



Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Molekulare Strukturbiologie



# **Elektronentomographische und biochemische Untersuchung des Cytoskeletts von *Spiroplasma melliferum***

**Julia Kürner**



Max-Planck-Institut für Biochemie  
Abteilung Molekulare Strukturbiologie



# **Elektronentomographische und biochemische Untersuchung des Cytoskeletts von *Spiroplasma melliferum***

**Julia Kürner**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie  
der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. Adelbert Bacher  
Prüfer der Dissertation: 1. Hon.-Prof. Dr. Wolfgang Baumeister  
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf (schriftliche Beurteilung)  
Priv.-Doz. Dr. Markus Fischer (mündliche Prüfung)  
3. Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Die Dissertation wurde am 22.11.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 22.03.2005 angenommen.

Ich widme diese Arbeit

Herrn Professor Hans J. Gross



# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>5</b>
<b>2 Biologische Grundlagen</b> .....	<b>7</b>
2.1 Struktureller Aufbau von Organismen.....	7
2.2 Das Cytoskelett der Eukaryonten.....	7
2.3 Cytoskelett-ähnliche Elemente und Proteine in Prokaryonten.....	9
2.3.1 Das Cytoskelett der Mycoplasmen.....	12
2.3.1.1 Mycoplasmen (Klasse <i>Mollicutes</i> ).....	12
2.3.1.2 Cytoskelett-ähnliche Elemente und Proteine in Mycoplasmen.....	13
2.3.1.3 Bewegungsmechanismen von <i>S. melliferum</i> .....	19
2.4 Die Evolution des Cytoskeletts.....	20
<b>3 Physikalische Grundlagen</b> .....	<b>22</b>
3.1 Mikroskopie und Auflösung.....	22
3.2 Elektronenmikroskopie.....	25
3.2.1 Aufbau und Funktion eines Transmissions-Elektronenmikroskops (TEMs)...	25
3.2.2 Elektronenquellen.....	27
3.2.3 Aufbau der Elektronenkanone.....	28
3.2.4 Objektivlinsen.....	28
3.2.4.1 Linsenfehler.....	28
3.2.5 Bildentstehung im Transmissions-Elektronenmikroskop.....	30
3.2.5.1 Streuung.....	30
3.2.5.2 Abbildungseigenschaften des Energiefilters.....	31
3.2.6 Kontrastentstehung.....	32
3.2.6.1 Streukontrast (Massendickenkontrast).....	33
3.2.6.2 Amplituden- und Phasenkontrast.....	33
3.2.6.3 Kontrastübertragungsfunktion (engl. <i>Contrast Transfer Function</i> = CTF) .	34
3.3 Elektronentomographie.....	36
3.3.1 Grundlagen der Elektronentomographie.....	36
3.3.1.1 Die Fourier-Transformation.....	38
3.3.2 Automatisierte Elektronentomographie im „low-dose“-Modus.....	40
3.4 Kryo-Präparation.....	41

<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>44</b>
4.1	Zellkultivierung .....	44
4.1.1	Bakterienstamm .....	44
4.1.2	Wachstumsbedingungen und Anzucht .....	44
4.1.3	Langzeitaufbewahrung von Kulturen .....	45
4.2	Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie .....	45
4.2.1	Kryo-Proben .....	45
4.2.2	Negativ-kontrastierte Proben (engl. <i>negative staining</i> ) .....	46
4.3	Kryo-Elektronentomographie .....	46
4.4	Bildverarbeitung und Visualisierung .....	46
4.5	Aufstellung von Bewegungsmodellen .....	47
4.5.1	Konfokale Lichtmikroskopie .....	47
4.5.2	Computersimulationen .....	48
4.6	Biochemische Untersuchung .....	49
4.6.1	Gel-Elektrophorese .....	49
4.6.2	Western-Blot-Analysen .....	49
4.6.3	Herstellung des Antikörpers gegen das „Fibril“-Protein .....	50
4.6.4	Isolierung und Aufreinigung der Filamente .....	51
4.6.5	Proteinsequenzanalysen .....	52
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>54</b>
5.1	Kryo-Elektronentomographie von <i>S. melliferum</i> .....	54
5.1.1	Struktureller Aufbau des Cytoskeletts .....	54
5.1.2	Lage und Verlauf des Cytoskeletts .....	58
5.2	Aufstellung von Bewegungsmodellen .....	61
5.2.1	Änderung der Händigkeit der Zelle .....	61
5.2.2	„Propagating kink“ .....	63
5.2.3	Fortlaufendes Abbiegen der Zelle .....	64
5.3	Biochemische Untersuchungen .....	65
5.3.1	Western-Blot-Analysen .....	65
5.3.2	Isolierung der Filamente .....	66
5.3.3	Proteinsequenzanalysen .....	71
<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>74</b>
6.1	Bisherige Erkenntnisse über das Cytoskelett von <i>S. melliferum</i> .....	74

6.2	Neue Einblicke in die Struktur des Cytoskeletts von <i>S. melliferum</i> durch Kryoelektronentomographie .....	74
6.3	Erklärung und Simulation der Bewegungen von <i>S. melliferum</i> .....	75
6.4	Identifizierung der Cytoskelett-Proteine von <i>S. melliferum</i> mit Hilfe biochemischer Untersuchungen.....	77
6.5	Ausblick.....	79
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>93</b>

**Verzeichnis der Abbildungen**

Abb. 2.1:	Cytoskelett von <i>Dictyostelium discoideum</i> .....	8
Abb. 2.2:	Vergleich der drei-dimensionalen Struktur von Aktin und MreB.....	10
Abb. 2.3:	Modellzeichnungen des Cytoskeletts von <i>Caulobacter crescentus</i> .....	11
Abb. 2.4:	Phylogenetischer Stammbaum .....	12
Abb. 2.5:	Aufbau der Zellwand Gram-positiver Bakterien.....	13
Abb. 2.6:	Modellzeichnungen der Cytoskelette von <i>Mycoplasma</i> und <i>Spiroplasma</i> .....	14
Abb. 2.7:	Modellzeichnung des Cytoskeletts von <i>M. pneumoniae</i> .....	15
Abb. 2.8:	Sekundär- und Tertiärstruktur des N-terminalen Teils des „Fibril“-Proteins aus <i>S. citri</i> .....	17
Abb. 2.9:	Modell für die Anordnung der Untereinheiten innerhalb der Cytoskelett- Filamente von <i>S. melliferum</i> .....	17
Abb. 2.10:	Simulation der Änderung der Händigkeit einer Zelle .....	20
Abb. 2.11:	Simulation einer sich durch eine Zelle fortpflanzenden Deformation .....	20
Abb. 2.12:	Evolution verschiedener pro- und eukaryontischer Proteine .....	21
Abb. 3.1:	Elektromagnetisches Spektrum .....	22
Abb. 3.2:	Darstellung des Rayleigh-Kriteriums .....	23
Abb. 3.3:	Größe biologischer Strukturen und Einsatzbereich verschiedener Mikroskopiearten.....	24
Abb. 3.4:	Transmissions-Elektronenmikroskop (CM 300) von FEI .....	26
Abb. 3.5:	Schematischer Aufbau und Strahlengang eines Transmissions- Elektronenmikroskops.....	27
Abb. 3.6:	Wirkung der sphärischen und chromatischen Abberation .....	29
Abb. 3.7:	Schematische Darstellung zum Funktionsprinzip eines Post-Column- Energiefilters .....	32
Abb. 3.8:	Entstehung des Amplituden- und Phasenkontrastes.....	34
Abb. 3.9:	Abhängigkeit der Kontrastübertragungsfunktion von der Fokusslage .....	35
Abb. 3.10:	Zusammenhang zwischen Bildkontrast und Fokusslage .....	36
Abb. 3.11:	Schematische Darstellung der tomographischen Datenaufzeichnung und Rekonstruktion .....	37
Abb. 3.12:	Veranschaulichung des „missing wedge“ und der „missing pyramid“ .....	38
Abb. 3.13:	Fourier-Zerlegung einer periodischen Rechteckwelle .....	39

Abb. 3.14:	Schematischer Ablauf eines automatisierten, tomographischen Aufnahmezykluses .....	41
Abb. 3.15:	Einschußapparat zur Kryofixierung .....	42
Abb. 3.16:	Schematische Erklärung der Kryopräparation .....	43
Abb. 3.17:	Kryo-Probenhalter .....	43
Abb. 4.1:	Veranschaulichung der sphärischen Koordinaten $r$ , $\varphi$ und $\theta$ .....	47
Abb. 4.2:	Modell der Struktur des N-terminalen Teils des „Fibril“-Proteins, in der die Lage der für die Antikörper-Herstellung ausgewählten Sequenzen markiert ist .....	50
Abb. 5.1:	0°-Bild einer Kippserie von <i>Spiroplasma melliferum</i> .....	54
Abb. 5.2:	Ausschnitt aus einem Tomogramm einer <i>S. melliferum</i> -Zelle .....	55
Abb. 5.3:	Vergrößerter Ausschnitt aus einem Tomogramm einer <i>S. melliferum</i> -Zelle .....	56
Abb. 5.4:	Ausschnitte aus Tomogrammen von <i>S. melliferum</i> -Zellen .....	56
Abb. 5.5:	Schnitte aus Tomogrammen von <i>S. melliferum</i> -Zellen und dazugehörige Profile der Filament-Grauwerte .....	57
Abb. 5.6:	Simulation von Filamentbändern, die die Unterscheidungsmöglichkeit einzelner Filamente im Tomogramm veranschaulicht.....	58
Abb. 5.7:	Ausschnitt aus einem Tomogramm einer <i>S. melliferum</i> -Zelle .....	58
Abb. 5.8:	Ausschnitte aus einem Tomogramm und 3-D-Visualisierung eines Teils einer <i>S.</i> <i>melliferum</i> -Zelle .....	59
Abb. 5.9:	Ausschnitt aus einem Tomogramm und 3-D-Visualisierung einer ganzen <i>S.</i> <i>melliferum</i> -Zelle .....	60
Abb. 5.10:	3-D-Visualisierung der geodätischen Linie.....	60
Abb. 5.11:	Lichtmikroskopische Aufnahmen von <i>S. melliferum</i> -Zellen, die ihre Händigkeit ändern .....	62
Abb. 5.12:	Computersimulation einer ihre Händigkeit ändernde <i>S. melliferum</i> -Zelle.....	62
Abb. 5.13:	Graph zur Erklärung der Händigkeitsänderung.....	63
Abb. 5.14:	Computersimulation einer Deformation in einer <i>S. melliferum</i> -Zelle.....	64
Abb. 5.15:	Lichtmikroskopische Aufnahmen einer abknickenden <i>S. melliferum</i> -Zelle .....	65
Abb. 5.16:	Western-Blots von <i>S. melliferum</i> mit einem Aktin-, „Fibril“-Protein- und MreB- Antikörper .....	66
Abb. 5.17:	Verfahren zur Isolierung und Untersuchung der Cytoskelett-Filamente .....	67
Abb. 5.18:	SDS-Gel des <i>S. melliferum</i> -Lysats, sowie des Überstands und Pellets nach Abzentrifugation des Lysats.....	68
Abb. 5.19:	SDS-Gel einzelner Fraktionen der Gradientenzentrifugation .....	68

Abb. 5.20: Isolierte „Fibril“-Filamente .....	69
Abb. 5.21: SDS-Gel einzelner Fraktionen der Gelfiltration.....	70
Abb. 5.22: Western-Blot mit einem MreB-Antikörper einzelner Gelfiltrationsfraktionen...	70
Abb. 5.23: Gel der „Fibril“-Fraktion der Gradientenzentrifugation .....	71
Abb. 5.24: Aminosäure-Sequenz des „Fibril“-Proteins von <i>S. citri</i> .....	72
Abb. 5.25: Gel der MreB-Fraktion der Gelfiltration .....	72
Abb. 5.26: Aminosäure-Sequenz des MreB2-Proteins von <i>S. citri</i> .....	73
Abb. 6.1: Hypothese über die Zusammensetzung des Cytoskeletts von <i>S. melliferum</i> .....	78

## Zusammenfassung

Diese Arbeit dokumentiert die Ergebnisse der Untersuchungen des bakteriellen Cytoskeletts von *Spiroplasma melliferum*, die durch Anwendung der Kryo-Elektronentomographie und biochemischer Methoden gewonnen wurden.

Die Elektronentomographie ist eine Abbildungstechnik, die eine drei-dimensionale (3-D) Abbildung pleomorpher, biologischer Objekte, wie z.B. Zellen, Organellen, Viren oder Proteine, mit einer Auflösung von derzeit 4-6 Nanometern ermöglicht. Durch Kombination mit Kryo-Präparationsmethoden, d.h. der Einbettung der Probe in einen amorphen Eisfilm, kann das Objekt in einem quasi-nativen Zustand untersucht werden. Diese Technik eignet sich daher bestens, um die Struktur und räumliche Anordnung abbildbarer makromolekularer Aggregate eines Organismus aufzuklären.

Ein limitierender Faktor für die Elektronentomographie ist die Größe des zu untersuchenden Objekts, welches eine Dicke von weniger als einem Mikrometer aufweisen sollte. Aus diesem Grund wurde für diese Arbeit das helikale Bakterium *S. melliferum* (Klasse *Mollicutes*) ausgewählt, welches einen Durchmesser von etwa 200 nm hat und nach bisherigen Untersuchungen ein Cytoskelett aufweisen soll.

Um die Existenz dieses Cytoskeletts zu überprüfen und einen detaillierten Einblick in dessen Struktur, Funktionsweise und Zusammensetzung zu erhalten, wurden in dieser Arbeit Elektronentomogramme aufgenommen, computergestützte Bewegungsmodelle aufgestellt und biochemische Untersuchungen der Cytoskelett-Filamente durchgeführt.

Die elektronentomographische Datenaufzeichnung ganzer Zellen erfolgte mit Hilfe eines 300 kV Transmissions-Elektronenmikroskops, welches mit einer Feldemissionskathode und einem Energiefilter ausgestattet ist. Der Energiefilter ermöglicht die Abtrennung inelastisch gestreuter Elektronen, die sich durch Kontrasterniedrigung negativ auf die Bildaufnahmen auswirken würden. Dennoch weisen die Tomogramme aufgrund der niedrigen Elektronendosis, die für vitrifizierte, biologische Proben unabdingbar ist, ein geringes Signal-zu-Rausch-Verhältnis auf.

In den aufgenommenen Tomogrammen konnte ein Cytoskelett nachgewiesen werden, welches aus drei Bändern aus parallel angeordneten Filamenten unterschiedlicher Dicke

besteht. Zwischen zwei Bändern aus je fünf dicken (11 nm) Filamenten liegt ein Band aus neun dünnen (4 nm) Filamenten. Diese Filamentbänder erstrecken sich helikal, dicht unterhalb der Zellmembran, über die ganze Länge der Zelle. Durch Western-Blot-Analyse und Sequenzierung konnten desweiteren zwei Filament-bildende Proteine nachgewiesen werden, das sogenannte „Fibril“-Protein und das Aktin-ähnliche Protein MreB. Isolierungs- und Aufreinigungsversuche gelangen nur für das „Fibril“-Protein, für das elektronenmikroskopisch gezeigt werden konnte, daß es etwa 10 nm dicke Filamente bildet. Es wird angenommen, daß das Protein MreB die dünnen Filamente bildet, welche jedoch sehr instabil sind und daher bei der Isolierung zerfallen. Die aufgestellten Bewegungsmodelle ließen zudem eine Erklärung verschiedener Bewegungsmechanismen dieser schwimmenden Bakterien zu. Demnach ermöglichen Längen- oder Abstandsänderungen der beiden äußeren Filamentbänder mittels des dazwischen liegenden Bandes eine Fortbewegung dieser Bakterien.

## Abstract

This work documents the results of the investigations of the bacterial cytoskeleton of *Spiroplasma melliferum*, which have been obtained using cryo-electron tomography and biochemical methods.

Electron tomography is an imaging technique that is presently capable of providing three-dimensional (3-D) images of pleomorphic, biological objects such as cells, organelles, viruses or proteins at a resolution of 4-6 nanometers. In combination with cryo-preparation techniques, which means embedding of the specimen in amorphous ice, the object can be investigated in a close-to-native state. Therefore, this technique is most suitable to reveal the structure and spatial arrangement of illustratable macromolecular aggregates of an organism.

A limiting factor for electron tomography is the size of the investigated object, which should have a thickness of less than one micrometer. For this reason the helical bacterium *S. melliferum* (class *Mollicutes*), which has a diameter of about 200 nm and has a cytoskeleton according to previous investigations, was chosen for this work.

Apart from the recording of electron tomograms, computer-based motility models were built up and biochemical investigations of the cytoskeletal filaments were performed in this work in order to examine the existence of this cytoskeleton and to get a detailed insight into its structure, function and composition.

The electron tomographic data acquisition of whole cells was performed using a 300 kV transmission electron microscope, equipped with a field emission gun and an energy filter. The energy filter enables the separation of inelastically scattered electrons, which would have a negative effect on image acquisition due to contrast reduction. Nevertheless, the tomograms show a low signal-to-noise ratio due to the low electron dose, which is necessary for vitrified, biological specimen.

In the acquired tomograms a cytoskeleton could be identified which comprises three ribbons of parallel filaments of different thickness. A ribbon of nine thin (4 nm) filaments is sandwiched between two ribbons of five thick (11 nm) filaments each. These ribbons run helically through the whole cell just underneath the cell membrane. Additionally, two filament-forming proteins, the so-called fibril protein and the actin-like protein MreB, could

be identified using western blot and sequence analysis. Isolation and purification experiments only succeeded for the fibril protein, which was shown to build 10 nm wide filaments by electron microscopy. It is assumed that MreB forms the thin filaments, which, however, are very instable and therefore depolymerize during the isolation procedure. The proposed motility models explained different motility modes of these swimming bacteria. Thus, motility of these bacteria can be achieved by length or distance changes of the two outer ribbons via the ribbon lying in between.

# 1 Einleitung

Unser Wissen über die Struktur von Zellen und ihrem komplexen Cytoplasma wuchs mit der Entwicklung fortgeschrittener Techniken und Apparaturen, die es uns ermöglichten, Zellkomponenten, wie z.B. Zellorganellen, Proteinkomplexe oder einzelne Proteine, im Detail zu untersuchen (Alberts, 1998). Neben biochemischen und genetischen Ansätzen liefert die Mikroskopie entscheidende Erkenntnisse über Aufbau und Funktion lebender Organismen. Mitte des 19. Jahrhunderts wurden erste Einblicke in die Komplexität des Zellinneren durch die Anwendung der Lichtmikroskopie gewährt. Die beste Auflösung, die man mit einem Lichtmikroskop erreichen kann, liegt jedoch bei 200 nm und ist somit nicht ausreichend, um Strukturen und auch Interaktionen im Bereich von einigen Nanometern zu untersuchen. Methoden, wie die Röntgenkristallographie oder NMR-Spektroskopie (= Nuclear Magnetic Resonance) wiederum, lassen zwar Strukturauflösungen bis ins atomare Detail zu, können allerdings nur auf isolierte und aufgereinigte Proteine oder Proteinkomplexe angewendet werden. Erst die Entwicklung des Elektronenmikroskops durch Ernst Ruska und Mitarbeiter zu Beginn der 30er Jahre ermöglichte es im Laufe der Zeit, eine Auflösung von bis zu 0,2 nm (= 2 Å) zu erreichen. Einzelne Zellen sind aber meist zu dick, um innere Zellstrukturen im Elektronenmikroskop sehen zu können. Um Präparate für direkte Untersuchungen zu erhalten, sind deshalb spezielle Techniken zur Herstellung von Dünnschnitten ( $\leq 100$  nm) erforderlich. Hierbei werden Zellen oder Gewebeteile in spezielle Harze (Epon) oder in der Kälte polymerisierende Materialien (Lowicryl) eingebettet und dann mit einem Ultramicrotom geschnitten. Um ausreichenden Kontrast zu erhalten, wird das Präparat außerdem mit speziellen Farbstoffen gefärbt. Diese Art der Kontrastierung kann aber, ebenso wie verschiedene andere Präparationstechniken (z.B. chemische Fixierung oder Entwässerung), zu Strukturveränderungen und Artefakten führen. Bei der Negativkontrastierung (englisch (engl.) *negative staining*) isolierter Proteinkomplexe entstehen Artefakte aufgrund von komplexen Wechselwirkungen zwischen Protein und Kontrastierungsmittel (Schwermetallsalze, wie z.B. Uranylacetat, Ammoniummolybdat oder Phosphorwolframsäure) und führen letztendlich zur Dehydratisierung des Proteins. Trotz allem liefern diese Präparationsmethoden bemerkenswerte Einblicke in die Proteinstruktur, wie einige Beispiele belegen (z.B. Valpuesta *et al.*, 1990). Revolutioniert wurde die Elektronenmikroskopie durch die Entwicklung der Kryo-Fixierung, die es ermöglicht, biologische Objekte im quasi-nativen Zustand im Mikroskop zu untersuchen (Dubochet *et al.*, 1988). Sie verhindert zum einen das Verdampfen

des Wassers im Hochvakuum des Mikroskops und erhält zum anderen artefaktfrei die Ultrastruktur der Proben (Ruiz *et al.*, 1995). Diese Technik, bei der das Präparat in nicht-kristallinem (vitrifiziertem) Eis eingebettet wird, wurde erstmals von Taylor und Glaeser (Taylor und Glaeser, 1974; Taylor und Glaeser, 1976) erfolgreich angewendet und fortan weiterentwickelt (Adrian *et al.*, 1984; Dubochet *et al.*, 1982; Lepault *et al.*, 1983). Zur Kontrastverstärkung dient der Einsatz von Energiefiltern und leistungsfähigen Kameras. Ein weiterer großer Fortschritt gelang mit der Entwicklung der Elektronentomographie, durch die, in Kombination mit Kryo-Fixierung, das sich in nativem Zustand befindliche Untersuchungsobjekt im 3-Dimensionalen (3-D) erforscht werden kann (Baumeister *et al.*, 1999; Baumeister, 2002; Frank, 1992). Hierbei wird aus einer Serie von zwei-dimensionalen (2-D) Projektionen, die in unterschiedlichen Blickwinkeln aufgenommen wurden, ein dreidimensionales (3-D) Volumen rekonstruiert (DeRosier und Klug, 1968; Hart, 1968; Hoppe *et al.*, 1974). Heute ermöglichen technologische Fortschritte, wie Computer-kontrollierte Transmissions-Elektronenmikroskopie und eine automatisierte Datenaufnahme Untersuchungen von intakten pro- und eukaryontischen Zellen mit einer Dicke von bis zu einem Mikrometer (Grimm *et al.*, 1998; Medalia *et al.*, 2002). Die Auflösung, die dabei erreicht werden kann, liegt momentan bei etwa 4 nm (Nickell, 2001).

Die Kryo-Elektronentomographie eignet sich somit besonders dafür, neue Einblicke in den strukturellen Aufbau von Mikroorganismen zu liefern. Ein in den letzten Jahren zunehmend Interesse gewinnendes Thema ist das Vorkommen eines Cytoskeletts in Prokaryonten. Nahm man früher an, daß nur Eukaryonten über ein Cytoskelett verfügen, so kann dies heute aufgrund von verschiedenen Studien widerlegt werden (z.B. Ausmees *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2001). So wurde unter anderem auch berichtet, daß das helikale Bakterium *Spiroplasma melliferum* ein aus einem Filamentband bestehendes Cytoskelett aufweist, welches eine Rolle bei der Zellformgebung und Bewegung spielen soll (Trachtenberg und Gilad, 2001). Für eine genauere Untersuchung dieses Cytoskeletts und seiner Funktionsweise eignet sich die Methode der Kryo-Elektronentomographie bestens. Sie ermöglicht erstmals eine native 3-D-Darstellung dieser Bakterien, die detaillierte Einblicke in die Struktur und Organisation ihres Cytoskeletts gewährt und es - in Verbindung mit biochemischen Untersuchungen – zudem erlaubt, Schlüsse auf dessen Funktion bei den Bewegungsvorgängen dieser Bakterien zu ziehen.

## 2 Biologische Grundlagen

### 2.1 Struktureller Aufbau von Organismen

Zellen sind in der Regel in ihrer Form veränderlich und beweglich. Sowohl die Form als auch die Motilität einer Zelle wird hauptsächlich durch das Cytoskelett bestimmt, das von einem verzweigten Netzwerk aus Filamenten im Cytoplasma der Zelle gebildet wird.

### 2.2 Das Cytoskelett der Eukaryonten

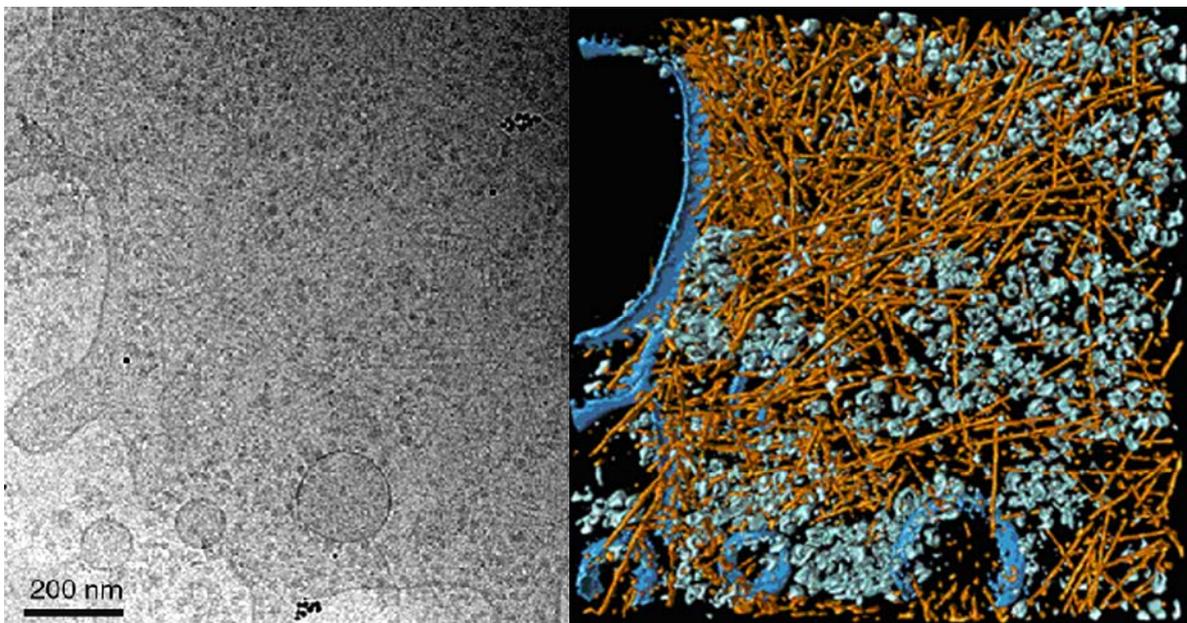
Bis vor einigen Jahrzehnten nahm man an, daß nur Eukaryonten ein Cytoskelett besitzen, welches im allgemeinen dazu dient, die Zellform zu erhalten, Stabilität zu verleihen und Bewegung zu ermöglichen. Man unterscheidet drei Typen von Filamenten: Aktinfilamente, Mikrotubuli und Intermediärfilamente. Die helikalen Aktinfilamente (filamentöses oder F-Aktin), die einen Durchmesser von etwa 8 nm haben und aus globulärem Aktin (G-Aktin, 43 kDa) aufgebaut sind, spielen bei Bewegungsvorgängen, bei der Zellteilung und bei der Muskelkontraktion eine wichtige Rolle. Außerdem dienen sie z.B. in den Mikrovilli als Stützelemente des Cytoskeletts. Sie machen 1-10% des gesamten Proteingehalts einer Zelle aus. Mikrotubuli sind 24 nm dicke, röhrenförmige Filamente bestehend aus Tubulin (55 kDa), die man in allen eukaryontischen Zellen findet. Sie bilden den Spindelapparat bei der Kernteilung und sind für den intrazellulären Transport von Partikeln verantwortlich. Desweiteren bilden sie die Bauelemente von Cilien oder Flagellen, die beide nach dem gleichen Prinzip ("9+2" Axonem) aufgebaut sind. Intermediärfilamente (z.B. Keratin) mit einem Durchmesser von etwa 10 nm haben hauptsächlich Stützfunktion. Ihre Expression und Organisation ist abhängig vom Zelltyp.

Viele der Bewegungen, sowohl zelluläre wie subzelluläre, werden durch Motorproteine erzeugt. Während Myosin mit Aktinfilamenten interagiert, wirken Dynein und Kinesin im Zusammenspiel mit Mikrotubuli. Sie wandeln dabei chemische Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) oder Guanosintriphosphat (GTP), in mechanische Kraft um. Motilität kann jedoch auch durch Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten erreicht werden (Pollard und Borisy, 2003). In sich aktiv fortbewegenden Zellen, wie z.B. den

sehr beweglichen Zellen des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum*, schieben Aktinfilamente die Membran nach vorne und bilden dadurch die sogenannten Lamellipodien oder Filopodien aus.

Im Laufe der letzten Jahrzehnte konnte die Struktur von Aktin bis ins atomare Detail aufgeklärt werden (Holmes *et al.*, 1990). Die funktionelle Organisation von Aktinfilamenten innerhalb der Zelle wurde mit Hilfe der Licht-, Fluoreszenz- und Elektronenmikroskopie veranschaulicht (Schafer *et al.*, 1998; Small *et al.*, 1999; Wang, 1987; Wehland und Weber, 1981). Diese Studien wurden jedoch an fixiertem Material, Detergenz-extrahierten Zellen oder Dünnschnitten durchgeführt (Clarke *et al.*, 1975; Flanagan *et al.*, 2001; Heuser und Kirschner, 1980; Svitkina und Verkhovsky, 1995; Svitkina *et al.*, 1997; Trotter *et al.*, 1978).

Die möglichen Auswirkungen dieser Präparationsmethoden auf das delikate Aktin-Netzwerk sind allerdings sehr umstritten (Resch *et al.*, 2002). Entscheidende Fortschritte gelangen schließlich mit Hilfe der Kryo-Elektronenmikroskopie, durch die extrahierte bzw. isolierte und in vitrifiziertes Eis eingebettete Cytoskelette und Filamente visualisiert werden konnten, ohne Strukturveränderungen auf Grund von Entwässerung, Trocknung oder Kontrastierung aufzuweisen (Resch *et al.*, 2002; Trinick *et al.*, 1986). Auf diese Weise konnte nun zwar die Struktur und Organisation der Cytoskelett-Elemente aufgeklärt werden, der genaue



**Abb. 2.1:** Elektronenmikroskopische 2-D-Aufnahme der Randregion einer vitrifizierten *D. discoideum*-Zelle (links) und 3-D-Visualisierung des Aktin-Netzwerks (orange), sowie der Membranen (blau) und der cytoplasmatischen makromolekularen Komplexe (hellblau) (aus Medalia *et al.*, 2002).

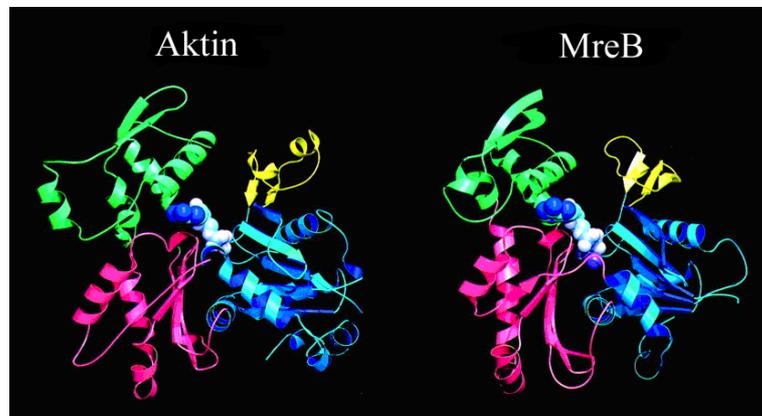
strukturelle Kontext innerhalb der intakten Zelle, die 3-D-Anordnung und die Interaktion mit der Cytoplasmamembran blieben aber noch immer unklar. Die Visualisierung des Aktin-Cytoskeletts in seinem unveränderten, quasi-nativen Zustand wurde erst kürzlich durch die Anwendung der Kryo-Elektronentomographie erzielt (Medalia *et al.*, 2002). 3-D-Rekonstruktionen ganzer, vitrifizierter Zellen von *D. discoideum* lieferten beeindruckende Einblicke in das dynamische Aktinfilament-Netzwerk (**Abb. 2.1**).

### 2.3 Cytoskelett-ähnliche Elemente und Proteine in Prokaryonten

Als ein Unterscheidungsmerkmal zwischen pro- und eukaryontischen Zellen galt lange Zeit das offensichtliche Fehlen eines Cytoskeletts in Bakterien. Vereinzelt Berichte (z.B. Searcy *et al.*, 1978; Searcy *et al.*, 1981) fochten dies zwar an, aber der Beweis für die Existenz Cytoskelett-ähnlicher Strukturen in Prokaryonten blieb aus. Eine der fundamentalen Funktionen eines Cytoskeletts ist es, die Form einer Zelle zu bestimmen und zu erhalten. Bei Bakterien ging man traditionell davon aus, daß die externe Zellwand aus Peptidoglycan primär für die Zellform ausschlaggebend ist. Dies wurde jedoch spätestens mit der Entdeckung der *Mollicutes* (Tully, 1992) in Frage gestellt - einer Klasse zellwandloser Bakterien, die diverse dynamische Morphologien und Zellbewegungen aufweisen, ohne jedoch über Zellanhänge (wie z.B. Flagellen oder Sekretionsorganellen (Bardy *et al.*, 2003)) zu verfügen, welche normalerweise mit Bewegung in Zusammenhang stehen (siehe 2.3.1).

Den ersten tatsächlichen Hinweis dafür, daß das eukaryontische Cytoskelett einen prokaryontischen Vorgänger gehabt haben könnte, stellte die strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zwischen dem bakteriellen Zellteilungsprotein FtsZ und dem eukaryontischen Tubulin der Mikrotubuli dar (Erickson, 1998; Faguy und Doolittle, 1998; Löwe und Amos, 1998; Lutkenhaus und Addinall, 1997). Mit Hilfe von Immunofluoreszenz konnte erstmals die Lokalisierung des FtsZ-Rings in *Escherichia coli* gezeigt werden (Bi und Lutkenhaus, 1991; Ma *et al.*, 1996). Ohne das Vorhandensein von FtsZ wachsen *E. coli*-Zellen weiter, ohne sich zu teilen, und bilden lange, vielkernige Filamente (De Pedro *et al.*, 1997). Analog zu Tubulin, benötigt FtsZ GTP zur Bildung von Protofilamenten (Hoppert und Mayer, 1999). Diese haben einen Durchmesser von 4-5 nm und können sich zu 23 nm dicken, tubulären Strukturen zusammenlagern, welche in Form und Größe den Mikrotubuli ähneln.

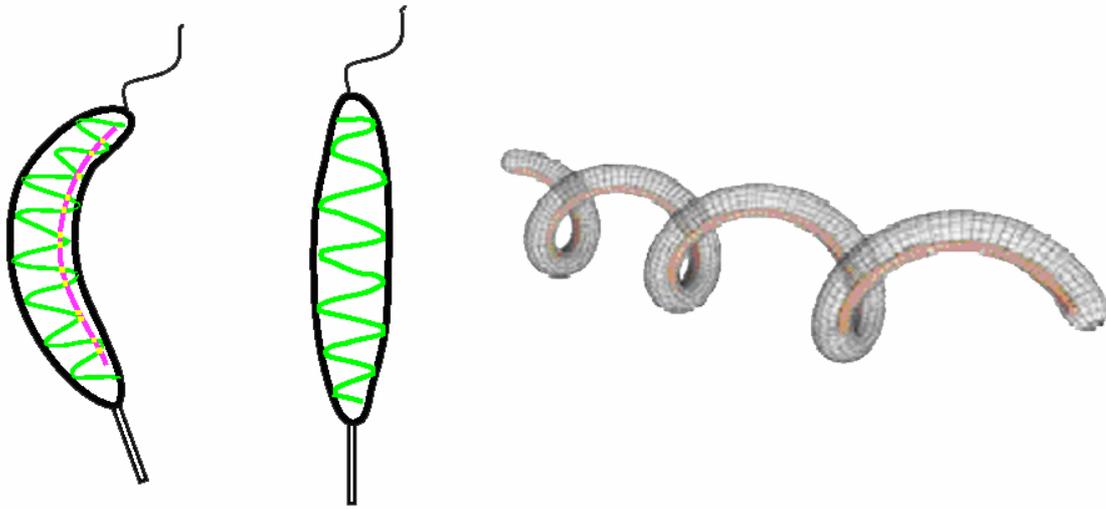
Erst kürzlich wurden durch die Entdeckung der Proteine MreB und Mbl (engl. *MreB-like*) auch bakterielle Homologe zu Aktin identifiziert. Diese die Zellform bestimmenden Proteine bilden in *Bacillus subtilis* helikale, filamentöse Strukturen aus, die spiralförmig unterhalb der cytoplasmatischen Membran durch die Zelle verlaufen (Jones *et al.*, 2001). Die Ausschaltung von MreB (39 kDa) induziert die Bildung runder, aufgeblähter Zellen und führt letztendlich zum Absterben der Zelle. Dieses Phänomen wurde auch in *E. coli* beobachtet (Doi *et al.*, 1988; Wachi *et al.*, 1987). Außerdem konnte gezeigt werden, daß aus *Thermotoga maritima* gereinigtes MreB *in vitro* zu F-Aktin-ähnlichen Filamenten polymerisiert (van den Ent *et al.*, 2001; van den Ent *et al.*, 2001). Trotz einer geringen Ähnlichkeit in der Sequenz (~15%) stimmt die 3-D-Struktur von MreB bemerkenswert mit der von Aktin überein (**Abb. 2.2**).



