

Bemerkungen zum Unterschied von verschiedenartigen Kontrastierungsverfahren bei elektronenmikroskopischen Schnitten (Glutaraldehyd-Fixierung) unter besonderer Berücksichtigung von Membranstrukturen

W. LIPPERT

Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M.

(Z. Naturforsch. 22 b, 663—665 [1967]; eingegangen am 16. Dezember 1966)

Physikalische und thermische Kontrastierung führt bei Fixierung in Glutaraldehyd und Einbettung in Vestopal bei Parenchymzellen der Leber zu weitgehend ähnlichen Kontrastunterschieden auch bei Mitochondrien und den Membranen des Retikulums. Beide Verfahren wirken also weitgehend unspezifisch. Von den chemischen Verfahren liefert Uranylacetat im Cytoplasma ähnliche Kontrastverhältnisse wie die beiden genannten Verfahren. Das spezifische Verhalten des Uranylacetats kann z. B. an der Kontrastierung des Chromatins demonstriert werden. Sie bleibt aus, wenn die färbare Substanz auf der Wasseroberfläche des Messertroges herausgewaschen wurde. Bleicitrat-Kontrastierung hat hier im Gegensatz zu Uranylacetat eine spezifische Wirkung nur auf RNS-haltige Zellbestandteile.

In früheren Veröffentlichungen¹⁻³ haben wir uns mit dem natürlichen Kontrast von mit Aldehyden fixiertem Gewebe in elektronenmikroskopischen Schnitten und mit der Veränderung dieses Kontrastes vor allem durch die physikalische und die thermische Kontrastierung befaßt. In diesen Arbeiten standen die Kontrastverhältnisse bei nucleinsäurehaltigen Bestandteilen (Chromatin, Nukleolus und Ribosomen) im Vordergrund. Diese Kontrastverhältnisse traten so allgemein in verschiedenen Geweben, unter verschiedenen Bedingungen und auch quantitativ in ähnlicher Weise auf, daß an ihrer Realität nicht zu zweifeln ist. Andere Zellorganellen wurden damals nicht in die Betrachtungen einbezogen, da die Strukturen und auch die Kontrastverhältnisse von einer Einbettung zur anderen relativ starken Schwankungen unterworfen waren. Wir konnten jetzt dadurch, daß wir die Mäuse vor der Entnahme der Gewebe zwei bis drei Tage lang nur mit gekochtem Hühnereiweiß fütterten, in dieser Richtung eine wesentliche Verbesserung erzielen. Die Parenchymzellen der Leber sind bei solchen Tieren sehr einheitlich aufgebaut. Als Zellorganellen findet man praktisch nur endoplasmatisches Retikulum und Mitochondrien, während z. B. Glykogenfelder, Fetttröpfchen, Golgi-Felder, Lysosomen weitgehend fehlen.

Wir wollen uns im folgenden auf die Parenchymzelle dieser „Mäuse-Eiweißleber“ beschränken sowie auf Fixierungen in Glutaraldehyd und Einbettungen in Vestopal. Für Schnitte benutzt wurden nur Ge-

websstücke, die in eingebettetem Zustand klar durchsichtig waren, das durch Erythrozyten markierte Kapillarnetz deutlich zeigten und auch sonst keine durch die Einbettung bedingten Veränderungen aufwiesen. Die benutzten Kontrastierungsverfahren seien zusammenfassend wie folgt kurz skizziert:

Physikalische Kontrastierung: Sie wird technisch wie das „negative-staining“ durchgeführt (Aufsprühen der Kontrastierungs-Lösungen auf die Schnitte). Sie unterscheidet sich vom negative-staining dadurch, daß für die Güte der Kontrastierung nicht nur die Dichte der kontrastierenden Substanz, sondern auch deren kolloidchemische Eigenschaften wichtig sind. Phosphorwolframsäure, die oft für das negative-staining benutzt wird, gibt nur eine schlechte physikalische Kontrastierung. Besonders gut eignen sich Jodide (CsJ, CdJ₂) und auch Silbernitrat. Die letztgenannte Substanz neigt allerdings, wie auch aus anderen Untersuchungen bekannt, zu besonders körnigen Niederschlägen. Wir benutzen die Kontrastierungs-Lösungen meistens in Form von 2-proz. wäßrigen Lösungen. Dem Wasser sind dabei ungefähr 3% Glycerin und 0,3% Pril zugesetzt. Die Objektträger kommen meistens unmittelbar nach dem Besprühen in das Elektronenmikroskop. Im Gegensatz zur chemischen Kontrastierung lassen sich die Substanzen der physikalischen Kontrastierung mit Wasser — auch nach schwacher Bestrahlung im Elektronenmikroskop — wieder auswaschen.

Thermische Kontrastierung: Sie beruht darauf, daß bei höheren Objektstromdichten bestimmte Substanzen, vor allem die Einbettungsmittel, durch thermische Wirkungen bevorzugt aus den Schnitten entfernt werden, so daß die übrigbleibenden Substanzen mit anderem Kontrast gegenüber der Umgebung erscheinen. Die

¹ W. LIPPERT, Z. Naturforsch. 20 b, 775 [1965].

² W. LIPPERT, Biophysik 2, 379 [1965].

³ W. LIPPERT, Naturwissenschaften 53, 39 [1966].

thermische Kontrastierung kann durch den Elektronenstrahl allein oder aber, unter Beachtung gewisser Vorsichtsmaßnahmen, auch mit einer Objektheizvorrichtung durchgeführt werden.

In nicht kontrastiertem Zustand fallen bei den Schnitten vor allem die relativ starken Kontrast zeigenden Außenmembranen der Mitochondrien auf (Abb. 1 *). Die Membranen sind meistens diffus und in der Breite (ungefähr 200–300 Å) ziemlich einheitlich. In selteneren Fällen besteht die Membran aus zwei voneinander getrennten feineren Linien, ungefähr 30–50 Å breit, mit einer helleren, breiteren Zone in der Mitte und ebenfalls einer Gesamtbreite von ungefähr 250 Å. Die sehr regelmäßig gebauten Cristae sind im Kontrast schwächer und ungefähr nur $\frac{2}{3}$ so breit wie die Außenmembran. Der dreiteilige Aufbau wird hier häufiger beobachtet. Das Retikulum besteht, ähnlich der Mitochondrienmembran, bevorzugt aus breiten dunklen Linien (Breite um 200–250 Å). Ein Besatz mit dunkleren Ribosomen ist gelegentlich ohne Kontrastierung zu erkennen. Ähnlich wie die Retikulum-Membranen sehen die Kernmembranen aus. Die üblichen Poren sind in der Kernmembran angedeutet zu erkennen. Während man bei den übrigen Membranen den Wechsel von dreiteiliger Membran und diffusem Streifen wohl durch verschiedene Schnittrichtungen zur Membranfläche erklären kann, ist das bei der Außenmembran der Mitochondrien vielleicht nicht immer ohne weiteres möglich. Es darf vielleicht die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß die Mitochondrien gegenüber dem übrigen Gewebe schrumpfen. Es würde dann an Stelle der Membran ein breiterer Zwischenraum, ausgefüllt mit Einbettungsmittel, in Erscheinung treten.

Zum Kontrast der „flächigen“ Gebilde kann gesagt werden, daß die Mitochondrienmatrix ungefähr die gleiche Massendicke aufweist wie das umgebende Cytoplasma. Wesentlich heller als die Mitochondrienmatrix sind das Chromatin und der Nukleolus, während das Interchromatin im allgemeinen dunkler als das Cytoplasma ist. Das starke Hervortreten der Membranstrukturen in nicht kontrastiertem Zustand scheint charakteristisch für die Eiweißleber zu sein.

