lichtquelle. Für die in dieser Arbeit verwendeten Leuchten wurden von der Firma Zeiss die Intensitätsverläufe der HBO und XBO-Lampen zur Verfügung gestellt (Abbildung 5).

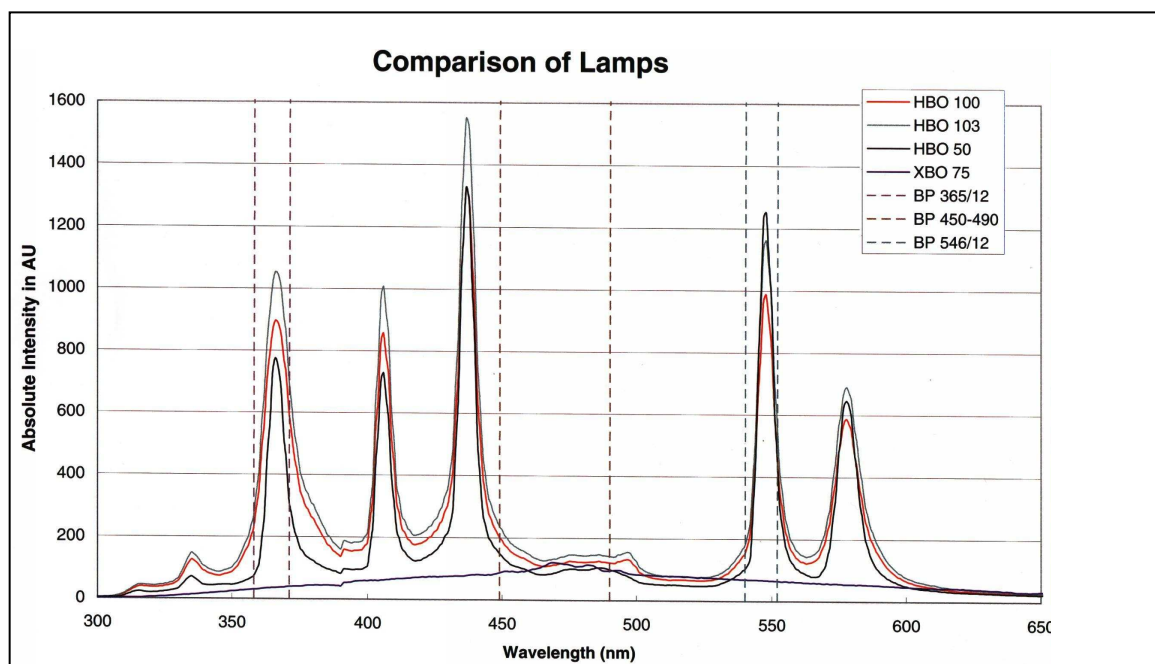


Abbildung 5: Intensitätsverläufe verschiedener Hg- bzw. Xe-Lampen über einen Wellenlängenbereich von 300 nm bis 650 nm (Zeiss, 1999).

Um ein möglichst starkes Fluoreszenzsignal zu erhalten, genügt es jedoch nicht, nur eine Lichtquelle auszuwählen, deren Spektrum im Bereich des Anregungsspektrums des Fluorochromes liegt und die entsprechend leistungsstark ist. Die geeignete Wahl des Anregungs- und Emissionsfilters, sowie des dichroiden Spiegels, spielen eine bedeutende Rolle bei der Erfassung lichtschwacher Objekte. So muß das Anregungsfilter die dem Absorptionsmaximum des Fluorochroms entsprechende Wellenlänge optimal generieren. Das Sperrfilter (bzw. der dichroide Spiegel) soll eine hohe Transmission der erforderlichen Wellenlänge besitzen, während das Emissionsfilter den restlichen Wellenlängenbereich vollständig ausblenden muß. Für das in der Arbeit verwendete Fluorochrom JC-1 und GFP wurden die in Abbildung 6 näher charakterisierten Filtersätze 09 und 14 der Firma Zeiss verwendet.

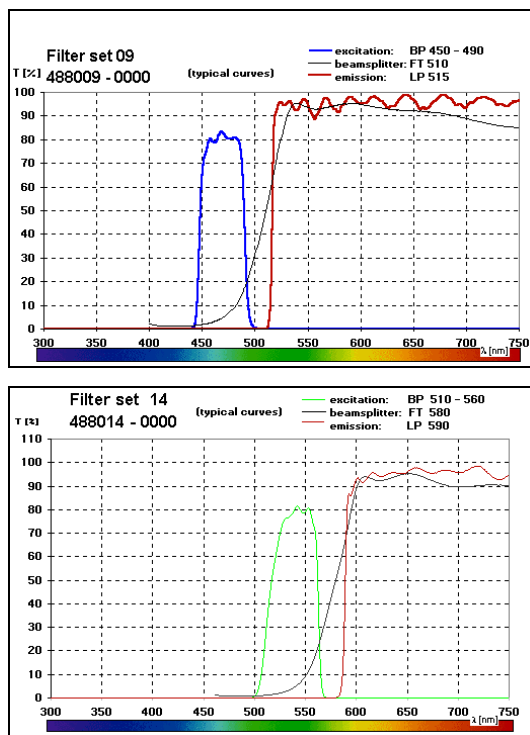


Abbildung 6: Spektrale Eigenschaften des Filtersets 09 und 14 der Firma Zeiss (<http://www.zeiss.de/de/micro/home.nsf>).

Da die verschiedenen Kameraeingänge am Mikroskop sich in der erreichten Lichtmenge unterscheiden, sollte die Kamera möglichst am lichtstärksten Eingang positioniert werden. Schließlich muß stets darauf geachtet werden, daß die Optiken sauber, frei von Staub und Immersionsöl, gehalten werden, denn dies kann die Qualität der erhaltenen Aufnahmen stark verringern.

2.3.3 Quantitative Fluoreszenzmikroskopie

Zur quantitativen Bestimmung fluoreszierender Substanzen stehen als meßbare Parameter die Fluoreszenzintensität des Objektes und die bekannte Konzentration des Fluorochroms in einem Standard zur Verfügung. Die Intensität der gemessenen Fluoreszenz I_f berechnet sich aus der absorbierten Lichtmenge I_a , der Quanteneffizienz Φ des Fluorochroms und einer optischen Konstante r :

$$I_f = I_a \phi r \quad (2.5)$$

Die absorbierte Lichtmenge I_a berechnet sich dabei aus der Differenz zwischen ursprünglicher Lichtmenge I_0 und transmittierter Menge I_t . Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich:

$$I_t = I_0 e^{-2,3\epsilon cd} \quad (2.6)$$

wobei c die Konzentration des Fluorochroms angibt und d die Dicke des Objektes beschreibt. Damit erhält man für I_f :

$$I_f = \phi r I_0 (1 - e^{-2,3\epsilon cd}) \quad (2.7)$$

Da angenommen wird, daß die Intensität der Lichtquelle konstant ist, wird der Term I_f / I_0 gewöhnlich durch eine relative Fluoreszenzintensität F ersetzt und man erhält:

$$F = \phi r (1 - e^{-2,3\epsilon cd}) \quad (2.8)$$

Die tatsächlich vorhandene Menge x an Fluorochrom berechnet sich aus c , d und der Fläche des betrachteten Bereichs a nach $x = cda$, so daß sich für den Zusammenhang zwischen F und x die folgende Beziehung ergibt:

$$F = \phi r (1 - e^{-2,3\epsilon x/a}) \quad (2.9)$$

Nimmt man an, daß die Extinktion des Fluorochroms 0,2 nicht übersteigt (Rost, 1991), also für kleine Werte von ϵcd , können für praktische Berechnungen die Terme zweiter und höherer Ordnung vernachlässigt werden. Damit reduziert sich Gleichung 2.9 auf die lineare Beziehung:

$$F = \phi r (2,3\epsilon cd) \quad (2.10)$$

Damit ist die gemessene Fluoreszenz direkt proportional zur Konzentration des Fluorochroms.

Diesen Berechnungen liegt eine Numerische Apertur von 0,4 zu Grunde. Da bei der Fluoreszenzmikroskopie meist Objektive mit höherer Numerischer Apertur eingesetzt werden, wird der Bereich in dem ein linearer Zusammenhang besteht jedoch verkleinert.

Kapitel 3

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Reagenzien

Zellkulturplatten und -flaschen	Greiner, Frickenhausen
RPMI 1640	Seromed, Berlin
hi FCS	“
EDTA	Biochrome
Mounting Medium	Sigma
Trypanblau	“
Erythrosin B	“
Ethanol	“
Essigsäure	“

Alle anderen Chemikalien stammen von der Firma Merck, Darmstadt.

Phosphat gepufferte Saline (PBS) 20 mM Na₃PO₄, 0,7 % NaCl, pH 7,2

3.2 Antikörper und Zell-Linien

Sämtliche Antikörper (IgGκ, MR2-1, 80M-2, Kaninchenserum), TNF und Ceramid wurden vom Institut für Zellbiologie und Immunologie (IZI) der Universität Stuttgart zur Verfügung gestellt. Ebenso stammen die in der Arbeit verwendeten Zellen (CHO-Zellen, HeLa-Zellen (humane Epithelzell-Linie), und Kym-Zellen (humane Rhabdomyosarcoma-Zellen)) aus dem IZI.

3.3 Experimentalmethoden

3.3.1 Kultivierung und Ernte eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgt in 75 cm² Gewebekulturflaschen, gefüllt mit 30 ml RPMI Medium unter Zusatz von 5 % fötalem Kälberserum (FCS, LIFE TECHNOLOGIES) bei 37 °C und 96 % Luftfeuchtigkeit unter 5 % CO₂-Begasung. Die Zellen werden alle zwei bis drei Tage umgesetzt, indem zunächst das überschüssige verbrauchte Medium abgesaugt und anschließend 10 ml 10 mM EDTA auf die adhärenen Zellen gegeben wird. Nach etwa 5 Minuten, wenn die Zellen sich abzulösen beginnen, wird das EDTA abgesaugt und die Zellen durch leichtes Klopfen auf die Flasche abgelöst. Das Abspülen der Zellen vom Flaschenboden erfolgt mit 10 ml Kulturmedium. 2 bis 5 ml werden wieder in Kulturflaschen ausgesät, der Rest der Zellsuspension wird anschließend für Färbeversuche verwendet.

HeLa-Zellen werden wie die CHO-Zellen in RPMI Medium kultiviert. Jeweils 7×10^4 Zellen werden in beschichteten 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten ausgesät und 48 h in 1 ml Medium kultiviert. Nach 48 h wird der Zustand der Zellen visuell kontrolliert und anschließend, bei gutem Wachstum, werden verschiedene Stimulantien (TNF, MR2-1, 80M2, Kaninchenserum, IgG) zugegeben.

Für die Untersuchungen mit Kym-Zellen werden je 10^5 Zellen in p35-Mikrotiterplatten ausgesät und in 2 ml RPMI Medium mit 10 % FCS 24 h inkubiert. Um die Zellen nach 24 h zu synchronisieren, wird das Medium abgesaugt. Anschließend wird mit RPMI Medium, das nur noch 5 % FCS enthält, inkubiert. Als Folge hiervon stoppen die Zellen bei der Zellteilung in der G₀/G₁ Phase des Zellzyklus. Nach 48 h wird erneut abgesaugt und wieder mit RPMI Medium mit 10 % FCS inkubiert. Die Zellen beginnen so alle gleichzeitig mit dem Eintritt in die S-Phase. Nun erfolgt die Stimulation der Zellen mit TNF.

3.3.2 Farbstoffe und Färbetechniken für die Hellfeldmikroskopie

Trypanblau / Erythrosin B:

Stammlösung: 10-fach Konzentrat (steril)

4 g/l Trypanblau bzw. Erythrosin B

8,1 g/l NaCl

0,6 g/l $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$

Einstellung des pH-Wertes mit 1 M HCl auf 7,2 bis 7,3, Lagerung bei 4°C bis 8°C, Verdünnung mit PBS-Puffer.

Neutralrot :

Lösen des pulverförmigen Farbstoffes in PBS: 0,075 % (w/v).

Nach Entnahme der Proben aus den T-Flaschen werden jeweils 1 bis 2 ml Zellsuspension bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen im selben Volumen PBS resuspendiert. Anschließend werden 0,5 ml Zellsuspension mit 0,4 ml Farbstoff (Trypanblau/Erythrosin B) gemischt und es erfolgt die Zählung mit dem Hämazytometer und der Bildverarbeitung. Wichtig ist die zügige Bearbeitung der Proben, da die Zellen relativ schnell wieder an den Gefäßwänden adhäreren und so ein Teil der Zellen nicht ausgewertet werden kann.

Für die Färbung mit Neutralrot wird 1 ml Zellsuspension bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 1 ml vorgewärmter Neutralrot-Lösung aufgenommen. Die Zellen werden in der Farbstofflösung für 25 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen erneut auf die gleiche Weise pelletiert, um die Farblösung abzunehmen. Nachfolgend erfolgt eine Flüssig/Flüssigextraktion mit einem Ethanol-Essigsäuregemisch (0,1 M; Mischungsverhältnis Ethanol zu Essigsäure: 50:50 (v/v)) und ein Waschschriff mit PBS (Frame and Hu, 1990).

Für die Aufnahme von Bildern wurde eine spezielle Kammer konstruiert (Abbildung 7). Diese wird auf dem Scanning-Tisch des Mikroskops aufgelegt. Sie ist durch einfaches Zerlegen leicht von Farb- und Zellresten zu reinigen und läßt sich problemlos befüllen und entleeren. Um die Einstellung der Bildschärfe zu erleichtern, sollte ihr Volumen möglichst gering sein. Das Kammervolumen beträgt daher nur 300 µl. Sie besteht aus zwei Trennblechen mit bekannter Dicke, die zwischen zwei herkömmlichen Objektträgern eingespannt werden. Zur Abdichtung dienen Parafilmstreifen, die auf die Form der Trennbleche zugeschnitten werden und sich jeweils zwischen Blech und

Objektträger befinden. Die Objektträger werden durch zwei kleine Klammern zusammengehalten, die durch Schrauben leicht zu befestigen sind.

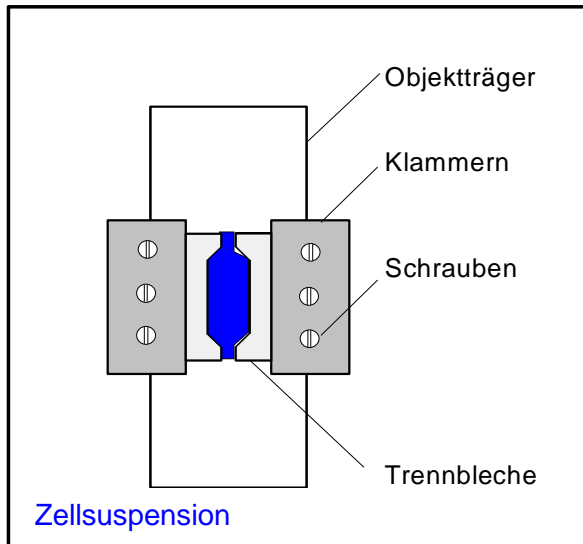


Abbildung 7: Zählkammer für die Bildanalyse.

3.3.3 Färbetechniken und Fluorochrome bei Fluoreszenzmarkierung

Für die Färbung von synchronisierten Zellen mit JC-1 und Hoechst 33342 wird JC-1 in RPMI Medium ohne Phenolrot gelöst und anschließend in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ in jedes Well pipettiert. Die Zellen werden in der Farbstofflösung 15 min bei 37°C inkubiert und nachfolgend dreimal mit PBS-Puffer gewaschen. Für die Färbung mit Hoechst 33342 wird der Farbstoff in PBS gelöst und in einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ pipettiert. Nach 15 min Inkubation wird die Farbstofflösung abgesaugt. Danach werden die Zellen mit 2 ml frischem RPMI Medium versetzt.

Für die mikroskopischen Untersuchungen der fluoreszenzmarkierten Zellen werden die auf den Glasplättchen adhärenen Zellen mit Mounting Medium versetzt und auf einen Objektträger aufgelegt. Um das schnelle Eintrocknen der Zellen zu verhindern, wird das bewachsene Glasplättchen mit Nagellack luftdicht abgeschlossen.

3.3.4 Langzeitversuche unter physiologischen Bedingungen

Die in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Versuche mit HeLa-Zellen wurden zunächst mittels einzelner bewachsener Glasplättchen, welche auf einem Objektträger fixiert wurden, durchgeführt. Um diese Zellen auch über einen längeren Zeitraum hinweg unter physiologischen Bedingungen untersuchen zu können, wurde eine Wachstumskammer entwickelt, die temperierbar ist und mit CO₂ begast werden kann. Die Zellen werden auf runden Glasplättchen unter herkömmlichen Bedingungen im Inkubator vorgezogen und anschließend, für die Versuche, in die temperierte Kammer eingesetzt. Diese wird mit Medium versetzt und verschlossen. Dann können über einen kleinen Zugang Stimulantien zugegeben werden, um die Zellen on-line mikroskopisch zu untersuchen. Die Versuche können sowohl steril als auch insteril vorgenommen werden. Abbildung 8 zeigt eine Aufnahme der entwickelten Kammer. Zusätzlich zur Zellkammer wurde eine Aufnahmeplatte konstruiert, mit welcher die Befestigung auf dem Mikroskopisch erfolgt.

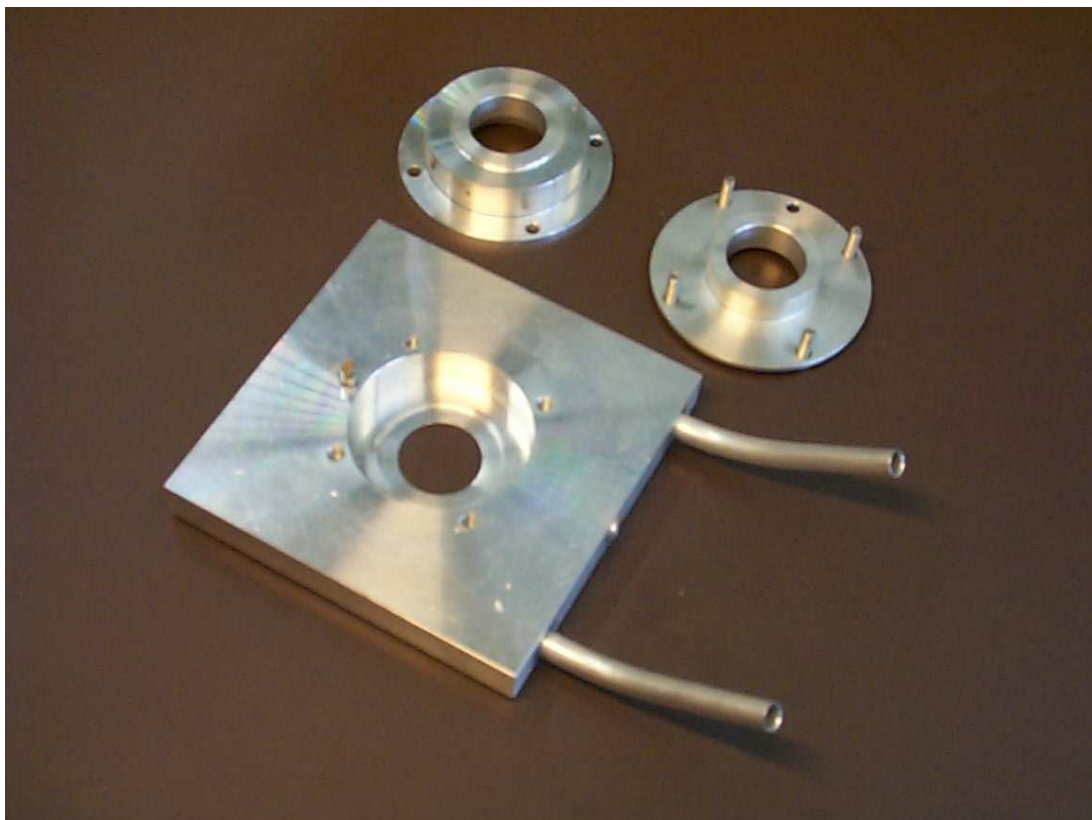


Abbildung 8: Aufnahme der temperierbaren Zellkammer.

Sämtliche Teile der Kammer sind aus Aluminium gefertigt und können zum Reinigen einfach auseinander gebaut werden. Für Langzeitversuche unter sterilen Bedingungen können die Teile einzeln autoklaviert werden und anschließend unter sterilen Bedingungen zusammengebaut werden. In Abbildung 9 ist das Kernstück der Zellkammer dargestellt. Die Nummern 1 und 2 zeigen den Zulauf bzw. Ablauf des Temperierungskreislaufes. Um zu große Temperaturschwankungen beim Einsetzen der bewachsenen Glasplättchen zu vermeiden, wird sowohl das Medium, als auch die Zellkammer, im Brutschrank vortemperiert. Die Nummer 3 bezeichnet die Öffnung in der Kammer, mit deren Hilfe entweder geringe Mengen an Stimulantien zugegeben werden können, oder eine Begasung der Zellen mit CO_2 erfolgen kann. Die in dieser Abbildung nicht dargestellten kreisförmigen Innenteile der Kammer werden mit dem Kernstück über die Schrauben a) und die Arretierung b) befestigt. c) zeigt das mit Zellen bewachsene Glasplättchen.

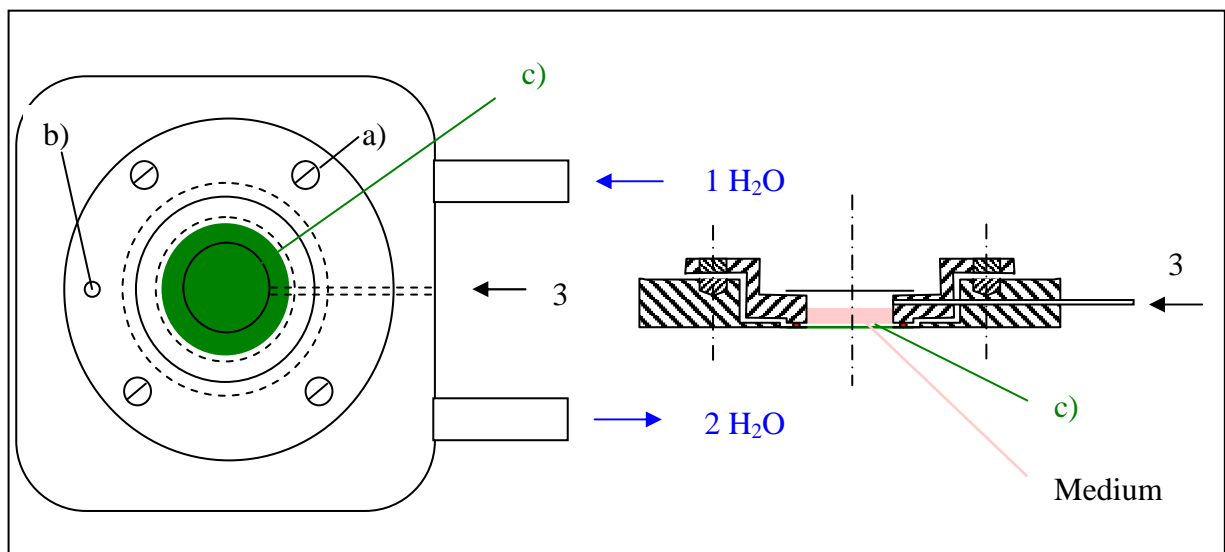


Abbildung 9: Aufsicht und Seitenansicht der Zellkammer.

3.4 Digitale Bildanalyse

3.4.1 Hard- und Softwarekomponenten

Die Bilder werden mit einer CCD Color Video Camera (DXC-950P Power HAD) von Sony aufgenommen, welche an ein inverses Mikroskop (Axiovert 10, Zeiss) angeschlossen ist. Diese Kamera ist einfach zu bedienen und kompatibel zu Standard-Videoausstattungen. Durch die variable on-chip Integrationsmöglichkeit wird die Lichtmenge am Detektor erhöht. Da das integrierte Bild nur einmalig ausgelesen werden muß, reduziert sich das Ausleserauschen drastisch. Durch den nachträglichen Einbau eines Lüfters zur Kühlung des Kamerachips ist eine Langzeitintegration von 10 Sekunden möglich. Da das thermische Rauschen somit deutlich reduziert ist, können auch sehr lichtschwache fluoreszierende Objekte aufgenommen werden. Die Kamera ist über einen A/D-Wandler mit dem Rechner (PC, Pentium 133, Framegrabber Matrox Meteor) verbunden. Durch den Einsatz einer Graphikkarte mit einem Videoeingangsteil zum Digitalisieren der Bilder ist kein zweiter Monitor zur Bilddarstellung nötig.

Abbildung 10 zeigt den Aufbau des Bildverarbeitungsplatzes.

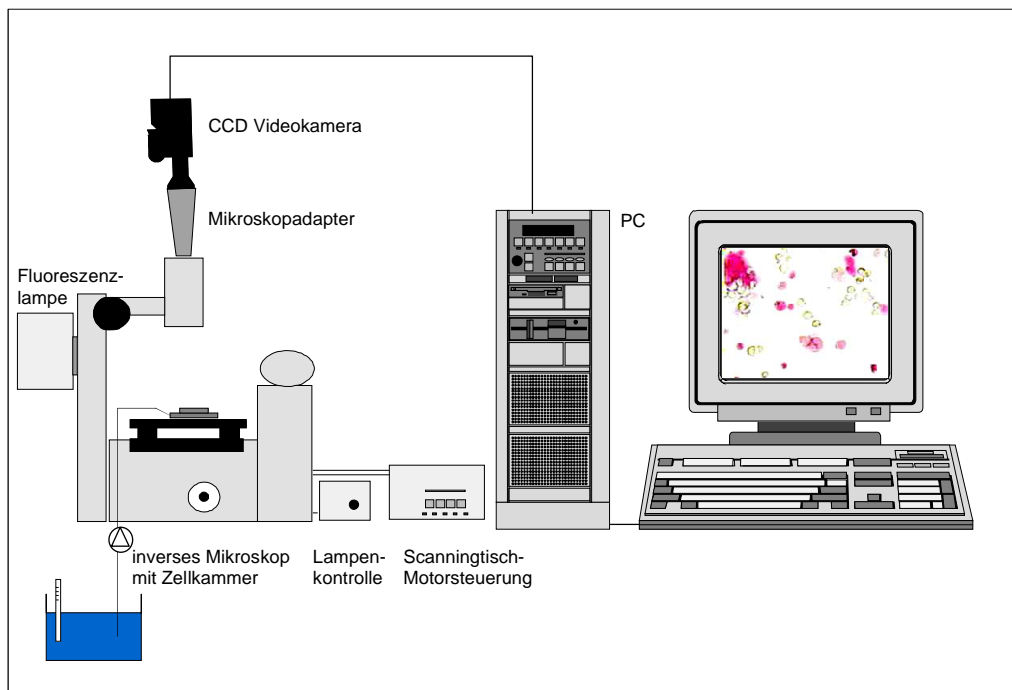


Abbildung 10: Komponenten des Bildverarbeitungsplatzes

Zur Bildverarbeitung wird die unter Windows 98 laufende Software OPTIMAS 6.5 der Firma Stemmer verwendet (OPTIMAS = OPTIcal Measurement and Analysis System). Sie bietet folgende Vorteile:

- Automatisierungsmöglichkeit durch eine Makrosprache,
- Ähnlichkeit der Makrosprache zur Programmiersprache C,
- Umfangreiche Bibliothek mit Bildverarbeitungsfunktionen,
- Funktionserweiterung möglich,
- Schnittstellen zu anderen Windows Programmen,
- sämtliche gängigen Datenformate können importiert und exportiert werden

Um die geometrischen Daten von Zellen exakt angeben zu können, muß das System zunächst längenkalibriert werden. Das zur Bildauswertung eingesetzte Bildformat von 480×512 Pixeln entspricht bei 200-facher Vergrößerung einer Fläche von $0,48 \text{ mm}^2$ und unter Verwendung der Zählkammer einem Volumen von $0,384 \text{ }\mu\text{l}$. Für die quantitative Erfassung des Intensitätswertes der Zellen bei der Hellfeldmikroskopie ist es unbedingt notwendig, den Lichtwert des Mikroskopes stets auf den selben Wert einzustellen. Hierzu wird zu Beginn jeder Messung zunächst ein Bild mit entsprechend konzentrierter Farbstofflösung, ohne Zellen, aufgenommen und hiermit, bei einem Signalumfang von $0 \dots 255$, ein mittlerer Intensitätswert des Gesamtbildes von 155 eingestellt. Dieser Wert wird für die gesamte Meßreihe nicht mehr geändert.

