

Präparation von mit Bakterien infizierten Wirtszellen für die Rasterelektronenmikroskopie REM/SEM

1. Anzucht der Zelllinie und Bakterien

Die entsprechenden Wirtszellen für die jeweiligen pathogenen Bakterien werden auf 12 mm grossen Deckgläschen in sogenannten 24-well Zellkulturschalen aus Plastik ausgesät, mit Kulturnährlösung überschichtet. Die Zellen wachsen mit der Zeit zu kleinen Zellinseln in einem 37° warmen CO₂-Zellinkubator heran. Bakterien werden im entsprechenden Nährmedium angezogen, am nächsten Tag zentrifugiert und im Nährmedium resuspendiert, um eine Verdünnungsreihe herzustellen.



24-well Zellkulturschale mit 12 mm Deckgläschen in jedem well

2. Infektion:

Bakterien werden in unterschiedlicher Anzahl zu den Wirtszellen hinzugefügt (aus den oben erstellten Verdünnungsreihen) und man lässt die Bakterien über 1 h auf die Wirtszellen absinken und anheften/adhäreren. Man kann auch mit Hilfe einer niedertourigen Zentrifugation die Bakterien auf die Wirtszellen "setzen". Je nach gewünschter Infektionszeit wäscht man nicht gebundene Bakterien mit Nährlösung ab. Die adhärenenten Bakterien treten nun in Kontakt mit der Wirtszellen und „erzwingen“ ihre eigene Invasion in die Wirtszelle oder bleiben nur angeheftet und bewirken andere Wechselwirkungen mit den Wirtszellen. Nach bestimmten Zeitpunkten entnimmt man ein Deckgläschen, wäscht nochmals sorgfältig mit Zellkulturmedium, um abgestorbene Zellen, nicht anheftende Bakterien oder sonstiges wegzuwaschen und fixiert anschliessend.

3. Fixierung der Proben

Da pathogene Bakterien ein Sicherheitslabor voraussetzen, werden alle Proben noch im Zellkulturlabor fixiert. Bei der Fixierung handelt es sich um eine chemische Fixierung mit Formaldehyd und Glutaraldehyd. Wichtig ist, dass ein Waschschriff mit einem geeignetem Puffer durchgeführt wird. Das Wort geeigneter Puffer bereitet oft Kopfschmerzen, da früher der Standardpuffer der medizinische Veronalpuffer gewesen ist, der aber Barbiturat enthält. Nach den neueren Sicherheitsvorschriften kann man diesen nicht mehr verwenden, ohne eine Riesenwelle mit dem Sicherheitsbeauftragten loszutreten. Sonst gibt es den sogenannten PBS Puffer, der oft in der Lichtmikroskopie verwendet wird. PBS stellt

eine gepufferte Kochsalzlösung dar, die jedoch keine befriedigende Erhaltung der Membran im Rasterbild gewährleistet hat, was im lichtmikroskopischen Bild meist nicht zu sehen ist, falls nicht die Membran spezifisch angefärbt wird.

Nach unterschiedlichen Zeitpunkten der Infektion stoppt man die Interaktion zwischen pathogenem Bakterium und der Wirtszelle durch die chemische Fixierung. Hierbei wird die Morphologie der Wirtszelle und der Bakterien festgelegt, so wie beide unter in vitro Bedingungen „aussehen“. Formaldehyd ist ein kleines Molekül und dringt sehr schnell ein und führt eine erste Festlegung der Strukturen durch, da der Aldehydrest mit Proteinen/Eiweißen reagiert. Da Formaldehyd nur eine reaktive Gruppe trägt, benutzt man Glutardialdehyd, welches zwei reaktive Gruppen, daher der Name--dialdehyd, trägt, um eine Quervernetzung der Strukturen zu erreichen und damit soweit wie möglich den "Ist"-Zustand festlegt.