Nach der physikalischen Kontrastierung (Abb. 2) erscheint die Außenmembran der Mitochondrien meistens von zwei dunklen Linien eingefaßt. Ge-

legentlich findet sich zwischen diesen Linien noch ein dunkler Mittelstreifen. Der Abstand der äußeren dunklen Linien kann bis zu 350 Å betragen. Einen sehr einheitlichen Eindruck machen die Cristae. Sie erscheinen beinahe ausschließlich als 5-fach-Struktur und in der gleichen Art (Breite ungefähr 180 Å) wie die zuletzt beschriebene Form der Außenmembran. Das Retikulum hat meistens einen Besatz von sehr intensiv kontrastierten Ribosomen. In dem hellen Streifen zwischen den beiden Ribosomenreihen befindet sich regelmäßig ein feiner dunkler Streifen. Die äußere Begrenzung der Retikulum-Membranen ist wegen der Ribosomen meistens nicht richtig zu erkennen. In den Randbezirken der physikalischen Färbung kann es jedoch vorkommen, daß die Färbung der Membranbegrenzung derjenigen der Ribosomen etwas voreilt. Man kann dann 5-teilige Gebilde erkennen, die genauso wie die Cristae aufgebaut sind. In diesen Randbezirken sind, wie auch gelegentlich in der Mitochondrienmatrix, auch 3-teilige Gebilde zu erkennen, die, begrenzt durch zwei dunkle Linien, ungefähr einer halben Membran des Retikulums entsprechen. Diese Beobachtungen an den Membranen entsprechen denen z. B. von PEASE⁴, THEMANN⁵ und MALHOTRA⁶, die z. T. bei anderer Behandlung des Gewebes gewonnen wurden. Sie lassen sich durch die Annahme, daß die 5-teiligen Strukturen aus zwei dicht nebeneinanderliegenden „unit membranes“ (ROBERTSON⁷) bestehen, erklären. Über die Kernmembran ist relativ wenig zu sagen, sie erscheint meistens als heller Streifen zwischen Chromatin und Ribosomen. Gelegentlich tritt auch hier ein dunkler Mittelstreifen auf. Auch sie hat die Breite einer doppelten „unit membrane“. Die Mitochondrienmatrix und das Cytoplasma werden ebenfalls kontrastiert. Das Aussehen ist meistens granulärer Natur und einigermaßen einheitlich.

Die thermische Kontrastierung ergibt weitgehend die gleichen Kontrastunterschiede wie die physikalische Kontrastierung (Abb. 3). Die Strukturen sind hier, bedingt durch das Verfahren, meistens etwas vergrößert. Die feinen dunklen Mittelstreifen in den Cristae und den Membranen des Retikulums sind ebenfalls oft zu erkennen. Die Übereinstimmung ist zunächst nur äußerlich. Bei der physikalischen Kontrastierung wird zusätzliche Substanz auf oder in den Schnitt gebracht, bei der thermischen Kontrastie-

* Abbn. 1–6 s. Tafeln S. 664 a u. b.

⁴ D. C. PEASE, Proc. 5th Intern. Congr. El. Micr. Philadelphia 1962, Q 1.

⁵ H. THEMANN, Naturwissenschaften 51, 535 [1964].

⁶ S. K. MALHOTRA, J. Ultrastr. Res. 15, 14 [1966].

⁷ J. D. ROBERTSON, J. biophysic. biochem. Cytol. 4, 349 [1958].