**Abb. 2.2:** Vergleich der 3-D-Struktur von Aktin und MreB [aus van den Ent *et al.*, 2002].

Im allgemeinen fand man MreB in Bakterienarten mit stäbchenförmigen, filamentösen oder helikalen Zellen, während es in runden Bakterien fehlt (Jones *et al.*, 2001). In *Caulobacter crescentus* bildet dieses Protein spiralförmige Strukturen aus, die sich während des Zellzyklus dynamisch verändern und für die Zellpolarität bedeutend sind (Gitai *et al.*, 2004). Das dynamische Lokalisierungsmuster von MreB während des Zellzyklus deutet darauf hin, daß MreB an der Zellwand-Bildung während der Zellteilung beteiligt ist (Figge *et al.*, 2004). Eine derartige Funktion wurde auch bereits für Mbl in *B. subtilis* nachgewiesen (Carballido-López und Errington, 2003; Daniel und Errington, 2003). Beide Proteine sind außerdem in *B. subtilis* und *E. coli* an der Trennung der Chromosomen während der Zellteilung beteiligt (Kruse *et al.*, 2003; Soufo und Graumann, 2003). *C. crescentus* besitzt zudem ein Cytoskelett, welches aus dem Intermediärfilament-ähnlichen Protein Crescentin aufgebaut ist und den Zellen ihre gebogene Form verleiht (Margolin, 2004). In sich in stationärer Phase befindlichen, helikalen Zellen bildet Crescentin eine Helix entlang der

Cytoplasma-Membran (Ausmees *et al.*, 2003). Ohne die 10 nm dicken Crescentin-Filamente nehmen diese Zellen ebenfalls eine gerade Stäbchenform an (**Abb. 2.3**).



**Abb. 2.3:** Modellzeichnungen von *C. crescentus*-Zellen, die ein Cytoskelett bestehend aus MreB (grün) und Crescentin (rot) besitzen. Je nach Wachstumsphase nehmen die Zellen eine gebogene (links) oder helikale (rechts) Form an. Ohne Crescentin wird die Zellform stäbchenförmig (Mitte) [aus Ausmees *et al.*, 2003; Margolin, 2004].

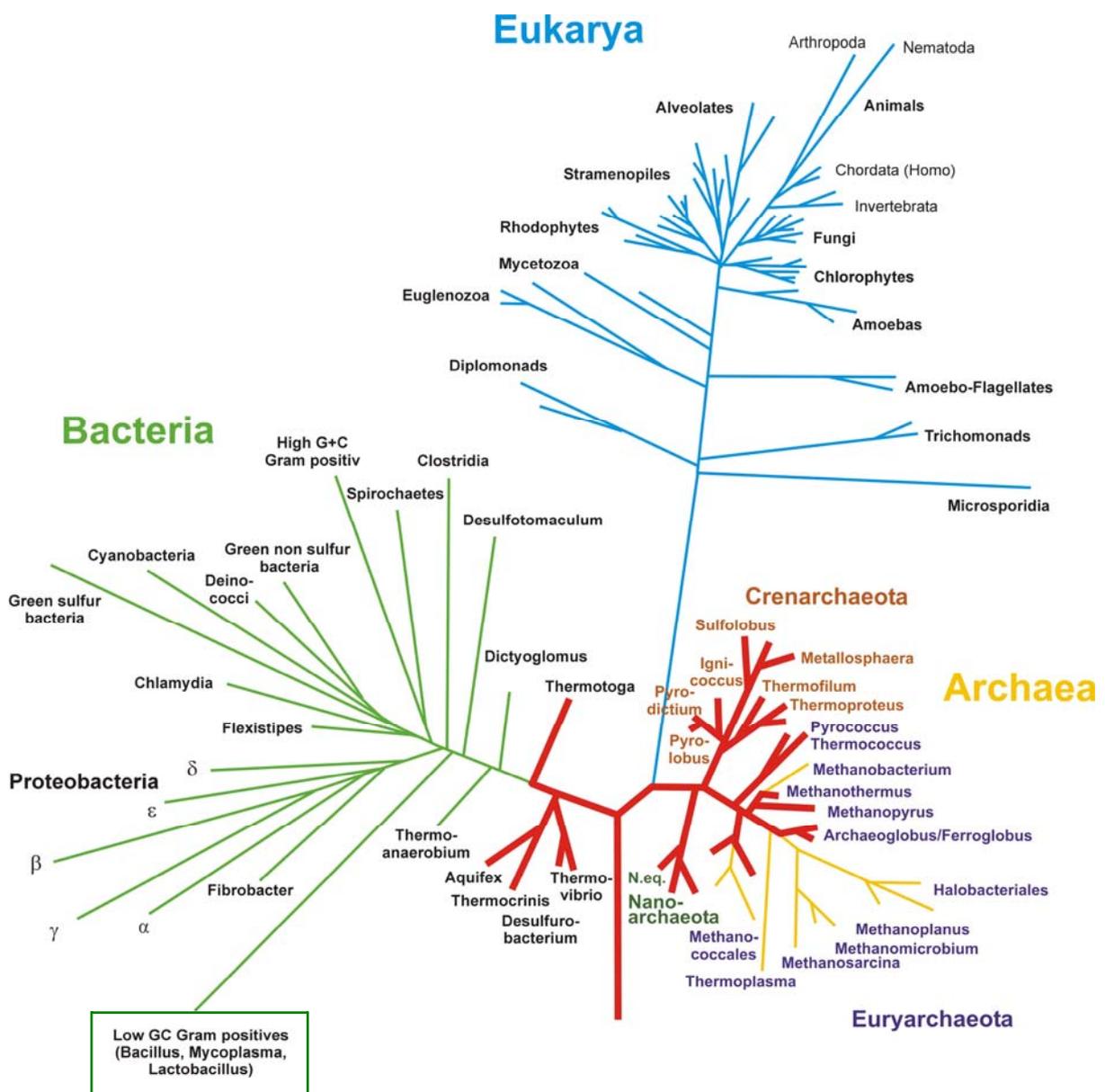
Ein weiteres Aktin-ähnliches und Filament-bildendes Protein ist ParM (StbA), ein Plasmid-kodiertes Protein, welches für die genaue Plasmid-Aufteilung während des bakteriellen Zellzyklus benötigt wird (Møller-Jensen *et al.*, 2002; van den Ent *et al.*, 2002). Immunofluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigte sehr dynamische, filamentöse Strukturen entlang der longitudinalen Achse in *E. coli*, die von diesem Protein gebildet wurden und denen von filamentösem Aktin (F-Aktin) und MreB-Filamenten ähnelten.

Schließlich sei noch ein letztes Aktin-ähnliches Protein erwähnt, welches in Bakterien, wie z.B. *E. coli* (Minkoff und Damadian, 1976), vorkommt, nämlich der Elongationsfaktor EF-Tu, der im allgemeinen an der bakteriellen Proteinsynthese (Translation) beteiligt ist. EF-Tu weist eine morphologische Ähnlichkeit zu Aktin auf (Rosenbusch *et al.*, 1976) und polymerisiert *in vitro* zu Filamenten mit einem periodischen Abstand von 6 nm entlang der Filamentachse (Beck *et al.*, 1978). Es bleibt jedoch zu klären, ob dieses Attribut in lebenden Zellen relevant ist, was bereits spekuliert wurde (Mayer, 2003). Man sollte jedoch nicht unbedingt erwarten, daß prokaryontische Cytoskelett-Elemente, die strukturelle Ähnlichkeiten mit dem eukaryontischen Cytoskelett aufweisen, notwendigerweise der gleichen Funktion in Bakterien dienen. Mehrere bakterielle Proteine, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz-Ähnlichkeit mit

Aktin verwandt sind, haben sehr unterschiedliche Funktionen, die meist in keinem Bezug zum Cytoskelett stehen. Hierzu zählen beispielsweise die Hexokinasen und Hitzeschock-Proteine (Hsp70/DnaK) (Bork *et al.*, 1992).

### 2.3.1 Das Cytoskelett der Mycoplasmen

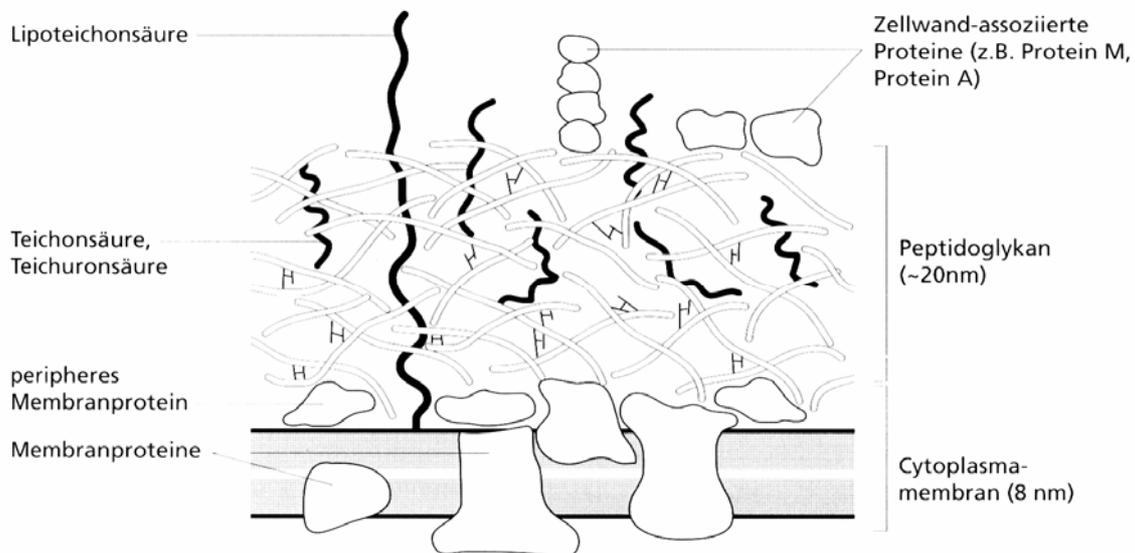
#### 2.3.1.1 Mycoplasmen (Klasse *Mollicutes*)



**Abb. 2.4:** Phylogenetischer Stammbaum, basierend auf 16S rRNA Sequenzen (von H. Huber und K. O. Stetter, Univ. Regensburg, modifiziert nach Woese, 1987).

Der Begriff „Mycoplasmen“ umfaßt die folgenden Unterklassen: Ureaplasmen, Entomoplasmen, Mesoplasmen, Spiroplasmen, Acholeplasmen, Asteroleplasmen und Anaeroplasmen, sowie die Mycoplasma-ähnlichen Organismen (MLOs = mycoplasma-like organisms) (Razin, 2003). Phänotypisch unterscheiden sich Mycoplasmen von anderen Bakterien durch ihre minimale Größe und das Fehlen einer Zellwand. Letzteres wird als Kriterium verwendet, um Mycoplasmen in der Klasse der *Mollicutes* (lateinisch: mollis, weich; cutis, Haut) zusammenzufassen. *Mollicutes* zählen zu den kleinsten und einfachsten, frei lebenden und selbstreplizierenden Organismen innerhalb der Prokaryonten, die nur von einer aus Cholesterol bestehenden Zellmembran umgeben sind (Tully, 1992).

Phylogenetische Daten ordnen diese Gruppe als ein monophyletisches Cluster innerhalb der Gram-positiven Bakterien mit niedrigem G+C- (G = Guanin; C = Cytosin) Gehalt ein (**Abb. 2.4**), welches sich stammesgeschichtlich durch regressive Evolution und Genomreduktion aus *Clostridia* entwickelt haben soll (Weisburg *et al.*, 1989). Aufgrund der fehlenden Zellwand reagieren *Mollicutes* im Gram-Test allerdings negativ (**Abb. 2.5**).

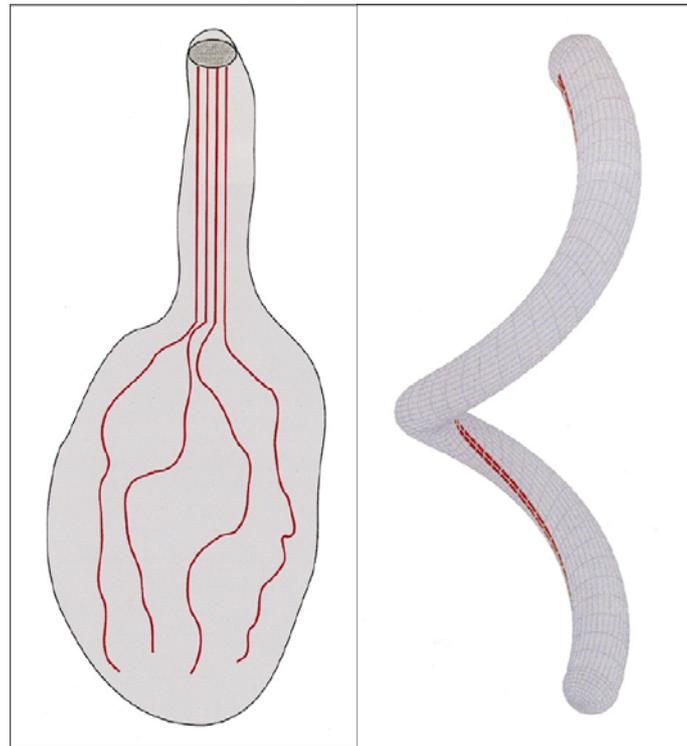


**Abb. 2.5:** Aufbau der Zellhülle Gram-positiver Bakterien [aus Munk, 2001].

### 2.3.1.2 Cytoskelett-ähnliche Elemente und Proteine in Mycoplasmen

Die genau definierten Zellformen, sowie die Beweglichkeit von Mycoplasmen, die weder Flagellen noch Sekretionsorganellen (Pili) aufweisen, ließen schon lange darauf hindeuten, daß Mycoplasmen über ein internes Cytoskelett verfügen. In den letzten Jahrzehnten traten

immer neue Berichte über die Existenz intrazellulärer, filamentöser Strukturen in verschiedenen *Mollicutes* und dessen Aufbau und Zusammensetzung zu Tage. Shlomo Trachtenberg stellte anhand dieser Erkenntnisse Modelle des Cytoskeletts in *Spiroplasma* und *Mycoplasma* auf (**Abb. 2.6**) (Trachtenberg, 1998).



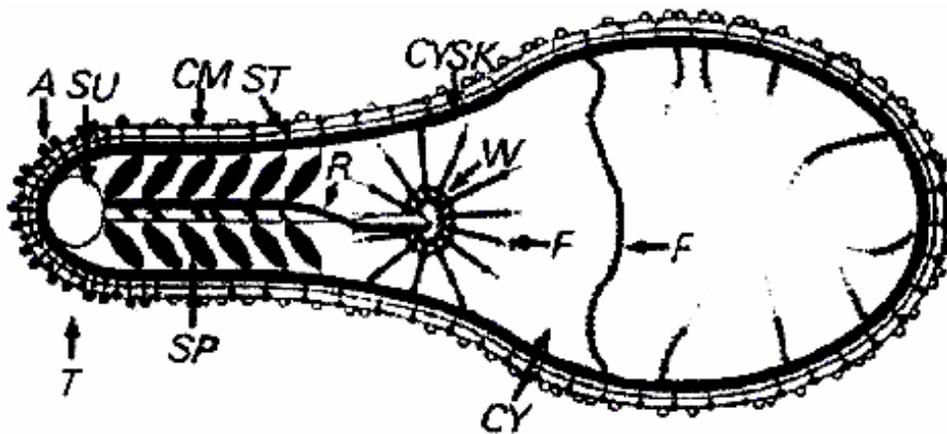
**Abb. 2.6:** Modellzeichnungen der Cytoskelette von *Mycoplasma* (links) und *Spiroplasma* (rechts) [aus Trachtenberg, 1998].

Das Vorhandensein Cytoskelett-ähnlicher Filamente in Mycoplasmen führte zu einer Suche nach Eukaryonten-ähnlichen, kontraktile Proteinen. Während das FtsZ-Gen in *Mollicutes* nachgewiesen wurde (Bork *et al.*, 1995; Fraser *et al.*, 1995; Himmelreich *et al.*, 1997; Wang und Lutkenhaus, 1996), blieb die Existenz von Aktin oder Aktin-ähnlichen Proteinen in *Mollicutes* jedoch lange Zeit umstritten (z.B. Bredt, 1979; Göbel *et al.*, 1981; Göbel *et al.*, 1990; Henrichsen, 1972; Kahane und Muhrad, 1977; Meng und Pfister, 1980; Neimark, 1983; Neimark, 1977; Rodwell *et al.*, 1979; Williamson *et al.*, 1979). Die Studien dazu beruhten auf Untersuchungen von Kreuzreaktionen mit Aktin-Antikörpern, Phalloidin oder Myosin S1, oder aber der Wirkung von Cytochalasin B, welches die Zellteilung und die Bewegung verhindert. Erst nach der Entdeckung des Aktin-ähnlichen Proteins MreB in *Bacillus subtilis* (Jones *et al.*, 2001), wurde dieses auch in *S. citri* beschrieben (Maccheroni *et al.*, unpublished).

### Das Cytoskelett von *Mycoplasma spp.*

Mycoplasmen haben eine annähernd runde (flaschen- oder birnenförmige) Form. An der Spitze befindet sich der sogenannte „Tip“-Bereich, von dem aus sich ein Netzwerk aus zellulären Filamenten in den Rest der Zelle erstreckt. Abgesehen von einigen unbeweglichen Mycoplasmen, bewegen sich andere (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. pneumoniae*, *M. pulmonis*) gleitend auf flüssigkeitsbenetzten Oberflächen mit Hilfe spezialisierter Organellen. Alle Mycoplasmen können sich jedoch mit Hilfe des „Tip“-Bereichs (Krause, 1996; Krause, 1998; Krause und Balish, 2001) an Zelloberflächen anheften, was eine entscheidende Rolle für ihre Pathogenität spielt (Razin und Jacobs, 1992; Razin, 1999).

Helikale Filamente wurden im Cytoplasma von *Acholeplasma laidlawii* gefunden (Kessel *et al.*, 1981). Genauere Untersuchungen gibt es außerdem zum Cytoskelett von *M. pneumoniae* (Hegermann *et al.*, 2002; Mayer *et al.*, 1998; Meng und Pfister, 1980), für das bereits ein Modell erstellt wurde (Abb. 2.7). Diese Ergebnisse stammen allerdings von isoliertem Material, Detergenz-extrahierten Zellen oder Dünnschnitten.



**Abb. 2.7:** Modellzeichnung des Cytoskeletts von *M. pneumoniae*: exponierte Membranproteine (A) der cytoplasmatischen Membran (CM), Cytoplasma (CY), Cytoskelett (CYSK), Fibrillen (F), versteifender Stab („rod“) (R), „Speichen“ (SP), Stiele („stalks“) (ST), undifferenzierte Proteinmasse (SU), „Tip“-Bereich der Zelle (T) und radähnlicher Proteinkomplex („wheel“) (W) [aus Hegermann *et al.*, 2002].

Das Cytoskelett besteht aus mehreren Polypeptiden, wie z.B. den akzessorischen Proteinen A, B, D, HMW1-HMW5, den P-65 und P200 Proteinen und den an der Oberfläche exponierten Proteinen P1 und P30 (Himmelreich *et al.*, 1996; Regula *et al.*, 2001). Welche dieser Proteine an der Bewegung und Zellformgebung direkt beteiligt sind, ist noch unklar.

**Das Cytoskelett von *Spiroplasma spp.***

*Spiroplasma* wurde erstmals von Saglio und Kollegen beschrieben (Saglio *et al.*, 1973). In flüssigem Medium bilden die Zellen helikal gewundene Filamente mit einem Durchmesser von 0,08 bis 0,2  $\mu\text{m}$  und einer Länge von 3 bis 10  $\mu\text{m}$ . In stationärer Phase können sie weitaus länger sein. Sie bewegen sich schwimmend fort durch Rotation um die longitudinale Achse und periodisches Biegen des Zellkörpers, welches mit Richtungsänderungen verbunden ist (Daniels *et al.*, 1980; Daniels und Longland, 1984; Davis *et al.*, 1972).

Williamson (1974) berichtete zum ersten Mal die Isolierung von Cytoskeletten nach erfolgter Zellyse und Natriumdeoxycholat-Extraktion von aus *Drosophila* isolierten *Spiroplasma* und später in *S. melliferum* (Williamson *et al.*, 1991). Die Zellen wiesen gestreifte Fibrillen mit einer Weite von etwa 4 nm und einem axialen Abstand von 9 nm auf. Ähnliche Strukturen wurden bereits in *S. citri* und *S. kunkelii* gefunden (Schmitt *et al.*, 1984). Cytoskelette wurden aus *Spiroplasma* auch durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen freigesetzt (Townsend *et al.*, 1980). Diese Autoren entwickelten außerdem Methoden zur Aufreinigung der Fibrillen aus *S. citri* und wiesen darauf hin, daß diese Membran-assoziierten Fibrillen auf irgend eine Weise an der Bewegung von *Spiroplasma* beteiligt sein könnten.

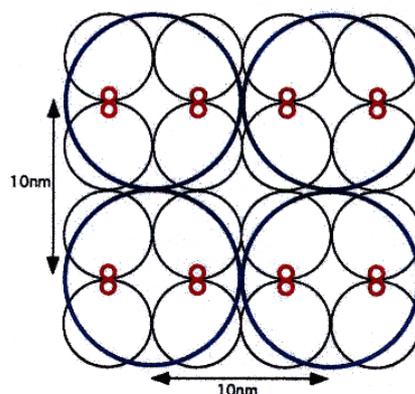
Elektronenmikroskopische Untersuchungen an *S. melliferum* BC-3 und *S. floricola* OMBG zeigten ein flaches, einschichtiges, Membran-gebundenes Cytoskelett-Band mit einem Durchmesser von etwa 94 nm, welches aus sieben Filamentpaaren aufgebaut und an der Zellmembran verankert ist (Charbonneau und Ghiorse, 1984; Townsend *et al.*, 1980; Trachtenberg und Gilad, 2001; Williamson *et al.*, 1984). Townsend und Plaskitt (1985) konnten außerdem durch Immunogold-Markierung dünner Schnitte mit einem Antikörper gegen das sogenannte „Fibril“-Protein die Lokalisierung des Bandes innerhalb von *S. melliferum*-Zellen demonstrieren. Das Band besteht aus etwa 4-5 nm dicken Filamenten mit einem axialen Abstand von etwa 9 nm und verläuft auf dem inneren, kürzesten, helikalen Weg durch die gewundene Zelle (Trachtenberg und Gilad, 2001). Diese Erkenntnisse wurden mit Hilfe verschiedenster Techniken, wie z.B. Kryo-Elektronenmikroskopie an isolierten Filamenten, Dünnschnitten von Zellen, Gefriersubstitution (engl. *freeze-substitution*), Gefrierbruch (engl. *freeze-fracture*), Zellyse mittels Detergenz, sowie Isolierung und Aufreinigung von Filamenten, gewonnen.

Was die Proteinzusammensetzung dieser Filamente betrifft, so nahm man bisher an, daß sie aus dem sogenannten „Fibril“-Protein aufgebaut sind (**Abb. 2.8**). Dieses Protein, dessen Sequenz (*fib*), bestehend aus 515 Aminosäuren (59 kDa), in *S. citri* bekannt ist, ist mit keinem der eukaryontischen Proteine verwandt und hat auch keine bekannten Homologe in anderen Prokaryonten (Williamson *et al.*, 1991). Es kommt als einzelne Kopie im Genom von *S. citri* und *S. melliferum* vor. Der Unterschied der Proteine beider Spezies liegt in einer Aminosäure.



**Abb. 2.8:** Zwei verschiedene Ansichten eines mit FUGUE erstellten Modells der vorhergesagten Sekundär- und Tertiärstruktur des N-terminalen Teils des „Fibril“-Proteins aus *S. citri* ([www-cryst.bioc.cam.ac.uk/servers.html](http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/servers.html)).

In *S. melliferum* macht das „Fibril“-Protein 1% des gesamten Proteingehalts der Zelle aus (Townsend *et al.*, 1980). Da dieses Protein einen Sphärendurchmesser von etwa 5 nm aufweist, wurde angenommen, daß die Untereinheit der Filamente ein Tetramer aus 59 kDa-Monomeren ist, und die Filamente Paare bilden, um die 10 nm weiten axialen und lateralen Abstände innerhalb des Cytoskelett-Bandes zu ergeben (**Abb. 2.9**) (Trachtenberg *et al.*, 2003).



**Abb. 2.9:** Modell für die Anordnung der Untereinheiten innerhalb der Filamente bzw. des Cytoskelett-Bandes von *S. melliferum* [aus Trachtenberg *et al.*, 2003].

Das „Fibril“-Protein tritt bei der Isolierung unter anderem zusammen mit einem 26, 40 und 43 kDa-Protein auf (Townsend *et al.*, 1980; Trachtenberg und Gilad, 2001). Trachtenberg und Gilad (2001) versuchten Vergleiche dieser Polypeptide mit bereits bekannten Proteinen ähnlicher molekularer Masse anzustellen. Ihnen zufolge ist das 26 kDa-Polypeptid wahrscheinlich Spiralin, ein Oberflächen-verankertes Lipoprotein, welches den Hauptbestandteil (~20%) in Membranen von Spiroplasma ausmacht (Chevalier *et al.*, 1990; Whitcomb *et al.*, 1983; Wróblewski *et al.*, 1977). Das Auftreten von Filamenten zusammen mit Membranfragmenten würde die Theorie bekräftigen, daß die Filamente mit einer integrierten Komponente der Membran verknüpft sind. Dies wird auch durch Beobachtungen gestützt, nach denen Antiserum gegen Spiralin einen raschen Verlust der Beweglichkeit und helikalen Morphologie intakter *S. melliferum*-Zellen verursacht (Bové *et al.*, 1993). Erst kürzlich stellten jedoch Duret und Kollegen (Duret *et al.*, 2003) durch Inaktivierung des Spiralin-Gens mittels homologer Rekombination *S. citri*-Mutanten her, die eine ähnliche helikale Morphologie und Beweglichkeit, wie die des Wildtyp-Stammes GII-3 aufwiesen, allerdings weniger effizient auf die Wirtspflanze übertragen wurden. Somit ist unklar, ob Spiralin tatsächlich an der Helizität und Beweglichkeit der Zellen beteiligt ist. Unter dem 40 kDa-Polypeptid vermuteten sie das in der nicht-helikalen und unbeweglichen Variante von *S. citri* (ASP-1) fehlende 39 kDa-Protein (Townsend *et al.*, 1977; Townsend *et al.*, 1980). Über ein 43 kDa-Polypeptid ist nichts bekannt, aber sie vermuten, daß es das *scm1*-Genprodukt sein könnte, welches in *S. citri* 409 Aminosäuren lang ist, was einer molekularen Masse von etwa 45 kDa entspricht.

Antikörper gegen das *S. melliferum* BC-3 „Fibril“ Proteinmonomer reagieren mit Filamenten aus 13 *Spiroplasma*-Gruppen (Townsend und Archer, 1983), einschließlich des nicht-helikalen *S. citri*-Stammes (ASP-1), aber nicht mit Filamenten aus *Mycoplasma spp.* oder *Acholeplasma spp.* (Williamson *et al.*, 1984). Dies stützt die Behauptung, daß *Spiroplasma*-Filamente nicht mit den Aktin-ähnlichen Proteinen verwandt sind, die aus Mycoplasmen isoliert wurden, oder mit den fibrillären Elementen aus *M. pneumoniae* (Göbel *et al.*, 1981; Meng und Pfister, 1980; Regula *et al.*, 2001).

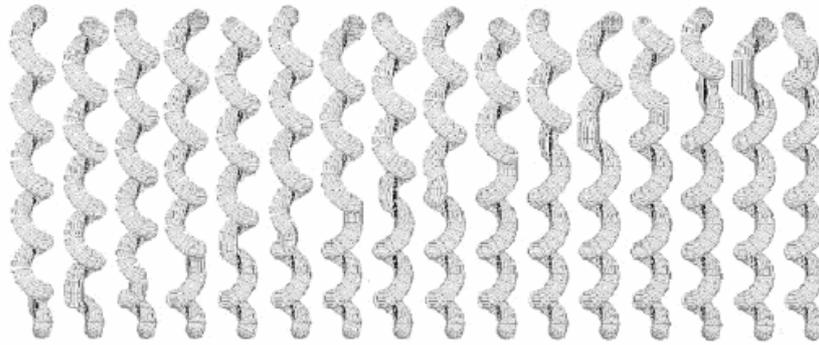
Die kürzliche Entdeckung von fünf MreB-Genen in *S. citri* (Maccheroni *et al.*, unpublished) wirft allerdings Fragen über die eventuelle Funktion von MreB als weiteres Cytoskelett-Element in Spiroplasma auf, blieb aber bislang unbeachtet.

### 2.3.1.3 Bewegungsmechanismen von *S. melliferum*

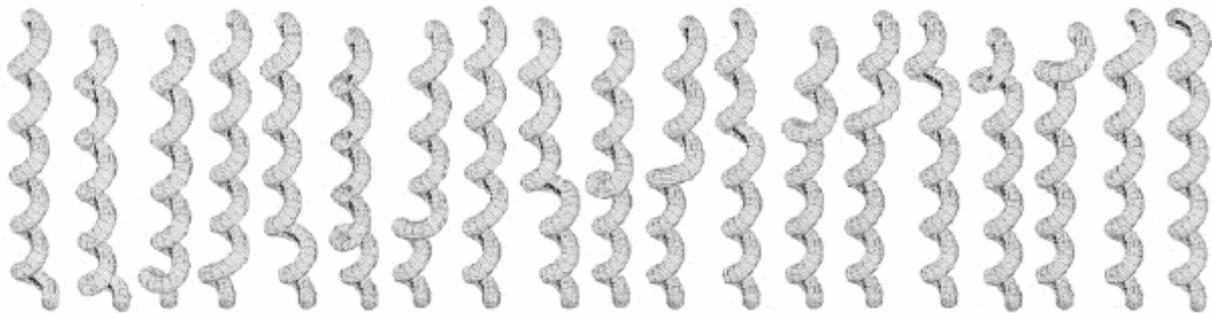
Wie bereits erwähnt, bewegen sich Spiroplasmaen schwimmend durch Rotation um die longitudinale Achse und durch periodisches Biegen des Zellkörpers fort (Daniels *et al.*, 1980; Daniels und Longland, 1984; Davis *et al.*, 1972). Da den *Mollicutes* jedoch jegliche der in Pro- und Eukaryonten vorkommenden molekularen Maschinerien (wie Flagellen, Cilien oder Pilis) fehlen, ist ihre Fortbewegung besonders verblüffend. Bis vor kurzem waren weder der Bewegungsmechanismus, noch die Beibehaltung der Zellform bei Mycoplasmen aufgeklärt. Townsend und Kollegen (Townsend *et al.*, 1980) schlugen allerdings bereits vor, daß die Membran-assoziierten Filamente, die sie in *S. citri* fanden, für die Bewegung der Zellen eine Rolle spielen könnten.

Lichtmikroskopische Untersuchungen zeigten die verschiedenen Bewegungsformen von *S. melliferum*-Zellen, welche sich in Standardmedium mit einer Geschwindigkeit von  $\sim 1,5 \mu\text{m/s}$  fortbewegen (Gilad *et al.*, 2003; Trachtenberg *et al.*, 2003). Folgende Mechanismen wurden beschrieben: (a) regelmäßige Streckung und Kontraktion (genannt engl. „*breathing*“); (b) spontane und zufällige Änderung der Händigkeit ausgehend von beliebigen Stellen entlang der Zelle (**Abb. 2.10**); (c) Bildung einer Deformation in Form eines Knicks in einer der helikalen Windungen, welche durch die Zelle wandert (**Abb. 2.11**); (d) zufälliges Krümmen, Beugen und Zucken. Die vorgeschlagenen Modelle für diese Bewegungen basieren auf der gut definierten, dynamischen, helikalen Zellgeometrie und der Feststellung, daß diese Zellen ein flaches, einschichtiges, Membran-gebundenes Cytoskelett besitzen (Trachtenberg und Gilad, 2001). Desweiteren wurde angenommen, daß das Cytoskelett wie ein linearer Motor funktioniert, der die dynamische Zellhelizität durch koordinierte, unterschiedliche Längenänderungen der Filamente kontrolliert. Die Längenänderung der Filamente, und damit die der Helix, wurde wiederum auf Konformationsänderungen der tetrameren Untereinheiten zurückgeführt, deren Form sich von nahezu zirkulär zu elliptisch verändert, was einer axialen Längenänderung von 40% entspricht (Trachtenberg und Gilad, 2001; Trachtenberg, 2004). Berg (Berg, 2002) schlug zudem einen Weg vor, wie das Cytoskelett-Band durch kreisförmiges Beugen den Antrieb steuern kann.

Die molekularen Mechanismen, mit denen Kräfte die Zellbewegung antreiben können, wurden bereits von Wolgemuth und Kollegen (Wolgemuth *et al.*, 2003) diskutiert. Sie schlugen ein Modell für die Ausbreitung einer helikalen Welle in *Spiroplasma* vor.



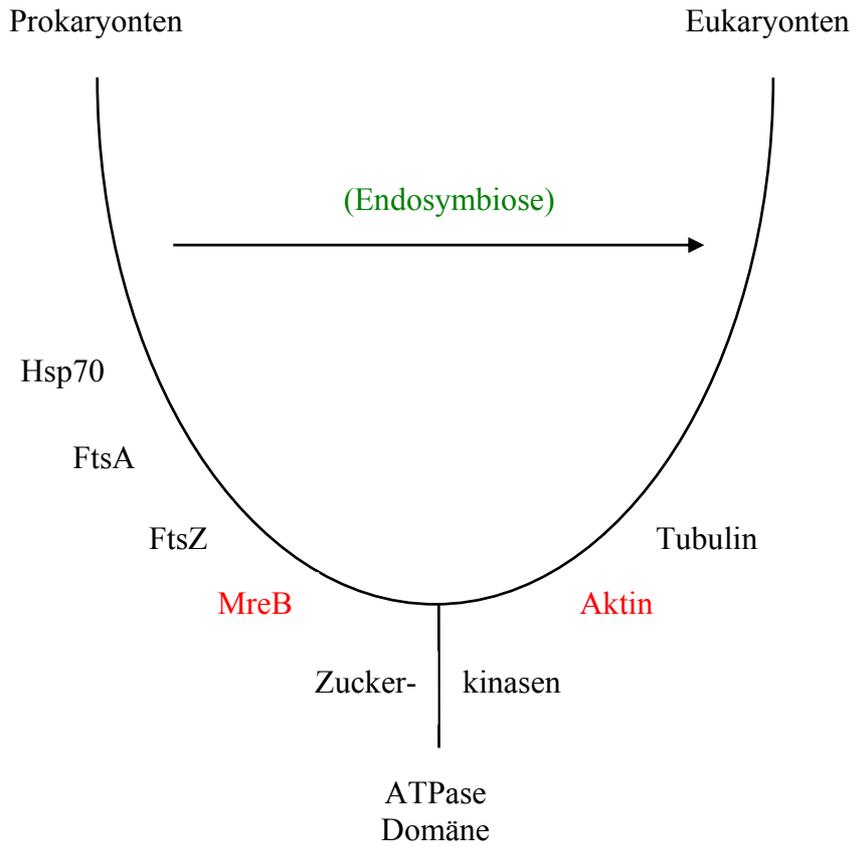
**Abb. 2.10:** Simulation der Änderung der Händigkeit einer Zelle von links- nach rechtshändig [aus Gilad *et al.*, 2003].



