



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT



ulm university

universität

uulm

**Entwicklung und Untersuchung einer neuartigen,
strukturerhaltenden Präparationsmethode
wässriger Polymersysteme zur
TEM-Charakterisierung**

Diplomarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades
eines Diplom Chemikers (Dipl. Chem.)
eingereicht an der
Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Ulm

von

Johannes Andreas Maria Hepperle
geboren am 18.08.81 in Ehingen (Donau)

Mainz, den 28. Juli 2009

Max-Planck-Institut für Polymerforschung

Max Planck Institute for Polymer Research



Amtierender Dekan:

Prof. Dr. Peter Bäuerle

1. Gutachterin:

Prof. Dr. Katharina Landfester

2. Gutachter:

PD Dr. Ulrich Ziener

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung	5
2. Grundlagen und Methoden.....	7
2.1. Polymerkapseln und die Miniemulsionstechnik	7
2.1.1. Die Miniemulsion.....	7
2.1.2. Polyurethane und Polyharnstoffe	8
2.2. Das Transmissionselektronenmikroskop	9
2.3. Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie	11
2.3.1. Auftropf-Methode	12
2.3.2. Kontrasierung.....	13
2.3.3. Einbettung und Ultramikrotomie.....	14
2.3.4. Chemische Fixierung	15
2.3.5. Hochdruckgefrieren.....	16
2.3.6. Gefriersubstitution.....	19
3. Experimenteller Teil.....	23
3.1. Verwendete Chemikalien und Geräte	23
3.2. Präparation der Proben fürs TEM.....	24
3.2.1. Darstellung der Polyurethankapseln	24
3.2.2. Vorbereitungen für Präparation der HeLa-Zellen	24
3.2.3. Präparation der HeLa-Zellen und der Polymere für die HPF.....	25
3.2.4. Herstellung des Substitutionsmediums	26
3.2.5. Durchführung der Kryosubstitution und Einbettung.....	27
3.2.6. Anfertigung von Schnitten am Mikrotom	28

4. Ergebnisse und Diskussion	29
4.1. Vergleich von verschiedenen Lösemitteln bei der Gefriersubstitution unbehandelter HeLa-Zellen	30
4.1.1. Methanol als Substitutionsmedium	30
4.1.2. Tertahydrofuran als Substitutionsmedium.....	31
4.1.3. Aceton als Substitutionsmedium	33
4.2. Methodenvergleich: chemische Fixierung und Kryo-Präparation	34
4.3. Kryo-Präparation von Polymeren.....	35
4.4. Vergleich verschiedener Präparationsmethoden von Polymeren zur elektronenmikroskopischen Untersuchung.....	39
4.4.1. Auftropfen von Polyurethankapseln	39
4.4.2. Kontrastierung in Dispersion	41
4.4.3. Kryo-Präparation.....	42
4.5. Anwendung der Kryo-Präparation zur Analytik von Polymeren ..	45
4.5.1. Langzeitstabilität der Polyurethankapseln.....	45
4.5.2. Nachweis von verkapselten, goldmarkierten Antikörpern.....	46
5. Zusammenfassung	49
6. Literatur	51

1. Einleitung

Die Transmissionselektronenmikroskopie ist aufgrund der hohen Ortsauflösung eine leistungsstarke Charakterisierungsmethode, die sowohl in der Materialwissenschaft als auch für biologische Fragestellungen eingesetzt wird. So hat die morphologische Untersuchung von Zellen mittels Transmissionselektronenmikroskopie einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der zellulären „Nanomaschinen“^[1] geliefert und detaillierte Einblicke in die Zellbestandteile ermöglicht^[2]. Um jedoch von den Vorteilen des Transmissionselektronenmikroskopie zu profitieren, muss die untersuchte Probe bestimmte Anforderungen zwingend erfüllen: Die Probe muss einerseits so dünn sein, dass sie für den Elektronenstrahl transparent ist und andererseits muss sie „hochvakuumfest“ sein, d.h. sie darf im Hochvakuum nicht ausgasen bzw. verdampfen. Biologische Systeme wie z. B. Zellen oder Zellgewebe erfüllen diese beiden Voraussetzungen in allgemeinen nicht und können nur durch entsprechende Präparation in ein „transmissionselektronenmikroskoptaugliches“ Präparat überführt werden. Die Überführung einer wasserhaltigen, relativ dicken biologischen Probe in eine trockene, elektronen-transparente Form ist insofern eine große Herausforderung an die Präparationstechnik, da sich mit jedem Eingriff die ursprüngliche Morphologie der Probe ändern kann. Ziel der Präparation ist es daher, die untersuchte Struktur möglichst artefaktfrei im TEM abzubilden.

Es gibt eine Reihe von Präparationsmethoden, die an die jeweiligen Proben angepasst sind. So werden metallische und keramische Proben mit Hilfe eines Ionenstrahls gedünnt und Polymere werden zumeist zu ultradünnen Schnitten mikrotomiert. Biologische Proben sind üblicherweise feucht, und man muss daher erst das Wasser entfernen. Hierzu gibt es mehrere etablierte Möglichkeiten:

Bei der chemischen Fixierung wird die Probe zunächst fixiert, dann das enthaltene Wasser schrittweise gegen ein organisches Lösemittel ausgetauscht. Anschließend wird die Probe kontrastiert und in ein Harz eingebettet. Von diesen eingebetteten Proben werden im Anschluss ultra-dünne Schnitte angefertigt.

Eine verbesserte Methode ist das Hochdruckgefrieren^[3], mit anschließender Gefriersubstitution und Einbettung der Proben in ein Harz. Sie stellt zurzeit die aussichtsvollste Vorgehensweise dar, eine Probe so nah wie möglich in ihrem natürlichen Zustand abzubilden.

In der Zukunft jedoch wird Kryo-TEM^[4] einen immer höher werdenden Stellenwert einnehmen, da nur mittels Kryo-TEM eine hinreichend artefaktfreie Untersuchung biologischer und auch polymerer Systeme möglich ist, ohne dass diese vorbehandelt werden müssen^[5]. Allerdings ist diese Methode weitestgehend beschränkt auf wässrige Systeme mit kleinen (< 100 nm) Objekten und auch die Präparationsparameter sind für jedes System unterschiedlich. Letzteres führt dazu, dass für neue Proben die Präparation erst aufwendig optimiert werden muss.

In der vorliegenden Arbeit sollen die bisherigen Ergebnisse der Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie aus den biologischen Anwendungen auf Polymere übertragen werden. Speziell empfindliche Systeme wie Kapseln oder Vesikel, die bisher kaum in ihrer natürlichen Form im Transmissionselektronenmikroskop (kurz: TEM) dargestellt werden konnten, sollen betrachtet werden.

Bei der Darstellung von zellulären Proben im TEM hat sich die Methode des Hochdruckeinfrierens mit anschließender Gefriersubstitution etabliert. Ziel der Arbeit ist es, dieses Präparationsverfahren auf wässrige Suspensionen von Polymerpartikeln bzw. Kapseln zu übertragen. Ein solcher Ansatz wurde bisher noch nicht in der Literatur beschrieben, obwohl diese Präparationsmethode viele Vorteile gegenüber bereits etablierten Methoden hat. Die hergestellten Proben sind formgetreu, d.h. es sind keine morphologischen Artefakte zu erwarten. Zweitens werden mit dieser Methode Schnitte mit einer einheitlichen Dicke angefertigt, wodurch man einen Querschnitt des entsprechenden Partikels erhält. Und zum Dritten sind diese TEM-Präparate sehr elektronenstabil (im Gegensatz zu Kryo-TEM Präparaten) und eröffnen damit auch alle analytischen Möglichkeiten wie Röntgenfluoreszenzspektroskopie (EDX) oder Elektronenenergieverlustspektroskopie (EELS).

Sollte es also gelingen, das Hochdruckeinfrieren mit anschließender Gefriersubstitution als standardisierte Methode auf polymere Systeme zu übertragen, so hat man eine sehr leistungsfähige Präparationsmethode an der Hand, die sowohl für morphologische als auch analytische, transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen ein Zugewinn ist.

2. Grundlagen und Methoden

2.1. Polymerkapseln und die Miniemulsionstechnik

Die Synthese von Polymernanokapseln spielt sowohl in der Wissenschaft als auch in der Industrie eine große Rolle^[6]:

Sie bieten verschiedenste, interessante Möglichkeiten, wie zum Beispiel die Verkapselung von Wirkstoffen, die dann gezielt freigesetzt werden können. Ebenso können Kapseln als Mikroreaktoren dienen, indem vor der Polymerisation eine nicht aktive Spezies der dispersen Phase zugegeben wird und diese nach der Polymerisation aktiviert wird^[7].

Polymernanokapseln werden hauptsächlich durch inverse Miniemulsion hergestellt. Dabei handelt es sich um eine Heterophasenpolymerisation mit Bildung kleiner, homogener Tröpfchen, bei denen auch während der Polymerisation die Tröpfchenidentität erhalten bleibt. Jeder Tropfen kann dabei als Nanoreaktor aufgefasst werden, die unabhängig voneinander sind.

2.1.1. Die Miniemulsion

Miniemulsionen bestehen aus kleinen, homogenen Tröpfchen, die durch wenig Tensid stabilisiert sind. Große Scherkräfte, zum Beispiel durch Ultraschall, bewirken, dass diese homogenisiert werden. Durch den Einsatz eines hydrophoben, osmotisch wirkenden Reagenz wird die Ostwaldreifung unterdrückt. Dadurch wird verhindert, dass große Tröpfchen auf Kosten kleinerer Tröpfchen wachsen, was für die Homogenität und Stabilität der Miniemulsion wichtig ist.

Durch die Zugabe eines hydrophoben Materials zur dispersen Phase vor der Homogenisierung wird dieses im Verlauf der Polymerisation eingekapselt.

Bei der inversen Miniemulsion (siehe Abbildung 1) bildet Wasser die disperse Phase und ein organisches Lösemittel die kontinuierliche Phase. Dadurch ist es möglich, hydrophile Materialien zu verkapseln. Ein gutes System hierfür ist die Herstellung von Polyurethan- und Polyharnstoffkapseln, da sich das Monomer, ein Polyol oder

Polyamin, in der dispersen Phase und das Comonomer TDI in der kontinuierlichen Phase löst und somit die Polyaddition nur an der Grenzfläche stattfinden kann.

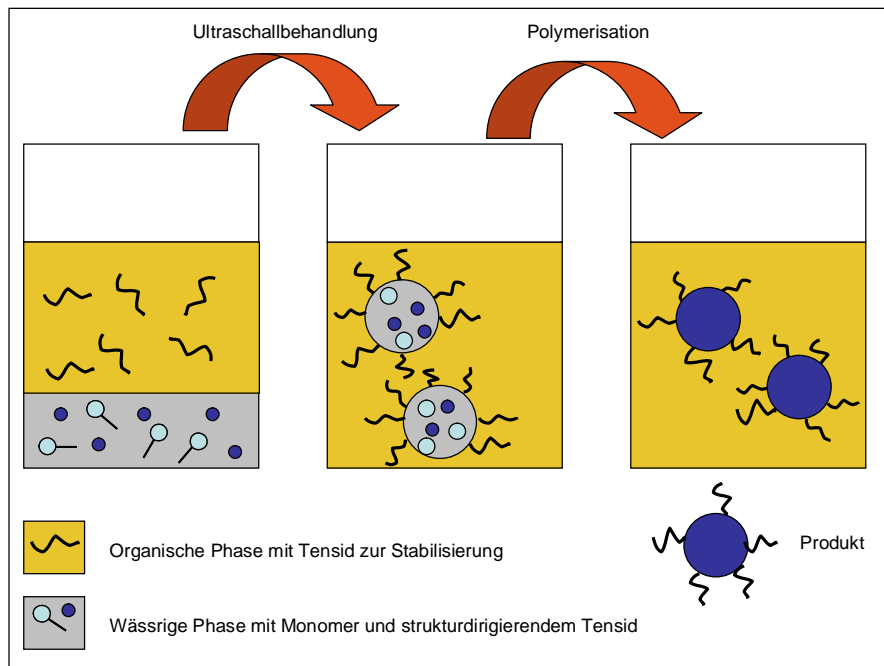


Abbildung 1: Herstellung einer inversen Miniemulsion.

2.1.2. Polyurethane und Polyharnstoffe

Polyurethane werden durch eine Polyadditionsreaktion aus Polyisocyanaten und Polyolen hergestellt (siehe Abbildung 2)^[8]. Dabei reagiert das positiv polarisierte C-Atom der Isocyanatgruppe mit der OH-Gruppe des anderen Moleküls. Bei dieser Reaktion erfolgt keine Abspaltung von Nebenprodukten.

Für die verwendeten Kapseln wurde TDI als Isocyanat verwendet. Als zweites Monomer dienten verschiedene Polyole, wie z.B. Hexandiol, Stärke und Milchsäure.

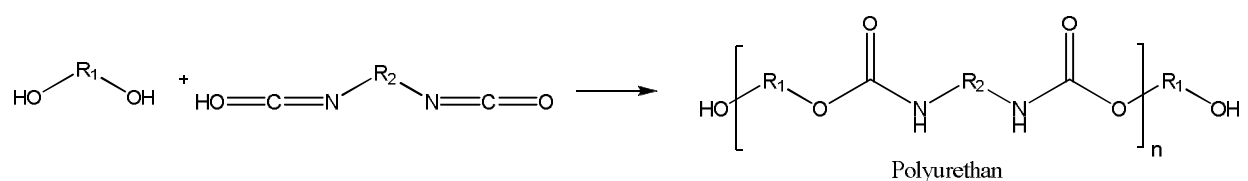


Abbildung 2: Reaktionsschema zur Bildung eines Polyurethans.

Polyharnstoffe können durch Reaktion von Polyaminen mit Polyisocyanaten hergestellt werden (siehe Abbildung 3). Die Reaktion läuft analog der Bildung von Polyurethanen ab.

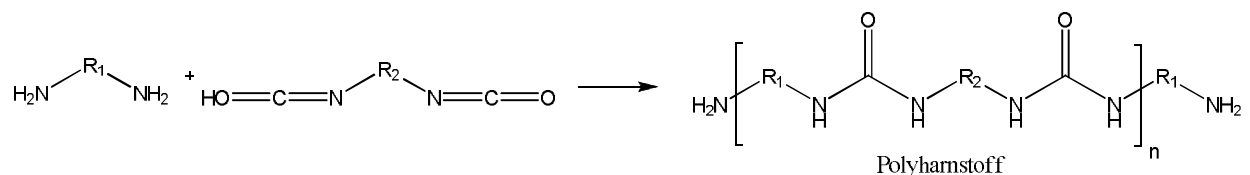


Abbildung 3: Reaktionsschema zur Bildung von Polyharnstoff.

2.2. Das Transmissionselektronenmikroskop

Prinzipiell ist der Aufbau eines Transmissionselektronenmikroskops^[9] (kurz TEM) dem eines Lichtmikroskops äquivalent. Ebenso wie ein Lichtmikroskop besteht ein TEM aus einer Quelle, dem Beleuchtungssystem (Kondensator) und dem Abbildungssystem mit Objektiv- und Projektionslinse. Ebenso muss für beide Mikroskope die Probe transparent für die jeweilige Sonde sein.

Durch die Verwendung von Elektronen als Sonde besitzt ein TEM jedoch ein wesentlich höheres Auflösungsvermögen als ein Lichtmikroskop, da die Wellenlänge von Elektronen (bei entsprechender Energie) viel kleiner als die des sichtbaren Lichts ist. Die maximal erreichbare Auflösung in einem Mikroskop ist durch Beugungseffekte auf etwa die halbe Wellenlänge der verwendeten Sonde beschränkt (Abbe'sche Abbildungstheorie^[10]). Dadurch können Abstände im atomaren Bereich sichtbar gemacht werden. Der Aufbau eines TEMs ist in Abbildung 4 schematisch dargestellt. In der Elektronenquelle werden Elektronen erzeugt und in Richtung Anode beschleunigt. Im Beleuchtungssystem wird der aus der Anode austretende, divergente Elektronenstrahl erst fokussiert und dann zu einem parallelen Strahl geformt, der die Probe durchdringt. Anschließend fokussiert die Objektivlinse den Strahl und erzeugt das erste, vergrößerte Bild. Wie auch im Lichtmikroskop bestimmt die Qualität dieser Linse das Auflösungsvermögen des Mikroskops. Im weiteren Verlauf des Strahlengangs folgt dann das Projektionssystem, um eine weitere

Vergrößerung des Bildes zu erreichen. In einem TEM können Vergrößerungen von 50 bis zu 1000000fach erreicht werden. Das Abbild der Probe wird schließlich auf einem Fluoreszenzschirm sichtbar und kann mittels einer CCD-Kamera unterhalb des Schirms dokumentiert werden.

Beim Durchdringen der Elektronen durch eine Probe kommt es entweder zu einer elastischen oder unelastischen Streuung. Bei der unelastischen Streuung wechselwirken die Elektronen mit den Elektronenhüllen der Probenatome unter Energieverlust. Dabei gilt, je höher die Massendicke der Probe ist, desto größer ist die Probe. Dagegen erfolgt bei der elastischen Streuung eine Wechselwirkung mit den positiven Atomkernen ohne Energieverlust, aber mit einer Richtungsänderung.

Diese beiden Wechselwirkungsmechanismen sind es letztlich, die einem TEM gegenüber einem Lichtmikroskopie zusätzlich analytische Möglichkeiten eröffnen. Elastisch gestreute Elektronen liefern Informationen über die Kristallstruktur der Probe und durch einfache Umstellung des Strahlengangs im TEM kann man das Beugungsbild eines lokal definierten Bereichs der Probe erhalten, um darüber Informationen über die Struktur der Probe zu erlangen. Desweiteren sind unelastische Streuprozesse in der Probe Grundlage für elementspezifische Charakterisierungsmethoden wie EDX und EELS.