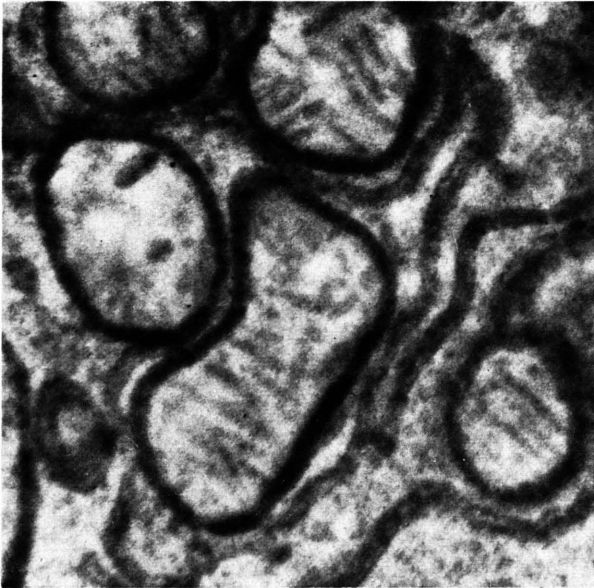


Abb. 1. Ausschnitt aus dem Cytoplasma einer nicht kontrastierten Eiweißleber. Mitochondrien mit stark hervortretender Außenmembran und Cristae. Retikulum mit Ribosomenbesatz. Vergr. 50 000-fach.

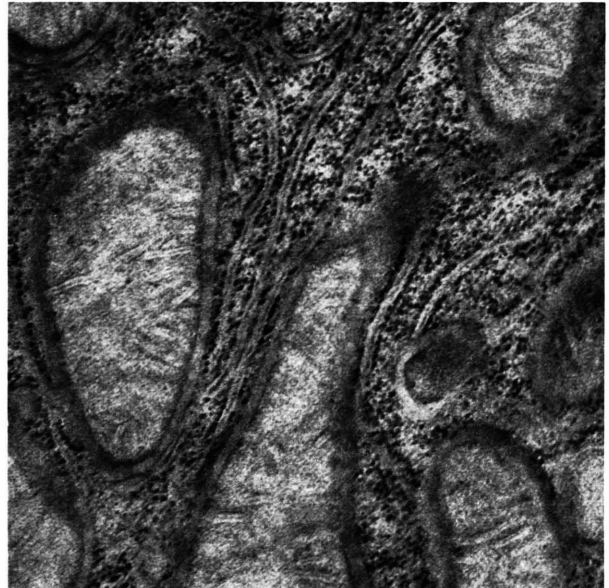


Abb. 2. Physikalische Kontrastierung einer ähnlichen Stelle wie in Abb. 1. „Geränderte“ Mitochondrien-Membranen, 5-teilige Cristae, 5-teilige Retikulum-Membranen mit stark hervortretenden Ribosomen. Vergr. 50 000-fach.

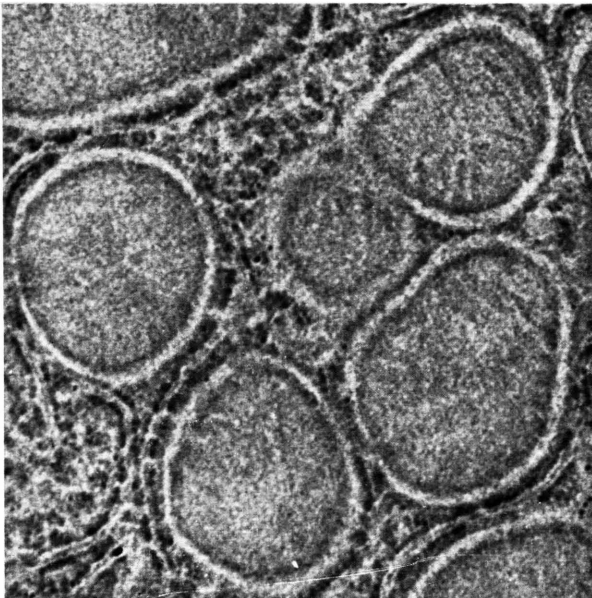


Abb. 3. Ähnliche Stelle wie in den Abbn. 1 und 2. Thermische Kontrastierung. Trotz stärkerer Granulierung ist zu erkennen, daß die Strukturen in ähnlicher Weise hervorgehoben wurden wie bei der physikalischen Kontrastierung. Vergr. 50 000-fach.

