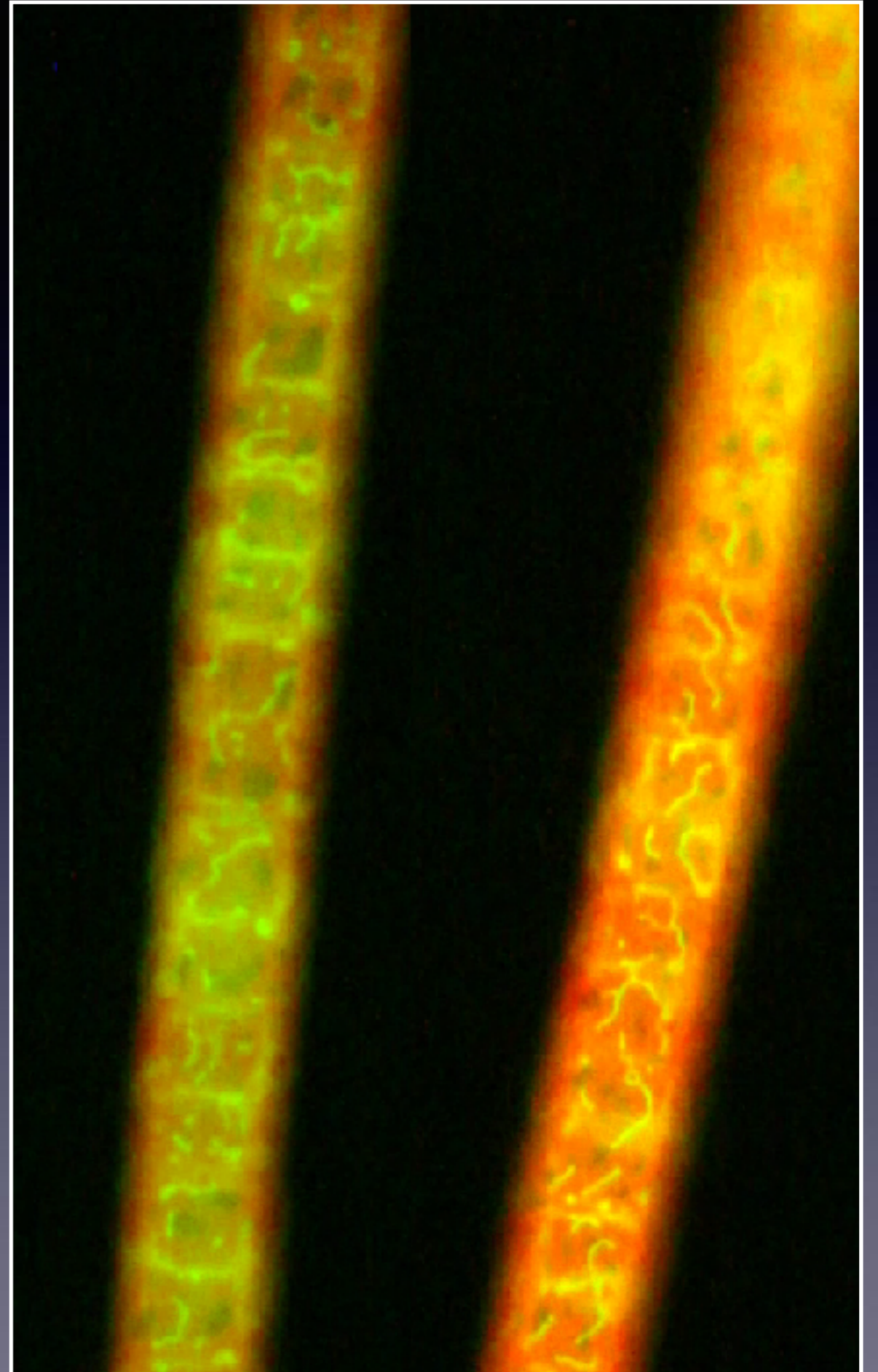


# Mitochondrien

Mikroskopieren, ein Workshop für Amateure  
Inzigkofen 2021  
Dipl.-Physiker Thilo Bauer



# Inhalt

- The Powerhouse of cells
- Aktuelles aus der Forschung
- Praktischer Teil

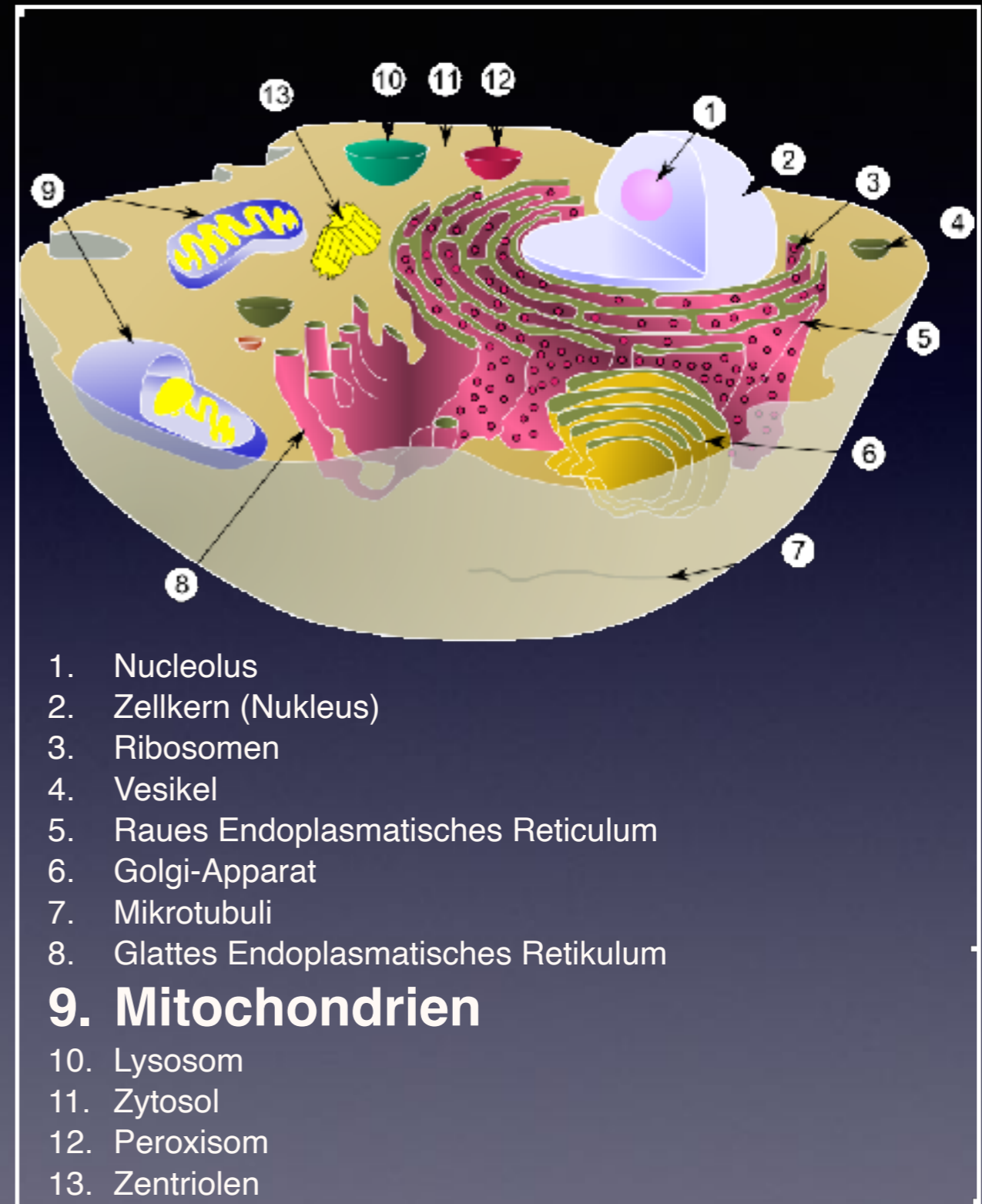
# The Powerhouse of Cells

## Die Zelle

Zelle: Die kleinste lebende Einheit eines Organismus.

Die eukaryotische Zelle besitzt strukturell abgegrenzte Einheiten, die man als Organellen bezeichnet.

Organellen sind im übertragenen Sinne die Organe der Zellen.



# The Powerhouse of Cells

## Historisch

Zwischen 1850 und 1918 uneinheitliche Bezeichnungen für ähnliche, gefundene Zellstrukturen:

- Blepharoblast
- Chondriokont
- Chondriomit
- Chondrioplast
- Chondriosom
- Chondriosphere
- Fila
- fuchsinophile Granulen
- Körner
- Fadenkörper
- Mitogel
- parabasale Körper
- Plasmasome
- Plastochondria
- Plastosome
- Vermicule
- Sarcosom
- Interstitial Body

Chondros (griechisch)

Grain (englisch)

Korn (deutsch)

# The Powerhouse of Cells

## Metabolismus

In den Mitochondrien laufen komplexe biochemische Abläufe ab, die der Zelle nützlich sind:

- Krebs-Zyklus
- Fettsäure Metabolismus
- Biosynthese des Harnstoffs
- Cardiolipin und Lipid Synthese/ Metabolismus
- Synthese von Ubiquinol
- ...

