(Aus dem Zoologischen Institut der Universität Utrecht und dem Institut für Elektronenmikroskopie Delft)

DIE HERSTELLUNG VON DÜNNEN GEWEBSSCHNITTEN UND IHRE UNTERSUCHUNG MIT DEM ELEKTRONENMIKROSKOP

Von L. H. BRETSCHNEIDER, Delft

Mit 15 Abbildungen

Der Wunsch, Schnitte von pflanzlichen und tierischen Geweben auch elektronenmikroskopisch untersuchen zu können, wurde bereits am Beginne der Elektronenmikroskopie geäußert. Das geringe Durchdringungsvermögen der Elektronenstrahlen erfordert aber eine Schnittdicke von erheblich weniger als 1 μ. Zur technischen Lösung dieser Frage wurden bisher nur wenige Versuche unternommen, die zu brauchbaren Ergebnissen führten. Es gelang uns nun, mit einer ganz einfachen Technik Schnitte von 0,6 μ und selbst 0,3 μ durch verschiedene Zellen und Gewebe herzustellen und diese elektronenmikroskopisch zu untersuchen.[1])

1. Das Mikrotom

Ermöglicht wurde diese Untersuchung durch ein altes Schaukelmikrotom der „Cambridge Instrument Co.", das sich noch in unserem Institute befand und imstande ist, unter bestimmten Bedingungen so dünne Schnitte herzustellen. Bedingt wird diese geringe Schnittdicke durch die eigentümliche Konstruktion dieses Schaukelmikrotoms, welches im Jahre 1885 durch Horace DARWIN entworfen wurde (Abb. 1). Während bei den meisten moder-

[1]) Als Erläuterung zu den Mikrophotographien: Der eingezeichnete Strich entspricht der Länge von 1 μ.

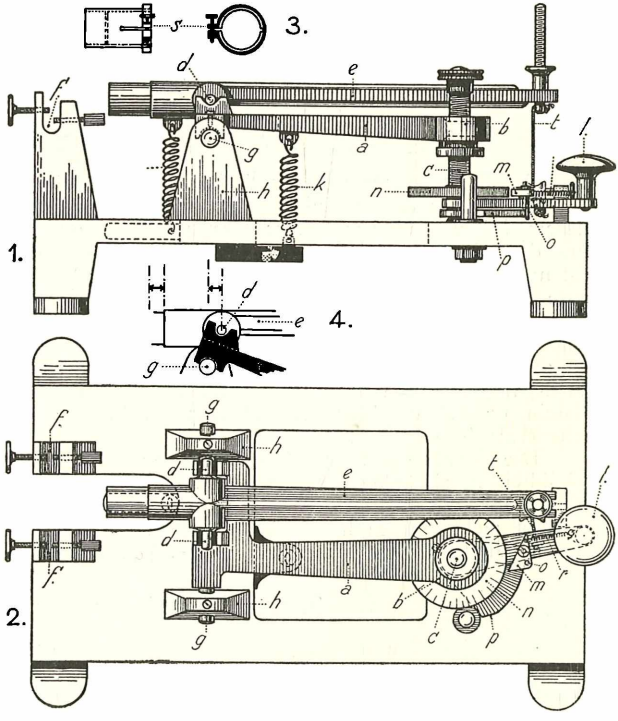


Abb. 1a. Altes Schaukelmikrotom (Rocking Microtome, Cambridge).
1. Ansicht, 2. Aufsicht, 3. Objektträger, 4. Hebelwirkung auf die Achse d.

nen Mikrotomen das Objekt unmittelbar durch die Drehung des Zahnrades und seiner Schraubenspindel nach dem Messer zu bewegt wird, sehen wir, daß bei unserem Schaukelmikrotom die Drehung des Zahnrades (n) und der Schraubenspindel (c) auf den langen Arm (a) eines Hebels übertragen wird, während auf dem kürzeren Arm dieses Hebels das Gelenk (d) des Objekthalters (e) ruht. Dadurch wird die Hubhöhe in (b) in einem stark verkleinerten Maßstab auf (d) übertragen, das heißt, der Schnitt wird viel dünner als die eigentliche Hubhöhe der Schraubenwindungen. Der Objekthalter ist ebenfalls ein Hebel, der sich automatisch durch den Handgriff (l) auf und nieder bewegt, wodurch das Objekt durch das Messer (im Halter f) gezogen wird. Die Anzahl (etwa 260) und Größe der Zähne hatte man damals so gewählt, daß die Fortbewegung um einen Zahn eine Schnittdicke von 0,6 μ ergibt. Dieses Instrument bildete nun die Grundlage zu unseren elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Gewebsschnitten, da Schnitte von dieser Dicke bereits bei Spannungen von 80 kV mit Erfolg durchstrahlbar sind. Inzwischen haben Unterhandlungen mit der Cambridge Instrument Co. in England bereits zum Bau eines modernen Ultramikrotoms auf diesem Prinzipe geführt, so daß in Kürze dieses Instrument auch anderen Forschern zugänglich sein wird (Abb. 1 b).

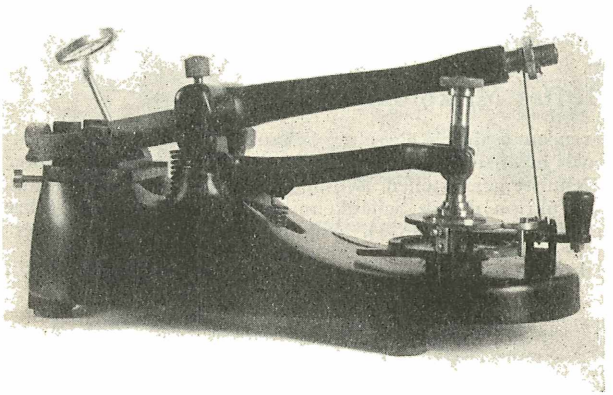


Abb. 1b. Neukonstruktion eines modernen Ultramikrotoms der Cambridge Instrument Co.

2. Vorbedingungen zur Erlangung dünner Schnitte

Bei Zimmertemperatur und der in der Histologie üblichen Paraffineinbettung der Objekte ist es allerdings nicht ohne weiteres möglich, brauchbare Schnitte von 0,6 μ mit diesem Mikrotom herzustellen; hierzu müssen einige Vorbedingungen erfüllt sein. Man muß das Objekt nämlich in einem Medium mit höherem Schmelzpunkt und zäherer Konsistenz einbetten und bei einer relativ niedrigen Temperatur von etwa 10° C schneiden. Die erste Bedingung wurde erfüllt, indem wir die Objekte in einem Gemenge von zwei Teilen gelben rohen Bienenwachses und einem Teil Paraffin vom Schmelzpunkt von etwa 68° C einbetteten, die zweite, indem wir das Mikrotom auf einen Eisschrank montierten (Abb. 2), der das Instrument samt Block und Messer lange Zeit auf etwa 10° C erhält. Eine weitere Bedingung ist ein säuberliches Schleifen der plan-konkaven Mikrotommesser auf einem Ölstein, da sich die kleinsten Scharten der Schneide bei dieser Schnittdicke sehr störend geltend machen würden.

Die Schnitte werden mit einem dünnen Aquarellpinsel vom Messer gehoben und in gekühlten Petrischalen bis zur weiteren Verarbeitung bewahrt. Den Pinsel benetzt man zweckmäßig vor Beginn der Arbeit erst mit einer 2%igen Lösung von Zelloidin in Äther-Alkohol, zieht ihn durch zwei Fingerspitzen hindurch und gibt ihm damit die Form eines Löffels. Die losen Pinselhaare würden nämlich die zarten Schnitte durchbohren (Abb. 4).

