## ANWENDUNG UND ERGEBNISSE DER ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Mit 15 Abbildungen

Von L. H. BRETSCHNEIDER, Utrecht und Delft (Dozent für Histologie am Zoologischen Institut der Universität Utrecht und biologischer Mitarbeiter des Institutes für Elektronenmikroskopie in Delft)

#### 1. Wie kommt das elektronenmikroskopische Bild zustande?

Die Anwendung der Elektronenstrahlen, denen kleinste Teilchen mit einer bestimmten Ladung zugrunde liegen, bringen im Elektronenmikroskop (EM) auf andere Weise die Objektabbildung zustande als das Lichtmikroskop (LM). Die Elektronenladung verursacht erstens eine nur geringe Tiefenwirkung im Objekt, so daß nur dünne Objekte zur Untersuchung gelangen können, zweitens werden die Elektronen in den Kraftfeldern der Objektatome verstreut, und zwar desto mehr, je schwerer die betreffenden untersuchten Atome sind, d. h. je höher ihre Atomzahl ist. Während das lichtmikroskopische Bild durch Absorption der Lichtstrahlen zustande kommt, stellt das elektronenmikroskopische Bild ein Streuungsbild der Elektronen dar. Die einzelnen Elektronen werden in den Kraftfeldern der Objektatome abgelenkt -- zerstreut -, was zur Folge hat, daß die abzubildenden Teilchen von einer bestimmten Dicke ab nicht mehr scharf abgebildet werden. Man rechnet bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Objekten, die sich aus schwereren Atomen zusammensetzen (z. B. Metallen) mit einer Objektdicke von weniger als 0,1 Mikron. Für organische Objekte liegt die maximale Dicke höher, da sie sich aus Atomen mit weit niedrigeren Atomzahlen (H., C<sub>12</sub>, N<sub>14</sub>, O<sub>16</sub>, P<sub>31</sub>, S<sub>32</sub>) zusammensetzen. Je schwerer die Atome sind, desto stärker ist die Elektronenstreuung. Sie kann schließlich so groß werden, daß die abgelenkten Elektronen nicht mehr an der Objektabbildung teilnehmen, weil sie bereits durch die Mikroskopblende abgefangen werden, ehe sie den Leuchtschirm oder die photographische Schichte erreichen. Auf dem photographischen Film des Negatives tritt dann keine Schwärzung ein, während in der positiven Kopie das Objekt als dunkle Silhouette erscheint (Abb. 1). Obwohl bei biologischen Objekten die Streuung wegen der leichteren Atome geringer ist, wird an die Objektdicke doch bald eine Grenze gesetzt, weil durch Summation der an sich geringeren Elektronenstreuungen schließlich doch ein unklares, verschwommenes Bild entsteht, so daß das Auflösungsvermögen des EM gegenüber dem LM schlechter werden würde. Die bereits erwähnte Tiefenwirkung der Elektronen verbessert sich, wenn die Beschleunigungsspannung der Elektronen erhöht wird. Dabei nimmt überdies die Streuung ab und werden die Abbildungen "schärfer", so daß es möglich ist, bei einer Spannung von 400.000 Volt (400 kV) auch 1 Mikron dicke organische Objekte noch hinreichend untersuchen zu können<sup>1</sup>). In

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>) Die in diesem Beitrage abgebildeten elektronenmikroskopischen Photographien wurden im allgemeinen mit einer Spannung von 90 000 Volt aufgenommen.



Abb. 1. Kopf eines Spermiums vom Stier. Ohne Vorbehandlung. 12,500 1. Aufnahme aus dem Institut für Elektronenmikroskopie, Delft.

Delft befindet sich gegenwärtig ein EM mit dieser Beschleunigungsspannung, über dessen Ergebnisse in einem späteren Beitrag berichtet werden wird. Eine erhöhte Beschleunigungsspannung hat durch die erhöhte Durchstrahlung des Objektes überdies eine geringere destruktive Wirkung auf diese, obwohl im allgemeinen von einer solchen bei den derzeitigen Vergrößerungen nicht viel zu merken ist. Veränderungen im Objekt infolge des Elektronenbombardements spielen sich ja schließlich im molekularen Gebiete ab und werden bei den heutigen Vergrößerungen bis zu 60.000 × noch nicht sichtbar.