3.4.2 Mikroskopische Einstellungen

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen muß die Hg-Dampfleuchte am Mikroskop mindestens eine halbe Stunde vor Beginn der Aufnahmen eingeschaltet werden, damit sie ein stabiles Spektrum emittiert. Häufiges Ein- und Ausschalten sollte vermieden werden, da sich damit die Lebensdauer der Lampe drastisch reduziert. Ändert man die Fokussierung des Lampenkollektors, muß berücksichtigt werden, daß sich die im Objekt ankommende Strahlungsintensität und die Ausleuchtung des Bildbereichs ebenfalls ändern. Für quantitative Aufnahmen ist es daher unerlässlich, innerhalb zu vergleichender Versuchsreihen diese Fokussierung nicht zu ändern. Muß die Lampe

ausgetauscht und damit neu fokussiert werden, so muß eine erneute Kalibrierung der Intensität vorgenommen werden.

3.5 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Daten mittels Varianzanalyse wird das Softwarepaket SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) verwendet.

Kapitel 4

4 Ergebnisse

4.1 Automatische Bestimmung der Zellzahl, -form und -vitalität in Zellpopulationen

Die industrielle biotechnologische Herstellung von Pharmaproteinen wie den monoklonalen Antikörpern, Interferonen, Interleukinen und anderen erfolgt mit tierischen Zellen (Billig, 1987). Dabei eignen sich Hybridoma-Zellen und CHO-Zellen sehr gut für die Kultivierung in Fermentern und sind daher derzeit von größter Bedeutung. Die Wachstumskurve der Zellen gliedert sich in eine Wachstumsphase und in eine sich anschließende Sterbephase, bei der die Anzahl vitaler Zellen im Fermenter wieder abnimmt. Für eine optimale Prozeßführung spielt die schnelle und reproduzierbare Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen in den Fermentationsprozessen eine bedeutende Rolle (Konstantinov et al., 1994). In der Regel werden Zellen hierfür gefärbt und mittels Hämazytometer anschließend unter Verwendung eines Mikroskops ausgezählt. Für die Charakterisierung von eukaryotischen Zellen in Suspension mittels digitaler Bildanalyse wurde ein PC-basiertes Bildanalysesystem aufgebaut (Kapitel 3.4.1). Es wurden verschiedene Vitalfärbungen an CHO-Zellen ausgetestet und ein Algorithmus zur automatischen Bestimmung der Zellzahl, Zellvitalität und Zellmorphologie entwickelt.

4.1.1 Erkennung toter Zellen

Die Farbstoffe Trypanblau (färbt tote Zellen blau) und Erythrosin B (färbt tote Zellen rot) werden von lebenden Zellen nicht aufgenommen. In tote Zellen dringen diese Farbstoffe jedoch aufgrund der zerstörten, durchlässigen Zellmembran ein und färben diese Zellen. Neutralrot ist im Gegensatz hierzu ein Vitalfarbstoff, der nur von lebenden

Zellen aufgenommen wird. Er dient als Kontrollfarbstoff, indem eine Probe sowohl mit Erythrosin B als auch Neutralrot angefärbt wird und dann die Anzahl toter, lebender sowie die Gesamtzellzahl bestimmt und verglichen wird.

Abbildung 11 zeigt Aufnahmen von CHO-Zellen, die mit den beiden Farbstoffen Trypan Blau (Abbildung 11 a) und Erythrosin B (Abbildung 11 b) angefärbt wurden. Die Untersuchungen mit dieser Zelllinie haben ergeben, daß die Färbung mit Erythrosin B der Trypan Blau Färbung deutlich überlegen ist. Sie ist einfach und schnell durchführbar, der Farbstoff zeigt nur eine geringe Affinität zu Serumproteinen (nur schwache Färbung des Hintergrunds) und die gefärbten toten Zellen zeigen schon nach kurzer Zeit (weniger als eine Minute) eine intensive Rotfärbung. Der Vergleich der Zellzahlen toter und lebender Zellen mit der Kontrollfärbung durch Neutralrot führte zu übereinstimmenden Ergebnissen.

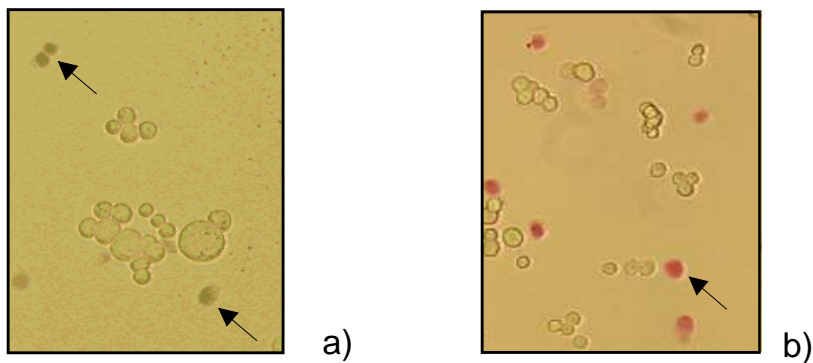
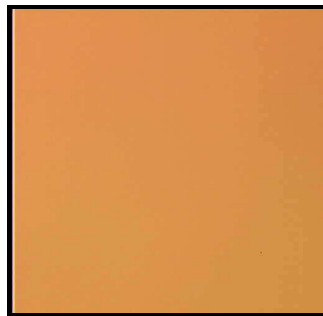
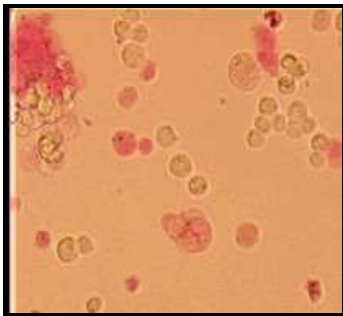


Abbildung 11: CHO-Zellen angefärbt mit a) Trypan Blau und b) Erythrosin B.

Im folgenden ist in Abbildung 12 anhand von Bildern der Ablauf der einzelnen Bildverarbeitungsschritte zur Erkennung der toten Zellen sowie der Gesamtzellzahl dargestellt. Diese Schritte wurden zu einem Makro-Programm zusammengefaßt, so daß vom Einzug der Bilder in den Speicher der Bildverarbeitungskarte bis hin zur Ausgabe der Ergebnisdaten in tabellarischer oder graphischer Form die gesamte Sequenz automatisiert abläuft.

Tote/gefärbte Zellen:



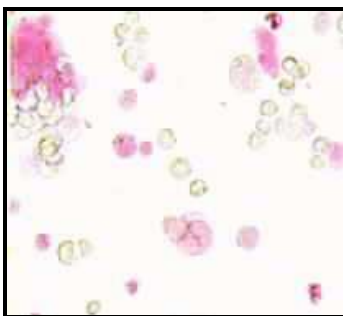
Einstellung des Lichtwertes

auf 155 (Farbstofflösung)

Bildeinzug (480 x 512 Pixel)

1.) Zellsuspension

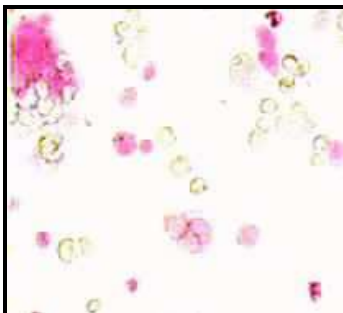
2.) Farbstofflösung (Hintergrundbild)



Bilddivision mit dem Hintergrundbild

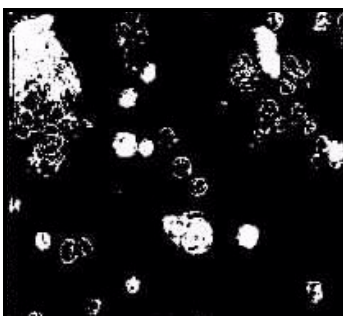
Hintergrundkorrektur

Kontrastverstärkung



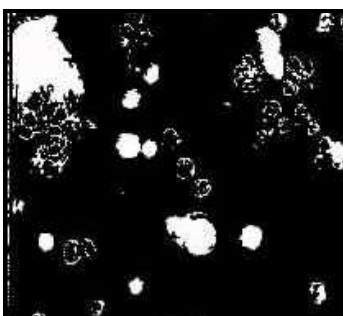
LUT-Transformation

Kontrastverstärkung



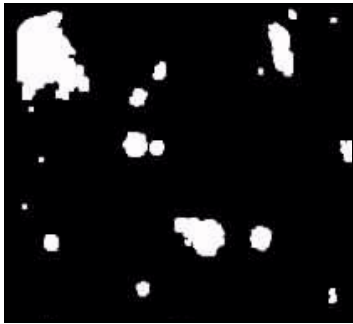
Segmentierung

*Trennung der Objekte vom
Hintergrund*

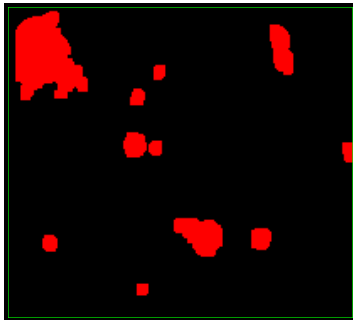


Fill-Operation

„Löcher“ werden gefüllt



Opening Operation
Glätten von Kanten
Elimination von Rauschen
Elimination von kleinen Objekten
Trennen von Objekten



Aufteilen nach Größe
Merkmalsextraktion
Objektzählung
Charakterisierung der Objekte

Abbildung 12: Automatisch ablaufender Algorithmus zur Bestimmung und Charakterisierung der toten Zellen.

Aus den Bildern wurde die Anzahl der erkannten Objekte, ihr Durchmesser, ihre Fläche und der mittlere Intensitätswert bestimmt. Um die Form der Objekte zu charakterisieren, wurde der Zirkularitätsfaktor Z berechnet (Formel 2.4). Zur Abschätzung der Zellzahl in den Zellklumpen wurde die mittlere Fläche toter bzw. lebender Zellen verwendet. Diese mittlere Fläche war der Mittelwert aus ca. 50 Einzelzellen. Man betrachtete dabei die Fläche eines Zellklumpens als Mono-Layer und dividierte seine Gesamtfläche durch die mittlere Fläche einer toten bzw. lebenden Zelle. Damit war es möglich, die Konzentration der Zellen in der Zellsuspension zu berechnen.

4.1.2 Erkennung aller Zellen

Die Erkennung und Charakterisierung aller Zellen im Bild läuft grundsätzlich nach dem selben Schema ab wie bei der Bestimmung toter Zellen, außer daß bei diesem Algorithmus das Farbbild auf den Grünkanal reduziert und anschließend in ein Grauwertbild umgewandelt wurde. Zur Erkennung sämtlicher Zellen im Bild genügte es, nur den Grünkanal zu verwenden, da dieser die meiste Information zur Trennung der Objekte vom Hintergrund enthielt. Damit war der Ablauf folgender:

- Division mit dem Hintergrundbild
- Reduzierung auf den Grünbereich
- LUT-Transformation
- Segmentierung
- Fill-Operation
- Opening
- Objektzählung und Merkmalsextraktion.

Die beiden Ergebnisbilder zur Bestimmung toter Zellen und der Gesamtzellen können anschließend voneinander subtrahiert werden, so daß auch die Daten der lebenden Zellen zur Verfügung stehen. Abbildung 13 zeigt ein Originalbild und die daraus automatisch generierten Ergebnisbilder zur Charakterisierung lebender und toter Zellen.

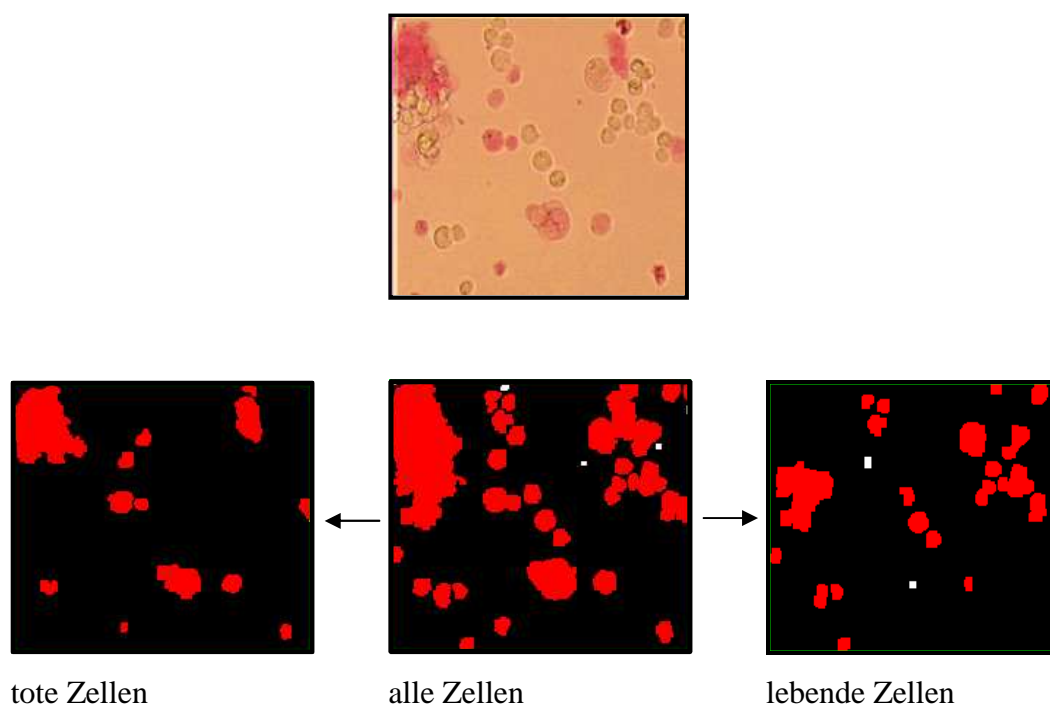


Abbildung 13: Ergebnisbilder nach automatischer Objekterkennung in einer CHO-Zellkultur. Oben ist die Originalaufnahme dargestellt und unten die Ergebnisbilder aus der automatischen Bildererkennung.

4.1.3 Vergleich der Methoden

Um den entwickelten Algorithmus zur bildanalytischen Auswertung der mikroskopischen Bilder zu testen und mit der manuellen Methode zu vergleichen, wurden unterschiedliche Formen des Zellwachstums erfaßt und die Zellen ausgezählt. Hierzu wurden Zellen vier Tage lang kultiviert, wobei täglich Probe gezogen wurde. Es wurden jeweils 30 Bilder aufgenommen und bildanalytisch ausgewertet sowie parallel von Hand ausgezählt. Die folgenden Abbildungen zeigen die Kultur während des viertägigen Wachstums.

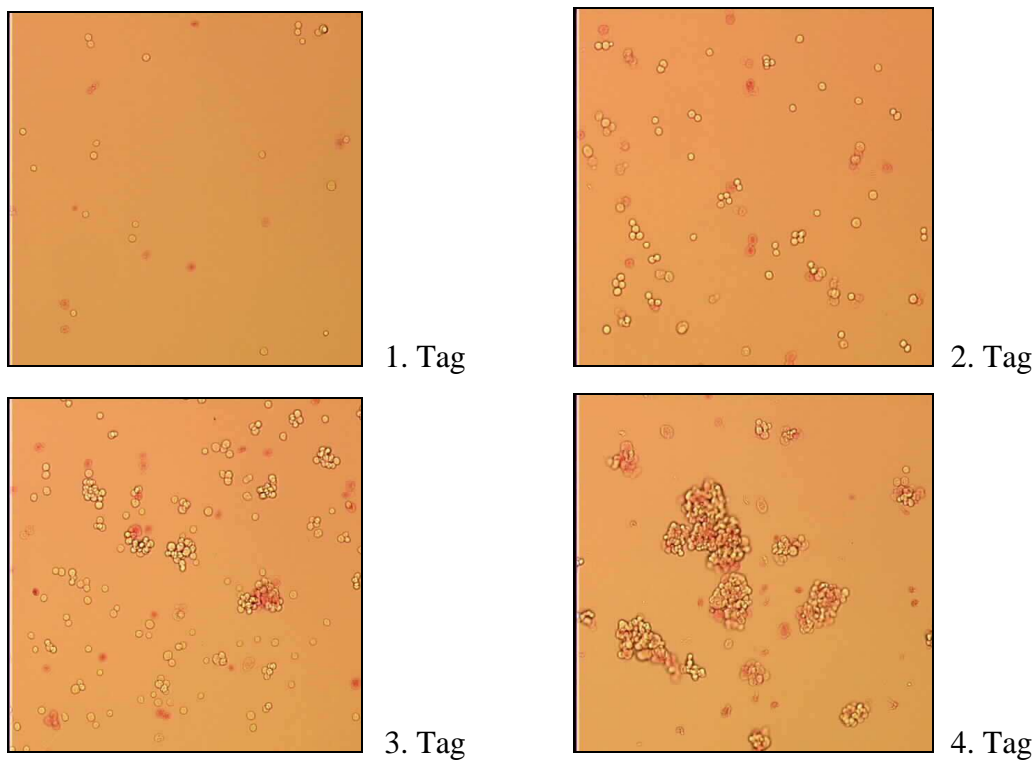


Abbildung 14: Aufnahmen von CHO-Zellen während viertägiger Kultivierung.

Die Auswertung ergab, daß bei vorwiegend einzelnen Zellen (Abbildung 14, Tag 1 und Tag 2) die bildanalytische und manuelle Auswertung zu dem gleichen Ergebnis führten, wobei bei der bildanalytischen Auswertung eine geringere Streuung der Werte auftrat. Je größer die Zellklumpen wurden und je mehr ihre Anzahl zunahm, desto mehr wichen die mit den beiden unterschiedlichen Methoden bestimmten Zellzahlen voneinander ab und desto größer wurden die Schwankungen.

Eine statistische Analyse der Anzahl toter Zellen und der Gesamtzellzahl aus mehreren Zählungen verschiedener Bildausschnitte bzw. Zählquadrate zeigte, daß die bildanalytische Auswertung der manuellen überlegen war. Da die Zellzahlen bei diesem Vergleich nicht auf ein einheitliches Zellvolumen bezogen waren (größeres Volumen bei der bildanalytischen Auswertung) und damit die Datensätze einen unterschiedlichen Umfang hatten, wurden die Variationskoeffizienten (CV) aus der Standardabweichung und den Mittelwerten berechnet und als Vergleichsmaß benutzt.

$$CV = \text{Varianz} / \text{Mittelwert}$$

Auswertung Hämazytometer: $CV = 17,44/46,10 = 0,37$

Auswertung Bildanalyse: $CV = 49,65/148,69 = 0,33$

Die bildanalytische Auswertung führte bei der Bestimmung der Zellzahl zu einem kleineren Variationskoeffizienten. Dies bedeutete, daß die Werte hier weniger schwankten und somit eine bessere Reproduzierbarkeit der Zellzahlbestimmung bei Einsatz der digitalen Bildanalyse gegeben war.

Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen die Größenverteilung und den Zirkularitätsfaktor von CHO-Zellen aus unterschiedlichen Probeserien. Die Zellen wurden in drei verschiedenen Versuchen unter identischen Bedingungen 48 Stunden kultiviert. Die berechneten mittleren Intensitätswerte der Zellen wurden nicht weiter verwendet, da sie keine zusätzliche Information zur Charakterisierung der toten und lebenden Zellen brachten. Diese Daten sind daher nicht näher dargestellt. Wie aus den Abbildungen hervorgeht, ist sowohl die mittlere Größe als auch der Zirkularitätsfaktor der lebenden und toten Zellen in etwa gleich groß, wobei es zu großen Varianzen innerhalb der einzelnen Probeserien kommt.

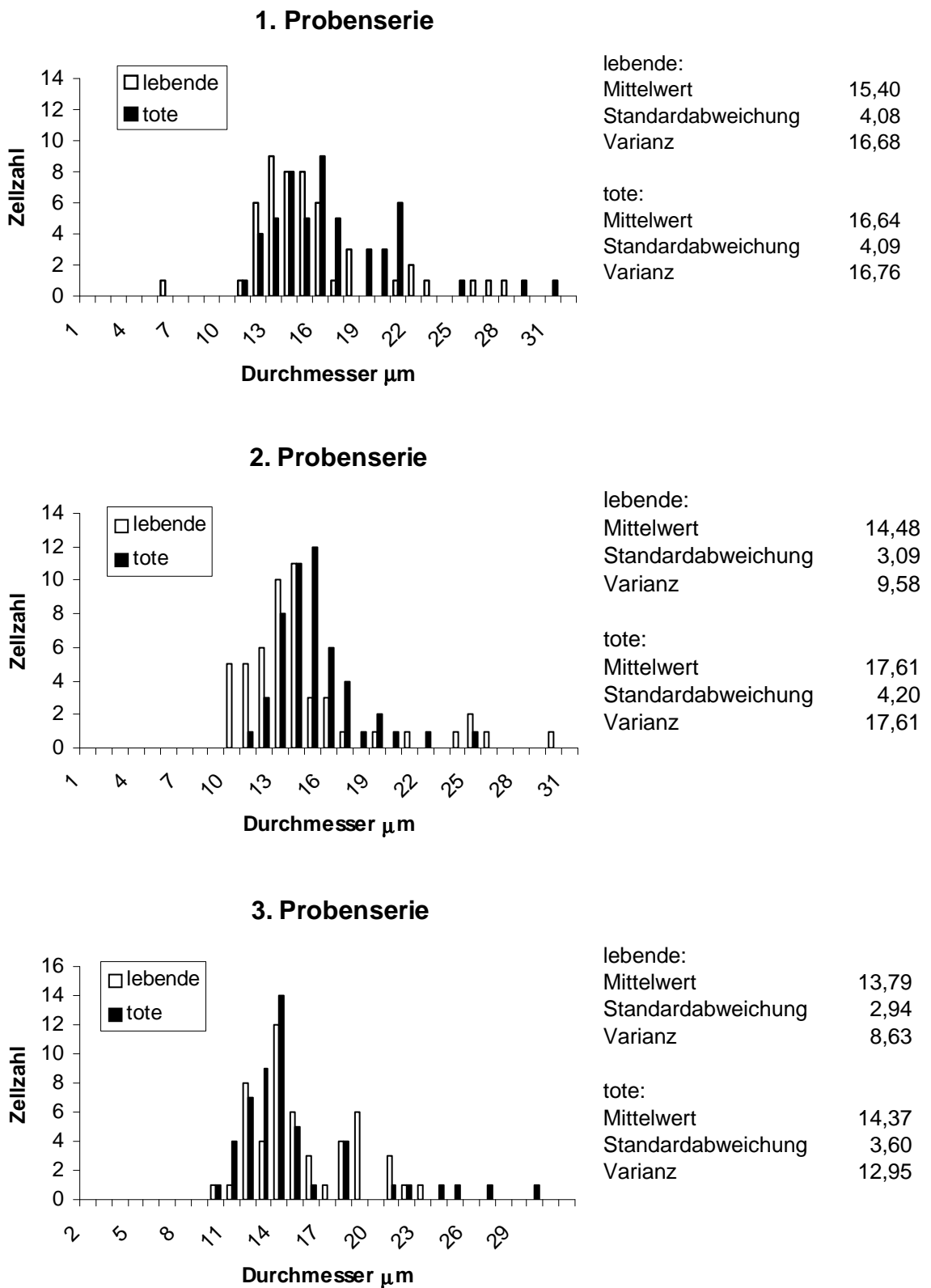


Abbildung 15: Größenverteilung von CHO-Zellen aus unterschiedlichen Probenserien

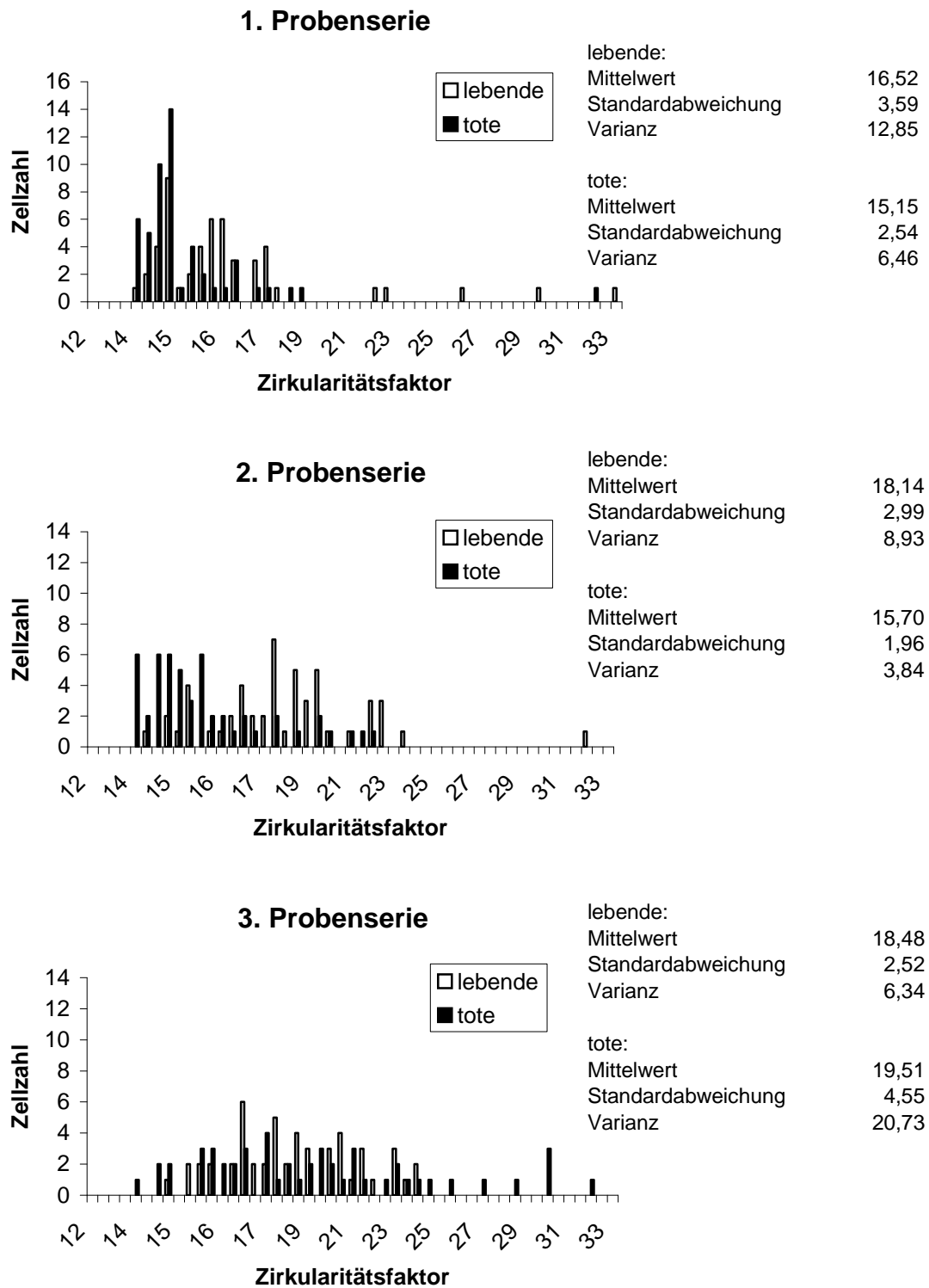


Abbildung 16: Zirkularitätsfaktor von CHO-Zellen aus unterschiedlichen Probeserien.

4.1.4 Prüfung des experimentellen Vorgehens

Entwickelte Färbemethode mit Erythrosin B

Um zu überprüfen, ob mit der entwickelten Färbemethode mit Erythrosin B der Anteil der toten Zellen korrekt bestimmt wurde, erfolgte parallel die Färbung und Auszählung mit Neutralrot. Hierzu wurden an vier verschiedenen Tagen Zellproben ausgezählt. Beide Färbemethoden führten dabei sowohl bei der Bestimmung der Gesamtzellzahl als auch der Anzahl toter Zellen zu übereinstimmenden Ergebnissen.

Auswirkung des Farbstoffes auf lebende Zellen

Für einen Test zur Auswirkung von Erythrosin B auf lebende Zellen wurde das Medium abgesaugt und anschließend direkt in die Flaschen Farbstofflösung in entsprechender Verdünnung gegeben. Die toten Zellen wurden unmittelbar in den Flaschen ausgezählt, danach die Farbstofflösung wieder abgesaugt und schließlich wieder mit frischem Medium befüllt und weiter kultiviert. Als Kontrolle dienten Flaschen mit den selben Kulturen und Kultivierungsbedingungen, bei denen nur das Medium abgesaugt und durch frisches ersetzt wurde. Dieser Vorgang wurde mehrmals alle zwei bis drei Tage wiederholt. Der Vergleich beider Kulturen ergab keinen Unterschied in der Lebendzellzahl, so daß ein merklicher Einfluß von Erythrosin B auf lebende Zellen ausgeschlossen werden konnte.