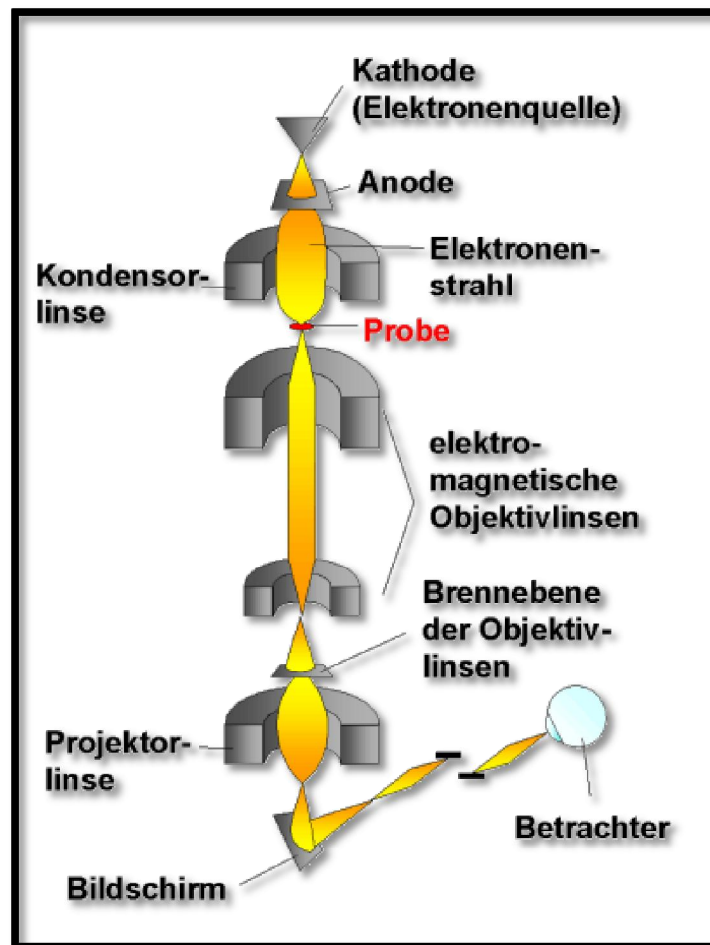


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Transmissionselektronenmikroskop^[11].

2.3. Probenpräparation für die Transmissionselektronenmikroskopie

Moderne Transmissionselektronenmikroskope arbeiten bei Beschleunigungsspannungen bis zu 300 kV. Zwar nimmt die schädigende Wirkung des Elektronenstrahls mit zunehmender Elektronenenergie ab, dennoch findet in der durchstrahlten Probe durch die ionisierende Elektronenstrahlung eine chemische Änderung statt. Darüberhinaus ist die mittlere freie Weglänge von Elektronen in Materie sehr gering, was bedeutet, dass Elektronen stark absorbiert werden. Diese physikalischen Eigenschaften des Elektronenstrahls haben für die Transmissionselektronenmikroskopie zwei grundsätzliche Folgen: Zum einen muss der Elektronenstrahl von der Quelle bis hin zum Detektionssystem im Hochvakuum

gehalten werden, um zu verhindern, dass die Elektronen des Strahls von Luftmolekülen absorbiert werden. Daher steht das Mikroskop unter einem Vakuum von bis zu 10^{-5} Pa. Zweitens muss die Probe elektronentransparent, d.h. durchstrahlbar sein. Das bedeutet, dass in der Praxis eine Probendicke von ca. 100 nm das obere Limit darstellt. Hinzu kommt noch, dass die Probe vakuumstabil sein muss. Das bedeutet, es dürfen sich im Hochvakuum selbst unter Elektronenbestrahlung keine Moleküle aus der Probe in die Umgebung verflüchtigen.

2.3.1. Auftropf-Methode

Die einfachste und schnellste Methode, um TEM-Proben herzustellen, ist das direkte Auftropfen (engl.: Drop-Casting) der Probensuspensionen auf ein, mit dünnem Kohlefilm befilmtes Kupfernetzchen^[12]. Dabei ist darauf zu achten, dass die Probe entsprechend verdünnt sein muss. Anschließend lässt man die Probe einfach eintrocknen. Das Problem dieser Methode liegt darin, dass typische Trocknungseffekte auftreten können:

- a) Adsorption der Probe auf dem Substrat und damit die Gefahr einer morphologischen Änderung:
- b) Während des Trocknungsvorgangs kommt es zur Aufkonzentration, d.h. die Konzentration der Probe bezogen auf das Lösemittel steigt kontinuierlich bis das komplette Lösemittel verdampft ist;
- c) Aufkonzentration von gelösten Stoffen, die dann auf dem Kohlefilm ausfallen.

Diese Effekte können zu Artefakten und morphologischen Änderungen der Probe führen. Daher kann man das Auftropfen nur einsetzen, wenn die Probe mechanisch hinreichend stabil ist. Beim Auftragen von empfindlichen Proben, wie Kapseln oder Zellen, ist jedoch häufig eine Deformierung oder sogar Zerstörung der Struktur beobachtbar.

2.3.2. Kontrastierung

In der Transmissionselektronenmikroskopie resultiert der Kontrast zwischen verschiedenen Bereichen (Phasen) einer Probe aus deren unterschiedlichen lokalen Elektronendichten. Jedoch bestehen Polymere und biologische Materialien meist aus Elementen mit niedrigerer Ordnungszahl, weshalb diese nur eine geringe Elektronendichte aufweisen. Aus diesem Grund ist der Kontrast in TEM-Bildern von Polymeren häufig nicht ausreichend, um verschiedene Bereiche voneinander zu differenzieren^[13].

Mit Hilfe der Kontrastierung (engl.: Staining) werden Atome mit hohen Elektronendichten, wie zum Beispiel Schwermetalle meist durch eine chemische Reaktion in die Probe eingebracht. Allgemein wird beim Staining also versucht, selektiv eine Phase mit einem Schwermetall zu versetzen. Diese erscheint dann bei der transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchung dunkler und ist damit leichter zu identifizieren.

Osmiumtetroxid:

Viele Polymere enthalten ungesättigte Doppelbindungen. Aus diesem Grund lassen sie sich mit Osmiumtetroxid OsO_4 anfärben^[14].

In der organischen Chemie wird Osmiumtetroxid verwendet, um aus ungesättigten Doppelbindungen selektiv das cis-Diol darzustellen. Aufgrund des hohen Preises und der Toxizität von Osmiumtetroxid wird es hierfür in der Zwischenzeit nur noch in katalytischen Mengen eingesetzt und ein weiteres Oxidationsmittel wie Wasserstoffperoxid zugegeben.

Durch die Reaktion von Osmiumtetroxid mit der Doppelbindung wird lokal die Elektronenstreuung durch das Schwermetall erhöht. Zusätzlich wird das Polymer durch die Reaktion mit einer weiteren Doppelbindung vernetzt und damit die Morphologie fixiert.

Rutheniumtetroxid:

Rutheniumtetroxid ist eines der reaktivsten Oxidationsmittel, die in der organischen Chemie verwendet werden. Es reagiert bereits bei sehr milden Bedingungen, toleriert dabei sogar Stereozentren. Aufgrund der Reaktivität und des hohen Preises wird Rutheniumtetroxid in-situ hergestellt und nur in katalytischen Mengen verwendet (siehe Abbildung 5)^[15]. Mit Rutheniumtetroxid ist es in geringem Maße möglich, Aromaten in Dicarbonsäuren zu oxidieren^[16]. Auch Alkohole, Aldehyde, Amine und Ester können mit Rutheniumtetroxid kontrastiert werden.

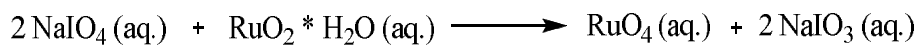


Abbildung 5: Schema der In-situ-Herstellung von Rutheniumtetroxid RuO₄.

Der Nachteil dieses Stainingreagenzes liegt jedoch in seiner hohen Reaktivität, weshalb die eingesetzte Natriumperiodatmenge eine große Rolle spielt:

Ist die eingesetzte Menge zu hoch, wird die Probe aufgrund sehr hoher Artefaktbildung und Überkontrastierung unbrauchbar.

2.3.3. Einbettung und Ultramikrotomie

Oftmals liefert die Präparation massive Proben, die aufgrund ihrer Dimensionen nicht mehr durchstrahlbar sind. Hierzu gehören typischerweise Polymere, aber auch Zellen und Gewebe sind aufgrund ihrer natürlichen Dimensionen nicht direkt im TEM zu charakterisieren. Sie müssen zuvor noch auf eine für die Untersuchung akzeptable Dicke gebracht werden.

Hier kommt das Ultramikrotom (Abbildung 6) zum Einsatz, um dünne Schnitte einer massiven Probe herzustellen. Da in der Elektronenmikroskopie nur elektronendurchlässige Proben betrachtet werden können, ist das Gerät ein wichtiger Bestandteil in der Präparationsschiene massiver und eingebetteter Proben. Mit diesem Gerät ist es möglich, Schnitte von 1-1000 nm anzufertigen, wobei für biologische und polymere Proben eine Schnittdicke von etwa 60 bis 80 nm ein

praktikabler Wert ist. Aus Gründen der Handhabung sollten diese hierbei Abmessungen von mindestens 1 mm haben. Ist die Probe kleiner, muss sie in ein Einbettmedium eingebettet und damit stabilisiert werden. Als Einbettmedien werden meist EPON[®], LR-Gold und Lowacryl verwendet. Da die Einbettmedien hydrophob sind, muss die einzubettende Probe entwässert werden. Bei der Kryo-Präparation geschieht dies während der Kryosubstitution, wogegen bei der chemischen Fixierung eine Entwässerung stufenweise vor der Einbettung durchgeführt werden muss.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich EPON[®] 825 verwendet. Dabei handelt es sich um ein Epoxidharz, das bei 60 °C ausgehärtet wird. Die Vorteile von EPON[®] 825 liegen in der relativ geringen Viskosität im Vergleich zu anderen Einbettungsmedien und seinen guten Polymerisationseigenschaften.

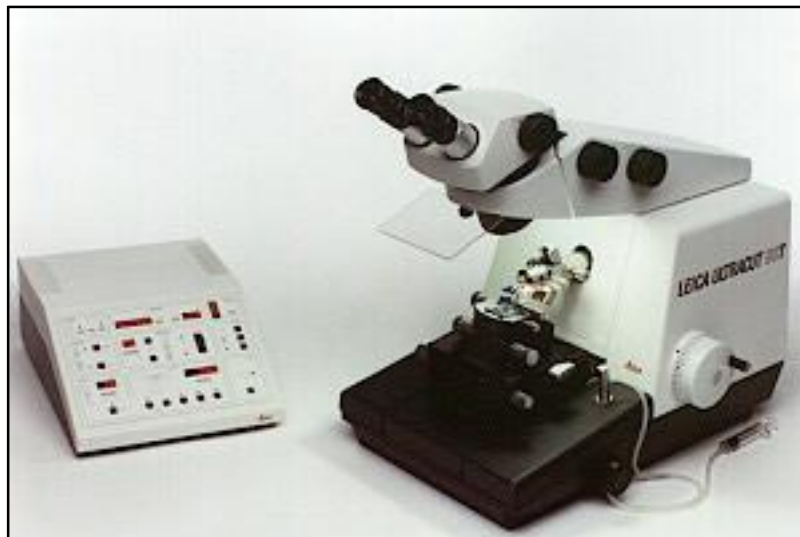


Abbildung 6: Darstellung des Ultramikrotoms "Leica Ultracut UCT".

2.3.4. Chemische Fixierung

Bei der chemischen Fixierung^[17] handelt es sich um eine mehrstufige Präparationsmethode, bei der die Probe zuerst mit Hilfe von Kontrastierungsreagenzien kontrastiert und fixiert wird. Danach wird die Probe stufenweise entwässert, um sie anschließend in ein Einbettmedium zu überführen.

Diese Entwässerung ist notwendig, da sich das Einbettmedium nicht in Wasser löst und somit ohne Substitution des Lösemittels die Probe nicht infiltrieren könnte. Man erhält schließlich ein in ein festes Harz eingebettetes Präparat, von dem dann im letzten Schritt ultradünne, durchstrahlbare Schnitte angefertigt werden.

Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass sich die Probe aufgrund der chemischen Reaktion mit dem Kontrastierungsreagenz verändert und Artefakte gebildet werden, die sich im TEM störend auswirken können. Nachteilig ist auch, dass durch die Reaktion mit dem Stainingreagenz die Probe verändert wird, weshalb diese nicht mehr in ihrer ursprünglichen, natürlichen Struktur vorliegt.

Für biologische Proben wird als Fixiermittel Glutaraldehyd eingesetzt. Vor allem bei Proteinen führt Glutaraldehyd dabei durch Reaktion mit Amino-Gruppen zu einem hohen Vernetzungsgrad.

Ein klassisches Kontrastierungsmittel bei diesem Verfahren ist Uranylacetat. Es reagiert vor allem mit Carboxyl-, sowie Phosphatgruppen, weshalb es sich sehr gut für Proteine und Phospholipide eignet.

2.3.5. Hochdruckgefrieren

Um die prinzipiellen Nachteile der chemischen Fixierung zu umgehen, wurde die Methode des Hochdruckgefrierens entwickelt. Die grundsätzliche Idee hierbei ist, dass alle Bestandteile einer Probe innerhalb kürzester Zeit tiefgefroren werden, um somit den natürlichen Zustand der Probe festzuhalten^[18]. Dies geschieht bei 2400 bar mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C innerhalb von 50 ms. Abbildung 7 zeigt den Druck- und Temperaturverlauf eines typischen Einfriervorgangs. Die Probe hat bereits nach ca. 10 ms eine Temperatur von -180 °C erreicht. Dadurch ist es möglich, Proben von bis zu 200 µm Dicke ohne Vorbehandlung einzufrieren. Durch die hohe Abkühlrate und den hohen angewandten Druck, bildet das sich in der Probe befindliche Wasser keine Eiskristalle aus, die die Struktur der Probe zerstören könnten^[19]. Es wird vielmehr zu einer hochviskosen Flüssigkeit, dem amorphen Wasser, eingefroren. Die so tiefgefrorenen Proben werden in flüssigen Stickstoff überführt, wo diese bis zur Weiterverarbeitung beispielsweise durch Gefriersubstitution gelagert werden können.

Das Prinzip der Hochdruckgefrierung wurde ursprünglich für biologische Anwendungen entwickelt^[20], ohne dabei Gefrierschutzmittel^[21] verwenden zu müssen, die zusätzliche, störende Artefakte bilden können. Der Gefrierprozess wurde nach und nach weiter verbessert^[22, 23] und weist in der Zwischenzeit eine hohe Reproduzierbarkeit bei biologischen Proben wie Zellen oder Gewebe auf. Die neueste Entwicklung stellt ein sogenanntes „Rapid Transfer System“^[24] dar, mit dem es möglich ist, Proben innerhalb von 5 s vollautomatisiert einzufrieren. Jedoch werden in der Zwischenzeit hauptsächlich die Folgeschritte nach dem Hochdruckgefrieren, wie die Gefriersubstitution, die Einbettung und die Kontrastierung verbessert, da das Hochdruckgefrieren eine etablierte Methode darstellt.

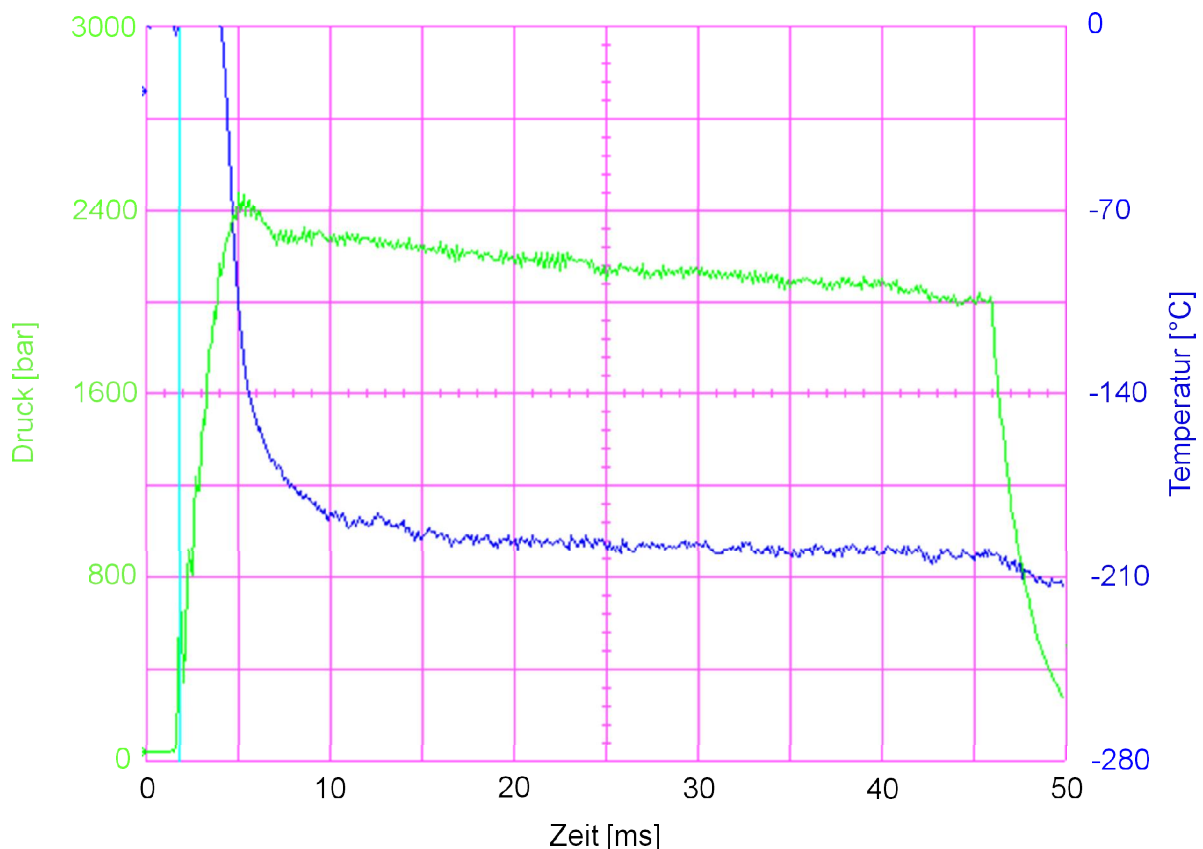


Abbildung 7: Temperatur/Druck- Zeit-Verlauf der Hochdruckgefrierung.