**Abb. 2.11:** Simulation einer sich durch eine Zelle fortpflanzenden Deformation (engl. *propagating kink*) [aus Gilad *et al.*, 2003].

## 2.4 Die Evolution des Cytoskeletts

Eukaryonten entstanden phylogenetisch aus Prokaryonten und somit stammen all ihre metabolischen und strukturellen Gene von verwandten Proteinen der Bakterien und/oder Archaeobakterien ab (Doolittle, 1995). Die beschriebenen Erkenntnisse über Cytoskelett-Strukturen in den verschiedensten Prokaryonten lassen annehmen, daß sich auch das Cytoskelett der Eukaryonten aus dem der Bakterien evolutionsbiologisch entwickelt hat (Erickson, 2001). Folglich sind die Proteine Aktin und Tubulin der Eukaryonten Homologe und gleichzeitig Abkömmlinge der prokaryontischen Proteine MreB und FtsZ (**Abb. 2.12**). Die geringe Ähnlichkeit zwischen der Sequenz von MreB und Aktin, welches ein extrem konserviertes Protein ist, könnte darauf hindeuten, daß Pro- und Eukaryonten bereits sehr früh während der Evolution divergierten.

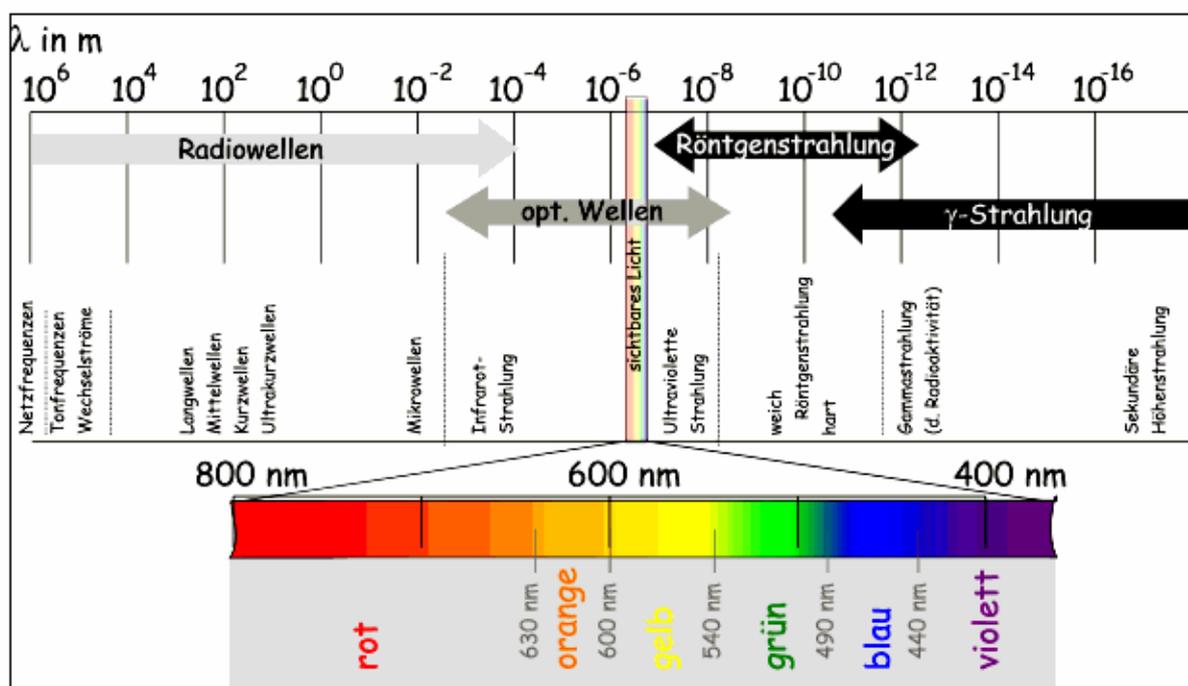


**Abb. 2.12:** Einfachste Erklärung der Ähnlichkeiten (basierend auf Sequenz oder 3-D-Struktur) zwischen verschiedenen pro- und eukaryontischen Proteinen. Durch Endosymbiose haben sich viele bakterielle Proteine in Eukaryonten angereichert. Archeen wurden in der Abbildung ausgeschlossen (modifiziert nach Doolittle und York, 2002).

## 3 Physikalische Grundlagen

### 3.1 Mikroskopie und Auflösung

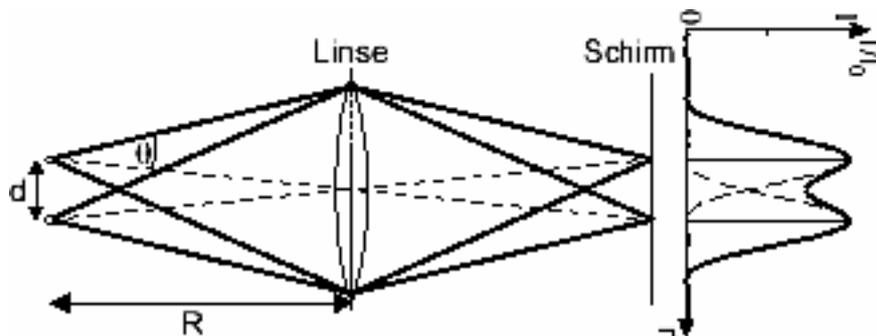
Während sich die Lichtmikroskopie des sichtbaren Lichts mit Wellenlängen von 400-800 nm bedient, werden in der Elektronenmikroskopie Elektronenstrahlen mit Wellenlängen im Pikometerbereich ( $10^{-12}$  m) zur Bilderzeugung verwendet. Die verschiedenen Arten elektromagnetischer Wellen werden anhand ihrer Wellenlänge in das sogenannte elektromagnetische Spektrum (**Abb. 3.1**) eingeordnet.



**Abb. 3.1:** Elektromagnetisches Spektrum.

Der prinzipielle Vorteil der Verwendung von Elektronen anstelle von Licht zur Bilderzeugung liegt darin, daß mit Elektronen ein tausendfach höheres Auflösungsvermögen erreicht werden kann. Der Grund dafür liegt darin, daß das Auflösungsvermögen, d.h. der Abstand von zwei Punkten, die in dem Abbild des Objekts noch zu unterscheiden sind, von der Wellenlänge  $\lambda$  der verwendeten Strahlen bestimmt wird. Die maximal erreichbare Auflösung eines Mikroskops ist jedoch beugungsbedingt begrenzt. Ein Maß dafür ist das Rayleigh-Kriterium, welches besagt, daß die Beugungsbilder zweier Punkt-Streuer (in **Abb. 3.2** links) mindestens

einen solchen Abstand haben müssen, daß das Minimum des einen auf das Maximum des anderen Bildes fällt.



**Abb. 3.2:** Darstellung des Rayleigh-Kriteriums. Zwei beleuchtete, punktförmige Objekte im Abstand  $d$  zueinander werden mit einer Linse abgebildet. Man erhält in der Ferne ein Fraunhofer-Beugungsmuster.

Nach der Abbeschen Theorie müssen demnach die zwei Punkte einen Abstand  $d$  von

$$d \geq \frac{0,61 \cdot \lambda}{n \cdot \sin \alpha}$$

mit

$\lambda$  = Wellenlänge des verwendeten Lichts

$n$  = Brechungsindex des Mediums zwischen Objekt und Objektiv

$\alpha$  = halber Öffnungswinkel (Aperturwinkel) der Objektivlinse

( $n \sin \alpha$  = numerische Apertur des Objektivs)

aufweisen. Damit ist die maximale optische Auflösung eines Mikroskops etwa  $\lambda/2$ . Im Falle von Elektronenstrahlen hängt die Wellenlänge von der Größe der Beschleunigungsspannung ab, da die Spannung den Impuls der Elektronen bestimmt. Nach der Formel von de Broglie beträgt die Wellenlänge  $\lambda$  von Elektronen

$$\lambda = \frac{h}{p} = \frac{h}{\sqrt{\frac{e^2 U^2}{c^2} + 2m_0 e U}}$$

mit

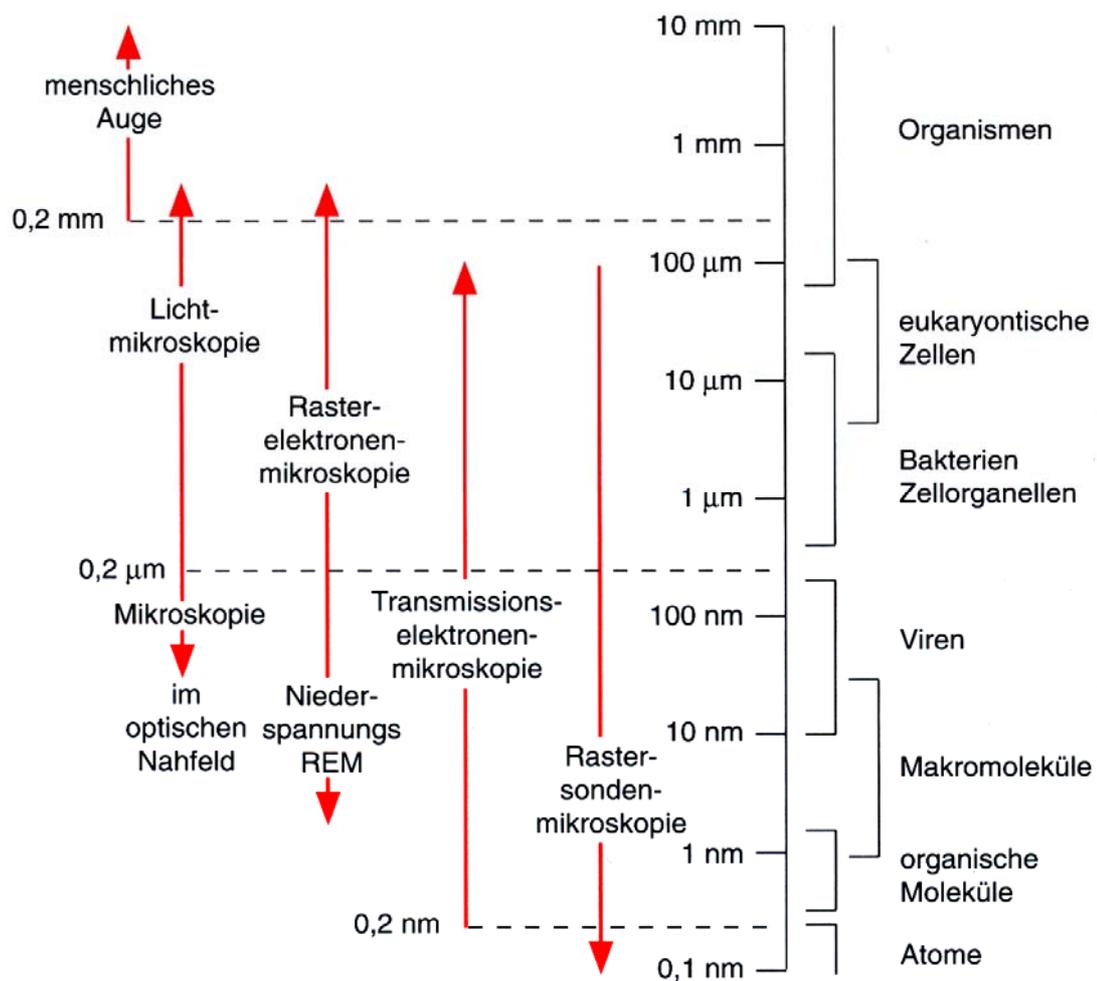
$h = 6,6262 \times 10^{-34} \text{ J s}$  (Plancksches Wirkungsquantum),

$p$  (Impuls = Masse x Geschwindigkeit des Teilchens)

$c = 2,9979 \times 10^8 \text{ m/s}$  (Lichtgeschwindigkeit),

- $e = 1,6022 \times 10^{-19} \text{ C}$  (Elektronenladung),
- $m_0 = 9,1095 \times 10^{-31} \text{ kg}$  (Ruhemasse des Elektrons)
- $U$  (Beschleunigungsspannung).

Die Wellenlänge des in dieser Arbeit verwendeten Mikroskops (CM 300), welches eine Beschleunigungsspannung von  $U = 300 \text{ kV}$  hat, beträgt demnach  $\lambda = 1,97 \text{ pm}$ . Leider wird diese Auflösung, bedingt durch Abbildungsfehler der magnetischen Linsen (siehe 3.2.4.1), nicht erreicht. Trotzdem erzielt man für einzelne, aufgereinigt Proteine oder Proteinkristalle eine Auflösung knapp unterhalb von  $2 \text{ \AA}$  (Unwin und Henderson, 1975), was eine wesentliche Verbesserung im Vergleich zum Lichtmikroskop darstellt, dessen Auflösungsgrenze bei  $200 \text{ nm}$  liegt. Die folgende Abbildung (Abb. 3.3) gibt einen Überblick über die Auslösbereiche verschiedener Mikroskope.



**Abb. 3.3:** Größe biologischer Strukturen und Einsatzbereich verschiedener Mikroskopiearten [aus Lottspeich und Zorbas, 1998].

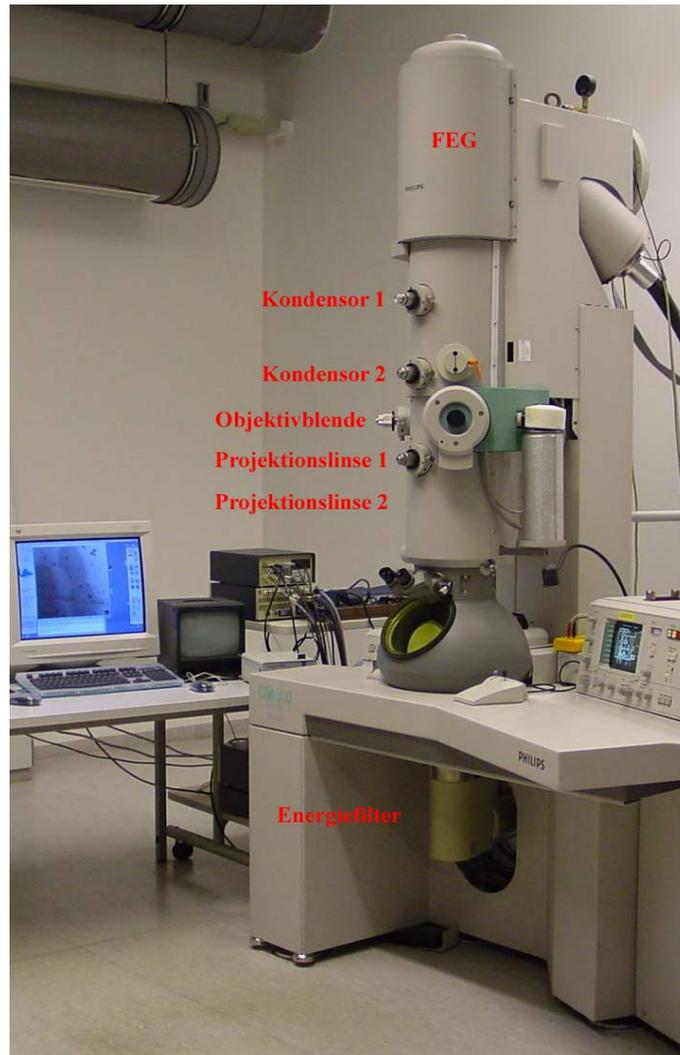
## 3.2 Elektronenmikroskopie

Seit der Entwicklung des Elektronenmikroskops durch Ernst Ruska und Mitarbeiter in den 30er Jahren trug die Elektronenmikroskopie wesentlich zur strukturellen Aufklärung von Zellen, Zellorganellen, Viren und Proteinen bei. Es gibt zwei Arten von Elektronenmikroskopen, das Raster- und das Transmissions- (Durchstrahlungs-) Elektronenmikroskop. Beim Raster-Elektronenmikroskop wird ein Elektronenstrahl rasterförmig über das Objekt bewegt und das Signal der rückgestreuten oder in der Oberfläche der Probe ausgelösten Sekundärelektronen detektiert. Im Folgenden soll ausführlicher auf Aufbau und Funktionsweise eines Transmissions-Elektronenmikroskops eingegangen werden.

### 3.2.1 Aufbau und Funktion eines Transmissions-Elektronenmikroskops (TEMs)

Grundsätzlich entsprechen der Aufbau und das Funktionsprinzip eines Elektronenmikroskops denen eines Lichtmikroskops. Anstelle einer Lichtquelle verwendet man im Elektronenmikroskop eine Elektronenquelle, welche zusammen mit dem Linsen-, Vakuum- und Abbildungssystem die Grundeinheiten bildet. Die folgende Abbildung (**Abb. 3.4**) zeigt das in dieser Arbeit verwendete CM300 Transmissions-Elektronenmikroskop, welches mit einer Feldemissionskathode (Field Emission Gun, FEG) und einem zusätzlichen Gatan Post-Column Energiefilter (Gatan Imaging Filter, GIF) ausgestattet ist.

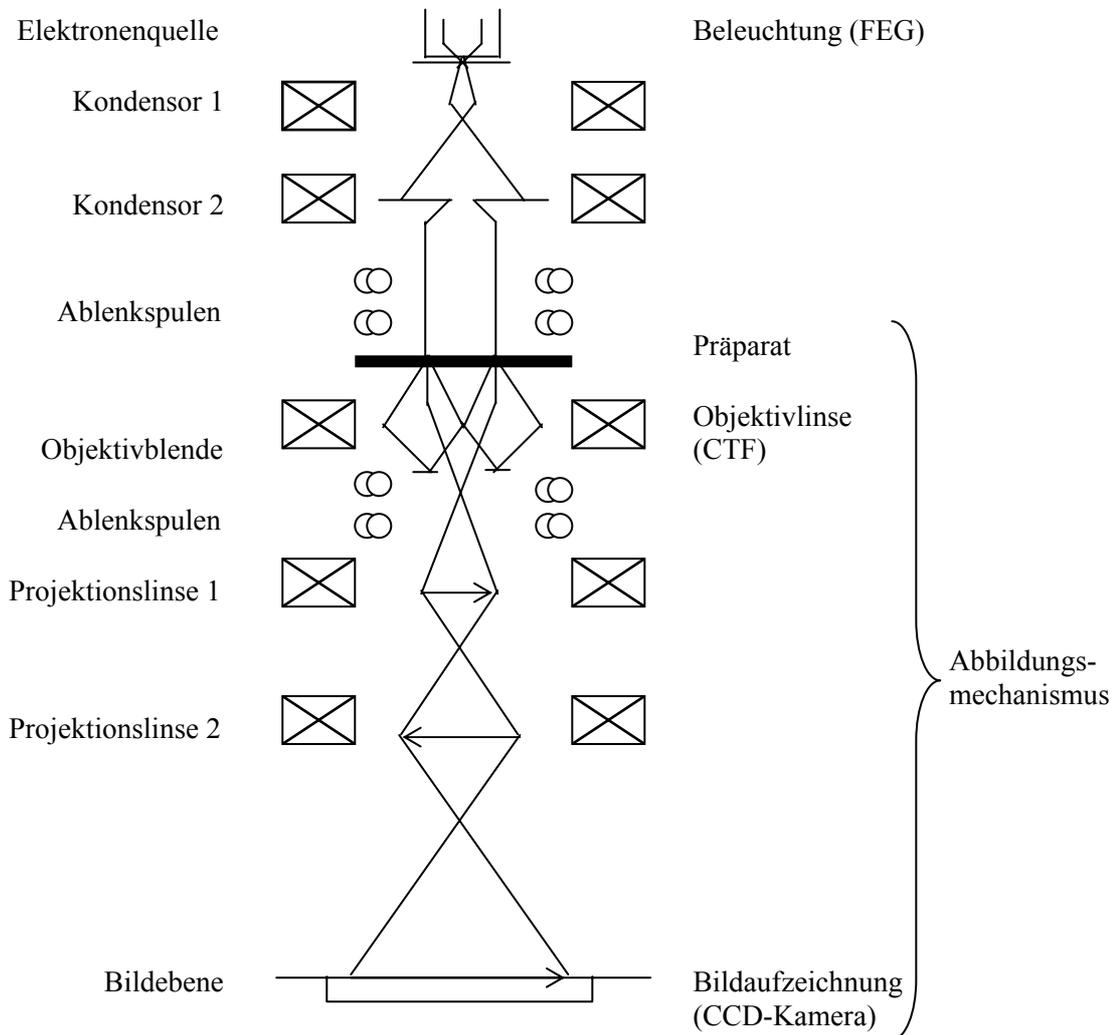
Abbildung 3.5 zeigt den schematischen Aufbau eines Transmissions-Elektronenmikroskops. Die in der Elektronenquelle erzeugten freien Elektronen werden in einem Hochspannungsfeld innerhalb eines Hochvakuums zur Anode hin auf 100-400 kV beschleunigt. Ein Vakuumsystem ist eine Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit eines Elektronenmikroskops. In einem Vakuum können sich die Elektronen ungehindert ausbreiten, ohne an Gasmolekülen gestreut oder absorbiert zu werden, die Probe wird geschützt, und Entladungen im Bereich der Kanone werden verhindert. Das magnetische Linsensystem des Kondensors fokussiert den Elektronenstrahl auf das Objekt. Die Bündelung der Elektronenstrahlen durch Magnetlinsen ist deshalb möglich, weil sich bewegende Elektronen ein Magnetfeld erzeugen, welches durch ein von außen angelegtes Magnetfeld beeinflusst werden kann. Die Defokussierung des Strahls, sowie die Wahl der Kondensorblende



**Abb. 3.4:** Transmissions-Elektronenmikroskop.

bestimmen die Größe und Helligkeit des ausgeleuchteten Bereichs. Ablenkspulen ermöglichen eine Verschiebung des Elektronenstrahls auf der Probe (engl. *Beam-Shift*). Während ein Teil der Elektronen beim Auftreffen auf die Probe reflektiert wird, erfährt der andere Teil der Elektronen eine Wechselwirkung mit der Probe und wird dabei elastisch oder inelastisch gestreut (siehe 3.2.4.1). Sowohl aus den inelastischen Streuprozessen, als auch aus der bei der erwähnten Wechselwirkung entstehenden charakteristischen Röntgenstrahlung, können Informationen über die Probenzusammensetzung gewonnen werden. Die am elektrischen Potential der Probe gebeugten Elektronen, die durch die Objektivblende gelangen, werden durch die Objektivlinse mit dem ungebeugten Primärstrahl zur Interferenz gebracht. Das so entstandene Bild läßt sich durch weitere Ablenkspulen in der Bildebene verschieben (engl. *Image-Shift*). Nach Vergrößerung durch ein Projektivlinsensystem kann es entweder auf einem Leuchtschirm oder durch Ankopplung eines Fernsehbildschirms direkt

betrachtet werden, oder aber mit photographischem Film oder einer CCD- (= charge-coupled device-) Kamera aufgezeichnet werden.



**Abb. 3.5:** Schematischer Aufbau und Strahlengang eines Transmissions-Elektronenmikroskops.

### 3.2.2 Elektronenquellen

Ein Elektronenmikroskop ist mit einer Kathode ausgestattet, aus der bei Anlegen einer Emissionsspannung Elektronen austreten. Man verwendet entweder thermische Kathoden, wie einen haarnadelförmig gebogenen Wolframdraht oder einen Lanthanhexaborid- ( $\text{LaB}_6$ -) Kristall, oder aber Feldemissionskathoden, die aus einer zugespitzten Wolframnadel bestehen. Um die für das jeweilige Kathodenmaterial charakteristische Austrittsenergie (Wolfram 4,5 eV,  $\text{LaB}_6$  2,7 eV) zu überwinden, werden herkömmliche Glühkathoden durch einen Strom zum Glühen gebracht (ca. 2500 K für  $\text{LaB}_6$ ), während im Fall der Feldemissionskathode eine

Saugspannung in Form eines hohen elektrischen Feldes angelegt wird, um die Emission von Elektronen zu ermöglichen. Um eine höhere Elektronenausbeute zu erreichen wird die Kathode zusätzlich auf ca. 1000-2000 K erhitzt, was den Vorteil hat, daß die Emission wesentlich stabiler ist. Die kinetische Energie der aus einer Glühkathode austretenden Elektronen ist aufgrund der thermischen Anregung nicht einheitlich und folgt einer Maxwell-Verteilung, deren Breite proportional zur Temperatur der Kathode ist. Eine deutlich schmalere Energieverteilung (etwa 1 eV), und damit eine höhere Helligkeit und bessere räumliche Kohärenz der Elektronen, erzielt man bei Verwendung einer Feldemissionskathode. Während das CM 120 Biofilter des Instituts eine LaB<sub>6</sub>-Kathode besitzt, verfügt das CM 300 Mikroskop über eine Feldemissionskathode.

### **3.2.3 Aufbau der Elektronenkanone**

Die Kanone besteht aus der Kathode (Heiz- oder Feldemissionskathode), einem Wehneltzylinder, der etwa 100 V negativer geladen ist, als die Kathode, und einer Anode. Die durch ein äußeres Feld beschleunigten Elektronen werden durch das negative Potential des Wehneltzylinders, der als elektrostatische Linse fungiert, zu einer Raumladungswolke gebündelt und fliegen durch ein Loch in der Anode in Richtung Objekt.

### **3.2.4 Objektivlinsen**

Um einen Elektronenstrahl abzulenken, kann man ein elektrisches oder ein magnetisches Feld verwenden. Die bevorzugten Linsen in der Elektronenmikroskopie sind die magnetischen Linsen (Sammellinsen), da der Strom, der das Magnetfeld erzeugt, leichter stabil gehalten werden kann, als eine Hochspannung.

#### **3.2.4.1 Linsenfehler**

Wie bereits erwähnt, bestimmen Linsenfehler das Auflösungsvermögen eines Elektronenmikroskops. Am wichtigsten ist die Korrektur der Linsenfehler der Objektivlinse, da diese Fehler von den nachfolgenden Linsen mit abgebildet und dadurch auch vergrößert

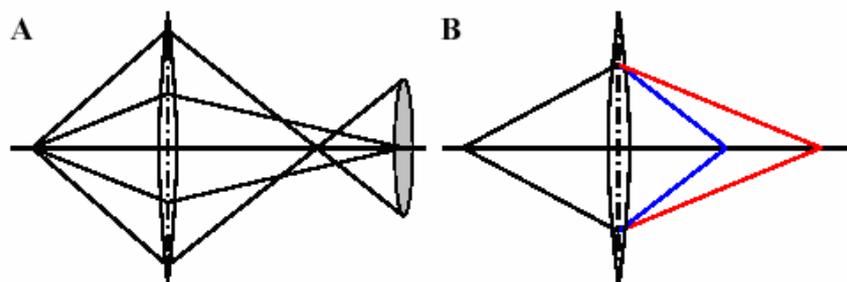
werden. In der Elektronenmikroskopie sind von den vorkommenden Linsenfehlern besonders die sphärische und die chromatische Abberation von Bedeutung.

### Sphärische Abberation (Öffnungsfehler)

Die Form des Magnetfelds kann verursachen, daß die Brennweite der äußeren Linsenzone verschieden ist von der Zone nah an der optischen Achse. Dies führt dazu, daß achsenferne Linsenzonen stärker brechen, als achsennahe und somit Strahlen, die verschieden weit von der optischen Achse verlaufen, an verschiedenen Stellen gebündelt werden (**Abb. 3.6A**). Dadurch wird ein Punkt in der Gaußschen Ebene als Scheibchen abgebildet. Korrigiert werden kann dieser Fehler durch Verwendung von Blenden oder Hexapollinsen.

### Chromatische Abberation (Farbfehler)

Der chromatische Fehler wird dadurch hervorgerufen, daß die in einer elektromagnetischen Linse eintretenden Elektronen sich in ihrer Geschwindigkeit, d.h. ihrer Energie, unterscheiden. Da die Brennweite einer elektromagnetischen Linse jedoch für verschiedene Elektronenwellenlängen unterschiedlich ist, werden die Elektronen unterschiedlich stark abgelenkt und nicht mehr ein Brennpunkt für den gesamten Strahl definiert (**Abb. 3.6B**). Es ergibt sich eine Strahlaufweitung und ein Punkt wird wiederum als Scheibchen abgebildet. Die Energieunterschiede der Elektronen werden durch die bei der thermischen Emission auftretende Maxwellsche Geschwindigkeitsverteilung, durch Schwankungen in der Beschleunigungsspannung und durch Geschwindigkeitsverluste auf Grund von inelastischer Streuung im Objekt verursacht. Daher kann diesem Fehler durch Verwendung einer Kathode mit einer möglichst schmalen Energieverteilung der austretenden Elektronen und durch Verwendung einer dünnen Probe, um die Wahrscheinlichkeit für inelastische Prozesse gering zu halten, vorgebeugt werden. Andernfalls kann der chromatische Fehler durch elektrostatische oder elektromagnetische Prismen korrigiert werden.



**Abb. 3.6:** Wirkung der sphärischen (A) und chromatischen (B) Abberation.

### **3.2.5 Bildentstehung im Transmissions-Elektronenmikroskop**

Das Transmissions-Elektronenmikroskop erzeugt ein Durchlicht-Elektronenbild einer dünnen Probe in 100- bis 500 000-facher Vergrößerung (vgl. Lichtmikroskop: 500- bis 1000-fach). Die Grundlage für die Abbildung im Elektronenmikroskop ist die Streuung der Elektronen an den Atomen des Objektes.

#### **3.2.5.1 Streuung**

Als mittlere freie Weglänge bezeichnet man die durchschnittliche Weglänge, die ein Teilchen ohne Wechselwirkung mit anderen Teilchen zurücklegt. Beim Auftreffen auf die Probe werden die Elektronen entweder reflektiert, oder aber sie dringen in die Probe ein und, falls sie diese nicht unverändert wieder verlassen, wechselwirken mit ihr, wobei sie je nach Dicke und Dichte der Probe, unterschiedlich stark gestreut werden. Je dicker das Präparat, desto häufiger tritt Streuung auf und umso größer ist die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Streueffekte. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen elastischer und inelastischer Streuung.

##### **Elastische Streuung**

Bei der elastischen Streuung werden die negativ geladenen Strahlelektronen im elektrischen Feld der positiv geladenen Atomkerne der Probe abgelenkt. Weil die Masse eines Elektrons sehr viel kleiner ist als die des Atomkerns, wird der Kern bei der Streuung in seiner Lage praktisch nicht verändert. Das Elektron verliert keine nennenswerte Energie, sondern wird lediglich in Abhängigkeit von der Kernladungszahl des Atomkerns und der eigenen Geschwindigkeit in seiner Bahn hyperbelförmig abgelenkt. Die Ablenkung ist dabei umso größer, je stärker die Coulomb-Kraft wirkt, d.h. je näher das Elektron dem Kern kommt, je langsamer das Elektron an dem Kern vorbeifliegt und je höher die Kernladungszahl ist. Der Streuwinkel wiederum beeinflusst die Auflösung des entstehenden Bildes. Sehr stark gestreute Elektronen werden durch der Objektivblende abgefangen und tragen nicht zur Abbildung des Objektes bei, wirken aber dagegen kontrastverstärkend (siehe 3.2.6.1).

##### **Inelastische Streuung**

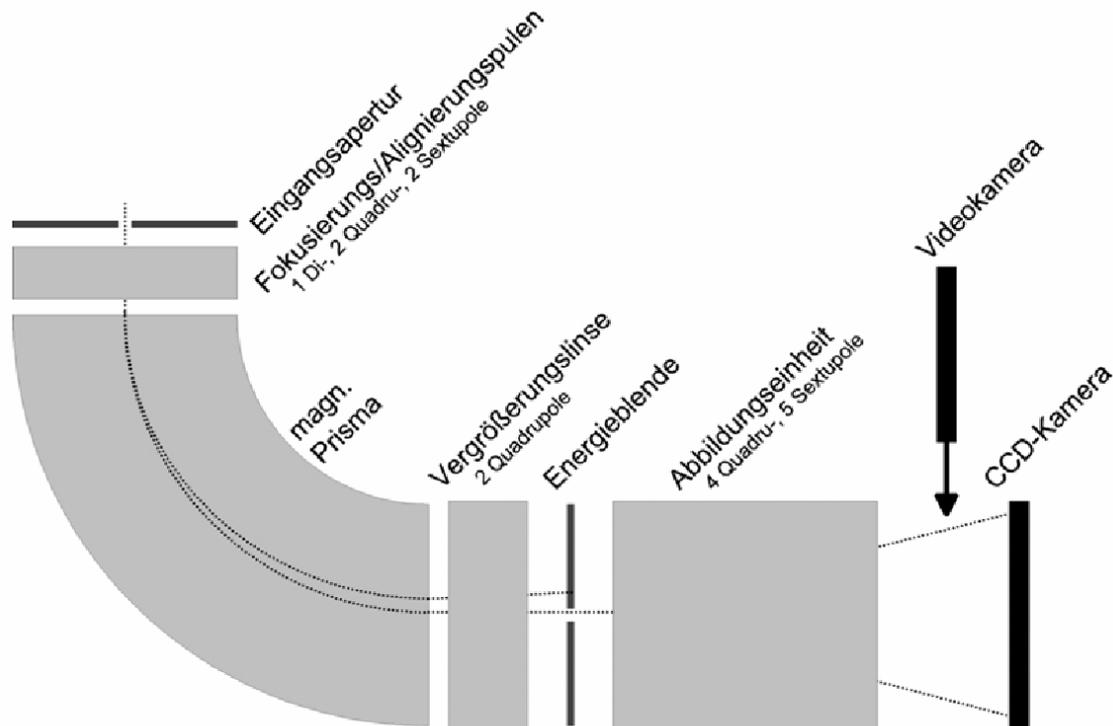
Im Gegensatz zur elastischen Streuung wird bei inelastischer Streuung Energie beim Aufeinandertreffen eines Strahlelektrons auf ein Hüllenelektron des Objekts übertragen. Der

Grund hierfür liegt in der Massen- und Ladungsgleichheit der beiden Stoßpartner. Die Strahlelektronen verlieren einen Teil ihrer kinetischen Energie und werden dadurch langsamer. Die an die Hüllenelektronen abgegebene Energie bewirkt entweder die Anregung von quasi-freien Elektronen, Aussendung von Bremsstrahlung, Anregung von Schwingungen oder Ionisation in den inneren Elektronenschalen. Die hierdurch freiwerdenden Plätze werden von Elektronen, die aus energetisch höher gelegenen Schalen stammen, wieder aufgefüllt. Die dabei freiwerdende Energiedifferenz wird in Form von charakteristischer Röntgenstrahlung emittiert oder für das Herauslösen weiterer Elektronen verwendet, welche das Atom verlassen. Die auf diese Art das Atom verlassenden Elektronen lassen Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung des Präparats zu, weshalb die inelastische Streuung Verwendung in den Materialwissenschaften (EELS = Electron Energy Loss Spectroscopy) findet. Verlieren die inelastisch gestreuten Elektronen so viel Energie, daß die Elektronen auf die thermische Energie abgebremst werden, können sie die Probe nicht mehr verlassen und werden von der Probe absorbiert, wobei Wärme entsteht. Durch den Energieverlust, den die inelastisch gestreuten Elektronen erleiden, erfahren sie auch eine Änderung (Vergrößerung) in der de-Broglie-Wellenlänge, was zur chromatischen Aberration beiträgt. Zudem verringert sich der Kontrast des Bildes, da Elektronen wellenlängenabhängig gebeugt werden, und dadurch von den Objektstrukturen unterschiedlich stark gebeugte Bildstrukturen erzeugt und einander überlagert werden. Die inelastische Streuung hat somit auch für die Bildentstehung unerwünschte Folgen und erschwert die Abbildung unkontrastierter, dicker biologischer Objekte enorm. Durch die Verwendung eines Energiefilters, der inelastisch gestreute Elektronen herausfiltert, kann dieser nachteilige Effekt jedoch vermieden und die Bildqualität deutlich verbessert werden.