Behandlung der Zellen

a) Zentrifugation

Zunächst wurde untersucht, ob der vorgenommene Zentrifugationsschritt einen Einfluß auf den Anteil vitaler Zellen in der Zellsuspension hat. Hierzu wurden ebenfalls 4 verschiedene Zählungen verwendet, die jeweils mit und ohne Zentrifugationsschritt durchgeführt wurden. Die Auswertung der Daten ergab, daß die Zentrifugation keine Verminderung der Gesamtzellzahl bzw. des Anteils lebender/toter Zellen bewirkte.

b) Zeitdauer

Indem die Auswertung der Zellen zum Einen sofort nach dem Anfärben erfolgte und zum Anderen 20 Minuten später, wurde untersucht, wie stark sich der Anteil toter Zellen veränderte (Tabelle 2). Es wurde deutlich, daß sich der Anteil der toten Zellen mit zunehmender Auswertungsdauer sehr stark erhöht.

Tabelle 2: Anteile toter Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten der Auswertung.

	0 min	20 min
durchschnittliche Gesamtzellzahl pro Zählquadrat	43,1	33,9
durchschnittliche Anzahl toter Zellen	10,5	14,9
Zellzahl pro ml	780.000	610.000
prozentualer Anteil toter Zellen [%]	24,4	43,9

4.1.5 Zellmorphologie

Für die Bestimmung der durchschnittlichen Größe und Form der Zellen wurden 150 Zellen aus einer Probe aufgenommen und vermessen. Aus Tabelle 3 wird ersichtlich, daß der mittlere Durchmesser der toten und lebenden Zellen in etwa gleich groß war. Es hatte sich gezeigt, daß die Durchschnittsgröße der toten Zellen deutlich größere Schwankungen aufwies als die der lebenden Zellen, so daß die Bestimmung der Zellzahl im Klumpen aufgrund der mittleren Fläche vor allem bei toten Zellen zu einer großen Varianz führte. Auch die Zirkularitätsfaktoren der toten Zellen schwankten sehr stark im Vergleich zu lebenden Zellen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Mittelwerte und Variationskoeffizienten des Zelldurchmessers und der Zirkularität (bestimmt aus je 150 Zellen) innerhalb einer Probe.

	tote Zellen	lebende Zellen
mittlerer Durchmesser [μm]	16,79	16,68
Variationskoeffizient	2,48	1,01
mittlere Zirkularität	27,23	16,53
Variationskoeffizient	1,24	0,11

4.1.6 Erweiterung des Systems auf Hybridoma-Zellen

Durch die Variation des Schwellenwertes und Änderung der LUT-Transformation war es möglich, die entwickelte Bildanalysesequenz auch auf andere Zelllinien, z.B. Hybridoma-Zellen, anwenden zu können.

4.2 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung von Signalkomponenten bei der TNF-induzierten Apoptose

4.2.1 Bildung von rezeptor-assoziierten Signalkomplexen

Durch die Bindung des homotrimeren TNF an TNF-R1 bzw. TNF-R2 kommt es zum Clustering der transmembranen Rezeptorproteine. Als Folge hiervon werden, bedingt durch die Rekrutierung von Adaptermolekülen an die cytoplasmatischen Teile der geclusterten Rezeptoren, nachfolgende Signalkaskaden in Gang gesetzt (Ashkenazi and Dixit, 1998). Wie in Kapitel 2.1.2 detailliert beschrieben, bindet der geclusterte TNF-R2 TRADD, welches wiederum RIP und TRAF2 bindet. Der TRADD/RIP/TRAF2-Komplex (RISC) induziert über weitere Zwischenschritte die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. TNF-R2 bindet direkt TRAF2, wobei TRAF2 zusätzlich TRAF1 in den Signalkomplex einbringt. Ob bei diesem Signalweg ebenfalls RIP in den Rezeptorkomplex eingebunden wird, ist unklar.

Über den zeitlichen Ablauf der Bildung dieser Rezeptorsignalkomplexe nach Stimulation mit MR2-1, TNF und anderen Stimulantien sowie die Art der Rekrutierung der Adapterproteine war bislang noch nichts bekannt. Mittels der GFP-Markierung von TRAF2 und dem in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Bildanalyse-System wurde die Lokalisation dieses zentralen Adaptermoleküls wie auch die zeitliche Dynamik der Rekrutierung in lebenden Zellen näher untersucht. Für die Versuche wurden stabile Transfektanten von HeLa-Zellen verwendet, welche den TNF-R2 sowie GFP-getaggtetes TRAF2 stabil exprimierten (HeLa80).

Intrazelluläre Translokation von TRAF2

Zunächst wurden HeLa80 TRAF2-GFP Zellen 3 Stunden mit MR2-1 inkubiert und anschließend bildanalytisch ausgewertet. HeLa80-Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche etwa 80.000 TNF-R2 Rezeptoren und nur etwa 3.000 TNF-R1 Rezeptoren. Diese hohe Anzahl an TNF-R2-Rezeptoren und somit auch an Rezeptorsignalkomplexen sollte es ermöglichen, mit dem vorhandenen Bildanalyse-System die Rekrutierung von TRAF2 zu visualisieren. Die bisher durchgeführten Versuche mit einem konfokalen Mikroskop

ließen nur die Beobachtung von stark überexprimierenden Zellen zu, in denen die TRAF2-Konzentration ein Vielfaches der physiologischen Konzentration überschritt. Die aus diesen Versuchen erhaltenen Ergebnisse konnten nur unter Vorbehalt verwendet werden.

Abbildung 17 zeigt Aufnahmen der Zellen vor und nach der Stimulation (Verwendung eines 63 x Ölimmersionsobjektives). Aus den videomikroskopischen Aufnahmen wurde deutlich, daß TRAF2-GFP in unstimulierten schwach exprimierenden Zellen gleichmäßig verteilt im Cytoplasma vorliegt, der Zellkern bleibt frei (Abbildung 17 A). Nach der Zugabe von MR2-1 in die Kulturgefäße und dreistündiger Inkubation wurden erneut Aufnahmen gemacht. TRAF2-GFP war nun in kleinen Domänen entlang der Cytoplasmamembran angereichert. Abbildung 17 B zeigt die hellen kleinen Spots entlang der Membran. In Abbildung 17 C sind Zellen dargestellt, die das GFP-Konstrukt stark überexprimieren. Bei diesen Zellen liegt das Protein schon vor der Stimulation in Aggregaten vor. Ein Änderung der Proteinverteilung innerhalb der Aggregate wird bei diesen Zellen nicht beobachtet.

Um zu überprüfen, ob die gebildeten Spots tatsächlich geclusterte Domänen des RISC darstellten, wurde ein Kontrollversuch mit HeLa-Zellen durchgeführt. Diese Zellen besitzen keine TNF-R2 Rezeptoren auf der Oberfläche. Abbildung 17 D zeigt eine Aufnahme der Zellen nach 3 Stunden Inkubation mit MR2-1. Wie erwartet traten keine Spots an der Cytoplasmamembran auf.

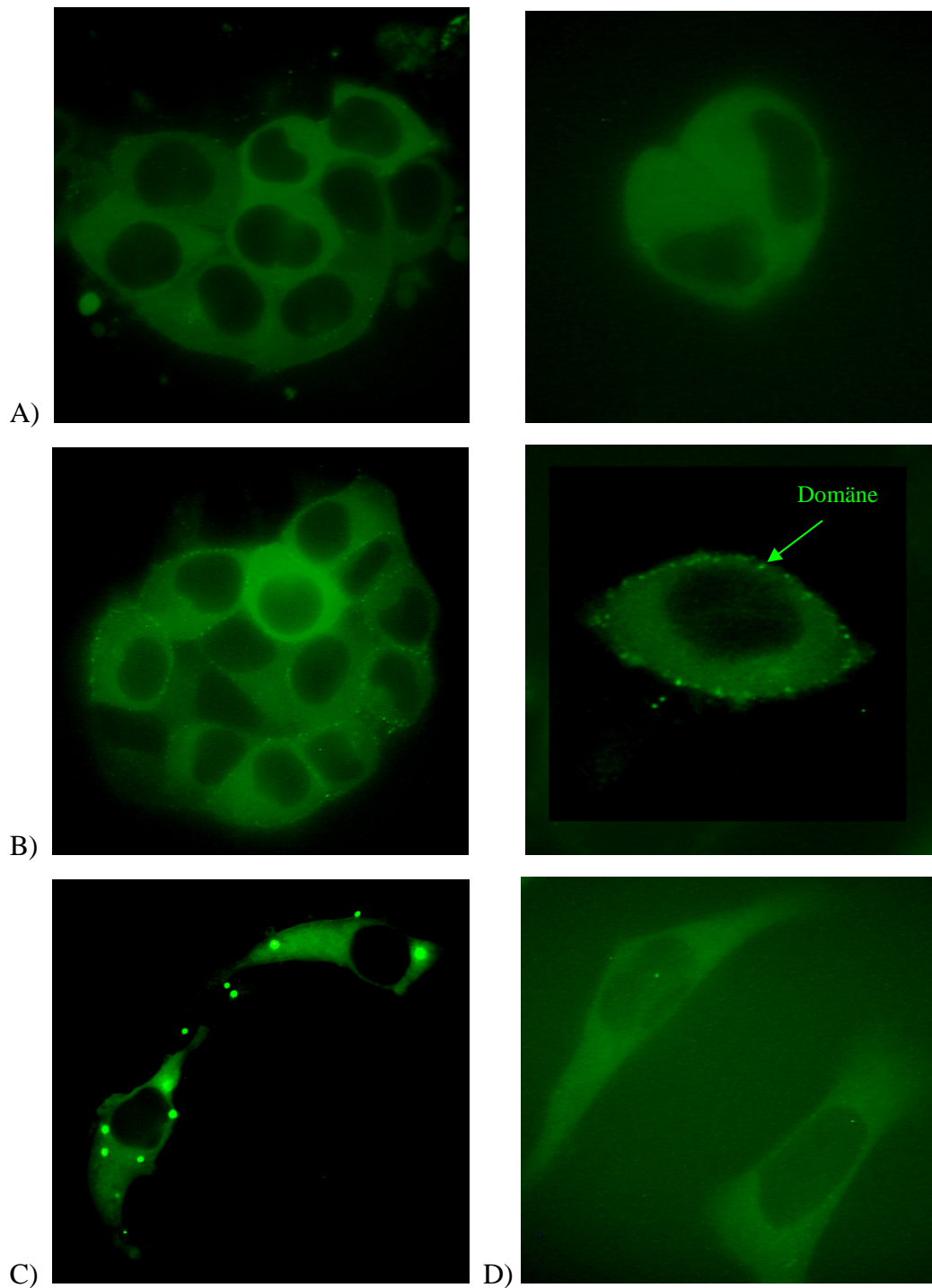
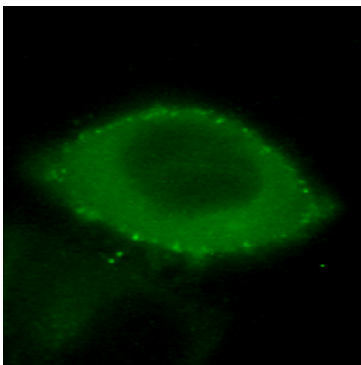


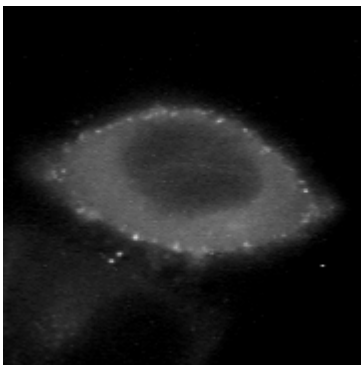
Abbildung 17: HeLa80 TRAF2-GFP Zellen vor und nach 3 h Inkubation mit MR2-1. A) Schwach exprimierende Zellen vor Inkubation (links Zellhaufen, rechts Einzelzellen). B) Schwach exprimierende Zellen nach Inkubation (links Zellhaufen, rechts Einzelzellen). C) Überexprimierende Zellen vor Inkubation. D) HeLa TRAF2-GFP Zellen nach 3 h Inkubation mit MR2-1.

Für die weiteren Versuche wurden daher stets Zellen ausgewählt, die nur eine sehr schwache Fluoreszenz zeigten, d.h. TRAF2-GFP nicht zu stark überexprimieren. Um eine höhere Signalintensität zu erhalten und damit die aufgenommenen Bilder auswerten zu können, wurden mit Hilfe der Videokamera 150 Bilder aufintegriert, was einer Aufnahmedauer von sechs Sekunden entspricht. Für die bildanalytische Bestimmung der Domänen an der Cytoplasmamembran wurde ein Algorithmus entwickelt, bei dem interaktiv die auszuwertenden Zellen festgelegt werden konnten. Abbildung 18 zeigt anhand von Bildern den Ablauf des Algorithmus. Dabei wurden die Farbbilder automatisch auf den Grünkanal reduziert und nach Anwendung eines Hochpaßfilters (eine detaillierte Beschreibung von Hochpaßfiltern findet sich bei Jähne (Jähne, 1991)) und anschließender Schwellenwertoperation wurden die Daten der extrahierten Objekte (Domänen), ihre Anzahl und Größe, gespeichert. Mittels entsprechender Variation des Schwellenwertes konnte dieser Algorithmus für sämtliche Versuche mit TRAF2 verwendet werden.

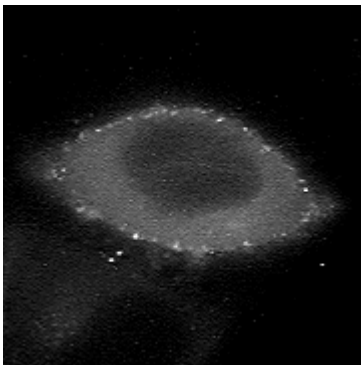


Originalbild

Einstellung der Integrationszeit (6 s)

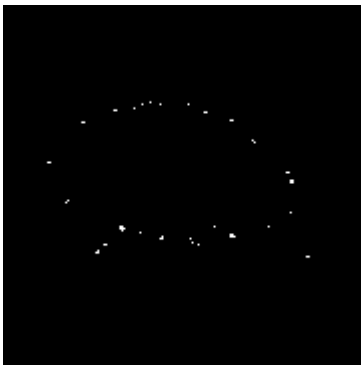


Reduktion auf den Grünkanal



Hochpaßfilter 3 x 3 (SharpenLow)

$$O = \begin{pmatrix} 0 & -1 & 0 \\ -1 & 6 & -1 \\ 0 & -1 & 0 \end{pmatrix}$$



Segmentierung (feste Schwelle)

Merkmalsextraktion: Anzahl der Objekte

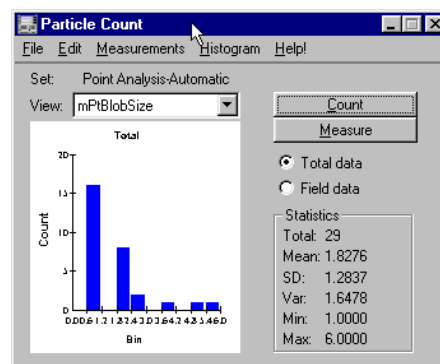
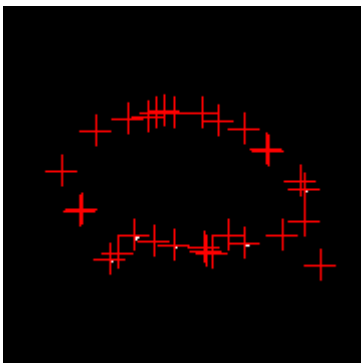


Abbildung 18: Interaktiv ablaufender Algorithmus zur Bestimmung der Anzahl von Domänen an der Cytoplasmamembran.

Dynamik der Translokation von TRAF2

Über den zeitlichen Verlauf der Rekrutierung von Adapterproteinen an die Cytoplasmamembran zur Bildung des RISC und eventuell auch die Degradation des Komplexes hatte es bisher noch keine genauen Angaben gegeben. Durch eine Versuchsreihe, bei der die Inkubationszeiten mit MR2-1 von mehreren Stunden auf eine Minute reduziert wurden und anschließender Aufnahme der Zellen, konnte der zeitliche

Verlauf der Bildung der membran-assoziierten Domänen ermittelt werden. In einem ersten Versuch wurden nach 1, 2 und 3 Stunden jeweils Bilder aufgenommen und die gebildeten Domänen pro Zelle ausgezählt (Tabelle 4). Für die Bestimmung der mittleren Anzahl wurden jeweils 10 Zellen verwendet.

Tabelle 4: Anzahl der Domänen nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit MR2-1.

Inkubationszeit [h]	Mittlere Anzahl Domänen/Zelle
3	11,5
2	11,3
1	6,8
0	0,2

Dieser Versuch zeigte, daß die Bildung der membrangebundenen Domänen in weniger als einer Stunde nach Zugabe des Antikörpers erfolgen mußte. Aus diesem Grund wurde in der folgenden Versuchsreihe die Aufnahme von Zellen in zweiminütigem Abstand vorgenommen. Dabei wurden für jeden Zeitpunkt 30 Zellen ausgewertet. Abbildung 19 zeigt den zeitlichen Verlauf der Bildung der membrangebundenen Domänen. Bereits nach vier Minuten Inkubation mit MR2-1 wurden die ersten Domänen gebildet und nach etwa 20 Minuten war ihre maximale Anzahl, in dieser Versuchsreihe etwa acht Domänen pro Zelle, erreicht. Dabei wurde aus dieser und der vorherigen Versuchsreihe deutlich, daß sich die Anzahl der Domänen über längere Zeit hinweg (bis zu drei Stunden) nicht wieder verringerte, sondern auf einem konstanten Niveau blieb.

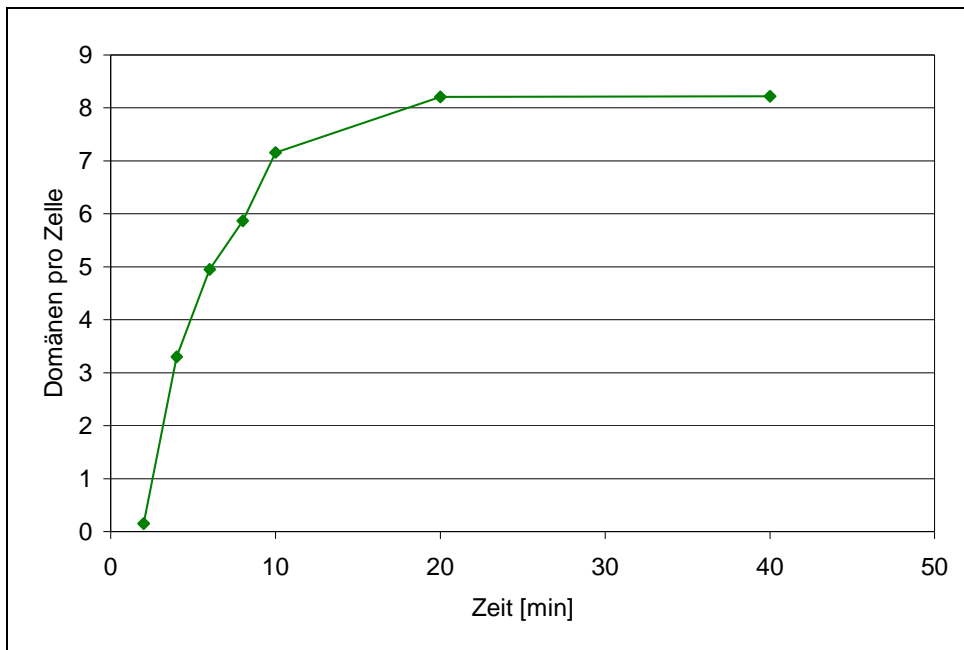


Abbildung 19: Kinetik der Bildung von Signalkomplexen

Effekte unterschiedlicher Stimulantien auf die Bildung membrangebundener Domänen

Neben der Aufklärung der zeitlichen Zusammenhänge zwischen der Stimulation des TNF-R1 und der Bildung der RISC galt eine weitere Versuchsreihe der Untersuchung von Effekten verschiedener Stimulantien auf die membran-assoziierten Signalkomplexe. Neben MR2-1 wurden hierfür 80-M2, lösliches TNF (l-TNF), Maus IgG κ , Kaninchenserum und l-TNF zusammen mit 80-M2 eingesetzt. In Abbildung 20 sind Aufnahmen dargestellt, die Zellen nach drei Stunden Inkubation mit den verschiedenen Stimulantien zeigen.

Wie die Auswertung der Bilder ergab, zeigten die gebildeten Domänen deutliche Unterschiede sowohl in ihrer Anzahl, als auch in ihrer Größe und Intensität. Wie aus Tabelle 5 deutlich wird, treten bei Einsatz des Kaninchenserums die meisten Domänen auf. Die mittlere Anzahl der Domänen unter Verwendung von MR2-1 erreichte einen Wert von 13,5. Wurden 80-M2 und l-TNF einzeln verwendet, so entstanden nur wenige membrangebundene Domänen. Verwendete man jedoch beide Stimulantien gleichzeitig, so erhöhte sich ihre mittlere Anzahl deutlich und war mit 10,7 pro Zelle in etwa so groß wie beim Einsatz von MR2-1. Das Immunglobulin IgG κ führte zu keinen Domänen.

Tabelle 5: Mittlere Anzahl der Domänen von jeweils 12 Einzelzellen nach 3 h Inkubation mit unterschiedlichen Stimulantien

Stimulus	Mittlere Anzahl Domänen/Zelle
kein	0,1
MR2-1	13,5
80-M2	5,7
1-TNF	5,2
80-M2 und 1-TNF	10,7
Kaninchenserum	15,9
IgGκ	0,0

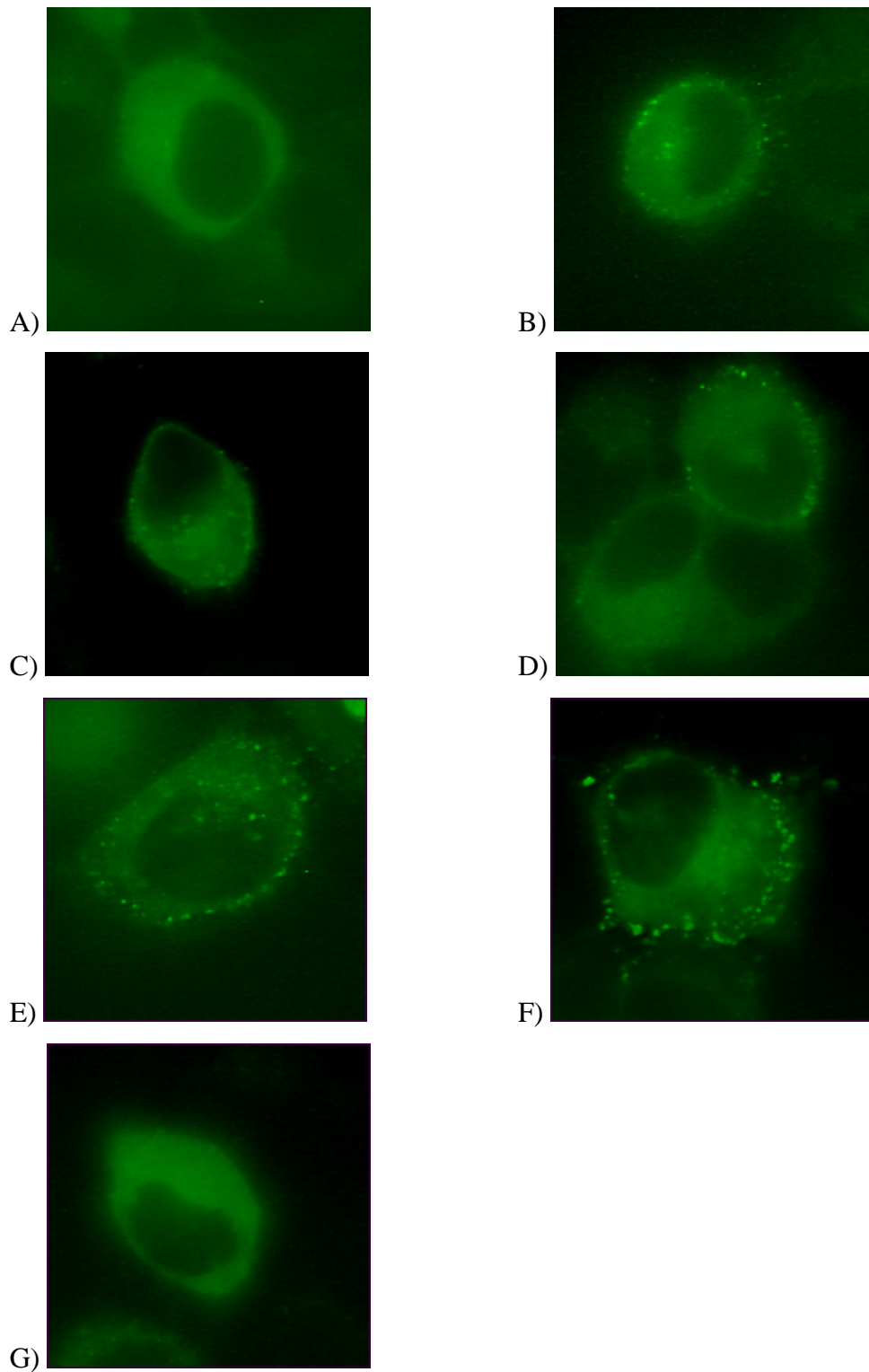


Abbildung 20: HeLa80 TRAF2-GFP Zellen nach 3 h Inkubation mit verschiedenen Stimulantien. A) Kontrolle, keine Stimulation B) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ MR2-1 C) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 80-M2 D) 0,01 $\text{ng}/\mu\text{l}$ lösliches TNF E) lösliches TNF zusammen mit 80M-2 F) Kaninchenserum G) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ IgG κ

Rekrutierung verschiedener Adapterproteine

Neben TRAF2 werden auch andere Adapterproteine in die Signalkomplexe an die Cytoplasmamembran eingebunden. So sollte in einem weiteren Versuch geprüft werden, welche der TRAF-Proteine sich ebenfalls in membran-gebundenen Domänen anreichern. Hierzu wurden HeLa80-Zellen eingesetzt, die entweder TRAF1-GFP, TRAF2-GFP, TRAF3-GFP, TRAF4-GFP, TRAF5-GFP oder TRAF6-GFP produzierten. Als Kontrollzellen dienten HeLa80-GFP. Stimuliert wurden die Zellen 3 Stunden mit MR2-1 und IgG1 κ . Falls genügend TRAF-GFP exprimierende Zellen vorhanden waren, wurden jeweils 15 Zellen ausgewertet. Da bei TRAF5-GFP bzw. TRAF6-GFP nur sehr wenige grüne Zellen vorhanden waren, konnten hier nur etwa fünf Zellen ausgewertet werden. Tabelle 6 zeigt die mittlere Anzahl an Domänen bei den einzelnen Zelltypen. Es zeigte sich, daß außer bei TRAF2 nur bei TRAF3 eine nennenswerte Rekrutierung in membrangebundene Domänen stattfand, wobei ihre Anzahl nur sehr gering war (im Durchschnitt etwa zwei Domänen pro Zelle). Die Verteilung aller TRAF-Moleküle vor Stimulation war, unter Aussparung des Zellkerns, cytoplasmatisch wie bei TRAF2.

Tabelle 6: Mittlere Anzahl an membrangebundenen Domänen bei Stimulation mit MR2-1 und IgG κ unter Einsatz verschiedener TRAF-GFP Konstrukte.

Zelltyp	Mittlere Anzahl Domänen/Zelle Inkubation mit MR2-1	Mittlere Anzahl Domänen/Zelle Inkubation mit IgG κ
HeLa80-TRAF1-GFP	0,3	1,0
HeLa80-TRAF2-GFP	12,5	0,1
HeLa80-TRAF3-GFP	2,1	0,0
HeLa80-TRAF4-GFP	0,0	0,0
HeLa80-TRAF5-GFP	0,0	1,6
HeLa80-TRAF6-GFP	-	0,0
HeLa80-GFP	0,0	0,0

Unterschiede im Bindungsverhalten N- bzw. C-terminaler GFP-Mutanten

Die Ankopplung des GFP Moleküls kann an verschiedenen Enden des TRAF2 Moleküls erfolgen. Bei der in den bisherigen Versuchen eingesetzten HeLa80 Mutante war das GFP Molekül am C-Terminus (TRAF-Domäne) angekoppelt (I). Durch die Herstellung einer Mutante deren GFP Molekül am N-Terminus (II) gebunden war, sowie einer weiteren Mutante ohne TRAF-Domäne und der Bindung des GFP am Ring-Finger des TRAF2-Moleküls (III), sollte das unterschiedliche Bindungsverhalten zum Rezeptor untersucht werden (Abbildung 21).

