

Schnitte am laufenden Nanometer: Moderne Ultrastrukturforschung mit Serial Block-Face Scanning Elektronenmikroskopie

THOMAS HÖRNSCHEMEYER¹, CHRISTIAN FISCHER¹, REBECCA KLUG¹, ROLAND RIES²,
RAINER WILLMANN¹

¹ Johann-Friedrich-Blumenbach-Institut für Zoologie und Anthropologie,
Abt. Morphologie & Systematik, Berliner Str. 28, 37073 Göttingen,
E-Mail: hoerns@gwdg.de

² Gatan GmbH, Ingolstädter Str. 12, 80807 München

Ende 2011 ist eine in Deutschland erdachte und von DENK & HORSTMANN (2004) vorgestellte Technik zur Erzeugung von Schnittserien mit Ultrastrukturauflösung in ihr Ursprungsland zurückgekehrt. Die sogenannte „Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy“ (SBFSEM) wurde am Max-Planck-Institut für Medizinforschung in Heidelberg von Denk & Horstmann speziell für die Untersuchung und Rekonstruktion von Nervengewebe und dessen komplexen dreidimensionalen Verflechtungen entwickelt (z.B. DENK & HORSTMANN 2004, MÜLLER-REICHERT & al. 2010, PELLETTIERI & al. 2010, LANG & al. 2011). Mit der Inbetriebnahme einer entsprechenden Gerätekombination in der Abteilung Morphologie & Systematik des Johann-Friedrich-Blumenbach-Instituts für Zoologie & Anthropologie der Universität Göttingen hält diese Technik nun auch Einzug in die entomologische und allgemein zoologische Ultrastrukturforschung.

Installiert wurde in Göttingen eine Gerätekombination aus einem FEI Quanta 250 FEG® Raster-Elektronenmikroskop und einem in dessen Probenkammer einsetzbaren Gatan 3View® Ultramikrotom. Je nach Bedarf kann diese Anlage durch die Benutzer von „normalem“ REM-Betrieb auf SBFSEM-Betrieb umgebaut werden. Damit ist ein sehr effizienter und vielseitiger Einsatz des Mikroskops möglich.

Besonders spannende Möglichkeiten ergeben sich durch das 3View® Ultramikrotom und die „Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy“. Die Besonderheit dieser Technik besteht darin, dass die in der „klassischen“ transmissions-elektronenmikroskopischen (TEM) Untersuchung räumlich und zeitlich getrennt und weitgehend von Hand durchgeführten Schritte des Schneidens und der Bildaufnahme nun automatisiert und direkt nacheinander in der Probenkammer des Raster-Elektronenmikroskops erfolgen. Ein weiterer sehr wesentlicher Unterschied besteht darin, dass das Bild nicht vom einzelnen Schnitt (der verworfen wird), sondern vom Anschnitt des Objektes im Kunstharzblock aufgenommen wird. Damit kann es sich hier natürlich nicht um ein transmissions-elektronenmikroskopisches Bild handeln. Letzteres ist ein Projektionsbild, das aus der Durchstrahlung eines Ultradünnschnittes erzeugt wird. Wie der Name schon sagt, handelt es sich im Gegensatz dazu beim SBFSEM-Bild um ein raster-elektronenmikroskopisches Bild. Dieses wird aus den rückgestreuten Elektronen des im Mikroskop erzeugten Elektronenstrahls mit Hilfe eines speziellen Rückstreu-Elektronendetektors (BSED – Back Scattered Electron Detector) aufgebaut (Abb. 1). Aus dieser Art der Bilderzeugung ergeben sich die wesentlichen Konsequenzen für die Vorbereitung

der zu untersuchenden Objekte und für neue Möglichkeiten bei der Auswertung der erzeugten Daten.

Ein wichtiger Aspekt ist die Größe der untersuchbaren Objekte. Hier bewegt man sich im gewohnten TEM-Bereich. Bei der in Göttingen installierten Anlage muss das zu bearbeitende Objekt in einen Block von maximal 1mm x 1mm x 1mm Kantenlänge passen. Diese Abmessungen ergeben sich im Wesentlichen aus der Größe des Diamantmessers und aus den Distanzen über die das Objekt in den drei Achsen bewegt werden kann.

Bei der Vorbereitung der Objekte besteht der einzige wesentliche Unterschied zu den üblicherweise eingesetzten TEM-Verfahren (vgl. ROMEIS 2010) darin, dass die Kontrastierung des Objektes vor dem Einbetten in Kunstharz erfolgen muss. Diese sogenannte Blockkontrastierung wird zwar teilweise auch im Rahmen von TEM-Präparationen eingesetzt, in der SBFSEM ist es aber die einzig verfügbare Möglichkeit, Kontrastmittel in das Objekt zu bringen, da die Bildaufnahme ja vom angeschnittenen Block erfolgt.