Scheffler I: Mitochondria. Wiley, 2008

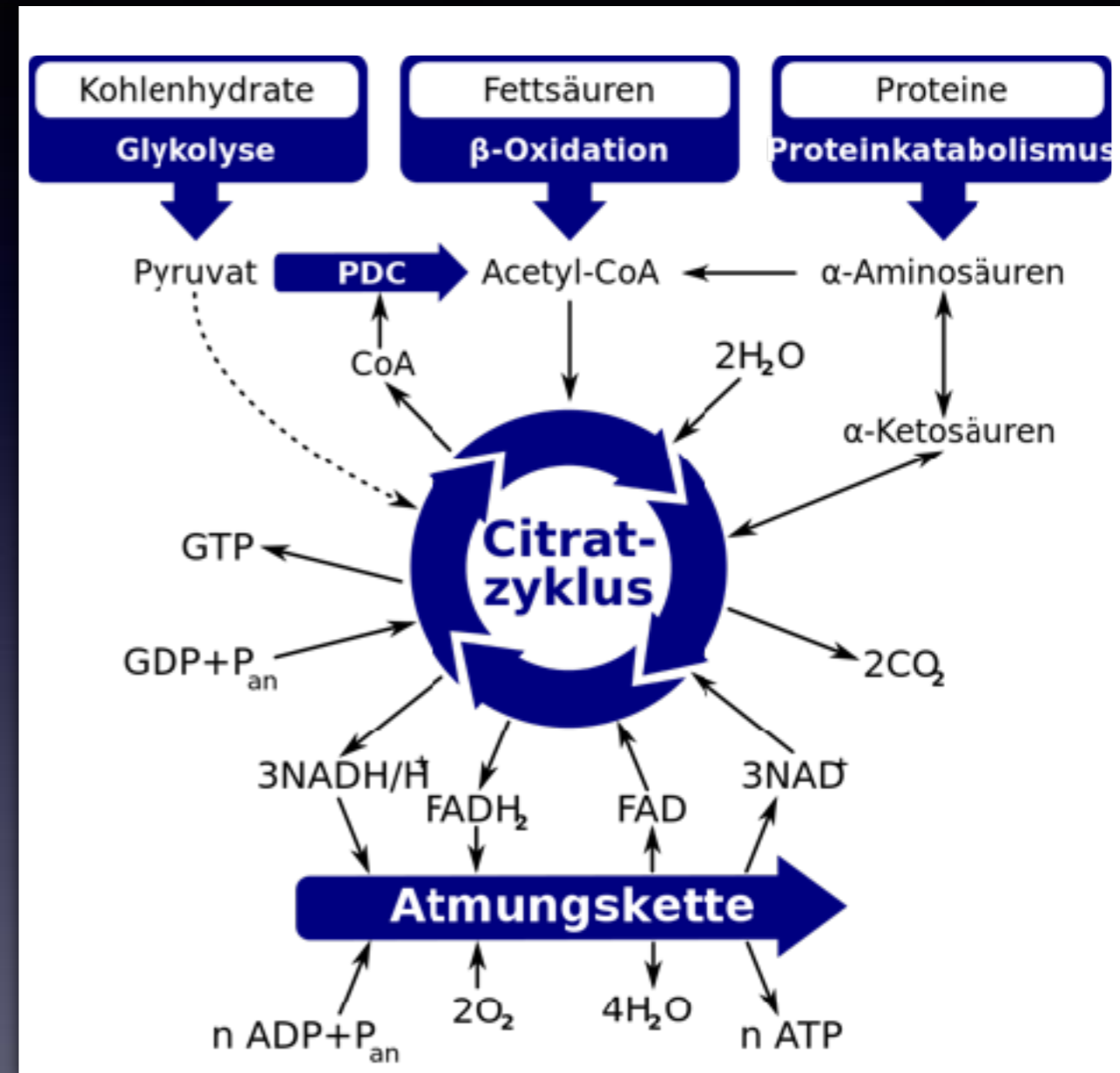
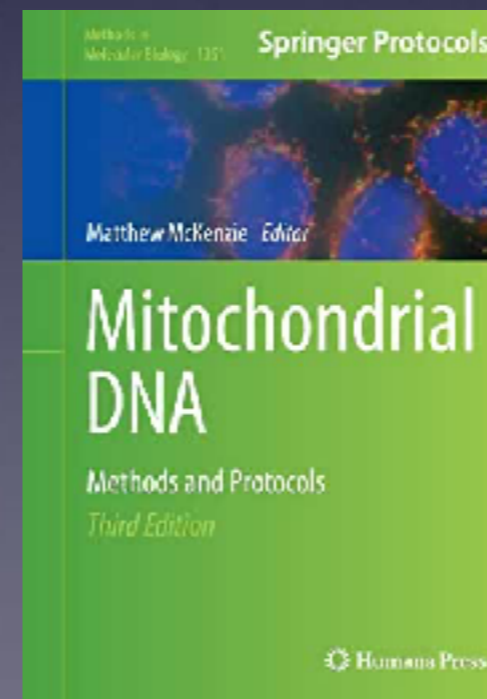
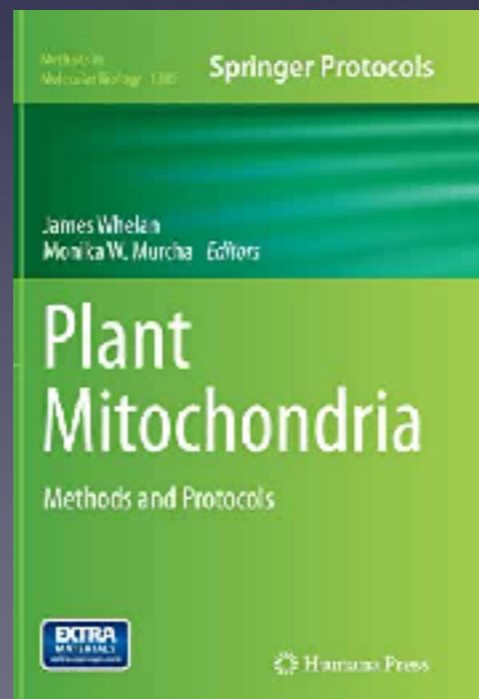
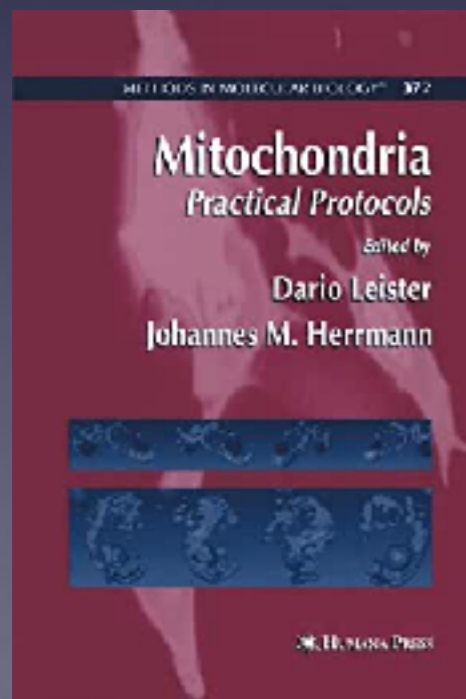
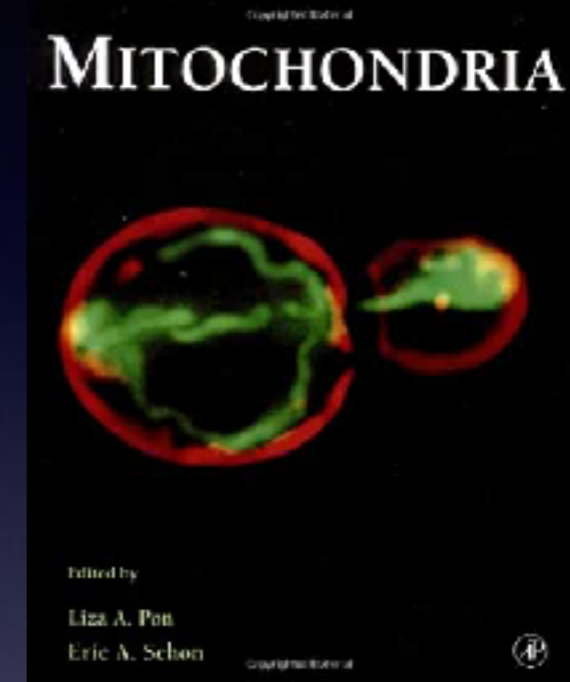
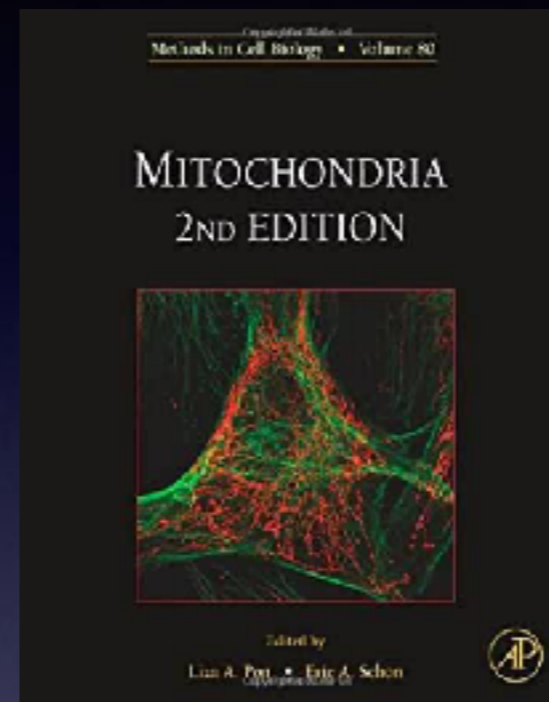
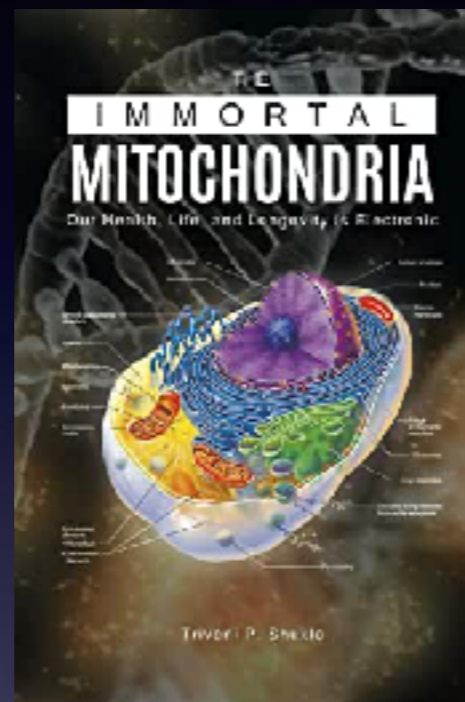
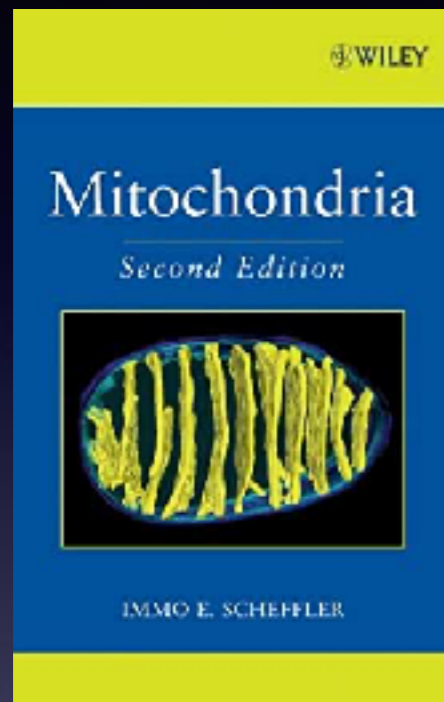


Abbildung: Wiki Commons

Atmungskette

# The Powerhouse of Cells

## Fachliteratur



## Aktuelles aus der Forschung

### Innerer Aufbau

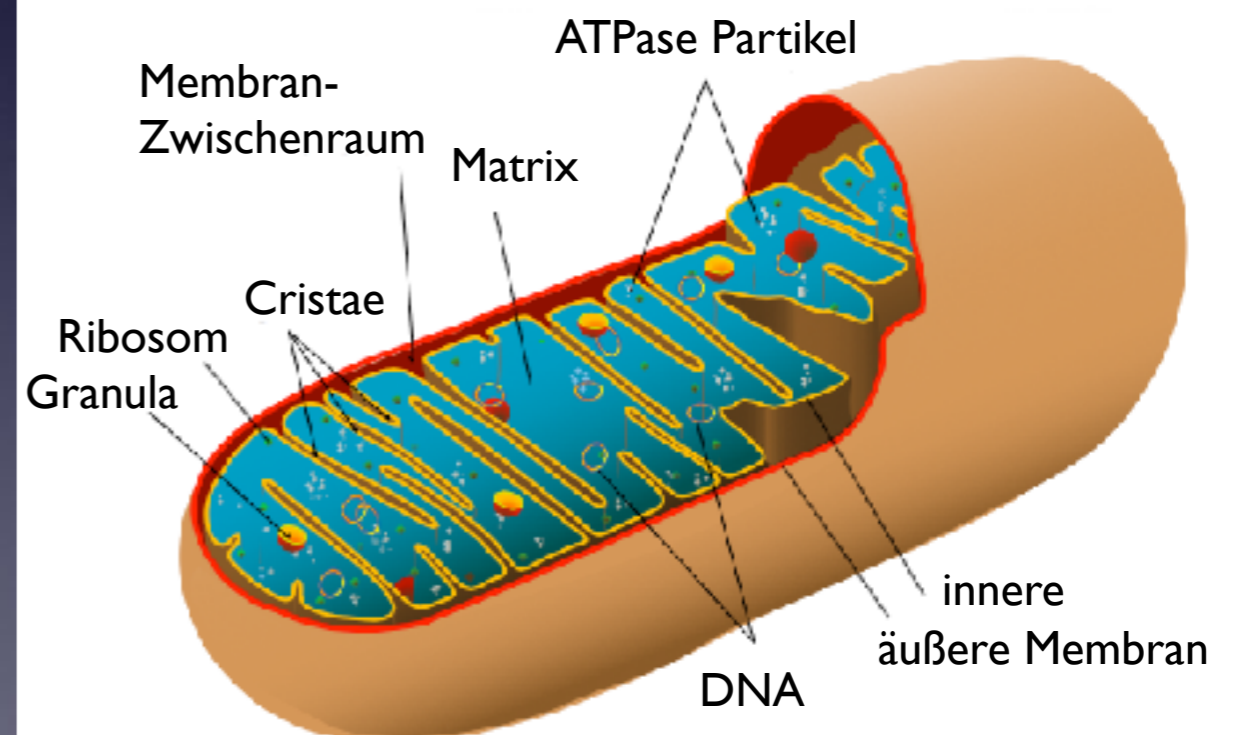
„Biochemistry starts at the slaughterhouse“

Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurden Einzelheiten des inneren Aufbaus der Mitochondrien geklärt.