Abbildung 8 zeigt den Hochdruckgefrierer^[25] HPF Compact 01. Durch ihn ist es möglich, Proben bei einem Druck von 2400 bar mit flüssigem Stickstoff bei -196 °C einzufrieren. Die Anlage wurde nach dem Prinzip von Moor^[26] entwickelt und wird fast ausschließlich zum Einfrieren von biologischen Proben eingesetzt. Die maximalen Abmessungen sollten hierbei eine Dicke von 0,2 mm nicht übersteigen, das maximale Volumen sollte nicht mehr als $0,6\text{ mm}^3$ betragen.



Abbildung 8: Darstellung des Hochdruckgefrierers HPF Compact 01^[27].

Prinzipiell kann man dieses Verfahren zum Einfrieren jedes beliebigen, wässrigen Systems verwenden. Für Polymere ist in der Literatur diesbezüglich allerdings nichts bekannt. Daher muß die präparative Handhabung speziell auf die Probe abgestimmt werden. So können die Suspensionen aus Partikeln beispielsweise vor dem Einfrierprozess in einer Kapillare gebracht werden, um diese dann anschließend komplett im HPF einzufrieren^[28].

2.3.6. Gefriersubstitution

Ist die Probe erst einmal im HPF eingefroren worden, so ist sie noch lange nicht bereit, um im TEM untersucht zu werden, da sie noch wesentlich zu dick ist. Der an die HPF anschließende Schritt ist dann die Gefriersubstitution. Hierbei wird im Wesentlichen das amorphe Wasser, welches die eigentliche Probe einschließt, durch ein Harz ersetzt. Man erhält am Ende des Prozesses einen festen Block, der die Probe weitestgehend in ihrem natürlichen Zustand enthält. Dieser wird dann im Ultramikrotom zu dünnen Schnitten weiterverarbeitet.

Für die Gefriersubstitution wurde eine Anlage von Leica verwendet, mit der es möglich war über einen zuvor programmierten Temperatur-Zeit-Verlauf die Probe langsam innerhalb von 20 h von -90 °C auf 0 °C zu erwärmen. Dabei ist wichtig, dass zunächst 13 h lang eine Erwärmung von -90 °C auf -80 °C erfolgt und für den weiteren Verlauf einem exponentiellen Gefriersubstitutionsprotokoll gefolgt wird^[29]. Nach erfolgter Substitution des Wassers können die Proben in ein Harz eingebettet werden.

Bei der Gefriersubstitution wird das tiefgefrorene, amorphe Wasser gegen ein organisches Lösemittel wie Ethanol, Aceton oder 1-Propanol^[30] bei -90 °C ausgetauscht, in dem sich die gefrorene Wasserphase bei den niedrigen Temperaturen löst^[31]. Im Lösemittel sind strukturstabilisierende und kontrasterhöhende Reagenzien wie Osmiumtetroxid, Uranylacetat und Glutaraldehyd enthalten^[32]. Diese reagieren jedoch erst ab Temperaturen oberhalb von -70 °C mit der Probe. Während und vor der Gefriersubstitution darf die Temperatur nicht höher als -70 °C sein, da ansonsten die Rekristallisation von Wasser einsetzt, was eine Zerstörung der Proben zur Folge hat.

Die Gefriersubstitution ist der Schritt in der Kryopräparation, der die Qualität der Probe am meisten beeinflusst und am schwersten zu kontrollieren ist. Die hierfür etablierten Methoden wurden nur empirisch ermittelt. Es gibt aus diesem Grund in der Literatur beinahe so viele Gefriersubstitutionsprotokolle wie Veröffentlichungen. Als Lösemittel der Wahl wird Aceton verwendet^[33], jedoch gibt es keine einheitliche Meinung über die zu verwendenden Stainingreagenzien. Der Nachteil von Aceton liegt jedoch darin, dass bei den niedrigen Temperaturen während der Substitution

nur wenig Wasser in Aceton löslich ist. Das Gefriersubstitutionsprotokoll muss deshalb individuell nach der Probe und der Art der durchgeführten Untersuchung angepasst werden.

In der Literatur ist bisher kaum etwas zum mechanistischen Verständnis des Substitutionsprozesses bekannt. Es wurden bisher auch nur wenige Beobachtungen und Aussagen zum Vorgang der Gefriersubstitution gemacht. Humbel und Müller^[34] stellten fest, dass die Geschwindigkeit des Substitutionsprozesses mit der Polarität des verwendeten Lösemittels zunimmt, jedoch drastisch abnimmt, wenn zusätzliches Wasser zugeben wird. Daraufhin wurden nur noch wasserfreie Lösemittel für die Substitution verwendet. Der Nachteil, der dadurch entsteht, ist, dass die Lösemittel mehr Lipide aus den Zellstrukturen extrahierten, wodurch weniger Kontrast vorhanden ist. Dabei gilt: Je polarer das Lösemittel (Methanol > Ethanol > Aceton), desto mehr Lipide werden aus den Zellen extrahiert und desto weniger Kontrast ist vorhanden.

Durch Zugabe von etwas Wasser zum Substitutionsmedium kann der Kontrast der Probe dagegen gesteigert werden^[35], da die Lipide, die in den Membranen vorhanden sind, bei höherem Wassergehalt weniger stark herausgelöst werden.

Zur Gefriersubstitution von Polymeren ist in der Literatur, ebenso wie über die Hochdruckgefrierung bisher nichts bekannt.

Abbildung 9 soll den Solvatationsprozess des tiefgefrorenen, amorphen Wassers innerhalb der Kapillare bei Temperaturen zwischen -90 °C und -80 °C veranschaulichen. Dabei werden vor allem Polymere, die sich an den Kapillarenden befinden durch Diffusion herausgeschwemmt. Nur in der Mitte der Kapillare und an der Kapillarwandung bleibt noch genug Polymer zurück. Ab Temperaturen um -70 °C beginnt schließlich die Kontrastierung.

Nach Erreichen von 0 °C werden die Proben noch eine Stunde lang weiter im Substitutionsmedium bei dieser Temperatur gelagert, so dass das Kontrastierungsreagenz vollständig abreagieren kann.

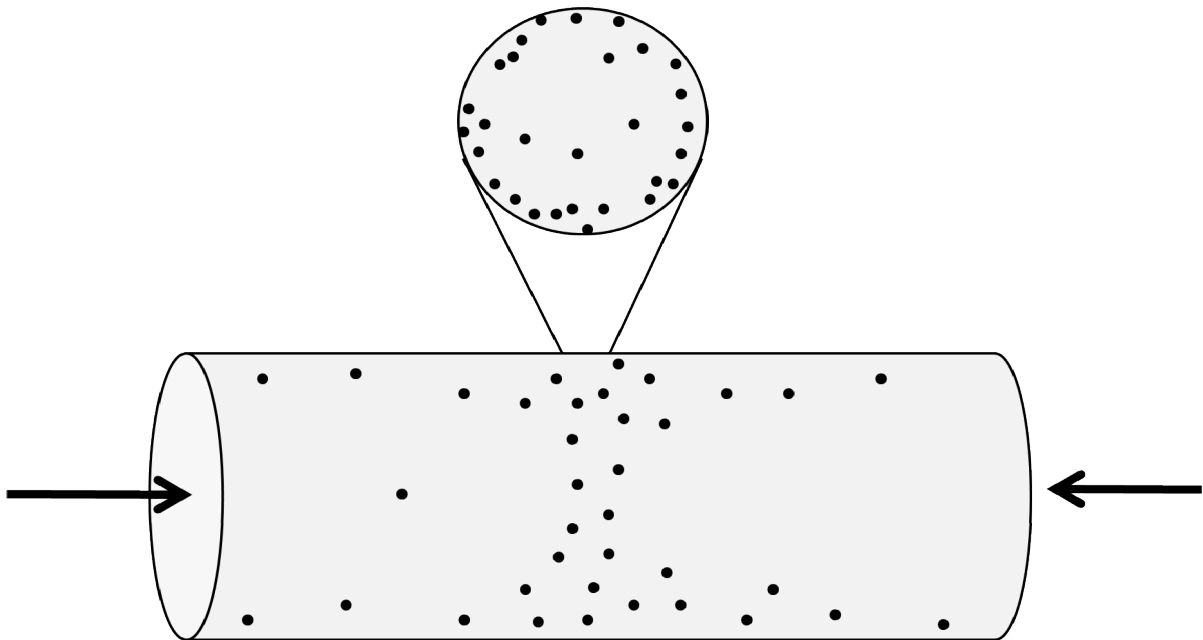


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Kapillare und eines Querschnitts durch die Mitte der Kapillare während der Substitution. Dabei ist auch die Verteilung der Polymere in der Kapillare berücksichtigt. In Pfeilerichtung erfolgt hauptsächlich das Herauslösen des hochdrucktiefgefrorenen, amorphen Wassers mit dem Substitutionsmedium.

Zum besseren Verständnis des Lösungsprozesses des amorphen Wassers, der bei -90 °C in der Gefriersubstitution abläuft, dient Abbildung 10. In ihr ist der Ort gegen die Konzentration von Wasser aufgetragen. An der Grenzfläche findet diffusionsgesteuert die Lösung des amorphen Wasser durch das Substitutionsmedium statt. In der Grenzschicht befindet sich ein Konzentrationsgefälle. Diese wird durch die Diffusion und den Lösungsprozess in Pfeilrichtung verschoben.

Erst nachdem der Prozess vollständig abgeschlossen ist, darf die Temperatur über -80 °C steigen (aufgrund der Rekristallisation von Wasser).

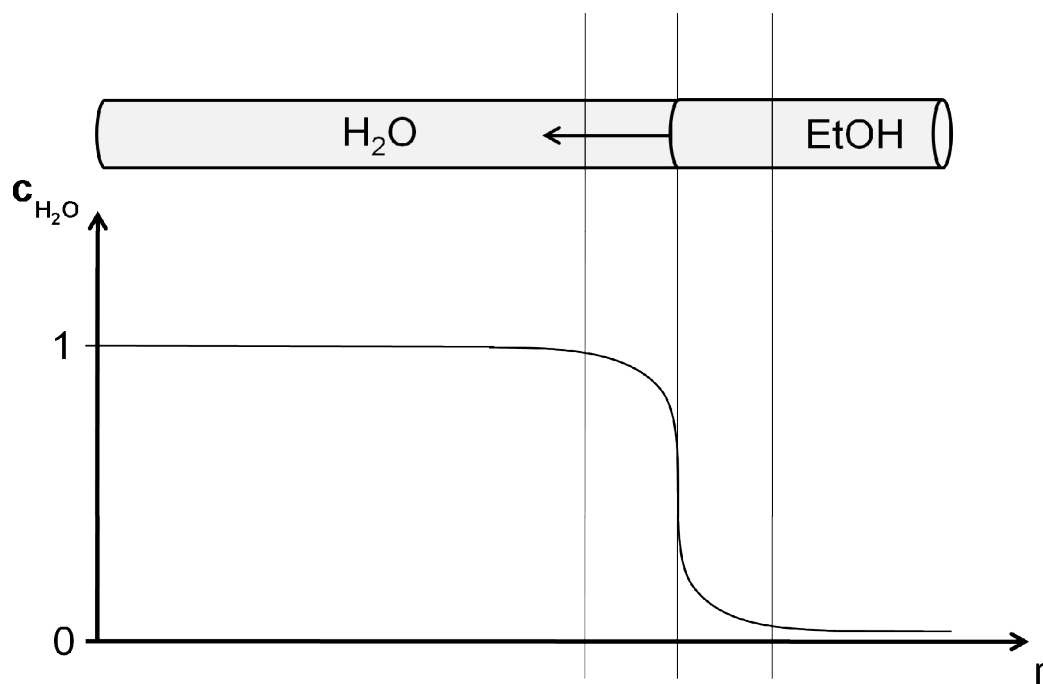


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Grenzfläche zwischen dem amorphen Wasser und dem Gefriersubstitutionsmedium.

3. Experimenteller Teil

3.1. Verwendete Chemikalien und Geräte

Chemikalien

In Tabelle 1 sind die verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien

Chemikalienbezeichnung	Herkunft	Reinheit
Ethanol p.A.	VWR International GmbH	>99,5%
1-Hexadecen	Alfa Aesar GmbH & Co KG	94%
Uranylacetat	VWR International GmbH	>99%
Osmiumtetroxidlösung 4%	Sigma	4% in Lösung
Ruthenium (IV)-oxid Monohydrat	SPI-Chem	k. A.
Natriumperiodat	Fluka	>99,8%
EPON [®] 825	Fluka	k. A.
Aceton p.A.	VWR International GmbH	>99,98%
Tetrahydrofuran	VWR International GmbH	>99,9%
Methanol p.A.	Alfa Aesar GmbH & Co KG	>99,8%

Zellkultur

Für die durchgeführten Versuche wurde eine HeLa-Zelllinie der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) verwendet. Diese wurden in einem Kulturmedium, bestehend aus DMEM (Gibco), versetzt mit 10% FCS (Invitrogen), 100 U Penicillin (Invitrogen) und 100 µg/mL Streptomycin (Invitrogen), gezüchtet.

Geräte

Genauere Angaben zu den verwendeten Geräten sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Transmissionselektronenmikroskop	FEI	Tenai F20
Trimmer	Leica	EM Trim
Mikrotom	Leica	Ultracut UCT
Hochdruckgefrierer	Engeneering Office M. Wohlend	HPF Compact 01
Gefriersubstitutionsanlage	Leica	EM AFS2

3.2. Präparation der Proben fürs TEM

3.2.1. Darstellung der Polyurethankapseln

Die Synthese der Polyurethan- und Polyharnstoffkapseln erfolgte mittels inverser (Wasser-in-Öl)-Miniemulsionstechnik. Die kontinuierliche Phase war Cyclohexan, die disperse Phase eine wässrige Stärkelösung. Die Vernetzung der Stärke mittels Toluoldiisocyanat (TDI) fand an der Tröpfchengrenzfläche zwischen kontinuierlicher und dispergierter Phase statt. Dazu wurde TDI zu der bereits gebildeten Miniemulsion zugegeben. Nach erfolgter Kapselsynthese wurden die synthetisierten Proben in eine wässrige SDS-Lösung (0,3%) überführt.

3.2.2. Vorbereitungen für Präparation der HeLa-Zellen

Die für das Hochdruckgefrieren von HeLa-Zellen benötigten Saphir-Discs wurden zunächst in 60%iger Schwefelsäure im Ultraschallbad 15 min geschallt und mit Wasser ab gespült und anschließend in einer Spülmittellösung für 15 min erneut geschallt, mit warmem Wasser ab gespült und zum Schluss dreimal mit Ethanol

gewaschen. Die gereinigten Saphir-Discs können dann unter Ethanol gelagert werden.

Um die HeLa-Zellen besser auf den Saphir-Discs kultivieren zu können, wurden diese zuvor mit Kohle bedampft. Außerdem diente diese Schicht später als Trennschicht zwischen der Saphir-Disc und den eingebetteten Zellen.

Die HeLa-Zellen wurden üblicherweise in einer 24 Well-Platte auf den vorbehandelten Saphir-Discs kultiviert, wobei pro Well etwa 100000 Zellen angesetzt wurden.

3.2.3. Präparation der HeLa-Zellen und der Polymere für die HPF

Die auf den Saphir-Discs kultivierten HeLa-Zellen wurde aus dem Nährmedium genommen, das auf den Zellen verbliebene Nährmedium mit einem Rundfilter abgezogen und dann in 1-Hexadecen getaucht. 1-Hexadecen verdrängt das restliche Wasser und diente als Druck- und Temperaturüberträger. Die Saphir-Disc wurde dann zwischen zwei Aluminiumplättchen gelegt, wobei darauf zu achten ist, dass die kultivierte Seite nicht in Kontakt mit dem Aluminiumplättchen kommt. Hierzu besitzen diese eine etwa 0,2 mm tiefe Auskerbung. Anschließend wird die so vorbereitete und eingeschlossene Probe im HPF tiefgefroren.

Diese Art der Probenvorbereitung ist für Polymerdispersionen nicht praktikabel, und daher wird eine etwas modifizierte Methode verwendet (siehe Abbildung 11)^[28]:

Hierzu wurde die Probe (eine wässrige Dispersion) in einer etwa 5 cm langen Kapillare aufgenommen, bis sich diese vollständig mit der Polymerdispersion gefüllt hat und danach in 1-Hexadecen getaucht. Mit Hilfe eines Skalpells wurde diese Kapillare dann in 2-2,5 mm kurze Stücke geschnitten, von denen jeweils 4-6 in ein Aluminiumplättchen mit 0,2 mm Auskerbung gelegt wurden. Dieses wurde mit einem planen Aluminiumplättchen verschlossen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Kapillaren nicht überstehen, da diese sonst während der HPF leergedrückt werden.