Im Gegensatz zum LM mit seinem punktförmigen Fokus besitzt das EM eine sehr große Tiefenschärfe, es besitzt sozusagen einen Fokusraum, der einige Mikron beträgt. Während man im LM nur einen optischen Durchschnitt abzubilden vermag, werden im EM wegen seiner großen Tiefenschärfe gleichzeitig alle Strukturen des Objektes "scharf" abgebildet. Dies hat allerdings wieder zur Folge, daß alle optischen Ebenen des Objektes gleich scharf übereinanderprojiziert werden und dadurch die Interpretation des Bildes schwieriger wird, weil wir dann auf verschiedenen Wegen ermitteln müssen, welche Strukturen oben, in der Mitte oder unten liegen. Zum Teil läßt sich diese Schwierigkeit elektronenmikroskopisch beheben, indem man stereosko-





Abb. 2. Kopf eines Spcrmiums vom Stier nach Behandlung mit Chloramin T. 12.500 1. Aufnahme aus dem Institut für Elektronenmikroskopie, Delft.

pische Aufnahmen macht, oder durch die sogenannte "shadowcasting", wobei man im Vakuum schwere Atome, wie Gold oder Chrom, durch Verdampfen im elektrischen Strom über das zu untersuchende Objekt unter einem bestimmten Winkel zerstäubt. Dadurch häufen sich, wie der Schnee beim Schneewehen, die Atome vor den oberflächlichen Erhöhungen auf, während sie dahinter im "Schatten" fehlen (Abb. 4, 9 und 15). Werden solche Bilder wieder in der photographischen Negativkopie abgebildet, dann ergeben sie eine räumliche Darstellung der Oberflächenstrukturen. Auf diese Weise werden noch kleinste Strukturen, wie die Geißeln von Bakterien (Abb. 9) oder Fibrillen (Abb. 15) und andere Skulpturen der Oberfläche, abgebildet, während sie bei der Durchstrahlung wegen ihrer geringen Masse oder zu geringem Kontraste im Bilde verlorengehen würden. Aus der Breite des "Schattens" und dem bekannten Winkel des Aufstäubens kann man umgekehrt auf die Dicke der Objekte schließen.

### 2. Die Vorbehandlung der Objekte

Die Objekte werden auf einem Trägerfilm montiert, der bloß eine Dicke von 10 Millimikrons (1 m $\mu$  ist 0,00001 mm) besitzt und aus Kollodium oder



Abb. 4. Aufnahme einer Fettprobe (B.P.M.). Mit Genehmigung des Institutes für Elektronenmikroskopie, Delft. 21.000 : 1. Bretschneider 163



Abb. 3. Rauch von Aluminiumoxyd. 30.000 1. Aufnahme aus der American Cynamid Co., Buton & Kohl.

Abb. 5. Molybdänoxyd. 30.000 : 1. Mit Genehmigung des Institutes für Elektronenmikroskopie, Delft.



- Abb. 6. Influenzavirus Typus A:95.000 1. ...... Aufnahme J. HILLIER. University of Michigan.
- Abb. 7. Colibakteriophag, 53.000 1. Aufnahme Th. F. ANDERSON.
- Abb. 8. Staphylococcus flavocyaneus 21.000 1. Aufnahme St. Stuart MUDD.



Abb. 6.



Abb. 7.



Abb. 8.

Zaponlack besteht. Man stellt sich so dünne Folien her, indem man gelöstes Kollodium auf destilliertes Wasser auftropft, wobei sich das Kollodium in einer solch dünnen Schichte ausbreitet. Nach dem Erstarren durch Verdampfen des Lösungsmittels wird die Folie über die Bohrung des Objektträgers gezogen und werden hierauf die Objekte aus destilliertem Wasser gebracht. Dann wird das Präparat getrocknet und in das EM eingeführt.

Bretschneider



Abb. 9. Vibrio Metschnikovii, 14.000 1. Mit Genehmigung des Institutes für Elektronenmikroskopie, Delft.

Abb. 10. Kollagene Fibrillen des Rattenserwo schwanzes, 37,500 1. Aufnahme C. E. HALL. Massachusetts.



Abb.12. Halsdes Spermiumsvom Stier, 40.000 1. Aufnahme Delft.