Mitochondrien lassen sich auch durch Zellfraktionierung isolieren und studieren.

Viele biochemischen Vorgänge sind teils indirekt erschlossen worden.

Bildquelle: Wikipedia



## Aktuelles aus der Forschung

### **Spirostomum n. sp.**

In 2018 habe ich eine grüne Morphospezies in meiner Region gefunden

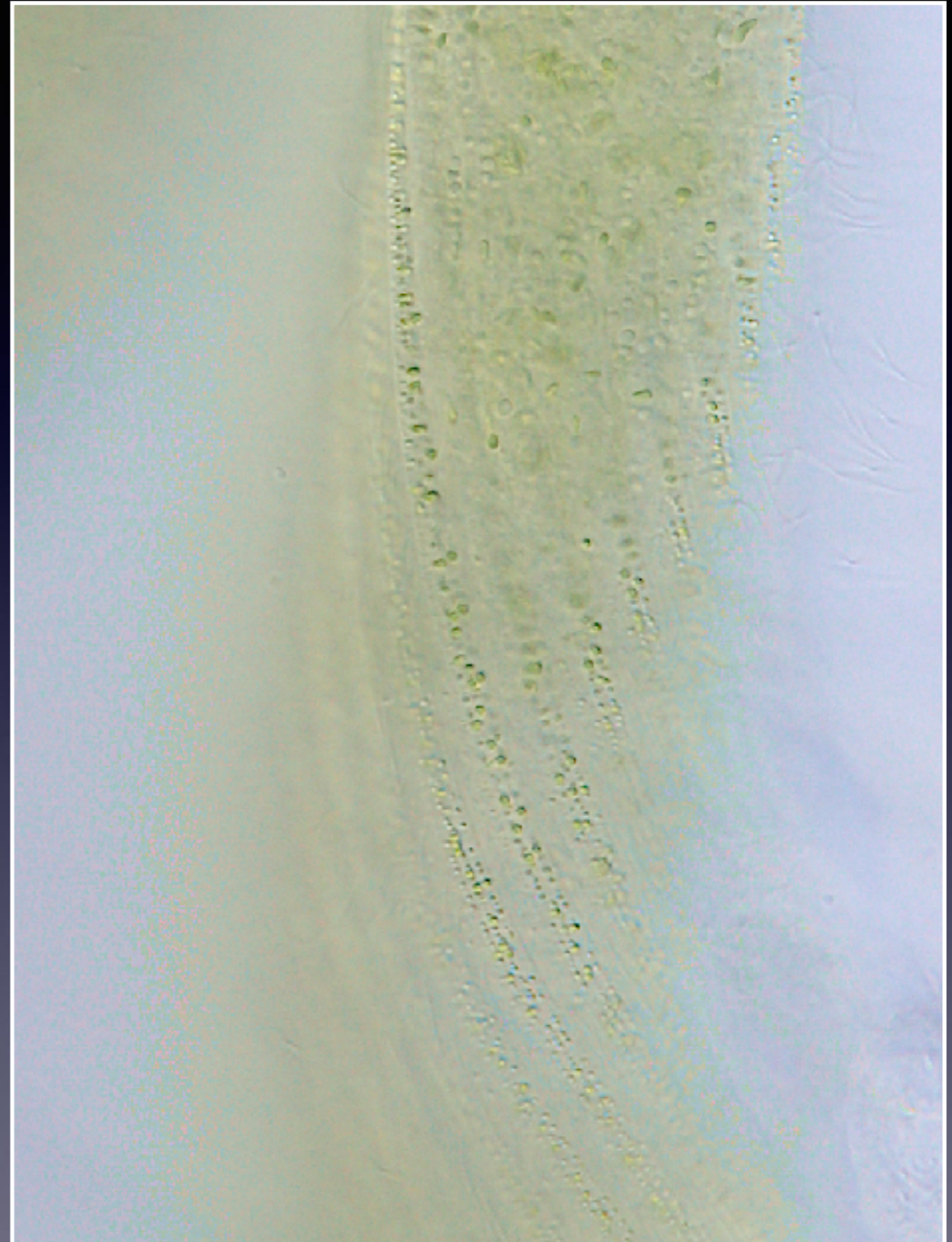
Sie erscheint bereits bei schwacher Vergrößerung im Stereomikroskop hellgrün

Keine Zoochlorellen!

Bislang existiert keine solche Beschreibung in der Literatur

Bislang bestätigte Fundorte:

Bornheim, Rheinbach, Kassel, Hannover, ...

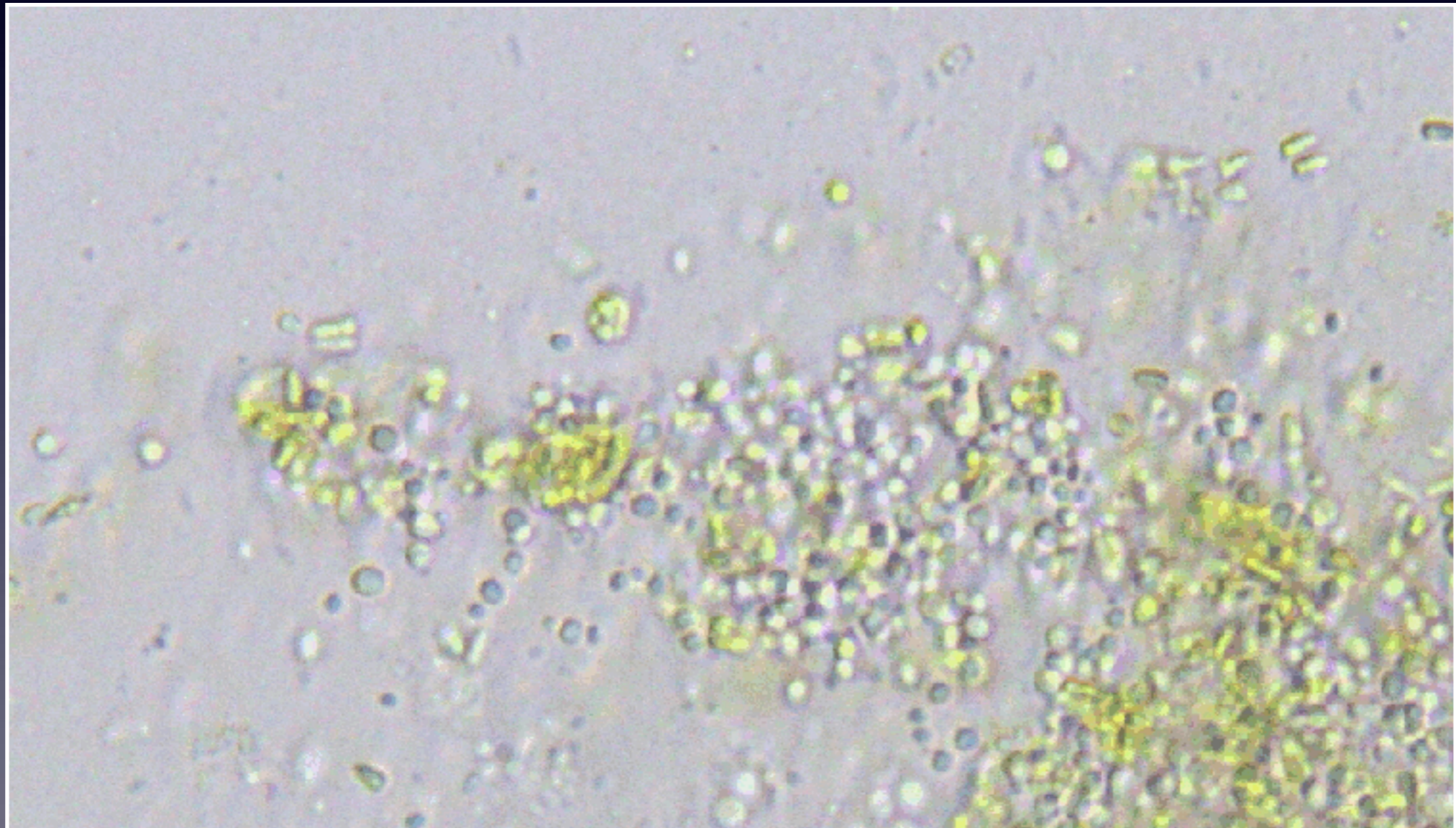




## Aktuelles aus der Forschung

### **Spirostomum n. sp.**

Fluoreszenzanalyse mit speziellen Fluorochromen hilft bei der Determinierung gefundener Organellen