3. Das Montieren der Schnitte

Trotz des höheren Schmelzpunktes des Einschlußmittels und der niedrigen Temperatur während des Schneidens schieben sich die Schnitte wie bei anderen histologischen Schneidetechniken stark zusammen. Man behebt dies wieder, indem man die Schnitte in einem

Wasserbad bei 45—50° C streckt. Die gestreckten Schnitte werden dann auf einem geeigneten Objektträger aufgefangen. Für die elektronenmikroskopische Forschung gebraucht man gegenwärtig runde vergoldete Kupfernetze, welche einen Durchmesser von 3 mm besitzen und durch die Firma Kodak in Rochester hergestellt werden (Abb. 3). Über dieses Netz wird vorerst ein äußerst dünner Film von Kollodion gezogen, indem man eine 2%ige Lösung von Parlodion in Amylazetat — und zwar einen Tropfen — auf die Oberfläche von destilliertem Wasser fallen läßt. Nach Verdunsten des Amylazetates ist dieser Film genügend hart. Man legt die Kupfernetze auf den Film, fischt sie mit dem auf Abb. 4 A dargestellten Ring aus dem Wasser und stülpt sie umgekehrt über den in der gleichen Abb. dargestellten Amboß B. Nach flüchtigem Antrocknen klebt der dünne Film gut auf dem Kupfernetz und kann dieses nun unter dem gestreckten Schnitt gebracht und der Schnitt auf ihm aufgefangen werden. Wird nach dem Trocknen bei etwa 50° C das Wachs-Paraffin mit Xylen gelöst, dann ist der Schnitt zur Untersuchung bereit.

4. Der Einfluß der Schnittdicke auf das elektronenmikroskopische Bild

Wie bereits früher erwähnt wurde (L. H. BRETSCHNEIDER 1948), summiert sich die an sich schwächere Elektronenzerstreuung biologischer Objekte — weil diese aus „leichteren" Atomen zusammengesetzt sind — mit zunehmender Dicke doch wieder so weit, daß von einer bestimmten Dicke an, nur „Schatten-

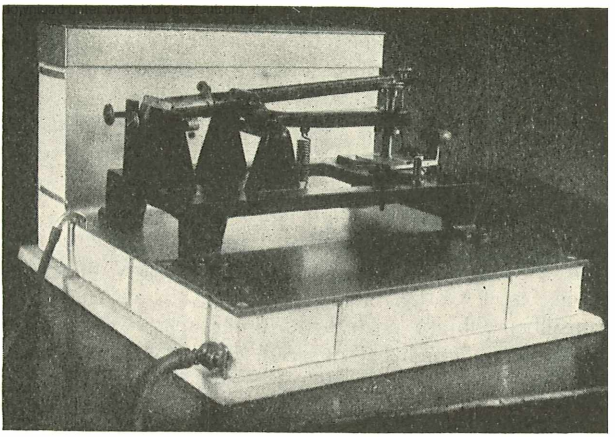


Abb. 2. Schaukelmikrotom auf der Kühlinstallation.

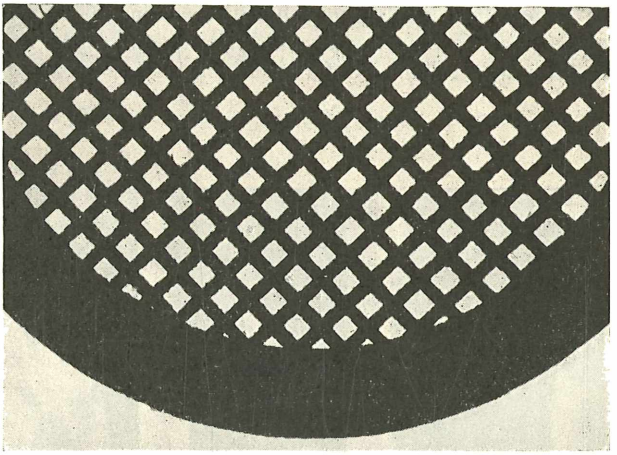


Abb. 3. Mikrophotographie des Kodaknetzes. 50 1.

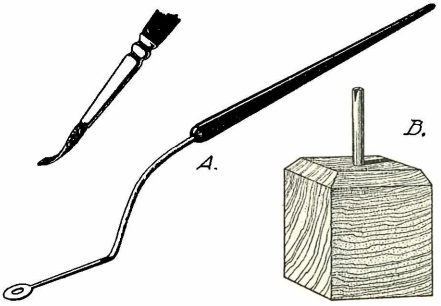


Abb. 4. Pinsel, Auffangring und Amboß zur Montage des Kodaknetzes.

bilder" entstehen. In der Abb. 5 wurden drei verschieden dicke Schnitte von 1,2, 0,9 und 0,6 μ des glatten Muskels einer Muschel (Mytilus edulis) elektronenmikroskopisch aufgenommen. In der Figur a des 1,2 μ dicken Schnittes sieht man die 2 bis 3 μ dicken Muskelfasern als kompakte Stränge, welche den sog. „Fibrillen" entsprechen, die man im gefärbten Präparat mit dem Lichtmikroskop sieht. An dem 0,9 μ dünnen Schnitt der Fig. b zeigt sich schon eine Unterteilung jeder dieser Fasern in noch dünnere Elemente von 200 mμ, während sich in dem 0,6 μ dicken Schnitt der Fig. c jede dieser Primärfasern schließlich zusammengesetzt erweist aus 60 mμ messenden Elementarfibrillen, den eigentlichen Myofibrillen. Die Primärfasern liegen in einem zarten fibrillären Bindegewebe eingebettet und anastomisieren innerhalb einer Sekundärfaser, wodurch deren festes Gefüge zustande kommt. Noch dünnere Schnitte haben wir bisher an demselben Objekt noch nicht untersucht, wohl aber an einem Ziliaten (Isotricha). Man kann nämlich bei unserem Mikrotom die Fortbewegung des Zahnrades so einstellen, daß die aufeinanderfolgenden Schnitte ungleich dick werden, und zwar 0,9 μ mit $1^1/_2$ Zähnen und 0,3 μ mit $^1/_2$ Zahn. Während die Zilienwurzeln im Ektoplasma des Ziliaten der Abb. 6 in einem 0,6 μ dicken Schnitt (a) in mehreren Lagen übereinander liegen, imponieren diese in dem 0,3 μ dicken Schnitt (b) als eine einzige Schichte dünner Fibrillen. Auch die Koagulationsstruktur des Ektoplasmas als 50 bis 70 mμ messende Globuli erscheinen in diesem Schnitt deutlicher. Obwohl man bisher im allgemeinen mit einer Schnittdicke von 0,6 μ in der Elektronenmikroskopie auskommt, beweist der vorliegende Schnitt, daß man mit dieser einfachen Technik doch auch dünnere Schnitte anfertigen kann.

