

Grundlagen der Zellbiologie und Elektronenmikroskopie

Matthias Bartneck
Sommersemester 2005

Inhalt

- Gliederung der Organismenreiche
- Historische Entwicklung der Zytologie
- Methoden der Zytologie
- Elektronenmikroskopie
- Zellorganellen der Säugerzelle

Organismenreiche

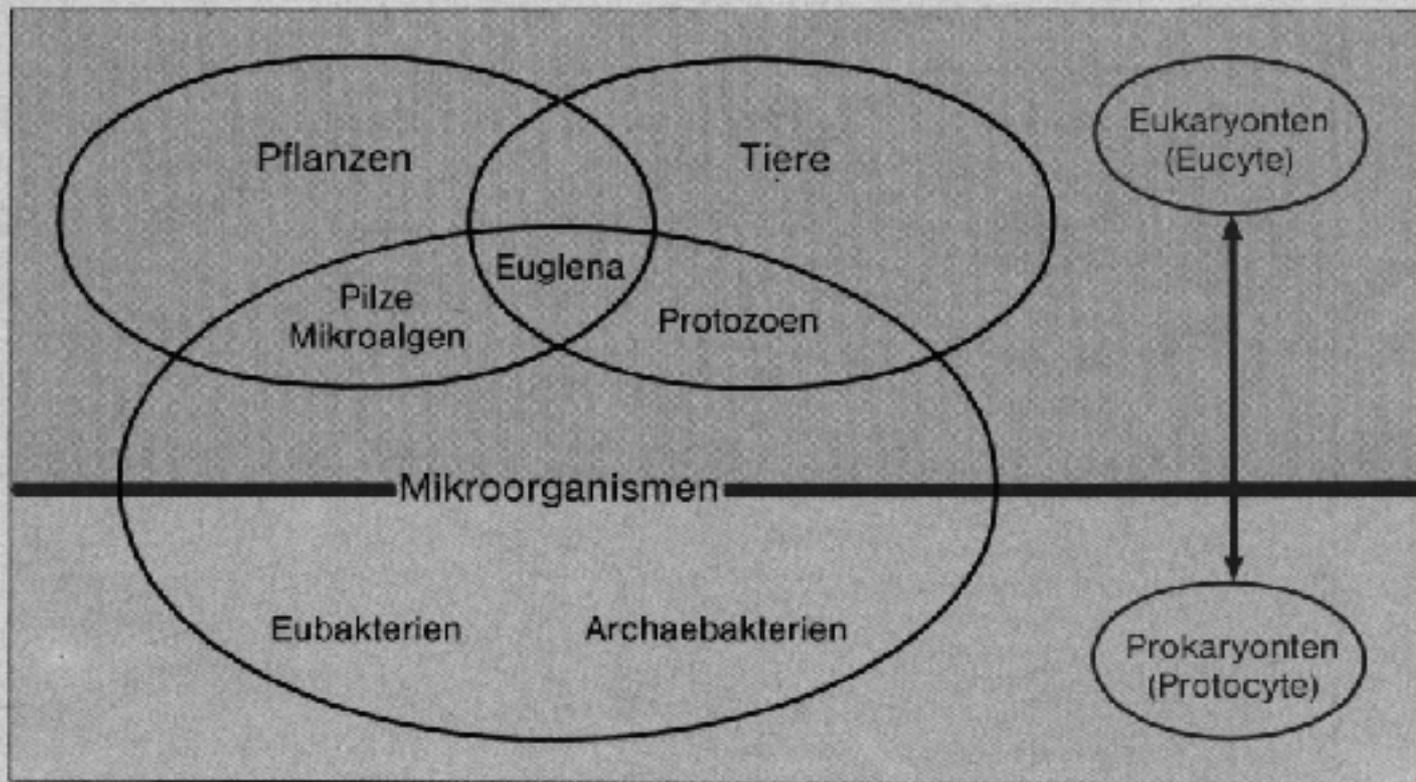


Abb. 1.2 Die drei Reiche, Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen, und die Unterscheidung von Eukaryonten und Prokaryonten

aus: Schlegel, Allgemeine Mikrobiologie, 7.Auflage, 1992

Prokaryonten

- Prokaryonten haben keinen Zellkern, sondern ein ringförmiges DNA-Molekül, den Nucleoid, "Kernäquivalent"
- Kleinere 70S- Ribosomen; Plasmide
- keine Kompartimente