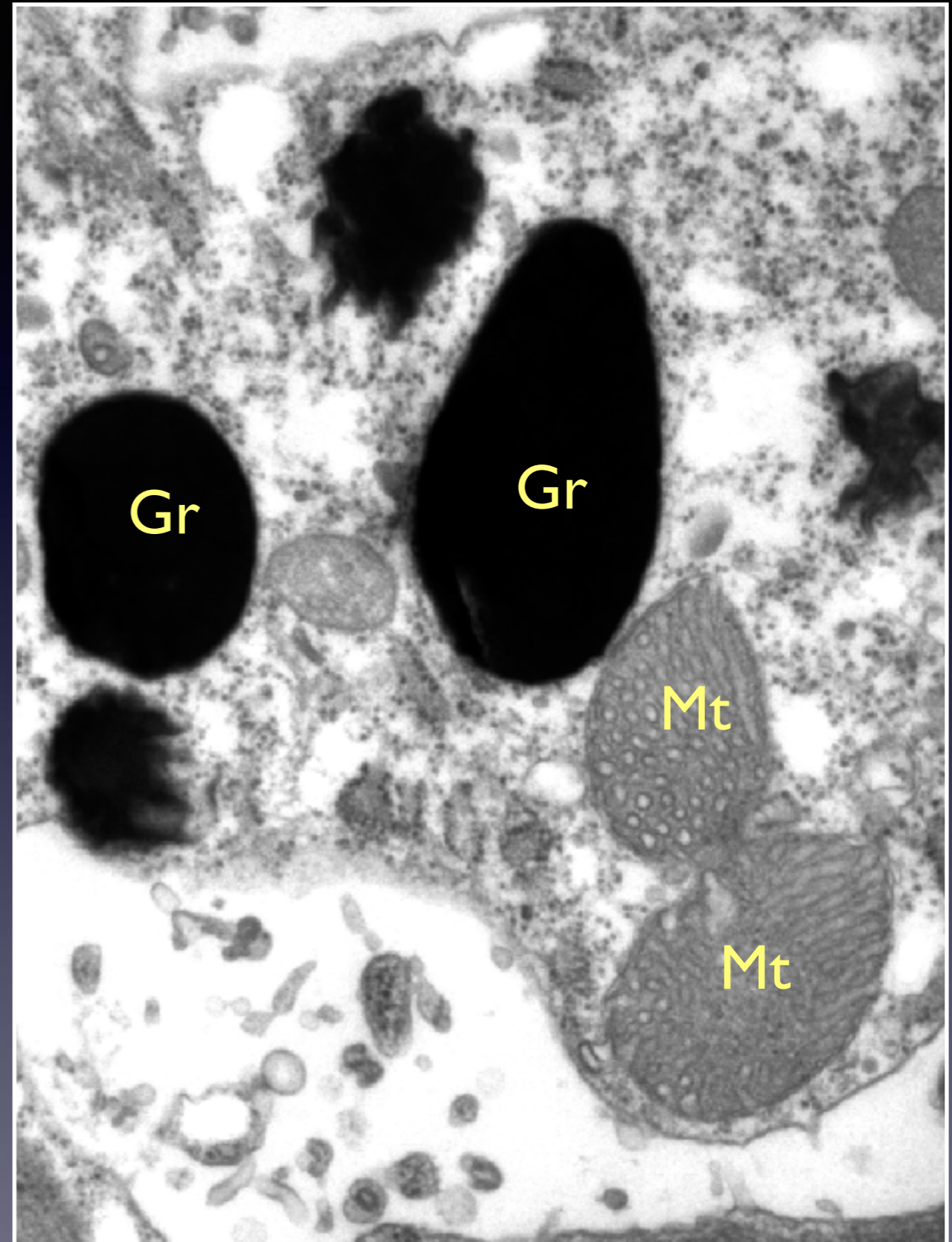


## Aktuelles aus der Forschung

### **Spirostomum n. sp.**

Mt - Mitochondrion

Gr - Grüne Organellen

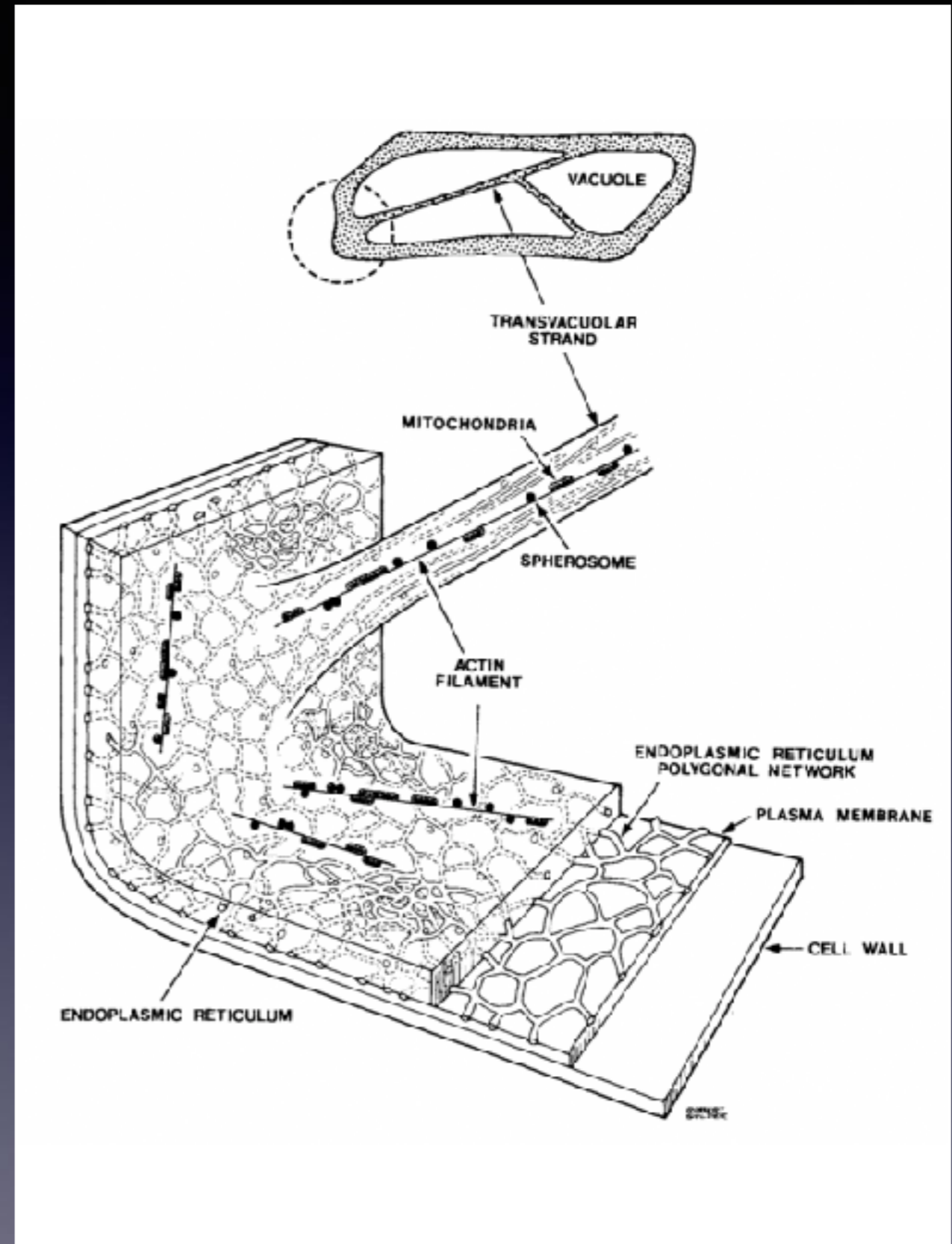


## Aktuelles aus der Forschung

# Mitochondria in Motion

Im Lichtmikroskop erkennt man bei hohem Kontrast bereits die Bewegung der Mitochondrien und Filamente entlang derer sie sich bewegen.

Vale, R. (1987). Intracellular Transport Using Microtubule-Based Motors. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 3(1), 347-378.

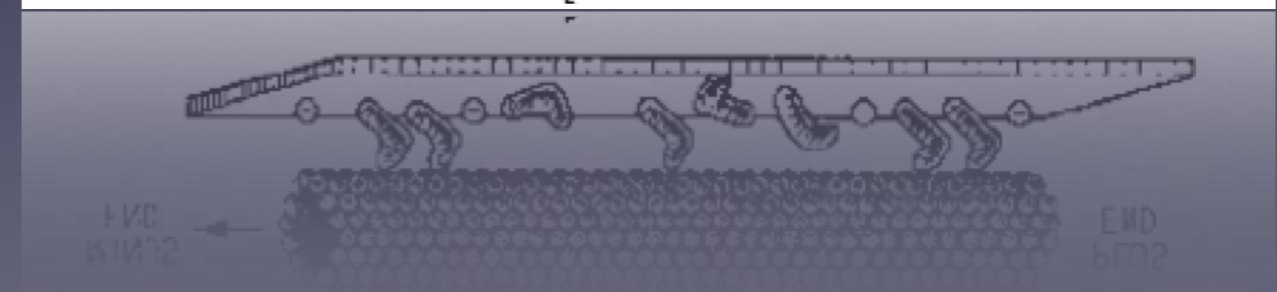
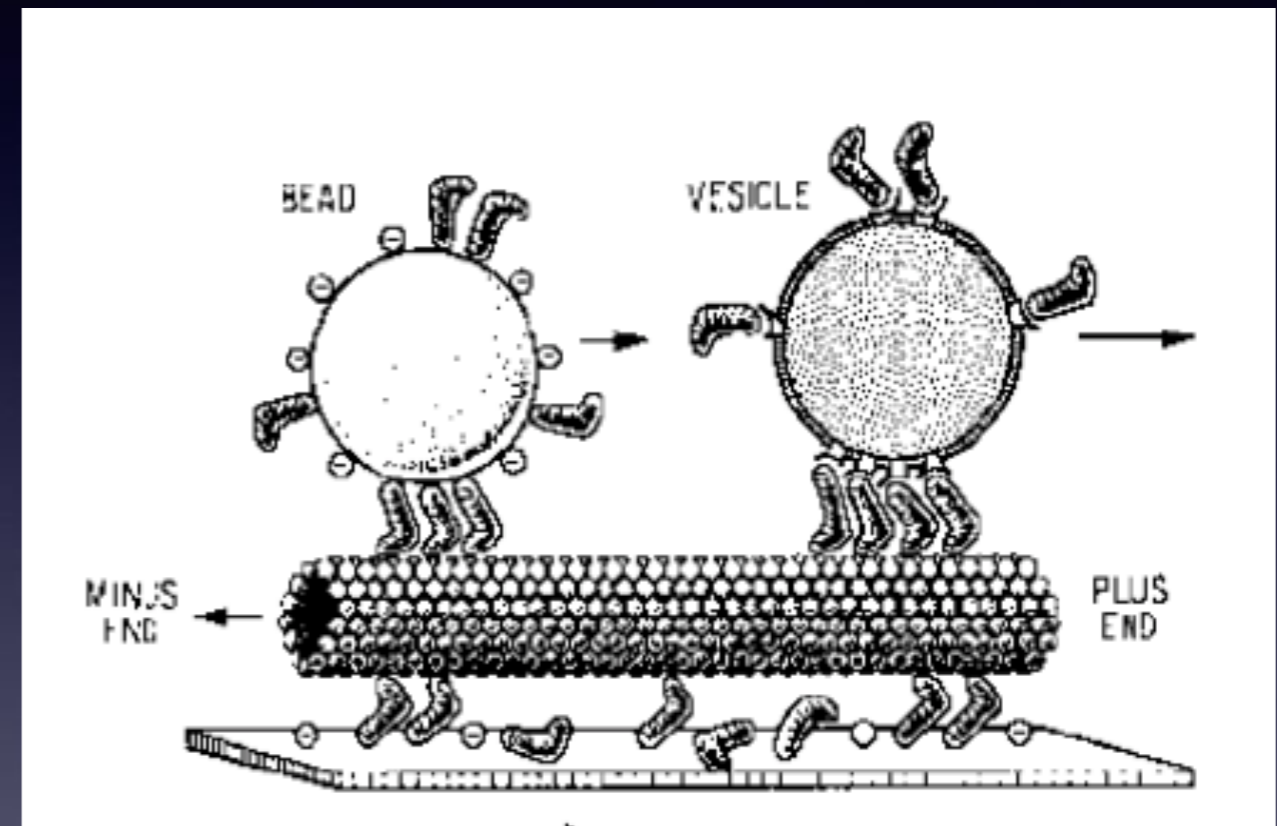


## Aktuelles aus der Forschung

# Mitochondria in Motion

Bei der Bewegung spielt das Cytoskelett eine wichtige Rolle. Mitochondrien (und andere Organellen) bewegen sich mit Hilfe von Motor-Proteinen, wie beispielsweise Myosin, entlang von Microtubuli, Filamenten aus Actin.