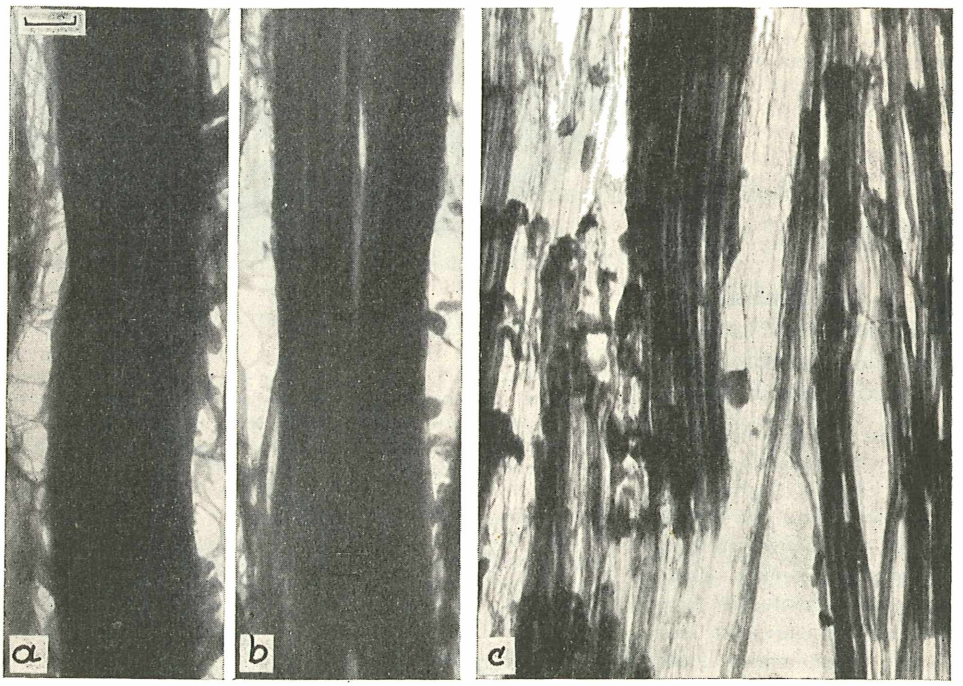


Abb. 5. Drei verschieden dicke Schnitte durch den glatten Muskel der Muschel Mytilus edulis.
a 1,2 μ dick, b 0,9 μ dick, c 0,6 μ dick. BOUIN. 10 000:1. 110 kV.

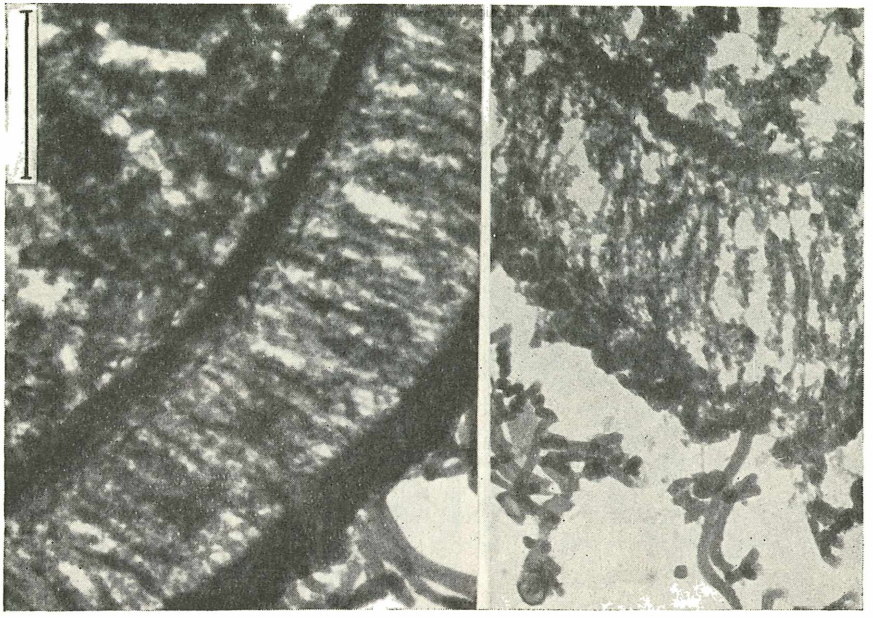


Abb. 6. Zwei verschieden dicke Schnitte durch das Ektoplasma des Ziliaten Isotricha ruminantia.
a 0,6 μ, b 0,3 μ dick. Sublimat-Alkohol. 25 000 : 1. 110 kV.

5. Der Einfluß der Emissionsspannung auf das elektronenmikroskopische Bild

Es besteht eine gewisse Beziehung zwischen der Schnellheit der Elektronenstrahlen, welche ihnen durch die angewandte Emissionsspannung erteilt wird, und ihres Durchdringungsvermögens innerhalb des zu untersuchenden Objektes. Da viele Elektronenmikroskope mit geringeren Spannungen arbeiten als unsere holländischen Instrumente, haben wir Versuche mit verschiedenen Spannungen angestellt.

Bei der Aufnahme der gleichen Präparatstelle mit Spannungen von 50 kV, 80 kV und 110 kV zeigten sich wesentliche Unterschiede in der Durchstrahlbarkeit und der Auflösung der Details. Je höher — bis zu einer bestimmten Grenze — die Spannung steigt, desto besser wird das Bild aufgelöst. Vergleicht man die Abb. 7 a und b miteinander — sie stammen von karzinomatösem Gewebe — dann sehen wir, daß bei 50 kV die meisten Strukturen nur silhouettartig abgebildet werden, während bei den höheren Spannungen von 80 und 110 kV je höher desto mehr Einzelheiten zum Vorschein kommen. So werden z. B. die Mitochondrien in der Abb. 7 a bei 50 kV bloß als dunkle Flecken dargestellt, während bei 110 kV in ihnen Granula und Vakuolen auftreten (Abb. 7 b). Auch die Plasmastrukturen, Zellgrenzen, Bindegewebsfibrillen usw. werden bei den höheren Spannungen besser durchstrahlt und aufgelöst. Dahingegen wirken sich Spannungsunterschiede zwischen 110 kV und 240 kV auf 0,6 μ dicke Schnitte nicht wesentlich aus. Scheinbar liegt für diese Dicke bei 110 kV bereits das Optimum. Wie wir also sehen, führt vor allem am Beginne der Spannungserhöhung (zwischen 50 kV und 100 kV) diese zu besseren und wesentlicheren Resultaten. Aus all dem kann man den allgemeinen Schluß ziehen, daß man Schnitte von 0,6 μ mit Spannungen um 110 kV untersuchen muß, umgekehrt bei Elektronenmikroskopen, welche nur mit niedrigeren Spannungen (um 50 kV) arbeiten, eben dünnerer (als 0,6 μ) Schnitte bedarf.