Die Proben wurden hierfür mit 5% Formaldehyd und 2% Glutardialdehyd in Cacodylatpuffer oder HEPES-Puffer (0.1 M Cacodylat oder HEPES, 0.01 M CaCl_2 , 0.01 M MgCl_2 , 0.09 M Saccharose, pH 6.9) für 1 h auf Eis fixiert und anschliessend mit TE-Puffer (10 mM TRIS, 2mM EDTA, pH 6.9) dreimal gewaschen. Der Waschschrift mit TE-Puffer ist zwingend notwendig, da dadurch eine bemerkenswert saubere Membranoberfläche erreicht wird. Die Konzentrationen der beiden Aldehyde können je nach Wirtszelle variieren. Für Endothelzellen hat sich eine erste Fixierung mit Formaldehyd für 10-30 min auf Eis und dann erst eine Fixierung mit 1% Glutardialdehyd als sinnvoll herausgestellt.



Fixierung in der 24-well Schale auf Eis für 1 h

Für diejenigen, die sich mit Elektronenmikroskopie auskennen, fehlt jetzt der Schritt der Osmifizierung mit Osmiumtetroxid. Diese Chemikalie ist nur unter absoluten Sicherheitsbedingungen zu verwenden und wenn man dies vermeiden kann, sollte man es tun. Osmiumtetroxid ist eine leicht gelblich erscheinende Flüssigkeit und wird aus Kristallen durch Auflösen in Wasser angesetzt. Leider ist die Flüssigkeit sehr leicht flüchtig und wenn man den typischen schwachen Knoblauchgeruch wahrnimmt, ist es oft leider schon zu spät und man hat Dämpfe abbekommen. Der Kühlschrank in dem gelösten Osmiumtetroxid in verschlossenen Gefäßen in einer Ölwanne mit Pflanzenöl (welches Osmium schnell

zum Abreagieren bringt) aufgehoben wird, sind trotz aller Vorsichtsmassnahmen spätestens nach 1-2 Jahren im Inneren schön dunkel angefärbt.

4. Entwässerung der Proben

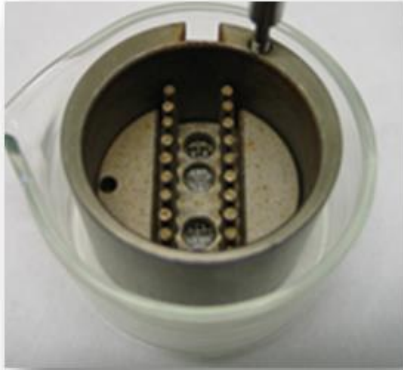
Im Rasterelektronenmikroskop herrscht ein Hochvakuum, um den Elektronen den freien Flug in der elektronenoptischen Säule zu gewährleisten. Im Zeiss Merlin beträgt das Vakuum 10^{-9} Bar im Bereich der Kathode, wo die Elektronen erzeugt werden und in der übrigen elektronenoptischen Säule 10^{-6} bis 10^{-7} Bar. Deshalb müssen alle Proben vollständig entwässert werden. Dies geschieht mit einer ansteigenden Acetonreihe (10, 30, 50, 70, 90, 100%), indem die Lösungen in die Wells der 24-well Schale gegeben werden, nach 15 min wird abgesaugt und die nächste Lösung der Reihe hinzugegeben. Da die 24-well Schale aus Plastik besteht, müssen die Deckgläschen vor dem 100%igem Acetonschritt in eine Glaspetrischale überführt werden, da das 100%ige Aceton das Plastik auflösen würde. Anschliessend noch mal in 100% Aceton bei Raumtemperatur für zweimal 15 min inkubiert. Alternativ kann man auch eine ansteigende Äthanolreihe verwenden, wenn z.B. Wirtszellen auf Plastikträgern angezogen wurden.



Entwässerung durch ansteigende Acetonreihe

5. Kritische-Punkt-Trocknung

Da die Proben nicht aus dem 100%igen Aceton direkt getrocknet werden können, wegen der entstehenden Oberflächenspannungen beim Übergang von flüssigem zu gasförmigem Aceton oder Äthanol, müssen die Proben mit flüssigem Kohlendioxid getrocknet werden. Dies geschieht in einer Kritischen-Punkt-Trocknungsapparatur. Zur Vorbereitung werden die Deckgläschen aus dem 100%igem Aceton in die Deckgläschenhalterung der Apparatur, die mit 100%igem Aceton gefüllt ist, überführt.