Aufgrund der raster-elektronenmikroskopischen Bilderzeugung ist es besonders wichtig, dass möglichst viel Schwermetall als Kontrastmittel in das Objekt eingebracht wird. Damit wird nicht nur ein ausreichender Kontrast zwischen den verschiedenen Gewebekomponenten, bzw. zwischen Gewebe und Einbettmedium erzeugt, sondern es wird auch die Ableitung der auf das Objekt geschossenen Elektronen erleichtert. Unsere bisherigen Erfahrungen mit dem System zeigen, dass der letzte Aspekt der deutlich wichtigere ist, da zu wenig Kontrastmittel sehr schnell zu drastischen Aufladungsartefakten führt.

Als Ergebnis der „Verarbeitung“ eines Objektes in der SBFSEM -Anlage erhält man eine mehr oder weniger große Anzahl von Einzelbildern (Abb. 2A; typischer Weise im TIFF-Format, Graustufen). Anzahl und Bildgröße können natürlich gewählt werden. Bei vorhandener Netzanbindung des Steuerrechners schickt das Gerät, nach Abschluss der Arbeit oder bei Störungen, auch eine E-Mail. Die Bildgröße kann quasi frei gewählt werden, solange es sich um Quadrate handelt. Bei der hier besprochenen Gerätekombination ist der obere sinnvolle Wert bei 4096x4096 Pixeln angesiedelt. Die Schnittdicke ist ebenfalls in einem weiten Bereich von 10nm bis maximal 200nm wählbar, so dass die Datenaufnahme an unterschiedlichste Ansprüche angepasst werden kann. Je nach Kombination der gewählten Parameter dauert eine Datenaufnahme dann von einigen Stunden bis zu mehreren Tagen. Unsere Anlage hat sich bisher auch bei längeren Aktionen als zuverlässig erwiesen und z.B. über mehrere Tage Schnitte und Bilder produziert.

Die erzeugten Bildstapel ermöglichen dann, mit Hilfe entsprechender Software, eine sehr flexible Auswertung. Da ein Objekt, bzw. der Ausschnitt eines Objekts, in einer Bildserie in der Regel lückenlos wiedergegeben ist (einzelne Ausfälle können z.B. dadurch entstehen, dass Schnitte auf die Blockoberfläche zurück fallen und das Objekt abdecken), können gerade dreidimensionale komplexe Strukturen einfach und vergleichsweise schnell rekonstruiert und bis in feinste Details analysiert werden.

Die mit dem 3View® gelieferte Software bietet hier bereits einige Hilfsmittel. Will man es aber vermeiden, den Steuerrechner mit Auswertungsarbeiten zu blockieren, ist es sehr sinnvoll einen zusätzlichen Rechner mit ausreichend Arbeitsspeicher

und Plattenkapazität sowie eine spezielle 3D-Software zur Verfügung zu haben. Für eine sinnvolle Auswertung muss es allerdings nicht gleich die mehrere tausend Euro teure Spezialsoftware sein, das frei verfügbare ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) leistet beispielsweise auch schon sehr gute Dienste.

Die erzeugten und dann natürlich zu lagernden Datenmengen sind nicht zu unterschätzen. Typischerweise ergeben z.B. 1000 Schnitte 16GB an Datenvolumen. Neben den erforderlichen lokalen Datenspeichern sollte man auch in Erwägung ziehen, Datensätze, die für Publikationen genutzt wurden, in einer öffentlichen Datenbank wie z.B. Morph-D-Base (www.morphdbase.de) zu hinterlegen und so dauerhaft für die Wissenschafts-Öffentlichkeit verfügbar zu machen.

Unsere bisherigen praktischen Erfahrungen haben gezeigt, dass der anspruchsvollste Teil im Umgang mit der Anlage bei der Vorbereitung der Objekte und ihrer Justierung im Mikrotom liegt (Abb. 1C). Ein zunächst nicht erwartetes Problem ergab sich daraus, dass es zumindest bei entomologischen Objekten durchaus wichtig ist, das Objekt kontrolliert zum Messer auszurichten. Dies ist besonders bedeutsam, wenn z.B. Teile eines Objektes mit verhältnismäßig hoher Vergrößerung und über eine längere Strecke aufgezeichnet werden sollen. Eine schiefe Ausrichtung des Objekts zur Schnittebene führt in solchen Fällen dazu, dass das interessante Detail recht schnell aus dem Bildfenster wandert und somit sehr häufiges Korrigieren der Einstellungen erforderlich wird. Letzteres ist zumindest zeitaufwändig und macht den Vorteil der automatischen Datenaufnahme zunichte. Das Ausrichten von Objekten in den klassischen, relativ großen Einbettformen ist nun nicht besonders problematisch. Das Herausschneiden des geforderten 1mm³-Blöckchens aus dem großen Kunstharzblock hat sich allerdings als Herausforderung erwiesen, die durchaus zu Materialverlusten führen kann.