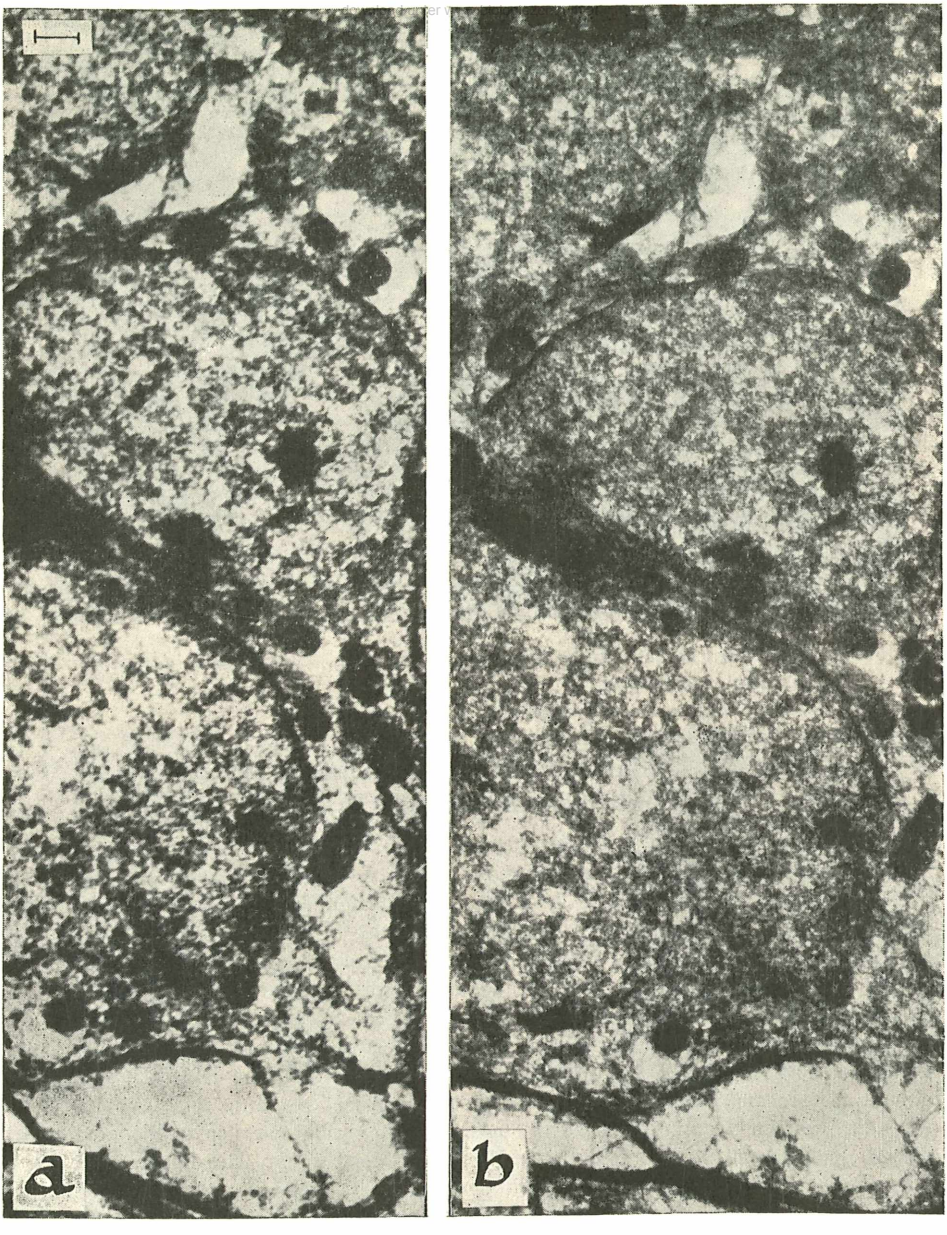


Abb. 7. Aufnahme der gleichen Präparatstelle mit verschiedenen Emissionsspannungen. Karzinom der Maus.
Beide 0,6 μ dick. CHAMPY. 6000 :1. 50 kV und 110 kV.

6. Der Einfluß der Fixation auf das elektronenmikroskopische Bild

Macht sich schon in der Lichtmikroskopie eine unzureichende Fixation oft sehr störend geltend, für die Elektronenmikroskopie mit ihren starken Vergrößerungen gilt dies noch um so mehr. Obwohl jede Fixation biologischer Objekte zu Artefaktbildungen führt, gibt es doch eine gewisse Gradation zwischen „schecht" und „besser". Je feiner die Plasmakoagulation ausfällt und je weniger sich der Entzug des hohen Wassergehaltes durch große Lücken bemerkbar macht, desto „besser" nennen wir den Fixationsgrad. Obwohl unsere diesbezüglichen Kenntnisse auf elektronenmikroskopischem Gebiete im Vergleich zur lichtmikroskopischen Technik noch sehr spärlich sind, ergab sich doch schon, daß die Ionen gewisser Schwermetalle am besten fixieren. Obenan steht vorläufig das Osmiumtetraoxyd und seine Gemenge, wie die Champysche oder Flemmingsche Flüssigkeit. In diesen OsO_4hältigen Gemischen fällt nicht nur das Kern- und Zytoplasma sehr fein aus, sondern es erhalten sich auch viele Zellstrukturen, wie Mitochondrien, Golgiapparat, Granula, Fibrillen usw., vorzüglich. Wir sehen dies gut an dem Schnitt durch die in dem Champyschen Gemisch fixierte Darmzelle von Ascaris (Abb. 8), in welcher die Fäden des Bürstensaumes als distinkte 80 mμ dicke Drähte bis hinab in das Ektoplasma zu verfolgen sind, das als eine dichte granuläre Zone auftritt, während im darunterliegenden wasserreicheren Entoplasma die zahlreichen fadenförmigen Mitochondrien gut erhalten sind. Auch Chromsalze, wie das Kaliumbichromat, bewirken zusammen mit dem Formalin — bekannt als Regaudsche Fixierungsflüssigkeit — ebenfalls eine sehr feine Plasmaausfällung und erhalten die Mitochondrien. In Schnitten durch die Wurzelspitzen der Zwiebel (Allium cepa) sehen wir in den jungen Zellen die relativ großen Ruhekerne liegen (Abb. 9). Wir sehen das Ruhechromatin als dunklere Bänder in einer dichten und feinen Ausfällung der Karyolymphe eingebettet. Der Plasmaniederschlag besteht hier aus bloß 10 bis 15 mμ dicken Fäden, in welchen 10 bis 20 mμ messende Mikrosomen eingestreut liegen. Die Mitochondrien erscheinen als breite dichte Strukturen im Plasma, die jungen Zellwände als homogene Membranen.

Auch die Sublimatgemische erhalten die feineren Strukturen wegen ihrer starken Eiweißfällung gut, obwohl die Plasmakoagulation bereits größer ist als bei den beiden oben genannten Fixationsgemischen. Man beachte die grobe Entoplasmafällung in den Schnitten durch Isotricha, welches mit Sublimat-Alkohol-Eisessig fixiert wurde (Abb. 6).

Von den organischen Fixationsstoffen haben wir die Pikrinsäure (Oxybenzolverbindung) auf ihre fällende Wirkung hin probiert, und zwar in der Zusammenstellung als Bouinsches Gemisch. Dort, wo es die Zellen rasch umspülen und fixieren kann, erweist es sich als sehr brauchbar. Wie die Abb. 11 von einer jungen Eizelle einer Qualle (Cyanea viridis) zeigt, fällt es sowohl das Zytoplasma als auch die Kernsubstanzen in feiner Form aus, ohne grobe Schrumpfungen oder Verlagerungen innerhalb der Zelle. Nicht so günstig war das Ergebnis bei größeren Gewebsstücken, wie z. B. der Schilddrüse eines Hahnes, welche ebenfalls mit dem Bouinschen Gemisch fixiert war. In diesen Zellen erschien das Plasma erheblich geschrumpft und zu dichteren Strängen zusammengeballt, während gleichzeitig große Lücken im Plasma auftraten.

Noch gröber aber fällt die Koagulation aus nach der Fixierung mit dem aus Alkohol-Chloroform-Eisessig bestehenden Gemenge von CARNOY. Es wurde von uns beim befruchteten Ei von Ascaris wegen der schwer permeablen Eischale gebraucht (Abb. 10). Die fällende Wirkung beruht hier zum Teil auf einem zu raschen Wasserentzug und bewirkt eine erhebliche Schrumpfung der gesamten Eizelle sowie eine recht grobe Ausfällung des Plasmas. Es verklumpt zu breiten Balken, welche die feine Struktur der mit Osmium- oder Chromgemischen fixierten Zellen vermissen lassen.