N. S. Allen and D. T. Brown, 1988. Cell Motility and the Cytoskeleton 10:153-163



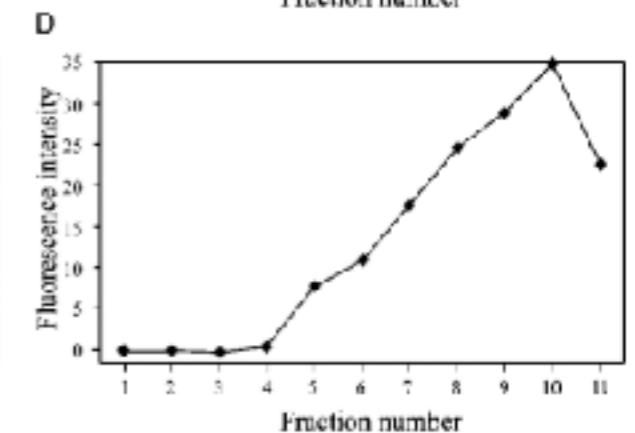
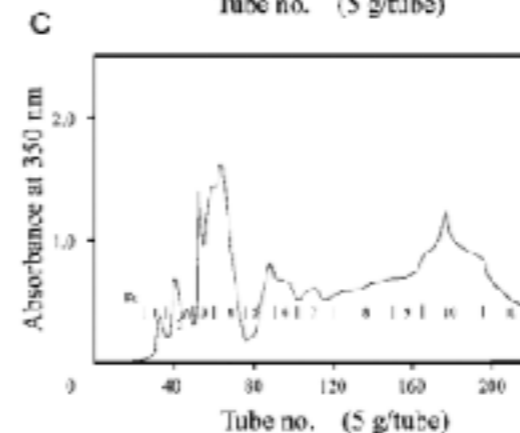
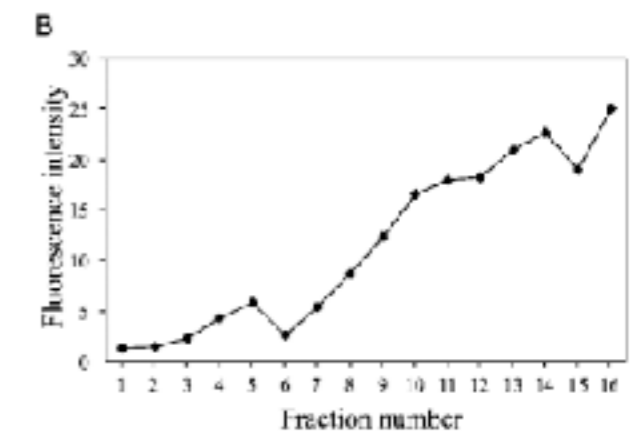
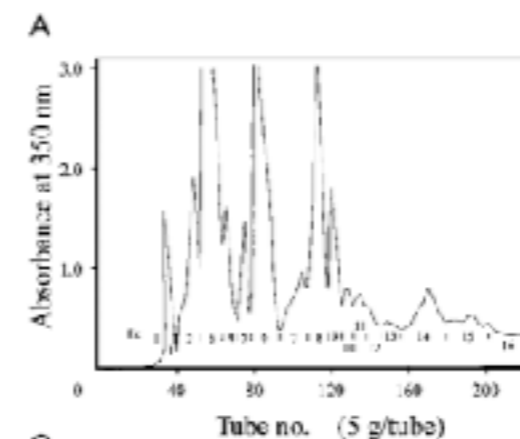
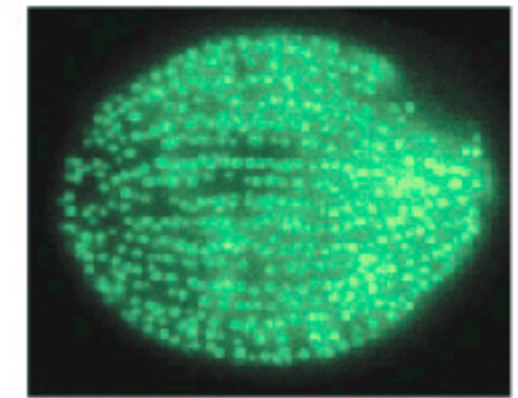
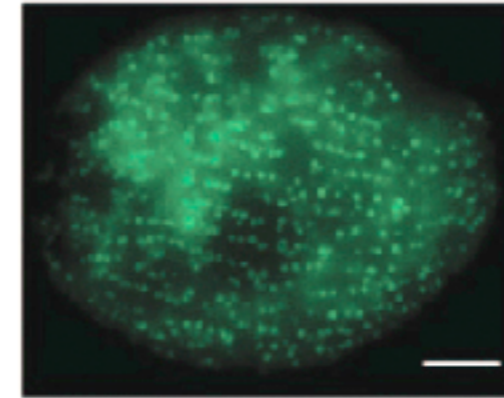
## Aktuelles aus der Forschung

# Oolong und schwarzer Tee

An dem Ciliaten Tetrahymena wurde der Einfluss der in Oolong Tee und schwarzem Tee enthaltenen Polyphenole auf das Membranpotential der Mitochondrien studiert.

Diese Antioxidantien verhindern Oxidation, beziehungsweise hemmen Reaktionen mit Sauerstoff oder der Peroxidase in den Mitochondrien.

Fujihara, Takashi, et al. High-molecular-weight polyphenols from oolong tea and black tea: purification, some properties, and role in increasing mitochondrial membrane potential. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71.3 (2007): 711-719.



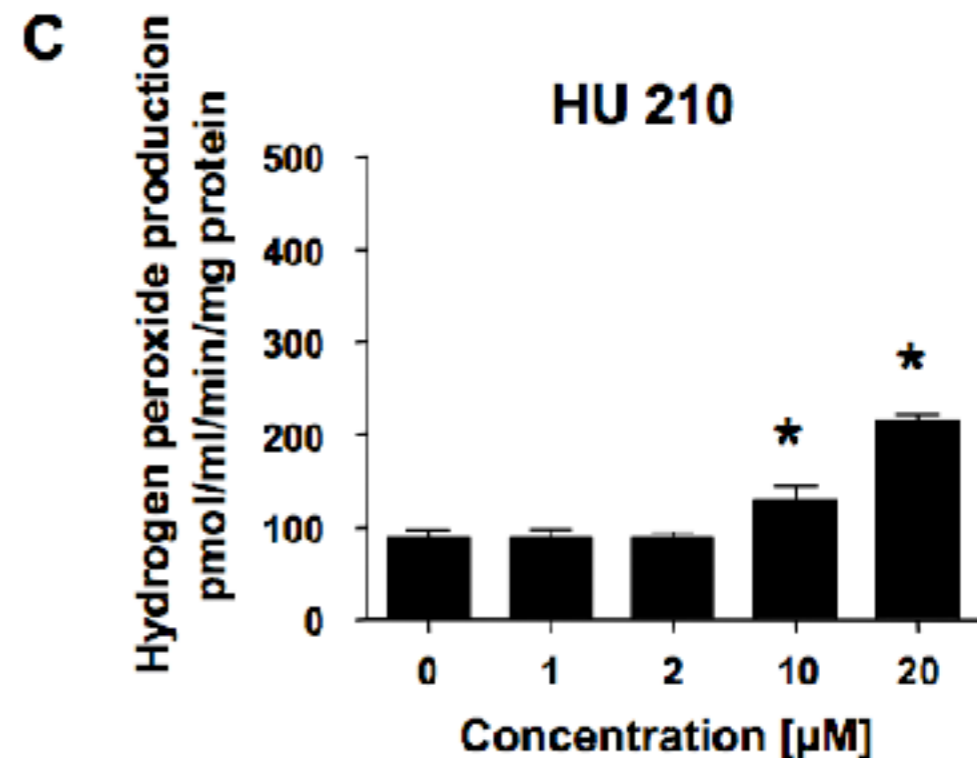
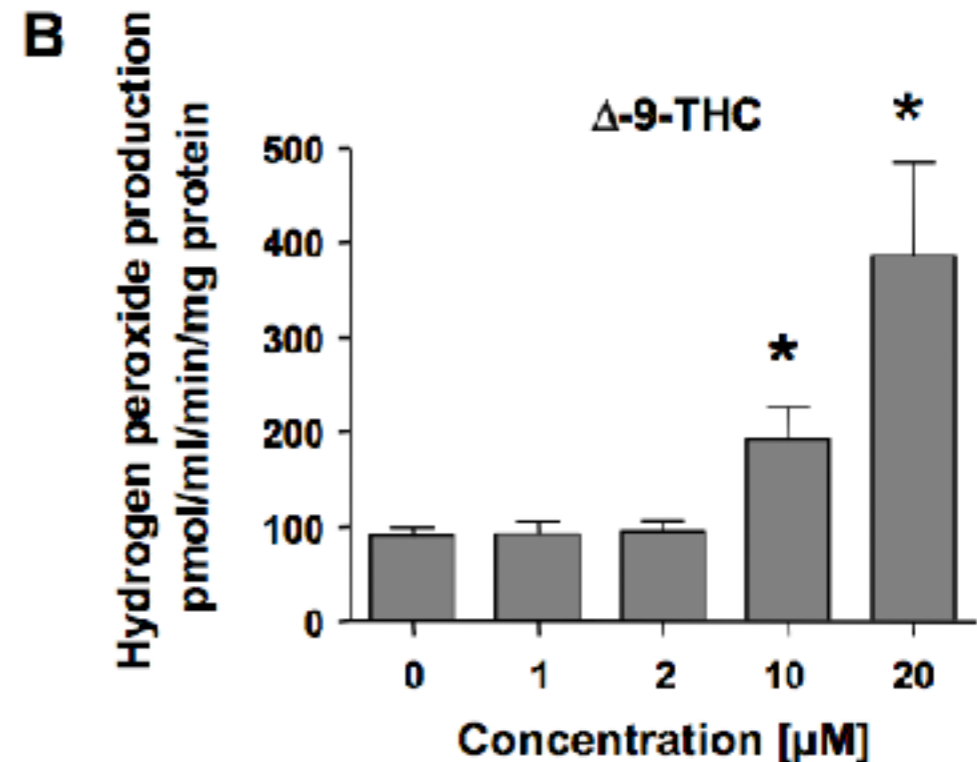
## Aktuelles aus der Forschung

### Cannabinoide

Für AEA, THC und HU 210 wurden mit Janusgrün B morphologische und chemische Veränderungen der Mitochondrien nachgewiesen.

Die Autoren merken an, dass Cannabinoide bei der Krebstherapie positive Effekte haben können, bei genetischer Preposition oder Dysfunktion der Mitochondrien jedoch schädlich wirken.

Athanasiou, A., et al. Cannabinoid receptor agonists are mitochondrial inhibitors: a unified hypothesis of how cannabinoids modulate mitochondrial function and induce cell death. *Biochem. and biophys. res. comm.* 364.1 (2007): 131-137.



Concentration [µM]

0 1 2 10 20

## Life-Style

# Antiaging Produkte

Basierend auf den wissenschaftlichen Befunden hat sich ungeachtet der Diskussion ihrer Aussagen eine ganze Industrie entwickelt. Sie möchte die positiven Aussagen zu Mitochondrien aufgreifen und hieraus diverse Produkte als Anti-Aging Mittel anbieten.

Die pharmazeutische Wirksamkeit der Substanzen kann nicht belegt werden. NADH wird gewöhnlich in den Mitochondrien aus zugeführtem Vitamin B3 gebildet (v.a. Fleisch und Fisch).

The advertisement features a woman's face in the top right corner. The logo 'MT' is in the top left. The main text reads 'Antiaging Concept nach Univ.Prof. Müller-Tyl'. Below this is a table with the following content:

Alterung	Die Mitochondriale Theorie d
Theorie des Alterns	Mitochondrien sind Organellen die sich prakt über den roten
Ursache und Folgen	Blutkörperchen finden. Mitochondrien sind die B für 90% der ATP
Anti-Aging Medizin	Produktion der ATP in die Interaktion
Latest news:	Kreisen, dem Zitronensäurezyklus (ETC). Mitochrosphorylisati-
	ektivität, die so wie
	Atmen versch die Hilfe des
	ekt wird, gle radikal.

Below the table are two bottles of supplements. The left bottle is labeled 'NADH sublingual' and 'Dr. med. Michalzik'. The right bottle is labeled 'Mitochondrium forte' and 'Dr. med. Alexander Michalzik'. There are also some pills and capsules scattered around the bottles.