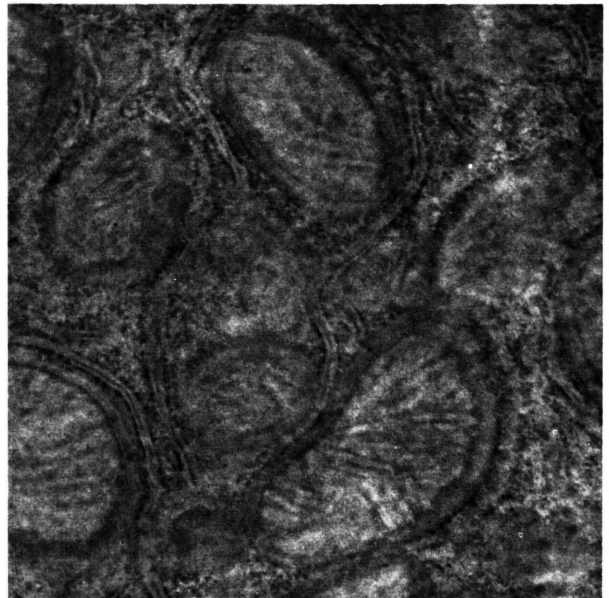


Abb. 4. Chemische Kontrastierung mit Uranylacetat. Auch hier ähnliche Kontrastverhältnisse wie bei den Abbn. 2 und 3. Vergr. 50 000-fach.

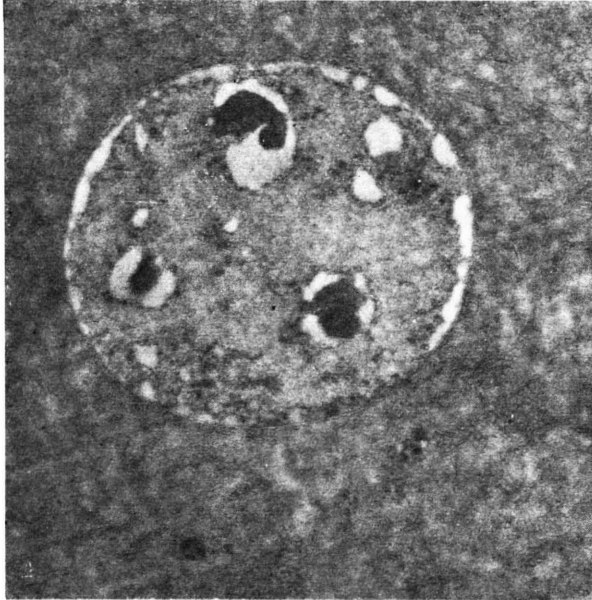


Abb. 5. Chemische Kontrastierung mit Uranylacetat. Zellkern. Bei der benutzten Präparationsart wird oft das Chromatin nicht oder nur schwach gefärbt, die Nukleolen treten dagegen meistens noch relativ stark hervor. Dies ist auf ein Herauswaschen von kontrastierbarer Substanz auf der Wasseroberfläche des Messertroges zurückzuführen. Vergr. 8000-fach.