Schon aus diesen vorläufigen Ergebnissen über die Darstellung der Plasma-

Download unter www.biologiezentrum.at

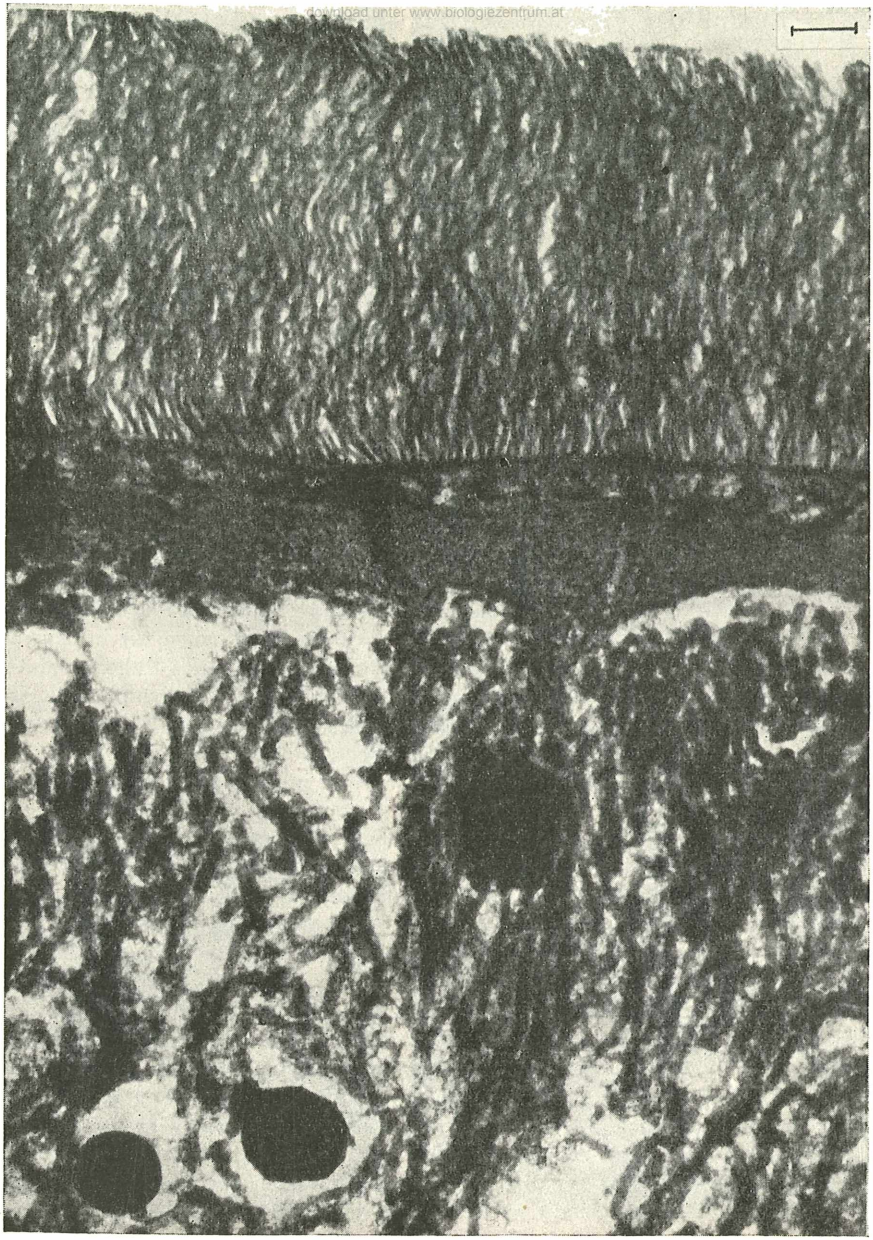


Abb. 8. Bürstensaum und Apex der Darmzelle von Ascaris megalocephala.
0,6 μ. CHAMPY. 8000 : 1. 110 kV.

Abb. 9. Zelle mit Ruhekern aus der Wurzelspitze von Allium cepa.
0,6 μ. Kaliumbichromat-Formol. 15 000 : 1. 240 kV.

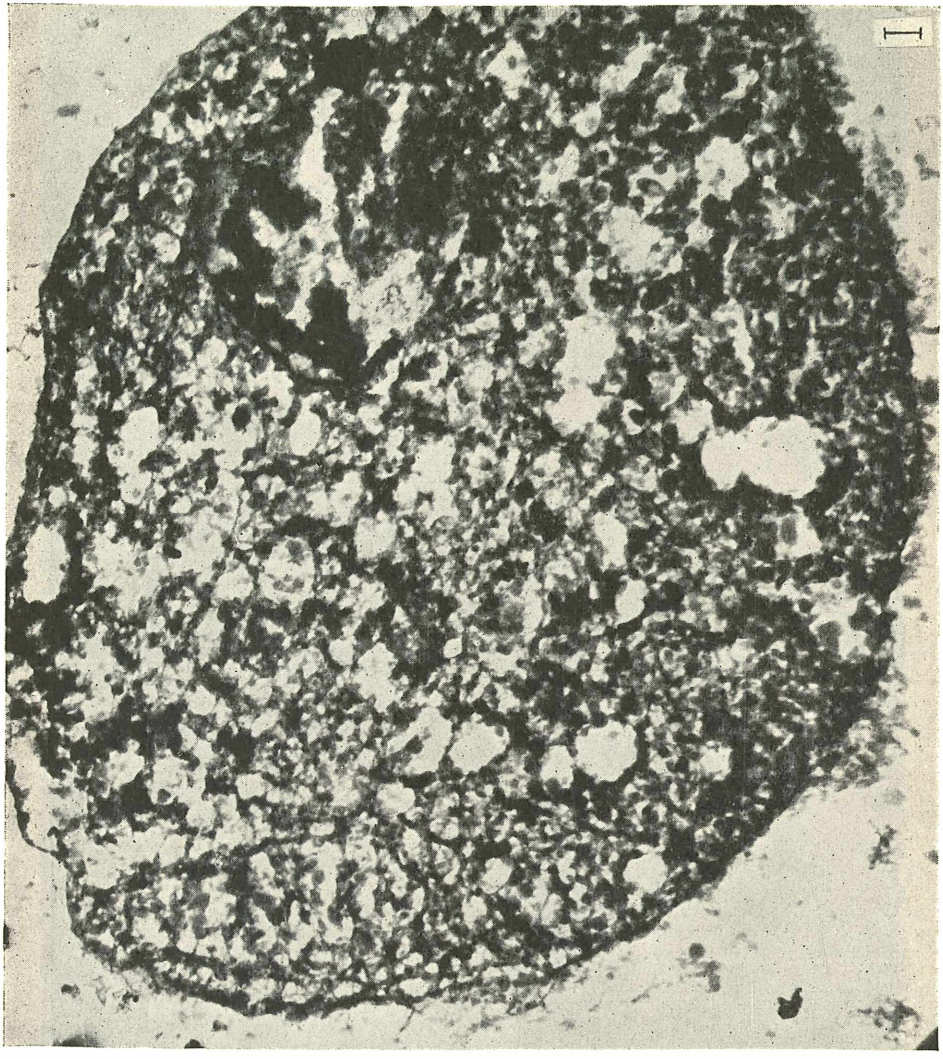


Abb. 10. Eizelle von Ascaris megalocephala.
0,6 μ. CARNOY. 6000 : 1. 110 kV

strukturen nach dem Einfluß verschiedener eiweißfällender Stoffe erhellt, wie sehr das elektronenmikroskopische Bild von der Wirkung dieser Stoffe abhängig ist. Eine systematische Versuchsreihe mit verschiedenen Fixationsgemischen, auf ein und dasselbe Objekt angewandt, wird von uns derzeit elektronenmikroskopisch ausgeführt. Was sich aber bisher auch aus den Untersuchungen anderer Forscher ergibt, zeigt uns, daß wir noch weit davon entfernt sind, mit dem Elektronenmikroskop eine „fundamentale Plasmastruktur" darzustellen. Befriedigender ist der Erhaltungszustand präformierter Zellstrukturen, wie Fibrillen, Membranen und richtigen Zellorganellen. Diesen liegt schon zweifelsohne vor der Fixation ein ganz bestimmter planmäßiger Aufbau aus fundamentalen Teilchen zugrunde, die in vielen Fällen schon in das makromolekulare Gebiet hineinreichen.