## Aktuelles aus der Forschung

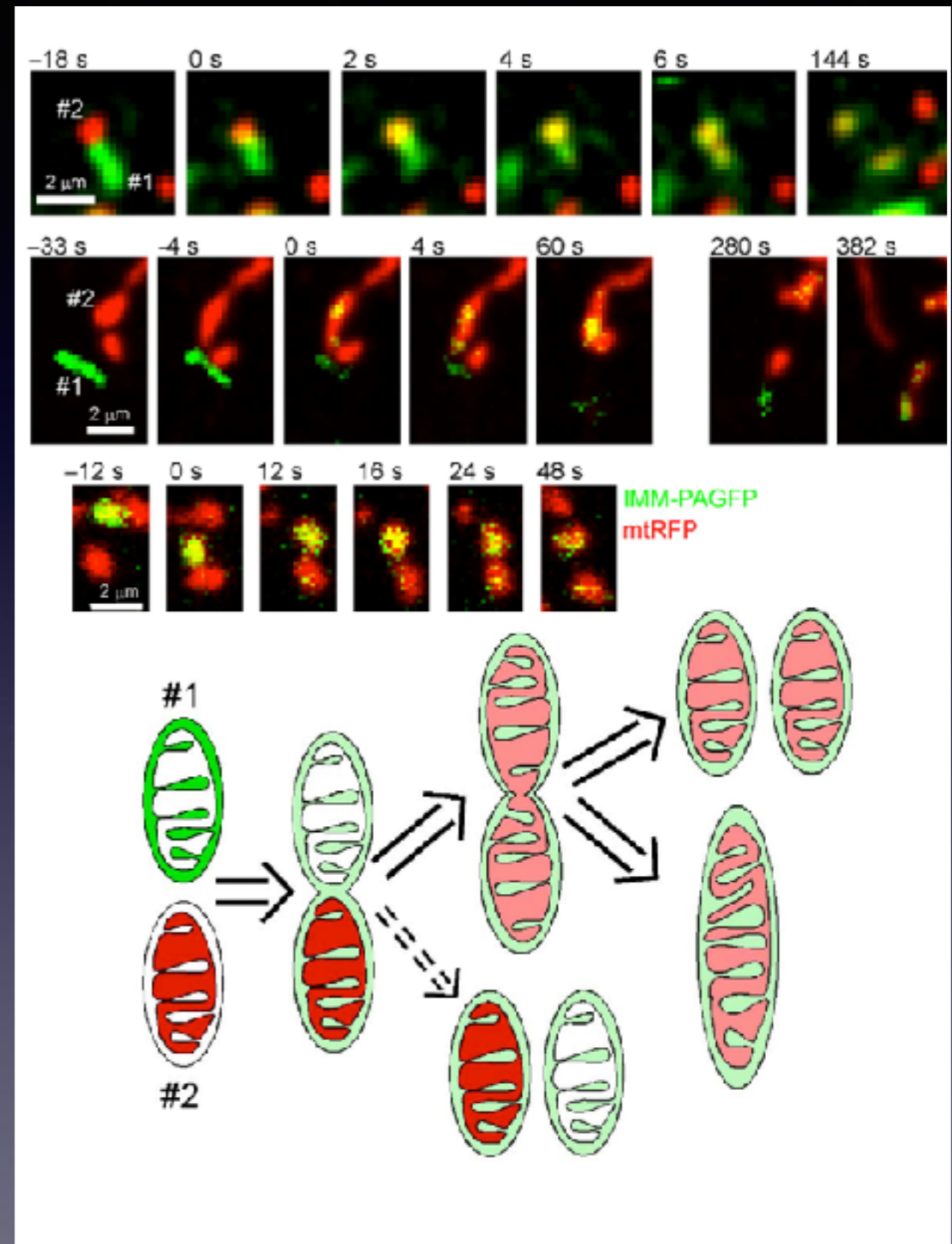
# Teilung und Fusion

Analog zu den Protozoen können sich Mitochondrien teilen und vereinigen.

Die Beobachtungen können bereits im Phasenkontrast beobachtet werden, wurden mit dem Elektronenmikroskop, und neuerdings auch mit neuen Fluoreszenz-Methoden näher untersucht und bestätigt.

Bereiter-Hahn, J., and M.Vöth. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microscopy research and technique* 27.3 (1994): 198-219.

Liu, Xingguo, et al. Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion–fission dynamics. *The EMBO journal* 28.20 (2009): 3074-3089.





## Aktuelles aus der Forschung

# Endosymbionten Theorie

Prokaryoten: „Bakterien“

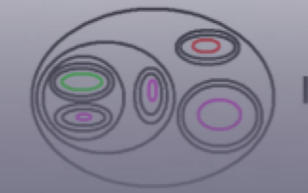
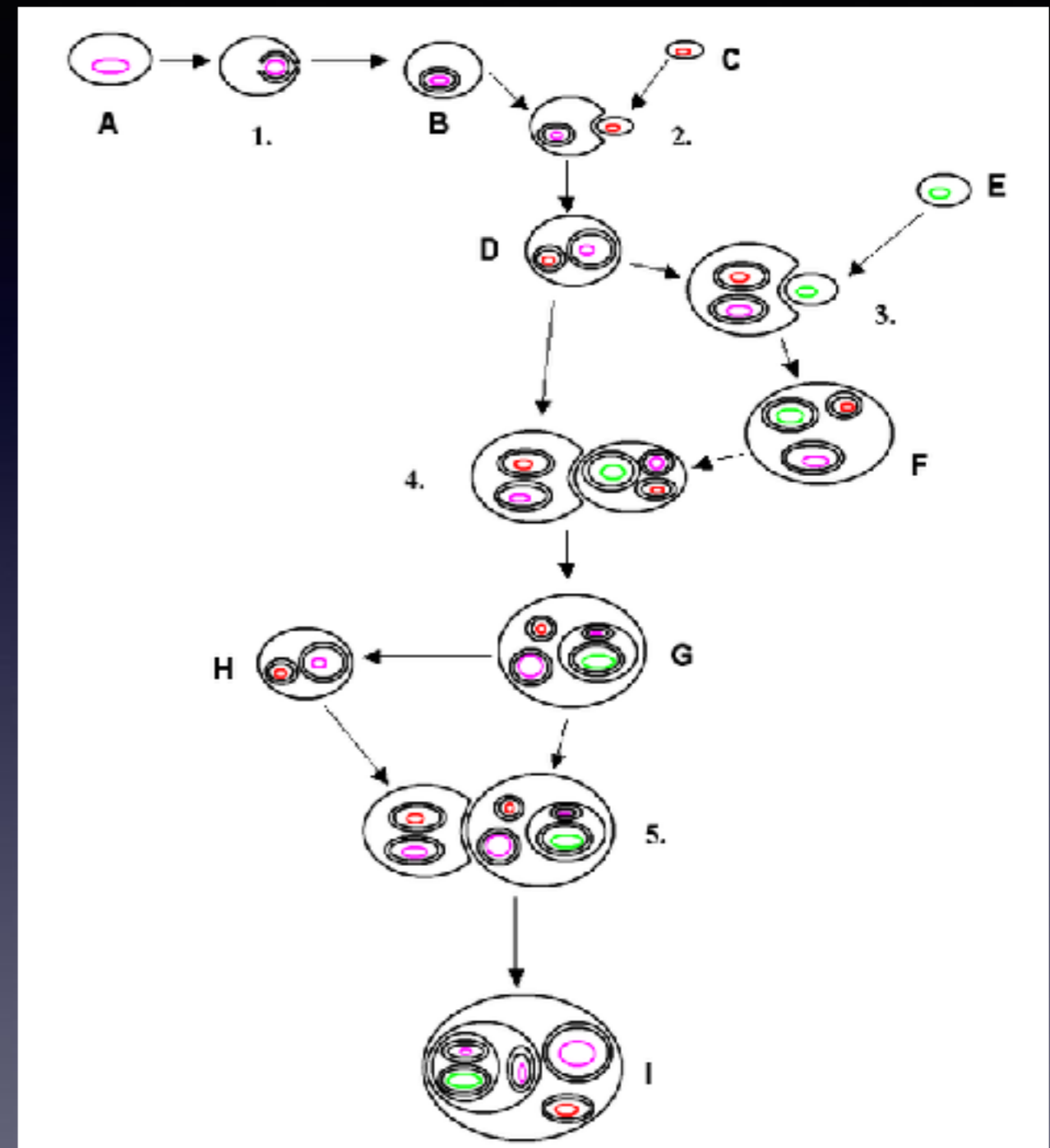
Eukaryoten: Tiere, Pflanzen, Pilze

Man nimmt heute an, dass Mitochondrien (und Chloroplasten) sich als eigenständige Lebewesen entwickelt haben und später von den Eukaryoten „assimiliert“ wurden.

Zahlreiche Nachweise: Mitochondrien besitzen eine eigene DNA, etc.

A. F.W. Schimper: Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. In: Bot. Z. Band 41, 1883, S. 102–113.

Bildquelle: Wikipedia



## Aktuelles aus der Forschung

### Quizfrage

Welche maximal Auflösung leistet ein gewöhnliches Lichtmikroskop?

- A. 1  $\mu\text{m}$
- B. 220 nm
- C. 196 nm
- D. 60 nm
- E. 15 nm



## Aktuelles aus der Forschung

# Auflösungsgrenze?

In 2019 ist es mit einem Zeiss LSM 880 erstmals gelungen mit einem Lichtmikroskop die Cristae (innere Membranen) der Mitochondrien sichtbar zu machen.

Man kann jetzt die Biochemie in den lebenden Mitochondrien sichtbar machen und obendrein studieren, wo genau sie geschieht.

Ein Quantensprung verglichen mit der Elektronenmikroskopie...

Zeiss in 2021: **60 nm Auflösung!**

Wolf, D. M., Segawa, M., Kondadi, A. K., Anand, R., Bailey, S. T., Reichert, A. S., ... & Shirihai, O. S. (2019). Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent. *The EMBO journal*, 38(22), e101056.