Die so fertigpräparierten Sandwiches wurden im Hochdruckgefrierer tiefgefroren und anschließend direkt in flüssigen Stickstoff überführt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die Temperatur der Proben stets unter -80 °C bleibt, da oberhalb dieser Temperatur die Rekristallisation des Wassers einsetzt.

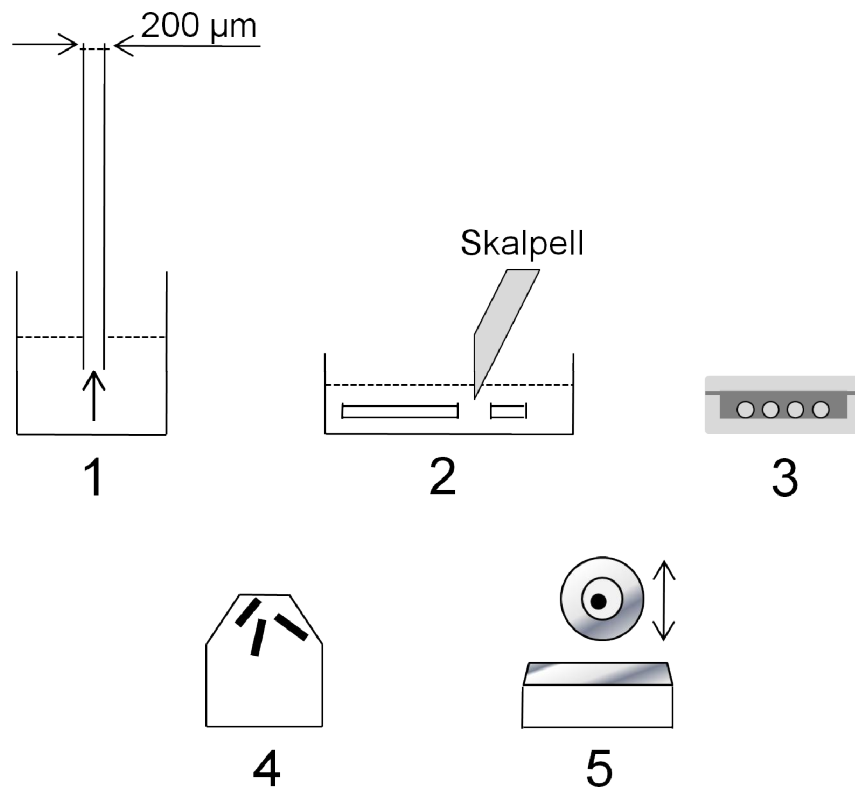


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Probenpräparation von suspensionsgefüllten Kapillaren. (1) Eine Kapillare (mit einem Innendurchmesser von $200\ \mu\text{m}$) wird durch Kapillarkräfte gefüllt. (2) Die Kapillare wird in einem 1-Hexadecenbad mit einem Skalpell in $2\text{-}2,5\ \text{mm}$ Stücke geschnitten. (3) 4-6 Kapillarstücke werden zwischen zwei Aluminiumplättchen gelegt (umgeben von 1-Hexadecen) und hochdrucktiefgefroren. (4) Die gefriersubstituierten Proben werden in einem Eppendorf®-Gefäß in EPON® eingebettet. (5) Nach dem Aushärten des EPON® können im Mikrotom dann ultradünne Querschnitte der Kapillare angefertigt werden.

3.2.4. Herstellung des Substitutionsmediums

Nach dem HPF war die Probe in amorphem Eis eingebettet, und dieses musste anschließend gegen ein Substitutionsmedium ausgetauscht werden. Hierzu wurden $6\ \text{mg}$ Uranylacetat in $5,7\ \text{ml}$ des zur Substitution verwendeten Lösemittels im Ultraschallbad gelöst. Dabei nimmt die Löslichkeit mit steigender Polarität des Lösemittels zu: THF < Aceton < Ethanol < Methanol. In Aceton und THF ist das Uranylacetat nicht mehr vollständig löslich. Anschließend wurden $300\ \mu\text{L}$ 4%ige Osmiumtetroxidlösung zugegeben und die Lösung kurz geschüttelt.

3.2.5. Durchführung der Kryosubstitution und Einbettung

Bei der Kryosubstitution wurden die Proben über einen Zeitraum 20 h von -90 °C auf 0 °C erwärmt. Dabei waren die tiefgefrorenen Proben vom Substitutionsmedium umgeben. Die Substitution wurde von der Substitutionsanlage entsprechend dem Temperatur-Zeit-Verlauf in Abbildung 12 gesteuert. Die Proben wurden anschließend auf Raumtemperatur gebracht und das Substitutionsmedium gegen eine Mischung aus EPON[®] und dem entsprechendem Lösemittel im Verhältnis 50:50 ausgetauscht. In diesem wurden die Proben weitere 2 h lang infiltriert und danach in reinem EPON[®] über Nacht stehen gelassen.

Anschließend wurden die Proben in ein mit EPON[®] gefülltes 0,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Dabei müssen die Saphir-Discs richtig (mit der kultivierten Seite nach oben) ausgerichtet sein.

Die Kapillaren mussten einzeln mit Hilfe einer feinen Präpariernadel entnommen und senkrecht ausgerichtet werden (für optimale Schnitte der eingebetteten Kapillaren).

Die so in EPON[®] eingebetteten Proben mussten nochmal für 2 Tage bei 60 °C in den Trockenschrank zum Aushärten.

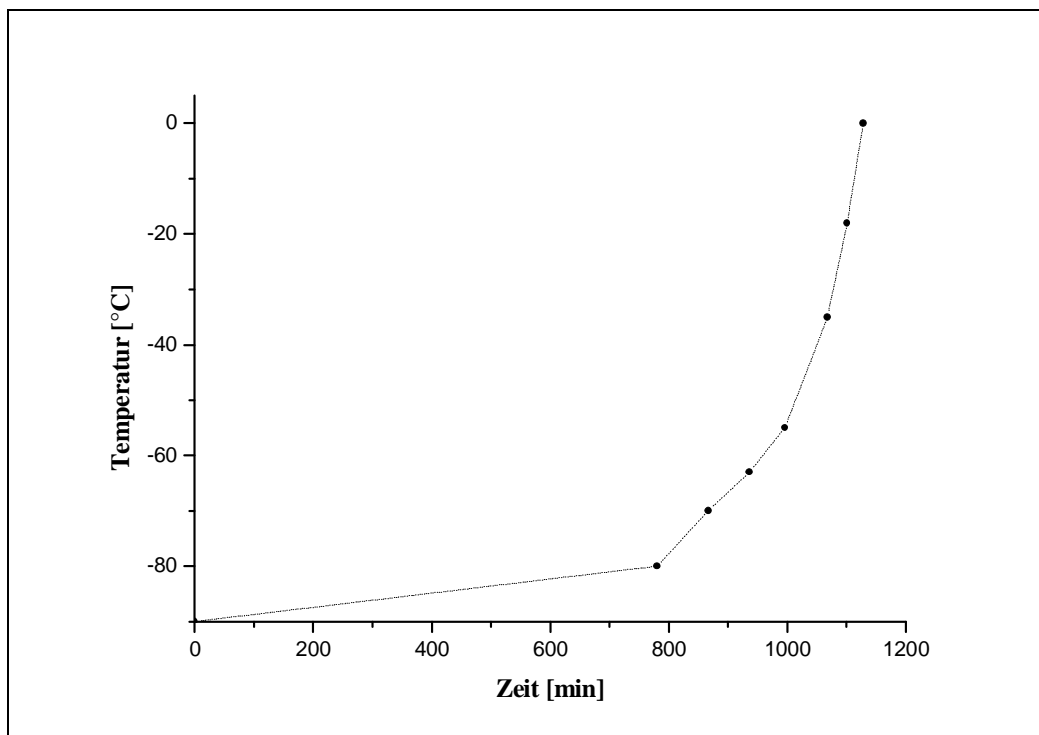


Abbildung 12: Temperatur-Zeit-Verlauf bei der Kryosubstitution.

3.2.6. Anfertigung von Schnitten am Mikrotom

3.2.6.1. Schnitte der eingebetteten HeLa-Zellen

Nach der Aushärtung wurden die Proben in flüssigen Stickstoff getaucht, wodurch die Saphir-Disc an der Kohle-Trennschicht durch den Temperaturschock weggesprengt wurde und nur noch die Zellschicht im Polymerblock verblieb. Aus diesem wurde mit Hilfe eines Trimmers ein Trapez um eine größere Zellanhäufung herausgefräst. Anschließend wurden am Mikrotom mit einem Diamantmesser ultradünne Schnitte von etwa 60 nm angefertigt, die mit Hilfe eines sPerfekt-Kescher% auf ein TEM-Netzchen übertragen wurden. Der %Perfekt-Kescher% ist eine Transferschlinge, bestehend aus Platin, mit der die Probenschnitte übertragen werden können.

3.2.6.2. Schnitte der eingebetteten Kapillaren

Die in EPON[®] eingebetteten Kapillaren mussten vor dem Schneiden erstmals mit Hilfe eines Trimmers freipräpariert werden. Das die Kapillaren umgebende EPON[®] wurde dabei weggefräst, so dass an der Spitze der Probe ein kleiner, etwa 0,5 mm breiter, trapezförmiger Block entsteht. Von dem so vorpräparierten Polymerblock wurden dann am Mikrotom 60 nm ultradünne Schnitte angefertigt, die anschließend mit einem sPerfekt-Kescher% auf ein Kupernetzchen übertragen wurden.

4. Ergebnisse und Diskussion

Für biologische System wie beispielsweise Zellen und Zellgewebe ist die Methode des Hochdruckgefrierens mit anschließender Gefriersubstitution bereits etabliert, da sie die Proben optimal in ihrer Struktur konserviert und auch kontrastiert. Daher wurde das Präparationsprotokoll im Rahmen dieser Arbeit zunächst an einem zellulären System (unbehandelte HeLa-Zellen) untersucht, um die optimalen Parameter für die HPF und die Gefriersubstitution einzustellen. Hierbei wurde hauptsächlich der Einfluss des Substitutionsmediums, das bei der Gefriersubstitution eingesetzt wird, untersucht. Es wurden drei verschiedene Lösungsmittel während der Gefriersubstitution verwendet und die resultierenden TEM-Bilder gegeneinander verglichen. Zusätzlich wurden unbehandelte HeLa-Zellen auch chemisch fixiert, um einen Vergleich zwischen diesen beiden Präparationsmethoden zu erhalten.

Nachdem sich dann gezeigt hat, dass die Kryo-Präparation reproduzierbare Ergebnisse für biologische Systeme liefert, konnte man dazu übergehen, diese auch auf polymere Systeme in wässrigem Medium zu übertragen. Hierzu wurden exemplarisch diverse Polyurethan- und Polyharnstoffkapseln herangezogen. Es wurden absichtlich Kapseln und keine Polymerpartikel eingesetzt, da Polymerkapseln wesentlich empfindlicher gegenüber Deformationen und Morphologieänderungen sind. Daher sind sie mit den herkömmlichen Präparationsmethoden (vor allem sDrop-Casting%Präparation) nur schwer morphologiegetreu im TEM abbildbar.

Zum Abschluss der Arbeit wurde die neu entwickelte Methode dazu verwendet, um TEM-Analytik an verschiedenen Polyurethankapseln zu betreiben: Mittels Kryo-Präparation sollte die Einkapselung von goldmarkierten Antikörpern überprüft werden.

4.1. Vergleich von verschiedenen Lösemitteln bei der Gefriersubstitution unbehandelter HeLa-Zellen

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Einfluss verschiedener Lösemittel bei der Gefriersubstitution untersucht. Dazu wurden unbehandelte HeLa-Zellen hochdrucktiefgefroren und bei -90 °C in die Gefriersubstitutionsanlage überführt, in der die drei verschiedenen Substitutionsmedien bereits vorgekühlt gelagert wurden. Bei den drei verschiedenen Lösemitteln handelte es sich um Methanol, Aceton und THF.

Auffallend war, dass sich bei THF ein gelber Niederschlag im Eppendorfgemäß ausgebildet hatte. Dabei handelte es sich sehr wahrscheinlich um die Kontrastierungsreagenzien Uranylacetat und Osmiumtetroxid, die in THF bei -90 °C nicht mehr vollständig löslich und daher bei diesen niedrigen Temperaturen ausgefallen sind.

4.1.1. Methanol als Substitutionsmedium

Mit Methanol als Substitutionsmedium während der Gefriersubstitution ist in den Schnitten keine deutliche Zellstruktur mehr erkennbar (Abbildung 13). Durch die Substitution mit dem polaren Lösemittel Methanol erfolgt die Extraktion vieler Zellbestandteile, die Zellorganellen schrumpfen^[30]. Aus diesem Grund erscheint die Zellstruktur in der TEM-Abbildung nur sehr diffus, obwohl das Kontrastierungsreagenz im Substitutionsmedium die Zelle durchdringt. Die Ursache hierfür ist bei dem verwendeten Lösemittel zu suchen: Aufgrund seiner hohen Polarität löst das Methanol während der Gefriersubstitution nicht nur das gefrorene Wasser aus dem Zellgewebe heraus, sondern auch noch Zellbestandteile und Membranen, die hauptsächlich aus Phospholipiden bestehen.

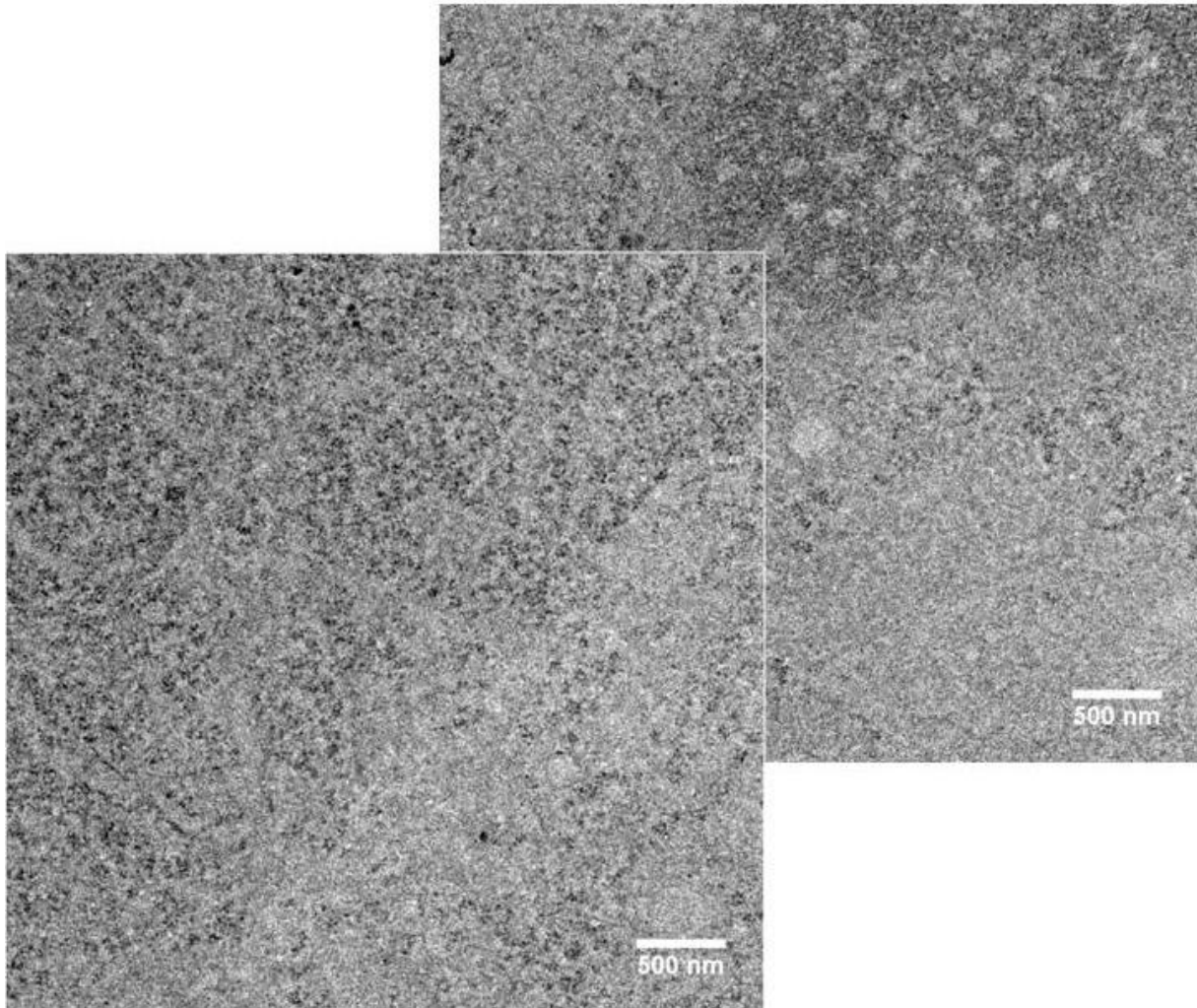


Abbildung 13: Kryo-Präparation mit Hochdruckgefrierer und Gefriersubstitution (mit Methanol als Lösemittel) von unbehandelten HeLa-Zellen. Die Zellstrukturen und Membranen werden mit Methanol als Lösemittel kaum kontrastiert. Der Grund hierfür liegt in der hohen Polarität des Lösemittels: Während der Gefriersubstitution wird nicht nur das amorphe Wasser substituiert, sondern auch wichtige Zellbestandteile sowie die Phospholipide der Membranen herausgelöst.