Abb. 11. Zentraler Teil einer jungen Eizelle von der Qualle Cyanea capillata.
Kern mit Nukleolus, Perinukleares Plasma mit Dotterkörnern. 0,6 μ. BOUIN. 6000 : 1. 110 kV

7. Ursachen des elektronenmikroskopischen Bildkontrastes

Bekanntlich ist der ungefärbte Schnitt bei der lichtmikroskopischen Beobachtung sehr kontrastarm und muß daher gefärbt werden, wobei durch Absorption bestimmter Lichtstrahlen der Bildkontrast zustande kommt. Das elektronenmikroskopische Bild entsteht aber durch Zerstreuung der Elektronenstrahlen in den Kraftfeldern der Atome (siehe Mikroskopie **3** [1948]). Auf zweierlei Weise kommt elektronenmikroskopisch der Bildkontrast zustande: durch den Massenunterschied zwischen leichteren und schwereren Atomen, welche das Objekt zusammensetzen, oder durch den Unterschied der örtlichen Dichte der untersuchten Strukturen. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Schnitten erhält man auch schon ohne irgend welcher „Färbung“

kontrastreiche Bilder. Sie beruhen hauptsächlich auf Massenunterschieden in der Dichte der Strukturen, da in biologischen Objekten die Massenunterschiede der Atome kaum in Frage kommen. Die Atomgewichte liegen fast ausschließlich unter 55 (Fe).

Betrachten wir die Schnitte (Abb. 11) durch Oozyten von Cyanea, welche mit dem Gemisch von BOUIN fixiert wurden, dann erscheint der Kern lichter als das perinukleale Plasma, während die Dotterkörner und der Nukleolus am dunkelsten sind. Wir können in diesem Falle „lichter" mit strukturell weniger dicht, „dunkler" mit strukturell dichter übersetzen. Wenn wir dieses elektronenmikroskopische Bild eines ungefärbten Schnittes vergleichen mit dem gefärbten lichtmikroskopischen desselben Objektes, dann stimmen beide in großen Zügen völlig überein. Auch im gefärbten lichtmikroskopischen Schnitt bestimmt anscheinend die Dichte die Nuance der Färbung, während die Farbwahl auf anderen, vielleicht Ladungserscheinungen, chemischer Affinität usw., beruht.

Trotz der an sich schon vorhandenen Bildkontraste im ungefärbten elektronenmikroskopischen Schnitt strebt die Elektronenmikroskopie nach geeigneten Differentialfärbungen. In Frage kommen hierfür wegen ihrer höheren Atomgewichte vor allem Metallsalze. In vielen Fällen wirkt ein solches schon als Bestandteil des Fixationsgemisches wie eine „Färbung", indem sich bestimmte Strukturen mit ihm mehr beladen als benachbarte und durch ihre stärkere Zerstreuung kontrastieren. So heben sich beispielsweise die Fettvakuolen in dem nach CHAMPY fixierten Ascarisdarm (Abb. 8) als dunkle Partien hervor, da in ihnen mehr metallisches Osmium (190) durch die reduzierende Wirkung der vorhandenen Fettsäuren niedergeschlagen wurde als im übrigen Plasma.

8. Einige Ziele und Ergebnisse der elektronenmikroskopischen Schnittuntersuchung

Die elektronenmikroskopische Strukturanalyse hat zwei Ziele zu verfolgen: erstens muß sie mit der Untersuchung dort beginnen, wo uns das Lichtmikroskop an der Grenze seines Auflösungsvermögens im Stiche läßt, und wird trachten, unsere Kenntnisse über diese Grenze hinaus zu vervollständigen; zweitens sucht sie bewußt nach bisher völlig unbekannten — rein elektronenmikroskopischen — Strukturen, um mehr Einsicht zu bekommen in fundamentale Gesetzmäßigkeiten und Zusammenhänge im Aufbau der organischen Strukturen überhaupt.

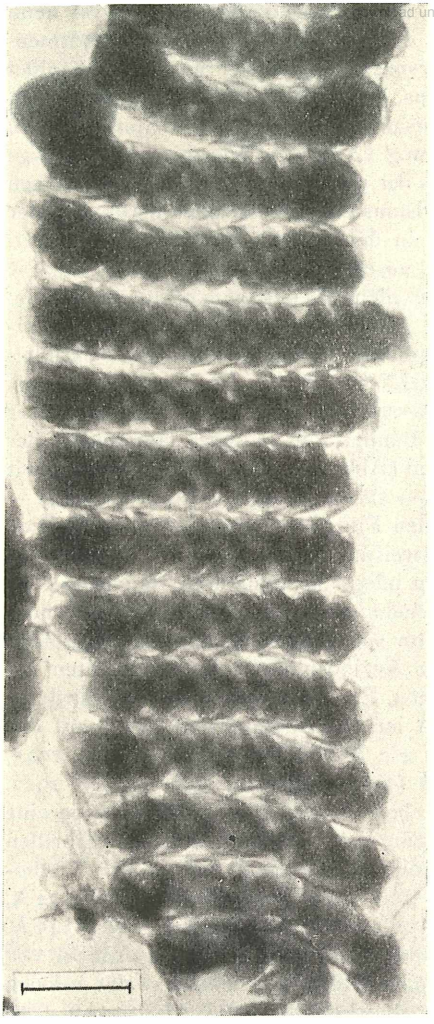
Die erstgenannte Richtung beginnt mit ihrer Analyse und ihrem Vergrößerungsbereich bei Strukturen, die wir aus unseren lichtoptischen Untersuchungen her bereits teilweise kennen. An der lichtoptischen Grenze gibt es bekanntlich viele Details, die wegen ihrer Kleinheit dem Forscher schon mehr zum Erraten als Erkennen zwingen und durch die verschiedenartigen Interpretationen zu Unstimmigkeiten führen. Die Elektronenmikroskopie wird gerade hier in vieler Hinsicht zu einem besseren Urteil gelangen.

Die zweite Richtung untersucht schon direkt in einem stärkeren Vergrößerungsbereich, weil ihre Objekte nicht an der lichtoptischen Grenze liegen, sondern oft weit darunter, und führt bereits hinüber in das physiko-chemische Bereich, wo die Prinzipien des Strukturaufbaues größere Gruppen biologischer Objekte umfassen und zusehends allgemeiner werden. Obwohl sich die zweitgenannte Richtung bereits zu einem selbständigen Zweig der Elektronenmikroskopie zu entwickeln beginnt, gehen doch in vielen Untersuchungen beide Richtungen nebeneinander her. An einem selbstuntersuchten Beispiel wollen wir dies näher illustrieren.

Die Nesselkapsel von Corynactis viridis

Bei lichtoptischen Immersionsvergrößerungen sehen wir in Durchschnitten durch die Tentakel dieses Polypen zahlreiche Nesselzellen von verschiedener Größe und wahr-

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at



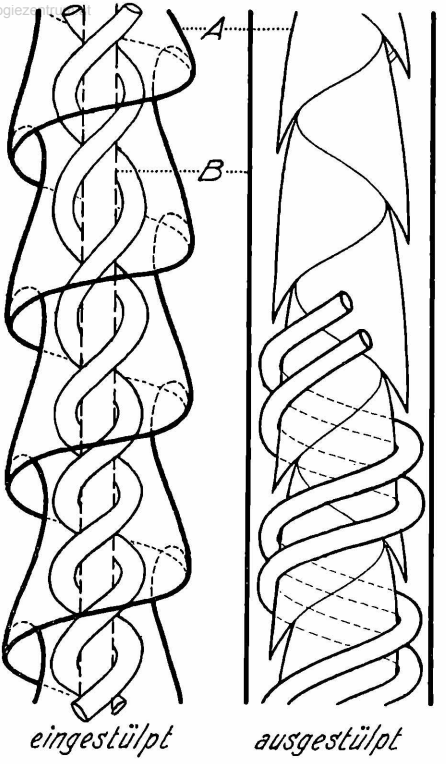


Abb. 13. Schema des ein- und ausgestülpten Nesselfadens von Corynactis. Schraubenbau und Spiralfibrillen.