Deckgläschenhalterung

Anschliessend wird die Halterung schnell in die Druckkammer der Kritischen-Punkt-Trocknung überführt, die ebenfalls mit 100%igem Aceton bis zur Hälfte gefüllt ist. Danach wird der Druckbehälter mittels des Deckels sorgfältig verschlossen. Die Druckkammer ist an eine mit flüssigem CO₂ gefüllte Gasflasche angeschlossen. Durch Magnetventile lässt man nun das flüssige Kohlendioxid in die Kammer einströmen, bis der obere Rand des Schauglases erreicht ist. Durch ein anderes Magnetventil wird das Aceton abgelassen, da es schwerer als flüssiges Kohlendioxid ist, hat es sich im unteren Bereich der Druckkammer angesammelt. Diesen Wechsel von flüssigem CO₂ ein, flüssigem Aceton aus, führt man solange durch, bis alles Aceton verdrängt wurde. Das erkennt man daran, dass beim Auslassen CO₂-Schnee aus dem Auslassschlauch austritt.



Kritischer-Punkt Trocknungsapparat, über Medium in und Medium out wird das Einströmen von flüssigem Kohlendioxid und Ausströmen von Aceton geregelt.

Nach dem Füllen der Druckkammer mit reinem flüssigem Kohlendioxid wird die Heizung angestellt und das Gerät wird mit 1° Celsius pro Minute aufgeheizt. Dabei steigt der Druck in der Druckkammer an. Es stellt sich mit der Zeit ein Gleichgewicht zwischen gasförmigem und flüssigem Kohlendioxid ein. An der Grenzfläche besteht nun keine Oberflächenspannung mehr. Am Kritischen Punkt von Kohlendioxid geht das gesamte noch verbliebene flüssige Kohlendioxid in gasförmiges über- ohne Oberflächenspannung. Der Druck steigt dabei auf etwa 100-110 Bar an. Da dieser Druck nicht schnell aus der Druckkammer entlassen werden darf, da sonst die Proben zerstört werden, lässt man den Druck über ein Nadelventil über etwa 45 Minuten bis 1 Stunde ab. Nun kann man die getrockneten Proben entnehmen und man erkennt einen weisslichen Hauch/Belag auf der Oberfläche der Deckgläschen.



Getrocknete Deckgläschen
mit Probenmaterial

6. Aufbringen der Proben auf Präparatehalter

Die getrockneten Deckgläschen mit den Proben werden auf Präparatehalter, die je nach Hersteller des Raster-EM spezifisch sind, mit Hilfe von Kohle-Aufklebern befestigt. Die Zeiss Träger sind genau 12 mm im Durchmesser und deshalb wurden 12 mm Deckgläschen verwendet. Der Grund hierfür ist, wie wohl jeder selbst in Erfahrung gebracht hat, dass Deckgläschen schnell zerbrechen. Da hier kein Glas über den Träger schaut, ist die Gefahr minimiert. Es können natürlich auch grössere Deckgläschen oder sogar Objektträger verwendet werden--mit der Gefahr eines möglichen Glasbruchs in der Probenkammer. Besonders während des Einbaus der Proben im Raster-EM, während der Annäherung des Probentisches