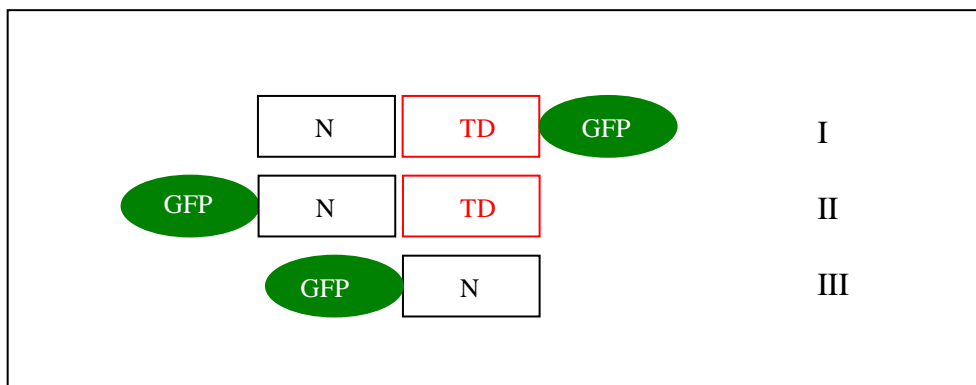


Abbildung 21: Schematische Darstellung des TRAF2-GFP Moleküls mit unterschiedlichen Ankopplungsstellen.

Als Kontrollzellen dienten HeLa80-GFP. Stimuliert wurden die Zellen 3 Stunden mit MR2-1. Der Versuch wurde zweimal wiederholt. Tabelle 7 zeigt die mittlere Anzahl der gebildeten Membrandomänen nach 10 bzw. 15 Minuten und nach 90 Minuten. Wie die beiden Versuche demonstrierten, erfolgte die Bildung der Domänen bei Ankopplung des GFP an das N-terminale Ende schneller als bei der C-terminal gekoppelten Mutante. Nach 90 Minuten nahm die Anzahl der Domänen bei der N-terminalen Mutante wieder leicht ab, wobei die Domänenanzahl der C-terminalen Mutante zwar weiterhin geringer war, jedoch im Vergleich zum ersten Zeitpunkt noch zugenommen hatte. Bei der Ring-Finger gekoppelten Mutante konnten keine bzw. nur sehr wenige Domänen nachgewiesen werden.

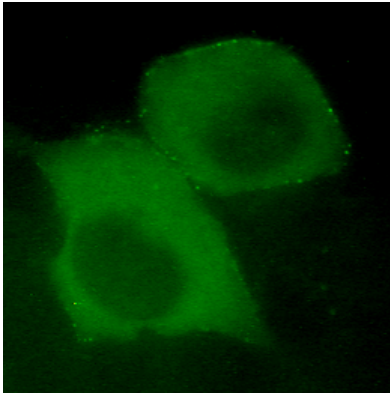
Tabelle 7: Mittlere Anzahl an membrangebundenen Domänen pro Zelle bei Stimulation mit MR2-1 unter Einsatz verschiedener Ankopplungsstellen für GFP.

GFP-Mutante	Domänen/Zelle 10 min	Domänen/Zelle 90 min	Domänen/Zelle 15 min	Domänen/Zelle 90 min
I	6,1	9,4	8,8	10,5
II	15,3	11,0	10,8	9,6
III	0,0	0,0	2,3	0,0

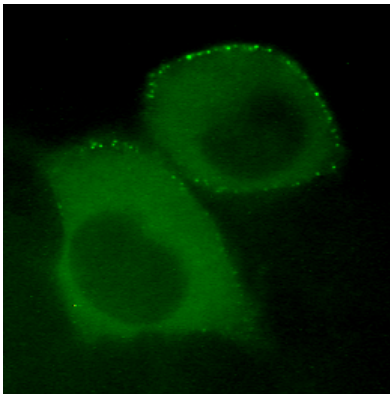
Zellkammerversuche

Die bisher beschriebenen Versuche wurden unter Einsatz eines Objektträgers und einzelner bewachsener Glasplättchen durchgeführt. Um einzelne Zellen über einen längeren Zeitraum unter physiologischen Bedingungen beobachten zu können, wurde die in Kapitel 3.3.4 detailliert beschriebene Kammer eingesetzt.

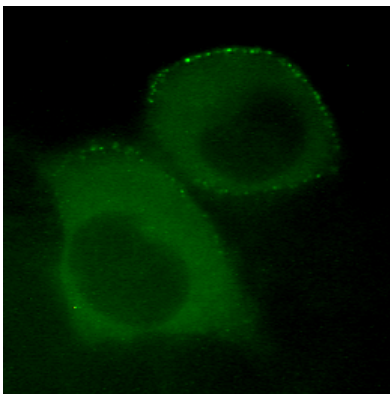
Zur Untersuchung der Bildung von membrangebundenen Domänen wurden wie bisher HeLa80 TRAF2-GFP Zellen verwendet. Abbildung 22 zeigt Zellen in der Kammer nach einer Minute Inkubation mit MR2-1 und weiter im Abstand von jeweils einer Minute. Bereits nach einer Minute sind erste Domänen zu erkennen, deren Anzahl und Intensität sich im weiteren Verlauf erhöhen. Im zweiten Bild wird jedoch deutlich, daß die Fluoreszenz mit der Länge der Bestrahlung deutlich abnimmt. Derartiges Fading wurde bei der bisherigen Verwendung von Objektträgern nicht beobachtet.



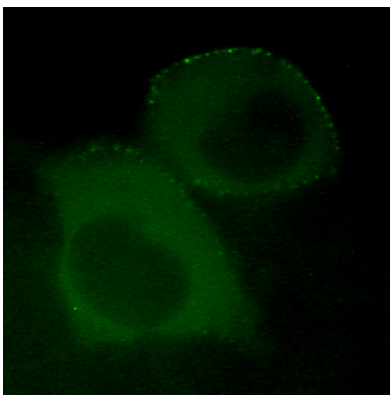
Inkubationsdauer 1 Minute



Inkubationsdauer 2 Minuten



Inkubationsdauer 3 Minuten



Inkubationsdauer 4 Minuten

Abbildung 22: HeLa80 TRAF2-GFP stimuliert mit MR2-1: Aufnahme unter physiologischen Bedingungen im Abstand von einer Minute.

Die Wiederholung des Versuchs zeigte, daß der Nachweis der membrangebundenen Domänen durch das Fading wiederum deutlich erschwert war. Zur Quantifizierung des Fading wurde eine Fadingkurve aufgenommen. Hierzu wurden einzelne Zellen kontinuierlich mit Fluoreszenzlicht bestrahlt und im Abstand von einer Minute aufgenommen. Anschließend wurde der mittlere Grauwert eines kleinen intrazellulären Bereichs (3x3 Pixel) ermittelt und dessen Abnahme mit der Zeit festgehalten. Abbildung 23 zeigt den Verlauf der Abnahme des mittleren Grauwertes. Bereits nach 3 Minuten Bestrahlungszeit waren nur noch 50 % der Signalintensität vorhanden und nach 10 Minuten waren praktisch keine GFP-Moleküle mehr nachweisbar.

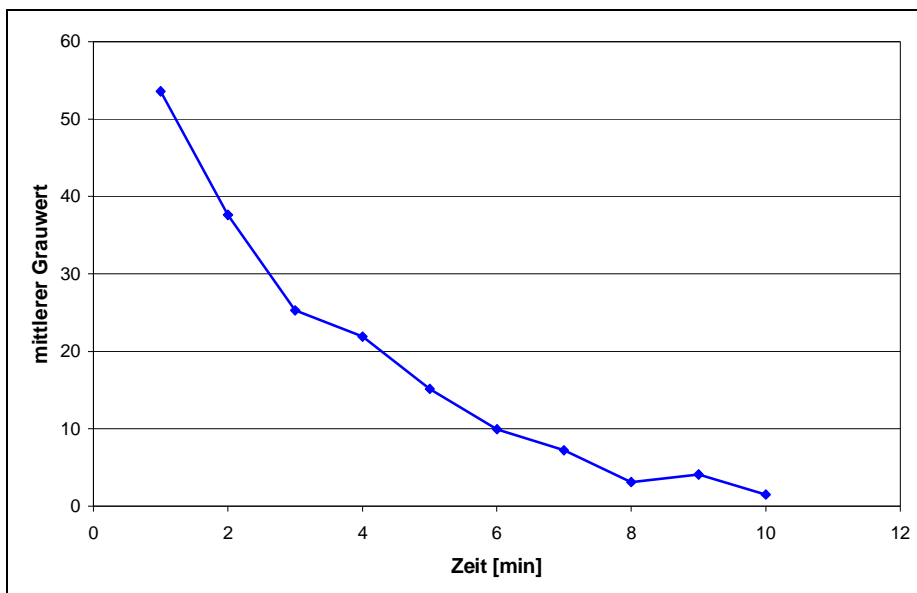


Abbildung 23: Fading-Kurve von TRAF-2-GFP in-vivo unter physiologischen Bedingungen in der Zellkammer.

4.2.2 Quantifizierung der Fluoreszenzsignale

Wie in Kapitel 2.3.3 detailliert beschrieben ist es realisierbar, bei Beachtung spezieller Vorgaben wie geringe numerische Apertur des Objektives, geringe Konzentrationen an Fluorophor und auftretendes Fading, Fluoreszenzsignale zu quantifizieren. Damit ist es möglich, einer bestimmten Signalintensität eine entsprechende Anzahl bzw. Konzentration an fluoreszierenden Molekülen zuzuordnen. Für die Untersuchungen zur Bildung membranassoziierter Signalkomplexe war nicht nur die Entstehungskinetik dieser Komplexe bzw. der Nachweis einzelner Signalmoleküle in diesen Komplexen

interessant, sondern es stellte sich auch die Frage, wieviele Moleküle in die Komplexe rekrutiert werden. Besonders im Hinblick auf die mathematische Modellierung der Signaltransduktionswege stellt die Quantifizierung unter physiologischen Bedingungen einen wichtigen Aspekt dar.

Um einen ersten Anhaltspunkt zu bekommen, ob die in den Versuchen ausgewählten schwach grünen Zellen eine physiologisch sinnvolle Menge an GFP-markiertem Protein exprimierten, wurde zunächst die Konzentration berechnet, die einer Molekülmenge von 500.000 Molekülen pro Zellen entspricht. Diese Molekülanzahl (H. Wajant, persönliche Mitteilung) stellt den maximalen Wert des physiologisch sinnvoll produzierten Proteines in der Zelle dar. Die folgenden Berechnungen ergeben die dieser Anzahl proportionale Proteinkonzentration.

Molekulargewicht eines Fusionsproteins: $M \approx 80.000 \frac{g}{mol}$

Avogadrozahl: $N_0 = 6,022045 * 10^{23} \frac{Moleküle}{mol}$

Anzahl Moleküle pro Zelle: $A_Z = 500.000 \frac{Moleküle}{Zelle}$

Molekülmasse pro Zelle:

$$m_Z = \frac{M * A_Z}{N_0} = \frac{80.000 * 500.000}{6,022045 * 10^{23}} \frac{g}{Zelle} = 6,6 * 10^{-14} \frac{g}{Zelle} \quad (4.1)$$

Zelldicke (Annahme): $D_Z = 6 \mu m$

Mittlere Fläche einer Zelle: $F_Z = 560 \mu m^2$

(bestimmt aus 50 Einzelzellen)

Mittleres Zellvolumen:

$$V_Z = D_Z * F_Z = 3.360 \mu m^3 = 3,36 * 10^{-9} ml \quad (4.2)$$

Molekülkonzentration:

$$c = \frac{m_Z}{V_Z} = \frac{6,6 * 10^{-14}}{3,36 * 10^{-9}} \frac{g}{ml} = 1,96 * 10^{-5} \frac{g}{ml} \quad (4.3)$$

d.h. 500.000 Fusionsproteine entsprechen einer Konzentration von $\approx 200 \frac{\mu g}{ml}$.

Um einen Standard zur Bestimmung der Proteinkonzentration aus dem Intensitätswert zu erhalten, wurde eine Verdünnungsreihe mit dem TRAF2-GFP-markierten Protein erstellt und anschließend mittels Videomikroskopie Aufnahmen dieser Proteinlösungen gemacht. In Abbildung 24 sind die Intensitätswerte über die Integrationsdauer der Kamera graphisch dargestellt. Dabei wurden drei Proteinkonzentrationen, 10 µg/mol, 50 µg/mol und 75 µg/mol verwendet. Aus der Abbildung wird deutlich, daß die Kamera in diesen Konzentrationsbereichen bei Erhöhung der Integrationsdauer lineare Ausgangssignale liefert. Erst bei 75 µg/mol weicht die Kamera ab etwa 200 aufintegrierten Bildern, dies entspricht einer Integrationszeit von 8 Sekunden, von dem linearen Verhalten ab. Damit ist eine wichtige Voraussetzung, nämlich die Bereitstellung linearer Ausgangssignale durch die Kamera, zur quantitativen Fluoreszenzmikroskopie erfüllt. Weiterhin wird aus Abbildung 25 deutlich, daß die Verfünffachung bzw. 7,5-fache Erhöhung der Proteinkonzentration nicht zu einer entsprechenden 5-fachen bzw. 7,5-fachen Erhöhung der Intensitätswerte führte. Somit konnten für die Korrelation zwischen Konzentration und Intensitätswert keine linearen Zusammenhänge angenommen werden. Wählt man wie in Abbildung 24 dargestellt eine andere Form der graphischen Darstellung dieser Daten, so erhält man eine Kurvenschar, bestehend aus den jeweiligen Integrationszeiten, bei der die Intensitätswerte über der Proteinkonzentration aufgetragen sind. Mit diesem Standard ließen sich nun direkt, bei bekanntem Intensitätswert, die entsprechenden Proteinkonzentrationen berechnen. Ein wichtiger Punkt hierbei ist, daß der Hintergrund bei der Berechnung mit berücksichtigt wird. Durch eventuelle Autofluoreszenzen der Zellbestandteile und auch durch Streulicht im System kann es zu einer Verfälschung der gemessenen Intensitätswerte kommen. Daher ist es notwendig, stets eine Messung des Hintergrundes unter den selben optischen Bedingungen vorzunehmen und diesen Hintergrundwert dann mit in die Berechnung mit aufzunehmen.

Die gesuchte Proteinkonzentration berechnet sich damit nach folgender Formel:

$$c_P = \frac{c_S * (I_P - I_{P,H})}{I_S - I_{S,H}} \quad (4.4)$$

wobei c_P die Konzentration der Probe und c_S die bekannte Konzentration des Standards angeben. I_P und I_S stellen die gemessenen Intensitätswerte der Probe und des Standards

dar und $I_{P,H}$ und $I_{S,H}$ jeweils die gemessenen Intensitätswerte des Hintergrundes der Probe und des Standards.

Die zuvor berechnete Proteinkonzentration von maximal 200 $\mu\text{g/ml}$ in der Zelle entsprach demnach bei Integration von 150 Bildern (verwendete Anzahl bei den Versuchen zur Translokation von TRAF2) einem maximalen Intensitätswert von etwa 42. Ein Vergleich der Intensitätswerte der ausgewerteten Zellen unter Berücksichtigung des Hintergrundes ergab, daß alle Zellen einen mittleren cytoplasmatischen Intensitätswert von ≤ 45 besaßen und somit die durchgeführten Untersuchungen stets mit Zellen erfolgt sind, die das entsprechende Protein nicht zu stark überexprimierten. Für die erhaltenen Ergebnisse können folglich physiologische Bedingungen angenommen werden.

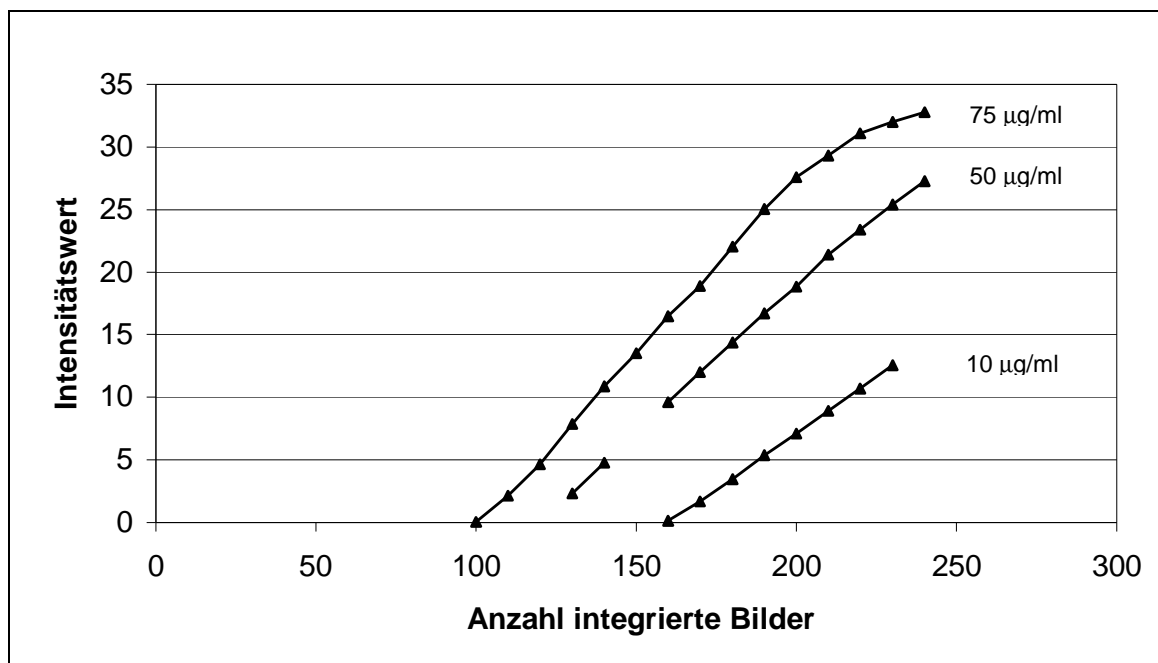


Abbildung 24: Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Intensitätswert: Intensitätswert über der Anzahl der integrierten Bilder.

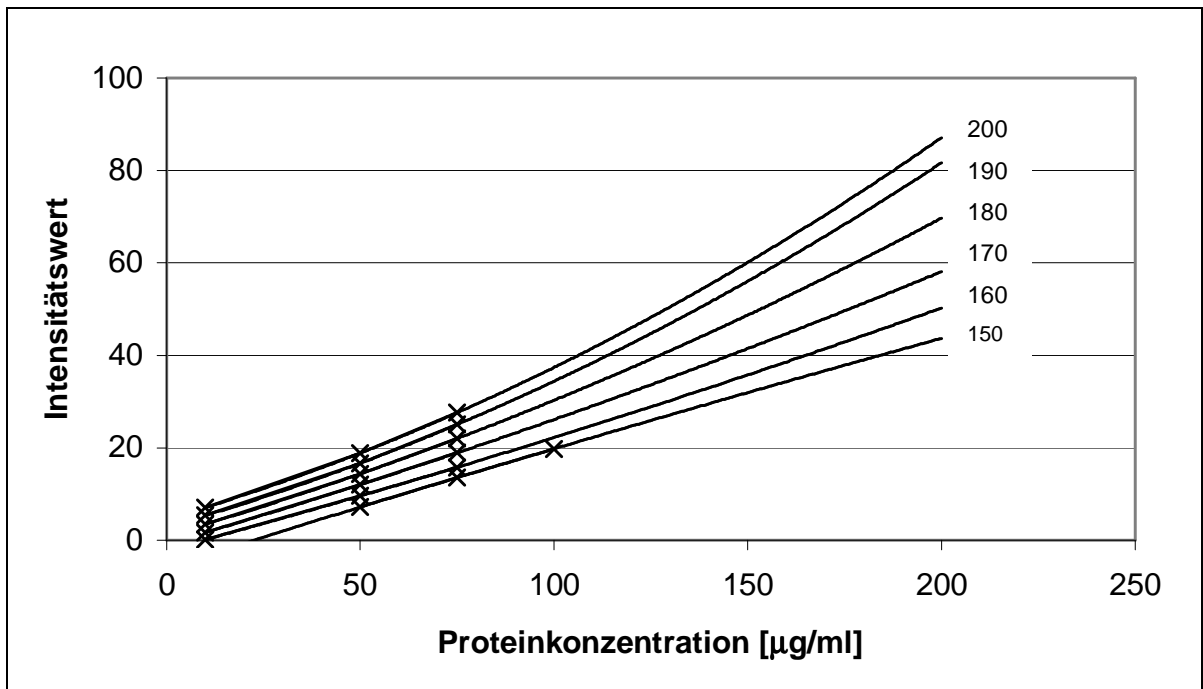


Abbildung 25: Zusammenhang zwischen Proteinkonzentration und Intensitätswert: Intensitätswert über der Konzentration.

Die Homogenität der Ausleuchtung ist ein weiterer wichtiger Faktor für die Reproduzierbarkeit quantitativer Bestimmungen. Für die Proteinkonzentration 50 µg/ml wurde die Messung der Intensitätswerte an zwei verschiedenen Stellen im Bild durchgeführt. Abbildung 26 zeigt den Verlauf beider Messungen. Kurve a) zeigt den Verlauf eines zentrumsnahen Intensitätswertes, während Kurve b) den Intensitätswert eines Pixels, der weiter zum Rand hin verschoben ist, zeigt. Dieser Versuch verdeutlicht, daß das Bild nicht homogen ausgeleuchtet ist. Durch die Aufnahme eines Hintergrundbildes ohne Objekt und die Darstellung der Intensitätswerte entlang einer vertikalen und horizontalen Achse durch die Bildmitte wurde klar, daß die Bildausleuchtung vom Bildmittelpunkt zum Rand hin konstant abnimmt (Abbildung 27).

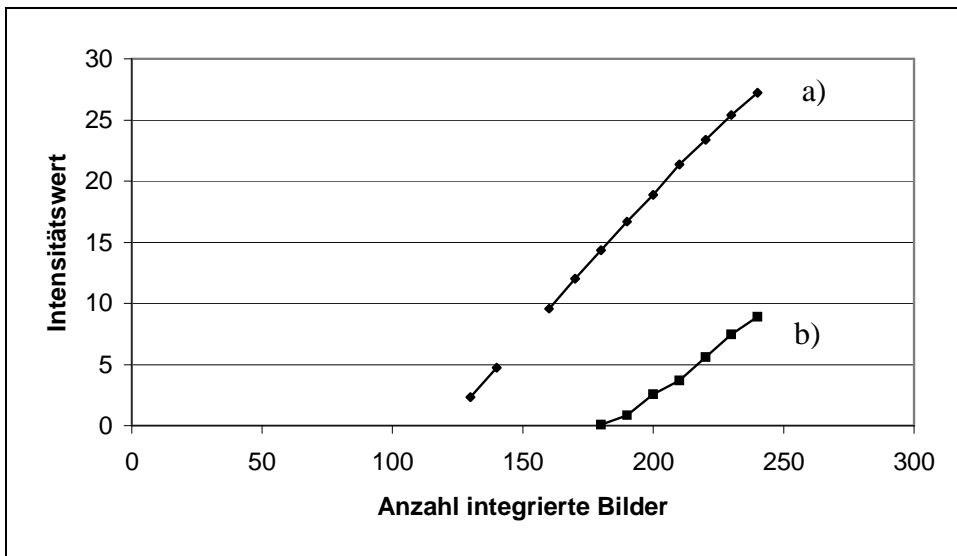
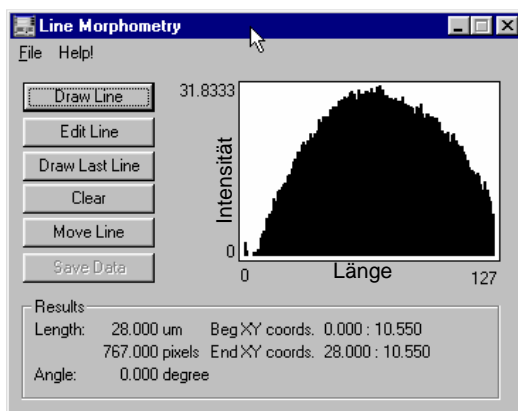
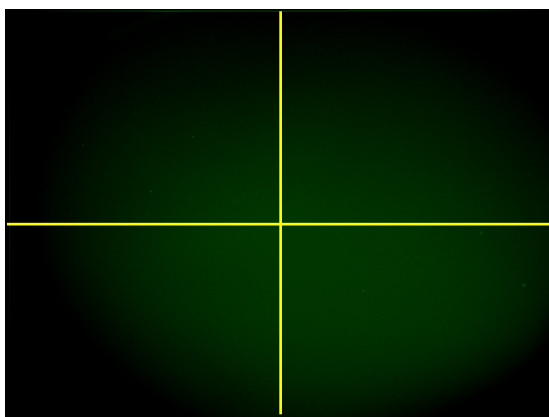
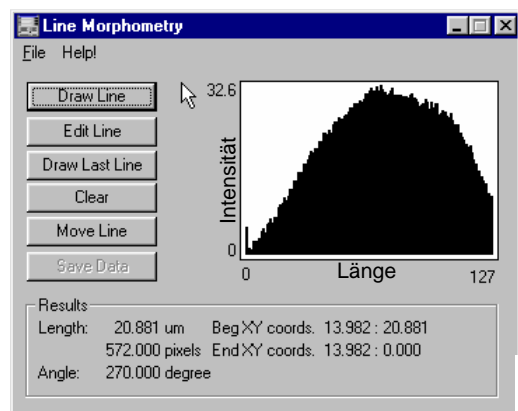


Abbildung 26: Verlauf des Intensitätswertes von 50 µg/ml TRAF2-GFP bei Variation der Integrationsdauer an zwei verschiedenen Stellen im Objekt.



a)



b)

Abbildung 27: Aufnahme eines Hintergrundbildes und Verlauf der Intensitätswerte entlang der eingezeichneten a) horizontalen und b) vertikalen Linie.

Zur Quantifizierung der Signale muß somit darauf geachtet werden, daß vergleichbare Messungen stets an der selben Stelle im Bild erfolgen (keine Verschiebung der Objekte), bzw. falls dies nicht möglich ist, eine Korrektur der Intensitätswerte entsprechend dem Ausleuchtungsverlauf im Bild vorgenommen wird.

Quantifizierung der Translokation von TRAF2 in der Zellkammer

Anhand der Aufnahmen aus der Zellkammer wurde eine erste Quantifizierung der Translokation von TRAF2-GFP aus dem Cytoplasma an die Membran und die Bildung von membrangebundenen Domänen vorgenommen. In Abbildung 28 ist eine einzelne Zelle als Ausschnitt aus der gesamten Aufnahme und die extrahierten Domänen dargestellt. Die Aufnahme erfolgte nach zwei Minuten Inkubation mit MR2-1. Die aus der Bildanalyse gewonnenen Daten der membrangebundenen Domänen und die entsprechenden Histogramme zeigen Tabelle 8 und Abbildung 29. Neben dem Durchmesser und dem mittleren Grauwert der Domänen sind in der Tabelle die berechneten fading-korrigierten Grauwerte und die berechnete Proteinkonzentration aufgeführt.

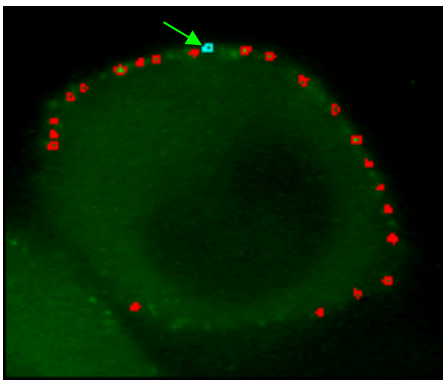


Abbildung 28: Bildausschnitt aus dem Zellkammerversuch mit HeLa80-TRAF2-GFP stimuliert mit MR2-1: Aufnahme unter physiologischen Bedingungen nach zwei Minuten. Extrahierte Domänen sind rot dargestellt.