Prokaryonten

- Prokaryonten werden in Archae- und Eubakterien gegliedert, parallele
- Gliederung in Gramnegativ – und positiv
- protos (gr.) = erster; karyon (gr.) = Kern;
eu (gr.) = echt, richtig

Archaeobakterien

- Archaeobakterien:
- Halophile Bakterien (Halobakterium, Halococcus)
- Thermoacidophile Bateriaen (Sulfolobus, Thermoplasma)
- Methanogene Bakterien (Methanothermus)

Eubakterien

- Eubakterien:
- Mycoplasmen (Acholeplasma laidlawii)
- Grampositive Bakterien (Bacillus subtilis)
- Gramnegative Bacterien (E.coli)
- Grüne, photos. Bakterien (Chlorobium)
- Cyanobakterien (Anabena)

Eukaryonten

- Kompartimentierung der Zelle durch membranbegrenzte Reaktionsräume der einzelnen Organellen
- Zellkern ist von Doppelmembran umgeben zu der eukaryontischen, mit Histonen (Proteine) komplexierten DNA

Eukaryonten

- Meiste Eukaryonten sind mehrzellig, durch eine schon früh in der Entwicklung einsetzende Differenzierung in verschiedene Gewebetypen kommt es zu Aufgabenteilungen, die überzellulär kontrolliert werden
- Höhepunkt ist der komplexe Säuger



aus: Ude/Koch, Die Zelle, 2.Auflage, 1994

Eukaryonten

- Modell vs. EM-Bilder – wie würden die Organellen für das menschliche Auge aussehen ?

Zellextrema

- Größte Einzelzelle ist das Straußenei mit 220 cm³ hauptsächlich Dotter), kleinste Zellen sind Mycoplasma (Bakterien, Ektoparasiten auf Eukaryontenzellen) mit 0,3 µm Länge; die Durchmesser verhalten sich 1 : 250 000, die Volumina 1:15 Billiarden

Historische Entwicklung

- Schleiden und Schwann haben 1830 die Zellenlehre begründet; gehört zu den großen Entdeckungen des 19. Jh
- Grundprinzip der Zytologie:
Alle Lebewesen von Einzeller zum hochorganisierten Säugetier sind zellulär organisiert

Historische Entwicklung

- Robert Brown beschreibt 1831 den Zellkern
- 1837 beobachten Meyen und Link die Chloroplasten der Pflanzenzelle
- Virchow(1855): "omnis cellula e cellula":
Jede Zelle entsteht aus einer Zelle
(durch Zellteilung)

Historische Entwicklung

- Virchow(1855):Die Zelle ist der kleinste Baustein des Lebens
- Boveri entdeckt 1878 das Centriol
- 1898 entdeckt Golgi den später sog. Golgi-Apparat

Historische Entwicklung

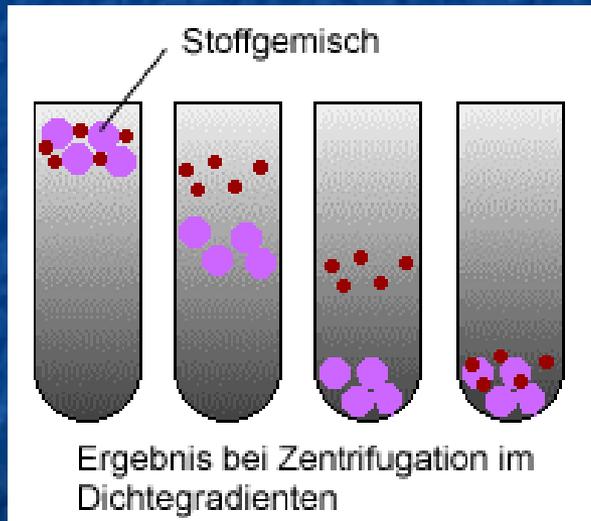
- 1899: Beschreibung des Ergastoplasmas als Teil des Endoplasmatischen Reticulums durch Garnier und Beschreibung der Mitochondrien durch Benda
- Rollen der meisten Zellstrukturen wurden jedoch erst Mitte des 20. JH geklärt

Methoden der Zytologie

- Ultrazentrifugation: Zur Auftrennung von Zelllysat in verschiedene Organellfraktionen
- Zytochemie (Enzyme, Farbstoffe) und
- Immunocytochemie (mit Antikörpern) lassen chemische Aussagen und Enzym-Charakterisierung zu mittels verschiedener Färbetechniken

Methoden der Zytologie

- Ultrazentrifugation:



Methoden der Zytologie

- Isotopentechnik gibt Einblick in zelluläre Prozesse, Bsp. DNA-Replikation
- Elektronenmikroskope wurden seit 1937 kommerziell hergestellt, erst Anfertigung von Ultradünnschnitten durch Ultramikrotome ab Mitte der 50er Jahre lieferte viele neue Erkenntnisse

Lichtmikroskop

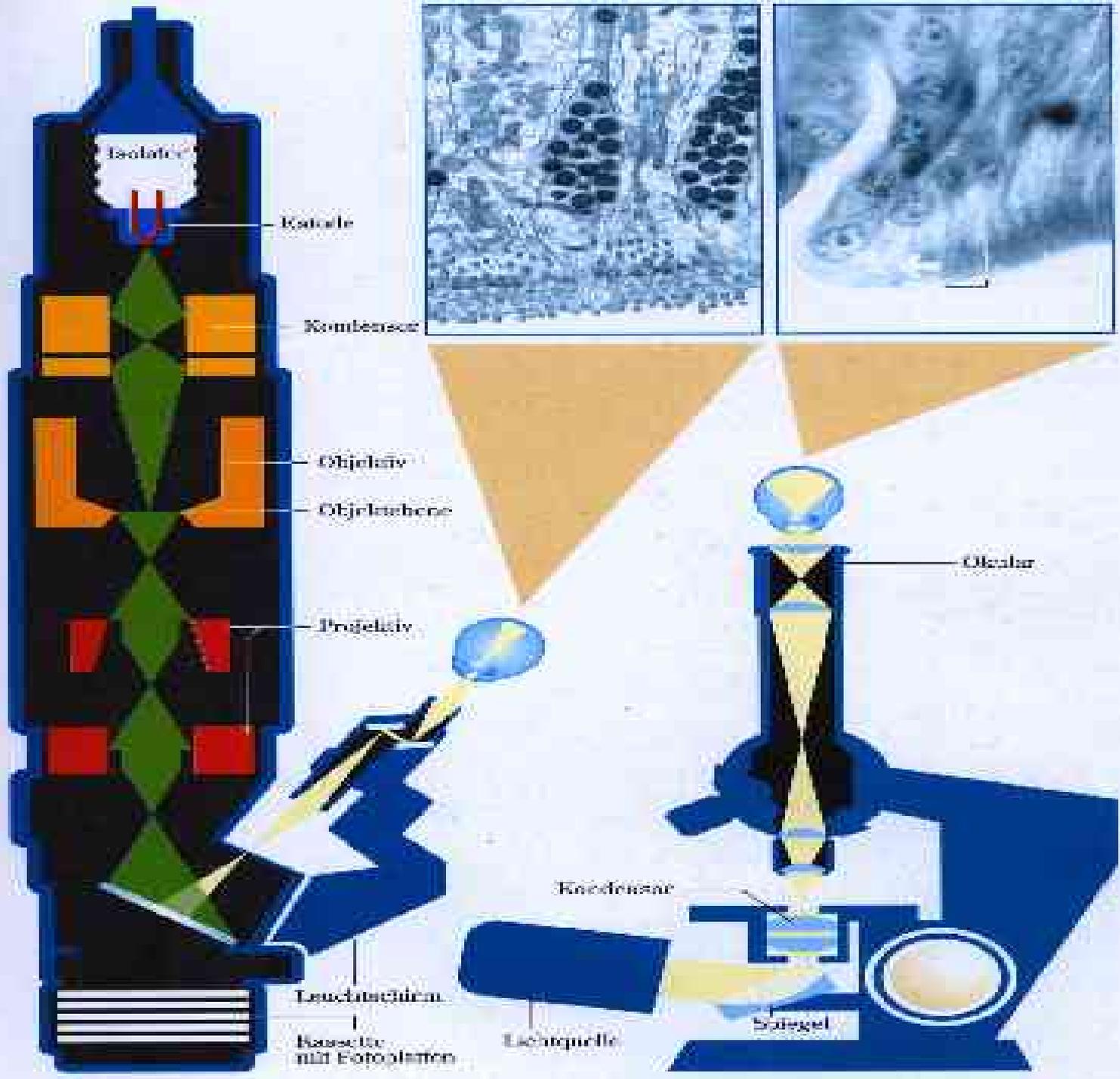
- Glühlampe dient als Strahlungsquelle
- Linsen sind die lichtbrechenden Elemente
- Auflicht- und Durchlichtmikroskope, Durchlichtmikroskope sind der Normalfall
- Zwischenbild wird vom Okular vergrössert