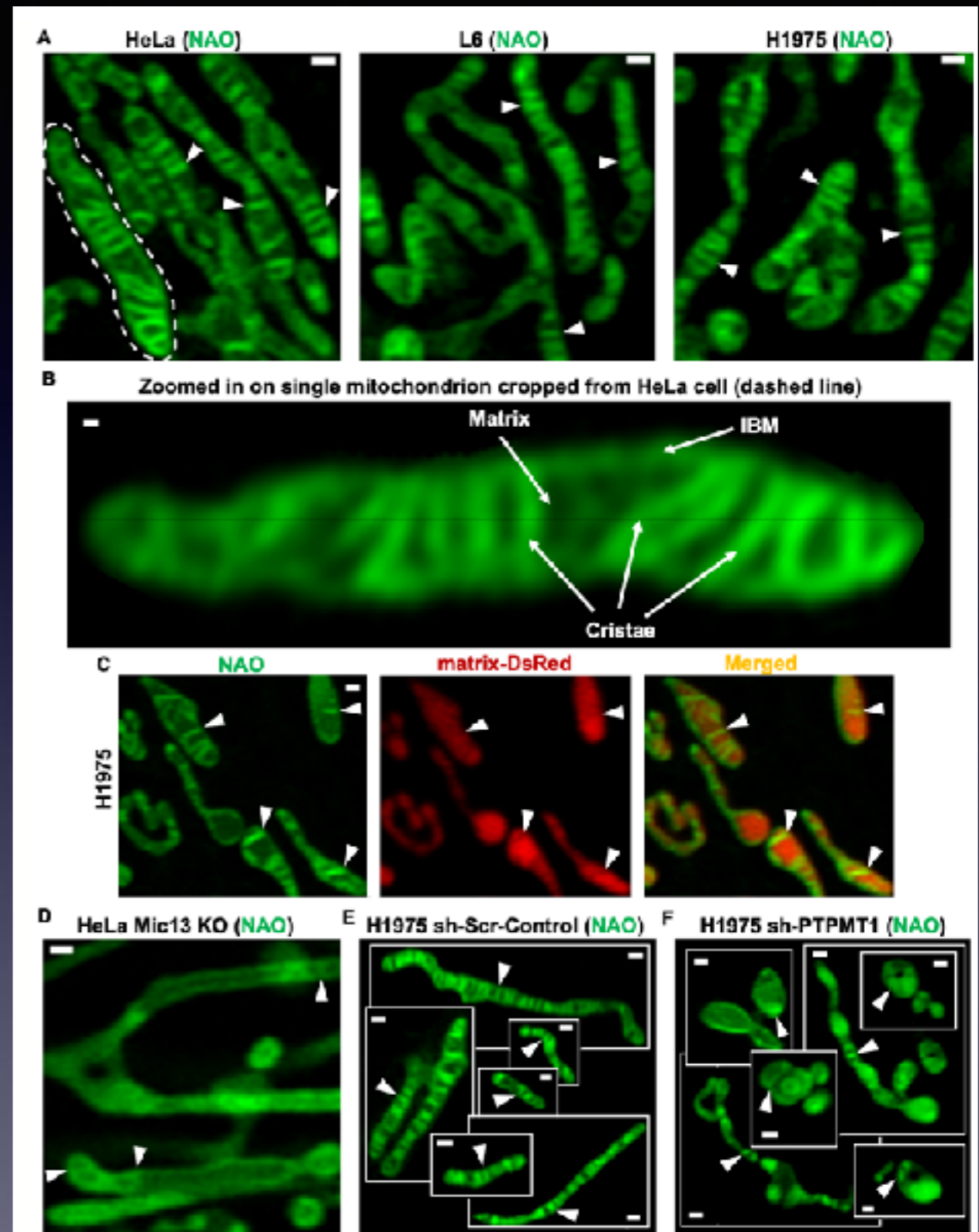


Figure 1.

Figure 1.



## Praktischer Teil

- Schiefe Beleuchtung einstellen
- Zwiebelhäutchen in schiefer Beleuchtung
- Färben mit Janusgrün B
- Fluoreszenz: Nonyl-Acridinorange

## Praktischer Teil

### Schiefe Beleuchtung

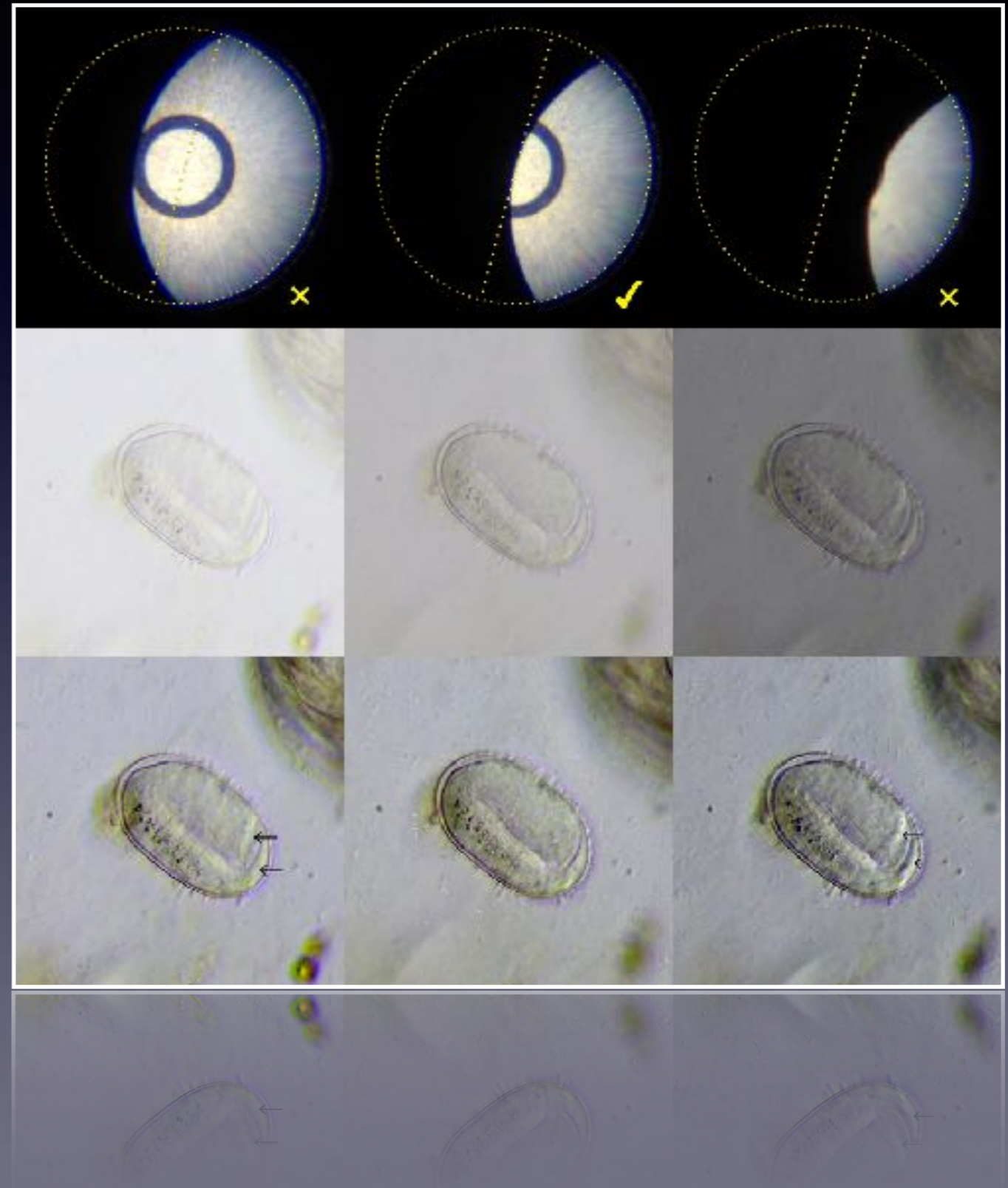
Okular herausnehmen und hintere Ebene des Objektivs betrachten.

**Optimum bei exakt halbseitiger Ausleuchtung der Pupille** von der Mitte bis zum Rand.

Die nachträglich angeglichenen Abbildungen mit der Digitalkamera belegen dies.

Nur die mittlere Einstellung ist frei von breiten Lichtern und Schatten.

**Weiterer Vorteil:** Bei exakt mittiger Justage kann man das Objektiv wechseln, ohne die Beleuchtung nachjustieren zu müssen.

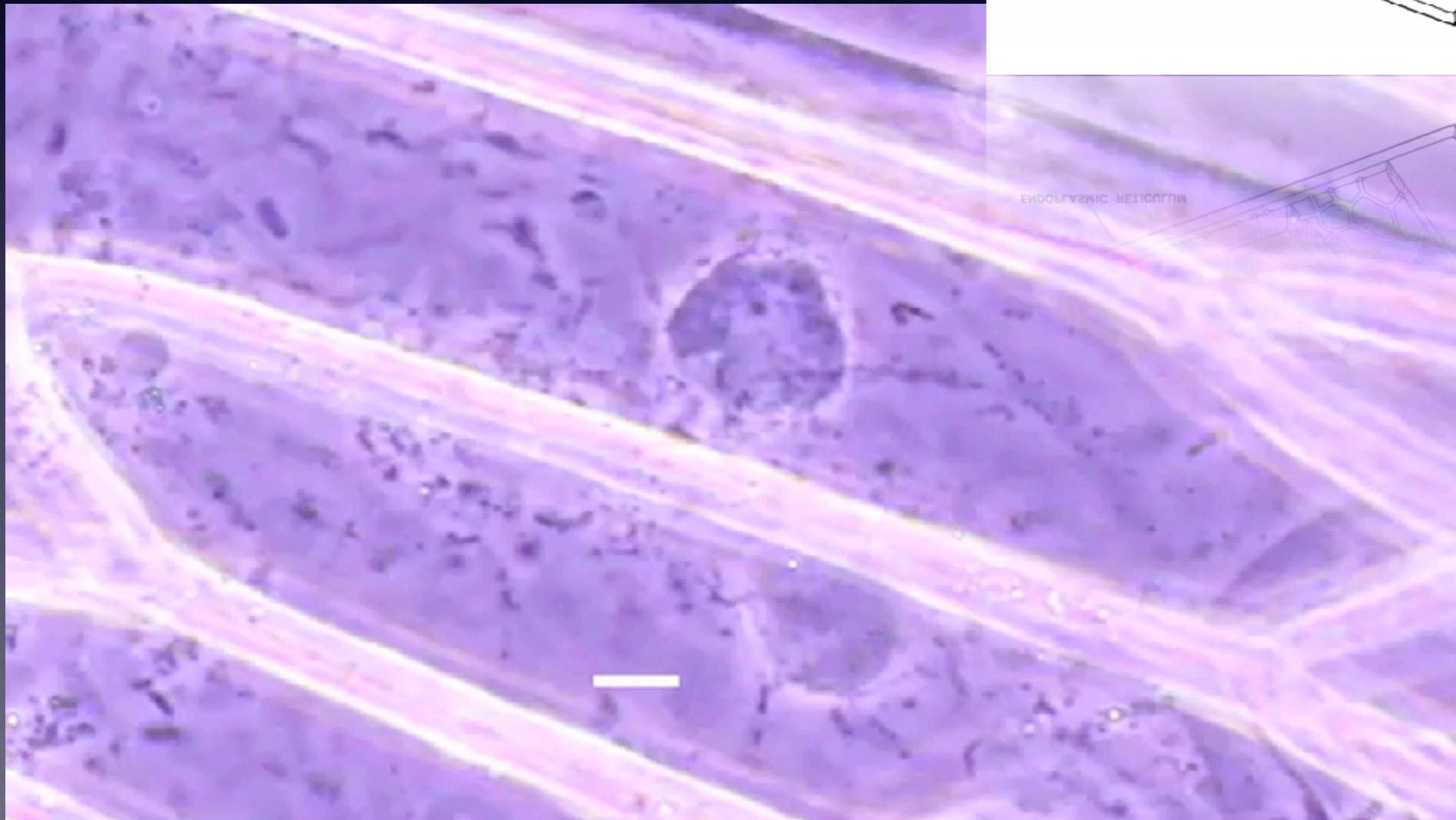
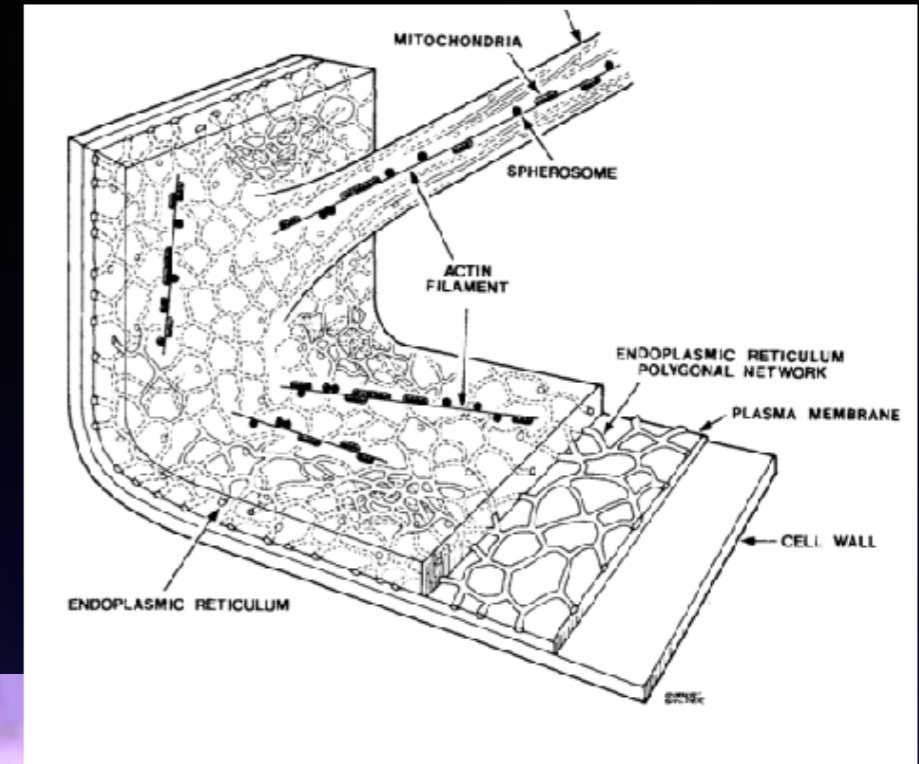


# Praktischer Teil

## I. Bewegung der Mitochondrien

Zwiebelhäutchen... Objektiv 40x...