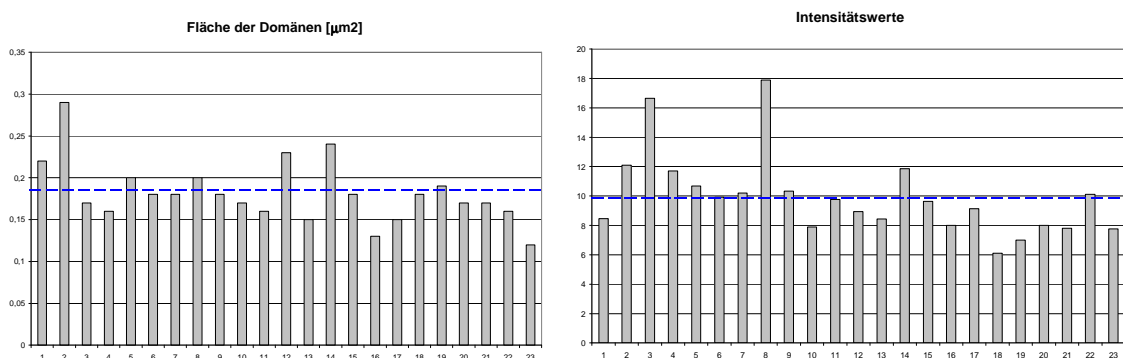


Abbildung 29: Histogramme der Domänenfläche (links) und mittleren Intensitätswerte der Domänen (rechts) zu den Daten aus Tabelle 8.

Tabelle 8: Mittels Bildanalyse extrahierte Daten der membrangebundenen Domänen aus Abbildung 28.

Count	Fläche [μm^2]	Umfang [μm]	Mittlerer Intensitätswert	Mittlerer Intensitätswert fading-korrigiert	Proteinkonz. [mg/ml]
1	0,22	1,8	8,45	10,97	76,48
2	0,29	2,08	12,08	15,68	109,33
3	0,17	1,59	16,63	21,58	150,52
4	0,16	1,58	11,71	15,20	105,99
5	0,2	1,84	10,67	13,85	96,57
6	0,18	1,85	9,92	12,88	89,78
7	0,18	1,65	10,2	13,24	92,32
8	0,2	1,82	17,89	23,22	161,92
9	0,18	1,69	10,33	13,41	93,50
10	0,17	1,61	7,89	10,24	71,41
11	0,16	1,54	9,75	12,65	88,25
12	0,23	1,96	8,92	11,58	80,73
13	0,15	1,55	8,44	10,95	76,39
14	0,24	1,83	11,85	15,38	107,25
15	0,18	1,75	9,64	12,51	87,25
16	0,13	1,38	8	10,38	72,41
17	0,15	1,56	9,13	11,85	82,63
18	0,18	1,63	6,1	7,92	55,21
19	0,19	1,88	7	9,09	63,36
20	0,17	1,55	8	10,38	72,41
21	0,17	1,67	7,8	10,12	70,60
22	0,16	1,67	10,11	13,12	91,50
23	0,12	1,49	7,75	10,06	70,14

Für die in Abbildung 28 mit Pfeil markierte Domäne wurde exemplarisch aus der Proteinkonzentration die TRAF2-GFP Menge vor und nach ein bzw. zwei Minuten Stimulation mit MR2-1 berechnet. Dabei wurde für die Domäne eine Fläche von $0,22 \mu\text{m}^2$ berechnet und eine Schichtdicke von $0,1 \mu\text{m}$ angenommen. Hieraus folgte ein Volumen V_D von $0,022 \mu\text{m}^3$ ($2,2 \cdot 10^{-14}$ ml). Zur Berechnung der Proteinmenge in der Domäne vor Stimulation ergab sich der Intensitätswert 6,01, was gemäß Abbildung 23 einer Proteinkonzentration von $41,91 \mu\text{g/ml}$ entspricht. Die entsprechende Proteinmasse m_D pro Domäne berechnet sich nach Gleichung 4.3:

$$m_D = c * V_D = 41,91 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} * 2,2 * 10^{-14} \text{ ml} = 9,22 * 10^{-13} \mu\text{g}$$

Die Molekülanzahl x pro Domäne wird mittels Avogadrozahl und Molekulargewicht gemäß Gleichung 4.1 folgendermaßen berechnet:

$$x = \frac{m_D * N_0}{M} = \frac{9,22 * 10^{-13} \mu\text{g} * 6,022045 * 10^{23} \frac{\text{Moleküle}}{\text{mol}}}{80.000 * 10^3 \frac{\mu\text{g}}{\text{mol}}} = 6,94 * 10^3 \text{ Moleküle}$$

Unter Berücksichtigung des Fading wurde für die markierte Domäne die Molekülanzahl im Abstand von einer Minute nach obigem Schema berechnet. Abbildung 30 zeigt, daß die Anzahl der TRAF2-GFP Moleküle in der Domäne während der ersten drei Minuten Inkubation mit MR2-1 zunahm. Nach drei Minuten war die Molekülmenge 6,5-mal größer als in unstimuliertem Zustand. Danach nahm sie wieder ab. Durch das starke Fading der Probe war es leider nicht möglich, den Intensitätswert der Domäne weiter zu erfassen. Die Proteinkonzentration im Cytoplasma blieb während dessen in diesem Zeitraum nahezu konstant.

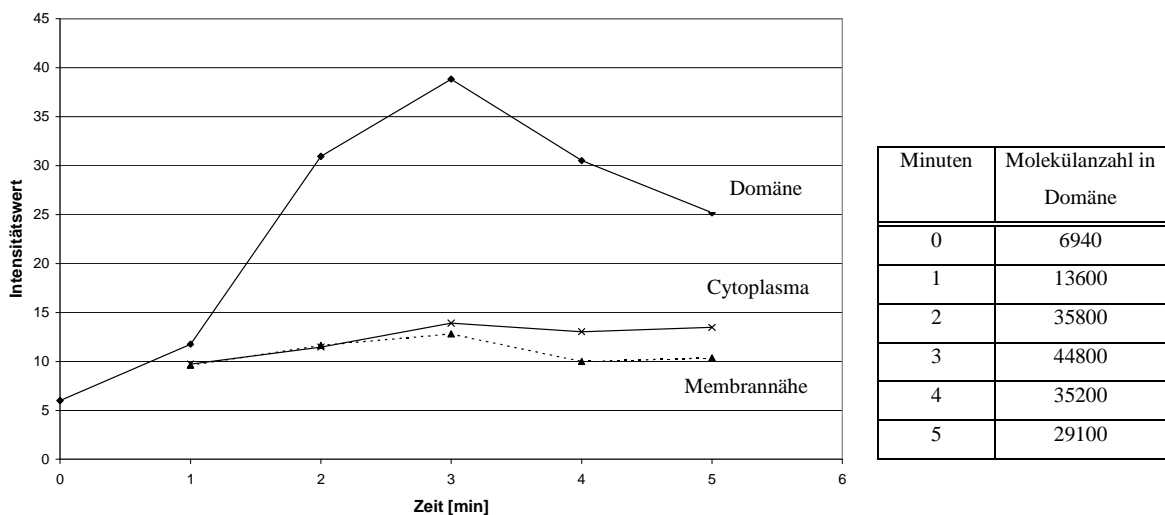


Abbildung 30: Verlauf des mittleren Intensitätswertes der in Abbildung 28 markierten Domäne, im Cytoplasma und in Membrannähe und entsprechende Proteinanzahl in der Domäne.

In unmittelbarer Nähe der Cytoplasmamembran war der Proteingehalt während der ersten drei Minuten ebenso hoch wie im Cytoplasma. Trotz der Zunahme der Proteinmenge an der Membran konnte keine Abnahme in Membrannähe festgestellt werden. Erst nachdem die Proteinmenge an der Membran wieder zurückging, kam es auch zu einer leichten Abnahme in Membrannähe.

4.2.3 Mitochondriale Veränderungen

In eukaryontischen Zellen stellen die Mitochondrien die Energielieferanten dar. Untersuchungen haben gezeigt, daß diese Organellen jedoch auch eine aktive Rolle bei der Apoptose spielen. Eine Reihe von apoptotischen Induktoren führen zur Depolarisierung der Mitochondrienmembran, was einen irreversiblen Schritt hin zum apoptotischen Zelltod darstellt, und im weiteren Verlauf zur Kondensation und Degradation der DNA. Durch den Verlust des Mitochondrien-Membranpotentials kommt es zum Austritt von Cytochrom C und u.a. Pro-Caspase 8 (Qin et al., 2000, Duriez et al. 2000). Die Aktivierung der Initiator-Caspasen, Caspase 8 und Caspase 9, führt weiter zur Aktivierung zusätzlicher Caspasen, wie Caspase 3, 6 und 7, welche eine Vielzahl zellulärer Proteine spalten und damit die endgültige Zerstörung der Zelle einleiten.

Mit Hilfe von GFP-markiertem Cytochrom C gelang es Goldstein und Mitarbeitern den koordinierten Austritt dieses Moleküls aus den Mitochondrien während der Apoptose zu verfolgen (Goldstein et al. 2000). Unter anderem fanden sie heraus, daß trotz der gesamten Ausschüttung an Cytochrom C das Membranpotential in der Mitochondrienmembran aufrechterhalten werden konnte. Dies bedeutet, daß das Absinken des Membranpotentials weder eine Voraussetzung für den Cytochrom C Austritt darstellt, noch eine Folge davon ist.

Die durch TNF vermittelten zellulären Reaktionen beinhalten auch die schnelle Aktivierung von Phospholipasen wie z.B. der Sphingomyelinasen (Müller et al., 1998). Ein Hydrolyseprodukt von Sphingomyelin stellen die pleiotropen Sekundär-messenger Ceramide dar, die ebenfalls in apoptotischen Prozessen wirksam werden. So kann exogenes kurzkettiges Ceramid zu TNF adäquaten Reaktionen führen. Anjum und

Mitarbeiter (Anjum et al., 1998) konnten zeigen, daß die Behandlung von AK-5 Tumor Zellen mit zellpermeablem exogenem Ceramid zur Aktivierung von Caspase 3 und damit zur Apoptose führte. Im Gegensatz hierzu belegten Untersuchungen von Watts (Watts et al., 1997), daß die Fas-induzierte Apoptose von T-Zellen unabhängig von der sphingosin-basierten Bildung von Ceramiden erfolgte. Die Vielzahl kontroverser Erkenntnisse machen die komplexe Rolle dieser Sekundärmediatoren deutlich, deren Funktionen bisher noch nicht eindeutig geklärt werden konnten.

Um näher zu analysieren, zu welchem Zeitpunkt Zellen, die mit TNF behandelt wurden, das Mitochondrienmembranpotential verlieren, wurden Versuche mit synchronisierten Kym-Zellen durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit dem Farbstoff JC-1 behandelt. Dieser Farbstoff färbt aktive Mitochondrien mit intaktem Membranpotential rot, während inaktive Mitochondrien grün gefärbt sind. Zusätzlich wurden die Zellen mit Hoechst 33342 inkubiert, um den Zustand der DNA in den Zellen zu verfolgen.

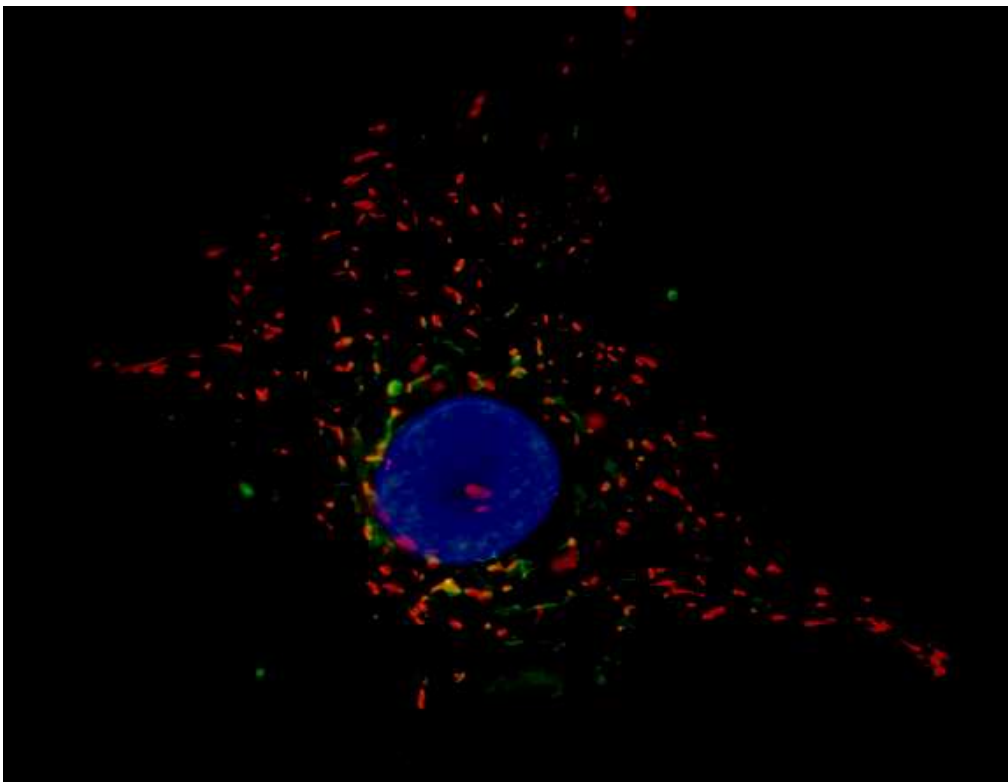


Abbildung 31: Kym-Zelle mit JC-1 gefärbten Mitochondrien und Hoechst 33342 markiertem Zellkern.

Die in Abbildung 31 aufgenommene Kym-Zelle zeigt eine gleichmäßige Verteilung der Mitochondrien im Cytoplasma, bis hin zu den äußersten Zellarmen. Neben den intakten Mitochondrien kommt bei unstimulierten Zellen jedoch auch ein kleiner Anteil an beschädigten Mitochondrien vor. Einige wenige grüne Bereiche sind in der Nähe des Zellkerns zu sehen. Vergleicht man die beiden Ergebnisbinärbilder aus der Bildanalyse mit den roten bzw. grünen Objekten miteinander, so wird deutlich, daß nur wenige (etwa 4%) Mitochondrien vorliegen, deren Membranpotential vollständig degeneriert ist. Etwa ein Fünftel der Mitochondrien bestehen sowohl aus aktiven als auch aus inaktiven Bereichen. Die einheitliche Blaufärbung des Zellkerns zeigt, daß die DNA gleichmäßig verteilt darin vorliegt und noch keine Kondensation stattgefunden hat.

Gehen Zellen in den apoptotischen Zustand über, so verändern sie deutlich ihre Form. Sie ziehen sich förmlich zusammen und aus den flächig ausgebreiteten Zellen mit einer Vielzahl an Zellarmen entstehen kleine kugelige Strukturen. Weiterhin können keine aktiven Mitochondrien mehr nachgewiesen werden (rote Spots in der Zelle), sondern das Anfärben mit JC-1 ergibt eine gleichmäßige Grünfärbung des Cytoplasmas (Abbildung 32 a)). Die Färbung des Zellkerns zeigt außerdem, daß die DNA kondensiert wurde (Abbildung 32 b)).

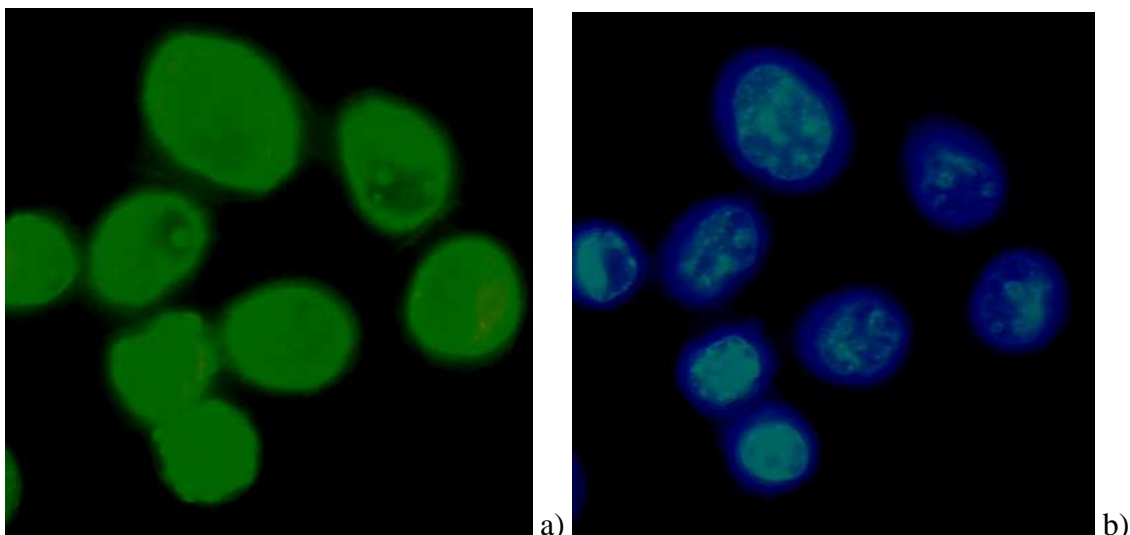
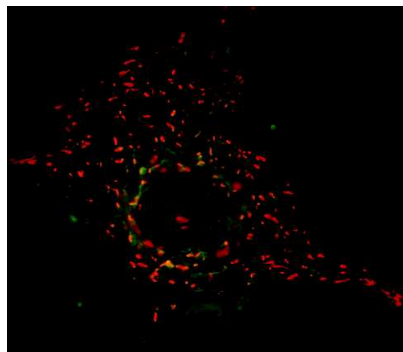
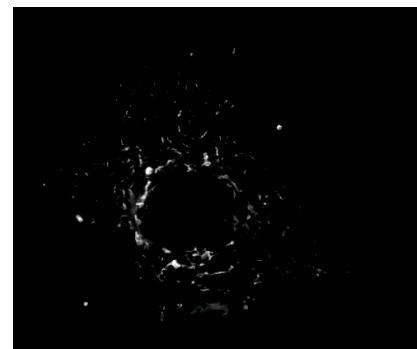


Abbildung 32: Apoptotische Kym-Zellen nach Inkubation mit TNF. a) Färbung der Mitochondrien mit JC-1. b) Färbung des Zellkerns mit Hoechst 33342.

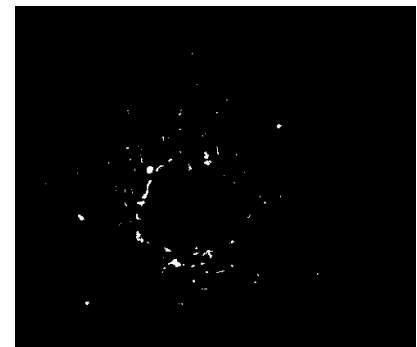
Mit Hilfe der Bildanalyse wurden aus den Aufnahmen die aktiven und inaktiven Mitochondrien extrahiert und ausgezählt. Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der automatisierten Bildanalyse zur Bestimmung der Mitochondrienanzahl. Für die Bestimmung der aktiven Mitochondrien wurden die Aufnahmen auf den Rotkanal reduziert und durch die einfache Anwendung eines festen Schwellenwertes und der Festlegung einer minimalen Objektgröße konnten die roten Objekte segmentiert werden. Die Segmentierung der grünen (inaktiven) Mitochondrien erfolgte adäquat nach der Reduzierung auf den Grünkanal. Die erhaltenen Daten wurden in Files abgelegt und können anschließend z.B. in Excel weiterverarbeitet werden.



Reduktion auf den
Rotkanal bzw.
Grünkanal



Segmentierung
(feste Schwelle)



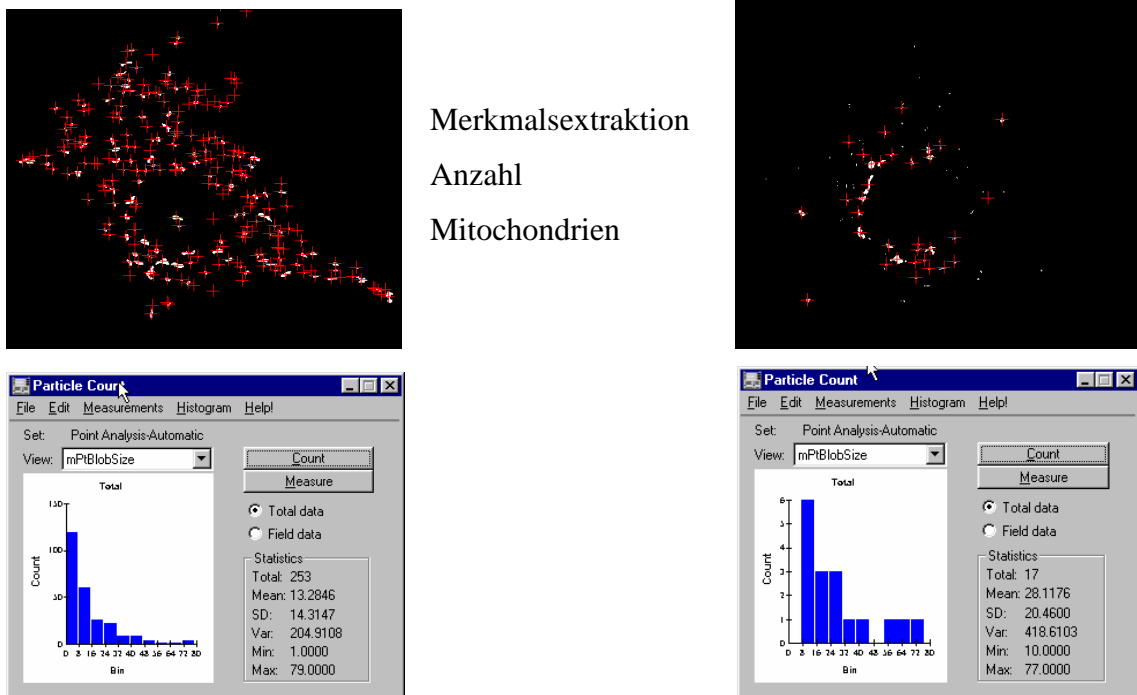


Abbildung 33: Interaktiv ablaufender Algorithmus zur Bestimmung der Anzahl aktiver (links) und inaktiver (rechts) Mitochondrien.

Die ersten Färbeversuche mit JC-1 machten deutlich, daß dieser Farbstoff erst kurz vor dem Färbeversuch angesetzt werden und zum Anfärben der Zellen auch nur kurze Zeit (15 Minuten) auf den Zellen verbleiben durfte. Längere Inkubationszeiten mit JC-1 führten dazu, daß die Zellen auch ohne weitere Behandlung apoptotische Merkmale aufwiesen und geschädigt wurden.

Eine weitere Schwierigkeit stellte das starke Fading von JC-1 dar. Innerhalb von Sekunden bleichte der Farbstoff aus. Kontinuierliches Bestrahlen einer Probe und die Aufnahme von Bildern im Sekundenabstand demonstrierte die drastische Abnahme des Signals.

Abbildung 34 veranschaulicht die Signalabnahme eines kleinen Bereichs von 3x3 Pixeln über der Zeit, sowohl für die rote Form des Farbstoffes als auch für das grüne Analog. Wie aus den Kurven hervor geht, war die rote Form des Farbstoffes wesentlich empfindlicher gegenüber der Bestrahlung. Der Intensitätsverlauf der grünen Form weicht vom typischen Verlauf einer Fading-Kurve ab. Anstatt einer kontinuierlichen Verringerung der Signalstärke trat nach 5 Sekunden wieder eine Erhöhung der

Signalintensität auf und erst nach einer Bestrahlungsdauer von etwa 30 Sekunden erfolgte ein kontinuierlicher Rückgang der Signalintensität.

Entsprechend der Signalabnahme konnten bildanalytisch immer weniger Objekte erfasst und ausgewertet werden (Abbildung 35).

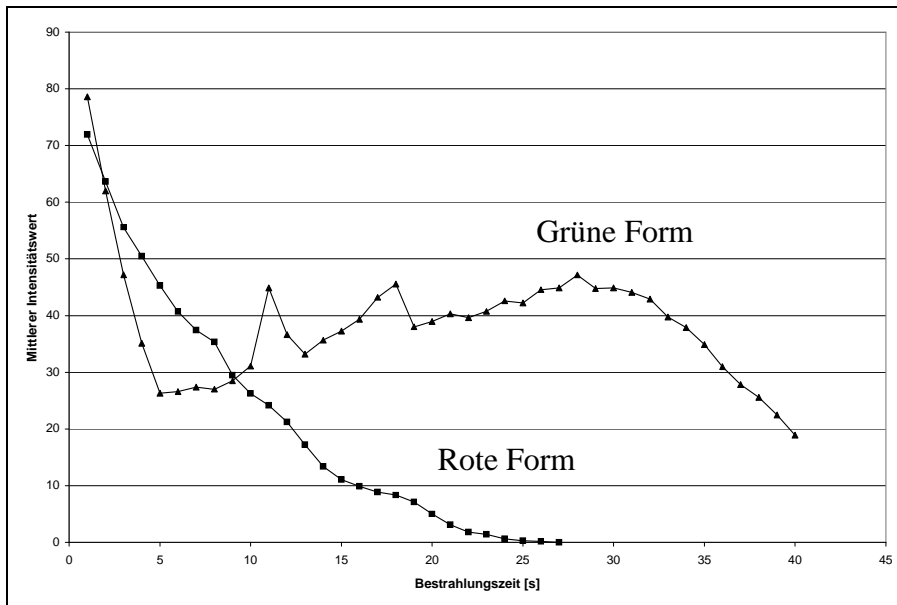


Abbildung 34: Fading-Kurve von JC-1.

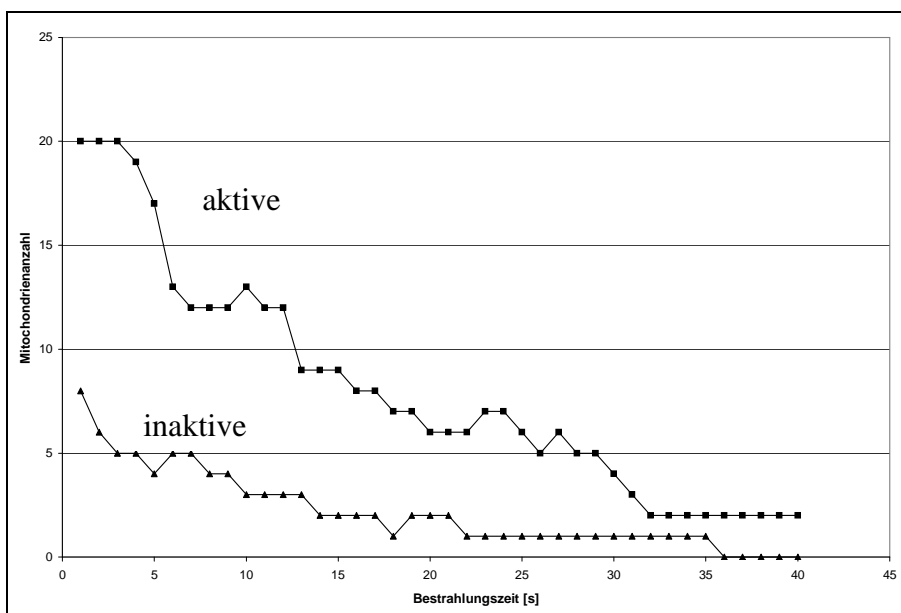


Abbildung 35: Abnahme der bildanalytisch extrahierten aktiven und inaktiven Mitochondrien bei Zunahme der Bestrahlungsdauer.

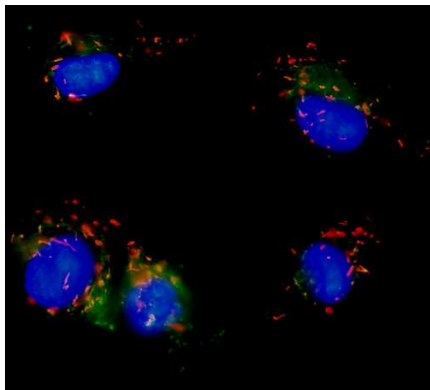
Veränderung der Mitochondrienfunktion durch TNF-Behandlung

Um zu untersuchen, ob und in welchem zeitlichen Rahmen die Behandlung von Kym-Zellen mit 10 ng/ml TNF eine Veränderung der mitochondrialen Funktionen mit sich bringt, wurden die Zellen wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben gezogen und nach der Synchronisation mit TNF behandelt. Hierbei wurden vier Mal im Abstand von je einer Stunde Aufnahmen, sowohl der adhärennten Zellen als auch der Zellen im Überstand, gemacht. Zur Aufnahme der Zellen wurden die bewachsenen Glasplättchen zwischen 2 runde Metallringe eingelegt, mit Medium versetzt und mit den entsprechenden Farbstofflösungen gefärbt. Da JC-1 lichtempfindlich ist, wurde nur im Dunkeln gearbeitet bzw. die runde Kammer mit Aluminiumfolie lichtdicht verschlossen.