### **3.2.5.2 Abbildungseigenschaften des Energiefilters**

Das Funktionsprinzip eines Energiefilters besteht darin, mit Hilfe eines elektromagnetischen Prismas Elektronen nach ihrer Wellenlänge aufzutrennen, um somit Elektronen mit abweichendem Energiegehalt abfangen zu können (Grimm, 1997). Dieses Prinzip wird auch „zero-loss filtering“ genannt, da der Filter ausschließlich Elektronen ohne Energieverlust, d.h. nur elastisch gestreute Elektronen, passieren läßt. Die Elektronen werden nach Eindringen in den Energiefilter um etwa  $90^\circ$  abgelenkt, wobei die Elektronen mit niedrigerer Energie eine größere Ablenkung erfahren, als solche mit hoher Energie. Die Elektronen werden somit örtlich getrennt und es können mit Hilfe einer Schlitzeblende bestimmte Energiebereiche

selektiert werden. Im Anschluß an das Prisma werden die herausgefilterten Elektronen schließlich auf eine Videokamera oder CCD-Kamera abgebildet (Abb. 3.7). Bei dem am CM300 TEM verwendeten Energiefilter der Firma Gatan Inc. handelt es sich um ein GIF 2002 mit einer 2048 x 2048 Pixel CCD-Kamera mit 30  $\mu\text{m}$  Pixelgröße.



**Abb. 3.7:** Schematische Darstellung zum Funktionsprinzip eines Post-Column-Energiefilters [aus Böhm, 2001].

### 3.2.6 Kontrastentstehung

In der Elektronenmikroskopie unterscheidet man drei Arten des Bildkontrastes: Streuabsorptions-, Phasen-, und Amplitudenkontrast. Der Streuabsorptionskontrast beruht auf der Teilcheneigenschaft der Elektronen, wohingegen Phasen- und Amplitudenkontrast auf dem Wellencharakter der Elektronen basieren. Der im TEM entstehende Kontrast ist abhängig von der Größe des abgebildeten Objektdetails. „Große“ Strukturen ( $> 10 \text{ nm}$ ) werden in erster Linie durch den Streuabsorptionskontrast abgebildet. Bei „kleinen“ Strukturen (in der Größenordnung der Auflösungsgrenze) wird deren Abbildung durch die Wellennatur der Elektronen und den damit verbundenen Interferenzphänomenen bestimmt.

### 3.2.6.1 Streukontrast (Massendickenkontrast)

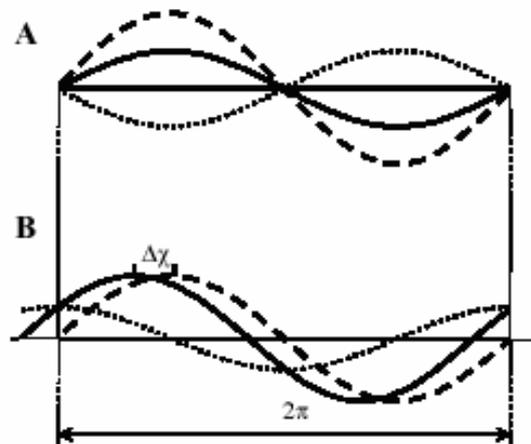
Der Streukontrast trägt vor allem in nichtkristallinen, amorphen Proben (wie vitrifizierten biologischen Materialien) entscheidend zum Bildkontrast bei. Er entsteht auf Grund von inkohärenter, elastischer Streuung der Strahlelektronen. Die Ursache für die verschieden starke Ablenkung der Elektronen ist die unterschiedlich große elektrische Anziehungskraft der Atome, die sie auf die Elektronen ausüben. Treffen Elektronen auf Atome mit hoher Kernladungszahl, werden sie auf Grund der höheren elektrischen Anziehung vergleichsweise um viel größere Winkel von der optischen Achse abgelenkt, als dies bei Atomen mit niedriger Kernladungszahl der Fall ist. Die meisten dieser stark gestreuten Elektronen werden durch die Objektivblende abgefangen, wodurch weniger Elektronen auf die Bildebene bzw. auf den Leuchtschirm treffen und diese Fläche dadurch dunkler erscheint. Durch die Ausblendung gestreuter Elektronen wird aber gleichzeitig die Auflösung des Bildes gemindert.

### 3.2.6.2 Amplituden- und Phasenkontrast

Jede Art von Strahlung (sichtbares Licht, Röntgen- oder Elektronenstrahlung) kann auch als oszillierende Wellenform beschrieben werden. Eine Welle wird wiederum durch eine Amplitude und eine Phase charakterisiert. Die Amplitude ist die maximale Ausdehnung der Oszillation, während die Phase bestimmt, wie eine Welle räumlich und zeitlich oszilliert. Beim Durchqueren einer elektromagnetischen Welle durch ein Objekt wird seine Amplitude auf Grund des Absorptionsverhaltens des Materials geschwächt, während Wellen, die am Objekt vorbeilaufen, ihre ursprüngliche Amplitude beibehalten. Nach der Abbeschen Bildentstehungstheorie wird das Bild eines kleinen Objekts dadurch erzeugt, daß in der Bildebene die in unmittelbarer Nähe des Objekts vorbeilaufenden, ungebeugten (gestrichelte Linie in **Abb. 3.8A**), und die am Objekt gebeugten, amplitudengeschwächten (punktierte Linie) Wellenzüge miteinander interferieren (durchgezogene Linie). Die resultierende Welle hat gegenüber der nichtgebeugten, einfallenden Welle eine kleinere Amplitude, aber keine Phasenänderung erfahren.

Der Phasenkontrast beruht auf der Tatsache, daß sich jede Materie im Brechungsindex von ihrer Umgebung unterscheidet und daher einige der auf sie auftreffenden Strahlen beugt. Dies bewirkt eine Verkleinerung der Phasengeschwindigkeit  $v_{\text{Ph}}$  bzw. der Wellenlänge  $\lambda$  ( $v_{\text{Ph}} = \lambda \nu$ ; mit Frequenz  $\nu$ ) und damit eine Phasenverschiebung des Elektronenstrahls in Bezug auf den

nichtgebeugten Strahl. Da sich die Energie der Welle beim Durchgang nicht ändert, bleibt die Frequenz gleich. Interferiert der ungebeugte Wellenzug (gestrichelte Linie in **Abb. 3.8B**), der in der Nähe des Objekts vorbeiläuft, in der Bildebene mit dem vom Objekt gebeugten, phasenverschobenen Wellenzug (punktierte Linie), resultiert eine um einen kleinen Winkel phasenverschobene Welle (ausgezogene Kurve) mit der gleichen Amplitude wie die ursprüngliche, nichtgebeugte Welle. Eine gegenüber der ursprünglichen, ungebeugten Elektronenwelle geringfügige phasenverschobene Welle ohne Amplitudenschwächung ergibt sich nur, wenn die gebeugte Welle gegenüber der ungebeugten Welle um  $\pi/2$  phasenverschoben ist und eine kleinere Amplitude als die ungebeugte Welle hat. Wird der gebrochene Strahl nochmals um etwa  $\pi/2$  verschoben, so daß die Amplituden phasengleich aufeinanderfallen, interferieren die Wellen des gebrochenen und des ungebrochenen Strahls mit einer wahrnehmbaren Amplitudenmodulation. Dieses Phänomen wird Phasenkontrast genannt. Der Phasenkontrast im Elektronenmikroskop wird durch die sphärische Abberation der Objektivlinse und durch die Lage der Fokusebene verursacht. Im idealen Fall beträgt die Phasenverschiebung  $\pi/2$ . Dies ist jedoch nicht über den gesamten Beugungswinkel- (= Auflösungs-) Bereich möglich - es entsteht eine Kontrastübertragungsfunktion.



**Abb. 3.8:** Entstehung des Amplituden- (A) und Phasenkontrastes (B) [aus Picht und Heydenreich, 1966].

### 3.2.6.3 Kontrastübertragungsfunktion (engl. *Contrast Transfer Function* = CTF)

Die Kontrastübertragungsfunktion beschreibt, wie Amplituden- und Phaseninformation der Objektwellenfunktion bei der elektronenmikroskopischen Abbildung auf das aufgezeichnete Bild übertragen werden. Dies ist abhängig von dem eingestellten Defokus und dem

Beugungswinkel des Elektronenstrahls. Mathematisch ist diese Funktion der Sinus der Phasenschiebung  $\sin\gamma(\theta)$ , der beide Vorzeichen haben oder auch null betragen kann. Näherungsweise läßt sich die Phasenschiebung wie folgt ausdrücken:

$$\gamma(\theta) = \frac{2\pi}{\lambda} \left( C_s \frac{\theta^4}{4} - \Delta z \frac{\theta^2}{2} \right)$$

mit

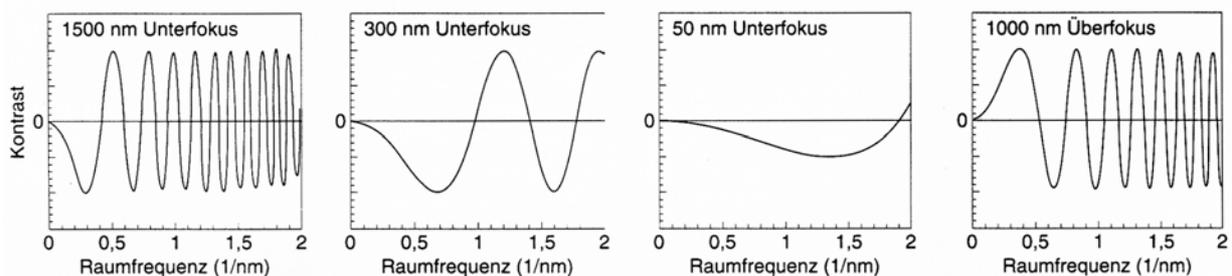
$\theta$  = Streuwinkel (in rad)

$\lambda$  = Wellenlänge der Elektronen

$\Delta z$  = Unterfokus

$C_s$  = Gerätekonstante (beschreibt die sphärische Aberation)

Änderungen der Fokusslage wirken sich wie in Abbildung 3.9 dargestellt auf die Kontrastübertragungsfunktion aus, die unterschiedliche Kontrastverhältnisse bewirkt.



**Abb. 3.9:** Abhängigkeit der Kontrastübertragungsfunktion von der Fokusslage. Beim Überfokus ist deutlich die Kontrastumkehr zu erkennen. Als Raumfrequenz bezeichnet man die Schwingungen pro Längeneinheit. Das Reziproke der Raumfrequenz ist die Wellenlänge  $\lambda$  (aus Lottspeich und Zorbas, 1998).

Bei Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop benutzt man in der Regel einen starken Unterfokus, um den Kontrast zu erhöhen. Gleichzeitig verschlechtert sich allerdings auch die Auflösung, die folgendermassen vom Unterfokus abhängt:

$$d = \sqrt{\lambda \cdot \Delta z}$$

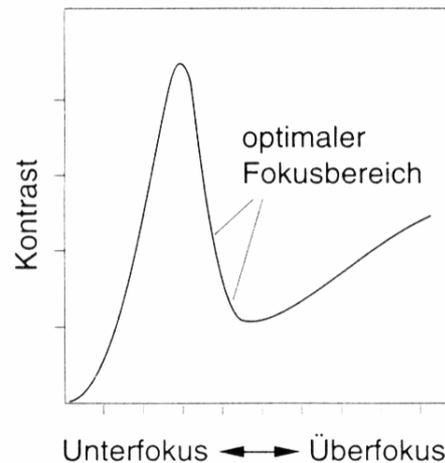
mit

$d$  = Auflösung

$\lambda$  = Wellenlänge der Elektronen

$\Delta z$  = Unterfokus

Der optimale Bereich liegt nahe dem Kontrastminimum im schwachen Unterfokus (auch Scherzer-Fokus genannt), wo die Phasenschiebung der gebeugten Welle etwa  $\pi/2$  beträgt (**Abb. 3.10**). Den Punkt der Kontrastumkehr beim Übergang vom Unter- in den Überfokus nennt man Gaußfokus.



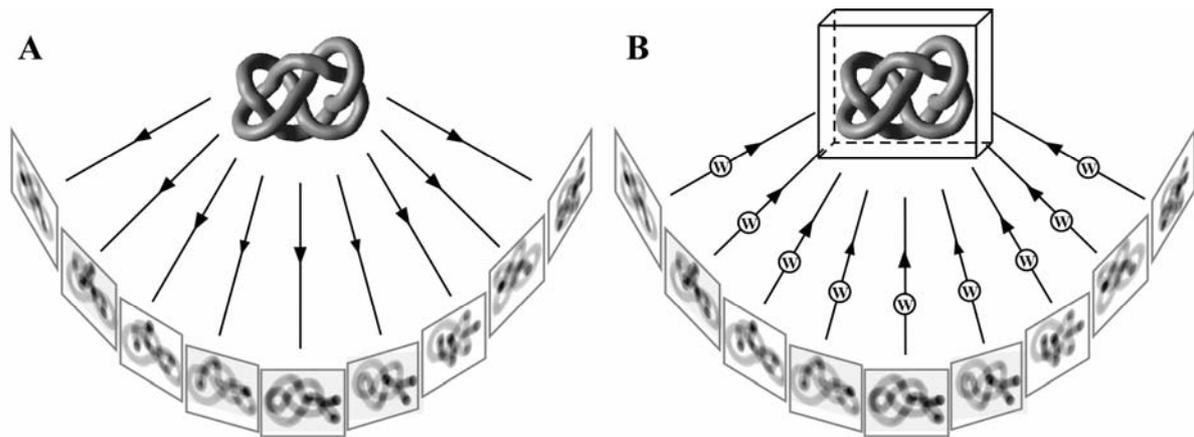
**Abb. 3.10:** Zusammenhang zwischen Bildkontrast und Fokuslage [aus Lottspeich und Zorbas, 1998].

Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Transmissions-Elektronenmikroskops enthalten also abhängig von der Fokussierung mehr oder weniger gut übertragene Objektinformationen. Um die Bilder korrekt zu interpretieren, muß daher immer eine Analyse der Kontrastübertragungsfunktion mit Hilfe von lichtoptischen Diffraktometern oder durch Analyse des Fourier-Spektrums der Aufnahmen vorgenommen werden (siehe 3.3.1.1).

## 3.3 Elektronentomographie

### 3.3.1 Grundlagen der Elektronentomographie

Ziel der Elektronentomographie ist es, aus zweidimensionalen (2-D) elektronenmikroskopischen Aufnahmen ein 3-D-Volumen des pleiomorphen Untersuchungsobjekts zu erhalten (**Abb. 3.11**). Die theoretische Grundlage für die Rekonstruktionsalgorithmen entwickelte bereits 1917 der Mathematiker J. Radon (Radon, 1917).



**Abb. 3.11:** Schematische Darstellung der tomographischen Datenaufzeichnung und Rekonstruktion. Von einem 3-D-Objekt wird eine möglichst hohe Anzahl von 2-D-Projektionen aus unterschiedlichen Richtungen aufgenommen (**A**). Die einzelnen Projektionen werden gewichtet und in ein gemeinsames Volumen rückprojiziert (**B**).

Die Aufnahmen aus den unterschiedlichen Projektionsrichtungen erhält man, in dem man das Objekt im Elektronenmikroskop mittels eines Goniometers um eine Achse senkrecht zum Elektronenstrahl kippt. Diese Projektionen werden anschließend mittels kolloidaler Goldmarker, die vor dem Auftragen der Probe in Lösung auf das Grid gegeben wurden, aufeinander aligniert, fouriertransformiert (siehe 3.3.1.1) und frequenzabhängig gewichtet. Die gewichtete Rückprojektion entlang der Strahlrichtung in den Realraum und Superposition der 2-D Bilder führt schließlich zur 3-D-Abbildung des Objekts. Die Auflösung der Rekonstruktion ist linear von der Anzahl der aufgenommenen Projektionen abhängig und kann für die Einachsenkipfung wie folgt beschrieben werden (Crowther *et al.*, 1970):

$$d = \frac{\pi \cdot D}{N}$$

mit

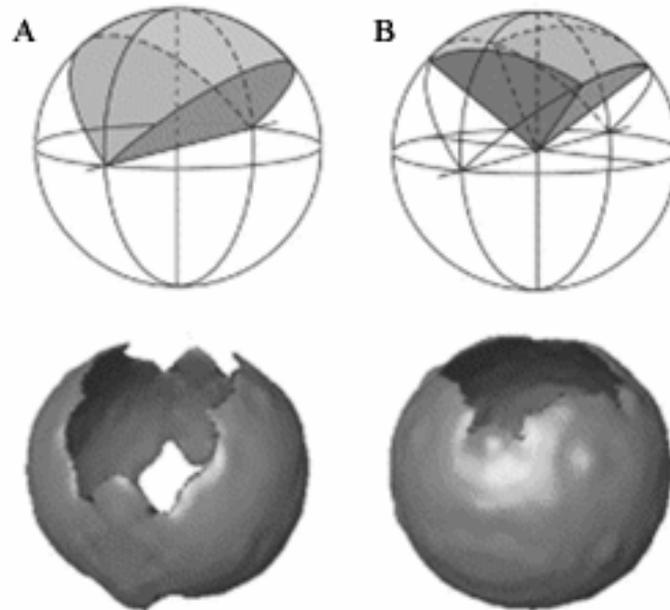
d = Auflösung

D = Dicke des Objekts

N = Anzahl der Projektionen

Die Anzahl der Aufnahmen kann zum einen durch Verkleinerung des Winkel-Inkrement erreicht werden, oder zum anderen durch Erweiterung des Kippwinkelbereichs. Dem letzteren sind jedoch durch mechanische Gegebenheiten des Goniometers und Kipphalters Grenzen gesetzt, und so kann in der Regel nur in einem Bereich von  $-70^\circ$  bis  $+70^\circ$  gearbeitet werden.

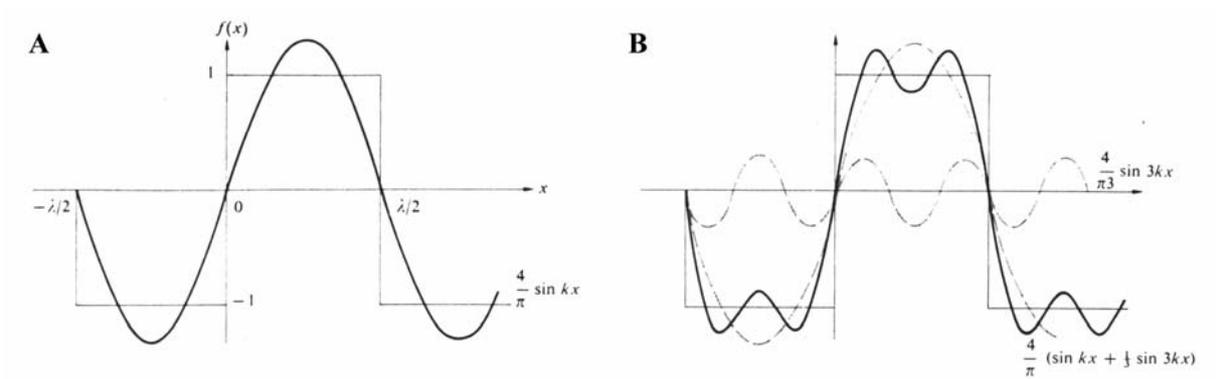
Die fehlenden Projektionen bilden im Fourier-Raum einen Doppelkeil (engl. *missing wedge*; **Abb. 3.12A**) bzw. bei Verwendung eines Doppelkipphalters eine Pyramide (engl. *missing pyramid*; **Abb. 3.12B**), in dessen Bereichen Objektinformation fehlt. Im Realraum ist die Auflösung in z-Richtung schlechter als in der x,y-Ebene, was sich unter anderem in einer Elongation und damit einer „Verschmierung“ der Strukturinformation auswirkt (Rekonstruktionsartefakt).



**Abb. 3.12:** Veranschaulichung des eingeschränkten Informationsgehalts in 3-D-Rekonstruktionen: „fehlender Keil“ (engl. *missing wedge*) (**A**) und „fehlende Pyramide“ (engl. *missing pyramid*) (**B**).

### 3.3.1.1 Die Fourier-Transformation

Fourier's Idee war es, jede beliebige Funktion angenähert als Überlagerung harmonischer Sinus- und Kosinus-Funktionen geeigneter Amplitude und zunehmender Frequenz darzustellen. Jede Abbildung im Realraum kann somit auch als Objektfunktion  $f(x)$  definiert werden, die sich als Summe vieler Sinusfunktionen, die sich in den Parametern Frequenz (Raumfrequenz), Amplitude und Phasenlage im Koordinatenursprung unterscheiden, darstellen läßt (**Abb. 3.13A**). Dabei wird die Übereinstimmung dieser Summe mit  $f(x)$  umso genauer, je mehr solcher Funktionssummanden man einsetzt (**Abb. 3.13B**).



**Abb. 3.13:** Fourier-Zerlegung einer periodischen Rechteckwelle [aus Hecht, 1992].

Im Fall von unendlich vielen Summanden, also der Integration über alle Frequenzen, läßt sich die Objektfunktion exakt beschreiben. Diese Darstellung nennt man Fourier-Transformation (FT):

$$FT[f(x)] = \int_{-\infty}^{\infty} f(x) e^{-i2\pi kx} dx$$

wobei

$$f(x) = \sum [k_i \cdot \sin(2\pi v_i x + \Delta\varphi_i)]$$

mit

$k_i$  = Strukturfaktor

$v_i$  = Frequenz

$\Delta\varphi_i$  = Phasenverschiebung

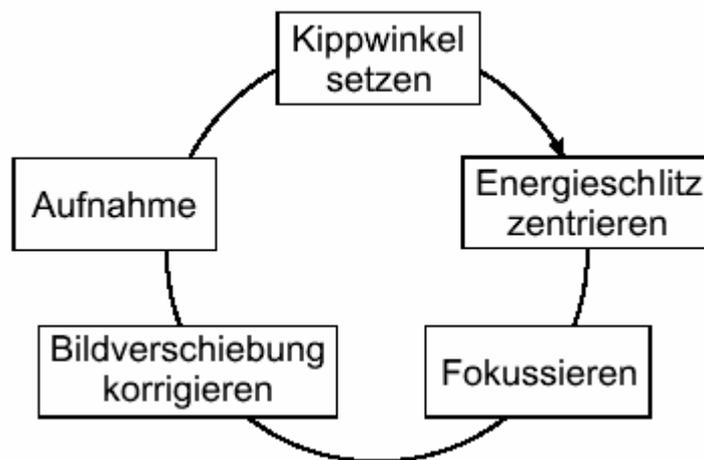
Fourier-transformierte EM-Aufnahmen sind also zweiteilige Bilder: sie enthalten die Amplituden (Strukturfaktoren) und Phasenverschiebungen der einzelnen Sinusfunktionen. Dabei kennzeichnen Funktionen mit kleiner Ortsfrequenz (großen Wellenlängen) grobe Objektstrukturen und Sinusfunktionen mit hoher Ortsfrequenz (kleinen Wellenlängen) feine Strukturdetails. Um ein Bild mit hoher struktureller Auflösung zu analysieren, muß man die kleinen Amplituden bestimmen und sie vom überlagernden hochfrequenten Rauschen trennen. Dazu verwendet man bestimmte Fourier-Filterungen, wie die Tief- und Hochpassfilterung. Bei der Tiefpassfilterung (engl. *low-pass*) werden hochfrequente Bildanteile (z.B. Rauschen) entfernt, während bei der Hochpassfilterung (engl. *high-pass*) die niederfrequenten Anteile beseitigt werden.

Für die Analyse von Bildqualität und von Objekteigenschaften genügt es, die Größe und die Verteilung der Strukturfaktoren als Funktion der Raumfrequenz zu kennen. Dazu wird das Energiespektrum (engl. *power spectrum*) herangezogen, welches das Quadrat der Fourier-Transformierten darstellt, wobei die Phaseninformation verloren geht. Es entspricht dem lichtoptischen Beugungsbild (Diffraktogramm) und besteht aus konzentrischen, abwechselnd hellen und dunklen Ringen. Die hellen Bereiche kennzeichnen die übertragenen Ortsfrequenzen, die die Strukturinformation beinhalten, während die dunklen Ringe (Thonsche-Ringe) Übertragungslücken darstellen. Der erste Thonsche-Ring kennzeichnet außerdem die erste Nullstelle der Kontrastübertragungsfunktion und beschreibt damit die Fokusslage (siehe 3.2.5.3).

### 3.3.2 Automatisierte Elektronentomographie im „low-dose“-Modus

Beugungsmessungen zu Beginn der 70er Jahre zeigten, welche verheerenden Auswirkungen Bestrahlung auf das Probenmaterial haben kann (Glaeser, 1971). Die Strahlenbelastung steigt zudem mit dem Quadrat der Vergrößerung. Obwohl biologische Strukturen im Vergleich zur Raumtemperatur unter Kryo-Bedingungen sehr viel weniger empfindlich gegenüber Elektronenstrahlung sind, stellt die hohe Strahlenempfindlichkeit von eiseingebetteten, biologischen Materialien dennoch eine wesentliche Limitierung bei der elektronentomographischen Datenaufzeichnung dar.

Durch die Automatisierung der Bildaufzeichnung (**Abb. 3.14**) wird die Dosis, und somit der Strahlschaden, innerhalb der Kippserie minimiert (engl. *low dose*) (Dierksen *et al.*, 1992). Die gesamte Elektronendosis während einer Kippserie sollte zwischen 2000 und 6000  $e^-/nm^2$  liegen (Grimm *et al.*, 1998). Da eine manuelle Einstellung und die Korrektur von wichtigen Mikroskopparametern, wie Defokus und Bildverschiebung, nach jedem Kippschritt zu einer hohen Strahlenbelastung des Objekts führen und sehr zeitintensiv sind, werden die einzelnen Schritte von einem externen Computer gesteuert. Die Werte der Bildauswanderung und Defokussierung werden vom Computer ermittelt und an das Elektronenmikroskop weitergeleitet und korrigiert. Somit kann für die eigentlichen Aufnahmen ein Großteil der zulässigen Gesamtdosis verwendet werden. Ein Nachteil dieser Nieder-Dosis-Bedingungen ist jedoch, daß die Auflösung und das daraus resultierende Signal-zu-Rausch- (engl. *signal-to-noise*) Verhältnis verschlechtert werden.



**Abb. 3.14:** Schematischer Ablauf eines automatisierten, tomographischen Aufnahmezykluses. Für jeden gesetzten Kippwinkel wird die Probe erneut fokussiert und die mechanische Probendrift mit Hilfe der Bildverschiebung korrigiert. Danach erfolgt die eigentliche Aufnahme. Eine Zentrierung des Energieschlitzes zur „zero-loss“-Filterung ist nur etwa alle 10 Aufnahmen nötig.

### 3.4 Kryo-Präparation

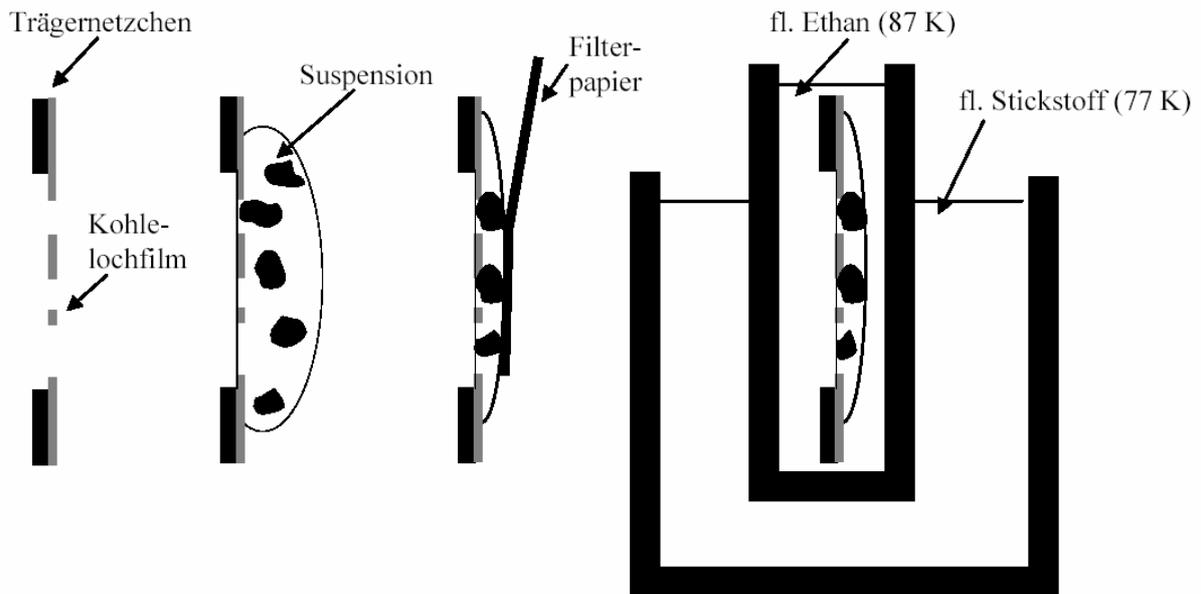
Helligkeit und Kontrast in elektronenmikroskopischen Aufnahmen hängen stark von der für die Bildaufnahme verwendeten Elektronendosis ab. Besonders bei dickeren Proben, wie ganzen Zellen, muß daher eine hohe Intensität verwendet werden. Biologische Materialien, wie etwa Zellen, Organellen, Makromoleküle oder Viren, sind allerdings sehr strahlungsempfindlich und werden durch den Elektronenstrahl aufgeheizt, was zu strukturellen Veränderungen und letztendlich zur Zerstörung der Probe führt. Eine Methode, dies zu verhindern oder zumindest zu verzögern, ist es, die zu untersuchende Probe durch Schockgefrieren mittels einer Guillotine-artigen Apparatur (**Abb. 3.15**) in flüssigem Ethan ( $T = -183\text{ °C}$ ) in einen dünnen Eisfilm einzubetten (vitrifizieren) (Dubochet *et al.*, 1988). Ethan zeichnet sich durch eine wesentlich bessere Wärmeleitfähigkeit gegenüber Stickstoff aus, welcher bei Wärmeaufnahme sofort verdampft und sich als isolierendes Gaspolster um die Probe legen würde (Leidenfrost-Phänomen). Auf Grund der hohen Abkühlrate des durch Stickstoff ( $T = -196\text{ °C}$ ) gekühlten Ethans, die bei Proben mit einer Dicke von weniger als einem Mikrometer  $10^6\text{ K/s}$  beträgt, bildet sich kein kristallines Eis aus, sondern amorphes Eis, welches die native Struktur bis auf atomare Dimensionen konserviert. Dies stellt einen entscheidenden Vorteil gegenüber den klassischen Präparationstechniken (wie der chemischen

Fixierung, Entwässerung oder Kontrastierung) dar. Zusätzlich wird ein Verdampfen der wässrigen, biologischen Proben im Hochvakuum des Mikroskops verhindert. Zwei Nachteile der Kryo-Präparation gegenüber der Negativkontrastierung sind allerdings der geringe Kontrast der abzubildenden Struktur auf Grund des geringen Dichteunterschieds von amorphem Eis und Protein, sowie die höhere Strahlungsempfindlichkeit des Präparats. Die maximale Elektronendosis für biologische Präparate beträgt ca. 20 bis 100  $e^-/\text{\AA}^2$ . Die ab dieser Dosis erkennbaren strukturellen Veränderungen beruhen auf der Bildung und der Diffusion von freien Radikalen und den durch sie ausgelösten Reaktionen.



**Abb. 3.15:** Einschubapparat zur Kryo-Fixierung. Sie funktioniert nach dem Prinzip einer Guillotine und gewährleistet eine kontrollierte und reproduzierbare Vitrifikation. Die Fallvorrichtung wurde in Anlehnung an die Konstruktion von Dubochet (Dubochet *et al.*, 1988) von der hauseigenen Werkstatt entworfen und gebaut.

Die genaue Vorgehensweise bei der Kryo-Präparation ist in der folgenden Abbildung (**Abb. 3.16**) illustriert:



**Abb. 3.16:** Bei der Kryo-Fixierung wird die in wässriger Lösung oder Kulturmedium befindliche Probe auf einen Kohlelochfilm aufgebracht. Nach dem Entfernen der überstehenden Flüssigkeit durch Filterpapier („Blotten“) wird das Grid in flüssiges Ethan eingeschossen und somit schockgefroren (von links nach rechts) [aus Böhm, 2001].

Nach der Kryopräparation wird die vitrifizierte Probe stets unter flüssigem Stickstoff gehalten und mittels eines speziellen Kryo-Probenhalters (**Abb. 3.17**), der sich ebenfalls auf Stickstofftemperatur befindet und die Probe somit über mehrere Stunden thermisch stabil hält, in das Hochvakuum des Mikroskops transferiert und die Datenaufnahme begonnen.



**Abb. 3.17:** Kryo-Probenhalter.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Zellkultivierung

#### 4.1.1 Bakterienstamm

Untersuchungsobjekt dieser Arbeit waren Zellen der Art *Spiroplasma melliferum* BC-3 (ATCC 33219), die in der Natur als Krankheitserreger in Honigbienen (*Apis mellifera*) vorkommen (Clark, 1977; Clark *et al.*, 1985). Die Zellen sind helikal gewunden und haben einen Durchmesser von 100-150 nm und eine Länge von 3-10  $\mu\text{m}$  (Krieg und Holt, 1984).

#### 4.1.2 Wachstumsbedingungen und Anzucht

Der Organismus wurde in 5-ml Cryoröhrchen (Roth, E295.1) in „798 plant mycoplasma medium“ (Tab. 1A und 1B, nach ATCC) bei 30°C gezüchtet. Die Inkubationszeiten betragen 24 Stunden für Umsetzungen bzw. 6-8 Stunden für Präparationsversuche. Zum Beimpfen wurden 0,5 ml zu 4,5 ml frischem Medium gegeben. Erfolgreiches Wachstum konnte anhand eines Farbumschlags des Mediums von rot über orange nach gelb festgestellt werden.

**Tab. 1A:** Mediumzusammensetzung.

D-Glukose	0,1 g	Merck 1.08337
D-Fruktose	0,1 g	Merck 1.05323
Saccharose	1,0 g	Merck 1.07651
Trypton	1,0 g	Difco 0123
D-Sorbit	7,0 g	Merck 1.07758
PPLO Broth w/o CV	2,1 g	Difco 0554
Pepton	0,8 g	Difco 0118
dest. H <sub>2</sub> O	70,0 ml	

Dieses Gemisch wurde mittels 1N NaOH auf einen pH-Wert von 7,8 eingestellt und 15 Minuten bei 121 °C autoklaviert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden folgende nicht-autoklavierbare Komponenten steril-filtriert zugegeben:

**Tab. 1B:** Mediumzusammensetzung.

Schneider's Drosophila Medium	160,0 ml	GIBCO 11720
fötale Rinderserum, hitze-inaktiviert, $\gamma$ -bestrahlt	50,0 ml	Biochrom S0113
Hefe-Extrakt-Lösung	10,0 ml	GIBCO 18180
Phenolrot-Lösung (0,5%)	1,2 ml	Merck 7241

Die Phenolrot-Lösung wurde folgendermaßen hergestellt: 1 g Phenolrot wird im Mörser unter langsamer Zugabe von 30 ml 1 N NaOH zerrieben. Danach füllt man mit destilliertem Wasser auf 200 ml auf und inkubiert über Nacht bei 4 °C. Anschließend wird die Lösung filtriert, auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und autoklaviert.

#### 4.1.3 Langzeitaufbewahrung von Kulturen

Kulturen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und aufbewahrt, um zu einem späteren Zeitpunkt wieder aufgetaut und angezüchtet werden zu können. Hierfür wurde eine 6-8 Stunden gewachsene Kultur im Verhältnis 9:1 mit 50%-igem DMSO (dimethyl sulfoxide) gemischt und durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff gefroren.

## 4.2 Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie

### 4.2.1 Kryo-Proben

Für die Untersuchung im Elektronenmikroskop wurden 5  $\mu$ l aus einer 6-8 Stunden gewachsenen Kultur auf ein mit einem Kohlelochfilm beschichtetes Kupfergrid (S166-2; Plano GmbH, Wetzlar) pipettiert. Dieses wurde vorher bereits im Beglimmer (engl. *plasma cleaner*) durch Glimmentladung in ionisiertem Gas hydrophil gemacht und mit 3  $\mu$ l einer

Goldlösung, bestehend aus 10 nm kolloidalem Gold (Sigma), beschichtet, um eine spätere Alignierung der 2-D-Aufnahmen zu ermöglichen. Danach wurde das Grid nach der wie in Kapitel 3.4 beschriebenen Kryo-Präparationsmethode eingefroren und anschließend im Elektronenmikroskop untersucht, oder in Gridboxen in Stickstofftanks aufbewahrt.

