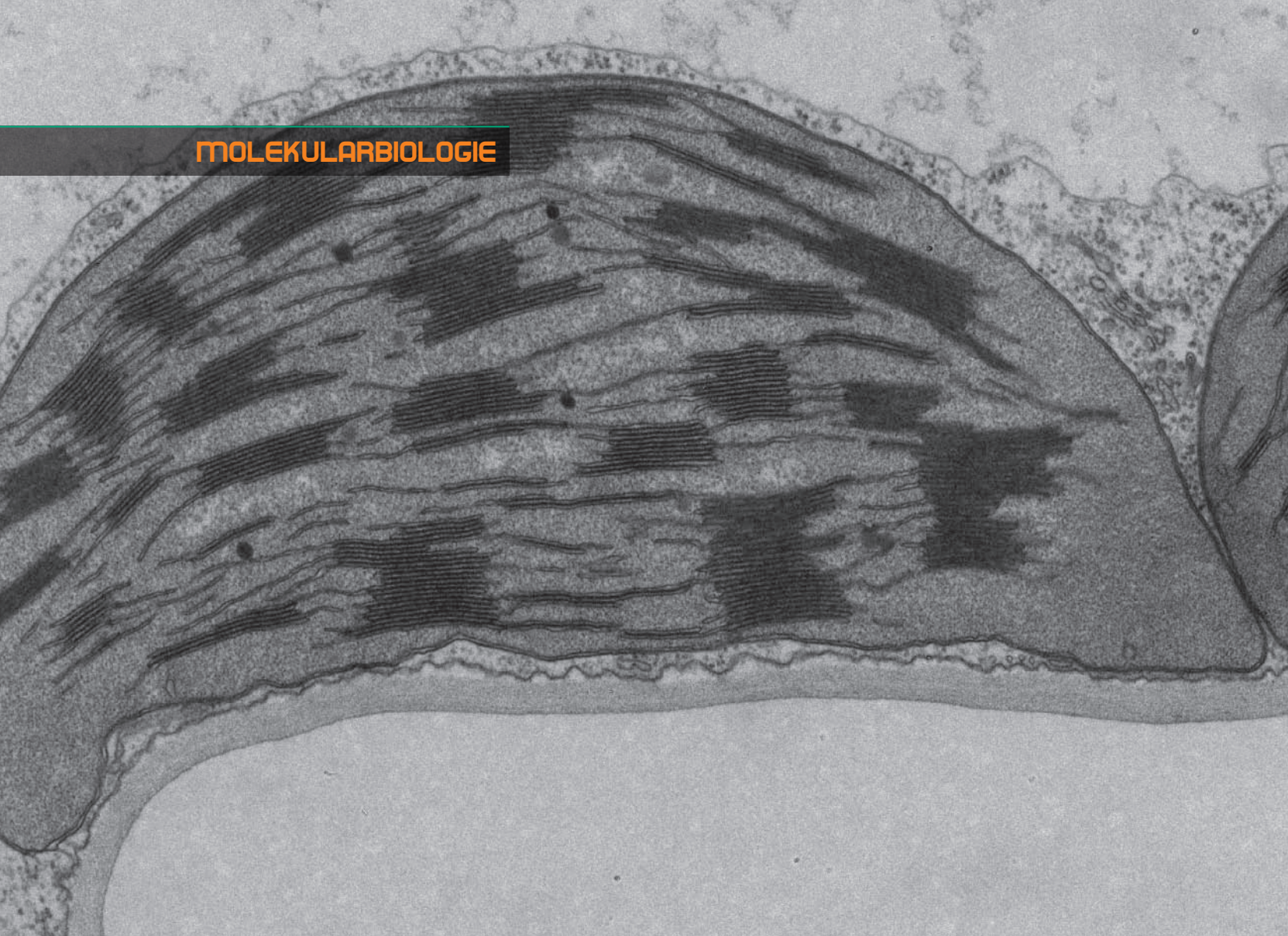




■ BENEDIKT WESTERMANN
STEFAN GEIMER

Elektronenmikroskopie

EINBLICKE IN DIE NANOWELT DER ZELLEN

■ Chloroplasten sind die Zellorganellen, die in pflanzlichen Geweben aus Sonnenlicht Stoffwechselenergie erzeugen. Im Transmissionselektronenmikroskop (TEM) wird die Organisation der Thylakoidmembranen sichtbar, die die Photosysteme enthalten (Bild: Maximilian Humm und Stefan Geimer).