Schiefe Beleuchtung oder Phasenkontrast



## Praktischer Teil

# Janusgrün B

1. Farbstoff Janusgrün B 1:5 verdünnen
2. Ein Zwiebelhäutchen in die Farbstofflösung geben
3. Etwa 5-10 Minuten in der feuchten kammer inkubieren
4. Alternativ: Sofortige Beobachtung der Färbewirkung

Michaelis, Leonor: Die vitale Färbung, eine

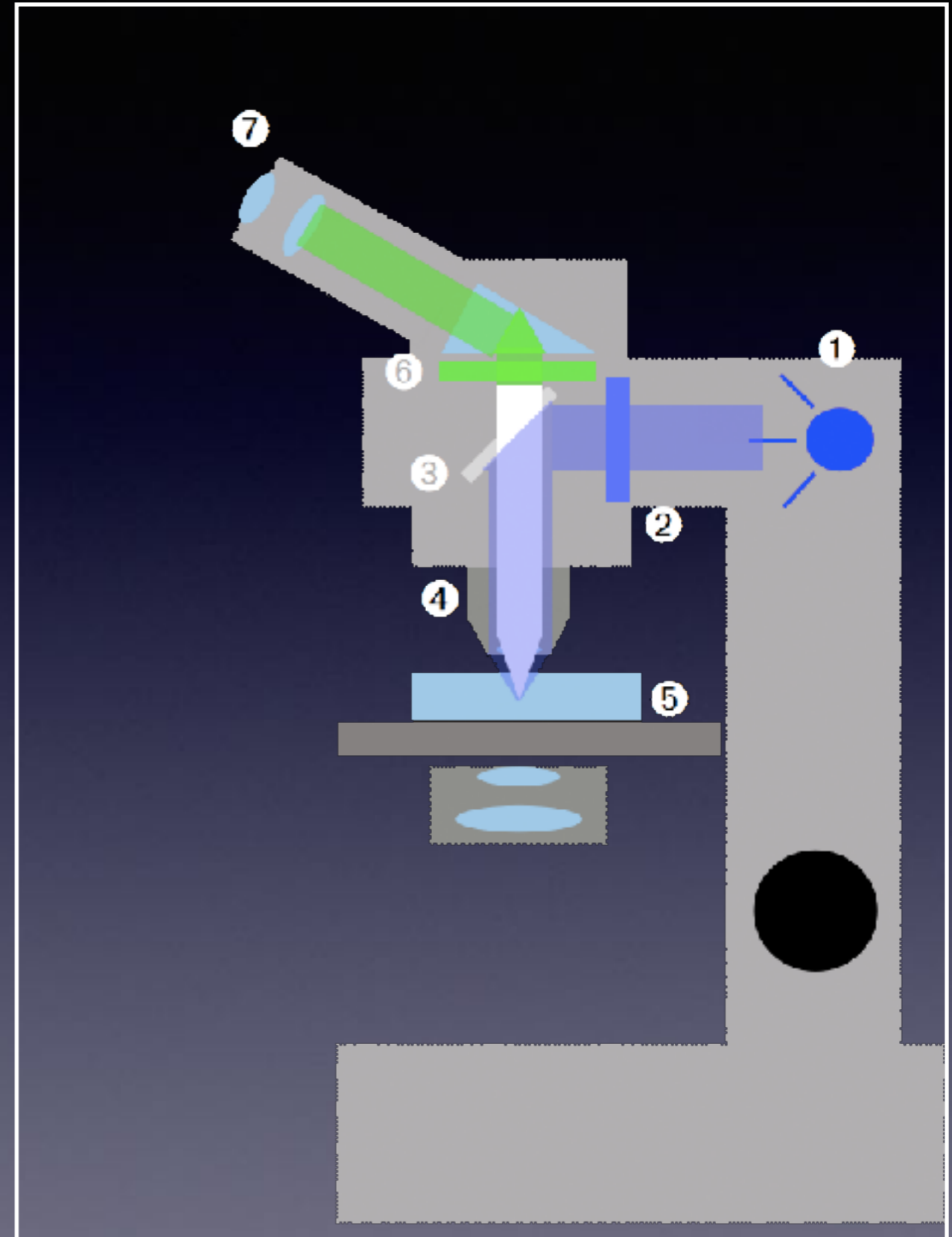


## Praktischer Teil

# Fluoreszenzmikroskop

Aufbau:

- ① Lichtquelle
- ② Anregungsfilter
- ③ Dichroitischer Strahlteiler
- ④ Objektiv
- ⑤ Fluoreszierendes Präparat
- ⑥ Sperrfilter (Emissionsfilter)
- ⑦ Okular / Kamera





## Praktischer Teil

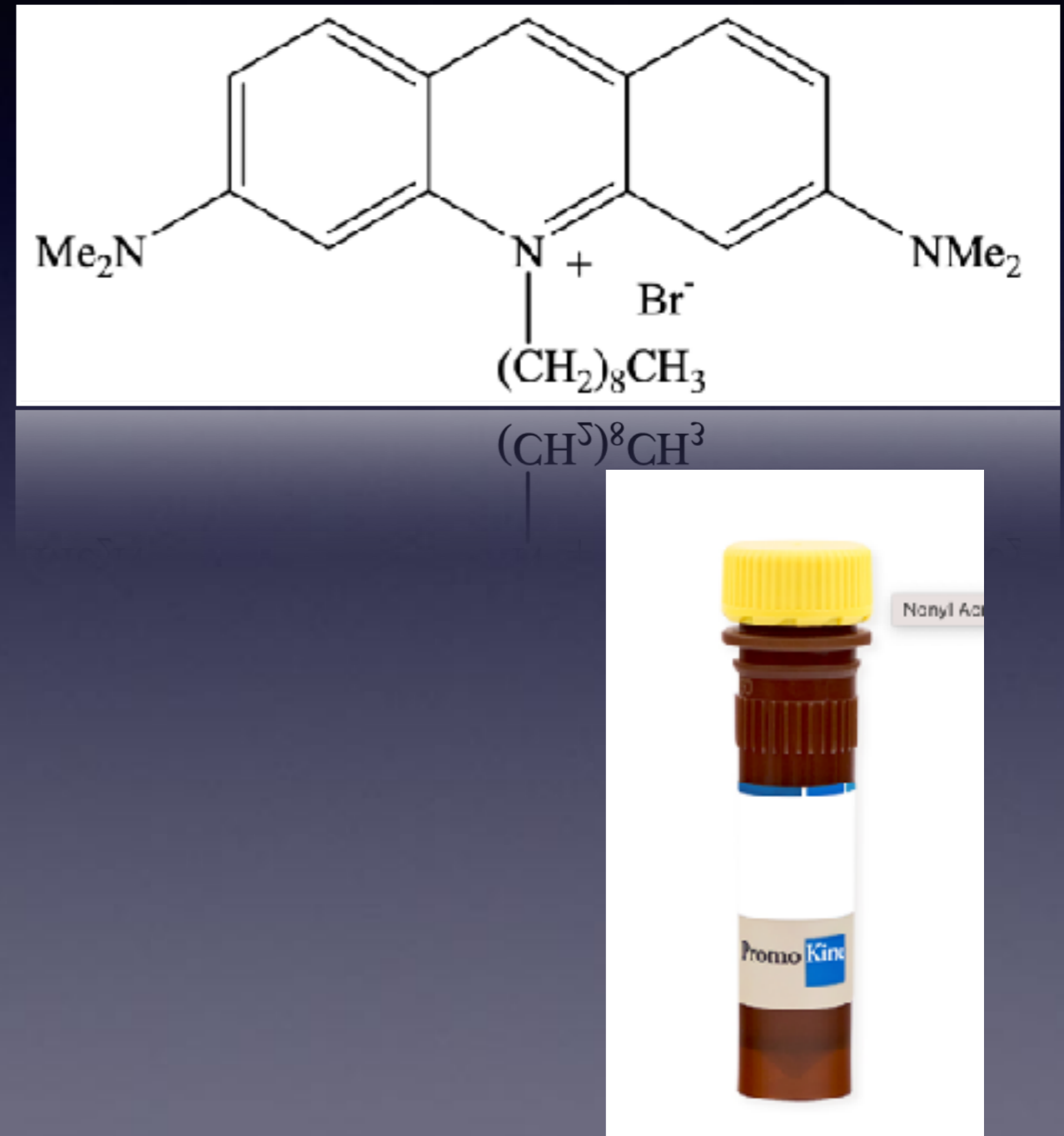
# Nonyl-Acridinorange

1. Ein Derivat des Acridinorange
2. Färbt Cardiolipin, also Stoffe, die in den Membranen der Mitochondrien vorhanden sind
3. Anregung bei 470 nm (blau)
4. Fluoreszenzfarbe: **Grün** (519 nm)

### Aufgabe:

Ein wässriges Präparat seiner Wahl (5 Teile) mit 1 Teil Nonyl-Acridinorange mischen. Etwa 5 Minuten inkubieren in der feuchten Kammer.

Ab unter das Fluoreszenzmikroskop!



# Übersicht Mito-Färber

Farbstoff	Lichtmikrosk	Fluoreszen	Wirkung
Anilin Fuchsin	+		siehe L. Michaelis, siehe auch Säurefuchsin
Brilliantkresylblau	+	+	widersprüchliche Literaturangaben
DiOC <sub>x</sub> (3), DiSC <sub>x</sub> (3), DiIC <sub>x</sub> (3)		+	Carbocyaningruppe DiRC <sub>x</sub> (3) mit O, S, oder I = C(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
DiOC <sub>6</sub> (3)		+	konzentrationsabhängig, Mitochondrien und ER
Eisenhämatoxylin	+		Zellkern, Mitochondrien, Plasma (unspezifisch)
Janusgrün B	+		Reduktion von Hydrogenase, färbt auch DNA
MitoTracker Green		+	spezifisch, proprietäre Verbindung
MitoTracker Red		+	spezifisch, proprietäre Verbindung
Pyronin Y		+	RNA, Mitochondrien
Rhodamin B		+	unsicher, lipophiler Charakter
Rhodamin 6G		+	spezifisch, Membranpotential, Mitochondrien und ER
Rhodamin 123		+	spezifisch, Membranpotential
Säurefuchsin	+		nach Altmann, Mitochondrien und Zellkern