#### **4.2.2 Negativ-kontrastierte Proben (engl. *negative staining*)**

Mit Kohlefilm beschichtete Grids wurden 30 Sekunden im Plasma Cleaner beglimmt, um sie hydrophil zu machen. Auf einem Parafilm wurden der Reihe nach je ein 5 µl-Tropfen Probe, destilliertes Wasser und 2% Uranylacetat (UA) pipettiert. Das Grid wurde anschließend nacheinander für 30 Sekunden (Probe), 1 Sekunde (H<sub>2</sub>O dest.) bzw. 1 Minute (UA) umgekehrt auf den jeweiligen Tropfen gelegt und zwischendurch mit Filterpapier abgesaugt. Das getrocknete Grid wurde für die spätere Untersuchung im CM12 Transmissions-Elektronenmikroskop aufbewahrt.

### **4.3 Kryo-Elektronentomographie**

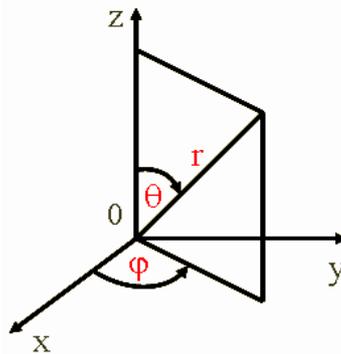
Mit einem 300kV Transmissions-Elektronenmikroskop der Firma FEI (Eindhoven, Niederlande), welches mit einer Feldemissionskathode (FEG) und einem GIF 2002 Energiefilter der Firma Gatan Inc. (Pleasanton, Kalifornien) ausgestattet ist, wurden tomographische Kippserien mit einem Inkrement von 1,5° innerhalb eines Winkelbereichs von etwa -60° bis +60° unter Niedrigdosisbedingungen aufgenommen. Die Belichtungszeit wurde nach der Funktion  $1/\cos \alpha$  für jeden Kippwinkel festgelegt. Der Defokus der verschiedenen Kippserien betrug zwischen 8 und 15 µm. Die Datenaufnahme erfolgte automatisiert (siehe 3.3.2). Die Pixelgröße betrug zwischen 0,68 und 0,86 nm.

### **4.4 Bildverarbeitung und Visualisierung**

Die 2-D-Aufnahmen wurden wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben aligniert und zu einem 3-D-Volumen mit einer Auflösung von bis zu 4 nm rekonstruiert. Hierzu diente das von R. Hegerl erstellte EM-Programm (Hegerl, 1996). Aufgrund des schlechten Signal-zu-Rausch-

Verhältnisses in den Aufnahmen wurde durch Anwendung der nichtlinearen anisotropen Diffusion im 3-D-Volumen das Rauschen vermindert (Frangakis und Hegerl, 2001).

Um die Anzahl und die Abstände der einzelnen Cytoskelett-Filamente zu bestimmen, wurde die sogenannte „Hough“-Transformation (Russ, 2002) für Filamentregionen aus mehreren Tomogrammen berechnet. Hierfür erstellt man zunächst Projektionen über alle  $\varphi$ - und  $\theta$ -Winkel (**Abb. 4.1**), bestimmt die Position mit maximalem Kontrast und wählt dann die entsprechenden Projektionswinkel aus.



**Abb. 4.1:** Veranschaulichung der sphärischen Koordinaten  $r$ ,  $\varphi$  und  $\theta$ .

Die Berechnung der geodätischen Linie, das heißt der kürzesten Verbindung zwischen zwei beliebigen Punkten auf der drei-dimensionalen Zellmembran, erfolgte in Anlehnung an Kimmel und Sethian (Kimmel und Sethian, 1998).

Zur 3-D-Visualisierung diente das AMIRA Software Programm (Mercury Computer Systems Inc., Chelmsford, Massachusetts), mit dem man einzelne Strukturen aus dem 3-D-Volumen manuell segmentieren und darstellen kann.

## 4.5 Aufstellung von Bewegungsmodellen

### 4.5.1 Konfokale Lichtmikroskopie

Um die Bewegungsmechanismen und Helizität von *S. melliferum* zu untersuchen, wurden von den Zellen lichtmikroskopische Aufnahmen am „European Molecular Biology Laboratory“ (EMBL) in Heidelberg aufgenommen.

Die Zellen wurden zunächst 30 Minuten mit 10 µg/ml Hoechst 33342 inkubiert. Anschließend wurden sie mit 45% Glycerin gemischt und sofort auf einem Objektträger mit Deckgläschen mikroskopisch untersucht. Mit einem für Fluoreszenzprotein-Aufnahmen angepaßten Zeiss LSM 510 Konfokalmikroskop (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit 100x PlanApochromat 1.4 NA Ölimmersions-Objektiv wurden Bilder gesammelt (vgl. Gerlich *et al.*, 2001). Um den sehr beweglichen Zellen in z-Richtung folgen zu können, wurden alle 250 Millisekunden zwei 7,7 µm dicke Bereiche mit einer Verschiebung von 2,0 µm aufgenommen. Mit dem gleichen Mikroskop wurden zudem Phasenkontrast-Aufnahmen von unbehandelten Zellen gemacht.

#### 4.5.2 Computersimulationen

Die Simulationen der Bewegungsmechanismen von *S. melliferum* basieren auf den Ergebnissen dieser Arbeit, die aus den tomographischen Untersuchungen gewonnen wurden.

Demzufolge wurde für unser Modell die Existenz eines aus drei miteinander verbundenen Filamentbändern bestehendes Cytoskelett vorausgesetzt, welches unterhalb der Membran durch die ganze Zelle verläuft. Zudem wurde angenommen, daß das innere Band eine elastische, zylindrische Form induziert, und daß jedes der beiden äußeren Bänder aus diskreten Elementen besteht, welche zwei verschiedene Konformationen annehmen können. Somit wurden die Simulationen folgendermassen erstellt: In 3-D wird eine beliebige Kurve, die aus diesen diskreten Elementen einer Konformation gebildet wird, definiert. Um diese Kurve wird in einem konstanten Abstand, welcher durch die in dieser Arbeit bestimmten Breite des inneren Bandes definiert ist, eine zweite Kurve mit unterschiedlicher Konformation ihrer diskreten Elemente berechnet. Anschließend wird ein elastischer, zylindrischer Körper, welcher den Zellkörper repräsentiert, um diese beiden Kurven gewickelt. Die Annahme eines elastischen Zylinders ist wichtig, da eine eindeutige Lösung sonst nicht möglich wäre.

Durch Simulation von Längen- und Distanzänderungen der beiden Kurven, welche die beiden äußeren Filamentbänder darstellen, können sowohl die Änderung der Händigkeit der Zelle, als auch die Fortpflanzung einer Deformation (engl. *propagating kink*) durch den Zellkörper erklärt werden – beides Mechanismen, die von *S. melliferum* zur Fortbewegung benutzt werden.

## 4.6 Biochemische Untersuchung

### 4.6.1 Gel-Elektrophorese

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurden die Proben im Verhältnis 4:1 mit 5x SDS-Puffer (1,7% SDS, 5% Glycerin, 58 mM Tris, 100 mM DTT, 0,02% Bromphenolblau, pH 6,8) gemischt und 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock erhitzt, um die Zellen zu lysieren. Als Elektrophorese-Puffer dienten ein Kathodenpuffer (100 mM Tris, 100 mM Tricine, 0,1% SDS, pH 8,25) und ein Anodenpuffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,9). Die Proben, sowie ein Marker (SeeBlue Pre-Stained Standard, Invitrogen), wurden auf ein 12%-Acrylamid-Gel aufgetragen und durch Elektrophorese (100 V, 400 mA, 1-2 h) getrennt. Anschließend wurde das Gel einige Minuten in TCAA (trichloroacetic acid) geschwenkt und danach mit Wasser gut abgewaschen. Als Färbelösung für die Gele wurde eine Coomassie-Lösung eingesetzt (0,3% Coomassie brilliant blue R250, 45% Methanol, 10% Essigsäure), zur Entfärbung wurde Wasser verwendet.

### 4.6.2 Western-Blot-Analysen

*S. melliferum* BC3-Zellen in mid-logarithmischer Phase wurden durch Zentrifugation (4 °C, 4 500 g, 30 min) geerntet. Ein Teil des Pellets wurde im Verhältnis 4:1 in 5x SDS-Puffer gelöst und 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock erhitzt, um die Zellen zu lysieren. Das Kulturmedium wurde auf die gleiche Weise behandelt und diente als Kontrolle. Die Proben wurden auf ein 12%-Acrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (siehe 4.5.1). Das Gel wurde anschließend für 15 Minuten in Blotting-Puffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,0375% (w/v) SDS, 20% Methanol) equilibriert und die Proteine durch Elektroblothen (15 V, 1 h) auf eine Optitran BA-S Nitrocellulose-Membran (Schleicher und Schuell) transferiert. Nach 30-minütigem Waschen mit NCP-Puffer (10 mM Tris, 1,5 M NaCl, 0,5% Tween, 0,2% Na-Azid) wurden unbesetzte Proteinbindungsstellen auf der Membran durch 30-minütige Inkubation mit NCP/5% BSA- (engl. *bovine serum albumin*) Puffer blockiert. Die Membran wurde anschließend jeweils getrennt mit dem ersten Antikörper (monoklonaler Aktin-Antikörper (236-1, Prof. Dr. G. Gerisch, MPI für Biochemie, Martinsried, Deutschland), polyklonaler MreB-Antikörper (Prof. J. Errington, University of Oxford, Oxford, UK) 1:500 verdünnt in NCP-Puffer, polyklonaler „Fibril“-Protein-Antikörper (Eurogentec, Seraing, Belgien) 1:500

verdünnt in NCP-Puffer) auf einem Schüttler bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach mehreren Waschschritten in NCP-Puffer (5 x 10 min) wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (Aktin: alkaline phosphatase-conjugated anti-mouse, MreB und „Fibril“-Protein: alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit (1:5000 verdünnt in NCP-Puffer), Sigma-Aldrich Inc.) für 1 Stunde auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschritten (5 x 5 min in NCP-Puffer und 1 x 5 min in 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, pH 10,2), wurden gebundene Antikörper mit einer Färbetablette (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium, Sigma-Aldrich Inc.) sichtbar gemacht und die Membran anschließend mit Wasser gewaschen.

#### 4.6.3 Herstellung des Antikörpers gegen das „Fibril“-Protein

Es wurden zwei Antikörper gegen das „Fibril“-Protein von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) hergestellt. Als Peptidsequenzen wurden folgende Sequenzen aus dem bereits sequenzierten Protein von *S. citri* (SWISS-PROT: FIB\_SPICI) verwendet: für den ersten Antikörper wurde die Sequenz STNDKHD TGDTTIST (AA 78-92) (**Abb. 4.2 links**) benutzt, für den zweiten Antikörper wurden die beiden Sequenzen ISVFIPS NKGANRGV (AA 461-474) (**Abb. 4.2 Mitte**) und DITRNDYDPIKVG SF (AA 492-506) (**Abb. 4.2 rechts**) im Rahmen des „Double XP“-Programms verwendet. Diese Sequenzen erwiesen sich aufgrund folgender Eigenschaften als besonders geeignet: starke Hydrophilizität und antigener Index (AA 78-92), hohe Wahrscheinlichkeit der Oberflächenexposition (AA 461-474), sowie starke Hydrophilizität und Flexibilität (AA 492-506).



**Abb. 4.2:** Modell der Struktur des N-terminalen Teils des „Fibril“-Proteins aus *S. citri*, in der die Lage der für die Antikörper-Herstellung ausgewählten Sequenzen (cyan) markiert ist (erstellt mit dem Grafikprogramm RasMol).

#### 4.6.4 Isolierung und Aufreinigung der Filamente

Die Isolierung und Aufreinigung der Filamente erfolgte, abgesehen von einzelnen Abweichungen, nach den Methoden von Trachtenberg und Gilad (Trachtenberg und Gilad, 2001):

Die Zellen einer 500 ml-Kultur, die 11 Stunden gewachsen war, wurden in einem Sorvall SS-34 Rotor abzentrifugiert (4 °C, 13 000 rpm, 30 min). Die Pellets wurden in Tris-Puffer (10 mM, pH 7,6) mit 400 mM NaCl gewaschen und anschließend in 50 ml 10 mM Tris-Puffer mit 1% Triton X-100, 1% Natriumdeoxycholat und 2 M Glycerin, pH 7,6, aufgelöst und bei 4 °C über Nacht gerührt. Der Tris-Puffer enthielt zusätzlich  $Mg^{2+}$  (5 mM), DNase (2,5 µg/ml) und eine Tablette "protease inhibitor complete" (Boehringer, Mannheim, Deutschland). Das Lysat wurde in einem Ti55.2 Rotor abzentrifugiert (4 °C, 35 000 rpm, 120 min). Nach der Zentrifugation enthielt das Pellet das „Fibril“-Protein, während sich MreB im Überstand befand. Das Pellet wurde mit Tris/EDTA-Puffer (TE; 10 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,6) gewaschen, in einem Ti55,2 Rotor abzentrifugiert (4 °C, 40 000 rpm, 20 min) und in 1 ml TE mit 1 M KCl (TEK) durch 4-tägiges Rühren bei 4 °C aufgelöst. Die TEK-Suspension wurde auf einen 15-60%-igen Sucrose-Gradienten in TE-Puffer gegeben und in einem Beckman SW28 Rotor zentrifugiert (20 °C, 28 000 rpm, 18 h). Anschließend wurden mit Hilfe eines Dichtegradienten-Fraktionssammlers (ISCO, Lincoln, Nevada, Model 640) 38 Fraktionen à 0,8 ml gesammelt.

Zur genaueren Untersuchung der Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation wurden SDS-PAGE-Gele von jeder zweiten Fraktion angefertigt und anhand eines Western-Blots mit einem Antikörper gegen das „Fibril“-Protein die Fraktionen bestimmt, welche das „Fibril“-Protein enthalten. Von der Fraktion mit dem höchsten Anteil an Protein wurden ein gesondertes Gel für die Sequenzanalyse, sowie negativ-kontrastierte Grids (siehe 4.2.2) zur Untersuchung im Elektronenmikroskop vorbereitet.

Um die Proteine des Überstands nach der Zentrifugation des Lysats zu trennen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Um die Auftrennung zu verbessern, wurde der Überstand (50 ml) zunächst durch Zentrifugation in einer Rotanta 46 RS Zentrifuge (4 °C, 3 500 rpm) 38-fach aufkonzentriert (Millipore, Amicon Ultra-15, 5 000 MWCO). Die Gelfiltration erfolgte an einer Äkta mit einer Superose-6-Säule (130 ml). Zum Equilibrieren der Säule wurde ein Tris/EDTA-Puffer (10 mM Tris, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH 7,6)

verwendet. Anschließend wurde die Säule mit 1,3 ml Probe beladen und mit 0,5 ml/min bei 4 °C gefahren. 32 µl jeder zweiten Fraktion des Peaks wurden auf einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und anhand eines Western-Blots mit einem Antikörper gegen MreB die Fraktionen bestimmt, welche MreB enthalten. Da sich bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung herausstellte, daß die Probe keine Filamente enthält, wurde ein Versuch unternommen, die MreB-Filamente mit Hilfe eines Polymerisationsassays wieder herzustellen.

#### **Polymerisationsassay:**

Nach der Gelfiltration wurden die Fraktionen mit dem höchsten Anteil an Protein vereinigt, mit Polymerisationspuffer (100 mM Tris-HCl, 2 mM ATP, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, pH 7,0) gemischt und 30 Minuten bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde diese Probe in einem Ti70.1 Rotor ultrazentrifugiert (4 °C, 45 000 rpm, 20 min) und vom in Polymerisationspuffer aufgenommenen Pellet, sowie vom Überstand, negativ-kontrastierte Grids (siehe 4.2.2) für die Untersuchung im Elektronenmikroskop angefertigt. 6 ml des Überstands wurden zudem 6-fach aufkonzentriert (Pall, Nanosep 10K Omega) und für die Proteinsequenzanalyse verwendet.

#### **4.6.5 Proteinsequenzanalysen**

SDS-PAGE-Gele der Dichtgradientenfraction, welche das „Fibril“-Protein enthielt, sowie der Gelfiltrationsfraktionen, in dem sich MreB befand, wurden für Proteinsequenzanalysen verwendet.

Die durch Western-Blot-Analyse und anhand ihres Molekulargewichts bestimmten, entsprechenden Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, Cystein-alkyliert und tryptisch gespalten (vgl. Eckerskorn und Lottspeich, 1989). Anschließend wurden die Peptidfragmente aus dem Gel eluiert und mittels ‚reverse-phase‘ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (SYCAM, Fürstenfeldbruck, Deutschland, Luna C-18-Säule, 150 x 1 mm) aufgetrennt. Die Sequenzierung einzelner Fragmente erfolgte durch N-terminalen Edman-Abbau mit Hilfe eines Procise 492 cLC Gasphase-Sequenators (Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland) gemäß den Anleitungen des Herstellers. Die gefundenen Sequenzen wurden schließlich mit Sequenzen in der Datenbank des NCBI (National Center

for Biotechnology Information, [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) verglichen und entsprechend zugeordnet.

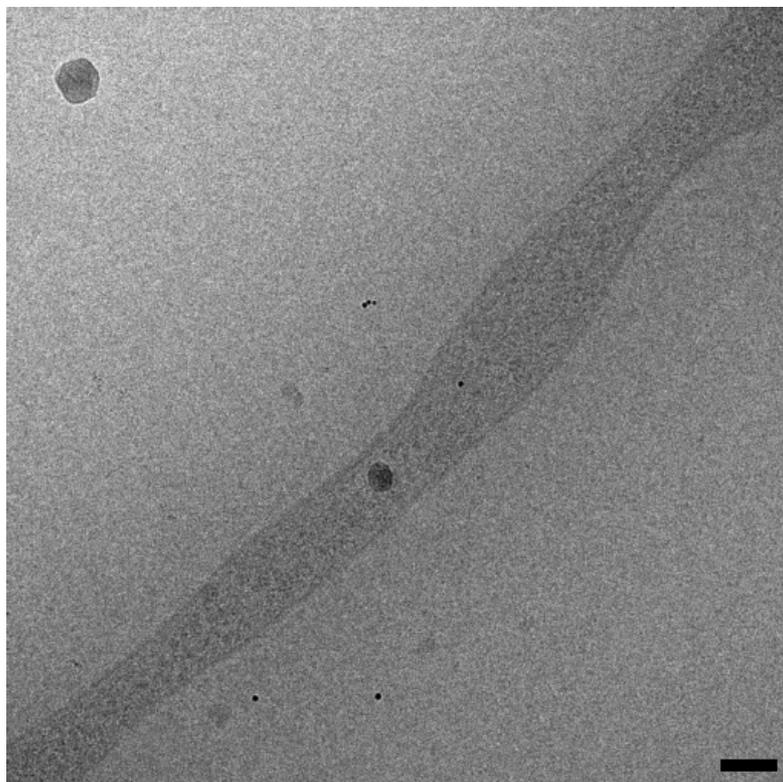
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Kryo-Elektronentomographie von *S. melliferum*

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchungen an *S. melliferum* beschrieben, die mit Hilfe der Kryo-Elektronentomographie gewonnen wurden. Dabei wird zunächst auf den strukturellen Aufbau des Cytoskeletts dieser Bakterien eingegangen und anschließend die Lage und 3-D-Struktur innerhalb der Zelle dargestellt.

#### 5.1.1 Struktureller Aufbau des Cytoskeletts

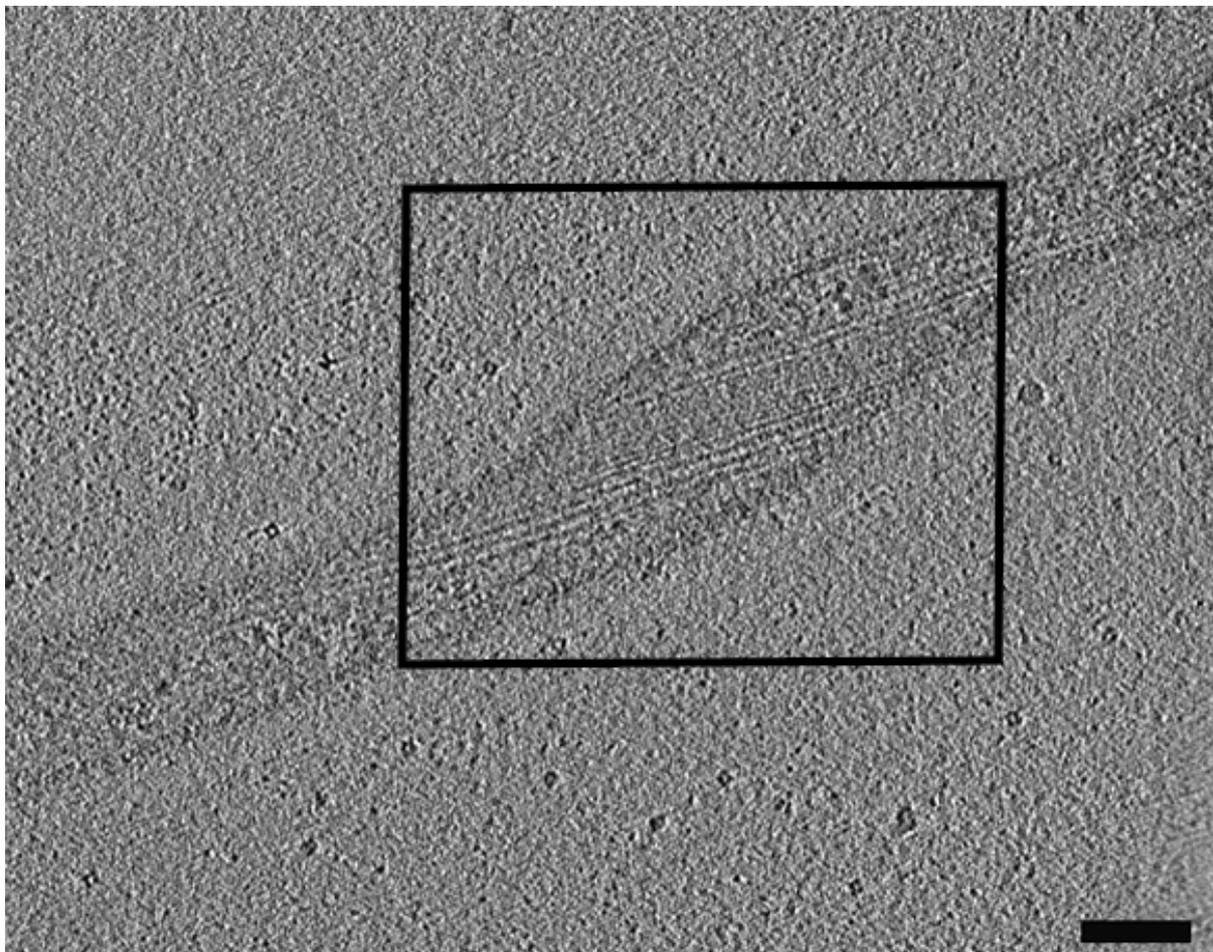
Um einen detaillierten Einblick in den Aufbau des Cytoskeletts von *S. melliferum* zu erhalten, muß eine hohe Bildauflösung gewährleistet sein, da Cytoskelett-Elemente generell im Größenbereich von wenigen Nanometern liegen. In elektronenmikroskopischen 2-D-Aufnahmen kann dies nicht erreicht werden, wie die Abbildung 5.1 veranschaulicht.



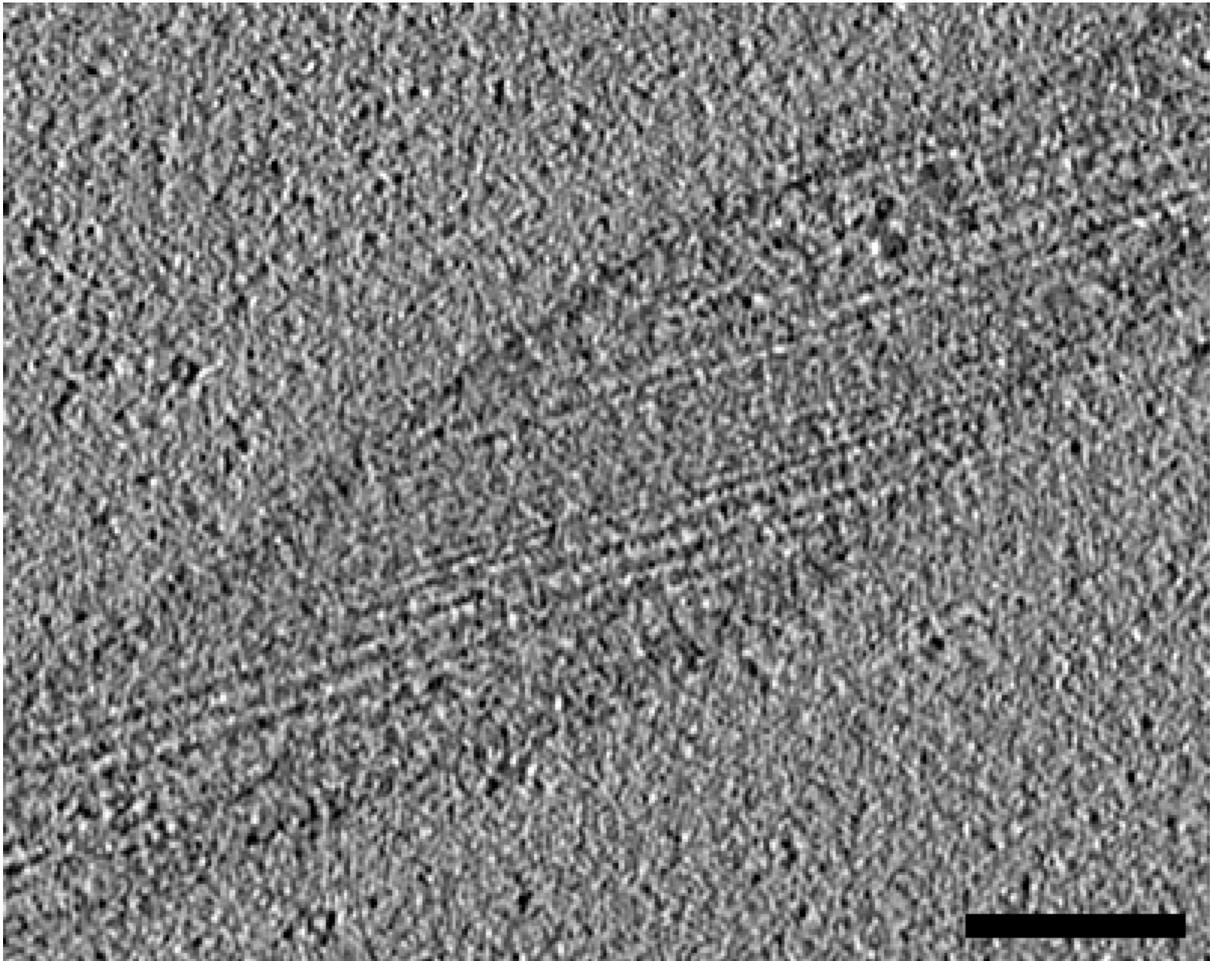
**Abb. 5.1:** 0°-Bild einer Kippserie von *S. melliferum*. Größenbalken: 100 nm.

Erst durch die Überlagerung von Informationen aus einer Vielzahl von Einzelbildern, wie es bei der Erstellung von Kryo-Elektronentomogrammen der Fall ist (siehe 3.3.1), ist eine Auflösung von 4-5 nm erreichbar. In den 3-D-Rekonstruktionen dieser Arbeit konnte eine Auflösung von 4 nm erzielt werden, wie die folgenden Ergebnisse zeigen.

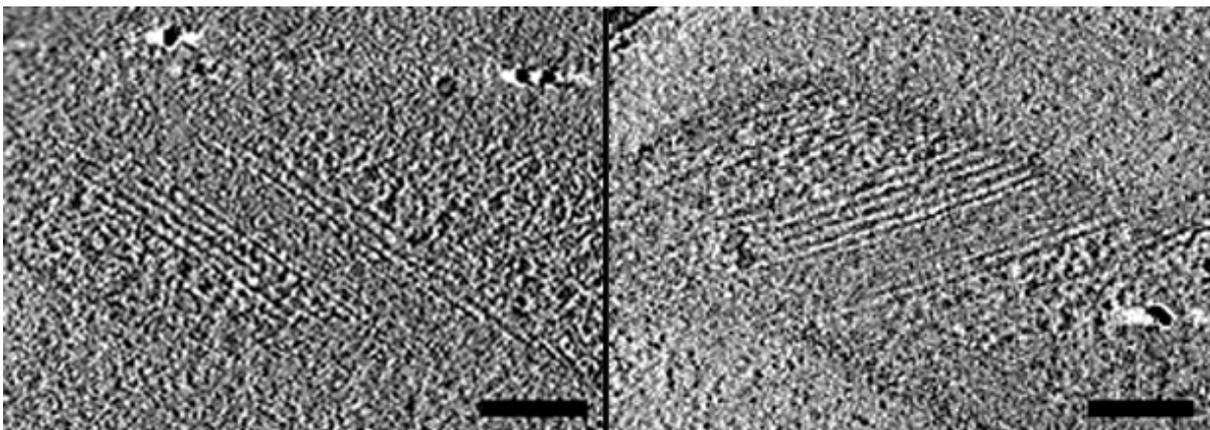
Die Abbildungen 5.2, 5.3 und 5.4 zeigen Ausschnitte aus Tomogrammen von *S. melliferum*-Zellen. Man erkennt verschieden dicke Filamente, die parallel zueinander angeordnet sind und durch die Zelle verlaufen. Das von diesen Filamenten gebildete Cytoskelett besteht aus drei Bändern - zwei äußeren Bändern aus dickeren Filamenten, welche ein drittes Band aus dünneren Filamenten umgeben. Die einzelnen Filamente sind sehr wahrscheinlich miteinander verbunden.



**Abb. 5.2:** Schnitt (1,4 nm dick) aus einem Tomogramm einer *S. melliferum*-Zelle, der den Aufbau des Cytoskeletts zeigt. Man erkennt deutlich die beiden äußeren Bänder aus dickeren Filamenten und das dazwischen liegende Band aus dünneren Filamenten. Die Bilder entstanden durch Aufeinanderprojizieren mehrerer z-Schichten des Tomogramms. Größenbalken: 100 nm.

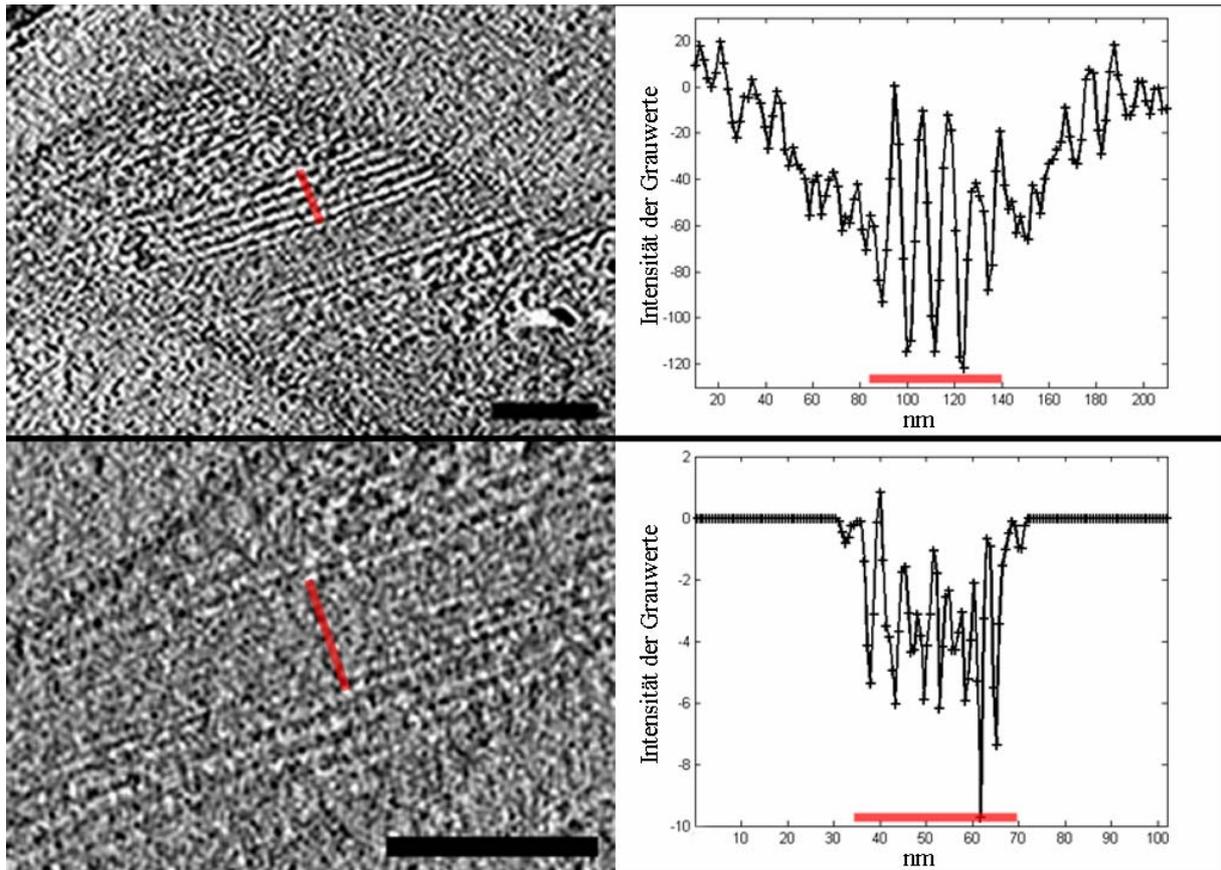


**Abb. 5.3:** Vergrößertes Bild des in Abbildung 5.2 markierten Ausschnitts, das die Struktur des inneren Bandes klarer verdeutlicht. Größenbalken: 100 nm.



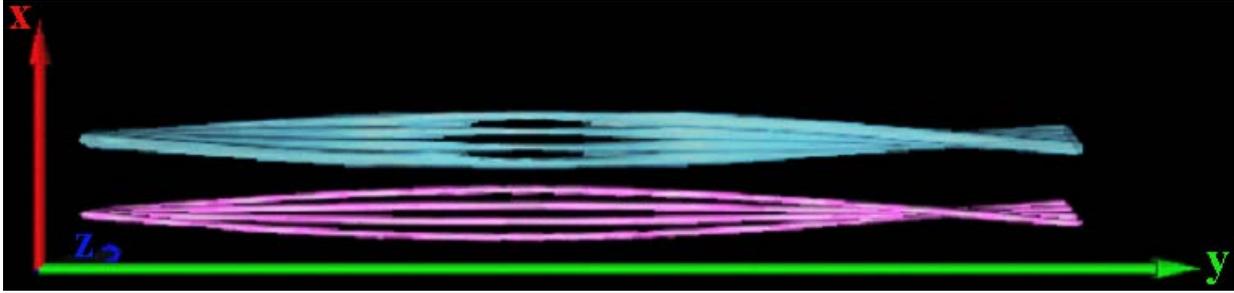
**Abb. 5.4:** Schnitte (2,7 nm dick) aus Tomogrammen von *S. melliferum*-Zellen, die deutlich die Zusammensetzung der beiden äußeren Bänder des Cytoskeletts zeigen. Die Bilder entstanden durch Aufeinanderprojizieren mehrerer z-Schichten des Tomogramms. Größenbalken: 100 nm.

Durch automatische Berechnung der sogenannten „Hough“-Transformation für Filamentregionen aus mehreren Tomogrammen konnten die Anzahl und die Abstände der einzelnen Filamente bestimmt werden (**Abb. 5.5**). Die beiden äußeren Bänder sind jeweils etwa 55 nm breit und bestehen aus je fünf dicken Filamenten, zwischen denen die Abstände etwa 11 nm betragen. Das dazwischen liegende Band hat eine Breite von etwa 35 nm und wird von neun dünnen Filamenten gebildet, welche etwa 4 nm voneinander entfernt sind.



**Abb. 5.5:** Schnitte (2,7 nm dick) aus Tomogrammen von *S. melliferum*-Zellen (links) und dazugehörige Profile der Filament-Grauwerte (rechts), die die Anzahl und die Abstände der dickeren (oben) und dünneren (unten) Filamente aufzeigen (hervorgehoben durch rote Balken). Jedes Kreuz in den Graphen steht für ein Pixel (Pixelgröße: oben, 1,72 nm; unten, 0,68 nm). (In dem unteren Graphen wurden die Werte auf beiden Seiten des inneren Bandes auf Null gesetzt.) Größenbalken: 100 nm.