Wer Botaniker oder Zoologe werden will ohne Mikroskop, ist mindestens ein ebenso großer Thor, als wer den Himmel beobachten will ohne Fernrohr.“ Mit diesem Satz hat der Botaniker Matthias Schleiden vor rund 150 Jahren in Jena den Mechaniker und Unternehmer Carl Zeiß davon überzeugt, Mikroskope zu produzieren und kommerziell zu vertreiben. Gemeinsam mit seinem Kollegen Theodor Schwann hatte Schleiden die Gewebe von Tieren und Pflanzen mikroskopisch untersucht und dabei erkannt, dass alle Organismen aus einer oder mehreren Zellen bestehen, und dass die Zelle die grundlegende Strukturinheit aller Organismen ist. Mit dieser Erkenntnis haben Schleiden und Schwann im Jahr 1839 die Zelltheorie begründet. Damit gehören sie ohne Zweifel zu den Vätern der modernen Biologie.

VON DER LICHTMIKROSKOPIE ZUR ELEKTRONENMIKROSKOPIE

An der grundsätzlichen Wahrheit von Schleidens Aussage hat sich bis heute nichts geändert: Wer den Aufbau und die Funktionsweise von Pflanzen und Tieren – oder auch von Mikroorganismen, Pilzen und menschlichen Geweben – verstehen will, braucht dazu Mikroskope. Je tiefer und detaillierter diese Einblicke sein sollen, desto komplizierter und aufwendiger konstruiert müssen die Mikroskope sein. Jedoch gibt es dabei eine durch die Physik des Lichts bedingte Grenze. Ernst Abbe war ein Physiker, der zusammen mit Carl Zeiß an der Entwicklung von Mikroskopen gearbeitet hat. Er erkannte, dass das Auflösungsvermögen eines Mikroskops – vereinfacht gesagt – der halben Wellenlänge des sichtbaren Lichts entspricht, also auf etwa 200 Nanometer begrenzt ist (ein Nanometer ist ein Millionstel Millimeter). Diese Auflösungsgrenze – auch Abbe-Limit genannt – hatte über 130 Jahre Gültigkeit und wurde erst in unserem Jahrhundert mit der Entwicklung der Super-Resolution-Microscopy mit einigen physikalischen Tricks überwunden.

Viele Objekte und Strukturen, die von Biologen untersucht werden, sind jedoch viel kleiner als das Abbe-Limit. Dazu gehören beispielsweise Viren, Zellorganellen oder Strukturelemente von Bakterien. Mit der Einführung der Elektronenmikroskopie in die zellbiologische Forschung wurde es ab der Mitte des 20. Jahrhunderts möglich, diese und andere Strukturen mit bis dahin ungeahnter Auflö-