Elektronenmikroskopie

- Beim Elektronenmikroskop wird ein Elektronenstrahl zur Abtastung des Objekts benutzt
- Haarnadelkatode wird im Vakuum auf 200°C erhitzt und die dabei emittierten Elektronen werden mit Hilfe einer lochblendenähnlichen Anode auf nahezu Lichtgeschwindigkeit erhitzt

Elektronenmikroskopie

- Die rotationssymmetrischen elektromagnetischen Felder, die in den Bohrungen der stromdurchflossenen Spule entstehen, brechen beim EM den Lichtstrahl
- Der Lichtstrahl wird vom Kondensor auf das Objekt gebündelt
- Im Tubus entsteht ein Zwischenbild



aus: Ude/Koch, Die Zelle, 2.Auflage, 1994

*Katoden-Anoden-System
(Strahlquelle)*

*N₂-Behälter für die
Objektraumkühlung*

Monitor

*Tafel 1:
Vergleich der Bildentstehung im Licht- und Elektro-
nenmikroskop.*

*Abbildung 1:
Modernes Elektronenmikroskop (EM 900) der Fir-
ma CARL ZEISS Oberkochen. Mit Hilfe einer Fern-
sehkamera kann das Bild vom Leuchtschirm auf ei-
nen Monitor übertragen werden.*

Objektschleuse

Fernsehkamera

Einblickfenster (verdeckt)

Kamerasteuerung

*Bedienpult für
Elektronenstrahlquelle,
Linsenströme und Stigmator*

aus: Ude/Koch, Die Zelle, 2.Auflage, 1994

Elektronenmikroskopie

- Das Zwischenbild wird mithilfe der Zwischenlinsen und des Projektivs verstärkt und auf den fluoreszierenden Leuchtschirm projiziert
- Fixierung der Objekte ist eines der Hauptprobleme der EM, da pH und Osmolarität die Struktur der Probe verändern können

Elektronenmikroskopie

- Nach Fixierung kommt Entwässerung und Fixierung in Kunstharz, dann Anfertigung von Schnitten im Ultramikrotom
- Da die Objekte < 100 nm sein mussten, brachte erst ab 1950 Ultradünnschnitte durch Ultramikrotome gute Ergebnisse
- Heute bis zu 25 nm herab

Elektronenmikroskopische Immunozytochemie

- Zur Lokalisierung von Antigenen, z.B. Enzymen
- Inkubation des Schnittes mit Antikörpern
- Abwaschen der ungebundenen Antikörper
- Inkubation mit Protein-A-stabilisierten Goldpartikeln; Protein A bindet AK; Gold Protein A
- Waschen und Trocknen

EM: Gefrierbruchtechnik

- Zur Betrachtung von Äquivalentbildern einzelner Zellen oder Gewebestücke
- Probe wird schnell bei -100°C eingefroren
- Probe wird auf dem Mikrotom in Ebenen zerschnitten
- Ebenen werden mit Kohle-Platinschicht bedampft und nach dem Auftauen betrachtet

EM: Gefrierbruchtechnik



Zellbiologie: Organellen der tierischen Zelle

- Generell sind eukaryontische Zellen 1000 mal grösser als Prokaryontenzellen und haben 10 – 1000 mal mehr DNA

Die Zellmembran

- Äußerst transparent
- Eukaryonten sind von einem Bilayer umgeben, einer Lipiddoppelschicht, welche fluid ist und in welcher die Fettsäuren frei beweglich sind
- In der Membran befinden sich integrale Proteine, Rezeptoren und Glykoproteine
- Periphere Proteine sind angelagert

Die Zellmembran

- Durch Glykosilierungen der Glykoproteine kann sich die Zelle aktiv verformen
- gap junctions dienen der Zellkommunikation und tight junctions der Verbindung zwischen Zellen