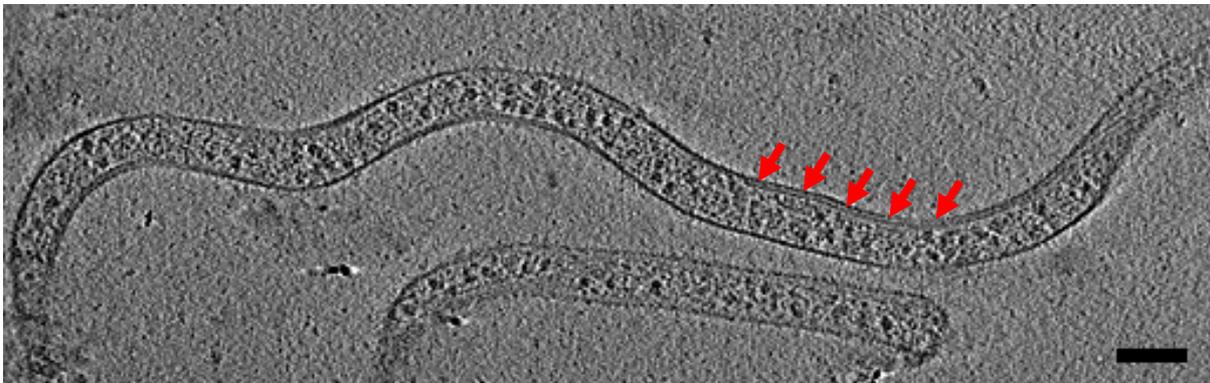
Abhängig von dem Grad der Verdrehung der Zelle und der Lage der Filamente relativ zur Einfallrichtung des Elektronenstrahls während der Datenaufnahme kann man in den Tomogrammen fünf oder lokal weniger als fünf dicke Filamente erkennen (vgl. **Abb. 5.6**).



**Abb. 5.6:** Simulation von Filamentbändern, die veranschaulicht, wann in Abhängigkeit von dem Grad der Verdrehung der Zelle bzw. des Bandes und der Lage der Filamente relativ zur Einfallrichtung des Elektronenstrahls (z-Richtung) eine Unterscheidung der einzelnen Filamente möglich ist.

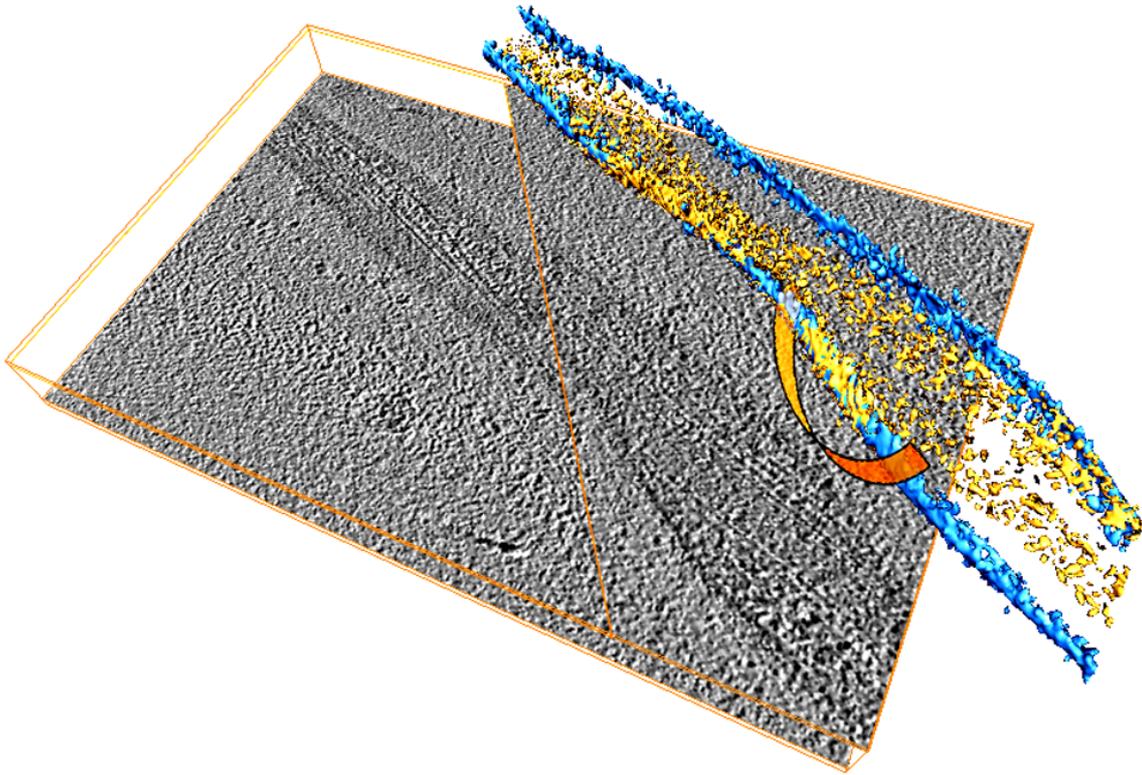
### 5.1.2 Lage und Verlauf des Cytoskeletts

Wie bereits in Abbildung 5.7 ersichtlich, verläuft das Cytoskelett direkt unterhalb der Zellmembran durch die Zelle. Vermutlich sind die Filamente mit der Membran verbunden. Es war jedoch nicht möglich, entsprechende Verbindungen in den Tomogrammen zu erkennen.



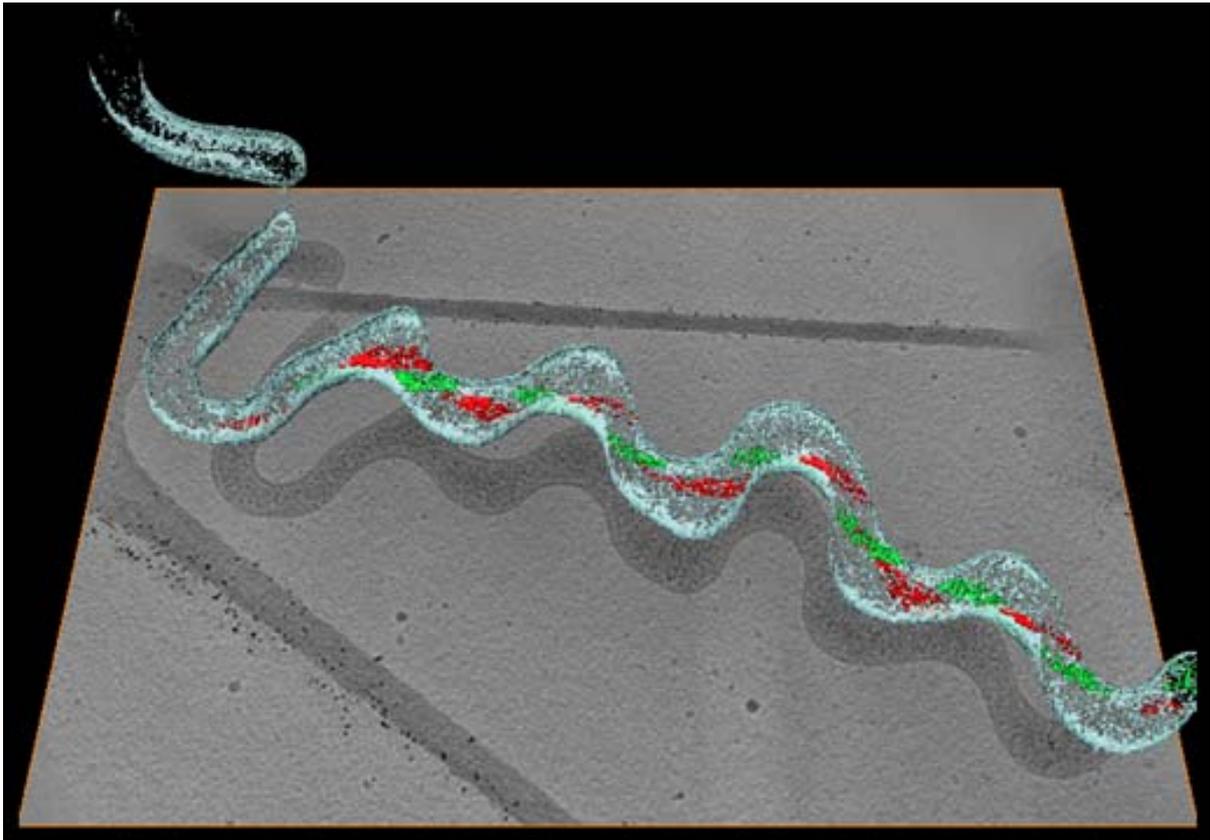
**Abb. 5.7:** Schnitt (3,3 nm dick) aus einem Tomogramm einer *S. melliferum*-Zelle, in dem die Lage des Cytoskeletts direkt unterhalb der Zellmembran deutlich wird (rote Pfeile). Größenbalken: 100 nm.

Mit Hilfe des Visualisierungsprogrammes AMIRA konnte die Anordnung und der Verlauf des Cytoskeletts innerhalb der Zelle in 3-D illustriert werden. Dazu wurden die Zellmembran sowie die beiden äußeren Bänder des Cytoskeletts manuell segmentiert.

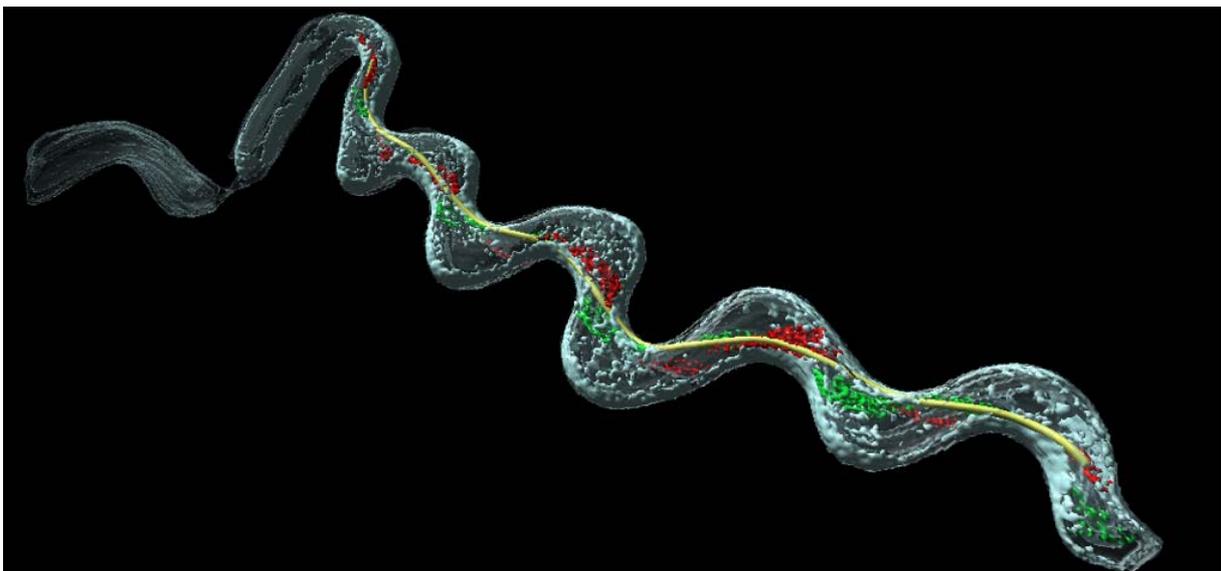


**Abb. 5.8:** Überlagerte Schnitte aus einem Tomogramm und entsprechende 3-D-Visualisierung eines Teils einer *S. melliferum*-Zelle, die den Verlauf des Cytoskeletts entlang der Zellmembran (blau) anhand der beiden äußeren Filamentbänder (gelb) veranschaulicht. Die Bänder winden sich parallel zueinander helikal (siehe Pfeil) durch die Zelle und liegen dabei immer dicht unterhalb der Zellmembran. Die beiden äußeren Filamentbänder, die bereits in den Tomogrammschnitten klar zu erkennen sind, verdeutlichen in der 3-D-Darstellung den in diesem Fall linkshändigen Verlauf des Cytoskeletts.

Hierbei wird deutlich, daß sich das aus den drei Filamentbändern bestehende Cytoskelett dicht unterhalb der Zellmembran in helikaler Weise durch die Zelle windet (**Abb. 5.8**). Im Tomogramm einer ganzen *S. melliferum*-Zelle war zu erkennen, daß die Filamente vom stumpfen bis zum spitz zulaufenden Ende durch die gesamte Zelle verlaufen (**Abb. 5.9**). Von Trachtenberg (1998) wurde bereits berichtet, daß sich das von ihm beschriebene Cytoskelett, bestehend aus einem Filamentband, auf dem kürzesten, helikalen Weg durch die Zelle windet. Um diese Aussage zu überprüfen, wurde die geodätische Linie, das heißt die kürzeste Verbindung zwischen zwei Punkten auf der Zellmembran, in der 3-D-Rekonstruktion der *S. melliferum*-Zelle berechnet und visualisiert (**Abb. 5.10**).



**Abb. 5.9:** Schnitt aus einem Tomogramm und entsprechende 3-D-Visualisierung einer ganzen *S. melliferum*-Zelle, welche den Verlauf der beiden äußeren Filamentbänder (grün und rot) durch die Zelle veranschaulicht.



**Abb. 5.10:** 3-D-Visualisierung des Verlaufs der beiden äußeren Filamentbänder (grün und rot) des Cytoskeletts, sowie der geodätischen Linie (gelb), durch eine *S. melliferum*-Zelle.

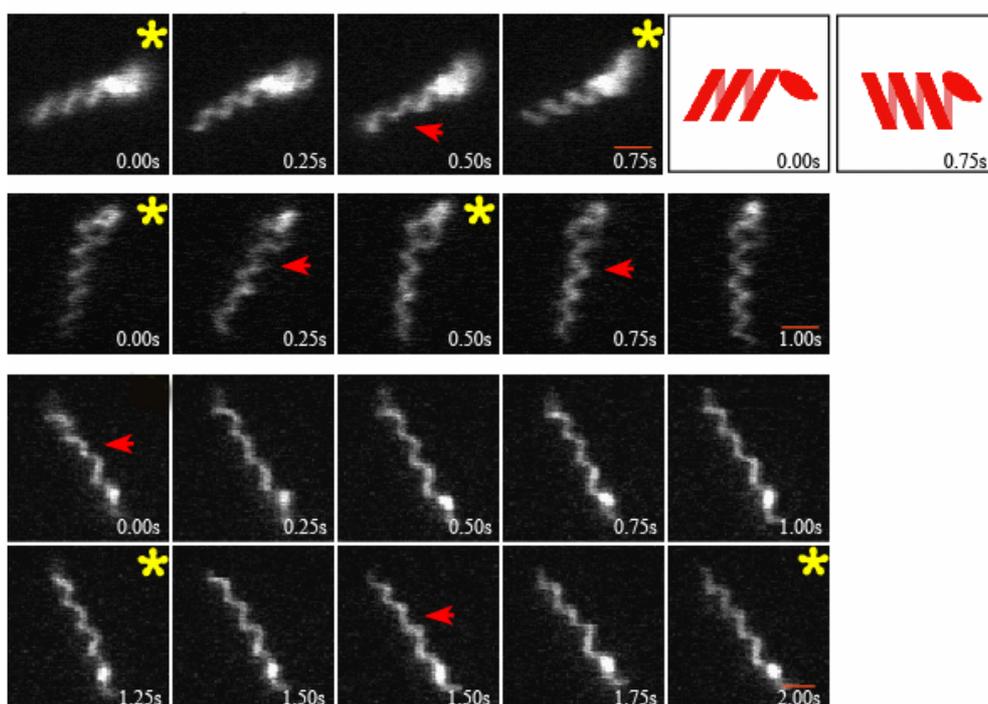
Man kann erkennen, daß sich eines der äußeren Filamentbänder (rot) teilweise auf dieser Linie befindet, das heißt, daß an dieser Stelle ein Längenunterschied zwischen den beiden Bändern besteht und das rote Band kürzer als das grüne ist. Dieser Zustand hat Auswirkungen auf die Form der Zelle und erklärt zudem, wie im Folgenden beschrieben, einen der Bewegungsmechanismen.

## 5.2 Aufstellung von Bewegungsmodellen

Trachtenberg und Gilad (Gilad *et al.*, 2003; Trachtenberg *et al.*, 2003) beschrieben bereits anhand von lichtmikroskopischen Untersuchungen die verschiedenen Bewegungsformen von *S. melliferum*. Durch eigene lichtmikroskopische Untersuchungen und Computersimulationen konnten die folgenden Mechanismen nachvollzogen bzw. erklärt werden.

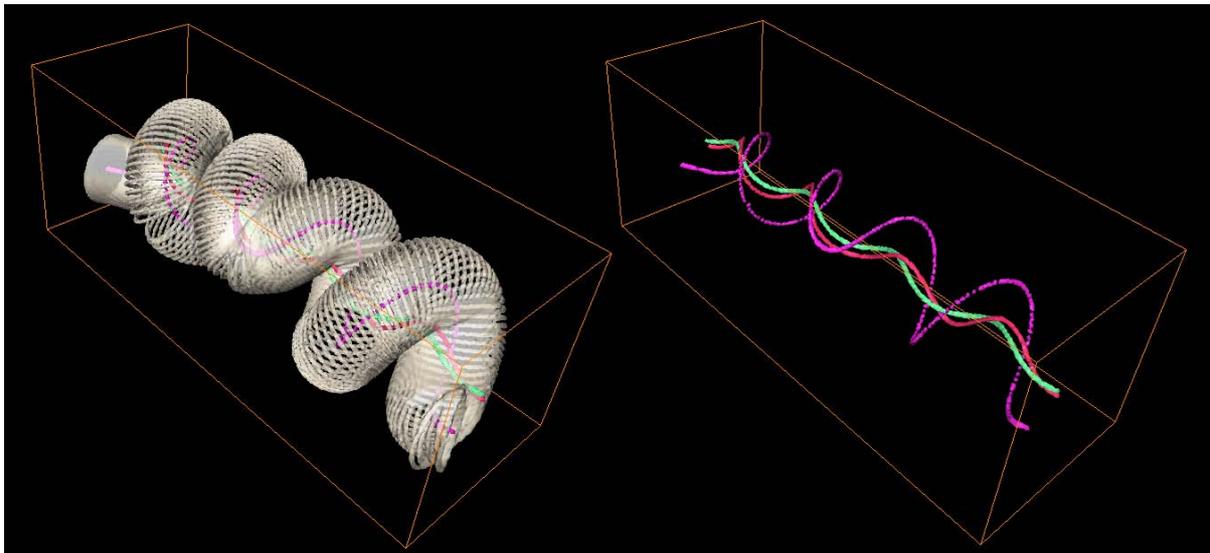
### 5.2.1 Änderung der Händigkeit der Zelle

Ein Mechanismus, der zur Fortbewegung von *S. melliferum* dient, ist die Änderung der Händigkeit der Zelle von links- nach rechtshändig bzw. umgekehrt. Die Änderung geht von einem Ende der helikal gewundenen Zelle aus und setzt sich durch die gesamte Zelle bis zum anderen Ende hin fort (Abb. 5.11). Dieser Vorgang dauert etwa 0,5-0,75 Sekunden.

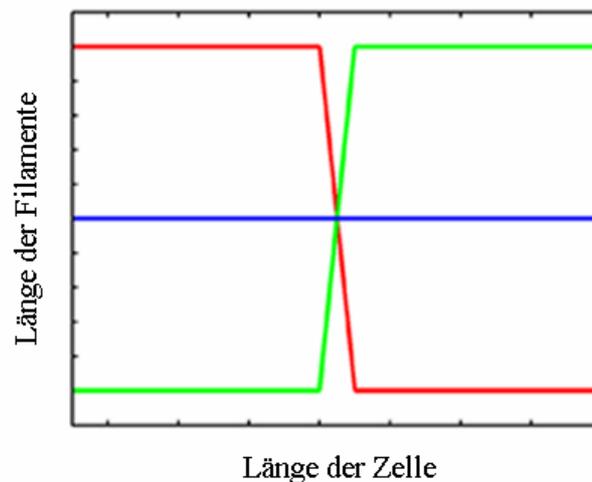


**Abb. 5.11:** Zeitlich aufeinander folgende lichtmikroskopische Aufnahmen von *S. melliferum*-Zellen, die ihre Händigkeit ändern. Roter Pfeil: Stelle der Händigkeitsänderung; gelber Stern: vollständige Links- bzw. Rechtshändigkeit der ganzen Zelle. Größenbalken (rot): 1  $\mu\text{m}$ .

In Abbildung 5.12 ist eine Zelle simuliert, in der sich die Längen der beiden äußeren Filamentbänder unterschiedlich ändern und dadurch die Händigkeit der Zelle umkehren (Abb. 5.13). Angenommen, die Zelle hat eine bestimmte Händigkeit über die gesamte Länge, dann ist eines der beiden äußeren Filamentbänder kurz, während das andere lang ist. Wenn sich nun das kurze Band nach und nach ausdehnt, während sich das andere gleichzeitig verkürzt, wechselt die Händigkeit und die Stelle des Übergangs zwischen den beiden Stadien wandert durch die gesamte Zelle. Auf molekularer Ebene kann dies erreicht werden, indem, wie bereits von Trachtenberg (Trachtenberg und Gilad, 2001) vorgeschlagen, die benachbarten Filament-Untereinheiten der fünf Filamente der äußeren Filamentbänder simultan Konformationsänderungen eingehen und ihre Form dadurch zwischen nahezu rund und elliptisch wechselt.



**Abb. 5.12:** Computersimulation einer *S. melliferum*-Zelle, die ihre Händigkeit von links- (rechts) nach rechtshändig (links) ändert. Die beiden äußeren Filamentbänder sind in grün und rot dargestellt, die zentrale Linie durch die Zelle in violett.



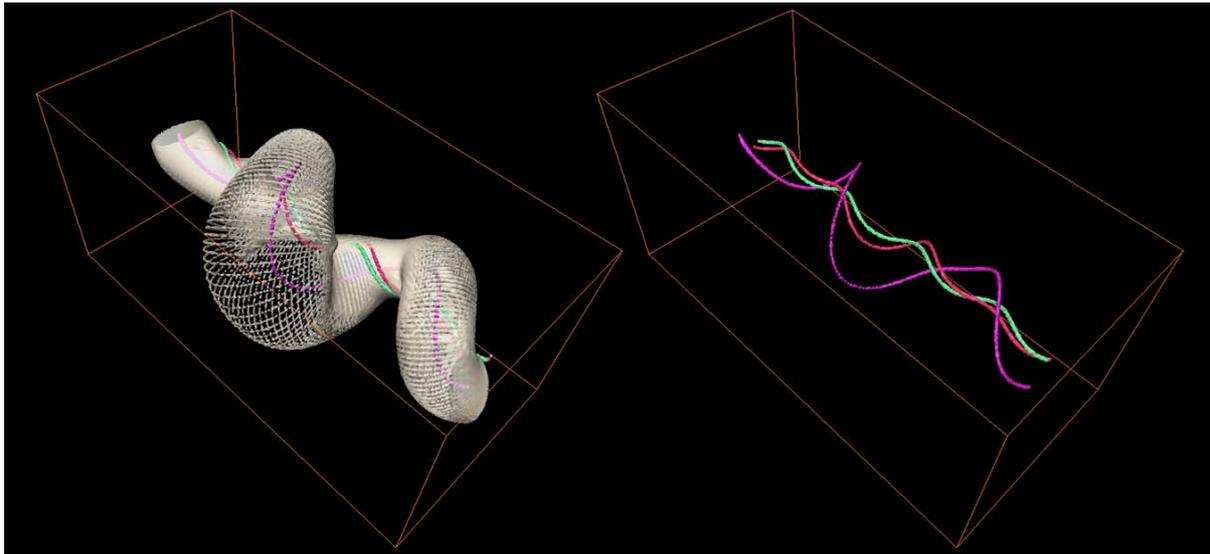
**Abb. 5.13:** Der Graph illustriert die Längenunterschiede zwischen den beiden äußeren Filamentbändern (grün und rot) auf beiden Seiten der Stelle der Händigkeitänderung (Kreuzungspunkt). Das dazwischen liegende Filamentband, welches seine Länge nicht ändert, ist in blau dargestellt.

Ein alternatives Modell besteht in der Möglichkeit, dass sich die Händigkeit dadurch ändert, indem sich eines der beiden äußeren Filamentbänder lokal an dem dazwischen liegenden Filamentband verschiebt, was phänomenologisch der Muskelbewegung nahe käme.

Beide Mechanismen würden letztlich dazu führen, daß sich die Zelle helikal aufwindet und ihre Händigkeit ändert. Wandert die Stelle der Händigkeitänderung dann von einem zum anderen Ende durch die Zelle, so bewirkt dies wiederum eine Rotation der Zelle um ihre eigene Achse und damit einen Antrieb in die entgegengesetzte Richtung. Diese Art der Bewegungsform der Zelle ähnelt stark der einer Flagelle.

### 5.2.2 „Propagating kink“

Ein weiterer Mechanismus von *S. melliferum*, sich fortzubewegen, wurde von Gilad und Trachtenberg (Gilad *et al.*, 2003; Trachtenberg *et al.*, 2003) beobachtet. Dabei bildet sich in einer der helikalen Windungen eine Deformation, welche durch die Zelle wandert (engl. *propagating kink*). Bei eigenen lichtmikroskopischen Untersuchungen konnte diese Art der Bewegung bisher jedoch nicht beobachtet werden. Ein solcher Bewegungsmechanismus läßt sich aber mit Hilfe einer Simulation erklären.

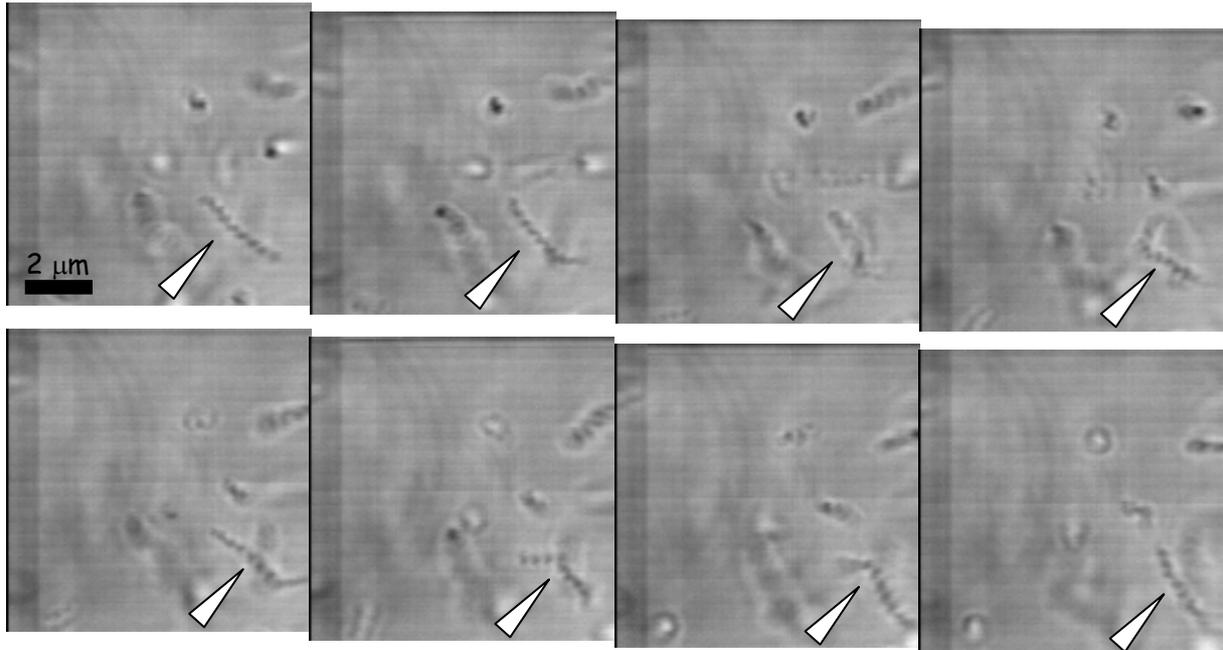


**Abb. 5.14:** Computersimulation einer *S. melliferum*-Zelle mit einer Deformation (engl. *kink*) in einer ihrer helikalen Windungen. Die beiden äußeren Filamentbänder sind in grün und rot dargestellt, die zentrale Linie durch die Zelle in violett.

In Abbildung 5.14 ist eine Zelle simuliert, die in einer ihrer helikalen Windungen eine derartige Deformation aufweist. Diese Art der Ausbeulung kann mit Hilfe des in dieser Arbeit beschriebenen Cytoskeletts dadurch erzeugt werden, daß sich der Abstand der beiden äußeren Filamentbänder lokal ändert. Wandert diese Deformation nun von einem Ende der Zelle zum anderen, so erfährt die Zelle einen Antrieb entgegengesetzt zur Fortpflanzungsrichtung der Verformung, vergleichbar mit dem, der durch Händigkeitsänderung hervorgerufen wird (siehe 5.2.1.1).

### 5.2.3 Fortlaufendes Abbiegen der Zelle

Unter dem Lichtmikroskop konnte außerdem die in Abbildung 5.15 gezeigte Bewegung bei *S. melliferum* beobachtet werden. Es handelt sich dabei um ein fortlaufendes Abbiegen einer sich um ihre eigene Achse rotierenden Zelle. Diese Art der Bewegung könnte dadurch erzeugt werden, daß sich ein Teil des Cytoskeletts relativ zum anderen Teil, oder das Cytoskelett relativ zur Zellmembran, unterschiedlich verkürzt und wieder ausdehnt. Dies geschieht auch bei der Händigkeitsänderung der Zelle. Somit könnte die Händigkeitsänderung gleichzeitig zum Abbiegen der Zelle führen, und zwar an der Stelle, wo sich die Händigkeit ändert. Wandert diese Stelle durch die Zelle, so bewirkt dies, daß sich die Zelle um ihre longitudinale Achse dreht, und der abgebogene Teil der Zelle kreisförmig rotiert.



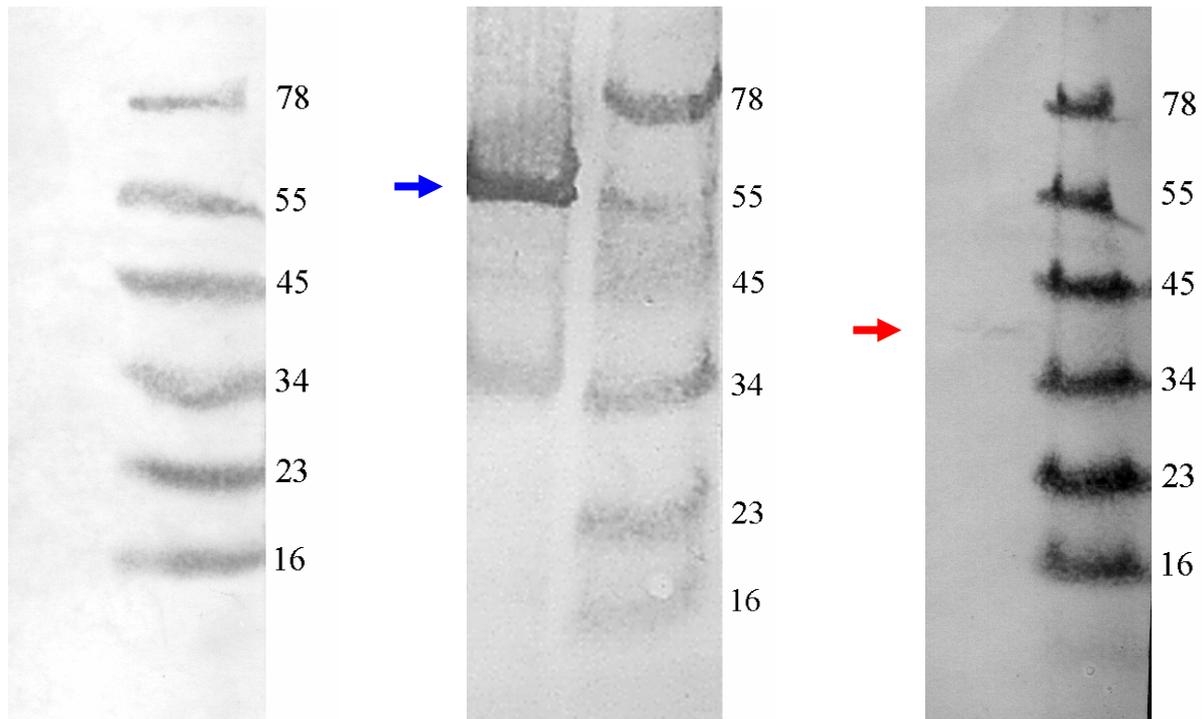
**Abb. 5.15:** Zeitlich aufeinander folgende lichtmikroskopische Aufnahmen einer *S. melliferum*-Zelle (weißer Pfeil), die sich fortlaufend an einer Stelle abbiegt.

### 5.3 Biochemische Untersuchungen

Die elektronentomographischen Daten haben gezeigt, daß das Cytoskelett von *S. melliferum* aus zwei unterschiedlich dicken Filamenten aufgebaut ist. Dies ließ vermuten, daß diese beiden Filamentarten aus verschiedenen Proteinen zusammengesetzt sind. Biochemische Untersuchungen sollten helfen, die beteiligten Proteine zu identifizieren. Mit Hilfe von Western-Blot-Analyse wurden die Filamente zunächst isoliert und aufgereinigt, um anschließend Proteinsequenzanalysen durchführen und elektronenmikroskopische Bilder aufnehmen zu können.

#### 5.3.1 Western-Blot-Analysen

Mit Hilfe von Western-Blots wurde zunächst die Existenz von Aktin oder Aktin-ähnlichen Proteinen in *S. melliferum* geprüft. Dabei stellte sich heraus, daß das eukaryontische Protein Aktin in diesen Zellen nicht vorkommt, aber neben dem bereits nachgewiesenen „Fibril“-Protein (Townsend *et al.*, 1980; Townsend und Plaskitt, 1985; Williamson *et al.*, 1991) das Aktin-ähnliche Protein MreB existiert (**Abb. 5.16**).

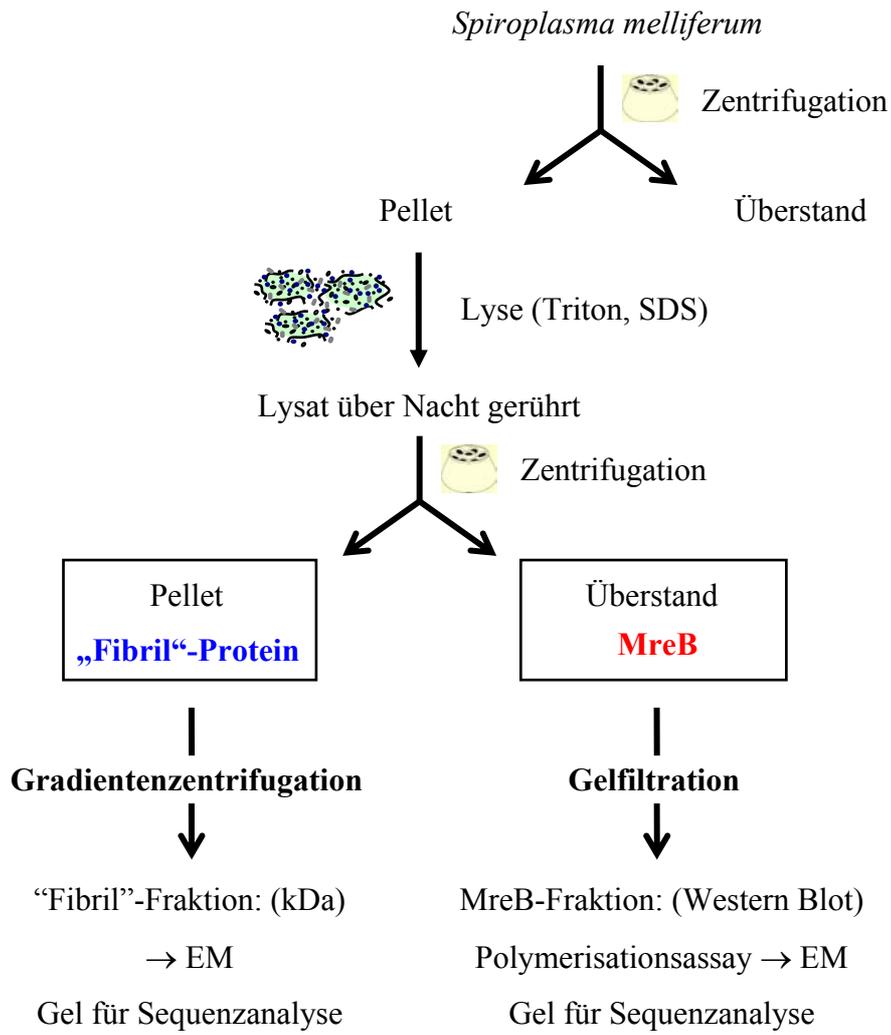


**Abb. 5.16:** Western-Blots von *S. melliferum*-Lysat mit einem Aktin- (links), einem „Fibril“-Protein- (Mitte) und einem MreB-Antikörper (rechts). Während die Reaktion mit dem Aktin-Antikörper negativ verlief, zeigen die beiden anderen Experimente, daß das 59 kDa-schwere „Fibril“-Protein (blauer Pfeil) und das 39 kDa-schwere MreB-Protein (roter Pfeil) in *S. melliferum* vorhanden sind.