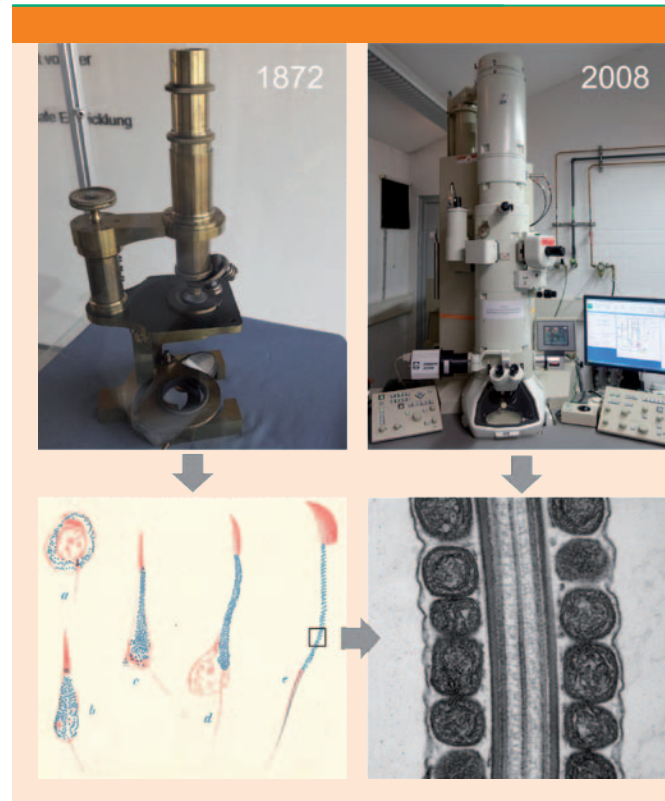


Abb. 1: Mit einfachen Färbetechniken und Lichtmikroskopen konnten Biologen im 19. Jahrhundert bereits einzelne Strukturen in Zellen darstellen. Die Abbildung zeigt ein Mikroskop-Stativ von Carl Zeiß von 1872 (ausgestellt im Abbe-Zentrum Beutenberg in Jena) und die Entwicklungsstadien einer Spermienzelle, wie sie im Buch „Allgemeine Biologie“ von Oscar Hertwig von 1912 dargestellt sind. Durch die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) können sehr viel kleinere Strukturen dargestellt werden, wie zum Beispiel die Elemente des Zytoskeletts und die Membranen der Zellorganellen. Zu sehen ist das TEM JEOL JEM-2100 im Labor für Elektronenmikroskopie der Universität Bayreuth und eine TEM-Aufnahme der Mitochondrien im Mittelstück von Spermienzellen (Fotos: Benedikt Westermann; TEM-Aufnahme: Stefan Geimer).

sung abzubilden. Im Elektronenmikroskop wird statt Licht ein Elektronenstrahl auf das Präparat gelenkt und anschließend detektiert. Da die Wellenlänge eines Elektrons sehr viel kleiner ist als die eines Photons, lässt sich eine mehr als 1000-fach höhere Auflösung erzielen. So können zelluläre Strukturen im Nanometerbereich problemlos abgebildet werden, wie zum Beispiel zelluläre Membranen oder Elemente des Zytoskeletts.

„DAS HOHE AUFLÖSUNGSVERMÖGEN DES ELEKTRONENMIKROSKOPS ERLAUBT FASZINIERENDE EINBLICKE IN KLEINSTE BIOLOGISCHE STRUKTUREN.“

Es gibt zwei unterschiedliche Arten von Elektronenmikroskopen: das Rasterelektronenmikroskop (REM) und das Transmissionselektronenmikroskop (TEM). Im REM wird ein biologisches Objekt, das zuvor mit einer sehr dünnen Edelmetallschicht bedampft wurde, im Vakuum mit einem Elektronenstrahl bestrahlt, der die Oberfläche abtastet. Dabei können beispielsweise Details von Blüten, Insekten oder planktonischen Organismen hochaufgelöst mit großer Tiefenschärfe abgebildet werden.

Im TEM wird der Elektronenstrahl durch die Probe hindurchgeschickt und anschließend mit einem

AUTOREN



Prof. Dr. Stefan Geimer ist Leiter des Labors für Elektronenmikroskopie der Biologie.



Prof. Dr. Benedikt Westermann ist Inhaber der Professur für Zellbiologie, der das Labor für Elektronenmikroskopie zugeordnet ist.

Leuchtschirm detektiert. Dafür muss die Probe vorher fixiert und in sehr dünne Scheiben von 60 bis 200 Nanometer Dicke geschnitten werden, was etwa einem Zehntausendstel Millimeter entspricht. Dadurch können beispielsweise Zellbestandteile wie Mitochondrien oder Chloroplasten mit höchster Auflösung abgebildet werden. Bei der Elektronentomographie wird die Probe im TEM gekippt und aus verschiedenen Winkeln abgebildet. Ähnlich wie bei der Computertomographie in der Medizin kann man aufgrund dieser Daten ein dreidimensionales Bild der Probe erhalten. So lassen sich zelluläre Strukturen in allen drei Dimensionen mit höchster Auflösung im Nanometerbereich rekonstruieren. Bei der Immunoelektronenmikroskopie werden mit Goldpartikeln beladene Antikörper verwendet, um bestimmte Proteine in der Probe zu lokalisieren. Auf diese Weise können Proteine in der Zelle sehr viel genauer lokalisiert werden, als es beispielsweise mit der Fluoreszenzmikroskopie oder anderen lichtmikroskopischen Methoden möglich ist.