Abb. 12. Kleine Nesselzelle des Polypen Corynactis viridis. Lateraler Schnitt.
0,6 μ. BOUIN. 15 000:1. 110 kV.

scheinlich verschiedener Funktion (Cnidozysten, Glutinanten, Volvanten). Die langgestreckten Nesselkapseln zeichnen sich durch ihre regelmäßigen Windungen des eingestülpten Nesselkanals aus. Wir haben elektronenoptisch die kleinsten Formen untersucht, welche einen Kapseldurchmesser von 2 bis 3 μ und einen Kanaldurchmesser von 0,3 bis 0,5 μ besitzen. Lichtoptisch sehen wir an dem Kanal nur eine undeutliche Spirale, ohne weitere Einzelheiten. Hingegen zeigte die elektronenmikroskopische Untersuchung viel mehr Einzelheiten. Wir wählten zu diesem Zwecke die lateralen Anschnitte der Kapseln. Es stellte sich heraus, daß der Kanal einen schraubigen Bau zeigt, der durch eine tiefe spiralig verlaufende Rinne zustande kommt und ihm das Aussehen einer „Schraube ohne Ende" gibt (Abb. 12). Der tiefe Einschnitt in der Kanalwand kennzeichnet sich durch einen spiralig verlaufenden Kamm, wie ihn die Zeichnung Abb. 13 zeigt. In der Wand dieses Nesselkanals finden wir zwei Spiralbänder verlaufen, deren Dicke ± 100 mμ entspricht. Sie stellen sich — da sie auf einem bestimmten Abstand voneinander parallel verlaufen — in der photographischen Projektion als zwei sich

überschneidende dunkle Bänder dar. Entladet sich die Nesselkapsel, dann wird beim Ausschleudern des Nesselkanals die Außenseite in der ehemaligen Ruhekapsel zur Innenseite des ausgestülpten Kanals, das heißt, der hervorspringende Schraubenkamm bildet dann die Begrenzung des eigentlichen Kanallumens. Durch diese Umstülpung legen sich die Kammwindungen übereinander und geben zusammen mit den zwei Spiralbändern der Wand eine besondere Festigkeit und Spannung (Abb. 13). Sowohl seiner Anlage als auch seiner Funktion gemäß, ist der Kanal als der eingestülpte Teil der eigentlichen Kapselwand aufzufassen. Der Entladungsmechanismus einer Nesselzelle beruht auf der Wirkung eines zeitweise höheren Innendruckes in der Kapsel, wodurch der Nesselkanal ausgestülpt wird. Die Kapselwand mißt in unserem Falle nur 30 bis 40 mμ. Sie muß dem höheren Innendruck standhalten und muß nicht allein darum relativ stark sein, sondern auch eine gewisse Elastizität besitzen. Bei stärkeren elektronenmikroskopischen Vergrößerungen sieht man, daß sich diese dünne Membrane aus lauter parallelgestellten Fibrillen zusammensetzt, welche in der Längsrichtung der Kapsel verlaufen. Jede dieser Fibrillen mißt etwa 90 Å im Durchmesser und zeigt in der Richtung ihrer Längsachse abwechselnd dunklere und lichtere Bänder, die in ihrer Gesamtheit der Membrane eine regelmäßige Querstreifung erteilen (Abb. 15). Aller Wahrscheinlichkeit nach ist anzunehmen, daß diese Kapselmembrane — als ein Produkt des Zytoplasmas — aus Eiweiß besteht und die sie zusammensetzenden Fibrillen demnach Proteinfibrillen sind. An ihnen zeigt sich also durch diese Querstreifung ein periodischer Aufbau, der bereits auf makromolekulärer Basis beruht. Man pflegt die dunkleren Bänder mit A, die lichteren mit B zu bezeichnen und mißt die Periode vom Zentrum des einen A-Bandes zu dem des folgenden (Abb. 14 a). Wir haben nun von 9 Kapselmembranen ungefähr 140 Perioden gemessen und dabei die folgenden Periodenlängen in Å-Einheiten gefunden: 260, 260, 275, 284, 285, 289, 296, 296, 304. Es ergibt sich daher ein mittlerer Wert von 283 Å. Hiervon fallen ungefähr 170 Å auf das A-Band und 113 Å auf das B-Band. Wie schon verschiedene Untersucher, wie SCHMITT 1942, HALL 1945, siehe L. H. BRETSCHNEIDER, Mikroskopie **3** (1948), Abb. 10, und JAKUS 1942, 1943, 1945, WOLPERS 1944 u. a., festgestellt haben, ist vielen Eiweißstrukturen eine solche Querstreifung eigen. Man fand sie ursprünglich an den kollagenen Fibrillen (F. O. SCHMITT 1942) und stellte ihre Periodenlänge mit 640 Å fest, an den Trichozysten von Paramaecium (M. A. JAKUS 1945) mit einer Periodenlänge von 554 Å, an glatten Muskelfibrillen (C. E. HALL 1945) mit einer Periodenlänge von bloß 145 Å, und mehreren anderen Eiweißstrukturen. Oft findet sich eine konstante Anzahl von diesen Perioden zu einer höheren Periode zusammengefaßt, wie beispielsweise bei den Trichozysten (JAKUS 1945) oder den glatten Muskelfibrillen (HALL 1945), der Nervenscheide (ROBERTIS 1948) usw. Man wird zukünftig aus der Periodenlänge auch auf die Art des Eiweißes schließen können und Periodenlänge und Funktion miteinander in Beziehung bringen. Über das Wesen dieser alternierenden dunkleren und lichteren Segmente in der Richtung der Längsachse einer Proteinfibrille gibt es verschiedene Ansichten. Diese periodische Querbänderung könnte zustande kommen durch Alternation strukturell dichterer und weniger dichter Abschnitte, wobei die Eiweißketten in den dichteren Abschnitten in einem gefalteten, sogenannten Alpha-Zustande, in den weniger dichten in einem gestreckten, sogenannten Beta-Zustand vorkommen (Abb. 14 b). ASTBURY (1933) hat seinerzeit die gefaltete α-Form und die gestreckte β-Form auf dem Wege der Röntgenanalyse (Diffraktion) für das Keratin nachgewiesen und gezeigt, daß die eine in die andere Form übergehen kann. Man fand seither aber, daß diese Faltung auch für andere Eiweiße zutrifft und von einer allgemeinen Art zu sein scheint. Man spricht jetzt schon von der „Keratin-Myosin-Epidermis-Fibrinogen-Gruppe", da ihnen allen das gleiche Bauprinzip zugrunde liegt. Nur die Periodenlängen wechseln. E. J. AMBROSE c. s. (1949) geben, auf der Idee C. ROBINSONs fußend, die in Figur 14 b abgebildete Art und intramolekuläre Bindung dieser Faltung langer

download unt

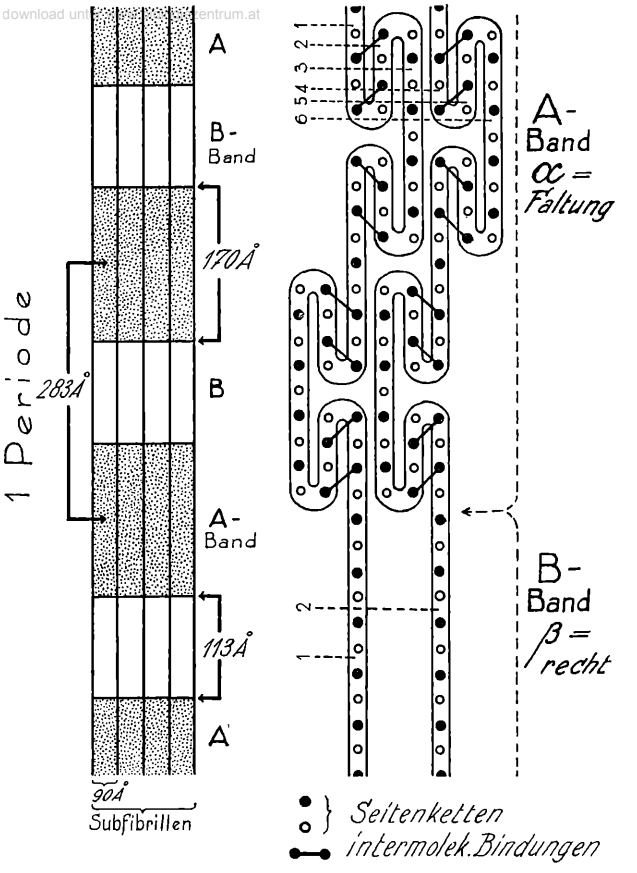


Abb. 14. Schema der Querstreifung der Kapselmembrane von Corynactis. Faltung der Eiweißmoleküle in quergestreiften Strukturen.