Eine von uns entwickelte, zunächst recht elegant erscheinende Methode, die Objekte direkt auf den speziellen Probenhaltern des 3View[®] einzugießen, führt leider zu größeren Problemen bei der Objektausrichtung. Hier haben wir wohl noch nicht die effektivste Vorgehensweise gefunden.

Nach der Montage des Objekts auf dem Probenhalter muss dieser zunächst in einen weiteren Halter eingesetzt werden, der die Zentrierung des Objekts im Mikrotom erlaubt. Als letztes wird dieser Zentrier-Halter in die Probenbühne des Mikrotoms eingesetzt, und Objekt und Messer werden zueinander ausgerichtet. Dieser Vorgang erfolgt ähnlich wie z.B. in einem Ultramikrotom.

Ist die Justierung des Objektes abgeschlossen, wird das Mikrotom in die Probenkammer des REM gefahren und alle weiteren Arbeitsschritte erfolgen per Computersteuerung.

Weitere Hinweise zur Vorbereitung von Objekten für die SBFSEM und Beispiele für einige Anwendungen sind z.B. bei DENK & HORSTMANN (2004), LANG & al. (2011), KLEINFELD & al. (2009), ZANKEL & al. (2009), TAPIA & al. (2012), etc. zu finden.

Die Abbildungen 2 & 3 zeigen zwei Beispiele, aus denen zum Einen hervorgeht, dass auch Objekte ohne spezielle Blockkontrastierung (Abb. 3) so abgebildet werden können, dass eine sinnvolle Auswertung möglich ist. Außerdem ist erkennbar, dass auch großräumigere Strukturen wie z.B. der becherförmige Sockel eines Windhaares lückenlos erfasst werden können.

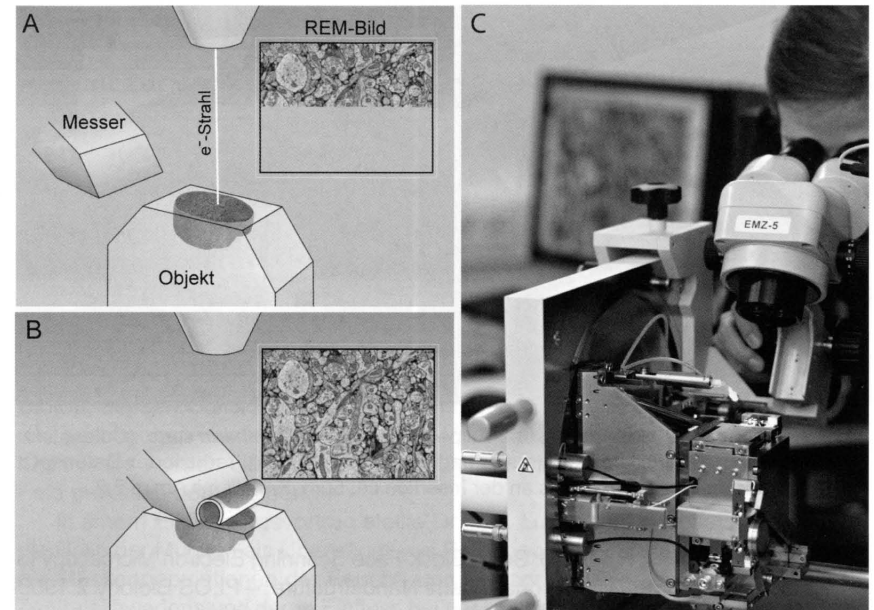


Abb. 1: Funktionsweise der „Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy“. A: Das Objekt wird vom Elektronenstrahl abgerastert, dabei wird das Bild erzeugt. B: Das Diamantmesser trägt einen Schnitt vom Objekt ab. Dieser wird verworfen. (nach KLEINFELD & al. 2011). C: Gatan 3View[®] mit angesetztem Bino beim Justieren des Objekts. Foto: C. Fischer.