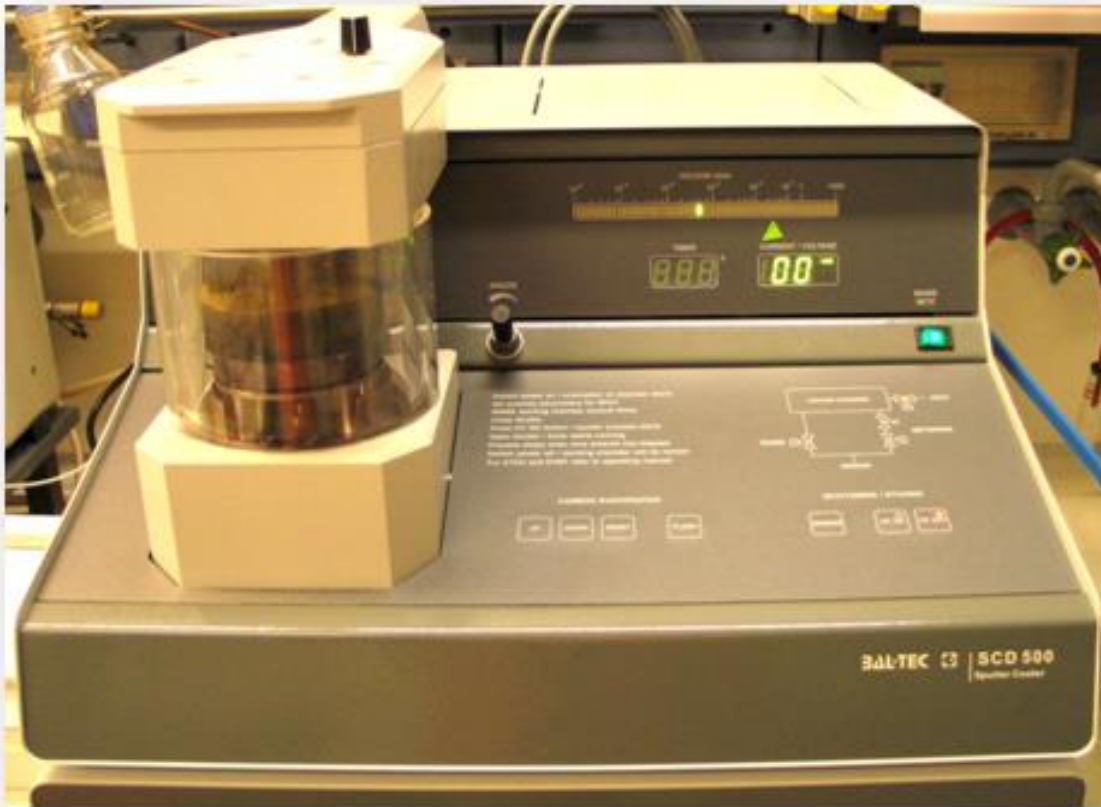
an die Objektivlinse oder während der Aufnahmen. Dies ist besonders tragisch, da Glasstückchen durch das Sieb in die Turbomolekularpumpe fallen könnten, die sich mit zigtausend Umdrehungen dreht. Leicht kann diese dann defekt werden.



Zeiss Träger mit Kohleklebefilm, auf den die Deckgläschen aufgeklebt werden

7. Leitfähigkeit der Proben herstellen

Da im Raster-EM mit Elektronen zur Bilderzeugung gearbeitet wird, müssen die Proben leitfähig gemacht werden, um den Abfluss der eintreffenden Elektronen von der Probe zu gewährleisten. Dies geschieht mit Hilfe einer Kathodenzerstäubungsanlage oder kurz Sputteranlage. Hierbei wird ein Gold oder Gold/Palladium Target (oder andere Metalle wie Platin) auf einem Magneten befestigt. Die Proben werden unterhalb des Targets auf den Tisch im Gerät gesetzt.



Kathodenzerstäubungsanlage oder Sputteranlage

Nach dem Anlegen eines Vakuums wird die Kammer mit einem leichten Argongasstrom durchspült und gleichzeitig eine hohe Spannung am Target angelegt. Die auf das Target treffenden Argonmoleküle schlagen nun aus dem Target Gold oder Gold/Palladium heraus, welches sich auf der Probe absetzt und mit der Zeit einen hauchdünnen goldfarbigen oder silbrigen Film bildet, der weniger als 10 nm dick ist. Die Dicke des Films wird über die Zeit geregelt.



Glühendes Target in der Sputteranlage

8. Einbau der Proben ins Raster-EM

Hat man alle vorherigen Schritte erfolgreich durchgeführt hat man nach etwa 6-8 h die getrockneten und leitfähigen Proben fertig zum Einbau ins Raster-EM.



Ziel erreicht: hier mit Gold besputterte Proben, fertig zum Einbau ins Raster-EM