4.1.2. Tertahydrofuran als Substitutionsmedium

Abbildung 14 zeigt TEM-Aufnahmen von Schnitten unbehandelter HeLa-Zellen, die durch Kryo-Präparation hergestellt wurden. Bei der Gefriersubstitution wurde als Lösemittel THF verwendet. Deutlich erkennbar sind auf den Bildern der Zellkern (a) und mehrere Vesikel (b), sowie die Zellstruktur. Jedoch sind die feinen Membranstrukturen nicht deutlich zu erkennen. Der Grund hierfür liegt in der

schlechten Löslichkeit der Kontrastierungsreagenzien im Substitutionsmedium, was eine geringe Kontrastierungseffizienz des Zellgewebes zur Folge hat.

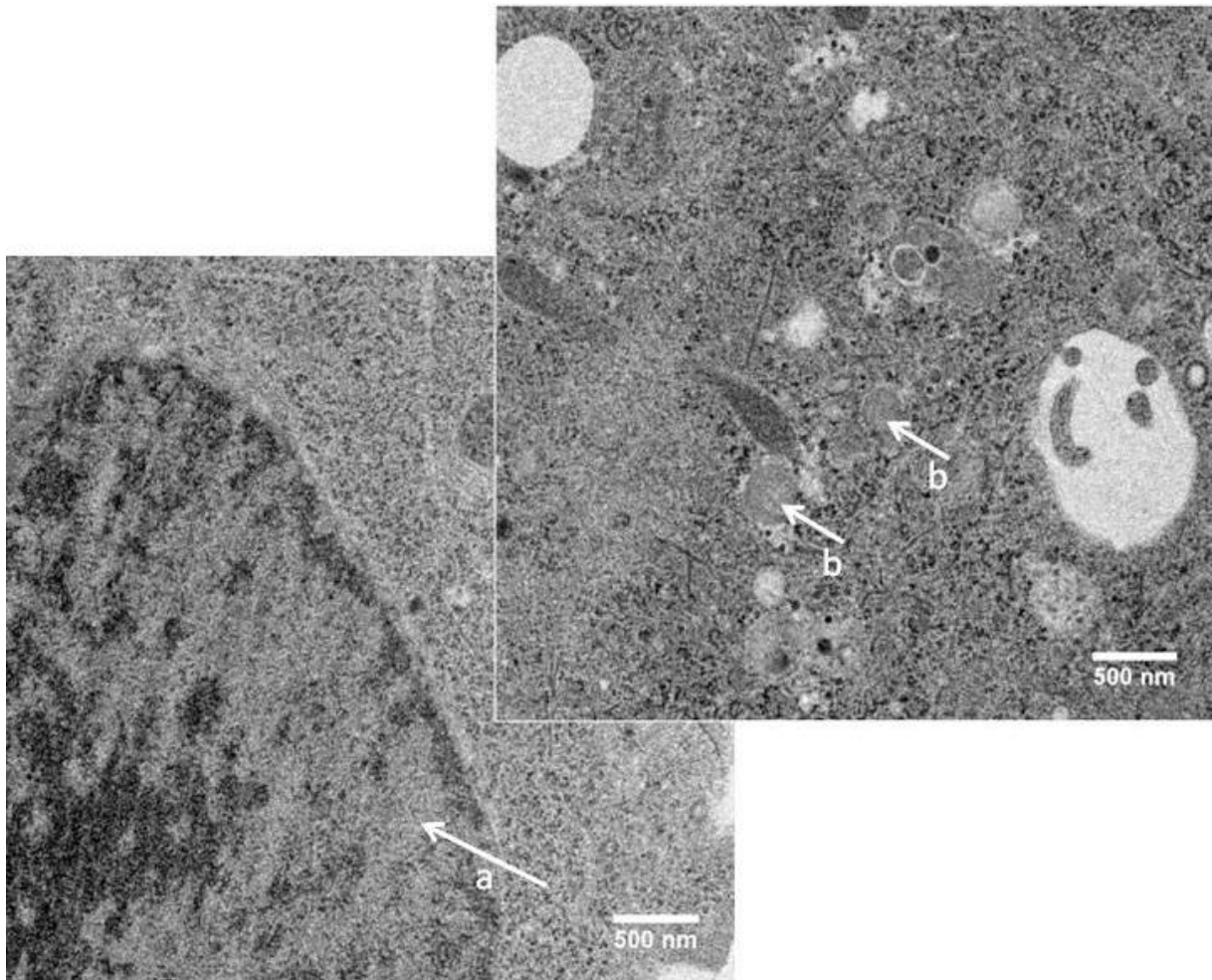


Abbildung 14: Kryo-Präparation mit Hochdruckgefrierer und Gefriersubstitution (mit THF als Lösemittel) von unbehandelten HeLa-Zellen. Membranen werden mit THF als Lösemittel kaum kontrastiert, jedoch sind die Zellstrukturen wie der Zellkern (a) und Vesikel (b) gut erkennbar. THF ist eines der unpolarsten, vollständig wasserlöslichen Lösemittel. Deshalb ist davon auszugehen, dass THF keine Zellbestandteile herauslöst. Jedoch lösen sich auch die verwendeten Kontrastierungsreagenzien (Uranylacetat und Osmiumtetroxid) kaum mehr, weshalb die TEM-Aufnahmen nur eine unzureichende Kontrastierung aufweisen und daher die Membranstrukturen nicht deutlich erkennbar sind.

4.1.3. Aceton als Substitutionsmedium

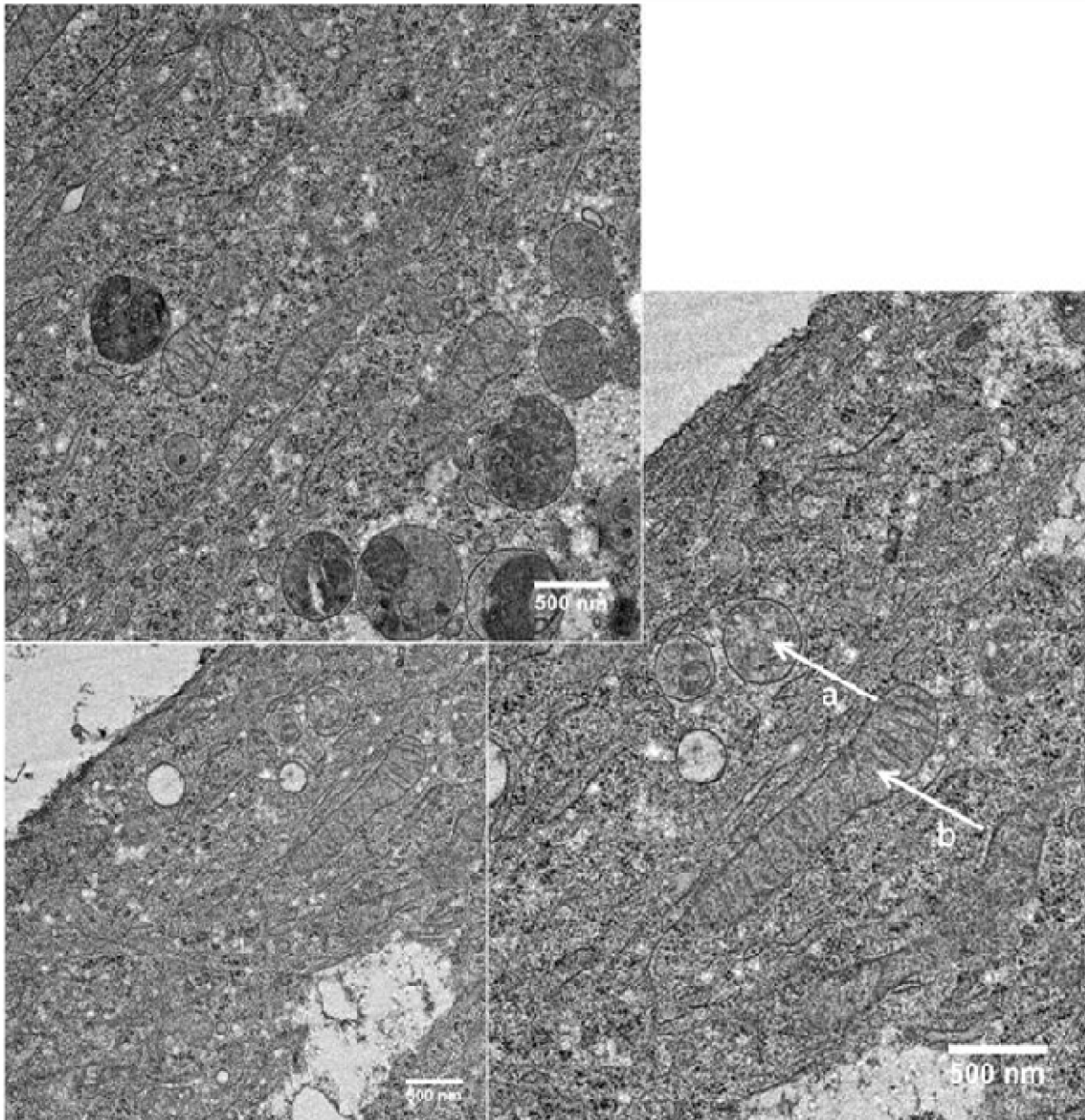


Abbildung 15: Kryo-Präparation mit Hochdruckgefrierer und Gefriersubstitution (mit Aceton als Lösemittel) von unbehandelten HeLa-Zellen. Zellbestandteile, wie Vesikel (a) und Mitochondrien (b) und Membranen werden mit Aceton als Lösemittel sehr gut kontrastiert und demzufolge in den TEM-Aufnahmen optimal dargestellt.

Mit Aceton als Substitutionsmedium werden sowohl die Zellbestandteile wie Vesikel und Mitochondrien, als auch die feinen Membranen ideal kontrastiert (s. Abbildung 15). Für die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten biologischen Materialien ist Aceton folglich das Lösemittel der Wahl. Im Übrigen hat sich Aceton für die meisten

biologischen Systeme als das ideale Substitutionsmedium herausgestellt, was sich auch in der entsprechenden Literatur-stellen widerspiegelt^[36].

4.2. Methodenvergleich: chemische Fixierung und Kryopräparation

Die Stärke der Kryopräparation biologischer Proben zeigt sich beim direkten Vergleich mit der herkömmlichen chemischen Fixierungsmethode. Wie bereits festgestellt wurde, werden bei der Kryopräparation die Zellstrukturen optimal konserviert und in der TEM-Abbildung wiedergegeben^[37]. Demgegenüber wurden HeLa-Zellen auch mittels chemischer Fixierung präpariert und die Ergebnisse beider Methoden in Abbildung 16 gegenüber gestellt.

In Abbildung 16 a ist ein Schnitt dargestellt, der durch chemische Fixierung erzeugt wurde. Hier ist die Zellstruktur zwar erkennbar, allerdings sind feinere Details wie beispielsweise Membranen nicht mehr sichtbar. Zusätzlich fällt im Vergleich zu den kryopräparierten HeLa-Zellen auf, dass es zu einer höheren Artefaktbildung kommt. Die Ursache hierfür liegt in der Durchführung der chemischen Fixierung, bei der die noch lebenden Zellen bei Raumtemperatur mit der Fixanz und dem Kontrastierungsreagenz, das unter diesen Bedingungen sehr reaktiv ist, versehen werden. Das bedeutet, dass sich die Struktur der Zellen noch während der Fixierung maßgeblich ändert; das Fixiermittel wirkt nicht instantan, sondern es benötigt eine gewisse Zeitspanne von der Zugabe bis zur letztendlichen Fixierung. Bei der Kryopräparation hingegen wird die Struktur innerhalb von 10 ms eingefroren und damit kann, solange die Probe im amorphen Eis eingebettet ist, keine weitere Strukturänderung erfolgen. Hierin liegt der große Vorteil dieser Methode.

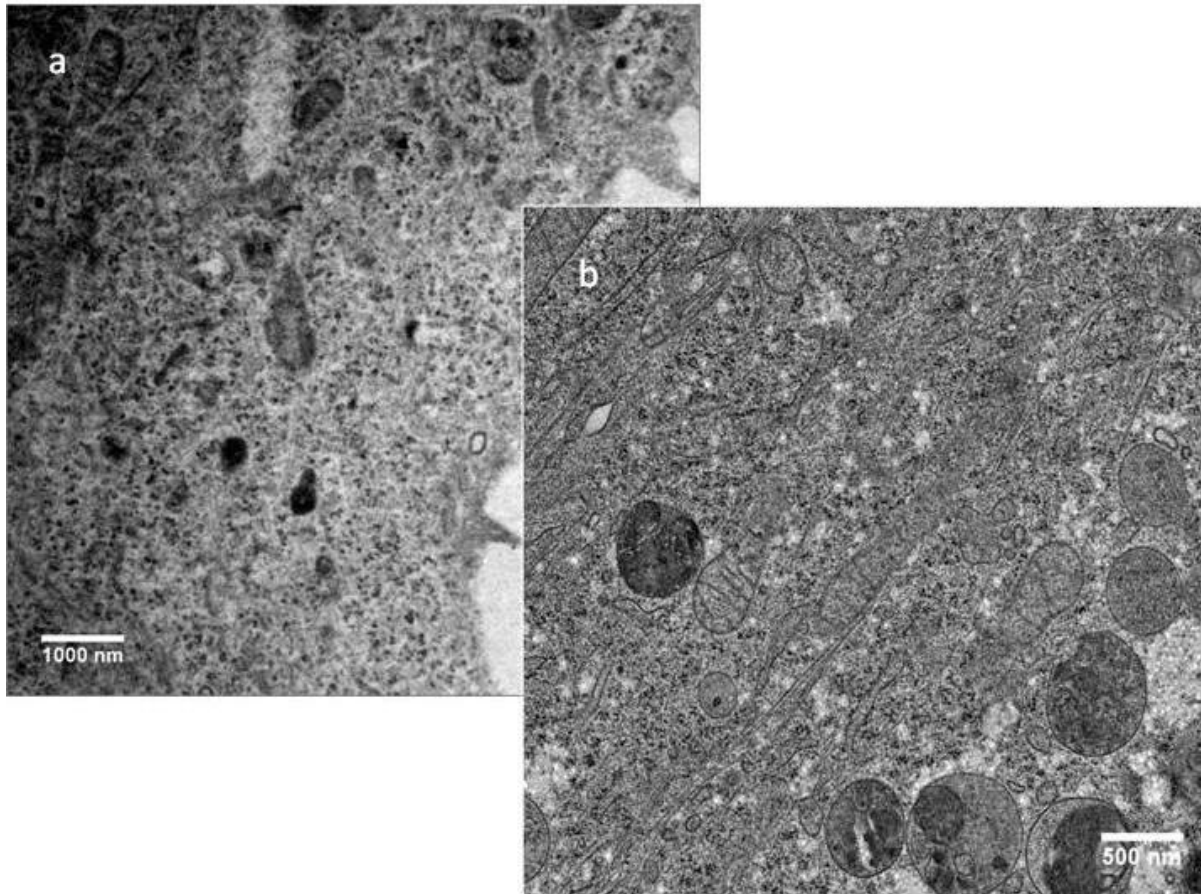


Abbildung 16: Methodenvergleich von chemischer Fixierung (a) und Kryopräparation (b) an unbehandelten HeLa-Zellen: Es wird deutlich, dass mit Hilfe der Kryopräparation der Erhalt von feinen Membranen erreicht werden kann. Durch die lange Einwirkungszeit der Fixanz und dem Kontrastierungsreagenz bei Raumtemperatur während der chemischen Fixierung ist eine erhöhte strukturelle Änderung der Probe zu erwarten, was die Qualität der chemischen Fixierung mindert.

4.3. Kryo-Präparation von Polymeren

Ganz allgemein betrachtet bestehen biologische Systeme wie zum Beispiel die oben untersuchten HeLa-Zellen aus selbstorganisierten organischen Molekülen, die sich in wässriger Umgebung befinden. Daher liegt es nahe, die exzellenten konservierenden Eigenschaften der Kryopräparation auf ähnliche, nicht biologische Systeme zu übertragen. Polymerteilchen oder -kapseln in wässriger Dispersion sollten sich demzufolge ebenso für diese Methode eignen. Allerdings muss das Präparationsprotokoll speziell auf Bedürfnisse und Eigenschaften der zu untersuchenden Probe angepasst werden.

Für die Anwendung der Kryo-Präparation auf Polymere stellt Aceton, welches für biologische Proben das optimale Substitutionsmittel ist, ein Problem dar, da viele Polymere durch Aceton angelöst oder sogar komplett gelöst werden. Aus diesem Grund wurde Ethanol als Lösemittel in den folgenden Gefriersubstitutionen ausgewählt.

Die Wahl von Ethanol beschränkte allerdings die Auswahl des Kontrastierungsreagenz, da nur noch Osmiumtetroxid verwendet werden konnte. Der Grund hierfür ist, dass das für Polymere weitaus besser geeignete Rutheniumtetroxid, mit dem selbst aromatische Systeme oxidiert werden können^[38], auch Ethanol oxidiert. Somit fällt schon bei der Zugabe einer in-situ hergestellten Lösung von Rutheniumtetroxid (s. Abbildung 5) zum Substitutionsmedium schwarzes Rutheniumdioxid durch Oxidation des Ethanols aus.

