

Humanbio 1.15

☒ Bearbeitet	☐
 Datum	@22/12/2020
☒ Gesehen	☐
 Kurs	Humanbio 1
 Notes	
 Property	
 Typ	Vorlesung
☒ Verfügbar	☐

Physiologische Systeme

- Kardiovaskulär
 - Herz-, Blut-, Lymphgefäße
- Atmung
 - Lunge, Trachea, Nase, Rachen
- Verdauung
 - Magen-Darmtrakt = Gastrointestinaltrakt
- Immun
 - Thymus, Tonsillen, Milz, Lymphknoten
- Urogenital
 - Niere, Blase, Reproduktionsorgane
- Nerven
 - Gehirn, Rückenmark, Darm
- Hormon
 - Leber, Nebenniere, Hypophyse
- Bewegung

- Muskeln, Knochen, Sehnen

Gewebe

- Epithelgewebe
- Binde- & Stützgewebe
- Muskelgewebe
- Nervengewebe

Schritte & Methoden der Gewebeaufarbeitung

1. Fixierung

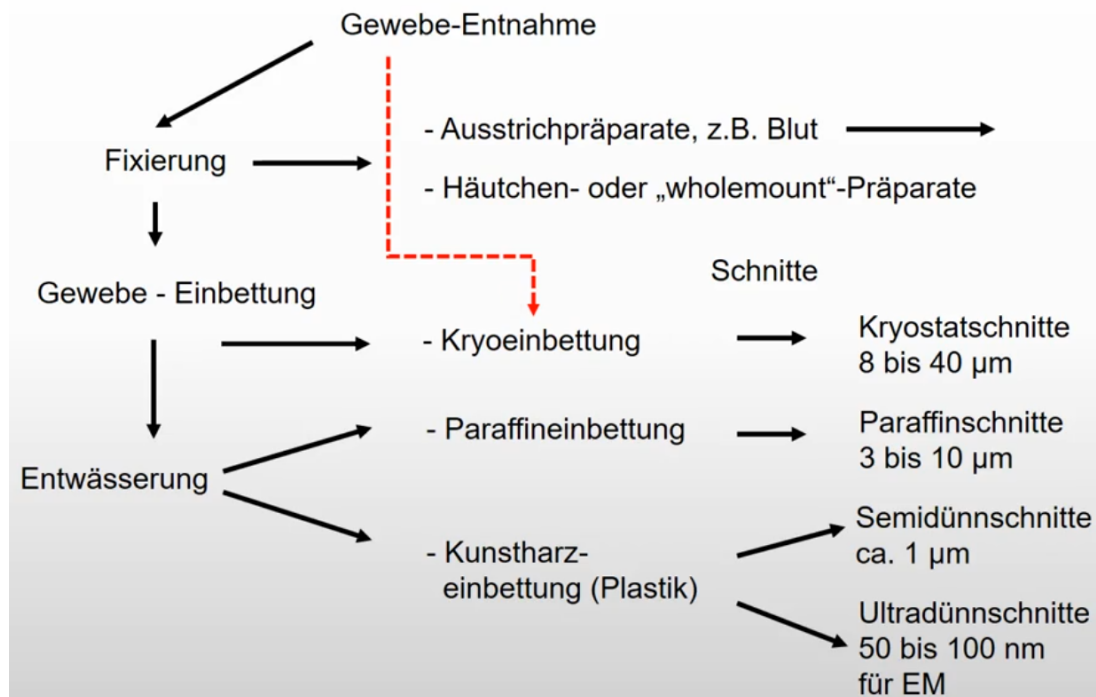
- Nötig um Abbau von Gewebe durch Enzyme zu verhindern
- Durch Immersion des Gewebes in Fixanz (fl. Stickstoff/ Paraformaldehyd) oder Perfusion (Fixanz in Blutgefäß spritzen)
- Chemische Fixierung
 - Aldehyde (Formaldehyd (M), Glutaraldehyd (EM))
 - Proteine werden Quervernetzt ("crosslinking") (= dichter Verband), Enzyme können nicht mehr angreifen)
 - Formaldehyd
 1. 4 Formaldehydmoleküle (H_2CO) von Paraformaldehydpolymer durch 60°C angetrennt, hat Doppelbindung an "O", neigt dazu "H" an "O" anzulagern unter aufspaltung der DB
 2. Proteine haben viele Wasserstoffreste → Formaldehyd kann binden
 3. 2. Protein wird gebunden unter Abspaltung von H_2O → CH_2
 - Glutaraldehyd für Transmissionselektromikroskopie
 1. 2 Sauerstoffdoppelbindungen
 2. Bindet mit 1. ODB an Protein mit 2. an Glutaraldehyd
- Aceton/Alkohol

- Zellen reißen auf und laufen aus, Enzyme die wässriges Milieu brauchen werden behindert
- Physikalische Fixierung (Kryofixierung)
 - Schnelles einfrieren in fl Stickstoff/Propan
 - Tiefe Temperaturen notwendig um Eiskristallbildung zu verhindern (limitiert Probengröße)
- Fixierung durch Wasserentzug mittel salzen
- Gewebe schrumpft durch Fixierung ein und verliert Farbe