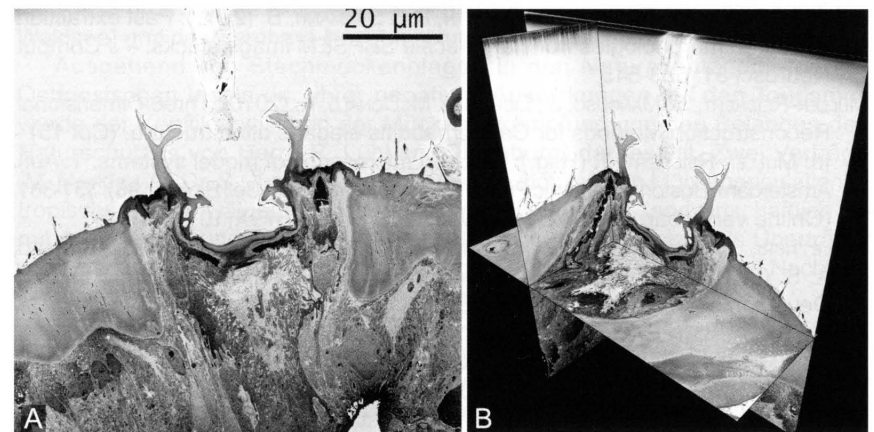


Abb. 2: Becher eines Windhaares auf einem Cersus von *Gryllus domestica* (Ensifera), blockkontrastiert, Durcupan-Einbettung, reduzierter Datensatz. Erstellt mit Amira 5.2.

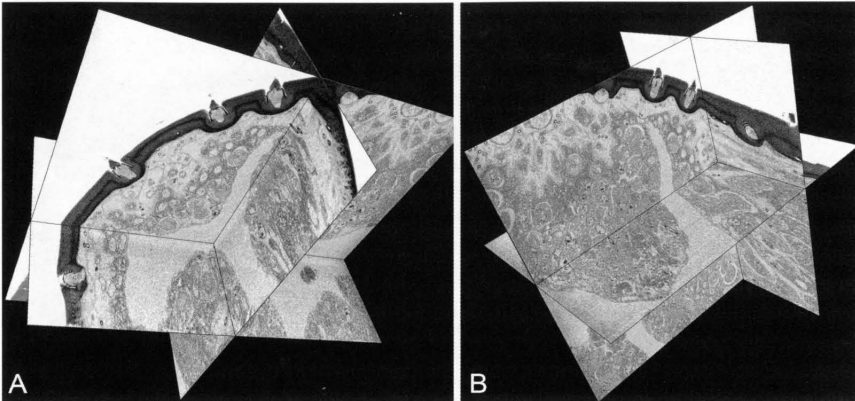


Abb. 3: Drei Schnittebenen durch das Palpenendglied von *Cantharis spec.* (Coleoptera: Cantharidae), ohne Blockkontrastierung, Araldit-Einbettung, reduzierter Datensatz. Durchmesser eines Sensillum an der Insertion ca. 5µm. Erstellt mit Amira 5.2.

Literatur

- DENK, W. & HORSTMANN, H. (2004): Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure. – *PLOS Biology* **2**:1900-1909.
- KLEINFELD, D., BHARIOKE, A. BLINDER, P., BOCK, D.D., BRIGGMAN, K.L., CHKLOVSKII, D.B., DENK, W., HELMSTAEDTER, M., KAUFHOLD, J.P., LEE, W.-C.A., MEYER, H.S., MICHEVA, K.D., OBERLAENDER, M., PROHASKA, S., REID, R.C., SMITH, S.T., TAKEMURA, S., TSAI, P.S. & SAKMANN, B. (2011): Large-Scale Automated Histology in the Pursuit of Connectomes. – *J. Neurosci.* **31**(45): 16125-16138.
- LANG, S., DROUVELIS, P., TAJAJ, E., BASTIAN, P. & SAKMANN, B. (2011): Fast extraction of neuron morphologies from large-scale SBFSEM image stacks. – *J Comput Neurosci* **31**: 533-545.
- MÜLLER-REICHERT, T., MANCUSO, J., LICH, B. & McDONALD, K. (2010): Three-Dimensional Reconstruction Methods for *Caenorhabditis elegans* ultrastructure. (Cpt 15) – In: MÜLLER-REICHERT, T. (Hsg.): *Electron microscopy of model systems*, 1. Aufl. Amsterdam, Boston: Academic Press / Elsevier (*Methods in Cell Biology*, **96**): 331-361. (Online verfügbar: [http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X\(10\)96015-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0091-679X(10)96015-9)).
- PELLETTIERI, J., FITZGERALD, P., WATANABE, S., MANCUSO, J., GREEN, D. R., ALVARADO, A. S. (2010): Cell death and tissue remodeling in planarian regeneration. – *Developmental Biology* **338**: 76–85.
- ROMEIS, B., AESCHT, E. MULISCH, M. (2010): *Romeis Mikroskopische Technik*. – 18. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akad. Verl.
- TAPIA, J. C., KASTHURI, N., HAYWORTH, K.J., SCHALEK, R., LICHTMAN, J.W., SMITH, S.J. & BUCHANAN, J. (2012): High-contrast *en bloc* staining of neuronal tissue for field emission scanning electron microscopy. – *Nature Protocols* **7**(2): 193-206.
- ZANKEL, A., KRAUS, B., POELT, P. & SCHAFFER, M. (2009): Ultramicrotomy in the ESEM, a versatile method for materials and life sciences. – *J. Microscopy* **233**: 140-148.