Für die Kryo-Fixierung polymerer Systeme wurden die mit den entsprechenden Polymerdispersionen gefüllten Kapillaren hochdrucktiefgefroren und in die Gefriersubstitutionsanlage überführt, ohne diese dabei aufzutauen. Als Substitutionsmedium diente dabei Ethanol, da sich Aceton im Falle von Polymeren nur bedingt eignet. Die substituierten und kontrastierten Polymere wurden in EPON[®] eingebettet, am Mikrotom geschnitten und im Transmissionselektronenmikroskop betrachtet (s. Abbildung 17):

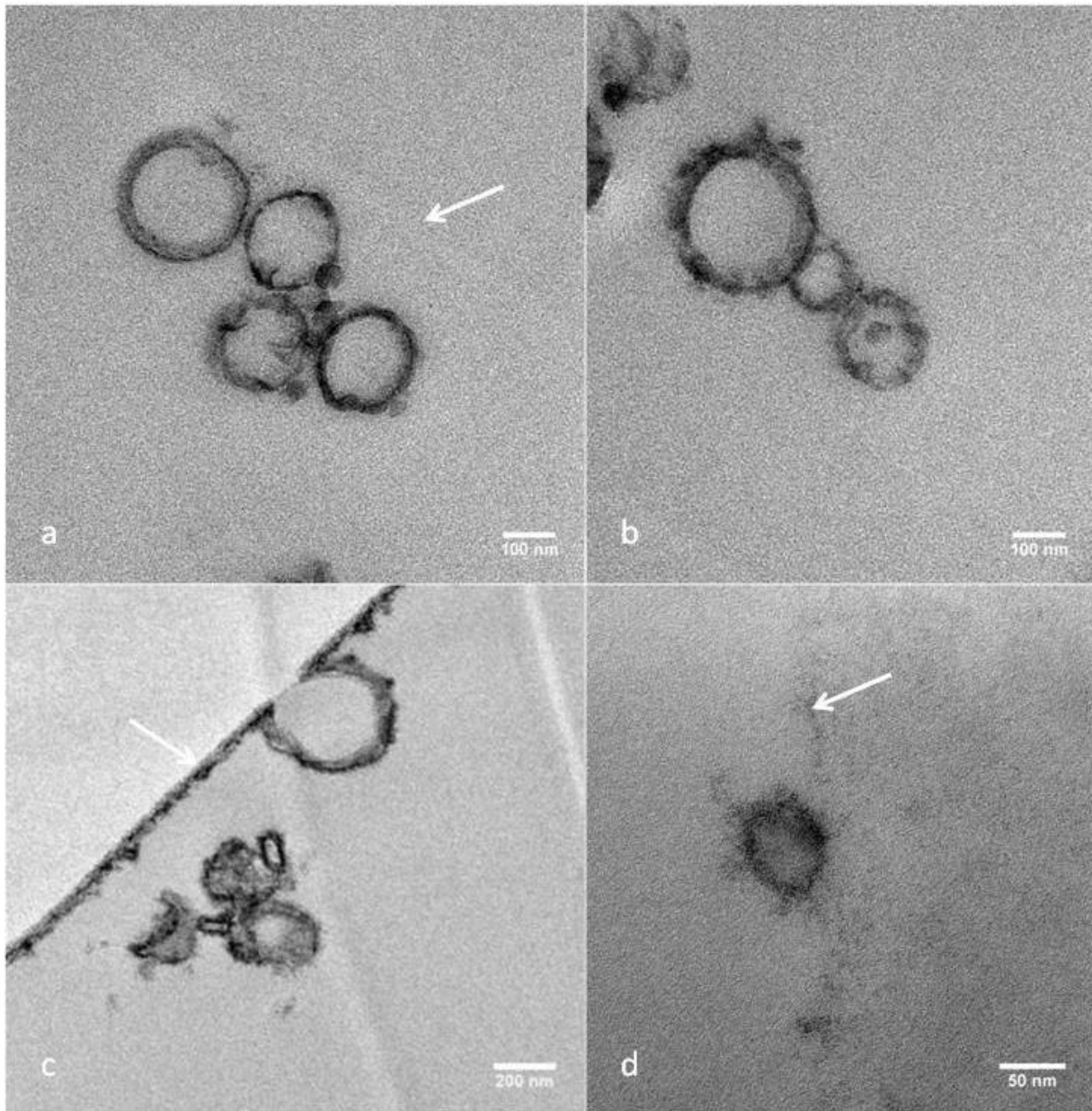


Abbildung 17: TEM-Aufnahmen von EPON[®]-Schnitten verschiedener Kapseln, die durch Kryopräparation hergestellt wurden. Aus den Bildern wird deutlich, dass sich die Kapseln nach der Präparation meistens an der Kapillarwand (markiert durch die Pfeile) befinden, wie in a, c und d deutlich wird. In a, b und d sind Polyharnstoffkapseln abgebildet, die aus Diaminohexan und TDI dargestellt wurden. Es sind keine Deformationen zu beobachten. c zeigt Polyurethankapseln aus Hexandiol und TDI. Dabei wird die Adsorption der Kapsel an der Kapillarwand deutlich, da dort die Reaktion mit dem Kontrastierungsreagenz nicht stattgefunden hat. Da die Kapseln in einem Harz eingebettet sind, sind diese TEM-Präparate sehr stabil gegen Elektronenstrahlung und daher ist es auch möglich, TEM-Aufnahmen bei höheren Vergrößerungen zu machen (d).

In Abbildung 17 sind TEM-Bilder verschiedener Kapseln abgebildet. Dabei handelt es sich um Polyharnstoffkapseln (a, b und d), die aus Diaminohexan und TDI hergestellt wurden und um Polyurethankapseln (c) aus Hexandiol und TDI. Auffallend ist, dass sich ein Großteil der durch Kryo-Fixierung präparierten Kapseln an der Kapillarwandung befindet (markiert durch die Pfeile in Abbildung 17). Dies ist sehr wahrscheinlich auf die an das Hochdruckgefrieren anschließende Gefriersubstitution zurückzuführen. Man kann davon ausgehen, dass nach dem Einfrieren die Probe in einem nahezu ursprünglichen Zustand vorliegt.

Bei der anschließenden Gefriersubstitution wird das hochdruckgefrorene, amorphe Wasser vom Substitutionsmedium Ethanol bei -90 °C bis -80 °C herausgelöst^[31]. Dieser Lösungsprozess findet nur sehr langsam statt, da er nur durch Diffusion vorangetrieben wird. Die Lösungen werden während der Gefriersubstitution nicht gerührt oder geschüttelt. Auf diese Weise löst sich das amorphe Wasser nach und nach auf, ohne dabei zu rekristallisieren. Man erhält dadurch ein flüssiges System, in dem die Kapillaren mit den darin enthaltenen Polymerdispersionen schwimmen. Die Dispersionen sind nach erfolgter Substitution nicht mehr wässrig, sondern ein Ethanol-Wasser-Gemisch mit sehr hohem Ethanolgehalt ($> 90\%$), wodurch die Probe bei den Substitutionstemperaturen von -90 °C flüssig bleibt.

In diesem Stadium der Gefriersubstitution geht durch die Diffusion innerhalb der Kapillare ein Großteil der dispergierten Polymerpartikel verloren, da diese herausgeschwemmt werden. Ähnlich dem Strömungsprinzip von Hagen-Poiseuille^[39] werden vor allem die Partikel herausgeschwemmt, die sich in der Mitte der Kapillare befinden. Je näher sich die Partikel am Rand befinden, desto niedriger ist die dort herrschende Strömung, wodurch sich nach der Gefriersubstitution die Partikel bevorzugt an den Kapillarwandungen befinden. Aus diesem Grund muss bei der Kryo-Präparation mit hohen Polymerkonzentrationen von 3-5 Gew% gearbeitet werden, so dass trotz des Verlustes an herausgespülten Polymerpartikeln während der Gefriersubstitution noch genügend Material in der Kapillare für die anschließende Einbettung erhalten bleibt.

Nach dem Austausch des Wassers gegen Ethanol wird das Substitutionsmedium mit der darin enthaltenen Probe langsam erwärmt. Bei etwa -70 °C beginnt dann das im Substitutionsmedium enthaltene Kontrastierungsreagenz mit den Polymerpartikeln zu reagieren, wodurch diese kontrastiert und zusätzlich fixiert werden. Dabei ist nicht

auszuschließen, dass es teilweise auch zur Adsorption und Fixierung der Polymerkapseln auf der Kapillarwandung kommt (siehe Abbildung 18 c).

Nach erfolgter Gefriersubstitution werden die Proben noch 1 h lang bei 0 °C gelagert, so dass das Kontrastierungsreagenz vollständig abreagieren kann, bevor die Proben dann in einem Epoxidharz eingebettet werden.

Aus den Aufnahmen in Abbildung 17 wird deutlich, dass die Kapseln durch die Kryopräparation kaum deformiert und nicht zerstört wurden. Dies spricht für einen sehr guten Strukturertalt, der genauso wie bei biologischen Materialien erfolgt.

Sind nur wenig Artefakte durch das Kontrastierungsreagenz vorhanden, ist sogar möglich HRTEM-Bilder (d) des Materials aufzunehmen.

4.4. Vergleich verschiedener Präparationsmethoden von Polymeren zur elektronenmikroskopischen Untersuchung

In diesem Abschnitt soll die Kryopräparation anderen, zur Präparation von Polymeren geeigneten Methoden gegenübergestellt werden. Bei der ersten Methode handelt es sich um die sogenannte Drop-Casting Methode, bei der die Probe einfach durch Auftropfen einer stark verdünnten Kapseldispersion auf ein kohlebefilmtes Netzchen erzeugt wurde. Als zweites wurde zur Dispersion ein Kontrastierungsreagenz (Osmiumtetroxid) zugeben und nach einer Stunde Inkubationszeit ebenfalls auf ein kohlebedampftes Netzchen aufgetropft. Eine dritte Probe wurde durch Kryopräparation hergestellt.

4.4.1. Auftropfen von Polyurethankapseln

Wie bereits in Kapitel 2.3.1. erwähnt, ist die Drop-Casting-Methode die einfachste Präparationsmethode zur Herstellung von TEM-Präparaten. Abbildung 18 zeigt anschaulich zwei verschiedene Effekte, die bei der Drop-Casting-Methode auftreten können. Zum einen werden empfindliche Proben, wie die hier verwendeten

Polyurethankapseln aus Milchsäure und TDI, deformiert oder kollabieren aufgrund des Lösemittelentzuges (Abbildung 18 a). Zum andern lagern sich beim Trocknen und der damit verbundenen Aufkonzentration die Kapseln um die Stege des TEM-Netzchens in großen Anhäufungen an (Abbildung 18 b). Auch hier kommt es dann bei empfindlichen, mechanisch instabilen Partikeln zu Deformationen und morphologischen Änderungen. Prinzipielle Aussagen über die ursprüngliche Gestalt der Probe sind zwar noch in gewissem Rahmen möglich, die Gefahr einer Fehlinterpretation der Bilder ist allerdings immer zu berücksichtigen.

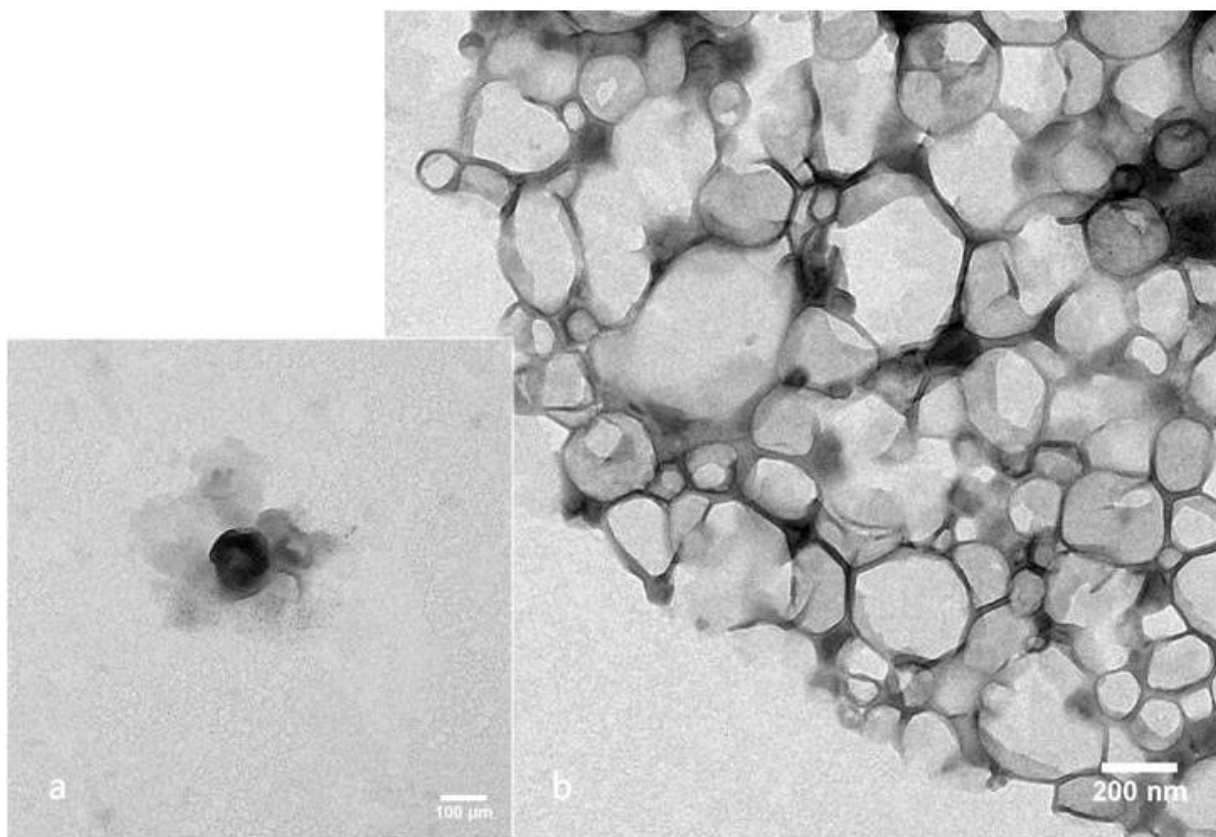


Abbildung 18: TEM-Aufnahmen von Polyurethankapseln, hergestellt aus Milchsäure und TDI, redispergiert in 0,3% wässriger SDS-Lösung. Als Präparationstechnik wurde die drop-casting-Methode verwendet. Die Kapseln zeigen die typischen Trocknungseffekte. Sie werden durch das Trocknen deformiert oder ganz zerstört. In (b) ist ein weiterer Effekt deutlich zu erkennen. Durch das langsame Trocknen lagert sich ein Großteil der Probe an den Stegen des TEM-Netzchens an.

4.4.2. Kontrastierung in Dispersion

Die Auftropf-Methode ist für mechanisch stabile Polymerpartikel aufgrund ihrer Einfachheit sehr erfolgreich. Will man allerdings auch Partikel präparieren, bei denen man Gefahr läuft, dass sich diese beim Trocknen morphologisch verändern, so kann man versuchen, diese Partikel vor dem eigentlichen Auftropfen zu fixieren.

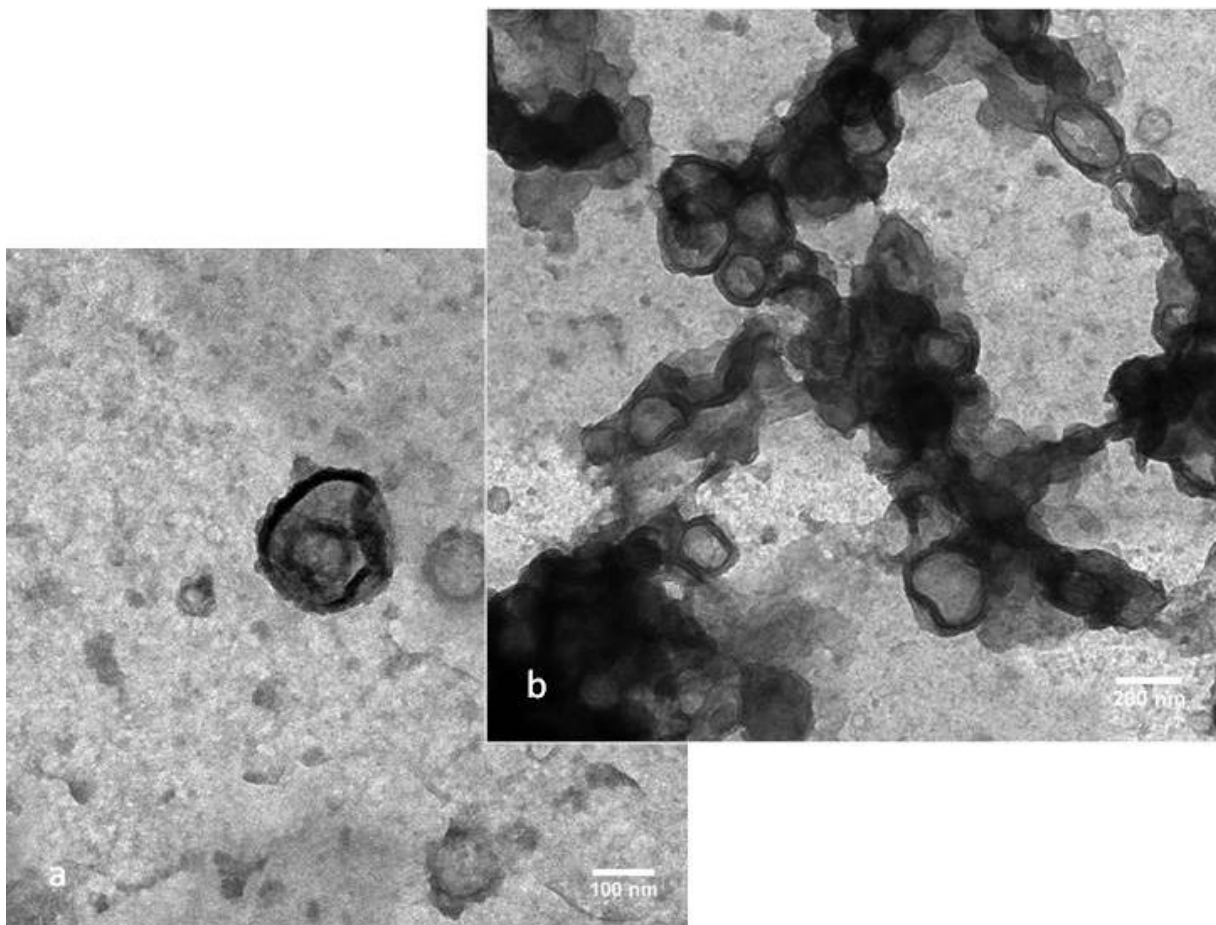


Abbildung 19: Polyurethankapseln aus Milchsäure und TDI, die zuerst in Dispersion mit Osmiumtetroxid kontrastiert und anschließend auf ein kohlebedampftes TEM-Netzchen aufgetragen wurden. Im Bulk an den Stegen des TEM-Netzchens treten auch hier die typischen Trocknungseffekte auf (b). Die Kapseln werden allerdings nicht mehr zerstört, sondern weisen nur Deformationen auf (a).

