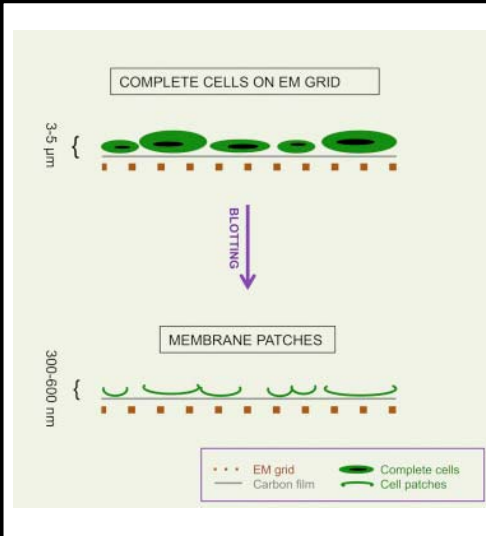


iMEM: Isolation of Plasma Membrane for Cryoelectron Microscopy

Camille F. Peitsch, Sven Beckmann, Benoît Zuber

Structure

November 2016



Institut für Anatomie

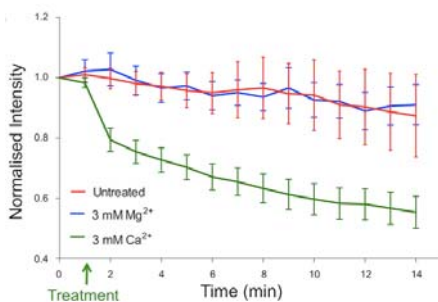
Universität Bern

iMEM: Isolation of Plasma Membrane for Cryoelectron Microscopy

von Benoît Zuber
 editiert von Markus Kipp (LMU München)

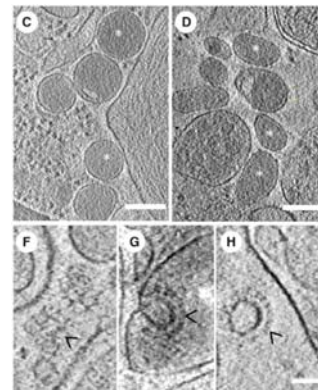
Die Plasmamembran und der Aktin-Zellkortex sind wesentliche Bestandteile eukaryotischer Zellen. Sie grenzen die Zelle gegen äußere Einflüsse ab und bestimmen die Zellform, welche eine wichtige Rolle für diverse Zellfunktionen spielt. An der Plasmamembran selbst finden dabei eine Vielzahl biochemischer und physiologischer Reaktionen statt. Mittels Kryoelektronenmikroskopie (kurz, Kryo-EM) kann die Feinstruktur der Plasmamembran und die des Zellkortex mit sehr hoher Auflösung untersucht werden. Dafür werden die Proben rasch eingefroren (vitrifiziert) und bei tiefen Temperaturen (ca. -180°C) ohne chemische Fixation und Entwässerung betrachtet. Über oben genanntes Verfahren bleibt die Feinstruktur bis auf nahezu atomarer Ebene erhalten.

Die meisten eukaryotischen Zellen sind nach Probenvitifizierung zu dick für eine direkte kryo-EM-Analyse, und müssen deswegen erst zu dünneren Proben verarbeitet werden. Zu diesem Zweck kann ein Kryoultramikrotom oder eine Ionenfeinstrahlanlage verwendet werden. Beide Verfahren sind sehr zeitaufwendige Methoden. Wir haben eine schnellere Alternativmethode entwickelt. Dabei werden Zellen zuerst direkt auf einem Netzchen zur Elektronenmikroskopie kultiviert. Anschließend wird das Kulturmedium mittels Filterpapier entfernt. Hierbei werden die Zellen geöffnet und das Zytoplasma gespült. Die basolaterale Zellmembran und die damit assoziierten Proteine verbleiben dabei auf dem Netzchen und sind somit für eine Kryo-EM-Analyse dünn genug.



Quantifizierung der kalziumabhängigen Exozytose bei isolierten Membranpatches von PC-12 Zellen anhand von Zeitraffer-Aufnahmen
 Diese Resultate zeigen, dass die Membranpatches exozytosefähig sind.

Auf diese Weise ist die zytoplasmatische Seite der Plasmamembran nun direkt für Pufferlösungen zugänglich. Hierdurch wird die Auslösung biochemischer und physiologischer Prozesse, wie beispielsweise Exozytose, ermöglicht. Auch lassen sich Strukturelementen wie *dense core vesicles* und Clathrin-Gitter im Detail analysieren.



Kryo-EM Bilder isolierter Membranpatches aus PC-12 Zellen
 Oben: Mehrere „dense core vesicles“. Unten: Clathrin-Gitter, Clathrin coated-pit, und Clathrin-coated vesicle.

Weitere Informationen

Institut für Anatomie
 Universität Bern
benoit.zuber@ana.unibe.ch