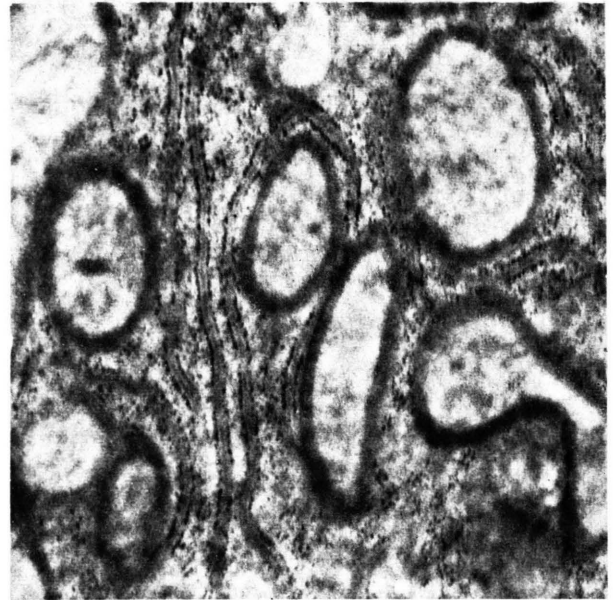


Abb. 6. Chemische Kontrastierung mit Bleicitrat (nach Reynolds). Im Gegensatz zu Uranylacetat kontrastiert Blei nur RNS-haltige Substanzen (Ribosomen). Die Mitochondrien sind gegenüber Abb. 1 nicht verändert. Vergr. 50 000-fach.

rung wird Substanz, und offenbar gerade diejenige, die nicht physikalisch gefärbt wird, fortgenommen. Macht man in erster Näherung die Annahme, daß im Schnitt biologisches Material und Einbettungsmittel nebeneinander, ohne sich gegenseitig zu beeinflussen, vorhanden sind, so würde daraus folgen, daß das biologische Material im Gegensatz zum Einbettungsmittel gut physikalisch anfärbbar und thermisch relativ beständig ist. Berücksichtigt man die relativ große Dichte von Vestopal, so wird man zu der Vermutung geführt, daß vielleicht bei den im nicht kontrastierten Schnitt dunkel erscheinenden Stellen Einbettungsmittel an die Stelle von beim Einbettungsvorgang herausgelösten lipoidhaltigen Substanzen getreten ist.

Bei der chemischen Kontrastierung wird man im allgemeinen die Vorstellung einer größeren Selektivität haben. Manche Substanzen, z. B. Uranylacetat, zeigen hierbei jedoch z. T. weitgehende Ähnlichkeiten mit der üblichen physikalischen Kontrastierung (Abb. 4). Uranylacetat gibt auch z. B. die dunklen Mittelstreifen bei den Cristae und im Retikulum. Die Kontraste der einzelnen Zellbestandteile erscheinen hier in der gleichen Reihenfolge wie bei den beiden anderen Verfahren. Feinheiten, z. B. die Granulierung, können dagegen entsprechend der Eigenart des Verfahrens etwas anders sein. Gerade bei Uranylacetat läßt sich aber auch die Besonderheit

dieser chemischen Färbung sehr gut zeigen. Bekanntlich kommt der ohne zusätzliche Kontrastierung so geringe Kontrast des Chromatins dadurch zustande, daß auf der Wasseroberfläche des Messertroges Substanz herausgewaschen wird. Dieses Auswaschen erfolgt offenbar quantitativ nicht immer auf die gleiche Art. Jedenfalls kann man nach chemischer Kontrastierung mit Uranylacetat unter Umständen beim gleichen Schnitt Kerne beobachten, die ein gefärbtes Chromatin zeigen, neben solchen, bei denen das Chromatin mehr oder weniger nicht, Nukleolus und Ribosomen der Umgebung dagegen normal kontrastiert erscheinen (Abb. 5). Diese Aufnahme ist so zu deuten, daß im Chromatin die mit Uranylacetat anfärbbare Substanz (DNS?) mehr oder weniger vollständig ausgewaschen ist, daß in den Nukleolen dagegen noch färbbare Substanz vorliegt. Die Bleifärbung nach REYNOLDS zeigt dagegen eine größere Selektivität (Abb. 6). Hier werden praktisch nur die Nukleolen und die Ribosomen angefärbt. Der dunkle Mittelstreifen der Membranen ist nur bei den Retikulum-Membranen schwach angedeutet; die Mitochondrien zeigen praktisch keine Kontrasterhöhung.

Frl. W. FRIESE hat durch verständnisvolle Mitarbeit diese Untersuchungen wesentlich gefördert.