Werden die Polyurethan-Kapseln vor dem Auftropfen auf ein TEM-Netzchen eine Stunde lang in der Mutter-Dispersion mit Osmiumtetroxid kontrastiert, so findet man nahezu keine kollabierten Kapseln auf dem TEM Netzchen. Das typische Ergebnis

der Vorfixierung vor dem Drop-Casting ist in Abbildung 19 dargestellt. Die Kapseln bleiben in ihrer Form als Kapsel erhalten, und man erkennt deutlich die im Kontrast dunklere Schale. Selbst in den Anhäufungen an den Stegen (b) des TEM-Netzchens weisen diese hauptsächlich nur Deformierungen auf. Auf diese Weise kann auch die Dicke der Kapselwandung bestimmt werden (a). Allerdings sind die Kapseln auch hier im Vergleich zu ihrer ursprünglichen, natürlichen Form verändert. Desweiteren erkennt man in den TEM-Aufnahmen leicht, dass sich das eingesetzte Kontrastierungsreagenz (in diesem Fall OsO_4) nicht nur an der Probe, sondern auch als undefinierbarer Niederschlag auf dem gesamten Kohlesubstrat wiederfindet. Dies muß man bei der Dosierung des Kontrastierungsmittels beachten.

4.4.3. Kryo-Präparation

Schließlich wurden die gleichen Polyurethankapseln mittels der beschriebenen Kryo-Methode präpariert. Im Gegensatz zu den auf Auftropfen beruhenden Methoden werden hier von der Probe Querschnitte angefertigt, was an sich einige Vorteile in sich birgt. So ist es wesentlich einfacher, beispielsweise die Dicke der Kapselwand anhand von Querschnitten zu bestimmen oder auch Kern-Schale-Architekturen eines Polymerpartikels darzustellen.

Abbildung 20 zeigt solche Querschnitte durch nahezu in ihrer ursprünglichen Form erhaltene Polymerkapseln. In Abbildung 20 (b) ist dabei ein für diese Präparationsmethode häufig auftretender Effekt gezeigt. Während dem Lösen des amorphen Wasser bei der Gefriersubstitution werden durch die in der Kapillare herrschende Diffusion ein Großteil der Kapseln heraus geschwemmt. Dadurch befinden sich die in der Kapillare verbliebenen Kapseln hauptsächlich in der Nähe der Kapillarwandung.

Alle drei Methoden sind zur Darstellung von Polymeren im TEM geeignet. Aus den aufgenommenen TEM-Bildern lassen sich unterschiedlich viele Informationen über das Polymer gewinnen. Die Drop-Casting Methode und das Kontrastierung in Dispersion beschreiben den wirklichen Zustand der Probe nur unzureichend. Durch

die Deformationen und die Zerstörung der Kapselstrukturen durch das Trocknen und durch die Reaktion mit dem Kontrastierungsreagenz wird die Struktur der Kapsel stark beeinflusst. Die bessere Methode stellt die Kryo-Präparation dar. Hier lässt sich ein Querschnitt der ursprünglichen Struktur der Kapsel darstellen.

Vergleicht man die chemisch fixierten Kapseln in Abbildung 19 mit den kryopräparierten in Abbildung 20, so wird deutlich, dass die Polyurethankapseln in Abbildung 19 viel stärker kontrastiert sind. Dies liegt daran, dass die Probe viel dicker ist als die kryopräparierten Kapseln in Abbildung 20. Zusätzlich befinden sich auf dem gesamten kohlebedamften TEM-Netzchen viele undefinierbare Niederschläge, die durch die Kontrastierung in Dispersion entstehen. Der Kontrast in Abbildung 20 dagegen beruht allein auf den unterschiedlichen Elektronendichten innerhalb der Probe, da der Schnitt überall ca. 60 nm dünn ist. Auffallend ist auch, dass sich in den allen Schnitten der kryopräparierten Kapseln (siehe Abbildung 17 und 20) Artefakte und Fragmente von zerstörten Kapseln befinden. Dies hängt zum einen mit der niedrigen Stabilität der Kapseln, wie in Kapitel 4.5.1. noch ausführlicher beschrieben wird, zusammen. Zum anderen befinden sich durch das Redispergieren der Kapseln in Wasser nach ihrer Herstellung, Tenside und andere Artefakte in der Probe, die während dem Gefriersubstitutionsprozess mitkontrastiert werden. Es kann jedoch ausgeschlossen werden, dass die verwendeten Polyurethankapseln während der Kryopräparation zerstört werden.

Die Methode der Kryopräparation ist sehr zeitaufwendig weswegen, sie sich als Routinemethode nur bedingt eignet.

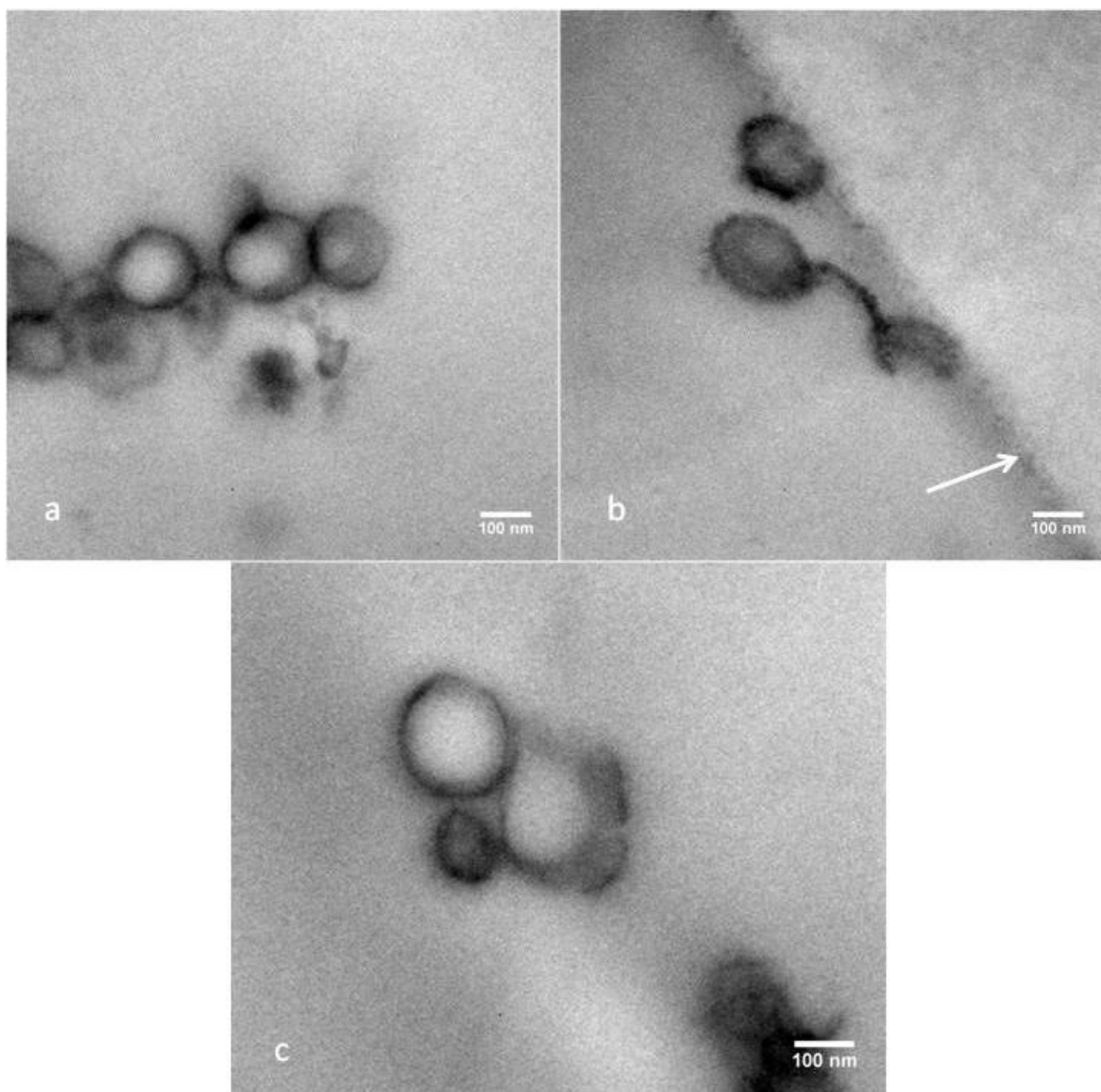


Abbildung 20: Kryo-Präparation mit Hochdruckgefrierer und Gefriersubstitution (mit Ethanol als Lösemittel) von Polyurethankapseln, die aus Milchsäure und TDI hergestellt wurden. In den angefertigten Ultradünnschnitten, sind die Kapseln gut erkennbar. In (b) ist ein typisches Phänomen dieser Präparationsmethode aufgezeigt: Die meisten abgebildeten Kapseln befinden sich an der Kapillarwandung. Die Kapillarwandung ist mit einem weißen Pfeil markiert.

4.5. Anwendung der Kryo-Präparation zur Analytik von Polymeren

Wie im vorhergehenden Abschnitt gezeigt wurde, gibt es verschiedene Möglichkeiten, partikuläre Polymere für TEM-Untersuchungen zu präparieren. Je nach Fragestellung und Eigenschaften der Polymerpartikel wird man die jeweils im Aufwand und Ergebnis optimale Methode auswählen. Die Kryo-Präparation mittels Hochdruckgefrierer und Gefriersubstitution zeichnet sich dabei vor allem durch die guten, morphologie-konservierenden Ergebnisse aus. Damit ist es nun gelungen, das Spektrum der Präparationsmethoden maßgeblich zu erweitern und auf komplexere Systeme und Fragestellungen anzuwenden.

In den weiteren Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit sollen nun vor allem analytische Fragestellungen der Polymerkapseln im Vordergrund stehen.

In den folgenden Beispielen sind im Vorfeld der Kryo-Präparation Fragen zur Probe aufgetreten, die mit Hilfe von transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen geklärt werden sollten.

4.5.1. Langzeitstabilität der Polyurethankapseln

In diesem Versuch wurden aus drei Monate alten Polyurethankapseln, die aus Kartoffelstärke und TDI hergestellt wurden, mit Hilfe der Kryo-Präparation elektronentransparente Schnitte hergestellt und im TEM untersucht. Hierbei stellte sich heraus, dass der typische Kapselquerschnitt, der normalerweise in den gefertigten Schnitten erkennbar ist, nicht vorhanden ist. Es konnten nur Fragmente der Kapselhüllen entlang der Kapillarwandung gefunden werden (s. Abbildung 21).

Die Zerstörung bzw. Zersetzung der Kapseln muss vor dem Hochdrucktiefgefrieren stattgefunden haben, da mittels HPF die Struktur beim Gefrieren durch die extrem hohe Kühlrate erhalten bleibt. Das bedeutet, dass die Kapseln eine geringe Stabilität aufweisen und sich innerhalb von 3 Monaten komplett zersetzt haben.

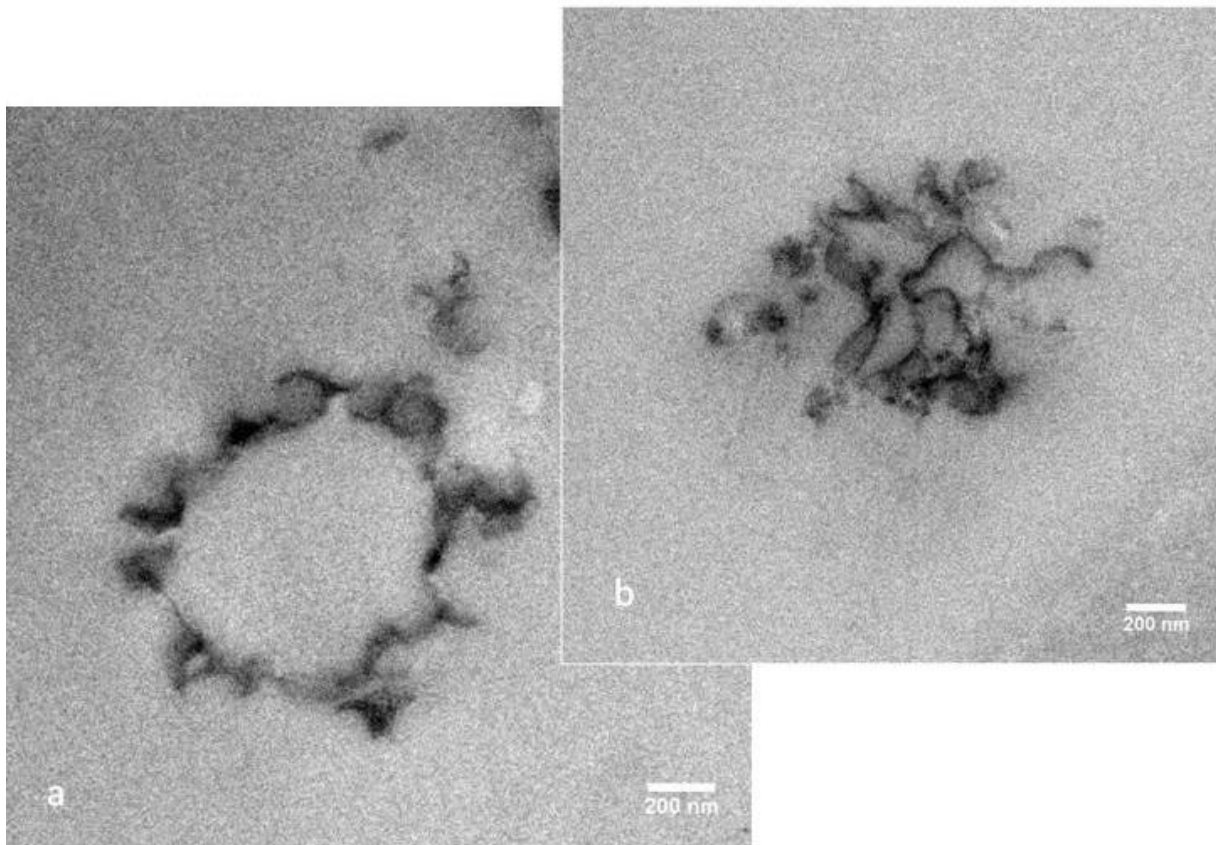


Abbildung 21: TEM-Aufnahmen von drei Monate alten Polyurethankapseln aus Kartoffelstärke und TDI. Es ist keine Kapselstruktur mehr erkennbar. Die Kapseln sind zerstört, und es sind nur noch Fragmente der Kapselhüllen vorhanden.

4.5.2. Nachweis von verkapselten, goldmarkierten Antikörpern

Neben reinen morphologischen Untersuchungen bietet das TEM noch eine Reihe weiterer Möglichkeiten, mit denen man u.a. auch die Elementzusammensetzung der Probe lokal darstellen kann. In der folgenden Untersuchung wurden goldmarkierte Antikörper in Polyurethankapseln eingeschlossen. Für den Nachweis dieser verkapselten, goldmarkierten Antikörper waren HRTEM-Aufnahmen erforderlich. Dadurch waren spezielle Anforderungen an die Probe nötig: Zum einen musste die Probe einer höheren Elektronenstrahlbelastung standhalten, da für die benötigten Aufnahmen im Transmissionselektronenmikroskop die Objektivblende entfernt werden musste, um einen höheren Kontrast zu erhalten. Zum anderen sollte die

abgebildeten ultradünnen Schnitte möglichst artefaktfrei sein, da Artefakte zu falschen Ergebnissen führen können.

In Abbildung 22 sind HRTEM-Aufnahmen der Probe GB-Gold-1 dargestellt. Die Polyurethankapseln, die aus Kartoffelstärke und TDI hergestellt wurden, sollten goldmarkierte Antikörper enthalten.