DAS LABOR FÜR ELEKTRONENMIKROSKOPIE DER BIOLOGIE

Das hohe Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops erlaubt faszinierende Einblicke in kleinste biologische Strukturen. Dies hat jedoch seinen Preis: die Elektronenmikroskope sind aufwendig konstruiert und dementsprechend teuer in der Anschaffung. Sie sind wartungsintensiv im Unterhalt, und die Proben müssen aufwendig präpariert werden, wozu einiges an Geduld, Geschick und Training gehört. Daher ist es notwendig, die Ge-

räte und das Knowhow in einem zentralen Labor zu vereinen und den interessierten Arbeitsgruppen zur Verfügung zu stellen.

Das Labor für Elektronenmikroskopie an der Universität Bayreuth bearbeitet eine Vielzahl von Projekten aus dem Bereich der Lebenswissenschaften. Insbesondere im TEM-Bereich konnte mit Unterstützung der Universität Bayreuth, des Freistaats Bayern und des Großgeräteprogramms der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) eine hervorragende Geräteausstattung etabliert werden. Im Jahr 2008 wurde durch die Beschaffung eines TEM mit 200 kV Beschleunigungsspannung die Technik der Elektronentomographie ermöglicht. Im Oktober 2016 wurde ein weiteres TEM beschafft, mit dem die Analyse von tiefgefrorenen Proben möglich ist (Cryo-TEM). An Peripheriegeräten sind unter anderem eine Hochdruckgefrieranlage und ein Cryo-Ultramikrotom verfügbar.

Die gute apparative Ausstattung und die im Labor vorhandene technische Expertise ermöglichen die Bearbeitung einer großen Vielzahl von Projekten zusammen mit zahlreichen Partnern. Neben Bayreuther Arbeitsgruppen aus der Biologie und den Ingenieurwissenschaften kooperiert das Labor mit externen Partnern im In- und Ausland, aktuell unter anderem mit Instituten der Max-Planck-Gesellschaft und der University of California at Davis/USA.

STRUKTUREN VON ZELLORGANELLEN

Die Untersuchung von Zellorganellen, wie zum Beispiel Chloroplasten und Mitochondrien, bildet einen besonderen Schwerpunkt unserer Arbeit.¹ Ohne Chloroplasten gäbe es kein höheres Leben auf der Erde. In diesen Zellorganellen, die in allen Pflanzen vorkommen, findet die Lichtreaktion der Photosynthese statt. Dadurch wird die Energie des Sonnenlichts in Stoffwechselenergie umgewandelt, so dass die Pflanze Zellbestandteile synthetisieren und wachsen kann. Die so gebildete pflanzliche Biomasse wiederum ist die Grundlage für die Nahrungsketten, durch die sich Tiere und Menschen ernähren. Die Lichtsammelkomplexe und Photosysteme befinden sich in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten. Dabei handelt es sich um die komplexesten energieumwandelnden Membranen, die man kennt. Sie bilden ein zusammenhängendes Lamellensystem und sind an einigen Stellen zu geldrollenähnlichen Strukturen, den Grana, übereinandergestapelt.

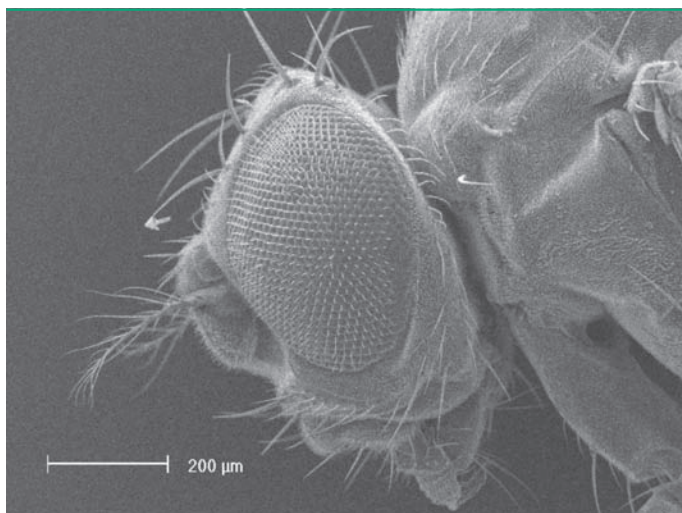


Abb. 2: Raster-elektronenmikroskopische (REM) Aufnahme eines Kopfes der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Bild: Magdalena Jünger und Stefan Heidmann).