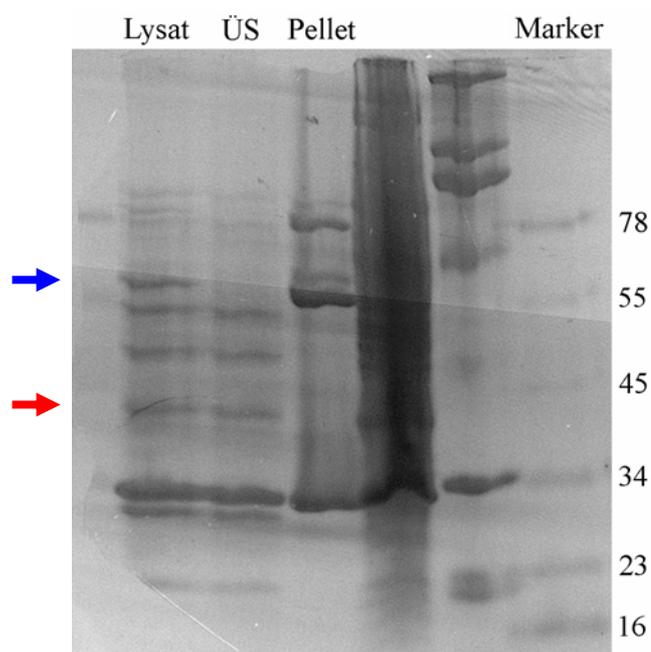
Kontrollexperimente zeigten, daß keiner der verwendeten Antikörper mit Bestandteilen des Mediums für *S. melliferum* reagierte.

### 5.3.2 Isolierung der Filamente

Das in Abbildung 5.17 skizzierte Verfahren zur Isolierung der Filamente orientiert sich an dem von Trachtenberg und Gilad (Trachtenberg und Gilad, 2001), die damit bereits die Existenz des „Fibril“-Proteins in *S. melliferum* nachgewiesen haben. Da Trachtenberg und Gilad jedoch elektronenmikroskopisch nur eine Art von Filamenten in *S. melliferum* nachgewiesen haben, erklärten sie das im Niederschlag gefundene „Fibril“-Protein zum Strukturprotein der von ihnen beschriebenen Cytoskelett-Filamente. Eine in dieser Arbeit vorgenommene genauere Untersuchung des Überstands mit Hilfe von Western-Blot und Proteinsequenzanalyse (siehe 5.3.2.2 und 5.3.3) ergab nun, daß sich in diesem zusätzlich das Aktin-ähnliche MreB-Protein befand (**Abb. 5.18**), welches bisher nur in *S. citri* nachgewiesen und sequenziert worden ist.



**Abb. 5.17:** Verfahren zur Isolierung und weiteren Untersuchung der Cytoskelett-Filamente.

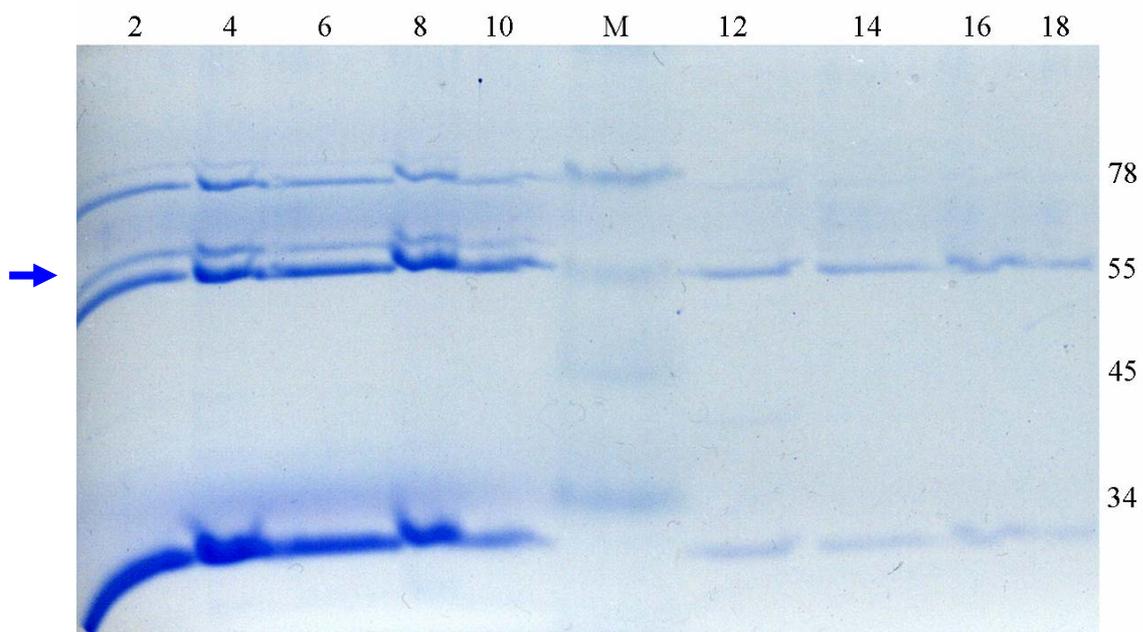


**Abb. 5.18:** SDS-Gel des *S. melliferum*-Lysats, sowie des Überstands und Pellets nach Zentrifugation des Lysats. Während sich das „Fibril“-Protein mit einer molekularen Masse von etwa 59 kDa im Pellet wiederfindet (blauer Pfeil), bleibt das etwa 39 kDa-schwere MreB-Protein im Überstand (ÜS) (roter Pfeil). Die Bandenzuordnung erfolgte nach dem jeweiligen Molekulargewicht, nachdem in den weiteren Untersuchungen das Vorkommen und die Identität der entsprechenden Proteine in Überstand bzw. Pellet durch Western-Blot und Proteinsequenzanalyse nachgewiesen werden konnte.

Um Proteinsequenzanalysen zur eindeutigen Identifizierung der beiden Proteine vornehmen und zudem elektronenmikroskopische Untersuchungen der jeweiligen Filamente anstellen zu können, wurde versucht, die Proteine auf unterschiedliche Weise aufzureinigen. Hierfür wurde für das „Fibril“-Protein eine Gradientenzentrifugation, für das MreB-Protein dagegen eine Gelfiltration durchgeführt.

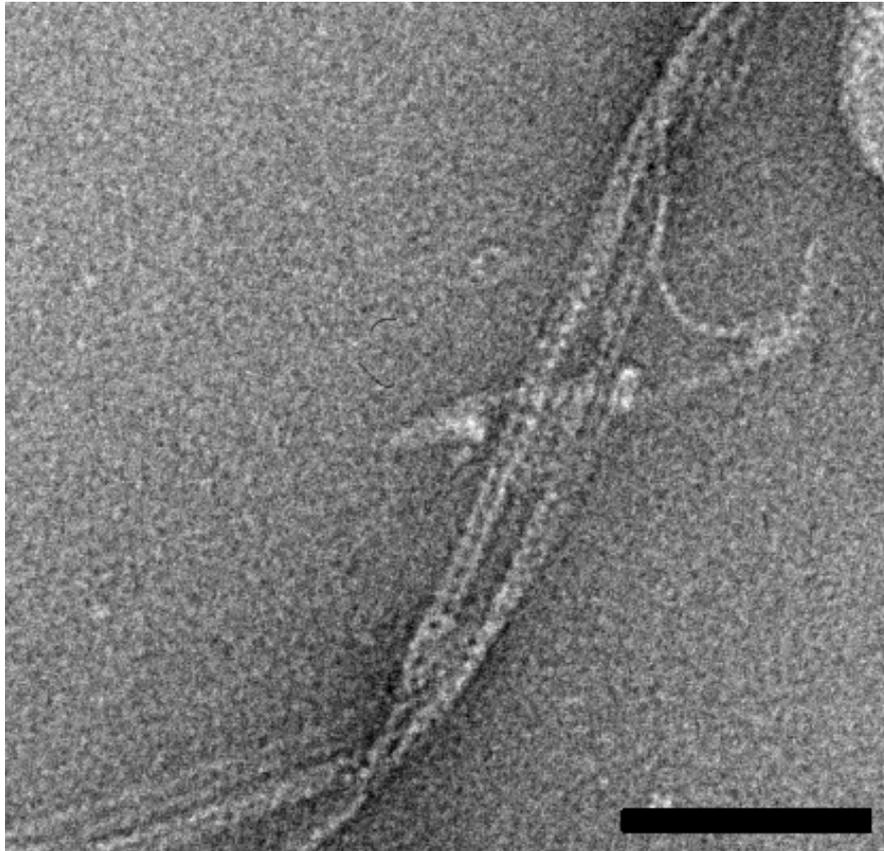
#### 5.3.2.1.1 „Fibril“-Protein

Die Aufreinigung des „Fibril“-Proteins mittels Gradientenzentrifugation gelang nicht vollständig, jedoch zeigten sich in den Anfangsfractionen auf der Höhe von etwa 59 kDa zwei klare Banden (blauer Pfeil in **Abb. 5.19**), die zur weiteren Analyse herangezogen werden konnten. Somit wurde ein weiteres SDS-Gel der Fraktion 3 der Gradientenzentrifugation angefertigt und für die Sequenzanalyse verwendet (siehe 5.3.3).



**Abb. 5.19:** SDS-Gel einzelner Fraktionen (oben numeriert) der Gradientenzentrifugation. Der Pfeil zeigt die Doppelbande bei 59 kDa, die weiter analysiert wurde. M = Marker.

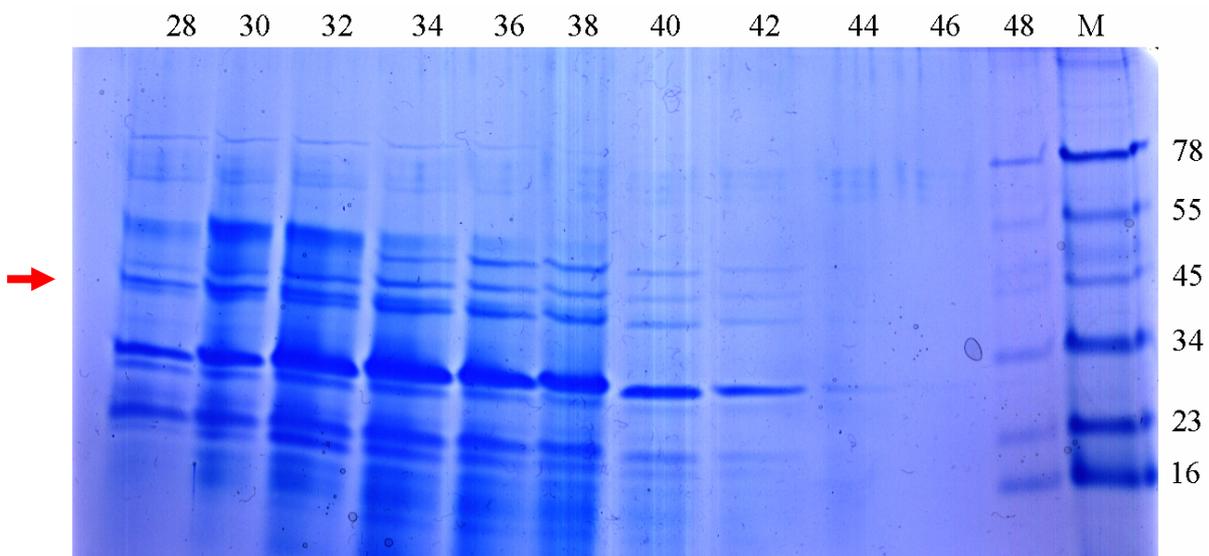
Außerdem wurde von Fraktion 2 der Gradientenzentrifugation ein negativ-kontrastiertes Präparat für die Elektronenmikroskopie hergestellt und untersucht. Hierbei zeigte sich, daß in dieser Fraktion doppelsträngige Filamente mit einem Durchmesser von etwa 10 nm vorhanden waren (**Abb. 5.20**).



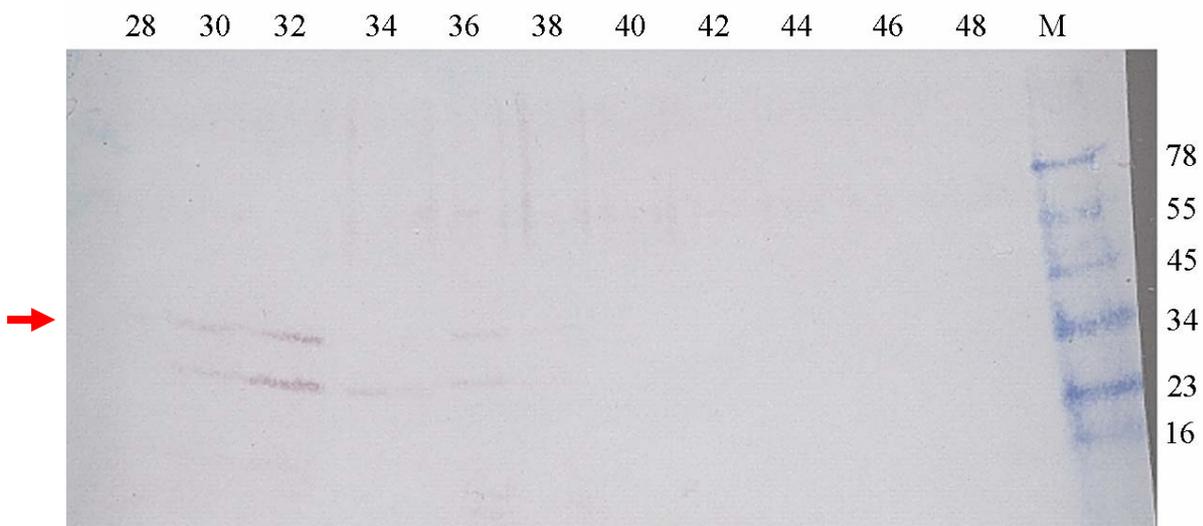
**Abb. 5.20:** Isolierte „Fibril“-Filamente (negativ-kontrastiert). Größenbalken: 100 nm.

#### 5.3.2.1.2 MreB

Die Gelfiltration erwies sich als Aufreinigungsmethode als ungeeignet. Der Grund liegt möglicherweise darin, daß das sich in der Suspension befindliche Triton X-100 Micellen bildet, in denen die verschiedenen Proteine eingeschlossen werden. Eine Auftrennung der einzelnen Proteine war somit nicht möglich. Dennoch war eine klare Doppelbande auf der Höhe von etwa 39 kDa erkennbar (roter Pfeil in **Abb. 5.21**), die auch mit dem MreB-Antikörper reagierte (**Abb. 5.22**) und somit zur weiteren Analyse herangezogen wurde. Anhand des Western-Blots wurden die Fraktionen 30-33 der Gelfiltration ausgewählt und ein Polymerisationsassay mit anschließender Ultrazentrifugation durchgeführt (siehe 4.6.4). Von dem Überstand wurde ein weiteres SDS-Gel für die Sequenzanalyse angefertigt (siehe 5.3.3).



**Abb. 5.21:** SDS-Gel einzelner Fraktionen (oben nummeriert) der Gelfiltration. Der Pfeil zeigt die Doppelbande bei 39 kDa, die weiter analysiert wurde. M = Marker.



**Abb. 5.22:** Western-Blot mit einem MreB-Antikörper einzelner Fraktionen (oben nummeriert) der Gelfiltration. Der Pfeil zeigt die Position, bei der das MreB-Protein vermutet wird. Die darunter liegende Bande könnte von teilweise abgebautem MreB herrühren. M = Marker.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung des Präparats ergab, daß sich in der Probe auch nach Durchführung des Polymerisationsassays keine Filamente befanden. Auch die Ultrazentrifugation des Polymerisationsassays führte zu keinem anderen Ergebnis. Offensichtlich sind die MreB-Filamente, falls sie in *S. melliferum* als solche existieren, sehr instabil und zerfallen bei der in dieser Arbeit verwendeten Isolierungsprozedur. Eine erneute Polymerisation des Proteins zur Wiederherstellung der Filamente könnte durch die

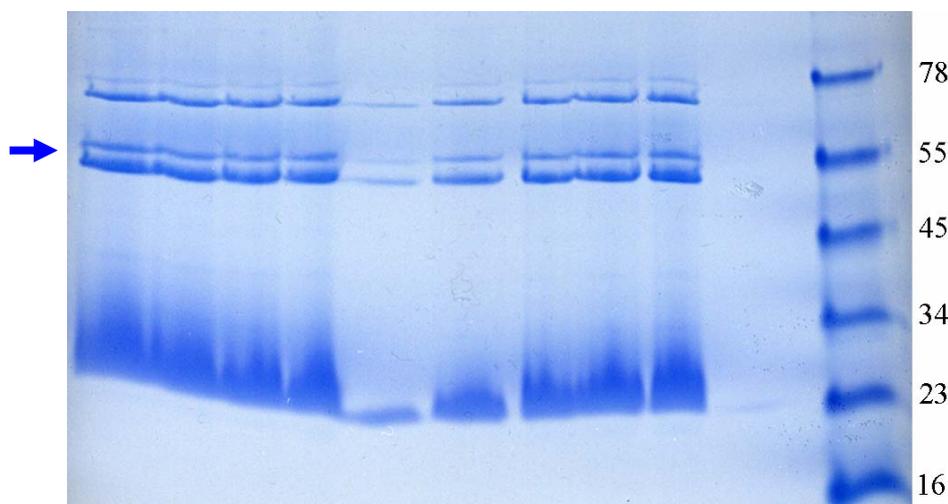
Anwesenheit von Triton X-100, welches Proteine durch Micellenbildung einschließt, verhindert worden sein.

### 5.3.3 Proteinsequenzanalysen

#### 5.3.3.1.1 „Fibril“-Protein

Zum Nachweis des „Fibril“-Proteins wurde die Fraktion 3 der Gradientenzentrifugation auf ein Gel aufgetragen (**Abb. 5.23**), zur Identifizierung von MreB Fraktionen der Gelfiltration nach Polymerisationsassay (siehe 4.6.4) (**Abb. 5.25**). Die aus den Gelen eluierten und aufgetrennten Peptidfragmente wurden anschließend mittels N-terminalen Edman-Abbaus sequenziert.

Zur Sequenzanalyse des „Fibril“-Proteins wurde die Probe in unterschiedlicher Menge auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen (**Abb. 5.23**).



**Abb. 5.23:** Gel der Fraktion 3 der Gradientenzentrifugation, welche das „Fibril“-Protein enthält. Die Probe wurde in unterschiedlicher Menge auf neun Spalten verteilt. Näher untersucht wurde die mit dem Pfeil markierte Doppelbande, die auf der Höhe von etwa 59 kDa liegt, welches etwa der molekularen Masse des „Fibril“-Proteins von *S. citri* (59 kDa) entspricht.

Während für die Peptidsequenzen der oberen Bande der in Abbildung 5.23 markierten Doppelbande keine ähnlichen Sequenzen in der NCBI-Datenbank gefunden wurden, zeigten die Aminosäure-Sequenzen einzelner Fragmente aus der unteren Bande klare

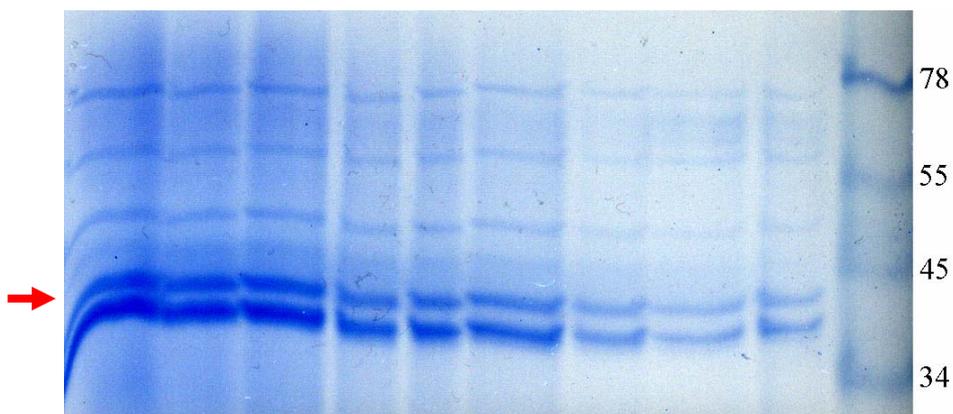
Sequenzverwandtschaft zu der bekannten Sequenz des „Fibril“-Proteins von *S. citri* (SWISS-PROT: FIB\_SPICI). So wurden die beiden folgenden Peptidsequenzen in *S. melliferum* gefunden: VILGEDEXK und NDYDPIK, wobei X für eine unbestimmte Aminosäure steht. Abbildung 5.24 zeigt die dazu homologen Sequenzabschnitte des „Fibril“-Proteins von *S. citri*.

```
MIGVISTAYFTMKDKHSIKTVKKYWWKNCVIOHVKYHGKTFIIATVGYGKANAAMTIT
YLLEKYPGLQTI LNVDLALSTNDKHDGTDTTISTKFIYRDADLTVFKDIKYGQIVNEP
ESFQFDGEFAKVVKDFKLGLTEGVTGTADMLIYNSKQFKEMVDKYGHTIDVIDTEAGA
IAQVAKKSSINYIALKIIYNNALSPWDNDPIHKFKMYETVNTLKYLLRRLFNLLSSNY
IIDLSQCSQDDLDSEINELFEIKHDQWIKLFPNTHKVLSGFGPSLMLVDKQEKTPVAL
DIIQVIRSKTKEAEGPSKVILGEDEWKNAPKKWLRKLLFLEQVRVNDDELLWNKSAKY
DLNNEKLYKIETVETVANEIAAAIAEKQDKSSYTYNGATVPEKYLLVNCDAISFYI
THNQSFHEFVEDKNFGTQLVSNFLKYLNEALKDVDSFYQIYIYMTIPALDYRKISVF
IPSNKGANRGVKFVALNQKLQRDYTEVVDITRNDYDPIKVGSFKVTIRLKSE
```

**Abb. 5.24:** Aminosäure-Sequenz des „Fibril“-Proteins von *S. citri* (SWISS-PROT: FIB\_SPICI) mit hervorgehobenen Sequenzabschnitten, die hohe Sequenzähnlichkeit zu den sequenzierten Peptiden des isolierten Proteins aus *S. melliferum* zeigen.

### 5.3.3.1.2 MreB

Zur Sequenzanalyse von MreB wurden Fraktionen der Gelfiltration nach Polymerisationsassay (siehe 4.6.4) in unterschiedlicher Konzentration auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen (**Abb. 5.25**).



**Abb. 5.25:** Gel der Fraktionen aus der Gelfiltration, welche MreB enthielten. Die Probe wurde in unterschiedlicher Konzentration (von links: 3 x 6-fach, 3 x 3-fach, 3 x unkonzentriert) auf neun Spalten verteilt. Untersucht wurde die mit dem Pfeil markierte Doppelbande, die auf der Höhe von etwa 39 kDa liegt, welches der molekularen Masse der verschiedenen MreB-Proteine von *S. citri* entspricht.

Für ein Peptidfragment aus der oberen Bande der in Abbildung 5.25 markierten Doppelbande konnte eine klare Sequenzähnlichkeit zum MreB2-Protein von *S. citri* (SWISS-PROT: Q8VQG4) nachgewiesen werden. Die für *S. melliferum* bestimmte Aminosäure-Sequenz lautet NVLLASFTR. Abbildung 5.26 zeigt den dazu homologen Sequenzabschnitt des MreB2-Proteins von *S. citri*.

```
MANYKFGKDYSFLTLDLGTANTVAYVSGQGIVYNEPSSMAYDTLNNLITLGNEAYKMVG
KTHDHIRMVTPPLVDGVISDMEAAQDLLKHIFSRKLSGIWKNSLVILACPSGVTELERGA
LKAIKDMGASHVLVEEVKLAALGAGINIGLAQGNLVIDIGGGTTDIAIISAGDIVISK
SVKVAGKQLDQEIQKYIRVEYNVLVGIRTAEQIKKEIGALVKIINEKTVRAFGRDIITGL
PREILIKPEEIKNVLLASFTRITDLLVEVLEQTPPELAGDVIRNGITICGGGALIRGIVK
YFESIFQLKVKAANDPLMCVIEGAKTYEKNLGAVERIQLLDANEYKIS
```

**Abb. 5.26:** Aminosäure-Sequenz des MreB2-Proteins von *S. citri* (SWISS-PROT: Q8VQG4) mit hervorgehobenem Sequenzabschnitt, der hohe Sequenzähnlichkeit zu dem sequenzierten Peptid des isolierten Proteins aus *S. melliferum* zeigt.

Das HPLC-Muster der tryptisch gespaltenen Proteine aus der oberen Bande des SDS-Gels wies eine große Anzahl von Peaks auf, was darauf hin deutet, daß mehrere Proteine in dieser Bande enthalten sind.

Eine Untersuchung der unteren Bande führte zu zwei Aminosäure-Sequenzen (EIYYLLDLAR und (C)AFEVA(C)LDK), welche Sequenzähnlichkeit zur Ornithin-Carbomoyltransferase von *Rhizobium etli* zeigten.

Zusammengefaßt legen die biochemischen Befunde die Existenz beider Cytoskelett-bildender Proteine, „Fibril“ und MreB, in *S. melliferum* nahe.

## 6 Diskussion

### 6.1 Bisherige Erkenntnisse über das Cytoskelett von *S. melliferum*

Bisher wurde das Cytoskelett von *S. melliferum* als ein aus sieben Filamenten bestehendes flaches, Membran-gebundenes Band beschrieben, welches sich auf dem kürzesten, helikalen Weg direkt unterhalb der Zellmembran durch die Zelle windet (Trachtenberg und Gilad, 2001). Desweiteren wurde angenommen, daß diese Filamente aus dem sogenannten „Fibril“-Protein aufgebaut sind, welches in *S. citri* bereits sequenziert wurde (Maccheroni *et al.*, unpublished). Die verschiedenen Bewegungsmechanismen (Gilad *et al.*, 2003; Trachtenberg *et al.*, 2003) wurden anhand von Konformationsänderungen der Filament-Untereinheiten erklärt (Trachtenberg und Gilad, 2001). Demnach ändern diese ihre Form von nahezu zirkulär zu elliptisch und ermöglichen dadurch Längenänderungen der Filamente.

### 6.2 Neue Einblicke in die Struktur des Cytoskeletts von *S. melliferum* durch Kryo-Elektronentomographie

Die Kryo-Elektronentomographie ermöglicht es, intakte und unbehandelte *S. melliferum*-Zellen *in toto* bei molekularer Auflösung zu studieren. Auf diese Weise können interne Strukturen eindeutig ihrem zellulären Zusammenhang zugeordnet werden. Die Vitrifizierung verhindert das Auftreten von Artefakten, die bei der Anwendung der klassischen Präparationsmethoden auftreten können. Zudem bietet die Elektronentomographie den Vorteil der 3-D-Visualisierung gegenüber beispielsweise der elektronenmikroskopischen Untersuchung von Dünnschnitten, die nur eingeschränkte Einblicke in die Probe liefert. Aufgrund der in dieser Arbeit durch Kryo-Elektronentomographie gewonnenen Ergebnisse muß nun die bisherige Sicht über die Organisation des Cytoskeletts von *S. melliferum* revidiert werden.

In den 3-D-Rekonstruktionen von *S. melliferum*-Zellen konnte ein Cytoskelett nachgewiesen werden, welches dicht unterhalb der Zellmembran durch die gesamte Zelle verläuft, jedoch

aus drei Filamentbändern aufgebaut ist. Diese Bänder laufen parallel zueinander und sind höchstwahrscheinlich miteinander sowie mit der Zellmembran verbunden.

Anhand der unterschiedlichen Tomogramme wird auch ersichtlich, warum man mit Dünnschnitten die tatsächliche Cytoskelett-Struktur nicht aufklären konnte. Abhängig von dem Grad der Verdrehung der helikal gewundenen Zelle und der Lage der Filamente relativ zur Einfallrichtung des Elektronenstrahls während der Datenaufnahme sind mehr oder weniger Filamente in den Dünnschnitten (vgl. Townsend und Plaskitt, 1985), wie auch in den 3-D-Rekonstruktionen sichtbar (vgl. **Abb. 5.6**). Erschwerend kommt zudem das „missing wedge“-Problem (Koster *et al.*, 1997) hinzu, welches eine vollständige Rekonstruktion der Zelloberfläche und des darunter liegenden Cytoskeletts unmöglich macht. Erst durch die Aufnahme einer Vielzahl von Tomogrammen konnten genügend Positionen visualisiert werden, um eine eindeutige Aussage über die Anzahl der jeweiligen Filamente treffen zu können.

### **6.3 Erklärung und Simulation der Bewegungen von *S. melliferum***

Verschiedene Bewegungsmechanismen von *S. melliferum* konnten im Rahmen dieser Arbeit unter dem Lichtmikroskop beobachtet und mit Hilfe von Simulationen erklärt werden. Als Grundlage dienten die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über das Cytoskelett dieser schwimmenden Bakterien.

Grundsätzlich müssen zwei Voraussetzungen erfüllt sein, damit ein kontraktiles Cytoskelett-System die Form und Bewegung einer Zelle beeinflussen kann: erstens muß es an der Zellmembran verankert, und zweitens mit einem Krafterzeuger assoziiert sein.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß die Cytoskelett-Filamente mit der Membran verbunden sind (siehe 5.1.2). Eine derartige Verbindung kann durch periphere oder integrierte Membranproteine entstehen und könnte somit auch dazu führen, daß Membranproteine zusammen mit den Cytoskelett-Proteinen aufgereinigt werden (vgl. Townsend *et al.*, 1980; Trachtenberg und Gilad, 2001).

Die Krafterzeugung kann entweder durch Motorproteine (ATP- oder GTP-getriebene Mechano-Enzyme), oder aber durch Konformationsänderungen der Cytoskelett-Proteine erzielt werden. So wäre es denkbar, daß die äußeren Filamentbänder – ähnlich wie das

Motorprotein Myosin bei der Muskelkontraktion an Aktin – in einem ATP- oder GTP-abhängigen Prozeß am inneren Band entlang gleiten und dadurch lokale Längenänderungen der Filamente hervorrufen. Ein derartiger Gleitmechanismus bezöge sich allerdings nur auf unmittelbar benachbarte Filamente der beiden miteinander agierenden Bänder und ist daher eher unwahrscheinlich. Zudem gab es bisher keinen Beweis dafür, daß es in Prokaryonten Motorproteine gibt. Trachtenberg und Gilad stützten ihre Erklärung zur Längenänderungen der Filamente daher auf einen Mechanismus, der auf der Konformationsänderung der Filament-Untereinheiten beruht und wesentlich schnellere Wirkung erzielt, als der der Muskelkontraktion (Trachtenberg und Gilad, 2001). Wolgemuth und Kollegen diskutierten ebenfalls zwei auf Konformationsänderungen basierende molekulare Mechanismen, mit denen Kräfte die Zellbewegung antreiben können, und erstellten ein Modell für die Ausbreitung einer helikalen Welle in *Spiroplasma* (Wolgemuth *et al.*, 2003). Demnach ermöglicht die Kopplung eines biochemischen Zykluses (wie z.B. ATP-Hydrolyse) an die Dynamik elastischer Filamente, daß Deformationen, die sich durch Änderung des Abstands (engl. *pitch*) oder des Radius der Helixkrümmung bilden, durch die Zelle wandern und dabei antreibende Kräfte entstehen lassen. Ausgelöst werden die Konformationsänderungen durch lokale Änderungen der Ionenkonzentration in der Umgebung der Zelle. Berg (Berg, 2002) schlug außerdem einen Weg vor, wie das Cytoskelett-Band durch kreisförmiges Beugen der Zelle den Antrieb steuern kann. Das Abbiegen der Zelle kann dadurch erzeugt werden, daß sich ein Teil des Cytoskeletts relativ zum anderen Teil, oder das Cytoskelett relativ zur Zellmembran, unterschiedlich verkürzt und wieder ausdehnt. Dies geschieht auch bei der Händigkeitsänderung der Zelle. Somit könnte die Händigkeitsänderung gleichzeitig zum Abbiegen der Zelle führen, und zwar an der Stelle, wo sich die Händigkeit ändert. (Diese Beobachtung wurde auch von Gilad und Kollegen gemacht (Gilad *et al.*, 2003)). Wandert diese Stelle durch die Zelle (vgl. **Abb. 5.15**), so bewirkt dies, daß sich die Zelle um ihre longitudinale Achse dreht, und der abgebogene Teil der Zelle kreisförmig rotiert.

Die oben genannten Bewegungsmodelle von Wolgemuth und Kollegen (Wolgemuth *et al.*, 2003) und Berg (Berg, 2002) ließen sich anhand der bisherigen Erkenntnisse über Konformationsänderungen der Filament-Untereinheiten (Trachtenberg und Gilad, 2001) und der in dieser Arbeit gewonnenen Einblicke in den strukturellen Aufbau des Cytoskeletts von *S. melliferum* simulieren bzw. nachvollziehen.

## 6.4 Identifizierung der Cytoskelett-Proteine von *S. melliferum* mit Hilfe biochemischer Untersuchungen

Lange währte eine Kontroverse über die mögliche Existenz von Aktin oder Aktin-ähnlichen Proteinen in Prokaryonten (siehe Neimark, 1983) einschließlich der *Mollicutes*. Aufgrund von Genomvergleichen verschiedener bereits sequenzierter *Mollicutes*, welche zeigten, daß das Genom dieser Bakterienklasse keine homologen Proteine zu den eukaryontischen Cytoskelett- und Motor-Proteinen aufweist (Chambaud *et al.*, 2001; Fraser *et al.*, 1995; Glass *et al.*, 2000; Himmelreich *et al.*, 1997), wurde eine Existenz derartiger Proteine in *Mollicutes* jedoch letztlich ausgeschlossen. Auch waren die bereits aus *Spiroplasma* sequenzierten Cytoskelett- und assoziierte Gene und daraus hergeleiteten Aminosäuresequenzen der Proteine (*fib*, Williamson *et al.*, 1991; *scm1*, Jacob *et al.*, 1997) nicht verwandt mit jenen der Eukaryonten oder anderen Prokaryonten.