2. Präparataufarbeitung

- Einbettung in Hartparaffin
 - Langkettige Kohlenwasserstoffmoleküle aus Gruppe Alkane
 - Über 60°C flüssig; unter 50°C fest
- 1. Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe notwendig weil Paraffin wasserabweisend
- 2. Einbettung in Hartparaffin
- Mikrotomschnittanfertigung
 1. Paraffinblock wird eingespannt mit Probe nach außen
 2. Dicke des Schnitts wird gewählt (3 bis 10µm) und geschnitten
 3. Schnitt wird auf Objekträger übertragen via kaltes und warmes Wasserbad
- Kryoeinbettung
 - Unterschiede zu Paraffin:
 - Gewebe wird nicht entwässert
 - kann vor oder nach Schneiden fixiert werden
 - Schnelle Herstellung von Schnitten
 - Weniger fixierartefakte (Schrumpfung)
 - 1. Kryoeinbettflüssigkeit in Form zusammen mit Gewebe
 - 2. Kühlen bei bsp. -80°C
- Kryotomschnitt

1. Gewebe wird gefroren aus Form entnommen
2. Zuschnitt auf passendes Maß
3. Auffrierend auf Trägerplatte
4. Kryotomschnitt bei -20°C (8 bis 40 μm)



3. Färbung

1. Histologische Färbungen

- Verwendung von Chromogenen (farbgebende Gruppen) oder Auxochrome (verschieben Absorptionsmaximum einer vorhandenen Gruppe (Chromophor in längerwelligen Spektrumsbereich und führen zu optisch wahrnehmbarer Farbänderung)
- Einteilung in saure, basische und neutrale Farbstoffe
 - Sauer: für azidophile (basische) Strukturen; bsp Eosin (für Zytoplasma)
 - Basisch: für basophile (saure) Strukturen; bsp Methylenblau für Zellkerne
 - Neutral: für neutrale Strukturen; bsp eosinsaures Methylenblau für Blutaussstriche
- Indifferente Farbstoffe (ohne salzbildende Gruppen);

- Fettfärbung; bsp Sudanfarbstoffe für Fettvesikel (schwarz), Osmiumtetroxid für TEM
- Sonderfärbungen:
 - PAS Reaktion für Kohlehydrate
 - Silberfärbungen für Kollagene & retikuläre Fibrillen, Neurone (schwarz)
- Beispiele:
 - Hämatoxylin/Eosin (Doppelfärbung)
 - Saures: Kerne, saurer Schleim → blau/violett
 - Zytoplasma und andere Strukturen: in Abstufungen rot
 - Azanfärbung
 - Azokarmin färbt Kerne rot
 - Anilinblau färbt Kollagenfasern blau
 - Orange G färbt Erythrocyten orange
 - Resorcinfuchsin
 - färbt elastische Fasern schwarz-blau
 - Kresylviolett
 - färbt Nissl-Substanz; Rauhes ER violett
 - Silberfärbung
 - färbt Reticulinfasern, neuronale Fasern schwarz

2. Immunfärbungen

- nutzt hochselektive Eigenschaften von Immunglobulinen (Ig) (Antikörper) um spezifisch Strukturen/Zielmoleküle (Antigene / Epitope) darzustellen
- An fc-terminaler Seite werden Fluoreszenzmoleküle gekoppelt
- Ablauf
 1. Permeabilisieren d.h. anrauen sodass Epitope besser zugänglich für Antikörper
 2. Erstantikörper gerichtet gegen anzufärbendes Gewebe

3. Zweitantikörper gerichtet gegen alle Zellen des Wirtstiers des Erstantikörpers

4. Mikroskopie

- Besonderheit der Fluoreszenzfärbung
 - Signal kommt direkt aus Präparat → Präparat muss nicht transparent sein
- Fluoreszenzfarbstoffe
 - Fluorescein → grün
 - Fluorescein Iso-ThioCyanate (FITC) → grün bleicht weniger schnell aus
 - Tetramethyl Rhodamine Iso-ThioCyanate (TRITC) → rot
 - Viele weitere Farbstoffe, nicht beliebig kombinierbar da sonst Überlappung in Wellenlänge und Anregung von 2 oder mehr Farbstoffen gleichzeitig

4. Mikroskopie

1. Lichtmikroskopie

- Maximale Vergrößerung abhängig von Linsendurchmesser, Brechungsindex und Wellenlänge des verwendeten Lichts
 - Auflösungsgrenze (=Abstand zweier Punkte die gerade noch getrennt voneinander wahrgenommen werden können) d_{min} :

$$d_{min} = \frac{\lambda}{2 * n * \sin \alpha} = \frac{\lambda}{2 * NA}$$

d_{min} = Minimalabstand zweier Punkte

λ = Wellenlänge des verwendeten Lichts

n = Brechungsindex (Luft:1; Öl: 1,5)

N.A. = Numerische Apertur ($n * \sin \alpha$)

2. Fluoreszenz Mikroskopie

1. Fluorophor absorbiert Anregungslicht
2. Lichtenergie hebt Elektronen auf instabiles S2 Energieniveau
3. Energie des S2 Niveaus wird teilweise abgegeben und führt zu energie-schwächerem, stabilem S1 Niveau
4. Fluoreszenz Emission: Fluorophor kehrt zum Grundzustand zurück und gibt ein Photon ab (aufgrund des Übergangs von S2 zu S1 ist die Energie $h \cdot \nu_{em}$ niedriger als $h \cdot \nu_{ex}$ -Stokes shift; also Verschiebung von kurzwelligem (hochenergetischem) Licht zu langwelligerem (niedriger energetisches) Licht
5. Filterkombination trennt Absorptionslicht von Emmisionslicht
 - ermöglicht Gewebe ohne mechanische Zerstörung mittels optischen Schnitten zu analysieren
 - Mehrfach-Fluoreszenz: Anregung durch mehrere Laser ermöglicht das hineinschauen in ein dickes Gewebe
 - Scans von verschiedenen Focusebenen ermöglicht Bild Stapel