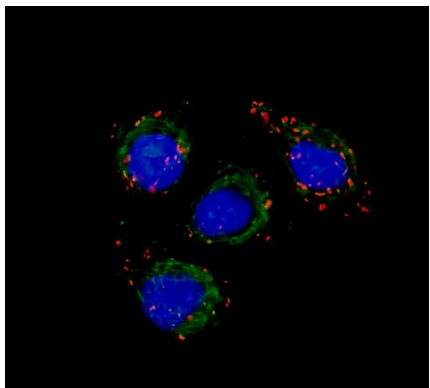
Die Auswertung der Bilder ergab, daß bei adhärennten Zellen während der ersten drei Stunden keine signifikante Änderung des Anteils der aktiven Mitochondrien nachweisbar war (Tabelle 9). Ihr Anteil betrug etwa 80 % (ausgewertet wurden jeweils 50 Einzelzellen). Die Aufnahme der Zellen nach vier Stunden zeigte jedoch, daß alle Zellen in die Apoptose übergegangen waren (fragmentierte Zellkerne) und keine aktiven Mitochondrien mehr nachgewiesen werden konnten (Abbildung 36). Der Überstand enthielt stets nur apoptotische Zellen, wobei die Zellzahl im Überstand mit der Zeit kontinuierlich zunahm.

Tabelle 9: Anteil der aktiven Mitochondrien der adhärennten Zellen bei Variation der Inkubationsdauer mit TNF.

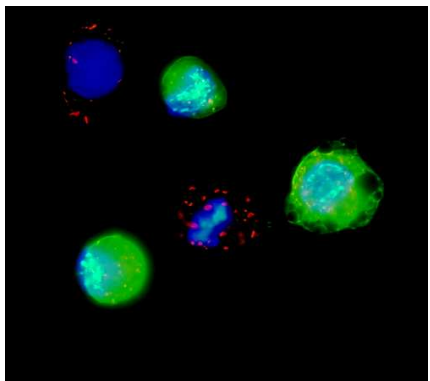
Inkubationsdauer mit TNF [h]	Anteil der aktiven Mitochondrien [%]
0	81,7
2	77,9
3	79,1
4	0



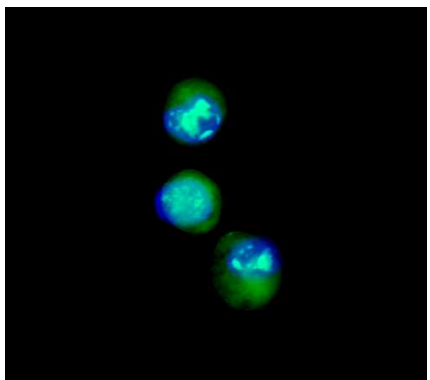
ohne TNF



2 h TNF



3 h TNF



4 h TNF

Abbildung 36: Kym-Zellen mit JC-1 bzw. Hoechst 33342 gefärbt nach TNF-Behandlung.

Zeitliche Zusammenhänge zwischen TNF-Behandlung und Degenerierung des Mitochondrienmembranpotentials

Um den Umschaltzeitpunkt der Mitochondrien von ihrer aktiven zur inaktiven Form genauer zu charakterisieren, wurden die Kym-Zellen noch einmal mit TNF behandelt und während sechs Stunden videomikroskopisch untersucht. Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse aus dem zweimal wiederholten Versuch.

Tabelle 10: Anteil der aktiven Mitochondrien der adhären Zellen bei Variation der Inkubationsdauer mit TNF zwischen zwei und sechs Stunden.

Inkubationszeit [h]	Anteil der aktiven Mitochondrien [%] Versuch A	Anteil der aktiven Mitochondrien [%] Versuch B
0	83,0	84,2
2	-	89,2
3	64,8	83,3
4	83,8	68,1
5	88,1	-
6	85,2	-

Wie aus Tabelle 10 ersichtlich ist, variierte der Anteil der aktiven Mitochondrien in beiden Versuchen stark und ließ keine übereinstimmende Tendenz erkennen. Auch die Bestimmung der apoptotischen Zellen ergab unterschiedliche Zahlen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Anteil der apoptotischen Zellen bei Variation der Inkubationsdauer mit TNF zwischen zwei und sechs Stunden.

Inkubationszeit [h]	Versuch A	Versuch B
0	0,9	0,7
2	-	1,1
3	-	5,0
4	10,1	5,7
5	11,0	-
6	14,6	-

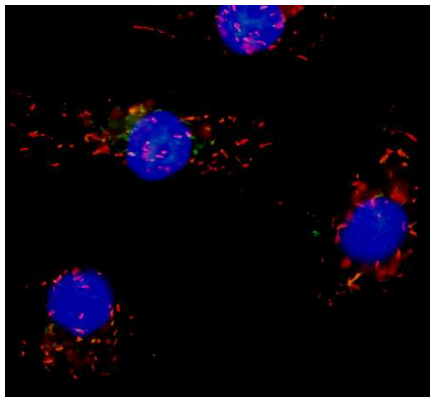
Veränderung der Mitochondrienfunktion durch Ceramid-Behandlung

Der folgende Versuch mit 50 µmol zellpermeablem exogenem C6-Ceramid sollte zeigen, ob dieser Lipidmessenger bei der verwendeten Kym-Zelllinie zur Apoptose führt, in welchem zeitlichen Rahmen dies im Vergleich zur TNF-induzierten Apoptose vonstatten geht und ob die Degeneration des Mitochondrienmembranpotentials hierbei auftritt. Hierzu wurden Zellen wie im vorherigen Versuch beschrieben mit C6-Ceramid inkubiert und anschließend videomikroskopisch aufgenommen.

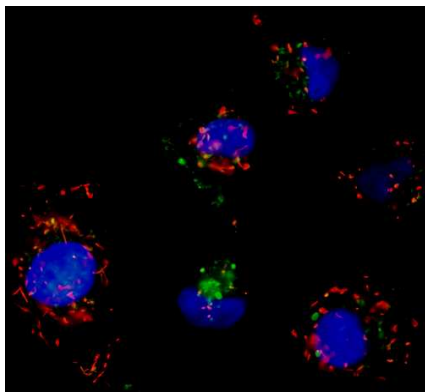
Abbildung 37 zeigt Kym-Zellen die unterschiedlich lange mit C6-Ceramid inkubiert wurden. Die Auswertung der Aufnahmen machte deutlich, daß, im Gegensatz zur Inkubation mit TNF, die Inkubation der Zellen mit C6-Ceramid bis zu einem Inkubationszeitraum von 14 Stunden keinen signifikanten Einfluß auf den Anteil der aktiven Mitochondrien hatte (Tabelle 12). Es ließ sich ebenfalls keine Zunahme der adhärennten apoptotischen Zellen nachweisen. Allerdings zeigte der überwiegende Teil der Zellen (> 95 %) zu diesem Zeitpunkt einen mehr oder minder stark kondensierten Zellkern.

Tabelle 12: Anteil der aktiven Mitochondrien der adhärennten Zellen bei Variation der Inkubationsdauer mit C6-Ceramid.

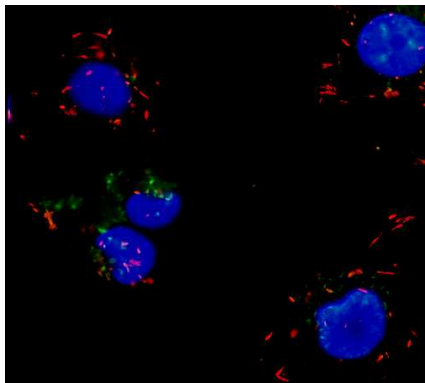
Inkubationsdauer mit C6-Ceramid [h]	Anteil der aktiven Mitochondrien [%]
0	84,1
4	84,6
8	86,4
14	80,0



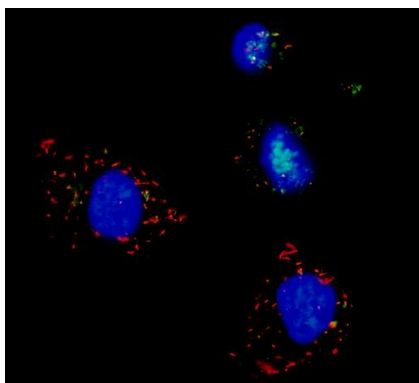
ohne C6-Ceramid



4 h C6-Ceramid



8 h C6-Ceramid



12 h C6-Ceramid

Abbildung 37: Kym-Zellen nach C6-Ceramid-Behandlung gefärbt mit JC-1 bzw. Hoechst 33342.

5 Diskussion

Mit der Entwicklung von Methoden, um eukaryotische Zellen unter Laborbedingungen als *in vitro* Zellkulturen unter definierten Bedingungen zu kultivieren, ergaben sich Mitte der sechziger Jahre die ersten Möglichkeiten, Zellwachstum und Zellproliferation gezielt zu untersuchen (Cooper, 1997). Heute werden Zellkulturen nicht mehr ausschließlich zu wissenschaftlichen Untersuchungen eingesetzt, sondern inzwischen ist es möglich, mittels tierischer Zellen eine Vielzahl hochwertiger pharmazeutischer Substanzen in großtechnischem Maßstab herzustellen (Wigley, 1994). Die Produktion von monoklonalen Antikörpern und viralen Impfstoffen stellen wichtige Beispiele dieser zahlreichen Produkte dar.

Der Kultivierungsprozeß (in der Regel mit adhärent wachsenden Zellen) und auch die Zusammensetzung des Mediums eukaryotischer Zellen sind im Vergleich zur Kultivierung von Bakterien und Hefen erheblich komplexer. Ein weiterer wichtiger Unterschied zu Prokaryonten und Hefen stellt die wesentlich längere Zellteilungszeit (15 bis 25 Stunden) tierischer Zellen dar. Diese Sachverhalte führen dazu, daß der Aufwand und damit die Kosten eukaryotischer Fermentationsprozesse bedeutend sind und somit eine wichtige Rolle bei der Prozeßoptimierung spielen. Ziel ist es, die aufwendigen Fermentationsprozesse stets nur solange durchzuführen, solange unter Einbeziehung des Wachstums eine gute Produktivität gewährleistet ist.

Das Wachstum einer "normalen" Zellkultur verläuft wie in Abbildung 38 dargestellt. Nach der anfänglichen Adaption der Zellen an die Kultivierungsbedingungen in der sogenannten Lag-Phase (konstante Zellzahl) gehen die Zellen in die exponentielle Phase über, bei der die Zellzahl exponentiell ansteigt. Im Anschluß daran folgt die stationäre Phase, in welcher die Zunahme der Zellzahl durch Zellteilung und die Abnahme der Zellzahl durch den Zelltod gerade ausgeglichen sind (Plateau). Schließlich kommt es in der Abnahmephase durch zunehmenden Zelltod zu einer stetigen Abnahme der Zellzahl.

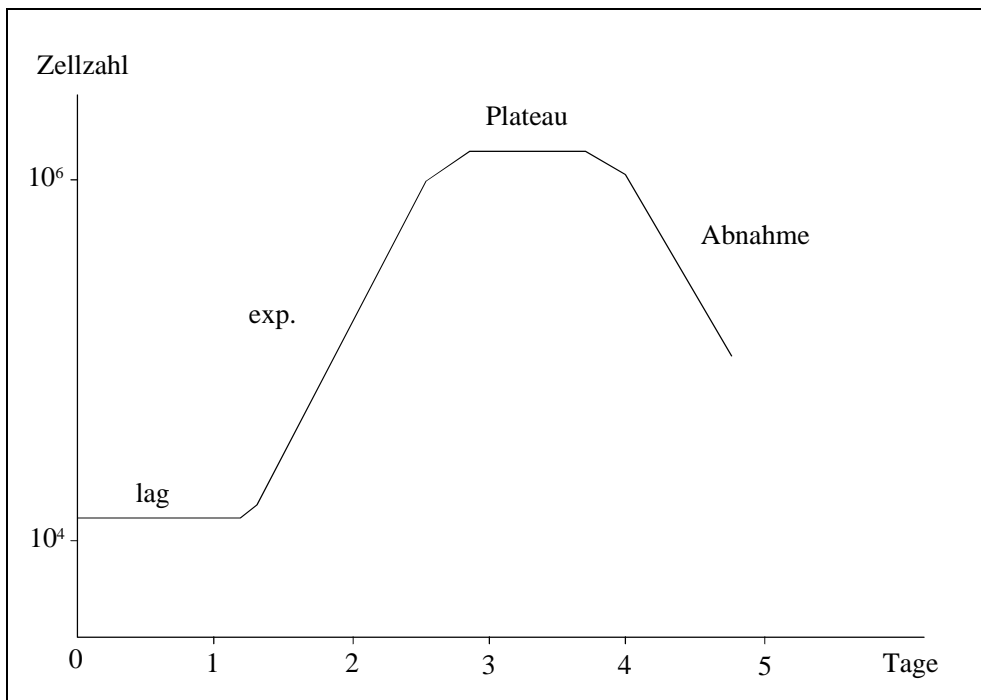


Abbildung 38: Herkömmlicher Wachstumsverlauf eukaryotischer Zellen in Kultur (McAteer and Davis, 1994).

Während sämtlicher Kultivierungsprozesse muß zur Dokumentation des Prozesses und zur Charakterisierung des Wachstumsverlaufs die aktuelle Zellzahl in der Kultur bestimmt werden, wobei in der Regel nicht nur die Gesamtzellzahl, sondern die genaue Anzahl lebender und toter Zellen bestimmt wird (McAteer and Davis, 1994). Die zwei gängigsten Methoden hierfür stellen das manuelle Hämazytometer und die elektronische Partikelzählung mittels Coulter Counter dar. In Kapitel 1.1 sind beide Methoden detailliert beschrieben. Eine neue Möglichkeit der Zellvitalitätsbestimmung stellt die Videomikroskopie in Verbindung mit digitaler Bildanalyse dar. Verglichen mit den oben genannten Methoden liefert die Bildanalyse schnell gut reproduzierbare morphologische Daten der Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein PC-basiertes Bildanalyse-System aufgebaut und getestet, mit dem die Erkennung von Zellen, ihre Vermessung und die Klassifizierung der Zellen in tot und vital vollautomatisch durchgeführt werden kann. Die mittels Bildanalyse extrahierten Daten können unmittelbar zur Prozeßführung eingesetzt werden.

Mit Hilfe der Bildanalyse ist es nun nicht nur möglich, vitale Zellen von toten Zellen zu differenzieren, sondern darüber hinaus können die beiden verschiedenen Formen des Zelltodes, nämlich Apoptose und Nekrose, nachgewiesen und unterschieden werden. Vor allem die Aufklärung der Apoptose, als zelleigenes Instrument zur Kontrolle der Populationsgröße, hat in den vergangenen Jahren sehr stark an wissenschaftlicher Bedeutung zugenommen. Untersucht werden die verschiedenen apoptotischen Signalwege mit den üblichen molekularbiologischen und genetischen Methoden, auf die jedoch wegen des großen Umfangs an verschiedenen Methoden an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden kann.

Mit dem Voranschreiten der technischen Entwicklung mikroskopischer Verfahren, visueller Sensoren und leistungsstarker Computer hat sich in jüngerer Zeit die Videomikroskopie als äußerst leistungsfähiges Instrument erwiesen, um mittels digitaler Bildanalyse mikroskopische Aufnahmen auszuwerten und intrazellulär einzelne Signalmoleküle örtlich zu lokalisieren bzw. zu quantifizieren. Die quantitative Charakterisierung von lebenden Zellen bei der Videomikroskopie in Verbindung mit der digitalen Bildanalyse ist gegenüber den herkömmlichen biochemischen Methoden, bei denen nur Zellpopulationen toter Zellen untersucht werden können, ein enormer Vorteil. Außerdem ist eine weitere wichtige Stärke der Videomikroskopie die Möglichkeit zeitliche Vorgänge zu untersuchen, denn sie erlaubt zelluläre Vorgänge in "Echtzeit" zu erfassen und zu quantifizieren. Um sehr kleine Substanzmengen nachzuweisen, eignet sich besonders die Fluoreszenz-Videomikroskopie. Die hohe Sensitivität der Methode ist ideal für die Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Verteilung einzelner Signalmoleküle in der Zelle.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde das Videomikroskopie-System dahingehend erweitert, daß neben der lichtmikroskopischen Charakterisierung der Vitalität von Zellen in Zellpopulationen auch eine fluoreszenzmikroskopische Untersuchung spezieller Signalmoleküle in Einzelzellen bei der TNF-induzierten Apoptose durchgeführt werden konnte. Im Zentrum der Untersuchungen standen hierbei der Nachweis des intrazellulären Adapterproteins TRAF2 und die Veränderung mitochondrialer Funktionen bei der TNF-induzierten Apoptose. Die biologischen Zusammenhänge sind in Abschnitt 2.1.2 detailliert dargestellt.

5.1 Videomikroskopische Charakterisierung der Zellvitalität in eukaryotischen Zellpopulationen

Die quantitative Bestimmung der Vitalität eukaryotischer Zellen spielt bei allen Kultivierungsprozessen eine entscheidende Rolle. Dabei stellen die Reproduzierbarkeit und die Geschwindigkeit der Unterscheidung in lebende und tote Zellen die zentralen Faktoren dar. Die zu entwickelnde Färbemethode und videomikroskopische Bildanalyse zur Erkennung von CHO-Zellen und zur Unterscheidung lebender und toter Zellen sollte verschiedenen Anforderungen gerecht werden. Die Färbung mußte schnell und einfach durchführbar sein und eine klare Unterscheidung der lebenden und toten Zellen ermöglichen. Der Bildverarbeitungsprozeß sollte möglichst einfach strukturiert sein, um Rechenzeit und Speicherkapazität zu sparen und die Bilder so wenig wie möglich zu modifizieren. Außerdem sollte es die bildanalytische Auswertung der Aufnahmen ermöglichen, die Anzahl von Zellen in einem Zellklumpen abzuschätzen.

5.1.1 Bildanalyse

Das aufgebaute System basierte auf einem handelsüblichen PC, einer Videokamera und einer gängigen Erweiterungskarte. Das System war daher verhältnismäßig kostengünstig sowie leicht zu bedienen. Die entwickelte Bildanalysesequenz zur Bestimmung und Charakterisierung der Zellen war einfach strukturiert und benötigte weniger als zehn Sekunden vom Einzug eines Bildes bis hin zur Ausgabe der Daten in Textdateien und der Abspeicherung der Bilder in komprimierten Bilddateien (z.B. JPEG). Durch den geeigneten Einsatz verschiedener bildanalytischer Operationen war es gelungen, Fehler wie z.B. die ungleichmäßige Ausleuchtung des Hintergrundes zu minimieren und die sehr geringen Kontraste zwischen Objekten und Hintergrund deutlich zu verbessern. Anzumerken ist, daß bei der Bildaufnahme die Einstellung des Lichtwertes stets auf einen mittleren Belichtungswert von 150 bis 155 erfolgen mußte. Alle nachfolgenden Bildverarbeitungsschritte, vor allem die Schwellenwertfestlegung, waren auf diesen Beleuchtungswert abgestimmt. So führt z.B. eine zu hohe Lichtintensität bei der Erkennung toter Zellen zu einer Verschiebung der Zellgrenzen in das Zellinnere der Zellen, so daß sich die auszuwertende Fläche der Zellen verringerte.

5.1.2 Experimentelles Vorgehen

Die verwendete Färbemethode mit Erythrosin B war einfach und schnell durchführbar. Sie beinhaltete nur einen Zentrifugationsschritt und keine Waschschriffe, so daß möglichst wenig Zellen verloren gingen oder abgetötet wurden und es zu keiner Verfälschung der Meßdaten kam. Der Farbstoff drang rasch in die Zellen ein und diese nahmen, im Vergleich zum Farbstoff Trypan Blau, eine intensivere Färbung an. Dabei wurden die lebenden Zellen nicht nachweislich durch den Farbstoff geschädigt.

5.1.3 Methodenvergleich

Die statistische Analyse aller Zählungen mit der bildanalytischen und der manuellen Methode ergab eine geringere Streuung der Ergebnisse aus der Bildanalyse. Damit liefert die Bildanalyse reproduzierbarere Ergebnisse als die Auswertung von Hand mit dem Hämazytometer, selbst wenn sie von ein und derselben Person durchgeführt wurde. Hier muß jedoch angemerkt werden, daß eine Auswertung der Bilder von Hand durch unterschiedliche Personen zu wesentlich größeren Schwankungen führte und so die Überlegenheit der Bildanalyse klar gegeben ist.

Die Auswertung von drei verschiedenen Probeserien zeigt, daß sowohl die durchschnittliche Größe als auch die Form der Zellen je nach Alter bzw. Entwicklungszyklus der Kultur variierten. Für die Bestimmung der Zellzahl in Zellhaufen war es daher sinnvoll, die mittlere Zellgröße toter und vitaler Zellen vor jeder Auszählung vorzunehmen.

Die bei der Bildanalyse aufgetretenen Schwankungen erklären sich aus der Bestimmung der Zellzahl in Zellhaufen. Die angewandte Methode der Berechnung der mittleren Fläche von Zellen und anschließender Division der Zellhaufenfläche durch die Durchschnittsfläche kann zu variierenden Ergebnissen führen. Folgende Sachverhalte erschweren die Auswertung:

- Innerhalb einer Probe schwankte die Größe der Zellen, vor allem die der toten Zellen, sehr stark. Damit ist die Varianz der berechneten mittleren Zellgröße sehr

groß und die Berechnung der Zellzahl in Zellaggregaten mit einer relativ großen Unsicherheit behaftet. Dies gilt vor allem für Zellhaufen mit toten Zellen.

- Weiterhin ist nicht geklärt, ob Zellen in einem Zellhaufen dieselbe Größe besitzen wie einzelne Zellen. Es wird vermutet, daß die Zellen im Haufen wesentlich dichter gepackt sind und damit auch die Anzahl im Aggregat nicht linear mit der Haufengröße zunimmt, sondern mehr Zellen vorhanden sind.
- Die Betrachtung des Zellhaufens als Monolayer ist nur eine Vereinfachung, da diese Aggregate in dreidimensionaler Form vorliegen. Allerdings ist die Festlegung einer anderen geometrischen Form, z.B. einer Kugel, wenig hilfreich, da auch dies nur eine grobe Annäherung bedeuten würde.
- Schließlich ist es nicht möglich, das Innere der Zellhaufen zu erfassen. So kann eine Ansammlung von außen aus vitalen Zellen bestehen, aber das gesamte Innere kann bereits nur noch tote Zellen beinhalten.

Da sich die Intensitätswerte über den gesamten Zellhaufen hinweg nicht mit der Dichte, Anzahl oder der Art der Zellen ändern, kann eine Abschätzung der Zellzahl im Zellhaufen anhand von Intensitätswerten nicht vorgenommen werden.

5.1.4 Morphologie der Zellen

Die durchgeführten Versuche ergaben, daß die durchschnittliche Größe toter und lebender Zellen der verwendeten CHO-Zelllinie annähernd identisch ist. Im Gegensatz zu anderen Angaben in der Literatur (Frame und Hu, 1990), in denen lebende Zellen generell als größer angegeben wurden als tote, konnte dies bei der verwendeten CHO-Zelllinie nicht festgestellt werden. Damit ist eine Unterscheidung der Zellen aufgrund ihrer Größe nicht möglich.

Betrachtet man die Form (Zirkularitätsfaktor) der Zellen, so zeigen die starken Schwankungen der Werte, daß eine Klassifizierung der Zellen allein aufgrund morphologischer Charakteristika ebenfalls stark fehlerbehaftet ist und nicht vorgenommen werden kann.

Maruhashi (Maruhashi, 1994) verwendete zur Bestimmung der Vitalität von Hybridoma Zellkulturen den Anteil an Zellbruchstücken in der Kultur. Für den Zusammenhang beider Größen wurde in Anlehnung an eine Michaelis-Menten-Kinetik eine entsprechende Funktion aufgestellt, welche jedoch von der Zelllinie und den Kultivierungsparametern abhing. Die Anwendung dieser Methode ist bei der verwendeten CHO-Zelllinie nicht sinnvoll, da in den Kulturen kaum Zelldebris vorhanden sind.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß die Bestimmung lebender und toter Zellen bei der verwendeten CHO-Kultur einzig mittels Vitalfärbung vorgenommen werden kann. Die entwickelte Färbemethode mit Erythrosin B hat sich hierbei im Vergleich zu der gängigen Trypan Blau Färbung als besser geeignet erwiesen. Zusätzlich zu dem enormen Vorteil der raschen Auswertung vieler Proben ergab ein statistischer Vergleich der Zählergebnisse aus der manuellen und bildanalytischen Methode eindeutig eine bessere Reproduzierbarkeit der bildanalytischen Methode. Das aufgebaute Bildanalyzesystem ist PC-basiert und arbeitet mittels Programm-Makro automatisiert, so daß eine PC-gesteuerte on-line Anbindung an Prozeßleitsysteme von Fermentern möglich ist (Falkner and Gilles, 1998).

5.2 Nachweis intrazellulärer Moleküle und Zellkompartimente bei der Apoptose mittels Fluoreszenz-Videomikroskopie

5.2.1 Apparative Ausstattung und Bildanalyse

Die Untersuchung fluoreszenzmikroskopischer Bilder unterscheidet sich von lichtmikroskopischen Aufnahmen dadurch, daß aufgrund der schwachen Fluoreszenzsignale der verwendete Sensor (im vorliegenden Fall ist dies eine Videokamera) deutlich sensitiver sein muß. Störfaktoren, wie verschiedene Rauscharten des Systems, kommen bei dieser Mikroskopietechnik wesentlich stärker zum Tragen und machen besondere apparative Bedingungen erforderlich. Durch den nachträglichen Einbau einer Luftkühlung in die in Abschnitt 3.4.1 genannte CCD-Kamera war es

möglich, das Temperaturrauschen derart zu minimieren, daß eine Integration der Bilder über zehn Sekunden durchgeführt werden konnte und somit auch sehr schwache Fluoreszenzsignale aufgenommen werden konnten. Als gut geeignet haben sich weiterhin 63-fach vergrößernde Ölimmersionsojektive mit einer Numerischen Apertur von 1,4 erwiesen. Diese hohe Numerische Apertur gewährleistet eine starke Helligkeit bei der Abbildung der intensitätsschwachen Fluoreszenzsignale. Ferner ist die sogenannte Epi-Beleuchtung des Mikroskops (Abbildung 39), wie sie für die in Kapitel 4.2 beschriebenen Versuche eingesetzt wurde, für fluoreszenzmikroskopische Anwendungen anderen Beleuchtungsarten überlegen, da unter anderem Fehler durch die Reabsorption von Fluoreszenzsignalen minimiert werden.

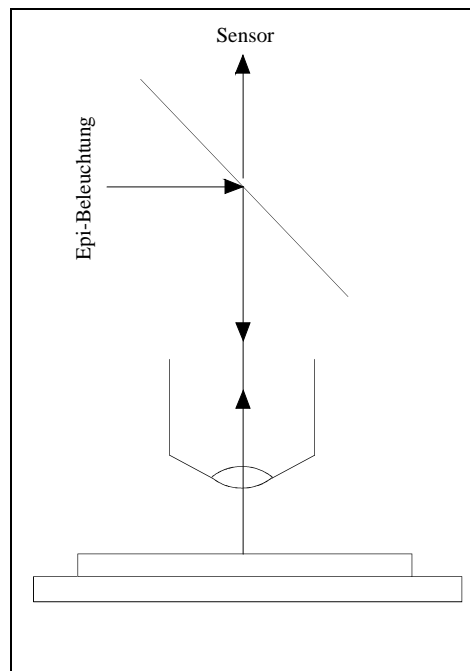


Abbildung 39: Optische Anordnung bei Einsatz der Epi-Beleuchtung (Rost, 1992).

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte temperierte Wachstumskammer erwies sich für Versuche unter physiologischen Bedingungen als sehr gut geeignet. Sie ist einfach im Zusammenbau und problemlos zu reinigen, was einen schnellen Wechsel des biologischen Materials erlaubt. Da die Zellen auf gängigen Glasplättchen vorkultiviert wurden, um diese dann für den eigentlichen Versuch in die Kammer einzusetzen, kamen keine besonderen und damit teuren Kultivierungsgefäße, so wie sie z.T. in kostenaufwendigen käuflichen Kammern Verwendung finden, zum Einsatz.