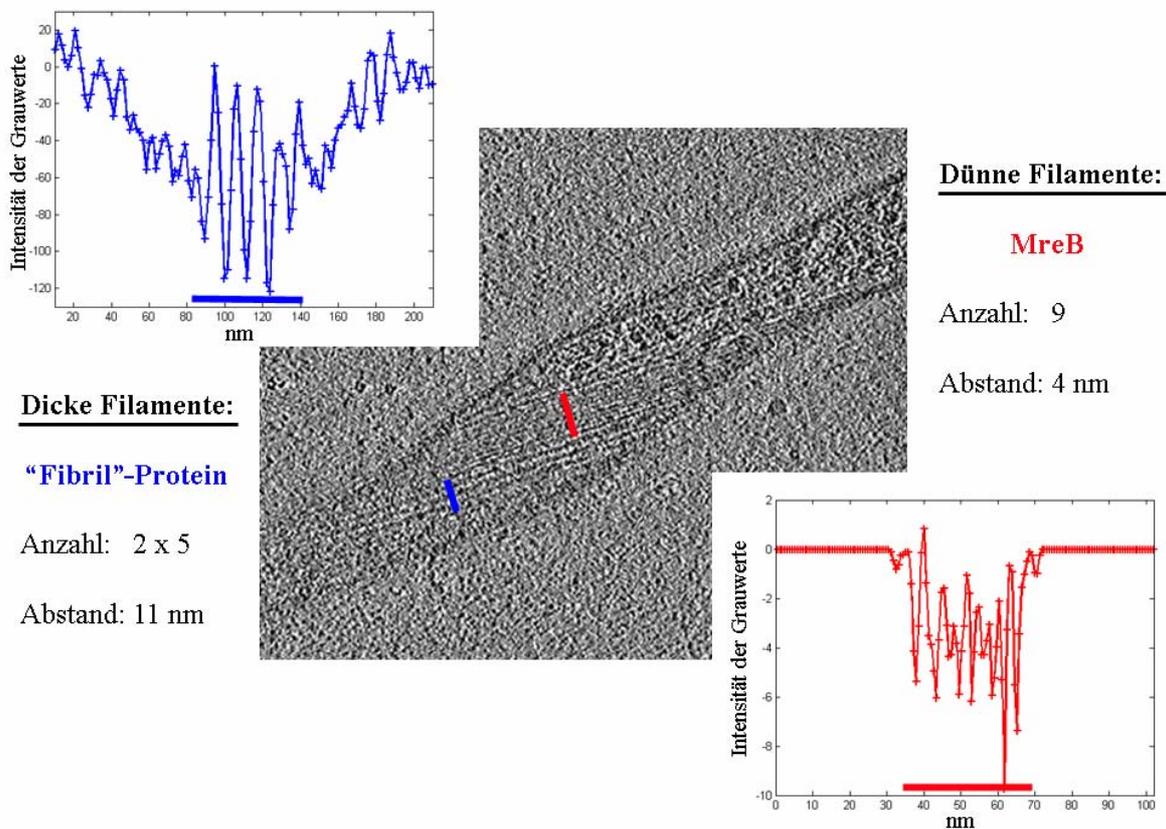
Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchung der Cytoskelett-Proteine von *S. melliferum* zeigte sich zunächst einmal, daß Aktin in diesen Zellen nicht vorhanden ist. Bisher nahm man an, daß die Cytoskelett-Filamente, wie sie von Trachtenberg und Gilad (Trachtenberg und Gilad, 2001) beschrieben wurden, von einem einzigen Protein, dem sogenannten „Fibril“-Protein, gebildet werden. Da dieses Protein einen Durchmesser von etwa 5 nm aufweist, wurde angenommen, daß die Untereinheit der Filamente ein Tetramer aus 59 kDa-Monomeren ist, und daß die Filamente Paare bilden, um die 10 nm weiten axialen und lateralen Abstände innerhalb des Cytoskelett-Bandes zu ergeben (Trachtenberg *et al.*, 2003).

Da sich in dieser Arbeit jedoch herausstellte, daß das Cytoskelett von *S. melliferum* aus zwei unterschiedlichen Filamenten gebildet wird, stellte sich die Frage nach der Identität des zweiten Proteins. Als möglicher Kandidat bot sich das Aktin-ähnliche Protein MreB an, welches bereits in mehreren Bakterien, darunter *S. citri*, als Filament-bildendes Protein nachgewiesen wurde (Doi *et al.*, 1988; Figge *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 2001; Maccheroni *et al.*, unpublished; van den Ent *et al.*, 2001; Wachi *et al.*, 1987). In *S. citri* wurden fünf verschiedene MreB-Gene gefunden und sequenziert.

Durch Western-Blot-Analyse und teilweise Sequenzierung konnte in dieser Arbeit nicht nur bestätigt werden, daß *S. melliferum* über das „Fibril“-Protein verfügt, sondern es konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, daß auch MreB in diesen Zellen vorkommt. Das HPLC-

Muster der tryptisch gespaltenen Proteine aus der MreB-Bande des SDS-Gels läßt vermuten, daß auch in *S. melliferum* mehrere MreB-Proteine existieren. Für eine genaue Bestimmung wäre jedoch die Durchführung eines 2-D-Gellaufes zur weiteren Auftrennung der Proteine notwendig.

Während in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, daß das „Fibril“-Protein Filamente mit einem Durchmesser von etwa 10 nm bildet, blieb die Frage offen, ob MreB überhaupt in Form (stabiler) Filamente vorkommt. Eine Isolierung des intakten Cytoskeletts, bestehend aus den drei Filamentbändern, war nicht möglich. Um die Existenz von MreB-Filamenten zu beweisen, wäre es z.B. notwendig, Immunmarkierungsversuche in weitgehend intakten Zellen durchzuführen. Da MreB in anderen Bakterien jedoch, wie bereits erwähnt, in Form von Filamenten auftritt, liegt es nahe, anzunehmen, daß dieses Protein auch in *S. melliferum* filamentös vorliegt. Davon ausgehend wurde eine Hypothese über die Zusammensetzung des Cytoskeletts von *S. melliferum* erstellt (**Abb. 6.1**), in der vermutet wird, daß die beiden äußeren Filamentbänder, bestehend aus dickeren Filamenten, von dem „Fibril“-Protein gebildet werden, während das innere Filamentband, bestehend aus dünneren Filamenten, aus MreB aufgebaut ist.



**Abb. 6.1:** Hypothese über die Zusammensetzung des Cytoskeletts von *S. melliferum*.

Diese Vermutung wird durch mehrere Ergebnisse bisheriger Forschungen gestützt. So ist gezeigt worden, daß MreB-Filamente etwa 4 nm dicke Protofilamente unter bestimmten Bedingungen *in vitro* bilden und sich unter anderem zu flachen Bändern zusammenlagern können (van den Ent *et al.*, 2001). Eine Verbindung zwischen den Fibrillen von *S. citri* und einem Aktin-ähnlichen Protein wurde von Williamson und Kollegen (Williamson *et al.*, 1991) vermutet. Zudem schlugen Townsend und Archer (Townsend und Archer, 1983) bereits vor, daß das Membranprotein Spiralin in Verbindung mit Fibrillen und einem 39 kDa-Protein (die Größe entspricht der von MreB) eine Rolle bei der Zellformgebung in *S. citri* spielen könnte. Dies würde zudem die Theorie stützen, daß das Cytoskelett mit einer integralen Komponente der Zellmembran verbunden ist. Schließlich ergaben Studien eines nicht-helikalen und unbeweglichen *S. citri*-Stammes (ASP-1), daß diesen Zellen ein 39 kDa-Protein fehlt (Townsend *et al.*, 1977; Townsend *et al.*, 1980). Der ASP-1-Stamm hat die gleichen ultrastrukturellen Merkmale wie der helikale Wildtyp und behält die Fähigkeit bei, unregelmäßig zu zucken, zeigt aber nicht die typischen Rotations- oder Beugebewegungen. Es wurde vorgeschlagen, daß das in diesem Stamm fehlende Protein Teil der Struktur sein könnte, welche die Fibrill-Elemente mit der Membran verbindet. Eine andere Erklärung wäre allerdings, daß dieses Protein MreB ist, dessen Fehlen die Zellform verändert und somit die Bewegung beeinträchtigt. Der Grund dafür könnte sein, daß die MreB-Filamente der Zelle die Stäbchenform verleihen, indem sie das innere, elastische Band bilden, während die damit verbundenen „Fibril“-Filamente die Bildung einer Helix, sowie Bewegung ermöglichen. Ohne MreB ist diese Interaktion nicht möglich.

## 6.5 Ausblick

Die Kryo-Elektronentomographie ermöglichte die Beschreibung der 3-D-Struktur und Organisation des Cytoskeletts intakter *S. melliferum*-Zellen auf molekularer Ebene. Eventuell könnte eine noch höhere Auflösung in den Tomogrammen durch Benutzung eines Dreh-Kipphalters (Penczek *et al.*, 1995) oder durch Arbeiten bei Helium-Bedingungen (Plitzko *et al.*, 2002) erzielt werden.

Ein Teil der Bewegungsmechanismen von *S. melliferum* konnte anhand der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse simuliert und erklärt werden. Allerdings besteht noch Unklarheit über die Energetik und Antriebskräfte des Systems.

Um endgültige Schlüsse über den Aufbau des Cytoskeletts ziehen zu können, ist es notwendig, die Identität der verschiedenen Cytoskelett-Proteine durch Immunomarkierungsversuche eindeutig nachzuweisen. Für GFP-Markierungsexperimente müssten zuerst neue genetische Hilfsmittel in *Mollicutes* entwickelt werden.

Zudem ist die Rolle der anderen, zusammen mit dem „Fibril“-Protein aufgereinigten Proteine zu klären. Dies würde vielleicht auch gleichzeitig Einblicke in die genaue Art der Verknüpfung des Cytoskeletts mit der Zellmembran geben.

## 7 Literaturverzeichnis

M. Adrian, J. Dubochet, J. Lepault und A. W. McDowell (1984). Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature* **308**: 32-36.

B. Alberts (1998). The cell as a collection of protein machines: Preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* **92**: 291-294.

N. Ausmees, J. R. Kuhn und C. Jacobs-Wagner (2003). The bacterial cytoskeleton: An intermediate filament-like function in cell shape. *Cell* **115**: 705-713.

S. L. Bardy, S. Y. M. Ng und K. F. Jarrell (2003). Prokaryotic motility structures. *Microbiology* **149**: 295-304.

W. Baumeister, R. Grimm und J. Walz (1999). Electron tomography of molecules and cells. *Trends in Cell Biology* **9**: 81-85.

W. Baumeister (2002). Electron tomography: towards visualizing the molecular organization of the cytoplasm. *Current Opinion in Structural Biology* **12**: 679-684.

B. D. Beck, P. G. Arscott und A. Jacobson (1978). Novel properties of bacterial elongation factor Tu. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 1250-1254.

H. C. Berg (2002). How *Spiroplasma* might swim. *Journal of Bacteriology* **184**: 2063-2064.

E. F. Bi und J. Lutkenhaus (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* **354**: 161-164.

J. Böhm. in *Physik* 98 (TU München, München, 2001).

P. Bork, C. Sander und A. Valencia (1992). An ATPase domain common to prokaryotic cell cycle proteins, sugar kinases, actin, and hsp70 heat shock proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 7290-7294.

P. Bork, et al. (1995). Exploring the *Mycoplasma capricolum* genome: A minimal cell reveals its physiology. *Molecular Microbiology* **16**: 955-967.

J. M. Bové, X. Foissac und C. Saillard. in *Subcellular Biochemistry* (eds. S. Rottem & I. Kahane) 203-223 (Plenum, New York, 1993).

W. Bredt. in *The Mycoplasmas* 141-155 (Academic Press, New York, 1979).

R. Carballido-López und J. Errington (2003). The bacterial cytoskeleton: In vivo dynamics of the actin-like protein Mbl of *Bacillus subtilis*. *Developmental Cell* **4**: 19-28.

I. Chambaud, et al. (2001). The complete genome sequence of the murine respiratory pathogen *Mycoplasma pulmonis*. *Nucleic Acids Research* **29**: 2145-2153.

- D. L. Charbonneau und W. C. Ghiorse (1984). Ultrastructure and location of cytoplasmic fibrils in *Spiroplasma floricola* OBMG. *Current Microbiology* **10**: 65-72.
- C. Chevalier, C. Saillard und J.-M. Bové (1990). Spiralins of *Spiroplasma citri* and *Spiroplasma melliferum* : Amino acid sequences and putative organization in the cell membrane. *Journal of Bacteriology* **172**: 6090-6097.
- T. B. Clark (1977). *Spiroplasma* sp., a new pathogen in honey bees. *Journal of Invertebrate Pathology* **29**: 112-113.
- T. B. Clark, et al. (1985). *Spiroplasma melliferum*, a new species from the honeybee (*Apis mellifera*). *International Journal of Systematic Bacteriology* **35**: 296-308.
- M. Clarke, G. Schatten, D. Mazia und J. A. Spudich (1975). Visualization of actin fibers associated with the cell membrane in amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **72**: 1758-1762.
- R. A. Crowther, D. J. DeRosier und A. Klug (1970). The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A* **317**: 319-340.
- R. A. Daniel und J. Errington (2003). Control of cell morphogenesis in bacteria: Two distinct ways to make a rod-shaped cell. *Cell* **113**: 767-776.
- M. J. Daniels, J. M. Longland und J. Gilbert (1980). Aspects of motility and chemotaxis in Spiroplasmas. *Journal of General Microbiology* **118**: 429-436.
- M. J. Daniels und J. M. Longland (1984). Chemotactic behavior of Spiroplasmas. *Current Microbiology* **10**: 191-194.
- R. E. Davis, J. F. Worley, R. F. Whitcomb, T. Ishijima und R. L. Steere (1972). Helical filaments produced by a mycoplasma-like organism associated with corn stunt disease. *Science* **176**: 521-523.
- M. A. De Pedro, J. C. Quintela, J.-V. Höltje und H. Schwarz (1997). Murein segregation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **179**: 2823-2834.
- D. J. DeRosier und A. Klug (1968). Reconstruction of three-dimensional structures from electron micrographs. *Nature* **217**: 130-134.
- K. Dierksen, D. Typke, R. Hegerl, A. J. Koster und W. Baumeister (1992). Towards automatic electron tomography. *Ultramicroscopy* **40**: 71-87.
- M. Doi, et al. (1988). Determinations of the DNA sequence of the *mreB* gene and of the gene products of the *mre* region that function in formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells. *Journal of Bacteriology* **170**: 4619-4624.
- R. F. Doolittle (1995). The origins and evolution of eukaryotic proteins. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* **349**: 235-240.

- R. F. Doolittle und A. L. York (2002). Bacterial actins? An evolutionary perspective. *Bioessays* **24**: 293-296.
- J. Dubochet, J. Lepault, R. Freeman, J. A. Berriman und J.-C. Homo (1982). Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions. *Journal of Microscopy* **128**: 219-237.
- J. Dubochet, et al. (1988). Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly Reviews of Biophysics* **21**: 129-228.
- S. Duret, N. Berho, J.-L. Danet, M. Garnier und J. Renaudin (2003). Spiralin is not essential for helicity, motility, or pathogenicity but is required for efficient transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector *Circulifer haematoceps*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6225-6234.
- C. Eckerskorn und F. Lottspeich (1989). Internal amino-acid sequence-analysis of proteins separated by gel-electrophoresis after tryptic digestion in polyacrylamide matrix. *Chromatographia* **28**: 92-94.
- H. P. Erickson (1998). Atomic structures of tubulin and FtsZ. *Trends in Cell Biology* **8**: 133-137.
- H. P. Erickson (2001). Cytoskeleton - Evolution in bacteria. *Nature* **413**: 30.
- D. Faguy, M. und W. F. Doolittle (1998). Cytoskeletal proteins: The evolution of cell division. *Current Biology* **8**: R338-R341.
- R. M. Figge, A. V. Divakaruni und J. W. Gober (2004). MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology* **51**: 1321-1332.
- L. A. Flanagan, et al. (2001). Filamin A, the Arp2/3 complex, and the morphology and function of cortical actin filaments in human melanoma cells. *Journal of Cell Biology* **155**: 511-517.
- A. S. Frangakis und R. Hegerl (2001). Noise reduction in electron tomographic reconstructions using nonlinear anisotropic diffusion. *Journal of Structural Biology* **135**: 239-250.
- J. Frank. *Electron Tomography* (Plenum Press, New York, 1992).
- C. M. Fraser, et al. (1995). The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. *Science* **270**: 397-404.
- D. Gerlich, J. Beaudouin, M. Gebhard, J. Ellenberg und R. Eils (2001). Four-dimensional imaging and quantitative reconstruction to analyse complex spatiotemporal processes in live cells. *Nature Cell Biology* **3**: 852-855.
- R. Gilad, A. Porat und S. Trachtenberg (2003). Motility modes of *Spiroplasma melliferum* BC3: a helical, wall-less bacterium driven by a linear motor. *Molecular Microbiology* **47**: 657-669.

- Z. Gitai, N. Dye und L. Shapiro (2004). An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 8643-8648.
- R. M. Glaeser (1971). Limitations to significant information in biological electron microscopy as a result of radiation damage. *Journal of Ultrastructure Research* **36**: 466-482.
- J. I. Glass, et al. (2000). The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature* **407**: 757-762.
- U. Göbel, V. Speth und W. Bredt (1981). Filamentous structures in adherent *Mycoplasma pneumoniae* cells treated with nonionic detergents. *Journal of Cell Biology* **91**: 537-543.
- U. B. Göbel, M. M. Müller und R. Maas (1990). Actin-related DNA sequences and proteins from motile Mycoplasmas: A molecular puzzle. *Zentralblatt Suppl.* **20**: 337-344.
- R. Grimm. in *Physik* (TU München, München, 1997).
- R. Grimm, et al. (1998). Electron tomography of ice-embedded prokaryotic cells. *Biophysical Journal* **74**: 1031-1042.
- R. G. Hart (1968). Electron microscopy of unstained biological material: The polytropic montage. *Science* **159**: 1464-1467.
- E. Hecht. *Optik* (Addison-Wesley GmbH, Bonn, 1992).
- R. Hegerl (1996). The EM program package: A platform for image processing in biological electron microscopy. *Journal of Structural Biology* **116**: 30-34.
- J. Hegermann, R. Herrmann und F. Mayer (2002). Cytoskeletal elements in the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Naturwissenschaften* **89**: 453-458.
- J. Henrichsen (1972). Gliding and twitching motility of bacteria unaffected by cytochalasin B. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* **80**: 623-624.
- J. E. Heuser und M. W. Kirschner (1980). Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *Journal of Cell Biology* **86**: 212-234.
- R. Himmelreich, et al. (1996). Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Research* **24**: 4420-4449.
- R. Himmelreich, H. Plagens, H. Hilbert, B. Reiner und R. Herrmann (1997). Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. *Nucleic Acids Research* **25**: 701-712.
- K. C. Holmes, D. Popp, W. Gebhard und W. Kabsch (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**: 44-49.
- W. Hoppe, J. Gassmann, N. Hunsmann, H. J. Schramm und M. Strum (1974). Three dimensional reconstruction of individual negatively stained yeast fatty-acid synthetase

- molecules from tilt series in the electron microscope. *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie* **355**: 1483-1487.
- M. Hoppert und F. Mayer (1999). Principles of macromolecular organization and cell function in bacteria and archaea. *Cell Biochemistry and Biophysics* **31**: 247-284.
- C. Jacob, F. Nouzières, S. Duret, J.-M. Bové und J. Renaudin (1997). Isolation, characterization, and complementation of a motility mutant of *Spiroplasma citri*. *Journal of Bacteriology* **179**: 4802-4810.
- L. J. F. Jones, R. Carballido-López und J. Errington (2001). Control of cell shape in bacteria: Helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* **104**: 913-922.
- I. Kahane und A. Muhlrad (1977). Actin-like proteins from mycoplasmas. *Israel Journal of Medical Sciences* **13**: 956.
- M. Kessel, I. Peleg, A. Muhlrad und I. Kahane (1981). Cytoplasmic helical structure associated with *Acholeplasma laidlawii*. *Journal of Bacteriology* **147**: 653-659.
- R. Kimmel und J. A. Sethian (1998). Computing geodesic paths on manifolds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 8431-8435.
- A. J. Koster, et al. (1997). Perspectives of molecular and cellular electron tomography. *Journal of Structural Biology* **120**: 276-308.
- D. C. Krause (1996). *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: unravelling the tie that binds. *Molecular Microbiology* **20**: 247-253.
- D. C. Krause (1998). *Mycoplasma pneumoniae* cytoadherence: organization and assembly of the attachment organelle. *Trends in Microbiology* **6**: 15-18.
- D. C. Krause und M. F. Balish (2001). Structure, function, and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters* **198**: 1-7.
- N. R. Krieg und J. G. Holt. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Williams & Wilkins, Baltimore, 1984).
- T. Kruse, J. Møller-Jensen, A. Løbner-Olesen und K. Gerdes (2003). Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO Journal* **22**: 5283-5292.
- J. Lepault, F. P. Booy und J. Dubochet (1983). Electron microscopy of frozen biological suspensions. *Journal of Microscopy* **129**: 89-102.
- F. Lottspeich und H. Zorbas. in *Bioanalytik* 413-449 (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1998).
- J. Löwe und L. A. Amos (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* **391**: 203-206.
- J. Lutkenhaus und S. G. Addinall (1997). Bacterial cell division and the Z ring. *Annual Review of Biochemistry* **66**: 93-116.

- X. Ma, D. W. Ehrhardt und W. Margolin (1996). Colocalization of cell division proteins FtsZ and FtsA to cytoskeletal structures in living *Escherichia coli* cells by using green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**: 12998-13003.
- W. J. Maccheroni, et al. (unpublished). Identification, organization and expression of five mreB-like genes in *Spiroplasma citri*: Effect of mreB1 disruption in insect transmission and phytopathogenicity.
- W. Margolin (2004). Bacterial shape: Concave coiled coils curve *Caulobacter*. *Current Biology* **14**: R242-R244.
- F. Mayer, B. Vogt und C. Poc (1998). Immunoelectron microscopic studies indicate the existence of a cell shape preserving cytoskeleton in prokaryotes. *Naturwissenschaften* **85**: 278-282.
- F. Mayer (2003). Cytoskeletons in prokaryotes. *Cell Biology International* **27**: 429-438.
- O. Medalia, et al. (2002). Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science* **298**: 1209-1213.
- K. E. Meng und R. M. Pfister (1980). Intracellular structures of *Mycoplasma pneumoniae* revealed after membrane removal. *Journal of Bacteriology* **144**: 390-399.
- L. Minkoff und R. Damadian (1976). Actin-like proteins from *Escherichia coli*: Concept of cytotonus as the missing link between cell metabolism and the biological ion-exchange resin. *Journal of Bacteriology* **125**: 353-365.
- J. Møller-Jensen, R. B. Jensen, J. Löwe und K. Gerdes (2002). Prokaryotic DNA segregation by an actin-like filament. *EMBO Journal* **21**: 3119-3127.
- K. Munk. *Grundstudium Biologie - Mikrobiologie* (Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, 2001).
- H. Neimark (1983). Mycoplasma and bacterial proteins resembling contractile proteins: A review. *Yale Journal of Biology and Medicine* **56**: 419-423.
- H. C. Neimark (1977). Extraction of an actin-like protein from the prokaryote *Mycoplasma pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 4041-4045.
- S. Nickell. in *Physik 128* (TU München, München, 2001).
- P. Penczek, M. Marko, K. Buttle und J. Frank (1995). Double-tilt electron tomography. *Ultramicroscopy* **60**: 393-410.
- J. Picht und J. Heydenreich. *Einführung in die Elektronenmikroskopie* (VEB Verlag Technik, Leipzig, 1966).
- J. M. Plitzko, et al. (2002). *In vivo veritas*: Electron cryotomography of cells. *Trends in Biotechnology* **20**: S40-S44.

- T. D. Pollard und G. G. Borisy (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**: 453-465.
- J. Radon (1917). Über die Bestimmung von Funktionen durch ihre Integralwerte längs gewisser Mannigfaltigkeiten. *Berlin Sächsische Akademie der Wissenschaften* **69**: 262-279.
- S. Razin und E. Jacobs (1992). Mycoplasma adhesion. *Journal of General Microbiology* **138**: 407-422.
- S. Razin (1999). Adherence of pathogenic mycoplasmas to host cells. *Bioscience Reports* **19**: 367-372.
- S. Razin. in *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections* (eds. M. Patrick & P. Boriello) (Edward Arnold Publishers, London, 2003).
- J. T. Regula, et al. (2001). Defining the mycoplasma 'cytoskeleton': the protein composition of the Triton X-100 insoluble fraction of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae* determined by 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry. *Microbiology* **147**: 1045-1057.
- G. P. Resch, K. N. Goldie, A. Hoenger und J. V. Small (2002). Pure F-actin networks are distorted and branched by steps in the critical-point drying method. *Journal of Structural Biology* **137**: 305-312.
- G. P. Resch, K. N. Goldie, A. Krebs, A. Hoenger und J.-V. Small (2002). Visualisation of the actin cytoskeleton by cryo-electron microscopy. *Journal of Cell Science* **115**: 1877-1882.
- A. W. Rodwell, E. S. Rodwell und D. B. Archer (1979). Mycoplasmas lack a protein which closely resembles  $\alpha$ -actin. *FEMS Microbiology Letters* **5**: 235-238.
- J. P. Rosenbusch, G. R. Jacobson und J.-C. Jaton (1976). Does a bacterial elongation factor share a common evolutionary ancestor with actin? *Journal of Supramolecular Structure* **5**: 391-396.
- T. Ruiz, I. Erk und J. Lepault (1995). Electron cryo-microscopy of vitrified biological specimens: Towards high spatial and temporal resolution. *Biology of the Cell* **80**: 203-210.
- J. C. Russ. *The Image Processing Handbook* (CRC Press, Florida, 2002).
- P. Saglio, et al. (1973). *Spiroplasma citri* gen. and sp. n.: a mycoplasma-like organism associated with "stubborn" disease of citrus. *International Journal of Systematic Bacteriology* **23**: 191-204.
- D. A. Schafer, et al. (1998). Visualization and molecular analysis of actin assembly in living cells. *Journal of Cell Biology* **143**: 1919-1930.
- U. Schmitt, H. Petzold und R. Marwitz (1984). An *in situ* freeze-fracture study of *Spiroplasma citri* and the corn stunt *Spiroplasma*. *Journal of Phytopathology* **111**: 297-304.
- D. G. Searcy, D. B. Stein und G. R. Green (1978). Phylogenetic affinities between eukaryotic cells and a thermophilic mycoplasma. *Biosystems* **10**: 19-28.

- D. G. Searcy, D. B. Stein und K. B. Searcy (1981). A mycoplasma-like archaebacterium possibly related to the nucleus and cytoplasm of eukaryotic cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* **361**: 312-324.
- J.-V. Small, K. Rottner, P. Hahne und K. I. Anderson (1999). Visualising the actin cytoskeleton. *Microscopy Research and Technique* **47**: 3-17.
- H. J. D. Soufo und P. L. Graumann (2003). Actin-like proteins MreB and Mbl from *Bacillus subtilis* are required for bipolar positioning of replication origins. *Current Biology* **13**: 1916-1920.
- T. M. Svitkina und A. B. Verkhovsky (1995). Improved procedures for electron microscopic visualization of the cytoskeleton of cultured cells. *Journal of Structural Biology* **115**: 290-303.
- T. M. Svitkina, A. B. Verkhovsky, K. M. McQuade und G. G. Borisy (1997). Analysis of the actin-myosin II system in fish epidermal keratocytes: Mechanism of cell body translocation. *Journal of Cell Biology* **139**: 397-415.
- K. A. Taylor und R. M. Glaeser (1974). Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science* **186**: 1036-1037.
- K. A. Taylor und R. M. Glaeser (1976). Electron microscopy of frozen hydrated biological specimens. *Journal of Ultrastructure Research* **55**: 448-456.
- R. Townsend, P. G. Markham, K. A. Plaskitt und M. J. Daniels (1977). Isolation and characterization of a non-helical strain of *Spiroplasma citri*. *Journal of General Microbiology* **100**: 15-21.
- R. Townsend, D. B. Archer und K. A. Plaskitt (1980). Purification and preliminary characterization of spiroplasma fibrils. *J. Bacteriol.* **142**: 694-700.
- R. Townsend, D. B. Archer und K. A. Plaskitt (1980). Purification and preliminary characterization of spiroplasma fibrils. *Journal of Bacteriology* **142**: 694-700.
- R. Townsend, J. Burgess und K. A. Plaskitt (1980). Morphology and ultrastructure of helical and nonhelical strains of *Spiroplasma citri*. *Journal of Bacteriology* **142**: 973-981.
- R. Townsend und D. B. Archer (1983). A fibril protein antigen specific to *Spiroplasma*. *Journal of General Microbiology* **129**: 199-206.
- R. Townsend und K. A. Plaskitt (1985). Immunogold localization of p55-fibril protein and p25-spiralin in *Spiroplasma* cells. *Journal of General Microbiology* **131**: 983-992.
- S. Trachtenberg (1998). Mollicutes - Wall-less bacteria with internal cytoskeletons. *Journal of Structural Biology* **124**: 244-256.
- S. Trachtenberg und R. Gilad (2001). A bacterial linear motor: cellular and molecular organization of the contractile cytoskeleton of the helical bacterium *Spiroplasma melliferum* BC3. *Molecular Microbiology* **41**: 827-848.

- S. Trachtenberg, S. B. Andrews und R. D. Leapman (2003). Mass distribution and spatial organization of the linear bacterial motor of *Spiroplasma citri* R8A2. *Journal of Bacteriology* **185**: 1987-1994.
- S. Trachtenberg, R. Gilad und N. Geffen (2003). The bacterial linear motor of *Spiroplasma melliferum* BC3: From single molecules to swimming cells. *Molecular Microbiology* **47**: 671-697.
- S. Trachtenberg (2004). Shaping and moving a spiroplasma. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **7**: 78-87.
- J. Trinick, J. Cooper, J. Seymour und E. H. Egelman (1986). Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of actin filaments. *Journal of Microscopy* **141**: 349-360.
- J. A. Trotter, B. A. Foerder und J. M. Keller (1978). Intracellular fibres in cultured cells: Analysis by scanning and transmission electron microscopy and by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Cell Science* **31**: 369-392.
- J. G. Tully. in *Encyclopedia of Microbiology* (ed. J. Lederberg) 181-191 (Academic Press, New York, 1992).
- P. N. T. Unwin und R. Henderson (1975). Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystalline specimens. *Journal of Molecular Biology* **94**: 425-440.
- J. M. Valpuesta, R. Henderson und T. G. Frey (1990). Electron cryomicroscopic analysis of crystalline cytochrom oxidase. *Journal of Molecular Biology* **214**: 237-251.
- F. van den Ent, L. Amos und J. Löwe (2001). Bacterial ancestry of actin and tubulin. *Current Opinion in Microbiology* **4**: 634-638.
- F. van den Ent, L. A. Amos und J. Löwe (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature* **413**: 39-44.
- F. van den Ent, J. Møller-Jensen, L. A. Amos, K. Gerdes und J. Löwe (2002). F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *EMBO Journal* **21**: 6935-6943.
- M. Wachi, et al. (1987). Mutant isolation and molecular cloning of *mre* genes, which determine cell shape, sensitivity to mecillinam, and amount of penicillin-binding proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169**: 4935-4940.
- X. Wang und J. Lutkenhaus (1996). Characterization of the FtsZ gene from *Mycoplasma pulmonis*, an organism lacking a cell wall. *Journal of Bacteriology* **178**: 2314-2319.
- Y.-L. Wang (1987). Mobility of filamentous actin in living cytoplasm. *Journal of Cell Biology* **105**: 2811-2816.
- J. Wehland und K. Weber (1981). Actin rearrangement in living cells revealed by microinjection of a fluorescent phalloidin derivative. *European Journal of Cell Biology* **24**: 176-183.

- W. G. Weisburg, et al. (1989). A phylogenetic analysis of the Mycoplasmas: Basis for their classification. *Journal of Bacteriology* **171**: 6455-6467.
- R. F. Whitcomb, J. G. Tully und H. Wróblewski (1983). Spiralin: Major membrane protein specific for subgroup I-1 Spiroplasmas. *Current Microbiology* **9**: 7-12.
- D. L. Williamson (1974). Unusual fibrils from the Spirochete-like sex ratio organism. *Journal of Bacteriology* **117**: 904-906.
- D. L. Williamson, D. I. Blaustein, R. J. C. Levine und M. J. Elfvin (1979). Anti-actin-peroxidase staining of the helical wall-free prokaryote *Spiroplasma citri*. *Current Microbiology* **2**: 143-145.
- D. L. Williamson, P. R. Brink und G. W. Zieve (1984). Spiroplasma fibrils. *Israel Journal of Medical Sciences* **20**: 830-835.
- D. L. Williamson, J. Renaudin und J.-M. Bové (1991). Nucleotide sequence of the *Spiroplasma citri* fibril protein gene. *Journal of Bacteriology* **173**: 4353-4362.
- C. R. Woese (1987). Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* **51**: 221-271.
- C. W. Wolgemuth, O. Igoshin und G. Oster (2003). The motility of Mollicutes. *Biophysical Journal* **85**: 828-842.
- H. Wróblewski, K.-E. Johansson und S. Hjérten (1977). Purification and characterization of spiralin, the main protein of the *Spiroplasma citri* membrane. *Biochimica et Biophysica Acta* **465**: 275-289.

### **Veröffentlichungen, die Teile dieser Arbeit beinhalten:**

- J. Kürner, O. Medalia, A. A. Linaroudis und W. Baumeister (2004). New insights into the structural organization of eukaryotic and prokaryotic cytoskeletons using cryo-electron tomography. *Experimental Cell Research* **301**: 38-42.
- J. Kürner, A. S. Frangakis und W. Baumeister (2005). Cryo-electron tomography reveals the cytoskeletal structure of *Spiroplasma melliferum*. *Science* **307**: 436-438.

## 8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2001 bis November 2004 in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumeister in der Abteilung Molekulare Strukturbiologie am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den zahlreichen Betreuern, derzeitigen und früheren Kollegen, Freunden und Verwandten für ihre Unterstützung und Mithilfe bedanken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Baumeister für seine stete Unterstützung und sein reges Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Außerdem bedanke ich mich bei ihm für die Bereitstellung der dem höchsten Stand der Technik entsprechenden instrumentellen Einrichtungen, sowie für die Ermöglichung der Präsentation meiner Arbeit auf nationalen und internationalen Kongressen.

Herrn Prof. Dr. Adelbert Bacher und Frau Prof. Dr. Sevil Weinkauf danke ich für die Möglichkeit, in der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zu promovieren.

Bei Dr. Harald Engelhardt bedanke ich mich für die immerwährende Unterstützung und wertvolle Hilfe bei einer großen Vielzahl von Fragen und Aufgaben, wie z. B. der Zellkultivierung oder der Durchführung von Experimenten. Vielen Dank für das immer „offene Ohr“ und die Anregungen und Tips.

Ganz besonders danke ich Dr. Achilleas S. Frangakis (EMBL) für seine überaus große Hilfe bei der Durchführung zahlreicher Experimente und Aufgaben, wie z.B. der Visualisierung, der Verfeinerung und Auswertung meiner Daten und der Erstellung von Bewegungsmodellen, sowie für anregende Diskussionen.

Dr. Daniela Nicastro, Dr. Stephan Nickell, Dr. Jürgen Plitzko und Dr. Reiner Hegerl danke ich für die Einweisung in die Elektronenmikroskopie bzw. Bildverarbeitung und die Unterstützung bei etwaigen Problemen.

Ich danke ganz besonders Günter Pfeifer für seine überaus große Hilfsbereitschaft und Großzügigkeit, sowie seine liebenswerte Art, die das Arbeiten oft angenehmer gestaltet hat.

Ich danke Oana Mihalache, Dr. Henrike Besche und Dr. Peter Zwickl für ihre tatkräftige Unterstützung bzw. wertvollen Hinweise bei der Durchführung biochemischer Experimente.

Reinhard Mentele danke ich für die Durchführung der Proteinsequenzanalysen.

Bei Dr. Jan Ellenberg (EMBL) und Nathalie Daigle möchte ich mich für die Nutzung der lichtmikroskopischen Einrichtungen und die Hilfestellung dabei bedanken.

Bei Prof. Dr. Günter Gerisch und Prof. Jeff Errington bedanke ich mich für die Bereitstellung des Aktin- bzw. MreB-Antikörpers.

Jan Lubiniecki danke ich für die Hilfestellung bei Fragen der Zellkultivierung.

Für die Durchsicht der Arbeit und konstruktive Korrekturvorschläge möchte ich mich bei Dr. Thomas Keil, Dr. Peter Zwickl, Lars Andrees und ganz besonders bei Dr. Harald Engelhardt bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin zahlreichen Kollegen, die während der Zeit meiner Arbeit zu einem konstruktiven und angenehmen Arbeitsklima beigetragen und wertvolle Hilfen beigesteuert haben: Friedrich Förster, Alexandros A. Linaroudis, Dr. Andrew Leis, Lars Andrees, Christine Kofler, Manuela Gruska, Gabriele Schweikert und Ariane Briegel.

Ich danke Herbert Breu und Toni Hillebrand für Hilfestellungen bei Computer- und Druckerproblemen.

Für ihre unmittelbare Hilfe bei allen technischen Problemen und Fragestellungen (inklusive des Mountain-Bikes) danke ich den Mitarbeitern der Werkstatt, insbesondere Rudolf Gatz.

Zu allerletzt danke ich meiner Familie für die immerwährende liebevolle Unterstützung und großzügige Förderung.

## **9 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel verfaßt habe. Das bearbeitete Thema wurde von mir nicht schon früher im Rahmen einer anderen Arbeit behandelt oder anderswo als Prüfungsarbeit abgegeben.

Martinsried, den

Julia Kürner