Der Zellkern

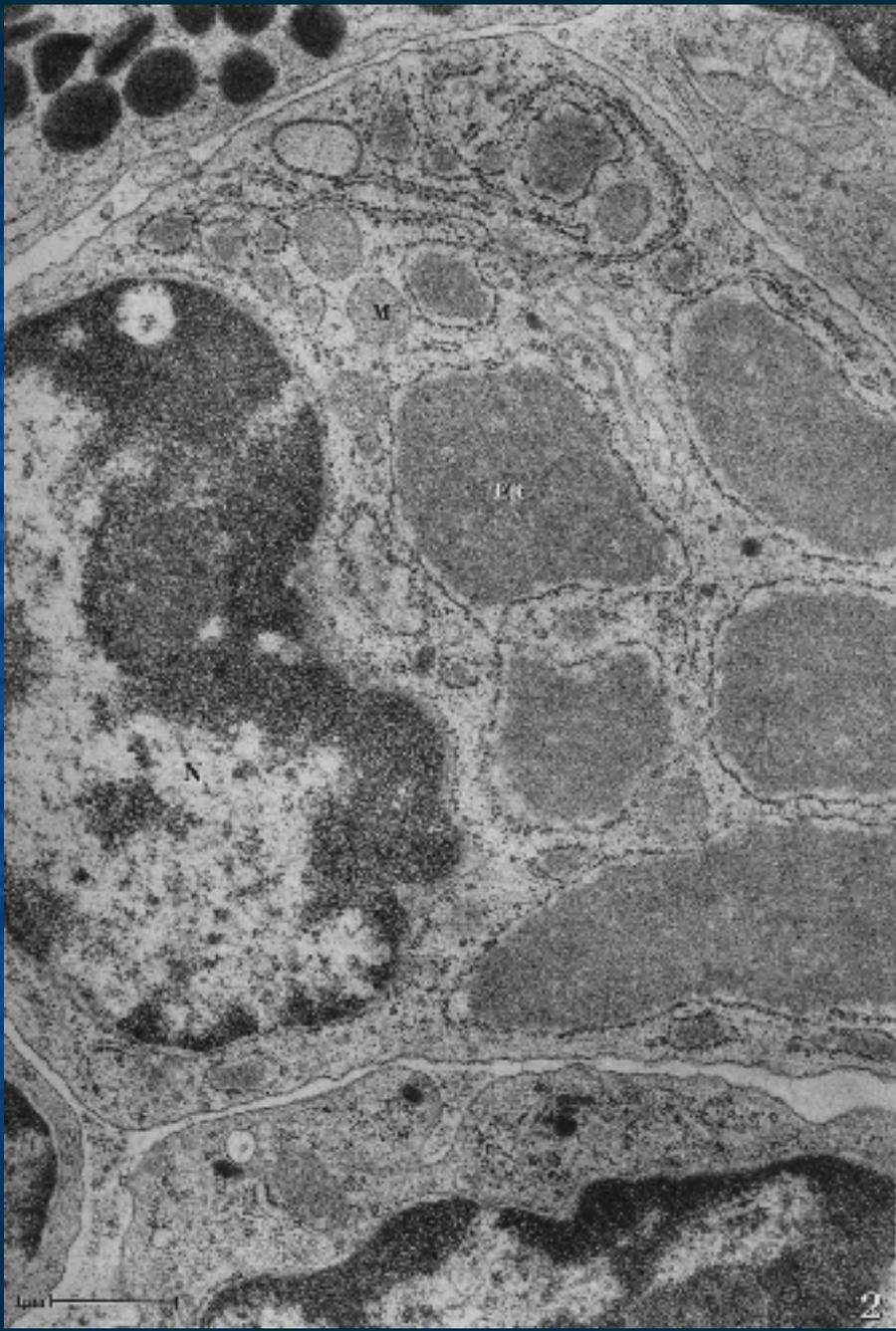
- Enthält 99 % der Erbinformation
- lebensnotwendig: Erythrocyten leben nur 100 Tage
- In der Interphase, d.h. wenn sich die Zelle nicht teilt, findet hier die Transkription statt
- Etwa 4000 Kernporen, durch die pro sec. 400 Moleküle transportiert werden

Der Zellkern

- 4 – 20 μm gross
- Enthaltene DNA ist 3 GB ($3 \times 10^9\text{bp}$) gross und ist 1m lang beim Menschen
- Simian Virus im Vergleich 5243 bp
- von unit membrane umgeben
- Ort der DNA-Replikation, Transkription und des splicings

Das Endoplasmatische Reticulum

- System von membranbegrenzten Zisternen
- Granuläres ER: Mit Ribosomen (\varnothing 19nm), Proteinsynthese, - modifikation und Faltung, z.B. AK-Produktion in Plasmazellen
- Agranuläres ER: Lipidstoffwechsel, z.B. häufig in Steroidhormon- produzierenden Zellen