Eiweißketten wieder. Da bei der elektronenmikroskopischen Beobachtung durch die Faltung im A-Bande jede einzelne Molekülkette eines B-Bandes dreifach übereinander liegt, die strukturelle Dichtheit an dieser Stele also größer ist, nimmt damit auch die Zerstreuung der Elekronen zu und erhalten wir auf unseren Aufnahmen ein dunkleres Band.

Nachdem man elektronenmikroskopisch öfters diese Querstreifung erst nach Fixierung mit Phosphor-Wolframsäure oder Osmiumsäure dargestellt bekam, neigen andere Forscher zur Ansicht, daß die dunkleren Querbänder zustande kämen durch eine Anhäufung — Adsorption — von Atomen mit einem höheren Atomgewicht als dem des Kohlenstoffes, beispielsweise Phosphor, Wolfram, Osmium usw., so daß also die Querstreifung der Ausdruck eines Massenunterschiedes der adsorbierten Atome wäre.

Die Hypothese der gestreckt-gefalteten Molekülketten hat aber den großen Vorteil, daß man mit ihr die Elastizität, Spannungserhaltung oder Kontraktilität, kurzweg die Verlängerung $\rightleftarrows$ Verkürzung, solcher Strukturen erklären kann, weil die α-Form in die β-Form — vice versa — übergehen kann. Bei der zweiten Hypothese muß man hingegen einen periodischen Bauunterschied annehmen, will man die verschiedene Adsorption erklären. Um eine reine Adsorption schwererer Atome kann es sich im Falle der hier beschriebenen Kapselmembrane gewiß nicht handeln, da dieses Objekt nur mit Pikrinsäure, also einem organischen Stoff (Bouinsches Gemisch), fixiert wurde.

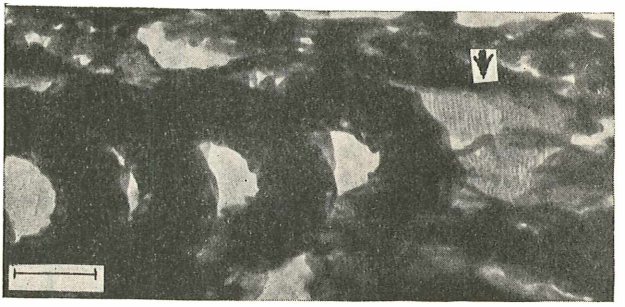


Abb. 15. Querstreifung der Kapselmembrane von Corynactis.

0,6 μ. BOUIN. 1:30000 und 30000:1. 110 kV.

Die hier erörterte Querstreifung der Kapselmembrane ist, wie wir sehen, eine rein elektronenmikroskopische Angelegenheit, die sich mit der Erschließung der Grundprinzipien organischer Gebilde bemüht, und kam zum Vorschein im Laufe der Untersuchung über den feineren Bau dieser Nesselzelle.

Ein folgender Artikel wird sich mit der Elektronenmikroskopie von Schnitten anderer biologischer Objekte befassen.

9. Summary

1. A description is given of a simple microtome (old model "Rocking Microtome, Cambridge"), and a fairly simple histological technique by which sections of 0.6 and 0.3 μ can be made through protozoa, animal and vegetable tissues. An ice-cooled installation is described, by means of which sectioning is possible also at room temperature.

2. Electron-microscopic photographs are described, of sections of 1.2, 1.0, 0.6 and 0.3 μ from which it appears that sections of 0.6 μ are already thin enough for examination with the Delft electromagnetic electron microscope at an emission voltage

of 110 KV and with the electron microscope with high accelleration voltage for 400 KV at emission voltages of 240 KV.

3. We investigated the influence on the cell of different fixation fluids–Champy's, Regaud's, Schaudinn's, Bouin's and Garnoy's. We found that the coagulation of the plasm is very fine after fixation with Champy's (osmic acid) and Regaud's (potash bichromate-formal) fluids.

The clearness with which the crosstriation of the capsule membrane of the nematocysts is shown up by picric acid, is striking. The recurrence of this striation is ± 280 Å units, and very probably represents the macromolecular arrangement of the protein chains forming the structure of this membrane.

4. Some results, elucidated by photographs, obtained with the following objects, are discussed to illustrate the technique described:

(a) root top cell in *Allium,*
(b) ciliary implantation in *Isotricha,*
(c) nematocysts in *Corynactis,*
(d) oocyte in *Ascaris* and *Cyanea,*
(e) muscle in *Mytilus,*
(f) striated border in the intestinal cell of *Ascaris,*
(g) thyroid glandcell in the *Cock,*
(h) carcinoma cells in the *Mouse.*

Literatur

Ambrose E. J., Elliott A. und *Temple R. B.,* Nature **163** (1949). — *Astbury W T.,* Fundamentals of fibre structure. Oxford 1933. — *Bretschneider L. H.,* Mikroskopie **3** (1948). — Derselbe, Proc. Ned. Kon Akad. Wet. **52** (1940). — *Hall C. E., Jakus M. A.* und *Schmitt F. O.,* J. appl. Phys. **16** (1945). — *Jakus M. A.,* J. exper. Zool. **100** (1945). — *Robertis E. De* und *Schmitt F. O.,* J. cell. and compar. Physiol. **31** (1948). — *Schmitt F. O.,* Advances in Protein. Chem. I (1944). — *Wolpers C.,* Virch. Arch. **312** (1944).

(Aus dem Ersten Chemischen Universitätslaboratorium und der Vereinigten Telephon- und Telegraphenfabriks-Aktiengesellschaft, Czeija, Nissl & Co., Wien)

MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ALUMINIUMFOLIEN

Von HANS NOWOTNY und LUDMILLA HOLIK

Mit 6 Abbildungen

Zur Herstellung von Elektrolytkondensatoren werden Aluminiumfolien verwendet, die besonderen Anforderungen entsprechen müssen. Eine wesentliche Bedingung für die Eignung derartiger Kondensatorfolien besteht darin, daß die Folie in einer begrenzten Zeitspanne so stark angeätzt werden kann, daß eine genügende Oberflächenvergrößerung und damit die notwendige Kapazitätserhöhung erreicht wird. Bei der üblichen Ätzung in Salzsäure strebt man eine Kapazitätserhöhung um den drei- bis sechsfachen Wert gegenüber der sogenannten blanken Folie an. Da nun der Säureangriff in außergewöhnlich starkem Maße vom Reinheitsgrad des verwendeten Aluminiums abhängt (1), ist der Auswahl der zu verwendenden Folien besondere Beachtung zu schenken. Der hier eingeführte Ätzfaktor kann z. B. mit dem Korrosions-

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Mikroskopie - Zentralblatt für Mikroskopische Forschung und Methodik

Jahr/Year: 1950

Band/Volume: 5

Autor(en)/Author(s): Bretschneider Ludwig H.

Artikel/Article: Die Herstellung von dünnen Gewebsschnitten und ihre Untersuchung mit dem Elektronenmikroskop. 15-31