Ein deutliches elektronenmikroskopisches Bild kommt erst dann zustande. wenn die zu untersuchenden Objekte einen bestimmten Massenunterschied gegenüber ihrer Umgebung besitzen, wodurch auf der photographischen Schichte ein Kontrastunterschied entsteht. Bei biologischen Objekten ist dieser Kontrast durch den Aufbau aus im allgemeinen leichteren Atomen an sich gering. Andererseits ist wieder die Dicke biologischer Objekte elektronenoptisch zu groß, um eindeutige Bilder zu ergeben. Es hat sich aber inzwischen eine elektronenmikroskopische Technik entwickelt, die gerade zur Kontrastierung wesentlich beiträgt. Einerseits wählte man hierzu die Extraktion bestimmter Bestandteile des Objektes, wodurch die Objektdicke abnimmt und die Kontrastwirkung der übrigbleibenden Strukturen zunimmt. Schon das Trocknen bedeutet durch den Wasserverlust eine Extraktion. Die teilweise Auflösung von Eiweißen gelingt beispielsweise durch die Anwendung von Fermenten, wie Pepsin und Trypsin oder durch Chloramin T und Hypochlorid, wobei je nach der Dauer der Einwirkung bestimmte Anteile herausgelöst werden, andere resistentere zurückbleiben und nun in stärkerem Kontrast zur Abbildung gelangen. In der Abbildung I und 2 sehen wir nebeneinander einen Spermiumkopf (Stier) ohne und nach der Behandlung mit Chloramin T (dem Natriumsalz von Toluen-Sulfon-Chloramid). Während der unbehandelte Spermiumkopf durch seine Dicke bloß ein Silhouettenbild ergibt, erscheinen nach der Vorbehandlung mit Chloramin T durch die Lösung bestimmter Eiweiße verschiedene kontrastierende Zonen und Flecken im Spermiumkopf. Es sind dies unter anderem die phosphorhältigen Orte der Chromosomen, die nun durch das schwerere Atom (P 31) deutlicher hervortreten, weil die Umgebung kontrastarmer wurde. Weiterhin lassen sich Fette mit Äther, Salze mit Säuren usw. extrahieren.

In Anlehnung an die lichtmikroskopische Technik hat man auch in der elektronenmikroskopischen Technik zur "Färbung" gegriffen, jedoch bedient man sich hierbei nicht echter Farbstoffe, sondern mit Hinsicht auf das durch Elektronenstreuung zustande kommende Bild bestimmter schwerer Atome, wie z. B. Eisen, Silber, Gold, Osmium, Quecksilber, Vanadium usw. Durch bestimmte Vorbehandlungen ist es möglich, diese "schweren Farbstoffe" selektiv in die Strukturen einzufügen oder zu adsorbieren, wodurch ein erhöhter Kontrast mit der Umgebung zustande kommt. Auf diese Weise wurden auch sehr zarte Strukturen, die im Durchstrahlungsbild nicht dargestellt werden, abgebildet. Wir können überdies die Extraktion mit der Anfärbung kombinieren. Neben der Untersuchung unfixierter biologischer Objekte, die nur durch Wasserentzug eine geringe Denaturierung erlitten, wendet man oft auch mit Erfolg eine vorhergehende Fixation an, wobei bestimmte Strukturen noch deutlicher hervortreten. Bei anorganischen Verbindungen kann man durch Zentrierung der Elektronenstrahlen eine Temperaturerhöhung bewirken und dabei das Objekt schmelzen lassen oder verdampfen, sublimieren oder umkristallieren. Man kann dann überdies hiervon wieder ein Elektronen-Beugungsdiagramm aufnehmen, wodurch es gelingt, auch etwas mehr über molekulare und atomare Abmessungen auszusagen.



Abb. 11. Schmetterlingsschuppe, 35.000 : 1. Mit Genehmigung des Institutes für Elektronenmikroskopie, Delft.



Abb. 13. Schwanz des Spermiums vom Stier, 20.000 1. Aufnahme Delft.



Abb. 14. Schwanzende des Spermiums vom Stier, 40.000 1. Aufnahme Delft.