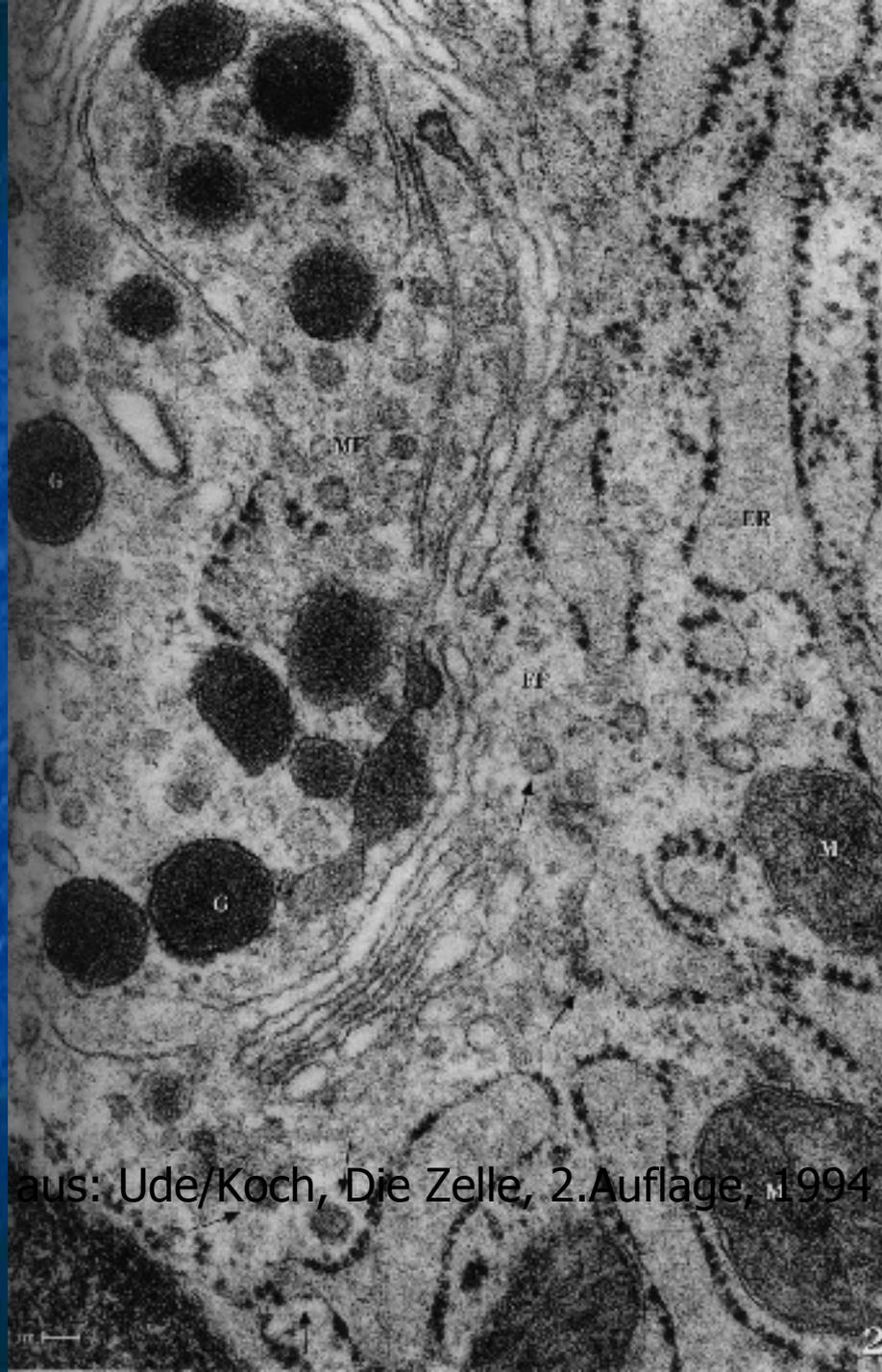
aus: Ude/Koch, Die Zelle, 2.Auflage, 1994

Der Golgi-Apparat

- Versendung von Proteinen und Fetten innerhalb der Zelle oder nach aussen
- Die im ER gebildeten Proteine werden in 50 nm grossen Vesikeln zum Golgi-Apparat transportiert, "transistional vesicles"
- Der cis-Seite des Golgi-Apparates liegt das ER gegenüber, trans zeigt zur Membran

Der Golgi-Apparat

- Glykosylierung von Proteinen
- Hauptelemente sind die Golgi- Stapel, die aus aus meist 3-7 Zisternen mit \varnothing 1 μ m bestehen
- Anzahl der Golgi- Stapel variiert je nach Zelle



aus: Ude/Koch, Die Zelle, 2.Auflage, 1994

Geschafft !