Die entwickelten Bildanalysesequenzen zur Bestimmung der gebildeten Membrandomänen bzw. der aktiven und inaktiven Mitochondrien werden interaktiv bedient. Nachdem vom Mitarbeiter der Bildausschnitt mit der gewünschten Zelle festgelegt wurde, werden die generierten Makros automatisch gestartet und innerhalb von zwei Sekunden werden die extrahierten Daten in Textdateien abgelegt. Im Verlauf einer Versuchsreihe kann eine beliebige Anzahl an Zellen ausgewertet werden, wobei die Daten nacheinander in demselben File abgelegt werden. Die weitere graphische bzw. tabellarische Auswertung kann dann mit einer beliebigen Softwareanwendung vorgenommen werden.

5.2.2 Fluoreszenzmikroskopie allgemein

Das in der vorliegenden Arbeit aufgebaute und in Abschnitt 3.4 eingehend beschriebene Bildanalyse-System erwies sich als sehr gut geeignet, GFP-markierte Signalmoleküle und auch strukturelle Änderungen der Mitochondrien nachzuweisen bzw. zu quantifizieren. Da mit den verwendeten Filterkombinationen keine Autofluoreszenzen zellulärer Substanzen wie z.B. FAD bzw. NADH auftraten, wurde die Quantifizierung der Signale durch diesen Faktor nicht beeinträchtigt. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß die Zuverlässigkeit des videomikroskopischen Systems sehr stark von den folgenden Faktoren abhängt:

- Stabilität der Lichtquelle

Bei dem Einsatz von Hg- bzw. Xe-Dampflampen muß stets berücksichtigt werden, daß diese Lampen mit der Zeit altern und nur eine beschränkte Lebenszeit besitzen. Man geht in der Regel davon aus, daß Hg-Lampen (HBO 103 von Zeiss) nach etwa 300 h und Xe-Lampen (XBO 75 von Hamamatsu) nach etwa 2000 h ausgetauscht werden müssen. Während dieser Betriebsdauer nimmt die Beleuchtungsintensität der Lampen ab, wobei von den Herstellern keine Aussagen über den Verlauf bzw. die Stärke der Abnahme gemacht werden. Aufgrund der maximalen Versuchsdauer von 5 h einer Versuchsreihe kann für die durchgeführten Untersuchungen die Abnahme der Intensität innerhalb der Versuchsreihe vernachlässigt werden. Trotzdem sollte vor jeder neuen Versuchsreihe ein Standard aufgenommen werden,

um verschiedene Versuchsreihen vergleichen zu können, insbesondere, wenn zwischenzeitlich ein Lampentausch vorgenommen werden mußte.

- Inhomogenität der Beleuchtung und Hintergrund

Wie in Abbildung 27 aus den Histogrammen eines aufgenommenen Hintergrundbildes zu sehen ist, wird der komplette Bildbereich nicht homogen ausgeleuchtet. Diese Inhomogenität in der Bildausleuchtung kann durch eine fehlerhafte Justierung von Lampe oder Kollektorlinse auftreten. Läßt sie sich jedoch nicht durch eine entsprechende Justierung beheben, so muß zur Auswertung der Fluoreszenzaufnahmen eine rechnerische Hintergrundkorrektur erfolgen. Eine derartige Hintergrundkorrektur hat außerdem den Vorteil, daß unerwünschte Hintergrundsignale, bedingt durch Streulicht und Störuschen eliminiert werden. Um sämtliche Untersuchungen mit GFP-markierten Molekülen miteinander vergleichen und die Quantifizierung der Signale vornehmen zu können, wurden alle Aufnahmen einer Hintergrundkorrektur unterworfen. Diese Hintergrundkorrektur bestand in der pixelweisen Division eines Hintergrundbildes von der Aufnahme einer Probe. Eine solche einfache arithmetische Operation benötigt nur sehr wenig Rechenzeit und kann somit problemlos bei der Verarbeitung sämtlicher Bilder durchgeführt werden. Bei den Versuchen mit fluoreszenzmarkierten Mitochondrien konnte auf eine Hintergrundkorrektur verzichtet werden.

- Nichtlinearität des optischen Systems

Die Linearität des Systems kann durch das Einbringen von Graufiltern bekannter optischer Dichte in den Strahlengang getestet werden. Diese Graufilter führen dazu, daß die einfallende Lichtmenge gezielt reduziert wird. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die schrittweise Lichtmenge zu erhöhen, indem die Integrationszeit der Bildaufnahme verlängert wird. Unter Verwendung eines Standards bekannter Fluoreszenz und der Voraussetzung, daß dieser keinem Fading unterliegt, konnte dieser Linearitätstest einfach und schnell durchgeführt werden. Wie in Abbildung 24 zu sehen ist, arbeitet das Aufnahmesystem bis zu einer Konzentration von 75 mg/ml und einer Integrationsdauer von acht Sekunden linear. Werden höhere Fluorophorkonzentrationen verwendet, so muß die Belichtungszeit entsprechend

kürzer gewählt werden. Da in den Versuchen stets Zellen mit niedriger Konzentration eingesetzt wurden, mußte dieser Sachverhalt nicht weiter berücksichtigt werden.

- Streulicht

Streulichtquellen können sich aus Lichtlöchern in der Apparatur ergeben und führen zu einer Verfälschung bei der Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen. Da eine Kontrolle der gesamten Anlage sehr aufwendig ist, wurde diese Fehlerquelle minimiert, indem die Arbeiten in einem absolut dunklen Raum durchgeführt wurden. Um auch das aus der Umgebung reflektierte Beleuchtungslicht abzufangen, ist es sinnvoll, eine schwarze Box möglichst nah um die Apparatur zu bauen.

Für die Quantifizierung der Signale ist außerdem eine andere, interne Art des Streulichtes von besonderer Bedeutung. Bei einem herkömmlichen Mikroskop zur Fluoreszenzmikroskopie tritt stets das Problem auf, daß in der Fokusebene auch Streulicht aus anderen, nicht fokussierten Schichten auftritt. Diejenigen Ebenen, die über bzw. unter der Fokusebene liegen, werden zwar theoretisch nicht mehr abgebildet, aber reflektiertes Fluoreszenzlicht (sogenanntes out-of-focus light) aus diesen Schichten wird dennoch mitdetektiert. Die daraus resultierende Unschärfe der Bilder führt zu einer fehlerhaften quantitativen Berechnung. Um diese Fehlerquelle zu eliminieren, stehen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Einerseits besteht die Möglichkeit, durch apparative Veränderungen dieses Phänomen auszuschalten. Hier können konfokale Laserscan-Mikroskope (LSM) zum Einsatz kommen, bei denen ein Laserstrahl die Fokusebene punktwise abtastet. Auf den detaillierten Aufbau, die Arbeitsweise und die Vorteile bzw. Nachteile eines solchen Systems kann an dieser Stelle aufgrund der Komplexität nicht näher eingegangen werden. Eine detaillierte Übersicht findet sich in der Literatur (Pawley, 1995).

Beim Einsatz der Videomikroskopie bedeutender ist die zweite Möglichkeit, nämlich das Eliminieren von Unschärfen durch die bildanalytische Anwendung von Deconvolution-Algorithmen (Wang Y.-L., 1998) auf fluoreszenzmikroskopische Bilder. Mittels einer schichtweisen Bildaufnahme (entlang der z-Ebene) und unter Berücksichtigung der Wellenlänge und des Objektivs (Numerische Apertur) kann

die sogenannte Point-Spread-Function (PSF) bestimmt werden. Mit ihrer Hilfe können dann wiederum die korrigierten Bilder berechnet werden. Diese Funktion stand in OPTIMAS 6.5 nicht zur Verfügung, so daß keine Vergleiche zwischen Originalaufnahmen und mittels Deconvolution korrigierten Aufnahmen durchgeführt werden konnten. Soll dieser Algorithmus indes für quantitative Bestimmungen verwendet werden, so müssen die PSF-Parameter klar definierbar sein. Da es zu einer Veränderung der Bildinformation kommt, muß die Berechnung für den Anwender exakt nachvollziehbar sein und darf nicht, so wie von zahlreichen Software-Herstellern angeboten, ohne definierte Parametereingabe erfolgen. Abbildung 40 zeigt die durch out-of-focus Light entstehenden verfälschten Aufnahmen. In der x-y-Ebene müßte die korrekte Abbildung der Fokusebene einen kleinen Kreis ergeben (rot dargestellt), während in der x-z-Ebene die rote Linie sichtbar sein sollte.

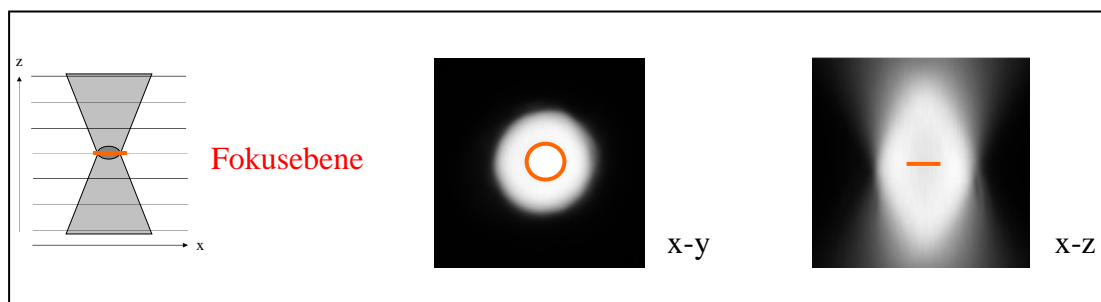


Abbildung 40: Unschärfe von Bildern durch out-of-focus Light und Darstellung der Point-Spread-Function (PSF).

- Quantifizierung mittels Standard

Zur Quantifizierung von Fluoreszenzsignalen ist ein Standard, der eine definierte Menge an Fluorophor enthält, unerlässlich. Die Messung des Standards muß theoretisch unter identischen Bedingungen erfolgen wie die Messung der Probe, d.h. unter denselben chemischen Umgebungsbedingungen. Der Standard sollte stabil und reproduzierbar sein, nicht faden und idealerweise einfach in der Herstellung bzw. lang lagerbar sein. Sollen Untersuchungen von Einzelmolekülen in intakten Zellen durchgeführt werden, ist es praktisch unmöglich, einen Standard unter exakt denselben intrazellulären Bedingungen (z.B. pH-Wert und Redoxzustand) zu messen, da diese in der Regel nicht bekannt sind. Außerdem kann es vorkommen,

daß Licht auch von anderen Substanzen als dem eingesetzten Fluorophor absorbiert wird und so eine Art Fading des Fluorophors beobachtet wird. Trotz dieser Schwierigkeiten ergab der Einsatz einer Protein-GFP-Lösung als Standard plausible Ergebnisse und konnte, stets unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte, in die Auswertung der Aufnahmen einbezogen werden. Die in den Versuchen verwendete GFP-TRAF2-Proteinlösung wurde in einfacher Weise als Standard für die Versuche eingesetzt, wobei vor jedem Versuch eine neue Standardmessung erfolgte.

- Fading

Sogenanntes Fading, die Abnahme der Intensität eines fluoreszierenden Moleküls mit der Länge der Bestrahlungsdauer, läßt sich grundsätzlich nicht vermeiden. Allerdings gibt es zwischen verschiedenen fluoreszierenden Molekülen sehr starke Unterschiede und auch die chemischen Umgebungsbedingungen sowie die Temperatur spielen eine wichtige Rolle. So zeigten die in der vorliegenden Arbeit untersuchten GFP-Proteine unter Verwendung von Mounting Medium, auch bei Bestrahlung über eine Dauer von einer Stunde, kein nennenswertes Fading. Wurden die gleichen Proteine jedoch in Versuchen mit der Wachstumskammer, ohne Verwendung des Mounting Mediums, unter physiologischen Bedingungen eingesetzt, so trat schon nach zwei Minuten Bestrahlungsdauer eine deutliche Abnahme der Signalintensität auf (Abbildung 23). Offenbar bringt die Verwendung des Mounting Mediums eine deutliche Stabilisierung der GFP-Proteine mit sich, während die physiologischen intrazellulären Umgebungsbedingungen bei 37 °C ein starkes Fading bewirken. Bei der Untersuchung des Mitochondrienmembranpotentials mit JC-1 trat das Fading des Farbstoffes noch drastischer auf und erschwerte die Aufnahme der mikroskopischen Bilder stark (Abbildung 34). Hier konnte eine sinnvolle Bildaufnahme nur erfolgen, indem ein Bildausschnitt fokussiert wurde, um anschließend einen benachbarten, bisher unbestrahlten Ausschnitt, aufzunehmen. In diesem Fall mußte sehr schnell gearbeitet werden. Diese möglichst schnelle Bildaufnahme ist eine von drei Möglichkeiten, um das Problem des Fading zu minimieren. Ist dies aufgrund apparativer oder versuchstechnischer Gründe nicht durchführbar, so bietet sich noch die Möglichkeit, immer in einem definierten

Zeitintervall Bilder aufzunehmen. Dabei muß man jedoch annehmen, daß das Fading der fluoreszierenden Substanz stets denselben Verlauf zeigt. Eine derartige Annahme ist vor allem im Hinblick auf die Variabilität intrazellulärer Bedingungen schwierig zu halten.

Für quantitative Bestimmungen bietet eine dritte Möglichkeit die verlässlichsten Aussagen zum Phänomen Fading, so daß diese in der Arbeit eingesetzt wurde. Bei dieser Methode werden bei kontinuierlicher Bestrahlung in definierten Zeitabständen Aufnahmen eines Bildausschnittes gemacht und der mittlere Grauwert eines kleinen Bereichs bestimmt. Legt man den Meßpunkten einen exponentiellen Zerfall zugrunde, so kann bis zum Zeitpunkt Null extrapoliert werden und damit der ursprüngliche Intensitätswert bzw. die entsprechende Konzentration berechnet werden. Abbildung 41 zeigt den Verlauf der folgenden, mittels Least-Square-Methode angepaßten, Zerfallskurve:

$$Y(t)=74.4*\exp(-0.3347*t) \quad (t \text{ in Minuten})$$

In diesem Fall ergibt sich aus der berechneten Kurve für den Zeitpunkt Null der Intensitätswert $y(0)=74.4$.

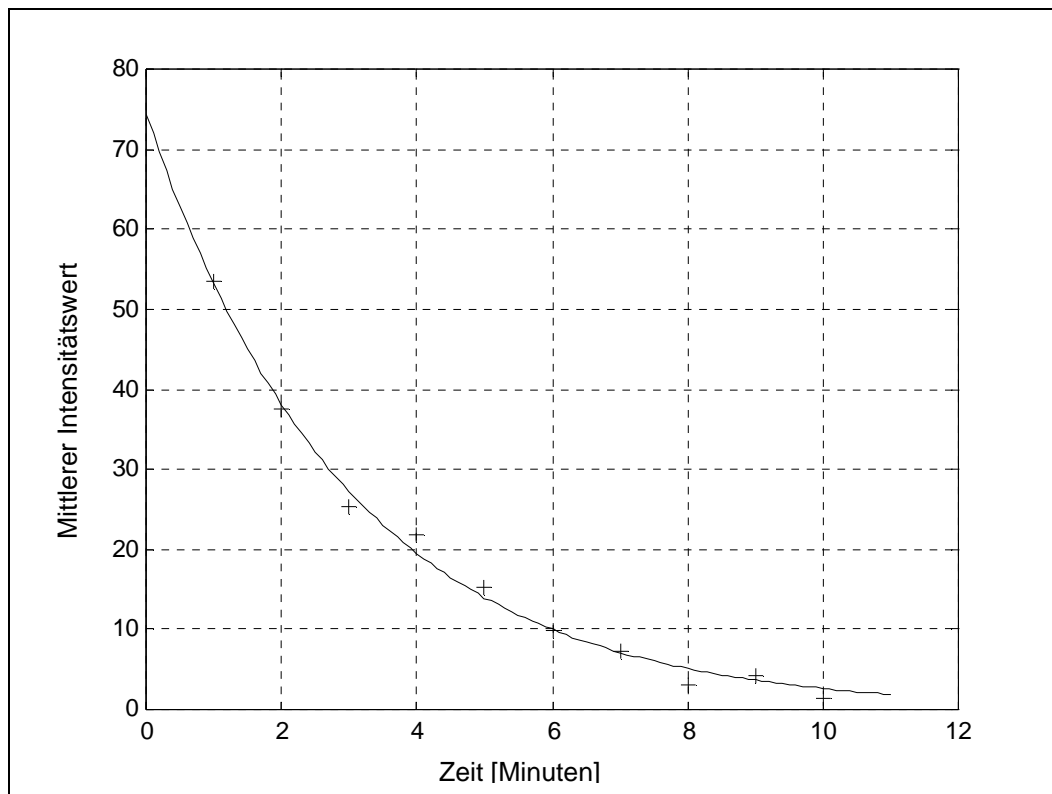


Abbildung 41: Fadingkurve von TRAF2-GFP in-vivo. Die Kreuze stellen die Meßpunkte dar. Die durchgezogene Linie ist die mit Hilfe der Least-Square-Methode ermittelte Zerfallskurve.

Die im Rahmen der Arbeit vorgenommenen Untersuchungen zur Translokation von TRAF2-GFP haben gezeigt, daß der Nachweis des besagten Signalmoleküls in Einzelzellen über einen Zeitraum von etwa 30 Minuten oder länger mit Hilfe der Zellkammer nur durchgeführt werden kann, wenn eine geringe Anzahl an Bildern aufgenommen wird. Die damit möglichst kurz gehaltenen Bestrahlungszeiten und die Verwendung eines Shutters zur Unterbrechung der Bestrahlung in den Aufnahmepausen verringern das Fading des zu beobachtenden Objektes.

Inzwischen ist eine Vielzahl an verschiedenen GFP-Mutanten mit unterschiedlichen spektralen Eigenschaften verfügbar, mit deren Hilfe sich Doppelmarkierungen durchführen lassen, die aber auch abweichend in ihren Stabilitätskriterien sind. Ellenberg (Ellenberg et al., 1999) hat zu verschiedenen Mutanten einen kurzen Überblick gegeben. Die Verwendung einer anderen, stabileren GFP-Mutante für Langzeitversuche könnte hier die Grenzen der eingesetzten instabilen Mutante aufheben.

5.2.3 Apoptotische Signalwege

Translokation von TRAF2-GFP und Bildung von membrangebundenen Domänen

Das intrazelluläre Signalmolekül TRAF2 spielt eine zentrale Rolle bei der Signalübertragung des TNF-R1 und TNF-R2, sowie weiterer verwandter Rezeptoren. Übereinstimmend mit anderen Untersuchungen (Hostager et al., 2000; Leonardi et al., 2000) liegt TRAF2-GFP in unstimulierten HeLa80-Zellen zunächst cytoplasmatisch, unter Aussparung des Zellkerns, vor. Im Gegensatz hierzu befindet sich bei Zellen, die nur GFP exprimieren, das GFP gleichmäßig verteilt in der gesamten Zelle, auch im Zellkern. Nach Stimulation der Zellen mit dem agonistischen Antikörper MR2-1 wird TRAF2 an die Cytoplasmamembran rekrutiert. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der Videomikroskopie der zeitliche Verlauf der Translokation des Moleküls und die Bildung von membrangebundenen Domänen erstmals unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen werden. Die durchgeführten Untersuchungen unter Verwendung von Mounting Medium ergaben, daß nach drei Minuten Inkubation mit MR2-1 die ersten Domänen an der Membran gebildet wurden, wobei nach 20 Minuten ihre Anzahl in etwa konstant blieb. Damit war nachgewiesen, daß der zeitliche Verlauf dieses frühen apoptotischen Schrittes schneller als erwartet vonstatten ging. Die Beobachtung der Zellen über drei Stunden zeigte außerdem, daß keine Abnahme der Domänenanzahl über diesen Zeitraum hinweg nachweisbar war. Eine anschließende Degradierung der RISC war somit nicht festzustellen. Im Kontrollversuch mit HeLa-Zellen konnte, wie erwartet, keine Domänenbildung an der Membran beobachtet werden. Diese Zellen besitzen keine TNF-R2 Rezeptoren an ihrer Oberfläche und damit sollte auch keine liganden-induzierte Translokation von TRAF2 auftreten. Die videomikroskopische Untersuchung einer Vielzahl an Zellen zeigte weiterhin, daß für eine sinnvolle Auswertung nur sehr schwach grüne Zellen, d.h. schwach TRAF2-GFP exprimierende Zellen, verwendet werden konnten. Wurde TRAF2-GFP in zu starkem Maß überexprimiert, so traten intrazellulär Aggregate auf, die fälschlicherweise auf die Stimulation der Zellen zurückgeführt werden können (Abbildung 17 C)). Die Überexpression von TRAF2 ist auch dahingehend problematisch, daß durch Aggregation der TRAF2 Moleküle eine liganden-induzierte Signaltransduktion vorgetäuscht werden kann (Rothe et al., 1996). Dieser Sachverhalt reduzierte die

Anzahl zur Auswertung geeigneter Zellen pro Versuch drastisch, da der überwiegende Teil der Zellkulturen TRAF2-GFP überexprimierte (ca. 95%). Die mittels Bildanalyse optimierte Auswahl der Zellen stellte eine wichtige Voraussetzung bei den Versuchen dar.

Die Auswirkung verschiedener Stimulantien auf die Domänenanzahl und die Domänengröße war deutlich unterschiedlich (Tabelle 5). Um zu testen, ob das Phänomen der Bildung der membrangebundenen Domänen unspezifisch, nur aufgrund der Bindung eines Antikörpers, ausgelöst wird, wurde zusätzlich zu den verschiedenen Stimulantien ein Kontroll IgG verwendet. Wie die Auswertung der Bilder ergab, traten bei Einsatz von Maus IgG bei HeLa80 TRAF2 Zellen keine Domänen entlang der Membran auf, so daß dieser Einwand ausgeschlossen werden konnte. Die meisten und auch größten Membrandomänen wurden bei denjenigen Zellen gebildet, welche mit einem Kaninchenserum stimuliert wurden. Die in diesem Serum enthaltene Vielzahl an verschiedenen Antikörpern führte zu der deutlichsten zellulären Antwort (durchschnittlich etwa 16 Domänen pro Zelle). Der agonistische Antikörper MR2-1 hatte, wie in vorherigen Versuchen, mit durchschnittlich 14 Domänen pro Zelle ebenfalls die Translokation von TRAF2 und die membranassoziierte Domänenbildung zur Folge. Die spezifische Bindung dieses Antikörpers an den TNF-R2 erfolgt adäquat der Bindung des natürlichen, membrangebundenen TNF und führt so zu den gleichen zellulären Antworten. Die einzelne Stimulation mit dem monoklonalen Antikörper 80-M2 bzw. mit löslichem TNF führte in beiden Fällen erwartungsgemäß nur zu einer geringen Anzahl an Domänen (etwa fünf Domänen pro Zelle), da beide Liganden bei TNF-R2 nur in hohen Konzentrationen eine geringfügige zelluläre Antwort hervorrufen. Bei Kombination beider Stimuli wurde eine dem agonistischen Antikörper bzw. membrangebundenen TNF entsprechende Anzahl an Domänen gebildet (durchschnittlich 11 Domänen pro Zelle).

Durch diese Versuchsreihe mit verschiedenen Stimuli, die in ihrer biologischen Wirksamkeit deutliche Unterschiede zeigen, konnte die Reproduzierbarkeit und Effizienz des quantitativen Nachweises des intrazellulären Signalmoleküls TRAF2 mittels der Fluoreszenzvideomikroskopie und der digitalen Bildanalyse eindeutig belegt werden.

Nachdem das Potential der Videomikroskopie mit den zuvor beschriebenen Versuchen abgeklärt worden war, wurden weitergehende Versuche mit verschiedenen neuen TRAF-GFP Mutanten unternommen. Innerhalb der als Adapterproteine fungierenden TRAF-Familie kommt TRAF2 als Signalmolekül eine Schlüsselrolle zu, wobei die genaue Funktionsweise bzw. der Zusammenhang in der Signalübertragung der anderen TRAF Proteine noch wenig bekannt ist. Daher wurden Zellen mit verschiedenen TRAF-GFP Mutanten mit MR2-1 stimuliert und auf die Bildung von membrangebundenen Domänen hin ausgewertet. Ebenso wie bei anderen Untersuchungen (Hostager et al., 2000) war allein bei TRAF3-GFP eine Anreicherung des Moleküls in Domänen nachweisbar, wobei die Anzahl der gebildeten Domänen im Gegensatz zu den von Hostager und Mitarbeitern durchgeführten Arbeiten nicht annähernd die Größenordnung der TRAF2 Domänen erreichte. Obwohl sowohl TRAF5 als auch TRAF6 an der Aktivierung von NF- κ B beteiligt sind (Aizawa et al., 1997) und angenommen wird, daß TRAF5 aufgrund seiner starken Ähnlichkeit zu TRAF2 dieses bei der Aktivierung von NF- κ B substituieren kann (Yeh et al., 1997), war interessanterweise bei beiden Molekülen keine Translokation oder die Bildung von Membrandomänen nachweisbar (Tabelle 6). Denkbar wäre, daß TRAF5 bzw. TRAF6 in deutlich geringerer, aber trotzdem biologisch wirksamer Menge die weitere Signalübertragung aktivierten und daß diese kleinen Mengen nicht vom System erfaßt werden konnten. Obwohl auch TRAF1 mit TRAF2 in den RISC mit eingebunden wird, war kein TRAF1-GFP in membrangebundenen Domänen nachweisbar. Allerdings muß an dieser Stelle angemerkt werden, daß im Gegensatz zu den verwendeten TRAF2-GFP Zellen keine stabilen Transfektanten, sondern nur transiente zur Verfügung standen. Da bei diesen Zellen ohnehin nur ein äußerst geringer Prozentsatz die GFP-Proteine exprimierten, war das Auffinden einer geeigneten schwach exprimierenden Zelle sehr schwer und verringerte damit die Gesamtzahl der bildanalytisch ausgewerteten Zellen drastisch, so daß eine statistisch abgesicherte Aussage bei diesen Versuchen schwierig war.

Die Fluoreszenzmarkierung mittels GFP-Proteinen bringt eine Reihe von Vorteilen mit sich, wobei der wichtigste sicherlich die Möglichkeit darstellt, die Lokalisierung von Proteinen in intakten Zellen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Jedoch

besitzen GFP-Moleküle mit ihrem Molekulargewicht von etwa 27 kDa eine nicht unerhebliche Größe, die bei Ankopplung an entsprechende Proteine durchaus mitberücksichtigt werden muß und auch bei der Auswahl der geeigneten Kopplungsstelle im Protein von Bedeutung ist (Ward, 1998). Das Signalprotein TRAF2 besitzt einen N-Terminus, welcher für die Weiterleitung von Signalen verantwortlich ist und einen C-Terminus (TRAF Domäne), der im wesentlichen für die Oligomerisierung und Rezeptorbindung verantwortlich ist (Baud et al., 1999). Für Untersuchungen der Translokation und des Bindungsverhaltens von TRAF2 mit dem Rezeptor sollten somit, je nach Ankopplungsstelle des GFP-Moleküls, Unterschiede nachweisbar sein. So zeigte ein Versuch, bei dem das GFP-Molekül einmal N- bzw. C-terminal an TRAF2 verankert wurde, die unterschiedlichen Auswirkungen der Kopplungsstelle auf die Bildung der membran-assoziierten Domänen nach Stimulation mit MR2-1 (Tabelle 7). Nach 10 bzw. 15 Minuten war bei N-terminal gekoppelten Zellen eine deutlich höhere Anzahl an Domänen nachweisbar als bei C-terminaler Verankerung. Nach 90 Minuten war die Anzahl der Domänen in beiden Fällen in etwa gleich groß, wobei die GFP-N-terminal gebildete Anzahl bereits wieder leicht abgenommen hatte. Dieser Rückgang könnte sich daraus ableiten, daß es sich hier um eine biologisch inaktive Form handelt, bei der es zu keiner Weiterleitung der Signale in der Kaskade kommt. Ist das GFP-Molekül am N-terminalen Ende verankert, liegt die Bindungsdomäne frei und eine störungsfreie, schnelle Bindung an den Rezeptor ist gegeben, so daß der erste Schritt, nämlich die Translokation von TRAF2, die Oligomerisierung und die Bindung an den Rezeptor, wie unter physiologischen Bedingungen verläuft. Alle folgenden Schritte sind gestört und können die Stabilität des gebildeten RISC und auch dessen Degeneration beeinflussen. Das am C-terminalen Ende angekoppelte GFP-Molekül stellt aufgrund seiner Größe eine sterische Behinderung bei der Rezeptorbindung dar und führt so zu einer zeitlichen Verzögerung bei der Bildung membran-assoziiierter Domänen. Die im Versuch eingesetzte Mutante mit GFP-Molekül am Ring-Finger zeigte, wie erwartet, keine Domänenbildung, da es aufgrund der fehlenden TRAF-Domäne zu keiner Rezeptorbindung kam.