# 3. Einige Ergebnisse mit dem Elektronenmikroskop

Den irrtümlichen Erwartungen mancher Mikroskopiker, man könnt mit dem EM bis in das echte molekulare Gebiet eindringen, muß ente gestellt werden, daß wir nur imstande sind, "makromolekulare" Gebi erfassen, die um vieles größer sind als 5 mu. Dennoch bereichert die tronenmikroskopische Untersuchung dieses Gebietes unser Wissen von bau der toten und lebenden Natur sehr wesentlich. In den folgende bildungen sehen wir drei allgemeine Ordnungsprinzipien der Mikrom die wir überall wieder zurückfinden. Verdampfen wir z. B. Aluminu und untersuchen elektronenmikroskopisch diesen Rauch, dann sehen ihm, wie sich die Moleküle stets zu Kugeln verschiedener Größenor zusammenballen (Abb. 3). Einen wesentlich anderen Aufbau sehen den zu langen Ketten vereinigten Molekülgruppen der Fettprobe (At wobei sich überdies die makromolekularen Ketten ineinander drehen weit wir hier noch von den echten Molekülen abstehen, illustriert der weis, daß die in dieser Aufnahme abgebildeten kleinen Kügelche 0,0001 mm doch noch aus mindestens 1 Million Molekülen besteher dritte Erscheinungsform ist durch ihren streng kristallinen Bau chara siert. Das lichtmikroskopisch kaum als Staub zu identifizierende ausk lisierte Molybdänoxyd erweist sich elektronenmikroskopisch als rasierkl artige Plättchen von verschiedener Größe (Abb. 5). Kugel- und Sta und kristalliner Bau beherrschen das makromolekuläre Gebiet und sir heute elektronenmikroskopisch schon zugänglich.

Die biologischen Objekte sind gegenwärtig noch wenig untersucht ihre Dicke dieser Untersuchung noch manches Hindernis entgegenstell einem Grenzgebiet ganz am Beginne der biologischen Hierarchie und halb im makromolekularen Gebiete wissen wir durch das EM heute etwas mehr, nämlich von den Viren und Bakteriophagen. Auch hier wir wieder die zwei Bauprinzipien der Kugel- und Stäbchenform z Als reine Kugeln erscheint das Elementarteilchen des Influenzavirus (A als Stäbchen z. B. das Tabakmosaikvirus. Als eine Kombination beider sich elektronenmikroskopisch der Coli-Bakteriophag heraus, desser kugeliger Kopf 80 mu, sein Schwanz 120 bei 20 mu mißt (Abb. 7). W lich tiefer konnten wir mit dem EM auch in den Bau des Bakterium dringen, und manche alten Streitfragen scheinen sich nun zu lösen. I genannten "Nukleoiden" als Nukleoproteidgranula und darum Orte größeren Phosphorreichtums bringt uns das EM sehr deutlich zur Ansch (Abb. 8). Die Geißelinsertion durch die Bakterienmembrane hindur protoplasmatischen Anteil des Bakterienkörpers zeigt uns die Abb. Vibrio Metschnikovii in Teilung. Durch die Beschattung mit ("shadowcast") tritt die zarte Geißel scharf hervor, während die Nukl als lichte Granula zu sehen sind. Während man hinsichtlich der Dic den eingetrockneten Bakterienzellen noch in Dezimalen eines Mikrons re liegen die Verhältnisse bei Zellen bereits um vieles höher. Doch ha



Abb, 15. Kopf des Spermiums Stier, 18.000 1. Aufnahme Delft.