Abb. 3: Transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Aufnahme von Mitochondrien in einer Hefezelle (Bild: Rita Grotjahn und Benedikt Westermann).

Während die Struktur und Funktion der Thylakoide relativ gut bekannt ist, weiß man kaum etwas darüber, wie sie gebildet werden. Die molekularen Mechanismen der Biogenese von Thylakoidmembranen werden seit 2014 von einer DFG-Forscherguppe untersucht. In diesem Verbund mit dem Titel „Biogenesis of thylakoid membranes: Spatiotemporal organization of photosynthetic protein complex assembly“ kooperiert das Bayreuther Labor für Elektronenmikroskopie mit Arbeitsgruppen der Humboldt-Universität Berlin, der Ruhr-Universität Bochum, TU Kaiserslautern, der LMU München und des Max-Planck-Instituts für Molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam-Golm. Das Bayreuther Labor spielt dabei eine Schlüsselrolle, da die Membranstrukturen der Chloroplasten, die untersucht werden, so klein sind, dass sie nur durch die Elektronenmikroskopie dargestellt werden können.

Mitochondrien kommen in praktisch allen Zellen höherer Organismen vor und werden auch als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet, da sie eine zentrale Rolle im Energiestoffwechsel spielen. Fehlfunktionen der Mitochondrien führen zu neurodegenerativen Erkrankungen, zum Beispiel Parkinson, und sind eine wichtige Ursache für das Altern von Geweben und Organismen. Mitochondrien sind Zellorganellen, die von zwei Membranen umgeben sind. Die Innenmembran bildet dabei Einstülpungen in die Matrix, die Cristae. Diese beherbergen die Atmungskettenkomplexe, die letztlich dafür verantwortlich sind, die in der Nahrung

enthaltene Energie für unseren Stoffwechsel verfügbar zu machen. Ähnlich wie die Thylakoide der Chloroplasten sind auch die Membranen der Mitochondrien und die Architektur der Cristae nur mit der Technik der Elektronenmikroskopie sichtbar zu machen. In mehreren von der DFG geförderten Projekten und in verschiedenen Kooperationen auf nationaler und internationaler Ebene untersuchen wir die molekularen Mechanismen, die die Architektur der Mitochondrien bestimmen.

Dies sind nur einige wenige Beispiele, die belegen, dass die Elektronenmikroskopie eine besonders leistungsfähige Methode ist, um faszinierende Einblicke in die Nanowelt der Zellen zu erhalten. Sie liefert nicht nur wichtige Beiträge für die Forschung, sondern ist auch für die Ausbildung des wissenschaftlichen Nachwuchses in der Molekular- und Zellbiologie unverzichtbar.

- 1 Aus diesen Forschungsarbeiten ist eine Vielzahl von Publikationen hervorgegangen, u.a.:
Mackinder, L.C.M. et al. (2016). A repeat protein links Rubisco to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 113:5958-5963. doi: 10.1073/pnas.1522866113.
Schneider, A. et al. (2016). The evolutionarily conserved protein PHOTOSYNTHESIS AFFECTED MUTANT71 is required for efficient manganese uptake at the thylakoid membrane in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 28:892-910. doi: 10.1105/tpc.15.00812.
Klecker, T. et al. (2013). The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *J. Cell Sci.*, 126:2924-2930. doi: 10.1242/jcs.126045.
Connerth, M. et al. (2012). Intramitochondrial transport of a phosphatidic acid in yeast by a lipid transfer protein. *Science*, 338:815-818. doi: 10.1126/science.1225625.

Abb. 4: Masterstudentin Romina Bachstein B.Sc. bei Forschungsarbeiten am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) (Foto: Peter Kolb).