Durch den Einsatz einer temperierten Zellkammer konnte erstmals die Bindung von TRAF2-GFP an den TNF-R2-Rezeptor in HeLa80 unter physiologischen Bedingungen nachgewiesen und weitergehend eine Quantifizierung der TRAF2 Moleküle in den

gebildeten membran-assoziierten Domänen vorgenommen werden. Die gebildeten Domänen variierten sowohl in ihrer Größe als auch in der Anzahl der gebundenen TRAF2 Moleküle (unterschiedliche Intensitäten) (Tabelle 8). Ebenso war ihre Bildungsdynamik unterschiedlich. Die kontinuierliche Aufnahme der Zellen in der Kammer hat gezeigt, daß nach Stimulation der Zellen mit MR2-1 schon nach zwei Minuten membran-assoziierte Domänen vorhanden waren. Die Quantifizierung der TRAF2-GFP Moleküle einer Domäne ergab, daß nach drei Minuten eine 6,5-mal größere Molekülanzahl als im Cytoplasma, örtlich konzentriert in der Domäne, vorlag (Abbildung 30). Interessanterweise nahm bereits nach drei Minuten die Molekülanzahl in den Domänen wieder ab. Dies läßt auf eine Degeneration der TRAF2-GFP Moleküle schließen, da gleichzeitig keine Zunahme der Molekülanzahl in Membrannähe nachweisbar war, was auf einen Abtransport der Moleküle hingedeutet hätte. Auch in Membrannähe nahm die Molekülanzahl nach drei Minuten leicht ab. Während des Versuchs blieb die TRAF2-GFP Menge im Cytoplasma nahezu konstant. Die Annahme, daß aufgrund des schnellen Prozesses der Domänenbildung die TRAF2-GFP Proteine eventuell an der Membran vororganisiert sind, konnte nicht bestätigt werden. Im Gegensatz zu Untersuchungen von Feng und Mitarbeitern (Feng et al., 2001), die in HUVEC Zellen die Colokalisation von TRAF2 mit Caveolin-1 in Membrannähe nachweisen konnten, ergab die bildanalytische Auswertung für Bereiche in Membrannähe und im Cytoplasma, vor der Stimulation und während der ersten drei Minuten, übereinstimmende Werte und keine erhöhte Anzahl an Molekülen in Membrannähe.

Änderung des Mitochondrienmembranpotentials

Die Veränderung mitochondrialer Funktionen, schon in beginnenden Stadien der Apoptose vor der Kondensation des Zellkerns, ließen früh die Vermutung aufkommen, daß diese Organellen eine wichtige Rolle im apoptotischen Prozeß spielen (Cavalli and Liang; 1998; Duriez et al., 2000). Zahlreiche Untersuchungen haben bisher stattgefunden, um diese Rolle genauer zu spezifizieren, die jedoch oftmals zu kontroversen Ergebnissen führten. Auch die Veränderung des mitochondrialen Membranpotentials, in Verbindung mit der Freisetzung des pro-apoptotischen Cytochrom C bei der Apoptose, ließ keine einheitlichen Schlüsse zu.

Mit Hilfe der Videomikroskopie wurden Veränderungen im Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) der Mitochondrien von Kym-Zellen nach Stimulation mit TNF untersucht. Wie in anderen Untersuchungen (Scarlett et al., 2000) hatte die Induktion der Apoptose durch TNF zunächst eine Abnahme der Mitochondrienanzahl mit aktivem Membranpotential zur Folge. Nach vier Stunden Inkubationsdauer mit TNF waren keine aktiven Mitochondrien mehr nachweisbar (Tabelle 9). Der Zellkern sämtlicher Zellen lag fragmentiert vor und zeigte somit, daß die Zellen weit fortgeschritten im apoptotischen Ablauf waren. Bei Wiederholung des Versuchs mit den gleichen Zellen und identischen Bedingungen war das Zusammenbrechen von $\Delta\Psi_m$ und die Fragmentierung des Zellkerns nach vier Stunden jedoch nicht mehr nachweisbar (Tabelle 10). Der einzige Unterschied bei der Durchführung des ansonsten identischen Versuchs bestand im Alter der eingesetzten Zellen. So wurden zuerst Zellen verwendet, bei denen bereits über 20 Passagen vorgenommen worden waren. Diese "alten" Zellen reagierten auf die TNF Behandlung nach drei Stunden mit verringertem $\Delta\Psi_m$ und fragmentiertem Zellkern. Diejenigen Zellen welche zehn Passagen hinter sich hatten, zeigten nach etwa vier Stunden eine Abnahme des $\Delta\Psi_m$. Wurden schließlich frische Zellen verwendet, so waren noch nach sechs Stunden sämtliche Mitochondrien in den Zellen aktiv und deren Zellkerne intakt. Betrachtet man die Vielzahl der Apoptose-Effektoren mit den verschiedenen apoptotischen Signalwegen, bei denen eine große Zahl an Signalproteinen aus dem Cytoplasma bzw. dem Zellkern an die Mitochondrien transloziert wird und dort mit entsprechenden Rezeptoren interagiert, so wird die Komplexität der Rolle dieser Organellen klar (Brenner and Kroemer, 2000). Sie übernehmen praktisch die Stellung einer zentralen Verrechnungseinheit sämtlicher pro-apoptotischer und eventuell auch anti-apoptotischer Signale und reagieren dann mit der Ausschüttung von Caspasen und anderen Aktivatoren wie Nukleasen und Sekundär-messenger-Molekülen (Ca^{2+} , Ceramide, Sphingosine, ROS, usw.). Dieses Modell würde die vielen kontroversen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen erklären und auch eine Interpretation der schlechten Reproduzierbarkeit der HeLa80-Zellen ermöglichen. Die komplexe Signalverarbeitung in diesen Organellen ist somit nicht nur Zelltyp und Stimulus-spezifisch, sondern es wäre durchaus denkbar, daß die Signalweiterleitung innerhalb eines Zelltyps mit Zellen in unterschiedlichem

physiologischen Zustand (Alter, Zellzyklus, Streß, usw.) durch eine unterschiedliche Zusammensetzung an Signalmolekülen variiert.

Auch die Funktion des Sekundärmessengers Ceramid wird kontrovers diskutiert. Die Behandlung von Zellen mit TNF oder anderen Cytokinen führt zur Aktivierung der Sphingomyelinase, die Shingomyelin hydrolysiert, so daß u.a. Ceramid entsteht (Liu et al., 1997). Die intrazelluläre Akkumulation von langkettigen Ceramiden beeinflusst wiederum biologische Prozesse wie Apoptose und Zellzyklus. Durch die Stimulation von Zellen mit kurzkettigem, exogenem Ceramid können einige der biochemischen Reaktionen von langkettigem Ceramid imitiert werden, so daß viele zellbiologische Untersuchungen mit C₂, C₆ und C₈-Ceramiden durchgeführt worden sind (Hannun and Luberto; 2000; Hofmann and Dixit, 1998). Untersuchungen von Cuvillier (Cuvillier et al., 2000) haben ergeben, daß exogenes Ceramid über den mitochondrialen Weg bereits nach drei Stunden Apoptose induziert. Bei dieser apoptotischen Signalkaskade transloziert aktivierte Caspase 8 zu den Mitochondrien und bewirkt dort den Austritt von pro-apoptotischem Cytochrom C. Die Geschwindigkeit der Apoptose hängt dabei vom verwendeten Zelltyp ab. Zur Klärung der Frage, ob Ceramid direkt oder indirekt auf die Mitochondrien wirkt, wurden im Rahmen dieser Arbeit Kym-Zellen mit exogenem C₆-Ceramid stimuliert und untersucht, ob diese Stimulation einen Einfluß auf $\Delta\Psi_m$ hat. Auch nach zwölf Stunden Inkubation mit C₆-Ceramid zeigte sich keine Änderung des Anteils der aktiven Mitochondrien (Tabelle 12). Allerdings war bei fast allen Zellen eine Kondensation des Zellkerns zu beobachten, was darauf hindeutete, daß sich die Zellen im apoptotischen Stadium befanden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Untersuchungen, bei denen der Austritt von Cytochrom C und damit die fortschreitende Apoptose nicht an den Zusammenbruch von $\Delta\Psi_m$ gekoppelt ist.

Die Auswertung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der TNF-behandelten Kym-Zellen im Hinblick auf die örtliche Verteilung der Mitochondrien innerhalb der Zellen ergab, daß diese keine Veränderung ihrer örtlichen Lage durch TNF erfuhren. Die bei De Vos und Mitarbeitern (De Vos et al., 1998) gemachten Beobachtungen mit L929 Zellen, bei denen es nach 2 Stunden Inkubation mit TNF zu einer Konzentration

der Mitochondrien in Clustern kam, konnten mit der verwendeten Kym-Zelllinie nicht gemacht werden.

Das im Rahmen dieser Arbeit aufgebaute Fluoreszenz-Videomikroskopiesystem konnte erfolgreich zur Charakterisierung mitochondrialer Funktionsänderungen und zur Lokalisierung des intrazellulären Signalmoleküls TRAF2 bei der TNF-induzierten Apoptose eingesetzt werden. Dabei war es möglich, die Auswirkungen verschiedener Stimulantien und unterschiedlicher Mutanten auf die Bildung von membran-assoziierten Signalkomplexen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen und Aussagen über die zeitlichen Abläufe der Translokationsvorgänge zu machen. Unter Einsatz einer temperierten Zellkammer gelang die Quantifizierung der TRAF2-Moleküle in diesen Komplexen. Die gewonnenen Daten können in die Modellbildung eingebracht werden und so den Ausbau der entwickelten mathematischen Modelle für den ersten Teil der apoptotischen Signalkaskade, die Bindung von Rezeptor-Ligand und anschließende Bildung intrazellulärer membran-assoziiierter Signalkomplexe, unterstützen.

6 Zusammenfassung

In biotechnologischen Prozessen nimmt die Produktion hoch spezifischer pharmazeutischer Substanzen mit Hilfe eukaryotischer Zellen einen ständig wachsenden Stellenwert ein. So werden auf der einen Seite Produkte wie monoklonale Antikörper in großtechnischem Maßstab produziert. Hier steht vor allem die Prozeßoptimierung im Vordergrund, um die Produktionskosten bei maximaler Produktausbeute zu minimieren. Auf der anderen Seite wird durch intensive Grundlagenforschung versucht, neue Wege bei bisher unverstandenen zellulären Vorgängen, wie bei Krebs oder der Immunschwächekrankheit AIDS, zu gehen. Beide, wenn auch deutlich unterschiedlich ausgerichteten Bereiche, nutzen die Entwicklung neuer Analysetechniken unter Einsatz einer stetig leistungsstärkeren Computertechnologie. Eine dieser Techniken stellt die Videomikroskopie in Verbindung mit der digitalen Bildanalyse dar. In der vorliegenden Arbeit wurde das Potential videomikroskopischer und bildanalytischer Methoden bei der Untersuchung des Zelltodes von eukaryotischen Zellpopulationen und einzelnen Zellen aufgezeigt.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ein PC-gesteuertes Bildanalyzesystem aufgebaut, mit dessen Hilfe die Bestimmung der Zellvitalität von CHO-Zellen in Fermentationsprozessen schnell und reproduzierbar durchgeführt werden kann. Die durchgeführten Untersuchungen zeigten, daß die Bestimmung lebender und toter Zellen bei der verwendeten CHO-Kultur mittels Vitalfärbung vorgenommen werden kann. Die entwickelte Färbemethode mit Erythrosin B hat sich hierbei im Vergleich zu der gängigen Trypan Blau Färbung als besser geeignet erwiesen. Zusätzlich zu dem enormen Vorteil der raschen Auswertung vieler Proben ergab ein statistischer Vergleich der Zählergebnisse aus der manuellen und bildanalytischen Methode eindeutig eine bessere Reproduzierbarkeit der bildanalytischen Methode. Das aufgebaute Bildanalyzesystem arbeitet mittels Programm-Makro automatisiert, so daß eine PC-gesteuerte on-line Anbindung an Prozeßleitsysteme von Fermentern möglich ist.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde das Videomikroskopiesystem für Fluoreszenzversuche entsprechend erweitert, um sehr spezifische Untersuchungen durchzuführen, welche eine weitere Aufklärung von Signalkaskaden im Ablauf des apoptotischen Zelltodes bringen sollten. Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen stand die Lokalisierung und Quantifizierung einzelner intrazellulärer Signalmoleküle sowie die Charakterisierung mitochondrialer Funktionsänderungen. Dabei war es möglich, die Auswirkungen verschiedener Stimulantien und unterschiedlicher Mutanten auf die Bildung von membran-assoziierten Signalkomplexen unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen und Aussagen über die zeitlichen Abläufe der Translokationsvorgänge zu machen. Unter Einsatz einer temperierten Zellkammer gelang die Quantifizierung des Signalmoleküls TRAF2 in diesen Signalkomplexen. Die gewonnenen Daten können in die Modellbildung eingebracht werden und so den Ausbau der entwickelten mathematischen Modelle für den ersten Teil der apoptotischen Signalkaskade, die Bindung von Rezeptor-Ligand und anschließende Bildung intrazellulärer membran-assoziiierter Signalkomplexe, unterstützen.

7 Literatur

- Aizawa, S. H. Nakano, T. Ishida, R. Horie, M. Nagai, K. Ito, H. Yagita, K. Okumura, J. Innoue and T. Watanabe (1997). Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 5 and TRAF2 are involved in CD30 mediated NF- κ B activation. *J. Biol. Chem.* **272**, 2042-2045.
- Anjum R., A. M. Ali, Z. Begum, J. Vanaja and A. Khar (1998). Selective involvement of caspase-3 in ceramide induced apoptosis in AK-5 tumor cells. *FEBS Lett.* **439**, 81-84.
- Arce G. R., N. C. Gallagher and T. A. Nodes (1986). Median filters: theory for one and two dimensional filters. In: Huang, T. S. (Ed.): *Advances in computer vision and image processing*. **2**, Greenwich, Connect.: JAI Press.
- Arch R. H., R. W. Gedrich and C. B. Thompson (1998). Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) – a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes & Development* **12**, 2821-2830.
- Arends M. J., R. G. Morris and A. H. Wyllie (1990). Apoptosis The role of endonuclease. *Am. J. Pathol.* **136**, 539-608.
- Ashkenazi A. and V. M. Dixit (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281**, 1305-1308.
- Bastiaens P. I. H. and A. Squire (1999). Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell. *Trends Cell Biol.* **9**, 48-51.
- Baud V., Z.-G. Liu, B. Bennett, N. Suzuki, Y. Xia and M. Karin (1999). Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient

- for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes & Development* **13**, 1297-1308.
- Bhalla U. S. and R. Iyengar (1999). Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* **283**, 381-387.
- Beg A. A. and D. Baltimore (1996). An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science* **274**, 782-784.
- Berland K., K. Jacobson and T. French (1998). Electronic cameras for low-light microscopy. *Methods in Cell Biology* **56**, 19-44.
- Biener R. K., W. Waldruff, W. Noe, J. Haas, M. Howaldt und E. D. Gilles (1996). Modellbildung und Simulation tierischer Zellkulturen. *Chemie Ingenieur Technik* **68**, 158-161.
- Billig D. (1987). Animal cell cultures for the production of bioproducts. *Biochemical Engineering*, Fischer Verlag Stuttgart, 301-306.
- Brenner C. and G. Kroemer (2000). Mitochondria – the death signal integrators. *Science* **289**, 1150-1151.
- Callard R., A. J. T. George and J. Stark (1999). Cytokines, Chaos, and Complexity. *Immunity* **11**, 507-513.
- Cavalli L. R. and B. C. Liang (1998). Mutagenesis, tumorigenity, and apoptosis: are the mitochondria involved? *Mutation Research* **398**, 19-26.
- Chalfie M. and S. Kain (1998). Green fluorescent protein properties, applications, and protocols. WILEY-LISS.
- Cooper G. M. (1997). *The Cell: a molecular approach*. ASM Press Washington, D.C.

- Cuvillier O., L. Edsall and S. Spiegel (2000). Involvement of Sphingosine in mitochondria-dependent Fas-induced apoptosis of type II Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* **275**, 15691-15700.
- Del Prete G., M. De Carli, M. M. Dèlios, I. Müller-Fleckenstein, H. Fickenscher, B. Fleckenstein, F. Almerigogna and S. Romagnani (1994). Polyclonal B cell activation induced by Herpesvirus Saimiri-transformed human CD4⁺ T cell clones. *J. Immunol.* **152**, 4872-4879.
- De Vos K., V. Goossens, E. Boone, D. Vercammen, K. Vancompernelle, P. Vandenameele, G. Haegeman, W. Fiers and J. Grooten (1998). The 55-kDa tumor necrosis factor receptor induces clustering of mitochondria through its membrane-proximal region. *J. Biol. Chem.* **273**, 9673-9680.
- Ding G. J. F., P. A. Fischer, R. C. Boltz, J. A. Schmidt, J. J. Colaiannes, A. Gough, R. A. Rubin and D. K. Miller (1998). Characterization and quantitation of NF- κ B nuclear translocation induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* **273**, 28897-28905.
- Duriez P. J., F. Wong, K. Dorovini-Zis, R. Shahidi and A. Karsan (2000). A1 functions at the mitochondria to delay endothelial apoptosis in response to tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **275**, 18099-18107.
- Ellenberg J., J. Lippincott-Schwartz and J. F. Presley (1999). Dual color imaging with GFP variants. *Trends in Cell Biology* **9**, 52-56.
- Enari M., R. v. Talanian, W. W. Wong and S. Nagata (1996). Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during FAS-mediated apoptosis. *Nature* **380**, 723-726.

- Falkner K. and E. D. Gilles (1998). Digital image analysis (DIA): quantitative evaluation of colored microscopic images of animal cells. In *New developments and new applications in animal cell technology*, 317-320. Kluwer Academic Publishers.
- Feng X., M. L. Gaeta, L. A. Madge, J.-H. Yang, J. R. Bradley and J. S. Pober (2001). Caveolin-1 associates with TRAF2 to form a complex that is recruited to the TNF receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 8341-8349.
- Frame, K. K. and W.-S. Hu (1990). Cell volume measurement as an estimation of mammalian cell biomass. *Biotechnol. Bioeng.* **36**, 191-197.
- Goodwin R. G., D. Anderson, R. Jerzy, T. Davis, C. I. Brannan, N. G. Copeland, N. A. Jenkins and C. A. Smith (1991). Molecular cloning and expression of the type 1 and type 2 murine receptors for tumor necrosis factor. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3020-3026.
- Goldstein J. C., N. J. Waterhouse, P. Juin, G. I. Evan and D. R. Green (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nature Cell Biology* **2**, 156-162.
- Grell M., G. Zimmermann, D. Hülser, K. Pfizenmaier and P. Scheurich (1994). TNF receptors TR60 and TR80 can mediate apoptosis via induction of distinct signal pathways. *J. Immunol.* **153**, 1963-1972.
- Grell M. and P. Scheurich (1997). Tumor necrosis factor. In "Growth factors and cytokines in health and disease", Vol. 2B, JAI Press Inc., 669-726.
- Grell M., H. Wajant, G. Zimmermann and Peter Scheurich (1998a). The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 570-575.

- Grell M., F. M. Becke, H. Wajant, D. N. Männel, and P. Scheurich (1998b). TNF receptor type 2 mediates thymocyte proliferation independently of TNFF receptor type 1. *Eur. J. Immunol.* **28**, 257-263.
- Grell M., G. Zimmermann, E. Gottfried, C.-M. Chen, U. Grünwald, D. C. S. Huang, Y.-H. Wu Lee, H. Dürkop, H. Engelmann, P. Scheurich, H. Wajant and A. Strasser (1999). Induction of cell death by tumor necrosis factor (TNF) receptor 2, CD40 and CD30: a role for TNF-R1 activation by endogenous membran-anchored TNF. *EMBO J.* **18**, 101-110.
- Hannun Y. A. and C. Luberto (2000). Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends in Cell Biology* **10**, 73-79.
- Heller R. A., K. Song, N. Fan and D. J. Chang (1992). The p70 tumor necrosis factor receptor mediates cytotoxicity. *Cell* **70**, 47-56.
- Herman B. (1998). Fluorescence microscopy. BIOS Scientific Publishers Limited.
- Higuchi M., N. Higashi, H. Taki and T. Osawa (1990). Cytolytic mechanisms of activated macrophages. *J. Immunol.* **144**, 1425-1431.
- Hofmann K. and V. M. Dixit (1998). Ceramide in apoptosis – does it really matter? *TIBS* **23**, 374-377.
- Hostager B. S., I. M. Catlett and G. A. Bishop (2000). Recruitment of CD40 and Tumor Necrosis Factor Receptor-associated Factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling. *J. Biol. Chem.* **275**, No. 20, 15392-15398.
- Hsu H., H.-B. Shu, M.-G. Pan and D. Goeddel (1996). TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways. *Cell* **84**, 299-308.

- Huang T. S. (1981). Two-dimensional digital signal processing II: transforms and median filters. Topics in applied physics. Vol. 43, Berlin: Springer.
- Itoh N. and S. Nagata (1993). A novel protein domain required for apoptosis. J. Biol. Chem. **268**, 10932-10937.
- Jähne B. (1991). Digitale Bildverarbeitung. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Kendlbacher Th., A. Kremling und E. D. Gilles (1998). Modellgestützte Optimierung bei der Prozeßführung bioverfahrenstechnischer Prozesse. at **8**, 375-380.
- Kerr J. F. R., A. H. Wyllie and A. H. Currie (1972). Br. J. Cancer **26**, 239.
- Konstantinov K., S. Chuppa, E. Sajan, Y. Tsai, S. Yoon and F. Golini (1994). Real-time biomass-concentration monitoring in animal-cell cultures. Tibtech **12**, 324-329.
- Leonardi A. , H. Ellinger-Ziegelbauer, G. Franzoso, K. Brown and U. Siebenlist (2000). Physical and functional interaction of Filamin (Actin-binding protein-280) and Tumor Necrosis Factor receptor-associated factor 2. J. Biol. Chem. **275**, 271-278.
- Li P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad. E. S. Alnemri and W. Wang (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. Cell **91**, 479-489.
- Liu B., L. M. Obeid and Y. A. Hannun (1997). Sphingomyelinases in cell regulation. Cell & Developmental Biology **8**, 311-322.
- Männel D. N., R. N. Moore and S. E. Mergenhagen (1980). Macrophages as a source of tumoricidal activity (Tumor Necrotizing Factor). Infec. Imm. **30**, 523-530.

- Maruhashi, F. (1994). Automated monitoring of cell concentration and viability using an image analysis system. *Cytotechnol.* **15**, 281-289.
- McAteer J. A. and J. Davis (1994). Basic cell culture technique and the maintenance of cell lines. In *Basic cell culture*. Oxford University Press.
- McKenna S. L., A. J. McGowan and T. G. Cotter (1998). Molecular mechanisms of programmed cell death. In *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Müller G., P. Storz, S. Bourteele, H. Döppler, K. Pfizenmaier, H. Mischak, A. Philipp and W. Kolch (1998). Regulation of RAF-1 kinase by TNF and its "second messenger" ceramide and crosstalk with mitogenic signaling. *EMBO J.* **17**, 732-742
- Parker J. R. (1997). *Algorithms for image processing and computer vision*. John Wiley & Sons, Inc..
- Patterson G. H., S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain and D. W. Piston (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescent microscopy. *Biophys. J.* **73**, 2782-2790.
- Pawley J. B. (1995). *Handbook of biological confocal microscopy*. Plenum Press New York.
- Pollok B. A. and R. Heim (1999). Using GFP in FRET-based applications. *Trends in Cell Biology* **9**, 57-60.
- Quin Z.-H., Y. Wang, K. K. Kikly, E. Sapp, K. B. Kegel, N. Aronin and M. DiFiglia (2000). Pro-Caspase-8 is pre-dominantly localized in mitochondria and released into cytoplasm upon apoptotic stimulation. *J. Biol. Chem.* **10**,

- Raff M. C. (1992). Social controls on cell survival and cell death. *Nature* **356**, 397-399.
- Reichl U., R. King and E. D. Gilles (1992). Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. *Biotechnol. and Bioeng.* **39**, 164-170.
- Rost F. W. D. (1991). *Quantitative fluorescence microscopy*. Cambridge University Press.
- Rost F. W. D. (1992). *Fluorescence microscopy Vol. 1*. Cambridge University Press.
- Rost F. W. D. (1995). *Fluorescence microscopy Vol. 2*. Cambridge University Press.
- Rothe M., V. Sarma, V. M. Dixit and D. V. Goeddel (1995). TRAF2-mediated activation of NF κ B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* **269**, 1424-1427.
- Rothe M., J. Xiong, H. B. Shu, K. Williamson, A. Goddard and D.V. Goeddel (1996). I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 8241-8246.
- Roy N., Q. L. Deveraux, R. Takahasi, G. S. Salvesen and J. C. Reed (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* **16**, 6914-6925.
- Saunders J. W. (1966). Death in embryonic systems. *Science* **154**, 604-611.
- Scarlett J. L., P. W. Sheard, G. Hughes, E. C. Ledgerwood, H.-H. Ku and M. P. Murphy (2000). Changes in mitochondrial membrane potential during staurosporin-induced apoptosis in Jurkat cells. *FEBS Lett.* **475**, 267-272.
- Stokes C. L. (2000). Biological systems modeling: powerful discipline for biomedical e-R&D. *AIChE Journal* **46**, 430-433.

- Sugarman B. J., B. B. Aggarwal, P. E. Hass, M. A. Palladino and H. M. Shepard (1985). Recombinant human tumor necrosis factor- α : effects on proliferation of normal and transfected cells in vitro. *Science* **230**, 943-945.
- Tartaglia L. A., D. Pennica and D. V. Goeddel (1993). Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.* **268**, 18542-18548.
- Treskatis S.-K., V. Orgeldinger, H. Wolf and E. D. Gilles (1997). Morphological characterization of filamentous microorganisms in submerged cultures by on-line digital image analysis and pattern recognition. *Biotechnol. Bioeng.* **53**, 191-201.
- Tucker K.G., S. Chalder, M. Al-Rubai and C. R. Thomas (1994). Measurement of hybridoma cell number, viability, and morphology using fully automated image analysis. *Enzyme Microbiol. Technol.* **16**, 29-35.
- Vassali P. (1992). The pathophysiology of tumor necrosis factors. *An. Rev. Immunol.* **10**, 411-52.
- Vercammen D., P. Vandenabeele, W. Declercq, M. Van De Craen, J. Grooten and W. Fiers (1995). Cytotoxicity in L929 murine fibrosarcoma cells after triggering of transfected human p75 tumor necrosis factor (TNF) receptor is mediated by endogenous murine TNF. *Cytokine* **7**, 463-470.
- Wajant H., M. Grell and P. Scheurich (1999). TNF receptor associated factors in cytokine signaling. *Cytokine and growth factors review*.
- Wang C.-Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel, A. S. Baldwin (1998). NF- κ B antiapoptosis: induction of TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress Caspase-8 activation. *Science* **281**, 1680-1683.

- Wang Y.-L. (1998). Digital deconvolution of fluorescence images for biologists. *Methodes Cell Biol.* **56**, 305-315.
- Ward W. W. (1998). Biochemical and physical properties of green fluorescent protein. Wiley-Liss, Inc.
- Watts J. D., M. Gu, A. J. Polverino, S. D. Patterson and R. Aebersold (1997). Fas-induced apoptosis of T cells occurs independently of ceramide generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7292-7296.
- Weiss T., M. Grell, B. Hessabi, S. Bourteele, G. Müller, P. Scheurich and H. Wajant (1997). Enhancement of the TNF receptor p60-mediated cytotoxicity by TNF receptor p80. *J. Immunol.* **158**, 2398-2404.
- Wenig G., U. S. Bhalla and R. Iyengar (1999). Complexity in biological signaling systems. *Science* **284**, 92-96.
- White J. and E. Stelzer (1999). Photobleaching GFP reveals protein dynamics inside live cells. *Trends in Cell Biology* **9**, 61-65.
- Wigley C. B. (1994). The cell culture laboratory. In *Basic cell culture*. Oxford University Press.
- Yeh W.-C., A. Shahinian, D. Speiser, J. Kraunus, F. Bilia, A. Wakeham, J. L. de la Pompa, D. Ferrick, B. Hum, N. Iscove, P. Ohashi, M. Rothe, D. V. Goeddel and T. W. Mak (1997). Early lethality, functional NF- κ B activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice. *Immunity* **7**, 715-725.
- Zeiss, Carl Zeiss Deutschland (1999). Persönliche Korrespondenz.