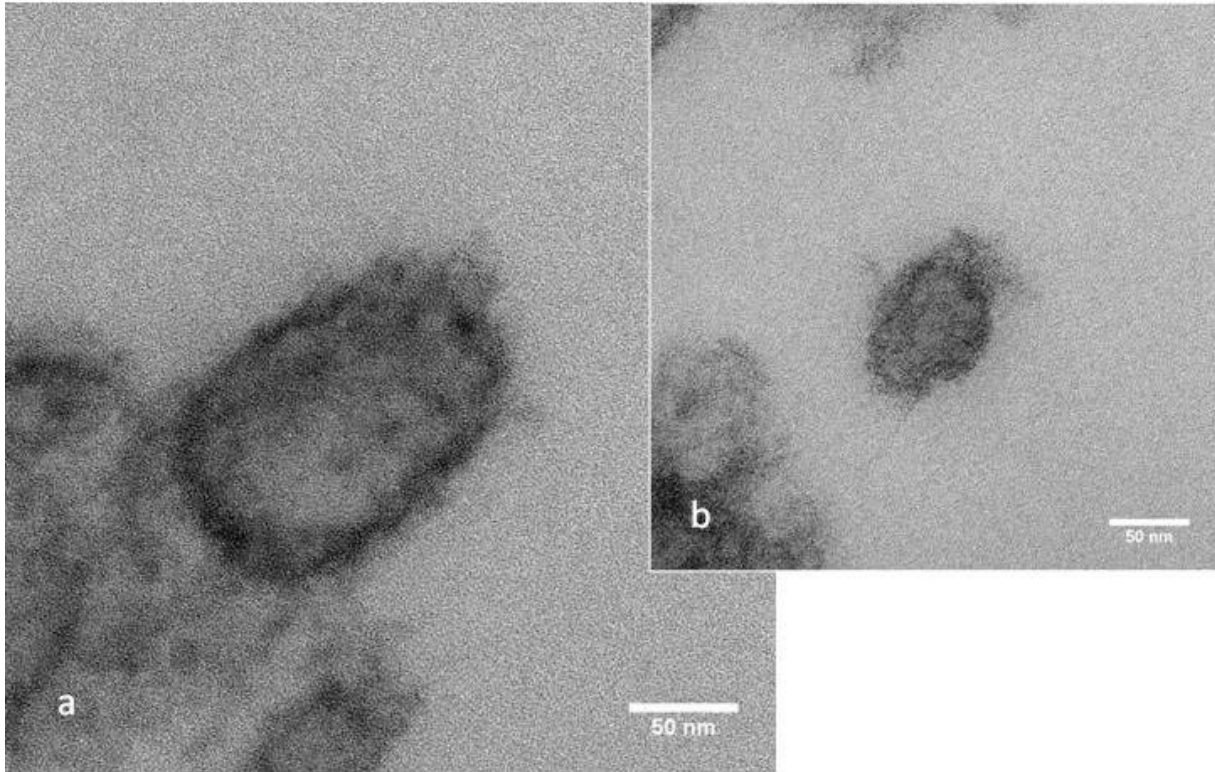


Abbildung 22: HRTEM-Aufnahmen von GB-Gold-1. Es handelte sich dabei um Polyurethankapseln bestehend aus Kartoffelstärke und TDI.

Laut Herstellerangaben haben die Goldcluster einen Durchmesser von etwa 10 nm. Jedoch wird aus den HRTEM-Bildern deutlich, dass sich in den Kapseln keine Goldcluster befanden.

Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen:

Entweder wurden die goldmarkierten Antikörper während der inversen Miniemulsion nicht verkapselt, oder die eingesetzte Konzentration der Antikörper wurde zu niedrig gewählt.

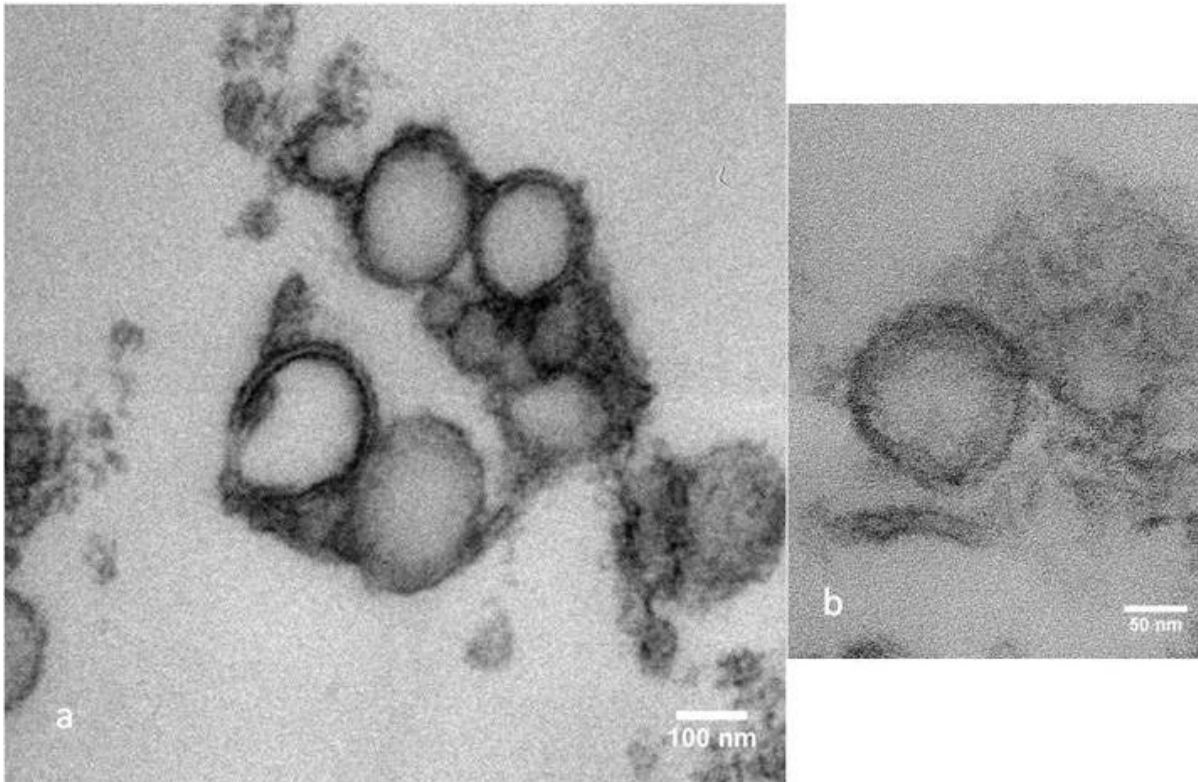


Abbildung 23: TEM-Aufnahmen von GB-Gold-2. Es handelte sich dabei um Polyurethankapseln bestehend aus Milchsäure und TDI

Auch in einem zweiten Versuch konnten die goldmarkierten Antikörper transmissionselektronenmikroskopisch nicht nachgewiesen werden. Obwohl die Kapselquerschnitte durch die Kryo-Präparation gut dargestellt werden konnten, sind die Goldcluster in den HRTEM-Aufnahmen (s. Abbildung 23 b) nicht erkennbar.

Da der Hersteller der Antikörper nur eine optische Dichte seiner goldmarkierten Antikörper angegeben hatte und nicht, wie üblich eine Konzentration, ist es sehr wahrscheinlich, dass für die Verkapselung zu wenig des teuren Ausgangsmaterial eingesetzt wurde.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die für biologische Materialien bekannte und auch etablierte Methode^[40] der Kryo-Präparation auf empfindliche Polymersysteme, wie zum Beispiel Kapseln zu übertragen. Die Methode wurde zunächst verwendet, um unbehandelte HeLa-Zellen zu präparieren. Dabei wurden drei verschiedene Lösemittel in der Gefriersubstitution eingesetzt und deren Einfluss auf die Qualität der Probe untersucht. Es stellte sich heraus, dass das in der Literatur am weitesten verbreitete Lösemittel Aceton die besten Ergebnisse lieferte. Nur mit Aceton waren alle Zellbestandteile, wie Mitochondrien und Vesikel, sowie die feinen Membranstrukturen der Zelle sehr gut kontrastiert.

In einem weiteren Versuch wurde ein Vergleich zwischen der klassischen, chemischen Fixierung und der Kryo-Präparation anhand unbehandelter HeLa-Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass durch die Kryo-Präparation ein deutlich besserer Strukturerehalt der Zellen erreicht werden kann.

Die bisher erhaltenen Ergebnisse, vor allem im Bezug auf die Wahl des Lösemittels, wurden anschließend verwendet, um die Methode der Kryo-Präparation auf ausgewählte Polymersysteme zu transferieren. Dazu wurden mehrere Polyurethan- und Polyharnstoffkapseln hochdrucktiefgefroren, gefriersubstituiert und in ein Epoxidharz eingebettet. Als Gefriersubstitutionsmedium für Polymersysteme wurde Ethanol dem in der biologischen Probenpräparation üblichen Aceton vorgezogen, da sich in Aceton viele Polymere lösen und dadurch die Gefahr von Artefaktentstehung erheblich zuzunehmen droht. Durch die Verwendung von Ethanol konnte allerdings das für Polymere besser geeignete Kontrastierungsreagenz Rutheniumtetroxid aufgrund seiner hohen Reaktivität nicht eingesetzt werden.

Beim wichtigsten Schritt der Kryo-Präparation handelt es sich um eine Gefriersubstitution. Allerdings ist in der Literatur bisher kaum etwas zum mechanistischen Verständnis der Substitution bekannt. Alle bisher verwendeten Erwärmungsprotokolle sind rein empirisch und weichen stark voneinander ab. Ein weiteres Problem ist der hohe Probenverlust der durch das Arbeiten in offenen

Kapillaren während der Gefriersubstitution zustande kommt. Der Verlust wurde in dieser Arbeit durch den Einsatz konzentrierter Polymerdispersionen kompensiert (3-5 Gew%). Die Methode könnte durch den Einsatz von Kapillaren, durch deren Wandung das Substitutionsmedium hindurchdiffundieren kann, optimiert werden. Durch Verschließen beider Kapillarenden kann dann der hohe Probenverlust minimiert werden.

Anhand der erzielten Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass sich die Kryo-Präparation erfolgreich auf Polymersysteme übertragen lässt. So konnte dann das neu entwickelte Präparationsprotokoll dazu verwendet werden, erste analytische Fragestellungen an wässrigen Polymersystemen im TEM zu bearbeiten. Es wurde in mehreren Experimenten nachgewiesen, dass die Stabilität der untersuchten Polyurethan- und Polyharnstoffkapseln unter drei Monaten liegt. Die Verkapselung von goldmarkierte Antikörper, konnte anhand der gemachten HRTEM-Aufnahmen nicht verifiziert werden.

Die Kryo-Präparation ist derzeit die vielversprechendste Methode, um eine Probe so nah wie möglich ihrer ursprünglichen, realen Struktur abzubilden. Jedoch gibt es mit cryo-electron microscopy of vitrous sections+ (kurz: CEMOVIS)^[41] bereits eine neue Vorgehensweise, die ebenfalls sehr aussichtsreich ist, jedoch noch verbessert werden muss, damit sie als Routinemethode verwendet werden kann. Der Vorteil hierbei ist, dass die Probe im natürlichen Zustand, ohne Zugabe von Fixier- oder Kontrastierungsreagenzien, welche die Morphologie der Probe verändern, betrachtet werden kann.

Die Ergebnisse, vor allem der Mechanismus der Gefriersubstitution sollte in weiteren Versuchsreihen noch genauer studiert werden, dienen aber als Grundlage für weitere Experimente.

6. Literatur

- [1] D. Studer, B. M. Humbel, M. Chiquet, *Histochemistry and Cell Biology* **2008**, 130, 877.
- [2] G. E. Palade, K. R. Porter, *Journal of Experimental Medicine* **1954**, 100, 641.
- [3] A. Sawaguchi, K. L. McDonald, S. Karvar, J. G. Forte, *Journal of Microscopy-Oxford* **2002**, 208, 158.
- [4] D. Danino, Y. Talmon, *Cryo-transmission electron microscopy*, Marcel Dekker, New York, **2000**.
- [5] M. Goldraich, Y. Talmon, *Direct-imaging cryo-transmission electron microscopy in the study of colloids and polymer solutions*, Elsevier Science Bv, Amsterdam, **2000**.
- [6] M. Antonietti, K. Landfester, *Progress in Polymer Science* **2002**, 27, 689.
- [7] D. Crespy, M. Stark, C. Hoffmann-Richter, U. Ziener, K. Landfester, *Macromolecules* **2007**, 40, 3122.
- [8] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, *Organic Chemistry*, Oxford University press, **2001**.
- [9] D. B. Williams, C. B. Carter, *Transmission Electron Microscopy*, **1996**.
- [10] L. Bergmann, V. Schaefer, H. Niedrig, Vol. 10 (Ed.: Optik), de Gruyter, **2004**.
- [11] <http://www.fzd.de/db/PicOri?pOid=23345>, Juli **2006**.
- [12] L. Reimer, *Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden*, 2 ed., Springer-Verlag OHG, Berlin, **1967**.
- [13] L. C. Sawyer, D. T. Grubbs, *Polymer Microscopy*, **1987**.
- [14] D. L. White, S. B. Andrews, J. W. Faller, R. J. Barnett, *Biochimica Et Biophysica Acta* **1976**, 436, 577.
- [15] R. Vitali, E. Montani, *Polymer* **1980**, 21, 1220.
- [16] U. A. Spitzer, D. G. Lee, *Journal of Organic Chemistry* **1974**, 39, 2468.
- [17] G. E. Sosinsky, J. Crum, Y. Z. Jones, J. Lanman, B. Smarr, M. Terada, M. E. Martone, T. J. Deerinck, J. E. Johnson, M. H. Ellisman, Academic Press Inc Elsevier Science, San Diego, CA, **2006**, pp. 359.
- [18] H. Hohenberg, M. Tobler, M. Müller, *Journal of Microscopy-Oxford* **1996**, 183, 133.
- [19] D. Studer, M. Michel, M. Müller, *Scanning Microscopy* **1989**, 3, 253.

- [20] H. Moor, U. Riehle, *Proceedings 4th European Reg. Conf. Electron Microsc.* **1968**, 2, 33.
- [21] H. T. Meryman, *Transfusion* **2007**, 47, 935.
- [22] E. Shimoni, M. Müller, *Journal of Microscopy* **1998**, 192, 236.
- [23] D. Studer, W. Graber, A. Al-Amoudi, P. Egli, *Journal of Microscopy-Oxford* **2001**, 203, 285.
- [24] P. Verkade, Blackwell Publishing, Dresden, GERMANY, **2006**, pp. 317.
- [25] K. McDonald, Federation Amer Soc Exp Biol, San Francisco, CA, **2006**, pp. A1332.
- [26] H. Moor, G. Bellin, C. Sandri, K. Akert, *Cell and Tissue Research* **1980**, 209, 201.
- [27] <http://www.technotradeinc.com/freeze.html>, Juli **2009**.
- [28] H. Hohenberg, K. Mannweiler, M. Muller, *Journal of Microscopy-Oxford* **1994**, 175, 34.
- [29] P. Walther, Blackwell Publishing Ltd, Bad Schandau, Germany, **2002**, pp. 34.
- [30] C. Buser, P. Walther, Blackwell Publishing, Dresden, GERMANY, **2006**, pp. 268.
- [31] T. H. Giddings, Blackwell Publishing Ltd, Bad Schandau, Germany, **2002**, pp. 53.
- [32] M. Müller, T. Marti, *Proceedings 7th Europ. Congr. on Electron Microscopy* **1980**, 2, 720.
- [33] P. Monaghan, H. Cook, P. Hawes, J. Simpson, F. Tomley, Blackwell Publishing Ltd, Bad Schandau, Germany, **2002**, pp. 62.
- [34] B. Humbel, M. Muller, *Freeze substitution and low temperature embedding*, Scanning Electron Microscopy, Inc., Illinois, **1985**.
- [35] P. Walther, A. Ziegler, *Journal of Microscopy* **2002**, 208, 3.
- [36] D. Studer, M. Michel, M. Wohlwend, E. B. Hunziker, M. D. Buschmann, *Journal of Microscopy-Oxford* **1995**, 179, 321.
- [37] K. Semmler, J. Wunderlich, W. Richter, H. W. Meyer, *Journal of Microscopy* **1998**, 190, 317.
- [38] D. G. Lee, U. A. Spitzer, J. Cleland, M. E. Olson, *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie* **1976**, 54, 2124.

- [39] P. A. Tipler, G. Mosca, *Physik für Wissenschaftler und Ingenieure 2. Auflage*, Elsevier GmbH, **2003**.
- [40] P. Wild, E. M. Schraner, H. Adler, B. M. Humbel, *Microscopy Research and Technique* **2001**, 53, 313.
- [41] A. Al-Amoudi, L. P. O. Norlen, J. Dubochet, *Journal of Structural Biology* **2004**, 148, 131.

TEM	Transmissionselektronenmikroskop
h	Stunde
s	Sekunde
k. A.	keine Angabe
ms	Millisekunde
Gew%	Gewichtsprozent
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
HR-TEM	High Resolution TEM
HPF	Hochdruckgefrierung (engl.: High Pressure Freezing)
TDI	2,6-Toluoldiisocyanat
THF	Tetrahydrofuran
HeLa-Zellen	permanente Zelllinie von Gebärmutterhalskrebszellen von <i>Henrietta Lacks</i>
RT	Raumtemperatur
FS	Freeze-Substitution (Gefriersubstitution)

Die vorliegende Diplomarbeit wurde im Zeitraum vom 29.01.-28.07.09 am Max-Planck-Institut für Polymerforschung verfasst.

Hiermit erkläre ich, dass die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken ausnahmslos und als solche erkenntlich gemacht sind. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form oder auszugsweise im Rahmen einer anderen Prüfung noch nicht vorgelegt worden.

õ õ õ õ õ õ õ õ õ õ õ õ õ õ õ õ

Datum/Unterschrift

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Prof. Dr. Katharina Landfester für die interessante Themenstellung.

Für die Übernahme der Zweitkorrektur bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. Ulrich Ziener.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Ingo Lieberwirth und Martin Dass für die sehr gute Betreuung und den fachlichen Rat.

Für die fachlichen Hilfestellungen und die Einführungen an die Geräte der Elektronenmikroskopie-Gruppe danke ich Herrn Gunnar Glaßer und Frau Katrin Kirchhoff.

Ich bedanke mich bei Frau Grit Baier für die Herstellung der zu untersuchenden Kapseln sowie die gute Zusammenarbeit.

Besonders bedanken möchte ich meinen Eltern und meinen Großeltern für die Unterstützung während des gesamten Studiums.