schon verschiedene sehr platte Zellen oder Zellfragmente mit Erfolg untersucht, So haben R. PORTER, A. CLAUDE und E. F. FULLAM (1945) die dünnen Zellen aus Gewebekulturen von Kückenembryonen elektronenmikroskopisch untersucht, A. CLAUDE und E. F. FULLAM (1945) isolierten Mitochondrien, F. O. SCHMITT (1946) hat sich dem Feinbau der kollagenen Fasern und glatten Muskeln zugewendet und hat dabei ein wahrscheinlich sehr allgemein verbreitetes Prinzip des Eiweißaufbaues biologischer Strukturen entdeckt, nämlich einen periodischen Feinbau, der elektronenmikroskopisch in einer regelmäßigen Ouerstreifung der Fasern zum Ausdruck kommt (Abb. 10). Fragmente chitinisierter Zellen sind wegen ihrer geringen Dicke und dem lockeren Bau schon öfters untersucht. Die Abb. 11 zeigt ein sehr kleines Fragment einer Schmetterlingsschuppe, in der ein etagenweiser Aufbau der Schuppe aus dünnen perforierten Chitinfolien zu erkennen ist, außerdem ein System von Längs- und Querrippen, an welchen überdies noch feinste Haarbüschel zu sehen sind. Da sich die ausdifferenzierte Schuppe aus einer einzigen einst lebenden Zelle entwickelt hat, illustriert uns die Abbildung, wie kompliziert sich Protoplasma unter richtenden Kräften der lebenden Zelle zu chitinisierten Strukturen umwandeln kann. Einer erfolgreichen elektronenmikroskopischen Untersuchung sind fernerhin die Spermien als isolierte Zellen wegen ihrer geringen Dicke zugänglich. M.R.B.BAYLOR, A.NALBANDOV und G.L.CLARK (1943) untersuchten erstmalig das Spermium vom Stier, E. B. HARVEY und Th. F. ANDER-SON (1943) vom Seeigel, SEYMOUR und BENMOSCHE (1941) vom Menschen, L. H. BRETSCHNEIDER und W. van ITERSON (1947) vom Stier, L. H. BRETSCHNEIDER von Askaris, Cavia, Pferd, Wal und Mensch unter verschiedenen technischen Kautelen. Den bereits erwähnten elektronenmikroskopischen Unterschied zwischen dem nicht vorbehandelten Spermiumkopf und dem mit Chloramin T extrahierten zeigen die Abb. 1 und 2. Der Aufbau der Kopfmembran aus nur 25-40 mu dünnen Eiweißfibrillen, die sich überkreuzen, wird erst sichtbar, wenn wir das Präparat mit Gold überschatten (Abb. 15). An der Kopfbasis, dem Spermiumhals, inseriert der Schwanz mit einigen dünnen Fibrillenbündeln, die ebenfalls eine deutliche Querstreifung erkennen lassen (Abb. 12). Den Aufbau des Schwanzes aus einer fibrillären Längsachse, die beim Stierspermium konstant aus 9 Subfibrillen besteht und aus einigen Fibrillen, die an der Außenseite um diese Achse herum in Spiralen bis zum Ende verlaufen, zeigen die Abb. 13 und 14. Die erstgenannte Abbildung stammt von einem Shadowcast-Präparat, wodurch die Spiralfibrillen deutlich hervortreten und aus der "Schattenbreite" die Objektdicke bestimmt werden kann. Auch hier messen die Spiralfibrillen bloß 25-40 mu und sind darum lichtmikroskopisch nicht mehr zu unterscheiden. In dem Hauptstück des Schwanzes (Abb. 13, rechts) wird überdies die Großspirale sichtbar, die sich von den Mitochondrien herleiten läßt und die fibrilläre Achse des Schwanzes in zahlreichen Spiraltouren umzieht. In der Abb. 14 ist schließlich das Endstück des Schwanzes elektronenoptisch abgebildet (Durchstrahlungsaufnahme), wobei die neun

Subfibrillen frei zu Tage treten, während man noch die letzten Spiraltouren der oberflächlich verlaufenden Spiralfibrillen sieht. Interessant ist die Beobachtung, daß auch die Geißeln der Flagellaten den nämlichen Aufbau aus einer fibrillären Achse und oberflächlich verlaufenden Spiralfibrillen zeigen, wie H. P. BROWN (1945) an *Euglena gracilis* und *Ochromonas variabilis* elektronenmikroskopisch entdeckte, so daß beiden Fortbewegungsorganellen das gleiche Bauprinzip zugrunde liegt.

Obwohl die Elektronenmikroskopie erst 10 Jahre alt ist, haben sich auf zahlreichen Gebieten die Ergebnisse bereits dermaßen angehäuft, daß in einer kurzen Zusammenfassung, wie sie hier vorliegt, nur Stichproben angeführt werden konnten. Dennoch zeigen diese wenigen Beispiele bereits, daß sich uns durch das Elektronenmikroskop eine neue Welt eröffnet, die einerseits unmittelbar anschließt bei den Dimensionen des Lichtmikroskopes, andererseits bereits hineinreicht in das makromolekulare Gebiet.

#### Literatur

- Baylor M. R. B., Nalbandov A. und Clark G. L., Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 54 (1943).
- Bretschneider L. H. und Iterson W., Proc. Kon. Akademie v. Wetensch. Amsterdam 50 (1947).
- Mikroskopie 3 (1948), siehe Heft 1/2.
- Brown H. P., Ohio Journ. of Sci. 45 (1945).
- Burton E. F. und Kohl W. H., The Electron Microscope. New York, 1946.

- Claude A. und Fullam E. F., Journ. exper. medic. 81 (1945).
- Harvey E. B. und Anderson Th. F., Biol. Bull. 85 (1943).
- Porter R., Claude A. und Fullam E. F., Journ. exper. medic. 81 (1945).
- Schmitt F. O., Advances in Protein Chemistry I (1946).
- Seymour F. J. und Benmosche., Journ. Amer. Med. A. 116 (1941).

# ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 1948

Band/Volume: 3

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

Artikel/Article: Anwendung und Ergebnisse der Elektronenmikroskopie. 160-175